

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 209 335

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 26 06 79
(21) PV 4364-79

(11)

(B 1)

(51) Int. Cl. C 07 D 457/00

(40) Zveřejněno 27 02 81
(45) Vydáno 30 11 81

(75)

Autor vynálezu TRTÍK BOHUMIL ing., OPAVA

(54) Způsob dělení a stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu

Způsob dělení a stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu.

Vynález řeší dělení a stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu ve směsi s dihydroergokristinem a dihydroergocorninem.

Způsob stanovení je založen na oddělení dihydro-alfa-ergokryptinu, dihydro-beta-ergokryptinu, dihydroergocorninu a dihydroergokristinu chromatograficky na tenké vrstvě silikagelu Polygram SIL-NHR s použitím dvojnásobného vyvíjení eluční soustavou voda-diethylamin 100:4 a methanol-roztok o pH 9 50:40, detekci oddělených látek roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu a vyhodnocení poměru intenzit skvrn denzitometricky.

Vynález se týká dělení a stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu ve směsi s dihydroergokristinem a dihydroergokorninem (v dihydroergotoxinu). Podle nejnovějších poznatků je z hlediska farmakologických účinků důležité přesné nastavení poměru nejen dihydroergokristinu, dihydroergokorninu a dihydroergokryptinu, ale také přesné nastavení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu. Velice důležitá je tedy vhodná metoda umožňující sledování tohoto poměru, jak při mezioperační provozní kontrole meziproductů, tak při konečném nastavování žádaného poměru ve finálním výrobku.

Ke stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu se dosud používá pouze přístrojově náročná kapalinová chromatografie. Jinými metodami se doposud dihydro-alfa-ergokryptin od dihydro-beta-ergokryptinu a dihydroergokristinu a dihydro-ergokorninu oddělit nepodařilo.

Nově byla vypracována jednoduchá metoda jejíž podstata spočívá v rozdělení všech čtyř složek dihydroergotoxinu nově vyvinutou chromatografií na tenké vrstvě silikagelu, s použitím nových elučních soustav, v detekci roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu s konečným denzitometrickým vyhodnocením.

Jak je patrné je způsob stanovení podle vynálezu založen na chromatografickém oddělení všech čtyř složek dihydroergotoxinu chromatografií na tenké vrstvě silikagelu. Nutným předpokladem pro úspěšné rozdělení je použití chromatografických desek POLYGRAM SIL-NHR fy Macherey Nagel, NSR, neboť na jiných vrstvách buď k dělení nedochází nebo se vrstvy rozlepi. Použitím eluční soustavy voda-diethylamin 100:4 bylo dosaženo výborného rozdílu R_F hodnot dihydro-alfa-ergokryptinu, dihydro-beta-ergokryptinu i dihydroergokorninu ($R_F = 0,125; 0,23; 0,31$). Dihydroergokristin má v této soustavě stejné R_F jako dihydro-beta-ergokryptin. Použitím druhého vyvíjení soustavou methanol-roztok o pH 9 50:40 se dosáhne i oddělení dihydroergokristinu a tím oddělení všech čtyř ergotoxinových alkaloidů. Oddělené alkaloidy tvoří kulaté skvrny dobře denzitometricky hodnotitelné. Doprovodné alkaloidy ostatních skupin či rozkladné produkty mají vyšší R_F a stanovení neruší. Mezi nevýhody patří doba chromatografického dělení, neboť dělení každou soustavou trvá cca 3 až 3 1/2 hodiny. Oddělení všech čtyř alkaloidů s menším rozdílem R_F hodnot oproti dvojímu vyvíjení lze dosáhnout také s použitím jedné soustavy methanol-octan amonný 0,1 M roztok-diethylamin 20:20:1. Vzhledem k menším rozdílům R_F hodnot však nelze provést denzitometrické vyhodnocení, ale pouze semikvantitativní vizuální odhad.

Metoda tedy představuje především novou, jednoduchou metodu identifikace dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu a zpřístupnění ověření totožnosti a semikvantitativního poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu všem průměrně vybaveným laboratořím. Denzitometrické vyhodnocení poměru lze provést s dostatečnou přesností až do poměru dihydro-alfa-ergokryptinu : dihydro-beta-ergokryptinu 20:1 či 1:20.

Další podrobnosti vyplývající z následujících příkladů provedení :

Příklady provedení :

Příklad 1 :

Připraví se takový roztok zkoumané substance ve směsi chloroform-methanol 9 : 1 tak, aby podle předpokládaného množství dihydroergokryptinu bylo v 5 μ l maximálně 2 μ g každého dihydroergokryptinu. /Např.: pro dihydroergotoxin mesylát s poměrem alkaloidů 1:1:1 a s poměrem dihydroergokryptinů 2:1 to je 0,18 % roztok/. Na tenkou vrstvu silikagelu Polygram SIL NH-R /fy Macherey Nagel, NSR/ se potom nanese z tohoto roztoku na 3 starty, ve vzdálenosti alespoň 2 cm, třikrát 5 μ l. Vyvíjí se v nasycené komoře eluční soustavou voda-diethylamin 100 : 4 do vzdálenosti 10 - 12 cm. Potom se deska odvětrá v proudu studeného vzduchu do oschnutí a vyvíjí se v nasycené komoře eluční soustavou methanol-roztok o pH 9 /příprava : 1,24 g kyseliny borité se rozpustí ve 100 ml 1 N NaOH a přidá se 1 N roztok HCl do pH 9 /v poměru 50 : 40 do vzdálenosti o 2 cm větší než předchozí soustavou /12 - 14 cm/. Po skončeném vyvíjení se chromatogram vysuší v proudu teplého vzduchu do oschnutí a postříká se detekčním činidlem /1 % roztok p-dimethylaminobenzaldehydu ve směsi methanol-konc. HCl 1 : 1/. Po postřiku se na desku přivádí ihned teplý vzduch a případně se postřík a vysoušení opakují do optimálního vybarvení skvrn. Hned po detekci se deska vystaví působení UV záření 366 + 254 nm po dobu 1 minuty /realizováno např. v přístroji Flhotest Universal fy Hanau, NSR/. Jednotlivé ergotoxinové alkaloidy mají tyto hodnoty R_F :

dihydroergokristin	0,31
dihydro-beta-ergokryptin	0,38
dihydro-alfa-ergokryptin	0,46
dihydroergokornin	0,58

Vyhodnocení chromatogramu se provede denzitometricky. Pro denzitometr ty OPTON platí tyto podmínky :

vlnová délka	580 mm
posun desky	50 mm/min
rychlost zapisovače	30 cm/min
šířka štěrby	0,02 mm
clona	10 mm
zesílení	17

Výpočet poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu se provede z denzitometrického záznamu podle vztahu :

$$x = \frac{P \text{ alfa}}{P \text{ beta}}$$

kde : P alfa = průměrná hodnota plochy dihydro-alfa-ergokryptinu z denzitometrických záznamů ze tří stanovení

P beta = průměrná hodnota plochy dihydro-beta-ergokryptinu z denzitometrického záznamu ze tří stanovení.

Příklad 2 :

Postupuje se jako v příkladě 1, jen s tím rozdílem, že se jako vyvíjející soustava použije směs methanol-0,1 M roztok octanu amonného-diethylamin 20:20:1. Jednotlivé ergotoxinové alkaloidy mají tyto hodnoty R_F :

dihydroergokristin	0,21
dihydro-beta-ergokryptin	0,28
dihydro-alfa-ergokryptin	0,33
dihydroergokornin	0,39

Neprovádí se denzitometrické vyhodnocení, ale pouze semikvantitativní vizuální odhad.

Příklad 3 :

Postup je vhodný pouze pro vzorky v nichž není přítomen dihydroergokristin.

Postupuje se jako v příkladě 1, jen s tím rozdílem, že se jako vyvíjející soustava použije směs voda-diethylamin 100:4. Jednotlivé ergotoxinové alkaloidy mají tyto hodnoty R_F :

dihydroergokristin	0,125
dihydro-beta-ergokryptin	0,125
dihydro-alfa-ergokryptin	0,23
dihydroergokornin	0,31

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U :

1. Způsob dělení a stanovení poměru dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu, vyznačující se tím, že se směs hydrogenovaných ergotoxinových alkaloidů rozpustí, nanese na start tenké vrstvy silikagelu Polygram SIL N-HR, rozdělí na dihydroergokristin, dihydro-alfa-ergokryptin, dihydro-beta-ergokryptin a dihydroergokornin chromatograficky s použitím buď dvojnásobného vyvíjení eluční soustavou voda-diethylamin 100:4 a methanol-roztok o pH 9 50:40, nebo s použitím eluční soustavy methanol-0,1 M roztok octanu amonného-diethylamin 20.20:1, načež se zdetekuje roztokem p-dimethylaminobenzal-dehydu a poměr dihydro-alfa-ergokryptinu a dihydro-beta-ergokryptinu se vyhodnotí.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se vyhodnocení provádí denzitometricky.
3. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se vyhodnocení provádí vizuálně.

original bez výkresu