

1 Einleitung und Zielsetzung

Pyrrolizidinalkaloide (PAs) sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, die als Schutz vor Herbivoren von schätzungsweise mehr als 6000 der weltweit vorkommenden Blühpflanzen gebildet werden (Hartmann und Witte 1995, Smith und Culvenor 1981). In den europäischen Breitengraden werden PAs vornehmlich von Pflanzenarten der Familien Asteraceae und Boraginaceae gebildet (Röder 1995). PAs stellen im Gegensatz zu vielen anderen sekundären Pflanzenmetaboliten eine Gruppe von gesundheitsschädlichen Verbindungen dar. Als wesentliche Ursache für die toxische Wirkung wird die metabolische Aktivierung von PAs zu reaktiven Pyrrolestern in der Leber beschrieben. Die reaktiven Pyrrolester können Intoxikationen mit schweren Leberfunktionsstörungen und der Lebervenenverschlusskrankheit (VOD) hervorrufen. Abgesehen von der Hepatotoxizität wird den PAs ein genotoxisch-kanzerogenes Potenzial zugeschrieben (Mattocks 1986). Infolgedessen stellt die Aufnahme von PAs für den Menschen ein gesundheitliches Risiko dar, welches es zu vermeiden bzw. zu minimieren gilt.

In den vergangenen Jahren zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass die Gesamtexposition gegenüber PAs eine hohe Relevanz für den gesundheitlichen Verbraucherschutz besitzt (BfR 2020, EFSA 2017). Menschen nehmen PAs vornehmlich über kontaminierte Lebensmittel wie zum Beispiel Tee, Kräutertee, pflanzliche Nahrungsergänzungsmittel, Honig, Gewürze oder Kräuter auf (BfR 2020). Da bereits ein regelmäßiger Verzehr in geringen Aufnahmemengen mit einem gesundheitlichen Risiko verbunden sein kann, wird in Europa seitens der European Food Safety Authority (EFSA) und dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) empfohlen, die Exposition gegenüber PAs so weit zu minimieren, wie dies vernünftigerweise erreichbar ist (ALARA-Prinzip, Akronym für engl. *as low as reasonably achievable*) (BfR 2020, EFSA 2017).

Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes wurde bei der Ratssitzung der Europäischen Kommission im Jahr 2020 die Einführung von PA-Höchstgehalten in verschiedenen Lebensmitteln ab dem 1. Juli 2022 beschlossen (Europäische Kommission 2020). Neben den Höchstgehalten sollen auch gesetzliche Vorgaben für die Probenahme, das Analytpektrum sowie Leistungskriterien der Analysemethoden eingeführt werden. Diese Vorgaben, insbesondere die Festlegung des Analytpektrums, sollen die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen gewährleisten und stellen die Grundlage für einen zukünftig einheitlichen Vollzug in der europäischen Überwachung von PAs in Lebensmitteln dar. Die Festlegung des Analytpektrums auf eine definierte Anzahl zu untersuchender PAs in Lebensmitteln hat aufgrund der hohen Anzahl von bisher in Pflanzen nachgewiesen PAs eine hervorzuhebende Bedeutung. Gemäß der Verordnung (VO) (EU) 2020/2040 zur Änderung der VO (EG) Nr. 1881/2006 soll für die Überwachung von PA-Höchstgehalten das vom BfR vorläufig

empfohlene Analytpektrum von 21 PAs um 14 natürlich vorkommende Stereoisomere erweitert werden (BfR 2015c, Europäische Kommission 2020). Die Empfehlung des BfR wurde bereits im Jahr 2015 auf Basis von PA-Gehaltsdaten zu Tee und Kräutertee publiziert. Die Gehaltsdaten zeigten auf, dass für den gesundheitlichen Verbraucherschutz nur bestimmte PAs in quantitativ relevanten Mengen in Tee und Kräutertee vorkommen. Die Bestimmung von individuellen PAs in Lebensmitteln erfolgt für eine höhere Sensitivität und Spezifität der Analyse mittels Flüssigchromatographie in Kombination mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) über entsprechende Standardsubstanzen. Für die Analytik steht bislang allerdings nur ein Bruchteil der natürlich vorkommenden PAs als Standardsubstanzen zur Verfügung. Diese Problematik kann zum Beispiel im Rahmen der Überwachung von Höchstgehalten in Lebensmitteln eine Unterschätzung des PA-Gesamtgehalts und damit der menschlichen Exposition gegenüber PAs zur Folge haben. Die Unterschätzung kann ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher bedeuten.

Um den Verbraucher vor dieser Problematik zu schützen sowie dieser entgegenzuwirken, sollten PAs, die ein toxisches Potenzial aufweisen und in quantitativ relevanten Mengen in Lebensmitteln vorkommen können, im Analytpektrum gängiger Analysemethoden enthalten sein. Für die Ermittlung relevanter PA-Verbindungen sollen im Rahmen dieser Arbeit die PA-Profile von neun PA-bildenden Pflanzenarten charakterisiert werden, die als Kontaminationsquelle in Lebens- und Futtermitteln eine Rolle spielen. Die charakterisierten Profile sollen Aufschluss geben, welche PAs hinsichtlich ihrer Struktur und quantitativen Verteilung in der Pflanze eine übergeordnete Bedeutung für das Analytpektrum gängiger Analysemethoden und damit für den gesundheitlichen Verbraucherschutz besitzen. Weiterhin soll beurteilt werden, ob das für die Überwachung von Höchstgehalten festgelegte Analytpektrum angemessen ist, um den tatsächlichen PA-Gehalt von PA-Pflanzenprofilen sowie Tee und Kräutertee quantitativ abzuschätzen. Für die Charakterisierung der PA-Profile und die Bestimmung von PAs in Tee und Kräutertee soll eine Analysemethode mittels Flüssigchromatographie in Kombination mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HR-MS) entwickelt werden, die in ihrer Erfassung unabhängig von der Verfügbarkeit von Standardsubstanzen ist. Die Methode umfasst bekannte und unbekannte PAs, welche im Vorfeld mit Hilfe von massenspektrometrischen Screening- und Bestätigungsexperimenten in den ausgewählten Pflanzenarten identifiziert wurden.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Pyrrolizidinalkaloide

PAs sind Verbindungen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, welche der Pflanze in ihrer Funktion vornehmlich als Schutz vor Herbivoren dienen (Hartmann und Witte 1995). Schätzungsweise bilden etwa 3 % der weltweit vorkommenden Blühpflanzen PAs (Smith und Culvenor 1981). Die Fähigkeit zur Biosynthese dieser Verbindungen ist für 13 verschiedene Pflanzenfamilien beschrieben (Wiedenfeld et al. 2008). Hervorzuheben sind die Familien Asteraceae (Tribus Eupatoreiae und Senecioneae), Boraginaceae (viele verschiedene Gattungen), Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) und Orchidaceae (10 verschiedene Gattungen), da diesen Pflanzenfamilien weltweit mehr als 95% der PA-haltigen Pflanzenarten zugeordnet sind (Hartmann und Witte 1995). Der Verzehr von PA-haltigen Pflanzen stellt für Menschen und Tiere aufgrund der nachgewiesenen toxischen Eigenschaften ein gesundheitliches Risiko dar (BfR 2020, EFSA 2017, Mattocks 1986, Stegelmeier et al. 1999).

2.1.1 Struktur

Chemisch betrachtet, handelt es sich bei PAs hauptsächlich um Esteralkaloide, die aus einer Necinbase und einer oder zwei aliphatischen Monocarbonsäuren oder einer Dicarbonsäure (Necinsäure) aufgebaut sind. In Abhängigkeit des Veresterungsgrads werden die PAs in Monoester, offenkettige und makrozyklische Diester unterteilt (s. Abbildung 2-1) (Hartmann und Witte 1995, Wiedenfeld et al. 2008).

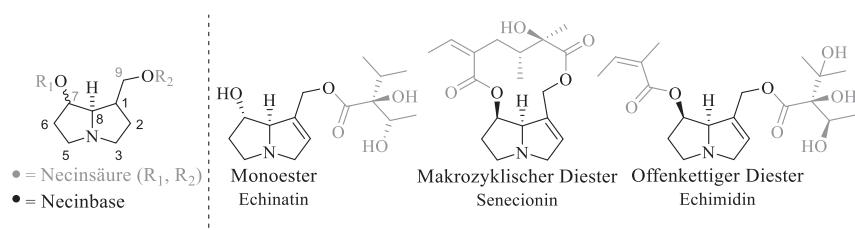


Abbildung 2-1: Basisstruktur der PAs (graue Markierung: Necinsäure, schwarze Markierung: Necinbase) sowie Strukturen der verschiedenen Esterarten am Beispiel von Echinatin (Monoester), Senecionin (makrozyklischer Diester) und Echimidin (offenkettiger Diester).

Die Necinbasen sind aufgebaut aus einem bizyklischen über Stickstoff verknüpften Fünfring-Ringsystem, welches üblicherweise in Position C1 mit einer Hydroxymethylgruppe (1-

Hydroxymethylpyrrolizidin) und in den meisten Fällen in Position C7 mit einer Hydroxygruppe substituiert ist. Substitutionen mit Hydroxygruppen in Position 2, 3, 5 oder 6 der Necinbase sind in der Natur selten vorzufinden (El-Shazly und Wink 2014, Hartmann und Witte 1995). Das bizyklische Ringsystem kann in 1,2-Stellung gesättigt oder ungesättigt vorliegen. Die bekanntesten Vertreter der 1,2-ungesättigten Necinbasen sind die C7-Diastereomere Retronecin (7R) und Heliotridin (7S). Die 1,2-ungesättigte Necinbase Otonecin besteht aus einem *N*-methylierten monozyklischen Ringsystem mit einer Carbonylgruppe an Position C8. Das Ringsystem kann durch transannulare Wechselwirkung in das bizyklische Pyrrolizidin-Ringsystem überführt werden. In der Abbildung 2-2 sind die in der Natur am häufigsten vorkommenden ungesättigten und gesättigten Necinbasen dargestellt (Röder 1995).

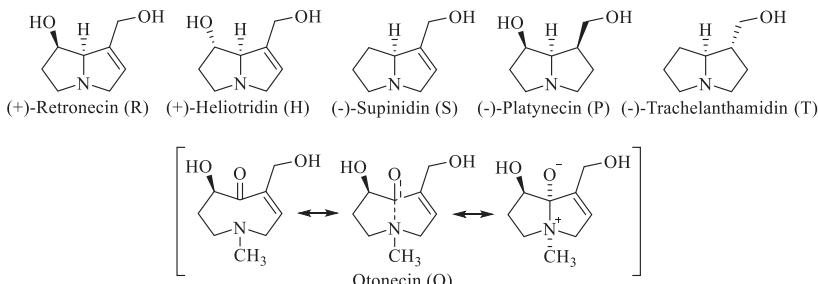


Abbildung 2-2: Strukturen der in der Natur häufig vorkommenden Necinbasen.

Die Necinsäuren stellen aliphatische Mono- oder Dicarbonsäuren mit verzweigten, in der Regel fünf bis zehngliedrigen Kohlenstoffketten dar, welche aus Hydroxy-, Alkoxy-, Epoxy- und Carboxyestergruppen aufgebaut sein können (Wiedenfeld et al. 2008). Die Abbildung 2-3 A und B zeigt Necinsäuren, die für die Pflanzenfamilien Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae charakteristisch sind (Röder 1995). In Abbildung 2-3 B sind u. a. Necinsäuren dargestellt, die einen Chlorsubstituenten aufweisen. Diese Modifikation ist bei pflanzlichen Sekundärstoffen selten zu beobachten. Die hingegen in der Natur häufig vorkommende Glykosylierung von Sekundärstoffen wurde für PAs bisher nur vereinzelt beschrieben. PA-Glykoside des 1,2-gesättigten Trachelanthamidin-Typs wurden in der Pflanzenart *Borago officinale* (Boraginaceae) sowie Arten der Familie Orchidaceae und Poaceae nachgewiesen (Herrmann et al. 2002, Koulman et al. 2008, Rizk 1991, Schramm et al. 2019).

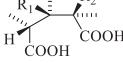
A 2-C Necinsäure:  Essigsäure (Ac)

5-C Necinsäure: 

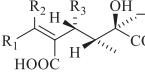
R ₁	R ₂	R ₃	Name
CH ₃	H	CH ₃	Angelikasäure (Ang)
CH ₃	CH ₃	H	Tiglinsäure (Tig)
CH ₃	CH ₃	CH ₃	Seneciosäure (Sen)

iso = Angelika-, Tiglin- oder Seneciosäure

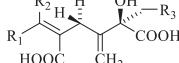
(+)-Trachelanthinsäure ((+)-Trach) (-)-Trachelanthinsäure ((-)-Trach) (+)-Viridiflorinsäure ((+)-Vir) (-)-Viridiflorinsäure ((-)-Vir) Echimidinsäure (Ech) Heliotrinsäure (Heliot) Lasiocarpinsäure (Las)

B 8-C-Necinsäure: 

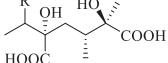
R ₁	R ₂	Name
OH	OH	Monocrotalinsäure

10-C-Necinsäure: 

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Name
CH ₃	H	H	H	Senecioninsäure
H	CH ₃	H	H	Integerrinecinsäure
H	H	CH ₃	H	Seneciverninsäure
CH ₃	H	H	OH	Isatinecinsäure
H	CH ₃	H	OH	Retronecinsäure



R ₁	R ₂	R ₃	Name
CH ₃	H	H	Seneciphyllinsäure
H	CH ₃	H	Spartiodinsäure
CH ₃	H	OH	Riddelliinsäure



R	Name
OH	Jacolinecinsäure
Cl	Jaconinecinsäure



R ₁	R ₂	Name
OH	OH	Scleratininsäure
Cl	OH	Säure des PA Merenskin

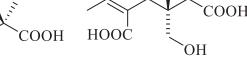


Abbildung 2-3: Charakteristische Necinsäuren der Pflanzenarten der Familie Boraginaceae und des Tribus Eupatorieae der Familie Asteraceae (A) sowie des Tribus Senecioneae der Familie Asteraceae und der Pflanzenarten der Familie Fabaceae (B).

In der Pflanze liegen die PAs in Form der tertiären Basen und/oder ihrer korrespondierenden Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxide (PANOs) vor (siehe Abbildung 2-4). Letztere entstehen durch enzymatische *N*-Oxidation (Hartmann und Witte 1995). Tertiäre Basen der Necinbase Otonecin können aufgrund des methylierten *N*-Atoms nicht zu PANOs transformiert werden (Rizk 1991, Wiedenfeld et al. 2008).

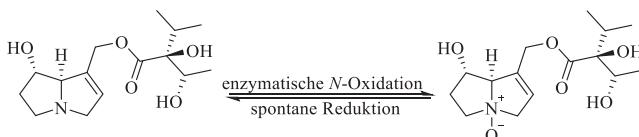


Abbildung 2-4: Darstellung der tertiären Base Echinatin und dem korrespondierenden *N*-Oxid Echinatin *N*-Oxid.

Als Folge der strukturellen Variabilität der Necinbasen und Necinsäuren ergibt sich eine hohe Anzahl an theoretisch möglichen PA- und PANo-Verbindungen (Mattocks 1986, Rizk 1991,

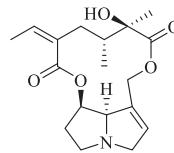
Smith und Culvenor 1981). Bisher sind mehr als 640 PAs und PANOs, vornehmlich aus den Pflanzenfamilien Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae, bekannt (El-Shazly und Wink 2014, Hartmann und Witte 1995, Mattocks 1986, Rizk 1991, Röder 1995, Smith und Culvenor 1981). Eine Übersicht über die in den Pflanzenfamilien und Pflanzenarten vorkommenden PAs und PANOs bieten Veröffentlichungen von Rizk (1991), Hartmann und Witte (1995), Langel et al. (2011) sowie El-Shazly und Wink (2014).

2.1.2 Chemotaxonomische Klassifikation

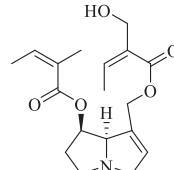
Für die chemotaxonomische Klassifikation von PAs wurde anfangs eine Unterteilung nach dem Necinbasengrundgerüst vorgeschlagen (Robins 1982). Allerdings zeigten spätere Studien, dass innerhalb einer Pflanzenart verschiedene Necinbasen nebeneinander auftreten können und diese Umwandlungen unterliegen. So können zyklische Retronecin-Typ PAs in entsprechende Otonecin-Typ PAs umgewandelt werden (Toppel et al. 1987). Unter Berücksichtigung von biogenetischen Aspekten schlugen Hartmann und Witte (1995) eine Klassifikation vor, die überwiegend auf den Merkmalen der Necinsäure(n) beruht. Dieser Vorschlag ist als Erweiterung der Klassifikation von Culvenor (1978) zu verstehen, der das Vorkommen von PAs unter Berücksichtigung von chemosystematischen und biogenetischen Aspekten auf Ebene der Pflanzengattungen und höher betrachtete. Nach der Klassifikation von Hartmann und Witte (1995) können PAs in sechs verschiedene Grundtypen unterteilt werden, dabei sind die meisten der vorkommenden PAs den in Abbildung 2-5 aufgeführten vier PA-Typen zuzuordnen. Nicht aufgeführt ist der Phalaenopsin-Typ, welcher Monoester verschiedener 1,2-gesättigter Necinbasen mit Aryl-, Aralkyl- oder Alkyl-Necinsäuren beschreibt (> 20 Strukturen, Vorkommen: Arten der Familie Orchidaceae), und der Typ „Sonstige“ (> 30 Strukturen). Der Typ „Sonstige“ umfasst u. a. PA-Ester und PA-Glykoside, die hinsichtlich ihres Aufbaus keinem der PA-Typen ähneln. Entsprechend der Abbildung 2-5 bestehen Unterschiede hinsichtlich der botanischen Verteilung der PA-Grundtypen sowie der Estertypen Monoester, offenkettiger und makrozyklischer Diester. So bilden Pflanzenarten der Familie Boraginaceae sowie des Tribus Eupatorieae der Familie Asteraceae vorwiegend PAs des Lycopsamin-Typs bzw. Monoester und offenkettige Diester, während PAs des Senecionin-Typs bzw. makrozyklische Ester für den Tribus Senecioneae der Asteraceae und für Gattungen der Fabaceae charakteristisch sind (Hartmann und Witte 1995).

Senecionin-Typ (> 100 Strukturen):

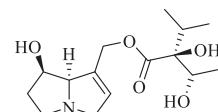
vornehmlich 12-gliedrige makrozyklische Diester, die vom PA Senecionin abgeleitet oder strukturell eng mit Senecionin verwandt sind. Vorkommen: vor allem Tribus Senecioneae (Asteraceae), auch Arten der Familie Fabaceae.

**Triangularin-Typ (> 50 Strukturen):**

Monoester oder Diester mit 5-C Necinsäuren und entsprechenden hydroxylierten Derivaten. Vorkommen: Tribus Senecioneae (Asteraceae), Arten der Familie Boraginaceae.

**Lycopsamin-Typ (> 100 Strukturen):**

Monoester oder Diester, die eine von hydroxylierter 2-Isopropylbuttersäure ableitbare 7-C Necinsäure enthalten. Vorkommen: Tribus Eupatorieae (Asteraceae), Arten der Familie Boraginaceae.

**Monocrotalin-Typ (> 30 Strukturen):**

11-gliedrige makrozyklische Diester mit Retronecin als Necinbase. Vorkommen: Gattung *Crotalaria* (Fabaceae), vereinzelt Arten der Familie Boraginaceae.

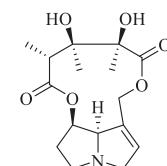


Abbildung 2-5: Chemotaxonomische Klassifikation von PAs nach Hartmann und Witte (1995).

2.1.3 Biosynthese und Variabilität von PA-Pflanzenprofilen

Die Biosynthese von PAs konnte in den vergangenen Jahren mit Hilfe von *tracer*-analytischen Fütterungsstudien, insbesondere mit ^{13}C -, 2H - und ^{15}N -markierten Verbindungen, weitestgehend aufgeklärt werden (Hartmann und Witte 1995, Schramm et al. 2019). So erfolgt die Biosynthese im Rahmen des Sekundärstoffwechsels der Pflanze, wobei der organspezifische Bildungsort abhängig von der Pflanzenfamilie ist. Während PA-haltige Pflanzenarten der Familie Asteraceae PAs ausschließlich in den Wurzeln synthetisieren (Fröhlich et al. 2007, Toppel et al. 1987), sind die Arten der Familie Boraginaceae hinsichtlich des Bildungsorts variabler. Hier findet die Biosynthese im Spross und den unteren Blättern (*Heliotropium indicum*), in den Wurzeln und jungen Blättern mit ungeöffneter Blütenknospe (*Sympytum officinale*) oder im Spross und in der Wurzel (*Cynoglossum officinale*) statt (Fröhlich et al. 2007, Kruse et al. 2017, Niemüller et al. 2012, van Dam et al. 1995). Für die

Gattung *Phalaenopsis* der Familie Orchidaceae konnten darüber hinaus die Bildungsorte Wurzel und junge Blüten nachgewiesen werden (Anke et al. 2008).

Die Substrate für die Biosynthese von PAs bzw. Necinbasen und Necinsäuren entstammen dem Primärstoffwechsel. Die Necinbase geht aus der Aminosäure Arginin oder Ornithin hervor; wobei Ornithin ausschließlich über den Arginin/Agmatin-Weg in die Biosynthese einfließt. Im weiteren Verlauf entstehen die Polyamine Putrescin und Spermidin (Hartmann et al. 1988, Robins 1989, Robins und Sweeney 1979), aus denen das erste spezifische Intermediat der PA-Biosynthese, Homospermidin, gebildet wird (Khan und Robins 1985). Die Bildung von Homospermidin wird durch das Enzym Homospermidinsynthase (HSS) katalysiert. HSS gilt als wichtiges Schlüsselenzym der PA-Biosynthese, da es den Zufluss von Homospermidin in den Sekundärstoffwechsel reguliert und damit die Bildung des PA-Gesamtgehalts in der Pflanze kontrolliert (Böttcher et al. 1993, Ober und Hartmann 1999). Homospermidin unterliegt im Gegensatz zu Putrescin und Spermidin keinem oxidativen Abbau und wird gänzlich für die Synthese der Necinbase eingesetzt. Für den weiteren Syntheseweg der Necinbase wird eine Oxidation des Homospermidins, vermutlich durch die kupferhaltige Diaminoxidase, zu 4,4'-Iminodibutanal, gefolgt von einer spontanen Zyklisierung der gebildeten Iminium-Ionen-Zwischenstufe und anschließender Reduktion zum Necinbasengrundgerüst (1-Hydroxy-methylpyrrolizidin) postuliert (Niemüller 2007, Schramm et al. 2019). Die postulierte spontane Zyklisierung würde zu den vier Necinbasengrundgerüsten (\pm)-Trachelanthamidin und (\pm)-Isoretronecanol führen, welche wiederum über die Necinbasen (\pm)-Supinidin zu stereoisomeren Gemischen von (\pm)-Retronecin und/oder (\pm)-Heliotridin überführt werden würden. In PA-haltigen Pflanzenarten konnte bisher allerdings kein Gemisch aus den genannten stereoisomeren Necinbasen beobachtet werden. Zum Beispiel wurden in den Pflanzenarten *Jacobaea vulgaris* und *Jacobaea aquatica* neben Otonecin-Typ PAs nur PAs des (+)-Retronecin-Typs und in *Heliotropium europaeum* nur (+)-Heliotridin-Typ PAs nachgewiesen. Aufgrund der bisher beobachteten stereochemischen Spezifität hinsichtlich der Bildung von Necinbasen wird statt der spontanen Zyklisierung der Dialdehyde eine stereospezifische, enzymkatalysierte Bildung des Necinbasengrundgerüsts vermutet (Schramm et al. 2019, Stegemann 2020).

Die aliphatischen Necinsäuren werden hauptsächlich aus den Aminosäuren L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin und L-Threonin aufgebaut. So werden die 5-C Necinsäuren, Angelika- und Tiglinsäure, aus der Aminosäure L-Isoleucin, die 7-C Necinsäuren Echimidinsäure und Trachelanthinsäure aus L-Valin und die Senecioninsäure aus der Aminosäure L-Isoleucin gebildet (Crout 1966, McGaw und Woolley 1979, Schramm et al. 2019, Weber et al. 1999).

Die Biosynthese von PAs erfolgt nach keinem einheitlichen Ablauf. In der Gattung *Senecio* (Tribus Senecioneae) bilden die meisten Arten Senecionin *N*-Oxid als primäres PA der Biosynthese. Senecionin *N*-Oxid wird vornehmlich im Spross in weitere artspezifische PAs diversifiziert. Die Diversifizierungsreaktionen sind ein- oder zweistufig und umfassen vornehmlich Hydroxylierung, Dehydrierung, Epoxidierung sowie *O*-Acetylierung. Für die Bildung von PAs der Necinbase Otonecin werden zwei verschiedene

Diversifizierungsreaktionen diskutiert. Im ersten Szenario wird eine spezifische Umwandlung von Senecionin in das Otonecin-Derivat Senkirkin angenommen, das als Vorstufe aller weiteren Otonecin-Typ PAs dient. Das zweite Szenario vermutet, dass die verschiedenen Otonecin-Typ PAs unabhängig voneinander aus den jeweiligen Retronecin-Typ PAs entstehen (Cheng 2020, Hartmann und Dierich 1998, Hartmann und Toppel 1987, Pelser et al. 2005). Für die stereoselektiven und positionsspezifischen Diversifizierungsreaktionen werden enzymatische Mechanismen vorgeschlagen (Hartmann und Dierich 1998).

Für die Pflanzenarten der Familie Boraginaceae wird die Synthese von PAs des Lycopsamin-Typs auf Basis von Studien zu *Heliotropium indicum*, *Cynoglossum officinale* und *Symphytum officinale* angenommen (Fröhlich et al. 2007). Demnach ist die Bildung von PAs, ausgehend von der Form des *N*-Oxids, auf drei Stufen zunehmender Diversifizierung zurückzuführen. Die erste Stufe umfasst die Biosynthese des Grundgerüsts Trachelanthamidin. In der zweiten Stufe erfolgt die Veresterung an Position C9 der Necinbase. Die Veresterung findet in Abhängigkeit der Pflanzenart nach oder vor der strukturellen Modifikation des Necinbasengrundgerüsts über Supinidin zu Retronecin oder Heliotridin statt. Die dritte Stufe beinhaltet die weitere chemische Diversifizierung, wie zum Beispiel eine Veresterung an Position C7 der Necinbase oder eine Veresterung der Necinsäure an Position C9.

Für die Gattung *Senecio* konnte eine Verlagerung der PAs in verschiedene Organe und Gewebe via Phloem bzw. Vakuolen des Phloems gezeigt werden, welche *carrier*-vermittelt beladen und entladen werden (Ehmke et al. 1988, Hartmann et al. 1989). Die spezifische Verlagerung von PAs der Pflanzenarten-Boraginaceae wurde bisher nicht näher untersucht. Eine gewisse räumliche Mobilität zur Verteilung und Speicherung in verschiedenen Organen bzw. Geweben wird angenommen (Fröhlich et al. 2007). In Studien zu *Senecio vulgaris* konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass über 80 % des PA-Gesamtgehalts in den Blütenköpfchen zu finden sind, damit ergab sich ein um den Faktor 10- bis 30-fach höherer Gehalt in den reproduktiven Organen als in den übrigen vegetativen Organen (Hartmann und Zimmer 1985). Auch andere Pflanzenarten akkumulieren PAs vornehmlich in den Blüten, wobei sich das Verhältnis der PA-Gehalte in den Blüten und übrigen Organen innerhalb der Familien Asteraceae und Boraginaceae unterscheidet (Fröhlich et al. 2007, Kruse et al. 2017, Niemüller et al. 2012, van Dam et al. 1995). Für die qualitative und quantitative Zusammensetzung bzw. das PA-Profil einer Pflanze werden *inter*-Spezies (Hartmann und Dierich 1998, Langel et al. 2011), *intra*-Spezies (Macel et al. 2004, Witte et al. 1992) und genetisch bedingte Variationen beschrieben (Cheng et al. 2011, Joosten et al. 2011). Auch abiotische Umweltfaktoren wie Klima, Standort und Bodenbedingungen beeinflussen das PA-Profil einer Pflanze (Johnson et al. 1985, Kirk et al. 2010, O'Dowd und Edgar 1989).

2.2 Toxikologie von PAs

PAs sind lebertoxische Sekundärmetaboliten mit einem genotoxisch-kanzerogenen Potenzial (Mattocks 1986). In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Intoxikationen bei Menschen nach Aufnahme PA-haltiger Pflanzen beobachtet (BfR 2013b, Bras et al. 1954, Culvenor et al. 1986, Datta et al. 1978, Fox et al. 1978, Kakar et al. 2010, Kumana et al. 1985, Mohabbat et al. 1976, Ridker et al. 1985, Tandon et al. 1976). Es wird angenommen, dass PAs die weltweit führenden Pflanzengifte darstellen (Prakash et al. 1999).

2.2.1 Strukturelle Voraussetzungen

Toxikologisch relevant sind PAs, die eine Doppelbindung in Position 1,2 der Necinbase aufweisen (1) und in Position C9 und/oder C7 (2) mit mindestens einer verzweigten Necinsäure verestert sind (3) (s. Abbildung 2-6) (Mattocks 1986).

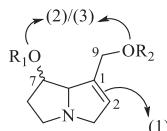


Abbildung 2-6: Strukturelle Merkmale, die für die Toxizität von PAs kennzeichnend sind.

Für die Merkmale (2) und (3) wird angenommen, dass diese in Abhängigkeit ihrer Struktur das toxische Potenzial von PAs beeinflussen. Studien zeigten ein höheres toxisches Potenzial für 1,2-ungesättigte makrozyklische sowie offenkettige Diester als für Monoester (Culvenor et al. 1976, Louisse et al. 2019, Merz und Schrenk 2016). Die höhere Toxizität von Diestern kann auf die vorhandene Esterfunktionalität an Position C-7 und C-9 der Necinbase zurückgeführt werden. Eine Veresterung mit einer stark verzweigten Necinsäure kann das toxische Potenzial grundsätzlich erhöhen, da eine detoxifizierende hydrolytische Spaltung von PAs durch die sterische Hinderung erschwert wird (Mattocks 1986, Wiedenfeld et al. 2008).

1,2-gesättigte PAs der Necinbasentypen Platynecin und Trachelanthamidin gelten als nicht toxisch (Louisse et al. 2019, Ruan et al. 2014a, Ruan et al. 2014b).

2.2.2 Resorption, Verteilung und Ausscheidung

Im Rahmen von Tierstudien konnte nach oraler Aufnahme von 1,2-ungesättigten PAs eine schnelle Resorption im Darm festgestellt werden. Die Aufnahme von PAs in den systemischen Kreislauf führt zum Transport der PAs in Organe wie Leber, Lunge und Niere (EFSA 2011). Zudem werden einige PAs als plazentagängig beschrieben (Schoental 1959, Sundareson 1942). Für die Resorption und Verteilung ist zu berücksichtigen, dass die Bioverfügbarkeit im Darm (Hessel et al. 2014) und im systemischen Kreislauf (Wang et al. 2011, Williams et al. 2011) von der Struktur der PAs abhängig ist. In der Leber und in geringerem Ausmaß in anderen