



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53909

(13) A

(51) 7 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АЛКАЛОЇДІВ ЧОРНОКОРЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО В КОРМАХ І ПАТОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

1

2

(21) 2002021483

(22) 22 02 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Малінін Олег Олексійович, Куцан Олександр
Тихонович(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб визначення алкалоїдів чорнокореня

лікарського в кормах і патологічному матеріалі, що включає вилучення алкалоїдів із рослинного матеріалу і паренхіматозних органів, очищення фільтруванням, перерозподіл екстрагентів та хроматографію, який відрізняється тим, що вилучення алкалоїдів здійснюють розчином лимонної кислоти, а при хроматографуванні використовують рухливий розчинник - етиловий спирт та оцтову кислоту при співвідношенні 9 : 1

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарії, а саме до способів визначення алкалоїдів при діагностиці отруєнь сільськогосподарських тварин

Отруйними речовинами чорнокореня лікарського є алкалоїди, а саме ціноглосин, ціноглосеїн, консолідин і геліосупін. Алкалоїди - специфічні отрути печінки, накопичуючись в ній, руйнують гепатоцити, створюючи умови до розвитку незворотних патологічних процесів. Чорнокорінь лікарський (*Synoglossum officinale* L.) відноситься до родини бурачникових (*Borraginaceae*), росте повсюди, але особливо сильно забруднює посіви еспарцету, який є кормом для сільськогосподарських тварин.

Існують способи визначення алкалоїдів із проб, які є дослідними.

Так, є спосіб виділення алкалоїдів (Патент Росії, Приор. ДЕ, Рег. номер заявки №96124780/04, від 27 05 1994). Цей спосіб виділення алкалоїдів з рослин, за яким алкалоїдний екстракт його фракції розчиняється у воді. Після чого здійснюють екстракцію рідини в рідину простим ефіром та виділенням органічної фази від рідинної фази. В органічній фазі знаходиться алкалоїд - лупанін. Цей спосіб є не зовсім точним, так як алкалоїди вилучаються не повністю.

Існує спосіб кількісного визначення алкалоїдів чемериці Лобеля (Патент Росії, №1561682, від 12 05 1988). Цей спосіб здійснюють потенціометричним титруванням алкалоїдів в розчинах мурашиної кислоти-метилетилкетон і оцтової кислоти-метилетилкетон. При здійсненні цього способу необхідні великі затрати та велика кількість реактивів.

Є спосіб хроматографічного визначення алкалоїдів в патологічному матеріалі та в рослинах (Методика, 1976г., автори В.И. Серов, В.А. Волкова, Киргизский НИИ животноводства и ветеринарии). Спосіб заснован на витягуванні алкалоїдів, визначенні їх в залишках шляхом постановки кольорової реакції на хроматографічному папері з послідуною ідентифікацією хроматографією у тонкому шарі. Цей спосіб може бути прототипом. Але цей спосіб є трудомістким і великозатратним.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб визначення алкалоїдів чорнокореня лікарського в кормах і патологічному матеріалі шляхом вилучення алкалоїдів із рослинного матеріалу і паренхіматозних органів, очищення фільтруванням, перерозподілу екстрагентів та хроматографії, при цьому вилучення алкалоїдів здійснюють розчином лимонної кислоти, а при хроматографуванні використовують рухливий розчинник - етиловий спирт та оцтову кислоту при співвідношенні 9 : 1, що дає змогу забезпечити чистоту одержання алкалоїдів та зменшити затрати на реактиви.

Спосіб визначення алкалоїдів чорнокореня лікарського, вилучення алкалоїдів, очищення фільтруванням, перерозподіл екстрагентів в неполярний органічний розчинник та кінцевим визначенням тонкошаровою хроматографією у прототипі є спільними ознаками зі способом, що заявляється.

Для здійснення запропонованого способу проводять вилучення алкалоїдів чорнокореня лікарського із рослинного матеріалу і паренхіматозних органів розчином лимонної кислоти, очищення фільтруванням, перерозподіл екстрагентів в неполярний органічний розчинник та кінцеве визначен-

(13) A

(11) 53909

(19) UA

ня тонкошаровою хроматографією

Спосіб здійснюють у такій послідовності

Готують реактив Драгендорфа (Государственная фармакопея, Изд Медицина, М, 1968г, с 900)

Основний реактив 16,5г лужного азотнокислого вісмуту розчиняють в 500мл 25% концентрованої оцтової кислоти. Окремо розчиняють 80г йодистого калію в 200мл дистильованої води. Обидва розчини змішують і зберігають в склянці із темного скла. Реактив придатний для використання на протязі місяця

Робочий реактив. Безпосередньо для проявлення готують робочий реактив. Для цього змішують 20мл основного реактива, 20мл льодяної оцтової кислоти і 100мл дистильованої води

Приготування паперових пластинок для хроматографії

Для хроматографічних пластинок використовують папір хроматографічний марки „М“, розрізаючи на пластинки розміром 9х12см. Для придатності пластинки обов'язково пропускають через дистильовану воду. Висушують і зберігають в ексикаторах

Проводять відбір проб для дослідження

Потім проводять екстракцію та первинну очистку екстрактів

Приклад 1 Рослинна сировина. Витягування алкалоїдів проводять у вигляді солей. Для цього 10г подрібненої рослинної сировини заливають 100мл 1% розчину лимонної кислоти ($pH \approx 3,0$). Потім все перемішують і ставлять на водяну баню при температурі $+40^{\circ}C$ на 2 години при періодичному перемішуванні, або залишають при кімнатній температурі ($18-22^{\circ}C$) на 1-2 доби

Лимонно-кислотну витяжку із рослинної сировини фільтрують через паперовий фільтр в розділову лійку і проводять реекстракцію 2 рази по 20,0мл хлороформом. Цю фракцію відкидають

Далі проводять підлучення лимонно-кислотної витяжки 2,5% розчином $NaOH$ ($\approx 20,0$ мл) до $pH=9$. Підлучену лимонно-кислотну фракцію обробляють знову хлороформом 2 рази по 25,0мл шляхом легкого змішування на протязі 5-7 хвилин. Хлороформні реекстракти об'єднують і випарюють у випарювальних чашках досуха. Чашки змивають 1-2мл хлороформу і екстракти використовують для хроматографування

Приклад 2 Патологічний матеріал. Беруть наважку подрібнених неконсервованих органів (лечінка, вміст рубця або шлунка) в кількості 10,0г. Проби хорошо подрібнюють і переносять в колби, заливаючи їх 1% розчином лимонної кислоти. Вміст колб декілька раз перемішують і ставлять на водяну баню на 1 годину при температурі $+40^{\circ}C$ або залишають при кімнатній температурі ($18-$

$22^{\circ}C$) на 1-2 доби. Після настоювання рідину з проб зливають і фільтрують через бумажний фільтр в суху колбу і розміщують в морозильну камеру побутового холодильника на 1-2 години для виморожування жиру. Після цього вміст колб фільтрують в розділову лійку і проводять реекстракцію 2 рази по 20,0мл хлороформом. Цю фракцію відкидають

Далі проводять підлучення лимонно-кислотної витяжки 2,5% розчином $NaOH$ ($\approx 20,0$ мл) до $pH=9$. Підлучену лимонно-кислотну фракцію обробляють знову хлороформом 2 рази по 25,0мл шляхом легкого змішування на протязі 5-7 хвилин. Хлороформні реекстракти об'єднують і випарюють у випарювальних чашках досуха. Чашки змивають 1-2 мл хлороформу і екстракти використовують для хроматографування

Приклад 3 Хроматографування

Використовують попередньо приготовлені хроматографічні пластинки, на які відступивши 1,5см від нижнього краю і бокових сторін, наносять ізольовано із проб залишки так, щоб діаметр плями не перевищував 0,5см з допомогою мікропіпетки. Для контролю поряд наносять стандартні зразки алкалоїдів

Хроматографічну пластинку з нанесеними пробами ставлять в хроматографічну камеру, на дно якої за 20 хвилин до внесення пластинки наливають рухливий розчинник етиловий спирт і оцтова кислота в співвідношенні 9:1, приготовлений за 1-2 години до аналізу. Після того, як фронт розчинника підніметься, не дійшовши 1см до верхнього краю, пластинку витягують її із камери і залишають для випарювання розчинника

Висушена пластинка брызгається реактивом Драгендорфа. При цьому алкалоїди проявляються у вигляді жовто-гарячих плям на загальному жовтому фоні

Ідентифікація алкалоїдів в дослідних зразках проводиться на основі співпадання плям дослідних проб і плям стандартів. Співпадання плям дає можливість зробити заключення про наявність суми алкалоїдів чорнокореня лікарського в рослинних кормах та патологічному матеріалі і поставити діагноз на отруєння тварин

Для документування проведених досліджень роблять фотокопію або відбиток пластинки на кальку, які потім підклеюють до експертизи хіміко-токсикологічного дослідження

Спосіб визначення алкалоїдів чорнокореня лікарського в кормах і патологічному матеріалі є ефективним, потребуючим менших витрат і таким, який забезпечує найбільшу чистоту при вилученні алкалоїдів із досліджуваних зразків