



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61723 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/00  
A61K 31/56 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ АЛКАЛОЇДІВ ЧЕМЕРИЦІ БІЛОЇ В РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ ТА БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ**

1

(21) u201100484  
(22) 17.01.2011  
(24) 25.07.2011  
(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.  
(72) МЕЛЬНИК ГАЛИНА ІВАНІВНА  
(73) МЕЛЬНИК ГАЛИНА ІВАНІВНА  
(57) Спосіб визначення суми алкалоїдів чемериці білої у рослинній сировині та біологічному матері-

2

алі, що включає вилучення суми алкалоїдів із досліджуваного матеріалу, очищення, концентрування, видалення розчинника, розчинення сухого залишку і вимірювання оптичної густини, який відрізняється тим, що кількісне визначення суми алкалоїдів чемериці білої здійснюють у перерахунку на вератридин методом спектрофотометрії.

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема фармації, і може бути використана у лабораторіях з контролю якості при Держлікінспекції, судово-токсикологічних лабораторіях, а також ВТК хіміко-фармацевтичних заводів.

Надземна та підземна частини рослин роду Чемериця (*Veratrum* L.) містять алкалоїди стероїдної будови. У рослині вони перебувають у формі вільних алкамінів, глюкозидів алкамінів та складних ефірів алкамінів. У медичній та ветеринарній практиці застосовуються кореневища з коренями чемериці Лобелієвої, чемериці білої та галенові препарати з них. Реєструються випадки смертельних або гострих отруєнь цими препаратами, коли єдиною ознакою отруєння є диспептичні розлади і різке сповільнення пульсу з падінням артеріального тиску. Методи ідентифікації та кількісного визначення алкалоїдів чемериці у рослинній сировині та біологічному матеріалі є трудомісткими і недостатньо чутливими.

Існує спосіб визначення суми алкалоїдів у лікарській рослинній сировині чемериці Лобелієвої (ФС 42-1051-89 від 29.03.1989 р.) титриметричним методом. Для цього аналітичну пробу сировини змочують розчином аміаку й алкалоїди екстрагують хлороформом. Хлороформну витяжку фільтрують, хлороформ відганяють до сухого залишку, який розчиняють в льодяній оцтовій кислоті, додають оцтовий ангідрид і титрують розчином хлорної кислоти (індикатор - кристалічний фіолетовий). Паралельно проводять контрольний дослід. Цей спосіб потребує великої кількості спеціальних реактивів і є трудомістким.

Недоліком цього методу також є невисока чутливість - 0,1 г, тому розробка простих і одночасно високочутливих інструментальних методів кількісного визначення алкалоїдів чемериці, придатних для фармацевтичного і хіміко-токсикологічного аналізу є актуальним завданням.

У практику лабораторій з контролю якості та судово-токсикологічних лабораторій впроваджують спектрофотометричні методи для дослідження будови, ідентифікації і кількісного аналізу біологічно активних речовин. Успішне застосування цього методу продемонстровано для кількісного визначення гідрокортизону ацетату, який полягає у розчиненні проби і вимірюванні оптичної густини етанольного розчину субстанції при 241,5 нм [Державна Фармакопея України.-1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1.-2004.-520 с.].

Спільними суттєвими ознаками аналога та способу, що заявляється, є метод аналізу і вимірювання оптичної густини.

Недоліком цього способу є недостатня специфічність, бо велика кількість інших органічних лікарських сполук має максимум поглинання при вказаній довжині хвилі.

Є спосіб спектрофотометричного визначення суми алкалоїдів чистотілу в рослинній сировині, який ґрунтується на вилученні алкалоїдів нагрітим на водяній бані розчином оцтової кислоти та енергійному струшуванні. Отриману витяжку охолоджують, фільтрують, додають розчин аміаку і реекстрагують органічним розчинником, який вишушують у вакуумі до сухого залишку. Одержаний сухий залишок розчиняють у 96 % етанолі при

(19) UA (11) 61723 (13) U

нагріванні і додають кольорореагенти. Одночасно готують компенсаційний розчин. Обидва розчини витримують на водяній бані, охолоджують і вимірюють оптичну густину при 570 нм. [Державна Фармакопея України.-1-е вид. - Доповнення 2. - Харків: Державне підприємство "Науково-експертний центр", 2008.-620 с.].

Цей спосіб має ряд недоліків: складність методики, використання токсичних розчинників, а також неспецифічність реагенту.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення суми алкалоїдів чемериці білої в рослинній сировині та біологічному матеріалі шляхом вилучення алкалоїдів із досліджуваного матеріалу, очищення, концентрування, видалення розчинника, розчинення сухого залишку і вимірювання оптичної густини, при цьому кількісне визначення суми алкалоїдів чемериці білої здійснюють у перерахунку на вератридин методом спектрофотометрії, що дасть змогу підвищити чутливість та точність виконання аналізу.

Поставлена задача вирішується тим, що вилучення суми алкалоїдів чемериці білої із досліджуваного матеріалу проводять хлороформом, а після видалення розчинника, сухий залишок розчиняють в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти і визначають оптичну густину досліджуваного розчину з подальшим розрахунком кількісного вмісту суми алкалоїдів у перерахунку на вератридин.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в тому, що спосіб визначення суми алкалоїдів чемериці білої у перерахунку на вератридин методом спектрофотометрії з подальшими математичними розрахунками за формулою є простішим у виконанні, чутливішим і дозволить більш точно визначити вміст алкалоїдів чемериці білої у рослинній сировині та біологічному матеріалі.

Порівняльний аналіз з прототипом дає змогу зробити висновок, що рішення, яке пропонується, відповідає критерію "новизна".

Спосіб здійснюють таким чином: алкалоїди чемериці білої із досліджуваного матеріалу вилучають хлороформом, витяжку очищають, концентрують, органічний розчинник видаляють, сухий залишок розчиняють у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти і ретельно перемішують. Вимірюють оптичну густину досліджуваного розчину при довжині хвилі  $292 \pm 2$  нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Розрахунок суми алкалоїдів чемериці білої здійснюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_o \cdot N}{A_o \cdot m}, \text{ де}$$

A - оптична густина досліджуваного зразка;  
 $C_o$  - концентрація стандартного зразка, г/мл;  
 N - розведення, мл;  
 $A_o$  - оптична густина стандартного зразка;  
 m - наважка, г.

Приготування розчину стандартного зразка. Точну наважку вератридину вносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, об'єм доводять до мітки і ретельно перемішують. Вимірюють оптичну густину

при довжині хвилі  $292 \pm 2$  нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Приклад 1. Кількісне визначення суми алкалоїдів чемериці білої у рослинній сировині.

4,0 г (точну наважку) сировини чемериці білої подрібнену до 0,5-1 мм вносять в колбу з пришліфованим корком ємністю 250 мл, змочують 10 мл 25 % розчином аміаку і залишають на 5 хв. Додають 120 мл хлороформу, збовтують на вібраційному пристрої 2 год. Хлороформну витяжку фільтрують, відкинувши перші 10 мл фільтрату, упарюють до 1/10 об'єму, додають 10 % розчин хлористоводневої кислоти до pH=2,0 та відділяють водну фракцію. До отриманої водної фракції додають 25 % розчин аміаку до pH=8,0 і екстрагують хлороформом. Хлороформну фракцію фільтрують через паперовий фільтр з натрію сульфатом безводним, попередньо змоченим хлороформом, в мірну колбу ємністю 100 мл. Фільтр промивають 10 мл хлороформу, долучають фільтрат до витяжки, об'єм якої доводять до мітки.

1 мл хлороформної витяжки вносять у колбу на 50 мл і висушують. Сухий залишок розчиняють у 10 мл 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, кількісно переносять в мірну колбу на 25 мл і доводять до мітки тим же розчинником. Розчин ретельно перемішують і визначають оптичну густину при довжині хвилі  $292 \pm 2$  нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину стандартного зразка.

Кількісний вміст суми алкалоїдів чемериці білої у рослинній сировині розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_o \cdot N}{A_o \cdot m}, \text{ де}$$

A - оптична густина досліджуваного зразка;  
 $C_o$  - концентрація стандартного зразка, г/мл;  
 N - розведення;  
 $A_o$  - оптична густина стандартного зразка;  
 m - наважка сировини, г.

Приклад 2. Кількісне визначення суми алкалоїдів чемериці білої у біологічному матеріалі.

Для кількісного визначення суми алкалоїдів у біологічному матеріалі готують модельні суміші крові, сечі та гомогенізату з витяжкою із коренів з коренями чемериці білої. Для цього до 10 мл відповідної біологічної рідини додають 2,00 мл розчину суми алкалоїдів в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої, ретельно перемішують і залишають на годину. Готують контрольні суміші біологічних рідин з розчинником (0,1 М розчин кислоти хлористоводневої), дослідження яких проводять паралельно з основними.

До 10 мл модельної суміші з алкалоїдами чемериці білої додають 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої до pH = 2 і тричі екстрагують діетиловим ефіром порціями по 5 мл. Ефірні витяжки відділяють та в подальшому не досліджують. До водного залишку додають 25 % розчин аміаку до pH=8 і тричі екстрагують хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування (5 хв при 5000 об./хв)).

Хлороформні витяжки об'єднують та фільтрують через паперовий фільтр з 1 г натрію сульфату

безводного у колбу на 50,0 мл, і висушують. Сухий залишок розчиняють у 10 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти, кількісно переносять в мірну колбу на 25 мл і доводять до мітки тим же розчинником. Розчин ретельно перемішують і визначають оптичну густину при довжині хвилі  $292 \pm 2$  нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину стандартного зразка.

Кількісний вміст суми алкалоїдів чемериці білої у рослинній сировині розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot N}{A_0 \cdot m}, \text{ де}$$

A - оптична густина досліджуваного зразка;

$C_0$  - концентрація стандартного зразка, г/мл;

N - розведення;

$A_0$  - оптична густина стандартного зразка;

m - наважка сировини, г.

Спосіб визначення суми алкалоїдів чемериці білої в рослинній сировині та біологічному матеріалі методом спектрофотометрії, що пропонується, є простішим у виконанні, чутливішим і дозволить більш точніше визначити вміст алкалоїдів.

Таким чином, запропонований спосіб визначення суми алкалоїдів чемериці білої в рослинній сировині та біологічному матеріалі може знайти застосування у фармацевтичному та судово-токсикологічному аналізі.