

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

Znanstveno mišljenje o pirolizidin alkaloidima u čajevima na tržištu RH

Znanstveni odbor za kemijske opasnosti Hrvatske agencije za hranu

(Zahtjev HAH – Z – 2015 – 4)

Usvojeno 11. veljače 2016.

ČLANOVI ZNANSTVENOG ODBORA

- prof.dr.sc. Jasna Bošnjir, NZZJZ “Dr. Andrija Štampar” – predsjednica Znanstvenog odbora
- prof.dr.sc. Tomislav Klačec, PTF, Osijek – zamjenik predsjednice
- prof.dr.sc. Helga Medić, PBF, Zagreb
- doc.dr.sc. Jelka Pleadin, HVI, Zagreb
- prof.dr.sc. Zdravko Špirić, „Oikon“ d.o.o., Zagreb

KOORDINATOR IZ HAH-a

Leonard Matijević, mag.nutr.

SAŽETAK

Pirolizidin alkaloidi (PA) prirodni su toksini koji nastaju kao sekundarni metaboliti u više od 6000 biljnih vrsta koje spadaju u porodice *Boraginaceae* (oštrolisti), *Compositae* (*Asteraceae*) (glavočika) i *Leguminosae* (*Fabaceae*) (leptirnjače) te se smatraju najrasprostranjenijim prirodnim toksinima. Biljke, kao što su gavez (*Symphytum*), lopuh (*Petasites hybridum L.*) i podbijel (*Tussilago farfara L.*), a koje sadrže PA-ove, od davnina se koriste kao hrana, dodaci prehrani ili u medicinske svrhe (kao ljekovito bilje). Međutim, glavni problem po pitanju ljudskog zdravlja su PA-ovi koji kontaminiraju hranu koja ih prirodno ne sadrži. Najveću ulogu u trovanju hranom ljudi imaju vrste kao što su boražinovke (*Heliotropium*) te krotalarija (*Crotalaria*). One su prisutne kao korov na poljima gdje rastu žitarice i mahunarke te se njihovo sjemenje može slučajno pomiješati s glavnim usjevom prilikom same žetve, a isti problem nastaje i s biljkama koje se koriste kao čajevi. Upravo su čajevi označeni kao prehrambeni proizvod koji bi mogao biti glavni izvor izloženosti ovim kontaminantima.

Kod akutne izloženosti, PA-ovi pri visokim dozama mogu dovesti do zatajenja jetre što može rezultirati i smrtnim ishodom. Međutim, akutna trovanja ljudi su izuzetno rijetka i slabo dokumentirana. Uobičajeni kronični učinak PA-ova uključuje štetno djelovanje na jetru, ali i na pluća. Eksperimenti na životinjama otkrili su kako neki PA-ovi mogu biti genotoksični kancerogeni te imati embriotoksične učinke, iako ne postoje konkretni dokazi o ovim štetnim djelovanjima za ljude.

HAH je u suradnji s njemačkim laboratorijem napravio analizu na 55 uzoraka različitih vrsta čajeva dostupnih na tržištu RH, na ukupno 30 različitih PA-ova. PA-ovi su analizirani koristeći „in – house“ metodu koju je razvio BfR, ali preciznost metode u velikoj mjeri nije postignuta, što je u konačnici dovelo do dodatnih nesigurnosti u procjeni rizika. U 35 % uzoraka kvantificiran je barem jedan PA. Jedan uzorak (čaj od mente) je imao ekstremno visoke koncentracije PA-ova u usporedbi s ostalim uzorcima.

Pregledom literature napravljena je kratka procjena rizika za slučaj konzumacije čaja s ekstremno izmjerenim vrijednostima te je zaključeno da je mogućnost akutnog trovanja zanemariva. Temeljem procjene izloženosti, zaključeno je kako je kod prosječnih konzumenata čajeva u RH rizik od štetnog utjecaja na zdravlje također zanemariv, dok česti konzumenti mogu biti izloženi većem riziku od štetnih posljedica po zdravlje, pogotovo ako konzumiraju proizvode s visokim udjelom PA-ova tijekom dužeg vremenskog perioda.

KLJUČNE RIJEČI

Pirolizidin alkaloidi, čajevi, procjena rizika, MOE pristup

SUMMARY

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are natural toxins produced as secondary metabolite of more than 6000 plant species, belonging to the families of *Boraginaceae*, *Compositae (Asteraceae)* and *Leguminosae (Fabaceae)* and occur world-wide. Plants which contain PAs, such as comfrey (*Symphytum officinale*), *Petasites hybridum L.*) and coltsfoot (*Tussilago farfara L.*) are used as food and as food supplements or for medical purposes (as herbs) from ancient times. However, the main problem in terms of human health are PAs that contaminate food that naturally does not contain them. The plants most commonly reported as being associated with food poisoning in humans are *Heliotropium* (in the family *Boraginaceae*) and *Crotalaria*. These occur as weeds in cereal or legume crops and the seeds are mixed accidentally with the main crop at harvest. The same problem can occur with the plants that are used as teas. Because of that, tea herbs as food products can be major source of exposure to these contaminants.

In acute exposure, PAs in high doses can lead to fatal liver failure. However, acute human poisonings are extremely rare and poorly documented. Common toxic chronic effect of PAs include harmful effects on the liver and the lungs. Tests on experimental animals have found that some PAs can be genotoxic carcinogens and have embryotoxic effects, although there is no concrete evidence of the harmful effects to humans.

Croatian Food Agency (CFA) in cooperation with the German laboratory performed analysis on 55 samples of different types of teas available in Croatia on a total of 30 different PAs. PAs were analysed with „in-house“ method developed by BfR, but precision of the method could not be achieved in great manner, which ultimately led to additional uncertainties in the risk assessment. At least one PA was quantified in 35% of the samples. One tea sample (mint tea) had an extremely high concentration of PAs, compared to other concentrations in other samples.

Based on the available literature, a brief risk assessment was made for case of consumption of tea with extreme concentration and it was concluded that the possibility of an acute toxicity is negligible. Based on the exposure assessment, it was concluded that the risk for average consumers of teas in Croatia is also negligible, while high consumers can be at increased risk of adverse health effects, especially if they consume products with high proportion of PAs over an extended period of time.

KEY WORDS

Pyrrolizidine alkaloids, herb teas, risk assessment, MOE approach

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Znanstvenog odbora na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

SADRŽAJ

SAŽETAK	2
SUMMARY	3
ZAHVALE	4
UVOD	6
PROCJENA RIZIKA.....	7
1. Identifikacija i karakterizacija opasnosti	7
Uvod.....	7
Toksikokinetika pirolizidin alkaloida	9
Akutna toksičnost.....	10
Toksičnost ponavljajućih doza	10
Razvojna i reproduktivna toksičnost	11
Kancerogenost.....	11
Toksičnost i trovanja kod ljudi	12
2. Procjena izloženosti	15
Izvori izloženosti.....	15
Analitička metoda za određivanje pirolizidin alkaloida.....	16
Procjena izloženosti	19
3. Karakterizacija rizika	26
ZAKLJUČCI	29
PREPORUKE	30
LITERATURA (REFERENCE).....	31

UVOD

Pirolizidin alkaloidi (PA) prirodni su toksini koji nastaju kao sekundarni metaboliti u biljkama. U Republici Hrvatskoj (RH), ne provodi se monitoring ovih spojeva niti trenutno postoji laboratorij koji ima mogućnosti za provesti analitičko ispitivanje. O potrebi za ispitivanjem određenih prehrambenih proizvoda biljnog podrijetla na tržištu RH na PA-ove, raspravljalo se na 2. sastanku Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti Hrvatske agencije za hranu (HAH), koji je održan 13. studenog 2014. god. Ministarstvo zdravlja podržalo je provođenje istraživanja koje će se provesti u skladu s preporukom o procjeni rizika od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA; EFSA, 2011). Dogovoreno je da HAH bude nositelj takvog istraživanja u suradnji s nekim od inozemnih laboratorija, a da se inicijalno istraživanje provede na čajevima, kao jednim od proizvoda gdje je moguće očekivati najveće koncentracije PA-ova.

EFSA je u dva navrata radila znanstvena mišljenja o PA-ovima. Prvi puta 2007. godine procjenu rizika za PA-ove u hrani za životinje, a u 2011. su procjenu rizika proširili i na hranu za ljude. Zbog nedovoljno podataka, ograničili su se na med i proizvode od meda. Nedostatni podaci su jedan od glavnih problema kada se govori o PA-ovima jer je provedeno vrlo malo istraživanja te su podaci koji bi se mogli koristiti za adekvatnu i sveobuhvatniju procjenu rizika, malobrojni. Osim EFSA-e, istraživanje PA-ova proveo je i njemački Federalni institut za procjenu rizika (BfR, *njem. Bundesinstitut für Risikobewertung*) koji je svoja istraživanja fokusirao na biljne proizvode te na čijem istraživanju se temelji i ovaj projekt (EFSA, 2007; 2011; BfR, 2013).

Na razini Europske unije (EU) ne postoji zakonski akt koji regulira pitanje PA-ova niti uspostavlja najveće dopuštene koncentracije. Nepoželjne tvari u hrani za životinje su regulirane Direktivom 2002/32/EZ Europskoga parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, no PA-ovi kao takvi nisu u popisu Priloga te Direktive. Međutim, nekoliko biljnih vrsta ili specifičnih biljnih dijelova koji sadržavaju PA-ove, kao što je krotalarija (*Crotalaria*) vrsta, kao i sjeme korova i nemljeveno i nerazdrobljeno voće koje sadrži alkaloidne, glukozide ili ostale toksične supstance, odvojeno ili u kombinaciji, izričito su navedeni na listi nepoželjnih supstanci. Maksimalni sadržaj (relevantan za hranu za životinje s udjelom vlage od 12%) za krotalarija vrste je 100 mg/kg, a za sjeme korova i nerazdrobljeno voće je 3000 mg/kg za svu hranu. Valja napomenuti da ova Direktiva (2002) ne određuje granice za pojedinačne ili grupne PA-ove, nego se referira na sjeme korova i nerazdrobljeno voće koje se može odrediti mikroskopskim pregledom. Međutim, u nekoliko europskih zemalja, na nacionalnoj razini, regulirane su toksične biljke i dijelovi biljaka koji sadržavaju PA-ove (EFSA, 2011).

Analitički podaci dobiveni u ovom istraživanju, dostaviti će se EFSA-i te na taj način pridonijeti zajedničkoj bazi podataka o PA-ovima na razini EU. Ovo Znanstveno izvješće ima za cilj prezentirati prvu procjenu rizika o PA-ovima u RH te samim time pridonijeti bližem razumijevanju problematike koja okružuje ovu vrstu kemijskim spojeva. Također, cilj je i postaviti temelje za sva eventualna buduća istraživanja i donošenje nacionalnog zakonodavstva kojim bi se reguliralo ovo pitanje, otvoriti mogućnost za edukaciju subjekata u poslovanju s hranom, kao i samih konzumenata.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija i karakterizacija opasnosti

Uvod

Riječ „alkaloid“ je prvi počeo koristiti W. Meisner početkom 19. stoljeća za opis prirodnih spojeva koji reagiraju kao baze, tj. alkalno. Alkaloidi su vrlo česti biljni metaboliti, a razvrstani su prema tipičnim strukturalnim karakteristikama (EFSA, 2007).

PA-ovi čine grupu od preko 600 spojeva. Oni su sekundarni metaboliti više od 6000 biljnih vrsta koje spadaju u porodice *Boraginaceae* (oštrolisti), *Compositae (Asteraceae)* (glavočika) i *Leguminosae (Fabaceae)* (leptirnjače) te se smatraju najrasprostranjenijim prirodnim toksinima. Pretpostavlja se da oko 3% svih biljaka s cvjetovima, sadržava barem jedan ili više PA-a, a na njihovu pojavnost utječu i drugi čimbenici poput klimatskih uvjeta te karakteristika tla. Najčešće ih biljke proizvode u svrhu obrane od biljojeda pa je stoga akutna intoksikacija stoke i divljih životinja rijetka jer životinje u pravilu izbjegavaju takve biljke. Osnovni alkaloidi se nakupljaju u sjemenju (gdje mogu biti u koncentracijama i do 5% suhe tvari), a pripadajući *N*-oksidi u zelenim dijelovima biljke (EFSA, 2011).

Biljke, kao što su gavez (*Symphytum*), lopuh (*Petasites hybridum L.*) i podbijel (*Tussilago farfara L.*), a koje sadrže PA-ove, od davnina se koriste kao hrana, dodaci prehrani ili u medicinske svrhe (kao ljekovito bilje). Međutim, glavni problem po pitanju ljudskog zdravlja su PA-ovi koji kontaminiraju hranu koja ih prirodno ne sadrži. Najveću ulogu u trovanju hranom ljudi imaju vrste kao što su boražinovke (*Heliotropium*) te krotalarija (*Crotalaria*). One su prisutne kao korov na poljima gdje rastu žitarice i mahunarke te se njihovo sjemenje može slučajno pomiješati s glavnim usjevom prilikom same žetve. Toksini preživljavaju mljevenje, pečenje i ostale procese prerade. Situacija se često može pogoršati zbog suše i drugih uvjeta povoljnih za rast korova, a na štetu usjeva (EFSA, 2011).

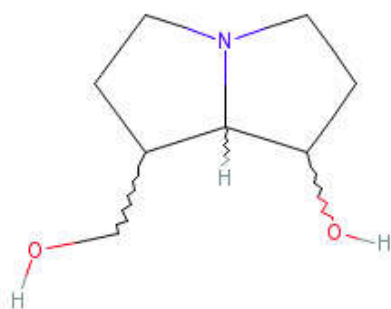
Pčele koje za ispašu koriste biljke koje sadržavaju PA-ove, prenose toksine u med i pelud, a time i dodatke prehrani od peludi. Također, postoje ograničene studije koje govore da se PA-ovi mogu prenijeti u mlijeko životinja i jaja peradi, ako životinja konzumira biljke kontaminirane PA-ovima (Dickinson, 1976; Edgar i Smith, 2000; Eröksüz, 2003; Kempf, 2011).

Fizikalno kemijska svojstva pirolizidin alkaloida

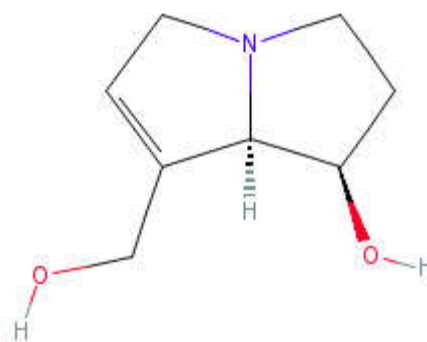
Pojam „pirolizidin“ je kemijski opis dva zbijena peteromembranska prstena s dušikovim atomom na spoju, a ovakva kemijska struktura je karakteristična za razne alkaloidne koji se onda zajedničkim imenom zovu pirolizidin alkaloidi (PA). Osim ovoga, za PA-ove je karakteristično i sljedeće:

- dvostruka veza na 1,2-poziciji pirolizidinskog prstena;
- esterifikacija hidroksimetilne skupine na C-1 u sustavu prstena ili (ako je prisutna) hidroksilne skupine na C-7;
- račvanje alkilne strane lanca na barem jednoj od esterificiranih karboksilnih kiselina.

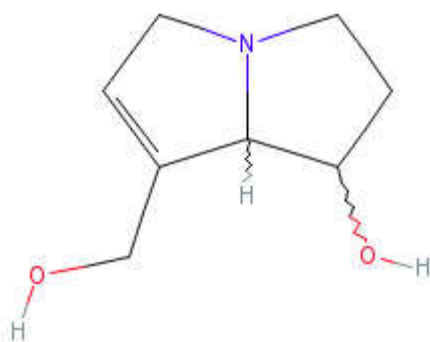
PA-ovi su dakle heterociklički spojevi i većina njih je derivirana iz 4 necinske baze: platinecin, retronecin, heliotridin i otonecin (**Slike 1-4**). Retronecin i heliotridin su enantiomeri na C-7 atomu. Većina PA-ova koji se pojavljuju u prirodi su esferificirani necini ili alkaloid *N*-oksidi (izuzev alkaloida tipa otonecin), a neesterificirani PA-ovi se rijetko mogu pronaći u biljkama. Esteri se mogu podijeliti u monoestere, ne-makrocikličke diestere i makrociklične diestere necinskih baza. 1,2-nezasićeni PA-ovi, u koje se ubrajaju tipovi retronecin, heliotridin i otonecin, a koji su esterificirani s barem jednom granom C₅-karboksilne kiseline, mogu se metabolizirati u jetri u reaktivne metabolite, tzv. pirolizine te tako ispoljavati hepatotoksične, kancerogene ili mutagene učinke. Općenito se smatra da je učinak estera hidroksimetilne skupine na C-1 (mono-ester) pojačan ako je sekundarna OH skupina prisutna na poziciji C-7 necina. Nadalje, vjeruje se da se učinak dodatno može pojačati ako je OH skupina također esterificirana (diester). Najjača toksičnost i kancerogeni učinak povezani su s cikličkim diesterima. Uz iznimku otonecin tipa, biljke koje se mogu naći u čajevima obično sadržavaju kombinaciju slobodnih nezasićenih PA-ova s njihovim *N*-oksidima (tzv. PANO-oblik) (EFSA, 2011, BfR 2013).



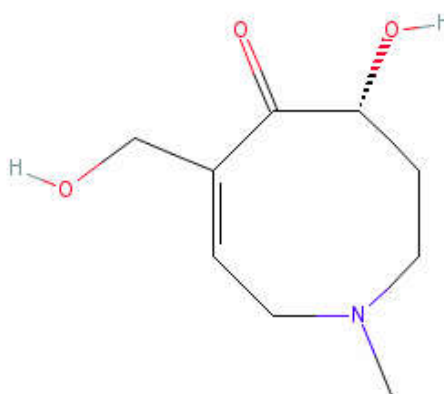
Slika 1: Platinecin



Slika 2: Retronecin



Slika 3: Heliotridin



Slika 4: Otonecin

Nekoliko je razloga velike raznolikosti ove skupine spojeva (preko 600 različitih, trenutno poznatih struktura). Naime, može doći do velikog broja kombinacija koje mogu nastati spajanjem necinskih baza s još većom skupinom necinskih kiselina, moguće je formiranje monoestera na različitim pozicijama (npr. na C-7 ili C-9 atomima) te otvorenih ili cikličkih diestera, a povrh svega toga, mnogi PA-ovi često se mogu pronaći u 2 oblika; kao *N*-oksid (PANO) i kao tercijarna baza PA-ova (EFSA 2011).

PANO-ovi su nabijene molekule koje su do određenog stupnja topljive u vodi, ali također i u polarnim organskim otapalima kao što su metanol ili acetonitril. Tercijarni PA-ovi su topivi u polarnim otapalima kao što je metanol, ali i u više lipofilnim otapalima kao što je diklormetan. Pri niskim pH-vrijednostima, tercijarni PA-ovi se protoniraju na dušikovom atomu te su do određenog stupnja topivi u vodi (EFSA 2011).

Što se tiče stabilnosti, struktura PA-ova i količina se mogu promijeniti tijekom analitičkog procesa. Priprema uzorka koja uključuje toplinsku obradu može utjecati na tercijarni PA/PANO omjer te ukupni sadržaj PA-ova u uzorku. *N*-oksidacija PA-ova je reakcija katalizirana enzimima, dok se redukcija PANO-ova događa spontano uz prisutnost kemijskih ili bioloških reducirajućih agensa. Međutim, tercijarni PA-ovi i PANO-ovi su svejedno prisutni u lipofiliziranim biljnim materijalima nakon skladištenja u tamnim i suhim uvjetima. S druge strane, zabilježena je potpuna biodegradacija PA-ova u silaži ili u uvjetima u kojima nastaje kompost. Esteri PA-ova mogu se hidrolizirati u vodenim otopinama pri pH-vrijednostima iznad 9. Da bi se izbjegla hidroliza, najčešće se amonijak koristi za podizanje pH-vrijednosti u većini opisanih postupaka ekstrakcije. Pri blago kiselim uvjetima, većina PA-ova je stabilna, iako je epoksidna funkcionalnost, prisutna u nekim PA-ovima, osjetljiva na halogene kiseline (EFSA 2011).

Toksikokinetika pirolizidin alkaloida

U pokusima na životinjama, 1,2-nezasićeni PA-ovi, uključujući ridelin, brzo se apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu te se dalje distribuiraju u organizmu. Uneseni oralnim putem, PA-ovi najveću koncentraciju u plazmi dostižu unutar jednog sata, a smatra se da je oralna apsorpcija 20 do 50 puta veća od dermalne. Studije s nekoliko radiomarkiranih PA-ova pokazale su distribuciju prvenstveno u crvenih krvnim stanicama, jetri, bubrezima, plućima i plazmi, dok je uočeno da se niske razine mogu prenijeti i u mlijeko. Vežanje za biološke makromolekule je uočeno i u *in vitro* i u *in vivo* studijama. Nadalje, studije na štakorima, pokazale su da postoje razlike u metabolizmu PA-ova, kako između spolova, tako i između pojedinih vrsta (mužjaci su nešto osjetljiviji na toksičnost PA-ova) (Wang i sur., 2011; Williams i sur., 2002).

PA-ovi se uglavnom metaboliziraju u jetri. Općenito, određena su tri glavna metabolička puta za PA-ove, koja dovode ili do njihove detoksifikacije ili do stvaranja reaktivnih pirolskih vrsta; (\pm)6,7-dihidro-7-hidroksi-1-hidroksimetil-5H-pirolizina (DHP) te ostalih srodnih estera (**Slika 5**). Potonji se smatraju kao najaktivnije vrste odgovorne za toksičnost 1,2-nezasićenih PA-ova putem njihovog potencijala da se ponašaju kao alkilacijski agensi prema proteinima i DNA. PA-ovi se metaboliziraju u

pirolske derivate pomoću hidrolize, *N*-oksidacije i dehidrogenacije pirolizidinskog prstena. Za necinske kiseline, otpuštene tijekom hidrolize, smatra se da nemaju toksikološki značaj. Svaki *N*-oksid metabolit, koji se formira, vrlo je topiv u vodi i ekstremno brzo se izlučuje iz organizma putem urina. Stoga se ovaj metabolički put smatra putem detoksifikacije. Pretvorba nerascijepljenih estera na toksične pirolske estere u jetri, zbog različite funkcionalnosti oksidaza, međutim, stvara toksičnu reakciju. Piroli ovog tipa su visoko reaktivni alkilacijski agensi koji mogu, kao što je već rečeno, reagirati s nukleofilnim skupinama nukleinskih kiselina i proteina te tvoriti aduktove pa se smatraju aktivnim metabolitima koji su nositelji hepatotoksičnih, hepatokancerogenih i mutagenih učinaka PA-ova (EFSA, 2011; BfR, 2013).

Ravnoteža između puteva detoksifikacije/aktivacije je vjerojatni uzrok različite osjetljivosti na 1,2-nezasićene PA-ove koja je uočena među vrstama, rodovima i spolovima. Konkretno, *in vitro* studije na hepatičkim mikrosomima ukazuju da su ljudi među osjetljivijim vrstama na ovaj tip PA-ova. Slične studije na domaćim životinjama također ukazuju na značajne razlike među vrstama, po pitanju metaboličkih puteva. Međutim, *in vitro* studije u kojima se odvija metabolizam ridelina do DHP-a i ridelin-*N*-oksida, a slično je i s nekim drugim PA-ovima, uz prisutnost ljudskih jetrenih mikrosoma u usporedbi s jetrenim mikrosomima štakora, ukazuju da studije na štakorima o kancerogenim svojstvima PA-ova, mogu biti bitne i za ljude (Fu i sur., 2007; Xia i sur., 2006; Wang i sur., 2006).

Akutna toksičnost

Po pitanju akutne toksičnosti, jetra i pluća su najizloženiji organi laboratorijskih životinja na 1,2-nezasićene PA-ove. U studijama u kojima je određivan LD₅₀, laboratorijske životinje su bile izložene PA-ovima intraperitonealno i intravenozno. Ispitivana je letalna toksičnost desetak različitih tipova PA-ova te su uočene različite razine toksičnosti, zavisno o tipu, a zaključeno je da veliki makrociklički diesteri (npr. retrorzin ili senecionin) imaju jaču snagu u odnosu na monoestere (npr. heliotrin; EFSA 2011). U novijoj studiji, Wang i sur. (2011) uspoređivali su akutnu oralnu toksičnost senecionina i adonifolina u miševa te zaključili da je senecionin približno tri puta toksičniji od adonifolina. Ova razlika u toksičnosti je povezana s različitim toksikokinetičkim profilima ova dva alkaloida. Osim različite toksičnosti prema tipu PA-a, kako je već rečeno, uočena je različita toksičnost i prema vrstama životinja, odnosno osjetljivost pojedine vrste, a koja je povezana s jetrenim razinama formiranih pirola, što ukazuje da je niža metabolička aktivacija vjerojatno odgovorna za veću otpornost na akutnu toksičnost retrorzina kod nekih vrsta. WHO je 1988. god. zaključio da su štetni učinci PA-ova na jetru podjednaki ako su rezultat jedne doze (koja nije akutno smrtonosna) ili više manjih doza.

Toksičnost ponavljajućih doza

Postoji malo studija koje su ispitivale toksičnost s obzirom na ponavljajuće doze. One su otkrile da 1,2-nezasićeni PA-ovi na laboratorijskim životinjama najčešće uzrokuju hepatotoksičnost, koju karakterizira megalocitoza te ponekad centrilobularna nekroza, fibroza i hiperplazija žučovoda.

Plućna toksičnost je također ponekad uočena kod 1,2-nezasićenih PA-ova (monokrotalin i fulvin označeni kao najrizičniji). Strukturni zahtjevi za toksičnost u plućima su jednaki kao i oni za toksičnost u jetri, a uzrokuju ju metaboliti proizvedeni u hepatocitima. Plućna toksičnost se očituje kao plućna hipertenzija te može dovesti do hipertrofije desnog ventrikula (EFSA, 2011).

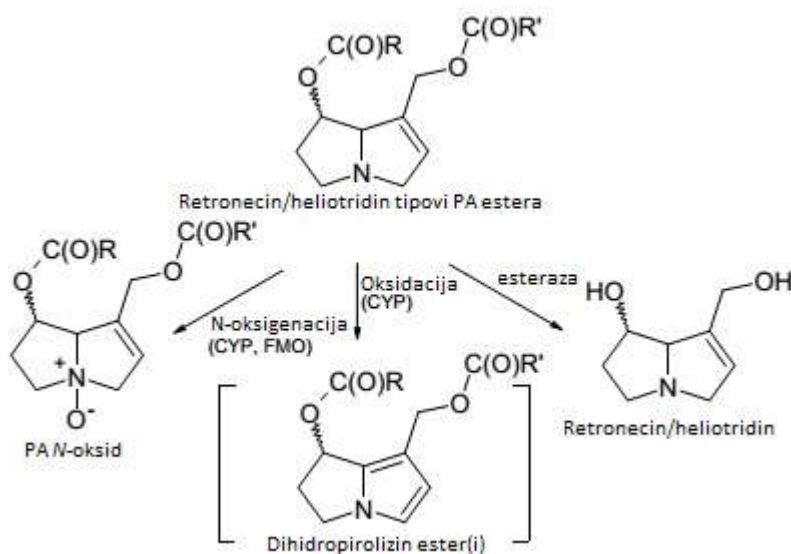
Razvojna i reproduktivna toksičnost

Što se tiče razvojne i reproduktivne toksičnosti, neke ranije studije ukazuju na hepatotoksičnost i uginuća štakora koji su sisali mlijeko majki koje su bile oralno ili intraperitonealno izložene određenim tipovima PA-ov (Schoental, 1959). Nadalje, studije na skotnim štakoricama, kojima se intraperitonealno davao heliotrin, pokazale su fetalne malformacije koje su uključivale retardaciju, mišićno-koštane defekte, rascjep nepca te pri visokim dozama (oko 300 mg/kg majčine t. m.) prestanak rasta, nezrele fetuse i intrauterina uginuća. Što se tiče podataka o razvojnoj i reproduktivnoj toksičnosti na ljude, podaci su rijetki te nema uvida u ovu kategoriju učinaka (Green i Christie, 1961).

Kancerogenost

Mehanizam odgovoran za kancerogene učinke (direktne ili indirektne učinke na DNA) još uvijek nije do kraja poznat. Činjenica da PA-ovi također uzrokuju ekstrahepatične lezije, povezana je s hidrolizom pirolskih estera, koji stvaraju pirolske alkohole kao što je DHP, a koji je toksičan za reproduktivni sustav te kancerogen. Ovi spojevi imaju kraći poluživot te su bolje topljivi u vodi, nego pirolski esteri, što u konačnici znači da se lakše distribuiraju u organizmu (BfR, 2013).

Provođene su opsežne *in vitro* i *in vivo* studije o genotoksičnosti PA-ova. S razvojem naprednih analitičkih metodologija, koje su omogućile detaljno proučavanje mehanizma djelovanja, došlo se do zaključka da je metabolička aktivacija PA-ova u pirolske estere te posljedično stvaranje DNA adukta ključni metabolički put koji dovodi do genotoksičnih učinaka (**Slika 5**; EFSA, 2011). Jedna *in vitro* studija je ukazala na cijepanje DNA lanca pod utjecajem isatidin i monokrotalin tipova PA-ova (Silva-Neto i sur., 2010). Pozitivni rezultati neplanske DNA sinteze su pronađeni za retrorzin, ridelin, senecionin i senecifilin. Nadalje, pokazalo se da PA-ovi uzrokuju štetu na kromosomima, a mutagenost PA-ova se jasno dokazala na bakterijskim stanicama (EFSA, 2011).



Slika 5: Glavni metaboliti PA-ova bitni za određivanje u svrhu toksikokinetike (napomena: ester(i) PA-ova i metabolita sastoje se ili od monoestera na 7. poziciji ili diestera na 7. i 9. poziciji) (EFSA, 2011)

Ciljna mjesta gdje dolazi do očitovanja kancerogenosti djelovanjem PA-ova su najčešće jetra, iako su tumori zabilježeni i na mnogim drugim mjestima poput pluća, bubrega, kože, mokraćnog mjehura, mozga i leđne moždine, gušterače i nadbubrežne žlijezde (EFSA, 2011). Neki tipovi PA-ova (lasioskarpin, monokrotalin i ridelin) su svrstani u kategoriju 2B (moguće kancerogeni spojevi za ljude) prema IARC klasifikaciji kancerogenih spojeva, dok su retrorzin, senecifilin, senkirkin i jakobin svrstani u skupinu 3 (nije ga moguće klasificirati prema kancerogenosti na ljude) (IARC, n.d.).

Toksičnost i trovanja kod ljudi

Dostupni su različiti podaci o toksikologiji nezasićenih PA-ova, a koji se temelje na zdravstvenim problemima kod ljudi, promatrani diljem svijeta, nastalih zbog konzumacije biljnih vrsta koje su sadržavale ove PA-ove. Bolesti jetre, sa smrtnim slučajevima, od kojih su neki epidemijskih razmjera, zabilježeni su u Pakistanu, Indiji i Afganistanu, uslijed konzumacije žitarica kontaminiranih sa sjemenom boražinovke ili krotalarija vrste. Također, zabilježeni su slučajevi endemskog trovanja na Jamajci od tzv. „bush“ čajeva koji su sadržavali dijelove krotalarije i glavočike. Toksični učinci nezasićenih PA-ova konzumiranih u velikim dozama tijekom kratkog vremenskog perioda, kod ljudi se prvenstveno očituju u jetri u obliku venookluzivnih promjena (venookluzivna bolest, VOD). Znakovi toksičnosti često nisu zabilježeni odmah, nego nakon nekoliko dana od izloženosti, što znači da je često teško utvrditi izvor trovanja. Početni klinički znakovi akutne i subakutne intoksikacije su intenzivnija bol u gornjem dijelu trbušne šupljine, brzo nakupljanje vode u peritonealnoj šupljini s oticanjem trbuha te katkad smanjena proizvodnja mokraće i oticanje nogu. Prateći sindromi mogu biti mučnina i povraćanje te rjeđe žutica i visoka temperatura. Povećanje i stvrdnjavanje jetre se obično uoči nakon nekoliko tjedana, često u kombinaciji s velikim pleuralnim izljevom. Izuzev VOD-a, neki

PA-ovi (npr. monokrotalin), kao što je već rečeno, pokazuju znakove plućne toksičnosti u vidu pulmoralne arterijske hipertenzije (BfR, 2013).

Akutni oblik bolesti ima visok stupanj smrtnosti, kada smrt može nastupiti unutar 2 tjedna ili do nakon 2 godine od izloženosti. Potpuni oporavak od hepatičnog VOD-a je moguć. Kronični oblik bolesti se može razviti među preživjelima od akutnog oblika VOD-a ili uslijed dugotrajne izloženosti manjim količinama nezasićenih PA-ova te na kraju rezultirati s cirozom jetre. Uočeno je da su djeca osjetljivija od odraslih, što potvrđuju i neke studije na štakorima (Mattock, 1986; NIH, 2003).

Kada se govori o trovanju ljudi, temeljem opisa slučaja trovanja koji su nastali namjernim ili slučajnim unosom biljaka koje sadrže PA-ove, podaci su rijetki. Stoga su jedino mogući ograničeni zaključci o dozama nezasićenih PA-ova koje mogu dovesti do toksičnosti kod ljudi uslijed kratkotrajne ili dugotrajne izloženosti. Po pitanju akutnih toksičnih doza, samo su dva slučaja opisana u literaturi, a koja sadržavaju precizne detalje oko doza koje se odnose na trovanje tijekom kratkotrajne izloženosti (4 do 14 dana). U ovim slučajevima se radilo o bebama starima 2 i 6 mjeseci, koje su konzumirale biljni čaj od vrste *Senecio longilobus* (jedna od vrsta glavočika, karakteristična za Sjevernu Ameriku). Kod jedne bebe je došlo do nakupljanja vode u peritonealnoj šupljini (što je dovelo do oticanja) te pleuralnog izljeva, popraćenog s fibrozom jetre nakon 2 mjeseca te u konačnici cirozom jetre nakon 6 mjeseci. Druga beba je patila od hematemeze (povraćanja krvi), razvijene žutice s naglašenom hepatomegalijom (povećanjem jetre), dolazilo je do pojave grčeva u središnjem živčanom sustavu, bradikardije (smanjenja otkucaja srca) te poremećaja u radu pluća (apnea), a sve je kulminiralo sa smrtnim ishodom nakon 6 dana. Gledajući suhu tvar, konzumirani čajevi su sadržavali 0.3 % PA-ova (najviše ridelina) te 1 % *N*-oksida (najviše od retrorzina te nešto manje od senecifilina i senecionina) u prvom slučaju, a u drugom 0.5 % PA-ova te 1 % *N*-oksida. Na osnovu rezultata analiza te rasporeda konzumacije, izračunato je da je prva beba unijela ukupno oko 70 do 147 mg PA-ova, što je ekvivalent 12 do 25 mg/kg t. m. tijekom perioda od 2 tjedna (jer je beba težila 6 kg), dok je druga beba unijela ukupno 66 mg, što je ekvivalent 12 mg/kg t. m. PA-ova unutar perioda od 4 dana (beba je težila 5,5 kg). Dalje preračunato, ove doze mješavine PA-ova (s glavnim komponentama ridelinom i retrorzin-*N*-oksidom) odgovaraju dnevnim dozama od 0.8 do 1.7 mg/kg t. m. za prvi te dnevnoj dozi od 3 mg/kg t. m. za drugi slučaj (BfR, 2013; Huxtable, 1980; Stillman i sur., 1977).

Vezano za toksične doze uslijed srednje i dugotrajne izloženosti, literatura opisuje slučaj VOD-a uslijed 4-mjesečne konzumacije pripravka s listovima gaveza (bez detalja o točnoj vrsti) koji su sadržavali do 0,27 g alkaloida/kg. Izuzev toga, biljni čajevi s PA-ovima konzumirali su se tijekom dužeg vremenskog perioda. Autori su procijenili da se doza od 15 µg alkaloida/kg t. m./dan konzumirala tijekom 6 mjeseci (glavni alkaloid je bio ehimidin). Ova pretpostavka se temelji na mnogo nesigurnosti, pošto je konzument bio izložen PA-ovima iz više različitih izvora (BfR, 2013; Ridker i sur., 1985). Nadalje, 4 slučaja VOD-a, uz jedan smrtni ishod, zabilježeni su kod konzumenata koji su konzumirali biljne čajeve od boražinovke (*Heliotropium lasiocarpum*) tijekom perioda od 19 do 46 dana. Procijenjeno je da su se konzumirale dnevne doze od 0.49 do 0.71 mg PA-ova (prvenstveno heliotrina)/kg t. m. tijekom tog perioda (Culvenor i sur., 1986). Još dva slučaja VOD-a su zabilježena gdje se tijekom 20 do 50 dana konzumirala boražinovka (*Heliotropium eichwaldii*) u medicinske svrhe

te je procijenjena izloženost bila oko 3.3 mg PA-ova (heliotrina)/kg t. m./dan (Datta i sur., 1978). U čestim slučajevima VOD-a u Afganistanu i Indiji uslijed konzumacije žitarica kontaminiranih sa sjemenjem koje sadrži PA-ove, procijenjeno je da je dnevna doza od 0.033 ili 0.66 mg PA-ova/kg t. m./dan bila konzumirana tijekom perioda od 2 do 6 mjeseci, a pretpostavlja se da su glavni alkaloidi bili heliotrin ili krotananin i krotaburmin (Krishnamurthi i sur., 2013; Mohabbat i sur., 1976; Tandon i sur., 1976).

2. Procjena izloženosti

Izvori izloženosti

Kao što je već rečeno, PA-ovi su vjerojatno najrasprostranjenija vrsta prirodnih toksina koja utječe na divlje i domaće životinje te čovjeka. Smatra se da preko 6000 biljnih vrsta sadrži PA-ove, iako se čini da su izravna trovanja ljudi i životinja povezana samo s nekoliko vrsta. PA-ovi su isključivo biljnog podrijetla što znači da bilo koja hrana ili hrana za životinje, koja sadrži (dijelove) biljaka s PA-ovima, sama po sebi će također sadržavati PA-ove. Opće pravilo vrijedi da što je hrana tijekom svog puta „od polja do stola“ više u kontaktu s biljkama koje sadrže PA-ove, veća će biti razina PA-ova u krajnjem proizvodu. Stoga, najveće razine PA-ova je moguće pronaći u biljkama ili mješavini bilja koje sadržavaju PA-ove, a koje se konzumiraju kao lijekovi na bazi bilja, dodaci prehrani, salate koje su slučajno kontaminirane s biljkama ili sjemenjem koje sadrži PA-ove (EFSA, 2011).

Premda rijetki, slučajevi izravnog trovanja ljudi su dobro dokumentirani te se najčešće odnose na konzumaciju žitarica i proizvoda od žitarica (brašno ili kruh) koji su kontaminirani sa sjemenjem različitih vrsta korova koji sadržavaju ove alkaloidne. Ovi rijetki slučajevi često se pojavljuju kao „izbijanja“ nakon sušnog perioda koje ide u prilog razvoju korova u primarnom usjevu. Predloženo je da se intoksikacija može dogoditi kao rezultat konzumacije mlijeka životinja koje konzumiraju hranu s PA-ovima, ali su količine PA-ova, koje se izlučuju u mlijeko, niske. Konzumacija meda od pčela koje su se hranile toksičnim biljnim vrstama, također se smatrala mogućim putem izloženosti, ali i ovdje su promatrane razine niske te nije bilo zabilježenih slučajeva intoksikacije. Isto vrijedi i za jaja. Namjerno korištenje toksičnih biljnih vrsta kao biljnih čajeva ili u tradicionalnoj medicini, predstavlja još jedan put moguće izloženosti te su slučajevi intoksikacije dobro dokumentirani i zna se da su imali smrtnu ishodu (EFSA 2007; 2011; BfR, 2013).

Domaće životinje, posebice stoka, ovce, koze, konji, perad i svinje podložne su trovanju, s visokom stopom smrtnosti, dok su manje životinje, kao što su zečevi, manje podložni. Postoje i izvještaji o intoksikaciji riba. Pojava otrovanja kod domaćih životinja uzrokuju ozbiljne ekonomske gubitke za farmere i seoske zajednice, a uvijek postoji i opasnost od mogućeg prijenosa toksina na ljude (EFSA, 2007).

Poznato je preko 600 različitih PA-ova, a ta brojka neprestano raste. Također je poznato da su prisutni u preko 6000 različitih biljnih vrsta gdje glavni izvor predstavljaju porodice *Boraginaceae* (oštrolisti, sve vrste), *Asteraceae* (glavočika, od toga rodovi *Senecioneae* i *Eupatoriae*) te *Fabaceae* (leptirnjače, od toga rod *Crotalaria*). Neke biljne vrste mogu sadržavati nekoliko različitih PA-ova, a isto tako, neki PA-ovi su karakteristični za nekoliko biljnih vrsta. Toksini su obično koncentrirani u sjemenju te cvjetnim dijelovima bilja, dok su manje količine moguće u lišću, stabljici i korijenu. Većina biljaka proizvodi mješavinu PA-ova u različitim koncentracijama koje se kreću od manje od 0,001% do 5% u određenim biljnim sjemenkama. Neke biljke koje sadržavaju PA-ove, koriste se kao biljke za pokrov tla, poboljšanje kvalitete tla (leptirnjače), ukrasne biljke te za ishranu životinja. Neke, posebice one iz porodice oštrolista su cijenjene zbog kvalitete meda koji se dobiva od njih (EFSA 2007; 2011; BfR, 2013).

Izuzev korištenja biljnih čajeva i biljaka za medicinske svrhe, biljke koje su najčešće povezane s trovanjem hranom kod ljudi su *Heliotropium* (boražinovke) iz porodice oštrolista te krotalarija (*Crotalaria*). One se pojavljuju kao korov u usjevima žitarica i mahunarki te može doći do slučajnog miješanja sjemenja s glavnim usjevom prilikom same žetve. Toksini preživljavaju mljevenje, pečenje i ostale procese prerade. Izbijanje epidemije veno-okluzivne bolesti te drugih poremećaja rada jetre bili su zabilježeni u dijelovima središnje Azije, Afganistana i Indije (EFSA 2007; 2011; BfR, 2013).

Trovanje životinja je zabilježeno iz svih prethodno spomenutih izvora, s dobro poznatim izbijanjima epidemija povezanih s boražinovkama, trihodermama, *Senecio* i krotalarija vrstama. Općenito, životinje na ispaši će izbjegavati biljke koje sadrže PA-ove, ali naravno, u uvjetima suše i ograničenih pašnjaka, može doći i do konzumacije toksičnih biljaka. Ako se za proizvodnju sijena i silaže koriste usjevi kontaminirani korovom, životinje više neće biti u stanju razabrati toksičnu hranu od netoksične zato što toksini preživljavaju uvjete skladištenja te su u potpunosti izmiješani s krmnim biljem. U takvim slučajevima, zabilježena smrtnost je vrlo visoka (EFSA 2011).

Analitička metoda za određivanje pirolizidin alkaloida

Analitička metoda za određivanje PA-ova u čajevima razvijena je i validirana „in - house“ pri Saveznom institutu za procjenu rizika (BfR) kao dio istraživačkog projekta (BfR, 2014). Kako u RH trenutno ne postoji laboratorij koji se bavi analizama pirolizidin alkaloida, Hrvatska agencija za hranu je ponude za suradnju poslala njemačkim laboratorijima koji rade prema ovoj BfR-ovoj metodi. Sama metoda, odnosno određivanje PA-ova se temelji na sljedećem postupku: uzorak biljnog materijala se dvostruko obrađuje ultrazvukom u vodenoj otopini sulfatne kiseline radi ekstrakcije PA-ova. Nakon centrifugiranja, alikvot supernatanta se pročišćava ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) pomoću reverzne faze C18 materijala. PA-ovi se oslobađaju s patrone pomoću metanola. Nakon toga, eluat se upari do suhe tvari i rekonstruira u metanolu/vodi (početni HPLC uvjeti). Za kromatografsko odvajanje, koristi se RP-HPLC kolona s binarnim gradijentom. Analiti se određuju pomoću trostruke kvadrupolne masene spektrometrije. Kvantifikacija PA-ova se postiže pomoću kalibracije koja odgovara matriksu.

Analitiku je proveo Quality Services International GmbH-a (*qs*) laboratorij iz Bremena. Ukupno je analizirano 55 uzoraka na 30 različitih PA-ova. Uzorci čajeva su kupljeni u slobodnoj prodaji u velikim trgovačkim lancima, a odabir vrste i količina se temeljio na podacima o prehranbenim navikama odrasle populacije RH (HAH) (**Tablica 1**). U suradnji sa Zavodom za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, uzorci su odvagani, upakirani u papirnate vrećice te poslani za Njemačku.

Tablica 1: Vrsta čajeva¹ i broj uzoraka

Vrsta čaja	Broj uzoraka
Šipak	15
Zeleni čaj	12
Kamilica	11
Menta	6
Šumsko voće	4
Marellica	3
Brusnica	2
Crni čaj	2
UKUPNO:	55

Za 28 PA-ova postoji opis metode od strane BfR-a, a dodatna dva PA-a je *qsi* - laboratorij dodao (ridelin i ridelin-N-oksidi) jer su u međuvremenu i za njih sintetizirani standardi. Što se tiče postignutih LOD i LOQ vrijednosti, kao što je vidljivo u **Tablici 2**, one su u pravilu nekoliko puta veće od onih koje je postigao BfR (za erucifolin je čak 26 veći). Iz laboratorija su pojasnili da su ovako visoke LOQ vrijednosti rezultat primjene određenog postupka pripreme uzorka, odnosno korištenja metode koja je manje precizna od one koja se koristila u BfR-ovom istraživanju. Ovako visoke LOD i LOQ vrijednosti znače i visok stupanj nesigurnosti.

Tablica 2: Usporedba postignutih LOD i LOQ vrijednosti BfR-a i Quality Services International GmbH-a (*qsi*)

Analit	LOD (BfR)	LOD (qsi)	LOQ (BfR)	LOQ (qsi)
Echimidine	0,8	3,1	2,6	10
Echimidine-N-oxide	1,9	3,1	6,1	10
Erucifoline	0,6	15,6	1,9	50
Erucifoline-N-oxide	1,2	6,3	3,8	20
Heliotrine	0,5	3,1	1,7	10
Heliotrine-N-oxide	0,6	3,1	2,0	10
Lycopsamine	2,0	3,1	6,4	10
Lycopsamine-N-oxide	1,5	3,1	4,9	10
Europine	0,7	3,1	2,1	10
Europine-N-oxide	0,7	3,1	2,3	10
Intermedine	1,0	3,1	3,1	10
7-acetylintermedine	1,2	3,1	3,8	10
Jacobine	1,3	15,6	4,0	50

¹ Pravilno bi bilo pod pojmom „čajevi“ označavati samo zeleni i crni čaj, dok bi svi ostali trebali biti biljni i voćni čajevi. Međutim, radi jednostavnosti, sve vrste su u ovom dokumentu označene pod pojmom „čaj“.

Jacobine-N-oxide	1,3	6,3	4,2	20
Senecionine	1,8	6,3	5,9	20
Senecionine-N-oxide	0,9	3,1	2,9	10
Seneci(o)phylline	1,3	6,3	4,0	20
Seneciphylline-N-oxide	0,9	3,1	2,7	10
Senecivernine	1,7	6,3	5,3	20
Senecivernine-N-oxide	0,8	6,3	2,6	20
Senkirkine	0,8	3,1	2,4	10
Monocrotaline	0,9	6,3	2,8	20
Monocrotaline-N-oxide	1,7	6,3	5,4	20
Lasiocarpine	0,8	3,1	2,4	10
Lasiocarpine-N-oxide	0,9	3,1	2,8	10
Retrorsine	0,8	6,3	2,7	20
Retrorsine-N-oxide	1,4	6,3	4,6	20
Riddelliine		15,6		50
Riddelliine-N-oxide		6,3		20
Trichodesmine	1,0	3,1	3,1	10

Tablica 3: Broj i postotak uzoraka prema vrsti čajeva kod kojih je kvantificiran barem jedan PA

Vrsta čaja	Broj uzoraka > LOQ-a	% uzoraka > LOQ-a
Šipak	0	0
Zeleni čaj	6	50
Kamilica	8	73
Menta	3	50
Šumsko voće	0	0
Marelica	0	0
Brusnica	1	50
Crni čaj	1	50
UKUPNO:	19	35

Procjena izloženosti

Procjena izloženosti se temeljila na koncentracijama PA-ova u svim vrstama čajeva koji su ispitivani (**Tablica 5**) te podacima o konzumaciji (**Tablica 8**). Sve brojčane vrijednosti se odnose na suhu tvar, a ne gotovi napitak. Kako su podaci o prehranbenim navikama, tj. konzumaciji čajeva, uključivali podatke o gotovom čaju [ml], iste je bilo potrebno preračunati na suhu tvar koristeći posebnu formulu i određene pretpostavke, po uzoru na BfR-ovu procjenu rizika (BfR, 2013). Naime, pretpostavilo se da jedna filter vrećica čaja sadrži 2 g suhog lišća, odnosno da je potrebno 2 g suhog lišća za pripravku 200 ml napitka. Također je pretpostavljeno da 100 % PA-ova migrira iz lišća u tekućinu. Važno je za napomenuti kako ne postoje znanstvene studije koje govore u prilog tome da zaista 100 % PA-ova migrira u okolni tekući medij (vrelu vodu) te ovakva pretpostavka povlači za sobom određenu razinu nesigurnosti.

Procjena izloženosti se računala za odraslu populaciju od 18 do 64 godine starosti jer za ovaj dio populacije postoji studija o prehranbenim navikama. Konzumacija se odnosi na čajeve općenito, a ne na svaku vrstu posebno zbog malog broja podataka, odnosno zabilježenih konzumenata. Za izračun izloženosti koncentracijama PA-ova po kg tjelesne mase konzumenta, korištena je individualna tjelesna masa svakog ispitanika. Iskazane vrijednosti koncentracija PA-ova se odnose na zbroj svih 30 ispitivanih pojedinačnih PA-ova. Četiri različita scenarija za svaku vrstu čaja se odnose na metode izračuna, kako je to objašnjeno u pojašnjenju **Tablice 4 i 5**.

Tablica 4: Koncentracije PA-ova prema vrstama čajeva [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

Vrsta čaja	Metoda izračuna	Broj uzoraka	Min	Srednja vrijednost	Medijan	Max
Šipak	1. scenarij ¹	15	0	0	0	0
	2. scenarij ²	15	165,7	165,7	165,7	165,7
	3. scenarij ³	15	265	265	265	265
	4. scenarij ⁴	15	530	530	530	530
Zeleni čaj	1. scenarij ¹	12	0	73	9,5	320
	2. scenarij ²	12	165,7	233,8	173,7	476,4
	3. scenarij ³	12	265	329,5	272	570
	4. scenarij ⁴	12	530	588,5	534,5	820
Kamilica	1. scenarij ¹	11	0	69,5	13	310
	2. scenarij ²	11	165,7	229,8	175,6	463,3
	3. scenarij ³	11	265	325,82	273	555
	4. scenarij ⁴	11	530	582,2	533	800
Menta	1. scenarij ¹	6	0	3 493,7	45	20 633
	2. scenarij ²	6	165,7	3 649,5	206,1	20 773,9
	3. scenarij ³	6	265	3 742,8	302,5	20 858
	4. scenarij ⁴	6	530	3 992	560	21 083
Šumsko voće	1. scenarij ¹	4	0	0	0	0
	2. scenarij ²	4	165,7	165,7	165,7	165,7
	3. scenarij ³	4	265	265	265	265
	4. scenarij ⁴	4	530	530	530	530
Marelica	1. scenarij ¹	3	0	0	0	0
	2. scenarij ²	3	165,7	165,7	165,7	165,7
	3. scenarij ³	3	265	265	265	265
	4. scenarij ⁴	3	530	530	530	530
Brusnica	1. scenarij ¹	2	0	36	36	72
	2. scenarij ²	2	165,7	198,6	198,6	231,5
	3. scenarij ³	2	265	296	296	327
	4. scenarij ⁴	2	530	556	556	582
Crni čaj	1. scenarij ¹	2	0	54	54	108
	2. scenarij ²	2	165,7	216,6	216,6	267,5
	3. scenarij ³	2	265	314	314	363
	4. scenarij ⁴	2	530	574	574	618

¹Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se 0; ²Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se LOD; ³Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se $\frac{1}{2}$ LOQ; ⁴Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se puni LOQ

Tablica 5: Ukupne koncentracije PA-ova u čajevima [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

Metoda izračuna	Broj uzoraka	Minimum	Srednja vrijednost	Medijan	P95	P99	Maksimum
1. scenarij ¹	55	0	414,2	0	260,3	9 664	20 633
2. scenarij ²	55	165,7	576,5	165,7	410,6	9 813,3	20 774
3. scenarij ³	55	265	673,5	265	501,1	9 902,5	20 858
4. scenarij ⁴	55	530	932,8	530	730	10 141	21 083

¹Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se 0; ²Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se LOD; ³Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se $\frac{1}{2}$ LOQ; ⁴Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se puni LOQ

Tablica 6: Usporedba koncentracija PA-ova s podnošljivom dnevnom dozom (PDD)²

Vrsta čaja	PDD [μg] (za osobu od 70 kg)		Srednja vrijednost PA u jednoj vrećici čaja (2 g) ³	%-ak PDD-a	Medijan udjela PA u jednoj vrećici čaja (2 g)	%-ak PDD-a
Šipak	0,49	1. scenarij ¹	0	0	0	0
	0,49	2. scenarij ²	0,33	68	0,33	68
	0,49	3. scenarij ³	0,53	108	0,53	108
	0,49	4. scenarij ⁴	1,06	216	1,06	216
Zeleni čaj	0,49	1. scenarij ¹	0,15	31	0,02	4
	0,49	2. scenarij ²	0,47	96	0,35	72
	0,49	3. scenarij ³	0,66	134	0,54	111
	0,49	4. scenarij ⁴	1,17	239	1,07	218
Kamilica	0,49	1. scenarij ¹	0,14	28	0,03	5
	0,49	2. scenarij ²	0,46	94	0,35	72
	0,49	3. scenarij ³	0,65	133	0,55	111
	0,49	4. scenarij ⁴	1,16	238	1,07	217
Menta	0,49	1. scenarij ¹	6,99	1 427	0,09	18
	0,49	2. scenarij ²	7,29	1 487	0,41	84
	0,49	3. scenarij ³	7,49	1 527	0,61	123
	0,49	4. scenarij ⁴	7,98	1 629	1,12	229

² Ova vrijednost je dobivena MOE pristupom, a akronim je izveden za potrebe ovog dokumenta. PDD iznosi 0,007 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./dan, što znači da osoba od 70 kg može unijeti dnevno 0,49 μg PA-ova. Više o MOE pristupu pogledati pod poglavljem 3. Karakterizacija rizika.

³ Jedna vrećica čaja najčešće sadrži 2 g osušenog čaja.

Šumsko voće	0,49	1. scenarij ¹	0	0	0	0
	0,49	2. scenarij ²	0,33	68	0,33	68
	0,49	3. scenarij ³	0,53	108	0,53	108
	0,49	4. scenarij ⁴	1,06	216	1,06	216
Marelica	0,49	1. scenarij ¹	0	0	0	0
	0,49	2. scenarij ²	0,33	68	0,33	68
	0,49	3. scenarij ³	0,53	108	0,53	108
	0,49	4. scenarij ⁴	1,06	216	1,06	216
Brusnica	0,49	1. scenarij ¹	0,07	15	0,07	15
	0,49	2. scenarij ²	0,40	82	0,40	82
	0,49	3. scenarij ³	0,59	121	0,59	121
	0,49	4. scenarij ⁴	1,11	227	1,11	227
Crni čaj	0,49	1. scenarij ¹	0,11	22	0,108	22
	0,49	2. scenarij ²	0,43	88	0,433	88
	0,49	3. scenarij ³	0,63	128	0,63	128
	0,49	4. scenarij ⁴	1,15	234	1,15	234

¹Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se 0; ²Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se LOD; ³Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se ½ LOQ; ⁴Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se puni LOQ

Tablica 7: Pojedinačni uzorci koji prelaze PDD vrijednost

Vrsta čaja	Koncentracija PA [$\mu\text{g}/2\text{ g}$]*	%-ak PDD-a
Zeleni čaj	0,64	131
Kamilica	0,62	127
Menta	41,26	8 420

Tablica 8: Konzumacija čajeva prema podacima prehrambenih navika u RH, izražene na suhu tvar

	Udio konzumenata unutar populacije	Dugotrajna konzumacija (svi ispitanici) [g/kg t.m./dan]		Kratkotrajna konzumacija (samo konzumenti) [g/kg t.m./dan]
		Srednja vrijednost	P95	P95
Čajevi ukupno	18%	0,0061	0,036	0,11

Za procjenu dugotrajne izloženosti, koristilo se 6 različitih scenarija:

- 1) Prosječna dugotrajna konzumacija čajeva i medijan⁴ koncentracija PA-ova, koja oslikava prosječnog konzumenta koji ponekad pije čajeve s višim razinama kontaminacije, a ponekad s nižim.
- 2) Visoka dugotrajna konzumacija čajeva (P95) i medijan koncentracija PA-ova, koja oslikava čestog konzumenta koji ponekad pije čajeve s višim razinama kontaminacije, a ponekad s nižim
- 3) Prosječna dugotrajna konzumacija čajeva i visoka koncentracija PA-ova (P95), koja oslikava prosječnog konzumenta koji pije samo čajeve s visokim razinama kontaminacije
- 4) Prosječna dugotrajna konzumacija čajeva i visoka koncentracija PA-ova (P99⁵), koja oslikava prosječnog konzumenta koji pije samo čajeve s krajnje visokim razinama kontaminacije
- 5) Visoka dugotrajna konzumacija čajeva (P95) i visoka koncentracija PA-ova (P95), koja oslikava čestog konzumenta koji pije samo čajeve s visokim razinama kontaminacije
- 6) Visoka dugotrajna konzumacija čajeva (P95) i visoka koncentracija PA-ova (P99), koja oslikava čestog konzumenta koji pije samo čajeve s krajnje visokim razinama kontaminacije

Tablica 9: Izračuni dugotrajne izloženosti prema različitim scenarijima

Scenariji konzumacije	Metoda izračuna*	Izloženost PA-ovima [µg/kg t.m./dan]
1) scenarij	1. scenarij	0
	2. scenarij	0,0010
	3. scenarij	0,0016
	4. scenarij	0,0032
2) scenarij	1. scenarij	0
	2. scenarij	0,0060
	3. scenarij	0,0095
	4. scenarij	0,0191
3) scenarij	1. scenarij	0,0016
	2. scenarij	0,0025
	3. scenarij	0,0031
	4. scenarij	0,0045
4) scenarij	1. scenarij	0,0590
	2. scenarij	0,0599
	3. scenarij	0,0604
	4. scenarij	0,0619

⁴ Kada u skupu podataka postoji jedna ekstremna vrijednost (tzv. „outlier“), kao što je to u ovom slučaju, gledano statistički, pravilnije je za izračune uzeti u obzir vrijednost medijana, nego srednju vrijednost.

⁵ Inače nije uobičajeno koristiti vrijednosti na 99. percentili, ali ovdje se koristio podatak na toj percentili iz razloga što 95. percentila za ovakav skup podataka (distribuciju) ne obuhvaća i tu jednu ekstremnu vrijednost („outlier“).

5) scenarij	1. scenarij	0,0094
	2. scenarij	0,0148
	3. scenarij	0,0180
	4. scenarij	0,0263
6) scenarij	1. scenarij	0,3479
	2. scenarij	0,3533
	3. scenarij	0,3565
	4. scenarij	0,3651

¹Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se 0; ²Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se LOD; ³Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se ½ LOQ; ⁴Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se puni LOQ

Što se tiče izračuna kratkotrajne izloženosti, koristila su se sljedeća tri scenarija:

- 1) Visoki konzumenti kratkotrajne konzumacije (P95) koji konzumiraju čajeve s medijan vrijednostima koncentracijama PA-ova
- 2) Visoki konzumenti kratkotrajne konzumacije (P95) koji konzumiraju čajeve s visokim koncentracijama PA-ova (P95)
- 3) Visoki konzumenti kratkotrajne konzumacije (P95) koji konzumiraju čajeve s krajnje visokim koncentracijama PA-ova (P99)

Tablica 10: Izračuni kratkotrajne izloženosti prema različitim scenarijima

Scenariji konzumacije	Metoda izračuna*	Izloženost PA-ovima [µg/kg t.m./dan]
1) scenarij	1. scenarij	0
	2. scenarij	0,0182
	3. scenarij	0,0292
	4. scenarij	0,0583
2) scenarij	1. scenarij	0,0286
	2. scenarij	0,0452
	3. scenarij	0,0551
	4. scenarij	0,0803
3) scenarij	1. scenarij	1,0630
	2. scenarij	1,0795
	3. scenarij	1,0893
	4. scenarij	1,1155

¹Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se 0; ²Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se LOD; ³Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se ½ LOQ; ⁴Za vrijednosti < LOQ-a, uzima se puni LOQ

Iz **Tablice 3** je vidljivo da je u 35 % uzoraka kvantificiran barem jedan od PA-ova (gledajući pojedinačno po vrstama čajeva, najviše u kamilici, 73 %), a približno 5 % (3/55) uzoraka bi bili rizični ako bi se dugotrajno konzumirali jer prelaze zadanu PDD vrijednost (**Tablica 7**). Osim ova tri uzorka, valja istaknuti još dva (1 zeleni čaj i 1 menta) koja nisu navedena u **Tablici 7**, a čije su koncentracije bile gotovo identične sa PDD-om (98 i 99 % PDU-a).

Što se tiče **Tablica 4, 5 i 6**, vidljivo je da su vrijednosti koncentracija PA-ova u ispitivanim čajevima visoke jer su i vrijednosti LOQ-a visoke te to samim time ima utjecaj na sumarne brojeve. Kada se govori o sumarnim brojevima, misli se na ukupne koncentracije PA-ova po uzorku (zbroy 30 PA-ova) te ako se za sumarne izračune kod svakog od tih 30 pojedinačnih PA-ova koriste ovako visoko zadane LOQ- vrijednosti, sami krajnji (sumarni) rezultati će biti iznimno visoki. Upravo zbog tako visokih LOQ vrijednosti, sumarne vrijednosti su često i veće od PDD vrijednosti (**Tablica 6**). Laboratorij je dostavio izvješće ili s brojčanim rezultatima (tamo gdje su analit mogli točno kvantificirati) ili kao „n.n.“ što znači da ga nisu uspjeli kvantificirati, tj. da je rezultat ispod razine LOQ-a. Zbog takvog načina prijave rezultata, nemoguće je isključiti mogućnost da postoje koncentracije između LOD-a i LOQ-a, ali i da su one nula. Stoga su se za procjenu izloženosti koristila 4 scenarija kako je i pojašnjeno u fusnotama za svaki pojedini scenarij.

Jedan uzorak iz skupine čajeva od mente ima ekstremne vrijednosti, čak 20 633 µg PA/kg (**Tablica 4**). To je provjereno s laboratorijem i oni jamče za dobiveni rezultat te ujedno i napominju da su već znali pronalaziti tako visoke koncentracije, međutim nikad u čaju od mente. Za svaki slučaj, ponovili su mjerenje za taj uzorak i dobili gotovo identične vrijednosti.

Za procjenu izloženosti proizašlu iz dugotrajne konzumacije, u obzir se uzimalo 6 različitih scenarija (**Tablica 9**), od kojih je svaki također uključivao 4 različita scenarija vezana za koncentracije PA-ova, ukupno dajući 24 moguća scenarija. Po istom principu su se obrađivali podaci za kratkotrajnu izloženost gdje je bilo ukupno 12 mogućih scenarija (3x4) (**Tablica 10**).

Korištenjem različitih scenarija vezanih za koncentracije PA-ova, pokušalo se simulirati što više situacija koje bi se mogle dogoditi u stvarnosti.

Zbog relativno malog broja uzoraka i konzumenata, nije bilo moguće detaljnije proanalizirati izloženost prema vrstama čajeva pa je shodno tome procjena izloženosti bila moguća za čajeve općenito (gdje se uzimaju u obzir sve vrste), a što u konačnici rezultira nesigurnostima proizašlim iz precjenjivanja izloženosti.

3. Karakterizacija rizika

Kada govorimo o karakterizaciji rizika vezano za PA-ove, glavna zabrinutost se veže za moguće kancerogene učinke koje PA-ovi imaju na ljudski organizam. Rizik od nastanka raka se pak veže za procjene dugotrajne (kronične) konzumacije, ali također je potrebno procijeniti i potencijalne rizike od akutne toksičnosti, npr. u slučajevima visoke kratkotrajne izloženosti. Iz tek 2 dokumentirana slučaja akutne toksičnosti beba (str. 9), može se izračunati sljedeće: u prvom slučaju, najmanja pretpostavljena izloženost od 0.8 mg/kg t. m., odnosno 800 µg/kg t. m. je rezultirala sa štetnim učincima. Ekstremna vrijednost izmjerena u jednom uzorku mente, iznosila je 41.26 µg/2 g proizvoda (Tablica 7), što bi iznosilo 6.88 µg/kg t. m. (za bebu od 6 kg), a što bi pak bilo ispod 1 % od 800 µg/kg t. m. Na temelju ovog izračuna bi se mogla odbaciti mogućnost za akutnim trovanjem nakon konzumacije čaja koji ima ovako ekstremno visoke razine PA-ova s obzirom na koncentracije u ostalim uzorcima.

Za tvari koje pokazuju kancerogene učinke, za procjenu rizika koristi se tzv. MOE pristup (*engl. Margin of exposure, MOE*) te je unutar EU prihvaćeno da dobivene vrijednosti MOE-a koje su iznad 10 000, ukazuju na nisku zabrinutost, tj. rizik. Da bi se postigla vrijednost od barem 10 000, dnevno se ne bi smjelo konzumirati više od 0,007 µg PA/kg t.m., jer bi sve iznad toga moglo povećati rizik po pitanju kancerogenih učinaka. Koristeći MOE pristup, na ovaj način je izračunata i PDD vrijednost, koja se spominje pod podnaslovom 2. Procjena izloženosti.

Još jedna činjenica koju je potrebno uzeti u obzir prilikom karakterizacije rizika je da se govori o kumulativnom učinku PA-ova, a ne o svakom pojedinačno. Stoga su Odbor za toksičnost (COT, *engl. Committee on Toxicity*) Britanske agencije za sigurnost hrane (FSA, *engl. Food Standard Agency*) i BfR u svojim procjenama rizika za MOE pristup koristili BMDL10 dobiven za lasiokarpin, za kojeg postoje najadekvatnije studije iz kojih se mogla izračunati BMDL10 vrijednost, a koja u konačnici iznosi 0,073 mg/kg t.m./dan. Dakle, preduvjet za ovu procjenu je da su mogući kancerogeni učinci lasiokarpina ekvivalent za sve detektirane PA-ove. Ovakav pristup koji uzima kumulativnu procjenu cijele grupe spojeva može precijeniti stvarni rizik, ali zbog toga što trenutno nema dovoljno podataka, nemoguće je usporediti kancerogene učinke pojedinačnih PA-ova (BfR, 2013; COT, 2008).

Tablica 11: Izračun MOE-a prema različitim scenarijima dugotrajne izloženosti

Scenariji konzumacije	Metoda izračuna	Unos PA-ova [$\mu\text{g}/\text{kg t. m./dan}$]	MOE (temeljen na BMDL10 od 0,073 mg/kg t. m./dan)
1) scenarij	1. scenarij	0	Nema rezultata
	2. scenarij	0,0010	73 000
	3. scenarij	0,0016	45 625
	4. scenarij	0,0032	22 813
2) scenarij	1. scenarij	0	Nema rezultata
	2. scenarij	0,0060	12 167
	3. scenarij	0,0095	7 684
	4. scenarij	0,0191	3 822
3) scenarij	1. scenarij	0,0016	45 625
	2. scenarij	0,0025	29 200
	3. scenarij	0,0031	23 548
	4. scenarij	0,0045	16 222
4) scenarij	1. scenarij	0,0590	1 237
	2. scenarij	0,0599	1 219
	3. scenarij	0,0604	1 209
	4. scenarij	0,0619	1 179
5) scenarij	1. scenarij	0,0094	7 766
	2. scenarij	0,0148	4 932
	3. scenarij	0,0180	4 056
	4. scenarij	0,0263	2 776
6) scenarij	1. scenarij	0,3479	210
	2. scenarij	0,3533	207
	3. scenarij	0,3565	205
	4. scenarij	0,3651	200

Iz **Tablice 11** je vidljivo da su vrijednosti MOE-a iznad 10 000 u slučajevima prosječne dugotrajne konzumacije i medijan vrijednosti koncentracije PA-ova [1) scenarij], donekle u slučaju visoke dugotrajne konzumacije (P95) i medijan vrijednosti koncentracije PA-ova [2) scenarij] te u slučaju prosječne dugotrajne konzumacije čajeva i visoke koncentracije PA-ova (P95) [3) scenarij]. Kao što je bilo i očekivano, najgori mogući scenarij [6) scenarij] koji predstavlja visoku konzumaciju (P95) i krajnje visoku koncentraciju PA-ova (P99), ima najniže MOE vrijednosti. Međutim, valja napomenuti da je ovaj scenarij (i slični), gdje osoba na dnevnoj bazi, tijekom dužem vremenskog perioda, konzumira u visokim količinama čajeve koji sadrže visoke i krajnje visoke koncentracije PA-ova, malo vjerojatan da će se dogoditi u stvarnosti.

Općenito, različite nesigurnosti se moraju uzeti u obzir kada se procjenjuje unos PA-ova. Prvo, u ovoj procjeni rizika ne postoje razlike između konzumacije različitih vrsta čajeva što može dovesti do precjenjivanja ili podcjenjivanja konzumacije određene vrste čaja. S druge pak strane, može se pretpostaviti da ne postoje veće razlike u količinama čaja koji se konzumira, posebno u slučaju čestih konzumenata. Drugo, iako se pokušalo uzorkovati što reprezentativniji uzorak, također se ne može sa sigurnošću znati očitavaju li izmjerene koncentracije stvarnu sliku o distribuciji PA-ova u čajevima na hrvatskom tržištu, pogotovo s obzirom na relativno mali broj uzoraka. Sadržaj 1,2-nezasićenih PA-ova izmjerenih u čajevima iz različitih serija značajno se razlikuje kako kvalitativno, tako i kvantitativno. Jedan od mogućih razloga je taj da biljke, od kojih se prave čajevi, rastu zajedno s različitim divljim biljnim vrstama koje sadržavaju PA-ove čiji dijelovi kontaminiraju čajevе. U posljednje je vrijeme primijećeno povećano širenje *Senecio* vrsta koje sadrže PA-ove u zonama umjerene klime koje mogu kontaminirati i druge prehrambene namirnice (npr. salate) (BfR, 2013).

ZAKLJUČCI

Na temelju trenutno dostupnih podataka i saznanja vezanih za metabolizam, mehanizme aktivacije, stvaranje DNA aduktora, genotoksičnost i kancerogenost, može se pretpostaviti da PA-ovi mogu imati kancerogene učinke po ljude. Međutim, nepotpuni podaci ne dozvoljavaju čvrsta stajališta o razlikama između pojedinačnih PA-ova u smislu njihovog potencijala da izazovu rak te općenito njihove toksičnosti. Teško je donijeti zaključak o tome ima li neki PA veći kancerogeni potencijal od drugog, odnosno međusobne usporedbe nisu u potpunosti moguće.

Procjena rizika temeljena na LD₅₀ dozama koje su mjerene intraperitonealnim unosom pojedinačnih PA-ova kod štakora, ne može se smatrati prikladnom za procjenu dugotrajne izloženosti na PA-ove niti za krajnje rizike (prvenstveno ne za kancerogene učinke), jer se ne uzima u obzir moguće razlike između pojedinačnih PA-ova u smislu toksikokinetike nakon oralnog unosa te u smislu toksikodinamike uslijed dugotrajne izloženosti. Stoga se, po uzoru na BfR-ovu procjenu rizika, na PA-ove gleda kao na skupinu tvari s kumulativnim učinkom što se tiče kancerogenog učinka. Međutim, moguće je da ovakav pristup precjenjuje rizik. Koristio se MOE pristup za procjenu rizika od tvari s genotoksičnim i kancerogenim svojstvima, odnosno pristup koji je trenutno standardan u EU, uz pomoć izračunatog BMDL10-a za lasiokarpin od 0.073 mg/kg t. m./dan. Kako je već rečeno, vrijednosti MOE-a koje su iznad 10 000, smatraju se od niskog rizika te se stoga može zaključiti da, uzimajući u obzir unos PA-ova iz svih izvora, MOE ne bi trebao biti ispod 10 000. Međutim, ukupna izloženost na PA-ove iz svih namirnica treba se držati što je niže moguća.

Iako je u jednom uzorku čaja izmjerena neočekivano visoka razina PA-ova s obzirom na koncentracije u ostalim uzorcima, akutni rizik po zdravlje se smatra malo vjerojatnim. Temeljem procjene izloženosti, općenito se može zaključiti da su česti konzumenti izloženi većem riziku od štetnih posljedica po zdravlje (posebice kancerogenosti), pogotovo ako konzumiraju proizvode s visokim udjelom PA-ova tijekom dužeg vremenskog perioda.

PREPORUKE

U pogledu genotoksičnih i kancerogenih učinaka PA-ova, potreban je dodatni angažman u svrhu smanjenja sadržaja PA-ova u čajevima radi umanjivanja pretpostavljenog većeg rizika od nastanka raka kod čestih konzumenata. Temeljem pregleda procjene rizika od strane BfR-a, može se zaključiti da su djeca posebno osjetljiva populacija, no kako za djecu u RH još ne postoji studija o prehranbenim navikama, istu je potrebno napraviti u budućnosti. Osim toga, rizik ne predstavljaju samo čajevi, nego i drugi prehranbeni proizvodi, kao što je npr. med koji se često konzumira u kombinaciji s čajevima. Stoga je bitno subjektima u poslovanju s hranom ukazati na štetnost PA-ova koji se do sada nisu sustavno ispitivali. Do smanjenja sadržaja PA-ova u prehranbenim proizvodima može doći ukoliko se provode botaničke analize biljnog materijala (jer je dobro poznato iz kojih biljnih vrsta mogu doći najveće koncentracije), poboljšanim metodama uzgoja, žetve te postupaka čišćenja i odvajanja. Kako je ovo bilo prvo istraživanje PA-ova u RH, potrebno je nastaviti pratiti razine jer je prema ovome inicijalnom istraživanju uočeno da su ipak moguće čak i ekstremno visoke razine PA-ova pa je nemoguće zanemariti postojanje određenog rizika po zdravlje ljudi. Nadalje, u budućnosti bi bilo poželjno proširiti istraživanje i na druge prehranbene proizvode (npr. med), ali i na medicinske proizvode koji su na biljnoj bazi.

LITERATURA (REFERENCE)

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2013): *Pyrrrolizidine alkaloids in herbal teas and teas*. BfR, Berlin.

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2014): *Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS/MS*. BfR, Berlin.

COT, Committee on Toxicity (2008): *COT Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food*. Food Standard Agency.

Culvenor CCJ, Edgar JA, Smith LW, Kumana CR, Lin HJ (1985): *Heliotropium Lasiocarpum* Fisch and Mey Identified As Cause of Venooclusive Disease Due to A Herbal Tea. *Lancet*, 1 (8487), 978.

Datta DV, Khuroo MS, Mattocks AR, Aikat BK, Chhuttani PN (1978): Herbal Medicines and Venooclusive Disease in India. *Postgraduate Medical Journal*, 54 (634), 511-515.

Dickinson JO, Cooke MP, King RR and Mohamed PA (1976): Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169, 192-196.

Direktiva 2002/32/EZ Europskoga parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Službeni list Europskih zajednica, L140/10.

Edgar JA, Smith LW (2000): Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: Food safety implications. U *Natural and Selected Synthetic Toxins: Biological Implications*. Eds Tu AT and Gaffield W. ACS Symposium Series, 745, 118-128.

EFSA, European Food Safety Authority (2007): *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed*. EFSA, Parma.

EFSA, European Food Safety Authority (2011): *Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed*. EFSA, Parma.

Eröksüz H, Eröksüz Y, Öser H, Yaman I, Tosun F, Akyüz Kizilay C, Tamer U (2003): Toxicity of *Senecio vernalis* to laying hens and evaluation of residues in eggs. *Veterinary and Human Toxicology*, 45: 76-80.

Fu, PP, Xia Q, Chou MW, Lin G (2007): Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15 (4), 400-415.

Green CR, Christie GS, (1961): Malformations in fetal rats induced by the pyrrolizidine alkaloid, Heliotrine. *British Journal of Experimental Pathology*, 42, 369-378.

Huxtable RJ (1980): Herbal Teas and Toxins - Novel Aspects of Pyrrolizidine Poisoning in the United-States. *Perspectives in Biology and Medicine*, 24 (1), 1-14.

IARC, International Agency for Research on Cancer (n.d.): List of Classifications, Volumes 1-113, dostupno na: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php

Kempf M, Wittig, M, Reinhard A, von der Ohe K, Blacquièrre T, Ræzke K-P, Michel R, Schreier P and Beuerle T (2011): Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28, 332-347.

Krishnamurthi D, Krishnaswamy K, Nagarajan V, Krishnamachari KAVR, Bhat RV (2013): Aetiopathogenesis of endemic ascites in Surguja district of Madhya Pradesh. *Indian Journal of Medical Research*, 65 (5), 672-678.

Mattocks AR (1986): Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. *Academic Press*.

Mohabbat O, Srivastava RN, Younos MS, Merzad AA, Sediq GG, Aram GN (1976): Outbreak of Hepatic Venocclusive Disease in Northwestern Afghanistan. *Lancet*, 2 (7980), 269-271.

NIH, National Institutes of Health (2003): TP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of Riddelliine in F344/N rats and B6C3F1 mice; *NIH Publication No. 03-4442*.

Ridker PM, Ohkuma S, Mcdermott WV, Trey C, Huxtable RJ (1985): Hepatic Venocclusive Disease Associated with the Consumption of Pyrrolizidine-Containing Dietary-Supplements. *Gastroenterology*, 88 (4), 1050-1054.

Schoental R (1959): Liver lesions in young rats suckled by mothers treated with the pyrrolizidine (senecio) alkaloids, lasiocarpine and retrorsine. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 77, 485-495.

Silva-Neto JP, Barreto RA, Pitanga BP, Souza CS, Silva VD, Silva AR, Velozo ES, Cunha SD, Batatinha MJ, Tardy M, Ribeiro CS, Costa MF, El-Bacha RS, Costa SL (2010): Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. *Toxicol*, 55, 105–117.

Stillman AE, Huxtable R, Consroe P, Kohlen P, Smith S (1977): Hepatic Venooclusive Disease Due to Pyrrolizidine (*Senecio*) Poisoning in Arizona. *Gastroenterology*, 73 (2), 349-352.

Tandon BN, Tandon RK, Tandon HD, Narndranathan M, Joshi YK (1976): Epidemic of Venooclusive Disease of Liver in Central India. *Lancet*, 2 (7980), 271-272.

Wang C, Li Y, Gao J, He Y, Xiong A, Yang L, Cheng X, Ma Y, Wang Z (2011): The comparative pharmacokinetics of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine and adonifoline, and their main metabolites in rats after intravenous and oral administration by UPLC/ESIMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 275-287.

Wang YP, Yan J, Fu PP, Chou MW (2005): Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicology Letters*, 155 (3), 411-420.

WHO-IPCS, World Health Organisation-International Programme on Chemical Safety (1988): *Pyrrolizidine alkaloids*. Environmental Health Criteria 80. WHO, Geneva, 1-345. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm>

Williams DE, Chou MW, Yan J, Young JF, Chan PC, Doerge D (2002): Toxicokinetics of riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, and metabolites in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182, 98-104.

Xia Q, Chou MW, Edgar JA, Doerge DR, Fu PP (2006): Formation of DHPderived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridinetype pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Cancer Letters*, 231 (1), 138-145.