



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

195151

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 519/02

/22/ Přihlášeno 15 11 77
/21/ /PV 7492-77/

(40) Zveřejněno 28 04 79

(45) Vydáno 15 05 82

(75)

Autor vynálezu

TRTÍK BOHUMIL ing., OPAVA

(54) Způsob stanovení poměru hydrogenovaných alkaloidů ergotoxinové skupiny

1

Vynález se týká stanovení poměru hydrogenovaných alkaloidů ergotoxinové skupiny /dihydroergokristinu, dihydroergokryptinu a dihydroergokorninu/ přítomných ve formě solí nebo bází. Znalost přesného poměrového zastoupení hydrogenovaných ergotoxinových alkaloidů v dihydroergotoxinových solích nebo bázích je důležitá z hlediska jejich účinku a tedy nezbytná i při kontrole meziproduktů a finálních výrobků při jejich výrobě.

Pro stanovení poměru hydrogenovaných ergotoxinových alkaloidů se používá chromatografického oddělení jednotlivých složek buď chromatografií papírovou, tenkovrstevnou, plynovou nebo kapalinovou. Vyhodnocení obsahu oddělených alkaloidů se provádí podle použité metody chromatografie buď extrakcí alkaloidů z papíru s konečným fotometrickým vyhodnocením, denzitometrickým vyhodnocením z tenké vrstvy, nebo vyhodnocením záznamů z kapalinového nebo plynového chromatografu. Uvedené metody se vyznačují některými nedostatky, zvláště metody používající k rozdělení papírové chromatografie jsou značně časově náročné /1,5 až 2 pracovní směny/, ostatní metody jsou zase značně přístrojově náročné, navíc metoda plynové chromatografie je problematické vzhledem k částečnému štěpení alkaloidů při stanovení. Také příprava chromatogramu pro denzitometrické účely vyžaduje zvláštní péči a celý výsledek denzitometrického stanovení je závislý na získání kvalitně oddělených skvrn jednotlivých složek na chromatogramu, který se ne vždy dostatečně daří.

2

Nově byla vypracována jednoduchá metoda přístrojově nenáročná, vyznačující se tím, že se směs hydrogenovaných ergotoxinových alkaloidů rozpustí ve směsi chloroform - methanol 9 : 1, nanese do pruhy na start tenké vrstvy celulózy impregnované dimethylftalátem, provede chromatografické oddělení jednotlivých složek v kyselé soustavě tvořené 0,05 N HCl, chromatogram se s výhodou bez sušení zdetekuje protažením 0,5% roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu v cyklohexanu a vystaví se účinku par kyseliny chlorovodíkové, načež se kvantitativně oddělí zóny s rozdělenými alkaloidy, provede se extrakce z celulózy do vodného roztoku kyseliny octové, s výhodou 25%, barevná reakce přidáním van Urkova činidla, oddělení celulózy filtrací či odstředěním a vyhodnocením barevnosti získaných roztoků na spektrofotometru.

Jak je patrné, je způsob stanovení podle vynálezu založen na chromatografickém oddělení složek dihydroergotoxinu na tenké vrstvě celulózy impregnované dimethylftalátem, přičemž bylo dosaženo důležité výhody - dobrého a spolehlivého dělení alkaloidů i za odlišných chromatografických podmínek /vlhkost desek, kvalita použitých rozpouštědel, teplota, vlhkost vzduchu, hodnota komory apod./. Použití kyselého eluční soustavy, s výhodou 0,05 N roztoku HCl, umožňuje vysokou nanášku vzorku na chromatogram, je výhodné z hlediska stálosti alkaloidů a poskytuje výhodné hodnoty R_f /dihydroergokristin 0,19, dihydroergokryptin 0,35 a dihydroergokornin 0,48/. Po chromatografii se chromatogram s výhodou

bez sušení a odstraňování dimethylftalátu z desky, zdetekuje protažením roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu /0,5% v cyklohexanu a vystavením na nejkratší nutnou dobu účinku par kyseliny chlorovodíkové. Extrakce se provede u kvantitativně vyškrabnutých modrých pruhů alkaloidů vodným roztokem kyseliny octové a roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu ve zředěné kyselině sírové /Van Urkova činidla/.

Po oddělení celulózy, s výhodou odstředěním nebo filtrací přes sitr G 4 a proběhnutí barvotvorné reakce /30 min./ se změní extinkce roztoků na vhodném přístroji a vypočte procentuální zastoupení jednotlivých složek dihydroergotoxinu.

Výhodou způsobu stanovení podle vynálezu je spolehlivé dělení jednotlivých složek, nový rychlý způsob detekce a extrakce, přístrojová nenáročnost a kvalitní výsledky a představuje tedy především zlepšení spolehlivosti kontroly jednotlivých stupňů výroby a finálních výrobků, solí nebo bází dihydroergotoxinu. Stanovení lze provést s dostatečnou přesností až do obsahu 5 % některé složky /např. při poměru 50 : 45 : 5 nebo 95 : 5 : 0 apod./ . Při nižším obsahu než 5 % je stanovení méně přesné.

Další podrobnosti vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Tenká vrstva celulózy /komerční výrobky, např.: LucefolR Quick, fy Kavalier Sázava nebo DC-Karten CE Cellulose für DC, fy Riedel de Haën AG, Seelze-Hanover, NSR/ se naimpregnuje ponořením do 4% roztoku dimethylftalátu v chloroformu a 5 minut se odvětrává v proudě studeného vzduchu. Potom se na start do 7 cm dlouhého pruhu nanese 40 µl roztoku /50 mg v 10 ml směsi chloroform-methanol 9 : 1/. Předvíjí se 1 cm za start 0,05 N kyselinou chlorovodíkovou, odsuší se v proudě studeného vzduchu a pak se opět vyvíjí 0,05 N kyselinou chlorovodíkovou jako eluční soustavou v nasycené komoře do vzdálenosti 12 cm. Deska se potom suší v proudě studeného nebo teplého vzduchu do vizuelního oschnutí /10 min, resp. 5 min/, ponoří se na deset sekund do 0,5% roztoku p-dimethylaminobenzaldehydu v cyklohexanu a po krátkém odsušení /1 min/ se deska vystaví ve vhodné komoře účinku par kyseliny chlorovodíkové tak dlouho, až jsou pruhy jednotlivých alkaloidů zřetelné. Proud vzduchu je realizován např. vysoušečem vlasů umístěným nad chromatografickou deskou ve vzdálenosti 25 cm/. Ergotoxinové alkaloidy mají tyto hodnoty R_F: dihydroergokristin 0,19, di-

hydroergokryptin 0,35, dihydroergokornin 0,48. Jednotlivé pruhy se kvantitativně vyškrabnou do zkumavek, přidají se 2 ml 25% kyseliny octové a po důkladném protřeptání 4 ml van Urkova činidla /0,125 g p-dimethylaminobenzaldehydu v 100 ml 65% kyseliny sírové s 0,1 ml 5% roztoku chloridu železitého/. Opět se důkladně promísí a po 5 minutách se zfiltruje přes sitr G 4 nebo odstředí 30 minut při 3000 ot/min. Čiré roztoky se po 30 minutách od přidání činidla změní na vhodném spektrofotometru při 580 nm v 1 cm kyvetách proti slepé zkoušce připravené ze 2 ml 25% kyseliny octové a 4 ml van Urkova činidla. Výpočet hmotnostních procent jednotlivých alkaloidů se provede podle vztahu:

$$\frac{AKRI \cdot MKRI}{AKRY \cdot MKRY} + \frac{AKO \cdot MKO}{AKRY \cdot MKRY} = x$$

$$\% KRI = \frac{AKRI \cdot MKRI \cdot 100}{x}$$

$$\% KRY = \frac{AKRY \cdot MKRY \cdot 100}{x}$$

$$\% KO = \frac{AKO \cdot MKO \cdot 100}{x}$$

kde: AKRI, AKRY, AKO jsou hodnoty extinkce dihydroergokristinu, dihydroergokryptinu a dihydroergokorninu.

MKRI, MKRY, MKO jsou molekulové hmotnosti solí nebo bází dihydroergokristinu, dihydroergokryptinu a dihydroergokorninu.

Postup je vhodný pro vzorky s poměrem složek přibližně 1 : 1 : 1.

P ř í k l a d 2

Postup je vhodný pro vzorky dihydroergotoxinu, v nichž převládá některá složka.

Postupuje se jako v příkladě 1, jen s tím rozdílem, že se k vyškrabnutým pruhům převládající složky přidají 4 ml 25% kyseliny octové + 8 ml van Urkova činidla a ke zbývajícím dvěma /případně jednomu/ pruhům /pruhu/ po 2 ml 25% kyseliny octové + 4 ml van Urkova činidla. Při výpočtu poměru se potom u převládající složky musí zjištěná extinkce násobit dvěma.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob stanovení poměru hydrogenovaných alkaloidů ergotoxinové skupiny, vyznačující se tím, že se směs hydrogenovaných ergotoxinových alkaloidů rozpustí ve směsi chloroform - metanol 9 : 1, nanese do pruhu na start tenké vrstvy celulózy impregnované dimethylftalátem, provede chromatografické oddělení jednotlivých složek v kyselé soustavě tvořené 0,05 N HCl, chromatogram se s výhodou bez sušení zdetekuje

protážením 0,5% roztokem para-dimethylaminobenzaldehydu v cyklohexanu a vystaví účinku par kyseliny chlorovodíkové, načež se kvantitativně oddělí zóny s rozdělenými alkaloidy, provede se extrakce z celulózy do vodného roztoku kyseliny octové s výhodou 25%, barevná reakce přidáním van Urkova činidla, oddělení celulózy filtrací nebo odstředěním a vyhodnocení barevnosti získaných roztoků na spektrofotometru.