



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66060 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ НАТИВНИХ ПІРОЛІЗИДИНОВИХ АЛКАЛОЇДІВ

1

2

(21) u201105869

(22) 10.05.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл. № 24, 2011 р.

(72) ЩЕТИНСЬКИЙ ІГОР МИХАЙЛОВИЧ, УЛЬЯНИЦЬКА АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА, ЗАХАР'ЄВ АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб виявлення нативних піролізидинових алкалоїдів, який відрізняється тим, що кристало-

скопичну реакцію проводять у соку рослин і рідких середовищах трупів тварин, а також у гістозрізах з нефіксованого, ущільненого підморожуванням патологічного матеріалу шляхом внесення у рідке середовище, що досліджується, або нанесення на гістозріз реактиву у складі 5 % AuCl_3 + конц. HCl + ацетон (1:1:1) з додаванням крихточки KBr , після попереднього додавання у рідке середовище 1-2 % розчину оцтової кислоти, або після обробки ним же гістозрізу.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме до патоморфологічної діагностики отруєнь великої рогатої худоби піролізидиновими алкалоїдами, та виявлення їх на мікроскопічному рівні у біологічному матеріалі.

Багато з відомих дотепер 1200 алкалоїдів мають здатність кристалізуватися, тобто перетворюватися під дією кристалогенів в кристали [1, 5, 7]. Одні і ті самі кристалогени взаємодіють з різними алкалоїдами, що призводить до утворення різних кристалів, що розвиваються за формою, кольором, розмірами, плеохроїзмом, знаком подовження, кутом згасання, показниками переломлення, двопереломлення, вісністю, в окремих реакціях - кутом між оптичними осями [5].

В переважній більшості випадків у мікрокристалічні реакції з водорозчинними солями алкалоїдів вступають різні кристалогени, в результаті цієї взаємодії можуть утворюватися: пікрати, пікролати, стифнати, рейнекати, нітранілати, хлороплатинати, хлоромеркуріати, хлоропаладеати, бромоаурати і хлороаурати [5, 6, 7].

Нині шляхом проведення мікрокристалічних реакцій вдавалося ідентифікувати лише похідне піролізидинових алкалоїдів - платифілін [5].

Платифіліну гідротартрат є похідним піролізидинових алкалоїдів, що міститься в рослинах. Він теж легко розчиняється у воді, погано у спирті, практично не розчинний у хлороформі та ефірі [7].

Існує спосіб визначення піролізидинових алкалоїдів в кормах і патологічному матеріалі (Патент № 53909. UA. МПК G01N33/00. Від 17.02.2003 р.)

заснований на хроматографічному якісному виявленні алкалоїдів після попереднього їх вилучення з субстратів корму або патологічного матеріалу розчином лимонної кислоти.

При хроматографуванні використовують рухливий розчинник - етиловий спирт та оцтову кислоту при співвідношенні 9:1, для ідентифікації алкалоїдів використовують реактив Драгендорфа.

Але недоліком цього способу є неможливість виявлення алкалоїдів безпосередньо у патологічно змінній тканині трупів тварин при проведенні патогістологічного дослідження, а також витрати часу на проведення екстракцій і хлороформної реекстракції алкалоїдів з субстрату, а також власне на саме проведення хроматографічного дослідження.

Найбільш близьким технічним рішенням до корисної моделі, що пропонується, є спосіб виявлення алкалоїдів у справжніх розчинах [5], при якому платифілін утворює кристали при взаємодії з сіллю Рейнеке (рейнекати) і з розчином у складі 5 % AuCl_3 + конц. HCl + ацетон (у співвідношенні 1:1:1) + крихточка KBr (бромоаурати). Якщо при взаємодії з сіллю Рейнеке властиві для піролізидинових алкалоїдів кристали утворювалися одразу, то після взаємодії з вищевказаних складом спочатку утворюється аморфний осад, який згодом перетворювався у кристали. Кристали, що утворилися при цій взаємодії, були світло-коричневими, у формі снопів, пучків голок. Але до цього цей спосіб не використовувався для виявлення піролізидинових алкалоїдів у соках рослин,

(13) U
(11) 66060
(19) UA

рідких середовищах і на гістозрізах органів трупів тварин.

Тому задачею корисної моделі є розробка способу мікрокристалоскопічного дослідження, який дозволить виявляти піролізидинові алкалоїди не тільки у рідких середовищах, а і у гістозрізах.

Поставлена задача вирішується тим, що виявлення нативних алкалоїдів у середовищах здійснюється в мікрокристалічних реакціях з застосуванням кристалогенів, згідно з корисною моделлю, кристалоскопічну реакцію проводять у соку рослин і рідких середовищах трупів тварин, а також у гістозрізах з нефіксованого, ущільненого підморожуванням патологічного матеріалу шляхом внесення у рідке середовище, що досліджується, або нанесення на гістозріз реактиву у складі 5 % AuCl_3 + конц. HCl + ацетон (1:1:1) з додаванням крихточки KBr , після попереднього додавання у рідке середовище 1-2 % розчину оцтової кислоти, або після обробки ним же гістозрізу.

Приклад конкретного виконання

А. Виявлення піролізидинових алкалоїдів у соках рослин і рідких середовищах трупів тварин.

На часове скельце невеликих розмірів вичавлюється сік з стебел, листя, квітів, коробочок, рослин, або наносять декілька краплин ексудату, сечі або жовчі, що отримані при розтині трупів тварин. До рідини, яка досліджується додають 3-4 краплини 1-2 % оцтової кислоти і рівну за об'ємом кількість кристалогену – 5 % AuCl_3 + конц. HCl + ацетон (1:1:1) з додаванням крихточки KBr . Суміш витримують на накритому склом часовому скельці 10 хвилин при температурі 25 °С.

Результат реакції визначається у прохідному світлі з використанням мікроскопа.

Результат реакції: Кристали, що утворилися при взаємодії кристалогену і піролізидинових алкалоїдів, проявляються у вигляді світло-коричневих голок, голок, зібраних у формі снопів, пучків голок.

Б. Виявлення піролізидинових алкалоїдів у гістологічних зрізах тканин трупів тварин.

1. З органів, в яких ведуть пошук піролізидинових алкалоїдів, висікають фрагменти-пластинки не товще 0,5 см. Одразу їх вкладали на заморожуючий термоелектричний столик ТОС - 1, що змонтований на санному мікромомі. Для більш якісної підморожки до столика підводять холодну воду через ультратермостат, в камері якого знаходився лід. Товщина зрізів 20-30 мікронів.

2. Отримані зрізи збирають на предметне скельце з приклеєними спеціальним клеєм по краю

скельця бортиками висотою 2 мм і нашаровують на них 1-2 краплі спочатку 1-2 % оцтової кислоти, а потім 2-3 краплини свіжоприготованого кристалогену.

3. Після 10-20 хвилинної інкубації при температурі 25 °С зріз накривають покривним скельцем і мікроскопують спочатку при малому, потім середньому і великому збільшенні мікроскопа.

4. Одразу після інкубації на зріз можна нашарувати будь-який з прижиттєвих ядерних фарбників - кармін, водний гематоксилін Маллорі [3], фарбування останнім здійснюється протягом 3-4 хвилин.

Результат реакції: При мікроскопічному дослідженні гістозрізів, на яких проведена гістокристалоскопічна реакція, виявляються кристали, що утворилися при взаємодії кристалогену і піролізидинових алкалоїдів у вигляді світло-коричневих голок або пучків голок.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє виявляти піролізидинові алкалоїди шляхом постановки мікрокристалічної реакції як у рідкому середовищі, так і на патогістозрізах.

Джерела інформації:

1. Манько І. В. Дослідження алкалоїдів чорнокореня лікарського і синяка звичайного та одержання стандартизованих препаратів з чорнокореня / Манько І. В. // Фармацевтичний журнал. - 1964. - № 3. - С. 22-26.

2. Микроскопическая техника: [руководство; под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова]. - М.: Медицина, 1996. - 544 с.

3. Мозгов И. Е. Фармакология / И. Е. Мозгов. - [8-е изд. доп и перераб.] - М.: Агропромиздат, 1985. - 416 с.

4. Племенков В. В. Введение в химию природных соединений: [учебник для химических, биологических и медицинских специальностей вузов и университетов] / Племенков В. В. - Казань: Newlibrary RU, 2001. - 223 с.

5. Позднякова В. Т. Микрокристаллические реакции на алкалоиды / В. Т. Позднякова - К.: Гос. мед. изд-во УССР, 1960. - 120 с.

6. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия: [учебник для вузов] / Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. А. - [5-е изд. стереотип.] - М.: Дофа, 2006. - 542 с.

7. Фармацевтична хімія: [навч. посібник для студентів вищ. фарм. навч. закладів і фарм. факультетів вищ. мед. навч. закладів III - IV рівнів акредитації] / [Безуглий П. О., Українець І. В., Таран С. Г. та ін.]. - Х.: Вид-во НФАУ; Золоті сторінки, 2002. - 448 с.