

STUDIUL METODELOR DE DOZARE A DERIVAŢILOR ANTRACHINONICI DIN ROIBĂ (RUBIA TINCTORUM L.)

I. Formanek

Determinarea conţinutului în principii active din droguri sau din preparate farmaceutice are ca scop final stabilirea valorii terapeutice a produselor respective. În general, eficacitatea terapeutică este proporţională cu cantitatea de principii active prezente.

În cazul drogurilor şi a preparatelor care conţin antraglicozide situaţia este mai complicată, fiindcă acţiunea farmacologică depinde în mare măsură de forma în care sînt prezente principiile active. La antraglicozidele cu acţiune purgativă, formele glicozidice sînt în general mult mai active decît formele libere, antranolii au un efect purgativ mai pronunţat decît antrachinonele (11, 12, 15, 23). În ceea ce priveşte preparatele de roibă folosite în afecţiuni renale, unii autori au tras concluzia că, acţiunea farmacodinamică a derivaţilor antracenicici cu efect diuretic şi calculolitic se datoreşte exclusiv glicozidelor (5, 6, 18, 28). După alţi autori însă, acest efect depinde şi de prezenţa agliconilor (32, 37).

Din această cauză metodele de dozare mai vechi, prin care se determină numai conţinutul total în derivaţi antracenicici, nu prezintă valoare practică, fiindcă ele nu oglindesc real eficacitatea terapeutică a produselor respective. Avînd în vedere aceste consideraţii generale, am încercat să găsim procedeul cel mai adecvat pentru determinarea cantitativă a principiilor active din roibă. Începînd cu ultimele decenii ale secolului trecut şi pînă în prezent, s-au elaborat numeroase metode de dozare a derivaţilor antracenicici. Metodele se pot grupa în procedee gravimetrice, titrimetrice, cromatografice, polarografice, fluorimetrice, colorimetrice, fotocolorimetrice şi spectrofotometrice.

După unii autori (1, 9), prin metodele de dozare gravimetrice (49, 10, 17, 24, 52, 51) se obţin în general valori mai mari decît cu alte metode. Cu toate că în ultimul timp se poate observa o tendinţă de a înlocui procedeele gravimetrice cu metode mai expeditivă, unele metode gravimetrice pot fi găsite şi între metodele mai moderne (14, 8).

Metodele titrimetrice (50, 42, 36) sînt mult mai expeditivă decît procedeele gravimetrice, însă rezultatele obţinute, în general, nu sînt destul de precise şi din această cauză în ultimul timp sînt rar întrebuiţate.

Separarea cromatografică pe coloană se întrebuiţează mai rar la determinările cantitative (13, 47, 48, 16), fiind folosită mai ales pentru izolarea în stare pură a derivaţilor antracenicici sau pentru purificare în diferite faze ale unor procedee de dozare.

Cromatografia pe hîrtie este o metodă des folosită pentru identificarea principiilor active, dar totodată, s-au elaborat mai multe procedee de dozare a principiilor active pe această cale (4, 20, 30, 31).

Metodele de electroforeză pe hîrtie, pe lângă separarea antrachinonelor, se pot folosi la dozarea derivaţilor antracenicici (43, 25, 35, 46). În literatura de specialitate găsim uneori descrise şi metode polarografice pentru determinarea cantitativă a unor derivaţi antracenicici (45, 44, 21).

Metodele colorimetrice, fotometrice şi spectrofotometrice sînt cele mai însemnate şi larg răspîndite. Metodele se bazează în majoritatea cazurilor pe reacţia

Bornträger (2, 3, 19, 9, 47, 48, 33, 34, 40, 29, 12, 27, 32, 1). Aceste metode prezintă avantaje față de celelalte procedee și anume: reacția de culoare este foarte sensibilă, procedeele sînt destul de expeditiv și prevăd atît determinarea cantitativă a derivaților antraceni liberi, cît și a antraglicozidelor (forme combinate), stabilind și raportul între formele oxidate (antrachinone) și formele reduse (antranoli). Procedeele se deosebesc unele de altele mai ales prin întrebuintarea diferiților acizi la hidroliză, prin folosirea altor solvenți la extracție și prin condițiile în care se realizează oxidarea formelor reduse. Singurul dezavantaj al acestor procedee este că nu sînt suficienți de specifice. Dacă solventul întrebuintat nu este destul de specific sau dacă soluția extractivă nu se purifică, se obțin rezultate mai mari decît cele reale.

Între metodele mai moderne se găsesc și procedee fotocolorimetrice și spectrofotometrice care nu se bazează pe reacția Bornträger (39, 22, 26, 38, 41).

Partea experimentală

Compararea rezultatelor obținute prin diferite metode de dozare, în vederea alegerii procedeeului cel mai corespunzător.

În vederea găsirii metodei celei mai corespunzătoare pentru studiul conținutului în principii active din roibă, — luînd în considerare că această plantă conține numai derivați antrachinonici — am ales patru metode fotocolorimetrice mai nou publicate și am dozat derivații antrachinonici din aceleași probe de roibă.

Luînd în considerare observațiile lui Paris (29), Cucu (9) și Adám (1) — care au arătat că la metodele unde sînt prevăzute operații de purificare se ivesc pierderi în principii active, ele fiind totodată mai complicate — am ales metode în care nu figurează purificări.

Din interpretarea rezultatelor metodelor de dozare se pot constata diferențe mari între valorile obținute la derivații antrachinonici (conținutul „total“). Cauza principală pare a fi hidroliza incompletă.

Hidroliza este o fază importantă a metodei, pentru că numai agliconii se pot extrage cu solvenți organici și numai ei reacționează cu alcalii. Hidroliza este corespunzătoare atunci cînd cantitatea totală a glicozidelor se scindează în agliconi și glucide, fără modificarea sau distrugerea agliconilor. De exemplu Schratz și Tombergs (40), verificînd metoda Auterhoff (2), au stabilit că 7,5 ml acid acetic glacial sînt suficienți, numai atunci, cînd se dozează o cantitate de drog mai mică de 60 mg. Kraus (19), a observat că prin adăugarea unei cantități de 1 ml acid clorhidric 25 %, hidroliza este mai completă, obținîndu-se valori mai mari. Auterhoff (3) — referitor la dozarea principiilor active din Folium Sennae — prevede adăugarea acidului clorhidric. Hidroliza se poate realiza și în mediu alcalin (49), în ultimul timp însă se întrebuintează aproape exclusiv diferiți acizi, mai ales acidul sulfuric (29) și acidul clorhidric (38, 41).

Pe baza acestor observații, am studiat hidroliza glicozidelor antrachinonice timp de 15 minute în diferite medii acide, variînd și cantitatea acizilor. Rezultatele sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

Din studierea datelor prezentate în tabelul nr. 1, reiese că valoarea cea mai mică s-a obținut prin hidroliza cu 7,5 ml acid acetic glacial (2). Rezultatul hidrolizei nu s-a modificat semnificativ nici cu mărirea cantității acidului acetic glacial (1). Hidroliza incompletă se poate dovedi prin cromatografiere pe hîrtie. În acest caz, în lichidul extractiv se găsesc substanțe (agliconi) în număr redus, față de extractul obținut în urma hidrolizei cu acid acetic glacial și acid clorhidric (19, 32) sau chiar cu acid clorhidric. Totodată reiese că, hidroliza efectuată cu 1 ml acid clorhidric 34 % dă rezultate mai slabe, care

Tabelul nr. 1

Hidroliza glicozidelor antrachinonice din roibă (*Rubia tinctorum* L.)
în diferite medii acide

Mediul de hidroliză	Antrachinone combinate și libere „Total”	
	%	Media
Acid acetic glacial (7,5 ml)	1,92 2,06 1,88 2,01	1,96
Acid acetic glacial (10 ml)	1,96 1,97 2,26 2,15	2,08
Acid acetic glacial și acid clorhidric 34 % (7,5+1,0 ml)	3,90 3,78 3,79 3,65	3,78
Acid clorhidric 34 % (1,0 ml)	2,79 2,88 2,90 2,86	2,85
Acid clorhidric 34 % (3 ml)	3,66 3,22 3,68 3,70	3,56

se pot corecta prin mărirea cantității acidului clorhidric 34 % (3 ml). Acest procedeu însă atrage după sine problema îndepărtării acidității excesive a soluției eterice, care provoacă erori în dozare.

Din cele relatate pînă acum se pare că, hidroliza cu acid acetic glacial și acid clorhidric (19, 32) este cea mai corespunzătoare la dozarea principiilor active din roibă.

Adám (1) în studiul selectivității solvenților organici a întrebuițat eter, clorform, benzen și eter de petrol pentru a stabili care este solventul cel mai corespunzător la dozarea principiilor active din *Rumex alpinus* L. S-a putut constata că, rezultatele obținute cu benzen și cu eter sînt aproape identice. Selectivitatea eterului în mediu anhidru, practic, nu este mai mică decît a benzenului. Eterul prezintă avantajul că nu formează emulsii la epuizare cu soluția alcalină, pe cînd în cazul benzenului este greu de a evita emulsionarea. Cloroformul pare a fi mai selectiv, dar din cauza că în pilnia de separare cloroformul formează stratul inferior, sînt necesare mai multe pilnii de separare, fapt care îngreunează extracția și duce la pierderi.

Pe baza celor relatate am ales metode de dozare care folosesc eter pentru extracție. Metodele examinate sînt cele elaborate de *Raszeja* (32), *Nikonov* (27), *Auterhoff* (2) și *Adám* (1). Primele două metode s-au elaborat pentru dozarea principiilor active din roibă, de aceea le-am considerat ca procedee de bază, cu care am comparat celelalte metode. În tabelul nr. 2 sînt trecute rezultatele medii a patru determinări prin 4 metode fotocolorimetrice.

Tabelul nr. 2

Rezultate obținute la dozarea derivaților antrachinonici în roibă (*Rubia tinctorum* L.) prin diferite metode (proba nr. 1)

Derivatul antrachinonic	Conținutul în derivați antrachinonici determinat prin diferite metode							
	Auterhoff		Ădám		Raszeja		Nikonov	
	%	media	%	media	%	media	%	media
Antrachinone combinate + libere („Total“)	1,92 2,06 1,88 2,01	1,96	1,96 1,97 2,26 2,15	2,08	3,90 3,78 3,79 3,65	3,78	2,59 2,55 2,65 2,57	2,59
Antrachinone libere	0,18 0,22 0,26 0,26	0,23	0,64 0,57 0,51 0,56	0,57	0,18 0,22 0,26 0,26	0,23	—	—

↳ Din examinarea datelor prezentate în tabelul nr. 2 se constată că, valoarea maximă de derivați antrachinonici („total“) a fost cea obținută prin metoda Raszeja (32). Acest fapt se poate atribui unei hidrolize mai complete cu ajutorul acidului acetic galical+acid clorhidric (7,5+1), preconizat prima dată de Kraus (19). Cantitatea derivaților antrachinonici este mult mai mare față de cantitățile obținute cu celelalte metode, însă corespunde valorilor obținute de Madaus și Schindler (24, 7, 37). Curba etalon se construiește cu ajutorul unei substanțe mai apropiate din punct de vedere fitochimic și mai accesibilă (alizarină S.), care ia parte în formarea glicozidei acidului ruberitric.

Din rezultatul analizei reiese că, conținutul în antrachinone libere determinat prin metoda Raszeja (32) este mai mic față de valorile obținute prin metoda Ădám (1). Aceasta se poate explica prin observațiile experimentale ale lui Ădám (1), privind influența gradului de mărunțire a drogului asupra rezultatelor dozărilor. În concluzie, reiese că, exactitatea dozărilor crește cu mărimea gradului de pulverizare. Din drogul mai puțin mărunțit (sita nr. IV) (53), se extrag numai 55—60 % din cantitatea antraderivaților liberi. Rezultatele obținute la drogurile mai fin pulverizate (sita nr. VI—VIII.) (53) sînt practic identice.

Valorile obținute prin metodele Auterhoff (2) și Ădám (1) sînt mult mai mici. Cauza principală este probabil hidroliza incompletă a glicozidelor antrachinonice. Kraus (19), verificînd metoda Auterhoff (2) a observat că prin adăugarea unei cantități mici de acid clorhidric 25 %, hidroliza este mai completă, obținîndu-se valori mai mari. Această metodă modificată a fost aplicată de Raszeja (32), după cum am mai arătat. Dozarea antrachinonelor libere pe baza metodei Ădám (1) a dat valori mai mici și pare a fi cea mai expeditivă.

Valorile obținute prin metoda Nikonov (27), au rămas inferioare față de rezultatele metodei Raszeja (32). Dezavantajele metodei constau în faptul că necesită o cantitate mare de drog, respectiv de extract relativ mare, operațiile de diluare și extracție sînt un timp îndelungat, metoda este aplicabilă numai pentru dozarea derivaților antrachinonici „totali“, sistemul construirii curbei etalon din substanța standard obținute din rădăcinile de roibă dă valori diferite, sînt necesare mai multe probe de separare și prin aceste transvazări sînt inevitabile unele pierderi.

Între cele patru metode fotocolorimetrice studiate, metoda Ra-

szeja (32) corespunde în cea mai mare măsură pentru dozarea derivaților antraglicozidici, iar pentru dozarea antrachinonelor libere metoda *Ádám* (1) s-a dovedit a fi cea mai corespunzătoare.

Descrierea metodei aplicate la dozarea derivaților antrachinonici din roibă (Rubia tinctorum L.):

a) *Determinarea cantitativă a derivaților antrachinonici totali:*

50 mg drog pulverizat (sita nr. VI) (53), exact cîntărit se fierbe cu un amestec format din 7,5 ml acid acetic glacial și 1 ml acid clorhidric 34 %, timp de 15 minute pe baie de nisip electrică, într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent cu reflux. După răcirea balonului se adaugă 30 ml eter prin refrigerent și se fierbe din nou 15 minute. După răcire, amestecul se filtrează printr-un mic tampon de vată într-o pilnie de separare de 250 ml. Reziduul din balon se fierbe din nou cu 30 ml eter timp de 10 minute și se filtrează prin același tampon de vată în pilnia de separare. Soluțiile eterice reunite se spală de două ori cu câte 20 ml apă pentru îndepărtarea acidității în exces.

Soluția eterică se agită cu precauție, întâi cu un amestec de 15 ml soluție de NaOH 30 % și 20 ml soluție de Na OH 5 %, care conține 2 % amoniac. Stratul apos de culoare roșie-violetă se separă, iar stratul eteric se extrage din nou cu 20—25 ml soluție de NaOH 5 %, care conține 2 % amoniac, pînă cînd stratul apos se separă incolor. Soluțiile alcaline se reunesc într-un balon cotat de 100 ml și se completează la semn cu soluția de NaOH 5 %, care conține 2 % amoniac. După 15 minute se determină extincția soluției la fotocolorimetrul Pulfrich, în cuve de 5 mm lățime, întrebuițind filtrul S₅₇ (A).

Soluția martor: un amestec format din 7,5 ml acid acetic glacial, 1 ml acid clorhidric 34 %, 15 ml soluție de NaOH 30 % și soluție de NaOH 5 %, care conține 2 % amoniac, completat pînă la 100 ml.

b) *Determinarea cantitativă a antrachinonelor libere:*

Se cîntăresc exact 100—200 mg drog pulverizat (sita nr. VI) (53), și se extrag prin fierbere cu 50 ml eter pe baie de nisip electrică într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent cu reflux. Soluția eterică se filtrează printr-un mic tampon de vată într-o pilnie de separare. Reziduul din balon se fierbe din nou cu 50 ml eter timp de 15—20 minute. Soluția eterică se filtrează prin același tampon de vată în pilnie de separare. Extractul eteric se extrage cu soluție de NaOH 5 % care conține 2 % amoniac. Extractia se repetă și soluțiile alcaline reunite se completează la 100 ml cu soluția de hidroxid de sodiu amoniacală. După 15 minute se fotometrează (B).

Soluția martor: soluție de NaOH 5 %, care conține 2 % amoniac.

c) *Determinarea cantitativă a antrachinonelor combinate (C)*

$$C = A - B$$

Construirea curbei etalon: se dizolvă 10 mg alizarină S (1.2-dioxiantrachinon-3-sulfonat de sodiu) într-un amestec format din 7,5 ml acid acetic glacial, 1 ml acid clorhidric 34 %, 15 ml soluție de NaOH 30 % și 70 ml soluție de NaOH 5 %, care conține 2 % amoniac. Această soluție se completează cu amestecul de mai sus, se prepară soluții avînd concentrația de 1 mg%, 2 mg%, 3 mg% și se determină extincția lor în cuve de 5 mm lățime, la filtrul S₅₇. Valorile obținute se trec într-un sistem de coordonate și se unesc. Linia dreaptă obținută arată că în acest interval este valabilă legea Lambert-Beer.

Concluzii

Dintre metodele fotocolorimetrice studiate, metoda *Raszeja* (32) corespunde în cea mai mare măsură pentru dozarea derivaților antraglicozidici, iar pentru dozarea antrachinonelor libere metoda *Ádám* (1) s-a dovedit a fi cea

mai corespunzătoare. Exactitatea dozărilor crește cu mărirea gradului de pulverizare și cu timpul necesar de extragere.

În studiul selectivității solventilor organici s-a putut constata că, rezultatele obținute cu benzen și cu eter sînt aproape identice. Eterul prezintă avantajul că nu formează emulsii la epuizare cu soluția alcalină.

Sosit la redacție: 22 ianuarie 1970.

Bibliografie

1. ADAM L.: Contribuții la studiul farmacognostic al plantei *Rumex alpinus* L. Teză de doctorat I.M.F. Tirgu Mureș, 1963; 2. AUTERHOFF H.: Dtsch. Apoth. Ztg. (1951), 91, 415; 3. AUTERHOFF H.: *Arzneim. Forsch.* (1951), 1, 412; 4. AUTERHOFF H., MAISS N.: *Pharm. Ztg.* (1959), 104, 117; 5. BAUER A.: *Z. f. Urol.* (1920), 14, 175; (1923), 17, 274; (1924), 18, 452; cit. RYBACKI E. (43); 6. BAUER A.: *Münc. Med. Wsch.* (1924), 71, 206; cit. RYBACKI (43); 7. BERGER F.: *Handbuch der Drogenkunde Band V. Radices*, Wien, 1960; 8. CIUMBURIDZE B. J.: *Aptecinoe delo* (1956), 1, 40; 9. CUCU V., TARPO E.: *Farmacia* (1959), 7, 559; 10. DAELS F.: *Kleines Handbuch der Pflanzanalyse III/1019*; cit. Berger F. (7); 11. FAIRNBAIN J. W.: *J. Pharm. Pharmacol.* (1949), 1, 683; 12. FAIRNBAIN J. W., LOU T. C.: *J. Pharm. Pharmacol.* (1951), 3, 93; 13. FISCHER R., IWANOFF W.: *Scientia Pharm.* (1942), 8; 14. FISCHER R., BUCHEGGER E.: *Pharm. Z.-halle* (1950) 89, 261; 15. ISSEKUTZ B.: *Gyógyszertan, III. Egészségügyi Kiadó, Budapest* 1954; 16. KARTING TH.: *Pharm. Z.-halle* (1959), 98, 495; 17. KAZANTEVA E. H.: *Med. Promișl. S.S.S.R.* (1949), 6, 23; 18. KELLER J.: *Pharmazie* (1951), 6, 675; 19. KRAUS L. J.: *Ceskoslov. Farmacia* (1954), 3, 171; 20. KRAUS L. J.: *Pharmazie* (1957), 12, 393; 21. KRJUKOVA T. A., SINJAKOV S. J., AREFJEVA T. V.: *Polarographische Analyse*. VEB. Deutscher-Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, 1964; 22. LIPINSKI B.: *Acta Poloniae Pharm.* (1959) 16, 467; 23. LIPTÁK P.: *Gyógyszerismeret, Magyar Gyógysz. T. T. E.* 1940, 40; 24. MADAUS G., SCHINDLER H.: *Arch. Pharm.* (1938) 276, cit. Berger (7); 25. NANO G. M.: *Pharm Acta Helv.* (1960) 35, 451; 26. NIHOUL-GHENNE L.: *J. Pharm. Belgique* (1960), 42, 49; ref.: *Pharm Z.-halle* (1961), 100, 474; 27. NIKONOV G. K., SAPUNOVA L. A.: *Mediținskaia promișl.* (1960), 10, 38; 28. NIKONOV G. K.: *Aptecinoe delo* (1962), 2, 31; 29. PARIS R., DAVID-CUNY M. F.: *Ann. pharm. Franc.* (1955), 13, 488; 30. PARIS DURAND M.: *Ann. pharm. Franc.* (1956), 14, 755; 31. PARIS R., DURAND M.: *Ann. pharm. Franc.* (1959), 17, 593; 32. RASZEJA W.: *Biuletin Instytutu Roslin Leczniczych* (1964), 1, 6; 33. ROMANOVA A. S., BANKOVSKII A. J.: *Med. Promișl. S.S.S.R.* (1960), 14, 27, 34. ROMANOVA A. S., BANKOVSKII A. J.: *Med. Promișl.* (1961), 15, 16; 35. ROUX A.: *Ann. pharm. Franc.* (1956) 14, 212; 36. RUGGIERI R.: *Boll. chim. Farm.* (1957), 96, 491; ref.: *Pharm. Z.-halle* (1958), 97, 194; 37. SCHINDLER H.: *Inhaltstoffe und Prüfungsmethoden homeopatisch verwendeter Heilpflanzen*, Ed. Cantor, Aulendorf u. Württ., 1955; 38. SCHMID W.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* (1951), 91, 452; 39. SCHNEIDER W.: *Arch. Pharmaz.* (1952), 285, 305; 40. SCHRATZ E., TOMBERGS H.: *Arzneim. Forsch.* (1954), 4, 678; 41. SCHULTZ O. E.: *I. Pharmazie* (1950), 5, 605; *II. Pharmazie* (1950), 5, 541; 42. SCHWIMMER E.: *Magyar Gyógysz. T.T.E.* 1947, 21, 36; 43. SIESTO A. I., BARTOLI A.: *II Farmaco* (1957), 12, 234; cit. Kraus L. J. (23); 44. STÁRKA L., VYSTRCIL A.: *Chem. listi* (1957), 51, 1449; 45. STONE K. G., FURMAN N. N.: *J. Amer. Chem. Soc.* (1948), 3062; 46. STERESCU M., PELLONI V.: *Pharm. Z.-halle* (1960), 99, 121; 47. TARPO E., CUCU V.: *Farmacia* (1960), 8, 371; 48. TARPO E., GHEORGHIU M.: *Farmacia* (1963) 11, 231; 49. TSCHIRCH A., EDNER I.: *Arch. Pharmaz.* (1907), 245, 139; cit.: Tukats S. (51); 50. TSCHIRCH A., SCHMITZ P.: *Pharm. Acta Helv.* (1928), 5, 88; Ref.: *Magy. Gyógysz. T.T.E.*, 1928, 4, 344; 51. TUKATS S.: *Magy. Gyógysz. T.T.E.*, 1929, 5, 172; 52. ZBÓRAY B.: *Magy. Gyógysz. T.T.E.*, 1926, 2, 247; 53. *Farmacopea Română VIII. Editura Medicală București*, 1965.