

Identifizierung und Quantifizierung von Lupinenalkaloiden mit Kapillargaschromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS)

C. Meißner, D. Krauß, M. Wink, Universität Heidelberg

Lupinen enthalten bittere und zum Teil toxische oder teratogene Chinolizidin- und Piperidinalkaloide. Diese können mit der Gas-Flüssig-Chromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) empfindlich und präzise detektiert und identifiziert werden. Die Analyse hat insbesondere bei der land- und ernährungswirtschaftlichen Nutzung der Lupinen eine wesentliche Bedeutung.

Die Lupine: Vorkommen und Nutzung

Weltweit sind über 500 Lupinenarten bekannt, die zum größten Teil in Süd- und Nordamerika beheimatet sind. 14 Arten kommen in Europa vor. Wegen des hohen Fett- und Proteinanteils in den Samen werden einige großsamige Lupinenarten ähnlich wie die Sojabohne in vielen Ländern landwirtschaftlich angebaut. Neben Australien, dem weltweit größten Produzenten von Lupinensamen, nutzen viele Länder in Südamerika, Afrika und Asien die Lupine als nahrhafte und billige Nahrungsquelle, deren Grundstoffe in den Bereichen Ernährung, Medizin und Landwirtschaft Verwendung finden. In Europa werden Lupinenprodukte bis zu einem Anteil von 20% bereits als Tierfuttermittel eingesetzt [1].

Lupinen sind als Pionierpflanzen in der Lage, sich an sehr unterschiedliche Standortbedingungen anzupassen; einige Arten sind sogar in arktischen Regionen und auf wüstenartigen Böden verbreitet. Da Lupinen, ebenso wie andere Leguminosen, in ihren Wurzelknöllchen die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstofffixierung besitzen, können sie neben ihrer Verwendung als Eiweiß-, Öl- und Faserlieferanten auch zur Gründüngung genutzt werden. In den letzten Jahrhunderten trugen sie so zu einer wesentlichen Erweiterung der Grenzen landwirtschaftlicher Nahrungsmittelproduktion bei.

Lupinen produzieren bittere und zumeist toxische Alkaloide, die in der Agrar- und Nahrungsmittelindustrie unerwünscht sind. Für das Überleben und die „Fitneß“ der Pflanzen sind diese Naturstoffe jedoch von entscheidender Bedeutung [2, 3, 10]. Die Stoffe spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr

insbesondere von Fraßfeinden, aber auch von Mikroorganismen. Die als „Cocktail“ in unterschiedlichen Konzentrationen und variabler Zusammensetzung in der Pflanze vorliegenden Substanzen garantieren den Lupinen einen Vorteil in der evolutionsgeschichtlichen Verbreitung. Darüber hinaus dienen diese Verbindungen, die in den Samen bis zu 5% des Trockengewichtes ausmachen können, als Stickstoffquelle für Lupinenkeimlinge. Während der Keim- und Entwicklungsphase der Lupinen kann auch das Wachstum verschiedener anderer konkurrierender Pflanzen durch Alkaloidausschüttung gehemmt werden (allelopathische Wirkung).

Lupinenalkaloide

Alkaloide kommen in 30% aller Pflanzen vor, und mehr als 10 000 Strukturen dieser stickstoffhaltigen Sekundärstoffe sind bislang bekannt. Lupinenalkaloide sind zum größten Teil chemisch den Chinolizidinen zuzuordnen. Je nach Grundstruktur unterscheidet man dabei mehrere Gruppen [4, 6, 7, 12]:

1. Bicyclische Chinolizidinalkaloide vom Lupinintyp
2. Tricyclische Cytisin-Alkaloide
3. Tetracyclische Spartein-Alkaloide

Bislang sind die Strukturen von etwa 170 Chinolizidinalkaloiden (QA) bekannt; allen liegt das Ringsystem des Chinolizidins zugrunde. Die Verbindungen mit Sparteinstruktur machen dabei den Hauptteil der Lupinenalkaloide aus. Abb. 1 zeigt die Strukturen der Diastereomeren Spartein, α -Isospartein und β -Isospartein. Alle drei Isomeren sind asymmetrisch und stellen Racemate dar. 1-Spartein (Lupinidin), d-Spartein (Pachycarbin), 1- α -Isospartein



Lupinus mutabilis, eine von über 500 bekannten Lupinenarten. (Foto: M. Wink)

(Genistein) und 1- β -Isospartein sind als pflanzliche Naturstoffe in der Literatur beschrieben.

Die QA-Strukturtypen sind in der Gattung *Lupinus* nicht gleichermaßen verteilt. Die Lupinenalkaloide liegen als komplexe Mischung von bis zu 30 individuell unterschiedlichen Strukturvarianten des Chinolizidingrundgerüsts vor. Unter den Sparteinen selbst sind die Oxosparteine, insbesondere das Lupanin (2-Oxospartein) häufig vorkommende und wichtige QA. Auch α -Pyridonalkaloide, wie das Anagryrin und Cytisin, können in zahlreichen, allerdings nicht landwirtschaftlich genutzten Species gefunden werden. Lupinderivate sind dagegen vergleichsweise selten und in nur wenigen Arten anzutreffen.

Auch Bipiperidinalkaloide und Indolprotoalkaloide können regelmäßig in

Pflanzenextrakten von Lupinen gefunden werden; zwei charakteristische Vertreter dieser Alkaloidklassen sind das Ammodendrin und das Gramin.

Der Verzehr bestimmter Lupinenarten durch Weidetiere kann zu ernsthaften Vergiftungen bis hin zum Tod der Tiere führen. Für die teratogene Wirkung werden sowohl einige Piperidinalkaloide wie das Ammodendrin, aber auch andere Alkaloide wie das Anagyrin verantwortlich gemacht [5].

Dagegen wird das Spartein in der Medizin bereits seit längerem erfolgreich als Antiarrhythmikum bei Herzleiden eingesetzt. Obwohl seine Wirkung bereits seit 1873 bekannt ist, gelang die Aufklärung der absoluten Konfiguration erst Mitte dieses Jahrhunderts.

Analytische Fragestellungen

Der Einsatz von Lupinen in Landwirtschaft und Ernährung setzt eine umfangreiche Kenntnis ihrer Inhaltsstoffe, insbesondere der Alkaloide, voraus [2-6, 10]. Inzwischen sind die Alkaloide von mehr als 70 Lupinenarten bekannt. Bei den im folgenden aufgeführten Gebieten aktueller Lupinenforschung ist eine moderne instrumentelle Analytik ein unentbehrlicher Bestandteil der Untersuchungen:

- Forschung zur Nutzung der Lupine in der Futter- und Lebensmittelindustrie

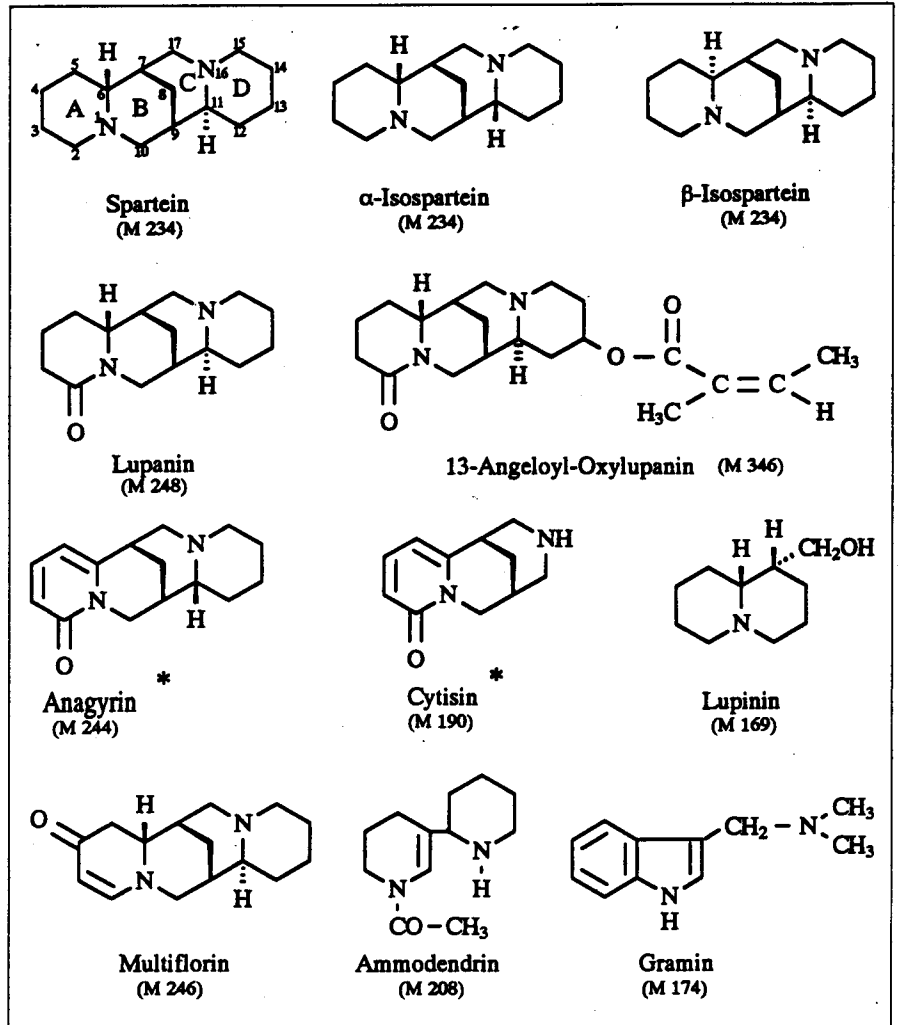
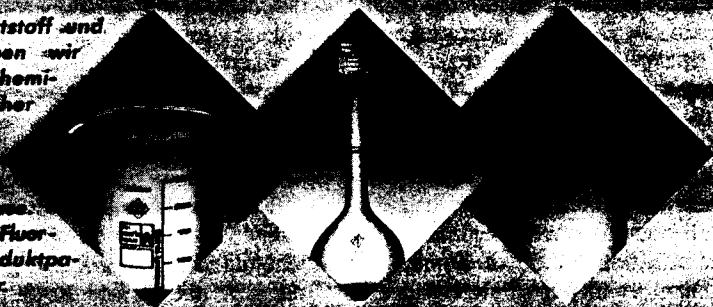


Abb. 1: Strukturformeln ausgewählter Lupinenalkaloide (Übersicht in [6]) (*: α -Pyridonalkaloide).

PFA – für Profis im Labor

Mit PFA, dem transparenten Fluorkunststoff und seinen entscheidenden Vorteilen, lösen wir höchste Laboranforderungen. Fast alle Chemikalien sind in PFA gelöstigkeitsfähig; Bechergläser aus PFA können bis 260°C erhitzen werden. PFA ist chemisch stabil und Beständigkeit gegenüber Säuren und Laugen garantiert. Die Qualität der PFA-Produkte ist als Spezialist in der Verarbeitung von Fluorkunststoffen bieten wir eine breite Produktpalette und stellen Sonderanfertigungen her.



VITLAB GmbH, Monoch 1152, D-63312 Seckau
Telefon 06257/9408-0, Telefax 06257/95933

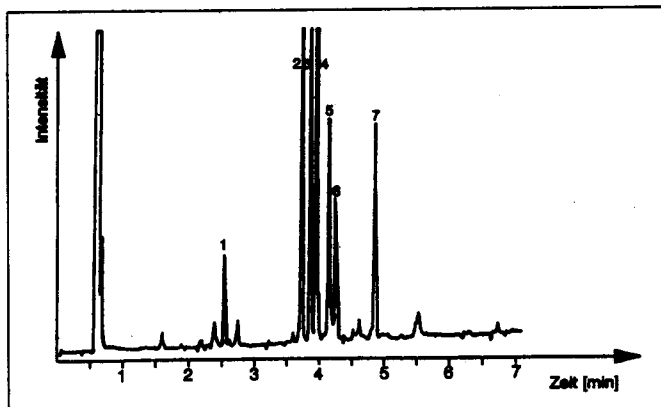


Abb. 2: PND-Gaschromatogramm eines Extraktes von *L. caudatus*; 1. Ammodendrin; 2. 5,6-Dehydrolupanin; 3. Lupanin; 4. Aphyllin; 5. unbekannt; 6. 3 β -Hydroxylupanin; 7. Anagyrin; (Bedingungen: Temp.-prog.: 150–300 °C, 15 °C/min; ab 300 °C isotherm; Split 1:20, Injektor 250 °C, Detektor PND 300 °C, Carriergas Helium 1,9–2,5 L/min.)

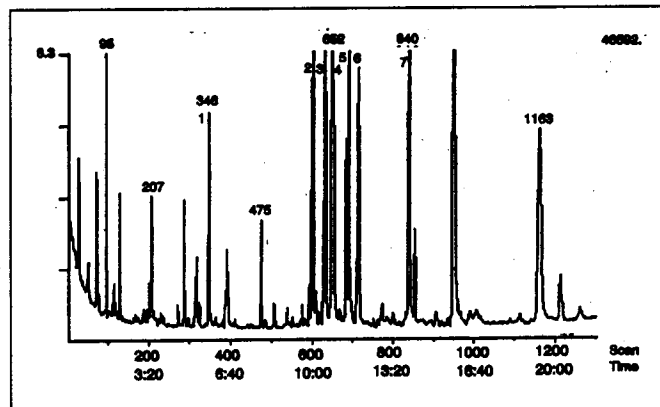


Abb. 3: TIC-Chromatogramm (*L. caudatus*); Substanzzuordnung wie in Abb. 2.

- und in der Qualitätskontrolle
- Untersuchungen zur Toxizität der Alkaloide
- Alkaloide als taxonomische Marker in der Botanik
- Fragen zur Evolutionsgeschichte der Lupine
- Grundlagenforschung zu Alkaloidbiochemie und chemischer Ökologie, u. a. Aufklärung von Biosynthese, Metabolismus und biologischer Wirkung der Naturstoffe
- Pharmakologische Untersuchungen der Alkaloide

In allen Fällen ist eine Identifizierung und zum Teil auch eine Quantifizierung der einzelnen Alkaloide erforderlich, eine trotz moderner Technik immer noch anspruchsvolle Aufgabe für den Analytiker.

Analyse der Naturstoffe

Pflanzenmaterial – getrocknet, gefriergetrocknet und tiefgefroren – wird wäbrig mit 0,5 M HCl homogenisiert. Nach Alkalisierung werden die Alkaloide mittels Festphasenextraktion mit Methylenechlorid eluiert. Aus dem einrotierten Extrakt wird eine methanolische Lösung für die weitere Analyse vorbereitet [7].

Die Methoden zur Untersuchung der Alkaloide, die häufig nur in pikomolaren Konzentrationen zu finden sind, erstrecken sich von einfachen gaschromatographischen Messungen mit einem hochempfindlichen stickstoffselektiven Detektor (PND) bis zu der im Spurenbe-

reich aussagekräftigsten Methode der Gas-Flüssig-Chromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) [4, 6–8, 11–13].

Für die Identifizierung der Alkaloide werden sowohl Informationen aus den charakteristischen Fragmentierungsmustern der Massenspektren als auch aus dem gaschromatographischen Retentionsverhalten benötigt. Der Retentionsindex nach Kovats ist eine gaschromatographische Kenngröße, die die zu identifizierenden Substanzen bezüglich ihrer Lage zwischen zwei benachbarten n-Alkanen beschreibt. Mit diesem Parameter können beispielsweise Diastereomere, deren Massenspektren sich in vielen Fällen nicht unterscheiden, eindeutig identifiziert werden.

Eine Bestimmung bekannter Lupinenalkaloide erfolgt über den Vergleich der Massenspektren und Retentionsdaten mit Referenzspektren und Literaturangaben. Für eine Identifizierung unbekannter Alkaloide ist diese Vorgehensweise allerdings nur bedingt anzuwenden. Mit der hochaufgelösten Massenspektrometrie, die die elementare Zusammensetzung der Fragmente und der besonders aussagekräftigen Molekülonen liefert, lassen sich jedoch Strukturvorschläge für unbekannte Verbindungen gewinnen. Eine endgültige Strukturauflösung ist nur nach Isolierung der Verbindungen und zusätzlichen Untersuchungen z. B. mit der Kernresonanzspektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse möglich. Andere Trenn- und Nachweisverfahren sind Dünnschichtchromatographie (TLC), Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) und Immunoassays (RIA, Elisa) [7, 10].

Gaschromatographie

Die gaschromatographische Auftrennung der komplexen Alkaloidmischungen in Lupinenextrakten gelingt unter Verwendung einer Fused-Silica-Kapillarsäule, beschichtet beispielsweise mit einer Siliconphase vom Typ DB-1 (J&W Scientific) [6, 7, 11, 13]. Ein Flammenionisationsdetektor (FID) oder noch besser ein stickstoffselektiver Detektor (PND) bietet sich zur Detektion der Naturstoffheterocyclen an (Abb. 2). Eine Quantifizierung kann über die integrierten Peakflächen erfolgen, wobei mangels Standardsubstanzen nur die Flächenkorrekturfaktoren einiger weniger käuflicher Substanzen berücksichtigt werden können [8]. Als Carriergas wird Helium verwendet.

Massenspektrometrie

Nach der gaschromatographischen Auftrennung eines Extraktes gelangen die eluierten Alkaloidmoleküle über eine Transferline in die Ionenquelle eines Massenspektrometers. Dort werden sie mittels Elektronenionisation (EI-MS) oder wahlweise chemischer Ionisation (CI-MS) ionisiert und fragmentiert und der Ionenstrom wird als Massenspektrum detektiert. Datenaufnahme und -bearbeitung erfolgt über ein angeschlossenes Computersystem.

Die Elutionsreihenfolge der Substanzen wird in Form von Totalionenstrom-

Chromatogrammen (TIC-Chromatogramme) dargestellt (Abb. 3). Eine Auswertung dieser Chromatogramme erfolgt nun entweder durch sukzessives Aufrufen und Auswerten der Massenspektren aller einzelnen Peaks oder besser mit Ionenchromatogrammen. Bei letzterer Vorgehensweise wird das Vorkommen charakteristischer Alkaloidfragmente im TIC angezeigt (Abb. 4). Die Massenspektren der so aufgefundenen Alkaloide können anschließend ausgedruckt werden. Für eine gründliche Auswertung im EI-Modus ist allerdings eine Vielzahl von Ionen zu berücksichtigen, und es ist sinnvoll, eine Computerroutine zur automatisierten Auswertung zu verwenden.

In Abb. 5 ist das Ergebnis einer solchen Auswerteprozedur graphisch dargestellt. Im oberen Teil sind die Ionenchromatogramme von über 100 Alkaloid-Schlüsselbruchstücken in einer Graphik zusammengefasst. Im unteren Teil ist das Ionenstromchromatogramm in drei Empfindlichkeiten dargestellt. Die markierten Peaks wurden nach definierten Kriterien ausgewählt und die entsprechenden Spektren nach Subtraktion des Untergrundes ausgedruckt. Die hierfür benutzte Programmroutine beruht auf einem Vergleich der Massenspektren mit einer Datei, in der über 100 charakteristische Schlüsselbruchstücke abgespeichert wurden.

Ein unbekanntes Massenspektrum wurde vom Programm als Alkaloidspektrum erkannt, wenn

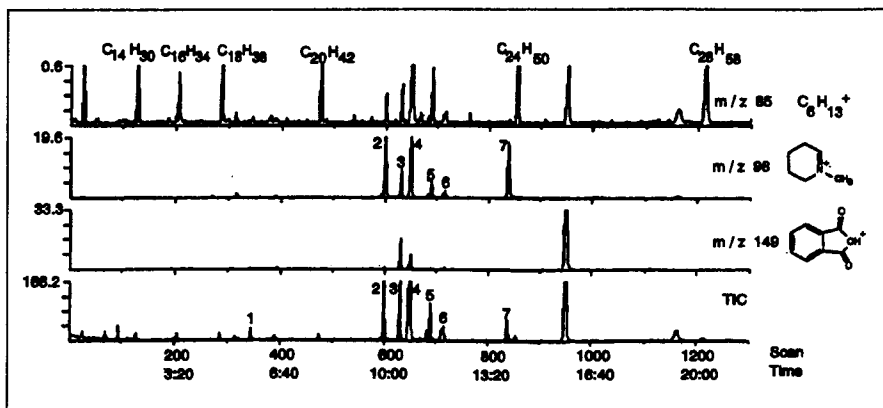


Abb. 4: Ionenchromatogramme (*L. caudatus*); folgende Ionen sind aufgezeichnet: m/z 85: charakteristische Ionen für die coinjizierte Alkanstandards; m/z 98: kennzeichnend für zahlreiche QA; m/z 149: Hinweis auf Weichmacher (Phthalate); untere Spur: TIC.

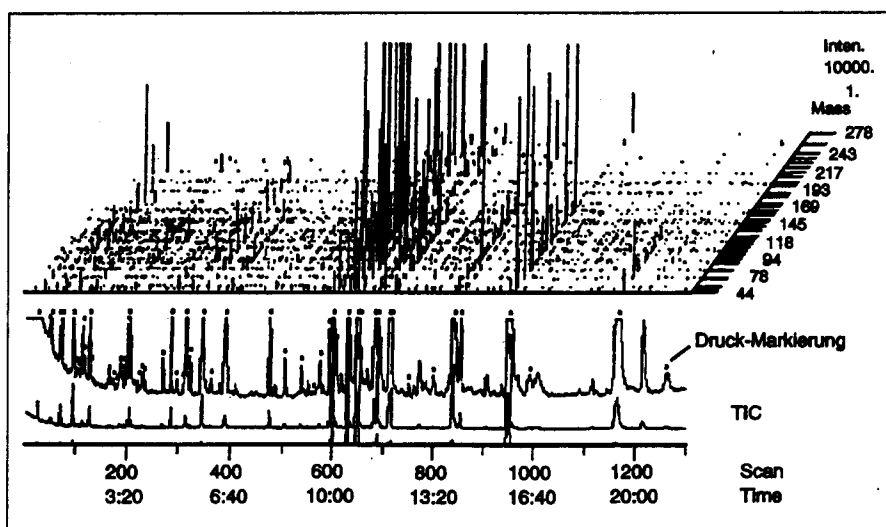


Abb. 5: Kartierung charakteristischer Alkaloidfragmente über den gesamten Scanbereich eines TIC (*L. caudatus*).

**Kunststoffartikel von Bibby Sterilin -
auch für die Bakteriologie und Mikrobiologie**

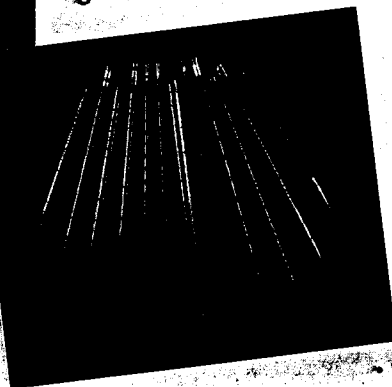
Bibby Dunn



Zum Beispiel:

Petrischalen

Aus kristallklarem Polystyrol unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Eine Vielzahl unterschiedlicher Arten und Größen für alle bakteriologischen Anwendungen.



Zum Beispiel:

Pipetten

Serologische Pipetten, Kurzpipetten, Mikropipetten aus hochwertigem Pyrex®-Borosilikatglas oder Kunststoff. Eine Vielzahl unterschiedlicher Ausführungen.

- Herausragende Qualität
- Außergewöhnlich große Auswahl
- Zuverlässig und weltweit bewährt

Bitte fordern Sie unsere Unterlagen an:

Bibby Dunn Labortechnik GmbH

Thelenberg 6 • 53567 Asbach

Tel. 02683/43094 • Fax 02683/42776

A member of J. Bibby & Sons plc. Science Products Division

Labortechnik GmbH

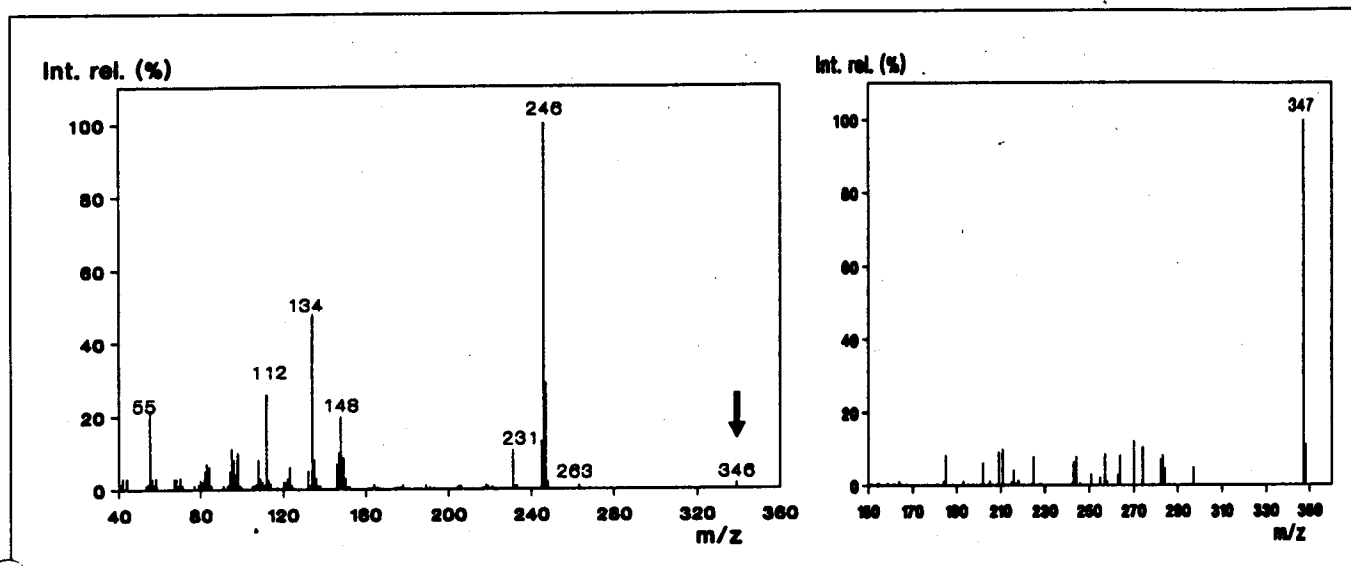


Abb. 6: Massenspektren des 13-Angeloyl-Oxylupanins (Mr 346); EI-Ionisation (links); CI-Ionisation (Ammoniak) (rechts).

- mindestens 4 Fragmente mit den Fragmenten der Vergleichsdatei übereinstimmen,
- die Fragmente in einer bestimmten Anzahl aufeinanderfolgender Scans vorhanden waren,
- die Intensität der Fragmente über einem empirisch bestimmten Grenzwert lagen.

Eine so automatisierte Prozedur kann mehrere Dateien über Nacht auswerten und die Auswertung von Chromatogrammen und Spektren erheblich beschleunigen. Nur wenige Massenspektren von Begleitstoffen erfüllen die Auswahlkriterien und werden ausgedruckt.

GC/MS-Kopplung mit chemischer Ionisation

Die Stabilität der Molekülonen einiger Alkaloide ist gering. Da es die potentiell informativsten Ionen sind, reduziert sich beim Fehlen dieser Ionen auch der Informationsgehalt der Spektren. In solchen Fällen, z. B. bei Estern des Hydroxylupanins und des Lupinins sowie bei verschiedenen Hydroxyalkaloiden, ist die GC/CI-MS die Methode der Wahl. Primär wird dabei ein Reaktandgas durch Elektronenstoß ionisiert, das dann seinerseits zur Ionisierung von Substanzmolekülen über Ionen/Molekül-Reaktionen benutzt wird. Mit dieser weichen Ionisierungsmethode bilden sich relativ stabile Quasimolekülonen der untersuchten Naturstoffe, die einen

Rückschluß auf die Alkaloidmassenzahlen zulassen. Ammoniak erwies sich bei der Alkaloidanalyse als geeignetes Reaktandgas. Abb. 6 zeigt das EI- und CI-Massenspektrum des 13-Angeloyl-Oxylupanins mit m/z 346 als Molekülon im EI-Modus und dem Quasimolekülon bei m/z 347 (Anlagerung eines Wasserstoffatoms) im CI-Modus. Das CI-Spektrum bestätigt damit einen Ester des Hydroxylupanins, dessen Molekülon im EI-Spektrum nur mit geringer Intensität auftritt [11].

GC/MS-Kopplung mit Massenfingerprinting

Die elementare Zusammensetzung von Ionen kann die hochauflösende Massenspektrometrie ermitteln. Diese Methode bestimmt die exakten Massen der Ionen, aus denen dann die elementare Zusammensetzung berechnet werden kann. Dies geht allerdings zu Lasten des Zeit- und Substanzbedarfs jeder Messung.

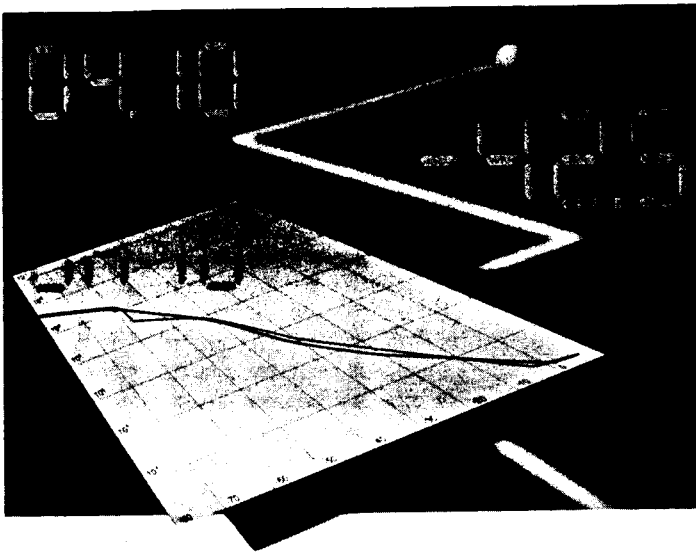
Die zusätzlichen Informationen über die elementaren Zusammensetzungen der Molekülonen und intensiver Fragmente können Hinweise auf eine mögliche Grundstruktur unbekannter Lupinenalkaloide geben. Die Interpretation der Fragmentierungsmuster kann zu einer Identifizierung der Position einer funktionellen Gruppe am Alkaloidskelett oder zur Bestimmung von Anzahl und Lage der Doppelbindungen im Molekül beitragen. Die Bestimmung

der absoluten Konfiguration von Alkaloiden ist mit der Methode allerdings nicht möglich.

Abb. 7 zeigt das Massenspektrum eines Hydroxyammodendrins; die exakten Massen und Zusammensetzungen sind in Tab. 1 angegeben. Die Abspaltung einer Hydroxylgruppe vom Molekülon (m/z 224) führt zur Bildung von Ionen bei m/z 207 (Basepeak). Das Spektrum weist eine starke Ähnlichkeit mit dem des Ammodendrins (nicht gezeigt) auf. Die hochauflösende Massenbestimmung bestätigte das Vorliegen eines Hydroxyammodendrins, eine detailliertere Interpretation der Fragmentierungsmuster ergab Hinweise auf eine Substitutionsposition der Hydroxylgruppe im Ring B.

Zusammenfassung

Die Nutzung der Lupine als ernährungsphysiologisch bedeutsames Agrarprodukt setzt eine detaillierte Kenntnis ihrer bitteren und teils toxischen Alkaloide voraus. Die Methode der gekoppelten GC/MS erfüllt die Forderung nach einem zuverlässigen und sehr empfindlichen Verfahren zu ihrer Identifizierung. Als Ergänzung zu der massenspektrometrischen Analyse mit Elektronenstoßionisation kann die chemische Ionisation (GC/CI-MS) zur Bestimmung der für Chinolizidin- und Piperidinalkaloide charakteristischen Quasimolekülonen herangezogen werden. Die hochauflösende Massenspek-



Der „springende“ Punkt

Der EUTECTIC-MONITOR AW2 von FINN-AQUA sagt Ihnen, wann der Punkt erreicht ist. Der Punkt, bei dem das Produkt in den gefrorenen Zustand übergeht.

Durch Widerstands- und Temperaturmessungen im Produkt werden beim Abkühlen und Wiedererwärmen die Gefrier- und Schmelztemperaturen präzise bestimmt. Die beim Abkühlen, Gefrieren und Wiedererwärmen häufig auftretenden komplizierten Reaktionen können durch die Ergebnisse der Messungen mit dem EUTECTIC-MONITOR AW2 zuverlässig vorher ermittelt werden.

Diese Werte sollten bei der Vorgabe von Gefrier- und Gefriertrocknungs-Bedingungen zugrunde gelegt werden, um gute Resultate zu erreichen. FINN-AQUA fertigt außer Gefriertrocknungsanlagen auch Wasserdestillatoren (WFI), Reinstampferzeuger und Dampf-Sterilisatoren.

FINN-AQUA®

FINN-AQUA Santasalo-Sohlberg GmbH · Kalscheurener Straße 92
D-50354 Hürth · Tel.: 02233/6999-213/215 · Fax 02233/6999-13

Lupinenalkaloide

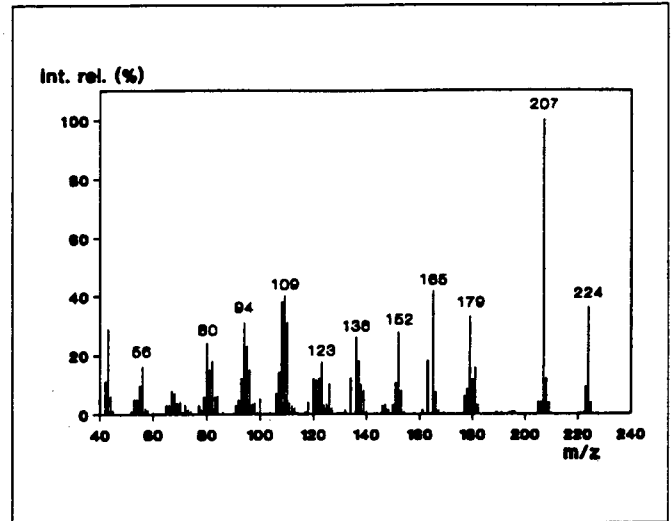


Abb. 7: Massenspektrum eines Hydroxyammodendrins.

Nominal-masse	gefundene exakte Masse	elementare Zusammensetzung	berechnete Masse
224	224,1493	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₂	224,1525
207	207,1453	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O	207,1497
179	179,1150	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O	179,1184
165	165,1284	C ₁₀ H ₁₇ N ₂	165,1392
152	152,0936	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	152,0950
123	123,0944	C ₇ H ₁₁ N ₂	123,0922
109	109,0814	C ₆ H ₉ N ₂	109,0766

Tab. 1: Auswahl wichtiger Massenfragmente mit ihrer elementaren Zusammensetzung [9]

trometrie erlaubt die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung wichtiger Fragmente und leistet somit einen Beitrag zur Strukturbestimmung unbekannter Lupinenalkaloide.

Literatur

- [1] Hill, G. D.: Proc. 4th Intl. Lupin Conf., Geraldton, Australia [1986], 244-77.
- [2] Wink, M.: Theor. Appl. Genet. 75 [1988] 225-233.
- [3] Wink, M.: Plant Syst Evol 150 [1985] 65-81.
- [4] Wink, M.: Planta Med. 53 [1987] 509-14.
- [5] Keeler, F.: Teratology 7 (1) [1973] 23-30.
- [6] Meißner, C., Wink, M., in Lupinen 1991 – Forschung, Anbau und Verwertung (M. Wink, Hrsg.), 91-129, Heidelberg.
- [7] Wink, M.: Methods Plant Biochem. Vol. 8 [1993] 197-239.
- [8] Priddis C. R.: J. Chrom. 261 [1983] 95-101.
- [9] Fitch, W. L., Djerassi, C.: JACS 96 (15) [1974] 4917-27.
- [10] Wink, M., in Lupinen 1991 – Forschung, Anbau und Verwertung (M. Wink, Hrsg.), 130-56, Heidelberg.
- [11] Wink, M., Schiebel, H. M., Witte, L., Hartmann, T.: Planta Med. 44 [1982] 15-20.
- [12] Cho, Y. D., Martin, R. O.: Anal. Biochem. 44 [1971] 49-57.
- [13] Wink, M., Witte, L., Hartmann, T., Veuring, C., Volz, V.: Planta Med. 48 [1983] 253-257.