

Tabelul 15

**Determinarea clasei de toxicitate  
conform TG 423: Acute Toxic Class Method  
(OECD)**

Denumirea	Clasa de toxicitate	DL50/LD50 mg/kg
MF 51	5	> 5000
MF 14	5	= 5000
MF 20	5	>2000-5000 = 2500
MF 0010	5	>2000-5000 = 2500
MF 0003	4	>300-2000 = 2000
MF 22	4	>300-2000 = 1000
MF 17	3	>50-300 = 300

**Bibliografie**

1. Macaev, F.; Rusu, Gh.; Pogrebnoi, S.; Gudima, A.; Stingaci, E.; Vlad, L.; ... & Reynolds, R. *Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazoles and the study of their structure-anti-mycobacterial activities*. Bioorganic & Medicinal chemistry, 2005, 13(16), p. 4842-4850.
2. Macaev, F.; Ribkovskaia, Z.; Pogrebnoi, S.; Boldescu, V.; Rusu, Gh.; Shvets, N.; ... & Reynolds, R. *The structure-antituberculosis activity relationships study in a series of 5-aryl-2-thio-1, 3, 4-oxadiazole derivatives*. Bioorganic & Medicinal chemistry, 2011, 19(22), p 6792-6807.
3. Patel, R. V.; Kumari, P.; Rajani, D. P.; & Chikhalia, K. H. *Synthesis of coumarin-based 1,3,4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents*. Medicinal Chemistry Research, 2013, 22(1), p. 195-210.

4. Yar, M.S.; Siddiqui, A.A.; & Ashraf Ali, M. (2007). *Synthesis and Anti Tuberculostatic Activity of Novel 1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives*. Journal of the Chinese Chemical Society, 54(1), p. 5-8.

5. Prodius, D.; Saeed Shah, H.; Iqbal, J.; Macaeva, A.; Dimoglo, A.; Kostakis, G. E.; ... & Powell, A. K. *A novel example of double 6-exo-trig heterocyclization: nitrile conversion to new anticancer active (HeLa cells) primary amine ionic liquids*. Chemical Communications. 2014, 50, p. 4888-4890.

6. Parii, B.; Todiraș, M.; Parii, S.; Valica, V.; Rusnac, L.; Golovin, P. *Rezultatele studiilor experimentale ale preparatului medicamentos combinat Neamon-hepa*. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Ediția a XI-a. Chișinău, 2010; 1, p. 329-334.

7. Каркищенко, Н.Н.; Грачева, С.В. и соавт. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Москва. 2010, с. 358.

8. Committee of experts of dangerous goods and on the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals of United Nations Sub-Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (Twenty-first session, 1-10 July 2002, agenda item 8 (c)).

9. OECD C(2001)282 Proposal for the updating of three guidelins and the deletion of one guideline of chemicals.

10. OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 17th December 2001. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788).

## STANDARDIZAREA SUBSTANȚEI FARMACEUTICE HIPERFORINĂ DE DIETILAMONIU

**Igor Casian – conferențiar cercetător, dr. șt. farm.,  
Ana Casian – cercetător științific superior, dr. șt. farm.,  
Vladimir Valica – profesor universitar, dr. hab. șt. farm.,**

**Centrul Științific al Medicamentului,  
IP USMF „Nicolae Testemițanu”  
tel.: 022205575; kasyan\_i@yahoo.com**

**Rezumat**

Au fost evaluate proprietățile fizico-chimice ale substanței farmaceutice noi Hiperforină de dietilamoniu, izolate din părți aeriene de sunătoare. Substanța prezintă pulbere cristalină de culoare albă cu nuanță surie sau cremă, fără miros și gust și conține cel puțin 97% suma sărurilor de dietilamoniu ale hiperforinei și adhiperforinei. Este ușor solubilă în etanol 96% și cloroform, solubilă în etanol 70%, puțin solubilă în acetonitril, practic insolubilă în apă și hexan. Se topește în intervalul de temperaturi 146-153°C. Pentru standardizare au fost elaborate metode chimice și fizico-chimice. Metoda HPLC s-a propus pentru identificarea, dozarea și determinarea impurităților înrudite. Analiza se efectuează pe coloana Kromasil 100 C-4, 5 mm, 100 x 4,6 mm, utilizând faza mobilă: 85% acetonitril în soluție acid trifluoracetic 0,05% sau acid acetic 0,5%, cu detecția în UV la 274 nm. De asemenea, pentru analiza cantitativă au fost elaborate metodele spectrofotometrică în UV și titrimetrică.

**Cuvinte-cheie:** standardizare, hiperforină de dietilamoniu, HPLC, spectrofotometrie, titrimetrie

### Summary. Standardisation of the pharmaceutical substance hyperforin diethylammonium

The physicochemical properties of a new pharmaceutical substance hyperforin diethylammonium, isolated from aerial parts of St. John's wort, have been studied. The substance represents a white crystalline powder with a grey or cream nuance, without odour or taste, that contains not less than 97% sum of hyperforin and adhyperforin diethylammonium salts. It is easy soluble in 96% ethanol and chloroform, soluble in 70% ethanol, slightly soluble in acetonitrile, practically insoluble in water and hexane. The melting interval is 146-153°C. Chemical and physicochemical methods have been developed for standardisation. The HPLC method was offered for identification, quantitative analysis and determination of impurities. Analysis is carried out on column Kromasil 100 C-4, 5 mm, 100 x 4,6 mm, using the mobile phase: 85% of acetonitrile in 0,05% solution of trifluoroacetic acid or 0,5% solution of acetic acid, with UV detection at 274 nm. UV spectrophotometrical and titrimetrical methods have been also developed for quantitative analysis.

**Key words:** standardisation, hyperforin diethylammonium, HPLC, spectrophotometry, titrimetry

### Резюме. Стандартизация лекарственного вещества гиперфорина диэтиламмониевой соли

Изучены физико-химические свойства новой лекарственной субстанции диэтиламмониевой соли гиперфорина, выделенной из надземных частей зверобоя продырявленного. Субстанция представляет кристаллический порошок белого цвета с сероватым или кремовым оттенком, без запаха и вкуса и содержит не менее 97% суммы диэтиламмониевых солей гиперфорина и адгиперфорина. Она легко растворима в 96% этаноле и хлороформе, растворима в 70% этаноле, мало растворима в ацетонитриле, практически нерастворима в воде и гексане. Плавится в интервале температур 146-153°C. Для стандартизации были разработаны химические и физико-химические методы. Метод ВЭЖХ был предложен для идентификации, количественного анализа и определения примесей. Анализ осуществляется на колонке Kromasil 100 C-4, 5 мкм, 100 x 4,6 мм с использованием подвижной фазы: 85% ацетонитрила в 0,05% растворе трифторуксусной кислоты или 0,5% растворе уксусной кислоты, с УФ детекцией при 274 нм. Для количественного анализа были разработаны также методы УФ спектрофотометрии и титриметрии.

**Ключевые слова:** стандартизация, гиперфорина диэтиламмониевая соль, ВЭЖХ, спектрофотометрия, титриметрия

**Introducere.** Studiul fitochimic al speciei *Hypericum perforatum* L. a depistat mai multe grupe de compuși farmacologic activi, fapt ce explică spectru larg de acțiuni ale acesteia. Printre aceste grupe se regăsesc derivații diantronici, flavonoide, derivații de floroglucinol, uleiul volatil, procianidine, acizii fenolici ș. a. Principalii compuși activi ai sunătoarei se consideră hipericina (din grupa antrachinonilor condensate), fiind în jur de 0,1-0,3% și hiperforina (din grupa floroglucinonilor prenilați) - în jur de 2-6% [1]. Acest fapt s-a luat în considerație la standardizarea produsului vegetal și produselor extractive din herba de sunătoare de unele standarde de calitate - Farmacopeea Europeană (Ph. Eur.), Farmacopeea Americană (USP) ș. a. [2, 3].

Hiperforina prezintă compusul activ căruia i se atribuie acțiunea antimicrobiană, antidepresantă, antitumorală, antiinflamatoare [4, 5] ș. a. Însă, acest compus se oxidează destul de ușor cu oxigenul atmosferic, fapt ce duce la instabilitatea lui în procesul de prelucrare, precum și în perioada de conservare a produsului vegetal „herba de sunătoare”, produselor extractive și formelor farmaceutice industriale pe baza acestora [6, 7].

Soluționarea problemei date poate consta în obținerea și utilizarea sărurilor de hiperforină, care sunt cu mult mai stabile [7].

La Centrul Științific în Domeniul Medicamentului, USMF „Nicolae Testemițanu” a fost obținută o nouă formă chimică – hiperforina de dietilamoniu – care, conform studiilor preliminare, este stabilă la păstrare. Procedul de obținere elaborat este relativ simplu și economic și, poate fi implementat în industria chimico-farmaceutică [8].

**Obiectivele lucrării.** Scopul studiului a constat în evaluarea proprietăților fizico-chimice și elaborarea metodelor de standardizare a substanței hiperforină de dietilamoniu, izolată din părți aeriene de sunătoare.

**Material și metode.** Substanța farmaceutică „Hiperforină de dietilamoniu” a fost izolată din herba de sunătoare, colectată din flora spontană în faza de înflorire - început de fructificare. Substanța de referință a fost obținută din substanța farmaceutică, fiind purificată prin re-cristalizare din acetonitril, conform procedurilor descrise anterior [8].

La efectuarea cercetărilor fizico-chimice au fost utilizate următoarele aparate de laborator: Cromatograf de lichide „Agilent 1260” cu detector UV-VIS cu șir de diode; spectrofotometru “Lambda 25” (Perkin Elmer); pH-metru Consort C861, conectat la calculator pentru înregistrarea curbelor de titrare potențiomtrică.

Reactivile și solvenții cu grad „pentru HPLC” au fost procurate de la „Fluka” și „Sigma-Aldrich”.

### Rezultate obținute și discuții.

#### Proprietățile fizico-chimice ale substanței „Hiperforina de dietilamoniu”

Produsul farmaceutic “Hiperforina de dietilamoniu” conține cel puțin 97% suma sărurilor dietilamoniu de hiperforină și adhiperforină. Raportul hiperforină: adhiperforină constituie în jur de 10:1 și este aproape egal cu raportul corespunzător în materia primă, din care a fost obținut produsul.

Substanța dată, după aspectul organoleptic, prezintă pulbere cristalină de culoare albă cu nuanță surie sau cremă, fără miros și gust. Ea este ușor solubilă în etanol 96% și cloroform, solubilă în etanol 70%, puțin solubilă în acetonitril, practic insolubilă în apă și hexan.

Hiperforina de dietilamoniu se topește în intervalul de temperaturi 146-153°C, iar la răcirea ulterioară se formează o masă amorfă transparentă. Pierderea la uscare (105-110°C) constituie 0,4-0,6%, iar cenușa totală – 0,02-0,06%.

Substanța este stabilă în stare solidă păstrată în loc uscat, iar în soluții se oxidează ușor cu oxigenul atmosferic.

#### Standardizarea substanței hiperforină de dietilamoniu

Pentru standardizarea substanței farmaceutice pot fi propuse metode chimice și fizico-chimice de analiză.

**Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)**, fiind o metodă de înaltă sensibilitate și mai selectivă, poate fi utilizată pentru identificarea și dozarea produselor vegetale, substanțelor și formelor farmaceutice, precum și în investigațiile farmacocinetice. Pentru determinarea cantitativă a sării de hiperforină am utilizat metoda propusă anterior pentru produsul vegetal “Părți aeriene de sunătoare” [9], dar cu unele modificări. Metoda în varianta finală se efectuează în felul următor:

##### Prepararea soluției probă și soluției standard

Circa 0,04 g (masă exactă) substanță de analizat sau standard de lucru se dizolvă în fază mobilă, apoi se completează volumul până la 100 ml.

##### Analiza cromatografică

Coloana cromatografică cu dimensiunile 100 x 4,6 mm, umplută cu sorbent Kromasil 100 C-4, diametrul particulelor 5 mm, se echilibrează cu faza mobilă, alcătuită din 85 părți volum acetonitril și 15 părți soluție acid trifluoroacetic 0,05% sau acid acetic 0,5%. Utilizarea acidului organic în loc de tampon fosfat exclude posibilitatea cristalizării sărurilor sau stratificarea fazei mobile la concentrații înalte a solventului organic.

Soluția probă și standard se injectează consecutiv în sistemul cromatografic câte 10 ml. Detecția are loc la lungimea de undă 274 nm (figura 1).

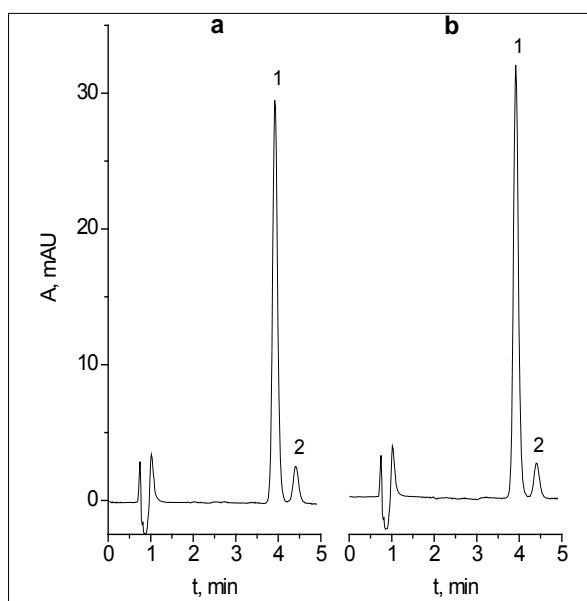


Figura 1. Cromatogramele soluției probă (a) și soluției standard (b) a hiperforinei de dietilamoniu: 1 – hiperforină; 2 – adhiperforină

Din cromatogramele obținute se determină valorile medii a ariilor picurilor de hiperforină și adhiperforină (pentru soluția standard – doar a hiperforinei).

Conținutul cantitativ poate fi exprimat ca suma hiperforinei și adhiperforinei în recalcul la hiperforină, fie ca conținut sumar a sărurilor de dietilamoniu corespunzător. În primul caz calculele se efectuează conform formulei:

$$X\% = \frac{S_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot 100 \cdot 100}{S_{st} \cdot m_{pr} \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st}}{S_{st} \cdot m_{pr}}$$

unde  $S_{pr}$  și  $S_{st}$  – valorile medii ale ariilor picurilor analitice pe cromatogramele soluției probă și soluției standard corespunzător;  $m_{pr}$  – masa substanței de analizat, g;  $m_{st}$  – masa standardului de lucru, g;  $C_{st}$  – conținutul hiperforinei în standardul de lucru, %.

Valoarea obținută reflectă conținutul părții farmacologic active a moleculei și este comod de utilizat în calculele cantităților necesare de substanță la prepararea formelor medicamentoase. În al doilea caz picurile analitice se prelucrează separat în conformitate cu formula expusă mai sus. Conținutul de hiperforină și adhiperforină se recalculează la sarea de dietilamoniu, apoi se sumează. Rezultatul obținut reflectă mai bine puritatea substanței analizate.

Metoda HPLC elaborată poate fi utilizată în testarea și altor indici recomandați pentru substanțe farmaceutice, conform Ph. Eur. [2]. Astfel, pentru **identificarea** substanței “Hiperforină de dietilamoniu” se compară corespunderea timpilor de retenție ale picurilor de hiperforină și adhiperforină de pe cromatogramele soluției probă și a soluției standard.

În cazul determinării **impurităților înrudite** se

examinează cromatogramele soluției probă, obținute la determinarea cantitativă. Suma ariilor tuturor picurilor adăugătoare nu depășește 1,0% din suma ariilor picurilor de hiperforină și adhiperforină la momentul producerii și 2,0% după 3 ani de păstrare în condiții normale.

**Spectrofotometria în UV** poate fi utilizată ca metodă alternativă pentru determinarea conținutului sumar de hiperforină și adhiperforină, utilizându-i propria absorbantă optică. Întrucât formarea sărurilor duce la deplasarea și lărgirea benzilor în spectru UV (figura 2), este necesar de reprimat ionizarea compușilor determinați, folosind solvenți acidulați. Ca urmare, propunem următoarea metodă de analiză:

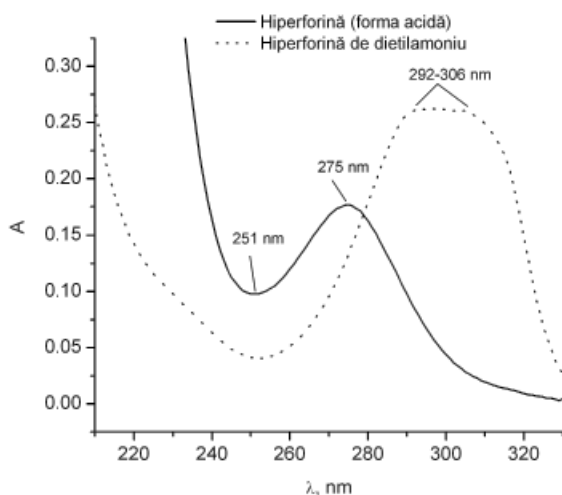


Figura 2. Spectrele în UV ale soluțiilor de hiperforină și hiperforină de dietilamoniu (10 mg/l) în etanol 96%

Circa 0,05 g (masă exactă) substanță de analizat sau standard de lucru se dizolvă în etanol 96%, ce conține acid acetic 0,2% și se aduce până la volumul 50 ml. 2 ml soluție obținută se diluează până la volumul 50 ml cu același solvent. Absorbanta soluției probă și a soluției standard se măsoară la spectrofotometru la lungimea de undă 275 nm în cuva cu grosimea stratului 10 mm. În calitate de soluție de compensare se utilizează soluția acid acetic 0,2% în etanol 96%. Conținutul cantitativ a părții active de substanță se calculează conform formulei:

$$X(\%) = \frac{A_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot 50 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 100}{A_{st} \cdot m_{pr} \cdot 100 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 50} = \frac{A_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st}}{A_{st} \cdot m_{pr}}$$

unde  $A_{pr}$  și  $A_{st}$  – absorbanta soluției probă și a soluției standard, corespunzător;  $C_{st}$  – conținutul sumar al hiperforinei și adhiperforinei (în recalcul la hiperforină) în mostra standardului de lucru,%. Restul desemnărilor au același sens, ca și în formula de calcul aplicată în metoda HPLC.

Spectrofotometria în UV poate fi utilizată și la identificarea substanței active după pozițiile maximu-

lui și minimului în spectrul UV înregistrat în diapazonul 215-320 nm.

**Analiza titrimetrică** a sărurilor de hiperforină se bazează pe interacțiunea bazei conjugate cu un oarecare acid puternic, de exemplu clorhidric. Titrarea s-a efectuat în mediu hidro-alcoolic cu concentrația etanolului aproximativ 50%. Utilizarea concentrațiilor de etanol mai înalte înrăutățesc forma curbei de titrare (figura 3), iar la concentrații mai joase se micșorează considerabil solubilitatea substanței de analizat. Din aceste considerente se poate recomanda dizolvarea probei în etanol 96%, apoi diluarea soluției cu apă până la concentrația necesară a etanolului.

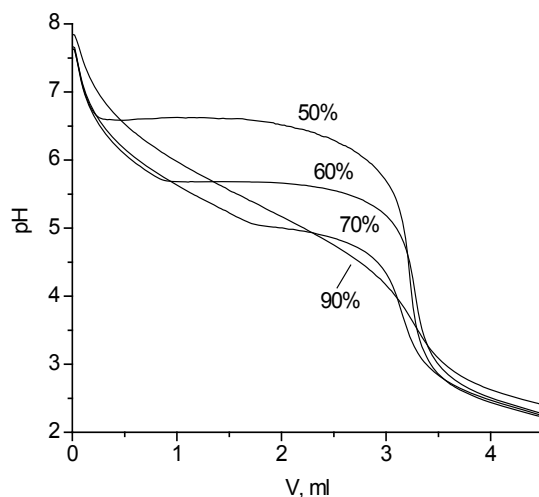


Figura 3. Curbele titrării potențimetrice a hiperforinei de dietilamoniu în soluțiile hidroalcoolice cu diferite concentrații de etanol

#### Tehnica de lucru:

Circa 0,1 g (masă exactă) substanță de analizat se dizolvă în 5 ml etanol 96%, se adaugă 5 ml apă și se titrează cu acid clorhidric 0,05 M. Punctul de echivalență se determină potențimetric după poziția minimumului derivatei de ordinul I al curbei de titrare. 1 ml acid clorhidric 0,05 M corespunde la 0,02684 g suma hiperforină și adhiperforină în recalcul la hiperforină.

Din **metode chimice** de analiză poate fi aplicată reacția la ionul de dietilamoniu. De bază s-a luat metoda farmaceutică de identificare a sărurilor de amoniu și de amine volatile. Însă, având în vedere insolubilitatea substanței de testat în medii apoase, ea a fost supusă unor modificări:

Circa 0,1 g substanță de analizat se introduce într-o eprubetă de sticlă, se dizolvă în 1 ml alcool etilic 96%, se adaugă 1 ml soluție hidroxid de sodiu 0,5 M și se încălzește până la fierbere. Se percepe miros de dietilamină, iar hârtia indicatoare de fenolftaleină, preventiv umectată și introdusă în orificiul eprubetei, se colorează în roz-violet.

**Concluzii:**

Au fost evaluate proprietățile fizico-chimice ale substanței farmaceutice “Hiperforină de dietilamoniu” și elaborate metode chimice și fizico-chimice de standardizarea acesteia după indicii “Identificare”, “Dozare” și “Impurități înrudite”.

Metodele elaborate, cât și alți indici prevăzuți de Farmacopeea Europeană, pot fi incluse în documentația de normare a calității pentru substanța farmaceutică “Hiperforină de dietilamoniu”.

**Bibliografie**

1. Kenneth, M., Klemow; Andrew, Bartlow; Justin, Crawford; et. al. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, Second Edition*. CRC Press. 2011, 211-229.
2. European Pharmacopoeia 7.0. St. John's Wort dry extract, quantified (1874) and Substances for pharmaceutical use (2034).
3. USP 30 – NF 25. St. John's Wort. 2007, pag. 978.

4. Assessment report on *Hypericum perforatum* L., herba. Doc. Ref.: EMA/HMPC/101303/2008.

5. Рожанец, В. Зверобой: применение в психиатрии и наркологии. *Наркология*. 2003, nr.7, 40-46. ISSN 1682-8313.

6. Catharina, Y., W., Ang; Lihong, Hu; Thomas, M., Heinze, et al. Instability of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and Degradation of Hyperforin in Aqueous Solutions and Functional Beverage. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (20), 6156 -6164.

7. Chatterjee, Shyam Sunder; Erdelmeier, Clemens; Klessing, Klaus et al. Stable hyperforin salts, method for producing same and their use in the treatment of alzheimer's disease. *United States Patent 6444662*. Application Number: 09/622151. Publication date: 09/03/2002.

8. Casian, I.; Casian, A. Obținerea sării dietilamoniu de hiperforină din herba de sunătoare (*Hypericum perforatum* L.). *Intellectus*. 2013, nr. 2, 95-97. ISSN 1810-7079.

9. Casian, I.; Casian, A.; Valica, V. Elaborarea metodei HPLC pentru studiu fitochimic al speciei *Hypericum perforatum* L. *Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”*. 2009, v. 1, 327-332. ISSN 1857-1719.

## STATE OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS

**Mihai Sheremet – PhD, candidat în științe,**

**Universitatea de Stat de Medicină din Bucovina, Ucraina, Cernăuți,**

**Nina Tkachuk – PhD, candidat în științe,**

**Universitatea de Stat de Medicină din Bucovina, Ucraina, Cernăuți,**

**Yana Girla – magistru în medicină,**

**Universitatea de Stat de Medicină din Bucovina, Ucraina, Cernăuți,**

**Andrei Tibirna – PhD, asistent universitar,**

**USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova**

*e-mail: Mihayl71@gmail.com, telefon+380956064607*

**Summary**

The paper presents some data about cytokine content in blood plasma of patients with autoimmune thyroiditis. A significant increase in production of anti-inflammatory cytokines by peripheral blood cells was observed. It was established that the degree of activation of pro-inflammatory cytokines corresponds to the degree of the thyroid gland enlargement.

**Key words:** thyroid gland; autoimmune thyroiditis; T cells; cytokines

**Rezumat. Starea citokinelor la pacienții cu tiroidită autoimună**

Lucrarea prezintă câteva date despre conținutul de citokine în plasma sanguină a pacienților cu tiroidită autoimună. A fost observată o creștere semnificativă a producției de citokine anti - inflamatorii de către celulele sanguine periferice. S-a stabilit că gradul de activare a citokinelor pro -inflamatorii corespunde cu gradul de extindere a glandei tiroide.

**Cuvinte-cheie:** glanda tiroidă; tiroidită autoimună; T-celule; citokine

**Резюме. Состояние цитокинов у больных аутоиммунным тиреоидитом**

Приведены некоторые данные о содержании цитокинов в плазме крови больных аутоиммунным тиреоидитом. Выявлено значительное увеличение производства противовоспалительных цитокинов клетками периферической крови. Было установлено, что степень активации провоспалительных цитокинов соответствует степени увеличения размеров щитовидной железы.

**Ключевые слова:** щитовидная железа; аутоиммунный тиреоидит; Т-клетки; цитокины