

УДК 543.49.665.765-404.921.892.27:661.184.23

Х. П. АКРИТИДУ, В. В. БОЙНИК, Н. Е. БЛАЖЕЕВСКИЙ

Национальный фармацевтический университет

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ АЛКАЛОИДОВ В СУХИХ ЭКСТРАКТАХ СЕМЯН И КОРНЕЙ ЛЮПИНА МНОГОЛИСТНОГО МЕТОДОМ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

Разработана методика количественного определения суммы алкалоидов в сухих экстрактах семян и корней люпина многолистного методом амперометрического титрования с использованием в качестве аналитического реагента — 12-молибдофосфорной гетерополициклоты. Предложенная методика отличается простотой, точностью, экспрессностью и достаточной чувствительностью.

Ключевые слова: амперометрическое титрование, сумма хинолизидиновых алкалоидов, сухие экстракты семян и корней люпина многолистного.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

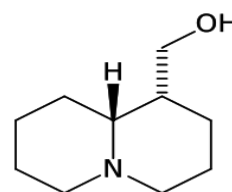
Люпин является ценным источником липидов и легкоусвояемого белка. Уникальность этого растения заключается в многофункциональности его использования. Это декоративная, сидератная, кормовая и пищевая культура. В настоящее время люпин рассматривается, как перспективное сырье для лечебного питания и производства лекарственных препаратов [1, 3, 4, 6].

Люпин – источник хинолизидиновых алкалоидов, которые часто встречаются в растениях семейства Бобовые (*Fabaceae*) родов: Люпин (*Lupinus*), Ракитник (*Cytisus*), Софора (*Sophora*) и др. А также в растениях других семейств: Мареновые (*Rubiaceae*), Барбарисовые (*Berberidaceae*) и Маковые (*Papaveraceae*).

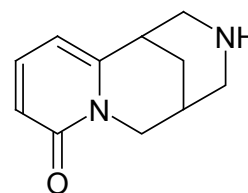
Хинолизидиновые алкалоиды, предшественником которых является аминокислота лизин, содержат ядро хинолизидина и насчитывают около 200 представителей. Все они делятся на шесть групп: люпинина; цитизина; спартеина; матрина; ормозанина; азафеналена. В растениях рода *Lupinus* найдены алкалоиды первых трех групп. Первую группу составляет люпинин и его сложные эфиры. Ко второй группе относятся цитизин и его производные. В третьей группе представлены люпанин, спартеин (пахикарпин) и др.

Алкалоиды находятся во всех органах люпина. Наибольшее их количество приходится

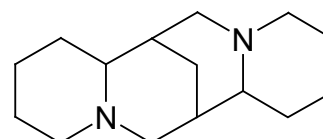
на семена, цветки и листья, а наименьшее на стебли и корни. Содержание алкалоидов составляет: в семенах – до 4 %, в цветках – до 2,5%, в листьях – до 1,5 %, а в корнях – они находятся в минимальных количествах.



Люпинин



Цитизин



Спартеин (Пахикарпин)

Количество алкалоидов в органах растения изменяется в течение вегетационного периода. К периоду созревания в семенах алкалоидов

© Коллектив авторов, 2015

в 5–10 раз больше, чем в зеленой массе. Состав алкалоидов изменяется в соответствии с видом люпина, в основном находятся такие алкалоиды: люпанин ($C_{15}H_{24}ON_2$), люпинин ($C_{10}H_{19}ON$), спартеин (пахикарпин) ($C_{15}H_{24}N_2$), а также присутствуют анагириин ($C_{15}H_{20}ON_2$), изолюпанин ($C_{15}H_{26}N_2$), изоспартеин ($C_{15}H_{24}ON_2$), гидроксилупанин ($C_{15}H_{20}O_2N_2$) и т. д. [5, 8, 9].

Для расчета средней молярной массы алкалоидов в экстрактах семян и корней люпина многолистного были взяты 4 основных алкалоида: люпанин — $C_{15}H_{24}ON_2$, люпинин — $C_{10}H_{19}ON$, спартеин (пахикарпин) — $C_{15}H_{24}N_2$, гидроксилупанин — $C_{15}H_{20}O_2N_2$. Их суммарная молярная масса составляет 909 г/моль. Для расчетов суммы алкалоидов в экстрактах люпина по экспериментальным данным рассчитывали среднее значение молярной массы алкалоидов, равной $909 : 4 = 227,25$ г / моль ($M_{\Sigma alk}$).

АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что достаточно хорошо изучены алкалоиды надземных органов люпина (травы и семян), а сведения об изучении подземных органов растения отсутствуют [8, 9].

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕРЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время разработано много различных методик количественного определения алкалоидов в люпине с использованием таких аналитических методов как гравиметрия, колориметрия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография высокого давления и др. [2]. Но в большинстве случаев данные методы достаточно дорогие и трудоемкие, а поэтому малодоступные.

ФОРМУДИРОВКА ЦЕЛЕЙ СТАТЬИ

Разработка методики количественного определения суммы алкалоидов в экстрактах люпина многолистного методом амперометрического титрования с использованием гетерополианиона (ГПА) структуры Кеггина - стандартного раствора 12-молибдофосфорной гетерополикислоты [7].

ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы. В работе использованы следующие материалы и реактивы:

1. МФК (12-молибдофосфорная гетерополикислота) $H_3PMo_{12}O_{40} \cdot 26H_{20}$, марки «ч.д.а.»;

Для приготовления 100,0 мл раствора МФК концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л навеску МФК мас-

сой 0,2294 г растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Суспензию нагревали на водяной бане до полного растворения навески.

2. Сухие экстракты семян и корней люпина многолистного (сумма 4 основных алкалоидов люпина: люпанин — $C_{15}H_{24}ON_2$, люпинин — $C_{10}H_{19}ON$, спартеин (пахикарпин) — $C_{15}H_{24}N_2$, гидроксилупанин — $C_{15}H_{20}O_2N_2$).

Для приготовления 25,0 мл раствора сухо-го экстракта семян люпина точную навеску экстракта массой 0,2502 г растворили в дистиллированной воде в мерной колбе на 25,0 мл.

Для приготовления 10,0 мл раствора сухо-го экстракта корней люпина точную навеску экстракта массой 1,0070 г растворяли в 10 мл дистиллированной воды.

В данном сообщении приведены результаты разработки новой методики количественного определения содержания суммы алкалоидов в сухих экстрактах семян и корней люпина многолистного методом амперометрического титрования с использованием как аналитического реагента гетерополианиона (ГПА) структуры Кеггина [7]. Аналитический реагент обладает уникальными свойствами (устойчивый состав, ионообменная и окислительно-восстановительная способность), может образовывать устойчивые ионные ассоциаты с органическими азотсодержащими катионами, для которых характерна малая растворимость в воде и значительная - в органических растворителях.

Исходя из того, что между определяемыми веществами и титрантом происходит реакция с образованием малорастворимого соединения, а титрант является электроактивным веществом, возможно амперометрическое титрования суммы алкалоидов люпина водным раствором МФК с индикацией точки эквивалентности по силе диффузионного тока электровосстановления гетерополианиона $PMo_{12}O_{40}^{3-}$.

Прямое амперометрическое титрование суммы алкалоидов выполняют с использованием электрохимической ячейки, которая состоит из исследуемого раствора и системы электродов: индикаторного - торцевого графитового вращающегося электрода и электрода сравнения - насыщенного каломельного полуэлемента. Аликвотный объем приготовленного раствора экстракта семян люпина (2,0 мл) вносят в электрохимическую ячейку, разведенным раствором кислоты (H_2SO_4) доводят pH раствора до 5,5, на электроды накладывают напряжение 0,05 В и через 2-3 мин фиксируют величину «нулевого» тока. Титруют предварительно приготовленным $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л водным раствором МФК порциями по 0,5 мл.

Величину силы диффузионного тока фиксируют, через 30-35 с после добавления титранта. Амперометрическое титрование заканчивают после установления постоянного значения силы диффузионного тока и определяют объект конечной точки титрования (КТТ) (рис.1).

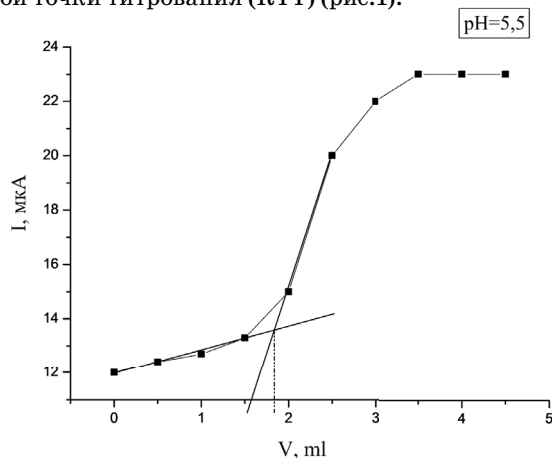


Рис. 1. Кривая амперометрического титрования суммы алкалоидов в экстракте семян люпина многолистного раствором МФК: $V_{\Sigma alk} = 2,0$ мл, $С_{МФК} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, pH 5,5

Содержание суммы алкалоидов в экстракте семян люпина рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{C_{МФК} \cdot V_{МФК}}{1000} \cdot 3 \cdot M_{\Sigma alk},$$

где: $C_{МФК}$ – молярная концентрация 12-молибдофосфорной гетерополикислоты, моль/л;

$V_{МФК}$ – объем титранта, который был использован на титрование, мл;

$M_{\Sigma alk}$ – молярная масса суммы алкалоидов люпина, равная 227,25 г/моль;

3 – стехиометрический коэффициент реакции взаимодействия между ГПА $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ суммой алкалоидов.

$$m = \frac{1,7 \cdot 10^{-3}}{1000} \cdot 3 \cdot 227,25 = 0,001160 \text{ г},$$

где m – масса суммы алкалоидов в 2,0 мл раствора.

$$x_1 = \frac{25 \cdot 0,0060}{2} = 0,145 \text{ г},$$

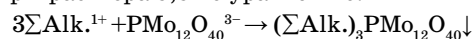
где x_1 – масса алкалоидов в 25,0 мл раствора.

$$x_2 = \frac{0,145 \cdot 100}{0,2502} = 5,795\%,$$

где x_2 – массовая концентрация суммы алкалоидов в экстракте семян люпина многолистного.

Результаты амперометрического титрования показывают, что органические катионы алкалоидов в экстракте семян люпина взаимодействуют

с гетерополианионом 12 – молибдофосфорной гетерополикислоты в мольном соотношении $\Sigma Alk.^{1+} : PMo_{12}O_{40}^{3-} = 3:1$, а исследуемая реакция происходит стехиометрически в водном растворе при pH раствора 5,5 по уравнению:



с образованием устойчивого малорастворимого ионного ассоциата.

Метрологические характеристики результатов определения суммы алкалоидов в сухом экстракте семян люпина многолистного представлены в табл. 1

Таблица 1

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ АЛКАЛОИДОВ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ СЕМЯН ЛЮПИНА МНОГОЛИСТНОГО (N = 7, P = 0,95)

Введено, мг (теор.)	Найдено, мг	Найдено, %	Метрологические характеристики
1,160	1,165	100,43	$\bar{X} = 1,158$ мг $S = 0,009$ $S_x = 0,003$ $\Delta x = 0,008$ $RSD = 0,78\%$ $\varepsilon = 0,73\%$ $\delta = 0,17\%$
	1,165	100,43	
	1,172	101,03	
	1,152	99,31	
	1,150	99,14	
	1,150	99,14	
	1,152	99,31	

В корнях люпина алкалоиды находятся в незначительном количестве. Для расчета содержания алкалоидов в сухом экстракте корней люпина использовали подход аналогичный как при анализе экстракта семян.

Аликвотный объем приготовленного раствора экстракта корней люпина (2,0 мл) вносят в электрохимическую ячейку, pH раствора 5,2 и на электроды накладывают напряжение 0,05 В и через 2–3 мин фиксируют величину «нулевого» тока. Титруют предварительно приготовленным $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л водным раствором МФК порциями по 0,50 мл. Величину силы диффузионного тока фиксируют через 30–35 с после добавления титранта. Амперометрическое титрование заканчивают после установления постоянного значения силы диффузионного тока и определяют значение конечной точки титрования (КТТ) графически по кривой титрования (рис. 2).

Содержание суммы алкалоидов в сухом экстракте корней люпина многолистного рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{C_{МФК} \cdot V_{МФК}}{1000} \cdot 3 \cdot M_{\Sigma alk},$$

где: $C_{МФК}$ – молярная концентрация 12-молибдофосфорной гетерополикислоты, моль/л;

$V_{МФК}$ – объем титранта, израсходованный на титрование, мл;

$M_{\Sigma alk.}$ – молярная масса суммы алкалоидов люпина, равная 227,25 г / моль;

z – стехиометрический коэффициент реакции взаимодействия ГПА $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ с суммой алкалоидов.

$$m = \frac{1,5 \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{1000} \cdot 3 \cdot 227,25 = 0,00511 \text{ г},$$

где m – масса суммы алкалоидов в 2,0 мл раствора.

$$x_1 = \frac{10 \cdot 0,00511}{2} = 0,025 \text{ г},$$

где x_1 – масса алкалоидов в 10 мл раствора.

$$x_2 = \frac{0,025 \cdot 100}{1,0070} = 2,483\%$$

где x_2 – массовая концентрация суммы алкалоидов в экстракте корней люпина многолистного.

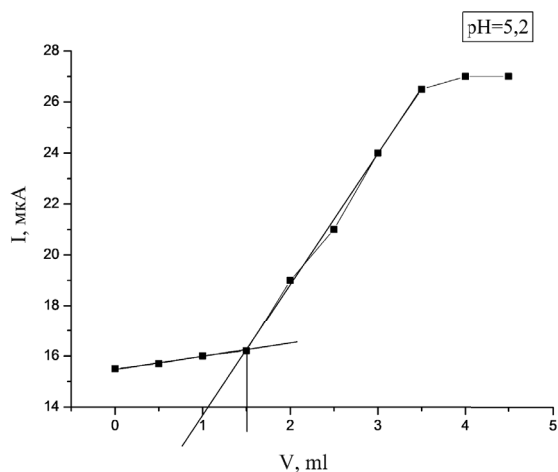


Рис. 2. Кривая амперометрического титрования суммы алкалоидов в экстракте корней люпина раствором МФК: $V_{\Sigma alk.} = 2,0$ мл, $C_{МФК} = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, pH 5,2

Метрологические характеристики результатов определения суммы алкалоидов в сухом экстракте корней люпина многолистного представлены в таблице 2.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определенно содержание суммы алкалоидов в сухих экстрактах семян и корней люпина многолистного, которое составило 5,795 % и 2,483 % соответственно.

Метрологические характеристики предложенной методики определения суммы алкалоидов в сухих экстрактах семян и корней люпина методом амперометрического титрования свидетельствуют о её простоте, высокой точности,

экспрессности и достаточной чувствительности ($\delta < RSD$).

Таблица 2

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ АЛКАЛОИДОВ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ КОРНЕЙ ЛЮПИНА МНОГОЛИСТНОГО (N =7, P =0,95)

Введено, мг (теор.)	Найдено, мг	Найдено, %	Метрологические характеристики
5,11	5,061	99,06	$\bar{X} = 5,1$ мг $S = 0,04$ $S_x = 0,02$ $\Delta x = 0,04$ $RSD = 0,86\%$ $\epsilon = 0,80 \%$ $\delta = 0,14 \%$
	5,140	100,58	
	5,181	101,38	
	5,079	99,39	
	5,079	99,39	
	5,140	100,58	
	5,140	100,58	

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Акритиду Х. П. Люпин – культура больших возможностей / Х. П. Акритиду, В. В. Бойник, О.В. Демешко // Тезисы доклада 1 международной научно-практической конференции «Функциональные пищевые продукты – диетические добавки как действенное средство разноплановой профилактики заболеваний». 11-12 апреля 2013. — Харьков : «ЕСЕН». — С. 5-6.
2. Количественное определение алкалоидов в люпине: Метод. пособие / А. И. Артюхов, Т.В. Яковенко, Е. В. Афонина, Л. В. Трошина. — Брянск : ГНУВНИН, 2012. — 16 с.
3. Использование люпиновой муки для производства функциональных продуктов / Е. Е. Курчаева и др. // Хранение и переработка сельхоз сырья. — 2011. — № 10. — С. 63–64.
4. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А. М. Гродзинський. – К. : Голов, ред. УРЕ, 1990. — 544 с.
5. Орехов А.П. Химия алкалоидов /А. П. Орехов. — М. : АН СССР. — 1955. — 828 с.
6. Пащенко Л. П. Перспективы применения люпина в технологии продуктов питания / Л. П. Пащенко, И. П. Черных, В. Л. Пащенко// фундаментальные исследования. – 2006. – № 6. – С. 101-102
7. Ткач В.І. Гетерополіаніони як аналітичні реагенти на азотвміщуючі органічні речовини / В. І. Ткач. – Дніпропетровськ : ДДУ, 1995. – 196 с.
8. Determination of quinolizidine alkaloids in different Lupinus species by NACE using UV and MS detection Original Research Article / M. Ganzera, A. Krüger, M. Wink // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2010. — Vol. 53, №5. — P. 1231-1235.

9. Evaluation of the Correlation between the Content of Alkaloids and Chemical Elements in Washington Lupine (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) Based on Statistical Analysis and Mathematical Simulation / G. N. Buzuk, M. Ya. Lovkova, S. M. Sokolova and Yu. V. Tyutekin // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2002. — Vol. 38, № 3. — P. 286-293

УДК 543.49.665.765-404.921.892.27:661.184.23

Х. П. Акрітіду, В.В. Бойнік, М.С. Блажеєвський

ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ АЛКАЛОЇДІВ В СУХИХ ЕКСТРАКТАХ З НАСІННЯ ТА КОРЕНІВ ЛЮПІНА БАГАТОЛИСТОГО МЕТОДОМ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ТИТРУВАННЯ

Розроблено методику кількісного визначення суми алкалоїдів в сухих екстрактах насіння та коренів люпину багатолістого методом амперометричного титрування з використанням як аналітичного реагенту – 12-молібдофосфатної гетерополікислоти. Запропонована методика відзначається точністю, простотою, експресністю та достатньою чутливістю.

Ключові слова: амперометричне титрування, сума хінолізидинових алкалоїдів, сухі екстракти насіння та коренів люпину багатолістого.

UDC 543.49.665.765-404.921.892.27:661.184.23

Ch. P. Akritidou, V. V. Boynik, N. Ye. Blazheyevskiy

DETERMINATION OF TOTAL ALKALOIDS IN DRY EXTRACTS SEEDS AND ROOTS LUPINUS MULTIVALENT METHOD AMPEROMETRIC TITRATION

The method of quantitative determination of choice amounts of alkaloids in the extract *Lupinus* by amperometric titration method using analytical reagent — 12 molybdohphosphateheteropolyacid. The technique is marked by simplicity, precision, accuracy, the express and sufficient sensitivity.

Key words: amperometric titration, quinolizidine alkaloids, hydroiodide choice amounts, the amount of alkaloid, dry extract of lupine seeds and roots.

Адреса для листування:

61168, г. Харьков, ул. Блюхера 4
Кафедра фармакогнозії НФаУ
Тел. (0572) 67-92-08

Надійшла до редакції:

12.01.2015 р.