







Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Lebensmitteln mittels Online-SPE LC/MS/MS Kopplung

SPARK Anwendertreffen 12.-13. Oktober 2015 Sprockhövel







Pyrrolizidinalkaloide: Struktur / Vorkommen

- ✓ mehr als 500 Verbindungen und ihre Oxide bekannt
- ✓ von vielen Pflanzenarten (3% aller Blütenpflanzen) zum Schutz vor Fraßfeinden gebildet
- ✓ hohe PA-Gehalte insbesondere bei **Korbblütlern** (Asteraceae), **Borretschgewächsen** (Boraginaceae) und **Hülsenfrüchtlern** (Fabaceae)
- ✓ gewöhnliches Greiskraut (*Senecio vulgaris*) verbreitetes Feld-Unkraut
- ✓ Jakobs-Greiskraut / Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio jacobeae*): extensive Ausbreitung auf Weiden und Wiesen; Gesamt-PA-Gehalt: 0,2-0,3%
- ✓ Humanexposition durch pflanzliche Arzneimittel ("traditionelle Medizin"), verunreinigte pflanzliche Nahrungsmittel (kontaminiertes Getreide, Salate (Rucola kontaminiert mit Senecio vulgaris), Kräutertee, "Busch-Tee"), tierische Nahrungsmittel (Milch, Honig, Eier)

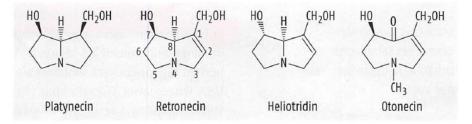








Pyrrolizidinalkaloide: Toxizität



- ✓ PAs mit **Doppelbindung in Position 1,2** in ihrem Grundgerüst (**Necin**) toxisch, Stärke der Toxizität **abhängig vom jeweiligen PA**
- ✓ stärkere toxische Wirkung bei Veresterung der OH-Gruppe an Position 7 und bei bei zyklischen Diestern
- ✓ in hoher Dosierung akute Leberschädigungen, bestimmte PA: genotoxisch, kanzerogen
- ✓ bei Aufnahme von PAs über längeren Zeitraum vor allem **Leberschäden** (Venenverschluss, Leberzirrhose), aber auch Schäden in Lunge, Blutgefäßen, Niere, Gastrointestinaltrakt, Pankreas und Knochenmark
- ✓ Toxizität abhängig von Menge, Dauer der Exposition, Geschlecht und Alter
- ✓ bei den meisten PAs Datenlage zur Toxizität rudimentär
- ✓ Risiken einer chronischen Aufnahme von PAs in niedrigen Dosen nur schwer abschätzbar
- ✓ BfR-Stellungnahme: max. 0,1 µg PA pro Tag und 0,007 µg ungesättigte PA pro kg Körpergewicht und Tag (Basis: MOE-Ansatz)



Pyrrolizidinalkaloide: Historie

√ 1988: WHO: gesundheitliches Risiko durch belastete Nahrungs- und
Futtermittel

✓ 1992: BGA: Phytopharmaka, die Pflanzen enthalten, die PA mit einem ungesättigten Necingerüst aufweisen, nur in Verkehr bringen, wenn tägl. max. Aufnahmedosis 1 µg nicht überschreitet, max. 6 Wochen, sonst max. 0,1 µg/Tag

✓2001: FDA: alle Beinwell-Präparate vom Markt nehmen

✓ 2007: BfR: Forderung der Nulltoleranz (Anwendung, wenn kein sicherer Grenzwert basierend auf wissenschaftlichen Daten festgelegt werden kann)

✓ 2007: EFSA: Forderung eines Futtermittel-Monitorings

✓ 2009: Kontaminationen von Rucola und Salat-Mischungen mit *Senecio vulgaris* entdeckt

✓ 2011: EFSA: Scientific Opinion



Pyrrolizidinalkaloide: Historie

✓2012: BfR-Forschungsprojekt: Analyse von über 200 handelsüblichen Kräutertee- und Teeproben

- •teilweise hohe Summengehalte (bis zu 3,4 mg/kg Trockenprodukt)
- •große Schwankungen bei gleicher Teesorte (auch bei derselben Marke zwischen unterschiedlichen Chargen)
- •ausreichende Kontrollen von Kräutertee- und Teechargen vor der Vermarktung notwendig
- •Zusage der Verbände, sich intensiv um Aufklärung der Ursachen und Minimierung der Gehalte zu bemühen
- •Lebensmittelüberwachung von BMELV gebeten, weitere Gehaltsdaten zu generieren



Pyrrolizidinalkaloide: Historie

- ✓ BfR-Stellungnahme 7/2013
 - •Bewertung mögl. gesundheitlicher Risiken nach MOE (Margin of Exposure)-Ansatz (wird international zur Abschätzung des potenziellen Risikos von genotoxisch und kanzerogen wirkenden Substanzen angewendet); MOE ergibt sich aus der menschl. Exposition als Maß für den Umfang des Kontakts mit einem Stoff im Verhältnis zu der im Tierversuch festgestellten oder berechneten Effektdosis für eine gegebene Tumorinzidenz
 - \rightarrow max. 0,1 µg PA pro Tag und 0,007 µg ungesättigte PA pro kg Körpergewicht und Tag
 - •akute Gesundheitsgefährdung durch Verzehr von Tee und Honig bei kurzfristiger Aufnahme (bis zu 14 Tage) unwahrscheinlich
 - •für Vielverzehrer (insbesondere Kinder, Schwangere, Stillende) könnte Risiko einer gesundheitlichen Gefährdung bestehen
 - •Kinder, Schwangere und Stillende sollten nicht ausschließlich Kräutertees und Tees trinken
 - Abwechslung und Vielfalt wichtig



Pyrrolizidinalkaloide: Methodenüberblick

- **✓** DC
 - qualitativ
 - •NG: 1-10 μg
- **✓LC-MS**
 - zahlreiche Veröffentlichungen
 - •überwiegend angewendetes Prinzip
 - *Bestimmung freier Basen und der N-Oxide möglich
 - •NG: < 0,1 μg
 - •daneben: Summenmethode (Extraktion mit LiAlH₄, Derivatisierung mit Phthalsäureanhydrid)
- **√**GC-MS
 - •Reduktion der N-Oxide vor Analyse erforderlich
 - •NG vergleichbar mit LC-MS
- **✓** ELISA
 - sehr empfindlich
 - •kaum Cleanup erforderlich
 - •sehr spezifisch (→ Antikörper für jede PA-Struktur erforderlich)



Pyrrolizidinalkaloide: Methodenüberblick

- ✓ zahlreiche Studien/Veröffentlichungen insbesondere zu
 - Extraktion
 - ➤ PAs relativ polar, basisch
 - --> gut löslich in polaren org. Lsm. (MeOH) und verdünnten wässrigen Säuren
 - ➤ Aufschlämmen, Erhitzen (Soxhlet), Ultra-Turrax, Ultraschall
 - ➤ Extraktionsdauer, pH
 - •Clean-up
 - ➤ ursprünglich Flüssig-/flüssig-Extraktion der sauren, wässrigen Extrakte mit unpolaren Lsm.
 - **≻**SPE
 - ➤ Diatomeenerde (ChemElut): nicht geeignet für nicht-zyklische Diester
 - ➤ C8/C18: relativ hoher Matrix-Anteil im Extrakt
 - ➤SCX: bessere Aufreinigung
 - ➤ Diol: sehr gute Wiederfindungen
 - >Amino: Verluste beim Waschen
 - ≽Si
 - •LC-MS



Pyrrolizidinalkaloide: BfR-Methode



zweimalige Extraktion mit 0,05 M Schwefelsäure (15 min Ultraschall)



Einstellung des pH-Wertes im vereinigten Extrakt auf 6-7



SPE mit C18-Material

- Aufgabe von 10 ml Extrakt
- Waschen mit 2 x 5 ml Wasser
- Trocknung mit Vakuum 5-10 min
- Elution mit 2 x 5 ml Methanol



Einengen und Aufnehmen mit MeOH/Wasser 5/95



LC-MS/MS (Quantifizierung über Matrixkalibration; Messung von 2 MRMs pro Analyt) BG 5-10 µg/kg



Pyrrolizidinalkaloide: BfR-Methode



zweimalige Extraktion mit 0,05 M Schwefelsäure (15 min Ultraschall)



Einstellung des pH-Wertes im vereinigten Extrakt auf 6-7



SPE mit C18-Materia

Aufgabe von 10 ml Extrakt

Online-SPE

mit MeOH/Wasser 5/95



LC-MS/MS (Quantifizierung über Matrixkalibration; Messung von 2 MRMs pro Analyt) BG 5-10 µg/kg



SPE Exchange Module (SEM)







grundsätzlicher Ablauf: Solvatisieren, Äquilibrieren, Beladen, Waschen, Elution durch HPLC-Gradienten, Spülen



SPE Exchange Module (SEM): Methodenablauf

1) Solvatisieren

- HPD pumpt 2 ml Methanol durch Kartusche
- Ziel: Befeuchten der Sorbens-Partikel
- Eluat läuft in den Abfall
- HPLC-Säule wird mit Start-Eluent äquilibriert

2) Äquilibrieren

- HPD pumpt 4 ml Wasser durch Kartusche
- Ziel: wässrige Umgebung auf Kartusche → kein Analyt-Durchbruch bei Aufgabe
- Eluat läuft in den Abfall
- HPLC-Säule wird mit Start-Eluent äquilibriert

3) Beladen

- Probe wird injiziert
- HPD spült Probenlösung mit geringem Volumen Wasser und niedriger Flussrate aus der HPLC-Probenschleife auf die Kartusche
- HPLC-Säule wird mit Start-Eluent äquilibriert



SPE Exchange Module (SEM): Methodenablauf

4) Waschen

- HPD pumpt mit geringer Flussrate Waschlösung durch die Kartusche
- Ziel: Entfernen von Matrix (wenn möglich mit etwas höherer Elutionskraft als beim Beladen)
- Eluat läuft in den Abfall
- HPLC-Säule wird mit Start-Eluent äquilibriert

5) Elution

- Kartusche wird in den Flussweg (vor HPLC-Säule) geschaltet
- Ziel: Elution aller Analyten
- Kartusche bleibt nur so lange im Säulen-Flussweg wie nötig, dann erneute Ventilschaltung

6) Spülen

- Kartusche wird mit Elutionsmittel hoher Elutionskraft gespült (vorzugsweise rückwärts)
- über HPLC-Säule läuft weiter der HPLC-Gradient



Online-SPE-LC-MS/MS





SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen

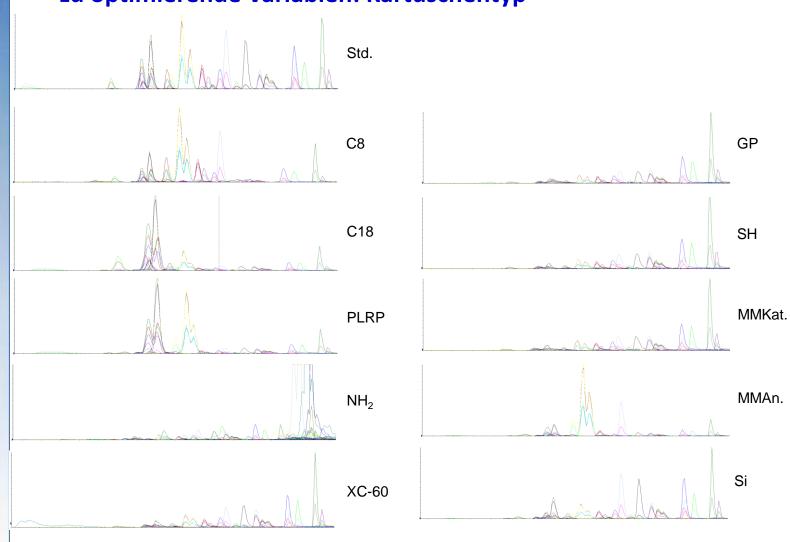
- ✓ veränderbare Parameter
 - √ Kartuschentyp
 - ✓ Flussrichtung beim Beladen und Eluieren
 - ✓ verwendete Lösemittel zum Konditionieren, Beladen, Spülen 4 Anschlüsse
 - ✓ Probenmenge / -konzentration
 - ✓ Volumina zum Konditionieren, Beladen, Waschen und Spülen
 - ✓ Elutionsdauer → Elutionsvolumen / Zusammensetzung des Elutionsmittels
 - ✓ Flussrate beim Konditionieren, Beladen, Spülen



SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Kartuschentyp

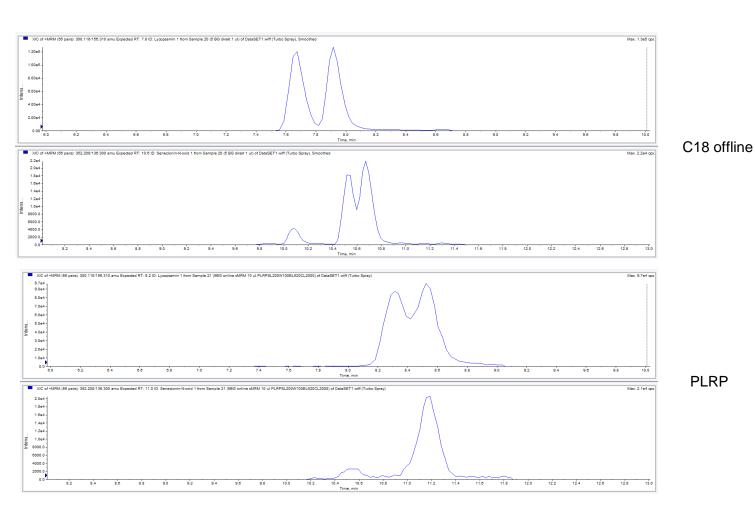
- ✓ Kartuschentyp
 - ■BfR-Methode: C18-Material
 - → naheliegendste Start-Option: unpolares Material (C8, C18, Polymerphase)
 - ■Phasen, zu deren Elution pH-Wert-Änderungen erforderlich sind (z. B. Kationentauscher), möglicherweise problematisch, da nachteilige Beeinflussung der Chromatographie möglich

SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Kartuschentyp



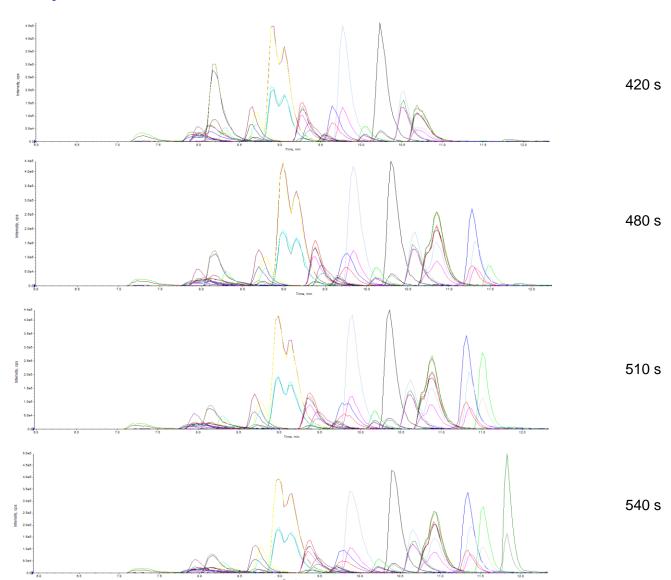


SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Kartuschentyp



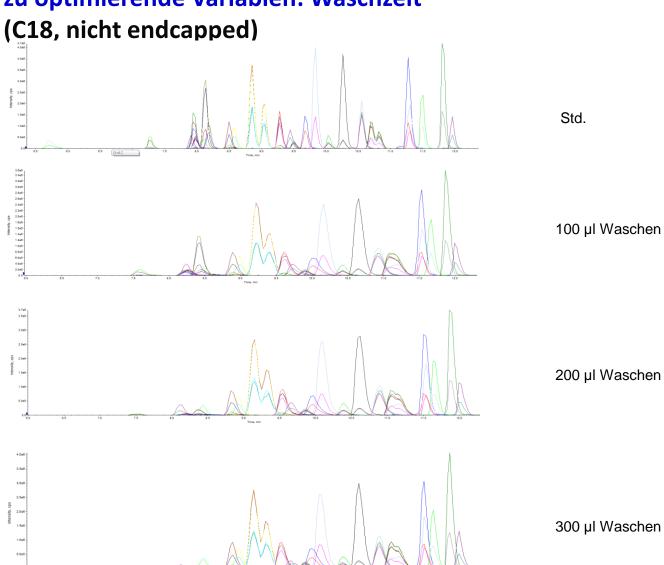


SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Elutionszeit



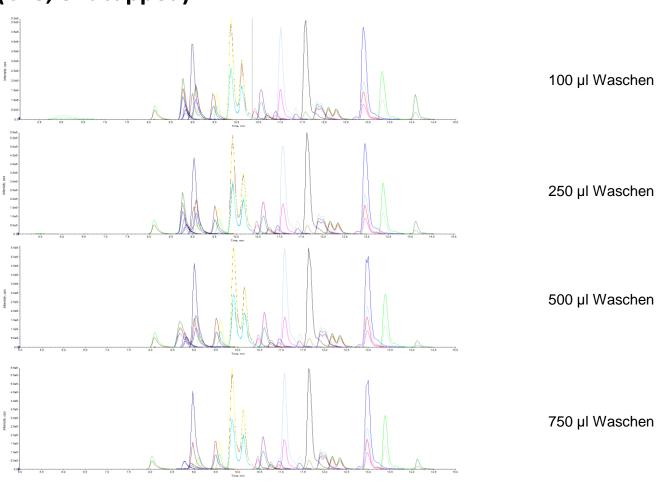


SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Waschzeit



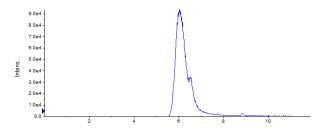


SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Waschzeit (C18, endcapped)

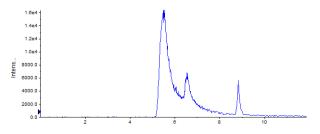




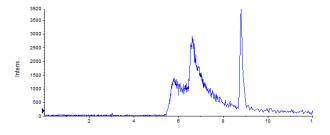
SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Waschzeit (C18, endcapped) - Monocrotalin



100 µl Waschen



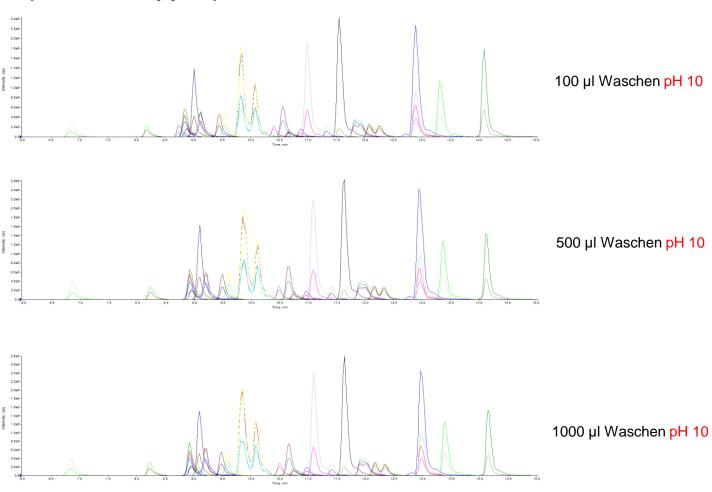
250 µl Waschen



500 µl Waschen

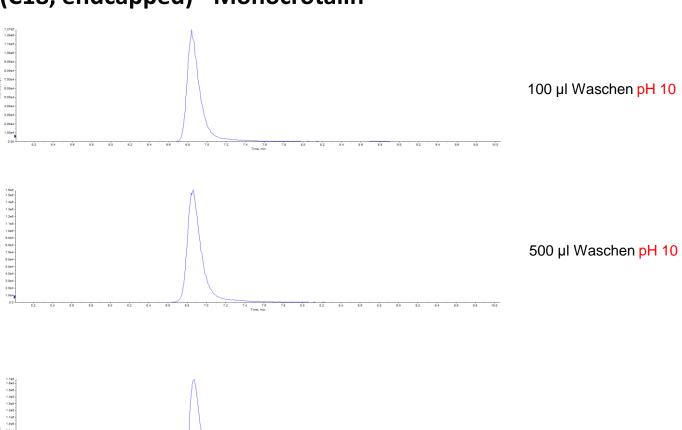


SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Waschzeit / Waschlösung (C18, endcapped)





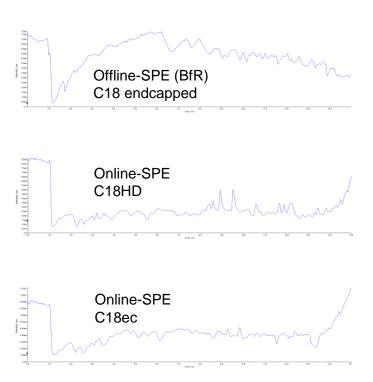
SPE Exchange Module (SEM): zu optimierende Variablen: Waschzeit / Waschlösung (C18, endcapped) - Monocrotalin



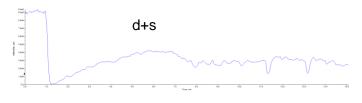
1000 µl Waschen pH 10

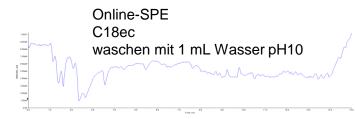


Matrixprofile (Kamille)



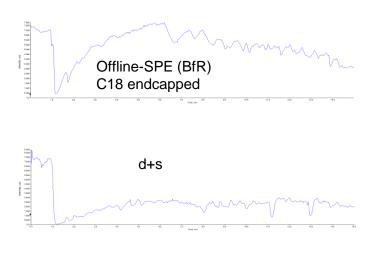


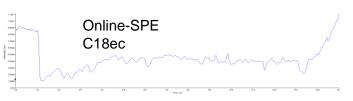




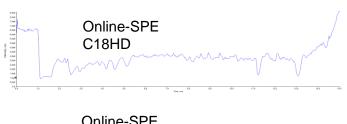


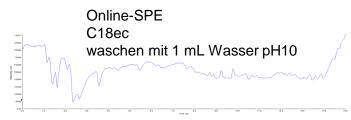
Matrixprofile (Kamille)





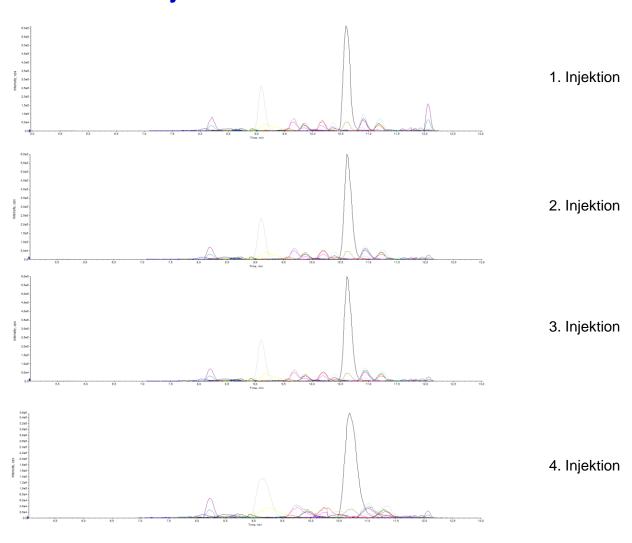








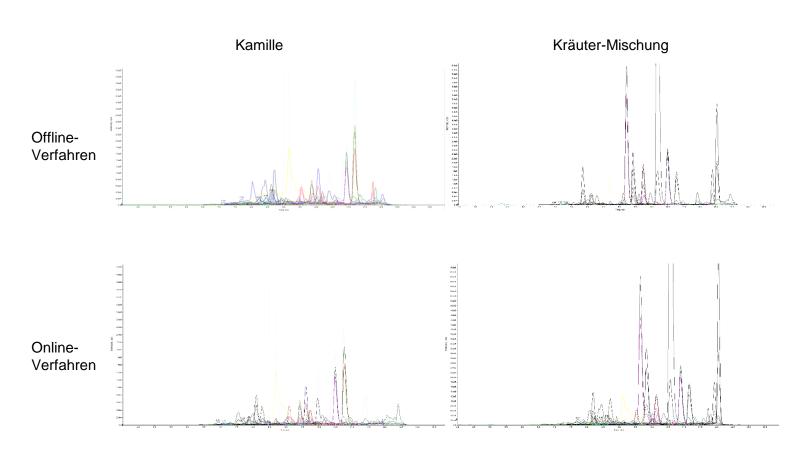
Mehrfachinjektionen über dieselbe SPE-Kartusche





Vergleich der Verfahren mit Offline- und Online-SPE anhand zweier Referenzproben aus einem Proof-ACS-Ringversuch

✓ Chromatographische Trennung, Signalintensitäten und Matrixinterferenzen vergleichbar





Vergleich der Verfahren mit Offline- und Online-SPE anhand zweier Referenzproben aus einem Proof-ACS-Ringversuch

- ✓ Kamille- und Kräuter-Teemischung, n=6, Kalibration über das Gesamtverfahren mit 5 Pkt. 10-300 µg/kg
- ✓ Mittelwerte der Ergebnisse und Wiederholpräzisionen beider Verfahren vergleichbar
- ✓ z-Scores liegen in akzeptablem Bereich

<u>Kamille</u>

Analyt	Mittelwert [µg/kg]		RSD [%]		rob. Mittel- wert RV [µg/kg]	robuste Standard- abweich. RV [%]	z-Score, berechnet berechnet nach über robusi Standa abwei		chnet ste dard-	
Retrorsin-NOX	45	41	3,0	4,7	41,5	9,1	0,4	0,0	0,4	0,0
Seneciphyllin	41	36	2,6	3,7	34,8	23,7	0,8	0,1	0,3	0,0
Seneciphyllin- NOX	66	63	3,4	7,9	69,2	18,8	-0,2	-0,4	-0,2	-0,3
Senecionin	71	64	3,9	5,0	50,3	17	1,9	1,3	1,2	0,8
Senecionin- NOX	102	98	4,7	3,2	102,3	22,9	0,0	-0,2	0,0	-0,2

schwarze Werte: Offline-Verfahren, grüne Werte: Online-Verfahren



Vergleich der Verfahren mit Offline- und Online-SPE anhand zweier Referenzproben aus einem Proof-ACS-Ringversuch

Kräuter-Teemischung

Analyt	Mittelwert [µg/kg]		RSD [%]		rob. Mittel- wert RV [µg/kg]	robuste Standard- abweich. RV [%]	z-Score, berechnet nach Horwitz		Z-Score, berechnet über robuste Standard- abweichung	
Monocrotalin- NOX	44	45	3,6	4,7	33,2	8,6	1,5	1,3	1,3	1,4
Retrorsin	222	239	3,5	7,2	199,4	62,8	1,1	0,4	0,4	0,6
Retrorsin-NOX	161	155	1,5	6,3	118,5	25,5	1,6	1,7	1,7	1,4
Seneciphyllin- NOX	44	41	6,0	7,2	55	22,7	-0,9	-0,5	-0,5	-0,6
Heliotrin-NOX	82	79	1,8	6,3	68,4	15,1	0,9	0,9	0,9	0,7
Senecionin	112	112	9,7	8,4	86,9	27,1	1,3	0,9	0,9	0,9
Senecionin- NOX	59	52	10	11	34,5	8,5	3,2	2,9	2,9	2,1
Lasiocarpin- NOX	57	59	5,5	6,5	56,6	10,6	0,0	0,0	0,0	0,2

schwarze Werte: Offline-Verfahren, grüne Werte: Online-Verfahren





- ✓ an das Team des Fachbereichs Rückstände und Kontaminanten der Institut Kirchhoff Berlin GmbH
- ✓ an Axel Semrau GmbH, insbesondere Marco Nestola, für die applikative und technische Unterstützung
- ✓ an Sie für Ihre Aufmerksamkeit



