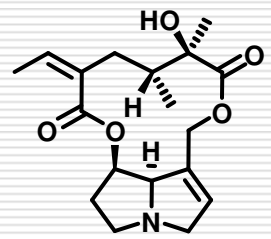
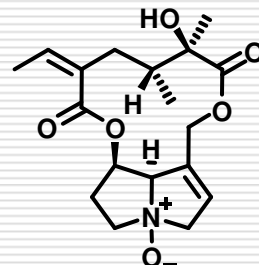


Pyrrolizidin-Alkaloide (PA) in Honig und Pollen



Senecionin



Senecionin-N-Oxid



Motivation

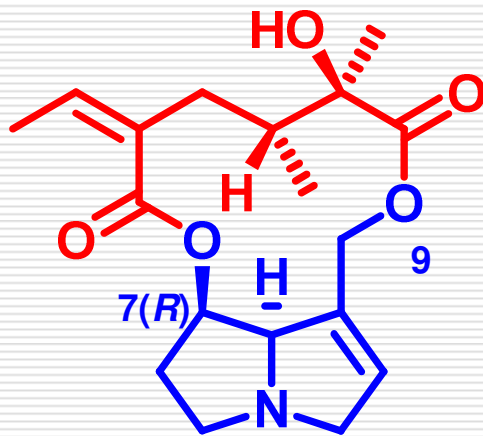
- Datenlage zu Gehalten von PA in Honigen (einschließlich Imkereierzeugnissen und Pollenprodukten) lückenhaft (SKLM 2002)
- Ziel des Projekts:
 - ➔ Entwicklung einer Methode zur selektiven und sensitiven Analytik (0.1 ppm) von PA in Honig und Pollen
 - ➔ Erarbeitung einer verlässlichen Datengrundlage über das Vorkommen von PA in diesen Produkten

Grenzwerte für Phytopharmaka¹:

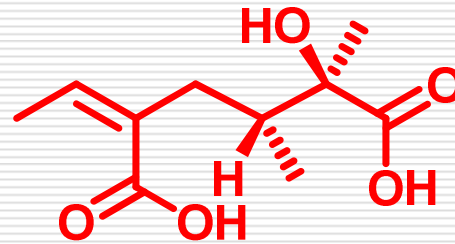
- innere Anwendung: 1 µg/Tag (<6 Wochen/Jahr); 0.1 µg/Tag (>6 Wochen/Jahr)
- äußere Anwendung: 100 µg/Tag (<6 Wochen/Jahr); 10 µg/Tag (>6 Wochen/Jahr)
- Schwangere und Stillende:
 - innere Anwendung: keine Benutzung
 - externe Anwendung: nach Rücksprache mit dem Arzt

¹⁾ für PA mit 1,2-ungesättigtem Necingerüst sowie deren N-Oxide

Pyrrolizidin-Alkaloide – Struktur I

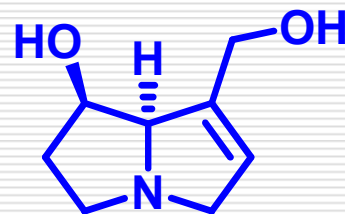


Senecionin

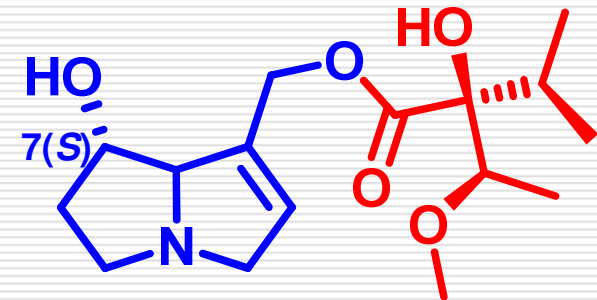


Necin-Säure

Necin-Base



Retronecin



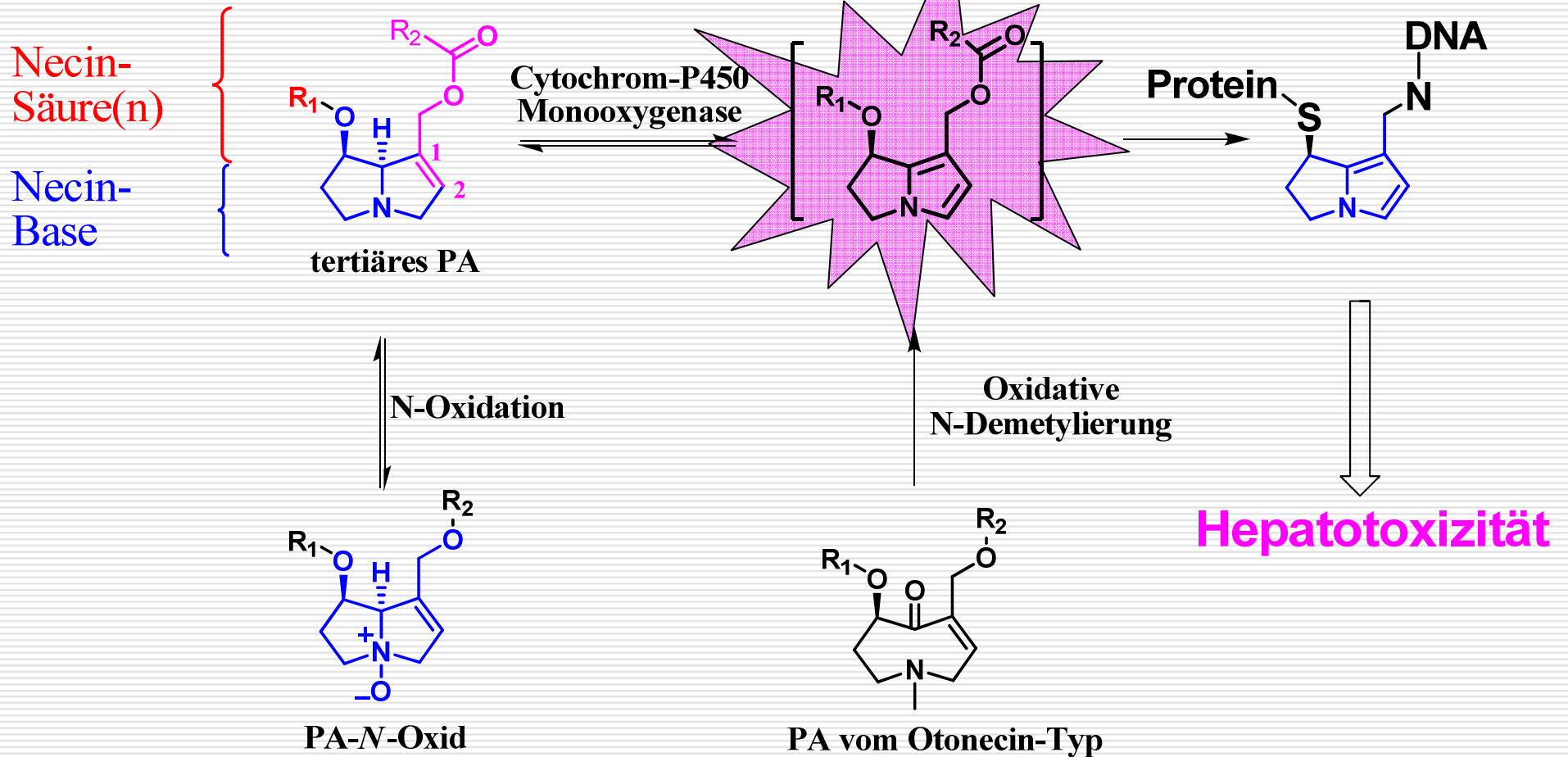
Heliotrin

- typische sekundäre (toxische) Pflanzeninhaltsstoffe
- ca. 380+ Strukturen aus 600 Pflanzen bekannt

Akute Toxizität / Genotoxizität

Akute Toxizität:

1,2-Doppelbindung + Makrocyclische Ester > Diester > Heliotridin-Monoester > Retronecin-Monoester

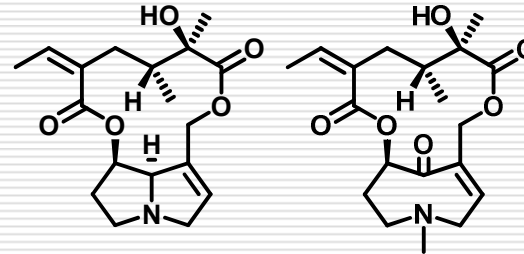


Nektarpflanzen / Verbreitung / Strukturen

Senecio spp.

Eupatorium spp.

Asteraceae



Echium spp.

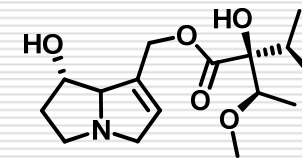
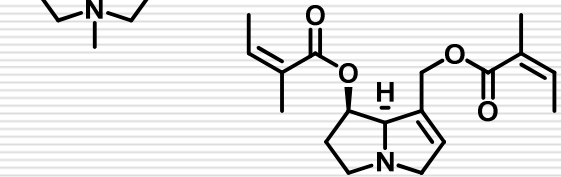
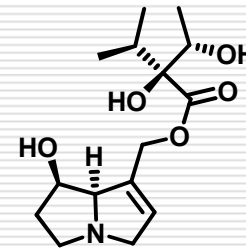
Borago off.

Symphytum off.

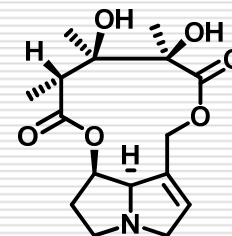
Heliotropium spp.

[*Crotalaria* spp.]

Boraginaceae



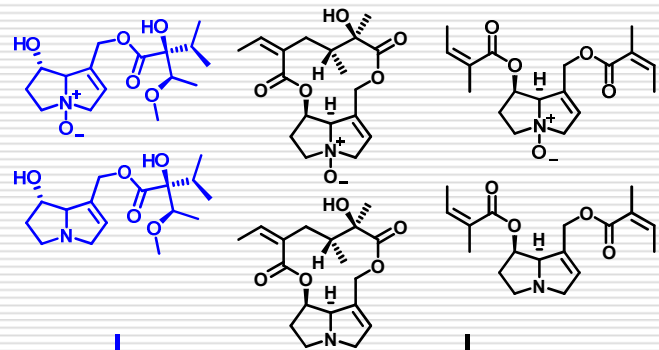
Fabaceae



Nektarpflanzen / Verbreitung / Strukturen



Analytische Methode I



Zugabe des **internen Standards Heliotrin** (2µg/20g)

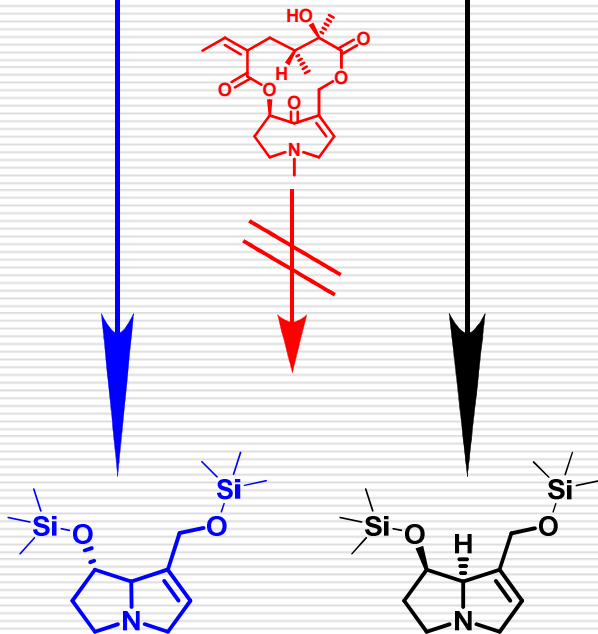


Zink-Reduktion
→ N-Oxide in tertiäre PA

Festphasenextraktion
Konzentrierung an SCX



LiAlH₄-Reduktion
→ PA-Ester in Retronecin/Heliotridin



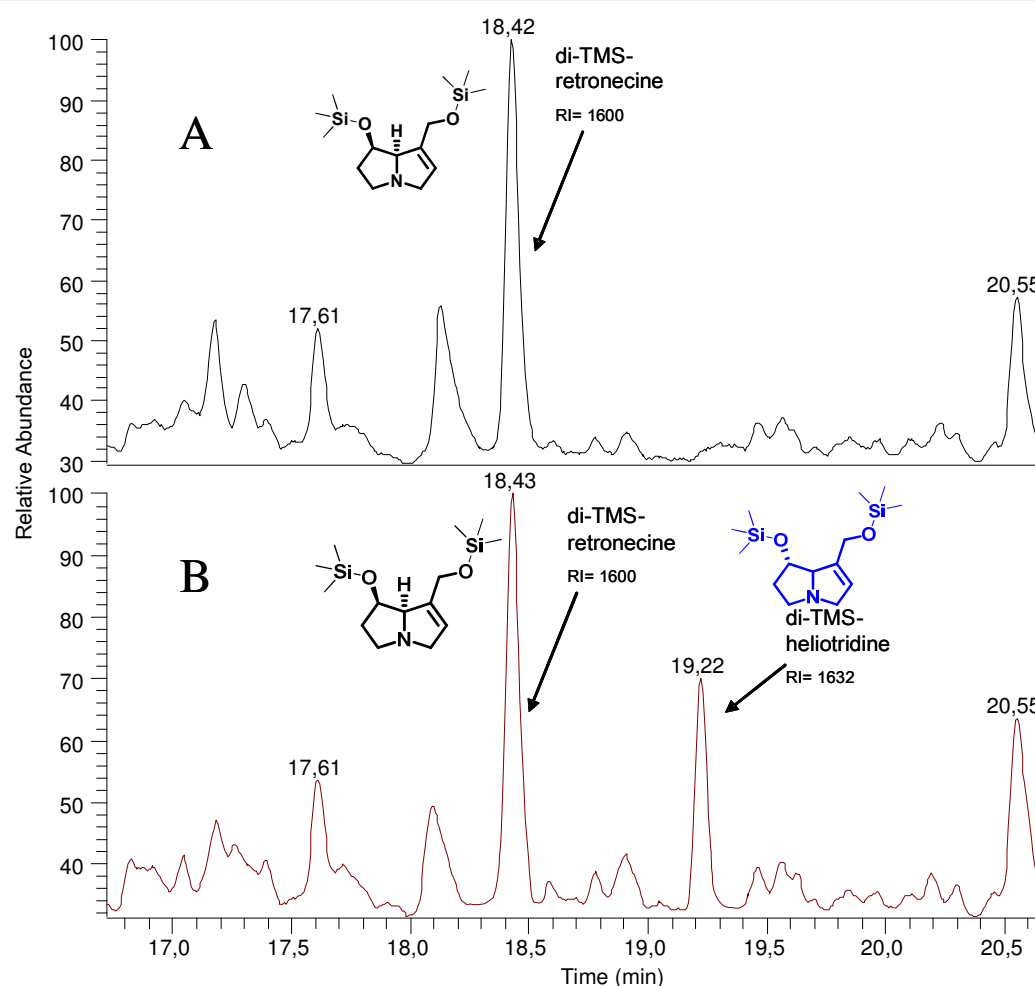
**Di-TMS-
Heliotridin**

**Di-TMS-
Retronecin**

Derivatisierung mit MSTFA
→ GC-MS Analytik



Analytische Methode II



Honig-Probe # 21A

Honig-Probe # 21B
+ interner Standard
(Heliotrin → di-TMS-Heliotridin)

LOQ: 10ng/g (0.01ppm)

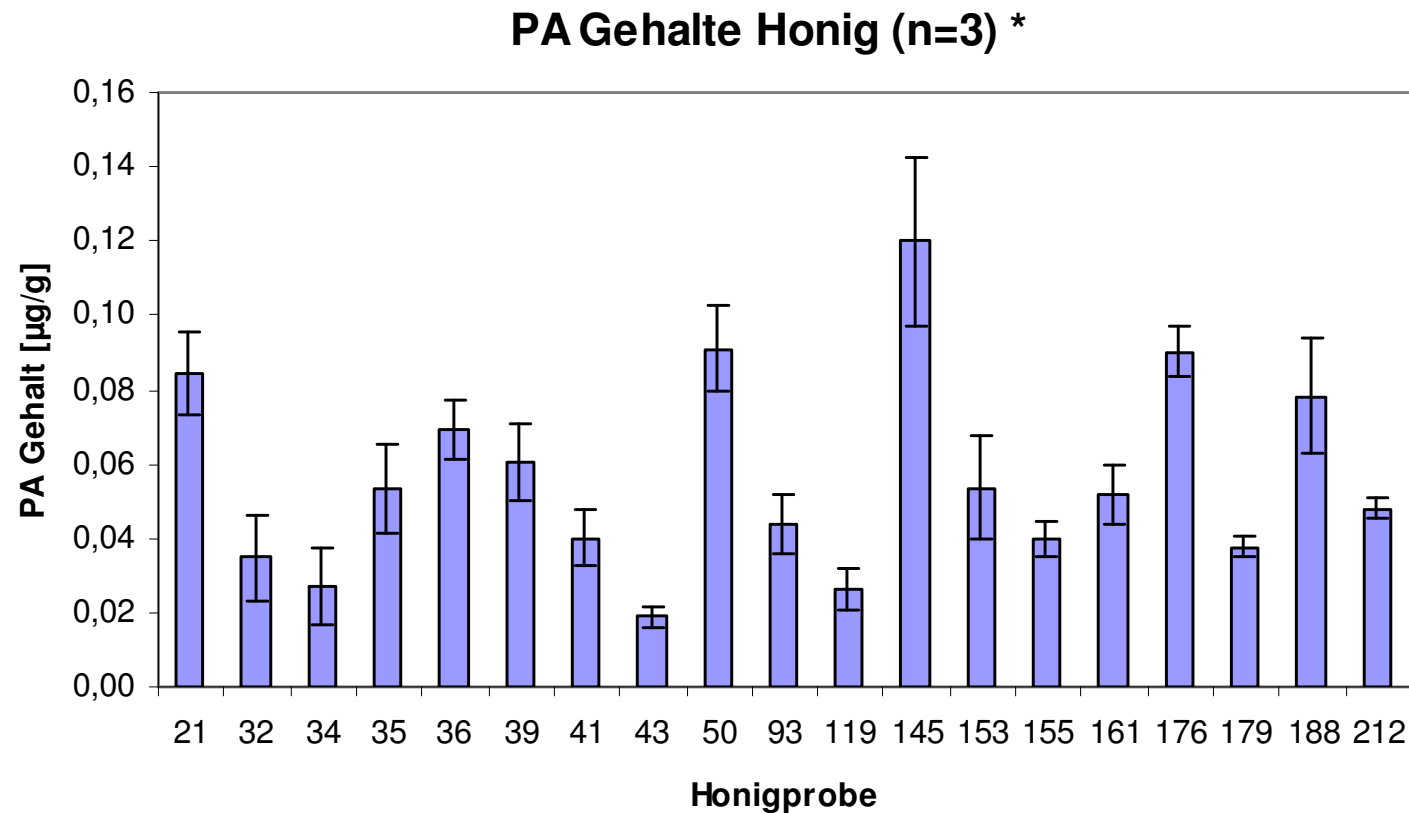
- bei allen untersuchten Honig- und Pollenproben (n=216/n=55) wurden nie natürlich vorkommende Heliotridin-PA gefunden
- alle Proben waren mit dieser Methode quantifizierbar

PA in Honig: Wissensstand

- Deinzer et al., 1977, Science: GC-MS, *Senecio jacobaea* (n=4) 0.3-3.9 µg/g
- Culvenor et al., 1981, J.Agric.Food.Chem.: GC-MS *Echium plantagineum* (n=5) 0.27-0.95 µg/g
- Crews et al., 1997, Food Add. Cont.: LC-MS, *Senecio jacobaea* (n=23) 0.002-1.48 µg/g
- Beales et al., 2004, J.Agric.Food.Chem.: LC-MS, *Echium plantagineum*, *H. europaeum*, *H. amplexicaule* (n=68, LOD:1ng/g) 0.03-2.2 µg/g
- Betteridge et al., 2005, J.Agric.Food.Chem.: LC-MS, *Echium vulgare* (n=9, LOD: 1ng/g) 0.017-2.85 µg/g
- NL, Nahrungsmittel- und Warenamt: 2007, LC-MS, *Senecio jacobaea* (n=171, 28%, Ø: 0.007 µg/g, LOD: 1 ng/g) 0.001-0.365 µg/g

PA in Honig: Ergebnisse I

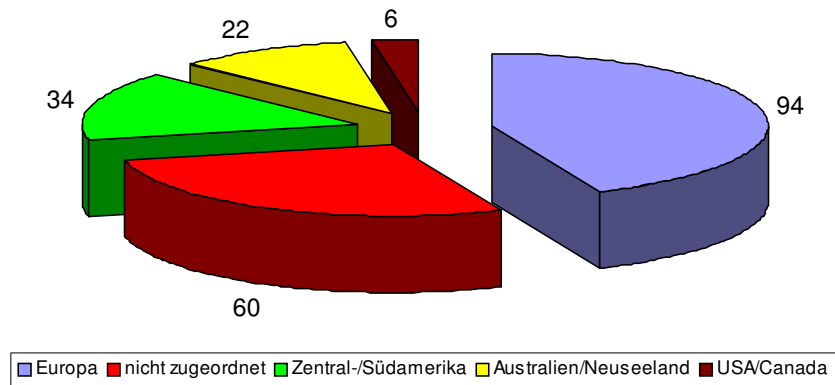
- non-target Analyse von 216 Honigen (19 PA-positiv; 9%)
- Bereich*: 0.02µg/g – 0.12µg/g, Ø 0.06µg/g



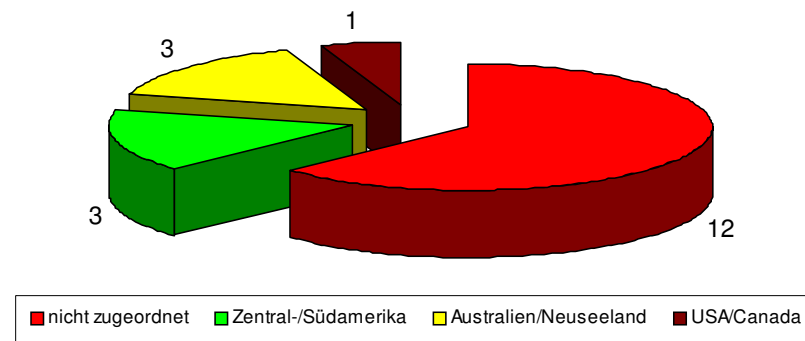
*) PA-Gehalt berechnet als Heliotridin/Retronecin-Äquivalente

PA in Honig: Ergebnisse II

Regionale Verteilung der untersuchten Proben



Regionale Verteilung der PA-positiven Proben



PA in Pollen: Wissensstand

2005

Boppré et al., *J.Agric.Food.Chem.*:

- *Echium vulgare* (Boraginaceae)
- nativer Pollen
- LC-MS, 8-14mg/g

2008

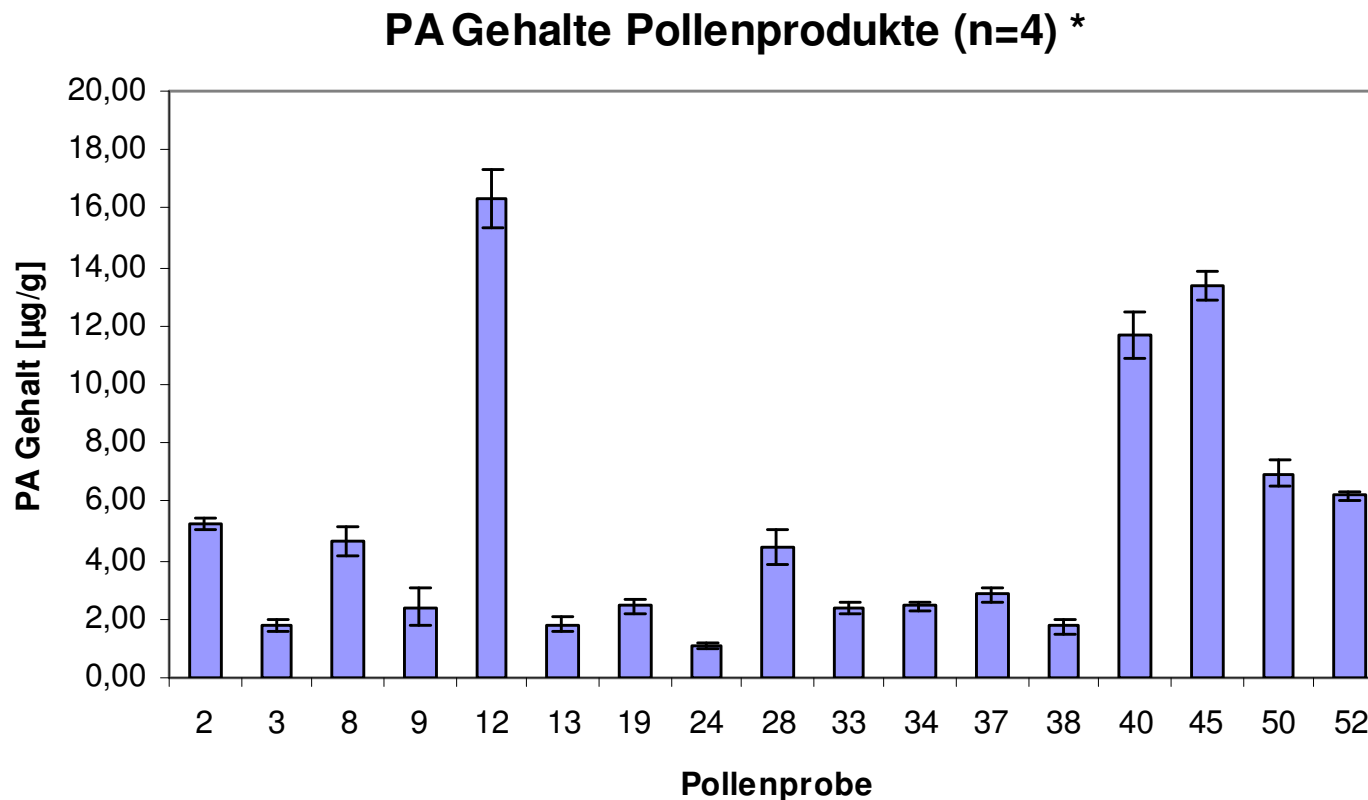
Boppré et al., *J.Agric.Food.Chem.*:

- Pollenhöschen, LC-MS, u.a.:
 - *Echium vulgare* (Boraginaceae): 350µg/g
 - *Echium plantagineum* (Boraginaceae): 6-28µg/g
 - *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae): 120µg/g
 - *Senecio jacobaea* (Asteraceae): 100µg/g
 - *Senecio ovatus* (Asteraceae): 70µg/g



PA in Pollenprodukten: Ergebnisse I

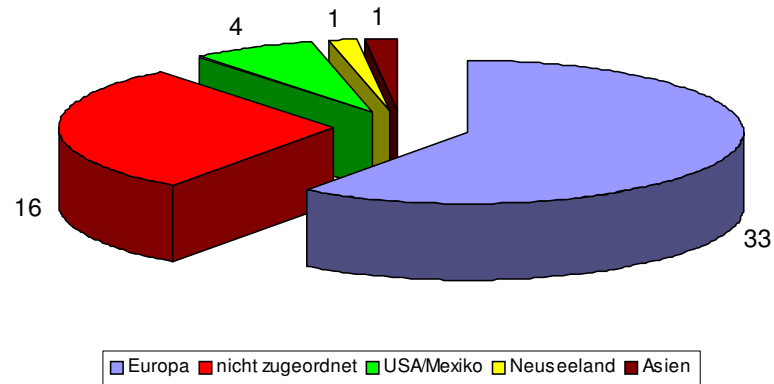
- non-target Analyse von 55 Pollenprodukten (17 PA-positiv; 31%)
- Bereich*: 1.08µg/g – 16.35µg/g, Ø 5.17µg/g



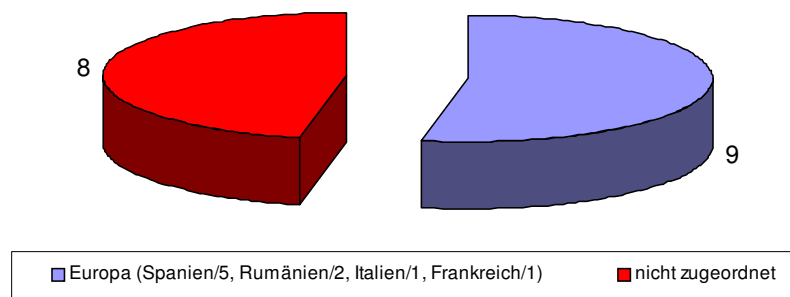
*) PA-Gehalt berechnet als Heliotridin/Retronecin-Äquivalente

PA in Pollenprodukten: Ergebnisse II

Regionale Verteilung der untersuchten Proben



Regionale Verteilung der PA-positiven Proben



PA in Honig / Pollen: Diskussion I

Deutschland

- **Bundesanzeiger, 1992, June 17, 4805**

Phytopharmaka: 1,2 ungesättigte PA max. 1µg/Tag bzw. 0.1µg/Tag und Nulltoleranz für Schwangere und Stillende

Niederlande

Europa

- **Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Positionspapier des BfR vom 12. März 2007**

USA

Bei der Bewertung der **Verunreinigungen** von Lebensmitteln **durch Pflanzenteile oder Pflanzenbestandteile** die toxikologisch relevante Stoffe enthalten ...wird unterschieden, ob einerseits akut-toxische oder andere nicht-genotoxische Effekte (z.B. THC, Morphin) oder andererseits **genotoxische Effekte (z.B. Pyrrolizidinalkaloide) des pflanzlichen Wirkprinzips im Vordergrund der Risikobewertung stehen.**

Australien /

Neuseeland

Im ersten Fall wird das Konzept des „margin of safety“ angewandt, **im zweiten das der „Nulltoleranz“.**

PA in Honig / Pollen: Diskussion I

Deutschland

- **Lebenslange tägliche Einnahme**

Virtually Safe Dose von 0.43 ng/kg/
Körpergewicht pro Tag (Riddellin)

Niederlande

- **Maximal Tolerable Risk**

Europa

3µg/Person/Tag

USA

- ***TDI (nicht-karzinogene Effekte)***

6.5µg/Tag

Australien /

Neuseeland

- **Kräuterbeschluss**

die Menge toxischer PA in Kräuterpräparaten
< 1 µg/kg oder Liter.

PA in Honig / Pollen: Diskussion I

Deutschland

- **Amtsblatt der Europ. Union 27.06.2008**

Niederlande

Genehmigung für raffiniertes Echium Öl

Europa

PA nicht nachweisbar (Nachweisgrenze 4µg/kg)

USA

**Berechnet auf eine Tagesdosis für dieses
Lebensmittel → ca. 0.05 µg PA/Tag**

Australien /

Neuseeland

PA in Honig / Pollen: Diskussion I

Deutschland

Niederlande

Europa

USA

Australien /

Neuseeland

- **FDA Empfehlung von 2001**

...the clear evidence of an association between **oral exposure to pyrrolizidine alkaloids** and serious adverse health effects and the lack of any valid scientific data that would enable the agency to determine whether there is an exposure, if any, that would present no harm to consumers, indicates that **this substance should not be used as an ingredient in dietary supplements...**

...the manufacturer bears the primary responsibility for ensuring that its dietary supplement products are safe...

PA in Honig / Pollen: Diskussion I

Deutschland

Niederlande

- **Food Standards Australia New Zealand**

Europa

provisorischer “safe level of intake” (tolerable daily intake): **1µg/kg Körpergewicht/Tag**

USA

Australien /

Neuseeland

Zusammenfassung / Fazit

- **19 von 216 (9%) Honigen, sowie 17 von 55 (31%) Pollenprodukten erwiesen sich als PA-positiv**
 - **Honig: \bar{x} 0.06 μ g/g**
 - **Pollen: \bar{x} 5.17 μ g/g**
- **Berechnete Tagesdosis mit einer Verzehrmenge von 20g (Honig) bzw. 10g (Pollen):**

Alle Proben (Ausnahme ein Honig) liegen über dem Grenzwert für Phytopharmaka von 1 μ g/Tag.
- **alle PA-positiven Proben enthielten z. T. erhebliche Anteile von Pollen PA-produzierender Pflanzen (meist *Echium* spp.).**
- **bei hoch belasteten Honigen besteht die Gefahr der downstream Kontamination in der Nahrungsmittelindustrie**

Vielen Dank für's Zuhören

Deutsche
Forschungsgemeinschaft

DFG



Niedersächsisches Landesamt
für Verbraucherschutz
und Lebensmittelsicherheit

Bieneninstitut Celle
Dr. Werner von der Ohe