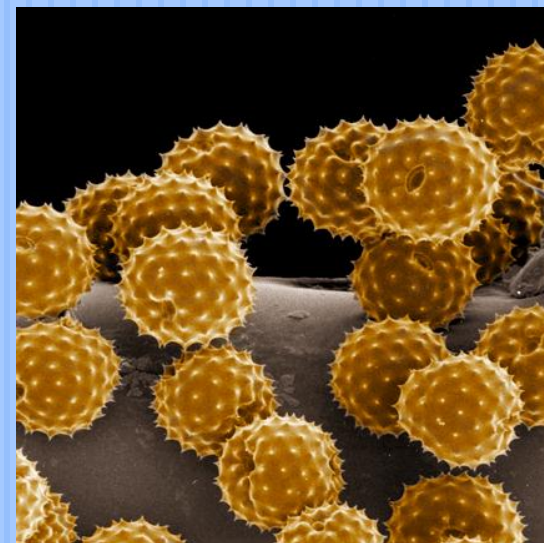


Pyrrrolizidinalkaloide in der Lebensmittelüberwachung

Untersuchung in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS und GC/MS

Forum für Lebensmittelsicherheit, Waldbronn
30. und 31. Januar 2013



Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
Münsterland-Emscher-Lippe (AÖR)

Überblick

2

- Pyrrolizidinalkaloide sind 2010 in den Fokus der Lebensmittelüberwachung gelangt
- 2011 gab es in Deutschland am BfR ein entsprechendes Expertentreffen
- Insbesondere liegt der Fokus zurzeit auf Honig
- um das Vorkommen von PA weiß man recht lange
- Methoden zur Messung wurden bereits Anfang der 1980er Jahre beschrieben



Pyrrrolizidinalkaloide

3

- Pyrrrolizidinalakloide (PA) sind sekundärmetbolite von Pflanzen
- Sie dienen der Pflanze als Fraßschutz
- Vorkommen in *Boraginaceae*, *Asteraceae* (*Senecioneae*, *Eupatorieae*), *Fabaceae* (Gattung *Crotolaria*)



Echium vulgare
Natternkopf



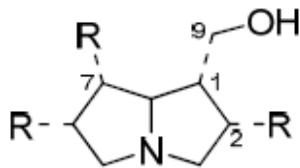
Senecio jacobaea
Jakobs-Geiskraut

- ca. 6000 Pflanzenarten weltweit können PA enthalten
- ca. 3 % aller Blütenpflanzen
- Hauptsächlich in Samen und Blütenteilen der Pflanzen, auch in Blättern, Stängeln und Wurzeln

chemische Struktur der PA

4

- PA sind Ester von Necinbasen mit sog. Necinsäuren
- Bestehen aus einem bicyclischen Doppelringssystem mit einer Hydroxymethyl-Gruppe an C-1 → **Necinbase**
1-Hydroxymethylpyrrolizidin-Derivate



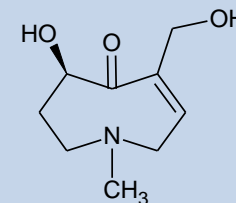
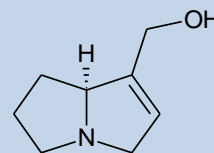
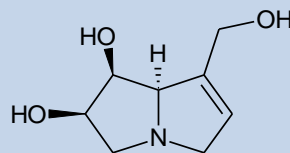
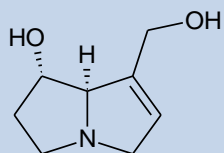
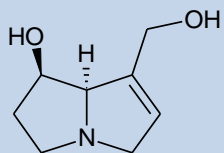
R = H or -OH

- Veresterung kann mit Mono- und Dicarbonsäuren erfolgen → **Necinsäuren**



Einteilung der PA

5



Retronecin-
Typ

z.B.

Retrorsin,
Echimidin,
Senecionin

> 300

Heliotridin-
Typ

z.B.

Heliotrin,
Lasiocarpin

> 20

Crotanecin-
Typ

z.B.

Anacrotin

> 20

Supinidin-
Typ

z.B.

Supinin

> 20

Otonecin-
Typ

z.B.

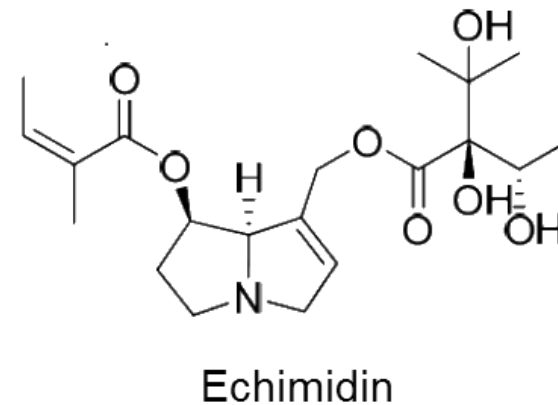
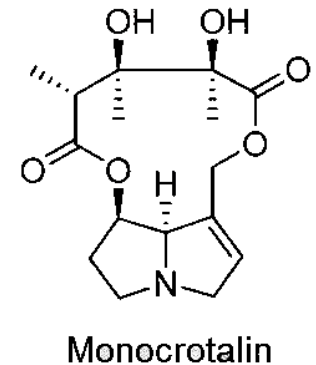
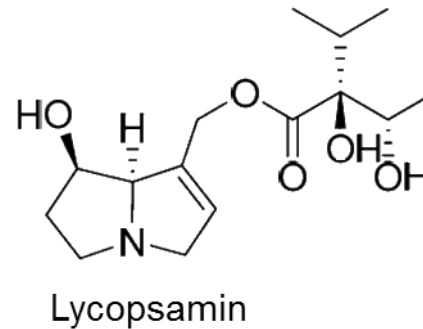
Senkirkin,
Otosenin

> 30

Strukturbeispiele PA

6

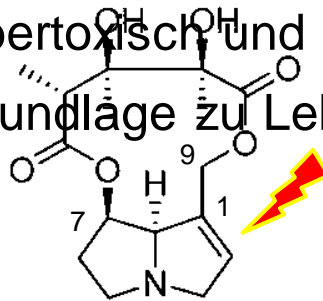
- enorme Strukturvielfalt durch Kombination von Necinbasen mit diversen Necinsäuren
- Sowohl als Monoester, Diester oder macrocyclische Strukturen
- z.Zt. sind ca. 600 PA bekannt
- Koexistenz in 2 Formen:
 - tertiäre Base
 - N-Oxid (PANO)



Toxikologie

7

- toxikologisch relevant sind vor allem PA mit einer Unsättigung in 1,2-Position am Necin-Grundgerüst
- Weiterhin gehören Veresterungen der OH-Gruppe an C-9 und/oder an C-7 zum toxischen Prinzip dieser Verbindungen
- Diese wirken teilweise verstärkend
- Cyclische Diester sind oft toxischer als offenkettige
- PA sind genotoxisch, lebertoxisch und cancerogen
- Dennoch ist die Datengrundlage zu Lebens- und Futtermitteln sehr lückenhaft



Monocrotalin

Vorkommen in Lebensmitteln

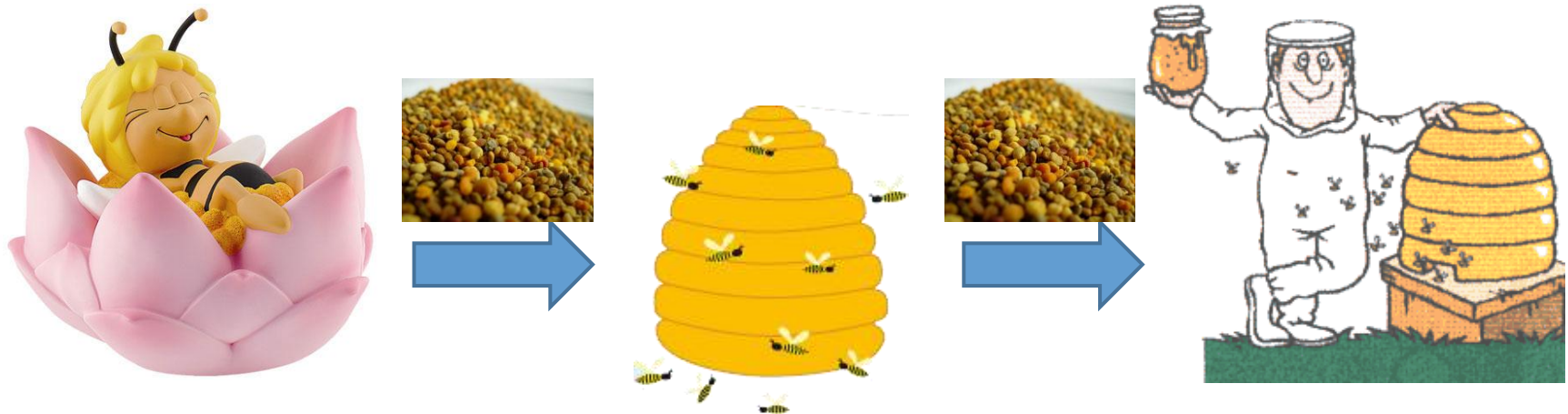
8

- PA können in unterschiedlichen Lebensmitteln vorkommen
- Die meisten Daten über Vorkommen und Gehalte existieren zur Zeit für Honige
- Über andere Lebensmittel ist nichts bis wenig bekannt
- Über das Vorkommen in Futtermitteln existieren zur Zeit Daten aus den Niederlanden (RIKILT) in Luzerne
- Über ein mögliches Carry-Over in z.B. Milch oder Eier fehlen entscheidende Daten bzw. belastbare Studien
- Vorkommen können PA auch in Kräutertees oder Kräutermischungen
- Oder Salaten (selten), optische Kontrolle



Eintrag in Lebensmittel und Futtermittel

- Verunreinigung mit PA-haltigen Pflanzen/-teilen (z.B. Tee, FM, Kräuter, Öle, Gemüse, Salat)
- über PA-haltigen Pollen in Honig beispielsweise
- PA-haltiger Pollen
- Carry-Over in Lebensmittel tierischer Herkunft (Milch, Käse, Eier, Fleisch) ?



Grenzwerte ?

10

- Aktuell gibt es noch keine rechtlich festgelegten Grenzwerte bezüglich Lebensmitteln
- Regelungen für Arzneimittel existieren hier schon seit mehr als 15 Jahren
- EFSA-Gutachten und BfR-Stellungnahmen aus 2011
- BfR: 0,007 µg ungesättigter PA pro kg Körpergewicht sollten nicht überschritten werden
- d.h. 0,46 µg PA absolut pro Tag für eine 60 kg schwere Person
- Die EFSA beschreibt in Ihrem Gutachten ein mögliches Risiko für Kleinkinder und Kinder die viel Honig verzehren
- EFSA: BMDL₁₀ 70 µg/kg KG/d



Regelungen in Arzneimitteln

11

Regulierung	Grenzwerte/Regelung
Dutch Committee on Toxicity - 2008	0,1 µg PA/kg KG/Tag
FSANZ* - 2001	1 µg PA/kg KG/d
Niederlande - 2001	1,0 µg PA/kg VSD 0,43 mg/kg KG/d
Deutschland (Arzneimittel) – 1992 in der Schweiz analog	1,0 µg PA/d für 6 Wochen 0,1 µg/d (bei Schwangerschaft und Stillen Nulltolerenz)

*Food Standards Australia New Zealand



- Es gibt zur Zeit Methoden sowohl für GC als auch für HPLC-MS/MS
- Durch die Toxizität der Substanzen müssen extrem kleine LOD und LOQ erreicht werden
- Es sind lediglich HPLC-MS/MS und GC/MS Anwendungen empfindlich genug
- Es haben sich zurzeit zwei Ansätze durchgesetzt
 - Targetanalytik mittels LC-MS/MS
 - summarische Erfassung mittels GC/MS als Retronecin-Grundkörper



- Im CUA-MEL wird eine modifizierte Methode des RIKILT aus den Niederlanden verwendet
- Diese wurde für die automatisierte SPE entsprechend modifiziert
- Kalibriert wird mittels matrix matched Kalibration
- Die Verwendung von Heliotrin als ISTD hat sich nicht als gut geeignet erweisen für alle Substanzen
- Eine Korrektur über einen MM-Standard kann funktionieren, da die Herstellung ohne automatisierte SPE extrem zeitintensiv ist
- Verfügbarkeit an Standardsubstanzen sehr begrenzt (13 verfügbar)
- Isotopen markierte Standards nicht verfügbar
- Matrixeffekte



Aufarbeitung Honig/Futtermittel

14

2 g Probe
PP-Falcon-Tube

40 mL 2%ige Ameisensäure; 30 min Schüttler

Zentrifugieren: 3500/min; 15 min

5 mL entnommen; pH 10 mit Ammoniak (25%); Schütteln 15 min

Zentrifugieren; 3500/min; 15 min

SPE; Strata-X 33 μ Polymeric RP 60 mg/3mL
Eluat trocknen; Aufnahme in Wasser/MeOH 9/1 (v/v)

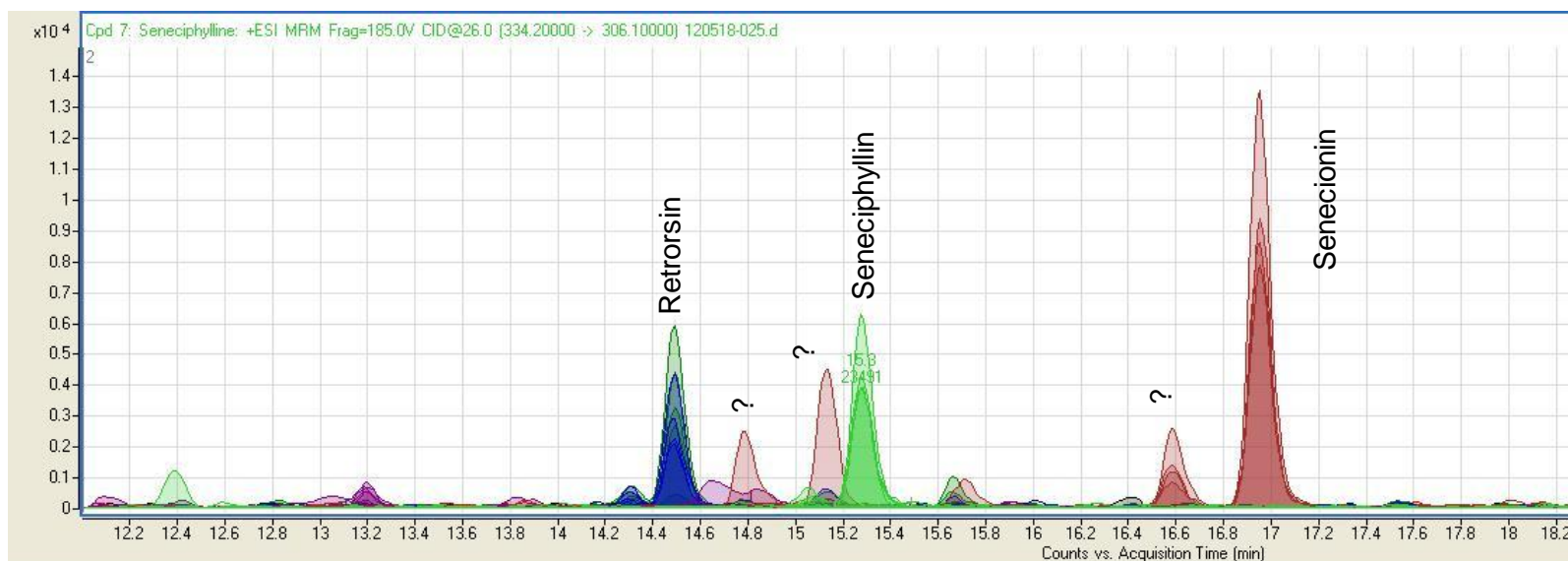
HPLC-MS/MS; 10 μ L



PA positive Honigprobe

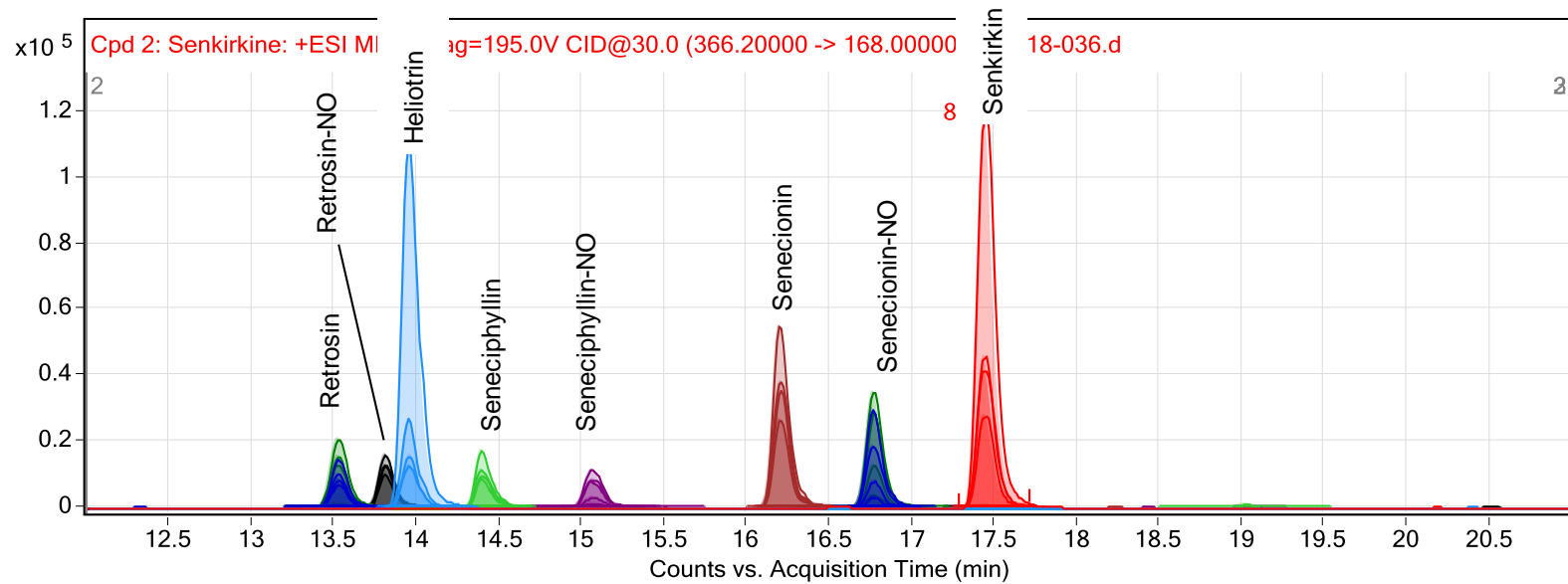
15

- Honige werden genauso aufgearbeitet wie Futtermittel
- Es muss lediglich zusätzlich mit 1 µm Glasfasermembranfilter filtriert werden



Lösungsmittelstandard

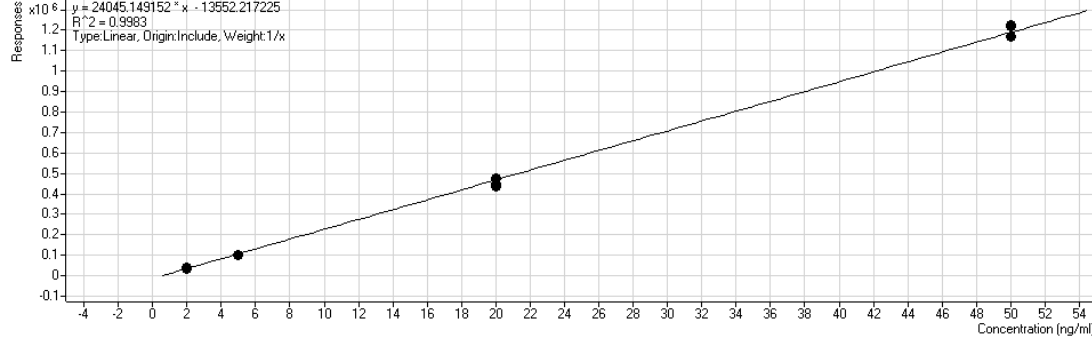
16



Matrix Matched Kalibration

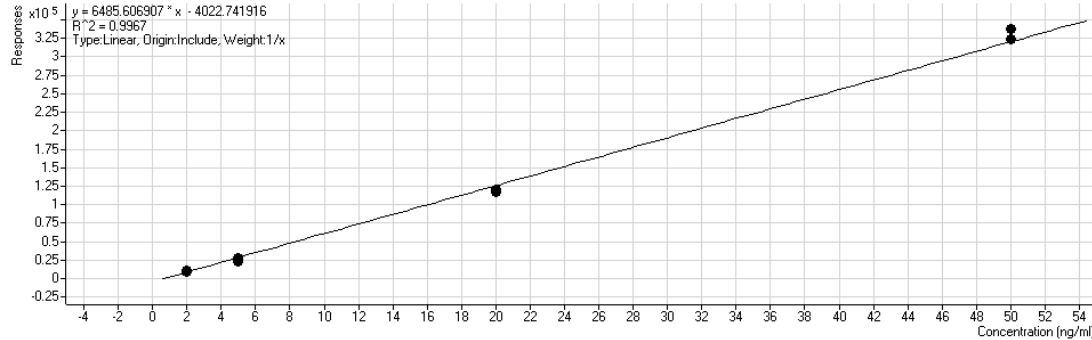
17

Retrorsin - 4 Levels, 4 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs
Responses $\times 10^6$
 $y = 24045.149152 \cdot x - 13552.217225$
 $R^2 = 0.9983$
Type:Linear, Origin:Include, Weight:1/x



Retrorsin

Retrosine NO - 4 Levels, 4 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs
Responses $\times 10^5$
 $y = 6485.606907 \cdot x - 4022.741916$
 $R^2 = 0.9967$
Type:Linear, Origin:Include, Weight:1/x



Retrosine-NO

Seneciphyllin - 4 Levels, 4 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs
Responses $\times 10^5$
 $y = 6732.635082 \cdot x - 4228.576395$
 $R^2 = 0.9967$
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x



Seneciphyllin



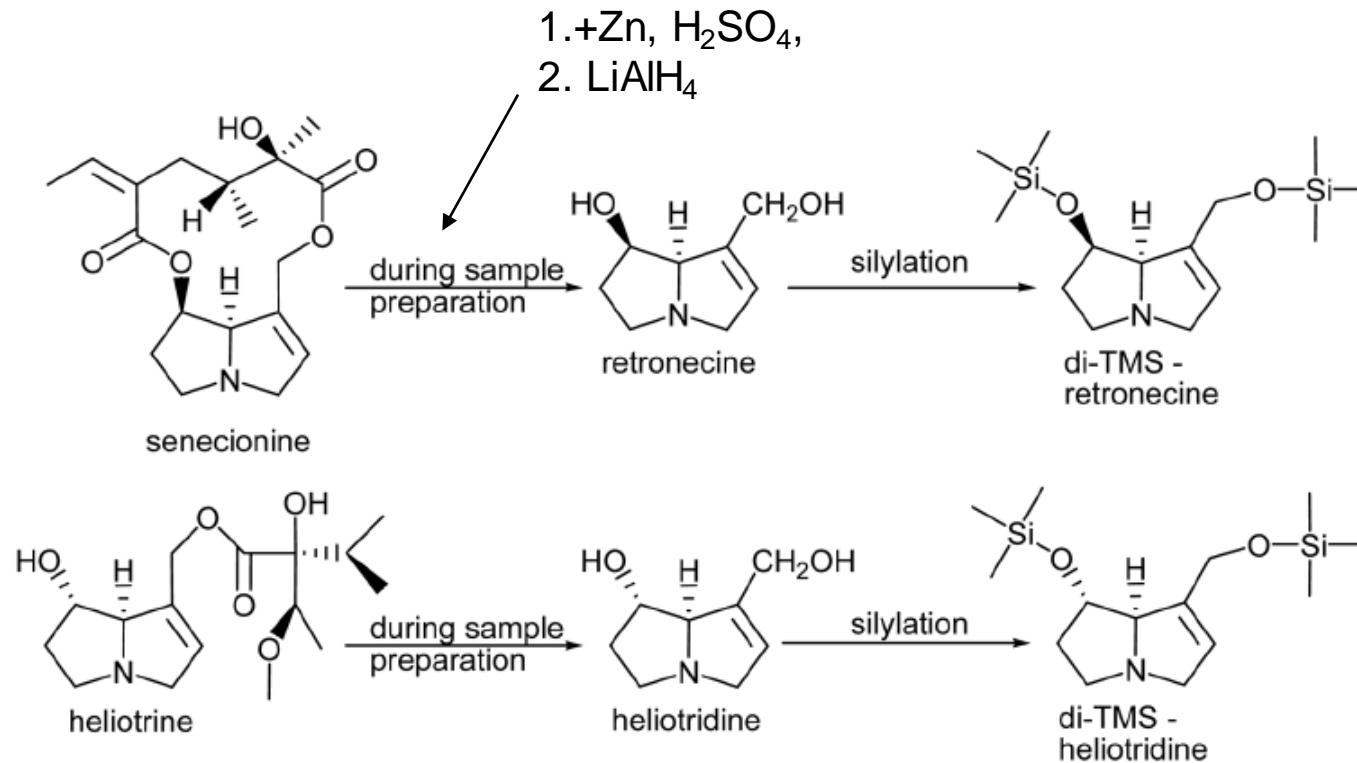
GC/MS Summenmethode

18

- Es wird im CVUA-MEL die Summarische Erfassung als Retronecin-Äquivalente durchgeführt nach der Methode von Kempf und Beuerle
- Non-Target-Screening
- Vorgesehen war eine Kalibration mit Einpunktkalibrierung
 - Erste Versuche mit kompletter Kalibriergeraden waren erfolgreich, aber aufwändig
- Interner Standard nicht ganz ideal, da er native Substanz vorkommen kann (außer Honig) → Doppeluntersuchung
- Insgesamt sehr aufwendiges Setup → schlecht für Routineuntersuchung
- Geringere Nachweisempfindlichkeit als LC-MS/MS LOQ ca. 10 µg/kg
- PA vom Otonecin-Typ werden nicht erfasst
- Zeitaufwand für 6 Proben 1 ½ bis 2 Tage



Analytik mittels GC Summenmethode



Kempf, M., et al., *Pyrrolizidine alkaloids in honey: risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry*. *Mol Nutr Food Res*, 2008. **52(10)**: p. 1193-200.



Setup GC/MS Summenmethode

20

20 g Probe lösen in 0,05 M H₂SO₄ + ISTD 2 µg/20 g

Zn-Reduktion

Zentrifugieren und Filtration

SPE auf SCX

Aufkonzentrierung

Reduktion mittel LiAlH₄ [3 h]; Kühlung erforderlich

Aufkonzentrierung

Derivatiseirung mittels MSTFA; GC-EI-MS (SIM)

Kempf, M., et al., Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2011. **28(3): p. 332 - 347.**



Verfügbare Standards

21

- Folgende Substanzen werden derzeit untersucht mit Targetanalytik

1	Echimidin
2	Heliotrine
3	Intermedin
4	Lycopsamin
5	Monocrotalin
6	Monocrotalin-NO
7	Retrorsine
8	Retrorsine-NO
9	Senecionine
10	Senecionine-NO
11	Seneciphylline
12	Seneciphylline-NO
13	Senkirkin



Probleme/offene Fragestellungen/Fazit

22

- Verfügbarkeit von Standardsubstanzen extrem begrenzt
- Keine Isotopen markierten Verbindungen vorhanden
- Belastbare Daten zu anderen Lebensmitteln als Honig gibt es kaum
- Carry-over (Milch, Eier, Fleisch...) ???
- Wie können aus Sicht der Lebensmittelüberwachung die erzeugten Daten bewertet werden ??
- Die Informationen beider Methodenansätze ergänzen sich
- Eine ohne das Andere ?
- Die aus toxikologischer Sicht benötigten LOQ sind technisch nicht realisierbar



