

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVIII, 39

SECTIO D

1963

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej. Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna.
Lublin.

Kierownik: doc. dr Eugenia Domagalina

Eugenia DOMAGALINA, Franciszka KROZE

**Nowe metody oznaczania sparteiny i alkaloidów ubocznych
w ziele żarnowca (*Sarothamnus scoparius*)**

**Новые методы определения спартеина и посторонних алкалоидов
в траве ракитника**

**New Methods of Estimating Sparteine and of Minor Alkaloids
in the Tops of Common Broom (*Sarothamnus scoparius*)**

Pospolity, dziko rosnący przy szosach, torach kolejowych i w wąwozach żarnowiec miotlasty (*Sarothamnus scoparius*; rodz. *Leguminosae*) jest cennym surowcem do otrzymywania głównego alkaloidu tej rośliny — sparteiny. Różnorodna zawartość sparteiny, zależna od pochodzenia, części rośliny i jej cyklu wegetacyjnego (najwyższa w młodych, zielonych, sierpniowych odrostach łodyg i niedojrzałych nasionach) wynosi w przeliczeniu na suchą masę od 0,3—5 % (1, 2). Godny uwagi jest fakt, że w nasionach — w miarę ich dojrzewania — sparteina stopniowo zanika, przekształcając się w formy utlenione — lupaninę i hydroksylupaninę (1, 3, 4).

Używana w lecznictwie w postaci uwodnionego siarczanu ($C_{15}H_{28}N_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 5H_2O$) jest środkiem pobudzającym ośrodek oddechowy i ośrodek nerwu błędnego, a także wywołuje łagodne skurcze macicy. Stosowana jest w niemiarowości serca i w położnictwie.

Jako wolna zasada sparteina jest bezbarwną, oleistą cieczą, łatwo utleniającą się na powietrzu, dobrze rozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych, lotną z parą wodną. Drobną zawartość alkaloidów ubocznych, pozostających w ługach macierzystych przy fabrykacji sparteiny z żarnowca, a mianowicie izomery przestrzenne d- i l- α -izosparteina (genisteina), izomery strukturalne (C-metylopirolidynowe) i optyczne sparteiny (5, 6), cytyzyna (7), oraz dehydrodwusparteina, sarotamnina (8, 9), różnicują skład alkaloidowy surowca i dlatego sumaryczne chociażby oznaczenie ich ilości, nie opracowane dotąd analitycznie, zasługuje na uwzględnienie i uzupełnienie. Stosowane dotychczas metody oznaczenia ilościowego sparteiny w wyciągach żarnowca opierają się na pomiarach acydymetrycz-

nych (10), wagowych — strącanie osadów kwasem krzemowowolframowym (11), pikrynowym (12), solą Reineckego (13), kolorymetrycznych (14, 15) oraz chromatograficznych, posługujących się techniką planimetryczną i densytometryczną pomiaru plam (1, 4).

W poszukiwaniu nowych, czułych pomiarów ilościowych przebadaliśmy użyteczność metody miareczkowania w środowisku niewodnym, oraz metody planimetrycznej na bibule kationitowanej, opracowanej przez Katedrę Chemii Ogólnej UAM w Poznaniu, a stosowanej m. in. z powodzeniem dla oznaczenia czystej sparteiny (16). W oznaczeniu miareczkowym zastosowaliśmy środowisko bezwodnego chloroformu i kwas nadchlorowy jako czynnik miareczkujący. Metodę tę, wycechowaną na czystej sparteinie i sprawdzoną na dokładność przez oznaczenie odzysku wzorca dodanego do przerabianej, uprzednio oznaczonej próby surowca, można uznać za przydatną tym bardziej, że samo miareczkowanie zajmuje mało czasu i daje ostre przejście barwy wskaźnika w punkcie równoważnikowym. Ilość odzyskanego wzorca wynosiła 99 %.

W metodzie planimetrycznej na bibule kationitowanej o działaniu kolumny jonowymiennej, sorbującej ze środowiska słabo kwaśnego kationy alkaloidów, zastosowaliśmy tzw. płaską technikę rombowa (17). Oznaczane roztwory wodne lub chloroformowe wkraplano mikropipetą na rombowe skrawki bibuły chromatograficznej i alkaloidy eluowano z nich 0,02 M kwasem octowym na standaryzowane paski bibuły kationitowanej. Po wywołaniu odczynnikami Dragendorffa powierzchnie uzyskanych, ostro odcinających się plam mierzono przy pomocy przejrzystego papieru milimetrowego i porównywano graficznie na prostej wzorcowej z powierzchniami zajęтыми przez znane ilości równolegle prowadzonego wzorcowego roztworu siarczanu sparteiny. Proces wmywania alkaloidów prowadzony przez ok. 12 godz. przebiegał wyczerpująco, a wyniki były powtarzalne i bardzo dokładne. Ilość odzyskanego wzorca wynosiła 100 %.

Dokładność obu metod, w szczególności bardzo czulej metody planimetrycznej na bibule kationitowanej, jak również przeprowadzona przez nas wyczerpująca ekstrakcja surowca pozwoliły na uchwycenie stałych drobnych różnic między ilością sparteiny uzyskiwaną w przechodzącym z parą wodną destylacie (średnio 0,804 %), a oznaczeniami w pierwotnym wyciągu, zawierającym kompleks alkaloidów żarnowca (średnio 0,889). Różnica ta wynosząca 0,085 % określa zawartość ubocznych nielotnych alkaloidów surowca i jest zgodna — w granicach błędu doświadczalnego — z wartością oznaczonej planimetrycznie pozostałości po destylacji sparteiny z parą wodną, wynoszącej średnio 0,1 %.

Z przeglądu metod literaturowych ekstrakcji żarnowca wynika, że najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami były: 2 % kwas trójchlorooctowy (11), 5 % kwas solny (18), 2 % kwas siarkowy (2, 15), etanol (1, 15) i chloroform (3).

W pracy naszej zastosowaliśmy dwukrotną ekstrakcję 2 % kwasem siarkowym, ogrzewanie mieszaniny na ciepłej łaźni wodnej i wytrząsanie mechaniczne. Zabieg ten okazał się w porównaniu z przeprowadzoną również ekstrakcją alkoholową korzystniejszy, gdyż prowadził do całkowitego wyczerpania surowca ze składników alkaloidowych.

Obecność poza sparteiną towarzyszących zasad oraz ich zróżnicowane właściwości polarne potwierdzono orientacyjnie na drodze chromatograficznej. Po nakropieniu roztworów chloroformowych sumy alkaloidów na paski bibuły Schl. Sch. 2043 b/Mgl, impregnowanej acetonowym roztworem formamidu (8:2), rozwinięciu chromatogramów słabo polarną mieszaniną cykloheksanu i dwuetyloaminy (9:1) i wywołaniu ich odczynnikami Dragendorffa zmodyfikowanym wg Amelinka, lub wodnym 0,06 % roztworem jodoplatynianu potasowego, uwidaczniały się 3 centra alkaloidowe: posuwająca się z czołem rozpuszczalnika wyraźna plama sparteiny zidentyfikowana wg wzorca, wyraźna mała plamka na starcie alkaloidu silniej polarnego oraz bardzo lekko rysująca się, rozmyta plama w środkowej części paska. W destylacie przechodzącym z parą wodną stwierdzono obecność jednej tylko plamy czołowej. Chromatogramy spryskiwane specyficznym dla amin odczynnikiem Ehrlicha (próba na ewent. obecność występującej w surowcu tyraminy i hydroksytyraminy) nie wywoływały się.

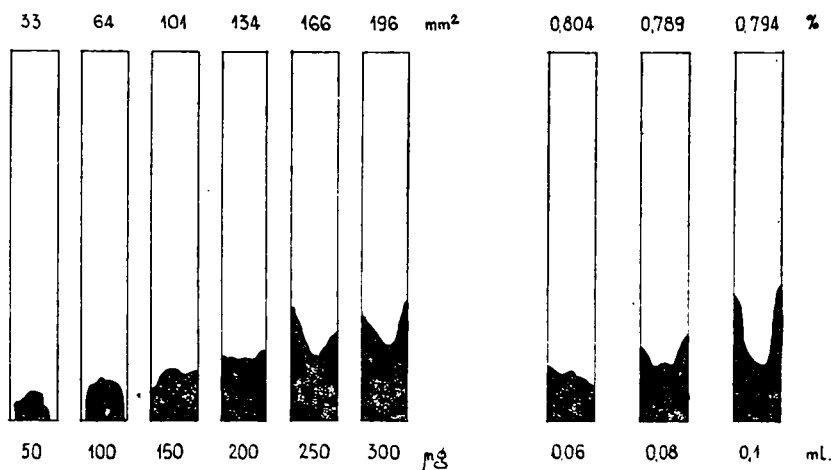
Surowiec, którym posługiwano się w pracy dostarczony był przez „Herbapol” w postaci grubo pociętego ziela, zmielonego przez nas na miazgi proszek. Ponieważ wszystkie uzyskane wyniki przeliczono na suchą masę, wilgoć w surowcu oznaczono przez suszenie próby do stałej wagi nad P_2O_5 , wynosi ona średnio 6,53 %.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Oznaczanie sparteiny

5 g drobno sproszkowanego surowca zwilżono 10 ml 2 % H_2SO_4 i pozostawiono na 1 godz. do napęcznienia. Po dodaniu dalszych 90 ml kwasu mieszaninę ogrzewano przez 1/2 godz. na ciepłej łaźni wodnej, wytrząsano mechanicznie przez 20 min. i odstawiono na 12 godzin. Roztwór zdekantowano ostrożnie znad osadu, a pozostałość poddano ponownej ekstrakcji nową porcją 100 ml 2 % H_2SO_4 . Połączone wyciągi wraz z osadem zalkalizowano w kolbie destylacyjnej 20 % NaOH i oddestylowano sparteinę z parą wodną, aż do zaniku obecności alka-

loidu (próbą z J_2 w KJ), zbierając destylat do odbieralnika zawierającego 2 ml 10 % H_2SO_4 . Kwaśny destylat zagęszczono na łaźni wodnej do małej objętości, przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej na 25 ml i uzupełniono wodą do kreski. Po nakropleniu odpowiednich ilości roztworu na romby (tab. 1, I = 0,06 ml, II = 0,08 ml) wymywano alkaloid na paski bibuły kationitowanej przy pomocy 0,02 M CH_3COOH , prowadząc równolegle próbę kontrolnego 0,5 % roztworu etanolowego pięciowodnego siarczanu sparteiny, na której podstawie wykonano wykres prostej wzorcowej. (Czas trwania procesu wynosił około 12 godzin).



Ryc. 1

Ryc. 1. przedstawia przykładowo 6 pasków wzorcowych i 3 paski uwiadczeniające po wywołaniu odczynnikiem Dragendorffa strefy zajęte przez alkaloidy oznaczanego roztworu. Wyniki oznaczeń zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

Nr próby	Zawartość sparteiny w 5 g surowca					
	mg			%		
	I	II	średnio	I	II	średnio
1	40,19	39,46		0,804	0,789	
2	40,19	40,32	40,19	0,804	0,806	0,804
3	39,47	41,54		0,789	0,831	

Inną porcję zagęszczonego destylatu przechodzącego z parą wodną, uzyskanego jak wyżej z przeróbki 5 g surowca, przeniesiono ilościowo do rozdzielacza, zalkalizowano 10 % $NaOH$ i wydzieloną zasadę ekstra-

howano (3×100) chloroformem. Połączone wyciągi chloroformowe odmyto zimną wodą, osuszono bezwodnym Na_2SO_4 , rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej na 50 ml. Próbki 20 ml (= 2 g surowca) z dodatkiem 10 ml bezwodnika octowego miareczkowano 0,05 M kwasem nadchlorowym w roztworze lodowatego kwasu octowego wobec fioletu krystalicznego, do zmiany zabarwienia fioletowego na niebiesko-zielone. 1 ml 0,05 M kwasu nadchlorowego odpowiadał 0,005859 g sparteiny.

Równocześnie przeprowadzono kontrolne oznaczenie miareczkowe wzorca. W tym celu odważono 0,1200 g pięciowodnego siarczanu sparteiny (= 66,6 mg wolnej zasady), rozpuszczono w wodzie i po zakalizowaniu 10 % NaOH zasadę wyczerpano chloroformem. Z odmytego i osuszonego roztworu chloroformowego przeniesionego ilościowo do kolbki miarowej na 50 ml pobierano 10 ml próby (= 13,32 mg zasady; przy innej naważce — 20,00 mg), które miareczkowano zmianowanym roztworem kwasu nadchlorowego. Wyniki oznaczeń sparteiny w surowcu i w substancji wzorcowej wg metody miareczkowej zestawiono w tab. 2.

Tabela 2

Oznaczana ilość surowca	Oznaczana ilość wzorca	Zużycie HClO_4	Zawartość sparteiny			Błąd oznaczenia
g	mg	ml	mg	%	średnio %	%
2,0000		2,36	14,793	0,740		
2,0000		2,29	14,278	0,714	0,726	
2,0000		2,31	14,469	0,723		
	13,32	2,43	13,206	99,14		— 0,86
	20,00	3,38	19,862	99,31	99,22	— 0,69

Sprawdzenie dokładności metody przeróbki surowca

Do 5 g oznaczonego uprzednio surowca dodano określoną ilość wzorcowej sparteiny, mieszaninę przerobiono i przygotowano roztwory chloroformowe do ponownych pomiarów wg wyżej opisanego toku. Wyniki uzyskane przy pomocy obu metod ilościowych przed i po dodaniu wzorca, określające jego procentowy odzysk, podano w tab. 3. Rubryka pierwsza zawiera wyniki średnie z tabel 1 i 2, nie przealiczone na suchą masę, a więc niższe o zawartość wilgoci w surowcu. czyli o 6,53 %.

Tabela 3

Metoda oznaczania	Średnia zawartości sparteiny w 5 g surowca	Dodano sparteiny	Średnia oznaczeń sparteiny	Ilość odzyskana	
	mg			mg	%
Planimetrycz.	37,58	34,29	71,86	34,28	100,00
Miareczkowa	33,98	17,14	50,97	16,99	99,09

Oznaczanie alkaloidów ubocznych

Ługi alkaliczne pozostałe w kolbie po oddestylowaniu sparteiny z parą wodną wytrząsano porcjami z ok. 1 l eteru. Odmyty wodą i osuszony rozpuszczalnik zagęszczono do małej objętości, zadano etanolem i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej na 25 ml. Odpowiednie ilości roztworu alkoholowego (I = 0,15 ml, II = 0,2 ml) oznaczono planimetrycznie na bibule kationitowanej. Wyniki obliczone wg krzywej wzorcowej sparteiny zestawiono w tab. 4.

Tabela 4

Nr próby	Zawartość alkaloidów ubocznych w 5 g surowca					
	mg			%		
	I	II	średnio	I	II	średnio
1	5,60	4,50		0,112	0,09	
2	5,60	5,10	5,15	0,112	0,102	0,103
3	5,50	4,50		0,110	0,09	

Oznaczanie sumy alkaloidów

Ekstrakcja kwaśna. 5 g drobno sproszkowanego surowca zwilżono 10 ml 20 % H_2SO_4 , pozostawiono na 1 godz. do napęcznienia, dodano dalsze 90 ml kwasu, ogrzewano przez 1/2 godz. na łaźni wodnej, wytrząsano mechanicznie i odstawiono na 12 godz. Roztwór zdekantowano a osad poddano ponownej ekstrakcji 100 ml 2 % H_2SO_4 . Połączone wyciągi i popłucz z surowca alkalizowano 20 % NaOH i porcjami wytrząsano z chloroformem do całkowitego wyczerpania alkaloidów. Odmyty wodą i osuszony bezwodnym Na_2SO_4 rozpuszczalnik zagęszczono do małej objętości, a pozostałość przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej.

Ekstrakcje alkoholowe. Dwie próby po 10 g surowca utartego dokładnie z mieszaniną antyoksydacyjną, tj. z 0,5 g $NaHSO_3$ i 0,2 g kompleksonu III (sól dwusodowa kw. wersenowego) przenie-

siono do gilz ekstrakcyjnych aparatu Soxhleta i wyczerpywano przez 20 godz. alkoholem, do ujemnej reakcji z odczynnikiem Mayera i J_2 w KJ, stosując dla jednej próby alkohol metylowy a dla drugiej etylowy. Alkoholowe wyciągi zakwaszono 2 % H_2SO_4 i rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałości kwaśne barwy zielono-brunatnej oczyszczono przez wytrząsanie z eterem, eter sprawdzony na obecność alkaloidów odrzucono (ujemna reakcja) a warstwy wodne po zalkalizowaniu 10 % NaOH wytrząsano kilkakrotnie z chloroformem. Połączone, odmyte wodą i wysuszone wyciągi chloroformowe zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych.

Uzyskane ze wszystkich 3 ekstrakcji roztwory chloroformowe użyto do oznaczeń na bibule kationitowanej. Oznaczenie miareczkowe wykonano z roztworem chloroformowym uzyskanym z ekstrakcji kwaśnej. Wyniki zestawiono w tab. 5.

Tabela 5

Rodzaj ekstrakcji	Metoda planimetryczna			Metoda miareczkowa	
	%			%	
	I	II	średnio		średnio
Woda kwaśna	0,888	0,890	0,889	0,796 0,802 0,790 0,788	0,794
Metanolowa	0,823	0,813	0,818		
Etanolowa	0,834	0,785	0,809		

PIŚMIENNICTWO

1. Jaminet Fr.: Application au dosage des alcaloides et des amines du genêt à balais (*Sarothamnus scoparius* L.), Pharm. Acta Helv. **34**, 571, 1959.
2. Jaretsky R., Axer B.: Beiträge zur Pharmakognosie von *Sarothamnus scoparius* und Paralleldrogen. Arch. Pharm. **272**, 152, 1934.
3. Jaminet Fr.: Contribution à l'étude biochimique du genêt à balais.. II. Au sujet de la dégradation de la spartéine dans les graines en voie de maturation, Journ. Pharm. Belg. **9**, 9, 1954.
4. Paris R., Faugueras G.: Application de l'électrophorèse à la séparation des alcaloides et des dérivés flavoniques chez quelques Légumineuses, Ann. Pharm. Franc. **13**, 395, 1955.
5. Winterfeld K., Nitzsche F.: Über die Nebenalkaloide von *Spartium scoparium*, Arch. Pharm. **278**, 393, 1940.
6. Kattelhack D., Rink M., Winterfeld K.: Side Alkaloides of *Sarothamnus scoparium*, Arch. Pharm. **277**, 1, 1954; wg Chem. Abstr. **94**, 12499, 1955.

7. Pluge P. C., Rauwerda, Arch. Pharm. **234**, 685, 1896.
8. Valeur A., C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. **167**, 26, 1918.
9. Hörhammer L., Wagner H.: Zur Pharmakognosie der Blüten von *Sarothamnus scoparium* und *Spartium junceum*, Dtsch. Apoth. Ztg. **35**, 884, 1958.
10. Sabetay S., Ann. Chim. analyt. appl. **21**, (3), 1939.
11. Bourget P., Bull. Sci. pharmacol. **36**, 235, 1929.
12. Schindler H.: Beitrag zur Sparteinbestimmung und zur Papierchromatographie von Zubereitungen des Besenginsters, Dtsch. Apoth. Ztg. **98**, 832, 1958.
13. Drabent Z., Podeszewski Z.: Oznaczanie sparteiny za pomocą soli Reineckiego, Farmacja Polska, **2**, 32, 1957.
14. Wierzchowski Z.: A New Method for the Determination of the Alkaloid Content of Peas. Biochem. Z. **293**, 192, 1937; wg Chem. Abstr. **32**, 620, 1938.
15. Kaczmarek F.: Kolorymetryczna metoda oznaczania sparteiny w żarowcu przy pomocy soli Reineckiego, Biul. Inst. Rośl. Lecz. **4**, 275, 1957.
16. Witkowski H.: Bibuła kationitowana. II. Zastosowanie do oznaczania alkaloidów, Chem. Anal. **4**, 317, 1959.
17. Lewandowski A., Witkowski H.: Ilościowe oznaczanie alkaloidów tytoniu za pomocą bibuły kationitowanej, Chem. Anal. **6**, 551, 1961.
18. Hirt J., Journ. Pharm. Chim. **10**, (8), 111, 145, 1929.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе предложено метод количественного определения алкалоидов ракитника: доминирующего спартеина и посторонних алкалоидов аналитически до сих пор не обработанных. Применен планиметрический метод на катионитированной бумаге и объемный анализ в безводной среде.

В кислом экстракте сырья определена сумма алкалоидных оснований (таб. 5), а также спартеин после его перегонки с водяным паром (таб. 1, 2). Вычисленная разница составляла содержание посторонних алкалоидов и равнялась около 10 %. Это количество согласно с результатами планиметрических определений посторонних алкалоидов оставшихся в маточном растворе после перегонки спартеина.

Сравнивая методы количественных определений — планиметрического и объемного анализа, констатируется что планиметрический метод хотя требующий точно стандартизованной катионитированной бумаги представляет более точный метод для определения небольших количеств алкалоидов — даже ниже 0,1 %.

Простой и быстрый в использовании объемный анализ ведет к пониженным и немного ошибочным результатам.

SUMMARY

The paper deals with a new quantitative method of estimating alkaloids of common broom, i.e. dominant alkaloid — sparteine and minor alkaloids which have not been investigated yet. Planimetric method on cation-exchange paper and titrimetric method in nonaqueous solution, were used. The total of alkaloid bases and the content of sparteine, separated by steam distillation, were estimated in the acidic extraction of plant material (Tables 1 and 2). The calculated difference, constituting 10 % of minor alkaloids, was in agreement with the results of the planimetric determinations, obtained in mother liquors from which sparteine had been separated by steam distillation (Table 4).

Comparing the results of both methods, it was found that the planimetric method is very accurate and makes it possible to determine even small amounts of alkaloids (below 0.1 %), although it is time-consuming and requires very accurately standardized cation-exchange paper. The titrimetric method, although simple and quick, is charged with small error and gives lower results.

