

Prof. Dr. Edmund Maser
Institut für Toxikologie und Pharmakologie
für Naturwissenschaftler
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Brunswiker Strasse 10
24105 Kiel

Kiel, 4.12.2016

Expertise für Greenpeace e.V. zum Thema: Ethoxyquin im Lachs

Einleitung

Ethoxyquin wurde in den frühen 1920-er Jahren für die Gummi-Industrie entwickelt. Hier diente es als Oxidationsschutz, um in der Reifenproduktion das oxidationsbedingte Brüchigwerden der noch größtenteils aus Naturkautschuk hergestellten Reifen zu verhindern. Ethoxyquin verhindert im Gummi die Oxidation von Isoprenen. Dadurch bleibt die Elastizität erhalten und es kommt zu keinen Rissen im Gummi.

Die hohe anti-oxidative Effizienz von Ethoxyquin sowie dessen kostengünstige Produktion wurde von Monsanto (USA) genutzt, um den Zusatz von Ethoxyquin als Oxidationsschutz im Tierfutter zu entwickeln. Im Tierfutter schützt Ethoxyquin die Lipidperoxidation (v.a. der mehrfach ungesättigten Fettsäuren), also das Ranzigwerden der Fette. Damit bleibt nicht nur der Geschmack des Tierfutters erhalten, sondern es werden auch fettlösliche Vitamine (A, E) stabilisiert.

Häufig werden besonders empfindliche Komponenten, wie Fischmehl und Fischöl, schon während der Produktion mit Ethoxyquin versetzt. Damit verlängert sich die Haltbarkeit des Tierfutters, was v.a. für die Lagerung und den Transport wichtig ist. Einige Transportunternehmer akzeptieren (z. B. in Brasilien) auch nur mit Ethoxyquin versetztes Fischmehl. Die Internationale Maritime Organisation der UN (IMO) schreibt z.B. vor, dass Fischmehl mindestens 400 mg/kg Ethoxyquin enthalten muss (sogar 1000 mg/kg wenn der Fettgehalt 12% übersteigt).

Zur Zeit wird Ethoxyquin in Dosenfutter für Hunde, sowie im Fisch- und Geflügelfutter verwendet. Ethoxyquin wird v.a. im großen Umfang zur Konservierung von Fischfutter in Aquakulturen eingesetzt. Hier reichert sich Ethoxyquin selbst und eines seiner Stoffwechselprodukte, das Ethoxyquin-Dimer, im Fischgewebe an.

Gesundheitliche Gefahren

Eine genaue Einschätzung der chronischen Toxizität von Ethoxyquin für den Menschen (also nach längerfristiger Aufnahme in den Körper) ist heute gar nicht möglich, weil es viel zu wenige Daten zur Exposition und Wirkung gibt. Dies wird dadurch erschwert, das Ethoxyquin im Organismus (auch z.B. im Fisch) verstoffwechselt und in verschiedene Metabolite

umgewandelt wird. Von einigen Haupt-Metaboliten, z.B. dem in großer Menge entstehendem Ethoxyquin-Dimer, weiß man bezüglich der Toxizität noch weniger, als von Ethoxyquin selbst.

Außerdem hat das Dimer eine längere Halbwertszeit (14 Tage) als das Ethoxyquin selbst (2,4 Tage) und akkumuliert im Gewebe. Deshalb wird das Dimer auch nicht während der üblichen Aushälterung vor der Schlachtung (Verringerung des Fischgeruchs – bei Lachsen für gewöhnlich 14 Tage ohne Fütterung) eliminiert. Im Gegenteil, während der Aushälterung wird ein Teil des Ethoxyquins in das Dimer umgewandelt und eingelagert. So wurden in einigen Lachsfleisch-Proben aus Fischfarmen im Vergleich zu Ethoxyquin 10-mal höhere Konzentrationen des Ethoxyquin-Dimers gefunden. Es liegt auf der Hand, dass eine toxikologische Bewertung des Ethoxyquins auch die entstandenen Metabolite mit einschließen muss, sofern deren Harmlosigkeit nicht nachgewiesen ist.

Während in *in vivo* Studien mit Ratten keine toxischen Effekte des Ethoxyquin-Dimers in Nieren und Leber gefunden wurden, fanden andere Autoren in Experimenten mit menschlichen Lymphozyten, dass das Ethoxyquin-Dimer die gleichen zytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften hat wie Ethoxyquin selbst. Aufgrund der wenigen Studien und der unsicheren Lage, schätzt deshalb die Europäische Lebensmittelbehörde (EFSA) die genotoxischen Wirkungen des Ethoxyquin-Dimers vorläufig als vergleichbar mit denen des Ethoxyquins (s.u.) ein.

Ein weiterer, problematischer Metabolit ist das Ethoxyquin-Chinon-Imin, von dessen Struktur die EFSA ableitet, dass es möglicherweise mutagene, karzinogene und DNA-bindende Eigenschaften hat. Als Nebenprodukt der Herstellung von Ethoxyquin wird auch die Substanz *p*-Phenetidin gefunden, die im Produkt nicht mehr als 3 % betragen soll. *p*-Phenetidin ist ein mögliches Mutagen und muss deshalb auch als toxikologisch relevant betrachtet werden.

Eine große Unsicherheit in der toxikologischen Bewertung von Ethoxyquin ist die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung: so hat man gefunden, dass Ethoxyquin in niedrigen Konzentrationen eine anti-oxidative Wirkung hat und im Tierversuch sogar vor karzinogenen Substanzen schützt. So wurde die antioxidative Wirkung von Ethoxyquin in Mäusen, Ratten und Hamstern gesehen, die mit dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid behandelt wurden. Hier reduzierte Ethoxyquin z.B. die Schädigungen der DNA und den Chromosomen. In Zellkultur-Experimenten, schützte Ethoxyquin in Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM menschliche Lymphozyten gegen Hydrogenperoxid-induzierte Schädigung der DNA.

Im Gegensatz dazu zeigte Ethoxyquin in hohen Konzentrationen pro-oxidative Eigenschaften und kann offensichtlich dem Körper schaden. Allerdings gibt es zur Zeit keine sicheren Erkenntnisse zur toxischen Wirkungen von Ethoxyquin im menschlichen Körper. Bei Menschen, die beruflich Ethoxyquin exponiert waren (Farmarbeiter), wurden allergische Reaktionen und entzündliche Reaktionen (Dermatitiden) der Haut beobachtet, aber gesicherte Expositionsstudien fehlen.

Hinweise auf die toxischen Eigenschaften von Ethoxyquin stammen v.a. aus Tierexperimenten und Zellkulturstudien.

Bei Tierexperimenten stellten sich Hunde als empfindlichste Spezies dar und die ersten Berichte gingen bereits 1988 bei der FDA (USA) ein. Hundebesitzer und Tierärzte hatten verschiedene Symptome beobachtet, wie Nierenfunktionsstörungen, Schilddrüsenunterfunktionen, Störungen der Reproduktion, teratogene und karzinogene Effekte sowie allergische Reaktionen und eine Vielzahl von Haut- und Haarabnormalitäten.

Ethoxyquin zeigte eine geringe akute Toxizität (z.B. oral bei Ratten eine $LD_{50} = 1.700$ mg per kg Körpergewicht). In niedrigerer Dosierung zeigten sich aber auch hier schon Symptome wie Gewichtsverlust ab, sowie Schäden in Leber, Nieren und im Verdauungstrakt. Bei Hunden, als sensibelste Spezies, genügten schon 2,5 mg pro kg Körpergewicht und Tag, um klinische Anzeichen einer Ethoxyquin-Toxizität und Leberschäden festzustellen.

Auf zellulärer Ebene wurden – konzentrationsabhängig - in Leber-, Herz- und Nierenzellen Schäden der mitochondrialen Atmungskette gesehen, welche in Verbindung mit einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs gesehen wurden. Zellkulturstudien zeigten, dass Ethoxyquin die Zellen sowohl in die Apoptose als auch Nekrose führen kann.

Auf subzellulärer Ebene wurde gesehen, dass Ethoxyquin die metabolische Kapazität der Leberzellen beeinflusst. So wurden einige Leber-Enzyme (wahrscheinlich durch einen genomischen Mechanismus) vermehrt gebildet. Ethoxyquin kann somit die Menge der Leberenzyme erhöhen und dementsprechend die Stoffwechselwege in der Leber verändern. Es gilt als Induktor von Phase I und Phase II Enzymen.

Insgesamt ist festzustellen, dass die langfristigen Fütterungsversuche (3 – 30 Monate) im Säugermodell (ab Ethoxyquin-Konzentrationen von 200 mg/kg Körpergewicht bei Ratten und 10 mg/kg bei Hunden) degenerative und pathologische Veränderungen v.a. Leber, Schilddrüse und Niere gezeigt haben. Dementsprechend muss geschlossen werden, dass eine langfristige Belastung durch hohe Konzentrationen von Ethoxyquin in Lebensmitteln auch zu einer Gesundheitsgefährdung des Menschen führen kann.

Hinsichtlich einer mutagenen Wirkung von Ethoxyquin existieren in der Literatur widersprüchliche Daten. So wurden im Ames-Test (Testsystem für mutagene Wirkungen) mit verschiedenen *Salmonella typhimurium* Stämmen sowohl positive als auch negative Effekte von Ethoxyquin gesehen. In einigen *in vitro* und *in vivo* Studien zeigte Ethoxyquin allerdings genotoxische und Chromosomen-schädigende Wirkungen, so dass man diese Substanz bezüglich einer krebserzeugenden Wirkung nicht freisprechen kann. Der Mechanismus einer möglichen krebserzeugenden Wirkung liegt wahrscheinlich an der pro-oxidativen Aktivität von Ethoxyquin. In der Folge kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche die DNA schädigen.

Gesetzliche Regulierung

Die Frage, ob Ethoxyquin gesundheitsschädlich ist liegt auf der Hand. Immerhin wurde es früher als Pestizid verwendet. Seit 2011 ist Ethoxyquin als Pflanzenschutzmittel in der Europäischen Union und in der Schweiz nicht mehr zugelassen.

Hohe Konzentrationen von Ethoxyquin im Tierfutter können einerseits die Tiere selbst schädigen, andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Gesundheit des Menschen durch den Verzehr von Ethoxyquin-haltigem Fisch beeinträchtigt wird. Als Zusatzstoff ist Ethoxyquin (E 324) mit einem Höchstgehalt von 150 mg/kg (Hundefutter 100 mg/kg) im Tierfutter für alle Spezies zugelassen. Auch in den USA gilt diese Regelung. Hier wird Ethoxyquin u.a. zur Behandlung von getrockneten Futterpflanzen (Mais, Weizen und Hafer) eingesetzt, um den oxidationsbedingten Verlust von Vitamin E und Carotin zu verhindern.

In der EU ist heute Ethoxyquin zur Haltbarmachung von Lebensmitteln nicht mehr erlaubt.

Seit Ethoxyquin nicht mehr als Pestizid zugelassen ist, galt auch die bis 2011 in der Rückstands-Höchstmengenverordnung maximal zulässige Konzentration von 0,01 mg/kg für Lebensmittel nicht mehr. Ohne festgelegte Höchstmenge war aber der Verbraucherschutz hier rechtlich unzureichend sichergestellt. Immerhin hat man in der EU reagiert und im Juni 2014 den Rückstandshöchstgehalt für Ethoxyquin in vielen pflanzlichen Produkten und einigen Erzeugnissen tierischen Ursprungs geregelt. So wurde etwa für Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch eine Rückstands-Höchstmenge von 50 Mikrogramm pro kg festgelegt. Leider gibt es aber keine Regelung für Fisch, wobei doch gerade der Fisch in Zuchtfarmen mit Ethoxyquin-haltigem Futter gefüttert wird.

Die empfohlene Höchstmenge an Ethoxyquin, die ein Mensch lebenslang täglich aufnehmen kann, ohne gesundheitliche Beeinträchtigungen zu bekommen (**ADI**-Wert = „Acceptable Daily Intake“) wurde im Jahr 2005 vom JMPR („Joint Meeting on Pesticide Residues“) von der WHO und der FAO („Food and Agriculture Organization of the United Nations“) auf **0,005 mg/kg Körpergewicht und Tag** festgelegt. Für einen 60 kg schweren Menschen wären das 0,3 mg Ethoxyquin pro Tag als Gesamtbelastung. Zusätzlich wurde ein **ARfD**-(akute Referenzdosis)-Wert von **0,5 mg/kg** ausgewiesen (dies ist die von der WHO festgesetzte Menge pro kg Körpergewicht, die über die Nahrung mit einer Mahlzeit oder innerhalb eines Tages ohne erkennbares Risiko für den Konsumenten aufgenommen werden kann).

Japan hat vor einigen Jahren das obligatorische Testen auf Ethoxyquin in Shrimps angeordnet, die aus Indien importiert werden. Gleichzeitig hat man den Höchstgehalt von 1 mg pro kg auf 0.01 mg, also 10 Mikrogramm pro kg Shrimp abgesenkt. Dieser Erlaß hat zu erheblichen Problemen der Shrimp-Produzenten in Indien geführt. Als Begründung wurde auch hier das sog. „Carry Over“ angegeben. Das ist der Übergang von Ethoxyquin aus tierischen Produkten (u.z. solchen Tieren, die mit Ethoxyquin-haltigem Futter gefüttert wurden) auf den Menschen.

Es reicht aber nicht aus, nur das Ethoxyquin selbst zur Dosisfindung heranzuziehen, aber z.B. nicht dessen Hauptmetabolit Ethoxyquin-**Dimer**. Wie oben schon dargelegt, kann eben letzteres in bis zu **10-mal höheren Konzentration** im Fischfleisch vorliegen.

Ist es sicher, Fische zu essen, die mit Ethoxyquin-haltigem Futter aufgezogen wurden?

Bei einem Verzehr von 300 g Muskelfleisch (dies ist nach RL 2001/79/EG die tägliche Verzehrmenge zur Festlegung von Rückständen) würde eine Person mit einem Körpergewicht von 60 kg rund 10 % (0,03 mg Ethoxyquin bei einer Ethoxyquin-Menge von 0,1 mg/kg Muskelfleisch) des empfohlenen ADI-Wertes von 0,3 mg/Tag (s.o.) ausschöpfen. Die Belastung für den Verbraucher wäre damit also relativ gering.

Würde aber das Ethoxyquin-Dimer mit einer ca. 10-fach höheren Konzentration eingerechnet (tatsächlich sind Konzentrationen des Ethoxyquin-Dimers von bis zu 1 mg/kg im Muskelfleisch von Lachsen gefunden worden), würde der ADI-Wert zu 100 % (!) ausgeschöpft.

Basierend auf den heute verfügbaren Zahlen zur Toxizität von Ethoxyquin würde allerdings bei einem üblichen Fischverzehr von 1 – 2-mal pro Woche (wie von der deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlen) keine gesundheitlichen Probleme zu erwarten sein.

Andererseits muß aber darauf hingewiesen werden, dass Ethoxyquin u.U. auch aus anderen Nahrungsmitteln in den menschlichen Körper gelangen kann. Die Verwendung von Ethoxyquin in Lebensmitteln für den Menschen ist zwar generell verboten (Ausnahmen sind die Verwendung in Paprika- und Chilipulver, sowie der oberflächliche Einsatz als Schutz vor Schalenfäule bei Äpfeln und Birnen), da aber Ethoxyquin in Futtermitteln zugelassen ist, muß damit gerechnet werden, dass weitere Produkte für die menschliche Ernährung Ethoxyquin enthalten, z.B. Fischmehl, Fischöle, sowie andere Öle, tierische Fette und Fleisch.

Ratschläge für den Verbraucher

Für Ethoxyquin besteht keine Deklarationspflicht. Hersteller müssten ihre Produkte freiwillig selbst auf Ethoxyquin testen und deklarieren (was bisher nicht gemacht wird). Zur Vermeidung eines potentiellen Risikos sollten Verbraucher, die viel Fisch essen z.B. auf Wildlachs ausweichen. Dieser Fisch wurde in freier Wildbahn gefangen und eben nicht in Lachsfarmen gezüchtet. Somit kann man davon ausgehen, dass im Wildlachs kein Ethoxyquin enthalten ist.

Fazit:

Es existieren einfach zu wenige Daten über die toxischen bzw. gesundheitsgefährdenden Wirkungen von Ethoxyquin, um ein Risiko für den Menschen abzuschätzen. Hier müssen

belastbare Expositionsstudien und Studien zu Mechanismen der Toxizität durchgeführt werden. Aus Vorsorgegründen bzw. vorbeugendem Gesundheitsschutz des Verbrauchers muss der Einsatz von Ethoxyquin sofort strenger geregelt und kontrolliert werden. Vor allem muss dringend eine Deklarationspflicht für Ethoxyquin-haltige Lebensmittel gefordert werden. Sollten sich die gesundheitsschädlichen Wirkungen von Ethoxyquin und seinen Metaboliten bestätigen, muss diese Substanz als Tierfuttermittelzusatz verboten werden. Parallel dazu sollten heute schon Alternativen zur Haltbarkeitsmachung von Futtermitteln entwickelt werden.

Glossar:

- Zytotoxisch: Fähigkeit einer chemischen Substanz, Zellen oder Gewebe zu schädigen.
 Genotoxisch: Wirkung chemischer Stoffe, die Änderungen im genetischen Material von Zellen auslösen.
 Mutagen: äußere Einwirkungen von physikalischen oder chemischen Einflüssen, die das Erbgut verändern können.
 Karzinogen: Substanz, die Krebs auslösen kann.
 Teratogen: äußere Einwirkungen, die zu Schädigungen von Embryonen führen können. (z.B. Chemikalien).
 Apoptose: programmierter Zelltod.
 Nekrose: absterbende Zellen, Gewebe durch schädigende Einflüsse (z. B. Gifte; Bakterien).

Literatur:

- Balange AK, Manjusha L, Venkateshwarlu. Ethoxyquin as an antioxidant: A bliss or bane? Fishing Chimes 32, 22-24, 2012.
- Benkenstein A, Adam S, Mögle S, Scherbaum E, Anastassiades M. Analysis of ethoxyquin and its metabolites in salmon using QuEChERS, CUVA Stuttgart, 2016.
- Blaszczyk A, Osiecka R, Skolimowski J. Induction of chromosome aberrations in cultured human lymphocytes treated with ethoxyquin. Mut Res 542,117-128, 2003.
- Blaszczyk A. DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes. Toxicol Lett 163, 77-83, 2006.
- Blaszczyk A, Skolimowski J. Comparative analysis of cytotoxic, genotoxic and antioxidant effects of 2,2,4,7-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and ethoxyquin on human lymphocytes. Chem-Biol Interact 162, 70–80, 2006.
- Blaszczyk A, Skolimowski J. Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin salts in human lymphocytes in vitro. Food Chem 105, 1159–1163, 2007.
- Blaszczyk A, Augustyniak A, Skolimowski J. Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. Intern J Food Sci, 2013, 1-12, 2013.
- Blaszczyk A, Skolimowski J. Cytotoxicity and genotoxicity of ethoxyquin used as an antioxidant. Food Rev Intern 31, 222-235, 2015.

Bohne VJB, Hove H, Hamre K. Simultaneous quantitative determination of the synthetic antioxidant ethoxyquin and its major metabolite in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – ethoxyquin dimer by reversed-phase HPLC and fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 90, 587–597, 2007.

Bohne VJB, Lundebye AK, Hamre K. Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chem Toxicol* 46, 1834–1843, 2008.

Ethoxyquin - Aquakultur

<http://www.aquakulturinfo.de/index.php/Ethoxyquin.html>;

EU Verordnung Nr. 703/2014 der Kommission vom 19. Juni 2014 zur Änderung der Anhänge II, III und V der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Höchstgehalte an Rückständen von Acibenzolar-S-methyl, Ethoxyquin, Flusilazol, Isoxaflutol, Molinat, Propoxycarbazon, Pyraflufen-ethyl, Quinoclamid und Warfarin in oder auf bestimmten Erzeugnissen.

EURL-SRM - Analytical Observations Report. Analysis of ethoxyquin and its metabolites in fish using the QuEChERS Method Version 1 (last update: 10.05.2016).

EFSA: European Food Safety Authority. Safety and efficacy of ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) for all animal species, doi:10.2903/j.efsa.2015.4272, 2015.

JMPR, "Pesticide residues in food—2005. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues," JMPR Report, Ethoxyquin 035, 2005, <http://www.fao.org/ag/AGP/>

Lundebye AK, Hove H, Mage A, Bohne VJB, Hamre K. Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Add Contam* 27, 1652–1657, 2010.

Ørnsrud R, Arukwe A, Bohne VJB, Pavlikova N, Lundebye AK. Investigations on the metabolism and potentially adverse effects of ethoxyquin dimer, a major metabolite of the synthetic antioxidant ethoxyquin in salmon muscle. *J Food Prot* 74, 1574-1580, 2011.

ÖKO-TEST. Räucherlachs: König im Käfig, November 2015.

U.S Food and Drug Administration, Animal and Veterinary. FDA requests that ethoxyquin levels be reduced in dog foods, 1997.

<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm127828.htm>