

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 245

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴
G 01 N 30/00

(21) PV 2053-88.V

(22) Přihlášeno

28 03 88

(40) Zveřejněno

12 09 89

(45) Vydáno

18 12 90

(75)

Autor vynálezu

ZAPLETAL JIŘÍ Pharm. Dr.,
CVAK LADISLAV Ing., OPAVA

(54)

Způsob stanovení obsahu ergoklavinových
alkaloidů ve směsi

(57) Ergoklavinové alkaloidy obsažené
ve směsi se stanoví metodou plynové chro-
matografie na náplňové nebo kapilární
koloně obsahující jako zakotvenou fázi
silikonový polymer s fenylovými a met-
hylovými skupinami v proudu nosného ply-
nu za plamenionizační detekce a kvanti-
tativního vyhodnocení metodou vnitřního
standardu.

Vynález se týká způsobu stanovení obsahu jednotlivých ergoklavinových alkaloidů ve směsi těchto látek, získaných zejména fermentačními a chemickými izolačními pochody, metodou plynové chromatografie.

Doposud jsou známy neselektivní metody stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů založené na tvorbě barevného produktu po reakci s p-aminobenzaldehydem v přítomném prostředí nebo vycházející ze skutečnosti, že roztoky těchto látek absorbují světlo v ultrafialové oblasti. Obě tyto metody jsou využívány pro sumární stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů v předloze spektrofotometrickou metodou.

Známe separační metody, tenkovrstevné a kapalinová chromatografie, vykazují také některé nevýhody, které budou dále rozebřány. Tenkovrstevná chromatografie neumožňuje kvantitativní vyhodnocení chromatogramu, nanejvýš, za použití škály standardů různých koncentrací, je možný semikvantitativní odhad obsahu sledovaných látek. Kapalinová chromatografie, má-li umožnit separaci čtyř hlavních komponent, elymoklavinu, chanoklavinu, agroklavinu a festuklavinu, je časově náročná. Doba jedné analýzy činí 20 až 30 minut. Navíc tato metoda vyžaduje alkálie v mobilní fázi, například roztok amoniaku nebo triethylaminu. Tyto látky zvyšují rozpustnost silikagelové náplně, a tím podstatně zkracují životnost kolony použité pro kapalinovou chromatografii.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že k separaci jednotlivých ergoklavinových alkaloidů ze směsi se použije plynová chromatografie, vyznačující se tím, že jednotlivé látky se rozdělí na náplňové koloně na sorbentu silikagelového typu pokrytém silikonovým polymerem s fenylovými a methylovými skupinami, v 50% zastoupení každé, nebo na kapilární koloně uvnitř pokryté silikonovým polymerem se 7% fenylových, 7% kyanopropylových a 86% methylových skupin, při teplotě termostatu 260 °C, nástřiku a detektoru 290 °C v proudu inertního plynu, například dusíku, helia nebo vodíku jako nosného plynu a po detekci plamenionizačním detektorem se kvantifikují metodou vnitřního standardu, přičemž jako vnitřní standard se použije festuklavin.

Způsob stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů podle vynálezu metodou plynové chromatografie vychází z experimentálního poznatku, že tyto látky je možno definovaným způsobem převést do plynné fáze a takto podrobit separaci na náplňové nebo kapilární koloně v proudu inertního plynu. Metoda je v tomto provedení jednoduchá, spolehlivá, selektivní a časově nenáročná.

Způsob stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů podle vynálezu byl proveden na plynovém chromatografu, spojeném s počítačím integrátorem. Kolona náplňová o rozměrech 1 200 x 3 mm byla naplněna sorbentem na bázi silikagelu o zrnění 0,080 až 0,100 mm pokrytým silikonovým polymerem s 50% methylovými a 50% fenylovými skupinami v množství 3% hmot. Kolona kapilární o rozměrech 10 m x 0,32 mm z čistého křemene byla pokryta na vnitřních stěnách filmem zakotvené fáze typu silikonového polymeru se 7% fenylovými, 7% kyanopropylovými a 86% methylovými skupinami o síle filmu 0,18 μm. Jako nosný plyn byl pro kolonu náplňovou i kapilární použit dusík a pro kolonu kapilární vodík. Detekce separovaných látek byla pro oba druhy kolon a oba typy nosných plynů provedena plamenionizačním detektorem s přívodem vodíku a vzduchu. Pro kvantitativní vyhodnocení byla použita metoda vnitřního standardu, kterým byl festuklavin v koncentraci cca 1,0 mg / ml, koncentrace sledovaných látek se pohybovala v rozmezí 0,1 až 10 mg / ml. Plochy piků byly měřeny elektronickým integrátorem.

Následující příklady ilustrují způsob stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů metodou plynové chromatografie podle vynálezu, nikterak ho však neomezuji.

Příklad 1

Kalibrační roztok se připraví rozpuštěním asi 25 mg každé z těchto látek: elymoklavinu, chanoklavinu, agroklavinu a festuklavinu ve 25 ml methanolu, přičemž rozpouštění se s výhodou urychlí v ultrazvukové lázni. Vzhledem ke skutečnosti, že festuklavin

není zpravidla zastoupen v přírodních zdrojích ergoklavinových alkaloidů, bude tato látka zvolena jako vnitřní standard pro kvantitativní vyhodnocení analýzy.

Roztok vzorku se připraví rozpuštěním předlohy v množství odpovídajícím výsledné koncentraci 0,1 až 10 mg každé obsažené složky v 1 ml methanolického roztoku. Do roztoku vzorku se přidá roztok festuklavinu v množství odpovídajícím výsledné koncentraci 1 mg v 1 ml. Rozpuštění předlohy se s výhodou urychlí v ultrazvukové lázni.

Plynový chromatograf, skleněná kolona o rozměrech 1 200 x 3 mm, naplněná nosičem silikagelového typu o zrnění 0,080 až 0,100 mm, smočeným 3 % hmot. silikonového polymeru s fenylovými 50% a methylovými 50% skupinami. Teplota nástřiku a detektoru 290 °C a teplota termostatu 260 °C. Jako nosný plyn se použije dusík o průtoku 40 ml / min, vodík o průtoku 30 ml / min. a vzduch o průtoku 400 ml / min. Za uvedených podmínek se do plynového chromatografu nástříkne a analyzuje kalibrační roztok a posléze roztok vzorku.

Korekční faktory sledovaných látek se vypočtou podle vzorce:

$$KF = \frac{\text{Conc}_i \times \text{Area}_{IS}}{\text{Area}_i \times \text{Conc}_{IS}}$$

kde Conc_i je koncentrace sledované látky v miligramech

Conc_{IS} je koncentrace vnitřního standardu v miligramech

Area_i je plocha píku sledované látky

Area_{IS} je plocha píku vnitřního standardu (festuklavín)

Obsah v procentech jednotlivých složek směsí se vypočte podle vzorce:

$$\text{Conc}_i = \frac{\text{Conc}_{IS} \times \text{Area}_i \times KF_i \times 100}{\text{Area}_{IS} \times \text{Conc}_{VZ}}$$

kde Conc_{IS} je koncentrace vnitřního standardu v miligramech

Conc_{VZ} je koncentrace vzorku v miligramech

Area_i je plocha píku sledované látky

Area_{IS} je plocha píku vnitřního standardu /festuklavín/

KF_i je korekční faktor sledované látky

Příklad 2

Příprava kalibračního roztoku a roztoku vzorku se provede podle příkladu 1.

Plynový chromatograf, kapilární křemenná kolona o rozměrech 10 m x 0,32 mm pokrytá na vnitřní stěně silikonovým polymerem s fenylovými 7%, kyanopropylovými 7% a methylovými 86% skupinami o síle filmu 0,18 μm. Teplota nástřiku a detektoru 290 °C a teplota termostatu 260 °C. Jako nosný plyn se použije vodík o vstupním průtoku 75 ml / min. a tlaku na kolonu 30 kPa. Pro plamenionizační detektor se použije vodík o průtoku 30 ml / min. a vzduch o průtoku 400 ml / min.

Za uvedených podmínek se analyzuje kalibrační roztok a roztok vzorku. K výpočtům se použijí vzorce uvedené v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob stanovení obsahu ergoklavinových alkaloidů ve směsi plynovou chromatografií, vyznačující se tím, že jednotlivé látky se rozdělí na náplňové koloně na sorbentu silikagelového typu pokrytém silikonovým polymerem s fenylovými a methylovými skupinami, v 50% zastoupení každé nebo na kapilární koloně uvnitř pokryté silikonovým polymerem se 7% fenylových, 7% kyanopropylových a 86% methylových skupin, při teplotě termostatu

260 °C, nástřiku a detektoru 290 °C v proudu inertního plynu, například dusíku, helia nebo vodíku jako nosného plynu a po detekci plamenoionizačním detektorem se kvantifikují metodou vnitřního standardu, přičemž jako vnitřní standard se použije festuklavin.