

INTERLABOR
BELP AG

ANALYTICS

Nr. 1
April 2017



Pharma 

**Pyrrolizidinalkaloide in
verschiedenen Pflanzen**



Analyse von Pyrrolizidinalkaloiden in verschiedenen Pflanzen mittels LC-MS/MS

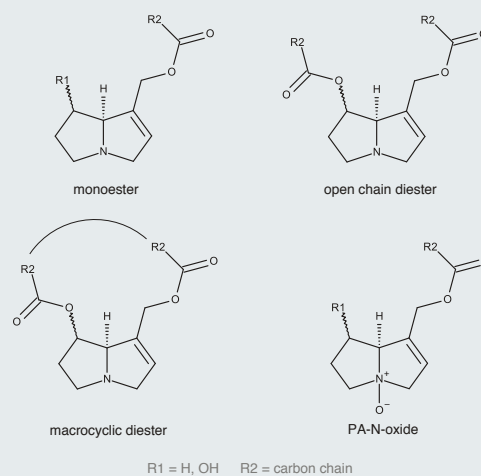
Autorin: Monika Gumpendobler

Pyrrolizidinalkaloide sind Derivate des basischen Pyrrolizidins. Pyrrolizidinalkaloide sind in zahlreichen Blütenpflanzen enthalten. Aktuell wurden bisher über 600 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide in mehr als 6000 Pflanzenarten identifiziert; besonders häufig wurden sie in Korbblütern und Raublattgewächsen nachgewiesen.

Im menschlichen und tierischen Organismus baut die Leber Pyrrolizidinalkaloide zu teilweise stark heptatoxischen Verbindungen ab, wobei die makrocyclischen Diester die höchste Toxizität aufweisen. In höheren Dosierungen können in der Folge tödliche Leberfunktionsstörungen auftreten.

In Mitteleuropa kommen Menschen selten zu Schaden, allerdings vergiften sich häufig Pferde durch Pyrrolizidinalkaloide aus dem Jakobskreuzkraut. Das Jakobskreuzkraut ist eine sehr genügsame Pflanze, die häufig extensiv bewirtschaftete Wiesen besiedelt.

Basisstrukturen der Pyrrolizidinalkaloide



Pyrrolizidinalkaloide sind ferner in zahlreichen Pflanzen enthalten, die für Tees oder medizinische Zwecke verwendet werden. Typische einheimische Repräsentanten sind etwa Beinwell, Huflattich, Pestwurz und Borretsch. →

Einheimische Heilpflanzen, die Pyrrolizidine enthalten



Pflanze	Indikation	Pyrrolizidinalkaloide
Beinwell (Symphytum officinale)	Prellungen, Zerrungen, Verstauchungen	Lycopsamin, Intermedin und deren Acetate
Huflattich (Tussilago farfara)	Husten, Schleim lösend	Senkirkin, Senecionin
Pestwurz (Petasites hybridus)	Migräne, Krämpfe, Allergien	Senecionin, Integerrimin
Borretsch (Borago officinalis)	Fieber, Durchfall, Entzündungen	Amabilin, Intermedin, Lycopsamin und Supinin

Methode

Für die Analyse der Pyrrolizidinalkaloide wurden in der Vergangenheit zahlreiche GC-Methoden entwickelt. Sie basieren zu einem grossen Anteil auf Arbeiten von Wiedenfeld aus den Achtzigerjahren¹⁾. Nach Extraktion und Reduktion der nichtflüchtigen N-oxide zu den freien Aminen sowie einem oder mehreren Schritten zur Aufreinigung erfolgt die Bestimmung mittels GC-MS oder GC-NPD.

Allen diesen Methoden ist nunmehr gemeinsam, dass der Reduktionsschritt oftmals nur schwer reproduzierbar ist und die GC-Bestimmung der stark basischen Analyte störungs-

anfällig ist. Mittels HPLC-MS kann ein Grossteil dieser Schwierigkeiten vermieden werden. So ist jetzt möglich, die N-oxide direkt zu bestimmen, was eine wesentliche Vereinfachung bedeutet. Das Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlichte 2014 eine Methode, welche die zuverlässige Bestimmung der Pyrrolizidinalkaloide und deren N-oxiden in Pflanzenmaterial erlaubt²⁾.

Nach Extraktion des zerkleinerten Pflanzenmaterials wird der Extrakt durch Festphasenextraktion aufgereinigt und nach Anreicherung mittels HPLC-MS/MS analysiert. Damit kann eine Vielzahl von Pyrrolizidinalkaloiden bestimmt werden. →

Analyseschema der BFR-Methode

Extraktion der Probe mit verdünnter Schwefelsäure



Aufreinigung mittels SPE (C18)

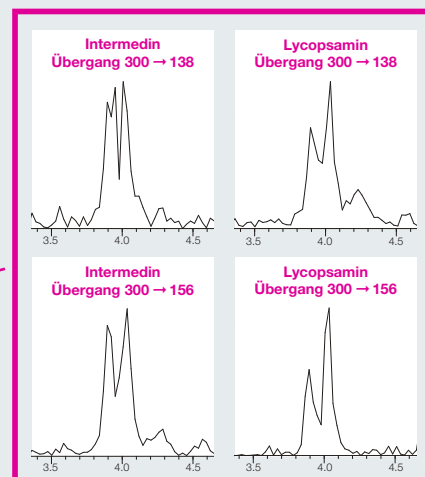
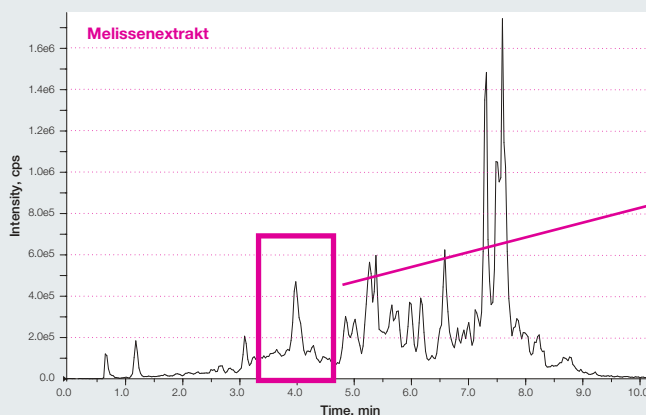
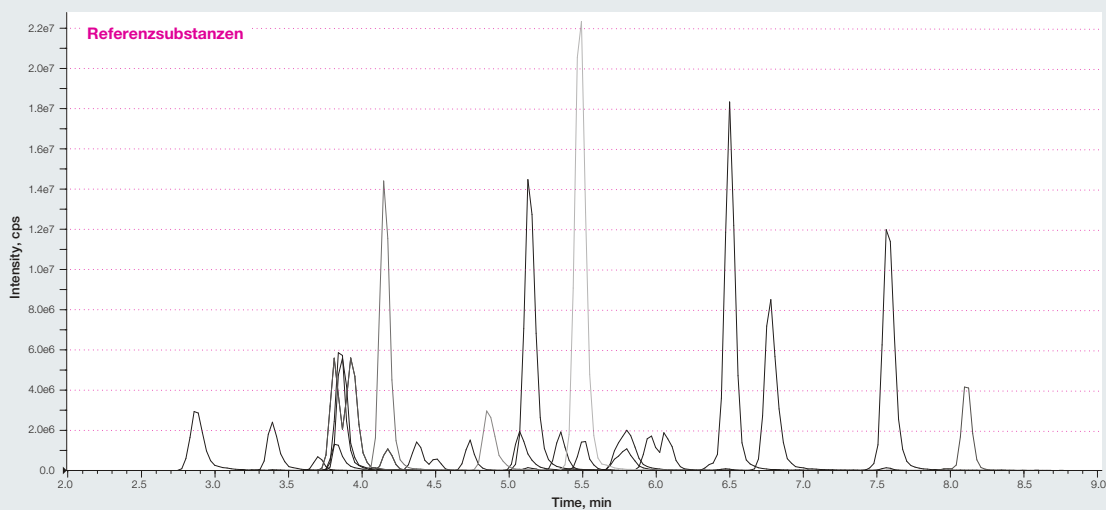


Aufkonzentrieren durch Eindampfen



LC-MS/MS

Chromatogramm einer Referenzlösung, die 28 Pyrrolizidinalkaloide enthält



Ergebnisse

Mit der vorliegenden Methode können Pyrrolizidinalkaloide in etlichen Pflanzenmaterialien (Tee, Drogen, Frischpflanzen CO₂-Extrakte etc.) bestimmt werden. Die Bestimmungsgrenzen liegen je nach Probe und Art des Pyrrolizidinalkaloids im Bereich von 1 bis 20 µg/kg. Allerdings setzt das Verfahren die Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen voraus. Dieser Umstand ist zurzeit der limitierende Faktor, da erst ca. 30 Pyrrolizidinalkaloide als Reinsubstanzen kommerziell verfügbar sind.

Ein HPLC-Spektrum von 28 Referenzverbindungen ist im oberen Teil des Chromatogramms (siehe vorige Seite) abgebildet, wobei Monocrotalin mit einer Retentionszeit von 2,9 Minuten als erste und Lasiocarpin-N-Oxid mit 8,1 Minuten als letzte Verbindung eluiert²⁾. Als aktuelles Beispiel ist das HPLC-Spektrum eines Melissenextraktes abgebildet (unterer Teil des Chromatogramms), in welchem die beiden Verbindungen Intermedin (0.004 µg/kg) sowie Lycopsamin (0.004 µg/kg) nachgewiesen werden konnten. Die isomeren Verbindungen Intermedin und Lycopsamin wurden über die beiden charakteristischen Fragmente $m/z = 138$ und 156 eindeutig identifiziert. Die entsprechenden Signale sind im Chromatogramm wiedergegeben.

Anhand der erzielten Ergebnisse kann auf die Präsenz von Beinwell geschlossen werden.

Diskussion & Schlussfolgerungen:

Seit längerem gibt es von verschiedenen Seiten allgemeine Empfehlungen für die maximale Exposition von Pyrrolizidinalkaloiden. Auf diesem Hintergrund wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt. Hierbei stellte man freilich Pyrrolizidinalkaloide in zahlreichen Zubereitungen fest, die aus Pflanzen hergestellt wurden, die keine Pyrrolizidin-

alkaloide biosynthetisieren. Man geht davon aus, dass dafür Verunreinigungen mit Unkräutern wie etwa Arten der Gattung Senecio, (Greiskraut) verantwortlich sind. Da bereits sehr wenig Individuen von Unkräutern zu toxikologisch relevanten Konzentrationen führen können, hat das Deutsche Bundesinstitut festgelegt, dass bei pflanzlichen Arzneimitteln die Limite von 1 µg Pyrrolizidinalkaloide bezogen auf die maximale Tagesdosis nicht überstiegen werden darf³⁾.

Unter Annahme, dass pro Tag maximal 10g der Arzneimitteldrogen konsumiert werden, liegen die erforderlichen Bestimmungsgrenze für die Summe von Pyrrolizidinalkaloide bei 100 µg/kg. Je nach Anzahl der in einer Probe enthaltenen Pyrrolizidinalkalkaloide muss die Bestimmungsgrenze entsprechend tiefer liegen. In den meisten Fällen sind in einer Pflanze nicht mehr als fünf Pyrrolizidinalkaloide in relevanten Mengen vorhanden. Deshalb ist die vorliegende Methode selbst im ungünstigsten Fall ausreichend empfindlich, um pflanzliche Arzneimittel auf Pyrrolizidinalkaloide hin zu prüfen. □

Zur Autorin



Monika Gumpendobler
Leiterin Spurenanalytik

Wissenschaftlerin mit langjähriger Erfahrung in der Spurenanalytik

1) Wiedenfeld et al., *Planta Medica*, 1981, Vol. 41

2) Bundesinstitut für Risikobewertung PA-Tee-2.0/2014

3) Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bekanntmachung vom 01. März 2016

INTERLABOR BELP AG



Interlabor Belp AG

Aemmenmattstrasse 16
3123 Belp, Schweiz
Tel. +41 (0)31 818 77 77
Fax +41 (0)31 818 77 78
www.interlabor.ch
info@interlabor.ch

Öffnungszeiten

Montag bis Freitag
07.30 – 12.00 Uhr
13.30 – 17.00 Uhr