

Keine Tropanalkaloide in Erdnussflips

Entwicklung einer leistungsstarken, routinetauglichen LC-MS/MS Methode

Julia Gadenne | Dr. Marion Raters | Dr. Frank Heckel

Tropanalkaloide sind in Lebensmitteln sowie Futtermitteln unerwünscht und treten als Verunreinigung der Ernte durch Unkräuter auf. Zur Analytik der beiden wichtigsten Vertreter, Atropin und Scopolamin, wurde im LCI eine leistungsstarke, routinetaugliche LC-MS/MS-Methode entwickelt. In einem anschließenden Monitoring an einer Auswahl an Erdnussflipsproben wurden keine Gehalte oberhalb der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze der Analysenmethode festgestellt.

Tropanalkaloide (TA) gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und werden auf natürliche Weise von bestimmten Pflanzen gebildet. Der Name „Tropan“ leitet sich vom Atropin ab, dem Wirkstoff der Tollkirsche (*Atropa belladonna*), in dem es als Strukturelement enthalten ist. Die Gruppe der TA umfasst mehr als 200 Verbindungen, die in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden können. Strukturformeln von Tropan und seinen Derivaten sind der Abbildung 1 zu entnehmen.

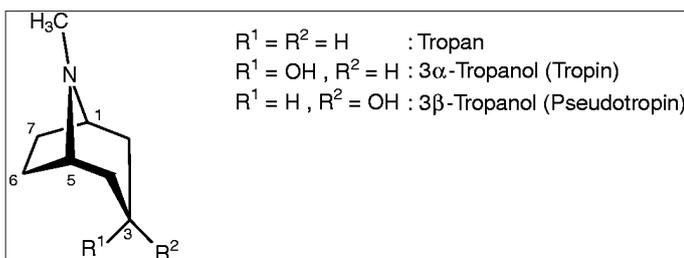


Abb. 1: Strukturformeln von Tropan und Derivaten

Vorkommen

TA werden in Pflanzen der Familien Brassicaceae, Moraceae, Erythroxylaceae u. a. gebildet. Vor allem jedoch in der Familie der Solanaceae (z. B. Alraune, schwarzes Bilsenkraut, Tollkirsche, gemeiner Stechapfel) ist das Auftreten

vielfältig. Atropin und (-)-Scopolamin sind die am häufigsten vorkommenden und am besten untersuchten Verbindungen der TA. Ihre Strukturen sind den Abbildungen 2 und 3 zu entnehmen.

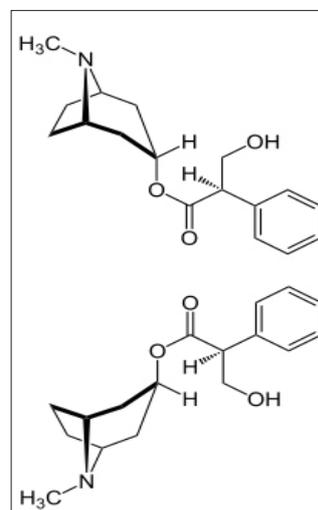


Abb. 2: Atropin (Racemat aus (R)- und (S)-Hyoscyamin)

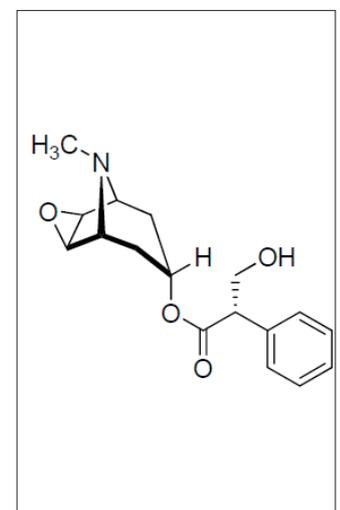


Abb. 3: (-)-Scopolamin

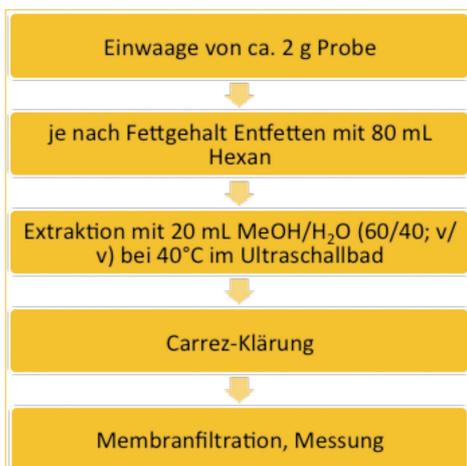


Abb. 4: Vereinfachtes Fließschema der Proben-aufarbeitung

Tab. 1: Quantifizierungsparameter für Atropin und Scopolamin

	Retentionszeit [min]	Massenübergang zur Quantifizierung [Da]
Atropin	8,74	290 -> 124
Atropin-D₃	8,73	295 -> 124
Scopolamin	8,43	304-> 156
Scopolamin-D₃	8,42	307 -> 159

Tab. 2: Validierungsparameter der Methode zu Bestimmung der TA

Parameter	Atropin	Scopolamin
Spezifität	✓	✓
Wiederholbarkeit RSD_r	12,4 %	7,9 %
Vergleichbarkeit RSD_R	16,9 %	17,7 %
Wiederfindung	77 – 131 %	
Robustheit	✓	✓
Lin. Arbeitsbereich	0,3 – 30,0 µg/kg	
Nachweisgrenze	0,1 µg/kg	0,1 µg/kg
Bestimmungsgrenze	0,4 µg/kg	0,3 µg/kg
Messunsicherheit	13,2 %	13,8 %

Im Allgemeinen ist die Kontamination von großkörnigen Getreidesorten, wie Weizen, Roggen, Hafer und auch Mais seltener, da die Samen von TA-haltigen Schadpflanzen aufgrund ihrer abweichenden Größe, Form, Farbe und Dichte mit den mühlenüblichen Reinigungstechniken recht zuverlässig aussortiert werden können. Durch mechanische Reinigung werden so auch anhaftende Kontaminationen oder Stäube von der Kornoberfläche entfernt. Zu den betroffenen Getreidearten zählen laut verfügbarer Literatur eher feinkörnige Arten wie Hirse, Sorghum und die Pseudocereale Buchweizen. Stechapfelpflanzen haben beispielsweise eine ähnliche Wuchshöhe und den gleichen Reifezeitpunkt, sodass sie bei der Ernte miterfasst werden können.

Generell sind von der Kontamination mit TA häufig Bio-Produkte betroffen, da beim Anbau die Möglichkeiten zur Bekämpfung von Unkräutern eingeschränkt sind und somit deren Samen bei der Ernte miterfasst werden. Häufig geht die Kontamination hierbei von mit tropanalkaloidhaltigen Säften verunreinigten Erntemaschinen/-teilen aus. Der Eintrag von TA in getreidebasierte Lebensmittel in der EU ist meist auf *Datura stramonium* (gemeiner Stechapfel), *Hyoscyamus niger* (Schwarzes Bilsenkraut) und *Atropa belladonna* (Schwarze Tollkirsche) zurückzuführen. Zu den betroffenen Getreidearten zählen Hirse, Sorghum, Mais und die Pseudocereale Buchweizen. Aber auch in Leinsamen, Sojabohnen, Sonnenblumenkernen und Mohnsamen sowie daraus gewonnenen Erzeugnissen konnten die Alkaloide vereinzelt nachgewiesen werden. Die Konzentrationen im Lebensmittel reichen hierbei von < 1 bis 100 µg/kg.

Toxikologische Betrachtung

Am intensivsten wurden die toxikologischen Wirkungen der TA Atropin und Scopolamin untersucht. Seit der Renaissance werden Auszüge der Tollkirsche zu pharmakologischen Zwecken, u. a. zur Pupillenerweiterung, verwendet. Aufgrund ihrer ausgeprägten psychoaktiven Wirkung können TA ferner in bestimmten Dosierungen Halluzinationen hervorrufen. Atropin und Scopolamin sind antimuscarine Agentien, also Antagonisten zum muscarinen Acetylcholin-Rezeptor, wobei nur das (-)-Hyoscyamin aus dem racemischen Gemisch (Atropin) anticholinerge Aktivität aufweist. Meist sind Wirkungen wie Pupillenerweiterung, Mundtrockenheit, verhinderte Harnproduktion, Herzrhythmusstörungen, Reduktion der Schweißproduktion und Erhöhung der Körpertemperatur zu beobachten. Bei höheren Mengen kann es zum Tod durch Herzstillstand kommen.

Die Toxikologie anderer TA ist weitgehend unerforscht, so dass alle TA von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) zunächst als toxikologisch relevant eingestuft werden. Laut der Verordnung (EU) 2016/239 der EU-Kommission wurde ein Höchstgehalt von je 1,0 µg/kg für die TA Atropin und Scopolamin in Lebensmitteln festgesetzt. Dieser gilt für Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder, die Hirse, Sorghum, Buchweizen oder daraus gewonnene Erzeugnisse enthält. Die akute Referenzdosis (ARfD) für die Summe dieser beiden Verbindungen liegt bei 0,016 µg/kg KG (Körpergewicht). Dieser Wert wurde 2013 durch das CONTAM-Gremium der EFSA ermittelt. Die Risikobewertung für andere Lebensmittel erfolgt derzeit unter Zuhilfenahme dieser akuten Referenzdosis. Es wird jedoch aktuell über die Festsetzung weiterer Höchstgehalte, unter anderem für Hirse, Buchweizen, Mais und die entsprechenden Mahl-erzeugnisse, diskutiert.

Analytik von Tropanalkaloiden im LCI

Zur Untersuchung von TA werden überwiegend LC-MS/MS-Methoden verwendet. Die Quantifizierung erfolgt häufig über externe Kalibriergeraden mit matrixangepassten Standards (MMS) oder interne, isotoptenmarkierte Standards. Im LCI wurde eine routineteaugliche, sehr sensitive LC-ESI-MS/MS-Methode zur schnellen Quantifizierung der TA Atropin und Scopolamin entwickelt und validiert. Ein vereinfachtes Fließschema der Probenaufarbeitung ist Abbildung 4 zu entnehmen. 2 g der Probe werden eingewogen und je nach Fettgehalt mit 80 mL Hexan entfettet. Anschließend erfolgt die Extraktion mit MeOH/Wasser (60/40) bei 40 °C im Ultraschallbad. Nach Carrez-Klärung, Zentrifugation und weiterer Aufreinigung durch Membranfiltration wird die Probe mittels LC-ESI-MS/MS (s. Abbildung 5) vermessen. Um Matrix-

2mag
magnetic^emotion

10 Years

Well-proven concepts - Innovative products

- ⌘ 100% wear- and maintenance-free
- ⌘ Volumes from 1 ml up to 3,000 litres
- ⌘ Submersible magnetic stirrers
- ⌘ Heat resistant up to +200 °C
- ⌘ Individual configurations on request
- ⌘ 3 years warranty



2mag AG

magnetic^emotion

Schragenhofstr. 35 I-K Phone.: +49 (89) 38153110 info@2mag.de
D - 80992 Munich Fax: +49 (89) 14 33 43 69 www.2mag.de

Made in Germany

effekte auszugleichen, werden isotope-markierte interne Standards (Atropin-D₅ und Scopolamin-D₃) zur Quantifizierung verwendet. Die Retentionszeiten sowie die zur Quantifizierung genutzten Massenübergänge sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Validierung der vorgestellten Analysenmethode erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben von Kromidas. Dazu wurde eine mit TA belastete Getreideprobe entsprechend der entwickelten Methode aufgearbeitet und mittels LC-ESI-MS/MS vermessen. Tabelle 2 fasst die wesentlichen Validierungsparameter zusammen.

Monitoring von Erdnussflips

Im Anschluss an die Entwicklung und Validierung der Analysenmethode wurde ein Monitoring an einer Auswahl an Erdnussflips verschiedener Hersteller durchgeführt. Bei Erdnussflips handelt es sich um ein extrudiertes Snackprodukt, das sich großer Beliebtheit erfreut. Zu den Hauptzutaten zählen Maisgrieß (grob zermahlene Maiskörner, Anteil > 60 %) und Erdnüsse. Zur Untersuchung des Vorkommens von TA wurden im LCI 21 Proben Erdnussflips verschiedener Hersteller nach der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet und vermessen. Drei der untersuchten Proben stammten dabei aus biologischem Anbau.

In keiner der untersuchten Proben (N=21) konnten Atropin bzw. Scopolamin oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,4 bzw. 0,3 µg/kg nachgewiesen werden. Als Ursache für diesen Befund kommt in Betracht, dass Erdnussflips üblicherweise aus geschältem Mais hergestellt werden. Die tropanalkaloidhaltigen Pflanzensäfte, die durch Ausquetschen während der Ernte auf die Schale des Mais gelangen, können durch den Schälvorgang somit zum überwiegenden Teil abgetrennt werden und gelangen nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil in die Endprodukte.

Abschließend ist zu konstatieren, dass Hersteller von Knabberartikeln im Rahmen ihres internen Qualitätsmanagementsystems ein regelmäßiges Monitoring von Snackprodukten auf derartige natürliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe durchführen, um die gleichbleibende Qualität ihrer Produkte auf höchstem Standard zu gewährleisten.

- [1] EFSA (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food, External Scientific Report, EFSA Supporting publication 2016:EN-1140, 30. November 2016.
[2] VO (EU) 2016/239 DER KOMMISSION zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte an Tropanalkaloiden in bestimmter Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder, 19. Februar 2016.
[3] RIKILT (2010) Tropane alkaloids in food, Report 2010.011.
[4] Kniel, B (2016) Natürliche pflanzliche Giftstoffe: Tropan-Alkaloide; backwaren aktuell, 01/2016.
[5] Bioland e. V. (2016) Tropanalkaloide, Verunreinigungen in Biokulturen verhindern, Merkblatt.



Autoren | Kontakt

Dr. Marion Raters | Julia Gadenne | Dr. Frank Heckel

Lebensmittelchemisches Institut (LCI) des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e.V.

Adamsstraße 52-54 | 51063 Köln | www.lci-koeln.de