

Einführung in die Analytik von Lupinenalkaloiden mittels GC-MS

Andreas Tei und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie

Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 364

D-69120 Heidelberg

Zusammenfassung

In der instrumentellen Analytik hat sich die Analyse unzersetzter verdampfbarer, flüchtiger Stoffe mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) und Massenspektroskopie (MS) als moderne, präzise und schnelle Analysenmethode etabliert.

Die in der Gattung *Lupinus* enthaltenen, bitter schmeckenden und zum Teil toxischen Sekundärstoffe vom Typ Chinolizidinalkaloide (QA), lassen sich durch die Methode der Festphasenextraktion (SPE) quantitativ aus dem Pflanzenmaterial extrahieren und anschließend mit Hilfe einer Gerätekombination von Gaschromatograph und Massenspektrometer (GC-MS) problemlos, bis hin zu Mengen von wenigen Nanogramm im Probenmaterial nachweisen, identifizieren und quantifizieren. Die zunächst zur Analyse notwendige Trennung des im Pflanzenextraktes vorliegenden komplexen Chinolizidinalkaloidgemisches, erfolgt mit Hilfe der Gaschromatographie. Die Identifizierung der im Gaschromatogramm als Signale (Peaks) erscheinenden Einzelkomponenten erfolgt anhand ihrer Massenspektren und ihrem Retentionsindex (RI), welcher durch Co-Chromatographie mit einer homologen Reihe linearer Alkane errechnet wird. Dieser Beitrag soll einerseits dem Leser einen Überblick über den Verlauf der Analyse eines chinolizidinalkaloidhaltigen Pflanzenextraktes aus *Lupinus mutabilis* (Samen) mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC-MS) und andererseits auch einen Überblick über das dazu notwendige technische Equipment vermitteln.

Abstract

Due to the growing importance of lupins in agriculture, there is an increasing demand for a simple method for the determination of their toxic alkaloids and other secondary metabolites. The most effective method for alkaloid extraction from plant material is the solid phase extraction method (SPE). For identification and quantification of lupin alkaloids gas chromatography (GLC) coupled with mass spectroscopy (GC-MS) is the fastest

and the most powerful modern analytical method, which allows us also to detect and identify even trace amounts of alkaloids in complex mixtures. This communication is an introduction as to how to analyse lupin alkaloids via gaschromatography (**GLC**) and mass spectrometry (**MS**) and sequel to the previous article from C. Meißner and M. Wink „GC-MS-Analysis of North-American-Lupins“, which contained a large variety of mass spectra from lupin alkaloids together with their calculated Kovats indices (**RI**) [C. Meißner, M. Wink, GC-MS-Analyse von Alkaloiden Nordamerikanischer Lupinen (1992)].

Key Words: Lupin alkaloids; Solid phase extraction; gaschromatography; Retention index; Quantification of alkaloid contents; Mass spectrometry; Identification of alkaloids

Einleitung:

Die Gattung *Lupinus* (Leguminosae) produziert als pflanzliche Sekundärstoffe neben Flavonoiden und Saponinen, hauptsächlich bitter schmeckende, toxische und teilweise sogar teratogen wirkende Alkaloide vom Chinolizidintyp (z.B. Anagyrin, Cytisin) oder Bipiperidintyp (z.B. Ammodendrin).

Mit Hilfe der Festphasenextraktionsmethode im Rahmen eines Alkaloidaufarbeitungsganges, lassen sich die in der Pflanze enthaltenen Chinolizidin-Alkaloide (**QA**) quantitativ extrahieren und anschließend durch Gas-Chromatographie (**GC**) und Massenspektroskopie (**MS**) präzise detektieren, identifizieren und quantifizieren. Bei den so gewonnenen Pflanzenextrakten handelt es sich immer um komplexe Vielstoffgemische, so daß zur Analyse zunächst eine chromatographische Auftrennung dieser Stoffgemische in ihre Einzelkomponenten erfolgen muß.

Da es sich bei denen im Extrakt von Lupinen vorkommenden Chinolizidinalkaloiden (**QA**) um eine Stoffklasse unzersetzt verdampfbarer, organischer Verbindungen handelt, hat sich die zur Analyse notwendige Auftrennung des Stoffgemisches mit Hilfe der Gas-Chromatographie besonders bewährt (Review: Wink, 1993).

Die Kapillarsäulen-Gas-Chromatographie (**GLC**) zählt zu den modernsten und zugleich effektivsten chromatographischen Verfahren, bei der weniger als 1 mm dicke Quarzkapillaren als Trennsäulen eingesetzt werden. In einer 30 m langen mit einer organischen Phase beschichteten Kapillarsäule erfährt ein Stoffgemisch bis zu 70.000 physikalische Trennoperationen während des Temperaturprogrammes. Die Einzelkomponenten des Stoffgemisches verlassen danach die Kapillarsäule zeitlich versetzt und werden dann von verschiedenen, je nach Einsatzzweck gewählten Detektoren als deutliche und scharf voneinander abgegrenzte Signale (Peaks) registriert.

Am häufigsten verwendete Detektoren sind der **FID** (Flammen-Ionisations-Detektor),

der zugleich als Universal-Detektor anzusehen ist und der **PND**, ein spezieller Detektor, der hauptsächlich zur Detektion von stickstoffhaltigen Verbindungen (Alkaloiden) eingesetzt wird. Am meisten Informationen über die Strukturen der untersuchten Moleküle liefert der Massenselektive Detektor (**MSD**), der auch als „**GC-MS**“ bezeichnet wird.

Der **MSD** ist der teuerste aller gaschromatographischer Detektoren. Er liefert aber detaillierte Informationen über die einzelnen Verbindungen eines Gemisches, die zur Identifizierung genutzt werden können.

Die genannten Detektoren zeichnen sich gleichwohl alle durch außerordentlich geringe Nachweisgrenzen aus, so daß Stoffmengen im unteren **Nanogrammbereich** (ng) noch ausreichend gut nachgewiesen werden können. Mit Hilfe der kostengünstigen Flammenionisations-Detektoren **FID** und **PND**, läßt sich der in einer Probe vorliegende Alkaloidgehalt quantitativ und präzise ermitteln.

Der **MSD** nimmt von jeder der in der Probe vorliegenden Substanzen Massenspektren auf. Diese Massenspektren enthalten Informationen über die Gesamtmasse eines Moleküls (**Molekülion**) und über seinen Zerfallsweg (**Fragmentierung**) nach Elektronenstoß im Hochvakuum. Massenspektren stellen somit Fingerprints von Verbindungen dar, wodurch deren schnelle Identifizierung möglich ist.

Die Identifizierung einer zunächst unbekanntes Verbindung erfolgt durch den computergesteuerten Vergleich ihres aufgenommenen Massenspektrums mit den Massenspektren einer Datenbank. Der Computer wählt dabei Massenspektren aus der Datenbank aus, welche die größtmögliche Übereinstimmung zum selbst aufgenommenen, unbekanntes Massenspektrum zeigen und schlägt diese dann zur Identifizierung des unbekanntes vor.

Durch die routinemäßige Einführung von GC-MS-Systemen in der Naturstoffforschung konnte seit Anfang der 80'er Jahre eine Potenzierung der Anzahl an Ergebnissen und Erkenntnissen hervorgebracht werden.

Was sind Alkaloide ?

Alkaloide sind basische, stickstoffhaltige, meist heterocyclische Verbindungen, bevorzugt pflanzlichen Ursprungs. Der Name Alkaloid (=Alkali ähnlich) wurde durch die auffallende Basizität dieser Verbindungen geprägt. Alkaloide sind im Pflanzenreich außerordentlich weit verbreitet und kommen in ca. 30 % aller Pflanzen vor. Mit bisher weit über 12.000 verschiedenen bekannten Strukturen ist die Gruppe der Alkaloide die größte und zugleich wichtigste Verbindungsklasse an Naturstoffen überhaupt.

In den menschlichen oder tierischen Organismus gebracht, entfalten sie meist schon in Mengen von wenigen Milligramm eine auffallende pharmakologische oder toxikologische Wirkung, da sie primär an Rezeptoren des Zentralnervensystems oder anderen wichtigen molekularen Targets angreifen (Wink, 1993b). Aufgrund ihrer vielseitigen phar-

makologischen Eigenschaften stellt Ihre Erforschung ein interessantes Arbeitsgebiet für Naturwissenschaftler dar (Roberts & Wink, 1998).

Was sind Lupinenalkaloide ?

Die Gattung *Lupinus* produziert sowohl Alkaloide des Chinolizidin-, Piperidin- und seltener auch des Indoltyps. In den Pflanzen liegt eine Mischung von verschiedenen Alkaloiden vor. Dieser „Alkaloidcocktail“ ist für die Fitneß und das Überleben der Pflanze von entscheidender Bedeutung. Er dient neben dem Schutz vor Fraßfeinden, auch als eine Art „Immunsystem“ der Pflanze, womit sie sich gegenüber Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze, aber auch Viren schützen kann (Wink, 1992, 1993a,b). Während der Keimungs- und Entwicklungsphase kann auch das Wachstum verschiedener anderer konkurrierender Pflanzen durch Alkaloidausschüttung gehemmt werden. Alkaloide zeigen somit ebenfalls eine „allelopathische Wirkung“. Die schützende Wirkung der Alkaloide läßt sich besonders gut im Vergleich der alkaloidreichen Bitterlupinen zu den nahezu alkaloidfreien Süßlupinen beobachten; letztere sind besonders anfällig gegenüber Fraß durch Insekten und Vertebraten, aber auch gegenüber pilzlichen Infektionen (Wink, 1988, 1992, 1993a,b).

Eine Verwendung der Lupine und den daraus hergestellten Nahrungsmitteln zur Ernährung von Menschen und Tieren, setzt umfassende Kenntnisse über die Zusammensetzungen und die Mengen, der darin enthaltenen für uns schädlichen Alkaloide voraus.

In Tabelle 1 ist die Komplexität illustriert, mit der wir bei diesen Analysen konfrontiert werden, am Beispiel eines Alkaloidcocktails, wie er in den Samen von *Lupinus campestris* und *Lupinus mutabilis* vorliegt.

Chemische Strukturen der Lupinenalkaloide:

Lupinenalkaloide werden chemisch den Chinolizidin- und Piperidinalkaloiden zugeordnet. Es kommen jedoch auch Alkaloide des Indoltyps vor (Abb. 1)

Material und Methoden

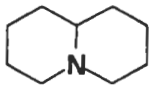
Eine definierte Mengen des zu untersuchenden Pflanzenmaterials wird zunächst durch Mörsern oder Mahlen zerkleinert und anschließend mit 0.5 N Salzsäure versetzt. Nach Homogenisieren im Mörser oder auch durch einfaches Stehen über Nacht gehen die im Pflanzenmaterial enthaltenen Alkaloide in Form ihrer Hydrochloride in die wässrige Phase über. Nach Zentrifugation oder Filtration wird eine klare, wässrige Lösung der Alkaloidhydrochloride erhalten. Nach Versetzen der wässrigen Lösung mit starken Basen, wie konz. Ammoniaklösung oder Natronlauge, werden die Alkaloidhydrochloride deprotoniert, so daß sie nun als Emulsion in Form ihrer lipophilen freien Basen in der wässrigen Phase vorliegen.

Tab. 1: Zusammensetzung des Alkaloidgemisches aus Samen von *Lupinus mutabilis* (L.m.) und *Lupinus campestris* (L.c.).

Die Ermittlung erfolgte durch **GC-MS-Analyse**; Konzentrationen an Alkaloid in zunehmender Menge: --, -, +, ++, +++

RI	Alkaloid	L.c.	L.m.
1628	Gramin	-	
1785	Sparteïn		++
1810	Dehydrosparteïn		--
2050	Tetrahydrorhombifolin		+
2077	Epiaphyllin	--	
2122	α -Isolupanin	-	
2131	Dehydrolupanin	-	-
2138	Hydroxy-tetrahydrorhomb.		-
2165	Lupanin		+++
2170	Iso-Multiflorin		-
2200	Aphyllin	+	
2237	Didehydrodihydroxylupanin	--	
2255	Hydroxylupanin	+++	
2261	Didehydrolupanin	+++	
2302	Didehydrohydroxylupanin	+++	
2310	Multiflorin		--
2345	17-Oxolupanin		+
2374	Dihydroxylupanin	--	
2402	13-Hydroxylupanin		+
2409	Hydroxylupanin	+	
2447	Dehydrohydroxylupanin	++	
2456	Hydroxylupanin	-	
2571	Dihydroxysparteïn	--	
2636	Dihydroxylupanin	-	
2733	13-Angeloyloxylupanin		+
2867	4-Tigloyloxylupanin		--

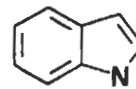
Stammverbindungen:



Octahydrochinolin
Chinolizidin



Piperidin

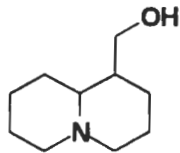


Indol

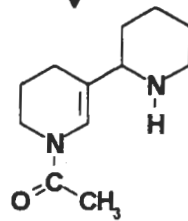


1. Bicyclische Chinolizidinalkaloide

= Bicyclische QA

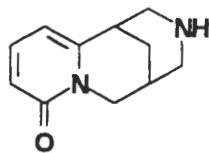


Lupinin



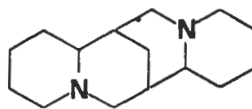
Ammodendrin

2. Tricyclische QA

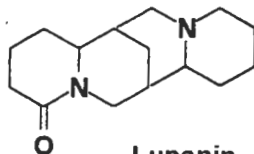


Cytisin

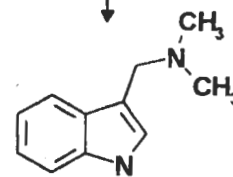
3. Tetracyclische QA



Spartein



Lupanin



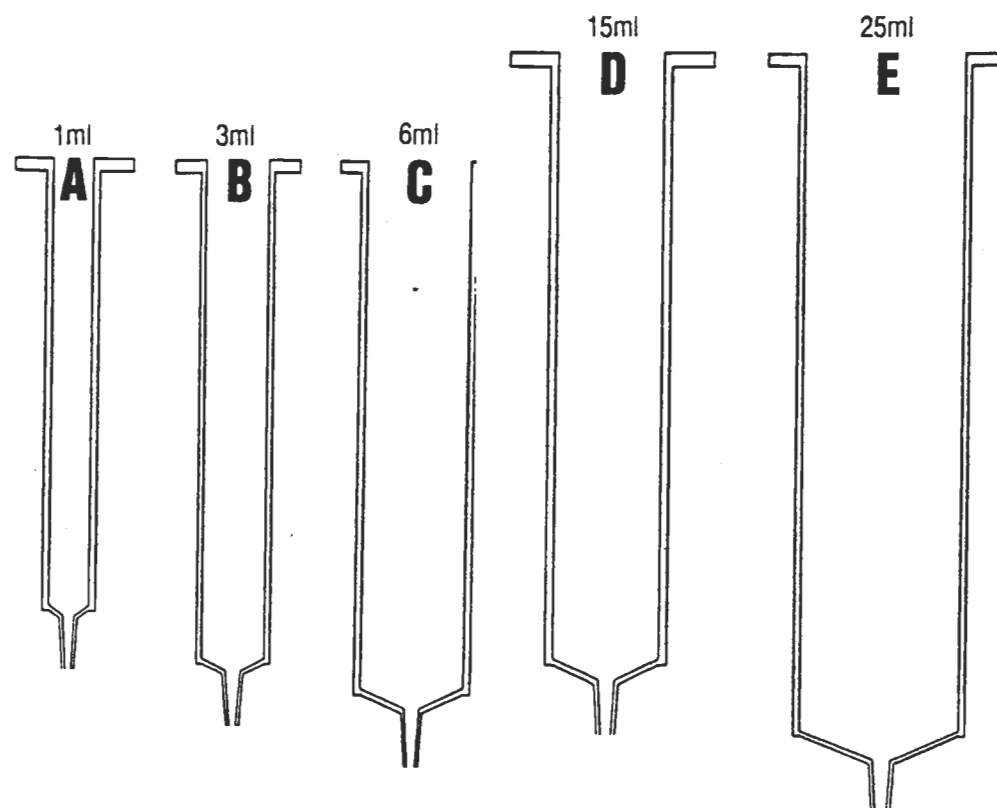
Gramin

ein Protoalkaloid

Abb. 1. Chemische Strukturen der Lupinenalkaloide

Die freien Basen der Alkaloide können mit lipophilen organischen Lösungsmitteln aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Zur quantitativen Extraktion der Alkaloide aus der wässrigen Phase hat sich die Methode der Festphasenextraktion (**SPE = Solid Phase Extraction**) besonders bewährt. Dabei handelt es sich um eine schnelle und zugleich auch präzise analytische Methode. Die wässrige, alkalische Alkaloidemulsion wird in eine Glasröhre, in der sich ein für Wasser geeignetes Adsorbiermaterial (**Extrelut®**; **Isolute®**) befindet, gegeben. Nach vollständiger Adsorption des Wassers durch das Adsorbens können die lipophilen freien Basen der Alkaloide mit lipophilen organischen Lösungsmitteln (Dichlormethan, Chloroform oder Ethylacetat) vom Adsorbiermaterial eluiert werden.

Die Festphasenextraktion garantiert ein schnelles und nahezu verlustfreies Arbeiten mit hohen Wiederfindungsraten (<99%) des Analyten. Weitere Vorteile sind ein geringer Verbrauch an teureren, organischen und schwer zu entsorgenden Lösungsmitteln sowie die Vermeidung der Bildung von Emulsionen, die häufig bei der Verwendung von Scheidetrichtern zur Extraktion auftreten. Ebenso ist durch eine Verwendung von standardisierten Adsorbierkartuschen eine problemlose Validierung dieser Extraktionsmethode möglich. Der schematische Aufbau einer Alkaloidextraktion mittels Festphasenextraktion ist in Abb. 2 dargestellt.

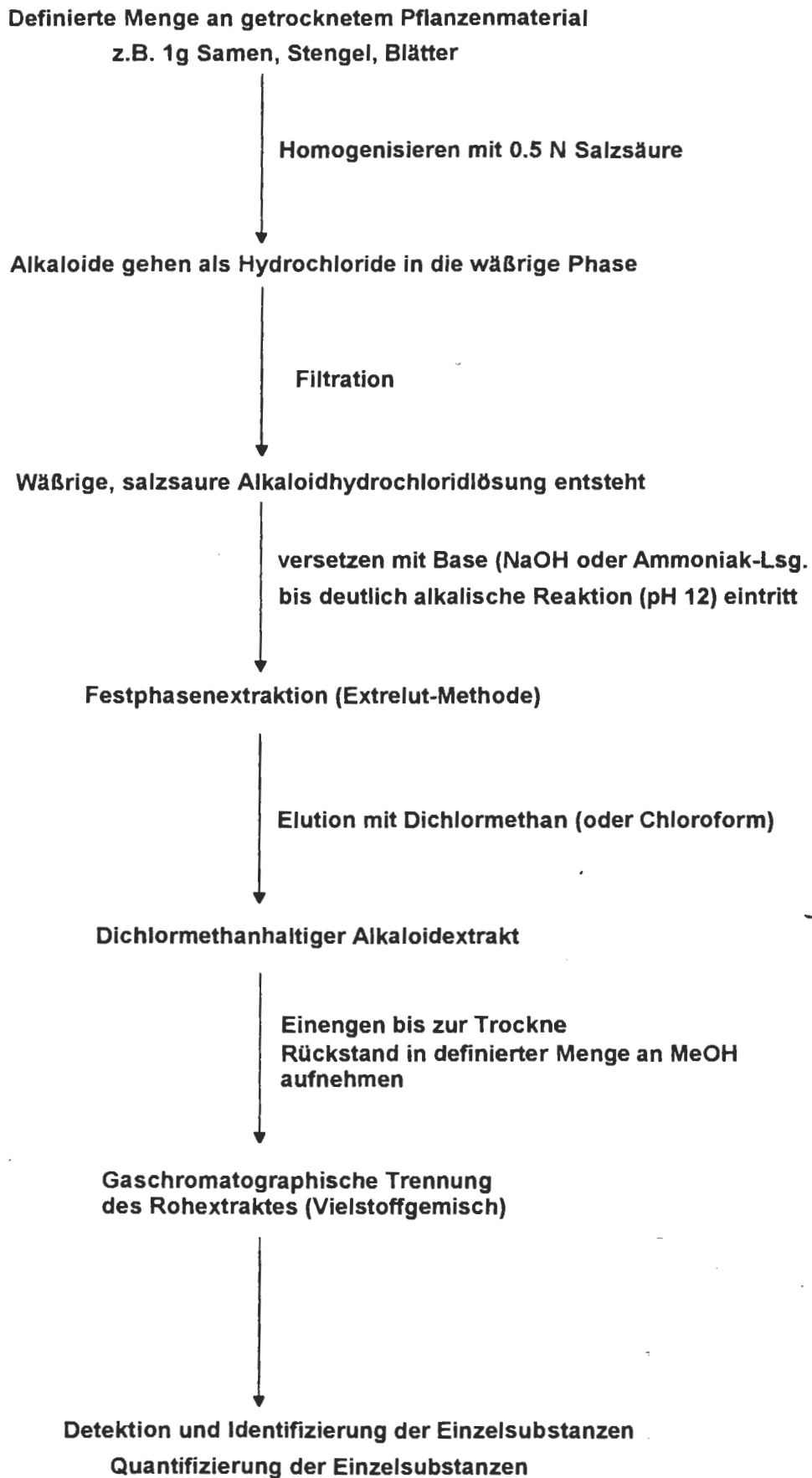


Die hier abgebildeten Längsschnitte der verschiedenen SPE-Säulen und Reservoirs sind in der Originalgröße wiedergegeben. Um Ihnen die Identifikation einer Reservoirgröße zu erleichtern, ist jede Säulendimension mit einem Kennbuchstaben versehen. Der Buchstabe, der jeder Bestellnummer der Fertigsäulen nachgestellt ist, gibt die Dimension der verwendeten Säule an. Die Säule mit der Bestell-Nummer 221-0010-A ist somit eine Säule mit der Säulengeometrie A usw.

Die zusätzlich angeführten Volumina entsprechen jenen der leeren Kunststoffsäulen.

Abb. 2. Aufbau und Geometrie der SPE-Säulen

Schematischer Ablauf einer Analyse von Lupinenalkaloiden



Gaschromatographische Trennung des Lupinenalkaloidextraktes:

Die Gaschromatographie nimmt bei der Analytik der Lupinenalkaloide, eine zentrale Stellung ein, gemäß des Zitates:

„Wo wir trennen können, können wir analysieren“ (Kelker 1985)

Chromatographische Methoden sind physikalische Methoden zur Trennung eines Stoffgemisches, die auf der **unterschiedlichen Löslichkeit** der Gemischkomponenten in zwei Phasen beruhen (z.B: wässrige oder organische Phase) (*R. Herb, Chromatographie in der Gasphase, 1985*).

Historisches:

1903: Der russische Biochemiker und Botaniker **Tswett** war erstmals in der Lage, den Blattfarbstoff in Chlorophyll A und B in Karotin und in Xanthophyll durch Säulenchromatographie zu trennen.

Aus der Tatsache, daß am Anfang nur Farbstoffgemische getrennt wurden, leitete sich der Name dieser Trennmethode her.

chroma = Farbe; graphein = schreiben

1952: A. T. **James** und A. J. P. **Martin** bauten den ersten Gaschromatographen

Sie verdampften das zu trennende Substanzgemisch und leiteten die Dämpfe in ein Trennrrohr, auf dessen Innenwand sich ein dünner Film eines hochsiedenden Silikonöles als Trennflüssigkeit befand.

Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der Einzelsubstanzen dieses Gemisches in dem Silikonölfilm erfolgte die Trennung.

Substanzen, die sich in der Trennflüssigkeit besser lösen, verweilen insgesamt länger in der Trennsäule als in der Trennflüssigkeit schlechter lösliche Substanzen.

Funktionsprinzip:

Eine definierte Menge (z. B. 1 µl) einer Probenlösung wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze in den 250-300°C heißen Injektor gespritzt (Abb. 3) und verdampft dort schlagartig (Flashverdampfung). Die entstandene Dampf Wolke wird durch einen kontinuierlich fließenden Trägergasstrom (Carrier: Inertgas He oder H₂) in die sich nach dem Injektor angebrachte Kapillarsäule gespült. Die Kapillarsäule ist eine mehrere Meter lange Quarzglas Kapillare, deren Innenwand mit einem dünnen Film eines hochsiedenden Silikonöles benetzt ist. Die mit Hilfe der Dampf Wolke als Aerosol in die Säule transportierten Substanzen kondensieren dort aus und lösen sich schließlich in dem Trennflüssigkeitsfilm (stationäre flüssige Phase).

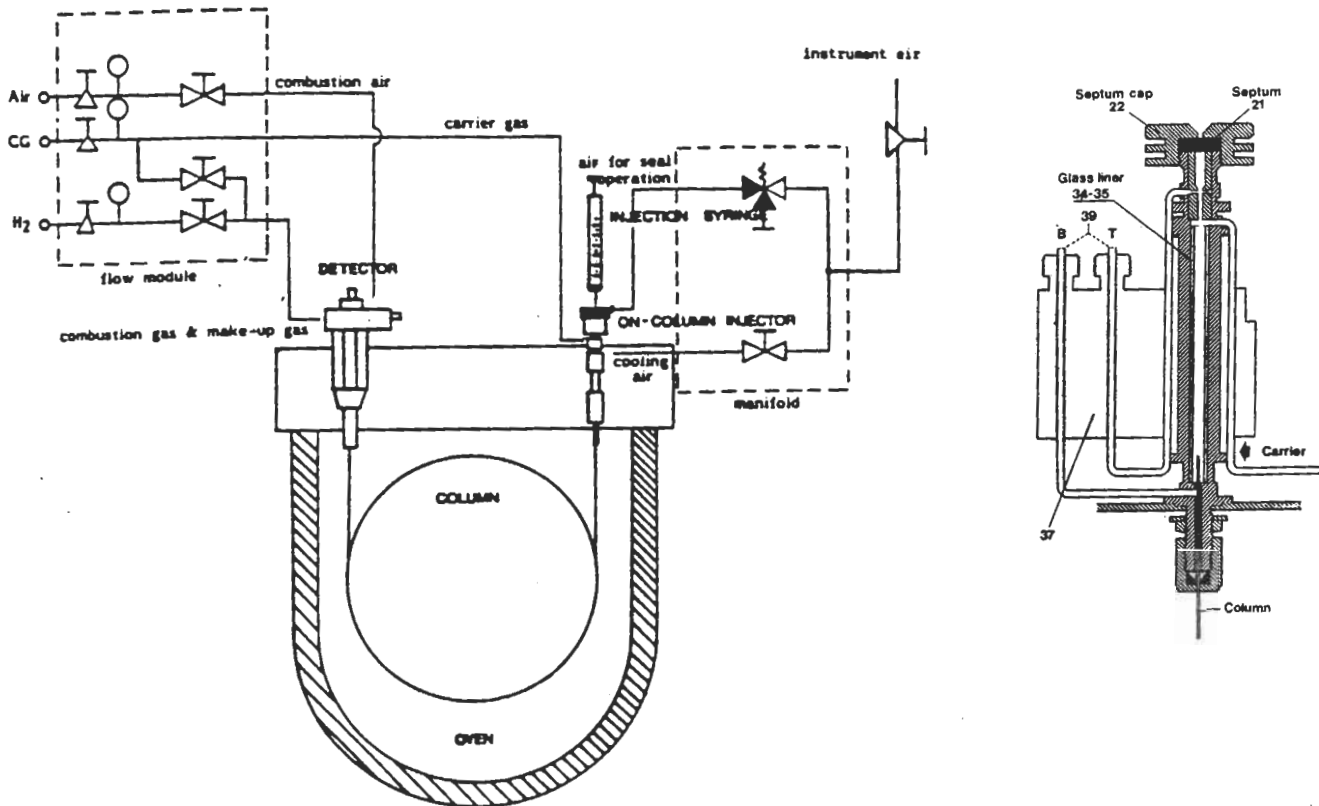


Abb. 3. Schema eines Gaschromatographen

Je nach Affinität der Substanzen zur stationären Phase, verweilen diese kürzer oder länger in ihr und verlassen deshalb die Kapillarsäule zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Beim Verlassen der Säule werden die Substanzen von einem Detektor als elektrische Signale detektiert. Die vom Detektor erzeugten elektrischen Signale werden einem Schreiber zugeführt, der das Gaschromatogramm aufzeichnet (Rücker et al., 1992).

In der instrumentellen Analytik häufig verwendete Kapillarsäulen sind zwischen 15- und 60 m lang und haben einen Innendurchmesser von 0,18 mm bis 0,53 mm. Die Filmdicke der stationären Phasen kann zwischen 0,1- und 7 μm betragen. Je mehr stationäre Phase sich auf der Säuleninnenwand befindet, umso größer werden die trennbaren Substanzmengen bis es zu einer Überladung der Säulenkapazität kommt.

Eine Überladung der Säulenkapazität macht sich durch eine unsymmetrische Signalform (leading oder tailing) bemerkbar. Die theoretische Trennstufenzahl und die damit verbundene Auflösung nimmt bei Verwendung von Säulen mit größerer Filmdicke ab, die Retentionszeiten verlängern sich. Die Wahl der Trennsäule stellt somit einen Kompromiß zu dem jeweiligen chromatographischen Trennproblem dar.

Zur gaschromatographischen Trennung von Lupinenalkaloiden bei Benutzung eines

FID oder **PND**, hat sich eine Säulenlänge von 15 m bei einem Innendurchmesser von 0,25 mm und 0,25 µm Filmdicke bewährt. Zur Erzielung ähnlich guter Ergebnisse in Verbindung mit einem **MSD**, sollte man die doppelte Säulenlänge bei sonst gleichen Säulendimensionen wählen.

Das Temperaturprogramm

Chromatographische Methoden sind Trennmethode, bei denen die unterschiedliche Verteilung der Gemischkomponenten in zwei Phasen ausgenutzt wird. In der Kapillarsäulen-Gaschromatographie, auch als **GLC** (Gas-Liquid-Chromatographie) bezeichnet, ist eine der beiden Phasen gasförmig, die andere hingegen flüssig.

Substanzen, die sich sehr gut in der flüssigen Phase lösen, verweilen folglich länger in der Kapillarsäule als weniger gut lösliche Verbindungen. Eine physikalische Größe, die dieses Löslichkeitsphänomen beschreibt, ist der **Verteilungskoeffizient** α . Er ist definiert als :

$$\alpha = \frac{C_1}{C_2}$$

C_1 = Konzentration des Stoffes in Phase 1 (Gasphase)

C_2 = Konzentration des Stoffes in Phase 2 (Trennflüssigkeit)

Der **Verteilungskoeffizient** α ist jedoch eine sehr stark temperaturabhängige Größe. Die Löslichkeit eines Stoffes in der flüssigen Phase nimmt mit ansteigender Temperatur stark ab, während dadurch seine Konzentration in der Gasphase zunimmt (ausgasen!). Gaschromatographische Trennungen sind folglich stark von Temperaturänderungen zu beeinflussen.

Je niedriger die Temperatur des **GC**-Ofens, desto länger verweilt die Substanz auf der Trennsäule, desto weiter sind die Peakmaxima voneinander entfernt. Da jedoch mit der Analysenzeit auch die Peakbreite zunimmt, bedeutet eine längere Verweildauer auf der Trennsäule nicht unbedingt eine verbesserte Trennung. Die optimale Temperatur stellt somit erneut einen Kompromiß zwischen akzeptablen Analysenzeiten und vertretbarem Verlust an Auflösung dar. Bei der **Chromatographie komplexer Gemische mit einem großen Flüchtigkeitsbereich ist eine Trennung bei konstanter Temperatur (isotherm) meistens nicht möglich**. In diesem Fall **verwendet man Temperaturprogramme**, bei denen der Säulenofen mit festgelegten Heizraten kontinuierlich aufgeheizt wird (Abb. 4). Bei der Trennung eines Lupinenalkaloidgemisches mit einer 15 m langen Kapillarsäule hat sich folgender Temperaturcyclus bewährt:

- **120°C Start - 2 min isotherm - Aufheizung 10°C / min bis 300°C - 10 min isotherm - Abkühlen auf Starttemperatur.**

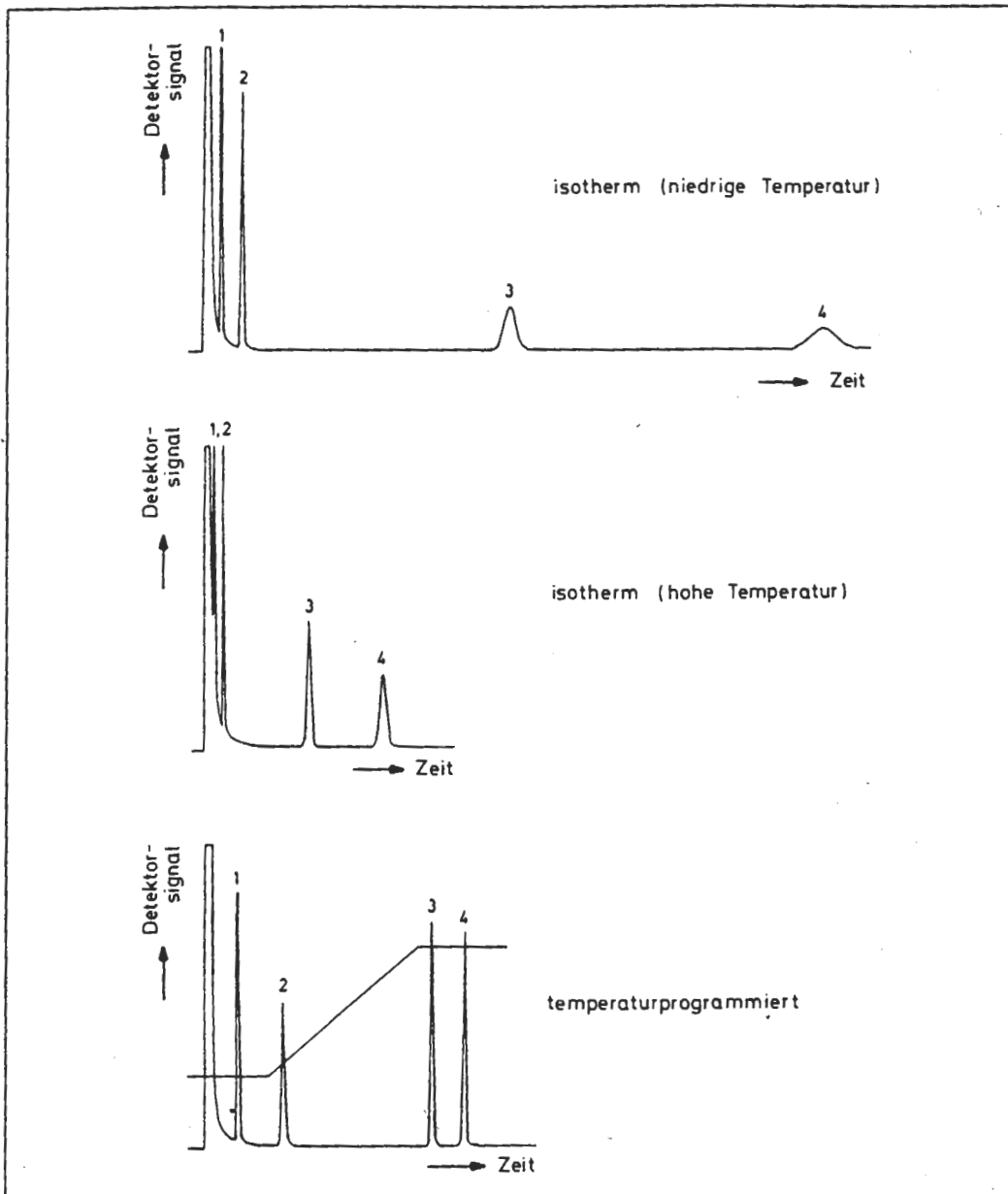


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der gaschromatographischen Trennung

Eine Modifikation des Heizprogrammes zur Anpassung an das entsprechende Trennproblem sollte vom jeweiligen Analytiker selbst durchgeführt werden. Eine optimale gaschromatographische Trennung des Substanzgemisches findet erst im untersten der abgebildeten Chromatogramme (Abb. 4) statt, bei dem ein Temperaturprogramm benutzt wurde. Bei modernen mikroprozessorgesteuerten Geräten, können auch mehrstufige Temperaturprogramme ausgeführt werden, bei denen isotherme Phasen und Aufheizphasen beliebig kombiniert werden können.

Das Gaschromatogramm:

Das Gaschromatogramm stellt das chronologische Protokoll einer Trennung von Substanzen in der Gasphase dar. Es liefert zwei wichtige Informationen:

1) Retentionszeit

Als Retentionszeit wird die Zeit bezeichnet, die eine Substanz vom Einspritzen bis zum Verlassen der Trennsäule benötigt. Sie ist eine relative Größe und hängt von vielen Parametern ab, wie Länge und Polarität der verwendeten Säule, Filmdicke der stationären Phase, Trägergasstrom, Art des verwendeten Trägergases und dem zur Trennung gewählten Temperaturprogramm.

2) Signalfläche (Peakfläche)

Die Fläche unter der Signalkurve ist proportional zur eingespritzten Substanzmenge, dadurch kann eine Quantifizierung einer unbekanntes Substanzmenge in Bezug auf eine Kalibrierungssubstanz (als Standard bezeichnet) erfolgen. Dabei ist jedoch zu beachten, daß unterschiedliche Verbindungen auch unterschiedlich starke Detektorsignale ergeben, weshalb zuerst die Ermittlung sogenannter **Responsefaktoren** notwendig ist, wenn man die Konzentration einer unbekanntes Substanzmenge mit Hilfe einer anderen, mit ihr nicht identischen Kalibrierungssubstanz berechnen will.

Deutlich erkennbar ist, daß es sich bei dem verwendeten Alkaloidextrakt um ein Vielstoffgemisch handelt (Abb. 6). Mit Hilfe des zur Kalibrierung angefertigten Gaschromatogrammes des „Lupanin-Standards“, läßt sich die unbekanntes Menge an Lupanin in der vorliegenden Lupinenprobe berechnen. Die Peakfläche des Standardsignals (Abb. 5) beträgt 134.818 Flächeneinheiten, entsprechend einer Menge von 210 ng / µl Lupanin. Das Lupaninsignal in der Lupinenprobe beträgt 2.360.144 Flächeneinheiten, wodurch sich eine mit Hilfe des Dreisatzes berechnete Menge von 3.676 ng / µl Lupanin ergibt. Bei bekannter Verdünnung der Probenlösung (4 ml) und bekannter eingewogener Menge an Pflanzenmaterial (0.5 g) von *Lupinus mutabilis* (Samen), errechnet sich eine Gesamtmenge von 29.4 mg Lupanin pro Gramm Pflanzenmaterial. Da es sich dabei um getrocknetes Pflanzenmaterial handelt, liegt der relative Alkaloidgehalt um etwa einen Faktor 10 höher als in frischem, wasserhaltigem Pflanzenmaterial.

Der Retentionsindex

Mit zunehmender Verbreitung der Gaschromatographie wurde das Bedürfnis geltend gemacht, die relative Größe Retentionszeit reproduzierbarer zu machen. Es wurde nach einer Größe gesucht, die unabhängiger von den vielen Parametern ist, von denen die Retentionszeit abhängt. Kovats führte 1958 den Begriff des Retentionsindex ein. Er ordnete willkürlich einer homologen Reihe von n-Alkanen Zahlen zu, die dem 100-fachen Wert ihrer Kohlenstoffatomzahl entsprachen und nannte diesen Wert **Retentionsindex** (Kovats, 1958).

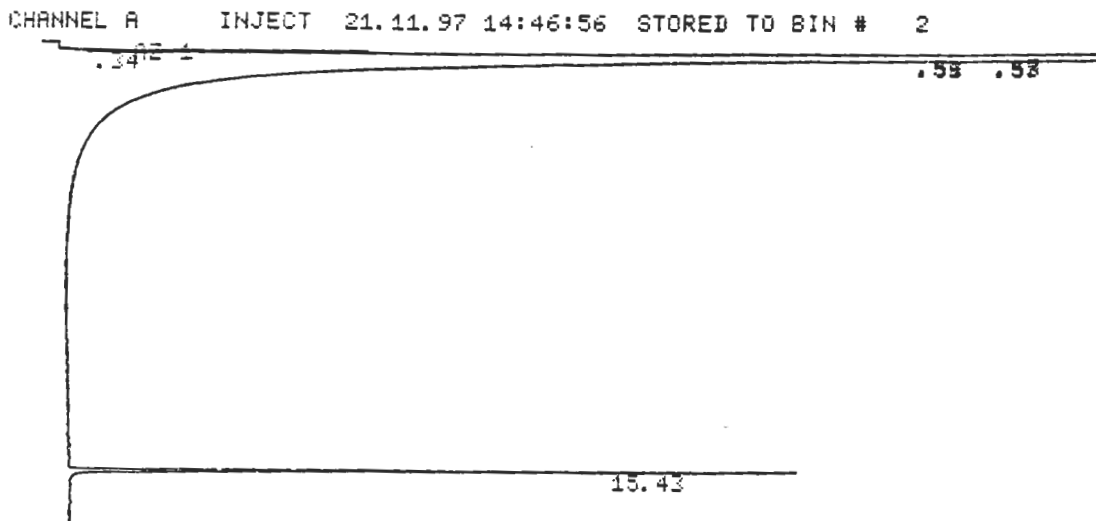


Abb. 5. Gaschromatogramm von 210 ng Lupanin zur Kalibrierung

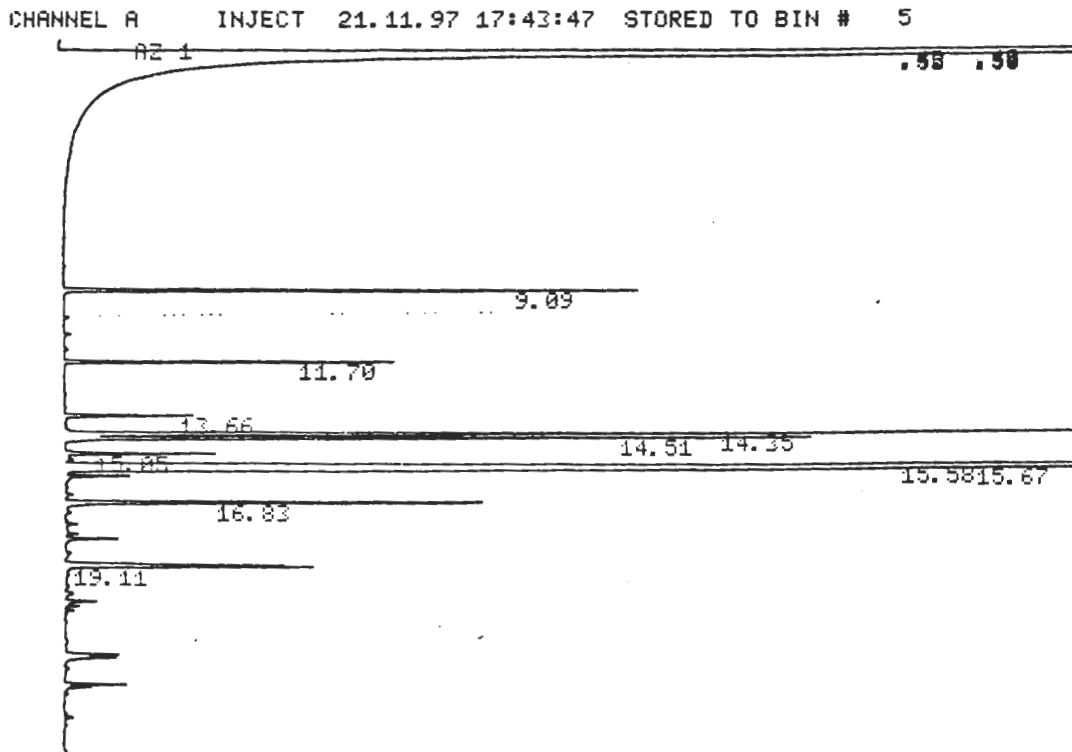


Abb. 6. Gaschromatogramm eines Alkaloidextraktes von *Lupinus mutabilis* (Samen)

Das Signal von Lupanin in der Probe von *Lupinus mutabilis* weist eine geringfügig größere Retentionszeit, als die des Standards auf. Dies ist auf eine Unsymmetrie des Signals in der Probe von *Lupinus mutabilis*, wegen Überladung der Trennkapazität der Säule zurückzuführen.

Das n-Alkan **Hexadecan** mit 16 Kohlenstoffatomen hat somit einen Retentionsindex von **RI = 1600**, während das n-Alkan **Eicosan** mit 20 Kohlenstoffatomen einen Retentionsindex von **RI = 2000** erhält. Durch **lineare Interpolation** zwischen den in periodischer Abfolge im Gaschromatogramm erscheinenden n-Alkansignalen, kann der Retentionsindex der dazwischenliegenden Substanzen berechnet werden. Er ist das **wichtigste Hilfsmittel zur Identifizierung von Lupinenalkaloiden im Gaschromatogramm**, da er unabhängig vom verwendeten Heizprogramm, dem Trägergasstrom und der Säulenlänge ist. Zu beachten ist lediglich seine Abhängigkeit von der Polaritätsstufe der verwendeten Trennsäule. Während Lupanin auf einer Säule mit der Polaritätsstufe DB 1 einen Retentionsindex von 2165 aufweist, erhöht sich dieser Wert bei der Verwendung einer Säule der Polaritätsstufe OV 1 auf 2177. (Anmerkung: „OV 1 ist geringfügig polarer als DB 1“).

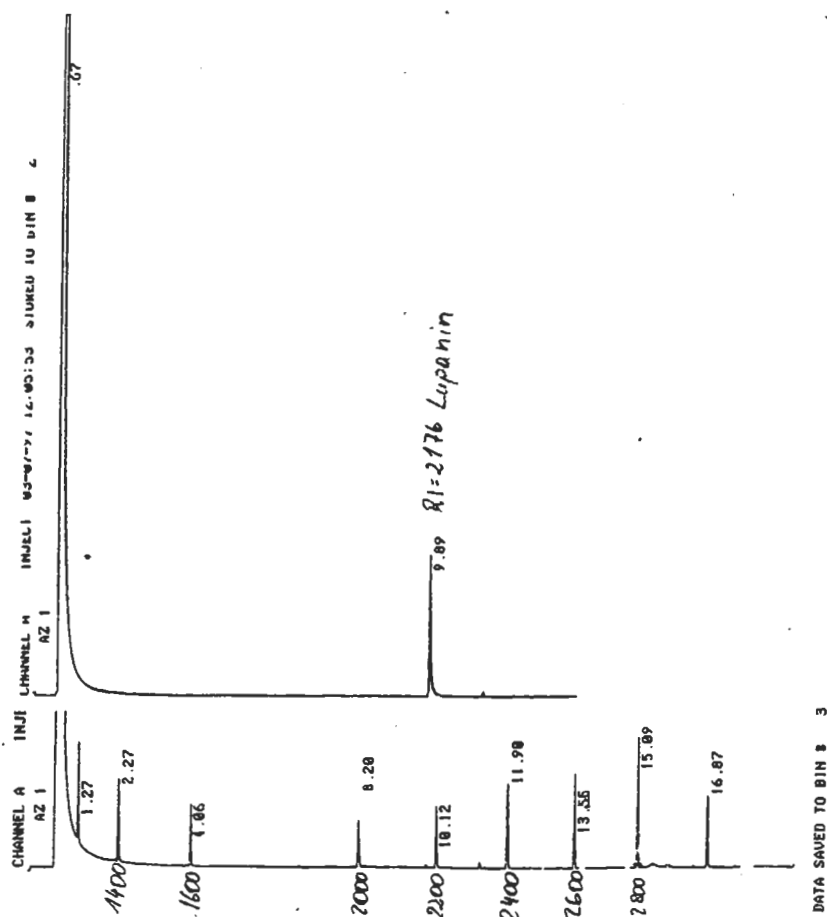
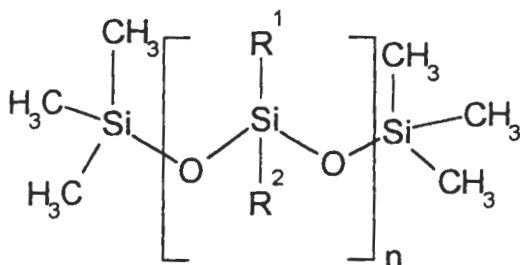


Abb. 7. Chromatogramme der Standard n-Alkane und von Lupanin

Berechnung des Retentionsindex durch lineare Interpolation zwischen den n-Alkansignalen (möglich z. B. mit Dreisatz oder graphisch) (Witte et al., 1993):

Aufbau der stationären Phase (Trennflüssigkeit)

Die Innenwand der Kapillarsäule ist mit einem dünnen Film **extrem hochsiedender Silikonöle** benetzt, die sich alle vom gleichen **Polysiloxangerüst** ableiten.



Aufbau des Polysiloxangerüsts

Bei den handelsüblichen Kapillarsäulen sind folgende Polaritätsabstufungen erhältlich (R bezieht sich auf die Reste des oben abgebildeten Polysiloxangerüsts). Die Typenbezeichnungen der stationären Phasen sich nach dem jeweiligen Hersteller. z.B. DB® (Durabond®) = Bezeichnung vom Hersteller J & W; OV® = Bezeichnung vom Hersteller OHIO VALLEY Laboratories

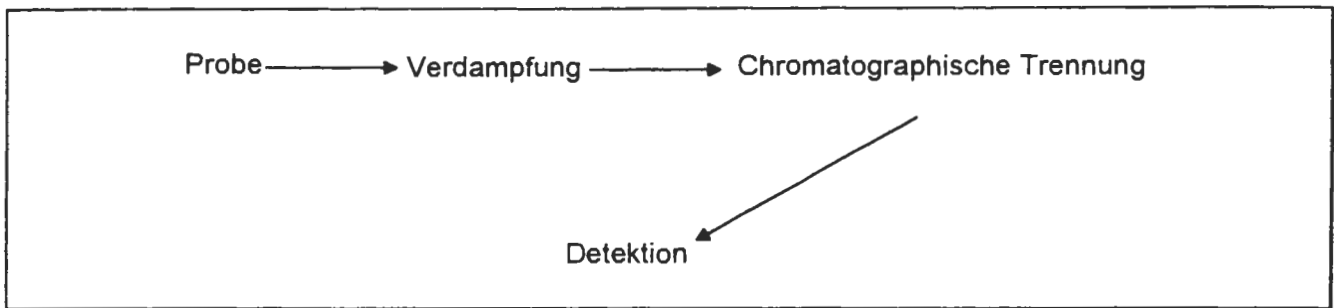
Polarität nimmt zu

- DB-1; OV-1; SE-30; SP-2100 (R = Methyl)
- DB-5; SE-54 (R = 5% Phenyl; 95 % Methyl)
- DB-17; OV-17 (R = 50% Phenyl; 50% Methyl)
- DB-210; OV-210 (R = 50% Trifluoropropyl; 50% Methyl)
- DB-225; OV-225 (R = 50% Cyanopropylmethyl; 50%Phenylmethyl)
- DB-1701; OV-1701 (R = 14% Cyanopropylphenyl; 86% Methyl)
- DB-WAX; Carbowax 20-M (Polyethylenglycol)

Diese Phasen werden auch als „Non-Extractable, Cross-Linked and Surface-Bonded-Phases“ bezeichnet, da die Trennflüssigkeiten chemisch an die Silanolgruppen der Oberfläche der Kapillarenwand gebunden sind, wodurch sogar ein Ausspülen verschmutzter Kapillarsäulen mit organischen Lösungsmitteln möglich ist. Zur Analytik von Lupinenalkaloiden haben sich besonders die **Polaritätsstufen DB 1** und **OV 1**, die als universell einsetzbar gelten, bewährt. Beim Auftreten von starkem Tailing der Signale (Anmerkung: „häufig bei Albin beobachtet“), kann auch eine Säule mit der Polaritätsstufe **DB 5** verwendet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß es zu einer Änderung der in der Literatur angegebenen Retentionsindices für Lupinenalkaloide kommt, wodurch eine Identifizierung der Substanzen im Gaschromatogramm oft erschwert wird. Die Wahl der Polaritätsstufe der stationären Phase richtet sich nach dem jeweiligen Trennproblem.

Gaschromatographische Detektoren

Schematischer Analysenverlauf:



Nach der gaschromatographischen Trennung des Stoffgemisches, werden die Einzelsubstanzen detektiert und als elektrische Signale einem elektrischen Schreiber zugeführt, der das Gaschromatogramm aufzeichnet. In der Gaschromatographie häufig verwendete Detektoren sind:

Wärmeleitfähigkeitsdetektor:

Er arbeitet für die Probe zerstörungsfrei und wird deshalb häufig bei der Gaschromatographie in präparativem Maßstab, in Verbindung mit gepackten Säulen, eingesetzt. Er ist jedoch für analytische Zwecke aufgrund seiner Unempfindlichkeit gegenüber den dort üblichen geringen Substanzmengen im Nanogrammbereich wenig geeignet.

FID (Flammen-Ionisations-Detektor)

Der FID ist für analytische Zwecke der am meisten eingesetzte gaschromatographische Detektor. Er zeichnet sich durch einen günstigen Anschaffungspreis, durch eine leichte Handhabung sowie eine geringe Nachweisgrenze und einen breiten nutzbaren Arbeitsbereich aus. Die Nachweisgrenze liegt bei 10^{-12} g / s, die Sättigungsgrenze bei 10^{-4} g/s, wodurch sich für den FID ein nutzbaren Arbeitsbereich von 8 Zehnerpotenzen ergibt.

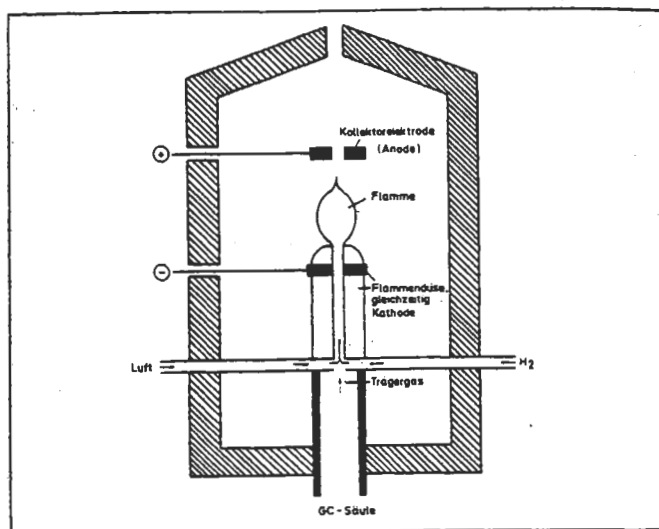
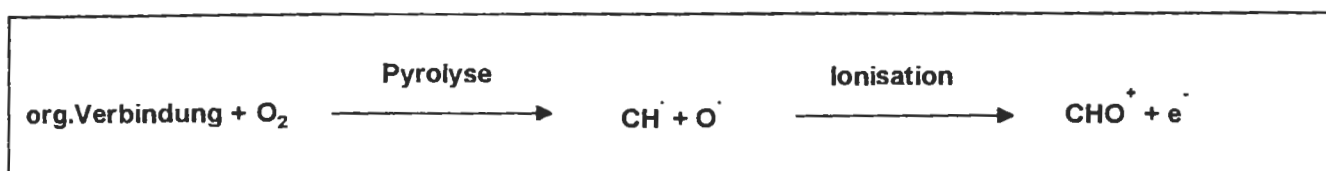


Abb. 8: Schema eines FID

Funktionsprinzip des FID

Am Ende der Kapillarsäule befindet sich eine Düse, in die durch zwei seitliche Bohrungen Wasserstoff und Luft geleitet wird. Oberhalb der Düse brennt eine Wasserstoffflamme. Werden nun Substanzen von der Kapillarsäule eluiert, so gelangen diese in die Wasserstoffflamme. Beim Durchschreiten der Flamme werden Substanzen, die oxidierbare Kohlenstoffatome enthalten pyrolysiert. Die durch Pyrolyse entstandenen Radikale werden durch ein sich oberhalb der Düse befindliches elektrisches Feld von ca. 300 V ionisiert. Durch anschließende Messung des fließenden Ionenstroms zwischen zwei Elektroden und Verstärkung der elektrischen Signale, ergibt sich das Messsignal in Millivolt, welches nun dem Schreiber zugeführt wird.



Der **Response** des FID's hängt stark von der jeweiligen Struktur, der Anzahl der Kohlenstoffatome und dem Gehalt an Heteroatome der detektierten Verbindungen ab. Sie stellen somit wichtige, die Ionenbildung bestimmende Parameter dar. Bei der Bestimmung der Konzentrationen verschiedener in der Probe enthaltener Verbindungen, bezogen auf das Kalibrierungssignal einer bestimmten Verbindung (Standards), benötigt man deshalb Kenntnisse der sog. **Responsefaktoren** der jeweiligen Verbindungen am FID.

PND (Phosphor-Stickstoff sensitiver Detektor)

Die Funktionsweise des PND, ist der des FID sehr ähnlich. Der PND ist jedoch für Verbindungen, die weder Stickstoff- noch Phosphoratome enthalten „blind“. Auch hier brennt am Säulenende über der Detektor-Düse eine Wasserstoffflamme. Direkt über dem Düsenausgang befindet sich aber innerhalb dieser Flamme eine kleine Alkalisalzperle, die die Ionenbildung an Molekülen ohne Stickstoff- oder Phosphor-Heteroatome unterdrücken kann. Es werden oftmals nur die Signale der Alkaloide im Chromatogramm sichtbar, während andere Verbindungen wie Fette und Wachse, unsichtbar bleiben. Nachteile des PND gegenüber des FID sind oftmals die kompliziertere Handhabung, die um zwei Zehnerpotenzen schlechtere Nachweisgrenze, die beim PND im mittleren Nanogrammbe- reich liegt und der relativ kleine, nur drei Zehnerpotenzen umfassende Wirkungsbereich, bis zum Erreichen der Sättigungsgrenze.

MSD (Massenselektiver Detektor oder Massenspektrometer)

In direkter Kopplung an einen Gaschromatographen wird dieser Detektor meist mit dem Begriff „**GC-MS**“ bezeichnet. Er liefert Informationen zur Identifizierung der im Gaschromatogramm vorliegenden Verbindungen. Trotz der hohen Anschaffungskosten (ca

100.000,-DM aufwärts) ist er in der instrumentellen Analytik unentbehrlich. Er hat eine geringfügig schlechtere Nachweisgrenze als der FID, die im unteren Nanogrammbereich (10^{-9} g) liegt (Full-Scan-Mode). Spuren von Verbindungen in einer Probe lassen sich jedoch durch besondere Einstellungen des Detektors (MID-Mode) noch bis in den Pico-grammbereich hinein gut nachweisen. Er registriert neben dem Ionenstrom (RIC), analog zum FID, zusätzlich auch die Massenspektren jeder einzelnen Verbindung in der Probe.

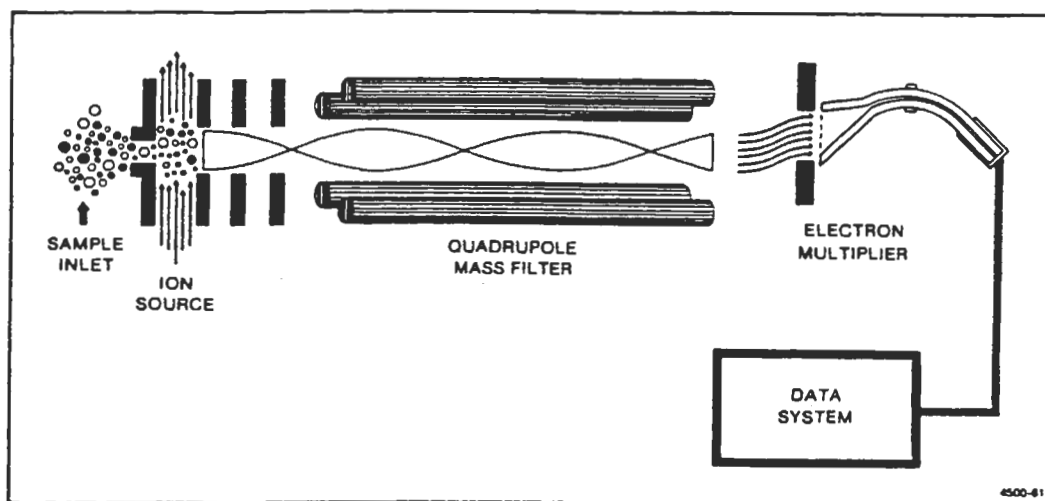


Abb. 9: Aufbau eines MSD (am Beispiel eines Quadrupol Massenspektrometers)
(Finnigan MAT, 4000 / 4500 Series Automated GC / MS, Service Manual 1985)

Die von der Kapillarsäule eluierten Substanzen gelangen direkt in das „Ion volume“ der Ionenquelle. Dort werden sie im Hochvakuum (10^{-6} mbar) von einem Elektronenstrahl mit der Ionisierungsenergie von 70 eV beschossen. Durch diesen Elektronenstoß (Electron Impact oder EI) werden Elektronen aus der Elektronenhülle der Atome der Verbindungen herausgeschlagen. Ist das Molekül nach Elektronenverlust noch in seiner Struktur intakt, so wird es als Molekülion (Radikalkation) im Massenspektrum sichtbar. Durch den starken Elektronenstoß kommt es aber meist zum Zerfall des Molekülions in kleinere Bruchstücke (Fragmentationen). Diese Fragmentierung läuft nach chemischen Regeln reproduzierbar ab (Gasphasenchemie) und ergibt schließlich einen Fingerprint der Verbindung. Die in der Ionenquelle entstandenen Molekül- und Fragmentationen einer Verbindung werden durch elektrostatische Linsen zu einem scharfen Ionenstrahl fokussiert, der die Ionenquelle in Richtung des Quadrupol-Massenfilters verläßt. Innerhalb des

Quadrupolstabsystems befindet sich ein elektrisches Hochfrequenz-Wechselstromfeld, welches die hineingelangten Ionen zunächst zurückhält. Durch gleichzeitige Überlagerung des Hochfrequenz-Wechselstromfeldes mit einer Sägezahn-Gleichspannung, werden die im Quadrupolfeld zurückgehaltenen Ionen beim Erreichen eines bestimmten, aufgrund ihres m/z - (Masse / Ladungs)-Verhältnisses zu ihrer Beschleunigung erforderlichen Sägezahnspannungswertes, durch das Quadrupolfeld hindurchbeschleunigt und gelangen anschließend zu dem Electron Multiplier (EM oder SEV = Sekundärelektronenvervielfacher). Am EM angelangt, erzeugen die Ionen elektrische Signale, welche nach Verstärkung als Signale in Millivolt einem Schreiber oder einem elektronischen Datensystem zugeführt werden. Das Durchlaufen einer solchen Sägezahnspannungsrampe bezeichnet man als „scan“. Die Scanzeit bei Kopplung des Massenspektrometers mit dem Gaschromatographen wird für Quantifizierungen auf 0.5 s und für qualitative Analysen auf 1.0 s pro massenspektrometrischer Dekade, d. h. von 50-500 Masseneinheiten, eingestellt.

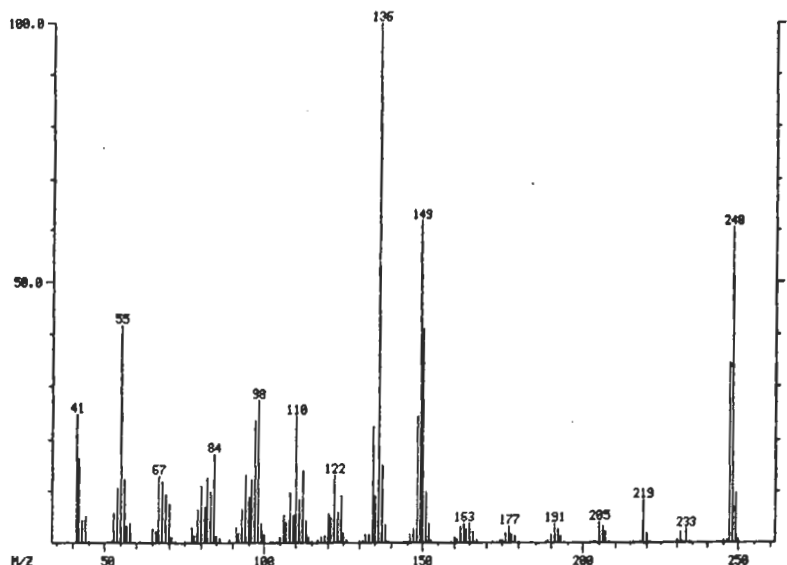
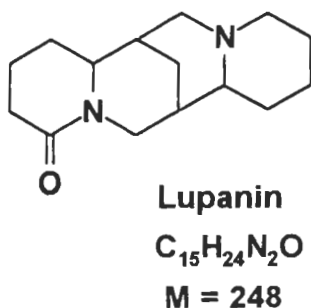
Ergebnisse:

Welche Informationen erhält man vom MSD ?

- 1) Ein durch den gemessenen Ionenstrom entstandenes Gaschromatogramm (Abb. 10)
- 2) Die Flächen unter den Signalkurven des Gaschromatogrammes, mit denen eine Quantifizierung der Substanzmengen möglich ist.
- 3) Der zur gaschromatographischen Identifizierung der Substanzen notwendige Retentionsindex, berechnet nach Co-Chromatographie mit einer homologen Reihe linearer Alkane.
- 4) Das reproduzierbare und zur endgültigen Identifizierung der Verbindung dienende Massenspektrum, welches durch den Zerfall der Verbindung nach Elektronenstoß im Vakuum entsteht (Abb. 11).

Massenspektrum von Lupanin:

Die im Gaschromatogramm erscheinende Verbindung mit der Scannummer 971 besitzt das folgende Massenspektrum:



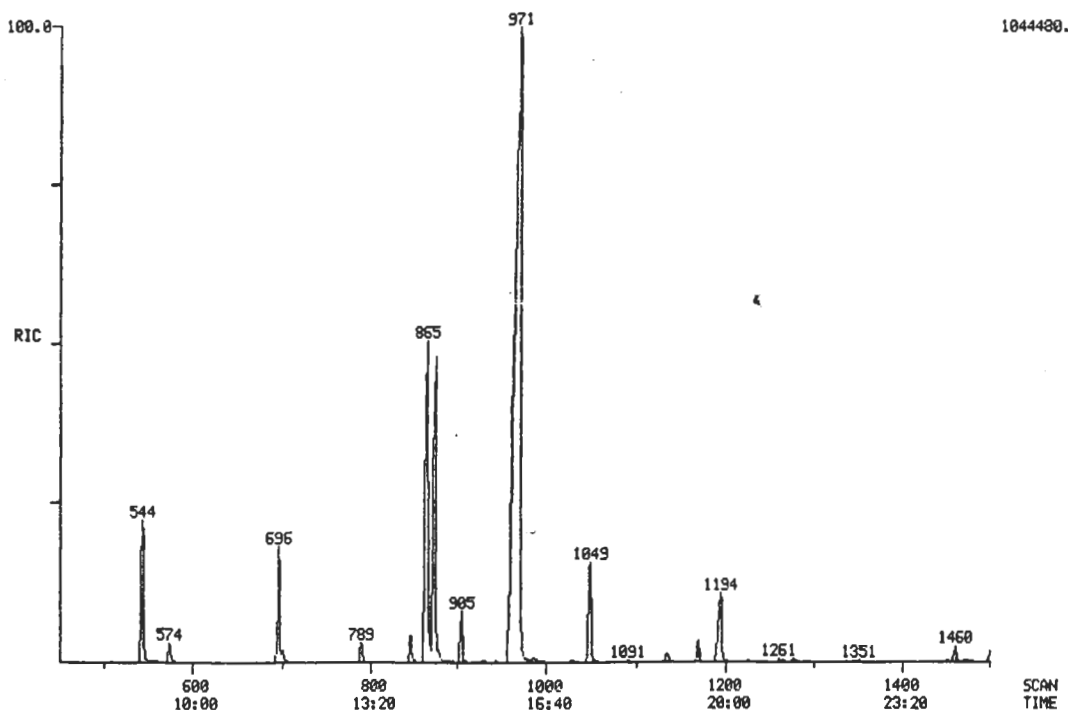


Abb. 10: Gaschromatogramm von *Lupinus mutabilis* (Samen) entstanden durch den vom MSD gemessenen Ionenstrom (RIC = Reconstructed Ion Current)

Welche Informationen liefert das Massenspektrum?

Am Beispiel des Lupanins soll der Zerfall des Moleküls nach Elektronenstoß verdeutlicht werden. Die Fragmentierungsschritte laufen nicht willkürlich sondern nach chemischen Regeln (α -Spaltungen, Mc-Lafferty-Umlagerungen, Retro-Diels-Alder-Reaktionen usw.) ab, durch deren Deutung der Chemiker Aussagen über die Strukturen des Moleküle treffen kann.

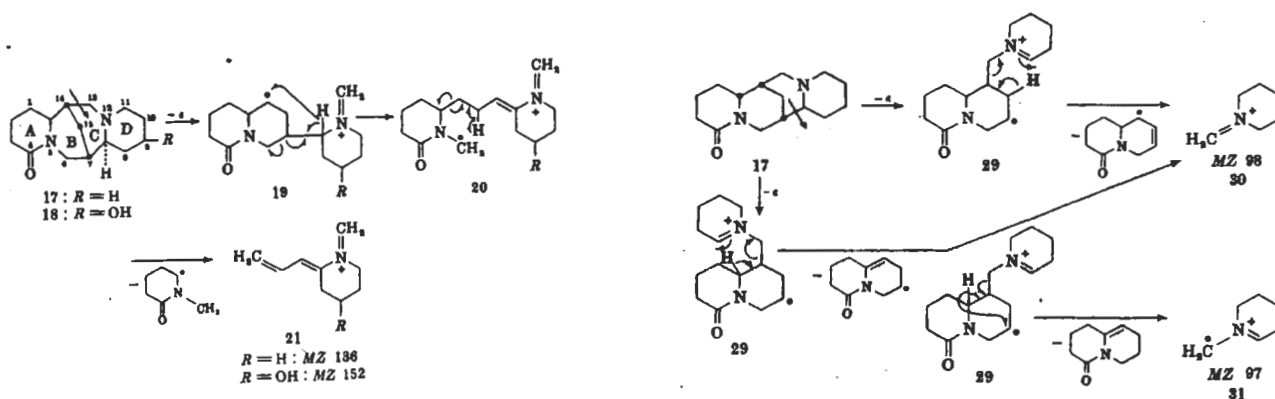


Abb. 11: Zerfall von Lupanin nach Elektronenstoß (EI) (Schumann et al., Schlüsselbruchstücke v. Alkaloiden, 1968)

Praktische Anwendung und dadurch weite Verbreitung in der instrumentellen Analytik hat die Massenspektroskopie durch den Einsatz von elektronischen Datenbanken gefunden, in denen Referenzspektren strukturbekannter Verbindungen vorliegen. Das Datensystem des Massenspektrometers vergleicht innerhalb von wenigen Sekunden das aufgenommene Massenspektrum mit den Massenspektren einer Datenbank und schlägt dann die Spektren der Datenbank mit der größten Übereinstimmung zum Unbekannten als Lösungen vor (Abb. 12). Kommerziell erhältliche Datenbanken beinhalten heute schon mehr als 200.000 Referenzmassenspektren, wodurch die Identifizierung unbekannter Verbindungen stark erleichtert wird.

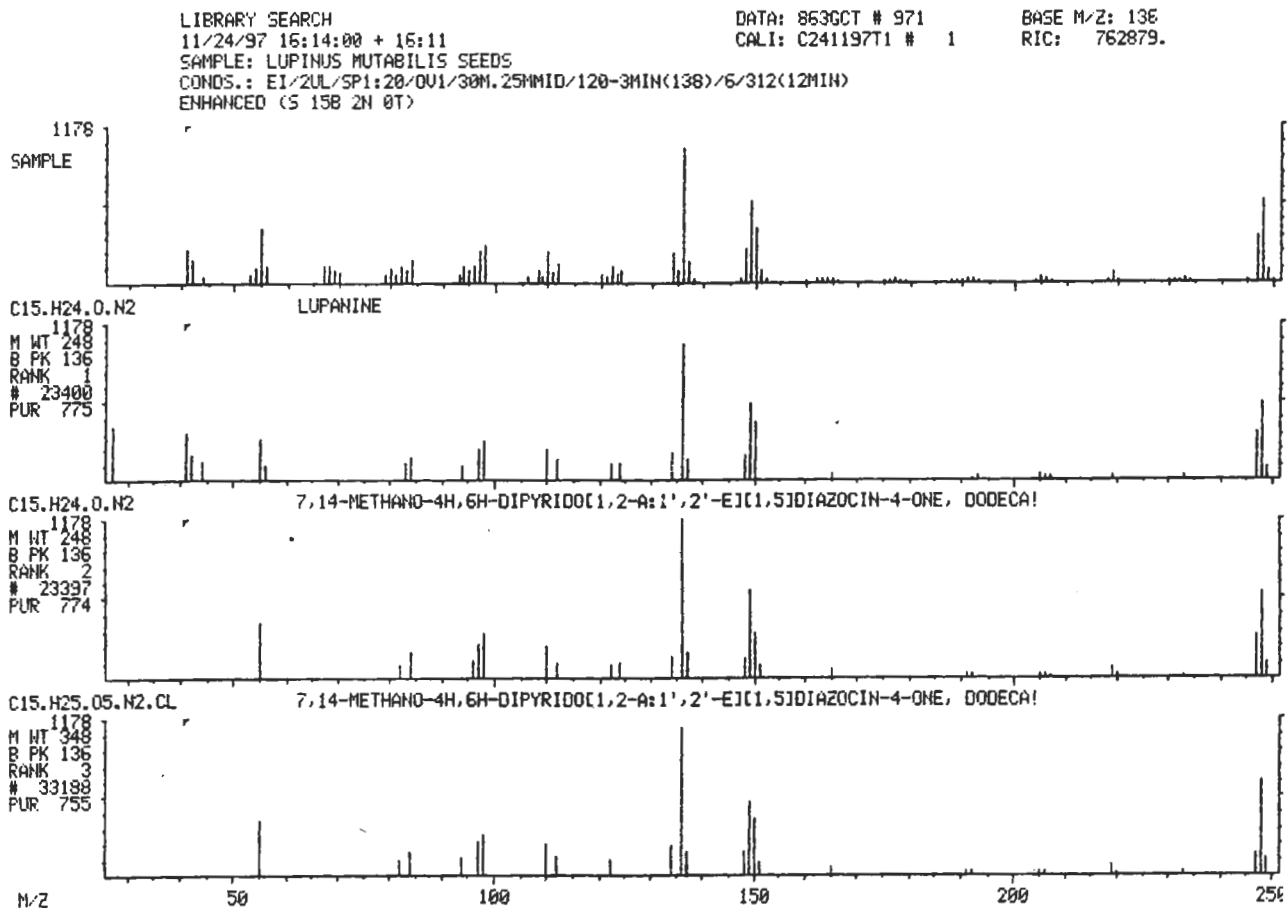


Abb. 12: Ein vom Datensystem INCOS durchgeführter Datenbankvergleich des Massenspektrums mit der Scannummer 971 im Gaschromatogramm von *Lupinus mutabilis* (Samen)

Als wichtigste Lösungsvorschläge zur Identifizierung des Massenspektrums 971 wurden vom Computer Lupanin und ein weiteres Stereoisomeres des Lupanins vorgeschlagen. Zusammen mit dem durch Co-Chromatographie von linearen Alkanen ermittelten Retentionsindex, der auf einer Kapillarsäule mit der Polaritätsstufe OV 1 den Wert 2177 hat, kann die eindeutige Identifizierung des Signales 971 im Gaschromatogramm als Lupanin erfolgen.

Diskussion

Die GC-MS-Analytik hat sich seit Beginn der 80'er Jahre zu einem unentbehrlichen Bestandteil der instrumentellen Analytik entwickelt. Durch die weite Verbreitung an GC-MS-Anlagen in analytischen Labors und letztenendes auch Dank der Entwicklung elektronischer Datenbanken, mit denen die Massenspektren unbekannter Verbindungen in Sekundenschnelle identifiziert werden können, wurden im Bereich der Naturstoffforschung große Fortschritte gemacht.

Durch die außerordentlich geringen erforderlichen Stoffmengen im Nano-Picogramm-bereich zur Aufnahme eines Massenspektrums lassen sich mit Hilfe der GC-MS-Analytik problemlos Giftstoffe in Nahrungsmitteln oder in der Umwelt bis hinunter in den ppb-Bereich nachweisen.

Die starke Nachfrage an GC-MS-Geräten führte deshalb zur Entwicklung preisgünstigerer, leicht bedienbarer kleinerer Messgeräte (Bench-Top-Machines), die zu einem Anschaffungspreis von ca. 150.000,- DM erhältlich sind und zur Reinheits- und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln in nahezu jedem analytischen Labor unentbehrlich wurden.

Die eindeutige Identifizierung der Substanzen einer Probe erfolgt gleichermaßen mit Hilfe ihres durch Co-Chromatographie von n-Alkanen errechneten Retentionsindex nach Kovats und anhand ihrer Massenspektren, welche Fingerprints der Verbindungen darstellen.

Mit Hilfe von uns durchgeführter, auf GC-MS-Analytik basierender Untersuchungen der Alkaloidzusammensetzungen von über 100 Lupinenspezies aus der alten und neuen Welt, können chemotaxonomische Aussagen über die mögliche Herkunft und Art der Lupinen getroffen werden.

Informationen über die Zusammensetzungen und Mengen der in der Lupine enthaltenen, für uns schädlichen Chinolizidinalkaloide sind nicht nur von akademischem Interesse, da gerade durch diese Informationen eine Optimierung der Aufzucht weiterer alkaloidarmer Süßlupinensorten zur Nutzung der Lupine als Nahrungsträger erfolgen kann.

Literatur

Finnigan MAT, 4000 / 4500 Series Automated GC / MS, *Service Manual*, 8, 7, 1985

- Herb, R., Chromatographie in der Gasphase, *Skript zum Kurs „Trennmethoden in der Organischen Chemie“*, Universität Heidelberg 1985
- Kovats, E., Gas-Chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen, *Helvetica Chimica Acta*, FASCICULUS VII, 206: 1915-1932, 1958
- Meißner, C., Krauß, D., Wink M, Identifizierung und Quantifizierung von Lupinenalkaloiden mit Kapillargaschromatographie und gekoppelter Massenspektroskopie (GC/MS), *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, Jahrgang 7/1993, 331-336
- Meißner, C., Wink, M., GC-MS-Analyse von Alkaloiden nordamerikanischer Lupinen. In: *Lupinen 1991-Forschung, Anbau und Verwertung*; M.Wink (Hrsg.), pp. 91-129, 1992
- Roberts, M.F. & M. Wink, (eds). (1998) Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications; Plenum, New York, 486 pp
- Rücker, Neugebauer, Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Schumann, D., Neuner-Jehle, N. und Spiteller, G., Schlüsselbruchstücke von Alkaloiden, *Mh. Chem.*, 99, 390-408, 1968
- Steinegger, R. und Hänsel, E., *Pharmakognosie*, 5. Auflage, Springer Verlag 1992
- Wink, M.: Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical Applied Genetics* 75, 225-233, 1988
- Wink, M.: The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. In *Insect-plant interactions* (E.A. Bernays, eds), Vol. IV, 133-169, CRC-Press, Boca Raton, 1992
- Wink, M. Allelochemical properties and the raison d'être of alkaloids. In "The Alkaloids, G. Cordell, ed.), Academic press, Vol. 43, 1-118, 1993
- Wink, M., Quinolizidine Alkaloids, *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 8, pp. 197-239, Academic Press 1993
- Wink, M., Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassung der Pflanzenfresser, In: *Lupinen 1991-Forschung, Anbau und Verwertung*; M.Wink (Hrsg.), pp. 130-156, 1992
- Wink, M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. In *Bioactive natural products*. Atta-Ur-Rahman (Ed.), Elsevier (in press)
- Wink, M., Meißner, C. und Witte, L.: Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 38, 139-153, 1995
- Wink, M., Schmeller, T., & Latz-Brüning, B. Modes of action of allelochemical alkaloids: Interaction with neuroreceptors, DNA and other molecular targets. *J. Chemical Ecology* (in press)
- Witte, L., et al., Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, 32: 187-196, 1993