

Analytik von Pyrrolizidinalkaloiden und deren N-Oxiden

Annette Meyer*, Talke Marschall, Simone Staiger
Eurofins WEJ Contaminants GmbH, Neuländer Kamp 1, 21079 Hamburg

Einleitung

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenmetabolite, die der Pflanze vor allem als Fraßschutz dienen. Vornehmlich gehören Pyrrolizidinalkaloid-haltige Pflanzen den Familien der Korbblütler (*Asteraceae*), der Borretschgewächse (*Boraginaceae*) und der Hülsenfrüchtler (*Leguminosae*) an^[1]. In die Nahrungskette des Menschen gelangen sie über Pollen und Honig oder in Extrakten und Ölen in Naturheilmitteln oder neuartigen Lebensmittelzutaten^[2].

Während einige Insekten an PAs angepasst sind und sie in eigene Fraßgifte umwandeln können, wirken sie auf Säugetiere toxisch.

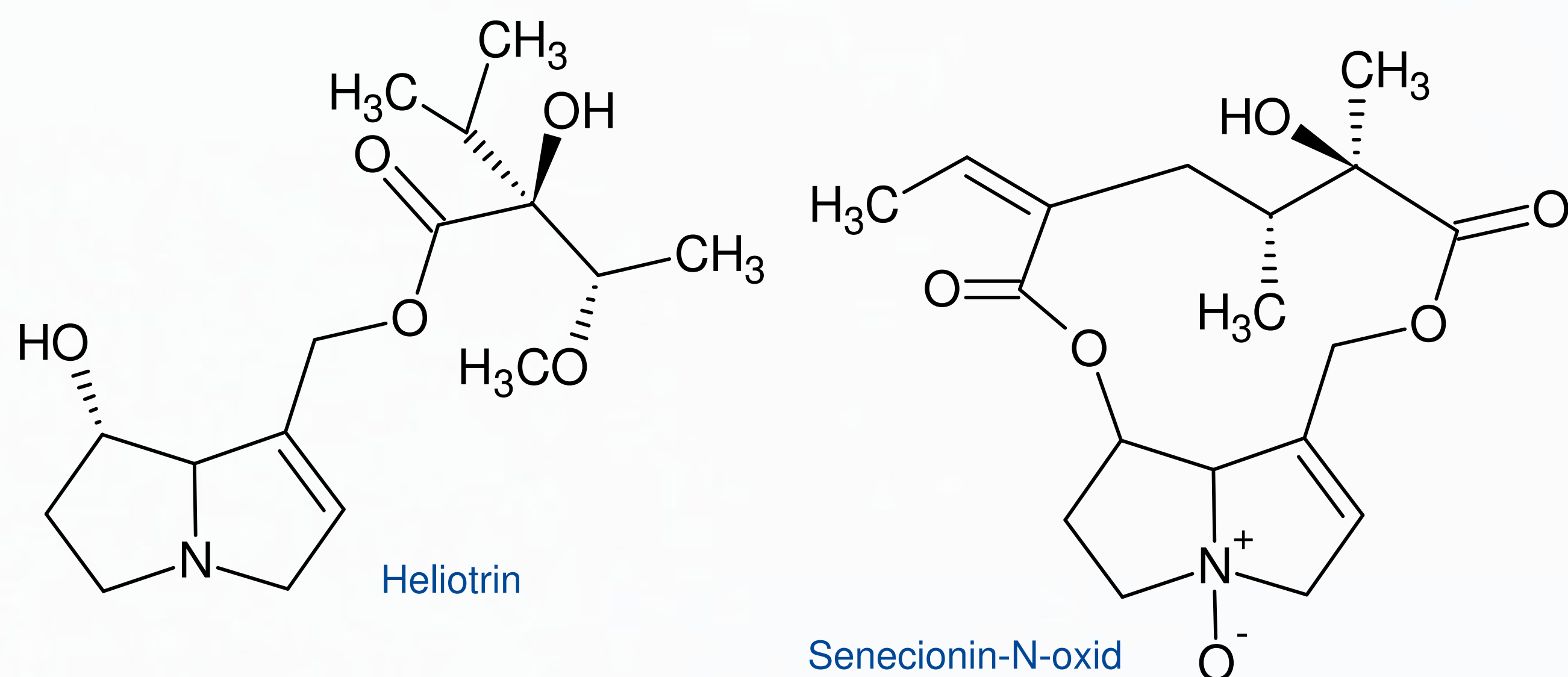


Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobaea*)
<http://www.landwirtschaftskammer.de/fotos/original/jakobskreuzkrautblueten.jpg> (Foto: Dr. Marianne Klug)

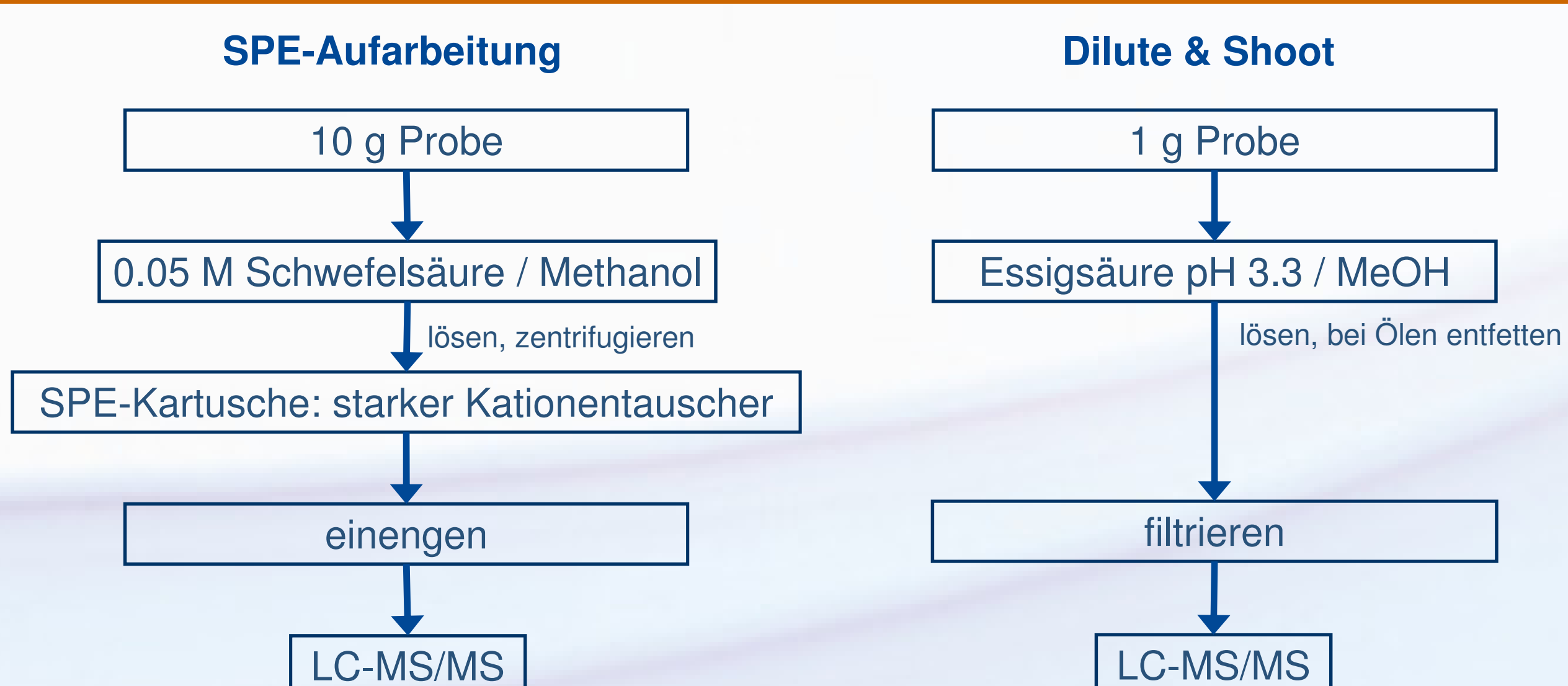
Insbesondere für Pferde sind diese sekundären Pflanzenstoffe gefährlich (Schweinsberger Krankheit), aber auch beim Menschen sind akute Vergiftungen (veno-occlusive disease) und chronische Schäden bekannt: PAs sind hepatotoxisch und werden als genotoxisch und kanzerogen betrachtet. Einen Grenzwert gibt es für medizinische Produkte, nicht jedoch für Nahrungsmittel. Das BfR empfiehlt bei einer chronischen Exposition einen Grenzwert von 7 ng/kg Körpergewicht^[3]. Bei einem Erwachsenen mit 70 kg Gewicht und einer täglichen Honigportion von 20 g entspräche dies einer Summe von maximal 25 µg/kg PA und PANO im Honig.

Strukturell handelt es sich bei PAs um 1,2-Dehydropyrrolizidinderivate mit einem Necin-Grundgerüst. Die Ester können als Mono-, Di- oder cyclische Ester auftreten.

Pyrrolizidinalkaloid-N-oxide (PANO) können im menschlichen Körper zu PA reduziert werden und sind daher in die toxikologische Bewertung mit einzubeziehen.



Methode



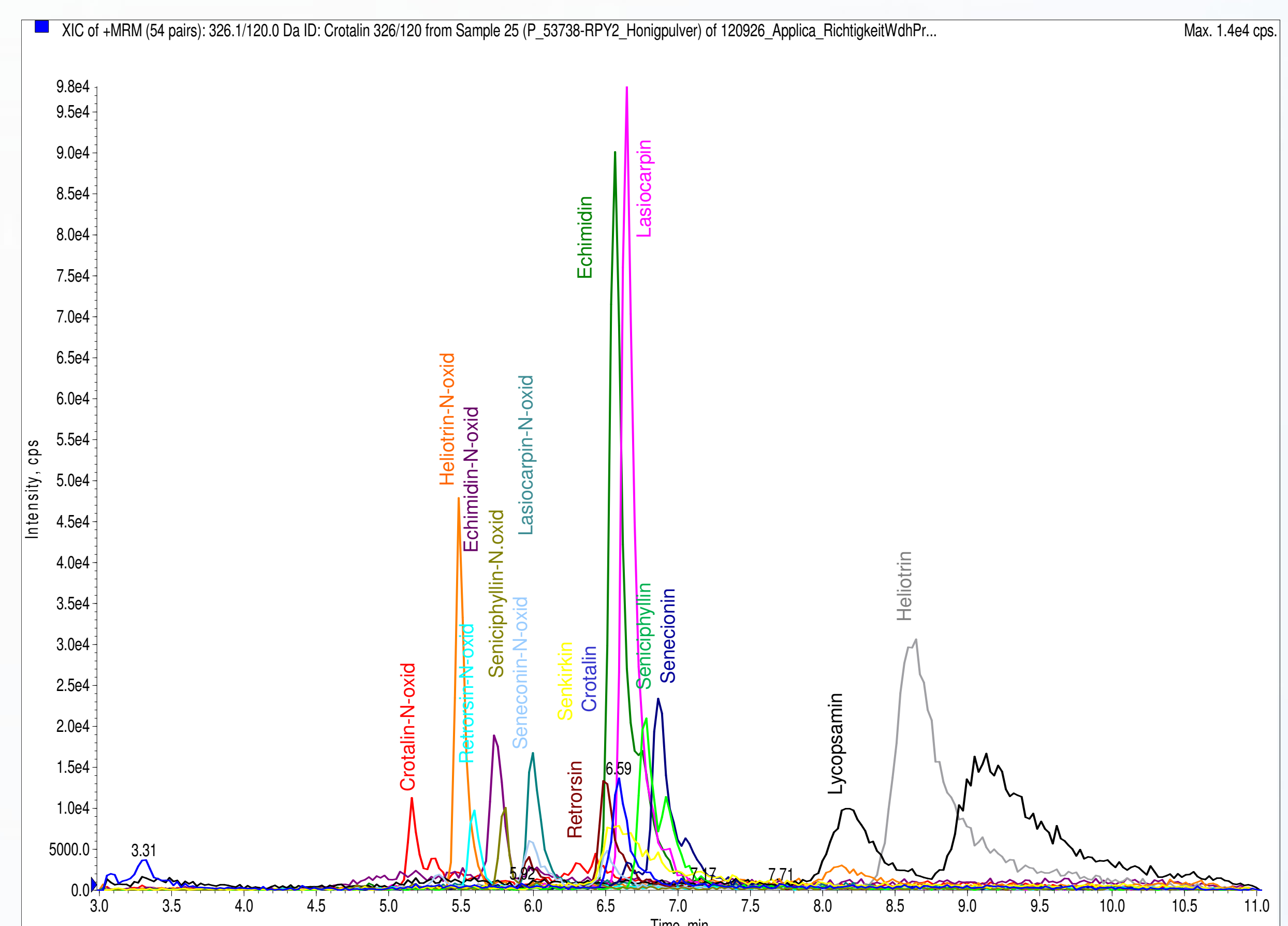
Es wurden zwei Aufarbeitungen getestet: ein einfacher Dilute & Shoot-Ansatz und eine SPE-Aufarbeitung angelehnt nach^[4].

Für PA und PANO wurden je drei Ionenübergänge (MRM) optimiert. Die Messungen wurden auf einer HPLC 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn) mit einem Massenspektrometer API 4000 (ABSciex, Darmstadt) durchgeführt.

Säule	Synergi Polar RP, 150x3mm, 5µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Laufmittel	MeOH, (NH ₄) ₂ CO ₃ -Puffer pH 6, Gradientenprogramm
Fluss	600 µL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Temperatur	40 °C

Die Auswertung erfolgt über die Wiederfindung einer aufdotierten Wiederfindungsprobe, da keine isotoptenmarkierten Standards zur Verfügung stehen.

Ergebnisse



Honigpulver, mit 1ppb aufdotiert, Dilute&Shoot, auf Synergi Polar RP

Das obige Chromatogramm zeigt ein typische Chromatogramm eines Standards. Lediglich spät eluierende PA zeigen ein leichtes Tailing. Die Isomeren Senecionin-N-oxid und Retrorsin sind basisliniengetrennt.

Die Methodenentwicklung zeigte, dass Öle mit dem Dilute&Shoot-Ansatz gute Bestimmungsgrenzen erreichen. Die Honigmatrix zeigte größere Variabilität und je nach Honig muss eine zusätzliche Aufreinigung über eine SPE-Kartusche erfolgen, um befriedigende Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

Die Bestimmungsgrenzen der folgenden Tabelle wurden im Rahmen einer Validierung durch eine 7fache Bestimmung in der Nähe der Nachweisgrenze ermittelt:

Analyt	CAS-Nr.	LOQ [µg/kg]		
		Öl	Honig	Honig (SPE)
Crotalin	315-22-0	1	1	1
Crotalin-N-oxid	35337-98-5	1	10	1
Echimidin	520-68-3	1	1	1
Echimidin-N-oxid		1	5	1
Heliotrin	303-33-3	1	1	1
Heliotrin-N-oxid	6209-65-0	1	5	1
Lasiocarpin	303-34-4	1	1	1
Lasiocarpin-N-oxid	127-30-0	1	2	1
Lycopsamin	10285-07-1	1	1	1
Retrorsin	480-54-6	1	2	1
Retrorsin-N-Oxid	15503-86-3	1	5	1
Senecionin	130-01-8	1	1	1
Senecionin-N-oxid	13268-67-2	1	2	1
Seniciphyllin	480-81-9	1	1	1
Seniciphyllin-N-oxid	38710-26-8	1	1	1
Senkirkin	2318-18-5	2	1	2

Die Wiederholpräzision beträgt im Konzentrationsbereich von 1 µg/kg für die Matrix Öl 5-15%, für die Matrix Honig 5-20% bzw. 5-25% (SPE-Aufarbeitung).

Reale Proben sind vor allem mit Lycopsamin belastet, es treten aber auch Echimidin, Senecionin, Seniciphyllin und Retrorsin auf. Die Summe der Pyrrolizidinalkaloide liegt bei positiven Proben meist im Bereich von 5-25 µg/kg.

Schlußfolgerung

Das hier vorgestellte Verfahren ermöglicht die Analytik von 16 Pyrrolizidinalkaloiden und ihren N-Oxiden in einem Lauf innerhalb von 15 min im Bereich von 1 µg/kg. Da Pyrrolizidinalkaloide auch in Blattsalaten, Kräutertees und Milch enthalten sein können, ist eine Erweiterung der Methode auf diese Matrices in Planung.

Literatur

- [1] <http://www.bfr.bund.de/cm/343/analytik-und-toxizitaet-von-pyrrolizidinalkaloiden.pdf> (vom 11.8.11, Zugriff am 6.11.2012)
 [2] http://www.bfr.bund.de/cm/343/raffiniertes_echium_oel.pdf (2008/558/EG vom 27.6.2008, Zugriff am 6.11.2012)
 [3] <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-pyrrolizidinalkaloiden-in-lebensmitteln.pdf> (vom 3.2.12, Zugriff am 6.11.2012)
 [4] Dübecke, A., Beckh, G., Lüllmann C. *Food Add. Cont.* 2011. p.348-358.

