

DOI 10.17590/20180212-105100

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

Methodenbeschreibung

BfR-PA-Nahrungsergänzungsmittel-1.0/2018

INHALTSVERZEICHNIS

1	Anwendungsbereich	3
2	Kurzbeschreibung	3
3	Chemikalien und Lösungen	4
3.1	Allgemein	4
3.2	Chemikalien	5
3.3	Lösungen	6
4	Geräte und Hilfsmittel	7
5	Durchführung	8
5.1	getrocknete Pflanzenbestandteile, Bienenprodukte	8
5.2	Durchführung (Samenöle)	10
6	HPLC-MS/MS	12
6.1	Chromatographische Trennung	12
6.2	Tandem-Massenspektrometrische Bestimmung	12
6.3	Identifizierung von PA (Qualitativer Nachweis).....	12
6.4	Bestimmung des PA-Gehaltes (Quantifizierung).....	13
6.5	Aufbau der Messsequenz für die quantitative Analyse.....	13
6.6	Maßnahmen zur Qualitätskontrolle.....	13
7	Berechnung	14
7.1	Kalibrierfunktion	14
7.2	Quantifizierung	14
8	Angabe der Ergebnisse	14
9	Anhang	16
9.1	LC-MS/MS Messung	16
9.2	Ergebnisse der <i>inhouse</i> -Validierung der Methode (Verfahrenskenndaten).....	19
9.3	Anbieter von PA-Standardsubstanzen	23
9.4	Fließschema zur Probenaufarbeitung.....	26

1 Anwendungsbereich

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffwechselprodukte, denen karzinogene und genotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden. Derzeit sind etwa 600 dieser Verbindungen bekannt, die hauptsächlich in den Pflanzengattungen der Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae gebildet werden. Auf Grund der weltweiten Verbreitung dieser Pflanzen, kann es leicht zu Kontaminationen von pflanzlichen Lebensmitteln, Honig, Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) oder auch tierischen Futtermitteln kommen (EFSA 2017; Mulder et al. 2017).

Die Methode beschreibt die Bestimmung von PA in NEM pflanzlicher Herkunft, bienenproduktbasierten NEM und Ölen. Die Methode ist für folgende 28 PA inhouse validiert: Echimidin (Em), Echimidin-*N*-oxid (EmN), Erucifolin (Er), Erucifolin-*N*-oxid (ErN), Europin (Eu), Europin-*N*-oxid (EuN), Heliotrin (Hn), Heliotrin-*N*-oxid (HnN), Intermedin (Im), Intermedin-*N*-oxid (ImN), Jacobin (Jb), Jacobin-*N*-oxid (JbN), Lasiocarpin (Lc), Lasiocarpin-*N*-oxid (LcN), Lycopsamin (La), Lycopsamin-*N*-oxid (LaN), Monocrotalin (Mc), Monocrotalin-*N*-oxid (McN), Retrorsin (Re), Retrorsin-*N*-oxid (ReN), Senecionin (Sc), Senecionin-*N*-oxid (ScN), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin-*N*-oxid (SpN), Senecivernin (Sv), Senecivernin-*N*-oxid (SvN), Senkirkin (Sk) und Trichodesmin (Td).

Die Methode wurde für Nahrungsergänzungsmitteln pflanzlicher Herkunft (getrocknete, gemahlene Pflanzenteile), bienenproduktbasierten NEM (Gelee Royale, Propolis, Bienenpollen) und Ölen (bspw. Samenöle) inhouse validiert. Die Leistungskriterien, die während der inhouse-Validierung bestimmt wurden, befinden sich im Anhang (9.2).

2 Kurzbeschreibung

NEM pflanzlicher Herkunft und bienenproduktbasierte NEM

Die PA werden aus den Nahrungsergänzungsmitteln mit 0,05 M H₂SO₄ unter Verwendung eines Ultraschallbades zweifach extrahiert. Die Proben werden anschließend zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wird durch Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von C-18-Material aufgereinigt. Nach methanolischer Elution der PA wird das Eluat zur Trockne gebracht, in Methanol/Wasser (HPLC-Anfangsbedingungen) aufgenommen und zur Vorbereitung der LC-MS/MS-Messung nochmals filtriert.

NEM aus Ölen

Die PA werden aus den Ölen mit 0,05 M H₂SO₄ in Methanol unter Verwendung eines Überkopfschüttlers zweifach extrahiert. Der methanolische Überstand wird durch Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von SCX-Material aufgereinigt. Nach basisch-methanolischer Elution der PA wird das Eluat zur Trockne gebracht, in Methanol/Wasser (HPLC-Anfangsbedingungen) aufgenommen und zur Vorbereitung der LC-MS/MS-Messung filtriert.

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) oder gegebenenfalls über eine Standardaddition 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- <i>N</i> -oxid	(ScN)
3.2.3	Seneciphyllin	(Sp)
3.2.4	Seneciphyllin- <i>N</i> -oxid	(SpN)
3.2.5	Monocrotalin	(Mc)
3.2.6	Monocrotalin- <i>N</i> -oxid	(McN)
3.2.7	Retrorsin	(Re)
3.2.8	Heliotrin	(Hn)
3.2.9	Heliotrin- <i>N</i> -oxid	(HnN)
3.2.10	Trichodesmin	(Td)
3.2.11	Retrorsin- <i>N</i> -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- <i>N</i> -oxid	(LcN)
3.2.18	Europin- <i>N</i> -Oxid	(EuN)
3.2.19	Europinhydrochlorid	(Eu)
3.2.20	Echimidin- <i>N</i> -oxid	(EmN)
3.2.21	Erucifolin	(Er)
3.2.22	Erucifolin- <i>N</i> -Oxid	(ErN)
3.2.23	Intermedin- <i>N</i> -Oxid	(ImN)
3.2.24	Jacobin	(Jc)
3.2.25	Jacobin- <i>N</i> -Oxid	(JcN)
3.2.26	Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid	(LaN)
3.2.27	Senecivernin	(Sv)
3.2.28	Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	(SvN)

Hinweis: Das Lösen der Standardsubstanzen erfolgt gemäß der Angabe des Herstellers

- 3.2.29 Ameisensäure 98 – 100 %, z.B. Sigma-Aldrich
- 3.2.30 Methanol (MeOH), LC-MS Qualität, z.B. Merck LiChrosolv®
- 3.2.31 Schwefelsäure 98 %, z.B. Merck
- 3.2.32 Ammoniak 32 %, z.B. Merck
- 3.2.33 Ammoniumformiat, LC-MS Qualität, z.B. Fluka
- 3.2.34 Acetonitril, z.B. Merck LiChrosolv®

3.3 Lösungen

3.3.1 Extraktionsmittel für NEM pflanzlicher Herkunft und bienenproduktbasierte NEM (0,05 M H₂SO₄)

Zur Herstellung des Extraktionsmittels werden 2,665 ml H₂SO₄ (3.2.31) mit Wasser auf 1 L aufgefüllt. Die Endkonzentration der Lösung beträgt 0,05 M.

3.3.2 Ammoniakalische Lösung zur Neutralisation

Zur Herstellung der ammoniakalischen Lösung zur Neutralisation werden 5 ml Ammoniak (3.2.32) mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt.

3.3.3 Extraktionsmittel für Öle (0,05 M H₂SO₄ in MeOH)

Zur Herstellung des Extraktionsmittels werden 2,665 ml H₂SO₄ (3.2.31) mit Methanol (3.2.30) auf 1 L aufgefüllt. Die Endkonzentration der Lösung beträgt 0,05 M.

3.3.4 SPE-Elutionsmittel für Öle (2,5 %iger Ammoniak in Methanol)

Zur Herstellung der ammoniakalischen Elutionslösung werden 7,8 ml Ammoniak (3.2.32) mit Methanol (3.2.30) auf 100 ml aufgefüllt.

Hinweis: Die Lösungen sind arbeitstäglich frisch anzusetzen

3.3.5 Eluenten für die Chromatographie:

Eluent A:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.33) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.29) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Hinweis: Eluent A sollte nicht länger als 1 Woche verwendet werden, da lagerungsbedingte Veränderungen der Lösung zu Retentionszeitschwankungen führen können.

Eluent B:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.33) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.29) wird hinzugefügt und mit Methanol (3.2.30) auf 1 L aufgefüllt.

3.3.6 5%iges Methanol

Zur Herstellung des 5%igen Methanols werden 5 ml Methanol (3.2.30) mit 95 ml Wasser vermischt und kräftig geschüttelt.

4 Geräte und Hilfsmittel

- 4.1 Kolbenhubpipetten, Mehrfachdispenser, z.B. Fa. Brand
- 4.2 Präzisionswaage
- 4.3 Mühle z.B. Fa. Retsch Grindomix GM 200
- 4.4 Präzisionswaage, Genauigkeit: 0,0001 g
- 4.5 50 ml Zentrifugenröhrchen aus PP
- 4.6 250 ml Zentrifugenflaschen aus PP
- 4.7 Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor für 50 ml Gefäße
- 4.8 Ultraschallbad
- 4.9 Vortex Mischer
- 4.10 Überkopfschüttler
- 4.11 Verdampfungsstation TurboVap
- 4.12 Schraubflaschen 30 oder 50 ml
- 4.13 Reagenzgläser 15 ml
- 4.14 Diverse Messzylinder
- 4.15 Messkölbchen, 10, 20 und 100 ml
- 4.16 Faltenfilter, z.B. Munktell
- 4.17 SPE-Kartuschen: Discovery DSC-18 SPE, 500 mg / 6 ml
- 4.18 SPE-Kartuschen: HF Bond Elut LRC-SCX, 500 mg Sorbensmaterial
- 4.19 SPE-Vakuumkammer
- 4.20 Zentrifugalfilter 0,5 ml Nylon, modifiziert, 0,2 µm, z.B. von VWR
- 4.21 Zentrifuge für Reaktionsgefäße, z.B. Microfuge RV Fa. Beckman
- 4.22 1,5 ml Reaktionsgefäße, z.B. Eppendorf
- 4.23 2 ml HPLC-Probenvials
- 4.24 250 µl konische Glaseinsätze für 2 ml Probenvials
- 4.25 Alu-Bördelkappe 11 mm für Probenvials PTFE/Silikon/PTFE-Septum
- 4.26 HPLC-Säule: z.B. Fa. Thermo, Hypersil Gold® C18; 150 x 2,1 mm; Korngröße: 1,9 µm
- 4.27 LC-MS/MS System

5 Durchführung

5.1 Getrocknete Pflanzenbestandteile, Bienenprodukte

5.1.1 Probenvorbereitung

Um für die Gesamtprobe ein repräsentatives Analysenergebnis zu erhalten, werden die einzelnen Einheiten (Pastillen, Tabletten, Dragées oder ähnliche zu untersuchende Darreichungsformen) einer ganzen Packung in einer Mühle (4.3) gemahlen und in ein geeignetes Gefäß überführt. Sollten verkapselte Proben vorliegen, bei denen ein Pulver lediglich umhüllt ist, wird die Hülle entfernt und alle Einheiten einer Packung in einem geeigneten Gefäß vereinigt.

Bienenpollen werden unter Zugabe von Trockeneis gemahlen (4.3) und in ein geeignetes Aufbewahrungsgefäß überführt.

Die Probe wird anschließend im Überkopfschüttler (4.10) für 30 min homogenisiert.

Zu Qualitätssicherungszwecken wird ein PA-freies Material dotiert und wie die unbekanntenen Proben aufgearbeitet. Die Akzeptanzkriterien bezüglich der Präzision und Wiederfindung für die Anwendung von Multianalytmethoden in der Routine sind in der SANTE/11813/2017 beschrieben.

Des Weiteren wird PA-freies Material als Blankprobe und für die Herstellung der Matrix-Standardreihe (siehe Tabelle 1) aufgearbeitet.

5.1.2 Probeneinwaage

Es werden je $0,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ der homogenisierten Probe zur Analyse eingewogen.

5.1.3 Extraktion

1. Extraktion	Auf die komplette Probe werden 20 ml 0,05 M H_2SO_4 (3.3.1) gegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das gesamte Probenmaterial mit dem Lösungsmittel benetzt ist (gegebenenfalls unter zur Hilfenahme des Vortex-Mischers (4.9)). Die Extraktion wird dann bei 45°C für 15 min im Ultraschallbad durchgeführt.
1. Zentrifugation	Die Probe wird für 5 min mit 2500 U/min zentrifugiert (4.7).
1. Filtration	Der Überstand in einem 50 ml Zentrifugengefäß (4.5) überführt.
2. Extraktion	Auf den Rückstand der ersten Zentrifugation werden erneut 20 ml 0,05 M H_2SO_4 (3.3.1) gegeben. Dabei muss ebenfalls darauf geachtet werden, dass das gesamte verbliebene Probenmaterial mit dem Lösungsmittel benetzt ist (gegebenenfalls unter zur Hilfenahme des Vortex-Mischers (4.9)). Die zweite Extraktion wird dann bei 45°C für 15 min im Ultraschallbad durchgeführt.
2. Zentrifugation	Die Probe wird für 5 min mit 2500 U/min zentrifugiert (4.7).
2. Filtration	Der zweite Überstand wird mit dem ersten Überstand vereinigt. Der verbleibende Rückstand kann verworfen werden.

Der Überstand wird kurz mittels Vortex-Mischer (4.9) homogenisiert und anschließend mit einer ammoniakalischen Lösung (3.3.2) neutralisiert (ca. 500-800 µl). Sollte durch die Neutralisation sich ein Niederschlag bilden, kann nochmals unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert werden. Anschließend wird die Probe über einen Faltenfilter (4.16) gegeben und in einem 50 ml Zentrifugalgefäß aufgefangen. Für die SPE wird ein Aliquot von 10 ml dieser Lösung verwendet.

5.1.4 Festphasenextraktion

Die Probenextrakte werden mittels SPE-Kartuschen Discovery DSC-18 SPE, 500 mg / 6 ml (4.17) gereinigt und angereichert. Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.19) durchgeführt.

Konditionierungsschritt 1	5 ml Methanol (3.2.30)
Konditionierungsschritt 2	5 ml H ₂ O
Probenauftrag	2 x 5 ml Extraktlösung
Waschschrift	4 ml H ₂ O
Waschschrift	4 ml H ₂ O
Trocknung	15 min (hierbei Vakuum anlegen)
Elution	2 x 5 ml Methanol (3.2.30)

Im Anschluss wird das Eluat unter Stickstoffstrom bei 50 °C ± 5 °C zur Trockne gebracht (4.11).

5.1.5 Rekonstruktion der Probe

Der Rückstand wird in 1 ml Methanol/Wasser (5/95, v/v) (3.3.6) aufgenommen und durch Schütteln auf dem Vortex-Mischer (4.9) gelöst. Die Probe wird durch einen geeigneten Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (4.20). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden 500 µl der Probe bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. 200 µl des Filtrats werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.23) mit Glasinsert (4.24) überführt.

5.1.6 Herstellung der Kalibrierlösungen

Um eventuell auftretende Matrixeffekte zu kompensieren wird eine Matrix-Standardreihe verwendet. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von PA-freiem, repräsentativen Probenmaterial.

Um die gleiche Matrixstärke in der Kalibration wie in den Proben sicherzustellen, wird das unbelastete Probenmaterial in der gleichen Weise wie die Proben aufgearbeitet (Kapitel 5). Die MMS-Level werden, wie Tabelle 1 beschrieben, pipettiert.

Hinweis: Die Linearität des gewählten Kalibrierbereiches ist geräteabhängig und ist in der jeweiligen Messung sicherzustellen. Die Überprüfung der Linearität erfolgt durch das Rekalkulieren der eingesetzten Kalibrierlevel anhand der ermittelten Kalibrierfunktion. Dabei muss die Abweichung der rekalkulierten Konzentration von der wahren Konzentration kleiner 20 % sein (SANTE/11813/2017).

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Kalibrationsreihe (getrocknete Pflanzenbestandteile, Bienenprodukte)

	Konzentration der Matrix-Kalibration ng/ml	Konzentration in der Probe µg/kg	Aliquot entnommen aus	Aliquot Volumen µl	Aliquot entnommen aus Blank Extrakt µl	Gesamt- volumen µl
MMS_1	1,0	8	MMS_3	20	180	200
MMS_2	5,0	40	MMS_6	20	280	300
MMS_3	10,0	80	MMS_9	20	280	300
MMS_4	25,0	200	MMS_9	20	100	120
MMS_5	50,0	400	MMS_9	50	100	150
MMS_6	75,0	600	PA-Mix	15	185	200
MMS_7	100,0	800	PA-Mix	20	180	200
MMS_8	125,0	1000	PA-Mix	25	175	200
MMS_9	150,0	1200	PA-Mix	60	340	400

5.2 Durchführung (Öle)

5.2.1 Probenvorbereitung

Ölhaltige Proben werden mit Hilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle aus den Kapseln entfernt und in ein geeignetes Aufbewahrungsgefäß überführt.

Die Probe wird anschließend im Überkopfschüttler (4.10) für 30 min homogenisiert.

Zu Qualitätssicherungszwecken wird ein PA-freies Material dotiert und wie die unbekanntenen Proben aufgearbeitet. Die Akzeptanzkriterien für die Anwendung von Multianalytmethoden in der Routine sind in der SANTE/11813/2017 geschrieben.

Des Weiteren wird PA-freies Material als Blankprobe und für die Herstellung der Matrix-Standardreihe (siehe Tabelle 2) aufgearbeitet

5.2.2 Probeneinwaage

Es werden je $5,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ der homogenisierten Probe zur Analyse eingewogen.

5.2.3 Extraktion

1. Extraktion	Auf die komplette Probe werden 15 ml Methanol (0,05 M H ₂ SO ₄ 3.3.3) gegeben. Die Extraktion wird dann für 15 min im Überkopfschüttler durchgeführt.
1. Zentrifugation	Die Probe wird für 5 min mit 2500 U/min zentrifugiert (4.7).
1. Filtration	Der methanolische Überstand wird mit Hilfe einer Pipette in ein 50 ml Zentrifugengefäß (4.5) überführt.
2. Extraktion	Auf den Rückstand der ersten Zentrifugation werden erneut 15 ml Methanol (0,05 M H ₂ SO ₄ (3.3.3)) gegeben. Die zweite Extraktion wird dann für 15 min im Überkopfschüttler durchgeführt.
2. Zentrifugation	Die Probe wird für 5 min mit 2500 U/min zentrifugiert (4.7).
2. Filtration	Der zweite Überstand wird mit dem ersten Überstand vereinigt. Das verbleibende Öl kann verworfen werden.

Der methanolische Überstand wird kurz mittels Vortex-Mischer (4.9) homogenisiert. Für die SPE wird ein Aliquot von 25 ml dieser Lösung verwendet.

5.2.4 Festphasenextraktion

Die Probenextrakte werden mittels SPE-Kartuschen HF Bond Elut LRC-SCX, 500 mg Sorbensmaterial (4.18) gereinigt und angereichert. Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.19) durchgeführt.

Konditionierungsschritt 1	5 ml Methanol (3.2.30)
Konditionierungsschritt 2	5 ml 0,05 M H ₂ SO ₄ in MeOH (3.3.3)
Probenauftrag	5 x 5 ml Extraktlösung
Waschschritt	4 ml MeOH (3.2.30)
Waschschritt	4 ml MeOH (3.2.30)
Trocknung	15 min (hierbei Vakuum anlegen)
Elution	2 x 5 ml Methanol (2,5 % NH ₃) (3.3.4)

Im Anschluss wird das Eluat unter Stickstoffstrom bei 50 °C ± 5 °C zur Trockne gebracht (4.11).

5.2.5 Rekonstitution der Probe

Der Rückstand wird in 1 ml Methanol/Wasser (5/95, v/v) (3.3.6) aufgenommen und durch Schütteln auf dem Vortex-Mischer (4.9) gelöst. Die Probe wird durch einen Zentrifugalfilter aus Nylon mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (4.20). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden 500 µl der Probe bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. 200 µl des Filtrats werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.23) mit Glasinsert (4.24) überführt.

5.2.6 Herstellung der Kalibrierlösungen

Um eventuell auftretende Matrixeffekte zu kompensieren wird eine Matrix-Standardreihe verwendet. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von PA-freiem, repräsentativen Probenmaterial.

Um die gleiche Matrixstärke in der Kalibration wie in den Proben sicherzustellen, wird das unbelastete Probenmaterial in der gleichen Weise wie die Proben aufgearbeitet (Kapitel 5). Die MMS-Level werden, wie in Tabelle 2 beschrieben, pipettiert.

Hinweis: Die Linearität des gewählten Kalibrierbereiches ist geräteabhängig und ist in der jeweiligen Messung sicherzustellen. Die Überprüfung der Linearität erfolgt durch das Rekalikulieren der eingesetzten Kalibrierlevel anhand der ermittelten Kalibrierfunktion. Dabei muss die Abweichung der rekalkulierten Konzentration von der wahren Konzentration kleiner 20 % sein (SANTE/11813/2017).

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Kalibrationsreihe (Ölproben)

	Konzentration der Matrix-Kalibration ng/ml	Konzentration in der Probe µg/kg	Aliquot entnommen aus	Aliquot Volumen µl	Aliquot entnommen aus Blank Extrakt µl	Gesamt- volumen µl
MMS_1	1,0	1,2	MMS_3	20	180	200
MMS_2	5,0	6,0	MMS_5	20	180	200
MMS_3	10,0	12,0	MMS_5	40	160	200
MMS_4	25,0	30,0	Standard-Mix (1 µg/ml)	5	195	200
MMS_5	50,0	60,0	Standard-Mix (1 µg/ml)	10	190	200

6 HPLC-MS/MS

6.1 Chromatographische Trennung

Die Messungen können mit verschiedenen Flüssigkeitschromatographen (LC) und Trennsäulen durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestretentionszeit beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule (SANTE/11813/2017). Die im Anhang (9.1) aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (4.26) und den unter 3.3.5 angegebenen Fließmitteln haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

6.2 Tandem-Massenspektrometrische Bestimmung

Die Messungen im SRM-Modus können mit MS/MS-Geräten verschiedener Hersteller durchgeführt werden. Im Anhang (9.1) sind beispielhaft die gerätespezifischen Bedingungen eines Messsystems aufgeführt, die sich als geeignet erwiesen haben. Die Analyten werden im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf drei Fragment-Ionen gewählt.

6.3 Identifizierung von PA (Qualitativer Nachweis)

Die Identifizierung der PA erfolgt durch den Vergleich der Retentionzeit und des Ionenverhältnisses der spezifischen Übergänge (mindestens 2) eines PA in der Probe mit dem ent-

sprechenden Signal im Matrixstandard. Für die maximal erlaubte Abweichung der Retentionszeiten und Ionenverhältnisse erfolgt gemäß der Kriterien der SANTE/11813/2017.

6.4 Bestimmung des PA-Gehaltes (Quantifizierung)

Für die quantitative Analyse mittels LC-MS/MS müssen Matrixeffekte (unterschiedliche Response des Analyten in Lösungsmittel bzw. in der Matrix) kompensiert werden. Das kann(?) anhand einer Matrix-Standardreihe erfolgen (5.1.6 und 5.2.6). Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit geeigneter unbelasteter Proben.

Andere geeignete Verfahren, wie z.B. Standardaddition oder die Verringerung von Matrixeffekten durch Verdünnung sind ebenfalls anwendbar.

6.5 Aufbau der Messequenz für die quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse werden folgende Kriterien festgelegt. Alle Proben und Matrix-Standards (MMS) werden doppelt injiziert. Mittels dieses Vorgehens werden die Wiederholbarkeit der MS-Detektion sowie der mögliche Responsedrift innerhalb der Sequenz geprüft. Die relative Wiederholstandardabweichung RSD_r sollte $\leq 20\%$ sein (SANTE/11813/2017).

- empfohlener Sequenzaufbau

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

1. Kalibrationslösungen
2. Lösungsmittelblindwert
3. Proben (erste Injektion)
4. Lösungsmittelblindwert
5. Kalibrationslösungen
6. Lösungsmittelblindwert
7. Proben (zweite Injektion)

6.6 Maßnahmen zur Qualitätskontrolle

Generell sollten Maßnahmen zur Überprüfung der Performance des LC-MS/MS-Gerätes und der Probenaufarbeitung für jede Probenserie vorgenommen werden.

Da kein zertifiziertes Referenzmaterial pyrrolizidinalkaloidhaltig NEM zur Verfügung steht, sollte die Wiederfindung anhand von dotiertem Leermaterial überprüft werden.

Für eine zusätzliche Überprüfung auf Verluste während der Aufarbeitung unbekannter Proben kann Trichodesmin als Wiederfindungskontrollstandard eingesetzt werden (aufgrund des seltenen Vorkommens).

Dazu wird vor der Probenaufarbeitung eine definierte Menge an Trichodesmin-Standardlösung zur Probe gegeben. Die Menge wird so gewählt, dass die resultierende Konzentration im mittleren Bereich der Matrixstandardreihe liegt. Die Konzentration von Trichodesmin wird dann anhand der Matrixstandardreihe bestimmt und die Wiederfindungsrate wird berechnet.

Bei starker Abweichung (z. B. $> \pm 25\%$) von der im Rahmen der inhouse-Validierung ermittelten Wiederfindungsrate für Trichodesmin, sollte die Analyse der unbekannt Probe wiederholt werden.

7 Berechnung

7.1 Kalibrierfunktion

Gleichung 1: Kalibriergerade

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

wobei:

- y Fläche unter dem Peak des Zielanalyten
- a Steigung der Kalibrierfunktion
- x Konzentration des Zielanalyten [ng/ml]
- b Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

7.2 Quantifizierung

Gleichung 2: Berechnung des Gehaltes an PA (Analytengleichung)

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

wobei:

- β Massenkonzentration [ng/ml]
- DF Umrechnungsfaktor von ng/ml auf µg/kg
- y Peakfläche des Zielanalyten
- b Achsenabschnitt aus Matrixkalibrierung
- a Steigung aus Matrixkalibrierung
- V_{Extrakt} Volumen des Extraktionsmittels [ml]
- m_{Einwaage} Masse der eingewogenen Probe [g]
- V_{Auftrag} Volumen des auf die SPE aufgetragenen Extrakts [ml]
- V_{Probe} Endvolumen der Probe [ml]

Gleichung 3: Umrechnung des PA-Gehaltes auf die jeweilige Darreichungsform

$$S = C \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] \times E [\text{g}]$$

wobei:

- S PA-Gehalt in ng pro Darreichungsform
- C PA-Gehalt in ng/g aus Gleichung 2
- E Gewicht in g der einzelnen Darreichungsform (Tablette, Dragée, etc.)

8 Angabe der Ergebnisse

Die Angabe der Ergebnisse kann in der Einheit „µg/kg“ mit zwei signifikanten Stellen erfolgen. Bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens liegt der Faktor zur Berechnung des Gehalts in µg/kg bei 8 für Nahrungsergänzungsmittel, die auf getrockneten Pflanzenbestandteilen oder Bienenprodukten basieren. Bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens liegt der Faktor zur Berechnung des Gehalts in µg/kg bei 0,24 für Nahrungsergänzungsmittel aus Ölen. Durch die Gleichung 3 ist ebenfalls möglich, den PA-Gehalt in ng/Darreichungsform anzugeben.

Referenzen

- EFSA (2017) Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements.
- DIN 32645 „Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung“. Deutsches Institut für Normung, Berlin 1994
- DIN 32633:2013-05 “Chemische Analytik - Verfahren der Standardaddition - Verfahren, Auswertung”, Deutsches Institut für Normung, Berlin 2013
- Mulder PPJ, López P, Castelari M, et al. (2017) Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across Europe. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment:1-16
- SANTE/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, implemented 01/01/2018
- VERORDNUNG (EG) NR. 519/2014 (15. Mai 2014) zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 hinsichtlich der Probenahmeverfahren für große Partien, Gewürze und Nahrungsergänzungsmittel, der Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Citrinin sowie der Screening-Methoden für die Analyse. *Amtsblatt der Europäischen Union* L147, 29-43

9 Anhang

9.1 LC-MS/MS Messung

LC-MS/MS System bestehend aus

Triple-Quadrupole-Massenspektrometer (z. B. Thermo TSQ Vantage)

HPLC-Anlage z. B. Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
bestehend aus UHPLC-Pumpe, Degasser, Autosampler und
Säulenofen

HPLC-Einstellungen

Eluent A und B 3.3.5
Temperatur Säule 40 °C
Flussrate 300 µl/min
Injektionsvolumen 2 µL
Säule z. B. Thermo Hypersil Gold ® C18; 150 x 2,1 mm, 1,9 µm
Gesamtlaufzeit 15 Minuten

Gradient

Zeit [min]	% A	% 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) 4000 (positive polarity)
Capillary Temperature (°C) 275
Vaporizer Temperature (°C) 350
Sheath Gas Pressure (psi) 45.0
Ion Sweep Gas Pressure (psi) 2.0
Aux Gas Pressure (psi) 10

Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf drei Fragment-Ionen gewählt. Die entsprechenden Übergänge und die Kollisionsenergie (CE) sind Tabelle 3 zu entnehmen. Ebenso ist dort die unter den beschriebenen Bedingungen vorliegende Retentionszeit jedes Analyten aufgeführt.

Tabelle 3: Substanzspezifische Parameter der LC-MS/MS Methode (SRM-Modus)

Kurzbezeichnung	Vorläuferion (amu)	S-Lens Spannung (V)	Fragmentation (amu)	CE (V)	Retentionszeit (min)
Mc	326,2	129	120,1	36	4,25
			194,1	29	
			280,2	23	
Er	350,2	110	120,3	32	4,87
			138,1	30	
			136,3	32	
McN	342,1	90	118,3	37	4,99
			120,2	34	
			136,2	37	
ErN	366,1	129	136,1	30	5,16
			120,1	33	
			118,1	34	
Jb	352,1	120	120,1	36	5,25
			155,2	29	
			280,1	22	
Im	300,1	112	120,2	24	5,40
			138,3	18	
			156,3	28	
Eu	330,1	89	138,1	20	5,34
			156,2	28	
			254,1	16	
JbN	368,1	110	120,1	32	5,51
			296,1	23	
			324,0	26	
EuN	346,1	91	111,2	41	5,63
			172,1	31	
			328,1	37	
La	300,1	112	138,3	18	5,53
			156,3	28	
			156,3	28	
ImN	316,1	95	111,2	37	5,91
			138,1	26	
			172,1	26	
LaN	316,1	95	111,2	37	6,02
		9	138,1	26	
			172,1	26	
Re	352,2	120	120,3	36	7,54
			138,3	28	
			324,2	27	
Td	354,2	109	120,3	35	6,37
			222,3	28	
			308,3	22	

Kurzbezeichnung	Vorläuferion (amu)	S-Lens Spannung (V)	Fragmention (amu)	CE (V)	Retentionszeit (min)
ReN	368,2	110	136,2	31	6,41
			118,2	29	
			120,1	32	
Sp	334,2	100	120,3	26	6,56
			138,4	26	
			306,2	26	
Hn	314,2	91	138,3	19	6,72
			156,3	28	
			120,3	32	
SpN	350,2	110	118,2	36	6,79
			136,3	32	
			120,3	32	
HnN	330,2	110	136,1	30	7,03
			172,1	26	
			111,2	39	
Sv	336,2	135	120,2	27	7,26
			138,2	27	
			308,2	26	
Sc	336,2	135	120,2	27	7,33
			138,2	27	
			308,2	26	
SvN	352,1	110	118,1	30	7,42
			120,1	36	
			136,3	27	
ScN	352,2	110	118,1	30	7,54
			120,1	36	
			136,3	27	
Em	398,2	112	120,3	21	8,02
			220,3	14	
			336,2	16	
EmN	414,2	129	254,1	32	8,01
			352,1	27	
			396,2	24	
Sk	366,2	106	150,3	24	8,19
			168,2	28	
			122,3	31	
Lc	412,2	94	120,2	30	8,99
			336,3	17	
			220,2	18	
LcN	428,1	110	136,1	33	9,33
			253,9	27	
			352,3	21	

9.2 Ergebnisse der *inhouse*-Validierung der Methode (Verfahrenskennndaten)

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden anhand der Probe FP14/0711 (Baldrian Tabletten) mittels Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 ermittelt.

Die Linearität des Arbeitsbereiches wurde mit Hilfe des Anpassungstests nach Mandel (DIN 38402, Teil 51) geprüft.

Aus den beiden Reststandardabweichungen der Funktion 1. und 2. Grades wird die Differenz der Abweichungsvarianzen berechnet und anschließend ein F-Test durchgeführt.

$$PW = \frac{(n-2) \cdot S_{y1}^2 - (n-3) \cdot S_{y2}^2}{S_{y2}}$$

Ist der errechnete Prüfwert (PW) kleiner als der F-Tabellenwert (1; n-3; Signifikanzniveau 99%), wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht, die Kalibrierfunktion 1. Grades ist linear.

Matrix Pflanzenmatrix	Blank-Matrix (FP14-0736, FP14-0751, FP14-0753)
Matrix Bienenprodukte	Blank-Matrix (FP14-0735, FP14-0726, FP14-0740)
Matrix Öle	Sonnenblumenöl (FP14_902)
Einwaage:	0,5 g (Pflanzenmatrix, Bienenprodukte) 5,0 g (Öle)
Probenanzahl n:	4
Kalibrationsbereich:	1 ng/ml bis 150 ng/ml
Vergleichswert (Mandel) F:	8,40

Tabelle 4: Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in pflanzlichen NEM und Bienenprodukten

Analyt	Pflanzenmatrix						Bienenprodukte					
	Mandel Anpassungstest		Matrixstandard [ng/ml]		Probe [µg/kg]		Mandel Anpassungstest		Matrixstandard [ng/ml]		Probe [µg/kg]	
	PW	R ²	LOD	LOQ	LOD	LOQ	PW	R ²	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Mc	0,536 6	0,999 7	0,4	1,4	3,0	10,8	0,439 8	0,998 9	0,3	0,9	2,0	7,3
Er	2,538 5	0,998 6	1,7	5,6	13,4	45,2	0,060 6	0,997 8	0,5	1,8	4,3	14,2
McN	2,726 4	0,998 3	2,3	8,3	18,6	66,3	3,887 1	0,999 5	0,5	1,6	3,6	13,0
ErN	7,913 9	0,997 1	0,6	2,3	5,0	18,1	7,207 0	0,997 8	0,4	1,4	3,0	10,8
Jb	4,520 0	0,998 4	2,2	8,0	17,9	64,1	0,076 1	0,996 4	0,5	1,6	3,7	13,2
Eu	1,550 5	0,999 0	0,3	1,1	2,4	8,6	0,059 7	0,997 3	0,2	0,8	4,2	15,1
Im	1,494 3	0,998 4	0,5	1,7	3,7	13,3	3,746 6	0,996 6	0,4	1,6	3,6	12,7
La	0,289 9	0,999 2	0,5	1,7	3,9	13,8	3,242 2	0,999 2	0,2	0,8	1,7	6,3
JbN	2,374 1	0,998 5	0,5	1,7	3,7	13,3	4,123 0	0,999 6	0,2	0,5	1,2	4,4
EuN	0,011 5	0,999 7	0,4	1,4	3,2	11,5	0,494 8	0,998 9	0,3	1,2	2,8	10,0
ImN	5,775 0	0,999 3	0,5	1,6	3,6	13,0	0,811 6	0,999 5	0,2	0,6	1,4	5,1
LaN	0,377 2	0,998 4	0,5	1,8	4,1	14,8	4,416 7	0,998 4	0,3	1,1	2,5	8,9
Re	0,011 8	0,997 1	2,1	7,4	16,8	59,1	0,485 8	0,998 7	0,3	1,0	2,2	8,0
Td	2,652 7	0,999 5	0,4	1,6	3,6	12,9	0,754 2	0,997 9	0,3	1,2	2,8	10,0
ReN	0,001 6	0,998 2	0,5	1,9	4,3	15,4	0,003 2	0,997 2	0,4	1,5	3,2	11,6
Sp	0,166 1	0,997 3	1,5	5,4	12,1	43,1	0,005 0	0,998 3	0,3	1,1	2,5	9,0
Hn	3,592 6	0,999 6	0,3	1,1	2,3	8,4	1,841 5	0,999 1	0,2	0,8	1,8	6,7
SpN	2,046 1	0,998 5	0,9	3,3	7,3	26,2	2,011 8	0,997 5	0,4	1,4	3,1	11,1
HnN	1,004 9	0,999 7	0,4	1,3	2,9	10,4	1,492 0	0,999 1	0,2	0,8	1,8	6,6
Sc	6,605 3	0,997 4	0,5	1,7	3,7	13,3	3,252 8	0,998 0	0,3	1,2	2,7	9,8
ScN	0,113 4	0,999 4	0,4	1,3	2,9	10,4	0,505 0	0,994 1	0,6	2,1	4,7	16,8
EmN	1,468 4	0,999 6	0,5	1,9	4,3	15,5	1,563 1	0,997 2	0,4	1,5	3,3	11,7
Em	2,968 6	0,999 8	0,3	0,9	2,0	7,4	0,610 8	0,997 5	0,4	1,4	3,1	10,9
Sk	1,583 5	0,997 7	0,4	1,5	3,3	11,8	0,045 3	0,998 8	0,3	0,9	2,1	7,5
Lc	1,694 3	0,999 9	0,4	1,3	2,9	10,4	3,098 5	0,999 3	0,2	0,7	1,6	5,9
LcN	0,895 4	0,999 9	0,6	2,3	5,1	18,3	3,415 5	0,998 5	0,3	1,1	2,4	8,5

Tabelle 6: Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in ölhaltigen NEM

Analyt	Öle					
	Mandel Anpassungstest		Matrixstandard [µg/ml]		Probe [µg/kg]	
	PW	R ²	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Mc	0,1863	0,9974	2,1	7,5	2,5	9,0
Er	0,6119	0,9951	4,5	14,8	5,4	17,8
McN	0,7358	0,9913	3,8	13,6	4,6	16,3
ErN	7,0654	0,9956	2,7	9,8	3,2	11,8
Jb	4,2637	0,9941	3,1	11,2	3,7	13,4
Eu	3,6782	0,9975	2,0	7,3	2,4	8,8
Im	5,2080	0,9979	1,9	6,8	2,3	8,2
La	1,6660	0,9970	2,2	8,0	2,6	9,6
JbN	1,6075	0,9972	2,2	7,8	2,6	9,4
EuN	5,2186	0,9993	1,0	3,8	1,2	4,6
ImN	4,1188	0,9982	1,7	6,2	2,0	7,4
LaN	2,8231	0,9983	1,7	6,0	2,0	7,2
Re	6,1483	0,9959	2,6	9,4	3,1	11,3
Td	1,4914	0,9973	2,1	7,7	2,5	9,2
ReN	8,0195	0,9986	1,5	5,4	1,8	6,5
Sp	7,9630	0,9987	1,5	5,4	1,8	6,5
Hn	2,6501	0,9973	2,1	7,7	2,5	9,2
SpN	8,0546	0,9970	2,2	8,0	2,6	9,6
HnN	7,8314	0,9981	1,8	6,4	2,2	7,7
Sc	5,2665	0,9995	0,9	3,3	1,1	4,0
ScN	1,8170	0,9981	1,8	6,5	2,2	7,8
EmN	4,7516	0,9993	1,1	3,8	1,3	4,6
Em	2,3569	0,9984	1,7	6,0	2,0	7,2
Sk	2,1501	0,9994	1,0	3,6	1,2	4,3
Lc	4,3424	0,9992	1,1	4,1	1,3	4,9
LcN	1,2637	0,9989	1,4	5,0	1,7	6,0

Tabelle 7: Wiederfindungsraten in NEM

Analyt	Wiederfindung [%]					
	Pflanzenmatrix		Bienenprodukte		Öl	
	80 µg/kg (n=14)	800 µg/kg (n=14)	80 µg/kg (n=4)	800 µg/kg (n=4)	6 µg/kg (n=2)	30 µg/kg (n=2)
Mc	91	90	91	85	72	61
Er	85	78	92	85	92	87
McN	107	91	92	71	83	79
ErN	105	95	91	87	100	97
Jb	88	85	84	86	83	88
Eu	102	91	95	91	104	96
Im	102	88	83	88	94	79
La	92	85	91	85	103	89
JbN	102	95	91	91	84	87
EuN	102	91	95	91	102	96
ImN	104	95	88	88	82	81
LaN	107	95	91	85	103	100
Re	98	95	79	83	84	86
Td	95	87	81	86	95	105
ReN	103	95	86	88	64	55
Sp	87	82	82	81	90	84
Hn	98	91	84	90	85	83
SpN	99	94	99	82	98	104
HnN	97	96	88	88	80	70
Sc	85	84	81	75	78	81
ScN	87	81	104	100	69	65
EmN	97	100	106	102	0	0
Em	93	92	98	90	67	58
Sk	96	93	91	82	28	42
Lc	96	95	84	77	68	64
LcN	104	98	91	86	0	0

Hinweis: In ölhaltigen NEM weist die Methode für einige N-Oxide eine nicht ausreichende Wiederfindung auf. Da aufgrund ihrer physikochemische Eigenschaften PAs in ölhaltigen Produkten nicht zu erwarten sind, wird dies als tolerierbar angesehen.

Beispielchromatogramm

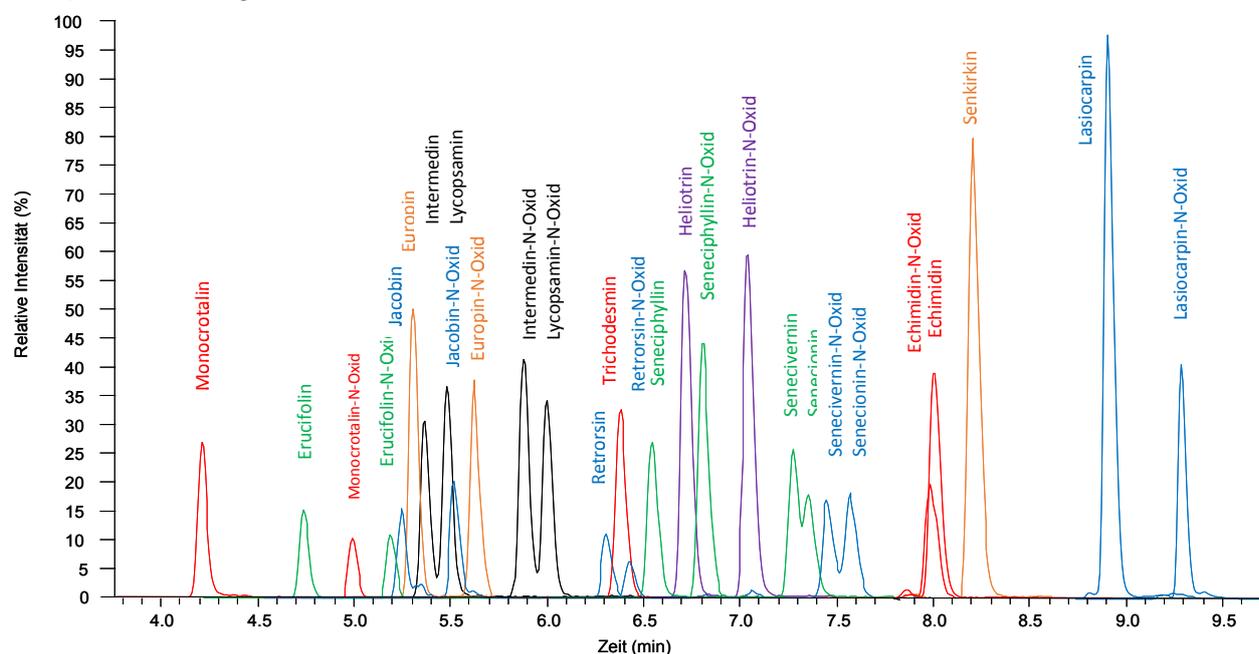


Abbildung 1: Chromatogramm eines Mischstandards [c = 1 ng/ml], SRM

Anbieter von PA-Standardsubstanzen

Pyrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
Echimidin	397,47	520-68-3	Oskar Tropitsch PhytoLab* PlantaAnalytica	7550006 89553 -
Erucifolin	349,38	40158-95-0	PhytoLab*	83446
Erucifolin-N-oxid	365,37	123864-94-8	PhytoLab*	83434
Europin-hydrochlorid	365,86	570-19-4	PhytoLab*	83237
Europin-N-oxid	345,39	65582-53-8	AppliChem PhytoLab*	A9574,0010 83238
Heliotrin	313,40	303-33-3	AppliChem Latoxan* Oskar Tropitzsch PhytoLab	A9583,0020 L6007 7550511 80403
Heliotrin-N-oxid	329,39	6209-65-0	AppliChem Oskar Tropitzsch* PhytoLab	A9590,0010 755054 83236
Indicin-hydrochlorid	335,83	1195140-94-3	PhytoLab	83234
Indicine-N-oxid	315,36	41708-76-3	AppliChem PhytoLab	A9593,0010 83235
Intermedin	299,37	10285-06-0	PhytoLab*	82424
Intermedin-N-oxid	315,36	95462-14-9	PhytoLab*	83434
Lasiocarpin	411,49	303-34-4	AppliChem	A9596,0010

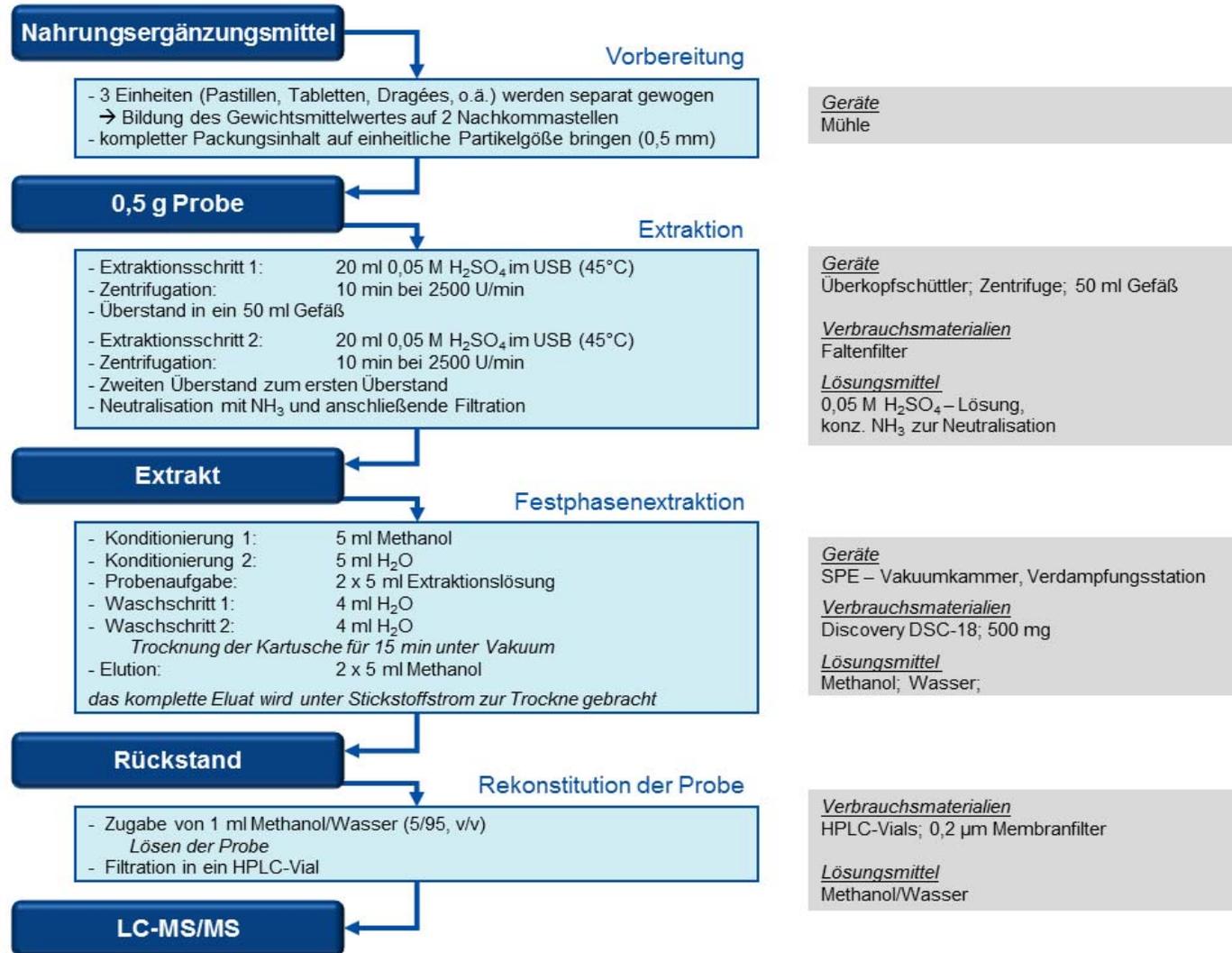
Pyrrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
			Oskar Tropitzsch* PhytoLab	7500019 80412
Lasiocarpin-N-oxid	457,5	127-30-0	AppliChem Oskar Tropitzsch* PhytoLab	A9600,0010 7501284 83220
Lycopsamin	299,37	10285-07-1	Oskar Tropitzsch PlantaAnalytica PhytoLab*	7501080 - 89726
Lycopsamin-N-oxid	315,36	95462-15-0	PhytoLab*	83447
			Carl Roth Fluka Sigma Oskar Tropitzsch PhytoLab*	3418.1 37024 C2401 7550522 89251
Monocrotalin	325,35	315-22-0	R&D Chemicals Santa Cruz Biotechnology Inc.	7351 sc-211921
Monocrotalin-N-oxid	341,36	35337-98-5	PhytoLab*	82629
			AppliChem Fluka Oskar Tropitzsch PhytoLab Santa Cruz Biotechnology Inc. Sigma*	A4922,0020 37025 7550659 89775 sc-215805 R0382
Retrorsin	351,40	480-54-6		
Retrorsin-N-oxid	367,40	15503-86-3	AppliChem PhytoLab*	A8668,0010 82630
			AppliChem Carl Roth* Fluka Oskar Tropitzsch PhytoLab* R&D Chemicals Sigma Santa Cruz Biotechnology Inc.	A2071,0020 2261.1 37031 7550292 89789 1828 17806 sc-286770
Senecionin	335,40	130-01-8		
Senecionin-N-oxid	351,40	13268-67-2	AppliChem Oskar Tropitzsch PhytoLab*	A8678,0010 7500301 82631
			AppliChem Carl Roth* Fluka R&D Chemicals Santa Cruz Biotechnology Inc. ABCR GmbH	A2072,0020 6414.1 37033 1850 sc-229697 AB167974
Seneciphyllin	333,39	480-81-9		

Pyrrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
			PhytoLab*	89275
Seneciphyllin-N-oxid	349,38	38710-26-8	AppliChem	A8684,0010
			Oskar Tropitzsch	7500573
			PhytoLab*	82632
Senecivernin	335,40	72755-25-0	PhytoLab*	83436
Senecivernin-N-oxid	351,39	101687-28-9	PhytoLab*	83437
Senkirkin	365,43	2318-18-5	AppliChem	A6765,0010
			Fluka	37032
			Oskar Tropitzsch	7500441
			PhytoLab*	89274
Trichodesmin	353,41	548-90-3	Latoxan*	L6049

*wurden vom BfR für die in-house-Validierung verwendet

Fließschema zur Probenaufarbeitung

Analysenschema – Nahrungsergänzungsmittel (pflanzen- & bienenproduktbasiert)



Analysenschema – Nahrungsergänzungsmittel (Samenöle)

