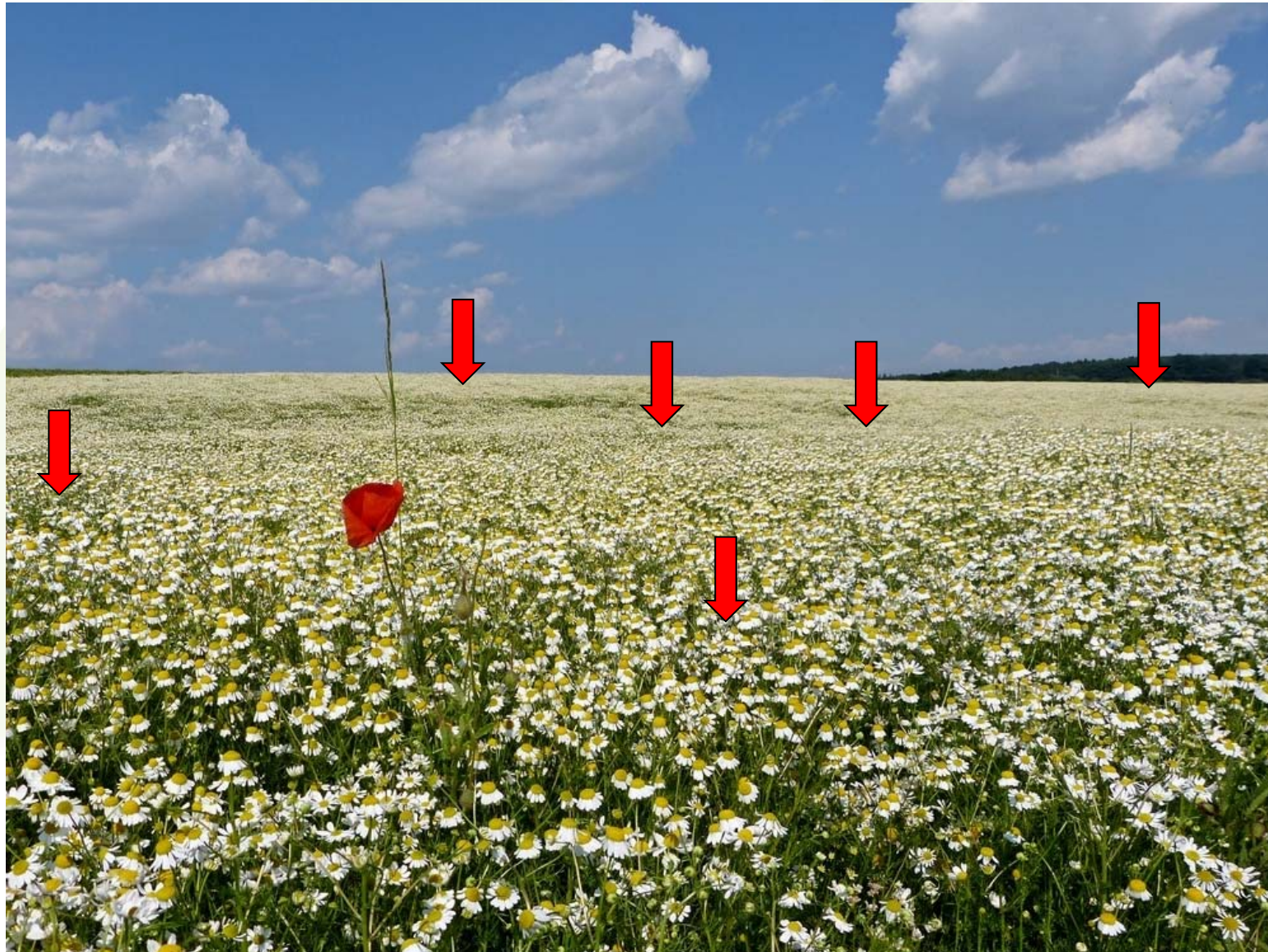


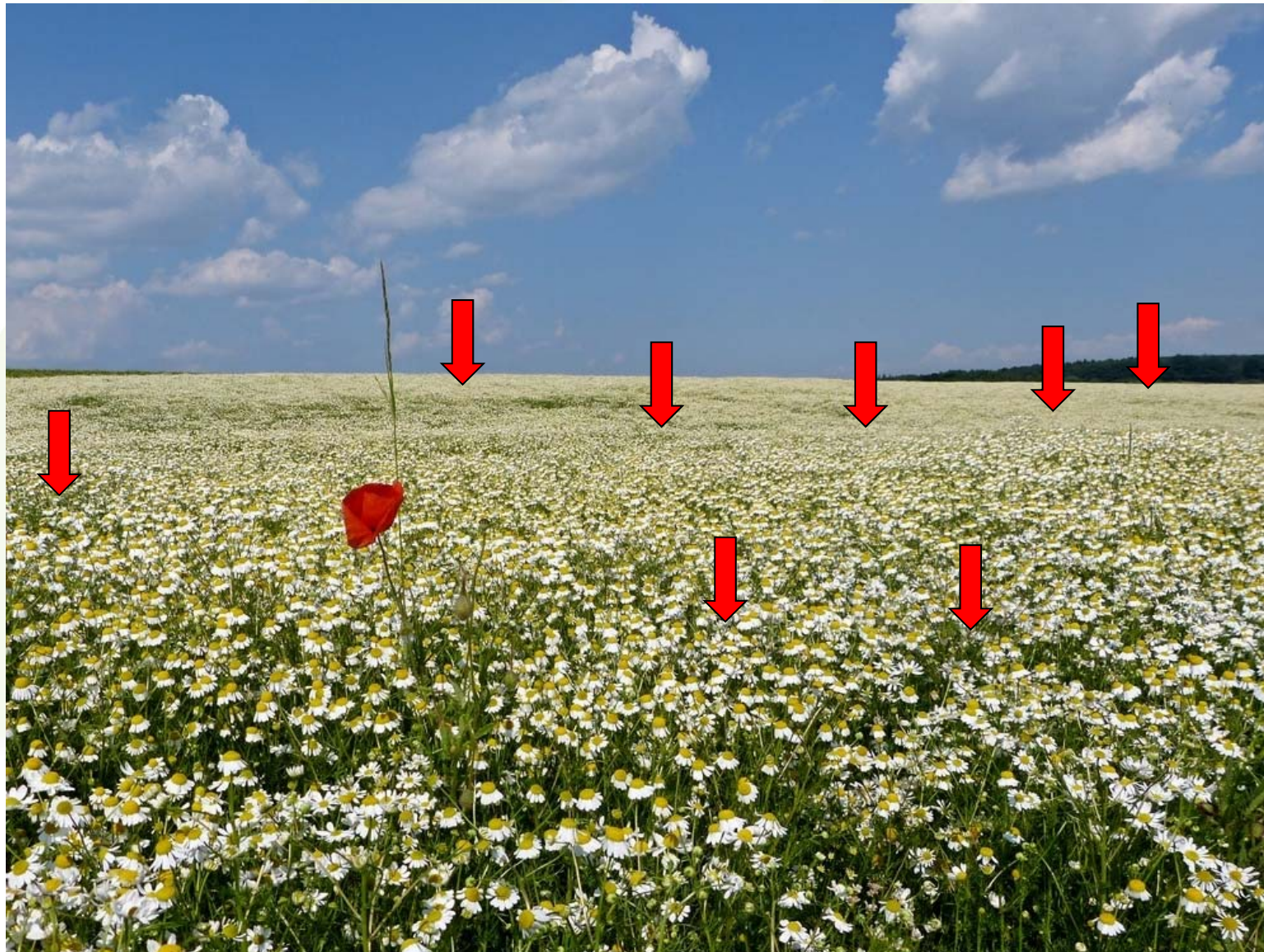
Pyrrolizidinalkaloide
Möglichkeiten und
Grenzen
der Analytik

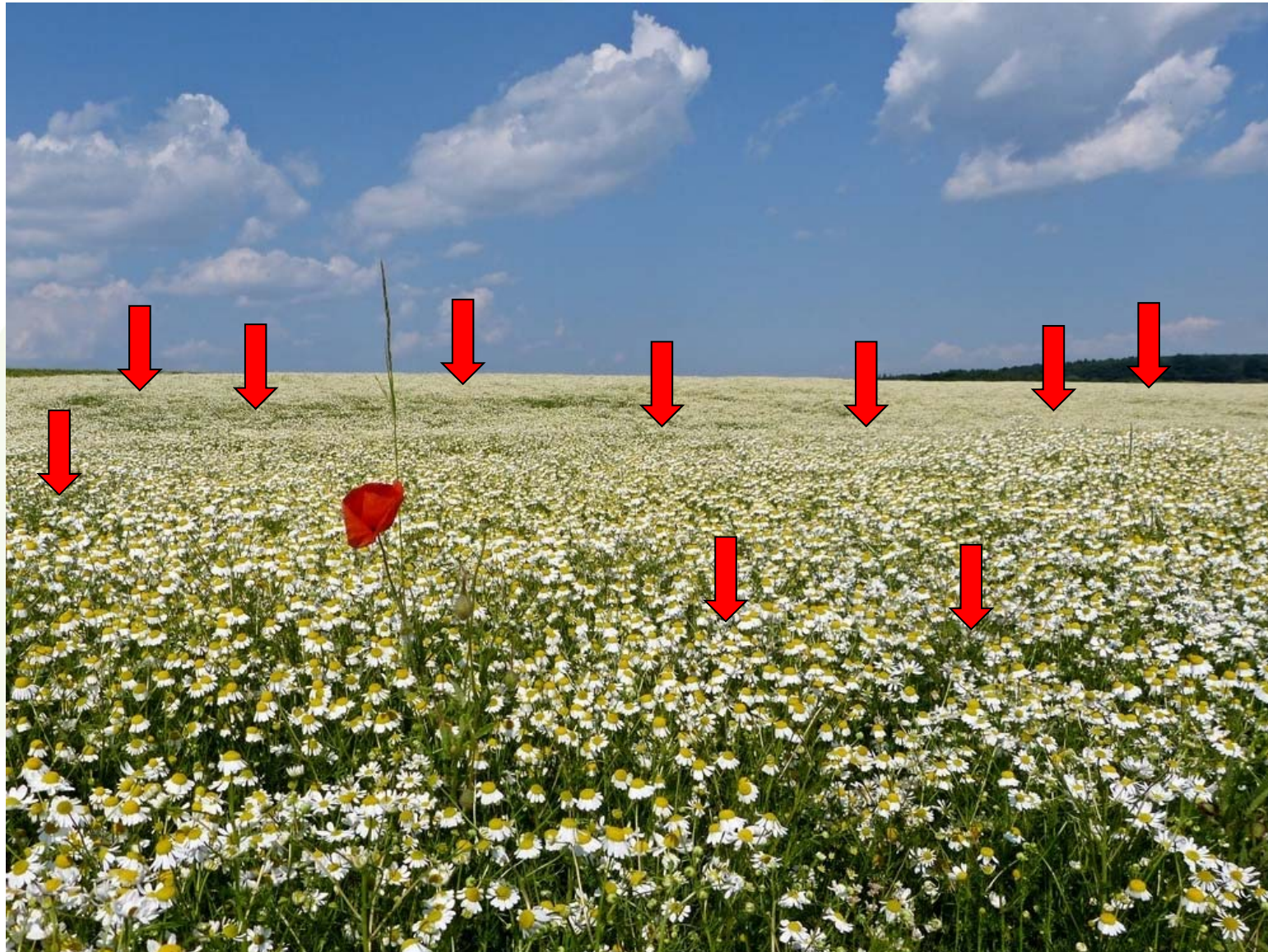


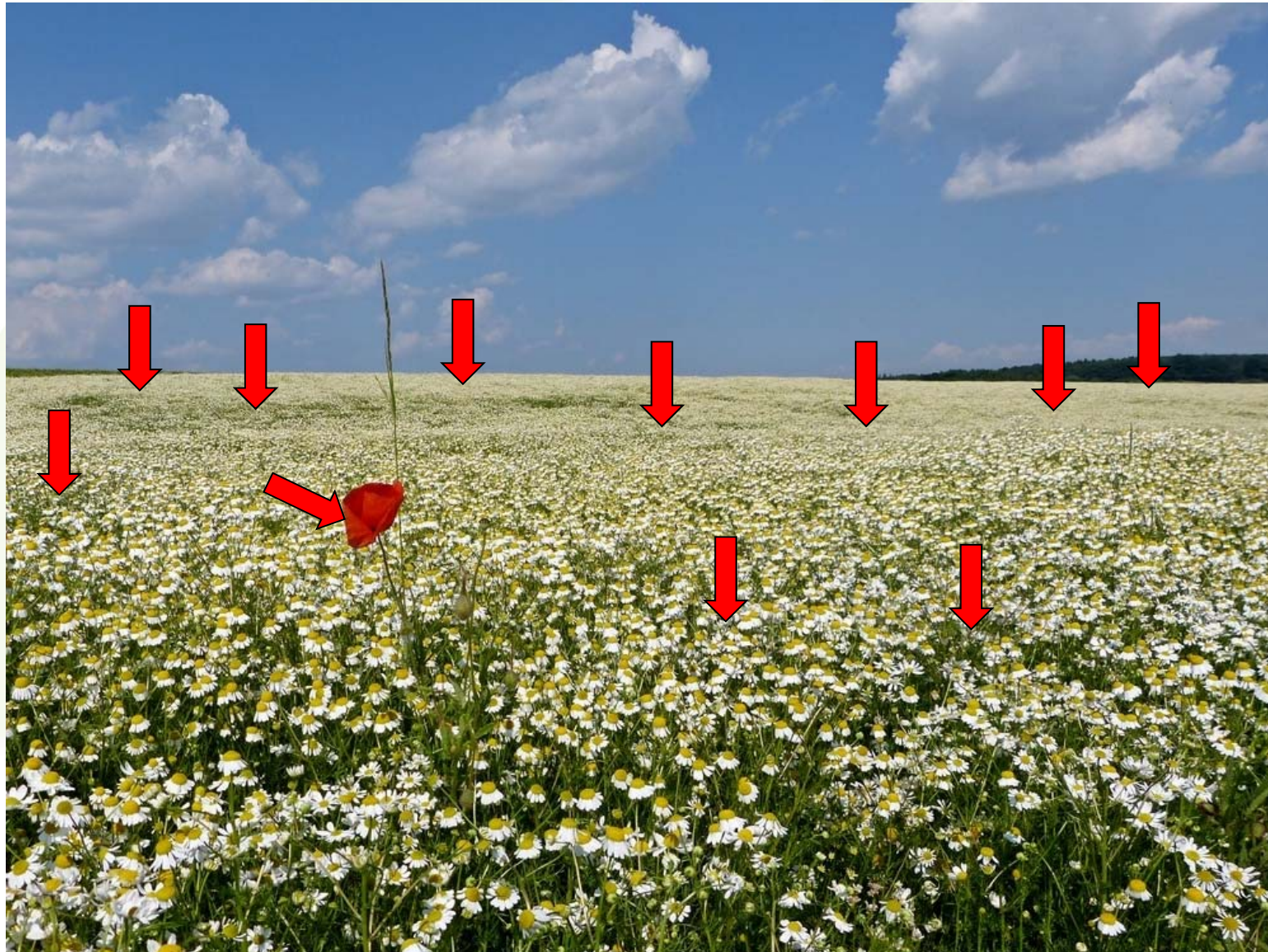


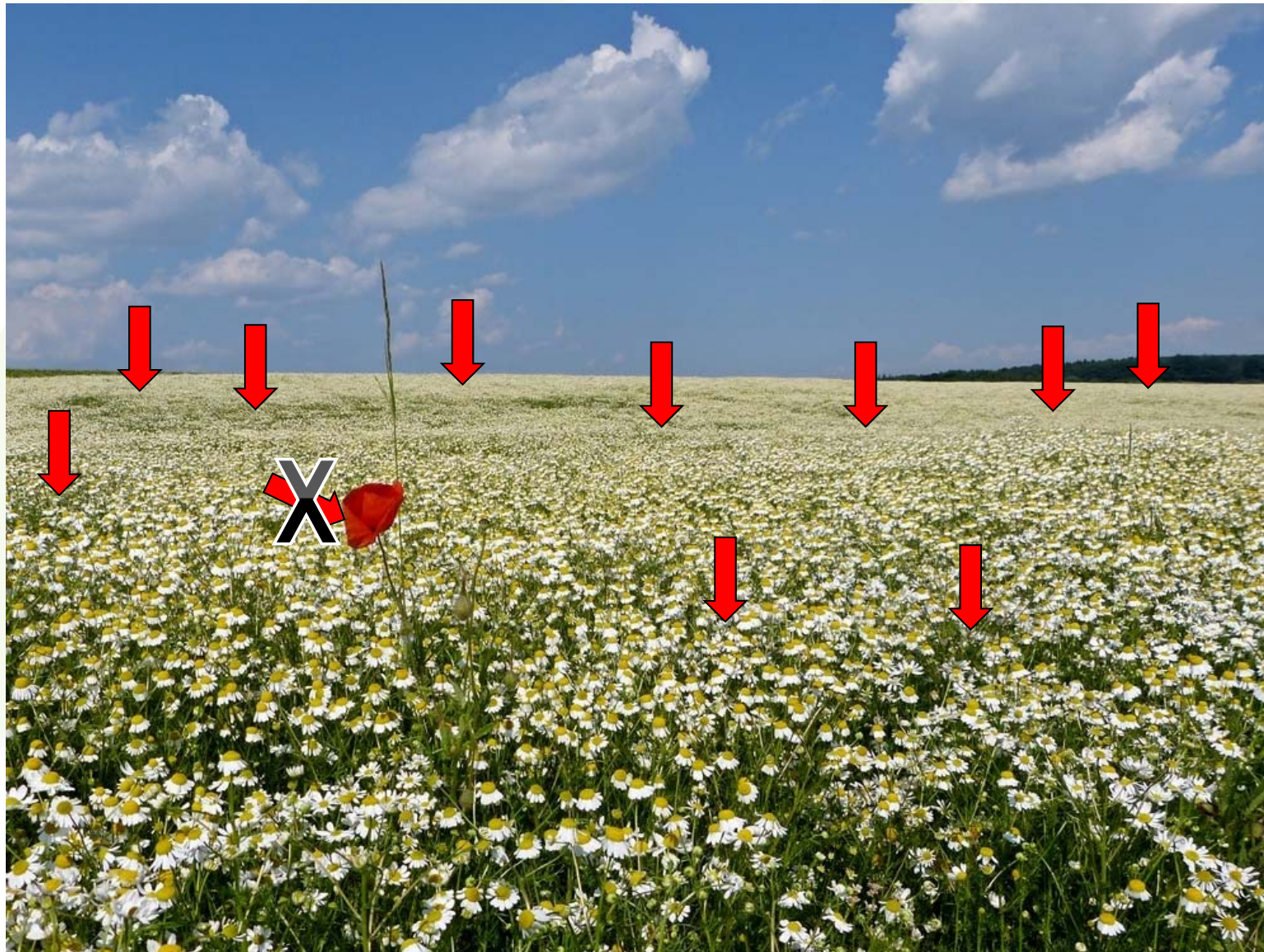








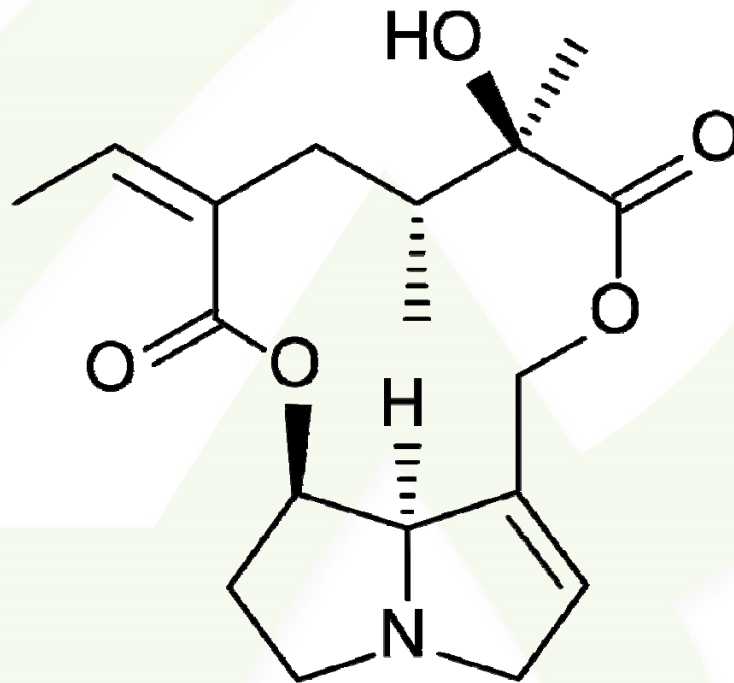




Kontamination mit Pyrrolizidinalkaloiden (PA)

zeller ☞

Jakobskreiskraut
Senecio jacobea



Senecionin



PAs als Kontaminanten

Rechenbeispiel: 10 *Senecio jacobea*-Pflanzen in einem Kamillenfeld von einem Hektar

- 1 Mio. Kamillenpflanzen/ha $\hat{=}$ ca. 500 kg Droge
- 10 *Senecio jacobea*-Pflanzen $\hat{=}$ ca. 0.020kg (20g)*
- Bei ca. 800.000 ppb PA $\hat{=}$ 16000 μ g PA/20g verteilt in 500kg Droge $\hat{=}$
32ppb
- 12g Droge als Aufguss/Tag $\hat{=}$ **0.384** μ g PA/ Tag
- Grenzwert des Public Statement des HMPC: **0.35** μ g PA/ Tag

- *Eine *Senecio jacobea*-Pflanze liefert ca. die vierfache Blütenkopfmenge wie eine Kamillenpflanze

Bei üblichen Probenaufarbeitungen

□ 2.0g *Matricariae flos* (mit 32ppb PA-Belastung) $\hat{=}$ **16ng/ml***

* Beispiel BfR-Methode – PA in Pflanzenmaterial 2013 ^[1]

□ ^[1] BfR (2013), Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS. Methodenbeschreibung BfR-PA-Tee-1.0, <http://www.bfr.bund.de/cm/343/bestimmung-von-pyrrolizidinalkaloiden.pdf>, Last access: March 2015.

Methoden zur PA-Bestimmung und ihre Empfindlichkeit

Um Werte um den Grenzwert von 0.35 ppb/d zu bestimmen, sollte man 16 ng/ml sicher quantifizieren können!

Methode	Literatur/Jahr	LoD [ng/ml]	LoD [ppb]	LoQ [ng/ml]	LoQ [ppb]
HPLC-ELSD	[1]/2004	40`000	3000	80`000	6000
HPLC-DAD	[1]/2004	1`000	80	2000	160
GC-NPD	[2]/2006	500	40	1000	80
GC-MS	[3]/2010	0.2	3	0.67	10
LC-MS-MS	[4]/2013	4	8	> 7.5	> 15
LC-MS-ToF	[5]/2015	< 0.15	< 1	0.6-3	4-20

[1] Schaneberg BT, Molyneux RJ, Khan IA (2004) Evaporative light scattering detection of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochem Anal* 15:36–39

[2] Zeller inhouse method PV-1263

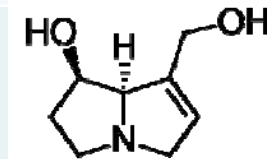
[3] Kempf M, Heil S, Hasslauer I, Schmidt L, von der Ohe K, Theuring C, Reinhard A, Schreier P, Beuerle T (2010) Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products

[4] BfR (2013), Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Pflanzenmaterial mittels SPE-LC-MS/MS. Methodenbeschreibung BfR-PA-Tee-1.0, <http://www.bfr.bund.de/cm/343/bestimmung-von-pyrrolizidinalkaloiden.pdf>, Last access: March 2015.

[5] Schenk A, Siewert B, Toff S, Drewe, J (2015) UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in *Petasites hybridus* extract (Ze 339)

Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methodentypen

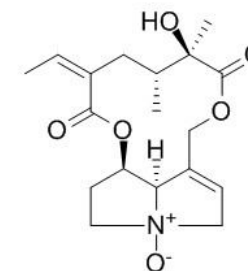
Methodentyp	+	-
HPLC-ELSD	immer ein Signal auch bei fehlendem oder nicht charakteristischem Chromophor	Schlechte Empfindlichkeit, keine qualitative Aussage über die Peaks
HPLC-DAD	Empfindlicher als ELSD	Wenig differenzierende Wellenlänge
GC-NPD/FID	Gute Auflösung der detektierbaren PAs. Möglichkeit der Gesamtbestimmung der PAs als Retronecin.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin).
GC-MS/MS-MS	Hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente bei MS-MS.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin). Matrixeffekte.
LC-MS-MS	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente.	Zumeist schlechte Massenauflösung. Risiko des Mitmessens «ähnlicher» Massen. Matrixeffekte.
LC-MS-ToF	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch hohe Massenauflösung.	Bei komplexer Matrix ohne MS-MS Verlust an Selektivität. Matrixeffekte.



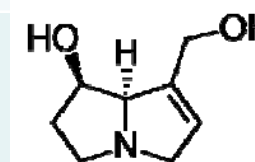
Retronecin

Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methodentypen

Methodentyp	+	-
HPLC-ELSD	immer ein Signal auch bei fehlendem oder nicht charakteristischem Chromophor	Schlechte Empfindlichkeit, keine qualitative Aussage über die Peaks
HPLC-DAD	Empfindlicher als ELSD	Wenig differenzierende Wellenlänge
GC-NPD/FID	Gute Auflösung der detektierbaren PAs. Möglichkeit der Gesamtbestimmung der PAs als Retronecin.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin).
GC-MS/MS-MS	Hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente bei MS-MS.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin). Matrixeffekte.
LC-MS-MS	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente.	Zumeist schlechte Massenauflösung. Risiko des Mitmessens «ähnlicher» Massen. Matrixeffekte.
LC-MS-ToF	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch hohe Massenauflösung.	Bei komplexer Matrix ohne MS-MS Verlust an Selektivität. Matrixeffekte.



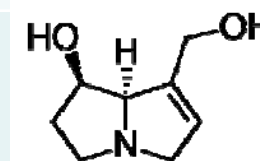
Senecionin-N-Oxid



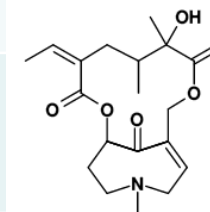
Retronecin

Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methodentypen

Methodentyp	+	-
HPLC-ELSD	immer ein Signal auch bei fehlendem oder nicht charakteristischem Chromophor	Schlechte Empfindlichkeit, keine qualitative Aussage über die Peaks
HPLC-DAD	Empfindlicher als ELSD	Wenig differenzierende Wellenlänge
GC-NPD/FID	Gute Auflösung der detektierbaren PAs. Möglichkeit der Gesamtbestimmung der PAs als Retronecin.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin) im Retronecin Gesamtwert.
GC-MS/MS-MS	Hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente bei MS-MS.	Keine Bestimmung der N-Oxide als solche. Keine Bestimmung der Otonecin-PAs (Senkirkin). Matrixeffekte.
LC-MS-MS	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch Bestimmung der Kardinalfragmente.	Zumeist schlechte Massenauflösung. Risiko des Mitmessens «ähnlicher» Massen. Matrixeffekte.
LC-MS-ToF	Sehr hohe Empfindlichkeit. Hohe Selektivität durch hohe Massenauflösung.	Bei komplexer Matrix ohne MS-MS Verlust an Selektivität. Matrixeffekte.



Retronecin

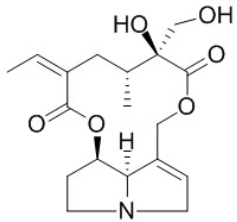


Senkirkin

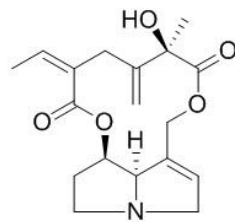
Gleiche Proben mit sehr unterschiedlichen Resultaten – was sind die Ursachen?

- Auswertung gegen Referenzsubstanzen mit anderem Response
- Matrixeffekte
- Unterschiedliche Massenfenster

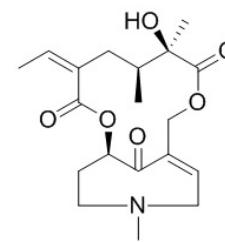
Auswertung gegen Referenzsubstanzen mit anderem Response



Retrorsine (Referenzstandard)
Gesetzter
Responsefaktor 1.0

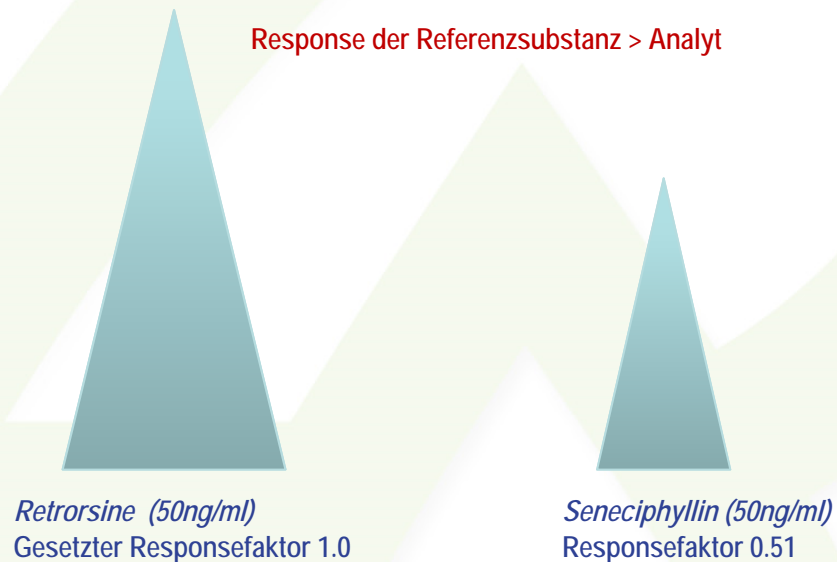


Seneciophyllin
Responsefaktor 0.51



Senkirkin
Responsefaktor 0.27

Auswertung gegen Referenzsubstanzen mit anderem Response



- Bei unbekannter Menge des Analyten und bei Nichtkenntnis des Responsefaktors würde man annehmen, die Seneciophyllinmenge in der Probe entspräche nur der Hälfte der Retrosinmenge.
- In Wirklichkeit aber ist die Menge gleich gross. Man misst also zu wenig: **falsch negativ**
- Ist der **Response der Referenzsubstanz < Analyt** misst man **falsch positiv**
- Ohne Kenntnis des Responsefaktors (mangels isoliertem und auf Response untersuchten Analyten) entspricht die Messung in den meisten Fällen nicht dem Absolutwert.
- Wichtig also, dass alle PAs, die man messen will als Standard vorliegen.

Matrixeffekte

- Matrixeffekte in der Massenspektrometrie → neben den Analyten in der Probe enthaltene Substanzen stören die Ionisierung an der Ionenquelle
- Matrixbestandteile konkurrieren mit den Zielanalyten um die zur Verfügung stehenden limitierten Oberflächenladungen.
- Dies führt zur Unterdrückung der Ionenbildung („Ion Suppression“) → Messung von Mindergehalten[*].
- Besonders betroffen → Elektrospray Ionisierung (ESI)

*W. Brodacz, Elektrospray-Ionisation. Die „sprühende“
Verbindung zwischen LC und MS, Chemiereport.at 4 (2009) 44

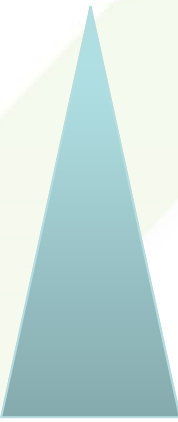
Gleiche Proben - unterschiedliche Resultate

Matrixeffekte*

PA	Eingewogener Standard (ng/ml)	Wiederfindung (%)		
		Wäss. Lsg.	Artischocken-matrix	Pestwurz-matrix
Senkirkine	28.10	99.0	33.6	endogen
Seneciphyllin	30.08	98.9	24.4	endogen
Senecionin	30.31	97.5	20.8	endogen
Senecionin-N-oxid	25.43	98.3	30.6	endogen
Seneciphyllin-N-oxid	28.57	99.4	24.8	endogen
Monocrotalin	30.73	97.0	15.1	27.2
Monocrotalin-N-oxid	31.60	96.0	34.0	28.5
Intermedin	33.77	98.2	19.2	31.9
Lycopsamin	29.59	98.1	18.7	31.8
Retrorsin	25.64	113.0	25.7	31.2
Retrorsin-N-oxid	25.04	96.9	30.6	29.3
Heliotrin	28.96	99.7	31.4	35.7
Heliotrin-N-oxid	29.02	98.3	33.1	35.1
Echimidin	27.93	98.5	34.0	40.1

*Schenk A, Siewert B, Toff S, Drewe, J (2015)
 UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in Petasites hybridus extract (Ze 339)

Matrixeffekte – Auswertung gegen Standards in Lösemittel



Standard in
Lösemittel

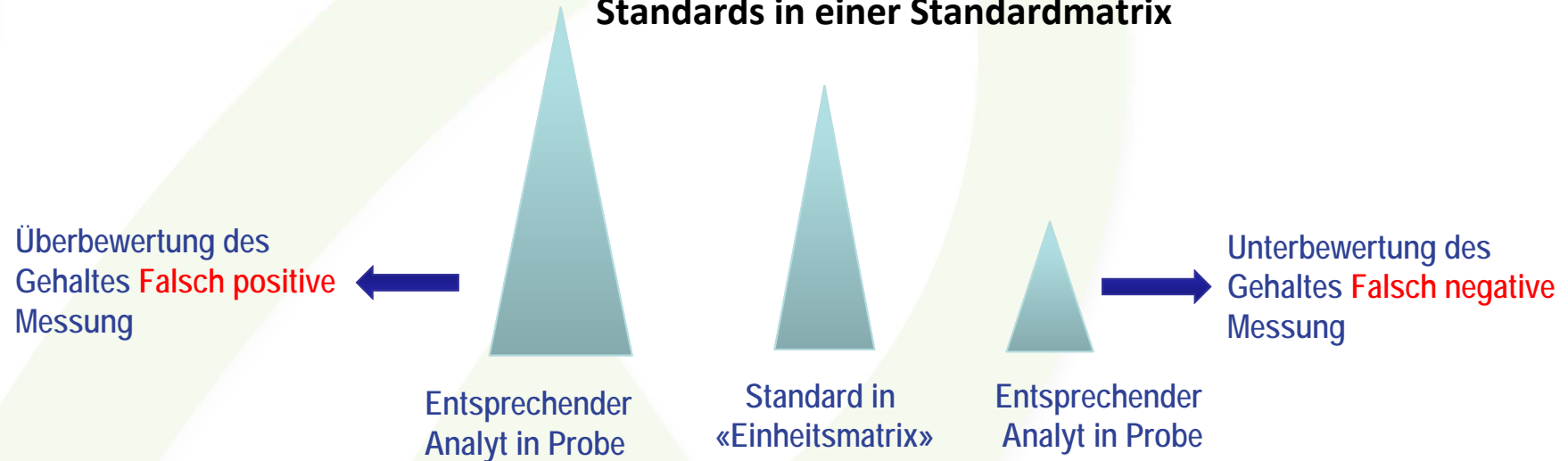


Entsprechender
Analyt in Matrix



Unterbewertung des Gehaltes
Falsch negative Messung

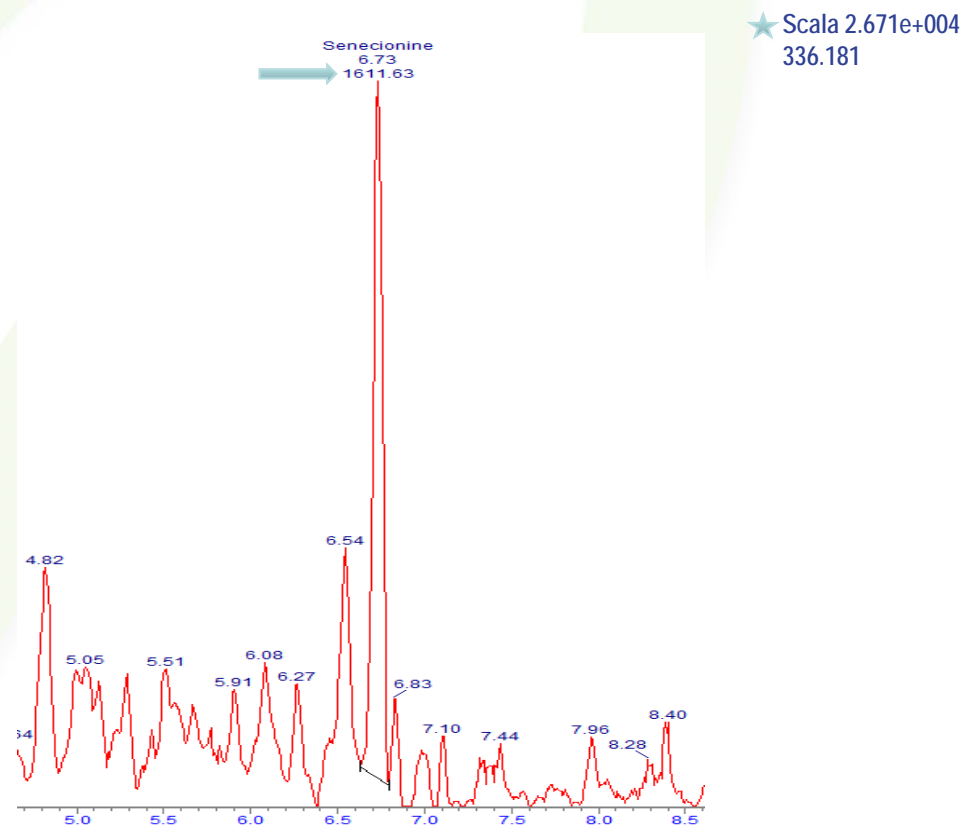
Matrixeffekte – Auswertung gegen Standards in einer Standardmatrix



- ❑ Um Matrixeffekte zu vermeiden, müssten Standards in derselben Matrix laufen wie die Proben.
- ❑ Dazu wird PA-freie Matrix benötigt, die häufig nicht zur Verfügung steht.
- ❑ Bei einigen Methoden hilft man sich, indem man die unterschiedlichen Proben (z.B. verschiedene Tees) gegen Referenzen in einer «Einheitsmatrix» (ein bestimmter PA-freier Tee) misst [1].

Unterschiedliche Massenfenster

Senecionin, gemessen mit einer Massengenauigkeit von 0.01 Dalton

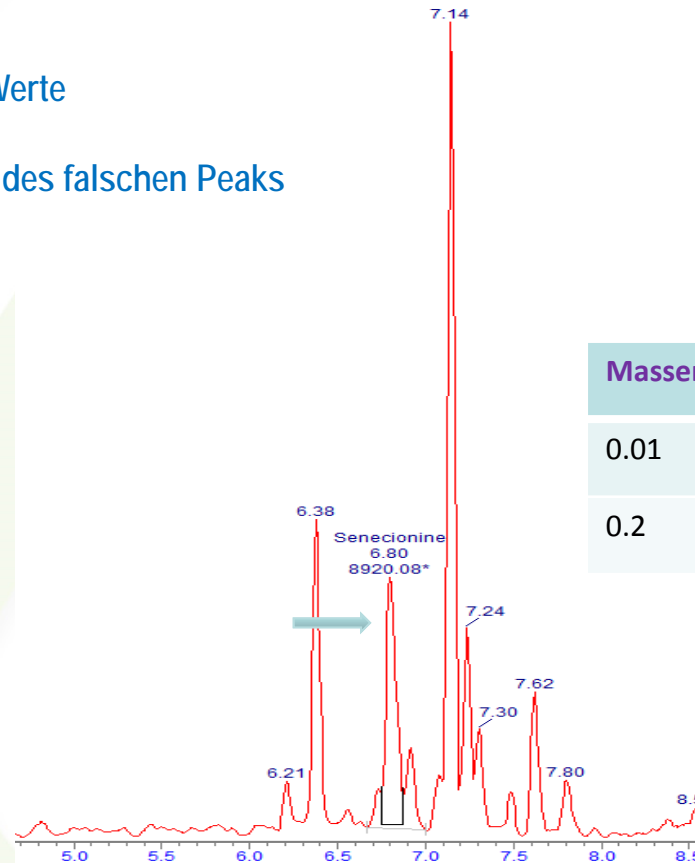


Unterschiedliche Massenfenster

Senecionin, gemessen mit einer Massengenauigkeit von 0.2 Dalton (der Peak ist 5.5 X grösser, weil Substanzen mit «ähnlicher» Masse aus der Matrix mitintegriert werden.)

- ➔ Falsch positive Werte
- ➔ u.U. Auswertung des falschen Peaks

★ Scala 4.455e+005
336.181



Massengenauigkeit [Da]	Peakfläche
0.01	1612
0.2	8920

Kurze Beschreibung der Zeller-PA-Methode

- 2-D-Chromatographie (trapping) zur Probenaufarbeitung (Verminderung von Matrixeffekten)
- Mit Ausnahme von vier Stereoisomeren wird die zeitgleiche Elution von PA-Isomeren vermieden.
- Detektion mit hoher Massenauflösung (0.01 Da) anstelle einer MS/MS (MRM) Fragmentierung.
- Externe Standardreihen für alle PA laufen in einer PA-freien Matrixlösung
- Es ist eine ausführliche Basisvalidierung am Beispiel des Hopfentrockenextraktes durchgeführt worden; für die anderen Extrakte: Validierung von Linearität, Präzision und Wiederfindung
- LoQ zwischen 6 and 20 ppb

Kurze Beschreibung der Zeller-PA-Methode

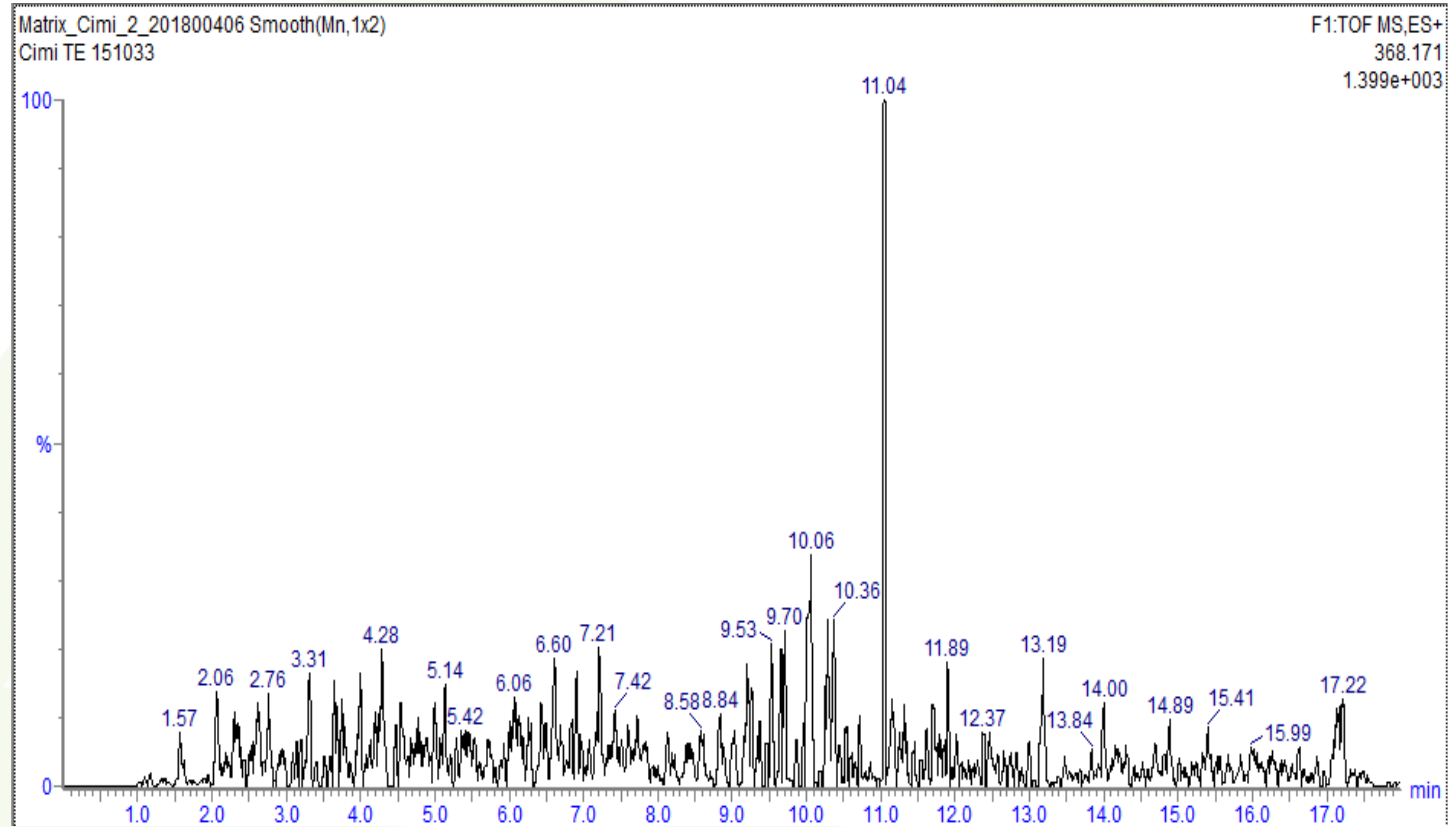
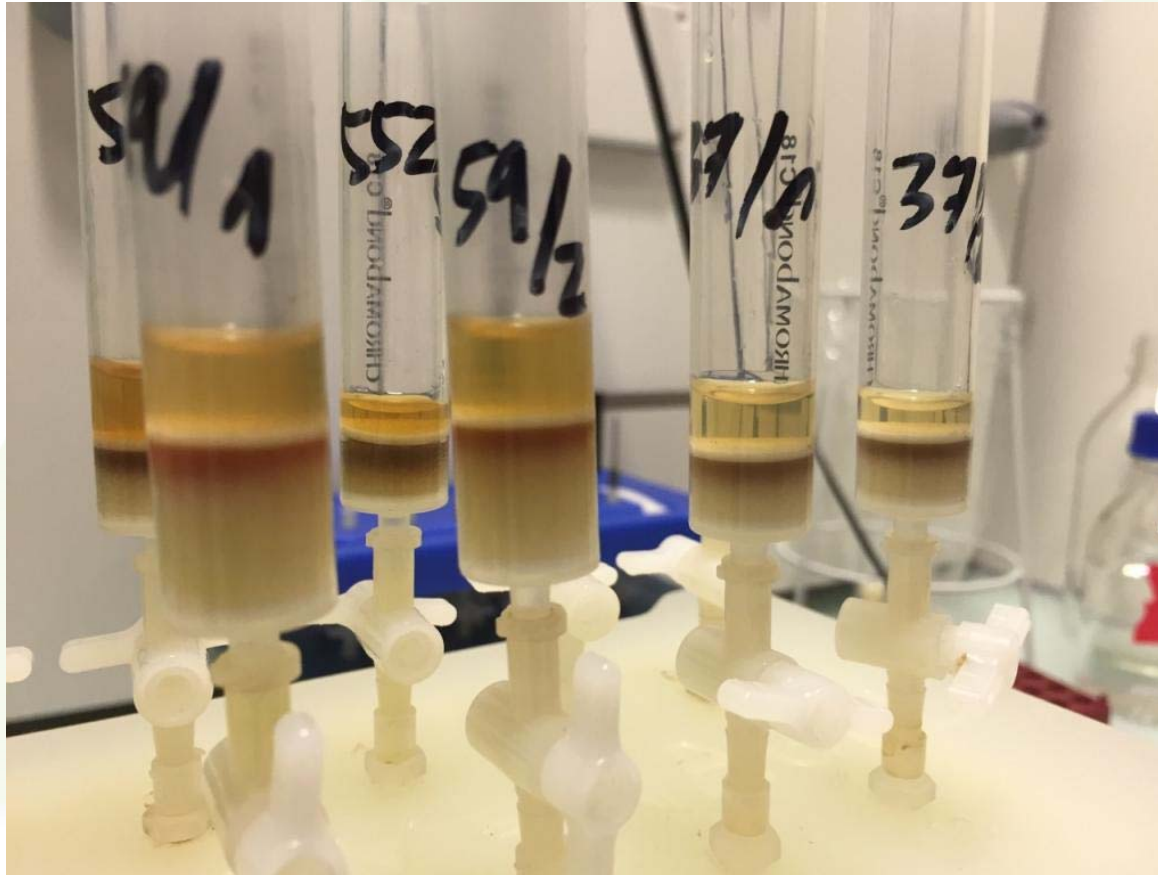


Figure 67: Matrix, PA-free Black cohosh dry extract, batch 151033

○ SPE-Probenaufarbeitung –

zeller ☒

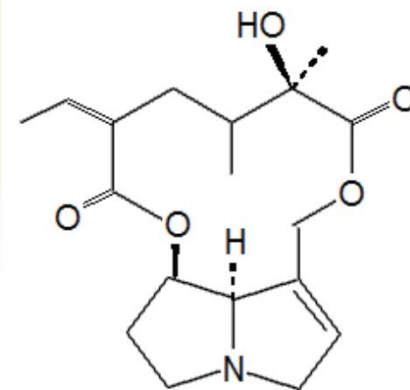
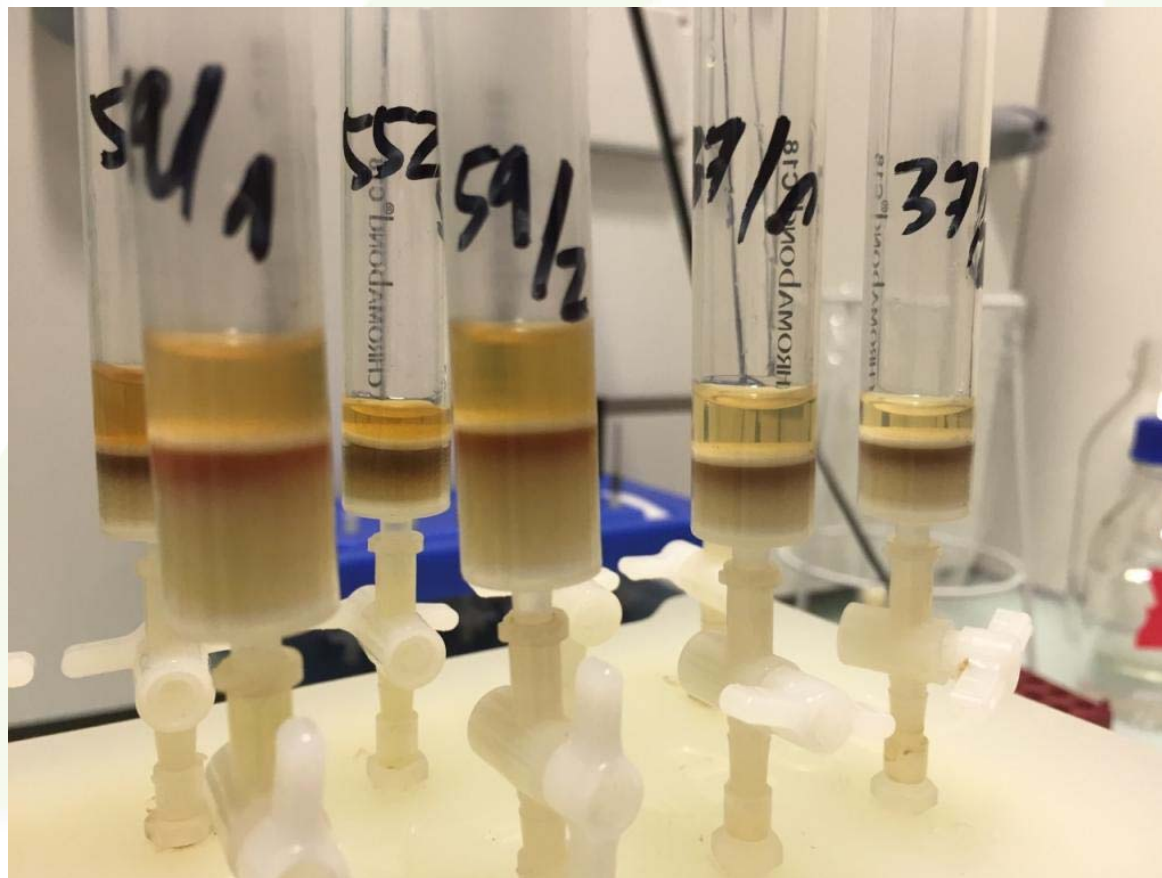
zeitaufwändig und schlecht reproduzierbar



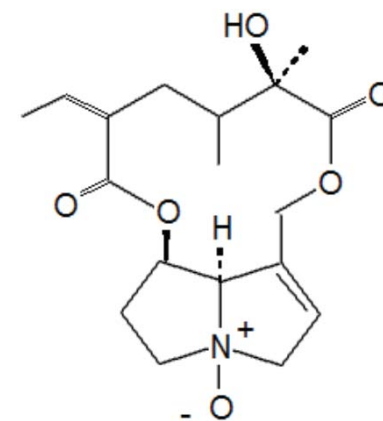
SPE-Probenaufarbeitung –

zeller 

zeitaufwändig und schlecht reproduzierbar



Senecionine



Senecionine-N-oxide

- Proben und PA-freie Matrices werden mit Dichlormethan dispergiert und anschließend mit 0.1 mol Schwefelsäure extrahiert
- *Die Standards werden gemeinsam (35 PAs) mit der fertigen Matrixlösung verdünnt*
- *Es gibt 6 Standardlevels: von 30 ng/ml – 0.6 ng/ml*

- *System:* UPLC Waters with quaternary (for trapping) and binary pump (for separation)
- Waters Synapt G2S HRMS
- *trapping column:* Direct Connect HP XBridge C18 10, 2.1 x 30 mm
- *separation column:* Aquity BEH C18 1.7 Mm, 150 x 2.1 mm;
- *eluent A:* 5 mM ammonium acetate buffer pH 8.5; *eluent B:* acetonitrile
- *flow:* 1.0 mL/ min (trapping), 0.4 mL/ min (separation)

- *stop time:* 20 min
- *oven temp.:* 50 ° C (for both columns)
- *injection volume:* 20 µl
- *gradient:* 0.00 min 98%A/2%B, 0.50 min 98%A/2%B, 12.50 min 55%A/45%B, 12.51 min 10%A/90%B, 15.01 min 98%A/2%B

2D-Trapping

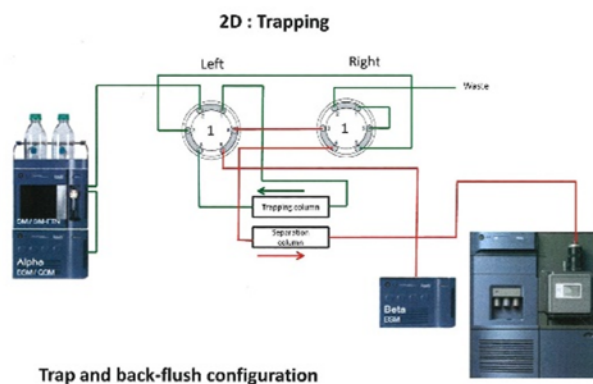


Fig. 1: The sample is injected and pushed with the pump on the left side on the trapping column (green cycle). Any matrix constituents eluting faster than PAs are rinsed in the waste. In the same time the second pump on the right side equilibrates the red cycle via separation column and HRMS-ToF.

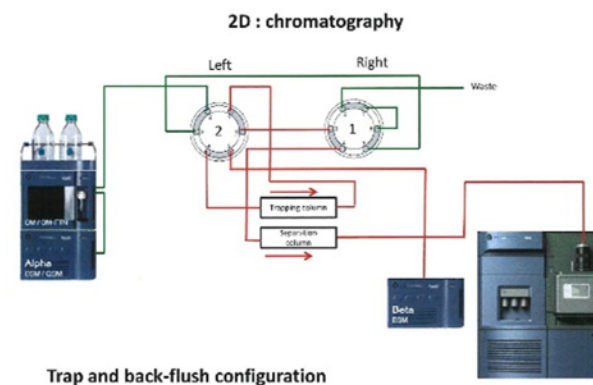
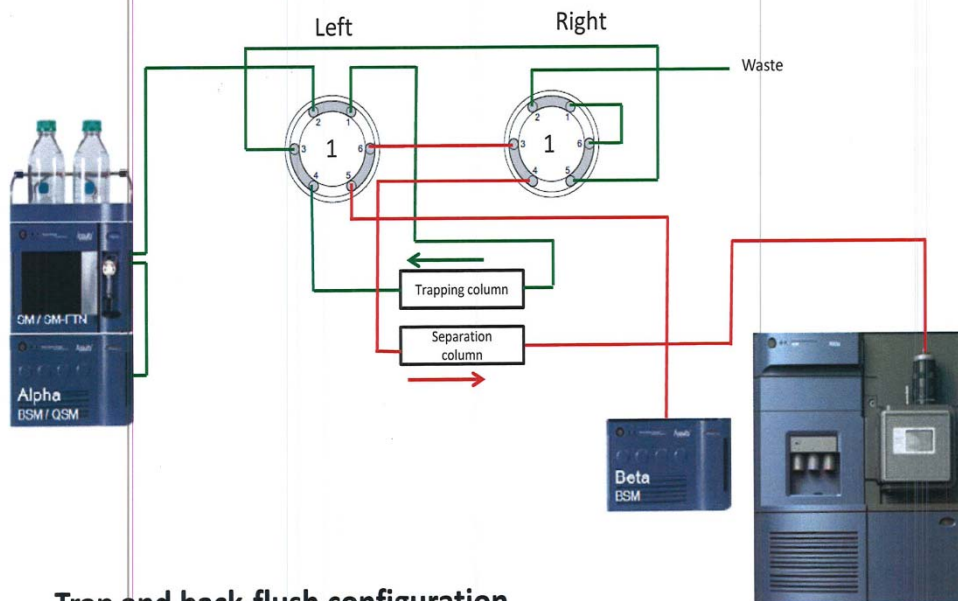


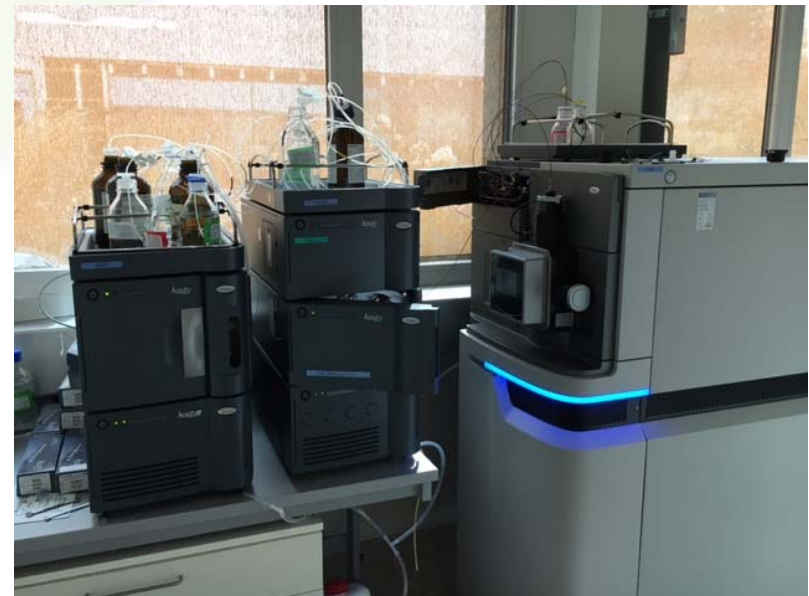
Fig. 2: After the switch over of the valve on the left side, the second pump purges the trapping column in the opposite direction and pushes the trapped PAs on the separation column. After separation the PAs are detected by HRMS-ToF (red cycle).

2D-Trapping solution

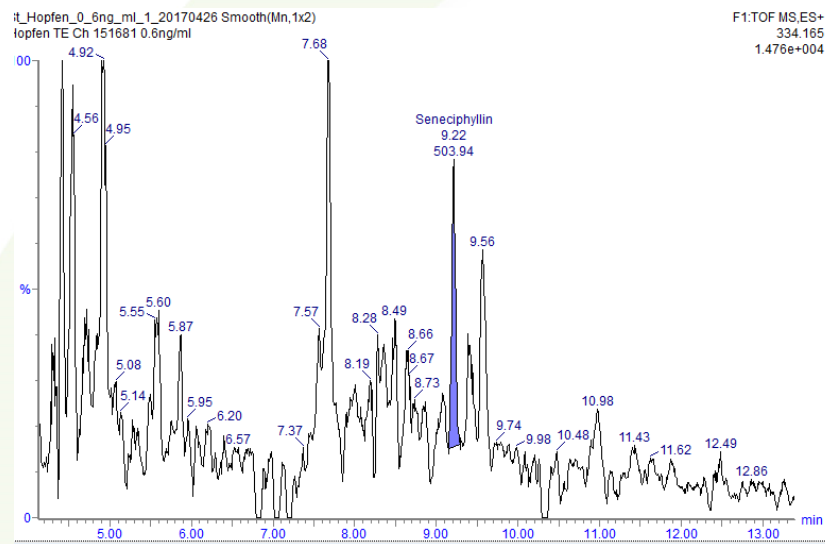
2D : Trapping



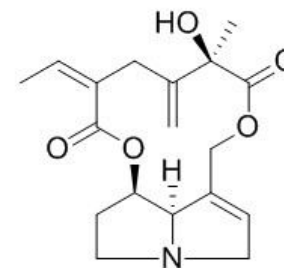
Trap and back-flush configuration



Berechnung des LoQ



Um in der Validierung den LoQ zu ermitteln musste das anvisierte unterste Level eines jeden untersuchten PA unzweifelhaft identifizier- und integrierbar sein. Dies war der Fall auf dem Level von 0.6 ng/ml für alle PAs mit Ausnahme von Jacolin und Jacobin (1.2 ng/ml).



seneciophylline

PA-Standards in PA-freier Trockenextrakt-Matrixlösung

*(7-acetylintermedin/7-acetyllycopsamine), *(7-actylintermedine-N-oxide/
7-acetyllycopsamine-N-oxide), echimidine, echimidine-N-oxide, europine,
europine-N-oxide, erucifoline, erucifoline-N-oxide, heliotrine, heliotrine-N-oxide,
indicine-N-oxide, integerrimine, integerrimine-N-oxide *(intermedine/
lycopsamine), *(intermedine-N-oxide/lycopsamine-N-oxide), jacobine, jacobine-
N-oxide, jacoline, jacoline-N-oxide, lasiocarpine, lasiocarpine-N-oxide,
monocrotaline, monocrotaline-N-oxide, retrorsine, retrorsine-N-oxide,
senecionine, senecionine-N-oxide, seneciphylline, seneciphylline-N-oxide,
senecivernine, senecivernine-N-oxide, senkirkine and trichodesmine

* The component pairs in parentheses are stereoisomers. They can be distinguished neither with the present chromatographic system nor by different masses. Due to their chemical structure, they show the same responses, and thus, in the validation they were treated as the same substances and were determined against one of both as external standard.

Die wichtigsten Validierungsergebnisse

- Linearity
 - Correlation coefficients (r) = 0.99850 – 0.99998 (\emptyset 0.99948)
 - Coefficients of variation = 1.9 – 19.2 (\emptyset 7.8)
- Precision/ Accuracy
 - Variation coeff. 60 ppb = 0.8 – 18.9 (\emptyset 6.5); 450 ppb = 1.4 - 5.7 (\emptyset 2.8)
 - Recovery[%] 60 ppb = 51.9 – 109.8 (\emptyset 83.1); 450 ppb = 48.3 – 106.4 (\emptyset 87.2)
- Intermediate precision
 - 2nd analyst Variation coeff. 450 ppb = 1.4 – 5.0 (\emptyset 3.0); intermed. precision variation coeff. = 1.9 – 9.9 (\emptyset 4.6)
- Robustness
 - Stability of PAs in solution = stable for 3 days
 - variation of flow rate; variation of column temperature; variation of mobile phase; variation of gradient slope; change of column batch; variation of different MS-parameters = within the prediction interval

Umsetzung des HMPC-Public statement zu Pyrrolizidinalkaloiden

HMPC 31. MAI 2016

EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH31 May 2016
EMA/HMPC/328782/2016
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products¹ with pyrrolizidine alkaloids

Transitional recommendations for risk management and quality control

Discussion in Working Party on European Union Monographs and European Union List (MLWP)	April 2016
Adoption by Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)	31 May 2016

“A contamination level of herbal medicinal products leading to a daily intake of **maximum 1.0 µg PAs/day** during a transitional period of 3 years is acceptable During this time period the producers of herbal medicinal products should take **actions necessary to reduce the contamination to a level leading to a daily intake not exceeding 0.35µg PAs/day.**”

Quelle: EMA Homepage, HMPC

Umsetzung des HMPC-Public statement zu Pyrrolizidinalkaloiden

EU-weite behördliche Vorgänge / Forderungen bzgl. PAs gem. Eingänge bei einem Phyto-Ausschuss-Unternehmen

Länder	PA-Daten / Variations / Spezifikationen	(vorläufiges) RA und/ oder Drogenliste	Fristen	Anmerkungen
Deutschland	Spezifikation / PA-Daten/ Variation	-	seit 01.03.2016	Volles Datenpaket (Spezifikationen, Variations, Methoden, Ref.-subs und Verifizierung PA-Analytik.
Schweden	Spezifikation / Variation	-	24.03.2016 01.07.2017	PAs sind am FP via IB Variation zu spezifizieren, Methoden etc. sind vorzulegen.
Österreich	Spezifikation / Variation	Drogenliste	01.07.2017	Die drogenspezifische Liste der AGES wurde zwischenzeitlich aktualisiert, zwingende Umsetzung & Variation IB für Drogen der Liste bis zum 01.07.2017.
England	Spezifikation / PA-Daten	Drogenspezifische Aufrufe	Frist wird bei Aufruf gesetzt	MHRA 06.04.2016: „Erster Schritt nur Hypericum-Produkte“. Die 1,0 µg sind via Spezifikation am Extrakt zu gewährleisten, keine Variation, sondern „externe Vorlage“ ohne Fees.
Ungarn	?	RA inkl. PA-Daten	30.09.2016	Vorlage eines RAs inkl. PA-Daten binnen Frist.
Slowenien	?	RA inkl. PA-Daten	30.09.2016	Vorlage eines RAs inkl. PA-Daten binnen Frist.
Finnland	?	RA inkl. PA-Daten	31.01.2017	Vorlage eines RAs inkl. PA-Daten binnen Frist.
Polen	3.2.S.3.2	-	zur MR-Frist	Gem. MR sind in der 3.2.S-Section „Impurities“ „Angaben zu PAs gem. PS der HMPC“ zu machen.
Kroatien	Spezifikationen Variations	RA, PA-Daten, Zeitplan	01.06.2017	RAs und PA-Methode sowie ein Zeitplan für die seitens des PU vorgesehene Schaltung von Variations (Spezifikationen HS, HP oder Fertigprodukt) sind bis zum 01.06.2017 vorzulegen.
Schweiz	RA	RA, Drogenliste	seit 05.02.2017	„Insbesondere“ für Produkte mit Drogen der Liste ist ein RA vorzunehmen. Generelles Verbot des Vertreibens, wenn PA > 1,0 µg / day. Swissmedic wird stichprobenartig auf Risk Evaluierung prüfen, aber keine Einreichung von Unterlagen / Variations etc.

RA: Risk Assessment / PS Public Statement / MR Mängelrüge / FP Fertigprodukt / HS Herbal Substance

Bekanntmachung des BfArM/DE vom 1. März 2016

- A. Sehr geringe oder keine Kontaminationsproblematik: Beleg, dass $\leq 0,1$ μg PA pro Tag \rightarrow Stichprobenprüfung
- B. Geringe Kontaminationsproblematik: Beleg, dass $\leq 0,35$ μg PA pro Tag \rightarrow engmaschigere Stichprobenprüfung
- C. Relevante Kontaminationsproblematik: Keine Daten vorhanden oder keine Einordnung in A oder B möglich \rightarrow Routineprüfung mit oberem Grenzwert 1,0 μg PA pro Tag

„Das BfArM wird in anhängigen Verfahren prüfen, ob die vorgelegten Unterlagen den Vorgaben entsprechen.“

DATENSAMMLUNG

- Seit 2013 Aufbau einer Datenbank zur Erfassung der Befunde mit derzeit 46 Firmen
- Jährliche Erfassung und Auswertung
- Versand der Daten zu Drogen, Extrakten und Urtinkturen an die beteiligten Firmen
- Ziel: Überblick über die Belastungssituation für die beteiligten Firmen und Grundlage für die Diskussion mit Behörden (BfArM, HMPC, nationale Behörden)
- „Positivliste“: Drogen mit unwahrscheinlicher Belastung in Arbeit, Diskussion BfArM in Kürze
- Homöopathische Urtinkturen: nur wenige positive Befunde (577 Datensätze) → Publikation

PA: FORSCHUNGSPROJEKTE, BEISPIELE (I)

- Erfassung der standortabhängigen und kulturpflanzen-spezifischen Beikrautflora in Arzneipflanzenbeständen unter besonderer Berücksichtigung PA-haltiger Unkräuter („Unkrautdatenbank“)
- FAH: Erarbeitung von „Unkrautsteckbriefen“ zur weltweiten Nutzung bei Anbau und Sammlung (Crotalaria, Echium, Heliotropium, Myosotis, Senecio): 17 Firmen beteiligen sich
- Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloiden aus dem Boden (verrottetes Material bzw. lebende Pflanzen)

PA: FORSCHUNGSPROJEKTE, BEISPIELE (II)

- Unkrautbekämpfung in konventionellem und ökologischem Anbau: Auswahl wirksamer Herbizide sowie nicht-chemische Unkrautbekämpfung (z.B. Roboter)
- Erkennung und mechanische Abtrennung von unerwünschtem Material aus Erntegut
- Entwicklung einer immunologischen Screening-methode zur Bestimmung toxikologisch relevanter PA in Lebens- und Futtermitteln (ELISA-Schnelltest)

PA: FORSCHUNGSPROJEKTE , BEISPIELE (III)

- In vitro-Untersuchungen der Hepatotoxizität und Genotoxizität von neun ausgewählten PA*
- Prof. Schrenk, Kaiserslautern; gefördert über Koop Phyto
- Derzeit erste Ergebnisse Cytotoxizitätstest an HepG2-Zellen: Lasiocarpin hat die höchste Toxizität, mit erheblichem Abstand gefolgt von Echimidin u.a. Diestern
- Ziel: Verbesserung der Vergleichsmöglichkeiten zwischen einzelnen PA, weg vom „WorstCase“ auf Basis Lasiocarpin, hin zu adäquateren Grenzwerten
- Weiteres neues Projekt: Struktur-Wirkungs-Beziehung von PA hinsichtlich ihrer Genotoxizität(DFG)

*) Lasiocarpin, Retrorsin, Senecionin, Seneciphyllin, Heliotropin, Echimidin, Lycopsamin, Europin, Indicin

Erstellung einer Monographie zur Bestimmung der PA für das europäische Arzneibuch

- ❑ Die EP wird ein Beispiel für eine LC-MS/MS-Methode ausführlich vorstellen.
- ❑ Andere Methoden sind möglich, wenn festgelegte Validierungskriterien erfüllt werden. Ausdrücklich können auch Methoden mit Messung der genauen Masse zur Anwendung kommen.
- ❑ Die Methoden müssen die PAs einzeln messen können: zukünftig wichtig, wenn unterschiedliche Toxizitäten der PAs bekannt sind.
- ❑ Verschiedene Ansätze zur Vermeidung von Matrixeffekten sollen möglich sein.
- ❑ Z.Z. wird diskutiert welche und wie viele PAs in die Methode aufgenommen werden. Dazu wird die beim BAH vorhandene Datenbank genutzt: welche Alkaloide sind in Drogen und Extrakten überhaupt relevant.
- ❑ Das EDQM wird die entsprechenden Standards zur Verfügung stellen.
- ❑ Schwierig ist die Festlegung eines Mindest-LoQ für die Methode: dieser ist abhängig vom jeweiligen Alkaloid in der jeweiligen Matrix.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

