

ODREĐIVANJE HIOSCIJAMINA U EKSTRAKTU HERBE *Datura innoxia* Mill. PRIMENOM HPLC

Nikolić B. Milan¹, Adamović S. Dušan², Ristić N. Bojana¹, Stoilković Ž. Zora¹

¹ AD "Zdravlje", Farmaceutsko-hemijska industrija,

² Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad,

Determination of hyoscyamine in extract of Datura innoxia Mill. Herb by HPLC; Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 2000: 145-149.

The procedure for determination of hyoscyamine in extract of *Datura innoxia* Mill. herb by high pressure liquid chromatography (HPLC), using column Lichrosorb RP-18 and mobile phase $6,66 \cdot 10^{-2}$ M sodium phosphate solution (adjusted to pH 3,5 using phosphoric acid) – methanol with $1,75 \cdot 10^{-2}$ M sodium dodecyl sulphate (48:52 v/v), was worked out. The procedure is convenient for quantitative analysis, because it provides high investigated of results (Kw=5,53%). Using HPLC procedure, it was found that extract of *Datura innoxia* Mill. herb obtained by 95% ethanol contain 0,021% (m/v) of hyoscyamine.

UVOD

Datura innoxia Mill. je jednogodišnja zeljasta biljka iz familije *Solanaceae*, koja dostiže visinu i do 2 m. Veoma je rasprostranjena u južnoj Americi, Meksiku, severno-indijskim ostrvima i svuda u toplim oblastima, a naročito u subtropskim zemljama [1], dok se u našoj zemlji može gajiti plantažno.

Nadzemni deo biljke (herba) predstavlja mogući izvor za dobijanje tropanskih alkaloida, od kojih su najvažniji skopolamin i hioscijamin [2,3].

Zbog lekovitog delovanja ovih supstanci, kao midrijatika i spazmolitika, njihovo određivanje ima poseban značaj za ocenu kvaliteta droge, ekstrakata droge i preparata u čijem se sastavu nalaze.

Veliki napredak u određivanju tropanskih alkaloida iz biljnih vrsta fam. *Solanaceae* ostvaren je uvođenjem hromatografskih metoda analize: hromatografije na

papiru [4] i tankom sloju [5-7] i u novije vreme tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) [8-10].

U okviru ovog rada postavljen je zadatak da se razradi pouzdan metod određivanja hioscijamina u ekstraktu herbe *Datura innoxia* Mill. i primenom razrađenog metoda u ekstraktu odredi sadržaj ovog alkaloida.

EKSPERIMENTALNI DEO

U ispitivanjima je korišćena herba *Datura innoxia* Mill. gajena u Vojvodini (Bački Petrovac, 1997. god.), koja je sakupljena u fazi plodonošenja (4. nivo formiranja plodova).

Kao standardni uzorak korišćen je L-hioscijamin (Extrasynthése). Ostale upotrebljavane hemikalije bile su stepena čistoće p.a. ukoliko drugačije nije naglašeno.

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom vršena je na aparatu HPLC SERIES 1100 HEWLETT PACKARD sa UV/VIS detektorom. Za obradu dobijenih rezultata korišćena je data stanica HPChem (Hewlett Packard).

Za degaziranje pokretne faze korišćeno je ultrazvučno kupatilo (ELMA-TRANSSONIC T 470/H).

PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

Priprema ekstrakta. 5,0 g samlevene i prosejane droge (sito sa otvorima veličine 0,8 mm) prenese se u erlenmajer od 250 ml sa brušenim zatvaračem, doda 95% etanol (100 ml), izmeri masa erlenmajera sa sadržajem, i ekstrakcija se vrši mućkanjem (1 h) na sobnoj temperaturi. Po isteku ovog vremena proveri se masa erlenmajera sa uzorkom i po potrebi doda 95% etanol. Filtriranjem preko filter papira odvoji se ekstrakt od droge i dobijeni ekstrakt koristi za određivanje hioscijamina primenom HPLC metode.

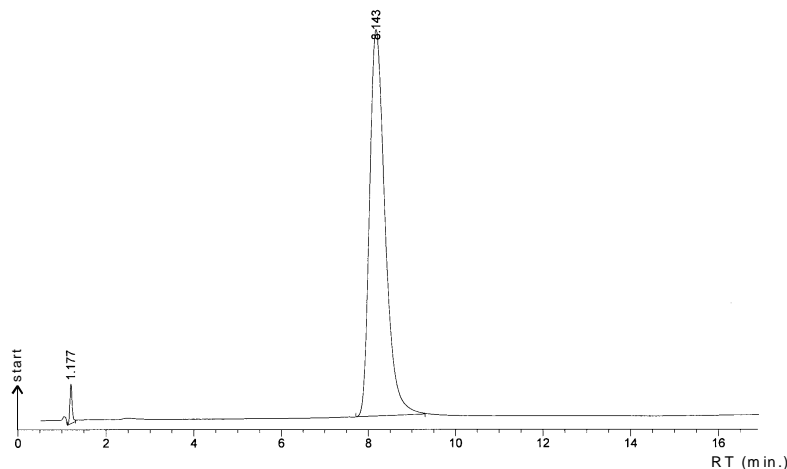
Određivanje hioscijamina primenom HPLC. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom izvršena je primenom kolone Lishrosorb RP-18 i sistema rastvarača: $6,66 \cdot 10^{-2}$ M rastvor natrijumfosfata (pH 3,5, podešen fosfornom kiselinom) – metanol sa $1,75 \cdot 10^{-2}$ M natrijum-dodecilsulfata (48:52 v/v), kao pokretne faze.

Pokretna faza se priprema neposredno pre upotrebe na sledeći način: pripremljeni rastvori i rastvarači se filtriraju kroz Durapore filter (Millipore Corp., 0,22 μ m), zatim mešaju u određenom zapreminskom odnosu i pokretna faza degazira primenom vakuuma i ultrazvuka.

Ekstrakt i standardni rastvor L-hioscijamina u metanolu (1,05 mg/ml), prethodno filtrirani kroz membranski filter (Sartorius, 0,45 μm), direktno se ubrizgaju (20 μl) u injektor tečnog hromatografa.

REZULTATI I DISKUSIJA

HPLC-hromatogrami L-hioscijamina i ekstrakta herbe *Datura innoxia* Mill. prikazani su na sl. 1 i 2.

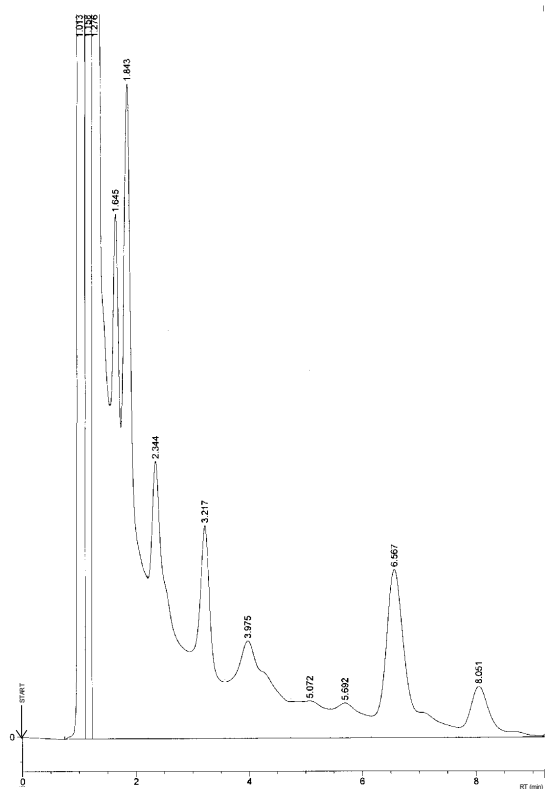


**Slika 1. HPLC-hromatogram L-hioscijamina (Extrasynthese); RT = 8,143 min.
Kolona: Lichrosorb RP - 18 (250 mm x 4 mm)**

Pokretna faza: $6,66 \cdot 10^{-2}$ M rastvor natrijumfosfata (pH 3,5, podešen fosfornom kiselinom) - metanol sa $1,75 \cdot 10^{-2}$ M natrijum-dodecil-sulfata (48:52 v/v);

Protok: 2,0 ml/min;

Detekcija: UV, 210 nm



Slika 2. HPLC-hromatogram ekstrakta herbe *Datura innoxia* Mill., dobijenog 95% etanolom;

Uslovi razdvajanja isti kao na sl. 1; hioscijamin (RT = 8,051 min.)

Iz hromatograma prikazanog na slici 2 se vidi da je pri navedenim uslovima HPLC analize ispitivani ekstrakt razdvojen na više komponenata, od kojih pik sa 8,051 min. predstavlja hioscijamin. Od ostalih komponenata prisutnih u ekstraktu identifikovan je skopolamin (RT = 6,567 min).

U nastavku ispitivanja proverena je reproduktivnost razrađenog hromatografskog postupka određivanja hioscijamina, u istom uzorku ekstrakta (n=5). Rezultati ovih određivanja dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja reproduktivnosti određivanja hioscijamina primenom HPLC

Broj probe	Sadržaj hioscijamina (mg/20 µl)	Statistički parametri
1	0,0038	$\bar{x} = 0,0206$
2	0,0044	$S = 1,14 \cdot 10^{-3}$
3	0,0040	$K_V = 5,53\%$
4	0,0042	
5	0,0042	

Iz rezultata prikazanih u tabeli 1, vidi se da je razrađeni hromatografski postupak pogodan za određivanje hioscijamina u ekstraktu herbe *Datura innoxia* Mill., jer obezbeđuje dobru reproduktivnost rezultata ($K_V=5,53\%$).

ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih ispitivanja može se zaključiti:

- Za određivanje hioscijamina u ekstraktu herbe *Datura innoxia* Mill., dobijenog 95% etanolom pogodan je metod tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) primenom kolone Lichrosorb RP-18 i pokretne faze: $6,66 \cdot 10^{-2}$ M rastvor natrijumfosfata (pH 3,5; podešen fosfornom kiselinom)-metanol koji sadrži $1,75 \cdot 10^{-2}$ M natrijum-dodecil-sulfata (48:52 v/v).
- Razrađeni HPLC metod određivanja hioscijamina u ekstraktu *Datura innoxia* Mill., odlikuje se dobrom reproduktivnošću rezultata ($K_V=5,53\%$).
- Primenom razrađenog metoda nađeno je da ekstrakt herbe *Datura innoxia* Mill., dobijen 95% etanolom sadrži 0,021% (m/v) hioscijamina, odnosno sama droga 0,42% hioscijamina.

LITERATURA

1. Hagers, Handbuch, Bd. IV 465
2. Verzar-Petri: Pharmazie, 21 (1966) 48
3. Shah et. al.: J. Pharm. Pharmacol., 17 (1965) 115
4. Pelt et. al.: Ann. Pharm. franc., 25 (1967) 59
5. Wu Chu, L.B., Kika, S. E., Soiomon, J.M., Crane, A.F.: J.Pharm. Sci., 58 (1969) 1073
6. He, Y.L., Chang, C.Y.: Acta Pharm. Sin., 14 (1979) 421
7. He, Y.L.: Zhongcaoyao, 13 (1982), 13
8. Paphassarang, S., Raynand, J.: J.Chromatogr., 319 (1985) 412
9. Duez, P., Chamart, S., Hanocq, M., Molle, I.: J. Chromatogr., 329 (1985) 415
10. Piank, H. K., Wagner, G.K.: Z. Naturforsch., Teil C., 41 (1986) 391

