

Anforderungen an Rizin-Nachweismethoden zur Detektion und Identifizierung aus Verdachtsproben

Daniel Stern, Martin Skiba, Bettina Kampa, Sylvia Worbs, Brigitte G. Dorner

Robert Koch-Institut, Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene (ZBS),
Biologische Toxine (ZBS 3), Seestraße 10, 13353 Berlin; DornerB@rki.de

Kurzfassung: Das hochwirksame Pflanzentoxin Rizin steht seit den jüngst bekannt gewordenen Vorbereitungen eines Terroranschlags in Deutschland besonders im Fokus des Interesses. Im Fall einer intentionalen Ausbringung muss der Nachweis von Rizin zeitnah aus einer Vielzahl verschiedener Matrices, z. B. Umweltproben und gegebenenfalls aus Patientenproben, erfolgen. Aus forensischer Sicht ist letztlich der zweifelsfreie Nachweis von Rizin entscheidend. Während immunologische Schnelltests und stationäre Labormethoden wichtig für den Einsatz vor Ort bzw. zur Spurenanalytik aus einer großen Anzahl von Proben sind, können massenspektrometrische Verfahren Rizin oder geeignete Surrogatmarker wie Rizinin zweifelsfrei identifizieren. Da keine der genannten Methoden allein allen Anforderungen gerecht wird, kann nur durch Kombination geeigneter Nachweisverfahren ein sicherer Nachweis von Rizin gelingen.

1. Einleitung

Rizin, ein Proteotoxin aus dem Samen des Wunderbaumes *Ricinus communis* L., gehört zu den giftigsten bekannten Pflanzentoxinen (Abb. 1). Die halblethale Dosis liegt zwischen 1 bis 10 µg/kg Körpergewicht bei systemischer Applikation und ca. um den Faktor 1000 höher bei oraler Aufnahme [1]. Das Pflanzenmaterial ist aufgrund der weiten Verbreitung von *R. communis* und der großtechnischen Verarbeitung der Samen zu Rizinusöl relativ leicht zugänglich. Ebendies hat dazu beigetragen, dass Rizin bereits mehrfach für kriminelle Anschläge oder Anschlagversuche eingesetzt wurde.

Wohl am bekanntesten ist die Ermordung des bulgarischen Dissidenten Georgi Markov 1978 in London (sogenannter „Regenschirmmord“). Hierbei wurde dem regimekritischen Autor eine winzige, mit Rizin präparierte Metallkapsel mit Hilfe eines manipulierten Regenschirms in die Wade injiziert [2]. Weltweite Aufmerksamkeit erregten mit Rizin präparierte Briefe 2003 und 2013 an den früheren US-Präsidenten und andere hochrangige US-Entscheidungsträger [3,4]. Zudem wurde die Entwicklung von Rizin als biologische Waffe während des zweiten Weltkrieges und im kalten Krieg forciert [5].

Heute ist Rizin als verbotene Substanz nach der Chemiewaffen- und Biowaffenkonvention eingestuft. Der Besitz und die Herstellung von Rizin sind streng reglementiert und unterliegen nationalen und internationalen Kontrollen. Rizin steht aktuell aufgrund der möglichen Verwendung in bioterroristischen Anschlägen im Fokus des Interesses [6]. So dokumentiert der Fund größerer Mengen Rizinus-Samen sowie des unter Anleitung hergestellten Rizens im Juni 2018 in Köln, dass in extremistischen Kreisen die Absicht besteht, Rizin für bioterroristische Anschläge in Deutschland einzusetzen [7,8].

Aus forensischer Sicht ist ein gesicherter Nachweis von Rizin notwendig. Der Nachweis von Rizin ist anspruchsvoll, insbesondere aus Patientenproben. Je nach Aufnahmeweg müssen unterschiedliche Patientenmaterialien auf die Anwesenheit von Rizin untersucht werden. Kritisch ist, dass Rizin selbst nach Aufnahme im Körper schnell verstoffwechselt wird und daher nur ein enges Zeitfenster für den Nachweis zur Verfügung steht. Zusätzlich muss unter Umständen

der Nachweis von Rizin-Präparaten unterschiedlicher Reinheit, die in bioterroristischer Absicht hergestellt wurden, aus komplexen Umweltproben sowohl schnell, als auch juristisch belastbar erfolgen. Idealerweise sollten forensische Analysen zudem Hinweise zum Aufarbeitungszustand und dem verwendeten Aufarbeitungsprotokoll erlauben. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, sind verschiedene Analyseverfahren notwendig, die sich in ihrer Aussagekraft, ihrer Sensitivität, der Eignung zum Nachweis aus verschiedenen Matrices und ihrer Komplexität komplementieren.

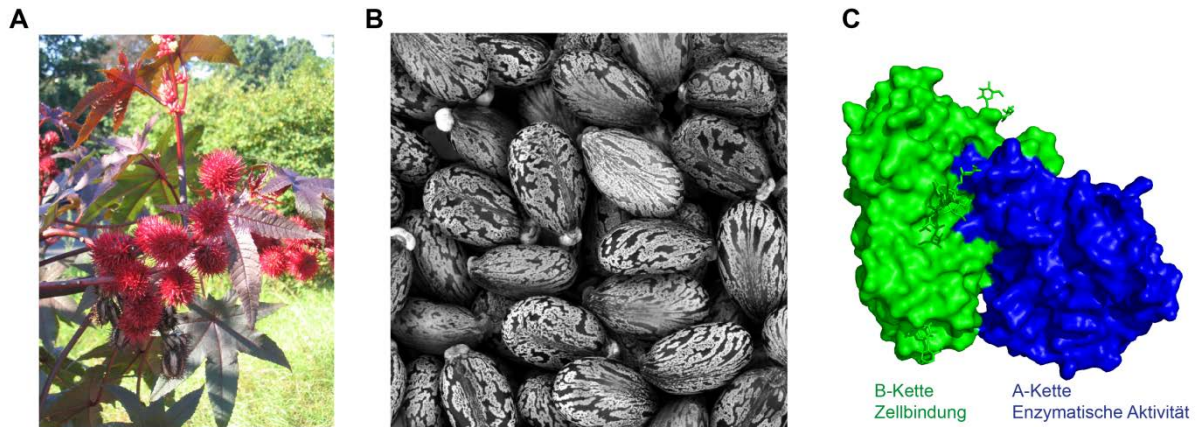


Abb. 1. **A.** Fruchtstand der Zierpflanze *Ricinus communis* L. (Wunderbaum), welcher Rizinus-Samen enthält. **B.** Rizinus-Samen ähneln morphologisch vollgesogenen Zecken, woraus sich der botanische Name – vom lateinischen Wort „ricinus“ für „Laus, Ungeziefer“ – ableitet. **C.** Proteinstruktur von Rizin, einem AB-Toxin (PBD ID 2AAI [9]). Die B-Kette vermittelt die Bindung an die Zelle, während die enzymatisch aktive A-Kette die Proteinbiosynthese in der Zelle nach rRNA-Inaktivierung inhibiert, was zum Zelltod führt. (Fotos A und B: RKI).

2. Nachweisverfahren für Rizin

Als klassische Schnelltests können *Lateral Flow Assays* die schnelle Einschätzung einer vorliegenden biologischen Gefahrenlage erleichtern [6,10]. Vor allem die einfache und rasche Versuchsdurchführung erlaubt einen Vor-Ort-Einsatz zur Analyse einzelner Proben durch Einsatzkräfte. Beachtet werden sollte jedoch, dass deutliche Qualitätsunterschiede bei kommerziellen *Lateral Flow Assays* beobachtet wurden [11,12]. Das Auftreten positiver Ergebnisse liefert hierbei ein Indiz für das Vorliegen von Rizin, wobei jedoch abhängig vom verwendeten Test und der vorliegenden Probenmatrix die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse besteht. Außerdem können geringe Rizin-Konzentrationen unterhalb der relativ hohen Nachweisgrenzen der Methode (im ng/mL-Bereich) nicht sicher erfasst werden. Daher sollten verdächtige Proben so schnell wie möglich in Expertenlabore zur weitergehenden Analyse gebracht werden, da nur hier eine gesicherte Diagnostik erfolgen kann [6].

Die im stationären Labor zum Einsatz kommenden immunologischen Methoden (ELISA oder Multiplex-ELISA) eignen sich aufgrund des Durchsatzes zum Screening einer größeren Anzahl von Proben. Durch die hohe Sensitivität im einstelligen pg/mL-Bereich stellen sie zudem häufig die einzige Möglichkeit zur Spurenanalytik dar, da andere Methoden z.T. wesentlich geringere Empfindlichkeiten aufweisen [13-16]. In Deutschland steht ein akkreditierter Rizin-spezifischer ELISA zur Verfügung, der bei Interesse Institutionen auf Bundes- und Landesebene zur Verfügung gestellt wird [13,17,18]. Essenziell für eine zuverlässige Analytik ist der Einsatz umfassend validierter Verfahren, die in experimentellen Leistungstests auf ihre Eignung zum Nachweis aus verschiedenen komplexen Matrices getestet wurden [17,19]. Für eine exakte Quantifizierung und Qualitätssicherung entscheidend ist darüber hinaus das Vorhandensein von

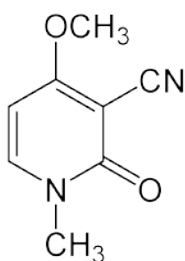
gründlich charakterisierten Referenzmaterialen [18]. Ein Nachteil von ELISA-basierten Verfahren ist, dass der Rizin-Nachweis zwar hoch-spezifisch, aber „indirekt“ erfolgt, d. h. über die Bindung der in den Testverfahren implementierten Antikörper. Zudem kann nur das Vorhandensein von Rizin, nicht aber seine potenzielle Toxizität, nachgewiesen werden. Die Toxizität kann mit verschiedenen funktionellen Verfahren überprüft werden, welche die zellschädigende Wirkung des Rizins oder dessen enzymatische Aktivität – eine Glykosidaseaktivität mit/ ohne Zellbindung – nachweisen (Zytotoxizitätsassay, *Adenine release assay*) [20-23].

3. Zweifelsfreie Identifizierung mit massenspektrometrischen Verfahren

Immunologische Nachweisverfahren erlauben zwar eine sehr sensitive Detektion von Rizin, sind aber nicht in der Lage, das Zielmolekül zweifelsfrei zu identifizieren. Hierfür stehen eine Reihe von massenspektrometrischen Verfahren als laborgestützte Analysemethoden zur Verfügung, die hochauflösende Massenspektrometer (MS) mit *matrix-assisted laser-desorption/ionisation time-of-flight* (MALDI-TOF) [24-26] oder Flüssigkeitschromatographie gekoppelte (LC)-MS/MS verwenden [27].

Im gängigsten Verfahren wird Rizin mittels einer Protease in seine Peptide gespalten, die anschließend durch MS/MS-basierte Techniken zu einer detaillierten Aminosäuresequenzinformation führen. Diese Methode ermöglicht es, das hochtoxische Rizin vom sehr eng verwandten, weniger toxischen *R. communis* Agglutinin zu unterscheiden. Darüber hinaus kann die Glykosylierungsstruktur des Rizins, die Unterscheidung zwischen den Isoformen Rizin D und E sowie die Unterscheidung zu weiteren *R. communis* Proteinen (vor allem Speicherproteine), die in einfachen Toxinpräparationen ebenfalls vorhanden sind, erfasst werden. Für eine forensische Untersuchung können mit weiterführenden massenspektrometrischen Verfahren Informationen zur Herstellungsweise des Rizins durch die Analyse der in der Probe enthaltenen Kohlenhydrate, Fettsäuren, Rizin-Markerpeptide (RCB-1 bis RCB-3) sowie des kleinen Moleküls Rizinin (Pyridin-Alkaloid aus *R. communis*) abgeleitet werden [28].

Der hohen Beweiskraft der Methode stehen einige technische Nachteile entgegen. Dazu zählen die teure apparative Ausstattung sowie die Notwendigkeit von speziell geschultem Personal. Des Weiteren ist die Methode weniger sensitiv (je nach Instrumentierung ca. Faktor 100 bis 1000) und im Vergleich zum gut etablierten hoch-sensitiven automatisierbaren Sandwich-ELISA weniger für den Hochdurchsatz geeignet. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher komplexer Matrices, die bei einem Rizin-Verdachtsfall anfallen können, ist eine massenspektrometrisch kompatible Probenaufarbeitung einer der kritischsten und zeitaufwendigsten Prozesse. Der Einsatz einer immunologischen Anreicherungsstrategie mit tryptischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung gilt bisher für Rizin aus komplexen Proben als die zielführendste Methode (Nachweis von Rizin bis zu 0,64 ng/mL) [29,30].



Aufgrund des schnellen Abbaus von Rizin im Körper und dem damit verbundenen kurzen analytischen Zeitfenster von ca. 60 Stunden für eine zweifelsfreie Diagnostik (eigene noch unpublizierte Daten aus Vergiftungsfällen in Deutschland) bietet sich als Alternative die Detektion des äußerst stabilen Pyridin-Alkaloids Rizinin (4-Methoxy-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-carbonitril) an.

Abb. 2. Strukturformel von Rizinin aus [31].

Rizinin ist mit 0,3-0,8 % Bestandteil der Rizinussamen [32-34] und dient als Surrogatmarker für eine Rizin-Intoxikation durch krude Toxin-Präparationen. Rizinin ist deutlich länger im

Körper nachweisbar als Rizin, ca. 10 bis 14 Tage (unpublizierte Daten, s. o.). Die Probenaufarbeitung erfolgt mittels einfacher, schneller und automatisierbarer Lösungs- oder Festphasenextraktionen aus Lebens- und Futtermitteln und klinischen Proben (vor allem Urin, Serum). Die Identifizierung erfolgt mit einer zielgerichteten LC- oder GC-MS/MS Methode. Das Detektionslimit liegt proben- und geräteabhängig bei ca. 0,1 ng/ml Rizinin [31,35,36].

4. Fazit

Während laborgestützte hochsensitive Nachweisverfahren wie ELISA die Spurenanalytik von Rizin aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proben und Matrices erlauben, muss der zweifelsfreie Nachweis von Rizin im Rahmen eines Ermittlungsverfahrens mittels massenspektrometrischer Verfahren erfolgen. Aus klinischen Proben bietet sich neben dem Nachweis von Rizin der Nachweis des niedermolekularen Alkaloids Rizinin als Surrogatmarker an. Hierbei decken verschiedene Verfahren unterschiedliche Aspekte des Nachweises ab, da kein Verfahren allein allen technischen Anforderungen gerecht werden kann.

5. Literatur

1. Worbs S, Köhler K, Pauly D, Avondet MA, Schaer M, Dorner MB, Dorner BG. *Ricinus communis* intoxications in human and veterinary medicine — a summary of real cases. *Toxins (Basel)* 2011;3:1332-1372.
2. Crompton R, Gall D. Georgi Markov — Death in a pellet. *Med Leg J* 1980;48:51-62.
3. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *J Am Med Assoc* 2005;294:2342-2351.
4. Hayden EC, Wadman M. US ricin attacks are more scary than harmful. *Nature News* 2013.
5. Kirby R. Ricin toxin: A military history. *CML Army Chem Rev* 2004;PB 3-04:38-40.
6. Stern D, Richter M, Schrick L, Lasch P, Keeren K, Polleichtner A, Lemmer K, Nitsche A, Grunow R, Herzog C, Dorner BG, Schaade L. Vor-Ort-Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien: Schnelle Nachweismethoden für Viren, Bakterien und Toxine — Potenziale und Grenzen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2016;59:1577-1586.
7. Pearson A. Germany: Man charged with producing biological weapon at home in Cologne. 2018; Verfügbar von: <https://p.dw.com/p/2zW6J>.
8. Der Generalbundesanwalt beim Bundesgerichtshof. Erklärung zum gegenwärtigen Stand der Ermittlungen gegen Sief Allah und Yasmin H. 2018; Verfügbar von: <https://www.generalbundesanwalt.de/de/showpress.php?themenid=20&newsid=788>.
9. Rutenber E, Katzin BJ, Ernst S, Collins EJ, Mlsna D, Ready MP, Robertus JD. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins* 1991;10:240-250.
10. Weber M, Schulz H. Immunological detection of ricin and castor seeds in beverages, food and consumer products. *Toxichem Krimtech* 2011;78:276-277.
11. Slotved HC, Sparding N, Tanassi JT, Steenhard NR, Heegaard NH. Evaluating 6 ricin field detection assays. *Biosecur Bioterror* 2014;12:186-189.
12. Hodge DR, Prentice KW, Ramage JG, Prezioso S, Gauthier C et al. Comprehensive laboratory evaluation of a highly specific lateral flow assay for the presumptive identification of ricin in suspicious white powders and environmental samples. *Biosecur Bioterror* 2013;11:237-250.
13. Simon S, Worbs S, Avondet M-A, Tracz D, Dano J, Schmidt L, Volland H, Dorner B, Corbett C. Recommended immunological assays to screen for ricin-containing samples. *Toxins (Basel)* 2015;7:4967-4986.
14. Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, Zbinden R, Avondet MA, Dorner MB, Dorner BG. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst* 2009;134:2028-2039.
15. Simonova MA, Valyakina TI, Petrova EE, Komaleva RL, Shoshina NS, Samokhvalova LV, Lakhtina OE, Osipov IV, Philipenko GN, Singov EK, Grishin EV. Development of xMAP assay for detection of six protein toxins. *Anal Chem* 2012;84:6326-6330.

16. Garber EA, Venkateswaran KV, O'Brien TW. Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and Staphylococcus enterotoxins A, B, and C in food. *J Agric Food Chem* 2010;58:6600-6607.
17. Worbs S, Skiba M, Bender J, Zeleny R, Schimmel H, Luginbühl W, Dorner BG. An international proficiency test to detect, identify and quantify ricin in complex matrices. *Toxins (Basel)* 2015;7:4987-5010.
18. Worbs S, Skiba M, Söderström M, Rapinoja M-L, Zeleny R, Russmann H, Schimmel H, Vanninen P, Fredriksson S-Å, Dorner B. Characterization of ricin and *R. communis* agglutinin reference materials. *Toxins (Basel)* 2015;7:4906-4934.
19. Dorner BG, Zeleny R, Harju K, Hennekinne J-A, Vanninen P, Schimmel H, Rummel A. Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *Trends Anal Chem* 2016; 85,Part B:89–102.
20. Zhou Y, Li XP, Kahn JN, Tumer NE. Functional assays for measuring the catalytic activity of ribosome inactivating proteins. *Toxins (Basel)* 2018;10: <http://doi.org/10.3390/toxins10060240>.
21. Pauly D, Worbs S, Kirchner S, Shatohina O, Dorner MB, Dorner BG. Real-time cytotoxicity assay for rapid and sensitive detection of ricin from complex matrices. *PLoS ONE* 2012;7:e35360.
22. Dawson RM, Paddle BM, Alderton MR. Characterization of the asialofetuin microtitre plate-binding assay for evaluating inhibitors of ricin lectin activity. *J Appl Toxicol* 1999;19:307-312.
23. Bozza WP, Tolleson WH, Rosado LA, Zhang B. Ricin detection: tracking active toxin. *Biotechnol Adv* 2015; 33:117-123.
24. Duracova M, Klimentova J, Fucikova A, Dresler J. Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. *Toxins (Basel)* 2018;10: <http://doi.org/10.3390/toxins10030099>.
25. Kull S, Pauly D, Störmann B, Kirchner S, Stämmler M, Dorner MB, Lasch P, Naumann D, Dorner BG. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2010;82:2916-2924.
26. Skiba M, Dorner BG, Guo L, Brinkworth CS. Analysis of ricin: MALDI-MS. In: Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament, 2017 Edition, P. Vanninen, Editor. 2017, University of Helsinki: Helsinki, Finland. 595-614.
27. Shi-Lei L, Chang-Cai L, Long-Hui L, Ji-Jun T, Brinkworth CS. Analysis of ricin: LC-MS/MS. In: Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament, 2017 Edition, P. Vanninen, Editor. 2017, University of Helsinki: Helsinki, Finland. 615-630.
28. Fredriksson S-Å, Wunschel DS, Lindstrom SW, Nilsson C, Wahl K, Åstot C. A ricin forensic profiling approach based on a complex set of biomarkers. *Talanta* 2018;186:628-635.
29. Kalb S, Schieltz DM, Becher F, Åstot C, Fredriksson S-Å, Barr J. Recommended mass spectrometry-based strategies to identify ricin-containing samples. *Toxins (Basel)* 2015;7:4881-4894.
30. Schieltz DM, McWilliams LG, Kuklennyik Z, Prezioso SM, Carter AJ, Williamson YM, McGrath SC, Morse SA, Barr JR. Quantification of ricin, RCA and comparison of enzymatic activity in 18 *Ricinus communis* cultivars by isotope dilution mass spectrometry. *Toxicon* 2015;95:72-83.
31. Johnson RC, Lemire SW, Woolfitt AR, Ospina M, Preston KP, Olson CT, Barr JR. Quantification of ricinine in rat and human urine: a biomarker for ricin exposure. *J Anal Toxicol* 2005;29:149-155. Kang SS, Gordell GA, Soejarto DD, Fong HDS. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. *J Nat Prod* 1985;48:155-156.
32. Kang SS, Gordell GA, Soejarto DD, Fong HDS. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. *J Nat Prod* 1985;48:155-156.
33. Gandhi V, Cherian K, Mulky M. Detoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71:827-831.
34. Waller GR, Skursky L. Translocation and metabolism of ricinine in the Castor Bean Plant, *Ricinus communis* L. *Plant Physiol* 1972;50:622-626.
35. Isenberg SL, Carter MD, Miller MA, Noras AI, Mojica MA, Carlsen ST, Bulathsinghala CP, Thomas JD, Johnson RC. Quantification of ricinine and abrine in human plasma by HPLC-MS-MS: Biomarkers of exposure to ricin and abrin. *J Anal Toxicol* 2018;17; doi: 10.1093/jat/bky040.
36. Carlier J, Guitton J, Romeuf L, Bevalot F, Boyer B, Fanton L, Gaillard Y. Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin. Application to forensic toxicology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;975:65-76.