

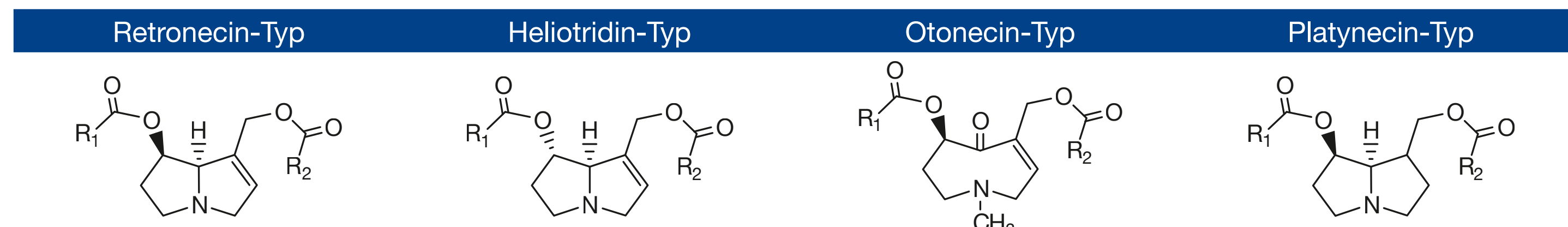
Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzenmaterial mittels SPE/LC/MS/MS

H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D, M. Roedel, Düren/D, H. Riering, Düren/D

Dr. H. R. Wollseifen, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, 52355 Düren/D



Die Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Über 500 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide und deren N-Oxide, die insbesondere in Korbblütlern, Rauhblass- oder Borretschgewächsen und Hülsenfrüchtlern vorkommen, sind bekannt [1]. Entsprechend der Struktur der N-cinbase werden vor allem Pyrrolizidinalkaloide der Retronecin-, Heliotridin-, Otonecin- und Platynecintypen unterschieden.



Dieser Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden unter anderem karzinogene und genotoxische Eigenschaften zugeschrieben [2], so dass effektive Bestimmungsverfahren zur Untersuchung von pflanzlichen Lebensmitteln und Futtermitteln erforderlich sind. Seitens des Bundesinstituts für Risikobewertung wurde ein Methodenvorschlag zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS veröffentlicht [3]. Die beschriebene Methodik beinhaltet den Einsatz von HPLC-Phasen mit Partikelgrößen von 1,9 µm, um eine ausreichende Auflösung von kritischen Peakpaaren zu erzielen. Der Einsatz dieser HPLC-Phasen macht eine Übertragung der Methodik auf allen, bzw. einfachen HPLC-Systemen nicht möglich. In dieser Arbeit wird eine verbesserte chromatographische Trennung der Pyrrolizidinalkaloide vorgestellt. Insbesondere mit polar modifizierten C₁₈ HPLC-Phasen kann bei den kritischen Analytenpeakpaaren eine höhere Auflösung erzielt werden. Ferner wird die chromatographische Trennung von Pyrrolizidinalkaloiden auf einer Core-Shell-Phase aufgezeigt, mit der ebenso eine schnelle und effiziente Trennung dieser Pflanzeninhaltsstoffe möglich ist.

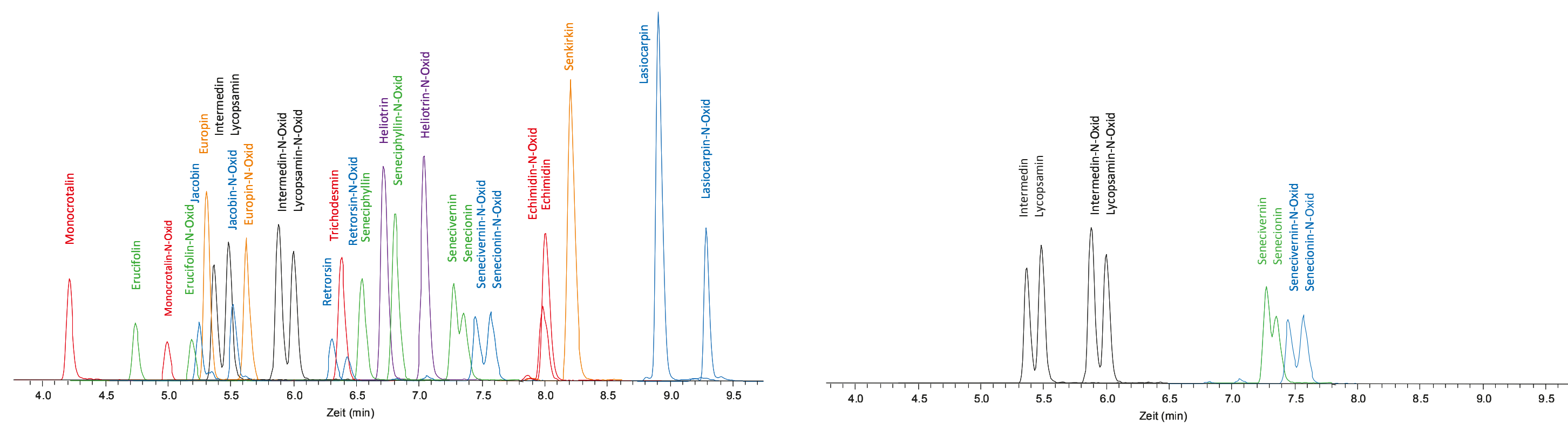
BfR Methodenvorschlag [3]

Chromatographische Bedingungen

Säule: z.B. Thermo Hypersil Gold C₁₈, 150 x 2,1 mm, 1,9 µm
 Eluent: A) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt
 B) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Methanol auf 1 L aufgefüllt
 Gradient: 5 % B für 0,5 min, 5–50 % B in 6,5 min, 50–80 % B in 0,5 min, 80–100 % B in 0,1 min 100 % B für 2,4 min, 100–5 % B in 0,1 min, 5 % B für 5,9 min
 Fluss: 0,3 mL/min
 Temperatur: 40 °C
 Injektionsvolumen: 10 µL

Parameter der massenspektrometrischen Detektion

Ionisation	Elektrospray positiv (ESI+)
Ion Spray Voltage [V]	+4000
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



NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-SB

Chromatographische Bedingungen

Säule: EC 50/2 NUCLEODUR®C₁₈ Gravity-SB, 1,8 µm
 Eluent: A) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt
 B) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Methanol auf 1 L aufgefüllt
 Gradient: 5–40 % B in 6 min, 40–80 % B in 1,5 min, 80–100 % B in 0,1 min, 100 % B für 1,4 min, 100–5 % B in 0,1 min, 5 % B für 5,9 min
 Fluss: 0,3 mL/min
 Temperatur: 30 °C
 Injektionsvolumen: 5 µL

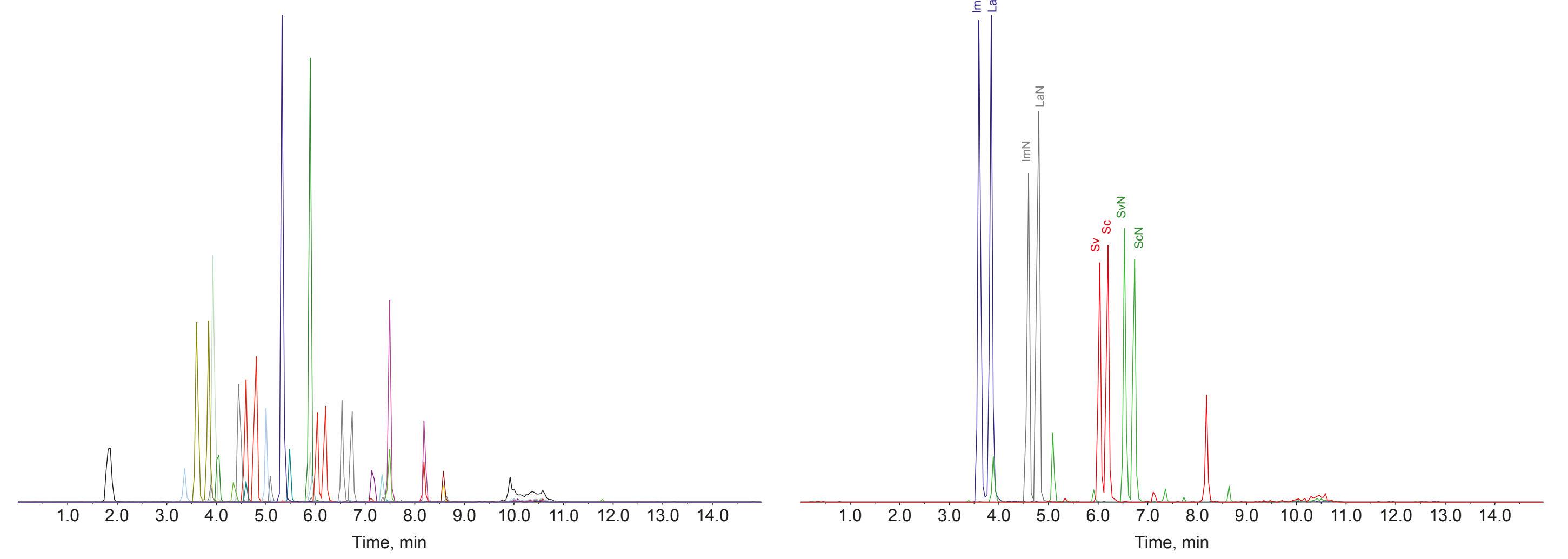
Parameter der massenspektrometrischen Detektion

API 3200, ion source ESI, positive ionization mode, Curtain gas 10 psi, ionspray voltage 5500 V, Temperatur 550 °C, nebulizer gas 20 psi, turbo gas 60 psi, CAD 6,0 psi

MRM transitions

Analyt	RT (min)	[M+H] ⁺	Q1	Q2
Monocrotalin (Mc)	1,84	326,2	120,2	291,2
Erucifolin (Er)	3,36	350,3	120,3	94,1
Intermedin (Im)	3,60	300,3	94,2	138,1
Lycopsamin (La)	3,84	300,3	94,2	138,1
Jacobin (Jb)	3,89	352,3	94,1	120,2
Europin (Eu)	3,93	330,3	138,2	172,3
Monocrotalin-N-Oxid (McN)	4,03	342,3	137,0	94,2
Erucifolin-N-Oxid (ErN)	4,35	366,3	94,2	168,3
Europin-N-Oxid (EuN)	4,45	346,3	172,2	328,3
Intermedin-N-Oxid (ImN)	4,60	316,3	172,3	138,0
Jacobin-N-Oxid (JbN)	4,60	368,2	120,2	94,2
Lycopsamin-N-Oxid (LaN)	4,80	316,3	172,3	138,0
Trichodesmin (Td)	5,00	354,3	120,2	94,1
Retrorsin (Re)	5,09	352,3	94,1	120,2

Analyt	RT (min)	[M+H] ⁺	Q1	Q2
Heliotridin (Hn)	5,32	314,3	138,2	156,3
Seneciophyllin (Sp)	5,33	334,3	120,1	94,1
Retrorsin-N-Oxid (ReN)	5,48	368,2	94,2	120,2
Heliotridin-N-Oxid (HnN)	5,89	330,3	172,3	138,2
Seneciophyllin-N-Oxid (SpN)	5,93	350,3	94,1	120,3
Senecivermin (Sv)	6,04	336,3	120,2	94,1
Senecionin (Sc)	6,20	336,3	120,2	94,1
Senecivermin-N-Oxid (SvN)	6,53	352,3	94,1	120,2
Senecionin-N-Oxid (ScN)	6,74	352,3	94,1	120,2
Echimidin (Em)	7,15	398,3	120,2	55,2
Echimidin-N-Oxid (EmN)	7,34	414,3	254,3	55,1
Senkirkirin (Sk)	7,49	366,3	168,3	94,2
Lasiocarpin (Lc)	8,19	412,3	120,2	220,2
Lasiocarpin-N-Oxid (LcN)	8,58	428,3	94,1	254,3



NUCLEOSHELL® RP 18 plus

Chromatographische Bedingungen

Säule: EC 150/2 NUCLEOSHELL® RP 18plus, 2,7 µm
 Eluent: A) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt
 B) 315 mg Ammoniumformiat werden in 5 mL Wasser gelöst, 1 mL Ameisensäure (98–100 %) wird hinzugefügt und mit Methanol auf 1 L aufgefüllt
 Gradient: 5–40 % B in 6 min, 40–80 % B in 1,5 min, 80–100 % B in 0,1 min, 100 % B für 1,4 min, 100–5 % B in 0,1 min, 5 % B für 5,9 min
 Fluss: 0,3 mL/min
 Temperatur: 40 °C
 Injektionsvolumen: 5 µL

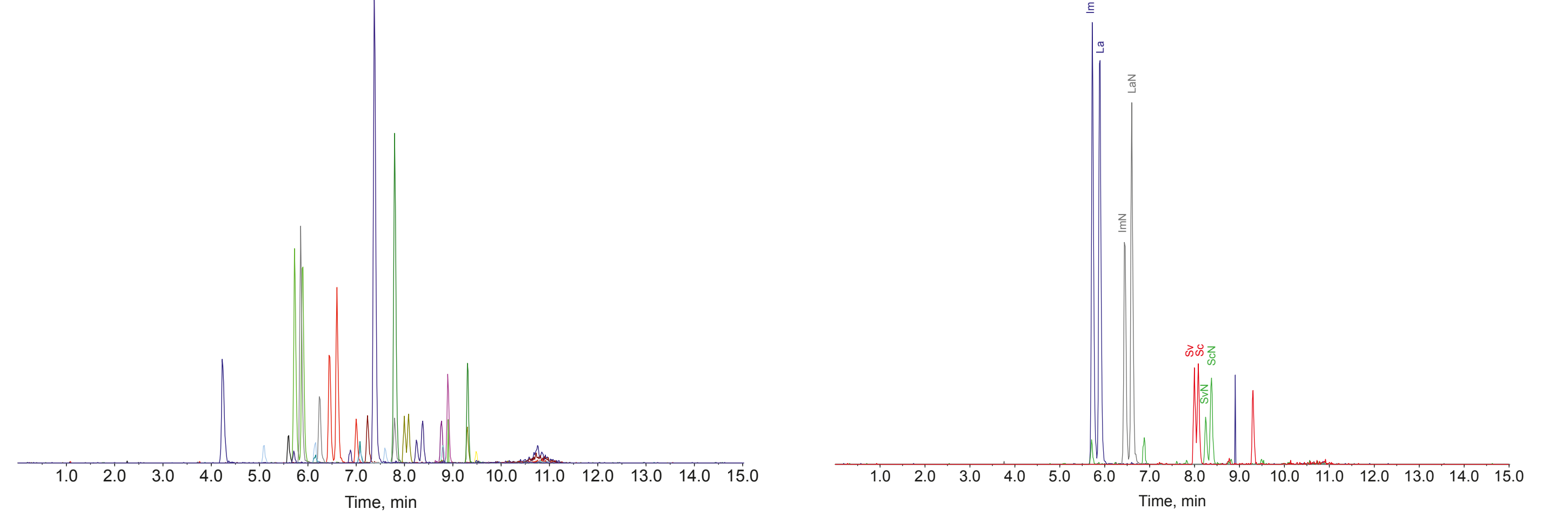
Parameter der massenspektrometrischen Detektion

API 3200, ion source ESI, positive ionization mode, Curtain gas 10 psi, ionspray voltage 5500 V, Temperatur 550 °C, nebulizer gas 20 psi, turbo gas 60 psi, CAD 6,0 psi

MRM transitions

Analyt	RT (min)	[M+H] ⁺	Q1	Q2
Monocrotalin (Mc)	4,23	326,2	120,2	291,2
Erucifolin (Er)	5,09	350,3	120,3	94,1
Monocrotalin-N-Oxid (McN)	5,60	342,3	137,0	94,2
Jacobin (Jb)	5,71	352,3	94,1	120,2
Intermedin (Im)	5,73	300,3	94,2	138,1
Erucifolin-N-Oxid (ErN)	5,78	366,3	94,2	168,3
Europin (Eu)	5,85	330,3	138,2	172,3
Lycopsamin (La)	5,89	300,3	94,2	138,1
Jacobin-N-Oxid (JbN)	6,15	368,2	120,2	94,2
Europin-N-Oxid (EuN)	6,24	346,3	172,2	328,3
Intermedin-N-Oxid (ImN)	6,45	316,3	172,3	138,0
Lycopsamin-N-Oxid (LaN)	6,60	316,3	172,3	138,0
Retrorsin (Re)	6,88	352,3	94,1	120,2
Trichodesmin (Td)	7,00	354,3	120,2	94,1

Analyt	RT (min)	[M+H] ⁺	Q1	Q2
Retrorsin-N-Oxid (ReN)	7,08	368,2	94,2	120,2
Seneciophyllin (Sp)	7,23	334,3	120,1	94,1
Heliotridin (Hn)	7,38	314,3	138,2	156,3
Seneciophyllin-N-Oxid (SpN)	7,60	350,3	94,1	120,3
Heliotridin-N-Oxid (HnN)	7,80	330,3	172,3	138,2
Senecionin (Sc)	8,00	336,3	120,2	94,1
Senecivermin (Sv)	8,08	336,3	120,2	94,1
Senecionin-N-Oxid (ScN)	8,25	352,3	94,1	120,2
Senecivermin-N-Oxid (SvN)	8,38	352,3	94,1	120,2
Echimidin (Em)	8,76	398,3	120,2	55,2
Echimidin-N-Oxid (EmN)	8,80	414,3	254,3	55,1
Senkirkirin (Sk)	8,90	366,3	168,3	94,2
Lasiocarpin (Lc)	9,31	412,3	120,2	220,2
Lasiocarpin-N-Oxid (LcN)	9,49	428,3	94,1	254,3



Diskussion der Ergebnisse

Die chromatographische Trennung der Pyrrolizidinalkaloide konnte sowohl mit NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-SB als auch mit NUCLEOSHELL® RP 18plus deutlich verbessert werden. Die Auflösung für alle kritischen Peakpaare (Im-La, ImN-LaN, Sv-Sc und SvN-ScN) konnte wesentlich erhöht werden. Insbesondere der Einsatz einer deutlich kürzeren Säule bei einer Partikelgröße < 2 µm führt zu einer erheblichen Reduzierung des Rückdruckes. Damit bleibt die Etablierung der Methodik auf „einfachen“ HPLC-Systemen weiterhin möglich. Die Anschaffungskosten einer 50 mm Säule sind zudem deutlich geringer. Ebenso stellt die NUCLEOSHELL® RP 18plus Säule eine gute Alternative zum Säulenvorschlag des BfR-Methodenvorschlags dar.

Literatur

- [1] Wiedenfeld, H.; Roeder, E.; Bouaul, T.; Edgar, J. Pyrrolizidine Alkaloids – Structure and Toxicity. V&R Uni Press, Bonn University Press 2008
- [2] Roeder, E. pyrrolizidinalkaloidhaltige Arzneipflanzen. Deutsche Apotheker Zeitung 1992, 45 (132), 2427–2435.
- [3] Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS - Prüfvorschrift – BfR-PA-Tee-2.0/2014

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Deutschland



Deutschland und International:
 Tel.: +49 24 21 969-0
 Fax: +49 24 21 969-199
 E-Mail: info@mn-net.com

Schweiz:
 MACHEREY-NAGEL AG
 Tel.: +41 62 388 55 00
 Fax: +41 62 388 55 05
 E-Mail: sales-ch@mn-net.com

Frankreich:
 MACHEREY-NAGEL EURL
 Tel.: +33 388 68 22 68
 Fax: +33 388 51 76 88
 E-Mail: sales-fr@mn-net.com

USA:
 MACHEREY-NAGEL Inc.
 Tel.: +1 484 821 0984
 Fax: +1 484 821 1272
 E-Mail: sales-us@mn-net.com

