

Bibliografie

1. Baloescu C, Curea E. Contolul medicamentelor - București: Ed. Didactică și pedagogică, 1983. p.129 – 130.
2. Bodoga B., Maria Virginia Coman . Cromatografie pe strat subțire – București: Ed. Tehnică, 1995 – 160p.
3. Cotelea T. Teza de doctor ”Investigații chimico – toxicologice asupra cinarizinei și clonidinei”. Chișinău, 2002, .208p.
4. Аншелес О.М. Буракова Т.Н. Микрохимический анализ на основе кристаллооптически ЛГУ.Л 1948
5. Бабилев Ф.В. Андроник И.Я. Полиморфизм лекарственных веществ Кишинев Штиинца 1981 – 239 с.
6. Приняжко Р.М. Калинюк Т.Г. Методы УФ-спектроскопии в фармацевтическом анализе Киев. Здоровье. 1976 – 126 с.

OPTIMIZAREA METODEI HPLC PENTRU ANALIZA FRUCTELOR DE ARMURARIU (SILYBUM MARIANUM (L.) GAERTN)

Igor Casian¹, Victor Luca², Ion Ungureanu³, Ana Casian¹

Centrul Științific în domeniul Medicamentului¹, Agenția Medicamentului²,

Centrul de Cultivare a Plantelor Medicinale³

Summary

Optimization of the HPLC method for analysis of Milk-Thistle fruit (*Silybum marianum* (L.) Gaertn).

An interlaboratory irreproducibility of the results of Milk-Thistle fruit assay has been discovered at realization of analytical procedure by the European Pharmacopoeia. It was found, that this irreproducibility is caused by insufficient plenitude of the analytes extraction from vegetal material.

A new procedure of probe preparation, that consists of two sequential extractions by ethylic alcohol 40% for 60 min at 70°C, has been developed. The offered procedure ensures recovery about 98 % and essentially decreases the volume of work.

Use of acetonitrile in the mobile phase composition and optimization of the gradient shape or switch-over to isocratic elution are offered for decrease of the analysis time.

Key words: *Silybum marianum*, flavonolignans, HPLC-UV, pharmaceutical analysis.

Rezumat

La efectuarea analizei cantitative a fructelor de armurariu prin metoda Farmacopeei Europene s-a depistat o ireproductibilitate interlaborator al rezultatelor. S-a stabilit că aceasta ireproductibilitate este condiționată de insuficiența plenitudinii de extracție a analiților din produsul vegetal.

S-a elaborat un nou procedeu de preparare a probelor, care constă din două extracții consecutive cu alcool etilic 40% timp de 60 min la temperatura 70°C. Procedeu propus asigură regăsirea circa 98% și micșorarea esențială a volumului de lucru.

Pentru reducerea timpului analizei cromatografice s-a propus utilizarea acetonitrilului în componența fazei mobile și optimizarea formei gradientului sau trecerea la eluare izocratică.

Cuvinte cheie: *Silybum marianum*, flavonolignane, HPLC-UV, analiza farmaceutică.

Actualitatea

Armurariul sau Ciulin (*Silybum marianum* (L.) Gaertn, familia Asteraceae) este o plantă ierboasa anală sau bienală, care crește în regiunile mediteraneene și în Asia, iar la noi în țară ea numai se cultivă. Semințele (fructele) de armurariu sunt folosite în scopuri medicinale - datorită

conținutului de flavonolignane, ce posedă proprietăți hepatoprotectoare, hepatogeneratoare, antioxidante ș.a. Extractul este foarte frecvent recomandat pentru a combate efectul dăunător al alcoolului asupra ficatului. De asemenea, el stimulează activitatea vezicii biliare reducând riscul de apariție a calculilor biliari [1].

Materia primă vegetală și formele farmaceutice cu extract de armurariu sunt standardizate după suma de flavonolignane în recalcul la silibinină [2-4].

La analiza unui eșantion de fructe de armurariu după metoda descrisă în Farmacopeea Europeană, întâmplător am depistat o divergență esențială a rezultatelor cantitative, obținute în 2 laboratoare. Totodată, în literatura studiată am găsit mențiunea despre regăsirea scăzută a flavonolignanelor la extracția în aparatul Soxhlet, ca și prin alte metode tradiționale [5]. Autorii au izbutit o regăsire înaltă într-un timp scurt prin aplicarea extracției asistată de microunde, dar aceasta metoda cere modificarea aparatului și nu poate fi recomandată pentru analiza farmaceutică.

Astfel, ireproductibilitate interlaborator al rezultatelor, la fel și metoda de analiză laborioasă de timp a devenit drept motiv pentru efectuarea prezentului studiu.

Obiectivele

Scopul prezentei lucrării constă în elaborarea unui procedeu analitic, care v-a asigura obținerea rezultatelor veridice și reproductibile la dozarea flavonolignanelor în fructele de armurariu. O sarcină suplimentară poate fi și optimizarea acestui procedeu în direcția micșorării timpului efectuării analizei.

Materiale și metode

În lucru s-au utilizat cromatograful de lichide Jasco LC-2000 cu detector UV-VIS cu șir de diode (DAD), cromatograful de lichide Agilent 1200 cu DAD, coloane cromatografice cu diferite faze inverse, aparate Soxhlet pentru extracție.

Compoziții soluției tampon au fost cu grad de puritate “chimic pur”, iar acetoneitrilul și metanolul – “pentru HPLC”.

Substanțele de referință au fost procurate de la “Sigma”.

Fructele de armurariu au fost cultivate și colectate de pe plantațiile Centrului de Cultivare a Plantelor Medicinale, al Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”.

Metoda de bază utilizată a fost cea recomandată de Farmacopeea Europeană, care a și devenit obiect de optimizare [1].

Rezultate și discuții

Studiul s-a început cu determinarea regăsirii flavonolignanelor (substanțelor farmacologic active ale fructelor de armurariu) la efectuarea metodei farmaceutice, aplicând extracția repetată conform următoarei tehnici de lucru:

5,00 g produs vegetal mărunțit s-a plasat în aparatul Soxhlet. S-a adăugat 100 ml eter petroleic și s-a încălzit pe baie de apă timp de 8 ore. Produsul vegetal degresat s-a lăsat la temperatura camerei până la uscare, apoi s-a extras în același aparat Soxhlet cu 100 ml metanol timp de 5 ore. Extractul metanolic s-a evaporat sub vid până la volumul de circa 30 ml, s-a filtrat în balon cotat, spălând balonul de extracție și filtru cu metanol, și s-a completat volumul extractului până la cota de 50 ml cu același solvent. Extracția produsului vegetal cu metanol s-a repetat în aceleași condiții, iar a 3^a extracție s-a petrecut timp de 2 zile lucrătoare (16 ore) pentru epuizarea produsului vegetal. Fiecare fracție de extract a fost evaporată până la volumul de circa 30 ml, apoi completat până la cota 50 ml cu metanol. Extractele s-au centrifugat, iar alicotele pentru dozare s-au diluat de 10 ori cu metanol. Analiza cromatografică s-a efectuat conform metodei Ph. Eur., evaluând suma flavonolignanelor în recalcul la silibinină.

Rezultatele obținute în două laboratoare (tabelul 1) demonstrează, că plenitudinea primei extracții, în ambele cazuri, este destul de scăzută și diferă semnificativ, în timp ce rezultatele cumulative finale sunt apropiate, și pot fi considerate că ele oglindesc valoarea adevărată.

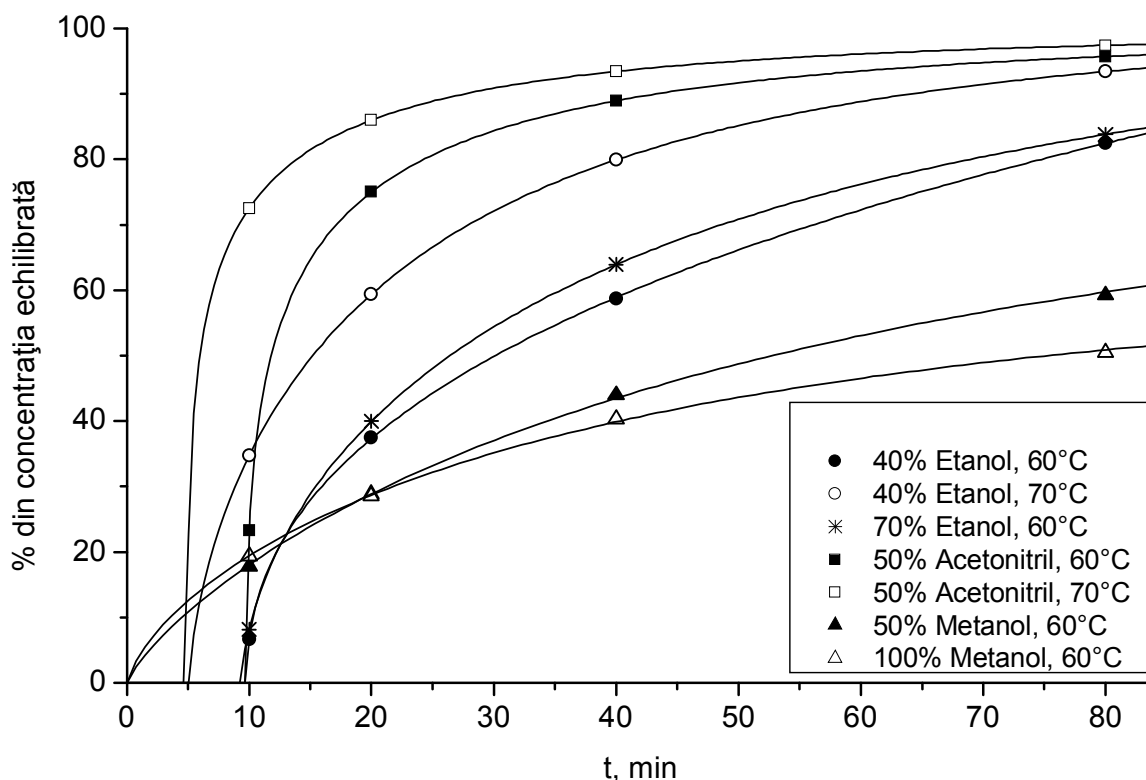


Fig. 1. Cinetica extracției fructelor de armurariu.

Următoarea etapă a fost studierea comparativă a cineticii de extracție a grupei flavonolignane cu diferiți solvenți, inclusiv și cel recomandat de metoda farmaceutică.

Tabelul 1

Rezultatele analizei unei mostre de fructe de armurariu, obținute în 2 laboratoare la efectuarea metodei farmaceutice

Nr. extracției	Rezultatele analizei fracțiilor extractului din produs vegetal			
	Laboratorul "Controlul calității medicamentelor", Agenția Medicamentelor		Laboratorul "Analiza, Standardizarea și Controlul medicamentelor", Centrul Științific în domeniul Medicamentului	
	Conținutul găsit, %	Conținutul cumulativ, %	Conținutul găsit, %	Conținutul cumulativ, %
1	2,9	2,9	3,6	3,6
2	1,0	3,9	0,4	4,0
3	0,2	4,1	0,2	4,2

Investigarea s-a efectuat în modul următor: Circa 0,5 g (masa exactă) produs vegetal mărunțit s-a plasat într-un balon cu capacitatea 100 ml, cu dop, s-a adăugat 50 ml solvent investigat și s-a încălzit pe baie de apă la temperatura 60°C sau 70°C, amestecând periodic. Probele, a câte 0.5 ml extract, s-au prelevat peste 10, 20, 40 și 80 min, s-au centrifugat timp de 5 min la 3000 g și s-au analizat prin metoda HPLC. Cantitatea flavonolignanelor, trecută în extract, s-a exprimat în % față de cea echilibrată, calculată prin aproximarea datelor cu model Weibull. Din fig. 1 se vede, că metanolul, recomandat de metoda farmaceutică, s-a dovedit a fi cel mai ineficient solvent pentru extracția flavonolignanelor.

Prin extracția repetată a 0,5 g produs vegetal cu porțiuni a câte 50 ml solvent investigat am determinat numărul necesar de extracții, reieșind din considerația, că regăsirea analiților - circa 97-98% este suficientă pentru standardizarea fructelor de armurariu. Datele din tabelul 2 permit de a selecta variantele optime de preparare a probelor: 2 extracții a câte 60 min la temperatura

70°C cu etanol 40% (regăsirea 97,9%), sau 2 extracții a câte 45 min la temperatura 70°C cu acetonitril 50% (regăsirea 98,3%). În final am selectat prima varianta, fiind mai ieftină și mai inofensivă din punct de vedere a toxicității solventului. Lipidele neutre sunt practic insolubile în etanol 40%, de aceea degresarea preliminară a probelor analizate, în cazul dat, duce doar la majorarea timpului analizei și poate fi considerată inutilă.

Tabelul 2

Regăsirea substanțelor analitice la extracția repetată

Solventul și condițiile de extracție	Randamentul cumulativ (în %) după numărul de extracții		
	1	2	3
40% etanol, 30 min, 60°C	62.2	85.5	94.6
40% etanol, 45 min, 70°C	81.5	96.6	99.4
40% etanol, 60 min, 70°C	85.7	97.9	99.8
30% acetonitril, 45 min, 70°C	80.2	97.8	99.7
50% acetonitril, 45 min, 70°C	85.5	98.3	99.8

Prin urmare, se propune următoarea tehnică de preparare a probelor de analiză pentru dozarea fructelor de armurariu:

Circa 0,5 g (masa exactă) materie primă mărunțită, care trece prin sita cu diametru orificiilor 0,5 mm, se introduce într-un balon cu capacitatea 100 ml, cu dop, se adaugă 50 ml soluție alcool etilic 40% și se încălzește pe baie de apă la temperatura $70 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 60 min, amestecând periodic. Conținutul balonului se filtrează prin tampon de vată într-un balon cotat cu capacitatea 100 ml. Tamponul cu materia primă se reîntoarce în primul balon și extracția se repetă încă o dată în aceleași condiții cu 50 ml alcool etilic 40%. Extractul sumar se răcește până la temperatura 20°C și volumul se completează până la cota 100 ml cu același extragent. Alicota se centrifughează 5 min la 3000-4000 g. Câte 10 μl probă și soluției standard se injectează în sistemul cromatografic.

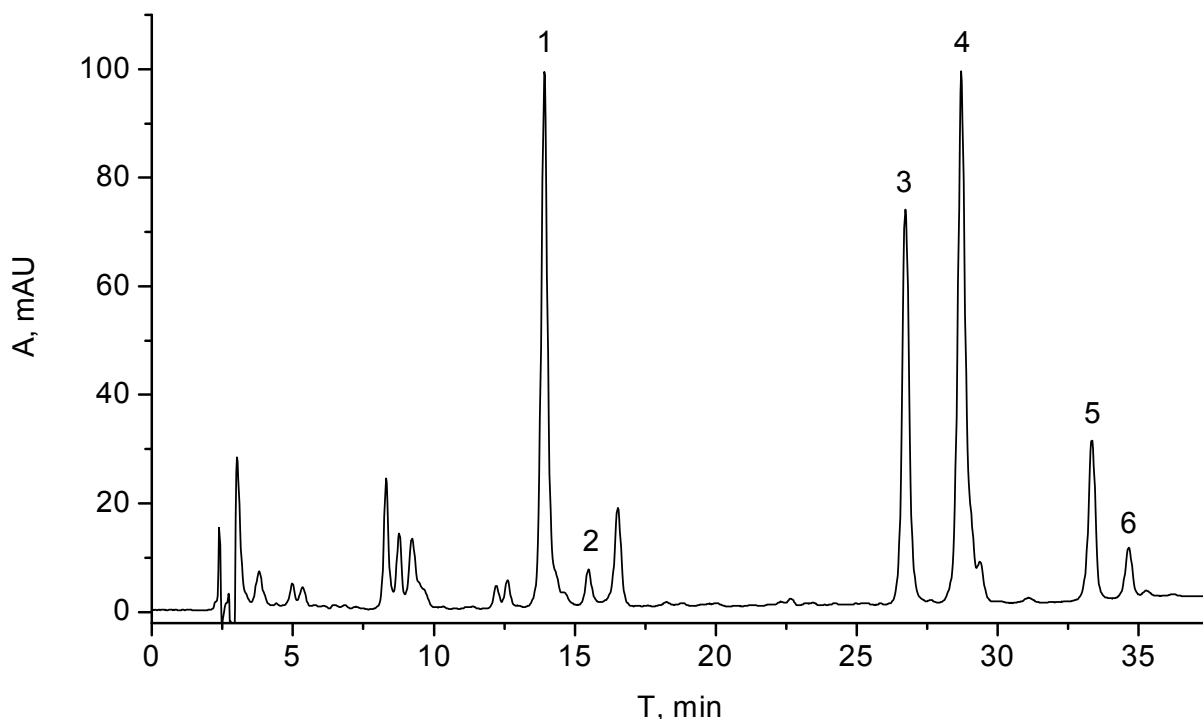


Fig. 2. Cromatograma extractului din fructe de armurariu obținută în condițiile prescrise de Ph. Eur.: 1 – silicristină; 2 – silidianină; 3, 4 – silibinină A și B; 5, 6 – isosilibinină A și B.

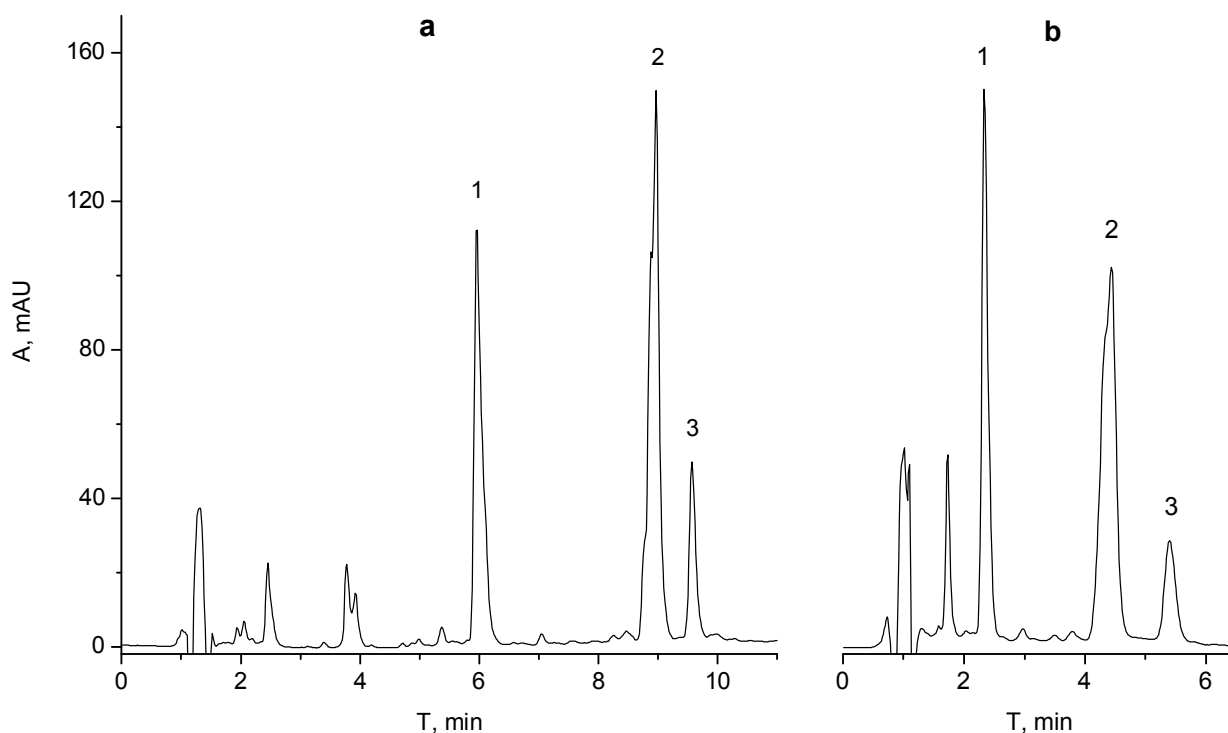


Fig. 3. Cromatogramele extractului din fructe de armurariu obținute în condițiile optimizate la eluare în gradient **(a)** și izocratică **(b)**.

1 – silicristină + silidianină; 2 – silibinină A + B; 3 – isosilibinină A + B.

Astfel, ca rezultat al optimizării procedurii de extracție, timpul total de preparare a unei mostre de fructe de armurariu s-a micșorat de la 15-17 ore până la 3-3,5 ore.

Pe fig. 2 este prezentată cromatograma unei probe de analizat, obținută în condițiile cromatografice recomandate de Ph. Eur. (coloana cu faza C-18 și dimensiunile 4x125 mm, gradient linear 35-50% metanol în soluție acid fosforic 0,5% timp de 28 min, apoi eluție izocratică timp de 7 min, viteza de eluare 0,8 ml/min, detecția la lungimea de undă 288 nm).

Reducerea suplimentară al timpului necesar pentru o analiză poate fi obținută prin optimizarea condițiilor cromatografice. Acest lucru poate fi ușor realizat în caz de refuz de la condiția de separare a picurilor silibininei A și B (cerința testului utilității sistemului cromatografic, care nu influențează asupra rezultatului final în cazul dat, deoarece se ia în calcul suma ariilor picurilor). Direcțiile posibile pentru realizarea acestei sarcini sunt:

- Înlocuirea metanolului în componența fazei mobile cu acetonitril, ce permite de a majora esențial viteza eluării și reechilibrării coloanei cu faza inițială;
- Optimizarea formei gradientului prin majorarea pantei și excluderea sectorului de eluare izocratică.

În rezultat am ajuns la următoarele condiții cromatografice: Coloana cu faza Zorbax Eclipse XDB C-8 și dimensiunile 4,6x150 mm, gradient linear 20-40% acetonitril în soluție acid fosforic 0,5% timp de 10 min cu viteza de eluare 1,5 ml/min. Timpul total a analizei unei probe s-a redus de la 51 min (prin metoda farmaceutică) până la 15 min; cromatograma corespunzătoare este prezentată pe fig. 3a.

Utilizarea fazei staționare cu catenă scurtă – coloana Kromasil 100 C-4, 5 μm, 4,6x100 mm și trecerea la eluție izocratică (30% acetonitril în soluție acid fosforic 0,5% la viteza de eluare 1,5 ml/min) a permis de a micșora timpul unei analize până la 6 min (fig. 3b).

Concluzii

S-a depistat ireproductibilitatea interlaborator a rezultatelor analizei cantitative a fructelor de armurariu la aplicarea metodei Farmacopeei Europene, care este condiționată de plenitudinea insuficientă a extracției flavonolignanilor din produs vegetal.

A fost elaborat un procedeu simplu de preparare a probelor, care asigură o regăsire înaltă a substanțelor analitice și micșorarea esențială a timpului de efectuare.

Deasemenea, s-a propus o direcție de micșorare a timpului de analiza HPLC prin optimizarea condițiilor cromatografice.

Bibliografie

1. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 2, 2004, p. 300-310.
2. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2008, p. 2425-2426.
3. Milk Thistle. USP 29–NF 24, p. 2362.
4. Radjabian T., Rezazaden SH. and Fallan Huseini H. Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from iran by HPLC. Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A, vol.32, nr. A2. 2008, p. 141-145.
5. Mahaveer Dhobi, Vivekananda Mandal and Siva Hemalatha. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan - silybinin. Journal Chemical Metrology. 3:1, 2009, p.13-23.