

Metabolisierung von Alternariol, Alternariolmonomethylether und Zearalenon in Pflanzenzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Beate Nadine Kohn

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mykotoxine	2
1.1.1	Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME)	2
1.1.1.1	Chemische Strukturen und Eigenschaften	3
1.1.1.2	Stabilität, Vorkommen und Exposition	3
1.1.1.3	Toxikokinetik	5
1.1.1.4	Toxizität.....	6
1.1.2	Zearalenon (ZEN).....	7
1.1.2.1	Chemische Strukturen und Eigenschaften.....	8
1.1.2.2	Stabilität, Vorkommen und Exposition	8
1.1.2.3	Toxikokinetik	9
1.1.2.4	Toxizität.....	11
1.2	Fremdstoffmetabolismus von Mykotoxinen in Pflanzen	13
1.2.1	Phase I-Metabolismus.....	14
1.2.2	Phase II-Metabolismus	15
1.2.3	Phase III-Metabolismus	16
1.2.3.1	Deposition in der Vakuole.....	17
1.2.3.2	Einlagerung in die Zellwand.....	18
1.3	Bioverfügbarkeit modifizierter Mykotoxine	22
2	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	29
3.1	Modellsysteme zur Synthese von modifizierten Mykotoxinen.....	29
3.1.1	Schimmelpilzkulturen.....	29
3.1.2	Pflanzenzellsuspensionskulturen	29
3.1.3	Explant-Kulturen	30
3.1.4	Extraktion der Phase II-Metaboliten aus Pflanzenzellen.....	30
3.2	Analyse und Strukturaufklärung der Phase II-Metaboliten	31
3.2.1	Analyse mittels LC-DAD-MS und LC-DAD-QTOF-MS	31
3.2.2	Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie.....	33
3.2.3	Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer NMR.....	34
3.3	Herstellung isotoopenmarkierter Standardsubstanzen	37
3.3.1	Einsatz und Voraussetzungen	37
3.3.2	Mögliche Verfahren zur Isotoopenmarkierung.....	38
3.3.2.1	¹³ C-Markierung.....	38
3.3.2.2	Deuterierung	39
3.3.2.3	Synthese von deuteriertem ZEN.....	40

3.3.2.4	Synthese von deuteriertem AOH und AME	41
3.4	Modellsysteme für Resorptionsstudien	42
3.4.1	Caco-2-Zellmodell	42
3.5	Methoden zur Untersuchung der Zellwandeinlagerung von Mykotoxinen	45
3.5.1	Saure Hydrolyse von Pflanzenzellwänden	45
3.5.2	Alkalische Hydrolyse von Pflanzenzellwänden	47
3.5.3	Enzymatische Hydrolyse von Pflanzenzellwänden	47
3.5.4	NMR-Analyse von Pflanzenzellwänden.....	49
3.6	Lignineinlagerung von Mykotoxinen.....	49
3.6.1	Synthese von Coniferylalkohol (CA)	50
3.6.2	<i>In vitro</i> -Synthese ligninähnlicher Verbindungen.....	50
3.6.3	Methoden zur Analyse von DHP (Dehydrogenierungspolymerisat).....	52
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Lösliche pflanzliche Mykotoxinkonjugate.....	53
4.1.1	Pflanzliche Konjugate von AOH und AME	53
4.1.1.1	Metabolitenprofile der verschiedenen Zellsuspensions- und Explant-Kulturen.....	53
4.1.1.2	NMR-spektroskopische Analyse der unbekanntes AOH- bzw. AME-Metaboliten.....	56
4.1.1.3	HRMS-Analyse der Zellsuspensionskultur-Extrakte	59
4.1.1.4	Semiquantitative Analyse der pflanzlichen AOH- und AME-Metaboliten.....	65
4.1.2	Pflanzliche Konjugate von ZEN	67
4.1.2.1	Metabolitenprofile der verschiedenen Zellsuspensionskulturen	67
4.1.2.2	HRMS-Analyse der Zellsuspensionskultur-Extrakte	68
4.1.2.3	NMR-spektroskopische Analyse der ZEN-Metaboliten	73
4.1.2.4	Semiquantitative Analyse der pflanzlichen ZEN-Metaboliten.....	75
4.2	Lösliche Konjugate aus Pilz und Pflanze.....	78
4.2.1	Sulfate von AOH und AME.....	78
4.2.2	Sulfoglucoside von AOH und AME.....	79
4.3	Synthese isotoopenmarkierter Standardsubstanzen der löslichen Konjugate	82
4.3.1	Deuterierung der Ausgangssubstanzen AOH, AME und ZEN	82
4.3.1.1	Deuterierung von AOH und AME.....	82
4.3.1.2	Deuterierung von ZEN	83
4.3.2	Stabilität der deuterierten Standardsubstanzen	84
4.3.3	Isotopenshift der deuterierten Standardsubstanzen.....	85
4.3.4	Synthese isotoopenmarkierter Standardsubstanzen der löslichen Konjugate in Tabakzellsuspensionskulturen.....	86
4.3.4.1	AOH- <i>d</i> ₄ - und AME- <i>d</i> ₄ -Metaboliten	87
4.3.4.2	HRMS-Messung der deuterierten AME-Metaboliten	89
4.3.4.3	ZEN- <i>d</i> ₂ -Metaboliten	90

4.4 Zelluläre Aufnahme und <i>in vitro</i> Resorption von modifizierten Mykotoxinen in Caco-2-Zellen	92
4.4.1 Stabilität der Ausgangsverbindungen	92
4.4.2 Aufnahme und Metabolismus in Caco-2-Zellen.....	93
4.4.3 Untersuchungen im <i>Transwell</i> -Modell	99
4.4.3.1 ZEN und pflanzliche ZEN-Metaboliten im <i>Transwell</i> -Modell	99
4.4.3.2 AOH und pflanzliche AOH-Metaboliten im <i>Transwell</i> -Modell	100
4.4.3.3 AME und pflanzliche AME-Metaboliten im <i>Transwell</i> -Modell.....	102
4.4.3.4 Zusammenfassung der Resorptionsversuche.....	103
4.5 Untersuchungen zur Zellwandbindung von Mykotoxinen.....	104
4.5.1 Versuche zur (physikalischen) Adsorption.....	104
4.5.2 Alkalische Hydrolyse.....	105
4.5.2.1 Vorversuche.....	105
4.5.2.2 Hauptversuch	106
4.5.3 Saure Hydrolyse.....	106
4.5.3.1 Vorversuche.....	106
4.5.3.2 Hauptversuch	108
4.5.4 Enzymatische Hydrolyse	109
4.5.4.1 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von AOH inkubierten Zellen nach Lösungsmittelextraktion	110
4.5.4.2 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von AME inkubierten Zellen nach Lösungsmittelextraktion	112
4.5.4.3 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von ZEN inkubierten Zellen nach Lösungsmittelextraktion	113
4.5.5 NMR-spektroskopische Untersuchung der Zellrückstände	115
4.6 Untersuchungen zur Bindung von Mykotoxinen an Lignin im <i>in vitro</i> -Modellsystem (DHP).....	119
4.6.1 Vorversuche zur DHP-Bildung.....	119
4.6.1.1 DHP-Synthese ohne Mykotoxine	119
4.6.1.2 Pilotversuch zur DHP-Bildung aus CA und ZEN	121
4.6.1.3 HRP-Aktivität in verschiedenen Lösungsmittelgemischen.....	122
4.6.1.4 Untersuchung der Einwirkung von H ₂ O ₂ auf die Mykotoxine und auf CA.....	124
4.6.2 Untersuchung der nukleophilen Addition von ZEN und AOH an DHP.....	126
4.6.3 Untersuchung der Bindung von AOH und ZEN an DHP über radikalische Prozesse während der DHP-Synthese	128
4.7 Zusammenfassende Diskussion	131
5 Zusammenfassung	139
6 Literaturverzeichnis	143
7 Zitierte Rechtsvorschriften	158

8	Chemikalien und Instrumente	159
8.1	Chemikalien	159
8.2	Enzyme.....	162
8.3	Zellkulturmedien	162
8.3.1	Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kultur-Medien	162
8.3.2	Caco-2-Zellkultur-Medien	162
8.4	Instrumente.....	163
9	Arbeitsvorschriften	165
9.1	Gewinnung von AOH und AME aus <i>A. alternata</i> -Schimmelpilzkulturen	165
9.2	Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kulturen.....	166
9.3	Inkubation der Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kulturen	167
9.4	Extraktion der löslichen Mykotoxinkonjugate.....	168
9.5	Präparative Isolierung der löslichen Mykotoxinkonjugate	169
9.6	Analytische Methoden zur Strukturaufklärung pflanzlicher löslicher Mykotoxinkonjugate.....	170
9.6.1	LC-DAD-MS-Analysen.....	170
9.6.2	LC-DAD-HRMS-Analysen	170
9.6.3	NMR-Spektroskopie	173
9.7	Strukturaufklärung von Sulfaten und Sulfoglucosiden	174
9.8	Synthese von isotopenmarkiertem ZEN.....	176
9.9	Synthese von isotopenmarkiertem AOH und AME.....	178
9.10	Untersuchung der Stabilität der deuterierten Standardsubstanzen.....	179
9.11	Analytische Methoden zur Messung der deuterierten Mykotoxinmetaboliten	180
9.12	Test auf Isotopenshift der deuterierten Standardsubstanzen	180
9.13	Kultivierung und Subkultivierung der Caco-2-Zellkultur.....	181
9.14	Messung spezifischer Parameter für die quantitative ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	182
9.15	Quantitative ¹ H-NMR-Spektroskopie zur Stoffmengenbestimmung.....	184
9.16	Stabilitätskontrolle der Mykotoxine und ihrer Metaboliten.....	185
9.17	Metabolismus der löslichen Mykotoxinkonjugate in Caco-2-Zellen.....	186
9.18	Resorption der löslichen Mykotoxinkonjugate im Caco-2- <i>Transwell</i> -Modell	188
9.19	Versuche zur (physikalischen) Adsorption	190
9.20	Saure Hydrolysen	191
9.21	Alkalische Hydrolyse	193
9.22	Enzymatische Hydrolysen.....	195
9.23	NMR-spektroskopische Untersuchung der Zellrückstände	196
9.24	Synthese von CA.....	197

9.25 Vorversuche zur Bildung von DHP	199
9.26 Pilotversuch zur Bildung eines DHP mit CA und ZEN.....	200
9.27 Peroxidase-Aktivitätstest.....	201
9.28 Umsetzung der Mykotoxine und CA mit H ₂ O ₂	202
9.29 Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH durch nukleophile Additionsreaktionen.....	202
9.30 Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH	203
9.31 NMR-spektroskopische Untersuchung der Ligninversuche	204
10 Anhang	205
10.1 Tabellen.....	205
10.2 Abbildungen.....	212
11 Publikationsliste	223
12 Danksagung	224



Abkürzungsverzeichnis

<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
ABC	„ATP Binding Cassette“, ATP-bindende Kassette
ACN	Acetonitril
AME	Alternariol-9- <i>O</i> -Monomethylether
AME-3-Glucosid	3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AME
AME-4'-Malonyl-3-Glucosid	3- <i>O</i> -(4'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME
AME-6'-Malonyl-3-Glucosid	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME
AME-7-Glucosid	7- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AME
AOH	Alternariol
AOH-3-Glucosid	3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AOH
AOH-6'-Malonyl-3-Glucosid	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-6'-Malonyl-9-Glucosid	9- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-9-Diglucosid	9- <i>O</i> -{ β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH
AOH-9-Glucosid	9- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AOH
AOT	Natriumdioctylsulfosuccinat
AQ	„Acquisition Time“, Aufnahmezeit
ATP	Adenosintriphosphat
a_w	Wasseraktivität
BER	„Borohydride Exchange Resin“, Borhydridaustauscherharz
bidest.	bidestilliert
BY-2	Bright Yellow-2
CA	Coniferylalkohol
COLOC	„Correlation Spectroscopy via Long-Range Coupling“
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
CONTAM	„Panel on Contaminants in the Food Chain“, Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette der European Food Safety Authority (EFSA)
CS	„Compressed Sensing“
CYP	Cytochrom P450-Monooxygenasen
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett
D	Deuterium
D1	Relaxationsdelay
DAD	Diodenarraydetektor
DBÄ	Doppelbindungsäquivalent

DFRC	„Derivatization Followed by Reductive Cleavage“
DHP	Dehydrogenierungspolymerisat
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	„European Food Safety Authority“, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EM	„Exponential Window Multiplication“, Exponentielle Multiplikation des FID
ER α/β	Estrogenrezeptor α/β
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU	Europäische Union
FID	„Free Induction Decay“
(G)	Guaiacyl
G	Glucosid
GA	Glucuronid
GB	„Gaussian Broadening Factor“, Gauss-Faktor
GC	Gaschromatographie
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker
GHS	„Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals“, global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
GM	„Gaussian Window Multiplication“, Gauss-Multiplikation des FID
(H)	Hydroxyphenyl
HBSS	„Hank's Balanced Salt Solution“, Salzlösung nach Hank's
H/D	Wasserstoff / Deuterium
(H,H)-COSY	„(H,H)-Correlated Spectroscopy“, zweidimensional homonuklear (H,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie
HMBC	„Heteronuclear Multiple Bond Correlation“
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“, Hochleistungsflüssigchromatographie
HRMS	„High Resolution Mass Spectrometry“, Hochauflösende Massenspektrometrie
HRP	„Horseradish Peroxidase“, Meerrettichperoxidase
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
HSQC	„Heteronuclear Single Quantum Coherence“
IARC	„International Agency for Research on Cancer“, Internationale Agentur für Krebsforschung
IDA	„Information Dependent Analysis“, Informationsabhängige Analyse
nJ	Kopplungskonstante über n Bindungen

J_{res}	J-aufgelöste NMR-Spektroskopie
KG	Körpergewicht
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
λ	Wellenlänge
LB	„Line Broadening Factor“, Linienverbreiterungsfaktor für EM
LC	„Liquid Chromatography“, Flüssigchromatographie
LChG	Lebensmittelchemische Gesellschaft
LD ₅₀	Letale Dosis 50 %
LY	„Lucifer Yellow“
MATE	„Multidrug and Toxin Extrusion Transporter“
MDR	„Multidrug Resistance“
MRI	Max Rubner-Institut
mRNA	„Messenger Ribonucleic Acid“, Boten-Ribonukleinsäure
MRP	„Multidrug Resistance-Related Protein“
MS	Massenspektrometrie
MS ⁿ	Tandem-Massenspektrometrie (Ion-Trap) mit n Fragmentierungsschritten
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (TripleTOF)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOD	deuteriertes Natriumhydroxid
nb	nicht bestimmbar
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“, Kernspinresonanz
nn	nicht nachweisbar
NOE	„Nuclear Overhauser Effect“, Kern-Overhauser-Effekt
NOEL	„No Observed Effect Level“
NTP	„National Toxicology Programs“
NUS	„Nonuniform Sampling“
P_{app}	„Apparent Permeability Coefficient“, scheinbarer Permeabilitätskoeffizient
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PepT1	Peptidtransporter 1
PET	Polyethylenterephthalat
QSINE	„Quadratic Sine Window Function“, Sinusquadratfunktion
qTOF	„Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer“, Quadrupol- Flugzeitmassenspektrometer
R^2	Bestimmtheitsmaß
RFU	„Relative Fluorescence Units“, Relative Fluoreszenz
ROS	„Reactive Oxygen Species“, Reaktive Sauerstoffspezies
RP	„Reversed Phase“, Umkehrphase
RPF	„Relative Potency Factor“, relative Potenzfaktoren
s	Singulett

(S)	Syringyl
S	Sulfat
S _E Ar	elektrophile aromatische Substitutionsreaktion
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis
SPE	„Solid Phase Extraction“, Festphasenextraktion
SSB	„Shifted Sine Bell“, Multiplikation mit einer Shifted-Sine-Bell-Funktion
T ₁	T ₁ -Relaxationszeit
TCA	„Trichloroacetic Acid“, Trichloressigsäure
TFMSA	„Trifluoromethanesulfonic Acid“, Trifluormethansulfonsäure
TDI	„Tolerable Daily Intake“, tolerierbare tägliche Aufnahme
TDP I	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase I
TEER	„Transepithelial Endothelial Electrical Resistance“, transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	„Trifluoroacetic Acid“, Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	„Time of Flight Mass Spectrometer“, Flugzeitmassenspektrometer
t _R	Retentionszeit
UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	„UDP Glucuronic Acid“, UDP-Glucuronsäure
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
V	Volumen
Vis	„Visible“, sichtbarer Bereich
XHCORR	„X-H Correlation“
XIC	„Extracted Ion Chromatogram“, Extrahiertes Ionenchromatogramm
ZAL	Zearalanol
ZAN	Zearalanon
ZEL	Zearalenol
ZEN	Zearalenon
ZEN-14-Glucosid	14- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-ZEN
ZEN-16-Glucosid	16- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-ZEN
ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid	14- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN
ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid	16- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN





1 Einleitung

Schimmelpilze sind ein natürlicher Teil unserer belebten Umwelt. Sie können nahezu jede Pflanze während des Wachstums und / oder nach der Ernte infizieren. Eine Vielzahl dieser Pilze ist außerdem in der Lage Mykotoxine zu bilden, die bereits in geringen Mengen toxisch für Mensch und Tier sein können. Es handelt sich dabei zumeist um niedermolekulare Stoffwechselprodukte, die hauptsächlich von den Gattungen *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* gebildet werden.

In der Europäischen Union gelten strenge gesetzliche Regelungen für den zulässigen Gehalt an Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln. Allerdings werden bei herkömmlichen analytischen Techniken, die zum Nachweis von freien Mykotoxinen verwendet werden, sogenannte „modifizierte Mykotoxine“ nicht berücksichtigt. Darunter fallen sowohl chemische als auch biologische Modifikationen, die die chemische Grundstruktur von Mykotoxinen verändern. Grund für die Nichterfassung von modifizierten Mykotoxinen ist teilweise die fehlende Aufklärung ihrer chemischen Strukturen und vor allem das Fehlen von analytischen Standardsubstanzen.

Es ist bekannt, dass Pflanzen (und andere lebende Organismen, z.B. Pilze, Bakterien, Säugetiere) im Rahmen ihres Fremdstoffmetabolismus die chemischen Strukturen von Mykotoxinen verändern können. Dieser Metabolismus ist pflanzenartspezifisch und kann in drei Phasen unterteilt werden. In Phase I finden hauptsächlich Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen statt, während in Phase II Aminosäuren, Zucker, Sulfatgruppen und Glutathion konjugiert werden. Der Phase III-Metabolismus, auch Kompartimentierungsphase genannt, ist bisher am wenigsten untersucht. Es wird vermutet, dass die zuvor gebildeten Mykotoxin-konjugate entweder zur Vakuole transportiert und dort gelagert werden oder weiter modifiziert und in der Zellwand abgelagert werden.

Im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit besteht das Hauptproblem darin, dass diese modifizierten Mykotoxine im Verdauungstrakt (z.B. durch die Säure im Magen, durch Enzyme im Dünndarm oder durch Dickdarmbakterien) von Mensch und Tier reaktiviert werden können. Durch die Freisetzung toxischer Vorläufer würden die modifizierten Formen dementsprechend zur Gesamttoxinbelastung beitragen und müssten ebenfalls bei Höchstmengenregelungen berücksichtigt werden.

Für die beiden *Alternaria*-Toxine Alternariol und Alternariolmonomethylether, die eine mutagene Aktivität *in vitro* aufzeigen, und das estrogen wirkende *Fusarium*-Toxin Zearalenon wurden in der Literatur bereits modifizierte Formen (vorläufig) beschrieben. Angesichts deren möglicher toxischen Wirkung ist es unerlässlich, sowohl die Strukturen eindeutig zu identifizieren, um Standardsubstanzen generieren zu können, als auch Studien zur Aufnahme und Resorption durchzuführen, um die Bioverfügbarkeit zu untersuchen. Darüber hinaus ist die bisher weitgehend unerforschte Zellwandbindung von Mykotoxinen von Interesse.

1.1 Mykotoxine

Schimmelpilze sind ubiquitär verbreitet und können auf einer Vielzahl von Lebens- und Futtermitteln wachsen. Diese bieten für die meisten Schimmelpilzarten ideale Voraussetzungen. Kohlenhydrate, Fette sowie organisch und anorganisch gebundener Stickstoff ermöglichen bei günstiger Temperatur, pH-Wert und Wasseraktivität ein optimales Wachstum der Schimmelpilze (Magan & Lacey, 1984).

Eine Reihe von Schimmelpilzen ist in der Lage, je nach Bedingungen, sogenannte Mykotoxine zu bilden. Dabei handelt es sich um niedermolekulare sekundäre Stoffwechselprodukte, die sich in ihren Strukturen stark unterscheiden. Es sind ca. 300 bis 400 verschiedene Mykotoxine bekannt, die sich etwa 25 Strukturtypen zuordnen lassen. Allen Mykotoxinen ist jedoch gemeinsam, dass sie bereits in geringen Konzentrationen zu Gesundheitsschädigungen, sogenannten Mykotoxikosen, führen können. Die Symptome hängen sowohl von der Art, der Menge und der Dauer der Exposition des Mykotoxins sowie weiteren Faktoren wie z.B. Alter, Gesundheit oder Geschlecht des Exponierten ab (Bennett & Klich, 2003).

Im Allgemeinen lassen sich drei Wege aufzeigen, wie Mykotoxine in die Nahrung gelangen. Bei einer Primärkontamination tritt der Befall von Lebensmittel- oder Futtermittelrohstoffen bereits während des Wachstums auf dem Feld auf. Werden die Mykotoxine erst während der Lagerung oder Verarbeitung pflanzlicher Produkte gebildet, wird von Sekundärkontaminationen gesprochen. Des Weiteren gibt es noch die Möglichkeit des Carryovers. Hierbei gelangen Mykotoxine über tierische Lebensmittel in die Nahrungskette, wenn die entsprechenden Nutztiere mykotoxinhaltiges Futter aufgenommen haben (Marín *et al.*, 2013).

Aufgrund ihrer Toxizität legte die europäische Gesetzgebung maximal zulässige Höchstgehalte für Mykotoxine fest. Für Lebensmittel finden sich diese Höchstgehalte in der jeweils geltenden Fassung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Im Bereich der Futtermittel gilt die Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 (2006/576/EG) betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN), Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen. Zusätzlich gibt es in Deutschland noch die Verordnung zur Begrenzung der Kontaminanten in Lebensmitteln (Kontaminanten-Verordnung), in der weitere Höchstgehalte für bestimmte Mykotoxine festgelegt sind.

1.1.1 Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME)

Alternaria-Toxine werden von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria* gebildet. Diese gehören zu der Gruppe der Schwärzepilze, da ihre Konidien aufgrund der Einlagerung von Melanin in der Regel dunkelbraun bis schwarz gefärbt sind.

Von den 100 verschiedenen Spezies, die weltweit beschrieben wurden, zählen *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima* zu den wichtigsten Vertretern. Deren Toxine zeichnen sich durch eine große strukturelle Vielfalt aus, die sich in fünf verschiedene Klassen einteilen

lassen: Dibenzo- α -pyrone, Tenuazonsäure, Perylenchinone, AAL-Toxine und sonstige Strukturen. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Dibenzo- α -pyrone Alternariol (AOH) und Alternariol-9-*O*-Monomethylether (AME). Aufgrund der potentiell toxischen Wirkung sind *Alternaria*-Toxine von besonderem Interesse für die Lebensmittelsicherheit. Daher veröffentlichte die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) 2011 eine Risikoabschätzung der Exposition von Tier und Mensch gegenüber *Alternaria*-Toxinen. Allerdings konnte aus Mangel an Daten bezüglich der Toxizität und Exposition von Nutztieren und Endverbrauchern kein Grenzwert für einzelne oder mehrere *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln festgelegt werden. Die EFSA beurteilt *Alternaria*-Toxine als besorgniserregend für die öffentliche Gesundheit und empfiehlt das Erheben weiterer Daten bezüglich des Vorkommens, der Toxikokinetik und Toxikologie (EFSA, 2011a).

1.1.1.1 Chemische Strukturen und Eigenschaften

Raistrick *et al.* (1953) untersuchten den Extrakt von zwei *A. tenuis*-Stämmen (heute: *A. alternata*) und isolierten erstmals die beiden *Alternaria*-Toxine AOH (3,7,9-Trihydroxy-1-methylbenzo[*c*]chromen-6-on, Abb. 1 A) und dessen Monomethylether AME (3,7-Dihydroxy-9-methoxy-1-methylbenzo[*c*]chromen-6-on, Abb. 1 B). Die Strukturen wurden durch klassische organisch-chemische Strukturanalytik zugeordnet. Acht Jahre später wurde schließlich die genaue Position der Methylgruppe aufgeklärt (Thomas, 1961).

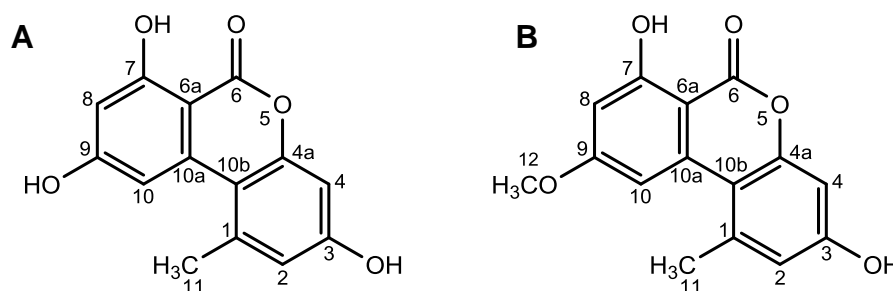


Abb. 1: Strukturformel von Alternariol (AOH) mit der Summenformel $C_{14}H_{10}O_5$ und einem Molekulargewicht von 258,23 Da (A) und Strukturformel von Alternariol-9-*O*-Monomethylether (AME) mit der Summenformel $C_{15}H_{12}O_5$ und einem Molekulargewicht von 272,25 Da (B).

AOH und AME kristallisieren in Ethanol als farblose Nadeln und haben Schmelzpunkte bei 350 °C (AOH, Zersetzungstemperatur) und 267 °C (AME). AOH und AME sind löslich in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid, jedoch schlecht löslich in wässrigen Pufferlösungen (Schade & King, 1984).

1.1.1.2 Stabilität, Vorkommen und Exposition

Aufgrund der weiten Verbreitung der Gattung *Alternaria* werden die Mykotoxine AOH und AME in einer Vielzahl von Lebens- und Futtermitteln gefunden. Dies liegt daran, dass *Alternaria*-Pilze an eine Reihe verschiedener Umweltfaktoren angepasst sind. Beispielsweise liegt die Wachstumstemperatur von *A. alternata* zwischen -5 und 36 °C mit einem Optimum bei 25 °C. Außerdem liegt die für das Wachstum benötigte minimale Wasseraktivität (a_w) bei 0,88 (Ostry, 2008). Auch der pH-Wert spielt für das Wachstum von *Alternaria*-

Schimmelpilzen eine Rolle. Bei pH 4,0 bis 4,5 wächst der Pilz optimal, jedoch wächst er auch in einem Bereich von 2,7 bis 8,0 (Hasija, 1970). Die Mykotoxinproduktion findet hauptsächlich bei 15 bis 30 °C und einem a_w -Wert von 0,92 bis 0,99 statt (Prendes *et al.*, 2017; Oviedo *et al.*, 2010). *Alternaria*-Pilze können somit sowohl Lebensmittel mit einer hohen Wasseraktivität wie Obst und Gemüse, als auch Lebensmittel mit einer niedrigeren Wasseraktivität wie Getreide kontaminieren. Zusätzlich ist zu beachten, dass auch Obst und Gemüse bei Kühlschranklagerung aufgrund des Wachstumspotentials bei niedrigen Temperaturen befallen werden können.

In einer Studie von Scott & Kanhere (2001) wurde die Stabilität von AOH und AME in Apfelsaft und Wein untersucht. Sowohl nach 20 Tagen bei Raumtemperatur als auch nach 20 Minuten bei 80 °C blieben die beiden Mykotoxine in beiden Testsystemen stabil. Um die Stabilität von AOH und AME bei Hitzebehandlung zu untersuchen, wurde eine weitere Studie mit Sonnenblumenmehl durchgeführt. Während die Konzentrationen von AOH und AME bei 100 °C für 90 Minuten konstant blieben, kam es bei 121 °C für 60 Minuten zu einer Verringerung der Mykotoxingehalte (Combina *et al.*, 1999). Des Weiteren beschäftigten sich Estiarte *et al.* (2018) mit der Stabilität von AOH und AME während der Lebensmittelverarbeitung von Tomatenprodukten. Auffällig war, dass die Konzentration von AOH und AME während der Lagerung signifikant abnahm (bei AOH nur bei einer Lagerung bei 35 °C). Außerdem konnte eine Reduktion des Gehaltes durch einen Waschschrift erreicht werden. Bei der anschließenden Hitzebehandlung bei 100 bis 110 °C verringerte sich die Konzentration von AOH erheblich, wohingegen AME stabil blieb (Estiarte *et al.*, 2018).

In einer Bewertung der EFSA wurde die chronische, ernährungsbedingte Exposition gegenüber AOH und AME auf der Grundlage von 3650 Proben abgeschätzt. Dabei konnten in 109 Proben AOH und in 163 Proben AME quantifiziert werden (EFSA, 2016b). Überwiegend kontaminiert waren Getreide und Getreideprodukte, Gemüse und Gemüseprodukte (insbesondere Tomatenprodukte), Früchte und Fruchtprodukte sowie Obst- und Gemüsesäfte, alkoholische Getränke (Wein) sowie Ölsaaten und pflanzliche Öle (hauptsächlich Sonnenblumenkerne und Sonnenblumenöl). Abgesehen von einer Probe einer Johannisbrotfrucht (180 µg/kg) lagen die höchsten mittleren Gehalte an AOH bei 30,5 µg/kg in Buchweizen und 37,5 µg/kg in Hafer. Außerdem wurde AOH in einer Reihe verschiedener tomatenbasierter Produkte wie z.B. Tomatenpüree (10,9 µg/kg), Tomatensauce (10,9 µg/kg) und sonnengetrockneten Tomaten (9,9 µg/kg) gefunden. Für AME waren die dokumentierten Mengen mit wenigen Ausnahmen niedriger als die für AOH. Die höchsten Durchschnittswerte wurden in Proben von Schalenfrüchten (Kastanien mit 17,2 µg/kg) und Ölsaaten (Sesamsaaten mit 11,5 µg/kg) gefunden.

Die durchschnittliche (Mittelwert) und hohe (95. Perzentil) chronische, ernährungsbedingte Exposition gegenüber AOH und AME wurde unter Berücksichtigung der Toxin-Konzentrationen und des durchschnittlichen täglichen Verbrauchs der jeweiligen Lebensmittel für verschiedene Altersklassen abgeschätzt. Die höchste AOH-Exposition wurde dabei in der Gruppe „Kleinkinder“ mit einer mittleren Exposition zwischen 3,8 und 71,6 ng/kg Körpergewicht (KG) pro Tag und der 95. Perzentil-Exposition zwischen 11,4 und 270,5 ng/kg KG pro Tag geschätzt. Die Hauptverursacher der Exposition gegenüber AOH

waren Lebensmittel aus der Gruppe „Obst und Obstprodukte“. Bei AME lag die höchste Exposition ebenfalls in der Gruppe der „Kleinkinder“ mit einer mittleren Exposition zwischen 3,4 und 38,8 ng/kg KG pro Tag und einer 95. Perzentil-Exposition zwischen 10,3 und 97,3 ng/kg KG pro Tag. Insgesamt waren die Gruppen „Pflanzenöl“ und „Kernobst“ (Birnen) ausschlaggebend für die Expositionsbewertung von AME.

Basierend auf diesen Daten scheinen Vegetarier eine höhere ernährungsbedingte Exposition gegenüber *Alternaria*-Toxinen zu haben als die allgemeine Bevölkerung (EFSA, 2016b).

1.1.1.3 Toxikokinetik

Die Resorption, Verteilung und Exkretion von AOH bzw. AME wurde in NMRI-Mäusen bzw. in männlichen Sprague Dawley-Ratten *in vivo* untersucht. Nach oraler Gabe von ¹⁴C-markiertem AOH bzw. AME wurden ca. 80–90 % der verabreichten Dosis in den Fäzes wiedergefunden und ca. 5–9 % als polare Metaboliten über den Urin ausgeschieden. In den untersuchten Geweben konnte nur eine geringe Radioaktivität detektiert werden. Die Autoren folgerten daraus, dass die Resorption von AOH bzw. AME nur in geringem Ausmaß erfolgt, der resorbierte Teil effektiv metabolisiert wird und nicht im Gewebe persistiert (Pollock *et al.*, 1982a; Schuchardt *et al.*, 2014).

Pfeiffer *et al.* (2007b) bestätigten die effektive Metabolisierung sowohl von AME als auch von AOH in einem *in vitro*-Versuch mit Mikrosomen aus Ratten-, Menschen- und Schweineleber in Gegenwart von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH). Dabei konnte die Monohydroxylierung an jedem der vier möglichen aromatischen C-Atome sowie an der Methylgruppe von AOH und AME beobachtet werden. Zusätzlich wurde AME zu AOH demethyliert und im geringen Ausmaß dihydroxyliert. Da es sich bei den gebildeten Metaboliten um Catechole oder Hydrochinone handelt und diese reaktive Semichinone oder Chinone bilden können, sind die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidative DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Schäden möglich. In einer weiteren Studie konnte im gleichen Testsystem, allerdings bei zusätzlicher Verwendung von Uridin-5'-Diphosphoglucuronsäure (UDPGA), die Entgiftung von AOH und AME durch Konjugation mit Glucuronsäure belegt werden. Während AME hauptsächlich zu dem 3-*O*-Glucuronid umgesetzt wurde, führte AOH zu zwei Hauptkonjugaten, die als AOH-3-*O*-Glucuronid und AOH-9-*O*-Glucuronid identifiziert wurden (Pfeiffer *et al.*, 2009b). In differenzierten Caco-2-Zellen konnten ebenfalls alle drei Metaboliten sowie zusätzlich die 3-*O*-Sulfate von AOH und AME identifiziert werden. Außerdem wurde die intestinale Aufnahme von AOH und AME in einem *Transwell*-Modell mit den gleichen Zellen untersucht. Auf die Caco-2-Zellen und deren Einsatzgebiete wird in Kapitel 3.4.1 näher eingegangen. Basierend auf den scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) kann vermutet werden, dass AOH effektiv und rasch absorbiert wird und das Pfortaderblut als Aglykon sowie als Glucuronid und Sulfat erreicht ($P_{app}(\text{AOH}) = 34,9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, $c = 20 \mu\text{M}$, $t = 1 \text{ h}$). Im Gegensatz dazu ist die AME-Aufnahme etwas langsamer, wobei nur AME-Konjugate in das Pfortaderblut gelangen ($P_{app}(\text{AME}) = 10,3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, $c = 20 \mu\text{M}$, $t = 1 \text{ h}$) (Burkhardt *et al.*, 2009). Diese *in vitro*-Versuche bestätigen den für AME durchgeführten *in vivo*-Versuch mit Ratten (Pollock *et al.*, 1982a), widersprechen allerdings dem für AOH durchgeführten *in vivo*-Versuch mit Mäusen

(Schuchardt *et al.*, 2014). Dies könnte auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein, da die Resorption, Metabolisierung sowie Enzymmenge und –aktivität stark variieren können.

1.1.1.4 Toxizität

Die akute Toxizität von AOH und AME bei Mäusen nach intraperitonealer Applikation ist mit LD₅₀-Werten von > 400 mg/kg KG als relativ gering einzustufen (Pero *et al.*, 1973). Allerdings zeigte AOH cytotoxische Wirkungen in Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms (HeLa), indem die Hemmung der Zellreplikation festgestellt wurde (Pero *et al.*, 1973). Außerdem konnte eine signifikante Reduktion von Zellen in der S-Phase sowie ein G0/G1-Arrest in Schweine-Endometriumzellen nach Exposition mit AOH beobachtet werden (Wollenhaupt *et al.*, 2008). Lehmann *et al.* (2006) konnten in Ishikawa-Zellen (humane endometriale Krebszellen) und Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) zeigen, dass AOH die Zellproliferation hemmt.

In vitro-Untersuchungen zur Genotoxizität ergaben die Induktion von DNA-Strangbrüchen in kultivierten V79-Zellen, humanen Leber (HepG2)-Zellen und humanen Dickdarm (HAT-29)-Zellen (Pfeiffer *et al.*, 2007a). Zusätzlich konnten kinetochor-negative Mikrokerne in Ishikawa und V79-Zellen registriert werden (Lehmann *et al.*, 2006), die auf Chromosomenbrüche zurückzuführen sind. Mutagenitätstests in Bakterien waren testsystemabhängig und ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Während AOH und AME im Ames-Test mit den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA98 (Leserastermutation GC) und TA100 (Basenpaarsubstitution GC) mit und ohne metabolische Aktivierung nicht mutagen waren (Scott & Stoltz, 1980), zeigten beide Mykotoxine eine stark mutagene Antwort im *Escherichia coli* ND160 Rückmutationstest (Zhen *et al.*, 1991).

Der zugrundeliegende Mechanismus der Genotoxizität von AOH und AME beruht auf einer Hemmung der DNA Topoisomerase I und II mit einer Selektivität für die II α -Isoform (Fehr *et al.*, 2009). DNA-Topoisomerasen sind für die Replikation der DNA, die Transkription von Genen, für Rekombinationsvorgänge und die DNA-Reparatur essentiell, da sie für Änderungen der räumlichen Anordnung von DNA-Molekülen (Topologie) verantwortlich sind. Durch die Interaktion von AOH mit den Topoisomerasen wird sowohl die katalytische Aktivität gehemmt, als auch der intermediäre, kovalente Enzym-DNA-Komplex stabilisiert, wodurch es zur Kollision mit der Replikationsgabel kommen kann. Dies führt schließlich zu Doppelstrangbrüchen, was ein plausibler Grund für den klastogenen Effekt ist. Zur Unterstützung der Annahme, dass AOH ein Topoisomerasegift ist, wurden Zellen verwendet, die das Enzym Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase I (TDP I) überexprimieren. Dieses Enzym ist an der Reparatur von kovalenten DNA-Topoisomerase-Intermediaten beteiligt. Die Überexpression führte zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Strangbrüche im Vergleich zu Zellen, die eine inaktive Form von TDP I exprimierten (Fehr *et al.*, 2010).

Ein weiterer möglicher Mechanismus für die beobachtete Genotoxizität ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in verschiedenen *in vitro*-Zellmodellen nachgewiesen werden konnte (Solhaug *et al.*, 2012; Fernández-Blanco *et al.*, 2015; Tiessen *et al.*, 2017). ROS können zu oxidativen Basenschäden, AP-Stellen sowie Einzelstrangbrüche führen (Cadet *et al.*, 1999). Die Bildung von oxidativen DNA-Schäden und DNA-Strangbrüchen im

Zusammenhang mit gebildeten ROS ergab allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Während Solhaug *et al.* (2012) neben der Bildung von ROS auch oxidative DNA-Schäden in der Mausmakrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW 264.7 detektierten, konnten Tiessen *et al.* (2017) in humanen Speiseröhrenkarzinom-Zellen lediglich eine Erhöhung der ROS, jedoch keine DNA-Strangbrüche feststellen. Aufgrund dieser Datenlage kann keine eindeutige Aussage über den Einfluss von ROS auf das mutagene Potential von AOH und AME getroffen werden.

Nur wenige Studien beschäftigen sich bisher mit nicht-genotoxischen Effekten. AOH scheint allerdings bei niedrigeren Konzentrationen (im Vergleich zu Genotoxizitätsstudien) estrogenen Eigenschaften zu haben. Es wurde vermutet, dass AOH aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu natürlichem Steroid-Estrogen hormonähnlich wirken kann (Frizzell *et al.*, 2013; Lehmann *et al.*, 2006). Daher wurde die Bindung von AOH an den humanen rekombinanten Estrogenrezeptor α/β (ER α/β) als Agonist in einem zellfreien System und in einem Reportgen-Assay in Ishikawa-Zellen untersucht und nachgewiesen. Die Estrogenität betrug dabei ca. 0,01 % von 17 β -Estradiol (E2) (Lehmann *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnte in nicht-entarteten Schweine-Endometriumzellen keine Bindung von AOH an den ER nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Empfindlichkeit von Karzinomzellen gegenüber AOH im Vergleich zu Schweine-Endometriumzellen in Primärkultur unterschiedlich ist (Wollenhaupt *et al.*, 2008).

In einer Studie von Frizzell *et al.* (2013) konnte gezeigt werden, dass AOH das endokrine System in Nebennieren-Tumorzellen (H295R) moduliert. Beobachtet wurden die vermehrte Expression des Progesteronrezeptors, die Veränderung der Hormonproduktion sowie die Störung der Genexpression einiger der steroidogenen Enzyme. Bereits 1973 dokumentierten Pero *et al.*, dass die subkutane Injektion von AOH bei trächtigen DBA12-Mäusen zu fetotoxischen Effekten führte. Unter verschiedenen Bedingungen waren eine erhöhte Zahl toter Föten sowie das vermehrte Auftreten von Missbildungen zu beobachten. Ebenso führte die Gabe von AME ab 200 mg/kg KG bei syrischen Goldhamstern zu einer erhöhten Anzahl an Resorptionen und reduziertem Gewicht der Föten, wohingegen bei Ratten keine toxischen Effekte beobachtet wurden (Pollock *et al.*, 1982b). Diese fetotoxischen Effekte sind möglicherweise auf die hormonähnliche Wirkung zurückführbar.

1.1.2 Zearalenon (ZEN)

Das Mykotoxin ZEN wird von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Sie umfasst etwa 150 Arten, von denen *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* die Hauptverursacher für Fusariosen sind. Darunter werden verschiedene Pilzkrankheiten zusammengefasst, die durch *Fusarien* ausgelöst werden, wobei häufig eine Kontamination mit Mykotoxinen einhergeht. Zu den *Fusarien*-Toxinen gehören neben ZEN und dessen Derivaten außerdem Trichothecene, wie DON, Nivalenol oder T-2-Toxin und HT-2-Toxin, und Fumonisine. Die reduzierten Formen α - und β -Zearalenol (α - und β -ZEL), α - und β -Zearalanol (α - und β -ZAL) sowie Zearalanon (ZAN) stellen Derivate von ZEN dar.

1.1.2.1 Chemische Strukturen und Eigenschaften

ZEN (Abb. 2 A) wurde 1962 erstmals aus mit *F. graminearum* kontaminiertem Mais extrahiert (Stob *et al.*, 1962). Die chemische Struktur wurde allerdings erst 4 Jahre später von Urry *et al.* (1966) mittels chemischer, massenspektrometrischer und kernresonanzspektroskopischer (NMR) Analysen identifiziert. Im folgenden Jahr wurde schließlich die absolute Konfiguration der Methylgruppe an Position 3 aufgeklärt (Kuo *et al.*, 1967). Es handelt sich bei ZEN um ein phenolisches β -Resorcylsäurelacton, das chemisch mit (3*S*,11*E*)-14,16-Dihydroxy-3-methyl-7-oxo-benzoxacyclotetradec-11-en-1-on beschrieben wird. Dessen Derivate α -ZEL und β -ZEL entstehen durch Reduktion der Keto-Gruppe zu einer Alkoholgruppe an Position 7 des makrozyklischen Ringsystems und unterscheiden sich in der Stereochemie an dem neu entstandenen Stereozentrum (Abb. 2 B).

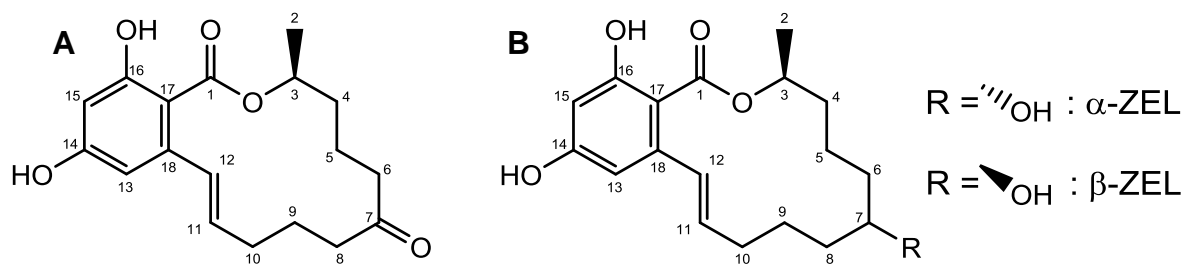


Abb. 2: Strukturformel von Zearalenon (ZEN) mit der Summenformel $C_{18}H_{22}O_5$ und einem Molekulargewicht von 318,36 Da (A) und Strukturformel von α - und β -Zearalenol (α - und β -ZEL) mit der Summenformel $C_{18}H_{24}O_5$ und einem Molekulargewicht von 320,38 Da (B).

ZEN bildet weiße Kristalle und besitzt einen Schmelzpunkt von 165 °C. Es ist gut löslich in alkalischen Lösungen, Ether, Benzol und Alkoholen, allerdings unlöslich in reinem Wasser (Urry *et al.*, 1966).

1.1.2.2 Stabilität, Vorkommen und Exposition

Fusarien kontaminieren vorzugsweise Mais, aber auch andere Getreide, die in gemäßigten Klimazonen Amerikas, Europas und Asiens angebaut werden. Temperatur und Wasseraktivität sind die vorrangigen Umweltfaktoren, die das Wachstum und die Mykotoxinproduktion von *Fusarien*-Spezies beeinflussen. Das optimale Wachstum von *Fusarium graminearum* findet bei einer Temperatur von etwa 25 °C und einem a_w -Wert von 0,995 statt. Bei einem a_w -Wert von 0,93 reduziert sich das Wachstum des Schimmelpilzes um den Faktor vier. Unabhängig vom a_w -Wert konnte bei 5 °C kein Wachstum mehr beobachtet werden (Ramirez *et al.*, 2006). Die höchste ZEN-Produktion hingegen wurde bei einem a_w -Wert von 0,97 und einer Temperatur von anfänglich 28 °C, gefolgt von einem Temperaturabfall auf 12 °C erreicht (Jiménez *et al.*, 1996). Je nach Feuchtigkeit und Klima wird somit Wachstum und Toxin-Produktion beeinflusst und somit schwanken die Gehalte an ZEN in Lebensmitteln saisonbedingt. Müller *et al.* (1997) zeigten in einer Studie, dass im niederschlagsreichen Jahr 1987 in Deutschland deutlich mehr Weizenproben mit ZEN kontaminiert waren als in den niederschlagsärmeren Jahren 1989–1993.

Die Stabilität von ZEN ist trotz des makrozyklischen Lactonrings als relativ hoch einzustufen. In einer Studie zur Hitzestabilität wurden die Gehalte an ZEN während des

Erhitzungsprozesses bei verschiedenen Temperaturen in wässrigen Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Dabei ergab sich, dass ZEN bei pH 7 die größte Stabilität aufwies, und die größten Verluste bei Temperaturen über 175 °C auftraten (> 92 % nach 60 Minuten). Bei Temperaturen bis 100 °C gab es unabhängig vom pH-Wert keine signifikanten Verluste an ZEN, während bei einer Temperatur von 125 °C 8–29 % an ZEN verloren gingen. Die Autoren weisen darauf hin, dass dies nicht zwingend eine Verringerung der Toxizität zur Folge haben muss (Ryu *et al.*, 2003).

In einem Review von Darsanaki *et al.* (2015) wurden 48 Studien zum weltweiten Vorkommen von ZEN in Getreiden und getreidebasierten Produkten aus den Jahren 1990–2013 zusammengefasst. Darunter sind Mais-, Weizen-, Weizenmehl-, Cornflakes-, Reis-, Gerste-, Hafer-, Frühstückszerealien- und Brot-Proben aufgeführt. Es wurden Werte bis zu ca. 1,5 mg/kg in einer Maisprobe gemessen (Klarić *et al.*, 2009). In einem weiteren Review wurde eine humane Expositionsabschätzung von ZEN anhand früherer Daten durchgeführt. Die dieser Expositionsabschätzung zugrunde liegenden Daten deuten darauf hin, dass Weizen, Gerste, Hafer und Roggen meist weniger belastet sind als Mais. Außerdem wurde ZEN auch in größeren Mengen in Erdnüssen und Erdnussmehl gefunden. Soja und Sojaprodukte sowie essbare Öle, Gewürze und andere Lebensmittel, wie z.B. Paprika, Bohnen oder Eier, enthielten ebenfalls ZEN. Da sich die Konsumgewohnheiten verschiedener Bevölkerungsgruppen unterscheiden, ist eine allgemeine Expositionsabschätzung schwierig. In Regionen, in denen viel Mais verzehrt wird, kann die ZEN-Belastung durchaus problematisch sein (Maragos, 2010).

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, wurden für ZEN in der Europäischen Union Höchstgehalte in Lebensmitteln in der Verordnung Nr. (EG) 1881/2006 festgelegt. In der aktuell gültigen Fassung (19.03.2018) gilt z.B. für unverarbeitetes Getreide außer Mais ein Höchstgehalt von 100 µg/kg, für unverarbeiteten Mais 350 µg/kg und für Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder 20 µg/kg.

Basierend auf dem NOEL („No Observed Effect Level“) von 10 µg/kg KG und einem Unsicherheitsfaktor von 40, aufgrund von Unterschieden in der Toxikokinetik zwischen verschiedenen Tierarten und zwischen unterschiedlichen Menschen, konnte die EFSA einen TDI („Tolerable Daily Intake“) von 0,25 µg/kg ableiten. Schätzungen zur chronischen ernährungsbedingten Exposition gegenüber ZEN liegen unterhalb oder im Bereich des TDI für alle Altersgruppen (EFSA, 2011b).

1.1.2.3 Toxikokinetik

Zur Abschätzung der intestinalen Bioverfügbarkeit von ZEN wurde das Caco-2-Zellmodell herangezogen. Dabei wurde die Bildung der Phase II-Metaboliten ZEN-14-Glucuronid und ZEN-16-Glucuronid sowie ZEN-14-Sulfat beobachtet. ZEN unterlag darüber hinaus einem reduktiven Phase I-Metabolismus zu α - und β -ZEL, die in der Phase II weiter zu dem α -ZEL-14-Sulfat und den α -ZEL-Glucuroniden an den Positionen 7 und 14 sowie dem β -ZEL-14-Glucuronid konjugiert wurden (Pfeiffer *et al.*, 2011). Die Reduktion der Ketogruppe zu α - und β -ZEL wird von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) katalysiert (Olsen *et al.*, 1981; Malekinejad *et al.*, 2006). Um Speziesunterschiede in der Biotransformation von ZEN zu

untersuchen, wurden subzelluläre Fraktionen der Leber verschiedener Tiere mit ZEN inkubiert und deren Metaboliten miteinander verglichen. In den Lebermikrosomen von Ratten, Schweinen, Hühnern, Kühen, Ziegen und Menschen befanden sich deutlich mehr α -ZEL als β -ZEL, jedoch variierten diese in ihren absoluten und relativen Mengen. Die größten Mengen an α -ZEL bildeten menschliche Lebermikrosomen, gefolgt von Mikrosomen aus Hühner- und Schweineleber (Yang *et al.*, 2017). Malekinejad *et al.* (2006) fanden ebenfalls eine hohe Umwandlung von ZEN zu α -ZEL in Schweineleber, allerdings produzierte Hühnerleber hauptsächlich β -ZEL.

Wie auch schon bei AOH und AME in Kapitel 1.1.1.3 beschrieben wurde, kann die Glucuronidierung von ZEN anhand eines *in vitro*-Tests mit Mikrosomen untersucht werden. In einer Studie von Pfeiffer *et al.* (2010) wurden Mikrosomen aus Ratten-, Menschen- und Schweineleber sowie elf humane UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Isoformen eingesetzt. Die höchste Aktivität trat bei Mikrosomen aus Schweineleber auf, während bei den humanen UGT die Isoformen UGT1A1, 1A3 und 1A8 die höchste Aktivität zeigten, was auf eine effektive Glucuronidierung sowohl in der Leber als auch im Darm schließen lässt. Die Hydroxygruppe an Position 14 von ZEN wird vermutlich aufgrund der geringsten sterischen Hinderung im Vergleich zu Position 16 bevorzugt konjugiert. Neben den HSD vermittelten Metaboliten von ZEN werden zusätzlich auch durch Cytochrom P450-haltige Monooxygenasen (CYPs) vermittelte oxidative Metaboliten gebildet. Dabei finden Monohydroxylierungen hauptsächlich an den aromatischen Positionen 13 und 15 statt, wodurch Catechole gebildet werden. Auch die aliphatische Position 8 sowie in geringerem Ausmaß die Positionen 9, 10 und 5 können monohydroxyliert werden (Pfeiffer *et al.*, 2009a; Hildebrand *et al.*, 2012). Eine weitere Metabolisierung durch das Enzym Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) aus Rattenlebercytosol führte außerdem zu zwei Methylierungsprodukten der beiden Catechole (Pfeiffer *et al.*, 2009a).

Im *Transwell*-Modell der Caco-2-Zellen wurde die *in vitro*-Resorption von ZEN untersucht, wobei große Mengen der Glucuronide und kleinere Mengen der Sulfate sowie α - und β -ZEL sowohl apikal als auch basolateral gefunden wurden. Basierend auf dem P_{app} -Wert ($P_{app}(\text{ZEN}) = 10,4 \times 10^{-6}$ cm/s, $c = 20$ μ M, $t = 1$ h) kann von einer effektiven und raschen Resorption im menschlichen Dünndarm ausgegangen werden (Pfeiffer *et al.*, 2011).

In *in vivo*-Versuchen kann die absolute orale Bioverfügbarkeit bestimmt werden. Diese ist definiert durch den Quotient der Flächen unter den Kurven für den Verlauf der Plasmakonzentration einer Substanz nach oraler bzw. intravenöser Gabe. Sie ist eine Messgröße dafür, wie schnell und in welchem Ausmaß eine Substanz resorbiert wird und im systemischen Kreislauf unverändert zur Verfügung steht. Für ZEN beträgt die absolute orale Bioverfügbarkeit in Sprague Dawley-Ratten lediglich 2,7 %, was auf den ausgeprägten Metabolismus von ZEN zurückzuführen ist (Shin *et al.*, 2009). Auch in juvenilen weiblichen Schweinen konnte eine absolute Bioverfügbarkeit von 1,8 % beobachtet werden. Ein weiterer Faktor für die geringe Bioverfügbarkeit könnte die schlechte Löslichkeit von ZEN in Wasser sein (Fleck *et al.*, 2017). Des Weiteren zeigten die Zeit-Konzentrationsprofile ein zweites Konzentrationsmaximum im Blut drei Stunden nach oraler Verabreichung. Dies und eine kürzere Halbwertszeit bei Ratten mit Gallengangkatheter weisen darauf hin, dass ZEN einem

enterohepatischen Kreislauf unterliegt (Shin *et al.*, 2009). Dieses Verhalten konnte auch in Schweinen beobachtet werden (Biehl *et al.*, 1993; Fleck *et al.*, 2017). Biehl *et al.* (1993) untersuchten die Rolle der biliären Ausscheidung und den enterohepatischen Kreislauf von ZEN in weiblichen Yorkshire-Schweinen. Dabei fanden sie Glucuronidkonjugate von ZEN und von α -ZEL in der Galle. Versuche an Schweinen, deren Gallenblase entfernt worden war, ergaben ebenfalls starke Hinweise darauf, dass ZEN dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt.

Außerdem wurde ZEN in verschiedenen Geweben der Ratte nachgewiesen. Dabei waren die Gehalte an ZEN in der Leber 3-fach, in der Niere 3-fach, im Fettgewebe 2-fach und in der Lunge 2-fach höher sowie im Gehirn 0,6-fach und in den Muskeln 0,2-fach niedriger als im Serum (Shin *et al.*, 2009).

Um den Übergang von ZEN und α -ZEL über die Blut-Plazenta-Schranke zu untersuchen, wurden schwangere Sprague Dawley-Ratten intravenös sowie gastral mit einer Einzeldosis ZEN behandelt. Neben der weiten Verteilung von ZEN und α -ZEL in den mütterlichen Geweben fand eine Übertragung im mittleren und späten Stadium der Schwangerschaft in den Fötus statt (Bernhoft *et al.*, 2001).

1.1.2.4 Toxizität

ZEN besitzt in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen sowohl nach intraperitonealer als auch oraler Verabreichung nur eine geringe akute Toxizität. Der LD₅₀-Wert liegt oberhalb von 20.000 mg/kg KG. Bei oraler Gabe einer Einzeldosis von 10.000 bzw. 20.000 mg/kg KG an Ratten bzw. Mäuse traten noch keine Todesfälle auf. Allerdings wurden leichte Reizbarkeit und Hypoaktivität sowie nach intraperitonealer Gabe zusätzlich eine verlangsamte Atmung und Absinken der Körpertemperatur der Tiere beobachtet (Hidy *et al.*, 1977).

Untersuchungen zur Genotoxizität von ZEN ergaben negative Ergebnisse im Ames-Test in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537 sowohl mit als auch ohne Aktivierung durch Lebermikrosomen der Ratte (Kuczuk *et al.*, 1978; Wehner *et al.*, 1978). Gleichmaßen war der eukaryotische Punktmutationstest im *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm D-3 negativ (Kuczuk *et al.*, 1978). Im Gegensatz dazu induzierte ZEN Chromosomenaberrationen in Knochenmarkzellen von weiblichen BALB/C-Mäusen (Ouanes *et al.*, 2005) sowie zusätzlich Schwesterchromatidaustausch in einer immortalisierten Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (Galloway *et al.*, 1987). Sowohl in Knochenmarkzellen von Mäusen als auch in Vero-Zellen (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen) induzierte ZEN Micronuclei. Das EFSA-Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette (CONTAM) schlussfolgerte aus diesen Daten, dass ZEN als klastogene Substanz angesehen werden kann (EFSA, 2011b).

Studien zur Bildung von DNA-Addukten ergaben je nach Spezies unterschiedliche Ergebnisse. Während in weiblichen BALB/C Mäusen DNA-Addukte durch ³²P-Postlabeling in der Niere, in der Leber und in den Ovarien gefunden wurden, konnten in den gleichen Organen von Sprague Dawley-Ratten keine Addukte detektiert werden (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1995). Durch die zusätzliche Verabreichung von α -Tocopherol konnte die Adduktbildung

in der Leber und in der Niere von Mäusen signifikant reduziert werden (Grosse *et al.*, 1997). Allerdings wurden die Strukturen dieser DNA-Addukte bisher noch nicht aufgeklärt, weshalb die Interpretation dieser Daten schwierig ist.

In einer Langzeitstudie des National Toxicology Programs (NTP) wurde die Kanzerogenität von ZEN in Fischer 344-Ratten und B6C3F1-Mäuse untersucht. In den Ratten konnten zwar einige nicht-neoplastische Veränderungen beobachtet werden, allerdings keine Erhöhung der Tumorzinzidenz. Dagegen war die Inzidenz von hepatozellulären Adenomen bei weiblichen Mäusen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren traten vermehrt Hypophysenadenome sowohl in weiblichen als auch in männlichen Mäusen auf. Daher wurde geschlussfolgert, dass ZEN bei B6C3F1-Mäusen als krebserregend angesehen werden kann (NTP, 1982). Die International Agency for Research on Cancer (IARC) stufte ZEN aufgrund der Datenlage in Gruppe 3 (nicht klassifizierbar hinsichtlich der Kanzerogenität im Menschen) ein (IARC, 1993).

Andere Toxizitätsstudien von ZEN und dessen reduktiven Metaboliten α - und β -ZEL zeigen allerdings, dass die estrogene Aktivität der kritische Wirkmechanismus ist. Dies bedeutet, dass den Substanzen ähnliche biologische Wirkungen wie den endogenen weiblichen Sexualhormonen E2 und Estron (E1) zugesprochen werden. Substanzen, deren Strukturen hormonähnlich sind, können an nukleäre ER binden. Anschließend werden assoziierte Hitzeschockproteine abgespalten und Rezeptordimere gebildet. Der Hormon-Rezeptor-Komplex kann nun in den Zellkern wandern, wo er an die Hormon-Response-Elemente der DNA binden und die Genexpression bestimmter Gene aktivieren oder reprimieren kann. Dadurch können estrogen-ähnliche Effekte induziert werden. Aufgrund der Störung der natürlichen biochemischen Wirkweise von Hormonen und daraus resultierenden schädlichen Effekte werden diese Substanzen als endokrine Disruptoren bezeichnet.

In einem Review von Metzler *et al.* (2010) wurden mehrere *in vivo* und *in vitro*-Studien zusammengefasst, in denen gezeigt wurde, dass ZEN und dessen reduktive Metaboliten sowohl an den Rezeptortyp ER α als auch an ER β binden. ZEN wirkt dabei etwa so stark wie das stärkste Phytoestrogen Coumestrol (Martin *et al.*, 1978; Kuiper *et al.*, 1998). In humanen Brustadenokarzinomzellen (MCF7) wurden die unterschiedlichen relativen Estrogenitäten verglichen, woraus sich eine Reihenfolge von α -ZEL > α -ZAL > ZEN > β -ZEL ergab (Malekinejad *et al.*, 2005). Auch im uterotrophen Assay in Mäusen zeigen die α -Stereoisomere von ZEL und ZAL eine stärkere Wirkung als ZEN und die β -Isomere von ZEL und ZAL (Peters, 1972; Katzenellenbogen *et al.*, 1979; Takemura *et al.*, 2007).

Wie schon in Kapitel 1.1.2.3 dargestellt, zeigten Studien mit subzellulären Fraktionen aus der Leber verschiedener Spezies, dass das Mengenverhältnis von α -ZEL zu β -ZEL bei der Reduktion von ZEN von der Tierart abhängt. Da die estrogene Aktivität von α -ZEL sehr viel höher ist als von β -ZEL, kann dies Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der jeweiligen Tierart gegenüber ZEN haben. Fitzpatrick *et al.* (1989) konnten darüber hinaus zeigen, dass die relative Bindungsaffinität von α -ZEL zum ER bei Schweinen größer war als bei Ratten und Hühnern. Sie schlussfolgerten daraus, dass artübergreifende Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber ZEN sowohl auf die Unterschiede der gebildeten ZEN-

Metaboliten als auch auf die Bindungsaffinität dieser Metaboliten an die artspezifischen Estrogenrezeptoren zurückzuführen ist.

Diese erhöhte Empfindlichkeit äußert sich schließlich in Symptomen des Hyperestrogenismus. Beispielsweise führte die Gabe von *Fusarium*-kontaminiertem Mais zu einer Vergrößerung der Vulva und der Milchdrüsen bei unreifen weiblichen Schweinen und einem erhöhten Uterusgewicht bei reifen ovariectomierten Mäusen (Stob *et al.*, 1962). In zahlreichen anderen Studien wurde ebenfalls Hyperestrogenismus in Schweinen wie verlängerter Östrus und Anöstrus, Veränderungen der Libido, Infertilität, erhöhte Inzidenz von Pseudoschwangerschaft, erhöhte Milchdrüsenentwicklung und abnormale Laktation beobachtet (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Andere Tierarten, wie z.B. Leghorn-Hühner, sind gegenüber ZEN relativ unempfindlich. Eine Gabe von 800 mg ZEN/kg KG für sieben Tage führte lediglich zu einer verringerten Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe und einem erhöhten Eileitergewicht (Chi *et al.*, 1980). Bei Milchkühen, die 500 mg ZEN pro Tag (ca. 700 µg ZEN/kg KG) für zwei Östruszyklen erhielten, konnten keine negativen Effekte festgestellt werden (Weaver *et al.*, 1986). Diese Beobachtungen decken sich mit den zuvor genannten *in vitro*-Studien.

1.2 Fremdstoffmetabolismus von Mykotoxinen in Pflanzen

Pflanzen sind durch ihre Umwelt einer Vielzahl an potentiell toxischen Fremdstoffen ausgesetzt. Dabei können natürliche Kontaminanten (z.B. Mykotoxine) oder Pestizide in die Pflanzenzellen gelangen. Insbesondere lipophile Fremdstoffe können leicht durch die ebenfalls lipophile Zellmembran in das Zellinnere gelangen und dort mit lebenswichtigen Zellbestandteilen wechselwirken. Um potentiellen Gefahren durch Fremdstoffe entgegenzutreten, besitzen Pflanzen ein effektives Detoxifizierungssystem (Abb. 3), das dem der Säugetiere relativ ähnlich ist. Sowohl im pflanzlichen Metabolismus als auch im Säugermetabolismus lässt sich dieses System in drei Phasen einteilen: Phase I, die auch als Funktionalisierungsphase bezeichnet wird, Phase II, in der Konjugationsreaktionen stattfinden, und Phase III, die im Säugermetabolismus eine effektive Ausscheidung und im pflanzlichen Metabolismus eine Kompartimentierung beschreibt (Sandermann, 1992). Diese drei Phasen werden im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet.

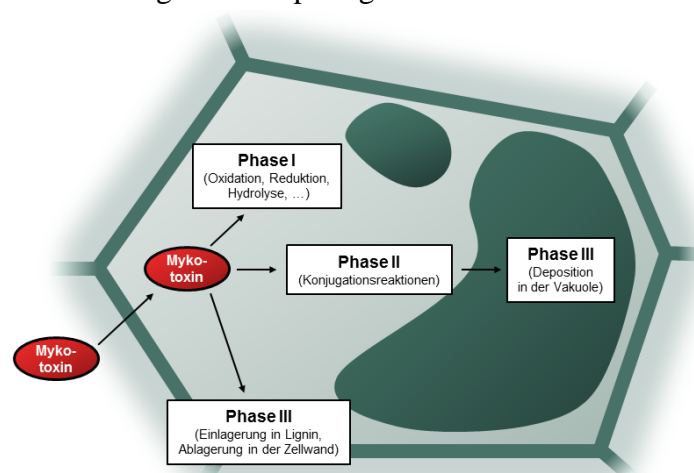


Abb. 3: Schematische Darstellung des Fremdstoffmetabolismus von Mykotoxinen in Pflanzenzellen. Dieser lässt sich in drei Phasen unterteilen (modifiziert nach Scheel & Sandermann (1981)).

Ein Beispiel für Kontaminanten, die dem Fremdstoffmetabolismus in der Pflanze unterliegen, sind Mykotoxine. Aus ihnen können Mykotoxinmetaboliten, sogenannte „maskierte“ Mykotoxine, gebildet werden, die aufgrund ihrer veränderten physikochemischen Eigenschaften in der Routineanalytik häufig nicht erfasst werden. Dies betrifft sowohl die Extraktion bei der Probenvorbereitung als auch chromatographische Methoden sowie antikörperbasierte Nachweisverfahren (Berthiller *et al.*, 2013). Maskierte Mykotoxine fallen unter den Überbegriff „modifizierte“ Mykotoxine, der auch Mykotoxine umfasst, deren chemische Strukturen biologisch durch Metabolisierung in anderen Organismen (Pilze, Tiere, Menschen) oder chemisch durch thermische und nicht-thermische Be- und Verarbeitungsprozesse verändert wurden. Diese unterscheiden sich wiederum von den ursprünglichen freien sowie den Matrix-assoziierten Mykotoxinen, die entweder komplexiert, physikalisch gelöst bzw. umschlossen oder kovalent an Matrixbestandteile gebunden sind (Rychlik *et al.*, 2014).

In einem wissenschaftlichen Gutachten beschäftigte sich die EFSA im Auftrag der Europäischen Kommission mit der Toxizität von modifizierten Mykotoxinen, ihrem Auftreten, der Exposition von Mensch und Tier sowie den gesundheitlichen Risiken dieser Substanzen und ihren unmodifizierten Formen. Die Toxizität vieler modifizierter Mykotoxine ist bislang unbekannt. Darüber hinaus besteht oft auch die Möglichkeit der Freisetzung des ursprünglichen Mykotoxins durch Hydrolyse während der Lebensmittelverarbeitung oder der Verdauung im menschlichen oder tierischen Organismus. Aufgrund dieses Risikos entschied das CONTAM-Panel, dass modifizierte Mykotoxine bei der Risikobewertung mit der gleichen Toxizität wie deren Mutter-Mykotoxine betrachtet werden müssen (EFSA, 2014).

In den letzten Jahren begann die EFSA Gruppenwerte („Group Health-Based Guidance Values“) für verschiedene Mykotoxine und deren modifizierten Formen festzulegen, um die bislang geltenden TDI-Werte an die neu entdeckten Metaboliten anzupassen (EFSA, 2016a, 2017a, 2017b, 2018). Für ZEN und dessen modifizierten Formen wurden außerdem relative Potenzfaktoren (RPF, relative potency factor) abgeleitet, die das estrogene Potential relativ zu ZEN (RPF = 1) angeben. Da das estrogene Potential von α - bzw. β -ZEL sehr unterschiedlich ist, wurden RPFs von 60 und 0,2 für die beiden Substanzen angesetzt (EFSA, 2016a).

1.2.1 Phase I-Metabolismus

Im Allgemeinen werden im Zuge von Phase I-Reaktionen entweder funktionelle Gruppen in lipophile Fremdstoffmoleküle eingeführt oder das Molekül wird enzymatisch so verändert, dass seine Polarität und Wasserlöslichkeit steigt. Fremdstoffe, die von Natur aus hydrophiler sind, unterliegen teilweise nicht dem Phase I-Metabolismus. Typische Reaktionen im Phase I-Metabolismus sind Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen, die durch CYPs, Peroxidasen, Reduktasen, Esterasen und Amidasen katalysiert werden (Cole, 1994). Allerdings führen diese Reaktionen nicht immer zu einer Entgiftung des Fremdstoffes. In einigen Fällen wird die Toxizität der ursprünglichen Substanz durch den Phase I-Metabolismus erhöht, weshalb der Phase I-Metabolismus auch Aktivierungsphase genannt wird (Coleman *et al.*, 1997).

Ein Beispiel für den Phase I-Metabolismus in Pflanzen und eine daraus resultierende erhöhte Toxizität für Säuger ist die Reduktion von ZEN zu α - und β -ZEL. Diese Aktivierung wurde zuerst von Engelhardt *et al.* (1988) in Mais-Zellsuspensionskulturen und später von Berthiller

et al. (2006a) in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* beobachtet. In einer belgischen Studie wurden 174 Nahrungsmittel auf Getreidebasis und 86 Futtermittel auf Kontaminationen mit α - und β -ZEL untersucht. Dabei traten Höchstwerte von 515 μg α -ZEL/kg und 147 μg β -ZEL/kg bei Cornflakes auf. 53 bzw. 63 % der Haferflocken-Proben waren mit α - bzw. β -ZEL kontaminiert (De Boevre *et al.*, 2012). Dieses hohe Vorkommen zeigt, dass Phase I-Metaboliten einen großen Beitrag zur Gesamtoxinbelastung leisten können.

1.2.2 Phase II-Metabolismus

In Phase II des Fremdstoffmetabolismus in Pflanzen werden Mykotoxine oder deren in Phase I gebildeten aktivierten Mykotoxinmetaboliten kovalent an endogene hydrophile Moleküle gebunden. Beispielsweise kann Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) an elektrophile Bindungsstellen in den Mykotoxinen binden. Diese Reaktion kann durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert werden. Überdies können Glutathionaddukte zu Cysteinylglycin oder Cystein-Konjugaten abgebaut werden (Kluger *et al.*, 2015). Eine weitere typische Phase II-Reaktion ist die Konjugation von Glucose an Hydroxy-, Thiol-, Amino- oder Carboxygruppen, wodurch hauptsächlich β -O-D-Glucoside bzw. O-1-Glucoseester-Konjugate gebildet werden. Diese werden durch UDP-O-Glycosyltransferasen katalysiert (Lamoureux & Rusness, 1986; Berthiller *et al.*, 2018). Besitzt ein Molekül mehr als eine Hydroxygruppe, kann die Stelle, an der glycosyliert wird, speziesabhängig variieren (Mizukami *et al.*, 1983). Diese Glucosylkonjugate werden häufig mittels O-Malonyltransferasen und Malonyl-CoA überwiegend zu 6'-O-Malonylglucosiden umgesetzt, wobei auch 4'-O-Malonylglucoside im Zuge des Fremdstoffmetabolismus in der Pflanze gebildet werden (Yerramsetty *et al.*, 2011). Allerdings wurde in mehreren Publikationen über eine geringe Stabilität der Malonylglucoside berichtet, was dazu führen kann, dass *in natura* Malonylglucoside fälschlicherweise als Glucoside identifiziert werden (Lamoureux & Rusness, 1986). Komplexere auf Glucose basierende Konjugate stellen z.B. β -Gentiobioside (β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside) dar. Ferner sind Oligoglycoside wie Tri- bzw. Tetraglucoside sowie Pentosylglucoside denkbare Metaboliten im pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus.

Wie bereits zu Beginn des Kapitels 1.2 erwähnt, sind einige Parallelen, aber auch Unterschiede, zwischen dem Säugermetabolismus und dem pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus erkennbar. Während in Phase I weitgehend die gleichen enzymatischen Reaktionen stattfinden, gibt es deutliche Unterschiede in der Konjugatbildung im Phase II-Metabolismus. Bei Säugetieren stellt die Bildung von Glucuroniden mittels UGT eine der wichtigsten Phase II-Reaktionen dar. Dies kann als Pendant zur Glucosylierung in Pflanzen angesehen werden. Ferner werden Fremdstoffe von Säugern meist gut mittels Sulfotransferasen sulfatiert, was bei Pflanzen eine eher untergeordnete Rolle spielt. Sowohl die Konjugation mit Glutathion als auch mit Aminosäuren ist bei Säugern und Pflanzen hingegen ähnlich. Im Gegensatz zur Malonylierung in Pflanzen treten in Säugern allerdings nur Acetylierungen auf (Lamoureux & Rusness, 1986). Beiden Systemen ist gemeinsam, dass die Toxizität des ursprünglichen Mykotoxins im Gegensatz zu Phase I in Phase II verringert wird,

weshalb der Phase II-Metabolismus als Deaktivierungsschritt angesehen werden kann (Berthiller *et al.*, 2013).

Ähnlich wie bei der Glucuronidierung im Säugermetabolismus wird ZEN in Weizen- und Maiszellkulturen zu den beiden Glucopyranosiden an den Positionen 14 und 16 metabolisiert, deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie identifiziert wurden (Kamimura, 1986; Kovalsky Paris *et al.*, 2014; Engelhardt *et al.*, 1988). Außerdem konnte auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nach Umwandlung von ZEN zu den Phase I-Metaboliten α -ZEL und β -ZEL eine anschließende Glykosylierung der drei Mykotoxine sowie eine Sulfatierung von ZEN beobachtet werden. Zehn weitere konjugierte Metaboliten von ZEN, α -ZEL und β -ZEL konnten mittels HPLC-MS/MS (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Kombination mit Tandem-Massenspektrometrie) in *Arabidopsis thaliana* gefunden werden. Allerdings wurden deren exakten Strukturen bislang noch nicht bestimmt. Es handelt sich dabei um Malonylglucoside, Dihexoside und Pentosylhexoside (Berthiller *et al.*, 2006b), die u.a. im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden sollten.

In der Studie von De Boevre *et al.* (2012) wurden neben α -ZEL und β -ZEL auch die Glucoside von ZEN, α -ZEL und β -ZEL sowie ZEN-Sulfat in verschiedenen Nahrungs- und Futtermitteln analysiert. Dabei traten Höchstwerte von 147–417 $\mu\text{g}/\text{kg}$ der Phase I- und II-Metaboliten von ZEN in Cornflakes auf. In einigen Proben überstieg der Gehalt an ZEN-Derivaten den Gehalt an freiem ZEN. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit Lebensmittelproben auf modifizierte Mykotoxine zu untersuchen.

Der Phase II-Metabolismus von AOH und AME wurde in unserer Arbeitsgruppe in Tabak-Zellsuspensionskulturen untersucht. Dabei wurden für AOH neben den zwei Glucosiden an den Positionen 3 und 9 sowie deren 6'-Malonylderivaten ein Gentiobiosid an Position 9 identifiziert. AME, das per se an Position 9 methyliert ist, wurde von den Tabakzellen an den Positionen 3 und 7 glucosyliert. Des Weiteren wurden Malonylderivate des Glucosids an Position 3 sowohl an den Positionen 6 als auch 4 der Glucose identifiziert (Hildebrand *et al.*, 2015). Deren Relevanz in Lebensmitteln zeigt eine Pilotstudie zur Bestimmung von *Alternaria*-Toxinen von in Österreich erworbenen Lebensmittelproben. Während in Sonnenblumenkernöl- und Weizenmehlproben keine AOH- bzw. AME-Metaboliten gefunden werden konnten, wurden das AOH-3- und AOH-9-Glucosid sowie das AOH-3-Sulfat und AME-3-Sulfat in Tomatensaucenproben nachgewiesen und teilweise bestimmt (Puntscher *et al.*, 2018).

1.2.3 Phase III-Metabolismus

Im Vergleich zur Ausschleusung von Fremdstoffen über die Nieren und die Galle bei Säugetieren, ist eine effektive Exkretion der Mykotoxine bzw. Mykotoxinkonjugate bei Pflanzen nicht möglich. Der Phase III-Metabolismus beinhaltet daher die Kompartimentierung und Lagerung von Fremdstoffen bzw. deren Metaboliten, weshalb er auch als „lokale Exkretion“ bezeichnet wird (Scheel & Sandermann, 1981). Dieser ist nötig, um eine Anreicherung der Konjugate im Cytosol zu verhindern, da sonst Aktivitäten von Konjugationsenzymen durch Produkthemmung beeinträchtigt werden könnten. Ein Beispiel dafür stellt die Glutathion-S-Transferase dar, die durch Anhäufung von Glutathion-

Konjugaten inhibiert wird. Die daraus resultierende Anhäufung von unkonjugierten elektrophilen Fremdstoffen kann schließlich zu Zellschädigungen führen (Coleman *et al.*, 1997).

In der Literatur werden zwei Mechanismen der Kompartimentierung beschrieben. Zum einen können lösliche Konjugate in der Vakuole gespeichert werden und zum anderen wird eine Einlagerung in die Zellwand geschildert. Diese zwei Kompartimentierungswege werden in den folgenden Kapiteln 1.2.3.1 und 1.2.3.2 näher betrachtet.

1.2.3.1 Deposition in der Vakuole

Die Vakuole ist das größte Organell der Pflanzenzellen. Sie kann je nach Gewebeart, 20–90 % des Zellvolumens einnehmen. Durch eine selektiv permeable Tonoplastenmembran ist sie vom Cytoplasma abgegrenzt. Eine ihrer vielfältigen Aufgaben ist die Speicherung einer großen Bandbreite an Produkten des Sekundärstoffwechsels. Zum Beispiel wurden glycosylierte sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide, Betalaine und Anthocyane in der Vakuole gefunden (Wink, 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch Fremdstoffe, wie z.B. Mykotoxinkonjugate, in die Vakuole transportiert werden, um deren Akkumulation im Cytosol zu vermeiden.

Für den Transport in die Vakuole sind Membrantransporter notwendig. Sie ermöglichen einen Stofftransport gegen den Konzentrationsgradienten durch die Tonoplastenmembran. Dieser Vorgang kann entweder primär aktiv durch direkten Verbrauch von ATP (Adenosin-triphosphat)-Verbrauch oder sekundär aktiv durch Aufbau eines Protonen- oder elektrochemischen Gradienten erfolgen. Bartholomew *et al.* (2002) fanden mithilfe von Inhibitoren heraus, dass die Art der Konjugation eine wichtige Rolle bei dem Transport von Herbiziden in die Vakuole spielt. Deren glucosylierte Konjugate werden sekundär aktiv über einen protonengekoppelten gegenüber Vanadat unempfindlichen Transporter in die Vakuole geschleust. Dieser weist Eigenschaften von einem H⁺-Antiporter auf. Im Gegensatz dazu werden Glutathionkonjugate der Herbizide primär aktiv über einen ATP-abhängigen, mit Vanadat hemmbarem Transporter aufgenommen. Dieser gehört zur Subklasse MRP (Multidrug Resistance-Related Protein) der Familie der ABC-Transporter (ATP-bindende Kasette). Außerdem wird vermutet, dass im Allgemeinen ausschließlich der Transport von Glucosiden in β -Konfiguration möglich ist, sowie dass die Glucose-Einheit für den vakuolären Transport an eine aromatische Hydroxygruppe gebunden sein muss, nicht aber an eine Carboxygruppe gebunden sein darf (Bartholomew *et al.*, 2002). Eine weitere Klasse von Transportern stellen MATE-Transporter (Multidrug and Toxin Extrusion Transporter) dar, über die viele sekundäre Verbindungen wie Alkaloide, cyanogene Glucoside und einige Flavonoide transportiert werden (Martinoia, 2018). MATE2 zeigt eine Substratspezifität für malonylierte Flavonoid- sowie Anthocyan-Glucoside im Gegensatz zu ihren nicht acylierten Vorstufen (Zhao *et al.*, 2011). Auch der Hauptfarbstoff von Petersilie, Apigenin-7-*O*-Glucosid wurde erst nach zusätzlicher Konjugation mit Malonsäure in die Vakuole aufgenommen (Matern *et al.*, 1986). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Glucosylierung, die Glutathionylierung und die Malonylierung als Markierungen für die Vakuolenspeicherungen dienen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Glutathion-Konjugate

in der Vakuole einem „Phase IV“-Metabolismus unterliegen können. Dies bedeutet, dass beispielsweise Peptidbindungen enzymatisch gespalten werden können, was zu γ -Glutamylcysteinyl-S-Konjugaten führt (Wolf *et al.*, 1996). Zahlreiche weitere Umwandlungen von Glutathion-Konjugaten wurden in der Literatur beschrieben (Lamoureux *et al.*, 1993), allerdings ist nicht bekannt, ob diese Prozesse ebenfalls bei Mykotoxinkonjugaten auftreten.

Außerdem wurden bislang noch keine Studien zum Transport von Mykotoxinen bzw. deren Konjugate in die Vakuole durchgeführt. Es wird jedoch vermutet, dass diese ebenfalls nach den zuvor genannten Mechanismen in die Vakuole sequestriert werden, um einer Akkumulation im Cytosol entgegenzuwirken.

1.2.3.2 Einlagerung in die Zellwand

In der Literatur wird häufig die Einlagerung von Fremdstoffen in die Zellwand beschrieben. Dabei wird meist von gebundenen oder auch nicht-extrahierbaren Rückständen (NER) gesprochen, da sie nicht unter Verwendung herkömmlicher Lösemittelextraktionen entfernt werden können. Pflanzliche Zellwände weisen eine sehr heterogene Struktur auf, weshalb eine Vielzahl an Verknüpfungsmöglichkeiten in Frage kommt. Im Folgenden soll daher zunächst der allgemeine Zellwandaufbau beschrieben werden.

Pflanzliche Zellwände bestehen im Allgemeinen aus einer Mittellamelle und einer Primärwand, denen je nach Funktion der Zelle eine Sekundärwand aufgelagert werden kann. Während die Mittellamelle hauptsächlich aus Pektinen aufgebaut ist, beinhaltet die Primärwand eine Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Strukturproteinen, welche in Cellulose eingebettet ist. Art und Anteil der Matrixpolymere unterscheidet sich je nach Zellwandtyp (McDougall *et al.*, 1996).

Dikotyle und monokotyle Pflanzen mit Ausnahme der Commeliniden besitzen in der Regel Primärzellwände vom Typ I. Neben Cellulosefibrillen weist dieser Zellwandtyp hauptsächlich Pektine (Homogalakturonan, Rhamnogalakturonane I und II), Xyloglucane und Strukturproteine auf. Aufgelagerte Sekundärwände bestehen hauptsächlich aus Cellulose, (Glucurono-)Xylanen und Mannanen. Im Gegensatz dazu weisen Primärzellwände von Commeliniden (Typ II-Zellwände) neben der Cellulose hauptsächlich Hemicellulosen, insbesondere neutrale Arabinoxylane, und je nach Getreideart mixed-linked β -Glucane, auf (Vogel, 2008; Carpita & Gibeaut, 1993). Beispielsweise haben Gerste und Hafer einen vergleichsweise hohen mixed-linked β -Glucan-Gehalt, während diese bei Weizen nur in geringen Mengen vorkommen und neutrale Arabinoxylane bei weitem überwiegen (Genç *et al.*, 2001). Die Sekundärwände der Commeliniden setzen sich aus Cellulose, (Arabinoglucurono-)Xylanen und Mannanen zusammen.

Mit Auflagerung der Sekundärzellwand kann auch Lignin in die Zellwand eingebaut werden, wodurch eine weitere Verfestigung der Zellwand erreicht wird. Bei Lignin handelt es sich um ein komplexes, phenolisches Polymer, das hauptsächlich aus den Monolignolen *para*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol (CA) und Sinapylalkohol aufgebaut ist (Abb. 4). Diese werden im Phenylpropanstoffwechsel gebildet. Nach dem Einbau in das Lignin-Polymer

werden sie als *para*-Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyl (S)-Einheiten bezeichnet (Ralph *et al.*, 2004).

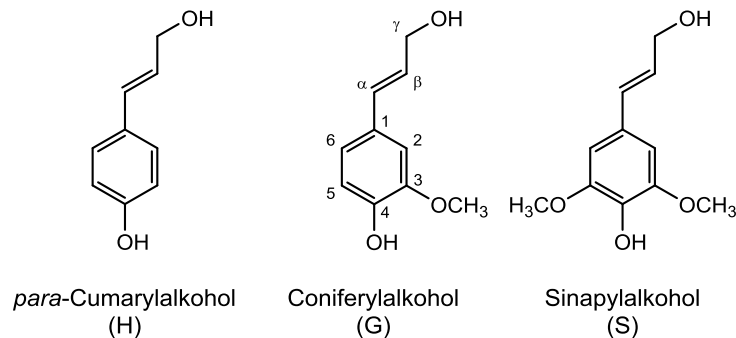


Abb. 4: Strukturformeln der Monolignole *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalcohol. Nach dem Einbau in das Lignin-Polymer werden sie als Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S) bezeichnet.

Während dikotyle Angiospermen im Allgemeinen G- und S-reiche Lignine aufweisen, sind Lignine von Gymnospermen besonders reich an G-Einheiten. Im Vergleich dazu weisen Monokotyledonen meist ein ausgeglichenes G/S-Verhältnis auf. Der Anteil der H-Einheiten ist bei monokotylen Pflanzen höher als bei dikotylen Pflanzen (Boerjan *et al.*, 2003).

Aber auch weitere monomere Bausteine, wie z.B. Kaffeealkohol, Hydroxyzimtaldehyde, Hydroxybenzaldehyde oder an der γ -Position veresterte Monolignole, können in das Ligninpolymer eingebaut werden, wodurch eine noch komplexere Struktur entsteht (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). Die Monolignole werden nach ihrer Synthese im Cytosol vermutlich entweder durch passive Diffusion, Exocytose oder über einen Transporter zur Zellwand transportiert oder ähnlich wie Fremdstoff-Konjugate als Glucoside in der Vakuole gespeichert. In der Zellwand werden sie schließlich durch Peroxidasen und H₂O₂ oder Laccasen und O₂ zu Phenoxyradikalen umgesetzt (Abb. 5).

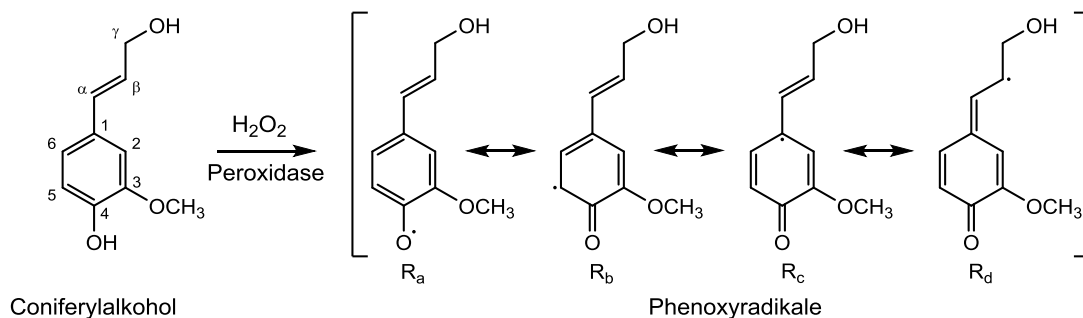


Abb. 5: Bildung eines resonanzstabilisierten Phenoxyradikals (R_a – R_d) durch die Einwirkung von Peroxidase und H₂O₂ auf Coniferylalcohol (CA).

Nach der Dehydrierung fungieren die resonanzstabilisierten Radikale entweder als Radikalüberträger auf das wachsende Ligninpolymer oder sie gehen verschiedene radikalische Kopplungsreaktionen ein, wodurch entweder Dimere gebildet werden oder das Ligninpolymer verlängert wird (Boerjan *et al.*, 2003). Aufgrund der vielen Bindungsmöglichkeiten an den Phenoxyradikalen, ergeben sich eine Vielzahl an Kopplungsmöglichkeiten zwischen den Einheiten. In der Natur treten folgende Kopplungen auf: β -O-4-, β -5-, 5-5-, β - β -, 5-O-4- und β -1-Bindungen (Abb. 6), wobei β -O-4-Bindungen den Hauptbindungstyp darstellen.

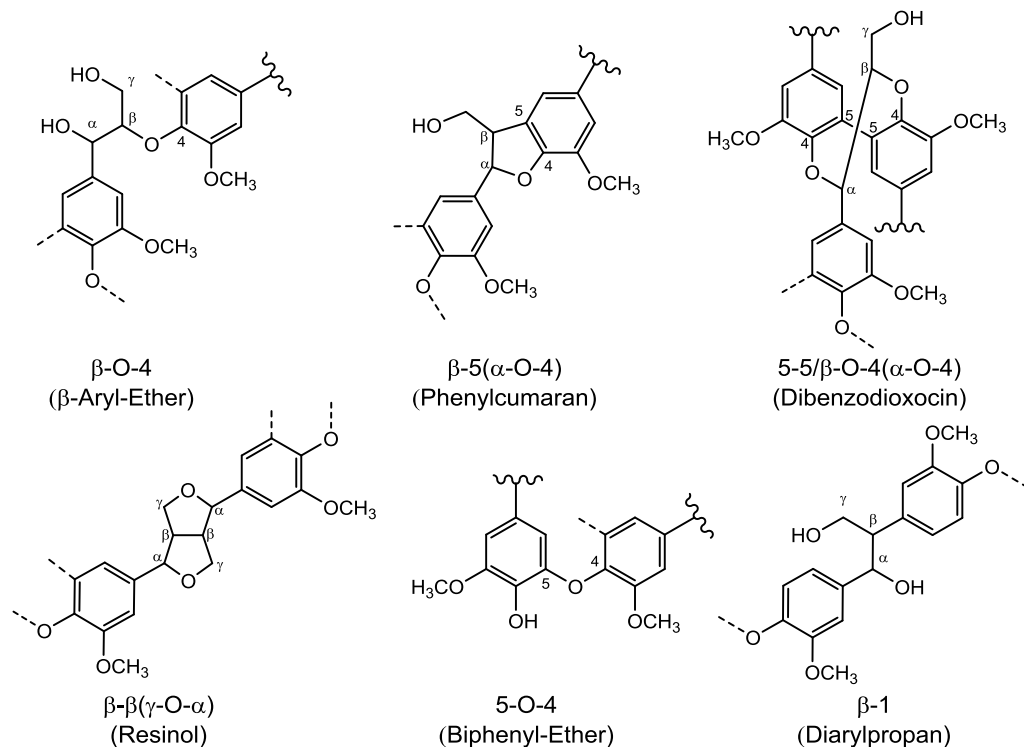


Abb. 6: Mögliche Bindungstypen, die im Ligninpolymer durch radikalische Kopplung entstehen können. Weitere Kopplungsmöglichkeiten während der Lignifizierung sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Die Bildung einer β -O-4-Bindung ist in Abb. 7 dargestellt. Während der radikalischen Kopplung entstehen Chinonmethide als reaktive Zwischenstufen, die mit Wasser an der α -Position reagieren können und schließlich zwei isomere Formen (*erythro*-, *threo*-Form) des β -Aryl-Ethers bilden (Ralph *et al.*, 2004).

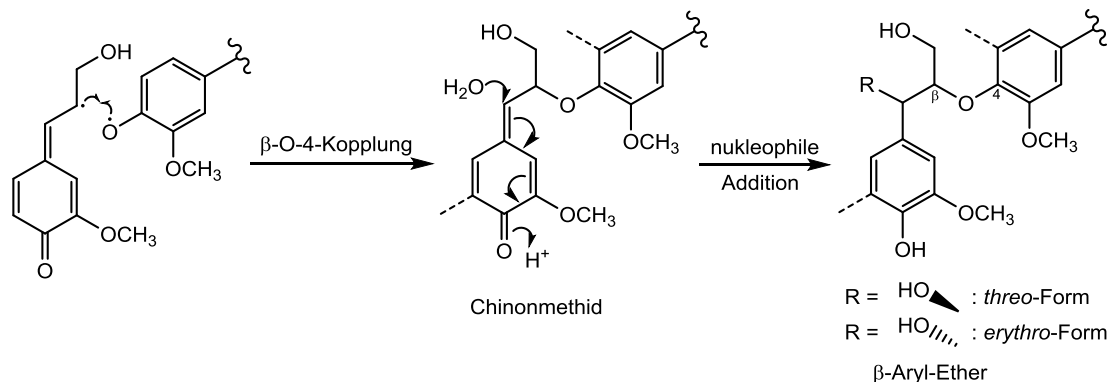


Abb. 7: Bildung einer β -O-4-Bindung durch die radikalische Kopplung eines Phenoxyradikals mit einem Oligomer. Nach der Bildung eines Chinonmethid-Intermediats können durch Wasseraddition zwei Isomere des β -Aryl-Ethers entstehen (*erythro*- und *threo*-Form).

Zusätzlich zur Addition von Wasser wird in der Literatur auch die Addition anderer Nucleophile an das Chinonmethid, z.B. die Phenolgruppe der polysaccharidgebundenen Ferulasäure, diskutiert, wodurch Cross-links zwischen Lignin und Arabinoxylanen oder Pektinen gebildet werden können (Lam *et al.*, 2001). Neben diesem „passiven“ oder „opportunistischen“ Mechanismus, der Ausbildung von Cross-links, bei dem α -Ether entstehen, wird außerdem ein „aktiver“ Mechanismus vorgeschlagen. Hierbei wird polysaccharidgebundene Ferulasäure selbst dehydrogeniert, wodurch resonanzstabilisierte

Phenoxyradikale entstehen, die in Radikalreaktionen mit Lignin eine Reihe verschiedener Produkte bilden können (Ralph *et al.*, 1995).

Neben der Einlagerung pflanzeigener Stoffe in Lignin wird außerdem die Einlagerung von Fremdstoffen wie z.B. Pestiziden in der Literatur beschrieben. Beispielsweise wurde die kovalente Inkorporation von chlorierten Anilinen in *in vitro* synthetisiertes Lignin (Kapitel 3.6) untersucht. Dabei wurde mithilfe zweidimensionaler NMR-Experimente sowie NOE (Kern-Overhauser-Effekt)-Differenzspektroskopie eine Benzylamin-Struktur vorgeschlagen (Abb. 8). Nach Lange *et al.* (1998) erfolgt die Bindung der chlorierten Aniline hauptsächlich über den α -Kohlenstoff des CAs an das synthetisierte Lignin, wobei die Strukturaufklärung einer Überprüfung bedarf (Kapitel 3.6). Unter der Annahme, dass die aufgeklärte Struktur richtig ist, müsste die Inkorporation über eine nukleophile Additionsreaktion stattgefunden haben (Abb. 8), da bei einem radikalischen Mechanismus nur die β -Position der Propenylseitenkette für eine Bindung in Frage kommt. Aufgrund dieses Ergebnisses schlussfolgerten die Autoren, dass weitere nukleophile Verbindungen ebenfalls in der Lage sein sollten in Lignin eingelagert zu werden (Still *et al.*, 1981; von der Trenck *et al.*, 1981; Lange *et al.*, 1998).

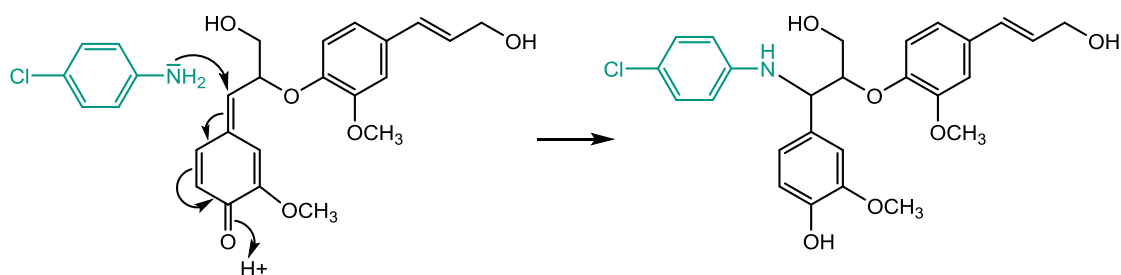


Abb. 8: Vorgeschlagener Mechanismus für die Inkorporation des 4-Chloranilins (grün) in *in vitro* synthetisiertes Dehydrogenierungspolymerisat, modifiziert nach von der Trenck *et al.* (1981). Dabei reagiert das 4-Chloranilin in einer nukleophilen Additionsreaktion mit dem Chinonmethid-Intermediat.

Weitere Experimente sollten zeigen, dass Pestizide neben Lignin sowohl in Proteine, Pektine als auch Hemicellulosen eingebaut werden können. Allerdings wurden in der Literatur meist Zellwandfraktionierungen durchgeführt, die nur auf dem Löslichkeitsverhalten der jeweiligen Makromoleküle beruhen (Langebartels & Harms, 1985). Zusätzlich wurden vereinzelt auch spezifische Enzyme wie z.B. Cellulase, Pektinase oder Proteinase verwendet, wodurch eine bessere Zuordnung zu den jeweiligen Makromolekülen erfolgen kann. Eine genaue chemische Identifizierung der Bindungstypen für Pestizide an Pektin oder Hemicellulosen ist bisher nicht erfolgt. Laurent & Scalla (1999) vermuten jedoch eine Esterbindung von Phenoxyessigsäuren an Hemicellulosen. Für Pektine, die energiereiche Methylestergruppen tragen, schlägt Sandermann (2004) eine nukleophile Substitution vor, beispielsweise durch Stickstoffgruppen, wie sie z.B. in Chloranilinen vorkommen. Des Weiteren wird die pflanzliche Cuticula als möglicher Bindungspartner für Fremdstoffe diskutiert. Dabei könnten Fremdstoffe mit Epoxygruppen des Cutins oder über photochemische Addition an Doppelbindungen der Cutinmonomere (Fettsäuren) gebunden werden (Jahn & Schwack, 2001; Riederer & Schönherr, 1986). Auch eine nicht-kovalente Einlagerung von Fremdstoffen in Zellwandbestandteile ist denkbar, wurde bisher aber noch nicht belegt.

Studien zur Untersuchung der Zellwandbindung von Mykotoxinen sind relativ rar. Simsek *et al.* (2012) untersuchten beispielsweise den Effekt verschiedener Enzymbehandlungen (α -Amylase, Cellulase, Protease, Xylanase) auf DON in Weizen. Dabei wurde ein starker Anstieg des Gehalts an extrahierbarem DON nach Behandlung mit Xylanase beobachtet, was auf eine mögliche Bindung von DON an Arabinoxylane hinweisen könnte. Allerdings wurde in dieser Studie keine Strukturaufklärung durchgeführt.

Die Zellwandbindung von ZEN wurde von Zill *et al.* (1990) untersucht. Dabei wurden die mit ZEN inkubierten Zellen einer Maissuspensionskultur mit 80%igem Methanol extrahiert, der Extrakt eingedampft, mit dem abfiltrierten Nährmedium vereinigt und schließlich mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Es wurde gezeigt, dass nach 12-tägiger Inkubation 50 % des eingesetzten radioaktiv markierten ZEN in dem nicht-extrahierbaren unlöslichen Rest vorlagen. Mit dem unlöslichen Rest erfolgte eine Zellwandfraktionierung mittels verschiedener Lösungsmittel und Enzyme nach Takeuchi & Komamine (1980) und Langebartels & Harms (1985), wobei die genaue Durchführung nicht erläutert wird. Durch Messung der Radioaktivität in den verschiedenen Fraktionen wurde gefolgert, dass ZEN hauptsächlich an Stärke (17 %), Lignin (37 %) und Hemicellulosen (20 %) gebunden ist. Allerdings wurden keine genauen Strukturuntersuchungen zu diesen Metaboliten durchgeführt. Hinzukommend ist zu beachten, dass die zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel möglicherweise nicht alle löslichen Phase II-Metaboliten aus den Zellen extrahierten und dies der Grund für das Auftreten von Radioaktivität im unlöslichen Rest war.

Im Gegensatz zu DON und ZEN wurde die Bindung der Mykotoxine AOH und AME an die pflanzliche Zellwand bisher noch nicht erforscht. Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass nach 48-stündiger Inkubation von AOH und AME in Tabak-Suspensionszellkulturen nur noch 50 bzw. 75 % des eingesetzten Gehalts der Ausgangsverbindungen als Summe der löslichen Metaboliten wiedergefunden werden konnten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass AOH und AME teilweise in die Zellwand eingelagert werden und somit im unlöslichen Rest verbleiben (Hildebrand *et al.*, 2015). Diese Hypothesen sollten in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden.

1.3 Bioverfügbarkeit modifizierter Mykotoxine

Um die toxikologische Relevanz modifizierter Mykotoxine besser einschätzen zu können, sind Bioverfügbarkeitsstudien notwendig. Die Bioverfügbarkeit ist definiert als das Verhältnis einer dem Organismus zugeführten und der davon resorbierten Menge einer Substanz. Bei modifizierten Mykotoxinen stellt sich die Frage, ob diese in konjugierter Form resorbiert werden können oder ob diese im Magen-Darm-Trakt hydrolysiert und anschließend resorbiert werden können.

Bislang existieren hauptsächlich Bioverfügbarkeitsstudien über Metaboliten von DON und einige wenige über ZEN-Metaboliten. Bereits im Jahr 1990 behandelte Gareis *et al.* ein junges weibliches Schwein mit 600 μ g ZEN-14-Glucosid pro Tag für insgesamt zwei Wochen. Im Urin und in den Fäzes wurden sowohl ZEN als auch das stärker estrogen-wirkende α -ZEL gefunden. Diese Studie deutet an, dass ZEN-14-Glucosid hydrolysiert und absorbiert wurde und somit zur Gesamtbelastung beiträgt. Binder *et al.* (2017) konnten diese Annahme in einer

Studie mit vier kastrierten männlichen Schweinen bestätigen, denen ZEN-14-Glucosid, ZEN-16-Glucosid und ZEN-14-Sulfat oral verabreicht wurden. Keine der drei modifizierten Formen waren in Urin oder Kot nachweisbar, was auf eine vollständige Hydrolyse hindeutet. Die gesamte biologische Wiederfindung in Form von freiem ZEN und Säugermetaboliten lag für ZEN-14-Glucosid bzw. ZEN-16-Glucosid bei $48 \pm 7 \%$ bzw. $34 \pm 3 \%$ und für ZEN-14-Sulfat bei $19 \pm 5 \%$. Als Erklärung für die geringen Wiederfindungsraten vermuten Binder *et al.* (2017) eine Metabolisierung durch Darmbakterien zu noch unbekanntem Metaboliten. Im Vergleich zu den Studien an Schweinen konnte die Freisetzung von ZEN aus ZEN-14-Glucosid auch in Ratten bestätigt werden. Basierend auf der Analyse verschiedener Gewebe und Teile des Gastrointestinaltrakts folgerten die Autoren, dass das Glucosid im oberen Teil des Gastrointestinaltrakts hydrolysiert wurde (Veršilovskis *et al.*, 2012).

Aufgrund von Studien, in denen die Spaltung von DON-3-Glucosid zu DON durch spezifische Darmbakterien gezeigt wurde (Berthiller *et al.*, 2011), wurden ZEN-14-Glucosid und ZEN-14-Sulfat ebenfalls in einem humanen *in vitro*-Modell untersucht. Dabei wurden verschiedene Schritte des Verdauungsprozesses mittels verschiedener künstlicher Verdauungssäfte (Speichelsaft, Magensaft, Duodenalsaft und Gallensaft) und frischen Stuhlproben imitiert. Im Gegensatz zur Studie von Veršilovskis *et al.* (2012) waren die ZEN-Konjugate in allen synthetischen Verdauungssäften stabil. Allerdings wurden sie von der menschlichen Kolonmikrobiota rasch und vollständig dekonjugiert. Neben dem Aglykon ZEN wurden auch weitere bislang nicht identifizierte Metaboliten gefunden (Dall'Erta *et al.*, 2013).

Cirlini *et al.* (2016) untersuchten die Aufnahme, den Metabolismus und die Resorption von $40 \mu\text{M}$ ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid mithilfe des Caco-2-Zellmodells, das auch bereits für die unkonjugierten Mykotoxine verwendet wurde (Kapitel 1.1.1.3 und 1.1.2.3). Dabei konnte festgestellt werden, dass nach vier Stunden beide Substanzen in die Zellen aufgenommen wurden und das Aglykon ZEN freigesetzt wurde. Dieses wurde auch in geringen Mengen basolateral gefunden. Des Weiteren konnten Unterschiede in der Aufnahme und in der Spaltungsfähigkeit zwischen ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid festgestellt werden. ZEN-14-Glucosid wurde schneller und in größeren Mengen von den Caco-2-Zellen aufgenommen und zeigte eine größere Spaltungsfähigkeit durch cytosolische β -Glucosidase als ZEN-16-Glucosid, was möglicherweise auf eine sterische Hinderung zurückzuführen ist.

Eine weitere Studie mit ZEN-14-Glucosid, α -ZEL-14-Glucosid und β -ZEL-14-Glucosid bestätigte, dass die maskierten Formen unter den Bedingungen des oberen Gastrointestinaltrakts (nach Inkubation mit künstlichen Verdauungssäften) stabil waren, jedoch von der Darmmikrobiota zu ZEN und weiteren unbekanntem Metaboliten hydrolysiert wurden. Allerdings konnte im Gegensatz zu der Studie von Cirlini *et al.* (2016) mit $2 \mu\text{M}$ Lösungen der maskierten Formen keine zelluläre Aufnahme in Caco-2 TC7-Zellen beobachtet werden. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Dosierungsmengen, den Caco-2-Zellklonen oder unterschiedliche Kulturbedingungen (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) bzw. RPMI-Kulturmedium) erklären (Gratz *et al.*, 2017; Gratz, 2017).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ZEN-Metaboliten eventuell im Dünndarm, spätestens im Dickdarm hydrolysiert werden können und somit einen Beitrag zur Gesamtoxizität liefern können.

Bezüglich der Phase II-Metaboliten von AOH und AME existieren bislang keine Bioverfügbarkeitsstudien. Ebenso verhält es sich mit gebundenen unlöslichen Phase III-Metaboliten von Mykotoxinen. Sandermann (2004) fasst in einem Review einige Bioverfügbarkeitsstudien von gebundenen unlöslichen Pestiziden zusammen. Es werden sowohl hohe als auch niedrige Bioverfügbarkeiten berichtet, allerdings betont der Autor eine Reihe von Unsicherheiten, die bei den Studien zu beachten sind. Beispielsweise wurden häufig nur relative und keine absoluten Werte angegeben oder Konzentrationen eingesetzt, die mehr als das 1000-fache höher lagen als dies unter landwirtschaftlichen Bedingungen möglich wäre (Lange *et al.*, 1998; Sandermann *et al.*, 1990). Daher bedarf es auch hier noch weiterer Forschung, um den Beitrag gebundener Fremdstoffe zur Gesamtoxizität einschätzen zu können.

2 Zielsetzung

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* und *Fusarium* sind ubiquitär verbreitet und können eine Vielzahl an Lebensmitteln und Futtermitteln befallen. Die von ihnen unter bestimmten Umständen gebildeten Mykotoxine können eine ernstzunehmende Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier darstellen. Vor der Aufnahme durch den Menschen oder das Tier über pflanzliche Lebensmittel bzw. Futtermittel können die vom Pilz gebildeten Mykotoxine im Zuge des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus in den Phasen I und II chemisch modifiziert werden. Aufgrund der veränderten chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften werden die resultierenden sogenannten „modifizierten Mykotoxine“ in der Routineanalytik jedoch nicht erfasst. Dennoch tragen sie ebenfalls zur Gesamt-Mykotoxinbelastung bei. Die EFSA forderte daher bereits im Jahr 2014 in einer Stellungnahme über modifizierte Mykotoxine weitere Studien zur Aufklärung der chemischen Strukturen und die Entwicklung von Methoden zur Erfassung modifizierter Mykotoxine in der Routineanalytik. Des Weiteren sind für die Durchführung einer Risikobewertung weitere Daten zur toxikologischen Wirkung der modifizierten Mykotoxine notwendig.

Für das *Fusarium*-Toxin ZEN wurden bereits einige pflanzliche Phase I- und Phase II-Metaboliten aufgeklärt und Studien zu deren Toxizität durchgeführt. Basierend auf diesen Ergebnissen legte die EFSA Gruppenwerte für ZEN und dessen modifizierte Formen fest. Dies wurde durch die Ableitung von relativen Potenzfaktoren realisiert, die das estrogene Potential im Vergleich zu ZEN angeben. Allerdings sind für eine bessere Risikoabschätzung weitere Daten zur Toxikokinetik erforderlich, insbesondere zur Resorption und Bioverfügbarkeit der pflanzlichen Phase II-Metaboliten, um die Risiken besser abschätzen zu können.

Im Gegensatz zu ZEN ist die Toxizität der modifizierten Formen von AOH und AME weitgehend unerforscht. Einige wenige Studien zeigen das Vorkommen verschiedener bereits aufgeklärter AOH- und AME-Metaboliten in Lebens- und Futtermitteln, weshalb Kenntnisse über die Toxizität und Toxikokinetik sowie geeignete Analysemethoden erarbeitet werden müssen.

Neben den löslichen pflanzlichen Phase I- und Phase II-Metaboliten, werden in der Literatur auch unlösliche zellwandgebundene Metaboliten (Phase III) diskutiert. Da einige wenige Studien die Zellwandbindung von Pestiziden belegen, liegt die Vermutung nahe, dass auch Mykotoxine an die Zellwand gebunden werden. Derzeit existiert jedoch lediglich eine Studie, die sich mit der Bindung von ZEN an die pflanzliche Zellwand befasst. Dabei wurde eine aufeinanderfolgende Zellwandfraktionierung mit Mais-Suspensionszellen durchgeführt, indem die Polymere mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert wurden. Die Zuordnung der Fraktionen zu den jeweiligen Makromolekülen der pflanzlichen Zellwand ist jedoch anzuzweifeln, da keine genauen Strukturuntersuchungen durchgeführt wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die chemischen Strukturen bislang unbekannter Phase I- und Phase II-Metaboliten von AOH, AME und ZEN aufzuklären und ihre Bildung in verschiedenen pflanzlichen Systemen zu untersuchen. Dabei sollten sowohl Zellsuspensionskulturen als auch Explant-Kulturen als Modelle unterschiedlicher Pflanzen eingesetzt werden,

um ein breites Spektrum an Metaboliten zu erzeugen und um die Modelle möglichst nah an der natürlichen Bildung modifizierter Mykotoxine zu halten. Eine detaillierte Strukturaufklärung der isolierten Metaboliten sollte durch die Kombination aus hochauflösender Massenspektrometrie und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie erfolgen. Aufgrund der relativ geringen Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie, insbesondere der zweidimensionalen Experimente, werden größere Mengen (0,1–1 mg Maßstab) der Metaboliten benötigt. Diese sollten zunächst im (semi)präparativen Maßstab in den Pflanzenzellkulturen gebildet und anschließend chromatographisch isoliert und aufgereinigt werden. Nach der Strukturaufklärung und Reinheitsprüfung können diese Verbindungen als Standardsubstanzen genutzt werden.

Die Verfügbarkeit von Standardsubstanzen ist Voraussetzung für die Entwicklung geeigneter Analysemethoden sowie für toxikologische Studien. Da Mykotoxine oft nur in Spuren in Lebensmitteln auftreten, werden häufig empfindliche, auf der Massenspektrometrie basierende Stabilisotopenverdünnungsanalysen durchgeführt, die ebenfalls optimal Analytverluste während der Probenaufreinigung kompensieren. Hierfür bedarf es allerdings isotopenmarkierter Standardsubstanzen, die für die meisten modifizierten Mykotoxine kommerziell nicht erhältlich sind. Aus diesem Grund sollten Methoden zur Markierung von AOH, AME und ZEN mit Deuterium entwickelt werden. Durch anschließende Inkubation der deuterierten Mykotoxine in Pflanzenzellkulturen sollten schließlich isotopenmarkierte modifizierte Mykotoxine produziert werden. Die Isotopenreinheit, die ein wichtiges Akzeptanzkriterium für diese Standardsubstanzen darstellt, sollte mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie nach Isolierung der Verbindungen überprüft werden.

Da der Beitrag modifizierter Mykotoxine zur Gesamttoxizität bislang noch relativ wenig untersucht ist, sollten *in vitro*-Resorptions- und Metabolismusstudien mit humanen Caco-2-Zellen durchgeführt werden. Von Interesse ist dabei vor allem, ob die modifizierten Formen von den Zellen aufgenommen und in die Ausgangsmykotoxine gespalten werden. Mithilfe massenspektrometrischer Analysen sollten sowohl die Inkubationsmedien als auch die Zellen auf die jeweiligen Mykotoxine sowie die in den Caco-2-Zellen gebildeten Metaboliten untersucht werden. Des Weiteren sollten in *Transwell*-Versuchen Transportprozesse (Aufnahme, Ausschleusung) in Caco-2-Zellen untersucht werden, um Vorhersagen in Bezug auf die *in vivo*-Resorption treffen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, durch geeignete Methoden die Zellwandbindung verschiedener Mykotoxine nachzuweisen. Hierfür sollten die Zellwände der in Gegenwart der Mykotoxine kultivierten pflanzlichen Zellen (Suspensionszellkulturen) entweder durch chemische Behandlung mit Säure oder Lauge oder enzymatisch hydrolysiert werden. Durch den Einsatz spezieller Enzyme sollten spezifische Fragmente der Zellwandpolysaccharide erhalten werden, die mittels massenspektrometrischer Verfahren analysiert werden sollten. Daneben sollten zweidimensionale NMR-spektroskopische Analysen der intakten Zellwände durchgeführt werden, um spezifische Signale der Mykotoxine in den Spektren zu identifizieren und mögliche Bindungsstellen der Mykotoxine an Zellwandpolymere zu identifizieren.

Neben der Bindung an Polysaccharide ist ebenfalls die Bindung der Mykotoxine an Lignin vorstellbar. Zur Untersuchung möglicher Interaktionen sollte ein künstliches Lignin-Modellsystem entwickelt werden, in dem Monolignole mit H_2O_2 -abhängigen Peroxidasen in Gegenwart der Mykotoxine zu Dehydrogenierungspolymerisaten (DHP) reagieren. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der Reaktionspartner bzw. der Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms vom Lösungsmittel sollten die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Mittels zweidimensionaler NMR-Experimente sollten schließlich Mykotoxin-Lignin-Interaktionen anhand der DHPs als Modellsystem identifiziert werden.



3 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zum Teil in Kooperation mit dem Max Rubner-Institut (MRI, Karlsruhe) sowie zum Teil im Rahmen wissenschaftlicher Abschlussarbeiten bzw. Masterarbeiten durchgeführt. Eine Aufstellung der durchgeführten Versuche und den jeweiligen mitwirkenden Personen kann den Arbeitsvorschriften (Kapitel 9) entnommen werden.

3.1 Modellsysteme zur Synthese von modifizierten Mykotoxinen

3.1.1 Schimmelpilzkulturen

Sowohl die *Alternaria*-Toxine AOH und AME als auch das *Fusarium*-Toxin ZEN sind kommerziell erhältlich. Im Gegensatz zu ZEN wurden AOH und AME allerdings aus Kostengründen nicht käuflich erworben, sondern aus *A. alternata*-Schimmelpilzkulturen, die auf handelsüblichem, autoklaviertem Reis kultiviert wurden, gewonnen. Die Züchtung und Kultivierung der Schimmelpilze wurde von Mitarbeitern des MRI Karlsruhe durchgeführt.

Neben den freien Mykotoxinen können auch modifizierte Formen von Schimmelpilzen gebildet werden. Beispielsweise bildeten Kulturen von *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum* und *F. roseum* var. *Gibbosum* neben großen Mengen an ZEN auch den Metabolit ZEN-14-Sulfat (Plasencia & Mirocha, 1991). Aber auch andere Schimmelpilze wie *Rhizopus arrhizus* oder *Aspergillus niger* sind in der Lage sowohl ZEN als auch α -ZEL zu sulfatieren (El-Sharkawy *et al.*, 1991; Brodehl *et al.*, 2014), weshalb die Vermutung nahe liegt, dass auch andere Mykotoxine von Schimmelpilzen sulfatiert werden können. Daher wurden am MRI Karlsruhe Schimmelpilzkulturen von *A. alternata* auf sulfatierte Formen von AOH und AME untersucht (Soukup *et al.*, 2016). Weiterführende Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Sulfate sowie deren Metabolisierung in Pflanzenzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (Kapitel 9.7).

3.1.2 Pflanzenzellsuspensionskulturen

Zur Untersuchung des pflanzlichen Metabolismus von Mykotoxinen stellen Pflanzenzellsuspensionskulturen ein geeignetes Modellsystem dar. Es handelt sich dabei um eine Zellkulturmethode, bei der sterile entdifferenzierte Pflanzenzellen in einem flüssigen Nährmedium als Suspension vorliegen. Diese werden unter definierten Bedingungen bezüglich Temperatur, Licht und Schüttelgeschwindigkeit kultiviert und je nach Zelllinie in bestimmten Zeitabständen subkultiviert. Unter geeigneten Kulturbedingungen können aus den Suspensionszellen wieder ganze Pflanzen gebildet werden (Mustafa *et al.*, 2011).

Pflanzenzellsuspensionskulturen bieten im Vergleich zu kompletten Pflanzen einige Vorteile: Homogenität, einfache experimentelle Handhabung, Vorhandensein in allen Jahreszeiten, einfache Sterilhaltung und gute Reproduzierbarkeit. Vor allem aber können sie als „Biofabrik“ zur Produktion größerer Mengen pflanzlicher Metaboliten dienen (Sandermann *et*

al., 1984). Harms (1992) konnte zeigen, dass Suspensionskulturen von Weizen und Tomate qualitativ die gleichen Metaboliten von Pestiziden bildeten wie deren intakte Pflanzen, die unter aseptischen Bedingungen kultiviert wurden. Des Weiteren beobachtete er, dass verschiedene Zellkulturen (Karotte, Gerste, Tomate) mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber den Pestiziden reagierten, was bedeutet, dass die Pflanzenzellkulturen ihre artspezifische Selektivität beibehielten und daher als Modellsystem geeignet sind.

In dieser Arbeit wurden von einer monokotylen und zwei dikotylen Pflanzen Zellsuspensionskulturen für Metabolismusstudien mit den Mykotoxinen AOH, AME und ZEN eingesetzt. Darunter war zum einen die vom Botanischen Institut (KIT, Karlsruhe) zur Verfügung gestellte Tabak-Suspensionszellkultur BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2), die häufig in der Metabolismusforschung Anwendung findet (Nagata *et al.*, 1992). Als weitere dikotyle Zelllinie wurden Suspensionszellen von Soja (*Glycine max.* L. Merr. cv. Mandarin) käuflich erworben, da sowohl ZEN als auch AOH und AME in Soja und Sojaprodukten vorkommen. Um die verschiedenen Zellwandzusammensetzungen dikotyler und monokotyler Pflanzen zu berücksichtigen (Kapitel 1.2.3.2), wurde außerdem noch eine Weizen-Suspensionszellkultur (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol. cv. Heines Koga II) für die Metabolismusuntersuchungen verwendet.

3.1.3 Explant-Kulturen

In der Literatur werden neben Suspensionszellen häufig Kalluskulturen eingesetzt (Bruins *et al.*, 1993). Dabei handelt es sich um Wund- und Vernarbungsgewebe, das aus oberflächlich sterilisierten Pflanzen gewonnen wurde. Er wird auf festem Nährmedium (Agarplatten) kultiviert und weist undifferenzierte totipotente Zellen auf. Es handelt sich sozusagen um die Zwischenstufe zu den Suspensionszellen. Der Nachteil der Kalluskulturen liegt allerdings in der Inhomogenität des Kallusgewebes und der damit verbundenen schlechteren Reproduzierbarkeit.

Eine Explant-Kultur zeichnet sich hingegen dadurch aus, dass intakte Gewebestücke von Pflanzen verwendet werden, wodurch naturnähere Bedingungen simuliert werden. Dabei wird oberflächlich sterilisiertes pflanzliches Gewebe entnommen und in ein flüssiges Kulturmedium übertragen. Im Gegensatz zu Suspensions- bzw. Kalluskulturen findet keine Entdifferenzierung von Zellen statt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Explant-Kulturen von Karotten (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) und Tomaten (*Solanum lycopersicum*) gewählt, da diese Pflanzen typischerweise von *Alternaria*-Pilzen befallen werden und daher häufig mit AOH und AME kontaminiert sind. Die zum Verzehr geeigneten Gewebeteile (Wurzel der Karotte und Fruchtfleisch der Tomate) wurden hierfür entnommen und in flüssigem Murashige & Skoog-Medium kultiviert.

3.1.4 Extraktion der Phase II-Metaboliten aus Pflanzenzellen

In Gegenwart von Mykotoxinen bilden Pflanzenzellen im Zuge des Fremdstoffmetabolismus lösliche Mykotoxinkonjugate (Phase I- und II-Metaboliten). Um diese Metaboliten aus den Pflanzenzellen zu gewinnen, müssen geeignete Extraktionsmittel gewählt werden. Die

Anforderungen, die dabei gestellt werden, sind eine quantitativ vollständige Extraktion, die spezifisch für die Zielanalyten ist und mit der daran anknüpfenden analytischen Methode kompatibel ist. Dabei muss beachtet werden, dass die im Fremdstoffmetabolismus gebildeten Konjugate polarer sind als deren ursprünglichen Mykotoxine. Aufgrund dieser Tatsache ist die Anwendung von Lösungsmittelgemischen sinnvoll. In der Literatur wird für Mykotoxin-Screenings häufig ein Gemisch aus Acetonitril (ACN), Wasser und Essigsäure im Verhältnis 79/20/1 verwendet (De Boevre *et al.*, 2012; Streit *et al.*, 2013; Walravens *et al.*, 2016). Bei einer Methodvalidierung mit 39 verschiedenen Mykotoxinen in Weizen und Mais lieferte dieses Gemisch den besten Kompromiss für die Extraktion (Sulyok *et al.*, 2006). Eine Erhöhung des Wasseranteils erzielte keine bessere Extraktion der polaren Analyten, reduzierte jedoch die Wiederfindung apolarer Analyten (Vendl *et al.*, 2009). Bei der Analyse von DON und dessen modifizierten Formen zeigte sich ein Gemisch aus Methanol und Dichlormethan in gleichen Anteilen geeigneter als ein ACN-Wasser-Gemisch im Verhältnis 84/16. Als Vorteil des wasserfreien Gemisches wird außerdem die verringerte Coextraktion von Matrixbestandteilen genannt (Sasanya *et al.*, 2008). Da Lebensmittelproben eine sehr komplexe Matrix aufweisen, folgt häufig noch ein Aufreinigungsschritt mittels Festphasenextraktion (SPE) oder mittels Immunoaffinitätssäulen. Allerdings zeigen verschiedene Studien, dass die Wiederfindungen für modifizierte Mykotoxine nicht zufriedenstellend sind (De Boevre *et al.*, 2012; Vendl *et al.*, 2009), weshalb in dieser Arbeit auf eine Aufreinigung verzichtet wurde.

In unserem Arbeitskreis wurde für AOH- und AME-Metaboliten aus BY-2-Zellen eine dreistufige Extraktion entwickelt. Hierbei wurde zunächst ein Methanol / Dichlormethan-Gemisch im Verhältnis 2/1 und anschließend ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure im Verhältnis 79/20/1 eingesetzt, um sowohl die apolaren freien Mykotoxine als auch die polaren Metaboliten vollständig zu extrahieren (Hildebrand *et al.*, 2015). Eine weitere dritte Extraktion mit dem ersten Lösungsmittelgemisch Methanol / Dichlormethan im Verhältnis 2/1 erhöhte die Ausbeute.

3.2 Analyse und Strukturaufklärung der Phase II-Metaboliten

3.2.1 Analyse mittels LC-DAD-MS und LC-DAD-QTOF-MS

Mithilfe chromatographischer Methoden können Zellkulturextrakte aufgetrennt und deren Bestandteile anschließend detektiert werden. Zur Analyse der Phase II-Metaboliten von Mykotoxinen bietet sich sowohl die Gaschromatographie (GC) als auch die Flüssigchromatographie (LC) an. Da bei der GC-Analyse ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt zur Absenkung des Siedepunkts der Analyten erforderlich ist, werden Mykotoxine und deren Metaboliten üblicherweise mittels LC analysiert. Hierbei werden meist Reversed-Phase (RP)-Säulen verwendet, da sie unter Berücksichtigung bestimmter Randbedingungen nicht nur für die Trennung mittelpolarer, sondern auch für polare und unpolare Analyten einsetzbar sind.

Die Detektion mittels eines Dioden-Array-Detektors (DAD) bietet den Vorteil, dass verschiedene Wellenlängen gleichzeitig detektiert werden und somit unterschiedlich absorbierende Verbindungen gleichzeitig bei ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum analysiert werden können. Hinzukommend ermöglicht dieser Detektor die Aufnahme von

UV/Vis-Spektren der einzelnen Verbindungen, wodurch zusätzliche Informationen über deren Identität erhalten werden. Beispielsweise weisen die modifizierten Formen von AOH und AME ebenso wie deren Ursprungstoxine charakteristische Maxima bei Wellenlängen um 254, 288, 299 und 340 nm auf (Hildebrand *et al.*, 2015).

Um die Strukturen der Phase II-Metaboliten weiter zu charakterisieren, ist eine massenspektrometrische Detektion sinnvoll. Dadurch kann das Molekulargewicht einer Verbindung bestimmt werden. Da der DAD zerstörungsfrei arbeitet, kann der MS-Detektor online gekoppelt werden. Die Moleküle müssen für die Detektion zunächst in einer Ionenquelle ionisiert werden. Hierfür eignet sich zum Beispiel die in dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisation (ESI). Dabei handelt es sich um ein weiches Ionisationsverfahren für polare und mittelpolare Analyten, bei dem während der Ionisation üblicherweise keine oder nur eine geringfügige Fragmentierung erfolgt. Im Zuge der ESI werden Quasimoleküle gebildet, wobei neben protonierten ($[M+H]^+$, positiver Modus) und deprotonierten ($[M-H]^-$, negativer Modus) Molekülen auch weitere Addukte durch die Anlagerung der im Lösungsmittel vorhandenen Ionen (z.B. Na^+ , NH_4^+ , Cl^- , CH_3COO^-) gebildet werden können. Im anschließenden Massenanalysator werden diese Ionen aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür eine lineare Ionenfalle verwendet. Diese besitzt im Vergleich zu einer Quadrupol-Ionenfalle (3D) ein 2D-Quadrupolfeld, wodurch die Speicherkapazität der Ionenfalle und somit auch die Nachweisempfindlichkeit erhöht wird (Schwartz *et al.*, 2002). Durch die Anwendung von MS^n -Experimenten können Fragmentierungsmuster von Substanzen erhalten werden, die Auskunft über deren Strukturen geben können. Beispielsweise werden bei einem MS^2 -Experiment ausgewählte Ionen durch Anpassung der Wechselspannung in der Ionenfalle gespeichert, durch Stöße mit Inertgasmolekülen fragmentiert und anschließend die erhaltenen Produkt-Ionen gescannt, um ein Produkt-Ionen-Massenspektrum zu erhalten. Konjugierte Mykotoxinmetaboliten können mithilfe solcher MS^n -Experimente in ihre Ausgangsverbindungen fragmentiert werden und als Metaboliten identifiziert werden.

In den letzten Jahren nahm vor allem die Anwendung der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) sowohl für gezielte Quantifizierungsmethoden, nichtgezielte Screeningmethoden und in gewissem Maße auch zur Strukturaufklärung zu (Righetti *et al.*, 2016). Zu den HRMS-Geräten zählen beispielsweise Flugzeit- (TOF), Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz- und Orbitrap-Massenanalysatoren. Daneben werden außerdem Hybrid-HRMS-Geräte, wie z.B. Quadrupol-TOF (qTOF), eingesetzt. Dieses Hybrid-Gerät stand bei unserem Kooperationspartner (MRI Karlsruhe) zur Verfügung. Wesentliche Vorteile der HRMS sind die hohe Empfindlichkeit und Auflösung im Full-Scan sowie die Messung akkurater Massen. Dabei ist die akkurate Masse die experimentell bestimmte exakte Masse eines Moleküls, während die exakte Masse als die berechnete Masse eines Ions oder Moleküls mit einer bestimmten Isotopenzusammensetzung definiert ist (Murray *et al.*, 2013). Dadurch kann auf die Elementarzusammensetzung eines Moleküls geschlossen werden, was zur Strukturaufklärung beiträgt. Aufgrund der zusätzlichen Quadrupole sind außerdem MS/MS-Messungen möglich, wodurch sowohl die akkuraten Massen der Vorläufer- als auch der Fragment-Ionen gemessen werden können. Allerdings können mittels MS-Analysen z.B. keine Aussagen über Bindungspositionen getroffen werden,

weshalb zur eindeutigen Strukturaufklärung NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt wurden.

3.2.2 Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Die Struktur modifizierter Mykotoxine kann meist nur durch die Kombination massenspektrometrischer und NMR-spektroskopischer Experimente vollständig aufgeklärt werden. Die NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil Bindungspositionen als auch anomere Konfigurationen und Ringformen von Zuckern bestimmen zu können, wodurch eine eindeutige Identifizierung ermöglicht wird.

Im Allgemeinen werden in der NMR-Spektroskopie deuterierte Lösungsmittel verwendet, die nicht nur die Intensität des Lösungsmittelsignals in der ^1H -NMR reduzieren, sondern die auch zur Stabilisierung des Feld-Frequenz-Verhältnisses mithilfe der Lock-Einheit benötigt werden. Restprotonensignale des nicht deuterierten Lösungsmittels können als interner Standard zur Kalibrierung dienen. Für die modifizierten Mykotoxine eignet sich DMSO- d_6 als Lösungsmittel, da die zu analysierenden Substanzen darin gut löslich sind und unsubstituierte Hydroxygruppen von Zuckern aufgrund des langsamen H/D-Austauschs sichtbar sind. Aufgrund der starken Hygroskopie von DMSO, können jedoch in den ^1H -NMR-Spektren starke H_2O -Signale auftreten (Claridge, 2016).

Mithilfe eindimensionaler ^1H -NMR-Spektren können Auskünfte über die chemischen Verschiebungen, Spin-Spin-Kopplungen und Intensitäten der Signale gewonnen werden. Beispielsweise können anhand der vicinalen Kopplungskonstanten der anomeren Protonen von Kohlenhydraten deren Konfiguration ermittelt werden, da diese Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel abhängig sind (Karplus, 1963). Üblicherweise werden in der Literatur β -verknüpfte Glycoside bei Mykotoxinen gefunden. Allerdings gibt es auch Nachweise für α -glycosidische Bindungen, wie z.B. bei dem T-2 Toxin- α -Glucosid. Diese Struktur wurde unter Zuhilfenahme der Karplus-Beziehung eindeutig identifiziert (Gorst-Allman *et al.*, 1985; McCormick *et al.*, 2015). Dies zeigt die Unverzichtbarkeit NMR-spektroskopischer Untersuchungen, da nicht immer von β -Glucosiden ausgegangen werden kann.

Zweidimensionale NMR-Experimente bieten im Vergleich zu ^1H -NMR-Experimenten unter anderem den Vorteil, dass Überlagerungen in ^1H -NMR-Spektren aufgelöst werden können. Darüber hinaus sind 2D-NMR-Experimente äußerst wertvolle Instrumente der vollständigen, von anderen Methoden unabhängigen, Strukturaufklärung. Die zweidimensionalen NMR-Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

Die Anwendung des (H,H)-korrelierten NMR-Experiments ((H,H)-COSY) liefert in der Strukturaufklärung unerlässliche Informationen über die Nachbarschaftsbeziehungen koppelnder Protonen. In den Spektren sind auf beiden Frequenzachsen ^1H -chemische Verschiebungen miteinander korreliert. Anhand von Kreuzpeaks (auch als Korrelationspeaks bezeichnet) können indirekte (skalare) Spin-Spin-Kopplungen zwischen benachbarten Protonen erkannt werden ($^3J_{\text{H,H}}$). „Diagonalpeaks“ mit gleichen chemischen Verschiebungen

auf der Ordinate und Abszisse bilden das eindimensionale ^1H -NMR-Spektrum ab und liefern daher keine zusätzlichen Erkenntnisse.

Mithilfe von J-aufgelösten (J_{res}) NMR-Experimenten können chemische Verschiebungen von skalaren Kopplungen getrennt bzw. aufgelöst werden, indem die beiden Parameter in separaten Frequenzdimensionen dargestellt werden. Dies bedeutet, dass die chemischen Verschiebungen in f2 und die Kopplungskonstanten in f1 dargestellt werden. Dadurch wird die Bestimmung von Kopplungskonstanten in komplexen ^1H -NMR-Spektren erleichtert und überlagerte Multiplettaufspaltungen werden aufgelöst.

Ein weiteres zweidimensionales Experiment ist das Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiment, bei dem ^1H - ^{13}C -Kopplungen über eine Bindung festgestellt werden können ($^1J_{\text{C,H}}$). Es handelt sich dabei um eine inverse Aufnahmetechnik, da Kohärenzen im Kanal der unempfindlichen ^{13}C -Kerne erzeugt werden, die auf den empfindlicheren ^1H -Kern übertragen werden, dessen Resonanzen gemessen werden. Dadurch wird die Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zu einem entkoppelten ^{13}C -Spektrum deutlich erhöht. Somit dient das HSQC-Experiment nicht nur als Zuordnungshilfe in der Strukturaufklärung, sondern kann auch als Alternative zu den zeitaufwendigen eindimensionalen ^{13}C -NMR-Messungen eingesetzt werden.

Für den eindeutigen Nachweis von Bindungspositionen sind Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC)-Experimente unabdingbar, in denen CH-Korrelationen über mehrere Bindungen bestimmt werden ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$). Es handelt sich wie bei dem HSQC um ein inverses Verfahren. Ein Vorteil im Gegensatz zum HSQC-Experiment ist die Bestimmbarkeit von ^{13}C -Verschiebungen von quartären Kohlenstoffatomen. Außerdem können Konjugate von Mykotoxinen mit Zuckern, wie sie im Phase II-Metabolismus häufig auftreten, mithilfe von HMBC-Experimenten eindeutig beschrieben werden, da C,H-Kopplungen über die glykosidischen Bindungen hinweg sichtbar sind. Auch die Ringform von Zuckern kann aufgrund der jeweiligen Kopplung zwischen C4 und H1 (Furanosen) bzw. C5 und H1 (Pyranosen) bestimmt werden (Claridge, 2016).

Im Allgemeinen handelt es sich bei der NMR-Spektroskopie allerdings um ein relativ unempfindliches Verfahren, weshalb, selbst bei Verwendung eines gekühlten Probenkopfes, größere Substanzmengen (0,1–1 mg) unabdingbar sind. Da manche Mykotoxinmetaboliten jedoch nur in sehr geringen Mengen gebildet werden, ist deren vorläufige Identifizierung nur anhand der akkuraten Massen aus HRMS-Messungen möglich.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer NMR

Um die Konzentration der isolierten Mykotoxinkonjugat-Lösungen zur Herstellung von Stammlösungen zu bestimmen, müssen Quantifizierungsmethoden herangezogen werden. Eine unkomplizierte Methode wäre zum Beispiel das Auswiegen eines Stoffes. Da die gewonnenen Metaboliten jedoch teilweise nur in Mengen im μg - bis ng -Bereich gebildet werden, wäre eine Auswaage stark fehlerbehaftet bzw. nicht möglich. Außerdem handelt es sich bei den erhaltenen Substanzen um im präparativen Maßstab chromatographisch aufgereinigte biologische Proben, bei denen Verunreinigungen aufgrund von Koelutionen

nicht auszuschließen sind, wodurch das Ergebnis selbst bei ausreichenden Mengen zusätzlich verfälscht werden könnte. Eine weitere Möglichkeit ist die Quantifizierung mittels chromatographisch-spektroskopischer Methoden. Beispielsweise kann im Rahmen einer LC-DAD-Messung mithilfe einer Kalibrierung über die UV-Absorption quantifiziert werden. Hierfür werden allerdings reine Referenzsubstanzen der Metaboliten in definierten Konzentrationen oder molare Extinktionskoeffizienten benötigt, die für die meisten neu identifizierten Metaboliten noch nicht vorliegen.

Eine Methode zur von authentischen Referenzsubstanzen unabhängigen Konzentrationsbestimmung stellt die quantitative $^1\text{H-NMR}$ dar. Diese Quantifizierungsmethode beruht darauf, dass die Signalintensität im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum direkt proportional zur Anzahl der Kerne, die das Resonanzsignal verursachen, ist. Prinzipiell kann jedes organische Molekül als interner Standard eingesetzt werden, wenn dessen Reinheit bekannt ist und bei dem mindestens ein Signal gut separiert vorliegt (Henderson, 2002). Es sollte sich dabei um chemisch inerte, stabile und nicht bzw. wenig flüchtige oder hygroskopische Verbindungen handeln, die eine relativ kurze T_1 -Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxationszeiten) aufweisen. Beispiele hierfür sind Malonsäure, Acetanilid, 1,4-Dioxan oder Ameisensäure (Bharti & Roy, 2012).

Häufig werden die internen Standardsubstanzen direkt in die zu messende Lösung gegeben, was den Nachteil mit sich bringt, dass die Analytlösung verunreinigt wird. Andererseits weist diese Methode eine höhere Präzision und geringere Unsicherheiten als externe Referenzmethoden auf (Cullen *et al.*, 2013). Um die Vorteile externer und interner Referenzmethoden zu vereinen, wurden koaxiale Einsätze für NMR-Röhrchen verwendet. Dabei wird die Referenzsubstanz, gelöst in einem geeigneten deuterierten Lösungsmittel, in den koaxialen Einsatz gegeben. Dieser wird anschließend in ein NMR-Röhrchen eingefügt, das die Analytlösung enthält (Abb. 9). Dadurch werden Verunreinigungen der Probe sowie Fehler aufgrund von instrumentbedingten Schwankungen zwischen zwei Messungen vermieden. Zwei Nachteile dieser Methode sind allerdings die geringere Empfindlichkeit aufgrund des geringeren Analytvolumens im Empfängerspulenbereichs und das kompliziertere Shimmen, wenn Referenz und Analyt in verschiedenen Lösungsmitteln vorliegen (Bharti & Roy, 2012). Daher wurden möglichst hoch konzentrierte Analytlösungen und identische Lösungsmittel für die Referenz- sowie die Analytlösung eingesetzt.

Für die Quantifizierung einer Substanz mittels quantitativer NMR-Spektroskopie sollte ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von mindestens 10:1 erhalten werden. Des Weiteren sollte der Relaxationsdelay (D1) bzw. die Pulswiederholungszeit (D1 + Datenaufnahmezeit) mindestens das Fünffache der Relaxationszeit (T_1) der am langsamsten relaxierenden Kerne betragen, damit die Spins zwischen den Pulsen vollständig relaxieren können und unterschiedliche Sättigungseffekte vermieden werden. T_1 -Zeiten können mithilfe der Inversion-Recovery-Methode (Inversionserholungs-Methode) gemessen werden. Dabei wird der Magnetisierungsvektor um 180° x' in die negative z-Richtung gedreht (Inversion). Anschließend wird der Magnetisierungsvektor nach variierenden Wartezeiten mit einem 90° x'-Puls in die y-Richtung gedreht, um eine messbare Quermagnetisierung zu erzeugen. Anhand der je nach Wartezeit unterschiedlichen Signalintensitäten kann schließlich T_1

berechnet werden. Die mittels der Inversionserholungs-Methode bestimmten T_1 -Zeiten der eingesetzten Mykotoxine bzw. Mykotoxinmetaboliten sind in Kapitel 9.14 aufgeführt.

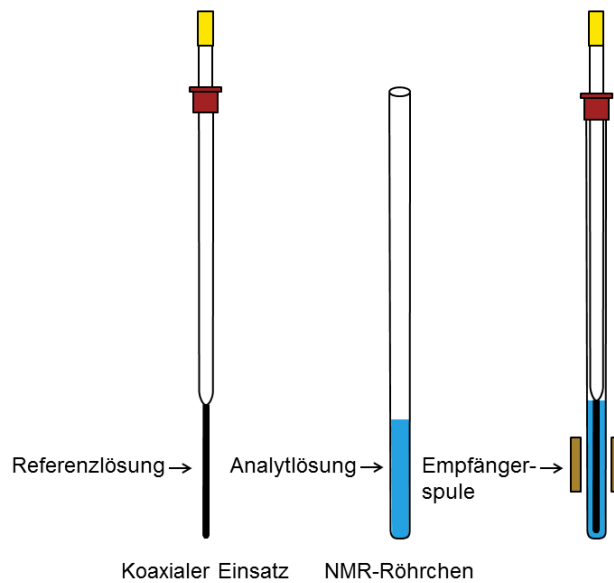


Abb. 9: Schematische Abbildung eines koaxialen Einsatzes mit Referenzlösung (links), eines NMR-Röhrchens mit Analytlösung (Mitte) und der Kombination eines koaxialen Einsatzes in einem NMR-Röhrchen, das zwischen den NMR-Empfängerspulen positioniert ist (rechts).

Durch Anpassung der Datenpunkte und / oder Reduzierung der spektralen Breite kann die spektrale Auflösung verbessert werden. Für die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie sollten mindestens vier Datenpunkte die Resonanzlinienbreite abdecken, um Intensitätsfehler zu minimieren. Auch bei dem Prozessieren muss auf genaues Phasing, Basislinienkorrektur und reproduzierbare Integration geachtet werden. Im Idealfall sollte ein Integral das 20-fache der Linienbreite des Peaks auf beiden Seiten des Peaks abdecken (ca. 10–20 Hz, entsprechen bei einem 500 MHz-Magneten ca. 0,02–0,04 ppm), wobei Überlappungen mit benachbarten Signalen vermieden werden sollten. Ebenso sollte der Integrationsbereich ^{13}C -Satelliten stets einschließen oder für alle Messungen ausschließen, um eine richtige und reproduzierbare Gehaltsbestimmung zu ermöglichen (Claridge, 2016).

Die Berechnung der Konzentration des Analyten (c_A) erfolgte anhand Gleichung (1):

$$c_A \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] = \left(\frac{\beta_R}{\text{FW}_R} \right) \left(\frac{I_A}{I_R} \right) \left(\frac{V_R}{V_A} \right) \quad (1)$$

Sie ist abhängig von der Massenkonzentration β_R ($\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und dem Molekulargewicht der Referenzsubstanz FW_R ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sowie von dem Verhältnis der Signalintensitäten der Analytsubstanz I_A und der Referenzsubstanz I_R . Für jede Kombination aus NMR-Röhrchen und Koaxial-Einsatz muss im Vorhinein das Volumenverhältnis der Referenzsubstanz V_R und der Analytsubstanz V_A im Bereich der Empfängerspule mit bekannten Konzentrationen gemessen und berechnet werden (Henderson, 2002). Die berechneten Volumenverhältnisse der eingesetzten Coaxial-Röhrchen sind in Kapitel 9.14 aufgeführt. Die Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer NMR wurde durchgeführt, um 2 mM Lösungen der Mykotoxinkonjugate für den Einsatz in den Caco-2-Zellkulturversuchen herzustellen.

3.3 Herstellung isotope markierter Standardsubstanzen

3.3.1 Einsatz und Voraussetzungen

Bei Isotopen kann zwischen stabilen und radioaktiven Isotopen unterschieden werden. Radioaktive Isotope zerfallen unter Aussendung radioaktiver Strahlung, die mithilfe der empfindlichen Szintillationsmesstechnik detektiert werden kann. Sie werden daher häufig als sogenannte Radiotracer zur Analyse von Biosynthesewegen, zur Lokalisierung von Metaboliten oder Stoffwechselreaktionen in Organen, Zellen oder Zellfraktionen eingesetzt. Beispielsweise wurde mithilfe von ^{14}C -markiertem ZEN (hergestellt durch Inkubation von *Fusarium graminearum*-Kulturen mit D-[U- ^{14}C]-Glucose oder [^{14}C]-Malonsäure (Zill *et al.*, 1989)) die Verteilung von ZEN in verschiedenen Zellwandfraktionen von Mais-Suspensionszellen untersucht (Zill *et al.*, 1990). Nachteile dieser Methode sind allerdings der radioaktive Zerfall, die aufwendigen Strahlenschutzmaßnahmen und die Problematik der Abfallbeseitigung (Rychlik & Asam, 2009).

Im Gegensatz dazu weisen stabile Isotope keinen radioaktiven Zerfall auf. Sie werden seit der routinemäßigen Nutzung von Massenspektrometern häufig in sogenannten Stabilisotopenverdünnungsanalysen (SIVA) eingesetzt, welche auch in der Analytik von Mykotoxinen Anwendung finden (Habler & Rychlik, 2016; Habler *et al.*, 2017). Durch den Einsatz stabilisotopenmarkierter Analoga der Analytsubstanzen als interne Standardsubstanzen können Nachteile massenspektrometrischer Methoden wie z.B. die Ionensuppression kompensiert werden. Dabei handelt es sich um die Unterdrückung (seltener auch die Verstärkung) der Signalintensität aufgrund von Matrixkomponenten in der Ionenquelle (Annesley, 2003). Da isotope markierte Standardsubstanzen annähernd identische chemische und physikalische Eigenschaften wie der Analyt aufweisen, können darüber hinaus in etwa die gleichen Analytverluste bei der Probenaufreinigung und vergleichbare Retentionszeiten erwartet werden. Erst bei der massenspektrometrischen Detektion kann schließlich zwischen dem Analyt und den Isotopologen unterschieden werden.

Um bei der Anwendung der SIVA richtige Ergebnisse zu erhalten, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Neben einer ausreichenden Zeit für die Äquilibration nach Zugabe der stabilisotopenmarkierten Standardsubstanz zu der Probe, um unterschiedlichen Extrahierbarkeiten zwischen Analyt und markiertem Standard aufgrund von Matrixeinschlüssen oder -adsorptionen zu gewährleisten, spielt die Vollständigkeit und Stabilität der Markierung eine große Rolle. Beispielsweise können D (Deuterium)-Isotope an aciden Positionen im Molekül in Säure-Base-Reaktionen durch Protonen ersetzt werden. Aber auch aromatische D-Atome können in Anwesenheit von starken Säuren durch elektrophile aromatische Substitution (S_{EAr}) gegen Protium ausgetauscht werden. Bei dem Einsatz von deuterierten Verbindungen sollte daher auf milde Versuchsbedingungen geachtet werden. Des Weiteren ist die eindeutige massenspektrometrische Unterscheidung der markierten Standardsubstanzen und des Analyts eine wichtige Voraussetzung, was durch eine minimale spektrale Überlappung gewährleistet wird (Rychlik & Asam, 2009). Spektrale Überlappungen treten vorwiegend aufgrund des natürlichen Vorkommens von ^{13}C auf, das mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1 % ^{12}C -Atome ersetzen kann. Die Wahrscheinlichkeit für das

Auftreten eines Ions mit einem ^{13}C -Atom ($\frac{P_{M+1}}{P_M}$) bzw. zwei ^{13}C -Atomen ($\frac{P_{M+2}}{P_M}$) lässt sich anhand der Formeln (2) und (3) berechnen:

$$\frac{P_{M+1}}{P_M} = w \left(\frac{c}{100 - c} \right) \quad (2)$$

$$\frac{P_{M+2}}{P_M} = \frac{w(w-1)c^2}{2(100-c)^2} \quad (3)$$

Dabei steht w für die Anzahl der Kohlenstoffatome, aus der das Molekülion M besteht und c für die Häufigkeit von ^{13}C . Mithilfe dieser Formeln kann schließlich auf die relative Intensität des $M+1$ - bzw. $M+2$ -Peaks geschlossen werden (Gross, 2013). Beispielsweise besitzen 22,2 % der Moleküle eines AOH-Glucosids (mit 20 C-Atomen) ein natürliches ^{13}C -Atom und 2,4 % enthalten bereits zwei ^{13}C -Atome.

Neben einer ausreichenden Anzahl an Markierungen spielt außerdem die Isotopenreinheit eine wichtige Rolle, da aufgrund von unvollständigen Markierungen spektrale Überlappungen auftreten können. Darüber hinaus sollten Isotopeneffekte vermieden werden, die vor allem bei mehrfach deuterierten Standardsubstanzen auftreten, da sich der Massenunterschied von 100 % im Vergleich zu Protium in einer größeren Trägheit und geringeren Polarisierbarkeit von Bindungen auswirkt. Dadurch kann ein Retentionszeitshift (Isotopenshift) bei chromatographischen Trennungen resultieren (Klein *et al.*, 1964), was Auswirkungen auf die Vergleichbarkeit der Ionisierung von Analyt und Standardsubstanz haben kann, da unterschiedliche Matrixbestandteile koeluierten. Daher sollte die Anzahl an Deuterierungen nicht zu hoch sein (Rychlik & Asam, 2009).

3.3.2 Mögliche Verfahren zur Isotopenmarkierung

Isotopenmarkierte Standardsubstanzen werden zur Durchführung von SIVAs benötigt. Zwar können Isotopologe für alle Mykotoxine, für die internationale Höchstmengen festgelegt wurden, käuflich erworben werden, allerdings mangelt es an isotopenmarkierten Standardsubstanzen für modifizierte Mykotoxine. In den Kapiteln 3.3.2.1 –3.3.2.4 werden zunächst unterschiedliche Verfahren vorgestellt, mit denen die freien Mykotoxine markiert werden können. Diese sollen anschließend in Tabak-Zellsuspensionskulturen eingesetzt werden, um markierte Mykotoxinmetaboliten zu generieren. Über chromatographische Aufreinigung im präparativen Maßstab können so isotopenmarkierte Standardsubstanzen modifizierter Mykotoxine erhalten werden.

3.3.2.1 ^{13}C -Markierung

Als Vorteile der ^{13}C -Markierung sind zum einen die Stabilität von C-C-Bindungen und die daraus resultierenden stabileren Isotope und zum anderen geringere Isotopenshifts im Vergleich zu deuterierten Verbindungen zu nennen. Nachteil sind allerdings die hohen Kosten bei dem Kauf ^{13}C -markierter Ausgangsmaterialien. Hinzukommend müssen häufig mehrstufige Synthesen mit teilweise geringen Ausbeuten durchgeführt werden, um stabile ^{13}C -Markierungen einzubringen. Um aufwendige Synthesen zu vermeiden, können jedoch

auch Schimmelpilzkulturen mit isoto­penmarkierten Kohlenstoffquellen inkubiert werden (Rychlik & Asam, 2009). Liu & Rychlik (2015) beschrieben beispielsweise die Bildung von $[^{13}\text{C}_{14}]$ -AOH und $[^{13}\text{C}_{15}]$ -AME durch Inkubation von *A. alternata* mit $[^{13}\text{C}_6]$ -Glucose und $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetat in modifiziertem Czapek-Dox-Medium. Ein ähnlicher Syntheseweg existiert für die Bildung von ^{13}C -markiertem ZEN, indem $[^{13}\text{C}_1]$ -Glucose zu einer Sporensuspension von *F. graminearum* gegeben wurde. Dabei konnte $[^{13}\text{C}_9]$ -markiertes ZEN gewonnen werden (Zill *et al.*, 1989).

3.3.2.2 Deuterierung

Eine Isotopenmarkierung mit Deuterium ist relativ schnell und einfach durch Austauschreaktionen von an Kohlenstoff gebundenem Wasserstoff durch Deuterium durchführbar. Als Deuteriumquelle kann dabei im Vergleich zu ^{13}C -markierten Ausgangs­substanzen häufig relativ preiswertes Deuteriumoxid (D_2O) oder D_2 -Gas dienen. Je nach Molekül kann der H/D (Wasserstoff / Deuterium)-Austausch durch säure-, basen- oder metallkatalytische Austauschreaktionen stattfinden (Atzrodt *et al.*, 2007).

Beispielsweise können Brønsted-Säuren (z.B. DCl , D_2SO_4) in einer $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ Wasserstoffatome an aromatischen oder elektronenreichen Substanzen durch Deuterium austauschen. Dabei addiert das Elektrophil D^+ unter Bildung eines mesomeriestabilisierten α -Komplexes an den Aromaten. Anschließend kommt es durch Reaktion mit einer Base zu einer Deprotonierung und Rearomatisierung des Systems (Abb. 10). Substituenten am Aromaten beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit und die Stelle, an der ein Molekül reagiert (dirigierender Effekt). Beispielsweise verlangsamen Hydroxygruppen, wie sie in AOH, AME und ZEN vorkommen, aufgrund ihres $-\text{I}$ -Effekts die Reaktion und dirigieren aufgrund des $+\text{M}$ -Effekts in *ortho*- und *para*-Stellung.

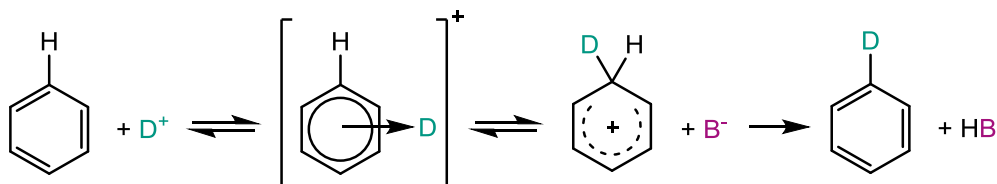


Abb. 10: Säurekatalysierte Deuterierung durch elektrophile aromatische Substitutionsreaktion am Beispiel von Benzol mit Deuterium als Elektrophil (modifiziert nach Beckert *et al.* (2015)).

Basenkatalysierte Austauschreaktionen können bei enolisierbaren Carbonylverbindungen (Ketone, Aldehyde, Ester) angewandt werden, da deren acide Wasserstoffatome leicht durch Deuterium ausgetauscht werden können. Basen können dabei die Abspaltung eines Protons katalysieren, wodurch ein mesomeriestabilisiertes Enolation entsteht. Je nachdem, ob das D^+ an den elektronegativen Sauerstoff oder an das Kohlenstoff-Atom bindet, entsteht entweder die Enol- oder die Keto-Form (Abb. 11). Da die Bildung von Keto- und Enol-Form reversibel ist, können alle Wasserstoff-Atome in α -Stellung durch Deuterium ausgetauscht werden (Beckert *et al.*, 2015).

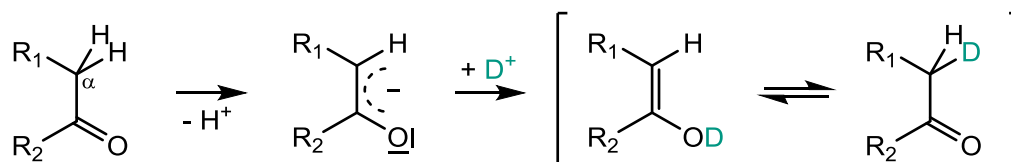


Abb. 11: Basenkatalysierte Deuterierung einer enolisierbaren Carbonylverbindung mit Deuterium als Elektrophil (modifiziert nach Beckert *et al.* (2015)).

Die Mechanismen heterogener metallkatalysierter Deuterierungen können je nach Abfolge der Anlagerung und Abspaltung des Deuteriums assoziativ oder dissoziativ ablaufen, wobei beide Mechanismen nebeneinander stattfinden können (Garnett & Sollich-Baumgartner, 1964). Der Vorteil von heterogenen im Vergleich zu homogen metallkatalysierten Deuterierungen ist, dass der Katalysator nach Beendigung der Reaktion durch Filtration wieder entfernt werden kann. Allerdings kann es je nach Reaktionsbedingungen zu unerwünschten Dehalogenierungen, Hydrierungen, Hydrolysen sowie Epimerisierungen und Racemisierungen kommen (Atzrodt *et al.*, 2007).

3.3.2.3 Synthese von deuteriertem ZEN

In der Literatur werden verschiedene Synthesarten für deuteriertes ZEN vorgeschlagen. Muñoz & Riguera (1990) beschrieben eine säurekatalysierte Synthese von sechsfach deuteriertem ZEN (6,8,13,15-ZEN- d_6). Dabei wurde ein Reaktionsgemisch aus ZEN, D_2O , Methanol- d_4 , Aceton- d_6 und deuterierter Trifluoressigsäure (TFA) unter Rückfluss erhitzt und eine Isotopenreinheit von 98 % massenspektrometrisch bestimmt. Im Vergleich dazu führten Miles *et al.* (1996) eine basenkatalysierte Deuterierung mit Kaliumcarbonat in D_2O durch. Dabei wurden zwei bis sechs Deuteriumatome in ZEN eingebaut (durchschnittlich 3,4 D-Atome pro Molekül), die ebenfalls an den Positionen 6, 8, 13 und 15 lokalisiert waren (Abb. 12). Die Verhältnisse der verschiedenen Deuterierungsgrade blieben zwar bei der Lagerung in wässrigen Lösungen konstant, allerdings wurde eine geringfügige Änderung des D/H-Verhältnisses in metabolischen Studien beobachtet (Cramer *et al.*, 2007). Dies lässt sich durch die in wässriger Lösung stattfindende Keto-Enol-Tautomerie begründen.

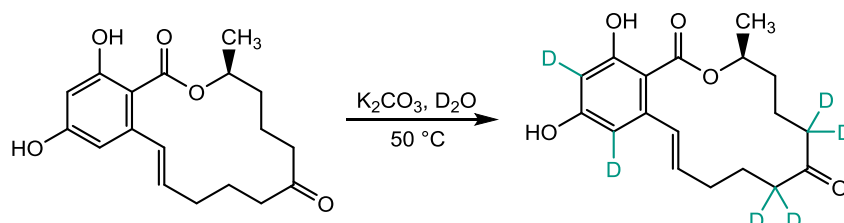


Abb. 12: Basenkatalysierte sechsfach-Deuterierung von ZEN (modifiziert nach Miles *et al.* (1996)).

Eine ausreichende Stabilität des deuterierten ZENs ist für die anschließende zweitägige Inkubation in der Tabak-Zellsuspensionskultur zur Synthese der ZEN-Metaboliten allerdings unumgänglich. Daher ist eine zweifache Markierung am Aromaten im Vergleich zur sechsfach-Markierung vorzuziehen. Cramer *et al.* entwickelten 2007 eine Synthesemethode für zweifach deuteriertes ZEN (13,15-ZEN- d_2). Durch die Verwendung einer Schutzgruppe kann die Keto-Enol-Tautomerie an den Positionen 6 bis 8 verhindert werden, wodurch eine selektive Deuterierung am aromatischen Ring erfolgen kann (Abb. 13).

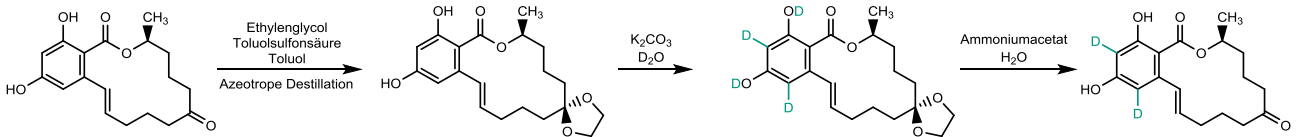


Abb. 13: Basenkatalysierte zweifach-Deuterierung von ZEN unter Verwendung einer Schutzgruppe (modifiziert nach Cramer *et al.* (2007)).

Zum Schutz bzw. zur temporären Blockierung von Ketonen bieten sich beispielsweise basenstabile cyclische Acetale an, die durch Reaktion der Ketogruppe mit 1,2- oder 1,3-Diolen, wie z.B. Ethylenglycol oder Trimethylenglykol, gebildet werden können. Cyclische Acetale können nach erfolgter Deuterierung leicht im sauren Milieu wieder abgespalten werden (Vollhardt *et al.*, 2011). Mithilfe dieser Methode wurde eine Reinheit von 97 % (NMR, GC-MS) bzw. 94,5 % (LC-MS/MS) erzielt (Cramer *et al.*, 2007). Um die Stabilitäten der zweifach- und sechsfach-Deuterierung zu vergleichen, wurde sowohl die Methode von Miles *et al.* (1996) als auch von Cramer *et al.* (2007) durchgeführt.

3.3.2.4 Synthese von deuteriertem AOH und AME

Asam *et al.* beschrieben (2009) eine Methode zur Synthese von vierfach deuteriertem AOH bzw. AME (2,4,8,10-AOH- d_4 , 2,4,8,10-AME- d_4). Für den heterogenen metallkatalysierten H/D-Austausch wurde AOH bzw. AME mit Dioxan- d_8 , D_2O und Palladium als Katalysator versetzt (Abb. 14 (I)). Nach einer Reaktionszeit von etwa vier Tagen bei 160 °C wurde die Reaktion abgebrochen, da die Bildung von thermischen Zersetzungsprodukten zunahm. Allerdings konnten für AOH und in geringerem Ausmaß für AME deutliche Mengen der $[D_3]$ -Isotopologen sowie bis zu siebenfach-deuteriertes AOH bzw. AME beobachtet werden. Die deuterierten Verbindungen erwiesen sich über drei Wochen bei Raumtemperatur in einem pH-Bereich von 2 bis 9 als stabil.

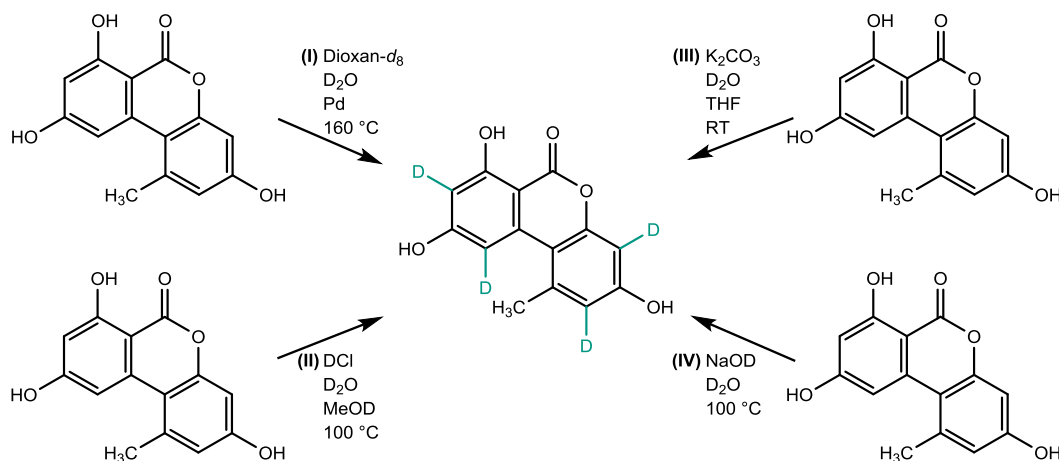


Abb. 14: Mögliche Synthesewege von vierfach-deuteriertem AOH: (I) metallkatalysierte Deuterierung nach Asam *et al.* (2009) (II) säurekatalysierte elektrophile aromatische Substitution (III) basenkatalysierte elektrophile aromatische Substitution nach Miles *et al.* (1996) (IV) basenkatalysierte elektrophile Substitution. Alle Synthesen können analog auch für AME durchgeführt werden.

Um eine höhere Isotopenreinheit zu erlangen, könnte z.B. auch eine Synthese mittels säurekatalysierter S_{EAr} eingesetzt werden. Dabei wird ein Reaktionsgemisch aus Deuteriumchlorid, Methanol- d_4 und D_2O mit AOH bzw. AME unter Rühren erhitzt (Abb. 14

(II)). Ebenso könnte eine basenkatalysierte S_EAr wie bei der Deuterierung von ZEN nach Miles *et al.* (1996) durchgeführt werden, bei der in Tetrahydrofuran (THF)-gelöstes AOH bzw. AME mit Kaliumcarbonat und D_2O reagiert (Abb. 14 (III)). Alternativ ist hierfür auch der Einsatz von NaOD und D_2O denkbar (Abb. 14 (IV)).

Um die verschiedenen Methoden zu vergleichen, wurden sowohl die metallkatalysierte Deuterierung (I), die säurekatalysierte S_EAr (II) sowie die basenkatalysierte S_EAr (III) durchgeführt, wobei lediglich bei der säurekatalysierten S_EAr eine Deuterierung stattfand. Methode IV wurde aufgrund der Instabilität von AOH und AME in Laugen bei hohen Temperaturen nicht durchgeführt.

3.4 Modellsysteme für Resorptionsstudien

Für eine Risikobewertung modifizierter Mykotoxine sind Resorptionsstudien unerlässlich. Die Resorption der Stoffe kann beispielsweise in Tierversuchen ermittelt werden, indem deren Ausscheidungen untersucht werden. Tierversuche bieten den Vorteil, dass das Zusammenwirken mehrerer Organsysteme berücksichtigt wird. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, gibt es für einige pflanzliche Phase II-Metaboliten von ZEN bereits Tierstudien an Schweinen und Ratten, die zeigen, dass ZEN-Konjugate im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert werden können (Gareis *et al.*, 1990; Veršilovskis *et al.*, 2012; Binder *et al.*, 2017). Allerdings sind die Ergebnisse von Tierstudien aufgrund von Speziesunterschieden nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Des Weiteren spielen ethische Aspekte eine Rolle, weshalb häufig versucht wird auf Tierversuche zu verzichten, indem z.B. *in vitro*-Zellmodelle herangezogen werden. Ein weit verbreitetes Testsystem stellen Caco-2-Zellen dar, die in Kapitel 3.4.1 näher betrachtet werden.

3.4.1 Caco-2-Zellmodell

Caco-2-Zellen stammen ursprünglich aus einem primären kolorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen männlichen Kaukasiers. Die Besonderheit dieser heterogenen Zelllinie ist, dass die Zellen nach Erreichen der Konfluenz spontan, ohne Einwirkung von chemischen Agentien, ausdifferenzieren und polarisieren. Dadurch weisen die Zellen morphologische sowie physiologische Ähnlichkeit mit dem Dünndarmepithel des Menschen auf (ATCC, 2016). Diese Ähnlichkeit äußert sich in der Ausbildung einer Bürstensaummembran mit vollständig ausdifferenzierten Microvilli (Peterson & Mooseker, 1993) sowie in der Ausbildung von *Tight Junctions* (Schlussleisten), durch die ein parazellulärer Transport verhindert bzw. reguliert wird (Vilasaliu *et al.*, 2011). Je nach Gewebeart bilden die *Tight Junctions* mehr oder weniger durchlässige Barrieren. Dabei zählen beispielsweise das Dünndarmepithel zu den undichten, das Dickdarmepithel zu den mitteldichten und das Harnblasenepithel zu den sehr dichten Epithelien (Powell, 1981). Der Vergleich der Caco-2-Zellen mit den verschiedenen Geweben zeigte, dass die parazelluläre Barriere bei Caco-2-Zellen höher ist als im humanen Dünndarm. Die Resorption von Verbindungen, die ausschließlich oder überwiegend über den parazellulären Weg aufgenommen werden, kann daher unterschätzt werden (Artursson *et al.*, 2001).

Neben den *Tight Junctions* exprimieren Caco-2-Zellen darüber hinaus für Enterozyten charakteristische Proteine und Enzyme wie z.B. Sulfotransferasen (Baranczyk-Kuzma *et al.*, 1991), Glucuronosyltransferasen (Siissalo *et al.*, 2008), Glutathion-S-Transferasen (Peters & Roelofs, 1992), Esterasen (Augustijns *et al.*, 1998) und einige Transportproteine (Vaessen *et al.*, 2017). Allerdings können sich die Konzentrationen der exprimierten Proteine bzw. Enzyme im Vergleich zum menschlichen Darm stark unterscheiden. Dies ist beispielsweise bei den CYP450-Isoenzymen CYP3A und CYP1A der Fall. Sie werden in Caco-2-Zellen nur in sehr viel geringeren Mengen gebildet als in menschlichen Enterozyten (van Breemen & Li, 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass Caco-2-Zellen je nach Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. In einer Studie wurden Caco-2-Zellen aus zehn verschiedenen Laboratorien hinsichtlich des mRNA (messenger Ribonukleinsäure)-Expressionsspiegels verschiedener Transporter und metabolisierender Enzyme untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass kleine Unterschiede in den Kulturbedingungen signifikante Einflüsse auf die Genexpression haben können (z.B. von den Transportern PepT1 (Peptidtransporter 1) und MDR1 (Multidrug-Resistance-Protein 1)), die allgemeinen Expressionsmuster allerdings ähnlich waren (Hayeshi *et al.*, 2008). Darüber hinaus kann der pH-Wert des Mediums einen Einfluss auf die Motilität, die Proliferation und die Enzymaktivität haben. Während die Motilität bzw. die Proliferation bei pH 7,6 bzw. 7,2 ein Maximum aufwies, war die Enzymaktivität der zwei Bürstensaummembranenzyme Dipeptidyl-dipeptidase und alkalische Phosphatase (Hydrolasen) bei pH 8,5 am höchsten (Perdikis *et al.*, 1998).

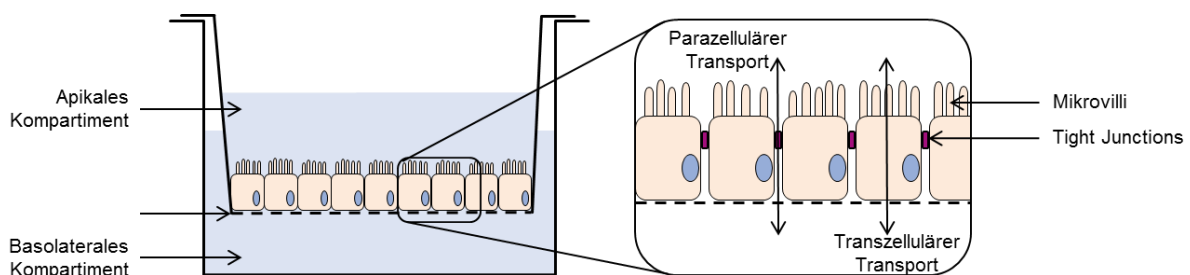


Abb. 15: Schematische Abbildung eines *Transwell*-Systems. Caco-2-Zellen wachsen als Monolayer auf einer permeablen Membran eines *Transwell*-Einsatzes und sind sowohl apikal als auch basolateral von Medium umgeben. Nach Erreichen der Konfluenz bilden die Caco-2-Zellen die für Enterozyten typischen Microvilli sowie *Tight Junctions* aus. Dadurch kann der Transport von Substanzen sowohl transzellulär als auch in geringem Ausmaß parazellulär stattfinden (modifiziert nach Hubatsch *et al.* (2007)).

Für Aufnahmeuntersuchungen werden Caco-2-Zellen üblicherweise in *Transwell*-Inserts kultiviert, die in entsprechende Well-Platten eingesetzt werden (Abb. 15). Dabei handelt es sich um permeable Membranfilter aus Polyethylenterephthalat (PET) mit definierter Porengröße, auf der der Zellmonolayer wachsen kann. Aufgrund der Fähigkeit der Caco-2-Zellen sich in einer polarisierten Zellschicht zu differenzieren, kann in dem System zwischen einer apikalen und einer basolateralen Seite unterschieden werden. Dabei entspricht die apikale Seite dem intestinalen Darmlumen und die basolaterale Seite ist äquivalent zur Blutseite, zu der die zu untersuchenden Substanzen transportiert werden. Sobald sich die konfluente polarisierte Schicht ausgebildet hat, ist der Transport einer Substanz nur noch durch den Zellrasen auf der Membran möglich. Dieser kann parazellulär über *Tight Junctions*,

transzellulär passiv oder aktiv über eine Transportervermittelte Route oder über Transzytose ablaufen.

Um die Permeabilität einer Zellschicht für eine bestimmte Substanz zu beschreiben, kann der P_{app} nach Gleichung (4) berechnet werden:

$$P_{app}(\text{cm s}^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{A c_{apikal}} = \frac{Q}{t A c_{apikal}} \quad (4)$$

Hierbei ist dQ/dt die Permeabilitätsrate ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$), A die Fläche des Membranfilters ($0,33 \text{ cm}^2$), c_{apikal} die Ausgangskonzentration im apikalen Kompartiment (mM), Q die Stoffmenge im basolateralen Kompartiment (μmol) und t die Inkubationszeit (s). Die Permeabilitätsrate kann erhalten werden, indem die auf die basolaterale Seite transportierte Substanzmenge gegen die Inkubationszeit aufgetragen wird, und die Steigung dieser Kurve bestimmt wird.

Der Zusammenhang zwischen den P_{app} -Werten aus Caco-2-Studien und der Resorptionsrate nach oraler Aufnahme im Menschen wurde an zahlreichen Substanzen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften untersucht. Eine Auftragung der oralen Aufnahme gegen die P_{app} -Werte ergab eine sigmoide Kurve, anhand derer ausgehend vom P_{app} -Wert die Resorption im Menschen abgeschätzt werden kann (Artursson & Karlsson, 1991). Bei P_{app} -Werten $< 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ kann von einer schlechten Resorption (0–20 %) ausgegangen werden. Liegt P_{app} zwischen $1\text{--}10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ist eine mittlere Resorption (20–70 %) zu erwarten und bei $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ liegt höchstwahrscheinlich eine hohe Resorption (70–100 %) *in vivo* vor (Yee, 1997).

Voraussetzung für die Richtigkeit eines Versuches ist der Erhalt der Integrität des Zellmonolayers während eines Versuches. Dies kann entweder über den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER, *Transepithelial Endothelial Electrical Resistance*) oder die Transportrate eines Markermoleküls bestimmt werden. Bei der TEER-Messung wird ein elektrisches Wechselstromsignal an Elektroden auf beiden Seiten des Zellmonolayers angelegt und sowohl Strom als auch Spannung gemessen, um den elektrischen Widerstand der Barriere zu berechnen (Srinivasan *et al.*, 2015). Werte über $300 \Omega\text{cm}^{-2}$ weisen auf eine ausreichende Integrität des Monolayers hin (van Breemen & Li, 2005). Alternativ kann die Integrität des Zellmonolayers auch durch Messung eines Markermoleküls bestimmt werden. Diese Methode basiert darauf, dass das Markermolekül die Zellschicht nur auf parazellulärem Wege passieren kann. Daher korreliert die Transportrate des Moleküls mit der Barrierefunktion des Systems. Als Markermolekül bietet sich Lucifer Yellow (LY) aufgrund seiner Fluoreszenz an, da diese einfach und schnell gemessen werden kann. LY wird zunächst apikal für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Für die fluorimetrische Messung zur Berechnung der Verteilung von LY wird eine LY-Referenzlösung benötigt, die der Gleichgewichtskonzentration (c_{GG}) entspricht, die sich bei Einstellung eines Gleichgewichts zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment ergibt. Hierfür wird die Konzentration der LY-Lösung (c_{apikal}), das apikale (V_{apikal}) und das basolaterale ($V_{basolateral}$) Volumen benötigt:

$$c_{GG} = \frac{c_{\text{apikal}} V_{\text{apikal}}}{(V_{\text{apikal}} + V_{\text{basolateral}})} \quad (5)$$

Anschließend wird die relative Fluoreszenz (RFU, Relative Fluorescence Units) des basolateralen Kompartiments der Probe ($\text{RFU}_{\text{Probe}}$) sowie die RFU des Blindwerts (RFU_{BW}) und die RFU der Referenzlösung (RFU_{Ref}) gemessen, um den prozentualen Anteil an LY im basolateralen Kompartiment und damit die LY-Transportrate zu ermitteln:

$$\% \text{LY-Passage} = \frac{\text{RFU}_{\text{Probe}} - \text{RFU}_{\text{BW}}}{\text{RFU}_{\text{Ref}} - \text{RFU}_{\text{BW}}} * 100 \% \quad (6)$$

Ein intakter Zellmonolayer sollte eine LY-Transportrate von $\leq 2 \%$ aufweisen (Debebe *et al.*, 2012).

Die Messung des TEERs eignet sich vor allem, wenn wiederholte Messungen an denselben Präparaten auch über längere Versuchszeiträume nötig sind. Da im Rahmen dieser Arbeit keine wiederholten Messungen an den Zellen durchgeführt werden sollten und kein TEER-Messgerät zur Verfügung stand, wurde die bereits etablierte Methode mit LY gewählt.

3.5 Methoden zur Untersuchung der Zellwandeinlagerung von Mykotoxinen

Während des Phase III-Metabolismus von Fremdstoffen können neben der Vakuolen-sequestration auch Einlagerungen in die Zellwand stattfinden. Um die Existenz von zellwandgebundenen Mykotoxinen zu zeigen bzw. die Art dieser Einlagerungen charakterisieren zu können, müssen die unlöslichen Zellwandbestandteile zunächst durch Hydrolyse in lösliche Verbindungen umgewandelt werden. Dies kann durch saure, alkalische oder enzymatische Hydrolysen erfolgen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen. Außerdem wird eine NMR-Methode vorgestellt, die es ermöglicht, Zellwandpolymere ohne vorherige Hydrolyse zu analysieren.

3.5.1 Saure Hydrolyse von Pflanzenzellwänden

Für die Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden können verschiedene Säuren eingesetzt werden, durch die glykosidische Bindungen gespalten werden. Abhängig von der Säurestärke, -konzentration und eingesetzten Temperaturen unterliegen Polysaccharide einer Fragmentierung, wobei Oligosaccharide, Disaccharide und / oder Monosaccharide erzeugt werden. Strukturelle Eigenschaften der Polysaccharide beeinflussen ebenfalls deren Abbaubarkeit (Brito-Arias, 2007). Beispielsweise bietet eine Hydrolyse mit H_2SO_4 (Vorhydrolyse: 12 M, 2,5 h, Raumtemperatur; Hydrolyse: 1,6 M, 3 h, 100 °C) den Vorteil kristalline Cellulose hydrolysieren zu können (Saeman *et al.*, 1945), während eine Hydrolyse mit TFA (2 M, 1 h, 121 °C) nicht in der Lage ist Cellulose (Selvendran *et al.*, 1979) oder spezielle Schleimstoffe (Griggs *et al.*, 1971) zu spalten. Allerdings ist TFA in dem Sinne vorteilhaft, dass es aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit schnell wieder entfernt werden kann (Willför *et al.*, 2009; Albersheim *et al.*, 1967). Des Weiteren könnten Mykotoxine auch an Proteine gebunden vorliegen. Eine Methode, um Proteine zu hydrolysieren ist beispielsweise

die Hydrolyse mit 6 M HCl bei 110 °C für 20–24 Stunden, wodurch Peptidbindungen zwischen Aminosäuren gespalten werden (Ng *et al.*, 1987). Dabei muss die Hydrolyse von Asparagin und Glutamin zu den jeweiligen Säuren, vollständige bzw. teilweise Zerstörung von Tryptophan bzw. Tyrosin, Serin, Threonin und Cystein sowie die Stabilität von Peptidbindungen zwischen Isoleucin und Valin beachtet werden (Ozols, 1990; Fountoulakis & Lahm, 1998). Zu berücksichtigen ist bei der vorgestellten Methode, dass diese auch zur Spaltung der Bindung zwischen Mykotoxin und den Zellwandbestandteilen führen können, wodurch das freie Mykotoxin erhalten werden kann. Dies kann ausgenutzt werden, um zwischen „freiem“ und „zellwandgebundenem“ Mykotoxin zu unterscheiden bzw. um Gesamtmykotoxingehalte zu bestimmen.

In der Literatur gibt es derzeit nur wenige Studien, die sich mit der Zellwandbindung von Mykotoxinen beschäftigen. Malachová *et al.* (2015) vergleicht in einer Studie drei Methoden zur Bestimmung von freiem und Gesamt-DON, die auf sauren Hydrolysen basieren. In der ersten Methode wird 1 M Trichloressigsäure (TCA) bei 140 °C für 40 Minuten zur Hydrolyse von gebundenen Rückständen von DON in Weizen eingesetzt. Nach anschließender Aufreinigung wurde mit 1 M KOH neutralisiert (Liu *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wurden in der zweiten Methode 1,25 M TFA bei 133 °C für 54 Minuten ohne Neutralisation nach Aufreinigung für die Analyse von in Gerste gebundenem DON verwendet (Zhou *et al.*, 2007). Die dritte Methode basierte auf einer Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)-Hydrolyse (0,5 M, 60 °C, 20 bzw. 40 Minuten) von Gerste bzw. Mais zur Bestimmung der gebundenen Rückstände von DON. TFMSA ist eine der stärksten Brønsted-Säuren (pK_s -13), die sich durch eine extreme thermische Stabilität auszeichnet. In dieser Methode wurde keine Aufreinigung durchgeführt, jedoch mit 1 M Na₂CO₃ neutralisiert (Tran & Smith, 2011). Die jeweils publizierten Zunahmen an DON nach der Hydrolyse könnten somit auch durch alkalische Spaltung bei der Neutralisation und nicht durch die Säurehydrolyse selbst verursacht sein.

Eine Voraussetzung für diese Methoden ist, dass die Verbindung, die während der Reaktion freigesetzt und später bestimmt wird (hier: DON), unter den Versuchsbedingungen stabil ist. Allerdings zeigte keine der drei Methoden eine zufriedenstellende Stabilität von DON bzw. einen zuverlässigen Abbau modifizierter Formen zu DON. Aus diesen Gründen raten Malachová *et al.* (2015) von der Verwendung von sauren oder alkalischen hydrolytischen Verfahren zur indirekten Bestimmung von Gesamt-DON ab. Bezüglich der Stabilität von ZEN konnten Beloglazova *et al.* (2013) zeigen, dass ZEN bis zu einer Konzentration von 0,025 M TFMSA stabil war. Bei dieser Konzentration wurde allerdings bereits 70 % des ZEN-14-Glucosids gespalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vorversuche in Anlehnung an die Methoden von Liu *et al.* (2005) (TCA), Zhou *et al.* (2007) (TFA) und Ng *et al.* (1987) (HCl) durchgeführt und die Konzentrationen der Säuren, Temperaturen und Hydrolysedauer angepasst.

Die Freisetzung von unkonjugierten Mykotoxinen durch chemische Spaltungen liefert jedoch keinen eindeutigen Beweis, sondern lediglich einen Hinweis für eine Zellwandbindung. Charakteristische Mykotoxinkonjugate werden aufgrund der unspezifischen Spaltung bei chemischen Hydrolysen daher nicht erwartet. Im Gegensatz dazu weisen enzymatische

Methoden eine höhere Spezifität auf, wodurch charakteristische Mykotoxinkonjugate aus Polymeren freigesetzt werden könnten.

3.5.2 Alkalische Hydrolyse von Pflanzenzellwänden

Einige Glycoside sind neben ihrer hohen Säureempfindlichkeit teilweise auch gegenüber alkalischen Bedingungen empfindlich. Allerdings werden diese häufig nicht in ihre Monomere gespalten; stattdessen werden Nicht-Zucker-Derivate gebildet (Brito-Arias, 2007). Allerdings können mittels alkalischer Hydrolyse Proteine sehr gut gespalten werden, wobei im Gegensatz zur Säurehydrolyse Tryptophan erhalten bleibt (Fountoulakis & Lahm, 1998). Malachová *et al.* (2015) untersuchten aufgrund des Neutralisationsschrittes bei der sauren Hydrolyse die Stabilität von DON und dessen modifizierter Formen unter alkalischen Bedingungen. Dabei zeigte sich, dass die modifizierten Formen im Alkalischen gespalten werden. Jedoch zeigte sich ab einer gewissen Konzentration von KOH und in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ebenso ein Abbau von DON. Da ZEN ebenfalls alkalilabil ist, müssen geeignete Bedingungen für die alkalische Hydrolyse gewählt werden. Beispielsweise berichten Krska & Josephs (2001) und Schuhmacher *et al.* (1998), dass die Expositionsdauer von ZEN gegenüber wässriger NaOH möglichst gering gehalten werden sollte, da der Lactonring hydrolysiert werden kann und eine Spaltung der Esterbindung in einem Verlust von ZEN resultiert. Da AOH und AME ebenso eine Lactongruppe besitzen ist eine Spaltung im Alkalischen denkbar. Allerdings ist der sechsgliedrige Lactonring mit den zwei benachbarten Aromaten bei AOH und AME wesentlich stabiler als der 14-gliedrige Lactonring von ZEN, weshalb AOH und AME als alkalistabiler einzuschätzen sind (Streitwieser *et al.*, 1994).

3.5.3 Enzymatische Hydrolyse von Pflanzenzellwänden

Da bei Anwendung der in Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 beschriebenen Methoden zwar Zellwandpolymere abgebaut werden, jedoch auch die Bindung zwischen Mykotoxinen und Zellwandpolymeren zumindest teilweise gespalten werden und die Mykotoxine oft unter den extremen Bedingungen der Polymerhydrolyse nicht stabil sind, sind weitere Methoden zur Untersuchung der Zellwandinteraktionen notwendig.

Um die bei der sauren und alkalischen Hydrolyse auftretenden Probleme zu vermeiden und um detailliertere strukturelle Informationen zu erhalten, kann eine enzymatische Hydrolyse der Pflanzenzellwände und anderer Polysaccharide wie z.B. Stärke durchgeführt werden. Um die verschiedenen Polymere zu spalten, werden unterschiedliche Enzyme benötigt.

Beispielsweise besteht Stärke aus Amylose, die aus linearen α -(1→4)-verknüpften Glucoseketten aufgebaut ist, und aus verzweigtem Amylopektin, das neben α -(1→4)-verknüpfte Glucoseketten auch α -(1→6)-glykosidische Bindungen aufweist. Während α -Amylase α -(1→4)-glucosidische Bindungen spalten kann, hydrolysiert Amyloglucosidase sowohl α -(1→4)- als auch α -(1→6)-glykosidische Bindungen vom nicht-reduzierenden Ende her. Um resistente Stärke zu spalten, kann thermostabile Amylase bei erhöhten Temperaturen eingesetzt werden. Isolierte Proteasen oder Gemische wie Pronase (Mischung aus mehreren unspezifischen Endo- und Exopeptidasen) können zur Spaltung von Peptidbindungen

eingesetzt werden. Des Weiteren können mittels Pektinase Pektine und mittels Cellulase Cellulose abgebaut werden. Zu berücksichtigen ist, dass Pektinasen je nach Zusammensetzung nur spezielle Pektinpolysaccharide spalten oder aus breiten Mischungen bestehen müssen, um die Gesamtheit an Pektinpolysacchariden abzubauen. Das in dieser Arbeit verwendete Enzymgemisch „Macerozyme R-10“ enthält neben Pektinase- auch Hemicellulase sowie Cellulase-Aktivität. Bezüglich der Hemicellulaseaktivität gelten vergleichbare Betrachtungen wie bei den Pektinasen. Ein weiteres Enzymgemisch „Onozuka R-10“ hydrolysiert β -1,4-glucosidische Bindungen und enthält zusätzlich Hemicellulase-, α -Amylase-, Pektinase- und Protease-Aktivitäten. Als drittes Enzymgemisch wurde Driselase eingesetzt. Dieses enthält verschiedene zellwandspaltende Enzyme wie Arabinanase, Cellulase, Xylanase, Galactanase und Polygalacturonase (Thibault & Rouau, 1990). Durch einzelne bzw. aufeinanderfolgende Anwendung der genannten Enzyme können die Zellwandpolymere und Stärke in unterschiedlichem Ausmaß hydrolysiert werden.

Beispielsweise verwendeten Zhou *et al.* (2008) Papain (Cystein-Protease), α -Amylase / Amyloglucosidase und Cellulase / Xylanase, um DON aus sieben verschiedenen Braugerstenproben freizusetzen. Die Inkubation von vier Proben mit Papain, von zwei Proben mit Cellulase / Xylanase und von einer Probe mit α -Amylase / Amyloglucosidase ergaben einen signifikant höheren Gehalt an DON als in den unbehandelten und den Kontrollproben ohne enzymatische Behandlung. Der größte Effekt trat bei der Inkubation mit Papain auf, bei der 16–28 % DON freigesetzt wurde. Da Papain bei dem Bierbrauen zum Entfernen von Trübstoffen eingesetzt wird, spielt die Freisetzung von gebundenem (hier vermutlich lediglich adsorbiertem) DON eine wichtige Rolle für die Lebensmittelsicherheit. Ebenso werden in der Brotherstellung häufig Enzyme wie α -Amylase, Xylanase, Cellulase, Protease, Lipase und Glucose-Oxidase eingesetzt. Daher untersuchten Vidal *et al.* (2016) die Auswirkungen dieser Enzyme auf den DON- und DON-3-Glucosid-Gehalt in Brot. Je nach Fermentations-temperatur wurde der nachweisbare DON-Gehalt entweder um 13–23 % erhöht (30 °C) oder um 10–14 % erniedrigt (45 °C). Des Weiteren wurde der DON-3-Glucosid-Gehalt in Anwesenheit von Xylanase, α -Amylase, Cellulase und Lipase bei einer Fermentationstemperatur von 30 °C erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Weizenkleie und Mehl gebundenes DON enthalten können, welches durch enzymatische Behandlung während des Brotbackens (Teigbereitung) freigesetzt werden kann.

Die Zellwandbindung von ZEN wurde, wie bereits in Kapitel 1.2.3.2 beschrieben, von Zill *et al.* (1990) mit radioaktiv markiertem ZEN in Mais-Zellsuspensionskulturen untersucht. Dabei verweisen die Autoren auf Methoden zur Zellwandfraktionierung von Takeuchi & Komamine (1980) und Langebartels & Harms (1985). Allerdings unterscheiden sich deren Durchführungen zur Zellwandfraktionierung voneinander. Während Takeuchi & Komamine (1980) die Pektin-, Hemicellulose- und Cellulose-Fraktion lediglich durch Löslichkeitsunterschiede (Extraktion mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), KOH und 72 % H_2SO_4) erhielten, verwendeten Langebartels & Harms (1985) neben verschiedenen Lösungsmitteln zusätzlich Enzyme wie Pronase E (Proteinfraktion), Pektinase (Pektin-Fraktion) und Hemicellulase (Hemicellulose-Fraktion). Darüber hinaus extrahierten Letztere Lignin durch sequentielle Fraktionierung mit entweder DMSO oder Dioxan-Wasser und Dioxan / HCl. Beiden Methoden ging ein Stärkeabbau mit Pankreas- α -Amylase voraus. In der Studie von

Zill *et al.* (1990) wurden sieben „Fraktionen“ erhalten (Stärke, Proteine, Pektin, Lignin, Hemicellulose, Cellulose, Rückstand). Die Messung mit dem Flüssigszintillationszähler ergab, dass die größten Mengen des ^{14}C -Markers in den Zellwandfraktionen Lignin (37 %), Hemicellulose (20 %) und Stärke (17 %) gefunden wurden. Da der Einsatz verschiedener Lösungsmittel zur Zellwandfraktionierung relativ unspezifisch ist und keine genauen Strukturuntersuchungen durchgeführt wurden, besteht die Möglichkeit, dass die gemessene Radioaktivität auch durch nicht vollständig extrahierte lösliche Metaboliten zustande kann.

3.5.4 NMR-Analyse von Pflanzenzellwänden

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Zellwandeinlagerung von Mykotoxinen stellt die NMR-Spektroskopie dar. In den letzten Jahren wurden Möglichkeiten beschrieben Zellwände mittels NMR-Spektroskopie in Lösung zu analysieren ohne diese zerstören oder fraktionieren zu müssen (Mansfield *et al.*, 2012). Das zu untersuchende Zellwandmaterial wird hierfür zunächst in einer Kugelmühle vermahlen und anschließend mit einem Gemisch aus DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4/1) im Ultraschallbad versetzt. Der Zusatz von Pyridin- d_5 zu DMSO- d_6 dient der effektiven Quellung der gelartigen Probe, wodurch erhöhte Intensitäten und eine verbesserte Auflösung im NMR-Spektrum resultieren. Des Weiteren ist eine Partikelgröße von $< 5 \mu\text{M}$ für eine optimale Gelbildung erforderlich (Kim & Ralph, 2010). Die entstehende viskose, gelartige Lösung / Suspension kann schließlich direkt für HSQC-Messungen verwendet werden. Diese einfache Probenvorbereitung ohne chemische Vorbehandlung ist ein großer Vorteil gegenüber Methoden, bei denen eine Zellwandfraktionierung durchgeführt werden muss (Mansfield *et al.*, 2012; Kim & Ralph, 2010).

Allerdings muss beachtet werden, dass die mechanische Belastung während des Kugelmahlens zu strukturellen Veränderungen von Zellwandpolymeren und eventuell vorliegenden Mykotoxinkonjugaten führen können. Vor allem schwache Bindungen wie glykosidische Verknüpfungen und β -Arylether in Lignin können teilweise gespalten werden. Einen weiteren Nachteil stellen die generell kurzen Relaxationszeiten der Gelproben für bestimmte Korrelationsexperimente, wie dem HMBC-Experiment dar. Die Magnetisierung geht dabei durch die schnelle Relaxation verloren, bevor sich die weitreichenden C-H-Kopplungen (über zwei bis vier Bindungen) entwickeln können (Kim & Ralph, 2010). Daher können zwar eventuelle Verknüpfungspunkte zwischen Mykotoxinen und der Zellwand mithilfe der Gel-NMR nicht genau bestimmt werden, jedoch besteht prinzipiell die Möglichkeit in HSQC-Spektren charakteristische Signale der Mykotoxine zu detektieren.

Daher wurden in dieser Arbeit Zellwandrückstände, aus in Gegenwart von Mykotoxinen inkubierten und lösungsmittlextrahierten Suspensionszellen, in einem Gemisch aus DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4/1) gelöst und anschließend HSQC-Spektren aufgenommen.

3.6 Lignineinlagerung von Mykotoxinen

Um die Einlagerung von Fremdstoffen in Lignin zu untersuchen wird häufig *in vitro* hergestelltes Lignin, sogenanntes DHP, eingesetzt. Im Vergleich zu natürlichem Lignin bietet DHP den Vorteil für analytische Methoden leichter zugänglich zu sein, da es weniger komplex ist und keiner aufwändigen Isolierung bedarf. Darüber hinaus kann DHP direkt in

Gegenwart der zu untersuchenden Fremdstoffe generiert werden, um zu untersuchen, ob und wie Fremdstoffe bei der Ligninsynthese in dieses eingebaut werden.

Beispielsweise führten Lange *et al.* (1998) eine Peroxidase / H₂O₂-vermittelte Polymerisation von CA in Gegenwart der Pestizide 4-Chloranilin bzw. 3,4-Dichloranilin durch. Die gebildeten Verbindungen wurden mithilfe der ¹H, ¹³C und ¹⁵N-NMR-Spektroskopie sowie zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (X-H Correlation (XHCORR) und Correlation Spectroscopy via Long-Range Coupling (COLOC)) und NOE-Differenzspektroskopie analysiert. Die Autoren belegen die Bindung der chlorierten Aniline an die α -Position des DHP sowohl anhand von Intensitätsabschwächungen einzelner Signale als auch anhand des Auftretens neuer Signale im Vergleich zu reinem DHP. Allerdings zeigen die NMR-Daten des COLOC-Experiments keine CH-Kopplung des H α mit dem C1 des Anilins, was ein eindeutiger Beweis für die Bindung wäre. Daher ist die Bindung von chlorierten Anilinen an Lignin anzuzweifeln.

3.6.1 Synthese von Coniferylalkohol (CA)

Für die *in vitro*-Synthese von künstlichem Lignin werden zunächst Monolignole benötigt. CA kommt sowohl in Angiospermen als auch in Gymnospermen vor (Boerjan *et al.*, 2003) und eignet sich daher als monomerer Baustein für *in vitro* synthetisiertes Lignin. Da CA im Vergleich zu Coniferylaldehyd oder Ferulasäure relativ teuer ist, wird dieser entweder durch eine einstufige Reduktion seines Aldehyds oder durch eine mehrstufige Reduktion der Carbonsäure gewonnen. Bereits 1949 gelang Allen & Byers die Herstellung von CA durch die Reduktion von Ethylferulat mittels Lithiumaluminiumhydrid. Als alternatives Reduktionsmittel kann beispielsweise auch Diisobutylaluminiumhydrid eingesetzt werden, das häufig für stereo- und chemoselektive Reduktionen eingesetzt wird (Quideau & Ralph, 1992). Seit der kommerziellen Verfügbarkeit von Coniferylaldehyd wird vorzugsweise die einstufige Reduktion des Aldehyds durchgeführt. Der Aldehyd kann beispielsweise mittels Natriumborhydrid (NaBH₄) oder Natriumtriacetoxborhydrid reduziert werden. Da diese Reagenzien bei Berührung mit Wasser entzündliche Gase bilden, die sich spontan entzünden können, eignet sich alternativ das leichter handhabbare und stabile Borhydridaustauscherharz (BER) als Reduktionsmittel. Aufgrund der hohen Regioselektivität von BER können α,β -gesättigte Produkte wie Dihydroconiferylalkohol, das durch 1,4-Reduktion entsteht, weitgehend vermieden werden (Kim & Ralph, 2005). Ein weiterer Vorteil ist, dass BER sowohl kommerziell verfügbar ist, als auch selbst synthetisiert und durch Behandlung mit NaBH₄ regeneriert werden kann (Sande *et al.*, 1984). Lediglich die geringe Ausbeute von 61 % stellt einen Nachteil dieser Methode dar, wobei dies durch die einfache und schnelle Durchführung ausgeglichen wird (Kim & Ralph, 2005).

3.6.2 *In vitro*-Synthese ligninähnlicher Verbindungen

Bei der Synthese ligninähnlicher Verbindungen sollte beachtet werden, dass die hergestellten DHP natürliche Lignine möglichst gut abbilden. Problematisch sind vor allem die häufig geringen Molekulargewichte von DHP sowie der oft geringe Gehalt an β -O-4-Bindungen in DHP, die den häufigsten Bindungstyp in nativem Lignin darstellen.

Für die Synthese der DHP können verschiedene Verfahren herangezogen werden, die sich in der Zufuhrtrate der Monolignole bzw. der Geschwindigkeit der Polymerisation unterscheiden. Beispielsweise werden bei dem Zulaufverfahren die Monolignole relativ schnell zu einem Peroxidase / H₂O₂- oder Laccase / O₂-Gemisch zugegeben. Da direkt zu Beginn eine große Menge an Monolignolen für die Polymerisation zur Verfügung steht, finden bevorzugt Dimerisierungsreaktionen statt, wodurch die Bildung hochmolekularer Strukturen unterdrückt wird. Dabei entstehen hauptsächlich Dehydro-Diconiferylalkohol, Pinoresinol und Guajacylglycerol- β -coniferylether. Im Gegensatz dazu werden die Monolignole bei dem Zutropfverfahren langsam zu dem Enzym-Cosubstrat-Gemisch zugetropft. Mit diesem Verfahren können vergleichsweise höhere Molekulargewichte erzielt werden sowie die Bildung von β -O-4-Bindungen begünstigt werden (Freudenberg, 1956; Lai & Sarkanen, 1975). Eine weitere Verringerung der Zufuhrtrate führt zu DHP, die natürlichem Lignin noch ähnlicher sind. Dies kann mithilfe des Dialysemembranverfahrens ermöglicht werden. Hierbei wird ein aus Cellulose bestehender Dialyseschlauch mit einer Peroxidase-Lösung befüllt und in eine wässrige CA / H₂O₂-Lösung eingetaucht (Tanahashi & Higuchi, 1981). Da die Substrate nur sehr langsam zu dem Enzym diffundieren, finden hauptsächlich Monolignol-Oligolignolreaktionen statt, wobei hauptsächlich β -O-4-Bindungen gebildet werden. Dimerisierungen werden dadurch unterdrückt (Syrjänen & Brunow, 2000). Tanahashi & Higuchi (1981) beobachteten bei dieser Methode, dass die Bildung des DHP-Präzipitats im Dialyseschlauch nach einem Tag stark abnahm, was die Autoren auf eine innere Beschichtung des Dialyseschlauchs mit Präzipitat zurückführten. Dies kann allerdings z.B. durch regelmäßiges Austauschen des mit Peroxidase gefüllten Schlauches oder gegenseitiges Austauschen der Enzym- bzw. CA / H₂O₂-Lösung vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit das Molekulargewicht der DHP zu beeinflussen stellt der Einsatz von organischen Lösungsmitteln wie Dioxan, ACN oder *iso*-Propanol dar. Dadurch sollen kleinere Oligomere in Lösung gehalten werden, um deren Wachstum zu größeren Polymeren zu ermöglichen. Ein weiterer Vorteil für die hier durchgeführten Arbeiten ist, dass die schlecht wasserlöslichen Mykotoxine in organischen Lösungsmitteln besser löslich sind und dadurch für die Reaktion zur Verfügung stehen. Hwang *et al.* (2015) beobachteten bei Verwendung von 10–40 % Lösemittelanteil in einem wässrigen Puffersystem einen prozentualen Anstieg an β -O-4-Bindungen sowie eine Erhöhung des Molekulargewichts. Eine weitere Erhöhung führte allerdings zu einem Aktivitätsverlust der verwendeten Enzyme. Um die wasserlöslichen Enzyme gegen die inaktivierende Wirkung von organischen Lösungsmitteln zu stabilisieren und trotzdem die Präzipitation des wachsenden Polymers zu verhindern, entwickelten Reale *et al.* (2010) eine Methode zur DHP-Synthese in Gegenwart eines kationischen Tensids. Dadurch werden Mizellen in einem organischen Lösungsmittel gebildet, in die die wasserlöslichen Enzyme eingeschlossen werden können (Martinek *et al.*, 1981). Sowohl die Oligomere als auch die Mykotoxine können so in Lösung gehalten werden und die Aktivität des Enzyms wird nicht beeinflusst. Somit wird die natürliche Umgebung im *in vitro*-Experiment besser nachgeahmt, wodurch naturähnlichere Polymere entstehen (Reale *et al.*, 2010).

Zur Entwicklung einer geeigneten Methode zur Untersuchung der Bindung der Mykotoxine an das DHP wurden sowohl das Zutropf- als auch das Dialyseverfahren einzeln sowie in

Kombination angewandt. Um das DHP-Modell zu vereinfachen, wurde lediglich CA als Monolignol eingesetzt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Mykotoxine in Wasser wurde die HRP-Aktivität in verschiedenen Lösungsmittel-Wasser-Gemischen sowie die Anwendung von inversen Mizellen untersucht.

3.6.3 Methoden zur Analyse von DHP (Dehydrogenierungspolymerisat)

Aufgrund der Komplexität von natürlichen Ligninen werden diese zur Strukturcharakterisierung häufig zunächst chemisch gespalten. Dabei kann zum einen die Thioacidolyse (Lapierre *et al.*, 1985) und zum anderen die DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage)-Methode (Lu & Ralph, 1997) angewandt werden. Diese beiden Methoden basieren darauf, dass die in den Ligninpolymeren häufig vorkommenden β -O-4-Bindungen im Vergleich zu anderen Bindungstypen relativ labil sind und selektiv gespalten werden kann. Dadurch können Monomere, die über β -O-4-Bindungen (und α -O-4-Bindungen) in das Ligninpolymer eingebaut wurden, mittels GC-Methoden bestimmt werden. Da bei der Synthese von DHP je nach Versuchsbedingungen kleinere oligomere Verbindungen entstehen, lassen sich diese mittels LC-DAD-MS analysieren. Hierbei können die Massenspektren auf die verschiedenen Monomere bzw. Dimere des CAs bzw. Konjugate dieser Verbindungen mit den Mykotoxinen untersucht werden. Charakteristische Abspaltungen der Mykotoxine bei MS²-Untersuchungen geben einen Hinweis auf mögliche Verknüpfungen.

Die Strukturcharakterisierung mittels 2D-NMR bietet den Vorteil polymere Lignine ohne vorherigen chemischen Abbau zu analysieren. Somit werden auch potentielle Bindungen zwischen den Lignineinheiten und den Mykotoxinen nicht gespalten. Neben der Erfassung von monomeren Einheiten, können zusätzlich Bindungstypen mittels HSQC-Experimenten analysiert werden, wodurch das hergestellte DHP charakterisiert werden kann (Bunzel & Ralph, 2006). Des Weiteren können mittels HMBC-Experimenten Informationen über Verknüpfungspositionen erhalten werden, wodurch kovalente Bindungen der Mykotoxine an Lignin-Monomere aufgeklärt werden sollen.

Da *in vitro* hergestellte DHP keine aufwändige Isolierung aus Zellwänden benötigen, können sie direkt für NMR-spektroskopische Untersuchungen eingesetzt werden. Hierbei eignet sich als Lösungsmittel das Gemisch aus DMSO-*d*₆ / Pyridin-*d*₅ (4:1), mit dem nach Quellung der Probe im Ultraschallbad ein Gel erhalten wird (Kapitel 3.5.4). Anhand von Literaturdaten können α -, β - und γ -¹H-¹³C-Korrelationen im aliphatischen Bereich zugeordnet und daraus die Bindungen an Mykotoxine bestimmt werden, um das DHP zu charakterisieren (Ralph *et al.*, 2004). Mykotoxinbindungen könnten durch Verschiebung einzelner Signale z.B. im aromatischen Bereich erkannt und anschließend weiter untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Lösliche pflanzliche Mykotoxinkonjugate

Eine erste Charakterisierung der löslichen pflanzlichen Konjugate von AOH, AME und ZEN erfolgte durch eine LC-DAD-MS-Analyse der Pflanzenzellkultur- bzw. Explant-Kultur-Extrakte. Dabei wurden Suspensionszellkulturen von Tabak, Soja und Weizen innerhalb von neun Tagen je zweimal mit AOH, AME bzw. ZEN und Explant-Kulturen von Karotte und Tomate für zwei Tage mit AOH bzw. AME inkubiert. Nach anschließender Filtration, Gefriertrocknung und Mörsern des jeweiligen Materials erfolgte eine dreistufige Extraktion. Die LC-DAD-MS-Analyse lieferte Hinweise auf mögliche Metaboliten durch charakteristische UV-Spektren, Molekülmassen sowie Fragmentierungen. Mithilfe von HRMS-Messungen konnten auch Metaboliten geringerer Intensität charakterisiert werden, sowie akkurate Massen bestimmt werden. Durch anschließende Auftrennung an einer präparativen HPLC wurden die Extrakte gereinigt. Fraktionen, die in ausreichender Konzentration vorlagen, wurden NMR-spektroskopisch analysiert.

4.1.1 Pflanzliche Konjugate von AOH und AME

4.1.1.1 Metabolitenprofile der verschiedenen Zellsuspensions- und Explant-Kulturen

Die Zellen der mit AOH bzw. AME inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellkultursuspensionskulturen wurden zunächst vom Medium getrennt. Die Inkubationsmedien aller Zellkulturen wurden mittels LC-DAD-MS analysiert. Sie zeigten keine nachweisbaren Mengen an AOH, weshalb von einer vollständigen Mykotoxinaufnahme in die Zellen ausgegangen werden kann. Nach Inkubation von AME konnten noch geringe Mengen an AME in den Medien gefunden werden, was auf eine schlechtere Aufnahme im Vergleich zu AOH schließen lässt. Da in den Zellextrakten nur noch Spuren an parentalem AOH bzw. AME detektiert werden konnten, lässt dies auf eine nahezu vollständige Metabolisierung schließen.

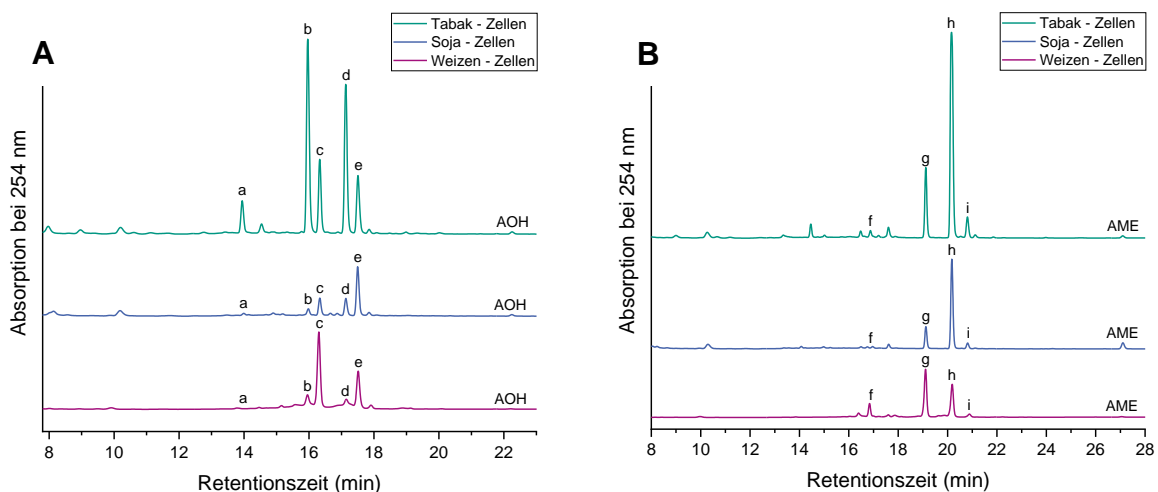


Abb. 16: HPLC-Profil von AOH-Metaboliten (A) und AME-Metaboliten (B) in Zellextrakten aus Tabak-, Soja- und Weizenzellkultursuspensionskulturen nach neuntägiger Inkubation (UV-Detektion bei 254 nm). Die gekennzeichneten Peaks stellen die Hauptmetaboliten von AOH (a-e) bzw. AME (f-i) dar.

Abb. 16 zeigt die Metabolitenprofile von AOH (A) bzw. AME (B) in Extrakten von Tabak-, Soja- und Weizenzellen. Qualitativ bildeten die drei verschiedenen Pflanzensuspensionskulturen die gleichen löslichen Hauptkonjugate, allerdings unterschieden sich die Metabolitenprofile quantitativ. Fünf Peaks konnten als Hauptmetaboliten von AOH (Peaks a–e) bzw. vier Peaks als Hauptmetaboliten von AME (Peaks f–i) identifiziert werden. Sie wiesen Absorptionsmaxima bei ca. 254, 288, 299 und 340 nm (AOH) bzw. 257, 289, 300 und 337 nm (AME) auf und die MS²-Spektren zeigten das *m/z*-Verhältnis von AOH bzw. AME. Die Tabakzellen bildeten im Vergleich zu den Soja- bzw. Weizenzellen die größten Mengen an Metaboliten (Kapitel 4.1.1.4). Da für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie sowohl eine ausreichende Substanzmenge als auch idealerweise hohe Reinheit erforderlich ist, wurde die Tabakzellkultur zur Erzeugung größerer Mengen an Metaboliten ausgewählt.

Die fünf Hauptmetaboliten von AOH (Peaks a-e) und drei der vier Hauptmetaboliten von AME (Peaks f-h) konnten in einer vorangegangenen Arbeit bereits aus den Tabakzellen isoliert und eindeutig mittels NMR-Spektroskopie als 9-*O*-{ β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH (Peak a, AOH-9-Diglucosid), 9-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AOH (Peak b, AOH-9-Glucosid), 3-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AOH (Peak c, AOH-3-Glucosid), 9-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH (Peak d, AOH-6'-Malonyl-9-Glucosid), 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH (Peak e, AOH-6'-Malonyl-3-Glucosid) sowie als 7-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AME (Peak f, AME-7-Glucosid), 3-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AME (Peak g, AME-3-Glucosid) und 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME (Peak h, AME-6'-Malonyl-3-Glucosid) identifiziert werden (Hildebrand *et al.*, 2015). Der vierte AME-Hauptmetabolit (Peak i) wurde im Rahmen dieser Arbeit in ausreichender Menge für NMR-Experimente gewonnen und dessen Struktur aufgeklärt (Kapitel 4.1.1.2). Die Strukturformeln aller AOH- und AME-Metaboliten, die eindeutig mittels NMR-spektroskopischer Methoden identifiziert wurden, sind in Kapitel 10.2 (Abb. 53 und Abb. 54) aufgeführt.

Um zu überprüfen, ob die in den Suspensionszellen gebildeten Metaboliten auch in intakten Pflanzengeweben gebildet werden, wurden Explant-Kulturen von Karotten und Tomaten mit AOH bzw. AME inkubiert. Die jeweiligen Metabolitenprofile sind in Abb. 17 dargestellt. Zum Vergleich ist auch das Metabolitenprofil des Tabakzellkulturextrakts abgebildet.

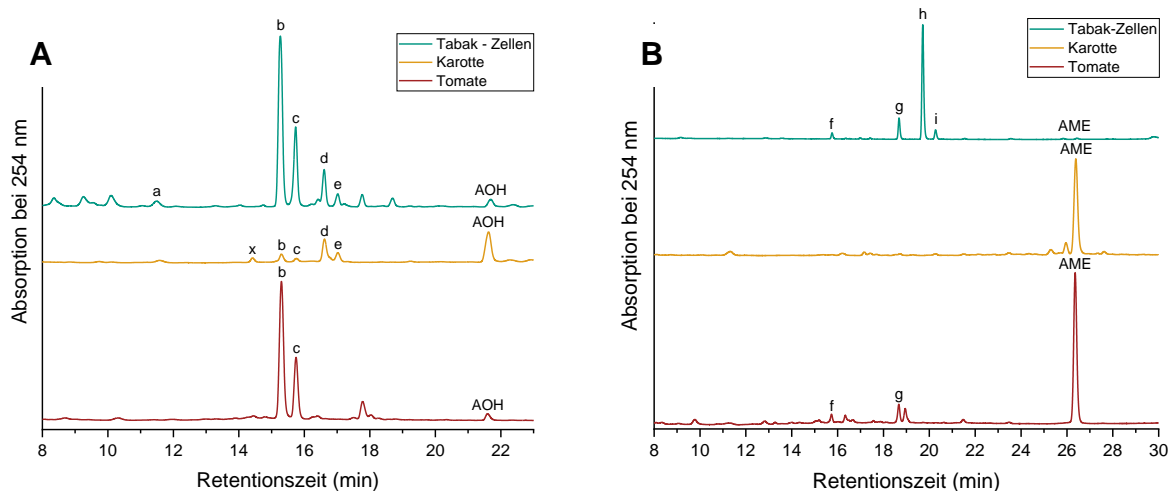


Abb. 17: HPLC-Profil von AOH-Metaboliten (A) und AME-Metaboliten (B) in Extrakten aus Karotten- und Tomaten-Explant-Kulturen nach zweitägiger Inkubation (UV-Detektion bei 254 nm). Die gekennzeichneten Peaks stellen die Hauptmetaboliten von AOH (a-e, x) bzw. AME (f-i) dar.

AOH wurde in beiden Explant-Kulturen aufgenommen und metabolisiert. In der Karotten-Explant-Kultur wurden die beiden Glucoside (Peaks b, c) und ihre 6'-Malonylderivate (Peaks d, e) gebildet. Somit zeigt die Karotten-Explant-Kultur ein qualitativ ähnliches Metabolitenmuster wie die Tabakzellen, jedoch bildeten sich in der Karotten-Explant-Kultur proportional mehr Malonylglucoside als Glucoside und kein Gentiobiose-Konjugat. Ein zusätzlicher Peak wurde im Karottenextrakt bei 14,2 Minuten beobachtet (Peak x). Das UV-Spektrum der Verbindung weist ähnliche Absorptionsmaxima wie AOH auf (Abb. 18 A), weshalb zu vermuten ist, dass es sich hierbei um einen AOH-Metaboliten handelt.

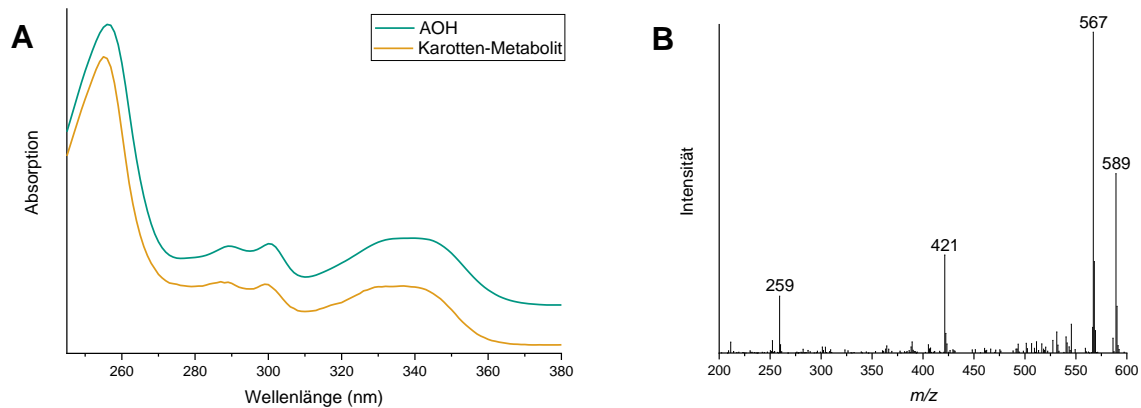


Abb. 18: UV-Spektren von AOH (grün) und dem unbekanntem AOH-Metaboliten (Peak x, orange) (A) und Massenspektrum des unbekanntem AOH-Metaboliten (Peak x) aus der Karotten-Explant-Kultur (B).

Dem Peak konnte anhand des Massenspektrums ein Quasimolekülion mit m/z 567 ($[M+H]^+$) zugeordnet werden (Abb. 18 B), dessen Identität durch ein weiteres Quasimolekülion m/z 589 ($[M+Na]^+$) bestätigt werden konnte. Des Weiteren ist eine Abspaltung (-146 Da), resultierend in m/z 421 ($[AOH+Hexose-H_2O]^+$), sowie eine weitere Abspaltung (-162 Da), resultierend in m/z 259 ($[AOH+H]^+$), erkennbar. Die entsprechende Molekülmasse stimmt sowohl mit AOH-*p*-Cumarylhexosid als auch mit AOH-Rutinosid überein. Aufgrund der konjugierten Doppelbindungen im *p*-Cumarsäure-Molekül weist *p*-Cumarsäure ein spezifisches Absorptionsspektrum auf. Bei einer Bindung an AOH ist im Absorptionsspektrum folglich eine Zunahme der Absorption bei ca. 310 nm zu erwarten, da in diesem Spektralbereich ein Absorptionsmaximum von *p*-Cumarsäure liegt (Kapitel 10.2, Abb. 62). Ein solches Maximum ist in dem UV-Spektrum des unbekanntem Metaboliten nicht zu erkennen. Für eine eindeutige Strukturaufklärung bedarf es NMR-spektroskopischer Analysen (Kapitel 4.1.1.2).

Im Unterschied zu der Karotten-Explant-Kultur wurden in der Tomaten-Explant-Kultur nur die beiden AOH-Glucoside (Peaks b und c), jedoch keine Malonylderivate nachgewiesen (Abb. 17 A). Daraus lässt sich schließen, dass es Unterschiede im Metabolismus gibt, die abhängig von der Enzymausstattung, -spezifität und -aktivität der jeweiligen Pflanze sind.

Im Gegensatz zu AOH wurde AME nur in sehr geringem Umfang von den Explant-Kulturen nach zweitägiger Inkubation metabolisiert (Abb. 17 B). Während in der Tomaten-Explant-Kultur geringe Mengen an AME-7- und AME-3-Glucosid detektiert werden konnten, waren bei Analyse der Karotten-Explant-Kultur keine Metaboliten im Chromatogramm (UV-Detektion) zu erkennen. Lediglich beim Einsatz der MS konnten auf den entsprechenden Massenspuren die beiden Glucoside und Malonylglucoside detektiert werden. Die langsamere

Metabolisierung von AME im Vergleich zu AOH lässt eine geringere Phytotoxizität von AME vermuten. Dieser Sachverhalt lässt sich nach Hildebrand *et al.* (2015) in Bezug auf das Zellwachstum von Tabakzellen nach Inkubation mit AME im Vergleich zu AOH bestätigen.

4.1.1.2 NMR-spektroskopische Analyse der unbekanntem AOH- bzw. AME-Metaboliten

Unbekannter AOH-Metabolit der Karotten-Explant-Kultur (Peak x)

Für die eindeutige Strukturaufklärung des unbekanntem AOH-Metaboliten (Peak x, Abb. 17 A), der in der Karotten-Explant-Kultur gebildet wurde, wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Anknüpfend an eine chromatographische Reinigung des Metaboliten erfolgte die Aufnahme von ^1H -NMR- und HSQC-Spektren. In Abb. 19 sind die zugehörigen NMR-Spektren dargestellt.

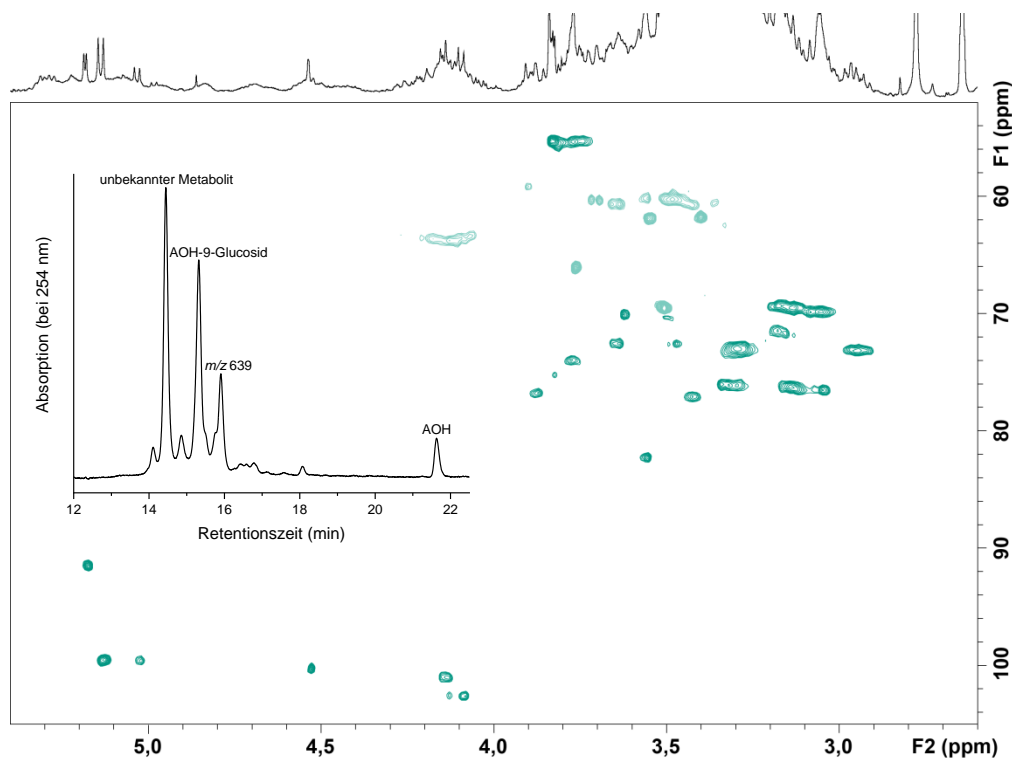


Abb. 19: Kohlenhydratbereich des HSQC-Spektrums des unbekanntem AOH-Metaboliten nach Reinigung aus dem Karotten-Explant-Kultur-Extrakt. Der Einschub zeigt die LC-DAD-Analyse der gemessenen Lösung nach der NMR-Messung (UV-Detektion bei 254 nm).

Auf Basis der zahlreichen Signale im aromatischen sowie im glycosidischen Bereich des HSQC-Spektrums der zuvor aufgereinigten Verbindung (Abb. 19) ist eine Umlagerung oder Zersetzung der Substanz anzunehmen. Daher wurde die Probe nach der NMR-Analyse mittels LC-DAD-MS analysiert. Das erhaltene Chromatogramm (Abb. 19, Einschub) zeigt, dass keine Reinsubstanz mehr vorlag, sondern ein Gemisch aus dem unbekanntem AOH-Metaboliten, AOH-9-Glucosid, freiem AOH sowie einer unbekanntem Substanz mit m/z 639, die weder anhand der Retentionszeit oder der Masse, noch anhand des UV-Spektrums (Maxima bei 233, 280 und 312 nm) identifiziert werden konnte. Daraus lässt sich eine Instabilität des unbekanntem AOH-Metaboliten ableiten. Auch eine weitere chromatographische Aufreinigung des unbekanntem Metaboliten führte zu verunreinigten Spektren.

Zur weiteren Analyse der Verbindung wurde mithilfe homonuklearer J_{res} -NMR-Spektroskopie (^1H - ^1H - J_{res}) nach spezifischen Kopplungskonstanten gesucht. Würde es sich um einen *p*-Cumarsäure-Metaboliten handeln, würden die *trans*-Protonen der Vinyl-Doppelbindung (Positionen α und β) der *p*-Cumarsäure eine skalare Kopplungskonstante von ca. 16 Hz aufweisen. Des Weiteren wäre eine Kopplungskonstante von ca. 6–8 Hz für die vicinale Kopplung der Protonen am Aromaten charakteristisch. Bei der Existenz eines Rutinosids würde ein weiteres anomeres Proton bei ca. 4,5–5,5 ppm mit einer Kopplungskonstante von ca. 7–9 Hz (β -Konfiguration) bzw. 2–5 Hz (α -Konfiguration) erwartet werden. Des Weiteren gäbe es ein Signal für die charakteristische CH_3 -Gruppe des 6-Desoxyzuckers bei ca. 1 ppm mit einer Kopplungskonstante von ca. 6 Hz.

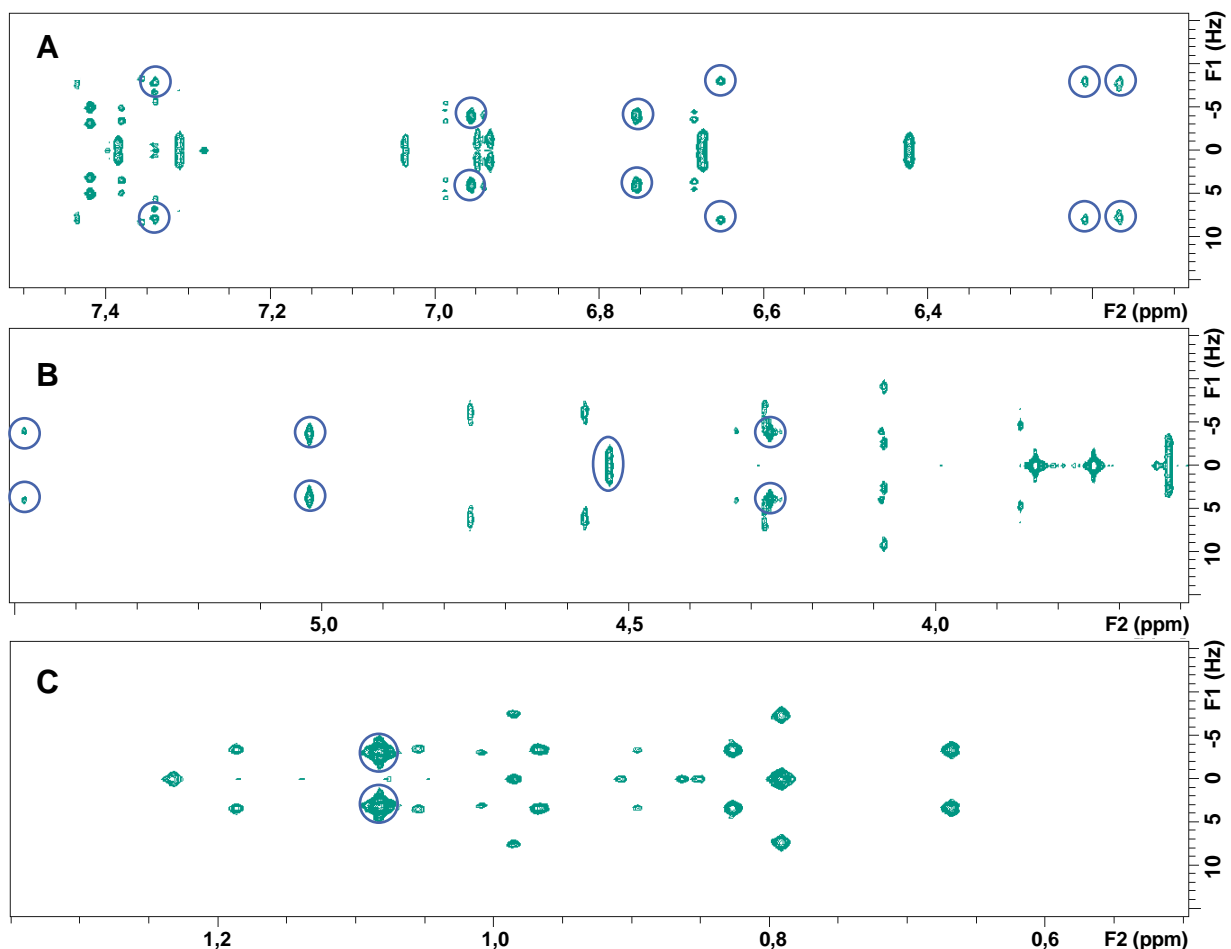


Abb. 20: Aromatischer (A), anomerer (B) und CH_3 -Bereich (C) des J -aufgelösten Spektrums (J_{res}) des unbekanntem AOH-Metaboliten. Die blauen Kreise kennzeichnen die im Text genannten Signale.

Das J_{res} -Spektrum der Verbindung ist in Abb. 20 abgebildet. Im aromatischen Bereich (Abb. 20 A) sind Kopplungskonstanten von ca. 16 Hz bei 7,34 ppm, 6,65 ppm, 6,21 ppm und 6,17 ppm zu erkennen. Des Weiteren treten Kopplungskonstanten von ca. 8 Hz bei 6,96 ppm und 6,76 ppm auf. Es ist möglich, dass diese Signale aus verknüpfter *p*-Cumarsäure stammen. Außerdem konnten im anomeren Bereich (Abb. 20 B) Kopplungskonstanten von ca. 8 Hz bei 5,49 ppm (schwach), 5,02 ppm und 4,27 ppm und von ca. 1,5 Hz bei 4,53 ppm ausgemacht werden. Zusätzlich ist ein Signal bei 1,08 ppm mit einer Kopplungskonstante von ca. 6 Hz zu erkennen, was beides auf eine verknüpfte Rhamnose hindeutet (Abb. 20 C). Weiterhin besteht auch die Möglichkeit der Bildung und Koelution beider Verbindungen. Jedoch müsste dies in

weiteren Analysen untersucht werden. Des Weiteren wäre in zukünftigen Arbeiten eine HRMS-Analyse des Extraktes sinnvoll.

Unbekannter AME-Metabolit der Tabakzellkultur (Peak i)

Für die Strukturaufklärung des unbekanntenen AME-Metaboliten (Peak i) wurden die Zellextrakte mehrerer Inkubationen kombiniert und im präparativen Maßstab chromatographisch fraktioniert. In der HRMS-Analyse zeigte der Metabolit im Full-Scan-Massenspektrum ein Quasimolekülion mit m/z 521,1290 ($[M+H]^+$), was einem AME-Malonylglucosid entspricht. Die Abspaltung von Anhydromalonylglucose (-248 Da) zu einem Fragment mit m/z 273 ($[AME+H]^+$) im MS^2 -Spektrum unterstützt diese Annahme. Zur eindeutigen Identifizierung wurden ein HSQC- sowie ein HMBC-Experiment durchgeführt. Während die NMR-Daten des AME-Anteils relativ ähnlich zu denen des AME-6'-Malonyl-3-Glucosid waren, konnten im Kohlenhydratbereich größere Unterschiede festgestellt werden. Abb. 21 zeigt eine Überlagerung der Kohlenhydratbereiche der HSQC-Spektren von AME-6'-Malonyl-3-Glucosid sowie von dem unbekanntenen Metaboliten (Peak i). Die 1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen der beiden Substanzen sind in Kapitel 10.1 (Tab. 47) aufgeführt.

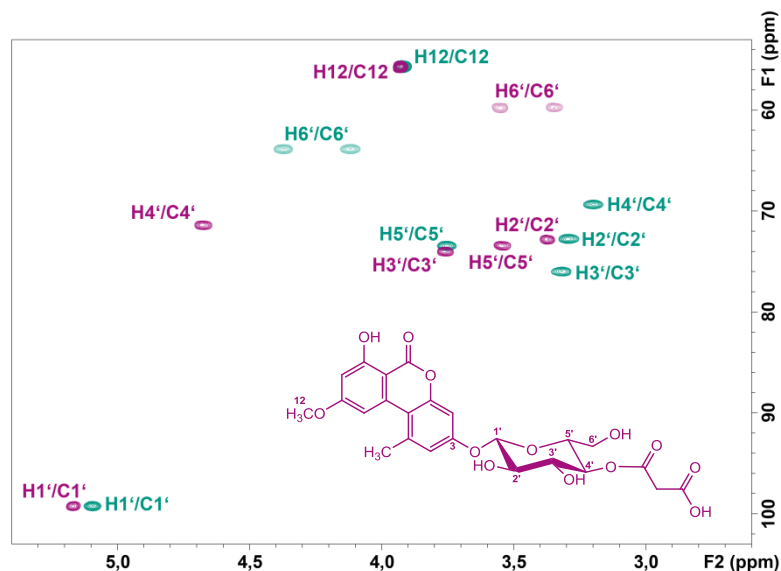


Abb. 21: Überlagerung der Kohlenhydratbereiche der HSQC-Spektren von 3-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME (grün) und des unbekanntenen AME-Metaboliten (lila).

Im Kohlenhydratbereich des unbekanntenen Metaboliten sind eine Tieffeldverschiebung des C/H-4-Korrelationssignals der Glucose sowie eine Hochfeldverschiebung des C/H-6-Korrelationssignals im Vergleich zu AME-6'-Malonyl-3-Glucosid zu beobachten. Dies deutet auf eine Anlagerung der Malonylgruppe an Position 4 der Glucose hin. Nach Auswertung des HMBC-Spektrums konnte diese Annahme anhand der Kopplung des Carbonyl-Kohlenstoffs der Malonsäure und des Protons an Position 4 der Glucose bestätigt werden.

Des Weiteren zeigt ein Korrelationspeak im HMBC-Spektrum zwischen dem anomeren Proton und C3 von AOH die glykosidische Bindung der Glucose an Position 3 von AOH an. Zur Bestimmung der anomeren Konfiguration wurde die Karplus-Beziehung angewandt. Da die Kopplungskonstante des anomeren Protons 7,4 Hz beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass die Glucose in β-Konfiguration vorliegt. Somit wurde der unbekanntene Metabolit

(Peak i) eindeutig als 3-*O*-(4'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME (AME-4'-Malonyl-3-Glucosid) identifiziert.

In der Literatur wurde bereits für Malonylglucoside verschiedener sekundärer Pflanzenstoffe wie z.B. Isoflavone eine Malonylwanderung entlang der Kohlenhydratkette beschrieben. Beispielsweise konnte eine 4 \rightarrow 6-Migration entlang der Glucoseeinheit für Malonylgenistin nachgewiesen werden (Yerramsetty *et al.*, 2011). Daher wurden Lösungen der isolierten AME-Malonylglucoside in Methanol und DMSO auf ihre Stabilität getestet. Beide Verbindungen, AME-6'-Malonyl-3-Glucosid und AME-4'-Malonyl-3-Glucosid, waren innerhalb der Testzeit von bis zu 2 Wochen bei -20 °C stabil.

4.1.1.3 HRMS-Analyse der Zellsuspensionskultur-Extrakte

Neben den eindeutig aufgeklärten AOH- und AME-Hauptmetaboliten konnten mittels HRMS-Analyse insgesamt 21 weitere AOH-Metaboliten und 13 weitere AME-Metaboliten nachgewiesen werden, die in geringeren Mengen gebildet wurden. In den Tab. 1 und Tab. 2 sind die Ergebnisse der HRMS-Analyse für die mit AOH und AME inkubierten Pflanzenzellsuspensionskulturen aufgeführt. Die Datenanalyse wurde sowohl retentionszeitgestützt (ungerichtet) als auch massenspezifisch (gerichtet) durchgeführt, um sowohl auffällige Peaks im UV-detektierten Chromatogramm zu untersuchen als auch hypothetisch denkbare Metaboliten zu finden. Um sowohl im positiven als auch im negativen ionisierbare Verbindungen zu detektieren, wurde in beiden Modi gemessen. Zur Identifizierung eines Metaboliten wurde zunächst die jeweilige Massenspur der exakten Masse aus dem Full-Scan extrahiert und ein „Extracted Ion Chromatogram“ (XIC) erzeugt. Anschließend wurde das Pseudomolekülion unter Berücksichtigung typischer Adduktbildungen (z.B. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+H+ACN]^+$, $[M+HCOO]^-$, $[M+Cl]^-$) ausgewählt und die potentielle Summenformel auf Basis der Massenabweichung bestimmt.

Tab. 1: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung der AOH-Metaboliten, die von Tabak-, Soja- und Weizenzellsuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die bereits mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	m/z $[M+H]^+$ (Da) ¹	m/z $[M-H]^-$ (Da) ¹	Summenformel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
						Tabak	Soja	Weizen	
AOH-1	8,0	583,1658	581,1512	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	+	+	+	AOH-Dihexosid
AOH-2	-	-	743,2040	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-3	11,7	669,1662	667,1516	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	+	+	AOH-Malonyldiglycosid
AOH-4	-	-	743,2040	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-5	-	567,1709	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	+	-	-	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-6	-	-	743,2040	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	+	AOH-Trihexosid
AOH-7	14,0	583,1658	581,1512	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	+	+	+	9- <i>O</i> -{ β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH
AOH-8	-	-	753,1520	C ₃₂ H ₃₄ O ₂₁	16	+	-	+	AOH-Dimalonyldiglycosid
AOH-9	14,6	-	757,1985	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	18	+	+	+	unbekannt
AOH-10	-	-	743,2040	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-11	-	567,1709	565,1563	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-12	-	553,1552	551,1407	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	12	+	-	+	AOH-Pentosylhexosid

4 Ergebnisse und Diskussion

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
						Tabak	Soja	Weizen	
AOH-13	-	567,1709	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-14	-	-	551,1407	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	12	-	+	+	AOH-Pentosylhexosid
AOH-15	-	-	581,1512	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	-	-	+	AOH-Dihexosid
AOH-16	-	-	581,1512	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	-	-	+	AOH-Dihexosid
AOH-17	15,8	-	757,1985	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	18	+	-	+	unbekannt
AOH-18	16,0	421,1129	419,0984	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	11	+	+	+	9- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-AOH
AOH-19	16,3	421,1129	419,0984	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	11	+	+	+	3- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-AOH
AOH-20	-	669,1662	667,1516	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	-	+	AOH-Malonyldiglucosid
AOH-21	-	-	667,1516	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	-	+	AOH- Malonyldiglucosid
AOH-22	17,1	507,1133	505,0988	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	9- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-23	17,5	507,1133	505,0988	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-24	17,9	507,1133	505,0988	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	AOH-Malonylhexosid
AOH-25	18,5	463,1235	461,1090	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	12	+	+	-	AOH-Acetylhexosid
AOH-26	18,7	463,1235	461,1090	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	12	+	+	-	AOH- Acetylhexosid
AOH	22,3	259,0601	257,0456	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	10	+	+	+	AOH

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

Tab. 2: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung der AME-Metaboliten, die von Tabak-, Soja- und Weizenzellensuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die bereits mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
						Tabak	Soja	Weizen	
AME-1	-	-	757,2197	C ₃₃ H ₄₂ O ₂₀	13	+	-	-	AME-Trihexosid
AME-2	-	683,1818	681,1673	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₈	14	+	-	-	AME-Malonyldihexosid
AME-3	-	-	757,2197	C ₃₃ H ₄₂ O ₂₀	13	+	-	-	AME-Trihexosid
AME-4	-	477,1392	-	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	12	+	+	-	AME-Acetylhexosid
AME-5	14,4	597,1814	595,1669	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	12	+	-	-	AME-Dihexosid
AME-6	-	769,1822	767,1677	C ₃₃ H ₃₆ O ₂₁	16	+	-	-	AME-Dimalonyldihexosid
AME-7	16,8	435,1286	433,1141	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	11	+	+	+	7- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-AME
AME-8	-	567,1709	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AME-Pentosylhexosid
AME-9	17,5	769,1822	-	C ₃₃ H ₃₆ O ₂₁	16	+	+	-	AME-Dimalonyldihexosid
AME-10	-	581,1865	-	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	12	-	-	+	AME-Desoxyhexosylhexosid
AME-11	17,8	683,1818	681,1673	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₈	14	+	-	+	AME-Malonyldihexosid
AME-12	19,0	435,1286	433,1141	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	11	+	+	+	3- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-AME
AME-13	20,1	521,1290	519,1144	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	+	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME
AME-14	20,5	521,1290	-	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	-	AME-Malonylhexosid
AME-15	20,7	521,1290	519,1144	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	+	3- <i>O</i> -(4'- <i>O</i> -Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME
AME-16	21,1	521,1290	-	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	-	AME-Malonylhexosid
AME-17	21,8	477,1392	-	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	12	+	+	+	AME-Acetylhexosid
AME	27,0	273,0758	271,0612	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10	+	+	+	AME

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

Durch den Vergleich der theoretischen und experimentellen Isotopenmuster konnte die erhaltene Summenformel zusätzlich bestätigt werden. Spezifische Fragmentierungen, die mittels „Information Dependent Analysis“ (IDA) erhalten wurden, boten weitere Hinweise auf die Identität des jeweiligen Metaboliten.

Die Analysen zeigten, dass neben den bereits bekannten Glucosiden, dem Diglucosid und den Malonylglucosiden auch akkurate Massen, die mit den exakten Massen von Acetylhexosiden, Trihexosiden, Malonyldihexosiden, Dimalonyldihexosiden, Pentosylhexosiden und Desoxyhexosylhexosiden übereinstimmen, gefunden werden konnten. Diese sollen im Folgenden näher betrachtet werden. Die zugehörigen MS/MS-Spektren der einzelnen Verbindungen finden sich in Kapitel 10.2 (Abb. 57–Abb. 59).

Dihexoside

Zusätzlich zu dem bereits aufgeklärten AOH-Gentiobiosid wurden drei weitere AOH-Dihexoside sowie ein AME-Dihexosid anhand der akkuraten Masse von 581,1512 Da ($[\text{AOH}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) bzw. 595,1669 Da ($[\text{AME}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) und anhand des Isotopenmusters bestimmt. Die Abspaltung einer Moleküleinheit mit 324 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 257 ($[\text{AOH}-\text{H}]^-$) bzw. m/z 273 ($[\text{AME}+\text{H}]^+$), unterstützte diese Annahme. Zwischen den verschiedenen MS/MS-Spektren der Dihexoside konnten Unterschiede festgestellt werden. Bei den bei 7,7 und 15,3 Minuten eluierenden AOH-Dihexosiden (AOH-1 und AOH-15) ist zusätzlich noch eine in einem m/z von 419 ($[\text{AOH}+\text{Hexose}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) resultierende Fragmentierung erkennbar, während bei dem AOH-Metaboliten (15,7 Minuten, AOH-16) und dem AME-Metaboliten keine Fragmentierung zu einem AOH- bzw. AME-Hexosid zu erkennen ist. Möglicherweise handelt es sich bei letzteren um verknüpfte Disaccharide, während erstere an zwei verschiedenen Positionen mit jeweils einer Hexose verknüpft sind. Für eine eindeutige Identifizierung sind allerdings NMR-spektroskopische Untersuchungen notwendig. Das bereits eindeutig aufgeklärte AOH-Gentiobiosid wurde von allen drei Zellkulturen gebildet, ebenso wie das AOH-Dihexosid bei 7,7 Minuten (AOH-1). Im Gegensatz dazu wurden die zwei später eluierenden Dihexoside nur von den Weizenzellen und das AME-Dihexosid nur von den Tabakzellen gebildet.

Trihexoside

Die gezielte Suche nach Trihexosiden ergab, dass von den Tabakzellen vier verschiedene AOH-Trihexoside (m/z 743,2040, $[\text{AOH}+3\text{Hexosen}-3\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) gebildet wurden, von denen eines auch in Weizenzellen vorkam. Des Weiteren wurden zwei AME-Trihexoside (m/z 757,2197, $[\text{AME}+3\text{Hexosen}-3\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) in den Tabakzellextrakten gefunden.

Während die Produktionen-Spektren der drei AOH-Trihexoside der Tabakzellen lediglich eine Massenabspaltung einer Moleküleinheit mit 486 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 257 ($[\text{AOH}-\text{H}]^-$) zeigten, war im Produktionenspektrum des vierten AOH-Trihexosids (AOH-6), das auch von den Weizenzellen gebildet wurde, zusätzlich eine Abspaltung von AOH (-258 Da), resultierend in einem m/z von 485 ($[\text{Trisaccharid}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$), zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass ein Trisaccharid an eine Hydroxygruppe des AOH gebunden ist.

In welcher Form die Hexosen bei den anderen drei AOH-Trihexosiden vorliegen, kann hingegen nicht vorhergesagt werden.

Ebenso konnte im MS/MS-Spektrum des bei 12,2 Minuten eluierenden AME-Trihexosids (AME-1) lediglich eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 486 Da, resultierend in Fragmenten mit einem m/z von 271 ($[AME-H]^-$), beobachtet werden, während bei dem später eluierenden AME-Trihexosid (14,0 Minuten, AME-3) eine Abspaltung von AME (-272 Da) zu Fragmenten mit einem m/z von 485 ($[Trisaccharid-H_2O-H]^-$) beobachtet werden konnte. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass ein Trisaccharid an eine Hydroxygruppe von AME gebunden vorliegt.

Malonylhexoside

Zusätzlich zu den beiden bereits aufgeklärten AOH-Malonylglucosiden konnte in allen drei Zellkulturen ein weiteres AOH-Malonylhexosid anhand der akkuraten Masse von 505,0988 Da ($[AOH+Hexose-H_2O+Malonyl-H]^-$) und dem Isotopenmuster detektiert werden. Im MS/MS-Spektrum der Verbindung war zunächst eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 44 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 461 ($[AOH+Hexose-H_2O+Acetyl-H]^-$), erkennbar. Des Weiteren waren Abspaltungen von Moleküleinheiten mit 86 Da (resultierend in Fragmenten mit m/z 419 ($[AOH+Hexose-H_2O-H]^-$)) und 248 Da (resultierend in Fragmenten mit m/z 257 ($[AOH-H]^-$)) zu sehen, die ein weiteres Indiz dafür sind, dass es sich um ein Malonylhexosid handelt. Genaue Verknüpfungspositionen können allerdings mittels HRMS-Messungen nicht bestimmt werden und müssen mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden.

Auch aus den Inkubationsansätzen mit AME konnten zwei weitere Malonylhexoside anhand der akkuraten Masse 521,1290 Da ($[AOH+Hexose-H_2O+Malonyl+H]^+$) und dem Isotopenmuster detektiert werden. Die MS/MS-Spektren beider Verbindungen zeigten eine charakteristische Abspaltung von Anhydromalonylhexose (-248 Da) zu Fragmenten mit m/z 273 ($[AME+H]^+$), wobei die Verknüpfungsposition jedoch nicht bestimmt werden kann. Beide Verbindungen wurden sowohl von Tabak- als auch von Sojazellen gebildet, jedoch nicht von den Weizenzellen.

Acetylhexoside

Jeweils zwei Acetylhexoside wurden anhand der akkuraten Massen 463,1235 Da ($[AOH+Hexose-H_2O+Acetyl+H]^+$) bzw. 477,1392 Da ($[AME+Hexose-H_2O+Acetyl+H]^+$) und anhand des Isotopenmusters als Metaboliten von AOH und AME bestimmt. Die UV-Spektren von drei der vier Verbindungen zeigten charakteristische Maxima von AOH bzw. AME. Die Intensität im UV-detektierten Chromatogramm war für eines der beiden AME-Acetylhexoside zu gering, um ein UV-Spektrum zu erhalten. Bei allen vier Metaboliten konnten im MS/MS-Spektrum Abspaltungen von Anhydroacetylhexose (-204 Da) zu Fragmenten mit m/z 257 ($[AOH-H]^-$) bzw. m/z 273 ($[AME+H]^+$) beobachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich um Acetylhexoside handelt. Über die Verknüpfungsstellen kann mittels HRMS allerdings keine eindeutige Aussage getroffen werden. In den Tabak- und Sojazellen kamen alle vier Acetylhexoside vor, während in den Weizenzellen lediglich ein AME-Acetylhexosid in geringen Mengen detektiert werden konnte.

Malonyldihexoside

Neben der Bildung von Malonylglucosiden sind ebenso Malonyldihexoside als AOH- bzw. AME-Metaboliten denkbar. Daher wurde eine gezielte Suche nach m/z 667,1516 ($[\text{AOH}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}+\text{Malonyl-H}]^-$) und m/z 681,1673 ($[\text{AME}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}+\text{Malonyl-H}]^-$) durchgeführt. Diese zeigte das Vorliegen von drei Malonyldihexosiden für AOH und von zwei Malonyldihexosiden für AME. Lediglich das bei 11,7 Minuten eluierende AOH-Malonyldihexosid (AOH-3) wurde in allen drei Zellkultursystemen gebildet. Die restlichen Malonyldihexoside von AOH und AME wurden alle in den Tabakzellextrakten gefunden. Diese waren auch bis auf das AME-Dimalonylhexosid bei 13,3 Minuten (AME-2) in den Weizenzellextrakten vorhanden. Die Identität der Malonylhexoside wurde sowohl anhand der jeweiligen Isotopenmuster als auch anhand der Abspaltungen von Anhydromalonyldihexose (-410 Da) bestätigt. Des Weiteren konnten bei zwei der AOH-Malonyldihexosiden (AOH-3, AOH-20) sowie bei einem der AME-Malonyldihexosiden (AME-2) Abspaltungen von Anhydromalonylhexose (-248 Da), resultierend in Fragmenten mit m/z 419 bzw. 435, beobachtet werden. Das bei 17,8 Minuten eluierende AME-Malonyldihexosid (AME-11) zeigte eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 162 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 521. Im Gegensatz dazu waren bei dem MS/MS-Spektrum des bei 16,8 Minuten eluierenden AOH-Malonyldihexosids (AOH-21) keine Fragmente von AOH-Hexosid oder AOH-Malonylhexosid erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass bei AOH-21 ein malonyliertes Disaccharid an eine Hydroxygruppe gebunden ist, wohingegen bei den anderen Malonyldihexosiden (AOH-3, AOH-20, AME-11) eine Verknüpfung an zwei verschiedenen Hydroxygruppen denkbar ist. Eine eindeutige Aussage über die Verknüpfungspositionen ist jedoch wiederum nur mittels NMR-Spektroskopie möglich.

Dimalonyldihexoside

Mittels gerichteter Analyse konnten für AOH ein (m/z 753,1520 Da, $[\text{AOH}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}+2\text{Malonyl-H}]^-$) und für AME zwei Dimalonyldihexoside (m/z 769,1822 Da, $[\text{AME}+2\text{Hexosen}-2\text{H}_2\text{O}+2\text{Malonyl-H}]^+$) als pflanzliche Metaboliten detektiert werden. Sowohl die Isotopenmuster als auch die Abspaltungen von Anhydromalonylhexose (-248 Da) und Anhydrodimalonyldihexose (-496 Da) im MS/MS-Spektrum sprechen dafür, dass es sich um Dimalonyldihexoside handelt. Das AOH-Dimalonyldihexosid konnte sowohl in den Tabak- als auch in den Weizenzellextrakten detektiert werden. Beide AME-Dimalonyldihexoside waren in den Tabakzellextrakten vorhanden, wohingegen nur das bei 17,6 Minuten eluierende AME-Dimalonyldihexosid (AME-9) auch in den Sojazellen gefunden wurde. In den Weizenzellen wurden keine AME-Dimalonyldihexoside unter den eingesetzten Inkubations- und Extraktionsbedingungen nachgewiesen. Für weitere Strukturinformationen werden größere Substanzmengen für NMR-spektroskopische Untersuchungen benötigt.

Pentosylhexoside

Die mittels HRMS detektierten Chromatogramme der Pflanzenzellkulturextrakte wurden auch auf das Vorkommen von Pentosylhexosiden untersucht. In den Extrakten der mit AOH inkubierten Pflanzenzellen konnten zwei verschiedene Pentosylhexoside (m/z 551,1407 Da, $[\text{AOH}+\text{Hexose}-\text{H}_2\text{O}+\text{Pentose}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$) gefunden werden, während von den mit AME

inkubierten Pflanzenzellen lediglich ein Pentosylhexosid (m/z 567,1709 Da, $[\text{AME}+\text{Hexose}-\text{H}_2\text{O}+\text{Pentose}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) gebildet wurde. Dies wurde anhand der Isotopenmuster und der Abspaltung einer Moleküleinheit mit 294 Da (Hexose + Pentose) im MS/MS-Spektrum bestätigt. Aufgrund keiner einzelnen Abspaltung von Hexose oder Pentose in den MS/MS-Spektren der AOH-Pentosylhexoside ist das Vorhandensein eines Disaccharids wahrscheinlich. Hingegen konnte im MS/MS-Spektrum des AME-Pentosylhexosids eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 132 Da (Pentose), resultierend in Fragmenten mit m/z 435 (AME-Hexosid) beobachtet werden. Daher ist bei dem AOH-Pentosylhexosid auch eine Verknüpfung der Monosaccharide an zwei verschiedenen Hydroxygruppen vorstellbar. Allerdings müsste dies NMR-spektroskopisch bestätigt werden. Alle drei Pentosylhexoside wurden in den Weizenzellen gebildet. In den Tabak- und Sojazellen konnte lediglich jeweils ein AOH-Pentosylhexosid detektiert werden.

Desoxyhexosylhexoside

Eine weitere gerichtete Analyse nach Desoxyhexosylhexosiden von AOH und AME zeigte für AOH drei entsprechende Metaboliten (m/z 567,1709 Da, $[\text{AOH}+\text{Hexose}+\text{Desoxyhexose}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) und für AME einen Metaboliten (m/z 581,1865 Da, $[\text{AME}+\text{Hexose}+\text{Desoxyhexose}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$), die anhand des Isotopenmusters und der Abspaltung einer Moleküleinheit mit 308 Da (Desoxyhexose+Hexose) im MS/MS-Spektrum identifiziert wurden. In dem Sojazellextrakt konnte keine der genannten Verbindungen beobachtet werden, wohingegen im Tabakzellextrakt ein AOH-Desoxyhexosylhexosid detektiert wurde. Die restlichen zwei AOH- und das AME-Desoxyhexosylhexosid wurden im Weizenzell-extrakt detektiert. Interessanterweise unterscheiden sich die MS/MS-Spektren der Verbindungen aus den Weizenzellen und dem AOH-Desoxyhexosylhexosid aus den Tabakzellen. Das AOH-Desoxyhexosylhexosid der Tabakzellen (AOH-5) weist zunächst eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 162 Da (Hexose) auf und anschließend mit 146 Da (Desoxyhexose), resultierend in Fragmenten mit m/z 405 ($[\text{AOH}+\text{Desoxyhexose}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) und m/z 259 ($[\text{AOH}+\text{H}]^+$). Im Gegensatz dazu ist bei allen Desoxyhexosylhexosiden der Weizenzellen zunächst eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 146 Da zu Fragmenten der jeweiligen Hexoside und anschließend eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 162 Da zu den Fragmenten $[\text{AOH}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{AME}+\text{H}]^+$ zu sehen. Dies deutet auf strukturelle Unterschiede hin, je nachdem von welcher „Pflanze“ das Desoxyhexosylhexosid gebildet wird. Für weitere Strukturinformationen sind allerdings NMR-spektroskopische Untersuchungen nötig.

Unbekannte Metaboliten

Eine ungerichtete Analyse ergab zwei weitere bislang unbekannte AOH-Metaboliten, die beide sowohl in Tabak- als auch in Weizenzellen vorkommen. Einer der beiden Metaboliten wird auch von Sojazellen gebildet. Die UV-Spektren beider Substanzen weisen charakteristische Maxima für AOH auf. Des Weiteren konnten ein m/z von 757,1985 Da, ein DBÄ von 18 und daraus resultierend eine Summenformel von $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$ für die unbekannte Substanz ermittelt werden. Das MS/MS-Spektrum zeigt jeweils Abspaltungen einer Moleküleinheit mit 258 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 499, und eine weitere Abspaltung einer Moleküleinheit mit m/z 242 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 257

([AOH-H]). Da das Fragmentierungsmuster nicht auf Kohlenhydratbasierte Metaboliten hinweist und auch weitere häufig vorkommende Konjugate ausgeschlossen werden konnten, kann die Struktur der Verbindungen an dieser Stelle nicht weiter aufgeklärt werden. Auch hierfür bedarf es NMR-spektroskopischer Analysen.

Zusammenfassung

Es lässt sich zusammenfassen, dass Glykosylierungen und Malonylkonjugationen sowie Acetylierungen in Tabak-, Soja- und Weizenzellen die wichtigsten Biotransformationswege darstellen, um AOH und AME zu entgiften. Außerdem fällt auf, dass AOH in den Tabak- und Weizenzellen umfangreich metabolisiert wird (Bildung von 21 bzw. 20 Metaboliten), wohingegen in den Sojazellen lediglich 13 Metaboliten gebildet wurden. Im Gegensatz dazu wurde AME in den Tabakzellen zu 15 Metaboliten umgesetzt, wogegen in den Soja- und Weizenzellen lediglich 9 Metaboliten detektiert werden konnten. Über die Identität der verknüpften Zucker in den mittels HRMS aufgeklärten Strukturen lassen sich an dieser Stelle nur Vermutungen aufstellen. Typischerweise werden Fremdstoffe zur Detoxifizierung mit der Hexose Glucose konjugiert. Darüber hinaus werden pflanzeigene Stoffe wie beispielsweise Flavonoide häufig auch mit Rhamnose, Galactose, Arabinose oder Xylose zur Speicherung verknüpft. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den mittels HRMS aufgeklärten Metaboliten um Acetylglucoside, Triglucoide, Malonyldiglucoide, Dimalonyldiglucoide, Pentosylglucoside (eventuell Arabinosyl- oder Xylosyl-) und Rhamnosylglucoside (Rutinoside) handelt (Tiwari *et al.*, 2013). Für eine eindeutige Identifizierung aller Metaboliten bedarf es allerdings NMR-spektroskopischer Analysen, um Kohlenhydrattyp, vor allem jedoch Verknüpfungspositionen sowie Konfigurationen zu ermitteln.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine große Bandbreite verschiedenster Konjugate gebildet wird, die bei der Sicherheitsbewertung von mykotoxinbelasteten Lebens- und Futtermitteln beachtet werden sollten.

4.1.1.4 Semiquantitative Analyse der pflanzlichen AOH- und AME-Metaboliten

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben, gestaltet sich die Quantifizierung von AOH- und AME-Metaboliten als schwierig, da bislang noch keine Standardsubstanzen für die neu aufgeklärten Metaboliten zur Verfügung stehen. Daher wurde in diesem Versuch eine UV-basierte semiquantitative Abschätzung auf Basis der molaren Extinktionskoeffizienten von AOH bzw. AME durchgeführt. Da viele der Metaboliten nur in Spuren enthalten waren und die Bestimmungsgrenze zu hoch war, konnten einige der Metaboliten nicht bei der Quantifizierung miteinbezogen werden.

Abb. 22 zeigt Säulendiagramme mit den jeweiligen Peakflächenverteilung der Hauptmetaboliten von AOH (Abb. 22 A) und AME, die in den drei Pflanzenzellsuspensionskulturen gebildet wurden (Abb. 22 B). Dabei fallen pflanzenspezifische Unterschiede auf. Beispielsweise werden in Sojazellen bevorzugt AOH-Malonylglucoside gebildet, während in Tabak- und Weizenzellen mehr als die Hälfte der Metaboliten nicht-malonyliert vorliegen.

4 Ergebnisse und Diskussion

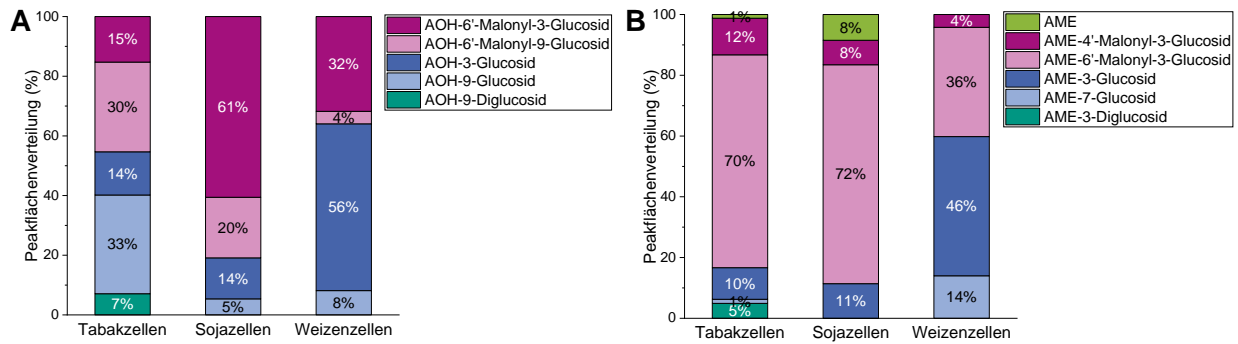


Abb. 22: Peakflächenverteilung der AOH-Metaboliten (A) und AME-Metaboliten (B) in den Tabak-, Soja- und Weizenzellkulturen.

Des Weiteren zeichnen sich die in der Tabakzellkultur gebildeten Metaboliten dadurch aus, dass bevorzugt die Hydroxygruppe an Position 9 des AOH glucosyliert wird, während in den Soja- und Weizenzellkulturen ein größerer Anteil der Metaboliten (Glucoside und Malonylglucoside) an Position 3 glucosyliert wurde. Dies kann auf pflanzenspezifische Unterschiede in der Enzymausstattung, Enzymspezifität oder Enzymaktivität zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich in den mit AME inkubierten Tabakzellen eine sehr ähnliche Metabolitenverteilung wie in den Sojazellen. Mit 70 bzw. 72 % stellt das AME-6'-Malonyl-3-Glucosid den Hauptmetaboliten dar. Bei den Weizenzellen ist das Metabolitenprofil von AME dem von AOH in der gleichen Zellkultur sehr ähnlich. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zellkulturen setzt sich der Hauptanteil der AME-Metaboliten in den Weizenzellen aus den beiden Glucosiden zusammen.

Die nach semiquantitativer Auswertung bestimmten Wiederfindungen für das eingesetzte AOH bzw. AME in Form ihrer Metaboliten bzw. in freier Form sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Wiederfindung der im Zellkulturversuch eingesetzten AOH- bzw. AME-Menge in Tabak-, Soja- und Weizenzellen sowie deren Medien

	Wiederfindung der im Zellkulturversuch eingesetzten AOH-Menge (%)	Wiederfindung der im Zellkulturversuch eingesetzten AME-Menge (%)
Tabak	78	37
Soja	15	18
Weizen	28	15

Während sich im Extrakt sowie im Medium der mit AOH inkubierten Tabakzellen 78 % der eingesetzten AOH-Menge als Summe der Metaboliten wiederfinden lässt, konnten in den Soja- und Weizenzellen lediglich 15 bzw. 28 % semiquantitativ bestimmt werden. Ebenso wurde bei den mit AME inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen eine relativ geringe Gesamtwiederfindung von AME in Form der Metaboliten bzw. als freies AME ermittelt. Mögliche Ursachen hierfür können unter anderem die Quantifizierung auf Basis des molaren Extinktionskoeffizienten von AOH bzw. AME oder die schlechte Löslichkeit der Mykotoxine sein, sodass trotz Optimierung mit den verwendeten Extraktions- und Lösungsmitteln nicht alle Metaboliten erfasst wurden. Eine weitere Möglichkeit ist allerdings auch die Einlagerung der Mykotoxine in die Zellwand unter Bildung unlöslicher Konjugate (Kapitel 4.5) sowie ein eventueller Abbau der Mykotoxine zu unbekanntem, hier nicht detektierten Substanzen.

4.1.2 Pflanzliche Konjugate von ZEN

4.1.2.1 Metabolitenprofile der verschiedenen Zellsuspensionskulturen

Ebenso wie bei den Versuchen mit AOH bzw. AME wurden die mit ZEN inkubierten in Suspension vorliegenden Tabak-, Soja- und Weizenzellen vom Medium getrennt und extrahiert. Sowohl die Inkubationsmedien als auch die Zellextrakte wurden anschließend mittels LC-DAD-MS analysiert. In den Inkubationsmedien waren nur noch Spuren von ZEN messbar, weshalb von einer relativ guten Mykotoxinaufnahme in die Zellen ausgegangen werden kann. In den Zellextrakten waren außerdem nur noch Spuren von parentalem ZEN vorhanden, was auf eine nahezu vollständige Metabolisierung schließen lässt. Allerdings konnten in den Inkubationsmedien ZEN-Metaboliten detektiert werden, die vermutlich von den Zellen wieder ausgeschieden wurden.

In Abb. 23 sind die Metabolitenprofile von ZEN in den Extrakten aus Tabak-, Soja- und Weizenzellen bei 280 nm (Abb. 23 A) und 239 nm (Abb. 23 B) dargestellt. Ebenso wie bei AOH und AME sind pflanzenspezifische Unterschiede im Metabolitenprofil zu erkennen. Sowohl quantitativ als auch qualitativ konnten unterschiedliche Metaboliten in den verschiedenen Pflanzzellkulturen detektiert werden. Die Tabakzellen bildeten im Vergleich zu den Soja- bzw. Weizenzellen ähnlich wie bei den Inkubationen mit AOH bzw. AME die größten Mengen an ZEN-Metaboliten. Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie bietet sich somit die Tabakzellkultur zur Erzeugung größerer Mengen an Metaboliten an.

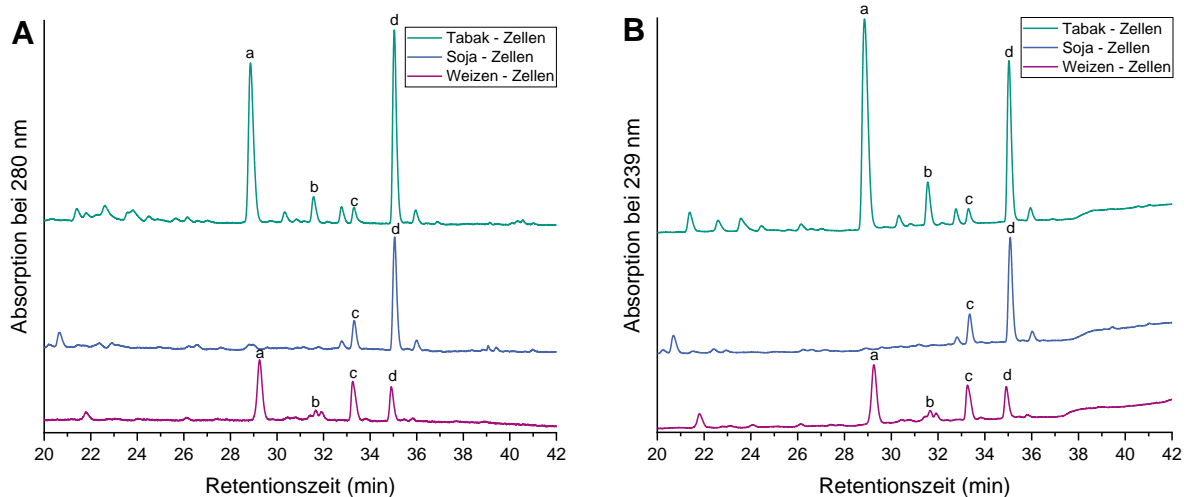


Abb. 23: HPLC-Profilen von ZEN-Metaboliten in Zellextrakten aus Tabak-, Soja- und Weizenzellkulturen nach neuntägiger Inkubation (UV-Detektion bei 280 nm (A) und 239 nm (B)). Die gekennzeichneten Peaks stellen die Hauptmetaboliten von ZEN (a-d) dar.

Allerdings konnten in den Extrakten der Soja- und Weizenzellen zusätzliche Metaboliten anhand der Massenspektren identifiziert werden, weshalb auch Soja- und Weizenzellkulturen im größeren Maßstab mit ZEN inkubiert wurden und deren Extrakte mit den Tabakzell-extrakten für die chromatographische präparative Aufreinigung vereinigt wurden. Bezüglich der Intensitäten der einzelnen Peaks ist außerdem zu beachten, dass diese je nach gewählter Wellenlänge unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Abb. 23 A und B). Dies resultiert aus den unterschiedlichen Absorptionsspektren der Metaboliten (Abb. 24).

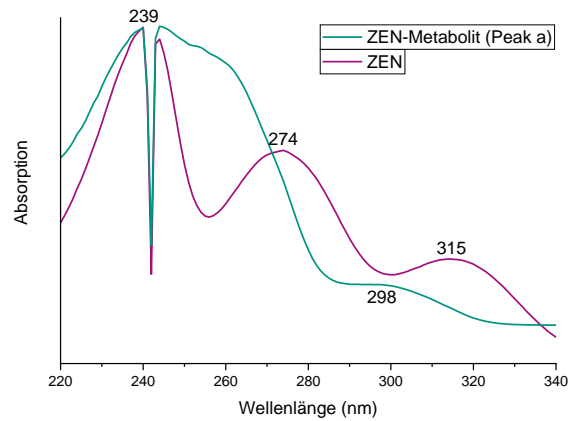


Abb. 24: UV-Spektren von ZEN (lila) und dem ZEN-Metaboliten (Peak a) (grün).

Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren der AOH- und AME-Metaboliten, beeinflusst die Verknüpfungsposition z.B. von Zuckern das Absorptionsspektrum von ZEN, weshalb eine Quantifizierung auf Basis des Absorptionsmaximums von ZEN bei 280 nm unter der Annahme ähnlicher Extinktionskoeffizienten nicht möglich ist. ZEN weist Absorptionsmaxima bei ca. 239 nm, 274 nm und 314 nm auf (Abb. 24), während beispielsweise einer der ZEN-Metaboliten (Peak a) zwei Absorptionsmaxima bei ca. 239 nm und 298 nm aufweist. Daher wurde für die semiquantitative Analyse eine Kalibrierung mit ZEN bei 239 nm durchgeführt (Kapitel 4.1.2.4).

Für eine erste Charakterisierung der ZEN-Metaboliten wurden die LC-DAD-MS-Daten herangezogen. Anhand der m/z -Verhältnisse sowie der Fragmentierungen im MS^2 -Modus der intensitätsstärkeren Peaks konnten die Peaks a–d als ZEN-Hexoside (a und c) und ZEN-Malonylhexoside (b und d) identifiziert werden. In der Literatur wurden bereits zwei ZEN-Hexoside als ZEN-14- und ZEN-16-Glucosid eindeutig identifiziert (Kamimura, 1986; Kovalsky Paris *et al.*, 2014; Borzekowski *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu konnten Malonylglucoside bisher nur mittels massenspektrometrischer Analyse charakterisiert, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Da dementsprechend keine Referenzsubstanzen für die Identifizierung zur Verfügung standen, wurden NMR-spektroskopische Analysen von allen Verbindungen durchgeführt, die in ausreichender Menge präparativ gewonnen werden konnten, um Verknüpfungsarten und -positionen sowie die Zuckerart zu bestimmen (Kapitel 4.1.2.3). Des Weiteren konnten mithilfe von HRMS-Untersuchungen weitere Metaboliten, die in geringeren Konzentrationen gebildet wurden, charakterisiert werden (Kapitel 4.1.2.2).

4.1.2.2 HRMS-Analyse der Zellsuspensionskultur-Extrakte

Mittels HRMS-Analyse konnten insgesamt 27 pflanzliche Metaboliten von ZEN detektiert werden. Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die in den drei verschiedenen Pflanzensuspensionskulturen gebildeten Metaboliten. Ebenso wie bei AOH und AME erfolgte die Datenanalyse sowohl gezielt als auch ungezielt. Unter Berücksichtigung des detektierten m/z sowie möglicher Addukte, des Isotopenmusters und spezifischer Fragmentierungen wurden die jeweiligen Verbindungen charakterisiert.

Tab. 4: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung von ZEN-Metaboliten, die in Tabak-, Soja- und Weizenzellensuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
						Tabak	Soja	Weizen	
ZEN-1	-	-	643,2608	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₅	9	+	-	-	ZEL-Dihexosid
ZEN-2	-	-	643,2608	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₅	9	+	-	+	ZEL-Dihexosid
ZEN-3	-	805,3125	803,2980	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	+	-	-	ZEN-Trihexosid
ZEN-4	24,5	483,2225	481,2080	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	+	+	ZEL-Hexosid
ZEN-5	-	729,2601	727,2455	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₈	12	+	-	+	ZEN-Malonyldihexosid
ZEN-6	25,4	483,2225	481,2080	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	+	+	ZEL-Hexosid
ZEN-7	26,3	643,2597	641,2451	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	+	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-8	-	-	613,2502	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₄	9	-	-	+	ZEL-Pentosylhexosid
ZEN-9	-	-	803,2980	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	-	-	+	ZEN-Trihexosid
ZEN-10	-	-	627,2659	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₄	9	-	-	+	ZEL-Desoxyhexosylhexosid
ZEN-11	-	613,2491	611,2346	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₄	10	+	-	+	ZEN-Pentosylhexosid
ZEN-12	27,8	569,2229	567,2083	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-13	-	-	803,2980	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	-	-	+	ZEN-Trihexosid
ZEN-14	-	-	567,2083	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	-	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-15	-	-	641,2451	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	-	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-16	30,4	481,2069	479,1923	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	9	+	+	+	ZEN-Hexosid
ZEN-17	31,2	569,2229	567,2083	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-18	-	-	481,2080	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	-	+	ZEL-Hexosid
ZEN-19	-	627,2648	625,2502	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₄	10	-	-	+	ZEN-Desoxyhexosylhexosid
ZEN-20	-	-	611,2346	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₄	10	+	-	+	ZEN-Pentosylhexosid
ZEN-21	32,2	-	641,2451	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	-	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-22	32,4	567,2072	565,1927	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃	11	+	+	+	ZEN-Malonylhexosid
ZEN-23	33,3	-	567,2083	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-24	33,9	481,2069	479,1923	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	9	+	+	+	ZEN-Hexosid
ZEN-25	-	729,2601	727,2455	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₈	12	-	-	+	ZEN-Malonyldihexosid
ZEN-26	35,5	567,2072	567,2083	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃	11	+	+	+	ZEN-Malonylhexosid
ZEN-27	-	-	521,2029	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	10	+	+	+	ZEN-Acetylhexosid
ZEN	41,2	319,1540	317,1395	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	8	+	+	+	ZEN

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

Mithilfe gerichteter sowie ungerichteter Datenanalyse konnten Hexoside, Di- und Trihexoside, Acetyl- und Malonylhexoside, Malonyldihexoside, Pentosylhexoside und Desoxyhexosylhexoside identifiziert werden, welche im Folgenden näher betrachtet werden. Die zugehörigen MS/MS-Spektren der einzelnen Verbindungen finden sich in Kapitel 10.2 (Abb. 60 und Abb. 61).

Hexoside

Mittels gerichteter Analyse konnten insgesamt zwei ZEN-Hexoside (m/z 479,1923, [ZEN+Hexose-H₂O-H]⁻) sowie drei ZEL-Hexoside (m/z 481,2080, [ZEL+Hexose-H₂O-H]⁻) detektiert werden. Sowohl die Isotopenmuster der Verbindungen als auch die Abspaltung einer Moleküleinheit mit 162 Da (Hexose) im MS/MS-Spektrum bestätigen das Vorhandensein von Hexosiden. Die beiden ZEN-Hexoside entsprechen den Peaks a und c in Abb. 23, die in allen drei Zellkultursystemen gebildet wurden. Sie konnten in ausreichender Menge für

NMR-spektroskopische Analysen gewonnen werden. Deren eindeutige Identifizierung als ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid ist in Kapitel 4.1.2.3 beschrieben. Im Gegensatz dazu wurden die drei ZEL-Hexoside in geringeren Mengen gebildet. Die beiden „früh“ eluierenden ZEL-Hexoside (24,5 und 25,4 Minuten, ZEN-4 und ZEN-6) konnten in allen drei Zellkultursystemen nachgewiesen werden, wohingegen das später eluierende ZEL-Hexosid (31,7 Minuten, ZEN-18) lediglich in den Tabak- und Weizenzellextrakten detektiert werden konnte. Beide ZEL-Hexoside weisen ein ähnliches UV-Spektrum wie das ZEN-16-Glucosid auf (Absorptionsmaxima bei ca. 260 und 300 nm). Davon unterscheidet sich allerdings das UV-Spektrum des ZEN-14-Glucosids (Absorptionsmaxima bei ca. 270 und 315 nm). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Hexose in den ZEL-Hexosiden an Position 16 gebunden ist. Eine Identifizierung des α - oder β -ZEL-Stereoisomers bei den ZEL-Hexosiden ist aufgrund fehlender Standardsubstanzen nicht möglich. NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten aufgrund Substanzmangels von den ZEL-Hexosiden nicht durchgeführt werden.

Dihexoside

Neben den Hexosiden konnten auch drei Dihexoside von ZEN (m/z 641,2451, [ZEN+2Hexosen-2H₂O-H]⁻) und zwei Dihexoside von ZEL (m/z 643,2608, [ZEN+2Hexosen-2H₂O-H]⁻) nachgewiesen werden. Während in den Sojazellen keine Dihexoside gebildet wurden, wurden in den Extrakten der Tabakzellen beide ZEL-Dihexoside sowie ein ZEN-Dihexosid gefunden. Die Weizenzellen bildeten ein ZEL-Dihexosid sowie alle drei ZEN-Dihexoside. Die MS/MS-Spektren aller fünf Verbindungen zeigten die Abspaltung einer Moleküleinheit mit 324 Da (auf Hexose basierendes Disaccharid), resultierend in Fragmenten mit m/z 317 ([ZEN-H]⁻) bzw. m/z 319 ([ZEL-H]⁻). Weitere Abspaltungen konnten nicht beobachtet werden, was auf das Vorliegen von Disacchariden hindeutet. Eindeutige Strukturinformationen können allerdings nur mittels NMR-Spektroskopie gewonnen werden, wofür größere Substanzmengen benötigt werden.

Trihexoside

Die gezielte Suche nach Trihexosiden zeigte das Vorliegen eines ZEN-Trihexosids in dem Tabakzellextrakt sowie von zwei ZEN-Trisacchariden in dem Weizenzellextrakt (m/z 803,2980, [ZEN+3Hexosen-3H₂O-H]⁻). Die experimentellen und berechneten Isotopenmuster stimmen überein. In Sojazellen konnten hingegen keine Trihexoside gefunden werden. Die MS/MS-Spektren der ZEN-Trihexoside zeigten alle eine Abspaltung von Moleküleinheiten mit 486 Da (auf Hexose basierendes Trisaccharid), resultierend in Fragmenten mit m/z 317 ([ZEN-H]⁻), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ZEN-Trisaccharide handelt. Weitere Aussagen über die Strukturen können mittels der HRMS-Analyse allerdings nicht getroffen werden.

Acetylhexoside

In allen drei Zellkulturen konnte eine akkurate Masse von 521,2029 Da ([ZEN+Acetyl+Hexose-H₂O-H]⁻) bei 36,3 Minuten detektiert werden. Aufgrund des Isotopenmusters und der Abspaltung von Anhydroacetylhexose (-204 Da), resultierend in Fragmenten mit m/z 317

([ZEN-H]⁻), ist davon auszugehen, dass ein ZEN-Acetylhexosid vorliegt. Da dieses allerdings nur in Spuren vorkam, konnte keine NMR-spektroskopische Analyse durchgeführt werden.

Malonylhexoside

Insgesamt konnten mittels gerichteter Analyse zwei ZEN-Malonylhexoside (m/z 565,1927, [ZEN+Malonyl+Hexose-H₂O-H]⁻) sowie vier ZEL-Malonylhexoside (m/z 567,2083, [ZEL+Malonyl+Hexose-H₂O-H]⁻) detektiert werden. Während alle sechs Verbindungen in den Tabak- und Weizenzellen gebildet wurden, konnten in dem Sojazellextrakt zwar alle ZEN-Malonylhexoside, allerdings nur drei der vier ZEL-Malonylhexoside gefunden werden. Anhand der Isotopenmuster der Verbindungen sowie anhand der Abspaltung von Anhydromalonylglucose (-248 Da) zu Fragmenten mit m/z 317 bzw. 319 ([ZEN-H]⁻ bzw. [ZEL-H]⁻) im MS/MS-Spektrum konnte die Identität als Malonylhexoside bestätigt werden. Die MS/MS-Spektren zeigten außerdem eine Abspaltung von CO₂ (-44 Da) zu Fragmenten mit m/z 521 bzw. 523 ([ZEN+Acetyl+Hexose-H₂O-H]⁻ bzw. [ZEL+Acetyl+Hexose-H₂O-H]⁻). Die beiden ZEN-Malonylhexoside (Peak b und d aus Abb. 23) wurden in ausreichender Menge für NMR-spektroskopische Analysen gebildet, sodass diese als ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid und ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid identifiziert werden konnten (Kapitel 4.1.2.3).

Für drei der vier ZEL-Malonylhexoside konnten aufgrund ausreichender Konzentration UV-Spektren erhalten werden. Ein Vergleich der UV-Spektren der drei ZEL-Malonylhexoside mit den beiden identifizierten ZEN-Malonylglucosiden zeigt, dass die beiden früher eluierenden ZEL-Malonylhexoside (bei 27,8 und 31,2 Minuten, ZEN-12 und ZEN-17) ähnliche Absorptionsmaxima (ca. 265 nm und 402 nm) wie das ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigt das später eluierende ZEL-Malonylhexosid (bei 33,3 Minuten, ZEN-23) ähnliche Absorptionsmaxima wie das ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid (ca. 270 nm und 316 nm). Möglicherweise lässt dies auf die jeweiligen Verknüpfungspositionen (14 oder 16) schließen. Anknüpfende NMR-Analysen ermöglichen in diesem Zusammenhang klarere Aussagen über die Verknüpfungspositionen sowie über die Stereoisomerie der ZELs. Hierfür bedarf es allerdings größerer Substanzmengen.

Malonyldihexoside

Neben der Bildung von Malonylhexosiden konnte auch die Bildung von zwei ZEN-Malonyldihexosiden (m/z 727,2455, [ZEN+Malonyl+2Hexosen-2H₂O-H]⁻) in Weizenzellen beobachtet werden, von denen eines auch in Tabakzellen gebildet wurde. Die MS/MS-Spektren der beiden Verbindungen zeigten beide eine Abspaltung von Anhydromalonyldihexose (-410 Da) zu Fragmenten mit m/z 317 ([ZEN-H]⁻). Das ZEN-Malonyldihexosid, das sowohl von den Tabak- als auch von den Weizenzellen gebildet wurde (ZEN-5), zeigt zusätzlich eine Abspaltung einer Hexose und von CO₂ (-206 Da) zu Fragmenten mit m/z 521 ([ZEN+Acetyl+Hexose-H₂O-H]⁻). Dieses Fragmentation trat auch bei der Fragmentierung von den ZEN-Malonylglucosiden auf. Da im MS/MS-Spektrum des ZEN-Malonyldihexosids, das ausschließlich von den Weizenzellen gebildet wurde, keine Hexose-Abspaltung beobachtet wurde, ist von strukturellen Unterschieden bezüglich der Verknüpfungspositionen der Hexosen auszugehen. Möglicherweise handelt es sich bei dem von Tabak- und Weizenzellen gebildeten ZEN-Malonyldihexosid um zwei an verschiedenen Positionen verknüpfte

Monosaccharide, während das ZEN-Malonyldihexosid, das ausschließlich von Weizenzellen gebildet wurde, ein Disaccharid repräsentiert. Für weitere Strukturinformationen werden allerdings NMR-spektroskopische Analysen benötigt.

Pentosylhexoside

Die gezielte Suche nach Pentosylhexosiden ergab insgesamt zwei ZEN-Pentosylhexoside (m/z 611,2346, [ZEN+Pentose+Hexose-2H₂O-H]⁺) und ein ZEL-Pentosylhexosid (m/z 613,2502, [ZEL+Pentose+Hexose-2H₂O-H]⁺). Die Bildung der ZEN-Pentosylhexoside erfolgte sowohl in den Tabak- als auch in den Weizenzellen. Hingegen konnten ZEL-Pentosylhexoside ausschließlich in Weizenzellen detektiert werden. Die Struktur wurde anhand der Isotopenmuster und der Abspaltung einer Moleküleinheit mit 294 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 317 bzw. 319 ([ZEN-H]⁺ bzw. [ZEL-H]⁺) in den MS/MS-Spektren bestätigt. Weitere Strukturinformationen konnten aus der HRMS-Analyse allerdings nicht gewonnen werden.

Desoxyhexosylhexoside

Des Weiteren wurden ein ZEN-Desoxyhexosylhexosid sowie ein ZEL-Desoxyhexosylhexosid anhand der akkuraten Masse, dem Isotopenmuster und der Abspaltung einer Moleküleinheit mit 308 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 317 bzw. 319 ([ZEN-H]⁺ bzw. [ZEL-H]⁺), im MS/MS-Spektrum identifiziert. Beide Verbindungen konnten ausschließlich in dem Weizenzell-extrakt gefunden werden, was vermuten lässt, dass dies eine pflanzenspezifische Metabolisierung ist. Für eine weitere Aufklärung der Struktur bedarf es NMR-spektroskopischer Analysen.

Zusammenfassung

Ebenso wie bei den AOH- und AME-Metaboliten stellen Glykosylierungen, Malonyl- und zu einem geringen Teil Acetyl-Konjugationen in den untersuchten Pflanzensystemen die wichtigsten Biotransformationswege von ZEN dar. Darüber hinaus unterlag ZEN auch dem Phase I-Metabolismus, da verschiedenste ZEL-Metaboliten detektiert werden konnten. ZEN wurde in Tabak- sowie in Weizenzellen zu 20 bzw. 26 Metaboliten umfangreich metabolisiert. Im Gegensatz dazu konnten in den Sojazellen lediglich 11 Metaboliten detektiert werden. Die Identität der Verbindungen kann zwar nur mittels NMR-spektroskopischer Methoden eindeutig aufgeklärt werden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass typischerweise in Pflanzen vorkommende Zucker wie Glucose, Rhamnose, Galactose, Arabinose oder Xylose als Konjugationspartner in Frage kommen, da diese häufig bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen oder bei der Speicherung von pflanzeneigenen Stoffen als Bindungspartner beobachtet werden (Tiwari *et al.*, 2013).

Zu beachten ist, dass bei den insgesamt 11 ZEL-Konjugaten entweder β -ZEL-Konjugate oder östrogen potentere α -ZEL-Konjugate gebildet worden sein könnten, wodurch sich die Toxizität im Vergleich zum ursprünglichen ZEN erhöht haben könnte. Daher ist die Berücksichtigung der von den Pflanzen gebildeten Metaboliten bei Sicherheitsbewertungen von Lebens- und Futtermitteln von großer Bedeutung.

4.1.2.3 NMR-spektroskopische Analyse der ZEN-Metaboliten

Für die NMR-spektroskopische Analyse der gebildeten Metaboliten wurden alle drei Zellkulturen mehrfach mit ZEN inkubiert, extrahiert und deren vereinigte Extrakte chromatographisch aufgereinigt. Dabei konnten vier Metaboliten in ausreichender Menge gewonnen werden, um deren Strukturen eindeutig mittels 2D-NMR-Spektroskopie aufzuklären.

Mithilfe der HRMS-Analysen konnten diese bereits als zwei ZEN-Hexoside (Peak a und c aus Abb. 23) sowie zwei ZEN-Malonylhexoside (Peak b und d aus Abb. 23) charakterisiert werden. Um die Metaboliten eindeutig aufzuklären, wurden (H,H)-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Als Vergleich diente freies ZEN. Die ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen der vier ZEN-Konjugate sind in Kapitel 10.1 (Tab. 50) aufgeführt.

ZEN-Hexoside (Peak a und Peak c)

Das HSQC-Spektrum der zu identifizierenden Verbindung aus Peak a (Abb. 25, blau) zeigte zum einen deutliche Verschiebungen im aromatischen Bereich und zum anderen neu aufgetretene Signale im Kohlenhydratbereich im Vergleich zu dem HSCQ-Spektrum von ZEN (Abb. 25, grün). Dies steht im Einklang mit den aus der HRMS-Analyse gewonnenen Daten. Die Verknüpfung einer Hexose an Position 16 konnte über die Kopplung zwischen dem anomeren Proton (δ_{H} 4,81 ppm) und C16 (δ_{C} 154,7 ppm) von ZEN im HMBC-Spektrum eindeutig bestimmt werden. Über das (H,H)-COSY-Spektrum konnten die Kopplungen der Protonen durch das gesamte Hexosemolekül verfolgt werden. Das anomere Protonensignal der Hexose zeigte im ^1H -NMR-Spektrum eine Kopplungskonstante von 7,5 Hz, was das β -Anomer der Hexoseeinheit impliziert. Des Weiteren konnte über die Kopplung zwischen dem anomeren Proton (δ_{H} 4,81 ppm) und C5 (δ_{C} 76,8 ppm) der Hexoseeinheit im HMBC-Spektrum die Pyranoseform identifiziert werden. Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen des vorliegenden ZEN-Hexosids mit NMR-Daten aus der Literatur (gelöst in $\text{DMSO-}d_6$) zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den chemischen Verschiebungen von 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (ZEN-16-Glucosid) (Kapitel 10.1, Tab. 51), weshalb das ZEN-Hexosid aus Peak a (Abb. 23) eindeutig als ZEN-16-Glucosid identifiziert werden konnte (Borzekowski *et al.*, 2018). Borzekowski *et al.* (2018) konnten neben den NMR-spektroskopischen Messungen zusätzlich die Identitäten mithilfe von Referenzsubstanzen bestätigen.

Da die isolierte Verbindung aus Peak c (Abb. 23) eine relativ geringe Konzentration aufwies, wurde ein Shigemi-Röhrchen für die NMR-spektroskopische Messung verwendet. Durch ein geringeres Lösungsmittelvolumen (220 μl im Vergleich zu 500 μl) ist eine Erhöhung der Konzentration der Probe und somit eine empfindlichere Messung möglich. Des Weiteren konnte durch Verwendung der Nonuniform Sampling-Methode (NUS) die Gesamt-experimentzeit der zweidimensionalen Experimente reduziert werden, indem der Teil der tatsächlich aufgenommenen Datenpunkte in der indirekten Dimension um einen gewissen Prozentsatz (Reduktion um ca. 25 bis maximal 50 %) reduziert wurde.

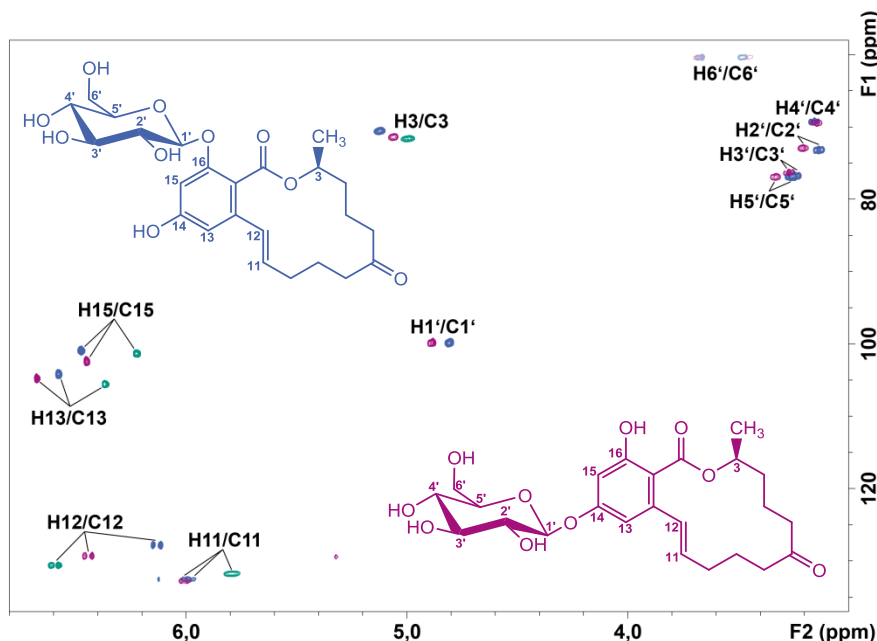


Abb. 25: Überlagerung der HSQC-Spektren von 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (Peak a, blau), 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (Peak c, lila) und freiem ZEN (grün). Die Strukturformeln von 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN und 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN sind in den entsprechenden Farben abgebildet.

Das HSCQ-Spektrum der zu identifizierenden Verbindung (Abb. 25, lila) wies deutliche Verschiebungen der Signale im aromatischen Bereich sowie neu auftretende Signale im Kohlenhydratbereich im Vergleich zu dem HSQC-Spektrum von ZEN auf, was auf eine Kohlenhydratbindung am aromatischen Ring schließen lässt. Die entsprechende Verknüpfung des Zuckers an den Aromaten bestätigte sich durch ein Signal, das die Kopplung zwischen dem anomeren Protonensignal (δ_{H} 4,89 ppm) und dem C14 (δ_{C} 159,6 ppm) von ZEN im HMBC-Spektrum angibt. Ebenso wie bei dem ZEN-16-Glucosid konnten die Kopplungen der Protonen durch das gesamte Hexosemolekül im (H,H)-COSY-Spektrum verfolgt werden. Auf Grundlage der Kopplung zwischen C5 (δ_{C} 76,9 ppm) und H1 (δ_{H} 4,89 ppm) der Hexose im HMBC-Spektrum konnte die Pyranoseform bestätigt werden. Die Kopplungskonstante $^3J_{1,2}$ beträgt 7,6 Hz, woraus abgeleitet werden kann, dass es sich um ein β -Anomer handelt. Der Literaturvergleich der NMR-Daten zeigt (Kapitel 10.1, Tab. 51), dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (ZEN-14-Glucosid) handelt (Borzekowski *et al.*, 2018). Anhand dieser Daten konnte das ZEN-Hexosid (Peak c) eindeutig identifiziert werden.

ZEN-Malonylhexosid (Peak b und Peak d)

Die HRMS-Analyse der den Peaks b und d (Abb. 23) entsprechenden Substanzen ergab, dass es sich bei den beiden Verbindungen um Malonylhexoside handelt. Das HSQC-Spektrum der Verbindung aus Peak b zeigt neben den aromatischen C,H-Signalen der Positionen 13 und 15 ebenfalls zusätzliche Signale im Kohlenhydratbereich des Spektrums sowie ein zusätzliches CH_2 -Signal bei δ_{H} 3,25 ppm und δ_{C} 42,9 ppm. Zunächst konnte die Verknüpfung von Glucose an ZEN an Position 16 anhand der Kopplung zwischen dem anomeren Protonensignal (δ_{H} 4,75 ppm) und dem C16 (δ_{C} 155,6 ppm) von ZEN im HMBC-Spektrum identifiziert werden. Des Weiteren konnte auf Grundlage des HMBC-Spektrums die Pyranoseform der Glucose ermittelt werden. Die Kopplungskonstante des anomeren Protons

(7,0 Hz) zeigt, dass das Glucoseanomer in β -Konfiguration vorliegt. Das zusätzliche CH_2 -Signal im HSQC-Spektrum ist der CH_2 -Gruppe der Malonsäure zuzuordnen. Verglichen mit ZEN-16-Glucosid sind die Signale der 6-Protonen der Glucose deutlich tieffeldverschoben (Abb. 26 A), was auf eine elektronenziehende Gruppe in der Umgebung hindeutet. Anhand der Kopplung zwischen einem der 6-Protonen der Glucose und dem Kohlenstoffatom der CH_2 -Gruppe der Malonsäure kann geschlossen werden, dass die Glucose an Position 6 malonyliert vorliegt. Daher handelt es sich bei der Verbindung aus Peak b um 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN (ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid).

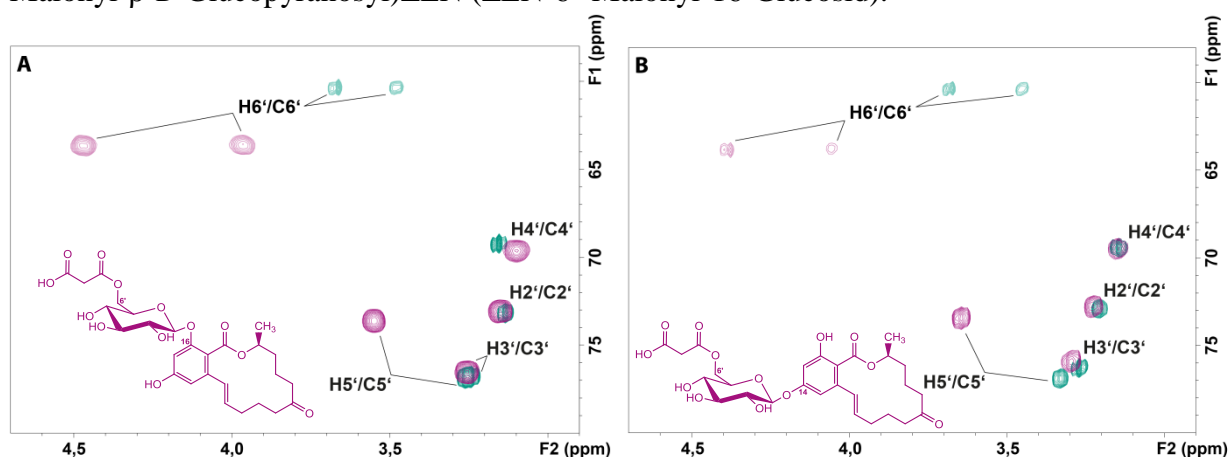


Abb. 26: Überlagerung der Kohlenhydratbereiche der HSQC-Spektren von 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (grün) und 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN (lila) (A) sowie 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN (grün) und 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN (lila) (B) sowie die Strukturformeln der Malonylglucoside.

Das Malonylhexosid aus Peak d (Abb. 23) zeigte im HSQC-Spektrum sowohl Signale im Zuckerbereich als auch ein zusätzliches CH_2 -Signal bei δ_{H} 3,30 ppm und δ_{C} 41,4 ppm, welches der Malonsäure zuzuordnen ist. Die HMBC-Daten deuten auf eine Verknüpfung der Glucose an Position 14 hin, da eine Kopplung zwischen dem anomeren Protonensignal (δ_{H} 4,90 ppm) und dem C14 (δ_{C} 158,9 ppm) von ZEN erkennbar ist. Auch die Pyranoseform sowie die β -Konfiguration der Glucose ($^3J_{1,2} = 7,2$ Hz) konnte bestätigt werden. Die Verknüfungsposition der Malonsäure an die Glucose konnte zum einen durch die Kopplung zwischen den H6'-Signalen bei δ_{H} 4,06 und 4,39 ppm und dem Carbonyl-Kohlenstoff der Malonsäure bei δ_{C} 166,7 ppm im HMBC-Spektrum und zum anderen aufgrund der Tieffeldverschiebungen der 6'-Protonen und des 6'-Kohlenstoffatoms im Vergleich zum ZEN-14-Glucosid (Abb. 26 B) zugeordnet werden. Somit konnte die Verbindung aus Peak d als 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN (ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid) identifiziert werden.

In Kapitel 10.2 (Abb. 55) sind die Strukturformeln aller eindeutig mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten ZEN-Metaboliten abgebildet.

4.1.2.4 Semiquantitative Analyse der pflanzlichen ZEN-Metaboliten

Wie bereits in Kapitel 4.1.2.1 erwähnt, unterscheiden sich die UV-Absorptionsspektren der ZEN-Metaboliten je nach Verknüfungsposition. Dabei fällt auf, dass vor allem eine Verknüpfung an Position 16 zu einer Änderung der Maxima im Absorptionsspektrum im Vergleich zu freiem ZEN führt. Um trotzdem eine semiquantitative Abschätzung durchführen

zu können, wurde zur Quantifizierung eine Wellenlänge von 239 nm gewählt, da sowohl ZEN als auch die Konjugate an Position 14 und 16 bei dieser Wellenlänge ein Maximum aufweisen. Abb. 27 zeigt ein Säulendiagramm, welches die jeweiligen Flächen der quantifizierbaren Metaboliten von ZEN in den drei Pflanzenzellsuspensionskulturen abbildet.

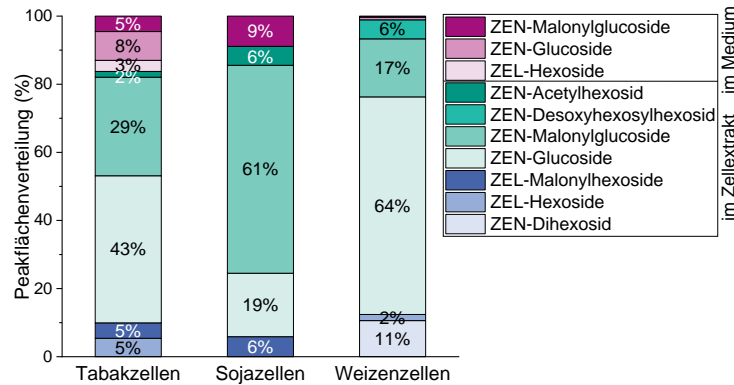


Abb. 27: Peakflächenverteilung der ZEN- und ZEL-Metaboliten in den Tabak-, Soja- und Weizenzellkulturen.

Dabei fällt auf, dass die ZEN-Metaboliten im Vergleich zu den ZEL-Metaboliten bei allen Zellkulturen den größeren Anteil ausmachen. Ähnlich wie bei den AOH- und AME-Metaboliten überwiegen bei den Weizenzellen die Glucoside gegenüber den Malonylglucosiden. In etwas geringerem Umfang trifft dies auch auf die Tabakzellen zu. Im Gegensatz dazu bilden die Sojazellen hauptsächlich Malonylglucoside, was auch schon bei den Inkubationen mit AOH und AME ersichtlich war (Kapitel 4.1.1.4). Aus Abb. 23 wird außerdem ersichtlich, dass Sojazellen ZEN hauptsächlich an Position 14 glucosylieren, wohingegen in Tabak- und Weizenzellen Position 16 von ZEN bevorzugt mit Glucose konjugiert wird. Dies deutet auf unterschiedliche Enzymspezifitäten in verschiedenen Pflanzen hin.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung sind in Tab. 5 dargestellt. Ebenso wie bei der Inkubation mit AOH konnte bei den Tabakzellen mit 60 % die höchste Gesamtwiederfindung ermittelt werden. Davon lagen 50 % im Zellextrakt und 10 % im Medium vor, was eventuell auf eine Ausscheidung der Metaboliten aus der Zelle zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu konnte in den Zellextrakten und in den Medien der Soja- und Weizenzellkultur in Summe lediglich 14–15 % der eingesetzten ZEN-Mengen wiedergefunden werden.

Tab. 5: Wiederfindungen der im Zellkulturversuch eingesetzten ZEN-Menge in Tabak-, Soja- und Weizenzellen sowie deren Zellkulturmedien

	Wiederfindung der im Zellkulturversuch eingesetzten ZEN-Menge (%)		
	Zellen	Medium	Gesamt
Tabak	50	10	60
Soja	13	1	14
Weizen	15	0	15

Diese geringe Wiederfindung kann unter anderem durch die fehlerbehaftete Quantifizierung bei 239 nm zustande kommen oder durch die schlechte Löslichkeit von ZEN bzw. dessen Metaboliten (mit)verursacht werden. Des Weiteren zeigten die HRMS-Analysen, dass eine

Vielzahl an Metaboliten in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, die aufgrund der zu hohen Nachweisgrenze der semiquantitativen Bestimmung über UV-Detektion nicht quantifiziert werden konnten. Die Einlagerung von ZEN in die Zellwand in Form von unlöslichen Konjugaten (Kapitel 4.5) oder ein eventueller Abbau von ZEN zu unbekannt Substanzen wären weitere denkbare Möglichkeiten.

4.2 Lösliche Konjugate aus Pilz und Pflanze

Die in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Metaboliten von AOH und AME wurden durch Inkubation verschiedener Zellsuspensions- bzw. Explant-Kulturen mit den Reinsubstanzen AOH und AME erzeugt. Es stellte sich daher die Frage, ob in mit Pilzen kontaminierten Pflanzen ebenfalls diese Metaboliten gefunden werden. Daher wurde in einer Pilotstudie am MRI (Karlsruhe) eine Tomate aus einem lokalen Supermarkt mit Sporen von *A. alternata* (Stamm 1346) inokuliert. Nach siebentägiger Inkubation wurde die beimpfte Stelle zusammen mit dem Pilz herausgeschnitten und extrahiert. Im LC-DAD-Profil des Extraktes konnten allerdings lediglich AOH und AME neben vier bislang unbekanntem Peaks in relevanten Anteilen detektiert werden. Auf Grundlage der gemessenen exakten Massen, Isotopenmuster und der Produktionenspektren (Arbeiten wurden am MRI Karlsruhe durchgeführt) wurden die den Peaks zugehörigen Verbindungen als zwei AOH-Sulfate, ein AME-Sulfat und ein AOH-Sulfoglucosid identifiziert (Soukup *et al.*, 2016). Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die eindeutige Aufklärung der Strukturen mittels NMR-Spektroskopie sein.

Weitere für die Interpretation dieser Daten relevante Untersuchungen am MRI (Karlsruhe) zeigten, dass die Bildung von AOH- und AME-Sulfaten durch die *A. alternata*-Stämme 1346 und 1348 abhängig vom jeweiligen Inkubationsmedium war. Während auf Malzglucose-Agar und Kartoffeldextrose-Agar Sulfate gebildet wurden, lagen nach Inkubation auf Hefeextrakt-saccharose-Agar lediglich Spuren der Sulfate vor. Keiner der Stämme erzeugte jedoch nachweisbare Mengen eines Glucosids oder Sulfoglucosids von AOH und AME auf allen getesteten Medien (Soukup *et al.*, 2016).

4.2.1 Sulfate von AOH und AME

Für die Strukturanalyse der unbekanntem Verbindungen wurde der *A. alternata* Stamm 1346 auf mehreren Agarplatten mit Kartoffeldextrose-Medium am MRI (Karlsruhe) gezüchtet und extrahiert.

In einer LC-DAD-MS-Analyse konnten drei Peaks identifiziert werden, die den Hauptmetaboliten entsprechen (Abb. 28). Die Verbindung des ersten Peaks zeichnete sich durch ein Molekulargewicht von 418 Da und zwei aufeinander folgenden Abspaltungen von Moleküleinheiten mit 80 Da (Sulfat) im MS²-Modus aus, was auf ein AOH-Disulfat hindeutet. Im zweiten Peak koeluierten AOH-Sulfat 1 (ca. 30 %) und 2 (ca. 70 %), die bereits in der Pilot-Studie mit der infizierten Tomate detektiert wurden. Diese konnten am MRI (Karlsruhe) mithilfe einer Waters Acquity HSS T3 small-bore UPLC-Säule getrennt werden (Einschub Abb. 28). Der dritte Peak repräsentiert das AME-Sulfat.

Mittels präparativer HPLC wurden die durch die drei Peaks repräsentierten Verbindungen isoliert, sodass sie anschließend NMR-spektroskopisch analysiert werden konnten. Die erhaltenen ¹H-NMR und HSQC-Spektren der vier Sulfatkonjugate wurden mit den Spektren von unkonjugiertem AOH bzw. AME verglichen, da Sulfatgruppen mittels ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Techniken nicht direkt detektiert werden können. Aufgrund der elektronenziehenden Wirkung von Sulfatgruppen werden allerdings Protonen und Kohlenstoffatome in *ortho*-

Position zur Substitutionsstelle entschirmt und deren Signale dadurch tieffeldverschoben, was zur Klärung der Verknüpfungsposition herangezogen werden kann.

Das HSQC-Spektrum des AOH-Disulfats zeigte eine Tieffeldverschiebung der Protonen- und Kohlenstoffsignale für die Positionen 2, 4, 8 und 10 im Vergleich zu AOH, was auf die Anlagerung von Sulfatgruppen an den Positionen 3 und 9 schließen lässt. Somit handelt es sich um das AOH-3,9-Disulfat, das einen neuen pilzinduzierten Metaboliten darstellt.

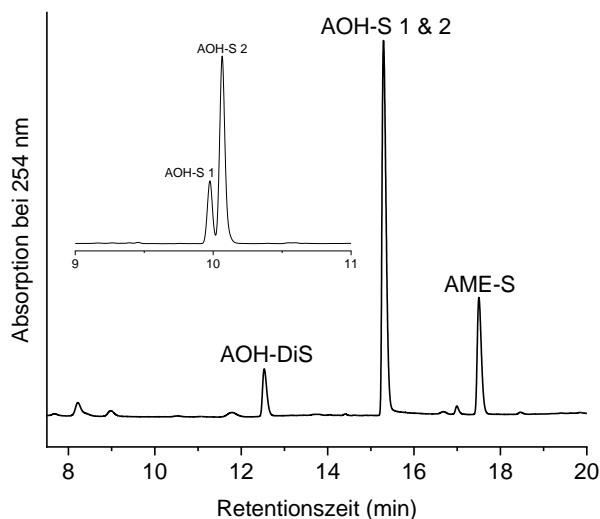


Abb. 28: LC-DAD-Profil des Extraktes von *A. alternata* Stamm 1346, der auf Kartoffeldextrose-Agar kultiviert wurde. Der Einschub zeigt die Trennung der AOH-Sulfate 1 (ca. 30 %) und 2 (ca. 70 %) auf einer Waters Acquity HSS T3 small-bore UPLC-Säule, die am Max Rubner-Institut eingesetzt wurde. S=Sulfat, DiS=Disulfat.

Die beiden AOH-Sulfate wurden als Gemisch mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Die beiden Substanzen konnten im NMR-Spektrum aufgrund des Substanzverhältnisses von 30/70, das im HPLC-Chromatogramm bestimmt wurde, und der dadurch bedingten unterschiedlichen Signalintensitäten unterschieden werden. Während AOH-Sulfat 1 Tieffeldverschiebungen (im Vergleich zu AOH) der Signale H-2, H-4 sowie C-2 und C-4 zeigte, waren bei AOH-Sulfat 2 die Signale von H-8, H-10 bzw. C-8 und H-10 tieffeldverschoben. Daher wurden AOH-Sulfat 1 als AOH-3-Sulfat und AOH-Sulfat 2 als AOH-9-Sulfat identifiziert. Die NMR-Spektren des AME-Sulfats zeigten Tieffeldverschiebungen für die Signale von H-2, H-4 bzw. C-2 und C-4 im Vergleich zu AME, was für eine Sulfatierung von AME an Position 3 spricht (AME-3-Sulfat).

Die jeweiligen NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 10.1) in Tab. 48 aufgeführt. Mithilfe von HRMS-Messungen wurden die erhaltenen Strukturen bestätigt (Soukup *et al.*, 2016).

4.2.2 Sulfoglucoside von AOH und AME

Um die Strukturen der in der Pilotstudie beobachteten Sulfoglucoside aufzuklären, waren größere Mengen für NMR-spektroskopische Untersuchungen zu erzeugen. Daher wurden Tabakzellsuspensionskulturen mit einem Gemisch aus dem AOH-Disulfat, den AOH-Sulfaten und dem AME-Sulfat inkubiert, da dieses Zellkultursystem ein für Glucosylierungen geeignetes Modell darstellt (Kapitel 4.1). Nach Extraktion der gefriergetrockneten Zellen wurde der Extrakt mittels LC-DAD-MS gemessen und das in Abb. 29 dargestellte Metabolitenprofil erhalten.

Neben den eingesetzten Sulfaten bzw. dem Disulfat konnten drei weitere Peaks mit m/z 337 (AOH-SG-1, AOH-SG-2, AOH-SG-3) und ein weiterer Peak mit m/z 351 (AME-SG) detektiert werden, deren entsprechende Molekülmassen auf das Vorliegen von Sulfoglucosiden hindeuten. Dies zeigt, dass die Sulfate von AOH und AME von den Tabakzellen aufgenommen und effizient in Sulfoglucoside umgewandelt werden.

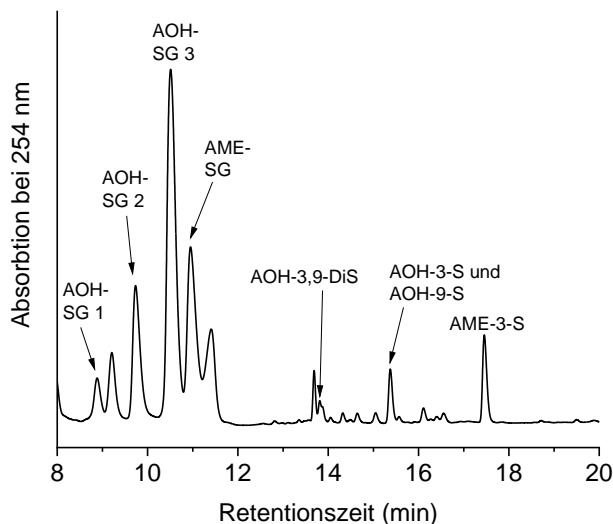


Abb. 29: HPLC-Profil eines Extrakts von Tabakzellsuspensionskulturen nach zweitägiger Inkubation mit einem Gemisch aus AOH-Sulfaten und AME-Sulfat (UV-Detektion bei 254 nm). S=Sulfat, DiS=Disulfat, SG = Sulfoglucosid.

Für die Strukturuntersuchungen wurden größere Mengen der Sulfatkonjugate aus Pilzkulturen gewonnen (MRI Karlsruhe) und in den Tabakzellen zu Sulfoglucosiden umgesetzt. Nach anschließender chromatographischer Aufreinigung im präparativen Maßstab konnten AOH-Sulfoglucosid-2, AOH-Sulfoglucosid-3 und AME-Sulfoglucosid eindeutig mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Eine eindeutige Strukturcharakterisierung von AOH-Sulfoglucosid-1 war aufgrund von Verunreinigungen und zu niedriger Konzentration nicht möglich.

Das ^1H -NMR-Spektrum von AOH-Sulfoglucosid-2 zeigte bei 5,15 ppm ein anomeres Protonensignal mit einer Kopplungskonstante von 7,3 Hz, was auf eine β -Konfiguration der Glucopyranoseeinheit hindeutet. Im HMBC-Spektrum dieser Verbindung konnte eine Kopplung zwischen H1 (Glucose) und C9 (AOH) bestimmt werden, was eine Verknüpfung der Glucoseeinheit an Position 9 des AOH zeigt. Somit kann AOH-Sulfoglucosid-2 als AOH-3-*O*-Sulfat-9-*O*- β -D-Glucosid bestimmt werden. Ebenso zeigte AOH-Sulfoglucosid-3 ein anomeres Proton bei 5,03 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 7,4 Hz, was auf eine β -Konfiguration hindeutet. Die Korrelationspeaks im HMBC-Spektrum zeigten u.a. die Kopplung zwischen H1 (Glucose) und C3 (AOH), wonach sich die Struktur von AOH-Sulfoglucosid-3 als AOH-9-*O*-Sulfat-3-*O*- β -D-Glucosid ableiten lässt. Im Gegensatz zu den AOH-Sulfoglucosiden deuten die NMR-Experimente des AME-Sulfoglucosids auf eine Verknüpfung von β -Glucopyranose an Position 7 hin, welche die einzige alternative Konjugationsstelle darstellt. Die β -Konfiguration wurde durch die Kopplungskonstante von 7,8 Hz (anomeres Proton bei 5,05 ppm) bestätigt, während die Verknüfungsposition durch die Kopplung von H1 (Glucose) und C7 (AME) bewiesen wurde. Somit handelt es sich bei dem AME-Sulfoglucosid um ein AME-3-*O*-Sulfat-7-*O*- β -D-Glucosid. Die jeweiligen NMR-

Daten sind im Anhang (Kapitel 10.1) in Tab. 49 aufgeführt. Zusätzliche HRMS-Messungen am MRI (Karlsruhe) bestätigten diese Ergebnisse.

Zur Überprüfung, ob die identifizierten Strukturen tatsächlich auch von Tomaten gebildet werden, wurden Tomaten-Explant-Kulturen mit den zwei AOH-Sulfaten und dem AME-Sulfat inkubiert. Deren Metabolitenprofile zeigten neben den eingesetzten AOH-Sulfaten (Abb. 30 A) bzw. dem AME-Sulfat (Abb. 30 B) deren glucosylierten Formen AOH-3-Sulfat-9-Glucosid und AOH-9-Sulfat-3-Glucosid bzw. AME-3-Sulfat-7-Glucosid.

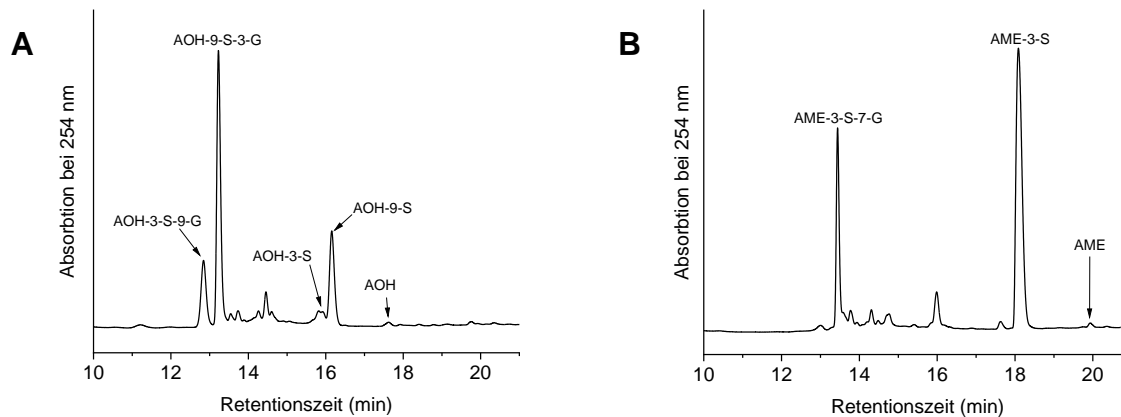


Abb. 30: HPLC-Profil von Extrakten von Tomaten-Explant-Kulturen nach zweitägiger Inkubation mit einem Gemisch aus AOH-3-Sulfat und AOH-9-Sulfat (A) bzw. AME-Sulfat (B) (UV-Detektion bei 254 nm). S=Sulfat, G=Glucosid.

Im Medium konnten weder Sulfate noch Sulfoglucoside detektiert werden, was für eine vollständige Aufnahme der Sulfate in das Tomatenfruchtgewebe spricht. Eine semiquantitative Analyse zeigte, dass die eingesetzten AOH-Sulfate zu 72 % umgesetzt wurden, während AME-Sulfat in geringerem Ausmaß glucosyliert wurde (25 %).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei den AOH- bzw. AME-Sulfaten um pilzinduzierte Metaboliten handelt, die im Zuge des Fremdstoffmetabolismus in Tomaten glucosyliert werden können. Die gebildeten Sulfoglucoside, die sowohl einen Sulfat- als auch einen Glucoseanteil an verschiedenen Hydroxygruppen des gleichen Aglykons tragen, wurden für Mykotoxine bisher noch nicht beschrieben und stellen daher eine neue Form modifizierter Mykotoxine dar. Es ist denkbar, dass auch andere Mykotoxine wie zum Beispiel ZEN als Sulfoglucosid vorkommt, da es über zwei freie Hydroxygruppen verfügt und bereits ZEN-14-Sulfat in natürlich kontaminierten Weizenkörnern gefunden wurde (Schwake-Anduschus *et al.*, 2015).

4.3 Synthese isotopenmarkierter Standardsubstanzen der löslichen Konjugate

Für die quantitative Analyse von modifizierten Mykotoxinen mittels SIVA werden isotopenmarkierte Standardsubstanzen benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst isotopenmarkiertes AOH, AME und ZEN hergestellt werden (Kapitel 4.3.1), die anschließend in Tabakzellsuspensionskulturen eingesetzt werden sollten, um modifizierte Mykotoxine zu erzeugen. Die einzelnen deuterierten Metaboliten sollten schließlich präparativ fraktioniert werden, um aufgereinigte, isolierte Standardsubstanzen zu erhalten (Kapitel 4.3.4).

4.3.1 Deuterierung der Ausgangssubstanzen AOH, AME und ZEN

4.3.1.1 Deuterierung von AOH und AME

Für die Deuterierung von AOH und AME wurden verschiedene Synthesen durchgeführt. Da bei der basenkatalytischen S_EAr und der metallkatalysierten Deuterierung keine nennenswerte Deuterierung von AOH und AME erzielt werden konnte, wurden die beiden Mykotoxine mittels säurekatalysierter S_EAr deuteriert. Zur Überprüfung des Reaktionsfortschritts wurden Aliquote entnommen und mittels LC-MS analysiert. Nach zehntägiger Reaktion wurde für AOH- d_4 eine Isotopenreinheit von 99 % und für AME- d_4 von 92 % erreicht (Tab. 6).

Tab. 6: Isotopenreinheit des vierfach deuterierten AOH und AME

Isotopolog	<i>m/z</i> (pos. Mode)	relative Intensität (%)	Isotopolog	<i>m/z</i> (pos. Mode)	relative Intensität (%)
AOH	259	0,10	AME	273	0,00
AOH- d_1	260	0,05	AME- d_1	274	0,02
AOH- d_2	261	0,13	AME- d_2	275	0,88
AOH- d_3	262	0,34	AME- d_3	276	8,16
AOH- d_4	263	100	AME- d_4	277	100
Isotopenreinheit von AOH- d_4 : 99 % Ausbeute: 69 %			Isotopenreinheit von AME- d_4 : 92 % Ausbeute: 76 %		

Das erhöhte Vorkommen des d_3 -Isotopologen bei AME führt zu einer niedrigeren Isotopenreinheit für AME. Die Ausbeuten lagen bei 69 und 76 % für AOH- d_4 und AME- d_4 . Ein höherer Deuterierungsgrad als die vierfach-Deuterierung konnte nicht festgestellt werden. Die beobachteten M+1 bzw. M+2-Peaks des vierfach deuterierten AOH bzw. AME ließen sich durch das natürliche ^{13}C -Vorkommen erklären (Kapitel 3.3.1). Im Vergleich dazu erzielten Asam *et al.* (2009) etwas höhere Ausbeuten von 73 bzw. 80 %. Dies kann durch die längere Reaktionszeit (zehn Tage im Vergleich zu vier Tagen) und die damit verbundene eintretende thermische Zersetzung von AOH und AME begründet werden. Die Isotopenreinheit von AOH- d_4 und AME- d_4 wurde zwar von Asam *et al.* (2009) nicht angegeben, kann allerdings aus den Integralen der 1H -NMR-spektroskopischen Messungen berechnet werden. Diese liegen für AOH- d_4 bei ca. 89 % und für AME- d_4 bei ca. 95 % und sind somit geringer als in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass keine Auskünfte zu den S/N der Signale im 1H -NMR-Spektrum gemacht wurden

und die Isotopenreinheiten mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt wurden, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

4.3.1.2 Deuterierung von ZEN

In der Literatur werden Methoden zur Synthese von ZEN- d_2 sowie ZEN- d_6 beschrieben. Eine zweifach-Deuterierung bringt den Vorteil eines geringeren Isotopenshifts im Vergleich zu einer sechsfach-Deuterierung mit, wodurch matrixbedingte Ionensuppressionseffekte besser ausgeglichen werden können. Andererseits sollte sich ein isotopenmarkierter Standard massenspektrometrisch eindeutig vom unmarkierten Analogon unterscheiden lassen, um spektrale Überlappungen zu vermeiden. Dies wäre ein Vorteil von ZEN- d_6 . Daher wurden sowohl die Methode von Cramer *et al.* (2007) zur Synthese von ZEN- d_2 als auch die Methode von Miles *et al.* (1996) zur Synthese von ZEN- d_6 durchgeführt.

Tab. 7: Isotopenreinheit des zweifach und sechsfach deuterierten ZEN

Methode nach Cramer <i>et al.</i> (2007)			Methode nach Miles <i>et al.</i> (1996)		
Isotopolog	m/z (neg. Mode)	relative Intensität (%)	Isotopolog	m/z (neg. Mode)	relative Intensität (%)
ZEN	317	0,04	ZEN	317	0,00
ZEN- d_1	318	0,99	ZEN- d_1	318	0,00
ZEN- d_2	319	100	ZEN- d_2	319	0,00
			ZEN- d_3	320	0,00
			ZEN- d_4	321	0,25
			ZEN- d_5	322	3,88
			ZEN- d_6	323	100
Isotopenreinheit von ZEN- d_2 : 99 % Ausbeute: 15 %			Isotopenreinheit von ZEN- d_6 : 96 % Ausbeute: 53 %		

Mit der Methode von Cramer *et al.* (2007) konnte eine hohe Isotopenreinheit von 99 % erzielt werden (Tab. 7). Dreifach oder mehrfach deuteriertes ZEN konnte nicht beobachtet werden. Allerdings war die Ausbeute mit 15 % sehr gering. Dies ist zum einen dadurch zu begründen, dass im ersten Reaktionsschritt lediglich 50 % des eingesetzten ZENs zu ZEN-Dioxolan umgesetzt wurden. Das ZEN-Dioxolan wurde chromatographisch von ZEN abgetrennt und anschließend für sieben Tage deuteriert, wodurch die Isotopenreinheit im Vergleich zu 95 % (Cramer *et al.*, 2007) auf 99 % erhöht werden konnte. Die Bestimmung der Isotopenreinheit durch Cramer *et al.* (2007) erfolgte ebenfalls mittels LC-MS, weshalb die Werte gut verglichen werden können. Durch die längere Reaktionszeit kam es allerdings teilweise zur Abspaltung der Schutzgruppe, weshalb das Gemisch wiederum präparativ aufgereinigt werden musste. Ebenso lag nach dem letzten Reaktionsschritt, der Abspaltung der Schutzgruppe, trotz Erhöhung der Reaktionszeit von zwei auf sechs Stunden noch restliches ZEN- d_2 -Dioxolan vor, weshalb auch hier eine Aufreinigung erforderlich war. Da ein höherer Deuterierungsgrad präferiert wurde, wurden Verluste hinsichtlich der Ausbeute in Kauf genommen.

Im Gegensatz dazu konnte mit der Methode nach Miles *et al.* (1996) sowohl eine höhere Isotopenreinheit von 96 % im Vergleich zu 57 % (Miles *et al.*, 1996) sowie eine höhere

Ausbeute von 53 % im Vergleich zu 36 % erzielt werden. Die etwas niedrigere Isotopenreinheit von ZEN- d_6 im Vergleich zur Synthese von ZEN- d_2 ist durch das erhöhte Vorkommen des d_5 -Isotopologen zu begründen.

4.3.2 Stabilität der deuterierten Standardsubstanzen

Ziel war es Tabakzellkultursysteme mit den deuterierten Mykotoxinen AOH- d_4 und AME- d_4 zu inkubieren, um deuterierte AOH- bzw. AME-Metaboliten zu erzeugen. Um zunächst die Stabilität der deuterierten Verbindungen im Testsystem zu überprüfen, wurden AOH- d_4 , AME- d_4 und ZEN- d_6 für 48 Stunden mit dem Zellkulturmedium (pH 5,7) inkubiert. Für ZEN- d_2 konnte aufgrund mangelnder Substanzmenge kein Stabilitätsversuch im Zellkulturmedium durchgeführt werden. Im Anschluss an die Inkubation im Zellkulturmedium wurden die Mykotoxine eingedampft, in Methanol aufgenommen und mittels LC-DAD-MS analysiert. Sowohl für AOH- d_4 als auch für AME- d_4 konnte kein relevanter D/H-Rücktausch beobachtet werden (Isotopenreinheiten: AOH- d_4 , 99 %; AME- d_4 , 91 %). Im Gegensatz dazu zeigte sich für ZEN- d_6 ein zeitabhängiger D/H-Austausch (Tab. 8). Die Isotopenreinheit von ZEN- d_6 lag bereits nach zwei Tagen nur noch bei 73 % und reduzierte sich nach sieben Tagen auf 43 %. Eine Erklärung hierfür ist die in wässrigen Lösungen stattfindende Keto-Enol-Tautomerie an der Keto-Gruppe an Position 7. Aufgrund der beobachteten Instabilität von ZEN- d_6 im Zellkulturmedium wurde lediglich ZEN- d_2 für die Zellkulturversuche verwendet.

Tab. 8: Wasserstoff / Deuterium-Rücktausch von ZEN- d_6 im Zellkulturmedium

nach zweitägiger Inkubation			nach siebentägiger Inkubation		
Isotopolog	<i>m/z</i> (neg. Mode)	relative Intensität (%)	Isotopolog	<i>m/z</i> (neg. Mode)	relative Intensität (%)
ZEN	317	0,00	ZEN	317	0,00
ZEN- d_1	318	0,00	ZEN- d_1	318	0,00
ZEN- d_2	319	2,06	ZEN- d_2	319	5,19
ZEN- d_3	320	3,62	ZEN- d_3	320	13,09
ZEN- d_4	321	6,83	ZEN- d_4	321	40,04
ZEN- d_5	322	21,85	ZEN- d_5	322	75,30
ZEN- d_6	323	100	ZEN- d_6	323	100
Isotopenreinheit von ZEN- d_6 : 73 %			Isotopenreinheit von ZEN- d_6 : 43 %		

Des Weiteren wurden die deuterierten Standardsubstanzen AOH- d_4 , AME- d_4 und ZEN- d_2 für zwei Tage mit den Tabakzellsuspensionskulturen inkubiert. Die Zellextrakte wurden extrahiert und mittels LC-DAD-MS analysiert. Um den Einfluss der Tabakzellen auf die Isotopenreinheit von AOH- d_4 , AME- d_4 und ZEN- d_2 zu untersuchen, wurde zunächst der nicht metabolisierte Rest der Ausgangsverbindungen betrachtet. Für AOH- d_4 konnte eine Isotopenreinheit von 99 % ermittelt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass dieser auch bei Inkubation mit den Zellen stabil bleibt. Im Gegensatz dazu konnte für AME- d_4 eine erhöhte Isotopenreinheit von 98 % ermittelt werden. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bevorzugt nicht bzw. weniger deuteriertes AME von den Tabakzellen

metabolisiert wurde. Im Unterschied dazu verringerte sich die Isotopenreinheit von ZEN- d_2 im Zellkulturversuch von 99 % auf 92 %.

Um die Gesamtisotopenreinheit der deuterierten Mykotoxine, d.h. sowohl der Ausgangs-Verbindung als auch aller Metaboliten, zu bestimmen, wurde der Gesamtextrakt mit β -Glucosidase verdaut. Für AOH ergab sich eine Isotopenreinheit von 95 %, was einer Abnahme der Isotopenreinheit im Vergleich zur Ausgangssubstanz um 4 % entspricht. Im Gegensatz dazu konnte für AME- d_4 in den Zellextrakten, die mit β -Glucosidase verdaut wurden, eine Isotopenreinheit von 92 % bestimmt werden. Diese entspricht der Isotopenreinheit der Ausgangssubstanz, weshalb AME- d_4 als stabil anzusehen ist. Bei dem Zellextrakt, der aus mit ZEN- d_2 inkubierten Zellen hergestellt wurde, konnte mittels β -Glucosidase-Verdau keine bzw. nur eine geringfügige Spaltung der Metaboliten erzielt werden. Dies kann möglicherweise darin begründet sein, dass in den Tabakzellen hauptsächlich Konjugate an Position 16 des ZEN gebildet werden und diese Konjugate für β -Glucosidasen schlecht zugänglich sind. Diese Spezifität von β -Glucosidasen konnte auch schon von Cirlini *et al.* (2016) beobachtet werden. Daher lässt sich für ZEN- d_2 keine Aussage über die Isotopenreinheit nach Zellinkubation treffen.

Bezüglich der Isotopenreinheit der deuterierten freien Mykotoxine konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass AOH- d_4 und AME- d_4 über drei Wochen bei Raumtemperatur in einem ACN-Wasser-Gemisch sowie in einem ACN-Puffer-Gemisch im pH-Bereich zwischen pH 2–9 stabil sind. Lediglich bei einem pH > 9 war die Stabilität insbesondere für AOH- d_4 begrenzt, da es zu einem alkalisch-katalysierten D/H-Rücktausch kam (Asam *et al.*, 2009). Da in den Pflanzenzellsuspensionskultursystemen sowie bei der anknüpfenden Aufarbeitung der Zellen bzw. des Mediums keine derart harschen Bedingungen auftreten, ist von keinem Rücktausch auszugehen. Dies deckt sich mit den zuvor genannten Ergebnissen aus den Stabilitätsversuchen. Für ZEN- d_6 konnten von Hartmann *et al.* (2008) und Miles *et al.* (1996) keine Veränderungen während der Probenvorbereitung oder Lagerung in wässrigen Lösungen beobachtet werden, wohingegen Cramer *et al.* (2007) Änderungen der D/H-Verhältnisse in Stoffwechselstudien feststellen konnten. Letztere Beobachtung steht im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen. Cramer *et al.* (2007) untersuchten darüber hinaus die Stabilität von ZEN- d_2 und konnten dabei feststellen, dass die ZEN- d_2 -Stammlösung bei Lagerung bei einer Temperatur von -18 °C in ACN für mehrere Monate stabil ist. Des Weiteren berichteten sie keine signifikanten Änderungen des Isotopenverhältnisses während der Probenaufarbeitung, weisen jedoch auf eine mögliche Instabilität bei extremeren pH-Bedingungen, erhöhten Temperaturen sowie längeren Lagerzeiträumen hin. Die hier beobachtete Verringerung der Isotopenreinheit von ZEN- d_2 kann somit möglicherweise durch zu lange Lagerung bei Raumtemperatur begründet sein.

4.3.3 Isotopenshift der deuterierten Standardsubstanzen

Deuterierte Standardsubstanzen sollten bei einer chromatographischen Trennung einen möglichst geringen Isotopenshift aufweisen, da sie sonst mit anderen Matrixbestandteilen koeluieren könnten und dies die Ionensuppression beeinflussen würde. Deuterium weist im Vergleich zu Wasserstoff eine erhöhte Trägheit und geringere Polarisierbarkeit auf. Daher

wurde ein Gemisch aus AOH und AOH- d_4 bzw. AME und AME- d_4 zu den Tabakzellen gegeben, und deren Extrakt mittels LC-DAD-MS gemessen. Dabei konnte jeweils ein Isotopenshift von ca. 2–4 Sekunden beobachtet werden. Bei einer durchschnittlichen Peakbreite von ca. 22 Sekunden ist dieser Retentionszeitunterschied als sehr gering einzuschätzen und damit zu vernachlässigen.

Aufgrund Substanzmangels konnte für ZEN- d_2 kein Test auf Isotopenshift durchgeführt werden. Allerdings ist aufgrund der zweifach-Markierung von ZEN im Vergleich zur vierfach-Markierung bei AOH und AME eine geringere Retentionszeitverschiebung anzunehmen.

4.3.4 Synthese isotopenmarkierter Standardsubstanzen der löslichen Konjugate in Tabakzellsuspensionskulturen

Die Tabakzellen wurden jeweils für zwei Tage mit AOH- d_4 , AME- d_4 und ZEN- d_2 inkubiert, anschließend extrahiert, und die Hauptmetaboliten wurden chromatographisch aufgetrennt. Abb. 31 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der präparativen Isolierung.

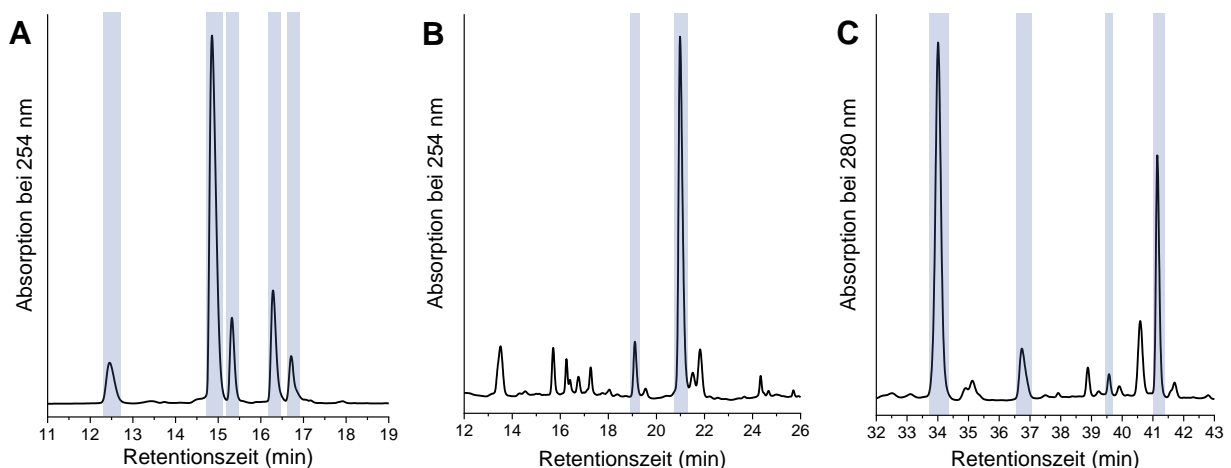


Abb. 31: Präparative Isolierung der AOH- d_4 -Metaboliten (A), AME- d_4 -Metaboliten (B) und ZEN- d_2 -Metaboliten (C). Die hellblau hinterlegten Peaks wurden präparativ isoliert.

Die isolierten Metaboliten wurden anschließend mittels LC-MS sowie mittels NMR-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, HSQC) analysiert. Bei der LC-MS-Analyse wurden die relativen Intensitäten der ein- bis vierfach deuterierten Metaboliten aufsummiert und die Isotopenreinheit des vierfach deuterierten Metaboliten bestimmt. Um dieses Ergebnis zu überprüfen und eventuell bevorzugte Rückaustausch-Positionen zu identifizieren, wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen. Bei einem Rückaustausch würden wieder Signale im aromatischen Bereich (6,3 bis 7,5 ppm) sichtbar werden. Die Integrale der Protonensignale wurden aufsummiert und ins Verhältnis zu einem Integral eines Signals gesetzt, das zu keiner Zeit deuteriert vorlag (z.B. anomeres Proton). Dadurch kann ebenfalls die Isotopenreinheit bestimmt werden.

In der Literatur werden Isotopenreinheitsbestimmungen sowohl mittels LC-MS-Analyse als auch mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt (Cramer *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008; Asam *et al.*, 2009). Während bei LC-MS-Analysen die Möglichkeit der Koelution

anderer Substanzen besetzt, die das Ergebnis verfälschen können, bringt die NMR-spektroskopische Analyse den Nachteil mit sich, dass geringe D/H-Rücktausche aufgrund der geringeren Empfindlichkeit nicht bestimmt werden und somit die Isotopenreinheit überschätzt wird. Bei dieser Methode sind die S/N bei geringen Rücktauschen häufig zu gering für eine Integration der Signale. Daher stellt die Kombination beider Verfahren einen guten Kompromiss dar, um die Isotopenreinheiten der pflanzlichen Metaboliten zu ermitteln.

Die Isotopenreinheit des deuterierten Mykotoxinstandards sollte im Allgemeinen möglichst hoch sein. Tritt beispielsweise eine geringe Menge an unmarkiertem Analyten in der Lösung des isotoopenmarkierten Standards auf, muss dieser bei der Erstellung einer Kalibrierung berücksichtigt werden. Generell werden bei SIVA interne Kalibrierungen durchgeführt, was bedeutet, dass die Konzentration an internem Standard (hier: isotoopenmarkierte Standardsubstanz) in der Lösung gleich bleibt, während die Konzentration des Analyten (hier: nicht-markierte Standardsubstanz) in Verhältnissen von z.B. 1:10 bis 10:1 im Vergleich zum internen Standard variiert. Eine unvollständige Deuterierung des internen Standards kann somit zu einer Simulation des Analyten führen, wenn noch komplett unmarkierte Substanz enthalten ist. Dieses Verhältnis kann berechnet werden und in der Kalibrierungsgleichung in Form des y-Achsenabschnittes kompensiert werden. Ebenso ist zu beachten, dass das natürliche ^{13}C -Vorkommen des Analyten zu Überlappungen mit dem internen Standard führen kann. Dies bedeutet, dass der Analyt in diesem Fall eine kleine Menge des internen Standards simuliert, der abhängig vom jeweiligen Konzentrationsverhältnis ist. Mithilfe einer Polynomannpassung der Kalibrierfunktion kann auch dieser Effekt weitestgehend ausgeglichen werden (Bretz *et al.*, 2006). Allerdings werden diese Berechnungsverfahren umso komplizierter, je ausgeprägter die Überlappung ist (Rychlik & Asam, 2008). Da es keine allgemeinen Akzeptanzwerte für die Isotopenreinheit gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Isotopenreinheit von > 85 % als akzeptabel beurteilt.

4.3.4.1 AOH- d_4 - und AME- d_4 -Metaboliten

Die Ergebnisse der MS- und ^1H -NMR-Analyse der AOH- d_4 - und AME- d_4 -Metaboliten sind in Tab. 9 aufgeführt. Zur Inkubation der Tabakzellen wurde AOH- d_4 mit einer Isotopenreinheit von 99 % und AME- d_4 mit einer Reinheit von 92 % eingesetzt.

Tab. 9: Isotopenreinheit der AOH- d_4 - und AME- d_4 -Metaboliten nach präparativer Isolierung aus dem Gesamtextrakt der Tabakzellen. Die Isotopenreinheiten wurden sowohl mittels MS als auch mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt

Metabolit	Isotopenreinheit (%)	
	MS	^1H -NMR
9- <i>O</i> -{ β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH- d_4	96	97
9- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AOH- d_4	84	92
3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AOH- d_4	94	97
9- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH- d_4	91	*
3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH- d_4	56	*
3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AME- d_4	80	93
3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME- d_4	44	*

* Verbindung bereits zersetzt / chemisch verändert

Im Massenspektrum der Verbindung 9-*O*-{ β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH-*d*₄ tritt lediglich das Natrium-Addukt der Verbindung auf, weshalb dieses zur Analyse der Isotopenreinheit bzw. des Deuterierungsgrades herangezogen wurde. Neben hauptsächlich vierfach deuteriertem AOH-9-Diglucosid konnten auch geringe Mengen an einfach und dreifach deuteriertem AOH-Diglucosid detektiert werden. Die berechnete Isotopenreinheit ergab 96 %. Im ¹H-NMR- und HSQC-Spektrum sind im Bereich zwischen δ H 6,3 und 7,5 ppm bzw. δ C 98 und 120 ppm Signale sichtbar, die aus einem D/H-Austausch resultieren. Dabei fällt auf, dass vor allem das Deuterium an Position 8 ausgetauscht wurde. Mittels Integration der sichtbaren Signale im ¹H-NMR-Spektrum konnte eine Isotopenreinheit von 97 % berechnet werden, die mithilfe der LC-MS-Analyse bestätigt werden konnte.

Eine geringere Isotopenreinheit konnte für 9-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AOH-*d*₄ mittels LC-MS festgestellt werden. Neben 84 % des vierfach deuterierten AOH-9-Glucosids, konnten 15 % dreifach und 1 % zweifach deuteriertes AOH-9-Glucosid detektiert werden. Im Gegensatz dazu ergab die ¹H-NMR-Analyse eine höhere Isotopenreinheit von 92 %, wobei hauptsächlich an der Position 2, jedoch auch an den Positionen 4, 6 und 8 ein geringfügiger Rückaustausch stattfand. Die mittels NMR-Spektroskopie bestimmte höhere Isotopenreinheit könnte daraus resultieren, dass bei der LC-MS-Analyse zufällig eine andere Substanz mit dem *m/z* 424 koeluiert, was dem *m/z* von dreifach deuteriertem AOH-9-Glucosid entspricht. Aufgrund der hohen Konzentration der Verbindung konnte in der NMR-Spektroskopie für jedes Signal ein ausreichend hohes S/N erzielt werden, sodass von einer Isotopenreinheit von 92 % ausgegangen werden kann.

Die LC-MS-Analyse von 3-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AOH-*d*₄ ergab eine Isotopenreinheit von 94 %, wobei ca. 4 % dreifach deuteriertes AOH-3-Glucosid und geringe Mengen an einfach und nicht deuteriertem AOH-3-Glucosid detektiert wurden. Die Isotopenreinheit, die über die Integrale des ¹H-NMR-Spektrums bestimmt wurde, lag mit 97 % etwas höher. Ähnlich wie bei dem AOH-9-Diglucosid kam es vor allem an Position 8 zum Rückaustausch, während an den anderen Positionen kein ausreichendes S/N für eine Integration erreicht werden konnte. An dieser Stelle lässt sich eine Übereinstimmung der beiden, aus den Daten unterschiedlicher Methoden berechneter, Isotopenreinheiten festhalten.

Bei einem der beiden deuterierten AOH-Malonylglucoside (9-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH-*d*₄) konnte mittels LC-MS eine akzeptable Isotopenreinheit von 91 % ermittelt werden. Allerdings ergab die nachfolgende NMR-Analyse (¹H-NMR und HSQC-Experiment), dass sich die Verbindung bereits teilweise zum AOH-9-Glucosid zersetzte oder die Malonsäure sich an anderer Position verknüpft wiederfand, sodass ein Gemisch aus mehreren Substanzen vorlag. Da sich die Integrale teilweise überschneiden, konnte keine Isotopenreinheit mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Ebenso konnte für das zweite AOH-Malonylglucosid (3-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH-*d*₄) keine Integration im ¹H-NMR-Spektrum durchgeführt werden, da es auch hier zum Abbau bzw. zur Umlagerung der Verbindung kam. Die nicht-deuterierten Malonylglucoside zeigten in DMSO eine Stabilität für bis zu zwei Wochen bei -20 °C (Kapitel 4.1.1.2). Allerdings konnte bei den Stabilitätsuntersuchungen für die Caco-2-Zellkulturversuche, die bei 37 °C durchgeführt wurden, ebenfalls ein Abbau bzw. eine Umlagerung der Malonylglucoside beobachtet werden

(Kapitel 4.4.1). Somit ist davon auszugehen, dass die Instabilität der Malonylglucoside temperaturabhängig ist und unabhängig von der Deuterierung auftritt. Da die Malonylglucoside bei den NMR-spektroskopischen Messungen teilweise mehr als 24 Stunden bei Raumtemperatur „gelagert“ wurden, kann es hierbei zur Abspaltung gekommen sein.

Die relativ niedrige mittels LC-MS bestimmte Isotopenreinheit von 56 % könnte wie bei AOH-9-Glucosid eventuell durch Koelution einer anderen Substanz zustande kommen. Allerdings bedarf es hier weiterer Analysen.

Für AME konnten aufgrund geringer Substanzmengen lediglich zwei Metaboliten analysiert werden. Die LC-MS-Analyse von 3-*O*-β-D-Glucopyranosyl-AME-*d*₄ ergab eine Isotopenreinheit von 80 %, wobei ca. 18 % dreifach deuteriertes und weniger als 2 % zweifach deuteriertes AME-3-Glucosid detektiert wurden. Im Gegensatz dazu konnte durch Integration der rückausgetauschten Protonen im ¹H-NMR-Spektrum eine Isotopenreinheit von 93 % bestimmt werden. Der Rückaustausch fand dabei wieder vor allem an Position 8 statt. Der Unterschied zwischen den beiden Analysen könnte auch hier möglicherweise durch Koelution einer anderen Substanz in der LC-MS-Analyse bedingt sein.

Für die Verbindung 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME-*d*₄ konnte im MS-Spektrum eine relativ geringe Isotopenreinheit von 44 % ermittelt werden, welcher möglicherweise auch durch Koelution anderer Substanzen begründet sein könnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei tatsächlich um einen relativ hohen Rückaustausch handelt, da die Analyse mittels ¹H-NMR-Spektroskopie aufgrund von Zersetzung bzw. Umlagerung der Verbindung nicht möglich war.

4.3.4.2 HRMS-Messung der deuterierten AME-Metaboliten

Da die Bestimmung der deuterierten AME-Metaboliten lediglich für zwei Metaboliten erfolgte (3-*O*-β-D-Glucopyranosyl-AME-*d*₄ und 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME-*d*₄) und die Ergebnisse der Isotopenreinheitsbestimmung mittels LC-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie große Unterschiede aufwiesen (80 % im Vergleich zu 93 % für 3-*O*-β-D-Glucopyranosyl-AME-*d*₄) bzw. teilweise nicht bestimmt werden konnten (für 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME-*d*₄), wurde eine weitere Methode zur Isotopenreinheitsbestimmung eingesetzt. Mittels HRMS können akkurate Massen gemessen werden, wodurch Fehler aufgrund von Koelution von Substanzen ähnlicher Masse weitestgehend vermieden werden können. Für die HRMS-Analyse wurde daher AME-*d*₄ mit einer Isotopenreinheit von 94 % in Tabakzellen eingesetzt und der Zellextrakt mittels HRMS gemessen. Zu beachten ist, dass der komplette Zellextrakt ohne präparative Aufreinigung gemessen wurde.

Die Ergebnisse der HRMS-Analyse (Tab. 10) zeigten, dass die Isotopenreinheit von AME von 94 % auf 90 % gesunken ist. Dies steht im Gegensatz zu dem in Kapitel 4.3.2 durchgeführten Versuch, bei dem die Isotopenreinheit von AME-*d*₄ nach der Inkubation anstieg. Für 3-*O*-β-D-Glucopyranosyl-AME-*d*₄ wurde in der HRMS-Analyse eine hohe Isotopenreinheit von 94 % mittels LC-MS ermittelt.

Tab. 10: Mittels HRMS bestimmte Isotopenreinheit der AME- d_4 -Metaboliten

Metabolit	Isotopenreinheit (%)	
	MS	$^1\text{H-NMR}$
7- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AME- d_4	0	
3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME- d_4	83	
3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-AME- d_4	94	
3- <i>O</i> -(4'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME- d_4	94	
AME- d_4	90	

Der Hauptmetabolit 3-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-glucopyranosyl)AME- d_4 wies hingegen eine relativ geringe Isotopenreinheit von 83 % auf, die auf das erhöhte Vorkommen des d_3 -Isotopologen bzw. auf eine mögliche Koelution zurückzuführen ist (16 %). Das zweite Malonylglucosid (3-*O*-(4'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME) lag hingegen zu 94 % vierfach deuteriert vor. Interessanterweise konnten für das 7-*O*- β -D-Glucopyranosyl-AME- d_4 aus ungeklärten Gründen nur noch Spuren des vierfach deuterierten Metaboliten detektiert werden, während die nicht deuterierte Form zu 83 % und die einfach deuterierte Form zu 15 % vorlagen. Zur Klärung der Instabilität des vierfach-deuterierten AME-7-Glucosids besteht weiterer Forschungsbedarf.

4.3.4.3 ZEN- d_2 -Metaboliten

Die Ergebnisse der MS- und $^1\text{H-NMR}$ -Analyse der ZEN- d_2 -Metaboliten sind in Tab. 11 aufgeführt. Zur Inkubation der Tabakzellen wurde ZEN- d_2 mit einer Reinheit von 99 % eingesetzt.

Tab. 11: Isotopenreinheit der ZEN- d_2 -Metaboliten nach präparativer Isolierung aus dem Gesamtextrakt der Tabakzellen. Die Isotopenreinheit wurde sowohl mittels MS als auch mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt

Metabolit	Isotopenreinheit (%)	
	MS	$^1\text{H-NMR}$
16- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-ZEN- d_2	89	92
16- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN- d_2	87	*
14- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-ZEN- d_2	81	**
14- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN- d_2	86	*

* Verbindung bereits zersetzt / chemisch verändert

** Signal/Rausch-Verhältnis zu gering

Das Massenspektrum der Verbindung 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN- d_2 zeigte neben 89 % des zweifach deuterierten ZEN-16-Glucosids auch noch ein Signal für ca. 11 % einfach deuteriertes ZEN-16-Glucosid. Die nachfolgende $^1\text{H-NMR}$ -Analyse ergab, dass der größte Teil des Rückaustausches an Position 13 stattfand und ein kleinerer Teil an Position 15. Die Integration der Signale ergab schließlich eine Isotopenreinheit von 92 %, der als akzeptabel anzusehen ist.

Das zweite ZEN-Glucosid (14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN- d_2) wies nach LC-MS-Analyse einer relativ geringe Isotopenreinheit von 81 % auf, da neben dem zweifach deuterierten ZEN-14-Glucosid auch ca. 19 % einfach deuteriertes ZEN-14-Glucosid vorlag. Dies könnte wiederum durch Koelution begründet sein. Da die Konzentration des Metaboliten sehr gering

war, konnte in der NMR-spektroskopischen Analyse aufgrund des zu geringen S/N keine Integration durchgeführt werden.

Ebenso wie bei den AOH- d_4 - und AME- d_4 -Malonylglucosiden konnten auch die beiden ZEN- d_2 -Malonylglucoside nicht mittels ^1H -NMR-Spektroskopie analysiert werden, da sich die Substanzen zum Zeitpunkt der Analyse bereits zersetzt bzw. chemisch verändert hatten. Allerdings konnte durch die vorherige massenspektrometrische Analyse eine Isotopenreinheit von 87 % für 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN- d_2 und 86 % für 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN- d_2 bestimmt werden. Dabei kamen jeweils ca. 19 % bzw. 14 % als einfach deuterierte Malonylglucoside vor.

Insgesamt liegen die Isotopenreinheiten der ZEN- d_2 -Metaboliten bis auf 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN- d_2 bei > 85 %. Ein Rückaustausch von Deuterium zu Wasserstoff fand teilweise statt. Allerdings bedarf es weiterer NMR-Analysen, um die auf Basis massenspektrometrischer Analysen berechneten Werte abschließend zu bewerten, da Koelutionen nicht auszuschließen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass deuterierte Standardsubstanzen von AOH, AME und ZEN in hohen Isotopenreinheiten mittels bereits etablierter, geringfügig angepasster Methoden hergestellt werden konnten. Um deuterierte modifizierte Mykotoxine zu generieren, wurden erstmalig Pflanzenzellsuspensionskulturen eingesetzt. Eine derartige Methode wurde in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Vergleichbare Versuche wurden bisher lediglich zur Synthese von ^{13}C -markierten freien Mykotoxinen, wie z.B. AOH und AME, mit Schimmelpilzkulturen durchgeführt. Hierfür wurden [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose und [$^{13}\text{C}_2$]-Natriumacetat zu *Alternaria*-Toxin-produzierenden Schimmelpilzkulturen gegeben, welche wiederum ^{13}C -markiertes AOH und AME bildeten (Liu & Rychlik, 2015). Die Gewinnung isotoopenmarkierter modifizierter Mykotoxine wurde bislang lediglich für modifizierte Formen von DON mittels chemischer Synthese (Königs-Knorr-Methode) durchgeführt (Habler *et al.*, 2016). Durch den Einsatz von Pflanzenzellsuspensionskulturen kann eine größere Bandbreite an isotoopenmarkierten modifizierten Mykotoxinen in einem Durchgang gewonnen werden. Allerdings ist hierbei anzumerken, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche eine relativ geringe Stabilität für Malonylglucoside aufzeigten. Diese Instabilität ist höchstwahrscheinlich auf die Lagerung bei Raumtemperatur während der NMR-spektroskopischen Messungen zurückzuführen und kann möglicherweise durch korrekte Lagerung der Substanzen bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vermieden werden. Die Methode zur Synthese deuterierter modifizierter Mykotoxine mittels Pflanzenzellsuspensionskulturen wurde erstmalig in dieser Weise durchgeführt und legt einen Grundstein für die Synthese weiterer markierter modifizierter Mykotoxine.

4.4 Zelluläre Aufnahme und *in vitro* Resorption von modifizierten Mykotoxinen in Caco-2-Zellen

Zur Untersuchung der humanen Bioverfügbarkeit der pflanzlichen Mykotoxinmetaboliten wurde das Caco-2-Zellmodell herangezogen. Zunächst wurde die Stabilität der eingesetzten Verbindungen im Testsystem unter zellfreien Bedingungen überprüft. Anschließend wurde die zelluläre Aufnahme der modifizierten Formen von AOH, AME und ZEN untersucht, indem Caco-2-Zellen in 24-Well-Platten kultiviert und nach 21-tägiger Differenzierung mit den jeweiligen Metaboliten inkubiert wurden. Die Untersuchung der *in vitro*-Resorption wurde in einem *Transwell*-Modell durchgeführt, wobei Transportprozesse vom apikalen zum basolateralen Bereich analysiert wurden.

4.4.1 Stabilität der Ausgangsverbindungen

Für die Caco-2-Zellkulturversuche wurden die in Tab. 12 aufgeführten Substanzen mittels quantitativer ¹H-NMR eingewogen und auf 2 mM Lösungen mit DMSO verdünnt. Für die Stabilitätsversuche sowie die weiteren Zellkulturversuche wurden die Lösungen auf eine Konzentration von 20 µM mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)-Puffer verdünnt, die schließlich 1 % DMSO enthielt.

Tab. 12: Standardsubstanzen, die im Rahmen der Caco-2-Versuche eingesetzt werden sollten

AOH	AME	ZEN
AOH-9-Diglucosid	AME-7-Glucosid	ZEN-14-Glucosid
AOH-9-Glucosid	AME-3-Glucosid	ZEN-16-Glucosid
AOH-3-Glucosid	AME-6'-Malonyl-3-Glucosid	ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid
AOH-6'-Malonyl-3-Glucosid		ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid

Die LC-DAD-MS-Untersuchungen zeigten, dass die Malonylglucoside von AOH, AME und ZEN in DMSO instabil waren, da die Malonsäure nach den NMR-Messungen zum Zeitpunkt Null der Stabilitätsversuche bereits vollständig oder teilweise abgespalten war. Folglich wurden nur noch die jeweiligen Glucoside detektiert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den im Deuterierungsversuch vorgefundenen Instabilitäten der Malonylglucoside (Kapitel 4.3.4). Die geringe Stabilität von Malonylglucosiden wurde auch schon von Köster *et al.* (1983) bei verschiedenen Isoflavon-Malonylglucosiden aus Kichererbsen sowie von Svehliková *et al.* (2004) bei Apigenin-7-O-(6'-Malonyl-Glucosid), dem Hauptflavonoid in Kamillenblüten, beobachtet. Des Weiteren wurde für die Malonylglucoside der Isoflavone Genistein und Daidzein gezeigt, dass diese im Vergleich zu deren Glucosiden eine geringere Bioverfügbarkeit in Ratten aufwiesen (Yerramsetty *et al.*, 2014). Es wurde gemutmaßt, dass die Malonylglucoside schlechte Substrate für die β-Glucosidasen im Darm darstellen und daher viel langsamer zu den Aglykonen hydrolysiert werden, was auch auf die vorliegenden Malonylglucoside von AOH, AME und ZEN zutreffen könnte. Allerdings ist aufgrund der Instabilität im Medium bei Raumtemperatur auch vorstellbar, dass die Malonylglucoside bereits im oberen Verdauungstrakt zu den jeweiligen Glucosiden gespalten werden und anschließend eine ähnliche Resorption wie die entsprechenden Glucoside zeigen. Daher und

vor allem aufgrund der Instabilität wurden keine weiteren Aufnahmeversuche mit den Malonylglucosiden durchgeführt.

Die freien Mykotoxine sowie deren Glucoside zeigten im Vergleich zu den Malonylglucosiden hingegen nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C eine Wiederfindung von 88–100 % verglichen mit dem Zeitpunkt Null (Abb. 32) und weisen somit eine ausreichende Stabilität für die Resorptionsversuche auf.

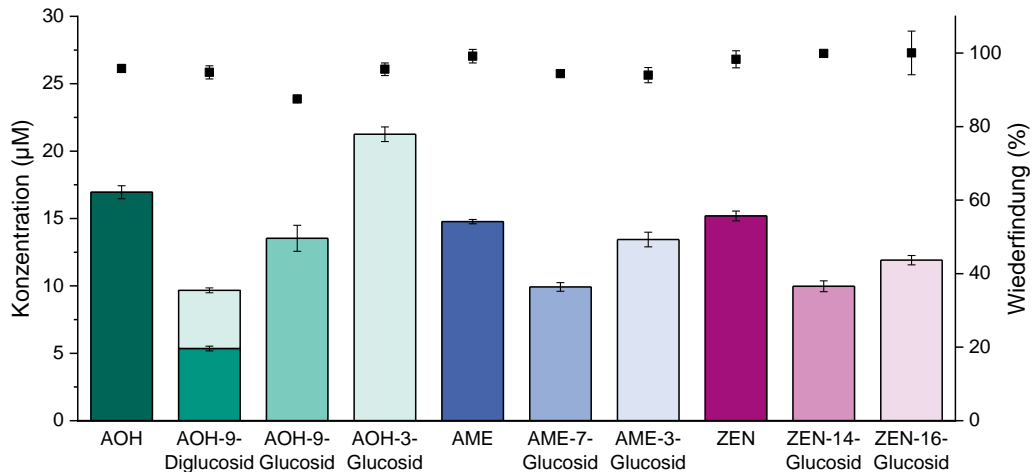


Abb. 32: Mittels LC-DAD gemessene Konzentrationen der Stammlösungen der freien bzw. modifizierten Mykotoxine (Säulendiagramm). AOH-9-Diglucosid setzt sich dabei zu 55,4 % aus AOH-9-Diglucosid und zu 44,6 % aus AOH-3-Glucosid zusammen. Das Punktdiagramm zeigt die Wiederfindung der jeweiligen Substanzen nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C.

Allerdings fiel bei den mittels LC-DAD-MS gemessenen Konzentrationen auf, dass die gewünschte Konzentration (20 µM) nur bei AOH-3-Glucosid annähernd eingestellt werden konnte. Die Quantifizierung erfolgte dabei über eine Kalibrierung, die aus der ursprünglichen 2 mM Stammlösung hergestellt wurde. Die Diskrepanz könnte möglicherweise auf Löslichkeitsprobleme zurückzuführen sein, da für die Stabilitätsversuche HBSS-Puffer und für die Kalibrierung Methanol zum Verdünnen der Stammlösung eingesetzt wurde. Außerdem wurden keine Abbauprodukte im LC-DAD-MS-Chromatogramm gefunden. Da die nachfolgenden Zellkulturversuche ebenfalls in HBSS-Puffer durchgeführt wurden, werden die in Abb. 32 gezeigten Konzentrationen für die folgenden Berechnungen verwendet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass ungelöste, ausgefallene Mykotoxine wieder nachgelöst werden können, wenn ein Teil der gelösten Mykotoxine metabolisiert werden und damit aus dem Gleichgewicht gezogen werden. Dies kann zu Über- bzw. Unterbestimmungen führen.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass aus ungeklärten Gründen die Lösung des AOH-9-Diglucosids mit AOH-3-Glucosid verunreinigt vorlag. Sie setzt sich aus 55,4 % AOH-9-Diglucosid und 44,6 % AOH-3-Glucosid zusammen (Abb. 32).

4.4.2 Aufnahme und Metabolismus in Caco-2-Zellen

Um zu untersuchen, ob die modifizierten Formen von AOH, AME und ZEN in die Caco-2-Zellen aufgenommen, gespalten und / oder weiter metabolisiert werden, wurden Caco-2-Zellen in normalen Wellplatten kultiviert und bei 37 °C mit den entsprechenden Substanzen

inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die adhären Zellen jedes Wells gewaschen und mithilfe eines Kunststoffspatels abgekratzt. Der Überstand sowie die extrahierten Zellen wurden mittels LC-DAD-MS analysiert. Die Konzentrationen der Muttersubstanzen sowie der Glucuronide bzw. Sulfate wurden mithilfe externer Kalibriergeraden für AOH, AME (UV-Detektion bei 254 nm) bzw. ZEN (UV-Detektion bei 280 nm) bestimmt.

Zur Überprüfung des Modellsystems wurden Positivkontrollen mit den freien Mykotoxinen durchgeführt sowie mit Literaturdaten verglichen. Die LC-DAD-MS-Analyse ergab für AOH, AME und ZEN ähnliche Ergebnisse wie in den Publikationen von Burkhardt *et al.* (2009) und Pfeiffer *et al.* (2011).

Aufnahme und Metabolismus von AOH, AME und deren modifizierten Formen

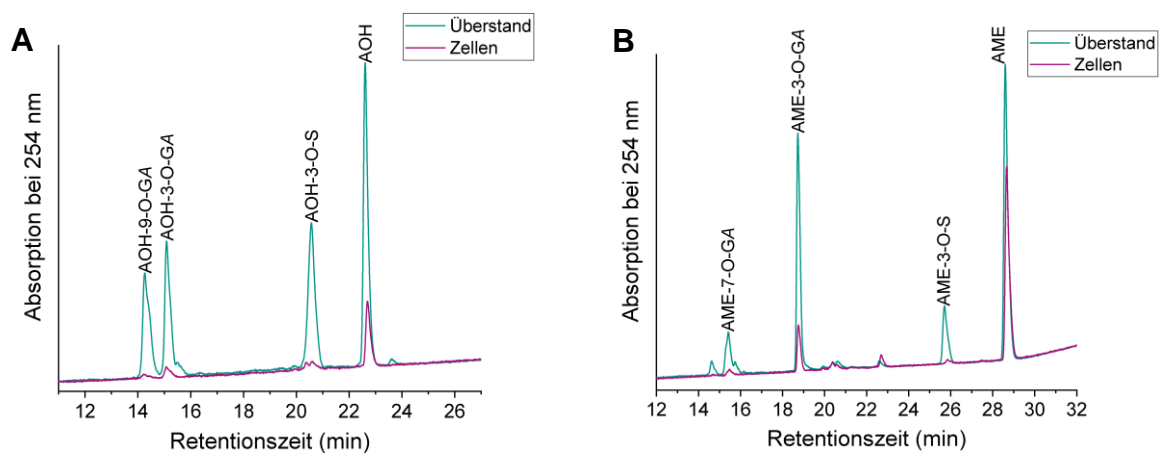


Abb. 33: HPLC-Profile des Überstands (Medium) und der extrahierten Caco-2-Zellen nach dreistündiger Inkubation mit AOH (A) und AME (B) in normalen Wellplatten. Die Zuordnung der Verknüpfungspositionen erfolgte tentativ. GA = Glucuronid, S = Sulfat.

Sowohl für AOH als auch für AME konnten zwei Glucuronide (m/z 433 bzw. 447) sowie ein Sulfat (m/z 337 bzw. 351) detektiert werden (Abb. 33). Neben den $[M-H]^-$ -Quasimolekülen der Metaboliten konnten im MS^2 -Spektrum die $[M-Glucuronid-H]^-$ - bzw. $[M-Sulfat-H]^-$ -Ionen (m/z 257 bzw. 271) detektiert werden. Die Position der Glucuronidgruppen wurde durch Literaturvergleich anhand der Retentionszeiten und Elutionsreihenfolge tentativ zugeordnet (Burkhardt *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2009b). Diese Zuordnungen basieren auf den chromatographischen Eigenschaften der Glucuronide. Für eine exakte Bestimmung der Verknüpfungspositionen der Glucuronide sind allerdings NMR-Daten unabdingbar. Bei den Sulfaten erfolgte ein Vergleich der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen. Die genannten Metaboliten wurden hauptsächlich im Überstand wiedergefunden, während in den Zellen lediglich AOH (Abb. 33 A) bzw. AME und ein AME-Glucuronid (Abb. 33 B) quantifiziert werden konnten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Burkhardt *et al.* (2009). Die Autoren fanden ebenfalls im Überstand größere Mengen an Metaboliten, während in den Zellen hauptsächlich die Aglykone vorlagen. Prozentual wurden von der eingesetzten AOH- bzw. AME-Menge $39,1 \pm 1,1$ % bzw. $50,5 \pm 5,9$ % wiedergefunden, was möglicherweise auf eine unvollständige Zellextraktion oder auf die schlechte Löslichkeit der Mykotoxine zurückzuführen ist (Kapitel 4.4.1). Die Positiv-Kontrollen mit den freien Mykotoxinen

zeigten qualitativ einen mit früheren Publikationen vergleichbaren Metabolismus, weshalb das Testsystem als geeignet beurteilt wurde.

Abb. 34 zeigt neben der prozentualen Verteilung der wiedergefundenen Verbindungen / Metaboliten von AOH auch die Ergebnisse der dreistündigen Inkubationen der modifizierten AOH-Metaboliten. Dabei fällt auf, dass das ursprünglich eingesetzte AOH-9-Glucosid lediglich 45 % der insgesamt wiedergefundenen Verbindungen ausmacht. Des Weiteren wurde AOH-9-Glucosid von den Caco-2-Zellen zu AOH gespalten, das sowohl im Überstand als auch in den Zellen detektiert werden konnte. Zusätzlich wurden die Metaboliten AOH-9-Glucuronid, AOH-3-Glucuronid sowie AOH-3-Sulfat gebildet, die hauptsächlich im Überstand vorlagen. In den Zellen wurden Spuren von AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid sowie von AOH-9-Glucosid gefunden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das AOH-9-Glucosid in die Zellen aufgenommen, gespalten und weiter metabolisiert wird. Zu beachten ist allerdings, dass die Summe der Stoffmengen der wiedergefundenen Verbindungen nur $65,3 \pm 6,3$ % der zur Inkubation eingesetzten Menge ausmacht.

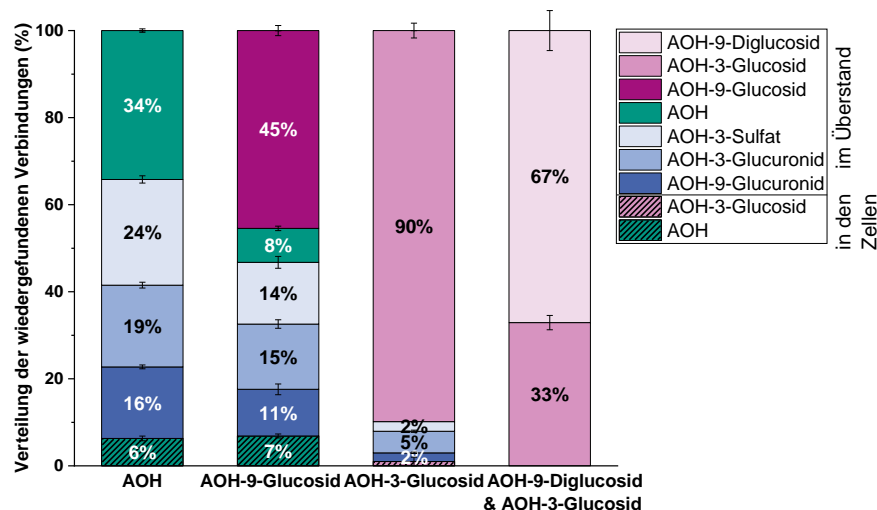


Abb. 34: Prozentuale Verteilung der detektierten Verbindungen im Überstand (nicht schraffiert) sowie in den extrahierten Caco-2-Zellen (schraffiert) nach dreistündiger Inkubation von AOH, AOH-9-Glucosid, AOH-3-Glucosid bzw. AOH-9-Diglucosid in normalen Wellplatten. Zu beachten ist, dass die Wiederfindung von AOH bei $39,1 \pm 1,1$ %, von AOH-9-Glucosid bei $65,3 \pm 6,3$ %, von AOH-3-Glucosid bei $71,4 \pm 1,9$ % und von AOH-9-Diglucosid bei $85,9 \pm 5,4$ % liegt.

Im Vergleich dazu wurde nach der Inkubation von AOH-3-Glucosid ein hoher Anteil (90 %) der Ausgangssubstanz unverändert wiedergefunden. Lediglich 10 % machten die zwei Glucuronide von AOH an den Positionen 3 und 9 sowie das AOH-3-Sulfat, die im Zellüberstand gefunden wurden, aus. Freies AOH wurde in Spuren sowohl im Überstand als auch in den Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus konnten geringe Mengen des AOH-3-Glucosids in den Zellen quantifiziert sowie zwei AOH-Glucuronide in den Zellen nachgewiesen werden. Somit ist auch bei AOH-3-Glucosid davon auszugehen, dass dieses in die Zellen aufgenommen, gespalten und weiter metabolisiert wird, allerdings zu einem geringeren Ausmaß als AOH-9-Glucosid. Die Position der Glucosylierung scheint somit einen Einfluss auf die Aufnahme in die Caco-2-Zellen zu haben. Auch für die Betrachtungen bezüglich des AOH-3-Glucosids ist jedoch zu beachten, dass nicht die gesamte eingesetzte Stoffmenge wiedergefunden wurde ($71,4 \pm 1,9$ %).

Die Auswertung der Daten aus der Inkubation des Gemisches aus AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid zeigt, dass keine nennenswerte Aufnahme, Spaltung oder Metabolisierung in den Caco-2-Zellen stattfand. Lediglich Spuren von AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid wurden in den Zellen nachgewiesen, was auf eine geringe Aufnahme hindeutet. Insbesondere zeigt der Vergleich der Versuche mit AOH-9-Diglucosid bzw. mit AOH-9-Glucosid, dass Disaccharide weniger effizient aufgenommen werden als Monosaccharide. Im Überstand der mit einem Gemisch aus AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid inkubierten Caco-2-Zellen konnten geringe Mengen an AOH-9-Glucosid nachgewiesen werden, die durch Spaltung des Gentiobiosids entstanden sein könnten. Da das AOH-3-Glucosid bereits im Einzelversuch hauptsächlich intakt blieb, deckt sich dies mit den Ergebnissen aus dem kombinierten Versuch mit AOH-9-Diglucosid. Die Gesamtwiederfindung der eingesetzten Stoffmenge lag bei $85,9 \pm 5,4 \%$.

Es lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die insgesamt wiedergefundene Stoffmenge höher ist, wenn weniger Metaboliten gebildet werden. Dies könnte zum einen durch einen unvollständigen Zellaufschluss oder zum anderen durch die relativ hohe Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze erklärt werden.

Die Ergebnisse der Metabolismusversuche der modifizierten Formen von AME sind in Abb. 35 dargestellt. Die Inkubation von AME-7-Glucosid in Gegenwart von Caco-2-Zellen ergab eine relativ geringe Umsetzung der Ausgangsverbindung. 80 % der wiedergefundene Stoffmenge entsprechen dem ursprünglich eingesetzten AME-7-Glucosid im Überstand. Des Weiteren konnten dort das AME-3-Glucuronid und das AME-3-Sulfat bestimmt sowie AME nachgewiesen werden.

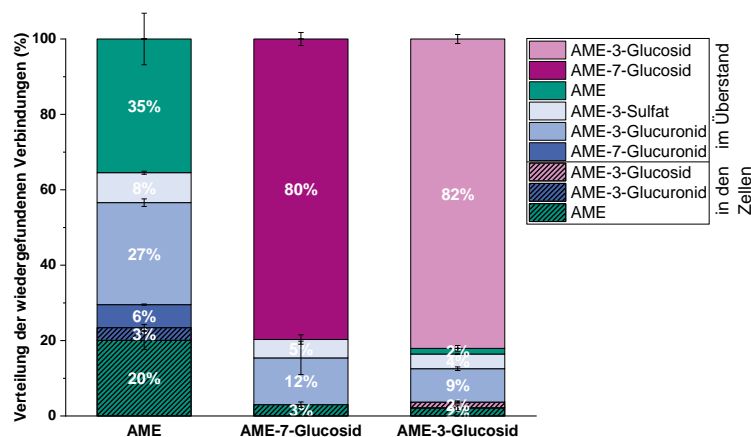


Abb. 35: Prozentuale Verteilung der detektierten Verbindungen im Überstand (nicht schraffiert) sowie in den extrahierten Caco-2-Zellen (schraffiert) nach dreistündiger Inkubation von AME, AME-7-Glucosid bzw. AME-3-Glucosid in normalen Wellplatten. Zu beachten ist, dass die Wiederfindung von AME bei $50,5 \pm 5,9 \%$, von AME-7-Glucosid bei $92,6 \pm 7,5 \%$ und von AME-3-Glucosid bei $109,7 \pm 3,9 \%$ liegt.

In den Zellen lag AME in quantifizierbaren Mengen vor, wohingegen AME-7-Glucosid, AME-Glucuronid und AME-3-Sulfat lediglich in Spuren nachgewiesen werden konnten. Insgesamt lag die Wiederfindung bei $92,6 \pm 7,5 \%$.

Eine ähnliche Verteilung ergab sich nach Inkubation von AME-3-Glucosid. 82 % der wiedergefundene Stoffmenge macht die Ausgangssubstanz im Überstand aus, in dem auch AME-3-Glucuronid, AME-3-Sulfat und AME in quantifizierbaren Mengen vorlagen. In den

Zellen befand sich die Ausgangssubstanz AME-3-Glucosid sowie dessen Aglykon AME und Spuren von AME-3-Glucuronid. Die Wiederfindung über alle Verbindungen im Überstand und in den Zellen lag bei $109,7 \pm 3,9 \%$.

Die Versuche mit den beiden modifizierten Formen von AME deuten ebenfalls auf eine, wenngleich nicht stark ausgeprägte, Aufnahme in die Zellen, Spaltung der Metaboliten und weitere Metabolisierung hin.

Aufnahme und Metabolismus von ZEN und dessen modifizierten Formen

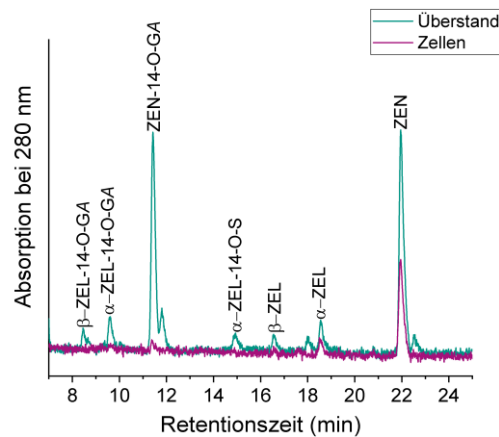


Abb. 36: HPLC-Profil des Überstands und der extrahierten Caco-2-Zellen nach dreistündiger Inkubation mit ZEN in normalen Wellplatten. Die Zuordnung der Verknüpfungspositionen bzw. der ZEL-Isomere erfolgte tentativ. GA = Glucuronid, S = Sulfat.

Im Überstand der mit ZEN inkubierten Zellen konnten ZEN sowie ein Glucuronid (m/z 493) quantifiziert werden (Abb. 36). Daneben konnten die beiden reduzierten Formen α - und β -ZEL (m/z 319) sowie zwei Glucuronide (m/z 495) und ein Sulfat (m/z 399) von ZEL nachgewiesen werden. Im MS^2 -Spektrum konnte die Abspaltung des Glucuronids bzw. Sulfats zu den jeweiligen Aglykonen ZEN bzw. ZEL (m/z 317 bzw. 319) beobachtet werden. Die Stereoisomerie von ZEL und die Verknüpfungspositionen der Glucuronid- bzw. Sulfatgruppen wurden ebenfalls durch Literaturvergleich anhand der Retentionszeiten und Elutionsreihenfolge tentativ zugeordnet (Pfeiffer *et al.*, 2011). In den Zellen lag ZEN in quantifizierbaren Mengen vor. α -ZEL konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Insgesamt lag die Wiederfindung für ZEN bei $38,6 \pm 0,9 \%$, während Pfeiffer *et al.* (2011) $73,8 \pm 2,9 \%$ wiederfanden. Die geringere Gesamtwiederfindung resultiert vermutlich größtenteils aus der geringeren ZEN-Menge (ca. $15 \mu M$ im Vergleich zu $40 \mu M$) und der damit verbundenen schlechteren Quantifizierbarkeit. Da keine Standardsubstanzen für die entsprechenden Glucuronide bzw. Sulfate verfügbar sind, wurden sie auf Basis des molaren Extinktionskoeffizienten von ZEN quantifiziert. Wie bereits in Kapitel 4.1.2.4 erwähnt, kann sich das Absorptionsmaximum je nach Verknüpfungsposition verschieben. Da jedoch hauptsächlich Konjugate an Position 14 von ZEN gebildet wurden, und diese Konjugation nur einen geringen Effekt auf das UV-Spektrum hat, wurde bei 280 nm ausgewertet. Lediglich die Konzentration von ZEN-16-Glucosid wurde bei 239 nm bestimmt. Neben möglichen Fehlerquellen bei der Quantifizierung könnten auch eine unvollständige Zellextraktion und die schlechte Löslichkeit von ZEN zu der geringen Gesamtwiederfindung beitragen.

Im Gegensatz zu den pflanzlichen AOH- und AME-Metaboliten, konnten für die pflanzlichen ZEN-Metaboliten keine quantifizierbaren Mengen an ZEN bzw. ZEN-Metaboliten der Caco-2-Zellen im Überstand oder in den Zellen detektiert werden. Abb. 37 zeigt die Ergebnisse des Metabolismusversuchs von ZEN, ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid.

Trotz der nicht quantifizierbaren Umsetzung der pflanzlichen Metaboliten ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid konnten Unterschiede im Metabolitenprofil der beiden Substanzen nach Inkubation mit Caco-2-Zellen auf den Massenspuren beobachtet werden. Während im Überstand der mit ZEN-14-Glucosid inkubierten Caco-2-Zellen ZEN-14-Glucuronid, ZEN-14-Sulfat und α -ZEL-14-Sulfat auf den jeweiligen Massenspuren detektiert werden konnten, war bei ZEN-16-Glucosid lediglich in einer Probe der Doppelbestimmung ZEN-14-Glucuronid auf der entsprechenden Massenspur sichtbar.

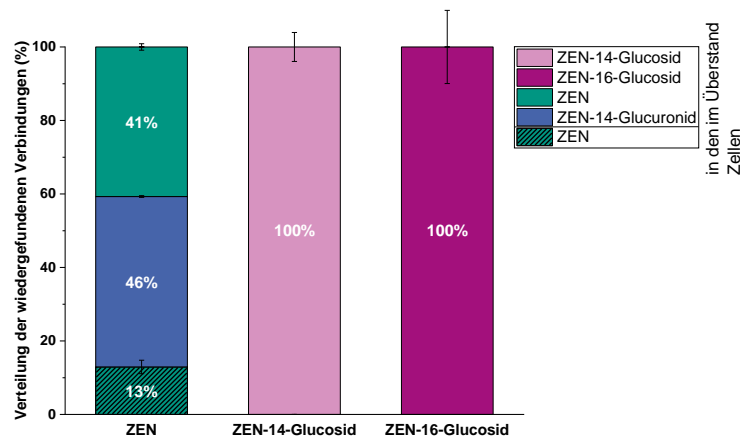


Abb. 37: Prozentuale Verteilung der detektierten Verbindungen im Überstand (nicht schraffiert) sowie in den extrahierten Caco-2-Zellen (schraffiert) nach dreistündiger Inkubation von ZEN, ZEN-14-Glucosid bzw. ZEN-16-Glucosid in normalen Wellplatten. Zu beachten ist, dass die Wiederfindung von ZEN bei $57,1 \pm 1,7$ %, von ZEN-14-Glucosid bei $117,2 \pm 4,6$ % und von ZEN-16-Glucosid bei $33,3 \pm 3,3$ % liegt.

Dies deutet an, dass potentiell auch hier Unterschiede in der Spaltbarkeit der Glucoside je nach Verknüpfungsposition bestehen. In der Literatur konnte ebenfalls in Caco-2-Zellen ein Unterschied in der Metabolisierung zwischen ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid festgestellt werden. Bei der Inkubation von ZEN-14-Glucosid nahm die Konzentration von ZEN-14-Glucosid in den Zellen konzentrations- und zeitabhängig zu und bereits nach einer Stunde wurde ZEN im Medium gefunden. Im Gegensatz dazu nahm ZEN-16-Glucosid zwar auch konzentrations- und zeitabhängig in den Zellen zu, jedoch war die Gesamtkonzentration im Vergleich zu ZEN-14-Glucosid geringer. Des Weiteren wurde freies ZEN erst nach sechsständiger Inkubation mit ZEN-16-Glucosid freigesetzt (Cirlini *et al.*, 2016). In einer weiteren Studie konnte keine zelluläre Aufnahme der modifizierten Formen von ZEN festgestellt werden (Gratz *et al.*, 2017). Eine gewisse Variabilität der Ergebnisse ist in Zellkulturversuchen üblich, da diese von vielen verschiedenen Faktoren abhängig sind. Darunter fallen beispielsweise der Zellklon, die Zellpassagennummer, das verwendete Medium, eingesetzte Konzentrationen, die Integrität der Zellen, verwendete analytische Methoden sowie DMSO-Konzentrationen und weitere Faktoren (Press & Di Grandi, 2008).

4.4.3 Untersuchungen im *Transwell*-Modell

Für die Untersuchung der *in vitro*-Resorption wurde ein *Transwell*-Modell herangezogen, in dem der Transport vom apikalen zum basolateralen Bereich analysiert wurde. Hierfür wurden die Caco-2-Zellen in *Transwell*-Inserts für drei Wochen kultiviert und der apikale Bereich für eine bzw. drei Stunden bei 37 °C mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurden das apikale und das basolaterale Medium abgenommen und mittels LC-DAD-MS analysiert. Die Konzentrationen von AOH, AME und ZEN sowie der Glucuronide bzw. Sulfate wurde mithilfe externer Kalibriergeraden der freien Mykotoxine bestimmt. Zur Überprüfung der Intaktheit des Zellmonolayers wurden die Caco-2-Zellen auf dem *Transwell*-Insert mit LY für eine Stunde nachinkubiert und der Inhalt des basolateralen Kompartiments fluorimetrisch vermessen. Dabei wurde in Anlehnung an Literaturwerte eine Transportrate von < 2 % als Integritätskriterium festgelegt (Debebe *et al.*, 2012).

4.4.3.1 ZEN und pflanzliche ZEN-Metaboliten im *Transwell*-Modell

Für ZEN, ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid wurden bereits Studien mit Caco-2-Zellen im *Transwell*-Modell durchgeführt (Pfeiffer *et al.*, 2011; Cirlini *et al.*, 2016; Gratz *et al.*, 2017). Diese Substanzen wurden daher in Kontrollversuchen mitgeführt. Tab. 13 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten *Transwell*-Versuche mit ZEN und dessen Metaboliten.

Tab. 13: Ergebnisse der *Transwell*-Versuche nach Inkubation mit ZEN, ZEN-14-Glucosid und ZEN-16-Glucosid in Dreifachbestimmung (t=Inkubationsdauer, G=Glucosid, GA=Glucuronid, S=Sulfat)

Substanz	eingesetzte Stoffmenge (nmol)	t	Kompartiment	Stoffmenge (nmol)				Wiederfindung (%)	
				Ausgangssubstanz	ZEN	ZEN-14-GA	ZEN-14-S		α -ZEL-14-S
ZEN	1,52	1 h	apikal		nb	nb	nb	nb	0
			basolateral		nb	nb	nb	nn	
		3 h	apikal		nb	nb	nb	nb	0
			basolateral		nb	nb	nb	nb	
ZEN-14-G	1,00	1 h	apikal	0,62 \pm 0,05	nn	nn	nb	nb	62
			basolateral	nn	nn	nn	nn		
		3 h	apikal	0,70 \pm 0,10	nb	nb	nb	nb	70
			basolateral	nn	nn	nn	nn	nn	
ZEN-16-G	1,19	1 h	apikal	0,90 \pm 0,10	nn	nn	nn	nn	75
			basolateral	nn	nn	nn	nn		
		3 h	apikal	0,85 \pm 0,05	nn	nn	nn	nn	71
			basolateral	nn	nn	nn	nn	nn	

nn nicht nachweisbar

nb nachweisbar, aber nicht bestimmbar

Die einstündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit ZEN ergab, dass im apikalen Bereich sowohl ZEN selbst als auch ZEN-14-Glucuronid, ZEN-14-Sulfat und α -ZEL-14-Sulfat zwar detektiert, jedoch nicht quantifiziert werden konnten. Bis auf α -ZEL-14-Sulfat waren alle zuvor genannten Verbindungen auch im basolateralen Kompartiment zu finden. Da die Nachweisgrenze für ZEN und dessen Metaboliten relativ hoch ist und sich die eingesetzte Stoffmenge auf relativ viele Verbindungen verteilt, konnte keine Quantifizierung erfolgen, weshalb die Wiederfindung bei 0 % liegt. Ebenso konnte nach dreistündiger Inkubation keine Quantifizierung erfolgen. Im Vergleich zur Inkubationsdauer von einer Stunde wurde zusätzlich α -ZEL-14-Sulfat im basolateralen Bereich nachgewiesen.

Bei der einstündigen Inkubation von ZEN-14-Glucosid konnte 62 % der eingesetzten Stoffmenge als ZEN-14-Glucosid im apikalen Kompartiment wiedergefunden werden. Des Weiteren wurden dort ZEN-14-Sulfat und α -ZEL-14-Sulfat nachgewiesen, wohingegen im basolateralen Kompartiment keine Verbindungen detektiert wurden. Nach dreistündiger Inkubation und 70 %iger Wiederfindung der Ausgangssubstanz konnten darüber hinaus ZEN und ZEN-14-Glucuronid auf der apikalen Seite nachgewiesen werden. Basolateral konnten allerdings auch bei längerer Inkubationsdauer keine Verbindungen nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass ZEN-14-Glucosid zwar von den Caco-2-Zellen gespalten und weiter metabolisiert werden kann, allerdings keine Resorption zur basolateralen Seite stattfindet.

Im Gegensatz dazu konnten für ZEN-16-Glucosid weder nach einstündiger noch nach dreistündiger Inkubation zusätzliche Verbindungen außer der Ausgangssubstanz nachgewiesen werden. Die Gesamtwiederfindungen lagen bei 75 und 71 %. Ähnlich wie bei dem Metabolismusversuch (Kapitel 4.4.2) kann in diesem Versuch geschlossen werden, dass auch die humane cytosolische β -Glucosidase zwar ZEN-14-Glucosid freisetzen kann, jedoch nicht das ZEN-16-Glucosid. Die Unterschiede in der Aufnahme und Spaltungsfähigkeit wurden wie bereits beschrieben auch von Cirlini *et al.* (2016) beobachtet. Allerdings konnten Cirlini *et al.* (2016) geringe Mengen an ZEN-14-Glucosid (0,5 %) bzw. ZEN-16-Glucosid (0,1 %) und ZEN (0,5–2 % bzw. 0,4 %) im basolateralen Kompartiment feststellen. Dies könnte durch die niedrigere eingesetzte Konzentration und die relativ hohen Nachweisgrenzen in dem hier eingesetzten System bedingt sein. Im Gegensatz dazu konnten Gratz *et al.* (2017) keine Resorption in die Caco-2-TC7-Zellen beobachten, was sich möglicherweise durch die eingesetzten Caco-2-Zellklone oder unterschiedlichen Kulturbedingungen erklären lässt.

4.4.3.2 AOH und pflanzliche AOH-Metaboliten im *Transwell*-Modell

In Tab. 14 sind die Ergebnisse der *Transwell*-Versuche von AOH und der drei pflanzlichen Metaboliten von AOH zusammengefasst. Bei der Inkubation mit AOH konnte bereits nach einer Stunde neben freiem AOH auch AOH-Sulfat im apikalen Kompartiment quantifiziert werden. Die Gesamtwiederfindung der insgesamt eingesetzten Menge beträgt allerdings nur 22 %, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass sich ein größerer Teil in den Zellen befindet. Nach dreistündiger Inkubation konnten zusätzlich AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid im apikalen Kompartiment bestimmt werden. Des Weiteren konnte im basolateralen Kompartiment auf den Massenspuren neben AOH auch AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid sowie AOH-3-Sulfat nachgewiesen werden. Die Gesamtwiederfindung lag bei 35 %, was ungefähr der Wiederfindung im Überstand bei den Metabolismusversuchen entspricht (37 %, Abb. 34). Qualitativ sind diese Ergebnisse mit den Daten von Burkhardt *et al.* (2009) vergleichbar.

Nach einstündiger Inkubation der Caco-2-Zellen mit AOH-9-Glucosid konnten neben AOH-9-Glucosid auch freies AOH im Überstand quantifiziert und AOH-3-Sulfat bestimmt werden. Im basolateralen Kompartiment wurde AOH auf der Massenspur detektiert. Dies bedeutet, dass AOH-9-Glucosid von Caco-2-Zellen gespalten werden kann und freies AOH auf die basolaterale Seite abgegeben werden kann. Die geringe Gesamtwiederfindung von 30 % ist

möglicherweise durch nicht bestimmte Metaboliten in den Zellen zu erklären. Die Inkubation von AOH-9-Glucosid für drei Stunden zeigt, dass die Ausgangssubstanz weiter abgebaut wurde, da die Konzentration für eine Quantifizierung zu gering war. Des Weiteren war die Metabolisierung durch die Caco-2-Zellen weiter vorangeschritten, da freies AOH lediglich nachgewiesen, aber nicht bestimmt werden konnte und AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid sowie AOH-3-Sulfat in größeren Mengen gebildet wurden. Auch im basolateralen Kompartiment wurden neben freiem AOH zusätzlich AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid auf den Massenspuren detektiert. Die Gesamtwiederfindung lag bei 40 %.

Tab. 14: Ergebnisse der *Transwell*-Versuche nach Inkubation mit AOH, AOH-9-Diglucosid / AOH-3-Glucosid-Gemisch, AOH-9-Glucosid und AOH-3-Glucosid in Dreifachbestimmung (t=Inkubationsdauer, DiG=Diglucosid, G=Glucosid, GA=Glucuronid, S=Sulfat)

Substanz	eingesetzte Stoffmenge (nmol)	t	Kompartiment	Stoffmenge (nmol)					Wiederfindung (%)
				Ausgangssubstanz	AOH	AOH-9-GA	AOH-3-GA	AOH-3-S	
AOH	1,69	1 h	apikal		0,23 ± 0,04	nn	nn	0,15 ± 0,04	22
			basolateral		nn	nn	nn	nn	
		3 h	apikal		nn	0,20 ± 0,06	0,22 ± 0,06	0,17 ± 0,05	35
			basolateral		nb	nb	nb	nb	
AOH-9-G	1,35	1 h	apikal	0,24 ± 0,06	0,16 ± 0,04	nn	nn	nb	30
			basolateral	nn	nb	nn	nn	nn	
		3 h	apikal	nn	nb	0,17 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,06	40
			basolateral	nb	nb	nb	nb	nn	
AOH-3-G	2,12	1 h	apikal	1,17 ± 0,14	nb	nn	nn	0,09 ± 0,03	59
			basolateral	nn	nn	nn	nn	nn	
		3 h	apikal	0,52 ± 0,17	0,05 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,16 ± 0,06	0,20 ± 0,07	57
			basolateral	nn	nn	nn	0,16 ± 0,03*	nn	
AOH-9-DiG & AOH-3-G	0,97	1 h	apikal	0,67 ± 0,13	nb	nn	nn	nb	70
			basolateral	nn	nn	nn	nn	nn	
		3 h	apikal	0,59 ± 0,07	nb	nb	nb	nb	61
			basolateral	nn	nn	nb	nb	nn	

nn nicht nachweisbar

nb nachweisbar, aber nicht bestimmbar

* Wert stammt aus zwei Versuchen der Dreifachbestimmung

Im Gegensatz zu AOH-9-Glucosid konnte bei der einstündigen Inkubation mit AOH-3-Glucosid lediglich im apikalen Kompartiment die Ausgangssubstanz AOH-3-Glucosid sowie geringe Mengen an AOH-3-Sulfat bestimmt, jedoch keine Substanzen im basolateralen Kompartiment nachgewiesen werden. Allerdings wurde AOH-3-Glucosid nach dreistündiger Inkubation weiter zu AOH abgebaut und dieses wiederum zu AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid sowie AOH-3-Sulfat metabolisiert. Auch im basolateralen Kompartiment konnten in zwei Versuchen der Dreifachbestimmung quantifizierbare Mengen an AOH-3-Glucuronid gemessen werden. Die Gesamtwiederfindungen der ein- und dreistündigen Inkubationen lagen bei 59 und 57 %. Während die Ausgangsverbindung AOH-3-Glucosid im Metabolismusversuch nach dreistündiger Inkubation 90 % der insgesamt wiedergefundenen Metaboliten ausmacht (Kapitel 4.4.2), sind es im *Transwell*-Versuch lediglich 42 % nach dreistündiger Inkubation. Die restlichen 58 % verteilen sich auf die beiden Glucuronide, das AOH-Sulfat und freies AOH. Der *Transwell*-Versuch zeigt somit, dass auch AOH-3-Glucosid von den Caco-2-Zellen aufgenommen, gespalten und als Metabolit auf die basolaterale Seite abgegeben werden kann.

Bei der einstündigen Inkubation der Caco-2-Zellen mit einem Gemisch aus AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid konnte neben den Ausgangsverbindungen auch freies AOH und AOH-3-Sulfat auf den Massenspuren im apikalen Kompartiment nachgewiesen werden. Im basolateralen Kompartiment hingegen konnte noch kein freies AOH bzw. keine Metaboliten detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten nach dreistündiger Inkubation auf apikaler Seite zusätzlich AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid sowie auf basolateraler Seite AOH-9-Glucuronid und AOH-3-Glucuronid nachgewiesen werden. Die Gesamtwiederfindungen lagen hierbei bei 70 und 61 %. Da es sich um ein Gemisch aus AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid handelt, ist in diesem Versuch nicht eindeutig festzustellen, ob AOH-9-Diglucosid ebenfalls gespalten wurde.

4.4.3.3 AME und pflanzliche AME-Metaboliten im Transwell-Modell

Die Ergebnisse der *Transwell*-Versuche mit AME, AME-3-Glucosid und AME-7-Glucosid sind in Tab. 15 dargestellt. Die einstündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit AME ergab eine sehr geringe Gesamtwiederfindung von 15 %. Dabei konnte lediglich AME im apikalen Kompartiment quantifiziert werden. Daneben konnte AME-3-Sulfat apikal und AME-3-Glucuronid apikal sowie basolateral nachgewiesen werden. Bei der dreistündigen Inkubation waren AME und AME-7-Glucuronid nachweisbar, während AME-3-Glucuronid und AME-3-Sulfat quantifiziert werden konnten. Diese machten 40 % der eingesetzten AME-Menge aus. Des Weiteren wurden im basolateralen Kompartiment AME-7-Glucuronid und AME-3-Glucuronid nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen qualitativ im Einklang mit den Daten von Burkhardt *et al.* (2009).

Tab. 15: Ergebnisse der *Transwell*-Versuche nach Inkubation mit AME, AME-7-Glucosid und AME-3-Glucosid in Dreifachbestimmung (t=Inkubationsdauer, G=Glucosid, GA=Glucuronid, S=Sulfat)

Substanz	eingesetzte Stoffmenge (nmol)	t	Kompartiment	Stoffmenge (nmol)					Wiederfindung (%)
				Ausgangssubstanz	AME	AME-7-GA	AME-3-GA	AME-3-S	
AME	1,48	1 h	apikal		0,22 ± 0,04	nn	nb	nb	15
			basolateral		nn	nn	nb	nn	
		3 h	apikal		nb	nb	0,39 ± 0,09	0,20 ± 0,03	40
			basolateral		nn	nb	nb	nn	
AME-7-G	0,99	1 h	apikal	0,50 ± 0,04	nb	nn	nb	nb	51
			basolateral	nn	nn	nn	nn		
		3 h	apikal	0,13 ± 0,04	nn	nn	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,02	70
			basolateral	nn	nn	nn	0,08 ± 0,04	nb*	
AME-3-G	1,34	1 h	apikal	1,04 ± 0,05	nb	nn	nb	nb	77
			basolateral	nn	nn	nn	nn		
		3 h	apikal	0,42 ± 0,09	nb	nn	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,03	63
			basolateral	nn	nn	nn	nb	nn	

nn nicht nachweisbar
 nb nachweisbar, aber nicht bestimmbar
 * in zwei Versuchen der Dreifachbestimmung nachgewiesen

Bei der einstündigen Inkubation der Caco-2-Zellen mit AME-7-Glucosid konnte 51 % der eingesetzten Menge als Ausgangsverbindung im apikalen Kompartiment wiedergefunden werden. Daneben konnten freies AME sowie AME-3-Glucuronid und AME-3-Sulfat apikal nachgewiesen werden, wohingegen basolateral keine Verbindungen detektiert wurden. Erst nach dreistündiger Inkubation konnten im basolateralen Kompartiment geringe Mengen von AME-3-Glucuronid quantifiziert und Spuren von AME-3-Sulfat nachgewiesen werden, was

auf eine Resorption hindeutet. Auf der apikalen Seite wurden neben der Ausgangssubstanz AME-7-Glucosid auch AME-3-Glucuronid und AME-3-Sulfat bestimmt. Die Gesamtwiederfindung lag bei 70 %.

Ebenso wie bei AME-7-Glucosid konnte auch bei einstündiger Inkubation mit AME-3-Glucosid lediglich die Ausgangsverbindung im apikalen Kompartiment quantifiziert und AME sowie AME-3-Glucuronid und AME-3-Sulfat detektiert werden, wohingegen basolateral keine Verbindung nachgewiesen werden konnte. AME-3-Glucosid machte dabei 77 % der eingesetzten Menge aus. Bei der dreistündigen Inkubation konnten apikal neben AME-3-Glucosid zusätzlich AME-3-Glucuronid und AME-3-Sulfat quantifiziert werden, die insgesamt 63 % der eingesetzten Menge ausmachten. Daneben wurden Spuren an AME nachgewiesen. Im basolateralen Kompartiment konnten außerdem geringe Mengen an AME-3-Glucuronid nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass AME-3-Glucosid von den Caco-2-Zellen aufgenommen, gespalten und basolateral wieder abgegeben wird.

4.4.3.4 Zusammenfassung der Resorptionsversuche

Mithilfe der *Transwell*-versuche konnte gezeigt werden, dass einige modifizierte Mykotoxine im Caco-2-Modell resorbiert werden können. Während für ZEN sowohl nach ein als auch nach dreistündiger Inkubationsdauer auf basolateraler Seite sowohl ZEN als auch Metaboliten nachgewiesen werden konnten, zeigten die modifizierten Formen ZEN-14- und ZEN-16-Glucosid keinen Transport auf die basolaterale Seite. Dies könnte jedoch möglicherweise auch nur an der relativ hohen Nachweisgrenze für ZEN und dessen Metaboliten liegen, sodass eine geringfügige Resorption, Metabolisierung und Abgabe an das basolaterale Kompartiment mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht erfasst wurde. Im Gegensatz dazu wurden AOH-9-Glucosid, AOH-3-Glucosid und AOH-9-Diglucosid gespalten und zu weiteren Metaboliten umgesetzt. Die gebildeten Metaboliten, die aus den ursprünglichen zwei AOH-Glucosiden resultierten, konnten spätestens nach dreistündiger Inkubation im basolateralen Bereich nachgewiesen werden. Auch bei den dreistündigen Inkubationen mit AME-7-Glucosid und AME-3-Glucosid konnte eine Spaltung und Metabolisierung sowie Metaboliten im basolateralen Bereich nachgewiesen werden. Da die Konzentrationen der nachgewiesenen Metaboliten auf basolateraler Seite für eine Quantifizierung teilweise zu gering waren, konnten lediglich für AOH-3-Glucosid und AME-7-Glucosid P_{app} -Werte (Gleichung (4)) berechnet werden. Diese lagen für AOH-3-Glucosid bei $2,1 \times 10^{-6}$ cm/s und für AME-7-Glucosid bei $1,7 \times 10^{-6}$ cm/s. Da bei P_{app} -Werten zwischen $1-10 \times 10^{-6}$ cm/s von einer mittleren Resorption ausgegangen werden kann (Yee, 1997) ist die Aufnahme modifizierter Mykotoxine nicht zu unterschätzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass modifizierte Mykotoxine bei der Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln berücksichtigt werden sollten, da sie möglicherweise im Dünndarm resorbiert und zu ihren Aglykonen, von denen ein toxisches Potential ausgeht, gespalten werden können.

4.5 Untersuchungen zur Zellwandbindung von Mykotoxinen

Neben den löslichen Mykotoxinkonjugaten, die im Phase I- und Phase II-Metabolismus gebildet werden, besteht die Möglichkeit, dass Mykotoxine im Zuge des Phase III-Metabolismus in die Zellwand eingelagert werden. Zwar wird darüber in der Literatur häufig gemutmaßt, allerdings mangelt es an Studien, die eine Zellwandbindung belegen. Daher und in Betracht der geringen Gesamtwiederfindung in den Zellkulturversuchen mit pflanzlichen Zellen (Kapitel 4.1.1.4 und Kapitel 4.1.2.4) sollen die Zellwände pflanzlicher Zellen aus Suspensionskulturen nach Inkubation in Gegenwart von AOH, AME und ZEN auf deren Anwesenheit in Zellwandfraktionen oder mögliche Bindung an Zellwandkomponenten untersucht werden. Hierfür wurden alkalische, saure und enzymatische Hydrolysen durchgeführt.

4.5.1 Versuche zur (physikalischen) Adsorption

Zunächst wurde überprüft, ob Mykotoxine durch physikalische adsorptive Kräfte an die Zellwand binden. Hierfür wurden filtrierte, gefriergetrocknete und gemörserte Tabakzellen (tote Zellen) mit Medium versetzt und für zwei Tage in Gegenwart von 100 bzw. 200 μM ZEN-Lösung inkubiert. Zusätzlich wurden autoklavierte Tabakzellen eingesetzt, um restliche Enzymaktivitäten ausschließen zu können. Nach erfolgter Inkubation wurden sowohl die Zellen als auch das Medium extrahiert. Die Extrakte wurden eingedampft und die Rückstände in Methanol gelöst. Die Extrakte wurden schließlich mittels LC-DAD auf ZEN untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 38 dargestellt.

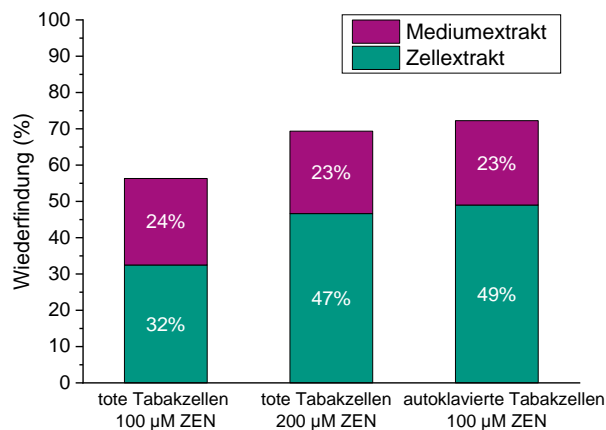


Abb. 38: Wiederfindung von ZEN im Tabakzellextrakt sowie im Mediumextrakt von toten bzw. autoklavierten Tabakzellen, die mit 100 bzw. 200 μM ZEN für zwei Tage inkubiert wurden.

Hierbei fällt auf, dass die Gesamtwiederfindungen von ZEN zwischen 56 und 72 % liegen. Um zu überprüfen, ob das ZEN tatsächlich am unlöslichen Zellextrakt adsorbiert und nicht-extrahierbar vorliegt, wurde der Rückstand in der Kugelmühle gemahlen, in einem Gemisch aus Pyridin- d_5 und DMSO- d_6 aufgenommen und anschließend ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Zum Vergleich diente ein HSQC-Spektrum von nicht-inkubierten Tabakzellen. Zusätzlich wurden nicht-inkubierte tote Tabakzellen mit einer ZEN-Standardlösung versetzt und direkt gemessen.

Würde ZEN adsorptiv an der Zellwand haften, sollten charakteristische Signale von ZEN im aromatischen Bereich sichtbar sein. Allerdings konnten in den inkubierten Zellrückständen keine ZEN-Signale beobachtet werden. Im HSQC-Spektrum der Tabakzellen waren nach Zugabe der ZEN-Standardlösung charakteristische Signale von ZEN in Konzentrationen sichtbar, die unterhalb der erwarteten Konzentration liegt, die sich nach Abzug der bereits detektierten ZEN-Menge in den Adsorptionsversuchen ergibt. Demnach lässt sich die Vermutung aufstellen, dass es bei den Adsorptionsversuchen entweder zu Verlusten bei der Extraktion kam oder dass sich ZEN nach dem Eindampfen nicht mehr vollständig in Methanol gelöst hat und daher unterbestimmt wurde. Da die autoklavierten Tabakzellen ähnliche Ergebnisse lieferten, können enzymatische Reaktionen ausgeschlossen werden.

4.5.2 Alkalische Hydrolyse

4.5.2.1 Vorversuche

Zur Untersuchung der in Gegenwart von Mykotoxinen inkubierten und extrahierten Zellrückstände wurden alkalische Hydrolysen durchgeführt, um eventuell gebundene Mykotoxine freizusetzen. Die Inkubationen für diese Versuche wurden mit Zellsuspensionssystemen, d.h. mit lebenden Zellen, durchgeführt. Mittels alkalischer Hydrolyse können Peptidbindungen in Proteinen gespalten werden sowie Lignin oder Hemicellulosen teilweise hydrolysiert bzw. freigesetzt werden, da sowohl Ether- (über Protonierung der α -Position) als auch Esterbindungen im Alkalischen gespalten werden.

In Vorversuchen wurden zunächst unterschiedliche Hydrolysebedingungen getestet, um die optimale Hydrolysetemperatur und -dauer für die Freisetzung von ZEN zu ermitteln, da vor allem ZEN in der Literatur als alkalilabil beschrieben wird (Kapitel 3.5.2). AOH und AME sind aufgrund ihres sechsgliedrigen Lactonrings mit den zwei benachbarten Aromaten wesentlich stabiler einzuschätzen als der 14-gliedrige Lactonring von ZEN. Die Hydrolysebedingungen sollten daher möglichst harsch sein, jedoch das freizusetzende Mykotoxin nicht strukturell beeinträchtigen. Die jeweiligen getesteten Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen von ZEN sind in Tab. 16 aufgeführt.

Tab. 16: Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen der Kontroll-Vorversuche Nr. 1.1 bis 2.2 für ZEN. NaOH = Natronlauge

Nr.	Lauge	Menge (ml)	Konzentration (M)	Temperatur (°C)	Dauer (h)	Wiederfindung (%)
1.1	NaOH	15	4	110	20	0
1.2	NaOH	15	4	110	3	2
2.1	NaOH	15	4	60	1	79
2.2	NaOH	15	4	60	3	65

Die Hydrolyse-Bedingungen der Versuche 1.1 und 1.2 orientierten sich an der amtlichen Untersuchungsmethode für die Bestimmung von Tryptophan in diätetischen Lebensmitteln nach §64 LFGB. Allerdings zeigte die Wiederfindung von ZEN, dass eine Hydrolyse bei 110 °C für 20 bzw. drei Stunden zu einem kompletten bzw. nahezu vollständigem Abbau von ZEN führt. Auf eine alkalische Hydrolyse des Lactonrings von ZEN kann eine Esterspaltung folgen, was eine irreversible Zerstörung von ZEN zur Folge hat (Krska & Josephs, 2001;

Schuhmacher *et al.*, 1998). Daher wurde in den Hydrolysen 2.1 und 2.2 eine geringere Temperatur von 60 °C gewählt. Diese Versuchsbedingungen richten sich nach Kim *et al.* (2003) und Park *et al.* (2004), die gebundene Fumonisine in Cornflakes und anderen maisbasierten Zerealien analysierten. Während bei einer einstündigen Hydrolyse 79 % des eingesetzten ZENs wiedergefunden wurden, waren nach dreistündiger Inkubation bereits 35 % des eingesetzten ZENs zerstört. Daher wurden für die Analyse der Zellwände die Hydrolysebedingungen von Versuch 2.1 gewählt.

4.5.2.2 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden jeweils 100 mg der extrahierten Zellrückstände von Tabak-, Soja- und Weizenzellkulturen aus Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 einer alkalischen Hydrolyse mittels NaOH (4 M, 60 °C, 1 h) unterzogen. Zusätzlich wurden Kontrollen mit allen Mykotoxinen ohne Zellen durchgeführt. Nach der Hydrolyse erfolgte eine Neutralisation mit 6 M HCl-Lösung. Das Hydrolysat wurde gefriergetrocknet und für die LC-DAD-MS-Analyse in Methanol aufgenommen.

Allerdings zeigten die Kontrollversuche ohne Zellen, dass AOH komplett bzw. AME nahezu vollständig zerstört wurden. ZEN lag unterhalb der Kalibrierung und wurde somit auch zu großen Teilen abgebaut. Zwar konnten im Vorversuch 79 % des eingesetzten ZENs wiedergefunden werden, allerdings wurde die Neutralisation aufgrund der hohen Probenzahl im Hauptversuch zeitlich verzögert durchgeführt, weshalb es eventuell zu höheren Verlusten kam. Des Weiteren wurden niedrigere Konzentrationen an Mykotoxinen in den Kontrollproben im Hauptversuch eingesetzt. Daher konnte übrig gebliebenes ZEN nicht mehr quantifiziert werden.

In den Versuchen mit den Zellrückständen konnte in keiner der Proben freie Mykotoxine gefunden werden. Aufgrund der hohen Instabilität der Mykotoxine im Alkalischen eignet sich somit die alkalische Hydrolyse nicht, um gebundene Formen von AOH, AME oder ZEN freizusetzen. Deren Lactonstrukturen werden im Alkalischen vermutlich gespalten und durch weitere Abspaltungen irreversibel zerstört. Daher wurde nachfolgend eine saure Hydrolyse durchgeführt.

4.5.3 Saure Hydrolyse

4.5.3.1 Vorversuche

Ebenso wie in Kapitel 4.5.2.1 wurden in Vorversuchen zunächst unterschiedliche Hydrolysebedingungen getestet. Hierbei wurde die optimale Hydrolysetemperatur, -dauer, Säurestärke und Konzentration der Säure für die Freisetzung der Mykotoxine ermittelt. Es sollte ein Kompromiss zwischen einer möglichst vollständigen Zellwandhydrolyse und einem geringen Abbau der Mykotoxine gefunden werden. Die Vorversuche wurden zunächst mit ZEN durchgeführt. Die jeweiligen Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen von ZEN sind in Tab. 17 aufgeführt.

Die Hydrolysen 1.1 und 1.2 wurden in Anlehnung an die Vorschriften von Zhou *et al.* (2007) und Liu *et al.* (2005) durchgeführt, wobei 1,25 M TFA (133 °C, 54 min) und 1 M TCA (140 °C, 40 min) in einem Lösungsmittelgemisch aus ACN und Wasser eingesetzt wurden. In den Versuchen 2.1 bis 2.3 wurde 2 M TFA in dem gleichen Lösungsmittelgemisch eingesetzt und die Hydrolysedauer variiert (40, 50 und 60 min). Des Weiteren wurde in den Versuchen 3.1 bis 3.3 bei gleichbleibender Hydrolysedauer die Konzentration der TFA variiert (2, 3 und 4 M ohne Zugabe von weiterem Lösungsmittel). Die Hydrolysen 4.1 und 4.2 wurden mit HCl mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Im Anschluss an die Hydrolysen wurde das Hydrolysat neutralisiert und eine SPE durchgeführt. Das Eluat wurde eingedampft, in Methanol aufgenommen und mittels LC-DAD-MS analysiert.

Tab. 17: Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen der Kontroll-Vorversuche Nr. 1.1 bis 4.2 für ZEN. TCA = Trichloressigsäure, TFA = Trifluoressigsäure, HCl = Salzsäure, ACN = Acetonitril

Nr.	Säure	Menge (ml)	Konzentration (M)	Lösungsmittel	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Wiederfindung (%)
1.1	TFA	1	1,25	4 ml ACN:H ₂ O (74/16, v/v)	133	54	87
1.2	TCA	1	1	und 2 ml H ₂ O	140	40	87
2.1	TFA	1	2	4 ml ACN:H ₂ O (74/16, v/v)	121	60	83
2.2	TFA	1	2	und 2 ml H ₂ O	121	50	83
2.3	TFA	1	2	-	121	40	84
3.1	TFA	3	2	-	121	60	89
3.2	TFA	3	3	-	121	60	90
3.3	TFA	3	4	-	121	60	46
4.1	HCl	15	6	-	110	1440	0
4.2	HCl	15	2	-	110	1440	0

Die Versuche 1.1 und 1.2 lieferten jeweils eine Wiederfindung von 87 %. Da TFA mit einem pK_s -Wert von 0,23 im Vergleich zu TCA ($pK_s = 0,65$) die stärkere Säure ist und in der Literatur häufiger Anwendung findet (insbesondere, um Zellwände zu hydrolysieren), wurde in den folgenden Versuchen TFA verwendet. Die Versuche 2.1 bis 2.3 zeigten, dass die Hydrolysedauern von 40, 50 und 60 Minuten keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität von ZEN hatten, weshalb eine 60-minütige Hydrolyse für die folgenden Versuche gewählt wurde. Bei der Wahl der geeigneten TFA-Konzentration konnte festgestellt werden, dass ZEN bei dem Einsatz von 3 M TFA noch stabil war, jedoch bei 4 M TFA zu 54 % abgebaut wurde. Daher sollte eine maximale Konzentration von 3 M TFA nicht überschritten werden.

Zur Spaltung von Proteinen durch saure Hydrolyse werden harschere Bedingungen benötigt, weshalb 6 M HCl in Versuch 4.1 eingesetzt wurde. Da ZEN unter den gegebenen Bedingungen jedoch vollständig zerstört vorlag, wurde in Versuch 4.2 als Kompromiss 2 M HCl eingesetzt. Hierbei konnte jedoch ebenfalls ein vollständiger Abbau von ZEN beobachtet werden. Aus diesem Grund und da es für eine Proteinhydrolyse harscherer Bedingungen bedarf, wurde auf eine Proteinhydrolyse mit HCl verzichtet.

4.5.3.2 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden jeweils 50 mg der extrahierten Zellrückstände von Tabak-, Soja- und Weizenzellkulturen aus Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 einer TFA-Hydrolyse (2 ml, 2 M, 121 °C, 60 min) unterzogen. Zusätzlich wurden Kontrollen mit allen Mykotoxinen ohne Zellen durchgeführt. Nach der Hydrolyse erfolgte eine Neutralisation mit 2 M KOH-Lösung. Das Hydrolysat wurde über eine SPE aufgereinigt, anschließend gefriergetrocknet und für die LC-DAD-MS-Analyse in Methanol aufgenommen. Um Verluste während der Probenvorbereitung (SPE) auszuschließen, wurden neben dem Eluat auch die aufgefangenen Lösungen nach der Probenaufgabe und dem Waschschrift mittels LC-DAD-MS analysiert.

In Abb. 39 sind die Ergebnisse der sauren Hydrolysen dargestellt. Während in den Lösungen nach der Probenaufgabe und dem Waschschrift keine Peaks detektiert werden konnten, zeigten die Kontrollversuche mit AOH, AME und ZEN ohne Zellen, dass AOH zu 85 %, AME zu 54 % und ZEN zu 33 % abgebaut wurde. Dies impliziert, dass vor allem AOH und AME bei den gewählten Bedingungen relativ instabil sind. Der stärkere Abbau von ZEN im Vergleich zu den Vorversuchen kann eventuell durch eine längere Standdauer in 2 M TFA erklärt werden, da mehrere Versuche auf einmal durchgeführt wurden. Des Weiteren kam es bei der Neutralisation mit KOH zur kurzfristigen Alkalisierung einiger Proben. Wie bereits in Kapitel 4.5.2 gezeigt wurde, sind die Mykotoxine AOH, AME und ZEN im Alkalischen relativ instabil, was sich auf die Wiederfindung in diesem Versuch auswirken könnte.

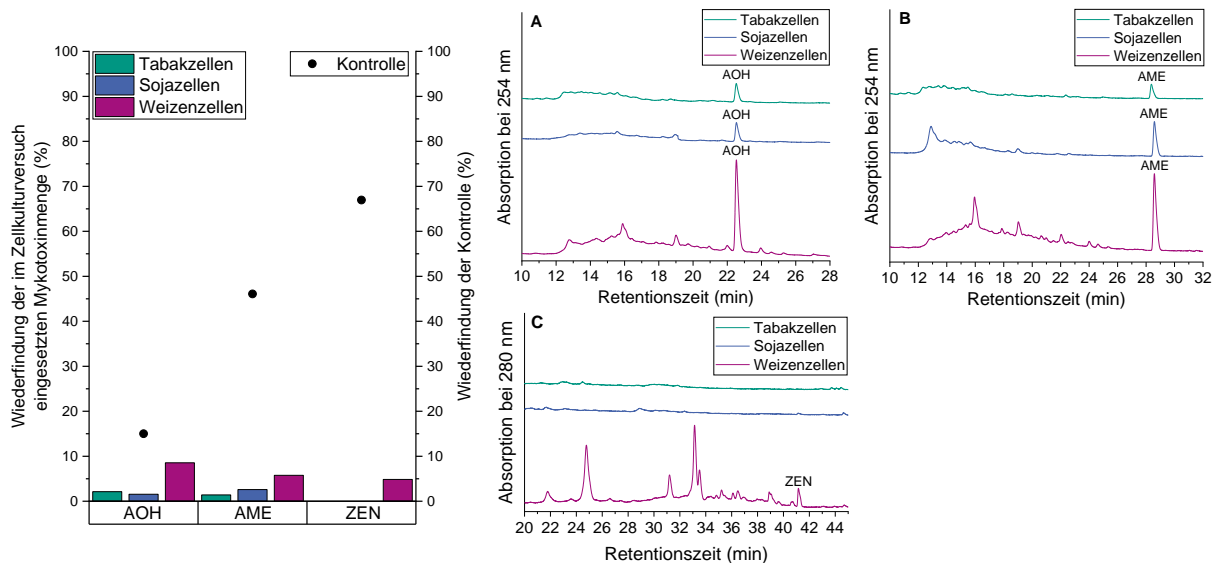


Abb. 39: Links: Prozentuale Wiederfindung der im Zellkulturversuch eingesetzten Menge an AOH, AME und ZEN (Balkendiagramm) sowie prozentuale Wiederfindung in den Kontrollversuchen mit AOH, AME und ZEN (Punktdiagramm). Rechts: HPLC-Chromatogramme der SPE-Eluate nach Gefrierdrehen und Wiederaufnahme in Methanol (A: Inkubation mit AOH (Absorption bei 254 nm), B: Inkubation mit AME (Absorption bei 254 nm), C: Inkubation mit ZEN (Absorption bei 280 nm)).

Trotzdem konnten aus den Tabak-, Soja- und Weizenzellrückständen zwischen 1,6 und 8,5 % der ursprünglich eingesetzten AOH-Menge freigesetzt werden. AME wurde in allen extrahierten Zellkulturrückständen zwischen 1,4 und 5,8 % wiedergefunden und ZEN lediglich in extrahierten Weizenzellrückständen zu 4,8 %. Aufgrund der Instabilität der Mykotoxine unter den gewählten Hydrolysebedingungen ist vorstellbar, dass zunächst

„gebundenes“ AOH, AME bzw. ZEN freigesetzt und im Anschluss bereits wieder abgebaut wurde und die Menge daher unterschätzt wurde. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Phase II-Metaboliten bei der Extraktion der Pflanzenzellen unvollständig extrahiert wurden und es sich bei den gefundenen Mykotoxinen um „Überreste“ der Phase II-Konjugate handelt.

Abb. 39 (rechts) zeigt die zugehörigen HPLC-Chromatogramme, woraus ersichtlich wird, dass die Mykotoxine vor allem aus den Weizenzellrückständen freigesetzt werden konnten. Die Chromatogramme wurden unter anderem nach bekannten Metaboliten untersucht. Die Analyse der unbekannt Peaks mittels MS lieferte keine bekannten bzw. zu erwartenden m/z -Verhältnisse. Darüber hinaus waren keine weiteren Signale auf der Massenspur von AOH (m/z 259), AME (m/z 273) bzw. ZEN (m/z 319) sichtbar. Ebenso zeigten die UV-Spektren der Peaks keine charakteristischen Absorptionsmaxima für die jeweiligen Mykotoxine. Prinzipiell ist bei den gewählten Hydrolysebedingungen auch davon auszugehen, dass glykosidische Bindungen gespalten wurden, weshalb auch keine Glucoside erwartet wurden. Nicht-extrahierte „Überreste“ von Phase II-Metaboliten würden daher als freie Mykotoxine erwartet werden. Für weitere Strukturuntersuchungen wurden enzymatische Hydrolysen durchgeführt (Kapitel 4.5.4).

4.5.4 Enzymatische Hydrolyse

Neben der chemischen Hydrolyse mittels Säure oder Base können auch spezifische Enzyme eingesetzt werden, um die Zellwand abzubauen. Da im Zuge des enzymatischen Abbaus polysaccharidgebundene Mykotoxine solubilisiert werden, jedoch weiterhin kohlenhydratgebunden vorliegen sollten, können strukturelle Informationen gewonnen werden, die Aussagen über die Art der Zellwandpolymere machen, an die Mykotoxine gebunden werden. Da in der Zellwand eine Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Polysacchariden und weiteren Polymeren (z.B. Strukturprotein) vertreten sind, wurden verschiedene Enzyme eingesetzt. Darunter befanden sich α -Amylase, Amyloglucosidase (beide zur Spaltung von Stärke als Speicherpolysaccharid), Protease, Pektinase Macerozyme R-10, Cellulase Onozuka R-10 und Driselase.

Die Zellrückstände der Tabak-, Soja- und Weizenzellen wurden für jeweils 48 Stunden nacheinander mit den sechs verschiedenen Enzymen inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mittels SPE aufgereinigt und das eingeeengte und in Methanol aufgenommene Eluat mittels LC-DAD-MS analysiert. Die Lösungen nach der Probenaufgabe und dem Waschgang bei der SPE sowie in Gegenwart von DMSO inkubierte Zellen (Negativkontrolle) wurden ebenfalls analysiert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden nach den jeweiligen freien Mykotoxinen (AOH, AME und ZEN) sowie nach zu erwartenden Mykotoxinmetaboliten, wie z.B. Glucosiden, Diglucosiden, Malonylglucosiden, Pentosiden oder Galacturoniden, untersucht. Des Weiteren wurden auffällige Peaks mit unbekanntem m/z näher betrachtet und mit den Kontrollproben verglichen.

4.5.4.1 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von AOH inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion

In Tab. 18 sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von in Gegenwart von AOH inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion aufgeführt. Die entsprechenden UV-detektierten Chromatogramme der Eluate aus den verschiedenen enzymatischen Hydrolysen aller drei Zellkulturen sind in Kapitel 10.2 (Abb. 63) abgebildet. Die Lösungen nach der Probenaufgabe (SPE) und dem Waschschrift (SPE) enthielten keine Peaks.

Tab. 18: Ergebnisse der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von AOH inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittlextraktion). t_R = Retentionszeit

Enzym	Tabak			Soja			Weizen		
	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit
α -Amylase	22,8	259	AOH	22,8	259	AOH	22,8	259	AOH
							17,7	507	AOH-Malonylglucosid
Amylo-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Protease	14,5	514	unbekannt	14,5	514	unbekannt	14,5	514	unbekannt
	22,7	259	AOH	22,7	259	AOH			
Pektinase	12,2	435	AOH-Galacturonid	12,2	435	AOH-Galacturonid	12,2	435	AOH-Galacturonid
	14,0	391	AOH-Pentosid	14,0	391	AOH-Pentosid	14,0	391	AOH-Pentosid
	14,5	514	unbekannt	14,5	514	unbekannt	14,5	514	unbekannt
Cellulase	16,3	935	unbekannt	16,3	935	unbekannt	16,3	935	unbekannt
Driselase	19,2	516	unbekannt	19,2	516	unbekannt	19,2	516	unbekannt

Bei der Inkubation der Rückstände mit α -Amylase werden α -1,4-glucosidische Bindungen gespalten, wodurch Stärke abgebaut wird. Die LC-DAD-MS-Analyse der SPE-Eluate zeigte auf der Massenspur von m/z 259 ($[\text{AOH}+\text{H}]^+$) bei allen drei Zellkulturen einen Peak bei 22,8 Minuten. Sowohl die Retentionszeit als auch das MS^2 -Spektrum dieses Peaks ist charakteristisch für AOH. Während bei den Tabak- und Weizenzellen keine Quantifizierung möglich war, wurden bei den Sojazellen insgesamt 0,3 nmol AOH bestimmt. Da dies unter 0,01 % der bei der Inkubation eingesetzten Stoffmenge an AOH entspricht, ist der Anteil an mittels α -Amylase freigesetztem AOH zu vernachlässigen. Des Weiteren zeigte die Massenspur von m/z 507 ($[\text{AOH-Malonylglucosid}+\text{H}]^+$) nach Behandlung der Zellrückstände von Weizenzellen mit α -Amylase bei 17,7 Minuten einen Peak, dessen MS^2 -Spektrum eine Abspaltung einer Moleküleinheit mit 248 Da, resultierend in Fragmenten mit m/z 259 ($[\text{AOH}+\text{H}]^+$), aufweist. Es konnte jedoch ebenfalls nur eine sehr geringe Stoffmenge von 0,3 nmol quantifiziert werden.

Das Enzym Amyloglucosidase spaltet neben α -1,4-verknüpften auch, wenngleich langsamer, α -1,6-verknüpfte Glucoseeinheiten. Bei Analyse aller Zellkulturen konnten keine Peaks auf den Massenspuren von bekannten bzw. zu erwartenden AOH-Metaboliten beobachtet werden.

Nach enzymatischer Proteinhydrolyse konnten einige Peaks in den UV-detektierten Chromatogrammen detektiert werden, die auch in der DMSO-Kontrolle enthalten waren. Bei Analyse aller drei Zellkulturen wurde darüber hinaus ein Peak bei 14,5 Minuten detektiert. Auf der Massenspur von AOH (m/z 259) ist hier ebenfalls ein Peak erkennbar, der das

charakteristische MS²-Spektrum von AOH aufweist. Das zu dieser Retentionszeit, im Full-Scan gemessene m/z -Verhältnis von 514 Da konnte allerdings keinem bekannten AOH-Konjugat zugeordnet werden. Daneben zeigten die Massenspuren von m/z 259 bei Analyse der Tabak- und Sojazellen Peaks bei 22,7 Minuten, die AOH zugeordnet werden konnten. Während die Quantifizierung von AOH im Proteasehydrolysat der Sojazellen 0,3 nmol AOH ergab, lag die Menge bei Tabakzellen unterhalb der Kalibrierung und konnte daher nicht bestimmt werden.

Das Enzym Pektinase Macerozyme R-10 ist in der Lage α -1,4-verknüpfte Galacturonsäuren zu spalten. Des Weiteren treten als Nebenaktivitäten Cellulase- und Hemicellulase-Aktivitäten auf. Ebenso wie in den Protease-Hydrolysaten war bei allen drei Zellkulturen nach Hydrolyse mit Pektinase ein Peak bei 14,5 Minuten auf der Massenspur m/z 259 ($[\text{AOH}+\text{H}]^+$) sichtbar. Allerdings waren in den UV-detektierten Chromatogrammen keine Peaks bei 14,5 Minuten zu erkennen, weshalb keine quantitativ bedeutsame Freisetzung erwartet wird. Des Weiteren konnte bei allen drei Zellkulturen ein Peak bei 12,2 Minuten auf der Massenspur m/z 435 ($[\text{AOH}+\text{Galacturonsäure}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) sowie ein Peak bei 14,0 Minuten auf der Massenspur m/z 391 ($[\text{AOH}+\text{Pentose}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) detektiert werden, die in den Negativkontrollen nicht auftraten. Allerdings waren auch zu dieser Retentionszeit in den UV-detektierten Chromatogrammen keine Peaks erkennbar, weshalb keine Quantifizierung durchgeführt werden konnte.

Mithilfe der Cellulase Onozuka R-10 können β -1,4-glucosidische Bindungen hydrolysiert werden. Daneben enthält das eingesetzte Enzym auch Hemicellulase-, α -Amylase, Pektinase- und Protease-Aktivitäten. Bei Analyse der Hydrolysate aus allen Zellkulturen war im UV-detektierten Chromatogramm ein Peak bei 16,3 Minuten erkennbar, dem ein m/z von 935 zugeordnet werden konnte. Da dieses m/z in Bezug auf AOH-Derivate unbekannt ist und das UV-Spektrum keine charakteristischen Maxima aufweist, ist von keiner AOH-Freisetzung auszugehen.

Das Enzymgemisch Driselase setzt sich aus verschiedenen zellwandpolysaccharidspaltenden Enzymen wie Arabinanase, Cellulase, Xylanase, Galactanase und Polygalacturonase zusammen. Bei Analyse der Hydrolysate aus allen Zellkulturen war ein Peak im UV-detektierten Chromatogramm bei 19,2 Minuten zu erkennen. Das zugehörige m/z von 516 war allerdings keinem bekannten AOH-Derivat zuzuordnen. Ebenso zeigte das UV-Spektrum keine charakteristischen Maxima für AOH.

Die enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von AOH inkubierten Zellen nach Lösungsmittelextraktion zeigte, dass allenfalls Spuren von AOH bzw. AOH-Konjugaten freigesetzt werden konnten. Somit konnte eine Zellwandbindung von AOH mit dieser Methode nicht beobachtet werden. Die Freisetzung von AOH, die mittels saurer Hydrolyse beobachtet werden konnte (Kapitel 4.5.3.2), konnte mittels enzymatischer Hydrolyse nicht eindeutig bestätigt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Summe der gefundenen, teilweise nicht quantifizierbaren AOH-Konjugate (AOH-Malonylglucoside, AOH-Galacturonide, AOH-Pentoside) bzw. des freien AOHs zu ähnlichen Ergebnissen führt. Hierfür bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen mit höheren Analysenmengen, um die einzelnen Metaboliten bzw. AOH quantifizieren zu können.

4.5.4.2 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von AME inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion

In Tab. 19 sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von in Gegenwart von AME inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion aufgeführt. Die entsprechenden UV-detektierten Chromatogramme der Eluate aus den verschiedenen enzymatischen Hydrolysen aller drei Zellkulturen sind in Kapitel 10.2 (Abb. 64) abgebildet. Die Lösungen nach der Probenaufgabe (SPE) und dem Waschschrift (SPE) enthielten keine Peaks.

Tab. 19: Ergebnisse der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von AME inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittlextraktion). t_R = Retentionszeit

Enzym	Tabak			Soja			Weizen		
	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit
α -Amylase	19,3	435	AME-Glucosid	19,3	435	AME-Glucosid	19,3	435	AME-Glucosid
	20,6	521	AME-Malonylglucosid	20,6	521	AME-Malonylglucosid	20,6	521	AME-Malonylglucosid
Amyloglucosidase	20,6	521	AME-Malonylglucosid	20,6	521	AME-Malonylglucosid	20,6	521	AME-Malonylglucosid
Protease	20,6	521	AME-Malonylglucosid	-	-	-	20,6	521	AME-Malonylglucosid
Pektinase	13,1	405	AME-Pentosid	13,1	405	AME-Pentosid	13,1	405	AME-Pentosid
	20,6	521	AME-Malonylglucosid	-	-	-	20,6	521	AME-Malonylglucosid
Cellulase	-	-	-	-	-	-	20,6	521	AME-Malonylglucosid
Driselase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Hydrolysate der Zellwandreste von Tabak-, Soja- und Weizenzellen nach α -Amylase-Inkubation zeigten im Zuge der chromatographischen Analyse auf den Massenspuren von m/z 435 ($[\text{AME-Glucosid}+\text{H}]^+$) Peaks bei 19,3 Minuten, deren MS^2 -Spektren Abspaltungen von Moleküleinheiten mit 162 Da zeigten. Daher und aufgrund des Retentionszeitenvergleichs kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um AME-Glucoside handelt. Lediglich für die Weizenzellen konnte eine Quantifizierung erfolgen, die 0,2 nmol AME-Glucosid ergab. Zusätzlich konnte bei Analyse aller Zellkulturen ein Peak auf der Massenspur von m/z 521 bei 20,6 Minuten detektiert werden, dessen Abspaltung einer Moleküleinheit mit 248 Da im MS^2 -Spektrum auf ein AME-Malonylglucosid hindeutet. Für die Sojazellen wurde eine freigesetzte Stoffmenge von 0,2 nmol und für die Weizenzellen von 0,4 nmol berechnet, während das AME-Malonylglucosid in den Tabakzellen aufgrund eines zu geringen S/N nicht quantitativ ausgewertet werden konnte.

Hydrolysate der mit Amyloglucosidase inkubierten Zellrückstände wiesen bei deren chromatographischen Analyse keinerlei auswertbaren Peaks im UV-detektierten Chromatogramm auf. Auf den Massenspuren des AME-Malonylglucosids (m/z 521) konnten ebenso wie bei der α -Amylase-Inkubation Peaks bei 20,6 Minuten festgestellt werden. Eine Quantifizierung war allerdings nicht möglich.

Ebenso wie bei den in Gegenwart von AOH inkubierten Zellen, zeigten die UV-detektierten Chromatogramme der Hydrolysate nach enzymatischem Proteinverdau relativ viele Peaks an, die allerdings keinen AME-Metaboliten zugeordnet werden konnten und ebenfalls in der

Negativkontrolle vorhanden waren. Allerdings konnte auch hier wiederum AME-Malonylglucosid (Peak auf der Massenspur m/z 521 bei 20,6 Minuten) nach Proteasebehandlung der Tabak- und Weizenzellen freigesetzt werden. Aufgrund der geringen Intensität der Peaks im UV-detektierten Chromatogramm konnte keine Quantifizierung erfolgen.

Die Analyse der Hydrolysate der mittels Pektinase behandelten Zellrückstände ergab keine auffälligen Peaks in den UV-detektierten Chromatogrammen. Allerdings konnte das AME-Malonylglucosid bei 20,6 Minuten anhand der MS^2 -Spektren und der Retentionszeit bei der Analyse der Hydrolysate der Tabak- und Weizenzellen identifiziert werden. Die Peaks waren jedoch nur auf der Massenspur m/z 521 und nicht im UV-detektierten Chromatogramm vorhanden, weshalb keine Quantifizierung erfolgte. Ebenso war ein Peak auf der Massenspur m/z 405 ($[AME+Pentose-H_2O+H]^+$) bei Analyse der Hydrolysate aller drei Zellkulturen bei 13,1 Minuten erkennbar, der jedoch im UV-detektierten Chromatogramm nicht auftrat und damit nicht quantifiziert werden konnte.

Die Inkubation mittels Cellulase setzte lediglich aus Weizenzellen Spuren an AME-Malonylglucosid frei, welches auf der Massenspur m/z 521 bei 20,6 Minuten detektiert wurde. Wie aus Abb. 64 ersichtlich, zeigten alle Zellkulturen zwei Peaks bei 16,5 und 16,9 Minuten auf, welche jedoch auch in der Kontrolle detektiert wurden.

Die Hydrolysate der mit Driselase inkubierten Zellwandreste von Tabak-, Soja- und Weizenzellen zeigten bei deren chromatographischen Analyse weder auf den Massenspuren Peaks mit charakteristischem MS^2 -Spektrum, noch Peaks, die nicht in der Kontrolle vorhanden waren. Daher ist davon auszugehen, dass keine nennenswerte Freisetzung von AME mittels Driselase-Verdau erreicht werden konnte.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der enzymatischen Hydrolysen von in Gegenwart von AME inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion lediglich Spuren freigesetzten AMEs bzw. freigesetzter AME-Metaboliten (darunter AME-Glucosid, AME-Malonylglucosid und AME-Pentosid). In Anbetracht der Ergebnisse der semiquantitativen Analyse der löslichen pflanzlichen AME-Konjugate (Kapitel 4.1.1.4) wurde vermutet, dass 63–85 % der eingesetzten AME-Menge an die Zellwand gebunden vorliegt. Dies konnte weder mittels der sauren noch mittels der enzymatischen Hydrolyse bestätigt werden. Eine Zellwandbindung von AME konnte somit mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht gezeigt werden.

4.5.4.3 Enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von ZEN inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion

In Tab. 20 sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von in Gegenwart von ZEN inkubierten Zellen nach Lösungsmittlextraktion aufgeführt. Die entsprechenden UV-detektierten Chromatogramme der Eluate aus den verschiedenen enzymatischen Hydrolysen aller drei Zellkulturen sind in Kapitel 10.2 (Abb. 65) abgebildet. Die Lösungen nach der Probenaufgabe (SPE) und dem Waschschrift (SPE) enthielten keine Peaks.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die UV-detektierten Chromatogramme der Hydrolysate der mit α -Amylase inkubierten Zellrückstände wiesen keine auswertbaren Peaks im UV-detektierten Chromatogramm auf. Allerdings konnten bei allen Zellkulturen zwei Peaks auf der Massenspur von m/z 321 ($[ZEL+H]^+$) bei 29,4 Minuten und 38,1 Minuten beobachtet werden.

Tab. 20: Ergebnisse der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von ZEN inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittelextraktion). t_R = Retentionszeit

Enzym	Tabak			Soja			Weizen		
	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit	t_R (min)	m/z	möglicher Metabolit
α -Amylase	29,4	437	ZEL-Metabolit	29,4	437	ZEL-Metabolit	29,4	437	ZEL-Metabolit
							29,9	917	ZEN-Metabolit
							32,5	767	ZEN-Metabolit
							34,0	625	ZEN-Metabolit
	38,1	701	ZEL-Metabolit	38,1	701	ZEL-Metabolit	38,1	701	ZEL-Metabolit
Amylo-glucosidase	29,4	437	ZEL-Metabolit	29,4	437	ZEL-Metabolit	29,4	437	ZEL-Metabolit
							30,0	873	ZEN-Metabolit
							35,6	659	ZEN-Metabolit
	38,1	701	ZEL-Metabolit	38,1	701	ZEL-Metabolit	38,1	701	ZEL-Metabolit
Protease	-	-	-	38,1	701	ZEL-Metabolit	38,1	701	ZEL-Metabolit
Pektinase	13,8	641	ZEL-Metabolit	13,8	641	ZEL-Metabolit	13,8	641	ZEL-Metabolit
	14,1	495	ZEN-Galacturonid	14,1	495	ZEN-Galacturonid	14,1	495	ZEN-Galacturonid
	21,4	451	ZEN-Pentosid	21,4	451	ZEN-Pentosid	21,4	451	ZEN-Pentosid
	22,1	453	ZEL-Pentosid	22,1	453	ZEL-Pentosid	22,1	453	ZEL-Pentosid
	24,9	593	ZEL-Metabolit	24,9	593	ZEL-Metabolit	24,9	593	ZEL-Metabolit
	31,3	497	ZEL-Galacturonid	31,3	497	ZEL-Galacturonid	31,3	497	ZEL-Galacturonid
Cellulase	18,7	807	ZEL-Metabolit	18,7	807	ZEL-Metabolit			
	24,9	799	ZEL-Metabolit	24,9	799	ZEL-Metabolit	24,9	799	ZEL-Metabolit
Driselase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diese zeigten charakteristische Fragmentionen von ZEL im MS^2 -Spektrum, weshalb vermutet wird, dass es sich um ZEL-Derivate handelt. Allerdings konnten die m/z von 437 bzw. 701 keinen bekannten ZEL-Metaboliten zugeordnet werden. Des Weiteren konnten auf der Massenspur m/z 319 ($[ZEN+H]^+$) (Weizenhydrolysat) drei Peaks bei 29,9 Minuten (m/z 917), 32,5 Minuten (m/z 767) und 34,0 Minuten (m/z 625) detektiert werden, deren MS^2 -Spektrum charakteristische Fragmentionen von ZEN enthält. Da die m/z der Quasimoleküle keinen bekannten Metaboliten zugeordnet werden konnten, ist deren Identität nicht feststellbar. Die Peaks im UV-detektierten Chromatogramm wiesen zudem eine sehr geringe Intensität auf, weshalb von einer geringen Relevanz ausgegangen werden kann.

Bei Analyse der Hydrolysate der mit Amyloglucosidase behandelten Zellrückstände konnten bei den Weizenzellen zwei Peaks auf der Massenspur m/z 319 ($[ZEN+H]^+$) bei 30,0 Minuten und 35,6 Minuten beobachtet werden, deren MS^2 -Spektren charakteristisch für ZEN sind. Da im UV-detektierten Chromatogramm keine Peaks erkennbar waren, erfolgte keine quantitative Auswertung. Ähnlich wie bei Analyse der Hydrolysate nach α -Amylase-Verdau konnten in den Hydrolysaten nach Amyloglucosidase-Verdau bei allen drei Zellkulturen zwei Peaks auf der Massenspur von m/z 321 ($[ZEL+H]^+$) bei 29,4 Minuten und 38,1 Minuten beobachtet werden, deren MS^2 -Spektren charakteristische Ionen von ZEL aufwiesen. Gleichmaßen konnte aufgrund zu geringer Intensität im UV-detektierten Chromatogramm keine Quantifizierung erfolgen.

Wie bereits in Kapitel 4.5.4.1 und 4.5.4.2 beschrieben, wiesen die Hydrolysate der mit Protease verdauten Zellwandrückstände mehrere Peaks im UV-detektierten Chromatogramm auf, die allerdings keinen ZEN- oder ZEL-Metaboliten zugeordnet werden konnten. Lediglich bei Analyse der Hydrolysate der Soja- und Weizenzellen konnte auf der Massenspur von m/z 321 ($[ZEL+H]^+$) ein Peak bei 38,1 Minuten beobachtet werden, der auch schon in der vorherigen Inkubation (mit Amyloglucosidase) auftrat. Da im UV-detektierten Chromatogramm kein Peak bei 38,1 Minuten vorhanden war, konnte keine Quantifizierung erfolgen.

Die Hydrolysate der mit Pektinase verdauten Zellwandrückstände zeigten im Zuge der chromatographischen Analyse bei allen drei Zellkulturen Peaks bei 13,8 Minuten und 24,9 Minuten auf der Massenspur von m/z 321 ($[ZEL+H]^+$). Des Weiteren waren Peaks auf den Massenspuren von m/z 451 ($[ZEN+Pentose-H_2O+H]^+$) bei 21,4 Minuten, m/z 453 ($[ZEL+Pentose-H_2O+H]^+$) bei 22,1 Minuten, m/z 495 ($[ZEN+Galacturonsäure-H_2O+H]^+$) bei 14,1 Minuten und m/z 497 bei 31,3 Minuten ($[ZEL+Galacturonsäure-H_2O+H]^+$) bei allen Zellkulturen erkennbar, die in den Negativkontrollen nicht auftraten. Eine Quantifizierung war jedoch aufgrund der niedrigen Signalintensitäten bzw. nicht vorhandenen Signalen im UV-detektierten Chromatogramm nicht möglich.

Die Analyse der Hydrolysate der mit Cellulase inkubierten Zellrückstände zeigte bei allen Zellkulturen Peaks auf der Massenspur von m/z 321 ($[ZEL+H]^+$). Während der Peak bei 24,9 Minuten bei allen Zellkulturen sichtbar war, wurde in Tabak- und Sojazellen ein weiterer Peak bei 18,7 Minuten mit einem unbekanntem m/z von 807 beobachtet.

Die Inkubation mit Driselase führte bei keiner der Zellkulturen zu einer Freisetzung von ZEN, ZEL oder Derivaten von ZEN bzw. ZEL.

Die enzymatische Hydrolyse von in Gegenwart von ZEN inkubierten Zellen nach Lösungsmittelextraktion zeigte, dass allenfalls Spuren von ZEN, bekannten bzw. unbekanntem ZEN- oder ZEL-Konjugaten freigesetzt werden konnten. Somit lässt sich schlussfolgern, dass mithilfe der enzymatischen Hydrolyse eine Zellwandbindung der Mykotoxine nicht belegt werden kann. Da auch bei den Versuchen mittels saurer Hydrolyse kein ZEN (Tabak- und Sojazzellkultur) bzw. nur geringe Mengen an ZEN (Weizenzellkultur) detektiert wurden, ist die Zellwandbindung von ZEN anzuzweifeln. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine weitere Untersuchungsmethode mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt (Kapitel 4.5.5).

4.5.5 NMR-spektroskopische Untersuchung der Zellrückstände

Da die semiquantitative Bestimmung der löslichen Mykotoxinkonjugate (Kapitel 4.1.1.4 und 4.1.2.4) auf Mykotoxinbindungen bzw. Interaktionen der Mykotoxine mit der Zellwand hindeuten und die LC-DAD- bzw. LC-MS-Analysen der verschiedenen enzymatischen (Kapitel 4.5.4) sowie sauren Hydrolysate (Kapitel 4.5.3) dies nicht bestätigen konnten, wurden die Zellwandrückstände nach Extraktion der in Gegenwart der Mykotoxine inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen mit der Kugelmühle fein vermahlen und für HSQC-Experimente mittels Gel-NMR eingesetzt. Dabei dienten mit DMSO inkubierte und extrahierte Zellen als Kontrolle. Durch Überlagerung der Spektren der Probe und der

Kontrolle wurden neu auftretende Signale identifiziert. Des Weiteren wurden die Spektren mit HSQC-Spektren der freien Mykotoxine überlagert, da, unter der Annahme, dass die Mykotoxine kovalent an die Zellwand binden, eine Verschiebung der Mykotoxinsignale zu erwarten wäre. Je nach Interaktion kann dies insbesondere auch im ^1H -NMR-Spektrum bei nichtkovalenten Interaktionen beobachtet werden. Daher wurde vor allem der Bereich der aromatischen Protonen näher betrachtet und neu aufgetretene Signale untersucht.

Während die mit AME inkubierten Zellen nach Extraktion keine zusätzlichen Signale aufwiesen, konnten bei den mit AOH bzw. ZEN inkubierten Zellen Unterschiede zu den Kontrollmessungen festgestellt werden. Das HSQC-Spektrum der in $\text{DMSO-}d_6 / \text{Pyridin-}d_5$ gemessenen Gel-Probe der mit AOH bzw. ZEN inkubierten und extrahierten Sojazellen ist in Abb. 40 dargestellt (blau). In lila ist das HSQC-Spektrum der Kontrolle abgebildet und die grünen Signale bilden die HSQC-Spektren der reinen Mykotoxine ab.

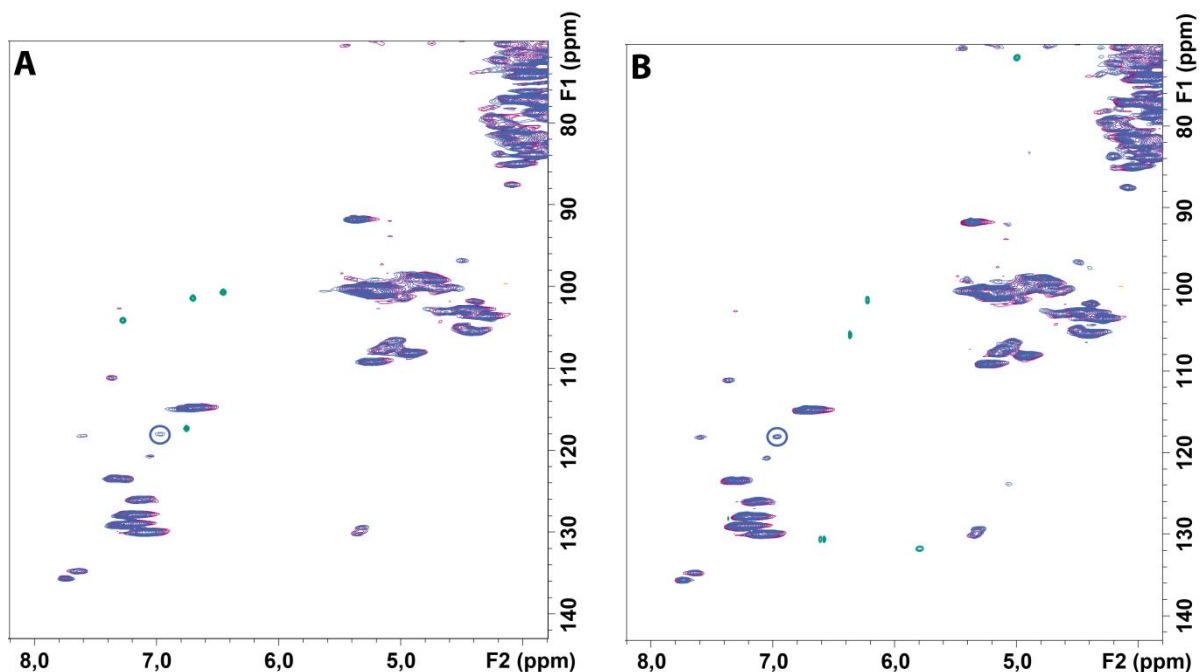


Abb. 40: Überlagerung der HSQC-Spektren der in $\text{DMSO-}d_6 / \text{Pyridin-}d_5$ gemessenen Gelproben von mit DMSO inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Sojazellen (lila), reinem AOH bzw. ZEN (grün) und mit AOH (A) bzw. ZEN (B) inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Sojazellen (blau). Die blauen Kreise kennzeichnen die im Text genannten Signale.

Dabei fiel auf, dass in beiden Spektren ein zusätzliches Signal bei $\delta \text{ } ^1\text{H}$ 6,97 ppm / $\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ 118,0 ppm im Vergleich zur DMSO -Kontrolle auftritt. Da dieses jedoch sowohl in den Spektren der mit AOH als auch mit ZEN inkubierten Sojazellen auftrat, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um ein Signal handelt, welches Verknüpfungen von AOH bzw. ZEN an die Zellwand zeigt. Möglicherweise sind diese Signale auf Verbindungen bzw. strukturelle Veränderungen, die aufgrund der Stressreaktion der Zellen im Zuge der Mykotoxinbehandlung ausgelöst werden, zurückzuführen. Des Weiteren konnte in den mit AOH inkubierten Sojazellen ein zusätzliches Signal bei $\delta \text{ } ^1\text{H}$ 3,49 ppm / $\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ 18,4 ppm (und somit außerhalb des aromatischen Bereichs) beobachtet werden, das jedoch nicht zugeordnet werden konnte. Ebenso zeigte das HSQC-Spektrum der mit ZEN inkubierten lösungsmittel-extrahierten Sojazellen ein weiteres Signal bei $\delta \text{ } ^1\text{H}$ 5,77 ppm / $\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ 54,8 ppm, das nicht

zugeordnet werden konnte. Da keine weiteren Signale in den Bereichen der aromatischen Protonen / Kohlenstoffatome von AOH und ZEN sichtbar waren, kann eine Zellwandbindung in den untersuchten Sojazellen mit dieser Methode nicht bestätigt (aber auch nicht ausgeschlossen) werden.

In den HSQC-Spektren der in Gegenwart von AOH bzw. ZEN inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Weizenzellen konnten (Abb. 41) neu aufgetretene Signale bei $\delta^1\text{H}$ 8,21 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 152,1 ppm, $\delta^1\text{H}$ 8,00 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 140,5 ppm sowie $\delta^1\text{H}$ 5,98 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 87,8 ppm beobachtet werden. Diese Signale waren weder in der Kontrolle enthalten, noch stammen sie von reinem AOH bzw. ZEN.

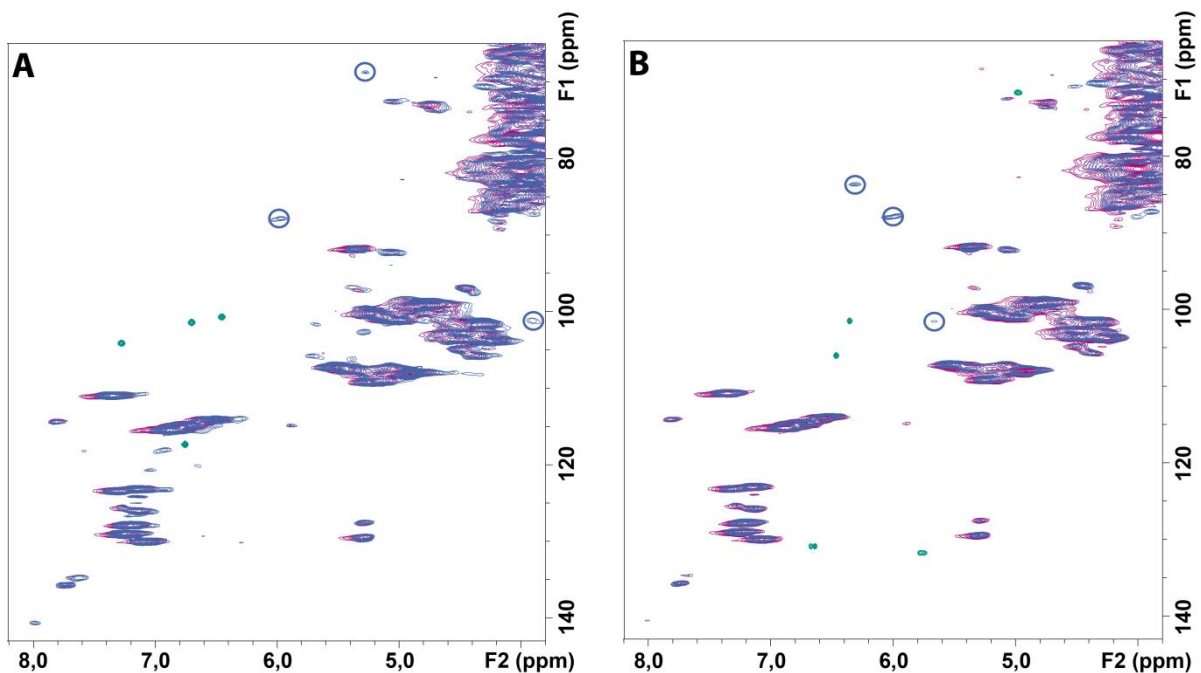


Abb. 41: Überlagerung der HSQC-Spektren der in $\text{DMSO-}d_6$ / $\text{Pyridin-}d_5$ gemessenen Gelproben von mit DMSO inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Weizenzellen (lila), reinem AOH bzw. ZEN (grün) und mit AOH (A) bzw. ZEN (B) inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Weizenzellen (blau). Die blauen Kreise kennzeichnen die im Text genannten Signale.

Da sie jedoch wiederum in den mit AOH und in den mit ZEN inkubierten Weizenzellen vorkommen, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um spezifische Signale von einem der beiden Mykotoxine handelt. Die für die Sojazellen getätigten Aussagen bezüglich einer möglichen Stressantwort gelten hier analog. Außerdem wurden bei den mit AOH inkubierten, lösungsmittel-extrahierten Weizenzellen drei weitere Signale detektiert ($\delta^1\text{H}$ 3,88 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 101,2 ppm, $\delta^1\text{H}$ 2,43 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 73,1 ppm, $\delta^1\text{H}$ 5,15 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 61,0 ppm, $\delta^1\text{H}$ 2,35 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 61,4 ppm). Bei den mit ZEN inkubierten, lösungsmittel-extrahierten Weizenzellen traten fünf weitere Signale auf ($\delta^1\text{H}$ 8,44 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 139,6 ppm, $\delta^1\text{H}$ 5,66 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 101,5 ppm, $\delta^1\text{H}$ 6,31 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 83,7 ppm, $\delta^1\text{H}$ 2,93 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 20,7 ppm, $\delta^1\text{H}$ 1,77 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 11,9 ppm). Allerdings konnten diese weder AOH noch ZEN zugeordnet werden.

Während in dem HSQC-Spektrum der mit AOH inkubierten, lösungsmittel-extrahierten Tabakzellen keine neuen Signale auftraten, konnten im HSQC-Spektrum der mit ZEN

inkubierten, lösungsmittel-extrahierten Tabakzellen drei neue Signale bei $\delta^1\text{H}$ 2,31 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 48,4 ppm, $\delta^1\text{H}$ 2,11 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 48,4 ppm sowie $\delta^1\text{H}$ 2,00 ppm / $\delta^{13}\text{C}$ 17,0 ppm beobachtet werden. Allerdings traten keine Unterschiede im aromatischen Bereich auf (Abb. 42 B), weshalb angenommen werden kann, dass es sich hierbei nicht um ZEN-spezifische Signale handelt.

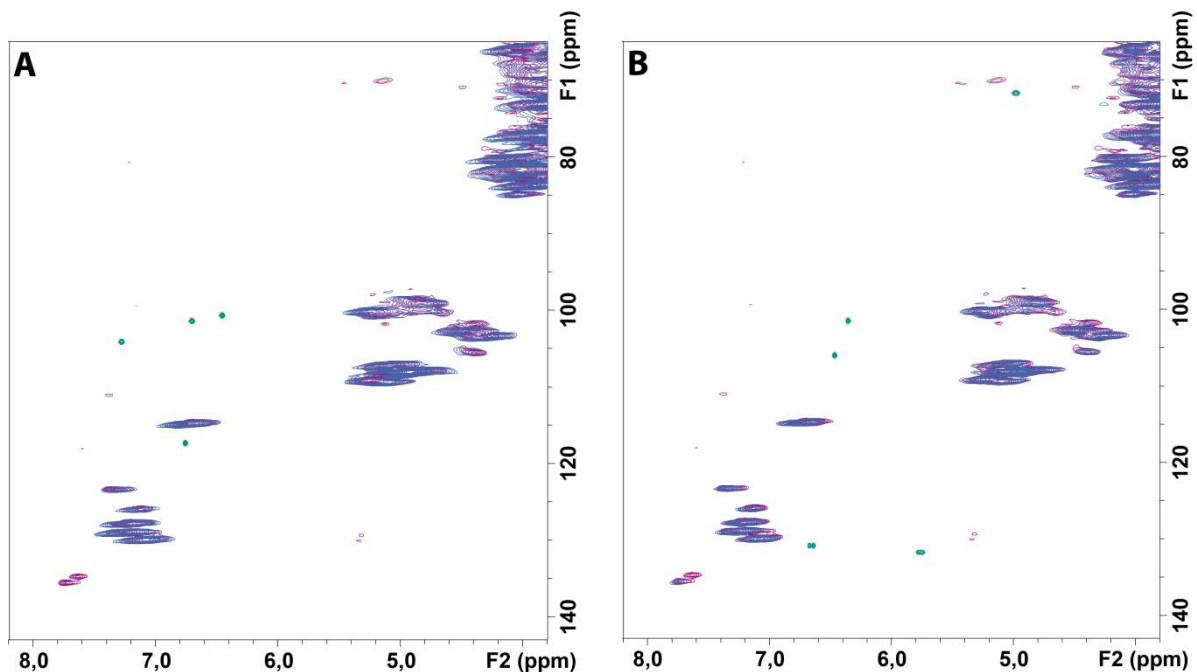


Abb. 42: Überlagerung der HSQC-Spektren der in $\text{DMSO-}d_6$ / $\text{Pyridin-}d_5$ gemessenen Gelproben von mit DMSO inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Tabakzellen (lila), reinem AOH bzw. ZEN (grün) und mit AOH (A) bzw. ZEN (B) inkubierten und lösungsmittel-extrahierten Tabakzellen (blau).

Um zu untersuchen, ab welcher Stoffmenge Signale von freien Mykotoxinen bei dem verwendeten NMR-Parameterset sichtbar werden, wurde eine ZEN-Standardlösung direkt zu gefriergetrockneten Tabakzellen ohne weitere Inkubation gegeben. Sowohl nach Zugabe von $300\ \mu\text{l}$ eines $20\ \text{mM}$ ZEN-Standards ($\approx 6\ \mu\text{mol}$) als auch von $30\ \mu\text{l}$ eines $20\ \text{mM}$ ZEN-Standards ($\approx 600\ \text{nmol}$) konnten charakteristische ZEN-Signale in den HSQC-Spektren der Gelproben detektiert werden. Bei einer Zugabe von $30\ \text{nmol}$ ZEN hingegen konnten keine ZEN-Signale mehr detektiert werden. Die höchste Wiederfindung nach saurer Hydrolyse betrug $8,5\ \%$ der eingesetzten Menge an AOH, dies entspricht $38,5\ \text{nmol}$ (Kapitel 4.5.3.2). Da die Mykotoxine durch die saure Hydrolyse teilweise zerstört wurden, ist von einer noch höheren tatsächlichen „gebundenen“ Menge auszugehen. Somit wären Signale in den HSQC-Spektren möglich gewesen, wobei zu berücksichtigen ist, dass eine kovalente Zellwandbindung die Relaxationseigenschaften der Mykotoxine und somit die NMR-spektroskopische Nachweisempfindlichkeit deutlich beeinflussen kann.

Zusammenfassend konnte eine Zellwandbindung der Mykotoxine AOH, AME und ZEN mit den hier verwendeten Methoden (chemische und enzymatische Hydrolysen sowie NMR-spektroskopische Analysen) nicht belegt werden.

4.6 Untersuchungen zur Bindung von Mykotoxinen an Lignin im *in vitro*-Modellsystem (DHP)

4.6.1 Vorversuche zur DHP-Bildung

Zur Untersuchung der Bindung von Mykotoxinen an Lignin wurde ein *in vitro*-Modellsystem (DHP) herangezogen. Zwar sind in der Literatur einige Methoden zur DHP-Bildung beschrieben, allerdings müssen diese auf die Anwendung mit Mykotoxinen angepasst werden. In Vorversuchen sollte zunächst reines DHP ohne den Einsatz von Mykotoxinen hergestellt werden, und anschließend ein geeignetes Reaktionsmedium und Versuchsdesign gefunden werden, um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen. Um das Modell zu vereinfachen, wurde lediglich CA als Monolignol eingesetzt, der durch Reduktion von Coniferylaldehyd gewonnen wurde.

4.6.1.1 DHP-Synthese ohne Mykotoxine

Für die DHP-Synthese werden in der Literatur mehrere Verfahren beschrieben. Dazu zählen das Dialysemembran-, das Zutropf- und das Zulaufverfahren. In einem Vorversuch wurden zunächst das Dialysemembran- und das Zutropfverfahren getestet, da je nach Zufuhr rate der Monolignole die Geschwindigkeit der Polymerisation beeinflusst wird und daraus unterschiedliche Reaktionsprodukte (Polymerisationsgrad und Bindungstypen) resultieren. Verfahren, bei denen die Polymerisation langsam verläuft, werden generell als näher an den natürlichen Verhältnissen betrachtet (Tanahashi & Higuchi, 1981). Tanahashi & Higuchi (1981) berichteten von einer Präzipitatbildung im Dialyseschlauch, wenn HRP im Schlauch vorlag, wodurch das Innere der Membran mit DHP beschichtet wurde und die Reaktion gestoppt wurde. Daher wurde bei dem Dialyseverfahren CA in den Dialyseschlauch und Peroxidase sowie H₂O₂ in die äußere Lösung gegeben. Dabei diente Wasser als Reaktionsmedium. Bei dem Zutropfverfahren hingegen wurde eine CA-Lösung mit einer HPLC-Pumpe (Flussrate 50 µl/min) in ein Becherglas mit Peroxidase und H₂O₂ zugetropft, wobei ebenfalls Wasser als Reaktionsmedium diente. Nach 48-stündiger Reaktionszeit wurde die äußere Lösung (Dialyseverfahren) bzw. der Becherglasinhalt (Zutropfverfahren) bis zur Trockene eingengt, und die erhaltenen gelblichen Rückstände wurden in Pyridin-*d*₅ / DMSO-*d*₆ (1/4) für NMR-spektroskopische Untersuchungen gelöst. In Abb. 43 sind die HSQC-Spektren der beiden Rückstände zu sehen. Die Signale der jeweiligen Bindungstypen zwischen den Monolignolen wurden anhand von Literaturdaten zugeordnet (Ralph *et al.*, 2004). Dabei werden die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen der α-, β- und γ-Positionen der Seitenketten verglichen. Durch Volumenintegration der α-CH-Signale wurden die prozentualen Anteile der Bindungstypen bestimmt, die in Tab. 21 aufgeführt sind.

Tab. 21: Prozentuale Verteilung der Bindungstypen in den synthetisierten DHPs, die durch das Dialysemembran- bzw. Zutropfverfahren erhalten wurden. Die prozentualen Anteile wurden durch Volumenintegration der α-C-H-Signale ermittelt

	β-O-4 (%)	β-5 (%)	β-β (%)
Dialysemembranverfahren	19,1	40,2	40,7
Zutropfverfahren	16,8	49,0	34,1

In den HSQC-Spektren (Abb. 43) sind noch Signale von freiem CA zu sehen, weshalb davon auszugehen ist, dass die Reaktion nicht vollständig abgelaufen ist. Bei dem Zutropfverfahren werden hauptsächlich Phenylcumaranstrukturen (β -5-Bindungen) ausgebildet (49,0 %), wobei bei dem Dialysemembranverfahren der Anteil an β -5-Bindungen und Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) relativ ausgeglichen vorliegt (40,2 % und 40,7 %). Bei dem Zutropfverfahren stellen β - β -Bindungen die zweithäufigste Verknüpfungsform zwischen den Monolignoleinheiten dar (34,1 %). Diese beiden Bindungstypen spielen in nativen Ligninen eher eine untergeordnete Rolle, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Polymerisation spielt die β - β -Bindung nur eine geringe Rolle. Deutlich bedeutender ist zumeist der Anteil an β -O-4-Bindungen in nativen Ligninen mit durchschnittlich 40 bis 60 % (Ralph *et al.*, 2004; Ghaffar & Fan, 2013). Werden beide hier durchgeführten Verfahren verglichen, so konnte der höhere Anteil an β -O-4-Bindungen in dem DHP festgestellt werden, das mit dem Dialysemembranverfahren hergestellt wurde (19,1 % im Vergleich zu 16,8 % bei dem Zutropfverfahren). Eine mögliche Ursache für die relativ geringen Gehalte an β -O-4-Bindungen, durch welche insbesondere Monolignole an das wachsende Polymer gebunden werden, könnte die geringe Löslichkeit der gebildeten Di-, Tri-, Tetra- oder Oligomere sein. Diese fallen in Wasser aus und stehen daher für weitere oxidative Kopplungsreaktionen nicht mehr zur Verfügung.

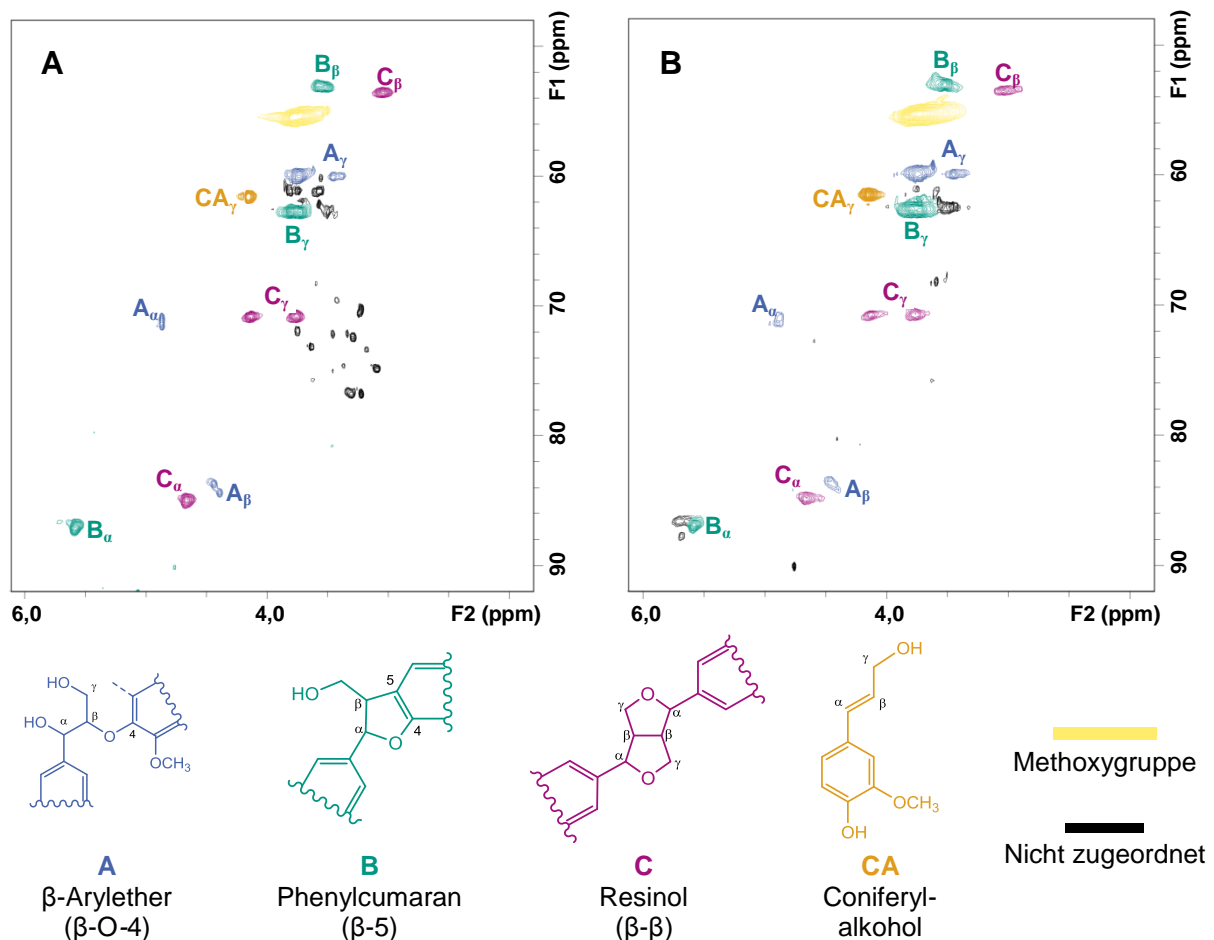


Abb. 43: HSQC-Spektren der Seitenkettenregion von DHPs, die über das Dialysemembranverfahren (A) und das Zutropfverfahren (B) in Wasser gewonnen wurden. Die Zuordnung der Bindungstypen erfolgte anhand von Literaturdaten (Ralph *et al.*, 2004).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich die Lösung im Dialyseschlauch ebenfalls gelblich färbte. Daher wurde diese Lösung mittels NMR-Spektroskopie analysiert (Kapitel 10.2, Abb. 68). Das HSQC-Spektrum zeigte neben Signalen von CA auch Signale von Phenylcumaran-, Resinol- und β -Aryl-Ether-Strukturen. Eine mögliche Begründung hierfür ist die Rückdiffusion bereits gebildeter DHP-Strukturen oder die Diffusion von HRP in den Dialyseschlauch. Die Ausschlussgrenze des Dialyseschlauchs beträgt 3500 Da. Mit einer Molmasse von 44000 Da sollte die HRP somit nicht in den Dialyseschlauch diffundieren können. Um dies näher zu analysieren, wurde ein Guajacol-Oxidationstest durchgeführt. Dabei wurde ein mit Wasser gefüllter Dialyseschlauch in eine wässrige HRP-Lösung getaucht. Nach einer Stunde wurde ein Aliquot aus dem Dialyseschlauch entnommen und mit Guajacol und H_2O_2 versetzt. Guajacol bildet mit HRP und H_2O_2 ein bernsteinfarbiges Produkt, das Licht bei einer Wellenlänge von 470 nm absorbiert. Die photometrische Messung ergab einen zeitabhängigen Anstieg der Extinktion (Kapitel 10.2, Abb. 67), weshalb davon auszugehen ist, dass die HRP die Membran des Dialyseschlauchs passieren kann. Beschädigungen am Dialyseschlauch können an dieser Stelle als mögliche Ursache für die Rückführung angeführt werden.

4.6.1.2 Pilotversuch zur DHP-Bildung aus CA und ZEN

Da mithilfe des Dialysemembranverfahrens ein höherer Gehalt an β -O-4-Bindungen in dem DHP erzielt werden konnte als mit dem Zutropfverfahren, wurde das Dialysemembranverfahren für die Pilotstudie ausgewählt. Um ein noch langsamerer Aufeinandertreffen aller Reaktionsprodukte zu gewährleisten wurde die HRP in die äußere Lösung und H_2O_2 sowie CA und ZEN in den Dialyseschlauch gegeben (Abb. 44).

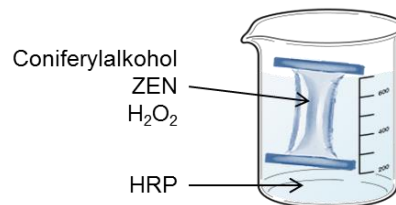


Abb. 44: Versuchsaufbau des Vorversuches. HRP = Meerrettichperoxidase

Als Reaktionsmedium wurde wässrige Natriumphosphatpufferlösung (pH 6,8) eingesetzt, um einen stabilen pH-Wert zu gewährleisten. Diese Pufferlösung findet in der Literatur häufig Verwendung (von der Trenck *et al.*, 1981). Bei der Zugabe von in DMSO-gelöstem ZEN in den Dialyseschlauch war sofort ein weißer Niederschlag zu erkennen, der darauf schließen lässt, dass ZEN aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Wasser ausgefallen ist. Nach 48 Stunden Reaktionszeit zeigte die äußere Lösung eine hellgelbe Trübung. Der Niederschlag der äußeren Lösung wurde abzentrifugiert, gefriergetrocknet und NMR-spektroskopisch in $DMSO-d_6$ analysiert.

In Abb. 45 ist das HSQC-Spektrum des gebildeten Niederschlags im Pilotversuch abgebildet (lila). Die grünen Signale stammen aus einer HSQC-Messung von reinem ZEN. Im gemessenen Rückstand sind keine charakteristischen Signale von ZEN erkennbar, weshalb davon auszugehen ist, dass ZEN nicht in die unlöslichen Konjugate eingebunden wurde.

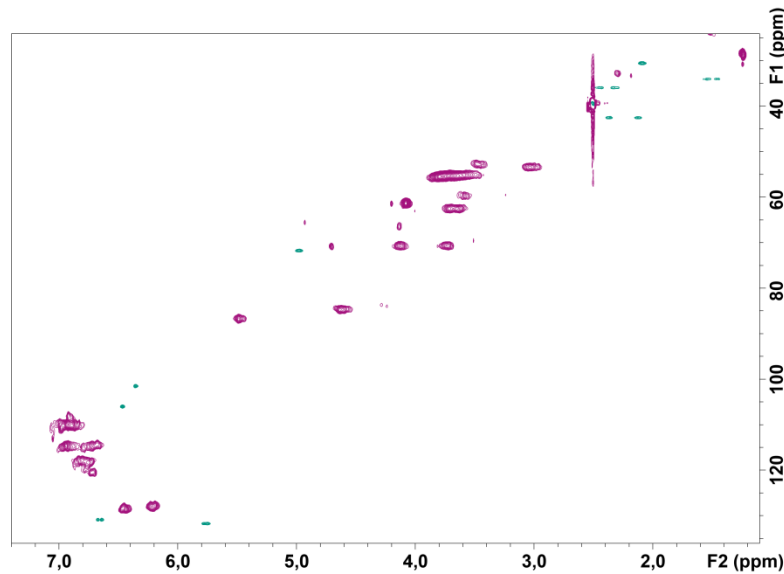


Abb. 45: Überlagerte HSQC-Spektren von DHP (Synthese in Anwesenheit von ZEN) (lila) und reinem ZEN (grün).

4.6.1.3 HRP-Aktivität in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Aufgrund der schlechten Löslichkeiten von ZEN (wie in der Pilotstudie demonstriert), AOH und AME in wässrigen Lösungen sollte ein geeignetes Reaktionsmedium für die DHP-Bildung in Gegenwart von Mykotoxinen gefunden werden. Daher sollten Gemische mit organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil von organischen Lösungsmitteln ist, dass gebildete Di-, Tri-, Tetra- und Oligomere (zumindest teilweise) in Lösung verbleiben und somit die Anzahl der β -O-4-Bindungen und der Polymerisationsgrad bei der DHP-Synthese erhöht werden kann (Hwang *et al.*, 2015). Bei dem Einsatz von organischen Lösungsmitteln ist allerdings die Instabilität bzw. verminderte Aktivität aufgrund der Beeinflussung der Tertiärstruktur der HRP in organischen Lösungsmitteln zu berücksichtigen. Daher wurden HRP-Aktivitätstests in verschiedenen Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Guajacol wurde mit HRP und H_2O_2 in den jeweiligen Reaktionsmedien umgesetzt, und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 470 nm gemessen.

Da bei dem Pilotversuch nach Abzentrifugieren und Gefriertrocknen des Rückstandes zusätzlich noch störende Salze aus dem Natriumphosphatpuffer im Rückstand enthalten waren, wurde überprüft, ob der Einsatz von reinem, entmineralisiertem Wasser statt des Puffers (wie in Kapitel 4.6.1.1) einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Der Vergleich der katalytischen Aktivität der HRP in Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) und Wasser zeigte, dass die HRP in Wasser sogar eine leicht höhere katalytische Aktivität aufwies als in Natriumphosphatpuffer (Abb. 46 A). Möglicherweise haben die Reaktionsprodukte einen Einfluss auf den pH-Wert, der sich positiv auf die katalytische Aktivität auswirkt. Daher wurde in den getesteten Lösungsmittelgemischen reines Wasser verwendet.

Als organische Lösungsmittel wurden *iso*-Propanol, Methanol, Ethanol, 1,4-Dioxan, Aceton und ACN gewählt. Diese wurden zunächst im Verhältnis 40/60 (organisches Lösungsmittel / Wasser, v/v) gemischt und als Reaktionsmedium für die Guajacol-Oxidation eingesetzt. Abb. 46 B zeigt, dass die HRP in Lösungsmittelgemischen generell eine geringere katalytische Aktivität aufweist als in reinem Wasser.

Zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln konnten allerdings Unterschiede festgestellt werden. Da die HRP in Gemischen aus Wasser und *iso*-Propanol, Methanol bzw. Ethanol eine höhere Aktivität aufwies, wurde mit diesen drei Lösungsmitteln das Mischungsverhältnis mit Wasser auf 30/70 angepasst (Abb. 46 C). Dabei zeigte sich eine erhöhte katalytische Aktivität der HRP bei einem Methanol/Wasser-Gemisch im Vergleich zu den anderen 30/70-Mischungen und im Vergleich zu Wasser eine nur geringfügig niedrigere katalytische Aktivität.

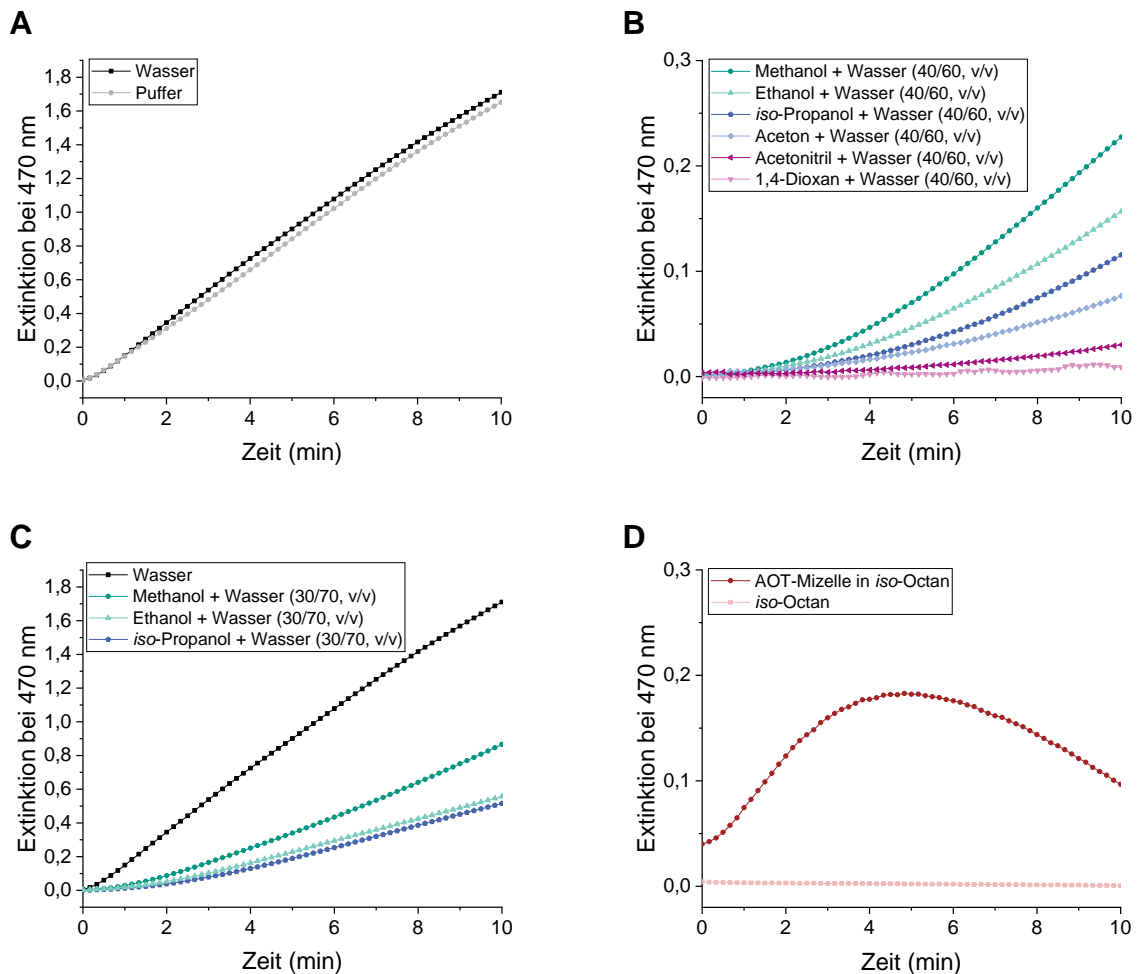


Abb. 46: Absorptionsmessungen von Lösungen mit Guajacol, Meerrettichperoxidase und H_2O_2 in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen.

Neben normalen Lösungsmittelgemischen können auch inverse Mizellen zur Stabilisierung der HRP in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden. Dadurch können Lösungsmittel verwendet werden, in denen die Mykotoxine löslich sind und die Präzipitation des wachsenden DHP-Polymers verhindert wird, wodurch naturähnlichere Polymere entstehen sollen (Reale *et al.*, 2010). Daher wurde zunächst das anionische Tensid AOT (Natriumdioctylsulfosuccinat) in *iso*-Octan als Reaktionsmedium eingesetzt und die Peroxidase-Aktivität mittels des Guajacol-Oxidations-Tests untersucht. In reinem *iso*-Octan ohne Zugabe des Tensids konnte keine katalytische Aktivität der Peroxidase beobachtet werden. Unter Ausbildung von inversen Mizellen mittels AOT zeigte sich ein relativ geringer Anstieg der Extinktion innerhalb der ersten vier Minuten und ein darauffolgender Abfall der Extinktion

(Abb. 46 D). Dies deutet auf eine geringfügige, wenngleich kurzfristige Stabilisierung des Enzyms hin. Das Absinken der Extinktion nach ca. fünf Minuten lässt sich möglicherweise durch einen Zerfall der Reaktionsprodukte in die Ausgangssubstanzen erklären. Allerdings war die HRP-Aktivität in Methanol-Wasser-Gemischen (30/70, v/v) deutlich höher, weshalb dieses Gemisch für die nachfolgenden DHP-Synthesen als Reaktionsmedium ausgewählt wurde. In einem Langzeitversuch mit dem Methanol-Wasser-Gemisch (30/70, v/v) als Reaktionsmedium konnte gezeigt werden, dass die HRP auch nach 24 Stunden noch katalytisch aktiv war, weshalb sich dieses Reaktionsmedium auch für längere Versuchsansätze eignet.

4.6.1.4 Untersuchung der Einwirkung von H₂O₂ auf die Mykotoxine und auf CA

H₂O₂ ist ein starkes Oxidationsmittel und daher potentiell in der Lage ZEN, AOH, AME oder CA zu oxidieren. Um den Einfluss von H₂O₂ in Abwesenheit der Peroxidase zu testen, wurden die Mykotoxine mit einer H₂O₂-Lösung für 24 Stunden versetzt und die Reaktionsprodukte mittels LC-DAD-MS bzw. NMR analysiert. Während die Mykotoxine nach Versuchsende unverändert vorlagen und keine oxidativen Reaktionen stattfanden, konnten bei der analytischen Kontrolle des CA-Ansatzes neben einem großen Peak noch weitere Peaks detektiert werden (Abb. 47 A, B, C).

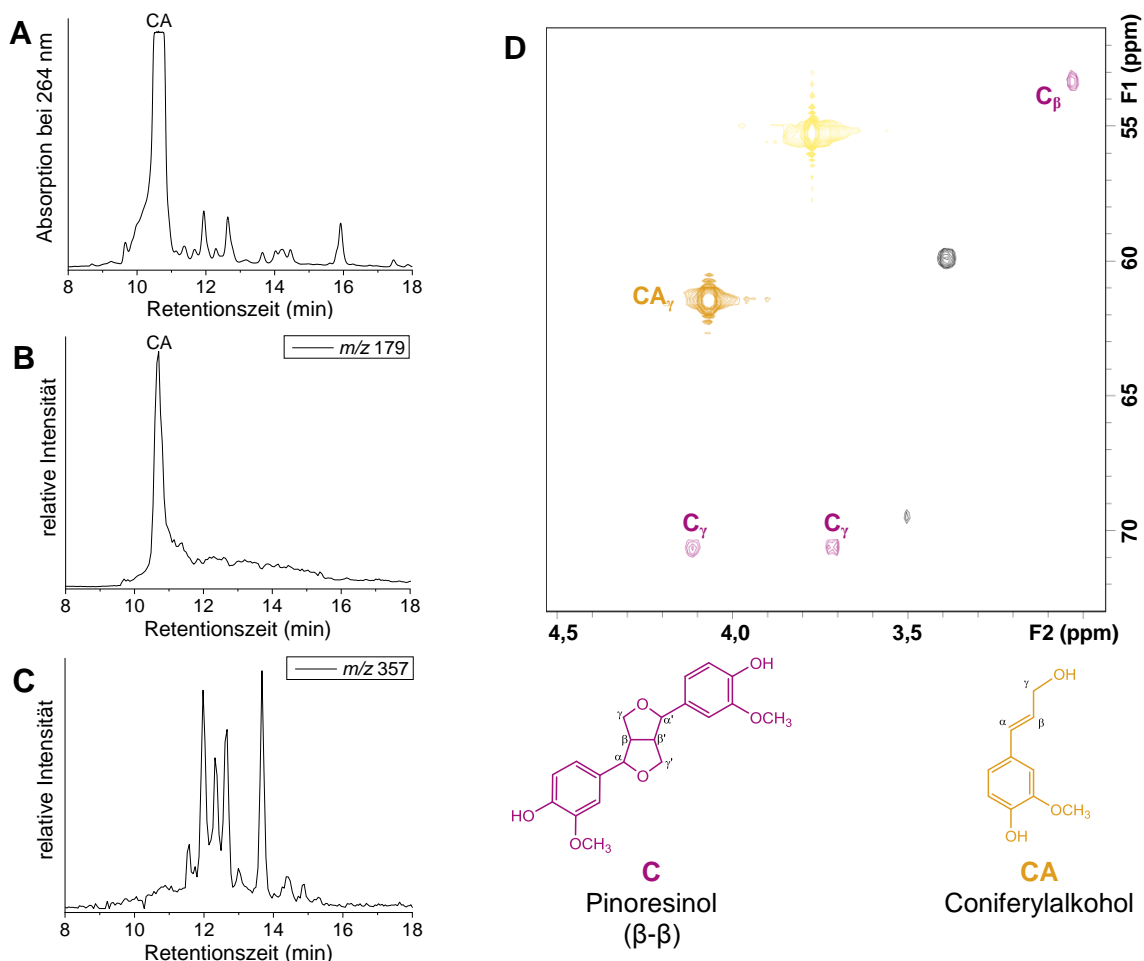


Abb. 47: Chromatogramme der Umsetzung von Coniferylalkohol mit H₂O₂: UV-detektiertes Chromatogramm (A), Massenspur von [Coniferylalkohol-H] (m/z 179) (B), Massenspur m/z 357 (C) und HSQC-Spektrum der Seitenkettenregion von Coniferylalkohol nach dessen Umsetzung mit H₂O₂ (D). CA = Coniferylalkohol.

Anhand der Auswertung der Massenspur m/z 179 konnte der größte Peak als CA identifiziert werden. Mögliche Dimere aus CA wie z.B. Pinoresinol (β - β), Phenylcumaran (β -5), Biphenyl (5-5) oder Biphenylether (5-O-4) weisen ein Molekulargewicht von 358 Da auf. Die entsprechende Massenspur m/z 357 ($[M-H]^-$) zeigte mehrere Signale, weshalb eine Dimerbildung wahrscheinlich ist. Um weitere Informationen über die Strukturen zu erhalten, wurde zusätzlich ein HSQC-Spektrum aufgenommen und die Signale mit Literaturdaten verglichen (Ralph *et al.*, 2004). Dabei sind neben den intensitätsstarken Signalen von CA auch Signale von Pinoresinol zu erkennen (Abb. 47 D). Dabei handelt es sich um ein CA-Dimer, das über β - β -Bindung verknüpft ist. Weitere schwächere Signale konnten allerdings nicht eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass CA in Gegenwart von H_2O_2 bereits ohne die katalytische Aktivität von HRP teilweise oxidiert wird, was zu Dimeren führt. Da Dimere nicht das „typische“ Muster an Bindungstypen in realen Ligninen abbilden, sind sie in diesem Versuch unerwünscht.

Für den Hauptversuch wurde folglich ein Versuchsaufbau gewählt, der die Ergebnisse der Vorversuche berücksichtigt (Abb. 48). Durch die Kombination aus Zutropf- und Dialysemembranverfahren wird zum einen ein langsames Aufeinandertreffen der einzelnen Komponenten gewährleistet, um einen hohen Gehalt an β -Aryl-Ether-Strukturen zu erzielen, und zum anderen eine getrennte Zugabe von CA und H_2O_2 ermöglicht, um die Bildung von β - β -Dimeren zusätzlich zu reduzieren. Als Reaktionsmedium wurde ein Methanol-Wasser-Gemisch (30/70, v/v) gewählt. Dadurch sollte die Löslichkeit der Mykotoxine sowie der gebildeten Di-, Tri-, Tetra- und Oligomere erhöht werden, wodurch ebenfalls mehr β -O-4-Bindungen sowie ein höherer Polymerisationsgrad erwartet werden. Des Weiteren wurde als Reaktionsmedium Wasser statt Pufferlösung gewählt, um die anschließende Aufreinigung des gebildeten DHPs zu erleichtern, da nach dem Gefriertrocknen des Rückstands keine Salzfracht auftritt.

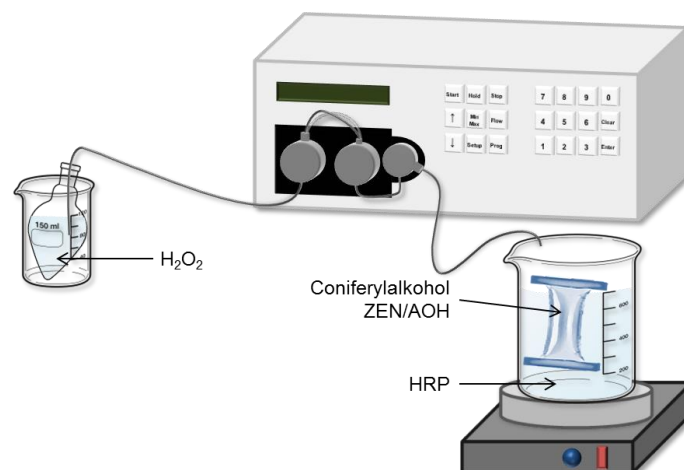


Abb. 48: Versuchsaufbau zur Kombination des Dialysemembran- und Zutropfverfahrens. HRP = Meerrettichperoxidase.

4.6.2 Untersuchung der nukleophilen Addition von ZEN und AOH an DHP

Wie in Kapitel 1.2.3.2 und 3.6 erwähnt, zeigten von der Trenck *et al.* (1981) in einer Studie mit chlorierten Anilinen, dass diese an die α -Position der polymerisierten Monolignole im DHP gebunden werden. Als Mechanismus wurde eine nukleophile Additionsreaktion der chlorierten Aniline an das intermediär auftretende Chinonmethid vorgeschlagen (Kapitel 1.2.3.2, Abb. 7). Grund für diese Annahme stellte das Versuchsdesign dar. Zunächst wurde DHP durch radikalische Polymerisation gebildet und anschließend das H_2O_2 mittels Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt. Da die chlorierten Aniline erst im Anschluss zugegeben wurden und deren ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine Verknüpfung an der α -Position der Monomerseitenkette ergaben, wurde ein nicht-radikalischer Mechanismus postuliert. Allerdings ist zu erwähnen, dass die ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen von von der Trenck *et al.* (1981) lediglich auf der Abschwächung, der Änderung der chemischen Verschiebung und dem Neuauftreten von Signalen im Vergleich zu reinem DHP basieren. In einer weiteren Studie wurde die DHP-Synthese in Gegenwart von 3,4-Dichloranilin durchgeführt (Lange *et al.*, 1998). Zwar wurden anschließend neben eindimensionalen ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Experimenten auch 2D-NMR-Techniken (z.B. $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COLOC) angewandt, allerdings wurde die Benzylaminstruktur an der α -Position der Monolignolseitenkette ebenfalls nur anhand der Abschwächung und dem Neuauftreten von Signalen in den eindimensionalen Spektren begründet. Einen eindeutigen Beweis für eine Bindung der chlorierten Aniline an die α -Position würde eine Long-Range-Kopplung zwischen dem Anilin und der Seitenkette liefern. Eine derartige Kopplung wurde allerdings von Lange *et al.* (1998) nicht beschrieben. Da keine eindeutige Strukturaufklärung stattfand und eine Anlagerung von Wasser an das intermediär gebildete Chinonmethid aufgrund des großen Überschusses den wahrscheinlicheren Reaktionspartner darstellt, sollte dieses Ergebnis angezweifelt werden.

Trotz der genannten Zweifel, wurde das Versuchsdesign von von der Trenck *et al.* (1981) in modifizierter Form für die Untersuchung der Mykotoxinbindung an das DHP via nukleophile Additionsreaktion angewandt. Hierfür wurde synthetisiertes DHP (aus Kapitel 4.6.1.1) ohne Zugabe von Peroxidase und H_2O_2 mit ZEN bzw. AOH für 48 Stunden versetzt und die Struktur anschließend mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Bei einer nukleophilen Addition von ZEN an das DHP müssten im HMBC-Spektrum entsprechende Korrelationssignale die Kopplungen von ZEN bzw. AOH an die α -Position anzeigen. Mögliche nukleophile Stellen am ZEN sind beispielsweise die beiden Hydroxygruppen an den Positionen 14 und 16. Eine Bindung an die α -Position der Monomerseitenkette im DHP über Position 14 bzw. 16 von ZEN müsste im HMBC-Spektrum ein Korrelationssignal entsprechend der Kopplung von H_α (DHP) mit C14 (ZEN) ergeben. Dabei handelt es sich um $^3\text{J}_{\text{C,H}}$ -Kopplungen, die im HMBC-Spektrum gut sichtbar sein müssten. Abb. 49 zeigt das HMBC-Spektrum des DHPs, das mit ZEN umgesetzt wurde (lila). Das Spektrum ist überlagert mit dem HMBC-Spektrum von reinem ZEN (grün). Der blaue Kreis zeigt den Bereich an, in dem eine Kopplung erwartet wird, wenn ZEN an der α -Position gebunden vorliegen würde. Außerdem ist zu beachten, dass es zu Verschiebungen der ZEN-Signale kommen würde, wenn eine Bindung an das DHP vorliegen würde.

Das HMBC-Spektrum des mit ZEN umgesetzten DHPs zeigt Signale von reinem ZEN an. Hierbei sind weder Änderungen in den chemischen Verschiebungen, noch neu auftretende Signale in der Umgebung zu erkennen. Auch der Vergleich mit einem HMBC-Spektrum von reinem DHP zeigte, dass keine weiteren Signale aufgetreten sind. Daher ist davon auszugehen, dass keine Bindung von ZEN an das zuvor polymerisierte DHP über nukleophile Addition erfolgte.

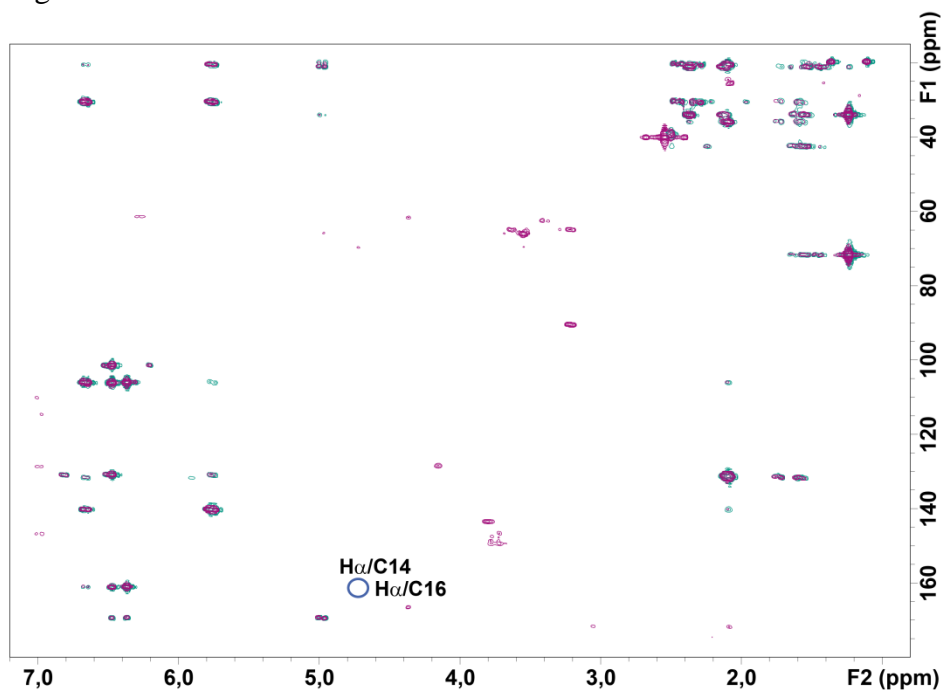


Abb. 49: Überlagerte HMBC-Spektren des synthetisierten DHPs, das nach Polymerisation mit ZEN umgesetzt wurde (lila), und von reinem ZEN (grün). Der blaue Kreis kennzeichnet den im Text genannten Bereich.

Ebenso wie für ZEN wurde der Versuch auch mit AOH durchgeführt. AOH besitzt mit den Hydroxygruppen an den Positionen 3, 7 und 9 drei mögliche Positionen für einen nukleophilen Angriff auf die α -Position der Ligninseitenkette. Bei einer Bindung über Position 3 müsste eine Kopplung von $H\alpha$ mit C3 zu sehen sein. Eine Verknüpfung über Position 7 hätte eine Kopplung von $H\alpha$ mit C7 zur Folge und bei einer Verknüpfung über Position 9 müsste eine Kopplung von $H\alpha$ mit C9 auftreten. Auch hier handelt es sich um $^3J_{C,H}$ -Kopplungen. Abb. 50 zeigt das HMBC-Spektrum von mit AOH umgesetztem DHP (lila) sowie das HMBC-Spektrum von reinem AOH (grün). Die blauen Kreise geben wiederum die Bereiche an, in denen Korrelationssignale verortet sein sollten, wenn AOH an der α -Position der DHP-Monomerseitenketten gebunden vorliegen würde. Bei einer Bindung von AOH an das DHP wären Verschiebungen der AOH-Signale aufgrund der veränderten chemischen Umgebung zu erwarten.

Im HMBC-Spektrum des mit AOH umgesetzten DHPs sind dem reinen AOH zuzuordnende Korrelationssignale zu sehen. Weder Änderungen in den chemischen Verschiebungen, noch neu auftretende Signale sind in den umliegenden Bereichen erkennbar. Auch bei dem Vergleich mit einem HMBC-Spektrum von reinem DHP konnten keine zusätzlichen Signale festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass keine Bindung von AOH an das zuvor polymerisierte DHP über nukleophile Addition erfolgte.

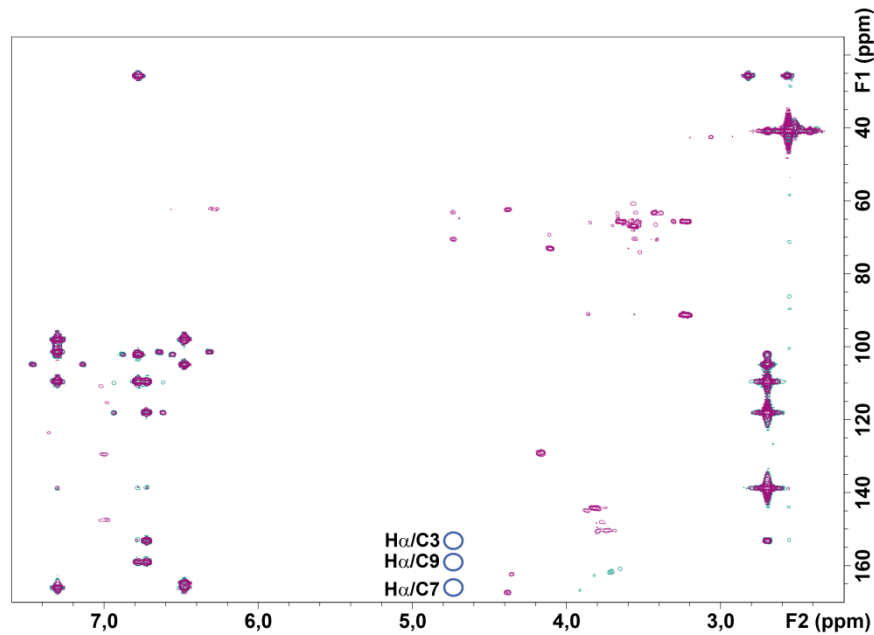


Abb. 50: Überlagerte HMBC-Spektren des synthetisierten DHPs, das nach Polymerisation mit AOH umgesetzt wurde (lila), und von reinem AOH (grün). Die blauen Kreise kennzeichnen die im Text genannten Bereiche.

4.6.3 Untersuchung der Bindung von AOH und ZEN an DHP über radikalische Prozesse während der DHP-Synthese

Wie bereits ins Kapitel 4.6.1.4 beschrieben, wurde für die Hauptversuche eine Kombination aus Zutropf- und Dialysemembranverfahren gewählt (Abb. 48). Die Stoffmengenverhältnisse CA / Mykotoxin betragen 1:1 und 10:1, um auf der einen Seite einen hohen Anteil an Mykotoxin für die Einlagerung in das DHP bereitzustellen und auf der anderen Seite einen etwas naturähnlicheren Ansatz zu verwenden.

Die gewonnenen eingedampften Rückstände wurden in DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4:1) gelöst und für HSQC- sowie HMBC-Experimente eingesetzt. Zur Strukturcharakterisierung der DHPs wurden die Monomerbindungstypen bestimmt. Die prozentuale Verteilung der Bindungstypen ist in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: Prozentuale Verteilung der Bindungstypen in den synthetisierten DHPs, die mit ZEN bzw. AOH umgesetzt wurden

Probe	β -O-4 (%)	β -5 (%)	β - β (%)
CA + ZEN (1:1)	12,6*	48,2	39,1
CA + ZEN (10:1)	9,9	48,5	41,7
CA + AOH (1:1)	8,3	42,0	49,7
CA + AOH (10:1)	5,1	43,4	51,4

* α -CH-Signal überlagert mit 3-CH-Signal von ZEN (Anteil wird überschätzt)

Der Gehalt an β -O-4-Bindungen liegt zwischen 5,1 und 12,6 % der analysierten Bindungstypen und somit trotz Optimierung der Versuchsbedingungen unter den in den Vorversuchen ermittelten Anteilen. Der hohe β -O-4-Gehalt des DHPs, welches unter Verwendung von CA und ZEN in einem Verhältnis von 1:1 hergestellt wurde, ist damit zu begründen, dass das α -CH-Signal leicht mit dem 3-CH-Signal von ZEN überlagert wurde. Während bei den Proben, bei denen ZEN während der Polymerisation zugegen war, β -5-

Bindungen den dominierenden Bindungstyp darstellen, treten bei den Proben, die in Gegenwart von AOH polymerisiert wurden, hauptsächlich β - β -Bindungen auf. Beiden Versuchen gemeinsam ist, dass geringere Anteile an β -O-4-Bindungen erzielt wurden als in Versuchen ohne Mykotoxine (Kapitel 4.6.1.1).

Um zu untersuchen, ob AOH und ZEN kovalent an ligninähnliche Strukturen binden, wurden zunächst die HSQC-Spektren nach neu auftretenden Korrelationssignalen sowie nach Intensitätsabschwächungen bekannter, dem DHP bzw. dem reinen Mykotoxin zuzuordnenden Korrelationssignalen, im Vergleich zu reinem DHP und reinem Mykotoxin untersucht. In den Spektren der DHPs, die in Gegenwart von ZEN polymerisiert wurden, konnten keine neu aufgetretenen Signale festgestellt werden, die nicht reinem ZEN oder reinem DHP zuzuordnen sind (Abb. 51 A, B). Da die gesamte Lösung eingedampft wurde und der komplette Rückstand NMR-spektroskopisch gemessen wurde, sind sowohl ZEN- als auch DHP-Signale zu erkennen. Da jedoch keine weiteren Signale auftraten, kann keine Bindung von ZEN an das DHP nachgewiesen werden, unabhängig vom Mengenverhältnis von CA zu ZEN.

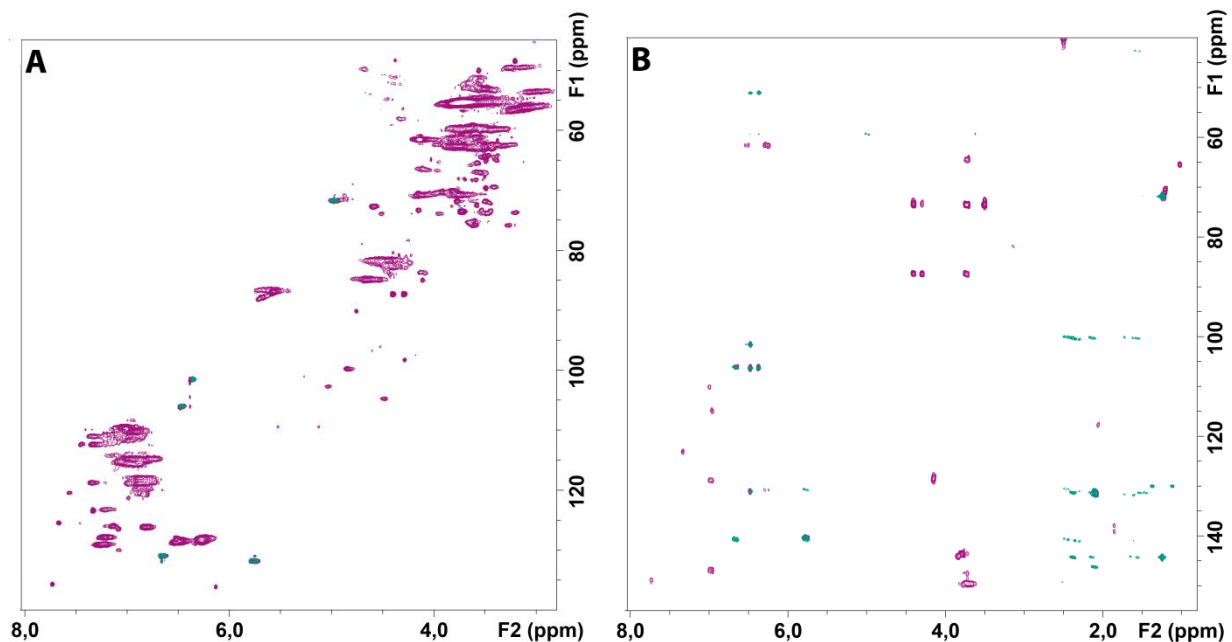


Abb. 51: Überlagerte HSQC-Spektren des in Gegenwart von ZEN synthetisierten DHP (lila) sowie von freiem ZEN (grün) (A) und überlagerte HMBC-Spektren des in Gegenwart von ZEN synthetisierten DHP (lila) sowie von freiem ZEN (grün) (B).

Gleichermaßen konnten in den HSQC-Spektren der DHPs, die in Gegenwart von AOH synthetisiert wurden, Korrelationssignale detektiert werden, die dem reinen AOH zuzuordnen sind (Abb. 52 A). Im HMBC-Spektrum waren bei einer Scanzahl von 64 jedoch keine dem AOH zuzuordnenden Korrelationssignale sichtbar, was vermutlich mit einer zu geringen Konzentration zu begründen ist (Abb. 52 B). Da auch im HSQC-Spektrum im Vergleich zum reinen DHP keine weiteren Signale erkennbar sind, kann mit diesem experimentellen Aufbau keine Bindung von AOH an DHP und somit an ligninähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Auch hier hat dieses Ergebnis unabhängig von den eingesetzten Mengenverhältnissen von CA zu AOH Bestand.

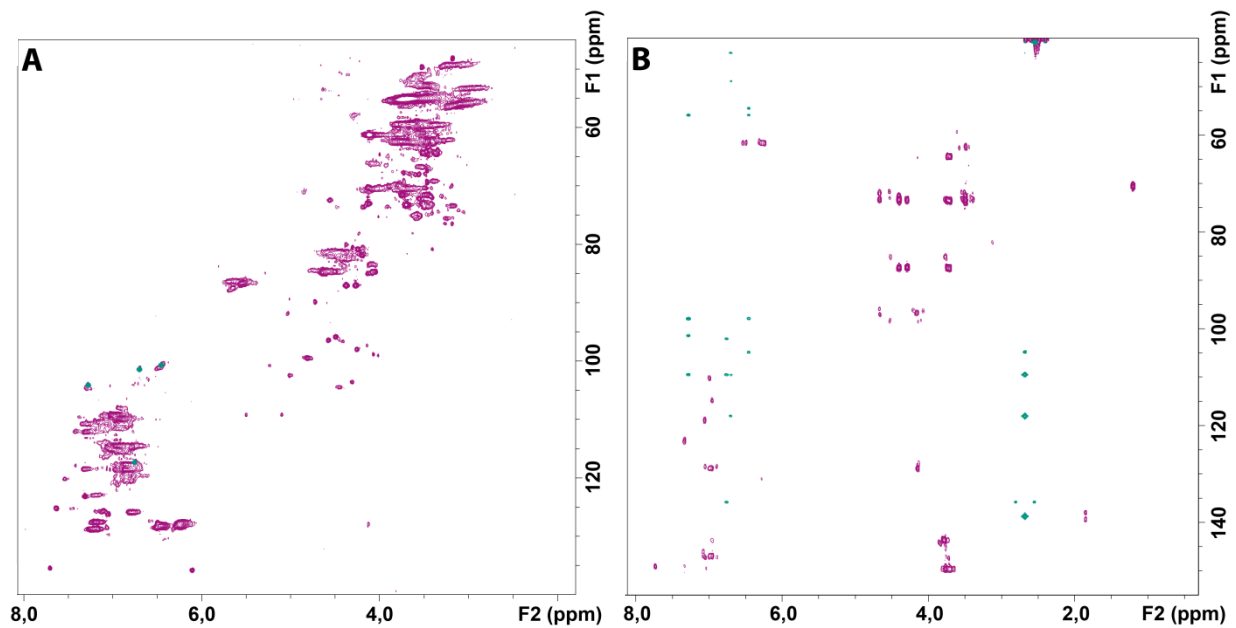


Abb. 52: Überlagerte HSQC-Spektren des in Gegenwart von AOH synthetisierten DHP (lila) sowie von freiem AOH (grün) (A) und überlagerte HMBC-Spektren des in Gegenwart von AOH synthetisierten DHP (lila) sowie von freiem AOH (grün) (B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weder eine Einlagerung der Mykotoxine über nukleophile Additionsreaktion an die α -Position der Monolignolseitenketten von zuvor polymerisiertem DHP, noch eine Inkorporation der Mykotoxine während der radikalischen Polymerisation mit den verwendeten Methoden beobachtet werden konnte. Prinzipiell ist die Bindung von Mykotoxinen an die α -Position über eine nukleophile Additionsreaktion als relativ unwahrscheinlich einzustufen, da die Mykotoxine in Konkurrenz mit anderen Nukleophilen, wie z.B. Wasser, stehen, die in großem Überschuss vorliegen. Im Gegensatz dazu wäre eine Einlagerung über radikalische Prozesse als wahrscheinlicher anzusehen. Dabei würde das Mykotoxin selbst dehydrogeniert werden, wodurch resonanzstabilisierte Phenoxyradikale entstehen würden. Diese könnten in Radikalreaktionen mit dem DHP eine Reihe verschiedener Produkte bilden. Eine Einlagerung in Lignin über diesen sogenannten „aktiven“ Mechanismus wurde beispielsweise für Ferulasäure gezeigt (Ralph *et al.*, 1995). Da es sich bei den hier durchgeführten Versuchen lediglich um ein Modellsystem handelt, ist nicht auszuschließen, dass Einlagerungen von Mykotoxinen in Lignin in der Natur vorkommen. Beispielsweise könnte der Einsatz von Laccase statt HRP zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Des Weiteren müssten für naturnähere Bedingungen weitere Monolignole, insbesondere Sinapylalkohol und *p*-Cumarylalkohol, zur DHP-Bildung eingesetzt werden.

4.7 Zusammenfassende Diskussion

Die Strukturaufklärung löslicher pflanzlicher Konjugate der *Alternaria*-Toxine AOH und AME sowie des *Fusarium*-Toxins ZEN war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Mithilfe von Tabak-, Soja- und Weizensuspensionszellen konnte belegt werden, dass die drei Mykotoxine umfangreich metabolisiert werden. Als Hauptmetaboliten wurden Glucoside und Malonylglucoside gebildet, die teilweise schon in vorangegangenen Arbeiten mittels NMR-spektroskopischer Analysen identifiziert wurden. Diese Metaboliten konnten auch in Karotten- und Tomaten-Explant-Kulturen teilweise nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Mykotoxine nicht nur von in Suspension vorliegenden Pflanzenzellen, sondern auch von intakten Pflanzengeweben metabolisiert werden können. Neben den Hauptmetaboliten konnten in geringeren Mengen auch Dihexoside, Trihexoside, Acetylhexoside, Malonyldihexoside, Dimalonyldihexoside, Pentosylhexoside, Desoxyhexosylhexoside sowie im Falle von ZEN, reduktive Metaboliten mittels HRMS-Analyse gefunden werden. Eine eindeutige Identifizierung der gering konzentrierten Metaboliten ist zwar allein mittels HRMS-Analyse nicht möglich, allerdings lassen sich Vermutungen über deren Strukturen aufstellen. Sowohl Fremdstoffe als auch pflanzeigene Stoffe werden entweder zur Detoxifizierung oder zur Speicherung häufig an Glucose, aber auch an Rhamnose, Galactose, Arabinose oder Xylose gebunden (Tiwari *et al.*, 2013). Daher handelt es sich bei den nicht vollständig identifizierten Mykotoxinmetaboliten vermutlich um Diglucoside, Triglucoside, Acetylglucoside, Malonyldiglucoside, Dimalonyldiglucoside, Arabinosyl- oder Xylosylglucoside und Rhamnosylglucoside (Rutinoside). Allerdings bedarf es hierfür weiterer NMR-spektroskopischer Analysen, um diese Hypothese zu bestätigen. Ebenso kann nur mittels NMR-spektroskopischer Analysen eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den Di- und Triglucosiden, zumindest zum Teil, auch um Oligosaccharide handelt.

Während die Hauptmetaboliten von AOH bereits in vorangegangenen Arbeiten NMR-spektroskopisch identifiziert wurden, konnte ein weiterer AME-Metabolit sowie vier ZEN-Metaboliten in ausreichender Menge für eine NMR-spektroskopische Strukturaufklärung gewonnen werden. Der AME-Metabolit konnte erstmals als 3-*O*-(4'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME identifiziert werden. Bislang sind in der Literatur noch keine Malonylglucoside als Mykotoxinkonjugate beschrieben, bei denen die Malonsäure an Position 4 der Glucose verknüpft vorliegt. Diese Verknüpfungsposition konnte allerdings schon in verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen wie z.B. Isoflavonen beobachtet werden (Yerramsetty *et al.*, 2011). In der Literatur wird auch die Wanderung der Malonsäure entlang des Glucosemoleküls beschrieben (Yoshimoto & Tsuda, 1983). Eine derartige Malonylwanderung konnte für das AME-Malonylglucosid bei Lagerung bei -20 °C nicht beobachtet werden.

Außerdem konnte die Struktur zweier ZEN-Glucoside sowie zweier Malonylglucoside eindeutig aufgeklärt werden. Während die Strukturen der ZEN-Metaboliten 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN und 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN in der Literatur bereits beschrieben wurden (Kovalsky Paris *et al.*, 2014), konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Strukturen der beiden ZEN-Malonylglucoside 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN und 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN erstmals eindeutig aufgeklärt werden.

Berthiller *et al.* berichteten bereits im Jahr 2006 über die Bildung von ZEN-Malonylglucosiden im späten Phase II-Metabolismus und betonten die Notwendigkeit deren Strukturklärung mittels NMR-Spektroskopie. Da die beiden ZEN-Malonylglucoside in den Zellsuspensionskulturen in relativ hohen Konzentrationen gebildet wurden, leisten sie möglicherweise einen relevanten Beitrag zur Gesamtexposition.

Die semiquantitative Betrachtung der gebildeten Metaboliten nach neuntägiger Inkubation ergab, dass die Metabolitenprofile in den drei Zellkultursystemen qualitativ zwar weitgehend vergleichbar waren, jedoch deutliche quantitative Unterschiede im Metabolismus bestehen. Beispielsweise bildeten Sojazellen bevorzugt Malonylglucoside aus allen drei untersuchten Mykotoxinen, wohingegen die glucosidischen Vorstufen in geringeren Anteilen detektiert wurden. Im Vergleich dazu stellte die Konjugation der Mykotoxine an Glucose in Weizenzellen den Hauptmetabolismusweg dar. In Tabakzellen war die bevorzugte Ausbildung von Glucosid- oder Malonylglucosidkonjugaten abhängig vom untersuchten Mykotoxin. Während die Inkubation der Tabakzellen in Gegenwart von AOH und ZEN zu ähnlichen Anteilen an Glucosiden und Malonylglucosiden führte, dominierte bei der Inkubation von AME ein Malonylglucosid als Hauptkonjugat.

Zu beachten ist, dass sich das Metabolitenprofil bei einer längeren Inkubationsdauer verändern kann, da die Glucoside Vorstufen zu den jeweiligen Malonylglucosiden darstellen. Einen weiteren pflanzenspezifischen Unterschied stellt die Verknüpfungsposition der Glucoside bzw. Malonylglucoside dar. Beispielsweise wird AOH in Tabakzellen bevorzugt an Position 9 glucosyliert, wohingegen in Soja- und Weizenzellen hauptsächlich an Position 3 konjugiert wird. ZEN wird im Sojazzellsuspensionssystem vorwiegend an Position 14 konjugiert, während in Tabak- und Weizenzellen Glucosylierungen an beiden Positionen (14 und 16) beobachtet wurden. Des Weiteren konnten Unterschiede bei der Bildung der in geringeren Konzentrationen nachgewiesenen Mykotoxinkonjugate beobachtet werden. Während in den Tabak- und Weizenzellen eine größere Vielfalt an Metaboliten gebildet wurde, war in den Sojazellen die Anzahl an Metaboliten für alle drei Mykotoxine geringer. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass, auch wenn grundsätzlich ähnliche Detoxifizierungswege beschrieben werden, der pflanzliche Metabolismus der Mykotoxine AOH, AME und ZEN je nach Pflanzenart variieren kann. Hieraus ergibt sich, dass grundsätzlich alle bekannten Metaboliten bei der Risikobewertung eines Lebens- oder Futtermittels in Betracht gezogen werden sollten.

Zur Überprüfung, ob die in Pflanzenzellsuspensionskultur gebildeten Metaboliten auch in intakten Pflanzen gebildet werden, wurden in Zusammenarbeit mit dem MRI in Karlsruhe Tomaten mit Sporen von *A. alternata* infiziert. Der betroffene Teil wurde nach einer Woche herausgeschnitten und auf *Alternaria*-Toxine und deren Metaboliten analysiert. Die dabei gefundenen Sulfatkonjugate wurden mittels NMR-Spektroskopie eindeutig als AOH-3,9-Disulfat, AOH-3-Sulfat, AOH-9-Sulfat und AME-3-Sulfat identifiziert. Bei den Monosulfaten handelt es sich um keine unbekanntenen Verbindungen, da AOH-9-Sulfat und AME-3-Sulfat bereits aus Kulturen eines endophytischen *Alternaria*-Stammes isoliert wurden und deren Strukturen mittels ¹H- und ¹³C-NMR sowie Massenspektrometrie aufgeklärt wurden (Aly *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden die Verbindungen AOH-3-Sulfat, AOH-9-Sulfat und

AME-3-Sulfat von Mikula *et al.* (2013) chemisch synthetisiert und mittels NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert. AOH-3-Sulfat und AME-3-Sulfat konnten bereits in Lebensmitteln (Tomatensaucen, Tomatensäfte und Tomatenkonzentrat) gefunden werden (Puntscher *et al.*, 2018; Walravens *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu den Monosulfaten konnte das AOH-3,9-Disulfat im Rahmen dieser Arbeit erstmals isoliert und strukturcharakterisiert werden. Neben den Sulfaten konnten noch weitere bislang unbekannte Verbindungen in dem Tomaten-Schimmelpilz-Extrakt detektiert werden. Aus den Massenspektren ergaben sich Hinweise auf gemischte Konjugate mit je einem Sulfat- und Hexoserest. Um größere Mengen dieser neuartigen Substanzen zu generieren, wurden Tabaksuspensionszellen mit den AOH- und AME-Sulfaten inkubiert, die Metaboliten im präparativen Maßstab isoliert und anschließend mittels NMR-spektroskopischer Analysen als AOH-3-*O*-Sulfat-9-*O*- β -D-Glucosid, AOH-9-*O*-Sulfat-3-*O*- β -D-Glucosid und AME-3-*O*-Sulfat-7-*O*- β -D-Glucosid identifiziert. In der Literatur fand sich bis dahin noch kein Hinweis auf vergleichbare Mykotoxin-Sulfoglucoside, die an zwei verschiedenen Hydroxygruppen jeweils eine Sulfat- und eine Glucosegruppe aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Schimmelpilze in der Lage sind, Mykotoxin-Sulfate zu bilden, die im Zuge des pflanzlichen Metabolismus weiter glucosyliert werden können. Generell sollte die Bildung von Sulfoglucosiden zukünftig auch bei anderen Mykotoxinen oder deren Phase I-Metaboliten mit zwei oder mehr Hydroxygruppen in Betracht gezogen werden. Dies stellt die Analytik modifizierter Mykotoxine vor eine neue Herausforderung, da für diesen extrem polaren Konjugationstyp optimierte Extraktions- und Quantifizierungsmethoden benötigt werden.

Im Allgemeinen wird die Richtigkeit und Präzision LC-MS-basierter Analysemethoden durch die Verwendung isotoopenmarkierter Standardsubstanzen verbessert, da Matrixeffekte, insbesondere im Rahmen der Ionenerzeugung, effektiv ausgeglichen werden können. Allerdings sind für die meisten modifizierten Mykotoxine noch keine isotoopenmarkierten Standardsubstanzen kommerziell verfügbar, weshalb im Rahmen dieser Arbeit deuterierte Standardsubstanzen für modifiziertes AOH, AME und ZEN hergestellt wurden. Zunächst konnten AOH-*d*₄, AME-*d*₄ und ZEN-*d*₂ in ausreichender Isotoopenreinheit (99 %, 92 % und 99 %) gewonnen werden. Hierfür wurden bereits publizierte Methoden für den katalytischen Austausch von aktivierbaren Protonen gegen Deuterium angewandt (Asam *et al.*, 2009; Cramer *et al.*, 2007). Die Verbindungen zeigten auf der einen Seite einen geringen Isotopenshift bei der chromatographischen Trennung und besaßen auf der anderen Seite einen ausreichend hohen Markierungsgrad, um spektrale Überlappungen im Massenspektrum weitestgehend zu vermeiden. Die deuterierten Mykotoxine AOH-*d*₄, AME-*d*₄ und ZEN-*d*₂ wurden anschließend in Tabakzellsuspensionskulturen eingesetzt, um deuterierte modifizierte Mykotoxine zu erzeugen. Eine derartige Methodik wurde in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Einen vergleichbaren Ansatz liefert die Synthese von ¹³C-markierten Mykotoxinen mit Schimmelpilzkulturen, indem [¹³C₆]-Glucose und [¹³C₂]-Natriumacetat zu dem Schimmelpilzkulturmedium zugegeben werden (Liu & Rychlik, 2015). Allerdings werden für die Synthese von markierten modifizierten Mykotoxinen pflanzliche Systeme wie z.B. Pflanzenzellsuspensionskulturen benötigt. Der Vorteil dieser Methodik im Vergleich zu rein chemischen Synthesen ist, dass eine größere Bandbreite an isotoopenmarkierten modifizierten Mykotoxinen während eines Versuchs gewonnen werden kann.

Die Stabilität der deuterierten Ausgangsverbindungen war im Zellsuspensionskultursystem gegeben. Für AOH konnten fünf deuterierte Metaboliten isoliert und aufgereinigt werden. Allerdings erwiesen sich die Malonylglucoside im zeitlichen Rahmen der MS- und NMR-Analysen als instabil, da Malonsäure mit der Zeit abgespalten wurde. Die zwei Glucoside (AOH-*d*₄-9-Glucosid, AOH-*d*₄-3-Glucosid) sowie das Diglucosid (AOH-*d*₄-9-Diglucosid) hingegen zeigten eine ausreichende Stabilität und wiesen Isotopenreinheiten zwischen 92 und 97 % auf, die mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es je nach Verbindung zu einem geringfügigen D/H-Rückaustausch an Position 2 oder 8 von AOH kam. Für AME wurden das AME-*d*₄-3-Glucosid sowie das AME-*d*₄-6'-Malonyl-3-Glucosid isoliert und aufgereinigt. Ähnlich wie bei den AOH-Malonylglucosiden konnte auch bei den AME-Malonylglucosiden eine Instabilität beobachtet werden. Das AME-3-Glucosid hingegen zeigte eine ausreichende Stabilität sowie eine ausreichende mittels ¹H-NMR-spektroskopischer Analyse bestimmte Isotopenreinheit von 93 %. Mithilfe einer HRMS-Analyse ließ sich dies bestätigen.

Die deuterierten modifizierten Formen von ZEN (ZEN-*d*₂-16-Glucosid, ZEN-*d*₂-14-Glucosid, ZEN-*d*₂-6'-Malonyl-16-Glucosid, ZEN-*d*₂-6'-Malonyl-14-Glucosid) wiesen laut LC-MS-Analyse Isotopenreinheiten zwischen 81 und 89 % auf. Aufgrund von Abspaltungen bzw. Umlagerungen der Malonsäure in den Malonylglucosiden und aufgrund der zu geringen Konzentration des ZEN-14-Glucosids, konnte lediglich für das ZEN-16-Glucosid eine ¹H-NMR-Messung zur Bestimmung der Isotopenreinheit durchgeführt werden. Diese ergab eine Isotopenreinheit von 92 % und zeigte auf, dass der D/H-Rückaustausch vorwiegend an Position 13, und nur zu einem geringeren Anteil an Position 15, stattfand.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem die Glucoside eine hohe Stabilität und ausreichende Isotopenreinheit aufweisen, um in SIVAs eingesetzt zu werden. Während in der Literatur bereits einige Studien zur Deuterierung oder ¹³C-Markierung von freien Mykotoxinen zu finden sind, wurde die Isotopenmarkierung von modifizierten Mykotoxinen bislang noch nicht durchgeführt. Die EFSA forderte in mehreren Stellungnahmen die Entwicklung analytischer Methoden für modifizierte Mykotoxine sowie dafür benötigte Standardsubstanzen (EFSA, 2014, 2017c). Mithilfe der deuterierten modifizierten Formen von AOH, AME und ZEN können in Zukunft SIVAs entwickelt werden, um den Gehalt der glucosylierten Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln akkurat und präzise quantifizieren zu können.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Aufnahme modifizierter Formen von AOH, AME und ZEN in Caco-2-Zellen, um deren Bioverfügbarkeit abschätzen zu können. Aufgrund der Instabilität der Malonylglucoside wurden lediglich zwei AOH-Glucoside sowie ein AOH-Diglucosid, zwei AME-Glucoside und zwei ZEN-Glucoside in dieser Versuchsreihe eingesetzt. Yerramsetty *et al.* (2014) zeigten bereits, dass Malonylglucosid-Konjugate von Isoflavonen im Vergleich zu deren glucosidischen Formen bei Ratten eine niedrigere Bioverfügbarkeit aufwiesen. Es ist daher anzunehmen, dass dies auch auf die Mykotoxin-Malonylglucoside zutrifft. Allerdings ist aufgrund deren Instabilität auch eine vergleichbare Resorption wie bei den Glucosiden möglich, je nachdem wann und an welcher Stelle des Gastrointestinaltrakts die Malonsäure abgespalten wird.

Die Untersuchung zum Metabolismus von AOH, AME und ZEN in Caco-2-Zellen ergaben ähnliche Ergebnisse wie bereits publizierte Studien (Burkhardt *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2011). Die Mykotoxine AOH, AME und ZEN wurden in die Zellen aufgenommen und zu Glucuroniden und Sulfaten metabolisiert. Für die modifizierten Formen ZEN-16-Glucosid und ZEN-14-Glucosid wurden in der Literatur bereits Aufnahme- und Metabolismusstudien durchgeführt. Während Cirlini *et al.* (2016) eine konzentrations- und zeitabhängige Freisetzung von ZEN bei beiden Glucosiden beobachten konnten, konnten Gratz *et al.* (2017) keine zelluläre Aufnahme der modifizierten Formen von ZEN feststellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit ZEN-16-Glucosid und ZEN-14-Glucosid ergaben weder im Inkubationsmedium, noch in den Zellen quantifizierbare Mengen von freiem ZEN bzw. von Metaboliten, die von den Caco-2-Zellen gebildet wurden, wobei Spuren von Glucuroniden und Sulfaten auf den Massenspuren der massenspektrometrischen Analyse detektiert werden konnten. Die Spaltbarkeit wurde dabei von der Verknüpfungsposition beeinflusst, da bei der Untersuchung von ZEN-14-Glucosid wesentlich mehr Metaboliten der Caco-2-Zellen gefunden wurden als bei der Untersuchung von ZEN-16-Glucosid. Aufgrund der in höheren Konzentrationen eingesetzten Ausgangssubstanzen konnten Cirlini *et al.* (2016) diese Effekte in deutlicherem Ausmaß feststellen. Prinzipiell werden Variabilitäten bei Zellkulturversuchen häufig beobachtet, da Einflussfaktoren wie z.B. Zellklone, Konzentrationen oder eingesetztes Medium die Ergebnisse beeinflussen können (Press & Di Grandi, 2008).

Die Aufnahme und der Metabolismus von pflanzlichen AOH- und AME-Metaboliten in Caco-2-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht. Dabei ließ sich beobachten, dass die glucosidischen Metaboliten (AOH-9-Glucosid, AOH-3-Glucosid, AME-3-Glucosid und AME-7-Glucosid) in die Zellen aufgenommen und in unterschiedlichem Ausmaß, je nach Verknüpfungsposition, gespalten und weiter zu Glucuroniden und Sulfaten metabolisiert wurden. AOH-9-Glucosid wurde zu einem Großteil zu AOH gespalten und wies ein zu AOH vergleichbares Metabolitenprofil auf. Im Gegensatz dazu wurden die an Position 3 verknüpften AOH- und AME-Glucoside zu einem geringeren Anteil gespalten und metabolisiert. Dies traf auch auf das AME-7-Glucosid zu. Das AOH-9-Diglucosid wurde hingegen lediglich in Spuren in den Zellen gefunden und nur in geringem Maße zu AOH-9-Glucosid umgesetzt.

Verantwortlich für die Deglucosylierung von Fremdstoffen sind β -Glucosidasen. Dazu zählt beispielsweise die cytosolische β -Glucosidase, die in der Leber, in der Niere und im Dünndarm vorkommt (Mellor & Layne, 1971; Daniels *et al.*, 1981). Steensma *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die cytosolische β -Glucosidase ebenfalls in Caco-2-Zellen gebildet wird. Neben Fremdstoffen können auch andere phenolische Glucoside wie z.B. Genistein-7-Glucosid, von einer β -Glucosidase gespalten werden (Steensma *et al.*, 1999; LaMarco & Glew, 1986; Gopalan *et al.*, 1992). Trotz der breiten Substratspezifität der cytosolischen β -Glucosidase, ist die Spaltbarkeit eines Glucosids abhängig von der Verknüpfungsposition und der Art des Kohlenhydratrests (Németh *et al.*, 2003; Day *et al.*, 1998). Bereits kleine strukturelle Unterschiede können dazu führen, dass ein dem Substrat ähnlicher Stoff nicht mehr als Substrat vom aktiven Zentrum der β -Glucosidase erkannt wird, wodurch die

unterschiedlichen Spaltbarkeiten von z.B. AOH-9-Glucosid und AOH-3-Glucosid erklärt werden können.

Die Resorption der Metaboliten wurde in einem *Transwell*-Modellsystem untersucht. Zwar konnte für die beiden ZEN-Glucoside keine Resorption, d.h. Ausschleusung zur basolateralen Seite, nachgewiesen werden, allerdings kann dies auch durch die relativ geringe Nachweisempfindlichkeit begründet sein. Im Gegensatz dazu konnte bei der Inkubation in Gegenwart von unkonjugiertem ZEN eine Ausschleusung zur basolateralen Seite von ZEN und ZEN-Metaboliten, die von den Caco-2-Zellen gebildet wurden, beobachtet werden. Ein Vergleich der Resorptionsstudie von unkonjugiertem ZEN mit den Resorptionsstudien der ZEN-Glucoside zeigt, dass bei den ZEN-Konjugaten von einer geringeren Bioverfügbarkeit auszugehen ist.

Anders als bei den ZEN-Glucosiden, wurden AOH-9-Glucosid und AOH-3-Glucosid nach dreistündiger Inkubation gespalten. Des Weiteren konnten, ähnlich wie bei unkonjugiertem AOH, AOH-Metaboliten, die von den Caco-2-Zellen gebildet wurden, im basolateralen Kompartiment nachgewiesen werden. Selbst beim Einsatz eines Gemisches aus AOH-9-Diglucosid und AOH-3-Glucosid wurden Glucuronide auf basolateraler Seite nachgewiesen, die möglicherweise auch nur von AOH-3-Glucosid stammen könnten. Die zwei Glucoside des AMEs (AME-3-Glucosid und AME-7-Glucosid) wurden unter den verwendeten Bedingungen ebenso gespalten und metabolisiert. Für AOH-3-Glucosid und AME-7-Glucosid konnten P_{app} -Werte von $2,1 \times 10^{-6}$ cm/s und $1,7 \times 10^{-6}$ cm/s bestimmt werden. Im Vergleich zu den P_{app} -Werten von AOH ($34,9 \times 10^{-6}$ cm/s) bzw. AME ($10,3 \times 10^{-6}$ cm/s) ist bei den Konjugaten von einer geringeren Resorption auszugehen. Allerdings konnte Yee (1997) zeigen, dass bei Substanzen mit P_{app} -Werten zwischen $1-10 \times 10^{-6}$ cm/s im Caco-2-Zellversuch von einer mittleren Resorption beim Menschen ausgegangen werden kann. Bei den Inkubationen von AOH-9-Glucosid, AOH-9-Diglucosid und AME-3-Glucosid im Caco-2-*Transwell*versuch waren die Konzentrationen der Metaboliten bzw. Aglykone auf basolateraler Seite zu gering für eine Quantifizierung, weshalb keine P_{app} -Werte berechnet werden konnten.

Die Ergebnisse der Caco-2-Versuche zeigten somit, dass eine Aufnahme in Dünndarmzellen und Spaltung der AOH- und AME-Glucoside sowie ein Transport der in den Caco-2-Zellen gebildeten AOH- und AME-Metaboliten in das Blut durchaus möglich ist. Aufgrund des toxischen Potentials, das von den Ursprungssubstanzen ausgeht, sollten die modifizierten Formen daher bei der Gesundheitsbewertung von Lebens- und Futtermitteln berücksichtigt werden. Auch für die beiden ZEN-Glucoside konnte bereits unter Verwendung höherer Konzentrationen eine Resorption und Ausschleusung auf basolateraler Seite im *Transwell*-Versuch gezeigt werden (Cirlini *et al.*, 2016), weshalb auch diese modifizierten Mykotoxine in die Risikobewertung einbezogen werden sollten. Darüber hinaus konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass ZEN-14-Glucosid sowie α - und β -ZEL-14-Glucosid von der Darmmikrobiota zu ZEN und weiteren unbekanntem Metaboliten hydrolysiert werden (Gratz *et al.*, 2017). Für die modifizierten Formen von AOH und AME wurden bislang noch keine Studien mit menschlicher Kolonmikrobiota durchgeführt, allerdings ist auch hier eine Freisetzung der Aglyka aufgrund der bakteriellen β -Glucosidaseaktivität zu erwarten. Spätestens im Dickdarm können modifizierte Mykotoxine somit einen Beitrag zur Gesamtoxizität liefern.

Neben der Bildung von löslichen Mykotoxinkonjugaten wird in der Literatur auch häufig eine Zellwandbindung der Mykotoxine im Zuge des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus diskutiert. Beispielsweise fanden Zill *et al.* (1990) in Pflanzenzellkulturen 50 % des ursprünglich eingesetzten radioaktiv markierten ZENs in „Zellwandfraktionen“ wieder. Dabei könnte es sich allerdings auch um zuvor nicht vollständig extrahierte lösliche Konjugate gehandelt haben. Ähnlich wie bei Zill *et al.* (1990) konnte nach Inkubation der Tabak-, Soja- und Weizenzellen in Gegenwart von AOH und AME und anschließender Lösungsmittel-extraktion nicht die gesamte bei der Inkubation eingesetzte Mykotoxinmenge in Form der löslichen Konjugate bzw. der Ursprungsmykotoxine wiedergefunden werden. Die Gesamtwiederfindung schwankte zwischen 15 und 78 %. Für ZEN lag die Gesamtwiederfindung zwischen 15 und 60 % der ursprünglich eingesetzten ZEN-Menge. Neben anderen Gründen wie beispielsweise einer schlechten Löslichkeit der Mykotoxine und deren Konjugaten oder einer eventuell fehlerhaften Quantifizierung (basierend auf den „geschätzten“ Extinktionskoeffizienten), wäre auch eine Zellwandbindung als Grund für die geringen Wiederfindungen denkbar.

Die zur näheren Untersuchung durchgeführten chemischen und enzymatischen Hydrolysen der Zellrückstände ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Während die Mykotoxine bei der alkalischen Hydrolyse, vermutlich aufgrund deren Lactonstruktur, zu instabil waren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, konnte nach der sauren Hydrolyse der Zellwandrückstände zur Freisetzung potentiell gebundener Mykotoxine zwar ebenfalls ein chemischer Abbau der Mykotoxine, daneben jedoch auch eine Freisetzung von Mykotoxinen aus den Zellrückständen beobachtet werden. Prozentual lagen die Freisetzungsraten aus den Zellwandrückständen zwischen 1,4 und 8,5 % der ursprünglich eingesetzten Mykotoxinmenge; aus Weizenzellen konnten die größten Mengen an Mykotoxinen freigesetzt werden. Die enzymatische Hydrolyse der Zellwandrückstände mündete jedoch in widersprüchlichen Ergebnissen. Lediglich teilweise konnten Spuren an Mykotoxinen in den Hydrolysaten detektiert werden, wobei es sich dabei auch um restliche, nicht vollständig extrahierte lösliche Konjugate gehandelt haben könnte. In einem weiteren methodischen Ansatz wurden die Zellrückstände nach Extraktion fein vermahlen, in DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 gelöst und mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Da hierbei keine Signale der Mykotoxine sichtbar waren bzw. keine Signale Mykotoxinkonjugaten zugeordnet werden konnten (auch nicht tentativ), kann eine Zellwandbindung mit dem hier angewendeten experimentellen Design nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch in der Literatur gibt es bisher noch keine eindeutigen Beweise für eine Zellwandbindung von Mykotoxinen, weshalb die These angezweifelt werden sollte.

Um die Bindung von Mykotoxinen an Lignin untersuchen zu können, wurden *in vitro* DHPs als künstliches Lignin-Modellsystem synthetisiert, da Pflanzenzellsuspensionskulturen ohne spezifische Anregung nahezu ausschließlich Primärzellwände besitzen und kein geeignetes Modellsystem für ligninbezogene Untersuchungen darstellen. Die Bedingungen der *in vitro*-Synthese von DHP aus CA konnten an die Löslichkeitseigenschaften der eingesetzten Mykotoxine angepasst werden. So wurde ein Lösungsmittel / Wasser-Gemisch eingesetzt, das mehrere Vorteile im Vergleich zum Einsatz von reinem Wasser oder rein wässrigen Pufferlösungen mit sich bringt. Zum einen wird die Löslichkeit der Mykotoxine erhöht, die in

Wasser nur schlecht bis nicht löslich sind und zum anderen verbleiben gebildete Di-, Tri-, Tetra- und Oligomere in Lösung, wodurch der Anteil an β -O-4-Bindungen, die in natürlichen Ligninen dominieren, erhöht werden kann (Hwang *et al.*, 2015). Da Lange *et al.* (1998) in einer Studie mit chlorierten Anilinen zeigen konnten, dass diese zu 95 % über nukleophile Addition an die α -Position der Seitenketten der Ligninmonomere gebunden werden, wurde zuvor polymerisiertes DHP mit ZEN und AOH versetzt. Mithilfe der ausschließenden NMR-Spektroskopie konnte keine Kopplung von AOH oder ZEN an das DHP beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass keine nukleophile Additionsreaktion stattfand. Das Ergebnis der Studie von Lange *et al.* (1998) ist ebenso anzuzweifeln, da hier kein eindeutiger Beweis für die Verknüpfung bzw. die Verknüfungsposition geliefert wurde. Die Autoren stützen sich auf die Abschwächung einzelner Signale sowie auf das Auftreten neuer Signale in den ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-spektroskopischen Analysen. Zwar wurden auch 2D-NMR-Experimente durchgeführt, allerdings zeigen die NMR-Daten des COLOC-Experiments keine CH-Kopplung des H_α mit dem C1 des Anilins, was ein eindeutiger Beweis für eine Bindung wäre. Ein derartiger Mechanismus ist zudem als sehr unwahrscheinlich einzustufen, da Wasser bei der nukleophilen Additionsreaktion in Konkurrenz zu den chlorierten Anilinen steht und dieses in großem Überschuss vorliegt.

Neben der nukleophilen Addition an das Polymer wurde auch die direkte Einlagerung der Mykotoxine (z.B. über radikalische Copolymerisation) während der DHP-Bildung in Betracht gezogen. Allerdings konnten auch hier keine Hinweise für eine Einlagerung der Mykotoxine in das DHP aus CA erbracht werden. Für weitere Untersuchungen zur Einlagerung von Mykotoxinen in Lignin sollten DHP-Synthesen mit CA und Sinapylalkohol oder Versuche mit Pflanzenzellsuspensionskulturen, in denen Ligninbildung angeregt wird, durchgeführt werden.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die neu identifizierten löslichen Mykotoxinkonjugate bei der Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung miteinbezogen werden sollten, und dass weiterer Forschungsbedarf bezüglich des pflanzlichen Phase III-Metabolismus besteht.

5 Zusammenfassung

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* und *Fusarium* können eine Vielzahl von Lebens- und Futtermittel kontaminieren. Einige Pilze dieser Gattungen sind unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage Mykotoxine wie Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) bzw. Zearalenon (ZEN) zu produzieren, die aufgrund ihrer Genotoxizität bzw. Östrogenität gesundheitlich bedenklich sind. Diese Mykotoxine können nach Bildung auf pflanzlichen Materialien im Zuge des Fremdstoffmetabolismus von Pflanzen chemischen Modifikationen unterzogen werden, sodass „modifizierte Mykotoxine“ entstehen. Mittels herkömmlicher analytischer Techniken, die zum Nachweis von freien Mykotoxinen verwendet werden, werden diese modifizierten Formen jedoch in der Regel nicht erfasst. Um die Lebensmittel- bzw. Futtermittelsicherheit zu gewährleisten, ist eine vollständige quantitative Erfassung der freien und modifizierten Mykotoxine notwendig. Um diese weitgehend unbekannt pflanzlichen Metaboliten der Mykotoxine zu analysieren, bedarf es zunächst einer detaillierten Strukturaufklärung sowie geeigneter Standardsubstanzen zur Entwicklung und Durchführung analytischer Verfahren. Darüber hinaus werden Bioverfügbarkeitsstudien benötigt, um die toxikologische Relevanz modifizierter Mykotoxine beurteilen zu können. Des Weiteren wird in der Literatur häufig die Einlagerung von Mykotoxinen in die Zellwände von Pflanzenzellen (Kompartimentierung) und damit einhergehend die Bildung weitgehend unlöslicher (und somit unter Standardbedingungen nicht extrahierbarer) Konjugate diskutiert, welche ebenfalls eine analytische bzw. toxikologische Relevanz haben könnten. Allerdings konnte eine derartige Bindung bisher nicht auf molekularer Ebene gezeigt werden.

Für ein besseres Verständnis der Struktur sowie der biologischen und toxikologischen Eigenschaften modifizierter Mykotoxine wurden die Strukturen bislang unbekannter modifizierter Formen von AOH, AME und ZEN aufgeklärt sowie ein Ansatz für die Darstellung deutlicher Standardsubstanzen entwickelt. Unter Verwendung eines Caco-2-Zellmodells wurde die Bioverfügbarkeit der extrahierbaren modifizierten Mykotoxine untersucht, um anhand dieser Daten deren Relevanz bei der Sicherheitsbewertung von Lebens- und Futtermitteln abschätzen zu können. Darüber hinaus wurden Versuche zur Untersuchung der Zellwandbindung der Mykotoxine in Pflanzenzellsuspensionskulturen sowie zur Einlagerung von Mykotoxinen in *in vitro* synthetisierte Modell-Lignine durchgeführt.

Zur Charakterisierung bislang unbekannter modifizierter Formen von AOH, AME und ZEN wurden Pflanzenzellsuspensionskulturen aus Tabak, Soja und Weizen in Gegenwart der Mykotoxine inkubiert und anschließend die gebildeten löslichen Konjugate extrahiert. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) konnten insgesamt 28 AOH-Metaboliten, 17 AME-Metaboliten und 27 ZEN-Metaboliten anhand ihrer akkuraten Masse, der Isotopenmuster und ihres Fragmentierungsverhaltens im MS/MS-Modus charakterisiert werden. Darunter waren vor allem Hexoside sowie Malonylhexoside und in geringeren Mengen Dihexoside, Trihexoside, Acetylhexoside, Malonyldihexoside, Dimalonyldihexoside, Pentosylhexoside, Desoxyhexosylhexoside sowie reduktive Metaboliten von ZEN. Die

quantitativ dominanten Metaboliten wurden teilweise bereits in eigenen zuvor durchgeführten Arbeiten bzw. in der Literatur beschrieben. Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser Arbeit die Strukturen eines AME-Metaboliten als 3-*O*-(4'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME sowie zweier ZEN-Metaboliten als 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN und 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN erstmalig eindeutig mittels ein- und zwei-dimensionaler NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die löslichen AOH- und AME-Konjugate nicht nur in Pflanzensuspensionskulturen, sondern teilweise auch von Explant-Kulturen aus Karotten und Tomaten gebildet werden und somit auch in pflanzlichen Lebens- und Futtermitteln zu erwarten sind.

Bei der Inkubation von intakten, an der Oberfläche angeritzten, Tomaten mit Sporen von *Alternaria alternata* konnten jedoch nur Spuren der strukturell bekannten AOH- und AME-Glucoside detektiert werden. Hingegen waren zwei AOH-Sulfate, ein AOH-Disulfat sowie ein AME-Sulfat vorrangig vertreten, die von dem Schimmelpilz gebildet wurden. Im Extrakt des herausgeschnittenen infizierten Tomatengewebes konnten darüber hinaus drei Metaboliten eines bislang unbekanntes Konjugationstyps, sogenannte Sulfoglucoside, identifiziert werden. Die in der infizierten Tomate nachgewiesenen Sulfoglucoside wurden durch Inkubation der AOH- und AME-Sulfate in Tabakzellsuspensionskulturen im präparativen Maßstab erzeugt. NMR-spektroskopische Analysen der Sulfoglucoside identifizierten diese als AOH-3-*O*-Sulfat-9-*O*- β -D-Glucosid, AOH-9-*O*-Sulfat-3-*O*- β -D-Glucosid und AME-3-*O*-Sulfat-7-*O*- β -D-Glucosid. Dieser durch die pflanzliche Konjugation der *Alternaria alternata*-Metaboliten gebildete Konjugationstyp sollte in zukünftigen Forschungsarbeiten auch bei anderen Mykotoxinen oder deren Phase I-Metaboliten mit zwei oder mehr Hydroxygruppen Berücksichtigung finden.

Ein großes Problem bei der quantitativen Analyse von modifizierten Mykotoxinen ist das Fehlen geeigneter Standardsubstanzen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie entwickelt, um stabilisotopenmarkierte modifizierte Mykotoxine zum Einsatz in der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) zu synthetisieren. Zunächst wurden AOH, AME und ZEN deuteriert und anschließend in Tabakzellsuspensionskulturen zu den Konjugaten umgesetzt. Die so generierten, deuterierten Metaboliten wurden chromatographisch fraktioniert, um die entsprechenden Standardsubstanzen zu erhalten. Auf diese Weise konnten die stabilen Metaboliten AOH-*d*₄-9-Diglucoosid, AOH-*d*₄-9-Glucoosid, AOH-*d*₄-3-Glucoosid, AME-*d*₄-3-Glucoosid sowie ZEN-*d*₂-14-Glucoosid und ZEN-*d*₂-16-Glucoosid in ausreichender Isotopenreinheit gewonnen werden. Im Gegensatz zu den Glucosiden erwiesen sich weitere isolierte Metaboliten wie beispielsweise Malonylglucoside von AOH, AME und ZEN als chemisch instabil, weshalb von diesen Substanzen keine deuterierten Standardsubstanzen erhalten wurden.

Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit der löslichen Metaboliten von AOH, AME und ZEN, wurde die Resorption dieser Verbindungen in Caco-2-Zellen untersucht. Während sich Malonylglucoside als zu instabil für die Zellversuche herausgestellt haben, konnte für AOH-9-Glucoosid, AOH-3-Glucoosid, AME-3-Glucoosid und AME-7-Glucoosid eine Aufnahme in die Zellen gefolgt von Spaltung und Metabolisierung zu Glucuroniden und Sulfaten beobachtet werden. ZEN-16-Glucoosid und ZEN-14-Glucoosid wurden in geringerem Ausmaß gespalten

und teilweise weiter metabolisiert. In einem *Transwell*-Modellsystem wurden zusätzlich Resorptionsversuche durchgeführt. Während die beiden ZEN-Glucoside keine Resorption zeigten, wurden AOH-3-Glucosid und AOH-9-Glucosid gespalten und die durch die Caco-2-Zellen gebildeten Glucuronide sowie teilweise Sulfate und freies AOH resorbiert, d.h. in das basolaterale Kompartiment abgegeben. Selbiges konnte für AME-3-Glucosid und AME-7-Glucosid beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit, modifizierte Formen von Mykotoxinen in die Risikobewertung von Lebens- unter Futtermitteln einzubeziehen.

Untersuchungen zur Bindung von Mykotoxinen an Zellwandpolysaccharide, einhergehend mit der Bildung von unlöslichen Konjugaten, wurden in Pflanzencellsuspensionskulturen durchgeführt. Eine saure Hydrolyse der Pflanzenzellen, die in Gegenwart der Mykotoxine inkubiert und anschließend zur Entfernung der löslichen Konjugate lösungsmittlextrahiert wurden, führte zu einer Freisetzung von AOH, AME und ZEN. Hierbei wurden 1,4 bis 8,5 % der ursprünglich eingesetzten Mykotoxinmenge aus dem Zellwandmaterial freigesetzt. Allerdings konnten bei einer enzymatischen Hydrolyse der Zellwandpolysaccharide nur Spuren der Mykotoxine sowie Spuren von Mykotoxinkonjugaten freigesetzt werden. Auch die NMR-spektroskopische Analyse nicht hydrolysierter Zellwände im Gelzustand lieferte keine Hinweise auf eine Zellwandbindung der Mykotoxine. Da nur die unselektive saure Hydrolyse Mykotoxine freisetzte, kann nach dem bisherigen Stand der Forschung nicht von einer Bindung der Mykotoxine an Zellwandpolysaccharide ausgegangen werden.

Da Pflanzenzellen in Suspensionskulturen ohne spezifische Anregung kein Lignin bilden, wurde ein *in vitro*-Lignin (Dehydrogenierungspolymerisat, DHP) synthetisiert, um eine mögliche Bindung von Mykotoxinen an Lignin zu untersuchen. Zunächst wurde das Versuchsdesign für die DHP-Synthese modifiziert, um DHP in Gegenwart von Mykotoxinen zu generieren. NMR-spektroskopische Analysen der so erzeugten DHPs zeigten keine Einlagerung von AOH und ZEN in das DHP während der DHP-Synthese. Ebenfalls konnte keine Bindung von AOH und ZEN an die α -Position der Monomerseitenketten in zuvor generiertem DHP nachgewiesen werden, weshalb die Hypothese einer Mykotoxinbindung an Lignin nicht bestätigt werden konnte.

Somit wurde in dieser Arbeit die Bedeutung löslicher Metaboliten von AOH, AME und ZEN, die im Rahmen des pflanzlichen Metabolismus gebildet werden, herausgestellt. Interaktionen dieser Mykotoxine mit Zellwandpolymeren, einhergehend mit der Bildung weitgehend unlöslicher Metaboliten, konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Neue experimentelle Herangehensweisen werden benötigt, um dieser Frage in Zukunft weiter nachzugehen.



6 Literaturverzeichnis

- ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D., KARR, A., **1967**, A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5, 340–345.
- ALLEN, C.F.H., BYERS, J.R., **1949**, A synthesis of coniferyl alcohol and coniferyl benzoate. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 2683–2684.
- ALY, A.H., EDRADA-EBEL, R., INDRIANI, I.D., WRAY, V., MÜLLER, W.E.G., TOTZKE, F., ZIRRGIEBEL, U., SCHÄCHTELE, C., KUBBUTAT, M.H.G., LIN, W.H., PROKSCH, P., EBEL, R., **2008**, Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *Journal of Natural Products*, 71, 972–980.
- ANNESLEY, T.M., **2003**, Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 49, 1041–1044.
- ARTURSSON, P., KARLSSON, J., **1991**, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175, 880–885.
- ARTURSSON, P., PALM, K., LUTHMAN, K., **2001**, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 27–43.
- ASAM, S., KONITZER, K., SCHIEBERLE, P., RYCHLIK, M., **2009**, Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5152–5160.
- ATCC, **2016**, Caco-2 ATCC® HTB-37™. Available at: https://www.lgstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo_country=de#characteristics. Accessed January 4, 2019.
- ATZRODT, J., DERDAU, V., FEY, T., ZIMMERMANN, J., **2007**, The renaissance of H/D exchange. *Angewandte Chemie*, 46, 7744–7765.
- AUGUSTIJS, P., ANNAERT, P., HEYLEN, P., VAN DEN MOOTER, G., KINGET, R., **1998**, Drug absorption studies of prodrug esters using the Caco-2 model: Evaluation of ester hydrolysis and transepithelial transport. *International Journal of Pharmaceutics*, 166, 45–53.
- BARANCZYK-KUZMA, A., GARREN, J.A., HIDALGO, I.J., BORCHARDT, R.T., **1991**, Substrate specificity and some properties of phenol sulfotransferase from human intestinal Caco-2 cells. *Life Sciences*, 49, 1197–1206.
- BARTHOLOMEW, D.M., VAN DYK, D.E., LAU, S.-M.C., O'KEEFE, D.P., REA, P.A., VIITANEN, P.V., **2002**, Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology*, 130, 1562–1572.
- BECKERT, R., FANGHÄNEL, E., HABICHER, W.D., KNÖLKER, H.-J., METZ, P., SCHWETLICK, K., **2015**, Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum. *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim.
- BELOGLAZOVA, N.V., DE BOEVRE, M., GORYACHEVA, I.Y., WERBROUCK, S., GUO, Y., DE SAEGER, S., **2013**, Immunochemical approach for zearalenone-4-glucoside determination. *Talanta*, 106, 422–430.
- BENNETT, J.W., KLICH, M., **2003**, Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- BERNHOF, A., BEHRENS, G.H., INGEBRIGTSEN, K., LANGSETH, W., BERNDT, S., HAUGEN, T.B., GROTMOL, T., **2001**, Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reproductive Toxicology*, 15, 545–550.

- BERTHILLER, F., CRAMER, B., IHA, M.H., KRŠKA, R., LATTANZIO, V.M.T., MACDONALD, S., MALONE, R.J., MARAGOS, C.M., SOLFRIZZO, M., STRANSKA-ZACHARIASOVA, M., STROKA, J., TITTEMIER, S.A., **2018**, Developments in mycotoxin analysis: An update for 2016-2017. *World Mycotoxin Journal*, 11, 5–32.
- BERTHILLER, F., CREWS, C., DALL'ASTA, C., DE SAEGER, S., HAESAERT, G., KARLOVSKY, P., OSWALD, I.P., SEEFELDER, W., SPEIJERS, G., STROKA, J., **2013**, Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 165–186.
- BERTHILLER, F., KRŠKA, R., DOMIG, K.J., KNEIFEL, W., JUGE, N., SCHUHMACHER, R., ADAM, G., **2011**, Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters*, 206, 264–267.
- BERTHILLER, F., WERNER, U., ADAM, G., KRŠKA, R., LEMMENS, M., SULYOK, M., HAUSER, M.T., SCHUHMACHER, R., **2006a**, Formation of masked *Fusarium* mycotoxins in plants. *Ernährung*, 30, 477–481.
- BERTHILLER, F., WERNER, U., SULYOK, M., KRŠKA, R., HAUSER, M.T., SCHUHMACHER, R., **2006b**, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1194–1200.
- BHARTI, S.K., ROY, R., **2012**, Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5–26.
- BIEHL, M.L., PRELUSKY, D.B., KORITZ, G.D., HARTIN, K.E., BUCK, W.B., TRENHOLM, H.L., **1993**, Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121, 152–159.
- BINDER, S.B., SCHWARTZ-ZIMMERMANN, H.E., VARGA, E., BICHL, G., MICHELMAYR, H., ADAM, G., BERTHILLER, F., **2017**, Metabolism of zearalenone and its major modified forms in pigs. *Toxins*, 9, 1–15.
- BOERJAN, W., RALPH, J., BAUCHER, M., **2003**, Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.
- BORZEKOWSKI, A., DREWITZ, T., KELLER, J., PFEIFER, D., KUNTE, H.-J., KOCH, M., ROHN, S., MAUL, R., **2018**, Biosynthesis and characterization of zearalenone-14-Sulfate, zearalenone-14-glucoside and zearalenone-16-glucoside using common fungal strains. *Toxins*, 10, 104.
- BRETZ, M., BEYER, M., CRAMER, B., HUMPF, H.-U., **2006**, Stable isotope dilution analysis of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 251–260.
- BRITO-ARIAS, M., **2007**, Synthesis and characterization of glycosides. *Springer*, New York, NY.
- BRODEHL, A., MÖLLER, A., KUNTE, H.-J., KOCH, M., MAUL, R., **2014**, Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 359, 124–130.
- BRUINS, M.B.M., KARSAI, I., SCHEPERS, J., SNIJDERS, C.H.A., **1993**, Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for *Fusarium* head blight resistance. *Plant Science*, 94, 195–206.
- BUNZEL, M., RALPH, J., **2006**, NMR characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8352–8361.
- BURKHARDT, B., PFEIFFER, E., METZLER, M., **2009**, Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells *in vitro*. *Mycotoxin Research*, 25, 149–157.

- CADET, J., DELATOUR, T., DOUKI, T., GASPARUTTO, D., POUGET, J.-P., RAVANAT, J.-L., SAUVAIGO, S., **1999**, Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, 9–21.
- CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M., **1993**, Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1–30.
- CHI, M.S., MIROCHA, C.J., WEAVER, G.A., KURTZ, H.J., **1980**, Effect of zearalenone on female White Leghorn chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1026–1030.
- CIRLINI, M., BARILLI, A., GALAVERNA, G., MICHELMAYR, H., ADAM, G., BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., **2016**, Study on the uptake and deglycosylation of the masked forms of zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 232–239.
- CLARIDGE, T.D.W., **2016**, High-resolution NMR techniques in organic chemistry. *Elsevier*, Amsterdam, London.
- COLE, D.J., **1994**, Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science*, 42, 209–222.
- COLEMAN, J., BLAKE-KALFF, M., DAVIES, E., **1997**, Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2, 144–151.
- COMBINA, M., DALCERO, A., VARSAVSKY, E., TORRES, A., ETCHEVERRY, M., RODRIGUEZ, M., GONZALEZ, Q.H., **1999**, Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour. *Mycotoxin Research*, 15, 33–38.
- CRAMER, B., BRETZ, M., HUMPF, H.-U., **2007**, Stable isotope dilution analysis of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8353–8358.
- CULLEN, C.H., RAY, G.J., SZABO, C.M., **2013**, A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51, 705–713.
- DALL'ERTA, A., CIRLINI, M., DALL'ASTA, M., DEL RIO, D., GALAVERNA, G., DALL'ASTA, C., **2013**, Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chemical Research in Toxicology*, 26, 305–312.
- DANIELS, L.B., COYLE, P.J., CHIAO, Y.B., GLEW, R.H., LABOW, R.S., **1981**, Purification and characterization of a cytosolic broad-specificity β -glucosidase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 13004–13013.
- DARSANAKI, R.K., RAHBAR, S., TAJEHMIRI, A., **2015**, Occurrence of zearalenone and ochratoxin A in cereals and cereal based products. *Journal of Chemical Health Risks*, 5, 301–311.
- DAY, A.J., DUPONT, M.S., RIDLEY, S., RHODES, M., RHODES, M.J.C., MORGAN, M.R.A., WILLIAMSON, G., **1998**, Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*, 436, 71–75.
- DE BOEVRE, M., DI MAVUNGU, J.D., LANDSCHOOT, S., AUDENAERT, K., EECKHOUT, M., MAENE, P., HAESAERT, G., DE SAEGER, S., **2012**, Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal*, 5, 207–219.
- DEBEBE, Z., NEKHAI, S., ASHENAFI, M., LOVEJOY, D.B., KALINOWSKI, D.S., GORDEUK, V.R., BYRNES, W.M., DES RICHARDSON, R., KARLA, P.K., **2012**, Development of a sensitive HPLC method to measure *in-vitro* permeability of *E*- and *Z*-isomeric forms of thiosemicarbazones in Caco-2 monolayers. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 906, 25–32.

- EFSA, **2011a**, Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9, 2407.
- EFSA, **2011b**, Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, 9, 2197.
- EFSA, **2014**, Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal*, 12, 3916.
- EFSA, **2016a**, Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal*, 14, 4425.
- EFSA, **2016b**, Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal*, 14, 4654.
- EFSA, **2017a**, Appropriateness to set a group health based guidance value for nivalenol and its modified forms. *EFSA Journal*, 15, 4751.
- EFSA, **2017b**, Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*, 15, 4655.
- EFSA, **2017c**, Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 15, 4851.
- EFSA, **2018**, Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA Journal*, 16, 5242.
- EL-SHARKAWY, S.H., SELIM, M.I., AFIFI, M.S., HALAWEISH, F.T., **1991**, Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 549–552.
- ENGELHARDT, G., ZILL, G., WOHNER, B., WALLNÖFER, P.R., **1988**, Transformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 75, 309–310.
- ESTIARTE, N., CRESPO-SEMPERE, A., MARÍN, S., RAMOS, A.J., WOROBO, R.W., **2018**, Stability of alternariol and alternariol monomethyl ether during food processing of tomato products. *Food Chemistry*, 245, 951–957.
- FEHR, M., BAECHLER, S., KROPAT, C., MIELKE, C., BOEGE, F., PAHLKE, G., MARKO, D., **2010**, Repair of DNA damage induced by the mycotoxin alternariol involves tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Mycotoxin Research*, 26, 247–256.
- FEHR, M., PAHLKE, G., FRITZ, J., CHRISTENSEN, M.O., BOEGE, F., ALTEMÖLLER, M., PODLECH, J., MARKO, D., **2009**, Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 441–451.
- FERNÁNDEZ-BLANCO, C., FONT, G., RUIZ, M.-J., **2015**, Oxidative DNA damage and disturbance of antioxidant capacity by alternariol in Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, 235, 61–66.
- FITZPATRICK, D.W., PICKEN, C.A., MURPHY, L.C., BUHR, M.M., **1989**, Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: An indicator of estrogenic potencies. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 94, 691–694.
- FLECK, S.C., CHURCHWELL, M.I., DOERGE, D.R., **2017**, Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 193–201.
- FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H.-W., **1998**, Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826, 109–134.
- FREUDENBERG, K., **1956**, Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angewandte Chemie*, 68, 508–512.

- FRIZZELL, C., NDOSSI, D., KALAYOU, S., ERIKSEN, G.S., VERHAEGEN, S., SØRLIE, M., ELLIOTT, C.T., ROPSTAD, E., CONNOLLY, L., **2013**, An *in vitro* investigation of endocrine disrupting effects of the mycotoxin alternariol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271, 64–71.
- GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C., BLOOM, A.D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S., RIMPO, J., MARGOLIN, B.H., RESNICK, M.A., ANDERSON, B., ZEIGER, E., **1987**, Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10, 1–35.
- GAREIS, M., BAUER, J., THIEM, J., PLANK, G., GRABLEY, S., GEDEK, B., **1990**, Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 37, 236–240.
- GARNETT, J.L., SOLLICH-BAUMGARTNER, W.A., **1964**, Catalytic deuterium exchange reactions with organics. XIV. 1 Distinction between associative and dissociative π -complex substitution mechanisms. *The Journal of Physical Chemistry*, 68, 3177–3183.
- GENÇ, H., ÖZDEMİR, M., DEMİRBAŞ, A., **2001**, Analysis of mixed-linked (1→3), (1→4)- β -D-glucans in cereal grains from Turkey. *Food Chemistry*, 73, 221–224.
- GHAFFAR, S.H., FAN, M., **2013**, Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57, 264–279.
- GOPALAN, V., PASTUSZYN, A., GALEY, William R., Jr., GLEW, R.H., **1992**, Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic β -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 14027–14032.
- GORST-ALLMAN, C.P., STEYN, P.S., VLEGGAR, R., RABIE, C.J., **1985**, Structure elucidation of a novel trichothecene glycoside using ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Chemical Society*, 1, 1553.
- GRATZ, S.W., **2017**, Do plant-bound masked mycotoxins contribute to toxicity? *Toxins*, 9, 1–10.
- GRATZ, S.W., DINESH, R., YOSHINARI, T., HOLTROP, G., RICHARDSON, A.J., DUNCAN, G., MACDONALD, S., LLOYD, A., TARBIN, J., **2017**, Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins withstand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota *in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61, 1–10.
- GRIGGS, L.J., POST, A., WHITE, E.R., FINKELSTEIN, J.A., MOECKEL, W.E., HOLDEN, K.G., ZAREMBO, J.E., WEISBACH, J.A., **1971**, Identification and quantitation of alditol acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 43, 369–381.
- GROSS, J.H., **2013**, Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch. *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- GROSSE, Y., CHEKIR-GHEDIRA, L., HUC, A., OBRECHT-PFLUMIO, S., DIRHEIMER, G., BACHA, H., PFOHL-LESZKOWICZ, A., **1997**, Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters*, 114, 225–229.
- HABLER, K., FRANK, O., RYCHLIK, M., **2016**, Chemical synthesis of deoxynivalenol-3- β -D-[$^{13}\text{C}_6$]-glucoside and application in stable isotope dilution assays. *Molecules*, 21, 838.
- HABLER, K., GOTTHARDT, M., SCHÜLER, J., RYCHLIK, M., **2017**, Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chemistry*, 218, 447–454.
- HABLER, K., RYCHLIK, M., **2016**, Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 307–317.

- HARMS, H.H., **1992**, *In-vitro* systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pesticide Science*, 35, 277–281.
- HARTMANN, N., ERBS, M., WETTSTEIN, F.E., HOERGER, C.C., SCHWARZENBACH, R.P., BUCHELI, T.D., **2008**, Quantification of zearalenone in various solid agroenvironmental samples using *d*₆-zearalenone as the internal standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2926–2932.
- HASIJA, S.K., **1970**, Physiological studies of *Alternaria citri* and *A. tenuis*. *Mycologia*, 62, 289.
- HAYESHI, R., HILGENDORF, C., ARTURSSON, P., AUGUSTIJS, P., BRODIN, B., DEHERTOGH, P., FISHER, K., FOSSATI, L., HOVENKAMP, E., KORJAMO, T., MASUNGI, C., MAUBON, N., MOLS, R., MÜLLERTZ, A., MÖNKKÖNEN, J., O'DRISCOLL, C., OPPERS-TIEMISSEN, H.M., RAGNARSSON, E.G.E., ROOSEBOOM, M., UNGELL, A.-L., **2008**, Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 383–396.
- HENDERSON, T.J., **2002**, Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: Purity determinations for military nerve agents. *Analytical Chemistry*, 74, 191–198.
- HIDY, P.H., BALDWIN, R.S., GREASHAM, R.L., KEITH, C.L., MCMULLEN, J.R., **1977**, Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 59–82.
- HILDEBRAND, A.A., KOHN, B.N., PFEIFFER, E., WEFERS, D., METZLER, M., BUNZEL, M., **2015**, Conjugation of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4728–4736.
- HILDEBRAND, A.A., PFEIFFER, E., RAPP, A., METZLER, M., **2012**, Hydroxylation of the mycotoxin zearalenone at aliphatic positions: Novel mammalian metabolites. *Mycotoxin Research*, 28, 1–8.
- HUBATSCH, I., RAGNARSSON, E.G.E., ARTURSSON, P., **2007**, Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2, 2111–2119.
- HWANG, H., MOON, S.-J., WON, K., KIM, Y.H., CHOI, J.W., **2015**, Parameters affecting *in vitro* monolignol couplings during dehydrogenative polymerization in the presence of peroxidase and H₂O₂. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26, 390–395.
- IARC, **1993**, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *Some Naturally Occurring Substances*, 56, 39–444.
- JAHN, C., SCHWACK, W., **2001**, Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1233–1238.
- JIMÉNEZ, M., MÁÑEZ, M., HERNÁNDEZ, E., **1996**, Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 417–421.
- KAMIMURA, H., **1986**, Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 515–519.
- KARPLUS, M., **1963**, Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2870–2871.
- KATZENELLENBOGEN, B.S., KATZENELLENBOGEN, J.A., MORDECAI, D., **1979**, Zearalenones: Characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β-resorcylic acid lactones. *Endocrinology*, 105, 33–40.
- KIM, E.-K., SCOTT, P.M., LAU, B.P.-Y., **2003**, Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Additives and Contaminants*, 20, 161–169.

- KIM, H., RALPH, J., **2005**, Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3693–3695.
- KIM, H., RALPH, J., **2010**, Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆/pyridine-*d*₅. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8, 576–591.
- KLARIĆ, M., CVETNIĆ, Z., PEPELJNIAK, S., KOSALEC, I., **2009**, Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60, 427–434.
- KLEIN, P.D., SIMBORG, D.W., SZCZEPANIK, P.A., **1964**, Detection and computation of isotope fractionation in the adsorption chromatography of dual-labelled compounds. *Pure and Applied Chemistry*, 8, 357–370.
- KLUGER, B., BUESCHL, C., LEMMENS, M., MICHLMAYR, H., MALACHOVÁ, A., KOUTNIK, A., MALOKU, I., BERTHILLER, F., ADAM, G., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., **2015**, Biotransformation of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* resistant and susceptible near isogenic wheat lines. *PLOS One*, 10, 1-19.
- KÖSTER, J., STRACK, D., BARZ, W., **1983**, High performance liquid chromatographic separation of isoflavones and structural elucidation of isoflavone 7-*O*-glucoside 6"-malonates from *Cicer arietinum*. *Planta Medica*, 48, 131–135.
- KOVALSKY PARIS, M.P., SCHWEIGER, W., HAMETNER, C., STÜCKLER, R., MUEHLBAUER, G.J., VARGA, E., KRŠKA, R., BERTHILLER, F., ADAM, G., **2014**, Zearalenone-16-*O*-glucoside - A new masked mycotoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1181–1189.
- KRŠKA, R., JOSEPHS, R., **2001**, The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369, 469–476.
- KUCZUK, M.H., BENSON, P.M., HEATH, H., WALLACE HAYES, A., **1978**, Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 53, 11–20.
- KUIPER, G.G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., CORTON, J.C., SAFE, S.H., VAN DER SAAG, P.T., VAN DER BURG, B., GUSTAFSSON, J.-Å., **1998**, Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139, 4252–4263.
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H., **1987**, Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7, 253–306.
- KUO, C.H., TAUB, D., HOFFSOMMER, R.D., WENDLER, N.L., URRY, W.H., MULLENBACH, G., **1967**, The resolution of (\pm)-zearalenone. Determination of the absolute configuration of the natural enantiomorph. *Chemical Communications (London)*, 761–762.
- LAI, Y.-Z., SARKANEN, K.V., **1975**, Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cellulose Chemistry and Technology*, 9, 239–245.
- LAM, T.B.T., KADOYA, K., IYAMA, K., **2001**, Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: Ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57, 987–992.
- LAMARCO, K.L., GLEW, R.H., **1986**, Hydrolysis of a naturally occurring β -glucoside by a broad-specificity β -glucosidase from liver. *Biochemical Journal*, 237, 469–476.
- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G., **1986**, Xenobiotic conjugation in higher plants. In Paulson, G.D. (ed), *Xenobiotic Conjugation Chemistry*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 62–105.

- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G., SCHRÖDER, P., **1993**, Metabolism of a diphenylether herbicide to a volatile thioanisole and a polar sulfonic acid metabolite in spruce (*Picea*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 47, 8–20.
- LANGE, B.M., HERTKORN, N., SANDERMANN, H., **1998**, Chloroaniline/lignin conjugates as model system for nonextractable pesticide residues in crop plants. *Environmental Science & Technology*, 32, 2113–2118.
- LANGEBARTELS, C., HARMS, H.H., **1985**, Analysis for nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10, 268–279.
- LAPIERRE, C., MONTIES, B., ROLANDO, C., CHIRALE, L.d., **1985**, Thioacidolysis of lignin: Comparison with acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 5, 277–292.
- LAURENT, F.M.G., SCALLA, R., **1999**, Metabolism and cell wall incorporation of phenoxyacetic acid in soybean cell suspension culture. *Pesticide Science*, 55, 3–10.
- LEHMANN, L., WAGNER, J., METZLER, M., **2006**, Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 398–408.
- LIU, Y., RYCHLIK, M., **2015**, Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 1357–1369.
- LIU, Y., WALKER, F., HOEGLINGER, B., BUCHENAUER, H., **2005**, Solvolysis procedures for the determination of bound residues of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6864–6869.
- LU, F., RALPH, J., **1997**, DFRC method for lignin analysis. 1. New method for β -aryl ether cleavage: Lignin model studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4655–4660.
- MAGAN, N., LACEY, J., **1984**, Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82, 71–81.
- MALACHOVÁ, A., ŠTOČKOVÁ, L., WAKKER, A., VARGA, E., KRŠKA, R., MICHLMAYR, H., ADAM, G., BERTHILLER, F., **2015**, Critical evaluation of indirect methods for the determination of deoxynivalenol and its conjugated forms in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 6009–6020.
- MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R.F., FINK-GREMMELS, J., **2005**, Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Veterinary Research*, 36, 799–810.
- MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R.F., FINK-GREMMELS, J., **2006**, Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal*, 172, 96–102.
- MANSFIELD, S.D., KIM, H., LU, F., RALPH, J., **2012**, Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nature Protocols*, 7, 1579–1589.
- MARAGOS, C.M., **2010**, Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3, 369–383.
- MARÍN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V., **2013**, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- MARTIN, P.M., HORWITZ, K.B., RYAN, D.S., MCGUIRE, W.L., **1978**, Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 103, 1860–1867.

- MARTINEK, K., LEVASHOV, A.V., KLYACHKO, N.L., PANTIN, V.I., BEREZIN, I.V., **1981**, The principles of enzymes stabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 657, 277–294.
- MARTINOIA, E., **2018**, Vacuolar transporters – Companions on a longtime journey. *Plant Physiology*, 176, 1384–1407.
- MATERN, U., REICHENBACH, C., HELLER, W., **1986**, Efficient uptake of flavonoids into parsley (*Petroselinum hortense*) vacuoles requires acylated glycosides. *Planta*, 167, 183–189.
- MCCORMICK, S.P., KATO, T., MARAGOS, C.M., BUSMAN, M., LATTANZIO, V.M.T., GALAVERNA, G., DALL'ASTA, C., CRICH, D., PRICE, N.P.J., KURTZMAN, C.P., **2015**, Anomericity of T-2 toxin-glucoside: Masked mycotoxin in cereal crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 731–738.
- MCDUGALL, G.J., MORRISON, I.M., STEWART, D., HILLMAN, J.R., **1996**, Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 133–150.
- MELLOR, J.D., LAYNE, D.S., **1971**, Steroid β -D-glucosidase activity in rabbit tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 4377–4380.
- METZLER, M., PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A.A., **2010**, Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal*, 3, 385–401.
- MIKULA, H., SKRINJAR, P., SOHR, B., ELLMER, D., HAMETNER, C., FRÖHLICH, J., **2013**, Total synthesis of masked *Alternaria* mycotoxins-sulfates and glucosides of alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME). *Tetrahedron*, 69, 10322–10330.
- MILES, C.O., ERASMUSON, A.F., WILKINS, A.L., TOWERS, N.R., SMITH, B.L., GARTHWAITE, I., SCAHILL, B.G., HANSEN, R.P., **1996**, Ovine metabolism of zearalenone to α -zearalanol (zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3244–3250.
- MIZUKAMI, H., TERAOKA, T., MIURA, H., OHASHI, H., **1983**, Glucosylation of salicyl alcohol in cultured plant cells. *Phytochemistry*, 22, 679–680.
- MÜLLER, H.-M., REIMANN, J., SCHUMACHER, U., SCHWADORF, K., **1997**, *Fusarium* toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. *Natural Toxins*, 5, 24–30.
- MUÑOZ, L., RIGUERA, R., **1990**, Conformation of zearalenone in solution: A vicinal coupling constant and molecular mechanics study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 28, 665–667.
- MURRAY, K.K., BOYD, R.K., EBERLIN, M.N., LANGLEY, G.J., LI, L., NAITO, Y., **2013**, Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*, 85, 1515–1609.
- MUSTAFA, N.R., WINTER, W. de, VAN IREN, F., VERPOORTE, R., **2011**, Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6, 715–742.
- NAGATA, T., NEMOTO, Y., HASEZAWA, S., **1992**, Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. In Kwang, W.J. (ed), *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology*. Academic Press, San Diego, pp. 1–30.
- NÉMETH, K., PLUMB, G.W., BERRIN, J.-G., JUGE, N., JACOB, R., NAIM, H.Y., WILLIAMSON, G., SWALLOW, D.M., KROON, P.A., **2003**, Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 42, 29–42.

- NG, L.T., PASCAUD, A., PASCAUD, M., **1987**, Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 167, 47–52.
- NTP, **1982**, Carcinogenesis bioassay of zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). *National Toxicology Program Technical Report Series*, 235, 1–155.
- OLSEN, M., PETERSSON, H., KIESSLING, K.H., **1981**, Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 48, 157–161.
- OSTRY, V., **2008**, *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, 175–188.
- OUANES, Z., AYED-BOUSSEMA, I., BAATI, T., CREPPY, E.E., BACHA, H., **2005**, Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17 β -estradiol, progesterone and Vitamin E. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565, 139–149.
- OVIEDO, M.S., RAMIREZ, M.L., BARROS, G.G., CHULZE, S.N., **2010**, Impact of water activity and temperature on growth and alternariol and alternariol monomethyl ether production of *Alternaria alternata* isolated from soybean. *Journal of Food Protection*, 73, 336–343.
- OZOLS, J., **1990**, Amino acid analysis. *Methods in Enzymology*, 182, 587–601.
- PARK, J.W., SCOTT, P.M., LAU, B.P.-Y., LEWIS, D.A., **2004**, Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1168–1178.
- PERDIKIS, D.A., DAVIES, R., ZHURAVKOV, A., BRENNER, B., ETTER, L., BASSON, M.D., **1998**, Differential effects of mucosal pH on human (Caco-2) intestinal epithelial cell motility, proliferation, and differentiation. *Digestive Diseases and Sciences*, 43, 1537–1546.
- PERO, R.W., POSNER, H., BLOIS, M., HARVAN, D., SPALDING, J.W., **1973**, Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". *Environmental Health Perspectives*, 4, 87–94.
- PETERS, C.A., **1972**, Photochemistry of zearalenone and its derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 867–868.
- PETERS, W.H., ROELOFS, H.M., **1992**, Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: A possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Research*, 52, 1886–1890.
- PETERSON, M.D., MOOSEKER, M.S., **1993**, An *in vitro* model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBe cells. *Journal of Cell Science*, 105, 445–460.
- PFEIFFER, E., ESCHBACH, S., METZLER, M., **2007a**, *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotoxin Research*, 23, 152–157.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A.A., DAMM, G., RAPP, A., CRAMER, B., HUMPF, H.-U., METZLER, M., **2009a**, Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone *in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1123–1133.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A.A., MIKULA, H., METZLER, M., **2010**, Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites *in vitro*: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1468–1476.

- PFEIFFER, E., KOMMER, A., DEMPE, J.S., HILDEBRAND, A.A., METZLER, M., **2011**, Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells *in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 560–567.
- PFEIFFER, E., SCHEBB, N.H., PODLECH, J., METZLER, M., **2007b**, Novel oxidative *in vitro* metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 307–316.
- PFEIFFER, E., SCHMIT, C., BURKHARDT, B., ALTEMÖLLER, M., PODLECH, J., METZLER, M., **2009b**, Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether *in vitro*: Chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mycotoxin Research*, 25, 3–10.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., CHEKIR-GHEDIRA, L., BACHA, H., **1995**, Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16, 2315–2320.
- PLASENCIA, J., MIROCHA, C.J., **1991**, Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 146–150.
- POLLOCK, G.A., DISABATINO, C.E., HEIMSCH, R.C., COULOMBE, R.A., **1982a**, The distribution, elimination, and metabolism of ¹⁴C-alternariol monomethyl ether. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B*, 17, 109–124.
- POLLOCK, G.A., DISABATINO, C.E., HEIMSCH, R.C., HILBLINK, D.R., **1982b**, The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food and Chemical Toxicology*, 20, 899–902.
- POWELL, D.W., **1981**, Barrier function of epithelia. *The American Journal of Physiology*, 241, 275–288.
- PRENDES, L.P., ZACHETTI, V.G.L., PEREYRA, A., MORATA DE AMBROSINI, V.I., RAMIREZ, M.L., **2017**, Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 481–492.
- PRESS, B., DI GRANDI, D., **2008**, Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Current Drug Metabolism*, 9, 893–900.
- PUNTSCHER, H., KÜTT, M.-L., SKRINJAR, P., MIKULA, H., PODLECH, J., FRÖHLICH, J., MARKO, D., WARTH, B., **2018**, Tracking emerging mycotoxins in food: development of an LC-MS/MS method for free and modified *Alternaria* toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1–14.
- QUIDEAU, S., RALPH, J., **1992**, Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and *p*-coumaryl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1108–1110.
- RAISTRICK, H., STICKINGS, C.E., THOMAS, R., **1953**, Studies in the biochemistry of micro-organisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*. *Biochemical Journal*, 55, 421–433.
- RALPH, J., GRABBER, J.H., HATFIELD, R.D., **1995**, Lignin-ferulate cross-links in grasses: Active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research*, 275, 167–178.
- RALPH, J., LUNDQUIST, K., BRUNOW, G., LU, F., KIM, H., SCHATZ, P.F., MARITA, J.M., HATFIELD, R.D., RALPH, S.A., CHRISTENSEN, J.H., BOERJAN, W., **2004**, Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3, 29–60.

- RAMIREZ, M.L., CHULZE, S., MAGAN, N., **2006**, Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291–296.
- REALE, S., ATTANASIO, F., SPRETI, N., ANGELIS, F. de, **2010**, Lignin chemistry: Biosynthetic study and structural characterisation of coniferyl alcohol oligomers formed *in vitro* in a micellar environment. *Chemistry-A European Journey*, 16, 6077–6087.
- RIEDERER, M., SCHÖNHERR, J., **1986**, Covalent binding of chlorophenoxyacetic acids to plant cuticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 15, 97–105.
- RIGHETTI, L., PAGLIA, G., GALAVERNA, G., DALL'ASTA, C., **2016**, Recent advances and future challenges in modified mycotoxin analysis: Why HRMS has become a key instrument in food contaminant research. *Toxins*, 8, 361.
- RYCHLIK, M., ASAM, S., **2008**, Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 617–628.
- RYCHLIK, M., ASAM, S., **2009**, Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 21, 470–482.
- RYCHLIK, M., HUMPF, H.-U., MARKO, D., DÄNICKE, S., MALLY, A., BERTHILLER, F., KLAFFKE, H., LORENZ, N., **2014**, Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 30, 197–205.
- RYU, D., HANNA, M.A., ESKRIDGE, K.M., BULLERMAN, L.B., **2003**, Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1746–1748.
- SAEMAN, J.F., BUBL, J.L., HARRIS, E.E., **1945**, Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 17, 35–37.
- SANDE, A.R., JAGADALE, M.H., MANE, R.B., SALUNKHE, M.M., **1984**, Borohydride reducing agent derived from anion exchange resin: Selective reduction of α , β -unsaturated carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters*, 25, 3501–3504.
- SANDERMANN, H., **1992**, Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 82–84.
- SANDERMANN, H., **2004**, Bound and unextractable pesticidal plant residues: Chemical characterization and consumer exposure. *Pest Management Science*, 60, 613–623.
- SANDERMANN, H., ARJMAND, M., GENNITY, I., WINKLER, R., STRUBLE, C.B., ASCHBACHER, P.W., **1990**, Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1877–1880.
- SANDERMANN, H., SCHEEL, D., VON DER TRENCK, K.T., **1984**, Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 167–182.
- SASANYA, J.J., HALL, C., WOLF-HALL, C.E., **2008**, Analysis of deoxynivalenol, masked deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* pigment in wheat samples, using liquid chromatography–UV–mass spectrometry. *Journal of Food Protection*, 71, 1205–1213.
- SCHADE, J.E., KING, A.D., **1984**, Analysis of the major *Alternaria* toxins. *Journal of Food Protection*, 47, 978–995.
- SCHEEL, D., SANDERMANN, H., **1981**, Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) : II. Evidence for incorporation into lignin. *Planta*, 152, 253–258.

- SCHUCHARDT, S., ZIEMANN, C., HANSEN, T., **2014**, Combined toxicokinetic and *in vivo* genotoxicity study on *Alternaria* toxins. *EFSA Supporting Publications*, 11, 679E.
- SCHUHMACHER, R., KRŠKA, R., GRASSERBAUER, M., EDINGER, W., LEW, H., **1998**, Immuno-affinity columns versus conventional clean-up: A method-comparison study for the determination of zearalenone in corn. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 360, 241–245.
- SCHWAKE-ANDUSCHUS, C., PROSKE, M., SCIURBA, E., MUENZING, K., KOCH, M., MAUL, R., **2015**, Distribution of deoxynivalenol, zearalenone, and their respective modified analogues in milling fractions of naturally contaminated wheat grains. *World Mycotoxin Journal*, 8, 433–443.
- SCHWARTZ, J.C., SENKO, M.W., SYKA, J.E.P., **2002**, A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 659–669.
- SCOTT, P.M., KANHERE, S.R., **2001**, Stability of *Alternaria* toxins in fruit juices and wine. *Mycotoxin Research*, 17, 9–14.
- SCOTT, P.M., STOLTZ, D.R., **1980**, Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 78, 33–40.
- SELVENDRAN, R.R., MARCH, J.F., RING, S.G., **1979**, Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Analytical Biochemistry*, 96, 282–292.
- SHIN, B.S., HONG, S.H., BULITTA, J.B., HWANG, S.W., KIM, H.J., LEE, J.B., DU YANG, S., KIM, J.E., YOON, H.-S., KIM, D.J., YOO, S.D., **2009**, Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 1406–1411.
- SISSALO, S., ZHANG, H., STILGENBAUER, E., KAUKONEN, A.M., HIRVONEN, J., FINEL, M., **2008**, The expression of most UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) is increased significantly during Caco-2 cell differentiation, whereas UGT1A6 is highly expressed also in undifferentiated cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 2331–2336.
- SIMSEK, S., BURGESS, K., WHITNEY, K.L., GU, Y., QIAN, S.Y., **2012**, Analysis of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. *Food Control*, 26, 287–292.
- SOLHAUG, A., VINES, L.L., IVANOVA, L., SPILSBERG, B., HOLME, J.A., PESTKA, J., COLLINS, A., ERIKSEN, G.S., **2012**, Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 738, 1–11.
- SOUKUP, S.T., KOHN, B.N., PFEIFFER, E., GEISEN, R., METZLER, M., BUNZEL, M., KULLING, S.E., **2016**, Sulfoglucosides as novel modified forms of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8892–8901.
- SRINIVASAN, B., KOLLI, A.R., ESCH, M.B., ABACI, H.E., SHULER, M.L., HICKMAN, J.J., **2015**, TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*, 20, 107–126.
- STEENSMA, A., NOTEBORN, H.P.J.M., JAGT, R.C.M.v.d., POLMAN, T.H.G., MENGELERS, M.J.B., KUIPER, H.A., **1999**, Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 209–212.
- STEENSMA, A., NOTEBORN, H.P.J.M., KUIPER, H.A., **2004**, Comparison of Caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 16, 131–139.
- STILL, G.G., BALBA, H.M., MANSAGER, E.R., **1981**, Studies on the nature and identity of bound chloroaniline residues in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 739–746.

- STOB, M., BALDWIN, R.S., TUTE, J., ANDREWS, F.N., GILLETTE, K.G., **1962**, Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196, 1318.
- STREIT, E., NAEHRER, K., RODRIGUES, I., SCHATZMAYR, G., **2013**, Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: Long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2892–2899.
- STREITWIESER, A., HEATHCOCK, C.H., KOSOWER, E.M., **1994**, Organische Chemie. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- SULYOK, M., BERTHILLER, F., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., **2006**, Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2649–2659.
- SVEHLIKOVÁ, V., BENNETT, R.N., MELLON, F.A., NEEDS, P.W., PIACENTE, S., KROON, P.A., BAO, Y., **2004**, Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-*O*-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* L. RAUSCHERT). *Phytochemistry*, 65, 2323–2332.
- SYRJÄNEN, K., BRUNOW, G., **2000**, Regioselectivity in lignin biosynthesis. The influence of dimerization and cross-coupling. *Journal of the Chemical Society*, 1, 183–187.
- TAKEMURA, H., SHIM, J.-Y., SAYAMA, K., TSUBURA, A., ZHU, B.T., SHIMOI, K., **2007**, Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 170–177.
- TAKEUCHI, Y., KOMAMINE, A., **1980**, Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. I. Synthesis and degradation of cell wall components. *Physiologia Plantarum*, 48, 271–277.
- TANAHASHI, M., HIGUCHI, T., **1981**, Dehydrogenative polymerization of monolignols by peroxidase and hydrogen peroxide in a dialysis tube. I. Preparation of highly polymerized DHPs. *Wood Research*, 67, 29–42.
- THIBAUT, J.-F., ROUAU, X., **1990**, Studies on enzymic hydrolysis of polysaccharides in sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 13, 1–16.
- THOMAS, R., **1961**, Studies in the biosynthesis of fungal metabolites. 4. Alternariol monomethyl ether and its relation to other phenolic metabolites of *Alternaria tenuis**. *Biochemical Journal*, 80, 234–240.
- TIESSEN, C., ELLMER, D., MIKULA, H., PAHLKE, G., WARTH, B., GEHRKE, H., ZIMMERMANN, K., HEISS, E., FRÖHLICH, J., MARKO, D., **2017**, Impact of phase I metabolism on uptake, oxidative stress and genotoxicity of the emerging mycotoxin alternariol and its monomethyl ether in esophageal cells. *Archives of Toxicology*, 91, 1213–1226.
- TIWARI, B.K., BRENNAN, C.S., BRUNTON, N., **2013**, Handbook of plant food phytochemicals. Sources, stability and extraction. *Wiley-Blackwell*, Chichester.
- TRAN, S.T., SMITH, T.K., **2011**, Determination of optimal conditions for hydrolysis of conjugated deoxynivalenol in corn and wheat with trifluoromethanesulfonic acid. *Animal Feed Science and Technology*, 163, 84–92.
- URRY, W.H., WEHRMEISTER, H.L., HODGE, E.B., HIDY, P.H., **1966**, The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7, 3109–3114.
- VAESSEN, S.F.C., VAN LIPZIG, M.M.H., PIETERS, R.H.H., KRUL, C.A.M., WORTELBOER, H.M., VAN DE STEEG, E., **2017**, Regional expression levels of drug transporters and metabolizing enzymes along the pig and human intestinal tract and comparison with Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 45, 353–360.

- VAN BREEMEN, R.B., LI, Y., **2005**, Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1, 175–185.
- VENDL, O., BERTHILLER, F., CREWS, C., KRŠKA, R., **2009**, Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC–MS–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1347–1354.
- VERŠILOVSKIS, A., GEYS, J., HUYBRECHTS, B., GOOSSENS, E., DE SAEGER, S., CALLEBAUT, A., **2012**, Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World Mycotoxin Journal*, 5, 303–318.
- VIDAL, A., AMBROSIO, A., SANCHIS, V., RAMOS, A.J., MARÍN, S., **2016**, Enzyme bread improvers affect the stability of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during breadmaking. *Food Chemistry*, 208, 288–296.
- VLLASALIU, D., FOWLER, R., GARNETT, M., EATON, M., STOLNIK, S., **2011**, Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: A comparison. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415, 579–585.
- VOGEL, J., **2008**, Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 301–307.
- VOLLHARDT, K.P.C., SCHORE, N.E., BUTENSCHÖN, H., ROY, K.-M., **2011**, Organische Chemie. Wiley-VCH, Weinheim.
- VON DER TRENCK, K.T., HUNKLER, D., SANDERMANN JR., H., **1981**, Incorporation of chlorinated anilines into lignin. *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 36c, 714–720.
- WALRAVENS, J., MIKULA, H., RYCHLIK, M., ASAM, S., DEVOS, T., NJUMBE EDIAGE, E., DI DIANA MAVUNGU, J., JACXSSENS, L., VAN LANDSCHOOT, A., VANHAECKE, L., DE SAEGER, S., **2016**, Validated UPLC-MS/MS methods to quantitate free and conjugated *Alternaria* toxins in commercially available tomato products and fruit and vegetable juices in Belgium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 5101–5109.
- WEAVER, G.A., KURTZ, H.J., BEHRENS, J.C., ROBISON, T.S., SEGUIN, B.E., BATES, F.Y., MIROCHA, C.J., **1986**, Effect of zearalenone on dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 1826–1828.
- WEHNER, F.C., MARASAS, W.F., THIEL, P.G., **1978**, Lack of mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Fusarium* mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 659–662.
- WILLFÖR, S., PRANOVICH, A., TAMMINEN, T., PULS, J., LAINE, C., SUURNÄKKI, A., SAAKE, B., UOTILA, K., SIMOLIN, H., HEMMING, J., HOLMBOM, B., **2009**, Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides – A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products*, 29, 571–580.
- WINK, M., **1997**, Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. In Leigh, R.A. & Sanders, D. (eds), *The Plant Vacuole*. Academic Press, San Diego, pp. 141–169.
- WOLF, A.E., DIETZ, K.J., SCHRÖDER, P., **1996**, Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters*, 384, 31–34.
- WOLLENHAUPT, K., SCHNEIDER, F., TIEMANN, U., **2008**, Influence of alternariol (AOH) on regulator proteins of cap-dependent translation in porcine endometrial cells. *Toxicology Letters*, 182, 57–62.
- YANG, S., ZHANG, H., SUN, F., RUYCK, K. de, ZHANG, J., JIN, Y., LI, Y., WANG, Z., ZHANG, S., DE SAEGER, S., ZHOU, J., LI, Y., DE BOEVRE, M., **2017**, Metabolic profile of zearalenone in liver microsomes from different species and its *in vivo* metabolism in rats and chickens using ultra high-

- pressure liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 11292–11303.
- YEE, S., **1997**, *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14, 763–766.
- YERRAMSETTY, V., GALLAHER, D.D., ISMAIL, B., **2014**, Malonylglucoside conjugates of isoflavones are much less bioavailable compared with unconjugated β -glucosidic forms in rats. *The Journal of Nutrition*, 144, 631–637.
- YERRAMSETTY, V., MATHIAS, K., BUNZEL, M., ISMAIL, B., **2011**, Detection and structural characterization of thermally generated isoflavone malonylglucoside derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 174–183.
- YOSHIMOTO, K., TSUDA, Y., **1983**, General path of *O*-acyl migration in D-glucose derivatives: Acyl migration of methyl mono-*O*-myristoyl- α - and β -D-glucopyranosides and mono-*O*-myristoyl-D-glucopyranosides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 4324–4334.
- ZHAO, J., HUHMANN, D., SHADLE, G., HE, X.-Z., SUMNER, L.W., TANG, Y., DIXON, R.A., **2011**, MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 23, 1536–1555.
- ZHEN, Y.Z., XU, Y.M., LIU, G.T., MIAO, J., XING, Y.D., ZHENG, Q.L., MA, Y.F., SU, T., WANG, X.L., RUAN, L.R., **1991**, Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer. *IARC Scientific Publications*, 253–257.
- ZHOU, B., LI, Y., GILLESPIE, J., HE, G.-Q., HORSLEY, R., SCHWARZ, P.B., **2007**, Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10141–10149.
- ZHOU, B., SCHWARZ, P.B., HE, G.-Q., GILLESPIE, J., HORSLEY, R., **2008**, Effect of enzyme pretreatments on the determination of deoxynivalenol in barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66, 103–108.
- ZILL, G., ENGELHARDT, G., WOHNER, B., WALLNÖFER, P., **1989**, Formation of [¹³C]- and [¹⁴C]zearalenone by *Fusarium graminearum* DSM 4529. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 340–345.
- ZILL, G., ENGELHARDT, G., WOHNER, B., WALLNÖFER, P.R., **1990**, The fate of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Mycotoxin Research*, 6, 31–40.

7 Zitierte Rechtsvorschriften

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen

Kontaminanten-Verordnung vom 19. März 2010 (BGBl. I S. 286, 287), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 24. November 2016 (BGBl. I S. 2656) geändert worden ist.

VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006 DER KOMMISSION vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.

8 Chemikalien und Instrumente

8.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Reinheit)	GHS- Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
Acetanilid	Sigma Aldrich (≥ 99,9 %)	GHS07	302, 315, 319, 335, 317	261, 280, 305+351+338
Aceton	VWR (HPLC-Grade)	GHS02, GHS07	225, 319, 336 EUH066	210, 240, 305+351+338, 403+233
Acetonitril	VWR (HPLC/LC-MS- Grade)	GHS02, GHS07	225, 302, 319	210, 240, 302+352 305+351+338, 403+233
Alternariol	(Extraktion aus <i>Alternaria alternata</i> , Kapitel 9.1)	GHS06	300, 310, 330	260, 264, 280, 284, 302 + 350, 310
Alternariol-9- <i>O</i> -Mono- methylether	(Extraktion aus <i>Alternaria alternata</i> , Kapitel 9.1)	GHS06	302, 317	280
Ameisensäure	Sigma Aldrich (≥ 96,0 %)	GHS02, GHS06, GHS05	226, 302, 314, 331 EUH071	210, 280, 304+340+310, 305+351+338, 403+233
Ammoniumacetat	Fluka (97 %)	-	-	-
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH (≥ 99,5 %)	GHS07	302, 319	305 + 351 + 338
Borhydridaustauscherharz (Polystyrylmethyl)trimethyl- -ammonium Borhydrid)	Sigma Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
<i>tert</i> -Butylmethylether	Sigma Aldrich (99,9 %)	GHS02, GHS07	225, 315	210, 233, 240, 302+352, 403+235
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH (≥ 99 % p.a.)	GHS07	319	305+351+338
CASY Clean	Roche	-	-	-
CASYton	OLS	-	-	-
Coniferylaldehyd (4-Hydroxy-3-methoxyzimt- aldehyd)	ChemCruz (≥ 98,0 %)	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Coniferylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxyzimt- alkohol)	(Synthese aus Coniferylaldehyd, Kapitel 9.24)	-	-	-
Deuteriumchlorid	Sigma Aldrich (99 %)	GHS05, GHS07	314, 335, 290	234, 260, 305+351+338, 303+361+353, 304+340, 309+311, 501
Deuteriumoxid	Deutero GmbH (99,9 %)	-	-	-
Dichlormethan	VWR	GHS08, GHS07	315, 319, 335, 336, 351, 373	261, 281, 305+351+338
2,4-Dichlorphenoxyessig- säure	Duchefa Biochemie (> 96 %)	GHS05, GHS07	302, 335, 318, 317, 412	280, 262, 273, 301+310, 305+351+338
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (≥ 99 %)	-	-	-
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH (≥ 99,8 %)	-	-	-
Dimethylsulfoxid (für Pflanzenzellkulturen)	Sigma Aldrich (≥ 99,5 %)	-	-	-

8 Chemikalien und Instrumente

Chemikalie	Hersteller (Reinheit)	GHS- Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Sigma Aldrich (≥ 99,9 % D)	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën (≥ 99,0 %)	-	-	-
1,4-Dioxan	Carl Roth GmbH (≥ 99,8 %)	GHS02, GHS08, GHS07	225, 319, 335, 351 EUH019 EUH066	210, 261, 305+351+338
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	Sigma Aldrich	-	-	-
Essigsäure	Carl Roth GmbH (≥ 99,8 %)	GHS02, GHS05	226, 290, 314	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Ethanol	VWR (≥ 99,5 %)	GHS02, GHS07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
Ethylacetat	Carl Roth GmbH (≥ 99,5 %)	GHS02, GHS07	225, 319, 336 EUH066	210, 233, 240, 305+351+338-403+235
Ethylenglycol	Riedel-de Haën (99,5 %)	GHS07, GHS08	302, 373	301+312+330
Gamborg B5 Medium	Duchefa Biochemie	-	-	-
D-Glucose	Sigma Aldrich (≥ 99,5 %)	-	-	-
Guajacol	Sigma Aldrich (≥ 98,0 %)	GHS07	302, 315, 319	302+352
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (≥ 99,5 %)	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (≥ 99 %, p.a.)	-	-	-
Kaliumhydroxid	Merck (p.a.)	GHS05, GHS07	290, 302, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Lucifer Yellow	Sigma Aldrich	-	-	-
Magnesiumchlorid Hexa- hydrat	Sigma Aldrich (99 %)	-	-	-
Magnesiumsulfat	VWR (100,2 %)	-	-	-
Methanol / Methanol- <i>d</i> ₄	VWR (HPLC/LC-MS- Grade) Deutero GmbH (99,8 %)	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+235
Murashige & Skoog Medium (Basal Salt Mixture)	Duchefa Biochemie	-	-	-
<i>myo</i> -Inositol	Duchefa Biochemie (> 97,0 %)	-	-	-
Natriumborhydrid	Sigma Aldrich (≥ 98,0 %)	GHS02, GHS06, GHS08, GHS05	260, 301, 314, 360F EUH014	201, 231+232, 280, 308+313, 370+378, 402+404
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (≥ 99,5 %)	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich (≥ 99,0 %)	-	-	-
Natriumdioctylsulfosuccinat (AOT)	Alfa Aesar (≥ 96,0 %)	GHS05	315, 318	261, 301+312, 302+352, 280, 305+351+338
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën (99,7 %)	-	-	-

Chemikalie	Hersteller (Reinheit)	GHS- Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH (≥ 99 %)	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<i>iso</i> -Octan	Sigma Aldrich (≥ 99,5 %)	GHS02, GHS08, GHS07, GHS09	225, 304, 315, 336, 410	210, 233, 240, 273, 301+310, 302+352, 304+340, 331, 403+235
Palladium auf Bariumsulfat	Sigma Aldrich (5 %)	-	-	-
Penicillin Streptomycin	Sigma Aldrich	GHS08, GHS07	302, 361fd	308+313
<i>iso</i> -Propanol	Condea	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
Pyridin- <i>d</i> ₅	Deutero GmbH (≥ 99,96 %)	GHS02, GHS07	225, 332, 302, 312, 319, 315	210, 280, 305+351+338
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH (≥ 99,5 %)	-	-	-
Salzsäure	VWR (35,7 %)	GHS05, GHS07	290, 314, 335	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Tetramethyl- <i>p</i> -benzochinon	VWR (99 %)	-	-	-
Thiamin Hydrochlorid	Duchefa Biochemie (> 98,5 %)	-	-	-
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Sigma Aldrich	GHS07	315, 319, 335	302+352, 304+340, 305+351+338
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich (≥ 99,0 %)	GHS05, GHS09	314, 410	273, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 391
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich (≥ 99,0 %)	GHS05, GHS06	290, 331, 314, 412 EUH071	260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 312
Trizma-Base	Sigma Aldrich (≥ 99,9 %)	-	-	-
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich (≥ 98,0 %)	GHS03, GHS05, GHS07	271, 302, 314, 332, 335, 412	280, 305+351+338, 310
Zearalenon	Fermentek Ltd. (≥ 98 %)	GHS05, GHS08	314, 361	280, 305+351+338, 310

8.2 Enzyme

Enzym	Herkunft	Aktivität	Firma
Accutase [®] solution			Sigma Aldrich
α -Amylase Typ VI-B	Schweinepankreas	≥ 10 U/mg	Sigma Aldrich
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	36 U/mg	Megazyme
Cellulase „Onozuka R-10“	<i>Trichoderma Viride</i>	1 U/mg	Serva
Driselase	<i>Basidiomycetes sp.</i>	-	Sigma Aldrich
β -Glucosidase	Mandeln	3,2 U/mg	Sigma Aldrich
Pektinase Macerozyme R-10	<i>Rhizopus sp.</i>	0,5 U/mg	Serva
Peroxidase Typ II	Meerrettich	200 U/mg	Sigma Aldrich
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i>	10 U/mg	Megazyme

8.3 Zellkulturmedien

8.3.1 Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kultur-Medien

	1 L MS-Medium für die Tabakzellsuspensions-, Tomaten- und Karotten-Explant-Kultur	1 L Gamborg B5-Medium für die Soja- und Weizenzellsuspensionskultur
MS-Salze	4,3021 g	-
B5-Salze	-	3,1640 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g	-
Thiamin Hydrochlorid	1 mg	-
<i>myo</i> -Inositol	0,1 g	-
2,4-D*	0,20 mg (\cong 20 μ l)	2,0 mg (\cong 200 μ l)
Saccharose	30 g	20 g
pH (Einstellen mit 1 M KOH)	5,7	5,5

*Stammlösung für 2,4-D (10 mg/ml): 0,020 g in 2 ml Ethanol

8.3.2 Caco-2-Zellkultur-Medien

DMEM F12 Medium Caco-2-Zellkultur-Medium		HBSS-Puffer Inkubationsmedium der Caco-2-Zellen	PBS-Puffer Waschlösung der Caco-2-Zellen
DMEM-Nährstoffmischung F12 Ham		NaCl	100 mM
Fetales Kälberserum	10 %	D-Glucose	-
Penicillin und Streptomycin	2 %	KCl	4,5 mM
		NaHCO ₃	-
		CaCl ₂	-
		MgCl ₂	-
		MgSO ₄	-
		Na ₂ HPO ₄	7,0 mM
		KH ₂ PO ₄	3,0 mM
		K ₂ HPO ₄	-
pH (Einstellen mit 1 M KOH)	7,2	pH (Einstellen mit 1 M KOH)	7,4

8.4 Instrumente

HPLC-DAD-MS-System

Pumpe	Thermo Scientific Finnigan Surveyor MS Pump Plus
Autosampler	Thermo Scientific Finnigan Surveyor Autosampler Plus
Detektor	Thermo Scientific Finnigan Surveyor PDA Plus Detector
Massenspektrometer	LXQ Linear Ion Trap MS mit ESI-Ionenquelle
Software	Xcalibur 2.0.7

HPLC-DAD-HRMS-System

Pumpe	Agilent 1290 Infinity (G4220A)
Autosampler	Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A)
Detektor	Agilent 1290 Infinity Diodenarraydetektor (G4212A)
Massenspektrometer	ABSciex TripleTOF 5600 mit ESI-Ionenquelle
Software	PeakView 1.2.0.3

HPLC-UV-System (präparativ)

Communication Modul	Shimadzu Prominence CBM-20A
Pumpen (2x)	Shimadzu LC-8A
Detektor	Shimadzu SPD-20A
Software	LCsolution Version 1.22 SP1

Kugelmühle	Retsch PM 100 mit 50 ml ZrO ₂ -Mahlbecher und zehn ZrO ₂ -Kugeln
-------------------	--

NMR-Spektrometer

Gerätebezeichnung	Bruker Ascend 500
Probenkopf	Prodigy Kryoprobenkopf
Software	Topspin 3.5pl7

Photometer	Jasco V-550 UV/Vis Spectrophotometer
-------------------	--------------------------------------

Zellzählgerät	Casy® TTC Cell Counter & Analyser System Roche
----------------------	--



9 Arbeitsvorschriften

9.1 Gewinnung von AOH und AME aus *A. alternata*-Schimmelpilzkulturen

- Extraktion des kleingeschnittenen *A. alternata*-Pilzmyzels für 2 h mit 200 ml Ethylacetat pro Agarplatte unter kontinuierlichem Rühren
- Filtrieren des Extraktes
- Fünffmaliges Ausschütteln des Extraktes mit je 50 ml 5 %iger NaHCO₃-Lösung
- Trocknen der organischen Phase mit MgSO₄
- Filtrieren und Eindampfen der organischen Phase
- Aufnahme des Rückstands in Methanol
- Auftrennung des *Alternaria*-Gesamtextrakts mittels präparativer HPLC (Tab. 23)

Tab. 23: HPLC-Parameter zur Isolierung von AOH und AME aus dem *Alternaria*-Gesamtextrakt

Anlage	HPLC-UV-System (präparativ)	Gradient	
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 15 mm	t _R (min)	% B
Säulentemperatur	Raumtemperatur	0	60
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in ACN B: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	5	60
Flussrate	8 ml/min	15	30
Art der Probe	<i>Alternaria</i> -Gesamtextrakt	22	30
Injektionslösung	Methanol		
Injektionsvolumen	1,5 ml		
Detektion	UV, λ = 254 nm		
Fraktionierung	manuell		

9.2 Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kulturen

Die Pflanzenzellsuspensionskulturen sowie die Explant-Kulturen wurden bei 25 °C im Dunkeln in 100 ml Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler (140 rpm) kultiviert.

Tabak-Pflanzenzellsuspensionskultur (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2)

- Subkultivierung
- wöchentlich
 - Pipettieren von je 1,5 ml Zellsuspensionslösung in 30 ml modifiziertes MS-Medium (Kapitel 8.3.1)
 - Durchführung unter sterilen Bedingungen

Soja-Pflanzenzellsuspensionskultur (*Glycine max* L. Merr.)

- Subkultivierung
- wöchentlich
 - Vakuumfiltration der Suspensionszellen durch steriles Miracloth
 - Überführen von je 4 g filtrierten Zellen in 30 ml Gamborg B5-Medium (Kapitel 8.3.1)
 - Durchführung unter sterilen Bedingungen

Weizen-Pflanzenzellsuspensionskultur (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol. Cv. Heines Koga II)

- Subkultivierung
- zweiwöchentlich
 - Vakuumfiltration der Suspensionszellen durch steriles Miracloth
 - Überführen von je 4 g filtrierten Zellen in 30 ml Gamborg B5-Medium (Kapitel 8.3.1)
 - Durchführung unter sterilen Bedingungen

Karotten-Explant-Kultur (*Daucus carota*, bezogen aus dem Supermarkt)

- frische
Herstellung
- Schneiden von ca. 0,5 mm dicken Scheiben aus der Karottenwurzel
 - Zugabe von 30 ml MS-Medium (Kapitel 8.3.1) zu ca. 3 g Karottenscheiben
 - Durchführung unter sterilen Bedingungen

Tomaten-Explant-Kultur (*Solanum lycopersicum*, bezogen aus dem Supermarkt)

- frische
Herstellung
- Schneiden von ca. 0,5 cm breiten Würfeln aus dem Fruchtfleisch der Tomate
 - Zugabe von 30 ml MS-Medium (Kapitel 8.3.1) zu ca. 5 g Tomatenwürfeln
 - Durchführung unter sterilen Bedingungen

Die Inkubation und Extraktion der Explant-Kulturen sowie die Messung der jeweiligen Extrakte mittels LC-DAD-MS wurden in Zusammenarbeit mit Hannah Renner im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

9.3 Inkubation der Pflanzenzellsuspensions- und Explant-Kulturen

Einfachinkubation der Pflanzenzellsuspensionskulturen

- Zugabe von 150 bzw. 300 µl 10 mM Mykotoxinlösung vier Tage nach Subkultivierung (Kontrolle mit DMSO)
- Inkubation im Dunkeln bei 25 °C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator
- Abbruch der Inkubation nach zwei bzw. sieben Tagen durch Vakuumfiltration über einem Glasfiltertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Zellen und des Mediums

Zweifachinkubation der Pflanzenzellsuspensionskulturen

- Zugabe von 150 µl 10 mM Mykotoxinlösung vier Tage nach Subkultivierung (Kontrolle mit DMSO)
- Inkubation im Dunkeln bei 25 °C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator
- Aufteilen der Suspensionszellen (je 15 ml) in zwei 100 ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von je 15 ml frischem Medium (sieben Tage nach Subkultivierung)
 - Ausnahme: Weizenzellen werden nicht aufgeteilt
- Zugabe von 150 µl 10 mM Mykotoxinlösung anschließend an die Subkultivierung (Kontrolle mit DMSO)
- Abbruch der Inkubation nach weiteren sechs Tagen (insgesamt neuntägige Inkubation) durch Vakuumfiltration über einem Glasfiltertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Zellen und des Mediums

Einfachinkubation von Explant-Kulturen

- Zugabe von 150 bzw. 300 µl 10 mM Mykotoxinlösung direkt nach Herstellung der Explant-Kultur
- Inkubation im Dunkeln bei 25 °C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator
- Abbruch der Inkubation nach zwei Tagen durch Vakuumfiltration über einem Glasfiltertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Karottenscheiben bzw. Tomatenwürfel und des Mediums

9.4 Extraktion der löslichen Mykotoxinkonjugate

- Gefriertrocknen und Mörsern der eingefrorenen Zellen, Karottenscheiben oder Tomatenwürfel
- Dreifache Extraktion unter folgenden Bedingungen:
 - 1. Extraktion: pro 0,1 g Zell- bzw. Pflanzenmaterial 4,5 ml Methanol / Dichlormethan (2/1, v/v) verwenden (1 h unter Rühren)
 - 2. Extraktion: pro 0,1 g Zell- bzw. Pflanzenmaterial 4,5 ml Methanol / Wasser / Essigsäure (79/20/1, v/v) verwenden (1 h unter Rühren)
 - 3. Extraktion: pro 0,1 g Zell- bzw. Pflanzenmaterial 4,5 ml Methanol / Dichlormethan (2/1, v/v) verwenden (1 h unter Rühren)
- Vereinigung der Extrakte und Eindampfen bis zur Trockene am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C Badtemperatur
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1) oder Aufbewahren bei -20 °C für präparative Aufreinigungen (Kapitel 9.5)

9.5 Präparative Isolierung der löslichen Mykotoxinkonjugate

- Aufnahme der vereinigten Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakten in geeigneter Menge Methanol
- Auftrennung mittels präparativer HPLC (Tab. 24)

Tab. 24: HPLC-Parameter zur Isolierung Mykotoxinmetaboliten aus Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakten

Anlage	HPLC-UV-System (präparativ)	Gradient für AOH-&AME-Metaboliten	
		t _R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 15 mm	0	80
Säulentemperatur	Raumtemperatur	5	80
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in ACN	12	60
	B: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	18	60
Flussrate	8 ml/min	25	0
Art der Probe	vereinigte Pflanzenzellkultur- bzw. Explant-Kultur-Extrakte	27	0
		30	80
Injektionslösung	Methanol	35	80
Injektionsvolumen	1,5 ml	Gradient für ZEN-Metaboliten	
Detektion	UV, λ = 254 nm für AOH und AME λ = 280 nm für ZEN	t _R (min)	% B
		0	90
Fraktionierung	manuell	35	70
		45	45
		50	0
		55	0
		57	90
		60	90

9.6 Analytische Methoden zur Strukturaufklärung pflanzlicher löslicher Mykotoxinkonjugate

9.6.1 LC-DAD-MS-Analysen

- Aufnahme des Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakts in 200 µl Methanol
- Homogenisieren auf Vortexmischer
- Zentrifugieren
- Injektion von 20 µl in das LC-DAD-MS-System (Tab. 25)

Tab. 25: LC-DAD-MS-Parameter zur Analyse der Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakte

Anlage	HPLC-DAD-MS-System	Gradient für AOH-&AME-Metaboliten	
		t _R (min)	% B
Säulen	für Extrakte, die ZEN-Metaboliten enthalten: Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	0	20
		5	20
	für Extrakte, die AOH/AME-Metaboliten enthalten: Phenomenex Luna 5 µm C8(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	15	50
		24	70
Säulentemperatur	Raumtemperatur	29	100
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	31	100
	B: 0,1 % Ameisensäure in ACN	32	20
Flussrate	0,5 ml/min	35	20
Art der Probe	Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakte	Gradient für ZEN-Metaboliten	
Injektionslösung	Methanol	t _R (min)	% B
Injektionsvolumen	20 µl	0	10
	Detektion	DAD, λ = 254 nm für AOH und AME λ = 239 oder 280 nm für ZEN MS (ESI, Positiv- und Negativ-Modus)	23
Kalibrierung	externe Kalibrierung	33	55
	c(AOH) = 1–5 µM und 5–85 µM	37	100
	c(AME) = 1–5 µM und 5–85 µM	41	100
	c(ZEN) = 3–85 µM	43	10
		48	10

9.6.2 LC-DAD-HRMS-Analysen

- Aufnahme des Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakts in 200 µl Methanol
- Homogenisieren auf Vortexmischer, Zentrifugieren
- Injektion von 1 µl in das LC-DAD-HRMS-System (Durchführung der Messung am MRI Karlsruhe) (Tab. 26)
- Gerichtete (massenspezifische) (Tab. 27 und Tab. 28) und ungerichtete (massenunspezifische) Auswertung der HRMS-Daten

Tab. 26: LC-DAD-MS-Parameter zur Analyse der Zellsuspensionskultur-Extrakte

Anlage	HPLC-DAD-HRMS-System	Gradient für AOH-&AME-Metaboliten	
Säulen	für Extrakte, die ZEN-Metaboliten enthalten: Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	t _R (min)	% B
		0	20
		5	20
	für Extrakte, die AOH/AME-Metaboliten enthalten: Phenomenex Luna 5 µm C8(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	15	50
		24	70
Säulentemperatur	Raumtemperatur	29	100
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	31	100
	B: 0,1 % Ameisensäure in ACN	32	20
Flussrate	0,5 ml/min	35	20
Art der Probe	Zellsuspensionskulturextrakte	Gradient für ZEN-Metaboliten	
Injektionslösung	Methanol		
Injektionsvolumen Detektion	1 µl	t _R (min)	% B
	DAD, λ = 254 nm für AOH und AME	0	10
	λ = 239 oder 280 nm für ZEN	23	31
	MS (ESI, Positiv- und Negativ-Modus)	33	55
	Full Scan (<i>m/z</i> 100–1000) und MS/MS (IDA)- Modus (<i>m/z</i> 50–1000)	37	100
		41	100
		43	10
	48	10	

Tab. 27: Exakte Massen der hypothetischen pflanzlichen AOH- und AME-Metaboliten

Metabolit	<i>m/z</i> [M-H] ⁻ (Da)	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ (Da)
AOH	257,0456	259,0601
AME	271,0612	273,0758
AOH-Acetat	299,0561	301,0707
AOH-Sulfat	337,0024	339,0169
AOH-Pentosid	389,0878	391,1024
AOH-Glucosid	419,0984	421,1129
AOH-Acetylglucosid	461,1090	463,1235
AOH-Malonylglucosid	505,0988	507,1133
AOH-Pentosylhexosid	551,1407	553,1552
AOH- <i>p</i> -Cumarylglucosid	565,1352	567,1497
AOH-Desoxyhexosylhexosid	565,1563	567,1709
AOH-Diglucosid	581,1512	583,1658
AOH-Malonyldiglucosid	667,1516	669,1662
AOH-Triglucosid	743,2040	745,2186
AOH-Dimalonyldiglucosid	753,1520	755,1666
AOH-Dimalonyltriglucosid	915,2048	917,2194
AME-Acetat	313,0718	315,0863
AME-Sulfat	351,0180	353,0326
AME-Pentosid	403,1035	405,1180
AME-Glucosid	433,1141	435,1286

Metabolit	m/z [M-H] ⁻ (Da)	m/z [M+H] ⁺ (Da)
AME-Acetylglucosid	475,1246	477,1392
AME-Malonylglucosid	519,1144	521,1290
AME-Pentosylhexosid	565,1563	567,1709
AME- <i>p</i> -Cumarylglucosid	579,1508	581,1654
AOH-Desoxyhexosylhexosid	579,1720	581,1865
AME-Diglucosid	595,1669	597,1814
AME-Malonyldiglucosid	681,1673	683,1818
AME-Triglucosid	757,2197	759,2343
AME-Dimalonyldiglucosid	767,1677	769,1822
AME-Dimalonyltriglucosid	929,2205	931,2350

Tab. 28: Exakte Massen der hypothetischen pflanzlichen ZEN-Metaboliten

Metabolit	m/z [M-H] ⁻ (Da)	m/z [M+H] ⁺ (Da)
ZEN	317,1395	319,1540
α -ZEL / β -ZEL	319,1551	321,1697
Hydroxy-ZEN	333,1344	335,1489
Hydroxy-ZEL	335,1500	337,1646
ZEN-Acetat	359,1500	361,1646
ZEN-Sulfat	397,0963	399,1108
ZEN-Pentosid	449,1817	451,1963
ZEN-Glucosid	479,1923	481,2069
Hydroxy-ZEN-Glucosid	495,1872	497,2018
ZEN-Acetylglucosid	521,2029	523,2174
ZEN-Malonylglucosid	565,1927	567,2072
ZEN-Pentosylhexosid	611,2346	613,2491
ZEN- <i>p</i> -Cumarylglucosid	625,2291	627,2436
ZEN-Desoxyhexosylhexosid	625,2502	627,2648
ZEN-Diglucosid	641,2451	643,2597
ZEN-Malonyldiglucosid	727,2455	729,2601
ZEN-Triglucosid	803,2980	805,3125
ZEN-Dimalonyldiglucosid	813,2459	815,2605
ZEN-Dimalonyltriglucosid	975,2987	977,3133
α -/ β -ZEL-Acetat	361,1657	363,1802
α -/ β -ZEL-Sulfat	399,1119	401,1265
α -/ β -ZEL-Pentosid	451,1974	453,2119
α -/ β -ZEL-Glucosid	481,2080	483,2225
α -/ β -ZEL-Acetylglucosid	523,2185	525,2331
α -/ β -ZEL-Malonylglucosid	567,2083	569,2229
α -/ β -ZEL-Pentosylhexosid	613,2502	615,2648
α -/ β -ZEL- <i>p</i> -Cumarylglucosid	627,2447	629,2593
α -/ β -ZEL-Desoxyhexosylhexosid	627,2659	629,2804
α -/ β -ZEL-Diglucosid	643,2608	645,2753
α -/ β -ZEL-Malonyldiglucosid	729,2612	731,2757
α -/ β -ZEL-Dimalonyldiglucosid	815,2616	817,2761

9.6.3 NMR-Spektroskopie

Probenvorbereitung

- Eindampfen und Gefriertrocknen der isolierten Mykotoxinmetaboliten
- Lösen der Mykotoxinmetaboliten in 500 μl DMSO- d_6
- Überführen in NMR-Röhrchen
- Messung mittels NMR-Spektroskopie (^1H -NMR, (H,H)-COSY, HSQC, HMBC)

Referenzierung

- DMSO (δ ^1H 2,50 ppm / δ ^{13}C 39,50 ppm)

Pulssequenzen

- Alle aufgeführten NMR-Experimente wurden jeweils mit den Standardpulsprogramme der Firma Bruker durchgeführt (Tab. 29)

Tab. 29: NMR-Experimente und zugehörige Pulsprogramme

Experiment	Pulsprogramm
^1H -NMR	zg30, zg0
(H,H)-COSY	cosygpqf, cosygpmfphpp
HSQC	hsqcetgp, hsqcedetgp
HMBC	hmbcgplpndqf
J_{res}	jresqf

- Bei Metaboliten, die nur in sehr geringen Mengen isoliert werden konnten, wurden Shigemi-Röhrchen verwendet. Hierbei konnte die Lösungsmenge von 500 μl auf 220 μl verringert und dadurch die Konzentration erhöht werden
- Zur Reduktion der Experimentzeit von 2D-Experimenten wurden teilweise NUS-Experimente durchgeführt. Der Teil der tatsächlich aufgenommenen Datenpunkte in der indirekten Dimension wurde jeweils um einen gewissen Prozentsatz (Reduktion um ca. 25 bis maximal 50 % je nach Probe) reduziert. Alle unter Verwendung von NUS aufgenommenen Spektren wurden mit dem Compressed Sensing (CS)-Algorithmus der TopSpin-Software rekonstruiert.

9.7 Strukturaufklärung von Sulfaten und Sulfolucosiden

A. alternata Stämme und Inokulation einer Tomatenfrucht mit *A. alternata*

Sowohl die Züchtung und Erhaltung der beiden *A. alternata*-Stämme BFE1346 und BFE1348 als auch die Inokulation einer Tomatenfrucht mit Sporen von *A. alternata* wurde von Mitarbeitern des MRI (Karlsruhe) durchgeführt. Des Weiteren wurden dort Versuche mit den Pilzen auf verschiedenen Kulturmedien durchgeführt.

Inkubation der Tabakzellsuspensions- und Tomaten-Explant-Kultur mit den AOH- und AME-Sulfaten

- Inkubation der Tabakzellsuspensions- und Tomaten-Explant-Kultur mit 60 µl 10 mM AOH- bzw. AME-Monosulfat-Lösung im Dunkeln bei 25 °C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator
- Abbruch der Inkubation nach zwei Tagen durch Vakuumfiltration über einem Glasfildertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Zellen bzw. Tomatenwürfel und des Mediums
- Dreifache Extraktion der Zellen bzw. Tomatenwürfel und des Mediums (Kapitel 9.4)
- Messung mittels LC-DAD-MS (Tab. 30)

Tab. 30: LC-DAD-MS-Parameter zur Analyse der Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakte

Anlage	HPLC-DAD-MS-System	Gradient für AOH-&AME-Metaboliten	
		t _R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	0	20
Säulentemperatur	Raumtemperatur	5	20
Eluenten	A: 5 mM Ammoniumacetat in H ₂ O	15	50
	B: 0,1 % Ameisensäure in ACN	24	70
Flussrate	0,5 ml/min	29	100
Art der Probe	Zellsuspensions- bzw. Explant-Kultur-Extrakte	31	100
Injektionslösung	Methanol	32	20
Injektionsvolumen	20 µl	35	20
Detektion	DAD, λ = 254 nm für AOH und AME λ = 239 oder 280 nm für ZEN MS (ESI, Positiv- und Negativ-Modus)		
Kalibrierung	externe Kalibrierung c(AOH) = 1–5 µM und 5–85 µM c(AME) = 1–5 µM und 5–85 µM c(ZEN) = 3–85 µM		

- Messung mittels HRMS und Auswertung der HRMS-Daten durch die Mitarbeiter am MRI (Karlsruhe)

Isolierung und Reinigung der Sulfate und Sulfoglucoside von AOH und AME

- Die im MRI (Karlsruhe) hergestellten Pilzextrakte sowie die Tabakzelleextrakte wurden im Rahmen dieser Arbeit präparativ gereinigt
- Durchführung gemäß Kapitel 9.5

NMR-spektroskopische Strukturaufklärung der AOH- bzw. AME-Sulfate und -Sulfoglucoside

- NMR-Spektroskopische Untersuchungen (^1H -NMR, (HH)-COSY, HSQC, HMBC)
- Durchführung gemäß Kapitel 9.6.3

9.8 Synthese von isotopenmarkiertem ZEN

Die Synthese von isotopenmarkiertem ZEN wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Mirjam Epp durchgeführt.

Synthese von ZEN- d_6

- Lösen von 16,5 mg ZEN in 200 μ L THF
- Zugabe einer Lösung aus 125 mg K_2CO_3 in 1,0 ml D_2O
- Rühren des Reaktionsgemisches für mehrere Tage bei 50 °C in der Dunkelheit
- Zeitweise Entnahme eines Aliquot, Neutralisation mit HCl und Überprüfen der Deuterierung mittels LC-MS
- Zugabe von 60 ml 0,2 M H_2SO_4
- Zweifache Extraktion mit je 20 ml Dichlormethan
- Zentrifugieren und Eindampfen der organische Phase
- Produkt kühl und dunkel lagern

Synthese von ZEN- d_2

- Synthese von ZEN-7'-[1,3]-Dioxolan
 - Zugabe von 20,2 mg ZEN zu einer Lösung aus 1 ml Ethylenglycol und 26 mg *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat und in 13 ml Toluol lösen
 - vierstündige azeotrope Destillation bei 125 °C
 - Nach Abkühlen der Lösung zweimalige Extraktion mit 6,7 ml 0,1 M NaOH in einem 15 ml Pyrexglas (Zentrifugieren)
 - Einstellen des pHs der wässrigen Phase mit 1,0 M Salzsäure auf pH 7
 - Zweifache Extraktion der Lösung mit 2 ml *tert*-Butylmethylether
 - Eindampfen des Lösungsmittels
- Synthese von ZEN- d_2 -7'-[1,3]-Dioxolan
 - Zugabe von 19 mg Pottasche und 1,5 ml Deuteriumoxid zu ZEN-7'-[1,3]-Dioxolan in ein 3 ml Vial
 - Rühren der Lösung für sieben Tage bei 50 °C
 - Verdünnen des Reaktionsgemisches mit 3 ml Wasser
 - Ansäuern mit HCl (1,0 mol/l)
 - Zweifache Extraktion mit 7 ml *tert*-Butylmethylether
 - Trocknen der organischen Phase über $NaSO_4$
 - Eindampfen des Lösungsmittels

- Synthese von ZEN- d_2
 - Lösen von ZEN- d_2 -7'-[1,3]-Dioxolan in 1 ml Methanol und Zugabe von 300 μ l 1,0 M Ammoniumchlorid
 - Rühren der Lösung für 2 h bei 50 °C
 - Aufreinigung des Spaltprodukts mittels präparativer HPLC (Tab. 31)

Tab. 31: HPLC-Parameter zur Aufreinigung von 13,15- d_2 -Zearalenon

Anlage	HPLC-UV-System (präparativ)	Gradient	
		t_R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 μ m C18(2) 100 Å; 250 x 15 mm	0	70
Säulentemperatur	Raumtemperatur	30	30
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in ACN	32	0
	B: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	35	0
Flussrate	8 ml/min	37	70
Art der Probe	Gemisch aus ZEN- d_2 und	40	70
	ZEN- d_2 -7'-[1,3]-Dioxolan		
Injektionslösung	Methanol		
Injektionsvolumen	1,5 ml		
Detektion	UV, $\lambda = 280$ nm für ZEN		

9.9 Synthese von isotopenmarkiertem AOH und AME

Die Synthese von isotopenmarkiertem AOH und AME wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Mirjam Epp durchgeführt.

Synthese von AOH- d_4 und AME- d_4 nach Asam *et al.* (2009) (heterogene Metallkatalyse)

- Überführen von 1 mg AME oder AOH und 1,5 ml Dioxan- d_8 , 1,5 ml Deuteriumoxid und Katalysator (250 mg Pd auf Bariumsulfat) in ein 0,5 ml Vial
- Rühren bei 160 °C für mehrere Tage (Apparatur: Metallblock auf Heizrührer)
- Zeitweise Reaktionsmischung abkühlen lassen und Aliquot in die LC-MS überprüfen
- Reaktionsende: Reaktionsgemisch abkühlen lassen, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß geben und Katalysator durch Zentrifugation entfernen (10 min, 13 200 rpm, 25 °C)
- Zentrifugat im Evaporator eindampfen

Synthese von AOH- d_4 mittels säurekatalytischer S_EAr

- Lösen von 6 mg AOH in 900 μ l MeOD in einem 3 ml Vial
- Zugabe von 880 μ l D₂O und 160 μ l DCI
- Rühren bei 100 °C für ca. sieben Tage (Apparatur: Metallblock auf Heizrührer)
- Zeitweise Aliquot entnehmen und Isotopenreinheit mittels LC-MS überprüfen
- Abkühlen, Extraktion mit Ethylacetat
- Eindampfen des Lösungsmittels

Synthese von AME- d_4 mittels säurekatalytischer S_EAr

- Lösen von 3,4 mg AOH in 600 μ l THF in einem 3 ml Vial
- Zugabe von 858 μ l D₂O und 143 μ l DCI
- Rühren bei 100 °C für ca. sieben Tage (Apparatur: Metallblock auf Heizrührer)
- Zeitweise Aliquot entnehmen und Isotopenreinheit mittels LC-MS überprüfen
- Abkühlen, Extraktion mit Ethylacetat
- Eindampfen des Lösungsmittels

9.10 Untersuchung der Stabilität der deuterierten Standardsubstanzen

Die Untersuchung der Stabilität der deuterierten Standardsubstanzen wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Mirjam Epp durchgeführt.

Stabilität im Zellkulturmedium

- Zugabe von 50 µl einer 10 mM Lösung von AOH- d_4 , AME- d_4 , ZEN- d_2 und ZEN- d_6 zu 10 ml MS-Medium
- Inkubation im Dunkeln bei 25 °C auf einem Rotationsschüttler (140 rpm)
- Abbruch der Inkubation nach zwei Tagen durch Vakuumfiltration über einen Glasfiliertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Zellen und des Mediums
- Gefriertrocknen der Lösung
- Aufnahme in 5 ml Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Tab. 25)

Stabilität in der Zellsuspensionskultur

- Zugabe von 150 µl einer 10 mM Lösung von AOH- d_4 , AME- d_4 und ZEN- d_2 zu 30 ml Tabaksuspensionszellen vier Tage nach Subkultivierung
- Inkubation im Dunkeln bei 25 °C auf einem Rotationsschüttler (140 rpm)
- Abbruch der Inkubation nach zwei Tagen durch Vakuumfiltration über einen Glasfiliertiegel (Porosität 3) und Einfrieren der Zellen und des Mediums
- Gefriertrocknen der Zellen
- Dreifache Extraktion (Kapitel 9.4)
- Aufnahme in 200 µl
- Messung mittels LC-DAD-MS (Tab. 25)

Enzymatische Spaltung der Mykotoxinmetaboliten mit β -Glucosidase

- Zugabe von 1 ml 0,1 M Acetatpuffer zu 100 µl Zellextrakt aus dem vorangegangenen Versuch
- Zugabe von 1 mg β -Glucosidase und Inkubation für 2 h bei 37 °C
- Extraktion mit Ethylacetat, Eindampfen des Lösungsmittels
- Analyse mittels LC-DAD-MS (Tab. 25)

9.11 Analytische Methoden zur Messung der deuterierten Mykotoxinmetaboliten

LC-DAD-MS

Die LC-DAD-MS-Messung der deuterierten Standardsubstanzen wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Mirjam Epp durchgeführt.

- Aufnahme des Zellsuspensionskultur-Extrakts bzw. der isolierten deuterierten Mykotoxinmetaboliten in je 200 µl Methanol
- Homogenisieren auf Vortexmischer
- Zentrifugieren
- Injektion von 20 µl in das LC-DAD-MS-System (Tab. 25)

LC-DAD-HRMS

- Aufnahme des Zellsuspensionskultur-Extrakts in 200 µl Methanol
- Homogenisieren auf Vortexmischer, Zentrifugieren
- Injektion von 1 µl in das LC-DAD-HRMS-System (Durchführung der Messung am MRI Karlsruhe) (Tab. 26)
- Gerichtete (massenspezifische) und ungerichtete (massen-unspezifische) Auswertung der HRMS-Daten

NMR-Spektroskopie

- Eindampfen und Gefriertrocknen der isolierten Mykotoxinmetaboliten
- Lösen der Mykotoxinmetaboliten in 500 µl DMSO- d_6
- Überführen in NMR-Röhrchen
- Messung mittels NMR-Spektroskopie (^1H -NMR, HSQC)
- Referenzierung: DMSO (δ ^1H 2,50 ppm / δ ^{13}C 39,50 ppm)
- Alle aufgeführten NMR-Experimente wurden jeweils mit den Standardpulsprogramme der Firma Bruker durchgeführt (Tab. 29)

9.12 Test auf Isotopenshift der deuterierten Standardsubstanzen

Der Test auf Isotopenshift der deuterierten Standardsubstanzen wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Mirjam Epp durchgeführt.

- Vereinigung der Zellextrakte aus den Inkubationen mit deuterierten Mykotoxinen und nicht-markierten Mykotoxinen
- Injektion von 20 µl in ein LC-DAD-MS-System (Tab. 25)

9.13 Kultivierung und Subkultivierung der Caco-2-Zellkultur

Kultivierung der Caco-2-Zellen

- Kultivieren der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 15 cm Petrischale mit 20 ml DMEM F12 Medium (Kapitel 8.3.2)
- Wechsel des Mediums alle zwei Tage

Subkultivierung der Caco-2-Zellen

- Waschen der Zellen mit 10 ml PBS (Kapitel 8.3.2)
- Benetzen der Zellen mit 2,5 ml Accutase
- Absaugen des Überstandes
- Inkubation der Zellen für 3 min bei 37 °C
- Ablösen der Zellen durch Resuspendieren mit 3–5 ml DMEM F12-Medium
- Bestimmung der Zellzahl mittels Casy® Cell Counter
 - Überführen von 50 µl der Zellsuspension in ein Casycup mit 5 ml Casyton
 - Durchführung der Messung am Casy (Doppelbestimmung mit einer maximalen Abweichung von 5 %)
 - Größenbereich lebender Caco-2-Zellen > 12,5 µm (durchschnittlich 19–22 µm)
 - Größenbereich toter Caco-2-Zellen < 12,5 µm (zwischen 8,1 µm und 12,5 µm)
- Überführen von 1–5 x 10⁶ Zellen in eine neue 15 cm Petrischale
- Auffüllen des Mediums auf 20 ml mit DMEM F12-Medium
- Kultivierung der Caco-2-Zellen nach oben genannten Bedingungen

9.14 Messung spezifischer Parameter für die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie

Ermittlung des Konzentrationsunterschiedes von Tetramethyl-*p*-benzochinon mit und ohne Zusatz von Europium(III)-tris(1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-7,7-dimethyl-4,6-octandionat) ($\text{Eu}(\text{fod})_3$)

- Herstellen von Standards in CDCl_3 : Acetanilid (2,00 mg/ml), Tetramethyl-*p*-benzochinon (1,00 mg/ml), Tetramethyl-*p*-benzochinon mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (je 1,00 mg/ml)
- NMR-spektroskopische Messung der einzelnen Lösungen mit normalen NMR-Röhrchen und Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Tab. 32)

Tab. 32: Chemische Verschiebungen der eingesetzten Substanzen Acetanilid, Tetramethyl-*p*-benzochinon und Tetramethyl-*p*-benzochinon mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ in CDCl_3

Acetanilid in CDCl_3		Tetramethyl- <i>p</i> -benzochinon in CDCl_3		Tetramethyl- <i>p</i> -benzochinon mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ in CDCl_3	
Anzahl der Protonen	δ ^1H (ppm)	Anzahl der Protonen	δ ^1H (ppm)	Anzahl der Protonen	δ ^1H (ppm)
3	2,18	12	2,02	12	2,32
1	7,11				
2	7,32				
2	7,49				

- Befüllen des Coaxial-Inserts mit 300 μl Acetanilid-Lösung
- Befüllen des äußeren Röhrchens mit 600 μl Tetramethyl-*p*-benzochinon-Lösung in der ersten Messung und 600 μl Tetramethyl-*p*-benzochinon mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ -Lösung in der zweiten Messung
- NMR-spektroskopische Messung (jeweils 7 Replikationen)
- Berechnung der Verhältnisse der Signalintensitäten von einem Acetanilidsignal (Signal bei δ ^1H 7,49 ppm, 2H) zu den Signalintensitäten des Tetramethyl-*p*-benzochinonsignals
- Die Konzentrationsverhältnisse zeigen, dass die Tetramethyl-*p*-benzochinon-Lösung mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ 1,02 % höher konzentriert ist als die Tetramethyl-*p*-benzochinon-Lösungen. Dieser Unterschied wurde in nachfolgenden Berechnungen berücksichtigt.

Ermittlung des Volumenverhältnisses des Analyten V_R und der Analytsubstanz V_A in den Coaxial-Röhrchen ($\frac{V_R}{V_A}$)

- Befüllen des Coaxial-Inserts mit 300 μl Acetanilid-Lösung
- Befüllen des äußeren Röhrchens mit Tetramethyl-*p*-benzochinon-Lösung
- NMR-spektroskopische Messung (jeweils 7 Replikationen) → Datensatz 1 (Tab. 33)

- Befüllen des Coaxial-Inserts mit 300 µl Tetramethyl-*p*-benzoquinon-Lösung
- Befüllen des äußeren Röhrchens mit Acetanilid-Lösung
- NMR-spektroskopische Messung (jeweils 7 Replikationen) → Datensatz 2 (Tab. 33)
- Berechnung der Mittelwerte aus den Datensätzen 1 und 2 (Tab. 33)

Tab. 33: Mittelwerte der sieben Replikationen und Berechnung der relativen Volumina der Coaxial-Inserts mit den prozentualen Standardabweichungen in Klammern

Insert	Datensatz 1	Datensatz 2	kombinierte Daten $\left(\frac{V_R}{V_A}\right)$
1	0,1833 (0,0003)	0,2041 (0,0005)	0,1935 (0,0068)
2	0,1853 (0,0002)	0,1972 (0,0005)	0,1913 (0,0062)
3	0,1848 (0,0001)	0,1927 (0,0005)	0,1887 (0,0041)
5	0,1861 (0,0002)	0,1969 (0,0002)	0,1915 (0,0056)

Messung der T_1 -Zeiten (Inversion Recovery-Experiment)

- Lösen der zu messenden Substanzen in 500 µl DMSO- d_6
- Aufnahme von Inversion Recovery-Experimenten der einzelnen Substanzen (Standard-Pulsprogramm von Bruker: „t1ir“) → Ergebnisse s. Tab. 34

Tab. 34: Ergebnisse der T_1 -Zeit-Bestimmung verschiedener Substanzen mittels Inversion-Recovery-Experiment

Substanz	T_1 -Zeiten (s)
AOH	3,1
AOH-9-Diglucosid	3,1
AOH-9-Glucosid	1,2
AOH-3-Glucosid	1,8
AME	2,5
AME-7-Glucosid	2,2
AME-3-Glucosid	1,8
ZEN	1,9
ZEN-14-Glucosid	1,6
ZEN-16-Glucosid	1,7
Acetanilid	3,0

9.15 Quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie zur Stoffmengenbestimmung

Die quantitative ^1H -NMR-Messung zur Stoffmengenbestimmung der Mykotoxinmetaboliten wurde in Zusammenarbeit mit Jörg Gottmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

Probenvorbereitung

- Verwendung von Coaxial-NMR-Röhrchen
- Gefriergetrocknete Substanz in 600 μl DMSO- d_6 lösen und in das äußere Röhrchen geben
- 150 μl Acetanilid-Standard (2,004 mg/ml in DMSO- d_6) in das Coaxial-Insert geben

Referenzierung

- DMSO (δ ^1H 2,50 ppm / δ ^{13}C 39,50 ppm)

Einstellungen

- Bei quantitativen Messungen wurde die Wartezeit D1 so angepasst, dass diese mindestens der fünffachen Relaxationszeit des Kerns mit der langsamsten Relaxation entspricht

Tab. 35: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für quantitative ^1H -NMR-Experimente

Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	zg0
Acquisition Time (AQ)	~1,6 s
D1	30 s
Prozessierungsparameter	
Window Function	EM
LB	0,10

Quantifizierung

- Intensitätsvergleich eines isolierten Signal der externen Standardsubstanz Acetanilid mit einem isolierten Signal der zu quantifizierenden Probe

Tab. 36: Chemische Verschiebungen von Acetanilid in DMSO- d_6

Acetanilid in DMSO-d_6	
Anzahl der Protonen	δ ^1H (ppm)
3	2,03
1	7,01
2	7,27
2	7,56

9.16 Stabilitätskontrolle der Mykotoxine und ihrer Metaboliten

- Quantifizierung der Metaboliten-Stammlösungen aus der präparativen Darstellung (Kapitel 9.5) mittels quantitativer $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie
- Herstellung 20 μM Lösungen der Mykotoxine bzw. Mykotoxinmetaboliten in HBSS (pH 7,5, 1 % DMSO)
- Inkubation der Lösungen bei 37 °C für 3 h
(Kontrolle zum Zeitpunkt 0 einfrieren)
- Einfrieren und Gefriertrocknen der Probe
- Aufnehmen des Rückstandes in 100 μl Methanol
- Analyse mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

9.17 Metabolismus der löslichen Mykotoxinkonjugate in Caco-2-Zellen

Versuchsvorbereitung

- Ausstreuen von 4×10^5 Zellen pro Well einer 24-Wellplatten (Corning® Costar®, 1,9 cm² Oberfläche)
- Kultivieren der Zellen mit 600 µl DMEM F12-Medium für 21 Tage
- Wechsel des Mediums alle zwei Tage

Inkubation der Zellen 21 Tage nach dem Ausstreuen

- Absaugen des Mediums
- Inkubation der Zellen mit 600 µl der 20 µM Lösungen der zu inkubierenden Substanzen in HBSS (pH 7,5; 1 % DMSO), Inkubation für 3 h bei 37 °C
- Abnahme des HBSS-Überstandes nach der Inkubationszeit
 - Einfrieren und Gefriertrocknen des Überstandes
- Waschen der Zellen mit 600 µl HBSS (pH 7,5)
- Ablösen der Zellen mithilfe eines Zellschabers
- zweimaliges Resuspendieren und Abnehmen der Zellen mit je 500 µl bidest. (bidestilliertes) H₂O in ein Eppendorf Reaktionsgefäß
 - Zellyse für 24 h bei -80 °C
 - Gefriertrocknen des Zellrückstandes
 - Zugabe von 500 µl Methanol:CH₂Cl₂ (2:1, v/v)
 - Behandeln der Zellsuspension für 10 min im Ultraschallbad
 - Zentrifugieren der Zellsuspension für 3 min bei 14 000 rpm
 - Abnahme des Überstandes
 - Zugabe von 500 µl Methanol:H₂O:Essigsäure (79/20/1, v/v/v) auf den Zellrückstand
 - Behandeln der Zellsuspension für 10 min im Ultraschallbad
 - Zentrifugieren der Zellsuspension für 3 min bei 14 000 rpm
 - Abnahme des Überstandes
 - Zugabe von 500 µl Methanol:CH₂Cl₂ (2:1, v/v) auf den Zellrückstand
 - Behandeln der Zellsuspension für 10 min im Ultraschallbad
 - Zentrifugieren der Zellsuspension für 3 min bei 14 000 rpm
 - Abnahme des Überstandes
 - Vereinen der jeweiligen Überstände
 - Abdampfen des CH₂Cl₂ unter Stickstoff

- Eindampfen der Zellextrakte am Evaporator
- Aufnehmen der extrahierten Zellrückstandes und des HBSS-Überstandes in je 100 µl Methanol
- Analyse mittels LC-DAD-MS (Tab. 37)

Tab. 37: LC-DAD-MS-Parameter zur Analyse der Caco-2-Zellextrakte und Überstände

Anlage	HPLC-DAD-MS-System	Gradient für AOH-&AME-Metaboliten	
		t _R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	0	20
Säulentemperatur	Raumtemperatur	5	20
Eluenten	A: 5 mM Ammoniumacetat in H ₂ O B: 0,1 % Ameisensäure in ACN	15	50
Flussrate	0,5 ml/min	24	70
Art der Probe	Caco-2-Zellextrakte und Überstände	29	100
Injektionslösung	Methanol	31	100
Injektionsvolumen	20 µl	32	20
Detektion	DAD, λ = 254 nm für AOH und AME λ = 239 oder 280 nm für ZEN MS (ESI, Positiv- und Negativ-Modus)	35	20
Kalibrierung	externe Kalibrierung c(AOH) = 1–5 µM und 5–85 µM c(AME) = 1–5 µM und 5–85 µM c(ZEN) = 3–85 µM	Gradient für ZEN-Metaboliten	
		t _R (min)	% B
		0	90
		35	70
		45	45
		50	0
		55	0
		57	90
		60	90

9.18 Resorption der löslichen Mykotoxinkonjugate im Caco-2-Transwell-Modell

Versuchsvorbereitung

- Durchführung der Subkultivierung bis einschließlich der Zellzahlbestimmung
- Ausstreuen von 6×10^5 Zellen pro *Transwell*-Insert einer 24-Wellplatten (Corning[®], 0,4 μm Porengröße, 0,33 cm^2 Oberfläche)
- Kultivieren der Zellen mit 100 μl DMEM F12-Medium apikal und 600 μl DMEM F12-Medium basolateral für 21 Tage
- Wechsel des Mediums alle zwei Tage in beiden Kompartimenten

Inkubation der Zellen 21 Tage nach dem Ausstreuen

- Absaugen des Mediums
- Zugabe von 600 μl HBSS (pH 7,5) basolateral
- Zugabe von 100 μl HBSS (pH 7,5) apikal, enthält 20 μM der jeweiligen Substanzen und 1 % DMSO
- Inkubation für 60 min bei 37 °C
- Abnehmen von 90 μl des apikalen und 500 μl des basolateralen HBSS Überstandes
 - Gefriertrocknen der Überstände
 - Aufnahme des Rückstandes in 100 μl Methanol
 - Analyse mittels LC-DAD-MS (Tab. 37)

Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers

- Waschen beider Kompartimente mit 2 x 100 μl HBSS (pH 7,5) apikal und 2 x 600 μl HBSS (pH 7,5) basolateral
- Zugabe von 600 μl HBSS (pH 7,5) basolateral
- Zugabe von 100 μl LY-Lösung apikal (LY c= 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in HBSS, pH 7,5)
- Inkubation für 60 min bei 37 °C
- Entnahme von zweimal 200 μl der basolateralen Lösung für fluorimetrische Analyse mittels Tecan (Doppelbestimmung)
 - Proben, Blindwert und Positiv-Kontrolle in eine 96-Wellplatte geben
 - Blindwert: 200 μl HBSS Puffer (pH 7,5)
 - Positivprobe: LY-Referenzlösung (c = 14,29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, entspricht maximalem Transfer)

- Messung der Fluoreszenz am Tecan (Extinktion bei 485 nm und Emission bei 535 nm)
- Berechnung des Durchflusses der einzelnen *Transwell*-Inserts anhand Formel (6)
- eine LY-Transportrate von $\leq 2\%$ weist auf einen intakten Zellmonolayer hin

9.19 Versuche zur (physikalischen) Adsorption

Die Versuche zur (physikalischen) Adsorption wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Sylvia Dreßler durchgeführt.

- Einwaage von 450 mg toten, gefriergetrockneten und gemörserten Zellwandrückständen von inkubierten und extrahierten Tabakzellen
- Einwaage von 450 mg autoklavierten, toten, gefriergetrockneten und gemörserten Zellwandrückständen von inkubierten und extrahierten Tabakzellen
- Zugabe von jeweils 30 ml MS-Medium
- Zugabe von 10 mM ZEN-Lösung
 - 300 µl zu den toten, gefriergetrockneten und gemörserten Zellwandrückständen von inkubierten und extrahierten Tabakzellen
 - 600 µl zu den toten, gefriergetrockneten und gemörserten Zellwandrückständen von inkubierten und extrahierten Tabakzellen
 - 300 µl zu den autoklavierten, toten, gefriergetrockneten und gemörserten Zellwandrückständen von inkubierten und extrahierten Tabakzellen
- Inkubation für zwei Tage im Dunkeln bei 25 °C und 140 rpm in einem Schüttelinkubator
- Abbruch der Inkubation durch Vakuumfiltration über einem Glasfiltertiegel (Porosität 3), Einfrieren und Gefriertrocknen der Zellen und des Mediums
- Dreifache Extraktion der Tabakzellen und des Mediums (Kapitel 9.4)
- Eindampfen bis zur Trockene am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C Badtemperatur
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

9.20 Saure Hydrolysen

Vorversuche zur sauren Hydrolyse

Die Vorversuche zur sauren Hydrolyse wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Sylvia Dreßler durchgeführt.

- Zugabe von TCA (Versuch 1.2), TFA (Versuche 1.1, 2.1–2.3, 3.1–3.3) oder HCl (Versuche 4.1, 4.2) zu 100 µl (bei den Versuchen mit TFA und TCA) bzw. 50 µl (bei den Versuchen mit HCl) 20 mM ZEN-Standard (Tab. 38)
- Hydrolyse im Trockenschrank
- Neutralisation mit 2 M (bei den Versuchen mit TCA und TFA) bzw. 4 M (bei den Versuchen mit HCl) KOH nach Abkühlen
- Durchführen einer SPE (Chromabond C18-Säulen, 3 ml, 500 mg)
 - Konditionierung mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O
 - Probenaufgabe
 - Waschen mit 2 x 5 ml bidest. H₂O
 - Elution mit 2 x 5 ml Methanol
- Trocknen des Eluats am Rotationsverdampfer bei 45 °C Badtemperatur und vermindertem Druck
- Aufnahme des Rückstands in 10 ml Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

Tab. 38: Hydrolysebedingungen für die saure Hydrolyse mit TFA, TCA und HCl. ACN = Acetonitril, TFA = Trifluoressigsäure, TCA = Trichloressigsäure, HCl = Salzsäure

Nr.	Säure	Menge (ml)	Konzentration (M)	Lösungsmittel	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1.1	TFA	1	1,25	4 ml ACN:H ₂ O (74/16, v/v)	133	54
1.2	TCA	1	1	und 2 ml H ₂ O	140	40
2.1	TFA	1	2	4 ml ACN:H ₂ O (74/16, v/v) und 2 ml H ₂ O	121	60
2.2	TFA	1	2		121	50
2.3	TFA	1	2		121	40
3.1	TFA	3	2	-	121	60
3.2	TFA	3	3	-	121	60
3.3	TFA	3	4	-	121	60
4.1	HCl	15	6	-	110	1440
4.2	HCl	15	2	-	110	1440

Hauptversuch: Hydrolyse der Zellrückstände mit TFA

- Einwaage von 100 mg mit Mykotoxin inkubierten und anschließend extrahierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen in ein 7 ml GC-Vial (Kontrolle: 10 µl 10 mM AOH-, AME- und ZEN-Standard)
- Zugabe von 2 M TFA-Lösung
- Hydrolyse im Trockenschrank bei 121 °C für 60 min
- Filtration über Tiegelfilter (Porosität 3) nach Abkühlen
- Neutralisation des Filtrats mit 2 M KOH
- Durchführen einer SPE (Chromabond C18-Säulen, 3 ml, 500 mg)
 - Konditionierung mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O
 - Probenaufgabe
 - Waschen mit 2 x 5 ml bidest. H₂O
 - Elution mit 2 x 5 ml Methanol
- Trocknen des Eluats am Rotationsverdampfer bei 45 °C Badtemperatur und vermindertem Druck
- Aufnahme des Rückstands in 200 µl Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

9.21 Alkalische Hydrolyse

Vorversuche zur alkalischen Hydrolyse

Die Vorversuche zur alkalischen Hydrolyse wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Sylvia Dreßler durchgeführt.

- Zugabe von NaOH zu 100 µl 20 mM ZEN-Standard (Tab. 39)
- Hydrolyse im Trockenschrank
- Neutralisation mit 6 M HCl nach Abkühlen
- Durchführen einer SPE (Chromabond C18-Säulen, 3 ml, 500 mg)
 - Konditionierung mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O
 - Probenaufgabe
 - Waschen mit 2 x 5 ml bidest. H₂O
 - Elution mit 2 x 5 ml Methanol
- Trocknen des Eluats am Rotationsverdampfer bei 45 °C Badtemperatur und vermindertem Druck
- Aufnahme des Rückstands in 10 ml Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

Tab. 39: Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen der Kontroll-Vorversuche Nr. 1.1 bis 2.2 für ZEN. NaOH = Natronlauge

Nr.	Lauge	Menge (ml)	Konzentration (M)	Temperatur (°C)	Dauer (h)
1.1	NaOH	15	4	110	20
1.2	NaOH	15	4	110	3
2.1	NaOH	15	4	60	1
2.2	NaOH	15	4	60	3

Hauptversuch: Hydrolyse der Zellrückstände mit NaOH

- Einwaage von 100 mg mit Mykotoxin inkubierten und anschließendes Überführen der extrahierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen in ein 15 ml Pyrex-Glas (Kontrolle: 10 µl 10 mM AOH-, AME- und ZEN-Standard)
- Zugabe von 4 M NaOH-Lösung
- Hydrolyse im Trockenschrank bei 60 °C für 60 min
- Filtration über Tiegelfilter (Porosität 3) nach Abkühlen
- Neutralisation des Filtrats mit 6 M HCl
- Durchführen einer SPE (Chromabond C18-Säulen, 3 ml, 500 mg)

- Konditionierung mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O
- Probenaufgabe
- Waschen mit 2 x 5 ml bidest. H₂O
- Elution mit 2 x 5 ml Methanol
- Trocknen des Eluats am Rotationsverdampfer bei 45 °C Badtemperatur und vermindertem Druck
- Aufnahme des Rückstands in 200 µl Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

9.22 Enzymatische Hydrolysen

- Einwaage von 100 mg mit Mykotoxin inkubierten und anschließend extrahierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen in einen 100 ml Erlenmeyerkolben (Kontrolle: 10 µl 10 mM AOH-, AME- und ZEN-Standard)
- Zugabe von 15 ml Natriummaleatpuffer
- Einstellen des pH-Werts auf 7 bzw. 4,5 (Tab. 40) mit 0,75 M Trizma-Base bzw. 2 M Essigsäure
- Zugabe von 20 mg des entsprechenden Enzyms (Tab. 40) und Verschließen des Erlenmeyerkolbens mit Alufolie
- Inkubation bei 40 °C und 150 rpm auf einem Schüttelinkubator für 48 h
- Abbruch der Inkubation durch Erhitzen im Wasserbad bei 100 °C für 10 min
- Zentrifugation und Abnehmen des Überstands
- Neutralisation des Überstands mit 0,75 M Trizma-Base bzw. 2 M Essigsäure
- Durchführen einer SPE (Chromabond C18-Säulen, 3 ml, 500 mg)
 - Konditionierung mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O
 - Probenaufgabe
 - Waschen mit 2 x 5 ml bidest. H₂O
 - Elution mit 2 x 5 ml Methanol
- Trocknen des Eluats am Rotationsverdampfer bei 45 °C Badtemperatur und vermindertem Druck
- Aufnahme des Rückstands in 200 µL Methanol
- Messung mittels LC-DAD-MS (Kapitel 9.6.1)

Tab. 40: Hydrolysebedingungen und Wiederfindungen der enzymatischen Hydrolyse von mit AOH, AME und ZEN inkubierten, extrahierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen

Zellmenge	Enzymmenge	Enzym	pH	Temperatur	Dauer
100 mg	20 mg	α-Amylase	7	40 °C	48 h
100 mg	20 mg	Amyloglucosidase	4,5	40 °C	48 h
100 mg	20 mg	Protease	7	40 °C	48 h
100 mg	20 mg	Pectinase Macerozyme R-10	4,5	40 °C	48 h
100 mg	20 mg	Cellulase Onozuka R-10	4,5	40 °C	48 h
100 mg	20 mg	Driselase	7	40 °C	48 h

9.23 NMR-spektroskopische Untersuchung der Zellrückstände

Vorbereitung der Proben für die NMR-Analyse

- Gefriertrocknen der Probe
- Mahlen von 150 mg Zellrückstand
 - Kugelmühle: 150 mg Zellrückstand werden für 35 min
(5 min Intervall mit 5 min Pause zwischen den Mahlgängen)
- Überführen von 50–70 mg Zellrückstand in ein NMR-Röhrchen
- Zugabe von 500 μl DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4:1)
- Behandlung im Ultraschallbad bis zur Ausbildung einer gelartigen Struktur
- Messung mittels NMR-Spektroskopie (HSQC)

Messung mittels eines NMR-Spektrometers

- Referenzierung mittels DMSO (δ ^1H 2,50 ppm / δ ^{13}C 39,50 ppm)
- Für die NMR-Messungen wurde das Standard HSQC-Pulsprogramme „hsqcetgpcsp2.2“ (adiabatische Pulse) von Bruker unter Verwendung der in Tab. 41 angegebenen Parametern verwendet

Tab. 41: Spezifische Parameter zur 2D-NMR Messung der Zellrückstände in DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4:1). Die Anzahl der Scans war abhängig von der Probenmenge. HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence, GM = Gaussian Multiplication, QSINE = Quadratic Sine Window Function, GB = Gaussian Broadening Factor, LB = Exponential Broadening Factor, SSB = Sine Bell Shift

Aufnahmeparameter	
F ₂ (^1H) Acquisition Time (AQ)	~170 ms
F ₁ (^{13}C) Acquisition Time (AQ)	~9 ms
Interscan Delay (D1)	1 s
Prozessierungsparameter	
F ₂ (^1H)	GM GB = 0,001 LB = -1
F ₁ (^{13}C)	QSINE SSB = 2

9.24 Synthese von CA

Die Synthese von CA wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Svenja Heizmann durchgeführt.

Regeneration des BER

- Befüllen einer leeren SPE-Kartusche mit etwas Glaswolle
- Zugabe von ca. 1 g Anionenaustauscherharz
- Zugabe von 0,5 M NaBH₄-Lösung
- Nach 20 min BER mit bidest. H₂O waschen (2 x 20 ml)
- Waschen des BER mit Ethanol (96 %) (3 x 3 ml)

Reduktion des Coniferylaldehyds zu CA

- Waschen des BER mit Methanol (2 x 6 ml)
- Überführen des BER mit Spatel und Pinzette in 50 ml Rundkolben
- Zugabe von 200 mg Coniferylaldehyd und 8 ml Methanol
- Rühren des Gemisches für 60 min bei Raumtemperatur
- BER in Trichter über Glaswolle abfiltrieren, Nachspülen mit ca. 5 ml Methanol
- Einengen des Filtrats unter vermindertem Druck bis zur Trockene
- Lösen des Rückstands in ca. 5 ml Methanol
- Reinigung des CA mittels präparativer HPLC (Tab. 42)
- Vereinigen der CA-Fractionen und Eindampfen der Lösung im Evaporator
- CA wird in Form weißer Kristalle gewonnen (Ausbeute: 68 %, Reinheit: 97 %)
- Bestimmung der Reinheit mittels LC-DAD-MS (Tab. 43)

Tab. 42: HPLC-Parameter zur Aufreinigung von Coniferylalkohol. CA = Coniferylalkohol

Anlage	HPLC-UV-System (präparativ)	Gradient	
		t _R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 15 mm	20	0
Säulentemperatur	Raumtemperatur	25	0
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in ACN	27	80
	B: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	32	100
Flussrate	8 ml/min	35	100
Art der Probe	CA-Lösung nach der Synthese		
Injektionslösung	Methanol		
Injektionsvolumen	1,5 ml		
Detektion	UV, λ = 280 nm		

Tab. 43: LC-DAD-MS-Parameter zur Analyse der Coniferylalkohol-Lösung. CA = Coniferylalkohol

Anlage	HPLC-DAD-MS-System	Gradient	
		t _R (min)	% B
Säule	Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å; 250 x 4,6 mm	0	20
Säulentemperatur	Raumtemperatur	20	100
Eluenten	A: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O	25	100
	B: 0,1 % Ameisensäure in ACN	27	20
Flussrate	0,5 ml/min	32	0
Art der Probe	CA-Lösung		
Injektionslösung	Methanol		
Injektionsvolumen	20 µl		
Detektion	DAD, λ = 280 nm		
	MS (ESI, Negativ-Modus)		

9.25 Vorversuche zur Bildung von DHP

Die Vorversuche zur Bildung von DHP wurden in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

DHP-Synthese mittels des Dialysemembranverfahrens in H₂O (ohne Mykotoxin)

- Konditionierung des Dialyseschlauchs in H₂O für 30 min
- Vorlegen von ca. 5 ml H₂O in den Dialyseschlauch und Zugabe von $5,55 \times 10^{-5}$ mol CA
- Verschließen des Dialyseschlauchs und Positionierung in einem 100 ml Becherglas
- Zugabe von ca. 60 ml H₂O (Dialyseschlauch muss vollständig bedeckt sein)
- Zugabe von 1 mg HRP und $5,55 \times 10^{-5}$ mol H₂O₂
- Rühren der Probe für 48 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
- Wiederholte Zugabe von HRP- und H₂O₂ nach 6 h und 22 h
- Entfernen des äußeren Reaktionsmediums am Rotationsverdampfer bei 45 °C Wasserbadtemperatur
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

DHP-Synthese mittels des Zutropfverfahrens in H₂O (ohne Mykotoxin)

- Vorlegen von ca. 5 ml H₂O in einen 250 ml Rundkolben
- Zugabe von 1 mg HRP und $5,55 \times 10^{-5}$ mol H₂O₂
- Lösen von $5,55 \times 10^{-5}$ mol CA in ca. 144 ml H₂O
- Zutropfen der CA-Lösung in Rundkolben mittels Pumpe (Flussrate: 50 µl/min)
- Rühren der Probe für 48 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
- Wiederholte Zugabe von HRP- und H₂O₂ nach 6 h und 22 h
- Entfernen von H₂O am Rotationsverdampfer bei 45 °C Wasserbadtemperatur
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

9.26 Pilotversuch zur Bildung eines DHP mit CA und ZEN

Der Pilotversuch zur Bildung eines DHP wurde in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

- Konditionierung des Dialyseschlauchs in H₂O für 30 min
- Vorlegen von ca. 5 ml wässrigen Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) in den Dialyseschlauch und Zugabe von $5,55 \times 10^{-5}$ mol CA und $5,55 \times 10^{-5}$ mol ZEN (in DMSO gelöst)
- Zugabe von $5,55 \times 10^{-5}$ mol H₂O₂ in den Dialyseschlauch
- Verschließen des Dialyseschlauchs und Positionierung in einem 100 ml Becherglas
- Zugabe von ca. 60 ml wässrigen Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) (Dialyseschlauch muss vollständig bedeckt sein)
- Zugabe von 1 mg HRP in die äußere Lösung
- Rühren der Probe für 48 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
- Zentrifugieren des äußeren Reaktionsmediums, Abnahme des Überstands
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

9.27 Peroxidase-Aktivitätstest

Die Peroxidase-Aktivitätstests wurden in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

- Zugabe von 50 μl 500 mM Guajacol-Lösung (in Ethanol) und 10 μl 30 mg/l HRP-Lösung zu dem Reaktionsmedium (Tab. 44) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen

Tab. 44: Reaktionsmedien, die im HRP-Aktivitätstest eingesetzt wurden

Wasser	<i>iso</i> -Propanol + Wasser (40/60, v/v)	<i>iso</i> -Propanol + Wasser (30/70, v/v)
Puffer	Methanol + Wasser (40,60, v/v)	Methanol + Wasser (30/70, v/v)
	Ethanol + Wasser (40,60, v/v)	Ethanol + Wasser (30/70, v/v)
	1,4-Dioxan + Wasser (40,60, v/v)	
	Aceton + Wasser (40,60, v/v)	
	Acetonitril + Wasser (40,60, v/v)	

- Homogenisieren auf Vortexmischer (1 min)
- Überführen von 1 ml der Lösung in eine Plastikkuvette
- Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl 250 mM H_2O_2 -Lösung
- Messung mittels UV/Vis-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 470 nm

HRP-Stabilisierung durch Ausbildung von inversen Mizellen

- Überführen von 300 μl Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) und 5 μl 60 mg/l HRP-Lösung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Zugabe von 5 ml 100 mM AOT-Lösung
- Homogenisieren für einige Sekunden im Vortexmischer
- Zugabe von 200 μl 500 mM Guajacol-Lösung (in *iso*-Octan), Warten für 5 min
- Überführen von 1 ml der Lösung in eine Plastikkuvette
- Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl 250 mM H_2O_2 -Lösung
- Messung mittels UV/Vis-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 470 nm

Langzeitversuch der HRP-Aktivität in Methanol:H₂O

- Überführen von 5 ml Methanol-H₂O-Lösung (30:70, v/v) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Zugabe von 50 μl 500 mM Guajacol-Lösung (in Ethanol) und 10 μl 30 mg/l HRP-Lösung
- Homogenisieren auf Vortexmischer (1 min)
- Überführen von 1 ml der Lösung in eine Plastikkuvette, 24 h warten
- Start der Reaktion durch Zugabe von 2 μl 250 mM H_2O_2 -Lösung
- Messung mittels UV/Vis-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 470 nm

9.28 Umsetzung der Mykotoxine und CA mit H₂O₂

Die Umsetzung der Mykotoxine und CA mit H₂O₂ wurde in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

- Einwaage von jeweils 1 mg Mykotoxin bzw. CA in ein 1,5 ml Vial
- Zugabe von 1,4 ml H₂O / *iso*-Propanol-Gemisch (50:50, v/v)
- Zugabe einer geeigneten Menge H₂O₂ (Stoffmengenverhältnis Probe:H₂O₂ = 2:1)
- Rühren der Probe für 24 h bei Raumtemperatur
- Eindampfen des Reaktionsmediums im Evaporator
- Messung mittels LC-DAD-MS (Tab. 25 und Tab. 42)
- Eindampfen der Lösung
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

9.29 Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH durch nukleophile Additionsreaktionen

Die Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH durch nukleophile Additionsreaktionen wurde in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

- Lösen von synthetisierten DHPs (aus Versuchen in Kapitel 9.25) in jeweils 3 ml 1,4-Dioxan-H₂O-Lösung (96:4, v/v)
- Zugabe von $2,78 \times 10^{-5}$ mol Mykotoxin
- Rühren der Probe für 48 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
- 1,4-Dioxan unter Stickstoff entfernen
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

9.30 Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH

Die Untersuchung der Ligninbindung von ZEN und AOH wurde in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

- Versuchsaufbau s. Abb. 48
- Konditionieren des Dialyseschlauchs für 30 min in einer Methanol-H₂O-Lösung (30:70, v/v)
- Vorlegen von ca. 5 ml Methanol-H₂O-Lösung (30:70, v/v) in den Dialyseschlauch und Zugabe von $2,78 \times 10^{-5}$ mol (Verhältnis 1:1) bzw. $2,78 \times 10^{-4}$ mol (Verhältnis 10:1) CA und $2,78 \times 10^{-5}$ mol Mykotoxin
- Verschließen des Dialyseschlauchs und Positionierung in einem 100 ml Becherglas
- Zugabe von ca. 60 ml Methanol-H₂O-Lösung (30:70, v/v) in das Becherglas (Dialyseschlauch muss vollständig bedeckt sein)
- Zugabe von 5 mg HRP in die Lösung im Becherglas
- Vorlegen von $5,55 \times 10^{-5}$ mol H₂O₂ in 100 ml Spitzkolben
- Zugabe von 72 ml Methanol-H₂O-Lösung in den Spitzkolben (30:70, v/v)
- Zutropfen der H₂O₂-Lösung mittels Pumpe in das Becherglas mit dem Dialyseschlauch (Flussrate: 50 µl/min)
- Rühren der Probe für 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
- Entfernen des äußeren Reaktionsmediums am Rotationsverdampfer bei 45 °C Wasserbadtemperatur
- Messung mittels eines NMR-Spektrometers (Kapitel 9.31)

9.31 NMR-spektroskopische Untersuchung der Ligninversuche

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Ligninversuche wurden in Zusammenarbeit mit Svenja Heizmann im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

Vorbereitung der Proben für die NMR-Analyse

- Gefriertrocknen der Probe
- Aufnahme der Rückstände in 500 µl DMSO- d_6 / Pyridin- d_5 (4:1)
- Homogenisieren der Probe und Behandlung im Ultraschallbad für 1–5 h
- Messung mittels NMR-Spektroskopie (HSQC, HMBC)

Messung mittels eines NMR-Spektrometers

- Referenzierung mittels DMSO (δ ^1H 2,50 ppm / δ ^{13}C 39,50 ppm)
- Für die NMR-Messungen wurde das Standard HSQC-Pulsprogramm „hsqcetgpcsp2.2“ (adiabatische Pulse) von Bruker unter Verwendung der in Tab. 45 angegebenen Parametern verwendet

Tab. 45: Spezifische Parameter zur 2D-NMR Messung der Rückstände aus den Ligninversuchen in DMSO- d_6 /Pyridin- d_5 (4:1). Die Anzahl der Scans war abhängig von der Probenmenge. HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence, GM = Gaussian Multiplication, QSINE = Quadratic Sine Window Function, GB = Gaussian Broadening Factor, LB = Exponential Broadening Factor, SSB = Sine Bell Shift

Aufnahmeparameter	HSQC	HMBC
F ₂ (^1H) Acquisition Time (AQ)	~170 ms	~240–300 ms
F ₁ (^{13}C) Acquisition Time (AQ)	~9 ms	~9 ms
Interscan Delay (D1)	1 s	1 s
Long-Range Coupling Delay (D6)		80 ms
Prozessierungsparameter	HSQC	HMBC
F ₂ (^1H)	GM GB = 0,001 LB = -1	GM GB = 0,1–0,5 LB = -30
F ₁ (^{13}C)	QSINE SSB = 2	QSINE SSB = 0

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tab. 46: Kalibrierdaten zur semiquantitativen Bestimmung von AOH, AME, ZEN und deren löslichen Konjugaten.
R² = Bestimmtheitsmaß

Substanz	λ (nm)	Kalibrierbereich	Regression	Kalibriergleichung	R ²
AOH	254	1–5 μ M	linear	$y = 89507,9 x - 24690,8$	0,98150
	254	5–85 μ M	linear	$y = 75001,295 x + 49314,525$	0,99932
AME	254	1–5 μ M	linear	$y = 91408,5 x - 13139,5$	0,98346
	254	5–85 μ M	linear	$y = 74698,98 x + 159932,9$	0,99701
ZEN	280	5–85 μ M	linear	$y = 20611,715 x + 37751,025$	0,99808
	239	3–85 μ M	linear	$y = 40193,16583 x + 44283,8038$	0,99898

Tab. 47: ¹H and ¹³C-NMR-Daten von AME, 3-O-(6'-O-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME und 3-O-(4'-O-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AME

	AME			AME-6'-Malonyl-3-Glucosid			AME-4'-Malonyl-3-Glucosid		
	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_C (ppm)
1			138,3			138,1			138,5
2	6,73	d (2,3)	117,4	6,96	d (1,8)	117,7	7,01	d (2,5)	118,0
3			158,3			157,2			157,7
3-OH	10,39	s							
4	6,65	d (2,3)	101,3	6,98	d (1,8)	102,3	7,03	d (2,5)	102,2
4a			152,5			152,1			152,2
6			nd			nd			nd
6a			98,5			98,5			99,0
7			164,0			163,9			164,2
7-OH	11,83	s		11,80			11,81	s	
8	6,63	d (1,9)	98,9	6,68	d (1,1)	99,5	6,71	d (2,1)	99,6
9			165,9			165,7			166,1
10	7,23	d (1,9)	103,2	7,30	d (1,1)	103,9	7,32	d (2,1)	103,9
10a			138,3			138,1			138,5
10b			108,6			110,8			111,3
11	2,74	s	24,8	2,80		24,8	2,81		24,8
12	3,91	s	55,6	3,93		41,2	3,93		55,7
1'				5,10	d (7,3)	99,3	5,17	d (7,8)	99,3
2'				3,29		72,8	3,37		72,8
3'				3,32		76,0	3,76		74,0
4'				3,20		69,4	4,68		71,4
5'				3,75		73,5	3,55		73,5
6'				4,37 & 4,12		63,9	3,57 & 3,35		59,8
Mal-CH ₂				3,39		41,2	3,42		41,5
Mal-COOR						166,7			166,3
Mal-COOH				nd		167,3	nd		168,2

Tab. 48: ^1H und ^{13}C -NMR-Daten von AOH-3,9-Disulfat, AOH-9-Sulfat, AOH-3-Sulfat und AME-3-Sulfat

	AOH-3,9-Disulfat			AOH-9-Sulfat			AOH-3-Sulfat			AME-3-Sulfat		
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2	7,06	d (2,6)	120,6	6,73	d (2,6)	117,4	7,06	d (2,5)	120,7	7,08	d (2,6)	120,6
4	7,17	d (2,6)	105,8	6,66	d (2,6)	101,3	7,14	d (2,5)	106,0	7,17	d (2,6)	105,9
8	6,89	d (2,1)	104,8	6,82	d (2,0)	104,1	6,43	d (1,9)	101,3	6,70	d (2,2)	99,6
10	7,74	d (2,1)	107,5	7,69	d (2,0)	106,8	7,33	d (1,9)	104,9	7,33	d (2,2)	103,9
11	2,75	s	24,7	2,71	s	24,7	2,76	s	24,9	2,80	s	24,7
12										3,93	s	55,6

Tab. 49: ^1H und ^{13}C -NMR-Daten von AOH, AOH-3-O-Sulfat-9-O- β -D-Glucosid, AOH-9-O-Sulfat-3-O- β -D-Glucosid, AME und AME-3-O-Sulfat-7-O- β -D-Glucosid

	AOH			AOH-3-O-Sulfat-9-O- β -D-Glucosid			AOH-9-O-Sulfat-3-O- β -D-Glucosid			AME			AME-3-O-Sulfat-7-O- β -D-Glucosid		
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1			138,1			137,6			137,2			138,3			136,9
2	6,72	d (2,3)	117,3	7,08	d (2,6)	120,7	6,98	d (2,7)	117,9	6,73	d (2,3)	117,4	7,01	d (2,6)	120,0
3			158,3			154,2			157,3			158,3			153,3
4	6,64	d (2,3)	101,4	7,17	d (2,6)	105,9	7	d (2,7)	102,2	6,65	d (2,3)	101,3	7,06	d (2,6)	105,3
4a			152,5			151,1			151,9			152,5			nd
6			164,0			nd			nd			nd			nd
6a			97,2			100,0			99,9			98,5			103,8
7			164,4			163,6			163,0			164,0			161,5
8	6,37	d (1,6)	100,6	6,71	d (2,1)	102,1	6,88	d (2,0)	104,7	6,63	d (1,9)	98,9	7,03	d (2,2)	101,9
9			165,3			163,9			160,7			165,9			164,3
10	7,25	d (1,6)	104,1	7,48	d (2,1)	104,6	7,75	d (2,0)	107,4	7,23	d (1,9)	103,2	7,44	d (2,2)	104,8
10a			138,1			139,0			137,9			138,3			nd
10b			108,8			111,8			111,0			108,6			111,5
11	2,71	s	25,0	2,82	s	24,7	2,77	s	24,7	2,74	s	24,8	2,8	s	24,5
12										3,91	s	55,6	3,95	s	55,4
1'				5,15	d (7,3)	99,6	5,03	d (7,4)	99,7				5,05	d (7,8)	101,5
2'				3,31		72,9	3,27		72,9				3,42		73,1
3'				3,33		76,0	3,29		76,2				3,32		76,0
4'				3,18		69,3	3,18		69,4				3,18		69,6
5'				3,44		77,2	3,44		76,9				3,45		77,3
6'				3,47 & 3,72		60,4	3,47 & 3,72		60,3				3,47 & 3,73		60,6

Tab. 50: ^1H and ^{13}C -NMR-Daten von ZEN, 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN, 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN, 16-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN und 14-*O*-(6'-*O*-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)ZEN

	ZEN			ZEN-16-Glucosid			ZEN-14-Glucosid			ZEN-6'-Malonyl-16-Glucosid			ZEN-6'-Malonyl-14-Glucosid		
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1			169,0			166,8			168,3			167,1			167,8
2	1,27	d (6,2)	19,8	1,25	d (6,3)	19,3	1,27	d (6,1)	19,6	1,25	d (6,4)	19,4	1,26	d (6,2)	19,5
3	4,99	m	71,6	5,13	m	70,5	5,06	m	71,4	5,11	m	70,7	5,08	m	71,0
4	1,49 & 1,60	m	33,9	1,46 & 1,64	m	34,0	1,51 & 1,64	m	34,1	1,46 & 1,63	m	34,1	1,50 & 1,65	m	34,0
5	1,58 & 1,67	m	20,7	1,43 & 1,64	m	20,4	1,51 & 1,74	m	20,7	1,44 & 1,68	m	20,5	1,57 & 1,76	m	20,8
6	2,39 & 2,46	m	36,0	2,16 & 2,42	m	43,06	2,28 & 2,30	m	42,8	2,16 & 2,42	m	43,1	2,26 & 2,32	m	42,9
7			211,0			210,4			212,0			211,0			212,0
8	2,18 & 2,38	m	42,6	2,17 & 2,55	m	36,7	2,38 & 2,44	m	36,4	2,17 & 2,56	m	36,8	2,32 & 2,50	m	36,3
9	1,64 & 1,72	m	20,3	1,50 & 1,87	m	20,9	1,64 & 1,71	m	20,7	1,47 & 1,87	m	20,9	1,49 & 1,65	m	20,5
10	2,11	m	30,4	1,89 & 2,26	m	30,6	2,03 & 2,17	m	30,7	1,89 & 2,26	m	30,7	1,99 & 2,21	m	30,6
11	5,79	m	131,7	5,99	ddd (15,7 & 9,8 & 4,2)	132,5	6,00	m	132,8	5,99	ddd (15,7 & 9,7 & 4,3)	132,0	6,01	ddd (15,5 & 9,1 & 6,0)	132,5
12	6,59	d (15,5)	130,5	6,13	d (15,7)	127,6	6,44	d (14,8)	129,3	6,12	d (15,7)	127,8	6,37	d (15,5)	129,1
13	6,37	d (2,2)	105,5	6,58	d (1,8)	104,0	6,68	d (2,1)	104,8	6,53	d (1,6)	104,4	6,61	d (1,6)	104,0
14			160,3			159,0			159,6			160,2			158,9
14-OH	10,03	s		9,84	s					8,13	s				
15	6,22	d (2,2)	101,3	6,48	d (1,8)	100,9	6,45	d (2,1)	102,4	6,59	d (1,6)	101,3	6,49	d (1,6)	102,3
16			169,0			154,7			159,2			155,6			157,3
16-OH	10,86	s					10,61	s					10,61	s	
17			105,6			115,0			111,4			115,0			112,6
18			139,6			135,7			138,3			135,9			137,3
1'				4,81	d (7,5)	99,7	4,89	d (7,6)	99,8	4,75	d (7,0)	100,5	4,90	d (6,9)	99,7
2'				3,13		73,2	3,20		72,9	3,15		73,4	3,23		72,8
3'				3,23		76,7	3,27		76,3	3,26		76,9	3,29		75,9
4'				3,16		69,2	3,14		69,4	3,11		70,0	3,15		69,5
5'				3,26		76,8	3,33		76,9	3,56		74,0	3,64		73,5
6'				3,67 & 3,48		60,3	3,45 & 3,68		60,4	3,97 & 4,47		63,6	4,06 & 4,39		63,8
Mal-CH₂										3,25		42,9	3,30		41,4
Mal-COOR												167,5			166,7
Mal-COOH										nd		168,8	nd		167,7

Tab. 51: Vergleich der ^1H and ^{13}C -NMR-Daten von 16-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN und 14-*O*- β -D-Glucopyranosyl-ZEN mit den Literaturdaten von Borzekowski *et al.* (2018). Alle Messungen wurden in DMSO- d_6 durchgeführt

	ZEN-16-Glucosid			ZEN-16-Glucosid (Borzekowski <i>et al.</i> , 2018)		ZEN-14-Glucosid			ZEN-14-Glucosid (Borzekowski <i>et al.</i> , 2018)	
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1			166,8		166,8			168,3		168,3
2	1,25	d (6,3)	19,3	1,3	19,4	1,27	d (6,1)	19,6	1,3	19,8
3	5,13	m	70,5	5,1	70,7	5,06	m	71,4	5,1	71,5
4	1,46 & 1,64	m	34,0	1,47, 1,65	34,1	1,51 & 1,64	m	34,1	1,51 & 1,65	34,2
5	1,43 & 1,64	m	20,4	1,47, 1,67	20,5	1,51 & 1,74	m	20,7	1,6	20,9
6	2,16 & 2,42	m	43,06	2,18 & 2,42	43,1	2,28 & 2,30	m	42,8	2,28, 2,31	42,9
7			210,4		210,5			212,0		210,5
8	2,17 & 2,55	m	36,7	2,18 & 2,56	36,9	2,38 & 2,44	m	36,4	2,37 & 2,46	36,5
9	1,50 & 1,87	m	20,9	1,50, 1,89	20,8	1,64 & 1,71	m	20,7	1,67, 1,74	20,9
10	1,89 & 2,26	m	30,6	1,90, 2,26	30,7	2,03 & 2,17	m	30,7	2,03, 2,18	30,9
11	5,99	ddd (15,7 & 9,8 & 4,2)	132,5	6,0	132,5	6,00	m	132,8	6,0	132,8
12	6,13	d (15,7)	127,6	6,2	128,0	6,44	d (14,8)	129,3	6,5	133,4
13	6,58	d (1,8)	104,0	6,6	104,5	6,68	d (2,1)	104,8	6,7	105,0
14			159,0		159,1			159,6		159,7
14-OH	9,84	s								
15	6,48	d (1,8)	100,9	6,5	101,2	6,45	d (2,1)	102,4	6,5	102,6
16			154,7		155,0			159,2		158,5
16-OH						10,61	s			
17			115,0		115,2			111,4		111,5
18			135,7		135,5			138,3		138,3
1'	4,81	d (7,5)	99,7	4,8	100,1	4,89	d (7,6)	99,8	4,9	100,1
2'	3,13		73,2	3,1	73,3	3,20		72,9	3,2	73,1
3'	3,23		76,7	3,3	76,9	3,27		76,3	3,3	76,5
4'	3,16		69,2	3,2	69,5	3,14		69,4	3,2	69,7
5'	3,26		76,8	3,3	77,0	3,33		76,9	3,3	77,1
6'	3,67 & 3,48		60,3	3,5 & 3,7	60,6	3,45 & 3,68		60,4	3,5 & 3,7	60,6

Tab. 52: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung von AOH-Metaboliten, die von Tabak-, Soja- und Weizenzellensuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	$t_{R,XIC}$ (min)		m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	pos	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	neg	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
		pos	neg							Tabak	Soja	Weizen	
AOH-1	8,0	8,0	7,7	583,1658	+	581,1512	+	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	+	+	+	AOH-Dihexosid
AOH-2	-	-	11,1	-	-	743,2040	+	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-3	11,7	11,7	11,7	669,1662	+	667,1516	+	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	+	+	AOH-Malonyldiglucosid
AOH-4	-	-	12,9	-	-	743,2040	+	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-5	-	13,3	-	567,1709	+	-	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	+	-	-	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-6	-	-	13,3	-	-	743,2040	+	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	+	AOH-Trihexosid
AOH-7	14,0	14,0	14,0	583,1658	+	581,1512	+	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	+	+	+	9-O- β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl}AOH
AOH-8	-	-	14,2	-	-	753,1520	+	C ₃₂ H ₃₄ O ₂₁	16	+	-	+	AOH-Dimalonyldiglucosid
AOH-9	14,6	14,6	14,6	-	-	757,1985	+	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	18	+	+	+	unbekannt
AOH-10	-	-	14,8	-	-	743,2040	+	C ₃₂ H ₄₀ O ₂₀	13	+	-	-	AOH-Trihexosid
AOH-11	-	14,8	14,8	567,1709	+	565,1563	+	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-12	-	-	14,9	553,1552	+	551,1407	+	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	12	+	-	+	AOH-Pentosylhexosid
AOH-13	-	15,2	-	567,1709	+	-	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AOH- Desoxyhexosylhexosid
AOH-14	-	-	15,3	-	-	551,1407	+	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	12	-	+	+	AOH-Pentosylhexosid
AOH-15	-	-	15,3	-	-	581,1512	+	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	-	-	+	AOH-Dihexosid
AOH-16	-	-	15,7	-	-	581,1512	+	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	12	-	-	+	AOH-Dihexosid
AOH-17	15,8	15,8	15,8	-	-	757,1985	+	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	18	+	-	+	unbekannt
AOH-18	16,0	16,0	16,0	421,1129	+	419,0984	+	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	11	+	+	+	9-O- β -D-Glucopyranosyl-AOH
AOH-19	16,3	16,4	16,4	421,1129	+	419,0984	+	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	11	+	+	+	3-O- β -D-Glucopyranosyl-AOH
AOH-20	-	16,5	16,5	669,1662	+	667,1516	+	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	-	+	AOH-Malonyldiglucosid
AOH-21	-	-	16,8	-	-	667,1516	+	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	12	+	-	+	AOH- Malonyldiglucosid
AOH-22	17,1	17,1	17,2	507,1133	+	505,0988	+	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	9-O-(6'-O-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-23	17,5	17,6	17,5	507,1133	+	505,0988	+	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	3-O-(6'-O-Malonyl- β -D-Glucopyranosyl)AOH
AOH-24	17,9	17,9	17,9	507,1133	+	505,0988	+	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	13	+	+	+	AOH-Malonylhexosid
AOH-25	18,5	18,5	18,5	463,1235	+	461,1090	+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	12	+	+	-	AOH-Acetylhexosid
AOH-26	18,7	18,7	18,7	463,1235	+	461,1090	+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	12	+	+	-	AOH- Acetylhexosid
AOH	22,3	22,3	22,3	259,0601	+	257,0456	+	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	10	+	+	+	AOH

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

Tab. 53: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung von AME-Metaboliten, die von Tabak-, Soja- und Weizenzellensuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	$t_{R,XIC}$ (min)		m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	pos	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	neg	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
		pos	neg							Tabak	Soja	Weizen	
AME-1	-	12,3	12,3	-	-	757,2197	+	C ₃₃ H ₄₂ O ₂₀	13	+	-	-	AME-Trihexosid
AME-2	-	13,4	13,3	683,1818	+	681,1673	+	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₈	14	+	-	-	AME-Malonyldihexosid
AME-3	-	14,0	14,0	-	-	757,2197	+	C ₃₃ H ₄₂ O ₂₀	13	+	-	-	AME-Trihexosid
AME-4	-	-	14,3	477,1392	+	-	-	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	12	+	+	-	AME-Acetylhexosid
AME-5	14,4	14,5	14,4	597,1814	+	595,1669	+	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	12	+	-	-	AME-Dihexosid
AME-6	-	14,7	14,7	769,1822	+	767,1677	+	C ₃₃ H ₃₆ O ₂₁	16	+	-	-	AME-Dimalonyldihexosid
AME-7	16,8	16,9	16,4	435,1286	+	433,1141	+	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	11	+	+	+	7-O-β-D-Glucopyranosyl-AME
AME-8	-	17,4	-	567,1709	+	-	-	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	12	-	-	+	AME-Pentosylhexosid
AME-9	17,5	17,6	-	769,1822	+	-	-	C ₃₃ H ₃₆ O ₂₁	16	+	+	-	AME-Dimalonyldihexosid
AME-10	-	17,8	-	581,1865	+	-	-	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	12	-	-	+	AME-Desoxyhexosylhexosid
AME-11	17,8	17,9	17,8	683,1818	+	681,1673	+	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₈	14	+	-	+	AME-Malonyldihexosid
AME-12	19,0	19,1	19,1	435,1286	+	433,1141	+	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	11	+	+	+	3-O-β-D-Glucopyranosyl-AME
AME-13	20,1	20,2	20,1	521,1290	+	519,1144	+	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	+	3-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME
AME-14	20,5	20,5	-	521,1290	+	-	-	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	-	AME-Malonylhexosid
AME-15	20,7	20,8	20,7	521,1290	+	519,1144	+	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	+	3-O-(4'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)AME
AME-16	21,1	21,1	-	521,1290	+	-	-	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	13	+	+	-	AME-Malonylhexosid
AME-17	21,8	-	21,8	477,1392	+	-	-	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	12	+	+	+	AME-Acetylhexosid
AME	27,0	27,1	27,1	273,0758	+	271,0612	+	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10	+	+	+	AME

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

Tab. 54: HRMS-basierte Strukturcharakterisierung von ZEN-Metaboliten, die von Tabak-, Soja- und Weizenzellensuspensionskulturen gebildet wurden. Die grau hinterlegten Zeilen beinhalten die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Metaboliten. t_R = Retentionszeit, DBÄ = Doppelbindungsäquivalente, HRMS = hochauflösende Massenspektrometrie

Analyt	$t_{R,DAD}$ (min)	$t_{R,XIC}$ (min)		m/z [M+H] ⁺ (Da) ¹	pos	m/z [M-H] ⁻ (Da) ¹	neg	Summen- formel	DBÄ	Auftreten (HRMS)			vermuteter Metabolit
		pos	neg							Tabak	Soja	Weizen	
ZEN-1	-	-	20,7	-	-	643,2608	+	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₅	9	+	-	-	ZEL-Dihexosid
ZEN-2	-	-	22,2	-	-	643,2608	+	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₅	9	+	-	+	ZEL-Dihexosid
ZEN-3	-	23,9	23,9	805,3125	+	803,2980	+	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	+	-	-	ZEN-Trihexosid
ZEN-4	24,5	24,5	24,5	483,2225	+	481,2080	+	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	+	+	ZEL-Hexosid
ZEN-5	-	25,4	25,4	729,2601	+	727,2455	+	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₈	12	+	-	+	ZEN-Malonyldihexosid
ZEN-6	25,4	25,4	25,4	483,2225	+	481,2080	+	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	+	+	ZEL-Hexosid
ZEN-7	26,3	26,4	26,4	643,2597	+	641,2451	+	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	+	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-8	-	-	26,8	-	-	613,2502	+	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₄	9	-	-	+	ZEL-Pentosylhexosid
ZEN-9	-	-	27,0	-	-	803,2980	+	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	-	-	+	ZEN-Trihexosid
ZEN-10	-	-	27,1	-	-	627,2659	+	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₄	9	-	-	+	ZEL-Desoxyhexosylhexosid
ZEN-11	-	27,8	27,8	613,2491	+	611,2346	+	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₄	10	+	-	+	ZEN-Pentosylhexosid
ZEN-12	27,8	27,9	27,8	569,2229	+	567,2083	+	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-13	-	-	28,1	-	-	803,2980	+	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₀	11	-	-	+	ZEN-Trihexosid
ZEN-14	-	28,2	28,2	-	-	567,2083	+	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	-	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-15	-	-	29,0	-	-	641,2451	+	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	-	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-16	30,4	30,5	30,5	481,2069	+	479,1923	+	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	9	+	+	+	16-O-β-D-Glucopyranosyl-ZEN
ZEN-17	31,2	31,3	31,3	569,2229	+	567,2083	+	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-18	-	-	31,7	-	-	481,2080	+	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	8	+	-	+	ZEL-Hexosid
ZEN-19	-	32,1	32,2	627,2648	+	625,2502	+	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₄	10	-	-	+	ZEN-Desoxyhexosylhexosid
ZEN-20	-	-	32,2	-	-	611,2346	+	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₄	10	+	-	+	ZEN-Pentosylhexosid
ZEN-21	32,2	-	32,4	-	-	641,2451	+	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₅	10	-	-	+	ZEN-Dihexosid
ZEN-22	32,4	32,4	32,4	567,2072	+	565,1927	+	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃	11	+	+	+	16-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN
ZEN-23	33,3	33,3	33,3	-	-	567,2083	+	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃	10	+	+	+	ZEL-Malonylhexosid
ZEN-24	33,9	33,9	33,9	481,2069	+	479,1923	+	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	9	+	+	+	14-O-β-D-Glucopyranosyl-ZEN
ZEN-25	-	34,0	34,0	729,2601	+	727,2455	+	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₈	12	-	-	+	ZEN-Malonyldihexosid
ZEN-26	35,5	35,5	35,6	567,2072	+	567,2083	+	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃	11	+	+	+	14-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN
ZEN-27	-	-	36,3	-	-	521,2029	+	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	10	+	+	+	ZEN-Acetylhexosid
ZEN	41,2	41,2	41,2	319,1540	+	317,1395	+	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	8	+	+	+	ZEN

¹ Akkurate Massen (m/z) mit Massenabweichungen ≤ 8 ppm (MS).

10.2 Abbildungen

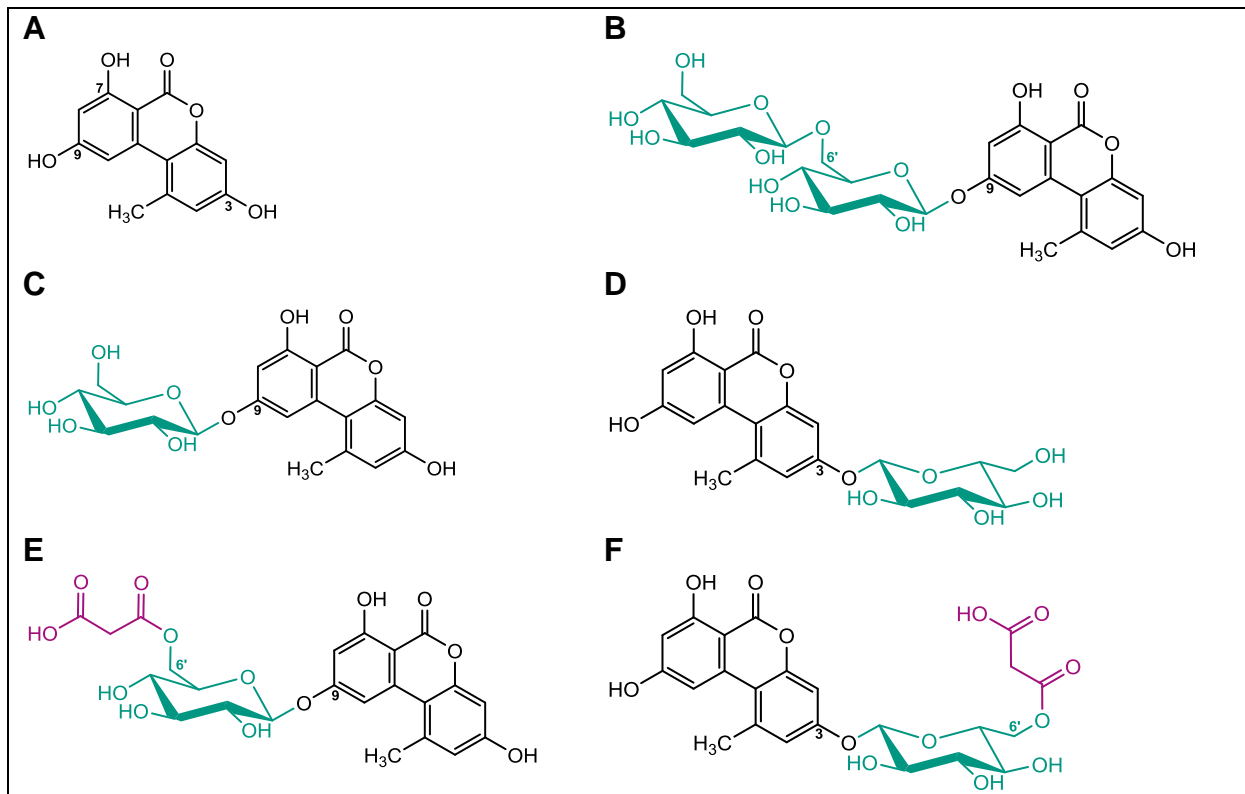


Abb. 53: Strukturen der mittels NMR identifizierte pflanzlichen AOH-Metaboliten; A: Alternariol (AOH), B: 9-O-β-D-Glucopyranosyl(1→6)-β-D-Glucopyranosyl-AOH, C: 9-O-β-D-Glucopyranosyl-AOH, D: 3-O-β-D-Glucopyranosyl-AOH, E: 9-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)-AOH, F: 3-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)-AOH.

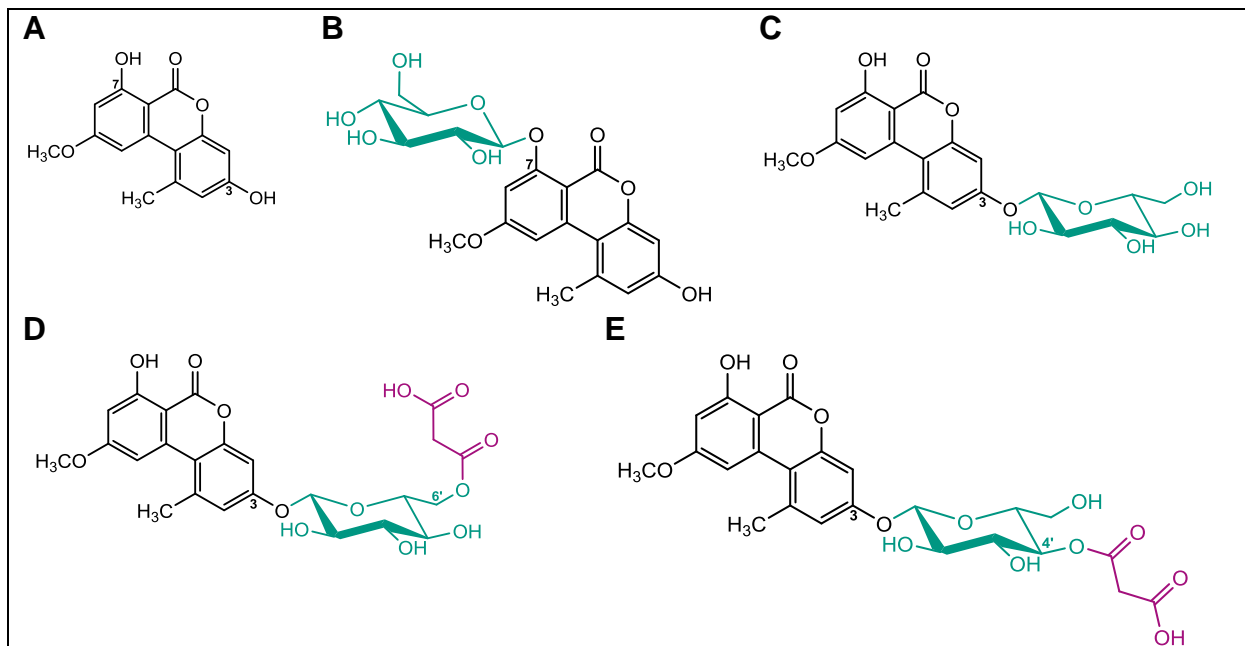


Abb. 54: Strukturen der mittels NMR identifizierte pflanzlichen AME-Metaboliten; A: Alternariol-9-O-Monomethylether (AME), B: 7-O-β-D-Glucopyranosyl-AME, C: 3-O-β-D-Glucopyranosyl-AME, D: 3-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)-AME, E: 3-O-(4'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)-AME.

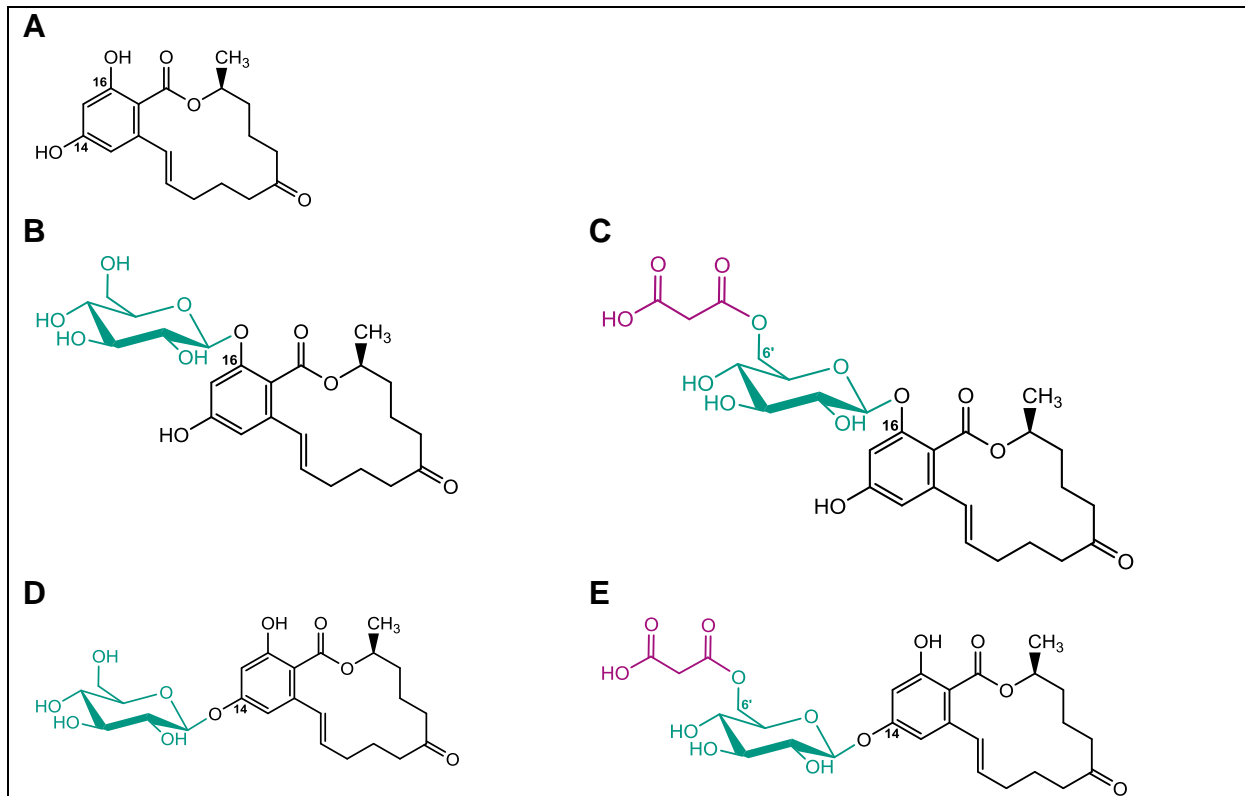


Abb. 55: Strukturen der mittels NMR identifizierten pflanzlichen ZEN-Metaboliten; A: Zearalenon (ZEN), B: 16-O-β-D-Glucopyranosyl-ZEN, C: 16-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN, D: 14-O-β-D-Glucopyranosyl-ZEN, E: 14-O-(6'-O-Malonyl-β-D-Glucopyranosyl)ZEN.

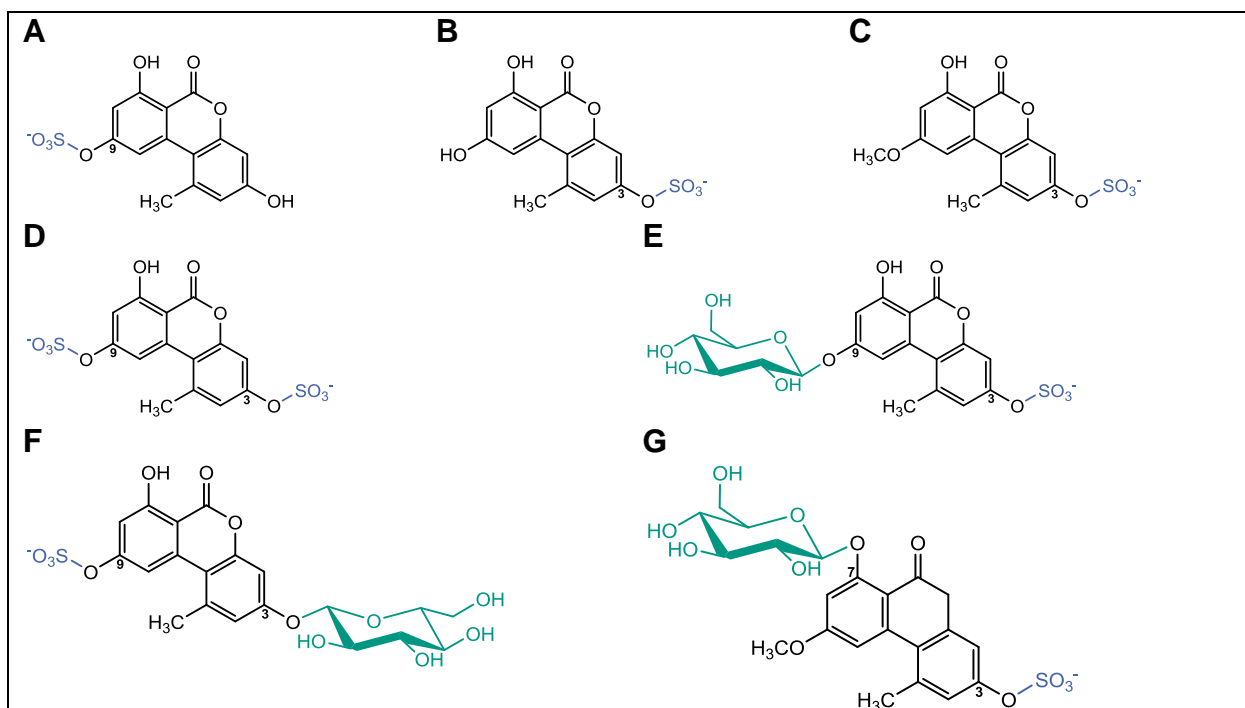


Abb. 56: Strukturen der mittels NMR identifizierten löslichen Konjugate aus Pilz und Pflanze; A: Alternariol-9-Sulfat, B: Alternariol-3-Sulfat, C: Alternariol-9-O-Monomethylether-3-Sulfat, D: Alternariol-3,9-Disulfat, E: Alternariol-3-Sulfat-9-Glucosid, F: Alternariol-9-Sulfat-3-Glucosid, G: Alternariol-9-O-Monomethylether-3-Sulfat-7-Glucosid.

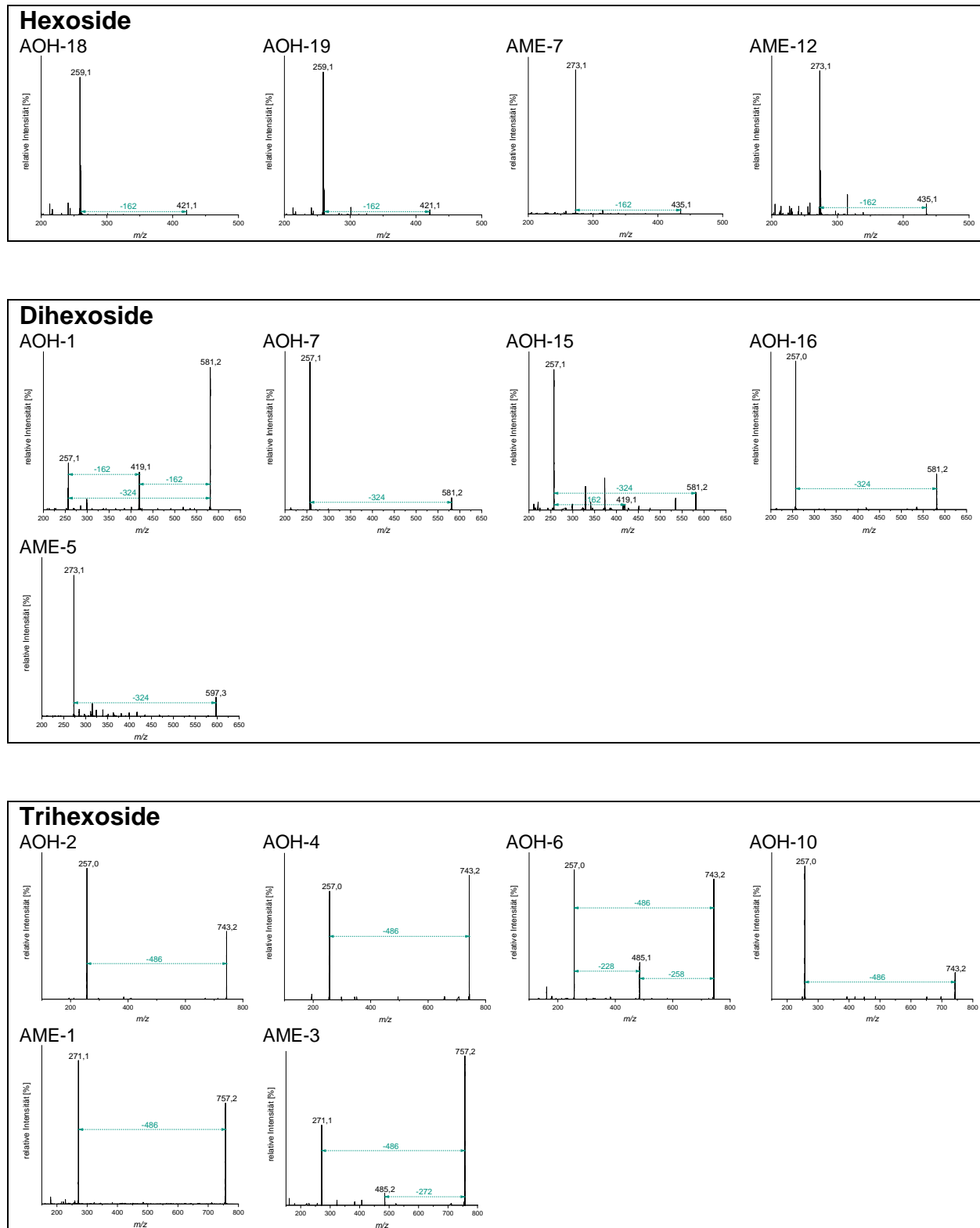


Abb. 57: MS²-Spektren der AOH- und AME-Hexoside, -Dihexoside und -Trihexoside aus der HRMS-Analyse. Weitere Informationen zu den Abkürzungen (AOH-x bzw. AME-x) sind den Tab. 52 und Tab. 53 zu entnehmen.

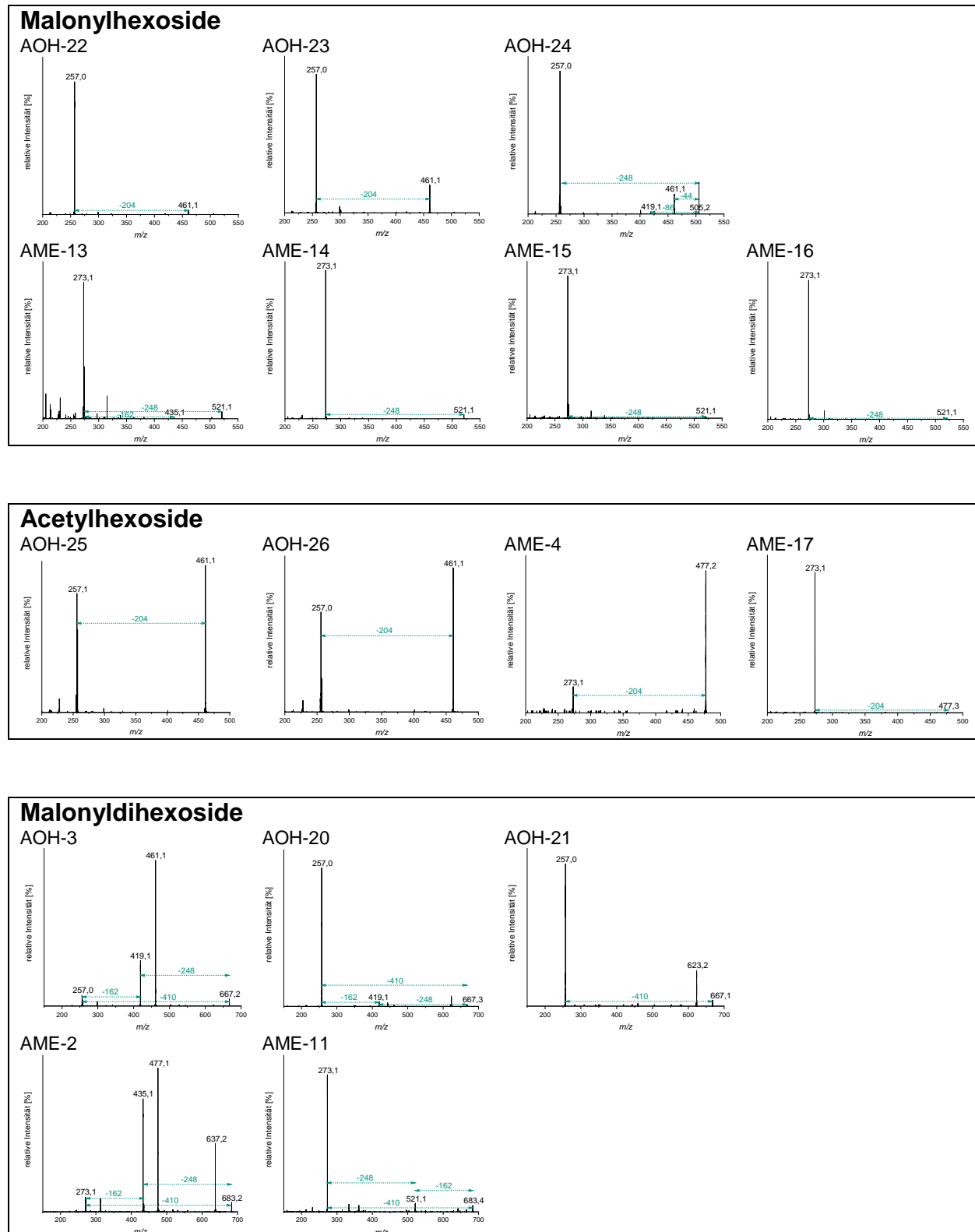


Abb. 58: MS²-Spektren der AOH- und AME-Malonylhexoside, -Acetylhexoside und -Malonyldihexoside aus der HRMS-Analyse. Weitere Informationen zu den Abkürzungen (AOH-x bzw. AME-x) sind den Tab. 52 und Tab. 53 zu entnehmen.

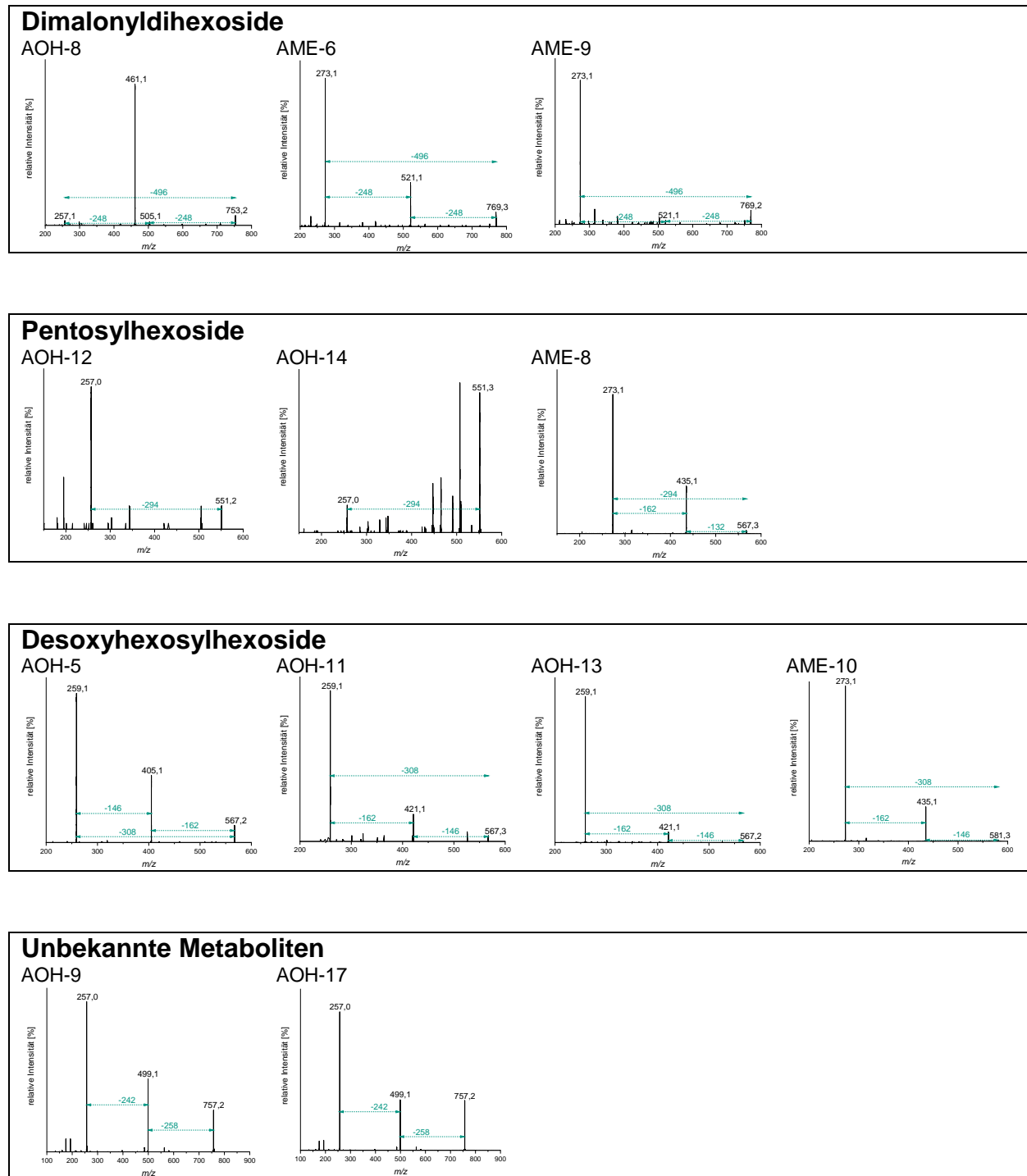


Abb. 59: MS²-Spektren der AOH- und AME-Dimalonyldihexoside, -Pentosylhexoside, -Desoxyhexosylhexoside und den unbekannt Metaboliten aus der HRMS-Analyse. Weitere Informationen zu den Abkürzungen (AOH-x bzw. AME-x) sind den Tab. 52 und Tab. 53 zu entnehmen.

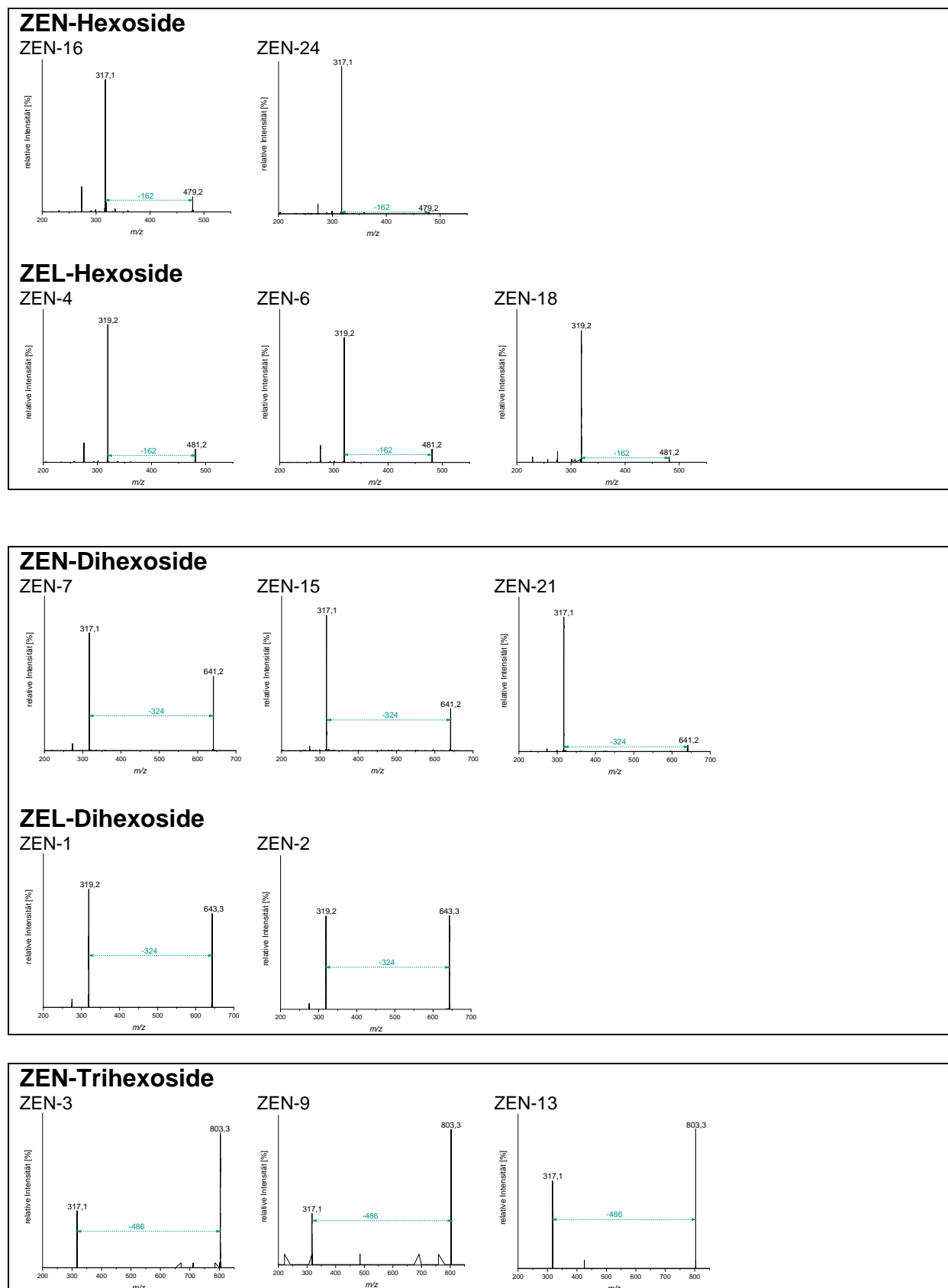


Abb. 60: MS²-Spektren der ZEN- und ZEL-Hexoside, -Dihexoside und -Trihexoside aus der HRMS-Analyse. Weitere Informationen zu den Abkürzungen (ZEN-x) sind der Tab. 54 zu entnehmen.

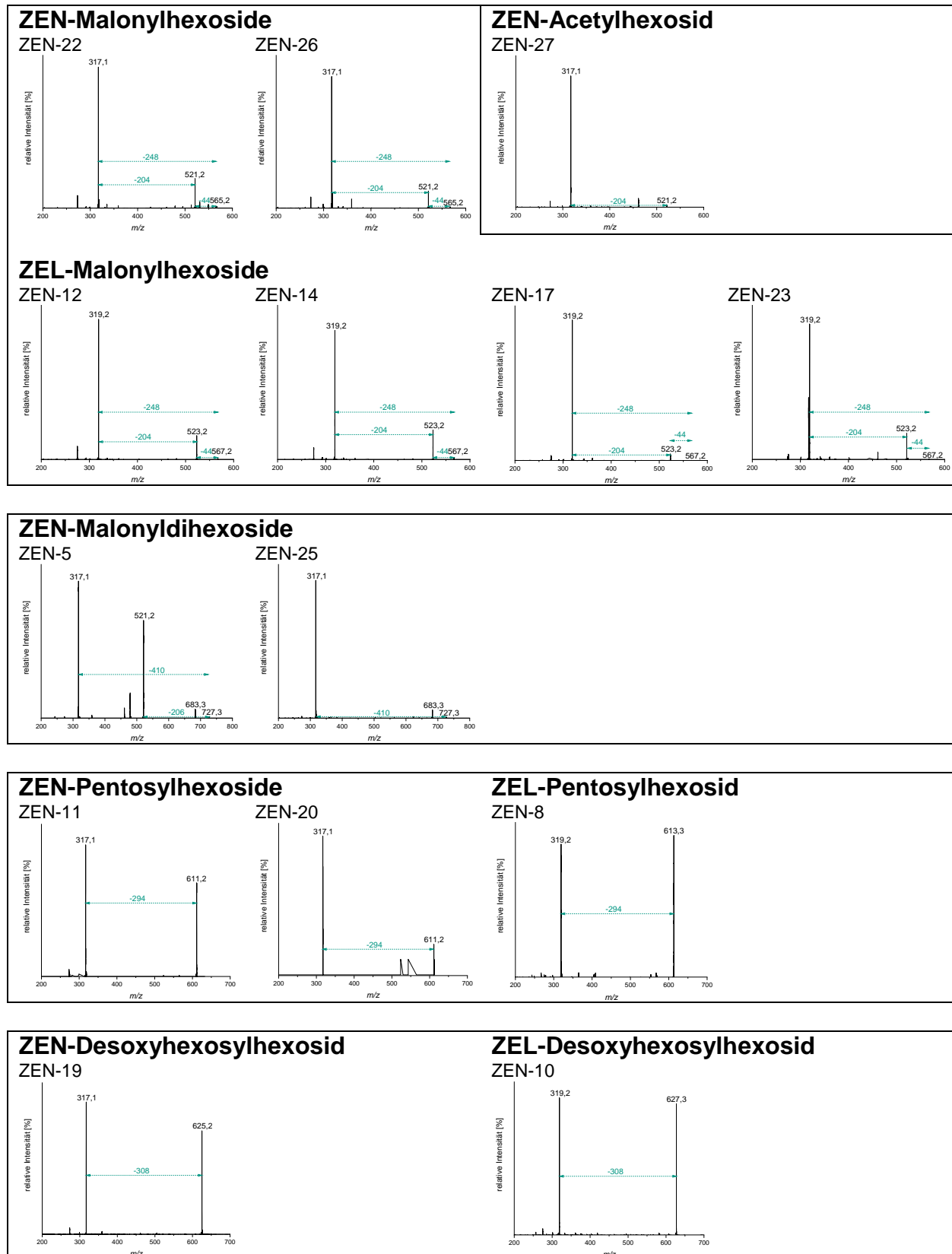


Abb. 61: MS²-Spektren der ZEN- und ZEL-Malonylhexoside, -Malonyldihexoside, -Acetylhexoside, Pentosylhexoside und Desoxyhexosylhexoside aus der HRMS-Analyse. Weitere Informationen zu den Abkürzungen (ZEN-x) sind der Tab. 54 zu entnehmen.

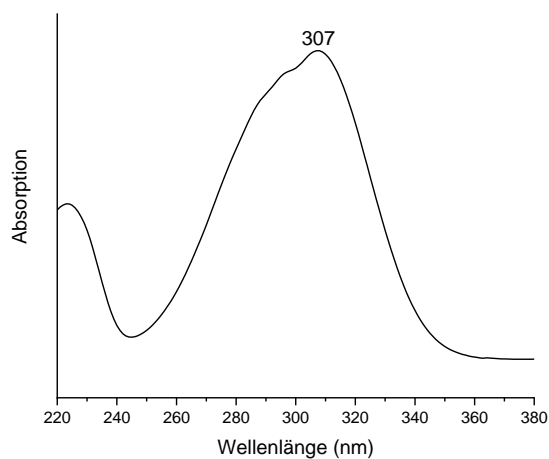


Abb. 62: UV-Spektrum von *p*-Cumarsäure.

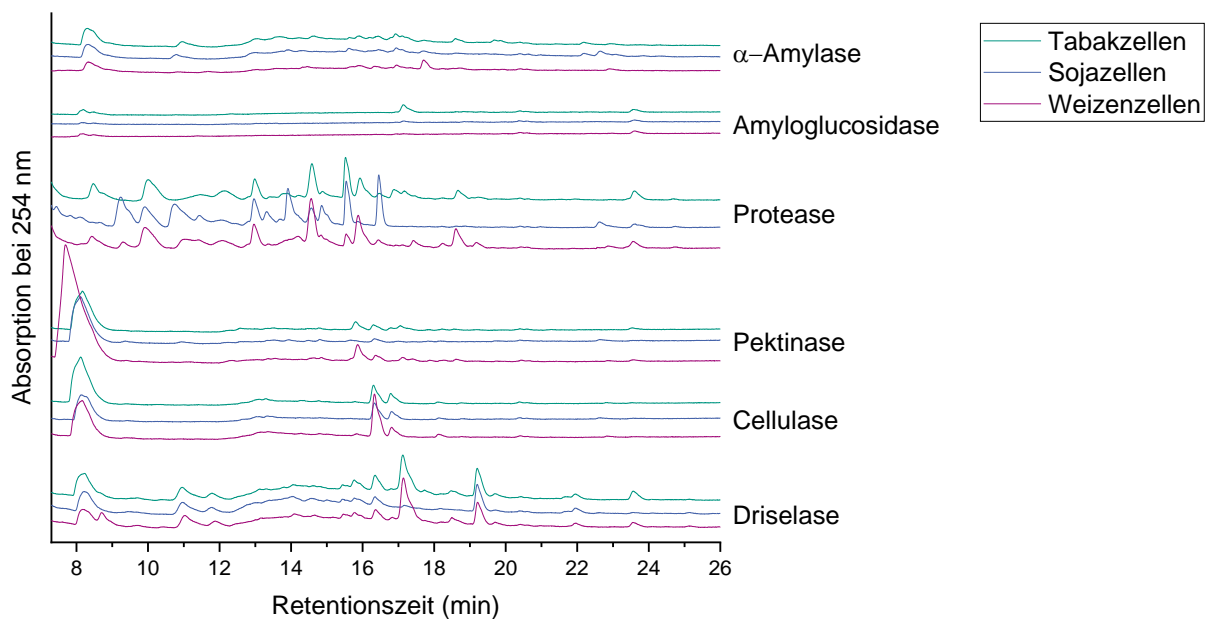


Abb. 63: Darstellung der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von AOH inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittelextraktion) mit α -Amylase, Amyloglucosidase, Protease, Pektinase Macerozyme R-10, Cellulase Onozuka R-10 und Driselase (Detektion: UV-Absorption bei 254 nm).

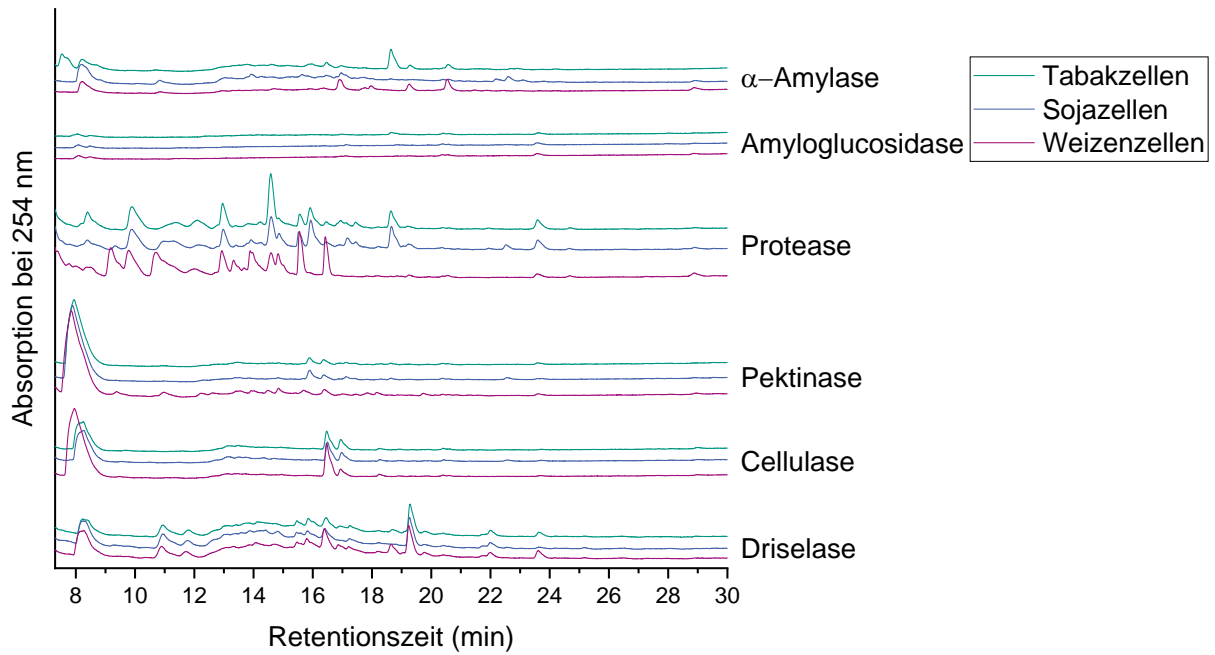


Abb. 64: Darstellung der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von AME inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittlextraktion) mit α -Amylase, Amyloglucosidase, Protease, Pektinase Macerozyme R-10, Cellulase Onozuka R-10 und Driselase (Detektion: UV-Absorption bei 254 nm).

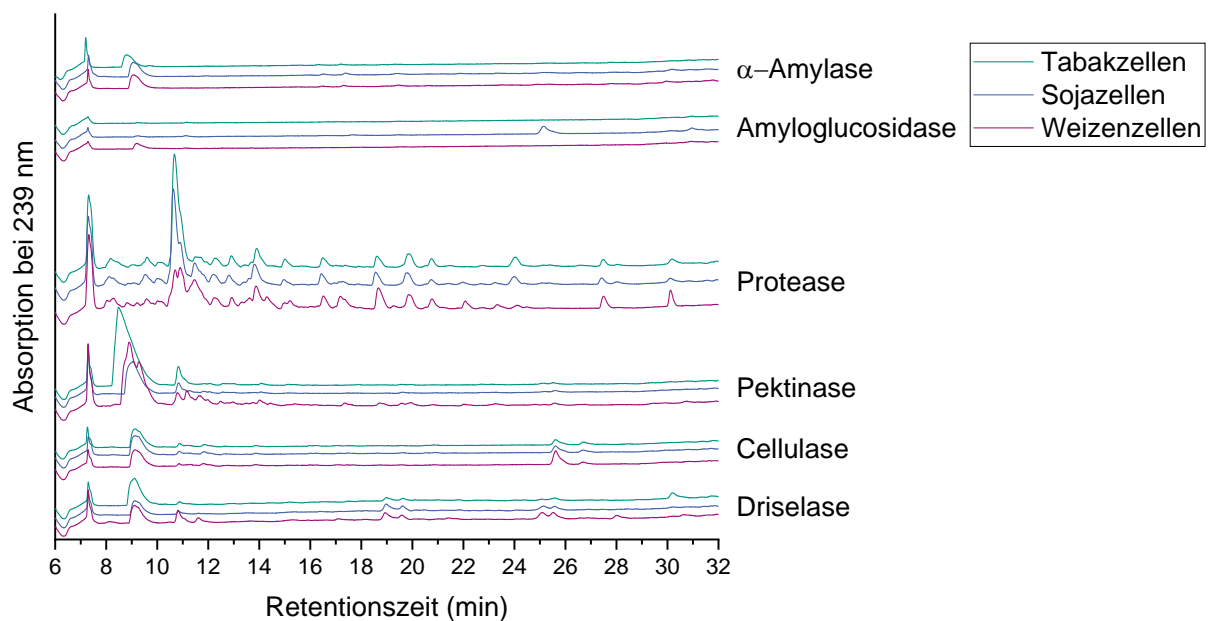


Abb. 65: Darstellung der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von ZEN inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittlextraktion) mit α -Amylase, Amyloglucosidase, Protease, Pektinase Macerozyme R-10, Cellulase Onozuka R-10 und Driselase (Detektion: UV-Absorption bei 239 nm).

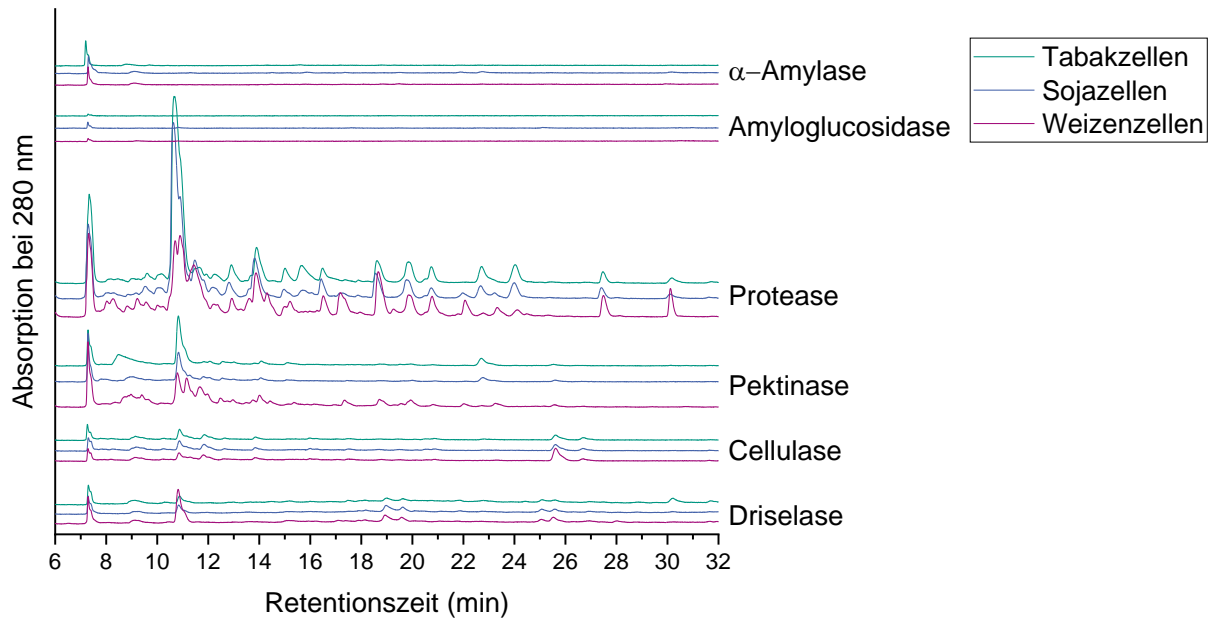


Abb. 66: Darstellung der flüssigchromatographischen Trennung der SPE-Eluate nach enzymatischem Verdau der in Gegenwart von ZEN inkubierten Tabak-, Soja- und Weizenzellen (Einsatz der Zellrückstände nach Lösungsmittlextraktion) mit α -Amylase, Amyloglucosidase, Protease, Pektinase Macerozyme R-10, Cellulase Onozuka R-10 und Driselase (Detektion: UV-Absorption bei 280 nm).

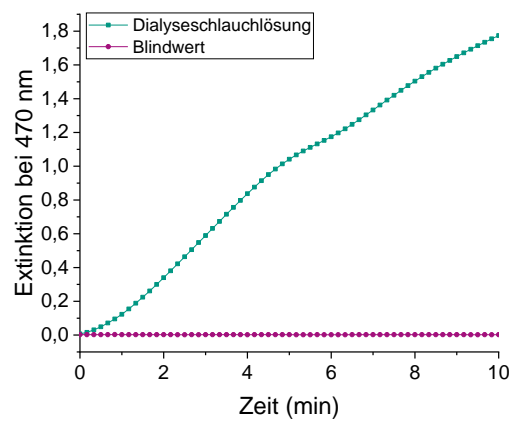


Abb. 67: Gemessene Absorption bei 470 nm nach Versetzen der Dialyseschlauchlösung mit Guajacol und H_2O_2 . Die Messung erfolgte nach einer Stunde Reaktionszeit.

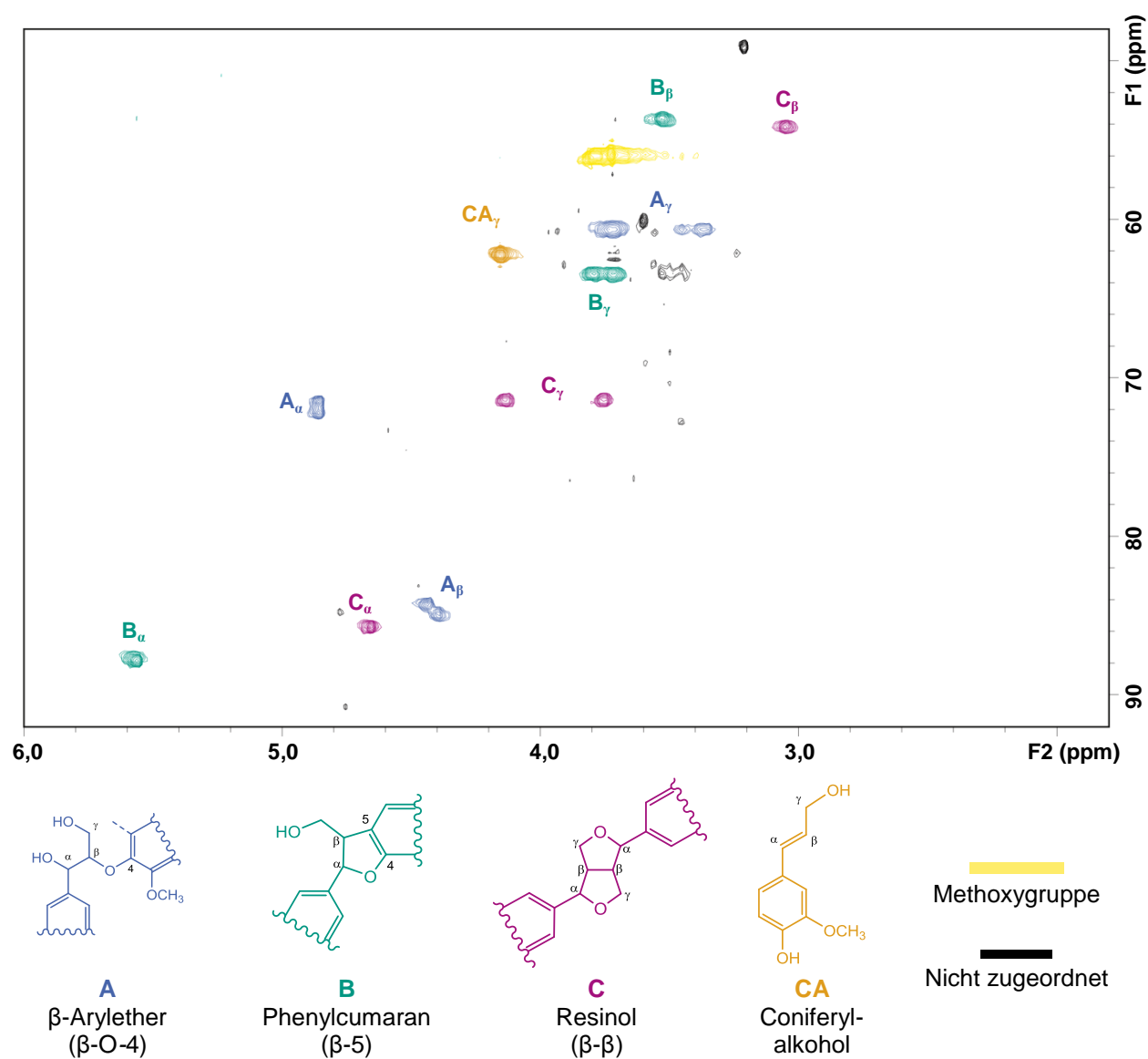


Abb. 68: HSQC-Spektrum der Seitenkettenregion von DHP, das im Dialyseschlauch vorlag. Die Zuordnung der Bindungstypen erfolgte anhand von Literaturdaten (Ralph *et al.*, 2004).

11 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Hildebrand, A.A., Kohn, B.N., Pfeiffer, E., Wefers, D., Metzler, M., Bunzel M., 2015. Conjugation of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4728-4736.

Soukup, S.T., Kohn, B.N., Pfeiffer, E., Geisen, R., Metzler, M., Bunzel, M., Kulling, S.E., 2016. Sulfoglucosides as novel modified forms of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8892-8901.

Vorträge auf Fachtagungen

Kohn, B.N., Soukup, S.T., Pfeiffer, E., Geisen, R., Metzler, M., Bunzel, M., Kulling, S.E., Sulfoglucoside als neue Formen modifizierter Mykotoxine. LChG Regionalverbandstagung Südwest, 07.–08.03.2017, Sigmaringen.

Kohn, B.N., Soukup, S.T., Pfeiffer, E., Geisen, R., Metzler, M., Bunzel, M., Kulling, S.E., Sulfoglucosides as novel forms of modified mycotoxins. Mycotoxin Workshop, 19.–21.06.2017, Bydgoszcz, Polen.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Hildebrand, A.A., Kohn, B.N., Pfeiffer, E., Metzler, M., Bunzel, M. Konjugation von *Alternaria*-Toxinen in Tabak-Suspensionszellen. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22.–24.09.2014 in Gießen

Kohn, B.N.; Renner, H.; Hildebrand, A.A.; Pfeiffer, E.; Metzler, M.; Bunzel, M., Phase II-metabolism of alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cell culture in comparison to carrot explant culture. Mycotoxin Workshop, 02.–04.05.2016 in Berlin

Kohn, B.N., Pfeiffer, E., Soukup, S.T., Geisen, R., Kulling, S.E., Bunzel, M., Modifizierte Formen von Alternariol und Alternariolmonomethylether und deren Aufnahme und Metabolismus in humanen Caco-2-Zellen. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 17.–19.09.2014 in Berlin

Kohn, B.N., Pfeiffer, E., Soukup, S.T., Geisen, R., Kulling, S.E., Bunzel, M., Modified forms of alternariol and alternariol monomethyl ether and their resorption and metabolism in human Caco-2-cells. Max Rubner Conference, 08.–10.10.2018 in Karlsruhe

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen besonderen Dank denen aussprechen, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Weise unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Mirko Bunzel, für die Überlassung des interessanten Themas. Dabei ist vor allem seine langjährige und stets gewährte Unterstützung zu betonen. Durch seine fachliche Kompetenz, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Geduld trug er im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit bei. Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Für die finanzielle Unterstützung während der Promotion bedanke ich mich bei der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.

Ein ganz besonderer Dank gilt weiterhin Erika Pfeiffer, die leider viel zu früh von uns gegangen ist. Mit ihrer immerwährenden Begeisterung und Freude an der Wissenschaft trug sie maßgeblich zu meiner Entscheidung zur Promotion bei. Ich bin dankbar für ihre wertvollen Ratschläge bei Problemen aller Art und die vielen guten Gespräche. Ich bin glücklich einen so bewundernswerten, starken Menschen in meinem Leben kennengelernt zu haben.

Für die gute Kooperation, die Durchführung der HRMS-Experimente sowie die Zurverfügungstellung und Kultivierung der *Alternaria*-Stämme geht ein Dank an die Mitarbeiter des Max Rubner-Instituts, insbesondere an Dr. Sebastian Soukup und Dr. Falco Beer sowie an den Arbeitskreis von Prof. Dr. Rolf Geisen.

Im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten bzw. Masterarbeiten unterstützten mich Hannah Renner, Mirjam Epp, Sylvia Dreßler, Svenja Heizmann und Jörg Gottmann. Ich bedanke mich herzlich für ihre gute Zusammenarbeit und ihren zuverlässigen Einsatz.

Herrn Prof. Dr. Manfred Metzler danke ich für jegliche Unterstützung, die er mir im Laufe meiner Promotion gewährt hat.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Bunzel für die wunderbare Arbeitsatmosphäre bedanken; insbesondere bei Dr. Judith Schäfer, Dr. Daniel Wefers, Dr. Martin Waterstraat, Felix Urvat, Andreas Becker, Lea Fels und Susanne Haid. Natürlich geht auch ein besonderes Dankeschön an Rebecca Niemand, Sarah Schoch, Matthias Hufnagel, Nadin Wedler und Dorothee Ott sowie allen anderen Mitgliedern des AK Hartwig. Dank ihnen konnte ich den Blick immer wieder nach vorne richten und in den vielen gemeinsamen außeruniversitären Aktivitäten Kraft tanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden aus der Schulzeit und Studienfreunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und Verständnis zeigten, wenn ich mal keine Zeit für sie hatte.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in jeder Lebenslage bedingungslos unterstützt, mich auf meinem Weg begleitet und mir Mut zugesprochen haben, wenn es nötig war. Insbesondere bedanke ich mich auch bei meinem Freund Dominik Appel, der mich mit Liebe, Verständnis und Geduld während den letzten drei Jahren begleitete.

*„Man muss das Unmögliche versuchen,
um das Mögliche zu erreichen.“*

(Hermann Hesse)