

Analytik von Coumarin mittels LC-MS/MS



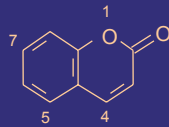
Marion Raters, Reinhard Matissek

Lebensmittelchemisches Institut (LCI)
des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e. V.
Adamsstraße 52-54, 51063 Köln, www.lci-koeln.de



Einleitung

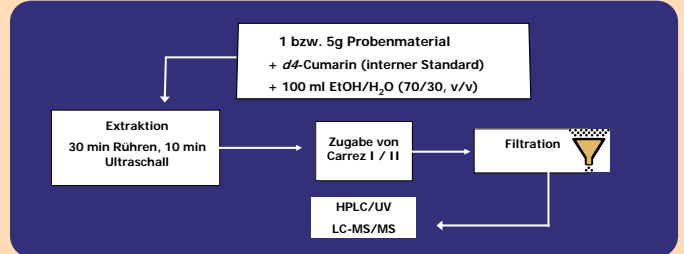
Coumarin zählt zu einer als „Active Principles“ bezeichneten Gruppe von Inhaltsstoffen bestimmter Kräuter und Gewürze, die zur Aromawirkung beitragen, jedoch auch eine toxikologische Relevanz aufweisen. Coumarin gilt als hepatotoxisch und verfügt im Tierversuch bei Gabe sehr hoher Mengen, die über lange Zeiträume verabreicht wurden, über eine cancerogene Wirkung. Neuere wissenschaftliche Ergebnisse der EFSA (European Food Safety Authority) deuten jedoch darauf hin, dass hierbei kein genotoxischer Wirkmechanismus vorliegt [1].



Ausgelöst durch toxikologische und politische Diskussionen über diesen in zahlreichen Pflanzen und u.a. auch in einigen Zimtsorten vorkommenden sekundären Pflanzenstoff Mitte 2006 bestand dringender Bedarf an einer empfindlichen Analysenmethode zur Bestimmung von Coumarin in Zimt und zimthaltigen Lebensmitteln [2, 3].

Da üblicherweise eingesetzte Analyseverfahren, wie beispielsweise per HPLC-UV bzw. per GC-MS zu unempfindlich bzw. recht aufwändig sind [4-6], wurde im LCI eine sensitive, praxistaugliche LC-MS/MS-Methode mittels Stabilsotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Coumarin in Lebensmitteln entwickelt (siehe Tabelle 2). Diese ermöglicht es, Coumarin-Gehalte im µg/kg-Bereich selektiv und schnell zu erfassen (siehe chromatografischer Vergleich in Abbildung 2 und 3). Die Performance-Kriterien der LC-MS/MS-Methode wurden mit denen der HPLC-UV-Methode verglichen (Tabelle 1). Mit der neuen, validierten LC-MS/MS-Methode in unserem Institut ca. 500 Proben, u. a. Gewürze und Feingebäck, auf Coumarin untersucht (Abbildung 2).

Probenaufarbeitung



HPLC-Bedingungen

Tabelle 2: Chromatografiebedingungen der Coumarinbestimmung mittels UV- bzw. MS/MS-Messung

	HPLC-UV	LC-MS/MS
Trennsäule	LiChrospher 60 RP Select B, 5 µm, 125 x 4 mm	PerfectSil Target ODS 3 3 µm, 125 x 4 mm
Eluent	NH ₄ Ac 5mmol (A), ACN/MeOH, 1/2, v/v (B)	MeOH / ACN / H ₂ O (80 / 0,1 / 19,9, v/v/v)
Fluss	0,8 ml/min Gradient 0 → 14 min: 22 % B → 15 min: 70 % B → 22 min: 70 % B → 25 min: 22 % B	0,25 ml/min isokratisch
Injektionsvolumen	20 µl	20 µl
Säulentemperatur	20 °C	20 °C
Detektion	279 nm	ESI+ MRM (Coumarin) 147,1→103,1 147,1→91,1 147,1→77,1 147,1→56,1 MRM (d4-Coumarin) 151,1→107,1 151,1→95,1 151,1→81,1 151,1→69,1

Methodenvergleich

Tabelle 1: Vergleich der Performance-Kriterien der UV- bzw. MS/MS-Messung

	HPLC-UV	LC-MS/MS
Linearität	0,15-15 µg/ml	1-500 ng/ml
Wiederfindung	85-95 %	100 %
RSD	7 %	8 %
BG	5 mg/kg	0,05 mg/kg
NG	2 mg/kg	0,03 mg/kg

Sowohl die HPLC-UV Methode als auch die LC-MS/MS Methode wurden für die folgenden Parameter validiert: Linearität, Wiederfindung, relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (RSD) sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NG, BG). Die Ergebnisse der Validierung sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Cumaringehalte in Lebensmitteln - 2006

Eine Auswahl an ca. 500 Proben wurde im Jahre 2006 mit der von uns etablierten LC-MS/MS-Methode auf Gehalte an Coumarin untersucht. Die Proben wurden in fünf Kategorien unterteilt, u. a. in Gewürze/Gewürzmischungen, Zimtgebäck und Lebkuchen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist Abbildung 1 zu entnehmen.

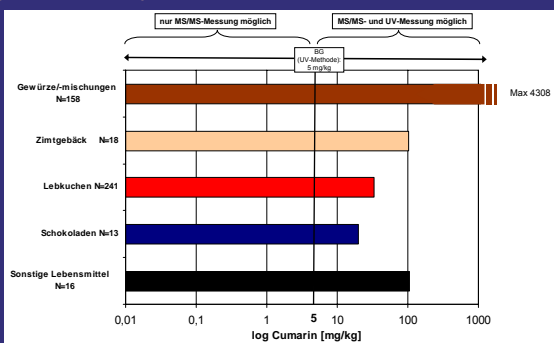


Abbildung 2: Ergebnisse des Coumarin-Monitorings bestimmter Lebensmittelgruppen (2006)

Fazit

Die von uns entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Coumarin in Lebensmitteln ermöglicht es, Coumarin-Gehalte im µg/kg-Bereich und somit weit unterhalb des laut Aromenverordnung geforderten Höchstwertes von 2 mg/kg selektiv und schnell zu erfassen und zu quantifizieren. Die in der Praxis häufig zum Einsatz kommende HPLC-UV Methode eignet sich aus unserer Sicht nur als Screeningmethode und ist für eine genaue Quantifizierung insbesondere im unteren mg/kg-Bereich zu unempfindlich.

Chromatogramme

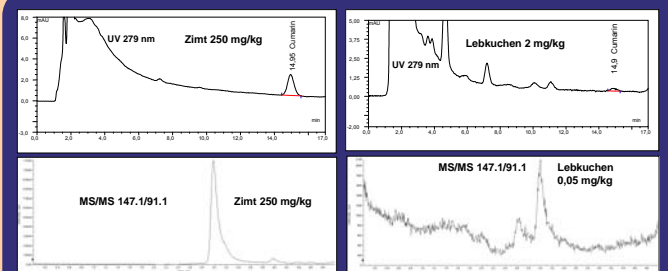


Abbildung 2: Chromatografischer Vergleich eines Zimt-extraktes mittels UV- bzw. MS/MS-Messung

Abbildung 3: Chromatografischer Vergleich eines Gebäck-extraktes mittels UV- bzw. MS/MS-Messung an der Nachweisgrenze der jeweiligen Methode

Literatur

- [1] EFSA 2004, Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin; Adopted on 6 October 2004. The EFSA Journal (2004) 104: 1-36
- [2] BfR 2006, Verbraucher, die viel Zimt verzehren, sind derzeit zu hoch mit Coumarin belastet. Gesundheitliche Bewertung des BfR Nr. 043/2006 vom 16 Juni 2006. http://www.bfr.bund.de/cm/208/verbraucher_die_viel_zimt_verzehren_sind_gerade_zu_hoch_mit_coumarin_belastet.pdf
- [3] BfR 2006, Hohe tägliche Aufnahmemengen von Zimt: Gesundheitsrisiko kann nicht ausgeschlossen werden. Gesundheitliche Bewertung Nr. 044/2006 des BfR vom 18. August 2006. http://www.bfr.bund.de/cm/208/hohe_taegliche_aufnahmemengen_von_zimt_gesundheitsrisiko_kann_nicht_ausgeschlossen_werden.pdf
- [4] Köhn A, Gratzfeld-Hüsgen A (1997) Bestimmung von Aromastoffen in Lebensmitteln mit HPLC und Diodearray-Detektion. GIT Labor-Fachzeitschrift 9/97: 888-889
- [5] de Jager LS, Perfetti GA, Diachenko GW (2007) Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method and validation studies 1145: 83-88.
- [6] He ZD, Qiao CF, Han QB, Cheng CL, Xu HX, Jiang RW, Bu PPH, Shaw PC. Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high pressure liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2005; 53:2424-2428.