

CHIMIE GENERALĂ ȘI FARMACEUTICĂ TEHNOLOGIA MEDICAMENTELOR

ELABORAREA METODEI HPLC PENTRU STUDIU FITOCHIMIC AL SPECIEI HYPERICUM PERFORATUM L.

Igor Casian, Ana Casian, Vladimir Valica

Centrul Științific în domeniul Medicamentului al USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

Elaboration of the HPLC method for the phytochemical study of Hypericum perforatum L. species

The HPLC method with multiwavelength UV-VIS detection has been developed for the quantification of pharmacologically active substances in herb of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and in extractive products.

The procedure for preparation of raw material samples has been optimized, having in mind instability of some active substances in solutions.

It was confirmed, that the greatest part of active substances can be found in flowers, smaller amount - in leaves, but stems are practically deprived them.

Rezumat

S-a elaborat metoda HPLC cu detecția în UV-VIS cu mai multe lungimi de undă pentru dozarea substanțelor farmacologic active în herba de sunătoare (*Hypericum perforatum* L.) și în produsele lor extractive.

Procedura de preparare a probelor de produs vegetal a fost optimizată, ținând cont de instabilitatea unor substanțe active în soluții.

S-a confirmat, că cantitatea majoră a substanțelor active se află în flori, mai puține – în frunze, iar tulpinile practic sunt lipsite de ele.

Actualitatea temei

Sunătoarea (*Hypericum perforatum* L., familia *Hypericaceae*) este o plantă ce prezintă în continuare interes pentru studiu din punct de vedere atât farmacologic, cât și fitochimic. Preparatele din sunătoare manifestă un spectru larg de acțiune farmacologică, inclusiv antidepresivă, adaptogenă, hepatoprotectoare, antimicrobiană, antiinflamatoare ș. a [2, 3, 4]. De asemenea componența chimică a plantei este destul de complexă, incluzând substanțe din diferite grupe, în primul rând, compuși fenolici [3, 5]. Necâtând la faptul, că sunătoare se consideră o plantă suficient studiată, până în prezent nu există o părere unică despre componentul sau grupa de componenți, care sunt responsabili pentru acțiunile farmacologice. Din aceasta cauză nu există o abordare unică față de standardizarea produselor farmaceutice obținute din herba de sunătoare. În orice caz, în studiile fitochimice existente și farmacognostice se preferă maximum o descriere cât mai detaliată a compoziției chimice și minimum – determinarea substanțelor potențial active și celor caracteristice pentru specia studiată.

Un aport considerabil în soluționarea acestei sarcini pot servi metodele analitice universale și, în primul rând, cromatografice. Alte metode, inclusiv și cele farmaceutice, destinate dozării unor grupe chimice aparte, și aplicate în studiile de rutină complexe a plantei sunt incomode și ineficiente, cerând un volum enorm de operațiuni la etapele de preparare a probelor și de analiză propriu-zisă [1].

Obiectivele lucrării

Scopul prezentei lucrării a constat în elaborarea metodei HPLC pentru dozarea mai multor substanțe din diferite grupe chimice într-o singură probă.

Materiale și metode

În lucru s-a utilizat cromatograful de lichide din seria Jasco LC-2000, alcătuit din două pompe, amestecător dinamic de presiune înaltă, injector manual, termostat de coloane și detector UV-VIS cu șir de diode (DAD). Separarea cromatografică s-a studiat pe coloane analitice cu faza inversă. Componentii tamponului au fost de gradul de puritate "chimic pur", iar acetonitrilul – "pentru HPLC". Substanțele de referință au fost procurate de la "Fluka" și "Sigma-Aldrich".

Rezultate și discuții

Alegerea condițiilor de separare a analizelor a fost dictată, mai întâi de comportarea cromatografică a derivaților de antracen condensați (hipericină și pseudohipericină). Având molecule cu structura plată și dimensiuni majorate, acești compuși demonstrează efecte de excluzie pe sorbenții cu mărimea porilor 60-80 Å, care sunt utilizați pe larg. Pe de altă parte, posedând câte 6 hidroxili fenolici într-o moleculă, acești compuși fiind analizați pe coloane cu faza C-8 sau C-18 formează picuri cromatografice cu forma alterată, posibil din cauza aportului majorat de interacțiuni nespecifice. Rezultate mai satisfăcătoare am obținut analizând probele pe coloana cu sorbent Kromasil 100 C-4. Îmbunătățirea ulterioară a formei picurilor s-a atins cu utilizarea concentrațiilor înalte ale electrolitului puternic în faza mobilă.

O altă dificultate este legată de diapazonul destul de larg a polarității substanțelor determinate, fapt ce nu permite efectuarea analizei în regim isocratic sau în gradient scurt, iar aplicarea gradientelor line mărește considerabil timpul analizei. Ca soluție de compromis am propus aplicarea gradientului cu mai multe trepte, în care sectoarele de gradient lin sau eluarea isocratică alternează cu sectoare de gradient abrupt, cum este redat în fig. 1.

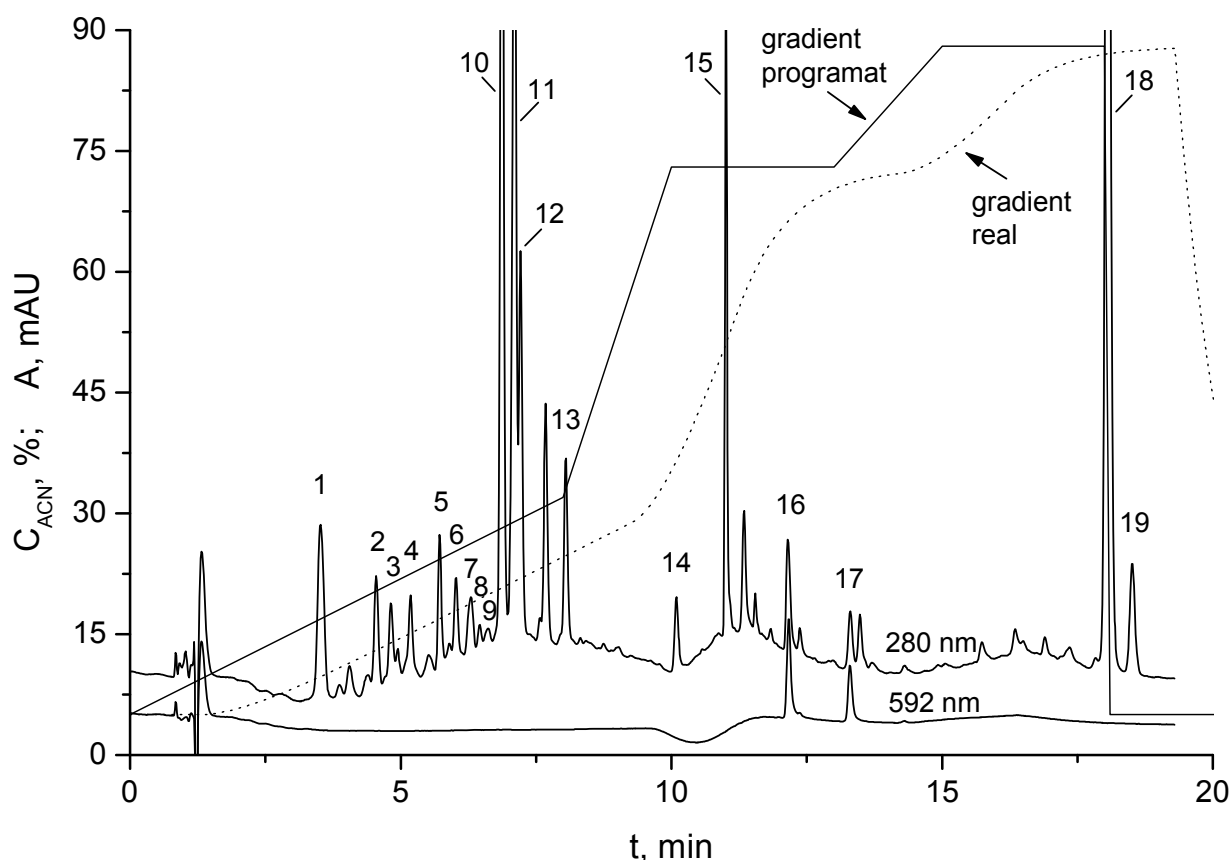


Fig. 1. Cromatograma extractului din herbă de sunătoare și forma gradientului programat la intrarea în coloană și real (calculat) la ieșirea din coloană. Componenti identificați: 1 – acizi oxicinamici; 2 – acid clorogenic; 3 – catehină; 5 – epicatehină; 4, 6-9 – proantocianidine oligomerice; 10 – rutozidă; 11 – hiperozidă; 12 – isocvercitrină; 13 – glicozid flavonolic; 14 – cvercetină; 15 – biapigenină; 16 – pseudohipericină; 17 – hipericină; 18 – hiperforină; 19 – adhiperforină.

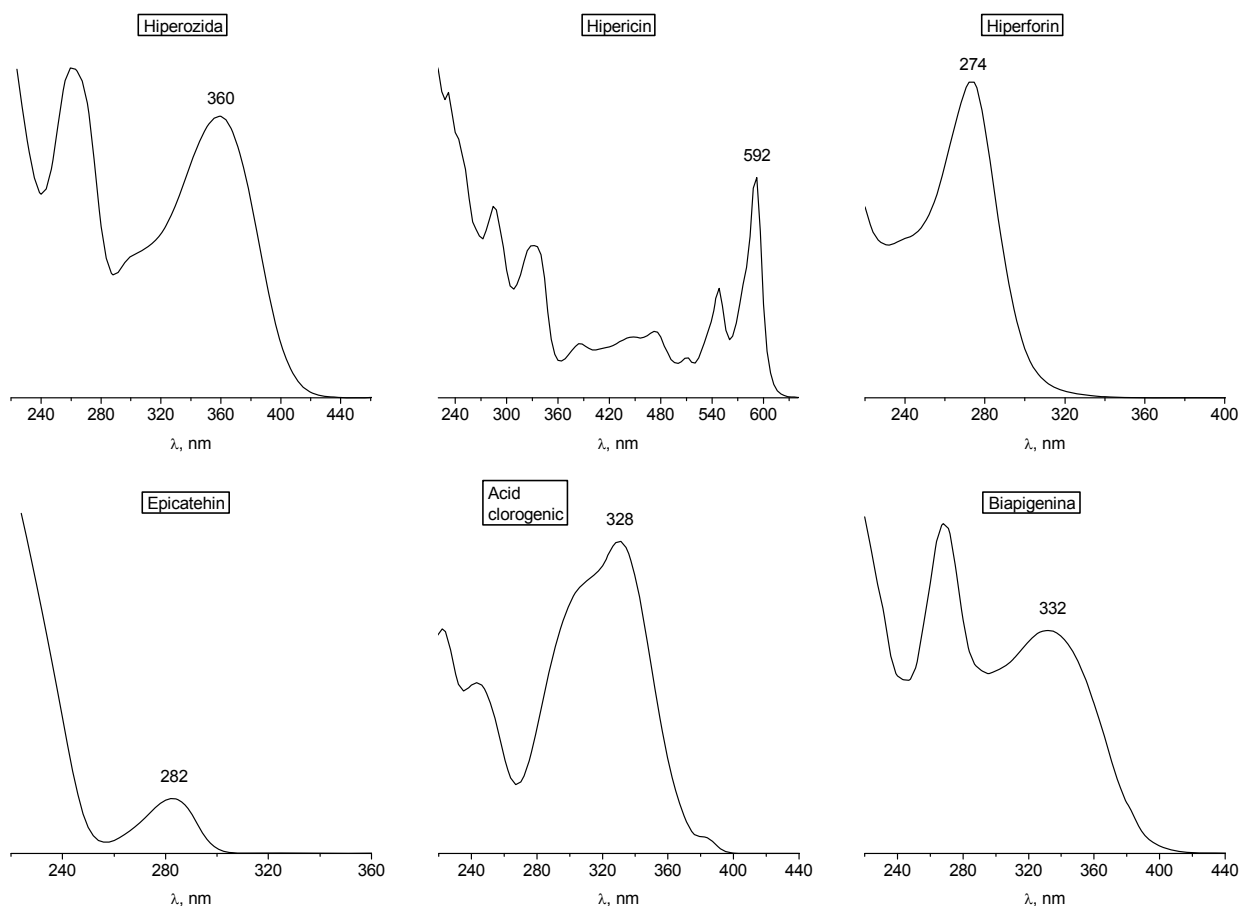


Fig. 2. Spectrele în UV-Vis ale substanțelor principale din specia *H. perforatum* L.

Prezența componentelor chimici din diverse grupe cere și efectuarea detecției la diferite lungimi de undă pentru a asigura selectivitatea și sensibilitatea necesară. Pe fig. 2 sunt prezentate spectrele UV-VIS a unor substanțe din grupele principale, caracteristice pentru specia *H. perforatum* L. Spectrele sunt extrase din cromatogramele, înregistrate cu DAD. Lungimea de undă 280 nm este preferabilă pentru detecția proantocianidinelor și hiperforinei. Restul componentelor interesați, de asemenea, posedă absorbanta suficientă în această regiune a spectrului, dar în acest caz selectivitatea determinării lor va fi scăzută, în special pentru hipericină. Astfel, se recomandă de efectuat detecția hipericinei și pseudohipericinei la lungimea de undă 592 nm, care este specifică pentru grupa dată. Derivații acidului cafeic se detectează la 328 nm, biapigenina – la 340 nm, iar glicozide flavonolice – la 360 nm. În cazul lipsei detectorului cu mai multe lungimi de undă, se poate efectua detecția aplicând detectorul cu scanare la cel puțin 2 lungimi de undă (280 și 592 nm), programând schimbarea lor în timpul înregistrării cromatogramelor.

Ca rezultat al studiului efectuat, propunem următoarele condiții de separare cromatografică a componentelor principali ai extractelor din herba de sunătoare: Coloana Kromasil 100 C-4, 5 μm, 100 x 4,6 mm. Faza mobilă, pompată cu viteza volumetrică 1,5 ml/min, se formează în amestecătorul dinamic de presiune înaltă din doi componente: A – acetonitril; B – soluție KH₂PO₄ 0,1 M + H₃PO₄ 0,02 M. Programul gradientului: 5-32% A în B, 0-8 min; 32-73% A în B, 8-10 min; 73% A în B, 10-13 min; 73-87% A în B, 13-15 min; 87% A în B, 15-18 min. Apoi coloana se echilibrează timp de 5 min cu faza inițială (5% A în B) înainte de a injecta proba următoare. Timpul total al unui ciclu cromatografic este 23 min. Soluția de etalonare Nr 1 conține 20 mg/l hipericină și câte 40 mg/l acid clorogenic, (-) epicatehină, hiperozidă și apigenină în amestec acetonitril – apă (1:1). Soluția de etalonare Nr 2 conține 80 mg/l hiperforină în faza mobilă cu concentrația acetonitrilului 50%. La concentrații mai joase a acetonitrilului este posibilă precipitarea hiperforinei, sau sorbția hipericinei pe suprafața vaselor.

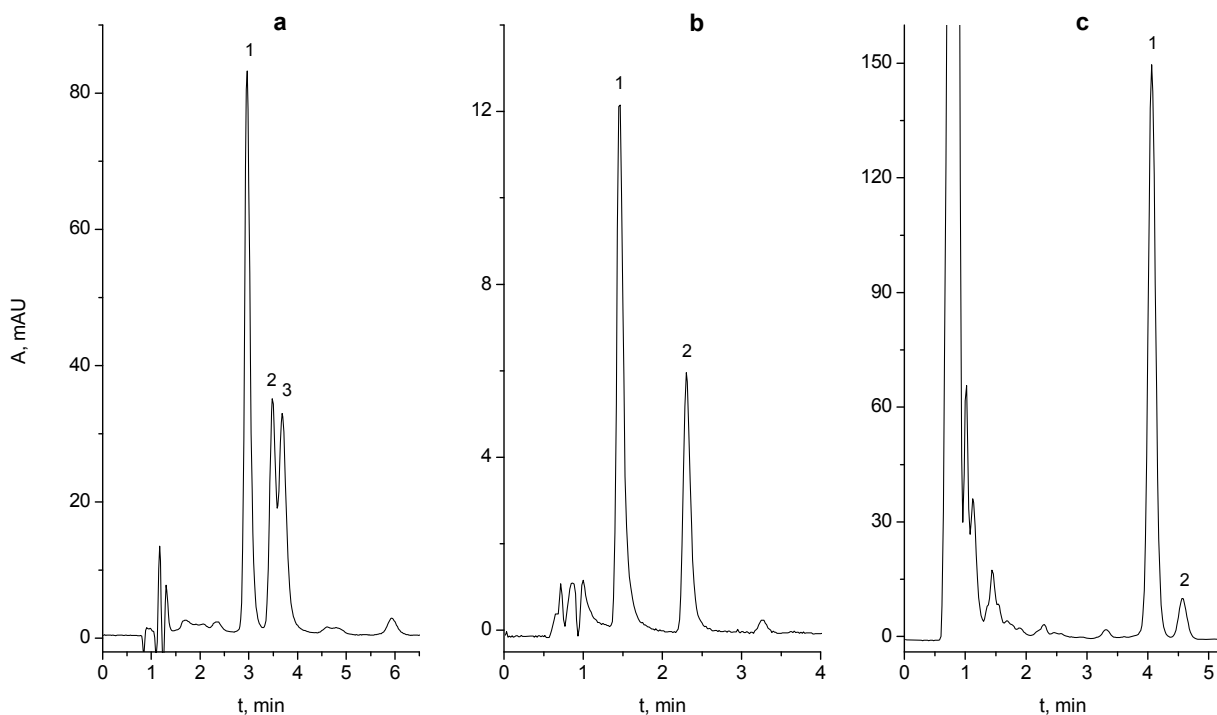


Fig. 3. Cromatoframele extractului din herbă de sunătoare în regim isocratic: **a** – 18% acetonitril în tampon fosfat: 1 – rutozidă, 2 – hiperozidă, 3 – isocvercitrină; **b** - 72% acetonitril în tampon fosfat: 1 – pseudohipericină, 2 – hipericină; **c** - 85% acetonitril în tampon fosfat: 1 – hiperforină, 2 – adhiperforină.

Din lipsa substanței de referință biapigenină, în soluția de etalonare s-a folosit apigenina, care are spectru UV asemănător, dar eluează cu 0,2 min înaintea biapigeninei. În aceste condiții cromatografice picurile glicozidelor flavonolice sunt separate incomplet, ceea ce nu prezintă o problemă pentru standardizarea produselor după suma glicozidelor în recalcul la hiperozidă sau rutozidă.

În cazul, când este necesară determinarea doar a unor grupe chimice aparte, se poate micșora considerabil timpul analizei, cu eluarea în regim isocratic la concentrația acetonitrilului în faza mobilă 18% pentru glicozide flavonolice, 72% pentru hipericină și pseudohipericină, sau 85% pentru hiperforină și adhiperforină. Cromatogramele corespunzătoare sunt prezentate în fig. 3.

O altă sarcină importantă este optimizarea tehnicii de preparare a probelor de materie vegetală înaintea separării cromatografice. Există doi factori care pot influența rezultatele analizei: instabilitatea hiperforinei și a derivaților de antracen în soluțiile hidroalcoolice și legarea strânsă a hipericinei cu matricea vegetală.

Instabilitatea hiperforinei este condiționată de oxidarea ei ușoară cu oxigenul din aer, care se intensifică în mediu bazic, de aceea se recomandă acidularea extragentului. Pe de altă parte, în mediu acid scade stabilitatea hipericinei și, în special, a pseudohipericinei. Ca variantă de compromis, s-a ajuns la utilizarea soluției de acid citric 0,2% în alcool etilic 80% în calitate de extragent. Acidul citric posedă proprietăți antioxidante și de tampon; pH-ul extractelor obținute se află în limitele 4,2-4,3. Concentrația înaltă a etanolului micșorează solubilitatea oxigenului în extragent și ușurează

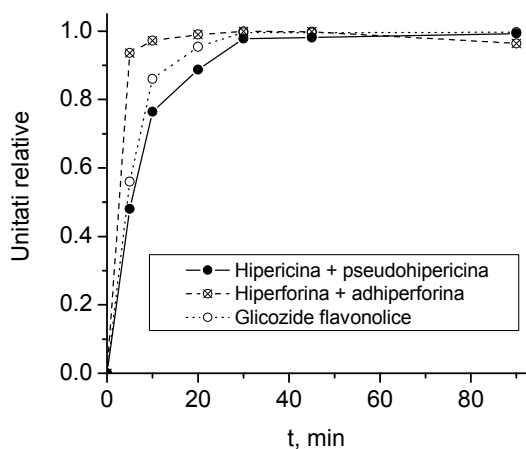


Fig. 4. Curbele cinetice ale extracției unor componente principale la prepararea probelor de materie primă.

extragerea componentilor lipofili, cum ar fi hiperforina. Încălzirea extragentului până la 60°C intensifică procesul de extracție și, de asemenea, micșorează solubilitatea oxigenului. Acești factori influențează favorabil stabilitatea compușilor activi. La temperaturi mai ridicate de 60°C crește pierderea extragentului din cauza evaporării.

Din curbele cinetice (fig. 4) se vede, că timpul optim pentru o singură extracție este în jur de 40-45 min. Majorarea timpului de extracție duce la micșorarea concentrației hiperforinei. Dependența randamentului hipericinei și hiperforinei de numărul de extracții este prezentată în tabelul 1. Cu evidență variantele optime și timpul total necesar sunt 3 extracții câte 30 min sau 2 extracții câte 45 min. Ultima variantă necesită mai puține operațiuni.

Tabelul 1

Randamentul compușilor principali la extracția repetată a 0,5 g herbă de sunătoare cu porțiuni a câte 50 ml extragent la temperatura 60°C

Nr. de extracție	Randamentul cumulativ, %					
	Hipericina		Hiperforina		Glicozide flavonolice	
	t=30 min	t=45 min	t=30 min	t=45 min	t=30 min	t=45 min
1	76,0	88,7	88,0	91,0	87,3	90,4
2	91,8	96,9	96,7	98,7	96,1	98,2
3	97,0	98,0	98,8	99,6	98,6	99,5

Pe baza datelor, expuse mai sus, se propune următoarea tehnică de preparare a probelor de herba de sunătoare pentru analiza cromatografică: Circa 0,5 g (masa exactă) materie primă mărunțită, care trece prin sita cu diametru orificiilor 1 mm, se introduce în balon cu capacitatea 100 ml, se adaugă 50 ml soluție acid citric 0,2% în alcool etilic 80%, se încălzește pe baie de apă la temperatura $60 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 45 min, amestecând periodic. Conținutul balonului se filtrează prin tampon de vată în 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. Extractul sumar se răcește până la temperatura 20°C și se completează până la volumul de 100 ml cu extragent pur. Alicota se centrifughează 5 min la 3000-4000 g. Câte 10 μl probă și soluției standard se injectează în sistemul cromatografic. Toate operațiunile de preparare a probelor trebuie efectuate în încăperi întunecate pentru a preveni descompunerea hiperforinei sub influența luminii.

Produsele extractive din herba de sunătoare pentru analiza cromatografică pot fi preparate în modul următor: Tincturile și extractele lichide se diluează de 20-100 ori (în dependența de concentrațiile substanțelor analizate) cu soluție acid citric 0,1-0,2% în alcool etilic 70-80%, sau cu fază mobilă cu concentrația acetonitrilului 40-50%. Extractele uscate și formele farmaceutice solide se prepară prin dizolvarea probei de pulbere în unul din acești solvenți utilizând baia cu ultrasunet. Masa probei și diluarea necesară se calculează, reieșind din diapazonul optim al concentrațiilor rezultante ale principalelor substanțe active: 10-50 mg/l pentru hipericină și 40-200 mg/l pentru hiperforină.

Cu ajutorul metodei elaborate am studiat repartizarea substanțelor potențial active în diferite părți ale plantei înflorite *H. perforatum* L.: flori, frunze și tulpini. Din rezultate (tabelul 2) se vede, că cantitatea majoră a acestor substanțe se află în flori, mai puține – în frunze, iar tulpinile practic nu conțin compuși activi. Rezultatele obținute denotă raționalitatea colectării părții de sus a plantei înflorite, precum și necesitatea limitării conținutului de tulpini în materia primă.

Conținutul compușilor principali în diferite organe ale herbei de sunătoare

Organul plantei	Conținutul, mg/g		
	Hipericina + pseudohipericina ¹	Hiperforina + adhiperforina ²	Glicozide flavonolice ³
Flori	4,63	48,0	30,8
Frunze	1,82	4,23	31,4
Tulpini	0,08	0,88	5,1

Nota: ¹ în recalcul la hipericină; ² în recalcul la hiperforină; ³ în recalcul la hiperozidă.

Concluzii

S-a elaborat metoda HPLC UV-Vis care s-a dovedit a fi rapidă și eficientă pentru dozarea diferitor grupe de substanțe farmacologic active în herba de sunătoare și a produselor extractive. Metoda permite dozarea hipericinei, pseudohipericinei, hiperforinei, biapigeninei, glicozidelor flavonolici, acizilor oxicinamici, catehinilor și proantocianidinelor oligomerice într-o singură probă.

Optimizarea procedurii de preparare a probelor de materie primă, asigură stabilitatea substanțelor active în timpul analizei.

S-a confirmat repartizarea neuniformă a substanțelor active între diferite organe ale plantei și necesitatea limitării conținutului de tulpini în materia primă.

Metoda elaborată poate fi utilă pentru standardizarea materiei prime herba de sunătoare, precum și ale preparatelor farmaceutice, ce conțin produse extractive din specia dată.

Bibliografie

1. European Pharmacopoeia 6.0, vol. 2, 2008, p. 2958-2959.
2. Ichim Daniela Luminița, Nicuța Daniela, Căpraru Gabriela. HYPERICUM PERFORATUM L. in modern phytotherapy. Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, tom VIII, 2007, p. 253-257.
3. WHO Monographs on selected medicinal plants. Hyperici Herba. Vol. 2, 2004, p. 149-171.
4. Карамышева Е.И., Лобанова Е.Г., Горьков В.А. Антидепрессивная активность препаратов зверобоя: Аналитический обзор. Фарматека, № 6 (42), 2000.
5. Правдивцева О.Е., Куркин В.А. Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного. Химия растительного сырья. 2008, №1, стр. 81-86.