

## Toxikologische Einschätzung von Kristallviolett

Empfehlung der BfR-Kommission für pharmakologisch wirksame Stoffe und Tierarzneimittel vom 16. Mai 2019

Die BfR-Kommissionen setzen sich aus externen, unabhängigen Sachverständigen zusammen. Die Stellungnahmen der BfR-Kommissionen müssen nicht der Meinung des BfR entsprechen.

In der EU dürfen an lebensmittelliefernden Tieren nur pharmakologisch wirksame Stoffe angewendet werden, die gemäß VO (EU) Nr. 470/2009 durch die EU-Kommission eingestuft und für die erforderlichenfalls Rückstandshöchstmengen (MRLs; Maximum Residue Limits) für tierische Erzeugnisse festgelegt worden sind. Die Einstufung erfolgt auf Basis einer Risikobewertung und Empfehlungen des Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) der European Medicines Agency (EMA). Die für die Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren erlaubten Stoffe sind in Tabelle 1 des Anhangs der VO (EU) Nr. 37/2010 aufgeführt. Hierin sind auch MRLs für bestimmte Stoffe in verschiedenen tierischen Erzeugnissen aufgeführt. Dennoch werden vereinzelt Rückstände nicht-erlaubter Stoffe wie z.B. Kristallviolett (KV) und Leukokristallviolett (Leuko-KV) in tierischen Erzeugnissen aus der EU und Drittländern nachgewiesen. Fehlende toxikologische Referenzwerte stellen für die gesundheitliche Bewertung dieser Rückstände oft eine besondere Herausforderung an die Risikobewertung dar, da für solche Stoffe oft kein ADI (Acceptable Daily Intake) und keine MRLs abgeleitet wurden.

Die BfR-Kommission für „Pharmakologisch wirksame Stoffe und Tierarzneimittel“ diskutierte Stoffe ohne ADI/MRL-Werte unabhängig und in beratender Funktion. Das Ziel ist eine Empfehlung für die Risikobewertung von Rückständen dieser Stoffe in Lebensmitteln.

Die BfR-Kommission diskutierte Rückstandsdaten zu KV und Leuko-KV aus der Überwachung, die Analytik von KV, die Toxizität von KV, die Zusammensetzung von KV, sowie die Anwendbarkeit des TTC-Konzeptes (Threshold of Toxicological Concern) und des BMD-Konzeptes (Benchmark-Dose) auf KV. Berücksichtigung fanden auch die Bewertungen der World Health Organization (WHO), der European Chemical Agency (ECHA) sowie der European Food Safety Authority (EFSA) zu KV [1-4].

Die BfR-Kommission kommt bezüglich Rückständen von KV und seinem Metaboliten Leuko-KV in Lebensmitteln zu dem Schluss, dass sowohl das TTC-Konzept als auch das BMD-/MoE-Konzept anwendbar sind. Aufgrund der sich aus der Verwendung von technischem KV ergebenden Unsicherheiten hält die BfR-Kommission die Verwendung des TTC-Konzeptes mit seinem konservativeren Ansatz für gerechtfertigt. Aus toxikologischer Sicht sollte die tägliche Aufnahme für die Summe aus KV und Leuko-KV 0,0025 µg/kg KG/Tag bzw. 0,15 µg/Tag nicht überschreiten.

Die BfR-Kommission verfasst zu Rückständen von KV folgende Empfehlung:

### 1. Einleitung

KV ist ein *N*-methylierter Triphenylmethanfarbstoff, der aufgrund seiner antibakteriellen, fungiziden und anti-helminthischen Wirkung lange Zeit in der Tiermedizin eingesetzt worden war. Die Behandlung von Lebensmittel liefernden Tieren (Geflügel, Rinder, Schweine, Fische) ist jedoch aufgrund seiner toxikologischen Eigenschaften weltweit schon längere Zeit verboten. Gelegentlich auftretende erhöhte Rückstandswerte können als Hinweis auf illegale Anwendungen bei Lebensmittel liefernden Tieren interpretiert werden.

Dennoch kann KV aufgrund seiner derzeitigen Anwendungen (beispielsweise zur Färbung von Materialien wie Holz, Leder, Seide, Nylon, Papier und Klebebändern sowie zur Färbung von histopathologischen Präparaten) weiterhin in geringen Konzentrationen in die Nahrungskette gelangen<sup>1</sup>. Darüber hinaus wird KV Bluttransfusionen zur Inaktivierung von *Trypanosoma cruzi*, dem Auslöser der Chagas Krankheit, zugesetzt [5].

Eine besondere Problematik ergibt sich aus analytischer, toxikologischer und somit letztlich regulativer Sicht, aus der mangelnden Qualität der verschiedenen am Markt befindlichen KV-Präparate. Bei der Synthese von KV, wird Michlers Keton mit *N,N*-Dimethylanilin zur Carbinolbase kondensiert, gefolgt von der säurekatalysierten Abspaltung von Wasser. Herstellungsbedingte Verunreinigungen im Endprodukt mit einem geringeren Methylierungsgrad lassen sich auf den Einsatz minderwertiger (mindermethylierter) Varietäten der Edukte Michlers Keton und *N,N*-Dimethylanilin zurückführen. Hinzu kommen Schwermetallrückstände aus den im Herstellungsprozess verwendeten Katalysatoren aufgrund ungenügender Aufreinigung. Die auf dem Markt befindlichen technischen Qualitäten weisen KV-Gehalte zwischen 76 und 90 % auf [3]. Im weiteren Sinn ist kommerzielles KV also ein Gemisch strukturell ähnlicher Triphenylmethanfarbstoffe. Einer dieser Bestandteile ist Methylrosaniliniumchlorid, welches dem Fuchsin (Rosaniliniumchlorid) ähnelt. Im engeren Sinn handelt es sich bei KV ausschliesslich um Hexamethyl-*p*-rosaniliniumchlorid (6 Methylgruppen). Die anderen Bestandteile unterscheiden sich im Ausmaß der *N*-Methylierung und werden auch als Methylviolette bezeichnet. In der Pharmazie wird KV heute in der Regel mit Methylrosaniliniumchlorid gleichgesetzt, zum Beispiel vom europäischen (Ph. Eur.) oder amerikanischen Arzneibuch (USP). Gemäss der Ph. Eur. darf Methylrosaniliniumchlorid bis zu 10% Pentamethyl-*p*-rosaniliniumchlorid enthalten (5 Methylgruppen). Über die Probleme bei der Qualität von KV wurde bereits 2009 im Neuen Rezeptur-Formularium berichtet und dezidiert auf die Problematik der Marktverfügbarkeit von KV in Arzneibuchqualität hingewiesen [14].

Für die gesundheitliche Bewertung von KV und dessen Rückständen in der Nahrungskette einschließlich Leuko-KV empfiehlt die BfR-Kommission, die Bewertung auf die Reinsubstanz KV abzustellen und auf die Unsicherheit bezüglich der Qualität der Stoffgemische hinzuweisen, insbesondere auf den möglichen Gehalt von Michlers Keton.

## 2. Das toxikologische Profil

Im Tierversuch zeigt sich, dass KV Redox-Cycling und somit mitochondriale Toxizität auslöst, was zu einer verminderten Nahrungsaufnahme, vermindertem Wachstum und Lethargie führt. In reproduktionstoxikologischen Untersuchungen an Ratten und Kaninchen konnten Wachstumsverzögerungen der Feten nur bei ausgeprägter maternaler Toxizität festgestellt werden, insofern wurde KV nicht als teratogen angesehen. Genotoxische Untersuchungen weisen auf eine hohe Bindungsaffinität zu A-T-Paaren sowie eine hohe Zytotoxizität von KV hin, was die weitere genotoxische Untersuchung erschwert. Übereinstimmend konnten jedoch klastogene Eigenschaften festgestellt werden. Kanzerogenitätsuntersuchungen an Mäusen ergaben eine erhöhte Inzidenz von Tumoren in mehreren Organen. In Kanzerogenitätsuntersuchungen an Ratten wurde eine erhöhte Inzidenz von Schilddrüsenadenomen und hepatozellulären Adenomen festgestellt [1]. Anhand des aus den zur Verfügung stehenden Studien abgeleiteten toxikologischen Profils wurde KV [CAS: 548-62-9] in Anhang IV der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 mit der Einstufung Carc. 2-H351 („kann vermutlich Krebs erzeugen“) aufgenommen. Wenn Michlers Keton in Konzentrationen grösser als 0,1 % enthalten ist, ändert sich die Kanzerogenitätseinstufung zu Carc. 1B-H350 („kann Krebs erzeugen“) [2,6]. Die WHO kommt

<sup>1</sup> Dieser Satz wurde auf der Kommissionssitzung am 10.11.2020 redaktionell konkretisiert, um Missverständnisse zu vermeiden.

in ihrer Einstufung zu der Schlussfolgerung, dass KV genotoxisch ist, und dass seine kanzerogene Wirkung in Ratten und Mäusen auf einem genotoxischen Wirkmechanismus basiert [1]. Somit kann für KV kein Schwellenwert wie der „no observed adverse effect level“ (NOAEL) und somit kein ADI bzw. MRL festgelegt werden.

Die herstellungsbedingten Verunreinigungen *N,N*-Dimethylanilin und Michler's Keton tragen zum toxikologischen Profil bei: *N,N*-Dimethylanilin wird als schwaches Kanzerogen eingestuft, während die Genotoxizität unklar ist [12]. Michler's Keton dagegen ist ein Klastogen sowie eindeutig ein Kanzerogen in Maus und Ratte [13]. Über eine mögliche Bildung von Nitrosometaboliten liegen keine wissenschaftlichen Informationen vor.

### 3. Metabolismus

KV wird *in-vivo* hauptsächlich in Leuko-KV umgewandelt. Letzteres ist von deutlich geringerer Polarität und persistiert im Gewebe. Weitere metabolische Veränderungen umfassen Demethylierungen, Ring-Hydroxylierung, *N*-Acetylierung und Mischungen dieser Reaktionen. Leuko-KV ist nicht intensiv getestet, aber die Leukovariante von Malachitgrün wird als kanzerogen [10] eingestuft und Leucopararosanilin (die vollständig demethylierte Version von Leuko-KV) erweist sich bei Ratten und Mäusen eindeutig als kanzerogen [15]. Deshalb betrachtet die BfR-Kommission Leuko-KV ebenfalls als Kanzerogen.

*N,N*-Dimethylanilin und Michler's Keton werden ebenfalls durch Demethylierung, Ring-Hydroxylierung, *N*-Acetylierung und Mischungen derselben verstoffwechselt.

### 4. Expositionsquellen

Aufgrund der genannten legalen technischen Anwendungen kann es zu einer signifikanten Umweltbelastung durch KV und Leuko-KV und seinen herstellungsbedingten Verunreinigungen und Schwermetallrückständen kommen, da ungefähr 10-15 % des Farbstoffs ins Abwasser gelangen. KV-Rückstände können dann nach Aufnahme durch Fische in die Nahrungskette gelangen. In der EU wurden 2012 über 630 000 Tonnen Zuchtfisch und Meeresfrüchte produziert. Von den 8264 genommenen Proben enthielten 39 (0,47 %) grenzwertüberschreitende Konzentrationen von Farbstoffen, insbesondere Varianten von Malachitgrün/Leukomalachitgrün und KV/Leuko-KV [11].

#### 4.1 Abschätzung der Exposition

Es gibt derzeit nur wenige Hinweise darauf, dass KV weiterhin illegal als Tierarzneimittel eingesetzt wird, jedoch wurde im August 2017 eine Meldung im Schnellwarnsystem der Europäischen Union mit Gehalten von bis zu 6,2 µg/kg Leuko-KV in Fischen veröffentlicht [16]. Nahezu identische Ergebnisse mit 6,5 µg/kg KV lieferte die Studie von Conti et al. aus dem Jahr 2015 [7]. Obwohl es nur vereinzelt Befunde im NRKP (Nationaler Rückstandskontrollplan) aus den letzten Jahren gibt, ist die Verbindung somit dennoch von einer gewissen toxikologischen Bedeutung.

Unter der Annahme des Verzehrs von 300 g kontaminiertem Fisch, der mit Rückständen in Höhe von 0,5 µg/kg sowie hypothetisch dem 10-fachen Wert von 5 µg/kg belastet ist, ergibt sich eine theoretische Exposition gegenüber KV zwischen 0,0025 und 0,025 µg/kg KG/Tag für einen Mensch mit einem Körpergewicht von 60 kg.

## 5. Modelle zur toxikologischen Einschätzung von Kristallviolett

Zur toxikologischen Einschätzung von KV bieten sich bei der beschriebenen Datenlage sowohl das durch das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) anerkannte „Margin of Exposure“- (MoE) bzw. „Benchmark dose“-Konzept (BMD) als auch das Konzept des „Thresholds of Toxicological Concern“ (TTC) an [1, 4, 8, 9].

### 5.1. Toxikologische Einschätzung von Kristallviolett nach dem BMD-/MoE-Konzept

Als entscheidende Studie für eine BMD-Betrachtung für KV wurden die 24-Monatsdaten der Kanzerogenitätsstudie in der Maus herangezogen, in der Adenome und Karzinome in der Leber der weiblichen Mäuse festgestellt worden waren [1]. Mit Hilfe der Benchmark Dose Software der US Environmental Protection Agency wurde der niedrigste BMD<sub>10</sub>-Wert auf 19,9 mg/kg KG und der niedrigste BMDL<sub>10</sub> auf 16,8 mg/kg KG geschätzt. Wie in Punkt 4.1 ausgeführt, ergibt sich eine theoretische Exposition gegenüber KV zwischen 0,0025 und 0,025 µg/kg KG/Tag für einen Mensch mit einem Körpergewicht von 60 kg. Ein Vergleich mit den geschätzten Expositionen in Verbindung mit dem BMDL<sub>10</sub> von 16,8 mg/kg KG ergibt einen MoE von ca. 6.720.000 bzw. 672.000.

Wendet man einen Sicherheitsabstand von 10.000 auf obige BMDL<sub>10</sub> an, so ergäbe sich eine als mit wahrscheinlich geringem Risiko einzustufende humane Exposition von 1,68 µg KV /kg KG pro Tag. Bei einem Körpergewicht von 60 kg wäre demnach eine tägliche Aufnahme von bis zu 101 µg KV pro Tag vertretbar.

Diese Abschätzung der Exposition im Vergleich zum BMD<sub>10</sub>-Wert belegt, dass von der Exposition gegenüber KV keine Gefahr für den Menschen zu erwarten ist.

### 5.2 Toxikologische Einschätzung von Kristallviolett nach dem TTC-Konzept

Das TTC-Konzept definiert unter Berücksichtigung spezifischer Anwendungskriterien für Substanzen mit bekannter chemischer Struktur nach oraler Aufnahme eine „virtuelle sichere Dosis“. Mit dem TTC-Konzept lassen sich auch genotoxische Kanzerogene wie KV bewerten. Als virtuelle sichere Dosis für genotoxische Kanzerogene werden Dosen < 0,0025 µg/kg KG/Tag bzw. < 0,15 µg/Tag angesehen. Dieser Wert basiert auf dem toxikologischen Kanzerogenitätspotential, das als empfindlichster toxikologischer Endpunkt innerhalb dieses Bewertungsschemas angesehen wird.

KV erfüllt die Voraussetzungen für eine Bewertung nach dem TTC-Konzept, da es keine der Ausschlusskriterien erfüllt (KV enthält weder Aflatoxin-, N-Nitroso- noch Azoxy-Strukturelemente, ist kein Schwermetalle, und gehört weder zur Strukturklasse der polychlorierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), noch zu den Steroiden oder Proteinen). Darüber hinaus wird festgestellt, dass aufgrund der verfügbaren Datenbasis die Exposition des Menschen gegenüber KV aus Nahrung und Trinkwasser genügend konservativ geschätzt werden kann.

Wie in Punkt 4.1 ausgeführt, ergibt sich eine theoretische Exposition gegenüber KV von 0,0025 µg/kg KG/Tag für einen Mensch mit einem Körpergewicht von 60 kg bei Annahme von Rückständen in Höhe von 0,5 µg/kg und Verzehr von 300 g kontaminiertem Fisch. Nach dem TTC-Konzept wäre so eine Exposition gerade noch tolerabel. Die in Punkt 4.1 angeführte höhere Exposition von 0,025 µg/kg KG/Tag resultierend aus mit 5 µg/kg KV kontaminiertem Fisch ist nach dem TTC-Konzept jedoch nicht mehr tolerabel. Dies führt für die Bewertung von

KV unter Anwendung des TTC-Konzepts zu einem Wert von weniger als 0,0025 µg/kg KG/Tag entsprechend weniger als 0,15 µg/Tag [8].

Die Abschätzung der Exposition im Vergleich zum TTC-Wert belegt, dass nur das niedrigere von beiden Expositionsszenarien zu einer für den Menschen tolerablen Exposition führt, von dem keine Gefahr für den Menschen zu erwarten ist.

### **5.3 Vergleich der toxikologischen Einschätzung von Kristallviolett nach BMD/MoE- bzw. TTC-Konzept**

Aus der, mit dem BMD-/MoE-Konzept ermittelten tolerablen Exposition von 1,68 µg KV/kg KG pro Tag ergeben sich Werte von 101 µg/Tag bezogen auf 60 kg Körpergewicht. Dieser Expositionswert liegt deutlich über der nach dem TTC-Konzept ermittelten tolerablen Aufnahme für KV von 0,15 µg/Tag [9]. Das TTC-Konzept stellt somit das konservativere Bewertungskonzept dar.

## **6. Empfehlung der BfR-Kommission für pharmakologisch wirksame Stoffe und Tierarzneimittel**

Die BfR-Kommission weist darauf hin, dass KV aufgrund der bisher für diese Substanz beschriebenen toxikologischen Eigenschaften sowie der gesetzlichen Regelungen nicht in Lebensmittel liefernden Tieren angewendet werden darf.

Die BfR-Kommission kommt für Rückstände von KV und seinem Metaboliten Leuko-KV in Lebensmitteln zu dem Schluss, dass sowohl das TTC-Konzept als auch das BMD-/MoE-Konzept anwendbar sind. Für die toxikologische Bewertung von Rückständen von KV in Lebensmitteln stellt das TTC-Konzept gegenüber anderen Modellen den konservativeren Ansatz dar und die BfR-Kommission empfiehlt den TTC-Wert von weniger als 0,0025 µg/kg KG/Tag entsprechend weniger als 0,15 µg/Tag für die gesundheitliche Bewertung von KV-Rückständen in Lebensmitteln heranzuziehen. Dieser Wert ist auch für sensible Verbrauchergruppen gültig.

Nicht abschließend einschätzen konnte die BfR-Kommission den möglichen Einfluss der für technisches KV typischen Verunreinigungen, wie z.B. den von Rückständen von Schwermetallen oder Nebenprodukten geringeren Methylierungsgrads, die in technischem KV, das nicht zur Anwendung als Arzneimittel vorgesehen ist, in Konzentrationen von bis zu 25 % vorkommen kann.

Aufgrund der sich aus der Verwendung von technischem KV ergebenden Unsicherheiten empfiehlt die BfR-Kommission die Verwendung des TTC-Konzepts mit seinem konservativeren Ansatz. Aus toxikologischer Sicht sollte die tägliche Aufnahme für die Summe aus KV und Leuko-KV 0,0025 µg/kg KG/Tag bzw. 0,15 µg/Tag nicht überschreiten.

### **Weitere Informationen zur BfR-Kommission für pharmakologisch wirksame Stoffe und Tierarzneimittel**

[https://www.bfr.bund.de/de/bfr\\_kommission\\_fuer\\_pharmakologisch\\_wirksame\\_stoffe\\_und\\_tierarzneimittel-11088.html](https://www.bfr.bund.de/de/bfr_kommission_fuer_pharmakologisch_wirksame_stoffe_und_tierarzneimittel-11088.html)

## Literatur

1. WHO/FAO (2014). Evaluation of certain veterinary drug residues in food, page 45 ff. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: Seventy-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO technical report series no. 988). ISBN 978 92 4 120988 5
2. ECHA (2012a). Doc: ED/87/2012, Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List (Decision of the European Chemicals Agency)
3. ECHA (2012b). Support Document for Identification of Basic Violet with Michler's Ketone or Michler's Base  $\geq 0.1\%$  as SVHC, adopted 7<sup>th</sup> June 2012
4. EFSA, Penninks A, Baert K, Levorato S und Binaglia M (2017). Scientific report on the dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA Journal 2017;15(7):4920, 43 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4920>
5. Docampo R und Moreno SNJ (1990). The metabolism and mode of action of gentian violet. Drug Metabolism Reviews 22, 161–178.
6. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.
7. Conti GO, Copat C, Wang Z, D'Agati P, Cristaldi A und Ferrante M (2015). Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. Food Control 50, 937-941 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.050>
8. Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, Schilter B, Schlatter J, van Schothorst F, Vos JG und Würtzen G (2004). Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. Food Chem Toxicol. 42, 65-83
9. Renwick A, Leblanc JC und Setzer RW (2010). Application of the margin of exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Leucomalachite green. Food and Chemical Toxicology 48 (Supplement 1), S75-S80
10. Rao KV und Fernandes CL (1996). Progressive effects of malachite green at varying concentrations on the development of N-nitrosodiethylamine induced hepatic preneoplastic lesions in rats. Tumori 82, 280-286.
11. European Food Safety Authority (2014). Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2014:EN-540. 65pp.
12. NTP (1989). Toxicology and Carcinogenesis Studies of N,N-Dimethylaniline (CAS No. 121-69-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program Technical Report Series 360, 1-181.
13. NCI (1979). Bioassay of Michler's Ketone for Possible Carcinogenicity. NCI Technical Report Series no. 181. DHEW (NIH) Publication No. 79-1737. Bethesda, MD: National Institutes of Health. 106 pp.
14. NRF/SR (2011). Standardisierte Rezepturen (NRF/SR). 5. Auflage. Govi, Eschborn 2011, ISBN 978-3-7741-1139-4, S. 171
15. NTP (1986). Toxicology and Carcinogenesis Studies of C.I. Basic Red 9 Monohydrochloride (Pararosaniline) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). National Toxicology Program Technical Report Series 285, 1-230
16. RASFF Portal Notification 2017.1317: unauthorised substance leucocrystal violet (6.2 µg/kg - ppb) in farmed trout from Germany