

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA, FACULTAD DE
MEDICINA, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON,
Apdo. POSTAL 1.563, MONTERREY, MEXICO

ANALISIS RAPIDO DE ALCALOIDES RELACIONADOS CON EL
ACIDO TROPICO POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

Fernández Alonso, M y Pachuca Cerdá, F.

RESUMEN

Se presenta un estudio acerca de la extracción y posterior análisis cuantitativo de alcaloides derivados del ácido trópico, aplicable tanto a productos vegetales como a preparaciones farmacéuticas. La extracción en el caso de muestras vegetales se lleva a cabo cuantitativamente, percolando una solución 0'1N de H_2SO_4 , a través de una columna que contiene la muestra molida. Los productos farmacéuticos se alcalinizan y se extraen las bases libres (alcaloides) con cloroformo, a pH controlado, analizándolas por cromatografía de gases. Con el método propuesto se logran extracciones de los alcaloides con recuperaciones superiores al 95 % y no se observa descomposición interna durante el proceso cromatográfico.

SUMMARY

A study is presented about the extraction and quantitative analysis of tropane alkaloids, aplicable both to plant and farmaceutical products. The extraction step for plant tissues is carried out quantitatively, grounding the sample, packing it in a glass column and eluting the alkaloid salts with a H_2SO_4 , 0'1N solution. Alkaloids are extracted with chlorophorm from medicinal products, at basis pH and quantified by gas liquid chromatography. By this method reconveries are better than 95 % for the alkaloids and no internal degradation of samples is observed during the chromatographic process.

INTRODUCCION

Los alcaloides comprenden un grupo de bases nitrogenadas que presentan propiedades semejantes a los de los álcalis y que aparecen como principios activos en algunas variedades de plantas y hongos. (1, 2).

La característica más notable de estos compuestos es su actividad fisiológica que con frecuencia altera el normal funcionamiento del organismo produciendo efectos muy variados según la naturaleza del alcaloide y la dosis administrada. Así algunos de estos compuestos incluso en bajas dosis son altamente venenosos, como los alcaloides Ergot, otros son estimulantes, creando en muchos casos estados esquizofrénicos temporales o permanentes tales como la cocaína, morfina, el L.S.D. y en otros casos tienen aplicaciones farmacológicas ventajosas como anestésicos, vasodilatadores, etc. (Atropina, escopolamina, reserpina, etc.).

Algunos de los alcaloides de uso comercial se producen en forma sintética mientras que otros se extraen directamente de los vegetales que los contienen. Este es el caso de la Atropina que se extrae de la *Atropa Belladonna* y de plantas del género *Stramonium*, abundantes en México y en Centro y Suramérica, donde se encuentra junto con la Escopolamina.

Al hacer un estudio de los métodos más frecuentemente utilizados para la determinación del contenido de alcaloides y aplicarlos a las plantas del género *Stramonium*, nos encontramos con resultados poco satisfactorios, en cuanto a los porcentajes de recuperación de la muestra, así como a falta de especialidad en algunos métodos analíticos y descomposición parcial de las muestras en otros. Esto nos llevó a realizar el presente estudio tendiente a desarrollar un método de extracción y de análisis cuantitativo de estos alcaloides que fuese rápido y confiable.

Los métodos analíticos existentes actualmente se pueden clasificar en dos tipos generales, volumétricos (3) y cromatográficos (4, 5). Los métodos volumétricos se basan en reacciones ácido-base y son altamente inespecíficos; ya que proporcionan solamente el contenido total de alcaloides sin determinar su naturaleza y composición relativa. Los métodos cromatográficos que se han usado han sido muy variados, se han desarrollado métodos de cromatografía líquida en papel y capa fina (6, 7) que adolecen de los inconvenientes de ser lentos, tediosos y poco precisos por lo que actualmente se ven substituidos por métodos instrumentales como cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.).

Los métodos instrumentales más utilizados han sido hasta ahora los de cromatografía de gases (8). Estos métodos tal como normalmente se utilizan presentan el inconveniente de que al ser los alcaloides polares y de peso molecular elevado, se necesitan temperaturas relativamente altas para eluirlos y en muchos casos los compuestos se descomponen parcialmente con el consiguiente error en su determinación cuantitativa. Para eliminar dicho problema se han propuesto métodos para la información de derivados más volátiles que los alcaloides puros (9), el inconveniente de estos métodos radica en que se prolonga el procedimiento de preparación de la muestra con las consiguientes pérdidas de tiempo y gastos en reactivos y adicionalmente no siempre se evita la descomposición de los compuestos si no se toman otras precauciones, tales como utilizar columnas más cortas.

En el presente trabajo se presentan alternativas para lograr una extracción eficiente y un análisis cuantitativo y rápido por cromatografía de gases en alcaloides relacionados con el ácido trópico sin necesidad de formar derivados.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

Las separaciones por cromatografía gaseosa se llevaron a cabo en un cromatógrafo varian 3700, con un detector de ionización de flama en una columna con OV-17 al 3 % en chromosorb W-HP de 80/100 mallas y de 50 cm. de longitud, tratada después de su separación con hexametil disilazano. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 220°C y la de la columna en 185° (Isotérmico); como gas acarreador se utilizó nitrógeno a un flujo de 25 ml/minuto.

Materiales y Reactivos

Las muestras de plantas fueron de arbustos *Datura Stramonium*, conocidas vulgarmente como Toloache y se obtuvieron del estado de Sianola en México.

Los medicamentos ensayados se obtuvieron en farmacias.

Como patrones de los alcaloides se utilizaron los clorhidratos correspondientes a Homatropina y Escopolamina y el sulfato de atropina obtenidos de Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, USA.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, sin ninguna purificación especial.

PROCEDIMIENTOS

Extracción de los alcaloides:

a) A partir de preparaciones farmacéuticas: 1 ml de solución o 1 gr. de muestra se lleva hasta pH 9 añadiéndole una solución tampón de fosfatos. En estas condiciones los alcaloides adquieren la forma de bases libres y se extraen a continuación con 3 porciones de cloroformo de 30 ml. cada una, se juntan los extractos y se aforan a 100 ml. La solución así preparada está lista para inyectar al cromatógrafo.

b) A partir de muestras vegetales: se pesan 3 gr. de muestra seca al aire y molida y se empacan en una columna de vidrio de 50 cm. X 2'5 cm. en la forma convencional, poniendo un poco de algodón abajo y arriba de la muestra. A continuación se extraen los alcaloides haciendo pasar de 80 a 100 ml., de una solución de H₂SO₄ 0'1N y Na Cl al 0'5 %. Una vez toda la solución ha percolado, se alcaliniza llevándola a pH 9 y se extrae como se indicó en el apartado a).

Análisis cualitativo y cuantitativo:

Los alcaloides se identificaron en las muestras por el método de adición patrón y se cuantificaron por el método del estándar externo, comparando las áreas de cada muestra con las obtenidas al inyectar en las mismas condiciones una solución patrón de concentración conocida.

RESULTADOS Y DISCUSION

Eficacia del método de extracción:

El método de la extracción propuesto para el caso de muestras vegetales, se aplicó a diferentes partes de la planta, raíz, tallos, hojas y frutos. Para comprobar su eficiencia en la recuperación de alcaloides se hicieron dos tipos de ensayos, por un parte se hicieron pruebas de recuperación en función de la cantidad de solución extractante añadida para percolar por la columna, comprobándose que a partir de unos 60 ml. de solución añadidos en adelante, no aumentaba la cantidad de alcaloides eluidos en ninguna de las muestras de diferentes partes de la planta, por lo que se fijó como cantidad de extractante entre 80 y 100 ml. dándole un margen extra de seguridad. Adicionalmente se hicieron preparados sintéticos añadiendo los alcaloides en forma de solución de clorhidratos en cantidades semejantes a como se encuentran normalmente en la naturaleza, (0'10-1 %), a tejido molido de diferentes partes de una planta (Mora), que no contiene alcaloides, una vez añadidos se homogeneizó la mezcla y se empacó en un columna extrayéndola por el método aquí propuesto y analizando cada muestra posteriormente. Se repitió seis veces el ensayo para cada alcaloide y para mezclas de ambos, encontrándose un porcentaje de recuperación en todos los casos superior al 97 % para la Atropina y al 95 % para la Escopolamina.

La extracción líquido-líquido de los alcaloides libres a pH controlado, tanto de medicamentos como de los extractos de plantas se comprobó analizando soluciones patrón y productos farmacéuticos tanto por el método volumétrico recomendado por la Farmacopea Americana, como por cromatografía de Gases, encontrándose en todos los casos extracciones prácticamente totales.

Cromatografía de gases:

La figura 1 muestra el cromatograma obtenido de una muestra patrón que contiene Homatropina, Atropina y Escopolamina, en las condiciones analíticas previamente indicadas. Como puede observarse la separación y forma de los picos, así como la ausencia de picos intermedios, indican que la columna y las condiciones propuestas son excelentes para la separación de este tipo de compuestos. Se ensayaron diferentes fases, desde polares (D.E.G.S.), hasta no polares (Metil Silicona), en diferentes proporciones encontrándose que la que producía menos coleo y buena separación, era la de una polaridad intermedia (OV 17) en baja proporción (3 %).

Para evitar la descomposición de las muestras, además de usar una fase no muy polar, se acortó el tamaño de la columna a una longitud tal que permitiese la separación sin una larga permanencia de los compuestos dentro de ella. Adicionalmente se silanizó la fase estacionaria, después de empaclarla, inyectándole 5 a 6 porciones de 10 microlitros de hexametildisilazano en las mismas condiciones del análisis.

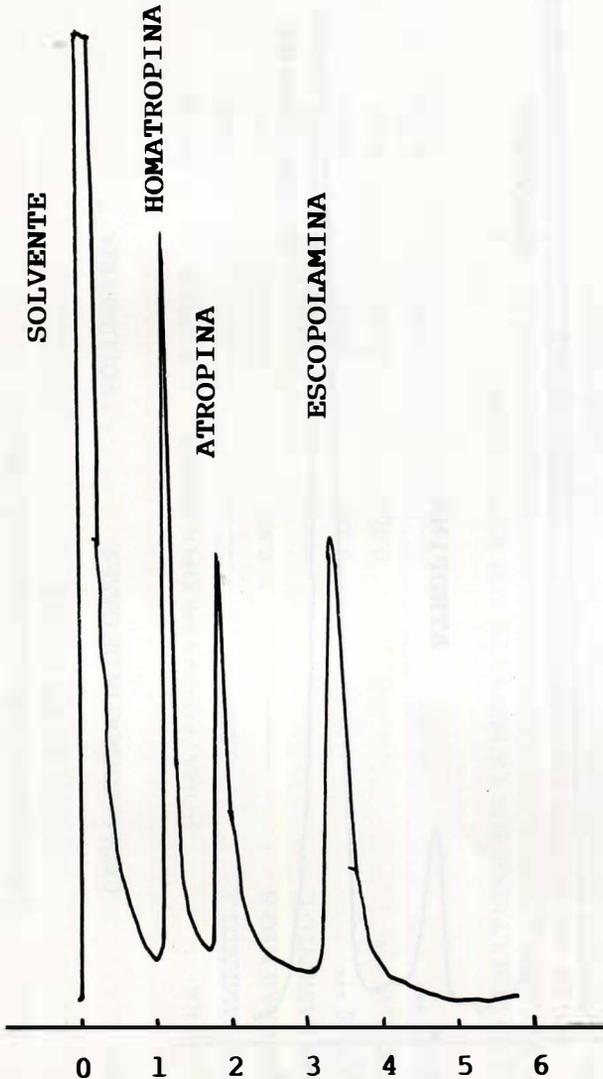


FIG. 1 CROMATOGRAMA DE MUESTRA PATRON DE ALCALOIDES
(VER CONDICIONES EN EL TEXTO)

La figura 2 muestra el cromatograma típico del extracto de una de las muestras de origen vegetal, en concreto semillas del fruto de la *Datura Stramonium*. En el cromatograma se observan perfectamente los picos correspondientes a la Atropina y a la Escopolamina y la ausencia de Homatropina que no se encuentra en muestras de origen vegetal.

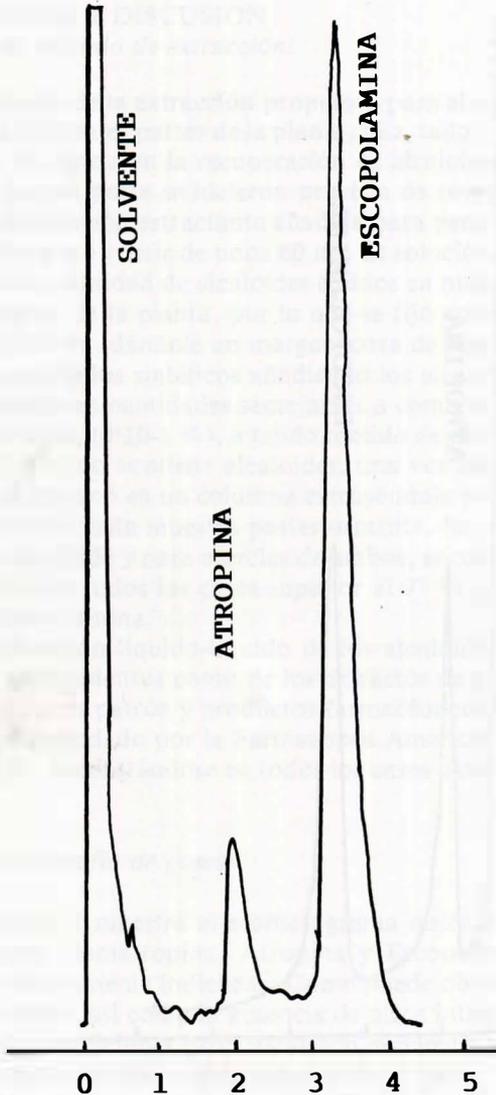


FIG. 2

CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE A EL ANALISIS DE SEMILLAS DE DATURA STRAMONIUM.

Tabla I.- Comparacion de métodos de análisis de alcaloides en medicamentos y muestras vegetales.

CONTENIDO DE ALCALOIDES * (%)
C. DE GASES

| TIPO DE MUESTRA: | CROMATOGRAFIA DE GASES | | VOLUMETRIA | | |
|------------------|------------------------|--------------|------------|-------|---------|
| | HOMATROPINA | ESCOPOLAMINA | ATROPINA | TOTAL | TOTAL |
| MEDICAMENTO A | 0.980 | ----- | ----- | 0.980 | 1.020 |
| MEDICAMENTO B | ----- | 0.970 | ----- | 0.970 | 0.980 |
| MEDICAMENTO C | ----- | ----- | 1.030 | 1.030 | 1.002 |
| FLORES *** | ----- | 0.029 | 0.055 | 0.084 | 0.105** |
| SEMILLAS *** | ----- | 0.011 | 0.056 | 0.067 | 0.073** |
| HOJAS *** | ----- | ----- | 0.038 | 0.038 | 0.041** |

(*) LOS RESULTADOS SON LA MEDIA DE SEIS REPETICIONES.

(**) VALORES APROXIMADOS OBTENIDOS CONSIDERANDO QUE EL TOTAL DE ALCALOIDES VALORADOS ERA DE ESCOPOLAMINA.

(***) MUESTRAS DE DIFERENTES PARTE DE DATURA STRAMONIUM.

NOTA: Los medicamentos A, B y C son productos comerciales constituidos por las sales de los correspondientes alcaloides en solución acuosa al 1 %.

En la Tabla I se muestra una comparación de resultados del análisis de muestras de medicamentos y de diferentes partes de la planta *Datura Stramonium* llevados a cabo por el método volumétrico oficial de la farmacopea Americana y por el método de cromatografía de gases aquí propuesto. Como puede observarse en el caso de preparaciones farmacéuticas ambos métodos son altamente coincidentes. En el caso de extractos de plantas el método volumétrico no es específico y sólo da una estimación del total de los alcaloides, por lo que el total indicado debe tomarse como aproximado, sin embargo sigue existiendo buena coincidencia entre el total obtenido por ambos métodos para este tipo de muestras.

Tabla II.- Precisión del método analítico.

| MUESTRA PATRON | CONCENTRACION UTILIZADA (%) | COEFICIENTE DE VARIACION * (% Desviación Patrón) |
|----------------|-----------------------------|--|
| HOMATROPINA | 1.80 | 1.82 |
| ATROPINA | 2.00 | 2.51 |
| ESCOPOLAMINA | 2.50 | 3.52 |

(*) TRES REPETICIONES DE CADA MUESTRA

La precisión del método analítico se estudió extrayendo y analizando muestras patrón de los diferentes alcaloides individualmente. En la Tabla II se dan los resultados obtenidos para tres repeticiones de la misma muestra. Como puede observarse las desviaciones patrón relativas o coeficientes de variación son muy aceptables y del orden que cabe esperarse de un método de cromatografía de gases. Adicionalmente cabe mencionar que no se observan picos debido a descomposiciones de los alcaloides y en todos los casos la recuperación obtenida después del análisis cromatográfico fue indicativa de la ausencia de cualquier descomposición apreciable.

CONCLUSIONES

El método de extracción propuesto para el caso de muestras vegetales es fácil de llevar a cabo, rápido, altamente cuantitativo y poco susceptible de producir alteración o descomposición de los alcaloides.

La extracción líquido-líquido a pH controlado es un método muy eficiente y también rápido para la recuperación de los alcaloides en una forma directamente inyectable al cromatógrafo.

El análisis por cromatografía de gases con una columna corta y una fase semipolar en baja concentración como la propuesta en este trabajo evita los costos y tediosos pasos de derivación previa y permite separar cuantitativamente los alcaloides sin que se descompongan.

Este método pudiera ser igualmente aplicable a otros alcaloides del Tropano diferentes a los aquí estudiados, tales como cocaína y alquilaminas, esta parte está actualmente en estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, J., BENDUSH, M., CHASE, R., GENNARO, E., GIBSON, R., GRANBERG, H., HARVEY, A., KING, J., MARTIN, B., SWINYARD, J., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15.^a Edición, Board Members, New York, 1975.
2. ROBERT, J., STEWART, R. y CASERIO, M., "Química Orgánica", Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A., México. 1974.
3. "The United States Pharmacopeia", 19.^a Edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975.
4. HEFTMANN, E., "Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic And Electrophoretic Methods", 3.^a Edición, Ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York. 1975.
5. HORWING, W. Editor, "Official Methods of Analysis Of The Association of Official Analytical Chemists, Po. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington, DC. 20044. 1984.
6. STEINEGGER, E. And PHOKAS, G., Pharm. Acta Helv., 31: 284 y 330. 1956.
7. SAINT-FIRMIN, A., PARIS, R., j. Chromatogr., 31: 252. 1967.
8. QUARCIA, U., CADINI, Co., TUCCI, B., Boll. Chim. Farm. 107: 737. 1968.
9. WINDHEUSER, J., SUTTER, J., SARRIF, A., J. Pharm. Sci., 61: 1.311. 1972.