

DE BEPALING VAN KLEINE HOEVEELHEDEN HYOSCYAMINE EN SCOPOLAMINE IN GENEESKRUIDEN *

door

J. W. DE BRUYN en J. G. VAN HALL **

The estimation of small quantities of hyoscyamine and hyoscyne in medicinal herbs

A method is described by which the alkaloids, after paperchromatographic separation, are determined according to Häussler's method, which is based on the formation of a coloured complex of the alkaloid with tropeoline oo, which can be extracted with chloroform. Thus quantities of 10-150 μ g can be determined.

An indicator strip was used to locate the alkaloids. The hyoscyamine and hyoscyne spots were cut out separately and were extracted with the required liquids without previous elution. A correction of 10% gives satisfactory results.

An examination of a series of indicators has shown that hyoscyamine can be estimated with the aid of methylorange at pH 8.0. Hyoscyne does not react in this case, so that an estimation without previous chromatographic separation is possible if a titrimetric determination is also carried out. The presence of other alkaloids has an adverse effect on the results. However, for selection purposes this method is usable, e.g. when selecting *Datura* samples for high hyoscyne content. It may be possible that mixtures of other alkaloids can also be estimated by using an indicator with which only one of the alkaloids reacts.

Inleiding

Bij het onderzoek van geneeskruiden met mydriatische alkaloiden is het vaak van belang hyoscyamine en scopolamine afzonderlijk te bepalen. Dit is b.v. het geval bij de waardebepaling van sommige *Datura*- en *Duboisia*-soorten, die scopolamine als hoofdalkaloïde bevatten. Bij het onderzoek van de wortels van *Scopolia lurida* is een afzonderlijke bepaling van hyoscyamine en scopolamine niet altijd noodzakelijk, maar moet men wel de som van deze twee alkaloiden kunnen bepalen naast het bij-alkaloïde cuscohygrine, dat steeds wordt aangetroffen (1).

De nieuwere methodes voor de afzonderlijke bepaling van genoemde alkaloiden berusten in de regel op papierchromatografische scheiding, gevolgd door elutie van de vlekken en colorimetrische bepaling of door vergelijken van de vlekken met standaardhoeveelheden na behandeling met verdund Dragendorff-reagens.

Drey en Foster (3) elueren de alkaloiden van het papierchromatogram met ethanol en passen vervolgens de reactie van Vitali-Morin toe. Met standaardhoeveelheden vinden zij op deze wijze slechts ca. 70 pCt. terug. Door tevens het totale alkaloidgehalte volgens een klassieke methode te bepalen, kunnen de gevonden gehalten gecorrigeerd worden.

Romeike (7) behandelt het chromatogram met verdund Dragendorff-reagens, schudt de alkaloiden bevattende papierstrookjes, na bevochtiging met ammonia, uit met chloroform en bepaalt de

*) Overdruk uit Pharmaceutisch Weekblad 94 (1959): 262—269.

**) Instituut voor de Veredeling van Tuinbouwgewassen te Wageningen.

alkaloïden kwantitatief met behulp van het dimethylaminobenzaldehyde-reagens volgens de methode van F. H. L. van O s. Met hoeveelheden vanaf 100 μ g werden goede resultaten verkregen.

De rechtstreekse planimetrische bepaling na besproeien van het chromatogram met een geschikt reagens werd o.a. toegepast door B ü c h i en S c h u m a c h e r (2) voor de bepaling van strychnine en brucine. Hyoscyamine en scopolamine kunnen natuurlijk op dezelfde wijze worden bepaald. Deze werkwijze geeft alleen goede resultaten wanneer alle omstandigheden bij de bepaling nauwkeurig worden gestandaardiseerd.

Het leek ons van belang na te gaan of er een eenvoudige, goed reproduceerbare methode te vinden is, waarmee kleine hoeveelheden hyoscyamine en scopolamine naast elkaar kunnen worden bepaald, al of niet na chromatografische scheiding. Als basis voor het verdere onderzoek werd de methode van H ä u s s l e r (5) gekozen. Deze auteur gebruikt tropeoline 00 voor de bepaling van zeer kleine hoeveelheden alkaloiden. De methode berust op de eigenschap van alkaloiden (en verschillende andere basen) met bepaalde kleurstoffen verbindingen te vormen, die met organische oplosmiddelen uitschudbaar zijn en dus colorimetrisch bepaald kunnen worden. Een dergelijke methode werd in 1940 voor het eerst beschreven door P r u d h o m m e (6), die op deze wijze kinine bepaalde met behulp van eosine.

Wij hebben getracht de methode van H ä u s s l e r toe te passen na papierchromatografische scheiding. Eerst werd nagegaan op welke wijze de alkaloiden van het chromatogram het best geëluëerd kunnen worden, vervolgens werden bepalingen gedaan met plantaardig materiaal en tenslotte werd onderzocht, of het mogelijk is met een bepaalde indicator één van de alkaloiden afzonderlijk te bepalen zonder chromatografische scheiding.

Elutie van de alkaloiden

Standaardoplossingen met hyoscyamine en scopolamine werden afdalend gechromatografeerd met n-butanol-ijsazijn 10 : 1, verzaaid met water, op papier S & S 2043 b Mgl (40 x 10 cm). Na drogen werden de chromatogrammen behandeld met verdund Dragendorff-reagens, of werd een indicatiestrook gebruikt om de plaats van de vlekken vast te stellen. De uitgeknipte papierstroken werden vervolgens in reageerbuisen geschud met verschillende oplosmiddelen (6 pCt. azijnzuur, alcohol + enkele dr. 0,1 N. HCl, aceton + enkele dr. 0,1 N.HCl, etc.) bij verschillende temperaturen en gedurende verschillende tijden. Ook werd de elutie-methode volgens S t e i n e g g e r en O c h s n e r (8) toegepast, waarbij het papierstrookje onder aan een capillair wordt bevestigd, waardoor de elueervloeistof stroomt. Wij elueerden volgens deze methode met methanol en met butanol-ijsazijn-water.

In geen enkel geval gelukte het om meer dan 90% van de alkaloiden terug te vinden. Vaak was het resultaat lager en klopten de duplo's slecht. De uitgetrokken papiersnippers werden steeds volledig nagewassen en de verkregen vloeistof niet gefiltreerd om ver-

liezen door adsorptie te voorkomen. Na droogdampen werden de alkaloiden in het residu bepaald volgens het onderstaande voorschrift van Häussler, in zoverre gewijzigd, dat de alkaloiden onder verwarming werden opgenomen in 3 ml bufferoplossing en 3 ml water.

Bepaling volgens Häussler:

Meng 3 ml waterige alkaloid-oplossing in een scheitrechter met een gelijk volumen acetaatbuffer pH 4,6. Voeg 3 ml verzadigde waterige tropeoline 00-oplossing toe en schud 4 maal uit met 5 ml zuivere, liefst vers gedestilleerde chloroform. Verzamel de geelgekleurde chloroform in een maatkolfje van 25 ml, ervoor zorgend, dat geen spoor van de waterige laag meeloopt. Voeg 2 ml van een mengsel van 1 ml geconcentreerd zwavelzuur en 99 ml methanol toe en vul aan met chloroform. Indien bij toevoeging van het zurreagens een troebeling optreedt, verdwijnt deze weer door nogmaals 2 ml. toe te voegen. De ontstane rood-violetten oplossing wordt in een geschikte colorimeter gemeten bij 545 m μ . Vooraf wordt een ijklijn gemaakt met hoeveelheden tussen 10 en 150 μ g.

Het uitschudden met chloroform voerden wij als volgt uit: 1 min. schudden, \pm 10 min. laten staan en dan langzaam af laten lopen. Filtratie geeft verliezen door adsorptie en werd dus vermeden.

De kleur van de oplossing blijft verscheidene dagen constant, hetgeen een groot voordeel betekent. De ijklijnen voor hyoscyamine en scopolamine zijn verschillend (fig. 1). Wij vonden bij gelijke hoeveelheden voor hyoscyamine een ongeveer 2x zo grote extinctie als voor scopolamine.

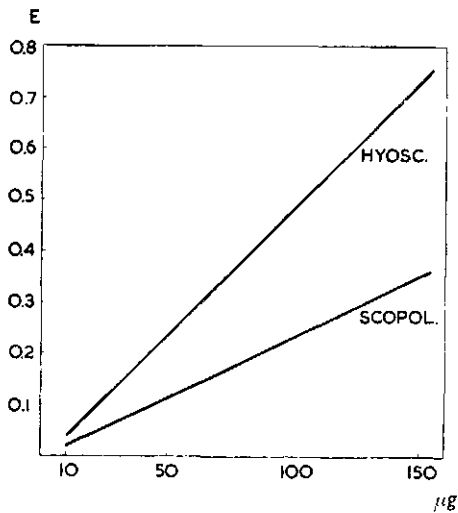


Fig. 1

Ijklijnen voor de bepaling van hyoscyamine en scopolamine vlg. Häussler (1 cm-cuvet).

Volgens Häussler (persoonlijke mededeling) vormt tropeoline 00 met alkaloiden 1,1- of 1,2-complexen. Men kan dus aannemen dat 1 mol. hyoscyamine zich verbindt met 2 mol. tropeoline en 1 mol. scopolamine met 1 mol. tropeoline. Dit verschil wordt blijkbaar veroorzaakt door de epoxy-groep van het scopolamine. Overigens is over de theoretische achtergrond van deze reacties nog weinig bekend.

De blancowaarde is gering en behoeft niet bij elke bepaling opnieuw vastgesteld te worden. Wel hebben wij geconstateerd, dat bij het gebruik van oudere oplossingen deze blancowaarde sterk kan toenemen, wanneer schimmelvorming begint op te treden in de bufferoplossing en/of de tropeoline-oplossing. Deze toename was al duidelijk waarneembaar, wanneer met het blote oog nog geen schimmelvlokjes waren te zien. Het is dus wel van belang met niet te oude oplossingen te werken en van tijd tot tijd een controlebepaling van de blancowaarde en van een standaardoplossing te doen. Ook de kwaliteit van de gebruikte chemicaliën beïnvloedt de hoogte van de extinctie.

Nadat gebleken was, dat met geen enkele van de gebruikte elutie-methodes 100 pCt. werd teruggevonden, hebben wij de papierstroken van het chromatogram (zonder Dragendorff, dus gebruik makend van een indicatiestrook) zonder te elueren in een scheidrecter gebracht en geschud met 3 ml water, 3 ml bufferoplossing, etc. (zie voorschrift vlg. H ä u s l e r). Deze eenvoudige methode gaf ca. 90 pCt. opbrengst en werd bij het verdere onderzoek steeds toegepast.

Met standaardoplossingen werden op deze wijze na chromatografie de volgende resultaten verkregen, waarbij een correctie van + 10 pCt. werd aangebracht.

	Gebruikte hoeveelheid in μg	Teruggevonden hoeveelheid in μg	Afwijking in pCt.
hyoscyamine	28	28	0
	46	44	-4
	74	74	0
	92	88	-4
	92	95	+3
	110	110	0
	112	107	-4
scopolamine	42	40	-5
	84	83	-1

Bepaling in *Datura*- en *Scopoliamonsters*

Datura-monsters werden bepaald volgens de methode van D i j k - s t r a (4), *Scopolia*-wortels volgens een voorschrift, dat in grote lijnen overeenkwam met de methode van de Pharm. Helv. V. bij *Radix Belladonnae*, waarbij van 4 g werd uitgegaan. Aansluitend hierop werden de alkaloiden op de volgende wijze afzonderlijk bepaald:

Schud de getitreerde vloeistof na alkalisch maken met ammonia 2x uit met 10 ml chloroform, de chloroformopl. 2x met 10 ml 0,04 N. HCl en de waterige opl. weer 2x met 10 ml chloroform en overmaat ammonia. Na afdestilleren van de chloroform wordt afgeblazen, het residu in weinig chloroform opgelost en ook dit weer verdampt en afgeblazen. Los het residu onder verwarming op in 96% alcohol spoel over in een reageerbuis met ingeslepen glazen stop, waarvan de tarra (met kooksteentje) bekend is en damp de oplossing in een kokend waterbad in tot 0,3 à 0,4 ml (bij *Scopolia*-monsters tot ± 2 ml); weeg de inhoud na bekoeeling. Breng van deze oplossing 25 mm³ met behulp van een micropipetje op het chromatogram en plaats op elk chromatogram van één van de oplossingen nogmaals 25 mm³, waardoor een indicatiestrook verkregen kan worden. Spoel de rest van de alkaloidenoplossing in een kolfje over met water, dat geneutraliseerd is op

mengindicator. Na titratie met 0,01 N. HCl uit een semi-microburet is de totale hoeveelheid alkaloiden per 25 mm³ te berekenen, wanneer men vooraf bepaald heeft hoeveel mg uit het pipetje loopt. Na chromatografie volgens de eerder omschreven methode wordt gedroogd, de indicatiestroom met verdund Dragendorff-reagens behandeld en de alkaloiden van het onbehandelde deel van het chromatogram afzonderlijk bepaald door de uitgesneden papierstroken in een scheitrechter te brengen, 3 ml water en 3 ml acetaatbuffer pH = 4.6 toe te voegen en verder het voorschrift vlg. Häussler (blz. 264) uit te voeren vanaf: „Voeg 3 ml verzadigde waterige tropeoline 00-oplossing toe.....” Bij de gevonden hoeveelheden alkaloiden wordt 10 pCt. opgeteld.

Het voordeel van een tweede titratie is, dat het uitschudden met chloroform etc. niet kwantitatief behoeft te worden uitgevoerd; door emulsievorming is dit trouwens in vele gevallen moeilijk te bereiken. Enkele uitkomsten zijn samengevat in tabel 1.

De hogere uitkomsten volgens titratie van de monsters 2 en 3 zijn te verklaren door de aanwezigheid van bij-alkaloiden (in hoofdzaak met R_F ca. 0,90). Het gehalte aan cuscohygrine in monster 4, berekend uit de titratie en de gevonden som, bedraagt 0,75 pCt.

Theoretisch moet het mogelijk zijn zonder chromatografische scheiding een mengsel van hyoscyamine en scopolamine te bepalen

Tabel 1. Gevonden percentages hyoscyamine en scopolamine na chromatografie, gevolgd door bepaling volgens Häussler.

	hyosc.	scopol.	hyosc. + scopol.	vlg. titratie
	pCt.	pCt.	pCt.	pCt.
1. <i>Datura stramonium</i> (herba)	0,180 0,160	0,020 0,026	0,200 0,186	
gem.	0,170	0,023	0,193	0,191
2. <i>Datura metel</i> var. <i>muricata</i> (herba)	0,022 0,026	0,189 0,209	0,211 0,235	
gem.	0,024	0,199	0,223	0,258
3. <i>Datura innoxia</i> (herba)	0,083 0,075	0,066 0,067	0,149 0,142	
gem.	0,079	0,067	0,146	0,168
4. <i>Scopolia lurida</i> (wortels)	0,650	0,070	0,720	2,660

door een titratie en een bepaling volgens Häussler. Scopolamine geeft immers een ca. $\frac{1}{2}$ x zo grote extinctie als een gelijke hoeveelheid hyoscyamine; hoe lager dus de extinctie bij een bepaald totaalgehalte, des te hoger is het gehalte aan scopolamine. Wij hebben getracht enkele *Datura* monsters op deze manier te bepalen, waarvoor een geschikte hoeveelheid van de te titreren oplossing bij de bepaling volgens Dijkstra na verdampen van de alcohol gebruikt werd voor een bepaling vlg. Häussler. De resultaten waren in dit geval onbevredigend. Bij *Datura stramonium* is het gehalte aan scopolamine laag, zodat kleine bepalingfouten bij de omrekening sterk vergroot worden en bij *D. metel* en *D. innoxia* is berekening in het geheel niet mogelijk door de aanwezigheid van een onbekende hoeveelheid bij-alkaloiden.

Proeven met andere indicatoren ter bepaling van één van de alkaloiden zonder chromatografische scheiding

Met kleine hoeveelheden (50—100 μg) hyoscyamine en scopolamine werd nagegaan of het mogelijk is één van deze alkaloiden te bepalen, zonder dat het andere stoort. Hiertoe werden proeven genomen met een aantal indicatoren en andere kleurstoffen in verzadigde oplossing en gemengd met bufferoplossingen met pH 4,6; 6,0; 8,0 en soms ook 3,6 en 9,2. Met elk van de alkaloiden afzonderlijk werd nu nagegaan in welke gevallen een verbinding van het alkaloid met de kleurstof gevormd wordt, die met chloroform uitgeschudbaar is. De volgende kleurstoffen werden onderzocht: tropeoline 00, tropeoline 0, tropeoline 000, broomthymolblauw, bromfenolblauw, thymolblauw, bromkresolgroen, methyloranje, gentiaanviolet, fuchsine, methyleenblauw, Martius-yellow, safranine, thionine, nijlblauwsulfaat, Magdalarot, methylgroen, congorood en neutraalrood. Verschillende andere kleurstoffen kwamen niet in aanmerking wegens te geringe oplosbaarheid in water. Van de bovengenoemde viel een aantal af, doordat de kleurstof zelf geheel met chloroform werd uitgeschud of een te hoge blancowaarde gaf. Verschillende andere waren niet bruikbaar, omdat beide alkaloiden ongeveer op dezelfde wijze reageerden. Het beste resultaat werd ten slotte verkregen met methyloranje bij pH 8,0. Hierbij wordt de hyoscyamine-indicatorverbinding met chloroform uitgeschud, terwijl dit met scopolamine niet of nagenoeg niet het geval is. Dit bleek o.a. uit de extinctie, die verkregen werd bij de bepaling van 50 μg hyoscyamine + 200 μg scopolamine; zonder scopolamine was de extinctie dezelfde. De gevoeligheid van deze methode is voldoende groot (fig. 2). Het is ons niet gelukt een indicator te vinden, die alleen met scopolamine een complex vormt.

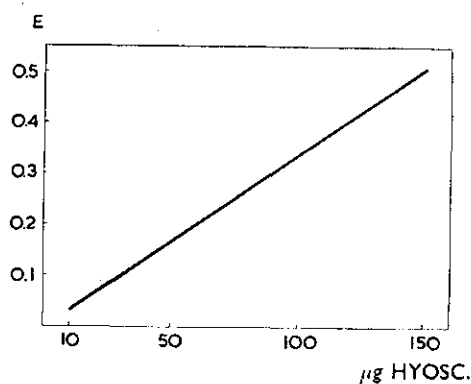


Fig. 2

IJklijnen voor de bepaling van hyoscyamine m.b.v. methyloranje bij pH 8,0 (1 cm-cuvet).

Wij hebben nagegaan in hoeverre deze methode bruikbaar is voor de bepaling van *Datura*-monsters.

De bepaling werd als volgt uitgevoerd:

Spoel de alcoholische oplossing van de alkaloiden, die bij de bepaling volgens Dijkstra verkregen wordt, kwantitatief over met alcohol in een maatkolfje van 20 ml; vul aan, pipetteer 1 ml, damp deze droog en los het residu onder verwarming op in chloroform. Bepaal in deze oplossing het hyoscyamine vlg. Häussler, echter met behulp van methyloranje en een bufferoplossing met pH 8,0 i.p.v. de door hem gebruikte tropeoline 00 en buffer pH 4,6. De extinctie wordt gemeten bij 535 m μ . De overblijvende 19 ml alcoholische oplossing wordt na indampen tot \pm 2 ml en verdunnen met water getitreerd met 0,01 N. HCl uit een semimicroburet. Uit het titercijfer kan berekend worden hoeveel alkaloiden 1 ml bevat. Het verschil tussen het totale gehalte en het percentage hyoscyamine levert het gehalte aan scopolamine met eventueel bij-alkaloiden.

De *Datura*-monsters van tabel 1 gaven bij deze bepaling de volgende uitkomsten:

1. 0,156 — 0,151 pCt. hyoscyamine
2. 0,036 — 0,038 pCt. „
3. 0,089 — 0,083 pCt. „

Cuscohygrine reageert ook met methyloranje, zodat *Scopolia*-monsters niet op deze manier bepaald kunnen worden. De methode is bruikbaar voor de selectie van *Datura*-monsters op hoog scopolamine-gehalte. Ligt de verhouding tussen de beide alkaloiden ongunstig, zoals bij *D. stramonium*, dan is de bepaling van het scopolamine minder nauwkeurig; het gehalte berekend uit titratie en bovenstaande uitkomsten (no. 1) is $0,191 - 0,154 = 0,037$ pCt. en volgens tabel 1 is het 0,023 pCt. *D. stramonium* is echter als scopolamine-producent onbelangrijk. De te hoge hyoscyamine-uitkomst van monster 2 (*D. metel*) is waarschijnlijk veroorzaakt door bij-alkaloiden, die bij het *D. innoxia*-monster blijkbaar in mindere mate stoorden.

Het is dus noodzakelijk, alvorens deze methode toe te passen bij de selectie van een bepaalde *Datura*-soort, eerst na te gaan of de afwijking t.o.v. de papierchromatografische bepaling niet te groot is.

Het is niet uitgesloten, dat ook mengsels van andere alkaloiden bepaald kunnen worden door gebruik te maken van een indicator, waarmee slechts één van de alkaloiden reageert.

Samenvatting

Hyoscyamine en scopolamine kunnen na papierchromatografische scheiding worden bepaald volgens de methode van Häussler. Voordelen van deze werkwijze zijn de grote gevoeligheid en — vergeleken bij de Vitali-Morin-reactie — de bestendigheid van de kleur.

Bij onderzoek van een reeks indicatoren is gebleken, dat hyoscyamine bepaald kan worden met behulp van methyloranje bij pH 8,0. Scopolamine reageert in dit geval niet, zodat een bepaling zonder chromatografische scheiding mogelijk is, wanneer tevens een titrimetrische bepaling gedaan wordt. De aanwezigheid van bij-alkaloiden veroorzaakt minder goede resultaten. Voor selectiedoeleinden is deze methode echter bruikbaar, b.v. bij de selectie van *Datura*-monsters op hoog scopolaminegehalte.

Het is niet uitgesloten, dat ook mengsels van andere alkaloiden bepaald kunnen worden door gebruik te maken van een indicator, waarmee slechts één van de alkaloiden reageert.

Literatuur

1. De Bruyn, J. W., *Pharm. Weekblad* 92, (1957) 547.
2. Büchi, J. en Schumacher, H., *Pharm. Acta Helv.* 33, (1958) 274.
3. Drey, R. E. A. en Foster, G. E., *J. Pharm. Pharmacol.* 5, (1953) 839.
4. Dijkstra, S. P., *Pharm. Weekbl.* 86, (1951) 129.
5. Häussler, A., *D. Apoth. Z.*, 97, (1957) 729.
6. Prudhomme, M. R. O., *J. pharm. chim.* 1 (S9), (1940) 8.
7. Romeike, A., *Pharmazie* 7, (1952) 496.
8. Steinegger, E. en Ochsner, F., *Pharm. Acta Helv.* 30, (1955) 345.