

Entwicklung und Validierung einer immunologischen Screening-Methode zur Bestimmung toxikologisch relevanter Pyrrolizidin-alkaloide in Kräutertees und verwandten Matrices sowie Futtermitteln

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie Prof. Dr. Martin Elsner/Dr. Florian Kaltner
Forschungsstelle II:	Universität München Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis/Dr. Christoph Gottschalk
Industriegruppen:	Deutscher Teeverband e.V., Hamburg Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchtee e.V. (WKF) Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bonn Milchwirtschaftlicher Verein Allgäu-Schwaben e.V. (muva), Kempten
	Projektkoordinator: Marco Willius Martin Bauer GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth
Laufzeit:	2016 - 2019
Zuwendungssumme:	€ 369.790,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind natürliche Inhaltsstoffe von Pflanzen der Familien der Korbblütler, Rauhlatt-/Borretschgewächse und Hülsenfrüchtler, die bereits in geringen Dosen ein gesundheitliches Risiko für Mensch und Tier darstellen, wenn sich Samen oder Teile PA-haltiger Pflanzen als Verunreinigungen in pflanzlichen Lebensmitteln oder Futtermitteln befinden. Man geht davon aus, dass PA von über 6.000 Arten weltweit gebildet werden können, wobei über 500 verschiedene Verbindungen (PA und deren oxidierte Form, PANO) bekannt sind, die den Pflanzen primär als Schutz vor Fraßfeinden dienen. PA wirken bei hoher Exposition stark leberschädigend, wobei bei chronischer Aufnahme die Leberkrebs-auslösende Wirkung und Schädigung anderer Organe (Lunge und Herz) im Vordergrund stehen.

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass PA in zum Teil auffällig hohen Gehalten in Lebensmitteln und in Futtermitteln vorkommen

können. Eine Reihe PA-haltiger Pflanzen kommen auch in Deutschland vor (Kreuzkräuter, Natternkopf u.a.) und verbreiten sich zunehmend. Zuletzt wurden Kräutertee und Tee neben Honig als nicht zu vernachlässigende Quelle der täglichen PA-Exposition des Verbrauchers identifiziert. Aufgrund der Erkenntnisse zur Verbreitung und vor allem zur Höhe der PA-Gehalte wurde das PA-Vorkommen seitens des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) in entsprechenden Stellungnahmen in den vergangenen Jahren bewertet. Dabei wurde geschlossen, dass ein gesundheitliches Risiko, vor allem für Kinder, Schwangere und Stillende sowie für Hochverzehrer betroffener Lebensmittel, nicht auszuschließen ist.

Vor dem Hintergrund internationaler Warenströme und globaler Märkte stellt die Rohstoffkontrolle einen integralen Bestandteil der Lebensmittel- und Futtermittelproduktion und ihrer Qualitätssicherung dar. Für eine schnelle und

einfache Vor-Ort-Kontrolle einer PA-Belastung (beim Erzeuger oder beim Wareneingang) sind kostenintensive und nur in Speziallaboratorien durchführbare Methoden (z.B. HPLC-Tandemmassenspektrometrie) allerdings ungeeignet.

Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Entwicklung und Validierung eines antikörperbasierten Screeningverfahrens zur vor Ort einsetzbaren Detektion von PA in pflanzlichen Rohstoffen, um insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen eine schnelle und kostengünstige Diagnostikmöglichkeit zur Rohwaren-, aber auch zur Endproduktkontrolle zur Verfügung zu stellen. Damit könnten Einbußen in der Qualität von Lebensmitteln oder Gefahren für die Gesundheit der Konsumenten frühzeitig detektiert und Imageschäden sowie Folgekosten (Produkthaftung) vorgebeugt werden.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurde an Forschungsstelle I erstmalig die Generierung und breite Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers (mAb) gegen Pyrrolizidinalkaloide unter Verwendung eines neuen Retronecin-Derivates (Hapten) durchgeführt. Der selektierte mAb 18H4 zeigt eine breite Kreuzreaktivität mit Retronecin-basierten PA, insbesondere mit nicht-makrozyklischen Verbindungen (insbesondere Intermedin, 7-O-Acetylintermedin und Intergerrimin) aber auch makrozyklischen PA (insbesondere Seneciphyllin). Die Bindung von Heliotridin- und Otonecin-basierten PA sowie der PANO ist vernachlässigbar. Damit steht ein Antikörper zur Verfügung, der prinzipiell für das Proben-Screening auf Retronecin-basierte PA geeignet ist. Trotz hervorragender Stabilität über einen breiten pH-Wert-Bereich und akzeptabler Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol und Acetonitril (von Bedeutung für die Probenvorbereitung, z.B. die Festphasenextraktion der Pflanzenextrakte vor der HPLC sowie für Analysen von medizinisch genutzten wässrig-ethanolischen Pflanzenausgüßen), muss einschränkend auf die relativ hohe Nachweisgrenze des entwickelten ELISA hingewiesen werden, die nicht zuletzt durch die notwendige 10-fache Verdünnung der Probenextrakte bedingt ist. Damit steht derzeit ein Test nur für stark kontaminierte Proben ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bis mg/kg) und die bisher geprüften Matrices Pfefferminze, Kamille, Fenchel und Honig zur Verfügung. Eine Ausweitung auf andere Matrices ist wahrscheinlich, muss aber im Einzelfall geprüft werden. Generell ist eine matrixangepasste Kalibrierung mit entsprechenden Kalibrierstandards erforderlich.

An Forschungsstelle II wurden im Rahmen des Vorhabens Analysemethoden zum Nachweis von PA/PANO entwickelt: eine zielgerichtete Methode zum Nachweis von 44 kommerziell erhältlichen Analyten, und ein Ansatz zur Bestimmung von PA/PANO in Summe nach Reduktion und Derivatisierung. Neben den Messmethoden wurde ein Probenvorbereitungsverfahren zur Extraktion intakter PA/PANO aus pflanzlichen Matrices entwickelt und validiert. Dieses ist für beide entwickelte Nachweismethoden geeignet und ebenfalls leicht für ELISA-Anwendungen adaptierbar. Die vollständige Einzelanalytmethode wurde für wirtschaftlich bedeutende Teematrixen validiert und auf Realproben angewendet. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sensitivität, Präzision und Wiederfindung der entwickelten Methode. Eine Anwendung für weitere relevante Matrices wird angestrebt. Weitere Untersuchungen zur Lagerstabilität von PA/PANO in Lösungsmitteln und in artifiziell mit analythaltigen Pflanzen kontaminierten Proben zeigten eine hohe Stabilität der Phytotoxine im sechsmonatigen Untersuchungszeitraum.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse haben eine hohe wirtschaftliche Bedeutung, insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU), die die Sicherheit ihrer Produkte garantieren müssen. Die Produktgruppen Tee sowie Kräuter- und Früchtetee („teeähnliche Erzeugnisse“), aber auch viele andere pflanzliche Zubereitungen, haben bei den Verbrauchern das Image eines gesundheitsfördernden Lebensmittels. Angesichts des Vorkommens und der Toxizität von PA besteht Handlungsbedarf im Rahmen des vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutzes.

In Deutschland werden jährlich ca. 45.500 Tonnen Tee und ca. 38.800 Tonnen Kräuter- und Früchtetees umgesetzt. Die Hersteller dieser Produkte sind fast ausschließlich KMU, die weder über entsprechende Forschungskapazitäten noch über das nötige Know-how verfügen, um neue Untersuchungsmethoden zu entwickeln. Gleiches gilt für die Futtermittelindustrie, die jährlich ca. 23,7 Mio. Tonnen Mischfuttermittel erzeugt. Die Ergebnisse des Projekts sind über diese Zielgruppen hinaus auch zur Untersuchung von Produkten anderer Branchen der Lebensmittelindustrie, z.B. von Honig und Gewürzen, interessant und können einen Beitrag zur Erhaltung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit einer Vielzahl von KMU leisten. Das entwickelte Screeningverfahren für die Detekti-

on von mit Retronecin-basierten Pyrrolizidinalkaloiden in hoch belasteten Proben ermöglicht eine deutliche Einsparung von Analysekosten. Besonders hervorzuheben ist zudem die Schnelligkeit des Verfahrens zur Beurteilung der Qualität untersuchter Chargen (innerhalb von wenigen Stunden), was Verzögerungen in der Produktionskette und damit verbundene Kosten vermeidet.

Darüber hinaus sind die Ergebnisse des Vorhabens in der Diagnostikbranche, der Messtechnik und im Hygiene-Dienstleistungsgewerbe verwertbar. Die Weiterentwicklung und Anwendung der antikörperbasierten Nachweismethode stellt zudem eine Erweiterung des Portfolios von Herstellern solcher Verfahren dar. Durch die praxisrelevante Testdauer und -konzeption kann eine neue Testgeneration entwickelt werden, die in naher Zukunft ein weltweit konkurrenzfähiges Verfahren darstellen könnte. Der in diesem vorwettbewerblichen Forschungsprojekt entwickelte Antikörper steht nach Abschluss der Arbeiten interessierten Biotech-Firmen zur Entwicklung und Vermarktung eigener Testformate, z.B. Streifen-tests, zur Verfügung. Erste Arbeiten zur Entwicklung eines immunologischen Streifen-tests (Test-Kassette) wurden begonnen.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasser-
chemie
Marchioninistraße 17, 81377 München
Tel.: +49 89 2180-78252
Fax: +49 89 2180-78255
E-Mail: m.elsner@tum.de

Universität München
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit
Schoenleutner Straße 8, 85764 Oberschleißheim
Tel.: +49 89 2180-78501
Fax: +49 89 2180-78502
E-Mail: m.gareis@lmhyg.vetmed.uni-muenchen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2019.
2. Kaltner, F., Stiglbauer, B., Rychlik, M., Gareis, M. & Gottschalk, C.: Development of a Sensitive Analytical Method for Determining 44 Pyrrolizidine Alkaloids in Teas and Herbal Teas via LC-ESI-MS/MS. *Analytic. Bioanalytic. Chem.* 411 (27), 7233-7249. DOI: 10.1007/s00216-019-02117-1 (2019).
3. Kaltner, F., Gottschalk, C. & Gareis, M.: Pflanzeninhaltsstoffe als Kontaminanten in der Lebensmittelkette. *Nachr. Chem.* 109-113 (2018).
4. Kaltner, F., Rychlik, M., Gareis, M. & Gottschalk, C.: Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *J. Agric. Food Chem.* 5221-5228 (2018).

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via

