



Autorin: Dr. Marianne Erbs

1.1.1 Nachweis vom Pflanzentoxin Ricin(in)

Das Kantonale Laboratorium Basel-Stadt hat eine Nachweismethode implementiert, welche eine quantitative Bestimmung von Ricinin in Umweltproben, Lebensmitteln und Körperflüssigkeiten erlaubt. Ricinin kann als Markersubstanz für das hochgiftige Pflanzenprotein Ricin verwendet werden.

Ausgangslage

Der Wunderbaum (*Ricinus communis*) ist eine Nutzpflanze der (sub)tropischen Sommerregengebiete, die in grossem Massstab, vorwiegend in Indien, Brasilien und China, für die Herstellung von Ricinusöl angebaut wird. Weltweit wird jährlich mehr als eine Million Tonnen Ricinusöl produziert. In Europa ist der exotische Wunderbaum als prächtige Zierpflanze beliebt.



Früchte des Wunderbaums



Verschiedene Sorten von Ricinussamen aus denen das Ricinusöl gewonnen wird

Die bohnenähnliche Ricinus-Samen sind vor allem reich an Öl und Protein (40–50% Öl, 14–22% Protein). Zudem sind zwei Giftstoffe enthalten, nämlich das wasserlösliche, hitzelabile und hochgiftige Protein Ricin sowie das thermostabile und weniger toxische Pyridin-Alkaloid Ricinin. Der Wunderbaum ist die weltweit giftigste Pflanze – alle Pflanzenteile sind nicht nur gifthaltig sondern auch extrem allergen. Unverarbeitete Ricinussamen sind ungiftig solange die harte wasserundurchlässige Samenschale intakt bleibt. Die Samen werden wegen ihrer schönen Musterung manchmal in exotischen Ketten als Schmuck verwendet.

Ricinusöl

Das viskose, durchsichtige bis gelbliche Ricinusöl wird aus den Samen der Pflanze kalt gepresst, es besteht zu 80 bis 85% aus Triglyzeriden der Ricinolsäure. Raffiniertes Ricinusöl ist frei von Ricin. Ricinusöl unterscheidet sich durch besondere chemische Eigenschaften von anderen Ölen. Ricinolsäure ist die einzige in grösseren Mengen kommerziell verfügbare natürliche Fettsäure, die eine Hydroxygruppe trägt. Diese Funktionalität macht Ricinusöl polar. Zudem bieten die Hydroxygruppen zahlreiche chemische Reaktionsmöglichkeiten, welche die Herstellung einer Vielfalt unterschiedlichster Verbindungen erlaubt, die von grossem wirtschaftlichen Interesse sind und aus anderen Saatölen nicht gebildet werden können. Bedeutung hat Ricinusöl im Wesentlichen als erneuerbarer und erschwinglicher Rohstoff in der Herstellung von Schmiermitteln, Lacken,

Farben und Kunststoffen sowie in kosmetischen und medizinischen Produkten. In den meisten Fällen wird Ricinusöl nicht direkt, sondern nach chemischen Umsetzungen verarbeitet. Ricinusöl wurde früher vor allem in Europa als kostengünstiges Brennöl eingesetzt. Der Einsatz als erneuerbarer Energieträger zur Herstellung von Biodiesel wird neuerdings wieder diskutiert.

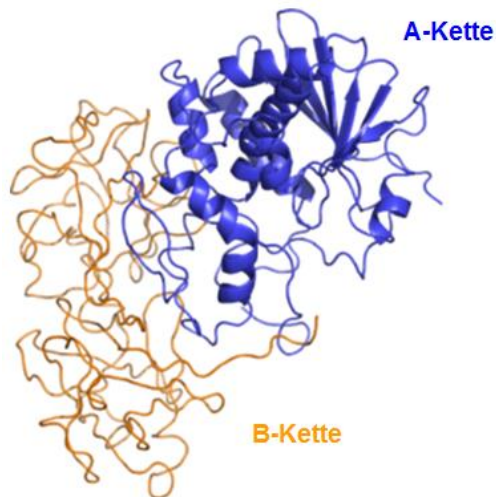
Die festen Rückstände, die in grosse Mengen aus der industriellen Ricinusölproduktion entstehen, werden nach Entgiftung durch Hitzeinaktivierung in der Regel zu Stickstoff-Biodünger (Ricinusschrot) verarbeitet oder Tierfuttermitteln beigegeben. Im Gegensatz zu Ricin lässt sich Ricinin nicht durch Hitzebehandlung inaktivieren. Um daher Presskuchen der Ricinuskerne als Tierfutter zu verwerten, muss Ricinin nach Zerstörung des Ricins durch aufwändige Extraktion entfernt werden. Auch wenn grössere Mengen an Ricinus-Pressrückstände ausserhalb Europa als Bestandteile von Tierfuttermitteln verwendet worden sind, scheint dieser Gebrauch zurzeit nicht weitverbreitet zu sein. Dies ist nebst der Gefahr einer unvollständigen Entgiftung vermutlich auch wegen des geringen Gehaltes an gewissen essentiellen Aminosäuren im Presskuchen zurückzuführen, welches Ricinus-Rückstände als umfassende Proteinquelle ausschliesst.

Vergiftungsfälle

Seit den 1970ern sind in Europa, Amerika und Asien immer wieder in Zusammenhang mit Biodünger stehenden Vergiftungsfälle von Hunden berichtet worden. Nahezu alle Fälle endeten tödlich. Die fraglichen Biodünger enthielten neben dem genannten Pressrückstand auch Abfälle aus der Fleischproduktion und wurde daher von Hunden gefressen. Eine fehlende oder ungenügende Entgiftung von Pressrückständen, welche in solchen Biodüngermitteln verwendet werden, können zu tödlichen Vergiftungen von Wild-, Nutz- und Haustieren führen. Ungewiss bleibt die Zahl der Vergiftungsfälle von Lebewesen, die nicht entdeckt oder gemeldet werden. In der Schweiz ist 2013 der bisher einzig bekannte tödliche Biodünger-Vergiftungsfall von einem Hundebesitzer gemeldet worden. Da damals kein Probenmaterial erhoben wurde, konnte die Todesursache nicht eindeutig ermittelt werden. In einer ähnlichen Ricinusschrot-haltigen Düngemittelprobe vom gleichen Hersteller wurde jedoch Ricin und Ricinin nachgewiesen. Der Fabrikant hat danach die verunreinigte Ware vom Markt zurückgezogen und durch ein Ricinusschrot-freies Produkt ersetzt. Das Bundesamt für Landwirtschaft hat folglich die Beigabe von *Ricinus communis* Bestandteilen zu Düngemitteln in der Schweiz verboten (per Januar 2014 in Kraft getreten). Die Düngemittelverordnung in der EU lässt solche Beimengungen noch zu, schreibt aber seit 2012 einen Grenzwert von 50 mg Ricin pro kg Düngemittel vor. Ricinin ist in der EU nicht geregelt.

Ricin

Ricin ist ein hochgiftiges Kohlenhydrat-bindendes Protein, welches nur in den Schalen der Ricinus-Samen vorkommt. Der Ricingehalt in den Samen liegt bei etwa 1-5% und dient dort vermutlich als Schutz gegen Frassfeinde. Strukturell ist es ein heterodimäres, globuläres Glycoprotein mit einer molaren Masse von 60 bis 65 kDa. Es besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten (A- und B-Kette) mit Molmassen von jeweils etwa 32 bzw. 34 kDa, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Ketten bestehen aus insgesamt 529 Aminosäuren.



3D-Struktur des Holotoxins Ricin. In Blau ist die A-Kette, in Orange die B-Kette dargestellt.

Die toxische Wirkung ist auf einen mehrstufigen Prozess zurückzuführen, welcher eine Zellbindung, einen Transport durch die Zelle, eine Aktivierung im endoplasmatischen Retikulum und letztlich eine fatale Hemmung der Proteinbiosynthese einschliesst. Die B-Kette des Ricins, welche die Lektinfunktion trägt, ermöglicht die Bindung an die Zelloberfläche. Solange die B-Kette nicht vorhanden ist, ist die Toxizität sehr gering. Viele Pflanzen sowie Gerste enthalten die A- aber nicht die B-Kette.

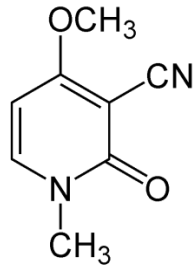
Für Ricin liegen nur wenige, zumeist tierexperimentelle toxikokinetische Daten vor. Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist nur beschränkt möglich. Die Toxizität ist stark abhängig vom Aufnahmeweg. So ist die orale Toxizität deutlich geringer als diejenige bei Inhalation oder Injektion. Ricin ist eines der giftigsten Substanzen, die in der Natur vorkommen. Die geschätzte letale Dosis LD_{50} beträgt beim Menschen 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht nach Injektion oder Inhalation bzw. 1 mg/kg Körpergewicht (oder ca. 8 Ricinussamen) bei oraler Aufnahme. Das Symptombild einer Ricin-Intoxikation umfasst Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Atemnot, Schwindelgefühl und Muskelschmerzen. Der Tod tritt üblicherweise durch Kreislaufversagen etwa zwei bis drei Tage nach der Vergiftung ein. Es ist kein Gegengift bekannt. Nach einer Aufnahme, sofern sie nicht zum Tod führt, wird der grösste Teil des Ricins innerhalb von 24 Stunden über den Urin ausgeschieden.

Trotz seiner mässigen Eignung als Massenvernichtungswaffe (instabiles Polypeptid, geringe orale Toxizität) ist Ricin in der Liste 1 der UN-Chemiewaffen-Konvention aufgeführt sowie auf den entsprechenden Listen der UN-Bio- und -Toxin-Waffenkonvention. Ricin ist dort als Substanz aufgelistet, die selbst als Bio- oder Chemiewaffe oder bei der Herstellung solcher Waffen eingesetzt werden kann. Bekanntheit erlangte der Mordanschlag mit Ricin als „Regenschirmattentat“ auf den bulgarischen Schriftsteller und Dissidenten Georgi Markow in London 1978.

Ricinin als Markersubstanz für Ricin

Ricinin gehört zur Gruppe der Pyridin-Alkaloide und ist neben dem hochgiftigen Glycoprotein Ricin verantwortlich für die Giftigkeit des Wunderbaums. Ricinin kommt, im Gegensatz zu Ricin, in allen Teilen der Pflanze vor und hat eine ziemlich starke insektizide Wirkung. Die Samen enthalten etwa 0,3-0,8% Ricinin. Ricinin ist deutlich weniger toxisch als Ricin. Die geschätzte letale Dosis LD_{50} beträgt für die Maus etwa 20 mg/kg Körpergewicht bei oraler Aufnahme. Die Symptome einer Ricinin-Vergiftung beinhalten Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe, niedriger Blutdruck, Leber- und Nierenschäden und Atemnot, welche schliesslich zu einem Mehrfach-Organversagen und dem Tod führen können. Gemäss Literaturangaben beträgt das Ricinin/Ricin-Mengenverhältnis in den Ricinussamen typischerweise 1:5. Ricin wird im menschlichen Körper rasch metabolisiert. Ricinin kann hingegen bis zu 2 Tagen nach einer Exposition in Urin und Serum nachgewiesen werden. Damit ist Ricinin als Markersubstanz für Ricin geeignet. Ricinin ist ein kleines Molekül (164 Da),

welches im Gegensatz zum grossen Ricin-Molekül (60-65 kDa) mittels LC-ESI-MSMS einfach analysiert werden kann. Mit Ricinin als hochspezifischer und empfindlicher Biomarker kann eine Ricin-Exposition rasch diagnostiziert werden. Dies ist bisher in den meisten Fällen (Menschen und Hunde) durch quantitative Bestimmung von Ricinin in Urin, Blut, Serum oder Mageninhalt geschehen. In einem suizidalen Vergiftungsfall wurde Ricinin sogar *post mortem* im Glaskörper des Auges nachgewiesen.



Struktur von Ricinin, eine Markersubstanz für Ricin.

Untersuchungsziele und Prüfverfahren

Die etablierte Methode ermöglicht den quantitativen Nachweis von Ricinin in Körperflüssigkeiten, Lebensmitteln und Umweltproben wie Biodünger bis in den Spurenbereich von ng/kg. Ricinin wird mittels Methanol (feste Proben wie Press-Schrot) oder Festphasenextraktion (wässrige Proben wie Urin) extrahiert. Unlösliche Anteile werden abzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen, filtriert und mittels HPLC-MSMS analysiert. Die neuimplementierte Methode ergänzt den hausinternen Ricin-Schnelltest, der eine qualitative Bestimmung von Ricin in Umweltproben erlaubt aber nicht für medizinische Anwendungen geeignet ist. Auch Fälle mit terroristischem Hintergrund können mit der Analyse von Ricinin in Verdachtsproben und Körperflüssigkeiten von exponierten Personen innert weniger Stunden abgeklärt werden. Damit wird eine hohe Bereitschaft zur Aufdeckung von Ricin-Vergiftungen darunter die Untersuchung von klinischen Proben aufrechterhalten. Die Ricinin-Analytik erweitert zudem unsere Aktivitäten im Themenbereich akute Vergiftungen, welche auf natürliche Toxine zurückzuführen sind.