

Pyrrrolizidinalkaloide in Lebens- und Futtermitteln – Herausforderung an die Analytik

Dorina Bodi



Menge an potentiellen Analyten

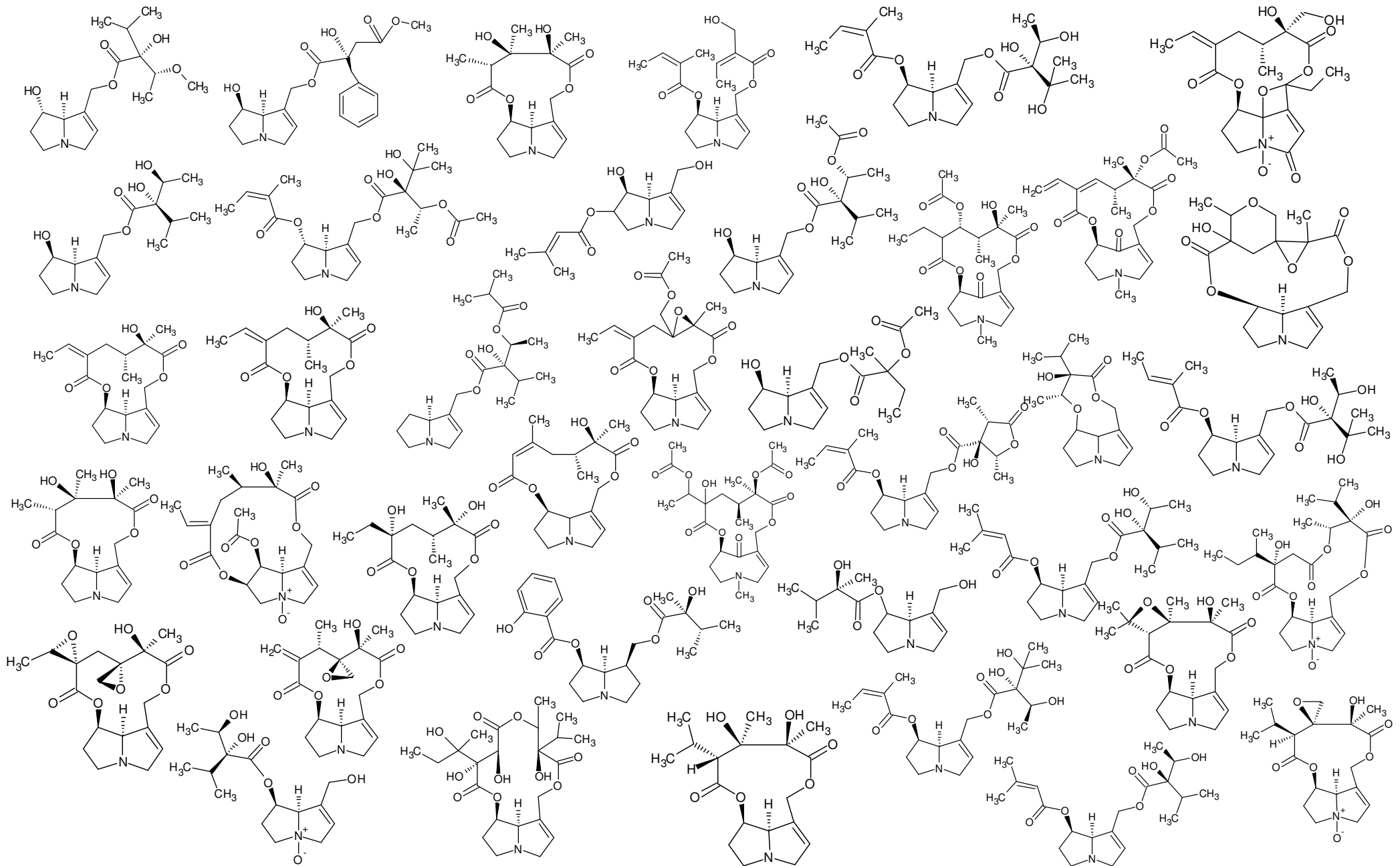
- 660 bekannte PA ↔ 30 Standardsubstanzen
- Analysenverfahren (indirekt/direkt)
- Relevanz (Vorkommen)



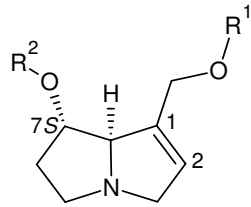
Beschaffenheit der Proben

- Einfluss des Probenmaterials auf die Analyse
- Homogenität (Charge – Stichprobe – Laborprobe)
- Probenahmeverfahren

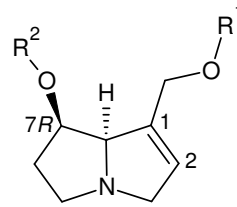
660 bekannte 1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide



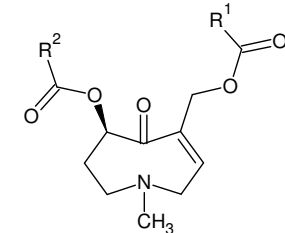
Pyrrolizidinalkaloid-Strukturen



Heliotridin-Typ

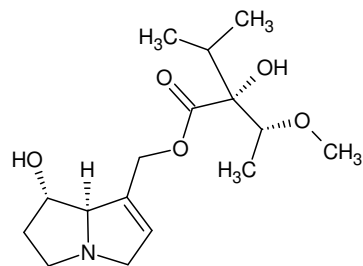


Retronecin-Typ



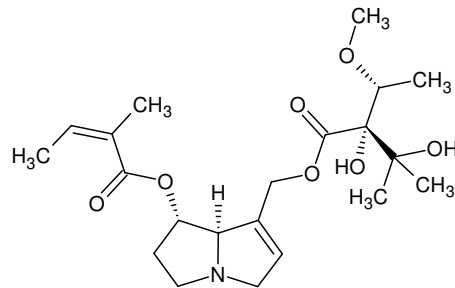
Otonecin-Typ

Monoester



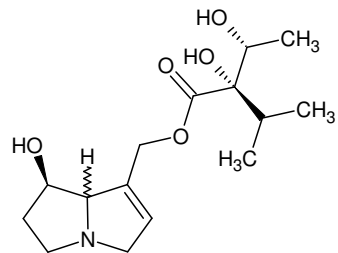
Heliotrin

Offenkettige Diester

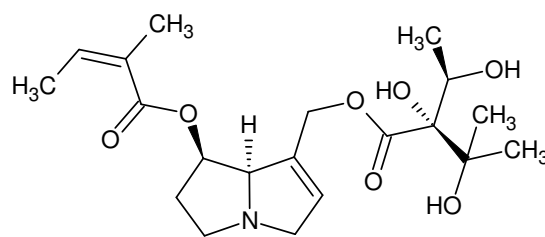


Lasiocarpin

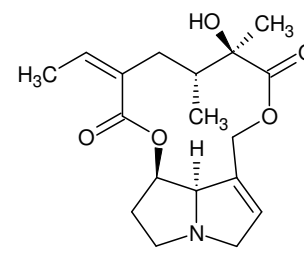
Zyklische Diester



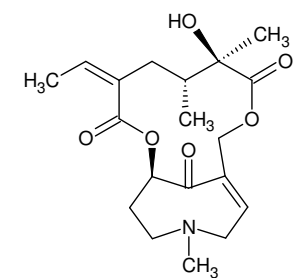
Lycopsamin



Echimidin



Senecionin



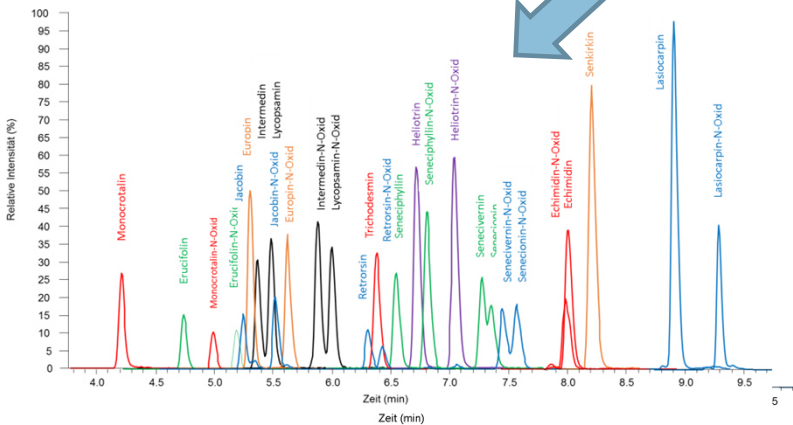
Senkirkin

direkte und indirekte Methoden – 2 Wege zum PA-Summengehalt

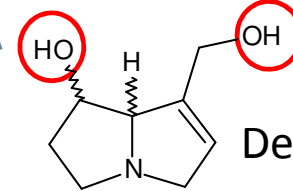
- direkte Bestimmung der Einzelsubstanzen mit HPLC-ESI-MS/MS (Betteridge et al., 2005)



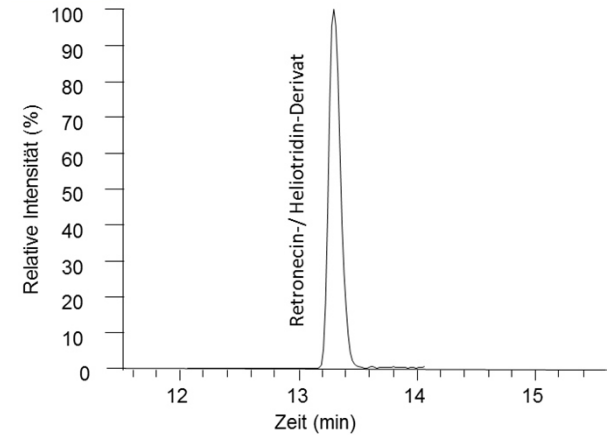
- indirekte Bestimmung über gemeinsames Grundgerüst mit GC-MS (Kempf et al., 2008) oder LC-MS/MS (Cramer et al., 2013)



Summenbildung



Derivatisierung



Retronecin 26 µg/kg

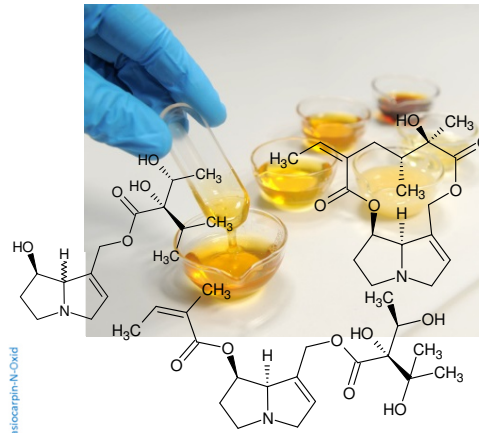
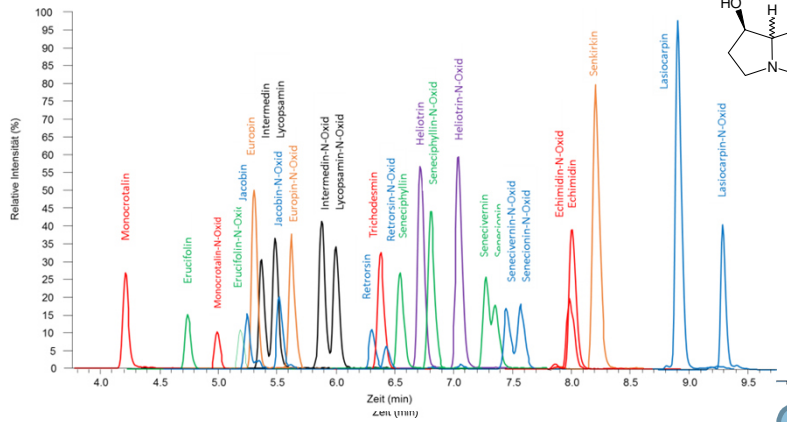
Re-Äquivalente

Lycoposamin	10 µg/kg	→	5,2 µg/kg
Echimidin	15 µg/kg	→	5,9 µg/kg
Seneciowernin	25 µg/kg	→	11,6 µg/kg
PA Gesamt	Σ=50 µg/kg	→	22,7 µg/kg

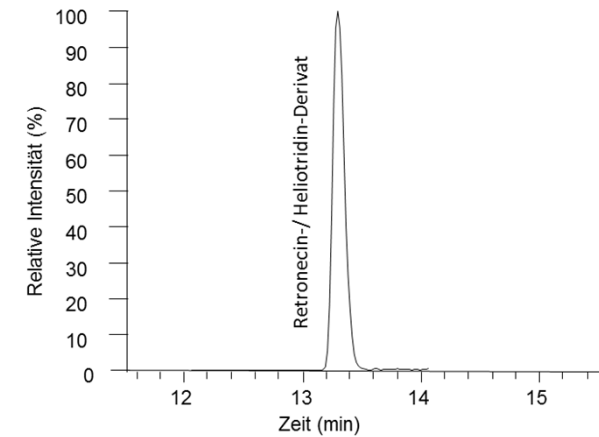
Summenbildung

direkte und indirekte Methoden – 2 Wege zum PA-Summengehalt

- direkte Bestimmung der Einzelsubstanzen mit HPLC-ESI-MS/MS (Betteridge et al., 2005)



- indirekte Bestimmung über gemeinsames Grundgerüst mit GC-MS (Kempf et al., 2008) oder LC-MS/MS (Cramer et al., 2013)



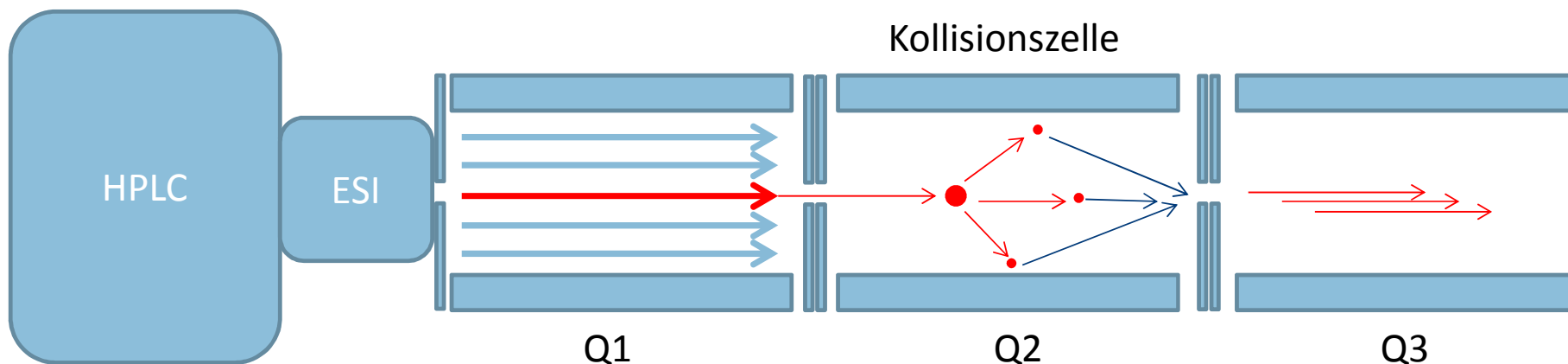
Vor- und Nachteile ?

- + sehr spezifisch
- + sensitiv
- + Strukturinformationen zu PA
- Standardsubstanzen erforderlich
- unbekannte PA vernachlässigt
- zeitintensive Auswertung

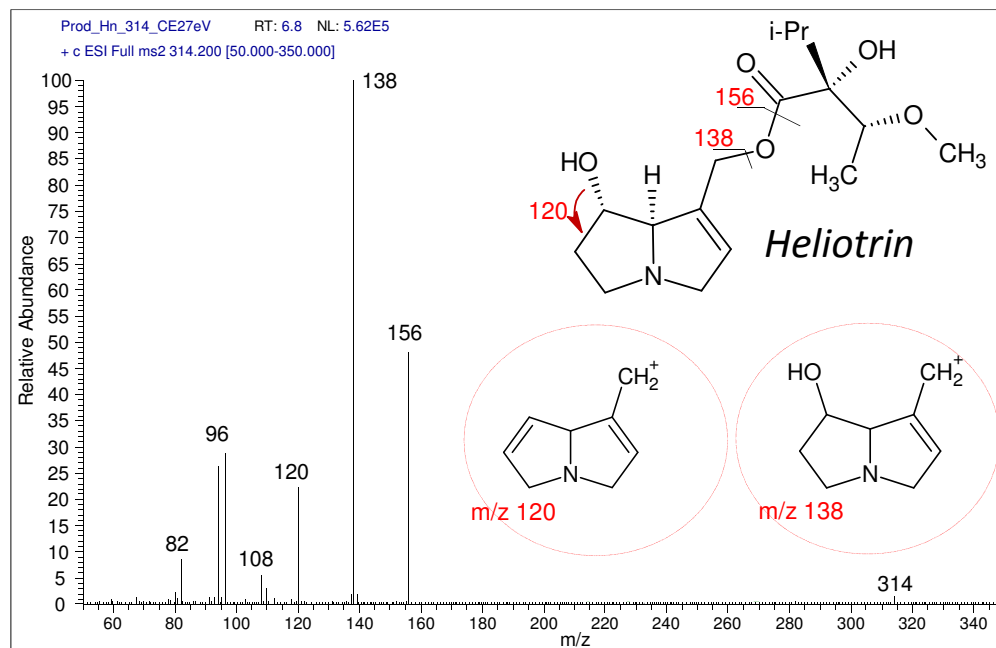
- + Großteil der relevanten PA erfasst
- + wenige Standardsubstanzen
- + Verwendung interner Standards (auch stabilisotopenmarkiert)
- keine Strukturinformationen zu PA
- aufwändige (doppelte) Probenaufarbeitung

BfR-Methoden: direkte Bestimmung der Einzelsubstanzen

- Detektionsmethode HPLC-ESI-MS/MS (Multi-Reaktion-Monitoring)



- **BfR-PA-Honig-1.0/2013** und **BfR-PA-Tee-1.0/2013** für 17 PA im internationalen Ringversuch erfolgreich validiert (2014 auf 28 PA erweitert)
- **BfR-PA-Mehl-1.0/2014** (28 PA)

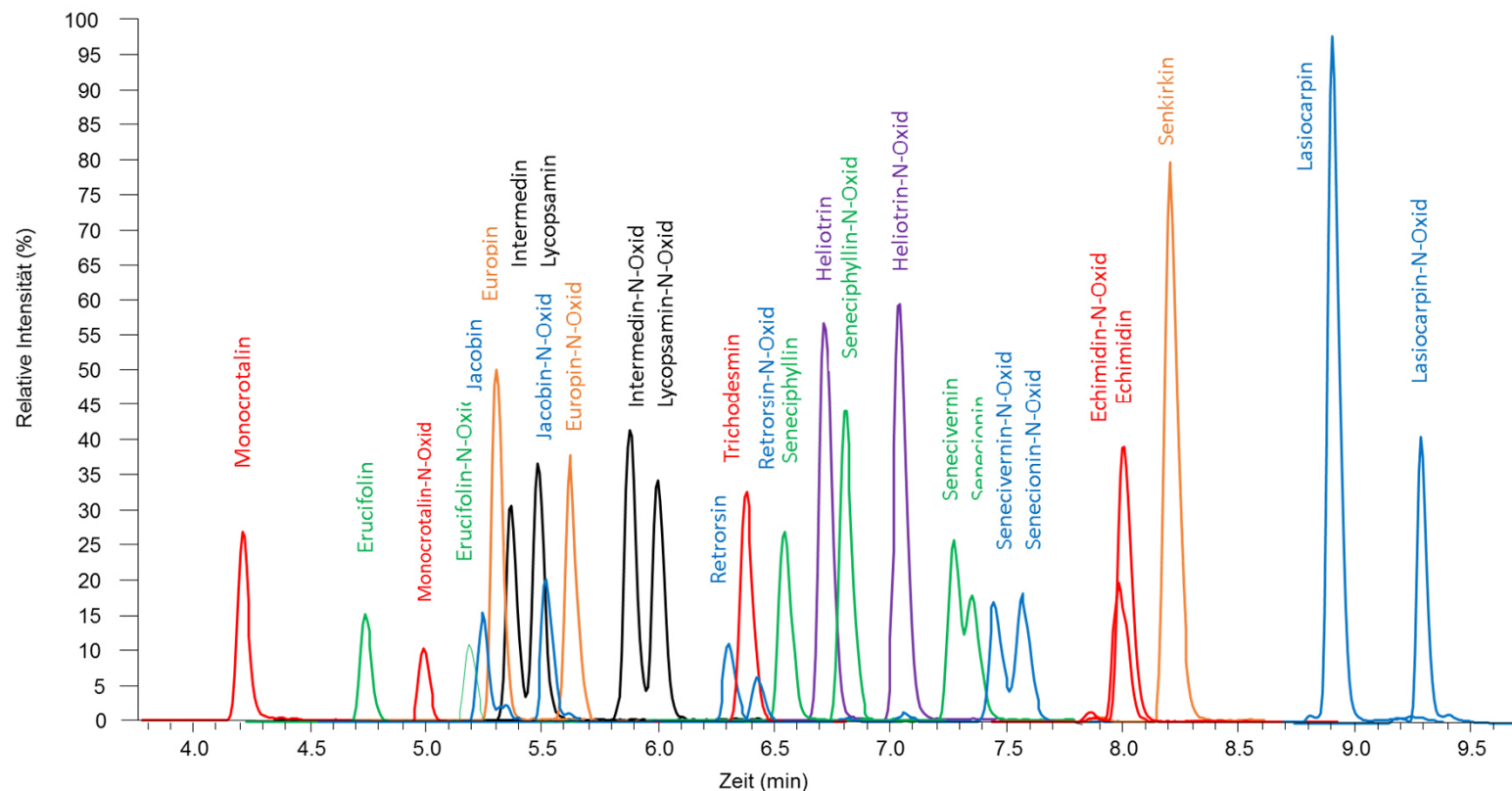


Und in der Praxis? - Vergleichbarkeit der Summengerhalte

variierendes Analytspektrum durch

- verbesserte Verfügbarkeit von Standardsubstanzen (BfR-PA-Tee-1.0/2013 mit 17 PA → BfR-PA-Tee-2.0/2014 mit 28 PA)
- Modifikation der Methode in den Laboratorien

→ Summengerhalte nicht vergleichbar! einheitliches Analytspektrum erforderlich!



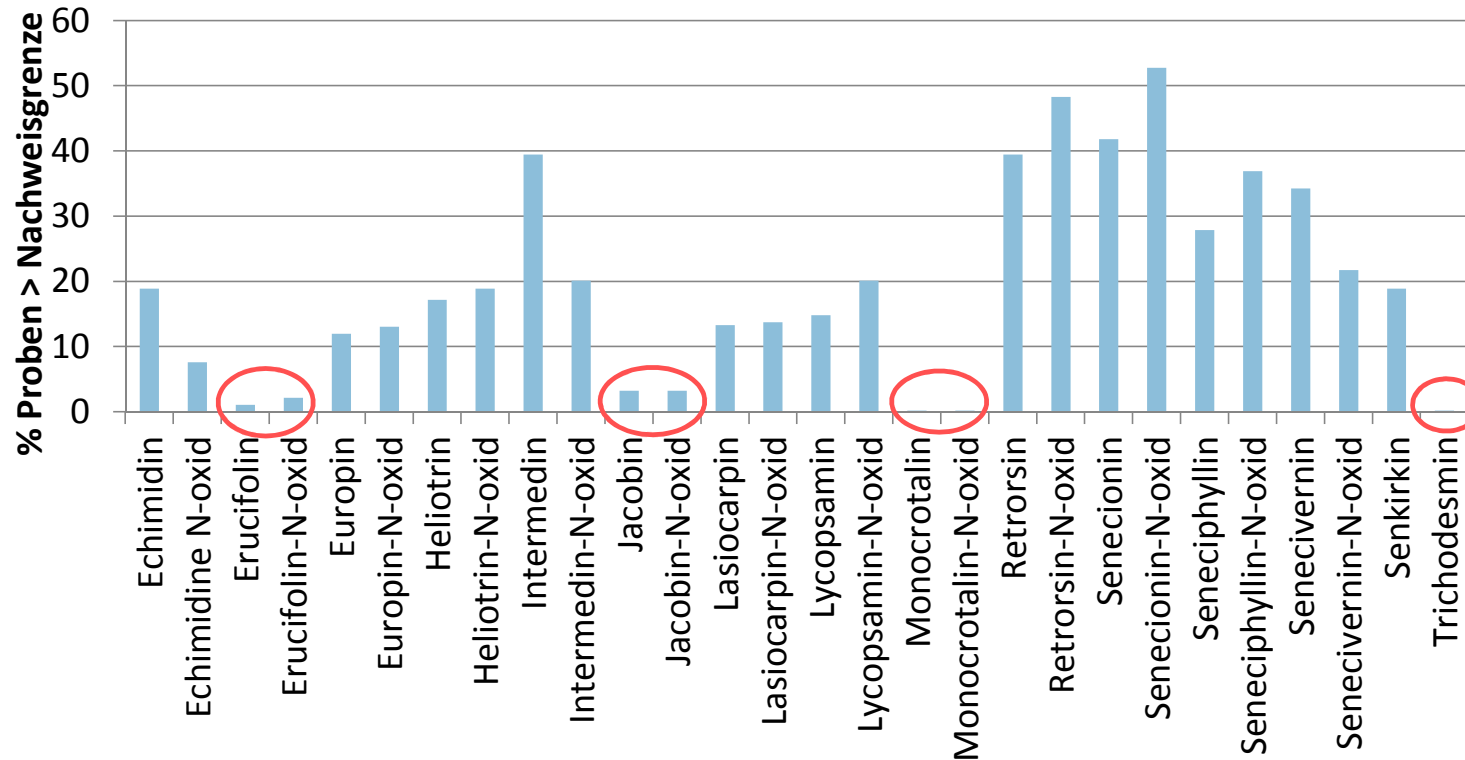
Einheitliches Analytspektrum zur Bildung des PA-Summengehalts

- Welche der vorhandenen Standards sind relevant ? (Beispiel Tee)

Auswertung der vorliegenden Gehaltsdaten nach

a) Häufigkeit

Datengrundlage
466 Teeproben
untersucht auf
17 bzw. 28 PA



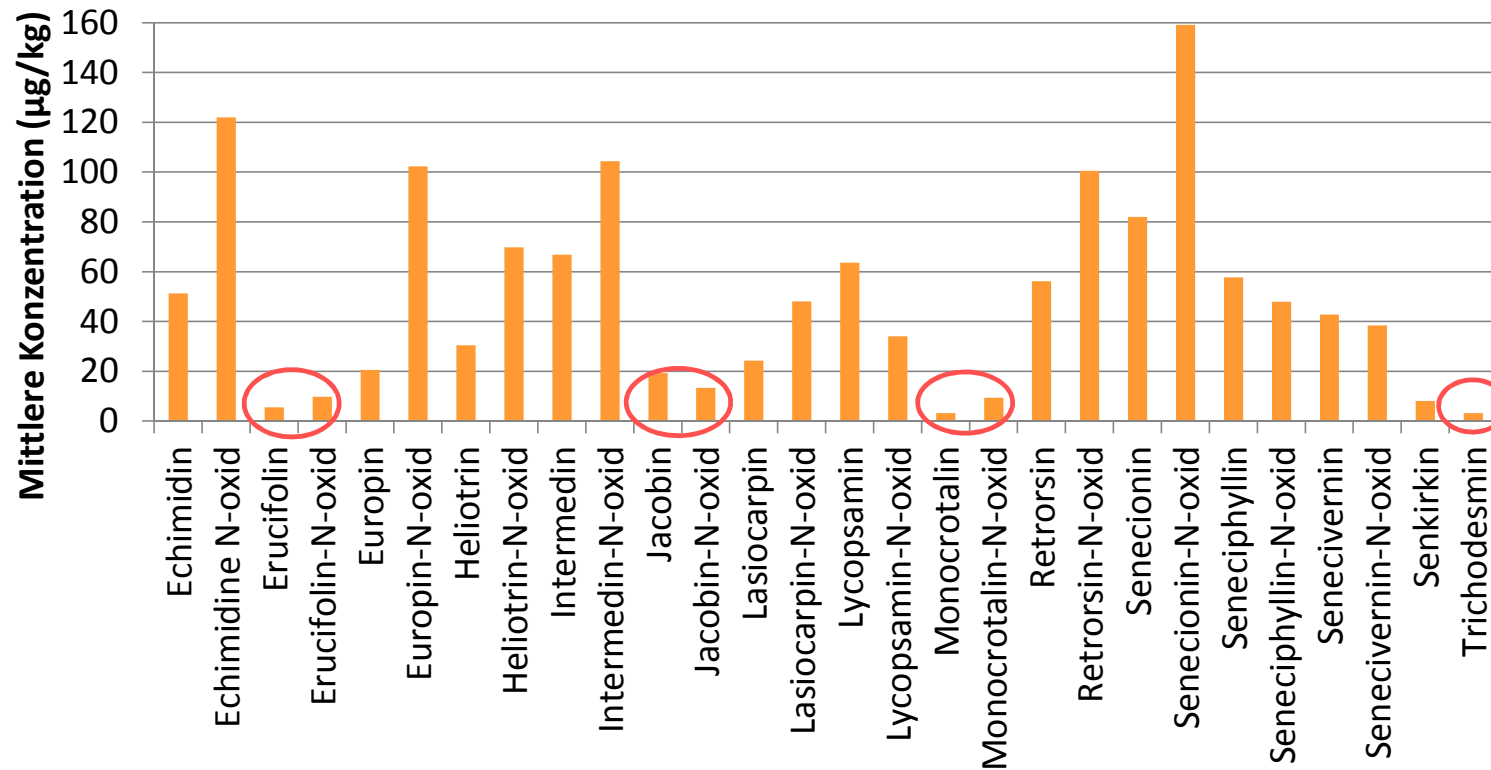
Einheitliches Analytspektrum zur Bildung des PA-Summengehalts

- Welche der vorhandenen Standards sind relevant ? (Beispiel Tee)

Auswertung der vorliegenden Gehaltsdaten nach

b) Höhe der Gehalte

Datengrundlage
466 Teeproben
untersucht auf
17 bzw. 28 PA



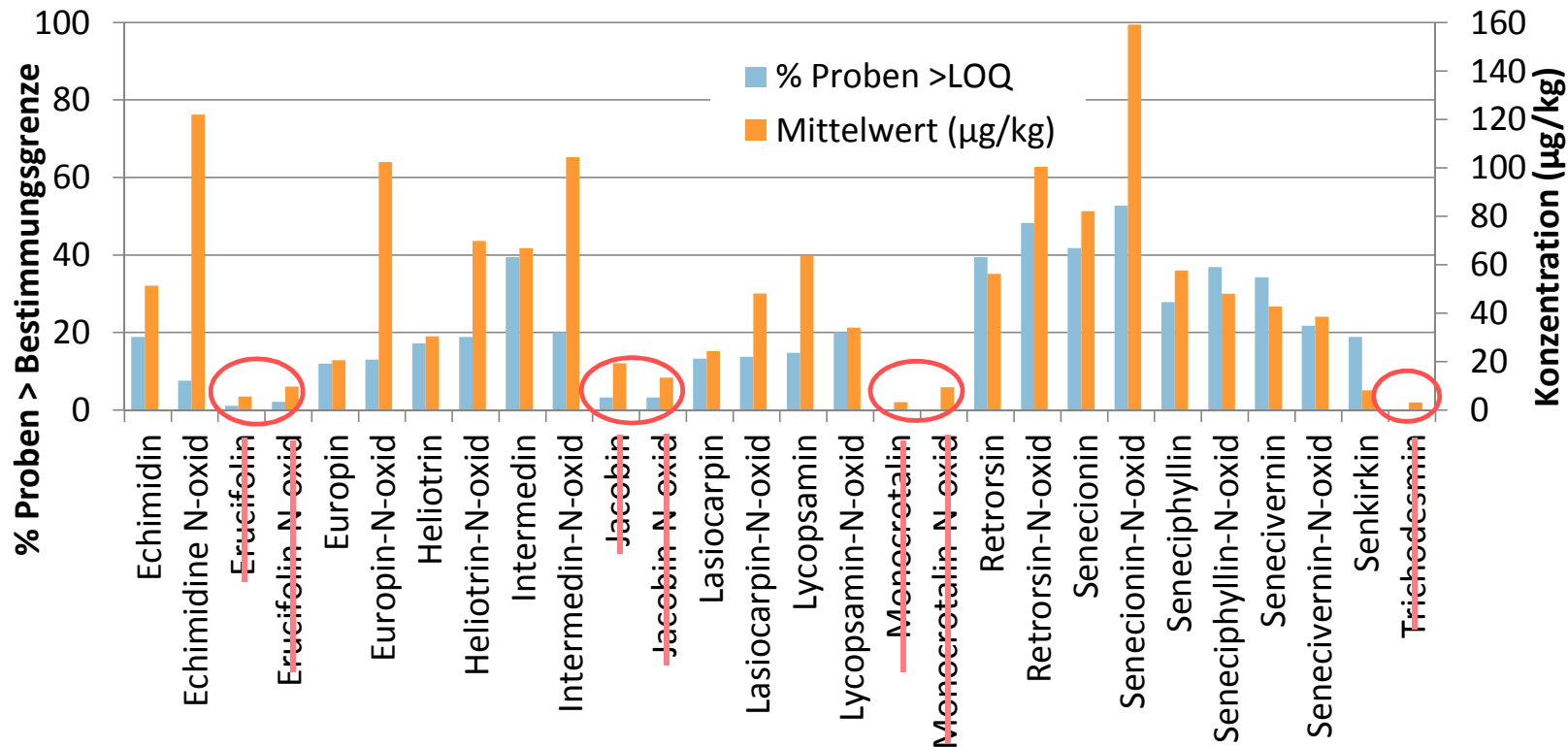
Einheitliches Analytspektrum zur Bildung des PA-Summengehalts

- Welche der vorhandenen Standards sind relevant ? (Beispiel Tee)

Auswertung der vorliegenden Gehaltsdaten nach

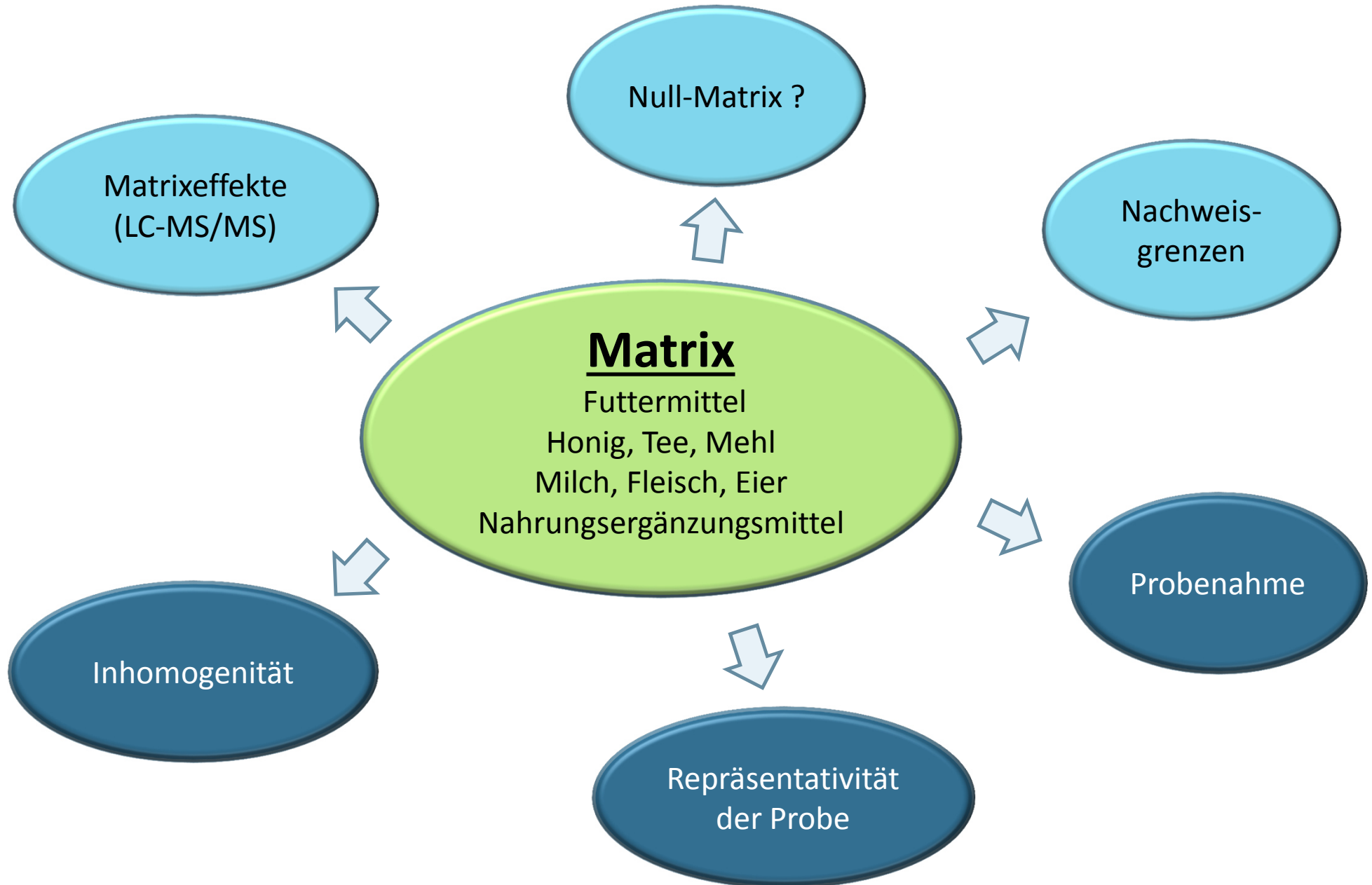
a) Häufigkeit und b) Höhe der Gehalte

Datengrundlage
466 Teeproben
untersucht auf
17 bzw. 28 PA

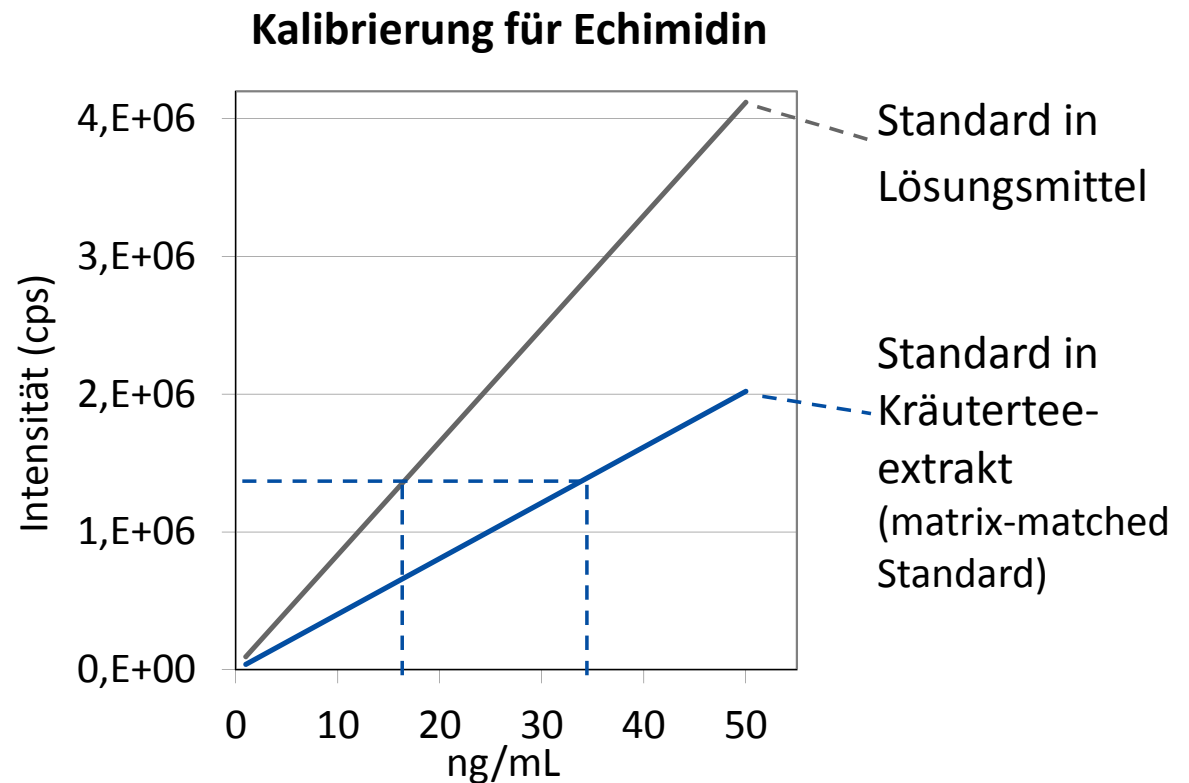
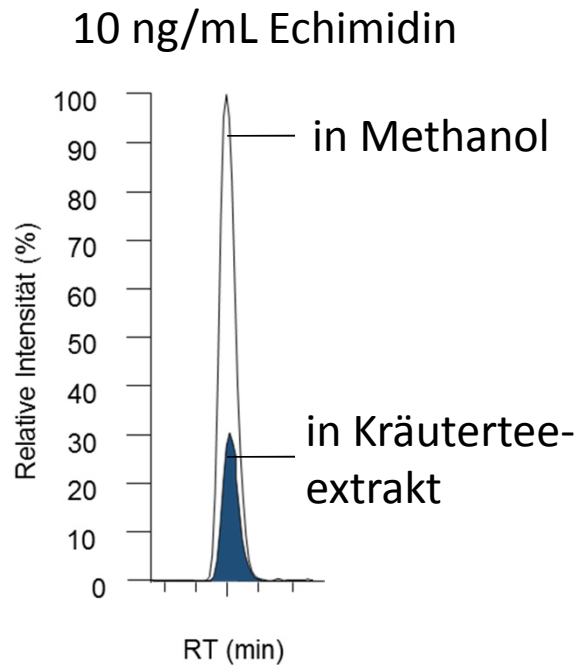


➔ **BfR-Empfehlung** : 21 PA zur Bildung des PA-Summengehaltes in Tee (vorläufig)

Beschaffenheit des Probenmaterials (Matrix)



Matrixeffekte bei der Teeanalyse – Folgen für die Quantifizierung

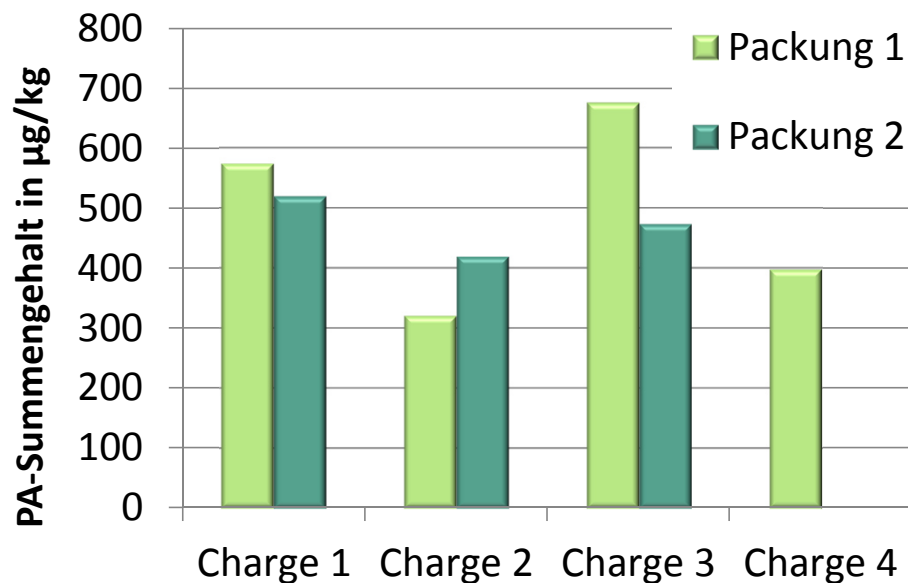


Quantifizierung in verschiedenen Teesorten?

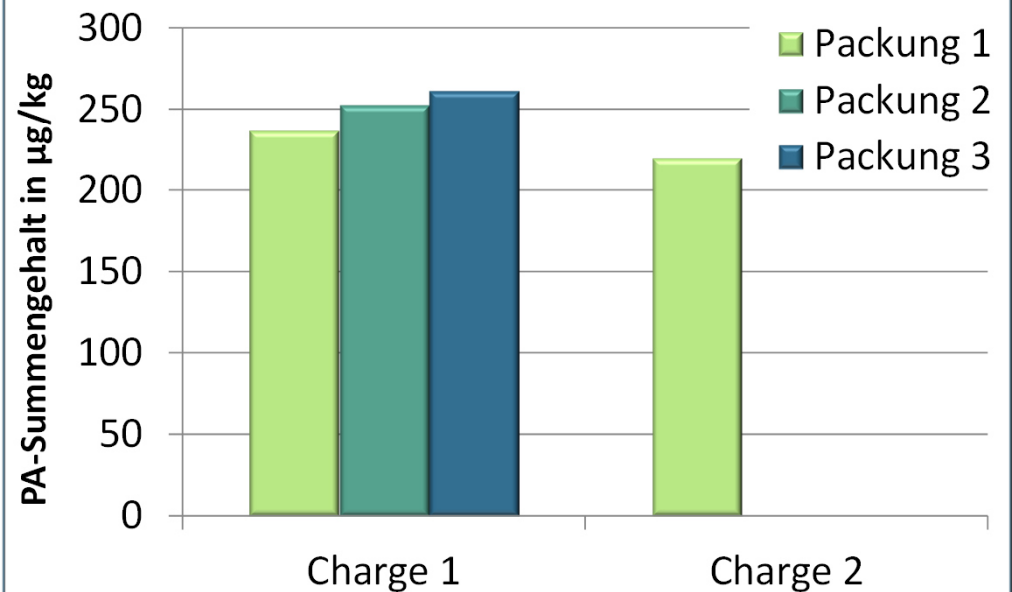
- für (fast) jede Teesorte entsprechende Matrix-matched Kalibrierung erforderlich
 - Aufwand
 - Null-Material verfügbar ?
- Alternative: Quantifizierung über Standardaddition

Variation des PA-Gehaltes innerhalb und zwischen Chargen

- Beispiel: „Rooibostee Vanille“
- jeweils 2 Packungen verschiedener Chargen
- Größenordnung vergleichbar!



- Beispiel: „Brennnesseltee“
- 3 bzw. 1 Packung von 2 Chargen
- Größenordnung vergleichbar!



→ Probenahmeverfahren angelehnt an VO (EG) 401/2006 Anhang I E (Gewürze)

Homogenität der Laborprobe – Mahlverfahren für Teeproben

Beispiel Rooibostee: gemahlen in Ultrazentrifugalmühle (UZM)
mit und ohne Trockeneis (TE)

- 5fach-Bestimmung der PA-Konzentrationen in beiden Homogenisaten
- Vergleich der relativen Standardabweichung (RSD)

ursprüngliches Verfahren

Ultrazentrifugalmühle (500 µm Sieb)



optimiertes Verfahren

Ultrazentrifugalmühle + Trockeneis (500 µm Sieb)

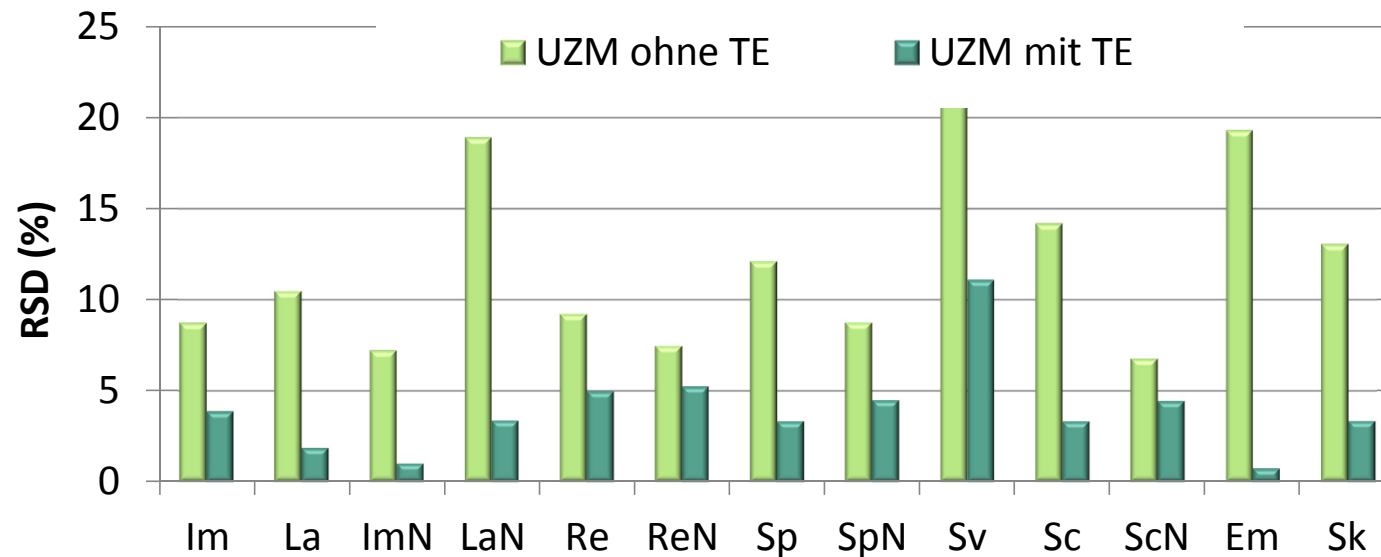


optimierte Homogenisierung (BfR-PA-Tee-2.0/2014)

Homogenität der Laborprobe – Mahlverfahren für Teeproben

Beispiel Rooibostee: gemahlen in Ultrazentrifugalmühle (UZM)
mit und ohne Trockeneis (TE)

- 5fach-Bestimmung der PA-Konzentrationen in beiden Homogenisaten
- Vergleich der relativen Standardabweichung (RSD)



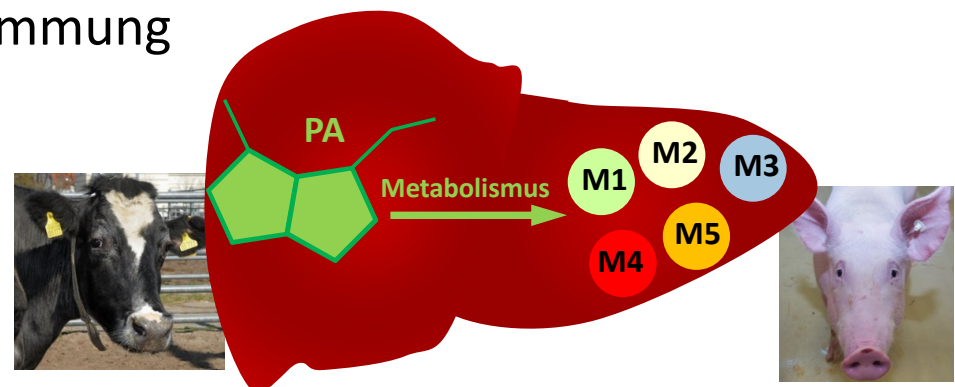
→ optimiertes Homogenisierungsverfahren (BfR-PA-Tee-2.0/2014)

Zusammenfassung

- leistungsfähige Analysenverfahren vorhanden
- verschiedene methodische Ansätze zur PA-Analytik
direkte/indirekte Verfahren
- im Ringversuch validierte Methoden für Honig und Tee
- umfangreiche Daten zum Vorkommen von PA
in Lebens- und Futtermitteln
- Empfehlungen zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit
von Analyseergebnissen für von PA in Tee:
 - Analytspektrum für Summenbildung (21 PA)
 - Probenahmeverfahren (VO (EG) 401/2006 Anhang I, E.4)



- Bericht zur Laborvergleichsuntersuchung zu PA in Tee
→ Erkenntnisse zur weiteren Methodenoptimierung
- Standardisierung einer Methode zur Bestimmung von PA in Futtermitteln (Mandat SA/CEN/ENTR/523/2013.14)
- Methoden zur Erfassung des PA-Gesamtprofils (hochauflösende LC-MS/MS)
→ Identifizierung weiterer relevanter PA
- Biotransformationsprodukte von PA in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ?
→ Identifizierung von Metaboliten in-vitro und in-vivo
→ Methoden zur quantitativen Bestimmung von PA-Metaboliten



DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Str. 8-10 • 10589 Berlin
Tel. 0 30 - 184 12 - 0 • Fax 0 30 - 184 12 - 47 41
bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de