

Analyse von Lupinenalkaloiden

Beitrag zur Lupinentagung 26./27. Nov. 2001, Heidelberg

Dr. Joachim Emmert, Institut für Pharmazeutische Biologie,
Universität Heidelberg

Verschiedene Klassen von Alkaloiden sind als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bei Lupinen von Bedeutung. Da sie als giftig oder gesundheitsgefährdend einzustufen sind, ist ihre Identifizierung und quantitative Bestimmung von Bedeutung für die Sortenzüchtung, Sortenzulassung und für alle Folgeprodukte, die aus Lupinensamen gewonnen werden, wie z.B. Lupinenmehl.

In der Hauptsache handelt es sich dabei um Chinolizidin-Alkaloide (tetra- oder bicyclisch), sowie Abkömmlinge von Piperidin und Indol.

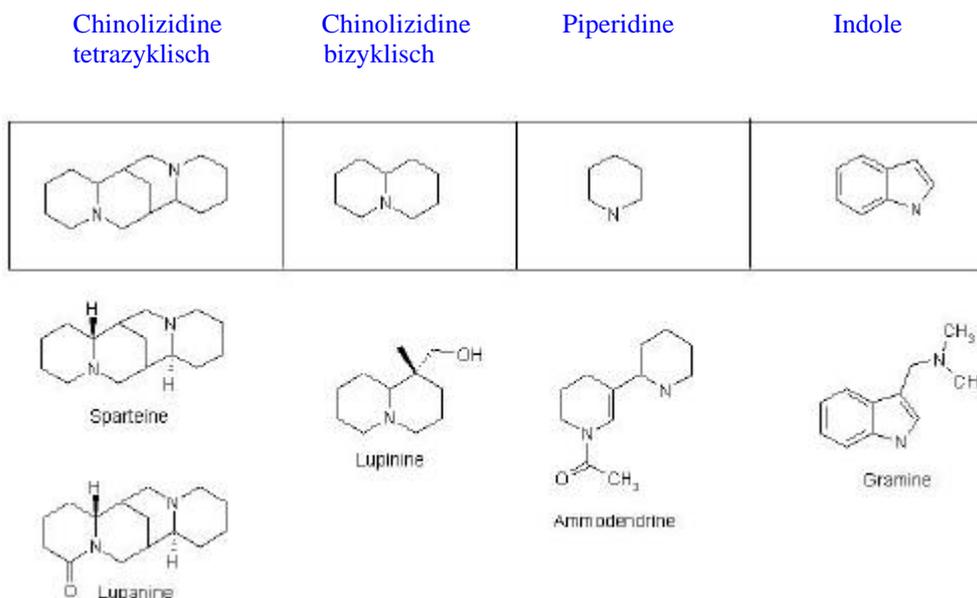


Abb. 1 Lupinen-Alkaloide

Vor der Analyse müssen die Alkaloide zunächst selektiv extrahiert werden. Im sauren Medium wandelt man sie zunächst in die wasserlöslichen Salze um. Nach Einstellung eines alkalischen pH-Wertes werden die freien Basen mittels Festphasen-Extraktion (SPE=Solid Phase Extraction) über Extrelut® weiter aufgereinigt. Die danach anfallende Lösung der Alkaloide in einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. Dichlormethan, kann nun mit verschiedenen Analysenverfahren untersucht werden.

Als schnelle und qualitative Verfahren kommen Farbreaktionen und Dünnschichtchromatographie (DC) in Frage. Bei der DC unterscheidet man zwischen Nachweis mit UV-Licht bzw. Fluoreszenz oder mittels spezifischen Anfärbereaktionen, wie z.B. Dragendorff's Reagenz.



Abb. 2 DC-Trennung von Lupinenalkaloiden

Die Trennung auf der DC-Platte (meist Kieselgel) erfolgt mit einem Gemisch aus organischen Lösungsmitteln. Zur Auswertung ist es wichtig, neben den Proben auch Standards mitlaufen zu lassen (im nebenstehenden Beispiel Lupanin und Spartein), da die Auswertung vergleichend erfolgt.

UV- und Fluoreszenzsignale müssen gekennzeichnet werden (Bleistift). Danach erfolgt die Anfärbung mit dem Sprühreagenz; die orange-braune Farbreaktion ist spezifisch für Alkaloide. Allerdings ist mit dieser Methode nur ein qualitativer bzw. ein grobhalbquantitativer Nachweis möglich.

Zu den anspruchsvolleren Analysen-Methoden gehört die Gaschromatographie (GC), mit der auch eine quantitative Bestimmung möglich ist. Bei der GC erfolgt die Trennung der Substanzen auf Kapillarsäulen, die ca. 30m lang und 0.2-0.5 mm im Durchmesser sind.

Folgende Grundlagen gelten in der GC:

- Mobile Phase bzw. Trägergas: He oder N₂
- Stationäre Phase: Glas- oder Quarz-Kapillare mit Film
- Verteilung zwischen beiden Phasen
- Adsorption / Desorption an Stationärer Phase
- Temperatur Programm zur Bewegung der Komponenten entlang der Säule

Mit Hilfe des Trägergasstromes und dem Temperaturprogramm erfolgt die Bewegung und Trennung der Substanzen. Beim Temperaturprogramm wird die Temperatur im GC-Ofen, in dem sich die Kapillare befindet, schrittweise erhöht, so dass nacheinander immer schwerer flüchtige Stoffe in die Gasphase übergehen. Nach Verlassen der Kapillarsäule werden die einzelnen Substanzen mit einem Detektor detektiert. Der Flammenionisations-Detektor (FID) ist dabei ein universeller Detektor, der alle Substanzen anzeigt, die „brennen“, also Kohlenstoff enthalten. Mit dem Phosphor-Nitrogen-Detektor (PND) erfasst man selektiv Substanzen, die Phosphor oder Stickstoff enthalten. Alkaloide, die immer ein oder mehrere Stickstoffatome im Molekül enthalten, können also mit diesem Detektor selektiv erfasst werden.

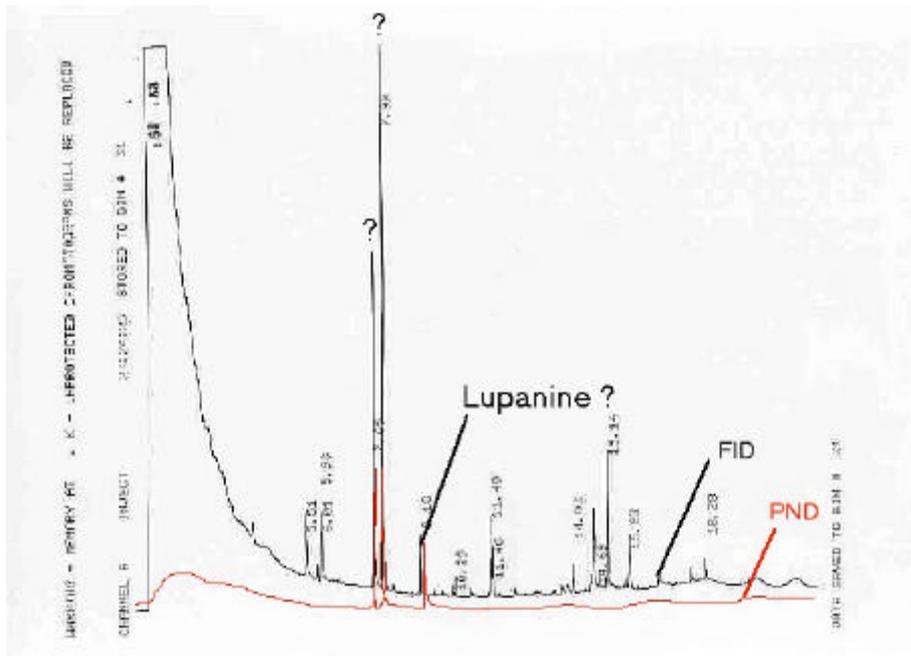


Abb. 3 Gaschromatogramm einer Lupinenprobe mit FID- und PND-Detektion

Die quantitative Auswertung erfolgt gegen einen Standard, z.B. Lupanin, auf dem FID. Mit der so erhaltenen Kalibrierung (dem sog. Responsefaktor) werden auch die anderen als Alkaloide identifizierten Peaks ausgewertet. Dies ist möglich durch das universelle Ansprechverhalten dieses Detektors. Der PND dient nur der Aussage, ob es sich um eine stickstoffhaltige Substanz handelt; er ist zudem auch um einen Faktor 10 unempfindlicher als der FID. Die als Alkaloide identifizierten Substanzen werden mit dem Responsefaktor von Lupanin berechnet und in Summe als Gesamtalkaloidgehalt ausgewiesen. Für den Einsatz in Tiernahrung gilt dabei ein Grenzwert von 0.05%, für die menschliche Ernährung sogar 0.02%.

Um diese engen Grenzen zu halten, ist es wichtig, keine Fehler bei der Zuordnung zu machen; ausser für Lupanin und Spartein existieren jedoch keine Standards. Pflanzenphysiologisch und aus Sicht der Züchtung ist es zusätzlich interessant, zu wissen, welche Nebenalkaloide gebildet werden. Diese Fragestellungen lassen sich nur mit Hilfe der GC/MS, der mit Massenspektrometrie gekoppelten Gaschromatographie, beantworten. Dabei wird der Auslass der Kapillare statt mit einem FID direkt mit der Quelle eines Massenspektrometers verbunden. Man erhält dann im Totalionenstrom ein dem FID vergleichbares Signal, daneben aber auch die Massenspektren der jeweiligen Substanzen, die man zur Identifizierung heranziehen kann.

Das Arbeitsprinzip der Massenspektrometrie ist ein 3-Stufenprozess:

- Ionisierung / Fragmentierung
- Massen-Filter
- Detektion

Die im ersten Schritt gebildeten Ionen bzw. Fragmente werden mit dem Analysator (meist ein Quadrupol) getrennt und mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) detektiert.

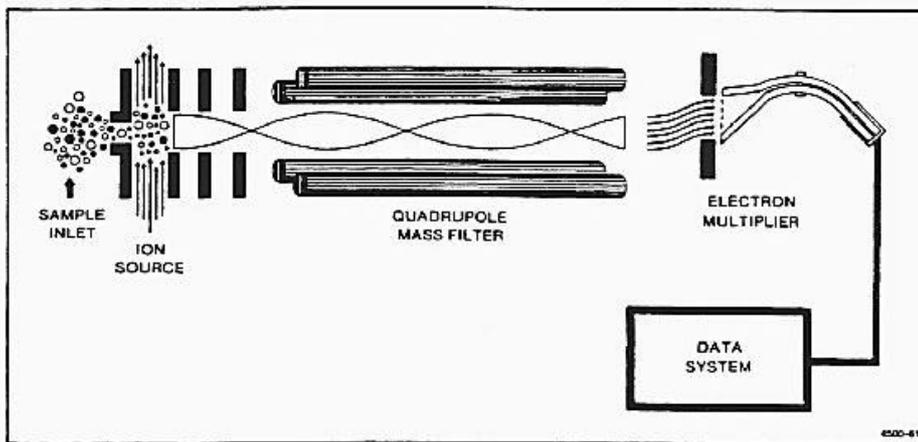


Abb. 4 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Bei der GC/MS-Kopplung wird üblicherweise die Elektronenstoss-Ionisierung (Electron Impact; EI) eingesetzt. Die Probe wird dabei einem Elektronenstrahl mit einer Energie von 70eV ausgesetzt, was zur Ionisierung und Bildung typischer Molekülbruchstücke (Fragmente) führt. Die Fragmentierung führt zu einem typischen Häufigkeitsverteilungsmuster von Massen, dem Massenspektrum. Unter den o.g. Bedingungen ist dies wiederholbar und vergleichbar, auch zwischen verschiedenen Instrumenten. Deshalb gibt es Datenbanken mit EI-Massenspektren, die eine eindeutige Identifizierung einer Substanz durch Datenbankvergleich erlauben.

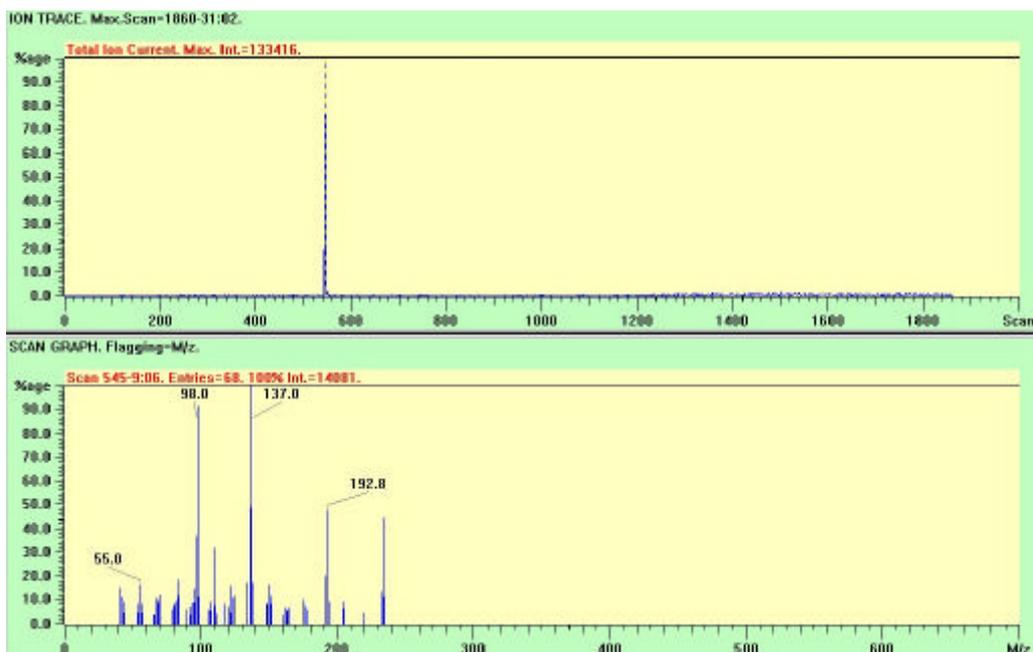


Abb. 5 Totalionenchromatogramm und Massenspektrum eines Spartein-Standards

Vergleich von Retentionszeit und Massenspektrum mit der Datenbank liefert bei Standard oder Probe eine Identifizierung mit Informationen zur Substanz, Trefferwahrscheinlichkeit sowie Strukturformel.

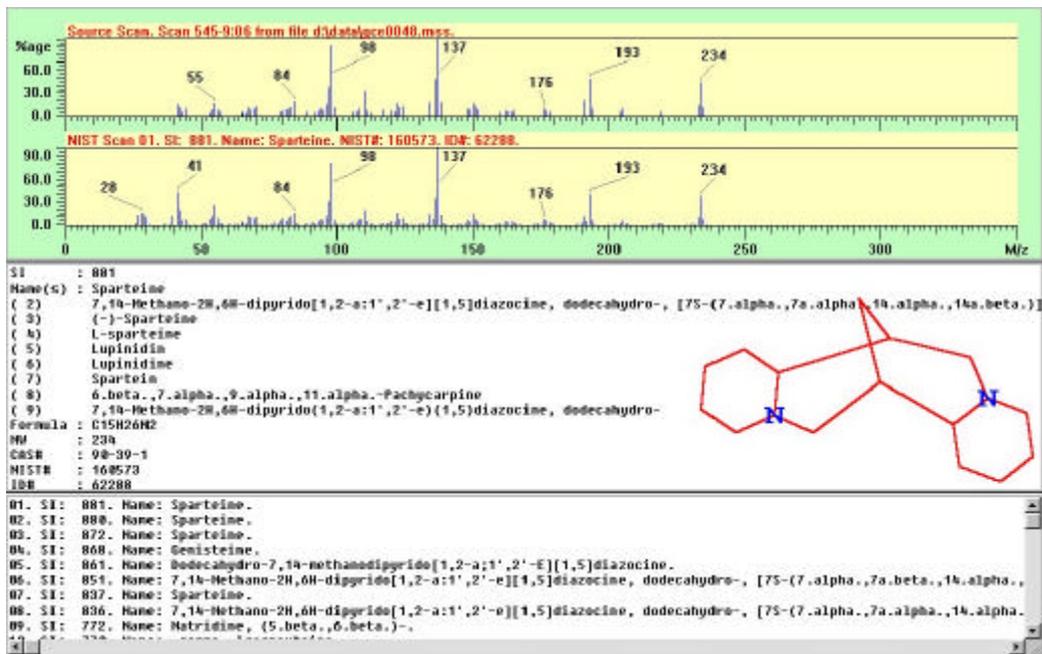


Abb. 6 Ergebnis eines Datenbankvergleiches für Spartein

Mit dieser Vorgehensweise gelingt in Pflanzenproben auch die Identifizierung von Alkaloiden, für die kein Standard zur Verfügung steht. Zur Auswertung herangezogen werden Retentionszeit (genauer Retentionsindex, RI) und Spektrenvergleich mit der Datenbank.

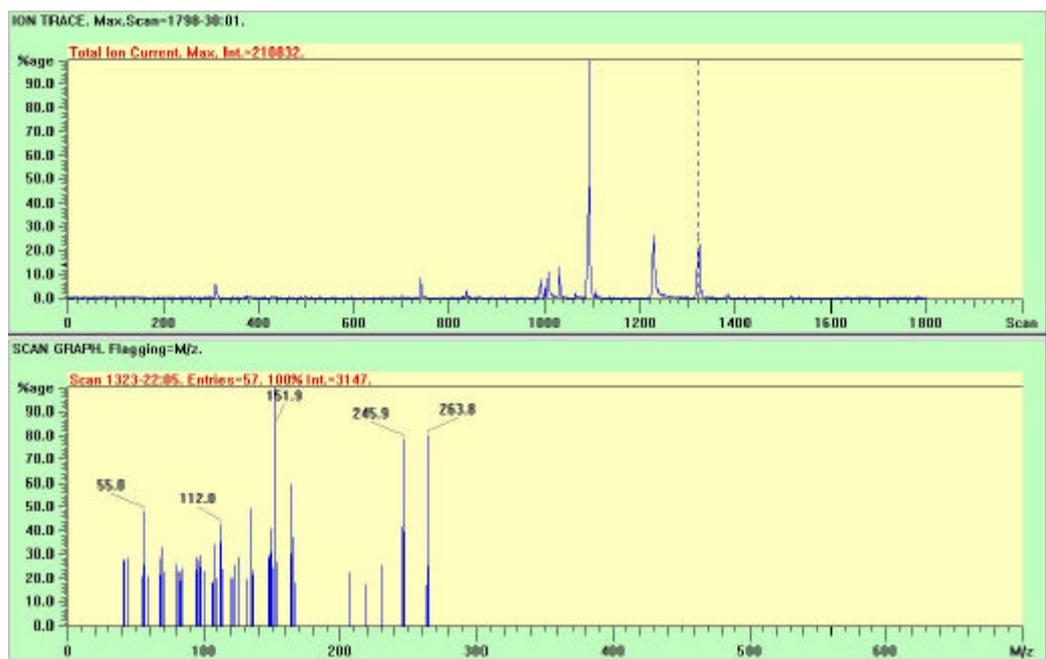


Abb. 7 GC/MS einer unbekannt Probe, der markierte Peak ist ein zunächst unbekanntes Alkaloid

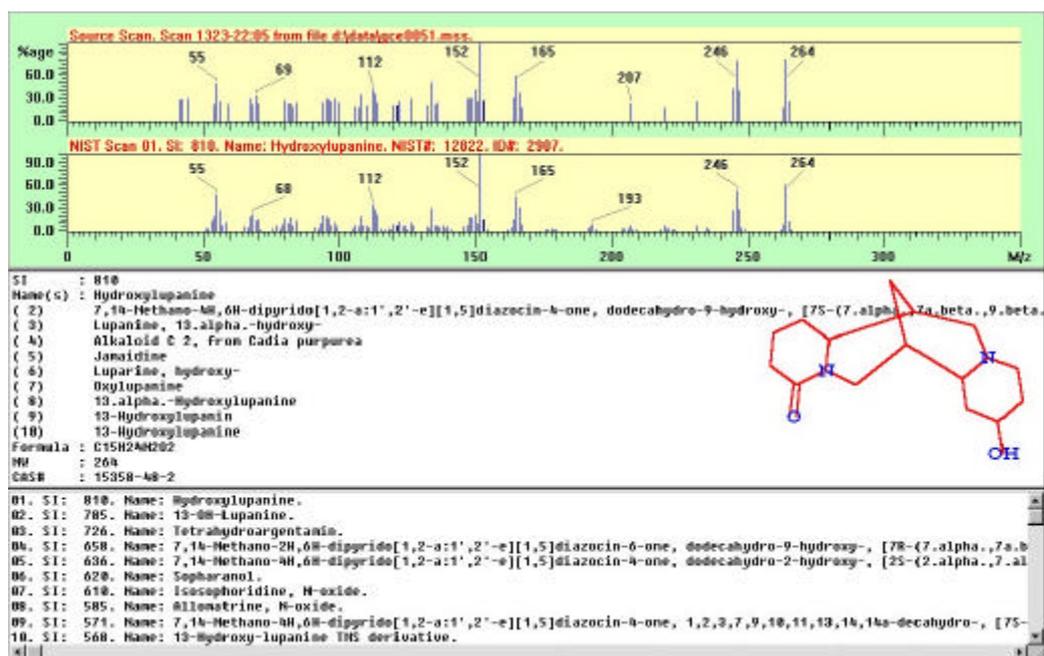


Abb. 8 Identifizierung des unbekanntes Alkaloids als 13-Hydroxy-Lupanine

Durch konsequente Anwendung der Kombination von RI und Datenbankvergleich können auch Stellungs- und Strukturisomere eindeutig nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich zwar meist kaum in den Spektren jedoch in physikalischen Eigenschaften, wie z.B. dem Siedepunkt, und zeigen daher auf der GC ein unterschiedliches Elutionsverhalten.

Die GC/MS ist also ein wichtiges Verfahren zur Identifizierung von Alkaloiden in Lupinen, um Substanzen, für die kein Standard vorliegt, auswerten zu können. Die quantitative Auswertung erfolgt jedoch mit GC / FID. Zur Erzielung richtiger Analyseergebnisse ist also die kombinierte Anwendung beider Analyseverfahren Voraussetzung.

Danksagung: Michael Wink, Frank Sporer, Astrid Backhaus