

RAPORT GRUPY DS. WSPÓŁPRACY NAUKOWEJ EFSA (ESCO)

Opinia w sprawie wytycznych EFSA dotyczących oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych używanych jako suplementy diety sporządzona w oparciu o realne studia przypadków¹

GRUPA ROBOCZA ESCO DS. SUBSTANCJI I PREPARATÓW BOTANICZNYCH^{2,3}

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
(EFSA), Parma, Włochy

STRESZCZENIE

W czerwcu 2008 roku, po zakończeniu wstępnych konsultacji społecznych, Komitet Naukowy EFSA opublikował dokument zawierający wytyczne dotyczące oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych przeznaczonych do stosowania w charakterze składników suplementów diety. Jednocześnie wydano zalecenie, aby przeprowadzić testy proponowanego sposobu dokonywania oceny bezpieczeństwa w oparciu o kilka przykładowych substancji, a także aby rozważyć wprowadzenie poprawek w treści Kompendiów i) substancji botanicznych w których stwierdzono obecność substancji toksycznych, uzależniających bądź psychotropowych oraz ii) substancji botanicznych, co do których stwierdzono także występowanie właściwości leczniczych.

Grupa Robocza EFSA ds. Współpracy Naukowej (ESCO) złożone z ekspertów wskazanych indywidualnie przez członków Forum Doradczego oraz przez Komitet Naukowy została utworzona w celu realizacji wskazanego wyżej zadania oraz wyrażenia opinii w kwestii przydatności proponowanej metody oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na potrzeby EFSA oraz Państw Członkowskich UE. Ponadto, wskazana wyżej Grupa Robocza otrzymała także zadanie przeprowadzenia aktualizacji Kompendiów.

Grupa Robocza ESCO poddała analizie sześć preparatów botanicznych w celu przetestowania ram badawczych opisanych w treści wytycznych: Ekstrakt wodno-alkoholowy z suszonej skórki pomarańczy gorzkiej *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L., ii) Ekstrakt z suszonej herbaty zielonej *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, iii) Ekstrakt z suszonych liści bazylii *Ocimum tenuiflorum* L., iv) Ekstrakt wodny z suszonych owoców kopru włoskiego *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare*, v) Suszone dojrzałe nasiona lnu zwyczajnego *Linum usitatissimum* L. oraz vi) Otręby pszenne z *Triticum aestivum* L. Przykłady powyższe wybrane zostały w celu rozwiązania różnego rodzaju problemów dotyczących bezpieczeństwa, takich jak błędy w identyfikacji / zafałszowania, hepatotoksyczność czy też możliwa obecność czynników genotoksycznych czy rakogennych. Opierając się na doświadczeniach nabytych w drodze analizy wskazanych przykładów, Grupa Robocza ESCO zidentyfikowała szereg możliwych poprawek i uzupełnień do wytycznych Komitetu Naukowego.

1 Na wniosek EFSA, Zapytanie nr. EFSA-Q-2008-388a, wystosowane w dniu 30 kwietnia 1999.

2 E-mail korespondencyjny: scientific.committee@efsa.europa.eu

3 Niniejszy naukowy raport techniczny EFSA powstał ze znaczącym wkładem ze strony (i) Ekspertów nominowanych przez Komitet Naukowy EFSA: Robert Anton, Angelo Carere, Luc Delmulle (Przewodniczący Podgrupy ds. Kompendium), Corrado L. Galli, Ivonne Rietjens (Przewodniczący Podgrupy ds. Przypadków Realnych), Vittorio Silano (Przewodniczący Grupy Nadzórnej) oraz Gerrit Speijers, (ii) Ekspertów nominowanych przez członków Forum Doradczego EFSA: Ilze Abolina, Judith Amberg-Müller, Ulla Beckman-Sundh, Birgit Dusemund, Marie-Hélène Loulergue, Andrea Lugasi, Martijn Martena, Maria Nogueira, Kirsten Pilegaard, Mauro Serafini, Jaroslav Toth, Arnold Vlietinck i Magdalini Zika.

botanicznych używanych jako suplementy diety sporządzona w oparciu o realne studia przypadków na wniosek EFSA. Dziennik EFSA 2009; (9):280. [104 str.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.280. Dostępny online: www.efsa.europa.eu

Biorąc pod uwagę komentarze otrzymane w trakcie konsultacji społecznych, Grupa Robocza ESCO dokonała połączenia dwóch istniejących kompendiów w jedno po usunięciu odnośników dotyczących możliwych zastosowań leczniczych poszczególnych substancji botanicznych. Powstałe w powyższy sposób Kompendium skupia się obecnie na kwestiach toksyczności poszczególnych substancji, przedstawiając wyliczenie substancji botanicznych, w których stwierdzono obecność związków toksycznych, uzależniających, psychotropowych bądź też innych substancji budzących zastrzeżenia. Celem Kompendium jest oznaczenie roślin i ich części bądź związków chemicznych potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia ludzkiego naturalnie występujących w wyliczonych substancjach botanicznych i wymagających z tego powodu szczególnej uwagi w trakcie dokonywania oceny bezpieczeństwa produktu bądź produktów zawierających tego rodzaju substancję bądź substancje botaniczne. Zaleca się, aby EFSA dokonywała regularnych aktualizacji treści wskazanego wyżej Kompendium.

Po dokonaniu przez Komitet Naukowy ewentualnej aktualizacji wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na podstawie zaleceń zawartych w treści niniejszej opinii, wytyczne oraz Kompendium zostaną udostępnione publicznie na stronie internetowej EFSA.

SŁOWA KLUCZOWE

Substancje botaniczne, preparaty botaniczne, ocena bezpieczeństwa, suplement diety, właściwości toksykologiczne, ESCO.

WYŁĄCZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

Konkluzje i zalecenia zawarte w niniejszym raporcie odzwierciedlają opinie ekspertów pracujących w ramach Grupy Roboczej ESCO ds. Substancji i preparatów Botanicznych i nie muszą one być tożsame z poglądami EFSA.

SPIS TREŚCI

Streszczenie	1
Wyłączenie odpowiedzialności	3
Spis treści	3
Kontekst powstania dokumentu wg. wskazań EFSA	4
Specyfikacja wg. wskazań EFSA	4
Podziękowania	4
Wprowadzenie	5
1. Ocena bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych przeznaczonych do wykorzystania w charakterze suplementów diety	5
1.1. Proponowane wymagania dotyczące danych w zakresie oceny bezpieczeństwa suplementów diety	5
1.1.1. Dane techniczne	6
1.1.1.1. Identyfikacja substancji bądź preparatu botanicznego	6
1.1.1.2. Proces wytwarzania	7
1.1.1.3. Skład chemiczny	8
1.1.1.4. Specyfikacje	8
1.1.1.5. Stabilność substancji botanicznych bądź preparatów botanicznych wykorzystywanych w roli składników suplementów diety	9
1.1.1.6. Proponowane zastosowania i poziomy zastosowania	9
1.1.1.7. Informacje dotyczące istniejących analiz	10
1.1.2. Narażenie: zakres i czas trwania	10
1.1.3. Dane toksykologiczne	12
1.2. Proponowane ogólne ramy oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych wykorzystywanych jako suplementy diety (domniemanie bezpieczeństwa na podstawie długotrwałego wykorzystywania jako składnik produktów spożywczych na terenie Europy)	12
1.2.1. Ocena dostępnych danych – brak konieczności prowadzenia dalszych testów (domniemanie bezpieczeństwa na podstawie długotrwałego wykorzystywania jako składnik produktów spożywczych na terenie Europy)	13
1.2.2. Poziom B: Konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych	15
Wnioski i zalecenia	16
Przypisy	17
Załącznik A: <i>Citrus aurantium</i> L. ssp. <i>aurantium</i> L.	18
Załącznik B: <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	32
Załącznik C: <i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	65
Załącznik D: <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i>	72
Załącznik E: <i>Linum usitatissimum</i> L.	84
Załącznik F: <i>Triticum aestivum</i> L.	98

KONTEKST POWSTANIA DOKUMENTU WEDŁUG WSKAZAŃ EFSA

Po przyjęciu w dniu 23 czerwca 2004 roku dokumentu dyskusyjnego Komitetu Naukowego nt. substancji i preparatów botanicznych oraz otrzymaniu przez Komitet Naukowy w sierpniu 2005 roku stosownego polecenia od EFSA, Komitet opracował dwuetapową metodę oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych. Opublikowane zostały wytyczne skupiające się na substancjach i preparatach botanicznych przeznaczonych do wykorzystania w charakterze suplementów diety⁴.

Opracowano ramy koncepcyjne procesu oceny bezpieczeństwa, opierające się na założeniu, że do substancji i preparatów botanicznych, co do których istnieje odpowiedni zasób wiedzy, mogłaby mieć zastosowanie instytucja „domniemania bezpieczeństwa” bez konieczności prowadzenia jakichkolwiek dalszych badań (poziom pierwszy systemu oceny). Kwestie, które należałoby poddać starannej analizie przed podjęciem takiej decyzji omówione zostały w sposób szczegółowy w treści wytycznych. Substancje i preparaty botaniczne, co do których nie byłoby możliwe zastosowanie domniemania bezpieczeństwa, poddawane byłyby bardziej kompleksowej ocenie bezpieczeństwa z zastosowaniem metodologii opisanej w ramach drugiego poziomu proponowanego systemu oceny.

W następstwie powyższych ustaleń przedstawiono propozycję przetestowania metody opisanej w treści wytycznych dot. oceny bezpieczeństwa w oparciu o kilka wybranych przypadków, wliczając w to substancje botaniczne w których stwierdzono występowanie substancji toksycznych, substancje botaniczne tradycyjnie stosowane w celach spożywczych oraz substancje botaniczne w których stwierdzono obecność potencjalnie genotoksycznych/rakogennych substancji.

SPECYFIKACJA WG. WSKAZAŃ EFSA

Grupa Robocza ESCO ds. Substancji i preparatów Botanicznych otrzymała od EFSA polecenie wykonania czynności następujących:

- poszerzenie bazy informacji leżących u podstaw kompendiów, a tym samym podniesienie wartości tychże kompendiów
- przeprowadzenie testu proponowanego stadialnego podejścia do oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych w oparciu o kilka wybranych przypadków.
- dostarczenie Dyrektorowi Wykonawczemu EFSA zaktualizowanych kompendiów, raportu zawierającego podsumowanie przeprowadzonych studiów przypadku oraz opinii nt. przydatności proponowanego podejścia stadialnego w ramach oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na potrzeby EFSA oraz Państw Członkowskich UE.

Niniejsza opinia sporządzona została w celu realizacji punktu 3 Specyfikacji. Do dokumentu niniejszego załączono sprawozdania dotyczące sześciu przypadków wybranych na potrzeby sprawdzenia przydatności proponowanej metody (punkt drugi Specyfikacji).

W ramach realizacji punktu 1 Specyfikacji, Grupa Robocza ESCO połączyła istniejące kompendia w jeden, zaktualizowany dokument. Kompendium to stanowi, wraz z niniejszą opinią, jeden z efektów omawianego działania.

PODZIĘKOWANIA

Niniejszy raport techniczny przygotowany został przez Grupę Roboczą ESCO ze wsparciem Komitetu Naukowego oraz Jednostki Forum Doradczego.

Komitet Naukowy EFSA pragnie podziękować wszystkim członkom Grupy Roboczej za ich wkład w realizację przedsięwzięcia w ramach odbywanych posiedzeń oraz przygotowywania niniejszego raportu.

⁴ Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true

WPROWADZENIE

Nadrzędna Grupa Robocza ESCO ds. Substancji botanicznych wskazała następujące 6 przypadków na potrzeby testów naukowego systemu oceny bezpieczeństwa opisywanego w treści wytycznych. Tabela zawiera także wykaz możliwych problemów dotyczących bezpieczeństwa, co do których podejrzewa się, że mogą one wykazywać związki z omawianymi przypadkami. Opinie przygotowane w odniesieniu do każdego z sześciu przeprowadzonych studiów przypadku załączone zostały do niniejszej opinii w formie załączników.

Substancja botaniczna	Preparat	Możliwe zagrożenia	Opinia zawarta w:
<i>Citrus aurantium</i> L. ssp. <i>aurantium</i> L.	Hydroalkoholowy ekstrakt z suszonej skórki owocu	Błędy w identyfikacji / zafałszowania	Załącznik 1
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	Ekstrakt z suszonej herbaty zielonej	Toksyczność dla wątroby	Załącznik 2
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Ekstrakt z suszonych liści	Działanie toksyczne na układ rozrodczy	Załącznik 3
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i>	Suszone owoce (ekstrakt wodny)	Genotoksyczne substancje rakogenne	Załącznik 4
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Suszone dojrzałe nasiona	Fitoestrogeny	Załącznik 5
<i>Triticum aestivum</i> L.	Otręby pszenne	Niski poziom ryzyka – domniemanie bezpieczeństwa	Załącznik 6

Kolejne sekcje zorganizowane są zgodnie ze strukturą opisaną w projekcie wytycznych dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych wykorzystywanych jako suplementy diety. Niniejszy dokument przedstawia opinię na temat tego, czy proponowany system jest przydatny z punktu widzenia oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych wykorzystywanych w charakterze składników produktów żywnościowych.

Dokument niniejszy przedstawia ogólną analizę zagadnień, jakie napotyka się w trakcie wykorzystywania proponowanego podejścia stadialnego oraz propozycje zmian/aktualizacji treści odpowiednich fragmentów wytycznych.

1. Ocena bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych przeznaczonych do wykorzystania w charakterze suplementów diety

1.1. Proponowane wymagania dotyczące danych w zakresie oceny bezpieczeństwa suplementów diety

Wytyczne wskazują, że wymienione poniżej sekcje mają na celu umożliwienie dokonania identyfikacji dodatkowych danych i informacji uważanych za konieczne bądź pożądane w celu dokonania oceny bezpieczeństwa w odniesieniu do suplementów diety. Dane te dotyczą kwestii: (i) technicznych; (ii) związanych z ekspozycją; oraz (iii) toksykologicznych. Wytyczne wskazują, że zawarte poniżej wykazy mają za zadanie dostarczyć odpowiednich wytycznych w zakresie ewentualnych wymagań dotyczących gromadzonych danych. Wykazy te sporządzono w sposób na tyle wyczerpujący, na ile było to możliwe; należy stosować je w sposób indywidualny dla każdego napotkanego przypadku, w zależności od charakteru analizowanej substancji bądź

preparatu botanicznego. Oznacza to, że nie wszystkie spośród wskazanych informacji będą potrzebne we wszystkich możliwych przypadkach.

1.1.1. Dane techniczne

1.1.1.1. Identyfikacja substancji bądź preparatu botanicznego

Grupa Robocza podkreśla, że substancje botaniczne należy identyfikować za pomocą ich nazw naukowych (nazewnictwa binominalnego, tj. obejmującego rodzaj, gatunek, podgatunek, autora), wliczając w to także określenie wykorzystywanej w danym przypadku części rośliny. Dozwolone jest także stosowanie synonimów.

W niektórych przypadkach konieczne może być definiowanie substancji bądź preparatów botanicznych na poziomie podgatunku bądź jeszcze dokładniej, jako że różne podgatunki mogą różnić się pod względem składników oraz poziomu toksyczności. Przykładem może być gatunek *Foeniculum vulgare* Mill ssp. *vulgare* var *dulce* (odmiana słodka) oraz var. *vulgare* (odmiana gorzka); olejek eteryczny tej pierwszej odmiany zawiera w sobie ok. 10 razy mniej estragolu niż w przypadku tej drugiej. Inny przykład to *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L (pomarańcza gorzka) oraz *Citrus aurantium* L. spp. *bergamia* (Risso & Poit.) Engl. (pomarańcza bergamota), wytwarzające różne owoce zawierające odmienne ilości czynników aktywnych takich jak furanokumaryny czy *p*-synefryna.

W innych przypadkach natomiast wydaje się możliwe dokonanie analizy szerokiego wachlarza podgatunków w oparciu o jeden gatunek reprezentatywny. Taka sytuacja ma miejsce np. w przypadku – będących w istocie owocami pozornymi – owoców dzikiej róży (*Rosa canina* L.), róży alpejskiej (*Rosa pendulina* L.) oraz innych gatunków z rodzaju *Rosa*, w szczególności zaś róży fałdzistolistnej (*Rosa rugosa* Thunb.). Dojrzałe owoce różnych gatunków róży zbiera się późną jesienią; różnią się one nieznacznie pod względem formy oraz zawartości głównego składnika aktywnego – kwasu askorbinowego.

Z konkretnej substancji botanicznej daje się pozyskać wiele różnych preparatów, w zależności zaś od całego szeregu czynników, wliczając w to zastosowane rozpuszczalniki czy proces ekstrakcji możliwe jest pozyskanie różnych składników danej substancji botanicznej. Identyfikacja substancji jest zatem niezbędna w celu właściwego opisanie omawianego w danym przypadku preparatu bądź preparatów. Grupa Robocza podkreśliła trudności związane z różnorodnością zastosowań oraz materiałów wyjściowych, konkludując, że każda ocena bezpieczeństwa powinna koncentrować się na precyzyjnie określonym gatunku (bądź też na podgatunku lub odmianie), na precyzyjnie określonej części danej rośliny oraz na precyzyjnie określonym preparacie. Tożsamość danej substancji botanicznej oraz poddawanej ocenie preparatu muszą być opisane w sposób klarowny.

Grupa Robocza zaleca zatem uzupełnienie wytycznych o następujące sformułowanie:

„Wiadomo jest, że identyfikacja źródła botanicznego oraz preparatu botanicznego może w niektórych przypadkach okazać się rzeczą bardziej skomplikowaną, niż można byłoby oczekiwać. Zaleca się zatem, aby na tyle, na ile to tylko możliwe, stosować zapisy zawarte w Farmakopei Europejskiej. Dodatkowymi źródłami w zakresie nomenklatury są dokumenty następujące: Światowa Lista Wybranych Rodzin Roślin (World Checklist of Selected Plant Families – Royal Botanic Garden, Kew); opracowania autorstwa Hanelta (2001) dostępne także w Internecie jako Światowa Baza Danych Roślin Rolniczych i Ogrodniczych Mansfielda (Mansfeld’s World Database of Agricultural Crops); a także baza danych sporządzona przez Amerykański Departament Rolnictwa. Jeśli dana nazwa naukowa nie figuruje we wskazanych wyżej źródłach, wówczas jej istnienie można zweryfikować odwołując się do Międzynarodowego Wykazu Nazw Roślin (The International Plant Names Index). Ponieważ w wielu przypadkach dochodziło do zmiany klasyfikacji poszczególnych gatunków, te same gatunki występować mogą pod różnymi nazwami systematycznymi. Istnieje zatem

wpis odnoszący się do synonimów, które nadal pozostają w użyciu. Nazwy zwyczajowe (wernakularne) w jęz. angielski, francuskim, niemieckim i włoskim (pod warunkiem, że takowe występują) są również podawane, należy jednak zauważyć, że nazwa zwyczajowa stosowana w jednym regionie w odniesieniu do konkretnej rośliny może w innych obszarach stosowana być jako określenie innego, zupełnie niespokrewnionego z nią gatunku. Z przyczyn powyższych nazwy zwyczajowe mogą nie pozwalać nam na jednoznaczną identyfikację danego gatunku i nie są one tak wiarygodne, jak nazwy systematyczne.

Zawarty poniżej schemat stanowi podsumowanie wymagań odnoszących się do identyfikowania substancji botanicznych:

Nazwa systematyczna (łacińska):	<i>pełna systematyczna nazwa gatunkowa z uwzględnieniem autora (zgodnie ze źródłem wzorcowym)</i>
Synonimy:	<i>nazwa lub nazwy botaniczne wg. innych źródeł</i>
Nazwy zwyczajowe:	<i>nazwa/nazwy wernakularne</i>
Rodzina:	<i>rodzina botaniczna</i>
Wykorzystywana część rośliny:	<i>np. korzeń, liście, nasiona...</i>
Pochodzenie geograficzne:	<i>kontynent, państwo, region</i>
Warunki dot. wzrostu i zbioru:	<i>roślina dzika/uprawna, praktyki związane z uprawą, czas zbioru w odniesieniu zarówno do pory roku, jak i stadium rozwoju rośliny."</i>

1.1.1.2. Proces wytwarzania

Grupa Robocza zaleca oparcie się na wymogach Systemu Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli (HACCP), które gwarantują, że wszystkie kroki w procesie produkcyjnym zostaną wykonane w sposób właściwy, wliczając w to staranną identyfikację stosowanej substancji botanicznej celem uniknięcia zafałszowania, błędnej klasyfikacji bądź podmiany gatunków.

Wytyczne już w tej chwili zawierają wskazanie, iż wymienione poniżej informacje uznawane są za niezbędne w celu dokonania oceny bezpieczeństwa substancji oraz preparatów botanicznych:

Informacje dot. metody bądź metod produkcji (np. proces przetwarzania surowca do postaci preparatu, taki jak ekstrakcja bądź inna procedura/procedury jak również współczynnik ekstrakcji dla danej rośliny).

ii) Informacje nt. substancji stosowanych w procesie produkcji, np. oznaczenie ekstrahenta, odczynniki, specjalne środki ostrożności (np. wymagania dot. światła i temperatury).

iii) Kryteria standaryzacyjne (zob. np. Farmakopea Europejska); w odniesieniu do kryteriów standaryzacyjnych, Grupa Robocza zaleca dokładne wyznaczenie kryteriów niezbędnych aby zagwarantować odpowiednią jakość.

Grupa robocza zwróciła także uwagę na ryzyko występowania zafałszowań. Producenci mogą np. dodawać to preparatów opartych na *Citrus aurantium* syntetyczną synefrynę bądź jej izomery takie jak meta-synefryna (znana też jako fenylefryna bądź neo-synefryna), które w warunkach naturalnych nie występują w owocach roślin cytrusowych. Fakt ten nie będzie mógł zostać ujawniony, jeśli specyfikacje obejmowały będą wyłącznie wykaz i kwantyfikację znanych składników.

Co więcej, Grupa Robocza zauważyła także, że w niektórych krajach zezwala się na regenerację preparatów botanicznych i że działania takie mogą wchodzić w skład procesu produkcji (np. w drodze uzupełniania wyciągu suchego o lotne składniki utracone w procesie produkcji).

Biorąc pod uwagę tego rodzaju aspekty dotyczące zafałszowań, błędnej klasyfikacji, zamiany gatunków oraz regenerowania substancji, Grupa Robocza stwierdza, że mimo iż wzmianki na temat kontroli jakości zostały usunięte z treści wytycznych po zakończeniu konsultacji społecznych, wydaje się, iż konieczne jest umieszczenie w dokumencie pewnych sformułowań odnoszących się do kontroli jakości.

Podsumowując, Grupa Robocza zaleca uzupełnienie treści wytycznych w sekcji dotyczącej procesu produkcji o następujące sformułowanie:

„Substancje bądź preparaty botaniczne mogą stać się źródłem zagrożenia na skutek występowania nieprawidłowości w procesie ich wytwarzania (np. nieprawidłowej klasyfikacji, zamiany gatunków). Dlatego też bezpieczeństwo substancji i preparatów botanicznych powinno zostać zapewnione dzięki zastosowaniu podejścia opartego na Analizie Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli [HACCP] (Codex Alimentarius 1997). Należy wziąć pod uwagę całość łańcucha produkcyjnego, od zasadniczego procesu wytwarzania substancji botanicznych po magazynowanie o wprowadzanie na rynek preparatów botanicznych. System HACCP stosować należy w sposób odpowiednio elastyczny, dostosowując go do każdego analizowanego preparatu botanicznego w zależności od potrzeby.”

1.1.1.3. Skład chemiczny

Wytyczne w tej materii stwierdzają jedynie, co następuje: „Dane dotyczące składu chemicznego składnika botanicznego oraz preparatu podlegającemu ocenie muszą być podawane w sposób kładący nacisk na związki chemiczne mające znaczenie z punktu widzenia oceny bezpieczeństwa.”

Grupa Robocza sugeruje, że sekcja ta powinna zostać rozszerzona, tak aby jej treść przedstawiała się w sposób następujący:

„Dane dotyczące składu chemicznego substancji botanicznej powinny być podawane w sposób kładący nacisk na stężenie składników mających znaczenie z punktu widzenia oceny bezpieczeństwa, wliczając stężenie elementów następujących:

- Najważniejsze związki chemiczne budzące zastrzeżenia z punktu widzenia ich ilości: Związki chemiczne należy klasyfikować w oparciu o ich strukturę chemiczną (np. flawonoidy, terpenoidy, alkaloidy itd.). Tam, gdzie jest to możliwe, należy wskazać zakres, w jakim składniki pozostają obecne w konkretnych częściach substancji lub preparatu botanicznego.
- Składniki charakteryzujące jakość, chemiczny „odcisk palca”, proces produkcyjny i/lub stopień aktywności biologicznej preparatu (znaczniki).
- Składniki budzące zastrzeżenia z uwagi na posiadane właściwości chemiczne, fizjologiczne bądź toksykologiczne.

W niektórych przypadkach zidentyfikowanie aktywnego składnika odpowiadającego za dany skutek może nastęrczać trudności. Z tego powodu należy także określić wagę materiału dowodowego wskazującego na istnienie zastrzeżeń w odniesieniu do analizowanego związku chemicznego.”

Grupa Robocza ma świadomość, że nierzadko dokonanie identyfikacji składnika bądź grupy składników budzących zastrzeżenia może nastęrczać trudności. Przykładem może być galusan epigallokatechiny (EGCG) obecny w herbacie chińskiej (*Camellia sinensis*), stanowiący czynnik

istotny z punktu widzenia jego ilości i jednocześnie czynnik przydatny z punktu widzenia dokonywania charakterystyki jakości preparatu, co do którego jednak jak do tej pory nie udało się ustalić ponad wszelką wątpliwość, że ma on związek ze zjawiskiem hepatotoksyczności wyciągu z suszonych liści zielonej herbaty (patrz Załącznik 2).

1.1.1.4. Specyfikacje

Wytyczne stwierdzają, że konieczne jest podawanie specyfikacji odnoszących się do substancji bądź preparatów botanicznych. Mogą one bazować na składnikach czynnych biologicznie lub składnikach odżywczych bądź też, w przypadku, kiedy brak jest danych na temat zarówno jednych, jak i drugich – na wybranych znacznikach chemicznych. Należy wskazać maksymalne wartości dla konkretnych substancji niepożądanych/toksycznych lub też brak takowych substancji.

Grupa Robocza zaznaczyła, że zawarcie wszystkich preparatów uzyskanych na bazie danej substancji botanicznej w jednym dokumencie wydaje się pomysłem nierealistycznym. Dlatego właśnie w przykładach zawartych w załącznikach wskazano konkretne preparaty celem ich oceny zgodnie z treścią wytycznych.

Grupa Robocza wskazała także, że wytyczne powinny w bardziej dokładny sposób określać, jak należy identyfikować charakter substancji botanicznej oraz bazującego na niej preparatu mającego podlegać ocenie. W powyższym zakresie stosować należy specyfikacje powiązane z określonymi procesami produkcji. Jako przykład tego, w jaki sposób należy to uczynić, posłużyć mogą specyfikacje zawarte w załącznikach.

Grupa Robocza podkreśliła, że zgodnie z tym, co już wcześniej wskazano w treści wytycznych, proponowane specyfikacje powinny być modelowane na specyfikacjach opracowanych w ostatnim czasie w Europie bądź innych specyfikacjach cieszących się międzynarodowym uznaniem. W sytuacji, gdy proponowane specyfikacje znacząco odbiegają od innych, cieszących się międzynarodowym uznaniem specyfikacji, należy zestawić je ze sobą, wskazując na występujące różnice. Na potrzeby analizowania związków chemicznych uwzględnionych w treści specyfikacji najlepiej jest wykorzystywać sprawdzone i powszechnie znane metody.

Grupa Robocza wskazała, że w sekcji wytycznych poświęconej specyfikacjom brakuje odniesienia do możliwych aspektów dotyczących zanieczyszczeń i że w celu naprawienia tego niedopatrzenia można wykorzystać istniejące już regulacje.

Grupa Robocza wskazała ponadto, że skład substancji bądź preparatu chemicznego może różnić się znacząco z uwagi na czynniki, nad którymi nie da się w prosty sposób zapanować.

Grupa Robocza uznała za stosowne zdefiniować w treści specyfikacji także wymagania dotyczące pozostałości pestycydów, mykotoksyn, metali ciężkich oraz pozostałości policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PAH). Mimo iż zagadnienie to można uznać za odnoszące się do kontroli jakości, Grupa Robocza uznała, że jest to zagadnienie znaczące w obszarze substancji i preparatów botanicznych i że nie można go lekceważyć. Zauważono, że niektóre rodzaje zanieczyszczeń (np. PAH w preparatach suszonych) mogą pojawiać się w trakcie produkcji i że należy zapewnić, aby ich ilość pozostawała w bezpiecznych granicach.

Uwzględniając wszystkie powyższe zastrzeżenia, Grupa Robocza proponuje poszerzenie sekcji poświęconej specyfikacjom poprzez dodanie do niej tekstu o treści następującej:

„Specyfikacje obejmować powinny dane dotyczące stężeń podstawowych grup składników występujących w preparacie botanicznym, wliczając w to, przykładowo: aminokwasy, lipidy, polisacharydy, olejki eteryczne, jony nieorganiczne, polifenole, alkaloidy, terpeny, alkenylobenzeny, ligninę, saponiny itd., a także zasadnicze składniki należące do tychże klas.

Dodatkowo, należy przedstawić propozycje dotyczące maksymalnych poziomów ewentualnych zanieczyszczeń, np. metali ciężkich, mykotoksyn oraz pozostałości pestycydów i

1.1.1.5. Stabilność substancji botanicznych bądź preparatów botanicznych wykorzystywanych w roli składników suplementów diety

Wytyczne stwierdzają, że stabilność składnika botanicznego należy wykazać dla całego okresu trwałości produktu. Należy także przekazać wszelkie informacje dotyczące ewentualnej degradacji.

Grupa Robocza wskazała, że dane dotyczące stabilności często nie są udostępniane i że stabilność w dużej mierze zależy będzie od warunków przechowywania danego produktu.

1.1.1.6. Proponowane zastosowania i poziomy zastosowania

Wytyczne stanowią jedynie, że należy przedstawić informacje na temat planowanego wykorzystania oraz zalecanego spożycia odnośnie każdego produktu.

Grupa Robocza wskazała, że konieczne może być uwzględnianie dodatkowych specyfikacji odnoszących się do planowanych sposobów wykorzystania. Komitet Naukowy może poddać pod rozagę to, czy w danej sytuacji nacisk kładziony jest wyłącznie na wykorzystanie spożywcze, czy też należy wziąć pod uwagę także inne zastosowania np. związane z produkcją perfum czy też z kontaktem produktu ze skórą.

Grupa Robocza zauważyła ponadto, że przydatną praktyką jest wskazywanie sposobów wykorzystania produktu w sposób skonkretyzowany dla następujących kategorii:

- Powszechne artykuły spożywcze
- Suplementy
- Produkty medyczne

Szczególną uwagę należy poświęcić tym częściom populacji, dla których sposoby wykorzystania danych substancji mają charakter specyficzny, np. spożycie herbat opartych na koprze włoskim (*Foeniculum*) przez małe dzieci. W zakresie wykorzystania na potrzeby produktów spożywczych często brakuje informacji dotyczących kwestii ilościowych.

Grupa Robocza poczyniła także spostrzeżenie, że informacje dotyczące zastosowań i poziomów zastosowań powinny także wskazywać czas stosowania (zob. sekcja 1.1.2), ponieważ, przykładowo, zastosowanie w charakterze leku ziołowego może dotyczyć jedynie krótkich okresów, podczas gdy wykorzystanie jako składnika żywności może powodować, że konsument mieć będzie kontakt z daną substancją przez okres całego życia.

Grupa Robocza sugeruje, aby treść wytycznych w omawianej sekcji uzupełnić o następujący akapit:

„Informacje dotyczące planowanego wykorzystania oraz zalecanego spożycia powinny wyraźnie określać zastosowania i poziomy zastosowania dla następujących kategorii:

- Powszechne artykuły spożywcze
- Suplementy
- Produkty medyczne

Szczególne uwagi należy poświęcić częściom populacji, dla których sposoby wykorzystania danych substancji mają charakter specyficzny (np. małe dzieci). Należy ponadto uwzględnić informacje dotyczące proponowanego zastosowania oraz poziomów zastosowania”.

1.1.1.7. Informacje dotyczące istniejących analiz

Wytyczne stanowią, że należy informować o istniejących analizach dokonanych przez właściwe organy państwowe bądź też inne instytucje.

Grupa Robocza sugeruje, że w treści wytycznych należy dodać także wzmiankę o „Instytucjach Europejskich/Międzynarodowych”, ponieważ istniejące analizy powinny, w optymalnej sytuacji, pochodzić od uznanych instytucji o charakterze międzynarodowym bądź państwowym. Założywszy, że zmiana ta zostałaby zaakceptowana, powyższy tekst otrzymałby brzmienie następujące:

„Należy uwzględnić informacje dotyczące jakichkolwiek istniejących analiz dokonanych przez instytucje międzynarodowe bądź też przez właściwe organy państwowe.”

1.1.2. Narażenie: zakres i czas trwania

Grupa Robocza proponuje zmianę treści nagłówka omawianej sekcji wytycznych, tak aby w miejsce sformułowania „Narażenie: zakres i czas” znalazło się tam sformułowanie „Narażenie: zakres i czas trwania”, a także aby termin „czas” zastąpić terminem „czas trwania” w odpowiednich punktach omawianej sekcji.

Dodatkowo, Grupa Robocza pragnie także podkreślić, że na podstawie analizowanych przykładów dało się stwierdzić, że wyniki analizy narażenia często zdawały się mieć decydujący wpływ na rezultaty analizy bezpieczeństwa substancji lub preparatów botanicznych. Przykładowo, margines narażenia (MOE) w odniesieniu do spożycia estragolu w efekcie zażywania preparatów na bazie *Foeniculum vulgare* jest w dużej mierze uzależniony od wyników oceny narażenia (Załącznik 4).

Grupa Robocza wskazała także, że często brak jest odpowiednich danych, a nawet odpowiednich narzędzi pozwalających na dokonanie odpowiedniej oceny narażenia. Można przykładowo poddawać w wątpliwość to, czy dostępne dziś narzędzia pozwalają dokonać oceny spożycia synefryny pozyskiwanej z pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium*) wskutek jej wykorzystywania w produkcji marmolady, jako że 15 szerokich kategorii żywności funkcjonujących w ramach Uproszczonej Europejskiej Bazy Danych EFSA może nie być na tyle złożonych, aby pozwolić na dokonanie oceny poziomu narażenia dla marmolady wytwarzanej na bazie pomarańczy gorzkiej.

Grupa Robocza wskazała, że możliwe jest, że konieczne stanie się opracowanie i/lub uzgodnienie odpowiednich strategii w zakresie oceny narażenia w odniesieniu do substancji i preparatów botanicznych, jako że w większości przypadków składniki analizowane są w sposób całościowy i nie są właściwie wyizolowane.

Grupa Robocza podkreśla także, że dane dotyczące aktualnych zastosowań oraz poziomów zastosowań substancji i preparatów botanicznych mogą być niewystarczające bądź też nawet że mogą występować w ich zakresie braki.

Grupa Robocza wskazała, że tego rodzaju niepewność w zakresie oceny narażenia jest już w tej chwili uwzględniona poprzez zastosowanie zawartego w treści wytycznych wymogu stanowiącego, że „należy w sposób klarowny opisywać czynniki niepewności odnoszące się do analizowanych danych dotyczących spożycia żywności oraz przewidywane zakresy narażenia.”

Grupa Robocza stwierdziła, że należy poczynić wyraźne rozróżnienie pomiędzy spożyciem samej substancji botanicznej a spożyciem jej olejków eterycznych oraz innych powstałych na jej bazie preparatów, jako że stężenia określonych składników oraz ich skład chemiczny mogą znacząco różnić się w przypadku poszczególnych preparatów.

Aby być w stanie w szerszym zakresie uwzględnić wskazany wyżej fakt, zawarty w treści wytycznych w omawianej sekcji podpunkt i) o treści następującej: "Oczekiwany poziom narażenia na składnik botaniczny, wliczając w to ilość (np. maksymalne i średnie dzienne spożycie lub narażenie), częstotliwość oraz czas trwania. Istotne jest, aby w takim zakresie, w jakim tylko będzie to możliwe, dokonać charakterystyki oczekiwanej narażenia na składnik botaniczny zgodnie z zalecanymi dot. sposobów wykorzystania odnośnie zakresu oraz czasu trwania."

należałoby uzupełnić poprzez dodanie zdania o treści następującej:

„Należy poczynić wyraźne rozróżnienie pomiędzy spożyciem samej substancji botanicznej a spożyciem jej olejków eterycznych oraz innych powstałych na jej bazie preparatów.”

Kwestią, którą należy w sposób szczególny uwzględnić w ramach dokonywanej oceny jest to, czy proponowane zastosowania oraz poziomy zastosowania przyczynią się do zwiększenia aktualnego poziomu narażenia wśród istot ludzkich. Kwestia ta może być szczególnie istotna w przypadkach, kiedy wykorzystanie substancji bądź preparatu botanicznego pociągałaby za sobą ekspozycję na związki chemiczne o charakterze genotoksycznym i rakogennym; przydatną ilustracją jest tutaj przykład *Foeniculum* zawierającego estragol (należący do grupy alkilobenzenów) (Załącznik 4). Aby uwzględnić omawianą kwestię należałoby dodać na końcu omawianej sekcji zdanie o treści następującej:

„Kwestią, którą należy w sposób szczególny uwzględnić w ramach dokonywanej oceny jest to, czy proponowane zastosowania oraz poziomy zastosowania przyczynią się do zwiększenia aktualnego poziomu narażenia w odniesieniu do istot ludzkich.”

Grupa Robocza zauważyła wreszcie, że dane dotyczące narażenia powinny także określać czas trwania narażenia.

1.1.3. Dane toksykologiczne

Grupa Robocza nie stwierdziła konieczności wprowadzania jakichkolwiek zmian w treści omawianej sekcji wytycznych.

1.2. Proponowane ogólne ramy oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych wykorzystywanych jako suplementy diety

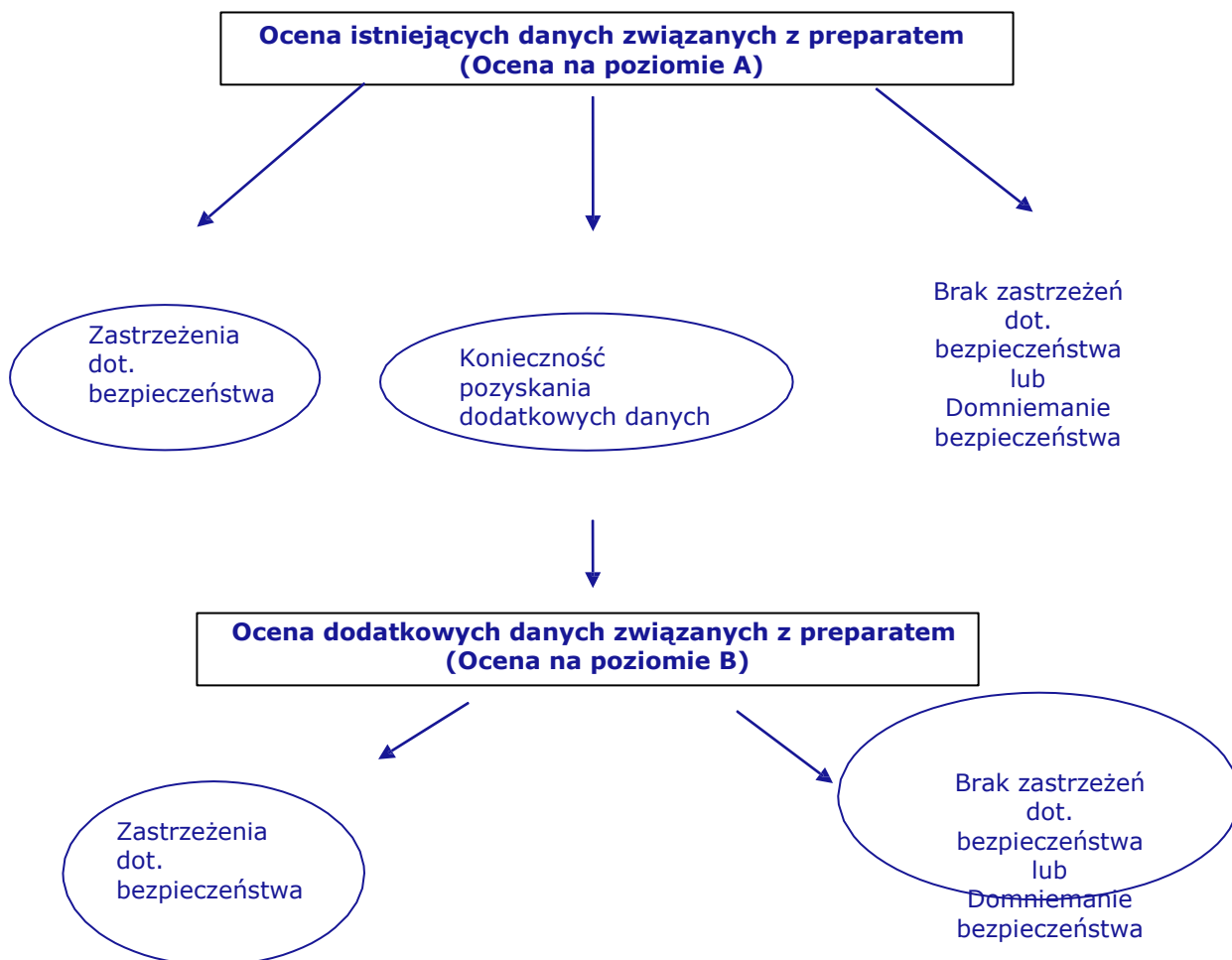
Podejście zaproponowane w treści wytycznych dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych nieuwzględnionych w ramach konkretnych regulacji takich jak regulacje dotyczące „nowej żywności” (novel food) czy GMO bazuje na dwóch następujących poziomach:

- Poziom A: Domniemanie bezpieczeństwa na podstawie dostępnej wiedzy.
- Poziom B: Konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych.

Podczas testowania proponowanego podejścia stadialnego dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych w oparciu o kilka wybranych przypadków stało się jasne, że nagłówek stanowiący oznaczenie poziomu A mógł wprowadzać odbiorcę w błąd. Przeprowadzenie oceny na poziomie A mogło w rzeczy samej doprowadzić do wniosku takiego, jaki sama nazwa tego poziomu sugerowała, a mianowicie że można zastosować domniemanie bezpieczeństwa na podstawie dostępnej wiedzy (tak jak w przypadku *Triticum aestivum* opisanego w Załączniku 6 bądź też niektórych wyciągów z *Camellia sinensis* opisanych w Załączniku 2), jednocześnie jednak ocena przeprowadzona na podstawie istniejącej wiedzy (ocena na poziomie A) mogła także doprowadzić do wniosku że dany produkt nie jest w pełni bezpieczny bądź też że konieczne jest przeprowadzenie dalszych testów i/lub pozyskanie dodatkowych danych. Oznacza to, że pierwotne oznaczenie poziomu A odzwierciedla jedynie jeden z trzech możliwych rezultatów oceny dostępnej wiedzy. Z tej też przyczyny Grupa Robocza pragnie zaproponować zmianę brzmienia tytułu poziomu A tak, aby było ono następujące:

„Poziom A: ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnej wiedzy”,

oraz aby w treści wytycznych znalazł się następujący schemat:



1.2.1. Poziom A: Ocena dostępnych danych – brak konieczności prowadzenia dalszych testów (domniemanie bezpieczeństwa na podstawie długotrwałego wykorzystywania jako składnik produktów spożywczych na terenie Europy)

Uwzględniając uwagi zamieszczone powyżej, tytuł tej sekcji w ramach wytycznych należy zmodyfikować tak, aby uzyskał on brzmienie następujące:

„Poziom A: ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnej wiedzy”.

Grupa Robocza pragnie podkreślić, że dana substancja botaniczna zawierać może kilka różnych związków chemicznych budzących zastrzeżenia z punktu widzenia bezpieczeństwa konsumentów. Wytyczne powinny w sposób jasny wskazywać, które z tych związków chemicznych należy wziąć pod uwagę, a które można pominąć. Grupa Robocza wskazała, że nie zawsze łatwą rzeczą jest zidentyfikować związek chemiczny mający działanie toksyczne. Przykładowo: w przypadku wyciągu z zielonej herbaty, galusan epigallokatechiny (EGCG) uznawany jest za związek mający charakter znacznika, ale nie udowodniono do tej pory jednoznacznie, że jest to jedyny związek chemiczny odpowiedzialny za niekorzystny wpływ preparatów z zielonej herbaty na wątrobę (Załącznik 2).

Powyżej przedstawiono już sugestię, aby w sekcji dotyczącej składu chemicznego dodać zdanie o brzmieniu następującym: „W niektórych przypadkach zidentyfikowanie aktywnego składnika odpowiadającego za dany skutek może nastęrczać trudności. Z tego powodu należy także określić wagę materiału dowodowego wskazującego na istnienie zastrzeżeń dot. bezpieczeństwa w odniesieniu do analizowanego związku chemicznego.” Sformułowanie to można zastosować w nieco zmienionej formie także w sekcji dotyczącej oceny na poziomie A, w brzmieniu następującym:

„Jeśli istnieje możliwość dokładnego określenia związków chemicznych budzących zastrzeżenia, wówczas podczas oceny można skoncentrować się na tych konkretnych związkach chemicznych. W niektórych przypadkach zidentyfikowanie aktywnego składnika odpowiadającego za dany skutek może nastęrczać trudności. W tego rodzaju sytuacjach waga materiału dowodowego leżącego u podstaw zastrzeżeń dotyczących związku chemicznego wykorzystywanego jako związek referencyjny na potrzeby oceny bezpieczeństwa także powinna zostać odpowiednio określona.

Kolejną kwestią, którą należy w ramach wytycznych poddać bardziej szczegółowej analizie, jest to, w jakim zakresie jesteśmy w stanie dokonać ekstrapolacji z konkretnego preparatu na inny preparat oraz z konkretnej substancji botanicznej na inną substancję botaniczną (z zachowaniem tych samych związków chemicznych budzących zastrzeżenia z toksykologicznego punktu widzenia).

Grupa Robocza doszła do wniosku, że dane toksykologiczne dotyczące konkretnego suszonego wyciągu nie mogą być zastosowane względem innego wyciągu bez przedstawienia dowodów występowania ekwiwalentnego schematu w odniesieniu do ich składu chemicznego. Fakt ten należy podkreślić w treści wytycznych poprzez zawarcie tam następującego sformułowania:

„Ekstrapolacji z konkretnego preparatu na inny preparat oraz z konkretnej substancji botanicznej na inny środek botaniczny zawierający te same związki chemiczne budzące zastrzeżenia z punktu widzenia toksykologii można dokonać jedynie wtedy, kiedy istnieją dowody na to, że oba analizowane preparaty/substancje botaniczne charakteryzują takie same schematy w zakresie ich zażywania oraz składu chemicznego.”

Wytyczne stanowią, że w przypadkach, gdy nie są dostępne wartości wzorcowe oparte na kryteriach zdrowotnych bądź też gdy dany środek lub preparat botaniczny zawiera substancje posiadające cechy zarówno genotoksyczne, jak i rakogenne, można zastosować podejście bazujące na zasadzie „Marginesu Narażenia” (MOE)⁵ w odniesieniu zarówno do badanych substancji botanicznych jak również do wszelkich innych źródeł narażenia związanych z żywieniem. Metoda MOE opiera się na porównaniu poziomów oddziaływania toksycznego oraz poziomów narażenia dla istot ludzkich. Grupa Robocza stwierdza, że w treści wytycznych powinno znaleźć się bardziej wyraźne stwierdzenie odnośnie tego, w jaki sposób osoby dokonujące oceny ryzyka powinny obchodzić się z aplikacjami/preparatami tak aby wzrost narażenia na analizowaną substancję był zerowy bądź co

Opinia ESCO odnośnie wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji botanicznych najwyżej znikomy. Ponadto należałoby także zamieścić sformułowanie określające, jaką metodę można byłoby zastosować zamiast metody opartej na kalkulacji MOE.

W tym celu treść wytycznych uzupełnić należy o sformułowanie następujące:

⁵ Zob. http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc_committee/sc_opinions/1201.html

„Substancje lub preparaty botaniczne dla których na podstawie metody MOE uzyskano wskazanie niskiego poziomu priorytetu dla zarządzania ryzykiem w odniesieniu do budzącego zastrzeżenia składnika o działaniu genotoksycznym lub rakogennym bądź też dla których poziom narażenia na tego rodzaju składnik wynikający z proponowanego zastosowania oraz poziomów zastosowania substancji bądź preparatu botanicznego byłyby znikomy w porównaniu do normalnego spożycia danego składnika w ramach stosowanej diety z innych źródeł, uznane mogą być za substancje bądź preparaty botaniczne nie budzące zastrzeżeń z punktu widzenia bezpieczeństwa, biorąc pod uwagę fakt, że baza danych opisująca inne punkty końcowe w badaniu toksykologicznym także nie daje podstaw do jakichkolwiek zastrzeżeń.”

Wytyczne wskazują, że w przypadkach, kiedy zaleca się zastosowanie efektu matrycowego w celu dostarczenia dowodów na potwierdzenie tezy, iż określone stężenia poszczególnych związków chemicznych nie powodują jakichkolwiek zagrożeń (np. w przypadku, kiedy użycie danych dla związku chemicznego w postaci czystej może skutkować przeszacowaniem skutków działania związku chemicznego w ramach matrycy roślinnej, należy przeprowadzić odpowiednie testy i/lub dostarczyć dodatkowe dane celem wykazania występowania efektu matrycowego dla danego preparatu oraz określenia skali tego zjawiska. Grupa Robocza wskazuje, że należy położyć dodatkowy nacisk na znaczenie efektu matrycowego i że być może zagadnieniu temu należałoby poświęcić więcej uwagi poprzez zawarcie w treści wytycznych bardziej rozbudowanej sekcji dotyczącej tej kwestii. Powinno się przykładowo wskazać, że efekt matrycowy należy oceniać na podstawie przypadków jednostkowych i że efekt ten może prowadzić zarówno do zmniejszenia, jak i zwiększenia poziomu toksyczności (np. toksyczność EGCG wydaje się osiągać wyższe wartości w przypadku wyciągów z zielonej herbaty niż w przypadku substancji w postaci czystej – zob. Załącznik 2).

Grupa Robocza proponuje zamieszczenie w treści wytycznych odrębnego akapitu poświęconego możliwości występowania efektu matrycowego oraz interakcjom z innymi związkami chemicznymi. W tym celu postuluje się rozszerzenie wskazanego wyżej sformułowania zawartego w treści wytycznych zgodnie z poprzednim oświadczeniem wystosowanym przez panel AFC (http://www.efsa.eu.int/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902090253.htm), i zaprezentowanie tegoż sformułowania w formie oddzielnego akapitu o treści następującej:

„Istnieje prawdopodobieństwo, że charakterystyka kinetyczna oraz formy ekspresji immanentnej toksyczności występującej w przyrodzie substancji mogą ulegać zmianom spowodowanym oddziaływaniem matrycy w której substancja ta się znajduje. W zależności od mechanizmu działania, poziom toksyczności może pozostać niezmienny, ale może on także spaść, a nawet wzrosnąć. badania poświęcone indywidualnym interakcjom na linii substancja/matryca bądź też indywidualnym preparatom botanicznym nie mogą być wykorzystywane na potrzeby formułowania na ich podstawie ogólnych wniosków dotyczących nieprzetworzonych substancji botanicznych, ziół czy przypraw we wszystkich warunkach w zakresie ich zastosowania, spożycia oraz przemian metabolicznych. W przypadkach, zaleca się zastosowanie efektu matrycowego w celu dostarczenia dowodów na potwierdzenie tezy, iż określone stężenia poszczególnych związków chemicznych nie powodują jakichkolwiek zagrożeń (np. w przypadku, kiedy użycie danych dla związku chemicznego w postaci czystej może skutkować przeszacowaniem skutków działania związku chemicznego w ramach matrycy roślinnej), należy przeprowadzić odpowiednie testy i/lub dostarczyć dodatkowe dane celem wykazania występowania efektu matrycowego dla danego preparatu oraz skali tego zjawiska. Efekt matrycowy należy poddawać ocenie na podstawie przypadków jednostkowych.”

Grupa Robocza wskazuje, że w sytuacji, gdy występowanie efektu matrycowego udowodnione zostanie w odniesieniu do olejku eterycznego, oddziaływanie tegoż efektu matrycowego będzie odmienne od efektu matrycowego dla substancji botanicznej w postaci nieprzetworzonej. Problem ten rozwiązany został poprzez zawarcie w powyższej sekcji sformułowania stanowiącego, że badania poświęcone indywidualnym interakcjom na linii substancja/matryca bądź też indywidualnym

preparatom botanicznym nie mogą być wykorzystywane na potrzeby formułowania na ich podstawie ogólnych wniosków dotyczących nieprzetworzonych substancji botanicznych, ziół czy przypraw we wszystkich możliwych warunkach w zakresie ich zastosowania, spożycia oraz przemian metabolicznych zachodzących z ich udziałem oraz że efekt matrycy należy oceniać na podstawie przypadków jednostkowych.

Grupa Robocza poczyniła także spostrzeżenie, że w sekcji dotyczącej toksykologii powinny znaleźć się dane odnoszące się do zbadanych interakcji (np. substancje ziołowe-lekarstwa), ponieważ interakcje takie w wielu przypadkach zostały już odpowiednio udokumentowane.

W tym celu należy uzupełnić treść wytycznych o sformułowanie następujące:

„Należy uwzględnić wszelkie dane dotyczące występowania możliwych interakcji (np. substancje ziołowe-lekarstwa) pod warunkiem, że są one dostępne.”

1.2.2. Poziom B: Konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych

Zgodnie z treścią projektu propozycji dotyczącej danych wymaganych na potrzeby zarządzania ryzykiem w odniesieniu do substancji aromatyzujących, będącego aktualnie przedmiotem dyskusji na forum Panelu EFSA dot. Materiałów Przeznaczonych do Kontaktowania z Żywnością, Enzymów, Substancji Aromatyzujących oraz Substancji Pomagających w Przetwarzaniu (CEF), Grupa Robocza sugeruje zastąpienie sekcji wytycznych poświęconej Genotoksyczności sekcją o brzmieniu następującym:

„ - test indukcji mutacji genetycznych u bakterii (test Ames; wytyczna OECD 471)

- test indukcji mutacji genetycznych i oddziaływania chromosomalnego w komórkach ssaków (test mutacji genu kinazy tymidynowej na komórkach chłoniaka myszy z badaniem wielkości kolonii; wytyczna OECD 476)

Test aberracji chromosomalnej *in vitro* (wytyczna OECD 473) bądź też test mikrojąder *in vitro* (wytyczna OECD 487, w przygotowaniu) także byłyby możliwe do zaakceptowania jako alternatywa dla testu na komórkach chłoniaka myszy. W pewnych okolicznościach odstępstwo od wskazanego wyżej podstawowego zestawu badań może być uzasadnione. W tego rodzaju przypadkach należy podać odpowiednie uzasadnienie naukowe; konieczne mogą być także dodatkowe analizy bądź badania mechanistyczne.

Po przeprowadzeniu jednego bądź kilku pomyślnych testów *in vitro* zazwyczaj należy przeprowadzić test *in vivo*, chyba że uda się w odpowiedni sposób wykazać, że pozytywne wyniki testów *in vitro* nie będą mieć znaczenia w kontekście *in vivo*. Wybór odpowiedniego testu *in vivo* ma krytyczne znaczenie z uwagi na różnice w zakresie wrażliwości, punktów końcowych oraz innych zmiennych. Wybór badania wymaga eksperckiej oceny opartej o całokształt dostępnych informacji, która dokonywana musi być w sposób indywidualny. Z tego powodu podejście o charakterze elastycznym jest uważane za bardziej korzystne niż zastosowanie sztywnego schematu drzewa decyzyjnego. Wytyczne w zakresie działań prowadzonych w następstwie uzyskania pomyślnych wyników testów *in vitro* zawarto w sekcji 3.10.5.6 Wytycznych Natury Technicznej ws. Oceny Ryzyka dla Substancji Chemicznych i Środków Biobójczych (TGD) (EC, 2003). Zgodnie z wskazanymi powyżej wytycznymi, test mikrojąder u myszy oraz test nieplanowanej syntezy DNA (UDS) w komórkach wątroby szczurów zalecane są dla substancji odznaczających się adekwatną dostępnością ogólnoustrojową (co oznacza, że istnieją dowody na adekwatną dostępność danej substancji dla komórek docelowych). W przypadku substancji odznaczających się krótkim okresem przydatności, stanowiących czynniki bezpośrednio genotoksyczne w warunkach *in vitro* lub też dla których nie określono poziomu dostępności ogólnoustrojowej, zaleca się zastosowanie strategii obejmującej badania na tkankach w miejscach pierwszego kontaktu. Dla tego rodzaju substancji za podstawowe opcje zgodnie z wytycznymi TGD uważa się badanie kometowe prowadzone w warunkach *in vivo*, testy mutacji genetycznej u zwierząt transgenicznych oraz badania adduktów DNA prowadzone w warunkach *in vivo*. W szczególności zaleca się zastosowanie badania kometowego w warunkach *in vivo* jako uzupełnienie badania mikrojąder u myszy. Badanie kometowe ma tę zaletę, że umożliwia ono analizę tkanek w miejscach pierwszego kontaktu z organizmem oraz że możliwa jest równoległa analiza kilku różnych tkanek. Co więcej, w ostatnim czasie udało się wykazać, że test kometowy jest w stanie wykryć kilka różnych rakogenów, dla których wyniki testu mikrojąder w warunkach *in vivo* były negatywne, a także że czułość testu (t.j. jego zdolność pozytywnego wykrywania czynników rakotwórczych) jest ewidentnie wyższa niż w przypadku badania UDS w warunkach

in vivo oraz testów na zwierzętach transgenicznych, podczas gdy specyficzność testu kometowego jest nieco wyższa niż w przypadku testów na zwierzętach transgenicznych (Kirkland i Speit, 2008). Rozwiązaniem możliwym do zaakceptowania byłoby też łączne zastosowanie testu mikrojąder w warunkach *in vivo* oraz testu kometowego w ramach jednej analizy, zgodnie z zaleceniami, które przedstawiają Pfuhrer i in. (2007).

Analizy winny być prowadzone z zastosowaniem uzgodnionych na forum międzynarodowym protokołów. Zaleca się stosowanie metod badań opisywanych przez OECD bądź też w treści Dyrektyw Komisji Europejskiej. Należy zawsze stosować najbardziej aktualną wersję wytycznych dotyczących danego testu. Badania należy przeprowadzać zgodnie z zasadami Dobrych Praktyk Laboratoryjnych (GLP) opisanych w treści Dyrektyw Rady Europejskiej 87/18/EWG oraz 88/320/EWG oraz załączyć do nich oświadczenie o zgodności z zasadami GLP. Zastosowanie jakichkolwiek metod niezgodnych z treścią uzgodnionych międzynarodowo protokołów należy odpowiednio uzasadnić. Dla badania kometowego nie istnieją jeszcze w chwili obecnej odpowiednie wytyczna OECD. Opublikowano jednak zalecenia dotyczące właściwego wykonywania badania kometowego na bazie wytycznych OECD dot. innych testów prowadzonych w środowisku *in vivo*, ponadto zaś opracowany został standardowy protokół i kryteria akceptacji dla tego badania w ramach Międzynarodowych Warsztatów dla Grup Roboczych dot. Zagadnienia Genotoksyczności oraz międzynarodowych warsztatów poświęconych zagadnieniu badania kometowego (Tice i in., 2000; Hartman i in., 2003; Burlinson i in., 2007). Dodatkowe informacje pozyskać można ze strony internetowej poświęconej zagadnieniu badania kometowego (<http://cometassay.com>)”

WNIOSKI I ZALECENIA

Grupa Robocza ESCO dokonała identyfikacji szeregu możliwych poprawek i uzupełnień wytycznych dotyczących oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych w celu uczynienia tego dokumentu bardziej szczegółowym i kompleksowym.

Grupa Robocza ESCO zaleca dołączenie schematu blokowego dotyczącego efektów oceny bezpieczeństwa na poziomach A i B do treści wytycznych.

Jak już wskazano w treści wytycznych, Grupa Robocza ESCO zaleca regularne aktualizowanie Kompendium substancji botanicznych w których stwierdzono obecność substancji toksycznych, uzależniających, psychotropowych bądź innych substancji budzących zastrzeżenia. Grupa Robocza ESCO zaleca także rozszerzenie bieżącego zakresu kompendium celem objęcia nim także roślin egzotycznych (pochodzących głównie z Ameryki Południowej, Chin (zagadnienie roślin z tych regionów jest obecnie przedmiotem prac Komisji ds. Medycznych Produktów Ziołowych Europejskiej Agencji ds. Leków (EMEA)), Afryki oraz tzw. regionów najbardziej oddalonych UE). W istocie, w ramach prowadzonej aktualnie rewizji Rozporządzenia o Nowej Żywności zakłada się, że „należy brać pod uwagę historyczne dane na temat bezpiecznego użytkowania substancji w państwie trzecim, będącym krajem jej pochodzenia... Jeśli Państwa Członkowskie i/lub Urząd nie przedstawią jakichkolwiek uzasadnionych obiekcji w zakresie bezpieczeństwa, opartych na dowodach naukowych,... wówczas uznawać się będzie, że należy dopuścić dany produkt żywnościowy na rynek Wspólnoty po odpowiednim notyfikowaniu takiego zamiaru...”. Tego rodzaju zmiana pozwoliłaby EFSA oraz państwom członkowskim uzyskać przydatne źródło informacji na temat budzących zastrzeżenia substancji obecnych w produktach roślinnych.

Grupa Robocza ESCO zaleca wreszcie dokonanie harmonizacji podejścia do zagadnienia testów w zakresie genotoksyczności i tym samym przeprowadzenie aktualizacji wytycznych poprzez uwzględnienie

PRZYPISY

European Commission (EC) 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment – Part 1. http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/TECHNICAL_GUIDANCE_DOCUMENT/EDITION_2/tgd_part1_2ed.pdf

Hanelt, P. (Ed.) 2001. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Springer. ISBN 3540410171.

Mansfeld's World Database of Agricultural and Horticultural Crops. IPK © Gatersleben. http://mansfeld.ipk-gatersleben.de/pls/htmldb_pgrc/f?p=185:3:1017216509346775

The International Plant Names Index. Published on the Internet: <http://www.ipni.org>

United States Department of Agriculture (USDA), ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network – (GRIN) [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?598>

World Checklist of Selected Plant Families. [Online Database]. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet: <http://apps.kew.org/wcsp/>

ZAŁĄCZNIK A: CITRUS AURANTIUM L. SSP. AURANTIUM L.

Niniejszy raport koncentruje się na ekstraktach wodno-alkoholowych z niedojrzałych owoców o ustandaryzowanej zawartości 6% *p*-synefryny.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przetestowanie proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie jest zadaniem niniejszego dokumentu dokonywanie formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanej substancji bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter substancji i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy; nie może on też być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanej substancji botanicznej ani też wszystkich możliwych jej składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa substancji botanicznej. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Tożsamość i charakter materiału źródłowego

Nazwa naukowa: *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L.

Synonimy: *C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.

[Uwagi: *Citrus* × *aurantium* jest najprawdopodobniej starożytną hybrydą stworzoną na bazie *Citrus reticulata*; w literaturze naukowej z dziedzin innych niż botanika gatunki, podgatunki i odmiany z rodzaju *Citrus* są często mylone]

Nazwy zwyczajowe: Pol.: Pomarańcza gorzka
Ang.: Neroli, bitter/sour/Seville/Bigarade orange tree
Fr.: Orange amère, bigaradier
Niem.: Bitterorangenbaum, Pomeranzenbaum
Wł.: Arancio amaro, neroli

Rodzina: Rutaceae

Wykorzystywana część rośliny: W suplementach diety znaczących z punktu widzenia niniejszego raportu: Owoce niedojrzałe suszone (w całości), suszona skórka owoców niedojrzałych (nazwa stosowana w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej (TCM): *zhi shi*), suszona skórka owoców dojrzałych (nazwa stosowana w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej: *zhi qiao*) oraz sporządzone na ich

bazie ekstrakty wodno-alkoholowe, zazwyczaj odznaczające się ustandaryzowaną zawartością *p*-synefryny (np. 6% *p*-synefryny).

Inne części wykorzystywane w ramach produkcji żywności, środków farmaceutycznych oraz na potrzeby etnomedycyny: liście, pąki, gałązki, suszone kwiaty w postaci zamkniętej (w całości) (*Aurantii amari* flos Ph. Eur. 6), świeże dojrzałe owoce (w całości), sok z świeżych dojrzałych owoców, skórka świeżych dojrzałych owoców, suszony epikarp i mezokarp owoców dojrzałych po częściowym odseparowaniu białej, gąbczastej tkanki mezokarpu i endokarpu (*Aurantii amari* epicarpium et mesocarpium Ph. Eur. 6), olejek eteryczny z liści i pąków (olejek petigrain), olejek eteryczny ze świeżych kwiatów (*Neroli aetheroleum* Ph. Eur. 6), olejek eteryczny ze świeżej skórki owoców

Pochodzenie geograficzne: Naturalne występowanie: południowe zbocza Himalajów.

Warunki dot. wzrostu i zbioru: Roślina uprawiana w południowych i subtropikalnych obszarach Europy i Ameryki, krajach śródziemnomorskich i na Karaibach; importowana z Hiszpanii, Portugalii, Włoch, Izraela, Meksyku oraz wysp karaibskich. Na terenie USA drzewka pomarańczowe występują jako roślina uprawna w stanie Arizona, gdzie szczytowy okres zbioru owoców przypada w styczniu. W Chinach owoce zbiera się, gdy są dojrzałe (lipiec), mimo iż nadal mają one zieloną barwę, bądź też gdy są jeszcze niedojrzałe (od maja do czerwca – owoce nie są jeszcze w pełni rozwinięte). Kwiaty zbiera się przed okresem kwitnienia.

2. Proces wytwarzania

Skórki owoców wykorzystuje się głównie po ich wysuszeniu. Zewnętrzna część owocni podlega złuszczeniu, tworząc obierki w kształcie spirali. Wymogi jakościowe na potrzeby produkcji wyrobów farmaceutycznych zakładają, że skórki dojrzałych owoców należy częściowo oczyścić z białej, gąbczastej tkanki (tj. *flavedo* z resztkami *albedo*). Proces suszenia skórki powinien być szybki, ale temperatura nie powinna przekraczać 50 °C. Po wysuszeniu skórka twardnieje i staje się krucha i łamliwa, ale w momencie umieszczenia jej w wilgotnym otoczeniu odzyskuje wytrzymałość i elastyczność. Zewnętrzna warstwa ma chropowatą powierzchnię o ciemnym, czerwono-pomarańczowym kolorze, pokrytą niewielkimi, okrągłymi zagłębieniami lub otworkami umieszczonymi powyżej gruczołów wydzielających olejki owocu; warstwa wewnętrzna jest biaława i mięsista (Wallis 1946, NTP/NIEHS 2004, Blaschek i in. 2006).

Mieszając jedną porcję świeżo sproszkowanego materiału suszonego i 5 porcji alkoholu o stężeniu 70% (v/v) uzyskuje się nalewkę aptekarską (*Aurantii amari epicarpium et mesocarpium tinctura* Ph. Eur. 6). Inna tradycyjnie zalecana receptura na płynny ekstrakt bądź nalewkę ze skórki pomarańczy gorzkiej bazuje na zastosowaniu rozpuszczalnika składającego się z dwóch porcji alkoholu i jednej porcji wody, za pomocą którego dokonuje się ekstrakcji substancji botanicznej (NTP/NIEHS 2004).

Wielu dostawców sproszkowanego wyciągu ze skórki *Citrus aurantium* sprzedaje swój produkt pod nazwą *Zhi Shi* o zawartości 6% lub 10% *p*-synefryny w ilościach hurtowych (do 25 kg). Informacje dotyczące procesu wytwarzania tych wyciągów, w których stężenie synefryny w porównaniu do

Opinia ESCO odnośnie wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji botanicznych

wartości zazwyczaj występujących w materiale roślinnym jest podwyższone, nie są przez nich podawane. Mimo iż wedle zapewnień producentów produkty te zawierają wyciąg ze skórki pomarańczy gorzkiej, bardziej prawdopodobne jest, że w istocie materiałem wyjściowym dla omawianych suszonych wyciągów wodno-alkoholowych są niedojrzałe owoce sprzedawane w postaci sproszkowanej, także w ilościach hurtowych. Funkcjonująca w tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM) nazwa *zhi shi* może odnosić się do niedojrzałych owoców pomarańczy gorzkiej i/lub skórki tych owoców (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Substancja chemiczna znana jako (\pm) -*p*-synefryna jest również dostępna na rynku i sprzedawana w opakowaniach do 25 kg przez firmy takie jak np. Boehringer Ingelheim Pharma (Niemcy).

3. Skład chemiczny

Głównym składnikiem skórki pomarańczy gorzkiej jest olejek eteryczny (1.0-2.5 % (V/m)). Główny składnik olejku eterycznego to limonen (do 90%); ponadto zawiera on także kilka innych monoterpenu (cytral, linalol, octan linalilu, octan nerylu, octan geranylu, octan citronelylu); aldehydy alifatyczne i antranilan metylu decydują o zapachu olejku (Wallis 1946, NTP/NIEHS 2004, Hänsel & Sticher 2007).

Substancje gorzkie zawarte w skórce pomarańczy gorzkiej to flawonoidy (flawanony w formie glikozylowanej powstającej na skutek przyłączenia neohesperydozy, np. naringina, neohesperydyna, neoeriocitryna) oraz tetranortriterpenoidy (limonoidy). W dawniejszej literaturze często wymieniana jest także aurantiamaryna – niezidentyfikowana chemicznie, amorficzna substancja gorzka. Wśród innych flawonoidów występujących w skórce pomarańczy gorzkiej wymienić należy hesperydynę, narirutynę, eriocitrynę (niegoryczowe flawonoidy w formie rutynozydów), izohesperydynę oraz naringeninę. Nieobecność pochodnych kwercetyny (należącej do grupy flawonoli) stanowi znaczny znak typowy dla *Citrus aurantium* (Wallis 1946, NTP/NIEHS 2004, Blaschek i in. 2006, Hänsel & Sticher 2007, Chuang i in. 2007).

Główne składniki fenolowe w skórce owoców niedojrzałych to flawonoidy: naringina i hesperydyna, podczas gdy główny składnik fenolowy miąższu świeżych owoców to umbeliferon (rodzaj kumaryny). Sok owoców tego gatunku zawiera także niewielką ilość furanokumaryn (bergamotyna, 6',7' – dihydroksybergamotyna oraz bergapten (5-36 $\mu\text{mol/l}$)) (Malhotra i in. 2001, Gurley i in. 2004, NTP/NIEHS 2004).

Najczęściej wymienianymi aminami biogennymi wchodzącymi w skład skórki pomarańczy gorzkiej są *p*-synefryna oraz *p*-oktopamina, nie ma jednak dowodów na to, że oktopamina czy też inne alkaloidy fenyloetyloaminowe są obecne w skórce pomarańczy gorzkiej w jakichkolwiek znaczących ilościach. Dla każdego ze wskazanych wyżej alkaloidów hydroksyfenyloetyloaminowych występuje sześć znanych regioizomerów i stereoisomerów, jednak rośliny z rodzaju *Citrus* zazwyczaj zawierają jedynie odpowiednie ich (-)-*para*-izomery. Suszony materiał zielony (skórka, owoce dojrzałe/niedojrzałe) zawierają około 0,25 – 0,35% (-)-*p*-synefryny (HPLC), ale występują bardzo znaczne różnice jeśli idzie o stężenia – od 0,1% do 2,0%. Zawartość tej substancji w świeżym soku może być nawet 1000 razy niższa (3-60 ppm). Wydaje się, że *p*-synefryna oraz pokrewne alkaloidy występują w nieco większych ilościach w owocach niedojrzałych niż w owocach dojrzałych (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005, Pellati i in. 2002, Pellati & Benvenuti 2007, Avula i in. 2005 & 2007).

Inne składniki skórki owoców obejmują pektynę, karotenoidy, peptydy cykliczne; sok zawiera sacharydy, witaminy, kwasy organiczne itd. (NTP/NIEHS 2004, Blaschek i in. 2006).

Związkiem chemicznym wybranym na potrzeby niniejszej oceny bezpieczeństwa jest *p*-synefryna, którą uważa się za składnik odpowiedzialny za działanie adrenergiczne preparatu z pomarańczy gorzkiej.

4. Specyfikacje

W celu dokonania kwantyfikacji zawartości alkaloidów fenyloetyloaminowych (np. synefryny, oktopaminy, tyraminy) w materiałach roślinnych, ekstraktach, produktach spożywczych oraz suplementach diety opracowano szereg metod analitycznych; większość z nich opiera się na metodach chromatograficznych (HPLC, GD) oraz elektroforetycznych (CE), wliczając w to metody enancjoselektywne (przegląd omawianych metod prezentują Pellati & Benvenuti, 2007).

Ekstrakty stosowane w wielu suplementach diety oraz ziołowych preparatach odchudzających jako alternatywa dla rodzaju *Ephedra* charakteryzują się stężeniami synefryny (będącej alkaloidem o działaniu sympatykomimetycznym) o wartościach nierzadko o wiele wyższych niż w przypadku stężenia synefryny w tradycyjnych ekstraktach z suszonej skórki bądź owoców. Ekstrakty komercyjne oferowane są jako zawierające 6-10% synefryny, w rzeczywistości jednak wartość ta może wynosić aż do 95% (Avula i in. 2005 & 2007, Pellati i in. 2002, Pellati & Benvenuti 2007, NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Synefryna jest substancją, która w części istniejących na rynku publikacji charakteryzowana jest w sposób nieprawidłowy. Izomer pozycyjny (regioizomer) synefryny występujący w skórce pomarańczy gorzkiej to *p*-synefryna (para-synefryna) a nie meta-synefryna, jak twierdzą niektórzy autorzy opracowań na ten temat (np. Penzak i in., 2001). Meta-synefryna (m-synefryna) oraz neo-synefryna są stosunkowo rzadko stosowanymi synonimami związku chemicznego określanego na liście Międzynarodowych Nazw Niezastrzeżonych (INN) Światowej Organizacji Zdrowia (WHO)⁶ jako fenylefryna. Fenylefryna stosowana jest jako syntetyczny lek udrażniający górne drogi oddechowe (The Merck Index, O'Neill 2008). W przypadku co najmniej jednego produktu rzekomo zawierającego alkaloidy z omawianej grupy pozyskane na bazie *Citrus aurantium* stwierdzono, że zawiera on zarówno para-synefrynę, jak i meta-synefrynę (Allison i in., 2005, Santana i in., 2008).

Na skutek zastosowania analizy enancjoselektywnej synefryny zawartej w żywności powstałej na bazie roślin z rodzaju *Citrus* stwierdzono, że owoce zawierają wyłącznie (-)-para-synefrynę. Jej enancjomer, czyli (+)-para-synefryna, powstawać może w procesie produkcji soków i marmolady na bazie owoców z rodzaju *Citrus*. W suchych ekstraktach oraz suplementach diety zaobserwowano także niewielkie ilości tego enancjomeru; możliwe, że powstaje on podczas wytwarzania ekstraktów z *Citrus aurantium* przy zastosowaniu wysokich temperatur oraz długich okresów refluksowania (Pellati i in. 2002, Pellati & Benvenuti 2007).

Nie ma dowodów na obecność oktopaminy bądź innych alkaloidów fenyloetyloaminowych w skórce pomarańczy gorzkiej w jakichkolwiek znaczących ilościach, aczkolwiek w niektórych ekstraktach i produktach ziołowych obecnych na rynku stwierdzono podwyższoną zawartość tych substancji (Pellati i in. 2002, Pellati & Benvenuti 2007, NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Obecność meta-synefryny w jakichkolwiek ilościach jak również większych ilości (+)-para-synefryny (stereoizomeru (-)-para-synefryny) czy też większych ilości oktopaminy w suplementach diety zawierających rzekomo jedynie ekstrakty bądź frakcje alkaloidowe pozyskane na bazie *Citrus aurantium* uznać należy za zjawisko niepożądane i rodzące podejrzenie zafałszowania. Związki te najprawdopodobniej nie pochodzą z naturalnego źródła botanicznego (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L.). Co więcej, w tego rodzaju przypadkach należy wziąć pod uwagę możliwe addytywne działanie *p*-synefryny, *m*-synefryny i/lub oktopaminy (Jordan i in. 1987, Brown i in. 1988, Evans i in. 1988, NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Innymi aktywnymi biologicznie składnikami występującymi w wodno-alkoholowym wyciągu z (niedojrzałych) owoców *Citrus aurantium* to glikozydy flawonoidowe oraz występujące w niewielkiej ilości furanokumaryny (Avula i in. 2005 & 2007).

Suszony ekstrakt wodno-alkoholowy nie będzie najprawdopodobniej zawierać szczególnie dużych ilości olejku eterycznego, mimo iż jego zawartość stanowi kryterium jakości w odniesieniu do aptekarskiego leku ziołowego. Farmakopea Europejska (Aurantii amari epicarpium et mesocarpium Ph. Eur. 6) wymaga, aby z kilograma suszonej skórki owoców uzyskiwać (w drodze hydrodestylacji) co najmniej 20 mililitrów olejku eterycznego.

⁶ Zob. <http://www.who.int/medicines/services/inn/en/>

5. Stabilność składnika botanicznego

Okres przydatności leków ziołowych zawierających olejki eteryczne w dużym stopniu zależy od warunków ich przechowywania, niemniej jednak zazwyczaj nie przekracza on 36 miesięcy. Brak jest dostępnych informacji na temat okresu przydatności ekstraktów z pomarańczy gorzkiej stosowanych w suplementach diety bądź też samych takich preparatów.

Według Indeksu Mercka, struktura krystaliczna (\pm)-p-synefryny wykazuje odporność na działanie światła oraz powietrza (O'Neill 2008).

Pellati i in. (2002) stwierdzają, że wodne roztwory (\pm)-p-synefryny, (\pm)-p-oktopaminy oraz (\pm)-p-tyraminy, a także wodny ekstrakt ze świeżych i suszonych owoców *Citrus aurantium* oraz wodne roztwory niektórych dostępnych na rynku ekstraktów oraz produktów ziołowych okazały się stabilne. Autorzy ci przeprowadzili test stabilności celem dokonania oceny możliwej izomeryzacji optycznej synefryny na skutek działania wysokich temperatur; w wyniku testu nie zaobserwowano znaczących zmian w zakresie relatywnej zawartości enancjomerów synefryny w przeciągu 24-godzinnego eksperymentu, podczas którego homogenizowana miazga owocowa poddana została procesowi refluksowania wodą przy temperaturze 100 °C.

6. Proponowane zastosowania i poziomy zastosowania

Drzewko pomarańczy gorzkiej to niewielka roślina; jej owoce odznaczają się wyjątkowo gorzkim i kwaskowatym smakiem. Generalnie nie uważa się ich za owoce jadalne, aczkolwiek w niektórych krajach są one spożywane. Z uwagi na kwaskowatość i cierpki posmak, owoce te często stosuje się do przygotowywania konfitur (w szczególności marmolady), syropów i likierów takich jak *triple sec*, *grand marnier*, *cointreau* i *curacao*. Suszona skórka owoców pomarańczy gorzkiej stosowana jest także w charakterze przyprawy. Olejki eteryczne wykorzystuje się na potrzeby nadania określonego aromatu w napojach i likierach, słodyczach, mydłach, detergentach, kosmetykach i artykułach perfumeryjnych.

W medycynie ziołowej w krajach zachodnich, suszona skórka pomarańczy gorzkiej wykorzystywana była dawniej w celu stymulacji apetytu oraz w ramach leczenia niestrawności (dyspepsji) i związanych z nią dolegliwości. Niemiecka Komisja E Federalnego Instytutu ds. Leków i Wyrobów Medycznych (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) uznaje wartość leczniczą skórki pomarańczy gorzkiej w leczeniu braku apetytu oraz dolegliwości dyspeptycznych; dawki dzienne obejmują 4-6 gramów skórki suszonej, 2-3 gramy nalewki i 1-2 gramy ekstraktu. Istnieją także informacje wskazujące, że pomarańcza gorzka sporadycznie stosowana była w charakterze środka wykrztusnego, przeczyszczającego, obniżającego ciśnienie krwi, uspokajającego, tonizującego oraz moczopędnego (BGA/BfArM 1987, Blumenthal 2005).

W tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM) stosuje się dwa tradycyjne leki – *zhi shi* oraz *zhi qiao*; oba uzyskuje się na podstawie skórki owoców pomarańczy gorzkiej i stosuje się w odniesieniu do szeregu wskazań, które można zbiorczo określić, zgodnie z zachodnią nomenklaturą medyczną, mianem niestrawności. Dawki kształtują się w granicach od 3 do 10 gramów suszonego materiału roślinnego (w postaci odwaru) dziennie (Blumenthal 2005).

Wszystkie te historyczne dane dotyczące zastosowań kontrastują w zaskakujący sposób ze współczesną praktyką, zakładającą stosowanie pomarańczy gorzkiej przede wszystkim jako składnik preparatów odchudzających.

Ekstrakty (wodno-alkoholowe) z suszonych niedojrzałych owoców i/lub skórki owoców dodawane są do wielu suplementów diety oraz środków odchudzających (jako alternatywa dla roślin z rodzaju *Ephedra*). Uważa się, że synefryna stanowi substancję czynną i że działa stymulująco, jako antagonist adrenergiczny. Produkty ją zawierające mają rzekomo umożliwiać zmniejszanie oraz utrzymywanie pożądanej wagi ciała, poprawiać sprawność fizyczną i zwiększać beztłuszczową masę mięśniową. Tego rodzaju specyfiki odchudzające zazwyczaj zawierają w sobie 100-200 mg ekstraktu z pomarańczy gorzkiej (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Zarówno para-synefryna jak i para-oktopamina są słabymi agonistami receptorów adrenergicznych działającymi na receptory α i β , niemniej jednak generalnie są one o kilka rzędów wielkości mniej aktywne niż norepinefryna. Meta-izomery alkaloidów fenyloetyloaminowych takie jak m-synefryna (fenylefryna) oraz m-oktopamina (norfenefryna) są generalnie silniejszymi agonistami receptorów adrenergicznych niż w przypadku odpowiadających im paraizomerów. Niektóre badania wykazały większy stopień aktywności p-oktopaminy niż p-synefryny, podczas gdy w innych badaniach jej aktywność okazała się taka sama bądź mniejsza niż w przypadku p-synefryny. Aktywność adrenergiczna (+)-izomerów (prawoskrętnych) jest co najmniej od 1 do 2-krotnie mniejsza niż w przypadku (-)-izomerów (leuoskrętnych). Aktywność poszczególnych izomerów synefryny i oktopaminy względem receptorów adrenergicznych α jest o 1-2 rzędy wielkości wyższa niż względem receptorów β (Jordan i in. 1987, Brown i in. 1988, Evans i in. 1988, Pellati i in. 2002, Pellati & Benvenuti 2007, Avula i in. 2005 & 2007).

W przypadku oktopaminy stwierdzono, że jest ona selektywnym agonistą receptorów adrenergicznych β_3 , stymulującym lipilizę komórek tkanki tłuszczowej w drodze aktywacji receptorów adrenergicznych β_3 , nie zaś aktywacji innych podtypów tych receptorów; oktopamina reklamowana jest jako produkt odchudzający o właściwościach termogenicznych oraz jako substancja hamująca apetyt (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

7. Informacje dotyczące istniejących badań

Szwedzki wykaz roślin uznawanych za niejadalne wskazuje, że ekstrakty z *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L. z wysoką zawartością synefryny nie nadają się do spożycia (poziom nieokreślony)⁷.

Duński wykaz dotyczący oceny toksykologicznej roślinnych składników suplementów diety (*Drogelisten*) wskazuje, że ekstrakty zawierające synefrynę nie mogą być akceptowane (poziom nieokreślony)⁸.

Rada Europy przeprowadziła ocenę roślin stosowanych w charakterze przypraw i zaliczyła napary oraz olejki eteryczne ze skórki *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L. do kategorii 3⁹, z uwzględnieniem ograniczeń w zakresie zawartości furokumarynu (Rada Europy, 2000).

Według obowiązującego w Belgii rozporządzenia (Arrêté Royal 29/8/1997 – załącznik 3 oraz akty prawne wykonawcze), suplementy diety z zawartością synefryny wynoszącą do 20 mg na każdą dawkę dzienną podlegają notyfikacji przez wprowadzeniem ich na rynek w charakterze suplementu diety. Produkty z zawartością synefryny przekraczającą 20 mg na każdą dawkę dzienną uznawane są za produkty medyczne.

Kanadyjskie ministerstwo zdrowia (Health Canada) wystosowało dwa ostrzeżenia dla konsumentów kanadyjskich dotyczące podejrzewanych niepożądanych reakcji krążeniowo-naczyniowych wywoływanych przez produkty zawierające pomarańczę gorzką (*Citrus aurantium*) bądź synefrynę i mających dzięki ich zastosowaniu posiadać właściwości odchudzające. Kanadyjskie ministerstwo zdrowia wskazuje, że tego rodzaju produkty nie mogą być sprzedawane na terytorium Kanady (Jordan i in. 2004, Jack i in. 2007).

⁷ Zob. http://www.slv.se/upload/nfa/documents/food_safety/lists_plants_may_05.pdf

⁸ Zob. <http://www.dfvf.dk/Default.aspx?ID=11322>

⁹ Rośliny, zwierzęta i inne organizmy oraz ich części i produkty sporządzone na ich bazie, zwyczajowo spożywane jako produkty spożywcze, zioła bądź przyprawy na terytorium Europy, zawierające określone „składniki aktywne”, dla których konieczne jest ustanowienie ograniczeń dot. poziomów zastosowania. Preparaty aromatyzujące, które same nie są spożywane jako produkty żywnościowe, ale które powstają na bazie roślin, zwierząt i innych organizmów lub ich części czy produktów sporządzonych na ich bazie, zwyczajowo spożywanych jako produkty spożywcze, zioła bądź przyprawy na terytorium Europy, zawierających określone „składniki aktywne”, dla których konieczne jest ustanowienie ograniczeń dot. poziomów zastosowania. Tego rodzaju substancje i preparaty nie są uważane za zagrażające dla życia i zdrowia ludzkiemu w stosowanych ilościach, pod warunkiem, że ograniczenia ustanowione względem substancji aktywnych nie będą przekraczane.

Citrus aurantium została umieszczona w Bazie Danych Roślin Trujących Amerykańskiej Administracji ds. Żywności i Leków (US FDA)¹⁰.

Z drugiej jednak strony olejki, ekstrakt, skórki owoców, kwiaty oraz liście *Citrus aurantium* zostały umieszczone w bazie danych suplementów diety EAFUS (opisującej „wszystkie dodatki” do żywności stosowane na terenie Stanów Zjednoczonych); wskazany status toksykologiczny dla omawianej substancji jest następujący: *poczyniono starania o uzyskanie w pełni aktualnych danych toksykologicznych*¹¹.

Skórka pomarańczy gorzkiej stosowana jako bezpośredni dodatek do produktów żywnościowych posiada status środka „ogólnie uznawanego za bezpieczny” (Generally Recognized as Safe – GRAS); ten sam status posiadają także ekstrakty i oleozywice kwiatów i skórek owoców pomarańczy gorzkiej oraz olejki petitgrain (olejki eteryczne uzyskiwane z liści i gałązek rośliny) (FDA 21CFR182)¹².

W przypadku mrożonego koncentratu soku z pomarańczy, ilość dodawanego soku z pomarańczy gorzkiej nie może przekraczać 5% (FDA 21CFR146.146)¹³.

Wytyczne FDA dot. przygotowywania marmolady pomarańczowej wskazują, że marmoladę z pomarańczy gorzkiej przyrządzać należy poprzez wymieszanie owoców (skórek i soku) i składnika słodzącego w proporcjach wagowych 25 do 75 (FDA/ORA CPG 7110.17)¹⁴.

¹⁰ Zob. <http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html>

¹¹ Zob. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>

¹² Zob. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fcf182.html>

¹³ Zob. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF146.html>

¹⁴ Zob. http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg550-575.html

Większość omawianych przepisów bezpieczeństwa opracowanych zostało przez US FDA kilka dekad temu, kiedy to ekstrakty z pomarańczy gorzkiej z ustandaryzowanym poziomem zawartości para-synefryny na poziomie wynoszącym nawet 6% nie istniały jeszcze na rynku (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Światowa Agencja Antydopingowa (WADA) nie uważa synefryny ani fenylefryny za substancje zakazane umieszczone na Liście Substancji Zakazanych na rok 2008 i 2009 (w przeciwieństwie do efedryny), natomiast obie wskazane wyżej substancje zostały uwzględnione w programie monitoringu substancji stymulujących. Niektóre narodowe organizacje sportowe traktują synefrynę jako substancję zakazaną (WADA 2007,2008, NTP/NIEHS 2004).

Grupa Robocza pragnie zauważyć, że w szeregu analiz zawarto stwierdzenie, że regularne spożywanie pomarańczy gorzkiej w ramach stosowanej diety nie niesie za sobą żadnego zagrożenia, podczas gdy najnowsze analizy preparatów zawierających znaczne ilości para-synefryny sugerują, że może ona budzić zastrzeżenia z punktu widzenia bezpieczeństwa.

8. **Narażenie**

Narażenie na skórkę pomarańczy gorzkiej oraz jej składniki odbywa się przede wszystkim poprzez spożycie samych owoców bądź też produktów z nich powstałych (np. soku z pomarańczy, marmolady czy suplementów diety). Skórkę pomarańczy gorzkiej dodaje się do różnych produktów spożywczych (piwa, likierów i innych napojów, ciast itd.). Sok z pomarańczy gorzkiej może być w ograniczonych ilościach dodawany do soku z pomarańczy słodkiej. Narażenie mieć może miejsce także na skutek stosowania olejku ze skórki pomarańczy gorzkiej w ramach aromaterapii czy też jako element substancji aromatyzujących.

Para-synefryna obecna jest w większości owoców z rodzaju *Citrus*, zarówno w ich soku, jak i w skórce. Para-synefryna jest zatem zapewne o wiele częściej spotykana w żywności konwencjonalnej niż się powszechnie uważa. Z drugiej strony, para-synefryna nie jest zbyt rozpowszechniona wśród roślin naczyniowych; oprócz rodzaju *Citrus*, obecna jest ona jedynie w kilku rodzajach roślin niemających zastosowania spożywczego (Blumenthal 2005).

Obliczenia bazujące na pomiarach HPLC sugerują, że zawartość para-synefryny w marmoladzie wynosi około 0,01%, co jest wartością wyjątkowo niską; ilość marmolady spożywanej jednorazowo zazwyczaj także jest raczej niewielka (20 – 30g). Większą zawartość para-synefryny obserwuje się w niektórych sokach z owoców roślin z rodzaju *Citrus*, np. w sokach pomarańczowych (od 15 do 27 mg/l); tangerynki (125 mg/l) oraz mandarynki (280 mg/l) wydają się być owocami zawierającymi największe jej ilości (Blumenthal 2005). Dragull i in. (2008) przeprowadzili badania na mandarynkach Satsuma i stwierdzili, że zawartość para-synefryny w soku tych owoców waha się znacznie w zależności od szeregu czynników (od 73 do 158 mg/l). Avula i in. (2005 & 2007) stwierdzili, że zawartość synefryny w 48 różnych rodzajach soków na bazie roślin z rodzaju *Citrus* wyniosła od 3 do 60 mg/l, podczas gdy w przypadku 32 różnych dżemów na bazie owoców roślin z rodzaju *Citrus* wynosiła ona od 0,018 do 1,02 mg na porcję. Co do mandarynek, na rynku dominują owoce świeże bądź z puszek, podczas gdy soki z mandarynek są rzadkością z uwagi na występowanie niepożądanych czynników smakowych jak również zmian w smaku samego soku pojawiających w okresie jego przechowywania.

Środki odchudzające zazwyczaj zawierają od 100 do 200 mg ekstraktu z pomarańczy gorzkiej, co daje od 6 do 40 mg para-synefryny na każdą dawkę (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005).

Historyczne zastosowania skórki pomarańczy gorzkiej – stymulacja apetytu i leczenie niestrawności – są podobne zarówno w przypadku medycyny zachodniej, jak i tradycyjnej medycyny chińskiej (TCM). W piśmiennictwie wskazuje się na następujące dzienne zalecane dawki: 4-6 g (sucha skórka) w lekarstwach, 2-3g w postaci nalewki i 1-2g w ekstraktach (niemiecka Komisja E, BGA/BfArM 1987) oraz 3-10 g suchej skórki stanowiącej podstawę do przygotowania naparu (TCM, Blumenthal 2005).

Teoretyczną wartość poziomu narażenia na działanie para-synefryny zawartej w produktach żywnościowych dla osoby preferującą dietę bogatą w pochodne roślin z rodzaju *Citrus* ocenić można, w oparciu o podane wyżej dane, na nawet 54 mg p-synefryny (2 litry soku z pomarańczy) na jedną osobę na dzień, czy też nawet 280 mg p-synefryny (ponad 1 kilogram mandarynek zawierających 1 litr soku) na jedną osobę na dzień. Spożycie marmolady pomarańczowej skutkuje zwiększeniem konsumpcji p-synefryny o ok. 1 mg na każdą porcję. Brak jest informacji na temat poziomu p-synefryny w innych produktach żywnościowych (napojach alkoholowych, likierach, słodyczach, pieczywie i przyprawach).

Hipotetycznie można założyć, że dawka np. 30 mg para-synefryny dziennie na jedną osobę, będąca skutkiem spożycia 500 mg ekstraktu z pomarańczy gorzkiej (ustandaryzowanego na poziomie 6% p-synefryny) zawartego w pastylkach odchudzających odpowiada dziennemu spożyciu 1,1-2 litrów soku z pomarańczy (zawierającego 15-27 mg p-synefryny na litr soku, w zależności od odmiany) bądź też 0,1-0,4 litra soku z mandarynek, 30 porcji marmolady lub odwaru z 8-12 gramów suszonej skórki owoców pomarańczy gorzkiej (stosowanych w tradycyjnych celach leczniczych, np. w leczeniu niestrawności).

9. Dane toksykologiczne

Suplementy diety reklamowane jako mające właściwości odchudzające i zawierające ekstrakt ze skórki pomarańczy gorzkiej charakteryzujący się wysoką zawartością synefryny, jednego z naturalnych składników tej rośliny, pojawiły się na światowych rynkach w dużej mierze po tym, jak US FDA w 2004 roku zakazała podobnych suplementów diety zawierających ekstrakt z roślin z rodzaju *Ephedra* oraz stanowiącego ich składnik alkaloidu – efedryny¹⁵.

Sugerowano wówczas, że *Citrus aurantium* stanowi bezpieczną alternatywę dla roślin z rodzaju *Ephedra*, a suplementy diety produkowane w oparciu o pomarańczę gorzką często reklamowane są jako „niezawierające efedryny”. Od tego czasu prowadzone są badania dotyczące bezpieczeństwa tego rodzaju ekstraktów oraz ich składników. Niektórzy eksperci chwalać potencjał *Citrus aurantium* w obszarze właściwości terapeutycznych, podczas gdy inni przestrzegają przed możliwymi zagrożeniami. Podnoszone zastrzeżenia dotyczą przede wszystkim możliwego niepożądanego działania na układ sercowo-naczyniowy oraz mózgowo-naczyniowy. Informacje dotyczące bezpieczeństwa uzyskiwane są głównie poprzez badania na zwierzętach, testy kliniczne, badania ostrych reakcji fizjologicznych u ludzi oraz obserwacje kliniczne. Do dziś nie powstały żadne obszernie analizy epidemiologiczne dotyczące bezpieczeństwa preparatów na bazie *Citrus aurantium* (Haaz i in. 2006, Fugh-Berman & Myers 2004).

Podawanie drogą doustną (karmienie raz dziennie za pomocą zgłębnika) ekstraktów wodno-alkoholowych z owoców *C. aurantium* ustandaryzowanych na dwóch różnych poziomach zawartości para-synefryny (4% i 6%), z których każdy podawany był w 4 różnych dawkach (odpowiednio 2,5, 5, 10 lub 20 mg/kg masy ciała) samcom szczurów laboratoryjnych odmiany Sprague-Dawley przez okres 15 dni (8 grup zwierząt laboratoryjnych) wywołało znaczący i zależny od stosowanych dawek badanego preparatu spadek spożycia pokarmów oraz wzrost masy ciała. We wszystkich grupach badawczych doszło do śmierci niektórych spośród badanych zwierząt; w przypadku najmniejszej dawki śmiertelność wynosiła 10% dla obu ekstraktów; przy najwyższej dawce śmiertelność wśród szczurów wynosiła odpowiednio 30 i 50% dla ekstraktów z zawartością 4% i 6% para-synefryny. Nie zanotowano znaczących zmian w zakresie ciśnienia krwi; zaobserwowano natomiast przypadki arytmii komorowej przy jednoczesnym wydłużeniu zespołu QRS. Im większe dawki, tym częściej występowało zjawisko arytmii (Calapai i in. 1999).

Największa dawka zastosowana w ramach omawianego badania (tj. 20 mg/kg masy ciała ekstraktu o standardowej zawartości 6% p-synefryny) odpowiada ilości 1,2 mg p-synefryny na kilogram masy ciała. Jako że 50% szczurów zmarło w trakcie eksperymentu na skutek podawania im tak wysokiej dawki ekstraktu, dawkę tą można uznać za przybliżoną wartość dawki śmiertelnej LD50 dla szczurów.

Jednorazowe podawanie doustne ekstraktów z *C. aurantium* (2,5% p-synefryny, 300-5000 mg/kg masy ciała) myszom laboratoryjnym spowodowało zmniejszenie aktywności lokomotorycznej; zażywanie przez zwierzęta p-synefryny (150-2000 mg/kg masy ciała) skutkowało piloerekcją, trudnościami z oddychaniem, wytrzeszczem oczu oraz zmniejszeniem aktywności lokomotorycznej, co potwierdzone zostało w drodze spontanicznego testu aktywności lokomotorycznej. Wszystkie symptomy miały charakter odwracalny i utrzymywały się przez okres 3-4 godzin (Arbo i in., 2008).

Opinia ESCO odnośnie wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji botanicznych

Przeprowadzono także ogromną liczbę badań eksperymentalnych mających za przedmiot właściwości farmakologiczne i toksykologiczne wyizolowanych alkaloidów pomarańczy gorzkiej, *p*-synefryny oraz *p*-oktopaminy.

¹⁵ Zob. <http://www.fda.gov/oc/initiatives/ephedra/february2004/>

Prowadzone badania obejmowały sprawdzanie wpływu synefryny, oktopaminy oraz ekstraktów *C. aurantium* na ludzi, szczury, świnki morskie, koty i/lub psy w zakresie wpływu na układ sercowo-naczyniowy, wliczając w to zmiany ciśnienia krwi, toksyczność sercowo-naczyniową, kurczliwość i pobudliwość mięśnia sercowego i/lub aktywność adrenergetyczną. Ustalono, że synefryna i oktopamina podnoszą ciśnienie krwi oraz są w stanie przywracać kurczliwość i pobudliwość mięśnia sercowego. (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005, Jordan i in. 1987, Brown i in. 1988, Evans i in. 1988).

W Chinach, w przypadkach wystąpienia wstrząsu w organizmie człowieka, *p*-synefryna podawana jest dożylnie razem z *N*-metylotyraminą w dawkach 20 – 60 mg każdej z tych substancji, w zależności od rozległości wstrząsu, rozpuszczonych w normalnym roztworze fizjologicznym bądź w roztworze glukozy. Pojawiają się sugestie, że synefryna może być uznawana za czynnik stymulujący pracę serca, zazwyczaj wtedy, kiedy podawana jest w drodze zastrzyku. Nie można jednak na tej podstawie zakładać istnienia bezpośredniej więzi pomiędzy działaniem podawanej dożylnie, wyizolowanej *p*-synefryny a działaniem podawanych doustnie ekstraktów z pomarańczy gorzkiej zawartych w suplementach diety (Blumenthal 2005).

Badania mające na celu dokonanie oceny wpływu pomarańczy gorzkiej na parametry pracy układu sercowo-naczyniowego doprowadziły do uzyskania niejednoznacznych rezultatów. Z niektórych badań klinicznych wynika, że pomarańcza gorzka podawana razem z kofeiną jest w stanie doprowadzić do wzrostu ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi oraz częstości akcji serca u zdrowych, normotensyjnych osobników dorosłych (Haller i in. 2005 & 2008). Zażycie pojedynczej dawki ekstraktu z pomarańczy gorzkiej (900 mg) z zawartością *p*-synefryny na standardowym poziomie 6% (54 mg) wydaje się prowadzić do wzrostu ciśnienia skurczowego i rozkurczowego oraz częstości akcji serca do 5 godzin u młodych, zdrowych osób dorosłych (Bui i in. 2005). Jednak zażycie dawki o połowy mniejszej i podanie o połowę mniejszej ilości *p*-synefryny nie wydaje się mieć znaczącego wpływu na ciśnienie krwi czy też na wydłużenie odstępu QT u zdrowych osób dorosłych (Min i in. 2005).

Kanadyjskie ministerstwo zdrowia (Health Canada) opublikowało dwa streszczenia obserwacji klinicznych dotyczących reakcji niepożądanych, co do których wystąpiły podejrzenia, że związane były ze spożywaniem pomarańczy gorzkiej i naturalnych produktów leczniczych zawierających *para*-synefrynę. W latach 1998-2006 powstało 37 sprawozdań; 31 z nich dotyczyło niepożądanych reakcji ze strony układu krążeniowo-naczyniowego (tachykardia, nagłe zatrzymanie krążenia, migotanie komór, przemijająca utrata przytomności oraz omdlenie), z czego 26 dotyczyło reakcji o charakterze poważnym. Zmarło dwóch pacjentów, z których każdy obok pomarańczy gorzkiej zażywał także produkty zawierające pochodne roślin z rodzaju *Ephedra*/efedrynę oraz kofeinę. Pojawił się też jeden przypadek zawału mięśnia sercowego. Uważa się, że wzmożone ryzyko reakcji niepożądanych związane jest ze stosowaniem produktów zawierających synefrynę u osób cierpiących na choroby serca, cukrzycę, choroby tarczycy, choroby centralnego układu nerwowego, glaukomę, guzy chromochłonne, nadciśnienie, objętych znanymi czynnikami ryzyka występowania chorób układu sercowo-naczyniowego a także cierpiących na przerost prostaty, u osób z niedowagą, osób zażywających hormony tarczycy, inhibitory monoaminooksydazy, leki mające na celu kontrolowanie częstości akcji serca lub ciśnienia krwi oraz produkty zawierająca kofeinę (Jordan i in. 2004, Jack i in. 2007, Firenzuoli i in. 2005). W międzyczasie ukazały się także inne raporty z obserwacji klinicznych dotyczące poważnych reakcji niepożądanych, wliczając w to przypadki chorób wieńcowych i ostrej rabdomiolizy spowodowanej ćwiczeniami fizycznymi (Smedema & Müller 2008, Burke i in. 2007).

Tylko jeden raport z obserwacji klinicznej (Jordan i in. 2004, Jack i in. 2007) dotyczy podejrzanego produktu zawierającego pomarańczę gorzką i nie zawierającego kofeiny ani składników na bazie roślin z rodzaju *Ephedra*/efedryny (brak danych na temat innych ewentualnych składników).

W przypadku większości badań istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia narażenia łącznej z innymi składnikami; badanie tego rodzaju łącznych skutków działania wykracza poza zakres niniejszej analizy

W chwili opracowywania niniejszego sprawozdania brak było jakichkolwiek badań dotyczących dystrybucji, metabolizmu bądź kinetyki podawanych produktów powstałych na bazie pomarańczy gorzkiej. Nie były także dostępne żadne badania dotyczące narażenia długotrwałej, cytotoksyczności, rakogenności czy też inicjacji/promocji nowotworów (NTP/NIEHS 2004).

Wpływ na rozrodczość i proces rozwojowy: U szczurów, codzienne domięśniowe zastrzyki *p*-synefryny (55 lub 110 mg/kg [0,33 lub 0,6 mmol/kg]) w okresie od 7 do 16 dnia ciąży skutkowały zmniejszeniem liczby pomyślnych zagnieżdżeń blastocysty wewnątrz macicy oraz liczby żywych płodów,

¹⁶ Zob. <http://ntp.niehs.nih.gov/go/TS-M050092>

zwiększenia średniej wagi płodów oraz liczby mikroplodów a także opóźnienie procesu kostnienia czaszki i klatki piersiowej. Dodatkowo, u niektórych płodów zaobserwowano krwotoki nerkowe i jelitowe, hipoplazję mózgu oraz mikroftalmię jednostronną (NTP/NIEHS 2004).

Genotoksyczność: w badaniu przeprowadzonym na komórkach chłoniaka mysiego L5178Y, *p*-synefryna (20-3600 µg/ml [120 µM-21.53 mM]) pozostawała nieaktywna (NTP/NIEHS 2004).

6',7'-Dihydroksybergamotyna oraz naringina, występujące w soku z grapefruita i mniejszym zakresie w niektórych sokach pomarańczowych, działają jako inhibitor metabolizmu substratów enzymów z podrodziny CYP3A. Z uwagi na bardzo niską zawartość tego związku chemicznego w soku z owoców *Citrus aurantium* oraz ich skórce i ekstraktach, ryzyko interakcji leków roślinnych z syntetycznymi zapośredniczonych przez enzymy CYP u ludzi uznawane jest za minimalne (Malhotra i in. 2001, Gurley i in. 2004, Fugh-Berman & Myers 2004).

10. Ocena bezpieczeństwa na bazie aktualnie posiadanej wiedzy (Poziom A)

Owoce i skórki owoców pomarańczy gorzkiej oraz pozyskiwany ze skórki tych owoców olejek są wykorzystywane w procesie produkcji marmolady pomarańczowej. Przeciętne spożycie produktów spożywczych zawierających skórkę pomarańczy gorzkiej (głównie marmolady, likierów, piwa i słodyczy) może być w oparciu o dane historyczne uznawane za pozostające na bezpiecznym poziomie. Można oczekiwać, że ilość *p*-synefryny zażywanej w ramach tego rodzaju dawek nie będzie mieć znaczącego wpływu na funkcje fizjologiczne. Narażenie na *p*-synefrynę w ramach zwykłego spożycia tego rodzaju produktów porównywalna jest do narażenia wynikającej ze spożywania innych produktów bazujących na roślinach z rodzaju *Citrus*, takich jak owoce pomarańczy czy soki pomarańczowe, które stały się normalną częścią diety powszechnie stosowanej w Europie (przykładowo, 1 mg synefryny zawiera jedna porcja marmolady na bazie owoców roślin z rodzaju *Citrus* czy też 37-67 ml soku pomarańczowego).

Mimo iż ekstrakty z *Citrus aurantium* były wykorzystywane przez różne kultury od tysięcy lat, nigdy nie były one stosowane w sposób długotrwały ani też wykorzystywane specjalnie z uwagi na właściwości odchudzające (Haaz i in. 2006).

W ekstraktach z pomarańczy gorzkiej zawartych w suplementach diety takich jak pastylki odchudzające stwierdzono jednak podwyższoną zawartość *p*-synefryny, zazwyczaj wynoszącą 6-10% (zdarzało się także, że występowały nawet ekstrakty zawierające do 95% *p*-synefryny). Fakt ten skutkuje znaczącym wzrostem spożycia w porównaniu z poziomami notowanymi w poprzednich okresach z uwagi na docelowy poziom zastosowania omawianej substancji w ramach suplementów diety.

Należy zatem stwierdzić, że w przypadku tradycyjnych zastosowań spożywczych pomarańczy gorzkiej nie istnieją żadne zastrzeżenia z punktu widzenia bezpieczeństwa, natomiast w przypadku oceny bezpieczeństwa dotyczącej stosowania preparatów bazujących na pomarańczy gorzkiej z zawartością *p*-synefryny przekraczającą 6% konieczne jest uzyskanie dodatkowych danych (Poziom B). Grupa Robocza pragnie zauważyć, że w ramach innych przeprowadzonych badań zalecono pozyskanie dodatkowych danych w celu dokonania oceny przypadków, w których szacowane maksymalne spożycie synefryny przekracza 20mg dziennie (Belgia – Arrêté Royal 29/8/1997 – załącznik 3 oraz akty prawne wykonawcze). Średnia narażenie na *p*-synefrynę w ramach normalnej, zbilansowanej diety obejmującej okazjonalne spożycie owoców cytrusowych i soków z nich najprawdopodobniej nie będzie przekraczać wskazanej wyżej wartości, tj. 20 mg *p*-synefryny dziennie.

11. Konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych. (Poziom B)

W przypadkach, w których szacowana narażenie przekracza tradycyjnie praktykowany poziom spożycia, konieczne byłoby pozyskanie dodatkowych danych. Wymagania odnośnie pozyskiwanych danych byłyby zgodne z treścią istniejących wytycznych, np. dla suplementów diety lub nowych środków spożywczych ("novel foods") i obejmowałyby analizy dotyczące dystrybucji, metabolizmu lub kinetyki stosowanych

produktów powstałych na bazie owoców pomarańczy gorzkiej. Te same założenia mogą mieć także zastosowanie w zakresie genotoksyczności, toksyczności długofalowej oraz toksyczności rozwojowej.

Para-synefryna uznawana jest za agonistę receptorów adrenergetycznych. Jako wyizolowany środek leczniczy w postaci czystej jest ona często podawana poprzez wstrzyknięcie. Z drugiej strony stwierdzono też że p-synefryna odznacza się słabym wchłanianiem poprzez przewód pokarmowy. Omawiana kwestia sposobu podawania substancji oraz relatywnie słabego wchłaniania p-synefryny podawanej drogą doustną ma oczywiste znaczenie, w szczególności w odniesieniu do suplementów diety, które zgodnie z ich prawną definicją muszą być podawane doustnie (Blumenthal 2005).

Dokonanie wiarygodnej ekstrapolacji wyników krótkoterminowych badań substancji stosowanych dla jednego wskazania w ramach jednej, określonej grupy osób (np. stosowanie przez okres kilku dni w celu udrożnienia przewodów nosowych, wśród populacji ogólnej) na potrzeby zastosowania długofalowego dla innego wskazania w ramach innej grupy osób (np. stosowanie na przestrzeni kilku miesięcy bądź kilku lat na potrzeby uzyskania efektu odchudzającego u osób otyłych) nie jest zadaniem łatwym. Mimo że dostępne są dane dotyczące kwestii bezpieczeństwa w zakresie spożycia preparatów na bazie pomarańczy gorzkiej, do tej pory nie opublikowano badań dotyczących działania ekstraktów z *Citrus aurantium* stosowanych w celach odchudzających na organizm człowieka obejmujących więcej niż 20 osób czy też okres dłuższy niż 7 tygodni, przez co w chwili obecnej możliwość wyciągania na ten temat wniosków pozostaje ograniczona (Haaz i in. 2006, Fugh-Berman & Myers 2004, Bent i in. 2004, Colker i in. 1999).

Wiele badań dotyczących bezpieczeństwa stosowania ekstraktów z *Citrus aurantium* wykonywanych było w oparciu o pacjentów normotensyjnych. Jako że nadciśnienie występuje częściej u osób z nadwagą oraz zmagających się z otyłością niż u osób o normalnej wadze ciała, uzasadnione byłoby przeprowadzenie dalszych analiz mających za przedmiot działanie ekstraktów z *Citrus aurantium* wśród osób z nadciśnieniem. Dodatkowo, brak jest także badań kliniczno-kontrolnych bądź epidemiologicznych badań kohortowych dot. ekstraktów z *Citrus aurantium* odnoszących się do sztywnych docelowych kryteriów oceny bezpieczeństwa takich jak zawał mięśnia sercowego czy udar mózgu (Haaz i in. 2006).

Większość danych dotyczących obserwacji klinicznych oraz wyników przeprowadzonych badań dotyczących suplementów diety zawierających p-synefrynę budzi kontrowersje, jako że osoby uczestniczące w badaniach zażywały wieloskładnikowe suplementy diety zawierające, obok p-synefryny z pomarańczy gorzkiej, na przykład efedrynę pochodzącą z roślin z rodzaju *Ephedra* bądź też kofeinę zawartą w roślinach takich jak guarana czy maté. Niektóre analizy wskazują, że spożywanie pomarańczy gorzkiej w zestawieniu z roślinami o właściwościach stymulujących takich jak *Ephedra* wywołuje działanie kardi toksyczne. Podobnie też łączne stosowanie p-synefryny oraz kofeiny uznaje się za niosące za sobą potencjalne ryzyko wywołania arytmii serca, nadciśnienia, ataku serca czy udaru mózgu (NTP/NIEHS 2004, Blumenthal 2005, Jordan i in. 2004, Jack i in. 2007).

W ramach Amerykańskiego Narodowego Programu Toksykologii (U. S. National Toxicology Program, NTP) prowadzone są aktualnie testy dotyczące toksyczności krótkofalowej, toksyczności względem układów narządowych oraz wpływu na zwykły proces rozwojowy (konwencjonalne badania teratologiczne) ekstraktu z pomarańczy gorzkiej (6%) na szczury laboratoryjne odmiany Sprague Dawley (dawkowanie: 10, 25, 50 i 100 mg na kilogram masy ciała) a także łącznego oddziaływania ekstraktu z pomarańczy gorzkiej i kofeiny (50 mg ekstraktu z pomarańczy gorzkiej (6%) na kilogram masy ciała plus 25 mg kofeiny na kilogram masy ciała).

Status testu (zlecony/w trakcie testowania) oraz standardowa metodologia testów zamieszczone są na stronie internetowej NTP¹⁷. Cenną informacją stanowiłyby tutaj specyfikacje zastosowanego ekstraktu, jako że nie jest jasne, czy wskazanie dotyczące „6%” odnosi się do stosunku substancji leczniczej do płynu czy też do zawartości p-synefryny w ekstrakcie suszonym, jako że standardowa zawartość 6% p-synefryny często stosowana jest wśród dostawców hurtowych oraz producentów suplementów diety.

¹⁷ Zob. <http://ntp.niehs.nih.gov/go/TS-M040019> oraz <http://ntp.niehs.nih.gov/go/TS-M050092>

PRZYPISY

- Allison D. B., Cutter G., Poehlman E. T., Moore D. R., Barnes S. (2005). Exactly which synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (bitter orange) contain? *International Journal of Obesity* **29**: 443-446
- Arbo M. D., Larentis E. R., Linck V. M., Aboy A. L., Pimentel A. L., Henriques A. T., Dallegrave E., Garcia S. C., Leal M. B., Limberger R. P. (2008). Concentrations of *p*-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and *p*-synephrine. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 2770-2775
- Avula B., Upparapalli S. K., Navarrete A., Khan I. A. (2005). Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *C. aurantium*, various *Citrus* species, and dietary supplements by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* **88**: 1593-1606
- Avula B., Upparapalli S. K., Khan I. A. (2007). Simultaneous analysis of adrenergic amines and flavonoids in *Citrus* peel jams and fruit juices by liquid chromatography: part 2. *Journal of AOAC International* **90**: 633-640
- Bent S., Padula A., Neuhaus J. (2004). Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. *American Journal of Cardiology* **94**: 1359-1361
- BGA/BfArM. (1990). Aurantii pericarpium (Pomeranzenschale). BGA/BfArM (Kommission E), Bundesanzeiger, Heftnummer: 193a, 15.10.1987; Berichtigung Heftnummer: 50a, 13.03.
- Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V. (eds). (2006). *HagerROM: Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer, Heidelberg.
- Blumenthal M. (2005) Bitter orange peel and synephrine: Part 1 & Part 2. *HerbalGram* **66**: 0 (web-only exclusive). <http://content.herbalgram.org/abc/herbalgram/articleview.asp?a=2833&p=Y>
- Brown C. M., McGrath J. C., Midgley J. M., Muir A. G., O'Brien J. W., Thonoor C. M., Williams C. M., Wilson V. G. (1988). Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on α -adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* **93**: 417-429
- Bui L. T., Nguyen D. T., Ambrose P. J. (2005). Blood pressure and heart rate effects following a single dose of bitter orange. *Annals of Pharmacotherapy* **40**: 53-57
- Burke J., Seda G., Allen D., Knee T. S. (2007). A case of severe exercise-induced rhabdomyolysis associated with a weight-loss dietary supplement. *Military Medicine* **172**: 656-658
- Calapai G., Firenzuoli F., Saitta A., Squadrito F., Arlotta M. R., Costantino G., Infrerra G. (1999). Antiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: A preliminary report. *Fitoterapia* **70**: 586-592
- Chuang C. C., Wen W. C., Sheu S. J. (2007). Origin identification on the commercial samples of *Aurantii fructus*. *Journal of Separation Science* **30**: 1235
- Colker C. M., Kaiman D. S., Torina G. C., Perlis T., Street C. (1999). Effects of *Citrus aurantium* extract, caffeine, and St. John's wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in overweight healthy adults. *Current Therapeutic Research* **60**: 145-153
- Council of Europe (2000). Natural sources of flavourings. Report No. 1. Council of Europe Press, Strasbourg, ISBN 92-871-4324-2.
- Dragull K., Breksa A. P., Cain B. (2008). Synephrine content of juice from Satsuma mandarins (*Citrus unshiu* Marcovitch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 8874-8878

- Evans P. D., Thonoor C. M., Midgley J. M. (1988). Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on octopaminergic receptor subtypes in locust skeletal muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **40**: 855-861
- Firenzuoli F., Gori L., Galapai C. (2005). Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). *Phytomedicine* **12**: 247-248
- Fugh-Berman A., Myers A. (2004). *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Experimental Biology and Medicine* **229**: 698-704
- Gurley B. J., Gardner S. F., Hubbard M. A., Williams D. K., Gentry W. B., Carrier J., Khan I. A., Edwards D. J., Shah A. (2004). In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: *Citrus aurantium*, *Echinacea purpurea*, milk thistle, and saw palmetto. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **76**: 428-440
- Haaz S., Fontaine K. R., Cutter G., Limdi N., Perumean-Chaney S., Allison D. B. (2006). *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obesity Reviews* **7**: 79-88
- Haller Ch. A., Benowitz N. L., Jacob P. (2005). Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. *American Journal of Medicine* **118**: 998-1003
- Haller Ch. A., Duan M., Jacob P., Benowitz N. (2008). Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions. *British Journal of Clinical Pharmacology* **65**: 833
- Hänsel R., Sticher O. (eds). (2007). *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. 8. Auflage. Springer, Heidelberg, 1570 p.
- Jack S., Desjarlais-Renaud T., Pilon K. (2007). Bitter orange or synephrine: update on cardiovascular adverse reactions. *Canadian Adverse Reaction Newsletter* **17**: 2-3
- Jordan R., Midgley J. M., Thonoor C. M., Williams C. M. (1987). β -Adrenergic activities of octopamine and synephrine stereoisomers on guinea-pig atria and trachea. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **39**: 752-754
- Jordan S., Murty M., Pilon K. (2004). Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. *Canadian Adverse Reaction Newsletter* **14**: 3-4
- Malhotra S., Bailey D. G., Paine M. F., Watkins P. B. (2001). Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **69**: 14-23
- Min B., Cios D., Kluger J., White C. M. (2005). Absence of QTc-interval-prolonging or hemodynamic effects of a single dose of bitter-orange extract in healthy subjects. *Pharmacotherapy* **25**: 1719-24
- NTP/NIEHS. (2004). Bitter orange (*Citrus aurantium* var. amara) extracts and constituents (\pm)-p-synephrine [CAS No. 94-07-5] and (\pm)-p-octopamine [CAS No. 104-14-3]. Review of toxicological literature. National Toxicology Program (NTP), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, North Carolina 2004, VIII + 73 p. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/Bitterorange.pdf
- O'Neil M. J. (ed.). (2008). *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 14th Edition – 2nd Electronic Update. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA, 11625 p.

- Pellati F., Benvenuti S., Melegari M., Firenzuoli F. (2002). Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *amara* by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**: 1113-1119
- Pellati F., Benvenuti S. (2007). Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. *Journal of Chromatography A* **1161**: 71-88
- Penzak S. R., Jann M. W., Cold J. A., Hon Y. Y., Desai H. D., Gurley B. J. (2001). Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *Journal of Clinical Pharmacology* **41**: 1059-1063
- Ph. Eur. (2008). Bitter-orange epicarp and mesocarp (Aurantii amari epicarpium et mesocarpium), 01/2008:1603. In: *European Pharmacopoeia 6th edition*. Council of Europe, Strasbourg, 1319-1320.
- Ph. Eur. (2008). Bitter-orange-epicarp and mesocarp tincture (Aurantii amari epicarpium et mesocarpium tinctura), 01/2008:1604. In: *European Pharmacopoeia 6th edition*. Council of Europe, Strasbourg, 1320.
- Ph. Eur. (2008). Bitter-orange flower (Aurantii amari flos), 01/2008:1810. In: *European Pharmacopoeia 6th edition*. Council of Europe, Strasbourg, 1320-1321.
- Ph. Eur. (2008). Neroli oil (Neroli aetheroleum), 01/2008:1175. In: *European Pharmacopoeia 6th edition*. Council of Europe, Strasbourg, 2490-2492.
- Santana J., Sharpless K. E., Nelson B. C. (2008). Determination of *para*-synephrine and *meta*-synephrine positional isomers in bitter orange-containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chemistry* **109**: 675-682
- Smedema J. P., Müller G. J. (2008). Coronary spasm and thrombosis in a bodybuilder using a nutritional supplement containing synephrine, octopamine, tyramine and caffeine. *South African Medical Journal* **98**: 372-373
- WADA. (2007). *The 2008 Prohibited List*. The World Anti-Doping Agency, Montreal, QC, Canada, 20 p. www.wada-ama.org
- WADA. (2008). *The 2009 Prohibited List*. The World Anti-Doping Agency, Montreal, QC, Canada, 18 p. www.wada-ama.org
- Wallis T. E. (1946). *Textbook of Pharmacognosy*. J. & A. Churchill, London, 504 p.

ZAŁĄCZNIK B: CAMELLIA SINENSIS (L.) O. KUNTZE

Przedmiotem niniejszego sprawozdania są “ekstrakty z suszonych liści zielonej herbaty”.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przetestowanie proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie jest zadaniem niniejszego dokumentu dokonywanie formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanej substancji bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter substancji i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy; nie może on też być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanej substancji botanicznej ani też wszystkich możliwych jej składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa substancji botanicznej. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Tożsamość i charakter materiału źródłowego

Nazwa naukowa: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze

Synonimy: *Camellia thea* Link, *Thea sinensis* L., *Thea viridis* L, *Theaphyla lanceolata* Raf. ,
Theaphyla laxa Raf. , *Theaphyla viridis* Raf.,

Odmiany:

Camellia sinensis (L.) Kuntze var. *sinensis* (Pol.: Herbata chińska, herbata drobnolistna)

Camellia sinensis (L.) Kuntze var. *assamica* (J.W. Mast.) Kitam. (Syn. *Camellia assamica* (Mast.) Hung T. Chang, *Camellia theifera* Griff., *Thea assamica* J.W. Masters, *Camellia assamica* (J. W. Mast.) W. Wight; Pol.: Herbata Assam, herbata cejlońska, herbata indyjska, herbata wielkolistna)

Nazwy zwyczajowe: Pol.: Herbata, Ang. Tea plant, Fr.: Thé, théier, Niem.: Teestrauch,
Wł.: Te

Rodzina: Theaceae

Stosowane części rośliny: Młode listki oraz pąki liściowe wykorzystywane do wytwarzania tradycyjnej „zielonej herbaty” jako podstawa tradycyjnych naparów wodnych z zielonej herbaty. Liście i pąki liściowe wykorzystywane są także do wytwarzania tak zwanych „suchych ekstraktów z zielonej herbaty”.

- Pochodzenie geograficzne: Herbata pochodzi z południowo-wschodniej Azji; w chwili obecnej uprawia się ją w ponad 30 krajach (np. Birma, Chiny, Indie (stan Asam), Indonezja, Japonia, Sri Lanka). Zielona Herbata wytwarzana jest np. w Chinach, w Japonii, w Indonezji, Wietnamie, państwach WNP, na Tajwanie i w Indiach.
- Warunki uprawy i zbioru: Na przestrzeni lat miał miejsce proces daleko posuniętej hybrydyzacji. Na skutek hodowli, propagacji wegetatywnej oraz selekcji powstały tysiące wariantów o zróżnicowanych cechach, wliczając w to różnice dotyczące składu (np. Graham, 1992).

2. Proces wytwarzania

W zależności od zastosowanego procesu wytwarzania z liści oraz pąków liściowych *C. sinensis* wytwarza się zasadniczo trzy różne produkty tradycyjne: zieloną herbatę, czarną herbatę oraz herbatę ulung. Podczas gdy zieloną herbatę wytwarza się bez zastosowania procesu fermentacji, zapobiegając tym samym utlenianiu się składników polifenolowych, produkcja czarnej herbaty opiera się na fermentacji, co powoduje, że polifenole ulegają w znacznym stopniu procesowi katalizowanego enzymatycznie aerobowego utleniania, po którym następuje seria reakcji kondensacji chemicznej. W przypadku herbaty ulung, będącej herbatą półfermentowaną, polifenole ulegają częściowemu utlenieniu. Niniejsze sprawozdanie ma za swój przedmiot ocenę „suchych ekstraktów z zielonej herbaty” na bazie *C. sinensis* i odnosi się także do danych dotyczących tradycyjnych naparów herbacianych na potrzeby analizy porównawczej. W związku z powyższym niniejsza analiza obejmuje następujące rodzaje ekstraktów z zielonej herbaty:

2.1. Tradycyjne napary z zielonej herbaty:

Tradycyjne napary z zielonej herbaty powstają na bazie „tradycyjnej zielonej herbaty” przygotowywanej w sposób następujący: w celu zachowania katechin zawartych w liściach rośliny po ich zbiorze dokonuje się dezaktywacji enzymów poprzez intensywną obróbkę cieplną za pomocą pary wodnej (japońska zielona herbata) lub też poprzez ich opiekanie lub prażenie na patelni (chińska zielona herbata); następnie liście są zwijane i suszone na powietrzu w wysokiej temperaturze (np. Graham, 1992).

W zależności od jakości zielonej herbaty, zalecenia dotyczące przygotowywania tradycyjnych naparów z zielonej herbaty różnią się co do ilości herbaty oraz wody stosowanych w tym procesie (od 0,75 do 1,5 g zielonej herbaty na 100 ml), temperatury wody (50 – 100°C, zazwyczaj poniżej temperatury wrzenia), czasu parzenia (30 sekund do 3 minut) oraz możliwości dokonywania powtórnej ekstrakcji (tj. zalecenie, aby do spożycia przeznaczać dopiero napój z drugiej ekstrakcji) (np. Scholz, 1995; Astill i in., 2001).

2.2. „Suche ekstrakty z zielonej herbaty”:

Do produkcji preparatów komercyjnych stosuje się różne techniki ekstrakcji oraz procedury produkcji, a ich charakter nie jest jednolity. Mogą one różnić się od tradycyjnych naparów z zielonej herbaty nie tylko pod względem braku obecności wody, ale także np. tym, że stosuje się rozpuszczalnik inny niż woda, że stosuje się różne źródła substancji (np. świeże liście krzewu herbacianego w miejsce zielonej herbaty), różne warunki ekstrakcji (np. stopień rozdrobnienia, stopień koncentracji, temperatura, czas trwania, mieszanie substancji) oraz różne procedury frakcjonowania pozwalające na zwiększenie koncentracji składników aktywnych. Niektóre ekstrakty sproszkowane bądź suszone otrzymuje się poprzez suszenie rozpryskowe silnych naparów powstających poprzez zanurzenie liści herbaty w

3. Skład chemiczny

W niniejszej sekcji w pierwszej kolejności podany zostanie skład chemiczny tradycyjnej zielonej herbaty, pozwalając na identyfikację materiału, z którego otrzymuje się analizowane ekstrakty z zielonej herbaty, następnie zaś dokonana zostanie analiza naparów z tradycyjnej zielonej herbaty oraz suchych ekstraktów z zielonej herbaty.

3.1. Tradycyjna zielona herbata

Dowiedziane zostało, że odmiana zastosowanej rośliny, środowisko uprawy, pora roku, wiek wykorzystywanych liści oraz warunki wytwarzania mają bardzo duży wpływ na skład otrzymywanej zielonej herbaty.

Polifenole: Zielona herbata zawiera zróżnicowane substancje polifenolowe, stanowiące do 30% suchej masy liści zielonej herbaty. Większość polifenoli zawartych w zielonej herbacie to flawonole zwane powszechnie katechinami. Najważniejsze katechiny wchodzące w skład zielonej herbaty to (-)-epikatechyna (EC), 3-galusan epikatechiny (ECG), 3-epigalokatechyna (EGC) oraz 3-galusan (-)-epigalokatechiny (EGCG). Ponadto występują także (+)katechyna (C), (+)galokatechyna (GC), galusan (-)galokatechiny (GCG), galusan (-)katechiny (CG) (zob. Tabela 1). Zielona herbata z młodych liści zawiera mniej EGCG oraz mniejszą ilość katechin jako takich niż zielona herbata ze starych liści (Lin i in., 2003).

Alkaloidy purynowe: kofeina (określana dawniej mianem teiny; zależnie od fazy rozwoju liści zawierają one 2,9-4,2% kofeiny, przy czym jej zawartość spada wraz z wiekiem liści), teobromina (0,15-0,2%), teofilina (0,02-0,04%).

Aminokwasy: Całkowita zawartość aminokwasów w zielonej herbacie to 4%, wliczając w to charakterystyczną dla herbat L-teaninę, stanowiącą najbardziej znaczący składnik w tej grupie (jego zawartość w zielonej herbacie wynosi 2%).

Proteiny: 15%.

Saponiny triterpenowe: saponiny zawarte w liściach herbaty (*folium theae*), aglikony takie jak np. barringtonol.

Pochodne kwasu kawowego: m.in. kwas chlorogenowy, teogalina.

Lignina: 6.5%.

Lipidy: 3%.

Polisacharydy: 13%.

Jony nieorganiczne: fluoryd (130-160 mg/kg), poziom zawartości zależny od gleby (jakości gleby), jony potasu i glinu.

Olejek eteryczny: głównym składnikiem jest linalol (Mitscher i in., 1997; Scholz, 1995; Gruenwald, 1998; Baza Danych USDA, 2007).

Tabela 1: Zawartość flawonoidów w suchych liściach zielonej herbaty wg bazy danych USDA (USDA, 2007)

Podrodzaj składnika	Flawonoid	Średnia zawartość (mg/100g)	Błąd standardowy (mg/100g)	N	Min (mg/100g)	Max (mg/100g)
Flavan-3-ols	(-)-Epikatechina	811,72	21,10	68	190,00	2000,00
	3-Galusan (-)-epikatechiny	1491,29	112,42	68	340,00	4630,00
	(-)-Epigalokatechina	2057,98	103,55	68	100,00	5477,40
	3-Galusan (-)-epigalokatechiny	7115,98	632,06	68	1600,00	20320,00
	(+)-Katechina	57,12	3,40	38	0,00	252,88
	3-Galusan (+)-katechiny	7,07	1,83	6	0,00	14,14
	(+)-Galokatechina	258,11	80,69	6	69,46	446,76
	Teaflawina	1,64	0,74	10	0,00	6,2451
	3,3'-Digalusan teaflawiny	1,08	0,63	4	0,00	2,3947
	3'-Galusan teaflawiny	0,44	0,26	4	0,00	0,9933
	3-Galusan teaflawiny	0,47	0,32	10	0,00	2,7387
	Tearubiginy	131,91	131,91	4	0,00	527,62
Flawony	Apigenina	12,03	2,86	9	0,00	23,76
	Luteolina	0,17	0,17	3	0,00	0,50
Flawonole	Kemferol	147,55	4,40	18	77,61	77,611
	Myricetyna	104,76	7,94	18	31,16	164,41
	Kwercetyna	223,97	9,60	18	54,36	405,00

3.2. Tradycyjne napary z zielonej herbaty:

Oprócz wpływu wynikającego z różnic w zakresie źródła botanicznego, stężenie poszczególnych składników zawartych w tradycyjnych naparach z zielonej herbaty w dużej mierze zależy od sposobu jej przygotowania przez konsumenta (użyta ilość wody i herbaty, czas parzenia (zob. Tabela 2) oraz stopień zmieszania); ponadto na ich stężenie ma wpływ także stopień rozdrobnienia liści herbaty oraz to, czy są one zapakowane w postaci torebek, czy też nie.

Tabela 2: Wpływ czasu parzenia herbaty na zawartość kofeiny oraz całkowitą zawartość katechin wyekstrahowanych z torebki herbaty zawierającej 3,125 g liści herbaty (najprawdopodobniej czarnej) w 200 ml wody (Astill i in., 2001)

Czas parzenia (s)	mg/l w roztworze wodnym	
	katechiny	kofeina
30	22,1 (19,9%) ^a	108,0 (34,6%)
60	36,5 (32,9%)	159,2 (50,9%)
120	62,9 (56,7%)	227,3 (72,7%)
300	90,5 (81,6%)	285,9 (91,5%)

^a Dane dotyczące efektywności ekstrakcji podane w nawiasach wyliczono na podstawie zawartości kofeiny i katechin w liściach herbaty wynoszącej odpowiednio 2,21% i 0,71%.

Tabela 3 określa zakres zawartości, podczas gdy Tabela 4 podaje przykłady zawartości flawonoidów w przygotowanych tradycyjną metodą naparach z zielonej herbaty.

Tabela 3: Baza danych USDA dot. zawartości flawonoidów w naparach z zielonej herbaty (USDA, 2007)

Podrodzaj składnika	Flawonoid	Średnia zawartość (mg/100g)	Błąd standardowy (mg/100g)	N	Min (mg/100g)	Max (mg/100g)
Flawan-3-ole	(-)-Epikatechina	8,29	0,49	67	1,90	26,00
	3-Galusan (-)-epikatechiny	19,73	2,76	67	4,30	139,60
	(-)-Epigalokatechina	16,71	1,41	67	1,00	54,40
	3-Galusan (-)-epikgalokatechiny	77,81	6,97	67	2,31	203,20
	(+)-Katechina	2,55	1,53	39	0,00	44,40
	(+)-Galokatechina	1,54		3	1,54	1,54
	Teaflawina	0,05	0,01	4	0,02	0,08
	3,3'-Digalusan teaflawiny	0,01	0,01	4	0,00	0,03
	3'-Galusan teaflawiny	0,01	0,00	4	0,00	0,01
	3-Galusan teaflawiny	0,01	0,01	4	0,00	0,03
	Tearubigin	1,08	1,08	4	0,00	4,30
Flawony	Apigenina	0,17	0,17	3	0,00	0,50
	Luteolina	0,17	0,17	3	0,00	0,50
Flawonole	Kemferol	1,42	0,22	12	0,67	3,31
	Myricetyna	1,10	0,11	12	0,52	1,60

	Kwercetyna	2,69	0,26	12	1,40	4,10
--	------------	------	------	----	------	------

Szeroki zakres stężenia podany dla EGCG w Tabeli 3 ma odzwierciedlać różnice wynikające z odmienności w zakresie stosowanych metod ekstrakcji. Dane w tym zakresie zgodne są z zakresem wskazanym przez Bronnera i in. (1998), stanowiącym kompilację danych wskazanych w dostępnym piśmiennictwie (EGCG w naparach z zielonej herbaty: 5 – 190 mg/100ml). Wykorzystując określoną metodę ekstrakcji (mieszanie 0,25 g liści zielonej herbaty w 80 ml wrzącej wody przez 3 minuty lub przez 20 minut), Bronner i in. (1998) stwierdzili obecność odpowiednio 6 mg EGCG na 100 ml i 9 mg EGCG na 100 ml naparu (średnie z 6 pomiarów; 2 porcje herbaty, każda analizowana trzykrotnie). Dane te pozostają zgodne z wynikami, jakie osiągnęli w swoim badaniu Khokar i in., (1997) (zob. Tabela 4), używając większej ilości liści zielonej herbaty do ekstrakcji.

Tabela 4: Zawartość (wartości średnie na 3-5 ustaleń) katechin w chińskim i japońskim naparze z zielonej herbaty (przygotowanie: 1g liści herbaty zaparzone w 100 ml wrzącej wody i odcedzone po 5 minutach, potrząsając wcześniej przez 30 sekund. Zawartość (+)-katechin jest poniżej dolnej granicy detekcji (10 µg/ml) (1). a = wartość procentowa w odniesieniu do całkowitej zawartości katechin (Khokar i in., 1997).

	EC (mg/100 ml)	ECG (mg/100 ml)	EGC (mg/100 ml)	EGCG (mg/100 ml)	Katechiny razem (mg/100 ml)
Napar z zielonej herbaty					
Chiny	4,7 (9,1 %) ^a	4,4 (8,5 %) ^a	16,3 (31,7 %) ^a	26,3 (51,1 %) ^a	51,5
Japonia	9,4 (11,1 %) ^a	5,9 (6,9 %) ^a	28,7 (33,8 %) ^a	40,8 (48,1 %) ^a	84,9

3.3. “Suche ekstrakty z zielonej herbaty”:

Wartości stężeń w suchych ekstraktach z zielonej herbaty różnią się znacznie w zależności od zastosowanego materiału źródłowego oraz procedury ekstrakcji. Aktualnie dostępne są komercyjne preparaty pozbawione kofeiny, charakteryzujące się zwiększoną zawartością polifenoli (60-80% suchej masy lub więcej), przy czym substancje te charakteryzują się szczególnie wysoką zawartością EGCG (Mitscher i in., 1997).

4. Specyfikacje

Specyfikacje dotyczące suchych ekstraktów z zielonej herbaty mieć winny zastosowanie do różnych zawartych w nich katechin (przede wszystkim zaś do EGCG), kofeiny oraz L-teaniny, które są najbardziej znaczącymi składnikami aktywnymi biologicznie. Specyfikacje powinny uwzględniać także stopień zanieczyszczenia pestycydami oraz benzo(a)pirenem. Badanie na obecność pestycydów w 38 chińskich zielonych herbatach, 22 japońskich zielonych herbatach oraz 8 zielonych herbatach pochodzących z innych źródeł dostępnych na rynku niemieckim wykazała, że odpowiednio 15, 17 i 4 próbki zawierały pozostałości pestycydów w stężeniu przekraczającym dopuszczalne normy (Stiftung Warentest, 1999). Badanie na obecność benzo(a)pirenu w 22 suplementach diety (pastylkach) zawierających preparaty na bazie zielonej herbaty wykazało, że w 18 produktach występowało skażenie benzo(a)pirenem na poziomie od 0,39 do 144,7 µg/kg, co daje dzienne spożycie 224,8 mg benzo(a)pirenu na osobę. Uważa się, że tego rodzaju zanieczyszczenia pojawiają się na skutek procesu obróbki cieplnej stosowanego podczas wytwarzania preparatów z zielonej herbaty (Martena, 2008).

5. Stabilność składnika botanicznego

Badanie dotyczące stabilności składników botanicznych wykazało, że zawarte w zielonej herbacie katechiny zachowują stabilność w temperaturze pokojowej. Podczas podgrzewania EGCG w autoklawie w temperaturze 120°C przez okres 20 minut stwierdzono wystąpienie epimeryzacji EGCG do postaci (-)galusanu galokatechiny (GCG). Stosunkowa duża ilość GCG występująca w niektórych napojach herbacianych była najprawdopodobniej efektem epimeryzacji EGCG na skutek podgrzewania w autoklawie.

Istnieją sugestie mówiące, że inne składniki używane w procesie produkcji napojów herbacianych mogą wchodzić w interakcję z katechinami zielonej herbaty, wpływając na ich stabilność. Podczas produkcji, magazynowania i transportu puszkowanych i butelkowanych napojów herbacianych należy brać pod uwagę ryzyko degradacji katechin zielonej herbaty (Chen, 2001).

Obecność izomerów epimerycznych (i)-epikatechiny, 3-O-galusanu (-) epikatechiny, (-)-epigallokatechiny, 3-O-galusanu (-) epigallokatechiny (EGCG) oraz (3-O-metylo)-3-O-galusanu(-) epigallokatechiny w zielonej herbacie zwiększa się wraz z wydłużeniem czasu ekstrakcji w temperaturze 90 °C. Wskaźniki epimeryzacji autentycznych katechin herbaty w wodzie destylowanej są o wiele mniejsze niż w przypadku naparu z herbaty bądź też roztworu buforowego o pH wynoszącym 6,0 (Suzuki i in., 2003).

Epimeryzacja katechin uległa zahamowaniu w momencie, gdy ekstrakt zawierający katechiny herbaty podgrzewany był w postaci sproszkowanej oraz gdy dokonano ekstrakcji suszonej herbaty w 50% (v/v) roztworze etanolu bądź też w wodzie w temperaturze 80°C lub niższej. Aby być w stanie poznać profil katechin herbacianych wchodzących w skład analizowanych herbat, zaleca się ekstrahowanie ich w 50% (v/v) roztworze etanolu przez 10 minut; świeże liście powinny być poddawane ekstrakcji w 75% (v/v) roztworze etanolu przez 10 minut (Liang i in., 2007).

6. Proponowane zastosowania i poziomy zastosowania

Suche ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane są w celach spożywczych, wliczając w to napoje oraz suplementy diety, oraz jako produkty farmaceutyczne.

6.1. Zastosowania spożywcze:

- Jako napoje stymulujące (używkii) pod postacią naparów, napojów gotowych do spożycia bazujących na „suchym ekstrakcie z zielonej herbaty” bądź też napojów przygotowywanych przez konsumenta, dostarczanych w postaci proszku typu instant (dane na temat poziomów zastosowania znajdują się w sekcji dotyczącej narażenia).
- Jako napoje nie będące używkami np. pod postacią bezkofeinowych napojów na bazie zielonej herbaty.
- Jako suplementy diety bądź produkty pokrewne w postaci stałej bądź też w postaci napojów bazujących w wielu przypadkach na suszonym ekstrakcie z zielonej herbaty; według materiałów promocyjnych mają one przynosić następujące korzyści (zob. np. lista zapewnień przedstawionych na mocy postanowień Art. 14 Rozporządzenia 1924/2006 (WE)¹⁸):
 - pomagają zmniejszyć wagę ciała i wspomagają metabolizm lipidów (dzienna dawka: odpowiednik co najmniej 150 mg kofeiny, 115-270 mg EGCG i 375 mg katechin),
 - zapewniają ochronę tkanek ciała przed procesem utleniania, pomagają zachować zdrowie w trakcie starzenia się poprzez ochronę DNA komórek oraz pozwalają zadbać o zdrowe kości, skórę oraz utrzymać w normie poziom glukozy we krwi (dzienna dawka: odpowiednik 1 – 3 filiżanek herbaty dziennie celem dostarczenia 360 – 1080 mg substancji stałych zawartych w herbacie),
 - działają relaksująco i ułatwiają zasypianie (dzienna dawka: odpowiednik 45-200 mg L-teaniny).

¹⁸ Zob. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_article13.htm

6.2. Zastosowania farmaceutyczne:

Tradycyjne napary z zielonej herbaty

Tradycyjne napary z zielonej herbaty stosowane są w ramach leczenia dolegliwości żołądkowych, wymiotów oraz biegunki (Gruenwald i in., 1998 – Podręczny Informator Lekarza (PDR): Leki Ziołowe).

Suche ekstrakty z zielonej herbaty

Preparat odchudzający zawierający wysokodawkowy ekstrakt wodno-alkoholowy z zielonej herbaty dostępny był na rynku tylko do kwietnia 2003 roku, kiedy to władze francuskie i hiszpańskie zawiesiły zezwolenie na sprzedaż preparatu z uwagi na działanie uboczne o charakterze hepatotoksycznym (AFSSAPS, 2003, Sarma i in., 2008).

Testy kliniczne mające na celu weryfikację ewentualnych skutków terapeutycznych stosowania ekstraktów z zielonej herbaty, często zawierających podwyższoną ilość EGCG, u pacjentów cierpiących na nowotwory w stadiach zaawansowanych bądź na choroby przewlekłe (np. rak prostaty, rak piersi, rak pęcherza, białaczka limfatyczna, choroba Parkinsona, cukrzyca typu 2, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, rzutowo-remisyjne stwardnienie rozsiane) są w tej chwili w trakcie realizacji bądź też trwa rekrutacja ochotników do tego rodzaju badań (Badania Kliniczne – NIH, 2008).

Ekstrakt z zielonej herbaty wykorzystywany jest miejscowo jako maść do leczenia zewnętrznych kłykcin kończystych zlokalizowanych na narządach płciowych i w okolicy odbytu (FDA, 2006).

7. Informacje dotyczące istniejących badań

Organizacja AFSSAPS (Francuska Agencja ds. Bezpieczeństwa Produktów Leczniczych) opublikowała w dniu 7 kwietnia 2003 roku komunikat prasowy, w którym stwierdzono, że pozwolenie na wprowadzenie do obrotu leku fitoterapeutycznego, zalecanego jako element dodatkowy programów odchudzających, zostało zawieszono z uwagi na podejrzenie wywołania przez ten produkt zaburzeń czynności wątroby w 13 przypadkach (9 we Francji, 4 w Hiszpanii), w tym 4 przypadków o charakterze poważnym. Jedna kapsułka omawianego leku fitoterapeutycznego zawierała 375 mg opatentowanego ekstraktu wodno-alkoholowego z zielonej herbaty, otrzymanego poprzez zastosowanie 80-procentowego etanolu w charakterze ekstrahenta i charakteryzującego się ustandaryzowaną zawartością 25% EGCG. Dodatkowo, ekstrakt ten zawierał 5-10% kofeiny. Stwierdzono, że lek stosowany był w zalecanej dawce dwóch kapsułek dwa razy dziennie (dzienna dawka odpowiadająca 375 mg EGCG). AFSSAPS oświadczyła, że jej decyzja nie ma zastosowania do innych produktów medycznych na bazie zielonej herbaty (słaby ekstrakt wodno-alkoholowy, ekstrakt wodny oraz sproszkowane liście zielonej herbaty) dopuszczonych do obrotu na terenie Francji i że nie wnosi ona żadnych zastrzeżeń wobec wykorzystywania zielonej herbaty w ramach fitoterapii bądź też w produktach spożywczych (AFSSAPS, 2003). Od 2006 roku AFSSAPS otrzymała informacje na temat nowych przypadków uszkodzeń wątroby na skutek stosowania suplementów diety na bazie wodnego ekstraktu z zielonej herbaty; w jednym przypadku stwierdzono silny związek przyczynowo skutkowy (AFSSA, 2009).

W odpowiedzi na przekazane informacje na temat ryzyka toksycznego oddziaływania preparatu na wątrobę, Komitet Ekspertów ds. Informacji nt. Suplementów Diety (DSI EC) Farmakopei Amerykańskiej (USP) prowadził systematyczną analizę informacji dot. bezpieczeństwa produktów na bazie zielonej herbaty. Przeprowadzono analizę 216 raportów z obserwacji klinicznej dotyczących działań niepożądanych produktów na bazie zielonej herbaty, wliczając w to 34 raporty dotyczące uszkodzeń wątroby. W przypadku 27 raportów dot. uszkodzeń wątroby istnienie związku przyczynowo skutkowego uznano za możliwe, a w przypadku siedmiu – za prawdopodobne. Pod uwagę wzięto także kliniczne informacje farmakokinetyczne oraz informacje toksykologiczne dotyczące działania na zwierzęta. Dostępne dane wskazują, że spożywanie stężonych ekstraktów z zielonej herbaty na pusty żołądek może częściej prowadzić do występowania działań niepożądanych niż w przypadku spożywania ich po posiłku. DSI EC przedstawiła sugestie, aby monografie dotyczące ekstraktów z zielonej herbaty znajdujące się w Farmakopei Amerykańskiej (USP)

zawierały następujące ostrzeżenie do zamieszczenia na etykietach produktów: "Zażywać podczas lub po posiłku. Osoby cierpiące na schorzenia wątroby oraz osoby, u których wystąpiły symptomy lub problemy dotyczące wątroby takie jak bóle brzucha, oddawanie moczu o ciemnej barwie lub żółtaczka powinny zaprzestać stosowania i skonsultować się z lekarzem." Propozycja przedstawiona przez Komisję nie ma zastosowania do tradycyjnych naparów z zielonej herbaty bądź też innych preparatów mających postać napojów (Sarma i in., 2008).

W odniesieniu do wniesionej petycji dotyczącej oświadczeń zdrowotnych, FDA zdecydowało, że nie istnieją wiarygodne dowody na prawdziwość kwalifikowanych oświadczeń zdrowotnych dotyczących zmniejszenia ryzyka zachorowania na nowotwory układu pokarmowego, płuc, jelita/odbytu, przelyku, trzustki, jajników oraz nowotwory o charakterze złożonym na skutek spożywania zielonej herbaty. Co więcej, FDA stwierdziła także, że istnieje bardzo niewiele wiarygodnych dowodów na prawdziwość kwalifikowanych oświadczeń zdrowotnych dotyczących, w szczególności, spożywania zielonej herbaty i zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka piersi oraz spożywania zielonej herbaty i zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka prostaty (FDA, 2005).

Po dokonaniu oceny danych farmakologicznych i toksykologicznych, FDA zezwoliło na stosowanie ziołowych maści zawierających 15% składników pochodzących z zielonej herbaty w celu leczenia zewnętrznych kłykcin kończystych zlokalizowanych na narządach płciowych i w okolicy odbytu wywoływanych przez niektóre odmiany wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV). W skład omawianej maści wchodziła tym przypadku częściowo oczyszczona frakcja ekstraktu wodnego z liści zielonej herbaty (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) stanowiąca mieszaną katechin i innych składników zielonej herbaty. Katechiny stanowią od 85% do 95% całkowitej wagi substancji leczniczej, z czego 55% stanowi EGCG, resztę zaś – inne pochodne katechin, takie jak EC, EGC, ECG oraz kilka dodatkowych, obecnych w mniejszych ilościach pochodnych katechin, tj. GCG, GC, CG i C. Oprócz znanych składników z grupy katechin omawiana substancja zawiera także kwas galusowy, kofeinę oraz teobrominę, stanowiące razem ok. 2,5% wagi tej substancji. Pozostałe składniki specyfiku leczniczego obejmują niezdefiniowane czynniki botaniczne pochodzące z liści zielonej herbaty (FDA, 2006).

8. **Narażenie**

8.1. **Tradycyjny napar z zielonej herbaty**

Według danych pochodzących z ankiety RKI dotyczącej żywienia na terenie Niemiec (RKI, 1998; Mensink, 2002), średnia wartość spożycia naparów z zielonej herbaty wynosi 362 g dziennie na osobę (95. percentyl: 1097 g dziennie na osobę). W znajdującej się poniżej tabeli 5 zawarto szacunkowe wartości narażenia bazujące na danych dot. zawartości katechiny w próbkach chińskiej oraz japońskiej zielonej herbaty (Tabela 4).

Tabela 5: Dzienny poziom narażenia na katechiny na skutek spożywania tradycyjnego naparu z zielonej herbaty – średni (362 g naparu dziennie) i wysoki poziom narażenia (95 percentyl: 1097 g naparu dziennie) (RKI, 1998).

		EC (mg/dzień)	ECG (mg/dzień)	EGC (mg/dzień)	EGCG (mg/dzień)	Katechiny – razem (mg/dzień)
Zielona herbata - Chiny	Spożycie 362 g naparu dziennie	17,0	15,9	59,0	95,2	186,4
	Spożycie 1097 g naparu dziennie	51,6	48,3	178,8	288,5	565,0
Zielona herbata – Japonia	Spożycie 362 g naparu dziennie	34,0	21,4	103,9	147,7	307,3
	Spożycie 1097 g naparu dziennie	103,1	64,7	314,8	447,6	931,4

8.2. Suplementy diety

Poziom narażenia na składniki zielonej herbaty zawarte w suplementach diety może osiągać bardzo zróżnicowane wartości.

Według sugerowanych poziomów zastosowania preparatów na bazie zielonej herbaty w suplementach diety stosowanych w celu obniżenia wagi ciała, istnieje ryzyko, że wartości dziennych dawek wynoszących 150 mg kofeiny, 115-270 mg EGCG oraz 375 mg katechin mogą być przekraczane. W przypadku produktów mających w zamierzeniu działać przeciwutleniająco, zapewniać zdrowe starzenie się poprzez ochronę DNA komórek ciała, pozytywnie wpływać na zdrowie tkanki kostnej i skóry oraz utrzymywać zawartość glukozy we krwi na normalnym poziomie, należy oczekiwać narażenia na poziomie odpowiadającym 1 – 3 filiżanek herbaty dziennie (dawki dzienne zawierające 360 – 1080 mg substancji stałych zawartych w herbacie, tj. substancji pozostałych po wysuszeniu ekstraktu mającego postać płynną).

9. Dane toksykologiczne

Spożywanie tradycyjnych naparów z zielonej herbaty wiąże się z konsumpcją kofeiny, przez co występują zarówno powszechnie znane, zamierzone efekty o charakterze stymulującym, jak również powszechnie znane niepożądane skutki działania kofeiny zależące od przyjętej dawki tej substancji (Jellin i in., 2007). W tym zakresie należy odwołać się do treści zawartych w odpowiedniej literaturze farmaceutycznej (np. Martindale, 2008) oraz do analiz dotyczących kofeiny jako składnika tzw. napojów energetycznych wykonanych przez SCF (SCF, 1999). Biorąc pod uwagę fakt, że zielona herbata w różnych kulturach Azji jest często spożywana codziennie, nie przynosząc żadnych istotnych efektów niepożądanych, nie stwierdzono jakichkolwiek zagrożeń bezpieczeństwa związanych z tradycyjnym spożywaniem naparów z zielonej herbaty. Nie wiadomo nic na temat ewentualnych zagrożeń zdrowia związanych z właściwym podawaniem ustalonych dawek terapeutycznych tradycyjnych naparów z zielonej herbaty (Gruenwald i in., 1998 – Podręczny Informator Lekarza (PDR): Leki Ziołowe). Podręczny Informator Lekarza dot. Leków Ziołowych wskazuje że efekty uboczne spożywania herbaty mogą występować u osób o wrażliwym żołądku. Nadkwasota, podrażnienia żołądka, spadek apetytu oraz zatwardzenie bądź biegunka mogą występować na skutek picia zielonej herbaty w dużych ilościach. Co do zawartości kofeiny w zielonej herbacie, Podręczny Informator Lekarza (PDR) dot. Leków Ziołowych wskazuje, że należy zachować ostrożność przy podawaniu tej herbaty osobom odznaczającym się słabą kondycją układu sercowo-naczyniowego.

cierpiącym na choroby nerek, nadczynność tarczycy, podwyższoną podatność na różnego rodzaju skurcze oraz określone dolegliwości psychiczne takie jak np. napady lęku panicznego. W przypadku długoterminowego zażywania dawek przekraczających 1,5g kofeiny dziennie występują objawy niespecyficzne takie jak niepokój, drażliwość, bezsenność, palpacje, zawroty głowy, wymioty, biegunka, utrata apetytu i bóle głowy. Przedawkowanie (przyjmowanie dawek odpowiadających ponad 300 mg kofeiny lub 5 filiżankom herbaty) może prowadzić do występowania uczucia niepokoju, konwulsji oraz podwyższonej pobudliwości odruchowej. Pierwszymi oznakami zatrucia są wymioty i skurcze mięśni brzucha. Niemowlęta karmione przez matki spożywające napoje zawierające kofeinę mogą cierpieć na zaburzenia snu. Według Podręcznego Informatora Lekarza dot. Leków Ziołowych, kobiety w ciąży nie powinny zażywać dawek większych niż 300 mg dziennie (5 filiżanek herbaty pod warunkiem, że zostaną one wypite w różnych porach celem rozłożenia konsumpcji na okres całego dnia) lub też w ogóle unikać kofeiny.

Należy w tym momencie odwołać się do perspektywicznego badania kohortowego, którego wyniki opublikowano w 2008 roku. Objęło ono grupę 1063 kobiet i dotyczyło przebiegu ciąży do 20 tygodnia. Badacze zauważyli, że w porównaniu z kobietami w ciąży które w ogóle nie spożywały kofeiny, kobiety zażywające do 200 mg kofeiny dziennie musiały liczyć się ze zwiększonym ryzykiem poronienia (15% w porównaniu do 12%); w przypadku kobiet zażywających ponad 200 mg kofeiny dziennie było ono znacznie większe (25% w porównaniu do 12%). Wynik ten nie zależał od tego, w formie jakiego preparatu kofeina była podawana (Weng i in., 2008).

Odnosząc się do nowych wyników dużego prospektywnego badania obserwacyjnego mającego za przedmiot spożycie kofeiny przez kobiety w ciąży oraz ryzyko wystąpienia ograniczenia wzrostu płodu (Grupa Badawcza CARE, 2008), Agencja ds. Standardów Żywności zaleciła kobietom w ciąży ograniczenie dziennego spożycia kofeiny, które w idealnym przypadku wynosić powinno mniej niż 200 mg dziennie (FSA, 2008).

Zielona herbata wydaje się obniżać poziom wchłaniania żelaza niehemowego zawartego w spożywanej żywności (np. Jellin i in., 2007, Wang i in., 2000).

Jellin i in. (2007) stwierdzają, że wśród osób spożywających tradycyjne napary z zielonej herbaty nie stwierdzono przypadków występowania zjawiska hepatotoksyczności, jak miało to miejsce w przypadku niektórych suplementów diety/medykamentów bazujących na wyciągu z zielonej herbaty.

Jeśli idzie o L-teaninę jako składnik zielonej herbaty, należy odwołać się do kompilacji dostępnych danych w zakresie bezpieczeństwa zawartych w treści raportu BfR dotyczącego wykorzystania wyizolowanej L-teaniny jako składnika napojów (BfR, 2003).

“Suche ekstrakty z zielonej herbaty” i produkty powstałe na bazie “suchych ekstraktów z zielonej herbaty”

W treści poniższych sekcji zawarto jedynie wybrane, przykładowe dane, co do których ocenia się, że mogą one mieć znaczenie na potrzeby dokonania oceny ryzyka odnośnie suchych ekstraktów z zielonej herbaty.

Dane dotyczące ludzi

Badania toksykokinetyczne i badania bezpieczeństwa

Po spożyciu drogą ustną zawarte w herbacie katechiny ulegają glukuronidacji, sulfatacji oraz O-metylacji (np. Chow i in., 2003; Lu i in., 2003; Higdon i Frei, 2003). Po spożyciu ekstraktu z zielonej herbaty przez ochotników uczestniczących w badaniu, cząstki EGCG w osoczu krwi zazwyczaj występują w postaci wolnej (64-77%), podczas gdy cząstki EGC i EC występują w formie w wyższym stopniu związanej (Lee i in., 2002). Brak jest danych na temat dystrybucji tkankowej oraz wydalania katechin zielonej herbaty i EGCG u ludzi.

Według randomizowanego badania z placebo przeprowadzonego na próbie zdrowych ochotników (po osiem osób w grupie), EGCG bądź też bezkofeinowy ekstrakt z zielonej herbaty zawierający 60% EGCG, podawane doustnie raz dziennie w dawce wynoszącej 800 mg EGCG dziennie przez okres 4 tygodni uznane zostały za bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm. Zdarzenia niepożądane, które występowały w 4-tygodniowym okresie badania, obejmowały nudności, bóle brzucha, zawroty głowy oraz bóle mięśniowe. Wszystkie spośród stwierdzonych zdarzeń niepożądanych miały charakter zdarzeń o charakterze łagodnym. Na skutek wielokrotnego podawania produktów polifenolowych na bazie zielonej herbaty nie stwierdzono znaczących zmian w morfologii i składzie chemicznym krwi. W przypadku obu formuł zawierających katechinę stwierdzono występowanie zbliżonej kinetyki EGCG na ostatni dzień leczenia (np. w przypadku EGCG zawartego w ekstrakcie bezkofeinowym: C_{max} 287.6 ± 124.2 ng/ml; t_{max} 248 ± 184.9 min; czas półtrwania: 163.0 ± 56.2 min). W efekcie długotrwałego podawania polifenoli zielonej herbaty w wysokich dziennych dawkach bolusowych (800 mg EGCG lub ekstraktu bezkofeinowego raz dziennie) przez okres 4 tygodni leczenia stwierdzono, w porównaniu ze stanem z początku badania, wystąpienie przekraczającego 60% wzrostu biodostępności (pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia EGCG w osoczu do czasu (AUC)). Test obejmujący podawanie 800 mg EGCG dziennie w dwóch dawkach każdego dnia (400 mg dwa razy dziennie) nie doprowadził do znaczącego wzrostu biodostępności po upływie 4 tygodni. Mechanizm odpowiadający za zaobserwowany wzrost wartości AUC dla wolnego EGCG po wielokrotnym podawaniu EGCG bądź ekstraktu bezkofeinowego w wysokich dziennych dawkach bolusowych będzie przedmiotem dalszych badań. Biologiczne okresy półtrwania EGCG nie wskazują na występowanie zjawiska akumulacji (Chow i in., 2003). Czynniki, które najprawdopodobniej wpływają na omawiany stan rzeczy, są inhibicja degradacji nieenzymatycznej, metabolizm jelitowej flory bakteryjnej, metylacja i/lub mechanizm transportu EGCG na zewnątrz jelita (Chow i in., 2003).

Badania przeprowadzone wśród zdrowych ochotników (po dziesięć osób w grupie) wykazały także, że ekstrakt bezkofeinowy podawany w pojedynczej dawce (800 mg EGCG dziennie) był dobrze tolerowany przez organizm (u pacjentów stwierdzono jedynie nieznaczne, przemijające nudności) w przypadku przyjmowania go razem z pokarmem. W szczególności, wartość C_{max} wolnego EGCG w osoczu przy spożyciu na czczo była pięciokrotnie wyższa niż w przypadku podawania takiej samej dawki z posiłkiem (Chow i in., 2005).

W randomizowanym badaniu z placebo przeprowadzonym metodą podwójnej ślepej próby analizowano parametry kinetyczne pojedynczych dawek EGCG (50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg, 800 mg, 1600 mg) lub placebo u 50 zdrowych mężczyzn biorących udział w badaniu. Stwierdzono, że 1600 mg EGCG podawanego na czczo prowadziło do maksymalnego stężenia substancji w osoczu o wartości 3300 ng/ml po upływie 1,3 – 2,2 godzin (Ullmann i in., 2003).

W drugim randomizowanym badaniu z placebo przeprowadzonym metodą podwójnej ślepej próby analizowano skutki wielokrotnego podawania dziennie 1 kapsułki zawierającej EGCG (94% czystego EGCG) uczestniczącym w badaniu osobnikom płci męskiej (dawki: 0, 200, 400 lub 800 mg dziennie) przez okres 10 dni na czczo (bez przyjmowania pokarmów nocą). Parametry kinetyczne badano 1 i 10 dnia leczenia. EGCG ulegało szybkiemu wchłanianiu. Pomimo bardzo znaczących różnic w zakresie stężenia wolnego EGCG w osoczu u poszczególnych osób udało się, dla zakresu dawkowania zastosowanego w ramach badania, zaobserwować liniowy wzrost biodostępności w zależności od stosowanej dawki już po pierwszym dniu stosowania leku (dzień 1). W następstwie regularnego podawania substancji (dzień 10), zjawisko proporcjonalności biodostępności do podawanych dawek zaobserwowano jedynie w dwóch niższych grupach dawek, podczas gdy zwiększenie dawki do 800 mg dziennie prowadziło do bardziej dynamicznego wzrostu biodostępności. Dłuższy czas półtrwania i wskaźnik akumulacji w grupie, której podawano dawkę 800 mg wykazało występowanie zależnego od wielkości dawki nasycenia dróg wydalania o ograniczonej wydajności lub też wzrost recyrkulacji wątrobowo-dwunastniczej. Ponieważ dla wszystkich grup dawkowania wyliczono wskaźnik akumulacji o wartości mniejszej niż 1, zakładamy, że EGCG nie ulega akumulacji. Porównanie parametrów kinetycznych mierzonych w dniu 1 oraz w dniu 10 wykazało, że średnie wartości biodostępności oraz maksymalnego stężenia w osoczu wolnych cząstek EGCG w przypadku wielokrotnego podawania leku ulegały zmniejszeniu przy dawce 200 mg/dzień (C_{max} (ng/ml): 327,4 (dzień 1); 259,5 (dzień 10)), a wzrastało przy dawkach 400 mg/dzień (C_{max} (ng/ml): 504,0 (dzień 1); 704,5 (dzień 10) oraz 800 mg/dzień (C_{max} (ng/ml): 2268,8 (dzień 1); 2800,2 (dzień 10)). Autorzy wskazali, że osoby biorące udział w teście dobrze zniosły terapię, że niewielkie zmiany różnych parametrów fizjologicznych nie zostały uznane za istotne z klinicznego punktu widzenia i że tylko u jednej osoby w grupie przyjmującej najwyższą dawkę stwierdzono niewielki, odwracalny wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej (Ullmann i in., 2004).

Wskazane wyżej wyniki pokazują, że podawanie ekstraktów z zielonej herbaty o wysokim stężeniu na czczo oraz w formie dawki bolusowej powoduje znaczny wzrost stężenia EGCG w osoczu oraz biodostępności tej substancji w porównaniu do sytuacji, w których ekstrakty te podawane są odpowiednio razem z posiłkami bądź też w mniejszych dawkach. Grupa Robocza poczyniła spostrzeżenie, że kształt przeprowadzonych badań (np. niewielka liczebność poszczególnych grup, krótki okres narażenia) nie pozwalały na wykrycie jakichkolwiek niekorzystnych skutków działania poza skutkami występującymi bardzo powszechnie. Grupa Robocza zauważa także, że mimo iż w ramach prowadzonych badań klinicznych obejmujących dawki o wysokości do 800 – 1600 mg EGCG dziennie nie wykazano występowania poważnych działań niepożądanych, analizy te nie zostały zaprojektowane z myślą o badaniu poziomu bezpieczeństwa EGCG.

Raporty z obserwacji klinicznej

Omawiając zagadnienie będące przedmiotem rozważań zawartych w niniejszym punkcie należy odnieść się do analizy przeprowadzonej przez Komisję Ekspertką ds. Informacji o Suplementach Diety (DSI EC), która przeprowadziła krytyczną analizę raportów dotyczących zdarzeń niepożądanych w postaci uszkodzenia wątroby z zastosowaniem służącego do badania więzi przyczynowej algorytmu Naranjo w celu dokonania oceny prawdopodobieństwa wywoływania skutków hepatotoksycznych przez produkty na bazie zielonej herbaty (Naranjo i in., 1981, Sarma i in., 2008). Skala Naranjo analizuje raporty dotyczące zdarzeń niepożądanych w oparciu o szereg kryteriów: poprzednie doświadczenia pacjenta z daną substancją, etiologie alternatywne, korelacja czasowa, korelacja ze spożyciem substancji oraz informacje dot. odstawienia/ponownego zastosowania leku. Prawdopodobieństwo wystąpienia więzi przyczynowo-skutkowej oceniane jest za pomocą skali od 0 (wątpliwe bądź nieprawdopodobne) do 1-4 (możliwe), 5-8 (prawdopodobne) oraz 9-13 (pewne lub niewątpliwe).

W kwietniu 2003 roku władze hiszpańskie i francuskie zawiesiły zezwolenie na obrót lekiem fitoterapeutycznym podejrzanym o wywołanie zaburzeń czynności wątroby u 13 pacjentów (9 przypadków zgłoszonych we Francji i 4 w Hiszpanii). Jedna kapsułka omawianego leku fitoterapeutycznego zawierała 375 mg opatentowanego ekstraktu wodno-alkoholowego z zielonej herbaty pozyskiwanego poprzez zastosowanie 80-procentowego etanolu w charakterze ekstrahenta i charakteryzującego się ustandaryzowaną zawartością 25% EGCG. Dodatkowo, ekstrakt ten zawierał 5-10% kofeiny. W zalecanej dawce wynoszącej dwie kapsułki dziennie (dawka dzienna odpowiadająca 375 mg EGCG), omawiany lek miał ułatwiać zmniejszenie wagi ciała w ramach diety opartej na kontrolowaniu ilości kalorii w spożywanych posiłkach. Szacowana częstotliwość występowania skutków hepatotoksycznych wynosiła jeden przypadek na 100 000 opakowań leku sprzedawanych w latach 1999 – 2003. Toksyczność dla wątroby występowała średnio po 50 dniach stosowania leku. Czas, od którego lek zaczynał powodować uszkodzenia wątroby wahał się od 9 dni do 5 miesięcy przy zażywaniu od 2 do 5 kapsułek leku dziennie (187,5 – 468,75 mg EGCG dziennie); zazwyczaj były to 4 kapsułki dziennie (375 mg EGCG dziennie). W 12 z 13 przypadków uszkodzenia wątroby, z których 4 okazały się przypadkami ciężkimi, odstawienie leku fitoterapeutycznego prowadziło do pomyślnego wyleczenia. Jednak w przypadku jednego pacjenta (u którego stwierdzono także stosowanie innych leków oraz regularne spożywanie alkoholu) zaburzenia czynności wątroby postępowały, prowadząc do jej niewydolności (AFSSAPS, 2003; Sarma i in., 2008; Gloro i in., 2005; Seddik i in., 2001; Vial i in., 2003; Pedros i in., 2003). Większość przypadków, w których stosowany lek miał działanie hepatotoksyczne, dotyczyło niejednorodnych przypadków zapalenia wątroby, cytolitycznych i cholestazy schorzeń wątroby oraz żółtaczki (Molinari i in., 2006; Sarma i in., 2008). W czterech z analizowanych przypadków lek fitoterapeutyczny był jedynym stosowanym lekiem. Pacjenci w sześciu przypadkach poddani zostali hospitalizacji. Po zastosowaniu skali Naranjo do wskazanych wyżej 13 przypadków dotyczących leku, w dwóch sprawach stwierdzono „prawdopodobne” istnienie więzi przyczynowej, ponieważ nie wykazano obecności innych przyczyn. Jednak informacje w dotyczących tych pacjentów sprawozdaniach były niepełne, ponieważ nie udało się uzyskać ich historii choroby. W pozostałych 11 przypadkach przyjęto, że istnienie więzi przyczynowej było „możliwe” (Sarma i in., 2008). Wśród nich znalazły się jedyne dwa przypadki w których najniższe udokumentowane dawki dzienne wynoszące 2 kapsułki leku (187,5 mg EGCG dziennie, co odpowiadało 3,13 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie dla osoby o wadze 60 kg) zażywane przez ponad miesiąc spowodowały zaburzenia wątroby (odpowiednio zapalenie wątroby oraz zaburzenia czynności wątroby o charakterze cytolitycznym i cholestazy) (Sarma i in., 2008).

Obok 13 wskazanych wyżej przypadków, które doprowadziły do wycofania omawianego leku z rynku, udokumentowano jeszcze 2 przypadki zapalenia wątroby oraz 2 przypadki wzrostu poziomu transaminaz, dotyczące produktu zawierającego wodny ekstrakt z zielonej herbaty, białej herbaty oraz herbaty rooibos z zawartością katechin wynoszącą 40-50% (Kantelip i in., 2003). W jednym przypadku miało miejsce pozytywne ponowne zastosowanie leku („prawdopodobne” istnienie więzi przyczynowej w skali Naranjo); w pozostałych 3 przypadkach pacjenci stosowali kilka różnych leków („możliwe” istnienie więzi przyczynowej) (Sarma i in., 2008).

Oprócz tego miał miejsce jeszcze jeden przypadek cytolitycznego zapalenia wątroby, po którym nastąpiło pozytywne ponowne zastosowanie leku (dotyczył on najbardziej popularnego proszku z liści zielonej herbaty). W omawianym przypadku 19-letnia kobieta miała, według dostępnych danych, spożywać 1800 mg produktu dziennie przez okres 1 miesiąca, doprowadzając do cytolitycznego zapalenia wątroby. Brak jest jakichkolwiek innych informacji na temat łącznego stosowania innych leków czy też historii medycznej pacjenta (wynik w skali Naranjo – 6, „prawdopodobne” istnienie więzi przyczynowej) (Sarma i in., 2008).

AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), prowadząc działania monitorujące, w ostatnim czasie zwróciła uwagę AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) na nowe przypadki uszkodzenia wątroby u osób stosujących suplementy diety oparte na wodnym ekstrakcie z zielonej herbaty pojawiające się od 2006 roku, przy czym w jednym z nich prawdopodobieństwo wystąpienia więzi przyczynowej było wysokie (AFSSA, 2009).

Jeśli idzie o sprawozdania US FDA MedWatch dotyczące uszkodzeń wątroby związanych ze stosowaniem produktów na bazie zielonej herbaty w okresie od stycznia 2001 roku do lipca 2006 roku, udokumentowano 5 takich przypadków; wszystkie wiążą się ze spożyciem preparatów wieloziołowych, wg. skali Naranjo istnienie więzi przyczynowej w tych przypadkach jest „możliwe” (Sarma i in., 2008).

Omawiane w treści Raportu Australijskiego Urzędu ds. Produktów Terapeutycznych 3 dotyczące zielonej herbaty przypadki niewłaściwego funkcjonowania wątroby związane były z produktami wieloziołowymi, przez co wg skali Naranjo wystąpienie więzi przyczynowej było w nich „możliwe” (Sarma i in., 2008).

W sprawozdaniach Kanadyjskiego Programu Monitorowania Niepożądanych Reakcji Polekowych opisano tylko jeden przypadek uszkodzenia wątroby związany z produktem zawierającym ekstrakt wodny (tj. powstały z użyciem wody gorącej) z zielonej herbaty (100 mg katechin zielonej herbaty na kapsułkę, 65 mg EGCG); dotyczył on 42-letniej kobiety skarżącej się na dolegliwości żołądkowe. Pacjentka według raportu zażywała kapsułki (w zalecanej dawce, tj. 6 kapsułek dziennie) przez okres 6 miesięcy w celach odchudzających przed przyjęciem jej do szpitala. U pacjentki stwierdzono podwyższony poziom enzymów wątrobowych oraz stężenie amoniaku we krwi, a badania serologiczne nie wykazały u niej wirusowego zapalenia wątroby typu B ani C (bilirubina związana – 234 $\mu\text{mol/l}$, bilirubina całkowita – 423 $\mu\text{mol/l}$, aminotransferaza alaninowa (ALT) – 432 IU, aminotransferaza asparaginianowa (AST) – 217 IU). Według dokumentacji, pacjentka zażywała równocześnie inne leki (medroksyprogesteron w zastrzykach, 150 mg raz na 3 miesiące) przez okres kilku poprzednich lat. Jednym ze znanych, poważnych działań niepożądanych medroksyprogesteronu podawanego drogą pozajelitową jest nieprawidłowe działanie wątroby. Według dokumentacji pacjentce ostatecznie przeszczepiono wątrobę i jej leczenie zakończyło się pomyślnie. Po zestawieniu dostępnych danych ze skalą Naranjo stwierdzono, że istnienie związku przyczynowego w omawianym przypadku było "możliwe" (Sarma i in., 2008, Newsletter Kanadyjskiego Programu Monitorowania Niepożądanych Reakcji Polekowych, 2007).

Poniżej zawarto krótkie streszczenie zawartych w literaturze przedmiotu relacji dotyczących przypadków występowania zjawiska hepatotoksyczności w związku ze stosowaniem produktów bazujących na zielonej herbacie, opublikowanych po 2005 roku. W większości przypadków brak jest szczegółowych informacji na temat zastosowanego ekstrahenta czy też składu preparatu. Nie da się też wykluczyć, że niektóre raporty sporządzane w ramach różnych programów monitorowania leków mogą w istocie dotyczyć tych samych przypadków.

Ostre działanie hepatotoksyczne stwierdzone zostało u dwóch mężczyzn zażywających roślinne odchudzające suplementy diety przez okres pięciu dni lub pięciu tygodni; specyfik zawierał, oprócz zielonej herbaty, także inne składniki, ale brak jest bardziej konkretnych informacji na temat zastosowanych dawek (Stevens i in., 2005).

Bonkovsky i in. (2006) opisali także przykład wystąpienia hepatotoksyczności u kobiety zażywającej przez okres 4 miesięcy suplement diety o właściwościach odchudzających. Oprócz innych składników zawierał on także ekstrakt z zielonej herbaty. Symptomy zanikły po odstawieniu preparatu, ale po jego ponownym zastosowaniu pojawiły się znowu. Odnosząc się do innych opublikowanych opisów przypadków uszkodzenia wątroby związanych z zażywaniem zielonej herbaty, autorzy doszli do wniosku, że spożywanie preparatów na bazie zielonej herbaty w dużych ilościach bądź w postaci silnych koncentratów może być niebezpieczne i należy go unikać.

Molinari i in. (2006) opisują przypadek ostrej niewydolności wątroby wywołany przez zażywanie suplementu diety zawierającego 720 mg ekstraktu z zielonej herbaty (na którego temat brak jest dalszych informacji) przez okres sześciu miesięcy w celu redukcji masy ciała (bilirubina związana: 224 $\mu\text{mol/l}$, bilirubina całkowita: 275 $\mu\text{mol/l}$, aminotransferaza alaninowa (ALT) – 3583 jednostek na litr, aminotransferaza asparaginianowa (AST) – 2393 jednostek na litr, transferaza gamma-glutamylowa (γ -GT) – 112 jednostek na litr). Autorzy zalecili, aby podczas ewaluacji stanu pacjenta cierpiącego na

ostre zapalenie wątroby lub niewydolność wątroby dokonywać starannej analizy danych dotyczących zażywania przez pacjenta produktów ziołowych.

Rosnące obawy ekspertów (np. Lambert i in., 2007) dotyczące regularnego zażywania preparatów na bazie zielonej herbaty podawanych w dużych dawkach odzwierciedlają także dwa listy skierowane do wydawcy czasopisma *Journal of Hepatology* (*Dziennik Hepatologii*) (Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006). Javaid i Bonkovsky (2006) opisują przypadek, w którym w efekcie zażywania przez okres siedmiu miesięcy ekstraktu z chińskiej zielonej herbaty (brak bardziej szczegółowych danych na temat tego preparatu) u pacjenta doszło do uszkodzenia komórek wątrobowych (aminotransferaza alaninowa (ALT): 1100 – 3962 jednostek na litr, bilirubina całkowita: 91-505 $\mu\text{mol/l}$). Autorzy ostrzegli przed zażywaniem ekstraktów z zielonej herbaty podawanych w dużych dawkach twierdząc, że są one przyczyną rzadko występujących, lecz ostrych przypadków polekowego uszkodzenia wątroby (DILI).

Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez (2006) opisali przypadek 45-letniego mężczyzny, który zapadł na ostre zapalenie wątroby (ALT: 1613 jednostek na litr, AST: 1033 jednostek na litr, γ -GT: 394 jednostek na litr, bilirubina związana: 102 $\mu\text{g/dl}$, bilirubina całkowita: 119 $\mu\text{g/dl}$) po 4 miesiącach codziennego zażywania 6 filiżanek nieznanego, dostępnego na rynku naparu z zielonej herbaty (brak dalszych informacji dot. składników bądź procesu produkcji). Po odstawieniu preparatu, poziom wskazanych wyżej substancji w surowicy krwi powrócił do normalnego stanu po upływie dwóch miesięcy. Kiedy pacjent po 6 tygodniach wznowił zażywanie preparatu stwierdzono u niego po raz kolejny występowanie podwyższonego stężenia ALT, AST, γ -GT oraz bilirubiny całkowitej w surowicy krwi po upływie jednego miesiąca.

Istnieje także raport dotyczący 26-letniej kobiety, która zapadła na ostre mięaszowe zapalenie wątroby, któremu towarzyszyła astenia oraz żółtaczka (ALT: 3314 jednostek na litr, AST: 1813 jednostek na litr, bilirubina związana: 6.5 mg/dl) na skutek zażywania przez okres czterech miesięcy napoju odchudzającego na bazie zielonej herbaty o nazwie „Hacendado” (75% liści zielonej herbaty, 25% liści mięty w materiale wyjściowym). Faktyczne dawkowanie wynosiło 2 filiżanki dziennie. Po odstawieniu napoju objawy zanikły, ale na skutek ponownej narażenia pojawiły się ponownie. Autorzy wskazują, że zawarty w liściach mięty pulegon także ma działanie hepatotoksyczne, ale mimo to przypisują uszkodzenia wątroby w opisanym przypadku działaniu zawartej w materiale wyjściowym do sporządzania napoju zielonej herbaty (Martinez-Sierra i in., 2006).

Wskazuje się także na niepożądane działanie zaobserwowane w odniesieniu do medycznego stosowania (+)-katechin jako substancji chroniących wątrobę poprzez doustne podawanie dawek o wartości 3g dziennie przez okres 6 miesięcy (drgawki gorączkowe, anemia hemolityczna, immunoalergiczne uszkodzenie wątroby) (Arznei-telegramm, 1992; Bar-Meir i in., 1985).

Zestawienia korzyści i czynników ryzyka w literaturze medycznej

Bazując na wiedzy o fakcie, że katechiny zawarte w zielonej herbaty oraz ich pochodne odznaczają się różnymi formami aktywności biologicznej, co oznacza na przykład, że wchodzi one w interakcje z różnymi enzymami endogennymi oraz innymi strukturami oraz że udowodniona została ich skuteczność jako antyoksydantów zarówno w badaniach *in vitro* jak i w badaniach na modelach zwierzęcych, przeprowadzono szereg badań epidemiologicznych mających na celu przeanalizowanie korzyści, jakie przynoszą te substancje w zakresie ochrony przed chorobami przewlekłymi (kwestię tą omawiają np. Higdon i Frei, 2003, Moyers i Kumar, 2004). Do dziś nie udało się udowodnić, że długofalowe zażywanie tego rodzaju produktów w wysokich dawkach jest w stanie zapobiegać karcynogenezie u ludzi. Ogólnie rzecz ujmując, rezultaty badań epidemiologicznych dotyczących związków pomiędzy powstawaniem nowotworów a ekspozycją na produkty na bazie zielonej bądź czarnej herbaty okazały się być ze sobą sprzeczne (w większości badań jednak nie udało się stwierdzić występowania związku pomiędzy zażywaniem herbaty a zapadalnością na nowotwory). Dla tych samych lokalizacji organów (np. żołądka, trzustki bądź odbytu) w niektórych badaniach stwierdzono, że narażenie na zieloną herbatę skutkuje mniejszą zapadalnością na nowotwory, podczas gdy w innych wykazano, że powoduje ona zwiększoną zapadalność na choroby tego rodzaju (Higdon i Frei, 2003; IARC, 1991). Z uwagi na niejasne rezultaty wskazanych wyżej badań oraz brak badań eksperymentalnych obejmujących cały ~~okres życia badanych zwierząt, zażywanie preparatów na bazie zielonej herbaty w dużych dawkach~~ *Dziennik EFSA 2009;*

przez długi okres czasu na potrzeby zapobiegania występowaniu chorób przy obecnym stanie wiedzy budzi pewne zastrzeżenia (Verschoyle i in., 2007).

Szczegółowe omówienie możliwych interakcji pomiędzy zawartymi w zielonej herbacie katechinami (w szczególności zaś EGCG) a substancjami endogennymi, które mogą być odpowiedzialne za występowanie skutków toksykologicznych nie jest możliwe w ramach niniejszego dokumentu; zawarto w nim zatem odniesienia do dostępnych opracowań dotyczących tego zagadnienia (np. Higdon i Frei, 2003, Moyers i Kumar, 2004).

Istnieją jednak sugestie, że omawiane produkty mogą mieć nie tylko zastosowania zapobiegawcze (np. hamowanie procesu oksydacyjnego uszkodzania DNA, peroksydacji lipidów czy uwalniania wolnych rodników) czy terapeutyczne (np. inhibicja wzrostu oraz indukcja apoptozy w przypadku linii komórek nowotworowych) (np. Higdon i Frei, 2003; Verschoyle i in., 2007; Lee i in., 2005; Muto i in., 2001, Paschka i in., 1998; Chung i in., 1999; Aktas i in., 2004), ale także działania niepożądane takie jak te, które opisane zostały poniżej (Lambert i in., 2007).

Przykładowo, EGCG i ECG wiążą się z receptorami estrogenowymi α i β oraz podnoszą poziom reakcji zapośredniczonych przez 17β -estradiol u myszy (Goodin i in., 2002). Co więcej, EGCG wykazuje szczególną zdolność blokowania katecholo-O-metylotransferazy (COMT) będącej katalizatorem metabolizmu związków zarówno endogennych (np. estrogenów, katecholamin) jak i egzogennych (Lu i in., 2003). Podczas przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że ma miejsce zjawisko silnej inhibicji procesu O-metylowania 2- i 4- hydroksyestradiolu; uznaje się, że reakcja ta ma charakter odtruwający (Nagai i in., 2004; Lakhani i in., 2003). Ponadto możliwe byłoby wykazanie, że zastosowanie inhibitorów COMT zwiększa intensywność procesu obumierania komórek zapośredniczonego przez EGCG. W tym kontekście zakłada się, że metabolizowanie przez COMT stanowi jedną z głównych biotransformacji katechin zielonej herbaty i że COMT może odegrać kluczową rolę w zapobieganiu zjawisku hepatotoksyczności wywoływanej przez EGCG. Dlatego też istnieje hipoteza, że podwyższony poziom wrażliwości niektórych osób na katechiny zawarte w zielonej herbacie może łączyć się z niską aktywnością COMT będącą konsekwencją występowania polimorfizmu (Lambert i in., 2007).

Dane dot. badań na zwierzętach oraz badań *in vitro*

Toksykokinetyka i toksyczność subchroniczna

Istnieją dwie wyodrębnione ścieżki przemian metabolicznych EGCG następujących po jego przyjęciu drogą doustną. I tak, EGCG rozkładane jest w jelitach na skutek działania mikroorganizmów oraz ulega koniugacji do postaci glukuronidów, siarczanów oraz O-metylowanych substancji pochodnych. Istnieją mocne dowody na to, że EGCG może brać udział w procesie krążenia wątrobowo-jelitowego. W następstwie doustnego podania EGCG znakowanego za pomocą węgla ^{14}C szczurom w dawkach 50 mg na kilogram masy ciała, 11,9% całkowitej radioaktywności odzyskano z moczu, a 78,3% z kału w przeciągu 96 godzin (np. Ullmann i in., 2003; Higdon i Frei, 2003).

Toksykokinetykę znakowanego izotopowo EGCG (podawanie dożylne w pojedynczej dawce wynoszącej 25 mg na kilogram masy ciała oraz doustne w pojedynczej dawce wynoszącej 250 mg na kilogram masy ciała) analizowano w drodze badań na psach rasy beagle (Swezey i in., 2003). Badanie to wykazało, że u psów rasy beagle około 20% EGCG podawanego doustnie ulega wchłonięciu ogólnoustrojowemu, w porównaniu z wartościami oscylującymi w granicach od 1,6% (Chen i in., 1997) do 14% (Zhu i in., 2000; Zhu i in., 2001) w przypadku szczurów.

Suganuma i in. (1998) przedstawili dane dotyczące biodystrybucji uzyskane w następstwie podania (^3H)EGCG myszom poprzez zgłębnikowanie żołądka. Autorzy stwierdzają, że EGCG rozprowadzane jest po całym organizmie, trafiając do różnych organów; jednym z docelowych organów dla EGCG jest wątroba. Powtórne podanie omawianej substancji po sześciogodzinnej przerwie doprowadziło do podniesienia poziomu radioaktywności tkanek mózgu, wątroby, trzustki, pęcherza, układu kostnego oraz krwi 4 do 6 razy ponad wartości obserwowane w przypadku pojedynczej dawki.

Wpływ zażywania pokarmu na biodostępność zielonej herbaty oraz związane z tym parametry bezpieczeństwa były przedmiotem badań, jakie przeprowadził Isbrucker i in. (2006a). Nie zauważono żadnych działań niepożądanych w następstwie podawania 500 mg preparatu na bazie zielonej herbaty (91,8% EGCG) na kilogram masy ciała przez okres 13 tygodni karmionym uprzednio psom w podzielonych dawkach. Natomiast podawanie 500 mg preparatu na bazie zielonej herbaty (80% EGCG) na kilogram masy ciała dziennie skutkowało występowaniem chorób powiązanych z ciężkimi uszkodzeniami wątroby oraz doprowadziło do zgonów wśród będących przedmiotem badania psów w przypadku podawania preparatu na czczo w formie pojedynczej dawki bolusowej przez okres 13 tygodni. W efekcie za poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL) uznano 500 mg preparatu na bazie zielonej herbaty na kilogram masy ciała dziennie dla psów uprzednio karmionych oraz 50 mg preparatu na bazie zielonej herbaty na kilogram masy ciała dziennie dla psów, którym preparat ten podawany był na czczo. Dodatkowo, maksymalne poziomy wolnego EGCG w osoczu były około dziesięciokrotnie wyższe w przypadku psów zażywających preparat na pusty żołądek niż u psów wcześniej nakarmionych w przypadku dawki w wysokości 500 mg na kilogram masy ciała dziennie ($C_{max} = 55.6 \mu\text{g/ml}$ u psów (samców) po 81 dniach podawania preparatu na pusty żołądek; w przypadku psów uprzednio nakarmionych poziom C_{max} wynosił $5.75 \mu\text{g/ml}$ po 78 dniach podawania preparatu). Poniżej zawarto szczegółowe informacje na temat badań, jakie przeprowadzili Isbrucker i in. (2006a), w tym badania przeprowadzonego na szczurach.

Podczas 13-tygodniowego badania, szczury odmiany Sprague-Dawley (po 10 zwierząt każdej płci i po 10 zwierząt na każdy wariant dawkowania) otrzymywały 0, 50, 150 lub 500 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie. EGCG podawano w postaci preparatu z zielonej herbaty zawierającego 77% EGCG. Zmian w zakresie ilości spożywanego pokarmu, masy ciała oraz danych klinicznych i hematologicznych u poddawanych terapii szczurów nie uznano za mające związek z zastosowaną terapią. Jedynym istotnym statystycznie skutkiem hematologicznym w przypadku samic należących do grupy szczurów, którym podawano najwyższą dawkę pod koniec terapii był wzrost poziomu bilirubiny całkowitej. W osoczu krwi zwierząt należących do grup przyjmujących dawki niskie oraz średnie (za wyjątkiem dwóch samców) nie wykryto niezwiązanego EGCG. W grupie przyjmującej najwyższą dawkę średnie wartości EGCG w osoczu wahały się pomiędzy 3,8 a 11,5 ng niezwiązanego EGCG na mililitr. Autorzy odnoszą się do wyników badań prowadzonych przez innych badaczy, zgodnie z którymi biodostępność po podaniu doustnym EGCG u szczurów wynosi zaledwie 0,003 – 0,45% zażywanej dawki. Dlatego też obniżony poziom toksyczności po podaniu doustnym należy analizować w powiązaniu z niskim poziomem biodostępności. Autorzy stwierdzili, że poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL) dla EGCG u szczurów wynosił 500 mg EGCG/kg masy ciała dziennie (Isbrucker i in., 2006a).

W ramach trwającego 13 tygodni badania, nakarmionym uprzednio psom rasy beagle (po sześć psów każdej płci i po sześć psów dla każdej grupy dawkowania) podawano doustnie kapsułki zawierające preparat z EGCG (91,8% czystego EGCG) w dawkach wynoszących 0, 50, 300 lub 500 mg na kilogram masy ciała dziennie (mimo iż badacze nie oświadczyli tego *expressis verbis*, zakłada się, że dawki te dostarczały w efekcie odpowiednio 0, 46, 275 i 460 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie). Dawki te podawano psom codziennie w dwóch porcjach. Najłatwiejszym do zaobserwowania skutkiem zależnym od wysokości podawanej dawki były wymioty; częstość ich występowania malała w miarę postępów w badaniach. Parametry kliniczne i hematologiczne pozostawały w normie. Nie występowały żadne skutki patologiczne z klinicznego punktu widzenia, nie zaobserwowano także wpływu na spożycie paszy bądź wagę ciała psów. Jedynym skutkiem histopatologicznym związanym ze spożywaniem preparatu opisywanym przez autorów było występowanie pigmentacji na końcówkach kosmków dwunastnicy uczestniczących w badaniu psów. Taki sam brązowy pigment pojawił się w komórkach Kupffera w wątrobie jednej z suk w grupie przyjmującej najwyższą dawkę; uznano, że wiązało się to z procesem fagocytozy EGCG. Jako że w analizowanych tkankach nie wystąpiły żadne zmiany histopatologiczne, zjawiska tego nie uznano za relewantne z toksykologicznego punktu widzenia, wskutek czego uznano, że NOAEL wynosi 500 mg na kilogram masy ciała dla omawianego preparatu zawierającego EGCG, co odpowiada dawce 460 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie. Poziom wolnego EGCG w osoczu krwi wykazywał znaczne wahania, przy czym w niektórych przypadkach pod koniec badania uzyskiwane wartości były wyższe (np. średnie wartości dla samic w

grupie przyjmującej najwyższą dawkę: C_{max} w pierwszym dniu badania: 4972 ng/ml, C_{max} w 78 dniu kuracji: 5752 ng/ml) (Isbrucker i in., 2006a).

W grupach 4 samców i 4 samic rasy beagle, którym podawano preparat zawierający EGCG (80% czystego EGCG) na czczo (po co najmniej 15 godzinach bez jedzenia), dawki wynosiły 0, 50, 150 lub 500 mg na kilogram masy ciała dziennie (co daje odpowiednio 0, 40, 120 i 400 mg czystego EGCG na kilogram masy ciała dziennie); preparat podawano psom w kapsułkach przez okres 13 tygodni. Psy otrzymywały preparat na 3-4 godziny przed jedzeniem. W zależności od wysokości dawki pojawiały się wymioty i biegunka – zaobserwowano je w grupach przyjmujących dawkę średnią oraz dawkę najwyższą. Trzy psy (1 samiec i 2 samice) w grupie przyjmującej najwyższą dawkę oraz 2 suki w grupie przyjmującej dawkę średnią zdechły bądź też zostały uśpione z uwagi na bardzo źle rokujący stan zdrowia. U zwierząt tych stwierdzono znaczną utratę masy ciała; na trzy tygodnie przed śmiercią cierpiały one na anoreksję. W grupie przyjmującej najwyższą dawkę u martwego samca stwierdzono ostrą martwicę proksymalnych kanalików nerek, zaś u jednej z samic – anemię hemolityczną, martwicę wątroby, dość ostre nadżerki żołądka oraz zwyrodnienia bazofilne kanalików nerkowych. U jednej z samic w grupie przyjmującej średnią dawkę także stwierdzono martwicę wątroby, nadżerki żołądka oraz martwicę mięśnia sercowego. W grupach przyjmujących dwie najwyższe dawki, u wszystkich zwierząt stwierdzono podwyższony poziom bilirubiny całkowitej oraz mniej lub bardziej wyraźnie podwyższony poziom AST i ALT. U żadnego ze zwierząt, które przeżyły, nie stwierdzono martwicy wątroby, ale w grupie przyjmującej najwyższą dawkę u jednego z samców wykryto martwicę proksymalnych kanalików nerek, a u jednej z samic – zwyrodnienie kanalików nerkowych. Na podstawie przeprowadzonego badania autorzy ustalili NOEL na poziomie 40 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (Isbrucker i in., 2006a).

Odnośne badania toksykokinetyczne pokazują, że biodostępność (ustalana jako pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia leku we krwi od czasu – AUC) wzrastała w analogiczny sposób wraz ze zwiększaniem dawek, że zjawisko to pojawiało się w dwóch punktach czasowych podczas pomiarów (dzień 1 i dzień 81 badania) oraz że biodostępność – w szczególności w grupie, w której podawano dawkę najwyższą – była wyższa pod koniec badania niż na jego początku (np. średnie wartości dla samców w grupie z najniższą dawką: C_{max} w dniu 1: 1047 ng/ml, C_{max} w dniu 81: 3832 ng/ml; w grupie ze średnią dawką: C_{max} w dniu 1: 5781 ng/ml; C_{max} w dniu 81: 13,370 ng/ml; w grupie z najwyższą dawką: C_{max} w dniu 1: 25,350 ng/ml; C_{max} w dniu 81: 55,560 ng/ml) (Isbrucker i in., 2006a).

Przeprowadzono także jeszcze jedno badanie, obejmujące podawanie preparatu zawierającego EGCG (78% czystego EGCG) psom rasy beagle w dawkach 300 mg na kilogram masy ciała dziennie pod postacią kapsułek żelatynowych przez okres dwóch tygodni. Psy otrzymywały preparat na czczo – po całej nocy bez jedzenia, 4 godziny przed karmieniem) oraz po jedzeniu. W przypadku psów otrzymujących preparat na czczo stwierdzono 10 razy wyższe stężenie EGCG w osoczu krwi 14 dnia kuracji w porównaniu z psami otrzymującymi go po jedzeniu (Isbrucker i in., 2006a).

Powołując się na nieobecność jakichkolwiek skutków toksykologicznych bądź histopatologicznych związanych z kuracją, opierając się na wartości NOEL ustalonej na bazie 13-tygodniowych badań na szczurach (500 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie) (Isbrucker i in., 2006a) oraz na karmionych wcześniej psach (500 mg preparatu zawierającego EGCG (91,8% czystego EGCG) na kilogram masy ciała dziennie) (Isbrucker i in., 2006a) i przyjmując wskaźnik niepewności na poziomie 100, Isbrucker i in. (2006a) sugerują, że dopuszczalne dzienne spożycie (ADI) EGCG winno wynosić 5 mg EGCG (preparat) na kilogram masy ciała dziennie, co odpowiada 300 mg EGCG (preparat) dziennie dla osoby dorosłej o wadze 60 kg. W odniesieniu do badania przeprowadzonego na psach zażywających preparat po karmieniu, obliczenia te muszą brać pod uwagę fakt, że podawany preparat zawierał tylko 91,8% czystego EGCG. W efekcie wartość ADI wynosi 4,6 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie, co odpowiada 276 mg EGCG (preparat) dziennie dla osoby dorosłej o wadze 60 kg.

Według opublikowanego opisu badania, szczury laboratoryjne odmiany Sprague-Dawley (po 20 osobników każdej płci i na każdą badaną grupę) otrzymywały doustnie dawki wynoszące 0, 45, 150 lub 500 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (karmienie za pomocą sondy) przez 13 tygodni.

Wśród toksykologicznych punktów końcowych znalazły się przeżycie, masa ciała, spożycie pokarmu, oznaki kliniczne, patologia kliniczna, oftalmologia, waga organów, patologia w ujęciu makroskopowym oraz w ujęciu mikroskopowym. W grupie przyjmującej wysoką dawkę miały miejsce przedwczesne zgony badanych szczurów oraz zjawisko zahamowania przyboru masy ciała uzależnione od przyjmowanej dawki preparatu; zjawiska te występowały wśród szczurów obu płci. Obserwacje mikroskopowe sugerujące możliwe zmiany w zakresie funkcji układu pokarmowego obejmowały martwicę trzustki oraz zmiany zwyrodnieniowe i martwicę okołozrazikową wątroby. U samic w grupie otrzymującej wysoką dawkę preparatu wystąpiły niewielkie wzrosty poziomu fosfatazy alkalicznej (ALP), aminotransferazy asparaginianowej (AST) oraz aminotransferazy alaninowej (ALT). Ponadto u szczurów obu płci w grupie przyjmującej wysoką dawkę stwierdzono martwicę/atrofię grasicy. Według autorów badania, dane histopatologiczne sugerują, że NOAEL dla EGCG wynosić powinien 150 kg/mg masy ciała dziennie dla szczurów – zarówno samców, jak i samic. Jednakże waga ciała oraz poszczególnych organów wydaje się być bardziej czułym wskaźnikiem toksyczności EGCG w przypadku samców. Bazując na zmniejszonym przyborze masy ciała oraz zmniejszeniu bezwzględnej i względnej masy grasicy, badacze wskazują, że dla samców NOAEL dla EGCG wynosić powinien 45 mg na kilogram masy ciała dziennie (streszczenie, McCormick i in., 1999).

W ramach trwającego 13 tygodni badania przeprowadzonego przez tych samych autorów, w którym psy rasy beagle (4 sztuki każdej płci, 4 sztuki na każdą grupę) otrzymywały doustnie dawki wynoszące 0, 30, 100 lub 300 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie w postaci kapsułek ustalono, że poziom NOAEL wynosi ≥ 300 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (streszczenie, McCormick i in., 1999).

W ramach trwającego 13 tygodni badania przeprowadzonego na szczurach odmiany Sprague-Dawley karmionych za pomocą zgłębnika (20 zwierząt każdej płci oraz na każdą grupę) zwierzętom podawano frakcję polifenolową na bazie zielonej herbaty (53.4% EGCG, 11.4% EGC, 9.1 % EC, 5.1 % GCG i 4.9% ECG) w dawkach wynoszących 0, 48, 160, 534 EGCG na kilogram masy ciała dziennie; badanie przeprowadzili ci sami co poprzednio autorzy. W grupie przyjmującej najwyższą dawkę preparatu stwierdzono przedwczesne zgony wśród szczurów obu płci. Przybór masy ciała, spożycie pokarmów oraz względna i bezwzględna masa śledziony i grasicy ulegały obniżeniu w zależności od stosowanej dawki. Badania histopatologiczne wykazały martwicę trzustki, zwyrodnienia/martwicę wątroby oraz martwicę/atrofię grasicy. Autorzy ustalili wartość NOAEL na poziomie 48 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (streszczenie, Johnson i in., 1999).

W ramach trwającego 13 tygodni badania przeprowadzonego przez tych samych autorów, polegającego na doustnym podawaniu psom rasy beagle (po 4 sztuki każdej płci, 4 sztuki na każdą grupę) takiej samej frakcji polifenolowej pod postacią kapsułek w dawkach odpowiadających 0, 32, 107 i 320 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie ustalono wartość NOAEL na ≥ 320 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (Streszczenie, Johnson i in., 1999).

Bun i in. (2006) poddali analizie parametry serologiczne funkcji wątroby (m.in. poziom aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej, fosfatazy alkalinowej, transferazy γ -glutamylowej oraz bilirubiny całkowitej) w ramach 12-tygodniowego badania przeprowadzonego na szczurach odmiany Wistar (9 sztuk w każdej grupie). Ekstrakty z zielonej herbaty pozyskane z użyciem wody lub etanolu (80%) w charakterze rozczynnika podawano z użyciem sondy (zgłębnika) w dawkach wynoszących odpowiednio 1400 mg na kilogram masy ciała dziennie lub 2000 mg na kilogram masy ciała dziennie. Ekstrakt etanolowy był tym samym wyciągiem, który zastosowano w podawanym doustnie leku fitoterapeutycznym wskazanym w sekcji 7, gdzie faktycznie zastosowane dawki były 80 razy wyższe niż zalecane dzienne dawki terapeutyczne tego specyfiku. Autorzy nie zaobserwowali żadnych charakterystycznych oznak hepatotoksyczności. Jediną istotną zmianą u zwierząt zażywających ekstrakt etanolowy był wzrost całkowitych poziomów bilirubiny a także, w przypadku zwierząt otrzymujących ekstrakt wodny, zmniejszenie całkowitych poziomów bilirubiny.

W ramach trwającego 13 tygodni badania przeprowadzonego na szczurach odmiany F344/Du Cij (po 10 zwierząt każdej płci oraz na każdą grupę), zwierzęta otrzymywały frakcję polifenolową na bazie zielonej herbaty zawierającą 32,1% EGCG, 17,7 % EGC, 8,5 % EC, 3,3% GCG, 10,7% ECG i 1,4% CG (całkowita zawartość katechin – 66,2%) w ramach stosowanej diety w stężeniach wynoszących 0, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 % frakcji polifenolowej, co odpowiada dawkom EGCG w wysokości 0, 141, 283, 566 i 1132 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie. Średnia masa tarczycy u szczurów otrzymujących dietę zawierającą 5,0% frakcji polifenolowej (grupa 5,0%) uległa znacznemu zwiększeniu, osiągając 444% wartości kontrolnej w przypadku samców i 304% wartości kontrolnej w przypadku samic. Badania histologiczne tarczycy w grupie 5,0% wykazały wyraźną hipertrofię i/lub hiperplazję pęcherzyków tarczycy. Lekka hipertrofia komórek pęcherzyków pojawiała się także u samców w grupie 1,25% oraz samic w grupie 2,5%. Stopień i liczba lezji tarczycy były wyższe w przypadku samców niż w przypadku samic w grupach 1,25%, 2,5% oraz 5,0%. Fakt, że katechiny zawarte w ekstrakcie z zielonej herbaty podawane w dużych dawkach prowadziły do tego, że u szczurów tworzyły się wole, mógł być konsekwencją przeciwtarczycowego działania katechin. Opierając się na zmianach histologicznych w obrębie tarczycy, wskaźnik NOAEL dla podawanej frakcji polifenolowej ustalono na poziomie 0,625% dla samców i 1,25% dla samic w ramach podawanej diety, co odpowiada 141 i 283 mg EGCG na kilogram masy ciała (Sakamoto i in., 2001).

Toksyczność reprodukcyjna i rozwojowa

W ramach analizowania omawianego w niniejszej sekcji zagadnienia przeprowadzone zostało badanie rozwoju embrionalno- płodowego szczurów. Doustne podawanie preparatu na bazie zielonej herbaty (katechiny stanowiły od 85 do 95% (pod względem wagi) preparatu, zawierającego ponad 55% EGCG, inne pochodne katechin takie jak EC, EGC i ECG oraz dodatkowe, obecne w mniejszych ilościach pochodne katechin, tj. GCG, GC, CG i C) w okresie organogenezy (od 6 do 15 dnia ciąży) nie spowodowało wystąpienia jakichkolwiek skutków związanych z terapią w ramach rozwoju embrionalno- płodowego przy zastosowaniu dawek wynoszących do 1000 mg na kilogram masy ciała dziennie (FDA, 2006; Faqi i in., 2001).

Inne badania nad rozwojem płodu, bazujące na podawaniu podskórnym bądź dopochwowym preparatów z zielonej herbaty (FDA, 2006) nie zostały uznane przez Grupę Roboczą za istotne z punktu widzenia oceny ryzyka w odniesieniu do ekstraktów z zielonej herbaty podawanych drogą doustną.

Preparaty zawierające >91% czystego EGCG podawane były ciężarnym szczurom podczas organogenezy oraz rozwoju płodu. Podawanie ciężarnym szczurom diety zawierającej 1400, 4200 lub 14 000 ppm preparatu w okresie organogenezy nie miało działania toksycznego na ciężarne samice ani na płody. Obejmujące dwa pokolenia szczurów badanie polegające na karmieniu ich preparatem zawierającym EGCG (1200, 3600 oraz 12 000 ppm) nie wykazało negatywnego wpływu na proces reprodukcji ani na płodność zwierząt. Przy największej dawce zmniejszeniu ulegało tempo wzrostu młodych; niewielkiemu zwiększeniu ulegała też liczba poronień. Wpływ na wzrost młodych widoczny był także w przypadku preparatu o stężeniu EGCG wynoszącym 3600 ppm, aczkolwiek dotyczyło to wyłącznie drugiego pokolenia. Najniższa dawka uznana została za stanowiącą poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL). Autorzy wywnioskowali z tego, że odpowiadać temu będzie wartość 200 mg preparatu zawierającego EGCG na kilogram masy ciała dziennie. Ponieważ samice spożywały podwójną ilość paszy w kluczowym okresie laktacji i wtedy właśnie występowały wskazane wyżej skutki, wyliczono dwa razy mniejszą dawkę, która w normalnym przypadku wynosiłaby 100 mg na kilogram masy ciała dziennie (Isbrucker i in., 2006b).

Genotoksyczność i kancerogeneza

Test Ames, test mikrojąder u szczurów, test UDS oraz test mutacji myszy transgenicznych dały wynik negatywny dla preparatu na bazie zielonej herbaty (w którym katechiny stanowiły od 85 do 95% (wagowo), z czego 55% stanowił EGCG, resztę zaś – inne pochodne katechin, takie jak EC, EGC, ECG

oraz kilka dodatkowych, obecnych w mniejszych ilościach pochodnych katechin, tj. GCG, GC, CG i C; test przeprowadzony na komórkach chłoniaka myszy natomiast dla tego samego preparatu dał wynik pozytywny (FDA, 2006; Chang i in., 2003). W ramach badania karcynogenezy obejmującego doustne podawanie preparatu (karmienie poprzez zgłębnik żołądkowy), taki sam preparat podawano codziennie przez okres 26 tygodni myszom transgenicznym typu p53 w dawkach wynoszących do 500 mg na kilogram masy ciała dziennie. W wyniku kuracji nie wystąpiła zwiększona częstotliwość występowania zmian chorobowych neoplastycznych (nowotworowych) oraz pozanowotworowych w poddanych analizie organach oraz tkankach (FDA, 2006).

Skutki podawania zawartych w zielonej herbacie katechin (GTC) w ramach stosowanej diety zostały poddane analizie za pomocą wieloorganowego modelu badania karcynogenezy. W badaniu wzięły udział liczące po 15 osobników grupy szczurów F334 (samce), którym początkowo podano metodą dootrzewnową pojedynczą dawkę 100 mg N-dietylonitrozoaminy na kilogram masy ciała, 4 dawki 20 mg N-metylonitrozomocznika na kilogram masy ciała (podawane metodą dootrzewnową), 4 dawki 40 mg 1,2-dimetylohydrazyny na kilogram masy ciała (podawane w iniekcji podskórnej), wraz z roztworem 0,05% N-butylo-N-(4-hydroksobutylo)nitrozoaminy przez okres 2 tygodni, następnie zaś 0,1% 2,2'-dihydrokso-di-n-propylo-nitrozoaminy przez okres 2 tygodni (w obu przypadkach substancja podawana była z wodą pitną), przez całkowity okres inicjacji wynoszący 4 tygodnie. W diecie szczurów uwzględniono GTC, podawane w dawkach 1,0 bądź 0,1% od 1 dnia przed rozpoczęciem narażenia na substancję rakotwórczą oraz podczas narażenia na nią, po zakończeniu narażenia na substancję rakotwórczą lub też zarówno podczas trwania narażenia na substancję rakotwórczą, jak i po jej zakończeniu. Kolejne grupy zwierząt poddawano działaniu substancji rakotwórczej, 1% GTC bądź też samą dietę bazową + w celu uzyskania wartości kontrolnej. Wszystkie zwierzęta poddano eutanazji pod koniec 36 tygodnia badania, poddając następnie wszystkie ich główne narządy badaniu histopatologicznemu. Liczba niewielkich nowotworów jelitowych (raków i gruczolaków) przypadająca na każdego szczura ulegała znaczącemu zmniejszeniu w przypadku grup zażywających 1% GTC podczas ($0,13 \pm 0,35$) po narażenia na substancje rakotwórcze ($0,31 \pm 0,48$) oraz w przypadku grup utrzymujących 1% i 0,1% GTC zarówno podczas, jak i po zakończeniu narażenia na substancje rakotwórcze (odpowiednio $0,14 \pm 0,36$ i $0,46 \pm 0,97$) w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie substancje rakotwórcze ($1,07 \pm 1,21$). Z drugiej strony, liczba zmian ogniskowych komórek wątroby GST-P-pozytywnych (łożyskowa forma S-transferazy glutationowej) na centymetr kwadratowy była w stopniu niewielkim acz wyraźnym wyższa w grupach otrzymujących 1% i 0,1% GTC podczas trwania narażenia na czynnik rakotwórczy, 1% GTC po zakończeniu narażenia na czynnik rakotwórczy oraz 1% GTC zarówno podczas, jak i po zakończeniu narażenia na czynnik rakotwórczy. Zdaniem autorów, wyniki te sugerują, że mimo iż GTC działają jako inhibitor powstawania niewielkich zmian nowotworowych jelita, podnoszą one jednocześnie w niewielkim stopniu częstotliwość występowania zjawiska hepatokarcynogenezy w zależności od wielkości podawanej dawki w przypadku podawania ich zarówno podczas narażenia na substancje rakotwórcze, jak i po jej zakończeniu (Hirose i in., 1993).

Eksperymenty *in vitro* na hepatocytach

Poziom cytotoksyczności składników zielonej herbaty analizowano za pomocą badań na hepatocytach szczurów przeprowadzanych metodą *in vitro*; dla EGCG poziom cytotoksyczności okazał się być najwyższy, ulegając zmniejszeniu w kolejności następującej: EGCG > galusan propylu > ECG > kwasy żółciowe > EGC > EC (Galati i in., 2006).

Badania metodą *in vitro*, które przeprowadził Schmidt i in. (2005), wykazały, że stosunkowo wysokie stężenia ekstraktów z zielonej herbaty pozyskiwanych z użyciem 80-procentowego etanolu mogą doprowadzić do uszkodzenia hepatocytów u szczurów; ustalono, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa EGCG. Z drugiej jednak strony „typowe związki hepatotoksyczne” wykazywały poziom toksyczności wyższy o 1-2 rzędy wielkości. Suche ekstrakty z zielonej herbaty pozbawione frakcji lipofilowej wykazywały poziom cytotoksyczności podobny jak w przypadku suchych ekstraktów nieprzetworzonych. Wyniki te wydają się wskazywać, że EGCG, substancja o budowie polarnej, rozpuszczalna w wodzie oraz mieszkankach wody i etanolu, jest czynnikiem odpowiadającym za występowanie zjawiska cytotoksyczności

10. Ocena bezpieczeństwa na bazie posiadanej wiedzy (Poziom A)

Niniejszy dokument ma na celu ocenę „suchych ekstraktów z zielonej herbaty”, wliczając w to także preparaty bezkofeinowe. Podczas opracowywania niniejszego dokumentu wzięto pod uwagę fakt, że skład poszczególnych ekstraktów będzie różnił się w zależności od zastosowanej techniki ekstrakcji. W ramach ewaluacji analizie poddany został stopień ekwiwalencji jakościowej i ilościowej ekstraktów względem tradycyjnych naparów w zielonej herbaty. Dodatkowo, ocenie poddane zostało to, czy w warunkach zastosowania danego ekstraktu możliwe jest przyjęcie takiego samego poziomu i rodzaju narażenia jak w przypadku tradycyjnych naparów w zielonej herbaty. W przypadku napojów ekwiwalentnych ilościowo względem tradycyjnych naparów z zielonej herbaty możliwe jest odwołanie się do domniemania ich bezpieczeństwa w oparciu o wiedzę wywodzącą się z powszechnego zastosowania tych ostatnich w ramach stosowanej diety.

W ramach poniższej oceny na poziomie A, Grupa Robocza dokonała analizy czterech różnych typów preparatów i/lub zastosowań suchych ekstraktów z zielonej herbaty:

- 1) Suche ekstrakty wodne z zielonej herbaty wytwarzane poprzez zastosowanie tradycyjnego procesu infuzji na potrzeby produkcji napojów
- 2) ekstrakty wodne z zielonej herbaty wytwarzane poprzez zastosowanie tradycyjnego procesu infuzji na potrzeby produkcji suplementów diety
- 3) Inne „suche ekstrakty z zielonej herbaty” wytwarzane poprzez zastosowanie procedur odbiegających od warunków przygotowywania naparów z zielonej herbaty w tradycyjny sposób
- 4) Suche ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane w ramach produktów, których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała.

10.1. Ocena (poziom A) suchych ekstraktów wodnych z zielonej herbaty produkowanych z zastosowaniem tradycyjnej procedury infuzji na potrzeby wytwarzania napojów

Produkty zawierające zieloną herbatę reklamowane są jako przynoszące rozliczne korzyści dla zdrowia ludzkiego i coraz częściej zaczynają być stosowane w obszarach wykraczających poza tradycyjne stosowanie naparów z zielonej herbaty w charakterze napoju o działaniu pobudzającym. W odniesieniu do występujących u ludzi przypadków działania hepatotoksycznego rodzą się pytania odnośnie tego, dlaczego uszkodzenia wątroby występują w szczególności w następstwie stosowania produktów odchudzających zawierających ekstrakty z zielonej herbaty spożywane w dużych dziennych dawkach, które składniki ekstraktów z zielonej herbaty należy uznać za pozostające w związku przyczynowym ze zjawiskiem hepatotoksyczności oraz jakie oddziaływania należy uznać za spowodowane przez efekt matrycowy występujący z powodu działania składników ekstraktów zielonej herbaty, a jakie za będące skutkiem oddziaływania składników produktów żywnościowych jako takich.

Analiza dostępnych danych dotyczących ludzi pokazuje wyraźnie, że w ostatnich latach w ponad 30 przypadkach dostrzeżono związki pomiędzy spożywaniem znacznych ilości produktów powstałych na bazie zielonej herbaty a występowaniem uszkodzeń wątroby, które w niektórych przypadkach okazały się bardzo poważne. W wielu przypadkach, w których wystąpiły tego rodzaju schorzenia wątroby, ekstrakty z zielonej herbaty o znacznej zawartości EGCG zażywane były pod postacią kapsułek przez okres kilku miesięcy jako produkt medyczny bądź suplement diety mający wspomagać proces odchudzania. W przypadku, w którym szkodliwa okazała się kuracja za pomocą podawanego doustnie leku fitoterapeutycznego, uszkodzenia wątroby wystąpiły dla dziennej dawki wynoszącej od 2 do 5 kapsułek (187,5 – 468,75 mg EGCG dziennie); w większości sytuacji były to 4 kapsułki (375 mg EGCG dziennie) (Sarma i in., 2008). Istnienie związku przyczynowego należy uznać za prawdopodobne w 7 przypadkach, w 27 dalszych zaś uznać je należy za możliwe (Sarma i in., 2008). Biorąc pod uwagę dużą popularność odnośnych produktów na terenie całego świata, zjawisko hepatotoksyczności opisane w ramach omawianej analizy wydaje się być stosunkowo rzadko spotykanym działaniem niepożądanym (AFSSAPS, 2003; Molinari i in., 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006). Mimo to jednak w ramach oceny częstotliwości występowania opisanych przypadków należy wziąć pod uwagę ograniczenia, z jakimi mierzyć muszą się systemy raportowania niepożądanych skutków stosowania suplementów diety (Sarma i in., 2008). Eksperti w dziedzinie hepatologii zdecydowali się w ostatnim czasie wystosować pilne ostrzeżenie z uwagi na możliwość poważnego uszkodzenia wątroby na skutek stosowania ekstraktów z zielonej herbaty (Molinari i in., 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006; Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006).

Bazując na wskazanych studiach przypadku w ostatnim czasie zanegowano założenie, że ekstrakty z zielonej herbaty pozyskiwane z użyciem wody w charakterze ekstrahenta nie mają związku z występowaniem toksycznego oddziaływania na organizm, w tym na wątrobę; w istocie, w niektórych przypadkach schorzeń wątroby pacjenci zażywali produkty zawierające wodny ekstrakt z zielonej herbaty (Kantelip i in., 2003; Sarma i in., 2008). AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), prowadząc działania monitorujące, w ostatnim czasie zwróciła uwagę AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) na nowe przypadki uszkodzenia wątroby u osób stosujących suplementy diety oparte na wodnym ekstrakcie z zielonej herbaty pojawiające się od 2006 roku, przy czym w jednym z nich prawdopodobieństwo wystąpienia więzi przyczynowej było wysokie (AFSSA, 2009). Co więcej, Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez (2006) w swoim sprawozdaniu opisali przypadek ostrego zapalenia wątroby w następstwie zażywania 6 filiżanek nieznanego, dostępnego na rynku naparu z zielonej herbaty przez okres 4 miesięcy, przy czym poziom enzymów wątroby u pacjenta wzrósł ponownie po tym, jak kontynuował on spożywanie przedmiotowej substancji. Nie wiadomo, czy napój ten wytwarzany był jako napar przyrządzany w tradycyjny sposób czy też jako gotowy do spożycia napój na bazie ekstraktu. Biorąc pod uwagę wskazane wyżej fakty, Grupa Robocza doszła do wniosku, że nawet w przypadku spożywania preparatów na bazie wodnych ekstraktów z zielonej herbaty w postaci płynnej istnieje ryzyko wystąpienia bardzo poważnego uszkodzenia wątroby u osób mających określone predyspozycje. Ponieważ jak do tej pory nie opublikowano odnośnych wyników badań dotyczących spożycia tradycyjnie przygotowywanych naparów z zielonej herbaty (Jellin i in., 2007), ryzyko uszkodzenia wątroby na skutek spożywania naparów z zielonej herbaty przygotowywanych w sposób tradycyjny jest, zdaniem Grupy Roboczej, bardzo niskie, szczególnie zważywszy na dostępną wiedzę w tym zakresie, zgromadzoną w trwającym wiele setek lat okresie, kiedy to na całym świecie napary z zielonej herbaty były powszechnie spożywane.

Z przyczyn powyższych, opierając się na istniejącej wiedzy, uznaje się, że występujące od wielu lat światowe spożycie tradycyjnych naparów z zielonej herbaty prowadzące do zażywania katechin w ilościach wskazanych w tabeli 5 nie pociąga za sobą zagrożeń z punktu widzenia oceny na poziomie A (domniemanie bezpieczeństwa w oparciu o dostępną wiedzę wynikającą z długotrwałego zastosowania w produktach spożywczych). Grupa Robocza pragnie zauważyć, że prawidłowość ta ma zastosowanie pod warunkiem, że kobiety w ciąży oraz kobiety karmiące, a także dzieci i inne osoby wrażliwe na działanie kofeiny spożywać będą tego rodzaju napoje w ograniczonych ilościach bądź też w ogóle powstrzymają się od ich spożywania (uznać należy, że ogólne zalecenia dotyczące spożywania napojów zawierających kofeinę są powszechnie znane).

Suche ekstrakty wodne z zielonej herbaty wytwarzane w takich samych warunkach w zakresie procesu ekstrakcji jak te stosowane w przypadku tradycyjnych naparów z zielonej herbaty i stosowane na potrzeby produkcji napojów, mające zbliżony do tradycyjnych naparów skład i nie przekraczające zawartych w nich poziomów stężenia polifenoli także uznawane są za bezpieczne na poziomie A (domniemanie bezpieczeństwa w oparciu o dostępną wiedzę) zgodnie z kryteriami wskazanymi w treści Wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych¹⁹.

Tak jak w przypadku tradycyjnych naparów z zielonej herbaty, należy wskazać, że kobiety w ciąży oraz kobiety karmiące, a także dzieci i inne osoby wrażliwe na działanie kofeiny spożywać powinny tego rodzaju napoje w ograniczonych ilościach bądź też powinny w ogóle powstrzymać się od ich spożywania (uznać należy, że ogólne zalecenia dotyczące spożywania napojów zawierających kofeinę są powszechnie znane).

Wnioski:

Powstające w opisany sposób napoje (gotowe do spożycia bądź też powstające na bazie preparatów typu instant) stanowią w sferze zarówno ilościowej, jak i jakościowej, odpowiednik tradycyjnych naparów z zielonej herbaty, jako że charakteryzują się zbliżonym składem chemicznym, a stężenie zawartych w nich polifenoli nie przekracza wartości właściwych dla tradycyjnych naparów. Zakładając, że poziom spożycia tych napojów nie będzie przekraczać poziomu spożycia właściwego dla naparów tradycyjnych zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 5, uznawać je należy za tak samo bezpieczne jak i tego rodzaju napary, w przypadku których zastosować można domniemanie bezpieczeństwa w oparciu o dostępną wiedzę wynikającą z długotrwałego zastosowania w produktach spożywczych.

¹⁹ Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true

Grupa Robocza pragnie ponadto zaznaczyć, że stosowanie tego rodzaju ekstraktów z zielonej herbaty jako składników napojów odchudzających nie może być uznane za bezpieczne na poziomie A, jako że stosowanie ich w tym celu łączyć się może z sugestią zażywania ich na czczo bądź przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości spożywanego pokarmu, w tym zakresie zaś brak jest obecnie wystarczających danych dotyczących bezpieczeństwa. Dotyczy to także spożywania napojów w celach odchudzających w przypadku, gdy zawierają one ekstrakty z zielonej herbaty będące częścią mikstur ziołowych. Ogólnie rzecz ujmując, w odniesieniu do tego rodzaju produktów mogą wystąpić zastrzeżenia w zakresie bezpieczeństwa odnośnie możliwego efektu synergii pomiędzy katechinami zielonej herbaty a składnikami biologicznymi odmiennego pochodzenia mogącymi mieć działanie hepatotoksyczne (np. inne katechiny i taniny).

10.2. Ocena (poziom A):

Suche ekstrakty wodne z zielonej herbaty wytwarzane z użyciem tradycyjnej procedury infuzji na potrzeby wytwarzania suplementów diety

Inne „suche ekstrakty z zielonej herbaty” wytwarzane poprzez zastosowanie procedur odbiegających od warunków przygotowywania naparów z zielonej herbaty w tradycyjny sposób

Suche ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane w ramach produktów, których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała

W odniesieniu do zastosowania suchych ekstraktów z zielonej herbaty w ramach suplementów diety należy brać pod uwagę raporty mówiące o toksycznym oddziaływaniu na wątrobę związanym ze stosowaniem produktów tego rodzaju bądź też innych produktów z nimi związanych. Tego rodzaju doniesienia sprawiają, że bezpieczeństwo wykorzystywania tych ekstraktów – nawet w odniesieniu do wodnych ekstraktów z zielonej herbaty – staje pod znakiem zapytania.

Z tego powodu suche ekstrakty z zielonej herbaty przeznaczone do spożywania w charakterze suplementów diety oraz „inne suche ekstrakty z zielonej herbaty” nie mogą być uznane za bezpieczne w oparciu o istniejącą wiedzę wynikającą z długotrwałego zastosowania w produktach spożywczych; konieczne jest zatem dokonanie bardziej szczegółowej analizy na poziomie A w oparciu o dostępne aktualnie dane.

Ocena tego, czy suche ekstrakty z zielonej herbaty przeznaczone do spożywania w charakterze suplementów diety oraz „inne ekstrakty z zielonej herbaty” są bezpieczne, może być przeprowadzona poprzez skupienie się na zawartości EGCG w tych preparatach oraz na zakładanym hepatotoksycznym działaniu tej substancji, biorąc pod uwagę wszystkie wskazane wyżej czynniki niepewności (np. dodatkowe składniki aktywne, inne organy docelowe, efekty matrycowe) dzięki zastosowaniu metody MOS (margines bezpieczeństwa). Takie podejście do zagadnienia powinno zagwarantować, że MOS, określony jako stosunek wartości NOAEL do wartości dziennego spożycia EGCG, wynosić będzie przynajmniej 100, przy czym jest to także wartość wskaźnika niepewności rutynowo stosowana w odniesieniu do związków chemicznych nie mających działania genotoksycznego.

Uważa się, że patogenezę opisanych uszkodzeń wątroby pozostaje nieznana (Molinari i in., 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006; Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006). Istnieje wiele różnych założeń co do tego, które składniki preparatów na bazie zielonej herbaty mają działanie hepatotoksyczne. Fakt, że na początku wskazywano głównie na uszkodzenia wątroby na skutek zażycia podawanego doustnie leku fitoterapeutycznego wskazanego w treści sekcji 7 leży u podstaw hipotezy, jakoby potencjalnie hepatotoksyczne związki chemiczne zawarte były we frakcji lipofilowej ekstraktów z zielonej herbaty pozyskiwanych z użyciem mieszanek wodno-etanolowych (Schmidt i in., 2005). Hipoteza ta jednak została odrzucona na podstawie wniosków, jakie przedstawili Schmidt i in. (2005): ekstrakty z zielonej herbaty uzyskiwane z użyciem 80-procentowego etanolu wywoływały taki sam poziom hepatotoksyczności w kulturach hepatocytów u szczurów nawet po usunięciu frakcji lipofilowej. Jako najważniejszy składnik ekstraktu z zielonej herbaty co do którego prawdopodobne jest, że powoduje on występowanie zjawiska hepatotoksyczności, uznano EGCG. Jako substancja o budowie polarnej, EGCG rozpuszcza się zarówno w wodzie, jak i w mieszkankach wody i etanolu. Wbrew założeniu, że cytotoksyczność wywoływana przez EGCG była powodem zaobserwowanych uszkodzeń wątroby u ludzi, wskazuje się, że poziom cytotoksyczności EGCG w hepatocytach w ramach badania *in vitro* był stosunkowo niski oraz że EGCG prowadziło do występowania martwicy wątroby u zwierząt jedynie wówczas, kiedy podawane było w wysokich dawkach i że biodostępność EGCG u ludzi jest stosunkowo niska (Molinari i in., 2006; Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006; Schmidt i in., 2005). W tym kontekście pojawiają się także głosy, że możliwą przyczyną uszkodzeń wątroby mogą być inne mechanizmy takie jak reakcje alergiczne na składniki zawarte w zielonej herbacie czy idiosynkrazje metaboliczne ((Molinari i in., 2006; Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006; Schmidt i in., 2005). Jak do tej pory nie opublikowano żadnych raportów na temat reakcji alergicznych po doustnym zażyciu preparatów na bazie zielonej herbaty. Opisany został natomiast przypadek reakcji astmatycznej na pył z zielonej herbaty u pracowników zatrudnionych przy jej produkcji; jednym ze stwierdzonych czynników w tym przypadku była obecność EGCG (Shirai i in., 1994). Sporadyczne występowanie skutków hepatotoksycznych wskazuje na to, że u niektórych osób występuje podwyższona wrażliwość na omawiane substancje mająca podłoże genetyczne (Javaid i Bonkovsky, 2006). Na podobnej zasadzie, Lambert i in. (2007) podejrzewają, że u szczególnie wrażliwych jednostek występuje polimorfizm w zakresie decydującego szlaku biotransformacji polifenoli zawartych w zielonej herbacie, co może prowadzić do wzrostu stężenia w osoczu krwi istotnych z toksykologicznego punktu widzenia substancji macierzystych. Koncepcję zakładającą, że jedną z przyczyn może być utrata wagi ciała wywołana przez działanie ekstraktów z zielonej herbaty uznano za mało prawdopodobną (Molinari i in., 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006 i in., 2006).

Odnosząc się do badań, jakie Isbrucker i in. (2006a) przeprowadzili na psach rasy beagle, Grupa Robocza wyraża powątpiewanie, czy skutki zaobserwowane u szczurów oraz psów spożywających preparat po uprzednim nakarmieniu (samice szczurów: znaczny wzrost poziomu bilirubiny całkowitej pod koniec fazy leczenia; psy: występowanie wymiotów w zależności od zastosowanej dawki) które występowały przy podawaniu dawki 500 mg na kilogram masy ciała dziennie można w istocie uznać za niezwiązane z przeprowadzaną kuracją. Jest tak dlatego, że porównywalne skutki występowały zarówno u ludzi, jak i u zwierząt po zażyciu preparatów zawierających EGCG (Bun i in., 2006; Chow i in., 2005; Chow i in., 2003; Jimenez-Saenz i Martinez-Sanchez, 2006; Javaid i Bonkovsky, 2006; Molinari i in., 2006). Badania przeprowadzone na psach rasy beagle (Isbrucker i in. (2006a)) wydają się przydatne na potrzeby dokonania interpretacji wyników badań prowadzonych wśród ludzi. Fakt, że przyjmowanie ekstraktów z zielonej herbaty przez psy na pusty żołądek doprowadziło do sytuacji, w której wartość NOAEL dla EGCG była dziesięciokrotnie niższa niż w przypadku badania, w którym psy otrzymywały preparat po jedzeniu (Tabela 6) może sugerować, że do minimalizacji ewentualnego ryzyka przyczyniać się mogą warunki, w jakich ekstrakty z zielonej herbaty są spożywane (zob. też Sarma i in., 2008).

Tabela 6: Skutki subchronicznej narażenia na ekstrakty z zielonej herbaty u zwierząt laboratoryjnych

Badany materiał (GTE = suchy ekstrakt z zielonej herbaty)	Gatunek zwierzęta /grupa	Dawka i sposób podawania mg EGCG na kg masy ciała dziennie	Czas obserwacji	NOAEL	Przypisy
GTE zawierający 77 % EGCG	szczury (Sprague-Dawley), 10 samców, 10 samic	0, 50, 150, 500 (żywienie doustne), dodatkowe grupy z 4-tygodniowym okresem powrotu do normalnego stanu bez kuracji GTE w tym okresie: 0, 500 (żywienie doustne)	13 tygodni	NOAEL dla EGCG u szczurów = 500 mg EGCG/kg masy ciała dziennie. Gdyby wzrost poziomu bilirubiny całkowitej uznany został za związany z prowadzoną kuracją, wówczas uzyskana wartość NOAEL wynosiłaby 150 mg/kg masy ciała dziennie.	Isbrucker i in., 2006a
GTE zawierający 91,8 % EGCG	Psy rasy beagle karmione przed podawaniem preparatu, 6 samców, 6 samic	0, 46, 275, 460 (doustnie w formie kapsulek, każda dzienna dawka podzielona na dwie porcje)	13 tygodni	Uzyskano wartość NOAEL wynoszącą 460 mg EGCG/kg masy ciała dziennie co odpowiada 500 mg GTE /kg masy ciała dziennie.	Isbrucker i in., 2006a
GTE zawierający 80 % EGCG	Psy rasy beagle przyjmujące preparat na czczo, bez jedzenia min. 15 godzin przed podaniem preparatu, 4 samce, 4 samice	0, 40, 120, 400 (doustnie jedna dawka bolusowa dziennie w formie kapsułki 3-4godziny przed jedzeniem)	13 tygodni	NOAEL : 40 mg EGCG/kg masy ciała dziennie.	Isbrucker i in., 2006a
GTE – brak danych	szczury (Sprague-Dawley), 20 samców, 20 samic	0, 45, 150, 500 (karmienie przez zgłębnik)	13 tygodni	Dane histopatologiczne sugerują, że wartość NOAEL dla EGCG wynosi 150 mg/kg masy ciała dziennie u szczurów obu płci. Bazując na spadku przyrostu masy ciała oraz spadku względnej i bezwzględnej masy grasicy uzyskano wartość NOAEL dla EGCG wynoszącą 45 mg/kg masy ciała dziennie w odniesieniu do samców.	McCormick i in., 1999 (Tylko streszczenie)
GTE zawierając 53,4% EGCG, 11,4% EGC, 9,1% EC, 5,1% GCG i 4,9% ECG	szczury (Sprague-Dawley), 20 samców, 20 samic	0, 48, 160, 534 (karmienie przez zgłębnik)	13 tygodni	NOAEL: 48 mg EGCG/kg masy ciała dziennie.	Johnson i in., 1999 (Tylko streszczenie)
GTE zawierający 32,1% EGCG, 17,7% EGC, 8,5% EC, 3,3% GCG, 10,7% ECG, 1,4% CG; całkowita zawartość katechin: 66,2%	szczury (F344/Du Cij), 10 samców, 10 samic	0, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 % GTE w stosowanej diecie, co odpowiada dawkom EGCG wynoszącym 0, 141, 283, 566 i 1132	13 tygodni	Opierając się na zmianach histologicznych tarczycy ustalono, że wartość NOAEL dla GTE wynosi 0,625% dla samców i 1,25% dla samic w stosunku do całości spożywanych posiłków, co daje odpowiednio 141 i 283 mg EGCG/kg masy ciała dziennie	Sakamoto i in., 2001

Fakt, że występowanie zjawiska toksyczności względem wątroby oraz innych uszkodzeń narządów ciała (np. nerek i przewodu pokarmowego) związany jest z podwyższonym stopniem biodostępności EGCG u psów przyjmujących preparat na czczo, podczas gdy u psów przyjmujących go po posiłku w takich samych dawkach poziom biodostępności EGCG okazał się znacznie niższy, a także że wskazane wyżej skutki u psów z tej drugiej grupy nie wystąpiły, stanowi kolejny istotny dowód na to, że EGCG stanowiło czynnik kauzalny w odniesieniu do zjawiska hepatotoksyczności spowodowanej przez ekstrakty z zielonej herbaty. Po drugie, rezultaty badań prowadzonych na psach podsuwają nam możliwe wytłumaczenie przyczyn, dla których to właśnie produkty odchudzające bazujące na ekstraktach z zielonej herbaty uznawane były za przyczynę podwyższonej częstotliwości występowania toksycznego oddziaływania na wątrobę: należy zakładać, że pacjenci uczestniczący w programach odchudzających wystawieni są na działanie ekstraktów z zielonej herbaty także w te dni, kiedy nie przyjmują posiłków bądź też przyjmują pokarmy mniej zróżnicowane bądź w mniejszych ilościach w konsekwencji stosowanej diety. Zakładając, że poziom biodostępności znacząco wzrasta w okresie, w którym dana osoba nie przyjmuje pokarmu, tak jak zaobserwowano to w badaniach przeprowadzanych na psach rasy beagle, u takich pacjentów może występować o wiele wyższy poziom biodostępności EGCG w porównaniu do osób stosujących normalną dietę. Dotyczy to w szczególności zażywania danego specyfiku przez okres kilku tygodni, ponieważ, jak wykazują to badania kinetyczne prowadzone na psach rasy beagle oraz na ludziach, wielokrotne doustne zażywanie preparatów omawianego rodzaju powoduje wystąpienie wyższego w porównaniu do stanu na początku narażenia poziomu EGCG we krwi (Isbrucker i in., 2006a; Ullmann i in., 2004). Potraktowane zbiorczo, czynniki te mogą pomóc wytłumaczyć, dlaczego zażywanie EGCG w ilości od 187,5 do 468,75 mg dziennie (2-5 kapsułek leku fitoterapeutycznego) pod postacią produktów odchudzających mogło wywoływać schorzenia wątroby, podczas gdy zażywanie naparów z zielonej herbaty, nawet w znacznych ilościach (95. percentyl: 1097 g naparu dziennie, co odpowiada dawce od 288,5 do 447,6 mg EGCG dziennie, zob. Tabela 5) jak dotąd nie powodowało żadnych uszkodzeń tkanek wątroby.

Możliwe mechanizmy prowadzące do wzrostu poziomu biodostępności EGCG przyjmowanego na czczo (np. szybsze tempo wchłaniania, zmiany w procesie biotransformacji) nie zostały jak dotąd poddane analizie. Dokonując interpretacji danych toksykokinetycznych i toksykodynamicznych dotyczących oczyszczonych preparatów zawierających EGCG należy wziąć pod uwagę hipotezy, które przedstawiają Chen i in. (1997), według których EGCG zawarte w ekstraktach z zielonej herbaty, w rezultacie zakładanych interakcji z innymi polifenolami (np. proces konkurowania o miejsca wiązania w ramach enzymów metabolizujących) może ulegać wolniejszej eliminacji niż w przypadku, kiedy pojawia się jako substancja wyizolowana. Koncepcja ta jest zgodna z wynikami, jakie zaprezentowali Johnson i in. (1999), którzy ustalili, że śmiertelność wśród szczurów zażywających analizowany preparat doustnie wskazywała na wyższą toksyczność ekstraktu z zielonej herbaty, niż można by przewidywać opierając się wyłącznie na zawartości EGCG. Przykład ten pokazuje, dlaczego dane toksykologiczne pozyskane w trakcie analizy konkretnego suszonego ekstraktu z zielonej herbaty nie mogą być zastosowane do innego ekstraktu bez podania dowodów na fakt, że oba ekstrakty charakteryzują się ekwiwalentnym składem.

Dane dotyczące genotoksyczności oraz, w ograniczonym zakresie, rakogenności, pozyskane w ramach eksperymentów ze stężonymi ekstraktami z zielonej herbaty, nie dają powodów do niepokoju z punktu widzenia bezpieczeństwa.

Grupa Robocza pragnie zauważyć, że wartości NOAEL uzyskane w oparciu o pięć subchronicznych badań na zwierzętach obejmujących doustne podawanie ekstraktów z zielonej herbaty zawierających nie więcej niż 80% EGCG wynoszą od 40 do 150 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie (Tabela 6). Na potrzeby dalszej oceny Grupa Robocza odniosła się do wyników w zakresie wartości NOAEL na poziomie od 40 do 50 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie, uzyskanych na bazie trzech z pięciu badań (McCormick i in., 1999; Johnson i in., 1999; Isbrucker i in., 2006a (psy zażywające preparat na czczo)).

Grupa Robocza stwierdza, że regularne przyjmowanie suchych ekstraktów z zielonej herbaty w ramach suplementów diety bądź produktów pokrewnych, mające charakter odmienny od przyjmowania tradycyjnych naparów z zielonej herbaty (bądź też napojów charakteryzujących się identycznym składem) może u niewielkiego ułamka populacji łączyć się z ryzykiem wystąpienia zjawiska hepatotoksyczności w postaci ostrej. Ryzyko może być wyższe w przypadku przyjmowania zmniejszonych dawek jedzenia bądź w przypadku głodzenia się, co bywa efektem starań o uzyskanie efektu odchudzającego. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, należy stwierdzić, że w ramach oceny ryzyka suchych ekstraktów z zielonej herbaty występuje niepewność w zakresie:

- tego, które składniki (poza EGCG) zawarte w ekstraktach z zielonej herbaty mogą przyczyniać się do powstawania zjawiska hepatotoksyczności,
- tego, w jaki sposób na poziom biodostępności EGCG wpływają interakcje z towarzyszącymi EGCG katechinami (możliwy wzrost biodostępności EGCG)
- wpływu warunków ekstrakcji na poziom hepatotoksyczności,
- wpływu nieprzyjmowania pokarmu lub przyjmowania go w zmniejszonej ilości na poziom toksyczności ekstraktów z zielonej herbaty
- tego, które grupy konsumentów są szczególnie narażone na uszkodzenia wątroby na skutek stosowania ekstraktów z zielonej herbaty,
- tego, czy inne uszkodzenia narządów (np. nerek, przewodu pokarmowego czy tarczycy) pojawiające się obok zjawiska hepatotoksyczności w testach prowadzonych na zwierzętach mają także znaczenie dla ludzi,
- tego, jakie mechanizmy leżą u podstaw zjawiska hepatotoksyczności.

Biorąc pod uwagę przytoczone wyżej dane i wnioski, Grupa Robocza przedstawia niniejszym następującą ocenę dotyczącą „suchych ekstraktów wodnych z zielonej herbaty wytwarzanych z zastosowaniem tradycyjnego procesu infuzji na potrzeby produkcji suplementów diety” oraz „innych suchych ekstraktów z zielonej herbaty”, „innych suchych ekstraktów z zielonej herbaty” oraz „suchych ekstraktów z zielonej herbaty wykorzystywanych w ramach produktów zalecanych jako dodatek do programów odchudzania bądź na potrzeby redukcji masy ciała”:

Suche ekstrakty wodne z zielonej herbaty wytwarzane z użyciem tradycyjnej procedury infuzji na potrzeby wytwarzania suplementów diety

Suche ekstrakty wodne z zielonej herbaty, wytwarzane w takich samych warunkach ekstrakcji, jakie stosowane są podczas przygotowywania naparów z zielonej herbaty przy użyciu tradycyjnych metod i wykorzystywane do produkcji suplementów diety w postaci stałej bądź płynnej powinny być oceniane w oparciu o zawartość EGCG oraz wartość dziennej narażenia wynikającą z proponowanych sposobów oraz poziomów zastosowania.

W suplementach diety oraz produktach pokrewnych, aktywne składniki zielonej herbaty, w szczególności zaś EGCG, budzące zastrzeżenia z toksykologicznego punktu widzenia, dostępne są w formie bardziej stężonej, przez co bardziej prawdopodobne jest zażywanie wyższych dawek (bądź też nawet zażywanie ich w formie dawek bolusowych) niż ma to miejsce w przypadku wskazanych

Wniosek:

Grupa Robocza niniejszym stwierdza, że wartość MOS (Marginesu Bezpieczeństwa) w związku ze spożywaniem suplementów diety i produktów pokrewnych, w zestawieniu z wartością NOAEL wynoszącą od 40 do 50 mg EGCG na kilogram masy ciała dziennie, ustaloną w ramach 14-tygodniowego badania (McCormick i in. (1999), Johnson i in. (1999) i Isbrucker i in. (2006a; psy otrzymujące preparat na czczo) powinna być ustalona na poziomie przekraczającym typowy 100-krotny współczynnik niepewności dla związków chemicznych niemających cech genotoksycznych. Mając na uwadze wskazane wyżej względy, Grupa Robocza stwierdza, że w przypadku, gdy dzienna dawka EGCG pozwala zachować odpowiedni margines bezpieczeństwa, omawiane ekstrakty uznawane będą za bezpieczne na poziomie A (domniemanie bezpieczeństwa w oparciu o dostępną wiedzę) zgodnie z kryteriami wskazanymi w treści Wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych²⁰.

Grupa Robocza pragnie też zauważyć, że wykorzystanie tego rodzaju ekstraktów z zielonej herbaty w suplementach diety o działaniu odchudzającym nie może zostać uznane za bezpieczne na poziomie A, ponieważ wskazanie to sugeruje, że ich zażywanie odbywać się będzie na czczo lub przy zmniejszonym poziomie spożycia pokarmów, w chwili obecnej zaś nie istnieją odpowiednie dane dotyczące bezpieczeństwa ich spożycia w tego rodzaju warunkach.

²⁰ Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true

„Inne suche ekstrakty z zielonej herbaty”

Suche ekstrakty z zielonej herbaty wytwarzane z zastosowaniem metod odmiennych od warunków towarzyszących tradycyjnemu wytwarzaniu naparów z zielonej herbaty, wzbogacone suche ekstrakty z zielonej herbaty, wyizolowane katechiny zielonej herbaty i mieszanki ekstraktów z zielonej herbaty i preparatów botanicznych odmiennego pochodzenia, co do których istnieje podejrzenie, że posiadają właściwości hepatotoksyczne, nie mogą być uznane za domyślnie bezpieczne na bazie dostępnej wiedzy, ponieważ mogą one różnić się pod względem składu od tradycyjnych naparów z zielonej herbaty.

Wniosek:

Suche ekstrakty z zielonej herbaty różniące się składem od tradycyjnych naparów z zielonej herbaty nie są uznawane za bezpieczne na poziomie A. Konieczna jest ich ocena na poziomie B, co oznacza, że niezbędne jest wykonanie dodatkowych testów i/lub pozyskanie dodatkowych danych zgodnie z kryteriami wskazanymi w treści Wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych.

Suche ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane w ramach produktów, których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała.

W odniesieniu do suchych ekstraktów z zielonej herbaty wykorzystywanych w ramach produktów (np. napojów bądź suplementów diety), których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała, Grupa Robocza uznała, że mogą występować przypadki regularnego zażywania tego rodzaju produktów na czczo, co oznacza, że poziom biodostępności EGCG może być o wiele wyższy niż w przypadku spożycia ich po jedzeniu.

Wniosek:

Biorąc pod uwagę raporty z obserwacji klinicznych opisujące przypadki toksycznego oddziaływania na wątrobę związanego z zażywaniem suchych ekstraktów z zielonej herbaty w celu uzyskania efektów odchudzających, omawiane ekstrakty nie mogą zostać uznane za bezpieczne na poziomie A. Należy tym samym poddać je ocenie na poziomie B, co oznacza, że konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych testów i/lub pozyskanie dodatkowych danych zgodnie z kryteriami wskazanymi w treści Wytycznych EFSA dot. oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych²¹.

11. Konieczność przeprowadzenia dalszych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych na potrzeby dokonania oceny (Poziom B)

Zgodnie z tym, co wskazano powyżej, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych testów i/lub pozyskanie dodatkowych danych w odniesieniu do „innych ekstraktów z zielonej herbaty” oraz „suchych ekstraktów z zielonej herbaty wykorzystywanych w ramach produktów których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała”.

²¹ Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true

“Inne suche ekstrakty z zielonej herbaty”

Zażywanie tego rodzaju ekstraktów łączy się z wystąpieniem narażenia na składniki zielonej herbaty, która nie jest ani pod względem jakościowym, ani ilościowym ekwiwalentna w stosunku do narażenia wynikającej z zażywania tradycyjnych naparów z zielonej herbaty. Mając na uwadze opisane przypadki zjawiska hepatotoksyczności występującego w następstwie zażywania ekstraktów z zielonej herbaty, zakładanego hepatotoksycznego potencjału EGCG, który stanowi zasadniczy składnik tych ekstraktów, a także istniejące nadal czynniki niepewności (np. wątpliwości dotyczące mechanizmów leżących u podstaw zjawiska hepatotoksyczności, możliwego oddziaływania innych składników zielonej herbaty na ogólny poziom toksyczności, możliwego wzrostu biodostępności EGCG będącego skutkiem interakcji ze współwystępującymi katechinami oraz wpływu warunków ekstrakcji na poziom toksyczności ekstraktu), należy poddać omawiane katechiny będące składnikami zielonej herbaty odpowiednim badaniom eksperymentalnym i klinicznym obejmującym zarówno zwierzęta, jak i ludzi. Jako że biodostępność EGCG uznawana jest za decydujący czynnik toksyczności ekstraktów zielonej herbaty, podczas prowadzonych badań należy dokonać rejestracji odnośnych danych kinetycznych – także w warunkach obejmujących spożywanie badanych substancji na czczo. Dla ekstraktów pozyskiwanych z zastosowaniem identycznych procesów produkcji z użyciem tego rodzaju zielonej herbaty można zakładać, że wyniki badań będą identyczne.

Suche ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane w ramach produktów, których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała

Ponieważ powyższy rodzaj zastosowania zakłada, że omawiane produkty stosowane będą codziennie, w sposób regularny i że będą one zażywane na czczo, przy zredukowanym spożyciu pokarmów bądź też w ramach stosowanej diety, istotne z toksykologicznego punktu widzenia składniki zielonej herbaty, w szczególności zaś EGCG, mogą ulegać procesom toksykokinetycznym innym od tych, jakie zachodzą w organizmie osoby nie redukującej ilości zażywanego pożywienia, a do takich właśnie osób odnosi się założenie, że zastosowanie tradycyjnych naparów z zielonej herbaty jest z natury bezpieczne. Z przeprowadzonych badań eksperymentalnych można wysnuć wniosek, że EGCG jest substancją przynajmniej po części odpowiedzialną za toksyczne oddziaływanie na wątrobę i że biodostępność tej substancji przy spożywaniu jej na czczo jest znacznie wyższa niż ma to miejsce w przypadku zażywania jej po posiłku, co oznacza, że odpowiednio mniejsze dawki będą mieć działanie toksyczne. Zakłada się, że ma to związek z opisanymi przypadkami hepatotoksycznego działania na organizm człowieka w następstwie zażywania produktów odchudzających zawierających suche ekstrakty z zielonej herbaty pozyskane w drodze ekstrakcji wodnej bądź wodno-alkoholowej. Ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystywane w ramach produktów (np. napojów bądź suplementów diety), których stosowanie zaleca się w połączeniu z programami odchudzającymi bądź na potrzeby redukcji masy ciała powinny zatem, bez względu na zastosowany proces wytwarzania oraz skład, poddane zostać odpowiednim badaniom eksperymentalnym i klinicznym obejmującym podawanie ich na czczo zarówno zwierzętom, jak i ludziom, wliczając w to analizę parametrów kinetycznych. Dotyczy to także mieszanek ziołowych zawierających ekstrakty z zielonej herbaty przeznaczonych do wykorzystywania w ramach produktów odchudzających.

PRZYPISY

- AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009). Communication to the Working Group.
- AFSSAPS, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, (2003). Communiqué de Presse. Suspension de l'autorisation de mise sur le marché de la spécialité pharmaceutique EXOLISE® (gallate d'épigallocatechol).
- Aktas, O., Prozorovski, T., Smorodchenko, A., Savaskan, N.E., Lauster, R., Kloetzel, P.M., Infante-Duarte, C., Brocke, S., Zipp, F., (2004). Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 173/9: 5794-800.
- Arznei-telegramm, (1992). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen - erkennen und vermeiden. Vol. 11: 111-113.
- Astill, C., Birch, M.R., Dacombe, C., Humphrey, P.G., Martin, P.T., (2001) Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5340-5347.
- Bar-Meir, S., Halpern, Z., Gutman, M., Shpirer, Z., Baratz, M., Bass, D., (1985). Effect of (+)-cyanidanol-3 on chronic active hepatitis: a double blind controlled trial. *Gut* 26: 975-979.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), August 2003. Getränke mit isoliertem L-Theanin.
- Bonkovsky, H.L., (2006). Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese green tea (*Camellia sinensis*). *Annals of Internal Medicine* 144: 68-71.
- Bronner, W.E., Beecher, G.R., (1998) Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 805, 137-142.
- Bun, S.S., Bun, H., Guédon, D., Rosier, C., Ollivier, E., (2006). Effect of green tea extracts on liver functions in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1108-1113.
- Canadian Adverse Reaction Newsletter, (2007). Green tea extract (Green Lite): suspected association with hepatotoxicity. Vol.17/1:3.
- CARE Study Group (2008). Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *BMJ* 337: a2332
- Chang, P.Y., Mirsalis, J., Riccio, E.S., Bakke, J.P., Lee, P.S., Shimon, J., Philips, S., Fairchild, D., Hara, Y., Crowell, J.A.; (2003). Genotoxicity and toxicity of the potential cancerperspective agent polyphenon E. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 43-54.
- Chen, L., Lee, M-J., Li, H., Yang, C.C., (1997). Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 25/9: 1045-1050.
- Chen, Z-Y., Zhu, Q.Y., Tsang, D., Huang, Y., (2001) Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.* 49, 477-482.
- Chow, H.H.S., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y., Alberts, D.S., (2003). Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research* 9: 3312-3319.
- Chow, H.H.S., Hakim, I.A., Vining, D.R., Crowell, J.A., Ranger-Moore, J., Chew, W.M., Celaya, C.A., Rodney, S. R., Hara, Y., Alberts, D.S., (2005). Effects of dosing condition on the oral

- bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 11/12: 4627-4633.
- Chung, J.Y.; Huang, C., Meng, X., Dong, Z., Yang, C.S., (1999). Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Cancer Res.* 59: 4610-4617.
- Clinical Trials, U.S. National Institute of Health (NIH), (2008) (actual research); www.ClinicalTrials.gov
- Faqi, A.S., Crowell, J.A., Polen, M., McCormick, D.L.; (2001). Developmental toxicity of polyphenon E in rats (Abstract). SOT Annual Meeting, Vol 1050:220.
- EFSA (2008) Guidance on the safety assessment of botanicals and botanical preparations http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178717026833.htm
- FDA, 2005. Letter responding to health claim petition dated January 27, 2004: green tea and reduced risk of cancer health claim (Docket number 2004Q-0083).
- FDA (Food and Drug Administration) (2006). NDA 21-902. Veregen™.
- FDA, CFSAN, (2005) Letter responding to health claim petition dated January 27, 2004: Green tea and reduced risk of cancer health claim (Docket No. 2004Q_0083), <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/qhc-gtea.html>
- FSA (Food Standard Agency) (November 2008), Food Standard Agency publishes new caffeine advice for pregnant women.
- Galati, G., Lin, A., Sultan, A.M., O'Brien, P.J., (2006). Cellular and *in vivo* hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biology & Medicine* 40: 570-580.
- Gloro, R., Hourmand-Ollivier, I., Mosquet, B., Mosquet, L., Rousselot, P., Salamé, E., Piquet, M-A., Dao, T., (2005). Fulminant hepatitis during self-medication with hydroalcoholic extract of green tea. *Gastroenterol. Hepatol.* 17: 1135-1137.
- Goodin, M.G., Fertuck, K.C., Zacharewski, T.R., Rosengren, R.J., (2002). Estrogen receptor-mediated actions of polyphenolic catechins *in vivo* and *in vitro*. *Tox. Sci.* 69: 354-361.
- Graham, H.N., (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* 21, 334-350.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenike, C., (1998) PDR for Herbal Medicines. 1st ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company, Inc.
- Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, (2003) Hager ROM.
- Higdon, J.V., Frei, B., (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43/1:89-143.
- Hirose, M., Hoshiya, T., Akagi, K., Takahashi, S., Hara, Y., Ito, N., (1993). Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 14/8: 1549-1553.
- IARC; (1991). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. WHO. Vol. 51.
- Isbrucker, R.A., Edwards, J.A., Wolz, E., Davidovich, A., Bausch, J., (2006a). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology* 44: 636-650.
- Isbrucker, R.A., Edwards, J.A., Wolz, E., Davidovich, A., Bausch, J., (2006b). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: Teratogenicity and reproductive toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44: 651-661.

- Javaid, A., Bonkovsky, H.L., (2006). Hepatotoxicity due to extracts of Chinese green tea (*Camellia sinensis*): a growing concern. *J Hepatology* 45: 334-336.
- Jellin, J.M., Gregory, P.J., (2007). Pharmacist's letter/prescriber's letter. *Natural Medicines Comprehensive Database*. 9th ed. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty; page 637-645.
- Jimenez-Saenz, M., Martinez-Sanchez, M.C., (2006). Acute hepatitis associated with the use of green tea infusions. *J. Hepatology* 44:616-619.
- Johnson, W.D., Morrissey, R.L., Crowell, J.A., McCormick, D.L., (1999). Subchronical oral toxicity of green tea polyphenols in rats and dogs. *The Toxicologist* 48: 57-58 (Abstract).
- Kantelip, J.P., Laroche, D., (2003). Green tea and liver disorders. National Drug Surveillance survey submitted to the Technical Committee. Besancon: Besancon regional drug surveillance centre, Feb. 11 (as cited by Sarma i in., 2008).
- Khokhar, S., Venema, D., Hollman, P.C.H., Dekker, M., Jongen, W., (1997) A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Letters* 114, 171-172.
- Lakhani, N.J., Sarkar, M.A., Venitz, J., Figg, W.D., (2003). 2-methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy* 23/2: 165-172.
- Lambert, J.D., Sang, S., Yang, C.S., (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 583-585.
- Lee, M-J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F.Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S., Yang, C.S., (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epid., Biomarkers & Prevention* 11: 1025-1032.
- Lee, W.J., Shim, J.-Y., Zhu, B.T., (2005). Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* 68/4: 1018-1030.
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., Lu, J., (2007) Tea extraction methods in relation to control of epimerization of tea catechins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1748-1752.
- Liebert, M., Licht, U., Böhm, V., Bitsch, R., (1999) Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 208, 217-220.
- Lin, Y-S., Tsai, Y-J., Tsay, J-S., Lin, J-K., (2003) Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1864-1873.
- Lu, H., Meng, X., Yang, C.C., (2003). Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-o-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition* 31/5: 572-579.
- Mansfeld, R., (1986). Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen), Volumes 1-4, 2nd edition. J. Herausgegeben von Schulte-Motel (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg & New York.
- Martena, M.J., (2008). Voedsel en Waren Autoriteit (VWA), Den Haag, NL, Personal Communication.
- Martindale. The complete drug reference.(1999). Caffeine. Ed. Parfitt, K.; Pharmaceutical Press.
- Martinez-Sierra, C., Unceta, P.R., Herrera, L.M., (2006). Hepatitis aguda tras ingestion de té verde. *Med. Clin. (Barc.)* 127/3: 117-119.
- McCormick, D.L., Johnson, W.D., Morrissey, R.L., Crowell, J.A., (1999). Subchronic oral toxicity of epigallocatechin gallate (EGCG) in rats and dogs (Abstract). *The Toxicologist* 48: 57.

- Mensink, G.B.M., Burger, M., Beitz, R., Henschel, Y., (2002) Was essen wir heute? Ernährungsverhalten in Deutschland. Robert-Koch-Institut Berlin, Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- Mitscher, L.A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J-H., Steele, L., Pillai, S.P., (1997) Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. Medicinal Research Reviews 17/4, 327-365.
- Molinari, M., Watt, K.D.S., Kruszyna, T., Nelson, R., Walsh, M., Huang, W-Y., Nashan, B., Pelfekian, K., (2006). Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. Liver Transplantation 12: 1892-1895.
- Muto, S., Fujita, K.-I., Yamazaki, Y., Kamataki, T., (2001). Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. Mutation Research 479: 197-206.
- Nagai, M., Conney, A.H., Zhu, B.T., (2004). Strong inhibitory effects of common tea catechins and bioflavonoids on the o-methylation of catechol estrogens catalyzed by human liver cytosolic catechol-o-methyltransferase. Drug Metabolism and Disposition 32/5: 497-504.
- Naranjo, C.A., Busto, U., Seilers E.M., Sandor, P., Ruiz, I., Roberts, E.A., Janecek, E., Domecq, C., Greenblatt, D.J., (1981). A method for estimating the probability of adverse drug reactions. Clin. Pharmacol. Ther. 30/2: 239-245.
- Paschka, A.G., Butler, R., Young, C.Y.F., (1998). Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component (-)-epigallocatechin-3-gallate. Cancer Lett. 130: 1-7.
- Pedros, C., Cereza, G., Garcia, N., Laporte, J-R., (2003). Liver toxicity of *Camellia sinensis* dried etanolic extract. Med. Clin. (Barc.) 121/15: 598-599.
- Porcel, J.M.; (accessed 2007 Oct 23). Hepatotoxicity associated with green tea extracts (online). <http://www.annals.org/cgi/eletters/142/6/477#1445>
- RKI, Robert-Koch-Institut, (1998) Verzehr von grünem Tee. Bundes-Gesundheitssurvey (Data not published).
- Sakamoto, Y., Mikuriya, H., Tayama, K., Takahashi, H., Nagasawa, A., Yano, N., Yuzawa, K., Ogata, A., Aoki, N., (2001). Goitrogenic effects of green tea extract catechins by dietary administration in rats. Arch. Toxicol. 75: 591-596.
- Sarma, D.N., Barrett, M.L., Chavez, M.L., Gardiner, P., Ko, R., Mahady, G.B., Marles, R.J., Pellicore, L.S., Giancaspro, G.I., Dog, T.L., (2008) Safety of green tea extracts. A systematic review by the US pharmacopeia. Drug Safety 31/6, 469-484.
- Scientific Committee on Food (SCF); January 1999. Opinion on caffeine, taurine and d-glucuronogamma-lactone as constituents of so-called "energy" drinks. CS/PLEN/ENDRINKS/9 Final.
- Schmidt, M., Schmitz, H.-J., Baumgart, A., Guédon, D., Netsch, M.I., Kreuter, M.-H., Schmidlin, C.B., Schrenk, D., (2005). Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. Food and Chemical Toxicology 43: 307-314.
- Scholz, E., Bertram, B., (1995) *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze Der Teestrauch. Zeitschrift für Phytotherapie 17, 235-250.
- Seddik, M., Lucidarme, D., Creusy, C., Filoche, B., (2001). Is Exolise hepatotoxic? Gastroenterol. Clin. Biol. 25/8-9: 834-835.
- Shirai, T., Sato, A., Hara, Y., (1994). Epigallocatechin gallate. The major causative agent of green tea-induced asthma. Chest 106: 1801-1802.
- Stevens, T., Qadri, A., Zein, N.N., (2005). Two patients with acute liver injury associated with use of the herbal weight-loss supplement Hydroxycut. Annals of Intenal Med. 142/6: 477-478.

- Stiftung Warentest, (1999) Grüner Tee, zuviel gespritzt. Test 2:80-83.
- Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Toda, Y., Ito, H., Fujiki, H., (1998). Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 19/10: 1771-1776.
- Suzuki, M., Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T., Maeda-Yamamoto, M., (2003) Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. *J. Agric. Food Chem.* 51, 510-514.
- Sweetman, S., (2008). *Martindale: The complete drug reference, Caffeine*. London: Pharmaceutical Press. Electronic version.
- Swezey, R.R., Aldridge, D.E., LeValley, S. E., Crowell, J.A., Hara, Y., Green, C.E., (2003). Absorption, tissue distribution and elimination of 4-[3H]-epigallocatechin gallate in beagle dogs. *Int. J. Toxicol.* 22/3:187-93.
- Ullman, U., Haller, J., Decourt, J.P., Girault, N., Girault, J., Richard-Caudron, A.S., Pineau, B., Weber, P., (2003). A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J. Int. Med. Research* 31/2: 88-101.
- Ullman, U., Haller, J., Decourt, J.P., Girault, J., Spitzer, V., Weber, P., (2004). Plasma-kinetic characteristics of purified and isolated green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) after 10 days repeated dosing in healthy volunteers. *Int. J. Vitamin. Res.* 74/4: 269-278.
- USDA database for the flavonoid content of selected foods. (2007) U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Verschoyle, R.D., Steward, W.P., Gescher, A.J., (2007). Putative cancer chemopreventive agents of dietary origin-how safe are they? *Nutr.Cancer* 59/2: 152-162.
- Vial, T., Bernard, G., Lewden, B., Dumortier, J., Descotes, J., (2003). Hépatite aiguë imputable à l'Exolise® (*Camellia sinensis*). *Gastroenterol Clin Biol* 27: 1166-1177.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K., (2000) Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food & Technology* 11, 152-160.
- Zhu, M., Chen, Y., Li, R.C., (2000). Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med* 66/5: 444-447.

Załącznik C: *OCIMUM TENUIFLORUM* L.

Niniejszy raport koncentruje się na ekstraktach z liści oraz na ich możliwej toksyczności reprodukcyjnej.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przetestowanie proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie jest zadaniem niniejszego dokumentu dokonywanie formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanej substancji bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter substancji i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy; nie może on też być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanej substancji botanicznej ani też wszystkich możliwych jej składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa substancji botanicznej. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Tożsamość i charakter materiału źródłowego

Nazwa naukowa: *Ocimum tenuiflorum* L.

Synonimy: *O. sanctum* L. (=synonim główny), *Geniosporum tenuiflorum* (L.) Merr., *Moschosma tenuiflorum* (L.) Heynhold, *Ocimum album* Blanco, *O. anisodorum* Muell., *O. brachiatum* sensu Hasskarl (non Blume), *O. flexuosum* sensu Blanco, *O. frutescens* sensu Burm. f. (non L.), *O. gratissimum* sensu Lour (non L.), *O. hirsutum* Benth., *O. inodorum*. Burm. f., *O. monachorum* L., *O. nelsonii*, Zipp ex Span., *O. sanctum* L. var. *hirsute* (Benth.) Hook.f., *O. villosum* Roxb., *O. virgatum* Blanco, *O. virgatum*, *O. tomentosum* Lam., *Lumnitzera tenuiflora* (L.) Spreng., *Plectranthus monachorum* (L.) Spreng., *P. striatus* sensu Meschler et Hosseus. (non Benth.), (Blaschek i in., 1998; MMPND, 2008; Suddee, 2001).

Nazwy zwyczajowe: Bazylia azjatycka (pol.), Holy basil, Sacred basil, Monks basil (ang.), Basilic sacré, Basilica thailandais (fr.), Heiliges Basilikum. Königsbasilikum, Indisches Basilikum (niem.), Basilico sacro, Sanskrit: Tulsi, Tulasi (wł.).

Rodzina:	Labiatae (Lamiaceae)
Stosowane części rośliny:	Liście lub nasiona.
Pochodzenie geograficzne:	Tropikalne i subtropikalne obszary Azji i Północnej Australii.
Warunki uprawy i zbioru:	<i>O. tenuiflorum</i> L. jest rośliną jednoroczną powszechnie spotykaną na terenie Indii. Stała się ona bardzo popularna na całym świecie i jest często uprawiana w ogrodach.

2. Proces wztwarzania

Brak dostępnych danych

3. Skład chemiczny

Głównymi składnikami ekstraktów z suszonych liści *Ocimum tenuiflorum* L. są taniny takie jak kwas galusowy i kwas chlorogenowy (do 4,6%) oraz olejek eteryczny (do 2%) (Materia Medika Indonesia, 1995). Wśród znaczących składników aktywnych należy wymienić także kwas ursolowy będący triterpenoidem pentacyklicznym (kwas 3 β -hydroksy-ursan-12-en-28-owy) (1,5% w ekstrakcie) (Silva i in., 2008). Zawartość głównych składników olejku eterycznego waha się w zależności od występowania geograficznego oraz odmiany źródłowego materiału roślinnego: eugenol (do 62%), metyloeugenol (do 86%) oraz α - i β -kariofilen (do 42%). Obecne są także metylochawikol (=estragol), linalol i 1,8-cyneol (=eukalyptol) (Blaschek i in., 1998; Sukari i Takahashi, 1988; Brophy i Jogia, 1984; Maheshwari i in., 1987; Lal i in., 1978, WHO, 2002). W liściach *Ocimum tenuiflorum* L. stwierdzono także obecność alkaloidów, glikozydów i saponin.

W ekstrakcie z omawianego gatunku rośliny stwierdzono obecność związków z grupy fenoli (brak bardziej szczegółowych specyfikacji); wykryto także kwas rozmarynowy. Ekstrakt z liści zawierał ocimumozydy A i B oraz ocimarynę, a także flawony i pochodne flawonów takie jak apigenina, apigenino-7-O-beta-D-glukopiranozyd, ester 6''-metylowy kwasu apigenino-7-O-beta-D-glukuronowego, ester 6''-metylowy kwasu luteolinowo-7-O-beta-D-glukuronowego, luteolino-5-O-beta-D-glukopiranozyd oraz 4-allilo-1-O-beta-D-glukopiranozylo-2-hydroksybenzen; oprócz tego wykryto także dwie znane substancje z grupy cerebrozydów (Gupta i in., 2007).

Grupa Robocza pragnie zaznaczyć, że *Ocimum tenuiflorum* L. znalazł się na liście gatunków mających zostać poddanych analizie z uwagi na ryzyko toksycznego oddziaływania na układ rozrodczy, niemniej jednak brak jest informacji na temat tego, jaka substancja miałaby być odpowiedzialna za tego rodzaju działanie.

Grupa Robocza pragnie także zauważyć, że ekstrakt z omawianego gatunku rośliny może zawierać do 86% metyloeugenolu, związku chemicznego mającego działanie genotoksyczne oraz rakotwórcze (SCF 2001). Z uwagi na fakt, że ocena przykładowej substancji botanicznej zawierającej alkenylobenzen pokrewny (estragol) zawarta została w Załączniku 4 (ocena bezpieczeństwa odnośnie gatunku *Foeniculum vulgare* Mill.), w ramach niniejszej oceny wskazana wyżej rakogenna, genotoksyczna substancja nie będzie omawiana. Dalsze informacje dotyczące oceny marginesu bezpieczeństwa w zakresie narażenia na metyloeugenol, dokonanej w sposób analogiczny jak w przypadku estragolu (Załącznik 4) uzyskać można zapoznając się z literaturą przedmiotu (Rietjens i in. 2008).

Mimo iż nazwa *Ocimum tenuiflorum* L. jest prawidłową i zalecaną obecnie nazwą, w większości publikacji nadal stosuje się jej synonim (*Ocimum sanctum*.)

4. Specyfikacje

Niniejszy dokument koncentruje się na ocenie bezpieczeństwa w odniesieniu do ekstraktu z liści *Ocimum tenuiflorum* L. W odniesieniu do ekstraktów z liści rośliny wykorzystywanych w przytoczonych tu badaniach i poddanych analizie w treści niniejszego dokumentu nie zostały sporządzone żadne specyfikacje.

5. Stabilność składnika botanicznego

Brak danych.

6. Proponowane zastosowania i poziomy zastosowania

O. tenuiflorum L. traktowana jest w Indiach jako roślina otoczona swoistym kultem (bazylija święta). Roślina działa odstraszańco na komary. Zgodnie z tradycją, sok ze świeżych liści bazylii często wykorzystywano w celu łagodzenia kaszlu, lekkich infekcji górnych dróg oddechowych, skurczu oskrzeli, ogólnych stanów stresowych, infekcji skórnych oraz w wielu innych celach o charakterze medycznym (Khanna i Bhatia, 2003).

Badania przedkliniczne i kliniczne wykazały także, że *Ocimum tenuiflorum* L. może działać stymulująco na układ odpornościowy i łagodzić stres. Na poparcie tej tezy przeprowadzone zostało badanie mające na celu ocenić wpływ ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. na zachowanie myszy podczas testu wymuszonego pływania. Zażycie ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. powodowało wydłużenie czasu pływania, co sugeruje, że działał on stymulująco na centralny układ nerwowy i/lub powodował obniżenie poziomu stresu. Działanie *Ocimum tenuiflorum* L. okazało się być zbliżone do działania dezypraminy, będącej lekiem antydepresyjnym. W ramach innego badania analizie poddano wpływ ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. na zmiany zachodzące w zachowaniu szczurów albinotycznych wywołane przez stres związany z hałasem. Uprzednie podanie gryzoniom ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. skutkowało obniżeniem się parametrów ulegających zmianie pod wpływem stresu – takich jak leukopenia, podwyższony poziom kortykosteronu oraz zwiększona aktywność neutrofilów – z powrotem do normalnego poziomu, co wskazywało na uspokajające działanie ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. Ekstrakty eterowe i alkoholowe z liści *Ocimum tenuiflorum* L. wykazały także znaczną aktywność przeciwko bakteriom *Escherichia coli*. Gatunek *Ocimum tenuiflorum* L. poddany został również szeroko zakrojonym badaniom mającym na celu określenie jego potencjału terapeutycznego w wielu różnych obszarach takich jak stymulacja układu odpornościowego, działanie przeciwutleniające pomagające w zwalczaniu nowotworów, zastosowanie w ramach terapii adiuwantowej (uzupełniającej) w trakcie radioterapii, działanie przeciwwrzodowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwcukrzycowe i wiele innych.

W chwili obecnej nie są dostępne ani sugerowane żadne dane o charakterze ilościowym. Ekstrakt z liści omawianej rośliny uznawany jest w wielu publikacjach za posiadający rozliczne cechy lecznicze. Wśród korzystnych efektów jego stosowania wymienia się działanie uspokajające w przypadku narażenia na hałas, działanie przeciwpasożytnicze, przeciwcukrzycowe, antyronkogenne, przeciwzapalne, pozytywny wpływ na gojenie ran, a także działanie immunomodulujące oraz zapewniające ochronę mięśnia sercowego. (np. Kamboj, 1988; Mokhasmit i in., 1971; Sharma i in., 2001; Shetty i in., 2008; WHO, 2002; Mediratta i in., 2002; Adhvaryu i in., 2007)

7. Informacje dotyczące istniejących badań

Brak jest oficjalnych analiz omawianej substancji botanicznej dokonanych przez instytucje narodowe bądź międzynarodowe. Światowa Organizacja Zdrowia (2002) przygotowała monografie dotyczące wybranych roślin medycznych, wliczając w to *Ocimum tenuiflorum* L., niemniej jednak monografie te nie zawierają oceny bezpieczeństwa substancji botanicznych.

8. Narażenie

Dane dotyczące zalecanego dawkowania w celach medycznych i w innych celach opierają się na praktyce historycznej. Mimo to jednak w przypadku produktów o charakterze naturalnym często nie jest jasne, jakie powinny być optymalne dawki pozwalające zachować równowagę pomiędzy efektywnością i bezpieczeństwem. Sposób przygotowania substancji botanicznych może różnić się w zależności od producenta, a nawet pomiędzy poszczególnymi seriami przygotowywanymi przez tego samego producenta. Jako że często nie wiadomo dokładnie, jakie są składniki aktywne danego produktu, dokonanie standaryzacji może okazać się niemożliwe, a efekty kliniczne poszczególnych środków leczniczych mogą nie mieć charakteru porównywalnego.

Dane dotyczące dawkowania bazują na tradycyjnym zastosowaniu substancji botanicznej i nie są wsparte dowodami klinicznymi. Generalnie stosowana dawka to 300-200 mg suszonych liści *Ocimum tenuiflorum* L. dziennie w dawce pojedynczej na potrzeby terapii prewencyjnej i 600 – 1800 mg w kilku dawkach w ramach terapii leczniczej. Napary przygotowuje się na bazie 2g suszonych liści na jedną filiżankę wody. Znane są także zastosowania substancji botanicznej zakładające spożycie od 10 do 20 ml soku ze świeżych liści rośliny bądź też 1 uncji (ok. 28 g) suszonego ziela na 16 uncji (ok. 450 g) wody trzy razy dziennie w dawkach po 5 uncji (ok. 140 g, zawierających 3-6 ml świeżego soku bądź 8,7 g suszonego ziela na każdą dawkę); u osób cierpiących na cukrzycę stosuje się dawkę 2,5 g sproszkowanych liści suszonych podawanych doustnie każdego ranka bądź 1 łyżeczkę od herbaty naparu z suszonej rośliny zaparzonej w filiżance gorącej wody trzy razy dziennie. W ramach tradycyjnego leczenia cukrzycy (*diabetes mellitus*) zaleca się uzupełnienie stosowanej diety o świeże liście *Ocimum tenuiflorum* L. podawane w postaci jednej dawki dziennie (2 g/kg masy ciała) przez okres 30 dni, co ma pozwalać na skuteczne obniżenie poziomu glukozy we krwi (Sethi i in., 2008). Ograniczone informacje dotyczące zażywania liści *Ocimum tenuiflorum* L., zarówno w charakterze preparatów medycznych, jak i suplementów diety, pozyskać można także z Internetu. Zalecane dawkowanie produktów komercyjnych waha się w przedziale od 300 do 600 mg świeżych liści na osobę dziennie, co odpowiada dawce w wysokości 5-10 mg/kg masy ciała dziennie.

9. Dane toksykologiczne

Istnieją różne doniesienia na temat korzystnego wpływu omawianej rośliny na zdrowie człowieka; na ich podstawie można wyrobić sobie co najwyżej pośrednią opinię na temat bezpieczeństwa ekstraktów i ekstraktów olejowych z *Ocimum tenuiflorum* L. Istnieje wiele danych o charakterze anegdotycznym oraz lokalnym na temat korzystnych efektów stosowania *Ocimum tenuiflorum* L., pozwalających niekiedy – w sposób pośredni – ocenić, na ile bezpieczne jest stosowanie preparatów na bazie tej rośliny.

Dane dotyczące działania toksycznego oraz związane z nimi dane farmakologiczne w większości przypadków uzyskane zostały w ramach specjalistycznych badań dotyczących konkretnych efektów stosowania preparatów w *Ocimum tenuiflorum* L.; tylko w ramach nielicznych spośród przeprowadzonych badań analizowano kwestię zależności oddziaływania toksycznego od zastosowanej dawki, czego wymaga większość wytycznych (np. EFSA czy JECFA) np. w odniesieniu do suplementów diety czy też wytyczne dotyczące preparatów botanicznych przyjęte przez Komitet Naukowy ds. Żywności EFSA.

Brak jest danych zgromadzonych na potrzeby oceny bezpieczeństwa na podstawie badań dotyczących działania toksycznego bądź rakotwórczego o charakterze ostrym, podostrym, chronicznym i podchronicznym.

Wpływ na proces rozmnażania i płodność u ludzi i zwierząt

Z zażywaniem poszczególnych części *Ocimum tenuiflorum* L. od dawna wiązano występowanie różnych form korzystnego oddziaływania na organizm, natomiast zaledwie kilku badaczy podjęło

próbę szczegółowej analizy zmian zachodzących w układzie rozrodczym w następstwie zażywania ekstraktu z *Ocimum tenuiflorum* L. Zagadnienie zmian histopatologicznych w organach rozrodczych będących następstwem zażywania liści *Ocimum tenuiflorum* L. stało się przedmiotem debaty wśród badaczy (Ahmed i in., 2002a&b; Reghunandan i in., 1997).

Świeże liście *Ocimum tenuiflorum* L. podawano dwa razy w tygodniu w dawce 1g/kg masy ciała przez okres jednego miesiąca dojrzałym płciowo królikom (samcom i samicom). Znaczące zmiany histologiczne jąder, najądrzy, jajników i macicy wystąpiły u zwierząt karmionych liśćmi *Ocimum tenuiflorum* L. W jądrach doszło do degeneracji struktur odpowiedzialnych za proces spermatogenezy; spadła też znacząco ilość plemników w najądrzach. U samic królików karmionych liśćmi *Ocimum tenuiflorum* L. wystąpił obrzęk macicy i przekrwienie we wszystkich warstwach jej ściany oraz zjawisko wzmożonego unaczynienia; dodatkowo zaobserwowano także występowanie krwotocznych ciałek żółtych w jajnikach. Ciąża i poród przebiegały pomyślnie jedynie u tych królików, które kopulowały po upływie miesiąca od zaprzestania podawania im liści *Ocimum tenuiflorum* L. – w przeciwieństwie do tych osobników, które dokonywały kopulacji bezpośrednio po zaprzestaniu podawania im liści tej rośliny (Reghunandan i in., 1997). Fakt ten sugeruje, że skutki zażywania *Ocimum tenuiflorum* L. w określonych warunkach mogą mieć charakter odwracalny.

Ahmed i in. (2002) poddali analizie właściwości antyplodnościowe u szczurów; badanie to jednak dotyczyło ekstraktu benzenowego z liści *Ocimum tenuiflorum* L. (250 mg/kg masy ciała) podawanego przez okres 48 dni. Zaobserwowano spadek ogólnej liczby plemników, ruchliwości plemników oraz szybkości ich przemieszczania się. Odsetek plemników o cechach atypowych był większy w płynie znajdującym się w ogonie najądrza, zanotowano także spadek zawartości fruktozy w płynie nasiennym w najądrzach i pęcherzykach nasiennych. Uzyskane wyniki sugerują, że występujące skutki spożycia substancji są efektem deprywacji androgenów wywołanej przez anty-androgenne działanie liści *Ocimum tenuiflorum* L. Zaobserwowane zjawisko miało charakter odwracalny, jako że wszystkie parametry odzyskały normalne wartości w przeciągu 2 tygodni od momentu zakończenia terapii.

Genotoksyczność i działanie rakotwórcze

Gorący ekstrakt wodny ze świeżych liści *O. tenuiflorum* L. nie wykazał działania mutagennego na bakterie *Bacillus subtilis* H-17(rec) i M-45(rec) przy stężeniu 0,5 ml na płytkę (Ungsurungsie i in., 1982). Brak dodatkowych danych.

Działanie genotoksyczne i rakotwórcze metyloeugenolu zostało obszernie udokumentowane (SCF, 2001; Rietjens i in., 2008).

Badania specjalne poświęcone oddziaływaniu toksycznemu

Wpływ ekstraktu z liści *Ocimum tenuiflorum* L. na zmiany w stężeniu trijodotyroniny (T_3), tyroksyny (T_4) oraz cholesterolu w surowicy, na aktywność glukozy-6-fosfatazy (G-6-P), dyzmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz katalazy (CAT) w wątrobie, na proces peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie oraz na zmiany w zakresie wagi organów płciowych został poddany analizie w ramach badania na myszach (osobniki płci męskiej). Podczas gdy ekstrakt roślinny w dawce wynoszącej 0,5 g/kg masy ciała podawany przez okres 15 dni powodował znaczący spadek stężenia T_4 w surowicy krwi, spowolnienie procesu peroksydacji lipidów w wątrobie oraz zmniejszenie aktywności G-6-P, aktywność endogenicznych enzymów przeciwutleniających, SOD oraz CTA ulegała zwiększeniu. Nie zanotowano znaczących zmian w stosunku zawartości T_3 do T_4 w surowicy oraz w stężeniu cholesterolu w surowicy krwi. Stwierdzono, że ekstrakt z liści *O. tenuiflorum* L. wykazuje działanie przeciwtarczycowe i przeciwutleniające (Panda i Kar, 1998).

10. Ocena bezpieczeństwa na bazie aktualnie posiadanej wiedzy (Poziom A)

W chwili obecnej brak jest jakichkolwiek badań dotyczących działania toksycznego o charakterze ostrym, podostrym, chronicznym i podchronicznym oraz badań dotyczących ewentualnej rakogenności. Badania dotyczące cech genotoksycznych, które zostały do tej pory przeprowadzone, są niewystarczające, podobnie jak badania odnoszące się do oddziaływania na układ rozrodczy oraz płodność. Jedno z przeprowadzonych badań wykazało wpływ na hormony tarczycy (spadek poziomu hormonów), aczkolwiek stosunek poziomu T_3 do T_4 pozostał niezmienny, a poziom niektórych enzymów wątroby uległ zwiększeniu; badanie to jednak nie miało na celu dokonania oceny bezpieczeństwa *Ocimum tenuiflorum* L. Z przyczyn powyższych należy stwierdzić, że konieczne jest uzyskanie dodatkowych informacji w celu dokonania oceny bezpieczeństwa w odniesieniu do *Ocimum tenuiflorum* L. oraz sporządzonych na bazie tego gatunku preparatów.

Grupa Robocza pragnie zauważyć, że niniejsza ocena bezpieczeństwa nie odnosi się do metyloeugenolu, związku chemicznego znanego z właściwości genotoksycznych i rakotwórczych (SCF 2001), którego zawartość w ekstraktach z suszonych liści *Ocimum tenuiflorum* L. wynosi do 86%.

11. Konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów i/lub pozyskania dodatkowych danych. (Poziom B)

Konieczne jest uzyskanie bardziej klarownego obrazu sytuacji w odniesieniu do właściwości teratogennych omawianej rośliny i jej wpływu na układ rozrodczy. Ponieważ istnieją dane wskazujące na wpływ substancji botanicznej na płodność zwierząt, konieczne jest przeprowadzenie odpowiedniego badania obejmującego analizę wpływu na układ rozrodczy i ciążę w celu dokonania pełnej oceny bezpieczeństwa substancji. Ponadto konieczne jest przeprowadzenie co najmniej badania toksyczności na poziomie podchronicznym kładącego szczególny akcent na funkcje i morfologię tarczycy.

Jako że brak jest obecnie właściwych danych dotyczących genotoksyczności, konieczne jest także przeprowadzenie dodatkowych badań wskazanych w treści wytycznych w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych oraz w treści wytycznych OECD.

W momencie, gdy dokonywana będzie pełna ocena oddziaływania gatunku *Ocimum tenuiflorum* na organizm, należy także wziąć pod uwagę obecność metyloeugenolu.

PRZYPISY

- Adhvaryu, M.R., Reddy, N. and Parabia, M.H. (2007). Effects of four Indian medicinal herbs on isoniazid-, rifampicin-, and pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. *World Journal of Gastroenterology*, **13**, 3199-3205.
- Ahmed, M., Khan, M.Y. and Khan, A.A. (2002a). Effects of *Ocimum sanctum* (Tulsi) on the reproductive system, an update review. *Biomedical Research*, **13**, 63-67.
- Ahmed, M., Ahamed, N., Aladakatti, R.H. and Ghosesawar, M.G. (2002b). Reversible anti/fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. *J. Basic & Clinical Physiology & Pharmacology*, **13**, 51-59.
- Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneider, G. (1998). EDs. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Folgeband 3: Drogen L-Z, 5th ed., Springer-Verlag. Heidelberg, Germany, 538 pgs.
- Brophy, J. and Jogia, M.K. (1984) Essential oils from two varieties of Fijian *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Fiji Agriculture Journal*, **46**, 21 -26.
- Gupta P., Yadav D.K., Siripurapu K.B., Palit G., Maurya R. (2007) Constituents of *Ocimum sanctum* with Antistress Activity. *J. Nat. Prod.* **70** (9), 1410–1416.
- Kamboj, V.P. (1988). A review of Indian medicinal plants with interceptive activity. *Ind. J. Medical Research*, **81**, 336-355.
- Khanna, N. and Bhatia, J. (2003). Antinociceptive action of *Ocimum sanctum* (Tulsi) in mice, possible mechanisms involved. *J. Ethnopharmacology*, **88**, 293-296.
- Lal, R.N., Sen, T.K., Nigam, M.C. (1978). Gas chromatography of the essential oil of *Ocimum sanctum* L., *Parfümerie und Kosmetiks*, **59**, 230-231
- Maheshwari, M.L., Singh, B.M, Gupta, R. and Chien M. (1987). Essential oil of sacred basil (*Ocimum sanctum*). *Indian Perfumer*, **31**, 137-145.
- Materia medika Indonesia (1995). Jilid VI, Jakarta, Departemen Kesehatan, Republik Indonesia, 1995.
- Panda, S. and Kar, A. (1998). *Ocimum sanctum* leaf extract in the regulation of thyroid function in the male mouse. *Pharmacological Research*, **38**, 107-110.
- Reghunandan, R., Sood, S., Reghunandan, V., Arora, B.B., Gopinathan, K., Mahajan, K.K. (1997). Effects of feeding *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaves on fertility in rabbits. *Biomedical Research Aligarh*, **8**, 187-191.
- Rietjens, I.M.C.M., Slob, W., Galli, C., Silano, V. (2008) Risk assessment of botanicals and botanical preparations intended for use in food and food supplements: Emerging issues. *Toxicology Letters* **180** (2008) 131-136
- SCF, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol (4-Allyl-1,2-dimethoxybenzene). (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out102_en.pdf)
- Sethi, J., Sood, S., Seth, S. and Talwar, A. (2008). Evaluation of hypoglycaemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum*. *Biochemical and Life Sciences*, **19**, 152-155.
- Searchable World Wide Web Multilingual Multiscript Plant Name Database (MMPND), 2008 (see: <http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Ocimum.html#tenuiflorum>).
- Sharma, M., Kishore, K., Gupta, S.K., Joshi, S., Arya, D.S. (2001). Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **225**, 75-83.

- Shetty, S., Udupa, S. and Udupa, L. (2008). Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* (L.) in rats. Evidence-based complementary and alternative medicine. *eCam*, **5**, 95-101.
- Silva, M.V.; Vieira, I.G.; Mendes, F.N.; Albuquerque, I.L.; dos Santos, R.N.; Silva, F.O.; Morais, S.M. (2008). Variation of Ursolic Acid Content in Eight *Ocimum* Species from Northeastern Brazil. *Molecules*, **13**, 2482-2487
- Suddee, S. (2001). A Taxonomic Revision of tribe Ocimeae Dumort. (Labiatae) in continental South East Asia. PhD Thesis. Dublin: Trinity College, Dublin. 408 pp. (under: http://www.dnp.go.th/Botany/publication%20online/SS_thesis/Chapter5/Ocimum.htm)
- Sukari, M.A., Takahashi, S. (1988). Biological activity of some Malaysian plant extracts. *Pertanika*, **11**, 249/253.
- Ungsurungsie, M i in. (1982). Mutagenicity screening of popular Thai spices. *Food and Cosmetic Toxicology*, **20**, 527-530.
- WHO (2002) *Folium Ocimi Sancti*, WHO monographs on selected medicinal plants, **2**, 206-216. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

ZAŁĄCZNIK D: *FOENICULUM VULGARE* MILL. SSP. *VULGARE* VAR. *VULGARE*

Niniejszy załącznik dotyczy ekstraktów z suszonych owoców *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare* oraz zawartości estragolu i *trans*-anetolu w takich ekstraktach.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przeprowadzenie próby proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa środków i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie ma on na celu stanowić formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanego środka bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter środków i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy, ani też nie może być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma on na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanego środka botanicznego ani też wszystkich możliwych jego składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa środka botanicznego. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Nazwa i charakterystyka materiału źródłowego

Nazwa naukowa:	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i>
Synonimy:	<i>Anethum foeniculum</i> L., <i>Anethum foeniculum</i> L. var. <i>vulgare</i> Schkuhr, <i>Foeniculum officinale</i> All. var. <i>silvestre</i> Alef., <i>Foeniculum vulgare</i> subsp. <i>silvestre</i> (Brot.) Janchen, <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>silvestre</i> Presl, <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> (nazwa nie naukowa)
Nazwy zwyczajowe:	Fenkuł włoski, koper włoski (pol.), bitter fennel, common fennel (ang.), fenouil amer (fr.), Bitterfenchel, Wilder Fenchel, Dunkler Fenchel (niem.), Finocchio comune, F. forte, F. selvatico (wł.), Hinojo amargo (hiszp.)
Rodzina:	Baldaszkowate (selerowate)
Część wykorzystywana:	Suszone rozłupnie i rozpluki w całości (owoce) (ekstrakt wodny)
Pochodzenie geograficzne:	Roślina typowa dla regionu śródziemnomorskiego oraz regionów o umiarkowanym klimacie w Azji, wprowadzona i rozpowszechniona w regionach podzwrotnikowych, Europie i Ameryce Płn., uprawiana na całym świecie.
Warunki uprawy i zbioru:	Roślina zostaje poszatkowana w całości w momencie, gdy owoce są dojrzałe.

2. Proces wytwarzania

Po zakończeniu zbiorów dojrzałe owoce zostają wysuszone na słońcu i oddzielone w procesie młócenia.

W procesie produkcyjnym z owoców uzyskuje się maks. 5% olejku eterycznego (Grieve, 1984; Uphof, 1959).

3. Skład chemiczny

Foeniculum vulgare Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare* (fenkuł włoski, koper włoski) zawiera 2-6% olejku eterycznego (Farmakopea Europejska, 2005).

Najważniejszym składnikiem olejku eterycznego jest *trans*-anetol w stężeniu 50-75%. Pozostałe składniki olejku eterycznego to estragol (3,5-12%), fenchon (12-25%), limonen (1-2%), α -pinen (1-5%) oraz inne monotereny, zazwyczaj w każdym przypadku w stężeniu poniżej 1%.

Skład chemiczny olejku eterycznego zależy od miejsca pochodzenia oraz fazy dojrzewania owoców. W olejku eterycznym występują dodatkowo kwasy tłuszczowe (10-20%) (duże stężenie kwasu *cis*-6-oktadekanowego), kwasy fenylokarboksylowe oraz flawonoidy).

W Tabeli 7 przedstawiono wartości stężeń estragolu w substancjach smakowych pochodzenia naturalnego (Rada Europy, 2006). Na podstawie danych zawartych w Tabeli 7 można stwierdzić, że *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare* nie jest jedynym źródłem estragolu w codziennej diecie.

Tabela 7: Podstawowe wartości stężeń estragolu w substancjach smakowych pochodzenia naturalnego (Rada Europy, 2006)

Nazwa botaniczna	Nazwa zwyczajowa	Stężenie olejku eterycznego w	Stężenie estragolu w olejku	Stężenie estragolu w wykorzystyw
<i>Artemisia dracuncululus</i> L. (astrowate)	Bylica draganek	0,25-1 (zióło)	60-75	0,7
<i>Ocimum basilicum</i> L. (jasnotowate)	Bazyliawonna	0,8 (zióło)	20-89	ok. 0,4
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> var. <i>dulce</i> (Mill.) Batt. (syn. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. var. <i>dulce</i> (Mill.) Batt. et Trab.) (selerowate)	Koper słodki, koper włoski		1,5-5,0	
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i> (syn. <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i>) (selerowate)	Koper gorzki, koper zwyczajny	2-6 (owoce)	3,5-12,0	0,3
<i>Pimpinella anisum</i> L. (selerowate)	Biedrzyeniec anyż,	1-4 (owoce)	1-5	maks. 0,04
<i>Illicium verum</i> Hook. f. (magnoliowate)	Badian właściwy,	5 (owoce)	5-6	maks. 0,25
<i>Agastache foeniculum</i> (Pursh.) Ktze. (syn. <i>Lophanthus anisatus</i> . A. <i>anethiodora</i> , A. <i>anisata</i>) (jasnotowate)	Kłosowiec anyżowy, kłosowiec fenkułowy		74	

<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. ssp. <i>cerefolium</i> (selerowate)	Trybula ogrodowa	0,9 (owoce)	do 85	maks. 0,8
<i>Melissa officinalis</i> L. (jasnotowate)	Melisa lekarska		6,3	
<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop. (selerowate)	Marchewnik anyżowy		do 75	

^aZgodnie z opracowaniem Rady Europy (1998a) oraz pobocznymi opracowaniami literaturowymi.

^bZgodnie z opracowaniem Leung (1980), Rady Europy (1997a) oraz Rady Europy (1995).

Fenchon to substancja o gorzkim smaku, natomiast *trans*-anetol to związek aromatyczny, który odpowiada za charakterystyczny, „lukrecjowy” smak anyżu, fenkułu, anyżu gwiazdzistego oraz mirtu anyżowego. Związek ten jest znany również pod nazwą p-propenyloanizol, kamfora anyżowa, izoestragol lub olejek anyżowy (Bown, 1995). Proporcje obu składników zależą od szczepu i regionu. Olejek pochodzący z roślin uprawianych w basenie Morza Śródziemnego oraz w południowej Europie jest zazwyczaj słodki, natomiast olejek z roślin rosnących w Europie środkowej i północnej jest zazwyczaj lekko gorzkawy (Bown, 1995). Jakość olejku zależy również od stopnia wysuszenia owoców - olejek uzyskany z całkowicie dojrzałych i wysuszonych owoców jest bardziej słodki i aromatyczny.

Stężenie *trans*-anetolu i estragolu w owocach fenkułu może różnić się w znacznym stopniu w zależności od pochodzenia geograficznego, dojrzałości rośliny podczas zbiorów, techniki zbioru, warunków magazynowania, metody obróbki (np. suszenie) oraz metody ekstrakcji (np. ekstrakcja za pomocą CO₂ w porównaniu do ekstrakcji za pomocą CH₂Cl₂) (Smith i in., 2002).

Najważniejsze związki występujące w owocach i olejku eterycznym z kopru gorzkiego, które wzbudzają obawy związane z ich właściwościami toksykologicznymi to estragol i *trans*-anetol. W związku z powyższym ocenę bezpieczeństwa można przeprowadzić pod kątem powyższych związków.

4. Specyfikacje

Stwierdzono, że stężenie estragolu w olejku eterycznym wynosi od 2 do 8% (Farmakopea Europejska, 2005). Biorąc pod uwagę, że owoce mogą zawierać do 6% olejku eterycznego (Farmakopea Europejska, 2005), stężenie estragolu w owocach wynosi 1200-4800 mg/kg. Skład olejku eterycznego może różnić się w zależności od pochodzenia geograficznego, dojrzałości rośliny podczas zbiorów, techniki zbioru, warunków magazynowania, metody obróbki (np. suszenie) oraz metody ekstrakcji (np. ekstrakcja za pomocą CO₂ w porównaniu do ekstrakcji za pomocą CH₂Cl₂) (Smith i in., 2002).

Stężenie *trans*-anetolu w olejku eterycznym wynosi 50-75% (Farmakopea Europejska, 2005). Biorąc pod uwagę, że owoce zawierają 2-6% olejku eterycznego, stężenie *trans*-anetolu w owocach wynosi 10000-45000 mg/kg.

5. Stabilność substancji botanicznej/preparatu botanicznego

Powszechnie wiadomo, że pod wpływem promieniowania UV *trans*-anetol w olejku eterycznym może izomeryzować do *cis*-anetolu, który jest bardziej toksyczny. Zjawisko izomeryzacji zazwyczaj nie występuje w owocach.

6. Proponowane zastosowania i stężenia

W niektórych krajach napoje w postaci naparów z owoców kopru gorzkiego lub olejku z kopru gorzkiego, częściowo w postaci herbat rozpuszczalnych ze zmniejszonym stężeniem estragolu, są stosowane u dzieci i niemowląt jako środek wiatropędny.

Monografia EMEA w sprawie owoców/nasion kopru gorzkiego (EMEA, 2007b) wskazuje, że u dorosłych można stosować pojedyncze dawki w ilości 1,5-2,5 g (świeżo) rozdrobnionych owoców, zalanych 0,25 l gotującej się wody (czas parzenia: 15 min), trzy razy na dobę w postaci naparu.

W przypadku dzieci w monografii podano średnią dawkę w ilości 3-5 g (świeżo) rozdrobnionych owoców w postaci naparu, podawany w trzech dawkach, w przypadku krótkiego okresu stosowania (poniżej 1 tygodnia), ze wskazaniem również, że stosowanie nie jest zalecane u dzieci poniżej 4 r.ż.

Zgłoszone zastosowania owoców kopru gorzkiego jako środka aromatyzującego (Burdock, 1995): produkty pieczone 130 mg/kg, tłuszcze i oleje 260 mg/kg, produkty mięsne 1200 mg/kg, przekąski 700 mg/kg, napoje alkoholowe 300 mg/kg, sosy 190 mg/kg (wartości zaokrąglone). Dane z opracowania Leunga i Fostera (1996) potwierdzają, że powyższe informacje odnoszące się do stężenia użytkowego dotyczą owoców.

7. Informacje dotyczące istniejących badań

Koper gorzki

Ocena kopru gorzkiego została przeprowadzona przez EMEA w 2007 r. i dostępne są opracowania monograficzne dotyczące zarówno olejku eterycznego (EMEA, 2007a), jak i owoców/nasion (EMEA, 2007b).

Foeniculum vulgare został dopuszczony do użytku w suplementach diety w Belgii (na mocy dekretu królewskiego). We Włoszech przeprowadzono ocenę pod kątem stosowania w suplementach diety.

Trans-anetol

JECFA uzyskała tymczasową wartość ADI równą 0-2,0 mg/kg mc w przypadku trans-anetolu, na podstawie czego wysunięto wniosek, że obecne poziomy spożycia w charakterze substancji smakowej nie budzą obaw w zakresie bezpieczeństwa (JECFA, 1998).

Dane naukowe dotyczące oceny bezpieczeństwa trans-anetolu (tzn. 4-metoksypropenylobenzen) jako substancji smakowej zostały ocenione przez panel ekspertów FEMA (Newberne i in., 1999). Stwierdzono, że ponieważ trans-anetol ulega wydajnej detoksyfikacji metabolicznej u ludzi w przypadku niskich stężeń, wpływ nowotworowy u szczurów, związany z hepatotoksycznością zależną od dawki, nie wskazuje na istotne ryzyko dla zdrowia ludzi w wyniku stosowania trans-anetolu jako substancji smakowej.

Trans-anetol został dopuszczony do obrotu przez amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (FDA) jako bezpośredni dodatek smakowy do produktów spożywczych przeznaczonych dla ludzi oraz sklasyfikowany przez panel ekspertów Stowarzyszenia Producentów Substancji Smakowych i Ekstraktów (FEMA) jako substancja GRAS (ogólnie uznana jako bezpieczna) w przypadku stosowania jako substancja smakowa (Newberne i in., 1999).

Estragol

SCF i Rada Europy opublikowały oceny naukowe estragolu (SCF, 2001; Rada Europy, 2006), w których stwierdzono, że estragol jest genotoksyczny i rakogenny, oraz podano ograniczenia dotyczące jego stosowania.

EMEA opublikowała oświadczenie w sprawie stosowania ziołowych produktów leczniczych zawierających estragol (EMEA, 2005), stwierdzając, że estragol stanowi naturalnie występującą ~~genotoksyczną substancję rakogenną, jednakże przy niskim poziomie narażenia wskutek~~
Dziennik EFSA 2009;

spożywania ziołowych produktów leczniczych (krótki okres stosowania u dorosłych przy zalecanym schemacie podawania) nie stwarza istotnego ryzyka wystąpienia raka. Powyższy wniosek jest zgodny z pracą Smitha i in. (2002), który opublikował ocenę bezpieczeństwa pochodnych aliloalkoksybenzenu, w tym estragolu, stosowanych jako substancje smakowe. Grupa Robocza stwierdza, że powyższe oceny stanowiły jakościowe oceny bezpieczeństwa.

Grupa Robocza stwierdza, że monografia EMEA zawiera wnioski dotyczące bezpieczeństwa preparatów, oceniając napary z owoców (ekstrakty wodne), przy czym przyjmuje się, że ekstrakty lipofilowe i olejki eteryczne zawierają estragol w większym stężeniu.

Monografia EMEA w sprawie owoców / nasion kopru gorzkiego (EMEA, 2007b) zawiera również wnioski, że ryzyko genotoksyczne związane z estragolem nie jest istotne w określonych warunkach stosowania ze względu na niewielką ilość obecną w naparach ziołowych kopru, chociaż nie przeprowadzono ilościowej oceny ryzyka.

Estragol został dopuszczony do obrotu przez amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (FDA) jako bezpośredni dodatek smakowy do produktów spożywczych przeznaczonych dla ludzi oraz sklasyfikowany przez panel ekspertów Stowarzyszenia Producentów Substancji Smakowych i Ekstraktów (FEMA) jako substancja GRAS (ogólnie uznana jako bezpieczna) w przypadku stosowania jako substancja smakowa (Hall i Oser, 1965).

W ostatnim czasie Unia Europejska zaktualizowała bieżące przepisy dotyczące substancji smakowych w świetle nowych danych technicznych i naukowych. Opracowane w ten sposób Rozporządzenie nr 1334/2008, mające zastosowanie od 20 stycznia 2011 r., zakazuje stosowania estragolu w produktach spożywczych. Dla przypadku określonych rodzajów żywności w rozporządzeniu określono maksymalne stężenia estragolu stosowanego jako dodatek smakowy lub składnik produktów spożywczych o właściwościach smakowych, który zawiera daną substancję (Tabela 2). Powyższym rozporządzeniem nie są objęte surowe środki spożywcze, które nie zostały poddane przetworzeniu, jednoskładnikowe środki spożywcze, takie jak przyprawy, zioła, herbaty, napary (np. herbaty owocowe lub ziołowe) ani mieszanki przypraw lub ziół, mieszanki herbat ani mieszanki naparów, o ile są spożywane jako takie i nie są dodawane do środków spożywczych (Unia Europejska, 2008).

Tabela 8: Maksymalne dopuszczalne stężenie estragolu (1-alilo-4-metoksybenzenu) w Europie, naturalnie występującego w środkach aromatyzujących i składnikach spożywczych o właściwościach aromatyzujących, w określonych jednoskładnikowych środkach spożywczych spożywanych jako takie, do których są dodawane środki aromatyzujące i/lub składniki spożywcze o właściwościach aromatyzujących

Wieloskładnikowe środki spożywcze podlegające ograniczeniom dotyczącym stężenia estragolu	Maksymalne stężenie [mg/kg]
Produkty nabiałowe	50
Przetwory owocowe, warzywne (w tym z grzybów, korzeni, bulw, jadalnych nasion roślin strączkowych i roślin strączkowych), z jadalnych orzechów i nasion	50
Produkty rybne	50
Napoje bezalkoholowe	10

Zródło: Unia Europejska, 2008

8. Poziom narażenia

Spożycie estragolu i trans-anetolu występujących w owocach kopru gorzkiego

Wydaje się, że rodzajem kopru najczęściej stosowanym jako przyprawa jest koper zwyczajny (np. koper gorzki). Jednakże, zgodnie z Amerykańską Farmakopeą Narodową (USA) oraz Kodeksem środków chemicznych stosowanych w produktach spożywczych (USA) olej z kopru gorzkiego jest stosowany wyłącznie w ograniczonym zakresie, głównie w kosmetykach (Leung i Foster, 1996).

Narażenie na estragoli trans-anetol występujące w owocach kopru gorzkiego można oszacować przy założeniu, że do przygotowania herbaty koprowej stosuje się 4,5-7,5 g (3 x 1,5-2,5 g) owoców kopru na dobę. Przy założeniu, że owoce zawierają 5% olejku eterycznego, że wydajność ekstrakcji olejku eterycznego wynosi 25-35% oraz że olejek zawiera 3,5-12% estragolu oraz 50-75% trans-anetolu, można przyjąć dobowe spożycie estragolu w stężeniu 1,9-15,8 mg oraz trans-anetolu w stężeniu 28-98 mg. W przypadku osoby o wadze 60 kg to odpowiada spożyciu na poziomie 33-263 g estragolu/kg mc/dobę oraz 0,5-1,6 mg trans-anetolu/kg mc/dobę.

9. Dane toksykologiczne

Dane z dotychczasowych ocen

Trans-anetol

Najczęściej odnotowywane działanie farmakologiczne trans-anetolu to obniżenie sprawności motorycznej, obniżenie temperatury ciała oraz działanie usypiające, przeciwbólne i przeciwkonwulsyjne. Właściwości toksykologiczne trans-anetolu zostały ocenione przez JECFA, przy czym określono wartość ADI równą 0-2 mg/kg. JECFA wydała opinię, że „stosowanie substancji jako środka aromatyzującego przy obecnym poziomie spożycia nie wzbudza obaw” (JECFA, 1998).

W monografii EMEA (EMEA, 2007a) stwierdzono, że ze względu na działanie estrogenne nadmierne dawki olejku koprowego mogą oddziaływać na terapię hormonalną, doustne środki antykoncepcyjne oraz zastępczą terapię hormonalną. Stwierdzono również, że dane dotyczące aktywności estrogennej trans-anetolu i ekstraktu acetonowego kopru i działania

przeciwkoncepcyjnego trans-anetolu zostało potwierdzone *in vitro* na zwierzętach laboratoryjnych w wysokich stężeniach, z tym że dane te nie dotyczą narażenia ludzi w przypadku przestrzegania zalecanych stężeń i warunków stosowania (EMEA, 2007a).

Estragol

Estragol to alkenylobenzen, który może budzić zastrzeżenia dotyczące bezpieczeństwa jego stosowania ze względu na stwierdzone działanie rakogenne w wysokich stężeniach (SCF, 2001).

EMEA opublikowała oświadczenie w sprawie stosowania ziołowych produktów leczniczych zawierających estragol (EMEA, 2005), stwierdzając, że estragol stanowi naturalnie występującą genotoksyczną substancję rakogeną, jednakże przy niskim poziomie narażenia wskutek spożywania ziołowych produktów leczniczych (krótki okres stosowania u dorosłych przy zalecanym schemacie podawania) nie stwarza istotnego ryzyka wystąpienia raka. Powyższy wniosek jest zgodny z pracą Smitha i in. (2002), który opublikował ocenę bezpieczeństwa pochodnych aliloalkoksybenzenu, w tym estragolu, stosowanych jako substancje aromatyzujące.

Monograf EMEA w sprawie owoców / nasion kopru gorzkiego (EMEA, 2007b) zawiera również wnioski, że ryzyko genotoksyczne związane z estragolem nie jest istotne w określonych warunkach stosowania ze względu na niewielką ilość obecną w naparach ziołowych kopru.

Rakogenność estragolu

W opinii SCF zaprezentowano przegląd danych toksykologicznych dotyczących estragolu (SCF, 2001). Stwierdzono, że związek ten jest zarówno genotoksyczny, jak i rakogeny. U różnych gatunków obserwowano indukcję raka wątroby. Z danych wskazanych w opinii SCF jedno badanie jest szczególnie użyteczne do dalszej oceny kopru gorzkiego i jego owoców.

Grupy ok. 50 myszy CD-1 płci żeńskiej, w wieku ok. 8 tygodni, utrzymywano przez 12 miesięcy na karmie z ziaren zawierających 2300 lub 4600 mg/kg estragolu i oznaczono ilościowo częstość występowania raka wątroby (Miller i in., 1983). Wyniki powyższego badania przedstawiono w Tabeli 3 (zob. też SCF, 2001). Tabela 4 zawiera wyniki z analizy dawki porównawczej (BMD) wykonanej z użyciem programu EPA BMD (wersja 1.4.1c).

Tabela 9: Przegląd danych z pracy Millera i in. (1983) dotyczących częstości występowania raka wątroby u myszy płci żeńskiej otrzymującej przez 12 miesięcy pokarm zawierający estragol

dawka	szacunkowa dawka [mg/kg mc/dobę]	liczba zwierząt	liczba mysz z rakiem wątroby	częstość występowania
0	0	43	0	0
0,23% w pokarmie	150-300	48	27	56
0,46% w pokarmie	300-600	49	35	71

Tabela 10: Wyniki analizy BMD na podstawie danych z pracy Millera i in. (1983) dotyczących częstości występowania raka wątroby u szczurów płci żeńskiej otrzymujących przez 12 miesięcy pokarm zawierający estragol (Tabela 3), z zastosowaniem BMDS wersja 1.4.1c, oraz domyślnych ustawień dotyczących dodatkowego ryzyka, odpowiedzi odniesienia (BMR) przy 10% i 95% przedziale ufności. W ramach najbardziej pesymistycznego scenariusza zastosowano najniższe stężenie w badanym zakresie (tzn. odpowiednio 150 i 300 mg/kg mc).

Płeć myszy	Model	Liczba parametrów	Prawdopodobieństwo [log]	Przyjęto	BMD ₁₀ [mg/kg mc/dobę]	BMDL ₁₀ [mg/kg mc/dobę]

płci żeńskiej	zerowy	1	-96,1243			
płci żeńskiej	pełny	3	-62,2103			
płci żeńskiej	dwuetapowy	1	-62,7403	tak	22,4	18,1
płci żeńskiej	gamma	1	-62,7403	tak	22,4	18,1
płci żeńskiej	log-logistyczny	1	-62,2124	tak	13,1	9,2
płci żeńskiej	log-probitowy	1	-62,7928	tak	40,7	32,7
płci żeńskiej	Weibulla	1	-62,7403	tak	22,4	18,1

Na podstawie powyższego można wnioskować, że wartości BMDL10 mieszczą się w zakresie od 9 do 33 mg/kg mc/dobę u myszy płci żeńskiej.

10. Ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnych informacji (Poziom A)

Koper jest powszechnie stosowany jako domowy środek leczniczy, wobec którego utrzymuje się, że jest przydany w leczeniu różnych dolegliwości, szczególnie tych związanych z układem pokarmowym (Wicht, 1989; Leung & Fosters, 1996). Można stosować również owoce, liście i korzenie, jednakże owoce są najbardziej istotne pod względem leczniczym i stanowią część normalnie wykorzystywaną. Z owoców często jest ekstrahowany olejek eteryczny.

Roślina ta ma działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwskurczowe, aromatyzujące, wiatropędne, moczopędne, wywołujące miesiączkę, wykrztuśne, mlekopędne, halucynogenne, przeczyszczające, pobudzające i żołądkowe (Emboden, 1979; Chiej, 1984; Grieve, 1984; Launert 1981; Bown, 1995). Koper gorzki jest często dodawany do środków przeczyszczających w celu uśmierzania tendencji powodowania kolki jelitowej oraz poprawy smaku. Olejek eteryczny ma właściwości bakteriobójcze, wiatropędne i pobudzające (Duke i Ayensu, 1985). Wcześniej roślina ta była stosowana jako środek dezynfekujący i zapachowy¹.

Trans-anetol

Poziom spożycia trans-anetoli z owoców kopru gorzkiego można ocenić w oparciu o tymczasową wartość ADI równą 0-2,0 mg/kg mc w przypadku trans-anetolu, na podstawie czego wysunięto wnioski, że obecne poziomy spożycia w charakterze substancji smakowej nie budzą obaw w zakresie bezpieczeństwa (JECFA, 1998).

Narażenie na trans-anetol występujący w owocach kopru gorzkiego można oszacować przy założeniu, że do przygotowania herbaty koprowej stosuje się 4,5-7,5 g (3 x 1,5-2,5 g) owoców kopru na dobę. Przy założeniu, że owoce zawierają 5% olejku eterycznego, że wydajność ekstrakcji olejku eterycznego wynosi 25-35% oraz że olejek zawiera 3,5-12% estragolu oraz 50-75% trans-anetolu, można przyjąć dobowe spożycie trans-anetolu wynosi 28-98 mg. W przypadku osoby o masie ciała 60 kg to odpowiada spożyciu na poziomie 0,5-1,6 mg trans-anetolu/kg mc/dobę. To jest poniżej wartości ADI równej 0-2,0 mg/kg mc, zgodnie z ustaleniami JECFA. Grupa Robocza stwierdza, że narażenie na trans-anetol w wyniku stosowania owoców kopru gorzkiego w procesie przygotowania herbaty koprowej stanowi 25-80% wartości ADI, przy czym występują również inne źródła trans-anetolu.

¹ Zob. [D:\Ewa\Tłumaczenia\Lidex\Grudzień 2013\107612\efsa\http://www.pfaf.org/database/plants.php?Foeniculum+vulgare+azoricum](http://www.pfaf.org/database/plants.php?Foeniculum+vulgare+azoricum)

Estragol

Owoce kopru gorzkiego i ich ekstrakty zawierają również estragol, który ma charakter zarówno genotoksyczny, jak i rakogeny. To wyłącza możliwość domniemania bezpieczeństwa na podstawie dostępnych danych i historii bezpiecznego użycia.

Ważną kwestią jest to, w jaki sposób należy postępować z roślinami i substancjami roślinnymi, które zawierają substancje będące zarówno genotoksyczne, jak i rakogenne.

Przewodnik EFSA² zawiera następujące wytyczne:

„W przypadku gdy dostępne są wartości dotyczące wpływu na zdrowie lub gdy składnik roślinny zawiera substancje zarówno genotoksyczne, jak i rakogenne, można stosować metodę marginesu bezpieczeństwa (MOE) (EFSA, 2005), obejmującą badane substancje roślinne oraz dowolne inne źródła narażenia poprzez żywność. Podejście MOE umożliwia porównanie poziomu efektu toksycznego z poziomem narażenia u ludzi. Zamiennie można ocenić, czy oczekiwany poziom narażenia na składniki genotoksyczne i rakogenne nie wzrośnie w istotnym stopniu w porównaniu do spożycia substancji pochodzących z innych źródeł.

W przypadku powołania się na efekt matrycowy w celu uzasadnienia bezpieczeństwa związków w określonym stężeniu (np. utrzymując, że dane dla czystych związków powodują zawyżenie wpływu związku w matrycy botanicznej), należy przedstawić odpowiednie wyniki badań i/lub inne dane na potwierdzenie występowania efekty matrycy w preparacie oraz jego wielkości.”

To oznacza, że konieczne są dodatkowe dane w celu oceny ryzyka wynikającego ze stężenia estragolu obecnego w owocach kopru gorzkiego i ich ekstraktach, w tym szacunkowej wartości MOE, a także informacji o efekcie matrycowym.

Margines narażenia

Metoda marginesu narażenia (MOE) została opracowana przez EFSA jako zharmonizowane podejście do oceny ryzyka związanego ze stosowaniem substancji, które są jednocześnie genotoksyczne i rakogenne (EFSA, 2005). Podejście MOE wykorzystuje punkt odniesienia, zazwyczaj określony na podstawie danych z badań na zwierzętach, który stanowi dawkę powodującą niewielką, lecz mierzalną odpowiedź nowotworu. W tym charakterze można wykorzystać np. BMDL10 (dolna granica 95% przedziału ufności dawki wyznaczającej stanowiącej 10% dla wystąpienia odpowiedzi nowotworu). MOE jest określona jako stosunek pomiędzy powyższym punktem odniesienia, BMDL10, a szacunkowym spożyciem w żywności (EDI) u ludzi.

EFSA wyjaśniła już, że punkt odniesienia należy porównać z różnymi szacunkowymi wartościami spożyci u ludzi, uwzględniając różne schematy pobierania w żywności (EFSA, 2005).

Narażenie na estragol występujący w owocach kopru gorzkiego można oszacować przy założeniu, że do przygotowania herbaty koprowej stosuje się 4,5-7,5 g (3 x 1,5-2,5 g) owoców kopru na dobę, co odpowiada 33-263 µg estragolu/kg mc/dobę dla osoby o masie ciała 60 kg.

Stosowanie wartości BMDL10 w ilości 9-33 mg/kg mc/dobę u myszy płci żeńskiej, zgodnie z pracą Millera i in. (Miller i in., 1983) (zob. Tabela 10 powyżej), można obliczyć MOE na poziomie 34-1000, co wskazuje, że użycie owoców kopru gorzkiego do przygotowania herbaty koprowej stanowi wysokopriorytetową kwestię w zarządzaniu ryzykiem.

² Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true;
Dziennik EFSA 2009;

Efekt matrycowy

Można zadać pytanie, czy badanie z zastosowaniem czystych związków podawanych metodą karmienia przymusowego, przy braku normalnej matrycy żywieniowej, stanowią dobry punkt wyjściowy dla oceny ryzyka związanego ze składnikami roślinnymi.

W ostatnim czasie Jeurissen i in. (2008) wykazali, że stężeniu wiążącego DNA bezpośredniego metabolitu rakogenego, 1^o-hydroksyestragolu, do DNA *in vitro* a także do DNA w nienaruszonych komórkach rakowych HepG2 u ludzi można przeciwdziałać za pomocą ekstraktu metanolowego bazylii. Podobny efekt można uzyskać poprzez dodatek pentachlorofenolu, inhibitora SULT, do środka inkubacyjnego. Ponieważ przeciwdziałanie za pomocą ekstraktu bazylii przypomina przeciwdziałanie za pomocą pentachlorofenolu, inhibitora SULT, oraz ponieważ przeciwdziałania takiego nie zaobserwowano w inkubacjach z bezpośrednim elektrofilem, 1^o-acetoksyestragolem, stwierdzono, że przeciwdziałanie za pomocą ekstraktu bazylii występuje na poziomie bioaktywacji 1^o-hydroksyestragolu, zapośredniczonej przez SULT, do 1-sulfoksyestragolu (Jeurissen i in., 2008). Chociaż należy jeszcze ustalić, czy podobne przeciwdziałanie będzie występować w warunkach *in vivo*, przeciwdziałanie bioaktywacji 1^o-hydroksyestragolu, zapośredniczonej przez SULT, za pomocą składników bazylii sugeruje, że możliwości bioaktywacji i późniejszych działań niepożądanych mogą być mniejsze przy dawkowaniu estragolu w matrycy innych składników bazylii niż oczekuje się na podstawie doświadczeń obejmujących dawkowanie estragolu jako pojedynczego związku.

W przeciwieństwie do wyników z użyciem ekstraktu metanolowego bazylii, Müller i in. (1994) wykazali, że potencjał genotoksyczny estragolu nie jest maskowany przez składniki olejku bazyliowego. Potencjał genotoksyczny olejku bazyliowego i estragolu porównano w nieplanowanym teście syntezy DNA (UDS), z użyciem olejku bazyliowego o 88% zawartości estragolu, i stwierdzono, że olejek bazyliowy powodował UDS w takim samym zakresie dawkowania jak estragol (Müller i in., 1994). Brak efektu ochronnego w przypadku olejku bazyliowego może być powiązany z wysokim stosunkiem stężenia estragolu (88%) oraz innych składników olejku ziołowego (12%) we frakcji olejku eterycznego bazylii w porównaniu do stosunku stężenie estragolu i innych składników ziołowych w całej roślinie zielnej. Grupa Robocza stwierdza, że ten ostatni przykład może wskazywać na efekt matrycowy estragolu w koprze gorzkim, ponieważ stężenie estragolu w olejku bazyliowym jest znacznie większe, natomiast stężenie innych składników jest prawdopodobnie znacznie niższe w porównaniu do stężenia w owocach kopru gorzkiego lub naparze z takich owoców.

Z powyższych przykładów wynika, że kiedy efekt matrycowy jest przywoływany na poparcie bezpieczeństwa substancji roślinnych lub składników botanicznych, należy wskazać dane doświadczalne i/lub inne, wskazujące, że efekt matrycowy *in vivo* ma miejsce przy określonym spożyciu oraz z zastosowaniem badanego składnika roślinnego lub preparatu botanicznego.

Na podstawie marginesu narażenia na poziomie od 34 do 1000 można stwierdzić na podstawie istniejących danych, że stosowanie naparów z owoców kopru gorzkiego w postaci herbaty stanowi priorytetową kwestię w zakresie zarządzania ryzykiem.

11. Dodatkowe badania i/lub dane wymagane w procesie oceny (Poziom B)

Grupa Robocza stwierdza, że w pierwszej kolejności konieczne są dodatkowe dane w celu oceny rakogenności estragolu w owocach kopru gorzkiego, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia efektu matrycowego oraz rzeczywistego poziomu narażenia w przypadku różnych zastosowań i stężeń. Grupa Robocza stwierdza, że biorąc pod uwagę obecnie dostępne dane, podejście MOE zależy raczej od dokładności oceny szacunkowego spożycia niż wartości BMDL10 uzyskanej z danych dotyczących rakogenności, chociaż może zaistnieć również konieczność bardziej dokładnego ustalenia wartości BMDL10.

REFERENCES:

- Bown, D. (1995) *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, London. ISBN 0-7513-020-31
- Burdock, G.A. (Ed.). (1995). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Volume I and II. 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London & Tokyo.
- Chiej, R. (1984). *R. Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald ISBN 0-356-10541-5
- Council of Europe (1996a). Committee of Experts on Flavouring Substances. IOFI note on content of essential oils for safrole, estragole, methyleugenol and use in Europe - RD 4.1/3-38.
- Council of Europe (1996b). Committee of Experts on Flavouring Substances. Information received from IOFI on natural source materials, Oct. 1996 - RD 6/4-39.
- Council of Europe (2006). Active principles (constituents of toxicological concern) contained in natural sources of flavourings. Approved by the Committee of Experts on Flavouring Substances, October 2005, Health Protection of the Consumer Series. Council of Europe Press, Strasbourg.
- (http://www.coe.int/t/e/social_cohesion/soc-sp/public_health/Flavouring_substances/Active%20principles.pdf)
- Duke, J. A. and Ayensu, E. S. (1985). *Medicinal Plants of China* Reference Publications, Inc. ISBN 0-917256-20-4
- EFSA (2005). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic
- http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc_committee/sc_opinions/1201.html
- EFSA (2008). Guidance document on the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use in food supplements.
- http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf?ssbinary=true
- Emboden, W. (1979). *Narcotic Plants*. Studio Vista ISBN 0-289-70864-8

- EMEA (2005). Committee on herbal medicinal products (HMPC). Public statement on the use of herbal medicinal products containing estragole. London 23 November 2005. Doc ref: EMEA/HMPC/137212/2005.
- EMEA (2007a). Committee on herbal medicinal products (HMPC). Community herbal monograph on *Foeniculum vulgare* miller subsp. *Vulgare* var. *vulgare*, aetheroleum. London 5 July 2007. Doc ref: EMEA/HMPC/263292/2006
- EMEA (2007b). Committee on herbal medicinal products (HMPC). Community herbal monograph on *Foeniculum vulgare* miller subsp. *Vulgare* var. *vulgare*, fructus. London 6 August 2007. Doc ref: EMEA/HMPC/137428/2006
- European Pharmacopoeia (2005). Fennel, Bitter - *Foeniculi amari fructus*. Council of Europe. 5th ed., 01/2005:0824
- European Union (2008). Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. Off. J. Eur. Union, L 354, 31.12.2008, p. 34-50.
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0034:0050:EN:PDF>
- Grieve M. (1984). *A Modern Herbal*. Lyle C.F. (Ed.), Penguin ISBN 0-14-046-440-9
- JECFA (1998). *trans*-Anethole (addendum), In: Safety evaluation of certain food additives, prepared by the 51st meeting of JECFA, FAS 42-JECFA 51/5, p.5-32 (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_137.htm).
- Jeurissen, S.M.F., Punt A., Delatour, T., Rietjens, I.M.C.M. (2008). Basil extract inhibits the sulfotransferase mediated formation of DNA adducts of the procarcinogen 1'-hydroxyestragole by rat and human liver S9 homogenates and in HepG2 human hepatoma cells. *Food Chem. Toxicol.*
- Launert, E. (1981). *Edible and Medicinal Plants*. Hamlyn ISBN 0-600-37216-2
- Leung, A.Y. and Foster, S. (1996). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food, Drugs and Cosmetics*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto & Singapore.
- Müller, L., Kasper, P., Müller-Tegethoof, K., Petr, T. (1994). The genotoxic potential in vitro and in vivo of the allyl benzene etheric oils estragole, basil oil and *trans*-anethole. *Mutat. Res.* 325, 129-136.
- Newberne, P., Smith, R.L., Doull, J., Goodman, J.I., Munro, I.C., Portoghese, P.S., Wagner, B.M., Weil, C.S., Woods, L.A., Adams, T.B., Lucas, C.D., Ford, R.A. (1999). The FEMA GRAS assessment of *trans*-anethole used as a flavouring substance. *Flavour and Extract Manufacturer's Association. Food Chem Toxicol.* 37(7), 789-811
- SCF (2001). Opinion of the Scientific Committee on Food on estragole (1-allyl-4-methoxybenzene). (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out104_en.pdf)
- Smith, R.L., Adams, T.B., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Rogers, A.E., Caldwell, J., Sipes, I.G. (2002). Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - methyl eugenol and estragole. *Food Chem. Toxicol.* 40, 851-870.
- Uphof, J.C.Th. (1959) *Dictionary of Economic Plants*. H.R. Engelmann (J. Cramer), Hafner Publ. Co., New York, 400 p.
- Wicht, M. (1989). *Teedrogen*, 2nd ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

ZAŁĄCZNIK E: *LINUM USITATISSIMUM* L.

Niniejszy załącznik dotyczy suszonych nasion lnu (zwanymi również siemieniem lnianym) oraz zawartości lignanów w nasionach lnu.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przetestowanie proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie jest zadaniem niniejszego dokumentu dokonywanie formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanej substancji bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter substancji i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy; nie może on też być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanej substancji botanicznej ani też wszystkich możliwych jej składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa substancji botanicznej. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Nazwa i charakterystyka materiału źródłowego

Nazwa naukowa:	<i>Linum usitatissimum</i> L.
Synonimy:	<i>Linum crepitans</i> (Boenn.) Dumort. Najważniejsze uprawiane podgatunki: <i>Linum usitatissimum</i> ssp. <i>usitatissimum</i> var. <i>vulgare</i> , <i>Linum usitatissimum</i> ssp. <i>crepitans</i> , <i>Linum usitatissimum</i> ssp. <i>humile</i>
Nazwy zwyczajowe:	Len zwyczajny (pol.), Flax, Common flax (ang.), Lin (fr.), Dreschlein, Saatlein, Flachs (niem.), Lino (wł.)
Rodzina:	Lnowate
Część wykorzystywana:	Suszone nasiona lnu (całe nasiona)
Pochodzenie geograficzne:	Len jest rośliną typową na obszarach od wschodniego basenu Morza Śródziemnego do Indii, uprawianą zasadniczo od czasów starożytnego Egiptu. Obecnie duże obszary przeznaczają się pod uprawę roślin oleistych i lnu zwyczajnego w ponad 16 krajach

znajdujących się w strefie o klimacie umiarkowanym. Największymi producentami siemienia lnianego są Rosja (len zwyczajny) i Kanada (olej).

Warunki uprawy i zbioru: Len to wyprostowana roślina roczna, osiągająca wysokość 1,2 m, o wysmukłych łodygach. Liście zielone, pokryte szarym nalotem, lancetowate, o długości 20-40 mm i szerokości 3 mm. Kwiaty jasnoniebieskie, o średnicy 15-25 mm, pięciopłatkowe. Owoce okrągłe, suche torebki nasienne o średnicy 5-9 mm, zawierające kilkanaście brązowych nasion o błyszczącej powierzchni (podobnych do pestek jabłka) i długości 4-7 mm. Nazwa „len” odnosi się do samej rośliny oraz surowych włókien uzyskanych z rośliny.

Len jest sadzony wczesną wiosną i zbierany jesienią, po okresie kwitnienia. Najlepszy czas zbiorów to okres, w którym występuje najmniejsza ilość kwiatów w rozkwicie oraz najmniejsza ilość zielonych liści. Zazwyczaj zbiory rozpoczyna się, gdy 90% torebek nasiennych zmieni kolor na brązowy. Len można zbierać za pomocą kombajnu, jednakże czasami pokos lnu jest pozostawiony na polu do wyschnięcia, a dopiero suchy len zostaje zebrany kombajnem.

2. Proces wytwarzania

Do uzyskania całych nasion lnu nie ma konieczności stosowania specjalnego procesu wytwarzania.

3. Skład chemiczny

Podstawowe związki

Nasiona lnu zawierają przede wszystkim klej roślinny (3-10%), błonnik pokarmowy (4-7%), olej tłuszczowy (20-45%), białko (20-25%), wodę (5-14%) i składniki mineralne (3-5%). Typowe kwasy tłuszczowe występują w oleju tłuszczowym: kwas palmitynowy (6%), kwas stearynowy (2,5%), kwas olejowy (19%), kwas linolowy (24,1%), kwas linolenowy (47,4%) oraz inne kwasy tłuszczowe w ilości ok. 0,5% (Hänseler i in., 1993-95; Morris, 2003; USDA, 2008).

Klej roślinny składa się z polisacharydów obojętnych i kwasowych, które w wyniku hydrolizy rozkładają się do galaktozy (8-10%), arabinozy (9-12%), ramnozy (13-29%), ksylozy (25-27%) oraz kwasu galakturonowego i mannuronowego (ok. 30%) (EMEA, 2006).

Lignany

100 g suchych nasion lnu zawiera ok. 300 mg lignanów, w tym pinorezinoł (870 µg), syringarezinoł (~48 µg), larycyrezinoł (~1780 µg), sekoizolarycyrezinoł (SEC) (~165 mg), matairezinoł (MAT) (~529 µg) oraz hydrokysmatairezinoł (HMR) (~35 µg), w każdym przypadku w przeliczeniu na aglikony (Smeds i in., 2007; Milder i in., 2005a)

Glikozydy cyjanogenne

100 g suchych nasion lnu zawiera ok. 1-500 mg cyjanoków pochodzących z glikozydów cyjanogennych, w zależności od odmiany hodowlanej, z uwzględnieniem linustatyny jako diglikozydu (210-350 mg, 54-76% całkowitego stężenia glikozydów cyjanogennych),

neolinustatyny jako diglikozydu (90-200 mg) oraz linamaryny jako monoglikozydu (<32 mg) (Oomah i in., 1992; Kobaisy i in., 1996).

Najważniejsze związki występujące w nasionach lnu, które wzbudzają obawy związane z ich właściwościami toksykologicznymi to lignany i glikozydy cyjanogenne.

Niniejsza ocena dotyczy lignanów ze względu na ich działanie estrogenne.

4. Specyfikacje

Produkty na bazie nasion lnu nie podlegają w ogólności normalizacji pod kątem określonych komponentów chemicznych, a raczej podlegają ocenie w szeregu analiz identyfikacyjnych i jakościowych. Testy te obejmują mikro-/makroskopową kontrolę i ocenę sensoryczną (Natural Standard Monograph, 2008).

5. Stabilność składnika botanicznego

Na podstawie struktury chemicznej należy wskazać, że nie jest prawdopodobne, że zawartość lignanów ulegała będzie znaczącym zmianom w czasie magazynowania. Wiadomo, że nieprawidłowe magazynowanie nasion lnu może prowadzić do wzrostu zawartości glikozydów cyjanogennych. Kwasy tłuszczowe, zwłaszcza wielonienasycone, łatwo ulegają utlenieniu, jednakże w całych nasionach lnu warstwa zewnętrzna nasiona stanowi zabezpieczenie przed utlenieniem.

Całe nasiona lnu można przechowywać przez maksymalnie jeden rok w suchym miejscu. Zmielone nasiona lnu można przechowywać w lodówce przez maksymalnie trzy miesiące lub zamrażarce przez sześć miesięcy. W przypadku wysokich temperatur, np. podczas gotowania, sproszkowane nasiona lnu / mąka lniana ulegają degradacji.

Brak dostępnych informacji dotyczących stabilności lignanów w żywności i/lub suplementach diety.

6. Proponowane zastosowania i stężenia

Nasiona lnu są stosowane w różnych celach, opisanych bardziej szczegółowo w kolejnych podpunktach.

6.1. Fitoestrogeny – lignany

Len stanowi najbogatsze źródło lignanów roślinnych, w tym diglukozydu sekoizolarycyrezinolu (SDG, MW 686.7). Powyższy lignan roślinny jest prekursorem lignanów ssaczycych, enterodiolu i enterolaktonu, oraz przechodzi w powyższe związki pod wpływem działania aerobów fakultatywnych w okrężnicy (Thompson i in., 1991). W nasionach lnu występują również inne lignany, np. matairezinol i larycyrezinol.

Fitoestrogeny stanowią rodzinę związków roślinnych o właściwościach estrogennych i antyestrogennych. Lignany, podobnie do izoflawanoidów i kumestanów, są często nazywane fitoestrogenami i mogą wykazywać właściwości agonistów lub antagonistów receptorów estrogeny, przy niewyjaśnionym wpływie w przypadku raka wrażliwego na hormony, np. raka piersi, macicy lub prostaty. Badania farmakodynamiczne wskazują, że nasiona lnu mogą mieć właściwości estrogenne lub antyestrogenne (Adlercreutz, 2002). W związku z tym niektórzy autorzy nazywają lignany ssacze modulatorami endogennych sterydowych hormonów płciowych. Od czasu zidentyfikowania lignanów ssaczycych w moczu ludzkim w 1981 r., stopniowo rośnie liczba wyników potwierdzających ich rolę jako modulatorów endogennych sterydowych hormonów płciowych. Jednakże większość przekonujących wyników pochodzi z badań *in vitro*, ~~na zwierzętach i epidemiologicznych. Wyniki przeprowadzonych kilku badań interwencyjnych~~

nie były jednoznaczne. W związku z tym konieczne są dalsze badania, zwłaszcza długoterminowe badania interwencyjne, w celu bardziej szczegółowego wyjaśnienia powyższej zależności (Adlercreutz, 1984; Adlercreutz i in., 1987).

Szereg badań epidemiologicznych i doświadczeń na zwierzętach wskazuje, że fitoestrogeny mogą odgrywać rolę w profilaktyce raków zależnych od hormonów płciowych. Wskaźniki działania ochronnego są oparte na następujących obserwacjach (Adlercreutz, 2002; Haggans i in., 1999 & 2000):

- wysokie wydzielanie fitoestrogenu w moczu, któremu towarzyszy wysokie stężenie globulin wiążących hormony płciowe (SHBG);
- wysokie wydzielanie fitoestrogenu w moczu, któremu towarzyszy niska częstość występowania określonych rodzajów raka, np. raka piersi u kobiet rasy azjatyckiej oraz raka prostaty u mężczyzn rasy azjatyckiej;
- spożywanie pokarmu ubogiego w lignany jest skorelowane z wyższym ryzykiem raka piersi.

Hutchins i in. (2001) przeprowadzili randomizowane badanie krzyżowe z udziałem 28 kobiet w okresie pomenopauzalnym (w wieku 52-82 lat). W trzech siedmiodobowych okresach żywienia uczestnicy spożywali normalne posiłki z dodatkiem lub bez dodatku nasion lnu (5-10 g). Stwierdzono, że dodatek nasion lnu spowodował istotny spadek stężenia 17-beta-estradiolu i siarczanu estronu we krwi oraz wzrost stężenia prolaktyny we krwi.

Thompson i in. (2005) przeprowadzili randomizowane badanie kliniczne z podwójnie ślepą próbą i kontrolowane placebo, z udziałem 32 kobiet, w celu oceny wpływu nasion lnu na występowanie raka piersi u kobiet w okresie menopauzalnym. Pacjentów przypisano do grupy, w której podawano muffinki zawierające 25 g nasion lnu (N=19), lub grupy kontrolnej (otrzymującej placebo) (N=13). W randomizowanym badaniu z udziałem 28 kobiet w okresie pomenopauzalnym, którym podawano 5-10 g zmielonych nasion lnu na dobę przez siedem tygodni, odnotowano istotny wzrost wydzielania 2-hydroksyestrogenu z moczem oraz wzrost stosunku 2-hydroksyestrogenu i 16-alfa-hydroksyestronu w moczu, w sposób zależny od podawanej dawki (Haggans i in., 1999). W podobny sposób Brooks i in. (2004) zaobserwowali w badaniu z udziałem 46 kobiet w okresie pomenopauzalnym wzrost stosunku 2-hydroksyestrogenu i 16-alfa-hydroksyestronu w moczu u uczestniczek spożywających muffinki zawierające 25 g nasion lnu/dobę w porównaniu do uczestniczek, którym podawano placebo przez 16 tygodni.

W badaniu z udziałem 18 kobiet, Phipps i in. (1993) stwierdzili wydłużenie cyklu menstruacyjnego w fazie lutealnej oraz mniejszą liczbę cykli bez owulacji u kobiet, u których stosowano suplementację w ilości 10 g nasion lnu/dobę (vs dieta uboga w błonnik). Kurzer i in. (1995) przeprowadzili niewielkie badanie z udziałem 13 kobiet, obejmujące trzy cykle menstruacyjne. W dobowej diecie stosowano suplementację w ilości 10 g zmielonych nasion lnu. Stwierdzono, że spożycie nasion lnu istotnie zwiększa wydzielanie enterodiolu, enterolaktonu i matairezynolu (w porównaniu do wartości początkowych).

Zalecane dawkowanie zmielonych, wyciskanych lub ubijanych całych nasion lnu jako środka przeczyszczającego u dorosłych wynosi 10-15 g 2-3 razy/dobę, jako źródła kwasów tłuszczowych Omega-3 - 15-50 g oraz w celu zmniejszenia stężenia glukozy we krwi - 50 g/dobę.

Jako źródło lignanów fitoestrogenowych nasiona lnu podawane same lub w posiłkach testowych stosowano w dawce 5-25 g/dobę w badaniach kontrolowanych, co odpowiadało spożyciu lignanów w ilości 15-75 mg/dobę (zawartość lignanów w nasionach lnu: 300 mg/100 g suchych nasion).

6.2. Działanie przeczyszczające

Działanie przeczyszczające nasion lnu było znane już od dawna na podstawie danych empirycznych, następnie zaś zanalizowano je także w oparciu o wyniki badań klinicznych i badań na zwierzętach. Wpływ ten wynika z materiałów masowych, a w szczególności z obecności kleju roślinnego, który wiąże wodą i ulega rozpuszczeniu do postaci żelu przeciwzapalnego w obrębie jelita (Schilcher i in., 1986; Wirths i in., 1985; Schulz i in., 1983). W randomizowanym badaniu ze ślełą próbą wobec badacza oraz dwiema równoległymi grupami leczenia, 55 pacjentów cierpiących na zaparcie z zespołem jelita drażliwego otrzymywało 6-24 g/dobę nasion lnu (grubozmielonych i częściowo odtłuszczonych) lub nasion babki śródziemnomorskiej przez 3 miesiące (Tarpila i in., 2004). Zalecana dawka jako środka przeczyszczającego u dorosłych, osób starszych i nastolatków w wieku powyżej 12 r.ż. (10-15 g, 2-3 razy/dobę) jest uzasadniona w oparciu o ogólne dane i wyniki badań klinicznych (Schilcher i in., 1986; Willuhn, 1989).

6.3. Źródło kwasów tłuszczowych Omega-3

Nasiona lnu można stosować jako źródło kwasów tłuszczowych Omega-3. W trzymiesięcznym badaniu żywieniowym zanalizowano wpływ suplementacji nasionami lnu na zmniejszenie wskaźnika aterogenicznego. Badacze zanalizowali wpływ suplementacji nasionami lnu na stężenie lipidów we krwi. Nasiona lnu podawano w ilości 15-50 g w postaci zmielonej, ubitej lub wyciskanej w posiłku testowym (Bierenbaum i in., 1993; Cunnane i in., 1993) lub 1-10 g w postaci zmielonej, ubitej, wyciskanej lub kruszonej 3 razy na dobę (Blumenthal i in., 2000; Fischer i in., 1984).

6.4. Wpływ na stężenie lipidów we krwi

Nasiona lnu mogą oddziaływać na stężenie lipidów we krwi. Spożywanie 50g/dobę zmielonych, surowych nasion lnu przez zdrowe ochotniczki przez 4 tygodnie spowodowało spadek poziomu całkowitego cholesterolu o 9% i cholesterolu LDL o 18% (Cunnane i in., 1993).

W badaniu z udziałem 32 osób z domów opieki/dla osób starszych (specjalne posiłki testowe poza normalnym żywieniem przez 84 dni) zanalizowano wpływ posiłków bogatych w błonnik na stężenie lipidów we krwi. Uczestnicy badania otrzymywali 39 g całych nasion lnu dwa razy/dobę przez 4 tygodnie, następnie 34 g błonnika pokarmowego z owocami dwa razy/dobę przez 4 tygodnie, a w późniejszym okresie 46 g muesli owocowego dwa razy/dobę przez 4 tygodnie. Stwierdzone spadki stężenia lipidów we krwi zostały uznane za nieistotne ze względu na podwyższone stężenie trójglicerydów we krwi (Wirths i in., 1985).

7. Informacje dotyczące istniejących badań

- Monografia ESCOP (2003) zawiera wskazania terapeutyczne, właściwości farmakodynamiczne oraz wybrane dane przedkliniczne i kliniczne dotyczące całych nasion lnu lub kleju roślinnego uzyskanego z nasion. Monografia nie zawiera informacji o bezpieczeństwie lignanów występujących w nasionach.
- EMEA (2006) opublikowała informację, że ziołowe produkty lecznicze zawierające nasiona lnu mają długą tradycję stosowania w leczeniu zaparć nawykowych lub w sytuacji, gdy pożądane jest wypróżnienie miękkim stolcem. Zalecana dawka jako środka przeczyszczającego u dorosłych, osób starszych i nastolatków w wieku powyżej 12 r.ż. (10-15 g, 2-3 razy/dobę) jest uzasadniona w oparciu o ogólne dane i wyniki badań klinicznych. Nasiona lnu są tradycyjnie stosowane jako środek przeciwzapalny w celu łagodzenia objawów łagodnych problemów żołądkowo-jelitowych. Nasiona lnu są od dawna stosowane jako środek leczniczy, mając głównie działanie przeczyszczające i wykrztuśne. Nasiona, w ilości jednej lub dwóch łyżeczek o pojemności 5 ml w szklance wody, można podawać w celu zwiększenia objętości treści jelitowej w leczeniu zaparć. Klej roślinny jest również stosowany jako napój przeciwzapalny. Masę z siemienia lnianego można przygotować

poprzez stopniowe dodawanie 100 g rozgniecionych nasion lnu do 250 g gotującej wody. Dostępne dane dotyczące obniżania stężenia cholesterolu i glukozy we krwi, działania przeciwnowotworowego i estrogennego nie są wystarczające. Nie ma danych potwierdzających szkodliwe działanie tiocyjanianu pochodzącego z glikozydów cyjanogennych u ludzi w ilości powstającej w wyniku spożycia nasion lnu. Utrzymuje się, że preparaty z nasion lnu mają delikatne i bezpieczne działanie przeczyszczające oraz są bezpieczne, pod warunkiem przestrzegania specjalnych ostrzeżeń dotyczących użytkowania tego rodzaju środków zwiększających objętość stolca.

- W opracowaniu monograficznym Natural Standard Monograph dotyczącym nasion lnu i oleju lnianego (2008) stwierdzono, że nasiona lnu są bezpieczne w przypadku stosowania doustnego w zalecanych dawkach przez cztery miesiące u zdrowych osób. Chociaż w dostępnej literaturze występuje niewiele danych długoterminowych dotyczących bezpieczeństwa stosowania nasion lnu, podstawowy komponent nasion lnu, kwas alfa-linolenowy, był dobrze tolerowany przez okres pięciu lat w ramach diety śródziemnomorskiej. Bezpieczeństwo stosowania nasion lnu przez okres > 4 miesięcy nie jest jasne ze względu na brak danych. Nasiona lnu mogą nie być bezpieczne w przypadku stosowania u pacjentów z rakiem prostaty ze względu na niezgodne dane dotyczące kwasu alfa-linolenowego i rozwoju raka prostaty, jednakże najnowsze dane dotyczące stosowania nasion lnu u ludzi i zwierząt wskazują na korzyści w stosowaniu nasion lnu w przypadku raka prostaty. Teoretycznie nasiona lnu mogą zwiększać ryzyko krwawienia, niższego ciśnienia krwi lub mogą powodować hipoglikemię, chociaż dostępne są jedynie znikome dane dotyczące stosowania nasion lnu u ludzi. Nasiona lnu są najprawdopodobniej niebezpieczne w przypadku stosowania u pacjentów z ostrą lub przewlekłą biegunką, zespołem jelita drażliwego, zapaleniem uchyłków jelit lub zapaleniem jelit.
- Zgodnie z informacjami na stronie MedlinePlus (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/patient-flaxseed.html>) dane z badań z udziałem ludzi wskazują, że nasiona lnu można stosować jako środek przeczyszczający. Jednakże konieczne są dodatkowe dane w celu porównania skuteczności i dawkowania z częściej stosowanymi środkami. Dostępnych jest bardzo niewiele badań dotyczących bezpieczeństwa stosowania nasion lnu u ludzi. Suplementy na bazie nasion lnu wydają się być dobrze tolerowane na podstawie dostępnych wyników badań, a produkty na bazie nasion lnu mają długą historię stosowania bez istotnych skutków ubocznych. Ze względu na potencjalnie estrogenne działanie nasion lnu, należy zachować ostrożność stosując preparaty na bazie lignanów u kobiet w stanie wrażliwym na stężenie hormonów, np. endometrioza, zespół policystycznych jajników, włókniaki macicy, rak piersi, macicy lub jajników. Do momentu uzyskania bardziej wyczerpujących informacji suplementacji na bazie nasion lnu należy unikać w przypadku mężczyzn z rakiem prostaty lub zagrożonych rakiem prostaty. Nasiona lnu mogą przyspieszać menstruację lub mieć inne skutki hormonalne oraz niekorzystny wpływ u kobiet ciężarnych.

Powyższe badania nie dotyczyły oceny bezpieczeństwa stosowania nasion lnu jako źródła fitoestrogenów i lignanów roślinnych.

8. Poziom narażenia

8.1. Spożycie lignanów w żywności

W amerykańskim badaniu porównawczym przypadków wykorzystano kwestionariusz Block Food Frequency Questionnaire oraz kilka opublikowanych baz danych w celu oszacowania spożycia fitoestrogenów. Średnie spożycie lignanów wynosiło 6 mg/dobę, najwyższe dotychczas odnotowane (Fink i in., 2006). We francuskim badaniu kohortowym wykorzystano FFQ oraz opublikowane bazy danych fitoestrogenu w celu oszacowania spożycia izoflawonu, lignanu i kumestanu. Średnie spożycie fitoestrogenów było niskie - 1 mg/dobę, w tym 97% dotyczyło

lignanów (Touillaud i in., 2006). Horn-Ross i in. (2001) stwierdzili, że spożycie matairezolinu wynosiło 29 µg/dobę, spożycie sekoizolarycyrezolinu wynosiło 121 µg/dobę, całkowite spożycie lignanów wynosiło 150 µg/dobę u 1272 kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym oraz 1616 kobiet z grupy kontrolnej.

W badaniu z udziałem 4660 Holendrów i Holenderek w latach 1997-1998 stwierdzono, że średnie całkowite spożycie lignanów wynosiło 0,98 mg/dobę (Milder i in., 2005b). Larycyrezinol i pinorezolin odpowiadały za ok. 75% całkowitego spożycia lignanów, natomiast sekoizolarycyrezinol i matairezolin odpowiadały wyłącznie za ok. 25% spożycia. Oszacowano, że dobowe spożycie fitoestrogenu u kobiet w okresie pomenopauzalnym w USA wynosi poniżej 1 mg/dobę przy 80% spożyciu lignanów i 20% spożyciu izoflawonów (de Kleijn i in., 2001). McCann i in. (2002) stwierdzili, że całkowite spożycie lignanów wynosiło 0,46-0,67 mg/dobę u 207 kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym oraz 188 kobiet z grupy kontrolnej, 0,47-0,50 mg/dobę u 122 kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym oraz 2036 kobiet z grupy kontrolnej, natomiast Keinan-Boker i in. (2002 i 2004) stwierdzili, że spożycie u kobiet w Holandii wynosiło 0,67, a w późniejszym okresie 1,1 mg/dobę.

8.2. Spożycie suplementów diety zawierających nasiona lnu

W Europie i USA wprowadzono do obrotu kilka różnych produktów o następującym składzie:

- 66 mg lignanów/kapsułkę; zalecane spożycie: 1 kapsułka 2-3 razy na dobę (132-198 mg/dobę),
- 78 mg diglukozydu sekoizolarycyrezolinu (SCG)/kapsułkę; zalecane spożycie: 1-2 kapsułki 2-3 razy na dobę (156-312 mg/dobę). Produkt zawiera 90% czystych lignanów z nasion lnu oraz 10% oleju z nasion lnu,
- 1 kapsułka zawierająca m. in. 200 mg ekstraktu lignanów z nasion lnu oraz 50 mg diglukozydu sekoizolarycyrezolinu, zalecane dobowe spożycie: 1 kapsułka/dobę,
- 70 mg lignanów/kapsułkę w 350 mg wysokolignanowego ekstraktu z łusek nasion lnu 20%, zalecane spożycie: 2 kapsułki/dobę (140 mg/dobę),
- nasiona lnu w formie sproszkowanej, zalecana dobowa porcja w ilości 15 g zawierająca 300 mg lignanów,
- 35 mg diglukozydu sekoizolarycyrezolinu (SCG)/kapsułkę; zalecane spożycie: 1 kapsułka na dobę, 20 mg lignanów z nasion lnu (SDG) na porcję w ilości 6 tabletek, 1-6 kapsułek/dobę,
- 40 mg lignanów/kapsułkę, 1 kapsułka na dobę,
- 20 mg lignanów z nasion lnu (SDG) na kapsułkę, 1-2 kapsułki/dobę,
- 20 mg lignanów z nasion lnu (SDG) na 3 kapsułki, 3 kapsułki/dobę,
- 24 mg lignanów z nasion lnu (SDG) na 2 kapsułki, 2 kapsułki/dobę,
- Na rynku znajdują się również produkty o nieznannej zawartości lignanów.

Spożycie lignanów z nasion lnu zawartych w suplementach diety wynosi 35-312 mg/dobę, przy czym wartość ta jest 5-52 razy większa w porównaniu do poziomu pobrania.

9. Dane toksykologiczne

Amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (FDA) nie zaklasyfikował nasion lnu jako substancji GRAS (ogólnie uznanej jako bezpieczna, chociaż dopuszcza maks. 12% w/w nasion lnu w produktach spożywczych (Natural Standard Monograph, 2008).

9.1. Toksyczność reprodukcyjna, genotoksyczność i rakogenność lignanów

Stwierdzono, że nie przeprowadzono żadnych badań dotyczących fitoestrogenów, sekoizolarycyrezinolu i matairezinolu. W swojej nowej analizie Muir i Westcott (2003) stwierdzili, że nasiona lnu zasadniczo nie zawierają związków powodujących ostrą toksyczność.

Wartości dotyczące charakterystyki czerwonych krwinek, w tym liczba czerwonych krwinek, stężenie hemoglobiny i hematokrytu oraz objętość płytek, były podobne u leczonych królików, u których stosowano kompleks lignanów, oraz nieleczonych królików z prawidłowym poziomem cholesterolu i hipercholesterolemią. Stwierdzono, że kompleks lignanów nie miał niekorzystnego wpływu na układ krwiotwórczy (Prasad, 2005).

W badaniu Mahmouda i in. (1992) nie zaobserwowano toksycznego wpływu nasion lnu w bioanalizie śmiertelności krewetki solankowej i nasion lnu nie stwierdzono aktywności mutagennej w teście Amesa z zastosowaniem szczepów *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 102.

Kulling i in. (1998) badali lignany ssacze, enterolakton i enterodiol, oraz lignany roślinne, matairezinol i sekoizolarycyrezinol w zestawie mikrotubul bezkomórkowych oraz w następujących punktach końcowych badania genetycznego w hodowlanych komórkach chomika chińskiego V79 płci męskiej: zaburzenie kompleksu cytoplazmatycznego mikrotubul, indukcja zatrzymania mitozy, indukcja mikrojąderkowa oraz ich charakterystyka za pomocą barwienia CREST oraz mutagenność w locusie genowym HPRT. Lignany badano w stężeniu 200 μM w systemie bezkomórkowym oraz 100 μM w komórkach hodowlanych, co odpowiada rozpuszczalności granicznej w każdej analizie. Dietylostilbestrol aneuploidogenu oraz 4-nitrochinolino-N-tlenek klastogenu zastosowano jako dodatnie związki odniesienia. Ponieważ żaden z czterech lignanów nie wykazywał aktywności w określonym punkcie końcowym, autorzy stwierdzili, że badane lignany ssacze i roślinne nie zawierają potencjału aneuploidogenicznego i klastogenicznego oraz nie wykazują aktywności mutagennej w stężeniu 100 μM w warunkach doświadczalnych zastosowanych w badaniu.

W doświadczeniach na szczurach nasiona lnu miały wpływ na rozwój rozrodczości potomków w zależności od dawki i punktu czasowego narażenia. Narażenie na poziomie 5 lub 10% nasion lnu w całym okresie życia lub w okresie ciąży i laktacji powodowało zmiany strukturalne w gruczołach piersiowych. Autorzy stwierdzili, że należy zachować ostrożność podczas spożywania nasion lnu w okresie ciąży i laktacji (Tou i in., 1998 & 1999a & 1999b). Wyższa częstość występowania raka piersi u szczurów urodzonych z matki spożywającej nasiona lnu w okresie ciąży i laktacji została zaobserwowana w przypadku modelu wywoływania guzów gruczołu piersiowego za pomocą 7,12-dimetylobenzenoantracenu, jednakże pozostaje pytanie, czy zaobserwowane działanie wynikało z obecności kadmu w nasionach lnu czy też zmniejszone stężenie beta receptora estrogenu w gruczołach piersiowych było przyczynowo powiązane z ryzykiem raka piersi u potomków (Khan i in., 2007).

10% karma lniana nie miała wpływu w wymiarze długoterminowym na wzrost, rozwój i zachowanie szczurów Fischer 344 płci męskiej i żeńskiej, ponieważ stężenie aminotransferazy alaniny i gamma-glutamyltranspeptydazy (γ -GT) było takie samo jak u szczurów regularnie otrzymującej karmę. Zaobserwowany wzrost stężenia γ -GT w wątrobie stanowił korzystny wpływ nasion lnu na wątrobę. Wyniki badania wskazywały na brak toksyczności rozwojowej oraz potencjalny wpływ wątroboochronny nasion lnu (Hemmings i in., 2004).

Przyjmowanie nasion lnu z pokarmem matki w okresie laktacji wydaje się bezpieczne w kategoriach wskaźników reprodukcyjnych wśród potomków, jednakże autorzy stwierdzili również, że konieczne są dodatkowe badania w celu oceny ewentualnych innych skutków dla płodności w wymiarze długoterminowym. Podawanie szczurom płci męskiej pokarmu zawierającego 10% nasion lnu lub równoważnej ilości lignanów, wyłącznie w okresie karmienia lub we wczesnej fazie okresu dorosłości, nie miało wpływu na stan kości, przy czym wyniki z pomiarów masy i wytrzymałości kości były podobne do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (Ward i in., 2001a, 2001b).

Lignan roślinny, hydroksymatairezynol (HMR), jest prekursorem lignanu ssaczego, enterolaktonu. Przeprowadzono również 13-tygodniowe badanie toksyczności z poziomem spożycia kompleksu octanu potasu HMR na poziomie 0, 0,25, 1 i 4% w/w na szczurach Wistar. Powyższe poziomy spożycia odpowiadały średniemu dobowemu spożyciu odpowiednio 160, 640 i 2600 mg lignanu HMR/kg mc/dobę. Narażenie na lignan HMR nie miało istotnego wpływu na objawy kliniczne, wyniki obserwacji oftalmoskopowej lub neurobehawioralnej i aktywność motoryczną. Przejściowe obniżenie spożycia i wzrost masy ciała w grupie otrzymującej średnią i dużą dawkę przypisywano mniejszej smakowitości karmy testowej. Jedynie u szczurów płci męskiej w grupie otrzymującej dużą dawkę masa ciała pozostała nieznacznie mniejsza w całym okresie badania. W grupie otrzymującej dużą dawkę stwierdzono wzrost liczby trombocytów (szczury płci żeńskiej) oraz całkowitej liczby białych krwinek (szczury płci męskiej). Stężenie trójglicerydów w osoczu było obniżone w zależności od dawki u szczurów płci męskiej we wszystkich grupach testowych oraz u szczurów płci żeńskiej w grupie otrzymującej średnią i dużą dawkę, natomiast całkowity poziom cholesterolu i fosfolipidów był obniżony u szczurów płci męskiej w grupie otrzymującej dużą dawkę. Powyższe zmiany nie stanowiły niekorzystnego wpływu. Masa względna nerek wzrosła u szczurów płci męskiej w grupie otrzymującej dużą dawkę. Masa pełnego i pustego jelita ślepego wykazywała zależny od dawki wzrost u szczurów płci męskiej we wszystkich grupach leczenia oraz u szczurów płci żeńskiej w grupie otrzymującej dużą dawkę. Masa bezwzględna jajników była mniejsza we wszystkich grupach leczenia, natomiast spadek masy względnej jajników został zaobserwowany wyłącznie w grupie otrzymującej średnią i dużą dawkę. Ponadto, u szczurów płci żeńskiej w grupie otrzymującej dużą dawkę odnotowano marginalne wydłużenie cyklu rui. Niezależnie od neuropatii hialinowej u szczurów płci męskiej w grupie otrzymującej duże dawki, nie stwierdzono zmian histopatologicznych związanych z zastosowanym leczeniem. Stwierdzono, że lignan HMR wykazywał niewielką aktywność podobną do działania antyestrogenu, która mogła być zapośredniczona przez metabolit HMR, enteroakton. Stężenie NOAEL (brak obserwowanych działań niepożądanych) lignanu HMR, na podstawie spadku ciężaru jajników, wynosiło 0,25% w pokarmie, co odpowiada dawce 160 mg/kg mc/dobę (Lina i in., 2005).

10. Ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnych informacji (Poziom A)

Niniejszy dokument dotyczy oceny lignanów jako fitoestrogenów pochodzących z nasion lnu. Niniejsza ocena obejmuje lignany jako jeden z kluczowych składników, jednakże nie dotyczy innych składników, które mogą wymagać uwzględnienia w pełnozakresowej ocenie (np. klej roślinny, kwasy tłuszczowe Omega-3, glikozydy cyjanogenne, kadm).

Ze względu na podobieństwo budowy chemicznej lignanów ssących i estradiolu sugerowano, że lignany mają słabsze właściwości estrogeniczne / antyestrogeniczne, a w kilku badaniach, głównie *in vitro*, wykazano, że lignany mają wpływ na wydzielanie hormonów.

Ponieważ narażenie na lignany w okresie ciąży i laktacji może mieć wpływ na rozrodczość, może również zmniejszać ryzyko raka piersi. Enterolakton może jednakże stymulować rozwój linii komórek raka piersi zależnego od estrogeny (Welshons i in., 1987). W oczywisty sposób wpływ nasion lnu i lignanów na wydzielanie hormonów obserwowany *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych na rozwój komórek rakowych i rozrodczości w zależności od dawki, czasu i okresu trwania narażenia na lignany może być korzystny lub niekorzystny. Niemniej jednak należy wziąć pod uwagę nie tylko potencjalne korzystne efekty zdrowotne, lecz również potencjalne niekorzystne skutki, które może wywoływać spożycie lignanów w określonym stężeniu w cyklu życia człowieka.

Na podstawie wyników testów na poziom genotoksyczności lignanów ssących, lignany w nasionach lnu nie są genotoksyczne, jednakże należy również podkreślić, że nie ma dostępnych badań dotyczących rakogenności lignanów. Sekoizolarycyrezynol i matairezynol nie wykazywały działania mutagennego w komórkach hodowlanych w przypadku zastosowania w stężeniu 100

μM (Kulling i in., 1998). W przypadku lignanów nie występują żadne alarmy strukturalne dotyczące genotoksyczności lub rakogenności.

W badaniu na zwierzętach kompleks lignanów nie miał niekorzystnego wpływ na układ krwiotwórczy (Prasad, 2005). 10% karma lniana nie miała wpływu w wymiarze długoterminowym na wzrost, rozwój i zachowanie szczurów Fischer 344 płci męskiej i żeńskiej (Hemmings i in., 2004). W innych doświadczeniach na szczurach nasiona lnu miały wpływ na rozwój rozrodczości u potomków, mogły potencjalnie zmienić rozrodczość w zależności od dawki i czasu narażenia, wieku lub ciąży i laktacji, przy czym narażenie na 5 lub 10% zawartość nasion lnu w pokarmie skutkowało zmianami strukturalnymi w gruczołach piersiowych (Tou i in., 1998, 1999a, 1999b). Podawanie szczurom płci męskiej pokarmu zawierającego 10% nasion lnu lub równoważnej ilości lignanów, wyłącznie w okresie karmienia lub we wczesnej fazie okresu dorosłości, nie miało wpływu na stan kości, przy czym wyniki z pomiarów masy i wytrzymałości kości były podobne do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (Ward i in., 2001a, 2001b).

W 13-tygodniowym badaniu toksyczności, przeprowadzonym na szczurach Wistar, stężenie NOAEL (brak obserwowanych działań niepożądanych) lignanu HMR, na podstawie spadku ciężaru jajników, wynosiło 0,25% w pokarmie w porównaniu do 160 mg/kg mc/dobę (Lina i in., 2005).

Codzienne spożycie lignanów w pokarmie wynosiło od 0,15-6 mg, co odpowiada 0,05-2 g nasion lnu lub 0,0025-0,10 mg lignanów/kg mc/dobę dla osoby o wadze 60 kg.

Na podstawie stężenia NOAEL równego 160 mg/kg mc/dobę z 13-tygodniowego badania toksyczności margines bezpieczeństwa dla spożycia lignanów zawartych w pokarmie wynosi od 1600 do 64000.

Na podstawie powyższych danych stwierdzono, że dobowe spożycie lignanów wymusza odpowiedni margines bezpieczeństwa i dotyczy poziomu A bezpieczeństwa (ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnych danych) zgodnie z kryteriami wyszczególnionymi w Przewodniku EFSA w sprawie oceny bezpieczeństwa substancji roślinnych i preparatów botanicznych³.

Spożycie lignanów pochodzących z suplementów diety oszacowano w zakresie od 35-312 mg/dobę, co odpowiada spożyciu od 0,58 do 5,2 mg/kg mc/dobę przez osobę o wadze 60 kg.

Na podstawie stężenia NOAEL równego 160 mg/kg mc/dobę z 13-tygodniowego badania toksyczności margines bezpieczeństwa dla spożycia lignanów zawartych w pokarmie wynosi od 31 do 275, przy czym nie można założyć, wartość ta jest bezpieczna wyłącznie na podstawie oceny istniejących danych. Poziom spożycia lignanów pochodzących z suplementów diety należy ocenić na poziomie, co oznacza, że konieczne są dodatkowe badania i/lub dane.

Grupa Robocza stwierdza również, że nie ustalono bezpieczeństwa stosowania suplementów na bazie lignanów u kobiet w ciąży lub okresie laktacji.

Ze względu na potencjalny wpływ lignanów podobny do działania estrogenów, należy zachować ostrożność stosując preparaty na bazie lignanów u kobiet w stanie wrażliwym na stężenie hormonów, np. endometrioza, zespół policystycznych jajników, włókniaki macicy, rak piersi, macicy lub jajników. Lignanów należy unikać u kobiet, u których zdiagnozowano rak piersi zależny od hormonów.

11. Dodatkowe badania i/lub dane wymagane w procesie oceny (Poziom B)

³ Zob.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/sc_draftguidance_botanicals_public_cons_update_en.pdf

Konieczne są dodatkowe badania w celu oceny bezpieczeństwa spożywania lignanów pochodzących z suplementów diety w stężeniu jedynie 31-275-krotnie większym od stężenia NOAEL (brak obserwowanych działań niepożądanych) równego 160 mg/kg mc/dobę. Powyższa wartość NOAEL została określona na podstawie wyników 13-tygodniowego badania na szczurach, którym podawano HMR, oraz stwierdzono spadek ciężaru jajników przy dawkach powyżej 640 mg HMR/kg mc/dobę. Niezbędne badania dodatkowe należy opracować zgodnie z kryteriami wyszczególnionymi w Przewodniku EFSA w sprawie oceny bezpieczeństwa substancji roślinnych i preparatów botanicznych i powinny dotyczyć w szczególności toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej nie tylko HMR, lignanu przebadanego w ramach 13-tygodniowego badania, lecz również innych lignanów wpływających na szacunkowe spożycie w postaci suplementów diety.

W celu wykonania pełnej oceny należy uwzględnić również poziom narażenia na glikozydy cyjanogenne, a w związku z tym możliwość wystąpienia anafilaksji (Alonso i in., 1996). Wykazano, że długoterminowe spożywanie nasion lnu powoduje wzrost stężenia tiocyjanianów w osoczu oraz wydalanych z moczem. Regularne spożywanie nasion lnu powoduje akumulację tiocyjanianów w stopniu porównywalnym do stężenia tiocyjanianów we krwi nałogowych palaczy. Jednakże nasiona lnu spożywane w ilości do 100 g nie powodują żadnych zmian w stężeniu cyjanków w surowicy krwi (Frehner i in., 1990). Podsumowując, dostępne dane naukowe są niewystarczające, aby uzasadnić ryzyko towarzyszące zawartości cyjanków w nasionach lnu (Schultz i in., 1983). Ponadto, konieczne są dodatkowe dane dotyczące bezpieczeństwa stężeń użytkowych i okresów użytkowania powyżej tradycyjnych wartości.

PRZYPISY

- Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol*, 3:364–73.
- Adlercreutz, H., Hoeckerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hämäläinen, E., Fotsis, T., Ollus, A. (1987). Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem*, 27: 1135-44.
- Adlercreutz, H. (1984). Does fiber-rich food containing animal lignan precursors protect against both colon and breast cancer? An extension of the „fiber hypothesis“. *Gastroenterology*, 86: 761-4.
- Alonso, L., Marcos, M.L., Blanco, J.G., Navarro, J.A., Juste, S., del Mar Garcés, M., Pérez, R., Carretero, P.J. (1996). Anaphylaxis caused by linseed (flaxseed) intake. *J Allergy Clin Immunol*, 98:2.
- Bierenbaum, M.L., Reichstein, R., Watkins, T.R. (1993). Reducing atherogenic risk in hyperlipemic humans with flax seed supplementation: a preliminary report. *J Am Coll Nutr* 12(5):501-504.
- Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinkmann, J. (2000). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Boston (MA): Integrative Medicine Communications
- Brooks, J.D., Ward, W.E., Lewis, J.E., Hilditch, J., Nickell, L., Wong, E., Thompson, L.U. (2004). Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. *Am J Clin Nutr*, 79(2):318-325.
- Cotterchio, M., Boucher, B.A., Kreiger, N., Mills, C.A., Thompson, L.U. (2008). Dietary phytoestrogen intake - lignans and isoflavones - and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control*, 19:259–272
- Cunnane, S.C., Ganguli, S., Menard, C., Liede, A.C., Hamadeh, M.J., Chen, Z.Y., Wolever, T.M., Jenkins, D.J. (1993). High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br J Nutr*, 69(2):443-453.
- de Kleijn, M.J., van der Schouw, Y.T., Wilson, P.W., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D.E., Jacques, P.F. (2001). Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study (1-4). *J Nutr*, 131(6):1826-1832.
- EMA (2006). Assessment report on *Linum usitatissimum* L., semen. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use. EMA/HMPC/167395/2006.
- ESCOP (2003). *ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products*, 2nd edition, Lini semen (linseed) European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) Publ. Ltd., Exeter (UK) and Thieme, Stuttgart p. 290.
- Fink, B., Steck, S., Wolff, M., Britton, J., Kabat, G., Schroeder, J., Teitelbaum, S., Neugut, A., Gammon, M. (2006). Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *Am J Epidemiol*, 165:514–523.
- Fischer, S., Honigsmann, G., Hora, C., Schimke, E., Beitz, J., Hanefeld, M., Leonhardt, W., Haller, H., Förster, W., Schliack, V. (1984). Results of linseed oil and olive oil therapy in hyperlipoproteinemia patients. *Deutsche Zeitschrift für Verdau Stoffwechselkrankheiten* 44(5):245-251.
- Frehner, M., Scalet, M., and Conn, E.E. (1990). Pattern of the cyanide-potential in developing fruits: Implications for plants accumulating cyanogenic monoglucosides (*Phaseolus lunatus*) or cyanogenic diglucosides in their seeds (*Linum usitatissimum*, *Prunus amygdalus*). *Plant Physiol*, 94(1):28-32.

- Haggans, C.J., Travelli, E.J., Thomas, W., Martini, M.C., Slavin, J.L. (2000). The effect of flaxseed and wheat bran consumption on urinary estrogen metabolites in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:719–25.
- Haggans, C.J., Hutchins, A.M., Olson, B.A., Thomas, W., Martini, M.C., Slavin, J.L. (1999). Effect of flaxseed consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women. *Nutr Cancer*, 33:188–95.
- Hänseler, R., Keller, K., Rimpler, H. (1993-1995). *Hagers Handbuch des Pharmazeutischen Praxis*, 5th Ed., Vol. 5/676 – 683.
- Hemmings, S.J., Barker, L. (2004). The effects of dietary flaxseed on the Fischer 344 rat: I. Development, behaviour, toxicity and the activity of liver gamma-glutamyltranspeptidase. *Cell Biochem Funct*, 22(2):113-21.
- Horn-Ross, P.L., John, E.M., Lee, M., Stewart, S.L., Koo, J., Sakoda, L.C., Shiao, A.C., Goldstein, J., Davis, P., Perez-Stable, E.J. (2001). Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol*, 154(5):434–41.
- Hutchins, A.M., Martini, M.C., Olson, B.A., Thomas, W., Slavin, J.L. (2001). Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. *Nutr Cancer*, 39 (1):58-65.
- Keinan-Boker, L., van Der Schouw, Y.T., Grobbee, D.E., Peeters, P.H. (2004). Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr*, 79(2):282 -8.
- Keinan-Boker, L., van der Schouw, Y.T., De Kleijn, M.J.J., Jacques, P.F., Grobbee, D.E., Peeters, P.H.M. (2002). Intake of Dietary Phytoestrogens by Dutch Women. *J. Nutr.* 132:1319–1328.
- Khan, G., Penttinen, P., Cabanes, A., Foxworth, A., Chezek, A., Mastropole, K., Yu, B., Smeds, A., Halttunen, T., Good, C., Mäkelä, S., Hilakivi-Clarke, L. (2007). Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reprod Toxicol*, 23(3):397-406.
- Kobaisy, M., Oomah, B.D., Mazza, G. (1996). Determination of cyanogenic acid-pyridine, pyridine-pyrazolone, chromatography methods. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3178-3181.
- Kulling, S.E., Jacobs, E., Pfeiffer, E., Metzler, M. (1998). Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoint in vitro. *Mutat. Res*, 416:115-124.
- Kurzer, M.S., Lampe, J.W., Martini, M.C., and Adlercreutz, H. (1995). Fecal lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 4(4):353-358.
- Lina, B., Korte, H., Nyma, n L., Unkila, M. (2005). A thirteen week dietary toxicity study with 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR lignan) in rats. *Reg Toxicol Pharmacol*, 41:28–38.
- Mahmoud, I., Alkofahi, A., Abdelaziz, A. (1992). Mutagenic and toxic activities of several spices and some Jordanian medicinal plants. *Int. J. Pharmacognosy*, 30:81-5.
- McCann, S.E., Moysich, K.B., Freudenheim, J.L., Ambrosone, C.B., Shields, P.G. (2002). The risk of breast cancer associated with dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J Nutr*, 132(10):3036–41.
- Milder, I.E.J., Arts, I.C.W., Van de Putte, B., Venema, D.P., Hollman, P.C.H. (2005a). Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol, and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 93:393-402.
- Milder, I.E., Feskens, E.J., Arts, I.C., de Mesquita, H.B., Hollman, P.C., Kromhout, D. (2005b). Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in Dutch men and women. *J Nutr*, 35(5):1202-1207.

- Morris, D. (2003). Flax: A health and nutrition primer. Winnipeg, Flax Council of Canada; p 11.
- Muir, A., Westcott, N.D. (2003). Flaxseed constituents and human health. In: Flax. Eds: Muir A., Westcott ND, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 243-251.
- Natural Standard Monograph (2008). Flaxseed and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) www.naturalstandard.com
- Oomah, B.D., Mazza, G., Kenaschuk, E.O. (1992). Cyanogenic compounds in flaxseed. J. Agric. Food Chem. 40(8):1346-48.
- Phipps, W.R., Martini, M.C., Lampe, J.W., Slavin, J.L., Kurzer, M.S. (1993). Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. J Clin Endocrinol.Metab, 77(5):1215-1219.
- Prasad, K. (2005). Effect of chronic administration of lignan complex isolated from flaxseed on the hemopoietic system. Mol Cell Biochem, 270(1-2):139-45.
- Schilcher, H., Schulz, V., Nissler, A. (1986). Zur Wirksamkeit und Toxikologie von Samen Lini. Z Phytotherapie, 7:113-7.
- Schulz, V., Löffler, A., Gheorghiu, T. (1983). Resorption von Blausäure aus Leinsamen. Leber Magen Darm, 13:10-4.
- Smeds, A.I., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Willför, S.M., Nishibe, S., Deyama, T., Holmbom, B.R. (2007). Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. J. Agric. Food. Chem. 55:1337-1346.
- Tarpila, S., Tarpila, P., Grohn, H.N., Silvennoinen, T., Lindberg, L. (2004). Efficacy of ground flaxseed on constipation in patients with irritable bowel syndrome. Curr. Topics Nutraceutical Res, 2:119-25.
- Thompson, L.U., Chen, J.M., Li, T., Strasser-Weippl, K., Goss, P.E. (2005). Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. Clin Cancer Res, 11(10):3828-3835.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. Nutr. Cancer, 16:43-52.
- Tou, J.C., Thompson, L.U. (1999a). Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures. Carcinogenesis, 20(9):1831-5.
- Tou, J.C., Chen, J., Thompson, L.U. (1999b). Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormone levels in rats. J Toxicol Environ Health A, 23;56(8):555-70.
- Tou, J.C., Chen, J., Thompson, L.U. (1998). Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. J Nutr, 128(11):1861-8.
- Touillaud, M., Thiebaut, A., Niravong, M., Boutron-Ruault, M.C., Clavel-Chapelon, F. (2006). No association between dietary phytoestrogens and risk of premenopausal breast cancer risk in a French cohort study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 15:2574-2576.
- U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service. (2008). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Willuhn, G. (1989). Leinsamen. In: Wichtl M, editor. Teedrogen. 2nd ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 306-8.
- Ward, W.E., Chen, J., Thompson, L.U. (2001a). Exposure to flaxseed or its purified lignan during suckling only or continuously does not alter reproductive indices in male and female offspring. J Toxicol Environ Health A, 7;64(7):567-77.

- Ward, W.E., Yuan, Y.V., Cheung, A.M., Thompson, L.U. (2001b). Exposure to flaxseed and its purified lignan reduces bone strength in young but not older male rats. *J Toxicol Environ Health A*, 11;63(1):53-65.
- Welshons, W.V., Murphy, C.S., Koch, R., Calaf, G., Jordan, V.C. (1987) Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat* 10:169-175
- Wirths, W., Berglar, T., Dieckhues, A., Bauer, G. (1985). Ballaststoffreiche Zwischenmahlzeit in ihrer Wirkung auf Verdauungstätigkeit und Blutlipide älterer Probanden. *Z. Gerontol*, 18(2): 107-10.

ZAŁĄCZNIK F: *TRITICUM AESTIVUM* L.

Niniejszy załącznik dotyczy otrębów pszennych.

Ostrzeżenie:

Celem niniejszego dokumentu jest przetestowanie proponowanej metody stadialnej w zakresie oceny bezpieczeństwa substancji i preparatów botanicznych na wybranym przykładzie oraz poddanie analizie wybranych, wchodzących w ich skład elementów. Nie jest zadaniem niniejszego dokumentu dokonywanie formalnej oceny bezpieczeństwa analizowanej substancji bądź preparatu botanicznego; wynik przeprowadzonej oceny nie może być zatem wykorzystywany w charakterze prawnie wiążącego dowodu na bezpieczny charakter substancji i preparatów botanicznych podlegających ocenie. Niniejszy dokument nie stanowi dokumentu ustanawiającego zasady polityki ani decyzji zezwalającej na zaklasyfikowanie danego produktu bądź preparatu botanicznego jako produkt spożywczy bądź leczniczy; nie może on też być za takowy dokument bądź decyzję poczytywany. Dokument niniejszy koncentruje się na jednym typie analizowanego preparatu i nie ma na celu dokonywania oceny wszystkich możliwych preparatów powstałych na bazie analizowanej substancji botanicznej ani też wszystkich możliwych jej składników, co w normalnej sytuacji stanowiłoby element pełnej oceny bezpieczeństwa substancji botanicznej. Poddane ocenie dane zostały zgromadzone na potrzeby niniejszego badania próbnego i nie miały one na celu stanowić kompletnego zbioru danych. Zanieczyszczenia takie jak metale ciężkie, mykotoksyny, dioksyny, pestycydy, mikroorganizmy bądź policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) nie zostały poddane analizie w ramach niniejszego badania.

Ocena możliwych korzystnych skutków działania analizowanych substancji oraz twierdzeń tych skutków dotyczących wykracza poza zakres kompetencji niniejszej Grupy Roboczej.

1. Nazwa i charakterystyka materiału źródłowego

Nazwa naukowa:	<i>Triticum aestivum</i> L. emend. Fiori et Paol.
Synonimy:	<i>T. aestivum</i> L. ssp. <i>aestivum</i> , <i>T. hybernum</i> L. emend. Mérat, <i>T. sativum</i> Lam., <i>Triticum vulgare</i> Vill., <i>T. cereale</i> Schrank;
Nazwy zwyczajowe:	Pszenica zwyczajna (pol.), Breadwheat, Common wheat (ang.), Blé, blé ordinaire (fr.), Saatweizen, gemeiner Weizen (niem.), Frumento, frumento tenero (wł.)
Rodzina:	Wiechlinowate (trawy)
Część wykorzystywana:	Otręby (zewewnętrzne warstwy ziarniaka/ziarna pszenicy)
Pochodzenie geograficzne:	Roślina uprawiana w krajach o umiarkowanym klimacie.
Warunki uprawy i zbioru:	Pszenica występuje w szeregu różnych odmian hodowlanych. Badano również produkcję pszenicy modyfikowanej genetycznie (Peterson i Shama, 2005) oraz możliwości wyboru specjalnych odmian nietoksycznych dla pacjentów o szczególnych potrzebach

(celiakia) (Spaenij-Dekking i in., 2005). Oceniono wpływ warunków wzrostu, w tym wysokich temperatur, nasłonecznienia, na właściwości antyoksydacyjne (Zhou i in., 2004a; Zhou i Yu, 2004b).

Uwaga:

Otręby pszenne można uzyskać również z innych gatunków *Triticum*, np. *T. turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husn. (= syn. *T. durum* Desf., Pszenica twarda, pszenica makaronowa (pol.), Durum wheat, hard wheat (ang.), Blé dur, froment dur (fr.), Hartweizen (niem.), Frumento duro, grano duro (wł.))

2. Proces wytwarzania

Przemiał: Dane dotyczące wielkości cząstek otrębów pszennych stanowią przedmiot zainteresowania ze względu na potencjalną zależność pomiędzy wielkością cząstek a wpływem otrębów pszennych na różne właściwości biologiczne. Na przykład, produkty zawierające otręby pszenne o różnej wielkości cząstek mają różne właściwości przeczyszczające i wpływ na fermentację jelitową (Jenkins i in., 1999).

3. Skład chemiczny

Otręby pszenne to produkt uboczny w procesie wytwarzania mąki pszennej z ziaren. Otręby składają się głównie z warstwy zewnętrznej ziarniaka pszenicy, w tym warstwy aleuronowej, tzn. łuski, nasiona, osłonki i zarodka. Nie występuje żadne naturalne rozgraniczenie pomiędzy warstwą skrobi zawierającą bielmo a warstwami otrębów, w związku z czym skład otrębów może być zróżnicowany w zależności od warunków wzrostu i procesu przemiału.

Podstawowe komponenty otrębów pszennych: węglowodany (skrobia 15-20%, błonnik nierozpuszczalny (celuloza i hemiceluloza) 43-45%), białko (15-17%), woda (10%), lignina (8%), witaminy i składniki mineralne (7%), lipidy (5%).

Otręby pszenne zawierają również następujące substancje: związki fenolowe, woski, saponiny i fitaty.

4. Specyfikacje

Niniejszy raport dotyczy otrębów pszennych.

Otręby pszenne muszą spełniać przepisy dotyczące produktów spożywczych (Rozporządzenie Rady 315/93/EWG), zwłaszcza pod kątem obecności mykotoksyn (WHO, 1990) wskutek zewnętrznego zanieczyszczenia grzybami (*Fusarium* spp.) (Mueller i in., 1994), pestycydami i zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Powyższe zanieczyszczenia mogą stwarzać ryzyko dla zdrowia (Luo i in., 1990). Na przykład, maksymalne stężenie mykotoksyn deoksyniwalenolu (DON), zgodnie z Kodeksem Żywnościowym, w produktach zbożowych wynosi 500 µg/kg (Visconti i in., 2004), a maksymalne stężenie sklerocjum *Claviceps purpurea* zostało ustalone na 0,05% m/m (Kodeks Żywnościowy, 1995).

Obecnie nie można całkowicie wyeliminować zanieczyszczenia grzybami i mykotoksynami (Kodeks Żywnościowy, 2003). W szczególności zanieczyszczenie mykotoksynami w wyniku obecności *Fusarium* spp. stanowi wynik niewielkiego skażenia ziaren oraz ich osłonki przez grzyby. Powyższe mykotoksyny są bardzo często spotykane w roślinach zbożowych: 57% 11 444 zbadanych próbek pszenicy zawierało zanieczyszczenia o maksymalnym stężeniu 30 µg/g DON (mykotoksyny z grupy trichotecen, deoksyniwalenol) zgodnie z badaniem FAO/WHO oraz 57% 11 022 próbek produktów spożywczych na terenie UE (za Visconti i in., 2004) było zanieczyszczonych DON. Otręby stanowią frakcję pszenicy, która jest w największym stopniu zanieczyszczona DON (Visconti i in., 2004). Stężenie DON w otrębach wynosiło średnio 160% stężenia w całym ziarnie pszenicy, z tym że ponad 200% w niektórych partiach pszenicy (np. w

otrębach stwierdzono DON w ilości 800 µg/kg w porównaniu do 350 µg/kg w całych ziarnach). Podobnie wysokie stężenia w otrębach pszennych odnotowano w przypadku innych mykotoksyn, przy czym wysokie stężenia mykotoksyn stwierdzono również w przypadku innych zbóż (Brera i in., 2006; Brera i in., 2004; Broggi i in., 2002; Ryu i in., 2002). W USA 37% próbek otrębów pszennych zawierało DON w stężeniu powyżej 1000 µg/kg (Trigo Stockli i in., 1996), tzn. wyższym od wartości granicznej zalecanej w Kodeksie dotyczącym produktów zbożowych (500 µg/kg) (za Visconti i in., 2004). Podobnie, na Węgrzech (Rafai i in., 2000) odsetek próbek otrębów niespełniających kryteriów był od dwóch do trzech razy wyższy w porównaniu do próbek pszenicy i kukurydzy.

Zanieczyszczenie toksyczne związane z obecnością grzyba pasożytniczego *Claviceps purpurea* nie zostało uwzględnione, ponieważ gatunek ten występuje głównie w *Secale cereale* L. (żyto). Niemniej jednak, w przypadku poszczególnych gatunków wiechlinowatych należy uwzględnić ok. 50 różnych gatunków grzybów z rodziny *Claviceps*. Grzyby z rodziny *Claviceps*, zwane również sporyszem, wytwarzają toksyczne alkaloidy z kwasu lizergowego, chociaż obecnie uprawa i produkcja pszenicy podlega ścisłemu nadzorowi oraz istnieją testy chemiczne umożliwiające wykrycie takich alkaloidów (WHO, 1990 oraz Mueller i in., 1994). Przetrwalniki sporyszu, tzw. sklerocja, są często większe od ziaren zbóż i mogą zostać usunięte mechanicznie z zastosowaniem tradycyjnych urządzeń do oczyszczania zbóż, np. sit i separatorów wykorzystywanych podczas zbiorów. W powyższym procesie można usunąć do 82% przetrwalników sporyszu, przy czym przetrwalniki stanowią „zanieczyszczenia”.

Przetrwalniki sporyszu pozostają nienaruszone podczas magazynowania ziaren zbóż, ale ulegają rozbiciu na mniejsze cząstki podczas transportu, co wpływa na wydajność procesu oczyszczania ziaren (EFSA, 2005).

Dostępne są jedynie ograniczone dane dotyczące występowania sporyszu w zbożach, a w szczególności paszach (EFSA, 2005). W większości przypadków częstość występowania podaje się w % w/w ze względu na bliższy związek z poziomem kontrolnym, który wynosi od 0,1 do 0,3% w przypadku ziaren. Dotychczasowe badania wskazują, że całkowite stężenie alkaloidów w zbożach na terenie Europy Środkowej wynosi od 0,09 do 0,21% (Wolff, 1989).

5. Stabilność preparatu botanicznego

Brak dodatkowych danych dotyczących stabilności preparatów zawierających otręby pszenne, dostępnych do oceny przez Grupę Roboczą. Wszystkie etapy łańcucha produkcyjnego, od pierwszego etapu do magazynowania i komercjalizacji, otręby pszenne podlegają w wysokim stopniu normalizacji w procesie przemiału.

6. Proponowane zastosowania i stężenia

Otręby pszenne są wykorzystywane ze względu na obecność błonnika i towarzyszący korzystny wpływ na pasaż jelitowy oraz właściwości przeczyszczające.

Ogólnie rzecz biorąc, podstawowe oświadczenie żywieniowe dotyczy produktu spożywczego jako „źródła błonnika”, co odpowiada zawartości 3 g błonnika/100 g produktu lub 1,5 g błonnika/100 kcal. Średnia zawartość błonnika w chlebie pełnoziarnistym i produktach zbożowych wynosi 6,7 g błonnika/100 g (MAFF, 1999). Oświadczenie dotyczące produktu „bogatego w błonnik” odpowiada zawartości 6 g błonnika/100 g produktu lub 3 g błonnika/100 kcal.

W różnych krajach występują różne zalecenia dotyczące spożycia przez ludzi, jednakże ogólnie zalecane dzienne spożycie błonnika wynosi 25 lub 30 g w przypadku diety wynoszącej odpowiednio 2000 lub 2500 kcal.

Zalecane spożycie niektórych produktów dostępnych na rynku wynosi 25 g błonnika/dobę u ~~kobiet w wieku od 31 do 50 lat oraz 38 g błonnika/dobę u mężczyzn.~~

7. Informacje dotyczące istniejących badań

EFSA opublikowała opinię panelu naukowego ds. zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym [CONTAM] na temat sporyszu jako niepożądanego składnika paszy dla zwierząt (EFSA, 2005).

8. Poziom narażenia

Udział pszenicy w dziennym zapotrzebowaniu kalorycznym per capita wynosi 521 kcal, co stanowi ok. 25% dziennego zapotrzebowania kalorycznego na świecie (źródło: FAO Statistics Global Outlook, 2006⁴). Nie znaleziono danych dotyczących samych otręb, jednakże uważa się, że poziom narażenia jest istotny, ponieważ otręby stanowią 17-19% w/w nasion pszenicy.

9. Dane toksykologiczne

W literaturze naukowej nie odnotowano zgłoszeń dotyczących niekorzystnego wpływu spożycia otręb pszenicznych na zdrowie ludzi, z wyjątkiem ostrzeżeń dotyczących sytuacji, w których otręby pszenne są niewskazane dla pacjentów cierpiących na następujące schorzenia:

- Enteropatie glutenowe (celiakia), ponieważ frakcja białkowa zawiera gluten (Charbonnier i in., 1980). Stosowanie otręb jest niewskazane w przypadku dzieci poniżej 2 r.ż. (Williams, 2006).
- Alergia na pszenicę, odmienna od nietolerancji glutenu u dzieci (James i in. 1997, Pourpak i in., 2004).
- Zespół jelita drażliwego, w przypadku którego obecność błonnika i uwalnianie kwasów krótkołańcuchowych w jelitach może powodować podrażnienie chemiczne delikatnej błony śluzowej jelit (Lewis i in., 1998; Hebden i in. 2002; Miller i in., 2006).
- Przyjmujących leki na receptę: w niektórych przypadkach mogą występować interakcje z lekami, ponieważ obecność błonnika może obniżać wchłanianie leku, a tym samym jego biodostępność w krwioobieg.

Dodatkowe aspekty dotyczące określonych stanów fizjologicznych lub patologicznych, które należy wziąć pod uwagę:

- Niektóre składniki mineralne, np. Fe, Mg, P, K oraz Ca, mogą być w znacznym stopniu eliminowane, co może prowadzić do niedoboru tych ważnych mikrośladników odżywczych, jeżeli błonnik występujący w otrębach pszenicznych jest podawany w zaparciach przewlekłych, co jest szczególnie istotne z biologicznego punktu widzenia u kobiet w ciąży oraz osób w podeszłym wieku.
- Spożycie otręb pszenicznych może stanowić przyczynę złego samopoczucia w niektórych przypadkach, powodując wzdęcia.
- Ostatecznie, najważniejszym przeciwwskazaniem do podawania błonnika jest zahamowanie prawidłowej motoryki jelit wskutek stanu chorobowego (np. raka).

Jednakże spożycie otręb pszenicznych jest w ogólności zalecane w przypadku kobiet w ciąży i osób w podeszłym wieku ze względu na występujące u nich problemy z pasażem żołądkowo-jelitowym. Otręby pszenne są również zalecane u diabetyków oraz w przypadku niektórych schorzeń układu sercowo-naczyniowego połączonego z wysokim poziomem cholesterolu (LDL) we krwi (Liu i in., 1999).

10. Ocena bezpieczeństwa na podstawie dostępnych informacji

Biorąc pod uwagę:

⁴ Zob. <http://faostat.fao.org/Portals/Faostat/documents/pdf/world.pdf>

- łatwą identyfikację *Triticum aestivum* i otrąb pszennych,
- długą historią i ogólnoswiatowe wykorzystanie otrąb pszennych w łańcuchu żywnościowym,
- brak zgłaszanych działań niepożądanych w najnowszej literaturze oraz fakt, że nie został określony żadnego progu toksyczności,
- wpływ mechaniczny błonnika występującego w otrębach pszennych, który nie jest trawiony ani wchłaniany w jelicie cienkim, na pasaż jelitowy (AFSSA, 2002),

można stwierdzić, że istnieje domniemanie bezpieczeństwa dla otrąb pszennych uzyskanych z *Triticum aestivum*, bez potrzeby dalszych badań toksykologicznych.

Jednakże, mimo braku obaw związanych z bezpieczeństwem, spożycie otrąb pszennych powinno być ograniczone do określonych grup populacji, takich jak małe dzieci, osób uczulonych na gluten i pacjentów z ciężkimi patologiami jelit.

PRZYPISY:

- AFSSA (2002). Dietary fibre : definitions, analysis and nutrition claims. Report of the Specialist Expert Committee on Human Nutrition, 61 pages.
- Asp N.G. (1995). Dietary fibre analysis – an overview. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, S42-S47.
- Brera, C., Catano C., et al. (2006). "Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(14), 5014-5019.
- Brera, C., Debegnach F., et al. (2004). "Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B-1 in dry milling corn fractions." *Journal of Food Protection* 67(6), 1261-1266.
- Broggi, L. E., Resnik S.L., et al. (2002). "Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina." *Food Additives and Contaminants* 19(5), 465-469.
- Charbonnier L., Jos J., Mougnot J.F., Mossé J. (1980). Comparative toxicity of different cereals for subjects intolerant of gluten. *Reprod. Nutr. Dev.* 20(4B), 1369-1377.
- Codex Alimentarius (2003). "Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin a, zearalenone, fumonisins and tricothecenes." CAC/RCP 51-2003: 1-8.
- Codex Alimentarius (1995). Codex standard for Wheat and Durum Wheat. CODEX STAN 199-1995. (www.codexalimentarius.net/download/standards/62/CXS_199e.pdf)

- EFSA(2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal 225, 1-27. http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_op_ej225_ergot_en1.pdf?ssbinary=true
- Englyst HN, Quigley ME, Hudson GJ (1994). Determination of dietary fiber non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst* 119, 1497-1509.
- Hebden, J. M., Blackshaw E., et al. (2002). "Abnormalities of GI transit in bloated irritable bowel syndrome: Effect of bran on transit and symptoms." *American Journal of Gastroenterology* 97(9): 2315-2320.
- James, J. M., J. P. Sixbey, et al. (1997). "Wheat [alpha]-amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99(2): 239-244.
- Jenkins, D., Kendall, C., Vuksan, V., Augustin, L., Li, Y-M., Lee, B., Mehling, C., Parker, T., Faulkner, D., Seyler, H., Vidgen, E. and Fulgoni III, V. (1999). The Effect of Wheat Bran Particle Size on Laxation and Colonic Fermentation. *Journal of the American College of Nutrition (JACN)* 18 (4), 339-345.
- Lee SG, Prosky L, DeVries JW (1992). Determination of total and insoluble dietary fiber in foods.
- Lewis, M. J. V. and P. J. Whorwell (1998). "Bran: May irritate irritable bowel." *Nutrition* 14(5): 470-471.
- Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH & Willett WC (1999). Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease : results from the nurses' health study. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 412-419.
- Luo Y, Yoshizawa T, Katayama T (1990). Comparative study on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(12), 3723-3726.
- MAFF CCFSDU (1999). Working group on definition of dietary fibre for purpose of fibre claims.
- Miller, V., R. Lea, et al. (2006). "Bran and irritable bowel syndrome: The primary-care perspective." *Digestive and Liver Disease* 38(10): 737-740.
- Mueller HM, Metzger KU, Modi R, Reimann J (1994). Ergosterol and Fusarium toxins in wheat bran and wheat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 71(1), 48-55.
- Ohkuma K, Matsuda I, Katta Y, Tsuki K (2000). New method for determining total dietary fiber by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 83, 1013.
- Peterson RK, Shama LM (2005). A comparative risk assessment of genetically engineered, mutagenic, and conventional wheat production systems. *Transgenic Res.* 14(6), 859-875.
- Pourpak, Z., Mansouri M., et al. (2004). "Wheat allergy: Clinical and laboratory findings." *International Archives of Allergy and Immunology* 133(2): 168-173.
- Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products : Interlaboratory study. *Journal of AOAC*, 71(5), 1017.
- Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I (1992). Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products : collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75(2), 360-367.
- Quemener B., Thibault J.F., et al. (1997) Integration of inulin determination in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *Int J Biol Macromol.* 21(1-2):175-178.

- Rafai, P., A. Bata, et al. (2000). "Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary." *Food Additives and Contaminants* 17(9): 799-808.
- Ryu, D., L. S. Jackson, et al. (2002). Effects of processing on zearalenone. *Mycotoxins and Food Safety*. 504: 205-216.
- Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, Van Veelen P, Drijfhout JW, Jonker H, Van Soest L, Smulders MJ, Bosch D, Gilissen LJ, Koning F (2005). Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology*, 129(3), 797-806.
- Theander O, Aman P, Westerlund E, Graham H (1994). Enzymatic chemical analysis of dietary fiber. *Journal of AOAC International*, 77, 703-709.
- Trigo Stockli, D. M., C. W. Deyoe, et al. (1996). "Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled fractions of wheat." *Cereal Chemistry* 73(3): 388-391.
- Visconti, A., E. M. Haidukowski, et al. (2004). "Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking." *Toxicology Letters* 153(1): 181-189.
- WHO (1990). Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. *Environmental Health criteria*, 105, 263 pages.
- Williams CL (2006). Dietary fiber in childhood. *J. Pediatr.*, 149(5S), S121-S130.
- Wolff, J. 1989. Mutterkorn in Getreide. *Getreidekonservierung und Futterschäden durch Getreide* 30. Bericht der Praktiker- Informationstagung; 14.03.1989; Grub. Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, editors
- Zhou K, Su L, Yu LL (2004a). Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 52(20), 6108-6114.
- Zhou, K, Yu L (2004b). Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.* 52(5), 1112-1117.