



Lebensmittelanalytik

Das Kreuz mit dem Kraut

Pflanzliche Lebens- und Futtermittel können natürlicherweise toxische Pyrrolizidinalkaloide (PA) enthalten. Experten empfehlen daher, agrarbasierte Rohstoffe vor der Verarbeitung sowie Lebens- und Futtermittel hinreichend auf eine Kontamination mit PA zu kontrollieren. Die Methode der Wahl ist die LC/MS-Analyse nach vorangegangener Festphasenextraktion (SPE).

Von Guido Deußing

Auf Viehweiden und Feldern gedeiht nicht nur gesundes Grün, sondern dort finden sich auch Wildkräuter, die Land- und Pferdewirten ein Dorn im Auge sind. Unter anderem handelt es sich dabei um das sogenannte Jakobs-Greiskraut, auch Jakobs-Kreuzkraut genannt, ein in den gemäßigten Zonen Europas weitverbreitetes Rucola-ähnliches Gewächs, das zum Ärger beiträgt. Im Gegensatz zu Rucola ist Jakobs-Greiskraut alles andere als bekömmlich, im Gegenteil. Jakobs-Greiskraut sowie artverwandte Spezies enthalten giftige Pyrrolizidinalkaloide (PA), die von der Pflanze gebildet werden, um sich unter anderem gegen Fressfeinde zur Wehr zu setzen. Auch für den Menschen droht Gefahr: PA sind natürliche Toxine und besitzen eine leberschädigende, manche auch eine genotoxisch-karzinogene Wirkung. Die Aufnahme bereits geringer Mengen PA kann zu einer schleichenden Vergiftung führen, was bei Pferden und Rindern beobachtet wird. Eine PA-Vergiftung kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, mitunter auch zum Tod.

Kontaminationen feststellen

Bedenklich ist, dass Jakobs-Greiskraut unter anderem in handelsüblichen Tees, etwa in Fenchel-, Kamillen-, Kräuter-, Pfefferminz-, Brennnessel- und Melissentee festgestellt wurde. Nach einer Einschätzung schlussfolgert das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin, die in den Lebensmitteln (Kräutertees, Rooibos-tee, schwarzem und grünem Tee sowie Honig) vorkommenden PA-Mengen seien für Kinder und Erwachsene bei längerer (chronischer) Aufnahme gesundheitlich bedenklich [1]. Und es sei Aufgabe der Lebensmittelunternehmen, konstatiert das BfR, Maßnahmen zu ergreifen, um die Belastung von Lebensmitteln mit PA zu senken.

Wie groß die Herausforderung ist, die es hierbei zu meistern gilt, macht folgende Betrachtung deutlich: Insgesamt gibt es mehr als 6.000 Pflanzenspezies, die PA produzieren, das sind drei Prozent der weltweiten Blühpflanzen, rechnet Dr. Birgit Christall vom Bund

für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde vor [3]. Bekannt sind und in mehr als 350 Pflanzen weltweit nachgewiesen wurden mehr als 600 verschiedene PA-Verbindungen und deren N-Oxide, berichtet das BfR. Die große Verbreitung von PA-Pflanzen weltweit lasse mutmaßen, gab Dr. Birgit Christall auf dem 16. BfR-Forum Verbraucherschutz im Dezember 2015 zu bedenken, dass es bei genauer Betrachtung keinen hundertprozentigen Schutz von Mensch und Tier vor PA gebe.

Diese Sicht mag ein Hinweis darauf sein, warum bislang keine gesetzlich vorgeschriebenen Bestimmungs- oder Grenzwerte für Pyrrolizidinalkaloide in Futter- und Lebensmitteln existieren, allenfalls Empfehlungen beziehungsweise ein „Code of Practice“ [4] der Kommission des „Codex Alimentarius“ [2] bezüglich der Handhabung sowie der Freisetzung und Verbreitung PA-haltiger Pflanzen. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sieht derzeit keine Möglichkeit, eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI-Wert) festzulegen.

Für das BfR gilt dem Grunde nach eine Nulltoleranzgrenze, die einzuhalten unter den gegebenen Umständen jedoch unrealistisch erscheint. Getreu dem Motto, „allein die Dosis macht das Gift“, rät Dr. Birgit Christall, die PA-Gehalte in Lebens- und Futtermitteln so niedrig wie möglich zu halten. Dies zu überwachen, erfordert eine wirksame, hochsensitive, durchsatzstarke Analytik.

Wirksamer Verbraucherschutz

Die Analyse landwirtschaftlicher Erzeugnisse einschließlich Futter- und Lebensmitteln auf das Vorhandensein kritischer PA ist alles andere als leicht, schlussfolgert das BfR [1]: Alkaloide stellen aufgrund ihrer großen strukturellen Vielfalt und ihres Vorkommens in unterschiedlichen Lebensmitteln eine besondere Herausforderung dar. In den letzten Jahren hat das BfR nach eigenen Angaben spezifische Nachweismethoden entwickelt und in Ringversuchen validiert. Diese Methoden ließen sich in der Lebens- und Futtermittelüberwachung der Länder sowie der Industrie einsetzen. Derzeit stehe allerdings nur eine begrenzte Anzahl der vorkommenden PA als Referenzstandard zur Verfügung, sodass im BfR zusätzliche Analysenverfahren entwickelt wurden, um den gesamten PA-Gehalt abschätzen zu können.

Für die Bestimmung von PA in Pflanzenmaterial empfiehlt das BfR eine LC-MS/MS-Methode nach vorangegangener Anreicherung der Analyten mittels Festphasenextraktion (SPE) [5]:

Die PA werden aus dem Pflanzenmaterial mit schwefelsaurem Wasser unter Verwendung eines Ultraschallbads zweifach extrahiert. Anschließend werden die Proben zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wird zur Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von C18-Materialien eingesetzt. Nach der methanolischen Elution der PA wird das Eluat bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in einem Methanol-Wasser-Gemisch aufgenommen. Im Anschluss daran erfolgen

die chromatographische Trennung und die Detektion mittels Massenspektrometrie. [1]

Automatisierung schafft Mehrwert

Ein Auftragslabor, das sich auf die Analyse von Lebens- und Futtermitteln spezialisiert hat, ist auf eine effiziente Bearbeitung der Proben angewiesen. Das gilt auch in Bezug auf den Nachweis von PA. „Hierin liegt allerdings das Manko der BfR-Methode, nämlich der hohe Arbeits- und Zeitaufwand insbesondere für die Probenvorbereitung“, sagt Franziska Chmelka, diplomierte Lebensmitteltechnologin und Geschäftsführerin der TeLA GmbH. Die TeLA ist ein akkreditiertes, auf die Analyse von Lebensmitteln und Umweltproben spezialisiertes Auftragslabor. Um die Produktivität bei der Analytik zu steigern, hat die TeLA die BfR-Methode automatisiert.

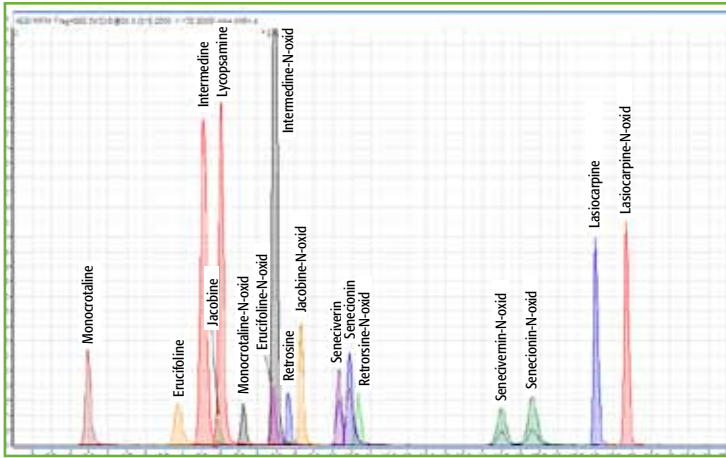
Fokus auf eingesetzter Analystechnik

Für die Probenvorbereitung für die PA-Analyse nutzen Franziska Chmelka und Kollegen den MultiPurpose-Sampler (GERSTEL-MPS). Einen zentralen Punkt bildet hierbei die automatisierte SPE in Verbindung mit einem LC-MS/MS-System von Agilent Technologies (1290er HPLC mit 6495 Triple-Quadrupol). Die Trennung der Analyten erfolgt auf einer Standard-RP-Phase (Nucleodur C18 HTec 250 x 2 mm x 5 µm, Macherey-Nagel) unter Verwendung eines Eluentengradienten, bestehend aus 5 mM Ameisensäure (Eluent A) und Me-



Für die Bestimmung der Pyrrolizidinalkaloide wurde eine Gerätekombination, bestehend aus einem MultiPurposeSampler (GERSTEL-MPS), konfiguriert für die automatisierte Ausführung der SPE, in Verbindung mit einem LC-MS/MS-System von Agilent Technologies (1290er HPLC mit 6495 Triple-Quadrupol), verwendet.

thanol (Eluent B): 0 min (5 % B) – 3 min (5 % B) – 7 min (20 % B) – 13 min (20 % B) – 16 min (65 % B) – 17 min (95 % B) – 20,1 min (5 % B). Die Flussrate beträgt 0,25 mL/min, die Säulentemperatur 28 °C. Injiziert werden 5 µL des Eluats. Die Analyten werden im Multiple Reaction Monitoring (MRM, ESI positiv) gezielt detektiert. Für die Methodenentwicklung verwenden sie eine wässrige Standardlösung, die 17 verschiedene, in der BfR-Methode genannte PA enthält: Monocrotalin, Erucifolin, Intermedin, Jacobin, Lycopsamin, Monocro-



Die Analyse der Standardmischung der untersuchten Pyrrolizidinalkaloide erbrachte ein in jeder Hinsicht sauberes Chromatogramm mit gut aufgelösten Signalen. Eine gute Trennung und Auflösung der einzelnen Substanzen ist äußerst wichtig, weil viele sehr ähnliche Massenübergänge besitzen und somit eine Differenzierung der verschiedenen PA nur über Retentionszeiten möglich ist. (Quelle: TeLA GmbH)

taline-N-oxid, Eucifolin-N-oxid, Intermedin-N-oxid, Retrorsin, Jacobin-N-oxid, Senecivernin, Senecionin, Retrorsin-N-oxid, Senecivernin-N-oxid, Senecionin-N-oxid, Lasiocarpin und Lasiocarpin-N-oxid.

Automatisierte SPE als Schlüssel

„Unser Augenmerk bei der Methodenentwicklung lag auf der Automatisierung des zeit- und arbeitsintensivsten Arbeitsschritts, sprich der Festphasenextraktion (SPE)“, berichtet Franziska Chmelka. Nach der erforderlichen Experimentierphase legten sich die Applikationsexperten der TeLA auf ein geeignetes C18-RP-Material als Sorbens fest (Macherey-Nagel C18 ec 3 mL/500 mg). Sämtliche SPE-Schritte ließen sich im Zuge ihrer Methodenentwicklung erfolgreich automatisieren: die Kon-

ditionierung des Sorbens mit 5 mL Methanol und 5 mL Wasser, die Aufgabe von 5 mL Probe auf das Sorbens sowie die Elution der Analyten mit 5 mL Methanol. „Es ist uns ebenfalls gelungen“, berichtet Dr. Norbert Helle, geschäftsführender Gesellschafter der TeLA und ausgewiesener LC/MS-Experte, „das Eindampfen des Eluats, die Wiederauf-

nahme des Rückstands in 1 mL zehnpromtigem Methanol sowie die Injektion von 5 µL des resultierenden Extrakts in das LC-MS/MS-System zu automatisieren.“

Die Analyse der Standardmischung habe ein in jeder Hinsicht sauberes Chromatogramm mit gut aufgelösten Signalen ergeben. Franziska Chmelka: „Eine gute Trennung und Auflösung der einzelnen Substanzen ist äußerst wichtig, weil viele Analyten ähnliche Massen-

übergänge besitzen und somit eine Differenzierung der verschiedenen PA über Retentionszeiten notwendig ist.“

Anschließend stellten die TeLA-Applikationsexperten die Funktionstauglichkeit von Gerät und Methode auf den Prüfstand, indem sie reale Proben, sprich die Blätter von Jakobs-Greiskraut, analysierten.

Hierbei zeigte sich, „sämtliche statistisch relevanten Parameter sprachen für die hohe Güte unserer automatisierten SPE-LC-MS/MS-Methode“, sagt Franziska Chmelka und berichtet weiter: „Die Linearität ist über einen weiten Kalibrationsbereich bis herunter auf 1 ng/mL hervorragend. Gleiches gilt für die Wiederfindung, die von Analyt zu Analyt zwischen 85 und 98 Prozent variiert. Die Reproduzierbarkeit der Methode – einschließlich Probenvorbereitung und Messung – zeigt eine analytabhängige Schwankungsbreite zwischen 1,3 und 4,8 Prozent. Besonders wichtig war uns, dass die Retentionszeiten stabil sind und lediglich zwischen 0,063 und 0,35 Prozent über einen Messzeitraum von mehreren Tagen schwanken. Erreichen lassen sich Bestimmungsgrenzen zwischen 0,5 und 0,05 µg/kg.“

In einem weiteren Arbeitsschritt gingen Franziska Chmelka und Kollegen der Frage nach, wie viele PA letztendlich tatsächlich in den Tee übergehen. Zu diesem Zweck versetzten sie Kamillentees mit unterschiedlichen Mengen Jakobs-Greiskraut; dessen Anteil betrug 10,1 respektive 0,1 Gewichtsprozent gegenüber dem Kamillentees. Über das Resultat der Messung sagt Franziska Chmelka: „Bereits eine Dreingabe von 0,1 Prozent genügt, um PA im Tee in signifikanter Menge nachzuweisen.“

Was am Ende zu sagen übrig bleibt

Alle von ihnen durchgeführten Untersuchungen bestätigten die hohe Güte und Praxistauglichkeit ihrer automatisierten SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von PA aus Lebens- und Futtermittelmatrices sowie aus anderen pflanzlichen Rohstoffen, berichtet die Lebensmitteltechnologin. Und mit Blick in die Zukunft sagt Franziska Chmelka, dass es darauf ankomme, die Zahl der untersuchten PA-Verbindungen zu erweitern sowie den Versuch zu unternehmen, die Empfindlichkeit der Messung weiter zu verbessern. In ihrer jetzigen Ausführung liefere ihre Methode allerdings bereits überaus zufriedenstellende Resultate, unterstreicht Franziska Chmelka.

Quellen

- [1] www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-pyrrolizidinalkaloiden-in-lebensmitteln.pdf (22. 12. 2017)
- [2] de.wikipedia.org/wiki/Codex_Alimentarius (22. 12. 2017)
- [3] www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-in-lebensmitteln-aktivitaeten-des-bll-und-positionen-der-lebensmittelwirtschaft.pdf (22. 12. 2017)
- [4] ehpta.eu/pdf/cop-revision-20090245.pdf
- [5] www.bfr.bund.de/cm/343/bestimmung-von-pyrrolizidinalkaloiden.pdf (22. 12. 2017)



Kamillentees (links), versetzt mit 0,1 % Jakobs-Kreuzkraut (rechts).