

ODREĐIVANJE *Chelidonium* - ALKALOIDA U FITOPREPARATU PRIMENOM VIS-SPEKTROFOTOMETRIJE

Milan Nikolić

Farmaceutsko- hemijska industrija "Zdravlje", AD Leskovac

Determination of Chelidonium-alkaloids in phytopreparations using vis-spectrophotometry; Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia. Sokobanja, 2000: 125-130.

Using VIS-spectrophotometry method, based on use of chromotropic acid as a coloured agent, contents of total alkaloids in phytopreparation were examined, containing alcoholic extract of celandine herb (drug/extract 0,5-1,5:1). The method worked out is convenient for this determination, because it provides high reproductiveness of results ($K_v = 2,21\%$). Analysis of the phytopreparation samples showed that they contained 0,38% of total alkaloids.

UVOD

Rusa (*Chelidonium majus* L.) je od davnina poznata po lekovitim svojstvima, čija su novija istraživanja pokazala da ona u najvećoj meri potiču od alkaloida. Potvrđeno je da ovi aktivni sastojci biljke imaju izraženo hepatoprotekorno (1), antitumorsko (2-7), antiinflamatorno (8), antimikrobno (4,7-22), antitumorno (15-16, 20, 23-28), analgetičko (29-30) i antivirusno delovanje (9,31).

Zbog lekovitog delovanja alkaloida njihovo određivanje ima poseban značaj za ocenu kvaliteta droge, ekstrakata i preparata u čijem se sastavu nalaze.

Cilj ovog rada bio je da se izvrši provera pouzdanosti metoda VIS-spektrofotometrije za određivanje ukupnih alkaloida u fitopreparatu u čijem se sastavu, pored ekstrakta ruse kao njegovog aktivnog sastojka, nalaze i druge komponente, koje se kao pomoćne koriste kod izrade preparata.

MATERIJAL I METOD RADA

U svim ispitivanjima su korišćene kapi fitopreparata (Chol 4000 Tropfen, Lichenstein Pharmazeutica) (trgovački uzorak).

Za kolorimetrijska određivanja je kao bojeni reagens korišćena dinatrijumova so hromotropne kiseline (E.Merck, Darmstadt, Germany), a kao referentna supstanca korišćen je helidonin (Extrasynthese, Genay France).

Ostale upotrebljavane hemikalije bile su stepena čistoće p.a. ukoliko drugačije nije naglašeno.

Spektrofotometrijska merenja vršena su na aparatu Lambda 15 i 16 UV/VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer).

EKSTRAKCIJA UKUPNIH ALKALOIDA I NJHOVO ODREĐIVANJE

U odgovarajuću posudu odmeri se 3,0 g fitopreparata, doda rastvor sirćetne kiseline (100 cm^3) koncentracije 12% (v/v) i alkaloidi ekstrahuju, uz mućkanje (30 min), na temperaturi $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Zatim se kiseli ekstrakt ($30,0 \text{ cm}^3$) prenese u erlenmajer od 250 cm^3 sa brušenim zatvaračem, podesi pH na 9,0 amonijumhidroksidom konc. 25%, doda hloroform (100 cm^3) i sadržaj erlenmajera mućka 30 minuta. Nakon razdvajanja faza, hloroformski ekstrakt se osuši bezvodnim natrijumsulfatom i ekstrakt (50 cm^3) upari do suva, pod sniženim pritiskom na temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Suvi ostatak se rastvara u 95% etanolu ($10,0 \text{ cm}^3$), blagim zagrevanjem, rastvor filtrira, upari do suva, i ostatak rastvara u sumpornoj kiselini ($25,0 \text{ cm}^3$) koncentracije 9,8%. Filtrat ($5,0 \text{ cm}^3$) se prenese u odmerni sud od $25,0 \text{ cm}^3$, doda hromotropna kiselina koncentracije 1% m/v ($5,0 \text{ cm}^3$) i sud dopuni do oznake koncentrovanom sumpomom kiselinom (ispitivani rastvor).

Na isti način vrši se priprema uporednog rastvora, koja se sastoji u sledećem: u odmerni sud od 25 cm^3 prenese se $5,0 \text{ cm}^3$ sumporne kiseline koncentracije 9,8%, doda hromotropna kiselina koncentracije 1% m/v ($5,0 \text{ cm}^3$) i sud dopuni do oznake koncentrovanom sumpornom kiselinom.

Ispitivani i uporedni rastvori zagrevaju se na ključalom vodenom kupatilu 10 minuta, brzo ohlade do sobne temperature i dopune koncentrovanom sumpornom kiselinom do oznake. Ovako pripremljenim rastvorima mere se apsorbancije na talasnoj dužini 573 nm u kiveti od 10 mm na pogodnom spektrofotometru. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija iz standardnog dijagrama se očitaju koncentracije helidonina, a računskim putem odredi sadržaj ukupnih alkaloida (sračunati kao helidonin) u ispitivanim uzorcima fitopreparata.

Izrada standardnog dijagrama

Pripremi se rastvor helidonina koncentracije 1 mg/cm^3 u sumpornoj kiselini koncentracije 9,8 %. Od ovog rastvora se, preciznom mikropipetom, uzima u odmerne sudove od 10 cm^3 : 0,012, 0,024, 0,036, 0,048, 0,060, 0,072, 0,084 i $0,096 \text{ cm}^3$, sumpornom kiselinom koncentracije 9,8% podesi se zapremina na $2,0 \text{ cm}^3$, doda hromotropna kiselina koncentracije 1% m/v ($2,0 \text{ cm}^3$) i sudovi dopune do crte koncentrovanom sumpornom kiselinom.

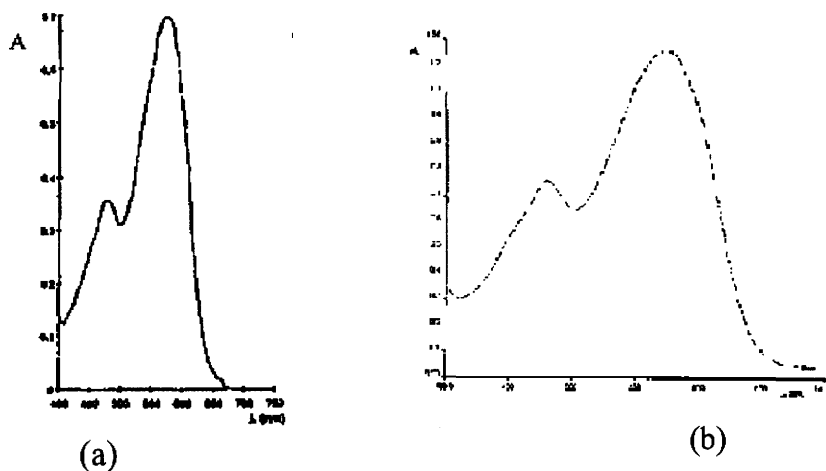
Pripremljenim rastvorima mere se apsorbancije na talasnoj dužini 573 nm u kiveti od 10 mm korišćenjem uporednog rastvora. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija konstruiše se standardni dijagram.

REZULTATI I DISKUSIJA

Alkaloidi ruse, u prisustvu sumporne kiseline, sa hromotropnom kiselinom kao reagensom obrazuju obojene rastvore, koji imaju karakterističnu apsorpciju u vidljivoj oblasti spektra.

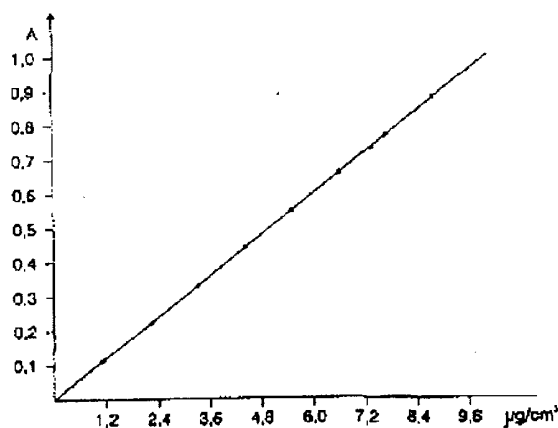
Ispitivanja apsorpcije rastvora helidonina na različitim talasnim dužinama su pokazala da je maksimum na talasnoj dužini 573 nm. Sva merenja apsorbancija su vršena na ovoj talasnoj dužini.

Iz apsorpcionih spektara u vidljivoj oblasti, sl. 1, helidonina (λ_{max} : 480 nm i 573 nm) (a) i ukupnih alkaloida iz fitopreparata (λ_{max} : 480 nm i 573 nm) (b), vidi se da su oni u potpunoj saglasnosti. Iz ovih razloga je za određivanje ukupnih alkaloida u fitopreparatu odabrana talasna dužina od 573 nm kao odgovarajuća.



Slika 1. Spektri helidonina (a) i ukupnih alkaloida iz fitopreparata (b)

Variranjem sadržaja helidonina nadeno je da se zavisnost apsorbancija od koncentracije helidonina pokorava Lambert-Berovom zakonu u ispitivanom intervalu koncentracija, slika 2.



Slika 2. Dijagram zavisnosti apsorbancija (A) od različitih koncentracija helidonina

Proverena je reproduktivnost metoda VIS-spektrofotometrije određivanjem ukupnih alkaloida, u istom uzorku fitopreparata, više puta (n=5), striktno primenjujući opisani postupak. Rezultati ovih određivanja dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati određivanja ukupnih alkaloida u fitopreparatu primenom VIS-spektrofotometrije

Broj probe	Sadržaj ukupnih alkaloida (%)	Statistički parametri
1	0,38	$\bar{x} = 0,378$ $S = 8,367 \cdot 10^{-3}$ $K_v = 2,21\%$
2	0,37	
3	0,37	
4	0,39	
5	0,38	

Iz rezultata prikazanih u tabeli 1, vidi se daje primenjeni VIS-spektrofotometrijski metod pogodan za određivanje ukupnih alkaloida u fitopreparatu, jer obezbeđuje visok stepen reproduktivnosti rezultata ($K_v = 2,21\%$).

ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih ispitivanja sadržaja ukupnih alkaloida u fitopreparatu, u čiji sastav ulazi ekstrakt herbe ruse, može se zaključiti da je metod VIS-spektrofotometrije pogodan kada se koristi hromotropna kiselina kao bojeni reagens.

Primenjeni metod određivanja ukupnih alkaloida odlikuje se visokom reproduktivnošću rezultata ($K_v = 2,21 \%$).

Analizom uzoraka fitopreparata nađeno je da oni sadrže 0,38% (m/m) ukupnih alkaloida, što iznosi 95% ovih alkaloida od njihovog deklarisanog sadržaja u preparatu (0,4% m/m).

LITERATURA

1. Cerny, E., Gulda, O., Parma, R., *Scr. Med.*, 43, 77 (1970)
2. Hejtmankova, N., Walterova, D., Preimnger, V., Simanek, V., *Fitoterapia*, 55, 291 (1984)
3. Frencl, I., Koscinski, R., *Dissertat. Pharm.*, 12,7 (1960)
4. Onda, M., Takiguchi, K., Hirakura, M., Fukushima, H., Akagawa, M., Naoi, F., *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 39, 168 (1965)
5. Adgina, V. V., *Mater. Vses. Kauf. Issled. Lek. Rast. Perspekt. Ikh. Ispol'z proizvod, Lek. Prep.* 221 (1970)
6. Vichkanova, S. A., Adgina, V. V., *Antibiotiki*, 16, 609 (1971)
7. Vichkanova, S. A., Rubinchik, M. A., Adgina V. V., Fedorchenko, T. S., *Farmakol. Toksikol.* 32, 325 (1969)
8. Lenfeld, J., Kroutil, M., Marsalek, E., Slavik, J., Preininger, V., Simanek, V., *Planta Med.*, 43, 161 (1981)
9. Vichkanova, S. A., Adgina, V. V., Isozilma, S. B., Shipulin L. D., Lyvtikof, L. I., *Khim. Farm. Zh.*, 12, 101 (1978)
10. Adgina, V. V., Vichkanova, S. A., *Fitontsidy*, 159 (1975)
11. Mitscher, L. A., Lev. R. P. Bathala, M. S, Wu, W. N, Beal. J. L. White R, *J. Nat. Prod.*, 35, 157 (1972)
12. Odebiyi, O. O, Soforowa, E. A., *Planta Med.*, 36, 204 (1976)
13. Tolkachev, O. N., Vichkanova, S. A., *Farmatsiya (Moscow)*, 27, 38 (1978)
14. Potopalskii, A. I. ,Akishima, T, Shishka, G. V., *Mikrobiol. Zh. (Kiev)*, 37, 755 (1975)
15. Zbierska, J, Kowalewski, Z, *Herba Pol.*, 25, 209 (1979)
16. Dzink, J. L., Socransky, S. S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, 663 (1985)
17. Kornman, K. S., *Dent. Plaque Control Meas, Hyg. Pract. Proc. Workshop*, 121 (1985)
18. Ladanyi, P, *Fr. Demande DR2 482 860* (1981)
19. Ladanyi, P, *Belg. BE 888 843* (1981)
20. Nandi, R, Maiti, M., *Biochem. Pharmacol.*, 34,321(1985)
21. Nandi, R., Maiti, M. Chandhori, K., Mahato, S. B., Bairagi, A. K., *Experimentia*, 39, 524 (1983)
22. Vichkanova, S. A, Rastotskii, B. K., Rubmchik, M. A, Adgina, V.V., Maksimova, R. G., Gubanov, I. A., *Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki*, 45, 82 (1968)
23. Ishii, H., Ichikawa, Y., Kawanabe, E., Ischikawa, M., Ischikawa, T., Kuretani, K., Inomata, M., Hoshi. A, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 4139 (1985)
24. Ke, M., Zhang, X, Wu. L, Zhao, Y, Zhu, D, Song C., Ku R, Zhiwi Xuebao, 24, 289 (1982)

25. Nagao, Y., Sano, S., Miyasaka, T., Ochiai, M., Fuji, K., Fujita. E., Ishii, H.,
Nucleic Acids Symp. Sar., 16, 37 (1985)
26. Cardell. G. A, Farnsworth, N. R, Heterocycles 4, 393 (1976)
27. Nowicki, W, Can. CA 1 191 837 (1985)
28. Sokoloff, B., Saelhof, C. C., Takeuchi.V., Powella, R., Growth, 28, 225 (1964)
29. Chelombito. V. A., Muraveva, D. A., Aktual. Probl. Farmakol. Farm., Vses.
Nauch. Kauf, 183 (1971)
30. Wrocmski, T., Biul. Inst. Roslin. Leczmczych, 9, 136 (1963)
31. Lozyuk, L. V, MikrobioL, Zh.(Kiev), 39, 343 (1977).