

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

Э. С. АВУНДЖЯН

РАЗДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ИХ КОЛИЧЕСТВА МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Разделение и количественное определение никотина и его аналогов имеет большое значение для оценки качества табачного сырья. Несмотря на это, до сих пор не имеется соответствующей и доступной для большинства лабораторий методики, с помощью которой можно было бы произвести полное разделение никотиновых алкалоидов и определение их количества. В литературе имеется довольно большое число работ [1—13], посвященных разделению и количественному определению никотиновых алкалоидов методом бумажной хроматографии. Однако, несмотря на ряд преимуществ, все эти методы страдают некоторыми недостатками: они являются слишком трудоемкими, в качестве растворителей используют или дефицитные реактивы или же как проявитель предлагают весьма ядовитый бромциан. Методика Тевари [10] ограничивается необходимостью применять низкие температуры ($5 \pm 1^\circ$) для получения четких разделений алкалоидов.

Исходя из вышесказанного, мы поставили перед собой задачу разработать более простую методику, позволяющую четкое разделение никотиновых алкалоидов и определение их количества с достаточной точностью. При этом не менее важным условием является исключение ядовитых проявителей, применение более доступных растворителей.

Приготовление раствора для хроматографирования
и для определения общей суммы алкалоидов

Материал для анализа фиксируется под текущим паром и высушивается при 50°C . Хорошо измельченный сухой материал, в количестве 1 г, помещается в колбу, емкостью 50 или 100 мл, прибавляется 15—20 мл этанола, подкисленного серной кислотой до 2% и экстрагируется с обратным холодильником на водяной бане при 50°C . Экстракция 3—4-кратная, каждая по 30—40 мин. до полного отсутствия алкалоидной реакции на реактив. После каждой экстракции смесь фильтруется в 100 мл колбу через слой гигроскопической ваты. Прозрачный фильтрат переносится в 100—150 мл кристаллизатор и высушивается досуха на водяной бане при 50°C . Остаток, содержащий смесь сернокислых солей алкалоидов, растворяется в минимальном количестве 0,5N H_2SO_4 и фильтруется складчатым бумажным фильтром. Освобождение алкалоидов от посторонних веществ, растворимых в спирте, достигается путем

превращения их соли в свободные основания. Для этого фильтрат переносится в 100 мл делительную воронку, прибавляется двойное количество смеси эфира и хлороформа (1 : 1) и избыток 20% раствора КОН, причем до прибавления щелочи воронка должна находиться в течение 5—7 мин. во льду или струе холодной воды. Затем воронка плотно закрывается притертой пробкой и сильно взбалтывается в течение 10—15 мин. С целью лучшего разделения слоев прибавляется новая порция эфира и вновь взбалтывается. Алкалоиды в значительно чистом виде перемещаются в верхний эфирный слой, который отделяется, а на нижний водяной слой прибавляется новая порция эфира и вновь взбалтывается. Данная операция повторяется до тех пор, пока в нижнем водном слое не обнаруживаются следы алкалоида. После полной экстракции алкалоидов эфирные слои переносятся в 100—150 мл стаканы и выпариваются до небольшого объема. Перед нанесением на бумагу эфирного раствора, содержащего смесь алкалоидов, объем доводится до определенной метки. В таком виде раствор готов для хроматографирования, а также для определения общей суммы никотиновых алкалоидов.

Определение общей суммы никотиновых алкалоидов

В 100 мл колбу вливается точно измеренное количество эфирного раствора алкалоидов, прибавляется определенное количество 0,1N соляной кислоты, взбалтывается и эфир выпаривается на кипящей водяной бане. После этого избыток соляной кислоты оттитровывается 0,01N едким калием в присутствии метила красного как индикатора, 1—2 мл-овой микробюреткой. 1 мл 0,01N соляной кислоты соответствует на 1,628 мг никотина.

Хроматографирование

Лучшие результаты получаются при нанесении на бумагу пятна, содержащего 0,25—0,40 мг алкалоида. Бумага ленинградская № 2, медленная. Четкое разделение алкалоидов получается при применении обреза бумаги в виде конуса. Растворитель проникает в бумагу через катушечную нитку №-10, подкрепленную к нижнему, острому концу конуса.

Растворителем служит н-бутанол, насыщенный при комнатной температуре фосфатным буфером с pH 7,1. Бумага была предварительно пропитана тем же раствором фосфатного буфера. Хроматограмма восходящая. При указанных условиях растворитель поднимается на 28—32 см в течение трех суток при температуре камеры 7—10°.

После разделения алкалоидов, бумага высушивается на воздухе и опрыскивается видоизменным проявителем Драгендорфа, предложенным Тиз и Рейтером [10]. Алкалоиды обнаруживаются в виде красных полос на светло-оранжевом фоне.

Для идентификации отдельных компонентов используется технический никотин и анабазин, в которых хроматографическим способом обнаруживаются, кроме главных алкалоидов — никотина и анабазина, также небольшие количества сопутствующих алкалоидов — норникотина, метаникотина, оксиникотина и миосмина.

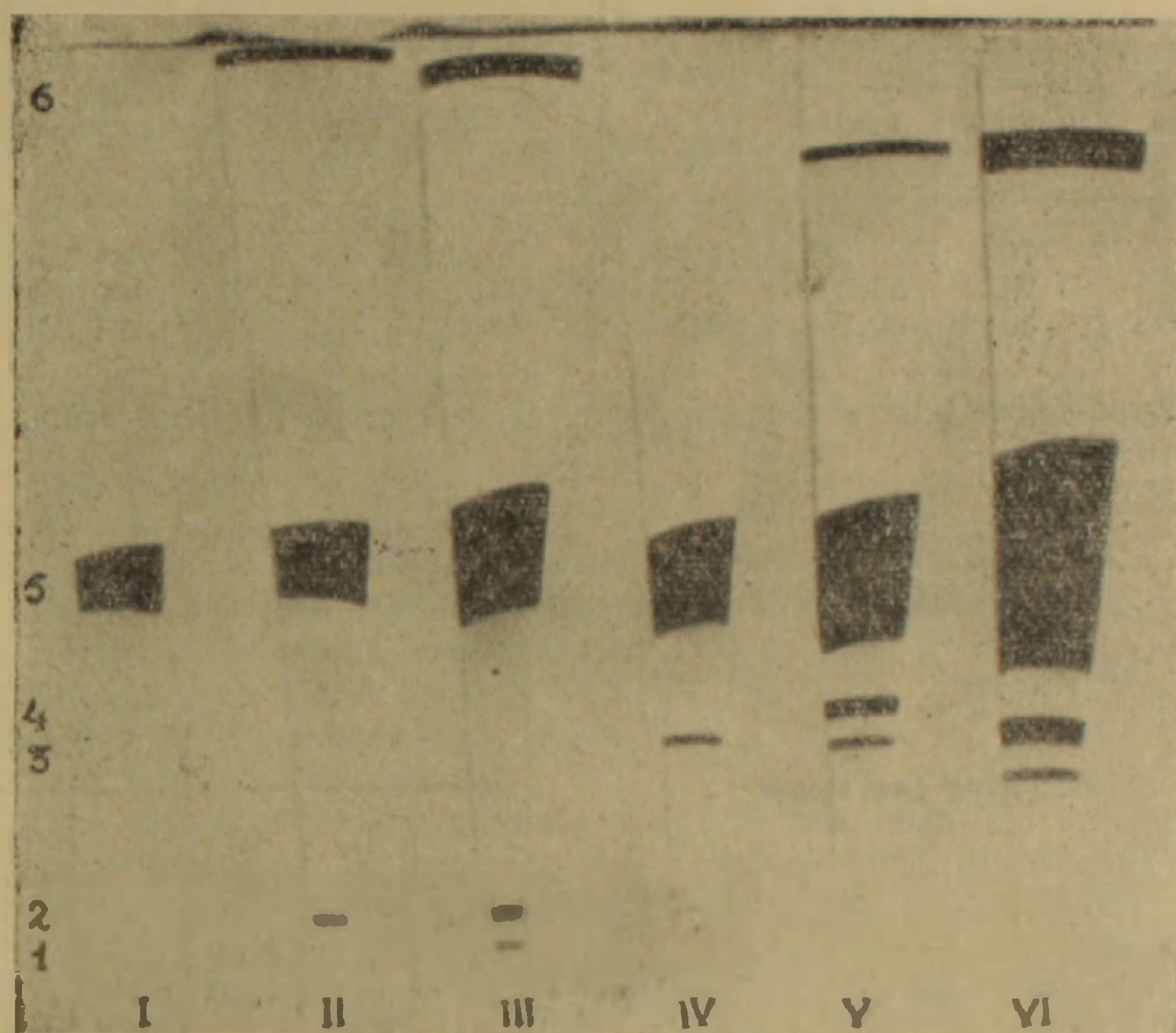


Рис. 1. I—III — корни и IV—VI листья растений табака, выращенных в условиях полива соответственно $4/5$, $2/3$ и $1/3$ от полной влагоемкости почвы. 1—оскиникотин, 2—метаникотин, 3—миосмин, 4 — норникотин, 5 — никотин, 6 — анабазин.

Количественное определение отдельных компонентов

При определении количества алкалоидов, разделяемых на бумаге, ввиду неустойчивости окраски пятен мы исходили из того, что существует прямая связь между логарифмом количества данного алкалоида и занимаемой им площадью [15, 17]. Метод измерения площади с успехом был применен для определения количества никотиновых алкалоидов, разделяемых на бумаге, рядом авторов [13—19]. Все авторы предпочитали данный метод как более быстрый, удобный и целесообразный для определения количества никотиновых алкалоидов.

Площади разделяемых пятен отдельных алкалоидов были точно определены при помощи весового метода. Для вычисления количества алкалоида на бумагу наносились пятна того или другого алкалоида, содержащих известное количество их и разделялись, проявлялись и

после измерения площади служили стандартами.

Приведенные в табл. 1 данные иллюстрируют особенности и степень точности метода.

Таблица 1

Отношение между количеством наносимого на бумагу алкалоида и занимаемой площадью*

Наименование алкалоидов	Нанесено на бумаге		Площадь, разделяемая пятнами см ²	1 см ² площади = количество алкалоидов в микрог.	Среднее	Отклонение от среднего	Макс. откл. в %
	микролит.	микрограмма					
Никотин	10	26,931	2,24	12,023	13,274	-1,251	-9,43
	20	53,862	4,05	13,293		+0,019	+0,141
	30	80,793	5,57	14,505		+1,231	+9,28

* Были также приготовлены соответствующие стандартные растворы нерникотина и анабазина.

Таблица 2

Содержание никотиновых алкалоидов в корнях и листьях табака в фазе бутонизации — начала цветения.
В % на сухой вес

Название алкалоида	В корнях			В листьях		
	I	II	III	I	II	III
Оксиникотин			0,03			
Метаникотин			0,03			
Миосмин		0,06		0,03	0,03	0,04
Норникотин					0,06	0,05
Никотин	0,41	0,52	0,79	0,72	0,88	1,68
Анабазин		0,02	0,09		0,08	0,27
Общая сумма	0,41	0,60	1,00	0,75	1,07	2,04

Количество оксиникотина и метаникотина вычислялось по стандарту никотина, а количество мисомина — по норникотину.

Ботанический институт
Академии наук АрмССР

Поступило 1.VII 1961 г.

Ե. Ս. ՀԱՎՈՒՆԺՅԱՆ

ՆԻԿՈՏԻՆԱՅԻՆ ԱԼԿԱԼՈՒԻԴՆԵՐԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՔԱՆԱԿԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԹՂԹԻ ՔՐՈՄՈՏՈՒՐԱՅԻՆԱՅԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. լ. մ.

Չնայած նիկոտինի և նրա ածանցյալների բաժանումն ու քանակական որոշումը խոշոր նշանակություն ունի ծխախոտի հումքի որակի գնահատման գործում, այնուամենայնիվ, մինչև օրս դրականության մեջ չկա այնպիսի մեթոդ, որը մատչելի լինի լաբորատորիաների մեծամասնության համար:

Ներկա աշխատության մեջ փորձ է արված մշակել համեմատաբար պարզ ճեթողիկա, որը թույլ է տալիս նիկոտինային ալկալոիդների բաժանումը թղթի վրա և նրանց քանակի որոշումը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Koch J. und Werle F. Naturwiss, 38, 333, 1951.
2. Kraft D. Pharmazie, 8, 251, 1953.
3. Munier R. Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 857, 1951.
4. Munier R. et Macheboeuf M. Bull. Soc. Chim. Biol, 31, 1198, 1949; 33, 846, 1951.
5. Porter W. L. Anal. Chem. 23, 412, 1951.
6. Porter W. L., Naghski J. and Fisner A. Arch. Bioch. 24, 461, 1949.
7. Rutter L. Nature, 161, 435, 1948.
8. Schute J. B. Chem. Weekbl. 49, 301, 1953.
9. Tewari S. S. Naturwiss. 41, 217, 1954.
10. Thies H. und Reuther F. W. Naturwiss, 41, 230, 1954; 42, 462. 1955; 42, 487, 1955.
11. Tso T. C. and Jeffrey S. N. Arch. Bioch. Biophys. 43, 269, 1953.
12. Wegner F. Naturwiss, 40, 580, 1953.
13. Werle F. und Koch J. Naturwiss 38, 333, 1951.
14. Cuzin J. et Fardy A. Rev. Int. Tabacs 31, 164, 1956.
15. Fisher R. B. Nature 161, 764, 1948.
16. Jeffrey R. N. and Eoff W. H. Anal. Chem. 27, 1903, 1956.
17. Latimer P. H. ит. R. M. Zacharius в статье Paper chromatography of the Nicotiana alkaloids. Bot. Rev. 25, 187, 1959.
18. List P. H. Naturwiss. 41, 454, 1954.
19. Schultz O. E. und Strauss D. Deut. Apoth. Ztg. 95, 642, 1955.