

## Csillagfürt alkaloidtartalmának mennyiségi mikromeghatározása reakcióvégpont módszerrel

NÉMETH GYÖRGY és SVÁB JÁNOSNÉ

*Gyulatanyci Kísérleti Gazdaság, Nyírtelek*

Egyes növények alkaloida-anyagcsere (keletkezés, vándorlás, stb.) vizsgálatánál elengedhetetlenül szükséges a növényi egyedek egyes szerveiben, vagy azok részeiben az alkaloidtartalom kvantitatív meghatározása. Ilyen például az alkaloidtartalmú növények nemesítése. Ezirányú munkánkban túlnyomórészt édescsillagfürttel foglalkozunk.

Tekintettel az édescsillagfürt kis (0,05—0,01 szárazanyag %) alkaloidtartalmára és arra, hogy kutatómunkánkban 100—500 mg szárazanyagtartalmú növényi részek kvantitatív alkaloidmeghatározása vált szükségessé, az eddigiekénél érzékenyebb módszer után kutattunk.

Az irodalomból ismert meghatározások legtöbbszörénél nagy (5—10 g) a kiindulás anyagszükséglete [1, 2, 3, 4]. Még az általunk ismert legérzékenyebb Gyenes-féle p-toluolsulfosavas módszer [1] alsó határa is 0,5 mg alkaloida, mely céljainkra még mindig sok volt.

Kidolgoztunk csillagfürt-alkaloida meghatározásra egy új módszert, amelynél 0,02 mg alkaloida az alsó határ.

### Elvi megfontolások

Bizonyos töménységű alkaloidoldatok különböző kémszerrel, különböző erősségű és a kémszerre jellemző csapadékot adnak. Ismert töménységű alkaloidoldatot lépcsőzetesen felhígítunk és alkaloida-kémszerrel lecsapjuk. Attól függően, hogy milyen kémszert használunk, korábban, vagy későbbben jelentkezik a reakció végpontja, vagyis a töménységnek az a foka, amikor már csapadékképzést nem észlelünk. Ha ugyanazon alkaloidoldat egyazon kémszerrel mindig a hígítás ugyanazon fokán adja a reakció-végpontot, ebből kvantitatív alkaloidvizsgálati módszert dolgozhatunk ki, ismeretlen töménységű anyag ismert hígításának visszaszámítása útján. Ha egyes cseppekben vizsgáljuk a reakció végpontját, akkor mikromódszert kapunk, amellyel igen kismennyiségű alkaloida határozható meg mennyiségileg.

Az ismert alkaloidakémszerek közül a  $K(BiJ_4)$  (komplex káliumbizmutjodid) bizonyult legjobbnak. Lupaninnal képzett csapadéka jellegzetes és jól felismerhető reakciót adott és érzékenyebb is a többiekénél.

Kísérleteket végeztünk a  $K(BiJ_4)$  reakció-végpontjának megállapítására és arra az eredményre jutottunk, hogy cseppreakcióban a kémszer töménységétől függően 0,002—0,003%-os alkaloidoldat a határérték és a reakció végpontja törvényszerűen, mindig azonos töménységnél következik be. Természetesen a reakcióidőnek is mindig azonosnak kell lenni.

Az 1. táblázatban néhány modellvizsgálat eredményét közöljük. A meghatározásokat 98 C° olvadáspontú kristályos lupaninból készült különböző töménységű oldatok 0,5 ml-éből végeztük, a fentiekben leírt elvek alapján.

Miután gyakorlati céljainknak a fent megadott eredmények megfeleltek, rátértünk a növényi anyagok vizsgálatára.

Kísérleteket végeztünk csillagfürt (*L. albus*, *L. pollyphylus*) mag- és zöld mintákkal, ezenkívül szójamag, lucerna és fűfélék (nem alkaloidás növények) zöld mintáival annak eldöntésére, hogy az alkaloida kivonás folyamatában nem következik-e be olyan kémiai átalakulás, amely esetleg zavar. A vizsgálatok során a *L. albus* minták paralleljei egyező eredményt adtak, az alkaloidamentes növényeknél pedig csapadékot nem kaptunk (2. táblázat.)

*Lupinus luteus* vizsgálatánál a K ( $\text{BiJ}_4$ ) nem bizonyult megfelelőnek, mert az alkaloidával keletkező csapadék fekete színű zavarosodással oldódik és ez a vizsgálatot bizonytalanra teszi. Itt feltehetően a nagyobb inulin-tartalom folytán keletkező hidrolizis-termékek reagálnak a bizmutterrel.

Kísérleteket végeztünk siliko-wolfrámsav 10%-os oldatával, 1% HCl jelenlétében. Az így kapott eredmények megbízhatóak voltak és így *L. luteus* vizsgálatára ezt a kémszert ajánljuk.

1. táblázat

## Néhány modellvizsgálat eredménye

(1) Bemért lupanin	(2) Talált lupanin	(3) Eltérés
%		
0,0416	0,0405	- 2,15
0,0714	0,0720	+ 0,83
0,0500	0,0495	- 1,00
0,0111	0,0108	- 2,70
0,1240	0,1220	- 1,61
0,0768	0,0756	- 1,56

2. táblázat

## Alkaloida-meghatározás növényi anyagból

(1) A n y a g	(2) M e g h a t á r o z á s			
	1.	2.	3.	4.
<i>L. albus</i> .....	0,043	0,043	0,044	0,045
« « .....	0,038	0,039	0,039	0,039
« « .....	0,108	0,110	0,109	0,109
<i>L. pollyphylus</i> .....	1,290	1,292	1,300	1,295
Szója (3) .....	0	0	0	0
Lucerna (4) .....	0	0	0	0
Fűfélék (5) .....	0	0	0	0

## A módszer részletes leírása

Teljesen száraz kémcsőbe bemérünk 100—500 mg légszáraz, őrlött édes csillagfürt növényi részt. Ha keserű csillagfürttel végezzük a meghatározást, elég a fenti mennyiség  $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{50}$ -ed része. 15%-os NaOH-dal átnedvesítjük és 3 óráig állni hagyjuk. Ezalatt a NaOH a sejteket kellő mértékben elroncsolja és az alkaloidákat vegyületeiből szabaddá teszi. 3 óra leteltével hozzáadunk 15 ml éter-kloroform 2:1 arányú keverékét (0,95 fs) és 90 percig rázzuk. 10 percnyi üleptetés után víztelenített  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -on keresztül az éter-kloroform keveréket rázótölcsérbe szűrjük, majd az anyagot tiszta éterrel újból kétszer kirázzuk és ezt is az előbbi rázótölcsérbe szűrjük.

A szüredéket 10 ml 1%-os HCl oldattal fél órán át rázzuk és a sósavas oldatot főzőpohárba folytatjuk. A sósavas kirázást kétszer megismételjük és az

oldatokat egyesítjük. 40—50 C°-on szárazra pároljuk. A pohárban lévő alkaloida-klorhidráthoz annyi ml 2%-os HCl-t adunk, ahány g anyagot bemértünk. Amennyiben nagy alkaloidtartalmú növények 200 mg-ról kisebb részét vizsgáljuk, akkor a hozzávetőlegesen ismert alkaloidtartalom arányában megfelelően több ml HCl-t adunk a bepárolt alkaloida-klorhidráthoz. Az így kapott oldatból 1 cseppet K(BiJ<sub>4</sub>)-dal kémlelünk és ezzel hozzávetőlegesen tájékozódunk az anyag alkaloida-tartalmáról. Ennek ismeretében egy cseppet az alkaloidaoldatból óráüvegre tesszünk és mikrobürettából addig cseppentünk hozzá 2%-os HCl-oldatot, amíg a belőle kivett próbacsepp tárgylemezen K(BiJ<sub>4</sub>)-dal csapadékot már nem ad. (A cseppnagyságról a későbbiekben szólunk részletesen.) Ezt a műveletet réhányszor megismételjük, amíg biztos számot kapunk arra, hogy a K(BiJ<sub>4</sub>)-dal való reakció végpontja hányszoros hígításnál következik be. A hígítás céljából adott cseppek eggyel növelt számát megszorozzuk a K(BiJ<sub>4</sub>) oldat előre megállapított faktorával.

#### A K(BiJ<sub>4</sub>) oldat készítése

80 g bizmut-szubnitrátot 200 g tömény salétromsavban feloldunk, 272 g KJ-ből tömény oldatot készítünk és az előző oldathoz lassan hozzáöntjük. Az így kapott oldat zavaros a kiváló bizmuttól. 200 ml tömény KJ-oldatot készítünk és ebből addig adunk az előbb készített kémszerhez, amíg teljesen tiszta, barra színű oldatot nem kapunk. Az egészet desztillált vízzel 1 literre hígítjuk. Néhány napig sötét üvegben állni hagyjuk.

#### A K(BiJ<sub>4</sub>) oldat faktorának kiszámítása

0,1%-os lupaninoldatot készítünk. Az előzőekben leírt módon, cseppenkint addig hígítjuk, amíg K(BiJ<sub>4</sub>)-dal pelyhes csapadékot már nem ad. Zavarsodást nem veszünk tekintetbe. Az így kapott állandó

$$F = \frac{0,1}{H + 1},$$

ahol H jelenti az alkaloidaoldat hígítását, F pedig a K(BiJ<sub>4</sub>) oldat faktorát. Példa :

Ha 0,1%-os lupaninoldathoz 30 cseppel 1%-os sósavat adunk és azt K(BiJ<sub>4</sub>)-dal reagáljuk, még észlelünk pelyhes csapadékot. Azonban ha 31 cseppet adunk hozzá, pelyhes csapadék már nem képződik azonos reakcióidő mellett. Ekkor a fenti képlet alapján

$$F = \frac{0,1}{31 + 1} = 0,003125$$

a K(BiJ<sub>4</sub>) faktor.

Ha egy ismeretlen oldatot vizsgálunk és azt találjuk, hogy 30 csepprel még van csapadék, 31-nél már nem, akkor

$$(31 + 1) \cdot 0,003125 = 0,1\%$$

az oldat koncentrációja.

A faktor úgy állítjuk be, hogy az 0,003 körül legyen, ennél nagyobb érték a módszer érzékenységének, kisebb érték pedig a pontosságának rovására megy. A tömény K(BiJ<sub>4</sub>) oldat érzékenységét szükség esetén KJ-oldat adagolásával csökkenthetjük. Ajánlatos a faktort időközönként ellenőrizni.

### Megjegyzések a módszer gyakorlati keresztülviteléhez

A módszer mikrojellegénél fogva igen pontos munkát igényel. Nagyon kell ügyelni először is a faktor legpontosabb beállítására, mert ez előfeltétele a módszer megbízhatóságának. Lényeges, hogy mind a faktor beállításakor, mind a vizsgálatok elvégzésekor mindig azonos pipettával, azonos szögben tartva vegyük ki a próba-cseppeket, hogy a cseppnagyság azonos legyen. Az általunk használt pipetták egy cseppje 50 mg körül volt. Esetleges pipettacsere esetén a faktort újra be kell állítani.

A világítási és egyéb külső körülmények mindig azonosak legyenek. Ernyőzött, cca 40 Wattos állólámpát a vizsgáló személytől mindig azonos szögben és távolságra kell beállítani oly módon, hogy a szemre ne legyen fárasztó a világítás és a vizsgált csepp azonos megvilágítását biztosítsa.

Már az előzőekben említettük, hogy a reakcióidő azonossága esetén számíthatunk csak pontos eredményre. Vizsgálatainknál a mintától függően 30—40 másodperces idővel dolgozunk, mely alatt a tárgylemezt gyengén rázogatójuk, hogy a keletkező csapadék könnyebben kiváljon.

A vizsgálat elvégzése közben kerüljük a dohányzást, mert az is befolyásolhatja az eredményt (nikotin). A meghatározásokhoz megfelelő gyakorlat szükséges. Előnye, hogy semmilyen költséges berendezést nem igényel és általa egészen kis növényi részek alkaloidtartalmát meghatározható.

A módszer új úton, minőségi vizsgálat útján jut el mennyiségi eredményhez. Elve esetleg más területen is felhasználható.

### Összefoglalás

Kidolgoztunk egy új mikromódszert csillagfürt alkaloidtartalmának meghatározására, melynek alsó határa 0,02 mg alkaloida, tehát 100—200 mg növényi szárazanyagból elvégezhető. Elve a káliumbizmutjodiddal vagy siliko-wolframsavval fellépő reakció végpontjának meghatározásán alapszik. A növényi mintából az alkaloidákat éter-kloroformmal kivonjuk, majd sósavval kirázzuk. Az így kapott alkaloidoldatot lépcsőzetesen hígítjuk mindaddig, míg káliumbizmutjodiddal, vagy silicowolframsavval csapadékot nem kapunk. A hígítás fokából kiszámítjuk a minta alkaloidtartalmát. *L. luteus* vizsgálatára silikowolframsavat, *L. albus*, *L. poliphyllus* mintáknál káliumbizmutjodidot használunk.

Érkezett: 1953. december 27.

### Irodalom

- [1] Gyenes, I.: M. Kém. Folyóirat, **56**. 383. 1950.
- [2] Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. J. Springer Wien. 1931—1932.
- [3] Mach & Lederle: Landw. Versuchsst., **98**. 117. 1921.
- [4] Notbom & Mayer: Landw. Jahrb., **85**. 1. 1935. **84**. 335. 1937.
- [5] Szabalitschka, Th. & Zahn, M. B.: Z. angew. Chem. **37**. 239. 1924.
- [6] Schwartze, P. & Wollner, Fr.: Züchter, **17/18**. 105. 1947.

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ МИКРООПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЛКАЛОИДОВ В ВИДАХ ЛЮПИНА МЕТОДОМ КОНЕЧНОГО ПУНКТА РЕАКЦИИ

Дь. Немет и Я. Шваб

Дьюлатанянское Опытное Хозяйство, Ньиртелек (Венгрия)

### Резюме

Для определения содержания алкалоидов в люпинах нами разработан микрометод, нижний предел которого — 0,02 мг алкалоидов, т. е. анализ может быть произведен со 100—200 г сухих веществ сладкого люпина. Принцип микрометода заключается в определении



конечного пункта реакции, вызываемой висмутово-иодистым калием или кремневольфрамовой кислотой в постепенно разбавленном растворе алкалоида.

Раствор алкалоида известной концентрации каплями разбавляется 1%-ой соляной кислотой до тех пор, пока взятая из него пробная капля на алкалоидный реагент на предметном стекле уже не даст определенно хлопьевидный осадок. В опытах нами исчислено, при сколькократном разбавлении наступает конечный пункт реакции и какой концентрации он соответствует. Зная предел концентрации раствора алкалоида, при которой уже осадка не получаем, мы можем исчислить процентное содержание алкалоидов в неизвестных растворах.

Результаты опытов (таблица 1.) проведенных на модельных растворах, вполне удовлетворяли нашим практическим целям и на основании этого были испытания распространены на определение содержания алкалоидов в частях растений. В таблице 2. приведено несколько результатов.

Из образцов люпина алкалоид извлекается известным из литературы эфирно-хлороформным взбалтыванием и испаруется до суха. Хлорид гидрат алкалоида постепенно разбавляется до тех пор, пока алкалоидным реагентом в пробной капле уже не наблюдается образование осадков. Из степени разбавления исчисляется оригинальное содержание алкалоидов в испытуемом образце.

Для исследования *Lupinus albus* и *Lupinus polophyllus* употребляется висмутно-иодистый калий, а для образцов *Lupinus luteus* кремневольфрамовая кислота.

Таблица 1.: Результаты некоторых испытаний. (1) Навеска люпинина. (2) Обнаруженный люпинин. (3) Отклонения.

Таблица 2.: Определение алкалоидов из растительных материалов. (1) Испытуемый материал. (2) Результаты параллельных определений. (3) Соя. (4) Люцерна. (5) Gramineae.

## Quantitative Mikrobestimmung des Alkaloidgehaltes der Lupinusarten vermittels der Reaktionsendpunktmethode

G. NÉMETH und J. SVÁB

Versuchsstation von Gyulátanya, Nyírtelek (Ungarn)

### Zusammenfassung

Zur Bestimmung des Alkaloidgehaltes der Lupinusarten wurde eine neue Mikromethode ausgearbeitet, deren untere Messungsgrenze bei einer Alkaloidenmenge von 0,02 mg liegt und die daher schon bei einer Trockensubstanzmenge der süßen Lupine von 100—200 mg durchführbar ist. Das Prinzip der Methode besteht in der Bestimmung des Endpunktes der Reaktion, die sich bei einer stufenweise verdünnten Alkaloidlösung durch Kaliumwismutjodid oder Silico-Wolframsäure ergibt.

Eine Alkaloidlösung von bekannter Konzentration wird tropfenweise durch 1% Salzsäure verdünnt bis diese Lösung am Objektträger mit dem Alkaloidreagenten schon keinen ausgeprägten flockigen Niederschlag ergibt. Es wurde in Modellversuchen bestimmt, in welcher Verdünnung und bei welcher Konzentration der Endpunkt der Reaktion eintritt. Wenn die Verdünnungsgrenze der Alkaloidlösung, bei welcher die Niederschlagbildung schon ausbleibt, bekannt ist, kann auch der prozentuelle Alkaloidgehalt unbekannter Lösungen bestimmt werden.

Aus den Ergebnissen der Modellversuche ging hervor, dass die Methode in praktischer Hinsicht als genügend zuverlässig betrachtet werden kann. Man konnte daher auf Grund des zahlreich vorliegenden Versuchsmaterials die Untersuchungen auch auf die Bestimmung des Alkaloidgehaltes pflanzlicher Organe ausbreiten. Einige Ergebnisse sind in Tabelle 2. angeführt.

Die Alkaloiden werden aus den Lupinusarten nach der allgemein bekannten Aether—Chloroform-Methode ausgeschüttelt und extrahiert. Der Auszug wird dann bis zum Trocknen eingeeengt. Das so erhaltene Alkaloidchlorhydrat wird, wie oben erwähnt, stufenweise verdünnt bis bei Zufügung der Reagenzien die Niederschlagbildung im Tropfen völlig unterbleibt. Aus dem Verdünnungsgrad kann der ursprüngliche Alkaloidgehalt der Proben berechnet werden.

Bei der Untersuchung von *Lupinus albus* und *Lupinus poliphyllus* wird Kaliumwismutjodid, bei *Lupinus luteus* jedoch Silico-Wolframsäure angewendet.

Tabelle 1. Die Ergebnisse einiger Modellversuche. (1) Eingewogene Lupininmenge. (2) Gefundene Werte. (3) Differenz.

Tabelle 2. Alkaloidbestimmungen im Pflanzenmaterial. (1) Versuchsmaterial. (2) Ergebnisse der Paralleluntersuchungen. (3) Sojabohne. (4) Luzerne. (5) Gräser.