

METHODEN ZUM NACHWEIS VON LUPINEN-ALKALOIDEN

Michael Wink
Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
W-6900 Heidelberg

ABSTRACT

Analytical methods for the identification and quantification of lupin alkaloids

The established methods of qualitative and quantitative analysis of lupin alkaloids are reviewed, such as thin-layer chromatography (TLC), high-resolution gas-liquid chromatography on capillary columns (GLC), high-pressure liquid chromatography (HPLC), gravimetry and colorimetry. The method of choice is GLC, which is best suited for the separation of the complex alkaloid pattern of lupins and at the same time sensitive enough to quantitate minute amounts of alkaloids, such as in sweet lupins.

New immunological methods, such as radioimmuno assay (RIA), scintillation proximity assay (SPA) and enzyme immuno assay (ELISA) are introduced, which allow the detection of trace amounts of lupin alkaloids, having the lupanine skeleton.

Seeds of *L. albus* and *L. mutabilis* can be screened under UV-light. Analysis by GLC show that fluorescing are alkaloid-rich and non-fluorescing seeds are sweet.

RESUMEN

Los métodos analíticos para la identificación y cuantificación de alcaloides de lupinos

Se revisaron los métodos cualitativos y cuantitativos de análisis de alcaloides de lupinos, tales como la cromatografía de capa delgada (TLC), la cromatografía de gas licuado de alta resolución en columna capilar (GLC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la gravimetría y la colorimetría. El método elegido fue el GLC, por ser el mejor para la separación de los complejos patrones de alcaloides de los lupinos, y a la vez, ser suficientemente sensitivo como para detectar las pequeñas cantidades que poseen los lupinos dulces.

Se presenta además, nuevos métodos inmunológicos como son: el ensayo radioinmunológico (RIA), el ensayo de sentelleo (SPA) y el ensayo inmunológico de enzimas (ELISA), que permiten detectar trazas de alcaloides de lupinos portadoras de la estructura de la lupanina.

Las semillas de *L. albus* y *L. mutabilis* pueden ser también analizadas bajo la luz ultravioleta, que indica por medio de la fluorescencia a las ricas en alcaloides, siendo las dulces no fluorescentes. Esta identificación fue luego comprobada con el análisis de GLC.

1. EINLEITUNG

Lupinenalkaloide gehören zu den typischen Sekundärstoffen der Lupinen. Diese Alkaloide kommen in allen Pflanzenteilen vor, insbesondere in den Samen, die bis zu 8% enthalten können. In allen Fällen liegt nicht ein einzelnes Alkaloid sondern ein Alkaloidgemisch vor, das aus über 30 Einzelkomponenten bestehen kann. Neben 2-6 Hauptalkaloiden liegen die übrigen Alkaloide als Nebenalkaloide vor, deren Anteil am Gesamtalkaloidgehalt unter 1% beträgt. Während für biochemische und chemotaxonomische Fragestellungen die Zusammensetzung dieser Nebenalkaloidfraktion von Interesse sein kann, kann sich der Lupinenzüchter oder -Verwerter auf die Erfassung der Hauptalkaloide, wenn nicht sogar die des Gesamtalkaloidextraktes beschränken und damit ein erhebliches analytisches Problem vermeiden (vergl. MEISSNER & WINK in diesem Band).

Bei den landwirtschaftlich genutzten Lupinenarten finden wir in den Samen die folgenden Hauptalkaloide (WINK ET AL. 1983, WINK & WITTE 1985, WINK 1991):

L. albus (synonym *L. termis*): Lupanin (50-80%), Multiflorin (3-10%), 13-Hydroxylupanin (5-15 %) und Albin (5-15 %)

L. angustifolius: Lupanin (50-80%), Angustifolin (5-20%) und 13-Hydroxylupanin (10-20%)

L. mutabilis: Lupanin (40-70%), 13-Hydroxylupanin (10-20%), 3-Hydroxylupanin (5-10%), Tetrahydrohombifolin (4%) und Spartein (5-20%)

L. luteus: Lupanin (40-70%) und Spartein (30-50%)

In den grünen Pflanzenteilen ist Lupanin weiterhin Hauptalkaloid, jedoch nimmt die Fraktion der Esteralkaloide, die sich vom 13-Hydroxylupanin, 3-Hydroxylupanin und Multiflorin ableiten signifikant zu. Auch Piperidinalkaloide, wie z.B. Ammodendrin werden regelmäßig nachgewiesen (WINK 1992a). Bei *L. luteus* und verwandten Arten, wie *L. hispanicus* oder *L. pilosus* kommt Lupanin nur in Spuren vor, hier ist das bityklische Lupinin Hauptalkaloid, das ebenfalls verestert sein kann (WINK 1992).

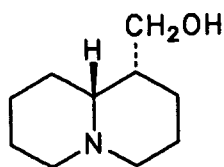
Bei den Alkaloidbestimmungsmethoden können wir zwischen den Schnellmethoden, die eine grobe Unterscheidung von hohem, mittlerem und niedrigem Alkaloidgehalt erlauben und den aufwendigen analytischen Verfahren unterscheiden, die in der Lage sind, die Zusammensetzung komplexer Alkaloidgemische, sowohl qualitativ als auch quantitativ zu beschreiben. Der Praktiker wird die Schnellmethoden bevorzugen, jedoch muß man sich klar werden, daß für eine verlässliche Qualitätskontrolle bei der Zulassung von Varietäten oder bei Vermarktung von Samen oder deren Fraktionen strenge Maßstäbe gelten müssen, wie sie heute in der Lebensmitteltechnologie üblich sind. Hier wird man an aufwendigen chromatographische oder immunologische Verfahren nicht vorbeikommen.

In dieser Übersicht werden die z.Z. etablierten Verfahren zur Alkaloidanalytik referiert, wobei eigene noch nicht veröffentlichte Erfahrungen mit berücksichtigt wurden.

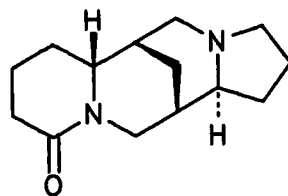
2. EXTRAKTION

Für die meisten Nachweismethoden ist die Extraktion der Alkaloide aus dem Pflanzenmaterial ein notwendiger erster Schritt, dem wir Aufmerksamkeit widmen müssen.

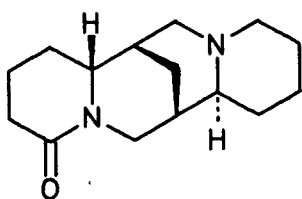
Lupinenalkaloide haben ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten, das davon abhängt, ob die Alkaloide protoniert oder als freie Basen vorliegen. Die freie Base ist in Wasser nicht, wohl aber in organischen Lösungsmitteln, wie CH_2Cl_2 oder Ether vollständig löslich. Umgekehrt ist das geladene Alkaloidmolekül in wässrigen und polaren Lösungsmitteln (z.B. Methanol) gut, nicht aber in apolaren organischen Lösungsmitteln löslich. Dieses unterschiedliche Verhalten macht man sich bei der Extraktion zu Nutze.



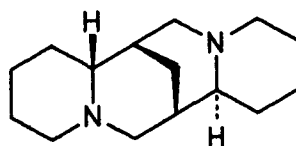
Lupinin (1)



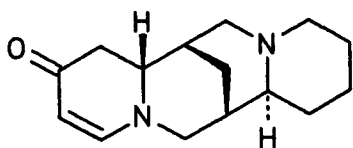
Camoensidin (2)



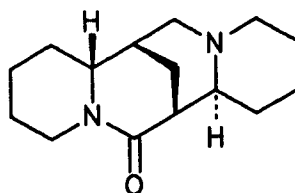
Lupanin (3a)



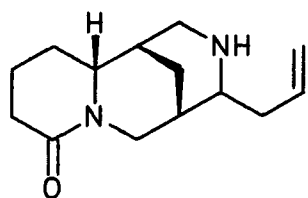
Sparteïn (3b)



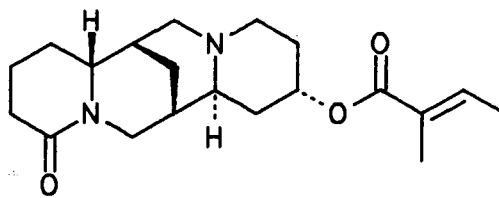
Multiflorin (3c)



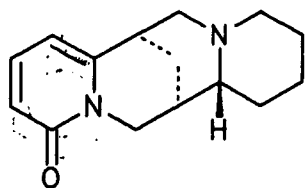
Aphyllin (3d)



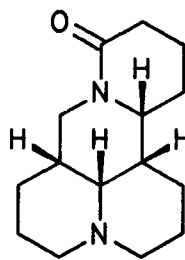
Angustifolin (3e)



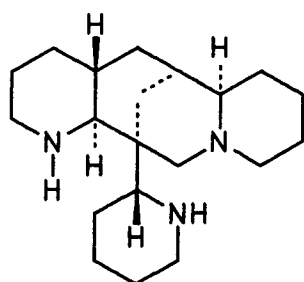
13α-Tigloyl-oxylupanin (3f)



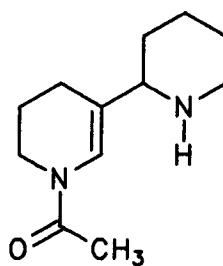
Anagyrin (4)



Matrin (5)



Piptanthin (6)



Ammodendrin (7)

In der Pflanze liegen die Alkaloide nicht als freie Base, sondern als Salze ionisiert vor, d.h. man kann sie relativ leicht mit Wasser oder Alkohol extrahieren.

Für einige Schnelltest-Verfahren, bei denen z.B. die Keimfähigkeit der Samen erhalten bleiben soll, nutzt man diese Eigenschaft aus: Die Samen kann man über Nacht in wenig Wasser quellen lassen (z.B. in einer Multititerplatte), ein Teil der enthaltenen Alkaloide geht in Lösung und kann dann direkt analysiert werden.

Für genauere Analysen kommt es jedoch darauf an, die Alkaloide möglichst quantitativ aus ihrer pflanzlichen Matrix heraus zu isolieren.

In der Praxis hat sich das folgende Extraktionsverfahren bewährt:

500 oder 1000 mg feingemahlene Samenmehl werden in 15 ml 0,5 N HCL oder 0,5 N H₂SO₄ gegeben und gut durchmischt und anschließend mehrere Stunden, z.B. über Nacht stehen gelassen, ohne daß Feuchtigkeit verdunsten kann. Frischmaterial wird mit Mörser und Pistill oder mit einem Ultraturax zerkleinert. Zur Weiterverarbeitung zentrifugiert man das Homogenat ab (z.B. 5 min bei 10.000 rpm), sammelt den Überstand und löst das Pellet erneut in 15 ml 0,5 N HCL. Nach 30 min wird erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Diese Überstände werden mit Ammoniak oder NaOH auf ca. pH 12 eingestellt (höhere pH-Werte führen zu Alkaloidverlusten). Danach erfolgt die Extraktion der Alkaloide mit einem apolaren Lösungsmittel, z.B. Dichlormethan (CH₂Cl₂). Die Methode der Wahl ist die Flüssig-Fest-Extraktion: Dazu gibt man 18 ml des Überstands (vorher Gesamtvolumen messen!) auf eine Extrelutsäule (Merck) oder Chemelut-Säule (Analytichem). Nachdem der wässrige Extrakt vom Säulenmaterial aufgenommen wurde, fügt man 3 x je 20 ml CH₂Cl₂ hinzu. Das Eluat wird in einem Rundkolben aufgefangen und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne bei 45° C eingeengt. Aus dem Rundkolben überführt man die Rohalkaloide in entsprechende, gut verschließbare Probenfläschen, indem man den Kolben gründlich mit 1-2 ml CH₂Cl₂ ausspült. Aus den Fläschen entfernt man das Lösungsmittel durch Abdampfen unter Preßluft oder N₂ oder noch einfacher, indem man sie über Nacht im Abzug stehen läßt. Am nächsten Morgen ist CH₂Cl₂ verdampft. Die Probenfläschen mit den Alkaloiden sollten bei <4° C und im Dunkeln aufbewahrt werden. Wenn nur wenige Proben zu extrahieren sind oder keine Säulen zur Verfügung stehen, kann die Trennung auch konventionell mittels Schütteltrichter (3-5 mal ausschütteln) erfolgen.

Für gewisse Fragestellungen kann das Verfahren abgekürzt werden, indem die Zentrifugationsschritte unterbleiben, nur enthält der Alkaloidextrakt dann auch die gesamte Lipidfraktion, die bei einigen chromatographischen Verfahren stört. Anstelle von verdünnter Säure kann die Extraktion mit MeOH oder EtOH erfolgen, z.B. im Soxhlet, jedoch ist der Alkaloidextrakt dann mit vielen anderen Komponenten verunreinigt. Für einen Schnelltest kann man 10 - 100 mg feingemahlene Samenmehl in ein Eppendorfgefäß, das mit 1 ml MeOH gefüllt ist geben und über Nacht schüttelnd inkubieren. Nach dem Abzentrifugieren kann man dann am nächsten Tag den Überstand mit einem geeigneten Schnelltest analysieren.

3. NACHWEISVERFAHREN

3.1. Chromatographische Verfahren

3.1.1. Gaschromatographie

Als Methode der Wahl zur genauen qualitativen und quantitativen Erfassung der Lupinenalkaloide hat sich die Gaschromatographie mittels Kapillarsäulen erwiesen (WINK 1987, 1992), die seit ca 10 Jahren allgemein in guter Qualität zugänglich wurden. Insbesondere unter Verwendung eines stickstoff-selektiven Detektors lassen sich die unter 2 erhalten Alkaloidextrakte (nach Flüssig-Fest-Extraktion) direkt analysieren. Der Vorteil der Methode liegt in der hohen Trennkapazität der Kapillarsäulen (ca. 70000 Trennböden/ 30 m Säule), die es sogar erlaubt, Stereoisomere, wie z.B. Lupanin und α -Isolupanin oder 13-Tigloyloxylupanin und 13-Angeloyloxylupanin aufzutrennen. Außerdem ist die Empfindlichkeit mit 10 ng/ μ l allen anderen chromatographischen Verfahren überlegen, was dann wichtig

wird, wenn nur geringe Alkaloidmengen vorliegen (WINK 1992).

Da man die Kapillar-GLC direkt mit einem Massenspektrometer koppeln kann (GC-MS) und die meisten QA charakteristische Fragmentierungsmuster aufweisen, ist es mit GC-MS relativ einfach, die gängigen QA eindeutig zu identifizieren. Für die Praxis sind authentische Vergleichsalkaloide (die aber kommerziell nicht erhältlich sind) und Kovats-Retention-Indexwerte von großer Hilfe. RI-Werte und MS-Fragmentierungsmuster sind in folgenden Publikationen tabelliert: KINGHORN & BALANDRIN, 1984, WINK ET AL. 1983, WINK & WITTE 1985, 1991, WINK 1992).

3.1.2. HPLC

Eine Alternative bietet die Analyse mittels HPLC, wobei hier eine geringere Empfindlichkeit (QA haben meist keine empfindlichen Chromophoren und müssen bei 210-220 nm detektiert werden) und eine geringe Trennkapazität (Säule mit 5000 theor. Trennböden) in Kauf genommen werden müssen. Alkaloide vom α -Pyridontyp, wie z.B. Cytisin können bei 310 nm gemessen werden. Eine Zusammenstellung von adäquaten Säulen, Eluenten und Retentionszeiten findet sich in (SAITO ET AL. 1989; WINK 1992). Eine direkte Identifizierung der Komponenten mittels MS ist zwar theoretisch möglich, z.B. im Thermosprayverfahren, jedoch in der Praxis nach wie vor kaum verbreitet. Bewährt hat sich die Verwendung eines Photodioden-Array-Detektors, mit dem man online die UV-Spektren aller Substanzen messen und somit erkennen kann, ob Verunreinigungen vorliegen.

Ein Vorteil der HPLC besteht in der Möglichkeit, präparativ zu arbeiten, z.B. um Reinalkaloide zu isolieren, die dann für andere spektroskopische Verfahren (NMR) oder für Biotests zur Verfügung stehen.

3.1.2. Dünnschichtchromatographie

Für analytische Arbeiten ist die DC deutlich schlechter geeignet als GLC oder HPLC, da sie nur geringe Trennkapazität und Empfindlichkeit aufweist. Dafür ist sie aber apparativ einfach, billig und in jedem Labor durchzuführen.

Als Trägermaterial haben sich Kieselgel und als Laufmittel Diethylamin/Cyclohexan (7/3), MeOH/CHCl₃/NH₃ (15/85/1) und MeOH/NH₃ (65/1) bewährt. Die Detektion erfolgt mit Dragendorff's Reagenz oder mit J₂/KJ-Lösung (KINGHORN & BALANDRIN 1984, WINK 1992).

Zur Identifizierung ist es dringend erforderlich, authentische Vergleichssubstanzen einzusetzen, aber dennoch ist größte Vorsicht bei der Zuordnung am Platze, da viele Alkaloide ähnliche R_f-Werte aufweisen. In der Lupinen-Literatur befinden sich mehrfach falsche Angaben über Alkaloidmuster, die aufgrund von DC-Analysen erfolgten. Eine Quantifizierung kann bestensfalls semiquantitativ sein.

3.2. Immunologische Verfahren

In vielen Bereichen der analytischen und klinischen Chemie haben sich immunologische Nachweisverfahren, wie Radioimmunoassay (RIA), Enzym-Immunoassay (EIA oder ELISA) etabliert, wenn es darum geht, geringe Mengen einer Substanz oder eines Metaboliten in vielen ungereinigten Proben zu bestimmen.

Auch zur quantitativen Bestimmung der Lupinenalkaloide eignen sich diese Verfahren. In Australien wurde ein ELISA (ALLEN et al. 1991), in meinem Labor RIA, ELISA und SPA zur Bestimmung von QA vom Lupanintyp entwickelt (WINK 1991, 1992), mit denen noch pg/ng-Gramm Mengen eindeutig quantifiziert werden können. Erfasst werden alle QA vom Lupanintyp, d.h. auch 13-Hydroxylupanin und Esteralkaloide, nicht jedoch Spartein oder Lupinin (WINK 1992).

Voraussetzung für diese Verfahren ist ein hochspezifischer Antikörper, der diese Alkaloide eindeutig "erkennt". Wir sind hier folgendermaßen vorgegangen: Reines 13-Hydroxylupanin wurde mit Bernsteinsäureanhydrid verestert. An-

schließend wurde diese Substanz an Rinder Serumalbumin chemisch gekoppelt. Dieses Konjugat (= Antigen) wurde 4 Kaninchen zusammen mit Freund'schen Adjuvanz subcutan injiziert. Nach 4 Wochen erfolgte eine 2. Immunisierung. Im Abstand von 4 Wochen wurden in den folgenden Monaten jeweils 20 ml aus den Ohrvenen entnommen. Das Blutserum wurde bei -20° C aufbewahrt. 2 Kaninchen produzierten hochspezifische Antikörper.

RIA

Für den RIA benötigt man zusätzlich ein radioaktives Traceralkaloid. Wir setzten hierfür tritiiertes 13-Hydroxylupanin ein. Die Alkaloidbestimmung wird wie folgt durchgeführt:

Eine Alkaloidprobe in PBS-Puffer wird mit stark verdünnten Antikörpern ($> 1:1000$) versetzt, gleichzeitig wird ^3H -13-Hydroxylupanin als Tracer zugegeben. Nach 2 h Inkubation werden die von den Antikörpern gebundenen von den nicht gebundenen Tracermolekülen durch Ammoniumsulfatfällung getrennt. Die Menge an gebundenen Tracermolekülen wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt.

Liegt kein Alkaloid in der Probenlösung vor, so wird das radioaktive Alkaloid quantitativ von den Antikörpern gebunden, d.h. man erhält einen maximalen Wert für die Radioaktivität. Liegen jedoch Alkaloidmoleküle vor, so kommt es zu einer Konkurrenz zwischen radioaktiven und nicht markierten Alkaloiden. Im Extremfall werden nahezu nur unmarkierte Alkaloide von den Antikörpern erkannt, d.h. die gemessene Radioaktivität wäre gleich 0%. Aus einer Standardkurve (Abb.1) kann man den Gehalt an Alkaloid in einer Probe sofort ablesen. Voraussetzung ist jedoch, daß man die Alkaloidkonzentration in der Probe so verdünnt, daß der Meßwert im Bereich der linearen Eickurve zu liegen kommt.

Der Vorteil des RIA liegt in seiner hohen Empfindlichkeit (Abb.1) und der Möglichkeit, viele Proben gleichzeitig zu vermessen, er erfordert jedoch die Erlaubnis zum Umgang mit radioaktiven Stoffen und ist apparativ relativ aufwendig.

Scintillation proximity assay (SPA)

Eine Variante des RIA ist der unlängst entwickelt SPA, den wir auch für Lupinenalkaloide einsetzen konnten. An die SPA-Beads wird der Antikörper gekoppelt. Wenn nun ein radioaktives Molekül am Antikörper bindet, kommt es zur Anregung der "Fluomicroperlen", die dann Photonen abgeben, die im Szintillationszähler gemessen werden können. Auch hier bestimmt die Relation markiertes Alkaloid/ kaltes Alkaloid die Meßkurve (Abb.2). Insgesamt ist der SPA-Assay mit dem RIA vergleichbar, jedoch weniger empfindlich und wesentlich teurer, dafür aber sind weniger Arbeitsschritte notwendig.

ELISA

Beim "Double-Sandwich-ELISA" koppelt man im ersten Schritt das Traceralkaloid, hier 13-Hydroxylupanin an ein Protein (= Antigen), mit dem die ELISA-Gefäße (Multititerplatten) beschichtet werden. Anschließend gibt man die Antikörperlösung und die zu messenden Alkaloide hinzu. Es kommt nun zu einer Konkurrenz der Antikörper mit dem Alkaloid, das an der Gefäßwand gebunden vorliegt und den Alkaloidmolekülen in Lösung. Anschließend wird das Gefäß gewaschen und alle freien Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt wird die Menge an Antikörpern bestimmt, die am fixierten Antigen gebunden haben. Dazu inkubiert man mit einem zweiten Antikörper, der spezifisch Kaninchenantikörper erkennen kann. Dieser "Anti-Rabbit Antikörper" ist mit einem Enzym, z.B. Peroxidase gekoppelt. Die Quantifizierung erfolgt über Zugabe eines chromogenen Substrats für die POD, indem die Farbentwicklung photometrisch bestimmt wird (im ELISA-Photometer) (Abb.3).

Auch der ELISA ist hochempfindlich und selektiv und hat den Vorteil, ohne radioaktive Substanzen auszukommen.

3.3. Schnelltests

RIA: Standardkurve

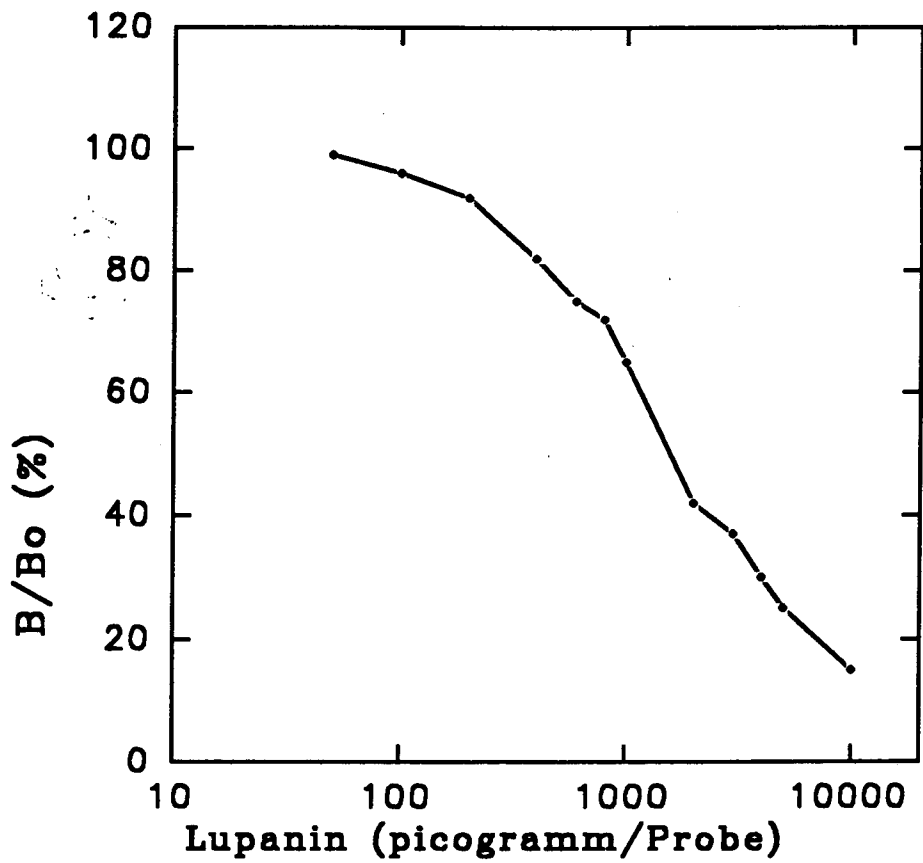
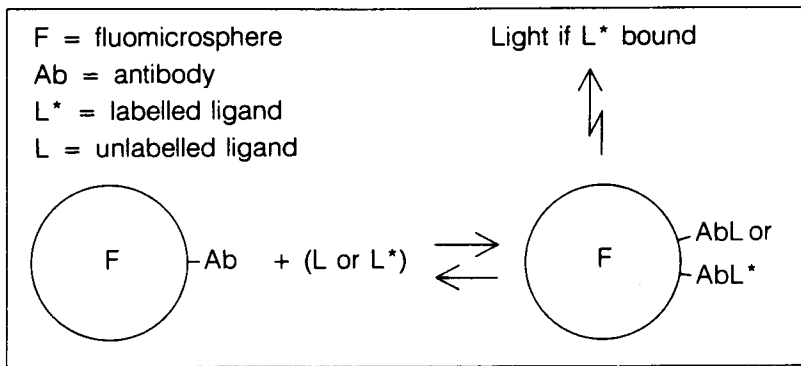


Abb. 1. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Radio-Immunoassay (RIA)



**SPA: Scintillation proximity assay
Standardkurve**

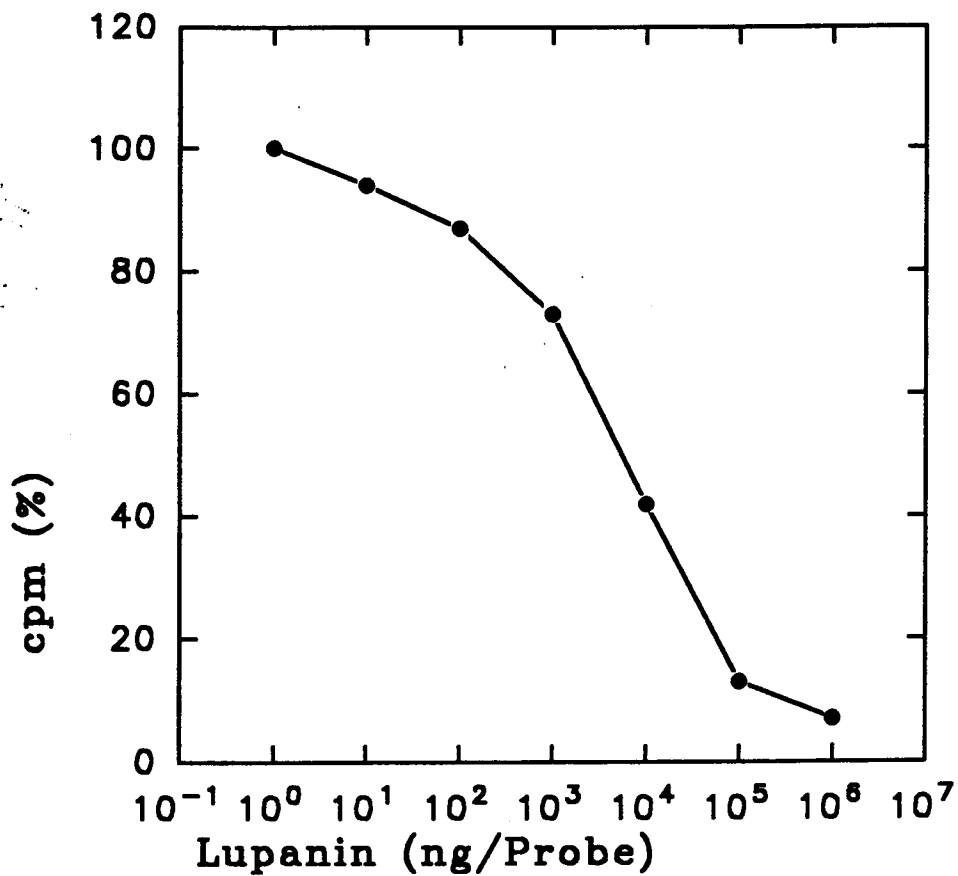


Abb.2. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Scintillation proximity assay (SPA)

ELISA Standardkurve

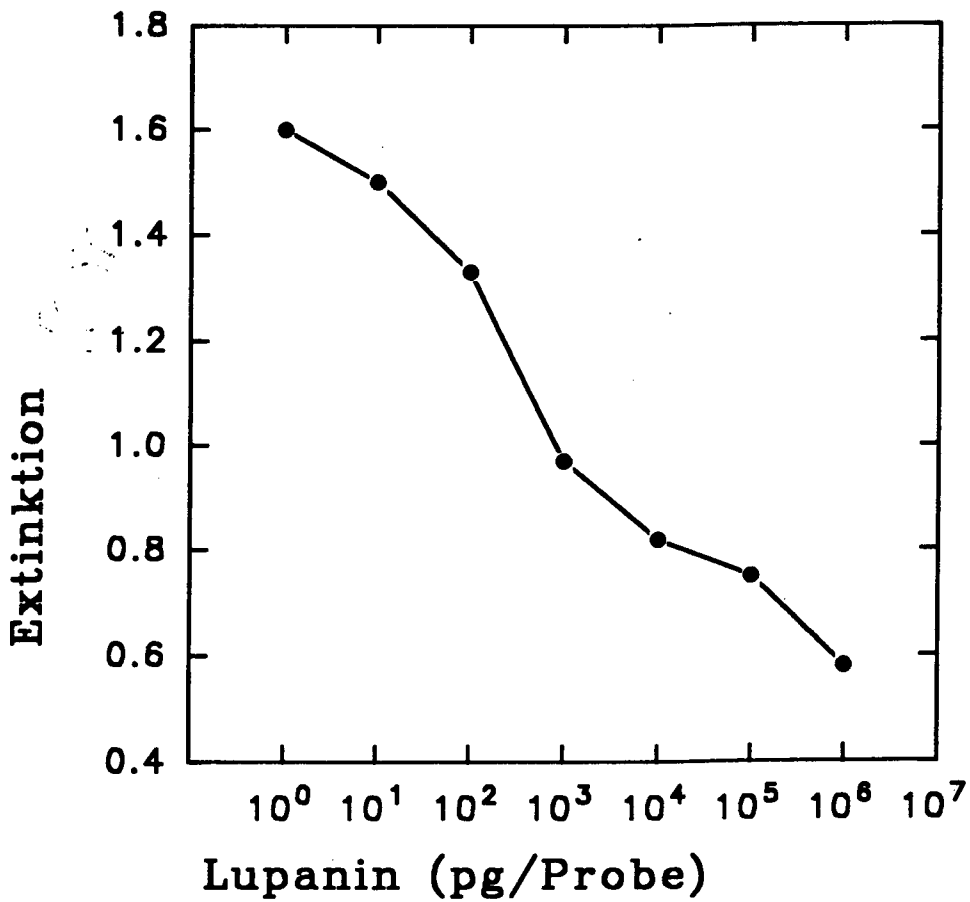


Abb.3. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Enzym-Immunoassay (ELISA oder EIA)

3.3.1. Titri- und Kolorimetrie

Wenn man Alkaloide über die Fest-Flüssigextraktion nach Kapitel 2 isoliert hat, kann man den Alkaloidgehalt gravimetrisch (hier können jedoch andere mit-isolierte Substanzen stören) oder titrimetrisch mit z.B. p-Toluensulfonsäure bestimmen, denn die Alkaloide liegen als stark basische Verbindung vor.

Ferner kann man die Alkaloidmenge über einige Farbreagentien anhand von entsprechenden Eichkurven bestimmen, z.B. Bromchresolpurpur oder J_2/KJ (VON BAER ET AL. 1979; WINK & HARTMANN 1981). Da die im Gemisch vorliegenden Alkaloide u.U. unterschiedliche Reaktionen bewirken, kann man mit diesen Verfahren immer nur einen Näherungswert erhalten, der aber für viele praktische Anwendungen durchaus genügt.

Diese Verfahren sind relativ kostengünstig, jedoch im unteren Konzentrationsbereich störanfällig, so daß man sie zur Evaluierung von Süßlupinen mit Vorsicht anwenden sollte.

Mit größeren Fehlern kann die Bestimmung von QA in wässrigen oder alkoholischen Extrakten behaftet sein. In der Praxis kann der folgende Schnelltest mit J_2/KJ leicht bei der Prüfung helfen, ob Lupinenalkaloide in größerer Menge vorliegen oder nicht, was bei Reihenscreenings von Bedeutung sein kann:

Zu 1 ml wässriger Alkaloidlösung in 0.5 N HCl gibt man 100 μ l des Jodreagenz (9 g J_2 , 14 g KJ in 100 ml 0,5 N HCl). Sind Alkaloide vorhanden, so entsteht eine gelb- bis dunkelbraune Trübung, genauer ein Niederschlag. Bei entsprechender Standardisierung läßt sich die Farbintensität bei 700 nm quantitativ bestimmen (WINK & HARTMANN 1981).

3.3.2 Indikatorpapier

Zur groben Abschätzung des Alkaloidgehaltes im grünen Pflanzenmaterial eignet sich ein Indikatorpapier (Filterpapier, das mit Dragendorff's Reagenz imprägniert wurde): Man schneidet einen Petiolus oder Stengel durch und tropft den austretenden Saft auf das Papier. Ist viel Alkaloid vorhanden, so ergibt sich ein orangroter Fleck.

3.3.3. NIRS-Methode

Zur schnellen und gleichzeitigen Quantifizierung von Protein und Öl in Samen kann man die NIRS-Methode anwenden. Mit ihr kann man relativ große Probemengen analysieren, ohne vorher die Inhaltsstoffe extrahieren zu müssen. Diese Methode wurde auch zur Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes herangezogen (WEIBMANN & WEIBMANN 1991). Vergleicht man die NIRS-Werte mit den Alkaloidgehalten, die gaschromatographisch bestimmt wurden, so ergibt sich eine gute Korrelation. Bei niedrigen Alkaloidgehalten, also bei alkaloidarmen Süßlupinen, ist die Quantifizierung mit großer Streuung versehen, so daß sich die NIRS-Methode hierfür nur bedingt einsetzen läßt.

3.3.4. UV-Test

In Deutschland, Frankreich und in Chile wurde und wird zur Selektion von alkaloidarmen Samen von *L. albus* eine Analyse unter der UV-Lampe vorgenommen (HACKBARTH & TROLL 1959, VON BAER & PEREZ, 1991). Es war aufgefallen, daß die Samen entweder blau fluoreszieren oder ohne Fluoreszenz sind. Fluoreszierende Samen erwiesen sich als alkaloidreich, die nicht fluoreszierenden als alkaloidarm (VON BAER & PEREZ 1991).

Wir haben diese Angaben für 4 Variäten von *L. albus* wiederholen und mittels Kapillar-GLC bestätigen können (Abb.4). Auch für *L. mutabilis* scheint dieser Test zu funktionieren (Abb.4). Wie die GLC-Messungen zeigen, gibt es einige wenige "Ausreißer", dennoch darf man annehmen, daß der UV-Test in der Praxis für eine schnelle Evaluierung sehr geeignet ist. Er ersetzt die spätere Qualitätskontrolle mit anderen Methoden jedoch nicht.

Dieses Fluoreszenz-Phänomen war für uns sehr überraschend, denn die Lupinenalkaloide selbst fluoreszieren nicht!

1= L.albus var. Blanka; 2= L.a. var. Lutop; 3=L.a.Kiew mutant
 4= L.a. var. Neutra; 5= L.a. var. Ida; 6= L. mutabilis
 F= Samen fluoreszieren; -F = Samen ohne Fluoreszenz

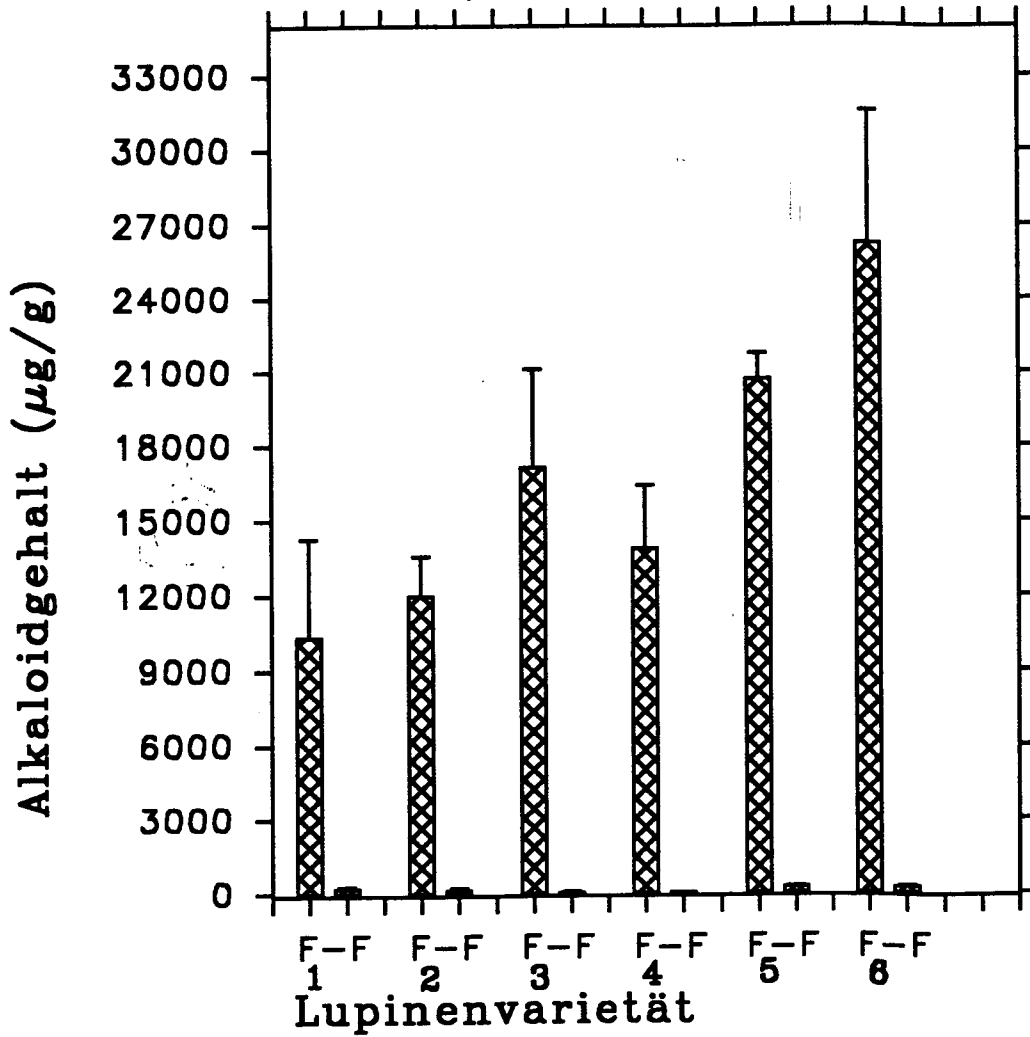


Abb.4. Korrelation zwischen Samenfluoreszenz und Alkaloidgehalt

Wir haben versucht, die fluoreszierende Substanz aus den Samenschalen zu extrahieren und zu identifizieren. Was wir im Moment sagen können, ist, daß sie sich gänzlich anders verhält als die Lupinenalkaloide. Es gilt nun herauszufinden, ob es sich hierbei vielleicht um Abbauprodukte der Lupinenalkaloide handelt oder aber um Sekundärstoffe (z.B. Flavonoide), deren Auftreten parallel zum Auftreten der Alkaloide verläuft.

4. Ausblick

Gegenüber der Situation zu Beginn der Lupinenzüchtung anfangs des Jahrhunderts ist die Analytik der QA ein gutes Stück weitergekommen. Die Alkaloidanalyse mittels Kapillar-GLC, HPLC und ELISA entspricht den modernen Möglichkeiten, ist aber für die Routine und den Praktiker zu aufwendig und zu teuer. Selbst die Schnellmethoden sind häufig immer noch kompliziert, wenn man einmal den UV-Test ausklammert, und versagen häufig bei niedrigen Alkaloidgehalten. Wenn Lupinensamen oder daraus isolierte Produkte auf den Markt gebracht werden sollen, z.B. für die tierische- oder menschliche Ernährung, muß eine strenge Qualitätskontrolle mittels GLC, HPLC oder ELISA erfolgen. Da der einzelne Lupinenanbauer dieser Forderung kaum nachkommen kann, benötigen wir in Deutschland oder in Europa dringend ein Servicelabor, in dem solche Tests routinemäßig durchgeführt werden können. Daß dieser Weg machbar ist, zeigen die Erfahrungen in Australien, in denen die Qualitätskontrolle nahezu vorbildlich in einem Zentrallabor betrieben wird (ALLEN et al. 1991).

Dank: Unsere Arbeiten zu den Lupinenalkaloiden wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Für technische Hilfe möchte ich Frau U. Schade, B. Weyerer, H. Wurm, H. Martin und U. Dostal danken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die analytischen Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Lupinenalkaloiden, wie z.B. GLC, GC-MS, HPLC, DC, Gravimetrie und Farbtests werden referiert. Die neu entwickelten immunologischen Verfahren RIA, SPA und ELISA eignen sich ebenfalls zur empfindlichen Detektion des Lupanins. Auch ein Schnelltest, bei dem auf Fluoreszenz der Samenschalen bei *L. albus* und *L. mutabilis* selektiert wird, eignet sich zur schnellen Unterscheidung von Bitter- und Süßlupinen.

5. LITERATUR

- ALLEN, D. G., GREIRSON, B.N. & HARRIS, D.J. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf. 24-27.
- HACKBARTH, J. & TROLL, H.J.(1959), in Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2.Aufl. Parey, Berlin & Hamburg, p 39-44.
- KINGHORN, D. & BALANDRIN, M.F.(1984), In, Alkaloids: Chemical and biological perspectives, W.S. PELLETIER, Hrsg., Vol. 2, 105-148.
- SAITO, K., KOBAYASHI, K., OHMIYA, S., OTOMASU, H. & MURAKOSHI, I. (1989), J. Chromatography 462, 333-340.
- VON BAER, D. & PEREZ, I. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf. 158-167
- VON BAER, D., REIMERDES, E.H. & FELDHEIM, W. (1979), Z. Lebensmittelunters. Forsch. 169,27-31.
- WINK, M. (1987), Planta Med. 53, 509-514.
- WINK, M. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf., 326-334
- WINK, M. (1992), in "Methods of Plant Biochemistry" (im Druck).
- WINK, M. & HARTMANN, T. (1981), Z. Pflanzenphysiol. 102,337-344
- WINK, M. & WITTE, L. (1985), Z. Naturforsch. 40c, 767-775.
- WINK, M. & WITTE, L. (1991), Entomol. Gener. 15, 237-254.
- WINK, M., WITTE, L., HARTMANN, T., THEURING, C. & VOLZ, V. (1983), Planta Med. 48, 253-257.