

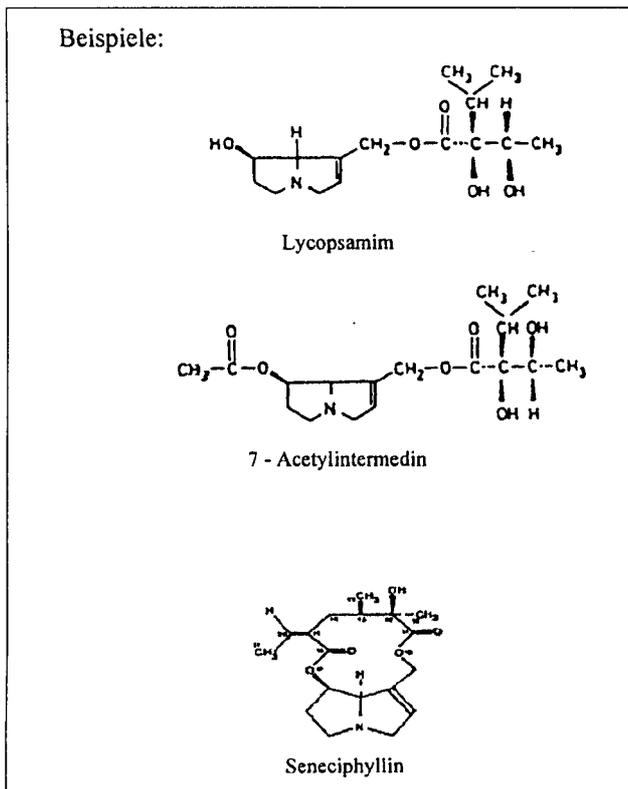
Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden durch Dünnschichtchromatographie in Samenölen von *Borago off. L*

H.-J. Mierendorff*

Es wird ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in *Borago*-(Borretsch-)Öl vorgestellt. Allfällig enthaltene N-Oxide der Alkaloide werden vorher reduziert. Da die relevanten *Borago*alkaloide nicht in reiner Form erhältlich sind und ihre Darstellung sehr aufwendig ist, werden ein *Symphytum*alkaloidextrakt als Referenzlösung und rein erhältliches Monocrotalin als innerer Standard verwendet. Die Anfärbung erfolgt nach *Mattocks*. Es lassen sich so Mengen von 0.1 – 5 µg bei einer reproduzierbaren Wiederfindungsrate von ca. 60% in insgesamt fünf Stunden nachweisen.

Einleitung

Pyrrolizidinalkaloide ("PAs") mit 1,2-ungesättigtem Necinring vom Mono- und Di-estertyp und insbesondere ringförmige Ester mit Dicarbonsäuren sind seit längerem als lebercarzinogene (hepatotoxische) Stoffe bekannt.



Sie finden sich in unterschiedlichen Mengen in Pflanzenteilen der Gattungen *Petasites*, *Symphytum*, *Tussilago*, *Senecio*, *Heliotropum*, *Cynoglossum*, *Anchusa*, *Eupatorium* und *Borago* etc. Sie dienen z. T. als klassische Arzneidro-

* Anschrift des Verfassers: H.-J. Mierendorff, Chemisches Laboratorium Dr. Hermann Ulex, Glasmoorstraße 23, D-22851 Norderstedt.

Determination of Pyrrolizidinalkaloids by Thin-Layer-Chromatography in the Oil of Seeds of *Borago off. L*.

A thin-layer-chromatographic-(TLC) procedure for the detection and quantification of PA in *Borago*oil is presented. The always existing N-oxides of the alkaloids are to be reduced to the alkaloids. The significant *Borago*alkaloids are not to get commercially and their production is very difficult and expensive. Therefore we inserted a *Symphytum* extract as reference-solution and commercial available pure monocrotalin as internal standard-solution. The visualisation is made by the method of *Mattocks*. Contents from 0.1 to 5 µg can be detected lineary in a time of about five hours and a recovery of about 60% absolute.

gen in der Volksmedizin und im Falle *Borago* als Küchenkraut (Borretsch, Gurkenkraut).

Im Stufenplan des BGA¹ wurde erstmalig ein Grenzwert von 0.1 mg/kg PA in Fertigarzneimitteln festgelegt.

1992 wurden vom BGA² endgültige Grenzwerte benannt:

Tägliche Maximalexposition durch die Summe aller 1,2-ungesättigten Necinalkaloide sowie deren N-Oxide:

100 µg bei externer Anwendung

1 µg bei interner Anwendung

für maximal 6 Wochen mit dem Warnhinweis: „Nicht anzuwenden in Schwangerschaft und Stillzeit“ und

10 µg bei externer Anwendung

0.1 µg bei interner Anwendung

ohne Warnhinweis.

Da seit einigen Jahren das Borretschöl als Quelle der nach vieler Ansicht physiologisch bedeutsamen γ -Linolensäure („GLA“, C18:3 ω 6, ca. 20% im Gesamtöl der Saat von *Borago officinalis* L.) pharmakologisch und kosmetisch verwendet wird, ist eine Bestimmung der Necinalkaloide relevant. In dieser Arbeit soll über ein einfaches und empfindliches Analysenverfahren berichtet werden.

Es sind zahlreiche analytische Verfahren in der Literatur beschrieben worden zur Anreicherung, Aufreinigung und zur qualitativen und quantitativen chromatographischen Bestimmung (DC, HPLC, GC, GC-MS) der PAs und ihrer N-Oxide³⁻¹³.

Zur routinemäßigen Bestimmung im Pharmalabor ist die Dünnschichtchromatographie u.E. aus instrumentellen Gründen, speziell zur Abschätzung der zulässigen Grenzwerte optimal geeignet. Die nach der Entwicklung mit dem Sprühreagenz nach *Mattocks* erkennbaren Flecken sind weitgehend spezifisch für 2,3-ungesättigte Necinalkaloide und gestatten eine exakte quantitative Auswertung¹⁴.

Experimentelles

Prinzip der Methode

Reduktion der N-Oxide durch naszierenden Wasserstoff, Extraktion der Alkaloide aus dem Öl, Säure-Basen-Aufreinigung der Alkaloide, DC-Entwicklung, Sichtbarmachung der Flecken, quantitative Messung.

Chemikalien und spezielle Lösungen

Monocrotalin (Roth 3418.1): 1 mg/ml in Chloroform (IST),

7 ACI/7ALY in Chloroform (ca. 1 mg/ml) (Referenzlösung)

Ethanol, Schwefelsäure 2n und 0.5n, Zinkgranulat (Merck 8756), Dichlormethan, Petrolbenzin (60/80°C), Ethylacetat (alle Lösungsmittel in p.a.-Qualität)

DC-Laufmittel No. 1: Aceton,

DC-Laufmittel No. 2: Chloroform/Methanol/Ammoniak conc.: 80/20/1

Sprühreagenz, nach *Mattocks*, mod. n. *Ulex*:

Sprühlösung 1: 10 ml Wasserstoffperoxid 36% + 10 ml Diethylenglycoldimethylether + 20 ml Essigsäureanhydrid

Sprühlösung 2: 5 ml Essigsäureanhydrid + 20 ml Petrolbenzin (60/80°C) + 25 ml Toluol

Sprühlösung 3: 0.5 g Dimethylaminobenzaldehyd + 35 ml Ethanol + 15 ml Diethylenglycoldimethylether und unmittelbar vor Gebrauch ca. 1 ml Salzsäure 38%.

Untersuchungsmaterial

Boragoöl (oder sonstige Samenöle, filtriert).

Probenaufbereitung

20 g Öl (oder aliquote Mengen) und 50 ml Ethanol und 50 ml 2 n Schwefelsäure unter Zusatz von ca. 5 g Zinkgranulat 3 Std. bei 40°C auf dem Magnetrührer turbinieren, wäßrige Phase nach dem Dekantieren über feuchtes Faltenfilter abfiltrieren, Filtrat 2 × mit 100 ml Dichlormethan und 1 × mit 100 ml Petrolbenzin (40/60) waschen.

Extraktion der Alkaloide

Die wäßrige Phase mit Ammoniak auf ca. pH 10 bringen und nacheinander extrahieren mit 3 × 100 ml Dichlormethan und 1 × 100 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen extrahieren mit 100 ml 0.5 n Schwefelsäure, die wäßrige Phase mit Ammoniak auf pH 10 bringen und 2 × mit je 100 ml Dichlormethan und 1 × mit 100 ml Ethylacetat extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen 30 min mit Natriumsulfat sicc. trocknen, filtrieren und am Rotationsverdampfer schonend bis zur Trockne einengen. Rückstand aufnehmen unter Zusatz von 10 µg Monocrotalin als IST in 200 µl Chloroform.

DC-Analyse

Auf eine Dünnschichtplatte Kieselgel KG 60 (Merck 5547) aliquote Mengen der extrahierten Alkaloide (zur quant. Auswertung im linearen Bereich 1 – 5 µg 7ACT/7ALY einsetzen!) punktförmig auftragen und in gesättigter Kammer mit Laufmittel No. 1 zur Befreiung von Störstoffen bis Plattenoberkante entwickeln (die PA bleiben praktisch am Startpunkt). Entwickeln in gesättigter Kammer mit Laufmittel No. 2 ca. 12 – 15 cm.

Detektion

Nach dem Trocknen der Platte 1 min bei 160 °C gleichmäßig besprühen mit den Sprühlösungen 1, 2 und 3, wobei zwischenzeitlich jeweils die Platte 5 – 10 min bei 160°C gleichmäßig erhitzt wird (Trockenschrank).

Die PA ergeben blaue Flecken (ca. 550 nm) auf hellgelbem Hintergrund. (Die SUP/AMA-Flecken sind unter diesen Bedingungen rötlichblau).

Auswertung

Visuell nach der Fleckenvergleichsmethode mit abgestuften Alkaloidgehalten von 1 – 5 (10) µg oder mit Scanner bei 550 nm.

Ergebnisse

Reinsubstanzen

Es war notwendig, einen allgemein im Handel zur Verfügung stehenden inneren Standard (IST) und/oder eine Referenzsubstanz (REF) zu finden und einzusetzen.

Die in *Borago*-Arten als Hauptbestandteile vorkommenden Pyrrolizidinalkaloide

Supinin (SUP)-Amabilin (AMA) (M=284),

Intermedin (INT)-Lycopsamin (LYC) (M=299),

7-Acetylintermedin (7ACI)-

7-Acetyllycopsamin (7ALY) (M=341)

sind im Handel nicht erhältlich; ihre Aufarbeitung aus *Borago* ist wegen des niedrigen Gehaltes an Pyrrolizidinalkaloiden (ca. 10 – 20 mg/kg Trockenware) nicht empfehlenswert.

Nach [4] ist das Alkaloidmuster von *Symphytum off. L.* dem des *Borago off. L.* sehr ähnlich. Das Hauptalkaloid von *Symphytum* ist ebenso wie bei *Borago* das Diastereomerenpaar 7ACI/7ALY; zusätzlich finden sich hier im wesentlichen die PA's Symphytin, Symlandin, INT-LYC sowie das Echimidin. Der PA-Gehalt dieser Droge liegt bei ca. 2.000 ppm; es wurde deshalb von uns dieses Material als Referenzsubstanz nach den bekannten Methoden der präparativen Chemie aufgearbeitet:

1000 g *Radix symphyti* mit Methanol erschöpfend extrahieren, in der Kälte abfiltrieren zur Entfernung des ausgefallenen Allantoin, einengen auf ca. 50 ml, versetzen mit ca. 200 ml 0.5 n-Schwefelsäure und je 3 × mit Petrolbenzin und Chloroform waschen. Wäßrige Lösung mit Ammoniak auf pH 10 bringen, freie Alkaloide 3 × mit Chloroform extrahieren, wäßrige Phase mit Schwefelsäure ansäuern und 3 Stunden mit Zinkgranulat bei 40°C turbinieren (Reduktion der N-oxide zu Alkaloiden). Reaktionsprodukt abfiltrieren und mit Ammoniak auf pH 10 bringen und die freien Alkaloide mit Chloroform extrahieren; beide organische Phasen vereinen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat am Rotationsverdampfer einengen und weitere 3 × über Säure-Base-Verteilung aufreinigen.

Wir erhielten hier ca. 180 mg Rohalkaloide.

Ebenso wurde eine Probe von 500 g *Borago off. L. sicc.* als Vergleichsmuster aufgearbeitet mit einer Ausbeute von ca. 19 mg Rohalkaloid.

Die beiden Rohalkaloidgemische wurden gaschromatographisch untersucht (Abb. 1 und 2).

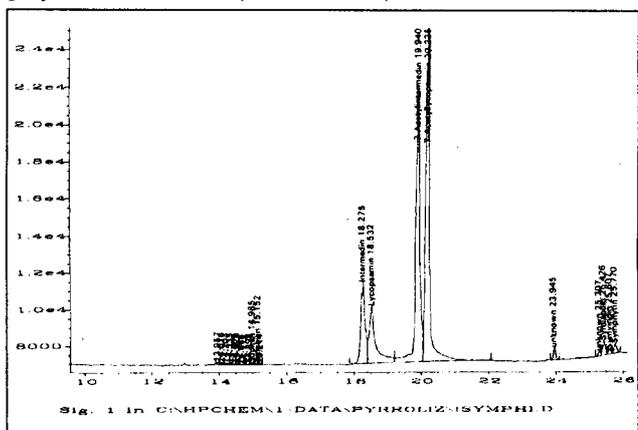


Abb. 1. Gaschromatogramm von *Symphytum*
GC-Bedingungen: Säule DB 1 (J&W) 60 m; 0.25 µm/
180° – 300° (mit 4°/min) 35 cm/sec He-Injektor: 225°; Det. 260°
– 1 µl (20 mg/ml), Split 1:20, FID

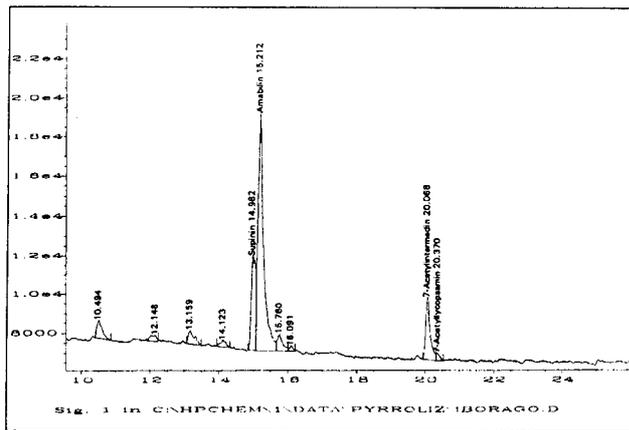


Abb. 2. Gaschromatogramm von *Borago*
 GC-Bedingungen: Säule DB 1 (J&W) 60 m; 0.25 mm; 0.25 µm/
 180° – 300° (mit 4°/min) 35 cm/sec He-Injektor: 225°; Det. 260°
 – 1 µl (20 mg/ml), Split 1:20, FID

Unter diesen Bedingungen eluieren die Ester der Trachelansäure stets vor denen der Viridiflorsäure. (In den uns vorliegenden Drogenmustern sind, wie normal, nicht alle grundsätzlich möglichen Alkaloide enthalten).

Die quantitative Auswertung mit Hilfe eines Rechen-systems (HP-Chem 3365 System II mit Interface 35 900), bezogen auf die Flächenprozent des FID-Signals ergaben in dem von uns aufgereinigten Alkaloidmuster aus *Symphytum off. L.* folgende Werte:

- 74.588 % 7 ACI/7 ALY
- 21.641 % IND/LYC
- 2.387 % Symphytin u. Ä.
- 0.104 % SUP/AMA
- 1.283 % n.n.

Ebenso ergab die Probe *Borago*-Rohextrakt folgende Werte:

- 12.68 % 7 ACI/7 ALY
- 72.73 % SUP/AMA
- 14.95 % n.n.

(Im uns vorliegenden Muster *Borago* ist der Gehalt an 7 ACI/7 ALY rel. niedrig und der Gehalt an SUP/AMA rel. hoch!)

Da auf dem Dünnschichtchromatogramm eine saubere Trennung der einzelnen Alkaloide (allerdings ohne Trennung der Diastereomerenpaare) erfolgt, erschien es uns sinnvoll, die einzelnen Flecken auf der Dünnschichtplatte additiv zu erfassen.

Der bei *Borago* dominante Doppelfleck von 7ACI/7ALY dient als Referenz (REF).

DC-Analytik

Zuerst wurden die allgemeinen Kriterien für eine DC-Analyse festgelegt.

Das klassische Laufmittel für Necin-Alkaloide nach *Mattocks*¹⁴

Chloroform/Aceton/Ethanol/Ammoniak 1.5 % = 5/3/1/1 wurde schrittweise variiert bis zum Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol/Ammoniak 25 % = 80/20/1 (ähnlich wie in Lit. 4).

(Ein Ersatz des Chloroforms durch Dichlormethan ist wegen des höheren Dampfdruckes, insbesondere bei höheren Temperaturen problematisch; der Wert von einem Teil Ammoniak 25 % ist für die Rf-Wert-Ermittlung kritisch und genau einzuhalten.)

Ein erster Vorversuch mit den *Symphytum*- und *Borago*-Rohextrakten und vorerst noch Retrorsin als (IST) auf einer Dünnschichtplatte Merck KG 60 F, Merck No. 5583 zeigt Abb. 3.

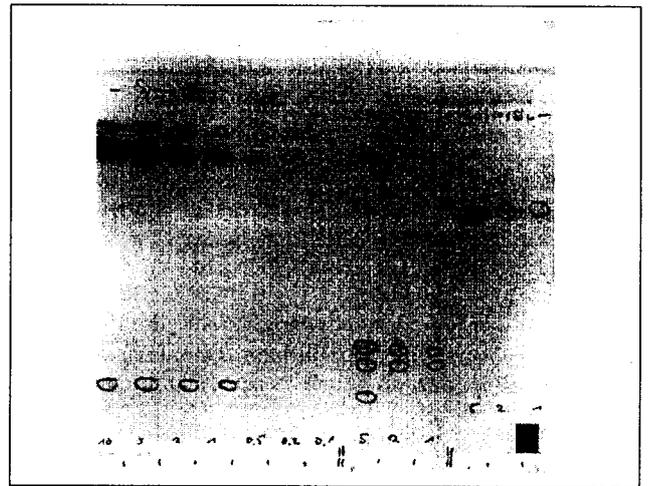


Abb. 3. Dünnschicht-Chromatogramm
 Es zeigt v.l.n.r.: 10/5/2/1/0.5/0.2/0.1 µg *Symphytum* Rohalkaloide; 5/2/1 µg *Borago*-Rohalkaloide; 5/2/1 µg Retrorsin

Der Farbspons von Retrorsin liegt ziemlich genau bei einem Zehntel der gleichen Menge 7ACI/7ALY.

Es wurden im folgenden verschiedene mehr oder weniger rein erhältliche Necin-Alkaloide auf ihre Eignung als IST mit möglichst gleichem Färbungsgrad wie 7ACI/7ALY geprüft. Hier erwies sich der Monocrotalinfleck bei gleicher Auftragsmenge als praktisch farbgleich mit dem Fleck von 7 ACI/7 ALY (Abb. 4).

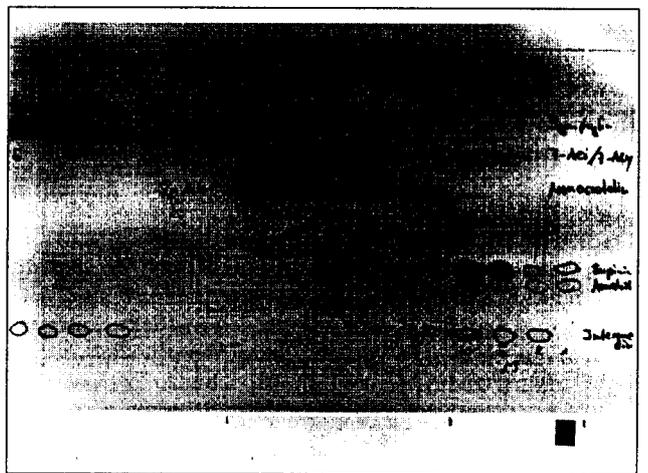


Abb. 4. Dünnschicht-Chromatogramm
 Es zeigt v.l.n.r.: 5/4/3/2/1/0.5/0.2 µg *Symphytum* Rohalkaloide
 10/8/6/4/2/1/0.5 µg Monocrotalin
 10/5/2/1 µg *Borago*-Rohalkaloide

[Ein DC-Run auf der HPTLC-Platte Merck 13728 (10×10 cm) mit einer aufgestockten Probe *Borago*öl mit absoluten Mengen von 10 µg 7ACI/7ALY pro 20 g Öl und entsprechender Verdünnung (hier auch noch mit den Alkaloid-Rohextrakten) zeigt, daß bei gleicher Laufmittelzusammensetzung die relativen Rf-Werte anders sind, jedoch bei einer Laufhöhe von ca. 4 – 5 cm eine vollständige Trennung erzielt wird. Störend sind hier einmal die nur sehr geringen Substanzmengen auf dieser speziell

konzipierten Platte für die Mikroanalytik und die unangenehme Neigung dieses Plattenmaterials in einer Sandwichkammer zur verstärkten chromatographischen Trennung auch des Laufmittelgemisches in Form der Rf-Wert-ändernden β -Zonenbildung.]

Es zeigt sich bei zahlreichen Anfärbungen nach *Matlocks*, daß die einzelnen Sprühreagenzien feinvernebelt ausreichend satt auf die Platte aufgebracht werden müssen. Dieses gilt insbesondere für Sprühlösung 3.

Referenzmaterialien

Die *Symphytum*-Rohalkaloidextrakte (siehe Absatz: *Reinsubstanzen*) wurden nach den bekannten Methoden der HPLC auf Säule LiChrosorb C18, 10 μm , 8 \times 30 mm; 2 ml/min; 30 % Acetonitril-70 % 0.01 m Kaliumdihydrogenphosphat (pH 6.5), höchstmöglich aufgereinigt.

Zur Erstellung einer endgültigen Referenzlösung wurde die Lösung des aufgearbeiteten Alkaloidgemisches aus *Symphytum off. L.* auf 1 mg/ml 7ACI/7ALY eingestellt, so daß sich folgende Konzentration ergab:

- 1000 $\mu\text{g/ml}$ 7ACI/7ALY
- 290 $\mu\text{g/ml}$ IND/LYC
- 32 $\mu\text{g/ml}$ Symphytin u. Ä.
- 1.4 $\mu\text{g/ml}$ SUB/AMA
- 17 $\mu\text{g/ml}$ n.n.

Referenzlösung

Als Berechnungsgrundlage der Fleckenauswertung gilt fortan der Gehalt von 1 mg/ml 7ACI/7ALY in Chloroform.

Innerer Standard

Monocrotalin (Roth 3418.1): 1 mg/ml in Chloroform. (Der Gehalt wurde gaschromatographisch zu 97.8 % ermittelt.)

Recovery

Nach Lit. 2 (hier die Anlage: „Anforderung an Prüfverfahren und die Dokumentation der Qualitätssicherung“) wurde raffiniertes Boragoöl vor seiner Verwendung als Trägersubstanz auf die Abwesenheit von PA's geprüft.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden je 6 identische Boragoölproben gleichen Batches (PA-frei) á 10 g mit je einem und 5 μg (Probe 10 nur mit 2.5 μg) 7ACI/7ALY und jeweils der gleichen Menge Monocrotalin entsprechend 0.1 und 0.5 ppm aufgestockt. Dies entspricht der maximal anzunehmenden Menge an Boragoöl in Kosmetikprodukten resp. in Kapseln pro Tag von 10 g.

Diese Probe wurde lege arte aufgearbeitet und quantitativ auf die Platte (Abb. 5) aufgegeben. Zusätzlich wurden auf den Seiten zur Grenzwertabschätzung jeweils zusätzlich ein Zwanzigstel und ein Zehntel der Probe No. 13 aufgetragen.

Bei visueller Auswertung sind die Fleckengröße und -intensität vollkommen gleich.

(Eine densitometrische Auswertung der Hauptflecken ergab eine Maximalstreuung von + 2.5/-2.0 % Fleckenintensitätsmittelwert.) Die absolute Wiederfindungsrate liegt hier wie sonst auch reproduzierbar bei ca. 60 %. Sie spielt wegen des Einsatzes von Monocrotalin als IST bei identischer Wiederfindungsrate jedoch keine Rolle.

Linearity

Die Intensitätskurve ist im optimalen visuellen Bereich der Ablesbarkeit absolut linear. Sie liegt bei 1 - 5

μg pro Fleck. (Die Densitometrie zeigte erst bei 10 μg einen Abfall von ca. 7 %, bei 25 μg einen Abfall von ca. 30 %). Unter günstigen Bedingungen sind Flecken bis minimal 0.1 μg 7ACI/7ALY und Monocrotalin erkennbar (Abb. 6).

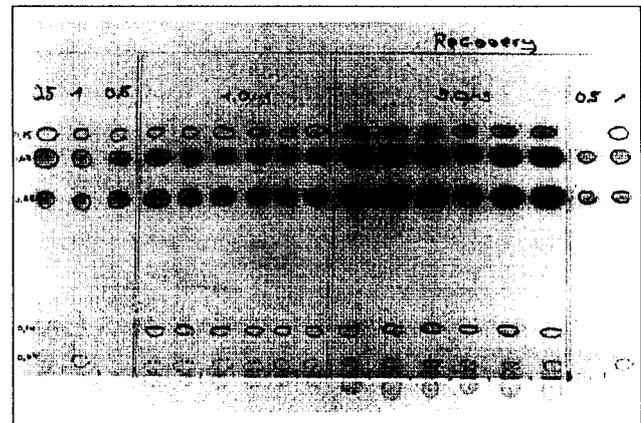


Abb. 5. Dünnschicht-Chromatogramm

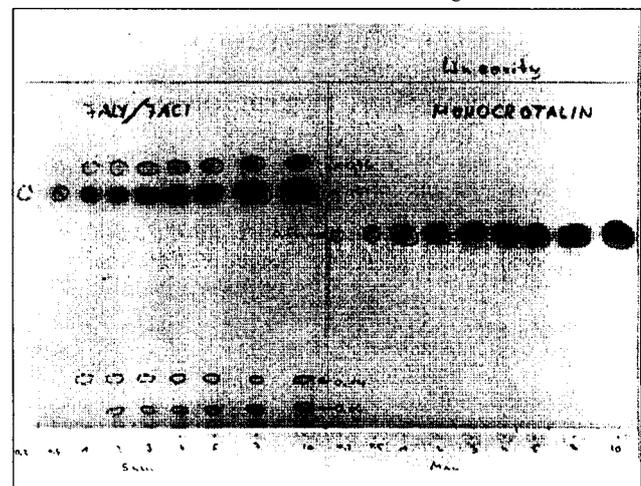


Abb. 6. Das DC zeigt jeweils 0.2/0.5/1/2/3/4/5/7/10 μg 7ALI/7ACY und Monocrotalin auf getrennten Bahnen

Schlußwort

Die weite Verbreitung der Pyrrolizidinalkaloide im Pflanzenreich, insbesondere in pharmakologisch bedeutsamen Kräutern und Drogen und auch in Pflanzen und Pflanzenteilen, die unbeabsichtigt Nahrungsstoffen oder Tierfutter beigemischt sind, bedingt, daß zum Ausschluß jeglicher Kontamination eine genaue Kontrolle der Rohstoffe erfolgen muß.

Die vorgestellte Analysenmethode ist auch auf andere Matrices anwendbar.

Literatur

- 1 BGA-Rundschr. an Stufenplan Beteiligte vom 10. 08. 1988.
- 2 BGA, Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln vom 05.06.1992, BGBl. Nr. 111, S. 4805 ff.
- 3 J. Bräuchli, Dissertation ETH Zürich 1987.
- 4 J. Lüthy et al., Pharm. Acta. Helv. 59, 242 [1984].
- 5 U. Zweifel et al., Pharm. Acta. Helv. 65, 165 [1990].
- 6 G. Tittel et al., Planta medica 37, 1 [1979].

- ⁷ *H. Wagner et al.*, *Planta medica* **41**, 232 [1981].
- ⁸ *D. Craig et al.*, *J. Nat. Prod.* **49**, 727 [1986].
- ⁹ *P. Schmidt et al.*, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **78**, 208 [1987].
- ¹⁰ *J. Lüthy et al.*, *Pharm. Acta Helv.* **58**, 98 [1983].
- ¹¹ *J. Lüthy et al.*, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **72**, 55 [1981].
- ¹² *J. Lüthy et al.*, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **71**, 73 [1980].
- ¹³ *H. J. Huizing et al.*, *Pl. Syst. Evol.* **137**, 127 [1981].
- ¹⁴ *A. R. Mattocks*, *J. Chrom.* **27**, 505 [1967].

D a n k s a g u n g

Für die Überlassung getrockneter Pflanzendrogen danken wir Herrn Apotheker *R. Patzinger* in der Firma Heinrich Klenk, Schwebheim, für Boragoöl Herrn *W. P. M. Imhoff* M. Sc., Firma Yamanouchi Europe, Leiderdorp/The Netherlands. Für wissenschaftliche Unterstützung danken wir Herrn *U. Zweifel*, Institut für Toxikologie, ETH Zürich, und Herrn Dr. *H. Wiedenfeld*, Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn.

Eingegangen am 5. September 1994.