

Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig

Stellungnahme Nr. 038/2011 des BfR vom 11. August 2011, ergänzt am 21. Januar 2013

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffe. Aufgrund ihres gesundheitsschädigenden Potenzials sind sie in Lebensmitteln und Futtermitteln unerwünscht. Insbesondere bei bestimmten Honigen können in Abhängigkeit von der Herkunft höhere Gehalte an Pyrrolizidinalkaloiden auftreten. Nach Auffassung des BfR sind Anstrengungen nötig, um diese Belastung zu senken. Weiterhin wird empfohlen, Aufnahmen von PA durch Nahrungsergänzungsmittel, wie z. B. Produkte, die Pollen PA-haltiger Pflanzen enthalten, durch geeignete Maßnahmen zu vermeiden. Anlässlich der Verunreinigung einer Salatmischung mit Blüten und Blättern des Gemeinen Greiskrautes (*Senecio vulgaris* L.) hatte das BfR bereits in der Vergangenheit zu besonderer Sorgfalt bei Ernte und Zubereitung von Salat, Blattgemüse und Kräutern geraten.

Chemisch gesehen sind Pyrrolizidinalkaloide Ester aus einem 1-Hydroxymethylpyrrolizidin (Necinbase) und aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäuren (Necinsäuren). In Abhängigkeit der Veresterung einer oder beider Hydroxylgruppen können Pyrrolizidinalkaloide als Monoester oder Diester vorliegen. Insgesamt sind mehr als 500 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide und deren N-Oxide bekannt, die wiederum in rund 6000 Pflanzenspezies enthalten sein können. Zu ihnen zählen vor allem Pflanzen aus den Familien der Korbblütler (Asteraceae), der Rauhlatt- oder Borretschgewächse (Boraginaceae) und der Hülsenfrüchtler (Fabaceae oder Leguminosae). Angesichts der Vielzahl an Einzelsubstanzen ist die Datenlage zur Toxikologie, zur oralen Bioverfügbarkeit und zum Vorkommen der Pyrrolizidinalkaloide in Lebens- und Futtermitteln als lückenhaft anzusehen. Bekannt ist jedoch, dass Pyrrolizidinalkaloide hauptsächlich die Leber von Mensch und Tier schädigen können. Typisch ist hierbei das Auslösen einer Lebervenen-Verschlusskrankheit (VOD, veno-occlusive disease). In Versuchstieren zeigten Pyrrolizidinalkaloide aber auch krebsauslösende Wirkungen.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat auf Basis der vorliegenden Daten eine vorläufige Bewertung des gesundheitlichen Risikos von Pyrrolizidinalkaloiden in Lebensmitteln und insbesondere von Honig vorgenommen. Dabei waren sowohl die akuten als auch die chronischen toxischen Effekte zu berücksichtigen. Unter Berücksichtigung aller bisher vorliegenden Daten kommt das BfR zu dem Schluss, dass die Gesamtexposition des Verbrauchers mit gentoxischen und karzinogen wirkenden 1,2-ungesättigten Pyrrolizidinalkaloiden aus verschiedenen Lebensmitteln so niedrig wie möglich zu halten ist. Eine Tageszufuhr von 0,007 Mikrogramm (μg)¹ ungesättigter Pyrrolizidinalkaloide je kg Körpergewicht (KG) sollte möglichst nicht überschritten werden.

Derzeit können nur einige wenige Pyrrolizidinalkaloide verlässlich in Lebens- und Futtermitteln bestimmt werden. Das BfR sieht daher Forschungsbedarf, um entsprechende validierte spezifische Nachweismethoden, aber auch Screeningmethoden für Pyrrolizidinalkaloide zu entwickeln, die in der Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung der Länder und der Industrie einsetzbar sind.

¹ 1 Mikrogramm (μg) ist ein Millionstel Gramm bzw. 10^{-6} Gramm

BfR		BfR-Risikoprofil: Pyrrolizidinalkaloide (PA) in Honig (Stellungnahme Nr. 038/2011)			
A	Betroffen sind	Gruppe 1: Allgemeinbevölkerung Gruppe 2: Kinder und Vielverzehrer			
B	Wahrscheinlichkeit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung bei Verzehr von Honig	Praktisch ausgeschlossen	Unwahrscheinlich (Gruppe 1)	Möglich (Gruppe 2)	Wahrscheinlich Gesichert
C	Schwere der gesundheitlichen Beeinträchtigung bei Verzehr von Honig	Keine Beeinträchtigung	Leichte Beeinträchtigung	Mittelschwere Beeinträchtigung	Schwere Beeinträchtigung, irreversibel (Gruppe 1 und 2)
D	Aussagekraft der vorliegenden Daten	Hoch: Die wichtigsten Daten liegen vor und sind widerspruchsfrei		Mittel: Einige wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich	Gering: Zahlreiche wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich
E	Kontrollierbarkeit durch Verbraucher [1]	Kontrolle nicht notwendig	Kontrollierbar durch Vorsichtsmaßnahmen	Kontrollierbar durch Verzicht	Nicht kontrollierbar

Dunkelblau hinterlegte Felder kennzeichnen die Eigenschaften des in dieser Stellungnahme bewerteten Risikos (nähere Angaben dazu im Text der Stellungnahme Nr. 038/2011 des BfR vom 11.08.2011).

Erläuterungen

Das Risikoprofil soll das in der BfR-Stellungnahme beschriebene Risiko visualisieren. Es ist nicht dazu gedacht, Risikovergleiche anzustellen. Das Risikoprofil sollte nur im Zusammenhang mit der Stellungnahme gelesen werden.

Zeile E - Kontrollierbarkeit durch Verbraucher

[1] – Die Angaben in der Zeile „Kontrollierbarkeit durch Verbraucher“ sollen keine Empfehlung des BfR sein, sondern haben beschreibenden Charakter. Das BfR hat in seiner Stellungnahme Handlungsempfehlungen abgegeben. Normalverzehrer müssen sich keine Sorgen machen. Rohhonige aus bestimmten Ländern Mittel- und Südamerikas sowie Asiens weisen im Vergleich zu Rohhonigen aus einigen europäischen Ländern höhere PA-Gehalte auf. Verbraucherinnen und Verbraucher können erkennen, woher der jeweilige Honig stammt (z.B. ist erkennbar, ob der Honig aus Nicht-EG-Ländern oder EG-Ländern stammt). Gemäß der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (in der aktuellen Fassung) muss die Herkunft auf der Verpackung angegeben werden. Eine erhöhte Aufnahme von PA über Honig kann durch die entsprechende Auswahl der Produkte vermieden werden. Grundsätzlich sollten aber bei der Produktion und Herstellung von Honigen Maßnahmen zur Reduktion von PA getroffen werden, um auch das mögliche Gesundheitsrisiko bei einem langfristigen hohen Verzehr von Honig so weit wie möglich zu minimieren.

1. Gegenstand der Bewertung

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) wurde vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) gebeten, die Toxizität von Pyrrolizidinalkaloide einzuschätzen und das mögliche gesundheitliche Risiko zu bewerten, wenn Pyrrolizidinalkaloide in Lebensmitteln und Futtermitteln enthalten sind. Aus diesem Grunde wurde am 04. März 2010 ein Expertengespräch zum Thema Pyrrolizidinalkaloide in Honig durchgeführt. Auf Grundlage der Erkenntnisse des Expertengesprächs und ergänzender Daten zum Vorkommen von Pyrrolizidinalkaloiden in Honig hat das BfR eine vorläufige Bewertung des gesundheitlichen Risikos von Pyrrolizidinalkaloiden in Lebensmitteln und Futtermitteln vorgenommen.

2. Ergebnis

Das BfR empfiehlt unter Bezug auf das Ergebnis des Expertengesprächs vom 04. März 2010 weiterhin, die Gesamtexposition des Verbrauchers mit gentoxischen und karzinogen wirkenden 1,2-ungesättigten Pyrrolizidinalkaloiden (PA)² aus verschiedenen Lebensmitteln so niedrig wie möglich zu halten. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand sollte eine Tageszufuhr von 0,007 Mikrogramm ungesättigten PA/kg Körpergewicht (KG) bzw. 0,42 Mikrogramm PA für eine 60 kg schwere Person möglichst nicht überschritten werden.

Nach Auswertung zusätzlich zur Verfügung gestellter Analysendaten zum Vorkommen von PA in Honigen werden Anstrengungen für notwendig erachtet, die PA-Gehalte in Honigen zu senken, um mögliche Risiken für Vielverzehrer von Honig und insbesondere Kinder, bei denen eine höhere Empfindlichkeit für PA-bedingte Effekte in Betracht zu ziehen ist, zu minimieren.

Es wird empfohlen, den Eintrag von PA und PA-haltigen Pflanzen/Pflanzenteilen in die Nahrungskette zu minimieren. Des Weiteren sollten Aufnahmen von PA durch Pollen bzw. Produkte, die Pollen PA-haltiger Pflanzen (z.B. Nahrungsergänzungsmittel) enthalten, vermieden werden.

Es liegen Auswertungen vor, nach denen Rohhonige aus bestimmten Ländern Mittel- und Südamerikas sowie Asiens im Vergleich zu Rohhonigen aus einigen europäischen Ländern höhere mittlere PA-Gehalte und häufig höhere Kontaminationsraten (% PA-positiv) aufweisen. Nach Ansicht des BfR sind diese Angaben zum Teil lückenhaft und daher nicht repräsentativ, deuten aber darauf hin, dass eine selektive Auswahl der Rohhonige, die zur Herstellung von gemischter Fertigware verwendet werden, zu einer Reduzierung der PA-Gehalte in verzehrsfertigen Honigen beitragen könnte. Geographische und botanische Faktoren sind hier zu berücksichtigen.

Eine weitere Überprüfung des Vorkommens von PA im Honig wird für notwendig erachtet. In diese Analysen sollten auch ungemischte oder uniflorale Honige zum direkten Verzehr (z.B. Sortenhonige), die von lokalen Anbietern oder aus Importen stammen, einbezogen werden. Das BfR weist darauf hin, dass die geographische Provenienz von Honigen (z.B. Nicht EG-Länder; EG Länder) für den Verbraucher erkennbar ist, da sie gemäß der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (in der aktuellen Fassung) auf der Verpackung angegeben werden muss.

² Im Folgenden steht der Terminus PA, wenn nicht anders erwähnt, für 1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide und schließt auch deren N-Oxide (PANO) mit ein.

Die Stoffgruppe der PA umfasst eine Vielzahl an möglicherweise in Lebens- und Futtermitteln vorkommenden Substanzen. Dies stellt eine außerordentliche Anforderung an die Leistungsfähigkeit analytischer Methoden hinsichtlich des Spektrums zu erfassender Analyten und der erforderlichen Empfindlichkeit. Eine Grundproblematik besteht zudem in der mangelnden Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen und geeigneten, biologisch relevanten Testsystemen.

Die vorliegende Bewertung von PA in Honig stützt sich auf die derzeit dem BfR verfügbaren Daten. In Anbetracht dessen, dass keine geeignete Basis für die Ableitung toxikologischer Äquivalenzfaktoren für die einzelnen PA vorhanden ist und derzeit nur einige PA analytisch bestimmbar sind, gibt es keinen eindeutigen Weg, die Exposition zu berechnen. Aus diesem Grund wurden die PA als Gruppe mit kumulativer Wirkung betrachtet und PA-Gehalte in Honig für die Expositionsschätzung in drei vergleichenden Ansätzen als Summe verwendet.

In Hinblick auf die Wissenslücken ist die Risikobewertung als vorläufig zu betrachten.

Es besteht erheblicher Forschungsbedarf hinsichtlich der Entwicklung und Etablierung einer zuverlässigen und adäquaten Analytik von PA zur Anwendung im Rahmen der Lebens- und Futtermittelkontrolle (chemisch-analytische Methoden und wirkungsbezogene Analytik), mit deren Hilfe die PA-Gehalte von Honig und anderen Lebensmitteln erfasst werden können sowie zur besseren toxikologischen Charakterisierung einzelner in Lebensmitteln vorkommender PA.

Das BfR weist darauf hin, dass demnächst eine Risikobewertung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) von PA in Lebensmitteln und Futtermitteln zu erwarten ist.

3. Begründung

3.1 Risikobewertung

3.1.1 Agens

Pyrrrolizidinalkaloide sind sekundäre Pflanzenstoffe. Sie stellen unerwünschte Stoffe in Lebensmitteln und Futtermitteln dar (1, 2, 3). Es sind mehr als 500 verschiedene Pyrrrolizidinalkaloide und deren N-Oxide bekannt (4), mit deren Vorkommen infolge chemotaxonomischer Überlegungen in über 6000 Pflanzenspezies gerechnet wird (5). Vornehmlich gehören Pyrrrolizidinalkaloid-haltige Pflanzen den Familien der Korbblütler (*Asteraceae*), der Rauhblatt- oder Borretschgewächse (*Boraginaceae*) und der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae* oder *Leguminosae*) an (6).

Unter Pyrrrolizidinalkaloiden werden Ester aus einem 1-Hydroxymethylpyrrrolizidin (Necinbase) und aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäuren (Necinsäuren) verstanden. In Abhängigkeit der Veresterung einer oder beider Hydroxylgruppen können Pyrrrolizidinalkaloide als Monoester oder Diester vorliegen. Erfolgt die Veresterung mit den beiden Carboxylgruppen einer Dicarbonsäure, entsteht ein zyklischer Diester. Je nach Struktur der Necinbase werden im Wesentlichen Pyrrrolizidinalkaloide vom Retronecin-, Heliotridin-, Otonecin- oder Platynecintyp unterschieden (Abbildung 1). Pyrrrolizidinalkaloide vom Retronecin- und Heliotridin-Typ sind Diastereomere an Position C-7 (7).

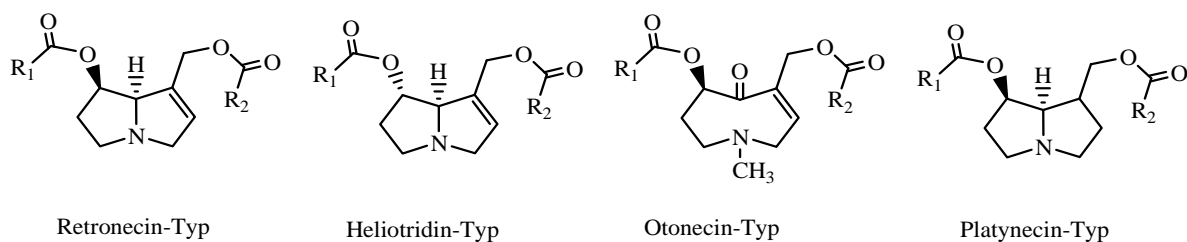


Abbildung 1: Strukturformeln wichtiger Necinbasen

3.1.2 Gefährdungspotenzial

Der im Folgenden zusammengefasste Kenntnisstand zur Toxikologie bildete die Basis für die gesundheitliche Beurteilung von Pyrrrolizidinalkaloiden in Lebensmitteln einschließlich Honig bei dem Expertengespräch (8) und war auch die Grundlage der bisherigen Berichterstattung des BfR zu dieser Thematik (9).

3.1.2.1 Strukturchemische Grundlagen

Für die typischen toxischen Wirkungen der Pyrrrolizidinalkaloide, die die Leber und z.T. auch die Lunge betreffen, sind folgende Strukturmerkmale kennzeichnend (1, 2, 10 - 12):

- a) Doppelbindung in der 1,2-Position des Pyrrrolizidinrings,
- b) Veresterung der Hydroxymethylgruppe am C-1 des Ringsystems oder - wenn vorhanden - der Hydroxygruppe am C-7,
- c) Verzweigung der Alkylseitenkette in mindestens einer der veresterten Carbonsäuren.

Pyrrrolizidinalkaloiden mit 1,2-ungesättigter Necinstruktur, die mit mindestens einer verzweigten C₅-Carbonsäure verestert sind, werden hepatotoxische, karzinogene und mutagene Wirkungen zugeschrieben (11, 13). Dazu zählen die ungesättigten Pyrrrolizidinalkaloide des Retronecin-, Heliotridin- und Otonecin-Typs, jedoch nicht die gesättigten Pyrrrolizidinalkaloide des Platynecin-Typs (Abbildung 1).

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass sich die Wirkungen von Estern der Hydroxymethylgruppe am C-1 (Monoester) verstärken, wenn eine zweite OH-Gruppe in Position C-7 des Necins vorhanden ist. Eine weitere Wirkungsverstärkung wird angenommen, wenn diese OH-Gruppe ebenfalls verestert ist (Diester). Die stärksten toxischen und karzinogenen Wirkungen werden zyklischen Diestern zugeschrieben (10, 11, 14). In der Pflanze liegen, abgesehen von Pyrrrolizidinalkaloiden des Otonecin-Typs, in der Regel Gemische der freien ungesättigten Pyrrrolizidinalkaloide mit deren N-Oxiden vor (4). Letzteren wird bei oraler Applikation prinzipiell eine vergleichbare Toxizität wie der reduzierten Form der Alkaloide zugeschrieben, zu der sie durch Reduktasen im Darm metabolisiert werden.

3.1.2.2 Toxikokinetik und Wirkungsmechanismus

PA werden nach peroraler Aufnahme im Tierversuch in der Regel schnell resorbiert. Die Ausscheidung erfolgt nach teilweiser Metabolisierung vornehmlich über die Niere, zu geringerem Anteil mit den Faeces (12). Der im Organismus verbleibende Anteil liegt hauptsächlich in Form von an Gewebebestandteile gebundenen Metaboliten vor (1).

Quantitative Daten zur oralen Bioverfügbarkeit von PA beim Menschen sind nicht vorhanden. In vitro-Daten zeigen, dass sowohl aktiviert als auch detoxifiziert wird.

Die Verstoffwechslung der PA erfolgt durch Hydrolyse, N-Oxidation und Dehydrogenierung des Pyrrrolizidinrings zu Pyrrolderivaten. Die bei der Hydrolyse frei werdenden Necinsäuren scheinen toxikologisch keine Relevanz zu besitzen. Gebildete N-Oxid-Metaboliten sind sehr gut wasserlöslich und werden schnell mit dem Urin ausgeschieden, so dass dieser Stoffwechselweg als Entgiftung betrachtet wird. Die in der Leber durch mischfunktionelle Oxidasen erfolgende Umwandlung der ungespalteten Ester zu toxischen Pyrrolestern stellt jedoch eine Giftingsreaktion dar. Pyrrole dieses Typs sind als hochreaktive alkylierende Agenten in der Lage, mit nukleophilen Gruppen von Nucleinsäuren und Proteinen zu Addukten zu reagieren und werden als aktive Metaboliten angesehen, die die hepatotoxischen, hepatokarzinogenen und mutagenen Wirkungen der PA bedingen (2, 12, 14, 15-19). Dass PA auch extrahepatische Läsionen verursachen, wird auf die Hydrolyse der Pyrrolester unter Bildung von karzinogenen und entwicklungstoxischen pyrrolischen Alkoholen, wie (±)6,7-Dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin (DHP), zurückgeführt (1, 12). Letztere sind weniger kurzlebig und besser wasserlöslich als die Pyrrolester, so dass sie sich eher im Körper verteilen können (1, 12).

Speziesunterschiede bezüglich der Empfindlichkeit für PA-induzierte Toxizität werden auf Differenzen im Gleichgewicht zwischen entgiftenden und giftenden Metabolismustwegen zurückgeführt (19). *In vitro*-Studien, bei denen die Metabolisierung von Riddelliin zu DHP und Riddelliin-N-Oxid in Gegenwart von Human-Lebermikrosomen im ähnlichen Ausmaß erfolgte wie mit Ratten-Lebermikrosomen (16), werden, wie auch ähnliche Ergebnisse mit Retrorsin, Retrorsin-N-Oxid, Riddelliin-N-Oxid und Monocrotalin-N-Oxid (17), als Hinweis gedeutet, dass Ergebnisse aus Rattenversuchen zur Tumorinduktion durch PA für den Menschen relevant sind.

Ungesättigte PA und die aus ihnen entstehenden Pyrrolderivate sind placentagängig und gehen in die Muttermilch über. So wiesen Rattenföten und gesäugte Rattenjunge, deren Müttern ungesättigte PA verabreicht wurden, u.a. akute und chronische Leberschäden auf (1).

3.1.2.3 Toxizität bei Mensch und Tier

Aufgrund von weltweit beobachteten Gesundheitsschäden bei Mensch und Nutztieren infolge der Aufnahme ungesättigter PA-enthaltende Pflanzenarten (landestypische Aufnahme als Nahrungs- oder Heilmittel, Verunreinigung von Nahrung oder Futter) sowie entsprechenden Fütterungsversuchen sind verschiedene Daten zur Toxikologie der ungesättigten PA publiziert. Dazu muss hier primär auf entsprechende Monographien und Übersichtsarbeiten verwiesen werden (1, 2, 12, 14, 20-22). Bekannt sind beim Menschen z. T. epidemische Lebererkrankungen mit Todesfällen in Pakistan, Indien und Afghanistan, das erst kürzlich regional erneut betroffen war (23), nach Verzehr von Getreide, das mit Samen von Sonnenwenden (*Heliotropium* spp.) oder *Crotalaria*-Arten kontaminiert war, und endemische Vergiftungen in Jamaika durch sogenannte Buschtees, die *Crotalaria*- und Kreuzkraut (*Senecio*)-Pflanzenteile enthielten. Das gehäufte Auftreten von Leberzirrhosen bei Schlachtrindern, die Alpenkreuzkraut (*Senecio alpinus*) mit Heu und Silage gefressen hatten, sowie die mit Leberdegeneration einhergehenden Seneciosen, die bei Pferden nach Aufnahme von *Senecio*-Arten beim Weiden beschrieben wurden, sind Beispiele aus der Tierhaltung (1, 14, 24-29).

Die toxischen Effekte der in größeren Dosen innerhalb kurzer Zeit aufgenommenen ungesättigter PA manifestieren sich beim Menschen hauptsächlich an der Leber in Form venookklusiver Veränderungen (veno-occlusive disease, VOD), wobei der Verschluss der zentralen sublobulären Lebervenen pathognomisch ist. Die Toxizitätszeichen werden oft erst einige Tage nach der Exposition wahrgenommen, so dass das Erkennen der Vergiftungsursachen oft problematisch ist. Nach akuten und subakuten Intoxikationen werden klinisch zunächst zunehmende Schmerzen im Oberbauch, sich innerhalb weniger Tage schnell entwickelnder Aszites und manchmal Oligurie und Ödeme an den Füßen beobachtet. Als Begleitsymptome können Übelkeit und Erbrechen, seltener Gelbsucht und Fieber auftreten. In der Regel ist nach wenigen Wochen eine Lebervergrößerung und -verhärtung feststellbar, oft vergesellschaftet mit massivem Pleuraerguss. Neben einer VOD induzieren einige PA (z.B. Monocrotalin) auch pulmonal-arterielle Hypertensien, die ein akutes Rechtsherzversagen (Cor pulmonale) zur Folge haben können (1, 2, 24).

Die akute Erkrankung bringt eine hohe Mortalitätsrate mit sich. Der Tod kann 2 Wochen bis zu mehr als 2 Jahre nach der Exposition eintreten. Eine vollständige Genesung von der hepatischen VOD ist möglich. Eine chronische Erkrankung kann sich bei den Überlebenden einer akuten hepatischen VOD oder bei langfristiger Aufnahme kleiner Mengen ungesättigter PA entwickeln und zur Leberzirrhose führen. Diese ist unspezifisch, so dass auch hier die ursächliche Diagnose schwierig ist. Kinder erscheinen empfindlicher als Erwachsene (2, 30-32). Analoge Befunde ergaben sich aus Rattenversuchen (12). Pathologisch ist die akute Intoxikation mit ungesättigten PA durch läppchenzentrale toxische Leberzellnekrosen gekennzeichnet (1, 2, 14). Angaben zur LD 50 von PA nach intraperitonealer (i.p.) - Verabreichung sind Mattocks (2) zu entnehmen. Für Retrorsin-N-Oxid liegen Untersuchungen mit peroraler Verabreichung vor, bei denen für Ratten eine LD 50 von 48 mg/kg KG (Verabreichung über sieben Tage) festgestellt wurde (2).

Für die chronische Lebertoxizität ungesättigter PA beim Tier sind vergrößerte Hepatozyten mit großen, hyperchromatischen Zellkernen typisch. Dies wird als morphologische Manifestation des antimitotischen Effektes ungesättigter PA angesehen und beim Menschen nicht ge-

funden (1). In einer chronischen Ratten-Studie, in der Riddelliin per Schlundsondierung verabreicht wurde (Behandlung an 5 Tagen pro Woche für 105 Wochen), wurde für nicht-neoplastische Veränderungen ein No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) von 0,01 mg/kg KG/Tag ermittelt (Hepatocytomegalie bei 0,033 mg/kg KG/Tag) (20).

Im Tierversuch wird die karzinogene Wirkung bestimmter ungesättigter PA (Lasiocarpin, Monocrotalin, Riddelliin) als gesichert angesehen und ein entsprechendes Risiko für den Menschen in Betracht gezogen (1, 14, 20-22, 33, 34). Bei anderen ungesättigten PA deuten die Tierstudien mit der Verbindung selbst oder ihren aktiven Metaboliten ebenfalls auf eine karzinogene Wirkung hin (z.B. Isatidin, Jacobin, Retrorsin, Seneciophyllin, Senkirkin, Petasitenin), jedoch ist hier die Datenlage unvollständig (1, 21, 33, 35). Vielfach zeigten Verbindungen, die sich im Tierversuch als Karzinogen erwiesen, auch positive Resultate bei der Mutagenitätstestung (1, 36). Die niedrigste BMDL10 (benchmark dose lower confidence limit 10%) von 0,073 mg/kg KG/Tag wurde aus einer Karzinogenitätsstudie mit Lasiocarpin aus Befunden an männlichen Ratten abgeleitet (34, 37). In dieser Studie war Fischer 344- Ratten über 104 Wochen Lasiocarpin mit dem Futter in Dosierungen von 7, 15, und 30 mg Lasiocarpin/kg (äquivalent zu 0,35, 0,75 und 1,5 mg/kg KG/Tag) verabreicht worden. Leberangiomas waren bei 13 von 23 männlichen und 2 von 23 weiblichen Ratten in der höchsten Dosis, bei 11 von 23 männlichen und 7 von 24 weiblichen Ratten in der mittleren Dosis und bei 5 von 24 männlichen und 8 von 22 weiblichen Ratten in der niedrigsten Dosis beobachtet worden (34).

Aus Tierversuchen ist die embryotoxische Wirkung bestimmter PA bekannt, jedoch sind die Daten spärlich und es liegen keine Kenntnisse über mögliche entwicklungstoxische Effekte am Menschen vor (1, 2).

3.1.2.3.1 Vergiftungen beim Menschen

Aufgrund der Beschreibung von Vergiftungen nach beabsichtigter oder versehentlicher Aufnahme PA-haltigen Pflanzenmaterials sind begrenzt Informationen verfügbar, die Rückschlüsse erlauben, in welchen Dosierungen ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide beim Menschen nach kurz- oder längerfristiger Exposition Toxizität zeigen können (1, 3).

Akut toxische Dosen

Es sind nur zwei Fälle in der Literatur beschrieben, die aussagekräftige Dosisangaben zu Vergiftungen nach kurzfristiger, nämlich 4- bzw. 14-tägiger Exposition enthalten (38-40). Es handelt sich um die Erkrankungen eines 6 Monate alten Mädchens (Körpergewicht: 6 kg) und eines 2 Monate alten Jungen (Körpergewicht: unbekannt), beide mexikanisch-amerikanischer Abstammung, denen *Senecio longilobus* als Kräutertee verabreicht worden war (38-40). Das Mädchen zeigte zunächst Aszites und Pleuraerguss, nach 2 Monaten eine sinusoidale Leberfibrose und 6 Monate später eine Leberzirrhose. Der Junge litt an Haematemesis, entwickelte eine Gelbsucht mit ausgesprägter Hepatomegalie, wies zentralnervöse Krämpfe, Bradykardie und Apnoeperioden auf und verstarb nach 6 Tagen. Die Kräutertees enthielten bezogen auf das Trockengewicht im ersten Fall 0,3 % PA (hauptsächlich Riddelliin) und 1 % N-Oxide (hauptsächlich von Retrorsin, zu geringeren Anteilen von Seneciophyllin und Senecionin abstammend) und im zweiten Fall 0,5 % PA und 1 % N-Oxide. An Hand der Analysenbefunde der Kräuterteeaufgüsse und des Verabreichungsschemas wurde errechnet, dass das 6 kg schwere Mädchen über eine 2-wöchige Periode insgesamt zwischen 70 und 147 mg, entsprechend 12 - 25 mg/kg KG, und der Junge (angenommenes KG: 5,5 kg) (1) über einen Zeitraum von 4 Tagen insgesamt etwa 66 mg, entsprechend 17 mg/kg KG an PA aufgenommen hatte. Demzufolge ergeben sich als geschätzte Tagesdosen bei dem

Mädchen 0,8 - 1,7 mg/kg KG und bei dem Jungen 3 mg/kg KG für ein Gemisch von PA mit Riddelliin und Retrorsin-N-Oxid als Hauptbestandteile.

Toxische Dosen bei mittel- und längerfristiger Exposition

In der Literatur wird ein Fall einer VOD nach viermonatiger Einnahme einer Zubereitung von „Comfrey“-Blättern (keine Angabe der *Symphytum* (Beinwell) -Spezies) beschrieben, die bis zu 0,27 g Alkaloide/kg enthielten. Zusätzlich war über einen längeren Zeitraum ein PA-haltiger Kräutertee konsumiert worden. Die Autoren schätzten, dass während sechs Monaten täglich eine Dosis von 15 Mikrogramm Alkaloid/kg KG/Tag zugeführt wurde enthielt (Hauptalkaloid: Echimidin) (1, 37, 41). Diese Annahme ist allerdings mit Unsicherheiten behaftet, da die betroffene Person PA aus verschiedenen Quellen aufgenommen hat (1, 37).

Eine VOD, die in einem Fall tödlich verlief, wurde auch jeweils bei vier Chinesinnen nach 19- bis 46-tägigem Konsum eines Kräutertees auf der Basis von *Heliotropium lasiocarpum* diagnostiziert. Es waren schätzungsweise über 45, 46, 19 oder 21 Tage täglich 0,59, 0,49 (tödlicher Verlauf), 0,60 oder 0,71 mg PA (Heliotrin)/kg KG/Tag aufgenommen worden (1, 42-44).

In zwei indischen Fällen einer VOD nach 20- bis 50-tägiger Einnahme von *Heliotropium eichwaldii* zu medizinischen Zwecken war eine Exposition mit 3,3 mg PA (Heliotrin)/kg KG/Tag berechnet worden (1, 45).

Bei in Afghanistan und Indien gehäuft aufgetretenen Fällen von VOD infolge des Verzehrs von Getreide, das mit PA-haltigen Samen kontaminiert war, wurde geschätzt, dass über Zeiträume von sechs oder zwei Monaten täglich 0,033 bzw. 0,66 mg PA/kg KG/Tag aufgenommen worden war, wobei als Hauptalkaloide Heliotrin bzw. Croatanin und Crotaburmin angenommen wurden (1, 46-48).

3.1.2.3.2 Beurteilungen nationaler sowie internationaler Gremien und Institutionen

Die WHO stellte bereits 1988 fest, dass die toxischen Wirkungen der PA kumulativen Charakter besitzen, und auch niedrige chronische Expositionen deshalb ein gesundheitliches Risiko darstellen können (1). Als Langzeit-Effekte beim Menschen würden Leberzirrhose und die Entstehung von Tumoren im Vordergrund stehen. Bisher gibt es jedoch keine aussagekräftigen follow up oder epidemiologische Studien, in denen über längere Zeit eine Korrelation zwischen Expositionshöhe und Wirkung untersucht worden wäre. Bezüglich der o.g. Fallbeschreibung hinsichtlich einer Leber-Erkrankung nach PA Aufnahme über Beinwellblätter (41), bei der die tägliche Aufnahme 15 Mikrogramm PA (Hauptalkaloid: Echimidin)/kg KG betrug, wurde diese Dosis auf Heliotrin umgerechnet. Da PA aus *Symphytum officinale* schwächer wirksam sind, wurde aus dem Verhältnis der LD 50 Werte (i.p.-Applikation) ein Dosis-Äquivalent von 10 Mikrogramm Heliotrin/kg KG und Tag hergeleitet, von dem angenommen wurde, dass es noch zu Erkrankungen beim Menschen führen dürfte.

Für Arzneimittel wurden 1992 in Deutschland im Rahmen eines Stufenplanverfahrens nicht zu überschreitende maximale Höchstmengen für Pyrrolizidinalkaloide mit einem 1,2-ungesättigten Necingerüst sowie deren N-Oxide festgelegt, die nach wie vor gültig sind. Bei Arzneimitteln mit anerkannten Anwendungsgebieten gemäß Monographien nach § 25 Abs. 7 Arzneimittelgesetz (AMG) darf hiernach die tägliche Exposition bei maximaler Dosierung folgende Werte nicht übersteigen: 100 Mikrogramm bei externer Anwendung, 1 Mikrogramm bei innerer Anwendung, 10 Mikrogramm bei der Anwendung von Huflattichblättern als Teeaufguss. Bei diesen Arzneimitteln ist außerdem die empfohlene Dauer der Anwendung auf maximal 6 Wochen pro Jahr zu begrenzen und es soll bei nicht-topischer Applikation keine

Anwendung in Schwangerschaft und Stillzeit erfolgen. Von dieser Regelung sind - neben bestimmten homöopathischen Arzneimitteln - PA-haltige Arzneimittel ausgenommen, bei deren maximaler Dosierung eine tägliche Exposition von 0,1 Mikrogramm bei innerer Anwendung und 10 Mikrogramm bei externer Anwendung nicht überschritten wird (13).

Die „Australia New Zealand Food Authority“ (ANZFA) hatte sich 2001 vorwiegend mit den „non cancer effects“ beschäftigt und auf der Basis der Daten aus der vorstehenden Fallbeschreibung einen „tentative NOAEL“ für alle PA von 10 Mikrogramm/kg KG/Tag vorgeschlagen. Bei Anwendung eines Unsicherheitsfaktors von 10 würde ein PTDI (provisional tolerable daily intake) von 1 Mikrogramm/kg KG/Tag resultieren. Außerdem wurde betont, dass bisher keine Evidenzen zur Humankarzinogenität von PA vorliegen (49).

Die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) kam 2002 zu dem Schluss, dass die Datenlage zu Gehalten von PA in Honigen, die aus PA-haltigen Pflanzen gewonnen wurden (z.B. Kreuzkraut- bzw. Natternkopf-Honig) sowie die Datenlage zur Exposition des Verbrauchers mit PA als unzureichend zu beurteilen sind. Auch wurde die Datenbasis zur Toxikologie solcher PA und zum Metabolismus beim Menschen als noch lückenhaft beurteilt, so dass keine abschließende Risikobewertung vorgenommen werden konnte. Weiterhin empfahl die SKLM, zunächst besonderes Augenmerk auf Produkte zu richten, die unter Verwendung von Pollen aus PA-haltigen Pflanzen hergestellt würden. Diese Produkte würden als Nahrungsergänzungsmittel in den Handel gelangen und vermutlich in größeren Mengen verzehrt (50).

2005 hat das „Dutch National Institute for Public Health and the Environment“ (RIVM) „non cancer effects“ beurteilt. Hierbei hat es tierexperimentelle Untersuchungen miteinbezogen. Auf der Basis des NOAEL von 0,01 mg/kg KG und Tag für nicht-neoplastische Veränderungen aus der chronischen Ratten-Studie mit Riddelliin (20) und einem Unsicherheitsfaktor von 100 wurde eine „tolerierbare tägliche Aufnahme“ (tolerable daily intake, TDI) von 0,1 Mikrogramm/kg KG/Tag abgeleitet. Hinsichtlich der Risikobewertung einer krebserzeugenden Wirkung der PA hat das RIVM aus derselben Studie eine sog. „Virtually Safe Dose“ (VSD) für PA von 0,00043 Mikrogramm/kg KG und Tag abgeleitet. Das ist jene Dosis, die noch zu einem Krebs-Risiko von eins zu einer Million führen soll (51).

Das Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette (CONTAM) der EFSA hatte 2007 im Rahmen einer Stellungnahme zur Bewertung von Pyrrolizidinalkaloiden als unerwünschte Substanzen in Futtermitteln Kenntnislücken bezüglich der Exposition aufgezeigt und darauf hingewiesen, dass das Vorkommen von PA im Honig besondere Beachtung verdient. Weiterhin wurde empfohlen, sich bei der analytischen Überprüfung zum Vorkommen in Futtermitteln auf ausgewählte PA zu konzentrieren: Senecionin, Seneciphyllin, Erucifolin, Monocrotalin, Trichodesmin, Heliotrin, Indicin, Intermedin und Lycopsamin (52). Gegenwärtig ist das CONTAM-Panel der EFSA mit der Erarbeitung eines neuen Gutachtens zur Risikobewertung von Pyrrolizidinalkaloiden in Lebens- und Futtermitteln befasst, dessen Fertigstellung im Oktober 2011 erwartet wird (53).

Das englische „Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and Environment“ (COT) hat 2008 ebenfalls „non cancer effects“ bewertet. Aus der Ratten-Studie mit Riddelliin wurde unter Anwendung eines Unsicherheitsfaktors von 100 und einem NOAEL von 0,01 mg/kg KG/Tag abgeleitet, dass unterhalb von 0,1 Mikrogramm Riddelliin/kg KG/Tag „non-cancer-effects“ nicht zu erwarten sind. Das COT empfiehlt dabei, dass das Verhältnis der LD₅₀ Werte benutzt werden kann, um andere PA in Riddelliin-Äquivalente umzurechnen. Hinsichtlich ihrer krebserzeugenden Wirkung wurden PA vom englischen COT als Gruppe mit kumulativer Wirkung angesehen. Hierbei wurde die niedrigste BMDL₁₀ von 0,073 mg/kg KG/Tag, die aus der Studie mit Lasiocarpin und männlichen Ratten abgeleitet

worden war, eingesetzt, um den MOE (Margin of Exposure) für einzelne PA oder deren Summe abschätzen zu können. Gemäß den EFSA (European Food Safety Authority)-Richtlinien wurde von einem MOE von 10000 ausgegangen (54). Seine Anwendung impliziert daher, dass Dosen von 0,007 Mikrogramm PA/kg KG/Tag bzw. 0,42 Mikrogramm PA/Tag für eine 60 kg schwere Person praktisch nicht mit Krebsrisiken assoziiert sind (37).

In einem 2011 veröffentlichten "Discussion Paper on Pyrrolizidine alkaloids" des Codex Committee on Contaminants in Food werden verfügbare Bewertungen, Regulierungen, Analysenmethoden sowie Daten zum Vorkommen und zur Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden zusammengefasst und Empfehlungen für eine künftige Bewertung durch JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) sowie für die Einrichtung eines „Code of Practice“ zur Vermeidung und Reduzierung der Kontamination mit PA gegeben (3).

3.1.3 Analytik

In ihrem o.g. Beschluss vom 8.11.2002 weist die SKLM auch auf Folgendes hin: „nach Auffassung der SKLM muss der Schwerpunkt der zukünftigen Forschung auf der sorgfältigen analytischen Erfassung von PA-Gehalten in Honigen und Pollen liegen.“ (50). Die Problematik der Analytik von PA in Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs, insbesondere in Honig, bzw. von PA in Futtermitteln wurde anlässlich eines EU-Workshops der DG SANCO in Zusammenarbeit mit dem Joint Research Centre (JRC) in Brüssel (22./23. Februar 2010) und eines BfR-Expertengesprächs am 4. März 2010 (8) diskutiert. Das Codex Committee on Contaminants in Food hat sich im März 2011 in einem ausführlichen Diskussionspapier zu PA u.a. mit der Analytik dieser Substanzen befasst (3).

Kräuter, Kräutertees, Bienenpollen, Honig, Blattsalate/Blattgemüse, Getreide, Eier, Milch/Käse und möglicherweise auch Fleisch werden als potentiell mit PA belastet angesehen (3, 8). Die höchsten Belastungen sind dabei in den Rohprodukten bzw. PA-haltigen Pflanzen zu erwarten. Aus Sicht der Analytik ergibt sich in der aufgeführten Reihenfolge der Lebensmittelgruppen eine steigende Anforderung an die Leistungsfähigkeit der Probenaufreinigung und -konzentrierung, da in den zuletzt genannten Lebensmittelgruppen niedrigere Gehalte zu erwarten sind, deren Nachweis entsprechend sensitive Methoden erfordert. Lebensmittel wie Milch oder Getreide können aufgrund ihres hohen Verzehrs trotz eines erwartungsgemäß geringen PA-Gehalts für eine Exposition gegenüber PA relevant sein. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind mehrere Nachweisverfahren wie Dünnschichtchromatographie (DC), der Enzymimmunoassay (ELISA), die Flüssigkeitschromatographie (HPLC), die Gaschromatographie (GC) sowie besonders auch GC bzw. HPLC mit massenspektrometrischer Detektion (MS, MS/MS) für die o.g. Matrizes in der Literatur beschrieben (3, 55). Keine dieser Methoden ist bisher vollständig validiert bzw. in der amtlichen Überwachung etabliert.

Die quantitative Bestimmung der Gesamtbelastung durch PA kann durch drei chemisch-analytische Herangehensweisen erfolgen: durch Bestimmung der Gehalte aller einzelnen Toxine und daran anschließender Summenbildung, durch Auswahl und Bestimmung von Markersubstanzen, oder durch die chemische Überführung der einzelnen PA in einen ihnen gemeinsamen Grundkörper und daran anschließender quantitativer Bestimmung dieser Substanz. Eine vierte Herangehensweise stellen innovative Testverfahren auf Basis der wirkungsbezogenen Analytik (Bioanalytik) dar.

Für die Bestimmung der einzelnen Toxingehalte besteht die prinzipielle Problematik in der mangelnden Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen. Angesichts der ca. 20 derzeit kommerziell verfügbaren PA und PANO und der geschätzten Anzahl von allein mehr als 500 vor-

kommenden PA kann die Erfassung dieser Einzelsubstanzen kein vollständiges Bild der Gesamtbelastung wiedergeben. Zusätzlich bringt die Vielzahl der Analyten eine außerordentliche Anforderung an die Nachweisempfindlichkeit der Methoden mit sich.

Für die Schätzung der erforderlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in den verschiedenen Matrices wurde in Ermangelung ausreichender Belastungsdaten eine modellhafte Kalkulation zugrunde gelegt: ausgehend von einem hypothetischen Gesamtverzehr von 100 g PA-belasteten Lebensmitteln und einer aus toxikologischer Sicht abgeleiteten maximalen Tageszufuhr, die nicht überschritten werden sollte, von nicht mehr als 0,42 Mikrogramm PA / Person (60 kg KG, vgl. Kapitel 3.1.5) über die Nahrung wurde ein potentieller maximaler Gehalt von ungefähr 4 Mikrogramm PA / kg Lebensmittel angenommen.

Demzufolge müssten dann die Bestimmungsgrenzen (BG), die aus grundsätzlichen Erwägungsgründen bei zumindest einem Drittel einer jeweiligen Höchstmenge liegen sollten, für eine zuverlässige Quantifizierung von beispielsweise 100 PA in einem Konzentrationsbereich von ungefähr 0,013 Mikrogramm/kg für jede einzelne Substanz liegen. Dies ist chemisch-analytisch gegenwärtig nicht realisierbar, d.h. es ist bei dieser Herangehensweise von einer Unterschätzung des tatsächlichen PA-Gehalts im Lebens- oder Futtermittel auszugehen.

Eine Alternative zur Bestimmung aller Einzelsubstanzen besteht in der Möglichkeit, repräsentative Markersubstanzen aus der Vielzahl der PA und PANO in den verschiedenen Futtermitteln und Lebensmitteln auszuwählen und zur Bestimmung dieser Substanzen entsprechende Analysenmethoden einzusetzen. Im Fall der Bestimmung von zehn Markersubstanzen wäre rechnerisch eine BG von zumindest 0,13 Mikrogramm/kg je Analyt notwendig. Die Auswahl der Markersubstanzen kann nur aufgrund von detaillierten Kenntnissen über Vorkommen und Toxikologie der PA erfolgen. Teil dieser Markersubstanzen könnten dem EU-Workshop der DG SANCO (22./23. Februar 2010) zufolge beispielweise Senecionin (für Honig, Milch, Futtermittel), Monocrotalin (für Getreide, Soja, Futtermittel), Echimidin (für Honig), Heliotrin (für Getreide, Honig) und Jacolin (für Milch) sein.

Mit beiden methodischen Herangehensweisen ergeben sich Schwierigkeiten bei der Bewertung der Ergebnisse: Generell ist nicht mit Sicherheit festzustellen, ob es sich bei den bisher bekannten und als Referenzstandards verfügbaren PA um die einzigen prominenten und repräsentativen Vertreter dieser Substanzklasse handelt. Zudem führt eine Summenbildung daraus zu Mengenangaben, die in Ermangelung von Toxizitätsäquivalenzfaktoren nur unsichere Aussagen über das toxikologische Potential (vgl. 3.1.2.1) zulassen.

Die dritte Alternative für die Bestimmung der PA stellt die quantitative Bestimmung des gemeinsamen Grundkörpers dar, in den die verschiedenen PA und PANO chemisch überführt werden. Die Erfassung dieses Grundkörpers stellt ein Modell für die Bestimmung der Gesamtbelastung des Verbrauchers mit PA dar. Gegenüber der Bestimmung von Einzelsubstanzen ist die toxikologische Bewertung hierbei jedoch erschwert, da kein Rückschluss mehr auf die ursprüngliche Identität der PA (weniger toxische Monoester oder höher toxische zyklische Diester) gezogen werden kann. Mit der von Kempf *et al.* publizierten Analysenmethode (56) zur Bestimmung der PA in Honig werden die einzelnen PA des Retronecin- bzw. Heliotridin-Typs zu deren jeweils gemeinsamen Grundkörpern reduziert, die in einem GC-MS Verfahren quantifiziert werden. Allerdings werden mit dieser Methode die PA des Otonecin-Typs nicht erfasst. Um eine Überwachung der PA-Belastung in der genannten Größenordnung aus analytischer Sicht sicher zu stellen, müsste die BG dieser Methode im Bereich von 1,3 Mikrogramm/kg liegen. Diese liegt jedoch mit 10 Mikrogramm/kg bei einem Signal:Rausch-Verhältnis von 7:1 über den diskutierten Leistungsparametern.

Ein Vergleich von Ergebnissen der Methode nach Kempf *et al.* (56) mit LC-MS/MS-Einzelbestimmungen zeigte für eine ausgewählte Gruppe von Honigen (16 Proben) gute Übereinstimmung der PA-Gehalte (57). Da bei der Methode nach Kempf *et al.* (56) alle PA des Retronecin- und Heliotridintyps erfasst werden, würden höhere Befunde mit dieser Methode auf das Vorhandensein unbekannter PA hindeuten. Solche Vergleichsmessungen sind zur Einschätzung der Repräsentativität einzelner PA und der Anforderungen hinsichtlich der zu erfassenden Analyten sehr hilfreich, jedoch sind die bisher vorliegenden Daten dafür nicht ausreichend.

Mit den Methoden der wirkungsbezogenen Analytik können sensitive Verfahren entwickelt werden, die es erlauben, Gruppen von PA in Lebens- und Futtermitteln zu detektieren.

Für die in dieser Stellungnahme durchgeführte Expositionsschätzung (3.1.4) wurden Daten zum PA-Vorkommen in Honig herangezogen, die in zwei vom Honigverband beauftragten Laboren mit LC-MS/MS Technik gemessen wurden. Nach Probenreinigung und -konzentrierung mittels Festphasensäulen (Kationentauscherverfahren) bzw. nach dem QuE-ChERS-Verfahren (58) wurden einzelne PA und PANO bestimmt und deren Gehalte dann als PA-Summe angegeben (57, 59, 60). In den untersuchten Honigproben der Fertigwaren wurden vor allem die PA Echimidin, Echiumin und Lycopsamin nachgewiesen (vgl. 3.1.4). In Rohhonigen wurde auch besonders häufig Echimidin, Lycopsamin sowie Lycopsamin-N-Oxid nachgewiesen (3). Die Bestimmungsgrenzen dieser Verfahren liegen je nach Analyt und Labor zwischen 1,0 und 3,0 Mikrogramm/kg und damit etwa um einen Faktor 10 über der anzustrebenden Empfindlichkeit.

Die notwendigen Bestimmungsgrenzen stellen in jedem Fall eine Herausforderung an die Analytik dar, weshalb nur sehr empfindliche Techniken wie GC-MS bzw. LC-MS/MS-Methoden für den Nachweis der PA geeignet sind.

Zusammenfassend ist für eine präzise Risikobewertung noch ein deutlicher Forschungsbedarf hinsichtlich einer adäquaten Analytik von PA im Rahmen der Lebens- und Futtermittelkontrolle ableitbar.

3.1.4 Exposition

3.1.4.1 Datengrundlagen

Für die Auswertung lagen Einzeldaten zu PA-Gehalten in Honig aus zwei Laboren der Jahre 2008 - 2011 (Probeneingang) vor. Insgesamt wurden 1324 Datensätze zu Fertigware (es wird davon ausgegangen, dass unter dem Begriff „Fertigware“ die vorwiegend gemischten Honige des Einzelhandels zu verstehen sind) und 13280 Datensätze zu Rohhonigen übermittelt, wobei je Probe verschiedene Pyrrolizidinalkaloide mittels LC-MS/MS Einzelmessung bestimmt wurden. In den Proben aus Labor-1 wurden 14 und im Labor-2 18 der insgesamt 24 verschiedenen PA bestimmt, wobei nur 8 PA in beiden Laboren gemessen wurden. Weiterhin wurde die jeweilige analytische Methode mit Bestimmungs- und Nachweisgrenzen angegeben, die sich teils zwischen den Laboren unterschieden. Die Proben unterliegen vermutlich keiner repräsentativen Stichprobenziehung auf dem Markt befindlicher Honige. Weiterhin wurden keine Informationen zur botanischen/regionalen Herkunft oder Marken der untersuchten Honige des Handels übermittelt.

Darüber hinaus wurden dem BfR die bereits ausgewerteten und zusammengefassten Daten von den Laboren übersandt. Es lagen jedoch keine näheren Informationen zu den ange-

wandten Berechnungsmodellen (z.B. Umgang mit Werten $< BG$) vor, was eine Einschätzung der Daten oder Vergleichbarkeit mit eigenen Auswertungen erschwert.

Die Auswertungen der Verzehrdaten für Erwachsene beruhen auf Daten der Nationalen Verzehrstudie II (NVS II). Sie ist die zurzeit aktuellste repräsentative Studie zum Verzehr der deutschen Bevölkerung. Die Studie, bei der etwa 20000 Personen im Alter zwischen 14 und 80 Jahren mittels drei verschiedener Erhebungsmethoden (Dietary History, 24h-Recall und Wiegeprotokoll) zu ihrem Ernährungsverhalten befragt wurden, fand zwischen 2005 und 2006 in ganz Deutschland statt (61).

Für die Langzeitaufnahmen wurden die „Dietary History“- Interviews ausgewertet, in denen 15371 Personen retrospektiv nach dem üblichen Verzehr der letzten vier Wochen (ausgehend vom Befragungszeitpunkt) mit Hilfe des Programms „DISHES 05“ befragt wurden. Sie liefert gute Schätzungen für die langfristige Aufnahme von Stoffen, wenn Lebensmittel in allgemeinen Kategorien zusammengefasst werden oder Lebensmittel betrachtet werden, die einem regelmäßigen Verzehr unterliegen.

Für die Kurzeitaufnahmen wurden die Daten der beiden unabhängigen 24h-Recalls der NVS II, die in einem computergestützten Interview mittels „EPIC-SOFT“ erhoben wurden, ausgewertet. Sie beruhen auf Daten von 13926 Personen, von denen beide Interviews vorlagen. Aufgrund des Vorliegens von Verzehrangaben zu einzelnen Tagen ist die Methode der 24h-Recalls für Expositionsschätzungen bei akuten Risiken geeignet.

Für die Aufnahmeschätzungen wurden die individuellen Körpergewichte der Befragten zugrunde gelegt. Fehlende Messwerte zum Körpergewicht wurden durch Selbstangaben der Befragten (846 Personen) oder in Anlehnung an die „Hot-Deck“-Methode (62) bei Stratifizierung nach Geschlecht, Altersgruppen, sozialer Schicht und Schwangerschaftstrimester (57 Personen) ersetzt.

Für die Aufnahmeschätzung der Kinder wurden Verzehrdaten aus der VELS-Studie³ herangezogen (63). Die Studie wurde zwischen 2001 und 2002 an 816 Säuglingen und Kleinkindern im Alter zwischen 6 Monaten bis unter 5 Jahren in ganz Deutschland durchgeführt. Die Eltern haben für jedes Kind zweimal 3-Tage Ernährungsprotokolle über alle verzehrten Lebensmittel geführt. Die Lebensmittel und Speisen wurden anschließend unter Berücksichtigung der Verarbeitungsfaktoren auf rohe Lebensmittel zurückgerechnet. Das Modell des BfR⁴ bezieht sich auf die Verzehrdaten der Kinder zwischen 2 und unter 5 Jahren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 16,15 kg. Aufgrund des Vorliegens von Verzehrangaben zu einzelnen Tagen sind 2x3- Tage Ernährungsprotokolle sowohl für Expositionsabschätzungen bei akuten als auch bei chronischen Risiken geeignet, wobei die Nutzung (Mittelung) von wenigen Einzeltagesmessungen für die Berechnung einer lebenslangen Aufnahme mit Unsicherheiten verbunden ist, die insbesondere bei Aussagen zu detaillierten Lebensmittelgruppen oder bei Schätzungen mit einem hohen Prozentsatz Nichtverzehrer zu beachten sind.

³ „Verzehrsstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen und Kleinkindern für die Abschätzung eines akuten Toxizitätsrisikos durch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln“

⁴ http://www.bfr.bund.de/cm/218/bfr_entwickelt_neues_verzehrmodell_fuer_kinder.pdf

3.1.4.2 Auswertung der Gehaltsdaten

Die Messungen in Labor-1 wurden mit LC-MS/MS nach einer nach der QuEChERS-Methode (58) adaptierten Aufarbeitung durchgeführt. Die Bestimmungsgrenzen (BG) lagen für alle Einzelanalyten bei 1,0 Mikrogramm/kg und die Nachweisgrenzen (NG) bei 0,5 Mikrogramm/kg. Labor-2 führte die Messungen mittels LC-MS/MS basierend auf einer Methode nach Betteridge *et al.* (59) durch. Die BG und NG lagen je nach PA-Analyt zwischen 1,0-3,0 Mikrogramm/kg bzw. 0,5-2,0 Mikrogramm/kg.

Für folgende PA lagen von den Laboren Messungen vor, wobei nicht jedes PA in allen Proben/ Laboren gemessen wurde: Echimidin, Echimidin-N-Oxid, Acetyl-Echimidin, Acetyl-Echimidin-N-Oxid, Echiumin, Echiumin-N-Oxid, Acetyl-Echiumin-N-Oxid, Echiuplatin, Echiuplatin-N-Oxid, Echivulgarin, Echivulgarin-N-Oxid, Lycopsamin, Lycopsamin-N-Oxid, weitere Lycopsamin-Typ-PA⁵, Retrorsin, Retrorsin-N-Oxid, Senecionin, Senecionin-N-Oxid, Seneciphyllin, Seneciphyllin-N-Oxid, Senkirkin, Lasiocarpin, Heliotrin, Heliotrin-N-Oxid. Die dargestellten Gehalte und Berechnungen beziehen sich im Folgenden immer auf die PA-Summe, die sich je nach Berechnungsmodell aus unterschiedlichen PA zusammensetzt. Generell ist nicht sicher, ob mit den gemessenen PA alle potentiell relevanten Vertreter dieser Substanzklasse erfasst wurden.

Für die Darstellung der Gehaltsdaten wurden die Proben mit Messergebnissen oberhalb der Bestimmungsgrenze (>BG) für beide Labore zusammengefasst und getrennt nach Jahren für Rohhonig und Fertigware ausgewertet (Tabelle 1 und 5). Weiterhin sind Unterschiede zwischen den Laboren und je nach Einbeziehung verschiedener PA-Analyten für Fertigwaren aufgeführt. Für die Expositionsschätzung wurden zusätzlich zu den bestimmbareren Werten die Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (<BG) mit in die Berechnungen einbezogen. Dadurch ergeben sich drei weitere Berechnungsansätze: lower bound (LB; Werte < BG werden 0 gesetzt), medium bound (MB; Werte < BG werden auf halbe Bestimmungsgrenze gesetzt) und upper bound (UB; Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt).

3.1.4.2.1 Rohhonige

In Tabelle 1 sind die Gehalte an PA in Rohhonigen oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG= 1,0 bis 3,0 Mikrogramm/kg) zusammenfassend dargestellt, die aus den dem BfR übermittelten Einzeldaten berechnet wurden.

Tabelle 1: Gehaltsdaten (Labor-1 und 2 zusammengefasst) zu Pyrrolizidinalkaloiden (Mikrogramm/kg) in Rohhonigen

Rohhonige (Summe aller 24 PA)	Jahre gesamt	2008*	2009	2010	2011*
n (gesamt)	13280	24	5370	7819	54
Gehalte < BG	26 %	58 %	32 %	21 %	9 %
Beschreibung der Daten > BG (Mikrogramm/kg)					
Min	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Max	3298,0	77,0	1523,0	3298,0	364,0
MW	54,5	30,7	45,9	57,9	56,8
Median	19,0	24,0	15,0	21,0	38,0
95.P.	218,0	70,2	189,0	232,0	121,6

*vergleichsweise wenige Messungen

⁵ Labor-2: Lycopsamin-N-Oxid und Isomere des Lycopsamin bzw. deren N-Oxide (z.B. Indicin und Indicin-N-Oxid)

Die Gehalte in Rohhonigen sind durch eine starke Variation (Min-Max) und sehr hohe Maximalgehalte gekennzeichnet. Weiterhin lässt sich ein verhältnismäßig hoher Anteil an Proben unterhalb der BG feststellen. Die durchschnittlichen Gehalte sind in den letzten Jahren tendenziell höher, wobei in den Jahren 2008 und 2011 die geringen Probenzahlen zu beachten sind. Ein Problem in den übermittelten Gehaltsdaten stellten die von den Laboren unterschiedlich gemessenen PA-Einzelanalyten, die in die Summe eingeflossen sind, dar. Somit beruhen die gebildeten Summen je Probe nicht immer auf der gleichen Ausgangsbasis. Selbst innerhalb eines Labors wurden in den Proben nicht immer dieselben Analyten gemessen. Weitergehende Auswertungen zu regionalen und saisonalen Abhängigkeiten sowie nach der botanischen Herkunft der Honige waren aufgrund fehlender (nicht übermittelter) Informationen nicht möglich. Daher wird im Folgenden auf die von den Laboren übermittelten Auswertungen der Daten Bezug genommen.

Die Auswertungen von Labor-2, die dem BfR in Form einer Präsentation übermittelt wurden, zeigen deutlich höhere mittlere Gehalte der Rohhonige aus bestimmten Ländern Mittel- und Südamerikas sowie Asiens im Vergleich zu Rohhonigen aus den meisten europäischen Ländern, wie z. B. Deutschland (Tabelle 2 bis 4). Auch die Kontaminationsraten (% PA-positiv) sind in diesen Ländern häufig höher. Dabei muss allerdings auf teilweise niedrige Probenzahlen als Unsicherheit hingewiesen werden. Dem BfR liegen keine weiteren Informationen zu den Berechnungsmodellen (z.B. Umgang mit Werten < BG) vor, was eine Einschätzung der Daten oder Vergleichbarkeit mit eigenen Auswertungen erschwert.

Tabelle 2: Gehalte in Rohhonigen aus Süd- und Mittelamerika (Auswertungen Labor-2)

Herkunft	Proben gesamt	Proben PA- positiv	Proben PA- positiv (%)	PA-Gehalt (Mikrogramm/kg)			
				Min	Max	MW (positi- ve Honige)	MW (alle Honige)
Argentinien	1195	773	65 %	1	555	47	30
Brasilien	157	131	83 %	1	698	89	74
Chile	815	683	84 %	1	1087	71	59
El Salvador	96	90	94 %	3	324	58	54
Guatemala	17	13	76 %	3	28	8	6
Kuba	95	85	89 %	3	301	47	42
Mexiko	749	296	40 %	1	1075	64	25
Nicaragua	6	6	100 %	10	21	16	16
Uruguay	376	376	100 %	1	1065	131	131
Gesamt	3506	2453	70 %	1	1087	71	50

Tabelle 3: Gehalte in Rohhonigen aus Asien (Auswertungen Labor-2)

Herkunft	Proben gesamt	Proben PA- positiv	Proben PA- positiv (%)	PA-Gehalt (Mikrogramm/kg)			
				Min	Max	MW (positi- ve Honige)	MW (alle Honige)
Aserbaidjan	1	1	100 %	5	5	5	5
China	29	3	10 %	2	314	107	11
Indien	26	3	12 %	11	43	32	4
Japan	2	1	50 %	3	3	3	2
Myanmar	9	9	100 %	6	220	95	95
Nepal	8	8	100 %	5	251	126	126
Thailand	13	11	85 %	8	531	163	138
Türkei	24	4	17 %	1	55	34	6
Vietnam	36	32	89 %	3	327	60	53
Gesamt	148	72	49 %	1	531	85	42

Auswertungen auf Basis dieser Daten wurden ebenso von Dübecke *et al.* 2011 (60) publiziert und decken sich mit den übermittelten Auswertungen von Labor-2 (Tabellen 2 bis 4).

Es könnten darüber hinaus Rohhonige aus weiteren Ländern, die hier nicht untersucht wurden und unter Umständen hohe PA-Gehalte aufweisen, in die Produktion der Fertigwaren eingehen (z. B. aus Neuseeland, PA-Gehalte bis 1 mg/kg Honig (49)).

Labor-1 lieferte mit Hinweis auf den kurzen Untersuchungszeitraum von einem Jahr keine Auswertungen der Gehalte nach geographischer oder botanischer Herkunft, da die Gehalte auch von klimatischen und saisonalen Faktoren beeinflusst sind. Es wird aber allgemein darauf hingewiesen, dass regionale Unterschiede im Vorkommen und der Verteilung der PA erkennbar sind.

Tabelle 4: Gehalte in Rohhonigen aus Europa (Auswertungen Labor-2)

Herkunft	Proben gesamt	Proben PA-positiv	Proben PA-positiv (%)	PA-Gehalt (Mikrogramm/kg)			
				Min	Max	MW (positive Honige)	MW (alle Honige)
Bulgarien	39	16	41 %	1	45	5	2
Dänemark	1	0	0 %	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Deutschland	70	15	21 %	1	130	12	3
Frankreich	18	2	11 %	1	3	2	0,2
Griechenland	11	2	18 %	1	51	26	n.n.
Italien	21	17	81 %	1	181	24	19
Kroatien	9	3	33 %	3	35	14	5
Österreich	7	3	43 %	2	7	4	2
Polen	9	1	11 %	1	1	1	0,1
Portugal	5	4	80 %	5	14	8	6
Rumänien	52	28	54 %	1	8	3	1
Schweiz	41	20	49 %	1	17	7	3
Serbien	2	2	100 %	2	3	3	3
Slowenien	10	3	30 %	1	2	2	1
Spanien	166	155	93 %	1	225	32	30
Tschechien	3	1	33 %	1	1	1	0,3
Ukraine	1	1	100 %	7	7	7	7
Ungarn	63	38	60 %	1	43	5	3
Gesamt	528	311	59 %	1	225	20	12

n.n. = nicht nachweisbar

3.1.4.2.2 Fertigware

In Tabelle 5 sind die Gehalte an PA in Honig als Fertigware oberhalb der Bestimmungsgrenze zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5: Gehaltsdaten (Labor-1 und 2 zusammengefasst) zu Pyrrolizidinalkaloiden (Mikrogramm/kg) in Fertigware

Fertigware (Summe aller 24 PA)	Jahre gesamt	2009	2010/2011*
n (gesamt)	1324	512	812
Gehalte < BG	9 %	6 %	10 %
Beschreibung der Daten > BG (Mikrogramm/kg)			
Min	1,0	1,0	1,0
Max	267,0	209,0	267,0
MW	21,4	25,2	18,8
Median	14,0	18,0	11,0
95.P.	66,0	70,0	64,6

* 8 Proben aus Jan. 2011 nicht extra dargestellt

Vergleichend zum Rohhonig lässt sich feststellen, dass trotz des höheren Anteils der Proben oberhalb der Bestimmungsgrenze in der Fertigware die mittleren Gehalte geringer sind. Hier lässt sich eine gegenläufige Tendenz mit Abnahme der Gehalte in den letzten beiden Jahren erkennen.

Eine Auswertung nach Herkunft oder Marke der Honige war aufgrund nicht übermittelter Angaben nicht möglich.

Auch die Darstellung getrennt nach Laboren (Tabelle 6) zeigt einen abnehmenden Trend der Gehalte bei der Fertigware, der auch unter Einbeziehung der Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (LB-, MB- und UB-Berechnungsansätze) bestehen bleibt (hier nicht dargestellt). Es ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil der Werte < BG bei Labor-2 geringer ist im Vergleich zu Labor-1. Unterschiede liegen auch in den Mittelwerten vor, die Proben aus Labor-2 haben höhere PA-Gehalte im Vergleich zu denen aus Labor-1. Eine Erklärung hierfür wäre die unterschiedliche Anzahl bzw. Art der bestimmten PA-Analyten in den beiden Laboren.

Tabelle 6: Auswertung der Gehalte an PA in Fertigware getrennt nach Labor und Jahren > Bestimmungsgrenze

		Gehalte >BG (Mikrogramm/kg)	
		2009	2010/2011
Labor-1 (14 PA)	n (gesamt)	98	110
	Gehalte < BG	13 %	17 %
	MW	18,1	13,9
	95. P.	54,8	40,0
Labor-2 (18 PA)	n (gesamt)	414	702
	Gehalte < BG	4 %	9 %
	MW	26,7	19,6
	95. P.	74,0	65,2
Labore gesamt (24 PA)	n (gesamt)	512	812
	Gehalte < BG	6 %	10 %
	MW	25,2	18,8
	95. P.	70,0	64,6

Ein Problem in den übermittelten Gehaltsdaten stellten die von den Laboren unterschiedlich gemessenen PA-Einzelanalyten, die in die Summenbildung einbezogen werden konnten, dar. Somit beruhen die gebildeten Summen je Probe nicht immer auf der gleichen Analyten und sind schwer vergleichbar. Selbst innerhalb eines Labors wurden in den Proben nicht immer dieselben Analyten gemessen. In den Proben aus Labor-1 wurden 14 und in Labor-2 18 der insgesamt 24 verschiedenen PA bestimmt, wobei nur 8 PA in beiden Laboren gemessen wurden (Echimidin, Echimidin-N-Oxid, Lycopsamin, Retrorsin, Senecionin, Seneciphyllin, Senkirkin, Heliotrin).

Es muss angemerkt werden, dass in zwei Proben des Labors-2 Echivulgarin und Echivulgarin-N-oxid nicht gemessen wurden. Außerdem wurden „weitere Lycopsamin-Typ PA“⁶ ebenso nur in einem Teil der Proben (65%) von Labor-2 bestimmt, so dass sich die PA-Summen in diesen Proben nicht aus der gleichen Anzahl PA zusammensetzen. Da die daraus resultierenden Unsicherheiten als vernachlässigbar einzuschätzen sind, wurden diese Messungen/ Proben in die Auswertungen eingeschlossen. Dies ermöglicht eine erweiterte Darstellung der

⁶ Lycopsamin-N-Oxid und Isomere des Lycopsamin bzw. deren N-Oxide (z.B. Indicin und Indicin-N-Oxid)

PA-Konzentrationen in den gemessenen Honigen und verfolgt damit einen umfassenderen Ansatz bei der Expositionsschätzung.

Für eine vergleichende Darstellung (Tabelle 7) wurden Auswertungen der Gehaltsdaten auf Basis aller (n=24) sowie in beiden Laboren gemessener (n=8) PA vorgenommen, die sich ebenso jeweils auf die PA-Summen beziehen. Hierbei wurden die Auswertungen sowohl für bestimmbare Werte (>BG), lower bound (LB; Werte < BG werden 0 gesetzt), medium bound (MB; Werte < BG werden auf halbe Bestimmungsgrenze gesetzt) als auch für den upper bound (UB; Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt) durchgeführt. Die halbe BG (medium bound) entspricht in dem vorliegenden Fall immer der Nachweisgrenze.

Dabei ist zu erwähnen, dass sich die BG zwischen den Laboren unterscheiden. Im Labor-1 lagen diese für alle PA bei 1 Mikrogramm/kg und bei Labor-2 je nach Analyt zwischen 1 und 3 Mikrogramm/kg.

Tabelle 7: Auswertung der Gehalte an PA in Fertigware getrennt nach Laboren für alle PA-Analyten (Summe aus 14 bzw. 18) und PA-Analyten, die in beiden Laboren gemessen wurden (Summe aus 8)

		Gehalt PA in Mikrogramm/kg (14 bei Labor-1, 18 bei Labor-2 einbezogen)				Gehalt PA in Mikrogramm/kg (nur die in beiden Laboren gemessenen 8 PA)			
		>BG ¹	LB ²	MB ³	UB ⁴	>BG	LB	MB	UB
Labor-1	N	176	208	208	208	176	208	208	208
	Min	1,0	0,0	7,0	14,0	1,0	0,0	4,0	8,0
	Median	11,0	7,0	13,5	20,0	11,0	7,0	10,5	14,0
	MW	15,9	13,5	19,4	25,4	15,9	13,5	16,4	19,4
	95. P.	48,2	46,6	51,3	56,1	48,2	46,6	48,3	50,1
	Max	150,0	150,0	156,5	163,0	150,0	150,0	153,5	157,0
Labor-2*	N	1034	1116	1116	1116	1021	1116	1116	1116
	Min	1,0	0,0	12,5	24,0	1,0	0,0	8,5	17,0
	Median	15,0	13,0	23,5	34,0	12,0	10,0	16,5	22,0
	MW	22,3	20,7	31,5	42,3	18,5	16,9	23,1	29,2
	95. P.	70,0	68,0	74,7	82,0	63,0	61,0	63,6	68,0
	Max	267,0	267,0	276,0	285,0	169,0	169,0	171,5	178,0
Labore gesamt (24 PA)	N	1210	1324	1324	1324	1197	1324	1324	1324
	Min	1,0	0,0	7,0	14,0	1,0	0,0	4,0	8,0
	Median	14,0	12,0	22,0	33,0	11,0	10,0	15,5	22,0
	MW	21,4	19,5	29,6	39,6	18,1	16,4	22,0	27,7
	95. P.	66,5	65,0	72,0	79,8	61,0	57,0	61,3	64,8
	Max	267,0	267,0	276,0	285,0	169,0	169,0	171,5	178,0

*fett markierte Werte sind in die Expositionsschätzung eingegangen

¹bestimmbar (gemessene Werte >BG); ²lower bound (Werte < BG werden 0 gesetzt); ³medium bound (Werte < BG werden auf halbe BG gesetzt); ⁴upper bound (Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt)

Es fällt auf, dass die PA-Summen von 8 gemessenen PA nur unwesentlich niedriger sind als die PA-Summen von 24 gemessenen PA, was auf eine mögliche Priorität dieser 8 PA hinsichtlich des Vorkommens bezogen auf die hier gemessenen PA schließen lässt. Beim Vergleich der Gehalte der 8 in beiden Laboren gemessenen PA sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen Labor-1 und Labor-2 oberhalb der BG erkennbar. Dies ändert sich bei Betrachtung des UB-Ansatzes (Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt), da hier die Daten aus Labor-2 höhere mittlere Gehalte aufweisen, was auf die höheren analytischen BG zurückzuführen ist.

Es wurden im Falle des MB und UB-Berechnungsansatzes bewusst auch PA in die Summenbildung eingeschlossen, die zu 100 % nicht bestimmbar waren (<BG), da ein Vorkommen aufgrund der fehlenden Angaben zu Werten unterhalb der Nachweisgrenze nicht ausgeschlossen werden kann und damit die Messungen nicht eindeutig als „nicht nachweisbar“ gekennzeichnet sind.

Die tatsächliche Belastung kann aufgrund des Einflusses der BG nur schwer angegeben werden und ist zwischen LB und UB anzusiedeln. Es ist zu vermuten, dass einige Messungen auch unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Da in den vorliegenden Einzeldaten jedoch keine Trennung von Werten unterhalb der Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze möglich war, konnten in die verschiedenen Berechnungsansätze nur die Bestimmungsgrenzen (und nicht die Nachweisgrenzen für Werte unterhalb der NG) eingehen, was eine starke Überschätzung des upper bound zur Folge hat. Die Überschätzung wird noch einmal durch die Addition der Einzel-PA und somit auch der BG verstärkt.

Im Folgenden sollen zusätzlich zu den bisher betrachteten Summen die Einzelmessungen der PA betrachtet werden (Tabelle 8), um die Bedeutung einzelner PA zu diskutieren.

Für 10 PA-Analyten (Labor-1: Lycopsamin-N-Oxid, Retrorsin-N-Oxid, Senecionin-N-Oxid, Seneciphyllin-N-Oxid, Lasiocarpin, Heliotrin-N-Oxid / Labor-2: Acetyl-Echimidin-N-Oxid, Echiumin-N-Oxid, Acetyl-Echiumin-N-Oxid, Echiuplatin-N-Oxid) liegen alle Werte unterhalb der BG. Keiner dieser Analyten wurde jedoch in beiden Laboren gemessen.

Echimidin-N-Oxid, Echivulgarin-N-Oxid, Senkirkin und Heliotrin wurden in den gemessenen Proben ebenfalls sehr selten bestimmt (nur wenige Proben > BG). Damit liegen für Acetyl-Echimidin, Echiumin, Echiuplatin, Echivulgarin und für die unter „weitere Lycopsamin-Typ PA“ zusammengefassten PA Werte aus Labor-2 vor, die nicht in der Summe (8 PA in beiden Laboren gemessen) berücksichtigt wurden. Legt man die bestimmbareren Werte zugrunde, fallen insbesondere die unter „weitere Lycopsamin-Typ PA“ zusammengefassten PA mit relativ hohen mittleren Gehalten im Verhältnis zu den mittleren Gehalten der in die Summe der 8 PA einbezogenen Alkaloide auf. Allerdings wird dies durch den hohen Anteil der Proben von 90 % unter der Bestimmungsgrenze in seiner Bedeutung über alle Proben hinweg etwas relativiert.

Betrachtet man die in beiden Laboren gleichermaßen gemessenen 8 PA-Analyten (in Tabelle 8 grau hinterlegt), so weisen über beide Labore hinweg Echimidin und Lycopsamin die höchsten mittleren Gehalte oberhalb der BG und den geringsten Anteil Proben unter der BG auf. Aufgrund vieler nicht bestimmbarer Werte tragen Echimidin-N-Oxid, Senkirkin und Heliotrin im geringsten Maße zur Summe der 8 PA bei.

Tabelle 8: Gehalte (Mikrogramm/kg) der Einzel-PA in Fertigware nach Laboren getrennt (Auswertung der Gehalte > BG)

Pyrrolizidinalkaloide	Labor-1					Labor-2				
	n (gemessen)	Gehalte < BG	MW	Median	95. P.	n (gemessen)	Gehalte < BG	MW	Median	95. P.
Echimidin	208	35 %	9,0	4,0	30,2	1116	12 %	7,5	4,0	27,0
Echimidin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	1116	97 %	1,6	1,0	5,2
Acetyl-Echimidin	0		.	.	.	1116	69 %	1,3	1,0	3,0
Acetyl-Echimidin-N-Oxid	0		.	.	.	1116	100 %	.	.	.
Echiumin	0		.	.	.	1116	45 %	2,1	1,0	6,0
Echiumin-N-Oxid	0		.	.	.	1116	100 %	.	.	.
Acetyl-Echiumin-N-Oxid	0		.	.	.	1116	100 %	.	.	.
Echiuplatin	0		.	.	.	1116	73 %	3,8	1,0	10,0
Echiuplatin-N-Oxid	0		.	.	.	1116	100 %	.	.	.
Echivulgarin	0		.	.	.	1114	84 %	2,2	1,0	8,0
Echivulgarin-N-Oxid	0		.	.	.	1114	99,8 %	1,0	1,0	1,0
Lycopsamin	208	44 %	7,1	5,0	23,1	1116	35 %	9,6	6,0	26,0
Lycopsamin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.
weitere Lycopsamin-Typ-PA*	0		.	.	.	721	90 %	8,0	5,0	26,5
Retrorsin	208	77 %	4,1	3,0	13,2	1116	82 %	5,4	4,0	13,0
Retrorsin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.
Senecionin	208	62 %	4,4	3,0	15,9	1116	74 %	7,0	5,0	17,0
Senecionin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.
Seneciphyllin	208	75 %	3,8	2,0	12,9	1116	82 %	6,9	5,0	19,0
Seneciphyllin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.
Senkirkin	208	99,5 %	1,0	1,0	1,0	1116	96 %	1,1	1,0	2,0
Lasiocarpin	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.
Heliotrin	208	99 %	1,5	1,5	.	1116	100 %	.	.	.
Heliotrin-N-Oxid	208	100 %	.	.	.	0		.	.	.

* Lycopsamin-N-Oxid und Isomere des Lycopsamin bzw. deren N-Oxide (z.B. Indicin und Indicin-N-Oxid)

3.1.4.2.3 Literaturdaten zu PA-Gehalten in Honig

Pyrrolizidinalkaloide in Honig wurden bereits seit Jahrzehnten und in verschiedenen Ländern gemessen. Dabei schwanken die Gehalte je nach botanischer und geographischer Herkunft der Honige. Bereits 1977 wurden Gehalten bis zu 3900 Mikrogramm PA/kg im Honig von Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobaea*) berichtet (64). Weitere Messungen von Honig dieser botanischen Herkunft ergaben Maximalgehalte von 1480 Mikrogramm/kg (65), 356 Mikrogramm/kg (66) bis hin zum Nachweis von ausschließlich Spuren an PA (67). Im Honig von Wegerichblättrigem Natternkopf (*Echium plantagineum*) wurden Gehalte bis zu 950 Mikrogramm/kg (68) bzw. 2634 Mikrogramm/kg (69) gemessen. In Honig von Gewöhnlichem Natternkopf (*Echium vulgare*) wurden PA-Gehalte zwischen 1263 Mikrogramm/kg (69) und 2850 Mikrogramm/kg (59) berichtet. Auch Honige von Sonnenwenden (*Heliotropium* spp.) können hohe Gehalte an PA von bis zu 1647 Mikrogramm/kg (69) aufweisen. Es ist zu beachten, dass die hier genannten Messungen meist in verdächtigen (Roh-)Honigen bzw. Versuchsienenstöcken durchgeführt wurden und damit nicht unbedingt vergleichbar mit den aktuell ausgewerteten Daten zu zum Verzehr bestimmten Honigen sind.

In einer Untersuchung von Handelsproben verschiedener Honige (Fertigware) lagen die PA-Gehalte zwischen 19 und 120 Mikrogramm/kg, wobei die höchste Konzentration in einem Honig aus Neuseeland, der vor allem *Echium*-Pollen enthielt, gemessen wurde (56).

Als weitere bedeutende PA-haltige Pflanzen sind Wasserdost (*Eupatorium* spp.) und Borretsch (*Borago* spp.), deren Alkaloide vermehrt im Honig vorkommen können, zu nennen (70).

3.1.4.3 Verzehrsdaten

Erwachsene (14 - 80 Jahre)

Die Verzehrsdaten für die Langzeitaufnahme (NVS II/ Dietary History) basieren auf Auswertungen aller Befragter (inklusive Nicht-Verzehrer). Die erwachsene Bevölkerung verzehrt täglich im Durchschnitt 0,05 g Honig pro kg Körpergewicht (KG) bzw. im 95. Perzentil 0,28 g/kg KG (bezogen auf ein Standard-KG von 60 kg: 3 g/d bzw. 17 g/d). Der Anteil Verzehrer liegt bei etwa 88% (NVS II/ Dietary History). Mit zunehmendem Alter erhöht sich der Verzehr von täglich 0,033 g/kg KG in der Gruppe der 14-18-Jährigen (entspricht bei 60 kg: 2 g/d) bis 0,073 g/kg KG bei den 65-80-Jährigen (entspricht bei 60 kg: 4 g/d). Zwischen den Geschlechtern und bei Vegetariern liegen keine nennenswerten Unterschiede vor (Tabelle 9). In die Verzehrsmengen ist der direkte und indirekte Honigverzehr aus Rezepten und zusammengesetzten Lebensmitteln eingeflossen, wobei die Rezepte (größtenteils) mit Standardrezepturen hinterlegt sind und somit keine Variation in der Zubereitung/ Herstellung und den daraus folgenden Verzehrsmengen berücksichtigt werden kann. Eine Unterschätzung des Honigverzehrs wäre somit beispielsweise durch die nicht berücksichtigte Verwendung von Honig als Süßungsmittel anstatt Zucker denkbar.

Die Verzehrsdaten für die Kurzeitaufnahme (NVS II/ 24h-Recall) basieren auf Auswertungen der maximalen Verzehrsmengen der Honig-Verzehrer. Der maximale Verzehr der Verzehrer von Honig ermittelt aus 2 Befragungstagen lag im 95. Perzentil bei 0,88 g/ kg KG (Tabelle 9; bezogen auf ein Standard-KG von 60 kg: 53 g/d). Bei den Auswertungen der Verzehrsdaten wurden die als Menüs gekennzeichneten Lebensmittel des Bundeslebensmittelschlüssels (X- und Y-Codes) aufgeschlüsselt, so dass Honig, welcher in Gerichten als Komponente vorkam, in den Auswertungen mit berücksichtigt ist. Dagegen wurden zusammengesetzte Lebensmittel, wie Frühstückscerealien oder Kuchen, nicht in die Einzelbestandteile aufgeschlüsselt und somit sind verzehrte Mengen an Honig aus diesen Lebensmitteln nicht berücksichtigt.

Kinder (2 - 5 Jahre)

Die Verzehrsdaten für die Langzeit- und Kurzeitaufnahme basieren auf Auswertungen der 3-Tage-Ernährungsprotokolle der VELIS-Studie. Die tägliche durchschnittliche Langzeitaufnahme beträgt 0,1 g/ kg KG bzw. 0,4 g/ kg KG für das 95. Perzentil (bezogen auf das Standard-KG von 16,15 kg: 6 g/d bzw. 24 g/d) und der Verzehreranteil lag bei 68% (Tabelle 9). Im Modell für den kurzfristigen Verzehr wurden alle drei Befragungstage jeweils wie einer behandelt und somit die Auswertung auf die dreifache Personenzahl gestützt. Das 97,5. Perzentil des Verzehrs der Verzehrer von Honig lag bei 1,36 g/ kg KG (entspricht bei 16,15 kg: 82 g/d). In die Verzehrsmengen ist der direkte und indirekte Honigverzehr aus Rezepten und zusammengesetzten Lebensmitteln eingeflossen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verzehr von Honig bei Erwachsenen (NVS II) und Kindern (VELS)

	Langzeitverzehr (alle Befragte)			Kurzzeitverzehr (Verzehrer)
	MW (g/kg KG/d)	95. Perz. (g/kg KG/d)	Anteil Verzehrer	95./ 97,5. Perz. (g/kg KG/d)
Erwachsene (14 - 80 J.)	0,05	0,28	88 %	0,88 (95.P.)
Kinder (2 - 5 J.)	0,10	0,40	68 %	1,36 (97,5.P.)

3.1.4.4 Expositionsschätzung

Für die Expositionsschätzung von PA über den Verzehr von Honig (Fertigware) wurden verschiedene Szenarien unter Berücksichtigung aller Berechnungsansätze (> BG, LB, MB, UB) ausgewertet, um einen umfassenden Überblick über den möglichen Bereich der Belastung zu erlangen. Die Gehaltsdatengrundlage für die hier durchgeführten Berechnungen bilden die Mittelwerte und 95. Perzentile der Summen der PA-Gehalte in Proben von Fertigware, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

3.1.4.4.1 Langzeitaufnahme - chronische Belastung

In Anbetracht dessen, dass keine geeignete Basis für die Ableitung toxikologischer Äquivalenzfaktoren gesehen wird und derzeit nur einige PA analytisch bestimmbar sind, gibt es keinen eindeutigen Weg, die Exposition zu berechnen, um sie an den toxikologischen Referenzwerten zu spiegeln.

Prinzipiell ergeben sich aus den vorliegenden Daten drei Modelle zur Berücksichtigung der Gehaltsdaten bei Berechnung der Aufnahme, die alle vergleichend berechnet wurden.

Im Modell 1 wurden alle vorliegenden Proben beider Labore berücksichtigt, unabhängig von der Anzahl der gemessenen PA in den einzelnen Proben. Damit fließt die maximal mögliche Probenzahl in die Expositionsberechnung ein. Allerdings sind die Summen über die gemessenen PA in den Proben unterschiedlich, da in Labor-1 die Summe aus 14 PA und in Labor-2 aus 18 PA gebildet wird. Damit sind die Summen nur bedingt vergleichbar und interpretierbar.

Im Modell 2 wurden nur die 8 PA für die Summe berücksichtigt, die in beiden Laboren gemessen wurden. Damit erhält man für alle Proben vergleichbare und interpretierbare Summen. Die Unsicherheit im Vergleich zu den anderen Modellen besteht darin, dass weniger PA in die Summenbildung eingehen und damit nicht berücksichtigt werden, wie die in Labor-2 nachgewiesenen PA Acetyl-Echimidin, Echiumin, Echiuplatin, Echivulgarin und Echivulgarin-N-Oxid.

Das Modell 3 bezieht nur Proben des Labors ein, in welchem die höhere Anzahl PA analytisch bestimmt wurde (Labor-2). Damit werden Lycopsamin-N-Oxid, Retrorsin-N-Oxid, Senecionin-N-Oxid, Seneciphyllin-N-Oxid, Lasiocarpin und Heliotrin-N-Oxid aus der Summenbildung ausgeschlossen, da diese nur in Labor-1 bestimmt wurden. Alle Proben dieser Substanzen lagen jedoch unter der Bestimmungsgrenze, womit dieser Nachteil nur marginal relevant für die vorliegende Aufnahmeschätzung ist. Als Nachteil verbleibt zudem, dass La-

bor-2 die teilweise höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aufweist, womit die Unsicherheit höher liegt im Vergleich zu Labor-1.

Da in Modell 3 alle PA mit positiv nachgewiesenen Messwerten berücksichtigt und alle Summen aus der gleichen Anzahl PA gebildet werden sowie in Labor-2 die meisten Proben (1116, entspricht 84 %) untersucht wurden, wird dieses Modell für die Expositionsschätzung und Risikocharakterisierung verwendet. Der Vergleich der Ergebnisse aller Modelle (siehe Tabelle 10) zeigt, dass die Unterschiede in der täglichen PA-Aufnahme gering und das gewählte Modell zudem konservativer ist, als die beiden Alternativansätze.

In Tabelle 10 sind die PA-Langzeitaufnahmen für vier verschiedene, im Folgenden aufgeführten Verzehr-Szenarien dargestellt. Die zugrunde gelegten Verzehrdaten sind der Tabelle 9 (3.1.4.3) zu entnehmen.

- Szenario 1 (mittlerer Verzehr (MW) und mittlerer Gehalt (MW)) beschreibt den Durchschnittsverzehrer, der mal höher und mal niedriger belastete Honige verzehrt (keine Markentreue).
- Szenario 2 (hoher Verzehr (95.P.) und mittlerer Gehalt (MW)) beschreibt den Vielverzehrer, der mal höher und mal niedriger belastete Honige verzehrt (keine Markentreue).
- Szenario 3 (mittlerer Verzehr (MW) und hoher Gehalt (95.P.)) beschreibt den Durchschnittsverzehrer, der ausschließlich höher belastete Honige verzehrt (z. B. einer bestimmten Marke/ Sorte).
- Szenario 4 (hoher Verzehr (95.P.) und hoher Gehalt (95.P.)) beschreibt einen worst case, bei dem ein Vielverzehrer ausschließlich höher belastete Honige verzehrt (z. B. einer bestimmten Marke/ Sorte).

Tabelle 10: Langzeit-Aufnahme von PA (Mikrogramm/kg KG/ d) über den Verzehr von Honig bei Erwachsenen und Kindern für verschiedene Modelle und Verzehr-Szenarien

		PA-Aufnahme (Mikrogramm/kg KG/ d)					
Verzehr-Szenarien	Berechnungsansatz	Modell 1: Summe aus 24 PA		Modell 2: Summe aus 8 PA		Modell 3: Labor-2, Summe aus 18 PA	
		Erw.	Kinder	Erw.	Kinder	Erw.	Kinder
Szenario 1: Durchschnittsverzehrer ohne Markentreue	bestimmbar ¹	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002
	lower bound ²	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002
	medium bound ³	0,002	0,003	0,001	0,002	0,002	0,003
	upper bound ⁴	0,002	0,004	0,001	0,003	0,002	0,004
Szenario 2: Vielverzehrer ohne Markentreue	bestimmbar	0,006	0,008	0,005	0,007	0,006	0,009
	lower bound	0,005	0,008	0,005	0,006	0,006	0,008
	medium bound	0,008	0,012	0,006	0,009	0,009	0,012
	upper bound	0,011	0,016	0,008	0,011	0,012	0,017
Szenario 3: Durchschnittsverzehrer mit Markentreue	bestimmbar	0,004	0,007	0,003	0,006	0,004	0,007
	lower bound	0,003	0,006	0,003	0,006	0,004	0,007
	medium bound	0,004	0,007	0,003	0,006	0,004	0,007
	upper bound	0,004	0,008	0,003	0,006	0,004	0,008
Szenario 4: Vielverzehrer mit Markentreue (worst case)	bestimmbar	0,019	0,026	0,017	0,024	0,020	0,028
	lower bound	0,018	0,026	0,016	0,023	0,019	0,027
	medium bound	0,020	0,029	0,017	0,024	0,021	0,030
	upper bound	0,022	0,032	0,018	0,026	0,023	0,032

¹bestimmbar (gemessene Werte >BG); ²lower bound (Werte < BG werden 0 gesetzt); ³medium bound (Werte < BG werden auf halbe BG gesetzt); ⁴upper bound (Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt)

Kinder nehmen aufgrund ihrer körperrgewichtbezogenen höheren Verzehrsmenge bis zu doppelt so viel auf wie Erwachsene. Die höchsten täglichen Aufnahmen an PA in allen Berechnungsansätzen ergeben sich aus dem Szenario 4 (worst case).

Grundsätzlich ist der längerfristige Verzehr von hoch belastetem Honig eher unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen, da die Hersteller eine möglichst gleichbleibende Qualität/Geschmack anstreben, welche sie durch konstante Mischverhältnisse der Ausgangshonige durch Vorratshaltung dieser über längere Zeiträume gewährleisten. Aus diesem Grund können insbesondere markentreue Verzehrer über längere Zeiträume einer höheren PA-Aufnahme ausgesetzt sein.

3.1.4.4.2 Kurzzeitaufnahme - akute Belastung

In Tabelle 11 sind die Kurzzeitaufnahmen für verschiedene Verzehr- und Gehaltsszenarien dargestellt. Die zugrunde gelegten Verzehrdaten sind der Tabelle 9 (3.1.4.3) zu entnehmen.

Tabelle 11: Kurzzeit-Aufnahme von PA (Modell 3: Gehalte von Labor-2, 18 PA) über den Verzehr von Honig bei Erwachsenen und Kindern für verschiedene Szenarien

		PA-Aufnahme (Mikrogramm/kg KG/ d)	
Verzehrs-Szenarien	Berechnungsansatz	Erwachsene	Kinder
Kurzzeit-Verzehr ohne Markentreue ¹	bestimmbar ³	0,020	0,030
	lower bound ⁴	0,018	0,028
	medium bound ⁵	0,028	0,043
	upper bound ⁶	0,037	0,057
Kurzzeit-Verzehr mit Markentreue ²	bestimmbar	0,062	0,095
	lower bound	0,060	0,092
	medium bound	0,066	0,102
	upper bound	0,072	0,112

¹ 95. P. des Maximalverzehr über zwei Befragungstage (Erwachsene) bzw. 97,5. P. (Kinder) des Verzehr der Verzehrer x mittlerer PA-Gehalt (MW); ² 95.P. des Maximalverzehr über zwei Befragungstage (Erwachsene) bzw. 97,5. P. (Kinder) des Verzehr der Verzehrer x hoher PA-Gehalt (95.P.); ³bestimmbar (gemessene Werte >BG); ⁴lower bound (Werte < BG werden 0 gesetzt); ⁵medium bound (Werte < BG werden auf halbe BG gesetzt); ⁶upper bound (Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt)

Auch die Kurzzeitaufnahmen zeigten eine höhere Belastung der Kinder vergleichend zur erwachsenen Bevölkerung (Tabelle 11). Ein einmaliger maximaler Verzehr von hoch belastetem Honig ist hier durchaus als realistisch einzuschätzen. Der Vergleich der Ergebnisse aller Modelle (nicht dargestellt) ergab, dass die Unterschiede gering und das gewählte Modell 3 zudem konservativer ist, als die beiden Alternativansätze.

Grundsätzlich liegt die tatsächliche Exposition des Verbrauchers zwischen LB und UB. Der UB stellt aus den unter 3.1.4.2.2 (Fertigware) beschriebenen Gründen/Unsicherheiten eine starke Überschätzung und der LB eine Unterschätzung dar.

Es ist davon auszugehen, dass ein geringer Teil des in Deutschland verzehrten Honigs unmittelbar der Kategorie „Rohhonig“ zuzuordnen ist, da er vom Imker direkt an den Verbraucher abgegeben wird bzw. in den Einzelhandel gelangt. Auf dem deutschen Markt dürften diese Honige vorwiegend aus Deutschland stammen. Direkt zum Verzehr bestimmte ungemischte Rohhonige können aber, z.B. als Spezialitäten in Form bestimmter Sortenhonige, auch als Importware in den deutschen Handel kommen. Verbraucher, die vorrangig regiona-

len in Deutschland geernteten Rohhonig verzehren, können eine abweichende PA-Aufnahme zu der auf Grundlage der gemischten Fertigware geschätzten Exposition haben. Legt man die nach Herkunftsland ausgewerteten Gehaltsdaten für Rohhonige von Labor-2 zugrunde (Tabellen 2 bis 4), würde sich aufgrund der geringeren durchschnittlichen PA-Gehalte der deutschen Rohhonige im Vergleich zu der hier ausgewerteten Fertigware (Tabelle 7) eine geringere PA-Aufnahme ergeben. Unsicherheiten bestehen darin, dass keine weiteren Informationen zu den Berechnungsmodellen (z.B. Umgang mit Werten < BG) vorliegen und damit eine Einschätzung der Daten erschwert wird.

3.1.4.5 Vorkommen von Pyrrolizidinalkaloiden in anderen Lebensmitteln

PA können neben Honig in verschiedenen weiteren Lebensmitteln enthalten sein. Hier sind Blattsalate (9) und Zubereitungen aus Kräutern (Tee) sowie Getreideprodukte (siehe 3.1.2.3), die über direkte Kontamination, sowie Eier, Milch/Käse und möglicherweise Fleisch, die mittels Carry-over indirekt betroffen sein können, zu nennen (3). Verhältnismäßig hohe Konzentrationen wurden auch in Lebensmitteln, die aus Honig hergestellt werden, wie Honigwein (Met) gemessen (71).

Eine weitere Quelle für die Aufnahme von PA können Blütenpollen PA-haltiger Pflanzen oder Präparate daraus sein, die als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben werden. Diese können, je nach Art (Pflanze, regionale Herkunft) erhebliche Mengen an PA enthalten (72). Der mittlere PA-Gehalt aus 55 internationalen Produkten lag hier bei 5,17 Mikrogramm/g und überschreitet damit die Gehalte in Honig deutlich. Nimmt man eine Verzehrsempfehlung von 1-2 Teelöffeln pro Tag an (entspricht ca. 10 g), kann sich eine PA-Aufnahme allein über diese Pollenprodukte von 15 Mikrogramm ergeben (72).

3.1.5 Risikocharakterisierung - Aktueller Stand der Erkenntnisse zur gesundheitlichen Bewertung von PA in Lebensmitteln, einschließlich Honig

Aussagen zur Notwendigkeit der Begrenzung der PA-Aufnahmen durch Lebensmittel orientieren sich zunächst an der Vermeidung des Risikos der Krebsentstehung. Hierbei werden chronische Aufnahmen der relevanten Lebensmittel zugrunde gelegt. Darüber hinaus müssen auch mögliche Risiken akuter Toxizität bei z.B. kurzfristig möglichen höheren Expositionen bewertet werden.

Zur Frage, ob PA beim Menschen eine krebserzeugende Wirkung haben, liegen keine aussagekräftigen epidemiologischen Studien oder follow up-Untersuchungen bei Vergiftungsfällen über längere Zeiträume vor. Basierend auf der Gesamtheit experimenteller Befunde zu Metabolismus, Aktivierungsmechanismus, DNA-Adduktbildung, Gentoxizität und Karzinogenität muss aber in Betracht gezogen werden, dass PA auch beim Menschen karzinogen wirken können.

Seitens des BfR und seiner Vorgängereinstitute war bisher bei der Risikobewertung von PA in Lebensmitteln an dem mit dem Arzneimittelbereich abgestimmten Bewertungsansatz festgehalten worden, der im Zusammenhang mit einem Stufenplanverfahren für PA-haltige Arzneimittel 1992 etabliert wurde. Dabei war, wie bei bestimmten Arzneimitteln, auch im Lebensmittelbereich gefordert worden, dass die maximale Tageszufuhr von 0,1 Mikrogramm PA/Person möglichst nicht überschritten werden sollte (13).

Bei dem BfR-Expertengespräch am 04.03.2010 (8) wurde aber grundsätzlich Übereinstimmung erzielt, dass dem in der EU derzeit üblichen MOE-Ansatz zur Risikobewertung von Substanzen mit gentoxischen und karzinogenen Eigenschaften gegenüber dem bisherigen Verfahren der Vorzug zu geben sei (54). Die entsprechende vom britischen COT 2008 vor-

geschlagene Bewertung, bei der die PA hinsichtlich ihrer krebserzeugenden Wirkung als Gruppe mit kumulativer Wirkung berücksichtigt werden, wurde als geeignet angesehen. Hierzu wird die für Lasiocarpin abgeleitete BMDL10 (Benchmark Dose Lower Confidence Limit, 10 %) von 0,073 mg/kg KG/Tag als Basis für die MOE-Abschätzung herangezogen. Voraussetzung für diese Bewertung ist, dass für alle nachweisbaren PA eine dem Lasiocarpin äquivalente krebserzeugende Potenz angenommen wird. Das tatsächliche Risiko könnte mit diesem „cumulative assessment group approach“ aber überschätzt werden. Vergleichende Aussagen zur krebserzeugenden Wirkung einzelner PA sind angesichts der lückenhaften Datenlage derzeit nicht möglich. Für Stoffe mit gentoxischen und karzinogenen Wirkeigenschaften ist innerhalb der EU akzeptiert, dass bei einem MOE von 10000 und mehr die entsprechenden Expositionshöhen als wenig bedenklich betrachtet werden können (54). Dies bedeutet, dass tägliche Dosen von 0,007 Mikrogramm PA/kg KG bzw. 0,42 Mikrogramm PA für eine 60 kg schwere Person hinsichtlich möglicher Krebsrisiken als wenig bedenklich angesehen werden. Das BfR empfiehlt daher, diese Aufnahmemenge bei Berücksichtigung der Zufuhr aus allen Quellen möglichst nicht zu überschreiten. Grundsätzlich sollte aber die Gesamtexposition mit PA aus allen Lebensmitteln so niedrig wie möglich gehalten werden.

3.1.5.1 Langzeitaufnahme von PA mit Honig

Aus dem mit verschiedenen Szenarien dargestellten möglichen Konsumverhalten von Verbrauchern (vgl. Tabelle 12) zeigt sich, dass bei Kindern und Erwachsenen mit Durchschnittsverzehr, die wechselnd höher und niedriger belastete Honige ohne Markentreue verzehren (Szenario 1), mittlerer Verzehr (MW) und mittlerer Gehalt (MW)), die PA-Aufnahmen grundsätzlich unterhalb des Wertes von 0,007 Mikrogramm PA/kg KG/Tag liegen und zu der BMDL10 von 0,073 mg PA/kg KG/Tag tolerierbare MOE-Werte zwischen 17422 und 65658 bestehen.

Tabelle 12: Langzeit-Aufnahme von PA auf Basis von Modell 3 (Tabelle 10, Gehalte von Labor-2, 18 PA) über den Verzehr von Honig bei Erwachsenen und Kindern und Ausschöpfung der maximalen Tageszufuhr, die nicht überschritten werden sollte, für verschiedene Szenarien*

Verzehrs-Szenarien	Berechnungsansatz	PA-Aufnahme (Mikrogramm/kg KG/d)*		Ausschöpfung der max. Tageszufuhr ⁵ (%)		MOE ⁵ (bezogen auf BMDL10)	
		Erw.	Kinder	Erw.	Kinder	Erw.	Kinder
Szenario 1: Durchschnittsverzehr ohne Markentreue	bestimmbar ¹	0,001	0,002	17	32	60858	33055
	lower bound ²	0,001	0,002	16	29	65685	35676
	medium bound ³	0,002	0,003	24	45	43136	23429
	upper bound ⁴	0,002	0,004	32	60	32112	17442
Szenario 2: Vielverzehr ohne Markentreue	bestimmbar	0,006	0,009	90	126	11631	8264
	lower bound	0,006	0,008	83	117	12553	8919
	medium bound	0,009	0,012	127	178	8244	5857
	upper bound	0,012	0,017	170	239	6137	4360
Szenario 3: Durchschnittsverzehr mit Markentreue	bestimmbar	0,004	0,007	54	99	19394	10534
	lower bound	0,004	0,007	52	96	19965	10844
	medium bound	0,004	0,007	57	106	18168	9868
	upper bound	0,004	0,008	63	116	16556	8992
Szenario 4: Vielverzehr mit Markentreue (worst case)	bestimmbar	0,020	0,028	281	396	3706	2633
	lower bound	0,019	0,027	273	385	3815	2711
	medium bound	0,021	0,030	300	423	3472	2467
	upper bound	0,023	0,032	330	464	3164	2248

*hervorgehobene Werte liegen über der nicht zu überschreitenden Tageszufuhr von 0,007 Mikrogramm PA/ kg KG

¹bestimmbar (gemessene Werte >BG), ²lower bound (Werte < BG werden 0 gesetzt), ³medium bound (Werte < BG werden auf halbe Bestimmungsgrenze gesetzt), ⁴upper bound (Werte < BG werden auf ganze BG gesetzt)
⁵ auf Basis der nicht gerundeten Werte (Spalte PA-Aufnahme) ermittelt

Bei Durchschnittsverzehrern mit Markentreue (Szenario 3, mittlerer Verzehr (MW) und hoher Gehalt (95.P.)), die ausschließlich höher belastete Honige verzehren (z.B. einer bestimmten Marke/Sorte), kann sich bei Kindern, nicht aber bei Erwachsenen, eine Überschreitung des Wertes von 0,007 Mikrogramm PA/kg KG/Tag ergeben.

Insbesondere Vielverzehrer von Honig können aber größere Mengen von PA, die über der maximalen Tageszufuhr von 0,007 Mikrogramm/kg KG liegen, aufnehmen, selbst, wenn sie wechselnd höher und niedriger belastete Honige verzehren (Szenario 2: Vielverzehrer ohne Markentreue).

Es zeigt sich, dass Kinder aufgrund ihrer körperrgewichtbezogenen höheren Verzehrsmenge bis zu doppelt so viel PA pro Tag aufnehmen wie Erwachsene. Im Szenario 4 (worst case) Szenario, bei dem Vielverzehrer ausschließlich höher belastete Honige verzehren (hoher Verzehr (95.P.) und hoher Gehalt (95.P.)), liegen sowohl Kinder als auch Erwachsene in jedem Berechnungsansatz weit über der maximalen Tageszufuhr. Für Kinder sinkt der MOE dabei bis zu einem Wert von 2248 und für Erwachsene bis zu einem Wert von 3164 und beträgt damit nur noch weniger als ein Viertel bzw. ein Drittel des als wenig bedenklich anzusehenden MOE von 10000.

Diese Expositions-Annahme, bei der eine Person über längere Zeit einen täglich hohen Verzehr an immer hoch belastetem Honig vorweisen müsste, dürfte jedoch nur in Einzelfällen zutreffen. Grundsätzlich ist der längerfristige Verzehr von hoch belastetem Honig aber nicht ausgeschlossen, da die Hersteller eine möglichst gleichbleibende Qualität/Geschmack anstreben und dies durch konstante Mischverhältnisse von vorrätig gehaltenen Ausgangshonigen über längere Zeiträume gewährleisten.

Bezüglich der Induktion nicht-neoplastischer Schädigungen liegt der in den Expositionsszenarien angenommene ungünstigste Fall, in dem ein Kind 0,032 Mikrogramm PA/kg KG/Tag mit Honig aufnehmen würde, noch um einen Faktor von 3 unter dem niedrigsten abgeleiteten Wert von 0,1 Mikrogramm PA (Riddelliin)/kg KG/Tag, bei dem eine Verursachung von nicht-neoplastischen Schäden nicht mehr erwartet wird (37, 51).

3.1.5.2 Kurzeitaufnahme von PA mit Honig

Auch die Kurzeitaufnahmen zeigen eine höhere Belastung der Kinder im Vergleich zu Erwachsenen (vgl. Tabelle 11). Ein einmaliger maximaler Verzehr von hoch belastetem Honig ist durchaus als realistisch einzuschätzen.

Für eine dosisorientierte Risikoabschätzung ist der Vergleich mit den unter 3.1.2.3.1 geschilderten Vergiftungsfällen bei Kindern geeignet. Die geschätzte Aufnahme einer Alkaloidmischung mit Riddelliin und Retrorsin-N-Oxid als Hauptbestandteile hatte bei einem 2 Monate alten Jungen in Dosen von 3 mg/kg KG/Tag (= 3000 Mikrogramm/kg KG/Tag) über 4 Tage zum Tode geführt und bei einem 6 Monate alten Mädchen in Dosen von 0,8 - 1,7 mg/kg KG/Tag (= 800 - 1700 Mikrogramm/kg KG/Tag) über 14 Tage nach Aszites und Pleuraerguss nach 2 Monaten eine Leberfibrose verursacht, die nach 6 Monaten in eine Leberzirrhose übergegangen war.

Geht man von dem angenommenen ungünstigsten Fall in den Expositionsszenarien aus (Szenario 4, worst case), in dem ein Kind 0,112 Mikrogramm PA/kg KG/Tag mit Honig aufnehmen würde, ergibt sich zu der letalen Dosis bei dem Jungen ein Abstand von über Faktor 26786 und der Leberzirrhose-verursachenden Dosis bei dem Mädchen ein Abstand von Faktor 7143 bis 15179. Die für die kurzfristige Exposition berechnete Aufnahme von 0,112 Mikrogramm PA/kg KG/Tag überschreitet selbst den für wiederholte längerfristige Aufnahme abgeleiteten Wert von 0,1 Mikrogramm PA (Riddelliin)/kg KG/Tag, bei dem eine Verursachung von nicht-neoplastischen Schäden nicht mehr erwartet wird, nur vernachlässigbar (37, 51). Daher wird in der kurzfristigen Aufnahme von PA mit Honig in Dosen, die den in Tabelle 11 dargestellten Szenarien entsprechen, kein Risiko für eine akute Toxizität gesehen.

3.2 Schlussfolgerungen, Handlungsrahmen und Maßnahmen

Basierend auf der Gesamtheit experimenteller Befunde zu Metabolismus, Aktivierungsmechanismus, DNA-Adduktbildung, Gentoxizität und Karzinogenität muss in Betracht gezogen werden, dass PA auch beim Menschen karzinogen wirken können. Die bestehende lückenhafte Datenlage erlaubt jedoch keine gesicherten Aussagen dazu, wie sich die einzelnen PA in ihrem karzinogenen Potenzial und ihrer Toxizität unterscheiden.

Zur Bewertung möglicher durch längerfristige Exposition mit PA resultierender Risiken (insbesondere krebsauslösender Wirkungen) wird die Anwendung von Äquivalenzfaktoren, die auf dem Verhältnis der nach i.p.-Verabreichung der einzelnen PA an Ratten ermittelten LD 50- Werte beruhen, für nicht geeignet gehalten, da sie möglichen Unterschieden einzelner PA in der Toxikokinetik nach oraler Applikation und in der Toxikodynamik nach längerer Exposition nicht Rechnung trägt.

Grundsätzlich empfiehlt das BfR, die Gesamtexposition mit karzinogen wirkenden Pyrrolizidinalkaloiden aus verschiedenen Lebensmitteln so niedrig wie möglich zu halten. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand sollte eine maximale Tageszufuhr von 0,007 Mikrogramm PA/kg Körpergewicht bzw. 0,42 Mikrogramm PA für eine 60 kg schwere Person möglichst nicht überschritten werden. Hierbei wird eine summarische Erfassung vorhandener PA für geeignet gehalten. Bei diesem „cumulative assessment group approach“ kann möglichen Unterschieden der PA bezüglich der kreberzeugenden Potenz wegen fehlender Daten keine Rechnung getragen werden.

Im Hinblick auf die gentoxische und karzinogene Wirkung der PA werden Anstrengungen für notwendig erachtet, die PA-Gehalte im Honig zu senken, um ein möglicherweise erhöhtes Krebsrisiko für Vielverzehrer von Honig und insbesondere für Kinder, bei denen eine höhere Empfindlichkeit für PA-bedingte Effekte in Betracht zu ziehen ist, zu minimieren. Diese Maßnahme wird u.a. auch im Hinblick darauf für erforderlich gehalten, dass eine mögliche zusätzliche PA-Exposition durch andere Lebensmittel hinzukommen könnte, die bei der vorliegenden Bewertung wegen fehlender Daten nicht berücksichtigt werden konnte.

Aufnahmen von PA durch Nahrungsergänzungsmittel, wie z. B. Produkte, die Pollen PA-haltiger Pflanzen enthalten, erscheinen durch geeignete Maßnahmen vermeidbar.

Rohhonige aus Mittel- und Südamerika sowie Asien zeigen im Vergleich zu Rohhonigen aus den meisten europäischen Ländern gemäß den dem BfR vorgelegten Auswertungen deutlich höhere mittlere PA-Gehalte und häufig höhere Kontaminationsraten (% PA-positiv). Zu Rohhonigen aus weiteren Ländern, die unter Umständen ebenfalls hohe PA-Gehalte aufweisen könnten (z. B. aus Neuseeland, PA-Gehalte bis 1 mg/kg Honig (49)), liegen keine Daten vor. Aufgrund der ungenügenden Datenlage ist eine detaillierte Analyse von Zusammenhängen

zwischen der geographischen Herkunft der Rohhonige und ihrer PA-Belastung derzeit nicht möglich.

Eine selektive Auswahl der Rohhonige, die zur Herstellung von Fertigware verwendet werden, könnte zu einer Reduzierung der PA-Gehalte in verzehrsfertigen Honigen beitragen. Deutliche Vorbehalte bestehen gegenüber der Senkung der PA-Gehalte hochbelasteter Rohhonige durch Mischung mit weniger belasteten Honigen, da dadurch die Gesamtbelastung der Bevölkerung mit den als karzinogen angesehenen PA nicht gesenkt würde und dies auch dem Prinzip widersprechen würde, die Belastung der Verbraucher mit Stoffen, denen karzinogenes Potenzial zugeschrieben wird, so niedrig wie möglich zu halten. Die Einhaltung dieses Grundsatzes ist auch im Hinblick auf mögliche synergistische Effekte mit anderen Lebensmittelkontaminanten mit karzinogenem Potenzial zu fordern.

Es ist davon auszugehen, dass ein geringer Teil des in Deutschland verzehrten Honigs unmittelbar der Kategorie „Rohhonig“ zuzuordnen ist, da er vom Imker direkt an den Verbraucher abgegeben wird bzw. in den Einzelhandel gelangt. Auf dem deutschen Markt dürften diese Honige vorwiegend aus Deutschland stammen. Direkt zum Verzehr bestimmte ungemischte Rohhonige können aber, z.B. als Spezialitäten in Form bestimmter Sortenhonige, auch als Importware in den deutschen Handel kommen. Verbraucher, die vorrangig regionalen, in Deutschland geernteten Rohhonig verzehren, können eine abweichende PA-Aufnahme zu der auf Grundlage der gemischten Fertigware geschätzten Exposition haben. Legt man die nach Herkunftsland ausgewerteten Gehaltsdaten für Rohhonige von Labor-2 zugrunde (Tabellen 2 bis 4), würde sich aufgrund der geringeren durchschnittlichen PA-Gehalte der deutschen Rohhonige im Vergleich zur hier ausgewerteten Fertigware (Tabelle 7) eine geringere PA-Aufnahme ergeben. Unsicherheiten bestehen darin, dass keine weiteren Informationen zu den Berechnungsmodellen (z.B. Umgang mit Werten < BG) vorlagen und damit eine Einschätzung der Daten erschwert wird.

Das BfR weist darauf hin, dass die geographische Provenienz eines Honigs für den Verbraucher erkennbar ist, da sie gemäß der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (in der aktuellen Fassung) auf der Verpackung angegeben werden muss. Dies erfolgt entweder durch die Angabe des Ursprungslandes oder der Ursprungsländer oder durch die Kennzeichnung "Mischung von Honig aus EG-Ländern", "Mischung von Honig aus Nicht-EG-Ländern" oder "Mischung von Honig aus EG-Ländern und Nicht-EG-Ländern".

Eine weitere Überprüfung des Vorkommens von PA im Honig wird für notwendig erachtet. In diese Analysen sollten auch ungemischte oder uniflorale Honige lokaler Anbieter oder aus Importen einbezogen werden. Es ist ungewiss, ob diese Honige, die bei möglicher regionaler Dominanz PA-haltiger Pflanzen erhöhte PA-Gehalte aufweisen könnten, bei den vorgelegten Untersuchungsbefunden Berücksichtigung fanden.

Aussagekräftige Daten, wie das Ausmaß der Kontamination von Honigen mit einzelnen PA mit der geographischen und botanischen Provenienz der Honige korreliert, sind nur eingeschränkt verfügbar, sind aber von grundsätzlichem Interesse, um Strategien der Risikominimierung zu entwickeln. Sie stellen darüber hinaus die Basis dafür dar, dem Verbraucher bei entsprechender Kennzeichnung die Auswahl von Honigen mit niedriger PA-Belastung zu ermöglichen.

Insgesamt wird die Datenlage zur Toxikologie der ungesättigten Pyrrolizidinalkaloide und zum Vorkommen von PA in Lebens- und Futtermitteln für eine umfassende und abschließende Risikobewertung nach wie vor als nicht ausreichend angesehen. Aufgrund der durch die mangelnde Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen eingeschränkten Leistungsfähigkeit der analytischen Methoden hinsichtlich der erfassbaren Analyten geben die vorliegenden analytischen Befunde zum Vorkommen von PA im Honig nur ein unvollständiges Bild der

tatsächlich bestehenden Kontamination von Honigen mit einzelnen PA. Es muss in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise toxikologisch relevante PA mit den angewandten Methoden nicht erfasst und bestimmt wurden.

Forschungsbedarf besteht bezüglich der Erarbeitung von Analysemethoden (chemisch-analytisch und wirkungsbezogene Analytik) von PA im Honig. Abgesehen vom Vorkommen im Honig, sollten auch zum Ausmaß der Kontamination anderer Lebensmittel (Blattsalate, Kräutertee, Getreide, Milch/Käse, Eier, Fleisch) Daten erhoben und entsprechende Analysemethoden für die Lebensmittel- und Futtermittelkontrolle etabliert werden.

Forschungsbedarf wird auch bezüglich der toxikologischen Charakterisierung einzelner in Lebensmitteln vorkommender PA gesehen, insbesondere zur oralen Bioverfügbarkeit von PA, da diese für die Risikoabschätzung relevant ist.

Ergänzend zu nennen ist ein Untersuchungsbedarf zur Korrelation zwischen dem Ausmaß der PA-Belastungen von Lebensmitteln, wie Honig, und ihrer geographischen und ggf. botanischen Herkunft. Die Erforschung von Zusammenhängen über das Vorkommen PA-haltiger Pflanzen in der regionalen Vegetation mit der PA-Belastung von Lebensmitteln, die dieser Region entstammen, dürfte Ansatzpunkte für Maßnahmen der Risikominimierung geben.

Das BfR unterstützt die Empfehlung zur Einrichtung eines „Code of Practice“ zur Vermeidung und Reduzierung der Kontamination von Lebens- und Futtermittel mit PA, die kürzlich in dem „Discussion Paper on Pyrrolizidine alkaloids“ einer Arbeitsgruppe der Codex Committee on Contaminants in Food abgegeben wurde (3).

Die vorliegende Bewertung stützt sich auf die derzeit dem BfR verfügbaren Daten. In Hinblick auf die erheblichen Wissenslücken ist die Risikobewertung als vorläufig zu betrachten.

Das BfR weist darauf hin, dass demnächst eine Risikobewertung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) von PA in Lebensmitteln und Futtermitteln zu erwarten ist.

3.3 Referenzen

1. IPCS International Programme on Chemical Safety; 1988. Environmental Health Criteria 80, Pyrrolizidine Alkaloids; WHO.
2. Mattocks AR; 1986. Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. Academic Press.
3. JOINT FAO/WHO, 2011. Discussion Paper on Pyrrolizidine Alkaloids, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Contaminants in Foods, 5th Session, The Hague, The Netherlands, 21 – 25 March 2011.
4. Wiedenfeld H, Roeder E, Bouaul T, Edgar J; 2008. Pyrrolizidine Alkaloids – Structure and Toxicity, V&R unipress, Bonn University Press, Goettingen, Germany.
5. Teuscher und Lindequist: Biogene Gifte. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2010.
6. Smith LW and Culvenor CCJ; 1981. Plant sources of hepatotoxic *pyrrolizidine alkaloids*. J. Nat. Prod. 44, 129–152.

7. Hartmann T, Witte L; 1995. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, S.W. Pelletier (ed). Vol 9. pp 155-233.
8. Bericht des BfR vom 04.06.2010: Pyrrolizidinalkaloide (PA) in Honig - Ergebnisprotokoll zum Expertengespräch vom 04. März 2010 (AZ 82-3812-00-5653489).
9. BfR-Stellungnahme Nr. 028/2007 vom 10.01.07; Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloidhaltigem Greiskraut verunreinigt.
http://www.bfr.bund.de/cm/208/salatmischung_mit_pyrrolizidinalkaloid_haltigem_geiskraut_verunreinigt.pdf
10. Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U; 2004. Biogene Arzneimittel; 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
11. Röder E; 1992. Pyrrolizidinalkaloidhaltige Arzneipflanzen. Deutsche Apotheker Zeitung, 132. Jahrgang, Nr. 45: 2427-2435.
12. National Institutes of Health; December 1993. NTP Technical Report on Toxicity Studies of Riddelliine administered by gavage to F344/N rats and B6C3P1 mice; NIH Publication No. 94-3350.
13. Bundesanzeiger Nr. 111, S. 4805 v. 17.6.1992. Pyrrolizidin-Alkaloide, Stufe II Abwehr von Arzneimittelrisiken. Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln, vom 5. Juni 1992, Bescheid.
14. Danninger T, Hagemann U, Schmidt V, Schönhöfer PS; 1983. Zur Toxizität Pyrrolizidinalkaloidhaltiger Arzneipflanzen. Pharmazeutische Zeitung, 128. Jahrgang, Nr.6: 289-303.
15. v. Borstel K, Witte L, Hartmann T; 1989. Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. Phytochemistry, Vol. 28/6: 1635-1638.
16. Xia Q, Chou MW, Kadlubar FF, Chan PC, Fu PP; 2003. Human liver microsomal metabolism and DNA adduct formation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine. Chem. Res. Toxicol. 16: 66-73.
17. Wang YP, Yan J, Fu PP, Chou MW; 2005. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. Toxicol. Lett. 155(3): 411-420.
18. Xia Q, Chou MW, Edgar JA, Doerge D, Fu PP; 2006. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. Cancer Lett. 231(1): 138-145.
19. Fu PP, Xia Q, Chou MW and Lin G; 2007. Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. J. Food Drug Anal. 15(4): 400-415.
20. National Institutes of Health; May 2003. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of Riddelliine in F344/N rats and B6C3F1 mice; NIH Publication No. 03-4442.

21. WHO; 1976. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to man; Volume 10.
22. WHO; 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volume 82.
23. Kakar F, Akbarian Z, Leslie T, Mustafa ML, Watson J, van Egmond HP, Omar MF, Mofleh J 2010. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Toxicology*, 2010, Article ID 313280.
24. Röder E; 1984. Wie verbreitet und wie gefährlich sind Pyrrolizidinalkaloide? *Pharmazie in unserer Zeit*, 13. Jahrg., Nr. 2.
25. Pohlenz J, Lüthi J; 1981. Enzootisches Auftreten einer Pyrrolizidinalkaloid-Zirrhose beim Rind nach Aufnahme von *Senecio alpinus* (Alpenkreuzkraut); *Wschr.* 111, Nr. 24.
26. Kim HY, Stermitz FR, Li JKK, Coulombe JrRA; 1999. Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 37: 619-625.
27. Brown PH; 1956. Seneciosis or grass staggers of horses in Basutoland. *Bull.epiz.Dis.Afr.*, Vol. 4: 285.
28. Bull LB, Culvenor CCJ, Dick AT; 1968. The pyrrolizidine alkaloids. Their chemistry, pathogenicity and other biological properties. North-Holland Publishing Company Amsterdam.
29. Sedlmaier H, Dahme E, Schiefer B; 1959. Frühveränderungen an der Rattenleber nach Fütterung von *Senecio vulgaris* (Kreuzkraut) und von p-Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb). *Zbl. Vet. Med.*, Vol. 6: 854-871.
30. IPCS Inchem; March 1990. Poisons information, *Senecio vulgaris* L.; www.inchem.org/.
31. Altaee MY, Mahmood MH; 1998. An outbreak of veno-occlusive disease of the liver in northern Iraq. *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol. 4/1: 142-148.
32. Huxtable RJ; 1980. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspectives in Biology and Medicine*, Vol. 24/1:1-14.
33. WHO; 1987. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volumes 1 to 42, Supplement 7.
34. NTP; 1978. Bioassay of Lasiocarpine for possible carcinogenicity. NTP Technical Report 39, 1-66.
35. WHO; 1983. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; Volume 31.
36. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW; 2004. Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, Vol. 36/1: 1-55.

37. COT Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food; 2008. Food Standard Agency.
38. Stillman AE, Huxtable RJ, Consroe P, Kohnen P, & Smith S; 1977. Hepatic veno-occlusive disease due to pyrrolizidine poisoning in Arizona. *Gastroenterology*, 73: 349-352.
39. Fox DW, Hart MC, Bergeson PS, Jarrett PB, Stillman AE & Huxtable RJ; 1978. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye's syndrome. *J. Paediatr.*, 93: 980-982.
40. Huxtable RJ; 1980. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspect. Biol. Med.*, 24: 1-14.
41. Ridker, PM, Ohkuma, S, McDermott, WV, Trey, C, Huxtable, RJ; 1985. Hepatic Venocclusive Disease Associated With the Consumption of Pyrrolizidine - Containing Dietary Supplements. *Gastroenterology* 88, 1050-1054.
42. Kumana CR, Ng M, Lin HJ, Ko W., WU PC & Todd D; 1983. Hepatic veno-occlusive disease due to toxic alkaloid in herbal tea - letter to the editor. *Lancet*, 10 December: 1360-1361.
43. Kumana CR, Lin M Ng, H J, Ko W, Wu PC, and Todd D, 1985: Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. *Gut* 26(1): 101-104.
44. Culvenor CCJ, Edgar JA, Smith LW, Kumana CR & Lin HJ; 1986. *Heliotropium lasiocarpum* Fisch and Mey identified as cause of veno-occlusive disease due to a herbal tea. *Lancet*, 1: 978.
45. Datta DV, Khuroo MS, Mattocks AR, Aikat BK & Chhuttanni PN; 1978. Herbal medicines and veno-occlusive disease in India. *Postgrad. med. J.*, 54: 511-515.
46. Tandon BN, Tandon HD, Tandon RK, Narendranathan M and Joshi YK; 1976. An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *Lancet*, 7 August: 271-272.
47. Krishnamachari KAVR, Bhat RV, Krishnamurthy D, Krishnaswamy K & Nagarajan; 1977. Aetiopathogenesis of endemic ascites in Sarguja district of Madhya Pradesh. *Indian J. med. Res.*, 65: 672-678.
48. Mohabbat O, Srivastava RN, Younos MS, Sediq GG, Menzad AA & Aram GN; 1976. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afghanistan. *Lancet*, 7 August: 269-271.
49. ANZFA (Australia New Zealand Food Authority); 2001. Pyrrolizidine Alkaloids in Food. A Toxicological Review and Risk Assessment. Technical report series no.2. Canberra, Australia. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/TR2.pdf
50. DFG – Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM), Stellungnahme zu Pyrrolizidinalkaloiden in Honigen, Imkereierzeugnissen und Pollenprodukten, Beschluss vom 8. Nov. 2002 (URL: http://www.dfg.de/aktuelles_presse/reden_stellungnahmen/2003/download/sklm_pa_honig_170403end.pdf ; Stand 24.09.2009).

51. RIVM; 2005. Advisory report on pyrrolizidine alkaloids in herb preparations.
52. EFSA, European Food Safety Authority; 2007. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to Pyrrolizidine Alkaloids as undesirable substances in Animal Feeds. The EFSA Journal (2007) 447, 1-51. Parma : http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178621166892.htm, January 25, 2007.
53. Request for an EFSA opinion on the risks for animal and public health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in food and feed; 21/07/2010, Question No. EFSA-Q-2010-01004, Mandate No. M-2010-0310.
54. EFSA; 2005. Gutachten des Wissenschaftlichen Ausschusses auf Ersuchen der EFSA in Bezug auf einen harmonisierten Ansatz für die Risikobewertung von Substanzen mit genotoxischen und karzinogenen Eigenschaften. The EFSA Journal 282, 1-30.
55. Crews C, Berthiller F, Krska R; 2010. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. Anal Bioanal Chem 369, 327-338.
56. Kempf M, Beuerle T, Bühringer M, Denner M, Trost D, von der Ohe K, Bhavanam VB, and Schreier P; 2008. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Mol Nutr Food Res 52: 1193 – 1200.
57. Kempf M, Wittig M, Reinhard A, von der Ohe K, Blacquièrre T, Ræzke KP, Michel R, Schreier P, Beuerle T; 2011. Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. Food Add Contam 28, 332-347.
58. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ; 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid phase extraction for the determination of pesticide residues in products. J AOAC Int. 86, 412-431
59. Betteridge K, Cao Y, Colegate S; 2005. Improved Method for Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Honey: Application to Echim vulgare Honeys. J Agric Food Chem 53, 1894-1902.
60. Dübecke A, Beckh G, Lüllmann C; 2011. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. Food Add Contam 28, 348-358.
61. Max Rubner-Institut (MRI); 2008. Nationale Verzehrsstudie II (NVS II), Ergebnisbericht 1, 2, <http://www.was-esse-ich.de/>
62. Little RJA, Rubin DB; 2002. Statistical Analysis with Missing Data. John Wiley & Sons, New York. S. 66ff.
63. Hesecker H, Oeppinger A, Vohmann C; 2003. Verzehrsstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen und Kleinkindern für die Abschätzung eines akuten Toxizitätsrisikos durch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln (VELS). Forschungsbericht im Auftrag des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Universität Paderborn.

64. Deinzer ML, Thomson PH, et al.; 1977. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from Tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L). *Science* 195: 497–499.
65. Crews C, Startin JR, Clarke PA; 1997. Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. *Food Addit. Contam* 14: 419–428.
66. RIVM Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIKILT, Institute of Food Safety, Risicobeoordeling inzake de Aanwezigheid van Pyrrolizidine Alkaloiden in Honing, Wageningen, The Netherlands 2007. In: Kempf M, Schreier P, Reinhard A, Beuerle T; 2010. Pyrrolizidinalkaloide in Honig und Pollen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5:393–406.
67. Foods Standards Agency (FSA 2007) Collection and Analysis of Honey Samples Potentially Contaminated with Pyrrolizidine Alkaloids from Ragwort and Borage. Research Project T01037.
68. Culvenor CCJ; 1980. Alkaloids and Human Disease : In: *Toxicology in the Tropics* Eds. R.L. Smith and E.A. Bababunmi. Taylor & Francis Ltd. London, pp 124 -141.
69. Beales KE, Betteridge K, et al.; 2004. Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honey. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6664-6672.
70. Kempf M, Schreier P, Reinhard A, Beuerle T; 2010. Pyrrolizidinalkaloide in Honig und Pollen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5:393–406.
71. Kempf M, Wittig M, Schönfeld K, Cramer L, Schreier P, Beuerle T; 2011. Pyrrolizidine alkaloids in food: downstream contamination in the food chain caused by honey and pollen. *Food Addit Contam.* 28:325–331.
72. Kempf M, Heil S, Haßlauer I, Schmidt L, von der Ohe K, Theuring C, Reinhard A, Schreier P, Beuerle T; 2010. Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 292–300.