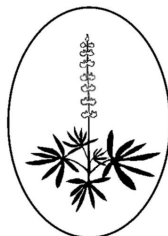


Российская академия сельскохозяйственных наук
Государственное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЛЮПИНА



**Количественное определение
алкалоидов в люпине**

Методические рекомендации

Брянск - 2012

УДК 547.94:633.367

ББК 24.239

К 60

Рекомендации подготовили: Артюхов А.И., доктор с.-х. наук, профессор, Яговенко Т.В., кандидат биол. наук, Афонина Е.В., кандидат биол. наук, Трошина Л.В.

Рассмотрены и рекомендованы к печати Ученым советом и экспертной комиссией ГНУ ВНИИ люпина.

Предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений, аналитических лабораторий, специалистов комбикормовой промышленности.

ISBN 978-5-901964-63-7

© ГНУ ВНИИ люпина, 2012

Содержание

Введение	4
1. Общие сведения об алкалоидах люпина	5
2. Методика выполнения измерения содержания хиноли- зидиновых алкалоидов в семенах люпина	7
Библиографический список	13

Введение

Уникальность люпина заключается в многофункциональности его использования. Это кормовая, сидеральная, а в последние десятилетия и пищевая культура. В России в основном культивируются 3 вида люпина: узколистный (*L. angustifolius*), желтый (*L. luteus*), белый (*L. albus*).

Кормовая ценность этой культуры обусловлена высоким содержанием в ней белка. В зерне люпина, в зависимости от вида, его содержание варьирует от 30 до 50%, в зеленой массе от 15 до 22%. Поэтому люпину принадлежит особое место в решении проблемы дефицита растительного белка в кормопроизводстве и животноводстве. Люпиновые добавки (от 5 до 30%) в качестве белковой части рационов обеспечат их сбалансированность по содержанию переваримого протеина и низкую себестоимость.

В связи с расширением посевов люпина и использованием его для кормовых целей, большое значение приобретает вопрос о содержании в нем алкалоидов, наличие которых является основным фактором, сдерживающим широкое использование этой культуры в кормопроизводстве и животноводстве. Эти антипитательные вещества, при концентрации выше 0,3%, оказывают токсическое действие на живой организм.

В настоящее время имеется немало разнообразных количественных методов определения алкалоидов в люпине. Это гравиметрия, колориметрия, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография высокого давления, иммунологические методы, позволяющие обнаружить следовые количества этого компонента. Однако, в большинстве случаев, перечисленные методы дорогостоящи, трудоемки и малодоступны для проведения массовых анализов. Отсутствие простых, быстрых и точных методов количественного определения алкалоидов, затрудняет оценку достоинств люпина и кормов на его основе.

Рекомендуемая методика достаточно проста в исполнении, недорога, а главное, имеет достаточно высокую воспроизводимость результатов. Она представляет собой модифика-

цию, выполненную во ВНИИ люпина, фотоколориметрического метода Ф.К.Терехова.

1. Общие сведения об алкалоидах люпина

Алкалоиды – группа азотсодержащих органических соединений основного характера, обычно, имеющих сложный состав. Подавляющее большинство их – гетероциклические соединения. В растениях алкалоиды находятся в виде солей различных органических и минеральных кислот, при этом в большинстве случаев, они содержатся в виде смеси из нескольких алкалоидов.

В основу современной классификации алкалоидов положена классификация, предложенная академиком А.П. Ореховым, который разделил их на группы в зависимости от строения основного углеродно-азотного цикла или положения азота в молекуле алкалоида. Алкалоиды люпина он относит к производным пиридина.

Каррер характеризует их как хинолизидиновые, так как в структуре их имеется хинолизидиновое кольцо.

Алкалоиды играют очень важную физиологическую роль в растениях люпина, обуславливая его более высокую устойчивость к засухе, к действию низких температур, вредителям, а также некоторым грибковым и вирусным заболеваниям. Они благоприятно влияют на фитосанитарное состояние почв.

Присутствие этих веществ обнаружено во всех органах растений культивируемых видов люпина, но наибольшее их количество отмечено в генеративных органах и листьях. Содержание алкалоидов в органах растений люпина изменяется в течение вегетационного периода. По мере созревания идет обеднение ими зеленой массы и передвижение их в семена. В результате чего к периоду созревания в семенах алкалоидов в 5 – 10 раз больше, чем в зеленой массе.

Различные виды и даже формы одного и того же вида могут иметь не только разное количество алкалоидов, но и разный состав. По данным М. Винка, в семенах узколистного

люпина основными алкалоидами являются: люпанин (50-80%), 13-гидроксилюпанин (10-20%), ангустифолин (5-20%). В семенах желтого – люпинин (40-70%), спартеин (30-50%). В семенах белого – люпанин (50-80%), мультифлорин (3-10%), 13-гидроксилюпанин (5-15%). Наряду с основными прочие алкалоиды (до 30) присутствуют как сопутствующие. Их доля в общем содержании невелика. По степени возрастания токсичности алкалоиды располагаются следующим образом – люпанин, люпинин, спартеин, гидроксилюпанин.

Согласно Международному классификатору рода *Lupinus* L., по содержанию алкалоидов, люпин подразделяют на следующие группы: сладкий с содержанием алкалоидов в семенах менее 0,025%; малоалкалоидный – от 0,025 до 0,1%; среднеалкалоидный – от 0,1 до 0,3%; высокоалкалоидный или горький – более 0,3%. Сорта люпина, содержащие в семенах менее 0,020% алкалоидов, можно использовать в пищевой промышленности. Малоалкалоидные и среднеалкалоидные сорта пригодны для скармливания животным. Горькие сорта люпинов нашли свое применение как сидеральные.

Современные сорта кормовых люпинов содержат в семенах от 0,01 до 0,10% алкалоидов. Их содержание и качественный состав в большей мере определяется генотипом, а также зависит от метеорологических факторов и условий возделывания (приложение). Чтобы исключить отравление алкалоидами люпина, необходимо контролировать их количественное содержание в люпиновых кормах, для кормовых целей использовать только безалкалоидные и малоалкалоидные сорта люпинов, регулярно производить замену семенного фонда люпина (через 3-4 года).

Расхождения результатов анализа алкалоидов в образцах люпина могут быть связаны с анализом разных сортовых популяций, а также обусловлены применением различных методов анализа. Поэтому для массовых анализов образцов люпина необходимо использование единой методики определения этого показателя.

2. Методика выполнения измерения содержания хинолизидиновых алкалоидов в семенах люпина

Настоящая методика распространяется на семена люпина кормового и устанавливает выполнение измерений массовой доли хинолизидиновых алкалоидов в пересчете на абсолютно сухое вещество фотометрическим методом.

Диапазоны измеряемых концентраций алкалоидов: от 0.01 до 2.00%.

Методика основана на способности алкалоидов образовывать окрашенный комплекс с йодом. Оптическая плотность раствора, содержащего этот комплекс зависит от концентрации алкалоидов и измеряется на спектрофотометре.

Данная методика позволяет также определять содержание алкалоидов в зеленой массе люпина.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений, вспомогательные устройства и материалы:

Спектрофотометр с пределом измерений оптической плотности от 0 до 2 при длине волны $500 \pm 0,5$ нм, допускаемой погрешностью при измерении коэффициента пропускания $\pm 1\%$ и кварцевыми кюветами с крышками рабочей длиной 10мм.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 53228-2008.

Набор гирь Г-2-210 2-го класса точности по ГОСТ 7328.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919 или газовая горелка.

Мельница лабораторная ЛМТ-1 с калиброванным ситом 0,8 мм ТУ 5142-001-48466245-98.

Секундомер механический СОПрр-2а-2-010 ТУ 25.1894.003-90.

Термостат, обеспечивающий температуру в рабочем объеме 22°С с отклонениями не более $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ по ГОСТ 20790-75.

Цилиндр (100, 1000) по ГОСТ 1770.

Стакан (ТС, В-1-1000, 500 или Н-1-1000, 500) по ГОСТ 223932-90.

Воронки лабораторные 36 x 50 мм по ГОСТ 25336.

Колбы мерные (50, 200, 1000) по ГОСТ 1770.

Пробирки с пробками (10) по ГОСТ 1770.

Дозатор одноканальный переменного объема (100–1000 мкл) и наконечники к нему ТУ 9452-002-33189998-2002.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Фильтры обеззоленные ФМ, диаметр 70 мм, «синяя лента», ТУ 2642-001-13927158-2003.

3.1.2. Реактивы

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Кислота трихлоруксусная ТУ 472 К-С, ч.д.а.

Калий йодноватокислый по ГОСТ 4202, ч.д.а.

Калий йодистый по ГОСТ 4232, ч.д.а.

Калия гидроксид по ГОСТ 24363, ч.д.а.

Чистые препараты алкалоидов с массовой долей алкалоида не менее 99,0%. Для сортов желтого люпина – люпинин, спартеин, для узколистного – люпанин, белого – спартеин. Допускается использование препарата одного алкалоида для 3-х видов люпина.

Допускается применение других средств измерения с метрологическими характеристиками и реактивов квалификации не ниже указанных.

3.2 Подготовка к выполнению измерения

3.2.1 Метод отбора проб

3.2.1.1 Отбор проб и подготовка их к проведению измерения – по ГОСТ 13586.3-83.

3.2.2 Приготовление растворов

3.2.2.1 Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с массовой долей 8% – 80 г ТХУ помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм³, добавляют 920 г дистиллированной воды и перемешивают. Хранится в герметично закрытой посуде при температуре 20 – 22° С не более 6 месяцев.

3.2.2.3 Йодат-йодистый реактив (ИИР). В стакан из термостойкого стекла помещают 13,00 г йодистого калия и 2,00 г йодата калия растворяют в 200 см³ горячей воды. После остывания раствор переносят в мерную колбу на 1 дм³. Для нейтрализации свободной йодноватистой кислоты и предупреждения выпадения свободного йода в колбу добавляют 0,2 – 0,4 г гидроокиси калия, размешивают и доводят водой до метки. В посуде из темного стекла реактив хранится 1 год.

3.2.2.4 Основной раствор главного алкалоида исследуемого вида люпина с концентрацией 300 мкг/см³ (основной раствор) – 0,030±0,001 г алкалоида помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 99,97 см³ раствора трихлоруксусной кислоты с массовой долей 8%. Перемешивают и выдерживают 1 час при температуре 22° С. Раствор хранят в холодильнике в герметично закрытой посуде. Срок хранения 6 месяцев.

3.2.3 Построение градуировочного графика

3.2.3.1 Приготовление рабочих градуированных растворов с концентрацией алкалоида 7,5; 15; 30; 45; 60; 75 мкг/см³ основано на разведении основного раствора алкалоида раствором ТХУ с массовой долей 8%.

Для этого в пробирки на 10 см³ вносят дозатором согласно таблице 1 раствор алкалоида и раствор ТХУ с массовой долей 8%.

Таблица 1

Концентрация основного р-ра алкалоида, мкг/см ³	Объем основного р-ра алкалоида для приготовления градуированного р-ра, см ³	Концентрация алкалоида в градуированном р-ре, мкг/см ³	Объем ТХУ с массовой долей 8%, см ³	Общий объем градуированного р-ра, см ³
300,0	0,1	7,5	3,9	4,0
300,0	0,2	15,0	3,8	4,0
300,0	0,4	30,0	3,6	4,0
300,0	0,6	45,0	3,4	4,0
300,0	0,8	60,0	3,2	4,0
300,0	1,0	75,0	3,0	4,0

Для измерения оптической плотности в кювету последовательно вносят 3,00 см³ дистиллированной воды, 0,10 см³ градуированного раствора, что соответствует 0,75; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 мкг алкалоида, и добавляют 0,15 см³ йодат-йодистого реактива. Закрывают крышкой. Перемешивают однократным переворачиванием кюветы и через 4 минуты измеряют оптическую плотность окрашенного раствора на спектрофотометре при длине волны 500±0,5 нм в кювете с рабочей длиной 10 мм по отношению к нулевому раствору (3,0 см³ Н₂О + 0,10 см³ 8%-ной ТХУ + 0,15 см³ ИИР). Нулевой раствор сохраняется в течение 1 часа при t 22°С.

Перед измерением исследуемых растворов измеряют оптическую плотность нулевого раствора. Этот показатель должен находиться в пределах 0,5 – 0,6. При несоответствии данной величине нулевой раствор следует переделать.

Градуировочный график строят в координатах: оптическая плотность – масса алкалоида, добавленного в раствор для фотометрирования, мкг.

Допускается построение градуировочного графика по образцам, точно проанализированным весовым методом Ма-

ха-Ледерлея (Методические указания по определению антипитательных веществ в зернобобовых культурах, Москва, 1999, с.12 – 14).

3.2.4 Приготовление экстракта алкалоидов

Навеску $0,2 \pm 0,001$ г воздушно сухой пробы, размолотой на мельнице с калиброванным ситом 0,8 мм, помещают в пробирку на 10 см^3 , приливают $4,0 \text{ см}^3$ 8%-ной ТХУ кислоты, встряхивают, закрывают пробками и оставляют на 16-18 часов в термостате при температуре 22°C . После отстаивания содержимое встряхивают и фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента). Полученный фильтрат используют для измерения оптической плотности.

3.3 Выполнение измерений

В кювету последовательно вносят $3,0 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, $0,10 \text{ см}^3$ фильтрата и $0,15 \text{ см}^3$ йодат-йодистого реактива, закрывают крышкой. Перемешивают однократным переворачиванием и через 4 минуты измеряют оптическую плотность окрашенного раствора по 3.2.3.1. Измерение проводят при температуре $20 - 22^\circ\text{C}$.

3.4 Обработка результата измерения

Массовую долю алкалоидов X , % в пересчете на абсолютно сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{C \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_1 (100 - W) \cdot 1000000} = \frac{C \cdot V}{m \cdot V_1 (100 - W) \cdot 100}$$

где C – содержание алкалоидов в экстракте, найденное по калибровочному графику; мкг

V – общий объем алкалоидного экстракта, см^3

m – навеска исследуемого материала, г

V_1 – объем алкалоидного экстракта, взятой для анализа, см^3

W – содержание гигроскопической влаги в анализируемом веществе (%) определяют по ГОСТ 12041-82.

1000000 – перевод микрограммов в граммы.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных измерений.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака.

3.5 Характеристика погрешности измерений

Данная методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей величин, приведенных в таблице 2.

Таблица 2

Диапазон измерения, % на абс. сухое в-во	Относительная погрешность, δ %
0,010 – 0,040	9
0,040 – 0,060	7
0,060 – 0,100	7
0,100 – 2,000	4

Сходимость результатов измерений массовой доли алкалоидов составляет 6% относительной при $P = 0,95$.

Воспроизводимость результатов измерений массовой доли алкалоидов составляет 9% относительной при $P = 0,95$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wink M. Methoden zum Nachweis von Lupinen Alkaloiden /Lupinen 1991 – Forschung, Anbau und Verwertung 1992. P. 78-90.
2. Майсурян, Н.А. Содержание и состав алкалоидов у люпина / Майсурян Н.А., Эдельштейн М.М. // Сборник научных работ кафедр растениеводства, агрохимии и ботаники. М., 1962, С. 317-339.
3. Орехов, А.П. Химия алкалоидных растений СССР / Орехов А.П // – М.: Наука., 1965. – 391 с.
4. Цибульская, И.Ю. Межвидовое и внутривидовое разнообразие коллекционных образцов желтого и узколистного люпина по биохимическим показателям / Цибульская И.Ю., Анохина В.С. // Научное обеспечение люпиносеяния в России: материалы международной научно-практической конференции (12-14 июля 2005 года), Брянск, 2005, С. 46-48.
5. Яговенко, Т.В. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине / Яговенко Т.В., Рудометкина М.В., Рудометкин С.В., Трошина Л.В. // Кормопроизводство – 2005, № 3, С. 27-29.
6. Методические указания по определению антипитательных веществ в зернобобовых культурах, Москва, Россельхозакадемия, ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса, 1999, С. 12 - 14.

Приложение

Содержание алкалоидов (% на абс. сух. в-во) в зерне разных
видов люпина (данные ГНУ ВНИИ люпина)

№	Сорта и сортообразцы, зона культивирования	Диапазон содержания за ряд лет (2006,2007,2008,2009,2010 гг.)
Узколистный люпин		
<i>Брянск</i>		
1.	Кристалл	0,036 – 0,095
2.	Снежить	0,022 – 0,055
3.	Белозерный 110	0,034 – 0,055
4.	Смена	0,034 – 0,055
5.	Витязь	0,035 – 0,050
6.	СН-1СМ-74-04	0,025 – 0,040
7.	Зничка	0,025 – 0,053
8.	Прима	0,019 – 0,035
9.	Добрыня	0,032 – 0,036
10.	Надежда	0,029 – 0,050
11.	Радужный	0,020 – 0,052
12.	Вектор	0,048 – 0,052
13.	Сидерат 38	0,480 – 1,100
14.	Узколистный 53	0,034 – 0,070
15.	Брянский 60	0,028 – 0,053
16.	Дикаф 14	0,032 – 0,050
17.	Митан	0,032 – 0,045
18.	БП 40-03	0,040 – 0,058
19.	Белозерный 121	0,042 – 0,077
20.	Брянский 45	0,030
21.	Орловский сидерат	0,600 – 0,830
22.	Брянский сидерат	0,600 – 0,770
<i>Белгород</i>		
23.		0,039 – 0,047
24.	Брянский 45	0,037 – 0,045
25.	Радужный	0,040 – 0,054
26.	Надежда	0,037 – 0,049
27.	Ярославна	0,550 – 1,000
	Сидерат 38	

Продолжение приложения

Желтый люпин		
<i>Брянск</i>		
28.	Дружный 165	0,042 – 0,092
29.	Надежный	0,025 – 0,054
30.	Престиж	0,032 – 0,072
31.	Демидовский	0,027 – 0,059
32.	С.Н. 1-00-2-9	0,035 – 0,059
33.	Бригантина	0,052*
34.	С.Н. 1097-08	0,025*
35.	С.Н. 672-08	0,024*
36.	С.Н. 131 ДТ	0,020*
37.	С.Н. 163-08	0,019*
Белый люпин		
<i>Брянск</i>		
38.	Дега	0,040 – 0,090
39.	Гамма	0,045 – 0,056
40.	Деснянский	0,040 – 0,063
41.	Тип-Топ х Детер	0,026 – 0,041
42.	Дега х Деснянский	0,034*
43.	Киев 51 х Гамма	0,044*
<i>Тамбов</i>		
44.	Гамма	0,041 – 0,057
45.	Дельта	0,036 – 0,043
46.	Деснянский	0,057 – 0,065
47.	Дега	0,048 – 0,054
48.	Детер	0,055 – 0,060
49.	С.Н. 571-00	0,044 – 0,052
<i>Белгород</i>		
50.	Дега	0,049*
51.	Гамма	0,046*
52.	Дельта	0,043*
53.	Деснянский	0,060*
54.	С.Н. 571-00	0,045*

*данные 2010 года

Артиухов А.И., Яговенко Т.В., Афонина Е.В., Трошина Л.В.

Количественное определение алкалоидов в люпине

Методические рекомендации.

Брянск: издательство «Читай–город». 2012. – стр. 16, табл. 2, прил. 1

Компьютерная верстка Н.В. Мисниковой

Отпечатано в ЗАО «Издательство «Читай-город»

241050, ул. Трудовая, 1. Тел. (4832) 74-31-64

Свидетельство № 1023202766017 от 05.05.2002 г.

Формат 60x84 1/16. Усл. печ. л. 1

Подписано в печать 12.03.2012 г.

Заказ № 6131. Тираж 200 экз.