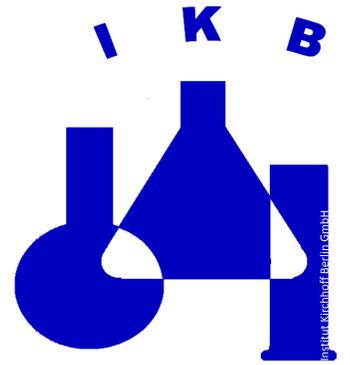


Fallstricke bei der Analytik von Pyrrolizidinalkaloiden

Konetzki, J., Becker, E., Kirchhoff, E.

Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestraße 3-4, 12159 Berlin



Hintergrund

Im Juli 2013 veröffentlichte das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine Stellungnahme zu Pyrrolizidinalkaloiden (PA). Beschrieben wurde in diesem Zusammenhang ein BfR-Forschungsprojekt, in dessen Rahmen in Kräutertees und Tees hohe PA-Gehalte bestimmt worden waren [1]. Vorgestellt wurde zeitgleich auch eine vom BfR entwickelte Analysenmethode zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS [2]. In den Jahren 2007 und 2011 waren zuvor bereits Stellungnahmen des BfR zu Pyrrolizidinalkaloiden in Salatmischungen und Honig veröffentlicht worden [3+4].

Probenahme

Insbesondere in Kräutertee-Mischungen sind PA häufig sehr heterogen verteilt.



- ✓ Durch „Spot-Kontamination“ kommt es häufig zu großen Schwankungen der Gehalte innerhalb einer Charge.
- ✓ Ein eindeutiger Rückschluss von der Laborprobe auf die Qualität eines großen Warenloses ist nur mit Einschränkung möglich.
- ✓ Probenahme ist somit der kritischste Schritt im gesamten Analyseprozess.

→ Zur Beurteilung ganzer Partien müssen möglichst repräsentative Proben gezogen werden.

Probenhomogenität

Gute Probenhomogenität ist von zentraler Bedeutung.



- ✓ Insbesondere die heterogene Verteilung der Kontamination stellt hohe Anforderungen an die Homogenität der Analysenprobe.
- ✓ „Die Gesamtprobe wird vor der Analyse auf eine einheitliche Partikelgröße (0,5mm) gebracht und homogenisiert“ [2]

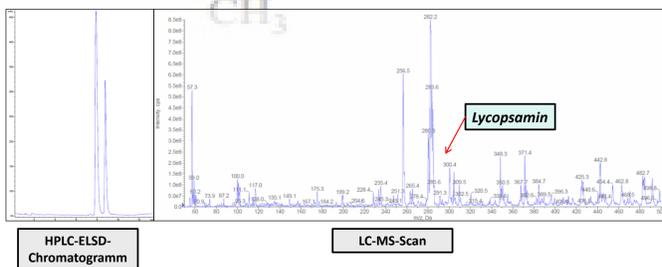
→ Zur Homogenisierung eingesetztes Equipment muss sorgfältig ausgewählt werden.

Referenzsubstanzen

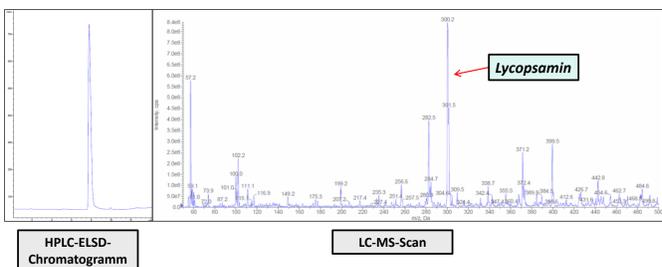
Zur Quantifizierung jedes einzelnen PA sind gut charakterisierte Referenzsubstanzen erforderlich.

- ✓ Die Verfügbarkeit der Referenzsubstanzen ist begrenzt (bislang nur 31 von ca. 600).
→ Das Untersuchungsspektrum wird eingeschränkt. Nur die wichtigsten PA werden analysiert.
- ✓ Isotopenmarkierte Standards sind nicht verfügbar.
→ Die Quantifizierung muss über Matrixkalibration bzw. Standardaddition erfolgen.
- ✓ Reinheit/Gehalt entsprechen nicht immer dem Herstellerzertifikat (siehe Chromatogramm).
→ Eine Überprüfung der Reinheit (z. B. mit HPLC-ELSD und LC-MS-Scans) ist erforderlich.

Lieferant A



Lieferant B

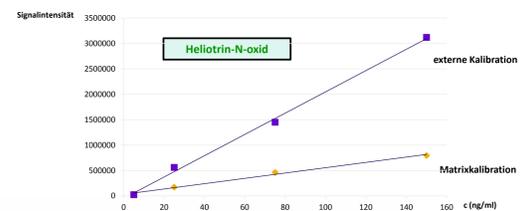


- ✓ Die Stabilität der Standardlösungen ist unsicher.
→ Eine Stabilitätskontrolle ist notwendig:
z. B. durch Versetzen eines Standardmixes mit UV-aktiver erfahrungsgemäß stabiler Substanz (beispielsweise Coffein), Lagerung bei -18°C, Messung mit HPLC-UV (218 nm), Monitoring der einzelnen Flächen-Verhältnisse PA/Coffein

Quantifizierungskonzept

Matrixeffekte erschweren wie häufig in der LC-MS/MS-Analytik die Quantifizierung.

- ✓ Eine externe Kalibration ist aufgrund starker Matrixeffekte nicht ausreichend.



- ✓ Da isotopenmarkierte Standards nicht verfügbar sind und Matrixkalibration anhand von Blank-Matrix-Extrakten nur bei Verfügbarkeit einer nahezu identisch zusammengesetzten Blank-Probe möglich ist, muss häufig über Standardaddition quantifiziert werden.
- ✓ Standardadditionen liefern genaue Ergebnisse, sind aber sehr aufwendig.

Summenmethode als Alternative?

Einige Fallstricke aus den Themenbereichen Referenzsubstanzen und Quantifizierungskonzept lassen sich durch Anwendung der Summenmethode nach Cramer et al. [5] umgehen.

- ✓ Die Bestimmung des Gesamt-PA-Gehalts erfolgt als Retronecin-Äquivalente.
- ✓ Eine isotope-markierte Verbindung wird als interner Standard eingesetzt.

Vergleich mit Bestimmung der einzelnen PA	
Vorteile	Nachteile
keine Einschränkung des Untersuchungsspektrums auf kommerziell verfügbare Referenzsubstanzen	keine Erfassung der Otonecin-PA (z.B. Senkirkon)
Erfassung des Gesamt-PA-Gehalts	kein Rückschluss auf Kontaminationsquelle und geographische Herkunft möglich
geringerer Aufwand bei Quantifizierung, da nur ein Standard und ein interner Standard verwendet wird → aufwendige Standardadditionen entfallen	interner Standard nicht kommerziell erhältlich, Synthese aufwendig
Reinheits-, Gehalts- und Stabilitätsprüfungen nur für eine Referenzsubstanz durchzuführen	unterschiedliche Toxizität einzelner PA kann nicht berücksichtigt werden

[1] Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees. Stellungnahme 018/2013 des BfR vom 5. Juli 2013
 [2] Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS, Methodenbeschreibung, BfR-PA-Tee-1.0/2013
 [3] Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Greiskraut verunreinigt. Stellungnahme 028/2007 des BfR vom 10. Januar 2007
 [4] Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig. Stellungnahme 038/2011 des BfR vom 11.
 [5] Cramer, L., Schiebel, H.-M., Ernst, L., Beuerle, T.: Pyrrolizidine Alkaloids in the Food Chain: Development, Validation and Application of a New HPLC-ESI-MS/MS Sum Parameter Method; J. Agric. Food Chem., 2013, 61 (47), pp 11382–11391