

**Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA)  
in Honig mittels SPE-LC-MS/MS**

**Methodenbeschreibung**

**BfR-PA-Honig-1.0/2013**

INHALT

1	Anwendungsbereich .....	1
2	Kurzbeschreibung.....	1
3	Chemikalien und Lösungen .....	1
3.1	Allgemein .....	1
3.2	Chemikalien .....	2
3.3	Lösungen .....	2
3.3.1	Extraktionsmittel: 0,05M Schwefelsäure .....	2
3.3.2	Elutionslösung für die Festphasenextraktion (SPE) .....	2
3.3.3	Eluenten für die Chromatographie .....	3
3.3.4	Matrix-Standardreihe .....	3
4	Geräte .....	4
5	Durchführung.....	5
5.1	Extraktion.....	5
5.2	Rekonstitution der Probe.....	5
6	HPLC-MS/MS.....	5
6.1	Chromatographische Trennung.....	5
6.2	Massenspektrometrische Bedingungen.....	6
6.3	Messung .....	6
7	Berechnung.....	6
7.1	Kalibrierfunktion .....	6
7.2	Quantifizierung.....	7
7.3	Angabe des Ergebnisses .....	7
8	Anhang.....	8
8.1	LC-MS/MS Messung .....	8
8.2	Beispielchromatogramm.....	11
8.3	Anbieter von PA-Standardsubstanzen.....	12
8.4	Fließschema zur Probenaufarbeitung .....	15

## 1 Anwendungsbereich

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Pflanzen, denen karzinogene und genotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden. Derzeit sind etwa 600 dieser Verbindungen bekannt, die in den Pflanzengattungen der Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae vorkommen. Über die Pollen dieser Pflanzen können PA in Honig eingetragen werden (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2011).

Die vorliegende Methode beschreibt die Bestimmung folgender Pyrrolizidinalkaloide in Honig: Senecionin (Sc), Senecionin-N-oxid (ScN), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin-N-oxid (SpN), Monocrotalin (Mc), Monocrotalin-N-oxid (McN), Retrorsin (Re), Heliotrin (Hn), Heliotrin-N-oxid (HnN), Trichodesmin (Td), Retrorsin-N-oxid (ReN), Echimidin (Em), Intermedin (Im), Lycopsamin (La), Senkirkin (Sk), Lasiocarpin (Lc) und Lasiocarpin-N-oxid (LcN).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die während der in-house-Validierung ermittelt wurden, befinden sich im Anhang in 8.

## 2 Kurzbeschreibung

Zur Extraktion der PA wird der Honig in schwefelsaurem Wasser gelöst. Zur Entfernung von Partikeln wird die gelöste Probe zentrifugiert und anschließend über eine Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung eines starken Kationenaustauschermaterials gereinigt. Die PA werden mit Hilfe von ammoniakalischem Methanol eluiert. Im Anschluss wird das Eluat zur Trockne gebracht und wieder in Methanol/Wasser (HPLC-Anfangsbedingungen) aufgenommen.

Zur chromatographischen Trennung wird eine RP-HPLC-Säule mit einem binären Gradienten verwendet. Die Analyten werden mittels Triple Stage Quadrupole Massenspektrometrie detektiert. Die Konzentration der Pyrrolizidinalkaloide wird über eine Matrix-Standardreihe (Matrix-Matched-Calibration) bestimmt.

## 3 Chemikalien und Lösungen

### 3.1 Allgemein

Hinweis: Die in dieser Methode vorgesehenen Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien sind unter geeigneten Vorsichts- und Schutzmaßnahmen, wie Vermeidung des Hautkontaktes und Benutzung des Abzuges durchzuführen. Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien und für die HPLC-MS/MS geeignete Lösungsmittel zu verwenden. Das verwendete Wasser muss in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert bzw. von entsprechender Reinheit sein.

### 3.2 Chemikalien

- 3.2.1 Senecionin (Sc)
- 3.2.2 Senecionin-N-oxid (ScN)
- 3.2.3 Seneciphyllin (Sp)
- 3.2.4 Seneciphyllin-N-oxid (SpN)
- 3.2.5 Monocrotalin (Mc)
- 3.2.6 Monocrotalin-N-oxid (McN)
- 3.2.7 Retrorsin (Re)
- 3.2.8 Heliotrin (Hn)
- 3.2.9 Heliotrin-N-oxid (HnN)
- 3.2.10 Trichodesmin (Td)
- 3.2.11 Retrorsin-N-oxid (ReN)
- 3.2.12 Echimidin (Em)
- 3.2.13 Intermedin (Im)
- 3.2.14 Lycopsamin (La)
- 3.2.15 Senkirkin (Sk)
- 3.2.16 Lasiocarpin (Lc)
- 3.2.17 Lasiocarpin-N-oxid (LcN)
- 3.2.18 Ameisensäure 98 – 100%, z.B. Sigma-Aldrich
- 3.2.19 Methanol (MeOH), LC-MS Qualität, z.B. Merck LiChrosolv®
- 3.2.20 Schwefelsäure 98%, z.B. Merck
- 3.2.21 Ammoniak 32%, z.B. Merck
- 3.2.22 Ammoniumformiat, LC-MS Qualität, z.B. Fluka
- 3.2.23 Acetonitril, z.B. Merck LiChrosolv®

### 3.3 Lösungen

#### 3.3.1 Extraktionsmittel: 0,05 M Schwefelsäure

Zur Herstellung des Extraktionsmittels werden 2,665 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.2.20) mit Wasser auf 1 L aufgefüllt. Die Endkonzentration der Lösung beträgt 0,05 M.

#### 3.3.2 Elutionslösung für die Festphasenextraktion (SPE)

Für die Herstellung der 2,5 %igen ammoniakalischen Lösung werden 7,8 mL Ammoniak (3.2.21) mit Methanol (3.2.19) auf 100 mL aufgefüllt.

Hinweis: Diese Lösung ist arbeitstäglich frisch anzusetzen.

### 3.3.3 Eluenten für die Chromatographie

#### Eluent A:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.22) werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (3.2.18) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

#### Eluent B:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.22) werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (3.2.18) wird hinzugefügt und mit Methanol (3.2.19) auf 1 L aufgefüllt.

### 3.3.4 Matrix-Standardreihe

#### Stammlösung (0,1 mg/mL)

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 mg eines Pyrrolizidinalkaloidstandards auf einer Präzisionswaage (4.3) eingewogen und mit Acetonitril (3.2.23) im Maßkolben auf 10 mL aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/mL.

#### Standard-Arbeitslösung (PA-Mix, 1 µg/mL)

Für die Standard-Arbeitslösung werden jeweilige Volumina der einzelnen PA-Stammlösung (0,1 mg/mL) in einen Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.23) bis zur Marke aufgefüllt, sodass eine Konzentration von 1 µg/mL PA vorliegt.

#### Herstellung der Matrix-Standardreihe (matrix matched standard, MMS)

Um eventuell auftretende Matrixeffekte zu kompensieren wird eine Matrix-Standardreihe verwendet. Um hierbei die gleiche Matrixstärke in der Kalibrierung wie in den Proben zu erreichen, wird ein Blank-Honig in gleicher Weise wie die Proben aufgearbeitet (Kapitel 5). Die MMS Level werden, wie in Tabelle 1 beschrieben, pipettiert.

Tabelle 1: Schema zur Herstellung der MMS

	<b>Konzentration der Matrix- Kalibration</b> ng/mL	<b>Konzentration in der Probe</b> µg/kg	<b>Aliquot entnommen aus</b>	<b>Aliquot Volumen</b> µL	<b>Aliquot ent- nommen aus Blank Honigextrakt</b> µL
MMS_1	<b>1,0</b>	<b>0,1</b>	MMS_3	20	180
MMS_2	<b>5,0</b>	<b>0,5</b>	MMS_5	20	180
MMS_3	<b>10,0</b>	<b>1,0</b>	MMS_5	40	160
MMS_4	<b>25,0</b>	<b>2,5</b>	Standard-Arbeitslösung (1 µg/mL)	5	195
MMS_5	<b>50,0</b>	<b>5,0</b>	Standard-Arbeitslösung (1 µg/mL)	10	190
MMS_6	<b>75,0</b>	<b>7,5</b>	Standard-Arbeitslösung (1 µg/mL)	15	185
MMS_7	<b>100,0</b>	<b>10,0</b>	Standard-Arbeitslösung (1 µg/mL)	20	180

## **4 Geräte**

### **4.1 Allgemein**

Neben der normalen Laborausrüstung werden folgende Geräte verwendet:

**4.2 Diverse Kolbenhubpipetten**, Mehrfachdispenser, z.B. Fa. Brand

**4.3 Präzisionswaage**, Genauigkeit: 0,0001 g

**4.4 Trockenschrank**

**4.5 Zentrifuge** für 50 mL Zentrifugengefäße, 5000 x g

**4.6 Reagensglasschüttler**, z.B. Fa. Vortex

**4.7 Überkopfschüttler**

**4.8 Verdampfungsstation**, z.B. TurboVap

**4.9 Zentrifugengefäß** 50 mL

**4.10 Reagenzgläser** 15 mL

**4.11 Messkolben**, 10 und 20 mL

**4.12 SPE-Kartuschen**: HF Bond Elut LRC-SCX, 500 mg Sorbensmaterial

**4.13 SPE-Vakuumkammer**

**4.14 Filter 0,2 µm**, z.B. VWR Zentrifugalfilter 0,5 mL, modifizierte Nylonmembran

**4.15 HPLC-Probenvials** 2 mL

**4.16 Glasinserts**, 250 µL konisch für 2 mL Probenvials

**4.17 LC-Säule**, z.B. Fa. Thermo, Hypersil Gold®; 150 x 2,1 mm; 1,9 µm

**4.18 LC-MS/MS System**

## 5 Durchführung

### 5.1 Extraktion

Für die Extraktion werden 10,0 g  $\pm$  0,1 g Honig in ein geeignetes Zentrifugengefäß (4.9) eingewogen.

Die Probe wird mit 30 mL 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.3.1) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (4.7) gelöst. Im Anschluss werden die Lösungen für 10 min  $\pm$  2 min mit 3800 x g zentrifugiert (4.5). Der Überstand wird in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt.

### 5.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.13) und im Trockenschrank bei 40 °C  $\pm$  5 °C (4.4) durchgeführt. Durch die erhöhte Temperatur wird das Auskristallisieren des Honigs auf der SPE-Kartusche vermieden.

Konditionierungsschritt 1	5 mL Methanol (3.2.19)
Konditionierungsschritt 2	5 mL 0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.3.1)
Probenaufgabe	30 mL Probe Probengefäß mit 5 mL 0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.3.1) spülen und auf Kartusche geben
Waschschritt 1	6 mL Wasser
Waschschritt 2	6 mL Methanol (3.2.19)
Trocknung	5 - 10 min (hierbei Vakuum anlegen (4.13))
Elution	2 x 5 mL 2,5% Ammoniak in Methanol (3.3.2)

Im Anschluss wird das Eluat unter Stickstoffstrom bei 50 °C  $\pm$  5 °C zur Trockne gebracht.

### 5.3 Rekonstitution der Probe

Der Rückstand wird in 1 mL Methanol/Wasser (5/95, v/v) aufgenommen und durch Schütteln auf dem Reagensglasschüttler (4.6) vollständig gelöst.

Die Probe wird durch einen geeigneten Filter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu$ m filtriert (4.14). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden 500  $\mu$ L der Probe bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. 200  $\mu$ L des Filtrates werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.15) mit Glasinsert (4.16) überführt.

## 6 HPLC-MS/MS

### 6.1 Chromatographische Trennung

Die Messungen können mit verschiedenen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) und Trennsäulen durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestretentionszeit beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule. Analyten, die nicht massenspektrometrisch unterschieden werden können, müssen chromatographisch getrennt vorliegen (z.B. Lycopersamin und Intermedin). Die im Kapitel 8.1 aufgeführten Bedingungen unter Verwendung

einer C18-Säule (4.17) und den unter 3.3.3 angegebenen Fließmitteln haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

## 6.2 Massenspektrometrische Bedingungen

Die Messungen können mit MS/MS-Geräten verschiedener Hersteller durchgeführt werden. Im Kapitel 8.1 sind beispielhaft die gerätespezifischen Bedingungen eines Messsystems aufgeführt, die sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen haben.

## 6.3 Messung

Für die quantitative Analyse werden folgende Kriterien festgelegt.

### Injektion:

Alle Proben und Matrix-Standards (MMS) werden doppelt injiziert, um die Wiederholbarkeit der MS-Detektion sowie einen möglichen Responsedrift innerhalb der Sequenz zu prüfen.

### Sequenz:

Für die Bestimmung der Pyrrolizidinalkaloide wird die folgende Reihenfolge der Analysen in einer Sequenz festgelegt.

1. Kalibrationslösung (1 – 100 ng/mL)
2. Lösungsmittelblindwert
3. Proben (erste Injektion)
4. Lösungsmittelblindwert
5. Kalibrationslösung (1 – 100 ng/mL)
6. Lösungsmittelblindwert
7. Proben (zweite Injektion)

## 7 Berechnung

Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels einer Matrix-Standardreihe (MMS). Die Berechnung erfolgt durch Einsetzen der Peakflächen der Proben in die Kalibrierfunktion.

### 7.1 Kalibrierfunktion

#### Gleichung 1: Kalibrierfunktion

$$f_{(x)} = y = ax + b$$

Legende:

$y$	Fläche unter dem Peak des Zielanalyten
$a$	Steigung der Kalibrierfunktion
$x$	Konzentration des Zielanalyten [ng/mL] = $\beta$ (Massenkonzentration)
$b$	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

## 7.2 Quantifizierung

### Gleichung 2: Berechnung des Gehaltes an PA (Analysegleichung)

$$\text{Gehalt PA} = \beta \times DF = \left[ (y - b) \times \frac{1}{a} \right] \times \frac{V_{\text{Extrakt}}}{m_{\text{Einwaage}}} \times \frac{1}{V_{\text{Auftrag}}} \times V_{\text{Probe}}$$

Legende:

$\beta$	Massenkonzentration [ng/mL]
$DF$	Umrechnungsfaktor von ng/mL auf $\mu\text{g/kg}$
$y$	Peakfläche des Zielanalyten
$b$	Achsenabschnitt aus Matrixkalibrierung
$a$	Steigung aus Matrixkalibrierung
$V_{\text{Extrakt}}$	Volumen des Extraktionsmittels [mL]
$m_{\text{Einwaage}}$	Masse der eingewogenen Probe [g]
$V_{\text{Auftrag}}$	Volumen des auf die SPE aufgetragenen Extrakts [mL]
$V_{\text{Probe}}$	Endvolumen der Probe [mL]

## 7.3 Angabe des Ergebnisses

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in  $\mu\text{g/kg}$  mit zwei signifikanten Nachkommastellen. Zur Umrechnung der Konzentration in der Messlösung in ng/mL in die Konzentration im Honig in  $\mu\text{g/kg}$  liegt bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufarbeitungsverfahrens der Faktor bei 0,1.

### Reference list

- Betteridge K, Cao Y, Colegate SM (2005) Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: application to Echim vulgare honeys. J Agric Food Chem 53 (6):1894-1902.
- DIN ISO 32645. (1994) Chemical Analysis; Decision limit, Detection limit and determination limit, Estimation in case of repeatability, terms, methods, evaluation. Deutsches Institut für Normung DIN.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011) Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. The EFSA Journal 9, 1-135

## 8 Anhang

### 8.1 LC-MS/MS Messung

#### LC-MS/MS System besteht aus:

Triple-Quadrupole-Massenspektrometer (Thermo TSQ Vantage)  
HPLC-Anlage HPLC-Pumpe (Thermo Accela 1250)  
Degasser  
Autosampler (CTC Analytics PAL ATS MYX)  
Säulenofen (MayLab MistraSwitch)

#### HPLC-Einstellungen

**Eluent A** siehe 3.3.3  
**Eluent B** siehe 3.3.3  
**Temperatur Säule** 40 °C  
**Flussrate** 300 µL/min  
**Injektionsvolumen** 10 µL  
**Säule** Thermo Hypersil Gold; 150 x 2,1 mm, 1,9 µm  
**Gesamtlaufzeit** 15 Minuten

#### **Gradient**

<b>Zeit [min]</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0,0	95	5
0,5	95	5
7,0	50	50
7,5	20	80
7,6	0	100
9,0	0	100
9,1	95	5
15,0	95	5

#### MS-Geräteeinstellungen

**Ionisation** Elektrospray positiv (ESI +)  
**Ion Spray Voltage [V]** 3500 (positive polarity)  
**Capillary Temperature [°C]** 270  
**Vaporizer Temperature [°C]** 300  
**Sheath Gas Pressure [psi]** 45.0  
**Ion Sweep Gas Pressure [psi]** 2.0  
**Aux Gas Pressure [psi]** 10

#### Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden durch Selected Reaction Monitoring (SRM) detektiert. Zur Identifikation wurden zwei spezifische Übergänge auf zwei Tochterionen (*Produkt-Ionen*) gewählt. Die entsprechenden Übergänge und die Kollisionsenergie (CE) sind Tabelle 2 zu entnehmen. Ebenso ist dort die unter den beschriebenen Bedingungen vorliegende Retentionszeit jedes Analyten aufgeführt.

Tabelle 2: Substanzspezifische Parameter der LC-MS/MS Methode

Analyt	Precursor	Fragment	CE	S Lense	Retentionszeit [min]
Monocrotalin	326.2	120.3	35	130	4,41
		237.3	25	130	
Monocrotalin-N-oxid	342.1	118.3	37	141	5,18
		137.4	29	141	
Intermedin	300.1	138.3	18	112	5,66
		156.3	28	112	
Lycopsamin	300.1	138.3	18	112	5,78
		156.3	28	112	
Retrorsin	352.2	120.3	27	140	6,60
		138.3	29	140	
Trichodesmin	354.2	120.3	35	137	6,68
		222.3	28	137	
Retrorsin-N-oxid	368.2	136.2	30	145	6,71
		118.2	40	145	
Seneciphyllin	334.2	120.3	26	138	6,89
		138.4	28	138	
Heliotrin	314.2	138.3	19	119	7,08
		156.3	28	119	
Seneciphyllin-N-oxid	350.2	118.2	36	135	7,12
		136.3	32	135	
Heliotrin-N-oxid	330.2	138.2	22	121	7,42
		172.1	27	121	
Senecionin	336.2	120.2	27	130	7,77
		138.2	29	130	
Senecionin-N-oxid	352.2	118.1	28	116	7,98
		136.3	27	116	
Echimidin	398.2	120.3	23	139	8,53
		220.3	17	139	
Senkirkin	366.2	150.3	24	132	8,71
		168.2	28	132	
Lasiocarpin	412.2	120.2	30	139	9,50
		336.3	17	139	
Lasiocarpin-N-oxid	428.2	136.1	29	135	9,75
		254.1	27	135	

Tabelle 3: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) bestimmt in einer in-house Validierung mit der beschriebenen Methode\*

Analyte	LOD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Monocrotaline	0.22	0.59
Monocrotaline-N-oxide	0.20	0.55
Intermedine	0.13	0.35
Lycopsamine	0.09	0.24
Retrorsine	0.13	0.35
Trichodesmine	0.23	0.62
Retrorsine-N-oxide	0.11	0.29
Seneciphylline	0.10	0.27
Heliotrine	0.13	0.37
Seneciphylline-N-oxide	0.17	0.47
Heliotrine-N-oxide	0.11	0.28
Senecionine	0.15	0.42
Senecionine-N-oxide	0.13	0.35
Echimidine	0.15	0.42
Senkirkine	0.10	0.27
Lasiocarpine	0.07	0.21
Lasiocarpine-N-oxide	0.06	0.18

\* LOD and LOQ were determined according to DIN EN ISO 32645 Calibration method (DIN ISO 32645 1994)

## 8.2 Beispielchromatogramm

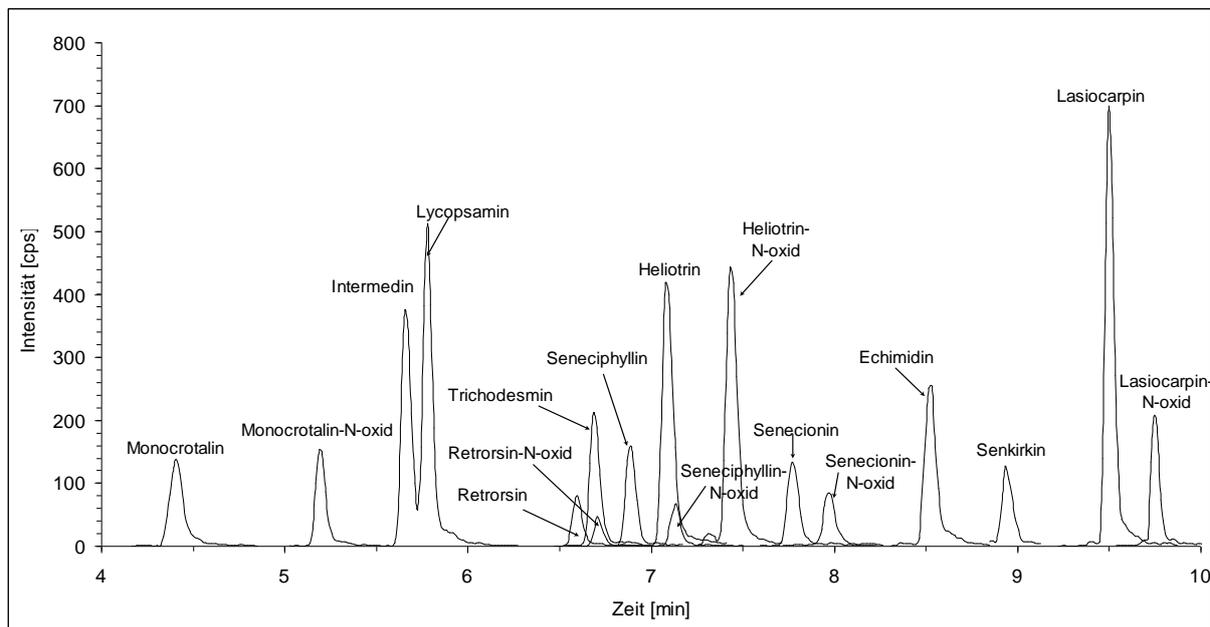


Abbildung 1: Chromatogramm eines Matrixstandards [c = 25 ng/mL], TIC der SRM-Übergänge

### 8.3 Anbieter von PA-Standardsubstanzen

Pyrrolizidinalkaloid	Masse	CAS	Anbieter	Bestellnummer
echimidine	397,47	520-68-3	Oskar Tropitzsch	7550006
			PhytoLab*	89553
			PlantaAnalytica	-
erucifoline	349,38	40158-95-0	Carl Roth	1657.1
			Oskar Tropitzsch	7550021
erucifoline-N-oxide	365,37	123864-94-8	PhytoLab*	83446
			Carl Roth	1664.1
europine-hydrochloride	365,86	570-19-4	PhytoLab*	83434
			Carl Roth	1676.1
europine-N-oxide	345,39	65582-53-8	PhytoLab*	83237
			AppliChem	A9574,0010
			Carl Roth	1687.1
			Oskar Tropitzsch	7500063
heliotrine	313,40	303-33-3	PhytoLab*	83238
			AppliChem	A9583,0020
			Carl Roth	1929.1
			Latoxan*	L6007
heliotrin-N-oxide	329,39	6209-65-0	Oskar Tropitzsch	7550511
			PhytoLab	80403
			AppliChem	A9590,0010
			Carl Roth	1944.1
indicine-hydrochloride	335,83	1195140-94-3	Oskar Tropitzsch*	755054
			PhytoLab	83236
			Carl Roth	1960.1
			Oskar Tropitzsch	7500069
indicine-N-oxide	315,36	41708-76-3	PhytoLab	83234
			AppliChem	A9593,0010
			Carl Roth	1961.1
			Oskar Tropitzsch	7500070
intermedine	299,37	10285-06-0	PhytoLab	83235
			Carl Roth	1962.1
intermedine-N-oxide	315,36	95462-14-9	Oskar Tropitzsch	7501610
			PhytoLab*	82424
lasiocarpine	411,49	303-34-4	PhytoLab*	83434
			AppliChem	A9596,0010
			Carl Roth	2090.1
			Oskar Tropitzsch*	7500019
lasiocarpine-N-oxide	457,5	127-30-0	PhytoLab	80412
			AppliChem	A9600,0010
			Carl Roth	2202.1
			Oskar Tropitzsch*	7501284
lycopsamine	299,37	10285-07-1	PhytoLab	83220
			Carl Roth	2208.1
			Oskar Tropitzsch	7501080
			PhytoLab*	89726

<b>Pyrrrolizidinalkaloid</b>	<b>Masse</b>	<b>CAS</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Bestellnummer</b>
lycopsamine-N-oxide	315,36	95462-15-0	Oskar Tropitzsch	7501358
			PhytoLab*	83447
monocrotaline	325,35	315-22-0	Carl Roth	3418.1
			Fluka	37024
			Sigma	C2401
			Oskar Tropitzsch	7550522
			PhytoLab*	89251
			R&D Chemicals	7351
monocrotaline-N-oxide	341,36	35337-98-5	Santa Cruz Biotechnology	sc-211921
			Carl Roth	2249.1
retrorsine	351,40	480-54-6	Oskar Tropitzsch	7501658
			PhytoLab*	82629
			AppliChem	A4922,0020
			Carl Roth	1213.1
			Fluka	37025
			Oskar Tropitzsch	7550659
retrorsine-N-oxide	367,40	15503-86-3	PhytoLab	89775
			Santa Cruz Biotechnology	sc-215805
			Sigma*	R0382
			AppliChem	A8668,0010
			Carl Roth	6733.1
senecionine	335,40	130-01-8	Oskar Tropitzsch	7500347
			PhytoLab*	82630
			AppliChem	A2071,0020
			Carl Roth*	2261.1
			Fluka	37031
			Oskar Tropitzsch	7550292
senecionine-N-oxide	351,40	13268-67-2	PhytoLab*	89789
			R&D Chemicals	1828
			Sigma	17806
			Santa Cruz Biotechnology	sc-286770
			AppliChem	A8678,0010
seneciphylline	333,39	480-81-9	Carl Roth	6734.1
			Oskar Tropitzsch	7500301
			PhytoLab*	82631
			AppliChem	A2072,0020
			Carl Roth*	6414.1
			Fluka	37033
seneciphylline-N-oxide	349,38	38710-26-8	R&D Chemicals	1850
			Santa Cruz Biotechnology	sc-229697
			Inc.	
			ABCR GmbH	AB167974
seneciphylline-N-oxide	349,38	38710-26-8	PhytoLab*	89275
			AppliChem	A8684,0010
			Carl Roth	6735.1
			Oskar Tropitzsch	7500573
			PhytoLab*	82632

<b>Pyrrrolizidinalkaloid</b>	<b>Masse</b>	<b>CAS</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Bestellnummer</b>
senecivernine	335,40	72755-25-0	Carl Roth	2209.1
			Oskar Tropitzsch	7550066
			PhytoLab*	83436
senecivernine-N-oxide	351,39	101687-28-9	Carl Roth	2215.1
			PhytoLab*	83437
senkirkine	365,43	2318-18-5	AppliChem	A6765,0010
			Carl Roth	4934.1
			Fluka	37032
			Oskar Tropitzsch	7500441
			PhytoLab*	89274
trichodesmine	353,41	548-90-3	Latoxan*	L6049

\*wurden vom BfR für die Methodvalidierung verwendet

## 8.4 Fließschema zur Probenaufarbeitung

