# Количественное определение алкалоидов ОФС

# в лекарственном растительном сырье,

# фармацевтических субстанциях

# растительного происхождения и

# лекарственных средствах

# растительного происхождения Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы количественного определения алкалоидов в лекарственном растительном сырье, фармацевтических субстанциях растительного происхождения, лекарственных средствах растительного происхождения.

Алкалоиды – большая группа органических азотсодержащих соединений основного характера синтезируемых растеними, которые по расположению атома азота можно разделить на две группы:

- алкалоиды с азотом в гетероцикле;

- алкалоиды с азотом в боковой цепи или алифатические алкалоиды (без гетероциклов).

При этом, алкалоиды, относящиеся к первой группе, согласно химической классификации, основанной на структуре азотсодержащего гетероцикла, могут быть также разделены на несколько групп, среди которых:

- производные пиридина и пиперидина: бициклические конденсированные системы пиперидина и пирролидина, или тропановые алкалоиды (гиосциамин);

- производные хинолизидина (термопсин);

- производные изохинолина (хелидонин);

- стероидные алкалоиды (протовератрин);

- и другие.

 Алкалоиды, являясь слабыми основаниями, в основной массе, нерастворимы или очень трудно растворимы в воде, но растворимы в спирте, эфире, хлороформе, метиленхлориде и других органических растворителях.

 Соли алкалоидов нерастворимы в органических растворителях, за исключением спирта; легко разлагаются под действием едких щелочей, аммиака раствора, а иногда и карбонатов с выделением свободных оснований. Эти свойства используются для выделения алкалоидов и последующего количественного определения их содержания.

Методике определения содержания алкалоидов предшествует пробоподготовка, заключающаяся в исчерпывающем извлечении суммы алкалоидов из лекарственного растительного сырья, фармацевтических субстанций растительного происхождения и лекарственных средствах растительного происхождения, очистка полученного извлечения от сопутствующих веществ.

 Для определения содержания алкалоидов в полученных очищенных извлечениях, как правило, применяются следующие методы: 1. химический − титриметрический: прямое титрование (методика 1.1) или обратное титрование (методики 1.2, 1.3, 1.4), основанный на нейтрализации алкалоидов − оснований; 2. физико-химический: спектрофотометрия в видимой области спектра (методики 2.1, 2.2).

Подготовку аналитической пробы лекарственного растительного сырья, фармацевтической субстанции растительного происхождения, лекарственного средства растительного происхождения и методику очистки полученного извлечения приводят в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

Расчет содержания суммы алкалоидов осуществляют по преобладающему в данном лекарственном растительном сырье соединению, которое указано в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

Нормы содержания суммы алкалоидов в лекарственном растительном сырье, фармацевтической субстанции растительного происхождения, лекарственном препарате растительного происхождения должны быть указаны в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

 В получаемых из него фармацевтической субстанции растительного происхождения, лекарственном препарате растительного происхождения используют тот же метод.

 Приведенные далее методы определения алкалоидов не являются альтернативными и используются в зависимости от преобладающей группы соединений алкалоидов.

1. **Титриметрический метод.**

 ***Методика 1.1. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

 ***гиосциамин (прямое титрование)***

 Около 0,1 г (точная навеска), если не указано иное в фармацевтической статье/нормативной документации, аналитической пробы растворяют в 20 мл уксусной кислоте ледяной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до сине-зеленого окрашивания. В качестве индикатора используют кристаллический фиолетовый.

 Параллельно проводят контрольный опыт.

 Содержание суммы алкалоидов красавки в пересчете на гиосциамин и абсолютно сухую фармацевтическую субстанцию растительного происхождения в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{(V₁-Vₒ)∙0,02894∙100∙100}{(100-W)∙a}=\frac{(V₁-Vₒ)∙289,4}{(100-W)∙a},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | 0,02894 | − | количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты, г |
|  | V₁ | − | количество 0,1 М раствора хлорной кислоты, израсходованное на титрование субстанции, мл; |
|  | Vₒ | − | количество 0,1 М раствора хлорной кислоты, израсходованное на титрование в контрольном опыте, мл; |
|  | а | − | навеска фармацевтической субстанции растительного происхождения, г; |
|  | W | − | влажность фармацевтической субстанции растительного происхождения, %. |

Метод определения предназначен для определения алкалоидов в фармацевтической субстанции растительного происхождения.

***Методика 1.2. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

***гиосциамин (обратное титрование)***

Сухой остаток, полученный после отгона хлороформа, растворяют в 15 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты при нагревании на водяной бане при температуре 60 °С, прибавляют 0,1 мл метилового красного спиртового раствора 0,1 % и 0,02 мл метиленового синего спиртового раствора, если иное не указано в фармакопейной статье, и избыток хлористоводородной кислоты титруют 0,02 М раствором натрия гидроксида до зеленой окраски.

 Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин и абсолютно сухое лекарственное растительное сырье в процентах *(X*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{\left(15-V\right)∙0,005780 ∙100 ∙100}{90∙\left(100-W\right)}= \frac{\left(15-V\right)∙57,8}{90∙\left(100-W\right)}, $$

где *V* – объем натрия гидроксида раствора 0,02 М, пошедшего на титрование, мл;

 0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты;

 90– навеска лекарственного растительного сырья, соответствующая объему эфирного извлечения, взятого на анализ, мл;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья, %.

 *Приготовление растворов.*

 *0,02 М хлористоводородной кислоты*. 20,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

 **Примечание**. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в % расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата, следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

 Метод определения предназначен для определения алкалоидов в лекарственном растительном сырье.

***Методика 1.3. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

 ***термопсин (обратное титрование)***

К сухому остатку, полученному после отгонки хлороформа, прибавляют 2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и растирают стеклянной палочкой до полного исчезновения комочков, затем прибавляют пипеткой 8 мл воды и перемешивают в течение 2 - 3 мин. К содержимому прибавляют 10,0 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, осторожно перемешивают и оставляют на 8 - 10 мин, затем встряхивают на вибрационном встряхивателе в течение 8 - 10 мин и фильтруют через тройной бумажный складчатый фильтр диаметром 7 см (раствор Б).

10,0 мл раствора Б переносят в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды, 2 капли метилового красного раствора и титруют избыток хлористоводородной кислоты 0,1 М раствором натрия гидроксида до желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. В колбу вместимостью
50 мл помещают 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, прибавляют
4 мл воды и 5 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают, прибавляют 2 капли раствора метилового красного и титруют избыток кислоты 0,1 М раствором натрия гидроксида до желтого окрашивания.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на термопсин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$Х= \frac{\left(V\_{o}- V\right)∙0,0244 ∙100 ∙20 ∙100 ∙100}{50 ∙10 ∙a ∙(100-W)}=\frac{\left(V\_{o}- V\right)∙976}{a ∙(100-W)} ,$$

где 0,0244 – количество алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, г;

*Vо* – объем 0,1 М раствором натрия гидроксида, пошедшего на титрование контрольного опыта, г;

*V* – объем 0,1 М раствором натрия гидроксида, пошедшего на титрование испытуемого раствора, мл;

*а* – навеска лекарственного растительного сырья, г;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья, %.

***Методика 1.4. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

 ***протовератрин (обратное титрование)***

Сухой остаток, полученный после отгонки хлороформа, сушат при температуре 100 - 105 °С в течение 30 мин. После охлаждения сухой остаток растворяют в 10,0 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты, избыток которой титруют 0,01 М раствором натрия гидроксида (индикатор – метиловый оранжевый).

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин и абсолютно сухое лекарственное растительное сырье в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:



где V– объем 0,01 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;

0,0625 – количество суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты;

*a* – навеска сырья, г;

45 – объем хлороформного извлечения, взятого для определения, мл;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья, %.

1. **Спектрофотометрический метод.**

***Методика 2.1. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

 ***гиосциамин***

Около 0,5 г (точная навеска), если иное не указано в фармакопейной статье/нормативной документации, аналитической пробы помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора С рН 7,5, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и дают отстояться.

 2,0 мл полученного раствора помещают в делительную воронку, прибавляют 8 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора с рН 7,5, добавляют 0,5 мл раствора бромтимолового синего, 10 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 10 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в мерную колбу вместимостью 50 мл. Фильтр промывают 3 мл хлороформа. Извлечение повторяют еще 2 раза по 10 мл хлороформа. Полученные извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. В ту же мерную колбу прибавляют 10 мл борной кислоты раствора, доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют хлороформ.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО атропина сульфата в аналогичных условиях.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в фармацевтической субстанции растительного происхождения в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$Χ=\frac{Α∙50∙ 50∙ а\_{о}∙ 10∙ \left(289,38 ∙2\right)∙3 ∙ 100}{А\_{о}∙а ∙2∙\left(694,8-18,02\right) ∙100∙ 100∙ 50 }== \frac{А∙а\_{о}∙6,41}{А\_{о}∙а},$$

где А - оптическая плотность испытуемого раствора;

Ао - оптическая плотность раствора СО атропина сульфата;

а - навеска фармацевтической субстанции растительного происхождения, г;

ао – навеска СО атропина сульфата, г;

289,38 – молекулярная масса атропина основания, г;

694,8 – молекулярная масса атропина сульфата, г;

18,02 – молекулярная масса воды, г.

*Приготовление растворов*.

*Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата*. Около 0,1160 г (точная навеска) СО атропина сульфата, предварительно высушенного при температуре 135 °С до постоянной массы, количественно переносят 10 мл воды в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл аммиака концентрированного раствора и извлекают последовательно 20 мл; 15 мл; 15 мл хлороформа при взбалтывании в течение 3 мин. Хлороформные извлечения фильтруют через фильтр с 2 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор А).

Срок годности раствора 6 месяцев.

10,0 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор Б). 1 мл раствора содержит 0,0001 г атропина основания.

Срок годности раствора 1 мес.

3,0 мл раствора Б стандартного образца атропина помещают в делительную воронку, прибавляют 7 мл хлороформа, 0,5 мл раствора бромтимолового синего, 10 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора с рН 7,5 и далее проводят определение аналогично определению испытуемого раствора.

*Раствор**бромтимолового синего.* 0,15 г бромтимолового синего и 0,15 г натрия карбоната безводного растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

*Раствор борной кислоты*. 0,5 г борной кислоты растворяют в смеси 25 мл спирта 95 % и 20 мл воды при нагревании в мерной колбе вместимостью 250 мл, охлаждают, доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 6 мес.

Метод определения предназначен для определения суммы алкалоидов в фармацевтической субстанции растительного происхождения, представленной красавки листьев экстрактом густым.

***Методика 2.2. Определение суммы алкалоидов в пересчете на***

 ***хелидонин.***

Сухой остаток, полученный после отгонки метиленхлорида, растворяют в 2 – 3 мл спирта 96 %, слегка нагревая колбу в горячей воде и переносят раствор в мерную колбу вместимостью 25 мл. Ополаскивают круглодонную колбу 2 раза по 10 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

5,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора натриевой соли хромотроповой кислоты 1 % в серной кислоте концентрированной, закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Аналогичным образом готовят раствор сравнения в мерной колбе вместимостью 25 мл, который состоит из 5 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и 5 мл раствора натриевой соли хромотроповой кислоты 1 % в серной кислоте концентрированной. Колбу закрывают пробкой и тщательно перемешивают, доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки и снова перемешивают.

Оба раствора помещают на кипящую водяную баню на 20 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и, при необходимости, доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин и абсолютно сухое лекарственное растительное сырье в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{A ∙250 ∙100 ∙25 ∙25 ∙100}{A\_{см}^{1\%}∙а ∙25 ∙50 ∙5 ∙\left(100-W\right)}= \frac{A ∙250000}{A\_{см}^{1\%}∙а∙\left(100-W\right)} ,$$

где *А* – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A\_{см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции хелидонина с хромотроповой кислотой при длине волны 570 нм, равный 933;

*а* – навеска лекарственного растительного сырья, г;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья, %.

*Приготовление растворов*

*Раствор натриевой соли хромотроповой кислоты 1 % в серной кислоте концентрированной.* 1,0 г динатриевой соли хромотроповой кислоты растворяют в 100 мл серной кислоты концентрированной в ультразвуковой бане.

Срок годности растворане более 1 мес при хранении в сосудах из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте.

**Примечание**. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов (в пересчете на хелидонин в %) расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата, следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Приведенные далее методы определения алкалоидов не являются альтернативными и используются в зависимости от преобладающей группы соединений алкалоидов.