

Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Erfassung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honig und Pollen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Michael Kempf
aus Würth am Main

Würzburg 2009

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Juni 2004 bis Januar 2009 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig, Herrn Dr. Till Beuerle.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Schreier, für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und seiner stets regen Anteilnahme an meinen Projekten sowie seinem mir in allen Belangen entgegengebrachten Vertrauen und die mir bei meinen Arbeiten gewährten Freiräume. Die zahlreichen Gespräche und vertrauensvoll übertragenen Aufgaben haben mich in meiner beruflichen sowie persönlichen Entwicklung nachhaltig geprägt. Nicht zuletzt erfüllt es mich mit Stolz, als letzter Betreuer des „GC-Labors“ eine äußerst erfolgreiche, über 25 Jahre andauernde Ära zu beenden. Für dieses stets offene und vertrauensvolle Verhältnis in allen Bereichen der Zusammenarbeit sei Ihnen noch einmal herzlichst gedankt.

Weiterer, besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Till Beuerle für unzählige Diskussionen, lange Telefonate, die konstruktive Kritik beim Erstellen von Publikationen und dieser Arbeit, sowie für zahlreiche Ideen ohne die diese Arbeit nie so erfolgreich verlaufen wäre. Dein Engagement für diese Arbeit war/ist aller Ehren wert. In diesem Zusammenhang sei auch Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann vom Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig für Anregungen sowie Korrekturen bei der Vorbereitung der Anträge und Publikationen gedankt.

Dem Bieneninstitut Celle, hier vor allem Frau Katharina und Herrn Werner von der Ohe, sei gedankt für die Durchführung der mikroskopischen Pollenanalysen.

Für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit in Rahmen von Fortgeschrittenen-Praktika danke ich Herrn Markus Bonk, Frau Ebru Ates, Frau Daniela Trost, Frau Martina Denner, Frau Manuela Bühringer, Herrn Lukas Schmidt, Frau Iris Haßlauer, Frau Sandra Heil, Frau Katrin Hempfling, Herrn Maximilian Wittig sowie Frau Kirsten Schönfeld.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die stets gute Arbeitsatmosphäre sowie die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank geht an die Herren Dr. Wolfgang Hümmer, Matthias Ackermann, Michael Menzel und auch Maximilian Wittig für etliche „forschungspolitische“ Kartenrunden und sonstige Unternehmungen, die für gute Laune gesorgt und erheblich zum Arbeitsklima beigetragen haben. Nicht missen möchte ich die oft kontroversen aber immer netten, fachlichen und sonstigen Diskussionen. Nicht vergessen werden darf in diesem Zusammenhang meine langjährige Studien- und Promotionskollegin Dr. Kathrin Kahle. Kathrin, hier jetzt aufzuzählen, wofür ich Dir „zurückdanken“ sollte, angefangen bei Spüldiensten im Grundstudium, wäre sinnlos. Ich denke, wir haben das am Ende ganz ordentlich hinbekommen.

Danken möchte ich auch Dr. Christina Preston sowie der langjährigen Laborantin Theresia Feuerbach für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit in „unserer“ Aromenabteilung.

Für die Aufnahmen der NMR-Spektren und Hilfe bei deren Auswertungen bedanke ich mich bei Herrn Martin König und der NMR-Crew der TU Braunschweig.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn, die im Rahmen der Projekte Nr. SCHR 211/22-1/23-1 und BE 3200/1-1/3-1 diese Arbeit finanziell gefördert hat.

Weiterer Dank geht an das Werkstatt-Team und den technischen Betrieb mit Schorsch, Matthias, Karl, Fritz, Thomas, Andi und Pierre. Ihr ward immer zur Stelle, wenn´s mal gebrannt hat.

Der abschließende, eigentlich an erste Stelle gehörende Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben, meiner Schwester, meinem Patenonkel und nicht zuletzt meiner wunderbaren Frau Daniela. Vielen Dank, dass Ihr immer an mich geglaubt und mein Arbeiten in einer Weise unterstützt und gefördert habt die ihresgleichen sucht. Euer stetiges Interesse an meiner Arbeit hat mich nicht zuletzt immer wieder aufs Neue motiviert. Dir liebe Daniela, danke ich für Deine liebevolle Unterstützung während der Promotionszeit und auch in allen anderen Bereichen des Lebens. Egal, ob mal kurz irgendwo Proben besorgt werden mussten, oder am Samstag/Sonntag mal wieder die GC-MS ausgefallen war, Du warst immer zur Stelle, um mich tatkräftig zu unterstützen. Dein unermüdlicher Beistand beim Erstellen dieser Arbeit, sowie Dein kritischer und konstruktiver Blick von außen haben sehr zum Gelingen beigetragen.

FÜR DANIELA,
MEINE ELTERN

„WIR MÜSSEN UNBEDINGT RAUM FÜR ZWEIFEL LASSEN, SONST GIBT ES KEINEN FORTSCHRITT, KEIN DAZULERNEN. MAN KANN NICHTS NEUES HERAUSFINDEN, WENN MAN NICHT VORHER EINE FRAGE STELLT. UND UM ZU FRAGEN, BEDARF ES DES ZWEIFELNS.“

Richard P. Feynman (*1918, †1988),
US-amerikanischer Physiker und Nobelpreisträger des Jahres 1965

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	V
Erläuterungen	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Summary	XVI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Pyrrolizidinalkaloide	3
2.1.1 Vorkommen und Klassifizierung	3
2.1.2 Biosynthese	7
2.1.3 Toxizität.....	9
2.1.3.1 Allgemeines	9
2.1.3.2 Resorption und Bioaktivierung der Pyrrolizidinalkaloide	10
2.1.3.3 Akute Toxizität	12
2.1.3.4 Chronische Toxizität	14
2.1.3.5 Genotoxizität	14
2.1.3.6 Entgiftung der Pyrrolizidinalkaloide.....	15
2.1.4 Analytik von Pyrrolizidinalkaloiden.....	17
2.1.4.1 Probenaufarbeitung	17
2.1.4.2 Gaschromatographie	18
2.1.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie	19
2.1.4.4 Weitere Methoden.....	20
2.1.5 Gesetzliche Regulierungen und Stellungnahmen.....	22
2.1.6 Exposition mit Pyrrolizidinalkaloiden.....	24
2.1.6.1 Phytopharmaka und Kräuterpräparate.....	24
2.1.6.2 Pyrrolizidinalkaloide in Lebensmitteln	25
2.1.6.3 Pyrrolizidinalkaloide in Honig und Pollen	27
2.2 Honig als Lebensmittel.....	32
2.2.1 Definition	32
2.2.2 Gewinnung, Inhaltsstoffe und Verwendung	33
2.2.3 Marktsituation.....	35
2.3 Pollen als Lebensmittel.....	39

3	Ergebnisse und Diskussion	42
3.1	Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung von Pyrrolizidin- alkaloiden	42
3.1.1	Referenzmaterialien	42
3.1.2	Entwicklung einer Extraktions- und Anreicherungs- methode zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honigen	43
3.1.2.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	43
3.1.2.2	Festphasenextraktion (SPE).....	44
3.1.2.3	Methodenoptimierung zur Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA).....	49
3.1.2.4	Identifizierung und Quantifizierung	52
3.1.2.4.1	Standardisierung mittels Heliotrin	52
3.1.2.4.2	Standardisierung mittels di-Butyryl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin	55
3.1.3	Methodenerweiterung zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pollenprodukten.....	56
3.1.4	Methodenanpassung zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in honig- haltigen Lebensmitteln.....	57
3.2	Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honigen	59
3.2.1	Handelshonige.....	59
3.2.2	Forschungshonige	70
3.2.2.1	<i>Senecio</i> -Honige	70
3.2.2.2	<i>Echium</i> -Honige	76
3.3	Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pollen	81
3.3.1	Vergleich der Analysenmethoden für native Pollen und Pollenprodukte	81
3.3.2	Native Pollen	82
3.3.3	Pollenprodukte.....	86
3.4	Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in honighaltigen Lebensmitteln.....	91
3.5	Filtrationsversuche	95
3.6	Betrachtung der Pyrrolizidinalkaloid-Gehalte in Honig in Bezug auf deren botanische Herkunft.....	99
4	Material und Methoden	101
4.1	Material.....	101
4.1.1	Chemikalien.....	101
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	101
4.1.3	Untersuchungsmaterial.....	101
4.1.3.1	Pflanzenmaterial zur Extraktion	101
4.1.3.2	Pflanzenmaterial zur Gewinnung von nativem Pollen	102
4.1.3.3	Handelsproben	102

4.1.3.3.1 Honige.....	102
4.1.3.3.2 Pollen	102
4.1.3.3.3 Honighaltige Lebensmittel.....	102
4.1.3.4 Forschungshonige	102
4.1.3.4.1 <i>Echium</i> -Honige	103
4.1.3.4.2 <i>Senecio</i> -Honige	103
4.1.3.4.3 Filtrationshonige.....	103
4.1.3.5 native Pollen	103
4.2 Geräte	103
4.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)	103
4.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	104
4.2.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	108
4.2.4 Durchlichtmikroskopie.....	109
4.2.5 Sonstige Geräte	109
4.3 Pyrrolizidinalkaloid-Extrakt aus <i>Senecio vernalis</i>	110
4.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften	111
4.4.1 Probenvorbereitung	111
4.4.1.1 Honige.....	111
4.4.1.1.1 Standardisierung mit Heliotrin	111
4.4.1.1.2 Standardisierung mit di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin	111
4.4.1.2 Pollen	111
4.4.1.3 Honighaltige Lebensmittel.....	112
4.4.1.3.1 Honig-Met	112
4.4.1.3.2 Honigbonbons und Gummibären	112
4.4.1.3.3 Getränke	113
4.4.1.3.4 Müsliriegel, Cerealien, Fruchtsoße und Baby-Brei-Pulver	113
4.4.1.3.5 Nahrungsergänzungsmittel	114
4.4.1.3.6 Fenchelhonige	114
4.4.2 Probenaufarbeitung	114
4.4.3 Identifizierung und Quantifizierung	115
4.4.3.1 Standardisierung mit Heliotrin	115
4.4.3.2 Standardisierung mit di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin	116
4.5 Mikroskopische Pollenanalyse.....	116
4.6 native Pollen	117
4.6.1 Gewinnung von nativen Pollen	117
4.6.2 Probenaufarbeitung	117
4.6.3 Identifikation und Quantifizierung.....	118

4.7	Filtrationsversuche	118
4.7.1	Versuchshonige	118
4.7.2	Aufbau der Filtrationsapparatur	119
4.7.3	Filtration der Versuchshonige	120
4.7.4	Probenaufarbeitung und Analyse	120
4.8	Synthesen	121
4.8.1	Pyrrrolizidinalkaloid- <i>N</i> -Oxide aus <i>Senecio vernalis</i> Extrakt	121
4.8.1.1	<i>N</i> -Oxidierung der tertiären Pyrrrolizidinalkaloide	121
4.8.1.2	Aufreinigung mittels Säulenchromatographie	121
4.8.1.3	Umkristallisation	121
4.8.2	Synthese von di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin	122
4.8.2.1	Umsetzung von Monocrotalin zu Retronecin	122
4.8.2.2	Umsetzung von Retronecin zu Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrrolizidin-1-carboxylat	123
4.8.2.3	Reduktion von Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrrolizidin-1-carboxylat zu [9,9- ² H ₂]-Retronecin	124
4.8.2.4	Veresterung von [9,9- ² H ₂]-Retronecin zu di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin	125
5	Strukturmatrix	127
6	Literatur	132
7	Anhang	148

Veröffentlichungen

ORIGINALPUBLIKATIONEN

Kempf, M., Schreier, P., Reinhard, A., Beuerle, T., Pyrrolizidinalkaloide in Honig und Pollen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2009, eingereicht.

Kempf, M., Heil, S., Haßlauer, I., Schmidt, L., Von der Ohe, K., Reinhard, A., Schreier, P., Beuerle, T., Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition and Food Research* 2009, im Druck.

Reinhard, A., Jahnke, M., Von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P., Beuerle, T., Feeding deterrence and detrimental effects mediated by toxic and nontoxic pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees. *Journal of Chemical Ecology* 2009, im Druck.

Kempf, M., Beuerle, T., Reinhard, A., Schreier, P., Pyrrolizidine alkaloids in honey bee products. In: Senate Commission on Food Safety SKLM (Ed.), *Risk Assessment on Phytochemicals in Food - Novel Approaches*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, eingereicht.

Caja, M. del M., Preston, C., Menzel, M., Kempf, M., Schreier, P., Online Gas Chromatography Combustion/Pyrolysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of (\pm)-Dihydroactinidiolide from Tea (*Camellia sinensis*) and Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 5899-5902.

Appel, M., Preston, C., Kempf, M., Menzel, M., Schreier, P., Authentizitätsbewertung von 'Grünnoten': Isotopenfraktionierung bei der Lipoxygenase-Hydroperoxidlyase-Katalyse. *Lebensmittelchemie* 2009, 63, 82.

Kempf, M., Ramm, S., Feuerbach, T., Schreier, P., Occurrence of 2,2,4-trimethyl-1,3-pentenediol monoisobutyrate (Texanol[®]) in foods packed in polystyrene and polypropylene cups. *Food Additives and Contaminants* 2009, 26, 563-567.

Kempf, M., Beuerle, T., Bühringer, M., Denner, M., Trost, D., Schreier, P., Analysis of pyrrolizidine alkaloids in honey. *Lebensmittelchemie* 2008, 62, 126.

Kempf, M., Beuerle, T., Bühringer, M., Denner, M., Trost, D., Von der Ohe, K., Bhavanam, V.B.R., Schreier, P., Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52, 1193-1200.

Knaup, B., Kempf, M., Fuchs, J., Valotis, A., Kahle, K., Oheme, A., Richling, E., Schreier, P., Model experiments mimicking the human intestinal transit and metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52, 840-848.

Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T., Richling, E., Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 10605-10614.

Caja, M. del M., Preston, C., Kempf, M., Schreier P., Flavor authentication studies of α -lonone, β -lonone, and α -lonol from various sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 6700-6704.

Kleinhenz, S., Elss, S., Kempf, M., Schreier, P., Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte von potentiellen carry-over/off-flavour Komponenten in Orangen- und Apfelsaft. *Lebensmittelchemie* 2007, 61, 154.

Stingel, D., Feldmeier, P., Richling, E., Kempf, M., Elss, S., Labib, S., Schreier, P., Urinary 2-ethyl-3-oxohexanoic acid as major metabolite of orally administered 2-ethylhexanoic acid in human. *Molecular Nutrition and Food Research* 2007, 51, 301-306.

POSTERBEITRÄGE

Kempf, M., Beuerle, T., Reinhard, A., Schreier, P., Pyrrolizidine alkaloids in honey bee products. Risk assessment of phytochemicals in food – novel approaches, Symposium of the SKLM, Kaiserslautern, 30. März – 01. April 2009.

Appel, M., Preston, C., Kempf, M., Menzel, M., Schreier, P., Authentizitätsbewertung von 'Grünnoten': Isotopenfraktionierung bei der Lipxygenase-Hydroperoxidlyase-Katalyse. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern, 08. – 10. September 2008.

Beuerle, T., Bhavanam, V., Reinhard, A., Von der Ohe, K., Denner, M., Bühringer, M., Trost, D., Kempf, M., Schreier, P., Pyrrolizidin-Alkaloide in Honig. Gemeinsame Arbeitstagung 2008 der Regionalverbände Nord und Nord-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, Braunschweig, 02. April 2008.

Reinhard, A., Von der Ohe, W., Janke, M., Kempf, M., Schreier, P., Beuerle, T., Bienen und Pyrrolizidin-Alkaloide. 55. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Bieneninstitute, Berlin, 11.-13. März 2008.

Kempf, M., Beuerle, T., Bühringer, M., Denner, M., Trost, D., Schreier, P., Analysis of pyrrolizidine alkaloids in honey. 25 Jahre Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern, Symposium "Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", Kaiserslautern, 28. September 2007.

Knaup, B., Kahle, K., Kempf, M., Valotis, A., Fuchs, J., Erk, T., Richling, E., Scheppach, W., Schreier, P., Studies of the intestinal transit and metabolism of plant constituents using an *ex vivo* ileo-/ colostoma model. 25 Jahre Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern, Symposium "Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", Kaiserslautern, 28. September 2007.

Kleinhenz, S., Elss, S., Kempf, M., Schreier, P., Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte von potentiellen carry-over/off-flavour Komponenten in Orangen- und Apfelsaft. 58. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, Würzburg, 13. März 2007.

VORTRÄGE

Kempf, M., Beuerle, T., Reinhard, A., Schreier, P., Pyrrolizidin-Alkaloide in Honig und Pollen: Eine Risikobetrachtung. 60. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, München, 03. März 2009.

Kempf, M., Beuerle, T., Bühringer, M., Denner, M., Trost, D., Schreier, P., Analytik von Pyrrolizidinalkaloiden in Honig. 59. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, Oberschleißheim, 04. März 2008.

Kempf, M., Schreier, P., Ein Ausflug in die Biologie: Pheromone und Pyrrolizidinalkaloide. Sitzung des Arbeitskreises Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Würzburg, 12. Juni 2007.

Erläuterungen

Die in der vorliegenden Dissertation relevanten Pyrrolizidinalkaloide, ihre biosynthetischen Vorläufer oder Metabolite, sowie Syntheseprodukte sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen chronologisch nach deren Nennung im Text durchnummeriert. Die unter Abschnitt 5 aufgeführte Strukturmatrix fasst die Verbindungen im Überblick zusammen.

Auf die Nummerierung einmalig genannter Verbindungen (z.B. Reagenzien in Synthesen) wurde verzichtet.

Die abgebildeten Spektren und Chromatogramme wurden unter Verwendung der Originaldaten erstellt.

Literaturhinweise sind unter Aufführung von maximal den beiden erstgenannten Autoren und des Erscheinungsjahres in Klammern angegeben und im Literaturverzeichnis vollständig hinterlegt.

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text durch den Zusatz „®“ bzw. „™“ gekennzeichnet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
APCI	chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>)
API	Atmosphärendruck-Ionisierung (<i>atmospheric pressure ionisation</i>)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
br	breites Multiplett
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CI	chemische Ionisierung (<i>chemical ionisation</i>)
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
cm	Zentimeter
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
d	Duplett
d_f	Filmdicke der Trennphasen von Kapillartrennsäulen
δ	chemische Verschiebung delta
DC	Dünnschichtchromatographie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
d. h.	das heißt
DHP	Dehydropyrrolizidinalkaloid
DIB	Deutscher Imkerbund e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ed./Eds.	Editor/Editoren
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>European Food Safety Authority</i>)
EI	Elektronenstoßionisation (<i>electron ionisation</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELSD	Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektion (<i>evaporative light-scattering detection</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisierung (<i>electrospray ionisation</i>)

<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
evtl.	eventuell
eV	Elektronenvolt
FDA	Amerikanische Gesundheitsbehörde (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FSANZ	<i>Food Standards Australia New Zealand (formerly the Australia New Zealand Food Standards Authority – ANZFA)</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
g	Gramm
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie (<i>gas chromatography</i>)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (<i>gas chromatography – mass spectrometry</i>)
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRGC	Kapillargaschromatographie (<i>high resolution gas chromatography</i>)
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (<i>high resolution gas chromatography – mass spectrometry</i>)
HSS	Homospermidin-Synthase
Hz	Hertz
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i> der Weltgesundheitsorganisation (WHO)
IT	Ionenfalle (<i>ion trap</i>)
k.A.	keine Angabe
kg	Kilogramm
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m	Multipllett (bei NMR)
M	Molar (mol/L)
MAFF	<i>Ministry of Agriculture, Fisheries and Food</i> (Großbritannien)
MEKC	Micellare-elektrokinetische Chromatographie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
mg	Milligramm
MHz	Megahertz

min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Trimethylsilyltrifluoroacetamid
MTR	<i>maximum tolerable risk</i>
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
NACE	wasserfreie Kapillar-Elektrophorese (<i>non-aqueous capillary electrophoresis</i>)
n.b.	nicht bestimmbar
ng	Nanogramm
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
n.n.	nicht nachweisbar
o. g.	oben genannte
PA	Pyrrrolizidinalkaloid(e)
p. a.	<i>pro analysis</i>
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppb	<i>parts per billion</i>
ppm	<i>parts per million</i> ; chemische Verschiebung in Hertz
PTDI	<i>provisional tolerable daily intake</i>
RI	linearer Retentionsindex (<i>retention index</i>)
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (<i>National Institute for Public Health and the Environment of the Netherlands</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur oder Retentionszeit
s	Singulett
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SIM	Selected Ion Monitoring
SIVA	Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse
SKLM	DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln
Smp.	Schmelzpunkt

SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
s. o.	siehe oben
t	Triplet (bei NMR)
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
TCM	traditionelle chinesische Medizin (<i>traditional Chinese medicine</i>)
TDI	<i>tolerable daily intake</i>
TIC	Totalionenchromatogramm (<i>total ion chromatogram</i>)
TSP	Thermospray (<i>thermospray</i>)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VOD	<i>(hepatic) veno occlusive disease</i>
VSD	<i>virtual safe dose</i>
v/v	Volumen pro Volumen
VWA	Voedsel en Waren Autoriteit (niederländisches Nahrungsmittel- und Warenamt)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink

Zusammenfassung

Pyrrrolizidinalkaloide (PA) sind eine Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, die ca. 400 bekannte Strukturen umfasst und meist in zwei Formen, als tertiäres PA bzw. als dessen korrespondierendes *N*-Oxid, auftreten. PA mit einer 1,2-Doppelbindung können durch lebereigene Cytochrom-P-450 Monooxygenasen zu reaktiven Pyrrolestern mit toxischen Wirkungen aktiviert werden. Neben einer akuten Toxizität wurde in verschiedenen Tiermodellen auch das genotoxische und tumorinduzierende Potential der PA belegt. Toxische Vertreter dieser Substanzklasse werden hauptsächlich in vier verschiedenen Familien innerhalb der Angiospermien gefunden: den Asteraceae (Tribus Senecioneae und Eupatorieae), den Boraginaceae, den Apocynaceae und dem Genus *Crotalaria* innerhalb der Fabaceae.

In jüngster Vergangenheit hat die potentielle Belastung von Lebens- und Futtermitteln mit PA wiederholt Aufmerksamkeit erregt. Eine Exposition des Menschen mit PA kann über den Genuss von Tees, Phytopharmaka, pflanzlichen Lebensmitteln (z.B. Salatmischungen) oder, im Fall einer Verfütterung von PA-Pflanzen an Tiere, als sekundäre Kontamination über tierische Lebensmittel erfolgen. Im 'International Programme on Chemical Safety (IPCS)' der WHO ist die grundsätzliche Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch PA dokumentiert. Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes gibt es demzufolge Rechtsvorschriften zur Regulierung PA-haltiger Phytopharmaka. Für diese gilt in Deutschland seit 1992 ein Grenzwert von 1 µg PA/Tag für 1,2-ungesättigte PA und deren *N*-Oxide bei oraler Aufnahme und einer Anwendungsdauer von max. 6 Wochen. Geht die Anwendung darüber hinaus, beträgt der Grenzwert 0,1 µg PA/Tag.

Im Hinblick auf Lebensmittel hat die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) auf die lückenhafte Datenlage zu Gehalten von PA in Honigen (einschließlich Imkereierzeugnissen und Pollenprodukten) hingewiesen und insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt des zunehmenden Verbrauchs von Nahrungsergänzungsmitteln die Imkereierzeugnisse enthaltenen Forschungsarbeiten zur analytischen Erfassung von PA in Honig und Pollen ange-mahnt.

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es daher, eine verlässliche, selektive Methode zur Ermittlung des PA-Gehaltes im relevanten Konzentrationsbereich von ≤ 0,1ppm für diese Lebensmittel zu entwickeln, sowie über breit aufgestellte Screenings eine Datengrundlage zur Abschätzung des Risikopotentials zu schaffen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine robuste, reproduzierbare und selektive analytische Methode basierend auf Zink-Staub-Reduktion, Festphasenextraktion (SCX-

SPE), LiAlH₄ Reduktion mit anschließender Silylierung sowie Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)-Analytik erarbeitet. Durch ein solches Vorgehen werden die PA-N-Oxide in tertiäre PA überführt, so dass alle PA in ihrer tertiären Form vorliegen. Durch die anschließende chemische Reduktion werden alle Mono- und Diester-PA in die jeweiligen Necinbasen überführt. Durch die anschließende Derivatisierung zum di-TMS-Derivat, konnten über den Summenparameter Retronecin PA-Kontaminationen mit 1,2-ungesättigten PA-Strukturen verlässlich detektiert und hochselektiv mittels HRGC-MS im SIM-Modus angezeigt werden. Die Validierung der Methode erfolgte durch die Verwendung von *Senecio vernalis*-Extrakt sowie authentischen PA-Standards und deren N-Oxiden. Unter Modifikationen der Probenaufarbeitung war diese Methode sowohl für Honig und Pollen, als auch für honighaltige Lebensmittel einsetzbar. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Methode durch die Synthese des deuterierten Standards di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin zur Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) erweitert und optimiert.

Unter Berücksichtigung, dass Retronecin eines der kleinsten vorkommenden PA mit 1,2-ungesättigter Necinstruktur ist, PA in der Natur jedoch meist als komplexe makrozyklische Diester oder offene Mono- bzw. Diester vorkommen, sowie der Tatsache, dass die zwar seltenen aber potentiell vorkommenden toxischen Otonecin- und Supinidin-Ester PA nicht von dieser Quantifizierungsart erfasst werden, stellen alle ermittelten Gehalte eine Unterbewertung der tatsächlich vorliegenden PA-Belastung und somit die kleinste mögliche, natürlich vorkommende Kontamination der jeweiligen Probe dar. Die entwickelte Methode erlaubt erstmals, anders als bei bereits vorliegenden Arbeiten zur Bestimmung von PA in Pflanzenteilen, eine exakte und selektive Bestimmung von PA im Spurenbereich, unabhängig von deren botanischem Ursprung oder chemischer Struktur (tertiäres PA, N-Oxide).

In einem breit aufgestellten Screening von 216 Honighandelsproben und 35 Forschungshonigen – letztere umfassten 27 *Senecio*- und 8 *Echium*-Honige - konnten zum Teil erhebliche Mengen an PA nachgewiesen werden. Die Belastungsrate der einzelnen Probensets reichte von 9 bis zu 100%. Die hierbei ermittelten Gehalte lagen, berechnet als Retronecin-Äquivalente, zwischen 0,019 µg/g und 4,66 µg/g. Ergänzt wurden die analytischen Daten durch die Erhebung von mellisopalynologischen Daten. Hierbei zeigte sich, dass eine Bestimmung von PA-Pflanzenpollen über die relative Pollenhäufigkeit nach DIN 10760 nur eine geringe Aussagekraft bei der Risikoabschätzung besitzt. Zwar war die Anwesenheit von PA-Pflanzenpollen immer ein Indikator für das Vorkommen von PA, jedoch konnten über den relativen Pollengehalt keine Aussagen über die Höhe der PA-Belastung getroffen werden.

In einer weiteren Studie zu PA-Gehalten in Pollen und Pollenerzeugnissen sind in den nativen Pollen die erwarteten hohen PA-Gehalte bestätigt worden. Aber auch die in Vollsortimentsupermärkten und Reformhäusern häufig vertretenen Pollenprodukte wiesen PA-Gehalte auf, die im Mittel weit über den bei Honig festgestellten Werten lagen. So ergaben sich für die nativen Pollen aller bedeutenden, PA-produzierenden Pflanzenfamilien PA-Gehalte von 0,57-4,07 mg/g, während sich für die Pollenprodukte Gehalte von 1,08-16,35 µg/g feststellen ließen. Eine zusätzliche Erhebung von mellisopalynologischen Daten bestätigte deren bereits bei den Honigproben festgestellte, eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich des PA-Gehaltes.

Durch ein Screening von 60 honighaltigen Lebensmitteln mit unterschiedlichen Honiganteilen konnte eine potentielle Downstream-Kontamination durch den Einsatz von hoch PA-belasteten Honigen im Herstellungsprozess nachgewiesen werden. Bei einer Belastungshäufigkeit von 13% lagen die hierbei ermittelten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, bei 0,010-0,484 µg/g.

Abschließend ist in modellhaft durchgeführten Filtrationsversuchen gezeigt worden, dass PA-Pflanzenpollen erheblichen Einfluss auf den PA-Gehalt des Honigs ausüben. Dennoch stellt eine Honigfiltration, wie sie in Anlage 1 der Honigverordnung zulässig ist, keine Möglichkeit dar, hoch mit PA belasteten Honig im PA-Gehalt zu senken. Vielmehr ließ sich mit den durchgeführten Versuchen eine Diffusion der PA aus Pollen in den Honig nachweisen.

In Anbetracht der insbesondere in Pollen und sortenreinen Honigen von PA-produzierenden Pflanzen detektierten PA-Gehalte stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit erfassten Lebensmittel weiterhin ohne Überwachung ihrer PA-Gehalte gehandelt werden sollten. Eine internationale Regulierung des Vorkommens von PA in Lebensmitteln ist geboten.

Summary

Pyrrolizidine alkaloids (PA) are secondary plant constituents which comprise about 400 different structures, occurring in two major forms, a tertiary form and the corresponding *N*-oxide. PA containing a 1,2-double bond are pre-toxins and metabolically activated by the action of hepatic P-450 enzymes to acute toxic and genotoxic pyrroles. Beside the acute toxic effects, the genotoxic and tumorigenicity potential of PA was demonstrated in some eukaryotic model systems. The PA occurrence is limited to only four plant families: the Asteraceae (Senecioneae and Eupatorieae), the Boraginaceae, the Apocynaceae and the genus *Crotalaria* within the Fabaceae.

Recently, the potentially PA contamination of food and feeding stuff attracted high attention. Humans are exposed to these toxins by consumption of herbal medicine, herbal teas, dietary supplements or food containing PA plant material. In the 'International Programme on Chemical Safety (IPCS)' the WHO states the potential threat to human health by PA. In pharmaceuticals, the use of these plants is regulated by the German Federal Health Bureau to a total PA intake of 1 µg per day for 1,2-unsaturated PA and their *N*-oxides within a six-week period per year, or, if six weeks are surpassed, the level is reduced to 0.1 µg total PA content per day.

With regard to food the DFG-Senate Commission on Food Safety (SKLM) passed an opinion that [...] *The existing data base dealing with the content of PAs in honey collected from PA-containing plants [...] as well as the data base dealing with the exposure of consumers to PAs are judged to be inadequate [...].* Furthermore, they reminded that [...] *The main goal of future research should be the careful analytical determination of the PA content of honey and pollen [...].*

Initiated by this, the essential intention of this work was to develop a reliable tool for selective and quantitative determination of PA in the relevant range of concentration at $\leq 0,1$ ppm in this food. Furthermore, the generation of a broad dataset should be the basis for the estimation of the potential risk of PA.

First of all, a robust, reproducible and selective method consisting of Zn-dust reduction, strong cation exchange solidphase extraction (SCX-SPE), chemical reduction with LiAlH_4 , subsequent silylation and capillary gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS) using SIM mode was established. This procedure converted PA-*N*-oxides into their basic tertiary form and, due to the subsequent chemical reduction, all mono- and diester PA resulted in their particular necine backbones. The newly developed method represented a reliable tool to detect potential PA contamination with toxic 1,2-unsaturated PA structures using retronecine as sum parameter by capillary gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS) in SIM mode. This procedure was validated using extracts of

Senecio vernalis as well as authentic standards of PA and their *N*-oxides. This method was applicable to honey and, after some modifications, to pollen and honey-containing foods, respectively. Furthermore, the analytical method was optimised by synthesis of a deuterium labelled standard, di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-retronecine, used for stable isotope dilution assays.

Retronecine is one of smallest known pyrrolizidine alkaloids, obeying the toxic principle of a 1,2-unsaturated necine structure. Generally, PA are found in nature as complex macrocyclic diesters or open chain mono- or diesters. Furthermore, the potentially occurring toxic otonecine and supinidine esters are not included in this quantitation as well. Due to these facts, all presented results are an “underestimate” of the actual toxic PA content and represent the lowest possible degree of contamination of a specific sample. For the first time, the present method allows the exact and selective determination of toxic PA by simply detecting a sum parameter which contains the toxic principle of the PA (1,2-double bond), independently from botanical origin or the oxidation state of the PA (tertiary PA, *N*-oxides).

The method was applied to 216 commercially available flower honey samples and 35 exploratory harvested honeys, comprising 27 *Senecio*- and 8 *Echium*-honeys. Among these honeys the contamination degree was between 9 and 100% and the measured PA content was in a range from 0.019 to 4.66 µg g⁻¹, calculated as retronecine equivalents. These results were completed by mellisopalynological data, performed according to DIN 10760. In this context, only a marginal significance between identification and relative frequency of PA plant pollen and the amount of PA contamination could be proven. The presence of PA plant pollen can rather be a precursor for a presence of PA.

In a further study, the expected high amounts of PA in pure, floral pollen were verified. Furthermore, pollen products, available as food supplements in various supermarkets and health food shops, showed a much higher PA contamination compared to honey. Within the pure, floral pollen of the major PA producing plant families showed a PA contamination of 0.57 to 4.07 mg g⁻¹. The analysed pollen products revealed PA contaminations in a range of 1.08 to 16.35 µg g⁻¹. An additional data acquisition of mellisopalynological data showed similar results referring the PA levels as it did within the honey samples.

Additionally, the modified method was applied to 60 honey-containing foods with various contents of honey. Thereby a downstream contamination caused by the usage of honey highly contaminated with PA could be proven. Among these foods the degree of contamination was about 13% and the products revealed PA contents in a range of 0.010 to 0.484 µg g⁻¹.

Finally, it could be proven by filtration experiments in a bench-scale model, that pollen of PA producing plants have a direct effect on the PA content in honey. Nevertheless, it is not possible to reduce the PA contamination in honey by filtration of the contaminated honey as it is allowed by the German honey-concerning legislation. In fact, PA diffuse from pollen to honey.

Considering the values observed especially in authentic honey from PA producing plants and pollen products, the results provoke the discussion of an international regulation of PA in food.

1 Einleitung und Zielsetzung

Pyrrrolizidinalkaloide (PA) sind in Ihrer Funktion und Biosynthese typische Vertreter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe und stellen Abwehrstoffe gegenüber Herbivoren dar (Hartmann und Witte, 1995). PA sind Pflanzengifte, die vor allem in der Leber ihre toxische Wirkung entfalten. Folgen der so verursachten Leberfunktionsstörungen sind u.a. Ammoniakvergiftungen und Zerstörung des zentralen Nervensystems bis hin zum Tod (Cheeke, 1989). PA können neben den schädigenden Effekten auf die Leber auch allgemein teratogen und karzinogen auf menschliche Zellen wirken (Steenkamp *et al.*, 2001).

PA-haltige Pflanzen sind die wohl weltweit am weitesten verbreitete Ursache für zum Teil tödliche Vergiftungen von Weidevieh (Huxtable, 1980; Cheeke, 1989). Dies wird vor allem aus den USA, Südafrika und Neuseeland/Australien berichtet, aber auch die in Deutschland bekannte Schweinsberger Krankheit wird auf eine PA-Aufnahme zurückgeführt (Huxtable, 1980).

Auch Menschen können durch PA-haltigen Pflanzen nachhaltig gefährdet sein (Mattocks, 1986). Vergiftungsgefahren bestehen hauptsächlich bei der Anwendung von traditioneller Medizin mit PA-haltigen Pflanzen (Steenkamp *et al.*, 2001), durch Verunreinigung von Getreide mit PA-haltigen Pflanzenteilen (Stegelmeier *et al.*, 1999) oder durch Kontamination tierischer Erzeugnisse wie Milch (Cheeke, 1989; Deinzer *et al.*, 1982) oder Honig (Deinzer *et al.*, 1977; Betteridge *et al.*, 2005). Vergiftungsfälle sind vor allem nach dem Genuss traditioneller Teeaufgüsse von so genannten „bush teas“ oder „herbal teas“ aus Südafrika und Amerika bekannt. Nahezu epidemieartige Lebererkrankungen sind durch mit Samen von PA-haltigen Pflanzen kontaminiertes Getreide aufgetreten. Das daraus hergestellte Brot führte in Pakistan und Indien zu Beginn der 80er Jahre zu einer Vielzahl von Todesfällen (Roeder, 1984).

Ende der 70er Jahre wurde in ersten Publikationen das Vorkommen von PA in Honig aus *Senecio jacobaea* in den USA und *Echium plantagineum* L. in Australien nachgewiesen (Deinzer *et al.*, 1977; Culvenor *et al.*, 1981). Vor dem Hintergrund der strengen Regulierung von Phytopharmaka wurde die potentielle Gesundheitsgefährdung durch PA-haltige Honige in einer Übersicht von Edgar *et al.* (2002) neu bewertet. Grundsätzlich ist nach Auffassung der Autoren ein Gefahrenpotential gegeben, da bei einer Auswertung von Pollenanalysen der Beitrag von PA-Pflanzen zu Honigen weltweit belegt werden konnte. Es gibt demzufolge keine direkten Hinweise darauf, dass Honigbienen PA-Pflanzen nicht anfliegen. Reine Pollenanalysen reichen jedoch nicht aus, um eine eventuelle PA-Belastung von Honig einschätzen zu können. Im Hinblick auf eine Risikobewertung erachten es die Autoren als unabdingbar, umfassende Analysen der PA-

Gehalte von Honigen durchzuführen. Wegen der zu erwartenden Vielzahl unterschiedlicher PA-Strukturen, geringer Konzentrationen und störender Einflüsse der Honigmatrix muss eine verlässliche Methode zur Analytik dieser Substanzen etabliert werden (Edgar *et al.*, 2002).

Im ‚International Programme on Chemical Safety (IPCS)‘ hat die WHO die grundsätzliche Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch PA dokumentiert (WHO, 1988). Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes gibt es daher Rechtsvorschriften zur Regulierung PA-haltiger Phytopharmaka. Für diese gilt in Deutschland seit 1992 ein Grenzwert von 1 µg PA/Tag für 1,2-ungesättigte PA und deren *N*-Oxide bei oraler Aufnahme und einer Anwendungsdauer von max. 6 Wochen. Geht die Anwendung darüber hinaus, beträgt der Grenzwert 0,1 µg PA/Tag (Bundesgesundheitsamt, 1992).

Für Lebensmittel sind derzeit keine Rechtsvorschriften in Bezug auf PA bekannt. Aus diesem Grund hat die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) auf die lückenhafte Datenlage zu Gehalten von PA in Honigen (einschließlich Imkereierzeugnissen und Pollenprodukten) hingewiesen und insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt des zunehmenden Verbrauchs von Nahrungsergänzungsmitteln, die Imkereierzeugnisse enthalten, Forschungsarbeiten zur analytischen Erfassung von PA in Honig und Pollen angemahnt (SKLM, 2002).

Aufgrund der hier kurz dargelegten Problematik und der dadurch möglichen Gefahren für die menschliche Gesundheit war es das Ziel dieser Arbeit, unter Verwendung geeigneter Isolierungs- und massenspektrometischer (MS) Techniken eine verlässliche, robuste und selektive Methode zur Ermittlung des PA-Gehaltes im relevanten Konzentrationsbereich von $\leq 0,1$ ppm für diese Lebensmittel zu entwickeln. Nach Etablierung der Methodik sollte ein breit aufgestelltes Probenscreening die strukturell gesicherte Grundlage für die Abschätzung des Gefahrenpotenzials liefern. Spezielles Augenmerk wurde hierbei auf die von der SKLM angemahnten Imkereierzeugnisse Honig und Pollen gelegt. Durch verschiedene Filtrationsversuche wurde der Einfluss von PA-haltigen Pollen auf den PA-Gehalt von Honig überprüft. Zusätzlich wurde die anfänglich aufwendige Analysenmethodik durch die Synthese eines stabilisotopen-markierten Standards zur Durchführung einer Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) vereinfacht. Da eine generelle Down-Stream-Kontamination in der Nahrungsmittelindustrie nicht auszuschließen ist, wurde die Analytik abschließend auf die Klasse der „honighaltigen Lebensmittel“ ausgeweitet, um auch hier über die Verbreitung der PA Aufschluss zu erhalten.

2 Kenntnisstand

2.1 Pyrrolizidinalkaloide

Die Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind in der Vergangenheit sowohl durch biochemische, physiologische als auch chemoökologische Untersuchungen gut charakterisiert worden (Hartmann und Witte, 1995; Frölich, 1996; Jenett-Siems *et al.*, 1998). Wissenschaftliche Studien belegen, dass sich die PA während der Evolution zu einer Stoffgruppe biologisch wirksamer Substanzen entwickelt haben (Hartmann, 1987). PA werden in den Pflanzen konstitutiv gebildet und dienen mit ihrer fraßabschreckenden und toxischen Wirkung zur Abwehr von Herbivoren (Hartmann und Witte, 1995; Hartmann und Ober, 2000).

2.1.1 Vorkommen und Klassifizierung

Nach Schätzungen sind PA in ca. 3 % aller blühenden Pflanzen enthalten (Smith und Culvenor, 1981). Das Vorkommen der PA innerhalb des Pflanzenreichs ist dabei auf wenige Taxa der Angiospermen beschränkt; 95 % der PA-enthaltenden Pflanzenarten gehören Gattungen innerhalb der Familie der Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum*) und Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) an. Innerhalb der Apocynaceae, Orchidaceae und Ranunculaceae sind ebenfalls einige PA-produzierende Gattungen bekannt (Smith und Culvenor, 1981; Hartmann und Witte, 1995). Vereinzelt treten PA unter anderem auch in einigen wenigen verwandten Spezies der Familie der Convolvulaceae auf (Hartmann und Witte, 1995; Jenett-Siems *et al.*, 2005).

PA zeigen mit mehr als 400 unterschiedlichen Strukturen aus ca. 600 Pflanzenarten eine große Vielfalt (Rizk, 1991; Pelser *et al.*, 2005; Hartmann und Witte, 1995; Hartmann und Ober, 2008). Bisher konnten in über 6000 Pflanzen PA identifiziert (Stegelmeier *et al.*, 1999; Roeder, 2000) werden.

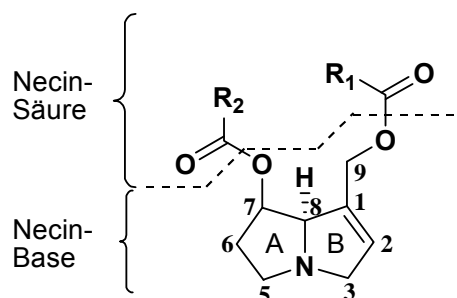


Abb. 2-1 Basisstruktur der Pyrrolizidinalkaloide (PA).

Chemisch gesehen handelt es sich bei den PA um Esteralkaloide bestehend aus einer Necinbase, die den charakteristischen bicyklischen basischen Pyrrolizidin-Grundkörper darstellt, und einer oder zwei mit ihr verknüpften Necinsäuren (s. Abbildung 2-1).

Necinbasen sind Derivate des bicyklischen Alkohols 1-Hydroxymethylpyrrolizidin (1). Die Hydroxymethylpyrrolizidine können gesättigt (1) oder 1,2-ungesättigt (Supinidin, 2) sein (s. Abbildung 2-2). Die PA weisen üblicherweise eine Hydroxymethyl-Gruppe am C-1 und in den meisten Fällen ebenfalls eine Hydroxygruppe am C-7 auf. In seltenen Fällen finden sich in Position 2 und 6 weitere Hydroxygruppen. Diese führen zur Ausbildung von Stereoisomeren, welche am H-Atom des C-8 orientiert werden. Die unter den PA am meist verbreitetsten Necinbasen gehören der C-8 α -H-Reihe an, gleichzeitig leiten sich die meisten Alkaloide von den 7,9-Necindiolen ab (Hartmann und Witte, 1995; Roeder, 1984). Die unter den PA am meisten verbreitete Necinbase stellt das Retronecin (3) dar. Eine untergeordnete Rolle stellen die Necinbasen Heliotridin (4), mit einer 7S-Konfiguration, das bei PA der Orchidaceae hauptsächlich vorkommende 1,2-gesättigte (-)-Platynecin (5), sowie das Otonecin (6) dar (s. Abbildung 2-2). Diese Hydroxylgruppen der Necinbasen sind üblicherweise mit einer oder zwei Necinsäuren verestert (s. Abbildung 2-1).

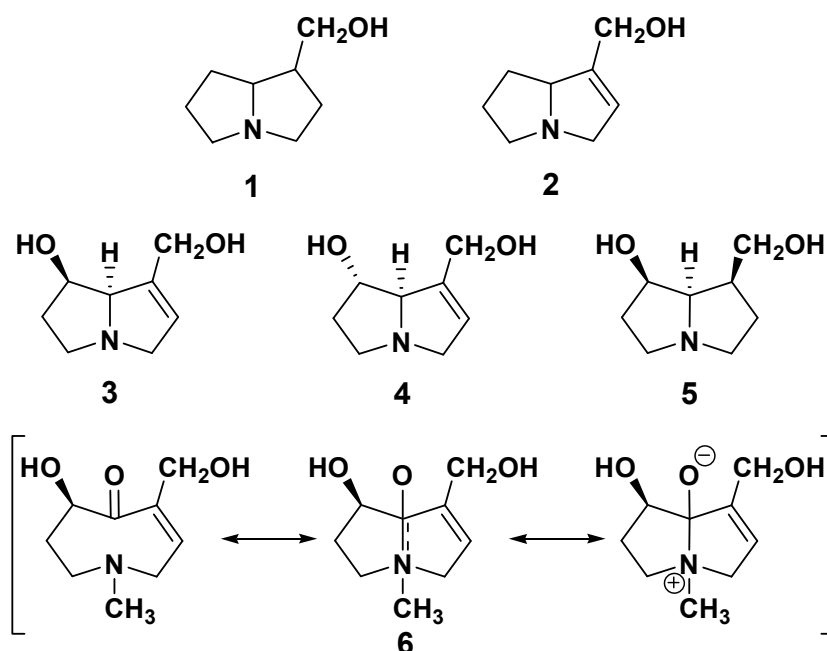


Abb. 2-2 Übersicht über verbreitete Necine 1-Hydroxymethylpyrrolizidin (1), Supinidin (2), Retronecin (3), Heliotridin (4), (-)-Platynecin (5), Otonecin (6).

Necinsäuren können als Mono- oder Dicarbonsäuren auftreten, weisen in der Regel fünf bis zehn Kohlenstoffatome auf und variieren stark in ihrer Struktur. Sie umfassen

Säuren mit verzweigten Kohlenstoffketten, die sich auf einfache Grundstrukturen zurückführen lassen und zusätzlich substituiert sind. Als Substituenten sind dabei Hydroxy-, Epoxy-, Carboxy-, Acetoxy- oder Methoxy-Gruppen zu nennen. PA können somit in Form von Monoestern, offenkettigen Diestern oder makrozyklischen Diestern auftreten. Die Vielfalt der chemischen Modifizierungen und die Variation der Necinsäuren führt zur bekannten, ausgesprochen hohen Strukturvielfalt der PA (Hartmann und Witte, 1995; Hartmann und Ober, 2008; Roeder, 1984).

Unter Berücksichtigung chemosystematischer und biogenetischer Untersuchungen (Culvenor, 1978; Hartmann und Witte, 1995) lassen sich die PA in fünf verschiedene Grundtypen mit jeweils charakteristischen Strukturmerkmalen einteilen (s. Abbildung 2-3).

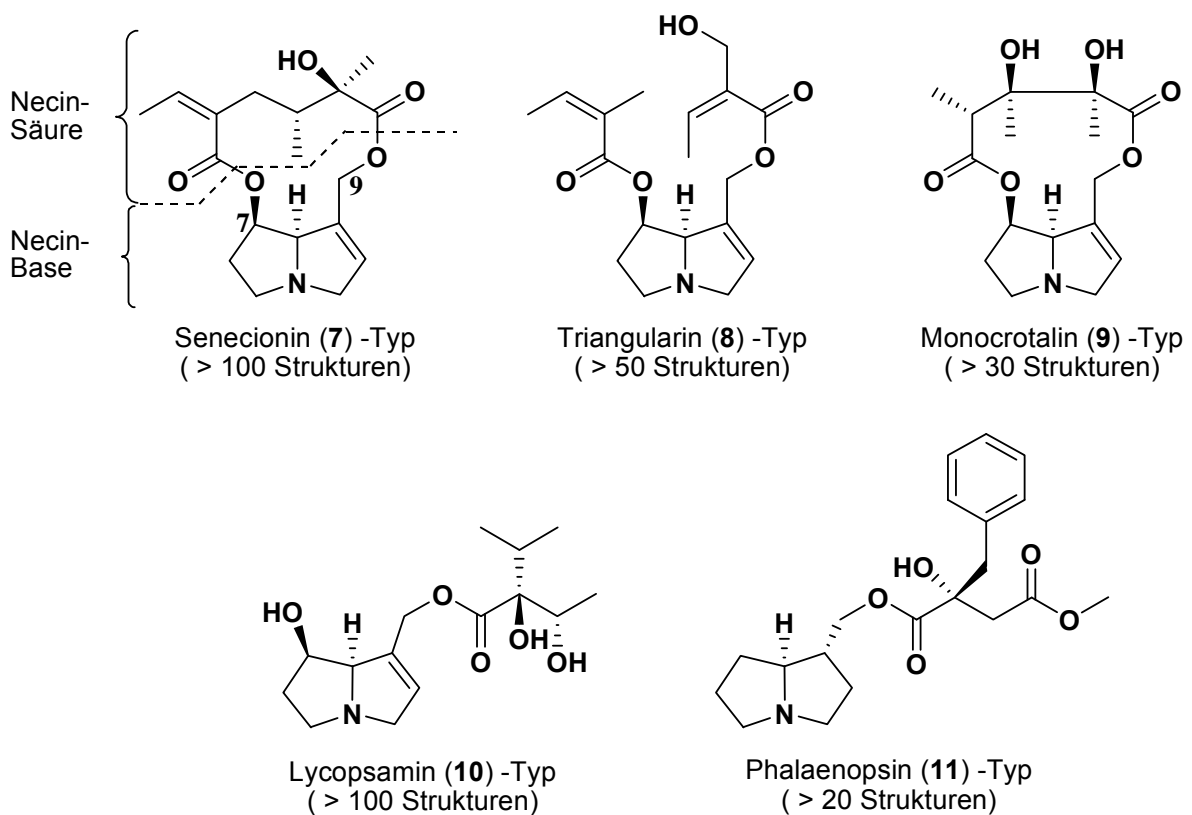


Abb. 2-3 Einteilung der PA in fünf verschiedene Grundtypen (nach Hartmann und Witte, 1995) anhand der PA Senecionin (7), Triangularin (8), Monocrotalin (9), Lycopsamin (10) und Phalaenopsin (11).

12-gliedrige makrozyklische Diester vom Senecionin-Typ kommen vor allem im Tribus Senecioneae (Asteraceae) vor. Ihnen gemeinsam ist die verzweigte C10-Necinsäure, die aus zwei C5-Körpern aufgebaut und aus den Aminosäuren L-Isoleucin bzw. (seltener) L-Leucin abgeleitet ist.

Mit diesem Typ verwandt ist die Gruppe der Triangularin-PA mit offenkettiger C5-Körper-Diesterstruktur. Triangularin-PA treten in vielen Boraginaceae spp. und *Senecio* spp. auf. Interessanterweise werden diese beiden letztgenannten PA-Typen nie nebeneinander gefunden.

Der Monocrotalin-Typ ist gekennzeichnet durch einen 11-gliedrigen makrozyklischen Diester. Das Vorkommen scheint auf den Genus *Crotalaria* (Fabaceae) und einige wenige Spezies der Familie der Boraginaceae beschränkt zu sein (Hartmann und Witte, 1995).

Beim Lycopsamin-Typ handelt es sich um eine weitere, sehr diverse Gruppe von PA, d.h. Mono- und Diester, die an C-9 mit einer C7-Necinsäure verestert sind. Diese leitet sich von 2-Isopropylbuttersäure ab. Sie werden vor allem im Tribus *Eupatoriae* (Asteraceae) und in Boraginaceae gefunden.

Der weitaus größte Teil der bekannten PA gehört zu diesen vier genannten PA-Typen, daneben tauchen PA nur sporadisch in anderen Pflanzenfamilien (u.a. Orchidaceae, Convolvulaceae, Apocynaceae) auf, wie z.B. die strukturell einfacheren Orchideen-PA, die in der Gruppe der Phalaenopsin-PA zusammengefasst sind und keine 1,2-Doppelbindung des Necinbasengerüsts besitzen (Hartmann und Witte, 1995).

In den oben genannten vier Haupttypen der PA ist Retronecin die vorwiegende Necinbase. Ein weiteres gruppenübergreifendes Strukturmerkmal stellt das überwiegende Vorkommen als *N*-Oxid dar. Beide Formen sind durch einfache Reduktion/Oxidation in einander überführbar (s. Abbildung 2-4).

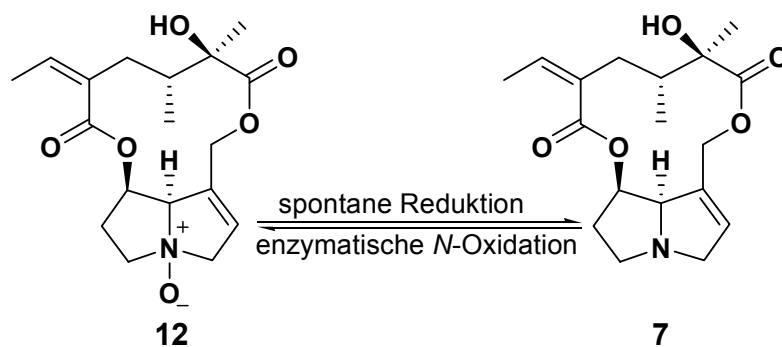


Abb. 2-4 Pyrrolizidin-*N*-Oxid und korrespondierendes tertiäres PA am Beispiel von Senecionin-*N*-Oxid (**12**) und Senecionin (**7**).

In den Asteraceae, den Boraginaceae und den Fabaceae liegen die PA überwiegend als *N*-Oxide vor. Nur innerhalb dieser Familien kommen auch die nicht *N*-oxidierbaren Otonecin-PA vor. Orchidaceae und Convolvulaceae enthalten nur PA mit 1,2-gesättigter Struktur. Während in *Phalaenopsis spec.* (Orchidaceae) die PA teilweise als *N*-Oxide

vorliegen, kommen sie innerhalb der Convolvulaceae ausschließlich als basische tertiäre Alkaloide vor (Frölich, 1996; Jenett-Siems *et al.*, 1998; Frölich *et al.*, 2006). Die eher seltenen Apocynaceae beinhalten ausschließlich tertiäre PA. Ebenfalls in ihrer basischen tertiären Form kommen die PA in den trockenen und wasserarmen Samen von *Crotalaria* (Fabaceae) vor (Toppel *et al.*, 1988; Chang und Hartmann, 1998).

Einmal gebildet, findet in der Pflanze kein turn-over dieser Strukturen mehr statt, vielmehr erfolgen beim Transport und der Speicherung chemische Modifikationen der Grundstrukturen zum jeweils artenspezifischen Alkaloidprofil (Hartmann *et al.*, 1989; Hartmann und Dierich, 1998). PA werden in den Vakuolen der Zellen akkumuliert und sind in allen Pflanzenteilen nachweisbar (Frölich *et al.*, 2007). Hauptspeicherort ist die (für die Fortpflanzung unerlässliche) Knospe, später die Blüte, aber auch die äußeren Gewebe der Blätter und des Sprosses weisen PA aus (Ehmke *et al.*, 1988; Frölich *et al.*, 2007).

2.1.2 Biosynthese

Die Fähigkeit zur PA-Biosynthese kommt in verschiedenen, taxonomisch nicht verwandten Familien vor (Reimann *et al.*, 2004). Tracerexperimente mit Wurzelorgankulturen sowie verschiedenen Asteraceae-Pflanzen zeigten, dass die PA-Biosynthese ausschließlich in der Wurzel lokalisiert ist (Toppel *et al.*, 1987; Hartmann *et al.*, 1989; Hartmann, 1994), wobei die Wurzelspitze die höchste Biosyntheseaktivität aufweist. Da die Wurzelspitze auch die höchste Wachstumsaktivität zeigt, ist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Biosyntheseaktivität der PA und dem Wurzelwachstum sehr wahrscheinlich (Sander und Hartmann, 1989). Von hier aus werden die PA über das Phloem an ihre bevorzugten Speicherorte, bei *Senecio* spp. vor allem in die Blüten, transportiert (Hartmann *et al.*, 1989).

Weitreichende Tracerexperimente an *Senecio*-Arten konnten den Einbau von Putrescin (**13**) und Spermidin (**14**) in die Necinbasen der PA nachweisen (Robins und Sweeney, 1979; Hartmann und Toppel, 1987). Damit zeigte sich eine enge Verbindung mit dem Polyaminstoffwechsel. Die beiden Polyamine Putrescin (**13**) und Spermidin (**14**) entstehen aus L-Arginin (**15**) oder L-Ornithin (**16**) über Agmatin (**17**) und *N*-Carbamoylputrescin (**18**) (Robins und Sweeney, 1983; Spenser, 1985; Hartmann *et al.*, 1988; Robins, 1989). Das hierbei gebildete Putrescin (**13**) ist eine gemeinsame Vorstufe für die Biosynthesen von Spermidin (**14**) und PA (Hartmann *et al.*, 1988; Graser und Hartmann, 1997, Graser *et al.*, 1998). Das Schlüsselenzym der PA-Biosynthese, die Homospermidin-Synthase (HSS), katalysiert den Transfer einer Aminobutyl-Gruppe des Spermidin (**14**) auf ein Putrescin (**13**) (Böttcher *et al.*, 1994; Graser und Hartmann, 1997; Graser und Hartmann, 2000). Das durch die HSS gebildete Homospermidin (**19**) stellt das erste spezifische Intermediat der PA-Biosynthese dar (Kahn und Robins, 1985; Kunec und Robins, 1985). Im

Gegensatz zu Putrescin (**13**) und Spermidin (**14**) unterliegt es keinem oxidativen Abbau. Das so entstandene Homospermidin (**19**) wird anschließend über Zyklisierung der Imminium-Ionen-Zwischenstufe und Bildung des (-)-Trachelanthamidin (**20**), welches die biosynthetische Vorstufe von Retronecin (**3**) darstellt, komplett in die Necinbase eingebaut (Rana und Robins 1983; Adolph, 1991; Hartmann und Ober, 2000). Abbildung 2-5 zeigt schematisch den Ablauf des Biosyntheseweges der PA vom Senecionin-Typ.

Die Biogenese des Kohlenstoffgerüsts der Necinsäuren wird indessen weniger gut verstanden. Markierungsexperimente zeigten, dass aliphatische Necinsäuren aus verzweigten Aminosäuren wie L-Valin (**21**), L-Leucin (**22**) oder L-Isoleucin (**23**) als Vorstufen abgeleitet sind (Crout *et al.*, 1966; Crout *et al.*, 1970; Robins *et al.*, 1974; Cahill *et al.*, 1980). Für das in den Abbildungen 2-4 und 2-5 dargestellte Senecionin-*N*-Oxid (**12**) konnte gezeigt werden, dass die Necinsäure aus L-Isoleucin (**23**) (Cahill *et al.*, 1980; Crout *et al.*, 1966), welche über 2-Oxoisocaproinsäure (**24**) in den Necinsäureanteil übergeht (Stirling *et al.*, 1997), gebildet wird (vgl. Abbildung 2-5). Nach erfolgter *N*-Oxidierung und anschließender Veresterung der Necinbase - hier Retronecin (**3**) - mit der Necinsäure - hier Senecioninsäure (**25**) - entsteht das entsprechende Senecionin-*N*-Oxid (**12**).

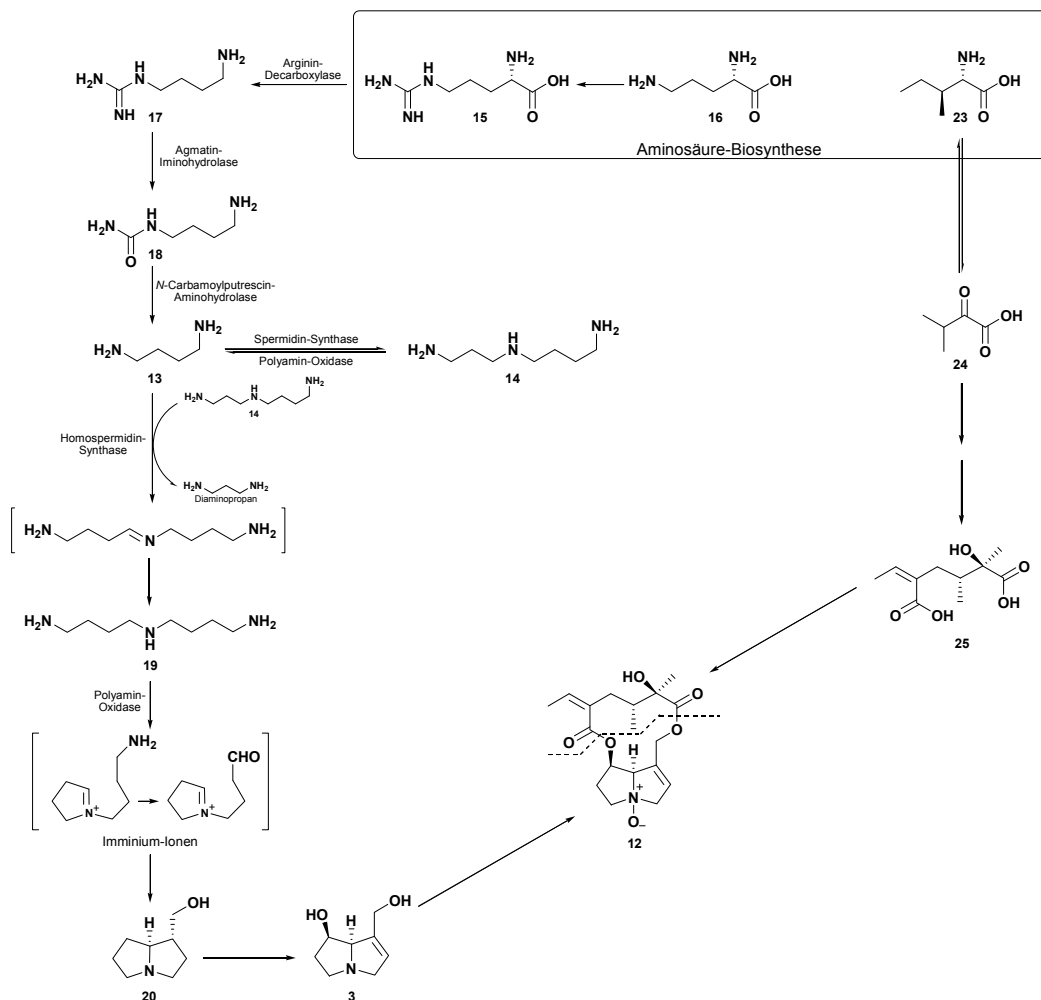


Abb. 2-5 Biosyntheseweg der Pyrrrolizidinalkaloide vom Senecionin-Typ am Beispiel von Senecionin-*N*-Oxid (**12**) (nach Hartmann, 1999; Hartmann und Ober, 2000).

Senecionin-*N*-Oxid (**12**) stellt bei *Senecio*-Arten das erste Produkt der PA-Biosynthese dar (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann *et al.*, 1988; Hartmann *et al.*, 1989). PA unterliegen keinem signifikanten Abbau, vielmehr werden sie durch die in *Senecio*-Arten stattfindende Diversifizierung ausgehend vom Senecionin-*N*-Oxid (**12**) in eine Vielzahl unterschiedlicher PA überführt (Sander und Hartmann, 1989; Hartmann und Dierich, 1998). Diese artspezifischen Transformationen finden zum größten Teil im Sproß statt (Hartmann und Dierich, 1998), können unter gewissen Umständen aber auch bereits in der Wurzel erfolgen. Letztere sind jedoch immer zeitlich und räumlich von der Senecionin-*N*-Oxid-Biosynthese getrennt (Toppel *et al.*, 1987; Hartmann, 1994). Die transformierten PA können in den verschiedenen Geweben gespeichert bzw. unter diesen verlagert werden (Hartmann und Dierich, 1998). PA werden vor allem in den Vakuolen der Zellen akkumuliert. In den einzelnen Pflanzenorganen bestehen große Unterschiede bezüglich des PA Gehaltes, so können Blütenköpfchen von *Senecio vulgaris* bis zu 80% der gesamten PA einer Pflanze enthalten, wobei die Konzentrationen 10 bis 30-fach höher sein können als in den vegetativen Organen (Hartmann und Zimmer, 1986).

2.1.3 Toxizität

2.1.3.1 Allgemeines

In erster Linie stellen die 1,2-ungesättigten PA aufgrund ihrer toxischen und abschreckenden Wirkung wirksame Abwehrstoffe gegen Herbivoren dar (van Dam *et al.*, 1995; Macel *et al.*, 2005). Auch auf Insekten wirken PA zum Teil abschreckend (Boppré, 1986), wobei jedoch einige angepasste Insekten in der Lage sind, durch spezielle Mechanismen diese für sie gefährlichen Stoffe zu bewältigen (Lindigkeit *et al.*, 1997). Aufgrund der Tatsache, dass die toxische Wirkung von PA bei Säugetieren erst lange nach der Aufnahme eintritt, stellt der PA-Gehalt der jeweiligen Pflanze vermutlich keine evolutiv gegen Säugetiere ausgebildete Abwehrstrategie dar (Hartmann und Witte, 1995). Hinzu kommt, dass Weidevieh, vermutlich abgeschreckt vom bitteren Geschmack, ohnehin für gewöhnlich PA-haltige Pflanzen meidet, solange genügend andere Futterpflanzen zur Verfügung stehen (Boppré, 1986).

Dennoch wurde in der Vergangenheit mehrfach von tödlichen Vergiftungen bei Weidevieh nach der Aufnahme von PA-haltigen Pflanzen berichtet (Cheeke, 1989), aber auch bei anderen Tieren können PA schwere Vergiftungen auslösen (Mattocks, 1986). PA stellen Toxine dar, welche vor allem die Leber angreifen. Typische Symptome sind dabei Zellvergrößerungen in der Leber (Megalocytose) sowie vermehrte Gewebsbildung (Fibrilose), einhergehend mit einer Vergrößerung des Organs (Hyperplasie) sowie Ödembildung. Die Folgen der verursachten Leberfunktionsstörungen sind z.B.

Ammoniakvergiftungen und Zerstörung des zentralen Nervensystems bis hin zum Tod (Cheeke, 1989). Aber auch andere Organe wie Lunge (Pneumonie, Ödeme), Niere (Megalocytose) oder Pankreas sowie der Gastrointestinaltrakt können von PA-Intoxikationen betroffen sein (Wiedenfeld und Roeder, 1984).

Auch Menschen können durch PA-haltige Pflanzen gefährdet sein (Mattocks, 1986). Eine Exposition des Menschen mit PA besteht hauptsächlich durch den Konsum von Phytopharmaka bzw. traditioneller Medizin, z.B. PA-haltige Samen (Steenkamp *et al.*, 2001), durch Verunreinigungen von Getreide mit PA-haltigen Pflanzenteilen (Stegelmeier *et al.*, 1999) oder durch sekundäre Kontamination tierischer Produkte wie z.B. Milch (Cheeke, 1989; Deinzer *et al.*, 1982), Eier (Edgar und Smith, 2000) oder Honig (Deinzer *et al.*, 1977; Betteridge *et al.*, 2005).

Vor allem sind humane Vergiftungsfälle nach dem Genuss traditioneller Teeaufgüsse (bush teas, herbal teas) bekannt. Als Folge einer chronischen Intoxikation tritt die „hepatic veno-occlusive disease“ (VOD) auf, die der Schweinsberger Krankheit ähnlich und durch Lebervergrößerung, -verhärtung und –zirrhose gekennzeichnet ist. Fälle von akuter Toxizität mit Todesfolge sind aus Pakistan und Indien bekannt (s. Kapitel 2.1.6). Allerdings muss angemerkt werden, dass akute Vergiftungen eher selten zu beobachten sind. Üblicher ist ein chronischer Verlauf der Pyrrolizidinalkaloidvergiftungen, wobei Kinder sensibler auf PA reagieren als Erwachsene (Wiedenfeld und Roeder, 1984). Neben der akuten Lebertoxizität können PA auch allgemein teratogen und mutagen auf menschliche Zellen wirken (Steenkamp *et al.*, 2001).

2.1.3.2 Resorption und Bioaktivierung der Pyrrolizidinalkaloide

Die tertiären PA selbst sind aufgrund ihrer molekularen Beschaffenheit an sich noch nicht giftig, werden jedoch durch lebereigene Cytochrom-P-450 Monooxygenasen zu reaktiven Pyrrolestern mit stark cytotoxischer und genotoxischer Wirkung aktiviert. Die Toxifizierung der 1,2-ungesättigten PA ist bei Wirbeltieren gut untersucht; akut-toxische, chronisch-toxische, cytotoxische sowie genotoxische Effekte wurden beschrieben (Culvenor *et al.*, 1976; Mattocks, 1986; Stegelmeier *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2004). Dadurch dass nur 1,2-ungesättigte tertiäre PA, aber nicht deren *N*-Oxide in toxische Intermediate überführt werden können, sieht man die tertiären PA als pro-toxisch an, während die PA-*N*-Oxide per se untoxisch sind (Tabelle 2-1). Im Darm findet jedoch nachweislich eine unspezifische, spontane Reduktion zu den pro-toxischen tertiären PA statt, wodurch auch PA-*N*-Oxide „bioaktiviert“ werden können (Stegelmeier *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2004).

Tab. 2-1 Vergleich der Eigenschaften von tertiärem PA und dessen *N*-Oxid am Beispiel von Senecionin (**7**) und Senecionin-*N*-Oxid (**12**) (nach Hartmann, 1999).

Senecionin (7)	Senecionin- <i>N</i> -Oxid (12)
<ul style="list-style-type: none"> - lipophil - kann Membranen passiv durchdringen - giftig nach Bioaktivierung durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen - metabolisch unsicher - wird aus den aufgenommenen <i>N</i>-Oxiden im Darm der Herbivoren und deren Fraßfeinden gebildet 	<ul style="list-style-type: none"> - hydrophil, salzartig - kann Membranen nicht passiv passieren - ungiftig - metabolisch sicher - wird als Abwehrstoff von spezialisierten Insekten gespeichert

Nach Resorption der tertiären PA im Verdauungstrakt von Säugetieren und Insekten können diese durch hepatische Cytochrom-P-450-Monooxygenasen toxifiziert werden. Dies geschieht v.a. durch die Enzyme des Typs CYP3A4 (Reed *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2004), aber auch die Enzyme CYP2B und CYP2C können hierbei involviert sein (Chung *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2003). Insekten und Säugetiere besitzen dieses Enzymsystem gleichermaßen. Die Bioaktivierung wird durch Hydroxylierung der Necinbase, gefolgt von einer spontanen Dehydratisierung zur Bildung der reaktiven Pyrrolester, initiiert (Fu *et al.*, 2004). Auch Otonecin-PA wie z.B. Senkirkin (**26**) können durch oxidative *N*-Demethylierung ebenfalls zu toxischen pyrrolischen Dehydronecinen aktiviert werden (s. Abbildung 2-6). Eine Entgiftung über *N*-Oxidierung (s. Kapitel 2.1.3.6) ist jedoch aufgrund der Methylgruppe am Stickstoff nicht möglich.

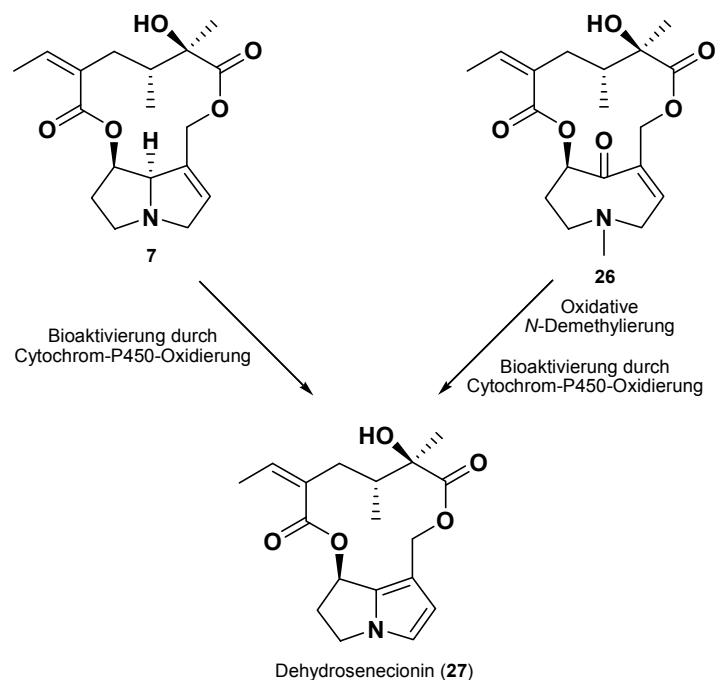


Abb. 2-6 Anhand von Senecionin (**7**) und Senkirkin (**26**) dargestellte Bildung von reaktiven Pyrrolestern, hier Dehydrosenecionin (**27**) (nach Fu *et al.*, 2004).

Die entstehenden Pyrrole sind instabil und stark alkylierend. In Laborexperimenten wurde gezeigt, dass Pyrrolester schnell kovalent an zelluläre Makromoleküle wie z.B. Proteine oder Nucleinsäuren binden und so die Zelle schädigen. Die im tertiären PA vorhandene 1,2-Doppelbindung sowie die im entstandenen Pyrrolester (Dehydropyrrolizidinalkaloide – DHP) vorhandene allylische Esterfunktion liefern die hierfür notwendigen strukturellen Voraussetzungen. Abbildung 2-7 gibt einen Überblick über mögliche Metabolisierungsreaktionen der gebildeten Dehydropyrrolizidinalkaloide.

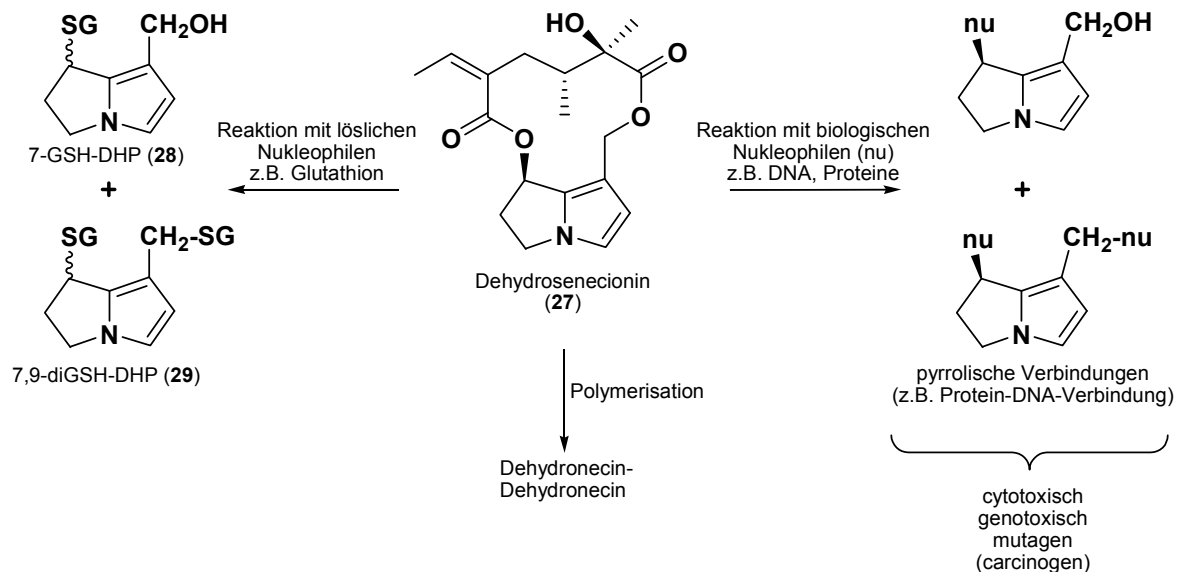


Abb. 2-7 Anhand von Dehydroseneconin (27) dargestellter Metabolismus der Dehydropyrrolizidinalkaloide (DHP) (nach Mattocks, 1986; Winter und Segall, 1989; Stegelmeier *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2004).

Die DHP sind in der Lage, sich mit löslichen Nucleophilen (z.B. Glutathion) zu verbinden um dann ausgeschieden zu werden oder zu Dehydronecin-Dehydronecin-Komplexen zu polymerisieren (Yan und Huxtable, 1995a/b; Fu *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Polymerisation und der Alkylierung von zellulären Nucleophilen wie z.B. Amino-, Thiol- und Hydroxygruppen von Proteinen und Enzymen, aber auch Purin- und Pyrimidinbasen der DNA. So kann es beim Angriff von „aktivierten Diestern“ auf die DNA nach zweimaliger nucleophiler Substitution zu Quervernetzungen der beiden Ketten kommen („cross-linking“) (Hartmann *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2004).

2.1.3.3 Akute Toxizität

Akute Vergiftungen mit PA führen zu massiver Hepatotoxizität und hämorrhagischen Nekrosen. Das Potential zur akuten Toxizität variiert merklich innerhalb der PA, so weisen die makrozyklischen Diester die höchste, offene Diester eine mittlere und Monoester die

geringste Toxizität auf (Mattocks, 1986). Die Stereochemie des PA-Moleküls und die Hydrophilie sind die entscheidenden Faktoren für den Grad der Metabolisierung. So sind Retronecin-Diester im Mittel viermal toxischer als Retronecin-Monoester und Heliotridin-Diester zwei- bis viermal toxischer als Retronecin-Diester (Culvenor *et al.*, 1976). Die erhöhte Toxizität der Diester gegenüber den Monoestern kann durch die Fähigkeit zwei Bindungen zu Nucleophilen einzugehen begründet werden. Aufgrund sterischer Hinderung wird auch die Entgiftung, durch z.B. Esterasen (s. Kapitel 2.1.3.6), erschwert, wodurch sich ebenfalls die erhöhte Toxizität der makrozyklischen PA erklären lässt (Hartmann und Ober, 2000; Fu *et al.*, 2004).

Freie Necinbasen, auch die 1,2-ungesättigten, wie z.B. Retronecin, sind nur bedingt in der Lage, Bindungen zu Nucleophilen einzugehen und sind somit entschieden weniger toxisch als Mono- oder Diester-PA (Yan *et al.*, 2008). Durch die fehlende Esterfunktionalität können diese keine direkten Alkylierungsreaktionen eingehen, da ihnen die Bindung zur Ausbildung eines Elektrophils fehlt.

Die in verschiedenen Tierversuchen ermittelten LD₅₀ – Werte der meisten PA im Rattenmodell liegen zwischen 34 und 300 mg/kg (Mattocks, 1986). Zudem spielen Faktoren wie Geschlecht, Alter oder auch Ernährung eine Rolle bei der individuellen Anfälligkeit. Tabelle 2-2 gibt einen exemplarischen Überblick über die Daten zur akuten Toxizität.

Tab. 2-2 LD₅₀ – Werte einiger ausgewählter Pyrrolizidin-Alkaloide (nach Mattocks, 1986)

PA Typ	Pyrrolizidinalkaloid	Tier	LD ₅₀ [mg/kg]
zyklische Diester	Monocrotalin (9)	Ratte (m)	109
	Monocrotalin (9)	Ratte (w)	230
	Monocrotalin (9)	Maus (w)	259
	Retrorsin (30)	Ratte (m)	34
	Retrorsin (30)	Ratte (w)	153
	Retrorsin (30)	Maus (w)	69
	Retrorsin (30)	Meerschweinchen	>800
	Senecionin (7)	Ratte (m)	50
	Senecionin (7)	Maus	64
	Integerrimin (31)	Maus	78
	offene Diester	Heliotrin (32)	Ratte (w)
Heliotrin-N-Oxid (33)		Ratte (w)	2500

2.1.3.4 Chronische Toxizität

Von chronischen Vergiftungen sind meist Leber, Lunge oder Blutadern, in Einzelfällen aber auch die Nieren, der Pankreas, der Gastrointestinaltrakt, das Knochenmark oder das Gehirn betroffen (Mattocks, 1986). Chronische Exposition führt zu Zellvergrößerungen (Megalocytose), Veno-Okklusion in Leber und Lunge, Hemmung der Zellteilung, Leberzirrhose, knollenförmigen Hyperplasien und Geschwulsten bis hin zu Karzinomen (Mattocks, 1986; Roeder, 1995).

2.1.3.5 Genotoxizität

Nach der erfolgten metabolischen Aktivierung können PA eine Vielzahl von genotoxischen Effekten aufweisen. Diese führen zu DNA-Bindungen, DNA "cross-linking", DNA-Protein "cross-linking", chromosomalen Veränderungen, Mutagenität, Teratogenität und Carcinogenität (u.a. IARC, 1976; Mattocks, 1986; Fu *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2004). Durch die verursachten DNA-DNA-Strangvernetzungen sowie die DNA-Protein-Verknüpfungen wirken PA cytotoxisch (Frei *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999; Stegelmeier *et al.*, 1999; Kosogof *et al.*, 2001). Diese Wirkung kann Änderungen der Zellfunktion bis hin zur Krebsbildung oder Zelltod zur Folge haben (Mattocks, 1986; Winter und Segall, 1989).

Frei und Mitarbeiter (1992) haben verschiedene tertiäre PA auf ihre Genotoxizität an *Drosophila melanogaster* untersucht und Struktur-Wirkungsbeziehungen - auch im Vergleich zu den bei Säugetieren ermittelten Daten (Mattocks, 1972; Culvenor *et al.*, 1976; Winter und Segall, 1989) - aufgestellt. In dem verwendeten Testsystem (*Drosophila* wing spot test) wurden PA oral an *Drosophila*-Larven verfüttert und die genotoxischen Effekte an Zellen der Flügeprimordien beobachtet. Die Autoren nahmen dabei an, dass in den Leberzellen der Säugetiere und *Drosophila* die gleichen Prozesse der Bioaktivierung stattfinden. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen lassen sich in folgenden Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammenfassen:

- (i) die 1,2-Doppelbindung ist Voraussetzung für die Bioaktivierung und Bildung der reaktiven Pyrrolstruktur durch die Cytochrom-P450-Monooxygenasen;
- (ii) makrozyklische Diester besitzen eine größere Toxizität als offenkettige Diester bzw. Monoester, bedingt durch die Wirkungsverstärkung der veresterten Hydroxygruppe an C-7. Die PA-Metabolite binden sich mit nukleophilen Molekülen im Bereich der C-7- und C-9-Esterbindungen;
- (iii) die Otonecin-Struktur erhöht die Toxizität erheblich (Lin *et al.*, 2000);
- (iv) Hydroxylierungen im Necinsäureteil senken im Allgemeinen die Toxizität.

Abbildung 2-8 zeigt wichtige strukturelle Voraussetzungen der PA für deren Genotoxizität bei *Drosophila* und deren Hepatotoxizität bei Säugetieren.

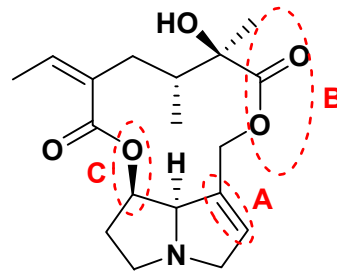


Abb. 2-8 Strukturelle Voraussetzungen für die Genotoxizität und die Hepatotoxizität von PA (farblich hervorgehoben) am Beispiel von Senecionin (7). A) eine 1,2-ungesättigte Bindung, B) eine Veresterung der Allyl-Hydroxy-Gruppe am C-9, C) eine freie oder veresterte Hydroxygruppe am C-7 (nach Winter und Segall, 1989; Frei *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1999; Stegelmeier *et al.*, 1999).

Die durch PA-haltige Pflanzenextrakte sowie einzelne PA ausgelöste Mutagenität wurde an verschiedenen biologischen Testsystemen, wie *Drosophila melanogaster*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* getestet (u.a. Brink, 1982; Candrian *et al.*, 1984; Zeiger *et al.*, 1988; Frei *et al.*, 1992; Carballo *et al.*, 1992). Die mit *Salmonella typhimurium* als mutagen getesteten PA Clivorin (34), Heliotrin (32), Lasiocarpin (35), Senkirkin (26), Retrorsin (30), Seneciphyllin (36) und Riddelliin (37) zeigten in Tierversuchen ebenfalls karzinogene Eigenschaften (u.a. Mattocks, 1986; Zeiger *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2004). Generell weisen Retronecin-PA, Heliotridin-PA und Otonecin-PA das größte genotoxische und karzinogene Potential auf (Fu *et al.*, 2004). Unlängst hat man die potenten karzinogenen Eigenschaften einzelner PA, u.a. Heliotrin (32), Jacobin (38), Jacolin (39), Lycopsamin (10), Senecionin (7) und Seneciphyllin (36), auch in *in silico* durch QSAR-Modeling bestätigt (Valerio *et al.*, 2007).

2.1.3.6 Entgiftung der Pyrrolizidinalkaloide

Je nach Organismus gibt es verschiedene Möglichkeiten, die aufgenommenen PA zu entgiften bzw. auszuscheiden (s. Abbildung 2-9). Bei einigen Insekten hat man spezifische Senecionin-*N*-Oxygenasen nachgewiesen, mit deren Hilfe Senecionin (7) in das nicht-toxische Senecionin-*N*-Oxid (12) umgeformt werden kann (Lindigkeit *et al.*, 1997). Senecionin (7) als freie Base stellt dabei die protoxische Form des Alkaloids dar, während das hydrophile, salzartige *N*-Oxid nicht toxisch ist und aufgrund der höheren Hydrophilie schnell ausgeschieden wird (Hartmann, 1999) (vgl. Tabelle 2-1). Eine Entgiftung von

Otonecin-PA über eine *N*-Oxidierung ist jedoch aufgrund der Methylgruppe am Stickstoff nicht möglich.

Einige Tierarten, wie z.B. Schafe und Meerschweinchen, verfügen über flavinhalige Monooxygenasen, welche in der Lage sind, tertiäre PA zu den entsprechenden PA-*N*-Oxiden zu oxidieren. Da diese, wie bereits erwähnt, kein Substrat der Cytochrom-P450-Oxygenasen in der Vertebratenleber darstellen und somit nicht zu giftigen Pyrrolen bioaktiviert werden können, ist die Oxidierung der PA eine wirkungsvolle Strategie zu deren Entgiftung (Fu *et al.*, 2004). Diese können dann als lösliche PA ausgeschieden werden (Miranda *et al.*, 1991). Neben unspezifischen Esterasen, die in der Lage sind, PA in Ihre entsprechenden Necinsäure(n) und Necinbase aufzuspalten, stellt die Glykosylierung in ein polares PA-Glykosid, welches untoxisch ist und bei gewissen Species sogar gespeichert wird, eine weitere Entgiftungsreaktion dar (Hartmann *et al.*, 1999). Aufgrund sterischer Hinderung wird jedoch die Spaltung von PA mit verzweigten Necinsäuren durch Esterasen erschwert, wodurch auch die erhöhte Toxizität der makrozyklischen PA erklärt werden kann (Hartmann und Ober, 2000).

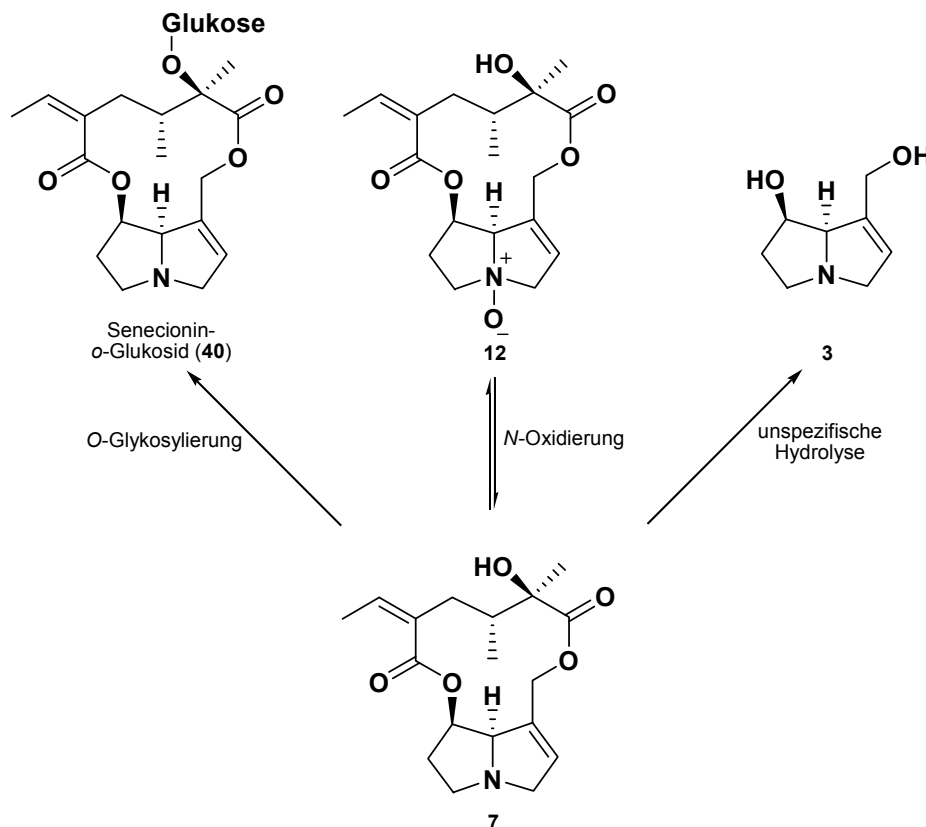


Abb. 2-9 Anhand von Senecionin (7) dargestellte Entgiftungswege (O-Glykosylierung, *N*-Oxidierung und unspezifische Hydrolyse) der Pyrrolizidinalkaloide (nach Mattocks, 1986; Winter und Segall, 1989; Stegelmeier *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1999).

Alle hier vorgestellten Metabolisierungswege (Bioaktivierung, N-Oxidierung, O-Glykosylierung, Esterhydrolyse) stehen in der Regel miteinander in Konkurrenz. Das Verhältnis der bioaktivierenden und entgiftenden Enzymsysteme zueinander ist folglich ausschlaggebend für das Ausmaß der artspezifischen Metabolisierung und möglicher toxischer Folgen. Besonders empfindlich gegenüber Pyrrolizidinalkaloiden reagieren z.B. Pferde, Rinder und Ratten, wohingegen Gattungen wie Ziegen, Kaninchen, Schafe und Meerschweinchen eine höhere Toleranz gegenüber PA zeigen (Mattocks, 1986).

2.1.4 Analytik von Pyrrolizidinalkaloiden

Die analytischen Möglichkeiten zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden wurden von verschiedenen Autoren für verschiedene Probenmaterialien, z.B. Pflanzen (Roeder, 1999), Honig (Edgar *et al.*, 2002) oder auch Blut und Gewebe (Stewart und Steenkamp, 2001) betrachtet und reichen von Anfärbereaktionen für die Dünnschichtchromatographie (DC) bis hin zur Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). In den letzten Jahren wurde vor allem die HPLC mit Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) für die Analytik von PA eingesetzt. Diese und einige andere Methoden werden im Folgenden näher betrachtet. Da hochreine Standards nur in Einzelfällen verfügbar sind, stellt die quantitative Analytik von PA grundsätzlich eine besondere Herausforderung dar. Präparative Isolationsstechniken, z.B. Gewinnung mittels Counter-current Chromatographie (Kim *et al.*, 2001) oder mehrdimensionaler DC (Mroczek *et al.*, 2006) wurden bislang nur vereinzelt durchgeführt.

2.1.4.1 Probenaufarbeitung

Die Extraktion von PA aus Pflanzenmaterial, Phytopharmaka, humanem Gewebe oder Lebensmitteln erfolgt üblicherweise durch mittelpolare Lösemittel, wie z.B. Chloroform, meist mittels einer Soxhletapparatur oder durch Batchextraktion. Der so erhaltene organische Extrakt lässt sich durch Abdampfen leicht aufkonzentrieren. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von angesäuertem Alkohol bzw. Wasser als Extraktionsmittel dar. Hierbei ist die Reduktion der PA-N-Oxide zu tertiären PA durch Zugabe von Zink-Staub leicht zugänglich. Die wässrige Lösung ermöglicht die Rückextraktion der PA in mittelpolare organische Lösemittel nach erfolgter Alkalisierung (Crews und Krska, 2008).

Techniken der Festphasenextraktion (SPE) wurden bisher vor allem zur Aufreinigung von mit PA kontaminiertem Pflanzenmaterial und Lebensmitteln eingesetzt. Auf Kieselerde basierende SPE-Kartuschen wurden für Pflanzen (Witte *et al.*, 1993; Mossoba *et al.*, 1994) und Honig (Crews *et al.*, 1997) eingesetzt. Als Phase für die Isolierung

rung von tertiären PA hat man Ergosil eingesetzt (Gray *et al.*, 2004). SPE-Kartuschen mit starken Kationenaustauscher (SCX)-Medien wurden ebenfalls zur Extraktion von PA aus pflanzlichen Geweben (Chizzola, 1994; Mroczek *et al.*, 2002) sowie Honig (Beales *et al.*, 2004; Betteridge *et al.*, 2005) verwendet. SCX-SPE Kartuschen ermöglichen eine parallele Isolierung von PA-*N*-Oxiden und tertiären PA ohne vorherigen Reduktionsschritt. Dies ist insbesondere in Verbindung mit HPLC-Messtechniken ein großer Vorteil.

Für eine vorgeschaltete Reduktion von PA-*N*-Oxiden zu tertiären PA sind Umsetzungen mit Zink-Staub (Stelljes *et al.*, 1991), Natriumdithionit (Crews *et al.*, 1997) oder reduzierende Harze (Chizzola, 1994; Colegate *et al.*, 2005) gängig.

2.1.4.2 Gaschromatographie

PA in ihrer tertiären Form oder deren Derivate lassen sich mittels Gaschromatographie (GC) aus organischen Lösungen direkt bestimmen (Luethy *et al.*, 1981; Deinzer *et al.*, 1982; Witte *et al.*, 1993; Conradie *et al.*, 2005). Witte und Mitarbeiter (1993) zeigten, dass sich ca. 100 verschiedene PA mittels HRGC-MS unter Verwendung niederpolarer stationärer Phasen (Methylpolysiloxan wie z.B. OV-01 oder DB-1) trennen und identifizieren lassen. Aber auch stationäre Phasen mit einer höheren Polarität, z.B. 50% Phenylmethylpolysiloxan (DB-17), hat man zur Trennung von PA eingesetzt (Stelljes *et al.*, 1991).

Eine milde Hydrolyse der PA zur Necinbase und deren anschließende Bestimmung in derivatisierter Form mittels GC stellt einen alternativen Ansatz zur Ermittlung des PA-Gehaltes dar (Hovermale und Craig, 1998).

Gaschromatographie in Verbindung mit Tandemmassenspektrometrie (HRGC-MS/MS) wurde bisher äußerst selten und meist nur zur Aufklärung von Metaboliten eingesetzt (Winter *et al.*, 1988; Schoch *et al.*, 2000). Auch die chemische Ionisierung (CI) erwies sich nur in vereinzelt Fällen, z.B. zur Absicherung der Molekularmasse, als hilfreich (Luethy *et al.*, 1981; Mossoba *et al.*, 1994). Unter der Prämisse, molekülspezifische Informationen zu erhalten, stellt eine Kopplung aus Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) und GC eine Alternative zur MS-Detektion dar. Hierbei werden die charakteristischen Fingerprintregionen des FTIR-Spektrums zur Identifikation herangezogen (Bicchi *et al.*, 1989; Mossoba *et al.*, 1994). Da eindeutige Identifikationen allerdings nur durch authentische Referenzen oder durch Absicherung mittels Massenspektrometrie möglich sind, ist diese Technik nur von eingeschränktem Nutzen (Bicchi *et al.*, 1989; Mossoba *et al.*, 1994).

PA lassen sich gaschromatographisch ohne Derivatisierung analysieren, aber Peakform und Auflösung des Chromatogramms können durch eine solche verbessert und auch die mögliche Zersetzung der Substanzen im Injektor kann dadurch minimiert werden. Die häufigste Detrivatisierungsform stellen Trimethylsilylether nach Reaktion mit *N,O*-Bis-

(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) dar. Aber auch die Umsetzung zu Alkylboronaten hat sich als nützlich erwiesen (Crews und Krska, 2008). Durch die Derivatisierung zu Trimethylsilythern gelang Winter und Mitarbeitern (1988) die Entwicklung einer Methode zur simultanen Detektion von tertiären PA, PA-*N*-Oxiden und deren hydrolytischen Metaboliten mittels GC-MS/MS und GC-MS.

2.1.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) birgt gegenüber Methoden der GC einige Vorteile, so lassen sich z.B. tertiäre PA, thermolabile PA-*N*-Oxide und PA-Metabolite simultan trennen und analysieren. HPLC Methoden werden neben der Analytik auch für die semi-präparative Isolierung von PA genutzt, wobei hierfür die verschiedensten reversed-phase (RP) Säulenmaterialien, z.B. C₁₈- (Lin *et al.*, 1998; Cui und Lin, 2000; Mroczek *et al.*, 2004a), C₈- (Parker *et al.*, 1990), Phenyl- (Crews *et al.*, 1997) und Cyano gebunden (Brown *et al.*, 1994), eingesetzt worden sind. Als mobile Phase dienten hierbei üblicherweise basische Fließmittelgemische aus Ammoniumhydroxid (NH₄OH) und Acetonitril (ACN), aber auch saure Lösungen aus Ameisen-/Essigsäure oder deren Ammoniumsalze in Methanol oder ACN. Gray und Mitarbeiter verglichen systematisch die Performance von C₁₈-, C₈- und Phenyl-Säulenmaterialien bei verschiedenen mobilen Phasen hinsichtlich Peakform und -auflösung (Gray *et al.*, 2004). Um das Problem der asymmetrischen Peakform zu lösen, diskutierten Mroczek *et al.* (2002) eine Trennung unter Verwendung eines Ionenpaarreagenzes.

Trotz der bisher zur Analytik von PA vorgeschlagenen, zahlreichen HPLC-Methoden lassen herkömmliche UV-Detektoren die erforderliche Sensitivität und Spezifität vermissen. Als Alternative zur UV-Detektion nutzten Schaneberg *et al.* (2004) die Verdampfungs-Lichtstreuung (ELSD) zur Bestimmung von tertiären PA (ohne chromophores System) und deren *N*-Oxide. Diese Detektionsform konnte die Massenspektrometrie (MS) allerdings hinsichtlich Empfindlichkeit und Genauigkeit nicht als Detektor der Wahl zur PA-Analytik ablösen.

Zur Kopplung der Flüssigchromatographie (LC) an die Massendetektion (MS) wurden mit Thermospray (TSP) (Ndjoko *et al.*, 1999), chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) (Crews *et al.*, 1997; Beales *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2004; Mroczek *et al.*, 2004a, 2006), Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Lin *et al.*, 1998; Altamirano *et al.*, 2005; Betteridge *et al.*, 2005; Boppré *et al.*, 2005; Colegate *et al.*, 2005) und Thermabeam[®] (TB) (Mroczek *et al.*, 2004b) diverse Interfaces eingesetzt.

Gegenwärtig werden überwiegend Techniken der Atmosphärendruck-Ionisierung (API), wie ESI und APCI eingesetzt. Dabei handelt es sich um „sanfte“ Ionisierungstechniken, die Erkenntnisse über die jeweilige Molmasse bei niedriger Fragmentierungsrate

zulassen. Strukturelle Informationen werden bei API-Techniken durch Einsatz der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) zugänglich, bei der entweder einstufige Massenspektrometer oder bevorzugt Tandemmassenspektrometer (MS/MS) bzw. Ionenfallengeräte (IT) zum Einsatz kommen. Das TB-Interface ermöglicht über Elektronenstoß-Ionisation (EI) ebenfalls strukturelle Information, lässt jedoch im Vergleich zu MS/MS-Geräten erheblich an Sensitivität vermissen. Dies wird auch an den bisherigen Einsatzgebieten der unterschiedlichen Techniken deutlich. So setzten Mroczek und Mitarbeiter ein LC/EI-MS mit TB-Interface zum Screening von Pflanzenextrakten auf toxische PA ein (Mroczek *et al.*, 2004b), während Lin *et al.* (1998) ein Quadrupol-Gerät mit CID zur Strukturaufklärung von PA in Blutproben nutzten.

Derzeit findet aufgrund der vielfältigen experimentellen Möglichkeiten vor allem die Kopplung von HPLC mit IT-MS- und MS/MS-Geräten unter Verwendung von API-Interfaces eine breite Anwendung (Beales *et al.*, 2004; Wuilloud *et al.*, 2004; Boppré *et al.*, 2005; Colegate *et al.*, 2005; Mroczek *et al.*, 2004a, 2006). Auch die quantitative PA-Bestimmung mittels HPLC über den Summenparameter Retronecin (**3**) kam jüngst zum Einsatz (Zhang *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2009).

2.1.4.4 Weitere Methoden

Die NMR-Spektroskopie wurde lange zur Bestimmung und Bestätigung von PA-Strukturen genutzt. Umfassende Datensammlungen für ^1H -NMR (Logie *et al.*, 1994) und ^{13}C -NMR (Molyneux *et al.*, 1982; Roeder, 1990) wurden durch diverse Studien möglich. NMR-Techniken hat man auch zur quantitativen Bestimmung von PA eingesetzt (Pieters und Vlietinck, 1985, 1987; Pieters *et al.*, 1989a) und später mit Methoden der GC und HPLC verglichen (Pieters und Vlietinck, 1986; Pieters *et al.*, 1989b). Das ^1H -NMR-Spektrum von Pflanzenextrakten ist oft sehr komplex und eine Quantifizierung daher äußerst problematisch. Folglich erlaubt es eigentlich nur eine qualitative Aussage, während das ^{13}C -NMR-Spektrum aufgrund der besseren Auflösung unter Umständen auch zur quantitativen Analyse herangezogen werden kann. Ein Vergleich von chromatographischen mit NMR-Methoden zeigte eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, jedoch stellen die geringe Empfindlichkeit und die lange Analysendauer der NMR-Methoden große Nachteile dar, wodurch der Einsatz auf Extrakte mit hohen PA Gehalten (~10 mg) limitiert ist. Die Kopplung von HPLC, MS und ^1H -NMR erwies sich zwar als hilfreich bei der Unterscheidung von isomeren Strukturen, ließ aber ebenfalls die nötige Empfindlichkeit vermissen (Ndjoko *et al.*, 1999).

Mit einer relativ großen Anzahl von Färbe- bzw. Sprühreagenzien ist man in der Lage, auf das Vorhandensein von PA hinzuweisen. Die einfacheren Reaktionen sind wenig spezifisch und zeigen oft alle Alkaloide an (Roeder, 1999). Quantitative

Bestimmungen mittels Spektralphotometrie sind mit Ehrlich oder Mattocks Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd) bis hin zu 1 µg/g möglich (Mattocks, 1967a; Bartkowski *et al.*, 1997). Die gleichen Farbreaktionen wurden eingesetzt, um PA auf DC-Platten zu visualisieren (Mattocks, 1967b; Huizing und Malingre, 1981; Chizzola, 1994). Alternativ kam auch Dragendorff's Reagenz zu Einsatz, welches zwar weniger spezifisch, aber um Faktor 10 empfindlicher als Mattocks Reagenz ist (Parvais *et al.*, 1994). Da sich aber vor allem die Trennung auf DC-Platten als unzureichend darstellt ist diese Anwendung lediglich für eine Art „Schnellscreening“ geeignet. Für eindeutige Analysen von komplexen PA-Mischungen müssen aufwendigere Methoden wie GC und HPLC eingesetzt werden. Auch die Empfindlichkeit und Spezifität von photometrischen und dünnschichtchromatographischen Methoden reicht nicht an die von GC- und HPLC-Methoden heran.

In den letzten Jahren hat man auch ELISA-Methoden zur Analytik von PA beschrieben (Roeder, 1999; Than *et al.*, 2005). Mit dem Ziel, hohe Empfindlichkeit (Detektionslimits im ng- und pg-Bereich), Robustheit und hohe Probendurchsatzraten zu erzielen, wurden für eine Reihe von PA unterschiedliche ELISAs entwickelt. PA selbst sind als Moleküle zu klein, um als Immunogene zu reagieren, daher müssen sie zu Komplexen durch die Bildung von *N*-Hydroxysuccinimidderivaten überführt werden, um eine Immunantwort auszulösen (Zuendorf *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Die meisten ELISA nutzen polyklonale Antikörper (Roeder und Pflueger, 1995; Roseman *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001), aber auch monoklonale Antikörper wurden bereits eingesetzt (Zuendorf *et al.*, 1998). Da die PA-Antikörper meist nicht mit PA-*N*-Oxiden reagieren, ist auch hier ein Reduktionsschritt bei der Probenvorbereitung nötig.

Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens, der kurzen Analysendauer, des Trennungsvermögens und der Tatsache, dass nur geringe Probenmengen eingesetzt werden müssen, wird die Kapillarelektrophorese (CE) erfolgreich bei der Analytik von Inhaltsstoffen pflanzlicher Heilmittel angewendet. Eine Vielzahl von Alkaloiden hat man mit Hilfe von verschiedenen CE-Methoden, wie z.B. der Kapillarzonen-Elektrophorese (CZE), der wasserfreien Kapillar-Elektrophorese (NACE) und der Micellaren-elektrokinetischen-Chromatographie (MEKC), getrennt und bestimmt (Kreft *et al.*, 2000, Feng und Li, 2002; Gong *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2004). Für die Analytik von PA sind diese Techniken allerdings noch nicht verbreitet. So berichteten Lebeda *et al.* (2000) über die quantitative Analyse von toxischen PA in Huflattich mittels CE. Yu und Mitarbeiter entwickelten eine MEKC-Methode und verglichen diese hinsichtlich ihrer Trennungleistung von PA mit HPLC und NACE. Mit der so entwickelten Methode konnten sie vier PA aus Pflanzen der traditionellen chinesischen Medizin (*Qian liguang* und *Kuan donghua*) erfolgreich bestimmen (Yu *et al.*, 2005).

2.1.5 Gesetzliche Regulierungen und Stellungnahmen

Im ‚International Programme on Chemical Safety (IPCS)‘ hat die WHO die grundsätzliche Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch 1,2-ungesättigte PA festgestellt (WHO, 1988). Einige europäische Staaten, darunter auch Deutschland, haben daraufhin aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes PA-haltige Phytopharmaka einer Regulierung unterworfen (Bundesgesundheitsamt, 1992). Demnach gilt für PA mit 1,2-ungesättigtem Negerüst und deren N-Oxide bei Phytopharmaka ein Grenzwert von 1 µg PA/Tag bei oraler Aufnahme und 100 µg PA/Tag für äußerliche Anwendungen. Der Zeitraum der Anwendung derartiger Produkte wird jedoch auf maximal 6 Wochen im Jahr beschränkt. Wird die Arznei länger eingesetzt, gelten niedrigere Grenzwerte von 0,1 µg PA/Tag (oral) bzw. 10 µg PA/Tag (äußerlich). Für schwangere oder stillende Frauen ist die innere Anwendung untersagt (Bundesgesundheitsamt, 1992). Diese Richtlinien werden in nahezu identischer Form ebenfalls in der Schweiz und Österreich umgesetzt, und es wird damit gerechnet, dass sie in ähnlicher Form auch in anderen europäischen Ländern maßgeblich werden (Roeder, 2000). So ist für die Niederlande durch den so genannten Kräuterbeschluss ein maximaler Gehalt von 1 µg PA/kg oder Liter Kräuterpräparat bzw. Lebensmittel vorgesehen (Warengesetz, 2001; Van Engelen *et al.*, 1997). In Großbritannien wurden Beinwellwurzel enthaltende Präparate vom Markt genommen (MAFF, 1994). Dies geht einher mit einer Empfehlung der FDA an die Hersteller von Beinwell enthaltenden Nahrungsergänzungsmitteln in der durch *“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”* empfohlen wird (FDA, 2001).

Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) hat einen „provisional tolerable daily intake“ (PTDI) von 1 µg PA/kg Körpergewicht/Tag eingeführt und rät gleichzeitig Honigkonsumenten vom täglichen Konsum von Honigen aus *Echium plantagineum* ab (FSANZ, 2001). Laut Edgar (2003) existiert in Australien ein Limit von maximal 20 *Heliotropium*-Samen auf ein Kilo Weizen zum menschlichen Verzehr, äquivalent zu 800 µg PA/kg.

Durch Empfehlungen von Eloff *et al.* (2003) ist vom Department of Health in Südafrika eine Toleranz von zehn *Crotalaria sphaerocarpa*-Samen pro 10 kg Getreide eingeführt worden (Anonym, 2002).

Für Lebensmittel sind in Europa indes keine gesetzlichen Regulierungen bekannt. Zwar erfolgte kürzlich die Zulassung von raffiniertem *Echium*-Öl (2008/558/EG) als neuartige Lebensmittelzutat durch die EU, jedoch wird dort nur indirekt auf PA eingegan-

gen. Bei den Spezifikationen des Produktes werden PA als „nicht nachweisbar“ bei einer Nachweisgrenze von 4 µg/kg angegeben. Der Einsatz als „raffiniertes Echium-Öl“ reguliert sich über dessen Gehalt an Stearidonsäure (2008/558/EG).

Im Hinblick auf Lebensmittel hat in Deutschland die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) bereits vor einigen Jahren eine Stellungnahme verabschiedet, in der festgehalten ist, 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 [...] ist* (SKLM, 2002). Dies geschieht insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt des zunehmenden Verbrauchs von Nahrungsergänzungsmitteln, die Imkereierzeugnisse enthalten. Desweiteren werden in der Stellungnahme Forschungsarbeiten zur analytischen Erfassung von PA in Honig und Pollen angemahnt (SKLM, 2002).

In einer im Jahr 2005 vom National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) der Niederlande abgegebenen Empfehlung wurde aufgrund der karzinogenen Eigenschaften verschiedener PA eine „virtual safe dose“ (VSD) für die am stärksten toxischen PA anhand von Riddelliin (37) ermittelt. Diese VSD beträgt 0,43 ng/kg Körpergewicht/Tag. Dazu korrespondiert ein „maximum tolerable risk“ (MTR) von 43 ng/kg Körpergewicht/Tag. Außerdem wurde, ebenfalls von Riddelliin (37) abgeleitet, ein „tolerable daily intake“ (TDI) für nicht-karzinogene toxische Effekte von 0,1 µg/kg Körpergewicht/Tag festgelegt (Van der Zee, 2005). Weiterhin hat man 2006 eine Empfehlung zu PA in tierischen Produkten abgegeben. In dieser wurde geschlussfolgert, dass PA auf Milch und Leber sowie möglicherweise auch auf andere Produkte des landwirtschaftlichen Nutztviehs übertragen werden können. Auf Basis der bislang nur beschränkt verfügbaren Daten war jedoch keine Schlussfolgerung hinsichtlich der Signifikanz dieser Produkte als Kontaktquelle für PA möglich. Honig war indes nicht Bestandteil dieser Empfehlung (Park, 2006). Eine vom niederländischen Nahrungsmittel- und Warenamt (VWA) initiierte Studie zur PA-Belastung von Honigen in den Niederlanden kam unter Berücksichtigung vorangestellter Daten zur Erkenntnis, dass [...] *regelmäßiger Konsum von Honig und gleichzeitiger Konsum von Kräutern (oder anderen Nahrungsmitteln), die PA's enthalten, durch den selben Konsumenten, können das Risiko karzinogener (und toxischer) Effekte infolge des Kontakts mit den PA's für den Konsumenten steigern [...]* (VWA, 2007).

In einem Positionspapier zu Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln fordert das BfR im Jahr 2007: *„Bei der Bewertung der Verunreinigungen von Lebensmitteln durch Pflanzenteile oder Pflanzenbestandteile, [...] wird unterschieden ob [...] oder andererseits genotoxische Effekte (z.B. Pyrrolizidinalkaloide) des pflanzlichen Wirkprinzips im*

Vordergrund der Risikobewertung stehen. [...] wird das Konzept [...] der „Nulltoleranz“ angewendet“ (BfR, 2007a).

In Ihrer Stellungnahme zu PA als unerwünschte Stoffe in Futtermitteln kommt das Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain der European Food Safety Authority (EFSA) zu der Schlussfolgerung, dass die PA-Rückstände in tierischen Produkten als eher gering zu erachten sind, jedoch auf Honig, in dem regelmäßig PA gefunden werden, ein spezielles Augenmerk gelegt werden sollte (EFSA, 2007).

Neben den bisher bestehenden Regulierungen und Stellungnahmen in einigen Ländern soll eine EU-weite Regulierung in Vorbereitung sein (van Kreijl *et al.*, 2006).

2.1.6 Exposition mit Pyrrolizidinalkaloiden

Es gibt im Wesentlichen zwei Quellen für die Exposition von Menschen mit PA. Zum einen die bewusste Aufnahme von PA-haltigen Pflanzenteilen durch Gemüse, Kräuter, Samen (Getreide) oder pflanzliche Arzneistoffe bzw. Präparate und zum anderen die versehentliche Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel, sei es tierischer oder pflanzlicher Herkunft. Die schlechte Assoziation von Pflanze und Erkrankung, mangelnde Kenntnis über die chronischen Effekte und die Verzögerung zwischen Aufnahme und Erkennen der Symptome haben dazu geführt, dass PA-Vergiftungen von Menschen offenbar jahrelang unterschätzt wurden (Roitman, 1983). Daneben werden viele PA-haltige Pflanzen ganz bewusst als Lebens- oder Heilmittel in allen Teilen der Welt verwendet (Roeder, 1995; Roeder, 2000; Fu *et al.*, 2002).

2.1.6.1 Phytopharmaka und Kräuterpräparate

Das wachsende Interesse an „alternativen“ Therapien und Phytopharmaka hat in Europa und den USA zu einem wahren Boom an (für ihre gesundheitsfördernden Effekte bekannten) PA-haltigen Pflanzen bzw. deren Zubereitungen geführt. So ist Beinwell (*Symphytum officinale*) ein sehr beliebtes Kraut. Präparate in Form von getrockneten Blättern, getrockneten Wurzeln, Wurzelpulver, Tabletten, Kapseln, oft mit anderen Pflanzen verschnitten, wurden lange Zeit unter Anpreisung der Heilkraft und verdauungsfördernden Wirkung angeboten (Crews und Krska, 2008). Im Jahr 1994 wurden vom britischen Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) pflanzliche Zubereitungen von *Symphytum* (Beinwell), *Tussilago* (Huflattich), *Borago* (Borretsch) und *Eupatorium* (Wasserdost) auf ihren PA-Gehalt überprüft (MAFF, 1994).

Mit bis zu 5000 mg/kg (Tablettenform) und 8300 mg/kg (Wurzelpulver), dies entspricht einer geschätzten Tagesdosis von 35 mg, erwies sich Huflattich als mit PA hoch belastet. Beinwell- und Borretschteezubereitungen hingegen zeigten mit 100 mg/kg deut-

lich niedrigere Gehalte (MAFF, 1994). Eine Studie über die Beinwellzubereitungen auf dem amerikanischen Markt ergab, dass diese bis zu 1200 mg/kg PA enthalten können (Betz *et al.*, 1994). Spätere Studien bestätigten, dass PA in vielen in den USA gehandelten Beinwellpräparaten vorhanden sind (Altamirano *et al.*, 2005).

Durch das zunehmende Interesse an der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) wurden die dort eingesetzten Pflanzen verstärkt untersucht. Bis heute hat man rund 50 als PA-haltige Pflanzen identifiziert (Roeder, 2000; Fu *et al.*, 2002).

Die falsche Identifizierung einer Pflanze stellt ein zusätzliches Risiko für Konsumenten von Wildgemüse und Wildkräutern dar. So berichteten Sperl und Mitarbeiter von einem Vergiftungsfall, bei dem anstelle des weniger toxischen Huflattichs der toxischere Alpendost gesammelt und konsumiert wurde (Sperl *et al.*, 1995).

In Südafrika werden bis heute einige *Senecio*- und *Crotalaria*-Species zur Gewinnung von traditioneller pflanzlicher Medizin genutzt. So kommt es immer wieder vor, dass dort auftretende VOD-Leiden auf PA-Vergiftungen zurückzuführen sind (Steenkamp *et al.*, 2000).

2.1.6.2 Pyrrolizidinalkaloide in Lebensmitteln

Im Falle von Lebensmitteln kann eine mögliche Exposition des Menschen mit PA über pflanzliche oder, im Falle einer Verfütterung von PA-Pflanzen an Tiere, als sekundäre Kontamination über tierische Lebensmittel erfolgen. Im Folgenden wird auf die Bereiche der pflanzlichen und tierischen Lebensmittel etwas genauer eingegangen. Das Lebensmittel Honig wird in Kapitel 2.1.6.3 getrennt betrachtet.

Für pflanzliche Lebens- bzw. Genussmittel sind die unterschiedlichsten Wege der PA-Aufnahme dokumentiert. So können PA durch Kontamination von Getreide mit Samen von PA-Pflanzen in den menschlichen Organismus gelangen; dies ist häufiger in Afrika, Indien, Sri Lanka, Japan, Russland, Afghanistan (Mattocks, 1986; Huxtable, 1989; Yan und Huxtable, 1995a/b; Mohabbat *et al.*, 1976; Tandon *et al.*, 1976) und vereinzelt in Jamaika und den USA (Roeder, 1984) beobachtet worden. Einige dieser Aufnahmen führten zu gravierenden Vergiftungsfällen. 1976 zeigten in Afghanistan 20% der Bevölkerung eines Dorfes, nach Aufnahme von mit *Heliotropium* kontaminiertem Mehl, Anzeichen einer Lebererkrankung (Mohabbat *et al.*, 1976). Nach Aufnahme von stark mit *Crotalaria*-Saaten kontaminiertem Getreide starben in Indien 28 von 67 Patienten (Tandon *et al.*, 1976). Aber auch in neuerer Zeit kam es zu Vergiftungsfällen, wie z.B. im Falle von einer mit *Heliotropium* belasteten Weizenernte (Chauvin *et al.*, 1994). Auch der Genuss von sogenannten „herbal teas“ oder „bush teas“ führte des Öfteren zu Vergiftungserscheinungen durch PA (Bras *et al.*, 1954; Kumana *et al.*, 1985).

Die gezielte Verwendung von PA-Pflanzen wie *Petasites* (Pestwurz); *Tussilago* (Huflattich), *Symphytum* (Beinwell) und *Farfugium* (Leopardenpflanze) als Lebensmittel spielt meist nur im asiatischen Raum um Japan eine Rolle. Dabei ist das Wissen über das Vorhandensein von PA in der Bevölkerung nur mangelhaft (Hirono, 1993). Jüngste Ereignisse zeigten, dass solche Pflanzen oder Kräutermischungen aus PA-Pflanzen, z.B. als Urlaubssouvenirs, auch in Deutschland auftauchen können. So wurde durch die tägliche Verwendung einer türkischen Kräutermischung mit einem PA-Gehalt von 12,5 µg/g ein Vergiftungsfall einer schwangeren Frau mit Todesfolge für den Fötus ausgelöst (Rasenack *et al.*, 2003).

Als weitere potentielle Quelle für PA wird die Verwendung von Borretschöl diskutiert, welches aufgrund des hohen gamma-Linolensäure-Gehaltes als wertvolles Pflanzenöl angesehen wird. Borretsch (*Borago officinalis*) stellt eine im Vergleich zu anderen PA-Pflanzen PA-arme Gattung dar (Larson *et al.*, 1984; Luethy *et al.*, 1984). Das Öl enthält nahezu keine PA (Parvais *et al.*, 1994; Langer und Franz, 1997). Das liegt daran, dass im Samen nur wenig PA vorkommen und diese sich aufgrund ihrer Polarität nur schlecht im Lipophilen lösen. *Borago officinalis* ist nicht zu verwechseln mit den in Australien und Neuseeland weitverbreiteten *Echium*-Arten, welche u.a. auch den Namen „blue borago“ tragen.

Auch Salate bzw. Salatmischungen wurden in jüngster Zeit mit PA in Verbindung gebracht. So prüfte das Bundesinstitut für Risikoforschung (BfR) im Jahr 2006 die Kontamination einer bunten Blattsalatmischung mit *Senecio vulgaris* (BfR, 2007b). Das Bekanntwerden von begleitenden *Senecio vulgaris*-Pflanzenteilen in Rucola, führte im August 2009 zu einer kurzfristigen Verbannung von Rucola aus dem Sortiment eines deutschen Discounters (Die Zeit, 2009).

Für tierische Erzeugnisse gibt es bereits verschiedene Untersuchungen, die eine PA-Belastung in Lebensmitteln tierischer Herkunft, z.B. Eier, Ziegen- oder Kuhmilch, belegen (u.a. Dickinson *et al.*, 1976; Deinzer *et al.*, 1982; Goeger *et al.*, 1982; Edgar und Smith, 2000).

Diverse Studien bestätigen das Vorhandensein von PA in Kuh- (Dickinson *et al.*, 1976; Dickinson 1980) und Ziegenmilch (Deinzer *et al.*, 1982; Goeger *et al.*, 1982). Durch die Ausscheidung in der Magermilch-Fraktion zeigten Eastmann *et al.* (1982), dass die meisten PA wahrscheinlich wasserlösliche Metabolite darstellen. Später wurde diese Vermutung dadurch bestätigt, dass man wasserlösliche PA-N-Oxide in der Milch gefunden hat (Candrian *et al.*, 1991). In einer von Dickinson *et al.* (1976) durchgeführten Studie wurden Kühe mit *Senecio jacobaea* - der PA-Gehalt beträgt 0,16% bezogen auf das Trockengewicht - gefüttert. Anschließend konnten in der Milch für das PA Jacolin (39)

Gehalte von 0,094 bis 0,167 ppm nachgewiesen werden. Bei einer Folgebetrachtung der Studie hat man die Gesamt-PA-Gehalte mit 0,544-0,892 ppm ermittelt (Dickinson, 1980). Auch bei Fütterung von Ziegen mit der genannten PA-Pflanze wurden in der Milch PA im Bereich von 0,222-0,530 ppm festgestellt (Dickinson, 1980). Durch Fütterung von Ziegen mit einer auf das Körpergewicht bezogenen 1%-igen PA-Diät zeigten Deinzer *et al.* (1982) dass PA im Bereich von 0,33-0,81 ppm in die Milch übergehen können. Durch die industrielle Vereinigung von Kuhmilchliefereien in großen Mengen dürfte jedoch die Gefahr einer PA-Aufnahme in solche Dimensionen gemindert werden bzw. ohnenin nur dann bestehen, wenn die Tiere keine Futterwahlmöglichkeit, wie z.B. bei Stallhaltung, haben. Eine mögliche Gefahr besteht vermutlich nur beim Konsum von Ziegenmilch, da Ziegen sich relativ tolerant gegenüber PA-Pflanzen im Nahrungsangebot zeigen (Dickinson, 1980; Molyneux und James, 1990). Ein weiteres Risiko könnte der Direktverzehr von Milch einer einzelnen Kuh bzw. Ziege, sofern diese PA aufgenommen hat, darstellen (Molyneux und James, 1990).

Es sind auch diverse, durch PA-haltiges Futter verursachte Vergiftungsfälle von Geflügel bekannt. Die Ergebnisse einer Publikation von Edgar und Smith (2000) belegen, dass PA die menschliche Nahrungskette auch über Eier erreichen können. Drei Scharen von Hühnern mit kleiner Legekapazität wurden mit weizenbasiertem Futter, welches *Heliotropum europaeum* in einer Konzentration von ca. 0,6% enthielt, gefüttert. Die Weizen-Analysen ergaben das Vorhandensein der PA Supinin (**41**), Heleurin (**42**), Heliotrin (**32**), Europin (**43**) und Lasiocarpin (**35**). Der Gehalt dieser PA sowie anderer die wahrscheinlich metabolisiert wurden lag bei 1,2 bis 9,7 µg pro Ei.

In Fleisch von mit PA-haltigen Pflanzen gefütterten Tieren sind bisher keine nennenswerten PA-Rückstände bekannt. Dafür nennt man diverse Gründe. So werden die reaktiven Pyrrol-Zwischenprodukte der PA mit einer relativ kurzen Halbwertszeit metabolisiert, welche schnell an zelluläre Makromoleküle (z.B. GSH, Proteine und DNA) binden (s. Kapitel 2.1.3 und Abbildung 2-9). Dadurch wird es wenig wahrscheinlich, dass PA-Rückstände in gesundheitsgefährdenden Mengen im Fleisch vorkommen (Coulombe, 2003). Ausnahmen sollte es nur dann geben, wenn die Tiere kurz nach der Fütterung mit kontaminiertem Futter geschlachtet werden. Demzufolge wird derzeit keine bedeutende Gefährdung der Gesundheit durch PA aus Fleisch gesehen (Coulombe, 2003).

2.1.6.3 Pyrrolizidinalkaloide in Honig und Pollen

Aufgrund der Biosynthese und anschließenden Verteilung sowie Speicherung der PA in der Pflanze stellt Honig ein Lebensmittel mit einem erhöhten Risiko für eine PA-Kontamination dar. Ende der 70er Jahre wurde in ersten Publikationen das Vorkommen von PA in Honig aus *Senecio jacobaea* (Jakobsgrleißkraut, Asteraceae) in den USA und *Echium*

plantagineum L. (Natternkopf, Boraginaceae) in Australien nachgewiesen (Deinzer *et al.*, 1977; Culvenor *et al.*, 1981). So fanden erstmals Deinzer *et al.* (1977) in vier Honigen von *Senecio jacobaea* PA-Gehalte zwischen 300 und 3900 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig). Culvenor und Mitarbeitern (1981) gelang es, in fünf Honigproben aus *Echium plantagineum* PA Kontaminationen von 270-950 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig) zu ermitteln.

Im 'International Programme on Chemical Safety (IPCS)' hat die WHO die grundsätzliche Gefährdung der menschlichen Gesundheit, die von 1,2-ungesättigten PA ausgeht, festgestellt (WHO, 1988). Darauf wurde bereits in Kapitel 2.1.5 hingewiesen.

Eine Studie aus Großbritannien (MAFF, 1995) zieht zur Abschätzung des Gefahrenpotentials die Spitzenverbraucher in den Bevölkerungsgruppen, d.h. Erwachsene, Schulkinder und Kleinkinder, heran. Man hat bei 8 aus insgesamt 23 Honigproben Pollen von *Senecio jacobaea* gefunden. In diesen kontaminierten Proben wurden nach Festphasenanreicherung und nachfolgender HPLC-APCI-MS-Analyse PA aus *Senecio jacobaea* im Bereich von 2 bis 1480 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig) nachgewiesen. Diese ersten Ergebnisse wurden anschließend in einer Publikation erweitert (Crews *et al.*, 1997). Abschließend erwiesen sich hierbei 10 aus 23 Honigen im Bereich von 2-1480 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig), bei Analysen von PA aus *Senecio jacobaea* als PA-positiv (Crews *et al.*, 1997).

Vor dem Hintergrund der strengen Regulierung von Phytopharmaka (siehe Kapitel 2.1.5) wurde die potentielle Gesundheitsgefährdung durch PA-haltige Honige in einer vor wenigen Jahren publizierten Übersicht neu bewertet (Edgar *et al.*, 2002). Grundsätzlich ist nach Auffassung der Autoren ein Gefahrenpotential gegeben, da bei einer Auswertung von Pollenanalysen der Beitrag von PA-Pflanzen zu Honigen weltweit belegt werden konnte (s. Tabelle 2-3). Es gibt keine Hinweise darauf, dass Honigbienen PA-Pflanzen nicht anfliegen. Folglich nehmen sie dort auch Nektar zur Honigproduktion auf.

Die folgende Tabelle 2-3 gibt einen Überblick über die wichtigsten PA-haltigen Pflanzen. Gattungen, die weltweit in Honigen per Pollenanalyse nachgewiesen werden konnten, sind fett dargestellt. Dies sind vor allem *Senecio*- (Kreuzkraut), *Echium*- (Natternkopf), *Borago*- (Borretsch) und *Symphytum*- (Beinwell) Arten.

Tab. 2-3 Übersicht PA-haltige Pflanzen; fett dargestellt sind Gattungen, die weltweit in Honigprodukten per Pollenanalyse nachgewiesen wurden (nach Roth *et al.*, 1994 und Edgar *et al.*, 2002)

Familie	Gattungen
Asteraceae	<i>Adenostyles</i> , <i>Arnica</i> , <i>Cacalia</i> , <i>Echinaceae</i> , <i>Eupatorium</i> , <i>Ligularia</i> , <i>Petasites</i> , <i>Senecio</i> , <i>Tussilago</i>
Boraginaceae	<i>Amsinckia</i> , <i>Anchusa</i> , <i>Borago</i> , <i>Cynoglossum</i> , <i>Echium</i> , <i>Heliotropium</i> , <i>Lindelofia</i> , <i>Myosotis</i> , <i>Rindera</i> , <i>Solenanthus</i> , <i>Symphytum</i> , <i>Trichodesma</i>
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus</i> , <i>Securinega</i>
Fabaceae	<i>Adenocarpus</i> , <i>Crotalaria</i>
Orchidaceae	<i>Liparis</i> , <i>Malaxis</i> , <i>Phalaenopsis</i> , <i>Vanda</i> , <i>Vandopsis</i>
Poaceae	<i>Festuca</i> , <i>Lolium</i> , <i>Thelepogon</i>

Die Ergebnisse früherer Studien zum Vorkommen von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Honig (u.a. Crews *et al.*, 1997) wurden kürzlich in einer von Beales *et al.* (2004) veröffentlichten Arbeit bestätigt. Dort hat man gezeigt, dass in 29 Honigen, die von PA-produzierenden Pflanzen (*Heliotropium* spp. und *Echium* spp.) gewonnen wurden, Gehalte von 33-2200 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig) vorhanden waren. Ferner fanden sich in 19 von 39 Honigproben, die nicht PA-produzierenden Pflanzen zugeordnet wurden, Gehalte von 3-800 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig). Im unmittelbaren Anschluss publizierten Betteridge *et al.* (2005), dass in 7 von 9 Honigproben, darunter 5 Honige, die *Echium vulgare* (Boraginaceae) zugeordnet werden konnten, 17-2850 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig) PA enthalten waren. Die bisher umfangreichste Studie zu PA in Honigen umfasste 171 Handelsproben. In dieser vom niederländischen Nahrungs- und Warenmittelamt initiierten Studie hat man PA-Kontaminationen im Bereich von 1-365 ppb nachgewiesen (VWA, 2007). Die Analytik dieser Proben war allerdings auf elf verschiedene PA bzw. PA-N-Oxide vornehmlich aus *Senecio jacobaea* limitiert.

Tabelle 2-4 gibt einen Überblick über die bisher publizierten PA-Gehalte in Honig.

Tab. 2-4 Zusammenfassung der bisher publizierten PA-Gehalte in Honig

Gattung/Target	Gehalt [$\mu\text{g/g}$]	Probenanzahl	Anmerkungen	Referenz
<i>S. jacobaea</i> L.	0,3-3,9	4 von 4 Proben belastet	per Pollenanalyse 0.7 - 2.6% <i>S. jacobaea</i> Pollen	Deinzer, 1977
<i>E. plantagineum</i>	0,27-0,95	5 von 5 Proben belastet	- 4 Proben sortenrein gewonnen - 1 Probe käuflich als „ <i>Echium</i> honey“ erworben	Culvenor <i>et al.</i> , 1981
<i>S. jacobaea</i>	0,01-0,056	6 von 13 Proben belastet ¹	in den 6 belasteten Proben 0 - 8.9% <i>S. jacobaea</i> Pollen	Crews <i>et al.</i> , 1997
<i>S. jacobaea</i>	0,42-1,48	2 von 2 Proben belastet ²	per Pollenanalyse 2.0 - 4.4% <i>S. jacobaea</i> Pollen	Crews <i>et al.</i> , 1997
<i>S. jacobaea</i>	0,002	2 von 8 Proben belastet ³	in den 2 belasteten Proben 0 - 1.1% <i>S. jacobaea</i> Pollen	Crews <i>et al.</i> , 1997
<i>E. plantagineum</i> <i>H. amplexicaule</i> <i>H. europaeum</i>	0,033-2,2	29 von 29 Proben belastet	Proben wurden durch Imker PA-produzierenden Pflanzen zugeordnet	Beales <i>et al.</i> , 2004
<i>E. plantagineum</i> <i>H. amplexicaule</i> <i>H. europaeum</i>	0,003-0,8	19 von 39 Proben belastet	Proben wurden durch Imker nicht PA-produzierenden Pflanzen zugeordnet	Beales <i>et al.</i> , 2004
<i>E. vulgare</i>	0,017-2,85	7 von 9 Proben belastet	- 5 Proben durch Imker zu <i>E. vulgare</i> zugeordnet - 4 Proben ohne Zuordnung	Betteridge <i>et al.</i> , 2005
<i>S. jacobaea</i>	0,001-0,365	43 von 171 Proben belastet ³	Proben wurden auf elf in <i>S. jacobaea</i> vorkommende PA vermessen	VWA, 2007

¹ gezielte Honiggewinnung in Gebieten mit potenziellem *S. jacobaea* Bestand;

² Verdachtsproben auf Grund von Hinweisen auf *S. jacobaea* Belastung durch Geruch und Aussehen;

³ Handelsproben

Zwei der jüngsten Arbeiten auf dem Gebiet der PA in Verbindung mit Bienenprodukten zeigten, dass auch ein direktes Gefahrenpotential durch die Einnahme von Pollenpräparaten ausgeht. So gelang Boppré *et al.* (2005) der Nachweis, dass reine Pollen von *Echium vulgare* (Boraginaceae) PA-Gehalte von 8222-13985 ppm ($\mu\text{g/g}$ Pollen) aufweisen. Ergänzt werden diese Ergebnisse durch eine aktuelle Arbeit von derselben Arbeitsgruppe, in welcher gehöselte Bienenpollen u.a. auf mit PA-Pflanzen

besiedelten Feldern gesammelt und native Pollen analysiert wurden (Boppre *et al.*, 2008). Man hat native Pollen und Pollenladungen von Bienen untersucht, welche von *Echium vulgare*, *E. plantagineum*, *Senecio jacobaea*, *S. ovatus* und *Eupatorium cannabinum* stammten. Die ermittelten PA-Werte lagen zwischen 155-800 ppm ($\mu\text{g/g}$) für native Pollen und in den gehöselten Pollenladungen von Bienen bei 6-350 ppm ($\mu\text{g/g}$) (Boppré *et al.*, 2008). Eine Trocknung der gehöselten Pollen, wie sie auch bei kommerziellen Pollenprodukten angewendet wird, hatte nur geringen Einfluss auf den PA-Gehalt.

Tabelle 2-5 gibt einen Überblick auf die bisher bekannten Daten zu PA-Gehalten in Pollen.

Tab. 2-5 Übersicht über bisher publizierte PA-Gehalte in nativen und gehöselten Pollen

Gattung/Target	Gehalt [$\mu\text{g/g}$]	Anmerkungen	Referenz
<i>E. vulgare</i>	8222-13985	native Pollen	Boppré <i>et al.</i> , 2005
<i>E. vulgare</i>	350 \pm 50	gehöselte Pollen (8 Pollenladungen von 4 Bienen)	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>E. plantagineum</i>	28 \pm 15	gehöselte Pollen (Queensland/Australia)	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>E. plantagineum</i>	6 \pm 1	gehöselte Pollen (New South Wales und Western Australia)	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>S. jacobaea</i>	800	native Pollen	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>S. jacobaea</i>	100	gehöselte Pollen (Pollenladungen von 17 solitären Bienen)	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>S. ovatus</i>	155 \pm 20	native Pollen	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>S. ovatus</i>	70 \pm 20	gehöselte Pollen (28 Pollenladungen von 14 Bienen)	Boppré <i>et al.</i> , 2008
<i>E. cannabinum</i>	120 \pm 20	gehöselte Pollen (20 Pollenladungen von 10 Bienen)	Boppré <i>et al.</i> , 2008

Aufgrund der bislang bereits bekannten PA-Konzentrationen in Pollen ist für Pollenprodukte eine deutlich höhere PA-Belastung als für Honig zu erwarten. Somit ist mit einer potentiellen Gefährdung durch zum menschlichen Verzehr genutzte Pollenprodukte zu rechnen (Boppré *et al.*, 2005).

2.2 Honig als Lebensmittel

2.2.1 Definition

Honig ist gemäß der Anlage 1 der Honigverordnung (HonigV) „der natur süße Stoff, der von Honigbienen erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Sekrete lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindende Exkrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydratisieren und in den Waben des Bienenstocks speichern und reifen lassen“ (Anlage 1 HonigV).

Honige verschiedener pflanzlicher Herkunft unterscheiden sich sowohl in Geruch als auch in Farbe und Geschmack voneinander. In der HonigV wird anhand der Kriterien Herkunft, Gewinnungsart, Angebotsform und Zweckbestimmung zwischen neun Honigarten unterschieden (Tabelle 2-6).

Tab. 2-6 Honigarten (nach Anlage 1 der HonigV)

Verkehrsbezeichnung	Begriffsbestimmung
1. Blütenhonig oder Nektarhonig	Vollständig oder überwiegend aus dem Nektar von Pflanzen stammender Honig
2. Honigtauhonig	Honig, der vollständig oder überwiegend aus auf lebenden Pflanzenteilen befindlichen Exkreten von aus Pflanzen saugenden Insekten (Hemiptera) oder aus Sekreten lebender Pflanzenteile stammt
3. Waben- oder Scheibenhonig	Von Bienen in den gedeckelten, brutfreien Zellen der von ihnen frisch gebauten Honigwaben aus feinen, ausschließlich aus Bienenwachs hergestellten gewaffelten Wachsplättchen gespeicherter Honig, der in ganzen oder geteilten Waben gehandelt wird
4. Honig mit Wabenteilen oder Wabenstücke in Honig	Honig, der ein oder mehrere Stücke Wabenhonig enthält
5. Tropfhonig	Durch Austropfen der entdeckelten, brutfreien Waben gewonnener Honig
6. Schleuderhonig	Durch Schleudern der entdeckelten, brutfreien Waben gewonnener Honig
7. Presshonig	Durch Pressen der brutfreien Waben ohne oder mit Erwärmung auf höchstens 45°C gewonnener Honig
8. gefilterter Honig	Honig, der gewonnen wird, indem anorganische oder organische Fremdstoffe so entzogen werden, dass Pollen in erheblichem Maße entfernt werden
9. Backhonig	Honig, der für industrielle Zwecke oder als Zutat für andere Lebensmittel, die anschließend verarbeitet werden, geeignet ist

Nach der EU Richtlinie für Honig (2001/110/EG) sowie der entsprechenden nationalen Honig-Verordnung (HonigV) ist gefilterter Honig als Verkehrsbezeichnung zugelassen. Neben dem Entzug von Pollen sind bei diesem weitere Qualitätseinbußen durch die Filtration zu befürchten. Gefilterter Honig ist daher von minderer Qualität und nicht mehr naturbelassen, er spielt auf dem deutschen Markt nur eine marginale Rolle, wodurch in Honig nahezu immer Pollen zur Bestimmung der Sorte und regionalen Herkunft angetroffen werden. Das Filtern sollte laut EU-Richtlinie und HonigV die Ausnahme sein. Honig unter dem Warenzeichen des Deutschen Imkerbundes darf nicht gefiltert werden (LAVES, 2006a).

2.2.2 Gewinnung, Inhaltsstoffe und Verwendung

Honig ist bekanntermaßen ein von Honigbienen erzeugtes Lebensmittel. Nach Angaben des deutschen Imkerbundes (DIB) produziert jedes deutsche Bienenvolk eine durchschnittliche Erntemenge von jährlich 15-20 kg Honig. Für die Erzeugung saugen die Bienen Blütennektar, Blütensäfte und Honigtau durch ihren Rüssel in die Honigblase, transportieren ihn auf diesem Weg in den Bienenstock und geben ihn dort an die Stockbienen ab. Diese pumpen nun den Inhalt ebenfalls in ihre Honigblase, würgen ihn anschließend mehrmals heraus und saugen ihn wieder auf. Durch diese Vorgehensweise werden dem Blütennektar, Blütensaft oder Honigtau Futtersaft und Speichel beigemischt, wodurch die für die Honigreifung wichtigen Enzyme wie Saccharase, Glucoseoxidase, Amylase und Phosphatase in den Honig gelangen. Im Weiteren wird die Flüssigkeit in den Wabenzellen eingelagert. Aufgrund der warmen Stockluft und dem damit verbundenen Wasserverlust wird dem Honig die Feuchtigkeit entzogen. Bis zur endgültigen Reifung wird der Honig von den Bienen immer wieder aufgesogen und mit deren körpereigenen Sekreten angereichert und mehrmals umgelagert. Nach der Reifung wird der Honig, dessen Wassergehalt jetzt $\leq 20\%$ beträgt, in eine Wabe gefüllt und mit Wachs gedeckelt (Deifel, 1998).

Zur Gewinnung des Honigs werden in der Regel die brutfreien Waben aus dem Bienenstock entnommen und die verschlossenen Honigwaben vom Imker entdeckt. Beim weiteren Vorgehen wird zwischen dem Leck-, Tropf-, Lauf- oder Senkhonig, dem Presshonig, dem Steinhonig, dem Stampfhonig und dem Schleuderhonig unterschieden (Römpp, 2006). Bei Schleuderhonig handelt es sich um die heute gängige Methode zur Honiggewinnung. Dabei werden die Waben in einen Rahmen gehängt und in einer Honigschleuder unter Ausnutzung der Zentrifugalkräfte ausgeschleudert. Dadurch wird der Honig aus den Waben gezogen und sammelt sich am Boden der Schleuder. Beim Ablassen des Honigs durch ein Sieb wird er von groben Partikeln, wie z.B. Wabenzellen oder Wabenstücken befreit. Feinere Partikel wie z.B. Pollen verbleiben dagegen im Honig

und sind unter anderem auch für dessen Färbung verantwortlich. Nach der Reinigung und einer evtl. Wärmebehandlung (Wiedererwärmung nach Auskristallisieren) wird der Honig abgefüllt (Römpf, 2006). Bei Backhonig handelt es sich im Gegensatz zum Speisehonig um einen nicht vollwertigen, nur als Zusatz zum Backen verwendbaren Honig. Dieser ist entweder in eine starke Gärung übergegangen, hat infolge Treibens fremdartigen Geruch und Geschmack angenommen oder wurde stark erhitzt (Belitz *et al.*, 2001).

Je nach Ertragszeit unterscheidet man zwischen Frühhonigen (Tracht bis Ende Mai), Haupthonigen (Tracht im Juni und Juli) und Späthonigen (Tracht im August und September). Je nach Pflanzenherkunft kann auch hier zwischen Blütenhonig und Honigtauhonig unterschieden werden.

Honig stellt im Wesentlichen eine konzentrierte wässrige Lösung von Invertzucker dar, enthält daneben aber eine sehr komplexe Mischung verschiedener anderer Kohlenhydrate, außerdem Enzyme, Aminosäuren, organische Säuren, Mineralstoffe, Aromastoffe, Pigmente, Wachse und Pollenkörner. Da Honig ein Naturprodukt ist, unterliegt seine Zusammensetzung naturgemäß starken Schwankungen.

Hierbei sind die Kohlenhydrate mit ca. 75% neben Wasser, ca. 16-18% (max. 21%), die Hauptbestandteile des Honigs (Deifel, 1998). Der Wassergehalt von Honig sollte immer unter 20% liegen, da Honige mit höheren Werten sehr anfällig gegen eine Vergärung durch osmophile Hefen sind. Neben den Hauptzuckern Glucose (ca. 34%) und Fructose (ca. 38%), die durch die Honigsaccharase aus Saccharose freigesetzt werden, enthält Honig in geringen Mengen eine Reihe von seltenen Oligosacchariden. Letztere können unter Umständen auch zur botanischen Herkunftsbestimmung herangezogen werden (Belitz *et al.*, 2001). Der Saccharosegehalt kann in Abhängigkeit vom Reifegrad sehr stark schwanken. Einen Überblick über die detaillierte Zusammensetzung von Honig und deren Schwankungsbreite gibt Tabelle 2-7.

Tab. 2-7 Zusammenfassung der Honiginhaltsstoffe (nach Römpp 2006; Belitz *et al.*, 2001)

Inhaltsstoffe	Mittelwert	Schwankungsbreite
Wasser	18,6 g	17,5-20,6 g
Protein	0,38 g	0,3-0,5 g
Fett	0	
Verwertbare Kohlenhydrate	75,1 g	
Asche	0,22 g	0,2-0,4 g
Natrium	7 mg	5-10 mg
Kalium	47 mg	43-56 mg
Magnesium	6 mg	-
Calcium	5 mg	-
Eisen	1,3 mg	-
Phosphor	30 mg	-
Vitamin K	25 µg	-
Vitamin B ₁	3 µg	2-4 µg
Vitamin B ₂	50 µg	20-100 µg
Vitamin B ₆	160 µg	-
Pantothensäure	70 µg	-
Glucose	33,9 g	26,3-39,8 g
Fructose	38,8 g	35,9-42,1 g
Stärke	0	

Als wichtigste Enzyme im Honig sind α -Glucosidase (Invertase, Saccharase), α - und β -Amylase (Diastasen), Glucose-Oxidase, Katalase und saure Phosphatase zu nennen (Belitz *et al.*, 2001; Römpp, 2006).

In Deutschland gilt Honig als Lebensmittel und dient außer zum unmittelbaren Genuss als Speisehonig auch zu Backzwecken (z.B. Honigkuchen), zur Herstellung alkoholischer Getränke durch Mischen mit Alkohol (z.B. Honiglikör) oder durch Vergären zu gewürztem Honigwein (z.B. Met). In der Kombination mit Milch und Getreideprodukten findet man Honig auch in Kindernährmitteln. Medizinisch wird Honig in reiner Form oder in Zubereitungen (z.B. Fenchelhonig) angewendet. Aber auch in der Süßwarenindustrie findet man mit Honig angereicherte Produkte (z. B. Honigbonbons) (Belitz *et al.*, 2001).

2.2.3 Marktsituation

Die jährliche Weltproduktion an Honig liegt bei 1,2 Mio Tonnen, wobei die größten Honigproduktionsländer in Mittel- und Südamerika angesiedelt sind. War der Weltmarktpreis im Jahr 2002 noch mit 0,50 bis 1,50 Euro/kg Honig angegeben, so wird er derzeit auf 0,50 bis 3,00 Euro/kg Honig taxiert (LAVES, 2002; LAVES 2006b). Der

Produktionspreis für ein kg Honig in Deutschland wird mit 3,50 Euro angegeben (LAVES, 2002). Von den Fairhandelsorganisationen TRANSFAIR und Max Havelaar wurde ein Richtpreis ermittelt, der sich an dem Durchschnittspreis der letzten Jahre für Honig aus der „Dritten Welt“ orientiert. Zurzeit liegt dieser Mindestpreis bei 1.550 US-\$ pro Tonne.

In Deutschland hält sich der Honigverbrauch seit Jahren auf einem gleich bleibend vergleichsweise hohen Niveau. Nach Angaben des deutschen Imkerbundes produziert jedes deutsche Bienenvolk eine durchschnittliche Erntemenge von jährlich 15-20 kg Honig, was einer Gesamtmenge von 15.000-20.000 t Honig entspricht. Diese Menge deckt ca. 20% des deutschen Honigverbrauchs, der jährlich bei ca. 90.000-100.000 t liegt (Warenverein, 2008; Warenverein, 2009).

Deutschland stellt neben den USA und Japan eines der größten sog. Honigimportländer dar, welches ca. 80% seines inländischen Bedarfes mit Importen deckt. Dies resultiert u.a. aus den seit Jahren sinkenden deutschen Honigernten (Warenverein, 2009). Im Jahr 2007 wurden insgesamt 95.320 t Honig nach Deutschland importiert, 2008 waren es dagegen mit 91.920 t ca. 3,5% weniger als im Vorjahr (Warenverein, 2009). Der Re-Export von Honig ist seit Jahren auf niedrigem Niveau und fiel auch 2008 mit 6.936 t erneut gering aus. Derzeit darf nach den bestehenden gesetzlichen Regelungen der Europäischen Union nur aus ca. 35 Drittländern Honig in die EU importiert werden (Warenverein, 2008; Warenverein, 2009). Tabelle 2-8 gibt eine Übersicht über die Entwicklung der wichtigsten Lieferländer und für den Honigimport in Deutschland.

Tab. 2-8 Honigimportmengen in den Jahren 2003, 2005, 2007 und 2008 nach Jahresberichten des Warenvereins (Warenverein, 2008; Warenverein, 2009)

Land	Importmenge in Tonnen			
	2003	2005	2007	2008
Spanien	1236	1510	3066	3257
Ungarn	6252	6069	5370	5592
Rumänien	5265	3759	3633	3895
Tschechische Republik	1732	1471	2096	481
Bulgarien	2441	1535	1927	1232
Niederlande	- ^{a)}	54	910	33
Polen	- ^{a)}	72	543	314
Slowakei	949	489	329	634
Österreich	- ^{a)}	273	245	143
Italien	1648	3261	2951	2071
Frankreich	440	429	542	310
andere EU Länder	243	106	456	536
Argentinien	29342	37181	29297	28606
Mexiko	9402	9386	14453	15253
Uruguay	3471	4359	9589	7696
Indien	4629	3870	3527	2744
Chile	2966	5410	5564	7065
Kuba	2162	3824	3435	3001
Ukraine	- ^{a)}	516	2095	1100
China	1462	1432	1191	2196
Guatemala	508	202	690	581
El Salvador	1678	1264	507	729
Brasilien	8017	6154	483	1350
Neuseeland	792	363	462	671
Kanada	555	527	402	826
Australien	144	375	331	476
Türkei	6286	1023	264	51
Vietnam	748	323	122	24
Nicaragua	- ^{a)}	80	122	399
Andere Länder	1220	334	718	654
<i>Gesamt-Import</i>	<i>93588</i>	<i>95651</i>	<i>95320</i>	<i>91920</i>
<i>Re-Export</i>	<i>7077</i>	<i>12056</i>	<i>8558</i>	<i>6936</i>
<i>Import netto</i>	<i>86511</i>	<i>83595</i>	<i>86762</i>	<i>84984</i>

a) keine Angaben

Insgesamt trugen 2008 mehr als 28 Länder zum deutschen Honigimport bei, wobei ca. 70% des Gesamtimports aus nur fünf Ländern stammte. Argentinien stellte hier mit 31,1% im Jahr 2008 den wichtigsten Honiglieferanten dar, gefolgt von Mexiko (16,6%), Uruguay (8,4%) und Chile (7,7%). Beachtlich blieb der Anteil der Importe aus Brasilien. Trotz eines 2006 in Kraft getretenen Importverbotes wurden über Zolllagerbestände noch 483 t nach Deutschland importiert. Seit März 2008 ist das Importverbot wieder

aufgehoben, und so wurden 2008 bereits wieder 1350 t nach Deutschland importiert. Mit einer Erhöhung seiner Importmenge nimmt auch Kuba einen immer wichtigeren Platz in der Liste der Honigimportländer für Deutschland ein (Warenverein, 2009).

Aus der EU wurden 2008 insgesamt 18.494 t Honig importiert, und damit rund 16% weniger als im Vorjahr. Stärkste Lieferländer waren dabei Ungarn (6,1%) und Rumänien (4,2%) gefolgt von Spanien (3,5%) und Italien (2,3%) (Warenverein, 2009). Zusammen mit der Slowakei sind das die Mitgliedstaaten, die ihre Liefermenge gegenüber dem Vorjahr steigern konnten. Bei allen Übrigen mussten z.T. deutliche Lieferrückgänge verzeichnet werden (Warenverein, 2009).

Statistisch gesehen verzehrte jeder Europäer im Jahr 2003 1,3 g Honig am Tag, was dem weltweit höchsten Verbrauch entspricht. Im Vergleich dazu lag die tägliche Aufnahme an Honig im mittleren Osten bei 0,8 g/Tag, die in Afrika bei 0,5 g/Tag und die in Lateinamerika bei 0,3 g/Tag (WHO, 2003). Da bei solchen statistischen Erhebungen alle Verbraucher, d.h. auch diejenigen, die bestimmte Lebensmittel überhaupt nicht zu sich nehmen, erfasst werden, geht man gerade im Bereich von Lebensmitteln, die nur von einer bestimmten Bevölkerungsgruppe konsumiert werden, wie z.B. Leber oder auch Honig, unter Anwendung der 95. Perzentile davon aus, dass der Verbrauch innerhalb dieser Gruppe ca. beim Dreifachen des Durchschnitts der gesamten Bevölkerung liegt (WHO, 1985). Bereinigt man daher die Statistik der WHO um diese sog. „Nicht-Honig-Esser“, ergibt sich ein täglicher Verzehr von 3,9 g Honig pro Person und Tag (WHO, 1985; WHO, 2003). Dass diese Berechnungsgrundlage gerechtfertigt ist, zeigt für Honige z.B. die Tatsache, dass Honig erst ab dem 13. Lebensmonat zum Verzehr geeignet ist und somit Säuglinge und Kleinkinder nicht berücksichtigt werden sollten.

Deutschland liegt bei seinem Honigverbrauch deutlich über dem europäischen Durchschnitt. Laut statistischen Jahrbüchern des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) lag der durchschnittliche pro Kopfverbrauch im Jahr 1996 bei 1,4 kg sowie in den Jahren 1997 bis 2007 bei ca. 1,1 kg Honig/Jahr (BMELV, 2007; BMELV, 2008; Warenverein, 2008). Daraus ergibt sich bei derzeit ca. 82,1 Mio. Bundesbürgern ein Durchschnitt von ca. 3 g/Tag. Unter Annahme, dass auch in Deutschland nur eine gewisse Subpopulation Honig verzehrt, und unter Berücksichtigung der Berechnungsgrundlage der WHO ist davon auszugehen, dass der tägliche Pro-Kopf-Konsum bei derzeit ca. 9 g liegt. Vereinzelt kann der Verbrauch bei den sog. „Honigliebhabern“ um ein Vielfaches höher liegen.

In Studien zur Erfassung von sog. Extremkonsumenten ergaben sich für diese weit höhere, tägliche Verzehrsmengen als in den Statistiken der WHO genannt. So konsumieren z.B. vereinzelt britische Kleinkinder Höchstmengen von bis zu 32 g Honig täglich, Schulkinder bis zu 60 g/Tag und Erwachsene sogar bis zu 93 g/Tag (MAFF, 1995).

Ähnliche Studien aus Australien berichten von Aufnahmemengen für das Gros der Honig-Esser, die für Kinder (2-4 Jahre) bei täglich 28,6 g Honig und für Jugendliche (13-19 Jahre) bei sogar 64,2 g liegen (Australian Bureau of Statistics, 1995).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die deutsche Bevölkerungsschicht der „Honig-Esser“ weit mehr als die von der WHO genannten 1,3 g/Tag konsumiert. Dies gilt insbesondere für Kinder und deren Vorliebe für Süßes.

2.3 Pollen als Lebensmittel

Pollen (lat. feiner Staub) ist der männliche Part in der geschlechtlichen Fortpflanzung von Samenpflanzen (LAVES, 2004). Samenpflanzen, sog. Spermatophyta, bilden Samen als Verbreitungsorgane. Die Fortpflanzungsorgane der Samenpflanzen befinden sich in der Blüte, wo in den Pollensäcken der Staubblätter die Pollenkörner erzeugt werden (Lüttge *et al.*, 1999; Sitte *et al.*, 2002). Die Pollen einer jeden Pflanzenart zeigen eine charakteristische Oberflächenstruktur der Pollenwand (Sporoderm). Sie sind mehr oder weniger kugelig und weisen je nach Pflanzenart einen Durchmesser zwischen 5 µm bis über 200 µm auf, wobei die meisten Pollenkörner im Bereich zwischen 20 µm und 75 µm liegen (LAVES, 2004).

Wie im Erscheinungsbild unterscheiden sich die Pollen auch in ihrem Nährstoffgehalt. Besonders nährstoffreich sind Pollen von z.B. Krokus, Weide, Obst, Raps oder Heide. Weniger nährstoffreich sind dagegen Pollen von z.B. Fichte, Kiefer, Haselnuss und Erle. Pollen oder Blütenstaub ist eine wichtige Nahrungsgrundlage für das Bienenvolk. Er enthält die für die Bienen notwendigen Proteine, Aminosäuren, Vitamine, Fette, Mineralstoffe, Spurenelemente. Über den Nährstoffgehalt und weitere Inhaltsstoffe von Frischpollen gibt Tabelle 2-9 Auskunft.

Tab. 2-9 Zusammenfassung der Inhaltsstoffe von Frischpollen (nach LAVES, 2004; LAVES, 2006c)

Inhaltsstoffe	Mittelwert
Kohlenhydrate	30%
Proteine	20%
Fette	5% (besonders im Pollenkitt)
Wasser	< 10%
Freie Aminosäuren	10%
Ballaststoffe	6%
Enzyme	Glucoseoxidase, Invertase, Diastase
Vitamine	Vitamin B-Gruppe
Mineralstoffe und Spurenelemente	Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, Chrom, etc.
Aromastoffe	„Grünnoten“; etc.
Farbstoffe	Flavanoide; Carotinoide
Sekundäre Pflanzenstoffe	Flavanoide; Phytosterine

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass Pollen nicht nur eine wichtige Nahrungsgrundlage für die Bienen darstellen, sondern dass sowohl das Immunsystem als auch die Entgiftungsmechanismen der Bienen von der Pollenversorgung abhängig sind. So sind z.B. Bienen mit schlechter Pollenversorgung anfälliger gegenüber Pflanzenschutzmitteln, als entsprechend gut versorgte Bienen. In der Ernährung der Bienen gibt es keinerlei Pollenersatzstoffe, weshalb es für ein Bienenvolk wichtig ist, ein ausreichendes Pollenangebot zu haben (LAVES, 2004).

Wegen seines hohen Nährstoffgehaltes und der damit verbundenen essentiellen Rolle in der Ernährung und dem Gesundheitsstatus der Biene wird Pollen als Lebensmittel ein spezielles, gesundheitsförderndes Image zugeschrieben. Daher erfreut er sich besonders im Bio-Segment einer gesteigerten Nachfrage. So sind Pollenprodukte schon seit längerer Zeit in Reformhäusern, und seit kurzem auch in Vollsortiment-Supermärkten als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich. Als solche sollen Pollen, so wird es nach Herstellerangaben suggeriert, insbesondere Dank der enthaltenen Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente und sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zur Steigerung des Immunsystems, der Belastungsfähigkeit und zur Förderung der Vitalität beitragen.

Pollen kommt entweder als Frischpollen (gehöseltes Konglomerat) oder als Bienenbrot in den deutschen Handel. Bei Frischpollen handelt es sich um reinen Blütenpollen, welchen die Honigbienen während ihrer Nektarsuche von den Staubblättern abstreifen und an den Hinterbeinen als sog. Pollenhöschen ansammeln. Für die Ernte des Frischpollens bringt der Imker vor dem Eingang des Bienenstockes eine sog. Pollenfalle an, die aus einem engmaschigen Gitter besteht. Die Bienen passen durch dieses Gitter hindurch, verlieren beim Hindurchlaufen aber ihre angesammelten Pollensäckchen. Diese fallen in

einen Sammelbehälter und werden vom Imker von Fremdstoffen gereinigt, getrocknet und eventuell tiefgefroren (LAVES, 2006c).

Für das Bienenbrot, auch Perga genannt, wird der gesammelte Blütenpollen von den Stockbienen bei der Einlagerung in die Wabenzellen mit ihrem Speichel vermischt und dadurch fermentiert, wodurch der Pollen haltbar gemacht wird. Zusätzlich wird der Pollen in der Zelle mit einer Propolissschicht verschlossen. Das Bienenbrot dient der Fütterung der Bienen, wird aber auch für die Brut verwendet. Die Gewinnung von Bienenbrot erfolgt durch ein Ausstanzen aus den Zellen oder durch Herausheben mittels eines Pollenhebers aus den Waben (LAVES, 2006c)

Über die aktuelle Marktsituation von Blütenpollen sind derzeit nur wenige Informationen verfügbar. Es liegen keinerlei Statistiken über Verzehrsmengen vor. Die von den Herstellern empfohlenen Tagesrationen schwanken zwischen 10-100 g/Tag. Deutschland ist ein Pollenimportland, dessen Hauptlieferanten Spanien (mit über 1000 t Pollen/Jahr) und Ungarn sind (LAVES, 2006c).

Für Pollenprodukte gibt es bisher weder Qualitätsnormen noch rechtliche Regulierungen, so sind Pollen im Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG) derzeit nicht definiert. Es gilt somit die allgemeine Sorgfaltspflicht sowie die Pflicht zur Deklaration, Angabe der Menge, Name und Adresse des Verkäufers oder Herstellers. Nach §12 LFBG gilt auch das Verbot der krankheitsbezogenen Werbung. Daneben gelten die Rückstands-Höchstmengenverordnung, die Hygiene-Verordnung, das Eichgesetz sowie die Los-Kennzeichnungsverordnung (LAVES, 2006c).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden

3.1.1 Referenzmaterialien

Zur Methodenentwicklung und –etablierung wurden fünf kommerziell verfügbare PA, d.h. Monocrotalin (**9**), Senecionin (**7**), Seneciphyllin (**36**), Senkirkin (**26**) und Retrorsin (**30**) (s. auch Kapitel 4.1.1) sowie der PA-Extrakt aus Blüten von *Senecio vernalis* (vergleiche Kapitel 4.3) eingesetzt. Die Aufreinigung des erhaltenen *S. vernalis*-Rohextraktes ergab 700 mg einer Referenz-PA-Mischung mit folgender Zusammensetzung (s. Abbildung 3-1).

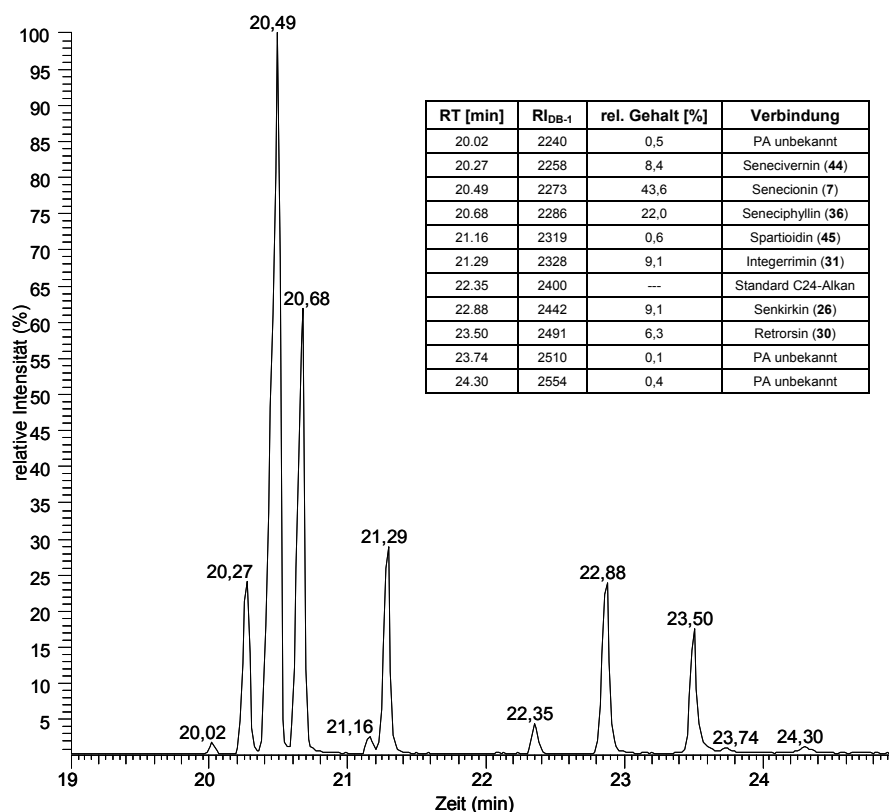


Abb. 3-1 HRGC-MS-Trennung auf einer J&W DB-1MS Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm, $d_f = 0,25 \mu\text{m}$) (Totalionenchromatogramm, TIC) des aufgereinigten *Senecio vernalis*-Extraktes. In der Tabelle ist die genaue Zusammensetzung angegeben.

Zusätzlich wurde ein Aliquot dieser Referenz-PA-Mischung aus *Senecio vernalis* mittels m-Chlorperbenzoesäure nach Cymerman Craig und Purushothaman (1970) in die entsprechenden PA-N-Oxide überführt, die nach LC-Reinigung an Al_2O_3 in > 97%-reiner Form gewonnen wurden (gemäß Kapitel 4.8.1). Die so erhaltenen PA-N-Oxide konnten nun ebenfalls einer Probenmatrix zugesetzt werden, um nach Reduktion methodisch

miterfasst zu werden. Die analytische Erfassung von PA-*N*-Oxiden ist essentiell, da – wie vorgängig ausgeführt – natürlicherweise in den meisten Pflanzen die *N*-Oxid-Form dominiert.

3.1.2 Entwicklung einer Extraktions- und Anreicherungs-methode zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honigen

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden diverse Varianten zur Isolierung und Konzentrierung von PA in Honig geprüft.

3.1.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

In Vorversuchen zur Extraktion von tertiären PA aus wässrigen Medien erwies sich ein Lösemittelgemisch aus CH₂Cl₂:Pentan im Mischungsverhältnis 1:2 (v/v) als ideal. Durch dieses Vorgehen konnten (mittels HRGC-MS bestimmte) Wiederfindungsraten im Bereich von 82,5-90,5% erzielt werden, während diese bei Extraktionen mit Dichlormethan (CH₂Cl₂) und Chloroform (CHCl₃) nur zwischen 34% und 65% lagen (s. Anhang Tabellen 7-2, 7-3 und 7-4).

Die Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen wurden nun auf LLE-Ansätze mit Honigmatrix übertragen. Hierzu wurden die Referenz-PA auf 10-25 g Honig dotiert; mit 250 ml Wasser verdünnt und anschließend analog zu den Vorversuchen mit CH₂Cl₂:Pentan (1:2, v/v) extrahiert.

Bei der Auswertung der LLE-Ansätze mit Honig zeigten sich jedoch die Grenzen dieser Extraktionstechnik. So resultierten aus den LLE-Aufarbeitungen zwar gute Wiederfindungsraten, jedoch ergaben sich, bedingt durch Coelution und Matrixeffekte, große Probleme bei der Reproduzierbarkeit. Abbildung 3-2 gibt die Wiederfindungsraten der Referenz-PA nach 24-stündiger LLE-Extraktion aus einer Honigmatrix wieder. Die Standardabweichungen zeigten trotz wiederholter Aufarbeitung (n=13) große Schwankungsbreiten (vgl. Anhang Tabelle 7-5), so dass die Ermittlung einer mittleren Wiederfindung als nicht sinnvoll erschien.

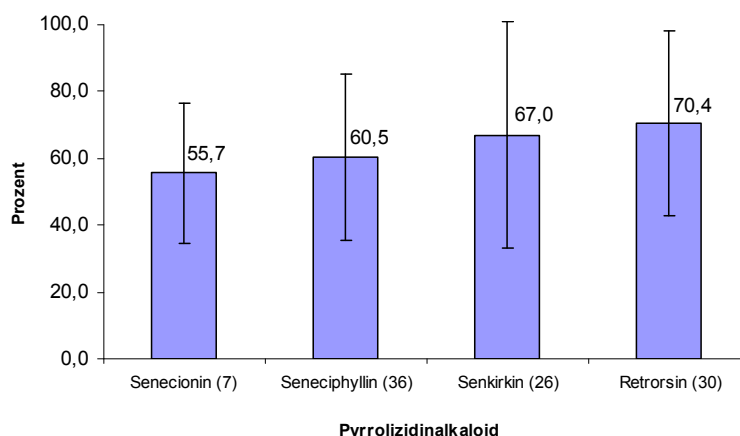


Abb. 3-2 Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=13) einzelner PA nach 24-stündigen LLE-Ansätzen (CH_2Cl_2 :Pentan 1:2; v/v) mit Honigmatrix (n= Anzahl der Durchführungen).

Aus diesem Grund wurde die weitere Isolationsstrategie an den kürzlich publizierten Methoden von Beales *et al.* (2004) und Betteridge *et al.* (2005) orientiert.

3.1.2.2 Festphasenextraktion (SPE)

Aufbauend auf Beispielen aus der Literatur (Hoesch *et al.*, 1996; Crews *et al.*, 1997; Mroczek *et al.*, 2002; Beales *et al.*, 2004; Betteridge *et al.*, 2005) wurde die SPE bei Variation von Lösemittel und der stationären Phasen getestet. Anhand von Literaturdaten (Betteridge *et al.*, 2005) wurde eine Kationenaustauscherphase (SCX) gewählt. Zur Optimierung wurden 14 verschiedene SCX-SPE-Produkte mit Mischungen aus bis zu 11 verschiedenen PA und deren *N*-Oxiden geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach Flußrate, Handling, möglichen Verstopfungen durch die zähe Matrix, Interferenzen und Wiederfindungsraten beurteilt (s. Anhang Tabelle 7-6). Diese ersten Vorversuche zeigten, dass eine Vielzahl von SCX-SPE-Kartuschen, bedingt durch Verstopfungen, für die Isolierung und Konzentrierung von PA aus Honig ungeeignet sind. Unter den 14 getesteten SCX-SPE-Produkten erwies sich die Varian HF Bond Elut LRC[®] SCX-Kartusche (Varian, Palo Alto, CA, USA) als für unsere Zwecke bestes Produkt. Die Kartusche zeichnet sich durch eine größere Porengröße aus und ist daher für viskose und klebrige Matrices gut geeignet. Das Problem des Verstopfens der SPE-Kartuschen konnte durch Temperierung der Proben auf dem Wasserbad (40°C) - analog Betteridge *et al.* (2005) - noch weiter minimiert werden.

Da sowohl tertiäre PA als auch die entsprechenden *N*-Oxide toxikologische Relevanz besitzen (s. Kapitel 2.1.3, u.a. Stegelmeier *et al.*, 1999), musste die Methodenentwicklung beide PA-Formen umfassen. Dies konnte durch die Verwendung

der synthetisierten *N*-Oxide (s. Kapitel 4.8.1) und der tertiären PA modelliert und optimiert werden.

Die besten Ergebnisse bei der Analyse von PA-*N*-Oxiden wurden durch eine Reduktion mit Zinkstaub in schwefelsaurem Milieu (Hartmann und Toppel, 1987) vor der Anreicherung mittels SPE erzielt. Dabei wurden die *N*-Oxide in die korrespondierenden tertiären PA überführt. Reduktionen mit Natriumdithionit oder eine Reduktion erst nach der Anreicherung mittels SPE lieferten keine adäquaten Ergebnisse.

Durch den Einsatz der HF Bond Elut LRC[®] SCX-SPE-Kartusche sind bei guten Fließeigenschaften und stabilen Reproduzierbarkeiten Wiederfindungsraten von 57-207% für Einzel-PA ermittelt werden (vgl. Anhang Tabelle 7-7). Als 100%-Wiederfindungskontrolle dienten hierbei direkt vermessene Probenlösungen der PA in der gleichen Ausgangskonzentration. Die für einzelne PA in der Literatur angegebenen Wiederfindungsraten von 70% (Beales *et al.*, 2004) bzw. 70-80% (Betteridge *et al.*, 2005) konnten somit mit Einschränkungen erreicht werden. Abbildung 3-3 gibt die für die jeweiligen PA ermittelten Wiederfindungsraten bei Verwendung der HF Bond Elut LRC[®] SCX-SPE-Kartusche an. Während dieser Versuchsreihe wurde ein entscheidender Faktor offensichtlich: je komplexer die Matrix, desto größer wurden die Interferenzen während der Chromatographie. So lassen sich auch die Wiederfindungen >100% erklären, die durch Coelution mit Honiginhaltsstoffen zustande kommen. Derartige Coelutionen sind, wie sich anhand einer Vielzahl von Tests zeigte, unvermeidlich und stellen somit ein grundsätzliches Problem dar.

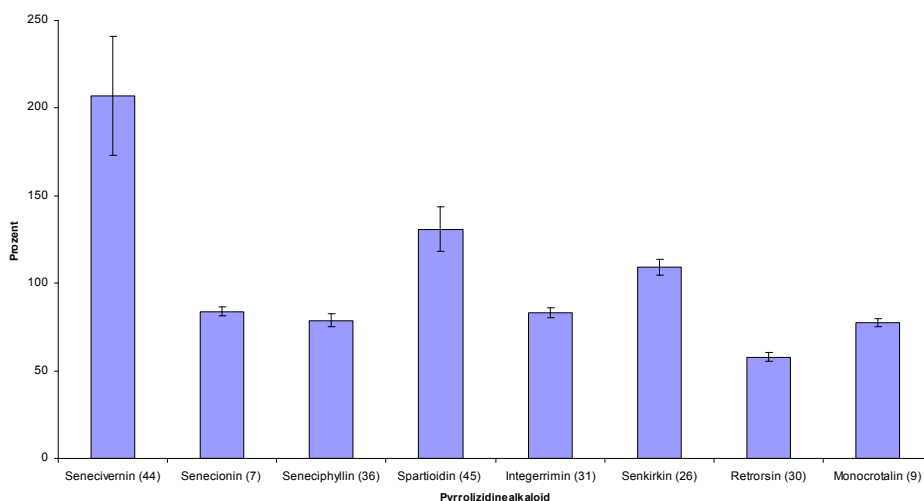


Abb. 3-3 Bei Anwendung der Varian HF Bond Elut LRC[®] SCX ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=4) mit Honigmatrix (n= Anzahl der Durchführungen).

Bei der Bewertung der erzielten Resultate der hier getesteten Methoden der PA-Anreicherung unter Einbeziehung der jeweils aufgetretenden Schwierigkeiten und vor dem Hintergrund, dass PA in hoher Vielfalt (ca. 400 Verbindungen) mit ähnlichen Strukturen in Pflanzen vorkommen (Hartmann und Witte, 1995; Hartmann und Ober,

2008), erfolgte zur Vereinfachung der komplexen Analytik eine Neuausrichtung der analytischen Strategie:

Toxische PA zeigen alle das gemeinsame Strukturmerkmal der 1,2-Doppelbindung der Necinbase in Verbindung mit einer allylischen Esterbindung. Dieses Strukturmerkmal ist Voraussetzung für die Bioaktivierung durch die hepatischen P-450-Enzyme sowie Bildung der reaktiven Pyrrolstruktur und damit ursächlich für die Toxizität der PA (s. auch Kapitel 2.1.3, u.a. Stegelmeier *et al.*, 1999). Dadurch bedingt zeigen die Necinbasen Retronecin (**3**) bzw. Heliotridin (**4**) selbst nahezu keine Toxizität (Yan *et al.*, 2008). Im Allgemeinen liegt die überwiegende Mehrheit der natürlich vorkommenden PA als Mono- oder Diester des Retronecins (**3**) vor. Weitaus seltener treten toxische PA mit Supinidin (**2**) oder Heliotridin (**4**) als Necinbase auf (Hartmann und Witte, 1995). Zudem bezieht sich die Reglementierung von PA in Phytopharmaka in Deutschland ebenfalls auf „*Pyrrrolizidin-Alkaloide[n] mit einem 1,2-ungesättigten Necin-Gerüst*“ (Bundesgesundheitsamt, 1992).

Demzufolge wurde das Ziel definiert, eine Methode zu entwickeln, bei der alle hauptsächlich toxikologisch relevanten Monoester- und Diester-PA der 1,2-ungesättigten Necinbasen (Retronecin (**3**) und Heliotridin (**4**)), sowie deren *N*-Oxide, als Summenparameter erfasst werden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass nur noch zwei Verbindungen für die Identifizierung und Quantifizierung herangezogen werden müssen. Zusätzlich werden alle relevanten PA mit 1,2-ungesättigter Struktur in maximal zwei mögliche Zielverbindungen überführt und dadurch die Sensitivität im geforderten Analysenbereich gesteigert.

Nachteil der beschriebenen Vorgehensweise ist, dass die ebenfalls toxisch bewerteten Otonecin-Typ-PA aufgrund ihres von Retronecin (**3**) bzw. Heliotridin (**4**) abweichenden Grundgerüsts sowie Supinidin-Typ-PA nicht erfasst werden. Jedoch ist bisher kein Fall bekannt, bei dem Otonecin-Typ-PA als einzige PA in einer Pflanzenart vorkamen (Hartmann und Dierich, 1998). Üblicherweise ist es eher umgekehrt, dass nämlich Retroencin-Ester-PA von Otonecin-Typ-PA begleitet werden. Supinidine-Typ-PA treten in der Natur selten und in weniger hohen Konzentrationen auf (Hartmann und Witte, 1995). Somit kann eine potentielle toxikologisch relevante PA-Kontamination noch immer durch die Detektion der Basisstruktur der Retronecin-Ester-PA, das Retronecin (**3**), erkannt werden.

Zur Überführung der PA-Ester in ihre korrespondierenden Necinbasen wurden diverse Vorgehensweisen getestet. Basische Hydrolysen mittels NaOH, KOH oder Ba(OH)₂ zeigten hierbei Ergebnisse mit mangelnder Reproduzierbarkeit. Als Methode der Wahl stellte sich die Reduktion der Esterbindung mit LiAlH₄ in THF heraus. Das einzusetzende Reagenz ist kommerziell erhältlich, einfach in der Handhabung und lieferte in einer Reihe von Modellversuchen reproduzierbare, verlässliche Ergebnisse.

Im Sinne der neuen analytischen Strategie wurde mit Heliotrin (**32**), einem wenig verbreiteten natürlichen PA, als internem Standard gearbeitet. Heliotrin (**32**) liefert nach Reduktion die Necinbase Heliotridin (**4**), wohingegen die eingesetzten Modell-PA (gemäß Kapitel 3.1.1) Retronecin (**3**) bilden (Abbildung 3-4).

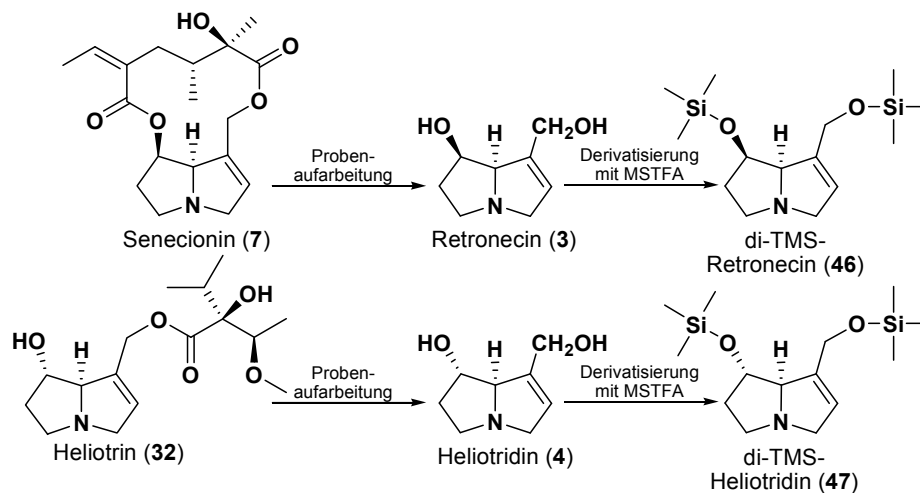


Abb. 3-4 Schematische Darstellung der ablaufenden chemischen Reaktionen bei der Proben-aufarbeitung und Derivatisierung der PA-Bestimmung, für Retronecin-PA, z.B. Senecionin (**7**, oben), und dem internen Standard Heliotrin (**32**, unten) in die entsprechenden derivatisierten Necinbasen (**46**, di-TMS-Retronecin; **47**, di-TMS-Heliotridin).

Heliotridin (**4**) stellt ein Diastereomer zu Retronecin (**3**) dar. Beide Necinbasen, Retronecin (**3**) und Heliotridin (**4**), waren nach Derivatisierung (Silylierung) mittels MSTFA sehr gut chromatographisch zu trennen und zu detektieren (s. Abbildung 3-5). Durch die Verwendung eines Diastereomers als interner Standard kann auf die Anwendung von Extraktions- und Responsefaktoren verzichtet werden. Durch die spärliche natürliche Verbreitung stellt Heliotrin (**32**) somit einen nahezu idealen Standard zur quantitativen Bestimmung von PA als Summenparameter dar.

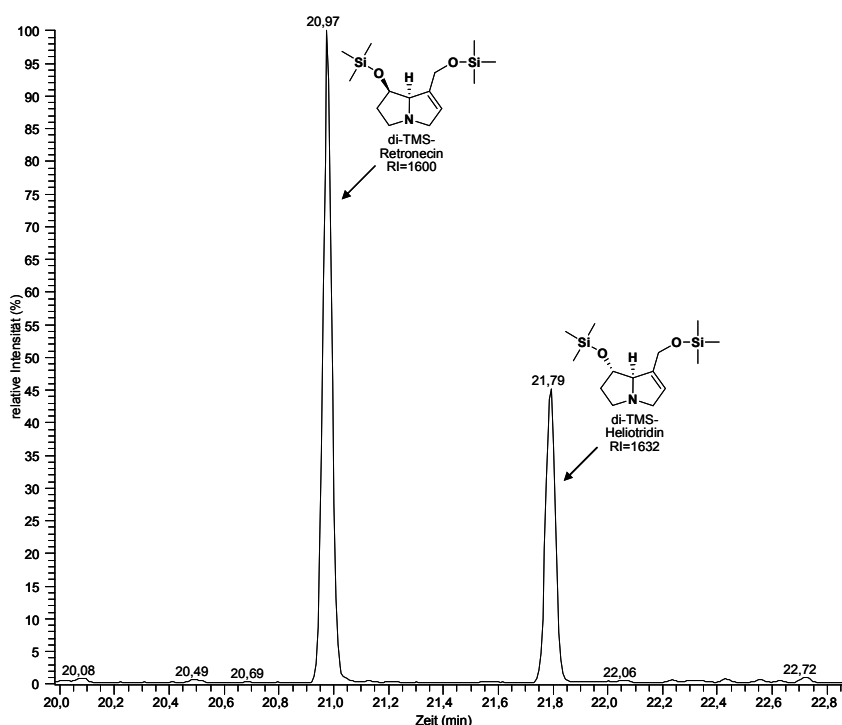


Abb. 3-5 Trennung der Diastereomere di-TMS-Retronecin (**46**, RI=1600) und di-TMS-Heliotridin (**47**, RI=1632) auf einer J&W DB-1MS Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm, $d_f = 0,25 \mu\text{m}$) mittels HRGC-MS (TIC).

Anhand dieser Versuche und den bereits durchgeführten Tests mit unterschiedlichen SPE-Materialien wurde als Methode der Wahl hinsichtlich Verlässlichkeit und Empfindlichkeit folgendes, kurz zusammengefasstes Vorgehen etabliert, um PA und deren PA-N-Oxide mit hoher Empfindlichkeit selektiv in Honig zu analysieren (siehe auch Kapitel 4.4.1.1.1 und Kapitel 4.4.2):

- (i) Lösen / Verdünnen mit 0,05 M H_2SO_4
- (ii) Zugabe des internen Standard Heliotrin (2 μg)
- (iii) Reduktion eventuell vorkommender PA-N-Oxide mit Zn-Staub zu tertiären PA
- (iv) Anreicherung an einer SCX-SPE Kartusche
- (v) Elution der isolierten PA mit ammoniakalischem Methanol
- (vi) Reduktion der PA-Ester mit LiAlH_4 zu Retronecin bzw. Heliotridin
- (vii) Derivatisierung mit MSTFA
- (viii) Chromatographische Trennung der TMS-Derivate und Nachweis/Quantifizierung mittels HRGC-MS

Der Einsatz von Heliotrin (**32**) als internem Standard machte eine doppelte Aufarbeitung notwendig, d.h. einmal mit und einmal ohne Zugabe von Heliotrin (**32**), da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Honigprobe bereits natürlicherweise Heliotridin-PA enthält. Wird in der Probe ohne Zugabe von Heliotrin (**32**) Heliotridin (**4**) als Base detektiert, dann kann diese Probe nicht mit dieser Methodik quantifiziert werden. Der Peak für di-TMS-Heliotridin (**47**) dient in der zweiten Probe immer zur Quantifizierung des di-TMS-Retronecin-Peaks.

Die zweite Probe (mit Heliotridin, **4**) ist zugleich eine Kontrolle der Probenvorbereitung, da immer zumindest Heliotridin (**4**) nachgewiesen werden muss; ist dies nicht der Fall, so gibt es ein generelles Problem (z.B. Unempfindlichkeit des Messsystems), und die Probe müsste erneut in der oben beschriebenen Form mit doppelter Aufarbeitung untersucht werden.

In einer Testserie von zehn Wiederholungen wies die HF Bond Elut LRC[®] SCX-Kartusche (Varian, Palo Alto, CA, USA) eine mittlere Wiederfindungseffizienz von $83 \pm 3,0\%$ SD für PA und deren *N*-Oxide, auf. Identische Experimente mit der früher von Betteridge *et al.* (2005) eingesetzten Strata[™] SCX SPE-Kartuschen lieferten eine Wiederfindung von $65 \pm 6,0\%$ SD. Das hier eingesetzte High Flow (HF) - Material der Firma Varian basiert auf Benzolsulfonsäure und zeigt eine größeren Porenweite ($> 60 \text{ \AA}$) als übliche Produkte; somit ein ideales Produkt für zähflüssige, klebrige Matrices.

3.1.2.3 Methodenoptimierung zur Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA)

Der Nachteil der o.g. Methodik liegt zum einen in der doppelten Probenaufarbeitung und zum anderen darin, dass bei natürlichem Heliotridin-PA-Gehalt keine Quantifizierung erfolgen kann. Idealerweise ließe sich eine empfindliche und exakte Quantifizierung über einen stabilisotopen-markierten internen PA-Standard mit der Markierung im Grundgerüst Retronecin (**3**) / Heliotridin (**4**) durchführen, um so Aufarbeitungsverluste und individuelle Faktoren der Proben zu eliminieren. Aufwand und Auswertung würden dadurch erleichtert. Um die Analysen so einfach wie möglich zu gestalten, müsste eine enantiomerenreine Synthese erfolgen. Gemäß Literaturrecherche gab es hierfür zwei Möglichkeiten, um mit vertretbarem Aufwand ein synthetisches PA mit dem Grundgerüst eines isotopenmarkierten Retronecins herzustellen. Die Synthese war dabei abhängig von der Verfügbarkeit eines geeigneten stabilisotopenmarkierten Synthesebausteins oder der enantiomerenreinen Necin-Base.

Ein möglicher synthetischer Zugang wurde von Pandey und Lakshmaiah (1994) veröffentlicht. Ausgehend von enantiomerenreinem (R)- bzw. (S)-3-Hydroxypyrrolidin kann optisch reines Retronecin (**3**) bzw. Heliotridin (**4**) erhalten werden. Als zweiter Baustein wird Methylpropiolat eingesetzt, welches auch in ¹³C-markierter Form verfügbar

war (Cambridge Isotope Laboratories, No. CLM-3056). Dieser Syntheszugang wurde jedoch nach intensiven Vorversuchen aufgegeben, da die Cycloaddition der Synthesestufe mit Methylpropiolat, welche die Markierung in das Molekül eingebracht hätte, in mehreren verschiedenen Ansätzen nicht erfolgreich war.

Eine zweite Möglichkeit stellte die vierstufige semi-synthetische Vorgehensweise zum Endprodukt di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) dar. Durch die an Hoskins und Crout (1977) angelehnte alkalische Hydrolyse von kommerziellem Monocrotalin (**9**) konnte nach Aufreinigung und Umkristallisierung enantiomerenreines Retronecin (**3**) in großer Reinheit ($\geq 98\%$) gewonnen werden. Dieses wurde anschließend nach Piper *et al.* (1981) durch Umsetzung mit MnO₂, KCN, Eisessig und Methanol selektiv an C-9 zum Carbonsäuremethylester, Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat (**49**), oxidiert. Nach Extraktion und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde dieses mit einer Ausbeute von 39% isoliert. Die an Hsu und Allen (1975) angelehnte Reduktion birgt gegenüber anderen Vorschriften (z.B. Hovermale *et al.*, 1994) den Vorteil der doppelten Stabilisotopenmarkierung. Durch die an Hsu und Allen (1975) orientierte Reduktion mit LiALD₄ in THF nach vorheriger Lagerung in CD₃OD am C-9 lag nach Aufreinigung mittels Kieselgel-Säulenchromatographie hochreines ($\geq 98\%$) [9,9-²H₂]-Retronecin (**50**) vor (Ausbeute: 59%). Die so erhaltene stabilisotopenmarkierte Necinbase [9,9-²H₂]-Retronecin (**50**) wurde anschließend mit Buttersäurechlorid in THF im großen Überschuss zu einem stabilisotopenmarkierten Diester-PA, di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**), umgesetzt (siehe auch Kapitel 4.8.2). Nach Extraktion erzielt man mittels fraktionierter Aufreinigung an einer Kieselgelsäule das gewünschte Endprodukt in einer Ausbeute von 57% (75 mg) und einer Reinheit $\geq 95\%$. Die Fraktionskontrolle erfolgte mittels HRGC-MS (Geräteparameter vergleiche Kapitel 4.2.2; HRGC-MS Systeme 1 & 4). Abbildung 3-6 gibt einen schematischen Überblick über die erfolgte Synthese von di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**).

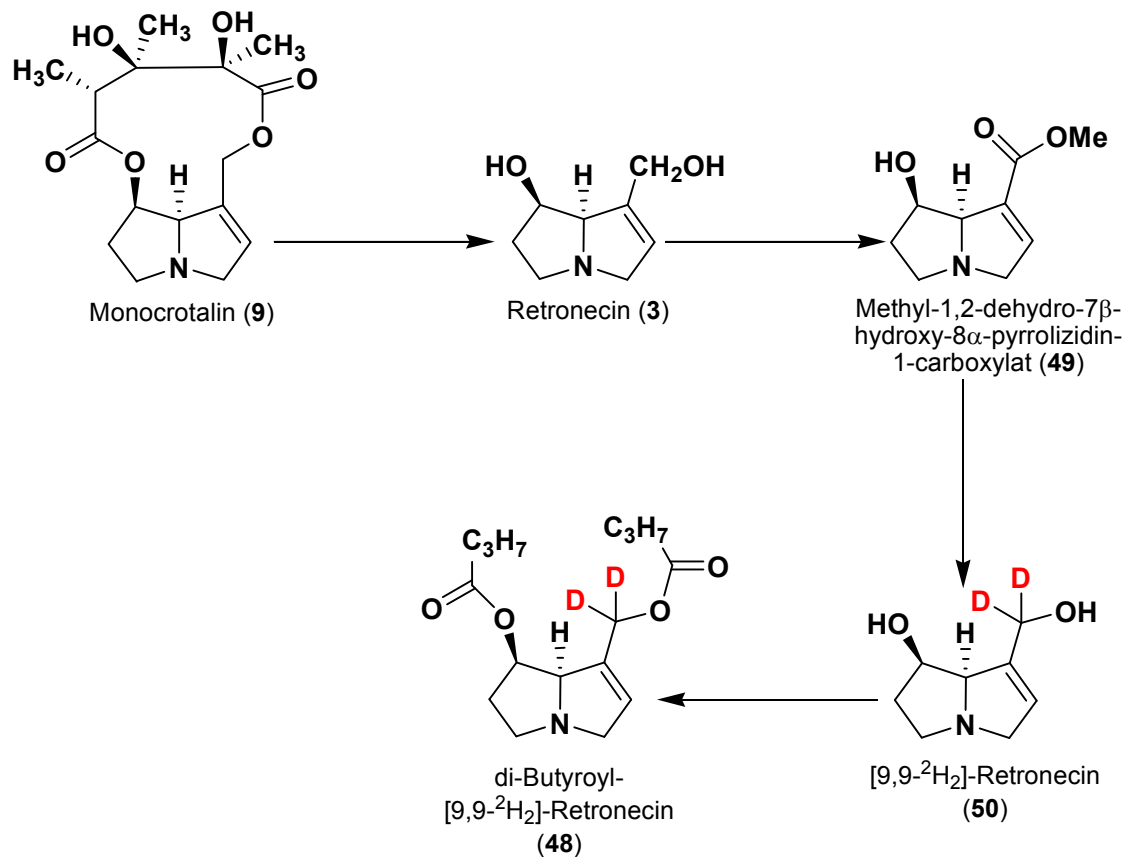


Abb. 3-6 Schematischer Überblick der vierstufigen Synthese von di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin (48) über die Zwischenstufen Retronecin (3), Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat (49) und [9,9-²H₂]-Retronecin (50) (Details s. Kapitel 4.8.2)

Mit Hilfe des synthetischen stabilisotopen-markierten di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin (48) konnte nunmehr die doppelte Aufarbeitung (Unterscheidung in A- und B-Probe) entfallen. Aufarbeitungsverluste und individuelle Fehler bzw. Faktoren der Analysensubstanz ließen sich so optimal eliminieren. Das aus der Probenaufarbeitung resultierende di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (51) zeigt eine um die selektive $m/z=2$ erhöhte Masse. Eine chromatographische Trennung der Analyten, di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (51) und di-TMS-Retronecin (46) war daher nicht mehr notwendig, da die Unterscheidung anhand der selektiven Massen erfolgte. Auch ein potentiell Vorhandensein natürlicher Heliotridin-PA stellte somit kein Problem mehr dar, vielmehr kann der di-TMS-Heliotridin-Peak (als Repräsentant für natürliche Heliotridin-PA) über den deuterierten Standard di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (51) in einem HRGC-MS-Lauf quantifiziert werden. Abbildung 3-7 stellt die Differenzierung der Analyten nach vorangegangener Analyse mittels HRGC-MS im SIM-Modus (Geräteparameter siehe Kapitel 4.2.2; HRGC-MS System 6) dar.

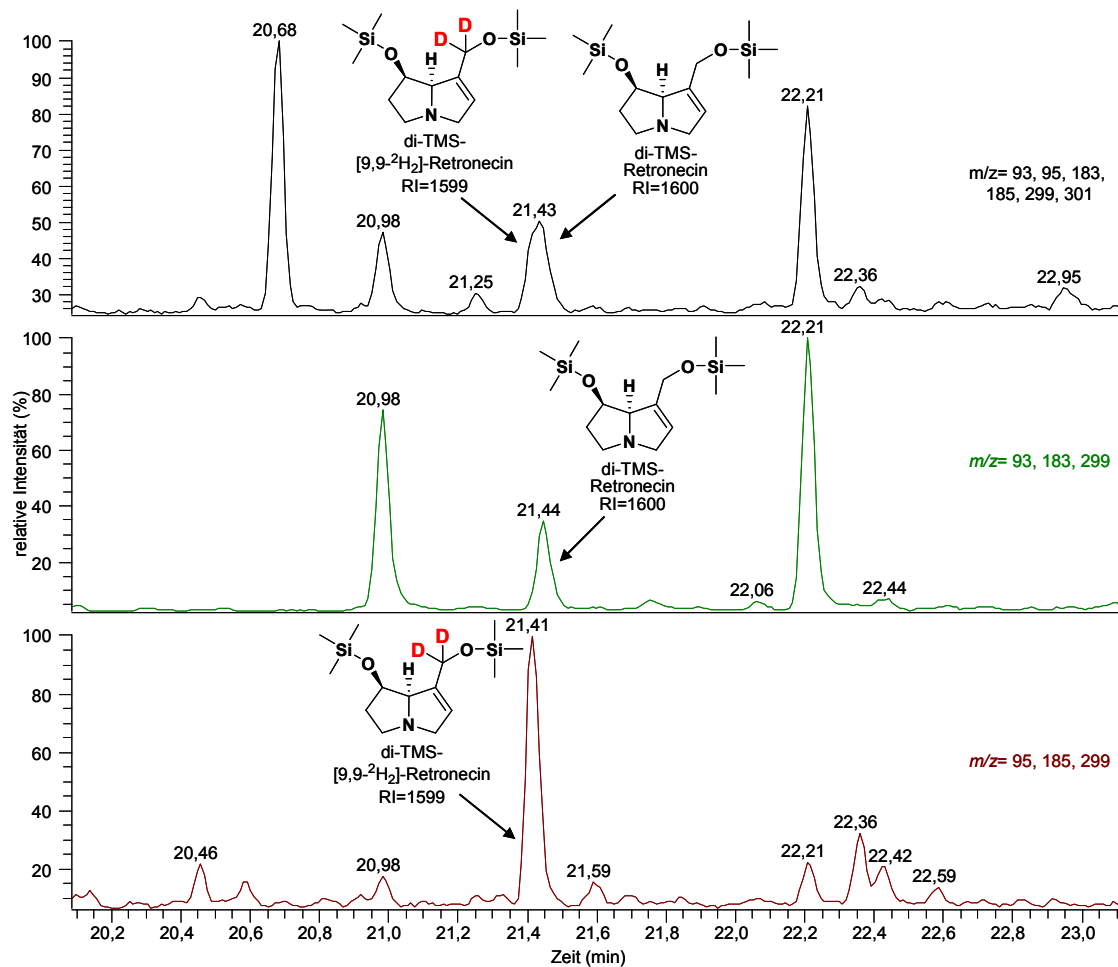


Abb. 3-7 HRGC-MS Chromatogramm im SIM Modus (Geräteparameter s. 4.2.2 HRGC-MS System 6) zur Verdeutlichung der Differenzierung von di-TMS-Retronecin (**46**) und di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**). Oben: alle vermessenen m/z -Verhältnisse; Mitte: für di-TMS-Retronecin (**46**) signifikante m/z -Verhältnisse; Unten: für di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**) signifikante m/z -Verhältnisse.

Die Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) eignet sich optimal zur exakten Quantifizierung. Durch die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Standard und Analyt sowie der Methodenstrategie zur Analyse der 1,2-ungesättigte Necinbase als Summenparameter konnten alle durchgeführten Quantifizierungen ohne Berücksichtigung von Extraktions- und Response-Faktoren ($F=1,0$) erfolgen (siehe Kapitel 3.1.2.4.2).

3.1.2.4 Identifizierung und Quantifizierung

3.1.2.4.1 Standardisierung mittels Heliotrin

Die durchgeführten quantitativen PA-Analysen wurden mit 2 μg (Honig & honighaltige Lebensmittel) bzw. 4 μg (Pollen & Pollenprodukte) des natürlichen PA Heliotrin (**32**) stan-

dardisiert. Die während der Probenaufarbeitung durchgeführte LiAlH_4 -Reduktion führt bei Heliotrin (**32**) zur Bildung von Heliotridin (**4**), dem Diastereomer von Retronecin (**3**) (vgl. Abbildung 3-4). Nach erfolgter Silylierung mit MSTFA können beide natürlich vorkommenden Necinbasen mittels HRGC-MS (Geräteparameter vergleiche Kapitel 4.2.2; HRGC-MS System 2) chromatographisch getrennt und detektiert werden. Für die Verbindungen di-TMS-Retronecin (**46**) und di-TMS-Heliotridin (**47**) ergaben sich die linearen Retentionsindices von $\text{RI}=1600$ und $\text{RI}=1632$. Neben diesen wurden die Verhältnisse der relativen Häufigkeiten der analytischen Ionen ($m/z = 93, 183, 299$) zueinander – im Vergleich zu denen mit authentischen Referenzen erzielten – zur eindeutigen Identifizierung der jeweiligen Peaks herangezogen. Relative Abweichungen von $< 10\%$ wurden toleriert. Die relative standardkontrollierte Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche von di-TMS-Heliotridin (**47**) in Bezug auf die Peakfläche von di-TMS-Retronecin (**46**). Durch die Analyse zweier chemisch nahezu identischer Diastereomere wurde auf die Anwendung von Extraktions- und Responsefaktoren ($F=1,0$) verzichtet. Es wurden die gesamten Peakflächen der SIM-Modus-Chromatogramme ($m/z = 93, 183, 299$) berücksichtigt. Die ermittelten Gehalte wurden als Retronecin-Äquivalente berechnet.

Durch die Verwendung des natürlich vorkommenden PA Heliotrin (**32**) als internem Standard für die Quantifizierung mussten die Analysen zunächst in zweifacher Ausfertigung durchgeführt werden. Eine sog. A-Probe wurde der jeweiligen Probenaufarbeitung unterzogen, während die B-Probe vor Durchführung dieser mit $2 \mu\text{g} / 4 \mu\text{g}$ Heliotrin (**32**) ($50 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l}$ der Heliotrin-Standardlösung mit $0,40 \text{ mg}/10 \text{ ml}$ Methanol) versetzt wurde. Probe A diente zur Überprüfung des natürlichen Vorhandenseins von Heliotridin-PA. Wurde in der A-Probe kein di-TMS-Heliotridin (**47**), jedoch aber di-TMS-Retronecin (**46**) detektiert, konnte der Retronecin-Gehalt mit Hilfe des internen Standardpeaks von Heliotrin (**32**) quantifiziert werden (Abbildung 3-8). Für den Fall einer PA-positiven Probe wurde das Ergebnis durch Wiederholungsanalysen bestätigt.

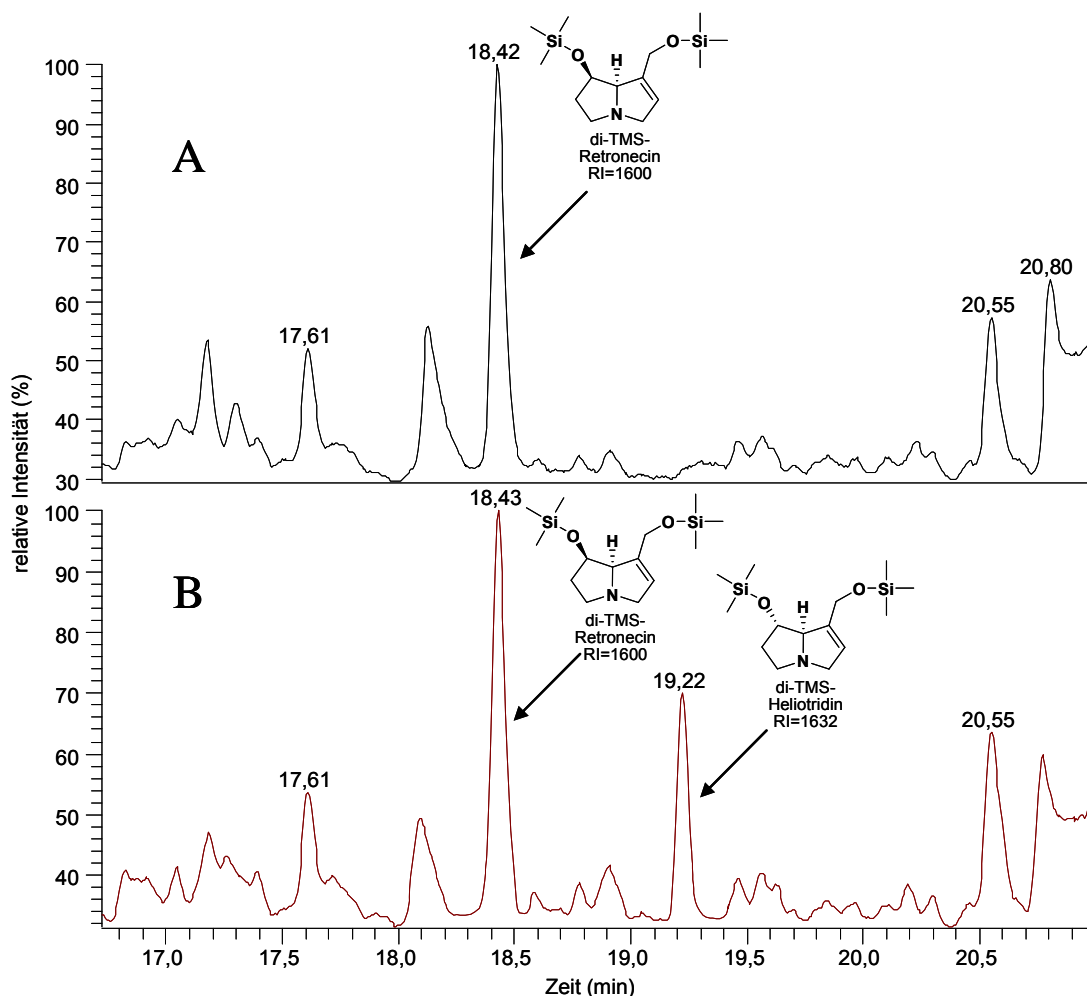


Abb. 3-8 HRGC-MS Chromatogramm im SIM-Modus ($m/z = 93, 183$ und 299) einer PA-positiven Honigprobe (Nr. 21). A, ohne internen Standard Heliotrin (**32**). B, mit internem Standard Heliotrin (**32**) (dargestellt als di-TMS-Heliotridin (**47**); RI=1632).

War in der A- und B-Probe kein di-TMS-Retronecin (**46**) jedoch in der B-Probe di-TMS-Heliotridin (**47**) zu detektieren, wurde die Probe als „PA-negativ“ definiert. Somit diente die B-Probe immer als Kontrolle für eine korrekte Probenaufarbeitung. Die Verwendung des internen Standards Heliotrin (**32**)/Heliotridin (**4**) mit der unüblichen S-Konfiguration am C-7 stellte sich als praxistauglich dar. So konnten in allen nach dieser Methode aufgearbeiteten Proben keine Heliotridin-PA in der A-Probe detektiert werden. Das mit dieser Methodik erreichte Quantifizierungslimit (LOQ) lag bei 0,01 ppm (S/N = 7:1).

Durch die angewendete Methodik lassen sich über den Summenparameter Retronecin (**3**) PA-Kontaminationen mit 1,2-ungesättigten PA-Strukturen verlässlich detektieren. Retronecin (**3**) stellt eines der kleinsten vorkommenden PA mit 1,2-ungesättigter Necin-Struktur dar. PA kommen in der Natur jedoch meist als komplexe makrozyklische Diester oder offene Mono- bzw. Diester vor (Hartmann und Witte, 1995). Zudem werden die zwar seltenen, aber potentiell vorkommenden toxischen Otonecin- und Supinidin-Ester PA nicht

von dieser Quantifizierungsart erfasst. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren sind alle ermittelten PA-Gehalte eine Unterbewertung der tatsächlich vorliegenden PA Belastung und stellen somit die kleinst mögliche, natürlich vorkommende Kontamination der jeweiligen Probe dar.

3.1.2.4.2 Standardisierung mittels di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin

Die durchgeführten quantitativen PA-Analysen wurden mit 5 µg di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) (50 µl der di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin-Standardlösung mit 1 mg/10 ml Methanol) standardisiert. Durch den Einsatz des stabil-isotopenmarkierten Standards di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) konnte auf eine doppelte Aufarbeitung mit A- und B-Probe verzichtet werden. Die während der Probenaufarbeitung durchgeführten Arbeitsschritte führen beim Standard di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) zur Bildung von di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**), welches eine um die selektive $m/z = 2$ erhöhte Masse zeigt. Eine chromatographische Trennung der Analyten ist daher nicht mehr zwingend notwendig, da die Unterscheidung anhand der selektiven Massen erfolgen kann (s. Abbildung 3-7). Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass mögliche Heliotridin-PA Belastungen, angezeigt durch di-TMS-Heliotridin (**47**), direkt über den deuterierten Standard di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**) in einem HRGC-MS-Lauf quantifiziert werden können. Für die Verbindungen di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**), di-TMS-Retronecin (**46**) sowie di-TMS-Heliotridin (**47**) ergaben sich die linearen Retentionsindices von RI=1599, RI=1600 und RI=1632 (s. Abbildungen 3-7 und 3-8). Neben den linearen Retentionsindices wurden für di-TMS-Retronecin (**46**) und di-TMS-Heliotridin (**47**) die Verhältnisse der relativen Häufigkeiten der analytischen Ionen ($m/z = 93, 183, 299$) zueinander - im Vergleich zu denen mit authentischen Referenzen erzielten - zur eindeutigen Identifizierung einer möglichen PA-Belastung herangezogen. Relative Abweichungen von < 10% wurden toleriert. Die relative standardkontrollierte Quantifizierung erfolgte über die Peakflächen der selektiven Ionen mit $m/z 183$ und $m/z 185$ des „Mischpeaks“ aus di-TMS-Retronecin (**46**) und di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**) unter Berücksichtigung des relativen natürlichen Isotopenanteils von $m/z 185$ (4,61% nach Isoform V1.02, FairCom[®] Corp., Columbia, MO, USA) nach folgendem Formelschema:

$$c(\text{Retronecin}) = \frac{\text{Area}(183)}{(\text{Area}(185)_{\text{gegeben}} - \text{Area}(185)_{\text{natürlich}})} \cdot \left(c(\text{Standard}) \cdot \frac{\text{MW}(\text{Retronecin})}{\text{MW}(\text{Standard})} \right)$$

mit:

$c(\text{Retronecin})$	Gehalt Retronecin in µg/g
Area (183)	Peakfläche des $m/z 183$ im SIM-Modus
Area (185) _{gegeben}	Peakfläche des $m/z 185$ im SIM-Modus

Area (185) _{natürlich}	Peakfläche des natürlich vorkommenden <i>m/z</i> 185, berechnet aus: Area (185) _{natürlich} = Area (183) x 0,0461 0,0461 repräsentiert die relative natürliche Häufigkeit des <i>m/z</i> 185 in einem Molekül der Summenformel: C ₉ H ₁₇ NOSi
c (Standard)	Gehalt an di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin in µg/g
MW (Retronecin)	Molekularmasse Retronecin (155,19 g/mol)
MW (Standard)	Molekularmasse di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin (297,17 g/mol)

Durch die nahezu identischen physikalisch-chemischen Eigenschaften von deuteriertem Standard und Analyt konnten alle durchgeführten Quantifizierungen ohne Berücksichtigung von Extraktions- und Response-Faktoren ($F=1,0$) erfolgen. Die Berechnung erfolgte zur Vergleichbarkeit der Daten ebenfalls als Retronecin-Äquivalente. Für den Fall einer PA-positiven Probe wurde das Ergebnis durch Mehrfachaufarbeitung bestätigt. Weiterhin gilt auch hier, wie bereits in Kapitel 3.1.2.4.1 erwähnt, dass alle über den Summenparameter Retronecin (**3**) ermittelten PA-Gehalte eine Unterbewertung der tatsächlich vorliegenden PA Belastung darstellen.

3.1.3 Methodenerweiterung zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pollenprodukten

Initiiert durch die Erfahrungen bei der Probenvorbereitung und –aufarbeitung von Honigen wurde die Isolierungsmethodik für PA aus Pollenprodukten mit dem Ziel möglichst wenig an der robusten und für Honig bereits etablierten Methodik zu verändern, an diese angelehnt. Im Vergleich zu Honig war bei Pollen eine intensivere Probenvorbereitung in Form von einer Verreibung mit Seesand im Mörser notwendig, um die kompakte und feste Exine der Pollen aufzubrechen. Durch die mechanische Behandlung wird die Freisetzung der PA aus den Pollen möglich. Versuchsreihen zur Etablierung der Methodik zeigten, dass eine zweifache Seesandbehandlung mit anschließender, jeweils 24-stündiger H₂SO₄-Extraktion notwendig ist, um die PA erschöpfend aus den Pollen zu extrahieren. Zwischen den beiden Extraktionszyklen wird der Extrakt abfiltriert und das Extraktionsmittel 0,1N H₂SO₄ nach einer weiteren Verreibung mit Seesand erneuert. Eine dritte Wiederholung des Zyklus führte zu keiner Steigerung der Ausbeute. Auch eine vorangehende Behandlung der Pollen zur Entfernung der Wachsschicht steigerte die PA-Ausbeute im Vergleich zu einer Verreibung mit Seesand ohne Entfettung nicht. Eine im Vergleich zu Honig stark verringerte Einwaage stabilisierte die Analysenergebnisse aufgrund der zu erwartenden höheren PA-Gehalte (vgl. Kapitel 2.1.6.3) deutlich. Dadurch konnte ein Überladen der SPE-Kartusche mit einer durchschnittlichen Kapazität von 0,79 meq/g (Milliequivalente/g) und somit ein „Durchbrechen“ der PA verhindert werden. Die

vereinigten Extrakte ließen sich wie gelöste Honige behandeln und zur Reduktion der PA-*N*-Oxide sowie Festphasenanreicherung nach der unter Kapitel 3.1.2.2 entwickelten Methode einsetzen. Analog zur Honiganalytik konnten somit die PA-Monoester und Diester sowie deren *N*-Oxide in einen Summenparameter überführt und nach entsprechender Standardisierung (s. Kapitel 3.1.2.4.1) quantifiziert werden. Die mittlere Wiederfindungsrate lag in Versuchsreihen unter Zugabe von PA und deren *N*-Oxiden (siehe Kapitel 3.1.1), bei der zu Honig analogen Verwendung der HF Bond Elut LRC[®] SCX-Kartuschen (Varian, Palo Alto, CA, USA) bei $80 \pm 3,8\%$ SD. Dies ist ein mit der bei der Isolierung von PA aus Honigen ermittelten Wiederfindung vergleichbarer Wert.

In keiner nach dieser Methode aufgearbeiteten Pollenproben waren, wie zuvor bei den Honigen, Heliotridin-PA in der A-Probe nachweisbar. Das mit dieser abgewandelten Methodik erreichte Quantifizierungslimit (LOQ) lag ebenfalls bei 0,01 ppm (S/N = 7:1), während die Nachweisgrenze mit einem S/N = 3:1 bei 0,003 ppm ermittelt wurde.

3.1.4 Methodenanpassung zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in honighaltigen Lebensmitteln

Die analytische Erfassung von Pyrrolizidinalkaloiden in honighaltigen Lebensmitteln stellt, abhängig von der Beschaffenheit und des Honiggehalts der Probe, die unterschiedlichsten Anforderungen an die Probenvorbereitung und -aufarbeitung. Ziel war es auch hier, die bereits etablierte Methodik (vergleiche Kapitel 3.1.2) mit möglichst wenigen Eingriffen zu modifizieren.

Lebensmittelproben wie Met und Fenchelhonig konnten ohne Modifikation der Methode direkt (Met) bzw. nach einem Verdünnungsschritt (Fenchelhonig) analog zu den Honigen zur Probenaufarbeitung eingesetzt werden. Ein Überladen der SCX-SPE-Kartuschen war, nicht zuletzt wegen der hohen Kapazität und der vergleichsweise geringen Probenmengen, nicht zu beobachten.

Für Lebensmittel mit fester Konsistenz oder niedrigerem Honiggehalt war eine Abwandlung der Probenvorbereitung notwendig. So kam es, dass diverse Lebensmittel, z.B. Bonbons gelöst, bzw. in größeren Mengen (z.B. Getränke mit niedrigen Honiggehalten), eingesetzt werden mussten, um repräsentative Daten zu erzielen. Für das Handling der im Vergleich zum Honig größeren Probenvolumina wurde auf die kontinuierliche Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE), wie sie bereits zu Beginn der Methodenentwicklung (siehe Kapitel 3.1.2.1) eingesetzt wurde, zurückgegriffen. Ein direkter Einsatz der großvolumigen Probenmengen hätte ein Überladen der SCX-SPE-Kartuschen und, damit verbunden, nicht reproduzierbare Ergebnisse verursacht.

Die unter Kapitel 3.1.2.1 erzielten Ansätze wurde demnach aufgegriffen und optimiert. Da sich bereits anfangs ein Lösemittelgemisch aus CH₂Cl₂:Pentan im

Mischungsverhältnis 1:2 (v/v) als ideal erwiesen hatte, wurde hieran keine Modifikation vorgenommen. Das Problem der anfänglich mangelhaften Reproduzierbarkeit konnte durch eine verlängerte Extraktionsdauer von 48h gegenüber 24h gelöst werden. So lagen bei 48-stündiger Extraktion die mittels HRGC-MS bestimmten Wiederfindungen zwischen 73,7 und 88,3% gegenüber 55,7-70,4% bei 24-stündiger Extraktion (vgl. Abbildung 3-2 sowie Anhang Tabellen 7-5 und 7-8). Nicht nur die Wiederfindung konnte gesteigert werden, auch Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode ließen sich, wie an den geringeren Standardabweichungen von 5-11% gegenüber 21-34% gezeigt, verbessern (vgl. Abbildung 3-2 sowie Anhang Tabellen 7-5 und 7-8). Da im weiteren Verlauf der Methodik durch die Festphasenanreicherung an einer SCX-SPE-Kartusche und die anschließende LiAlH_4 -Reduktion zur Necinbase auch Coelutionen und Matrixeffekte minimiert werden, war die 48-stündige LLE in Kombination mit den genannten Folgeschritten für die Probenvorbereitung von honighaltigen Lebensmitteln einsetzbar. Abbildung 3-9 gibt die Wiederfindungsraten der Referenz-PA nach 48-stündiger LLE-Extraktion aus einer zuckerhaltigen Matrix (repräsentativ für gelöste Cerealien und Honigbonbons) wieder.

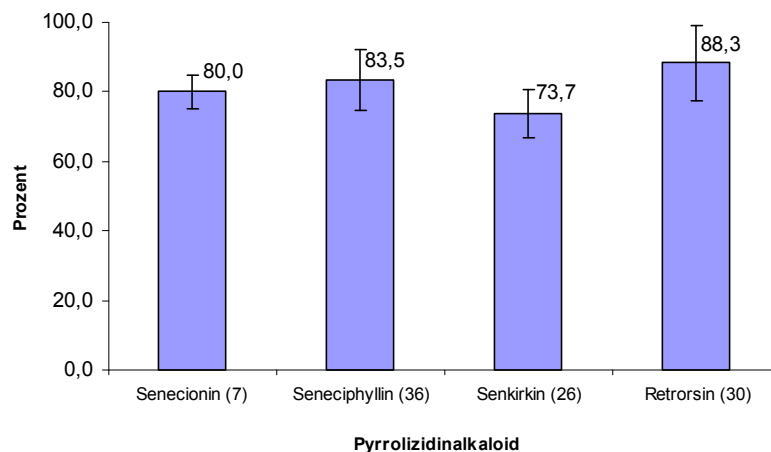


Abb. 3-9 Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=10) einzelner PA nach jeweils 48-stündiger LLE (CH_2Cl_2 :Pentan 1:2; v/v) mit Honigmatrix (n= Anzahl der Durchführungen).

Mittels LLE ließen sich große Volumina flüssiger bzw. fester, gelöster Lebensmittel aufarbeiten. Nach Aufkonzentrierung der erhaltenen organischen Extrakte konnte das ursprüngliche Volumen erheblich verringert werden und somit ein direkter Zugang zur bereits etablierten Festphasenanreicherung ermöglicht werden.

Die Standardisierung der honighaltigen Lebensmittel erfolgte, unabhängig ob die Proben direkt zur Festphasenanreicherung eingesetzt werden konnten oder ob diese zuvor mittels LLE extrahiert werden mussten, mit Heliotrin (vgl. Kapitel 3.1.2.4.1). Eine Unterscheidung in A- und B-Probe wurde auch hier vorgenommen; in keiner der

analysierten Proben waren die Quantifizierung interferierende Heliotridin-PA in der A-Probe detektierbar. Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die gewählten Modifikationen PA in honighaltigen Lebensmitteln zuverlässig nachzuweisen und zu quantifizieren (LOQ = 0,01ppm; S/N = 7:1) waren (siehe auch Kapitel 3.4).

3.2 Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honigen

3.2.1 Handelshonige

Wesentliches Ziel dieser Studie war es, eine fundierte Datengrundlage über die vorhandenen PA-Kontaminationen in Honighandelsproben vornehmlich des deutschen, teilweise europäischen Marktes bereitzustellen. Im Vorfeld der durchgeführten Analytik wurden keinerlei Selektionskriterien angewendet. So wurden weder gezielt Honige von PA-produzierenden Pflanzen gekauft, noch wurden bei der Probenauswahl zusätzliche Informationen, wie z.B. Imkerbefragungen über die Erntegebiete oder Pollenanalysen eingeholt. Die Honige wurden über diverse Supermärkte in Deutschland und anderen europäischen Staaten, wie z.B. Frankreich und Italien, sowie in verschiedenen, auf Imkereierzeugnisse spezialisierte Internetshops bezogen. Es wurden insgesamt 216 kommerziell verfügbare Blütenhonige (siehe Kapitel 4.1.3.3.1) nach Kapitel 4.4.1.1.1 (siehe dazu auch Kapitel 3.1.2.2 und Kapitel 3.1.2.4.1) aufgearbeitet und analysiert. Innerhalb dieser Gruppe stammten 94 aus Europa, 34 aus Mittel- und Südamerika, 22 aus Australien und Neuseeland und 6 aus USA/Kanada. Weitere 60 Proben wiesen keine eindeutigen Herkunftsangaben auf, sie stellten vielmehr Mischungen aus verschiedenen Regionen, u.a. mit den Vermerken „Mischung von Honig aus EG-Ländern“ bzw. „Mischung von Honig aus EG-Ländern und Nicht-EG-Ländern“, dar. Innerhalb der 94 europäischen Proben waren 44 Honige deutscher Herkunft (vgl. Anhang Tabelle 7-9). Abbildung 3-10 gibt einen Überblick über die regionale Verteilung der analysierten Honighandelsproben.

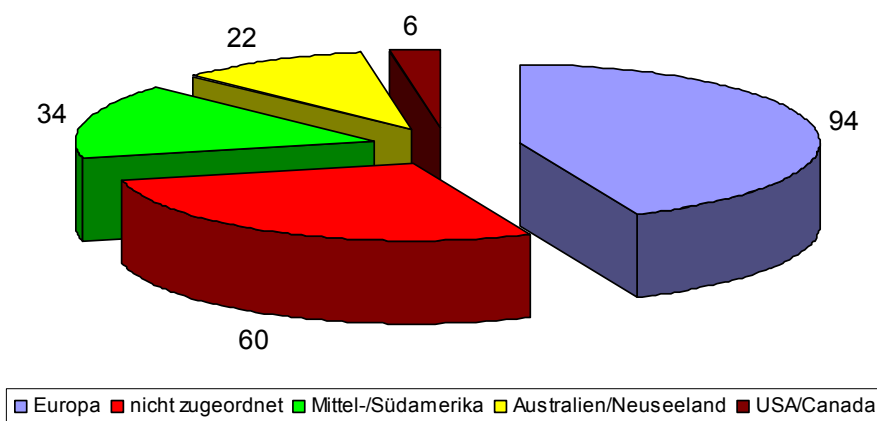


Abb. 3-10 Übersicht über die regionale Verteilung der analysierten 216 Honighandelsproben.

Innerhalb dieser 216 Handelshonige erwiesen sich 19 Proben (9%) als PA-positiv (Abbildung 3-11). Diese enthielten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, von 0,019-0,120 µg/g, wobei sich eine durchschnittliche Belastung von 0,056 µg/g ergab (Abbildung 3-11 und Anhang Tabelle 7-9).

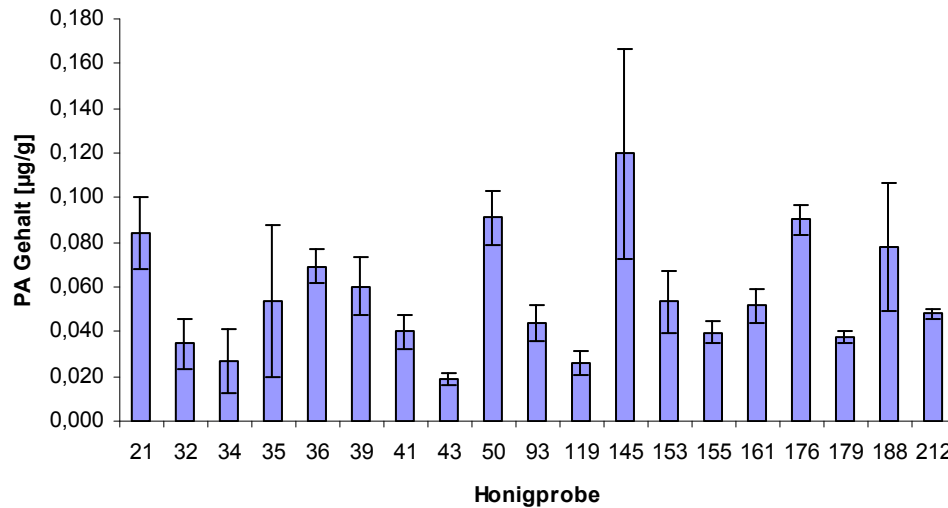


Abb. 3-11 PA-Gehalte der PA-positiven Honighandelsproben (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

Unter den 19 PA-positiven Proben waren sieben mit „Mischung von Honig aus Nicht-EG-Ländern“, fünf als „Mischung von Honig aus EG-Ländern und Nicht-EG-Ländern“ deklariert, weitere drei kamen aus Neuseeland, drei aus Mittel-/Südamerika und eine Probe aus Kanada, während sich von den 94 Proben europäischer Herkunft kein Honig als PA-positiv erwies (vgl. Anhang Tabelle 7-9). Abbildung 3-12 gibt einen Überblick über die regionale Verteilung der PA-positiv bestimmten Honighandelsproben.

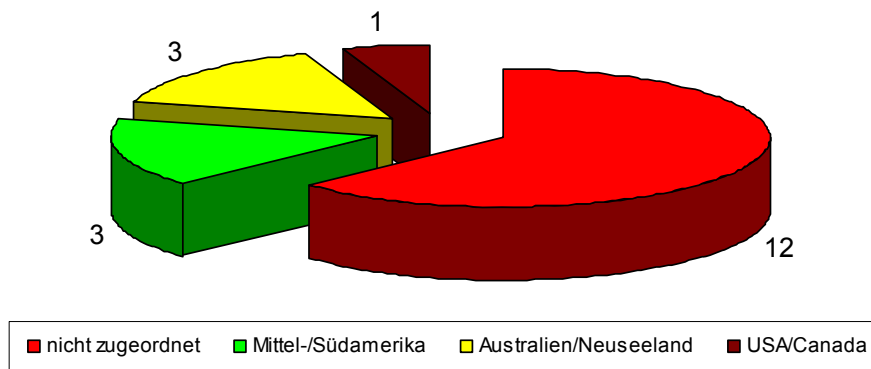


Abb. 3-12 Übersicht über die regionale Verteilung der PA-positiven Honighandelsproben

In einer späteren und bereits dargestellten Weiterentwicklung der analytischen Methode wurden die mittels Heliotrin-Quantifizierung PA-positiv getesteten Honige unter Einsatz eines stabilisotopen-markierten Standards (gemäß Kapitel 3.1.2.3) erneut aufgearbeitet und vermessen. Die Aufarbeitung der PA-positiven Proben erfolgte nach den Angaben in Kapitel 4.4.1.1.2. Die in Abbildung 3-13 dargestellten Ergebnisse geben eine Zusammenfassung über die eingesetzten analytischen Methoden und zeigen die Vorteile einer SIVA zur Quantifizierung auf.

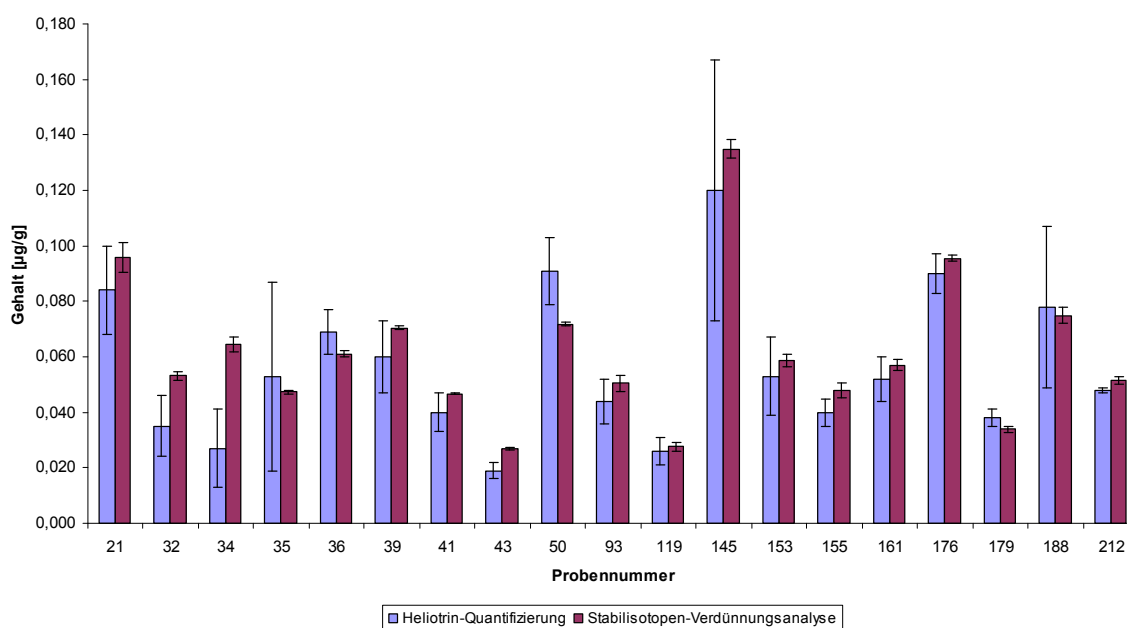


Abb. 3-13 Gegenüberstellung der mit den eingesetzten Quantifizierungsarten ermittelten PA-Gehalte (Retronecin-Äquivalente) der PA-positiven Proben. Ebenfalls angegeben sind die Standardabweichungen aus Dreifachbestimmung.

Durch den Einsatz des synthetischen, Stabilisotopen-markierten di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) konnte die doppelte Aufarbeitung (Unterscheidung in A- und B-Probe) entfallen. Die mittels SIVA ermittelten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, lagen im Bereich von 0,027-0,135 µg/g (vgl. Anhang Tabelle 7-9). Der ermittelte Durchschnittsgehalt ist mit 0,062 µg/g nahezu identisch zu dem mittels Heliotrin-Quantifizierung erzielten. Es zeigten sich somit unabhängig von der eingesetzten Quantifizierungsmethode gute Übereinstimmungen der ermittelten PA-Gehalte. So liegen nahezu alle mittels SIVA ermittelten Werte innerhalb der Schwankungsbreiten der Quantifizierungen mittels Heliotrin (vgl. auch Anhang Tabelle 7-9). Die signifikant geringeren Standardabweichungen – 0,001-0,005 µg/g gegenüber 0,003-0,047 µg/g – der SIVA-Werte verdeutlichen die gesteigerte Robustheit der Methodik aufgrund der verminderten Interferenzen während der Chromatographie und Massenspektrometrie. Für die im

weiteren Verlauf folgende Diskussion der Werte werden daher nur die mittels SIVA erzielten Gehalte berücksichtigt.

Die in diesen Versuchsreihen erzielten Ergebnisse korrelieren gut mit bisher veröffentlichten Daten über PA-Gehalte diverser Honige. So berichteten bereits 1977 Deinzer und Mitarbeiter, dass sortenreine Honige ($n=4$) von *Senecio jacobaea* L. PA in Mengen von 0,2-3,9 $\mu\text{g/g}$ enthielten (Deinzer *et al.*, 1977). Eine weitere Studie über PA von *Senecio jacobaea* berichtet, dass 10 von 23 Proben PA in Bereich von 0,002-1,48 $\mu\text{g/g}$ aufwiesen (Crews *et al.*, 1997). Der PA-Gehalt von Honigen ($n=5$) aus *Echium plantagineum* (Boraginaceae), einer weiteren PA-Pflanze, wurde mit 0,27-0,95 $\mu\text{g/g}$ angegeben (Culvenor *et al.*, 1981). Beales *et al.* (2004) zeigten in ihrer auf PA aus *Echium* spp. und *Heliotropium* spp. ausgelegten Studie, dass Honigproben (29 von 29) dieser PA-produzierenden Pflanzen PA-Gehalte von 0,033-2,2 $\mu\text{g/g}$ aufwiesen. Unter weiteren 39 Proben konnten die Autoren 19 mit einem Gehalt von 0,0003-0,8 $\mu\text{g/g}$ als PA-positiv identifizieren (Beales *et al.*, 2004). Ein Jahr später berichtete die Gruppe um Betteridge, dass sieben (von neun) Proben PA von *Echium vulgare* im Bereich von 0,017-2,85 $\mu\text{g/g}$ enthielten. Innerhalb dieser neun Honige wurden durch Imker fünf als *Echium*-Honige bestimmt, die restlichen vier blieben ohne Zuordnung (Betteridge *et al.*, 2005).

Die neueste Studie auf diesem Gebiet spiegelt die gute Korrelation mit den von uns erzielten Daten wieder. So wurde eine ähnlich gelagerte Studie vom Niederländischen Nahrungsmittel und Warenamt durchgeführt (VWA, 2007). Beiden Studien ist gemeinsam, dass nicht speziell Verdachtshonige aus Gebieten mit hohem Anteil an PA-Pflanzen bzw. Honige mit auffälligen Pollengehalten untersucht wurden, sondern eine große Anzahl zufälliger Einzelhandelsproben. Dies steht im Gegensatz zu den vorgenannten Untersuchungen, bei denen vor allem kleine Probenzahlen von Verdachtshonigen im Mittelpunkt standen (z.B. Culvenor *et al.*, 1981; Beales *et al.*, 2004; Betteridge *et al.*, 2005).

Beide Studien sollten somit die vorherrschende Marktsituation in Deutschland bzw. den Niederlanden abbilden. Die Ansätze unterscheiden sich jedoch methodisch grundlegend. Während bei unserem Vorgehen die toxikologisch relevanten 1,2-ungesättigten PA und deren *N*-Oxide in einen Summenparameter überführt werden und die Methode eine Bestimmungsgrenze von 0,01 ppm aufweist, wird in der niederländischen Studie (NL-Studie) ein LC-MS-Ansatz mit Targetanalyse durchgeführt; man erreicht daher eine höhere Empfindlichkeit (LOQ: 0,001 ppm). Allerdings bleibt die NL-Studie aus Mangel an verfügbaren Referenzen auf den Nachweis und die Quantifizierung von 8 Einzel-PA und 3 PA-*N*-Oxide beschränkt.

Daraus ergeben sich zwangsläufig Unterschiede in der Beurteilung der Ergebnisse. Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen waren 9% ($n=216$; HRGC-MS) der

Honige PA-positiv gegenüber 28% (n=170; LC-MS) in der NL-Studie. Der Gehalt umfasst einen Bereich von 0,027-0,135 µg/g (Retronecin-Äquivalente). Berechnet man dies, um eine Näherung mit der NL-Studie zu erzielen, auf Senecionin-Äquivalente, so kommt man zu einem Bereich von 0,058-0,292 µg/g und einem Durchschnittsgehalt von ca. 0,13 µg/g. In der NL-Studie hat man 0,002-0,365 µg PA pro Gramm Honig bzw. durchschnittlich 0,007 µg/g gefunden. Berücksichtigt man in der NL-Studie nur die Honige, die in ihrem PA-Gehalt über der Bestimmungsgrenze der hier beschriebenen HRGC-MS-Methode liegen, dann ergibt sich ein geschlossenes Bild. Demzufolge wären 11,7% der NL-Honige PA-positiv und würden im Mittel 0,05 µg/g PA enthalten.

Im Gegensatz zu anderen bisher veröffentlichten Studien wurden unsere Untersuchungen über die PA-Gehalte in Honighandelsproben auch durch mellisopalynologische Daten der entsprechenden PA-positiven Honige ergänzt. Die Erhebung der Daten durch mikroskopische Pollenanalyse erfolgte nach DIN 10760 "Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit" (vgl. Kapitel 4.5). Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf PA-produzierende Pflanzen der Familien Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum*) und Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) gelegt. Es wurden jeweils 500 Pollen ausgezählt, die sowohl zur Erfassung der relativen Pollenhäufigkeit als auch zur Bestimmung der geographischen Herkunft herangezogen wurden. In nahezu allen bisher untersuchten Beispielen wurden in PA-positiv analysierten Honigen auch Pollen von PA-Pflanzen nachgewiesen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um *Echium*- und, in wesentlich geringerem Umfang, auch um *Eupatorium*-Pollen.

Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die mellisopalynologischen Daten der PA-positiven Honighandelsproben.

Tab. 3-1 Mellisopalynologische Daten der von uns untersuchten PA-positiven Honighandelsproben. Angegeben sind die relativen Häufigkeiten der Pollen von PA-produzierenden Pflanzen sowie die geographische Herkunft der Proben.

Probe Nr.	Pollenanalyse	geographische Herkunft	
		durch Pollenanalyse	laut Etikett
21	48% <i>Echium</i> spp. sporadisch <i>Borago</i>	Neuseeland	Neuseeland
32	6% <i>Echium</i> spp.	Südamerika (Argentinien, Uruguay)	Nicht-EG-Länder
34	11% <i>Echium</i> spp.	Südamerika, Australien	EG-/Nicht-EG-Länder
35	16% <i>Echium</i> spp.	Südamerika (Argentinien, Uruguay)	EG-/Nicht-EG-Länder
36	2% <i>Echium</i> spp.	Südamerika (Chile, Brasilien)	Mittel-/Südamerika
39	2% <i>Eupatorium</i> spp.	Mittel-/Südamerika (Chile, Kuba)	EG-/Nicht-EG-Länder
41	n.n. ^{a)}	Kanada	Kanada
43	n.n. ^{a)}	Mittel-/Südamerika (Chile, Mexiko, Argentinien, Uruguay)	EG-/Nicht-EG-Länder
50	11% <i>Echium</i> spp. 2% <i>Eupatorium</i> spp.	Mittel-/Südamerika	Nicht-EG-Länder
93	n.n. ^{a)}	Südamerika (Argentinien, Uruguay)	Nicht-EG-Länder
119	n.n. ^{a)}	Mittel-/Südamerika (Chile, Mexiko, Argentinien, Uruguay)	EG-/Nicht-EG-Länder
145	62% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
153	n.n. ^{a)}	Neuseeland	Neuseeland
155	n.n. ^{a)}	Südamerika (Argentinien, Uruguay, Brasilien)	Argentinien
161	n.n. ^{a)}	Mittel-/Südamerika	Chile
176	20% <i>Echium</i> spp. < 1% <i>Eupatorium</i> spp.	vorwiegend Südamerika	Nicht-EG-Länder
179	< 1% <i>Echium</i> spp.	Mittel-/Südamerika (Mexiko, Argentinien, Uruguay)	Nicht-EG-Länder
188	5% <i>Echium</i> spp.	vorwiegend Südamerika	Nicht-EG-Länder
212	9% <i>Echium</i> spp.	vorwiegend Südamerika	Nicht-EG-Länder

a) n.n. = keine Pollen von PA-Pflanzen nachweisbar

Die mikroskopischen Pollenanalysen zeigten, dass ein hoher PA-Gehalt nicht zwangsläufig mit einer hohen relativen Häufigkeit an PA-Pflanzenpollen einhergeht. So zeigte zwar Honig Nr. 145 mit dem größten gemessenen PA-Gehalt von 0,135 µg/g, auch

den höchsten Anteil an an *Echium*-Pollen (62%), jedoch wiesen andere Honige mit erhöhten PA-Gehalten, wie z.B. die Proben Nr. 36 und Nr. 39 (mit 0,061 bzw. 0,071 µg/g) nur geringe PA-Pollen auf (2% *Echium* spp. bzw. 2% *Eupatorium* spp.). Ein weiteres Beispiel verdeutlicht diese Situation noch besser. Betrachtet man die Proben Nr. 21 und 176 mit deren identischen PA-Gehalten von je 0,096 µg/g und korreliert diese mit deren mellisopalynologischen Daten, so stellt man fest, dass trotz identischen PA-Gehaltes die Häufigkeiten der PA-Pollen mit 48% bzw. ca. 21% deutlich variieren.

Häufig drängen Pollen-Typen welche stark überrepräsentiert vorliegen, wie z.B. *Eucryphia* (Eucryphiaceae) oder *Mimosa* spp. (Mimosaceae), Pollen von PA-produzierenden Pflanzen in den Hintergrund. Zudem kommen Pollen von PA-produzierenden Pflanzen aus der Familie der Asteraceae in aller Regel meist unterrepräsentiert vor. Eine Korrelation der nach DIN 10760 erhaltenen relativen Pollenhäufigkeit in Bezug zu den gefundenen PA-Gehalten ist somit nicht gegeben. Dieses Ergebnis zeigt die Grenzen einer Pollenanalyse zur Abschätzung der PA-Belastung, selbst für den Fall, dass ein spezielles Augenmerk auf das Vorhandensein von PA-Pflanzenpollen gelegt wird. Ob die Bestimmung der absoluten Pollenhäufigkeit eine Korrelation zulässt, ist noch nicht untersucht.

Weiterhin wurde, wie bereits eingangs erwähnt, bei den 216 untersuchten Honigen auch die im Etikett deklarierte Herkunft bzw. Pollenanalyse erfasst. Der größte Anteil (94 Honige; davon 44 aus Deutschland) war demnach europäischen Ursprungs, gefolgt von Honig aus „EG- und Nicht-EG-Ländern“. Während bei dem erstgenannten Probenset keine PA-positive Probe gefunden wurde, ergaben sich im zweiten Set mit 20% – im Vergleich zu 10% im Durchschnitt aller Proben – überproportional häufig PA-positive Befunde. Erklären lässt sich dies wahrscheinlich aus der Situation der deutschen/europäischen Agrarlandschaft. PA-Pflanzen werden hier nur sehr sporadisch wirtschaftlich genutzt, womit die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass PA in den Honig gelangen. Aus Südeuropa (z.B. Spanien) sind zwar *Echium*-Vorkommen dokumentiert (Sanz *et al.*, 2004), dass sich dies nicht in den 94 europäischen Honigen niederschlägt, liegt vermutlich daran, dass im Verhältnis zu osteuropäischen oder auch südamerikanischen Ländern nur geringe Mengen Honig aus Südeuropa nach Deutschland importiert werden (vgl. Kapitel 2.2.3 und Tabelle 2-8).

Unter Berücksichtigung des genotoxischen Potentials der PA, und der Tatsache, dass für Karzinogene keine Schwellenwerte benannt werden können, da ja grundsätzlich jede Dosis, wie gering sie auch sein möge, zum Krebsrisiko beiträgt, erscheint die Betrachtung einer üblicherweise konsumierten Portionsgröße eines einzelnen Honigessers sinnvoller als die auf das gesamte Jahr betrachtete, tägliche durchschnittliche Verzehrsmenge. Wählt man die gewöhnliche Portionsgröße (als

Brotaufstrich oder als Süßungsmittel) mit 1-2 Teelöffeln, was einer Menge von 10-20 g entspricht, so scheint dies auch unter dem Gesichtspunkt der handelsüblichen Portionsverpackung von 20 g (bzw. von „Honig-Sticks“ zum Süßen von Warmgetränken mit 8 g Inhalt) nicht übertrieben.

Würde man die derzeit in Deutschland geltenden Regularien für Phytopharmaka von 1 µg 1,2-ungesättigter PA und deren *N*-Oxide am Tag bei einer Aufnahmedauer von maximal sechs Wochen anwenden, so würden unter obigen Gesichtspunkten bei einer Menge von 20 g drei Viertel der PA-positiven Honighandelsproben diesen Grenzwert überschreiten. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass die hier dargestellten Ergebnisse als Retronecin-Äquivalente berechnet wurden, und somit nur den Necinbasenteil, also ungefähr die Hälfte der in der Natur meist als komplexe makrozyklische Diester oder offene Mono- bzw. Diester vorkommenden PA-Moleküle darstellen. Demnach könnte ein auf Retronecin-Äquivalente (MW: 155,19 g/mol) berechneter PA-Gehalt mit einem Faktor von ca. „2“ multipliziert werden, um diesen in ein Diester-Äquivalent, z.B. Senecionin (**7**) (MW: 335,39 g/mol) umzurechnen. Zudem werden die zwar seltenen aber potentiell vorkommenden toxischen Otonecin- und Supinidin-Ester-PA nicht von dieser Quantifizierungsart erfasst. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren sind alle ermittelten PA-Gehalte eine Unterbewertung der tatsächlich vorliegenden PA-Belastung und eine Multiplikation der Ergebnisse mit dem Faktor „2“ erscheint durchaus sachgerecht. Bei Anwendung dieses Faktors würden alle PA-positiven Proben den deutschen Grenzwert von 1 µg PA/Tag für Phytopharmaka überschreiten.

Auch wenn es nach wie vor keinen Grenzwert für PA in Lebensmitteln gibt, so würde der in den Niederlanden diskutierte mögliche Grenzwert von 0,1 µg PA pro 100 g (1 ppb) Lebensmittel (Van Engelen *et al.*, 1997) im Falle der PA-positiven Honighandelsproben weit überschritten werden. Desweiteren würde von diesen die jüngst in einer Stellungnahme des BfR geforderte Nulltoleranz für Stoffe mit genotoxischen Effekten in Lebens- und Futtermitteln ebenfalls nicht erfüllt werden (BfR, 2007a).

Wie bereits erwähnt, werden für Karzinogene keine Schwellenwerte benannt, da davon ausgegangen wird, dass grundsätzlich jede Dosis zum Krebsrisiko beitragen kann. Daher wird hierfür eine Dosis abgeleitet, bei der die zusätzliche Gefahr für Krebs als gleich null angenommen wird, dies entspricht statistisch maximal einer von einer Millionen Personen bei lebenslänglicher täglicher Einnahme. Diese wird „virtual safe dose“ (VSD) genannt und beträgt für die am stärksten toxischen PA, abgeleitet von Riddelliin (**37**), 0,43 ng/kg Körpergewicht/Tag (Van der Zee, 2005). Diese VSD ist Grundlage für den Grenzwert des maximal zulässigen Risikos (MTR). Dieser gilt für karzinogene Effekte und beschreibt eine Dosis, die bei ebenfalls lebenslänglichem täglichem Konsum unter 10.000

Personen einen Krebsfall auslöst. Er liegt demnach bei 43 ng/kg Körpergewicht/Tag (Van der Zee, 2005). Zusätzlich lässt sich ein TDI für nicht-karzinogene toxische Effekte von 100 ng/kg Körpergewicht/Tag ableiten (Van der Zee, 2005). Dieser beschreibt die Dosis, die bei einer lebenslänglichen täglichen Einnahme keine gesundheitlichen - im Detail nicht-karzinogene - Effekte verursacht.

Für die Diskussion der ermittelten PA-Gehalte wird folgender täglicher Honigkonsum modellhaft herangezogen. Der tägliche, abgeleitete Pro-Kopfverbrauch liegt derzeit in Deutschland bei 3 g. Unter Berücksichtigung der in Kapitel 2.2.3 herangezogenen Argumentation, ist davon auszugehen, dass die deutsche Subpopulation - hier angenommen mit 27,4 Mio. Personen (1/3 der Bundesbürger) - der „Honigesser“ täglich ca. 9 g Honig verzehrt. Innerhalb dieser Gruppe wird darüber hinaus noch die Gruppe der „Honigliebhaber“ mit einer angenommenen doppelten Konsummenge, also 18 g/Tag, betrachtet. Diese Gruppe wird über die 95. Perzentile mit ca. 1,4 Mio. Personen festgesetzt. Innerhalb dieser Gruppen werden noch die Szenarien der Aufnahme eines Honigs mit der durchschnittlichen PA-Belastung aller untersuchten Honighandelsproben von 0,005 µg/g (A) und der ausschließlichen Aufnahme des Honigs mit der größten PA-Belastung von 0,135 µg/g (B) berücksichtigt. Tabelle 3-2 gibt einen Überblick auf die im Folgenden betrachteten Konsumtypen (KT).

Tab. 3-2 Honigverzehr: Auflistung der betrachteten modellhaften Konsumtypen (KT)

	mittlere PA-Belastung 0,005 µg/g (A)	höchste PA-Belastung 0,135 µg/g (B)
Aufnahme 3g/Tag	KT 1A	KT 1B
Aufnahme 9g/Tag	KT 2A	KT 2B
Aufnahme 18g/Tag	KT 3A	KT 3B

Allen Berechnungen wird eine durchschnittliche Person mit 75 kg Körpergewicht zugrunde gelegt. Daraus ergeben sich die in Tabelle 3-3 aufgelisteten, errechneten PA-Aufnahmen der einzelnen Konsumtypen.

Tab. 3-3 Rechnerisch im Modell ermittelte PA-Aufnahmen (Retronecin-Äquivalente) in ng/kg Körpergewicht/Tag bei den aus Tabelle 3-2 festgelegten PA-Belastungen und Honigkonsummengen

	bei Honig der PA-Belastung (A) in [ng/kg Körpergewicht/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (B) in [ng/kg Körpergewicht/Tag]
Konsumtyp 1	0,20	5,40
Konsumtyp 2	0,60	16,20
Konsumtyp 3	1,20	32,40

Schon auf den ersten Blick lässt sich anhand der Daten aus Tabelle 3-3 erkennen, dass die VSD für fast alle (modellhaften) Konsumtypen überschritten wird. Da, wie bereits erwähnt, die hier zugrundeliegenden PA-Belastungen in Retronecin-Äquivalenten (MW: 155,19 g/mol), also nur dem Necinbaseanteil von in der Natur meist als komplexe makrozyklische Diester oder offene Mono- bzw. Diester vorkommenden PA berechnet sind, ist eine Umrechnung in Äquivalente eines durchschnittlichen makrozyklischen Diesters als Repräsentant für ein übliches PA gerechtfertigt. Als Modell-PA wird daher das häufig vorkommende Senecionin (MW: 335,39 g/mol) gewählt, der daraus resultierende Umrechnungsfaktor liegt bei 2,16. Es ergeben sich somit für den durchschnittlich und den maximal belasteten Honig mit 0,011 µg/g (C) und 0,292 µg/g (D) neue, auf Senecionin berechnete PA-Gehalte. KT3D vertritt damit in hohem Maße ein *worst case*-Konsumszenario. Tabelle 3-4 gibt die errechneten PA-Aufnahmen in Senecionin-Äquivalenten für die einzelnen Konsumtypen an.

Tab. 3-4 Rechnerisch im Modell ermittelte PA-Aufnahmen (Senecionin-Äquivalente) in ng/kg Körpergewicht/Tag (75kg Person) bei den aus Tabelle 3-2 festgelegten PA-Belastungen und Honigkonsummengen

	bei Honig der PA-Belastung (C) in [ng/kg Körpergewicht/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (D) in [ng/kg Körpergewicht/Tag]
Konsumtyp 1	0,44	11,68
Konsumtyp 2	1,32	35,04
Konsumtyp 3	2,64	70,08

Für den realistischerweise eigentlich nicht existierenden bundesdurchschnittlichen Konsumtyp 1 ergibt sich im Falle einer Aufnahme des in der Studie ermittelten durchschnittlich belasteten Honigs C (Szenario KT1C) eine Belastung die minimal über der VSD liegt. Für den nicht existierenden, theoretischen Fall des alleinigen lebenslänglichen täglichen Konsums des maximal belasteten Honigs ergibt sich ein gegenüber der VSD um

Faktor 27,2 gesteigertes Risiko. Beide für den Konsumtyp 1 betrachteten Szenarien bleiben deutlich unter dem MTR. Das sich aus der VSD auf die Population der Bundesrepublik ableitende Krebsrisiko liegt für die Gruppen KT1C und KT1D bei 84 bzw. 2230 zusätzlichen Krebserkrankungen. Da es sich hier vermutlich nur um einen theoretischen, auf die gesamte Bevölkerung berechneten Konsumtyp handelt, ist diese Erkenntnis nur von geringer Bedeutung. Anders gestaltet sich dies bei der Subpopulation der Honigesser (KT2 und KT3).

Der Konsumtyp 2, die Gruppe der Honigesser, hier im Modell mit 27,4 Mio Personen angenommen, setzt sich einem weit größeren Risiko aus. Für die möglichen lebenslänglichen, täglichen Kontakte mit dem durchschnittlichen (KT2C) bzw. dem maximal belasteten Honig (KT2D) ergeben sich gegenüber der VSD um Faktor 3,1 und 81,5 gesteigerte Risiken. Beide bleiben allerdings, wie schon KT1C und KT1D, unterhalb des MTR. Die sich aus der VSD ableitenden zusätzlichen Krebserkrankungen müssen für KT2C und KT2D mit 84 und 2233 angegeben werden. Somit verteilt sich das durch den Konsum von PA-belasteten Honigen zusätzlich entstehende bundesdurchschnittliche Krebsrisiko auf die Gruppe der Honigesser, wodurch sich für sie ein ca. dreifach erhöhtes karzinogenes Risiko ergibt.

Für die postulierten Honigliebhaber, hier im Modell mit 1,4 Mio Personen angenommen, stellt sich die Situation komplexer dar. Die Konsumtypen KT3C und KT3D liegen um die Faktoren 6,1 und 163 über der VSD. Zusätzlich überschreitet der *worst case*-Konsumtyp KT3D das MTR um Faktor 1,6. In diesem Modellfall würde sich für die Liebhabergruppen KT3C und KT3D ein gesteigertes Risiko von 9 und 228 Krebserkrankungen für diese Bevölkerungsgruppe ergeben. Gegenüber dem bundesdurchschnittlichen Konsumtyps (KT1) resultiert ein sechsfach erhöhtes karzinogenes Risiko.

Der von Van der Zee (2005) angegebene TDI von 100 ng/kg Körpergewicht/Tag für nicht-karzinogene Effekte wird bei keinem der betrachteten Szenarien überschritten. Auch der von der FSANZ eingeführte „provisional tolerable daily intake“ von 1 µg/kg Körpergewicht/Tag würde durch keine der PA-positiven Honighandelsproben erreicht werden (FSANZ, 2001).

Bei all den hier dargestellten Berechnungsbeispielen ist darauf hinzuweisen, dass es sich lediglich um Modellannahmen handelt. Beispielsweise könnte die Subpopulation der Honigesser einen wesentlich geringeren Teil als die hier angenommenen 33% der Bevölkerung ausmachen. So wird diese z.B. in den Niederlanden, welche unter soziodemographischen Gesichtspunkten mit der Bundesrepublik Deutschland vergleichbar ist, durch die 3. Nahrungsmittelverbrauchsschätzung mit nur ca. 5% der Bevölkerung angegeben (VCP3, 1997-1998). Dabei wurde festgestellt, dass von 6250 Teilnehmern 324 an einem oder an beiden der zwei Bewertungstagen Honig konsumiert haben. Eine an die

Niederlande angelehnte Annahme würde sich stark auf die oben angeführten konsumierten Honigmengen und damit auch auf die PA-Aufnahmen auswirken. Auch die sogenannten Extremkonsumenten oder Liebhaber einzelner Lebensmittelgruppen sind in den oben angeführten Beispielen nur gering berücksichtigt. So weisen z.B. Extremkonsumenten von Honig weit höhere tägliche Verzehrmenen als die angeführten 18 g/Tag auf. Studien aus Australien berichten für das Gros der Honigesser Aufnahmemengen für Kinder (2-4 Jahre) von täglich bis zu 28,6 g Honig und für Jugendliche (13-19 Jahre) von sogar 64,2 g (Australien Bureau of Statistics, 1995). Britische Kleinkinder konsumieren vereinzelt Höchstmengen von bis zu 32 g Honig täglich, Schulkinder bis zu 60 g/Tag und Erwachsene sogar bis zu 93 g/Tag (MAFF, 1995). Auch in der 2007 vom Niederländischen Nahrungsmittel- und Warenamt durchgeführten Studie wird der Honigliebhaber mit einem täglichen Konsum von 30 g angegeben (VWA, 2007).

Daraus und aus der Tatsache, dass die zwar seltenen aber potentiell vorkommenden toxischen Otonecin- und Supinidin-Ester-PA nicht von dieser Quantifizierungsart erfasst werden, stellen alle hier angestellten Betrachtungen im Wesentlichen eine Unterbewertung der tatsächlichen Situation dar.

3.2.2 Forschungshonige

Bei unseren folgenden Studien wurde das Augenmerk auf potentielle Risikohonige gelegt. Zum einen erfolgte die Analytik von Honigen aus regionalen Gebieten mit Massenvorkommen an *Senecio*-Gattungen (siehe Kapitel 3.2.2.1), zum anderen wurden spezielle *Echium*-Honige aus Neuseeland erfasst (vergleiche Kapitel 3.2.2.2).

3.2.2.1 *Senecio*-Honige

Senecio-Gattungen kommen in unseren Breiten seit Jahren immer häufiger vor. Besonders die Gattungen *Senecio jacobaea*, *Senecio vernalis* und *Senecio inaequidens* sind vor allem im Norden Deutschlands und im Nachbarland, den Niederlanden, verbreitet. *S. inaequidens* stellt sogar eine invasive, gebietsfremde Pflanze dar, deren Ursprung in Afrika liegt (BfN, 2009). Sie kam über die Hafenstädte nach Deutschland und hat sich mittlerweile bis nach Mitteldeutschland insbesondere an Autobahnen und Eisenbahntrassen entlang ausgebreitet. Pflanzen der Gattung *Senecio* sind als besonders resistent bekannt und stellen sog. Pionierpflanzen dar, welche sich auf nährstoffarmem und trockenem Brachland, z.B. nach größeren Bauvorhaben, schnell ansiedeln. Gerade die großen Massenvorkommen (s. Abbildung 3-14) von *S. jacobaea* werden in Norddeutschland immer häufiger in Verbindung mit jüngsten Weidevieh bzw. Pferdever-

giftungen gebracht. Interessensgemeinschaften forcieren daher eine Meldepflicht für solche Pflanzen (Arbeitskreis Kreuzkraut, 2009).



Abb. 3-14 Wildbestand von *Senecio jacobaea* auf einer Freifläche in der Nähe von Braunschweig (eigene Aufnahme)

Senecio-Arten stellen jedoch nicht nur in nördlicheren Gebieten Probleme für die Landwirtschaft dar, so weist die Arbeitsgemeinschaft zur Förderung des Futterbaues (AGFF) der Schweiz bereits seit 2002 auf die vermehrte Verbreitung von *Senecio jacobaea* besonders auf Weiden hin, ausgelöst durch extensive Landnutzung sowie durch Rationalisierungs- und Ökologierungsmaßnahmen im Strassen- und Bahnunterhaltungsdienst (AGFF, 2002). Durch das stetig wachsende Interesse fand jüngst eine Fachtagung mit dem Hintergrund der Früherkennung des Kreuzkrautproblems statt, um eine Etablierung des Jakobs-Kreuzkrauts auf Grünland zu unterbinden (JKI, 2009). Durch die derzeit umgebremste Verbreitung der PA-haltigen Kreuzkräuter lag es also nahe, Honig aus Gebieten mit Massenvorkommen von *Senecio* spp. einmal genauer zu betrachten.

Zur Gewinnung solcher Honige wurden in Zusammenarbeit mit Imkern gezielt Bienenvölker in der Nähe von *Senecio*-Massenvorkommen angesiedelt. Diese konnten somit während der Blüte (v.a. im Juli) diese Bestände anfliegen, hatten aber aufgrund von bewusst fehlenden Netzen auch die Möglichkeit, andere blühende Pflanzen als Nektarquellen anzufliegen. Insgesamt wurden 27 Honige dieser Art gewonnen und gezielt für Forschungszwecke eingesetzt und analysiert. Die Aufarbeitung und Analyse der Honige erfolgte – die SIVA-Methode war zum Zeitpunkt der Analyse von uns noch nicht vollständig etabliert – gemäß den Angaben in Kapitel 4.4.1.1.1 unter Standardisierung mittels Heliotrin. Abbildung 3-15 gibt einen Überblick über die ermittelten PA-Gehalte der PA-positiven *Senecio*-Honige.

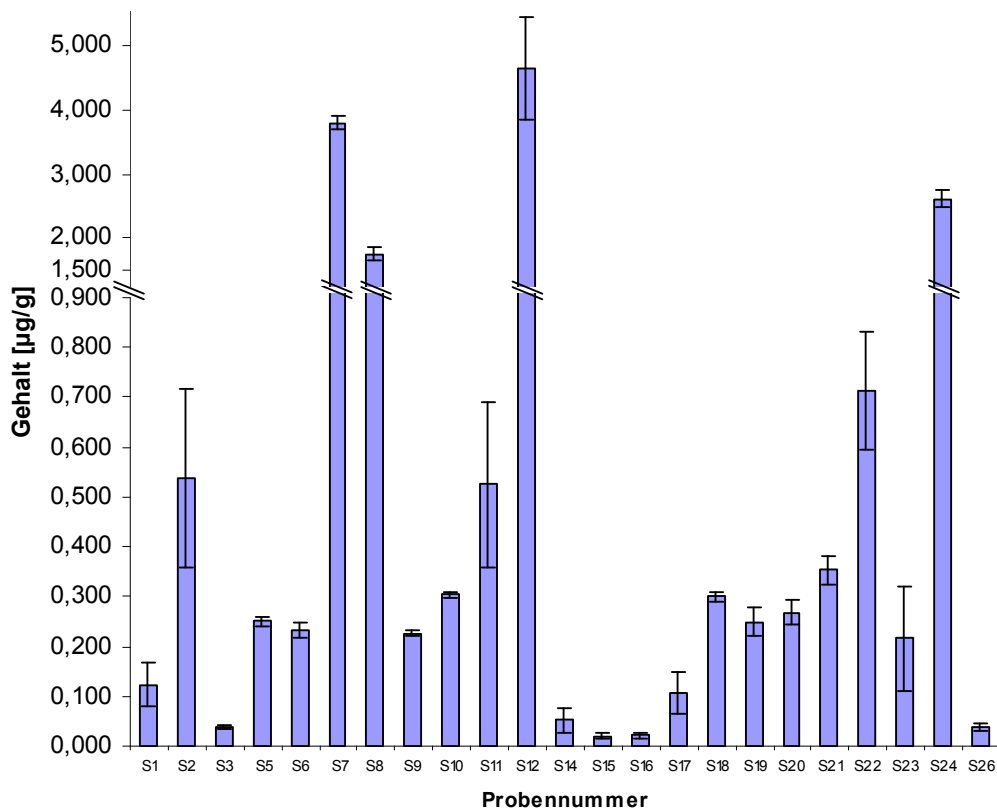


Abb. 3-15 PA-Gehalte der PA-positiven *Senecio*-Honigproben (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Dreifachbestimmung.

Innerhalb dieser 27 *Senecio*-Honige erwiesen sich 23 Proben (85%) als PA-positiv (Abbildung 3-15). Diese enthielten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, von 0,020-4,66 µg/g, bei einer durchschnittlichen Belastung von 0,756 µg/g. Die Standard-Abweichungen aus Dreifachbestimmung lagen zwischen 0,005-0,800 µg/g (vgl. Anhang Tabelle 7-10).

Die PA-Belastung der *Senecio*-Honige aus Regionen mit *Senecio* spp.-Massenvorkommen liegt damit um ein Vielfaches über den in Handelsproben festgestellten PA-Gehalten (s. Kapitel 3.2.1). Ähnliches gilt auch für die Häufigkeit der PA-positiven Befunde, die mit 85% einer von nur 9% bei kommerziellen Proben gegenüber steht. Im Vergleich zu bisher publizierten Daten ergibt sich ein nahezu geschlossenes Bild. Zwar sind die hier mit bis zu 4,66 µg/g ermittelten Werte höher als die bisher literaturbekannten PA-Belastungen, jedoch zeigten PA-Bestimmungen in Honig mit *S. jacobaea* als Target ohnehin mit bis zu 3,9 µg/g im Vergleich zu anderen Messungen, z.B. *Echium* spp., erhöhte PA-Gehalte (Deinzer *et al.*, 1977; Crews *et al.*, 1997). Auch erwiesen sich in einer anderen Studie bei gezielter Honiggewinnung in Gebieten mit potenziellem *S. jacobaea*-Bestand nur 46% (6 aus 13) im Vergleich zu den hier ermittelten 85% (23 aus 27) als PA-

positiv (Crews *et al.*, 1997). Dies lässt sich neben der bewussten und sorgfältigen Standortwahl unter anderem mit den heute im Vergleich zu damals weit größeren Beständen an *S. jacobaea* begründen.

Die analog zu den Honighandelsproben durchgeführte Erhebung der mellisopalynologischen Daten einiger zufällig ausgewählter PA-positiver *Senecio*-Honige nach DIN 10760 "Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit" (siehe Kapitel 4.5) bestätigte ein Auftreten von *Senecio*-Pflanzenpollen in den PA-positiven *Senecio*-Honigen. Besonderes Augenmerk wurde erneut auf PA-produzierende Pflanzen der Familien Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum*) und Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) gelegt.

Tabelle 3-5 gibt einen Überblick über die mellisopalynologischen Daten der PA-positiven *Senecio*-Honige.

Tab. 3-5 Mellisopalynologische Daten der PA-positiven *Senecio*-Honige. Angegeben sind die relativen Häufigkeiten der Pollen von PA-produzierenden Pflanzen sowie die geographische Herkunft der Proben.

Probe Nr.	Pollenanalyse	geographische Herkunft	
		durch Pollenanalyse	laut Etikett
S1	1,6% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S2	n.n. ^{a)}	Niederlande	Niederlande
S3	1,3% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S5	0,6% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S6	0,6% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S7	1,0% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S8	1,8% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S12	1,4% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S14	1,0% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S17	6,3% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande
S24	0,6% <i>Senecio</i> spp.	Niederlande	Niederlande

a) n.n. = keine Pollen von PA-Pflanzen nachweisbar

Das Bild der mellisopalynologische Daten erscheint im Vergleich zu den bei den Handelshonigen festgestellten relativen Pollenhäufigkeiten von PA-Pflanzen, dort vor allem *Echium* spp., unterschiedlich. Ein Vergleich mit Literaturdaten ergibt jedoch ein stimmiges Bild. So hat man bereits in früheren Studien zu PA-Gehalten in *Senecio*-Verdachtshonigen hohe PA-Konzentrationen bei relativ geringen Pollenhäufigkeiten von *Senecio* spp. festgestellt.

So zeigten bereits Deinzer *et al.* (1977), dass ein hoher PA-Gehalt nicht mit einer hohen relativen Häufigkeit an *Senecio*-Pollen einhergeht. Die in deren Studie maximal belasteten Honige von 3,2 und 3,9 µg/g zeigten einen *Senecio*-Pollengehalt von 0,7%, während die Honige mit dem größten Auftreten an *Senecio*-Pollen von 2,6% nur 1,1 bzw. 1,4 µg/g PA-Gehalt aufwiesen. Auch Crews *et al.* bestätigten bei hohen PA-Gehalten von bis zu 1,48 µg/g nur geringe relative Mengen an *Senecio*-Pollen (Crews *et al.*, 1997), verglichen mit den bei den Handelshonigen (s. Kapitel 3.2.1) festgestellten relativen Pollenhäufigkeiten. Weiterhin bestätigt sich auch in den hier ermittelten Daten die bereits bei den Handelshonigen fehlende Abhängigkeit des PA-Gehaltes von der nachgewiesenen PA-Pollenhäufigkeit. So zeigte der mit 4,66 µg/g maximal PA-belastete Honig S12 mit 1,4% *Senecio*-Pollen eine im Vergleich zum restlichen Datenset mittlere Pollenhäufigkeit, während der Honig mit der höchsten ermittelten *Senecio*-Pollenhäufigkeit von 6,34%, S17 mit 0,107 µg/g nur einen geringen PA-Gehalt aufwies.

Diese Studie repräsentiert einen speziellen Fall, nämlich dass regionale Imker in einem Gebiet mit *Senecio*-Massenvorkommen ansässig sind und ihre Bienenvölker in deren unmittelbarer Nähe zur Honiggewinnung aussetzen. Anders als bei der industriellen Honigverarbeitung findet beim Hobby-/Nebenerwerbsimker keine Vermengung mit größeren Mengen unterschiedlicher Honigsorten statt, weshalb nicht zuletzt beim Kauf eines Honigs vom ortsansässigen Imker die Möglichkeit besteht, einen z.T. aus Pflanzen der Gattung *Senecio* gewonnenen Honig zu konsumieren. Daher wurde auch hier eine Risikoabschätzung analog zu der bei den Honighandelsproben unter Punkt 3.2.1 durchgeführten vorgenommen. Als PA-Belastungen der einzelnen Honige werden die niedrigste gemessene Belastung (0,020 µg/g) der Durchschnitt aller vermessenen Proben (0,644 µg/g) und die maximal belastete Honigprobe (4,66 µg/g) für die Konsumtypen 1-3 festgelegt.

Zur Vergleichbarkeit der Daten und vor dem Hintergrund der unter Kapitel 3.2.1 erläuterten Gründe werden auch hier die als Retronecin-Äquivalente berechneten PA-Gehalte in Senecionin-Äquivalente umgerechnet. Somit ergeben sich für die niedrigste, die durchschnittliche und die höchste Belastung umgerechnete PA-Gehalte von 0,043 µg/g (E), 1,39 µg/g (F) und 10,07 µg/g (G). Konsumenten (KT1-3) mit der Aufnahme F repräsentieren, durch die Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit für einen PA-belaste-

ten Honig, eine durchschnittliche PA-Aufnahme bezogen auf alle analysierten Honige, die während der Blütezeit von *Senecio* aus Gebieten mit *Senecio*-Massenvorkommen gewonnen wurden. KT3G vertritt als modellhafter Konsument eines hochbelasteten *Senecio*-Honigs in höchstem Maße ein, wenn auch sehr unwahrscheinliches, *worst case*-Konsumszenario. Tabelle 3-6 gibt die errechneten PA-Aufnahmen in Senecionin-Äquivalenten für die einzelnen Konsumtypen an.

Tab. 3-6 Rechnerisch, im Modell ermittelte PA-Aufnahmen (Senecionin-Äquivalente) in ng/kg Körpergewicht/Tag (75kg Person) bei den festgelegten PA-Belastungen und Honigkonsummengen

	bei Honig der PA-Belastung (E) in [ng/kg KG/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (F) in [ng/kg KG/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (G) in [ng/kg KG/Tag]
Konsumtyp 1	1,72	55,60	402,80
Konsumtyp 2	5,16	166,80	1208,40
Konsumtyp 3	10,32	333,60	2416,80

Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass für alle ermittelten PA-Aufnahmen Überschreitungen der VSD und zum Großteil auch Überschreitungen des MTR vorliegen. Die Beurteilung der jeweiligen Daten ist vor dem Hintergrund der „speziellen“ Honigproben jedoch nicht trivial.

Der bundesdurchschnittliche Konsumtyp 1 mit einer täglichen Honigaufnahme von 3 g erfährt hierbei die geringste Belastung. Selbst im Falle des ausschließlichen Konsums des durchschnittlich belasteten *Senecio*-Honigs (KT1F) würde der TDI von 100 ng/kg KG/Tag (Van der Zee, 2005) für nicht-karzinogene Effekte noch nicht überschritten werden. Jedoch ist aufgrund des genotoxischen Potentials der PA ein gesteigertes karzinogenes Risiko zu verzeichnen. Die Überschreitung des MTR erfolgt im Falle von KT1F und KT1G um das 1,3- bzw. 9,4-fache. Somit wäre im Modellfall von 10616 bzw. 76907 zusätzlichen karzinogenen Erkrankungen auszugehen. Da dieses Konsumszenario, wie bereits mehrfach erläutert, nicht dem Konsumverhalten in Deutschland entspricht, müssen vielmehr die Konsumtypen 2 und 3 betrachtet werden.

Innerhalb dieser Konsumtypen geht der gesteigerte tägliche Honigkonsum mit einem höheren gesundheitlichen Risiko für diese Konsumentengruppe einher, so dass mit karzinogenen Erkrankungen und nicht-karzinogenen toxischen Erscheinungen zu rechnen ist. Die Betrachtung der Daten bleibt erneut modellhaft, da bisher keine aussagekräftigen Erhebungen zur Verbreitung solcher Honige mit den entsprechenden PA-Gehalten vorliegen. Generell weisen die modellhaften Konsumgruppen „Honigessser“ (KT2) und

„Honigliebhaber“ (KT3) ein drei- bzw. sechsfaches Risiko für karzinogene und nicht-karzinogene toxische Effekte gegenüber dem durchschnittlichen Verbraucher in Deutschland auf.

Der von der FSANZ eingeführte und als sehr hoch betrachtete, „provisional tolerable daily intake“ von 1 µg/kg Körpergewicht/Tag (FSANZ, 2001) würde durch die beiden Konsumtypen KT2 und KT3 im Falle des täglichen Verzehrs des maximal belasteten Honigs (KT2G & KT3G) erstmals überschritten werden.

Diese Modellberechnungen stehen auch weiterhin im Gegensatz zu der Tatsache, dass auf Grund des genotoxischen Potentials keine Schwellenwerte benannt werden können, da jegliche, auch einmalige, noch so große Dosis zur Belastung beiträgt. Ein Vergleich mit nahe liegenden Bestimmungen, wie z.B. des in Deutschland gültigen Grenzwerts für Phytopharmaka von 1 µg PA/Tag bei einer Anwendungsdauer von maximal sechs Wochen (Bundesgesundheitsamt, 1992), erscheint aus Mangel an Regulierungen im Lebensmittelbereich als sinnvoller. Modellhaft könnte man also bei sechswöchiger Anwendungsdauer eine Gesamt-PA-Aufnahme von 42 µg als tolerierbar erachten. Für die Konsumgruppen KT2 und KT3 würde eine solche Betrachtung bedeuten, dass innerhalb der festgelegten sechs Wochen der tägliche Konsum des minimal belasteten Honigs (E) nicht zu einer Überschreitung des Grenzwertes führt. Anders stellt sich dies jedoch für die Honige F und G dar. KT2 würde bei nur viermaligem Konsum des durchschnittlich belasteten Honigs F innerhalb der sechs Wochen den Grenzwert überschreiten, für KT3 wäre dies schon nach zweimaligem Konsum der Fall. Der unwahrscheinliche Fall des maximal belasteten Honigs G würde dazu führen, dass für KT2 und KT3 ein einmaliger Konsum innerhalb dieser sechs Wochen zur Grenzwertüberschreitung ausreicht. Bedenkt man jetzt noch den rechtlichen Hintergrund des Grenzwertes, der nur im nachgewiesenen Fall eines gesundheitsfördernden Effektes des Arzneimittels die Aufnahme von PA toleriert, so muss auch diese Betrachtung in Bezug auf das Lebensmittel Honig relativiert werden.

3.2.2.2 *Echium*-Honige

Im weiteren Verlauf der Studien zum PA-Gehalt in Honigen wurden auch *Echium*-Honige betrachtet. Dieses Vorgehen lag nahe, da in den allermeisten Fällen, wenn PA in Honig-handelsproben gefunden wurden, auch Pollen von *Echium* spp. präsent waren. *Echium* spp., auch als „blue borago“ bekannt, ist eine ertragreiche Nektarpflanze deren Honig als besonders lieblich und fein im Geschmack gilt (Edgar *et al.*, 2002; Beales *et al.*, 2004). Honige von *Echium* spp. sind vor allem aus Australien und Neuseeland bekannt (Beales *et al.*, 2004; Betteridge *et al.*, 2005). In Deutschland kann der Bezug solcher Honige über Spezialitätengeschäfte oder den Internethandel erfolgen. Die geprüften acht neuseelän-

dischen, sortenreinen *Echium*-Honige (siehe Kapitel 4.1.3.4.1) wurden gemäß den Angaben in Kapitel 4.4.1.1.2 standardisiert und aufgearbeitet.

Abbildung 3-16 gibt die in den *Echium*-Honigen mittels SIVA ermittelten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, wieder.

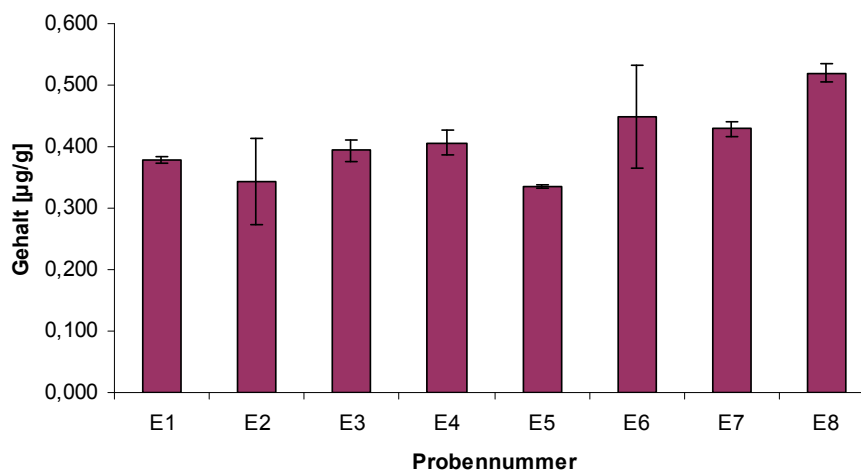


Abb. 3-16 PA-Gehalte der geprüften *Echium*-Honigproben (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Dreifachbestimmung.

Die PA-Gehalte der vermessenen Proben lagen zwischen 0,334 und 0,520 µg/g, es resultierte ein Mittelwert von 0,407 µg/g (vgl. Anhang Tabelle 7-11). Die Standard-Abweichungen aus Dreifachbestimmung lagen zwischen 0,003-0,084 µg/g. Damit erwiesen sich die sortenreinen *Echium*-Honige erwartungsgemäß deutlich stärker belastet – im Mittel um Faktor 6,5 – als die Honighandelsproben. Ein Blick auf die mellisopalynologischen Daten lässt ein solches Ergebnis nicht unbedingt erwarten. Denn es korreliert weder der mittlere Faktor von 6,5, um den die *Echium*-Honige stärker PA-belastet sind als die Honighandelsproben mit deren entsprechenden zugrundeliegenden Pollengehalte, noch ein hoher Gehalt an PA bei den hier vermessenen *Echium*-Honigen per se mit einem hohen relativen Gehalt an *Echium*-Pollen. So zeigte zwar – analog den PA-belasteten Honighandelsproben – der maximal belastete Honig E8 mit 80% *Echium* spp. Pollen auch den höchsten relativen Gehalt an PA-Pflanzen-Pollen, jedoch zeigte die Probe mit der zweithöchsten Belastung E6 mit 61% mit den niedrigsten relativen *Echium*-Pollengehalt im Probenstet der *Echium*-Honige. Damit wies sie einen nahezu identischen relativen *Echium*-Pollengehalt auf wie die maximal belastete Honighandelsprobe Nr. 145 (s. Kapitel 3.2.1). Dennoch liegt der PA-Gehalt mit 0,449 µg/g ca. um ein 3,5-faches über dem der Probe Nr. 145 mit 0,135 µg/g. Allen hier untersuchten *Echium*-Honigen ist gemeinsam, dass sie sowohl einen erhöhten PA-Gehalt, als auch einen hohen relativen Anteil an PA-Pflanzen-Pollen zeigen. Somit waren bei PA-positiven Honigproben nahezu

immer PA-Pflanzen-Pollen präsent (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2.1). Daher könnte eine relative Pollenanalyse nach DIN 10760 zwar als Indiz auf das Vorhandensein von PA dienen, eignet sich jedoch zur quantitativen Risikoabschätzung nur mäßig.

Tabelle 3-7 gibt einen Überblick auf die bei den *Echium*-Honigen ermittelten mellisopalynologischen Daten.

Tab. 3-7 Mellisopalynologische Daten der PA-positiven *Echium*-Honigen. Angegeben sind die relativen Häufigkeiten der Pollen von PA-produzierenden Pflanzen sowie die geographische Herkunft der Proben.

Probe Nr.	Pollenanalyse	geographische Herkunft	
		durch Pollenanalyse	laut Etikett
E1	61% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E2	62% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E3	62% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E4	68% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E5	66% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E6	61% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E7	72% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland
E8	80% <i>Echium</i> spp.	Neuseeland	Neuseeland

Auch im Vergleich zu bisher publizierten, auf PA aus *Echium* spp. bezogene PA-Gehalte in Honig ergibt sich ein geschlossenes Bild, insbesondere wenn man bedenkt, dass die hier ermittelten Werte als Retronecin-Äquivalente berechnet wurden. So hat bereits 1981 die Gruppe um Culvenor in fünf Proben PA von *Echium plantagineum* im Bereich von 0,27-0,95 µg/g gefunden (Culvenor *et al.*, 1981). In der Studie von Beales *et al.* erwiesen sich alle geprüften 29 Proben – sie wurden durch Imker PA-produzierenden Pflanzen zugewiesen – PA-positiv mit Gehalten von 0,033-2,2 µg/g. Auch hier war die Analytik auf PA aus *Echium plantagineum* sowie zwei *Heliotropium*-Arten limitiert (Beales *et al.*, 2004). Die bisher höchsten gemessenen PA-Gehalte, bezogen auf *Echium* spp. wurden jüngst von Betteridge *et al.* ermittelt. In dieser Studie zeigten 7 von 9 Honigen aus *Echium vulgare* PA-Gehalten von 0,017-2,85 µg/g (Betteridge *et al.*, 2005).

Da sortenreine *Echium*-Honige im deutschen Handel zwar selten sind, aber unter Liebhabern durchaus ihre Abnehmer finden, ist auch in diesem Fall eine modellhafte Risi-

koabschätzung angebracht. Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.2.1 erläuterten Daten werden hierfür erneut die Konsumtypen 1-3 betrachtet. Als PA-Belastungen werden, da sich alle vermessenen *Echium*-Honige als PA-positiv erwiesen, der niedrigste ermittelte PA-Gehalt (0,334 µg/g) der mittlere PA-Gehalt (0,407 µg/g) und der höchste PA-Gehalt (0,520 µg/g) herangezogen.

Zur Vergleichbarkeit der Daten und vor dem Hintergrund der unter Kapitel 3.2.1 erläuterten Gründe werden auch hier die als Retronecin-Äquivalente berechneten PA-Gehalte in Senecionin-Äquivalente umgerechnet. Somit ergeben sich für die niedrigste, mittlere und höchste Belastung umgerechnete PA-Gehalte von 0,722 µg/g (H), 0,880 µg/g (I) und 1,12 µg/g (J). KT3J vertritt als modelhafter Honigliebhaber eines sortenreinen PA-Pflanzenhonigs in höchstem Maße ein *worst case*-Konsumszenario. Tabelle 3-8 gibt die errechneten PA-Aufnahmen in Senecionin-Äquivalenten für die einzelnen Konsumtypen an.

Tab. 3-8 Rechnerisch im Modell ermittelte, PA-Aufnahmen (Senecionin-Äquivalente) in ng/kg Körpergewicht/Tag (75 kg Person) bei den festgelegten PA-Belastungen und Honigkonsummengen

	bei Honig der PA-Belastung (H) in [ng/kg KG/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (I) in [ng/kg KG/Tag]	bei Honig der PA-Belastung (J) in [ng/kg KG/Tag]
Konsumtyp 1	28,88	35,20	44,80
Konsumtyp 2	86,64	105,60	134,40
Konsumtyp 3	173,28	211,20	268,80

Die Beurteilung der hier im Modell ermittelten Daten ist auf Grund der zwiespältigen Voraussetzungen schwierig. Zum einen ist KT1 eine realistischere eigentlich nicht existierende bundesdurchschnittliche Bevölkerungsgruppe, und zum anderen ist der Verzehr der sortenreinen, hochbelasteten *Echium*-Honige als eher selten einzustufen. Aufgrund dieser Tatsache sind auch die ermittelten Werte für KT2 und KT3 äußerst wagemutig, wenn auch eher ein Liebhaber zu einem solchen Honig greifen würde als der Durchschnittskonsument.

Für den Konsumententyp 1 besteht aufgrund der geringsten täglichen Aufnahmemenge das kleinste Risiko. Aber auch er überschreitet für die einzelnen Szenarien H-J die VSD erheblich. Aus der Definition der VSD würden somit für die Gruppen KT1H, KT1I und KT1J 5514, 6721 und 8554 zusätzliche Krebserkrankungen bei lebenslänglichem, täglichem Konsum resultieren. Auch das MTR wird durch die Konsumenten KT1J leicht überschritten.

Der modellhafte Konsumtyp der Honigesser (KT2) setzt sich, bedingt durch den erhöhten täglichen Konsum, einem stark erhöhten Risiko aus. Bei der hier zugrunde liegenden dreifachen Aufnahmemenge würde demnach auch das Risiko der Gruppen KT2H, KT2I und KT2J für karzinogene Erkrankungen um den Faktor 3 ansteigen. Das MTR wird von allen drei Fällen um mehr als das Doppelte überschritten. Dies würde für die Subpopulation der Honigesser in 5521, 6729 bzw. 8564 Krebserkrankungen resultieren. Für die Gruppen KT2I und KT2J ist erstmals der TDI für nicht-karzinogene toxische Effekte überschritten, womit in diesen Konsumtypen auch mit anderen gesundheitsschädlichen, z.B. akut-toxischen Effekten zu rechnen sein muss.

Der postulierte Honigliebhaber setzt sich, wie auch in den vorangegangenen Betrachtungen, erneut dem größten Risiko aus. Im Modellfall würden diese 1,4 Mio Konsumenten, bedingt durch die Überschreitungen der VSD und des MTR, für die Gruppen KT3H, KT3I und KT3J ein Risiko von zusätzlichen 564, 688 und 875 Krebserkrankungen auf sich nehmen. Das potentielle Risiko würde sich durch diesen Genuss im Vergleich zur durchschnittlichen Bundesbevölkerung versechsfachen. Der für stark toxische PA geltenden TDI wäre von allen KT3-Typen deutlich überschritten, wodurch auch für diese mit weiteren nicht-karzinogenen, gesundheitsschädlichen Effekten zu rechnen wäre.

Der von der FSANZ eingeführte „provisional tolerable daily intake“ von 1 µg/kg Körpergewicht/Tag würde durch keinen der PA-positiven *Echium*-Honige erreicht werden (FSANZ, 2001). Jedoch raten gerade die australischen Behörden, aufgrund des erhöhten Gesundheitsrisikos von einem täglichen Genuss von Honigen aus *Echium plantagineum* ab (FSANZ, 2004).

Diese hier angeführten Modellberechnungen stehen im Gegensatz zu der Tatsache, dass auf Grund des genotoxischen Potentials ohnehin keine Schwellenwerte benannt werden können, da jegliche, auch einmalige, noch so große Dosis zur Belastung beiträgt. Aus Mangel an Regulierungen im Lebensmittelbereich, bleibt ohnehin nur der Vergleich mit anderen, naheliegenden Bestimmungen. Eine Überschreitung des in Deutschland für Phytopharmaka gültigen Grenzwerts von 1 µg PA/Tag bei einer Anwendungsdauer von maximal sechs Wochen wäre schon im Falle eines durchschnittlichen Verzehr von 3 g/Tag (BMELV, 2007) bei allen vermessenen *Echium*-Honig-Proben, wenn man die Berechnung in Senecionin-Äquivalente zugrunde legt, um mindestens das Doppelte gegeben. Unter der Berücksichtigung, dass dieser nur für die Anwendungsdauer von maximal sechs Wochen gültig ist bzw. bei einer längeren Anwendungsdauer auf 0,1 µg PA/Tag korrigiert wird, sowie die zugrundeliegende Verzehrzahl aber auf das gesamte Jahr ermittelt wurde, ist die Überschreitung als extrem unterbewertet anzusehen.

Für den speziellen Fall der *Echium*-Honige stellen diese Ergebnisse einen noch größeren Unterschätzung der vermeintlichen PA-Gehalte dar, als die in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2.1 beschriebenen Ergebnisse, da das in *Echium*-Arten hauptsächlich vorkommende PA Echimidin (Beales *et al.*, 2004; Betteridge *et al.*, 2005), eine Molekularmasse von 397,46 g/mol aufweist und daher ein weit größerer Umrechnungsfaktor von Nöten wäre, als die Umrechnung in Senecionin-Äquivalente mit sich bringt.

3.3 Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Pollen

3.3.1 Vergleich der Analysemethoden für native Pollen und Pollenprodukte

Für die Bestimmung von PA in nativen Pollen und Pollenprodukten waren zwei unterschiedliche analytische Methoden einzusetzen. Im Falle der nativen Pollen mit PA-Gehalten im mg/g-Bereich war die etablierte Standardprozedur für die Bestimmung von PA in Pflanzenteilen in höheren Konzentrationen mittels EIMS-Scan-Modus (siehe Kapitel 4.6.2 und 4.6.3) ausreichend. Unter diesen Bedingungen ist der Einsatz von Fullscan-MS empfindlich genug um auch Minor-PA zuverlässig zu identifizieren. Im Falle kommerzieller Pollenprodukte ist der interessierende Konzentrationsbereich jedoch ca. um einen Faktor von 1000 ($\mu\text{g/g}$) reduziert. In diesem Fall würde eine Analytik nach bestehenden Standardverfahren wie sie bei der Analyse von Pflanzenteilen zum Einsatz kommen, keine verwertbaren Daten generieren. Aus diesem Grund wurde für Pollenproben des Handels die bereits für Honig etablierte, empfindlichere Methode zur analytischen Erfassung von PA im SIM-EIMS-Modus entsprechend der neuen Matrix angepasst (vergleiche Kapitel 3.1.3 und 4.4.1.2).

Um die Verlässlichkeit der Methoden sowie die Vergleichbarkeit der daraus erhaltenen Daten zu überprüfen, wurde eine Probe von nativem *Senecio vernalis*-Pollen jeweils dreifach mit beiden Methoden aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse der EIMS-Scan-Methode (native Pollen) und der SIM-EIMS-Methode (Pollenprodukte) waren mit $4,05 \pm 0,15$ mg/g und $3,96 \pm 0,42$ mg/g, berechnet als Senecionin-Äquivalente, in guter Übereinstimmung.

Bei Einsatz der Methodik für native Pollen können die analysierten Verbindungen auch strukturell identifiziert werden, während die Technik für Pollenprodukte eine empfindlichere und selektivere Möglichkeit zur Erfassung von PA im Spurenbereich darstellt. Durch die Analyse im SIM-EIMS-Modus sind keine weiteren Informationen, wie z.B. über den botanischen Ursprung des Materials notwendig. Jede der beiden eingesetzten Methoden repräsentiert somit eine verlässliche Möglichkeit zur Bestimmung von PA, abhängig vom analytischen Problem oder dem Anwendungsgebiet.

3.3.2 Native Pollen

Obwohl bereits in jüngsten Publikationen (Boppré *et al.*, 2005; Boppré *et al.*, 2008) das Vorhandensein von PA in Pollen von PA-Pflanzen belegt wurde, ist die Datenlage weiterhin limitiert. Die hier durchgeführte Studie hatte das Ziel, native Pollen von allen bedeutenden PA-Pflanzenfamilien zu betrachten. Als Repräsentanten hierfür wurden nativen Pollen von *Senecio vernalis* (Asteraceae), *S. jacobaea* (Asteraceae), *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae), *Echium vulgare* (Boragniaceae), *Crotalaria juncea* (Fabaceae), *C. sagittalis* (Fabaceae) und *Phalaenopsis hybrid* (Orchidaceae) gewählt. Diese wurden größtenteils aus Wildbeständen bezogen (vgl. Kapitel 4.1.3.2) und der native Pollen gemäß den Angaben in Kapitel 4.6.1 gewonnen. Vor der PA-Extraktion wurden die Pollenproben durch mehrfaches Waschen mit Cyclohexan gereinigt, um sicherzustellen, dass nur die Pollen und kein anderweitiges Pflanzenmaterial analysiert werden. Die Reinigung mit Cyclohexan erwies sich als sinnvoll, da Pollen ein anderes Sedimentierverhalten besitzen, als begleitende Pflanzenbruchstücke, die sich viel schneller absetzen. Die dadurch gewonnenen reinen Pollenfraktionen wurden zusammengeführt, das organische Lösemittel wurde abfiltriert und die Reinheit der Pollen durch Lichtmikroskopie bestätigt. Die PA-Extraktion und -Analyse erfolgten in Anlehnung an eine bereits publizierte Methodik (Hartmann und Toppel, 1987) analog Kapitel 4.6.2 und 4.6.3. Abgesehen von *C. juncea* und *C. sagittalis* der Pflanzenfamilie Fabaceae, konnten in allen Pflanzenfamilien PA in Pollen und Blüte detektiert werden. Die hierbei identifizierten PA zeigten eine Übereinstimmung mit bereits für die jeweilige Pflanze bekannten PA (vgl. Tabelle 3-9). Tabelle 3-9 zeigt die in Blüten und nativen Pollen ermittelten PA-Gehalte, sowie den Anteil der N-Oxide am Gesamtgehalt.

Tab. 3-9 PA-Gehalte und PA-N-Oxid-Anteile in Pollen und Blüten der untersuchten PA-haltigen Pflanzen

Pflanzenart	Pollen		Blüte bzw. Blütenkopf		identifizierte PA
	PA-Gehalt [mg/g]	PA-N-Oxid-Anteil am PA-Gehalt [%]	PA-Gehalt [mg/g]	PA-N-Oxid-Anteil am PA-Gehalt [%]	
<i>Senecio vernalis</i>	4,07	71%	2,29	84%	vgl. Abbildung 3-18
<i>Senecio jacobaea</i>	3,30	95%	3,37	74%	Witte <i>et al.</i> , 1992
<i>Eupatorium cannabinum</i>	0,61	83%	4,23	69%	a)
<i>Echium vulgare</i>	0,93	81%	2,02	98%	El-Shazly <i>et al.</i> , 1996
<i>Crotalaria juncea</i>	n.v. ^{c)}	n.v. ^{c)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	
<i>Crotalaria sagittalis</i>	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	n.d. ^{d)}	
<i>Phalaenopsis hybrid</i> ^{b)}	0,57	0%	4,38	3%	Frölich <i>et al.</i> , 2006

a) Rinderin (46%; **52**), Intermedin (31%; **53**), Echinatin (23%; **54**)

b) Pollinien

c) n.v. = nicht vorhanden

d) n.d. = nicht detektiert

Die von uns für native Pollen mittels HRGC-FID/NPD ermittelten Daten liegen in derselben Größenordnung wie die zuvor mittels LC-MS publizierte Gehalte (Boppré *et al.*, 2008). Der für *E. vulgare*-Pollen bestimmte PA-Gehalt liegt in etwa ein Zehntel niedriger als die von Boppré *et al.* (2005) festgestellten PA-Mengen, sind aber nahe an den später publizierten Daten für Pollenladungen von Honigbienen (Boppré *et al.*, 2008). Die Pollen und Blüten der beiden *Crotalaria*-Arten waren frei von PA. Ob *Crotalaria* Pollen generell PA-frei sind, bleibt ungewiss. Auf der einen Seite gelang es nicht, aus den zur Verfügung stehenden Samen *C. juncea*-Pflanzen mit männlichen Blütenteilen zu ziehen. Auf der anderen Seite sind gerade für *Crotalaria* spp. einige Beispiele bekannt, bei denen PA nicht gleichmäßig über alle Pflanzenteile verteilt sind (Kaleb Asres *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2005). Möglicherweise war auch gerade die hier verwendete *C. sagittalis* Varietät zufälligerweise frei von PA in den analysierten Pflanzenteilen, obwohl in den Samen Monocrotalin (**9**) in Spuren detektiert werden konnte (nicht dargestellt).

In Pollen und Blüten der analysierten Asteraceen wurden PA vorwiegend als *N*-Oxide nachgewiesen. Einzig die Pollinien der *Phalaenopsis* wiesen nur die tertiäre Form der PA auf (vgl. Tabelle 3-9). Im Allgemeinen war die qualitative Zusammensetzung der individuellen PA-Muster in Pollen und Blüte identisch, jedoch differierten diese in ihrer relativen Zusammensetzung. Um dies detaillierter zu prüfen wurde die bereits zur Methodenentwicklung eingesetzte Modellpflanze *S. vernalis* genauer betrachtet, nicht zuletzt, da sich für sie das Sammeln der Pollen als hocheffizient herausstellte.

Wildpopulationen blühender *S. vernalis*-Pflanzen von vier verschiedenen Standorten mit jeweils ca. 40-60 Einzelpflanzen wurden einmal pro Woche abgeerntet. Aufgrund der Tatsache, dass die PA-Biosynthese in den Wurzeln von *S. vernalis* lokalisiert ist, wurden die Proben in zwei Gruppen unterteilt, einmal in abgeschnittene Pflanzen und einmal in Pflanzen komplett mit Wurzelstock. Die wöchentliche Pollenproduktion jeder Gruppe wurde zusammengefasst und nach vorangegangener Cyclohexanwaschung gemäß den Angaben in den Kapiteln 4.6.2 und 4.6.3 auf ihren PA-Gehalt hin analysiert. Der vereinigte organische Lösemittelrückstand des Waschschrilles, der die Wachsschicht der Pollen enthielt, wurde separat untersucht. Diese Studie wurde über einen Gesamtzeitraum von drei Wochen durchgeführt, entsprechend der Hauptblütezeit von *S. vernalis*. Die von zwölf individuellen *S. vernalis*-Proben erhaltenen Datensets zeigten für Pollen oder Blüten keine signifikanten Unterschiede im PA-Gehalt oder den individuellen PA-Verhältnissen in Bezug auf Ernteort, Zeitpunkt der Ernte, Haltung mit Wurzel oder Haltung ohne Wurzel. Allerdings ergaben sich bei den beiden Probensets zwischen Pollen und Blüten signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 3-17 sowie Anhang Tabellen 7-12 und 7-13).

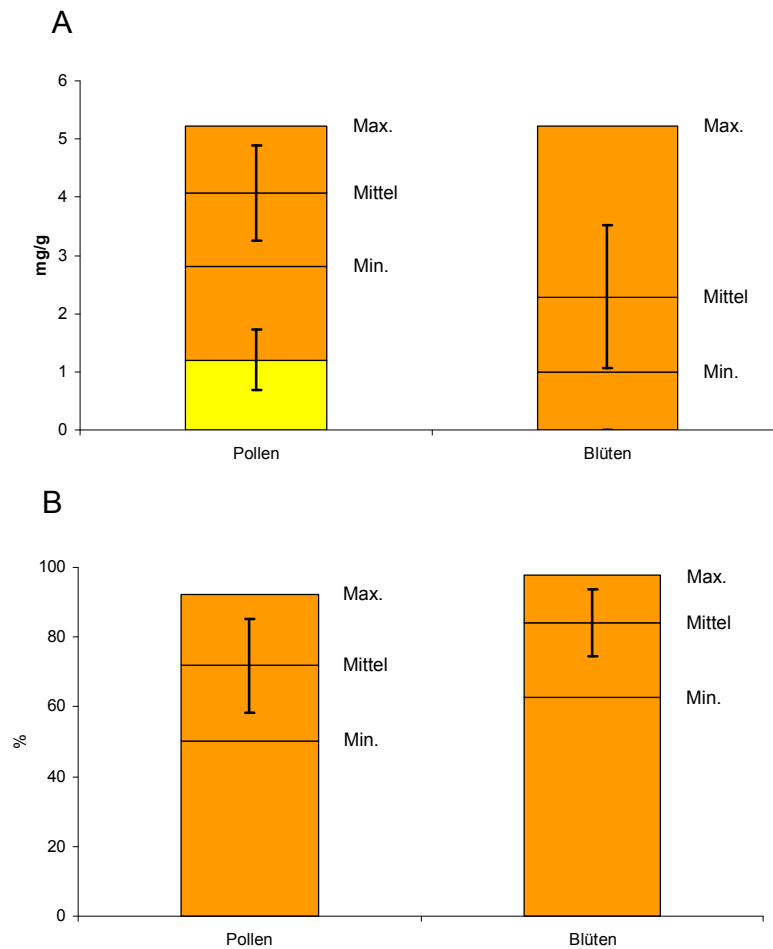
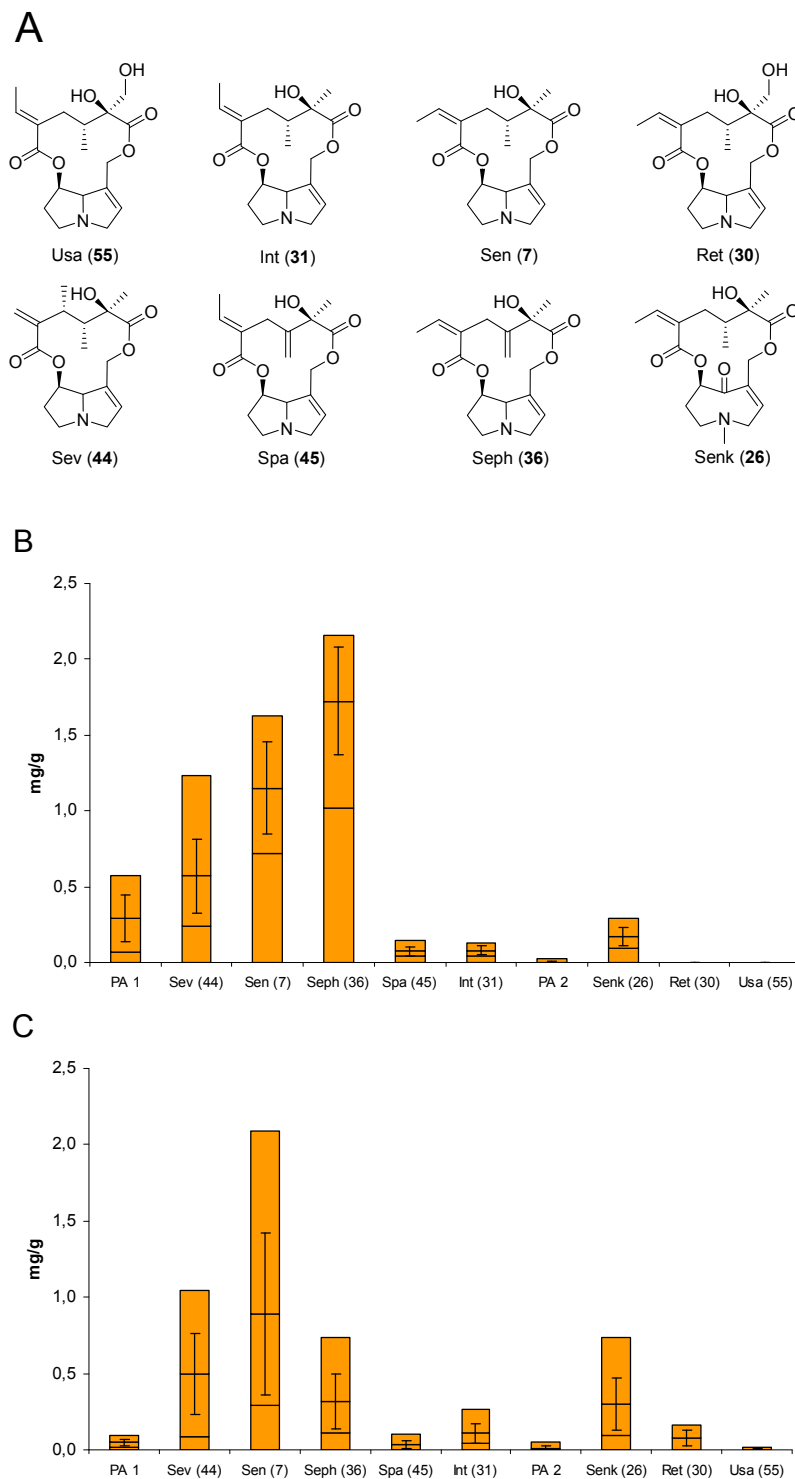


Abb. 3-17 PA-Gehalte (A) und PA-N-Oxid-Anteile (B) in Pollen und Blüten von *Senecio vernalis*. Die Querstriche zeigen Mittelwert (\pm SD), Minimum und Maximum der Messungen ($n=12$). Die gelbe Farbe zeigt die in der Wachsicht der Pollen gefundene Menge an PA.

Der Maximalgehalt reichte bis zu 5,23 mg/g, jedoch war im Allgemeinen der PA-Gehalt im Pollen ca. doppelt so hoch wie in den Blüten (vgl. Anhang Tabelle 7-12). Desweiteren unterschied sich die PA-Zusammensetzung zwischen Blüten und Pollen. Das PA-Muster von Pollen war hauptsächlich von Senciphyllin (**36**) geprägt, während Retrosin (**30**) und Usaramin (**55**) nur in Blüten detektiert werden konnten (vgl. Anhang Tabellen 7-14 und 7-15). Abbildung 3-18 zeigt, neben den in *S. vernalis* detektierten PA, die Zusammensetzung der PA-Muster in Pollen und Blüten.



PA 1 = unbekanntes PA, Sev = Senecivernin (44), Sen = Senecionin (7), Seph = Seneciphyllin (36), Spa = Spartioidin (45), Int = Integerrimin (31), PA 2 = unbekanntes PA, Senk = Senkirkin (26), Ret = Retrorsin (30), Usa = Usaramin (55).

Abb. 3-18 Detektierte PA (A), Verteilung der einzelnen PA in Pollen (B) und Blüten (C). Die Querstriche zeigen Mittelwert (\pm SD), Minimum und Maximum der Messungen (n=12).

Die Biosynthese von Senecionin ist in der Wurzel lokalisiert (Hartmann und Toppel, 1987), es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Variationen in den PA-Mustern zwischen Pollen und Blüten durch Unterschiede im Transport bedingt sind. Jedoch scheint es, dass die Zunahme an Seneciphyllin in Pollen durch eine pollen-spezifische Umwandlung von Senecionin in Seneciphyllin ursächlich ist. Auf der anderen Seite scheinen nur Blüten die Fähigkeit zur Senecionin-Hydroxylierung zu besitzen. Die Diversität der erhaltenden PA-Muster in *Senecio* spp. ist Resultat von einfachen enzymatischen Modifikationen, wie z.B. Hydroxylierung oder Dehydrierung, der Grundstruktur (vgl. Abbildung 3-18A). Dadurch, dass diese Modifikationen zwischen den einzelnen Organen variieren und zeitgleich individuell spezifisch sind, kann innerhalb einer Pflanze eine große Plastizität an PA-Mustern auftreten (Hartmann *et al.*, 1989; Hartmann und Dierich, 1998).

Bemerkenswerterweise erwies sich das PA-Muster der Pollen-Wachsschicht indentisch zu dem der Blüten und nicht wie zu erwarten, zu dem der Pollen. Die Wachsschicht machte im Durchschnitt 25% des in Pollen nachgewiesenen PA-Gehaltes aus, setzte sich jedoch durch einen weit größeren Anteil an tertiären PA anstelle von PA-N-Oxiden zusammen, und kann mit der größeren Lipophilie der tertiären PA erklärt werden.

3.3.3 Pollenprodukte

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, u.a. ausgelöst durch zwei Publikationen über PA-Gehalte in nativen Pollen (Boppré *et al.*, 2005; Boppré *et al.*, 2008), die Anwesenheit von PA in kommerziellen Pollenprodukten zu überprüfen und mengenmäßig zu erfassen. Durch methodische Anpassungen bei der Probenaufarbeitung ließ sich die zuvor für Honige etablierte Methode erfolgreich zur Bestimmung von PA-Gehalten in Pollenprodukten adaptieren (siehe auch Kapitel 3.1.3). Insgesamt wurden 55 kommerzielle Pollenprodukte (vergleiche Kapitel 4.1.3.3.2) nach den Angaben in Kapitel 4.4.1.2 aufgearbeitet und analysiert. Diese umfassten hauptsächlich getrocknete gehöselte Pollen jedoch auch in Tablettenform gepresste Pollen. Die Produkte wurden über diverse Supermärkte in Deutschland und anderen europäischen Ländern, wie z.B. Italien und Frankreich, sowie in verschiedenen Internetshops bezogen. Innerhalb der 55 analysierten Proben waren 33 europäischer Herkunft, vier aus den USA und Mexiko, eine aus Neuseeland und eine aus Asien. Die weiteren 16 Proben waren ohne spezifische Herkunftsangabe (vgl. Anhang Tabelle 7-16). Abbildung 3-19 gibt einen Überblick auf die regionale Verteilung der analysierten Pollenprodukte.

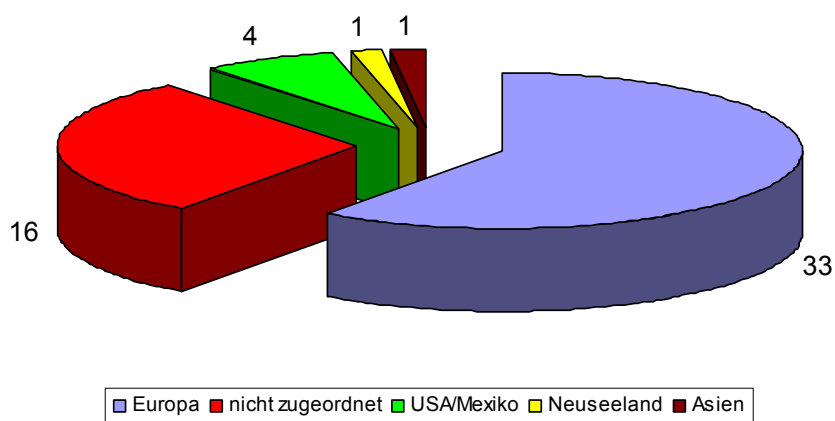


Abb. 3-19 Übersicht über die regionale Verteilung der analysierten 55 Pollenprodukte

Innerhalb dieser Pollenprodukte erwiesen sich 17 Proben (31%) als PA-positiv. Diese enthielten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, von 1,08-16,35 $\mu\text{g/g}$ mit einem Mittelwert von 5,17 $\mu\text{g/g}$ (vgl. Anhang Tabelle 7-16). Abbildung 3-20 gibt eine Übersicht über die Gehalte der PA-positiven Pollenprodukte.

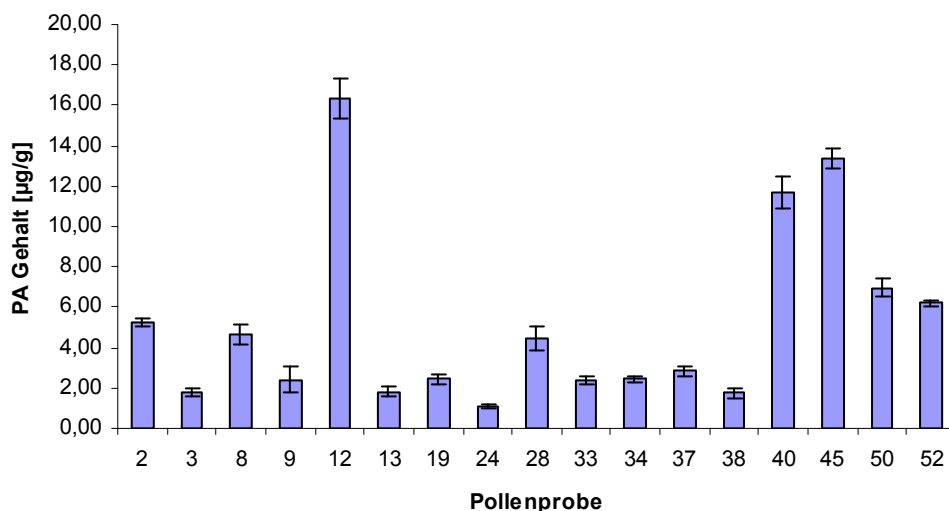


Abb. 3-20 PA-Gehalte der PA-positiven Pollenprodukte (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Vierfachbestimmung.

Unter den 17 PA-belasteten Proben waren neun europäischer Herkunft und die weiteren acht ohne Angabe der regionalen Herkunft. Bei den europäischen Proben stammten fünf aus Spanien, zwei aus Rumänien und je eine aus Italien und Frankreich (Abbildung 3-21 und Anhang Tabelle 7-16).

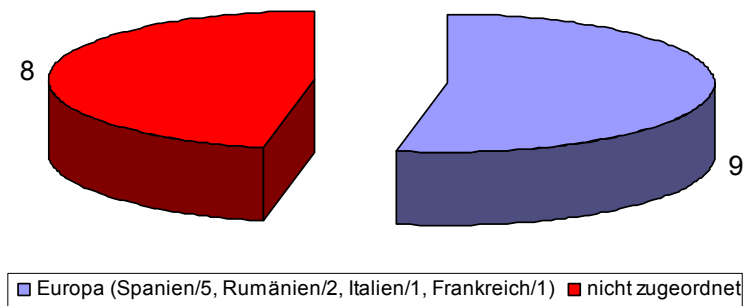


Abb. 3-21 Übersicht auf die regionale Verteilung der PA-positiven Pollenprodukte

Die PA-Gehalte lagen im Mittel mit $5,17 \mu\text{g/g}$ um ca. zwei Zehnerpotenzen über denen der für die Honighandelsproben ($0,062 \mu\text{g/g}$) ermittelten PA-Belastungen (vergleiche Kapitel 3.2.1). Selbst die Gehalte der *Senecio*- und *Echium*-Honige (vergleiche Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2) werden um ein Vielfaches überschritten. Die hier ermittelten PA-Gehalte liegen um einiges niedriger als die in sortenreinen nativen PA-Pflanzenpollen (bis zu $13985 \mu\text{g/g}$; Boppré *et al.*, 2005) bzw. die in gehöselten Pollenladungen detektierten Mengen (bis zu $350 \mu\text{g/g}$; Boppré *et al.*, 2008). Dies ist jedoch das zu erwartende Ergebnis aus der zwangsläufig stattfindenden Verdünnung von PA-Pollen mit nicht-PA-Pollen in den Handelsprodukten.

Anschließend wurden alle PA-positiven Proben einer mikroskopischen Pollenanalyse nach DIN 10760 (gemäß Kapitel 4.5) zur Erhebung der mellisopalynologischen Daten unterzogen. Besonderes Augemerkt wurde, wie zuvor bei den Honigen, auf PA-produzierende Pflanzen der Familien Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum*) und Fabaceae (z.B. *Crotalaria*) gelegt. Es wurden 500 Pollen ausgezählt, die sowohl zur Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit als auch der geographischen Herkunft herangezogen wurden. Alle analysierten Proben enthielten per Etikett keinerlei Information bezüglich der pflanzlichen Abstammung der Pollen. In allen PA-positiven Pollenprodukten konnten zum Teil erhebliche Mengen an PA-Pflanzenpollen, hauptsächlich *Echium* spp. nachgewiesen werden.

Tabelle 3-10 zeigt eine Zusammenfassung der mellisopalynologischen Daten.

Tab. 3-10 Mellisopalynologische Daten der PA-positiven Pollenproben. Angegeben sind die relativen Häufigkeiten der Pollen von PA-produzierenden Pflanzen sowie die geographische Herkunft der Proben.

Probe Nr.	Pollenanalyse	geographische Herkunft	
		durch Pollenanalyse	laut Etikett
2	66% <i>Echium</i> spp.	Spanien	k.A. ^{a)}
3	23% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	k.A. ^{a)}
8	66% <i>Echium</i> spp.	Spanien	Spanien
9	27% <i>Echium</i> spp.	Spanien	k.A. ^{a)}
12	83% <i>Echium</i> spp.	Spanien	Rumänien
13	12% <i>Echium</i> spp.	Spanien (teilweise osteuropäische Regionen)	k.A. ^{a)}
19	22% <i>Eupatorium</i> spp.	n.d. ^{b)}	Rumänien
24	25% <i>Echium</i> spp., < 1% <i>Senecio</i> spp.	Spanien (teilweise osteuropäische Regionen)	Spanien
28	58% <i>Echium</i> spp.	Spanien	k.A. ^{a)}
33	67% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	Italien
34	44% <i>Echium</i> spp., 6% <i>Eupatorium</i> spp.	mediterrane Regionen	Frankreich
37	47% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	Spanien
38	21% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	k.A. ^{a)}
40	75% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	k.A. ^{a)}
45	77% <i>Echium</i> spp.	Spanien	Spanien
50	60% <i>Echium</i> spp.	n.d. ^{b)}	k.A. ^{a)}
52	43% <i>Echium</i> spp.	Spanien	Spanien

a) k.A. = keine Angaben

b) n.d. = nicht durchgeführt

Im Wesentlichen spiegelt die Korrelation der relativen Pollendaten mit den ermittelten PA-Gehalten den schon mehrfach bei den Honigen festgestellten Trend wieder: Ein hoher PA-Gehalt geht mit einem relativ hohen Anteil an PA-Pollen einher; so zeigten die drei Proben Nr. 12, 40 und 45 mit den höchsten gemessenen PA-Gehalten von 16,35 µg/g, 11,65 µg/g und 13,36 µg/g, mit 83%, 75% und 77% *Echium* spp. auch die höchsten relativen Mengen an PA-Pollen. Der Umkehrschluss ist allerdings nicht zwangs-

läufig richtig; so zeigt ein hoher relativer PA-Pflanzenpollen-Anteil, wie z.B. bei Probe Nr. 33 (mit 67% *Echium* spp.) nicht zwingend einen hohen PA-Gehalt an, in obigem Beispiel lag er nur bei 2,38 µg/g. Aufgrund dieser mehrfach bestätigten Tatsache bleibt festzuhalten, dass die relative Pollenanalyse nur ein sehr eingeschränktes Werkzeug zur quantitativen Prognose der PA-Belastungen darstellt, selbst wenn ein spezielles Augenmerk auf PA-Pflanzenpollen gelegt wird. Andererseits war die Anwesenheit von PA-Pflanzenpollen immer ein Indikator für eine vorhandene PA-Belastung.

Über die aktuelle Marktsituation von Pollenprodukten sind derzeit nur wenige Informationen verfügbar, es liegen keinerlei Statistiken über Verzehrsmengen vor. Die von den Herstellern empfohlenen Tagesrationen schwanken zwischen 10-100 g/Tag. Empfohlen wird die Einnahme als Zugabe zu Getränken oder Zusatz zu Frühstückscerealien. Unter diesem Gesichtspunkt scheint eine Risikobetrachtung dieses Spartenlebensmittel äußerst schwierig. Zwar wird das Lebensmittel „Pollen“ von der breiten Masse der Bevölkerung nicht wahrgenommen, dennoch ist dessen zunehmende Verbreitung in Reformhäusern und Vollsortimentsupermärkten ein Indiz für das wachsende Interesse. Nimmt man für einen Modellfall einen PA-Gehalt von 5,17 µg/g, eine 30%-ige Wahrscheinlichkeit und die minimale empfohlene Tagesration von 10 g (entspricht ca. 2-3 Teelöffeln) an, so resultiert daraus eine Aufnahme von ca. 15,5 µg PA für einen Pollenkonsumenten. Da diese Berechnung auf Retronecin-Äquivalenten beruht müsste - auch um der Regulierung für Phytopharmaka gerecht zu werden - dieser Wert in ein gewöhnliches verestertes PA umgerechnet werden. Zieht man hierzu erneut Senecionin (7) heran, so ergibt sich eine auf Senecionin-Äquivalente berechnete PA-Aufnahme von 33,5 µg. Für regelmäßige Konsumenten von Pollenprodukten würde dadurch der für Phytopharmaka festgelegte Grenzwert bei regelmäßiger Einnahme (von 0,1 µg PA) um mehr als das 300-fache überschritten werden. Der für akute (Leber-) Toxizität diskutierte TDI von 100 ng/kg Körpergewicht/Tag (Van der Zee, 2005) würde durch eine solche Dosis bei einem 75 kg Menschen um das vierfache und bei einem 20 kg Kind um mehr als das fünfzehnfache überschritten werden. Eine Diskussion der Daten mit den vorhandenen Grenzwerten der VSD bzw. des MTR erscheint aufgrund der limitierten Verbreitung als nicht sinnvoll, wenngleich eine einmalige Aufnahme zur Entfaltung des genotoxischen Potentials ausreicht.

Festzuhalten bleibt, dass für Konsumenten von Pollenprodukten durch die im Vergleich zu Honig um ein vielfaches höheren PA-Gehalte (5,17 µg/g gegenüber 0,062 µg/g) und nicht zuletzt aufgrund der relativ hohen Frequenz für einen Positiv-Befund von 31% gegenüber 9% bei Honig ein ernstes Gesundheitsrisiko bestehen kann. Die festgestellten PA-Gehalte in Pollenprodukten werfen nicht zuletzt die Frage auf, ob solche Produkte ohne Kontrollen der PA-Gehalte als Nahrungsergänzungsmittel verkauft werden

sollten zumal bereits 2001 die FDA empfohlen hat, dass PA nicht in Nahrungsergänzungsmitteln vorkommen dürfen (FDA, 2001).

3.4 Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in honighaltigen Lebensmitteln

In Kapitel 3.2 ist gezeigt worden, dass Honige z.T. beachtliche Mengen an PA enthalten können. Da Honig durchaus nicht nur als reines Lebensmittel, sondern auch als Lebensmittelzutat verzehrt wird, soll im Folgenden die Klasse der „honighaltigen Lebensmittel“ etwas genauer betrachtet werden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass man aktuell seitens der Lebensmittelindustrie forciert, „gesund wirkende“ Lebensmittel mit Honig - sozusagen als „natürliche Süße“ - zu süßen ist, bei Betrachtung der PA-Problematik eine intensivere Auseinandersetzung mit dem Problem der Downstream-Kontamination in der Nahrungskette angebracht. Hierbei spielen vor allem „Bio“-Produkte und Lebensmittel, für die oft Kinder als Zielgruppe gelten, eine große Rolle. Unter dem Slogan der „natürlichen Süße“ ist mittlerweile eine Vielzahl von Lebensmitteln mit der Zutat „Honig“ verfügbar. Sie enthalten teilweise nicht unerhebliche Mengen an Honig im Zutatenverzeichnis. Damit könnte im Falle einer hohen PA-Belastung des Honigs die durchschnittliche PA-Aufnahme mit der Nahrung größer sein als vielleicht vermutet. Desweiteren erschien es von Interesse, festzustellen ob die PA-Problematik bedingt durch die technologischen Prozesse überhaupt eine Rolle in honighaltigen Lebensmitteln spielt.

Bei den von uns analysierten Produkten handelte es sich um Vertreter vieler unterschiedlicher Warengruppen, die Honig in einem Anteil von mindestens 5% in ihrem Zutatenverzeichnis führten. Ergänzt wurden die „klassischen Lebensmittel“ durch honighaltige Nahrungsergänzungsmittel sowie den ebenfalls als Lebensmittel geltenden „Fenchelhonig“. Insgesamt wurden 60 verschiedene honighaltige Lebensmittel ausgewählt und jeweils gemäß den Angaben in Kapitel 4.4.1.3 aufgearbeitet und analysiert. Die Standardisierung erfolgte nach den Angaben in Kapitel 4.4.3.1 mittels Heliotrin. Die Probeneinwaagen richteten sich nach dem jeweils angegebenen Honiggehalt der Produkte, so dass pro Probenaufarbeitung mindestens ein Äquivalent von 20 g Honig vorlag. Im Detail handelte es sich bei den honighaltigen Lebensmitteln (HL) um Met (n=19), Bonbons (n=10), Fenchelhonige (n=9), Getränke (n=5), Riegel und Cerealien (n=7), Gummibären (n=3) Baby-Breie (n=3), Nahrungsergänzungsmittel (n=3) und Fruchtsoßen (n=1). Honigmet enthält keine genauen Angaben zum Honiggehalt, muss jedoch nach den gültigen Rechtsvorschriften der Leitsätze für weinähnliche und schaumweinähnliche Getränke ein Erzeugnis aus einem Teil Honig und höchstens zwei Teilen Wasser ohne Zusatz von Zuckerarten oder anderen süßenden Zutaten hergestellt werden (GMBI, 2003). Der

Honiggehalt des Lebensmittels „Met“ wurde daher mit 30% angenommen. Auch für das Erzeugnis „Fenchelhonig“ ist eine genaue Deklaration nicht verfügbar. Zwar stellt gemäß der Deklaration Honig (gemäß Honigverordnung) die Hauptzutat der Zubereitung dar, jedoch werden diesen Produkten auch weitere Zuckerarten (z.T. Invertzucker) zugesetzt. Unter Berücksichtigung des Invertzuckergehaltes ist der Honiggehalt von Fenchelhonig, bei Produkten ohne Invertzuckerzusatz, im Mittel mit ca. 37% anzunehmen. Die laut Deklaration zugrunde liegenden Honigmengen in den restlichen Lebensmitteln variierten von 3% - 50%. Die jeweiligen Honiggehalte des entsprechenden Lebensmittels können Anhang Tabelle 7-17 entnommen werden.

In der Studie zu PA-Gehalten in honighaltigen Lebensmitteln erwiesen sich acht Lebensmittel als PA-positiv. Somit zeigten ca. 13% aller Proben PA-Gehalte von 0,010-0,484 $\mu\text{g/g}$ (vgl. Anhang Tabelle 7-17). Der durchschnittliche Gehalt lag bei 0,100 $\mu\text{g/g}$. Die Ergebnisse wurden analog den Honigen und Pollen als Retronecin-Äquivalente berechnet. Abbildung 3-22 gibt einen Überblick über die ermittelten PA-Gehalte in honighaltigen Lebensmitteln.

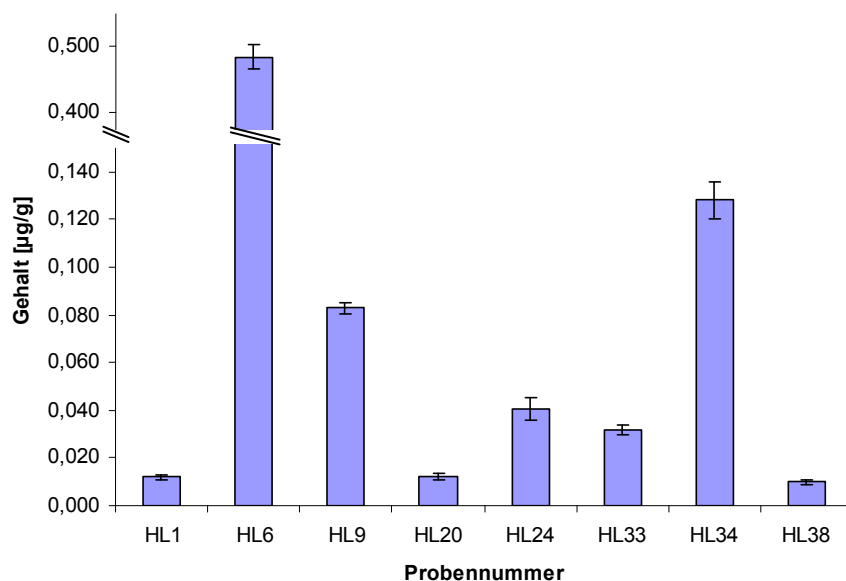


Abb. 3-22 PA-Gehalte der vermessenen honighaltigen Lebensmittel (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Dreifachbestimmung. HL1, HL6, HL9 = Met; HL20, HL24 = Honigbonbons; HL33, HL34, HL38 = Fenchelhonig.

Die honighaltigen Lebensmittel zeigen mit 13% ungefähr die gleiche Belastungshäufigkeit wie die analysierten Honighandelsproben (9%). Der ermittelte Höchstgehalt von 0,484 $\mu\text{g/g}$ liegt aber mit ca. dem Vierfachen im Vergleich zum maximal belasteten Handelshonig (0,135 $\mu\text{g/g}$) deutlich höher. Berücksichtigt man nun den „Verdünnungseffekt“ dadurch, dass Honig im Lebensmittel nur eine Zutat und nicht alleiniger Bestandteil

des Lebensmittel ist, muss man annehmen, dass in der Herstellung ein stark PA-belasteter Honig eingesetzt worden ist. Dies belegt, wie in den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.2.2.2 postuliert, dass solche Honige durchaus dem Verbraucher, sei es auch in verarbeiteter Form, zugänglich sind. Bei den Proben HL1, HL6 und HL9 handelte es sich um Metproben, HL20 und HL24 waren Honig-gefüllte Bonbons und HL33, HL34 sowie HL38 waren Fenchelhonige. Alle PA-positiven Lebensmittel wiesen somit einen deklarierten Honiganteil von 7 – ca. 37% auf. Mellisopalynologische Daten sind auf Grund der Vielzahl an technologischen Verarbeitungsschritten, wie z.B. Mahlen, Walzen oder Filtrieren, für die honighaltigen Lebensmittel nicht verfügbar.

Eine Bewertung der Daten hinsichtlich des gesundheitsgefährdenden Potentials stellt sich für diese drei betroffenen Produktgruppen, nicht zuletzt wegen der fehlenden gesetzlichen Regulierungen für Lebensmittel, als schwierig dar. Außerdem ist die Probenanzahl der HL für eine gesicherte statistische Auswertung zu gering, soll jedoch in diesem Zusammenhang modellhaft durchgeführt werden. Generell gelten die vorgängig in Kapitel 3.2 für Honige getroffenen Aussagen. Eine Umrechnung der als Retronecin-Äquivalente berechneten Daten in Senecionin-Äquivalente ist daher erforderlich.

Für die drei PA-positiven Metproben HL1, HL6 und HL9 ergeben sich auf Senecionin-Äquivalente berechnete PA-Gehalte von 0,026 µg/g, 1,05 µg/g und 0,179 µg/g. Da es keinerlei statistische Erhebungen zum Konsum von Met gibt, wird hier, unter Berücksichtigung des genotoxischen Potentials der PA, eine Einmalkonsummenge von einem Glas (200 ml, entspricht ca. 210 g) Met betrachtet. Legt man dies zugrunde, so ergeben sich Aufnahmemengen von 5,46 µg, 220,5 µg und 37,59 µg. Vergleichend mit dem für Kurzzeitanwendung gültigen Phytopharmaka-Grenzwert von 1 µg PA/Tag würde bei einem solchen Konsum eine Überschreitung von weit mehr als dem Fünffachen erfolgen. Berücksichtigt man nun die aus der Gesamtheit der Metproben (n=19) resultierende Wahrscheinlichkeit für einen PA-belasteten Met, so ergibt sich für die Lebensmittelgruppe „Met“ eine modellhafte, durchschnittliche Belastung von 0,066 µg/g. Ein Konsum von 200 ml des „Durchschnittsmet“ würde mit 13,86 µg ebenfalls eine PA-Aufnahme bedeuten, die den pharmazeutischen Grenzwert weit überschreitet. Vergleiche mit den für lebenslängliche tägliche Aufnahmen gültigen Grenzwerten VSD, MTR und TDI erscheinen bei einem solchen Nischen-Lebensmittel, auch da entsprechende Verbrauchszahlen fehlen, als nicht sinnvoll.

Im Falle der PA-positiven Honig-gefüllten Bonbons ergibt sich ein ähnlicher Sachverhalt. Die in Senecionin-Äquivalente umgerechneten PA-Gehalte liegen für HL20 bei 0,026 µg/g bzw. für HL24 bei 0,088 µg/g. Ein Honigbonbon wurde durch Referenzwägung von je 10 Bonbons aller analysierten Bonbons mit 3 g Durchschnittsgewicht ermittelt. Honig-Bonbons bzw. mit Honig gefüllte Bonbons sind oft als Erkältungsbonbons im Han-

del, daher ergibt sich ebenfalls ein eher partieller und nicht kontinuierlicher Konsum. Geht man nun von einem Erkältungsfall aus, bei dem der Erkrankte täglich über einen kürzeren Zeitraum (maximal die Dauer der Erkältung) 3-5 Bonbons täglich lutscht, so kommt man auf einen durchschnittlichen Konsum von 12 g dieses Lebensmittels. In einem solchen Fall würde eine PA-Aufnahme von 0,312 µg bzw. 1,06 µg für Bonbons aus HL20 bzw. HL24 resultieren. Berücksichtigt man nun noch die Wahrscheinlichkeit von 20%, zu einer PA-positiven Bonbonsorte zu greifen - hier in der Studie 2 aus 10 - so lässt sich feststellen, dass man zumindest für den Bonbonskonsum im Falle einer Kurzzeitanwendung mit der individuellen PA-Aufnahme unter dem für Phytopharmaka festgelegten Grenzwert liegen würde. Vermutlich gibt es für diese spezielle Lebensmittelgruppe auch Liebhaber, die solche Bonbons ganzjährig, also nicht nur in der Erkältungszeit, zu sich nehmen; ob deren Konsum aber dann hochgerechnet auch bei 3-5 Bonbons/Tag liegen würde, darf allerdings bezweifelt werden.

Für die verbleibenden drei PA-positiven honighaltigen Lebensmittel HL33, HL34 und HL38 ergibt sich indes eine brisantere Konstellation. Diese Lebensmittel repräsentieren, wie bereits erwähnt, sogenannte Arzneihonige. Alle analysierten Produkte waren im freien Handel, gleichgültig ob Apotheke, Discounter oder Drogerie, ohne Rezept verfügbar und gelten als Nahrungsergänzungsmittel bzw. Lebensmittel. Alle Produkte werden jedoch als Arzneimittel beworben, was dem Verbraucher durch die Aufmachung der Verpackung, Dosieranleitung, dem Aufdruck einer Zulassungsnummer, einem Beipackzettel und durch pharmazeutische Unternehmen als Hersteller suggeriert wird. Öfter fand sich in den Beipackzetteln auch der Hinweis „es sind keine toxischen Effekte bekannt“, wodurch ausreichende toxikologische Studien, so wie sie bei der Zulassung eines Medikaments von Nöten sind, vermutet werden könnten.

Der auf Senecionin-Äquivalente berechnete Gehalt der Proben HL33, HL34 und HL38 liegt bei 0,068 µg/g, 0,277 µg/g und 0,022 µg/g. Geht man auch hier wieder vom Erkältungsfall aus, so kann man auch hier von einer Kurzzeitanwendung bzw. einem Kurzzeitkonsum ausgehen. Die üblichen, auf den Packungen oder in den Beipackzetteln vermerkten Dosieranleitungen empfehlen die Aufnahme von dreimal täglich 1 Dosierlöffel (5 ml entsprechend 6,5 g). Somit kann von einer mittleren Aufnahme von ca. 20 g ausgegangen werden. Wendet man nun den Grenzwert für Phytopharmaka, und dieser scheint für Fenchelhonig aufgrund ihres Einsatzes als Arzneimittel durchaus angebracht, von 1 µg PA/Tag an, so würde dieser nur beim Produkt HL38 eingehalten werden. Für die Proben HL33 und HL34 würde eine bis zu fünffache Überschreitung vorliegen. Berücksichtigt man die Wahrscheinlichkeit, unter allen analysierten Fenchelhonigproben eine PA-positive zu konsumieren – hier 3 aus 9 – von 33%, so resultiert für den durchschnittlichen, getesteten Fenchelhonig eine mittlere PA-Belastung von 0,041 µg/g, wodurch eine

Überschreitung des Grenzwertes bei der oben angenommenen Dosis von 20 g nicht erfolgt. Wie für die anderen PA-positiven Lebensmittel gilt, dass eine Betrachtung mit weiteren relevanten Grenzwerten wie der VSD, dem MTR oder dem TDI nicht zuletzt aufgrund der limitierten Anwendungsdauer als wenig sinnvoll erscheint.

Diese Studie zur möglichen Downstream-Kontamination von honighaltigen Lebensmitteln durch den Einsatz von hoch PA-belasteten Honigen im Herstellungsprozess zeigt, dass PA in verarbeiteten Lebensmitteln durchaus vorkommen können. Auch wenn sich in der zugrundeliegenden Studie keine honighaltigen Cerealien, Getränke oder Süßwaren (ausgenommen Bonbons) als PA-positiv erwiesen, zeigen die PA-positiven Beispiele doch, dass dies nicht grundsätzlich auszuschließen ist. Durch ein Auftreten von PA-Belastungen in solchen Lebensmittelgruppen wären PA-Aufnahmen auch in einer breiteren Masse der Konsumenten (als z.B. nur der Honigesser) zu erwarten.

3.5 Filtrationsversuche

In unseren Studien hatten sich sowohl Honige als auch Pollen und honighaltige Lebensmittel zum Teil als stark PA-belastet erwiesen (siehe Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4). Der hohe PA-Gehalt von nativen Pollen von PA-Pflanzen könnte ursächlich für die PA-Gehalte sein, die in Honig gefunden wurden und somit auch eine Ursache der Down-stream Kontamination in der Lebensmittelverarbeitung darstellen. Dies macht drei Szenarien möglich, (i) entweder der Nektar von PA-Pflanzen enthält per se PA, oder (ii) die für Honig bestimmten PA-Gehalte sind direkt auf die PA-Pollen zurückzuführen, die bei der Aufarbeitung PA freisetzen und anschließend detektiert werden, oder (iii) im Laufe der Zeit gehen die PA der Pollen per Diffusion in den Honig über und tragen zu den gefundenen Werten bei. Variante (ii) böte die Möglichkeit, mit PA-Pollen belasteten Honig per Filtration von den Pollen und damit von den PA zu befreien. Eine Honigfiltration ist nach Anlage 1 der gültigen Honigverordnung eine zulässige Behandlung und könnte damit die Möglichkeit eröffnen, mit PA-Pollen belasteten Honig weiterhin wirtschaftlich zu nutzen.

Zu diesem Zweck erfolgten von uns weitere Studien. Hierbei wurde ein PA-freier Honig, d.h. Rapshonig aus der Bienenstation der Universität Würzburg, mit unterschiedlichen Mengen an *S. vernalis*-Pollen versetzt. Die nativen Pollen wurden nach bereits erfolgreich durchgeführter Methode (siehe Kapitel 3.3.2 und 4.6.1) gewonnen und hatten einen PA-Gehalt, berechnet als Retronecin-Äquivalente, von 1,85 mg/g. Die Aufarbeitung und Analyse des nativen Pollens erfolgte gemäß den Angaben in Kapitel 4.4.1.2 (siehe dazu auch Kapitel 3.3.1). Bei der im Labormaßstab durchzuführenden Filtration sollten die allgemein gängigen Parameter (Filterausschlussgröße, Temperatur, etc.) der industriellen Honigverarbeitung simuliert werden (vgl. hierzu auch Paine *et al.*, 1934; Crane, 1979;

Beckmann, 2008). In Vorversuchen wurden daher unterschiedliche PA-Pflanzen-Pollen unter dem Lichtmikroskop betrachtet um bei der Wahl der Filterausschlussgröße die richtige Porenweite zu verwenden. Abbildung 3-23 gibt die ermittelten Durchmesser der betrachteten PA-Pflanzen-Pollen wieder.

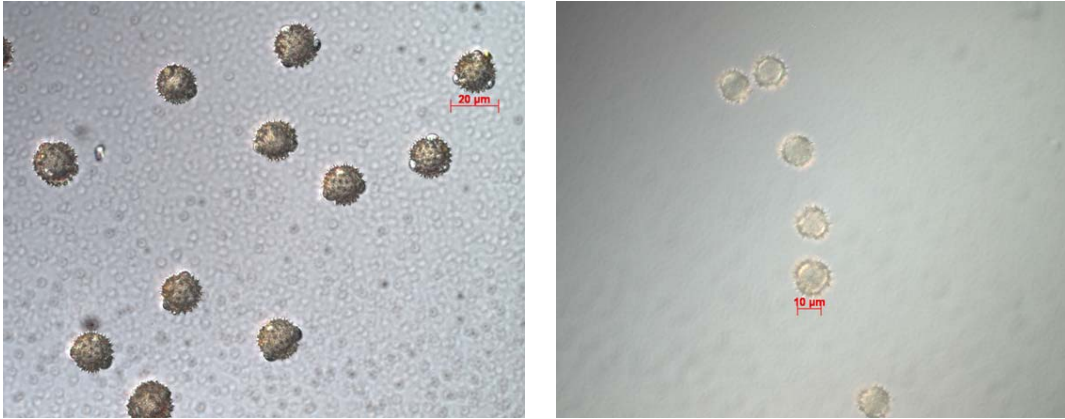


Abb. 3-23 Lichtmikroskop-Aufnahmen von *Senecio vernalis* (links) und *Eupatorium cannabinum*-Pollen (rechts). Ebenfalls angegeben ist der Durchmesser der nativen Pollen.

Die Filtrationsapparatur im Labormaßstab bestand aus einem durch Wasserdurchfluss temperierbaren Messingmantel mit innenliegender 20 ml-Spritze und aufgesetztem 5 µm-Cellulosenitrat-Spritzenfilter (siehe Kapitel 4.7.2). Die Filtrationstemperatur von 80°C wurde durch ein temperierbares Wasserbad mit Umwälzpumpe gewährleistet. Durch die Filterausschlussgröße von 5 µm ließen sich alle zugesetzten *S. vernalis*-Pollen abfiltrieren. Abbildung 3-24 zeigt den Aufbau der Filtrationsapparatur, Details sind Kapitel 4.7.2 zu entnehmen.



Abb. 3-24 Aufbau der Filtrationsapparatur (Details siehe Kapitel 4.7.2)

Zur Simulation von geschleuderten und gepressten Honigen wurden unterschiedliche Mengen an *S. vernalis*-Pollen dem PA-freien Rapshonig zugesetzt. Insgesamt wurden somit drei Versuchshonige (VSH) zur Durchführung der Filtrationsversuche angesetzt (siehe Kapitel 4.1.3.4.3 und 4.7.1). Tabelle 3-11 gibt einen Überblick auf die verwendeten Versuchshonige (VSH).

Tab. 3-11 Angesetzte Versuchshonige und ihre PA-Pollen Zusätze

	Einwaage PA-freier Rapshonig	Einwaage <i>Senecio vernalis</i> Pollen	Konzentration PA-Pollen	Repräsentant für
VSH 1	1000g	3mg	0,0003%	pollenarmen Honig
VSH 2	1000g	30mg	0,003%	geschleuderten Honig
VSH 3	1000g	300mg	0,03%	Presshonig

Nach definierten Standzeiten von sechs und zwölf Wochen bei Raumtemperatur wurden Aliquote der Proben VSH1-VSH3 einer Honigfiltration im Labormaßstab unterzogen. Zum Vergleich wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten, sowie nach einem Tag Standzeit, auch unfiltrierte Aliquote analysiert. Die VSH mit unterschiedlichen PA-Pollen-Dotierungen wurden alle mit der von uns entwickelten Methode für Honige analysiert (gemäß den Angaben in den Kapiteln 4.4.1.1.1 und 4.4.2). Die ermittelten PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, der jeweiligen Proben sind in Abbildung 3-25 dargestellt.

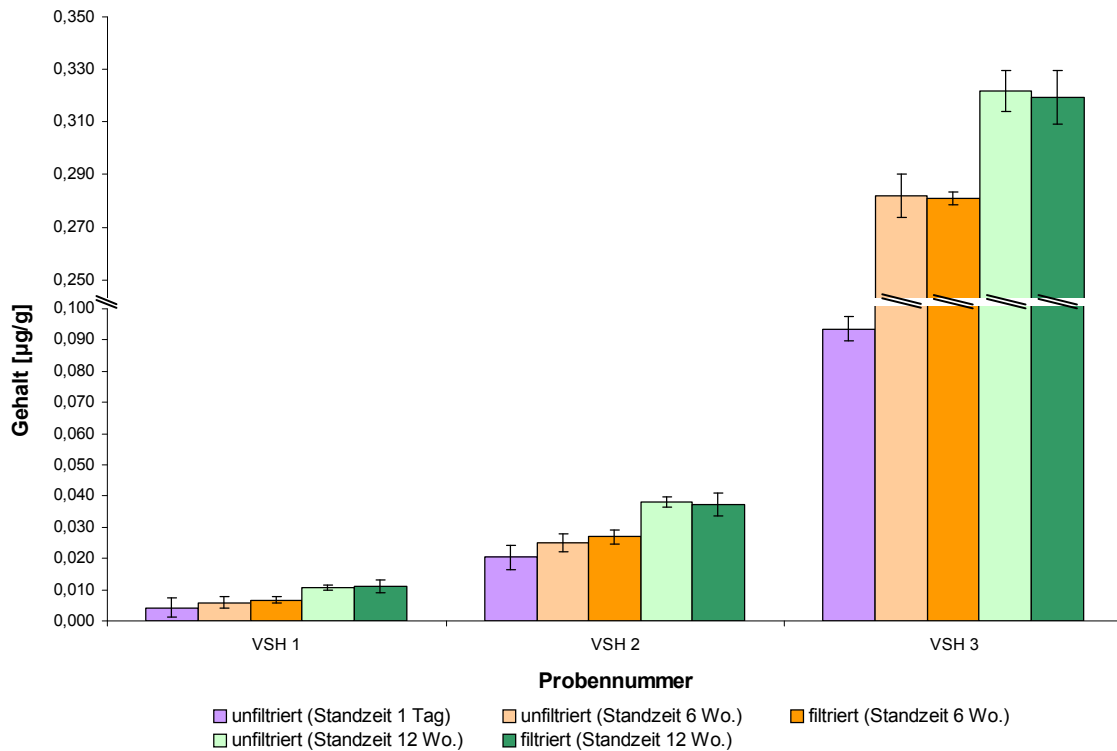


Abb. 3-25 PA-Gehalte der jeweiligen filtrierten und unfiltrierten Versuchshonige (VSH1-3) nach unterschiedlichen Standzeiten (berechnet als Retronecin-Äquivalente). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Dreifachbestimmung.

Die für die Proben VSH1-3 ermittelten PA-Gehalte lagen zwischen 0,04 und 0,322 µg/g in Abhängigkeit zur zugesetzten PA-Pollen-Menge und der unterschiedlichen Standzeit (vgl. Anhang Tabelle 7-18). Bei VSH1 konnten trotz der stark verminderten Zugabe an PA-Pollen von 0,0003% – die natürlicherweise vorkommende Pollenkonzentration liegt bei ca. 0,003% – nach den jeweiligen Standzeiten geringe Menge an PA detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Bestimmung wurden mit Dreifachbestimmungen abgesichert, unterliegen aber dennoch einem gewissen Fehler, da die Gehalte in unmittelbarer Nähe zur bzw. unter der Bestimmungsgrenze von 0,01 ppm liegen. Zur Veranschaulichung der bei den Filtrationsversuchen ablaufenden Tendenzen wurden diese Werte dennoch in der grafischen Darstellung (s. Abbildung 3-25) berücksichtigt.

Die detektierten PA-Gehalte der Proben VSH2 und VSH3 zeigen die unmittelbare Korrelation der Daten mit der zugesetzten absoluten Menge an PA-Pollen. So liegen die Werte von VSH3 zum jeweiligen Zeitpunkt im Mittel ein Zehnfaches über denen der Probe VSH2, analog zur zehnfach höheren Pollenzugabe (Vergleich 3 mg/30 mg/300 mg *S. vernalis*-Pollen Zugabe). Durch die nach den jeweiligen Standzeiten durchgeführte Filtration ließ sich der PA-Anteil im Honig nicht beeinflussen (Vergleich filtriert/unfiltriert). Eine vollständige Entfernung der PA-Pflanzen-Pollen hatte keinen Einfluss auf den PA-

Gehalt. Vielmehr fand ein zeitabhängiger Übergang der PA aus den Pollen in den PA-freien Honig statt (Vergleich 1 Tag/6 Wochen/12 Wochen). Da kein signifikanter Unterschied innerhalb der jeweiligen Paare (filtriert/unfiltriert) beobachtet wurde, kann daraus geschlossen werden, dass die mit der hier beschriebenen Probenbereitung erfassten PA-Gehalte im Honig nur die im Honig gelösten PA widerspiegelt und keine signifikanten Mengen an PA aus den Pollen zusätzlich miterfasst wurden.

Andererseits ist durch die zeit- und mengenabhängige Zunahme des PA-Gehaltes (vgl. Abbildung 3-25) auch belegt, dass PA aus dem Pollen in den Honig übergehen und daher bei einem positiven PA-Pollen-Nachweis auch PA im Honig nachweisbar sein müssen. Eine Gewinnung von Honig durch Pressen der Waben bzw. Nutzung von Brut- und Futterwaben (höhere Anteile an Bienenbrot/Perga) führt bei entsprechendem Eintrag von PA-Pflanzen-Pollen durch das Bienenvolk zu einer Erhöhung des PA-Gehaltes des Honigs.

Die vergleichende Auswertung dieser Experimente zeigte auch, dass eine möglicherweise eingesetzte Honigfiltration nach gewissen Standzeiten – die Diffusion der PA beginnt ja bereits im Bienenstock bei der Honigreifung – bei Risikohonigen, wie z.B. sortenreinen *Echium*-Honigen, nicht geeignet ist, durch die Entfernung der Pollen den PA-Gehalt des Honigs zu reduzieren.

3.6 Betrachtung der Pyrrolizidinalkaloid-Gehalte in Honig in Bezug auf deren botanische Herkunft

Bis heute gibt es keine analytischen Daten zum Vorkommen von PA in Pflanzennektar. Die hier untersuchten Einzelhandelsproben eignen sich aufgrund ihrer Verarbeitung und der dabei häufig durchgeführten Vermischung mit Honigen anderer geographischer bzw. botanischer Herkunft nur bedingt dazu generelle Aussagen zur PA-Herkunft im Endprodukt Honig zu treffen. Zusätzlich kann durch Verarbeitungsschritte wie Filtration und Zentrifugation ein Verlust oder eine Verschiebung von Pollen bzw. Pollenverhältnissen resultieren, so dass im endgültigen Produkt nicht notwendigerweise die Mengen an Pollen enthalten ist, wie er ursprünglich von den Bienen eingetragen wurde. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Studien an speziellen Honigen von *Senecio* spp. und *Echium* spp. können jedoch Rückschlüsse auf die Herkunft der PA in Honig postuliert werden. Wie im Kapitel 3.2.2 dargestellt ist, unterscheiden sich diese sowohl essentiell in Ihren PA-Gehalten als auch in Ihren jeweiligen relativen Pollenhäufigkeiten.

So zeigen *Senecio*-Honige bei einer hohen PA-Belastung eine nur geringe Menge an *Senecio*-Pollen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass vermutlich ein hoher PA-Gehalt des gesammelten Nektars als Ursache für die gefundenen PA-Mengen verantwortlich sein

sollte. Da keine weiteren PA-Pflanzenpollen detektiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass *Senecio*-Nektar hoch mit PA belastet sein muss.

Anders bei *Echium*-Honigen. Hier geht häufig ein im Vergleich zu *Senecio*-Honigen moderater PA-Gehalt mit hohen Mengen an *Echium*-Pollen einher. Anhand unserer durchgeführten Filtrationsversuche (vergleiche Kapitel 3.5) wurde gezeigt, dass eine Diffusion der PA aus dem Pollen in den Honig stattfindet. Daher liegt der Schluss nahe, dass die PA-Belastung des Nektars von *Echium* spp. wesentlich niedriger sein sollte als in *Senecio* spp. und somit ein nicht unerheblicher Anteil der PA in *Echium*-Honig auf die vorhandenen Pollen zurückzuführen sein dürfte. Diese Aussage wird unterstützt durch die Befunde, dass *Echium*-Pollen signifikante PA-Mengen aufweisen (siehe Kapitel 3.3.2 und Boppré *et al.*, 2005; Boppré *et al.*, 2008)

Erste experimentelle Daten weisen zudem auf eine gewisse Toleranz der Honigbienen gegenüber PA hin (Reinhard *et al.*, 2009). Besonders *Echium* spp. stellt offensichtlich eine attraktive Nektar- und Pollentracht für Bienen dar; dies konnte durch eigene Beobachtungen (s. Kapitel 3.2) und Literaturhinweise bestätigt werden (u.a. Sanz *et al.*, 2004). *Senecio* spp. werden möglicherweise bedingt durch ungünstige klimatische und geographische Bedingungen z.B. beim Fehlen alternativer Nektarquellen und/oder Massenvorkommen von PA-Pflanzen, angefliegen, und stellen nur unter diesen Voraussetzungen ein Gefahrenpotential hinsichtlich PA im Honig und Pollenprodukten dar.

In Zusammenfassung mit den oben genannten Beobachtungen scheint eine Prävention und Minimierung des PA-Gehaltes in Honig durch eine gezielte Standortwahl der Bienenvölker, d.h. unter Vermeidung von Standorten mit hohem PA-Pflanzenanteil, möglich. Eine „Verdünnung“ von hoch belasteten Honigen, wie sie in Australien propagiert wird (FSANZ, 2004), ist durch Anwendung des Prinzips der „Nicht-Verdünnung“ zu vermeiden (EFSA, 2007).

Im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes und einer generellen Minimierung von PA in Nahrungsmitteln, sollten Bienenprodukte mit hohen PA-Gehalten analytisch erkannt und entsprechend reguliert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p. a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Acros Organics (Geel, Belgien), Latoxan (Valence, Frankreich) und Guëssing (Filsum) bezogen. Die zur Methodenentwicklung eingesetzten PA Heliotrin (**4**, Latoxan), Monocrotalin (**9**, Sigma-Aldrich), Retrorsin (**30**, Sigma-Aldrich), Senecionin (**7**, Roth), Seneciphyllin (**36**, Roth) und Senkirikin (**26**, Roth) wurden kommerziell bezogen, der PA-Mix aus *Senecio vernalis* nach Kapitel 4.3 gewonnen. Die PA-N-Oxide wurden aus den jeweiligen tertiären PA nach Cymerman Craig und Purushothaman (1970) synthetisiert (s. Kapitel 4.8.1). Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser wurde aus der hauseigenen Millipore™-Aufbereitungsanlage gewonnen (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Reinstgase lieferten die Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt).

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Varian (Palo Alto, CA, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Whatman (Dassel) und Laborbedarf Hartenstein (Würzburg) erworben. Für die Festphasenextraktion wurden Varian HF Bond Elut LRC® SCX-Kartuschen (10 ml, 500 mg Adsorbens) der Firma Varian (Palo Alto, CA, USA) verwendet. Das hierbei verwendete Kationenaustauschmaterial ist kieslegelbasierend und weist als funktionelle Gruppen Benzolsulfonsäurereste auf. ProbengefäÙe sowie Zubehör für die Kapillargaschromatographie wurden von der Firma CTZ (Kriftel) bezogen.

4.1.3 Untersuchungsmaterial

4.1.3.1 Pflanzenmaterial zur Extraktion

Das zur Extraktion von Referenzverbindungen eingesetzte Pflanzenmaterial wurde wie folgt erhalten: *Senecio vernalis* (Frühlings-Greiskraut) wurde in den Jahren 2005-2007 aus einem Wildbestand in der Nähe von Braunschweig geerntet. *Eupatorium cannabinum* (Wasserdost) wurde in den Jahren 2004-2006 in der Umgebung von Würzburg gesammelt.

4.1.3.2 Pflanzenmaterial zur Gewinnung von nativem Pollen

Das zur Gewinnung von nativem Pollen eingesetzte Pflanzenmaterial wurde im Falle von *Senecio vernalis*, *Senecio jacobaea* und *Eupatorium cannabinum* aus heimischen Wildbeständen (Würzburg, Braunschweig) bezogen. *Crotalaria sagittalis*, *Crotalaria juncea*, *Echium vulgare* und *Phalaenopsis hybrid* wurden im Gewächshaus des Arzneipflanzengartens der Technischen Universität Braunschweig aus Samen gezogen.

4.1.3.3 Handelsproben

4.1.3.3.1 Honige

Die kommerziellen Blütenhonige (n=216) wurden aus lokalen Supermärkten, von Wochenmärkten, aus anderen europäischen Ländern (Italien, Frankreich, Spanien, Griechenland) sowie über das Internet bezogen. Bei allen Proben handelt es sich ausschließlich um Blütenhonige, es wurden keine Wald- oder Tannenhonige analysiert.

4.1.3.3.2 Pollen

Die als Nahrungsergänzungsmittel erhältlichen Pollenprodukte/Pollengranulate (n=55) wurden ebenfalls aus lokalen Supermärkten, Wochenmärkten, aus anderen europäischen Ländern (Italien, Frankreich) sowie über das Internet bezogen.

4.1.3.3.3 Honighaltige Lebensmittel

Als Untersuchungsmaterial zur Überprüfung der down-stream Kontamination wurden 60 verschiedene honighaltige Lebensmittel ausgewählt und jeweils mehrere Packungen einer Charge in lokalen Supermärkten und Drogerien sowie Onlineshops erworben. Analysiert wurden Met (n=19), Bonbons (n=10), Fenchelhonige (n=9), Getränke (n=5), Riegel und Cerealien (n=7), Gummibären (n=3) Baby-Breie (n=3), Nahrungsergänzungsmittel (n=3) und Fruchtsoße (n=1).

4.1.3.4 Forschungshonige

Bei den hier aufgeführten Forschungshonigen handelte es sich nicht um Handelsproben, vielmehr stellten diese Honige speziell für die Forschung hergestellte, z.T. sortenreine PA-Pflanzenhonige dar.

4.1.3.4.1 *Echium*-Honige

Die sortenreinen *Echium*-Honige (n=8) wurden von Imkern aus Neuseeland bezogen. Es handelte sich hierbei um Rohware, die noch keiner Mischung mit anderen Honigen bzw. einer Verfeinerung unterzogen waren.

4.1.3.4.2 *Senecio*-Honige

Die *Senecio*-Honige (n=27) wurden von einem Imker aus den Niederlanden bereitgestellt. Diese wurden durch gezielte Positionierung der Bienenvölker in der Nähe von starken *Senecio jacobaea* Vorkommen gewonnen.

4.1.3.4.3 *Filtrationshonige*

Die zum Einsatz der Filtrationsversuche verwendeten Honige (n=3) wurden nach Kapitel 4.7.1 hergestellt.

4.1.3.5 native Pollen

Die nativen Pollen aus *Senecio vernalis*, *Senecio jacobaea*, *Eupatorium cannabinum*, *Crotalaria sagittalis*, *Crotalaria juncea*, *Echium vulgare* und *Phalaenopsis hybrid* wurden nach Kapitel 4.6.1 gewonnen.

4.2 Geräte

4.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

HRGC System 1

HRGC 1	HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	HP 7613 GC/SFC Injektor
Trennsäule	J&W DB-1 (30 m x 0.25 mm, d _f = 0.25 µm)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0
Make-up Gas	30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergase	30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min gereinigte Luft
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 300°C, 10 min isotherm
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 310°C

HRGC System 2

HRGC 2	HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Trennsäule	J&W DB-1 (15 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0
Make-up Gas	30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergase	30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min gereinigte Luft
Temperaturprogramm	100°C, 3 min isotherm, 6°C/min, 300°C, 3 min isotherm
Detektorkopplung	Y-Splitter aus „fused silica“, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$
Detektor 1	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 310°C
Detektor 2	Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD), Temperatur 310°C

Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation® (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

4.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)*HRGC-MS System 1*

HRGC 3	Fisons Instruments GC 8060 (Thermo Electron, Dreieich)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Fisons Instruments AS 800
Trennsäule	Säule 1: J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$) Säule 2: J&W DB-5MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 300°C, 10 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$
MS 1	Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplifier	350 V
Massenbereich	38-450 u

Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 2

HRGC 3	Fisons Instruments GC 8060 (Thermo Electron, Dreieich)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Fisons Instruments AS 800
Trennsäule	J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 180°C, 22 C/min, 300°C, 5 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

MS 1	Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplifier	350 V
Massenbereich	SIM m/z 93, 183 und 299

Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 3

HRGC 3	Fisons Instruments GC 8060 (Thermo Electron, Dreieich)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Fisons Instruments AS 800
Trennsäule	J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 180°C, 22°C/min, 300°C, 5 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

MS 1	Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplifier	350 V
Massenbereich	SIM m/z 93, 95, 183, 185, 299 und 301

Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 4

HRGC 4	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule	Säule 1: J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$) Säule 2: J&W DB-5MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trärgas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 300°C, 10 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

MS 2	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplifier	1800 V
Massenbereich	38-450 u

Die Datenaufnahme erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation® (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA), nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 5

HRGC 4	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule	J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trärgas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 180°C, 22°C/min, 300°C, 5 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

MS 2	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	1*10 ⁻⁵ mbar
Multiplier	1800 V
Massenbereich	SIM <i>m/z</i> 93, 183 und 299

Die Datenaufnahme erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation® (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA), nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 6

HRGC 4	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule	J&W DB-1MS (30 m x 0.25 mm, d _f = 0.25 µm)
Trägergas	2.0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	60°C, 5°C/min, 180°C, 22°C/min, 300°C, 5 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, d _f = 0.25 µm

MS 2	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck	1*10 ⁻⁵ mbar
Multiplier	1800 V
Massenbereich	SIM <i>m/z</i> 93, 95, 183, 185, 299 und 301

Die Datenaufnahme erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation® (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA), nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mittels Xcalibur™ Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HRGC-MS System 7

HRGC 4	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 280°C
Autosampler	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule	Phenomenex ZB-1 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trärgas	1.6 ml/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	100°C, 3 min isotherm, 6°C/min, 300°C, 3 min isotherm
Kopplung	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 280°C
Transferkapillare	unbelegt und deaktiviert, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

MS 2	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 220°C, Transferline 280°C
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplifier	1800 V
Massenbereich	39-450u

Die Datenaufnahme erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA), nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mittels Xcalibur[™] Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

4.2.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-System 1

Gerät	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer (Rheinstetten)
Lösungsmittel	CDCl ₃ (CDCl ₃ , 99.9% D), MeOD- <i>d</i> ₄ (MeOD- <i>d</i> ₄ , 99.9% D), ND ₃ (Ammonia- <i>d</i> ₃ , 99% D)

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mittels Mestre-C 4.4.1.0 Software (Santiago de Compostea, Spanien).

NMR-System 2

Gerät	Bruker Avance II 600 MHz Spektrometer (Rheinstetten)
Lösungsmittel	CDCl ₃ (CDCl ₃ , 99.9% D), MeOD- <i>d</i> ₄ (MeOD- <i>d</i> ₄ , 99.9% D), ND ₃ (Ammonia- <i>d</i> ₃ , 99% D)

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit Bruker 1D WINNMR Software (Rheinstetten).

Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Als interner Standard dienten bei den ^1H -NMR-Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm, $\delta_{\text{MeOD-}d_4} = 3,35$ ppm) und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die entsprechenden ^{13}C -Resonanzsignale der Lösungsmittel ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 76,5$ ppm, $\delta_{\text{MeOD-}d_4} = 49$ ppm).

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, brs = breites Singulett, d = Duplett, dd = Duplett vom Duplett, ddd = Duplett vom Duplett vom Duplett, ddq = Duplett vom Duplett vom Quartett, dt = Duplett vom Triplet, t = Triplet, q = Quartett, sext = Sextett, m = Multiplett und br = breit. Die Kopplungskonstante J ist in Hertz (Hz) angegeben. Bei der Schreibweise ^nJ gibt n die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen an.

4.2.4 Durchlichtmikroskopie

Mikroskop 1

Gerät	Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Jena)
Vergrößerungen	200x und 400x
Software	AxioVision

Mikroskop 2

Gerät	Olympus AX70 (Olympus, Hamburg)
Vergrößerungen	100x, 200x und 400x

4.2.5 Sonstige Geräte

Lyophilisator	Christ Alpha1-4; 0,063 mbar (Christ, Osterode)
Magnetrührer	IKA [®] RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen) mit IKA [®] ETS-D4 fuzzy (IKA Labortechnik, Staufen) Kontakthermometer Variomag [®] Poly 15 (Variomag [®] , Daytona Beach, FL, USA)
Mixer	Mixi [®] 700
pH-Meter	WTW pH 330 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Weilheim)
Rotationsverdampfer	Büchi Rotavapor mit Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz)

Schüttler	Schüttelinkubator GFL 3031 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Trockenschrank	Memmert, Modell 400 (Memmert, Schwabach)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex TK 52, (Bandelin Electronics, Berlin)
Vakuumkammer	Supelco Visiprep™ (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Waagen	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler Waagen GmbH, Gießen) Mettler P 1200N (Mettler Waagen GmbH, Gießen) Sartorius BP 210 S Analysenwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Zentrifugen	Universal 16 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) EBA12 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

4.3 Pyrrolizidinalkaloid-Extrakt aus *Senecio vernalis*

Frisch blühende Blütenköpfe von *Senecio vernalis* wurden aus Wildbeständen geerntet, getrocknet, lyophilisiert und anschließend in einem Mixer zerkleinert. Insgesamt wurden ca. 2,5 kg des Pulvers in Portionen à 350 g extrahiert. Dazu wurde jede Charge in einem Soxhlet mit Petrolether zur Entfernung der lipophilen Bestandteile extrahiert (20 Extraktionszyklen pro Ansatz). Abschließend wurden die tertiären PA und ihre *N*-Oxide mit Methanol, ebenfalls in einem Soxhlet, extrahiert. Der methanolische Rohextrakt wurde zur Trockne eingeeengt und in 1N HCl gelöst. Die salzsaure Lösung wurde zur Reduktion der PA-*N*-Oxide über Nacht mit Zn-Staub (Korngröße < 60 µm) versetzt. Mit Hilfe von NH₄OH_{conc.} wurde die Lösung auf pH=12 gebracht und die tertiären PA mehrfach mit CH₂Cl₂ im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden eingeeengt. Nach wiederholter Umkristallisation mit Aceton bei 4°C ergaben sich 700 mg einer Mischung aus zehn PA mit folgender Zusammensetzung (vgl. Abbildung 3-1): PA unbekannt (0,5%), Senecivernin (8,4%; **44**), Senecionin (43,6%; **7**), Seneciphyllin (22,0%; **36**), Spartioidin (0,6%; **45**), Integerrimin (9,1%; **31**), Senkirkin (9,1%; **26**), Retrorsin (6,3%; **30**), PA unbekannt (0,1%) und PA unbekannt (0,4%). Die Reinheit und Zusammensetzung dieser Mischung wurde mittels HRGC-FID (s. Kapitel 4.2.1, HRGC System 1) HRGC-NPD (s. Kapitel 4.2.1, HRGC System 2) und HRGC-MS (s. Kapitel 4.2.2, HRGC-MS System 1) überprüft. Der hierbei erhaltene PA-Extrakt wurde zur Methoden-etablierung (s. Kapitel 3.1.1) und zur Synthese der PA-*N*-Oxide (s. Kapitel 4.8.1) eingesetzt.

4.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.4.1 Probenvorbereitung

4.4.1.1 Honige

4.4.1.1.1 *Standardisierung mit Heliotrin*

Die Honige wurden vor der Einwaage für 30 min im Wasserbad auf 30°C temperiert. Nach gutem Durchmischen wurden für die Honigaufarbeitung jeweils 20 g genau abgewogen, 50 µl (2 µg Heliotrin (**32**) absolut) der Heliotrin-Standardlösung (0,40 mg/10 ml Methanol) zugegeben und in 30 ml 0,05 M H₂SO₄ durch Schütteln vollständig gelöst. Anschließend wurden 0,5 g Zinkstaub (Korngröße < 60 µm) zugegeben und der Ansatz 3 h auf dem Magnetrührer gerührt. Es wurde zentrifugiert (6 min, 4000 rpm), filtriert und der Überstand im Wasserbad bei 40°C warm gehalten. Die wässrige, saure Lösung wurde nach Kapitel 4.4.2 aufgearbeitet und vermessen.

Um auszuschließen, dass sich Heliotridin-PA bereits vor der Standardzugabe in der Probe befindet, wurde stets ein Ansatz ohne Zusatz von Heliotrin-Lösung, die sog. A-Probe, aufgearbeitet und vermessen. Die Ansätze mit Standard-Zusatz wurden folglich B-Proben genannt.

4.4.1.1.2 *Standardisierung mit di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin*

Im Falle der SIVA mit di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) entfiel die Einteilung in A- und B-Probe und die jeweilige Probe wurde mit 5 µg di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) (50 µl der di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin-Standardlösung mit 1 mg/10 ml Methanol) standardisiert und analog den Kapiteln 4.4.1.1.1 und 4.4.2 zur Analyse eingesetzt. Eine Modifikation erfolgte ebenfalls im Messsystem, so wurde die Proben der SIVA mit dem HRGC-MS System 6 (Geräteparameter s. Kapitel 4.2.2) ohne Injektionssplit-Verhältnis vermessen.

4.4.1.2 Pollen

Die im Handel erhältlichen Pollenprodukte (getrocknete Pollenhöschen oder in Tablettenform gepresste Pollen) wurden mit einem Mixer zerkleinert und homogenisiert. Um das Vorhandensein von Heliotridin-PA auszuschließen wurden die Pollenproben, analog den Honigen einer doppelten Aufarbeitung (A- und B-Probe) unterzogen. Es wurden 2 g, der vorher zerkleinerten und homogenisierten Probe, in einen Mörser (70 mm Ø) eingewogen und zur B-Probe 100 µl (4,0 µg Heliotrin (**32**) absolut) Heliotrin-Standardlösung (0,40 mg/10 ml MeOH) zugegeben. Nach Zugabe von 5 ml 0,05 M H₂SO₄ und 15 minütiger

Quellzeit, wurde die Probe mit 1 TL Seesand versetzt und zu einer homogenen Suspension zermörsert. Das Gemisch wurde unter Nachspülen mit weiteren 45 ml 0,05 M H_2SO_4 in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Weithals überführt (Gesamtvolumen: 50 ml 0,05 M H_2SO_4) und für 24 h im Schüttler (s. Kapitel 4.2.5) bei 20°C und 80 rpm extrahiert. Nach 24 h wurde die Probe zentrifugiert (5 min, 4000 rpm) und anschließend mittels einer Nutsche und Filter im Vakuum in ein 50 ml Zentrifugentube abgesaugt. Der Filtrückstand wurde mit Filterpapier zurück in den Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend erneut mit 50 ml 0,05 M H_2SO_4 versetzt, suspendiert und weitere 24 h im Schüttler (Gerät s. Kapitel 4.2.5) bei 20°C und 80 rpm extrahiert. Nach weiteren 24 h der Extraktion wurde nach Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, Gerät s. Kapitel 4.2.5) wiederum in ein 50 ml Zentrifugentube abgesaugt. Die wässrigen, leicht sauren Fraktionen der jeweilige Probe wurden vereinigt und mit 1,0 g Zinkstaub (Korngröße < 60 μm) versetzt und für 3 h zur Reduktion der N-Oxide auf dem Magnetrührer gerührt. Daraufhin wurde zentrifugiert (4 min, 4000 rpm) und filtriert. Der wässrige, saure Extrakt wurde nach den Angaben in Kapitel 4.4.2 aufgearbeitet und vermessen.

4.4.1.3 Honighaltige Lebensmittel

4.4.1.3.1 Honig-Met

Die Met-Proben wurden ebenfalls einer A- und B-Probenaufarbeitung unterzogen, zur Überprüfung des Vorkommens von Heliotridin-PA. Es wurden 45 g Probe genau eingewogen, mit 2 ml einer 0,5 M Schwefelsäure angesäuert, die B-Probe mit 2 μg Heliotrin (**32**) standardisiert (50 μl der Heliotrin-Standardlösung mit 0,40 mg/10 ml MeOH) und nach Zugabe von 0,5 g Zinkstaub (Korngröße < 60 μm) wurde der Ansatz für 3 h auf dem Magnetrührer gerührt. Nach Zentrifugation (6 min, 4000 rpm, Gerät s. Kapitel 4.2.5) und anschließender Filtration wurde das wässrige, saure Filtrat nach den Angaben in Kapitel 4.4.2 aufgearbeitet und vermessen.

4.4.1.3.2 Honigbonbons und Gummibären

Die Probeneinwaagen richteten sich nach dem jeweils angegebenen Honiggehalt der Bonbons bzw. Gummibärchen, so dass pro Probenaufarbeitung ein Äquivalent von 20 g Honig vorlag. Auch hier wurde jede Probe, zur Kontrolle auf Heliotridin-PA, einer doppelten Aufarbeitung (A- und B-Probe) unterzogen. Die B-Probe wurde mit 2 μg Heliotrin (**32**) (50 μl der Heliotrin-Standardlösung mit 0,40 mg/10 ml MeOH) standardisiert. Die Probe wurde unter Rühren in 750 ml Wasser gelöst und mit 4 ml 0,5 M H_2SO_4 angesäuert. Anschließend erfolgte für drei Stunden die Reduktion mit 2 g Zinkstaub (Korngröße < 60

μm). Die Lösung wurde zentrifugiert (6 min, 4000 rpm, Gerät s. Kapitel 4.2.5) und filtriert und mit 5 ml 10%iger NaOH alkalisiert (pH~11) sowie anschließend mittels LLE 48 h extrahiert. Das hierbei verwendete Lösemittelgemisch waren 210 ml Pentan: CH_2Cl_2 im Verhältnis 2:1 (v/v). Der organische Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in 50 ml 0,05 M H_2SO_4 aufgenommen (Ultraschallbad, s. Kapitel 4.2.5) und anschließend analog Kapitel 4.4.2 aufgearbeitet.

4.4.1.3.3 *Getränke*

Die honighaltigen Getränke wurden ebenfalls der Unterteilung in A- und B-Probe unterzogen. Es wurden pro Probe 1000 ml eingesetzt. Die Proben wurden mit 8 ml 4 N H_2SO_4 versetzt, die jeweilige B-Probe mit 2 μg Heliotrin (**32**) (50 μl der Heliotrin-Standardlösung mit 0,40 mg/10 ml MeOH) standardisiert. Nach Zugabe von 2 g Zinkstaub (Korngröße < 60 μm) wurde 3 h unter Rühren reduziert. Nach Zentrifugation (6 min, 4000 rpm) und Filtration wurde das Filtrat mit 8 ml 4N NaOH alkalisiert (pH~11). Mittels LLE (210 ml Pentan: CH_2Cl_2 , 2/1, v/v) wurde die wässrige Lösung 48 h extrahiert. Der erhaltene organische Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und bis zur Trockene unter Stickstoffstrom eingeblasen. Der Rückstand wurde mit 50 ml 0,05 M H_2SO_4 aufgenommen (Ultraschallbad, s. Kapitel 4.2.5) und analog Kapitel 4.4.2 appliziert.

4.4.1.3.4 *Müsliriegel, Cerealien, Fruchtsoße und Baby-Brei-Pulver*

Müsliriegel und Cerealien wurden in einem Mixer zerkleinert und homogenisiert, das Baby-Brei-Pulver sowie die Fruchtsoße durch Schütteln homogenisiert. Zur Überprüfung auf Heliotridin-PA wurden auch hier A- und B-Probe angesetzt. Die Einwaage richtete sich nach dem jeweils angegebenen Honiggehalt, so dass pro Probenaufarbeitung ein Äquivalent von 20 g Honig vorlag. Die Probe wurde in 500-1000 ml Wasser gelöst, die B-Probe mit 2 μg Heliotrin (**32**) (50 μl der Heliotrin-Standardlösung mit 0,40 mg/10 ml MeOH) standardisiert und mit 5 ml 0,5 M H_2SO_4 versetzt. Nach Zugabe von 2 g Zinkstaub (Korngröße < 60 μm) erfolgte unter Rühren die dreistündige Reduktion. Nach Klärung, falls notwendig mit Carrez I + II wurden die Proben zentrifugiert (6 min, 4000 rpm) und abschließend filtriert. Das Filtrat wurde mit 10%iger NaOH alkalisiert (pH~11) und mittels LLE (Lösemittel 210 ml Pentan: CH_2Cl_2 , 2:1, v/v) 48 h extrahiert. Nach Trocknung des organischen Extrakts über Na_2SO_4 wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand unter Stickstoffstrom zur Trockne eingeblasen. Der trockene Rückstand wurde mit 50 ml 0,05 M H_2SO_4 (Ultraschallbad, s. Kapitel 4.2.5)

aufgenommen. Die so erhaltene wässrige Lösung wurde nach den Angaben in Kapitel 4.4.2 aufgearbeitet.

4.4.1.3.5 Nahrungsergänzungsmittel

Die Aufbaukur auf Honigbasis wurde wie Honig (s. Kapitel 4.4.1.1.1 und 4.4.2) aufgearbeitet. Die Trinkkapseln wurden geöffnet sowie die Nahrungsergänzungsmittel in Tabelettenform in möglichst wenig Wasser gelöst und wie Met (s. Kapitel 4.4.1.3.1 und 4.4.2) behandelt.

4.4.1.3.6 Fenchelhonige

Die Probenaufarbeitung erfolgte in A- und B-Probe. Es wurden je 50 g Fenchelhonig eingesetzt, die zu Beginn aufgrund ihrer Viskosität zu gleichen Teilen, d.h. je 25 g, auf zwei Portionen/Fraktionen aufgeteilt wurden. Die so erhaltenen zwei Teilansätze der B-Probe wurden mit je 1 µg Heliotrin (**32**) (25 µl der Heliotrin-Standardlösung mit 0,40 mg/10 ml MeOH) versetzt und analog den Honigen gemäß den Kapiteln 4.4.1.1.1 und 4.4.2 aufgearbeitet. Eine Änderung der Methodik (s. Kapitel 4.4.2) erfolgte dahingehend, dass die Eluate zweier Teilansätze, welche aus einer Probe hervorgegangen sind, vereinigt und gemeinsam eingeeengt wurden.

4.4.2 Probenaufarbeitung

Die HF Bond Elut LRC SCX-SPE-Kartusche (Varian, Palo Alto, CA, USA) wurde mit 6 ml Methanol und 6 ml 0,05 M H₂SO₄ konditioniert und die warme, leicht saure Lösung bei einem Fluss von 0,5 - 1 ml/min vollständig auf die Kartusche appliziert. Es wurde mit 3 ml H₂O_{dest} und 3 ml Methanol gewaschen und anschließend mit 6 ml ammoniakalischem Methanol (30 ml NH₄OH_{conc.}/500 ml MeOH) eluiert. Das Eluat wurde nach und nach in ein 2 ml Probengläschen („GC-Gläschen“) überführt und im Stickstoffstrom bei 40°C zur Trockne abgedampft.

Zur Reduktion der PA wurden 100 µl (~3,8 mg LiAlH₄) einer 1 M Lösung an LiAlH₄ in THF zum trockenen Rückstand gegeben, geschüttelt und der Ansatz für 3 h bei 4°C (Kühlschrank) zur Reaktion gebracht. Zur Extraktion der Necinbasen wurden 500 µl Dichlormethan und 5 Tropfen einer 10%-igen NaOH vorsichtig hinzu gegeben und mittels Säulenchromatographie separiert. Als Säule diente hierbei eine mit Watte verschlossene 15 cm Pasteurpipette. Das Füllmaterial bestand aus einer Schicht (0,7 cm) Natriumsulfat wfr. einer darüber befindlichen Schicht (0,7 cm) Celite® 545. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend noch zweimal mit je 500 µl Dichlormethan nachgespült, die Lösung

ebenfalls auf die Minisäule gegeben und das organische Eluat im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur zur Trockne abgedampft.

Der trockene Rückstand wurde mit 50 μl *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) versetzt und luftdicht verschlossen. Die Reaktionsmischung wurde bei 40°C für 30 min silyliert. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde die Lösung in ein GC-Autosampler-Vial mit μ -Einsatz (microinsert) umgefüllt und mittels HRGC-MS (Geräteparameter s. Kapitel 4.2.2; HRGC-MS System 2 oder HRGC-MS System 5) ohne Injektionssplit-Verhältnis analysiert.

4.4.3 Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mit Hilfe authentischer Referenzsubstanzen und Vergleich linearer Retentionszeiten (RI) die mit Hilfe einer Mischung aus *n*-Alkanen (C_{10} - C_{28}) berechnet wurden, sowie im Falle von HRGC-MS-Chromatogrammen zusätzlich durch Vergleich der jeweiligen Massenspektren. Im SIM-Modus wurden zusätzlich die Verhältnisse der relativen Intensitäten der jeweiligen *m/z*-Ionen zueinander, im Vergleich zu Referenzspektren im SIM-Modus, zur Identifizierung herangezogen.

4.4.3.1 Standardisierung mit Heliotrin

Durch die Unterscheidung in A- und B-Probe lagen im Falle einer Standardisierung mit Heliotrin (**32**) pro Probe zwei Chromatogramme vor. In Folge der Probenaufarbeitung und Derivatisierung wurden Retronecin-PA in di-TMS-Retronecin (**46**) und der Standard in di-TMS-Heliotridin (**47**) überführt. Die beiden Diastereomere sind chromatographisch auch auf achiralen stationären GC-Phasen trennbar. War in der A-Probe kein di-TMS-Heliotridin (**47**) jedoch aber di-TMS-Retronecin (**46**) zu detektieren, so konnte der PA-Gehalt anhand der B-Probe bestimmt werden. Waren in der A-Probe weder di-TMS-Retronecin (**46**) noch di-TMS-Heliotridin (**47**) zu detektieren, wurde, im Fall des Vorhandenseins von di-TMS-Heliotridin (**47**) (Aufarbeitungskontrolle) in der B-Probe, die Probe als PA-negativ definiert. Die relative, standardkontrollierte Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche von di-TMS-Heliotridin (**47**) in Bezug auf die Peakfläche von di-TMS-Retronecin (**46**) ohne Berücksichtigung von Extraktions- und Response Faktoren ($F=1,0$). Es wurden die gesamten Peakflächen der SIM-Modus Chromatogramme (*m/z* 93, 183, 299 [M^+]) berücksichtigt. Die ermittelten Gehalte wurden in Retronecin-Äquivalente berechnet.

4.4.3.2 Standardisierung mit di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin

Durch den Einsatz des stabil-isotopenmarkierten Standards di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) konnte auf eine Unterscheidung in A- und B-Probe verzichtet werden. Die relative, standardkontrollierte Quantifizierung erfolgte über die Peakflächen der selektiven Ionen mit m/z 183 und m/z 185 des „Mischpeaks“ aus di-TMS-Retronecin (**46**) und di-TMS-[9,9-²H₂]-Retronecin (**51**) unter Berücksichtigung des relativen natürlichen Isotopenanteils von m/z 185 (4,61% nach Isoform V1.02, FairCom[®] Corp., Columbia, MO, USA) nach folgendem Formelschema:

$$c(\text{Retronecin}) = \frac{\text{Area}(183)}{(\text{Area}(185)_{\text{gegeben}} - \text{Area}(185)_{\text{natürlich}})} \cdot \left(c(\text{Standard}) \cdot \frac{\text{MW}(\text{Retronecin})}{\text{MW}(\text{Standard})} \right)$$

mit:

$c(\text{Retronecin})$	Gehalt Retronecin in $\mu\text{g/g}$
$\text{Area}(183)$	Peakfläche des m/z 183 im SIM-Modus
$\text{Area}(185)_{\text{gegeben}}$	Peakfläche des m/z 185 im SIM-Modus
$\text{Area}(185)_{\text{natürlich}}$	Peakfläche des natürlich vorkommenden m/z 185, berechnet aus: $\text{Area}(185)_{\text{natürlich}} = \text{Area}(183) \times 0,0461$ 0,0461 repräsentiert die relative natürliche Häufigkeit des m/z 185 in einem Molekül der Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NOSi}$
$c(\text{Standard})$	Gehalt an di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin in $\mu\text{g/g}$
$\text{MW}(\text{Retronecin})$	Molekulargewicht Retronecin (155,19 g/mol)
$\text{MW}(\text{Standard})$	Molekulargewicht di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin (297,17 g/mol)

Es wurden keine Extraktions- und Response-Faktoren ($F=1,0$) berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte als Retronecin-Äquivalente.

4.5 Mikroskopische Pollenanalyse

Die mikroskopische Pollenanalyse erfolgte mit einem Olympus AX70 Mikroskop (Olympus, Hamburg) (s. Kapitel 4.2.4). Arbeitsvorschrift war dabei die DIN 10760 „Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit“. Besonderes Augenmerk wurde hierbei v.a. auf Pollen von PA-produzierende Pflanzen der Familien Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Heliotropium*, *Symphytum*) und Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) gelegt. Die Auswertung und Identifizierung erfolgte anhand der „Celler Melissopalynologischen Sammlung“ (von der Ohe, 2002). Es wurden jeweils 500 Pollen ausgezählt, die sowohl zur Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit als auch, soweit möglich, zur Bestimmung der geographischen Herkunft herangezogen

wurden. Letztere erfolgte auch unter Miteinbeziehung unterrepräsentierter Einzelpollen, soweit vorhanden.

4.6 native Pollen

4.6.1 Gewinnung von nativen Pollen

Die frisch blühenden Blütenstände von *Senecio vernalis*, *Senecio jacobaea*, *Eupatorium cannabinum*, *Echium vulgare*, *Crotalaria sagittalis*, *Crotalaria juncea* wurden mit und ohne Wurzeln geerntet und anschließend 5 Tage für die Zeit der Blüte in Blumenvasen auf, mit Papier bedeckten, Fensterbänken gehalten. Zum Bezug des Pflanzenmaterials siehe auch Kapitel 4.1.3.2. Die Gewinnung der nativen Pollen erfolgte durch tägliches Abklopfen der Blütenstände. Pollen, die so gewonnen wurden, wurden sortenrein zusammengeführt, luftgetrocknet und dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Die Pollinien von *Phalaenopsis hybrid* wurden durch Sezieren von im Gewächshaus aufgezogenen *Phalaenopsis* gewonnen und unmittelbar für die PA-Extraktion eingesetzt.

Zusätzlich zu den Pollen wurden 25-30 zufällig ausgewählte junge Blütenköpfe zu jedem Zeitpunkt der Pollensammlung, mit Ausnahme der *Phalaenopsis*, hier waren es nur fünf Blüten, gesammelt und gepoolt, nachdem die Pollensammlung abgeschlossen war.

4.6.2 Probenaufarbeitung

Vor der PA-Extraktion wurden die Pollenproben durch dreimaliges Waschen mit Cyclohexan (insg. 15 ml) gereinigt, um sicherzustellen, dass nur die Pollen und kein anderweitiges Pflanzenmaterial analysiert werden. Die dadurch gewonnenen reinen Pollenfraktionen wurden zusammengeführt, das organische Lösemittel abfiltriert und die Reinheit der Pollen durch Lichtmikroskopie (s. Kapitel 4.2.4; Mikroskop 1) bestätigt. Der vereinigte organische Lösemittelrückstand, der die wächserne Beschichtung der Pollen enthielt, wurde im Falle von *Senecio vernalis* separat vermessen.

Die gereinigten Pollenfraktionen wurden in Anlehnung an eine bereits von Hartmann und Toppel (1987) publizierte Standardmethode für Pflanzenmaterial extrahiert. Hierzu wurden die getrockneten Pollen im Mörser mit 3 g Seesand und 30 ml 1N HCl für die Dauer von fünf Minuten gut verrieben und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Der wässrige, saure Probenextrakt wurde abfiltriert und in zwei Hälften geteilt.

Die eine Hälfte wurde zur Analyse der freien tertiären PA benutzt, hierzu wurde die erste Hälfte mit $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{conc}}$ alkalisiert und auf eine ExtrelutTM-Säule aufgetragen (1,4 ml wässrige Lösung/g ExtrelutTM). Die Elution der PA erfolgte mit 6 ml CH_2Cl_2 /g ExtrelutTM.

Das organische Lösemittel wurde schonend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 ml MeOH gelöst und zur HRGC-FID/NPD- bzw. HRGC-MS-Analyse eingesetzt.

Die andere Hälfte wurde zur Erfassung des Gesamt-PA-Gehaltes einer Reduktion mit Zink-Staub unterzogen, hierzu wurde die zweite Hälfte mit 0,5 g Zinkstaub (Korngröße < 60 µm) versetzt und bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt (500 rpm). Nach Filtration der Lösung und Alkalisierung mit $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{conc.}}$ wurde die Lösung ebenfalls auf eine ExtrelutTM-Säule (1,4 ml wässrige Lösung/g ExtrelutTM) appliziert und die PA anschließend mit 6 ml CH_2Cl_2 /g ExtrelutTM eluiert. Das organische Lösemittel wurde schonend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 ml MeOH gelöst und zur HRGC-FID/NPD- bzw. HRGC-MS-Analyse eingesetzt (Geräteparameter s. Kapitel 4.2.1 und 4.2.2; HRGC-System 2 und HRGC-MS System 7).

4.6.3 Identifikation und Quantifizierung

Die chromatographische Trennung und Identifizierung der einzelnen PA wurde mittels HRGC-MS (siehe Kapitel 4.2.2; HRGC-MS System 7) durchgeführt. Die Identifizierung der Alkaloide erfolgte mit Hilfe authentischer Referenzsubstanzen, soweit vorhanden, und Vergleich ihrer linearen Retentionsindices (RI). Moleküle und Fragmentierung wurden mit einer hauseigenen Referenzdatenbank verglichen. Der RI der jeweiligen Verbindungen wurde durch Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C_{10} – C_{28} durch lineare Interpolation berechnet.

Für die Quantifizierung der einzelnen PA wurden die PA-Extrakte mittels HRGC-FID/NPD analysiert (Gerätedetails s. Kapitel 4.2.1; HRGC System 2). Die relative, standardkontrollierte Quantifizierung erfolgte, ohne Berücksichtigung von Extraktions- und Response-Faktoren ($F=1,0$), über die Peakfläche des FID-Signals mit Heliotrin (**32**) als internem Standard.

4.7 Filtrationsversuche

4.7.1 Versuchshonige

Zur Durchführung der Filtrationsversuche wurden je 1000 g PA-freier Rapshonig mit 3 mg, 30 mg und 300 mg *Senecio vernalis* Pollen (Frühjahr 2007) versetzt. Der Pollen wies dabei einen PA Gehalt von 1,85 mg/g, berechnet als Retronecin-Äquivalente auf (vgl. Kapitel 3.3.1). Hierfür wurden die Honige im Wasserbad auf 35°C temperiert und die jeweilige Menge an Pollen bis zur homogenen Verteilung eingerührt. Zur Analyse wurden analog den Handelsproben je 20 g entnommen. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 6 Wochen und 12 Wochen nach Kontaminationsbeginn. Als Vergleich wurde

für jeden filtrierte Versuchshonig zum jeweiligen Zeitpunkt eine Analyse eines unfiltrierten Versuchshonigs angefertigt. Es lagen folgenden Versuchshonige (VSH), jeweils filtrierte und unfiltriert, zur Analyse vor:

VSH 1 = 1000 g Rapshonig + 3 mg *Senecio vernalis* Pollen

VSH 2 = 1000 g Rapshonig + 30 mg *Senecio vernalis* Pollen

VSH 3 = 1000 g Rapshonig + 300 mg *Senecio vernalis* Pollen

4.7.2 Aufbau der Filtrationsapparatur

Die an industrielle Parameter angepasste Filtrationsapparatur (vgl. hierzu auch Paine *et al.*, 1934; Crane, 1979; Beckmann, 2008) bestand aus einem durch Wasserdurchfluss temperierbaren Messingmantel. An diese wurde ein temperierbares Wasserbad mit Umwälzpumpe angeschlossen, sowie ein Auffangbehälter für das Filtrat positioniert (s. Abbildung 4-1A). In den Messingmantel wurde eine 20 ml Einmalspritze mit zentriertem Luer-Lock-Anschluss und aufgestecktem 5 µm Cellulosenitrat Spritzenfilter (Puradisc™ FP 30/5,0 CN, Whatman, Dassel) eingebaut (s. Abbildungen 4-1B+C). Nach unten hin, wurde die Spritze durch einen Teflondichtring gegen den Messingmantel abgedichtet (s. Abbildung 4-1B). Nach Verschließen der Apparatur, konnte der Wärmemantel mit 80°C temperiertem Wasser vorgewärmt werden (s. Abbildungen 4-1A+D). Die Lösungen der zu filtrierenden Honige wurden von oben in die Apparatur gefüllt und anschließend filtrierte (s. Kapitel 4.7.3). Nach Wechsel des Spritzenfilters und Reinigung war die Apparatur erneut einsatzbereit.





Abb. 4-1 Darstellung der Filtrationsapparatur (A, Übersicht; B, ausgebaute Spritze; C, Detailaufbau; D, Übersicht)

4.7.3 Filtration der Versuchshonige

Die nach Kapitel 4.7.1 hergestellten Versuchshonige wurden analog den Handelsproben abgewogen in 30 ml 0,05M H_2SO_4 gelöst, mit 2 μg Heliotrin (**32**) (50 μl der Heliotrin-Standardlösung, 0,40 mg/10 ml MeOH) versetzt und im Wasserbad auf 40°C temperiert. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 6 Wochen und 12 Wochen nach Kontaminationsbeginn. Die Filtrationsapparatur wurde 10 min mit 80°C warmem Wasser konditioniert. Die Honiglösung wurde von oben in die Apparatur gefüllt und nach kurzer Temperierzeit (2 min) manuell durch den Spritzenfilter (5 μm , Cellulosenitrat, Whatman, Dassel) gedrückt. Nach jeder Honigprobe wurde der Spritzenfilter erneuert und der eingebaute Spritzenkonus fünfmal mit je 20 ml heißem Wasser gespült. Das erhaltene Filtrat wurde als „filtrierter Versuchshonig“ bezeichnet.

4.7.4 Probenaufarbeitung und Analyse

Die filtrierten Versuchshonige wurden mit 0,5 g Zn-Staub (Korngröße < 60 μm) versetzt und anschließend für drei Stunden reduziert. Nach Zentrifugation (6 min, 4000 rpm) und Filtration erfolgte die weitere Aufarbeitung und Analyse nach den Kapiteln 4.4.2 und 4.4.3.1. Als Vergleich wurde für jeden filtrierten Versuchshonig eine Probenaufarbeitung eines unfiltrierten Versuchshonigs angefertigt. Hierfür wurden, analog Kapitel 4.4.1.1.1, je 20g Versuchshonig abgewogen und mit 2 μg Heliotrin (**32**) (50 μl der Heliotrin-Standardlösung, 0,40 mg/10 ml MeOH) standardisiert. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte analog den Kapiteln 4.4.1.1.1, 4.4.2 und 4.4.3.1.

4.8 Synthesen

4.8.1 Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxide aus *Senecio vernalis* Extrakt

4.8.1.1 *N*-Oxidierung der tertiären Pyrrolizidinalkaloide

Die *N*-Oxidierung der PA-Mischung wurde nach der von Cymerman Craig und Purushothaman (1970) beschriebenen Methode zur *N*-Oxidierung von tertiären Aminen durchgeführt. Es wurden 0,10 g des PA-Extraktes aus *S. vernalis* in 4 ml Chloroform gelöst und in einem 100 ml-Dreihalskolben im Eisbad bei 0 - 5°C gerührt. Im äquimolaren Verhältnis wurden 0,05 g *m*-Chlorperoxybenzoesäure in 2 ml Chloroform gelöst und tropfenweise (langsam) zu der Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben und zweimal mit je 1 ml Chloroform nachgespült. Anschließend wurde 3 h bei 0-5°C gerührt, während der letzten 15 Minuten wurde das Eisbad weggenommen und bis zum Erreichen der Raumtemperatur weitergerührt.

4.8.1.2 Aufreinigung mittels Säulenchromatographie

Für die Aufreinigung des Reaktionsgemisches mittels Säulenchromatographie wurden 5 g basisches, aktiviertes Aluminiumoxid 90 – Aktivität I – (0,063-0,200 mm) abgewogen, in ein Chromatographierohr (20 x 1 cm) gegeben und anschließend mit 10 ml Chloroform konditioniert. Die Reaktionslösung wurde aufgegeben und der Dreihalskolben mit ca. 2 ml Chloroform ausgewaschen. Nicht umgesetzte tertiäre PA und Beiprodukte wurden durch Waschen mit 8 ml Chloroform entfernt. Die *N*-Oxide wurden mit 20 ml eines Methanol-Chloroform-Gemisches (1:3; v/v) eluiert und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

4.8.1.3 Umkristallisation

Zur Umkristallisation wurde der Rückstand in ca. 5 ml warmem Aceton gelöst und die *N*-Oxide mit ca. 5 ml eisgekühlten Hexan ausgefällt und zur vollständigen Auskristallisation über Nacht bei 4°C gelagert. Der Überstand wurde abpipettiert und der erhaltene Rückstand im Exsikkator getrocknet. Der Überstand wurde unter dem Stickstoffstrom erneut zur Trockne abgedampft und anschließend noch zweimal umkristallisiert. Als Reaktionsprodukt ergaben sich 57,4 mg *N*-Oxide des PA-Extraktes aus *S. vernalis* (Ausbeute: 54%).

4.8.2 Synthese von di-Butyroyl-[9,9-²H₂]-Retronecin

4.8.2.1 Umsetzung von Monocrotalin zu Retronecin

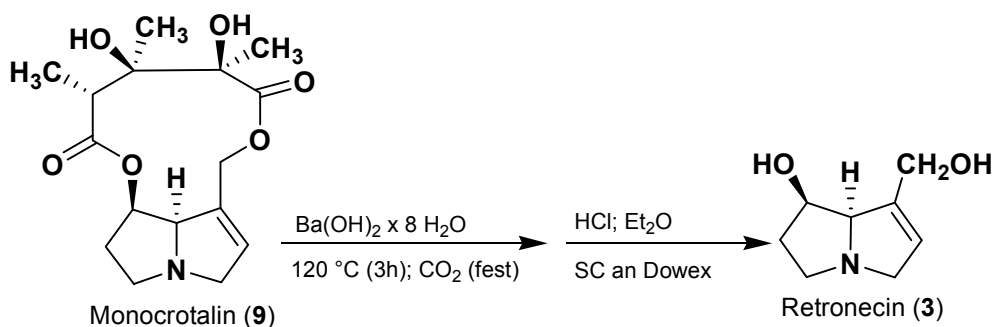


Abb. 4-2 Basische Hydrolyse von Monocrotalin (9) zu Retronecin (3).

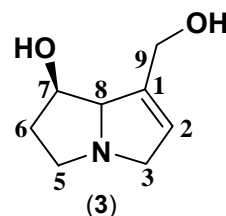
Die basische Hydrolyse des Monocrotalin (9) erfolgte nach Modifikationen in Anlehnung an die von Hoskins und Crout (1977) beschriebene Methode. Die wässrige Lösung (40 ml) aus 1,3 g Monocrotalin (9) (4 mmol) und 2,5 g Ba(OH)₂ x 8 H₂O und 2 ml MeOH wurde am Rückfluss für 3 Stunden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und zur Neutralisation mit Trockeneis (CO₂-fest) versetzt, anschließend zur Abtrennung des BaCO₃ filtriert. Das Filtrat wurde zur Entfernung der Säurereste auf eine Säule mit Dowex[®] 50W Ionenaustauscherharz (Säulenpackung: 2 cm x 20 cm) aufgebracht. Es wurde mit 100 ml dest. Wasser gespült und anschließend 15 Fraktionen à 10 ml 2N NH₄OH gesammelt. Die Eluate wurden eingedampft und anschließend mittels HRGC-FID (Geräteparameter s. Kapitel 4.2.1; HRGC-System 1) überprüft. Die Fraktionen mit 100% Retronecin (3) wurden vereinigt und zur Trockne eingeeengt, die Restlichen, z.T. mit nicht umgesetzten Monocrotalin (9), verworfen. Als Reaktionsendprodukt ergaben sich 0,45 g kristallines Retronecin (3, Ausbeute: 73%). Der Schmelzpunkt von 120°C stimmt mit dem der Literatur überein (Hoskins und Crout, 1977).

Smp.: 120°C

HRGC-EI-MS (70eV) von Retronecin

RI (DB-1MS): 1430; RI (DB-5MS): 1468

m/z (%): 155 (19), 138 (2), 111 (45), 94 (20), 80 (100), 68 (16), 53 (13)



¹H-NMR (600.13 MHz, MeOD): δ (ppm) = 1.89-1.99 (m, 2H, 6-H), 2.69-2.78 (m, 1H, 5-H), 3.18-3.22 (m, 1H, 5-H), 3.39 (ddd, ²J_{3e,3a} = 15.3 Hz, ³J_{3e,5e} = 5.3 Hz, ³J_{3e,2} = 1.9 Hz, 1H, 3-H_e), 3.81 (ddd, ²J_{3a,3e} = 15.3 Hz, ⁵J_{3a,8} = 3.0 Hz, ³J_{3a,2} = 2.3 Hz, 1H, 3-H_a), 4.14 (m, 1H, 8-

H), 4.22 (m, 2H, 9-H), 4.32 (dt, $^3J_{7,6a} = 3.9$ Hz, $^3J_{7,6e} = ^3J_{7,8} = 1.4$ Hz, 1H, 7-H), 4.58 (brs, 1H, OH), 5.71 (d, $^3J_{2,3a} = ^3J_{2,3e} = ^3J_{2,8} = 1.9$ Hz, 1H, 2-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600.13 MHz, MeOD): δ (ppm) = 36.8 (C-6), 54.4 (C-5), 59.7 (C-9), 63.0 (C-3), 71.9 (C-7), 78.9 (C-8), 126.1 (C-2), 139.7 (C-1).

4.8.2.2 Umsetzung von Retronecin zu Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat

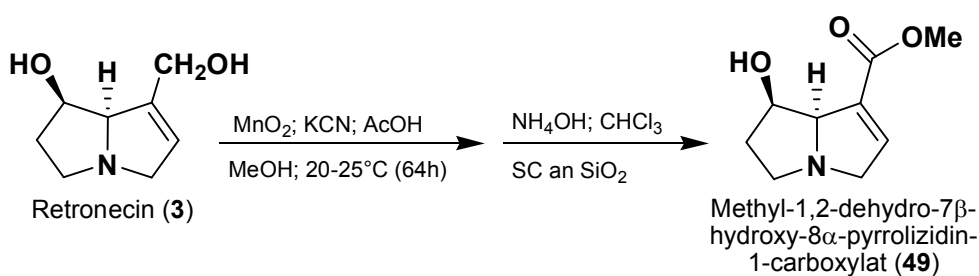
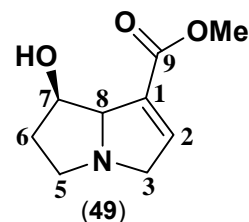


Abb. 4-3 Übersicht des Synthesewegs zur Bildung von Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat (49) aus Retronecin (3)

Die Umsetzung von Retronecin (3) zu Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat (49) erfolgt im Wesentlichen nach der bereits von Piper et al. (1981) beschriebenen Methode. Zu einer Lösung aus aktiviertem MnO_2 (17,4 g), KCN (1,6 g), Eisessig (1 ml) in 50 ml Methanol wurde 400 mg (2,58 mmol) Retronecin (3) (gelöst in 10 ml MeOH) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 64 h bei 20-25 $^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend filtriert. Der Filtrückstand wurde mit 20 ml MeOH gerührt, nach Bildung einer Suspension wurde diese filtriert, der Filterkuchen ausgepresst, und der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt. Das Filtrat sowie die beiden methanolischen Waschlösungen wurden vereinigt und im Vakuum schonend zur Trockne eingengt. Der gelb-orange, ölige Rückstand wurde mit 2N HCl (6,5 ml) versetzt, gerührt und die verbleibenden festen Bestandteile über Celite[®] abfiltriert. Das schwach gelbe Filtrat wurde mit $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{conc}}$ alkalisiert, mit NaCl gesättigt und anschließend fünfmal mit je 10 ml CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Aufreinigung mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (SiO_2 0,063 - 0,200 mm; 30 cm x 2 cm; Elutionslösung: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH 80:10:1 v/v/v), ergaben sich 184 mg (Ausbeute: 39%) der weiß-kristallinen Verbindung Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat (49). Der Schmelzpunkt von 118 $^\circ\text{C}$ stimmte mit denen der Literatur überein (Piper et al., 1981; Hsu und Allen, 1975).

Smp.: 118°C



HRGC-EI-MS (70eV) von Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat

RI (ZB-5MS): 1487

m/z (%): 183 (29), 152 (13), 139 (100), 124 (10), 111 (8), 94 (5), 80 (82), 53 (6)

¹H-NMR (400.14 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.93-2.02 (m, 2H, 6-H), 2.41 (brs, 1H, OH), 2.64-2.77 (m, 1H, 5-H_a), 3.18-3.27 (m, 1H, 5-H_e), 3.54 (ddd, ²J_{3e,3a} = 18.2 Hz, ³J_{3e,5e} = 5.7 Hz, ³J_{3e,2} = 2.2 Hz, 1H, 3-H_e), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (ddd, ²J_{3a,3e} = 18.3 Hz, ⁵J_{3a,8} = 3.4 Hz, ³J_{3a,2} = 2.0 Hz, 1H, 3-H_a), 4.39-4.42 (m, 1H, 8-H), 4.45-4.48 (m, 1H, 7-H), 6.81 (q, ³J_{2,3e} = ³J_{2,3a} = ⁴J_{2,8} = 2.0 Hz, 1H, 2-H).

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 36.1 (C-6), 52.0 (OCH₃), 54.3 (C-5), 62.8 (C-3), 71.4 (C-7), 77.0 (C-8), 132.2 (C-1), 142.0 (C-2), 175.5 (C-9).

4.8.2.3 Reduktion von Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat zu [9,9-²H₂]-Retronecin

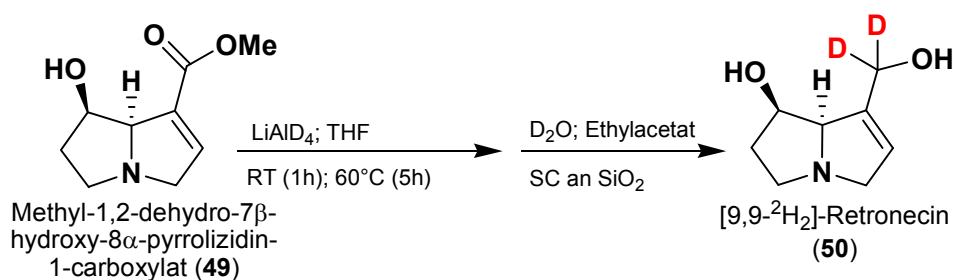
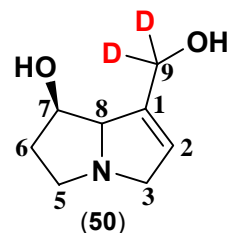


Abb. 4-4 Bildung von [9,9-²H₂]-Retronecin (**50**) aus Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat (**49**)

Die Umsetzung von Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat (**49**) zu [9,9-²H₂]-Retronecin (**50**) wurde in Anlehnung an die von Hsu und Allen (1975) für ³H-Retronecin publizierte Methode durchgeführt. Das Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat (**49**) wurde drei Tage in CD₃OD gelagert. In einem ofentrockenen Kolben wurde eine Lösung aus LiAlD₄ (38 mg) und 15 ml frisch destilliertem THF vorgelegt und anschließend 150 mg (0,82 mmol) Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-

pyrrolizidin-1-carboxylat (**49**) (in 5 ml frisch destilliertem THF) bei -78°C zugetropft. Die Mischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 5 h am Rückfluss erhitzt (60°C). Die Reaktionskontrolle erfolgte per DC (Abreaktion des Methyl-1,2-dehydro-7 β -hydroxy-8 α -pyrrolizidin-1-carboxylat-Spots). Die Reaktionsmischung wurde mit 40 ml D_2O und 40 ml Ethylacetat versetzt. Nach Filtration wurde das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Aufreinigung mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (SiO_2 0,063 - 0,200 mm; 30 cm x 2 cm; Elutionslösung: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH 80:30:2 v/v/v) wurden 76 mg (Ausbeute: 59%) $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin (**50**) erhalten.



HRGC-EI-MS (70eV) von $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin

RI (DB-1MS): 1428; RI (DB-5MS): 1465

m/z (%): 157 (15), 140 (3), 113 (50), 96 (16), 80 (100), 69 (10), 68 (8), 53 (8)

$^1\text{H-NMR}$ (600.13 MHz, MeOD): δ (ppm) = 2.13-2.17 (m, 2H, 6-H), 3.32 (m, 1H, 5- H_a), 3.78-3.84 (m, 2H, 3- H_a und 5- H_e), 4.33 (ddd, $^2\text{J}_{3e,3a} = 15.4$ Hz, $^3\text{J}_{3e,2} = ^3\text{J}_{3e,5e} = 1.9$ Hz, 1H, 3- H_e), 4.53-4.56 (m, 1H, 8-H), 4.78-4.81 (m, 1H, 7-H), 5.74 (ddd, $^3\text{J}_{2,3a} = 3.8$ Hz, $^3\text{J}_{2,3e} = ^3\text{J}_{2,8} = 1.9$ Hz, 1H, 2-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600.13 MHz, MeOD): δ (ppm) = 36.8 (C-6), 54.4 (C-5), 59.7 (C-9), 63.0 (C-3), 71.9 (C-7), 78.9 (C-8), 126.1 (C-2), 139.7 (C-1).

4.8.2.4 Veresterung von $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin zu di-Butyryl- $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin

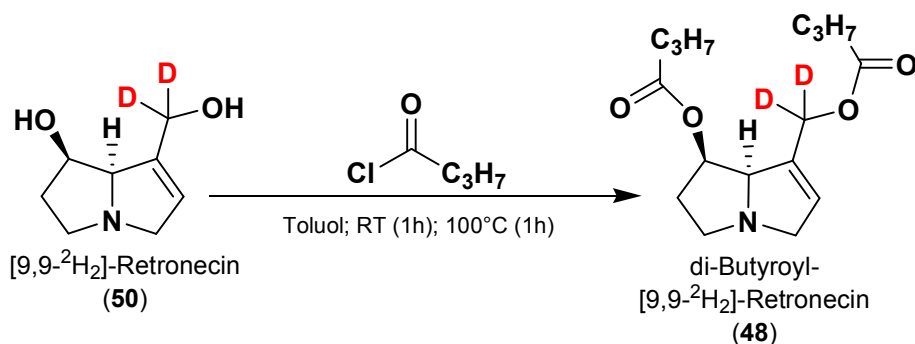
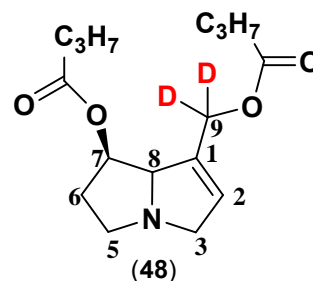


Abb. 4-5 Veresterung von $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin (**50**) zu di-Butyryl- $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -Retronecin (**48**)

Die Umsetzung zum di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) erfolgte in Anlehnung an die von Witte *et al.* (1993) für die Synthese von PA Mono- bzw. Diestern genannten Methode. 70 mg [9,9-²H₂]-Retronecin (**50**) (0,45 mmol) wurden in 10 ml Toluol mit 0,5 ml (4,7 mmol) Buttersäurechlorid versetzt und für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur und bei 100°C zur Reaktion gebracht. Nach Entfernung der Lösemittel wurde der Rückstand mit NH₄OH alkalisiert und fünfmal mit je 10 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum zur Trockne eingengt. Das gelbliche, kristalline Rohprodukt wurde mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (SiO₂ 0,063 - 0,200 mm; 30 cm x 2 cm; Elutionslösung: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH 10:1:3 Tropfen v/v/v) fraktioniert. Das gewünschte Endprodukt di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin (**48**) konnte mit einer Ausbeute von 57% (75 mg) gewonnen werden.



HRGC-EI-MS (70eV) von di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin

RI (DB-1MS): 1972

m/z (%): 297 (5), 227 (30), 210 (44), 183 (5), 138 (48), 122 (39), 121 (49), 96 (43), 95 (100), 82 (11), 71 (24)

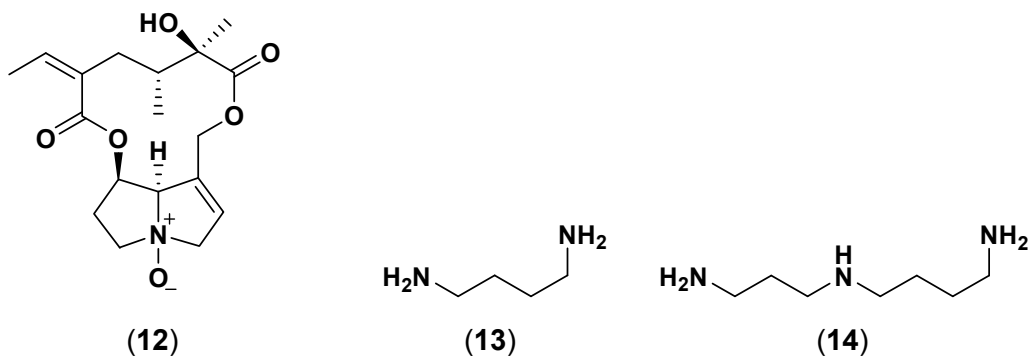
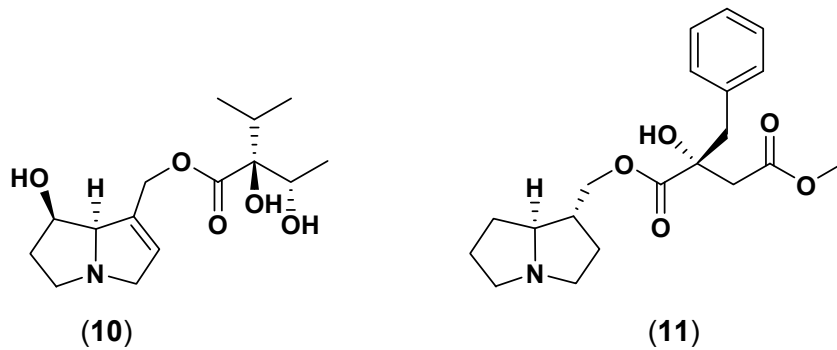
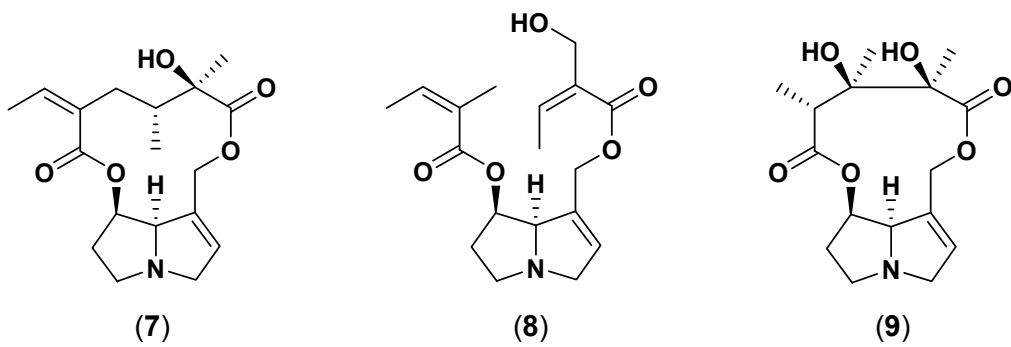
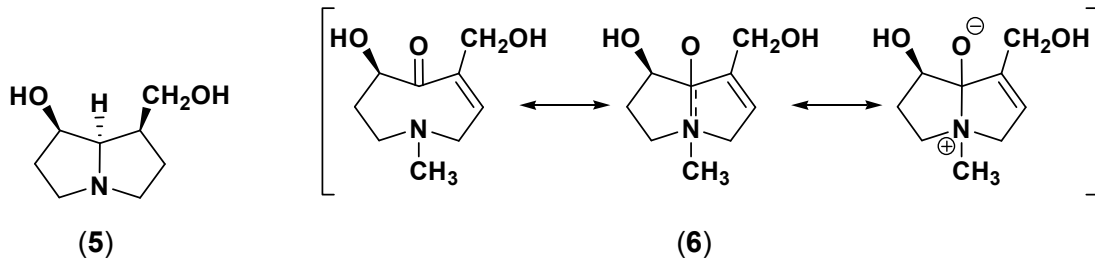
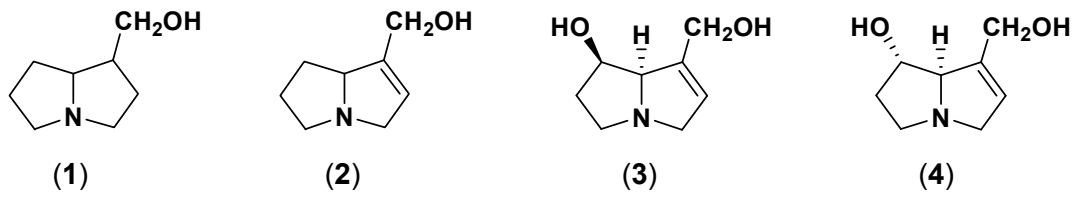
¹H-NMR (400.14 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.93 und 0.95 (t, ³J_{CH₃,CH₂} = 7.4 und 7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.60 und 1.65 (sext, ³J_{CH₂,CH₂} = ³J_{CH₂,CH₃} = 7.4 und 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 2.00-2.12 (m, 2H, 6-H), 2.23 und 2.29 (t, 2H, ³J_{CH₂,CH₂} = 7.5 und 7.4 Hz, O=CCH₂), 2.63 (ddd, ²J_{5a,5e} = 9.2 Hz, ³J_{5a,3a} = 5.7 Hz, ³J_{5a,3e} = 2.2 Hz, 1H, 5-H_a), 3.29 (m, 1H, 5-H_e), 3.38 (ddq, ²J_{3e,3a} = 18.2 Hz, ³J_{3e,5e} = 5.7 Hz, ³J_{3e,2} = 2.2 Hz, 1H, 3-H_e), 3.93 (ddd, ²J_{3a,3e} = 18.3 Hz, ⁵J_{3a,8} = 3.4 Hz, ³J_{3a,2} = 2.0 Hz, 1H, 3-H_a), 4.28 (br, m, 1H, 8-H), 5.30 (m, 1H, 7-H), 5.74 (m, 1H, 2-H).

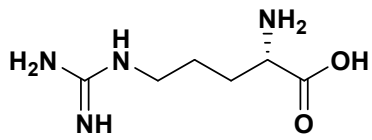
¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 13.7 (CH₃), 18.4 (CH₂CH₃), 36.0 und 36.5 (O=CCH₂), 53.7 (C-5), 60.9 (C-9), 62.8 (C-3), 73.6 (C-7), 75.7 (C-8), 127.2 (C-2), 133.8 (C-1), 172.7 und 173.3 (C=O).

5 Strukturmatrix

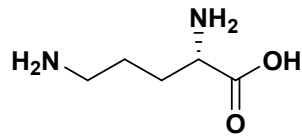
Strukturformeln ausgewählter Verbindungen, chronologisch geordnet nach Nennung im Text.

Nr.	Substanz	Nr.	Substanz
(1)	1-Hydroxymethylpyrrolizidin	(31)	Integerrimin
(2)	Supinidin	(32)	Heliotrin
(3)	Retronecin	(33)	Heliotrin- <i>N</i> -Oxid
(4)	Heliotridin	(34)	Clivorin
(5)	(-)-Platynecin	(35)	Lasiocarpin
(6)	Otonecin	(36)	Seneciphyllin
(7)	Senecionin	(37)	Riddelliin
(8)	Triangularin	(38)	Jacobin
(9)	Monocrotalin	(39)	Jacolin
(10)	Lycopsamin	(40)	Senecionin- <i>o</i> -Glukosid
(11)	Phalaenopsin	(41)	Supinin
(12)	Senecionin- <i>N</i> -Oxid	(42)	Heleurin
(13)	Putrescin	(43)	Europin
(14)	Spermidin	(44)	Senecivernin
(15)	L-Arginin	(45)	Spartioidin
(16)	L-Ornithin	(46)	di-TMS-Retronecin
(17)	Agmatin	(47)	di-TMS-Heliotridin
(18)	<i>N</i> -Carbamoylputrescin	(48)	di-Butyroyl-[9,9- ² H ₂]-Retronecin
(19)	Homospermidin	(49)	Methyl-1,2-dehydro-7β-hydroxy-8α-pyrrolizidin-1-carboxylat
(20)	(-)-Trachelanthamidin	(50)	[9,9- ² H ₂]-Retronecin
(21)	L-Valin	(51)	di-TMS-[9,9- ² H ₂]-Retronecin
(22)	L-Leucin	(52)	Rinderin
(23)	L-Isoleucin	(53)	Intermedin
(24)	2-Oxoisocaproonsäure	(54)	Echinatin
(25)	Senecioninsäure	(55)	Usaramin
(26)	Senkrikin		
(27)	Dehydrosenecionin		
(28)	7-GSH-DHP		
(29)	7,9-diGSH-DHP		
(30)	Retrorsin		

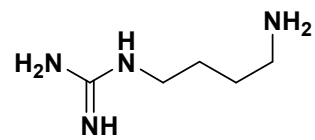




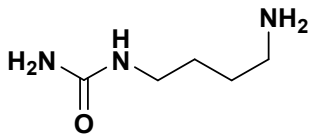
(15)



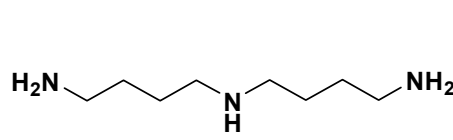
(16)



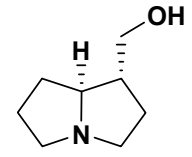
(17)



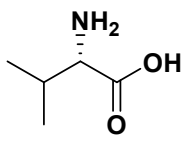
(18)



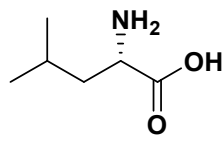
(19)



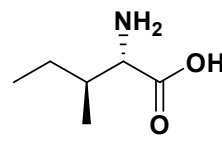
(20)



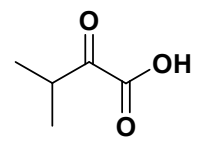
(21)



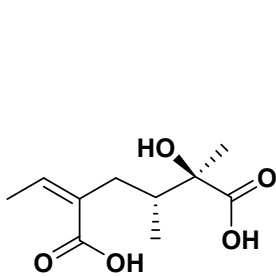
(22)



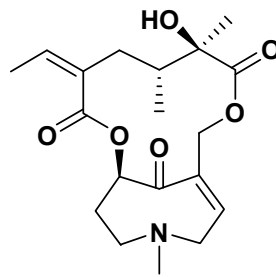
(23)



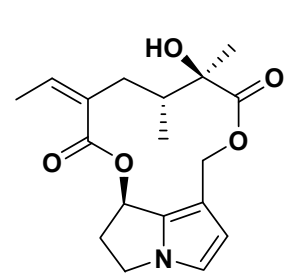
(24)



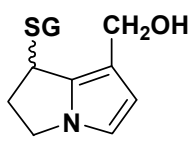
(25)



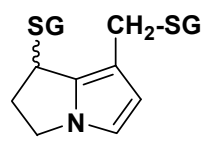
(26)



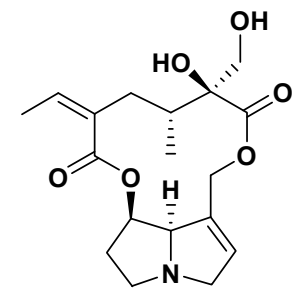
(27)



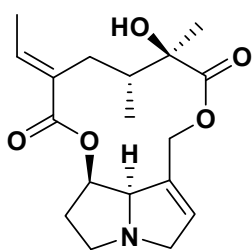
(28)



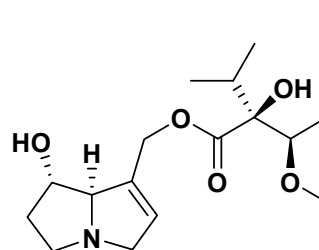
(29)



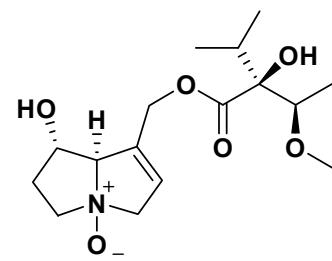
(30)



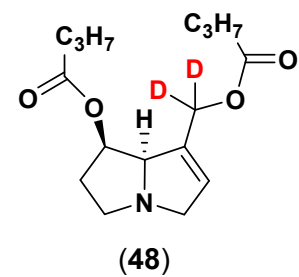
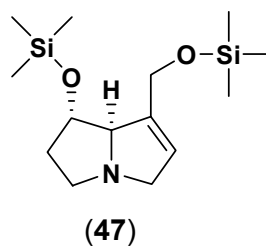
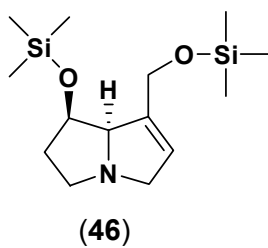
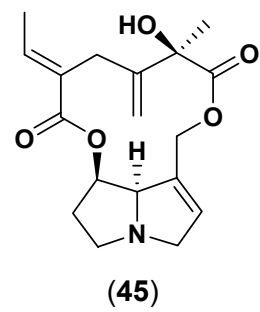
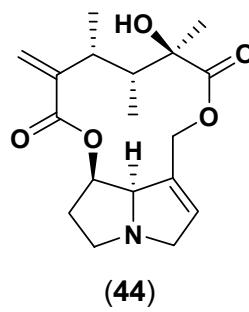
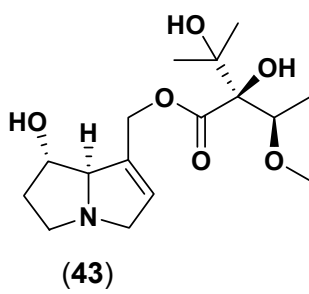
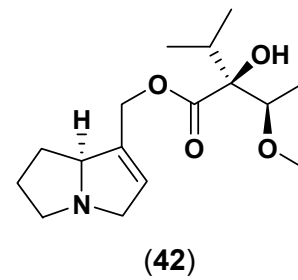
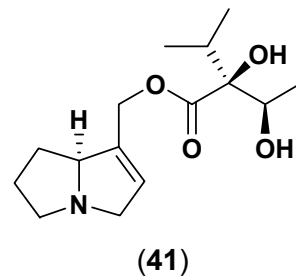
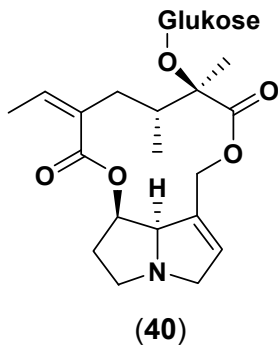
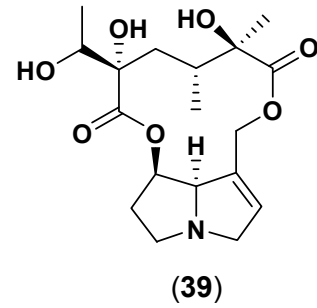
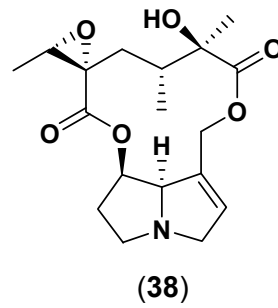
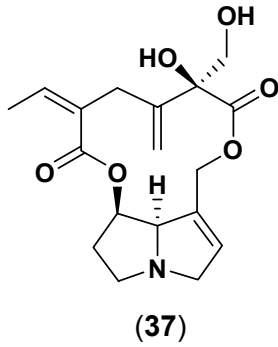
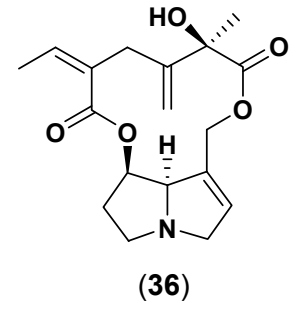
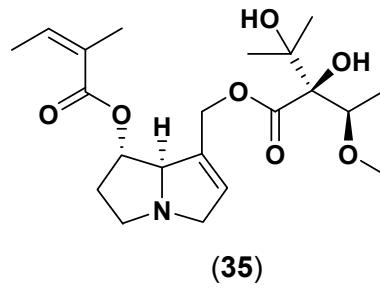
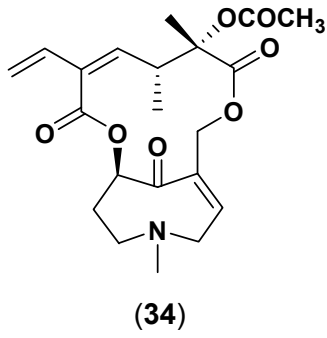
(31)

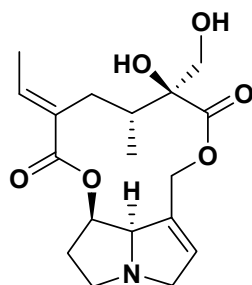
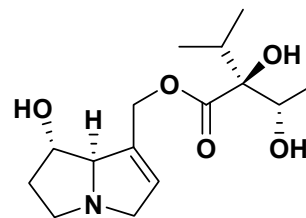
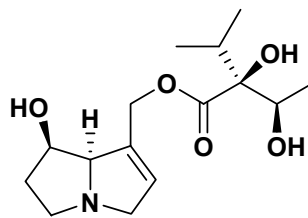
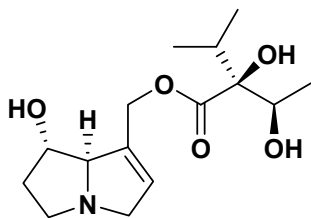
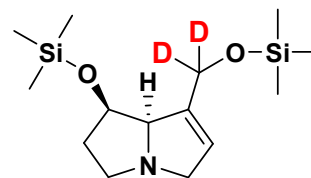
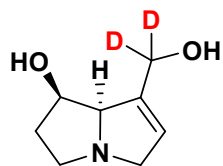
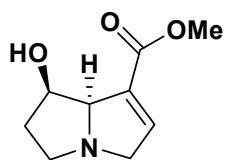


(32)



(33)





6 Literatur

- Adolph, R.D., Stoffwechsel des Putrescins, der Vorstufe von Pyrrolizidinalkaloiden, in Wurzelkulturen von *Senecio vulgaris*. Dissertation, Technische Universität Branschweig, 1991.
- AGFF, Arbeitsgemeinschaft zur Förderung des Futterbaues, *Jakobs-Kreuzkraut, eine Giftpflanze auf dem Vormarsch*, AGFF 2002, <http://www.agff.ch/pdf/Jakobskreuzkraut%20LBL-AGFF%202002-18.10..pdf> (Zugriff am 24.05.2009)
- Altamirano, J.C., Gratz, S., R., Wolnik, K., A., Investigation of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-Oxides in commercial comfrey-containing products and botanical materials by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 2005, 88, 406-412.
- Anonym, Regulations governing the tolerances for certain seeds in certain agricultural products. 2002, Department of Health, Pretoria, Südafrika.
- Arbeitskreis Kreuzkraut 2009, <http://www.jakobskreuzkraut.de/> (Zugriff am 23.04.2009)
- Australian Bureau of Statistics, *1995 National Nutrition Survey*, Canberra, Australia 1995.
- Bartkowski, J.P.B., Wiedenfeld, H., Roeder, E., Quantitative photometric determination of senkikine in farfarae folium. *Phytochemical Analysis* 1997, 8, 1-4.
- Beales, K.A., Betteridge, K., Colegate, S.M., Edgar, J.A., Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 6664-6672.
- Beckmann, K., Neue Ansätze in der Qualitätsicherung von Honig. Dissertation, Technische Universität Dresden, 2008.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.(Eds.), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- Betteridge, K., Cao, Y., Colegate, S.M., Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in honey: Application to *Echium vulgare* honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 1894 -1902.
- Betz, J.M., Eppely, R.M., Taylor, W.C., Andrzejewski, D., Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1944, 83, 649-653.
- BfN, Bundesamt für Naturschutz, *Senecio inaequidens* DC. (Asteraceae), *Schmalblättriges Greiskraut*, Bundesamt für Naturschutz 2009, <http://www.floraweb.de/neoflora/handbuch/senecioinaequidens.html> (Zugriff am 01.08.2009)
- BfR, Bundesinstitut für Risikoforschung, *Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln*. Positionspapier des BfR vom 12. März 2007, Berlin, Deutschland, 2007a. http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen_in_lebens_und_futtermitteln.pdf (Zugriff am 12.03.2009).

- BfR, Bundesinstitut für Risikoforschung, *Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Geiskraut verunreinigt*. Stellungnahme Nr.028/2007 des BfR vom 10. Januar 2007, Berlin, Deutschland, 2007b. http://www.bfr.bund.de/cm/208/salatmischung_mit_pyrrolizidinalkaloid_haltigem_geiskraut_verunreinigt.pdf, (Zugriff am 23.08.2009).
- Bicchi, C., Rubiolo, P., Frattini, C., Capillary gas chromatography-fourier transform infrared spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio inaequidens* D.C. *Journal of Chromatography* 1989, 473, 161-170.
- BMELV, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg). *Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2007*, Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, 2007.
- BMELV, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg). *Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2008*, Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven, 2008.
- Böttcher, F., Ober, D., Hartmann, T., Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: Putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Canadian Journal of Chemistry* 1994, 72, 80-85.
- Boppré, M., Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften* 1986, 73, 17-26.
- Boppré, M., Colegate, S.M., Edgar, J.A., Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 594-600.
- Boppré, M., Colegate, S.M., Steven, M., Edgar, J.A., Fischer, O.W., Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 5662-5672.
- Bras, G., Jelliffe, D.B., Stuart, K.L., Veno occlusive disease of liver with nonportal type of cirrhosis, occurring in Jamaica. *A.M.A. Archives of Pathology* 1954, 57, 285-300.
- Brink, N.G., Somatic and teratogenic effects induced by heliotrine in *Drosophila*. *Mutation Research* 1982, 104, 105-111.
- Brown, M.S., Molyneux, R.J., Roitman, J.N., A general method for high performance liquid chromatography of pyrrolizidine alkaloid free bases and N-Oxides. *Phytochemical* 1994, 5, 251-255.
- Bundesgesundheitsamt, Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln, *Bundesanzeiger* 1992, 111, 4805.
- Cahill, R., Crout, D.H.G., Mitchell, M.B., Müller, U.S., Isoleucine biosynthesis and metabolism: Stereochemistry of the formation of L-isoleucine and its conversion into senecic and isatinic acids in *Senecio* species. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1980, ohne, (10), 419-421.
- Candrian, U., Luethy, J., Graf, U., Schlatter, C., Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in *Drosophila* and their transfer into rat milk. *Food and Chemical Toxicology* 1984, 22, 223-225.

- Candrian, U., Zweifel, U., Luethy, J., Schlatter, C., Transfer of orally administered 3H-seneciophylline into cow's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991, 39, 930-933.
- Carballo, M., Mudry, M.D., Larripa, I.B., Villamil, E., D'Aquino, M., Genotoxic action of an aqueous extract of *Heliotropium curassavicum* var. *argentinum*. *Mutation Research* 1992, 279, 245-253.
- Chang, A., Hartmann, T., Solubilization and characterization of a senecionine N-oxygenase from *Crotalaria scassellatii* seedlings. *Phytochemistry* 1998, 49, 1859-1866.
- Chauvin, P., Dillon, J.C., Moren, A., An outbreak of heliotrope food poisoning, Tadjikistan, November 1992 – March 1993. *Santé* 1994, 4, 263-268.
- Cheeke, P.R., In: Cheeke, P.R. (Ed.) *Toxicants of plant origin: Alkaloids*, Vol 1, CRC Press, Boca Raton 1989, pp. 1-22.
- Chizzola, R., Rapid sample preparation technique for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant extracts. *Journal of Chromatography A* 1994, 668, 427-433.
- Chung, W.G., Miranda, C.L., Buhler, D.R., A cytochrome P4502B form is the major bioactivation enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in the guinea pig. *Xenobiotica* 1995, 25, 929-939.
- Colegate, S.M., Edga, J.A., Knill, A.M., Lee, S.T., Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their N-Oxides: a case study of *Echium plantagineum*. *Phytochemical Analysis* 2005, 16, 108-119.
- Conradie, J., Stewart, M.J., Steenkamp, V., GC/MS identification of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional remedies given to two sets of twins. *Annals of Clinical Biochemistry* 2005, 42, 141-144.
- Coulombe, R.A., Pyrrolizidine alkaloids in foods. *Advances in Food and Nutrition Research* 2003, 45, 61-99.
- Crane, E. (Ed.), *Honey, a comprehensive survey*. William Heinemann London, 1979.
- Crews, C., Startin, J.R., Clarke, P.A., Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. *Food Additives and Contaminants* 1997, 14, 419-428.
- Crews, C., Krska, R., In: Gilbert, J., Senyuva, H.Z., (Eds.) *Bioactive Compounds in Foods*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008.
- Crout, D.H.G., Benn, M.H., Imaseki, H., Geissman, T.A., Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of seneciophyllin acid. *Phytochemistry* 1966, 5, 1-21.
- Crout, D.H.G., Davies, N.M., Smith, E.H., Whitehouse, D., Biosynthesis of C₁₀ necic acids of the pyrrolizidine alkaloids, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1970, *ohne*, (11), 635-636.
- Cui, Y., Lin, G., Simultaneous analysis of clivorine and its four microsomal metabolites by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 2000, 903, 85-92.

- Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Jago, M.V., Outteridge, A., Peterson, J.E., Smith, L.W., Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemical-Biological Interaction* 1976, 12, 299-324.
- Culvenor, C.C.J., Pyrrolizidine alkaloids - occurrence and systematic importance in angiosperms. *Botaniska Notiser* 1978, 131, 473-86.
- Culvenor, C.C., Edgar, J.A., John, A., Smith, L.W., Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1981, 29, 958-960.
- Cymerman Craig, J., Purushothaman, K.K., An improved preparation of tertiary amine *N*-oxides. *The Journal of organic chemistry* 1970, 35, 1721-1722.
- Deifel, A., Die Chemie des Honigs. *Chemie in unserer Zeit* 1998, 23, 25-33.
- Deinzer, M.L., Thomson, P.H., Burgett, D.M., Isaacson, D.L., Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science* 1977, 195, 497-499.
- Deinzer, M.L., Arbogast, B.L., Buhler, D.R., Cheeke, P.R., Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Analytical Chemistry* 1982, 54, 1811-1814.
- Dickinson, J.O., Cooke, M.P., King, R.R., Mohamed, P.A., Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle, *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1976, 169, 1192-1196.
- Dickinson, J.O., Release of pyrrolizidine alkaloids into milk, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 1980, 23, 377-379.
- Die Zeit, Newsticker der DPA, *Plus räumt vergifteten Rucola-Salat aus dem Regal*, 2009. <http://www.zeit.de/newsticker/2009/8/12/HAUPTSTORY-RUCOLA-MI22069532xml> (Zugriff am 23.08.2009).
- Eastman, D.F., Dimenna, G.P., Segall, H.J., Covalent binding of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine and seneciophylline, to hepatic macromolecules and their distribution, excretion, and transfer into milk and lactating mice. *Drug Metabolism and Disposition* 1982, 10, 236-240.
- Edgar, J.A., Smith, L.W., in: Tu, A.T., Gaffield, W. (Eds.), *Natural and Selected Synthetic Toxins: Biological Implications*, ACS Symposium Series, Vol 745, American Chemical Society, Washington D.C. 2000, pp. 118-128.
- Edgar, J.A., Roeder, E., Molyneux, R.J., Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 2719-2730.
- Edgar, J.A., Pyrrolizidine alkaloids and food safety. *Chemistry in Australia* 2003, 70, 4-7.
- EFSA, European Food Safety Authority, *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 feed*. The EFSA Journal 2007, 447, 1-51.
- Ehmke, A., von Borstel, K., Hartmann, T., Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta* 1988, 176, 83-90.

- Eloff, J. N., Jansen Van Rijssen, F. W., Naude, T. W., Joubert, J.P.J., What levels of potentially toxic seed should be allowed in grains in South Africa ? I. Background and pyrrolizidine alkaloid-containing plants. *South African Journal of Science* 2003, 99, 337-344.
- El-Shazly, A., Sarg, T., Ateya, A., Abdel Aziz, A., El-Dahmy, S., Witte, L., Wink, M., Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of Natural Products* 1996, 59, 310-313.
- FDA, US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, *FDA Advises Dietary Supplement Manufacturers to Remove Comfrey Products From the Market*, Stellungnahme von 06.07.2001, <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/dspltr06.html> (Zugriff am 14.04.2009).
- Feng, H-T., Li, S.F.Y., Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* 2002, 973, 243-247.
- Frei, H., Luethy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wuergler, F.E., Schlatter, C., Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions* 1992, 83, 1-22.
- Frölich, C., Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1996.
- Frölich, C., Hartmann, T., Ober, D., Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry* 2006, 67, 1493-1502.
- Frölich, C., Ober, D., Hartmann, T., Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species, *Phytochemistry* 2007, 68, 1026-1037.
- FSANZ, Food Standards Australia New Zealand, *Pyrrolizidine alkaloids in food. A Toxicological Review and Risk Assessment*. Technical report series no. 2, 2001, Canberra, Australia. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/TR2.pdf (Zugriff am 14.04.2009).
- FSANZ, Food Standards Australia New Zealand, *Consumers advised to limit consumption of Paterson's Curse/Salvation Jane honey*, Fact Sheet, 9. February 2004, Canberra, Australia, <http://www.foodstandards.gov.au/newsroom/factsheets/factsheets2004/consumersadvisedtoli2347.cfm> (Zugriff am 07.08.2009).
- Fu, P.P., Chou, M.W., Xia, Q., Yang, Y.C., Yan, J., Doerge, D.R., Chan, P.C., Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides – mechanism leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Review* 2001, 19, 353-386.
- Fu, P.P., Yang, Y.C., Xia, Q., Chou, M.W., Cui, Y.Y., Lin, G., Pyrrolizidine alkaloids – tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002, 10, 198-211.

- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism, enzymes, metabolic activation and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews* 2004, 36, 1-55.
- GMBI, Leitsätze für weinähnliche und schaumweinähnliche Getränke in der Fassung vom 27.11.2002, Bekanntmachung vom 23.01.2003, *Gemeinsames Ministerialblatt (GMBI)* 2003, 8-10, 150.
- Goeger, D.E., Cheeke, P.R., Schmitz, J.A., Buhler, D.R., Effect on feeding milk from goats fed tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. *American journal of veterinary research* 1982, 43, 1631-1633.
- Gong, S., Su, X., Bo, T., Zhang, X., Liu, H., Li, K.A., Determination of dissociation constants of ten alkaloids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chemistry and Molecular Engineering* 2003, 26, 549-554.
- Graser, G., Hartmann, T., Biosynthetic incorporation of the aminobutyl group of spermidine into pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1997, 45, 1591-1595.
- Graser, G., Witte, L., Robins, D., Hartmann, T., Incorporation of chirally deuterated putrescine into pyrrolizidine alkaloids: a reinvestigation. *Phytochemistry* 1998, 47, 1017-1024.
- Graser, G., Hartmann, T., Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 2000, 211, 239-245.
- Gray, D.E., Porter, A., O'Neil, T., Harris, R.K., Rottinghaus, G.E., A rapid cleanup method for the isolation and concentration of pyrrolizidine alkaloids in comfrey root. *Journal of AOAC International* 2004, 87, 1049-1057.
- Hartmann, T., Zimmer, M., Organic-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Plant Physiological* 1986, 122, 67-80.
- Hartmann, T., Warum gibt es so viele Arzneipflanzen? Zur Rolle des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1987, 127, 2523-2527.
- Hartmann, T., Toppel, G., Senecionine N-Oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root culture of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 1987, 26, 1639-1643.
- Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R., Toppel, G., Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 1988, 175, 82-90.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., Von Borstel, K., Theuring, C., Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-Oxides in *Senecio vulgaris*. *Planta* 1989, 177, 98-107.
- Hartmann, T., *Senecio*: Biochemistry of the formation of pyrrolizidine alkaloids in root cultures. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 1994, 26, 339-355.
- Hartmann, T., Witte, L., In: Pelletier, S.W. (Ed.) *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Vol 9, Pergamon Press, Oxford 1995, pp. 155-233.

- Hartmann, T., Dierich, B., Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* 1998, 206, 443-451.
- Hartmann, T., Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids, *Planta* 1999, 207, 483-495.
- Hartmann, T., Theuring, C., Schmidt, J., Rahier, M., Pasteels, M., Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology* 1999, 45, 1085-1095.
- Hartmann, T., Ober, D., In: Leeper, F.J., Vederas, J.C. (Eds.) *Topics in Current Chemistry: Biosynthesis - Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, Vol 209, Springer, Berlin 2000, pp. 207-244.
- Hartmann, T., Ober, D., In: Schaller A. (Ed.) *Induces Plant Resistance to Herbivory*, Springer, Berlin 2008, pp. 213-231.
- Hirono, I., Edible plants containing naturally-occurring carcinogens in Japan. *Japanese Journal of Cancer Research* 1993, 84, 997-1006.
- Hoesch, G., Wiedenfeld, H., Dingermann, T., Roeder, E., A new high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in plant material. *Phytochemical Analysis* 1996, 7, 284-288.
- HonigV, Honigverordnung vom 16.01.2004, *Bundesgesetzblatt* (BGBl), BGBl. I S. 92 zuletzt geändert durch Artikel 9 V. v. 08.08.2007 BGBl. I S. 1816.
- Hoskins, W.M., Crout, D.H.G., Pyrrolizidine alkaloid analogs. Preparation of semisynthetic esters of retronecine. *Journal of Chemical Society* 1977, 5, 538-544.
- Hovermale J.T., Fleming, F.F., White, J.D., Craig, A.M., Improved labelling methods for C9-²H-retronecine, *Heterocycles* 1994, 38, 135-142.
- Hovermale, J.T., Craig, A.M., A routine method for the determination of retronecine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1998, 361, 201-206.
- Hsu, I.C., Allen, J.R., Synthesis of a tritium labeled pyrrolizidine alkaloiddisenecioyl-retronecine. *Journal of Labelled Compounds* 1975, 11, 71-76.
- Huang, J.Y., Miranda, C.L., Buhler, D.R., Cheeke, P.R., The roles of CYP3A and CYP2B isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998, 151, 229-235.
- Huizing, H.J., Malingre, T.M., Ion-pair adsorption chromatography of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chromatography* 1981, 205, 218-222.
- Huxtable, R.J., Problems with pyrrolizidines. *Trends in Pharmacological Sciences* 1980, 1, 299-303.
- Huxtable, R.J., In: Cheeke, P.R., (Ed.) *Toxicants of Plant Origin*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, pp. 41-48.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, some naturally occurring Substances, Vol. 10, Lyon, France, 1976.

- Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M.P., Witte, L., Hartmann, T., Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae: pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry* 1998, 47, 1551-1560.
- Jenett-Siems, K., Ott, S.C., Schimming, T., Siems, K., Müller, F., Hilker, M., Witte, L., Hartmann, T., Austin, D.F., Eich, E., Ipangulines and minalobines, chemotaxonomic markers of the infrageneric *Ipomoea* taxon subgenus Quamoclit, section Mina. *Phytochemistry* 2005, 66, 223-231.
- Ji, X., Khan, I., Mosjidis, J.A., Wang, H., Livant, P., Variability for the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria juncea* L.. *Pharmazie*, 2005, 60, 620-622.
- JKI, Julius Kühn-Institut, *Fachtagung Jakobs-Kreuzkraut Februar 2009*, Julius Kühn-Institut 2009, http://www.jki.bund.de/nn_807082/DE/Aktuelles/akt_feld_wald_gar/Jakob_kreuzkraut/Jakobs_Kreuzkraut_inhalt.html (Zugriff am 01.08.2009)
- Kaleab Asres, K., Sporer, F., Wink, M., Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, 32, 915-930.
- Khan, H.A., Robins, D.J., Pyrrolizidine alkaloids biosynthesis. Synthesis of ¹⁴C-labelled homospermidines and their incorporation into retronecine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* 1985, ohne, (4), 819-824.
- Kim, H.Y., Stermitz, F.R., Li, J.K.K., Coulombe, R.A., Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. *Food and Chemical Toxicology* 1999, 37, 619-625.
- Kim, N.C., Oberlies, N.H., Brine, D.R., Handy, R.W., Wani, M.C., Wall, M.E., Isolation of symplandine from the roots of common comfrey (*Symphytum officinale*) using countercurrent chromatography. *Journal of Natural Products* 2001, 64, 251-253.
- Kosogof, C., Tepe, J.J., Williams, R.M., DNA cross-linking by a phototriggered pyrrolic progenitor developed from monocrotaline. *Tetrahedron-Letters* 2001, 42, 6641-6643.
- Kreft, S., Zel, J., Pukl, M., Umek, A., Strukjel, B., Non-aqueous capillary electrophoresis for the simultaneous analysis of solasonine. *Phytochemical Analysis*, 2000, 11, 37-40.
- Kumana, C.R., Ng, M., Lin, H.J., Ko, W., Wu, P.C., Todd, D., Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. *Gut* 1985, 26, 101-104.
- Kunec, E.K., Robins, D.J., Stereochemistry of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Incorporation of chiral [2-²H]putrescines into retrorsine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1985, ohne, (20), 1450-1452.
- Langer, T., Franz, C., Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial samples of borage seed oil products by GC-MS. *Scientia Pharmaceutica* 1997, 65, 321-328.
- Larson, K.M., Roby, M.R., Stermitz, F.R., Unsaturated pyrrolizidines from borage (*Borago officinalis*), a common garden herb. *Journal of Natural Products* 1984, 47, 747-748.
- LAVES, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde Celle, *Steckbrief Honig*, 2002

- LAVES, Institut für Bienenkunde Celle, *Pollen - ein wichtiger Bestandteil der Bienenernährung*, 2004, http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C2994567_L20.pdf (Zugriff: 17.03.2009).
- LAVES, Institut für Bienenkunde Celle, *Gefilterter Honig*, 2006a, http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C28459072_L20.pdf (Zugriff am 15.04.2009)
- LAVES, Institut für Bienenkunde Celle, *Steckbrief Honig*, 2006b, http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C2995963_L20.pdf (Zugriff am 13.03.2009)
- LAVES, Institut für Bienenkunde Celle, *Steckbrief Pollen*, 2006c, http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C2995966_L20.pdf (Zugriff am 17.03.2009)
- Lebada, R., Schreier, A., Scherz, S., Resch, C., Krenn, L., Kopp, B., Quantitative analysis of the pyrrolizidine alkaloids senkrikine and senecoinine in *Tussilago farfara* L. by Capillary electrophoresis. *Phytochemical Analysis*, 2000, 11, 366-369.
- Lee, S.T., Schoch, T.K., Stegelmeier, B.L., Gardner, D.R., Than, K.A., Molyneux, R.J., Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the hepatotoxic alkaloids riddelliine and riddelliine N-Oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 4144-4151.
- Lin, G., Zhou, K.Y., Zhao, X.G., Wang, Z.T., But, P.P., Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interface. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998, 12, 1445-1456.
- Lin, G., Cui, Y.-Y., Hawes, E.M., Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, and hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition* 2000, 28, 1475-1483.
- Lin, G., Cui, L.L., Lui, X.Q., Gender differences in microsomal metabolic activation of hepatotoxic clivorine in rat. *Chemical Research in Toxicology* 2003, 16, 768-774.
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H., Boppré, M., Hartmann, T., The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* 1997, 245, 626-636.
- Logie, C.G., Grue, M.R., Liddell, J.R., Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1994, 37, 43-109.
- Luethy, J., Zweifel, U., Karlhuber, B., Schlatter, C., Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio alpinus* L. and their detection in feedingstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1981, 29, 302-305.
- Luethy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Schmid, P., Schlatter, C., Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of boraginaceae: *Borago officinalis* L. and *Pulmonaria officinalis* L. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 1984, 59, 242-246.
- Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G. (Eds.), *Botanik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 1999.
- Macel, M., Bruinsma, M., Dijkstra, S.M., Ooijendijk, T., Niemeyer, H.M., Klinkhamer, P.G.L., Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species, *Journal of Chemical Ecology* 2005, 31, 1493-1508.

- MAFF U.K., *Naturally Occurring Toxicants in Food. Food Surveillance Paper No. 42.* MAFF 1994, HMSO, London.
- MAFF U.K., Surveillance for pyrrolizidine alkaloids in honey. *Joint Food Safety and Standards Group Food Surveillance Information Sheet 52*, MAFF 1995, <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1995/no52/52honey.htm> (Zugriff am 12.03.2009).
- Marsh, A., Clark, B.J., Altria, K.D., Orthogonal separations of nicotine and nicotine-related alkaloids by various capillary electrophoretic modes. *Electrophoresis* 2004, 25, 1270-1278.
- Mattocks, A.R., Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Analytical Chemistry* 1967a, 39, 443-437.
- Mattocks, A.R., Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography* 1967b, 27, 505-508.
- Mattocks, A.R., In: Harbone, J.B. (Ed) *Phytochemical Ecology, Annual Proceedings of the Phytochemical Society*, Academic Press, London 1972, pp. 179-200.
- Mattocks, A.R. (Ed.), *Chemistry and toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. Academic Press, London 1986.
- Miranda, C.L., Chung, W., Reed, R.E., Zhao, X., Henderson, M.C., Wang, J.L., Williams, D.E., Buhler, D.R., Flavin- containing monooxygenase: A major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, 178, 546- 552.
- Mohabbat, O., Younos, M.S., Merzad, A.A., Srivastave, R.N., Seddiq, G.G., Aram, G.M., An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afghanistan. *Lancet* 1976, 2, 269-271.
- Molyneux, R.J., Rusell, J., Roitman, J.N., Benson, M., Lundin, R.E., ¹³C-NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1982, 21, 439-443.
- Molyneux, R.J., James, L.F., Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. *Veterinary and Human Toxicology* 1990, 32 (Supplement), 94-103.
- Mossoba, M.M., Lin, H.S., Andrzejewski, D., Sphon, J.A., Betz, J.M., Miller, L.J., Eppley, R.M., Trucksess, M.W., Page, S.W., Application of gas chromatography/matrix isolation/fourier transform infrared spectroscopy to the identification of pyrrolizidine alkaloids from comfrey root (*symphytum officinale* L.). *Journal of AOAC International* 1994, 77, 1167-1174.
- Mroczek, T., Glowniak, K., Wlaszczyk, A., Simultaneous determination of N-Oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2002, 949, 249-262.
- Mroczek, T., Ndjoko, K., Glowniak, K., Hostettmann, K., On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004a, 1056, 91-97.

- Mroczek, T., Baj, S., Chrobok, A., Glowniak, K., Screening for pyrrolizidine alkaloids in plant materials by electron ionization RP-HPLC-MS with thermabeam interface. *Biomedical Chromatography* 2004b, 18, 745-751.
- Mroczek, T., Ndjoko-Ioset, K., Glowniak, K., Mietkiewicz-Capala, A., Hostettmann, K., Investigation of symphytum cordatum alkaloids by liquid-liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2006, 566, 157-166.
- Ndjoko, K., Wolfender, J.L., Roder, E., Hostettmann, K., Determination of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species by liquid chromatography/thermospray-mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta Medica* 1999, 65, 562-566.
- Paine, H.S., Gertler, S.I., Lothrop, R.E., Colloidal constituents of honey influence on properties and commercial value. *Industrial and Engineering Chemistry* 1934, 26, 73-81.
- Pandey, G., Lakshmaiah, G., A short and new synthesis of optically pure (+)-retronecine. *Synlett* 1994, 4, 277-278.
- Park, M., Literaturuntersuchung in Sachen Pyrrolizidinalkaloide in Nahrungsmitteln von landwirtschaftlichen Nutztieren, RIVM/SIR, Bericht 10490A00, 2006, RFVM, Bilthoven.
- Parker, C.E., Verma, S., Tomer, K.B., Reed, R.L., Buhler, D.R., Determination of *Senecio* alkaloids by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* 1990, 19, 1-12.
- Parvais, O., Vander, S.B., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., TLC detection of pyrrolizidine alkaloids in oil extracted from the seeds of *Borago officinalis*. *Journal of Planar Chromatography* 1994, 7, 80-82.
- Pelser, P.B., de Vos, H., Theuring, C., Beuerle, T., Vrieling, K., Hartmann, T., Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *jacobaea* (Asteraceae). *Phytochemistry* 2005, 66, 1285-1295
- Pieters, L.A.C., Vlietinck, A.J., Quantitative proton fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of mixtures of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris*. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 1985, 321, 355-358.
- Pieters, L.A.C., Vlietinck, A.J., Comparison of high-performance liquid chromatography with proton nuclear magnetic resonance spectrometry for the quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris*. *Journal of Liquid Chromatography* 1986, 9, 745-755.
- Pieters, L.A.C., Vlietinck, A.J., Quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloid mixtures from *Senecio vulgaris* by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1987, 25, 8-10.
- Pieters, L.A.C., Van Zoelen, A.M., Vrieling, K., Vlietinck, A.J., Determination of the pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* by ^1H and ^{13}C -NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1989a, 27, 754-759.
- Pieters, L.A.C., Hartmann, T., Janssens, J., Vlietinck, A.J., Comparison of capillary gas chromatography with ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the quantitation of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vernalis*. *Journal of Chromatography* 1989b, 462, 387-391.

- Piper, J.R., Kari, P., Shealy, Y.F., Synthesis of tritium-labelled indicine *N*-oxide. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 1981, 18, 1579-1591.
- Rana, J., Robins, D.J., Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Incorporation of deuterium-labeled putrescines into retrorsine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1983, *ohne*, (21), 1222-1224.
- Rasenack, R., Muller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., Wiedenfeld, H., Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal diagnosis and therapy* 2003, 18, 223-225.
- Reddy, M.M., Suresh, V., Jayashanker, G., Rao, B.S., Sarin, R.K., Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the principal gum alkaloids. *Electrophoresis* 2003, 24, 1437-1441.
- Reed, R.L., Miranda, C.L., Kedzierski, B., Henderson, M.C., Buhler, D.R., Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of the pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Xenobiotica* 1992, 22, 1321-1327.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenkoehler, A., Ober, D., Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* 2004, 16, 2772-2784.
- Reinhard, A., Jahnke, M., Von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P., Beuerle, T., Feeding deterrence and detrimental effects mediated by toxic and nontoxic pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees. *Journal of Chemical Ecology* 2009, im Druck.
- Rizk, A. F. M. (Ed.), *Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids*. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Robins, D.J., Bale, N.M., Crout, D.H.G., Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of monocrotalic acid, the necic acid component of monocrotaline, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* 1974, *ohne*, (18), 2082-2086.
- Robins, D.J., Sweeney, J.R., Pyrrolizidine alkaloids: Evidence for the involvement of spermidine and spermine in the biosynthesis of retronecine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1979, *ohne*, (3), 120-121.
- Robins, D.J., Sweeney, J.R., Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Derivation of retronecine from L-arginine and L-ornithine. *Phytochemistry* 1983, 22, 457-459.
- Robins, D.J., Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chemical Society Reviews* 1989, 18, 375-408.
- Roeder, E., How widespread and how dangerous are pyrrolizidine alkaloids?. *Pharmazie in unserer Zeit* 1984, 13, 33-38.
- Roeder, E., Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1990, 29, 11-29.
- Roeder, E., Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 1995, 50, 83-98.

- Roeder, E., Pflueger, T., Analysis of pyrrolizidine alkaloids: a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of some toxic pyrrolizidine alkaloids. *Natural Toxins* 1995, 3, 305-309.
- Roeder, E., Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Current Organic Chemistry* 1999, 3, 557-576.
- Roeder, E., Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 2000, 55, 711-726.
- Roth, L., Daunderer, M., Kormann, K., (Eds.) *Giftpflanzen – Pflanzengifte*, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, 1994.
- Römpp, Lexikon der Lebensmittelchemie, Eisenbrand, G., Schreier, P., (Eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2006.
- Roitman, J.N., Ingestion of pyrrolizidine alkaloids: a health hazard of global proportions. *ACS Symposium Series* 1983, 234, 345-378.
- Roseman, D.M., Wu, X., Kurth, M.J., Enzyme-linked immunosorbent assay detection of pyrrolizidine alkaloids: immunogens based on quaternary pyrrolizidinium salts. *Bioconjugate Chemistry* 1996, 7, 187-195.
- Sander, H., Hartmann, T., Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 18, 19-31.
- Sanz, M.L., Gonzalez, M., de Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I., Carbohydrate composition and physico chemical properties of artisanal honeys from Madrid (Spain): Occurrence of *Echium* sp. honey. *Journal of Science and Food and Agriculture* 2004, 84, 1577-1584.
- Schaneberg, B.T., Molyneux, R.J., Khan, I.A., Evaporative light scattering detection of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemical Analysis* 2004, 15, 36-39.
- Schoch, T.K., Gardner, D.R., Stegelmeier, B.L., GC/MS/MS detection of pyrrolic metabolites in animals poisoned with the pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *Journal of Natural Toxins* 2000, 9, 197-206.
- Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, L.W., Bresinsky A., Körner, C. (Eds.), *Strasburger Lehrbuch der Botanik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002.
- SKLM, DFG – Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln, *Pyrrolizidinalkaloide in Honigen, Imkereierzeugnissen und Pollenprodukten*, 2002, Beschluss vom 08.11.2002.
- Smith, L.W., Culvenor, C.C.J., Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Natural Products* 1981, 44, 129-152.
- Spenser, I.D., Stereochemical aspects of the biosynthetic routes leading to the pyrrolizidine and the quinolizidine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* 1985, 57, 453-470.
- Sperl, W. Stuppner, H., Gassner, I., Judmaier, W., Dietze, O., Vogel, W., Reversible hepatic venoocclusive disease in an Infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *European Journal of Pediatrics*, 1995, 154, 112-116.

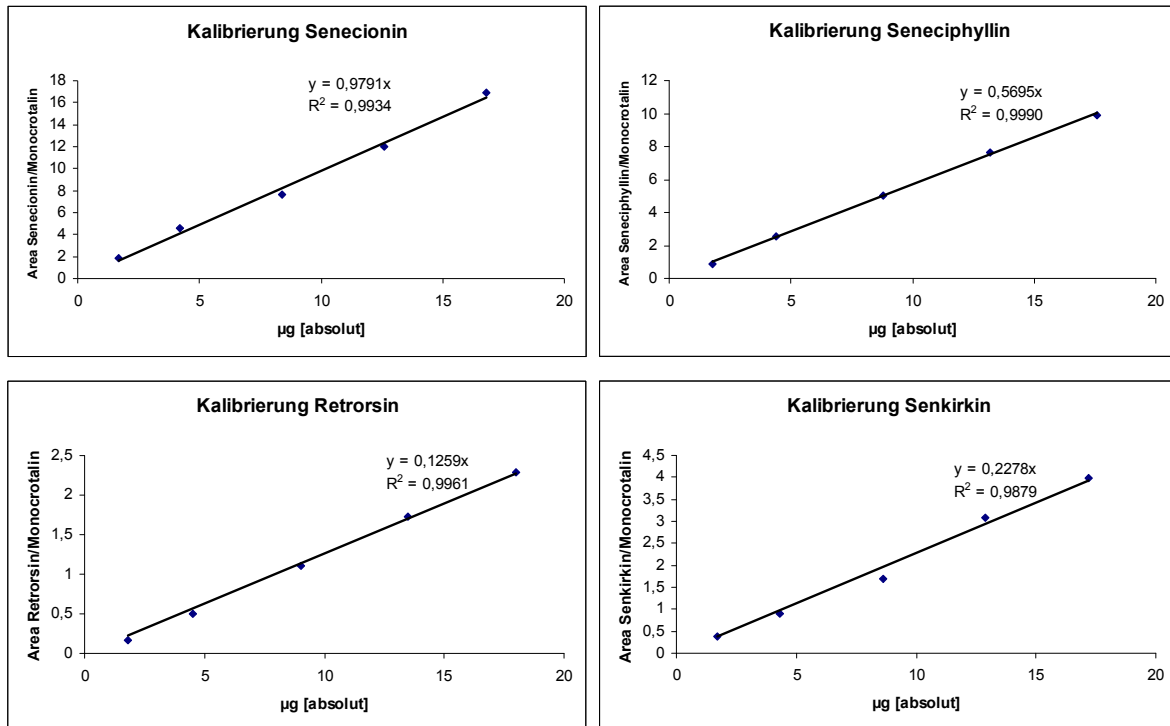
- Steenkamp, V., Stewart, M.J., Zuckerman, M., Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. *Therapeutic Drug Monitoring* 2000, 22, 302-306.
- Steenkamp, V., Stewart, M.J., Van der Merwe, S., Zuckerman, M., Crowther, N.J., The effect of *Senecio latifolius* a plant used as a South African traditional medicine, on a human hepatoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 2001, 78, 51-58.
- Stegelmeier, B.L., Edgar, J.A., Steven, M., Gardner, D.R., Schoch, T.K., Coulumbe, R.A., Molyneux, R.J., Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *Journal of Natural Toxins* 1999, 8, 95-116.
- Stelljes, M.E., Kelles, R.B., Molyneux, R.J., Seiber, J.N., GC-MS determination of pyrrolizidine alkaloids in four *Senecio* species. *Journal of Natural Products* 1991, 54, 759-773.
- Stewart, M.J., Steenkamp, V., Pyrrolizidine poisoning: a neglected area in the human toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 2001, 23, 698-708.
- Stirling, I.R., Freer, K.A., Robins, D.J., Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. Incorporation of 2-aminobutanoic acid labeled with ^{13}C or ^2H into the senecic acid portion of rosamarinine and senecionine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* 1997, ohne, (5), 677-680.
- Tandon, B.N., Tandon, H.D., Tandon, R.K., Narndranathan, M., Joshi, Y.K., An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *Lancet* 1976, 2, 271-272.
- Than, K.A., Stevens, V., Knill, A., Gallagher, P.F., Gaul, K.L., Edgar, J.A., Colegate, S.M., Plant-associated toxins in animal feed: screening and confirmation assay development. *Animal Feed Science and Technology* 2005, 121, 5-21.
- Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., Von Borstel, K., Hartmann, T., Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. *Plant Cell Reports* 1987, 6, 466
- Toppel, G., Witte, L., Hartmann, T., N-Oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry* 1988, 27, 3757-3760.
- Valerio, L.G., Arvidson, K.B., Chanderbhan, R.F., Contrera, J.F., Prediction of rodent carcinogenic potential of naturally occurring chemicals in the human diet using high-throughput QSAR predictive modeling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, 222, 1-16.
- Van Dam, N.M., Vuister, L.W.M., Bergshoeff, C., de Vos, H., Van der Meijden, E., The „raison d'être“ of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 1995, 21, 507-523.
- Van der Zee, M., Empfehlung in Sachen Pyrrolizidinalkaloide in Kräuterpräparaten, RIVM/S1R, Bericht 09685A00, 2005, RIVM, Bilthoven.
- Van Engelen, J.G.M., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Pyrrolizidine Alkaloiden (Pyrrolizidine Alkaloids). *CSR rapport 05666A00*, Centrum voor Stoffen en Risicobeoordeling (Centre for Substances and Risk Assessment), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (National Institute of Public Health and the Environment), The Netherlands 1997.

- Van Kreijl, C.F., Knaap, A.G.A.C., van Raaij, J.M.A. (Eds.), *Our food, our health. Healthy diet and safe food in the Netherlands*, National Institute for Public Health and the Environment (Eigenverlag), Bilthoven, Niederlande, 2006. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/270555009.pdf> (Zugriff am 14.04.2009).
- VCP3, Dritte Nahrungsmittelkonsumschätzung, TNO Nahrungsmittel, Zeist 1997-1998. <http://www.zuivelengezondheid.nl/tno/start.htm> (Zugriff am 20.05.2009).
- Von der Ohe, W., von der Ohe, K. (Eds.), *Celler Melissopalynologische Sammlung*, Niedersächsisches Landesamt für Bienenkunde (Hrsg.); Eigenverlag, Celle, 2002
- VWA, Voedsel en waren autoriteit (niederländisches Nahrungsmittel- und Warenamt), Pyrrolizidine alkaloiden in honing, 2007, http://www.vwa.nl/cdlpub/servlet/CDLServlet?p_file_id=22703 (Zugriff am 14.04.2009).
- Warengesetz, Beschluss über Kräuterpräparate im Rahmen des Warengesetz vom 1. Januar 2001 (Niederlande), Staatsblatt 2001, 56.
- Warenverein, Waren-Verein der Hamburger Börse e.V., *Jahresbericht 2007*, 2008 http://www.warenverein.de/pdf/wv_jb_2007_web.pdf (Zugriff am 03.03.2009).
- Warenverein, Waren-Verein der Hamburger Börse e.V., *Jahresbericht 2008*, 2009 http://www.warenverein.de/pdf/wv_jb_2008_web.pdf (Zugriff am 20.07.2009)
- WHO, ICPS *Environmental health criteria 80 Pyrrolizidine alkaloids*. WHO, Geneva 1988, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm> (Zugriff am 12.03.2009).
- WHO, Food Safety Issues *GEMS/Food regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities*. WHO, Geneva 2003, http://www.who.int/foodsafety/chem/en/gems_regional_diet.pdf (Zugriff am 12.03.2009)
- WHO, *Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants*. WHO Offset Publication 87, Geneva 1985, http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/Guidelines_chem_contam.pdf (Zugriff am 12.03.2009).
- Wiedenfeld, H., Roeder, E., Pyrrolizidinalkaloide, Struktur und Toxizität. *Deutsche Apothekerzeitung* 1984, 124, 2116-2122.
- Williams, L., Chou, M.W., Yan, J., Young, J.F., Chan, P.C., Doerge, D.R., Toxicokinetics of riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, and metabolites in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002, 182, 98-104.
- Winter, C.K., Segall, H.J., Jones, A.D., Determination of pyrrolizidine alkaloid metabolites from mouse liver microsomes using tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* 1988, 15, 265-273.
- Winter C.K., Segall H.J., In: Cheeke, P.R. (Ed.) *Toxicants of plant origin: Alkaloids*, Vol 1, CRC Press, Boca Raton 1989, pp. 23-40.
- Witte, L., Ernst, L., Adam, H., Hartmann, T., Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloid-containing *Senecio* spp. *Phytochemistry* 1992, 31, 559-566.
- Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., Hartmann, T., Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* 1993, 32, 187-196.

- Wuilloud, J.C.A., Gratz, S.R., Gamble, B.M., Wolnik, K.A., Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and *N*-Oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *Analyst* 2004, *129*, 150-156.
- Xiong, A.Z., Yang, L., Zhang, F., Yang, X.J., Wang, C.H., Wang, Z.T., Determination of total retronecine-type hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in plant materials by pre-column derivatization high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 2009, *23*, 665-671.
- Yan, C.C., Huxtable, R.J., Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, in isolated, perfused liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995a, *130*, 13-17.
- Yan, C.C., Huxtable, R.J., The relationship between the concentration of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline and the pattern of metabolites released from the isolated liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995b, *130*, 1-8.
- Yan, Y.C., Yan, J., Doerge, D.R., Daniel, R., Chan, P.C., Fu, P.P., Chou, M.W., Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation in vivo. *Chemical Research in Toxicology* 2001, *14*, 101-109.
- Yan, J., Xia, Q., Chou, M.W., Fu, P.P., Metabolic activation of retronecine and retronecine *N*-oxide – formation of DHP-derived DNA adducts. *Toxicology and Industrial Health* 2008, *24*, 181-188.
- Yu, L., Xu, Y., Feng, H., Li, S.F.Y., Separation and determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal medicines by micellar electrokinetic chromatography with organic modifier. *Electrophoresis* 2005, *26*, 3397-3404.
- Zhang, F., Wang, C.H., Xiong, A.Z., Wang, W., Yang, L., Branford-White, C.J., Wang, Z.T., Bligh, S.W., Quantitative analysis of total retronecine ester-type pyrrolizidine alkaloids in plant by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2007, *605*, 94-101.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Salmonella mutagenicity test: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1988, *11* (Suppl 12), 1-157.
- Zuendorf, I., Wiedenfeld, H., Roeder, E., Dingermann, T., Generation and characterization of monoclonal antibodies against the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Planta Medica* 1998, *64*, 259-263.

7 Anhang

Tab. 7-1: Kalibriergeraden, aufgetragen gegen den Standard Monocrotalin (11 µg absolut) zur Auswertung der LLE – Wiederfindungsraten von Pyrrolizidinalkaloiden.



Tab. 7-2 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=4) einzelner PA nach 24-stündigen LLE-Ansätzen mit CH₂Cl₂:Pentan (1:2; v/v) in wässriger Lösung (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecionin (7)	85,8	9,4
Seneciphyllin (36)	82,5	9,8
Senkirkin (26)	90,5	8,3

Tab. 7-3 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=1) einzelner PA nach 24-stündigen LLE-Ansätzen mit CH₂Cl₂ in wässriger Lösung (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecionin (7)	33,6	n.b.
Seneciphyllin (36)	40,8	n.b.
Senkirkin (26)	64,7	n.b.

n.b. = nicht bestimmbar; da aufgrund der schlechten Wiederfindungsraten nur Einfachbestimmung durchgeführt

Tab. 7-4 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=1) einzelner PA nach 24-stündigen LLE-Ansätzen mit CHCl₃ in wässriger Lösung (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecionin (7)	37,6	n.b.
Seneciphyllin (36)	38,4	n.b.
Senkirkin (26)	59,1	n.b.

n.b. = nicht bestimmbar; da aufgrund der schlechten Wiederfindungsraten nur Einfachbestimmung durchgeführt

Tab. 7-5 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=13) einzelner PA nach 24-stündigen LLE-Ansätzen (CH₂Cl₂:Pentan 1:2; v/v) mit Honigmatrix (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecionin (7)	55,7	21,0
Seneciphyllin (36)	60,5	24,8
Senkirkin (26)	67,0	33,9
Retrorsin (30)	70,4	27,7

Tab. 7-6 Zur Ermittlung der, für die Isolierung von PA aus Honigmatrix, optimalen SCX-SPE-Kartusche eingesetzte Produkte. Angegeben die Platzierung nach Beurteilung der Faktoren: Wiederfindungsrate, Flußrate, Handling, Auftreten von Verstopfungen, Interferenzen.

Hersteller	Bezeichnung/Typ	Platzierung
Machery - Nagel	Chromabond [®] PSA	6.
Machery - Nagel	Chromabond [®] SA	7.
Alltech	Extract-Clean [®] SCX	11.
IST / Separtis	Isolute [®] SCX-2	7.
Merck	LiChrolut [®] SCX	9.
Supelco [®]	Supelclean [®] LC-SCX	10.
Supelco [®]	Supelclean [®] LC-WCX	11.
Phenomenex [®]	Strata [®] SCX	3.
Phenomenex [®]	Strata-X-C [®] 33µm	4.
Varian TM	Bond Elut [®] CBA	11.
Varian TM	Bond Elut Jr. [®] SCX	5.
Varian TM	Nexus [®]	11.
Varian TM	HF Bond Elut LRC [®] SCX	1.
Varian TM	HF Mega Bond Elut [®] SCX	2.

Tab. 7-7 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=4) einzelner PA bei Anwendung der Varian HF Bond Elut LRC[®] SCX SPE-Katusche mit Honigmatrix (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecivernin (44)	207,0	33,9
Senecionin (7)	83,9	2,5
Seneciphyllin (36)	78,7	3,6
Spartioidin (45)	130,9	12,6
Integerrimin (31)	83,0	2,8
Senkirkin (26)	109,3	4,4
Retrorsin (30)	57,8	2,5
Monocrotalin (9)	77,5	2,3

Tab. 7-8 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=10) einzelner PA nach 48-stündigen LLE-Ansätzen (CH₂Cl₂:Pentan 1:2; v/v) mit zuckerhaltiger Matrix (n= Anzahl der Durchführungen).

PA	Wiederfindung [%]	SD [%]
Senecionin (7)	80,0	5,0
Seneciphyllin (36)	83,5	8,8
Senkirkin (26)	73,7	7,0
Retrorsin (30)	88,3	11,0

Tab. 7-9 Auflistung und Herkunftsangaben laut Etikett der untersuchten Honighandelsproben. Ebenfalls angegeben der ermittelte PA-Gehalt, berechnet als Retronecin-Äquivalente, aus Dreifachbestimmung nach (A) Heliotrin- und (B) di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin-Standardisierung der untersuchten Honighandelsproben.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
1	Hublandsommer	Deutschland	n.n.	n.d.
2	Bienenhonig Wildblüte	Kuba	n.n.	n.d.
3	Bienenhonig Eukalyptus	Brasilien	n.n.	n.d.
4	Imported Natural Honey, Brand Australia	Australien	n.n.	n.d.
5	Echter Deutscher Honig Frühtracht	Deutschland	n.n.	n.d.
6	Echter Deutscher Honig Rapshonig	Deutschland	n.n.	n.d.
7	Echter Deutscher Honig Sommerblüte	Deutschland	n.n.	n.d.
8	Echter Deutscher Honig Bergflora	Deutschland	n.n.	n.d.
9	Obstblütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
10	Spätsommertracht Honigtau- und Erika-Heide	Deutschland	n.n.	n.d.
11	Bergland-Honig	Frankreich	n.n.	n.d.
12	Mesquitehonig	USA, Arizona	n.n.	n.d.
13	Geestland-Honig	Deutschland	n.n.	n.d.
14	Kleehonig, Luzerne	Mischung aus EG-Ländern	n.n.	n.d.
15	Kaffeeblütenhonig	Brasilien	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
16	Heidehonig Haupttrachtquelle: Besenheide	Deutschland	n.n.	n.d.
17	Sommerblütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
18	Sonnenblumenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
19	Blütenhonig „Exzellente“	Mischung aus EG-Ländern	n.n.	n.d.
20	Honig aus Griechenland	Griechenland	n.n.	n.d.
21	Boretsch, Honig aus Boretschblüten-Nektar	Neuseeland	0,084 ± 0,016	0,096 ± 0,005
22	Avocadohonig	Mexiko	n.n.	n.d.
23	Heidehonig	Deutschland	n.n.	n.d.
24	Korianderhonig	Mischung aus EG-Ländern	n.n.	n.d.
25	Pampashonig	Argentinien	n.n.	n.d.
26	Thymianhonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
27	Urwaldhonig	Guatemala	n.n.	n.d.
28	Sommerblütenhonig	Ungarn	n.n.	n.d.
29	Seidenpflanzenhonig	Ungarn	n.n.	n.d.
30	Eukalyptus-Honig	Australien	n.n.	n.d.
31	Imkerhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
32	Bienenhonig Auslese	Nicht-EG-Länder	0,035 ± 0,011	0,053 ± 0,002
33	Bienenhonig Griechischer Art	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
34	Bienenhonig Fein cremige Auslese	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	0,027 ± 0,014	0,064 ± 0,003
35	Landhonig Feine Auslese	EG-Länder, Nicht-EG-Länder, Europa, Mittel- und Südamerika	0,053 ± 0,034	0,047 ± 0,001
36	Blütenhonig Cremig	Süd- und Mittelamerika	0,069 ± 0,008	0,061 ± 0,002
37	Gebirgsblütenhonig Wabenecht	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
38	Gelée Royale in Honig	unbekannt	n.n.	n.d.
39	Wildblütenhonig Blumig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	0,060 ± 0,013	0,071 ± 0,002
40	Sommerblütenhonig Feine Auslese	EG-Länder, Nicht-EG-Länder, Europa, Australien, Mittel- und Südamerika	n.n.	n.d.
41	Honig	Kanada	0,040 ± 0,007	0,047 ± 0,001
42	Wabenechter Sommerblütenhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
43	Bienenhonig Goldklare Auslese	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	0,019 ± 0,003	0,027 ± 0,001
44	Bergblütenhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
45	Gebirgsblütenhonig Extra feine Auslese	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
46	Echter Deutscher Honig Frühlingsblüte	Deutschland	n.n.	n.d.
47	Echter Deutscher Honig Wildblütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
48	Echter Deutscher Honig	Deutschland	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
49	Mischblütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
50	Gebirgsblütenhonig Wabenecht	Nicht-EG-Länder	0,091 ± 0,012	0,072 ± 0,002
51	Imkerhonig Goldklare Auslese	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
52	Imkerhonig Streichzarte Blütenauslese	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
53	Akazienhonig	Ungarn	n.n.	n.d.
54	Natural Honey	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
55	Eucalyptushonig	Australien	n.n.	n.d.
56	Manukahonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
57	Thymianhonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
58	Echter Deutscher Bienenhonig Frühtracht	Deutschland	n.n.	n.d.
59	Echter Deutscher Bienenhonig Sommertracht	Deutschland	n.n.	n.d.
60	Kleehonig	Kanada	n.n.	n.d.
61	Blütenhonig Würzig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
62	Kastanienhonig	Italien	n.n.	n.d.
63	Kleehonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
64	Auslesehonig	Mexiko und Argentinien	n.n.	n.d.
65	Gebirgshonig	Mexiko	n.n.	n.d.
66	Yukatanhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
67	Eukalyptushonig	Brasilien	n.n.	n.d.
68	Blütenhonig	Frankreich	n.n.	n.d.
69	Pampashonig	Argentinien	n.n.	n.d.
70	Pinienhonig	Türkei	n.n.	n.d.
71	Wollampferhonig (Salbei)	Kalifornien	n.n.	n.d.
72	Thymianhonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
73	Mexikanischer Hochlandhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
74	Sommerblütenhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
75	Karibikhonig	Kuba	n.n.	n.d.
76	Wildblütenhonig	Kuba	n.n.	n.d.
77	Rape Flower Honey	England	n.n.	n.d.
78	Borage Honey	England	n.n.	n.d.
79	Mixed Flower Honey	England	n.n.	n.d.
80	Heather Honey	England	n.n.	n.d.
81	Berghonig „Tasco“	Mexiko	n.n.	n.d.
82	Wildblütenhonig	Süd-/Mittelamerika	n.n.	n.d.
83	Bayerischer Frühlingsblütenhonig	Bayern / Deutschland	n.n.	n.d.
84	Echter Deutscher Honig Moorblüte	Deutschland	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
85	Echter Deutscher Honig Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
86	Echter Deutscher Honig Heidehonig	Deutschland	n.n.	n.d.
87	Blütenhonig mit Sanddorn	unbekannt	n.n.	n.d.
88	Friesischer Klee-Honig Streichart	EG-Länder	n.n.	n.d.
89	Florida-Blütenhonig mit Wabenstück	USA	n.n.	n.d.
90	Heide-Honig Naturkost	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
91	Lateinamerikanischer Wildblütenhonig	Süd- und Mittelamerika	n.n.	n.d.
92	Bienenhonig Auslese	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
93	Bienenhonig cremig	Nicht-EG-Länder	0,044 ± 0,008	0,050 ± 0,003
94	Heidehonig	unbekannt	n.n.	n.d.
95	Bienenhonig Wiesentracht	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
96	Blütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
97	Honig aus Friesland Waldblüte	Deutschland	n.n.	n.d.
98	Echter Deutscher Honig Heide	Deutschland	n.n.	n.d.
99	Wildblütenhonig Lieblich-mild	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
100	Honey creamy	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
101	Honey clear	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
102	Echter Deutscher Honig Sommertracht	Deutschland	n.n.	n.d.
103	Deutscher Bienenhonig Werdumer Sommer	Deutschland	n.n.	n.d.
104	Landhonig	Deutschland, Ungarn und Mexiko	n.n.	n.d.
105	Bienenhonig	Deutschland, Ungarn und Brasilien	n.n.	n.d.
106	Honig	Südfrankreich	n.n.	n.d.
107	Manukahonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
108	Echter Deutscher Honig Frühtracht	Deutschland	n.n.	n.d.
109	Thymianhonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
110	Ulmo-Honig	Chile	n.n.	n.d.
111	Honig der Provence	Frankreich	n.n.	n.d.
112	Kleehonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
113	Heidehonig	Frankreich	n.n.	n.d.
114	Sanddorn in Honig Sonnenblumenhonig mit Sanddornmark	Deutschland	n.n.	n.d.
115	Akazien & Blüten- „Zum Tee“ Honig	Deutschland	n.n.	n.d.
116	Eucalyptus-Honig Auslese	Australien, Brasilien und Argentinien	n.n.	n.d.
117	Klee-Raps-Honig Auslese	Argentinien, Neuseeland	n.n.	n.d.
118	Sonnenblumenhonig Auslese	Ungarn, Rumänien, Türkei, Moldawien, Spanien	n.n.	n.d.
119	Wildblütenhonig Auslese	Mexiko, Südamerika, Ost-Europa	0,026 ± 0,005	0,028 ± 0,002
120	Deutscher Bienenhonig Linde	Deutschland	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
121	Honig aus Friesland Waldblüte	Deutschland	n.n.	n.d.
122	Deutscher Bienenhonig Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
123	Deutscher Bienenhonig Raps	Deutschland	n.n.	n.d.
124	Deutscher Bienenhonig Sonnenblumen	Deutschland	n.n.	n.d.
125	Honig aus Friesland Blüte	Deutschland	n.n.	n.d.
126	Honig aus Friesland Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
127	Gebirgsblütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
128	Gebirgsblütenhonig	EG-Länder	n.n.	n.d.
129	Greek Honey – Thym, Fir and selected Flowers	Griechenland	n.n.	n.d.
130	Honig	Griechenland	n.n.	n.d.
131	Greek Honey	Griechenland	n.n.	n.d.
132	Greek Honey	Griechenland	n.n.	n.d.
133	Honey Delphi	Griechenland	n.n.	n.d.
134	Flower Honey	Griechenland	n.n.	n.d.
135	Blütenhonig	Europa, Südamerika	n.n.	n.d.
136	Pinienhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
137	Akazienhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
138	Kleehonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
139	Rapshonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
140	Orangenhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
141	Echter Deutscher Honig Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
142	Waldhonig	Toskana / Italien	n.n.	n.d.
143	Sommerblütenhonig	Toskana / Italien	n.n.	n.d.
144	Wildblütenhonig	Argentinien	n.n.	n.d.
145	Borretsch Honig	Neuseeland	0,120 ± 0,047	0,135 ± 0,003
146	Bio Wildblütenhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
147	Kamahi Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.
148	Manuka Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.
149	Pampas Honig	Argentinien	n.n.	n.d.
150	Wildblütenhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
151	Sommerblütenhonig	Ungarn	n.n.	n.d.
152	Bio Rapshonig	Schleswig-Holstein / Deutschland	n.n.	n.d.
153	Rewarewa Honig	Neuseeland	0,053 ± 0,014	0,059 ± 0,002
154	Kleehonig	Kanada	n.n.	n.d.
155	Eukalyptushonig	Argentinien	0,040 ± 0,005	0,048 ± 0,003
156	Waldhonig	Brasilien	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
157	Orangenhonig	Mexiko	n.n.	n.d.
158	Sommerblütenhonig goldklar	Süd- und Mittelamerika	n.n.	n.d.
159	Imker Landhonig Auslese	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
160	Productos Apícolas Propóleo-Miel	Chile	n.n.	n.d.
161	Productos Apícolas Pólen-Miel	Chile	0,052 ± 0,008	0,057 ± 0,002
162	Bio-Imkerhonig cremig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
163	Bio-Imkerhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
164	Kleehonig	Neuseeland	n.n.	n.d.
165	Miel Chailan	Frankreich	n.n.	n.d.
166	Miel de France	Frankreich	n.n.	n.d.
167	Blütenhonig	Frankreich	n.n.	n.d.
168	Honig mit Gelée Royale	Frankreich	n.n.	n.d.
169	Blütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
170	Gelée Royale in Blütenhonig	unbekannt	n.n.	n.d.
171	Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
172	Ökologischer Wildblütenhonig Cremig	Mexiko und Nicaragua	n.n.	n.d.
173	Feine Auslese Honig - aus ökologischer Landwirtschaft	Osteuropa	n.n.	n.d.
174	Vielblütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
175	Blütenhonig	Deutschland/Röhn	n.n.	n.d.
176	Bienenhonig	Nicht-EG-Länder	0,090 ± 0,007	0,096 ± 0,001
177	Sommerblüten- mit Sonnenblumenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
178	Blütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
179	Imkerhonig	Nicht-EG-Länder	0,038 ± 0,003	0,034 ± 0,001
180	Ökologischer Wildblütenhonig Flüssig	Mexiko und Nicaragua	n.n.	n.d.
181	Reiner und natürlicher Blütenhonig	Türkei	n.n.	n.d.
182	Reiner und natürlicher Blütenhonig	Türkei	n.n.	n.d.
183	Honig mit Wabe	Türkei	n.n.	n.d.
184	Filtrierter Blumenhonig	Türkei	n.n.	n.d.
185	Sommertracht	Deutschland	n.n.	n.d.
186	Frühjahrsblütenhonig	Deutschland	n.n.	n.d.
187	Wildblütenhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
188	Blütenhonig Goldflüssig	Nicht-EG-Länder	0,078 ± 0,029	0,075 ± 0,003
189	Australischer Bio-Honig	Australien	n.n.	n.d.
190	reiner australischer Honig	Australien	n.n.	n.d.
191	Manuka-Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.
192	Klee-Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	(A) PA-Gehalt [µg/g]	(B) PA-Gehalt [µg/g]
193	Rewarewa-Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.
194	Pohutukawa-Honig	Neuseeland	n.n.	n.d.
195	Thymian-Honig	Griechenland	n.n.	n.d.
196	Sulla-Honig	Italien	n.n.	n.d.
197	Zitrusfrucht-Honig	Italien	n.n.	n.d.
198	Asphodill-Honig	Italien	n.n.	n.d.
199	Vielblütenhonig	Italien	n.n.	n.d.
200	Blütenhonig	Griechenland	n.n.	n.d.
201	Kastanienhonig	Italien	n.n.	n.d.
202	Wildblütenhonig	Griechenland	n.n.	n.d.
203	Blütenhonig (Akazien, Orange)	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
204	Blütenhonig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
205	Vielblütenhonig	Frankreich	n.n.	n.d.
206	Garigue-Honig	Frankreich	n.n.	n.d.
207	Blütengold cremig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
208	Wildblütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
209	Vielblütenhonig	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
210	Ökologischer Blütenhonig cremig	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
211	Imker-Auslese	Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
212	Imker-Auslese feincremig	Nicht-EG-Länder	0,048 ± 0,001	0,051 ± 0,001
213	Imkerhonig gold	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
214	Imkerhonig hell	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	n.n.	n.d.
215	Bio-Wildblütenhonig	Brasilien	n.n.	n.d.
216	Bergland Honig	Österreich	n.n.	n.d.

n.n. = nicht nachweisbar

n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 7-10 Auflistung und Herkunftsangaben der untersuchten *Senecio*-Honige (Honige aus Gebieten mit *Senecio*-Massenvorkommen). Ebenfalls angegeben der ermittelte PA-Gehalt, berechnet als Retronecin-Äquivalente, aus Dreifachbestimmung nach Heliotrin-Standardisierung.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	PA-Gehalt [µg/g]
S1	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,124 ± 0,045
S2	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,537 ± 0,180
S3	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,038 ± 0,005
S4	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	n.n.
S5	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,250 ± 0,010
S6	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,232 ± 0,015
S7	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	3,796 ± 0,110
S8	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	1,751 ± 0,106
S9	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,226 ± 0,006
S10	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,304 ± 0,006
S11	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,525 ± 0,165
S12	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	4,658 ± 0,800
S13	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	n.n.
S14	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,052 ± 0,025
S15	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,020 ± 0,005
S16	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,022 ± 0,005
S17	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,107 ± 0,041
S18	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,300 ± 0,010
S19	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,248 ± 0,029
S20	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,268 ± 0,024
S21	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,354 ± 0,028
S22	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,712 ± 0,118
S23	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,217 ± 0,104
S24	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	2,604 ± 0,133
S25	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	n.n.
S26	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	0,038 ± 0,007
S27	<i>Senecio</i> -Honig	Niederlande	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Tab. 7-11 Auflistung und Herkunftsangaben der untersuchten *Echium*-Honige. Ebenfalls angegeben der ermittelte PA-Gehalt, berechnet als Retronecin-Äquivalente, aus Dreifachbestimmung nach di-Butyryl-[9,9-²H₂]-Retronecin-Standardisierung.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	PA-Gehalt [µg/g]
E1	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,378 ± 0,006
E2	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,344 ± 0,071
E3	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,394 ± 0,017
E4	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,406 ± 0,020
E5	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,334 ± 0,003
E6	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,449 ± 0,084
E7	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,429 ± 0,012
E8	<i>Echium</i> -Honig	Neuseeland	0,520 ± 0,015

Tab. 7-12 PA-Gehalte, berechnet als Summe der Einzel-PA, in Pollen und Blüten von *Senecio vernalis* (n=12); ebenfalls angegeben das Minimum und Maximum der Messungen (n= Anzahl der Durchführungen).

Pflanzenteil	PA-Gehalt [mg/g]	minimaler, gemessener PA-Gehalt [mg/g]	maximaler, gemessener PA-Gehalt [mg/g]
Pollen	4,07 ± 0,81	2,81	5,22
Waxschicht der Pollen	1,20 ± 0,52	0,52	2,10
Blüte	2,29 ± 1,24	0,99	5,23

Tab. 7-13 PA-N-Oxid-Anteile in Pollen und Blüten von *Senecio vernalis* (n=12); ebenfalls angegeben das Minimum und Maximum der Messungen (n= Anzahl der Durchführungen).

Pflanzenteil	PA-N-Oxid-Anteil [%]	minimaler, gemessener PA-N-Oxid-Anteil [%]	maximaler, gemessener PA-N-Oxid-Anteil [%]
Pollen	71,83 ± 13,53	50,37	92,15
Blüte	84,23 ± 9,58	62,63	97,83

Tab. 7-14 Verteilung der einzelnen PA in Pollen von *Senecio vernalis* (n=12); ebenfalls angegeben das Minimum und Maximum der Messungen (n= Anzahl der Durchführungen).

Pflanzenteil	Gehalt [mg/g]	minimaler, gemessener Gehalt [mg/g]	maximaler, gemessener Gehalt [mg/g]
PA 1	0,29 ± 0,15	0,07	0,57
Senecivernin (44)	0,57 ± 0,24	0,24	1,23
Senecionin (7)	1,15 ± 0,31	0,72	1,63
Seneciphyllin (36)	1,72 ± 0,35	1,02	2,16
Spartioidin (45)	0,07 ± 0,03	0,04	0,14
Integerrimin (31)	0,08 ± 0,03	0,04	0,13
PA 2	0,00 ± 0,01	n.n.	0,03
Senkirkin (26)	0,17 ± 0,06	0,09	0,29
Retrorsin (30)	n.n.	n.n.	n.n.
Usaramin (55)	n.n.	n.n.	n.n.

PA 1 = unbekanntes PA
 PA 2 = unbekanntes PA
 n.n. = nicht nachweisbar

Tab. 7-15 Verteilung der einzelnen PA in Blüten von *Senecio vernalis* (n=12); ebenfalls angegeben das Minimum und Maximum der Messungen (n= Anzahl der Durchführungen).

Pflanzenteil	Gehalt [mg/g]	minimaler, gemessener Gehalt [mg/g]	maximaler, gemessener Gehalt [mg/g]
PA 1	0,05 ± 0,02	0,02	0,09
Senecivernin (44)	0,50 ± 0,26	0,09	1,05
Senecionin (7)	0,89 ± 0,53	0,29	2,09
Seneciphyllin (36)	0,32 ± 0,18	0,11	0,73
Spartioidin (45)	0,03 ± 0,03	0,00	0,10
Integerrimin (31)	0,11 ± 0,06	0,04	0,26
PA 2	0,01 ± 0,02	n.n.	0,05
Senkirkin (26)	0,30 ± 0,17	0,09	0,73
Retrorsin (30)	0,07 ± 0,05	n.n.	0,16
Usaramin (55)	0,00 ± 0,00	n.n.	0,01

PA 1 = unbekanntes PA
 PA 2 = unbekanntes PA
 n.n. = nicht nachweisbar

Tab. 7-16 Auflistung und Herkunftsangaben laut Etikett der untersuchten Pollenprodukte. Ebenfalls angegeben der ermittelte PA-Gehalt, berechnet als Retronecin-Äquivalente, aus Vierfachbestimmung nach Heliotrin-Standardisierung.

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	PA-Gehalt [µg/g]
1	Blütenpollen	Spanien	n.n.
2	Blütenpollen naturbelassen	keine Angaben	5,28 ± 0,21
3	Blütenpollen	keine Angaben	1,79 ± 0,18
4	Pollen de Fleurs en pelote	Frankreich	n.n.
5	Pollen en pelotes	Frankreich	n.n.
6	Pollen in synergie	Frankreich	n.n.
7	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
8	Bienenpollen	Spanien	4,64 ± 0,52
9	Blütenpollen	keine Angaben	2,42 ± 0,67
10	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
11	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
12	Blütenpollen	Rumänien	16,35 ± 0,98
13	Blütenpollen	keine Angaben	1,81 ± 0,24
14	Blütenpollen	Spanien	n.n.
15	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
16	Hochland Bio-Blütenpollen	Spanien	n.n.
17	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
18	Blütenpollen	Schweiz	n.n.
19	Blütenpollen	Rumänien	2,44 ± 0,23
20	Blütenpollen	Spanien	n.n.
21	Blütenpollen	Asien	n.n.
22	Blütenpollen	Ungarn	n.n.
23	Blütenpollen	Süd-Ost Europa	n.n.
24	Blütenpollen	Spanien	1,08 ± 0,13
25	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
26	Pollen	Spanien	n.n.
27	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
28	Blütenpollen	keine Angaben	4,46 ± 0,63
29	Blütenpollen	England	n.n.
30	Heidekraut/Erica-Blütenpollen	Frankreich	n.n.
31	Bee Pollen -whole granules-	USA	n.n.
32	Bee Pollen Tablets	USA	n.n.
33	Blütenpollen	Italien	2,38 ± 0,22
34	Pollen en pelotes	Frankreich	2,46 ± 0,15

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	PA-Gehalt [µg/g]
35	Blütenpollen	Österreich	n.n.
36	Polline di Flori	Italien	n.n.
37	Blütenpollen aus der Sierra Morena	Spanien	2,83 ± 0,28
38	Blütenpollen	keine Angaben	1,74 ± 0,26
39	Blütenpollen	Spanien	n.n.
40	Bio-Blütenpollen	keine Angaben	11,65 ± 0,78
41	Bee Pollen Granules	Neuseeland	n.n.
42	Blütenpollen	Deutschland	n.n.
43	Blütenpollen	Spanien	n.n.
44	Blütenpollen	Spanien	n.n.
45	Blütenpollen	Spanien	13,36 ± 0,49
46	Blütenpollen	Spanien	n.n.
47	Blütenpollen	Deutschland	n.n.
48	Blütenpollen	Deutschland	n.n.
49	Blütenpollen	Deutschland	n.n.
50	Blütenpollen	keine Angaben	6,97 ± 0,46
51	Blütenpollen	keine Angaben	n.n.
52	Blütenpollen	Spanien	6,20 ± 0,16
53	Blütenpollen	Spanien	n.n.
54	Blütenpollen	Mexiko / Provinz Michoacan	n.n.
55	Blütenpollen	Mexiko / Provinz Chematal	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Tab. 7-17 Auflistung und Honiggehalte laut Packungsangaben der untersuchten honighaltigen Lebensmittel. Ebenfalls angegeben der ermittelte PA-Gehalt, berechnet als Retro-necin-Äquivalente, aus Dreifachbestimmung nach Heliotrin-Standardisierung.

Nr.	Bezeichnung	Honiggehalt	PA-Gehalt [µg/g]
HL1	Met	mind. 30% ¹⁾	0,012 ± 0,001
HL2	Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL3	Honig - Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL4	Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL5	Honig - Met (lieblich)	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL6	Honig - Met (feinherb)	mind. 30% ¹⁾	0,484 ± 0,019
HL7	Honig - Met (classic)	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL8	Honig - Met - Lindenhonig -	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL9	Honig - Met - Orangenhonig -	mind. 30% ¹⁾	0,083 ± 0,002
HL10	Honig - Met mit feuriger Gewürzmischung	mind. 30% ¹⁾	n.n.

Nr.	Bezeichnung	Honiggehalt	PA-Gehalt [µg/g]
HL11	Honig - Met mit Hanf-Aroma	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL12	Mischgetränk aus Honig - Met und Johannisbeerenwein	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL13	Honig - Met mit Vanilleschote	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL14	Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL15	Met (trocken)	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL16	Tannenhonig Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL17	Waldhonig Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL18	Südfrucht Met	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL19	Met (schwarz)	mind. 30% ¹⁾	n.n.
HL20	gefüllte Kräuter Bonbons mit Vitamin C und Honig	7,00%	0,012 ± 0,001
HL21	Zitronenbonbon mit Honigfüllung	8,60%	n.n.
HL22	Anis-Fenchel-Honig-Bonbon mit flüssiger Honigfüllung	8,60%	n.n.
HL23	BIO Honig Bonbons (gefüllt)	11,60%	n.n.
HL24	Honig-gefüllte Bonbons	11,60%	0,041 ± 0,005
HL25	Honig-Spitzwegerich Bonbons	5,00%	n.n.
HL26	Salbei-Bonbons mit Honigfüllung	6,80%	n.n.
HL27	Honig-Blütenpollen Bonbons	5,00%	n.n.
HL28	gefüllte Milch-Honig Bonbons	5,00%	n.n.
HL29	Halsbonbons (Honig gefüllt)	8,00%	n.n.
HL30	Fenchelhonig	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL31	Fenchelhonig N	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL32	Fenchelhonig S	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL33	Fenchelhonig N	ca. 37% ²⁾	0,032 ± 0,002
HL34	Fenchelhonig S	ca. 37% ²⁾	0,128 ± 0,008
HL35	Fenchelhonig N	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL36	Fenchelhonig AH	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL37	Fenchelhonig SN	ca. 37% ²⁾	n.n.
HL38	Fenchelhonig N	ca. 37% ²⁾	0,010 ± 0,001
HL39	Cola mit Honig	15,00%	n.n.
HL40	Lemon mit Honig	9,60%	n.n.
HL41	Karottensaft mit Honig	3,00%	n.n.
HL42	Karottensaft mit Honig	4,20%	n.n.
HL43	Karottensaft mit Honig	3,00%	n.n.
HL44	Sesam-Honig (Sesamriegel)	42,00%	n.n.
HL45	Sesam Riegel mit Honig	40,00%	n.n.
HL46	Mandel-Honig Riegel	31,00%	n.n.
HL47	Honig-Ingwer-Frucht-Riegel	28,00%	n.n.

Nr.	Bezeichnung	Honiggehalt	PA-Gehalt [µg/g]
HL48	Amaranth Riegel	≥33,00%	n.n.
HL49	Knusper-Ringe mit Honig	4,50%	n.n.
HL50	Dinkel gepufft mit Honig	30,00%	n.n.
HL51	Honig-Bären Gummibonbons	11,00%	n.n.
HL52	Honig Doppel-Bärchen	10,00%	n.n.
HL53	Fruchtige Honig-Bärchen	5,00%	n.n.
HL54	Getreide-Brei (mit Honig)	11,10%	n.n.
HL55	Feiner Milchbrei (mit Honig)	6,60%	n.n.
HL56	Milchbrei Vollkorn-Honig	4,50%	n.n.
HL57	Gelée Royale Plus - Nahrungsergänzung -	keine Angaben	n.n.
HL58	Gelée Royale Kapseln mit Vitamin E	keine Angaben	n.n.
HL59	Aufbau Mix	50,00%	n.n.
HL60	Sanddorn mit Honig	34,00%	n.n.

¹⁾ laut Leitsätzen für weinähnlichen und schaumweinähnliche Getränke

²⁾ laut Annahme nach Kapitel 3.4

n.n. = nicht nachweisbar

Tab. 7-18 Mittels Heliotrin-Standardisierung ermittelte PA-Gehalte, berechnet als Retronecin-Äquivalente, der jeweiligen filtrierten und unfiltrierten Versuchshonige (VSH1-3) nach unterschiedlichen Standzeiten. Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung aus Dreifachbestimmung.

Standzeit	VSH 1		VSH 2		VSH 3	
	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert	unfiltriert	filtriert
1 Tag	0,004 ± 0,003 ¹⁾	n.d.	0,020 ± 0,004	n.d.	0,094 ± 0,004	n.d.
6 Wochen	0,006 ± 0,002 ¹⁾	0,007 ± 0,001 ¹⁾	0,025 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,282 ± 0,008	0,281 ± 0,002
12 Wochen	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,002	0,038 ± 0,001	0,037 ± 0,004	0,322 ± 0,008	0,319 ± 0,010

¹⁾ unterhalb der Bestimmungsgrenze

n.d. = nicht durchgeführt

