

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ СПЕКТРАЛЬНОГО МЕТОДА АНАЛИЗА АЛКАЛОИДОВ ЛЮПИНА В ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ ПРОДУКТАХ

А.А. Павич, аспирантка, С.М. Арабей, докт. физ.-мат. наук, доцент, В.А.Чернявский, канд. физ.-мат. наук (БГАТУ)

Аннотация

Выполнен анализ литературных данных спектральных свойств алкалоидов люпина. Экспериментально получены спектры комбинационного рассеяния солей спартеина и люпанина - двух основных алкалоидов люпина. Показана принципиальная возможность разработки спектрального метода анализа сельскохозяйственных продуктов на содержание алкалоидов.

The analysis of literary sources for spectral properties of lupine alkaloids is given. The Raman spectra of sparteine and lupanin salts are experimentally obtained, which are the basic lupine alkaloids. The essential opportunity of spectral method development for the analysis of alkaloid contents in agricultural products is shown.

Введение

Группа азотсодержащих циклических соединений, к которым относятся алкалоиды, синтезируется преимущественно растениями. Особенно богаты алкалоидами растения из бобовых, маковых, пасленовых, лютиковых, мареновых и других семейств, в которых они находятся в клеточной среде в растворенном виде. С одной стороны, растительные алкалоиды, обладая физиологическим действием на организм животных и человека, широко применяются в медицине и сельском хозяйстве для борьбы с вредителями. С другой стороны, в условиях острой проблемы обеспечения сельскохозяйственных животных высококачественными кормами, присутствие алкалоидов является сдерживающим фактором расширения кормовой базы. Среди культур, необходимых для приготовления некоторых видов кормов, уникальными являются различные сорта кормового люпина. В связи с тем, что все части этого растения в разной степени содержат горькие и ядовитые алкалоиды (спартеин, люпанин, люпинин и их производные) [1], может произойти отравление организма животных люпином в случае не соблюдения специальных мер защиты. Очевидно, что для расширения культуры люпина и использования его для кормовых целей огромное значение приобретает контроль количественного и качественного содержания в нем таких токсических веществ.

Алкалоиды люпина, как многоатомные органические молекулы, интенсивно изучались в течение многих десятилетий, главным образом из-за их биологической и биохимической активности [2]. Достаточно вспомнить их аналитическое использование

как реактива при качественном определении катионов и идентификации аминов [3]. Рассматриваемый класс алкалоидов имеет длинную историю использования в медицине, особенно для возбуждения мускульного действия сердца и легкого [4]. Кроме того, Си(II)-спартеиновый комплекс является модельным соединением для изучения биологической функции иона меди типа I в белках (синие медные протеины, участвующие в реакциях переноса электрона в некоторых растениях и бактериях), имеющего в качестве обязательных лигандов два атома азота [5].

Алкалоиды люпина и их производные являются подходящими бидентантными лигандами (молекулы с двумя координирующими атомами азота) для многих приложений, например, для устойчивого комплексообразования с ионами металлов 2A группы и ионами некоторых переходных металлов [6]. Спартеин, как естественный диамин, имеет широко распространенное использование как хиральный лиганд в асимметричном синтезе [7], т.е. в направлении стереоселективных синтезов. Во многих реакциях полимеризации алкалоидные металлокомплексы используются как катализаторы [8].

Для более глубокого понимания механизмов биоактивности алкалоидов люпина, а также для разработки новых спектральных методов контроля содержания алкалоидов люпина в продуктах природного и техногенного происхождения, необходимы систематические исследования их спектрально-люминесцентных свойств. Целью настоящей работы является анализ литературных данных спектральных свойств основных алкалоидов люпина и их металлокомплексов и полу-

чение экспериментальных сведений о связи химической структуры алкалоидов люпина (производные спартеина и люпанина) со спектральными свойствами, полученными методом комбинационного рассеяния (КР) света. Актуальность работы обусловлена необходимостью разработки научных основ простого и надежного спектрального метода контроля содержания алкалоидов (количественная и качественная оценка) в различных частях люпина как растения, а также в их зеленой массе и семенах, используемых непосредственно для скармливания животным или для приготовления комбикормов. Уровень новизны выполненных исследований определяется отсутствием в литературе достоверных данных о спектрально-люминесцентных свойствах алкалоидов люпина.

Основная часть

Объекты исследования и методика эксперимента

Различные сорта люпина содержат разнообразные по химическому строению алкалоиды. Однако по распространению и количественному содержанию основными из них являются спартеин ($C_{15}H_{26}N_2$), люпинин ($C_{10}H_{19}ON$), люпанин ($C_{15}H_{24}ON_2$) и гидроксилупанин ($C_{15}H_{24}O_2N_2$). Химическая структура основных алкалоидов люпина, обозначения колец, входящих в их структуру и нумерация атомов изображены на рис. 1.

По химическому строению алкалоиды люпина представляют собой азотсодержащие органические вещества, у которых азот входит в состав двух замкнутых циклических хинолизидиновых группировок (А/В и С/Д). Основой последних является бициклическое производное пиридина, включающее два конденсированных пиперидиновых кольца. Азот в моле-

куле алкалоидов люпина находится в третичной форме, т. е. не связан ни с атомами водорода, ни с другими атомными группами. Алкалоиды проявляют пространственную *цис-транс* изомерию, определяемую положением атомов водорода при С6 и С11 относительно центрального метиленового мостика С7-С8-С9. Гибкость тетрациклического скелета спартеина и его производных способствует конформационным изменениям [9]. При этом хинолизидиновая А/В система достаточно стойкая к конформационным перестройкам, и наоборот, С/Д система способна к инверсии относительно атома азота N16, что и является причиной разнообразия конформационных структур. Структура алкалоидов люпина с двумя атомами азота делает их превосходными лигандами для образования металлических комплексов [6]. При взаимодействии алкалоидов с кислотами они образуют соли путем присоединения к атому азота алкалоида молекулы кислоты.

В настоящей работе объектами исследования были две коммерческие алкалоидные соли: спартеина сульфат пентагидрат ($C_{15}H_{26}N_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 5H_2O$) и люпанина перхлорат ($C_{15}H_{24}ON_2 \cdot HClO_4$). КР спектры были получены на спектрографе «SpectraPro 500i», путем усреднения 30 сканирований. Источником возбуждающего света служил полупроводниковый лазер с непрерывным монохроматическим излучением ($\lambda_{изл} = 532$ нм). Образцы для исследований были в виде кристаллических мелкодисперсных порошков алкалоидов, помещенных в тонкие капиллярные стеклянные трубки.

Результаты и их обсуждение

В литературе изучению спектральных свойств алкалоидов люпина и их металлокомплексов методами оптической спектроскопии не уделено достаточного внимания. Спектрально-люминесцентные исследования данного класса соединений практически отсутствуют. Основные результаты применения методов оптической ультрафиолетовой (УФ), видимой и инфракрасной (ИК) спектроскопии, а также КР-спектроскопии, описанные в литературе, могут быть обобщены следующим образом.

Электронные спектры поглощения

В электронных спектрах поглощения спартеина и его метил- и оксипроизводного, зарегистрированных в ацето-

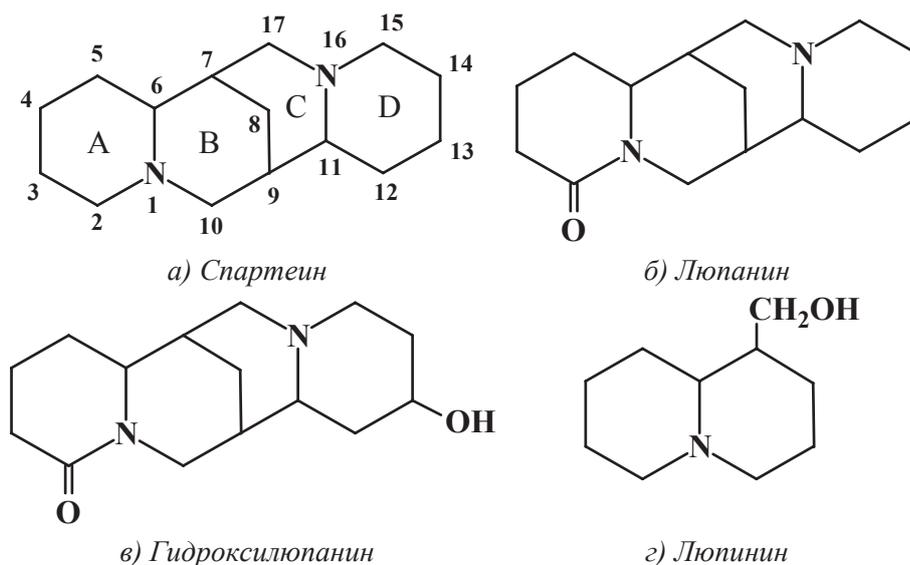


Рис. 1. Химические структуры основных алкалоидов люпина, обозначение колец и нумерация атомов

нитриле, наблюдается единственная полоса в УФ области при 202, 202 и 206 нм соответственно, отнесенная к π - π -переходу [10]. Соответствующий максимум полосы имеет молярный коэффициент экстинкции в пределах $\epsilon = 7400$ - $9800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. В спектре поглощения спартеина в метаноле [9] в УФ области также проявляется интенсивная полоса с максимумом при 202 нм. Эти результаты коррелируют с более ранними данными по УФ-поглощению алкалоидов люпина, обобщенными в [11,12]. В частности, было показано, что оксиспартеин и люпанин имеют единственный максимум при ~ 214 нм ($\log \epsilon = 3.8$), люпанина перхлорат в 95% этаноле – при ~ 215 нм ($\log \epsilon = 3.7$), α -изоспартеин в эфире – при ~ 216 нм ($\log \epsilon = 3.79$), спартеин в эфире – при ~ 214 нм ($\log \epsilon = 3.71$). Люпинин, который представляет собой половину скелета спартеина, обладает поглощением в области 200 нм с $\epsilon \approx 4000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [12].

Видно, что разные алкалоиды имеют практически идентичные УФ-полосы поглощения. Это может быть обусловлено тем, что только третичные атомы азота являются хромофорами в головных мостиках хинолизидиновых систем. Однако незначительное влияние на УФ спектры алкалоидов люпина может оказать наличие в структуре карбонильной группы, смежной с третичным азотом. В работе [11] отмечено, что введение единственной изолированной двойной связи, например, как в случае 5,6-дигидро-17-оксоспартеина или 2,3-дигидро-17-оксоспартеина, заметно влияет на УФ спектр (смещение полосы до ~ 245 нм ($\log \epsilon \approx 4.00$)).

Большинство спектров поглощения алкалоидов и их солей получено в полярных растворителях (этанол, метанол или вода). Это является одной из причин отсутствия тонкой структуры спектральных полос, и, следовательно, отсутствия их характеристичности для разных алкалоидов. Последнее является серьезным препятствием для разработки спектральных методов качественного и количественного анализа содержания алкалоидов люпина в природных и техногенных продуктах. Другое препятствие обусловлено расположением полос поглощения на границе вакуумной УФ области. В области длин волн короче 200 нм кварц становится непрозрачным (основной материал оптических элементов при УФ исследованиях) и начинается поглощение излучения атмосферным кислородом, что требует использования специальных вакуумных спектральных приборов.

Существенные изменения электронных спектров поглощения наблюдаются для металлокомплексов алкалоидов. В литературе электронные спектры поглощения приведены для медных [5,9,13,14], кобальтовых [14] и литиевых [10] комплексов спартеина, а также предложены варианты их интерпретации. Свя-

звание иона металла с двумя атомами азота спартеинового бидентантного лиганда (образование устойчивого металлокомплекса) приводит к появлению в УФ, видимой и ИК области спектра металлокомплекса полос поглощения различной полуширины и интенсивности. Согласно [13], для Cu(II) -спартеиновых комплексов в области 200-350 нм возникают полосы, соответствующие переходам с внутрикислородным переносом заряда от лиганда к металлу ($\epsilon \approx 3000$ - $5000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Наблюдаемый в области 500-1000 нм широкий и асимметричный контур поглощения, состоящий, по крайней мере, из трех наложившихся полос, соответствует полосам d-d переходов иона металла ($\epsilon \approx 200$ - $900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Для некоторых медных комплексов наблюдается широкая межлигандная полоса поглощения при 1400-1500 нм ($\epsilon \approx 100$ - $300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Для производных спартеина, исследованных в [10], комплексообразование с LiClO_4 вызывает появление широкой полосы очень низкой интенсивности, лежащей в диапазоне 230-380 нм. Эти данные показывают, что металлокомплексы алкалоидов обладают необходимыми свойствами для проведения спектрально-люминесцентных исследований в видимой области спектра. Вместе с тем, полосы поглощения имеют сильное уширение, что не способствует решению проблемы спектральной идентификации отдельных алкалоидов.

Спектры инфракрасного поглощения

Метод инфракрасной (ИК) спектроскопии находит широкое применение для идентификации и количественного анализа различных химических соединений, которые основаны на известных корреляциях между спектральными ИК полосами соединений и их химическим строением.

Равновесную конфигурацию молекулы спартеина (одного из конформеров) можно условно отнести к точечной группе низшей симметрии C_2 . Спектры ИК поглощения спартеина и его металлокомплексов характеризуются большим количеством узких полос умеренной интенсивности. Появление этих полос обусловлено большим количеством колебательных состояний алкалоидной молекулярной системы (к примеру, спартеин имеет 123 нормальных колебания). Несмотря на то, что нормальные колебания спартеина имеют сложную форму для молекулы такого размера, большинство из них спектрально разрешены в ИК спектрах, а многие идентифицированы и по форме.

Еще в 50-ые годы прошлого столетия Бохлмэнн установил [15], что в области 2500 - 2840 cm^{-1} спектра ИК поглощения свободных оснований алкалоидов люпина проявляются полосы валентных C-H колебаний, в которых участвуют атомы водорода на углеродах, присоединенных к атомам азота N1 и N16, и находящиеся в *транс*-аксиальном положении к орбита-

ли неподеленной пары электронов атомов азота (колебания атомов водорода при С2, С6, С10 и при С11, С15, С17, ориентированных *транс*-аксиально относительно орбиталей неподеленных пар электронов третичных атомов азота N1 и N16 соответственно). Так, для спартеина в этой области наблюдаются две полосы при 2795 и 2760 см⁻¹ (*транс*-полосы Бохлмэнна), которые смещены в низкочастотную область относительно «нормальных» С-Н валентных колебаний (2800-3000 см⁻¹). Согласно [15],

наблюдаемое спектральное смещение является следствием взаимодействия неподеленной пары электронов азота и электронов соседних *транс*-аксиальных С-Н связей. Подтверждением такой интерпретации является, во-первых, существенное понижение частоты одного из отмеченных С-Н колебаний при замене Н17 водорода дейтерием [16] – $\nu_{C-D} \approx 2170 \text{ см}^{-1}$. Во-вторых, присоединение металла к N атомам алкалоида приводит к исчезновению *транс*-полос Бохлмэнна [10,14], что является следствием включения неподеленной пары электронов атомов азота в бидентантную координацию металла. Важно отметить, что появление *транс*-полос имеет место и в случае, когда скоординирован даже только один атом азота алкалоида [16].

Частоты и интенсивности ИК полос спартеина при 786 и 737 см⁻¹ также являются характеристичными и они соответствуют С-Н деформационным колебаниям. При комплексообразовании эти две полосы сдвигаются на 10-30 см⁻¹ в низкочастотную область. Слабые полосы в области 410-470 см⁻¹ соотносены с валентными колебаниями металл – спартеиновый азот (Me-N) [13]. Такое соотношение подтверждено методом изотопного замещения чистого металла. [7]. В работе [17] измерены спектры поглощения и колебательного кругового дихроизма спартеина, которые интерпретированы на основе *ab initio* расчетов. Получено неплохое согласие теоретических и экспериментальных частот и интенсивностей полос поглощения в средней ИК области. Необходимо отметить, что большинство колебательных полос ИК спектра алкалоидов соответствуют колебаниям сложной формы.

Спектры комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния света практически не использовались в литературе для изучения молекул алкалоидов люпина. Насколько из-

вестно, только в работе [18] представлен КР спектр (область 200-2500 см⁻¹) спартеина сульфата пентагидрата в КВг, который не был подвергнут глубокому анализу. В настоящей работе исследованы КР спектры спартеина сульфата пентагидрата и люпанина перхлората, полученные на кристаллических мелкодисперстных порошках алкалоидов, помещенных в стеклянные капилляры (рис.2).

Анализ молекулярных КР спектров позволяет

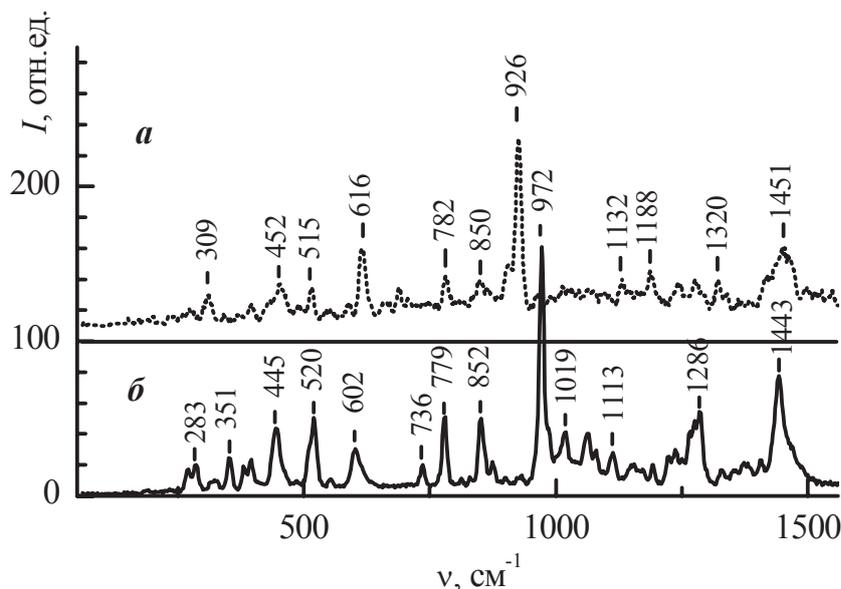


Рис. 2. КР спектры люпанина перхлората (а) и спартеина сульфата пентагидрата (б).

изучать строение электронных оболочек, а также молекулярные колебательные движения, которые обуславливают данный вид светового рассеяния. Как видно из рис.2, изученные молекулы проявляют сложные и богатые линиями КР спектры. Спектральный анализ по КР спектрам на содержание алкалоидов может быть основан на том, что каждая молекула алкалоида имеет свой индивидуальный спектр собственных частот, как результат влияния на частоты колебаний незначительных изменений химического строения молекул. Для успешной интерпретации КР спектра вещества, содержащего смесь алкалоидов, необходимо выделить несколько линий, которые могут быть уверенно отнесены к спектрам индивидуальных соединений. Наиболее благоприятной ситуацией в этом случае является наличие интенсивных линий предполагаемого алкалоида. Полученные спектры показывают, что в КР спектрах спартеина сульфата пентагидрата и люпанина перхлората наблюдается по одной интенсивной линии при 972 и 926 см⁻¹ соответственно, которые могут быть выбраны как наиболее пригодные для анализа. Их спектральное смещение на 46 см⁻¹ устраняет возможность переналожения этих аналитических КР линий при реализации спектрального качественного и количественного анализа

– основное требование при разработке данного аналитического метода. Важно отметить, что локальное окружение незначительно влияет на спектральное положение выделенных аналитических линий: аналогичная линия спартеина сульфата пентагидрата в КВг наблюдается при 977 см^{-1} [18]. Анализ колебательных частот двух алкалоидов в исследованной области показывает соответствие многих наблюдаемых частот, что может свидетельствовать об их отнесении к колебаниям атомов алкалоидного скелета, одинакового для двух исследуемых алкалоидов. Очевидно, что более обоснованная интерпретация КР спектров может быть выполнена с привлечением квантово-химических расчетов частот и формы возможных колебательных движений, не только изученных в настоящем сообщении алкалоидных молекул, но и их производных, в том числе и металлокомплексов.

Заключение

В работе выполнен анализ литературных данных (оптическая ультрафиолетовая (УФ), видимая и инфракрасная (ИК) спектроскопии, а также КР-спектроскопия) спектральных свойств основных алкалоидов люпина. Сделан научно обоснованный вывод о возможности создания простого и надежного спектрального метода контроля содержания алкалоидов в различных сортах люпина как растения, а также в их зеленой массе и семенах, используемых непосредственно для приготовления кормов животным. Показано, что для разработки спектрального метода могут быть использованы высоко разрешенные ИК или КР спектры веществ, содержащих алкалоиды.

Экспериментально получены КР спектры солей двух основных алкалоидов люпина – спартеина и люпанина в области $250\text{--}1500\text{ см}^{-1}$. В спектрах выделены интенсивные линии, которые могут быть использованы в качестве основы при разработке спектрального аналитического метода (аналитические линии). Уровень новизны выполненных исследований определяется отсутствием в литературе данных по разрешенным спектрам КР алкалоидов люпина и их возможным применением для качественного и количественного спектрального анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мироненко, А.В. Биохимия люпина / А.В. Мироненко. – Минск: Наука и техника, 1975. – 312 с.
2. Wink, M. / Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism and function in plants and cell suspension cultures / M.Wink // *Planta Medica*. – 1987. – Vol. 53, Issue 6. – P. 509-514.
3. Welcher, F.J. *Organic Analytical Reagents* / F.J.Welcher. – Vol. IV, Van Nostrand: Princeton, N. Y., 1984. – P. 243.
4. McCawley, E.L. *The Alkaloids, Chemistry and Physiology* / E.L. McCawley. – Vol.V, R.H.F. Manske,

Ed. – Academic Press, New York, N. Y., 1955. – P. 93, 123.

5. A Mimic Molecule of Blue Copper Protei. Active Site [(-)-Sparteine-*N,N'*](maleonitriledithiolato-*S,S'*) copper (II) / Y.-J. Kim [et al.] // *Inorganic Chemistry*. – 2001. – Vol. 40, No. 17. – P. 4481-4484.

6. Dichloro[(-)-sparteine-*N,N'*] copper (II) / S. Lopez [et al.] // *acta crystallographica*. – 1998. – Vol. C54, Issue 3. – P. 355-357.

7. Preparation of meso-1,3-diphenylallyllithium(-)-Sparteine - its crystal structure and reactions / F. Marr [et al.] // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 2002. – Vol. 13, Issue 23. – P. 2587-2592.

8. Vibrational circular dichroism spectra of selected chiral polymers / J.L. McCann [et al.] // *Mikrochimica Acta (Suppl)*. – 1997. – Vol. 14. – P. 809-810.

9. Jasiewicz, B. Sparteine and α -Isosparteine Complexes with Zn(II) and Cu(II): Structure and Spectroscopic Properties / B. Jasiewicz // *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. – 2009. – Vol. 6, No. 4. – P. 275-282.

10. Synthesis and Spectroscopy of LiClO₄ Complexes of (-)-Sparteine, 2-Methyl- and 2-Oxosparteine, and 2-Cyano-2-methylsparteine / B. Jasiewicz [et al.] // *Zeitschrift für Naturforschung B*. – 2003. – Vol. 58b, No. 11. – P. 1133-1140.

11. Sangster, A.W. Ultraviolet spectra of alkaloids / A.W. Sangster, K.L. Stuart // *Chemical Reviews*. – 1965. – Vol. 65, No 1. – P. 69-130.

12. Chiroptical studies. Part LXXXVII. Circular dichroism of some sparteine alkaloids / W. Klyne [et al.] // *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*. – 1974. – P. 2565-2570.

13. Stereoelectronic properties of metalloenzymes-III. A soluble tetrahedral coordination complex of copper(II)-dichloro(Sparteine) copper (II) / S.-N. Choi [et al.] // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. – 1975. – Vol. 37, Issue 10. – P. 2087-2090.

14. Diffuse Reflectance Spectroscopy Applied to Solid-State 2-Methylsparteine Metal Complexes / B. Jasiewicz [et al.] // *Polish Journal of Chemistry*. – 2003. – Vol. 77. – P. 117-122.

15. Bohlmann, F. Lupinen-Alkaloide. VIII. Zur Konfigurationsbestimmung von Chinolizidin-Derivaten / F. Bohlmann // *Chemische Berichte*. – 1958. – Vol. 91, Issue 10. – P. 2157-2167.

16. Conformation of the C₁₅ lupine alkaloid / M. Wiewiorowski [et al.] // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1967. – Vol. 45, No. 13. – P. 1447-1457.

17. Vibrational Circular Dichroism Study of (-)-Sparteine / P. Bouř [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 1997. – Vol. 101, No. 50. – P. 9783-9790.

18. Спектроскопические свойства пентагидрата сульфата спартеина – алкалоида люпина / В.А. Чернявский [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сборник статей Международной научной конференции, Минск, 21-23 июня 2006 г. / – Минск, 2006. – Том I. – С. 168-170.