

ODREĐIVANJE ATROPINA U EKSTRAKTIMA BELOG BUNA (*Scopolia carniolica* Jacq.) PRIMENOM HPLC

Nikolić Milan ¹, Banković Vladimir ¹, Mihajlov Milena ², Vlastimir Stamenković ¹

¹ AD "Zdravlje" Farmaceutsko-hemijska industrija, Leskovac

² Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

Determination of atropine in extracts of white henbane (Scopolia carniolica Jacq.) using HPLC; Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 2000: 139-144.

Razraden je metod za određivanje atropina u ekstraktima rizoma belog buna koji se zasniva na primeni tačne hromatografije pod visokim pritiskom, kolone Lichrosorb RP-Select B i sistema rastvarača: rastvor kalijum-dihidrogenfosfata, di-natrijum-hidrogenfosfata i natrijum-heptansulfonske kiseline (pH 5,6) - acetonitril (78:24 v/v), kao pokretne faze. Razradeni HPLC metod za određivanje atropina u ekstraktima belog buna odlikuje se dobrom reproduktivnošću rezultata ($K_v = 3,46-4,14\%$). Primenom razrađenog metoda nađeno je da 70% etanolni ekstrakt belog buna sadrži 0,11% (m/v) atropina, dok je njegov sadržaj u 40% i 95% etanolnim ekstraktima bio 0,021% i 0,024% (m/v), respektivno.

UVOD

Rod *Scopolia* Jacq. razlikuje četiri vrste od kojih je u flori SR Srbije (1) zastupljen samo sa jednom vrstom *Scopolia carniolica* Jacq., koja u našem narodu ima naziv beli bun. Ova biljna vrsta je veoma retko rasprostranjena i nalazi se samo na Kučajskim planinama, u istočnoj Srbiji. Raste u zasenjenim listopadnim šumama, obično bukovim, na humusnom i krečnjačkom zemljištu. Koristi se podzemni deo (koren i rizom) biljke, a naročito rizom kao sirovina za dobijanje tropanskih alkaloida, koji najvećim delom čine hioscijamin-atropin i skopolamin.

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

Veliki napredak u određivanju tropanskih alkaloida iz biljnih vrsta roda *Scopolia* Jacq. ostvaren je primenom hromatografskih metoda analize (2-6).

U okviru rada postavljen je cilj da se razradi pouzdan metod određivanja atropina u ekstraktima rizoma belog buna i primenom razrađenog metoda u ekstraktima ispita sadržaj ovog alkaloida.

MATERIJAL I METOD RADA

U ispitivanjima je korišćen rizom belog buna sakupljen sa prirodnih staništa na Kučajskim planinama, u okolini Majdanpeka, krajem jula 1997. god. Na vazduhu osušena droga je grubo samlevena na mlinu BORO (Madžari, Skoplje) i dodatno usitnjena pomoću električnog mlina (mlin za kafu, $n = 12\ 000\ \text{min}^{-1}$, \varnothing čekića 60 mm).

Kao standardni uzorak korišćen je atropinsulfat (Sigma, Chemie GmbH, W. Germany). Ostale korišćene hemikalije bile su stepena čistoće p.a.

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 primenjeno je ultrazvučno kupatilo (ELMA-TRANSSONIC T 470/H).

PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

Priprema ekstrakata. U tri odmerena erlenmajera od 50 ml sa brušenim zatvaračem prenese se po 5,0 g droge, u svakom erlenmajeru pojedinačno doda 40%, 70% i 95% etanol (25,0 ml) i ekstrahuje uz mućkanje (1 h) na sobnoj temperaturi. Po isteku ovog vremena proveri se masa erlenmajera sa uzorcima i po potrebi doda odgovarajući ekstragens. Filtrovanjem preko filter papira odvoje se ekstrakti od droge i ovako pripremljeni ekstrakti koriste za određivanje atropina.

Priprema standardnog rastvora. Atropinsulfat (10,5 mg) se rastvori u odmernom sudu od 10 ml pokretnom fazom.

ODREĐIVANJE ATROPINA PRIMENOM HPLC

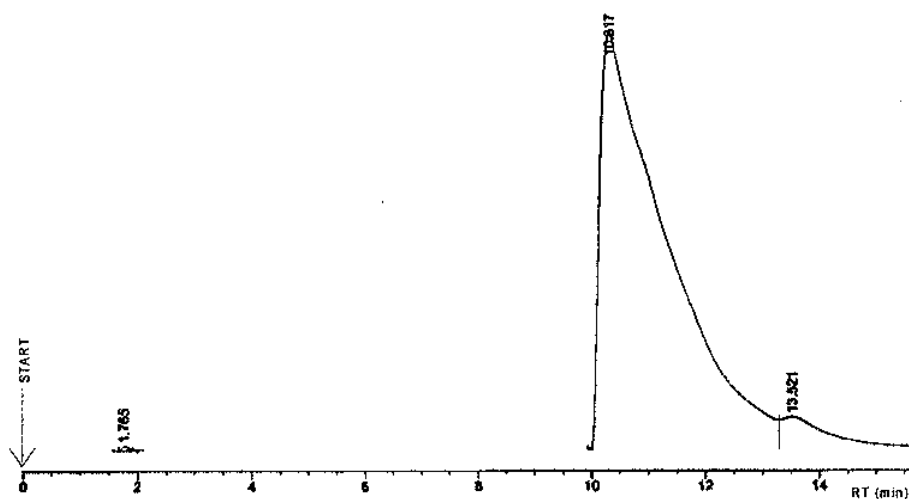
Pripremljeni 40%, 70% i 95% etanolni ekstrakti i standardni rastvor, prethodno filtrirani kroz membranski filter (Sartorius, 0,45 μm), direktno se ubrizgavaju (20 μl) u injektor tečnog hromatografa.

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom izvršena je primenom kolone Lichrosorb RP-Select B i sistema rastvarača: rastvor kalijum-dihidrogenfosfata, dinatrijum-hidrogenfosfata i natrijum-heptan-sulfonske kiseline (pH 5,6) - acetonitril (78:24 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 µm), zatim mešaju u određenom zapreminskom odnosu i pokretna faza degazira primenom ultrazvuka.

REZULTATI I DISKUSIJA

HPLC hromatogrami atropina i ekstrakata rizoma belog buna prikazani su na slikama 1, 2, 3 i 4.



Slika 1. HPLC-hromatogram atropina (Sigma); RT = 10,32 min.

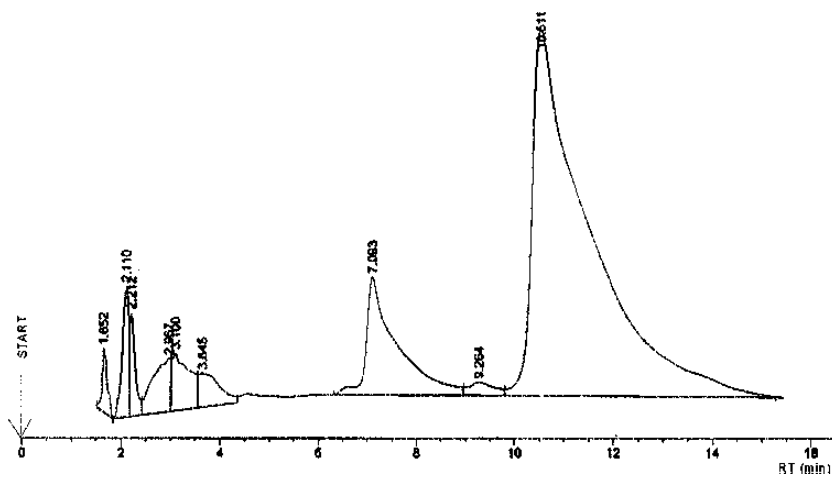
Kolona: Lichrosorb RP-Select B

Pokretna faza: rastvor kalijum-dihidrogenfosfata, dinatrijum-hidrogenfosfata i natrijum-heptan- sulfonske kiseline (pH 5,6) -acetonitril (78:24 v/v)

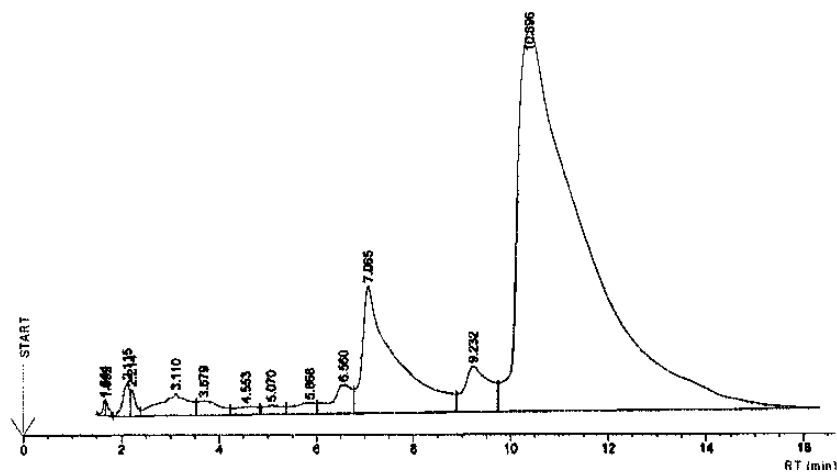
Protok : 1,0 ml/min.

Temperatura: sobna

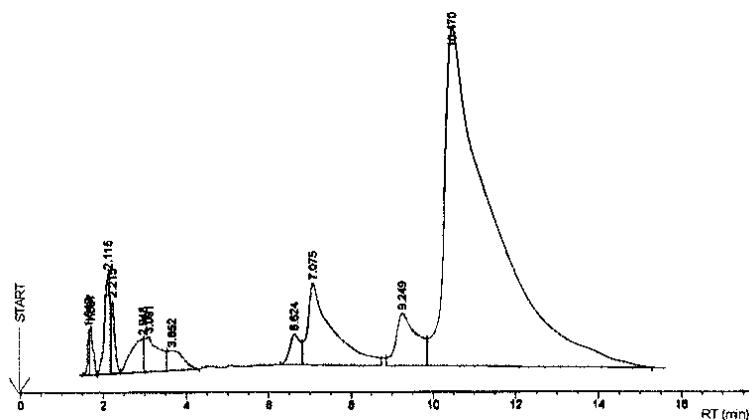
Detekcija: 210 nm



Slika 2. HPLC-hromatogram 40% etanolnog ekstrakta rizoma belog buna
Uslovi razdvajanja isti kao na sl. 1; atropin (RT = 10,51 min)



Slika 3. HPLC-hromatogram 70% etanolnog ekstrakta rizoma belog buna
Uslovi razdvajanja isti kao na sl. 1 i 2; atropin (RT = 10.39 min)



Slika 4. HPLC-hromatogram 95% etanolnog ekstrakta rizoma belog buna

Uslovi razdvajanja isti kao na sl. 1, 2 i 3; atropin (RT = 10,47 min)

Iz hromatograma prikazanih na slikama 2, 3 i 4 vidi se da su pri navedenim uslovima ispitivani ekstrakti razdvojeni na više komponenata, od kojih signal sa RT=10,39-10,51 min. predstavlja atropin. Od ostalih komponenata identifikovan je skopolamin, čiji se signal javlja pri RT= 7,06-7,09 min.

U nastavku istraživanja proverena je reproduktivnost razrađenog hromatografskog metoda određivanja atropina, u istim uzorcima ekstrakata (n = 5), striktno primenjujući razrađeni metod.

Rezultati ovih određivanja dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja reproduktivnosti određivanja atropina primenom HPLC

Broj probe	Sadržaj atropina (mg/20 µl)		
	40% etanolni ekstrakt	70% etanolni ekstrakt	95% etanolni ekstrakt
1	0,0040	0,0220	0,0050
2	0,0040	0,0200	0,0048
3	0,0042	0,0220	0,0048
4	0,0044	0,0220	0,0050
5	0,0042	0,220	0,0046
	Statistički parametri		
	X= 0,0208 S = 0,837 · 10 ⁻³ K = 4,02 %	X = 0,1080 S = 4,472 · 10 ⁻³ K = 4,14%	X = 0,0242 S = 0,837 · 10 ⁻³ K = 3,46%

Iz rezultata prikazanih u tabeli 1. se vidi da je razrađeni hromatografski postupak pogodan za kvantitativnu analizu jer obezbeđuje dobru reproduktivnost rezultata ($K_v = 3,46 - 4,14\%$).

ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti sledeće:

Za određivanje atropina u ekstraktima rizoma belog buna, dobijenih navedenim postupkom, podesean je metod tačne hromatografije pod visokim pritiskom na koloni Lichrosorb RP-Select B kada se koristi pokretna faza: rastvor kalijum-dihidrogenfosfata, di-natrijum hidrogenfosfata i natrijum-heptansulfonska kiselina (pH 5,6)-acetonitril (78:24 v/v).

Razrađeni HPLC metod određivanja atropina u ekstraktima belog buna odlikuje se dobrom reproduktivnošću rezultata ($K_v = 3,46-4,14\%$).

Ispitivanjem ekstrakcije atropina iz korena belog buna primenom alkohola i alkoholno-vodenih rastvora kao rastvarača, utvrđeno je da je najpogodniji ekstragens 70% etanol. Analizom uzoraka ekstrakata nađeno je da 70% etanolni ekstrakt belog buna sadrži 0,11% (m/v) atropina, dok je njegov sadržaj u 40% i 95% etanolnom ekstraktu znatno manji (0,021% i 0,024%, m/v), respektivno.

LITERATURA

1. Gajić, M., Diklić, M., Janković, M., Jovanović-Dunjić, R., Kojić, M., Nikolić, V., Obradović, M., Parabućki, S., Stjepanović, L., Tucović, A., Cicanović, T., (1974): Flora SR Srbije, VI, 78-80
2. Nakanishi, H., Imamori, K., Iwasa, A., (1992): Yakugaku-Zasshi 112,12, 944
3. Nishimoto, N., Kato, R., Hayashi, S., (1980): Yakugaku-Zasshi 100, 4, 396
4. Szymanska, M., (1986): Herba Pol., 161, 3 - 4
5. J Gyeresi, A., Szanthy, K., Fulop, L., (1987): Farmacia (Bucharest) 35, 59
6. Gyeresi, A., Szanthy, K., Fulop, L., (1986): Farmacia (Bucharest) 34, 55.