

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

**Methodenbeschreibung**

BfR-PA-Tee-2.0/2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. Anwendungsbereich .....	3
2. Kurzbeschreibung .....	3
3. Chemikalien und Lösungen .....	3
3.1 Allgemein .....	3
3.2 Chemikalien .....	3
3.3 Lösungen .....	4
4. Geräte .....	6
4.1 Allgemein .....	6
5. Durchführung .....	7
5.1 Probenvorbereitung (Mahlen des Pflanzenmaterials) .....	7
5.2 Extraktion .....	7
5.3 SPE .....	8
5.4 Rekonstitution der Probe .....	8
6. HPLC-MS/MS .....	8
6.1 Chromatographische Trennung .....	8
6.2 MS-Bedingungen .....	8
6.3 Messung .....	9
7. Berechnungen .....	9
7.1 Kalibrierfunktion .....	9
7.2 Quantifizierung .....	10
7.3 Angabe der Ergebnisse .....	10
8. Anhang .....	11
8.1 LC-MS/MS Messung .....	11
8.2 Beispielchromatogramm .....	15
8.3 Anbieter von PA-Standardsubstanzen .....	15
8.4 Fließschema zur Probenaufarbeitung .....	17

## 1. Anwendungsbereich

Pyrrrolizidinalkaloide (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, Astera-ceae und Fabaceae gebildet werden. Auf Grund der weltweiten Verbreitung dieser Pflanzen, kann es leicht zu Kontaminationen von pflanzlichen Lebens- und Genussmitteln, Phytopharmaka oder auch tierischen Futtermitteln kommen (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2011).

Die Methode beschreibt die Bestimmung folgender Pyrrrolizidinalkaloiden in Pflanzenmaterial: Senecionin (Sc), Senecionin-N-oxid (ScN), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin-N-oxid (SpN), Senecivernin (Sv), Senecivernin-N-Oxid (SvN), Monocrotalin (Mc), Monocrotalin-N-oxid (McN), Retrorsin (Re), Heliotrin (Hn), Heliotrin-N-oxid (HnN), Trichodesmin (Td), Retrorsin-N-oxid (ReN), Echimidin (Em), Echimidin-N-Oxid (EmN), Intermedin (Im), Intermedin-N-Oxid (ImN), Lycopsamin (La), Lycopsamin-N-Oxid (LaN), Europin (Eu), Europin-N-Oxid (EuN), Erucifolin (Er), Erucifolin-N-Oxid (ErN), Jacobin (Jb), Jacobin-N-Oxid (JbN), Senkirkin (Sk), Lasiocarpin (Lc) und Lasiocarpin-N-Oxid (LcN). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die während der in-house Validierung bestimmt wurden, befinden sich im Anhang (8.1) in Tabelle 3.

## 2. Kurzbeschreibung

Die PA werden aus dem Pflanzenmaterial mittels schwefelsaurem Wasser unter Verwendung eines Ultraschallbads zweifach extrahiert. Die Proben werden anschließend zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands wird zur Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von C-18-Materialien eingesetzt. Nach methanolischer Elution der PA, wird das Eluat zur Trockne gebracht und wieder in Methanol/Wasser (HPLC-Anfangsbedingungen) aufgenommen.

Zur chromatographischen Trennung wird eine RP18-HPLC-Säule mit einem binären Gradienten verwendet. Die Analyten werden mittels Triple Stage Quadrupole Massenspektrometrie detektiert. Die Konzentration der Pyrrrolizidinalkaloide 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	Europin-N-Oxid	(EuN)
3.2.19	Europinhydrochlorid	(Eu)
3.2.20	Echimidin-N-oxid	(EmN)
3.2.21	Erucifolin	(Er)
3.2.22	Erucifolin-N-Oxid	(ErN)
3.2.23	Intermedin-N-Oxid	(ImN)
3.2.24	Jacobin	(Jc)
3.2.25	Jacobin-N-Oxid	(JcN)
3.2.26	Lycopsamin-N-Oxid	(LaN)
3.2.27	Senecivernin	(Sv)
3.2.28	Senecivernin-N-Oxid	(SvN)

- 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:**

Zur Herstellung des Extraktionsmittels werden 2,665 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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 2,5% Ammoniak in Methanol (zur SPE-Elution für Schwarz-/Grüntee)

Zur Herstellung der ammoniakalischen Methanol-Lösung werden 7,8 ml 32% Ammoniak mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist arbeitstäglich frisch anzusetzen.

3.3.4 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.

▪ 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.

3.3.5 Standardlösung zur Kalibration

▪ Stammlösung (0,1 mg/ml):

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 mg eines Pyrrolizidinalkaloidstandards auf einer Präzisionswaage (4.4) eingewogen und mit Acetonitril (3.2.34) im Messkolben auf 10 ml aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/ml.

▪ Standard-Arbeitslösung 1 µg/ml (PA-Mix)

Für die Standard-Arbeitslösung werden jeweilige Volumina der einzelnen PA-Stammlösung (0,1 mg/ml) in ein Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.34) bis zur Messmarke aufgefüllt, sodass man eine Konzentration von 1 µg/ml PA erhält.

▪ Herstellung der Matrix-Standardreihe (Matrix matched standard - MMS)

Für die Kompensation eventuell auftretender Matrixeffekte wird eine Matrix-Standardreihe (MMS) verwendet. Um hierbei die gleiche Matrixstärke in der Kalibration wie in den Proben zu erreichen, wird ein Blank-Pflanzenmaterial in gleicher Weise wie die Proben aufgearbeitet (Kapitel 5). Um ausreichend Blank-Matrix-Extrakt für die Herstellung der MMS zu erhalten, werden zweimal 10 ml des neutralisierten Blank-Extraktes (5.2) mittels SPE aufgereinigt. Dies ergibt 2 ml rekonstituierten Blankextrakt zur Herstellung der MMS. Die MMS Level werden, wie in Tabelle 1 beschrieben, pipettiert.

Tabelle 1: Schema zur Herstellung der MMS

	Konzentration der Matrix- Kalibration ng/ml	Konzentration in der Probe µg/kg	Aliquot entnommen aus	Aliquot Volumen µl	Aliquot entnommen aus Blank PM-Extrakt µl
MMS_1	5,0	10,0	MMS_5	20	280
MMS_2	10,0	20,0	MMS_8	20	280
MMS_3	25,0	50,0	MMS_8	20	100
MMS_4	50,0	100,0	PA-Mix	10	100
MMS_5	75,0	150,0	PA-Mix	15	185
MMS_6	100,0	200,0	PA-Mix	20	180
MMS_7	125,0	250,0	PA-Mix	25	175
MMS_8	150,0	300,0	PA-Mix	60	340

## 4. Geräte

### 4.1 Allgemein

Neben der normalen Laborausrüstung werden folgende Geräte verwendet:

#### 4.2 Mühle

4.3 diverse Kolbenhubpipetten, Mehrfachdispenser, z.B. Fa. Brand

4.4 Präzisionswaage, Genauigkeit: 0,0001 g

4.5 Zentrifuge für 50 ml Zentrifugengefäße, 5000 x g

#### 4.6 Ultraschallbad

4.7 Überkopfschüttler, z.B. Heidolph

4.8 Reagensglasschüttler, z.B. Fa. Vortex

4.9 Verdampfungsstation, z.B. TurboVap

4.10 Zentrifugengefäß 50 ml

4.11 Reagenzgläser 15 ml

4.12 Messkolben, 10 und 20 ml

4.13 Faltenfilter, z.B. Munktell

4.14 SPE-Kartuschen: DSC-C18 SPE (Supelco), 500 mg, 6ml

#### 4.15 SPE-Vakuumkammer

4.16 Filter 0,2 µm, z.B. VWR Zentrifugalfilter 0,5 ml, modifizierter Nylonmembran

4.17 HPLC-Probenvials 2 ml

4.18 Glasinserts, 250 µl konisch für 2 ml Probenvials

4.19 LC-Säule, z.B. Fa. Thermo, Hypersil Gold® C18; 150 x 2,1 mm; 1,9 µm

#### 4.20 LC-MS/MS System

## 5. Durchführung

### 5.1 Probenvorbereitung (Mahlen des Pflanzenmaterials)

Um für die Gesamtprobe repräsentative Analysenergebnisse zu erhalten, wird diese vor der Analyse auf eine einheitliche Partikelgröße gebracht und homogenisiert. Dazu wird die gesamte Probe portionsweise mit Trockeneis gemischt (im Verhältnis 2:1), auf eine Korngröße von 0,5 mm gemahlen (4.2) und anschließend homogenisiert, z. B. durch Schütteln im Überkopfschüttler (4.7): Alternativ zur Verwendung von Trockeneis (sehr gleichmäßige Vermahlung aufgrund von Scherkräften und Porosität des gekühlten Probenmaterials) kann auch auf eine Korngröße von 0,25 mm gemahlen werden, sofern die Probe dabei nicht maßgeblich erhitzt wird.

Sollte weder das Mahlen auf 0,5 mm Korngröße mit Trockeneis noch das Mahlen auf 0,25 mm Korngröße möglich sein, so kann eine im Vergleich zu 5.2 erhöhte Menge von mindestens 10 g der auf 0,5 mm Korngröße gemahlten Probe eingewogen werden. Das verwendete Volumen an Extraktionslösungsmittel muss entsprechend erhöht werden, damit das Verhältnis von Einwaage zu Extraktionslösungsmittel gleich bleibt.

### 5.2 Extraktion

Für die Extraktion werden  $2,0 \pm 0,1$  g Pflanzenmaterial in ein geeignetes Zentrifugengefäß (4.10) eingewogen.

- |                |   |
|----------------|---|
| 1. Extraktion  | Auf die komplette Probe werden 20 ml der 0,05 M $H_2SO_4$ (3.3.1) gegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das komplette Probenmaterial mit dem Lösungsmittel benetzt ist. Die Extraktion wird dann für 15 min bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad (4.6) durchgeführt.                     |
| Zentrifugation | Die Probe wird für $10 \text{ min} \pm 2 \text{ min}$ mit $3800 \times g$ zentrifugiert (4.5). Der Überstand (Extrakt 1) wird in ein geeignetes sauberes Gefäß übergeführt. Der Rückstand wird für eine zweite Extraktion verwendet.  |
| 2. Extraktion  | Auf die bereits extrahierte Probe werden erneut 20 ml der 0,05 M $H_2SO_4$ (3.3.1) gegeben und das Pflanzenmaterial wird durch Schütteln (gegebenenfalls durch Rühren) im Extraktionsmittel vollständig suspendiert. Anschließend wird erneut für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad extrahiert. |
| Zentrifugation | Die Probe wird erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem ersten Extrakt vereinigt.  |
| Neutralisation | Die vereinigten Extrakte werden mit der $NH_3$ -Lösung (3.3.2) auf pH 6-7 eingestellt. Die pH-Wert-Kontrolle erfolgt mit Indikatorstäbchen. In der Regel werden ca. 500 $\mu\text{l}$ bis 1000 $\mu\text{l}$ der $NH_3$ -Lösung benötigt.   |

Der neutralisierte Gesamtextrakt wird über einen Papierfilter filtriert. Ein Aliquot des Filtrates wird für die SPE verwendet. Sollte das Filtrat noch größere Mengen an Partikeln enthalten, kann dieses zusätzlich zentrifugiert werden um ein Verstopfen der SPE-Kartuschen zu verhindern.

## SPE

Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.15) durchgeführt.

<b>Konditionierungsschritt 1:</b>	5 ml Methanol (3.2.30)
<b>Konditionierungsschritt 2:</b>	5 ml Wasser
<b>Probenaufgabe</b>	10 ml Probe
<b>Waschschritt</b>	2 x 5 ml Wasser
<b>Trocknung</b>	5 - 10 min (hierbei Vakuum anlegen) 2 x 5 ml Methanol (3.2.30) bzw.
<b>Elution:</b>	im Fall von Grün- und Schwarztee: 2 x 5 ml ammoniakalisches Methanol (3.3.3)

Im Anschluss wird das Eluat unter Stickstoffstrom bei  $50\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  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 (4.8) gelöst.

Die Probe wird durch einen geeigneten Filter mit einer Porengröße von  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  filtriert (4.16). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden  $500\text{ }\mu\text{l}$  der Probe bei  $20000 \times g$  für 10 min zentrifugiert.  $200\text{ }\mu\text{l}$  des Filtrats werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.17) mit Glasinsert (4.18) 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. Intermedin und Lycopsamin). Die im Anhang (8.1) aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (4.19) und den unter 3.3.4 angegebenen Fließmitteln haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

### 6.2 MS-Bedingungen

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

**Hinweis:** Für den qualitativen Nachweis sowie für die Quantifizierung ist es erforderlich, das pro Analyt mindestens zwei substanzspezifische Übergänge detektiert und ausgegeben werden.



### 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 von der Pyrrolizidinalkaloide wird die folgende Reihenfolge der Analysen in einer Sequenz festgelegt.
  1. Kalibrationslösungen (5 – 150 ng/ml)
  2. Lösungsmittelblindwert
  3. Proben (erste Injektion)
  4. Lösungsmittelblindwert
  5. Kalibrationslösungen (5 – 150 ng/ml)
  6. Lösungsmittelblindwert
  7. Proben (zweite Injektion)

### 7. Berechnungen

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 der Ergebnisse

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 Pflanzenmaterial in  $\mu\text{g/kg}$  liegt bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens der Faktor bei 2.

## Referenzen

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 bestehend aus

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

#### HPLC-Einstellungen

**Eluent A**                            siehe 3.3.4  
**Eluent B**                            siehe 3.3.4  
**Temperatur Säule**                40 °C  
**Flussrate**                            300 µl/min  
**Injektionsvolumen**                10 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 Valve Flow**                        10

#### Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden durch Selected Reaction Monitoring (SRM) detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf drei Tochterionen (*Fragmentionen*) 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

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

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

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

Analyt	LOD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Mc	0,9	2,8
McN	1,7	5,4
ErN	1,2	3,8
Jb	1,3	4,0
Eu	0,7	2,1
Im	1,0	3,1
JbN	1,3	4,2
La	2,0	6,4
EuN	0,7	2,3
ImN	1,2	3,8
LaN	1,5	4,9
Td	1,0	3,1
ReN	1,4	4,6
Sp	1,3	4,0
Hn	0,5	1,7
Er	0,6	1,9
SpN	0,9	2,7
HnN	0,6	2,0
Sv	1,7	5,3
Sc	1,8	5,9
SvN	0,8	2,6
Re	0,8	2,7
ScN	0,9	2,9
EmN	1,9	6,1
Em	0,8	2,6
Sk	0,8	2,4
Lc	0,8	2,4
LcN	0,9	2,8

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

## 8.2 Beispielchromatogramm

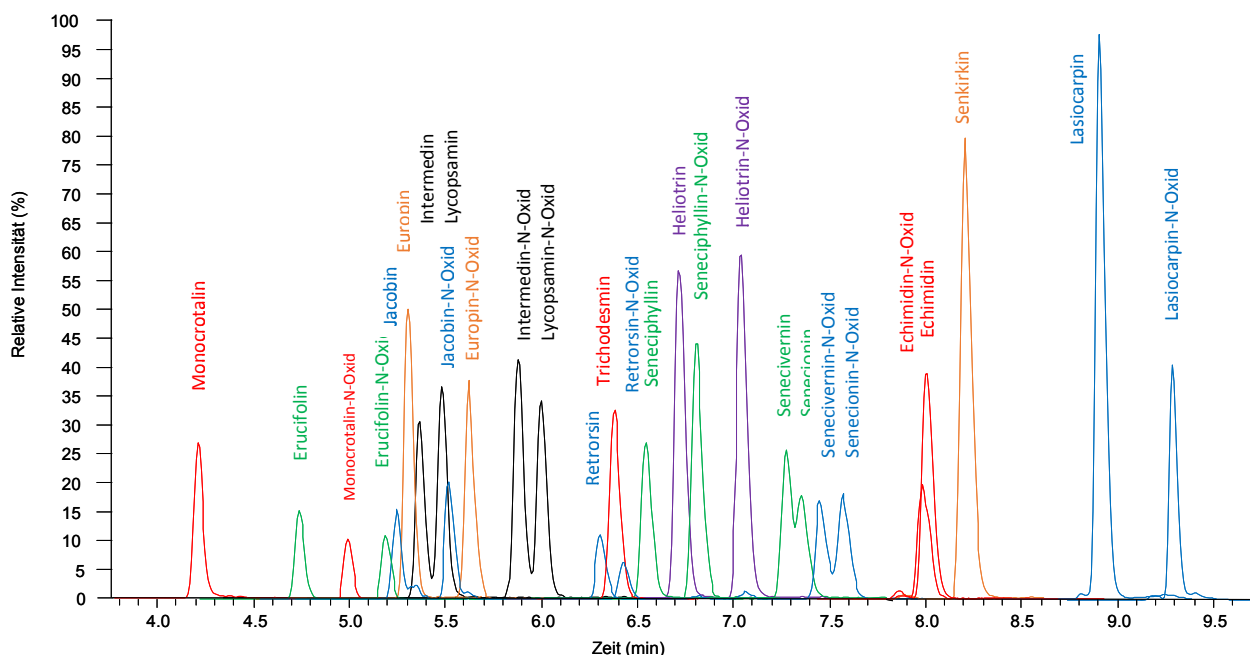


Abbildung 1: Chromatogramm eines Mischstandards [c = 1 ng/ml], SRM

## 8.3 Anbieter von PA-Standardsubstanzen

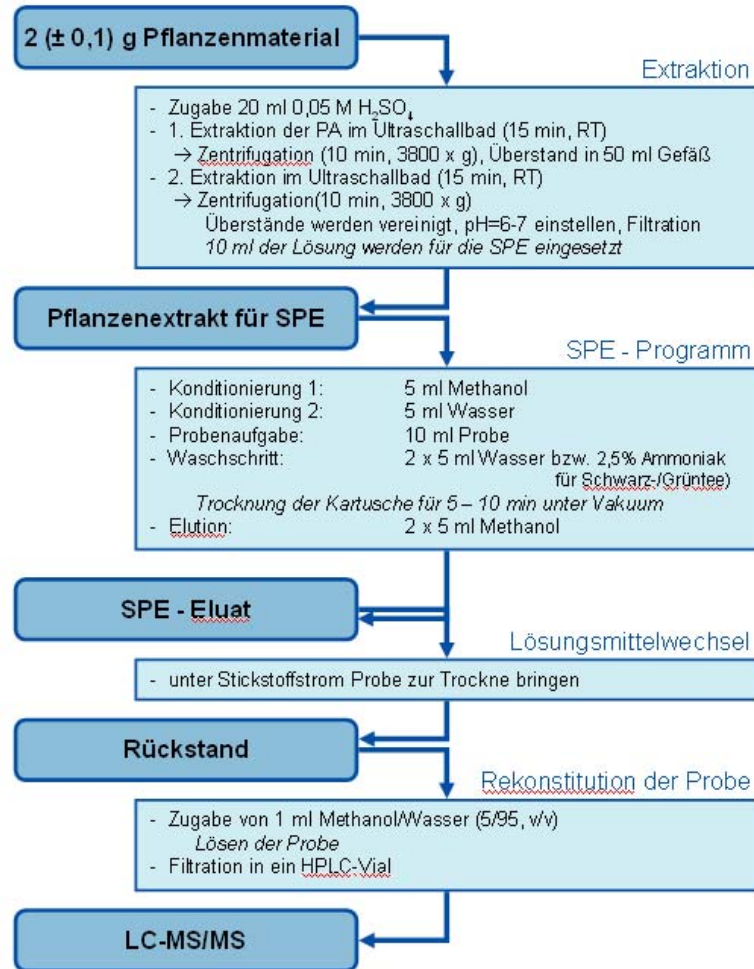
Pyrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
Echimidin	397,47	520-68-3	Oskar Tropitsch PhytoLab* PlantaAnalytica	7550006 89553 -
Erucifolin	349,38	40158-95-0	PhytoLab*	83446
Erucifolin-N-oxid	365,37	123864-94-8	PhytoLab*	83434
Europin-hydrochlorid	365,86	570-19-4	PhytoLab*	83237
Europin-N-oxid	345,39	65582-53-8	AppliChem PhytoLab* AppliChem	A9574,0010 83238 A9583,0020
Heliotrin	313,40	303-33-3	Latoxan* Oskar Tropitsch PhytoLab	L6007 7550511 80403
Heliotrin-N-oxid	329,39	6209-65-0	AppliChem Oskar Tropitsch* 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 Oskar Tropitsch* PhytoLab	A9596,0010 7500019 80412
Lasiocarpin-N-oxid	457,5	127-30-0	AppliChem Oskar Tropitsch* PhytoLab	A9600,0010 7501284 83220

<b>Pyrrolizidinalkaloid</b>	<b>Molekülmasse</b>	<b>CAS</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Bestellnummer</b>
Lycopsamin	299,37	10285-07-1	Oskar Tropitzsch	7501080
			PlantaAnalytica	-
			PhytoLab*	89726
Lycopsamin-N-oxid	315,36	95462-15-0	PhytoLab*	83447
Monocrotalin	325,35	315-22-0	Carl Roth	3418.1
			Fluka	37024
			Sigma	C2401
			Oskar Tropitzsch	7550522
			PhytoLab*	89251
			R&D Chemicals	7351
Monocrotalin-N-oxid	341,36	35337-98-5	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-211921
Retrorsin	351,40	480-54-6	PhytoLab*	82629
			AppliChem	A4922,0020
			Fluka	37025
			Oskar Tropitzsch	7550659
			PhytoLab	89775
			Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-215805
Retrorsin-N-oxid	367,40	15503-86-3	Sigma*	R0382
Senecionin	335,40	130-01-8	AppliChem	A8668,0010
			PhytoLab*	82630
			AppliChem	A2071,0020
			Carl Roth*	2261.1
			Fluka	37031
			Oskar Tropitzsch	7550292
			PhytoLab*	89789
			R&D Chemicals	1828
			Sigma	17806
Senecionin-N-oxid	351,40	13268-67-2	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-286770
Seneciphyllin	333,39	480-81-9	AppliChem	A8678,0010
			Oskar Tropitzsch	7500301
			PhytoLab*	82631
			AppliChem	A2072,0020
			Carl Roth*	6414.1
			Fluka	37033
Seneciphyllin-N-oxid	349,38	38710-26-8	R&D Chemicals	1850
			Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-229697
			ABCR GmbH	AB167974
			PhytoLab*	89275
Senecivernin	335,40	72755-25-0	AppliChem	A8684,0010
			Oskar Tropitzsch	7500573
			PhytoLab*	82632
Senecivernin-N-oxid	351,39	101687-28-9	PhytoLab*	83436
			PhytoLab*	83437
			AppliChem	A6765,0010
Senkirkin	365,43	2318-18-5	Fluka	37032
			Oskar Tropitzsch	7500441
			PhytoLab*	89274
			Latoxan*	L6049

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



## 8.4 Fließschema zur Probenaufarbeitung



Risiken erkennen – Gesundheit schützen

Geräte

Ultraschallbad; Zentrifuge; 50 ml Gefäß, 10ml Pipette, Filter

Lösungsmittel/

0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>– Lösung, NH<sub>3</sub>-Lösung

Geräte

SPE - Vakuumkammer

Verbrauchsmaterialien

DSC-C18 SPE Kartusche; 500 mg

Lösungsmittel/

Methanol; Wasser; 2,5% Ammoniak

Geräte

Verdampfungsstation

Verbrauchsmaterialien

HPLC-Vials; 0,2 µm Membranfilter

Lösungsmittel/

Methanol/Wasser