

**Determinazione della stricnina e della brucina nei semi
di *Strychnos Nux Vomica***

MARIA A. CIASCA RENDINA e CORRADO GALEFFI

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Viene proposto un nuovo metodo per il dosaggio della stricnina nella polvere di semi di Noce Vomica, che può essere effettuato su 1 g di droga.

Gli alcaloidi totali vengono estratti con cloroformio dalla polvere della droga mescolata a secco con allumina basica.

L'estratto alcaloidico totale è separato su colonna di gel di silice tamponato a pH 7 come fase stazionaria ed etere saturo di tampone come eluente.

Gli alcaloidi minori vengono così subito separati.

La stricnina si separa quindi usando come eluente etere-cloroformio saturo di tampone a pH 7.

La brucina viene eluita successivamente con cloroformio saturo di tampone a pH 7 o con metanolo.

La separazione stricnina-brucina è perfettamente quantitativa.

Il dosaggio viene effettuato spettrofotometricamente.

Summary (*Strychnine and brucine determination in Strychnos Nux Vomica seeds*). — A new method for strychnine dosage in powdered *Nux Vomica* seeds is indicated; this method may be employed using only 1 g of drug.

Total alkaloids were extracted with chloroform from the powdered drug to which basic alumina had been added in absence of water.

The total alkaloidic extract was applied on a silica gel column buffered at pH 7 and eluted with ether saturated with buffer. Minor alkaloids were thus immediately separated.

Strychnine was then separated using chloroform-ether saturated with buffer at pH 7 as eluent.

Finally, brucine was eluted with chloroform saturated with buffer at pH 7, or with methanol.

The separation of strychnine from brucine is absolutely quantitative.

The dosage is performed spectrophotometrically.

I semi di *Strychnos Nux Vomica* sotto forma di estratti o di tinture sono utilizzati in medicina come cardiotonici e neurotonici.

Tra le farmacopee che includono questa droga ricordiamo la Farmacopea Ufficiale italiana VII, il Codex 1965, la British Pharmacopoeia 1968, la Pharmacoepa Helvetica V 1959, e la Nederlandse Pharmacoepa 1966.

L'attività della droga è da attribuire principalmente alla stricnina presente nella percentuale di circa 1% e solo in minima parte alla brucina ed agli altri alcaloidi minori che costituiscono 1.4% circa della droga stessa.

La brucina presenta infatti un'attività biologica pari a 1/50 di quella della stricnina, e proprietà diverse presentano gli alcaloidi minori: pseudostricnina, vomicina, icajina, novacina, α e β colubrina e pseudobrucina.

Un sistema di separazione di tutti gli alcaloidi della *Strychnos Nux Vomica* è stato recentemente proposto da MARINI-BETTÒLO *et al.* (1968).

Abbiamo pertanto desiderato di vedere se fondandoci sugli stessi principi e cioè sul diverso coefficiente di ripartizione e sul diverso pK dei vari alcaloidi fosse possibile stabilire un metodo quantitativo semplice per la separazione e la determinazione della stricnina e della brucina nella *Strychnos Nux Vomica* ai fini della utilizzazione per la farmacopea.

I metodi analitici proposti dalle Farmacopee per il dosaggio della stricnina e della brucina sono simili tra loro e consistono in un prolungato esaurimento della polvere di semi, previamente trattata con alcali, nella separazione della frazione alcaloidea, laboriosa a causa delle emulsioni, e nella successiva ossidazione della brucina a cacotelina con acido nitrico e nitroso e finalmente nel dosaggio della stricnina per titolazione acidimetrica secondo la Farmacopea Ufficiale italiana VII, il Codex 1965, la Pharmacoepa Helvetica 1959, e la Nederlandse Pharmacoepa 1966, oppure spettrofotometricamente secondo la British Pharmacopoeia 1968.

Per separare la stricnina dalla brucina sono stati finora proposti numerosi metodi cromatografici ed elettroforetici (WALIGORA, 1955; SARSUNOVA, TOLGYESSI & MAJER, 1960; CHICH-CHUNG CH'EN, SHU-LIANG CHANG & JEN-LAI TAI, 1966; WALDI, SCHNACKER & MUNTER, 1961; GIACOPELLO, 1965; GRANDOLINI *et al.*, 1964; OHLWEIVER DE SILVEIRA, 1956). Dei procedimenti cromatografici per la separazione quantitativa della stricnina e della brucina, quello su strato sottile presenta il problema del recupero della sostanza, laborioso data la lentezza della eluizione. Anche i procedimenti di cromatografia su colonna di allumina o di Kieselguhr non danno risoluzione soddisfacente oppure, ad esempio il metodo di FISCHER &

Gharbo (1958), richiedono l'uso di più di una colonna. D'altra parte i metodi di dosaggio di stricnina e di brucina in presenza l'una dell'altra fondati su metodi spettrofotometrici (Luchner, Bessler & Luchner, 1967), di spettrometria di RMN (Plat & Poisson, 1964), titrimetrici e colorimetrici (Semila Tulus, 1965); Shvidkii & Kramarenko, 1966; El Ridi & Khalifa, 1953), non danno risultati soddisfacenti e spesso sono troppo complicati.

Il metodo da noi proposto si divide in due fasi: la prima è l'estrazione degli alcaloidi totali dalla droga e la seconda la separazione della stricnina e la sua determinazione quantitativa.

L'estrazione degli alcaloidi dalla droga è stata effettuata secondo il metodo di Poetke & Kinze (1965) da noi modificato. Il metodo consiste nell'eluizione con cloroformio dei semi polverizzati ed alcalinizzati con soda, mescolati a secco con allumina basica. In queste condizioni si ha un'estrazione quantitativa, mentre l'estrazione con cloroformio e con metanolo eseguita a caldo in continuo direttamente sulla polvere, proposta da vari AA., richiede la purificazione successiva della frazione alcaloidica, che comporta notevoli difficoltà pratiche anche dal punto di vista quantitativo.

Per realizzare la separazione della stricnina dagli altri alcaloidi, abbiamo utilizzato, come si è detto, la diversa ripartizione di stricnina e brucina nelle coppie di solventi etere/acqua e cloroformio/acqua, nonché la diversa basicità di questi due alcaloidi rispetto a quelli del gruppo pseudostricnina-vomicina.

Si usa gel di silice con tampone a pH 7 (vedi parte sperimentale), come fase stazionaria e come eluenti prima etere/tampone a pH 7 per gli alcaloidi minori e la miscela etere-cloroformio 8:2 saturi di tampone a pH 7 per la stricnina. La brucina è eluita successivamente con cloroformio saturo di tampone, a pH 7, o più rapidamente, con metanolo.

L'uso del tampone invece della sola acqua ha anche la funzione di aumentare i volumi di ritenzione (*).

L'andamento della separazione è stato seguito sia fotometricamente che cromatograficamente su strato sottile sulle varie frazioni opportunamente concentrate, impiegando come rivelatore il reattivo di Dragendorff.

Come reattivo specifico della sola brucina si può utilizzare la nota colorazione rossa con acido nitrico, come pure la colorazione rossa, invece che arancio, su lastra di silice con il reattivo di Dragendorff, da noi osservata quando sia stata impiegata dietilamina come eluente.

In tal modo si riesce a stabilire il volume necessario per l'eluizione dei due alcaloidi ed effettuare le relative determinazioni per via spettrofotometrica.

(*) Jensen & Svendsen (1950) utilizzano Kieselguhr ed etere non saturo di acqua per eluire la stricnina, e cloroformio per la brucina.

Questo metodo permette di determinare quantitativamente la stricnina a partire da 1 g di droga secca.

Il procedimento proposto risulta, rispetto ai metodi riportati dalle Farmacopee, molto semplificato ed inoltre la accennata separazione degli alcaloidi secondari consente di dare valori più precisi alla determinazione della stricnina.

PARTE SPERIMENTALE

I solventi utilizzati sono Carlo Erba R.P.

Il cloroformio è stabilizzato con 0,5 % di etanolo assoluto.

Gli adsorbenti cromatografici sono Merck. Il gel di silice Merck Darmstadt (0,05-0,2 mm) è stato lavato con acido cloridrico 2N e poi con acqua fino a pH neutro ed attivato per 8h a 120° C. Tampone fosfato a pH 7 secondo Sørensen e Clark. La polvere di semi di *Strychnos Nux Vomica* è quella del commercio.

Estrazione della droga

1 g di polvere di semi di *Strychnos Nux Vomica* è alcalinizzato con 4 ml di NaOH al 15 % e mescolato in un mortaio con 20 g di allumina basica attività I. La polvere secca così ottenuta viene caricata in una colonna avente sul fondo un setto poroso GI ed eluita con cloroformio fino a che l'eluato, opportunamente concentrato, non dia più la reazione con il reattivo di Dragendorff. Occorrono circa 500 ml di solvente che vengono successivamente portati a secco nel vuoto in evaporatore rotante.

Separazione degli alcaloidi

10 g di gel di silice mescolati con 100 ml di tampone a pH 7 si dispongono in una colonna avente sul fondo un setto poroso GI (\varnothing cm 1,8, h cm 30) e vi si fanno passare altri 50 ml di tampone.

La colonna viene poi equilibrata facendovi passare 100 ml di etere saturo dello stesso tampone.

A questo punto si carica sulla colonna l'estratto di *Strychnos*, ripreso con 2 ml di miscela costituita da etere-cloroformio 1:1 saturo di tampone fosfato, e si continua l'eluizione con etere-tampone raccogliendo frazioni di 50 ml ognuna. Nelle prime frazioni passano gli alcaloidi del gruppo della pseudostricnina e della vomicina insieme alle impurezze. Dopo alcune frazioni prive di alcaloidi (vedi Fig. 1) si prosegue l'eluizione con etere-cloroformio 8:2 (saturi di tampone); si ha allora l'eluizione totale della stric-

nina, mentre facendo passare anche 2 litri dello stesso solvente non si ha spostamento della brucina dalla colonna.

La brucina viene spostata invece quantitativamente con cloroformio-tampone, o più rapidamente, con metanolo.

L'andamento della separazione è seguito sia spettrofotometricamente (vedi Fig. 1) che per cromatografia su strato sottile di gel di silice G (solvente: benzolo-etile acetato-dietilamina 7:2:1) usando come rivelatore

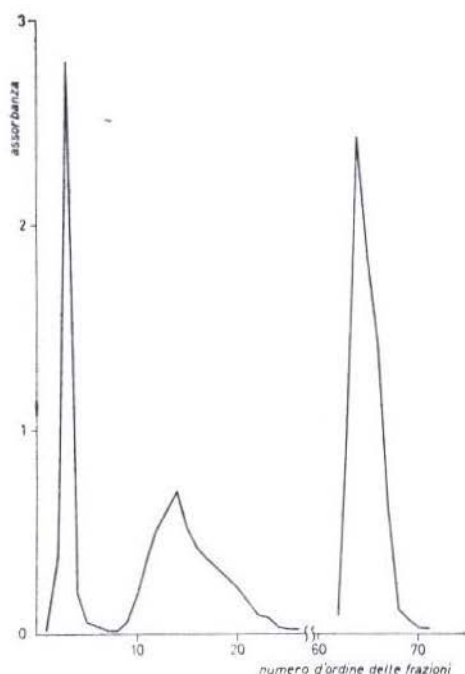


Fig. 1. — Eluizione di stricnina e brucina dalla colonna di gel di silice.

Assorbimento delle frazioni della colonna (volume delle singole frazioni: 50 ml). Frazioni: 1-6 a 260 nm (solvente etere saturo di tampone); 7-26 a 256 nm (solvente etere-cloroformio 8:2 saturo di tampone); successive a 268 nm (solvente cloroformio saturo di tampone).

il reattivo di Dragendorff. Con questo reattivo la stricnina dà il colore giallo arancio proprio degli alcaloidi, mentre la brucina, per interferenza con la dietilamina del solvente, dà un colore rosso intenso. In questo solvente lo R_f della brucina è 0,20 e quello della stricnina 0,33.

In parallelo alla separazione degli alcaloidi della droga è stata effettuata una separazione di una miscela quantitativamente nota di stricnina e brucina: il recupero, determinato spettrofotometricamente, è stato del 100 %.

Per la stricnina si è determinato il valore di ϵ 17200 in etere-cloroformio 8:2 saturi di tampone a pH 7 a 256 nm, e per la brucina il valore di 13300 a 268 nm in cloroformio saturo di tampone.

10 maggio 1969.

BIBLIOGRAFIA

- CHICH-CHUNG-CH'EN, SHU-LIANG CHANG & JEN-LAI TAI, 1966. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **13**, 131; *Chem. Abstrs.*, **65**, 8673 (1968).
- EL RIDI, M. S. & K. KHALIFA, 1953. *Proc. Pharm. Soc. Egypt. Sci. Ed.*, **35**, 31; *Chem. Abstrs.*, **51**, 8368 (1957).
- FIESCHER, R. & S. GHARBO, 1958. *Pharm. Zentralhalle*, **97**, 101.
- GIACOPELLO, D., 1965. *J. Chromatog.*, **19**, 172.
- GRANDOLINI, G., C. GALEFFI, E. MONTALVO, C. G. CASINOVI & G. B. MARINI-BETTÒLO, 1964. In: *Thin layer chromatography*, G. B. Marini-Bettòlo, Ed., Elsevier, Amsterdam, London, New York.
- JENSEN, K. B. & A. B. SVEDSEN, 1950. *Pharm. Acta Helv.*, **25**, 31.
- LUCHNER, M., O. BESSLER & R. LUCHNER, 1967. *Pharm. Zentralhalle*, **106**, 223.
- MARINI-BETTÒLO, G. B., F. DELLE MONACHE, A. GELABERT DE BROVETTO & E. CORIO, 1968. *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **51**, 185.
- OHLEWEIVER DE SILVEIRA, F., 1956. *Tribuna Pharm.*, **24**, 86; *Chem. Abstrs.*, **51**, 5950 (1957).
- PLAT, M. & J. POISSON, 1964. *Ann. Pharm. Franc.*, **22**, 603.
- POETKE, W. & W. KINZE, 1965. *Pharm. Zentralhalle*, **104**, 489.
- SARSUNOVA, M., J. TOLGYESSY & J. MAJER, 1960. *Pharm. Acta Helv.*, **35**, 271.
- SEMILA TULUS, 1965. *Istanbul Univ. Eczacilik Fak. Mecmuasi*, **1**, 170; *Chem. Abstrs.*, **65**, 8673 (1966).
- SHVIDKIL, B. I. & V. P. KRAMARENKO, 1966. *Pharmatsevt. Zh.*, **21**, 20; *Chem. Abstrs.*, **65**, 15159 (1966).
- WALDI, D., K. SCHNACKER & F. MUNTER, 1961. *J. Chromatog.*, **6**, 61.
- WALIGORA, B., 1955. *Zeszyty Nauk. Univ. Jagiel. Ser. Nauk Mat. Przyrod.*, **3**, 83; *Chem. Abstrs.*, **52**, 7925 (1958).

Controllo della genuinità dei campioni commerciali di pepe mediante l'analisi elettroforetica degli estratti proteici

In commercio il pepe, specialmente se macinato, viene frequentemente miscelato con numerosi altri prodotti quali farine di semi di diversi vegetali (cereali, leguminose, etc.) e polveri ottenute dalla triturazione di gusci legnosi (olive, datteri, palma, nocciole, etc.)¹⁻³.

Nonostante l'esistenza di numerosi metodi chimici di analisi (determinazione dell'umidità, delle ceneri, dell'estratto, degli olii, della piperina etc.) il criterio di purezza più valido resta tuttora l'esame microscopico della polvere o dei grani².

In questa nota è riportato uno studio tendente ad accertare se anche l'esame della composizione elettroforetica degli estratti proteici di pepe possa essere utilizzato come criterio di purezza dei campioni commerciali.

Sono state analizzate tre varietà di pepe nero (Tellicherry prov. India, Madagascar prov. Madagascar, Sarawak prov. Borneo) e due di pepe decorticato (Sarawak prov. Borneo, Muntok prov. Indonesia).

Per l'estrazione delle proteine, un grammo di pepe in polvere (od opportunamente macinato con un macinello Buhler-Uzwill, Swiss, a gradazione 3) fu mescolato con 3 ml di una soluzione di acido acetico 0,05 M (pH = 3) ed agitato dolcemente per 12 ore a temperatura ambiente. La sospensione così ottenuta fu centrifugata a 15.000 r.p.m. in centrifuga International Mod. HR-1 per 30 min ed il supernatante fu nuovamente centrifugato nelle identiche condizioni.

Il frazionamento degli estratti proteici fu effettuato mediante elettroforesi discontinua su gel di poliacrilamide in accordo ad ORNSTEIN⁴ e DAVIS⁵. 120 μ l di

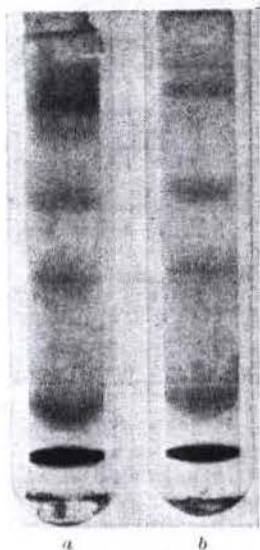


Fig. 1. — Composizioni elettroforetiche degli estratti proteici di pepe decorticato in grani ed in polvere. (Soluzioni di acrilamide al 7,5%; la migrazione elettroforetica è avvenuta dall'alto in basso in un tampone glicina-acido acetico a pH = 2,3).

a: estratto proteico di pepe in grani, b: estratto proteico di pepe in polvere.

estratto proteico furono caricati su gel in una soluzione all'11% (p/v) di saccarosio. Le soluzioni per la preparazione dei gel e dei tamponi sono identiche a quelle riportate nei fogli informativi della Shandon Scientific Company, Londra, per un gel a pH 2,3.

I dettagli sperimentali sono identici a quelli precedentemente descritti da CENTI GROSSI, TASSI MICCO & SILANO⁶.

Le mobilità delle bande proteiche sono riferite a quelle della safranina, usata come marcatore, posta eguale ad 1.

Coma risulta dalla Fig. 1, nelle composizioni elettroforetiche degli estratti proteici di pepe decorticato in grani (A) ed in polvere (B) sono distintamente

evidenziabili otto frazioni proteiche (M_r 0,09; 0,12; 0,16; 0,21; 0,36; 0,53; 0,80; 0,91).

Dal confronto delle composizioni elettroforetiche degli estratti proteici di tre varietà di pepe nero (Tellicherry prov. India, Madagascar prov. Madagascar, Saravak prov. Borneo) e di due varietà di pepe decorticato (Saravak prov. Borneo, Muntok prov. Indonesia) è risultato che tutti questi estratti hanno dal punto di vista qualitativo una composizione analoga a quella riportata in Fig. 1.

Dalla Fig. 2 risulta che le composizioni elettroforetiche di estratti proteici ottenuti da miscele, appositamente preparate, con il 90% di pepe ed il 10% di farine

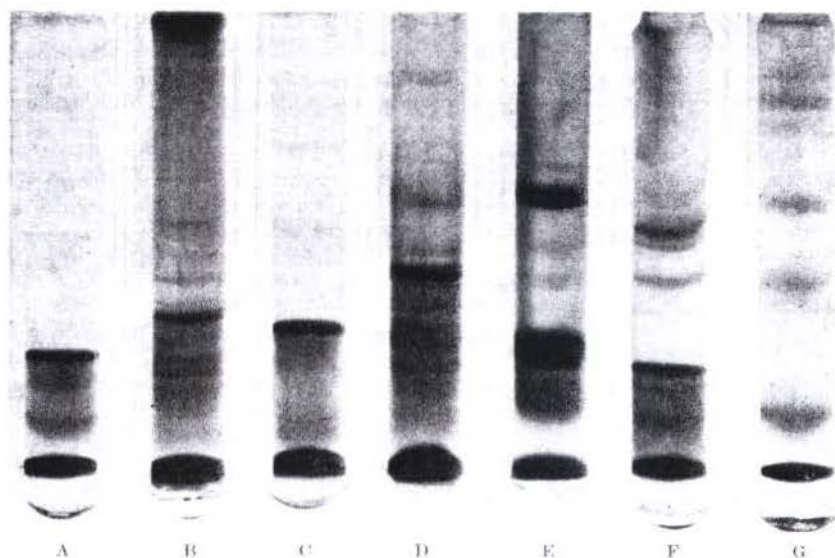


Fig. 2. — Composizioni elettroforetiche degli estratti proteici di campioni di pepe adulterati con farine di cereali e leguminose (Soluzioni di acrilammide al 7,5%; la migrazione elettroforetica è avvenuta dall'alto in basso in un tampone glicina-acido acetico a pH = 2,3).

A: miscela contenente il 10% di farina di frumento, B: miscela contenente il 10% di farina di mais, C: miscela contenente il 10% di sfarinato integrale di lenticchie, D: miscela contenente il 10% di sfarinato integrale di fagioli, E: miscela contenente il 10% di sfarinato integrale di ceci, F: miscela contenente il 10% di sfarinato integrale di piselli, G: pepe genuino.

di cereali (A-B) e di leguminose (C-F) sono del tutto diverse da quella dell'estratto proteico di pepe genuino (G).

Infine, in Fig. 3 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di un campione commerciale di pepe in polvere effettuato secondo il metodo elettroforetico (a) descritto in questa nota e secondo il metodo dell'esame microscopico della polvere (b); come si vede dalla figura, la presenza di bande proteiche diverse da quelle specifiche del pepe, nel primo caso, e di granuli di amido di leguminose e cereali, nel secondo caso, permette di evidenziare nel campione in questione la presenza di farine di semi diverse dal pepe.

Pur tenendo conto dell'opportunità di estendere le analisi ad un maggior numero di varietà di pepe, i dati riportati in questa nota forniscono l'evidenza che l'esame

delle composizioni elettroforetiche degli estratti proteici ottenuti dai campioni di pepe con acido acetico 0,05 M può essere adottato come sensibile criterio di purezza

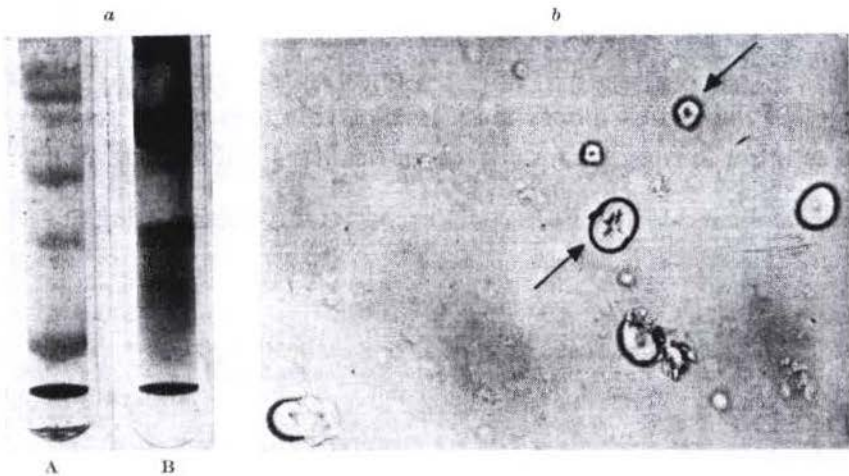


Fig. 3. — Sofisticazione di un campione commerciale di pepe rivelata mediante l'esame elettroforetico e microscopico.

a) Composizione elettroforetica di : pepe genuino (A) e di pepe commerciale (B)

b) Granuli di amido di leguminose e di mais in un campione commerciale di pepe rivelati al microscopio ottico.

dei campioni commerciali di pepe; infatti, la presenza di bande proteiche non «tipiche» del pepe è da considerarsi una prova di sofisticazione del prodotto mediante farine di vegetali non appartenenti al genere piper.

Gli autori ringraziano la Signora L. Benelli per la pregevole assistenza tecnica.

30 luglio 1969.

CLAUDIA MICCO, MARGHERITA GROSSI
Laboratori di Chimica

VITTORIO SILANO
Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ CHARRIER, G. & E. GHIGI. *Chimica Bromatologica e applicata all'igiene degli alimenti*. R. Patron, Bologna 1959, IV Ed., p. 520.
- ² VILLAVECCHIA, V. *Trattato di chimica analitica applicata*. Hoepli, Milano 1937, Vol. II, p. 470.
- ³ SECCHI, G. *I nostri alimenti*. Hoepli, Milano 1967, p. 895.
- ⁴ ORNSTEIN, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
- ⁵ DAVIS, B. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- ⁶ CENTI GROSSI, M., C. TASSI MICCO & V. SILANO. *Phytochemistry*, **8**, 1749 (1969).