

ODREĐIVANJE SADRŽAJA VALEPOTRIATA U KORENU I EKSTRAKTU ODOLJENA (*Valeriana officinalis* L.)

Milan Nikolić

Farmaceutsko-hemijska industrija "Zdravlje" A.D Leskovac

*Determination of vale potriates contens in valerian (*Valeriana officinalis* L.) Root and extract; Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 2000: 131-137.*

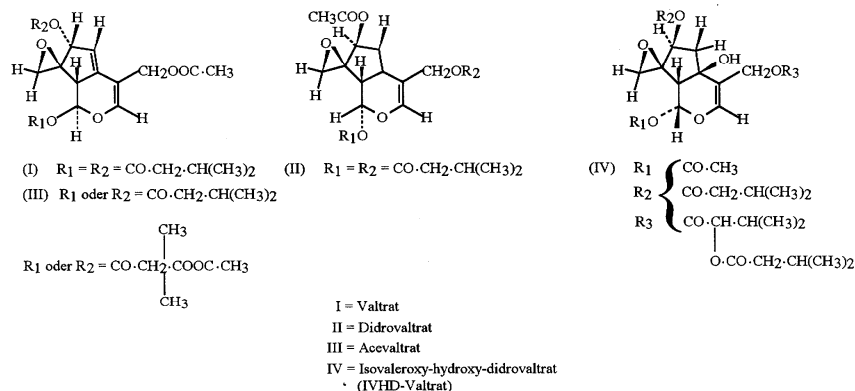
In the framework of this paper, a method for qualitative and quantitative analysis of total valepotriates, in valerian root and its alcoholic extract, based on use of thin layer chromatography on silica gel HF₂₅₄ and spectrophotometry, using Fe (III) salt and hydroxylamine as a coloured agent, was worked out. The chromatographic-spectrophotometric method for valepotriates determination in examined samples, which we worked out, is characterized by high reproductiveness of results ($K_v = 3,72$ % for root, and $K_v = 3,85$ % for drug extract). The analysis of valerian root samples showed that they contained 1,09 %, and this drug alcoholic extracts contained 0,26 % of total alkaloids.

UVOD

Hemijski sastav odoljena (*Valeriana officinalis* L.) bio je predmet izučavanja mnogih istraživača. Zahvaljujući brzom razvoju hromatografskih metoda otkriven je veliki broj aktivnih komponenata koje sadrži koren odoljena. Pored komponenata koje su u najvećem broju sadržane u etarskom ulju (1-3), i imaju blago sedativno delovanje (4), alkaloida (5-10), holina (11), glikozida (12-14) i drugih sastojaka (hlorogenska i kafena kiselina, smole, različiti enzimi, šećeri) (15), koren odoljena sadrži i valepotriate (grupa jedinjenja sa triesterepoksi strukturom) koji se odlikuju izraženim sedativnim i spazmolitičkim delovanjem (15).

Od valepotriatnih sastojaka odoljena od značaja su estri sirćetne, izovalerijanske i P-acetoksiizovalerijanske kiseline i terpenoidnog trohidroksilnog alkohola tipa iridoidnog ciklopenta-(c)-pirana sa dodatnim epoksi-grupama, od kojih su najvažniji

valtrat, didrovaltrat i acevaltrat. Oni se međusobno razlikuju po stepenu hidriranja i esterifikovanja, odnosno po rasporedu estarskih grupa. Osim ovih glavnih valepotriata autori (16) su otkrili sledeći hromogeni valepotriat koji su, zbog nove vrste estrarskog grupisanja, nazvali izovaleroksi-hidroksi-didrovaltrat (IVHD-Valtrat)(shema 1).



Shema 1.

Koren odoljena se koristi kao sastojak čajeva a najčešće za izradu tinktura i ekstrakata, standardizovanih na određen sadržaj valepotriata. Iz navedenih razloga određivanje ovih sastojaka ima poseban značaj za ocenu kvaliteta droge i ekstrakata droge koji ulaze u sastav preparata.

U okviru ovog rada postavljen je cilj da se razradi metod određivanja valepotriata u korenu i ekstraktu odoljena, dobijenim maceracijom droge 95% etanolom kao ekstragensom, primenom kombinovanog hromatografsko-spektrofotometrijskog metoda.

MATERIJAL I METOD RADA

U ispitivanjima su korišćeni koren odoljena (trgovački uzorak) i ekstrakt korena odoljena pripremljen postupkom maceracije.

Za pripremanje tankog sloja korišćen je TLC Kieselgel 60 HF₂₅₄ (E.Merck, Darmstadt, Germany). Suspenzija silika gela u vodi nanošena je pomoću aplikatora Desaga-DC, GmbH, Heidelberg, Germany) na staklene ploče 20 x 20 cm u debljini sloja 0,25 mm.

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

Za identifikaciju pojedinih valepotriata, hromatografijom na tankom sloju silika gela HF₂₅₄, korišćeni su p-anisaldehyd i vanilin (Aldrich, Chem. Co. Mihv.) kao uporedne supstance.

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

EKSTRAKCIJA UKUPNIH VALEPOTRIATA

Ekstrakcija droge metilenhloridom. Samlevena i prosejana (sito 0,8 mm), vazdušno suva droga (5,0 g) prenese se u erlenmajer od 100 cm³ i ekstrahuje metilenhloridom (25,0 cm³) mućkanjem tokom 30 minuta. Filtriranjem se odvoji ekstrakt i ekstrakcija droge se ponovi pod istim uslovima još dva puta. Dobijeni ekstrakti se spoje, rastvarač odstrani pod sniženim pritiskom i suvi ostatak rastvori u metilenhloridu (5,0 cm³). Ovako dobijeni rastvor koristi se za određivanje valepotriata.

PRIPREMA EKSTRAKTA

Za pripremu alkoholnog ekstrakta primenjen je postupak maceracije, a kao ekstragens korišćen je 95% etanol. Priprema ovog ekstrakta sastoji se u sledećem:

Samlevena, na vazduhu osušena droga i prosejana kroz sito sa otvorima veličine 0,8 mm (100 g) prenese se u erlenmajer od 500 cm³ sa brušenim zatvaračem, doda etanol koncentracije 95% (200 cm³) i izmeri masa erlenmajera zajedno sa ekstragensom. Zatim se droga ekstrahuje mućkanjem na sobnoj temperaturi tokom 90 minuta. Po isteku ovog vremena proveriti se masa erlenmajera sa uzorcima i po potrebi doda etanol. Ekstrakt se odvoji od droge filtriranjem preko filter papira i podvrgava ekstrakciji metilenhloridom.

Ekstrakcija metilenhloridom. Pripremljeni ekstrakt odoljena (50,0 cm³) se upari, pod sniženim pritiskom, na zapreminu od 10,0 cm³, dobijeni ostatak razblaži vodom (30,0 cm³) i valepotriati ekstrahuju metilenhloridom (5x20 cm³). Spojeni metilenhloridni ekstrakt se osuši bezvodnim natrijumsulfatom i rastvarač odstrani pod sniženim pritiskom i temperaturi od 40 °C. Suvi ostatak se rastvara u metilenhloridu (5,0 cm³) i dobijeni rastvor koristi za njihovo određivanje.

Hromatografsko razdvajanje valepotriata i njihovo određivanje. Staklene ploče (20 x 20 cm) sa slojem silika gela HF₂₅₄ (0,25 mm) aktiviraju se na 140 °C za vreme od 4 sata.

Na ploču se nanosi metilenhloridni rastvor, za određivanje valepotriata u drogi (25 µl), a za određivanje u ekstraktu (10 µl) i rastvori uporednih supstanci, p-anisaldehyda i vamlina (10 µl). Razvijanje hromatograma izvodi se primenom smeše

rastvarača heksan-etilmetilketon (8:2 v/v). Po završenom razvijanju hromatograma (oko 35 min.) hromatogrami se suše na vazduhu. Posmatranjem hromatograma pod UV svetlošću ($\lambda = 254$ nm) identifikuju se i oiviče mrlje valepotriata u Rf-području od 0,60-0,25 (valtrat do izovaleroksi-hidroksi-didro-valtrat). Oivičene zone silika gela se kvantitativno sastružu i spoje i ekstrahuju etiletom (25,0 cm³) mućkanjem za vreme od 15 minuta. Centrifugiranjem (3500 o/min) i filtriranjem kroz guč B-4 dobije se bistar rastvor, rastvarač upari na zapreminu od 5 cm³, na vodenom kupatilu (40 °C), i ostatak prenese u odmerni sud od 10,0 cm³. U sud se zatim doda metanol (3,0 cm³), rastvor hidroksilaminhidrohlorida u metanolu konc. 10% (1,0 cm³), rastvor natrijum hidroksida u metanolu koncentracije 10% (1,0 cm³) i smeša zagreva (20 min) na vodenom kupatilu (40°C). Nakon otparenja etiletra, doda se rastvor hlorovodonične kiseline koncentracije 10% (1,0 cm³), rastvor feri-hlorida u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselinu koncentracije 10% (1,0 cm³) i odmerni sud dopuni metanolom do crte. Na isti način se vrši priprema uporednog rastvora. Ovako pripremljenim rastvorima se mere apsorbancije na talasnoj dužini 512 nm na pogodnom spektrofotometru. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija iz standardnog dijagrama Fe(III)-hidroksamat kompleksa valtrata, preuzetog iz literature (17), očitaju se odgovarajuće koncentracije valtrata i računski odredi ukupni sadržaj valepotriata (sračunati kao valtrat) u drogi i ekstraktu droge.

HROMATOGRAFSKO ISPITIVANJE SASTAVA VALAPOTRIATA

Priprema rastvora valepotriata iz droge. Droga (2,0 g) se ekstrahuje metilenhloridom (5,0 cm³), uz mućkanje, za vreme od 30 minuta. Filtriranjem se odvoji ekstrakt, rastvarač odstrani na vodenom kupatilu (40 °C) i ostatak rastvori u metanolu (5,0 ml).

Priprema rastvora valepotriata iz ekstrakta. Pripremljen ekstrakt odoljena (4,0 cm³) se razblaži vodom (12,0 cm³) i ekstrahuje metilenhloridom (50,0 cm³) mućkanjem tokom 30 minuta. Odvojeni metilenhloridni ekstrakt se osuši bezvodnim natrijumsulfatom, rastvarač odstrani na vodenom kupatilu i ostatak rastvori u metanolu (5,0 cm³).

Tankoslojna hromatografija valepotriata

Primenjena je hromatografija na tankom sloju silika gela HF₂₅₄. Na startne tačke nanete su uporedne supstance (10 µl), metanolni rastvori p-anisaldehyda koncentracije 0,1% (v/v) i vanilina koncentracije 0,1% (m/v), i pripremljeni metanolni rastvori valepotriata iz droge i ekstrakta (50 µl). Hromatogram je razvijen korišćenjem mobilne faze heksan-etilmetilketon (8:2 v/v). Detekcija komponenata je izvršena pod

UV svetlošću ($\lambda = 254 \text{ nm}$) i izazivanjem mrlja pomoću 0,2% (m/v) rastvora 2,4-dinitrofenilhidrazina u smeši metanol-konc. hlorovodonična kiselina - etilacetat (2:4:4 v/v/v) i zagrevanje hromatograma na $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 minuta.

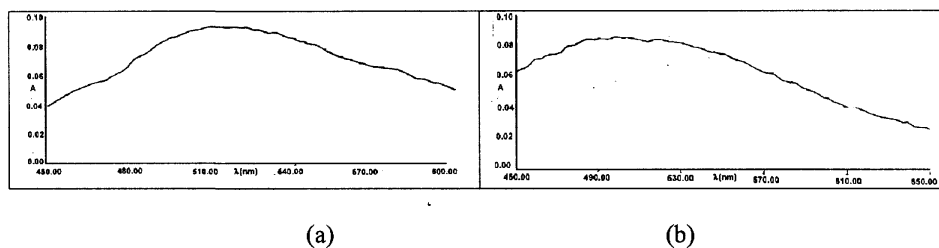
REZULTATI I DISKUSIJA

Na osnovu sprovedenih ispitivanja, primenom hromatografije na tankom sloju silika gela HF₂₅₄, od valepotriata su identifikovani valtrat i izo-valeroksi-hidroksi-didro-valtrat.

Iz dobijenih hromatograma valepotriata iz droge i ekstrakta droge, na osnovu uporednih supstanci, jasno se vidi prisustvo valtrata ($R_f = 0,60$; mrlja ljubičaste boje pod UV svetlošću- 254 nm i plavozelenkaste kada se izazivanje mrlje vrši rastvorom 2,4-dinitrofenilhidrazina) i izovaleroksi-hidroksi-didro-valtrata ($R_f = 0,25$; mrlja ljubičaste boje na 254 nm i plave kada je izazvana istim reagensom). Pored ovih komponenata identifikovani su i didrovaltrat i acevaltrat koji, po R_f -vrednosti i boji mrlja na 254 nm i izazvanih reagensom, u potpunosti odgovaraju literaturnim podacima (17) dobijenih primenom istih hromatografskih uslova .

Valepotriati odoljena u prisustvu soli-Fe(III) i hidroksilamina obrazuju obojene rastvore, koji imaju karakterističnu apsorpciju u VIS-oblasti, što ukazuje na mogućnost njihovog određivanja primenom spektrofotometrije.

Ispitivanja apsorpcije rastvora ovih komponenata (ukupni valepotriati iz droge i ekstrakta) na različitim talasnim dužinama pokazala su da je najveći maksimum apsorpcije na talasnoj dužini 509 nm, što je u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima (17). Sva merenja apsorpcija su vršena na ovoj talasnoj dužini. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na sl. 1 (a) i (b).



Slika 1. Vidljivi spektar Fe(III)-hidroksamat-kompleksa sa ukupnim valepotriatima iz korena (a) i ekstrakta odoljena (b)

Radi ispitivanja reproduktivnosti razradenog hromatografsko-spektrofotometrijskog metoda u homogenom uzorku korena odoljena i ekstraktu ove droge više puta ($n=3$) je određivan sadržaj ukupnih valepotriata, sračunatih na valtrat, striktno

primenjujući opisani metod. Izračunavanje sadržaja valepotriata vršeno je na osnovu standardnog dijagrama iz literaturnih podataka (17). Rezultati ovih određivanja dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati određivanja ukupnih valepotriata u korenu i ekstraktu odoljena

Sadržaj ukupnih valepotriata (%)		Statistički parametri	
Koren odoljena	95% etanolni ekstrakt odoljena	Koren odoljena	95% etanolni ekstrakt odoljena
1,08	0,25	$\bar{x} = 1,09$	$\bar{x} = 0,26$
1,13	0,27	$S = 4,041 \cdot 10^{-2}$	$S = 1,0 \cdot 10^{-2}$
1,05	0,26	$K_v = 3,72\%$	$K_v = 3,85\%$

Iz rezultata prikazanih u tabeli 1 vidi se da je razrađeni hromatografsko-spektrofotometrijski metod pogodan za određivanje ukupnih valepotriata u korenu i ekstraktu korena odoljena, jer obezbeđuje dobar stepen reprodukcije rezultata ($K_v = 3,72\%$ za koren i $K_v = 3,85\%$ za ekstrakt droge). Analizom uzoraka korena odoljena nađeno je da sadrže 1,09% (m/m), a 95% alkoholni ekstrakt iz ove droge 0,26% (m/v) ukupnih valepotriata.

ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da je za određivanje ukupnih valepotriata u korenu odoljena i alkoholnom ekstraktu ove droge pogodan hromatografsko-spektrofotometrijski metod, kada se koristi sistem rastvarača heksan-etilmetilketon (8:2 v/v) kao pokretna faza i soli-Fe(III) i hidroksilamina kao reagenasa za obrazovanje bojenog kompleksa sa valepotriatima.

Razrađeni kombinovani hromatografsko-spektrofotometrijski metod određivanja ukupnih valepotriata odlikuje se dobrom reproduktivnošću rezultata ($K_v = 3,72\%$ za koren i $K_v = 3,85\%$ za ekstrakt droge).

Primenom razrađenog metoda nađeno je da uzorak korena odoljena sadrži 1,09%, a 95% alkoholni ekstrakt ove droge 0,26% ukupnih valepotriata.

LITERATURA

1. Ribalčenko, A. S., Fursa, M. S., Litvinenko, V. I., Farmaceut. žurn., 4, 28 (1980)
2. Krepinski J., Herout, V., Šorm, F., Collect. Czechosl. Chem. Commun. 24, 1884. (1959)
3. Witek, S., Krepinski, J., ibidem 31, 113 (1966)
4. Gstirner, F., Kind, H., Pharmazie, 6, 346 (1951)

5. Waliszewski, Unionpharmaz., 34, 251(1891)
6. Chevalier, J, Soc. Biol, 144, 154 (1907)
7. Cionga, E., C. R. hebdomadaire Seances Acad.Sci., 200,780 (1935)
8. Torsell., K., Wahlberg, K., Tetrahedron Letters 4, 445 (1966), Acta Chem.Scand., 21, 53 (1967)
9. Gross, D., Edner, G., Schutte, H., Arch., Pharmaz., 304, 19 (1971)
10. Franck; B., Petersen, U., Huper, F., Angew. Chemie, 82, 875 (1970)
11. Szentpetery, R. G., Nyomerkay, M. K., Sarkany, S., Horvath, D. K., Pharmazie, 18, 816 (1963)
12. Schultz, E. O., Muller, F., Arzneimittel-Forsch.(DrugRes.), 10, 78 (1960)
13. Nikul'shina, Talau, Bukarov, Ivanova, Farmatsiya, 18, 44 (1969)
14. Thies; W. P, Tetrahedron Letters, 28, 2471 (1970)
15. Schaette; R., Diss. Munchen (1971)
16. Stahl, E., Schild, W, Tetrahedron Letters, 13, 1053 (1969)
17. Wagner; H., Horhammer, L., Arzneimittel-Forsch. (DrugRes.), 20, 1149 (1970).

