

Entwicklung einer Screening-Methode zur Einschätzung von Pyrrolizidin-Alkaloidgehalten in Honig mittels melissopalynologischer Analysen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Institut für Innovationen im Lebensmittel- und Umweltbereich e.V., Bremen Dr. C. Lüllmann
Forschungsstelle II:	Technische Universität Dresden Professur für Spezielle Lebensmittelchemie/Lebensmittelproduktion Prof. Dr. K. Speer
Forschungsstelle III:	Technische Universität Braunschweig Institut für Pharmazeutische Biologie (IPB) Prof. Dr. L. Beerhues/Dr. T. Beuerle
Industriegruppe:	Honig-Verband e.V., Hamburg
	Projektkoordinator: F. Filodda, Fürsten-Reform, Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & CO. KG, Braunschweig
Laufzeit:	2009 - 2012
Zuwendungssumme:	€ 450.300,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Pyrrolizidin-Alkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffe, denen karzinogene und genotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden. Ihr Vorkommen in Lebensmitteln stellt eine Bedrohung der Gesundheit des Menschen dar. Sie werden von mehr als 6.000 Pflanzenarten der Familien Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae gebildet. Die Pollen dieser Pflanzen stellen potenzielle PA-Quellen dar. Über den Eintrag von Pollen und Nektar gelangen PA in den Honig, was eine akute Problematik für den Honigmarkt darstellt.

Nach dem Verzehr PA-haltiger Lebensmittel werden diese im Darm reduziert und anschließend resorbiert. Gelangen sie schließlich in die Leber, werden sie durch enzymatische Reaktionen in die äußerst reaktiven Pyrrole überführt. Diese wiederum besitzen stark alkylierende Eigenschaften und können DNA-Addukte bilden, die zu Leberzirrhosen führen können.

Verschiedene Untersuchungen belegen bereits, dass Pyrrolizidin-Alkaloide in Honig nachweisbar sind und z.T. bedenklich hohe Konzentrationen erreichen können. In einer Studie des Nahrungsmittel- und Warenamtes in Den Haag sind in 25 % der untersuchten Honige Gesamt-PA-Gehalte von bis zu 0,365 µg/g gefunden worden.

Pollenanalysen wurden stets nur begleitend an wenigen Honigproben vorgenommen, so dass nur sehr wenig Datensätze von Pollenanteilen und PA-Gehalten in Honig existieren. Zudem wurde meist die konventionelle Pollenanalyse nach DIN 10760 verwendet, bei der in einer kleinen Unterprobe des Pollensedimentes die verschiedenen Pollen ausgezählt und anschließend die relativen Pollenanteile errechnet werden. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen den relativen Pollenanteilen PA-haltiger Pflanzen und den PA-Gehalten im Honig besteht. Für die Entwicklung der Screening-Methode ist es jedoch

erforderlich, die absoluten Pollenzahlen PA-haltiger Pflanzen in Honig zu kennen.

Die Bestimmung von PA-Gehalten in Honig ist äußerst aufwändig (ca. 2 Tage Zeitaufwand für eine Analyse) und erfordert eine kostspielige analytische Ausstattung (LC-MS) sowie hochqualifiziertes Personal. Um der honigverarbeitenden Industrie eine regelmäßige Untersuchung einer großen Anzahl von Proben zu ermöglichen, ist es notwendig, eine weniger zeit- und kostenintensive Methode zu entwickeln. Dies kommt letztlich auch dem Verbraucherschutz zu Gute.

Grenzwerte für PA in Lebensmitteln existieren derzeit nicht. Das Bundesministerium für Gesundheit hat allerdings die Einnahme von pflanzlichen pharmazeutischen Präparaten, denen ein medizinischer Nutzen nachgewiesen werden konnte, auf 1 µg PA/Tag bei einer Einnahmezeit von maximal 6 Wochen begrenzt. KEMPF¹ et al. (2008) konnten in verschiedenen Honigen PA-Konzentrationen nachweisen, durch die beim Verzehr von nur 20 g Honig (entspricht einer Portion) dieser Grenzwert überschritten würde. Dies zeigt die Notwendigkeit, auch ohne offiziell eingeführten Grenzwert für PA in Honig, aktiv zu werden und die Entwicklung von Methoden zum Screening von PA in Honigen voranzutreiben.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, für die honigverarbeitende Industrie eine zuverlässige Screening-Methode zur Einschätzung von Pyrrolizidin-Alkaloid-Gehalten in Honig mittels einer weiterentwickelten melissopalynologischen Analyse (Pollenanalyse) zu entwickeln.

Forschungsergebnis:

Forschungsstelle 1 beschaffte getrocknetes Material 14 verschiedener, PA-haltiger Pflanzen aus Südamerika, um diese Forschungsstelle 2 zur Extraktion der PA zur Verfügung zu stellen. Parallel hierzu wurde eine Vielzahl an Honigproben aus Europa, Mittel- und Südamerika beschafft. Die in den Honigen enthaltenen PA wurden mittels LC-MS/MS quantifiziert, wobei die durch Forschungsstelle 2 bereitgestellten Standards genutzt wurden.

Außerdem wurde eine Methode zur absoluten Quantifizierung von PA-Pollen (z.B. Echium-Pollen) entwickelt und die Anzahl PA-haltiger Pollen in den Honigproben bestimmt. Für die Anfertigung von Fotografien für eine Foto-Referenz wurden Pollenproben aus Südamerika genutzt, die Forschungsstelle 1 beschaffte. Außerdem konnte Forschungsstelle 3 noch weitere Pollen zur Verfügung stellen. Von den Pollen wurden Dauerpräparate für die Lichtmikroskopie hergestellt. Außerdem wurde eine Vielzahl von Fotografien angefertigt, die in Form einer Foto-Referenz zusammen mit Beschreibungen und Fotografien der Ursprungspflanzen Interessenten zugänglich gemacht werden. Die Ergebnisse der Auszählung der Pollen sowie der LC-MS-Messungen wurden zusammengeführt, um mögliche Korrelationen zu ermitteln, die eine Einschätzung der PA-Gehalte im Honig mittels quantitativer Pollenanalyse ermöglichen. Es wurden deutliche Zusammenhänge zwischen Konzentrationen einzelner pflanzentypischer Marker-PA und deren Pollen dargestellt. Mittels der durch Forschungsstelle 2 isolierten Substanzen konnten weitere, bisher noch nicht untersuchte PA in Honig nachgewiesen werden. Einige PA stellten sich als „Begleit-PA“ heraus, die meist mit pflanzentypischen Marker-PA auftraten, jedoch in wesentlich geringerer Konzentration (z.B. Acetyl-Lycopsamin). Ein PA, Amabilin, konnte in ca. 50 % der Proben detektiert werden und erreichte Konzentrationen von bis zu 108 µg/kg. Obwohl dieses PA zu den PA geringerer Toxizität gezählt wird, ist dies ein wichtiger Befund, da Amabilin in einigen Honigen wesentlich zum Gesamt-PA-Gehalt des Honigs beiträgt.

Im Zeitraum von Oktober 2009 bis August 2012 wurden insgesamt 15 verschiedene Pyrrolizidin-Alkaloide durch Forschungsstelle 2 aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial isoliert bzw. im Falle der N-Oxide durch Synthese erhalten. Hierzu musste für jede einzelne Pflanze eine eigene Methode zur Isolierung der Standards entwickelt werden. Es war aufgrund der Komplexität der Matrix der einzelnen Pflanzen und auf Grund des unterschiedlichen chemischen Verhaltens der PA (Reduktion, Elution) nicht möglich, eine einheitliche Routine-Methode für die Isolierung aller Pyrrolizidine zu entwickeln. Die einzelnen Methoden-Parameter mussten zudem ständig angepasst und für eine adäquate Reinheit der Standards immer wieder überprüft werden.

¹ Kempf, M., Beuerle, T., Bühringer, M., Denner, M., Trost, D., von der Ohe, K., Bhavanam, V. B. R. and Schreier, P.: Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Mol. Nutr. Food Res. 52, 1193-1200 (2008).

Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Alkaloiden konnten im Rahmen des Projektes für einige wichtige Pyrrolizidin-Alkaloide die genaue NMR-Reinheiten angegeben werden.

Forschungsstelle 3 kultivierte PA-haltiges Pflanzenmaterial auf einem Forschungsfeld in Braunschweig (*Echium vulgare*, *Symphytum officinale*, *Cynoglossum officinale*). Außerdem wurden PA-Pflanzen an verschiedenen Orten in Deutschland geerntet (*Senecio vernalis*, *Senecio jacobaea*, *Eupatorium cannabinum*). Das Pflanzenmaterial wurde lyophilisiert und gemahlen und in dieser Form der Forschungsstelle 2 zur Extraktion der PA zur Verfügung gestellt. Zuvor wurden die enthaltenen PA ermittelt, um Forschungsstelle 2 eine erste Übersicht über die in dem Material enthaltenen PA geben zu können. Vor der Ernte wurden den Pflanzen noch Pollen entnommen, welche der Forschungsstelle 1 zur Herstellung von Referenzpräparaten für die Lichtmikroskopie und zur Anfertigung von Fotografien für eine Foto-Referenzsammlung zur Verfügung gestellt wurden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der Honigverzehr in Deutschland beläuft sich auf 1,4 kg pro Kopf und Jahr. Um diesen Bedarf zu decken, werden pro Jahr 100.000 t Honig benötigt. Die in Deutschland produzierte Menge reicht dafür nicht aus, weshalb 80 % des Bedarfs durch Importe gedeckt wird. Die honigverarbeitende Industrie besteht aus kleinen und mittleren Unternehmen, deren Umsatz ca. 180 Mio. € beträgt. Dieses Umsatzvolumen dokumentiert die wirtschaftliche Bedeutung des Lebensmittels Honig in Deutschland.

In einer holländischen Studie (VAN RHIJN² et al., 2007) wurden 43 von 171 Honigen (25 %) PA-positiv getestet. KEMPF¹ et al. (2008) konnten in 19 von 216 untersuchten Honigen (9 %) PA nachweisen.

Von Juli bis September 2008 wurden 23.087 t Honig mit einem Wert von 45,9 Mio. € nach Deutschland importiert (Warenverein der Hamburger Börse). Nach den Daten von VAN RHIJN et al. (2007) und KEMPF et al. (2008) kann davon ausgegangen werden, dass ca. 2.300 - 5.700 t dieses Honigs im Wert von ca. 4,6 - 11,5 Mio. € PA-positiv sind.

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, eine kostengünstige, schnelle und effektive Methode zur Quantifizierung von PA bereitzustellen, um wirtschaftlichen Schaden zu verhindern, der aus der Vermarktung ungeeigneter Honige resultiert.

Der Honigindustrie sowie den Handelslaboratorien wird durch die Forschungsergebnisse eine Methode zur Einschätzung der PA-Gehalte in Honig an die Hand gegeben, die es ihnen ermöglicht, mit geringem Zeit- und Kostenaufwand PA-haltige Honige zu identifizieren. Hierdurch profitieren insbesondere kleine und mittlere Unternehmen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussnachweis 2012.
2. Cramer, L. und Beuerle, T.: Detection and Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in Antibacterial Medical Honeys. *Plant. Med.* 78 (18), 1976-1982, DOI: 10.1055/s-0032-1327900 (2012).
3. Dübecke, A., Beckh, G. und Lüllmann, C.: Einschätzung von Pyrrolizidinalkaloidgehalten in Honig anhand von Pollenanalysen. *Lebensmittelchem.* 66, 7 (2012).
4. Ronczka, S. und Speer, K.: Pyrrolizidine Alkaloids – Analytical Difficulties., *EurFoodChem XVI Conf. Proc.*, Poster p51, 41 (2011).
5. Dübecke, A., Beckh, G. und Lüllmann, C.: Pyrrolizidine Alkaloids in European Honeys and Honeys from Overseas. *EurFoodChem XVI Conf. Proc.*, Poster p52, 41 (2011).
6. Ronczka, S. und Speer, K.: Pyrrolizidinalkaloide als Standardsubstanzen aus Senecio-Arten. *Lebensmittelchem* 65, 70 (2011).
7. Dübecke, A., Beckh, G. und Lüllmann, C.: Interrelationship between concentrations of the Pyrrolizidine Alkaloid Echimidine and amounts of Echium-Pollen in Honey. *Apimondia Conf. Proc.*, Poster 42, 248 (2011).
8. Dübecke, A., Beckh, G. und Lüllmann, C.: Pyrrolizidine Alkaloids in Honey. *Proc 125th AOAC Ann. Meet. Expo, 1902*, 77 (2011).
9. Ronczka, S., Entrich, S. und Speer, K.: Pyrrolizidine Alkaloid Contents of Boraginaceae in different Stages of Growth., *Apimondia Conf. Proc.*, Poster 106, 251 (2011).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

² Van Rhijn, J. A.: Pyrrolizidine alkaloiden in honing. Factsheet, Voedsel en Waren Autoriteit Regio Oost, Afd. Laboratorium, Zutphen www.vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=22703 (2007).

Weiteres Informationsmaterial:

Institut für Innovationen im Lebensmittel- und
Umweltbereich e.V.
Flughafendamm 9a, 28199 Bremen
Tel.: +49 421 594770
Fax: +49 421 594771
E-Mail: info@qsi-q3.de

Technische Universität Dresden
Professur für Spezielle Lebensmittelchemie/
Lebensmittelproduktion
Bergstr. 66, 01069 Dresden
Tel.: +49 351 4633-3132
Fax: +49 351 4633-4138
E-Mail: Karl.Speer@chemie.tu-dresden.de

Technische Universität Braunschweig
Institut für Pharmazeutische Biologie (IPB)
Mendelssohnstraße 1, 38106 Braunschweig
Tel.: +49 531 391-5385
Fax: +49 531 391-7351
E-Mail: t.beuerle@tu-bs.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079669-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:

