

## CHROMATOGRAFICZNA METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA ALKALOIDÓW ŁUBINOWYCH

I. REIFER, J. PRZEŹDZIECKA i D. KLECZKOWSKA

Jaminet (1), Wiewiórowski i Bratek (8) oraz Schwarze i Hackbarth (7) zastosowali metodę chromatografii bibułowej do wykrywania alkaloidów łubinowych. Do rozdziału czterech głównych alkaloidów występujących w łubinach gorzkich, a mianowicie lupaniny, hydroksylupaniny, sparteiny i lupininy, wymienieni autorzy stosowali dwa względnie trzy układy rozwijające, ponieważ w każdym układzie dwa alkaloidy posiadały bardzo zbliżone  $R_F$ .

Niniejsza praca miała na celu przebadanie wpływu oczyszczania wyciągów alkaloidów w zastosowaniu do ich ilościowego oznaczania metodą chromatograficzną oraz opracowanie takiej fazy rozwijającej, która umożliwiałaby rozdział wszystkich czterech alkaloidów i ich oddzielne oznaczenie po eluacji z bibuły.

### C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a

Do chromatograficznego rozdziału alkaloidów stosowano technikę krążkową używając bibuły Whatman 3. Wycinano krążki o średnicy 15 cm, język dług. 5 cm i szer. 3 mm. Roztwory wodne względnie chloroformowe alkaloidów наносzono na obwodzie koła o średnicy 2,5 cm na wycinkach o dług. od 0,5 cm i więcej w zależności od zawartości alkaloidów w próbie. Roztwory alkaloidów nakraplano odmierzając pipetami Carlsberg'a i suszono na zimno za pomocą suszarki fryzjerskiej.

Stosowano fazę rozwijającą o składzie: n-butanol nasycony kwasem solnym-toluen (4 : 1). Fazę przygotowano w następujący sposób: 100 ml n-butanolu wytrząsano w rozdzielaczu z 300 ml rozcieńczonego kwasu solnego (HCl o d. 1,19 rozcieńczony wodą w stos. 1 : 3). Po oddzieleniu fazy wodnej (A) od fazy alkoholowej tę ostatnią wytrząsano z 25 ml toluenu. Górną fazę butanol-toluen (B) sączono przez sączek z bibuły. Ponieważ faza ta jest trwała, nie wymaga ona regeneracji.

Rozwijanie chromatogramów w tym układzie rozpuszczalników przeprowadzono w eksykatorze o średnicy 21 cm. W eksykatorze umieszczano szalkę Petriego o średnicy 10 cm, zawierającą ok. 15 ml kwasu solnego nasyconego butanolem (A). Na środku szalki ustawiano naczynko wagowe (wysokość 4 cm, średnica 25 mm), do którego wlewano ok. 5 ml fazy (B). Otwór naczynka zwężano za pomocą nie wystającej ponad brzegi naczynka obrączki z korka z otworem o średnicy 10 mm. Odległość między bibułą a powierzchnią fazy wynosiła do 3,5 cm. Eksykatory uszczelniano plasteliną.

Chromatogramy rozwijano ok. 24 godzin. Następnie usuwano pozostałości rozpuszczalników przez odparowanie za pomocą suszarki fryzjerskiej. Suche chromatogramy spryskiwano odczynnikami Dragendorffa w modyfikacji Muniera i współpracowników (3, 4, 5).

Plamy poszczególnych alkaloidów wycinano, cięto na poprzeczne skrawki, alkalizowano 0,4 N roztworem wodorotlenku sodowego (od 0,4 ml — 1,0 ml do całkowitego zwilżenia pociętych skrawków) i ekstrahowano w rozdzielaczu o poj. 25 ml chloroformem 4 razy po 5 ml. Zawartość alkaloidu w wyciągu chloroformowym oznaczano kolorymetryczną

Tabela 1

## Oznaczanie alkaloidów po rozdziale chromatograficznym

Lp.	Wg alkaloidów											
	HL			S			L			Li		
	nakroplono	wykryto	różnica w %%	nakroplono	wykryto	różnica w %%	nakroplono	wykryto	różnica w %%	nakroplono	wykryto	różnica w %%
1	11,0	10,6	-3,6	6,7	6,6	-1,5	10,0	9,8	-2,0	6,4	6,4	0,0
2	22,0	22,0	0,0	15,4	13,4	0,0	20,0	20,0	0,0	12,8	13,0	+1,6
3	11,0	11,0	0,0	20,1	20,0	-0,5	10,0	9,8	-2,0	25,6	25,0	-2,3
4	55,0	55,5	+0,9	6,7	6,6	-1,5	50,0	49,0	-2,0	6,4	6,2	-3,1
5	64,8	62,0	-4,2	6,7	6,6	-1,5	—	—	—	—	—	—
6	5,4	5,0	-7,4	53,6	51,2	-4,5	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	6,7	6,8	+1,5	60,0	61,5	+2,5	—	—	—
8	—	—	—	93,8	96,0	+2,3	10,0	9,2	-8,0	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	60,0	61,0	+1,6	6,1	5,6	-8,2
10	—	—	—	—	—	—	10,0	10,2	+2,0	85,4	79,0	-7,5

W przypadku bardzo niskich względnie bardzo wysokich stężeń alkaloidów ekstrahowano je z bibuły do odpowiednio mniejszej lub większej ilości chloroformu.

HL — hydroksylupanina

S — sparteina

L — lupanina

Li — lupinina

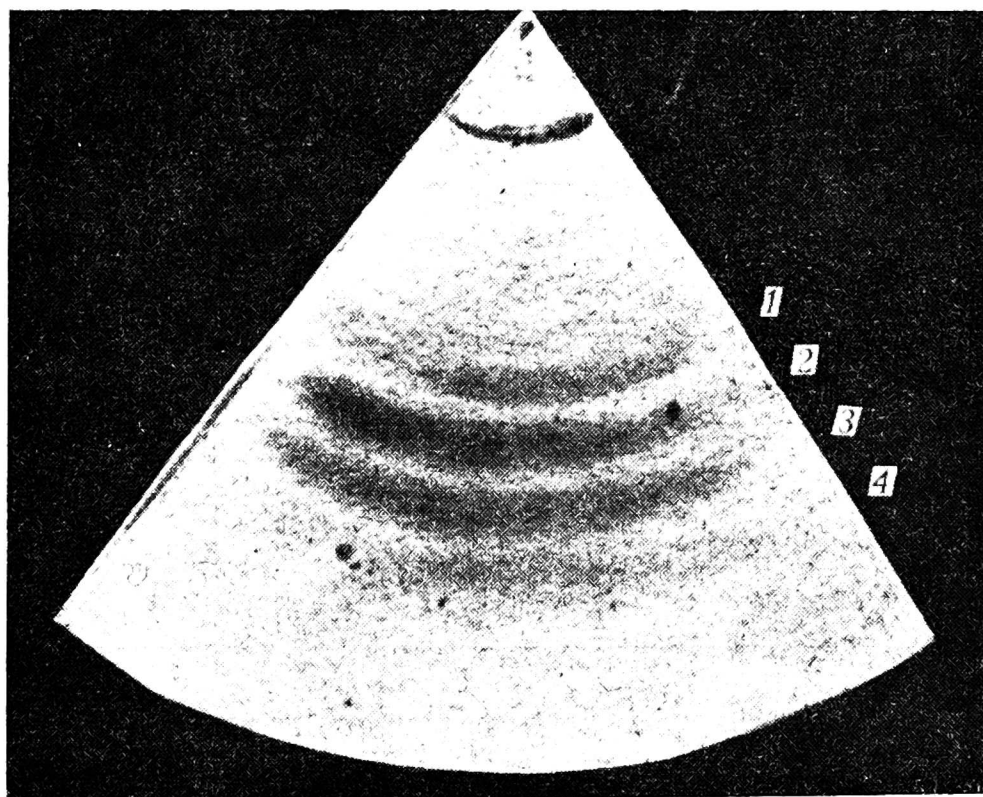
\* Wata opatrunkowa stosowana w tej metodzie do sączenia wyciągów chloroformowych powinna być przed użyciem odtłuszczona eterem.

metodą Reifera i Niziołka (6)\*. Oznaczenia wg. tej metody należy przeprowadzać w pomieszczeniach absolutnie wolnych od par lotnych kwasów i zasad.

Wymienioną fazę rozwijającą przebadano na mieszaninie roztworów czystych alkaloidów. Jak wynika z tabeli 1. oznaczenia każdego z czterech alkaloidów po eluacji z chromatogramów są zgodne z wynikami bezpośrednich oznaczeń kolorymetrycznych na czystych roztworach. W tabeli podano średnie wartości z 2—4 równoległych oznaczeń.

Odległości między poszczególnymi alkaloidami na chromatogramie są dostatecznie duże, tak że rozdzielają nawet wówczas, gdy znajdują się one w stosunku 1 : 10. Plama lupininy po spryskaniu odczynnikami Dragendorffa jest mało intensywna, dobrze widoczna jest dopiero po wysuszeniu.

Na rys. 1 przedstawiony jest układ poszczególnych alkaloidów na chromatogramie. Ustalono  $L_{Li}$  czyli stosunek przesunięcia poszczególnych alkaloidów w odniesieniu do lupininy i tak dla hydroksylupaniny, sparteiny i lupaniny wynosi on 0,57, 0,71 i 0,86.



Rys. 1. Rozmieszczenie poszczególnych alkaloidów na chromatogramie: 1 — hydroksylupanina, 2 — sparteina, 3 — lupanina, 4 — lupinina

Dla sprawdzenia przydatności opracowanej metody chromatograficznej do oznaczania alkaloidów w materiale roślinnym przeanalizowano nasiona i zielone części łubinu wąskolistnego, białego i żółtego. Ekstrakcję

Tabela 2

Wyniki oznaczeń alkaloidów w oczyszczonych wyciągach łubinowych (6)

L. p.	Materiał	Nazwa alkaloidu	% alkaloidow		Różnica w %%
			wg metody Reifera i Niziołka	wg opisanej metody	
1	Łubin wąskolistny nasiona	HL	0,667	0,536	
		L	0,816	0,812	
		P <sub>W2</sub>		0,115*	
Suma			1,483	1,463	1,4
2	Łubin wąskolistny kielki	P <sub>W1</sub>		0,030*	
		HL	0,855	0,467	
		L	1,127	1,230	
		P <sub>W2</sub>		ślady	
		P <sub>W3</sub>		0,144*	
Suma			1,982	1,871	5,6
3	Łubin biały nasiona	P <sub>B1</sub>		ślady*	
		P <sub>B2</sub>		0,113*	
		HL	0,640	0,161	
		L	1,641	1,641	
		P <sub>B3</sub>		ślady*	
Suma			2,281	1,915	11,6
4	Łubin biały kielki	P <sub>B1</sub>		0,310*	
		P <sub>B2</sub>			
		HL	0,377		
		L	3,143		
		P <sub>B3</sub>			
Suma			3,520	3,427	2,6
5	Łubin żółty nasiona	P <sub>Z1</sub>		0,106**	
		S	0,199	0,109	
		Li	0,610	0,457	
Suma			0,809	0,758	6,3
6	Łubin żółty kielki	P <sub>Z1</sub>		0,026**	
		S	0,511	0,512	
		Li	0,822	0,609	
		P <sub>Z2+3</sub>		0,145**	
Suma			1,333	1,292	3,0

Wszystkie wartości odnoszą się do suchej masy.

HL — hydroksylupanina P<sub>1</sub> P<sub>2</sub> — itd. plamy innych zasad na chromatogramie

S — sparteina

\* — obliczone jako hydroksylupanina

L — lupanina

Li — lupinina

\*\* — obliczone jako lupinina

alkaloidów z roślin przeprowadzono metodą Reifera i Niziołka (6). Na chromatogramach stwierdzono obok znanych alkaloidów obecność dodatkowych plam. Plamy te w miarę wzrastających wartości  $R_{Li}$  nazwano  $P_1$ ,  $P_2$  itd.

W tabeli 2 zestawiono wyniki oznaczeń zawartości alkaloidów w nasionach i kielkach łubinów gorzkich. Porównano wyniki oznaczeń w wyciągach z chromatogramów z wynikami bezpośrednich oznaczeń metodą Reifera i Niziołka.

Wszystkie metody oznaczania alkaloidów w materiale roślinnym obejmują zasadniczo ekstrakcję alkaloidów, oczyszczanie otrzymanego wyciągu i ilościowe oznaczenie. Dlatego m. in. przy opracowywaniu opisanej metody szczególną uwagę zwrócono na to, w jakim stopniu należy oczyszczać wyciągi łubinowe dla uzyskania poprawnych wyników w oparciu o ilościowy rozdział alkaloidów na chromatogramie. Przebadano nieoczyszczone chloroformowe wyciągi roślinne oraz oczyszczone jedno- i dwukrotnie. Do oczyszczania materiałów wprowadzono dwie nieznaczące modyfikacje, a mianowicie chloroform oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem oraz zaniechano oczyszczania chlorowodorków alkaloidów eterem naftowym. Wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Jak widać z tabeli 3, uzyskano we wszystkich przypadkach wyniki zgodne w granicach błędu metody. W oparciu o te spostrzeżenia nanoszono na chromatogramy bezpośrednio pierwsze wyciągi chloroformowe. Wyciągi przygotowywano w następujący sposób: w zależności od zawartości alkaloidów w badanej próbce rozcierano od 0,5—2 g materiału łubinowego z stężonym roztworem amoniaku w moździerzu porcelanowym o średnicy 6 cm przez 30 min. Następnie ciodawano porcjami odpowiednią ilość ziemi okrzemkowej (ok. 1 g) i ucierano do otrzymania sypkiego i optycznie suchego proszku. Proszek ten przenoszono do suchego cylindra o poj. 50 ml z dobrze doszlifowanym korkiem. Moździerz wycierano małą ilością ziemi okrzemkowej, którą przenoszono do cylindra. Następnie do cylindra dodawano 30 ml chloroformu, przemywając porcjami moździerz i lejek, po czym wytrząsano na wytrząsarce przez 30 min. Zawartość cylindra sączono na nuczycy G3, przemywano trzykrotnie chloroformem i uzupełniano do 50 ml. Wyciąg chloroformowy nakraplano na bibułę w ilości 50—400  $\mu$ l. W przypadku oznaczania alkaloidów w świeżym materiale zagęszczano odpowiednio wyciąg chloroformowy pod zmniejszonym ciśnieniem przed nakropieniem na bibułę.

W tabeli 4 zestawiono wyniki analiz uzyskane metodą chromatograficzną dla materiału świeżego i suszonego w temp. 105°.

## Wyniki oznaczeń alkaloidów w zależności

Materiał	Łubin wąskolistny						
	Nasiona w % s. m.			Kiełki w % s. m.			
	HL	L	P <sub>W2</sub>	P <sub>W1</sub>	HL	L	P <sub>W2+3</sub>
Alkaloidy w przebadanych wyciągach							
Pierwszy wyciąg chloroformowy	0,450 0,450	0,660 0,705	0,135	0,030	0,487	1,175	0,135
Przesączony pierwszy kwaśny wyciąg wodny	0,435 0,440	0,663 0,650	0,135 0,135	—	0,473	1,197	0,138
Drugi wyciąg chloroformowy	0,444 0,424	0,640 0,668	0,128	—	0,484	1,159	0,139
Drugi kwaśny wyciąg wodny	0,445 0,442	0,660 0,699	0,132 0,134	—	0,467	1,230	0,144

Średnie wartości równoległych naważek materiału

HL — hydroksylupanina

L — lupanina

S — sparteina

Li — lupinina

P — plamy innych zasad na chromatogramie

## Dyskusja

Znane dotychczas metody chromatografii bibułowej alkaloidów łubinowych wymagają użycia dwóch względnie trzech układów rozpuszczalników dla przeprowadzenia rozdzielania hydroksylupaniny, sparteiny, lupaniny i lupininy.

Opisana faza rozwijająca n-butanol nasycony kwasem solnym — toluen (4:1) w ustalonych warunkach doświadczalnych umożliwia rozdział wymienionych alkaloidów i oddzielne ich oznaczenie. Ponadto metoda chromatograficzna pozwala na wykrywanie i oznaczenie innych zasad występujących w łubinach gorzkich. Na obecność dodatkowych zasad o charakterze alkaloidowym w wyciągach łubinowych zwrócili uwagę Wiewiórowski i Bratek (8, 9), Van der Kuy (2) oraz Schwarze i Hackbarth (7).

Na chromatogramach z nasion i kielków łubinu wąskolistnego rozwijanych w podanym przez nas układzie wykryto plamę odpowiadającą angustifolinie względnie lupininie. Ponieważ obie te zasady umiejscawiają się w opisanym układzie bez rozdzielania, plama P<sub>W2</sub> może być zarówno jednym jak drugim alkaloidem. Jednak z analizy chromatograficznej w fazie opisanej przez Wiewiórowskiego i Bratek wynika, że

Tabela 3

od oczyszczenia materiału łubinowego

Łubin biały						Łubin żółty						
Nasiona w % s. m.		Kiełki w % s. m.				Nasiona w % s. m.			Kiełki w % s. m.			
$P_{B1+2}$	$\bar{L}$	$P_{B1+2}$	HL	L	$P_{P3}$	$P_{Z1}$	S	Li	$P_{Z1}$	S	Li	$P_{Z\epsilon 2+}$
0,350	1,610 1,610 1,600	0,065	0,104	1,840	0,120	0,100	0,150	0,425	0,065	0,462	0,638	0,145
0,353	1,606 1,488	—	0,108	1,850	0,121	0,099	0,151	0,422	—	—	—	—
0,350	1,515 1,509	—	0,112	1,908	0,119	0,098	0,150	0,399	—	—	—	—
0,351	1,597 1,578	0,066	0,108	1,948	0,110	0,106	0,154	0,410	0,026	0,492	0,609	0,145

plama  $P_{W2}$  odpowiada angustifolinie. Ponadto w kielkach stwierdzono dwie nieznane zasady: jedną w ilościach śladowych leżącą poniżej hydroksylupaniny, drugą o  $R_{Li} = 1,28$ .

W łubinie białym w nasionach i kielkach wykryto oprócz lupaniny i hydroksylupaniny trzy dodatkowe zasady o  $R_{Li}$  1,27,044 i jedną niewyraźną smugę poniżej hydroksylupaniny. W odróżnieniu od danych cytowanych w piśmiennictwie (2,8) nie stwierdzono obecności sparteiny.

W nasionach łubinu żółtego zaobserwowano występowanie obok sparteiny i lupaniny zasady o  $R_{Li}$  0,52, w kielkach zaś jeszcze dwóch zasad o  $R_{Li}$  1,44 i 1,66. Nie wykryto lupaniny ani hydroksylupaniny (2).

Jak wynika z tabeli 1, w przypadku mieszaniny roztworów czystych alkaloidów uzyskano wyniki powtarzalne i obciążone niewielkim błędem nawet wówczas, gdy położone najbliżej siebie alkaloidy znajdowały się w stosunku stężeń 1 : 10.

Wartości na sumę alkaloidów uzyskane metodą opisaną są zgodne z wynikami oznaczeń metodą Reifera i Niziołka w granicach błędu metody. Wykazano, że wyniki otrzymane metodą Reifera i Niziołka są zazwyczaj nieco wyższe, a różnice dochodzą do 11,6% (tab. 2). Nasiona i zielone części przebadanych łubinów zawierają poza znanymi alkaloidami jeszcze inne zasady reagujące zarówno z odczynnikiem Dragendorffa jak oranżem metylowym. W metodzie Reifera i Niziołka zasady wystę-

Tabela 4

Wyniki oznaczeń alkaloidów w świeżym i suszonym materiale łubinowym

L. p.	Materiał	Nazwa alkaloidu	% alkaloidów w suchej masie	
			w kielkach świeżych	w kielkach suszonych
1	Łubin wąskolistny	HL	0,507*	0,487*
		L	0,156	1,175
		P <sub>W2+3</sub>	0,137*	0,139*
		Suma	1,800	1,801
2	Łubin biały	P <sub>B1+2</sub> } HL }	0,311	0,310
		L	3,050	2,760
		P <sub>B3</sub>	0,330	0,517
		Suma	3,691	3,587
3	Łubin żółty	P <sub>Z1</sub>	0,086	0,065**
		S	0,450	0,462
		Li	0,600	0,638
		P <sub>Z2+3</sub>	0,143	0,145**
		Suma	1,279	1,310

HL — hydroksylupanina

S — sparteina

L — lupanina

Li — lupinina

P — plamy innych zasad na chromatogramie

\* — obliczone jako hydroksylupanina

\*\* — obliczone jako lupinina

pujące w łubinie białym i wąskolistnym oznaczone są razem z hydroksylupaniną, w łubinie zaś żółtym razem z lupiną.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie alkaloidów w surowych wyciągach chloroformowych zarówno z materiału świeżego, jak i suszonego. Metoda ta jest szybka, pomija bowiem kłopotliwe i pracochłonne oczyszczanie materiału roślinnego.

#### LITERATURA

1. Jaminet Fr. — J. Pharm. Belg., 8, 9, 1954.
2. Kuy A. Van der — Bijdrage tot de Kennis van alkaloide-vorming by enkele species van het genus *Lupinus*. Oranjeplein 96: Gravenhage, 1956.
3. Munier R., Macheboeuf M. — Bull. Soc. Chim. biol. 31, 1144, 1949.
4. Munier R., Macheboeuf M. — Bull. Soc. Chim. biol. 33, 846, 1951.
5. Munier R., Macheboeuf M., Cherrier N. — Bull. Soc. Chim. biol. 34, 204, 1952.
6. Reifer I., Niziołek S. — Acta Biochim. Polon. 4, 165, 1957.



7. Schwarze P., Hackbarth J. — *Der Züchter* **27**, 332, 1957.
8. Wiewiórowski M., Bratek D. — *Acta Soc. Bot. Pol.* **26**, 129, 1957.
9. Wiewiórowski M., Galinovsky F., Bratek M. D. — *Mh. Chem.* **88**, 663, 1957.

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЮПИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

И. Рейфер, И. Пржездзецка, Д. Клечковска

### С о д е р ж а н и е

Разработан новый развивающий фазис со следующим составом: алкоголь *n*-бутиловый насыщенный соляной кислотой — толуэн в отношении 4 : 1, который делает возможным отчетливый раздел 4 главных алкалоидов, выступающих в люпинах. Этот фазис исследовано в определенных условиях ободочной бумажной хроматографии и установлено следующую последовательность размещения алкалоидов: гидроксилупанин, спартеин, лупанин и лупинин. Точное разделение названных алкалоидов является возможным даже тогда, когда лежащие ближе всего себя алкалоиды находятся в количественном отношении 1 : 10. Из хроматограмм проявленных реактивом Драгендорффа были вырезаны пятна отдельных алкалоидов. Эти вырезки смачивали щелочью и экстрагировали хлороформом. В хлороформовой вытяжке было определено содержание алкалоидов методом Рейфера и Низёлка. Результаты определений каждого из 4 алкалоидов с развитых и проявленных хроматограмм, соглашаются с результатами непосредственных колориметрических определений на чистых растворах.

Описанный метод является пригодным для определения алкалоидов у синего, белого и жёлтого люпинов в муке и зелёной массе. Исследовано неочищенные хлороформовые растительные экстракты, а также очищенные одно- и двухкратно и получено во всех случаях результаты сходные в пределах ошибки метода. Возможность определения алкалоидов в неочищенных хлороформовых вытяжках, разрешает избежать хлопотливую и требующую много работы очистку растительного материала.

На развитых хроматограммах с помощью выше описанного фазиса установлено, кроме того добавочные пятна с реактивом Драгендорффа. Хроматограммы из экстрактов семян синего люпина дают добавочно полосу, которая лежит выше лупанина, из семян белого люпина полосу, которая лежит ниже гидроксилупанина, из семян жёлтого люпина — слабо видимую полосу ниже спартеина. Хроматограммы экстрактов из надземных частей проростков люпина обнару-

живают, рядом с известными алкалоидами, присутствие 3 добавочных полосок. Однако, ни в коем случае количество этих неизвестных щелочей не превышает 10% суммы алкалоидов.

## CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF LUPIN ALKALOIDS

*I. Reifer, G. Przeździecka, D. Kleczkowska*

### S u m m a r y

A new developing phase, consisting of n-butyl alcohol saturated with toluene-hydrochloric acid in proportions of 4:1, has been worked out, it makes the separation of the 4 main lupin alkaloids possible. This phase was tested under standard conditions using filter-paper disc chromatography and the following sequence of the alkaloids was established: hydroxylupanine, sparteine, lupanine, lupinine. An accurate separation of the alkaloids is possible even when adjacent alkaloids are in a proportion of 1:10. Spots corresponding to individual alkaloids were cut out from chromatograms which had been developed with Dragendorff's reagent. They were moistened with caustic soda and chloroform extracted. The alkaloid content in the chloroform extracts was determined by the Reifer and Niziołek method. Results of determinations for each of the 4 alkaloids from developed chromatograms are in agreement with results obtained from direct colorimetric determinations done on pure solutions.

The method is suitable for alkaloid determinations in narrow-leaved, white and yellow lupins, in ground dry material and in green mass (dry or fresh). Investigations were carried out on impure plant chloroform extracts and on extracts purified once and twice, and in all cases the results fell within the limits of error for this method.

The possibility of determining alkaloids on raw chloroform extracts allows one to avoid the laborious, time-consuming purifications of plant material.

Using Dragendorff's reagent, additional spots were found on chromatograms developed with the phase described. In chromatograms of extracts from narrow-leaved lupin seeds an additional spot occurs lying above lupanine, whereas in the extracts of white lupin seeds there is an additional spot below hydroxylupanine and in yellow lupin seed extracts an additional spot is visible below sparteine. On chromatograms of extracts of the serial portions of lupin seedlings 3 additional spots were found besides those of the known alkaloids. In no case however, does the quantity of these unknown systems exceed 10% of the alkaloid total.