

***In vitro* Metabolismus der  
Mykotoxine Alternariol und  
Alternariolmonomethylether**

**Diplomarbeit**

vorgelegt von

**Nils Helge Schebb**

Universität Karlsruhe

Institut für angewandte Biowissenschaften

Abteilung für Lebensmittelchemie und Toxikologie

Arbeitskreis Prof. Dr. Manfred Metzler

November 2005

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Karlsruhe, 11. November 2005

Unterschrift

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2005 bis Oktober 2005 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. Metzler am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Toxikologie der chemischen Fakultät der Universität Karlsruhe angefertigt.

# INHALT

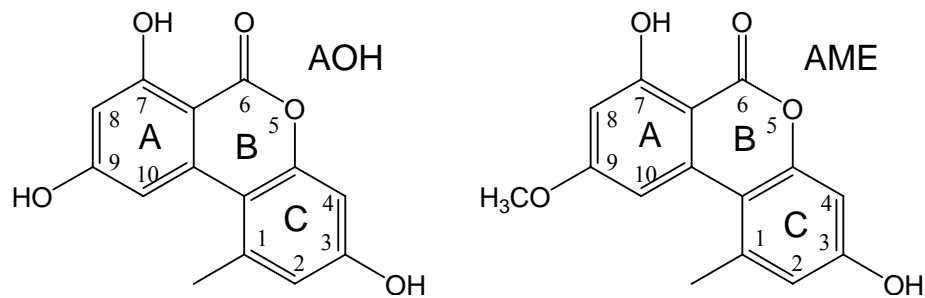
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	ALTERNARIA TOXINE	1
1.2	GEHALTE AN AOH UND AME IN LEBENSMITTELN	3
1.3	TOXIZITÄT VON AOH UND AME	4
1.4	METABOLISMUS VON AOH UND AME	8
1.5	IN VITRO-TESTSYSTEME	10
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>12</b>
3.1	OXIDATIVER METABOLISMUS MIT LEBERMIKROSOMEN	12
3.1.1	<i>Qualitative Betrachtung</i>	12
3.1.2	<i>Zusatz von Antioxidantien</i>	18
3.1.3	<i>Umsetzungen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies</i>	22
3.1.4	<i>Zusammenfassung der oxidativen Umsetzungen</i>	26
3.2	STRUKTURAUFKLÄRUNG DER OXIDATIVEN METABOLITE MIT GC-MS	27
3.2.1	<i>Fragmentierung von AOH und AME</i>	27
3.2.2	<i>Fragmentierung und Strukturaufklärung von M1-M5</i>	30
3.2.3	<i>Fragmentierung und Strukturaufklärung der Metabolite O1-O4</i>	34
3.2.4	<i>Zusammenfassung der Strukturaufklärung</i>	37
3.3	UMSETZUNG DER METABOLITE MIT COMT	38
3.3.1	<i>AME-Metabolite</i>	38
3.3.2	<i>AOH-Metabolite</i>	43
3.3.3	<i>Bestätigung der Identität von synthetischem 4-HO-AME</i>	47
3.3.4	<i>Zusammenfassung und Diskussion der COMT-Umsetzung</i>	48
3.4	MIKROSOMALE KONJUGATION MIT GLUCURONSÄURE	52
3.4.1	<i>Qualitative Betrachtung</i>	52
3.4.2	<i>Quantitative Betrachtung</i>	54
3.4.3	<i>Umsetzung durch einzelne Isoenzyme</i>	56
3.4.4	<i>Zusammenfassung der Glucuronidierung</i>	58
3.5	PRÄZISIONS-GEWEBESCHNITTE	58
3.6	EXKURS: FRAGMENTIERUNGSREAKTIONEN TRIMETHYLSILYLIERTER POLYPHENOLE IM GC-MS	60
3.6.1	<i>Reaktion I</i>	60
3.6.2	<i>Reaktion II</i>	63
3.6.3	<i>Reaktion III</i>	68
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>VERWENDETE METHODEN</b>	<b>76</b>
6.1	MIKROSOMALE UMSETZUNGEN	76
6.1.1	<i>Oxidative Umsetzung</i>	76
6.1.2	<i>Glucuronidierung</i>	77
6.2	UMSETZUNG MIT MEERRETTICH PEROXIDASE	79
6.3	ISOLIERUNG DER OXIDATIVEN METABOLITE	79
6.4	COMT ASSAY	80
6.5	AUFARBEITUNG DER METABOLITE AUS ZELLKULTURMEDIUM	82

6.6	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN.....	84
6.6.1	HPLC-DAD.....	84
6.6.2	HPLC-MS.....	85
6.6.3	GC-MS-(MS).....	86
<b>7</b>	<b>VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN.....</b>	<b>88</b>
7.1	VERWENDETE GERÄTE.....	88
7.2	VERWENDETE MATERIALIEN.....	89
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>99</b>
11.1	MESSDATEN ZU DEN IM TEXT DARGESTELLTEN GRAFIKEN.....	99
11.2	CHROMATOGRAMME.....	102
11.3	RETENTIONSZEITEN DER METHYLIERTEN OXIDATIVEN METABOLITE.....	103
11.4	TABELLEN DER INTENSITÄTEN DER FRAGMENTIENEN.....	104
11.4	SPEKTREN DER OXIDATIVEN METABOLITE.....	106

## 1 Einleitung

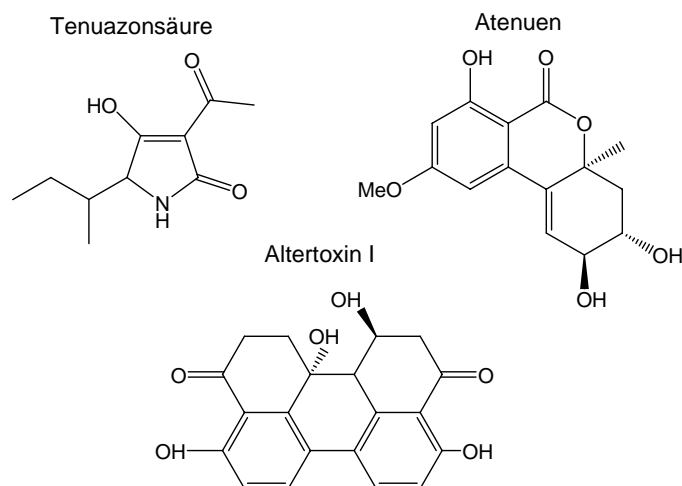
### 1.1 *Alternaria* Toxine

Die Dibenzo- $\alpha$ -Pyron-Derivate Alternariol (3,7,9-trihydroxy-1-methyl-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one, AOH) und Alternariolmonomethylether (3,7-trihydroxy-9-methoxy-1-methyl-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one, AME, Abb1) werden von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria*, insbesondere von *Alternaria Alternata*, gebildet.



**Abb.1** Strukturformel von Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME)

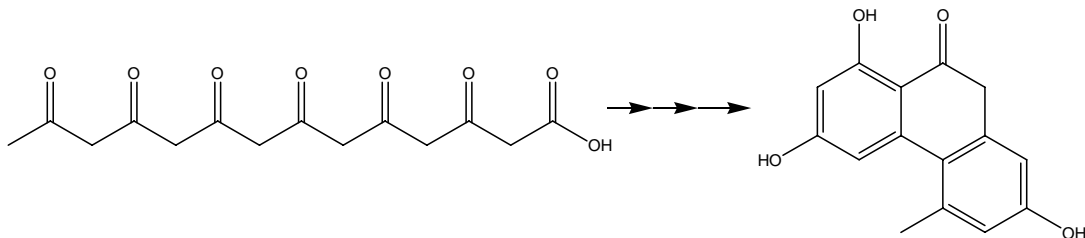
Pilze der Gattung *Alternaria* kommen ubiquitär vor und werden auf biologischen Material aber auch auf Böden, Wänden (Tapeten), Textilien etc. gefunden. Sie können über einen weiten Temperaturbereich von 5-30 °C wachsen und Toxine bilden. Die höchste Produktion an Mykotoxinen durch *A. Alternata* wird bei 28°C und einem  $a_w$ -Wert von 0,98 beschrieben (Hasan et al. (1996), Magan und Cayley, 1984). Die Gattung *Alternaria* umfasst 40–100 Arten (BfR 2003), welche in unterschiedlichem Maße Toxine bilden.



**Abb.2** Strukturformel der *Alternaria*-Toxine Tenuazonsäure, Atenuein und Alternatoxin I

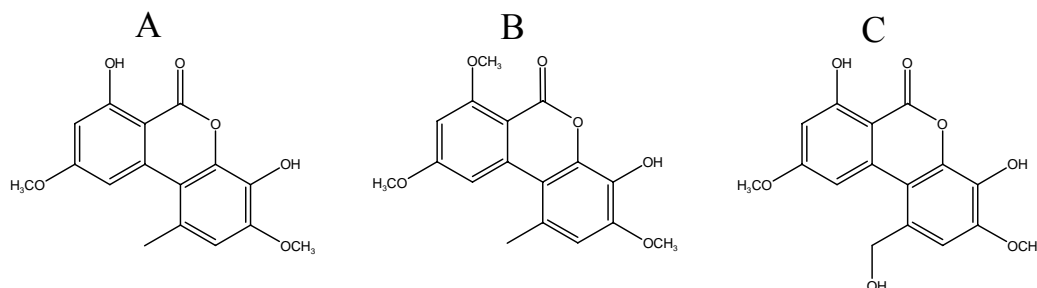
Weit über die Hälfte der *Alternaria* Stämme bildet mehr als ein Mykotoxin (Stinson, 1985). *A. Alternata* ist der am verbreitetsten vorkommende Vertreter der Gattung *Alternaria*. Als Haupttoxine bildet *A. Alternata* neben AOH und AME die Toxine Alternuen, Tenuazonsäure und Altertonin I. (Schrader et al. (2001), Abb. 2). Insgesamt sind mehr als 30 *Alternaria*-Toxine bekannt.

AOH und AME gehören wie die Aflatoxine zur Gruppe der Polyketide, d.h. die Biosynthese erfolgt aus Acetyl-Coenzym-A- bzw. Malonyl-Coenzym-A-Einheiten. Dabei wird Alternariol aus einer Acetyl-Coenzym A- und sechs Malonyl-Coenzym A-Einheiten synthetisiert (Abb.3). AOH stellt die Vorstufe vieler anderer *Alternaria*-Toxine dar - neben Alternuen auch für AME, welches durch Methylierung von AOH gebildet wird (Stinson, 1985).



**Abb.3** Biosynthese von Alternariol aus dem Polyketid 3,5,7,9,11,13- Hexaoxotetradecansäure

Die in Flechten vorkommenden Graphislactone (Tanahashi et al., 1997) sind AOH und AME sehr ähnlich. Insbesondere Graphislacton A (Abb.4) entspricht von seiner Struktur einem hydroxylierten und methylierten AOH. Untersuchungen der Biosynthese mit isotonen-markierten Substraten legen nahe, dass AOH und AME Vorstufen in der Biosynthese der Graphislactone sind. Dementsprechend wird Alternariol auch in der Flechte *Graphis Prunicola* gefunden (Tanahashi et al. (2003).



**Abb.4** Struktur einiger Graphislactone: Graphislacton A (links), Graphislacton B (Mitte) und Graphislacton C (rechts)

Ein weiteres Vorkommen von AME beschreiben Oncha et al. (1994), die AME in der Wurzel der afrikanischen Heilpflanze *Anthocleista Djalonensis* (ca. 30 mg/kg Trockenmasse) gefunden haben. Die Autoren schließen eine Kontamination durch Schimmelpilze aus und benennen AME als Djalonensone.

AOH und AME reagieren in wässriger Lösung leicht sauer. Dies wird auf eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton der Hydroxygruppe in Position 7 und der Ketogruppe zurückgeführt (Molina et al., 1998).

GLA ist ein nahezu vollständig planares Molekül (Gehring, 2005). Aufgrund der übereinstimmenden Dibenz- $\alpha$ -Pyron-Grundstruktur können AOH und AME ebenso als planar betrachtet werden.

## **1.2 Gehalte an AOH und AME in Lebensmitteln**

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der *Alternaria ssp.* können praktisch alle Lebensmittel befallen werden. Ob es zu einem Wachstum und damit zu einer Kontamination kommt, hängt von weiteren Bedingungen wie dem  $a_w$ -Wert, Verletzungen des Pflanzengewebes und der Temperatur ab. Bei Getreide und Saaten tritt die Infektion zumeist vor der Ernte auf, wenn der Gehalt an Feuchtigkeit im Korn noch hoch ist. Zu einer Kontamination durch die sekundären Pilzmetabolite kommt es aber nur, wenn die Trocknung des Getreides auf dem Feld aufgrund ungünstiger Wetterbedingungen nicht ausreichend (schnell) stattfindet. Bei Obst und Gemüse bleibt der Wassergehalt auch nach der Ernte für ein Wachstum von *Alternaria ssp.* hoch genug, so dass die Kontamination auch zu diesem Zeitpunkt stattfinden kann. (Molina et al., 1998; Sauer et al., 1978)

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Berichten über die Kontamination von Lebensmitteln mit *Alternaria*-Toxinen. So berichten beispielsweise Ostry et al. (2005), Müller und Gagern (2005) von Funden in Weizen in Europa, Li und Yoshizawa (2000) von kontaminiertem Weizen in China sowie Ansari und Shrivastava (1990) von belasteter Hirse in Indien. Bei Gemüse und Obst sind viele Funde von *Alternaria*-Toxinen in Tomaten beschrieben, z.B. von Harwig et al. (1979). Aber auch andere Gemüse wie bspw. Karotten (Solfrizzo et al., 2004) können betroffen sein. Ebenso ist der Befall von Obst und daraus hergestellten Produkten bekannt. So berichten Robiglio und Lopez (1995) von



*Alternaria* befallenen Äpfeln und Delgado und Gomez-Cordoves (1998) von kontaminierten Apfelsäften.

Die gefundenen Gehalte an AME und AOH schwanken stark, bewegen sich aber für AOH und AME – sofern die Toxine gefunden werden – in der Größenordnung  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb). Einige Berichte zeigen deutlich höhere Werte, so wurden bspw. in Weizenproben aus China im Mittel jeweils 0,4 mg/kg AOH bzw. AME gefunden (Li und Yoshizawa, 2000).

Die Belastung mit Mykotoxinen von Lebensmitteln bei Befall mit *Alternaria ssp.* ist nicht auf die befallene Stelle begrenzt und auch nach Entfernen des Mycels nachweisbar (Schrader et al., 2001).

Bei der Fermentation von Lebensmitteln können die Gehalte an AOH und AME im Vergleich zu den Ausgangsprodukten sinken (Karlovsky, 1999). Ebenso kann der Verarbeitungsprozess zu einer Verringerung des Gehaltes an AOH und AME führen. Solfrizzo et al. (2005) berichten, dass weniger als zwei Prozent der in Karotten enthaltenen Mykotoxine nach Saftherstellung im Labormaßstab im Karottensaft nachweisbar sind.

Zur Bestimmung der *Alternaria* Toxine – v.a. AOH und AME – in Lebensmitteln gibt es eine Vielzahl von veröffentlichten Methoden. Dabei finden v.a. GC-MS (Kellert et al., 1984; Scott, 1997), HPLC-UV (Solfrizzo et al., 2004), HPLC-Fluoreszenz (Staak et al., 1985) und HPLC-MS (Lau et al., 2003; Nielsen und Smedsgaard, 2003) Anwendung.

### **1.3 Toxizität von AOH und AME**

Interesse an der biologischen Wirkung der *Alternaria*-Toxine ist in den 80er Jahren entstanden als man in einer Region Chinas eine hohe Inzidenz an Speiseröhrenkrebs feststellte. In der gleichen Region wurde auch ein hoher Anteil von mit Schimmelpilzen kontaminiertem Getreide gefunden, wobei *A. Alternata* den Hauptkontaminanten darstellte. Die *Alternaria*-Toxine wurden so mit der Ätiologie von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht (Liu et al., 1991; 1992). Li und Li (1980) berichten, dass in der betroffenen Region (Linxian) 161 Bewohner pro 100.000 Einwohner jährlich an Speiseröhrenkrebs sterben, während es im restlichen China nur 16 Tote waren.

Daneben werden die *Aternaria*-Toxine mit einem Geflügelsterben in den 50er Jahren in Verbindung gebracht (Griffin und Chu, 1983).

Untersuchungen des Extraktes von *Alternaria* ssp. zeigen eine mutagene Wirkung *in vitro*. So berichten Dong et al. (1987) und Liu et al. (1991) von einer mutagenen Wirkung auf V79 Zellen (Hamsterlungenfibroblastenzelllinie). Dabei zeigt der *Alternaria* Stamm 261 im Gegensatz zum Stamm 261-B2-3 erst nach metabolischer Aktivierung der Substanzen (Inkubation mit S-9-Mix) eine Wirkung. Die Autoren entdeckten zudem morphologische Veränderungen von Maus-Fibroblasten (NIH/3T3) nach Inkubation mit dem Extrakt. Werden diese Zellen Nacktmäusen gespritzt, entwickeln diese im subkutanen Gewebe Tumore.

Ebenso zeigt der Extrakt eine mutagene Wirkung auf Prokaryonten, so konnten Schrader et al. (2001) positive Ergebnisse im Ames-Test (*Salmonella* TA97 und TA100) ohne vorherige metabolische Aktivierung beobachten.

Über die akute Toxizität des Extraktes von *Alternaria* ssp. ist wenig bekannt. Sauer et al. (1978) beschreiben eine akuttoxische Wirkung von kontaminiertem Getreide auf Hühner und Ratten. Dabei haben nur die *Alternaria* ssp. negative Wirkung auf die Tiere, die neben AOH, AME und Altenuen auch Tenuaonsäure und Altertoxin I bilden. Pero et al. (1973) berichten von einer akutletale Wirkung des *Alternaria*-Extraktes auf Mäuse ab 300 mg/kg KG.

Die biologische Wirkung des Extraktes ist in vielen Testsystemen höher als die der getesteten Einzelsubstanzen, daher ist unklar, welche Mykotoxine die genannten Effekte hervorrufen (Pero et al., 1973; Schrader et al., 2001). Die bekannten Wirkungen von AOH bzw. AME in Kombination oder als Einzelsubstanzen werden im Folgenden dargestellt.

Die akute Toxizität von AOH und AME ist als gering einzustufen. Erst eine intraperitoneale Dosis von 400 mg/kg KG AOH führt bei drei von zehn Mäusen zum Tode, bei AME stirbt nur eine. Werden AOH und AME zusammen (je 100 mg/kg KG) verabreicht führt dies wiederum bei drei von zehn Mäusen zum Tode (Pero et al., 1973).

Sauer et al. (1978) finden ebenso keine toxischen Effekte auf Ratten und Hühner, nachdem sie 21 Tage Futter bekamen, das bis zu 39 mg/kg AOH und bis zu 24 mg/kg AME enthielt. Auch nach dreiwöchiger oraler Gabe von AME (3,75 mg/kg KG pro Tag) wurden keine toxischen Effekte auf Ratten festgestellt (Pollock und Sabatino, 1982).

Fetotoxische Effekte werden erst bei relativ hohen Konzentrationen beobachtet: AOH zeigt bei einer subkutanen Dosis von 100 mg/kg KG fetotoxische Wirkung in Mäusen, während die gleiche Menge AME keinen signifikanten Effekt zeigt. Es werden allerdings synergistische Effekte zwischen AOH und AME angenommen (Pero et al., 1973). Pollock und Sabatino (1982) fanden eine deutlich fetotoxische Wirkung bei intraperitonealer Gabe von 200 mg/kg KG AME an syrischen Goldhamstern. Keine Effekte werden dagegen bei Dosen von 50 und 100 mg/kg KG beobachtet. Griffin et al. (1983) haben veröffentlicht, dass eine fetotoxische Wirkung von AOH bzw. AME auf Hühnerembryos bei einer Gabe von maximal 1 mg/Ei nicht nachgewiesen werden kann.

AOH und AME werden als zytotoxisch eingestuft, so wird der ID<sub>50</sub>Wert für HeLA Zellen (Gebärmutterhalskrebszelllinie) mit 23 µM für AOH und mit 30-51 µM für AME angegeben. Ebenso zeigen sie eine zytotoxische Wirkung auf Bakterien (*Bacillus mycoides*), wobei starke synergistische Effekte zwischen AOH und AME beobachtet werden. (Pero et al., 1973). Zytotoxische Wirkung auf Krebszelllinien wurden auch kürzlich an unserem Institut beobachtet. Bruger (2005) beobachtet einen Rückgang lebender MOLY-(Mauslymphom)-Zellen um 30 % durch 24 h Inkubation mit 20 µM Alternariol. Bei V79-Zellen führen 24 h Inkubation mit 30 µM AOH zu einem Rückgang der lebenden Zellen auf 30 % im Vergleich zur Kontrolle.

AOH und AME zeigen eine mutagene Wirkung *in vitro*, wobei die Ergebnisse auf Prokaryonten nicht ganz einheitlich sind:

Davis und Stack (1994) beschreiben für AOH und AME keine Wirkung im Ames-Test in den *Salmonella*-Stämmen TA98 und TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung. Hingegen beschreiben Schrader et al. (2001) eine leicht mutagene Wirkung beider Mykotoxine auf TA100 nach metabolischer Aktivierung. Auch Scott und Stoltz (1980) haben eine schwach mutagene Wirkung von AME allerdings auf TA98 und ohne metabolische Aktivierung beobachtet, während AOH keine Wirkung gezeigt hat. Im Gegensatz dazu wirken AME und AOH auf *E.Coli* (ND-160) ohne metabolische Aktivierung deutlich mutagen (Zhen et al., 1991).

Auf eukaryontische Zelllinien wirken AOH und AME unwidersprochen mutagen: Im HPRT-Test zeigt AOH (Bruger, 2005) und AME (Liu et al., 1992) in V79-Zellen ohne metabolische Aktivierung ein positives Ergebnis. AOH wirkt ebenso auf V79-Zellen ohne

metabolische Aktivierung mutagen, wie neueste – bisher unveröffentlichte – Untersuchungen an unserem Institut zeigen (Burger, 2005). Die mutagene Wirkung von AOH konnte Bruger (2005) auch im TK-Test mit MOLY-Zellen bestätigen.

Liu et al. (1992) zeigen, dass AOH und AME die Proliferation von humanfetalem Speiseröhreneptithel auslöst. Neben dieser Hyperplasie werden auch morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Werden die mit AOH behandelten Epithelzellen Nacktmäusen subkutan injiziert, bilden diese Tumore aus. In diesem Zusammenhang wird eine Aktivierung des Onkogenes c-H-ras diskutiert (Liu et al., 1992). Dagegen gehen Dong et al. (1987) von einer Punktmutation im c-H-ras Gen aus und spekulieren, dass dies ein früher Schritt in der Entstehung des Speiseröhrenkarzinoms sein könnte.

Als molekulare Wirkmechanismen für die Mutagenität werden v.a. genotoxische Effekte beschrieben: Liu et al. (1992) zeigen, dass sich AOH und AME an isolierte DNA aus humanfetalen Speiseröhreneptithel binden und dabei ein Bindungsverhältnis von fünf AOH bzw. AME Molekülen pro 1000 Basenpaare auftritt. Die Autoren schlagen aufgrund der Hitzestabilität und des geringen Umfangs der Reaktion bei höheren Salzkonzentrationen eine ionische Bindung vor. Aufgrund der planaren Struktur der Moleküle (s. Kap.1.1) kann zunächst eine Interkalation der Mykotoxine in die DNA angenommen werden. Dieses wird von DiCosmo and Straus (1985) vorgeschlagen. Des Weiteren beschreiben sie, dass AOH – jedoch nicht AME – phototoxisch (320-400 nm) ist, wobei die DNA das Zielmolekül darstellt.

DNA-Schäden durch AOH und AME werden von mehreren Autoren beschrieben. So berichten Liu et al. (1992) über die Induktion von Mikrokernen in Ratten-Erythrocyten *in vivo* durch AME (ab 54 mg/kg KG). Lehmann et al. (2005) zeigen, dass AOH Mikrokernne *in vitro* auslöst. Sie beschreiben eine klastogene Wirkung auf V79- und Ishikawa (Gebärmutterkrebszelllinie)-Zellen nach Inkubation mit mehr als 10 µM AOH. Liu et al. (1992) zeigen ebenso *in vitro* eine strangbrechende Wirkung von AOH (10-30 µM) mittels der alkalischen Filterelution nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten. Dabei ist die Wirkung von AOH zehnmal stärker als die von AME (90-350 µM).

Die biologische Wirkung der Graphis lactone ist so gut wie nicht beschrieben. Für Graphis lacton A (GLA) haben Hormazabal et al. (2005) eine geringe Zytotoxizität (>1 mM)

in MRC-5 (humane Lungenfibroblasten)-Zellen nachgewiesen. Auch lassen ihre Ergebnisse keine antibakterielle bzw. antifungale Wirkung erwarten. Untersuchungen der Wirkung auf die Acetylcholinesterase zeigen eine moderate Wirkung ( $IC_{50}$ : 27  $\mu$ M). Aufgrund der Struktur ist zu erwarten, dass GLA eine Wirkung als Radikalfänger aufweisen, was Song et al. (2005) bestätigen.

#### **1.4 Metabolismus von AOH und AME**

Pollock et al. (1982) untersuchten den Metabolismus von AME *in vivo* bei Ratten. Dazu haben sie die Resorption und Ausscheidung von  $C^{14}$ -markiertem AME nach oraler Gabe in Olivenöl verfolgt:

- 85 % des AME werden über den Feces ausgeschieden. Die Analyse mit Dünnschichtchromatographie (DC) zeigt, dass davon 90 % unverändert als AME, 3 % als stark polare Metabolite und weitere 3 % als AOH vorliegen. Während bei den unveränderten 90 % unklar ist, ob diese resorbiert wurden lässt sich für AOH bzw. die polaren Metabolite/Konjugate eine Exkretion über die Galle vermuten.
- 7 % des AME werden über den Urin ausgeschieden. Davon zeigen 77 % eine höhere Polarität. Von diesen 77 % stellt AOH 7 % und für die restlichen 70 % wird vermutet, dass es sich um Glucuronsäure- oder Glutathionkonjugate handelt.
- Ein beachtlicher Anteil von 2 % wird mit der Atemluft als  $CO_2$  abgegeben. AME wird also ganz oder teilweise katabolisch bis zum  $CO_2$  oxidiert.

Insgesamt werden 94 % der mit  $C^{14}$ -markiertem AME aufgenommenen Menge an radioaktiver Aktivität innerhalb von drei Tagen wieder ausgeschieden. Zusammenfassend konstatieren die Autoren, dass der resorbierte Teil an AME einem intensiven Metabolismus zu (hoch)polaren Metaboliten unterliegt.

Pollock et al. (1982) untersuchten auch den Metabolismus *in vitro*:

Hierzu setzten sie AME oxidativ mit Rattenlebermikrosomen um. Die Analyse des Extraktes nach Dünnschichtchromatographie zeigt neben AOH verschiedene weitere Metabolite, die einen kleineren  $R_f$ -Wert aufweisen. Auch verbleiben einige Metabolite am Startpunkt. Die Struktur dieser polaren Metabolite ist ebenso unbekannt wie jene des *in*

*vivo* Metabolismus und die Autoren regen weitere Untersuchungen zu deren Strukturaufklärung an.

Eine weitere *in vitro* Studie zum Metabolismus von AME haben Olsen und Visconti (1987) durchgeführt. Sie inkubierten AME mit Homogenat aus Mukosa und Leber von weiblichen Schweinen. Dabei zeigt sich eine hohe Glucuronidierungsaktivität beider Gewebekomponenten. Die ermittelte Aktivität des Mucosa-Homogenates ( $65,7 \pm 25,3$  nmol/mg Protein/h) liegt dabei deutlich über der des Lebergewebes ( $5,0 \pm 3,3$  nmol/mg Protein/h). Für den oxidativen Metabolismus beschreiben die Autoren als einziges Produkt AOH und ermitteln für das Leberhomogenat eine Aktivität von  $0,31 \pm 0,26$  nmol/mg Protein/h für die Demethylierung, während es durch das Mukosahomogenat zu keiner Umsetzung kommt.

Andere oxidative Produkte als AOH werden von Olsen und Visconti (1987) ebenso wenig wie Glutathionaddukte gefunden. Damit treten die Autoren bewusst in Widerspruch zu Pollock et al. (1982).

Zusammenfassend wird von (Pollock et al., 1982) eine deutliche Konjugation *in vivo* zu polaren Konjugaten beschrieben und Olsen und Visconti (1987) vermuten aufgrund von *in vitro* Experimenten, dass die Glucuronidierung im Schwein die dominierende Metabolisierungsrouten darstellt. Unklar ist, ob und von welcher Spezies AME zu anderen oxidativen Metaboliten als AOH metabolisiert wird. Hingegen wird die oxidative Demethylierung von AME zu AOH für Ratte und Schwein *in vitro*, für die Ratte auch *in vivo* gefunden.

Der Metabolismus von AOH wurde bisher – so weit bekannt – nicht untersucht.

## 1.5 *In vitro*-Testsysteme

### Mikrosomen

Für die *in vitro*-Untersuchung des oxidativen Metabolismus und Konjugation mit Glucuronsäure dienen Mikrosomen als gängiges Modellsystem. Mikrosomen sind kleine Vesikel bestehend aus zusammengelagerten Membranfragmenten des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese Vesikel bilden sich bei der Homogenisierung von Zellen und können durch Zentrifugation gewonnen werden.

In den Mikrosomen sind verschiedene Enzyme des Fremdstoffmetabolismus lokalisiert. Von besonderer Bedeutung sind die im Phase-I-Metabolismus wichtigen CYP-450-haltigen Monooxygenasen (CYPs) sowie ihre Reduktasen. Auch die Glucuronyltransferasen (UGTs) liegen als membrangebundene Enzyme im ER und somit in den Mikrosomen vor. Beide Enzymsysteme sind nur membrangebunden funktionsfähig. Da Mikrosomen nur Zellfragmente sind, müssen die jeweils benötigten Cosubstrate zugegeben werden. CYPs benötigen als Cosubstrat reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Die UGTs sind auf aktivierte Glucuronsäure, Uridindiphospho- $\beta$ -glucuronsäure, (UDPGA), angewiesen.

Supersomen<sup>®</sup> sind Mikrosomen aus transfizierten Insektenzellen, die jeweils nur eine Isoform der UGTs enthalten. Die Anwendung von Supersomen<sup>®</sup> ermöglicht es, die Aktivität der UGTs für ein Substrat im Einzelnen zu bestimmen.

### Präzisions-Gewebeschnitte

Präzisions-Gewebeschnitte (Precision Cut Tissue Slices, PCTS) sind ein Anfang der 80er Jahre entwickeltes *in vitro*-Modell für Toxikologie- und Biotransformationsstudien. Bei dieser Primärzellkultur kommt eine damals neuartige Kultivierungsmethode, die sogenannte Dynamische Zellkultur, zum Einsatz. Bei den Umsetzungen mit Gewebeschnitten werden die verschiedenartigen Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband belassen, so dass dieses System eine Möglichkeit bietet, der *in vivo*-Situation sehr nahe zu kommen.

## 2 Fragestellung

Das Vorkommen der Mykotoxine AOH und AME wird in einer Vielzahl von Lebensmitteln insbesondere in Getreide und in Gemüse beschrieben. Es muss also befürchtet werden, dass durch Lebensmittel nennenswerte Mengen an AOH und AME aufgenommen werden. Obwohl AOH und AME schon lange bekannt sind und Raistrick et al. bereits 1953 ihre Struktur aufklärten, ist ihr Metabolismus nur wenig untersucht. Um die Toxizität von Xenobiotika wie Mykotoxinen beurteilen zu können, ist aber das Wissen über die metabolischen Veränderungen denen sie nach der Aufnahme in den menschlichen Körper unterworfen sind essentiell. Nur mit diesem Wissen kann das Gesundheitsrisiko durch belastete Lebensmittel beurteilt (risk assessment) und erforderliche Maßnahmen wie die Festlegung einer Höchstmenge eingeleitet werden (risk management).

Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, einen Teil des Metabolismus von AOH und AME aufzuklären. Der erste Schritt besteht in der Untersuchung des oxidativen Metabolismus sowie der Konjugation mit Glucuronsäure. Zu diesem Zweck sollen die Mykotoxine mit Lebermikrosomen von Ratte, Schwein und Mensch umgesetzt werden. Als weiteres *in vitro* Modellsystem werden Umsetzungen mit Gewebeschnitten aus Rattenlebern durchgeführt.

Die Charakterisierung und wenn möglich die Identifizierung der Metabolite durch chromatographische, spektroskopische und spektrometrische Methoden soll den zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden.



### 3 Ergebnisse

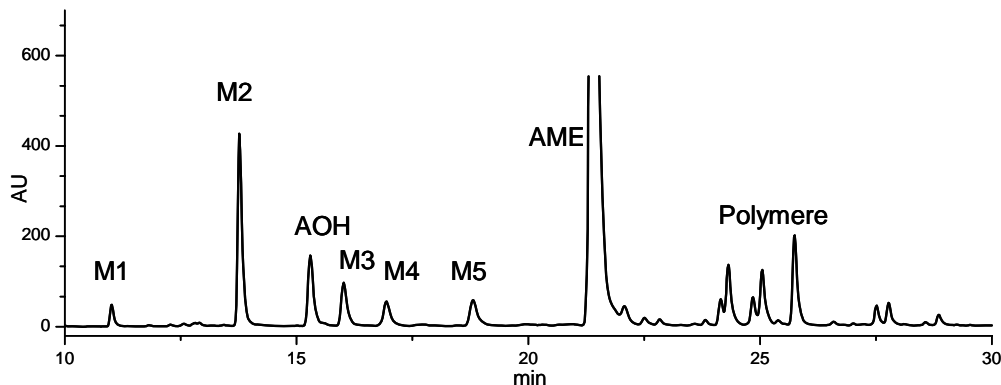
#### 3.1 Oxidativer Metabolismus mit Lebermikrosomen

##### 3.1.1 Qualitative Betrachtung

Der *in vitro* Metabolismus der Mykotoxine Alternariolmonomethylether (AME) und Alternariol (AOH) wird durch Inkubation mit Lebermikrosomen von männlichen Sprague-Dawley Ratten untersucht.

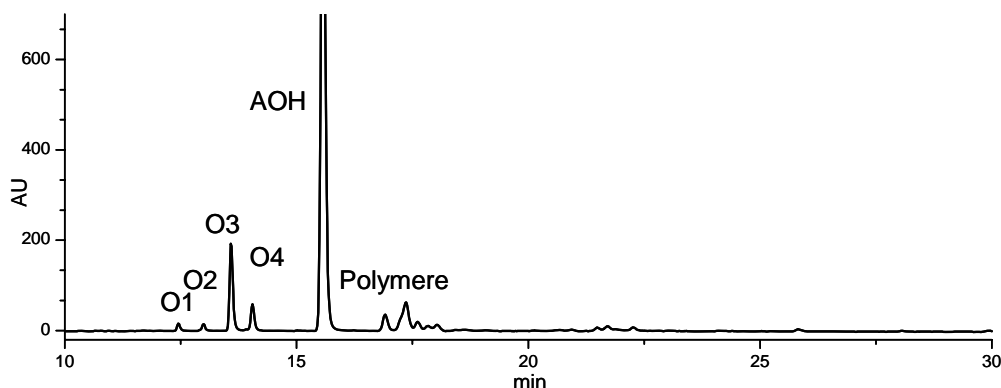
Nach oxidativer Umsetzung von AME zeigen die Chromatogramme fünf Peaks polarerer Verbindungen, welche im Kontrollansatz nicht zu finden sind. Diese Metabolite werden nach ihrer Retentionszeit als M1-M5 bezeichnet.

Neben der Bildung dieser Produkte wird AME zu AOH demethyliert. Zusätzlich entstehen eine Vielzahl an Verbindungen deren Peaks eine höhere Retentionszeit aufweisen (Abb.5).



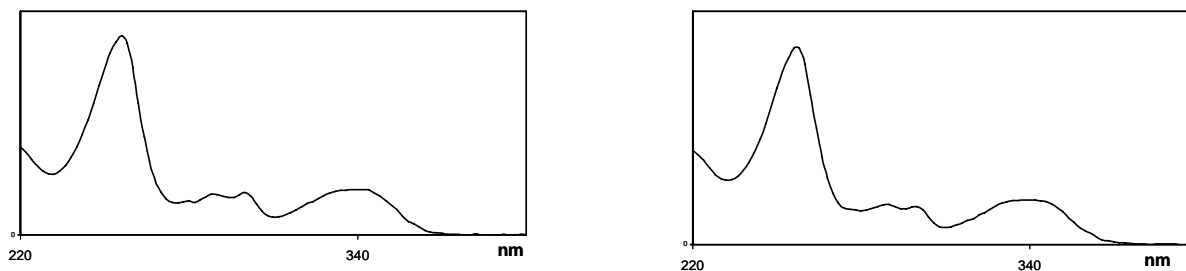
**Abb.5** HPLC-DAD (254 nm) Chromatogramm der oxidativen mikrosomalen Umsetzung von **AME** mit Rattenlebermikrosomen (RLM). Da das eingesetzte AME mit AOH verunreinigt ist, erscheint die Fläche des entstehenden AOH größer.

Vier polarere Metabolite (O1-O4) lassen sich nach oxidativem Umsatz und HPLC Trennung von AOH detektieren. Auch hier finden sich eine Vielzahl von Peaks mit einer höheren Retentionszeit als die Ausgangsverbindung (Abb.6).



**Abb.6** HPLC-DAD (254 nm) Chromatogramm der oxidativen mikrosomalen Umsetzung von **AOH** mit RLM.

Die Mykotoxine zeigen ein charakteristisches UV-Spektrum (Abb.7). Die im DAD ermittelten Absorptionsmaxima von AME und AOH liegen bei 257, 340, 288 und 300 nm. Dies entspricht den von Tanahashi et al. (2003) für AOH in methanolischer Lösung beschriebenen Absorptionsmaxima bei 256, 289, 340 und 300 nm. Wie zu erwarten, zeigen AOH und AME auch ein gleich verlaufendes UV-VIS Spektrum. Dabei stimmt der Verlauf der Spektren mit denen von Molina et al. (1998) für AOH und AME im Sauren (pH<5) beschriebenen überein.



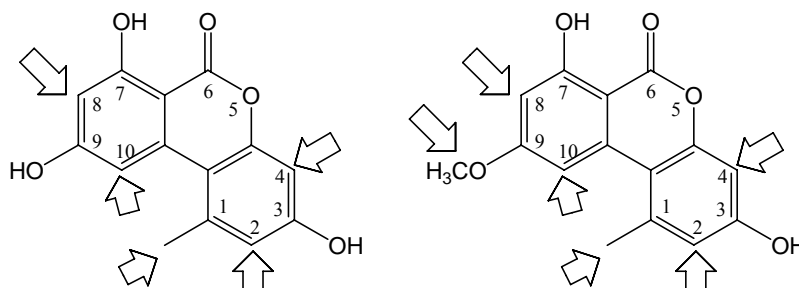
**Abb.7** HPLC-DAD UV-VIS Spektrum von AOH (links) und AME (rechts)

Alle gefundenen Peaks der Metabolite zeigen ein sehr ähnliches Spektrum wie AME und AOH (s. Anhang). Hier sind die Maxima bei 288 und 300 nm z.T. nicht so ausgeprägt wie bei AOH und AME, was aber auf die geringe Konzentration der Metabolite zurückzuführen sein könnte.

Das Absorptionsverhalten von AME, AOH und ihrer Metabolite beruht vermutlich auf ihrer Dibenzo- $\alpha$ -pyronstruktur. Die unterschiedliche Substitution mit Methoxy- bzw. Hydroxygruppen scheint nur einen geringen Einfluss zu haben, so zeigt Graphislacton A ein entsprechendes Spektrum. Selbst wenn einer der Ringe nicht als Aromat vorliegt, wird ein ähnliches Spektrum erhalten, wie der Vergleich mit dem von Visconti et al. (1989) für Isolaltenuen dargestellten Spektrum zeigt.

Die oxidativen Umsetzungen erfolgen in Anwesenheit von NADPH durch Cytochrom P-450 Monooxygenasen (CYPs). CYPs übertragen ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf ihre Substrate. In Folge dessen sind Hydroxylierungsreaktionen vorherrschend. Darüber hinaus können Folgereaktionen wie Desalkylierungen stattfinden.

Bei den entstehenden polaren Metaboliten von AME und AOH handelt es sich vermutlich um hydroxylierte Produkte. Bei beiden Mykotoxinen sind fünf Hydroxylierungsprodukte möglich. (Abb. 8)



**Abb. 8** AOH (links) und AME (rechts); Pfeile markieren mögliche Positionen für Hydroxylierungen durch CYPs

Vier verschiedene Metabolite können dabei durch Hydroxylierung am aromatischen Ring und eine durch aliphatische Hydroxylierung gebildet werden. Zusätzlich ist die Bildung mehrfach hydroxylierter Metabolite möglich.

Dass es sich bei den gefundenen polaren, oxidativen Metaboliten tatsächlich um die hydroxylierten Verbindungen handelt, zeigen HPLC-MS-Untersuchungen. Mit Elektrosprayionisierung (ESI) wird im positiven Modus gearbeitet. Das heißt, es werden positive Ionen detektiert, die durch Anlagerung eines Protons ( $[M+1]^+$ ) oder von Kationen (Natrium  $[M+23]^+$ , Kalium  $[M+39]^+$  etc.) gebildet werden.

Für die vier AOH Metabolite O1-O4 zeigen die erhaltenen Spektren die Massen von monohydroxylierten AOH  $[M+1]^+$  ( $m/z = 275$ ). Dabei ist der Peak des Metaboliten O1 durch eine Verunreinigung ( $m/z = 279$ ) überlagert, so dass sich die Masse nur erahnen lässt. Da O1 im GC-MS die entsprechenden Massen deutlich zeigt (s. Kap.3.2.3), wird trotzdem von einer Monohydroxylierung ausgegangen.

Aussagen über die Position der Hydroxylierung lassen sich aus den erhaltenen Spektren nicht treffen. Eine Erhöhung der Fragmentorspannung führt zwar zu einer deutlichen Fragmentierung der Metabolite (Spektren s. Anhang), jedoch lässt sich kein Muster ableiten.

Da es sich bei den möglichen Hydroxylierungsprodukten um bisher nicht beschriebene Verbindungen handelt und folglich keine Vergleichssubstanzen bzw. Spektren zur Verfügung stehen, lässt sich so keine Aussage über die Molekülstruktur treffen.

Das für den AME Metaboliten M1 erhaltene Spektrum zeigt die Massen  $[M+1]^+$  und  $[M+23]^+$  ( $m/z = 305; 327$ ) der dihydroxylierten Ausgangsverbindung. Es handelt sich

hierbei also um zweifach hydroxyliertes AME. Hierfür spricht auch die deutlich kürzere Retentionszeit von M1 im Vergleich zu anderen AME bzw. AOH Metaboliten.

Für die Metabolite M2-M5 werden die Massen  $[M+1]^+$  ( $m/z = 289$ ) von monohydroxylierten AME gefunden. Eine Aussage über die Position der Hydroxylierung auf Grundlage der Fragmentierung ist wie für die hydroxylierten AOH Metabolite nicht möglich.

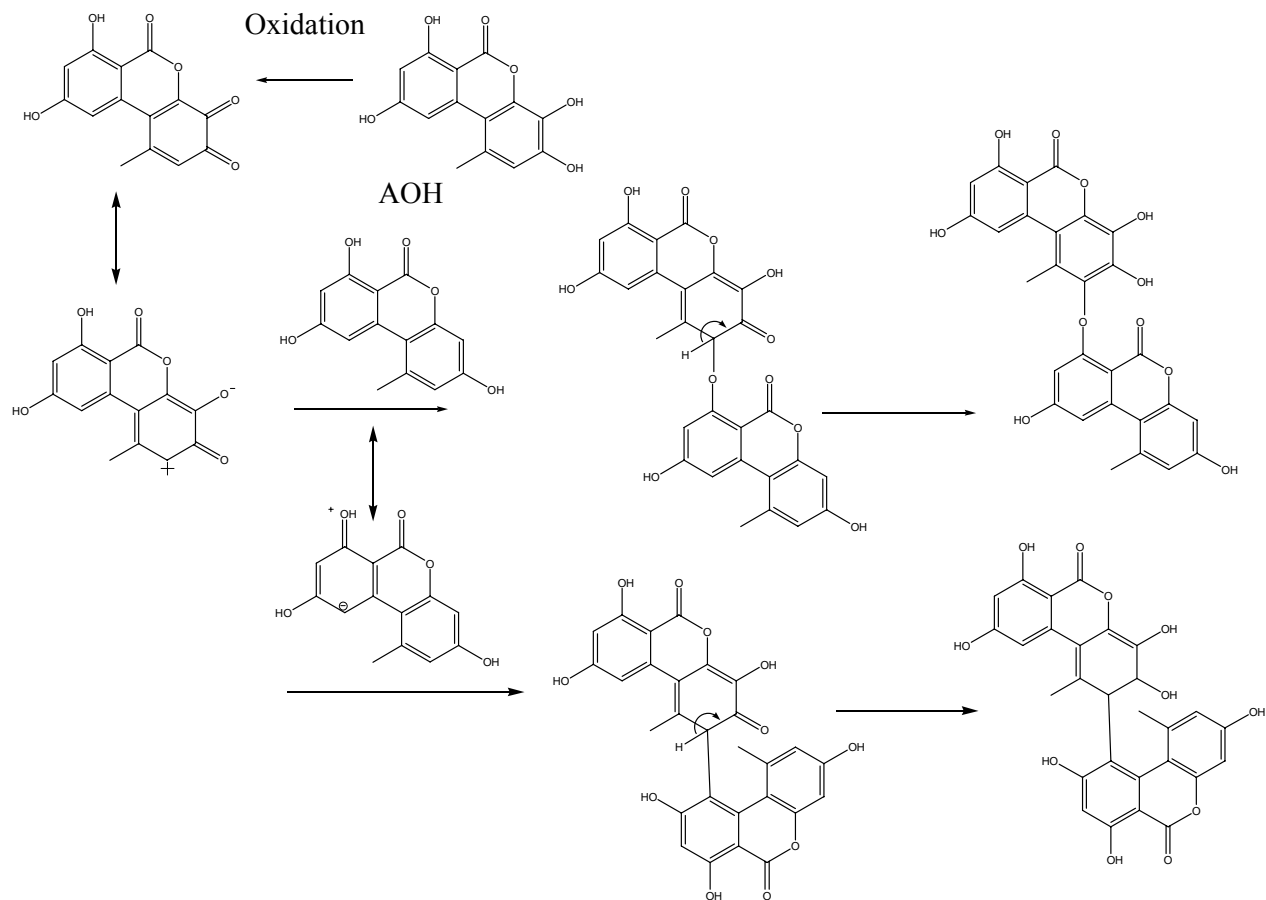
Eine Hydroxylierung der Methoxygruppe des AME führt zu einem instabilen Halbacetal. Es folgt die Abspaltung von Formaldehyd und so die Demethylierung zu AOH. Diese oxidative Demethylierung von AME zu AOH konnte durch Cochromatographie nachgewiesen werden und wird von Pollock et al. (1982) sowie von Olsen und Visconti (1987) als Metabolisierungsrouten von AME beschrieben.

Die bei beiden Mykotoxinen gebildeten Verbindungen mit höheren Retentionszeiten zeigen jeweils das gleiche charakteristische UV-VIS Spektrum wie die Alternaria-Toxine. Damit ist es nahezu sicher, dass es sich um Produkte aus AOH bzw. AME handelt. Eine direkte Bildung über die Oxidation durch die CYPs ist wenig wahrscheinlich, da keine Produkte oder Folgeprodukte denkbar sind, die eine geringere Polarität als die Ausgangsverbindungen aufweisen. Vermutlich handelt es sich hierbei um Polymere aus AOH bzw. AME. Folgende Überlegungen führen zu dieser Vermutung:

Es ist aus vielen Bereichen bekannt, dass Polyphenole zu Polymerisationsreaktionen neigen. So kommt es durch diese Reaktionen z.B. in Lebensmitteln insbesondere in Obst und Tee zu Farbveränderungen. Auch wenn hierbei enzymatische Reaktionen im Vordergrund stehen, treten diese Reaktionen auch ohne Katalyse auf. Für die Polymerisation sind hauptsächlich zwei Mechanismen in Betracht zu ziehen:

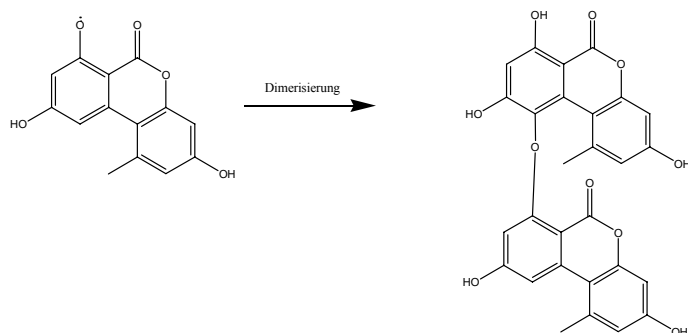
Erstens eine Reaktion, die über die Oxidation der Catechole zum entsprechenden o-Chinon verläuft, welches dann ein weiteres Molekül addiert (Abb. 9). Zweitens ein radikalischer Mechanismus: In einer Nebenreaktion könnten in Anwesenheit von NADPH die CYPs oder andere in der Mikrosomenfraktion enthaltene Enzyme, AOH und AME in die entsprechenden Phenoxyradikale überführen. Diese können dann in einer Kettenreaktion

weiterreagieren und Dimere bilden. Ebenso können die entstehenden hydroxylierten Produkte in die Kettenreaktion involviert werden (Abb. 10).



**Abb. 9** Mögliche Dimerisierung von AOH-Metaboliten: Oxidation des Catechols zum o-Chinon und nucleophiler Angriff eines weiteren Moleküls AOH.

Sowohl bei der radikalischen Reaktion als auch bei der Polymerisation über das o-Chinon sind aufgrund verschiedener Positionen für die Verknüpfung eine Vielzahl von Produkten möglich. Des Weiteren können auch die Dimere weiterreagieren und Trimere, etc. bilden. Beide vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen können so die Vielzahl der gefundenen Produkte nach oxidativem Umsatz von AOH und AME erklären.



**Abb. 10** Mögliche Dimerisierung von AOH: Reaktion zweier AOH-Radikale.

Die durch radikalische Reaktion aus AOH und AME gebildeten Dimere (Abb.10) weisen die doppelte Masse der Ausgangsverbindungen abzüglich zweier Wasserstoffatome (AOH = 514 g/mol; AME = 542 g/mol) auf. Würden sie unter Beteiligung der hydroxylierten Metabolite entstehen, läge ihre Masse durch ein bzw. zwei zusätzliche Sauerstoffatome um 16 g/mol bzw 32 g/mol höher. Bei Reaktion über das o-Chinon muß zumindest eines der Edukte hydroxyliertes AOH bzw. AME sein. In den LC-ESI-MS Spektren werden nur Ionen  $[M+1]^+$  mit der Masse der Dimere der Ausgangsverbindung (514 g/mol für AOH; 542 g/mol für AME) gefunden (Spektren s. Anhang). Da diese Ionen aus den Ausgangsverbindungen gebildet werden können, wird ein radikalische Mechanismus angenommen. Für eine Kondensationsreaktion, wobei unter Wasserabspaltung aus einem hydroxylierten Produkt und AOH bzw. AME die gleiche Masse resultieren würde, kann keine sinnvolle chemische Reaktion vorgeschlagen werden. Da die Polymere teilweise im Spülschritt des LC-MS Gradienten von der Säule kommen, coeluiieren sie mit einer Vielzahl von anderen Verbindungen, wie der Totalionenstrom zeigt. Deshalb konnten zwar anhand der LC-MS Daten die vorherrschenden (vermuteten) Polymere als Dimere aus den Ausgangsverbindungen charakterisiert werden, jedoch weitere Produkte – und damit die Beteiligung der hydroxylierten Metabolite an der Reaktion - keinesfalls ausgeschlossen werden. Zwei weitere Befunde sprechen für eine radikalische Bildung aus den Ausgangsverbindungen:

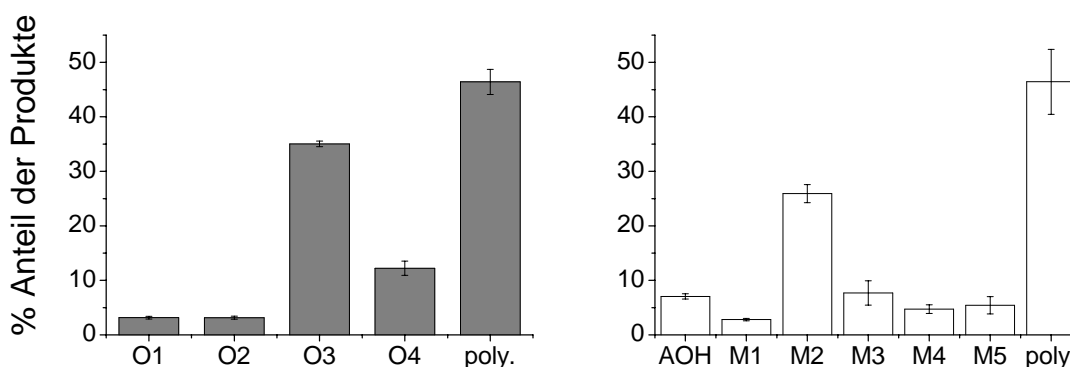
Setzt man AOH in Anwesenheit von  $H_2O_2$  mit Meerrettich-Peroxidase um, erhält man ein ähnliches Peakmuster der unpolaren Metabolite wie bei oxidativem Umsatz von AOH mit CYPs (Chromatogramm s. Anhang). Die Peroxidase katalysiert keine aromatischen Hydroxylierungen, so dass keine Catechole und o-Chinone entstehen können. Phenole werden jedoch von der Peroxidase zu Radikalen umgesetzt. So spricht das ähnliche Peakmuster dafür, dass auch bei der Umsetzung mit Mikrosomen ein radikalischer Mechanismus für die Polymerisation im Vordergrund steht.

Setzt man AOH bzw. AME oxidativ in Anwesenheit von Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und S-Adenosylmethionin (SAM) um (s. Kap.3.3), bleibt der Anteil der Polymere unverändert, unabhängig davon, ob SAM zu Beginn der Inkubation oder erst später zugesetzt wird. Dies unterstützt die Annahme, dass diese Produkte aus den Mykotoxinen selbst und nicht aus ihren hydroxylierten Metaboliten gebildet werden. Wäre letzteres der Fall, müsste der Anteil der Polymere bei späterer Zugabe von SAM größer werden, da die hydroxylierten Metabolite länger frei im Ansatz vorliegen und dabei als Reaktionspartner zur Verfügung stehen.

### 3.1.2 Zusatz von Antioxidantien

Um auch die zu einem geringen Anteil entstehenden Metabolite quantifizieren und charakterisieren zu können, wurden die Reaktionsbedingungen im Hinblick auf einen hohen Umsatz optimiert. Es wurden Proteinmengen zwischen 0,25-2,0 mg Protein pro ml Reaktionsansatz und Substratkonzentrationen von 25-100  $\mu\text{M}$  getestet. Der Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  Substrat und 1 mg Protein pro ml bei 40 Minuten Inkubationszeit erwies sich im Hinblick auf einen hohen Umsatz zu den polaren Produkten bei rationellem Einsatz von Mikrosomen als optimal. Die Reaktionszeit wurde im Hinblick auf eine möglichst geringe Polymerbildung nicht über 40 Minuten verlängert.

Nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen wurden unter diesen Bedingungen  $37,0 \pm 3,0$  % des eingesetzten AME zu polaren wie unpolaren Metaboliten umgesetzt. Bei AOH war die Umsatzrate mit  $24,0 \pm 5,6$  % etwas geringer. Die Verteilung der Metabolite ist in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11** Produktanteile nach oxidativem Umsatz von AOH (links) und AME (rechts) mit RLM. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Anteil der Polymere an den gebildeten Produkten liegt mit  $46,4 \pm 6,0$  % für AME und  $46,4 \pm 2,3$  % für AOH sehr hoch. Sie werden im Kontrollansatz nicht gefunden und stellen somit das Hauptprodukt der Umsetzung dar. Wie diskutiert, handelt es sich vermutlich um Polymere der Ausgangsverbindungen. Da die Bildung der Polymere die messbaren Produktanteile der anderen Metabolite beeinflussen kann, aber keine metabolische Reaktion *in vivo* repräsentiert, wird versucht die Polymerisation zu verringern.

Hierzu werden verschiedene Antioxidantien eingesetzt. Die vor allem reduzierend wirkende L-Ascorbinsäure (Vitamin C), das als Nucleophil (Elektronenpaardonor, Lewis-

Säure) wirksame Glutathion und die als Radikalfänger wirksamen Lebensmittelzusatzstoffe *tert.*-Butylhydroxyanisol (BHA), *tert.*-Butylhydroxytoluol (BHT) und *tert.*-Butylhydrochinon (TBHQ).

BHA, BHT und TBHQ werden dem zur Extraktion verwendeten Ethylacetat in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Ein direkter Zusatz in den Reaktionsansatz erfolgt nicht, da BHA und BHT zum einen keine ausreichende Löslichkeit im Wässrigen aufweisen und zum anderen diese phenolischen Antioxidantien von den CYPs umgesetzt werden würden.

Glutathion und Ascorbinsäure werden direkt dem Reaktionsansatz zugesetzt. Zusätzlich wird Ascorbinsäure dem Methanol zugesetzt, in dem der einrotierte Ethylacetatrückstand zur HPLC wieder aufgenommen wird.

Im Vergleich zu Ansätzen ohne Antioxidantien werden weder der Umsatz noch der Anteil der Polymere von AOH und AME durch den Zusatz von BHA, BHT signifikant beeinflusst. Die AME Umsetzung unter Zusatz von TBHQ kann nicht ausgewertet werden, da die Retentionszeit von TBHQ mit der von AME Metaboliten zusammenfällt.

TBHQ hat auf die Umsetzung von AOH ebenso wenig einen Einfluss wie BHA und BHT.

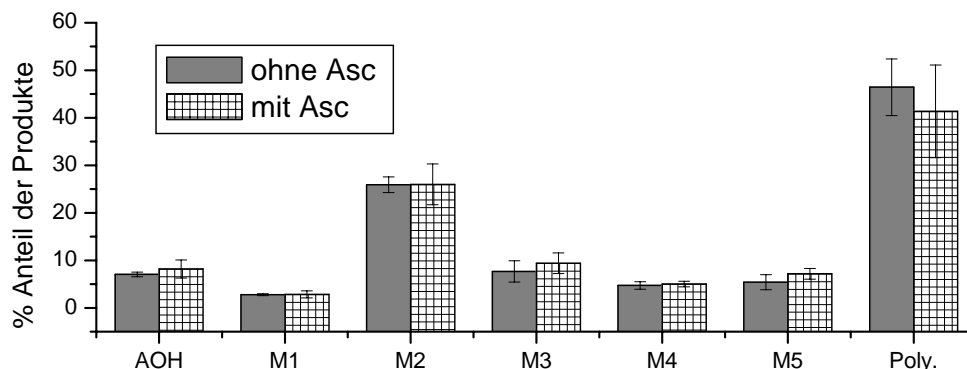
Auch der Zusatz von Glutathion (10 mM) zum Ansatz beeinflusst die Bildung der Polymere nur marginal. Der Umsatz verringert sich durch eine Konzentration von 10 mM Glutathion nur geringfügig. Höhere Konzentrationen an Glutathion verkleinern den Umsatz stärker. Bei einer Konzentration von 100 mM Glutathion im Ansatz kann kein Umsatz zu oxidativen Metaboliten detektiert werden.

Der Zusatz von Ascorbinsäure (10 mM) zeigt bei beiden Mykotoxinen eine marginale Wirkung auf die Bildung der Polymere. Der Anteil der Polymere wird geringfügig zugunsten der hydroxylierten Metabolite verringert. Abb. 12 zeigt exemplarisch die Verteilung der Produkte nach oxidativem Umsatz von AME mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure.

Ebenso wie beim Zusatz von Glutathion wird der Umsatz durch eine Konzentration von 10 mM Ascorbinsäure geringfügig verringert. Bei einem höheren Anteil an Ascorbinsäure ist diese Wirkung stärker, so kann bei einer Konzentration von 100 mM Ascorbinsäure kein Umsatz zu oxidativen Produkten detektiert werden.



Der Zusatz von Ascorbinsäure zum Methanol, in dem der Extrakt wieder aufgenommen wird, zeigt keinen Effekt.



**Abb.12** Produktanteile nach oxidativer Umsetzung von AME durch RLM mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure (10 mM). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse des Antioxidanzienzusatzes können wie folgt interpretiert werden:

Das Fehlen einer Wirkung des Zusatzes von BHA, BHT und TBHQ entspricht den Erwartungen. Allerdings ist es fraglich, ob diese Substanzen die Polymerisation überhaupt beeinflussen können, da es sich bei den Ausgangssubstanzen um Phenole handelt, deren Radikale ähnlich mesomeriestabilisiert sind wie jene der Antioxidantien. Weiterhin werden die Substanzen nicht dem Ansatz, sondern dem Extraktionsmittel zugesetzt. Es ist aber davon auszugehen, dass die Polymerisation vermutlich durch die bzw. direkt nach der Reaktion mit den CYPs im Ansatz stattfindet und der spätere Zusatz hierauf keine Wirkung haben kann. Für eine Polymerisation direkt im Ansatz spricht auch die Tatsache, dass der Zusatz von Ascorbinsäure zum Methanol, in dem der Extrakt wieder aufgenommen wird ebenso wenig einen Einfluss auf den Anteil der Polymere hat, wie auch nach längerer Lagerung (mehrere Tage) des Extraktes.

Glutathion würde der Polymerisation entgegenwirken, indem es als Elektronenpaardonor mit entstehenden Chinonen reagiert. Weder der Anteil der Polymere oder andere Produkte werden durch das Glutathion beeinflusst, noch werden Glutathion-Addukte mit den gewählten HPLC-Parametern detektiert. Der Befund, dass Glutathion keine Wirkung hat, bestätigt, dass die Polymerisation vermutlich nicht über Oxidation zu den Catecholen verläuft.

Ascorbinsäure zeigt einen geringfügigen Effekt. Dieser ist wahrscheinlich auf die reduzierenden Eigenschaften zurückzuführen. Dies können sowohl gebildete Chinone wie

auch Radikale sein. Allerdings kann die Wirkung auch auf eine Änderung der Bedingungen (z.B. pH-Wert) im Ansatz zurückzuführen sein. (10 mM Ascorbinsäure in 100 mM Puffer).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Zusatz von Antioxidantien geringfügige bis keine Effekte auf die Bildung der Polymere hat. Die Tatsache, dass der Zusatz von Glutathion keine Veränderung bewirkt, unterstützt die Theorie von einem radikalischen Mechanismus für die Polymerisierung.

Da die Polymere nicht als Produkte des oxidativen mikrosomalen Umsatzes anzusehen sind, werden sie in der folgenden quantitativen Betrachtung außer Acht gelassen.

### 3.1.3 Umsetzungen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies.

Verschiedene Spezies exprimieren in ihren Geweben verschiedene CYP-Isoenzyme in unterschiedlichen Menge und Anteilen. Ebenso gibt es zwischen verschiedenen Organismen Unterschiede in der Struktur der Isoenzyme, welche Auswirkungen auf ihre Aktivität und Spezifität haben. Aufgrund dieser Tatsachen ist der oxidative Metabolismus in verschiedenen Lebewesen unterschiedlich und die Ergebnisse mikrosomaler Untersuchungen können keinesfalls direkt von der einen auf die andere Art übertragen werden.

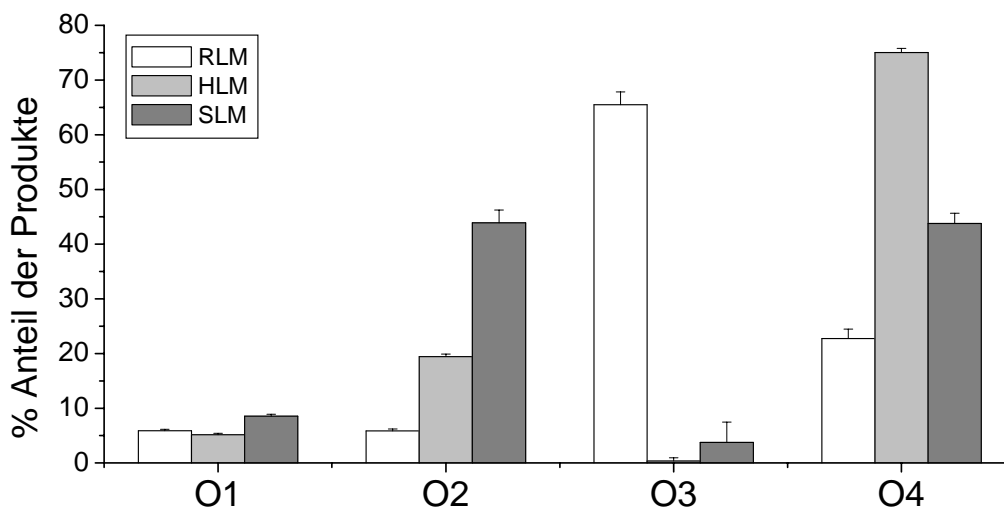
Um den Metabolismus in Menschen und Nutztieren beurteilen zu können, werden neben Untersuchungen an Rattenlebermikrosomen (RLM) auch Untersuchungen an Lebermikrosomen von weiblichen Schweinen (SLM) und eines Mannes (HLM) durchgeführt.

Die Umsetzungen mit HLM und SLM zeigen qualitativ die gleichen Ergebnisse wie die Umsetzung mit RLM (Abb. 11, 13, 14). Es werden die gleichen polaren Verbindungen mittels HPLC detektiert und auch die Peaks der nicht weiter betrachteten Polymere zeigen das gleiche Bild wie bei Rattenlebermikrosomen. Allerdings zeigen sich erhebliche Unterschiede in Umsatz und Verteilung der oxidativen Metabolite zwischen den Spezies:

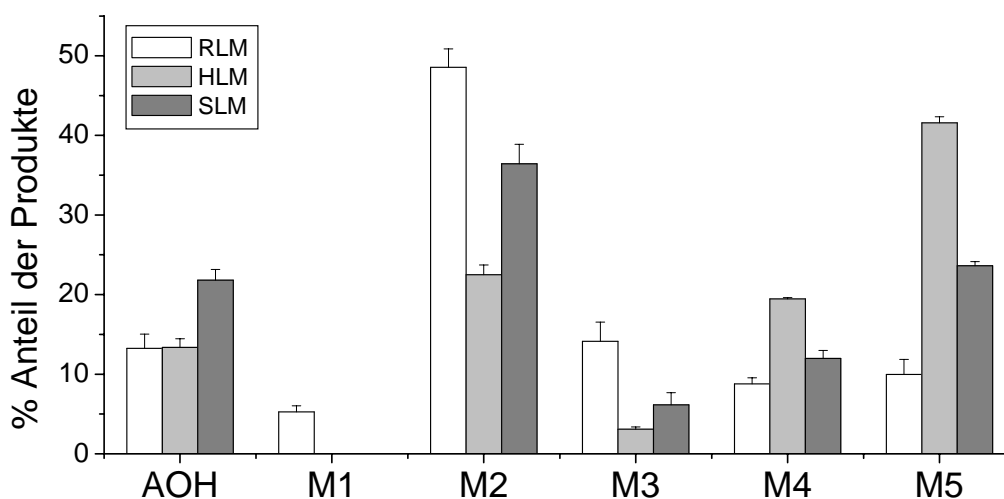
**15,3 ± 2,2 %** AOH und **19,8 ± 3,2 %** AME werden durch RLM zu den hydroxylierten Produkten umgesetzt. Die Umsätze durch HLM sind mit **5,5 ± 0,3 %** für AOH und **7,6 % ± 1,0 %** für AME deutlich geringer. Mit SLM werden **2,8 ± 0,2 %** des AOH und **12,2 ± 2,2 %** des AME zu oxidativen Metaboliten umgesetzt. Damit liegt der Anteil für AOH unterhalb und für AME oberhalb der Umsetzung mit HLM, für beide Mykotoxine aber deutlich unterhalb der Umsetzung mit RLM.

Der höhere Umsatz durch RLM ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die eingesetzte Proteinmenge bei RLM mit 1 mg/ml um 0,3 mg/ml höher liegt als bei Umsetzung durch HLM und SLM mit 0,7 mg/ml. Zum anderen weisen die HLM mit 0,20 nmol/mg Protein und die SLM mit 0,39 nmol/mg Protein einen deutlich geringeren Anteil an CYPs auf als die RLM mit 0,84 nmol/mg. Der rechnerische Umsatz den man bei den HLM für die gleiche Menge eingesetzten CYPs wie bei RLM erhält, liegt deutlich über dem Ergebnis der RLM. Bezogen auf den CYP-Gehalt setzen HLM sowohl AOH als auch AME am stärksten um.

Der höhere Umsatz von AME durch SLM verglichen mit HLM lässt sich ebenso über die Menge der CYPs erklären. Die Tatsache, dass durch SLM nur drei Prozent – und damit deutlich weniger als bei HLM – des AOH zu hydroxylierten Produkten umgesetzt werden, könnte durch Unterschiede in der Expression der CYP Isoenzyme begründet werden.



**Abb.13** Rel. Verteilung der Hydroxylierungsprodukte nach oxidativer Umsetzung von **AOH** mit RLM (□), HLM (▒) und SLM (■). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.



**Abb.14** Rel. Verteilung der Hydroxylierungsprodukte nach oxidativer Umsetzung von **AME** mit RLM (□), HLM (▒) und SLM (■). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Es wird aufgrund des erwartungsgemäßen Umsatzes von AME aber angenommen, dass die Minderbefunde mit der Bildung von Polymeren zusammenhängen, da deren Anteil (70 % Gesamtprodukte) bei den HLM deutlich höher liegt als bei RLM und HLM (jeweils 45 % Gesamtprodukte). Die Tatsache, dass dieser Effekt nur bei AOH zu beobachten ist kann mit der geringeren Stabilität der oxidativen AOH Produkte erklärt werden (s. Kap.3.3.2).

AOH wird durch RLM dominierend zu O3 hydroxyliert, O4 wird zu 20 %, und O1 sowie O2 nur zu marginalen Anteilen gebildet. Hingegen wird der Metabolit O3 von HLM und SLM nicht bzw. im sehr geringen Umfang gebildet. Als Hauptmetabolit mit HLM wurde O4 in einer Menge gefunden, welche die Summe der Anteile aller anderen Metabolite um das Doppelte übertrifft. Durch SLM werden O2 und O3 zu gleichen Anteilen als dominierende Produkte gebildet. O1 entsteht durch die Mikrosomen aller drei Spezies nur zu geringfügigen Anteilen (Abb.13).

AME wird durch RLM und SLM hauptsächlich zu M2 hydroxyliert. Während M2 in RLM etwa im gleichen Umfang gebildet wird wie alle anderen Metabolite zusammen, wird durch SLM der Metabolit M5 ebenfalls zu einem relativ großen Anteil von 25 % gebildet. In HLM ist M5 mit 41 % Anteil der Hauptmetabolit, wobei M2 mit einem Anteil von 22 % in gleicher Menge wie M4 gebildet wird. Die anderen monohydroxylierten Metabolite und AOH werden durch alle Mikrosomen zu einem Anteil von 10–20 % gebildet. Eine Ausnahme bildet M3, der nach Umsetzung durch HLM nur zu 5 % gefunden wird. Der dihydroxylierte Metabolit M1 wird nur nach Umsetzung durch RLM detektiert (Abb.14). Es wird angenommen, dass es sich bei M1 um den hydroxylierten Hauptmetaboliten M2 handelt. Die Tatsache, dass er durch SLM und HLM nicht gebildet wird, kann zum einen an dem deutlich höheren Umsatz durch RLM insgesamt liegen (s.o.) und/oder zum anderen daran, dass M2 in HLM und SLM nicht in so großem Umfang gebildet wird.

RLM, HLM und SLM weisen starke Unterschiede in der Produktverteilung der gebildeten oxidativen Metabolite auf. Dies lässt sich mit einer unterschiedlichen Expression verschiedener CYPs im Lebergewebe der Spezies erklären und zeigt, dass die Enzymausstattung der Gewebe eine unterschiedliche Spezifität bezüglich der Hydroxlierung aufweist. So scheint das Isoenzym welches AOH zu O3 hydroxyliert in Mensch- und Schweineleber nicht oder nur im geringen Ausmaß exprimiert zu werden, während die Enzyme in der Rattenleber diesen Metaboliten vorherrschend bilden. Die Rattenleber stellt also nur bedingt ein gutes Modell für den Metabolismus von AOH und AME im Menschen

dar. Für den oxidativen mikrosomalen AOH Metabolismus ist die Schweineleber aufgrund der ähnlicheren Produktverteilung ein geeigneteres Modell. Im oxidativen AME Metabolismus unterscheiden sich die drei Spezies deutlich, wobei auch hier die Ähnlichkeiten zwischen HLM und SLM bestehen. Bei Verwendung von RLM als Ersatz für HLM gilt es, die Metabolite O4 und M5 bei der Beurteilung der Toxizität besonders zu beachten, da sie die Hauptmetabolite in HLM darstellen.

Es ist anzumerken, dass die verwendeten HLM nur von einem Individuum stammen und so die Ergebnisse nicht generell auf den *in vitro* Metabolismus von Menschen verallgemeinert werden können. Insbesondere da es starke, individuelle Unterschiede in der Expression der CYP-Isoenzyme zwischen verschiedenen Menschen gibt. Auch gilt es zu beachten, dass die SLM von weiblichen Tieren stammen und bei den anderen Spezies die Mikrosomen männlicher Exemplare verwendet werden. Auch könnte ein Teil der gefundenen Unterschiede auf verschiedene Stabilitäten der Isoenzyme der einzelnen Spezies zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse über die Bildung (polarer) hydroxylierter Produkte durch SLM steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Olsen und Visconti (1987). Diese haben nach Inkubation von AME mit Leberzellhomogenat von Schweinen und NADPH als Cosubstrat keine anderen oxidativen Metabolite als AOH gefunden. Dieses ist vermutlich auf das von ihnen gewählte Analyseverfahren zurückzuführen. (Dünnschichtchromatographie). Des Weiteren kommt in Betracht, dass die CYP-Aktivität in dem von Olsen und Visconti (1987) verwendeten Homogenat (3 mg Protein/ml) deutlich unterhalb der hier verwendeten Mikrosomen gelegen haben könnte und so in ihren Untersuchungen nur sehr wenige oxidative Metabolite gebildet werden konnten.

### 3.1.4 Zusammenfassung der oxidativen Umsetzungen

Die oxidativen Umsetzungen von AOH und AME mit Lebermikrosomen von Mensch, Ratte und Schwein zeigen in der Analyse mit HPLC-DAD-(MS), dass die Mykotoxine einem deutlichen oxidativen Metabolismus durch CYPs unterliegen.

Aus AME werden vier monohydroxylierte Metabolite und ein dihydroxylierter Metabolit durch Rattenlebermikrosomen gebildet. Vier monhydroxylierte Metabolite werden durch Human- und Schweinelebermikrosomen gebildet. Zusätzlich wird AME durch alle Mikrosomen zu AOH demethyliert.

Aus AOH werden vier monohydroxylierte Metabolite durch Mikrosomen aller drei Spezies gebildet. In der Verteilung der einzelnen Metabolite zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies.

Andere als hydroxylierte polare Produkte, wie sie beispielsweise durch eine Öffnung des Lactonrings entstehen könnten, werden nicht gefunden.

Ein Großteil der Produkte nach Umsetzung sowohl von AME als auch von AOH wies nach Umsetzung mit allen Mikrosomen eine geringere Polarität als die Ausgangsverbindungen auf. Diese Produkte treten in einem ähnlichen (Verteilungs-)Muster bei Mikrosomen aller Spezies auf. Ein Großteil von ihnen weist im LC-ESI-MS die Masse eines Dimeres aus AOH bzw. AME auf. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um Polymere v.a. Dimere aus den Ausgangsverbindungen bzw. um oxidative Metabolite handelt. Der Einsatz von Antioxidantien hat auf die Bildung keinen bis marginalen Einfluss. Weder die chemische Natur noch der Mechanismus der Bildung dieser Substanzen kann eindeutig geklärt werden, es wird aber angenommen, dass diese vermutlich durch radikalische Reaktion v.a. aus den Ausgangsverbindungen gebildet werden.

AME wird generell stärker oxidativ umgesetzt als AOH. Da die entstehenden Produkte zum Großteil Catechole sind, könnte dies eine metabolische Aktivierung darstellen. Von diesem Standpunkt her, ist der Metabolismus bei AME aufgrund des höheren Umsatzes für die toxikologische Beurteilung relevanter.

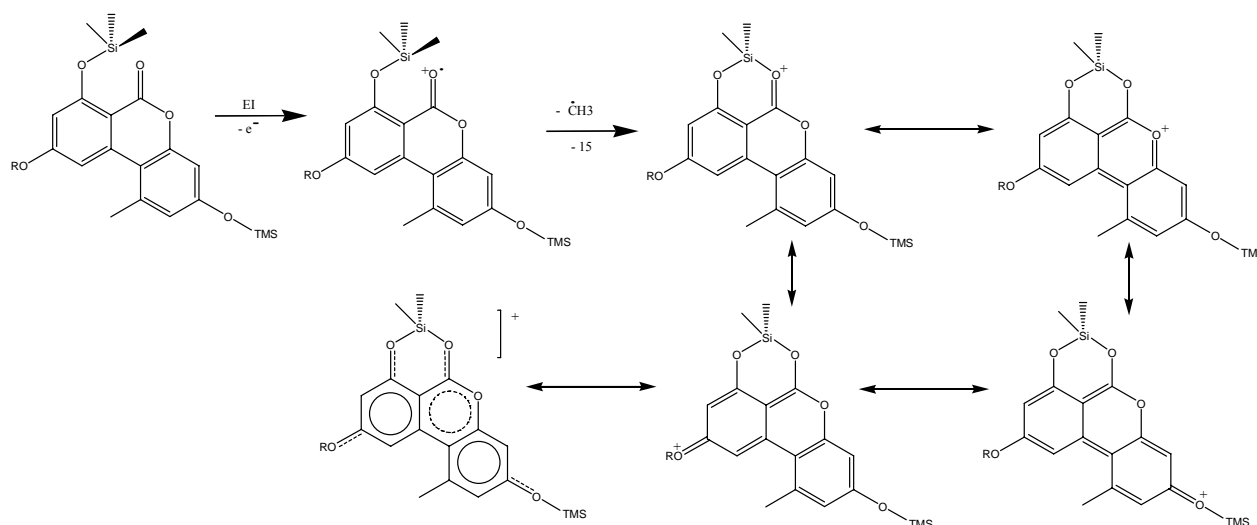
## 3.2 Strukturaufklärung der oxidativen Metabolite mit GC-MS

### 3.2.1 Fragmentierung von AOH und AME

Auch wenn die Struktur von AME und AOH bekannt ist, gilt es die Fragmentierung dieser Substanzen möglichst gut zu verstehen, um die Struktur der aus ihnen abgeleiteten Metabolite aus den Spektren ableiten zu können:

Nach Trimethylsilylieren mit *N*-Trimethylsilyl-acetimid-säure-trimethylsilylester (BSTFA) zeigen weder AME noch AOH Moleküliononen ( $[M]^+$ ) der vollständig silylierten Verbindungen im MS-Spektrum. Stattdessen werden dominierend  $[M-15]^+$  Produkt-Ionen gebildet. Dies entspricht den Ergebnissen von Kellert et al. (1986) und Scott et al. (1997). Bei Verwendung von deuteriertem *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) werden für beide Mykotoxine  $[M-18]^+$  Ionen der entsprechend höheren Masse detektiert.

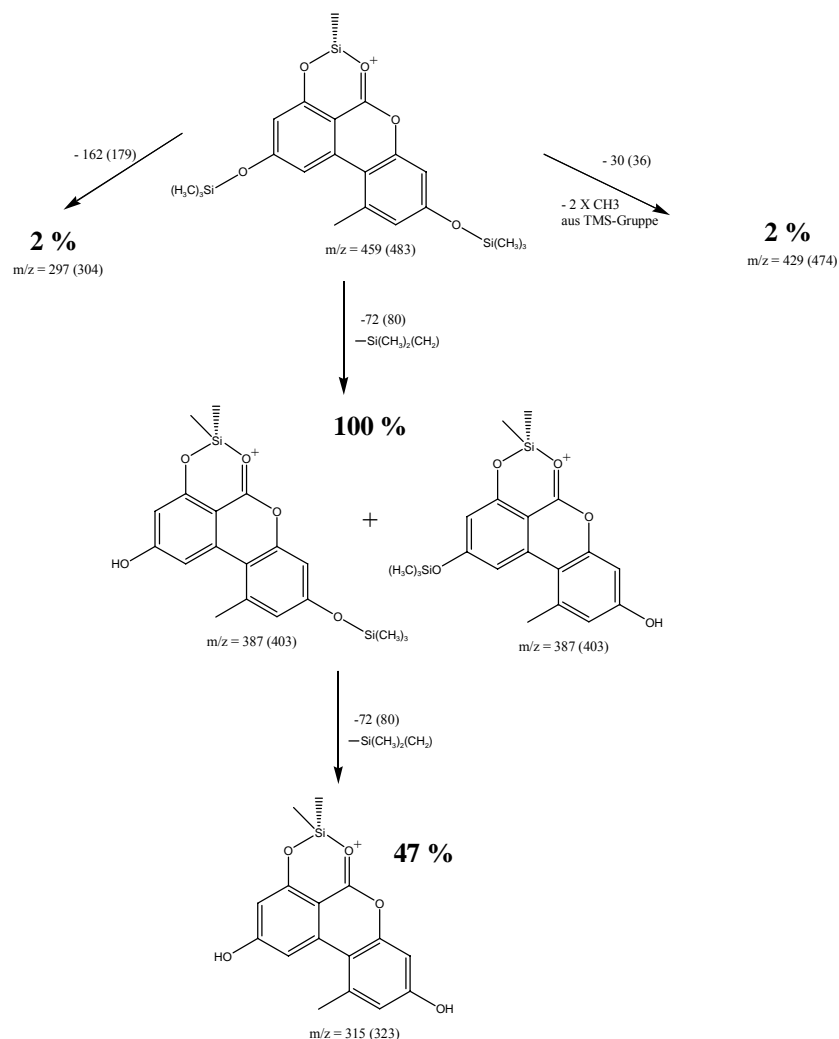
Der Vergleich der Derivatisierungen mit BSTFA und deuteriertem BSA zeigt eindeutig, dass das  $[M-15]^+$  bzw.  $[M-18]^+$  Ion durch Abspaltung einer Methylgruppe aus einem der TMS-Ether gebildet wird. Es wird angenommen, dass die Abspaltung der Methylgruppe aus dem TMS-Ether an Position 7 unter Ausbildung eines cyclischen Siloxans mit der benachbarten Ketogruppe erfolgt. (s. Abb.16). Diese Fragmentierung wird als Reaktion I bezeichnet und in Kap.3.6.1 näher erläutert.



**Abb.16** Fragmentierungsreaktion von trimethylsilylierten AOH (Reaktion I): Abspaltung einer Methylgruppe aus TMS-Ether in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe im GC-EI-MS.



MS-MS Untersuchungen der  $[M-15]^+$  Ionen von AOH zeigen, dass es ausschließlich zu Fragmentierungen durch die Abspaltung von einer bzw. zwei (47% Intensität) TMS-Gruppe(n) kommt (Abb. 17).



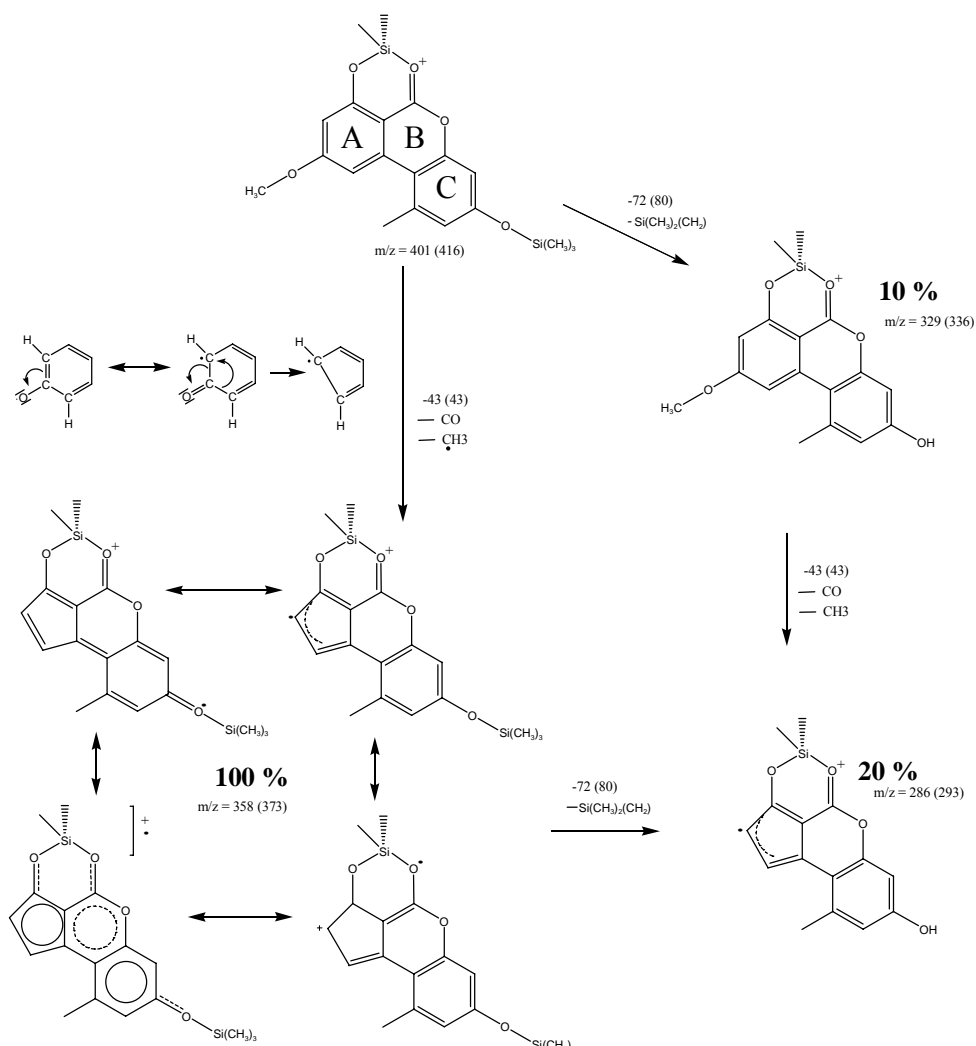
**Abb.17** Fragmentierungsmuster des  $[M-15]^+$  Ions von Tris-TMS-AOH im MS-MS. %-Angaben stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar. Zahlen in Klammer geben die Massen(differenzen) bei Verwendung von deuteriertem BSA an.

Im Gegensatz dazu zeigen die MS-MS Spektren der  $[M-15]^+$  Ionen von AME das  $[M-15-43]^+$  Ion als dominierendes Fragment (Abb.18, Spektren s. Anhang).

Da auch bei Verwendung von deuteriertem BSA die Masse  $m/z = 43$  abgespalten wird, zeigt sich, dass diese Fragmentierung ohne Beteiligung von TMS-Gruppen stattfindet. AME unterscheidet sich von AOH nur in der Methylierung der Hydroxygruppe in Position 9, so dass angenommen wird, dass diese Gruppe an der Bildung des  $[M-15-43]^+$  Ions beteiligt ist und es wird folgende Fragmentierungsreaktion vorgeschlagen:

Zunächst wird aus der Methoxygruppe in Position 7 ein Methylradikal abgespalten. Das resultierende Phenoxyradikal spaltet unter Verkleinerung des aromatischen Rings Kohlenmonoxid ab. Derartige Fragmentierungen, bei denen es zu einer Ringverkleinerung von einem Sechs- zu einem Fünf- Ring kommt, sind im EI-MS von Phenolen bekannt. Abb.18 zeigt einen möglichen Mechanismus für die Abspaltung von Kohlenmonoxid aus einem Phenolradikal.

Der durch diese Fragmentierung gebildete Fünfring ist mesomeriestabilisiert. Das Radikalelektron und die positive Ladung sind über das gesamte Molekül delokalisiert. Dieser energetisch günstige Zustand führt zu hoher Stabilität des  $[M-15-43]^+$  Kationradikals und erklärt so den Befund, dass keine weitere Fragmentierung – mit Ausnahme der Abspaltung der verbliebenen TMS-Gruppe – stattfindet.

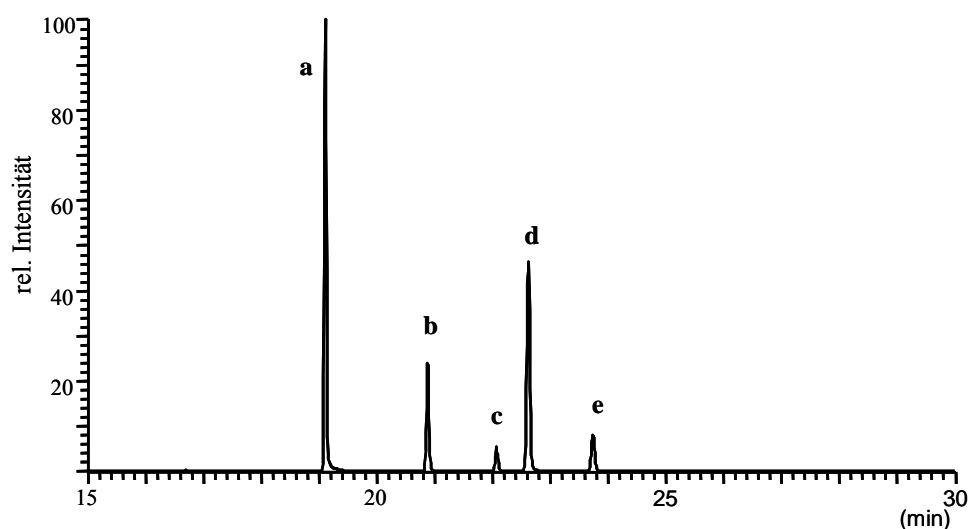


**Abb.18** Fragmentierungsmuster des  $[M-15]^+$  Ions von Bis-TMS-AME im MS-MS. Links Bildung des  $[M-15-43]^+$  Ions, mit vorgeschlagenem Mechanismus. %-Angaben stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar. Zahlen in Klammer geben jeweils die Massen(differenz) bei Verwendung von deuteriertem BSA an.

Diese charakteristische Bildung der  $[M-15-43]^+$  Ionen, bei der es zu einer Verkleinerung des A-Rings von AME kommt, ist nach Hydroxylierungen im gleichen Ring – also an Position 10 und 8 – nicht denkbar. So kann diese Ringverkleinerung im Folgenden eine Grundlage für die Strukturaufklärung von substituierten AME Metaboliten darstellen.

### 3.2.2 Fragmentierung und Strukturaufklärung von M1-M5

Die GC-MS Analyse des Extraktes der oxidativen Umsetzung von AME führt zu fünf Peaks mit der Masse ( $[M-15]^+$ ) des vollständig silylierten HO-AME. Die Peaks werden anhand ihrer Retentionszeit als a-e bezeichnet (Abb.19). Molekülionen der HO-AME werden - Reaktion I entsprechend – nicht gefunden. Auch kann bei den Massen ( $[M]^+$ ,  $[M-15]^+$ ,  $[M-15-15]^+$ ) von dihydroxylierten AME (M1) kein Peak detektiert werden.



**Abb.19** GC-MS-MS ( $m/z = 489$ ) Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von AME. Die dargestellte Masse ( $m/z = 489$ ) entspricht dem  $[M-15]^+$  Ion von HO-AME.

Die Annahme, dass es sich bei den Peaks a-e um monohydroxyliertes AME handelt, wird durch entsprechende Befunde nach Einsatz von deuteriertem BSA unterstützt. Durch die GC-Analyse der einzelnen Metabolite können den HPLC-Peaks die entsprechenden GC-Peaks zugeordnet werden (Tab.1).

M2 und M3 zeigen im MS-MS der  $[M-15]^+$  Ionen ein nahezu gleiches Fragmentierungsmuster (Abb.20; Spektrum s. Anhang). Dabei bilden M2 und M3 dominierend  $[M-15-30]^+$  Ionen.

**Tab.1** Zuordnung der GC-Peaks der AME Metabolite zu den in der HPLC gefundenen HO-AME.

Peak in der HPLC	Peak in der GC	Retentionszeit der GC [min]
M1	-	-
M2	d	22,4
M3	a	19,1
M4	b	20,5
M5	e	23,5
-	c	22,1

Dies wird der Abspaltung zweier Methylgruppen – eine aus der Methoxygruppe und eine aus dem TMS-Ether (Abb.20) – zugeordnet und geschlussfolgert, dass M2 und M3 eine mit einer Methoxygruppe benachbarte Hydroxygruppe aufweisen. Diese Fragmentierung wird als Reaktion III bezeichnet und in Kap.3.6.3 näher erläutert.

Betrachtet man die möglichen Hydroxylierungspositionen (Abb.8) erkennt man, dass nur die im A-Ring hydroxylierten 8-HO-AME und 10-HO-AME eine Hydroxy- neben einer Methoxygruppe aufweisen.

Für eine Hydroxylierung im A-Ring spricht auch das Fehlen von  $[M-15-43]^+$  Ionen, welche bei nicht substituierten AME durch Ringverkleinerung des A-Rings auftreten (s. Kap.3.2.1). Auf Grundlage dieser Fragmentierung kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei M2 und M3 um einen der im A-Ring hydroxylierten Metabolite 8-HO-AME bzw. 10-HO-AME handelt.

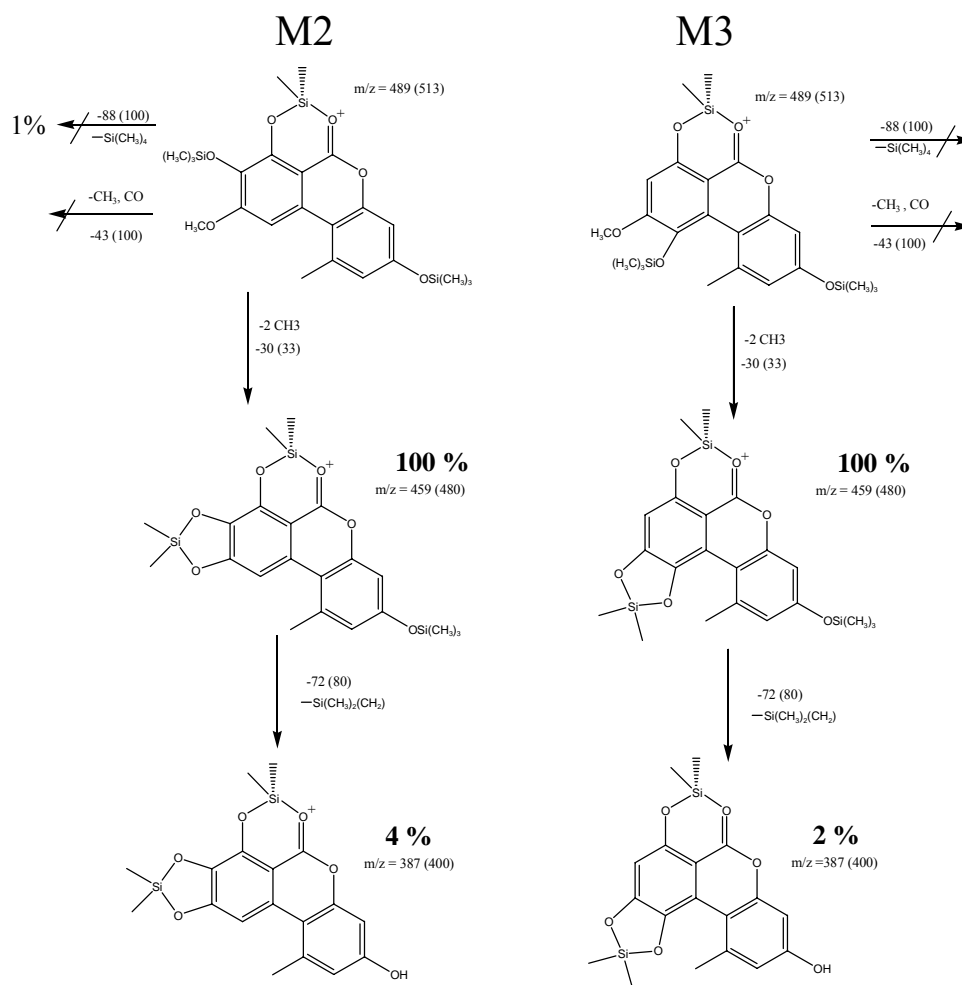
**Tab.2** Überblick über die strukturelevanten Fragmentierungsreaktionen der  $[M-15]^+$  Ionen der HO-AME

<i>Reaktion Fragment Strukturelement</i>	<b>Reaktion II [M-15-88]<sup>+</sup> Catechol</b>	<b>Reaktion III [M-15-30]<sup>+</sup> -OH neben -OCH<sub>3</sub></b>	<b>A-Ringverkleinerung [M-15-43]<sup>+</sup> A-Ring nicht substituiert</b>
<b>Metabolit</b>			
M2		X	
M3		X	
M4	X		X
M5	X		X

Bei den catecholischen Metaboliten wird in den MS-MS Spektren die Abspaltung von Tetramethylsilan ( $m/z = 88$ ) unter Bildung eines cyclischen Siloxans (s. Abb.21) beobachtet. Diese als Reaktion II (s. Kap.3.6.2) bezeichnete Fragmentierungsreaktion kann aber nicht verwendet werden, um das Catechol 8-HO-AME vom Hydrochinon 10-OH-AME abzugrenzen: Die Hydroxygruppe in Position 7 von 8-HO-AME reagiert bereits bei

der Bildung der  $[M-15]^+$  Ionen (Reaktion I) zum cyclischen Siloxan und steht so nicht zu weiteren Reaktionen zur Verfügung.

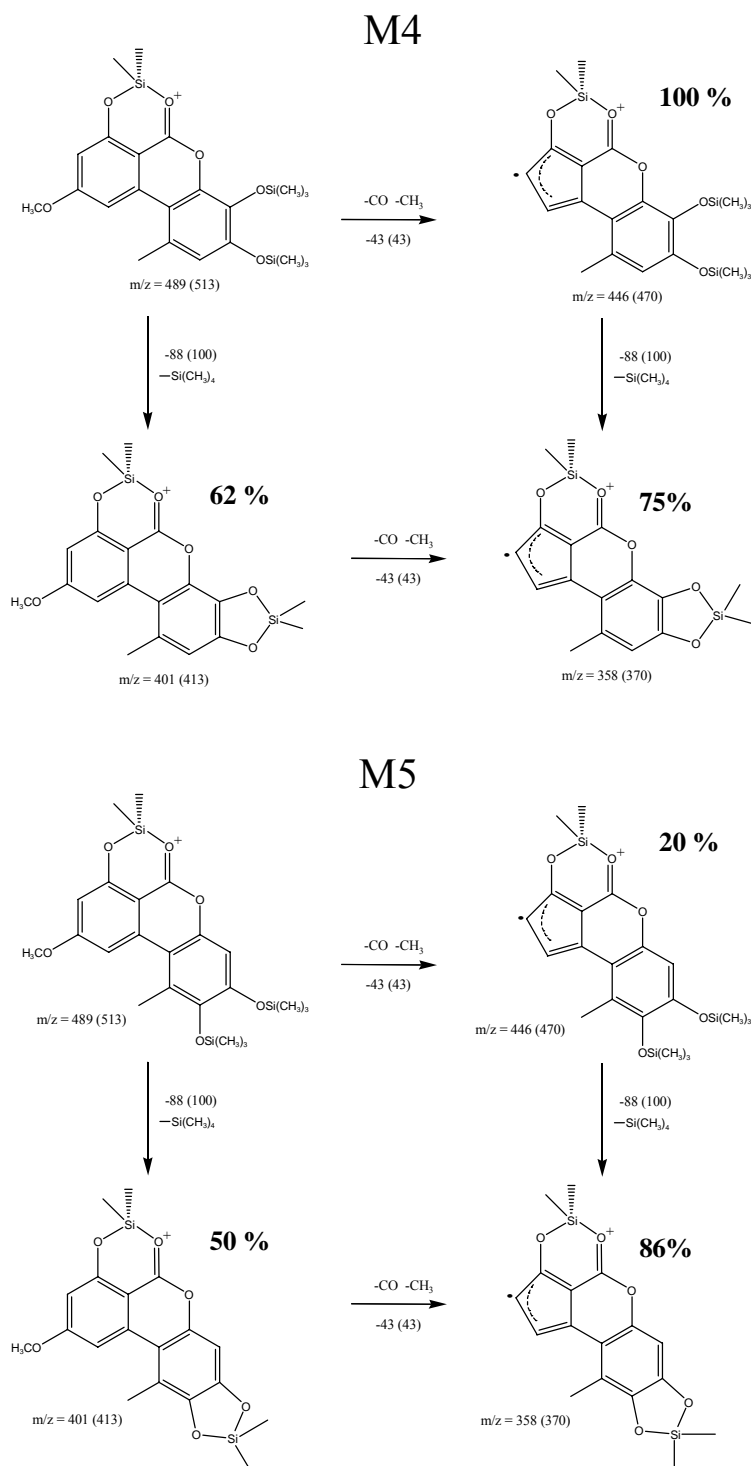
Die Differenzierung von M2 und M3 erfolgt über ihre Umsetzung mit Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT, s. Kap.3.3). M3 wird durch die COMT nicht umgesetzt und kann so als das nicht catecholische 10-HO-AME identifiziert werden. M2 wird durch die COMT zu zwei Produkten methyliert und ist folglich 8-HO-AME.



**Abb.20** Fragmentierungsmuster der  $[M-15]^+$  Ionen von M2 (8-HO-AME, links) und M3 (10-HO-AME, rechts) im MS-MS. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensität der Ionen dar. Zahlen in Klammern geben die Massen(differenzen) bei Verwendung von deuteriertem BSA an.

Die anderen HO-AME M4 und M5 zeigen ebenfalls einander sehr ähnliche Fragmentierungsmuster. (Abb.21; Spektrum s. Anhang).  $[M-15-43]^+$  Ionen werden unter Ringverkleinerung des A-Rings von beiden Metaboliten gebildet. Aufgrund der Ringverkleinerung ist es unwahrscheinlich, dass die Metabolite im A-Ring hydroxyliert

sind. Ebenso zeigen beide Metabolite  $[M-15-88]^+$  Ionen mit großen Intensitäten. Dies wird der Abspaltung von Tetramethylsilan ( $m/z = 88$ ) aus zwei silylierten vicinalen Hydroxygruppen zugeordnet (Reaktion II, Abb.21) und M4 und M5 werden so als Catechole identifiziert.



**Abb.21** Fragmentierungsmuster der  $[M-15]^+$  Ionen von M4 (4-HO-AME, oben) und M5 (2-HO-AME, unten) im MS-MS. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensität der Ionen dar. Zahlen in Klammern geben die Massen(differenzen) bei Verwendung von deuteriertem Silylierungsmittel an.

Betrachtet man die möglichen Positionen für eine Hydroxylierung (s. Abb.21), die zu Catecholen führt und nicht in Ring A stattfindet, wird klar, dass es sich bei M4 und M5 um 4-HO-AME bzw. 2-HO-AME handelt.

Die Struktur von M4 kann durch Cochromatographie mit synthetischer Vergleichsubstanz (s. Kap.3.3.3) in GC und HPLC eindeutig als Desmethylgraphis lacton A (DGLA, 4-HO-AME) aufgeklärt werden. M5 wird nach dem Ausschlussprinzip als 2-HO-AME identifiziert.

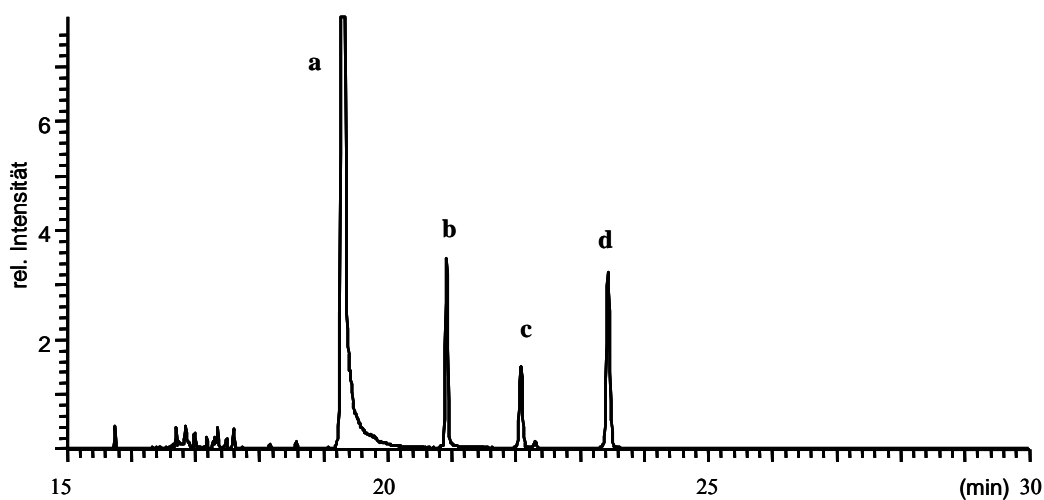
Tab.2 und Abb.20-21 geben eine Übersicht über die gefundenen Fragmente und die ihnen zugeordneten Reaktionen und Strukturelemente.

Bei der GC-MS Analyse des Extraktes nach oxidativer Umsetzung wird im Vergleich zur HPLC ein zusätzlicher Metabolit-Peak (Peak c in Abb.19) gefunden. Da der Peak auch bei der Verwendung von deuteriertem BSA Ionen die Masse von Tris-TMS-HO-AME ( $[M-18]^+$ -Ionen) zeigt, muss angenommen werden, dass es sich tatsächlich um einen weiteren hydroxylierten AME-Metaboliten handelt. Das Fragmentierungsmuster von Metabolit c weicht deutlich von den anderen Metaboliten ab (Spektrum s. Anhang). Dominierend ist hier die Bildung von  $[M-15-88]^+$  bzw.  $[M-18-96]^+$  Ionen nach Silylierung mit deuteriertem BSA. Hierbei kann es sich nicht um die Abspaltung von Tetramethylsilan handeln. Vielmehr legen die Massendifferenzen eine ungewöhnliche Abspaltung von  $O-Si(CH_3)_2(CH_2)$  nahe. Eine solche Abspaltung aus einer aromatischen Hydroxygruppe erscheint unwahrscheinlich.

Aufgrund der deutlichen Abweichungen in der Fragmentierung und da keine anderen Position (s. Abb.8) für eine Hydroxylierung übrig ist, wird vermutet, dass es sich bei dem Metaboliten c um 1-Hydroxymethyl-AME handelt.

### 3.2.3 Fragmentierung und Strukturaufklärung der Metabolite O1-O4

Nach oxidativer Umsetzung von AOH werden im Extrakt vier Peaks der Masse ( $[M-15]^+$ ) der vollständig silylierten HO-AOH gefunden. Anhand ihrer Retentionszeit werden die z.T. sehr kleinen Peaks als a-d bezeichnet (Abb.22). Molekülonen können - Reaktion I entsprechend (s. Abb.16) – sowohl für die monohydroxylierte Metabolite als auch für AOH nicht gefunden werden.



**Abb.22** GC-MS-MS ( $m/z = 547$ ) Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von AOH. Die dargestellte Masse entspricht dem  $[M-15]^+$  Ion von HO-AOH.

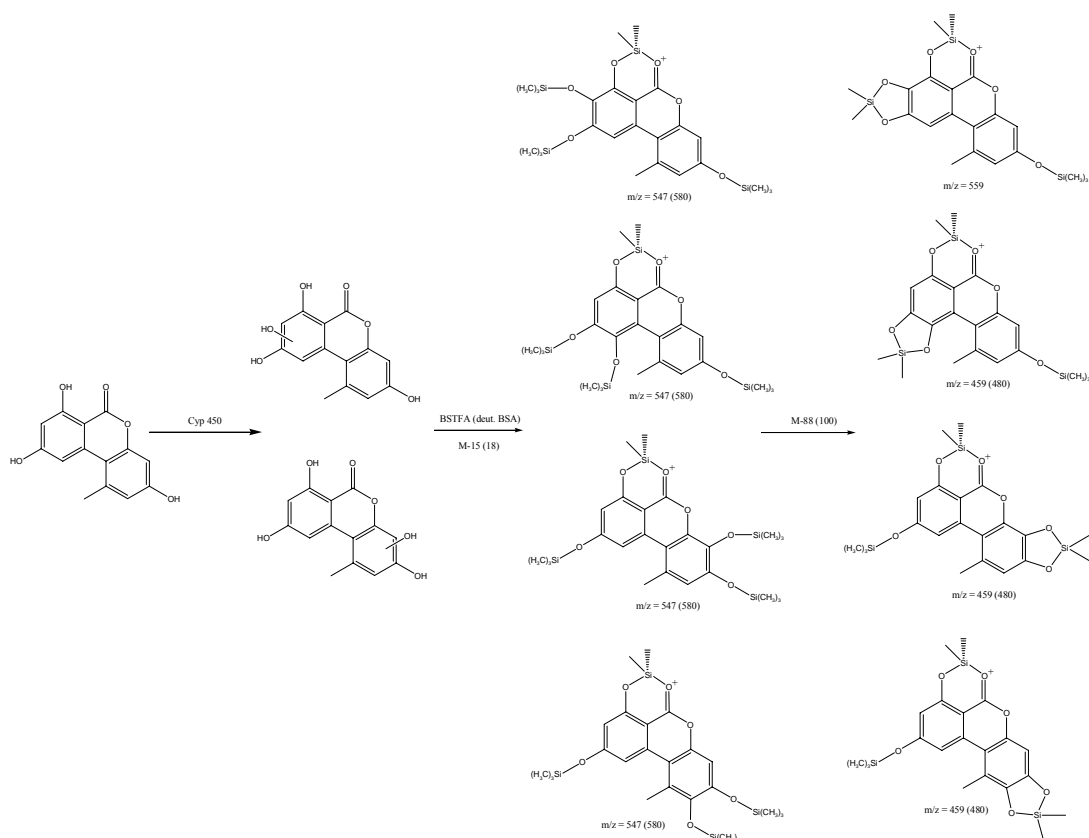
Die Annahme, dass es sich bei den Peaks a-d um monohydroxyliertes AOH handelt, wird durch den Einsatz von deuteriertem BSA bestätigt. Durch die GC-Analyse der einzelnen Metabolite können den HPLC-Peaks die entsprechenden GC-Peaks zugeordnet werden (Tab.3).

**Tab.3** Zuordnung der GC-Peaks der AOH Metabolite zu den in der HPLC gefundenen HO-AOH.

Peak in HPLC	Peak in GC	Retentionszeit GC [min]
O1	c	21,4
O2	b	20,3
O3	a	19,1
O4	d	22,6

Die MS-MS Spektren der durch Reaktion I gebildeten  $[M-15]^+$  Ionen zeigen für alle Metabolite ein ähnliches Fragmentierungsmuster (Spektren s. Anhang). Dominierend ist die Bildung von  $[M-15-88]^+$  und  $[M-15-88-72]^+$  Ionen. Diese Fragmentierung wird der Bildung des cyclischen Siloxans aus zwei vicinalen Hydroxygruppen in Reaktion II zugerechnet. Dem Modell folgend sind alle oxidativen AOH Metabolite aromatisch hydroxyliert und damit Catechole (Abb.23). Da die Bildung der  $[M-15-72]^+$  und  $[M-15-88-72]^+$  Ionen durch Abspaltung der TMS-Gruppe die einzigen weiteren Fragmentierungen sind, denen ein Strukturelement zugeordnet werden kann, ist die Aufklärung der Hydroxylierungspositionen der HO-AOH mittels GC-MS-MS nicht möglich.





**Abb.23** AOH Metabolite O1-O4: Bildung durch CYPs, Silylierung und Formierung der  $[M-15]^+$  Ionen (Reaktion I) sowie Weiterreaktion zu  $[M-15-88]^+$  Ionen (Reaktion II). Zahlen in Klammern geben die Massen(differenzen) bei Verwendung von deuteriertem Silylierungsmittel an.

O1 und O3 erweisen sich als erheblich instabiler als O2 und O4. So wurde nach Fraktionierung des oxidativen Ansatzes nur ein sehr geringer Anteil an O1 und O3 wiedergefunden. Eine Hydroxylierung im A-Ring (Position 8 oder 10) könnte diese Instabilität erklären, da sowohl die Pyrogallolstruktur von 8-HO-AOH als auch 10-HO-AOH als ortho-hydroxyliertes Hydrochinon sehr oxidationsanfällig und damit instabil sind. Es kann also vermutet werden, dass es sich bei O3 und O1 um 8-HO-AOH bzw. 10-HO-AOH handelt.

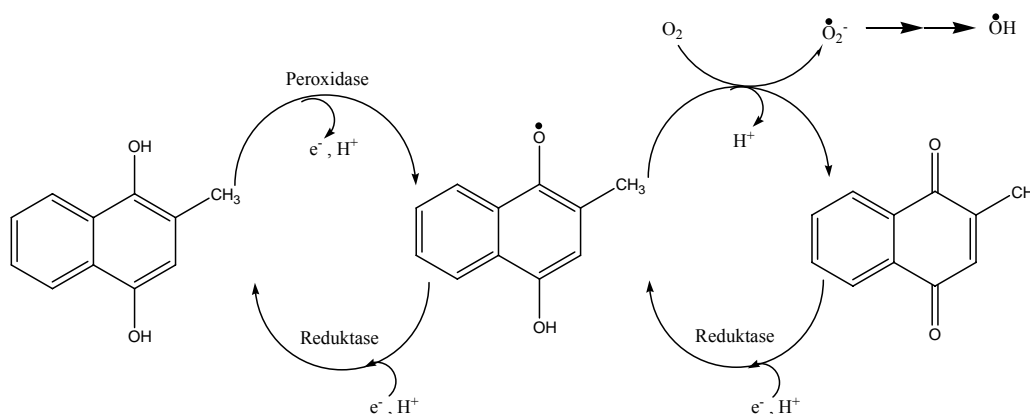
Das UV-Vis Spektrum von O2 (s. Anhang) zeigt aufgrund eines zusätzlichen Maximums bei 230 nm eine deutliche Ähnlichkeit zu dem Spektrum des im C-Ring hydroxylierten AME Metaboliten M4 (4-HO-AME, dessen UV-VIS Spektrum als einziger anderer Metabolit dieses Maximum aufweist. Dies kann als erster Hinweis dafür gewertet werden, dass es sich bei O2 um 4-HO-AOH handelt.

### 3.2.4 Zusammenfassung der Strukturaufklärung

Auf Grundlage der GC-MS-MS Spektren können die monohydroxylierten AME Metabolite identifiziert werden: Der oxidative Hauptmetabolite von AME in HLM (M5) ist 2-HO-AME. Hierbei handelt es sich ebenso um ein Catechol wie bei dem Hauptmetaboliten in RLM (M2), der 8-HO-AME ist. Als das Hydrochinon 10-HO-AME kann M3 identifiziert werden. Die Struktur des AME Metabolit M4 kann mit einer synthetischen Vergleichssubstanz als 4-HO-AME aufgeklärt werden.

Die vier hydroxylierten AOH Metabolite O1-O4 können aufgrund ihrer Fragmentierung als Catechole erkannt werden. Damit sind alle HO-AOH Metabolite aromatisch hydroxyliert. Die Hydroxylierungsposition kann jedoch nicht aus den Spektren abgeleitet werden. O1 und O3 erweisen sich als ausgesprochen instabil. Es wird angenommen, dass es sich um die im A-Ring hydroxylierten 8-HO-AOH bzw. 10-HO-AOH handelt.

Der Bildung von Catecholen im Rahmen des Xenobiotika- und Endobiotika-Metabolismus kommt besondere Aufmerksamkeit zu, da sie durch s.g. „Redoxcycling“ zu Zellschäden führen können. Hierbei handelt es sich um eine Art „elektrochemischen Kurzschluss“ von reduzierenden und oxidierenden Enzymsystemen (s. Abb.24), wobei reaktive Sauerstoffspezies generiert werden.



**Abb.24** Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Redoxcycling eines Hydrochinons (Menadion). Bei Catecholen verläuft die Reaktion entsprechend.

Die durch Oxidation aus den Catecholen entstehenden o-Chinone können überdies – sofern sie nicht durch Reaktion mit Glutathion entgiftet werden – mit kritischen Nucleophilen (DNA-Basen, Proteinen) reagieren und so auch durch Konjugatbildung Zellschäden hervorrufen (Bolton et al., 2000). Sollten die gebildeten Catechole nicht, oder nur

unzureichend durch COMT methyliert oder im Phase II Metabolismus konjugiert werden, kann ihre Bildung eine metabolische Aktivierung darstellen, die zu toxischen Effekten führt.

### **3.3 Umsetzung der Metabolite mit COMT**

Catechole werden im Organismus durch die Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) methyliert. Die COMT liegt hauptsächlich frei im Cytosol vor und überträgt eine Methylgruppe vom Cosubstrat *S*-Adenosyl-*L*-methionin (SAM) auf ein weites Spektrum an Substraten. Einzige strikte Voraussetzung ist, dass die Substrate zwei vicinale Hydroxygruppen aufweisen müssen (Lautala et al., 2001). Da die Methylierung durch COMT eine der wichtigsten Reaktionen in der „Entgiftung“ von ggf. im Phase I Metabolismus gebildeten Catecholen ist, wird die Methylierung der hydroxylierten AME und AOH Metabolite untersucht. Statt des Zusatzes von (aufgereinigter) COMT wird aus rationellen Gründen Rattenlebercytosol (RCYT) eingesetzt, da es eine ausreichend hohe COMT-Aktivität aufweist.

#### **3.3.1 AME-Metabolite**

Die Hydroxylierungsprodukte von AME werden einzeln mit COMT umgesetzt und mittels HPLC analysiert. Dabei werden alle Metabolite, denen in Kap.3.2.2 eine catecholische Struktur zugeordnet wurde (M1,M2,M4 und M5), methyliert. M3 stellt als Hydrochinon kein Substrat für die COMT dar. Tab.4 gibt eine Übersicht über die Umsetzung von HO-AME durch COMT.

Die catecholischen HO-AME werden alle zu über 90 % von der COMT umgesetzt. Während die zwei methylierten M5 Metabolite mit 57 % M5-CH<sub>3</sub>-1 und 43 % M5-CH<sub>3</sub>-2 in etwa gleichem Anteil gebildet werden, entsteht aus M2 und M4 jeweils ein dominierendes Produkt. So werden M2-CH<sub>3</sub>-2 und M4-CH<sub>3</sub>-2 um den Faktor sieben mal stärker gebildet als M2-CH<sub>3</sub>-1 bzw. M4-CH<sub>3</sub>-1. Die deutlich unterschiedlichen Konzentrationen im Ansatz zeigen dabei keinen Einfluss auf Umsatz oder Verteilung der Produkte.

**Tab.4** Produktverteilung nach Methylierung der HO-AME. Dargestellt sind die rel. Anteile nach COMT-Umsetzung. Daneben ist die Anzahl der Bestimmungen (n) und Konzentration im Ansatz (Berechnet aus der Flächensumme nach Umsetzung) angegeben.

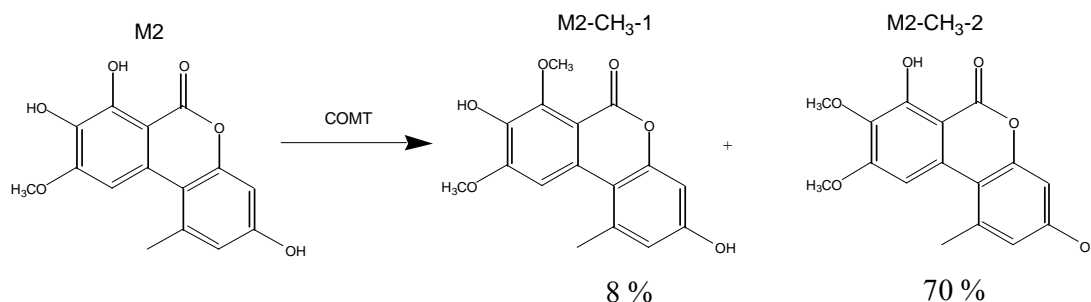
Metabolit	% Anteil nach Umsetzung mit COMT				n	c [µM]
	HO-AME	CH <sub>3</sub> -1	CH <sub>3</sub> -2	Polares Produkt		
<b>M1</b> (HO) <sub>2</sub> AME	13,6Γ3,9	58,7Γ3,8	-	27,7Γ1,7	3	0,04-1,5
<b>M2</b> 8-HO-AME	4,3Γ0,9	6,6Γ1,0	69,3Γ2,5	19,8Γ1,6	3	0,07-3
<b>M3</b> 10-HO-AME	<i>kein Catechol</i>				3	0,2-1
<b>M4</b> 4-HO-AME	2,5Γ2,9	13,0Γ1,9	84,5Γ4,4		4	0,2-6,7
<b>M5</b> 10-HO-AME	1,7Γ1,7	54,7Γ0,7	43,6Γ2,4		2	0,2-2,5

Vom dihydroxylierten M1 wird nur ein unpolarer Metabolit detektiert. Da sich auch die Methylierungsprodukte von M1 nicht mit der GC-MS detektieren lassen, kann nur vermutet werden, dass es sich um ein Methylierungsprodukt handelt.

Nach COMT-Umsetzung von M1 und M2 wird jeweils eine polarerer Metabolit als die Ausgangsverbindung gefunden, welcher in den Kontrollen ohne Cosubstrat nicht gefunden wird. (Retentionszeiten s. Anhang). Beide Verbindungen zeigen das charakteristische UV-VIS Spektrum von AME, lassen sich aber in der GC-MS-Analyse keinem Peak zuordnen. Für diese polaren Metabolite kann keine Struktur vorgeschlagen werden, da eine Erklärung fehlt, wie durch Methylierung ein polares Produkt entstehen kann. Eine andere Reaktion, z.B. eine enzymatische Spaltung des Lactonrings durch Enzyme des Cytosol würde auch im Kontrollansatz auftreten und kein SAM als Cosubstrat benötigen. Eine mögliche – jedoch nicht unbedingt wahrscheinliche – Erklärung wäre, dass die methylierten HO-AME im Gegensatz zu HO-AME Substrate für Enzyme (z.B. Hydrolasen, Lyasen) sind.

Die GC-MS-Analyse des Extraktes nach COMT Umsetzung zeigt für M2, M4 und M5 jeweils zwei Peaks der Masse methylierter HO-AME. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um die in der HPLC gefundenen Metabolite handelt und die Peaks werden M2 und M4 aufgrund der deutlichen Größenunterschiede zugeordnet. Bei M5 ist diese Zuordnung nicht möglich, da M5-CH<sub>3</sub>-1 und M5-CH<sub>3</sub>-2 in gleichen Mengen gebildet werden.

Im GC-MS zeigt M2-CH<sub>3</sub>-1 vorherrschend Molekülionen ( $[M]^+$  Ionen), während alle anderen Methylierungsprodukte dominierend  $[M-15]^+$  Ionen bilden. Bei M2-CH<sub>3</sub>-1 kommt es also nicht zur Bildung des cyclischen Siloxans aus der silylierten Hydroxygruppe in Position 7 (Reaktion I, s. Abb.25). Deshalb wird geschlussfolgert, dass die Hydroxygruppe in Position 7 bei M2-CH<sub>3</sub>-1 methyliert vorliegt und die Fragmentierung nicht möglich ist.



**Abb.25** Methylierungsprodukte von M2: M2-CH<sub>3</sub>-1 (8-HO-7-CH<sub>3</sub>O-AME) und M2-CH<sub>3</sub>-2 (7-CH<sub>3</sub>O-AME)

Daher wird angenommen, dass es sich bei M2-CH<sub>3</sub>-1 um 8-HO-7-CH<sub>3</sub>-O-AME und bei M2-CH<sub>3</sub>-2 dementsprechend um 7-CH<sub>3</sub>O-AME handelt. Die sterisch schlecht zugängliche Hydroxygruppe in Position 7 wird also mit einem Anteil von 8 % erwartungsgemäß in deutlich geringerem Umfang methyliert als die Hydroxygruppe in Position 8.

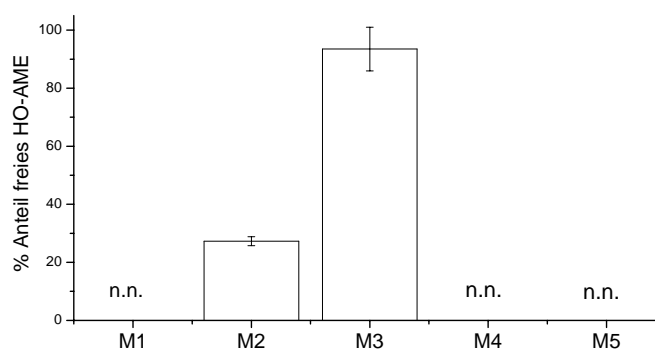
Die Methylierungsprodukte von M4 und M5 zeigen in MS-MS Untersuchungen eine nahezu gleiche Fragmentierung (Fragmentierungstabelle s. Anhang). Dabei werden dominierend  $[M-15-30]^+$  Ionen gebildet. Dies wird der Abspaltung zweier Methylgruppen aus einer trimethylsilylierten Methoxygruppe in ortho-Position zu einer Hydroxygruppe zugeordnet (Reaktion III). Dieser Befund bestätigt zwar, dass es sich bei den gefundenen Metaboliten um durch COMT methylierte Catechole handelt, ermöglicht aber keine Aussage über die Methylierungsposition.

Die Struktur von M4-CH<sub>3</sub>-1 kann durch Cochromatographie in GC und HPLC mit einer synthetisch hergestellten Vergleichssubstanz eindeutig als Graphislacton A (GLA, 3-CH<sub>3</sub>O-AME) identifiziert werden. Aufgrund des Ausschlussprinzips kann M4-CH<sub>3</sub>-2 die Struktur 3-HO-4-CH<sub>3</sub>O-AME zugeordnet werden.

Die Methylierungsposition von M5-CH<sub>3</sub>-1 und M5-CH<sub>3</sub>-2 kann nicht bestimmt werden.

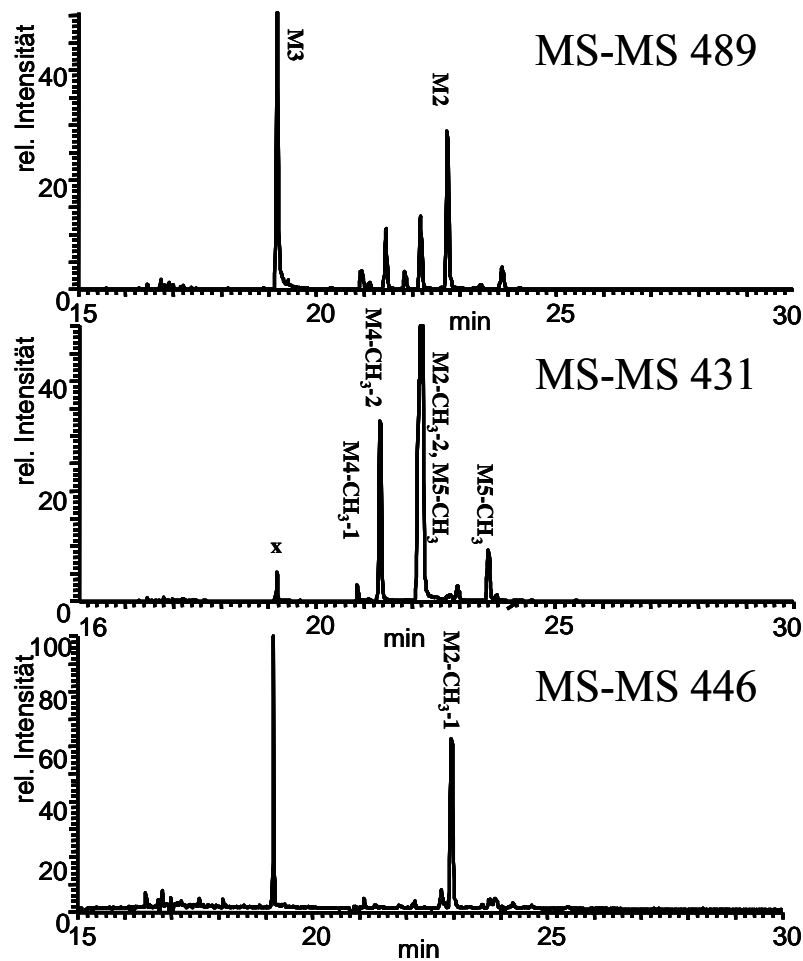
Nach gleichzeitiger Umsetzung von AME durch CYPs und COMT bleiben zwei der fünf HO-AME in messbaren Anteilen übrig. Ob das Cosubstrat zu Beginn oder in der Mitte der Inkubationszeit zugegeben wird, hat keinen Einfluss auf das Ergebnis. Der M3-Metabolit wird als Hydrochinon erwartungsgemäß in der gleichen Konzentration detektiert wie bei der Kontrollinkubation (ohne SAM).

Von dem Hauptmetaboliten M2 verbleiben 27 % der Kontrolle unmethyliert. Die anderen Metabolite (M1, M4 und M5) werden vollständig durch COMT umgesetzt und lassen sich nach gemischter Umsetzung mit CYPs und COMT weder mittels HPLC noch mittels GC-MS nachweisen (Abb.26, 27).



**Abb.26** Anteil nicht methylierter HO-AME Metabolite nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Im GC-MS-Chromatogram (Abb.27) lassen sich die Peaks der sechs methylierten HO-AME-Metabolite erkennen. Fünf davon zeigen dabei deutliche Peaks der Masse  $[M-15]^+$  Ionen, nur M2-CH<sub>3</sub>-1 zeigt deutliche Molekülionen (Abb.27). Die Retentionszeiten von M4-CH<sub>3</sub>-2 und M2-CH<sub>3</sub>-2 fallen zusammen. Zusätzlich zu den vorgestellten aus den einzelnen Umsetzungen bekannten Peaks wird ein Peak (x) mit  $m/z = 431$  bei der Retentionszeit von M3 gefunden. Auch wenn die Masse dieser Substanz mit der methylierter HO-AME ( $[M-15]^+$ -Ionen) übereinstimmt – auch nach Silylierung mit deuteriertem BSA – wird diese Verbindung für eine Verunreinigung bzw. ein M3-Fragment gehalten und nicht näher betrachtet.



**Abb.27** GC-MS-MS Chromatogramme der gemischten Umsetzung von AME mit CYPs und COMT. Oben:  $m/z = 489$  repräsentiert die Masse der  $[M-15]^+$  Ionen von HO-AME. Mitte:  $m/z = 431$  repräsentiert die Masse der  $[M-15]^+$  Ionen von methylierten HO-AME. Unten:  $m/z = 446$  repräsentiert die Masse der Molekülonen von methylierten HO-AME.

Im Gegensatz zur nahezu vollständigen einzelnen Umsetzung von M2 verbleiben nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT 27 % unmethyliert. Berechnet man die Konzentration von M2 im gemischten Ansatz auf Grundlage der Ergebnisse der oxidativen Umsetzung (Kap.3.1) ergibt sich eine Konzentration von etwa  $5 \mu\text{M}$  für M2. Damit liegt die Konzentration im gemischten Umsatz etwas über der Konzentration in einzelnen Umsetzungen mit  $0,7\text{-}3 \mu\text{M}$  (Tab.4). Da auch der Anteil von nicht-methyliertem M2 unabhängig vom Zeitpunkt der SAM-Zugabe und der Einfluss der Konzentration auf die Methylierung relativ gering ist, können Konzentrationsunterschiede die gefundene Diskrepanz zwischen einzelner und gemischter Umsetzung nicht erklären.

### 3.3.2 AOH-Metabolite

Die vier catecholischen HO-AOH (O1-O4) werden einzeln mit COMT umgesetzt und mittels HPLC analysiert. Dabei werden O2 und O4 zu zwei Metaboliten umgesetzt (Tab.5). O1 erwies sich als sehr instabil, so dass auch in der Kontrolle kein O1 bzw. Metabolite nachgewiesen werden konnten. Von O3 werden nach Kontrollumsetzung nur geringe Menge gefunden. Aufgrund der geringen Konzentrationen können Methylierungsprodukte jedoch weder eindeutig detektiert noch ausgeschlossen werden.

**Tab.5** Produktverteilung nach Methylierung der HO-AME. Dargestellt sind die rel. Anteile nach COMT-Umsetzung. Daneben ist die Anzahl der Bestimmungen (n) und der Konzentration im Ansatz (Berechnet aus der Flächensumme nach Umsetzung) angegeben.

Metabolit	% Anteil nach Umsetzung mit COMT			n	c [µM]
	HO-AOH	CH <sub>3</sub> -1	CH <sub>3</sub> -2		
O1	<i>nicht bestimmbar</i>				
<b>O2</b>	9,8Γ3,4	8,1Γ1,1	82,1Γ2,3	2	0,5-1,8
O3	<i>nicht bestimmbar</i>				
<b>O4</b>	0	83,7Γ2,9	16,3Γ2,9	3	0,04-0,8

Während O4 vollständig durch die COMT zu zwei Produkten (O4-CH<sub>3</sub>-1 und O4-CH<sub>3</sub>-2) methyliert wird, bleiben von O2 rund 10 % unmethyliert zurück. Bei beiden Metaboliten wird eines der Methylierungsprodukte mit einem Anteil von über 80 % dominierend gebildet.

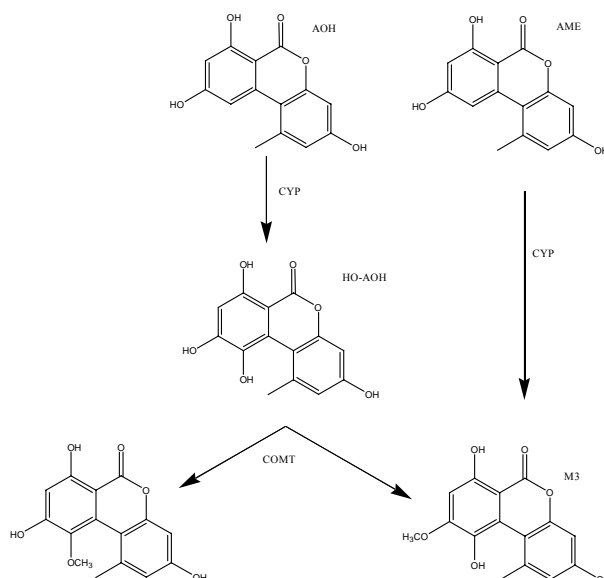
Die GC-MS Analyse nach COMT Umsetzungen von O2 und O4 zeigt jeweils zwei Peaks der Masse ([M-15]<sup>+</sup> Ionen) der methylierten HO-AOH-Metabolite. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um die in der HPLC gefunden Peaks handelt und die Peaks werden aufgrund ihrer deutlichen Größenunterschiede zugeordnet. Im MS-MS der [M-15]<sup>+</sup> Ionen zeigen die vier Methylierungsprodukte dominierend [M-15-30]<sup>+</sup> Fragmentionen. Dies wird der Abspaltung zweier Methylgruppen aus einer trimethylsilylierten Hydroxygruppe in ortho-Position zu einer Methoxygruppe zugeordnet (Reaktion III). Diese Fragmentierung bestätigt zwar, dass es sich bei den gefunden Metaboliten um durch COMT methylierte Catechole handelt, ermöglicht aber keine Aussage über die



Methylierungsposition. Da als einzige weitere Fragmentierung die Spaltung des TMS-Ether gefunden wird ( $[M-15-30-72]^+$  Ionen), kann weder die Hydroxylierungs- noch die Methylierungsposition von O2 bzw. O4 ermittelt werden.

Nach COMT Umsetzung von O1 lassen sich auch mit GC-MS keine Methylierungsprodukte detektieren. Dies wird auf die geringe Stabilität von O1 zurückgeführt und ist somit nicht so zu interpretieren, dass sich O1 nicht durch COMT methylieren lässt.

Die GC-MS-Analyse der Umsetzung von O3 zeigt einen Peak ( $O3-CH_3$ ) bei der Masse des methylierten HO-AOH ( $[M-15^+]$ -Ionen). Die Retentionszeit und Fragmentierung von  $O3-CH_3$  stimmt mit dem AME Metaboliten M3 überein. Dieser Tatsache folgend, handelt es sich bei O3 um 10-HO-AME, da man – wie Abb.28 zeigt – nur 10-HO-AME (M3) durch Methylierung in M3 überführen kann.



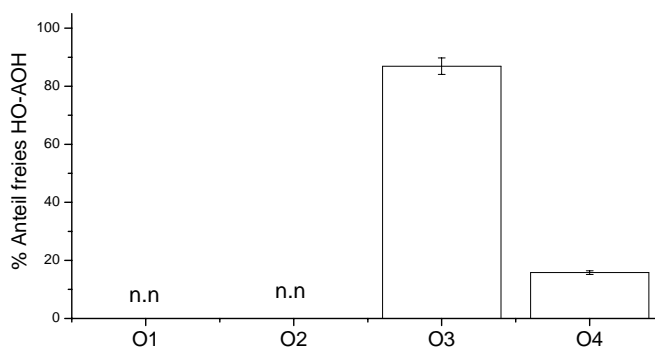
**Abb.28** Mögliche Bildungen von M3 (10-HO-AME): durch CYP aus AME (rechts); durch CYP und COMT aus AOH (links).

Trotz der Bestätigung dieses Befundes durch Cochromatographie ist die Identifikation von O3 als 10-HO-AOH als unsicher anzusehen. Zum einen coeluiert  $O3-CH_3$  mit O3, zum anderen wird auch nach Methylierung von HO-AME bei entsprechender Retentionszeit ein nicht zuzuordnender Peak detektiert. Folglich kann die Identifikation von  $O3-CH_3$  als O3 und damit O3 als 10-HO-AOH nur als Vermutung gesehen werden.

Nach gleichzeitiger Umsetzung von AOH durch CYPs und COMT bleiben von den zwei oxidativen Hauptmetaboliten O3 und O4 messbare Anteile nicht-methylierter Produkte übrig. Der Zeitpunkt der Zugabe des Cosubstrat zeigt keinen Einfluss auf das Ergebnis.

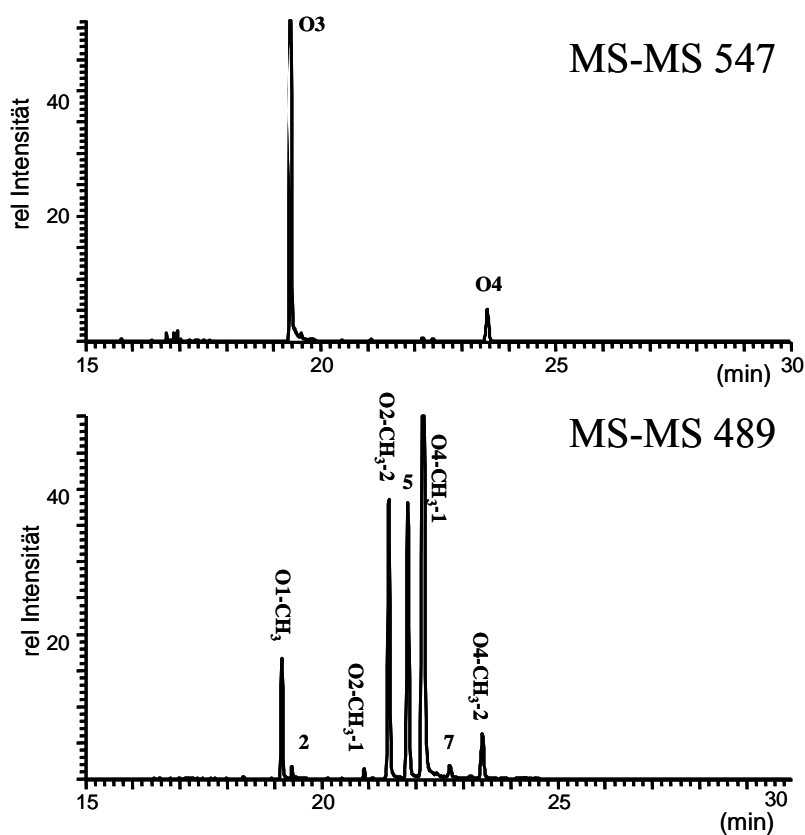
O3 wird dabei mit einem Anteil von 83 % der Konzentration der Kontrollinkubation detektiert. Von O4 verbleiben 15 % unmethyliert. Die anderen nur im geringen Umfang gebildeten Metabolite (O1 und O2) werden vollständig durch COMT umgesetzt und lassen sich nach gemischter Umsetzung mit CYPs und COMT weder mit HPLC noch mit GC-MS nachweisen (Abb.29, 30).

Bei O1-O4 handelt es sich um aromatisch hydroxyliertes AOH, also um Catechole (s. Kap.3.2.3). Da folglich alle Metabolite Substrate für die COMT darstellen sollten, ist der hohe Anteil an nicht-methyliertem O3 bemerkenswert. Das Catechol O3 stellt ein ungeeignetes Substrat für die COMT dar.



**Abb.29** Anteil nicht-methylierter HO-AOH nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die GC-MS-Analyse nach gemischter Umsetzung zeigt acht Peaks bei der Masse des methylierten HO-AOH ( $[M-15]^+$  Ionen). Davon können fünf der Umsetzung von O2, O3, und O4 zugeordnet werden (Abb.30). Es ist wahrscheinlich, dass zwei der weiteren Peaks Methylierungsprodukte von O2 sind.



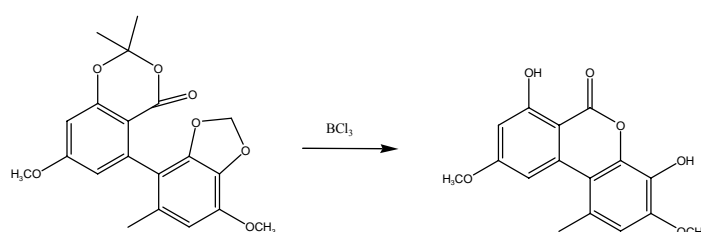
**Abb.30** GC-MS-MS Chromatogramme der gemischten Umsetzung von AOH mit CYPs und COMT. Oben:  $m/z = 547$  repräsentiert die Masse der  $[M-15]^+$  Ionen von HO-AOH. Mitte:  $m/z = 489$  repräsentiert die Masse der  $[M-15]^+$  Ionen von methylierten HO-AOH.

Die MS-MS-Spektren der deutlich unterschiedlich großen Peaks zeigen alle dominierend die Bildung der  $[M-15-30]^+$  Ionen, was der Abspaltung von zwei Methylgruppen zugeordnet wird (Reaktion III). Daneben werden ausschließlich  $[M-15-30-72]^+$  Ionen in nennenswerten Anteilen (Intensität  $>1\%$ ) gebildet. Dies wird auf die Abspaltung des verbleibenden freien TMS-Ethers zurückgeführt (Tabelle der Fragmente s. Anhang).

### 3.3.3 Bestätigung der Identität von synthetischem 4-HO-AME

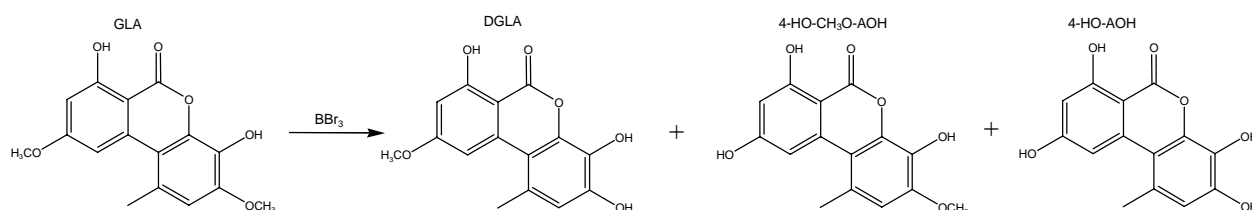
Bei einem der methylierten HO-AME handelt es sich um Graphsilacton A (GLA, 4-HO-3-CH<sub>3</sub>O-AME). Ein Nebenprodukt der von Gehring (2005) durchgeführten GLA Totalsynthese kann als Desmethylgraphsilacton A (DGLA, 4-HO-AME) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um den hydroxylierte AME-Metabolit M4 (4-HO-AME):

In der Totalsynthese von GLA wird im letzten Syntheseschritt eine Acetonid-Schutzgruppe und eine Acetalschutzgruppe unter Einsatz von BBr<sub>3</sub> bzw. BCl<sub>3</sub> entfernt (Abb.31).



**Abb.31** Letzter Schritt der Totalsynthese von GLA: Abspaltung der Schutzgruppen (Gehring, 2005)

Durch den Einsatz der Lewisäuren BBr<sub>3</sub> und BCl<sub>3</sub> kommt es z.T. auch zur Spaltung von Methylethern. Während durch den Einsatz von BBr<sub>3</sub> ausschließlich GLA gebildet wird, deuten die NMR-Daten der Produkte nach Einsatz von BCl<sub>3</sub> an, dass zusätzlich demethyliertes GLA gebildet wird. Hier sind drei Produkte denkbar. Neben einem vollständig demethylierten Metabolit (4-HO-AOH), können zwei einfach demethylierte Derivate (4-HO-AME und 4-HO-3-CH<sub>3</sub>O-AOH) entstehen. (Abb.32).



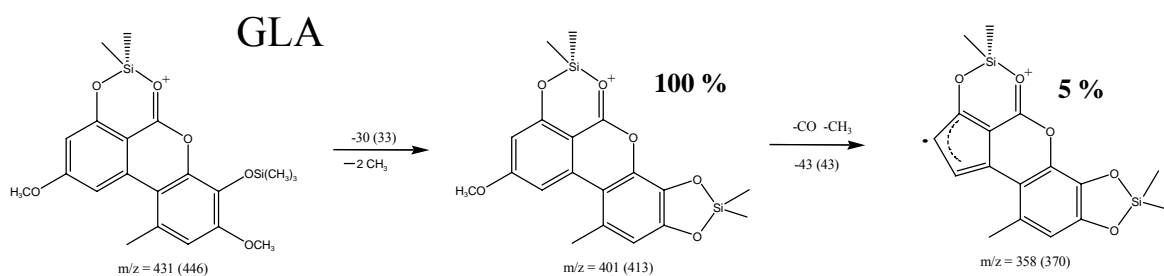
**Abb.32** Demethylierung von GLA: Drei demethylierte GLA sind möglich. Das AME-Derivat Desmethylgraphsilacton (DGLA, 4-HO-AME) und die AOH Derivate 4-HO-3-CH<sub>3</sub>O-AOH sowie 4-HO-3-AOH.

Die HPLC- und GC-Analytik zeigen, dass unter den von Gehring (2005) gewählten Bedingungen ausschließlich ein einfach demethyliertes Produkt gebildet wird. Im GC-MS-MS der [M-15]<sup>+</sup> Ionen (m/z = 489) zeigt dieses Nebenprodukt deutlich die

Fragmentierungsreaktion II und die Ringverkleinerung des A-Rings, also die Bildung von  $[M-15-43]^+$ ,  $[M-15-88]^+$   $[M-15-43-88]^+$  Ionen (Spektrum s. Anhang). Hierdurch kann es eindeutig als Desmethylgraphislacton (DGLA, 4-HO-AME) identifiziert werden. Das andere Demethylierungsprodukt (4-HO-3-CH<sub>3</sub>O-AOH) würde statt dessen in Fragmentierungsreaktion III  $[M-15-30]^+$  Ionen bilden.

Das Nebenprodukt lässt sich weiterhin mittels COMT zu GLA methylieren. Da nur DGLA hier Substrat sein kann, wird die Identifikation des Nebenproduktes als DGLA bestätigt. Es steht also neben GLA auch synthetisches DGLA als Vergleichssubstanz zur Verfügung.

Die Reinheit des synthetischen GLA wird mittels HPLC und GC bestätigt. Auch stimmt die Fragmentierung der  $[M-15]^+$  Ionen im MS-MS mit der Bildung von  $[M-15-30]^+$  und  $[M-15-30-43]^+$  Ionen erwartungsgemäß (Reaktion III, A-Ringverkleinerung) überein (Abb.33, GC-MS-MS-Spektren s. Anhang).



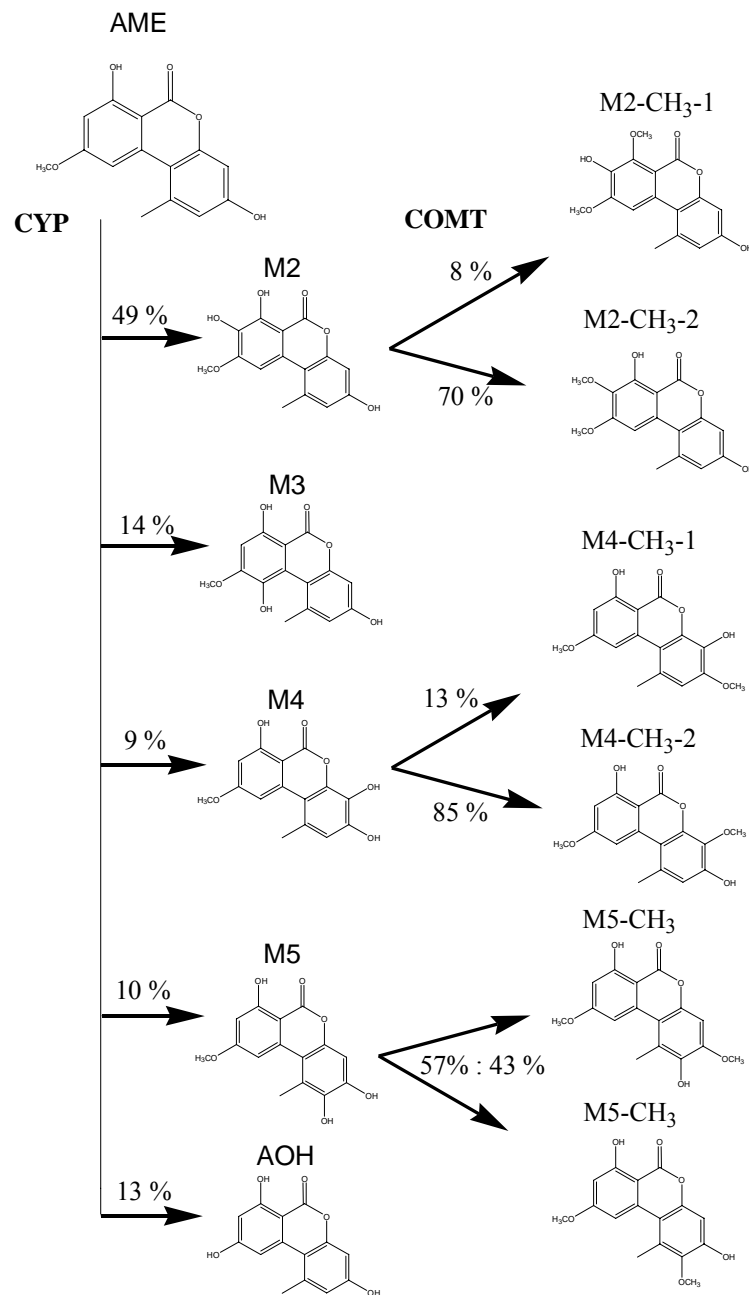
**Abb.33** Fragmentierungsmuster von GLA (4-HO-3-CH<sub>3</sub>O-AME) im MS-MS. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensität der Ionen dar. Zahlen in Klammern geben die Massen(differenzen) bei Verwendung von deuteriertem Silylierungsmittel an.

### 3.3.4 Zusammenfassung und Diskussion der COMT-Umsetzung

Freie Catechole können in der Zelle toxische Wirkungen haben. Neben Konjugationen stellt die Methylierung durch die COMT die wichtigste Metabolisierung von gebildeten Catecholen dar. Alle catecholischen AOH und AME Metabolite werden durch die COMT umgesetzt. M4 (10-HO-AME) stellt als Hydrochinon kein Substrat für die COMT dar.

Die monohydroxylierten AME M4 und M5 werden nahezu vollständig methyliert. Während bei M5 die beiden Methylierungsprodukte in etwa der gleichen Menge gebildet werden, wird bei M4 ein Produkt in deutlich geringerem Umfang gebildet. Dieses

Minorprodukt konnte als das in Flechten vorkommende Graphislacton A (GLA) identifiziert werden. M2 wird ebenfalls nahezu vollständig umgesetzt, es verbleiben aber bei paralleler Umsetzung durch CYPs und COMT 15 % nicht methyliert. Dies könnte ein Hinweis sein, dass M2 ein nicht so gutes Substrat für die COMT ist. Da die Struktur der HO-AME bekannt ist, kann auf Grundlage der MS-Spektren die Methylierungsposition von vier der sechs Metabolite ermittelt werden. Abb.34 gibt einen Überblick über die aus AME durch CYPs und COMT gebildeten Metabolite.

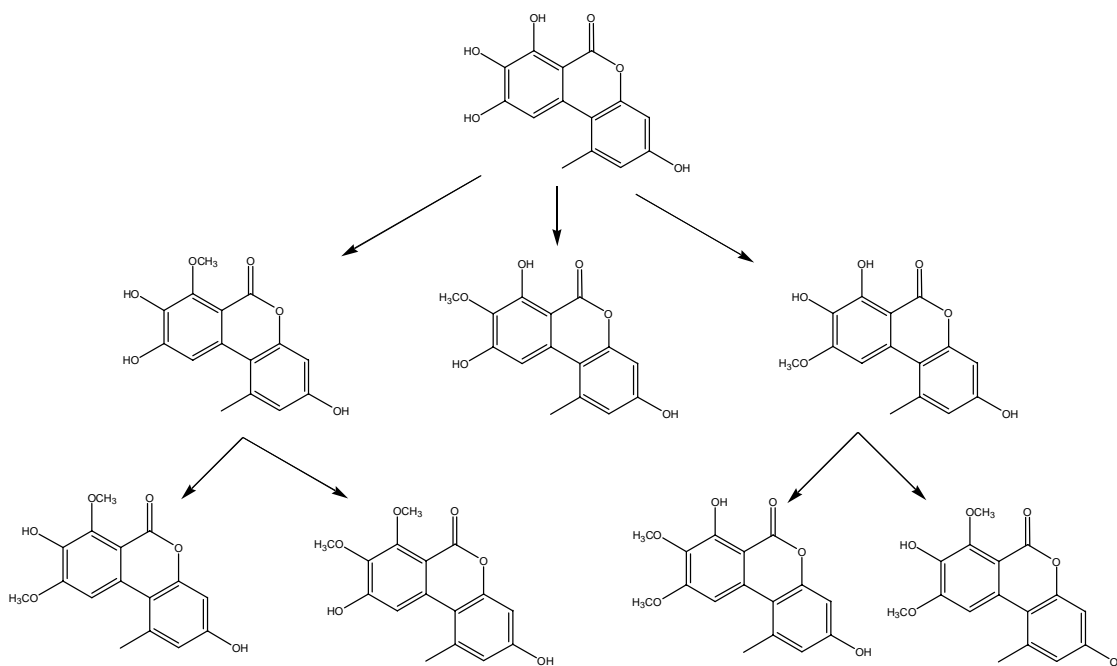


**Abb.34** *In vitro* AME-Metabolismus: Umsetzung durch CYPs und COMT aus Rattenleber. % Zahlen geben die Produktanteile an der jeweiligen Reaktion an.

Von den AOH Metaboliten können nur O2 und O4 einzeln durch COMT umgesetzt werden. O1 und O3 erweisen sich als zu instabil. O2 wird mit 90 % Umsatz zu zwei methylierten Produkte umgesetzt. Nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT ist er ebenso wie O1 nicht mehr nachweisbar. Hingegen verbleiben von O4, das einzeln vollständig von COMT umgesetzt wird, im gemischten Ansatz 15 % unmethyliert. Der instabile Hauptmetabolit O3 wird so gut wie nicht methyliert. Es muss also davon ausgegangen werden, dass O3 kein gutes Substrat für die COMT darstellt. O3 ist auch erheblich instabiler als die anderen Metabolite. Interpretiert man Instabilität als Reaktivität ist die Bildung von O3 aus toxikologischer Sicht kritisch zu betrachten, da es zu Adduktbildungen o.ä. kommen kann. O3 wird jedoch durch HLM und SLM kaum gebildet. Wobei – wie in asd diskutiert – nur die HLM eines Individuums verwendet wurden und es große individuelle Unterschiede in der CYP Expression und damit im Metabolismus gibt.

Die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster des methylierten O3 (O3-CH<sub>3</sub>) entspricht dem des AME-Metaboliten M3. Dies legt nahe, dass es sich bei O3 um 10-HO-AOH handelt.

Insgesamt bleibt COMT-Umsetzung mit diesen Ergebnissen hinter den Erwartungen für die Strukturaufklärung der vier HO-AOH zurück, da I.) die Identifikation über die Bildung von M3 (s.o.) nicht eindeutig verläuft und II.) das Pyrogallol nicht wie erhofft identifiziert werden kann: Die Umsetzung eines Pyrogallols mit COMT würde theoretisch zu sieben Produkten, darunter vier dimethylierte, führen (Abb.35). S. Kulling (2001) konstatiert für IF in ihrer Habilitationsschrift, dass in Pyrogallolstrukturen nur die mittlere Hydroxygruppe durch COMT methyliert und so nur ein Produkt gebildet werden kann, während Catechole zu zwei Produkten führen. Die Übertragung dieses Ergebnisses auf HO-AOH Metabolite hätte die Möglichkeit zur Folge, über die Zahl der Methylierungsprodukte das Pyrogallol 8-HO-AOH zu identifizieren. Da aber kein HO-AOH eindeutig ein oder mehr als 2 Methylierungsprodukte zeige, kann diese Option zur Strukturaufklärung nicht genutzt werden.



**Abb.35** Mögliche Methylierungsprodukte von 8-HO-AOH durch COMT

Auch kann festgestellt werden, dass sich mit den ausgewählten Methoden die Umsetzung von HO-AOH mit COMT nur unzureichend untersuchen lässt. Insbesondere die geringe Affinität von O<sub>3</sub> zur der COMT bedarf weiterer Untersuchungen.

Als weiteres Ergebnis der gemischten COMT Umsetzung muss festgehalten werden, dass der Zeitpunkt der Zugabe von SAM sowohl bei AOH als auch bei AME keinen Einfluss auf den Anteil der gebildeten Polymere hat. Dies unterstützt die Annahme, dass diese Produkte aus den Mykotoxinen selbst und nicht aus ihren hydroxylierten Metaboliten gebildet werden. Wäre letzteres der Fall, müsste der Anteil der Polymere bei späterer Zugabe von SAM größer werden, da die hydroxylierten Metabolite länger frei im Ansatz vorliegen und dabei als Reaktionspartner zur Verfügung stehen.



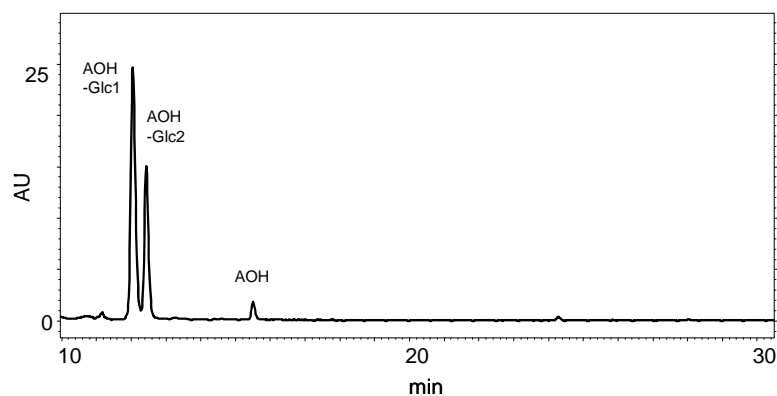
### 3.4 Mikrosomale Konjugation mit Glucuronsäure

#### 3.4.1 Qualitative Betrachtung

Zur Untersuchung des konjugativen Metabolismus werden AME und AOH mit Rattenlebermikrosomen in Anwesenheit von aktivierter Glucuronsäure (Uridine-5'-Diphosphat-Glucuronsäure, UDPGA) umgesetzt .

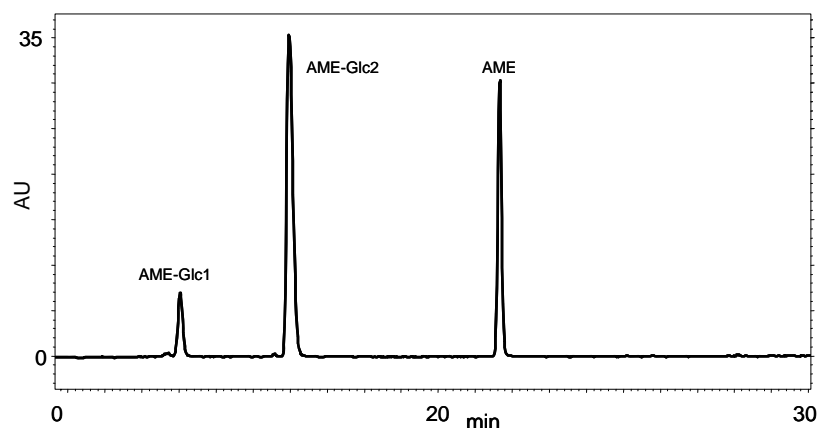
Die Aufarbeitung erfolgt I) durch Extraktion nach Ansäuern mit Ethylacetate und II) durch Fällung der Proteine und direkten Einsatz der Lösung. Die entstehenden Metabolite werden mittels HPLC-DAD analysiert.

Die Chromatogramme zeigen nach Umsetzungen von AOH zwei Peaks polarerer Verbindungen, welche im Kontrollansatz nicht zu finden sind. Diese zwei gebildeten vermutlichen Glucuronide weisen das für AOH charakteristische UV-VIS Spektrum auf (s. Anhang) und werden nach ihrer Retentionszeit als AOH-Glc1 und AOH-Glc2 bezeichnet. Wie aus dem Chromatogramm (Abb.36) ersichtlich, werden die entstehenden Metabolite nicht vollständig voneinander getrennt. Auch Variationen des Lösungsmittelgradienten der HPLC führen weder zu einer deutlich verbesserten Trennung, noch können weitere Metabolite detektiert werden.



**Abb.36** HPLC-DAD (254 nm) Chromatogramm nach Inkubation von AOH mit Mikrosomen in Anwesenheit von UDPGA und Extraktion mit Ethylacetat.

Nach Umsetzung von AME lassen sich ebenfalls zwei deutlich polarere Verbindungen detektieren. Diese weisen das charakteristische UV-VIS Spektren von AME auf und werden als AME-Glc1 und AME-Glc2 bezeichnet. Im Gegensatz zu den AOH Metaboliten zeigen diese deutlich verschiedene Retentionszeiten (Abb.37).



**Abb.37** HPLC-DAD (254 nm) Chromatogramm nach Inkubation von AOH mit Mikrosomen in Anwesenheit von UDPGA nach Extraktion mit Ethylacetat.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den entstehenden polaren Produkten tatsächlich um Glucuronide handelt, werden die Extrakte der Umsetzung mit LC-MS untersucht. Auch hier wird, wie bei der Analyse der oxidativen Metabolite, im positiven ESI Modus gearbeitet.

Für die beiden AOH Metabolite wird neben den  $[M+1]^+$  Ionen sowohl die Masse der Natrium- ( $[M+23]^+$ ) als auch der Kalium-Addukte ( $[M+39]^+$ ) der Glucuronide gefunden. Des Weiteren kommt es – wie erwartet – bei der ESI zur Spaltung der Glykosidbindung der Glucuronide und die Spektren zeigen die Masse von AOH ( $[M+1]^+$ ). (Tab.6, Spektren s. Anhang)

**Tab.6** Massen von AOH, AME und ihrer Glucuronide im LC-ESI(+)-MS (Spektren s. Anhang)

	<b>AOH</b>	<b>AOH-Glc1</b>	<b>AOH-Glc1</b>
<b>m/z</b>		473	473
		457	457
		435	435
	259	259	259

$$M(\text{AOH}) = 258 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{AOH-Gluc}) = 434 \text{ g/mol}$$

	<b>AME</b>	<b>AME-Glc1</b>	<b>AME-Glc1</b>
<b>m/z</b>			487
			449
		471	471
	273	273	273

$$M(\text{AME}) = 272 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{AME-Gluc}) = 448 \text{ g/mol}$$

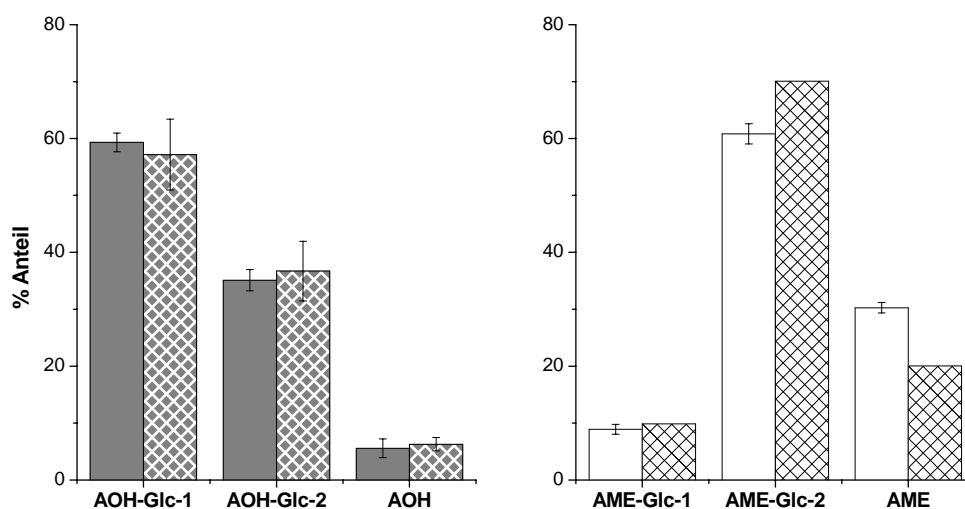
Die für die AME Metabolite erhaltenen Spektren der zwei AME Glucuronide entsprechen diesem Befund, bei AME-Glc-1 lassen sich allerdings nur die Massen des Natrium-Adduktes sowie die Masse von AME  $[M+1]^+$  erkennen. (Tab.6, Spektren s. Anhang)

Durch LC-ESI-MS konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den zwei Metaboliten der beiden Mykotoxine um Glucuronide handelt. Eine Aussage über die Position der Konjugation lässt sich aber anhand der erhaltenen Spektren nicht treffen.

### 3.4.2 Quantitative Betrachtung

Aus AOH werden bei einem Umsatz von  $94,4 \pm 1,6$  % die beiden Glucuronide im Anteil 1:2 gebildet. Bei AME liegt der Umsatz mit  $69,2 \pm 0,9$  % um  $\odot$  niedriger und eines der Glucuronide wird mit einem Anteil von 1:7 nur in geringem Umfang gebildet. (Abb.38).

Die AOH-Glucuronide lassen sich vollständig aus saurer Lösung mit Ethylacetat extrahieren. Bei AME zeigt die wässrige Aufarbeitung deutliche Abweichungen in der Verteilung nach der Umsetzung (Abb.38). Eventuell sind die AME-Glucuronide nicht vollständig extrahierbar. Da die Streuung der Messergebnisse nach Extraktion geringer ist und eine Extraktion generell eine bessere Abtrennung anderer Bestandteile vor der HPLC Trennung ermöglicht, wird diese Aufarbeitung bevorzugt.



**Abb.38** Anteile nach Umsetzung von AOH (links) und AME (rechts) mit Mikrosomen in Anwesenheit von UDPGA. Einfarbige Balken: Aufarbeitung nach Extraktion; karierte Balken: wässrige Aufarbeitung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (bei AME (wässrig) Mittelwert aus Doppelbestimmung).

Die Extrahierbarkeit lässt erkennen, dass die entstehenden Glucuronide im Sauren eine gewisse Polarität aufweisen. Variationen des pH-Wert zeigen, dass sich bei einem pH-Wert von 7,4 weniger als 5 % der Glucuronide beider Mykotoxine extrahieren lassen. Folglich kann angenommen werden, dass bei diesem pH-Wert nahezu alle Glucuronsäurekonjugate deprotoniert vorliegen.

Das AME Molekül hat zwei freie Hydroxygruppen und bietet so zwei mögliche Positionen für die Konjugation mit Glucuronsäure durch die Glucuronyltransferasen (UGTs). Die Hydroxygruppe in Position 7 ist durch die direkte Nachbarschaft zur Ketogruppe sterisch weniger gut zugänglich. Des Weiteren bildet sich – wie die Untersuchungen von Molina et al. (1998) zeigen – zwischen dem Wasserstoffatom dieser Hydroxygruppe und dem Sauerstoffatom der Ketogruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung aus. Aufgrund dieser Erschwerung einer Glucuronidierung lässt sich also erwarten, dass die Glucuronidierung der Hydroxygruppe in Position 7 in deutlich geringerem Ausmaß stattfindet als die der relativ gut zugänglichen Hydroxygruppe in Position 3.

Tatsächlich wurden zwei Glucuronide in deutlich verschiedenen Anteilen (1:7) gefunden. Vermutlich handelt es sich bei AME-Glc-1, welches deutlich weniger gebildet wurde, um das 7-Glucuronid. Während der Hauptmetabolit AME-Glc-2 wahrscheinlich das in Position 3 glucuronidierte AME ist.

Da im AOH Molekül die Hydroxygruppe in Position 9 nicht methyliert vorliegt, stellt sie eine weitere mögliche Position zur Konjugation mit Glucuronsäure dar. Dabei sind die Hydroxygruppen in Position 9 und in Position 3 aus sterischer Sicht in etwa gleichwertig. Für die Hydroxygruppe in Position 7 gilt das für AME diskutierte. Es lässt sich also erwarten, dass drei Glucuronide gebildet werden, von denen zwei in einem deutlich größeren Anteil gebildet werden.

Tatsächlich werden nur zwei Glucuronide gefunden. Dabei entsteht AOH-Glc-1 zu einem etwa doppelt so großem Anteil wie AOH-Glc-2. Bei AOH-Glc-2 und AOH-Glc-1 handelt es sich vermutlich um die Glucuronide in Position 9 und 3. Die sterisch ungünstig liegende Hydroxygruppe in Position 7 wird entsprechend nicht, oder nur in einem sehr geringen Umfang konjugiert. Vermutlich wird AOH so schnell (Umsatz 95 %) durch die UGTs zum 3- und 9-Glucuronid umgesetzt, dass es nicht wie bei AME zu einer Bildung des 7-Glucuronids kommt.

Vergleicht man die Umsatzraten von AOH und AME erkennt man, dass AOH unter den gewählten Bedingungen um etwa ein Drittel stärker konjugiert wird. Da sich die beiden Mykotoxine nur durch Methylierung der Hydroxygruppe in Position 9 unterscheiden, wird vermutet, dass die Konjugation dieser Hydroxygruppe bei AOH dieses Drittel ausmacht.

### 3.4.3 Umsetzung durch einzelne Isoenzyme

Bei den UGTs handelt es um eine vielfältige Gruppe von Enzymen, die aktivierte Glucuronsäure auf gegebenenfalls im Phase I Metabolismus funktionalisierte Xenobiotika und Endobiotika übertragen. Sie werden anhand ihrer Übereinstimmung in ihrer Primärsequenz in die Familien UGT 1 und UGT 2 eingeteilt. Dabei weisen die Isoenzyme eine unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Des Weiteren werden in verschiedenen Geweben die Isoenzyme unterschiedlich (stark) exprimiert. Um zu erfahren, welche humanen Isoenzyme AOH und AME glucuronidieren und so einen Einblick zu erhalten, in welchen Geweben diese Mykotoxine konjugiert werden können, werden Inkubationen mit s.g. Supersomen<sup>®</sup> durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Mikrosomen aus transfizierten Insektenzellen, welche jeweils eine humane UGT exprimieren. Als Kontrolle der Aktivität der Supersomen<sup>®</sup> werden Inkubationen mit 4-(Trifluormethyl)umbiliferon (Ergebnis s. Methoden) durchgeführt.

Nahezu alle eingesetzten UGTs glucuronidieren AOH und AME (Tab.7). Bei allen Isoenzymen die AME umsetzen, werden – wenn auch in geringem Umfang – neben AME-Glc-2 auch AME-Glc-1 gebildet. Bei AOH war aufgrund chromatographischer Schwierigkeiten eine Differenzierung zwischen AOH-Glc-1 und AOH-Glc-2 nicht möglich.

**Tab.7.:** Aktivitäten einzelner Isoenzyme für die Glucuronidierung von AOH bzw. AME. Ein + bedeutet, dass die UGT das Mykotoxin umsetzt.

UGT	Umsetzung von AOH	Umsetzung von AME
1A1	+	+
1A4	-	-
1A7	+	+
1A8	+	+
1A9	+	+
1A10	+	+
2B7	-	-

Die in ihrer Primärsequenz sehr ähnlichen UGT 1A8 und UGT 1A10 sind die vorherrschenden UGTs im menschlichen Darm (King et al., 2000). Die gefundene Aktivität spricht dafür, dass eine Glucuronidierung von AOH und AME direkt nach der Resorption im Darm stattfinden kann. UGT 1A1 ist die wichtigste UGT in der menschlichen Leber. Daneben werden in der Leber auch eine Vielzahl andere UGTs exprimiert, darunter UGT 1A9 (King et al., 2000). Die Tatsache, dass UGT 1A1 die Mykotoxine zu konjugieren vermag, bestätigt die aus den RLM-Inkubationen abgeleitete Vermutung, dass die Mykotoxine in der menschlichen Leber zu den beschriebenen Glucuronoiden umgewandelt werden können.

Es wird erwartet, dass die u.a. in der Leber exprimierte UGT 1A4 AME bzw. AOH nicht umsetzt, da dieses Isoenzym hauptsächlich Aminogruppen konjugiert. Da UGT1A4 bei einzelnen Substraten auch Aktivität für die Konjugation von Hydroxygruppen zeigt (King et al., 2000), wird dessen Aktivität auch auf die Mykotoxine untersucht. Da die UGT 1A4 - Supersomen<sup>®</sup> auch das Kontrollsubstrat 4-(Triflourmethyl)umbiliferon (Abb.49) nicht umsetzen, kann nicht sicher davon ausgegangen werden das die Enzyme der Supersomen<sup>®</sup> intakt sind. Folglich kann eine Aktivität von UGT 1A4 für AOH und AME nicht völlig ausgeschlossen werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass AME und AOH durch ein breites Spektrum an humanen UGTs der Familie 1A konjugiert werden und folglich eine Glucuronidierung im humanen Metabolismus in einer Vielzahl von Geweben – insbesondere in Darm und Leber – möglich ist.

### 3.4.4 Zusammenfassung der Glucuronidierung

Sowohl AOH als auch AME werden durch RLM mit hohen Umsatzraten zu jeweils zwei Glucuroniden umgesetzt. Unter gleichen Bedingungen wird AOH deutlich besser konjugiert als AME. Die Glucuronide werden bei AOH mit einer Verteilung von 1:2 ähnlich gut gebildet, während bei AME mit einer Verteilung von 1:7 ein Konjugat deutlich schlechter gebildet wird.

Umsetzungen mit „Supersomen“ zeigen, dass AOH und AME auch durch humane UGTs glucuronidiert werden. Dabei werden AOH und AME von nahezu allen getesteten UGTs der 1A-Familie umgesetzt. Dies lässt für den humanen Metabolismus sowohl eine Konjugation im Darm als auch in der Leber vermuten.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Olsen und Visconti (1987), die eine starke Konjugation mit Glucuronsäure *in vitro* von AME im Schweinedarm und in der Schweineleber beschreiben, überein. Auch die Ergebnisse von Pollock et al. (1982), die in Ratten (*in vivo*) die Bildung stark polarer AME Metabolite beschreiben, korrelieren mit diesen Daten.

## 3.5 Präzisions-Gewebeschnitte

Die Inkubation mit Präzisionsgewebeschnitten der Leber und anderen Geweben ist eine aussagekräftige *in vitro* Methode um Informationen über den Metabolismus von Xenobiotika zu erhalten. Zum einen besitzen die Zellen die komplette für den Metabolismus wichtige Enzymausstattung und zum anderen verbleiben die Zellen in ihrem natürlichen Verband.

Phase I und Phase II Metabolismus können so parallel ablaufen. Das heißt es kommt sowohl zur Konkurrenz zwischen den metabolisierenden Enzymsystemen als auch zu konsekutiven Reaktionen (z.B. Hydroxylierung in Phase I, dann Konjugation).

Für einen ersten Vorversuch wurden Rattenleberschnitte mit AOH (100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M) und AME (100  $\mu$ M) sechs jeweils Stunden inkubiert.

Nach sechsstündiger Inkubation von AOH (100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ ) und AME (100  $\mu\text{M}$ ) mit Rattenleberschnitten konnten mittels HPLC-DAD keine hydroxylierten Metabolite im Medium nachgewiesen werden. Auch nach Spaltung der Konjugate mit Glucuronidase/Sulfatase konnte keines der in Kap.3.1 - 3.3 beschriebenen Metabolite gefunden werden.

Der Vergleich der nach Konjugatspaltung gefunden Mengen an AOH bzw. AME mit der nach direkter Extraktion erhaltenen zeigt, dass 20 % an AOH und AME bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Medium konjugiert wurden. Bei 200  $\mu\text{M}$  AOH Konzentration ist der Anteil mit etwa 15 % erwartungsgemäß etwas niedriger. Da die gefundenen Anteile nur auf einem Experiment beruhen und die Messwerte der einzelnen Schnitte große Schwankungen zeigten, handelt es sich nur um Richtwerte.

Wurde statt einer Spaltung der Konjugate das angesäuerte Medium extrahiert, zeigten die erhaltenen Chromatogramme eindeutig die in Kap.3.4 durch mikrosomale Umsetzung erhaltenen Glucuronide von AME und AOH. Dabei stimmte die Stoffmenge der Glucuronide mit jender der (Gesamt)-Konjugate überein

Die Inkubationszeit von sechs Stunden war für Metabolismusversuche mit Gewebeschnitten ungewöhnlich kurz gewählt. Trotz dieser kurzen Inkubationszeit wurden rund 20 % des eingesetzten AOH und AME in den Rattenleberschnitte glucuronidiert. Mindestens dieser Anteil wurde also während der Inkubationszeit in die Zellen aufgenommen.

Es wäre zu kurz gegriffen, das Fehlen von oxidativen Metaboliten ausschließlich durch die kurze Inkubationszeit zu begründen. Es sollte auch in Erwägung gezogen werden, dass die Glucuronidierung in der Leber (bzw. in den Gewebeschnitten daraus) wesentlich schneller erfolgt, als dass oxidativen Metabolite gebildet werden.



### **3.6 EXKURS: Fragmentierungsreaktionen trimethylsilylierter Polyphenole im GC-MS**

Bei der Strukturaufklärung wurden drei Fragmentierungsreaktionen (Reaktion I-III) verwendet, die alle auf der Bildung eines Siloxansrings aus trimethylsilylierten Hydroxygruppen beruhen. Da die dieser Reaktion zugrunde liegenden Strukturelemente

- eine Hydroxygruppe in  $\beta$ -Stellung zu einer Ketogruppe
- zwei vicinal Hydroxygruppen
- eine Hydroxygruppe in ortho-Position zu einer Methoxygruppe

bei einer Vielzahl von Polyphenolen vorliegen, soll dieses Fragmentierungsmodell anhand der Spektren von weiteren Naturstoffen überprüft werden. Dabei werden die in Kap.3.2 vorgestellten Fragmentierungen der AOH- und AME-Metabolite tiefergehend erläutert.

#### **3.6.1 Reaktion I**

##### **Abspaltung einer Methylgruppe aus Phenolen mit trimethylsilylierter Hydroxygruppe in $\beta$ -Stellung zu einer Ketogruppe**

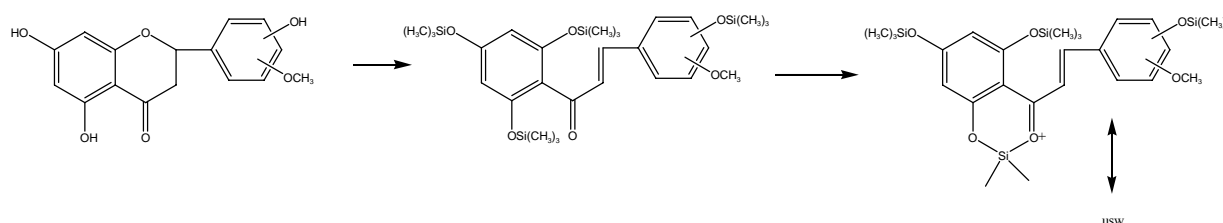
Die vollständig trimethylsilylierten AOH und AME zeigen im Gegensatz zum teilweise silylierten AME bzw. AOH (Spektren s. Anhang) nach EI-Ionisierung keine Molekülionen. Bis-TMS-AOH und Mono-TMS-AME weisen als teilweise silylierte Verbindungen eine nicht silylierte Hydroxyfunktion auf. Da die Silylierung der Hydroxygruppe in Position 7 durch die Nähe zur Ketogruppe sterisch benachteiligt ist, erfolgt diese vermutlich als letztes. Wie bereits in Kap.3.2.1 gezeigt, erfolgt die Abspaltung der Methylgruppe im EI-MS aus einer TMS-Gruppe. Es ist daher anzunehmen, dass die (dominierende) Abspaltung einer Methylgruppe aus den vollständig silylierten AME und AOH aus der TMS-Gruppe an Position 7 erfolgt.

Um die spezifische Abspaltung an dieser Position zu erklären, wird ein Fragmentierungsmodell vorgeschlagen, welches von der Bildung eines cyclischen Siloxans unter Abspaltung einer Methylgruppe aus einem TMS-Ether in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe ausgeht (Abb.16):

In ersten Schritt wird durch Elektronenstoßionisation ein Elektron aus dem Molekül herausgeschlagen und ein Kationradikal gebildet. Unter Abspaltung einer Methylgruppe

aus der TMS-Gruppe in Position 7 wird ein cyclisches Siloxan gebildet. Aufgrund der Ausbildung dieses Sechsrings ist die Ladung über das gesamte Molekül delokalisiert. Diese Mesomeriestabilisierung des  $[M-15]^+$  Ions erklärt auch den Befund, dass die Struktur sehr stabil ist (s.u.) und keiner weiteren Fragmentierung unterliegt.

Eine Ketogruppe in  $\beta$ -Stellung zu einer aromatischen Hydroxygruppe kommt in einer Vielzahl von Naturstoffen vor, so zum Beispiel in Flavonoiden. Für diese beschreiben Creaser et al. (1991) ebenso den Zusammenhang zwischen einer Hydroxygruppe in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe. Grundlage hierfür ist die Untersuchung von 5 Flavonen, 2 Isoflavonen und 5 Chalconen nach Trimethylsilylierung im GC-MS: Alle in 5-Position hydroxylierten Flavone bzw. in 6-Position hydroxylierten Chalcone bilden das  $[M-15]^+$  Ion anstelle des Molekülions. (Abb.39). Zur Erklärung schlagen Creaser et al. (1991) die Bildung eines 6-Rings (Reaktion 1) vor.



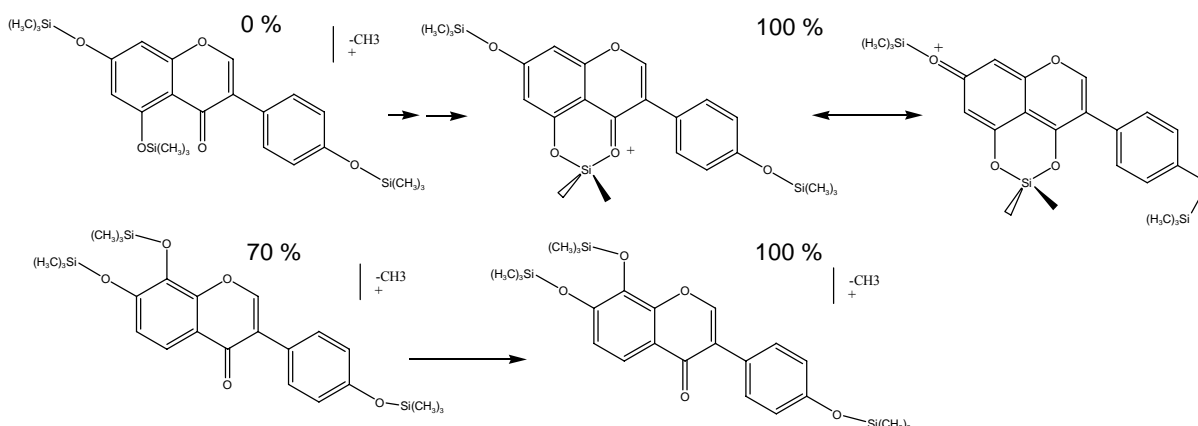
**Abb.39** Fragmentierungsreaktion von Hesperitin (Creaser et al., 1992). Im ersten Schritt Bildung des Chalcones aus dem Flavon, dann folgt die Abspaltung von einer Methylgruppe aus dem TMS-Ether in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe im GC-EI-MS (Reaktion I).

Um zu überprüfen, ob bei trimethylsilylierten Molekülen mit einer Ketogruppe in  $\beta$ -Stellung zu einer aromatischen Hydroxygruppe stets das  $[M-15]^+$  Ion dominierend in EI-MS Spektren ist, wurden Untersuchungen weiterer Naturstoffe herangezogen.

Der Vergleich der GC-MS Spektren von 14 Isoflavonen und ihrer Metabolite, welche Kulling et al. (2001) beschreiben, bestätigt das Modell: Alle in 5-Position hydroxylierten Isoflavone, zeigen (nahezu) kein Molekülion, dafür dominiert das  $[M-15]^+$  Ion (Tab.8). Abb.40 zeigt dies anhand der Konstitutionsisomere Genistein und 8-Hydroxy-Daidzein.

**Tab.8** Relative Intensität der Molekülionen und  $[M-15]^+$  Ionen von verschiedenen vollständig trimethylsilylierten Isoflavonen bzw. ihrer Metabolite im GC-EI-MS in Abhängigkeit von der Hydroxylierung in Position 5. Messdaten aus Kulling et al. (2001).

Isoflavone	Pos. 5	% $[M]^+$	% $[M-15]^+$
Daidzein	H	100	70
Glycitein	H	100	40
Genistein	OH	0	100
7,3'4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	70
6,7,4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	60
7,8,4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	70
7,8,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	40
6,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	70
6,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	40
5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	0	100
5,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	0	100
5,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	3	100
5,7,8,3',4'-Pentahydroxyisoflavon	OH	0	100
5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavon	OH	1	100

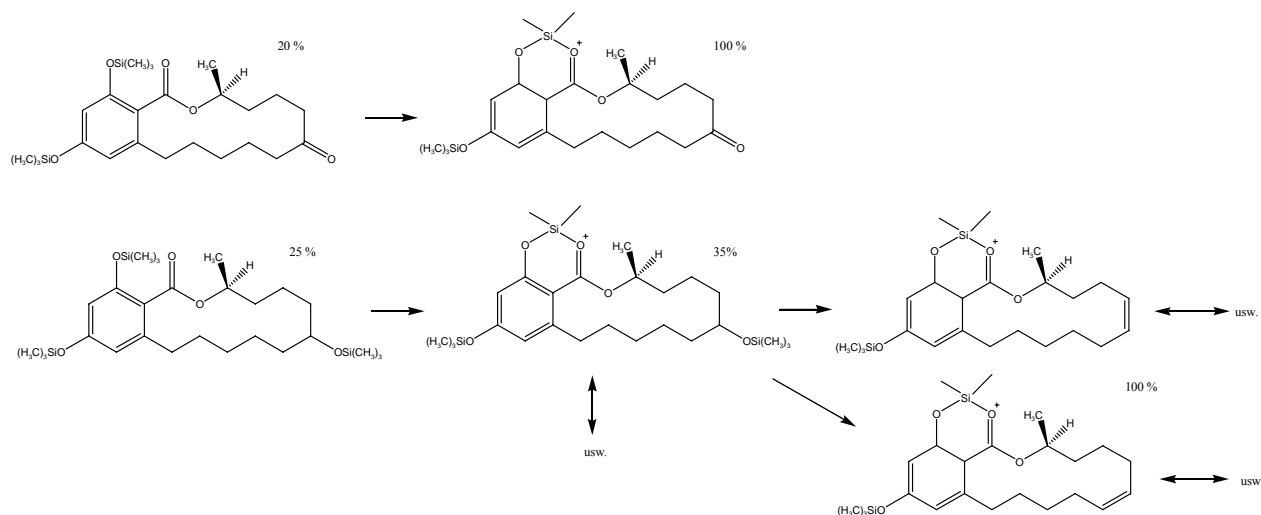


**Abb.40** Fragmentierungsreaktionen von Genistein (oben) und 8-HO-Daidzein (unten): Abspaltung einer Methylgruppe aus dem TMS-Ethern in  $\beta$ -Stellung zu einer Ketogruppe im GC-EI-MS. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar. Messdaten aus Kulling et al. (2001).

Neben den Isoflavonen wurde das vom Mykotoxin Zearalenon abgeleitete Masthilfsmittel Zearalanol (ZAL, Zeranol) und dessen oxidativer Hauptmetabolit im Säugetier Zearalanon (ZAN) (Migdalof et al. 1983) nach Derivatisierung mit BSTFA im GC-MS untersucht. Beide zeigten – wie erwartet – die Abspaltung der Masse 15.

So bildet ZAN vorherrschend das  $[M-15]^+$  Ion. Das dominierende  $[M-15-90]^+$  Ion von ZAL wird einer zusätzlichen Eliminierung von TMS-OH aus der aliphatischen Hydroxyfunktion zugeordnet. Anders als bei den Flavonoiden bzw. Dibenzo- $\alpha$ -pyron-

Mykotoxinen stellt das Molekülion mit rund 20 % rel. Intensität in beiden Fällen einen relevanten Anteil an den Ionen dar (Abb.41). Dieser Befund lässt sich z.T. darüber begründen, dass ZAN bzw. ZAL ein kleineres konjugiertes/aromatisches System aufweisen und so die Ladung damit weniger delokalisiert - und das  $[M-15]^+$  Ion somit weniger stabilisiert ist.



**Abb.41** Fragmentierungsreaktionen von ZAN (oben) und ZAL (unten): Abspaltung einer Methylgruppe aus TMS-Ether in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe im GC-EI-MS. Bei ZAL kommt es zusätzlich zur Abspaltung von TMS-OH. Die Prozentzahlen stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar.

Insgesamt ist in allen betrachteten Naturstoffen die Bildung vorherrschender  $[M-15]^+$  Ionen von silylierten Verbindungen im EI-MS stets mit einer Hydroxygruppe in  $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe korreliert. Das dominierende Auftreten von  $[M-15]^+$  Ionen in EI-MS Spektren trimethylsilylierter Polyphenole kann also als deutlicher Hinweis auf dieses Strukturelement verwendet werden.

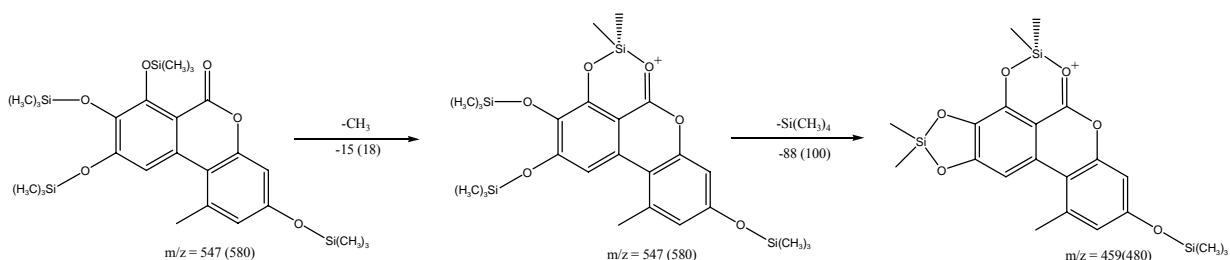
### 3.6.2 Reaktion II

#### Abspaltung von Tetramethylsilan ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) aus zwei vicinalen, trimethylsilylierten, aromatischen Hydroxygruppen.

Alle vier möglichen aromatisch hydroxylierten AOH Metabolite (HO-AOH) weisen vicinale Hydroxygruppen auf (s. Kap.3.2.3). Im MS-MS der  $[M-15]^+$ -HO-AOH Ionen zeigten alle Metaboliten vorherrschend eine Abspaltung der Masse  $m/z = 88$ . Bei Verwendung von deuteriertem BSA lag der Massenunterschied bei  $m/z = 100$ . Diese

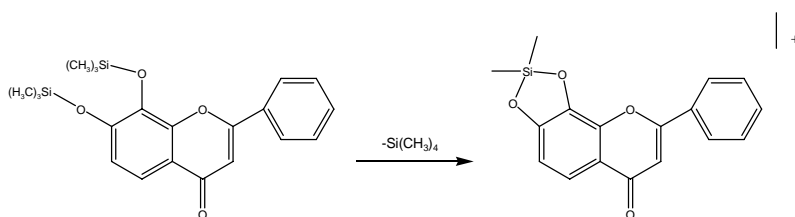
Massen entsprechen der Abspaltung von Tetramethylsilan ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$  bzw.  $\text{Si}(\text{CD}_3)_4$ ) aus zwei TMS Gruppen.

Es wird geschlussfolgert, dass diese Abspaltung unter Ausbildung eines cyclischen Siloxans entsprechend der Reaktion I (s.o.) aus zwei vicinalen aromatischen trimethylsilylierten Hydroxygruppen erfolgt. Anders als bei der Bildung der  $[\text{M}-15]^+$  Ionen resultiert bei dieser Reaktion keine positive Ladung. Abb.42 zeigt am Beispiel von 8-HO-AOH die Bildung des  $[\text{M}-15-88]^+$  Ions.



**Abb.42** Fragmentierungsreaktion von 8-HO-AOH: Bildung von  $[\text{M}-15-88]^+$  Ionen aus trimethylsilylierten 8-HO-AOH. Abspaltung einer Methylgruppe ( $m/z = 15$ ) mit anschließender Abspaltung von  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ . Die Zahlen in Klammern geben die Massen(-differenzen) bei Verwendung von deuteriertem BSA an.

Die Abspaltung von Tetramethylsilan ( $m/z = 88$ ) aus Flavonoiden mit catecholischer Struktur wird von Creaser et al. (1991) beschrieben. Zur Erklärung dieser Fragmentierung gehen die Autoren von der Bildung des beschriebenen cyclischen Siloxans aus zwei silylierten vicinalen Hydroxygruppen aus (Abb.43).

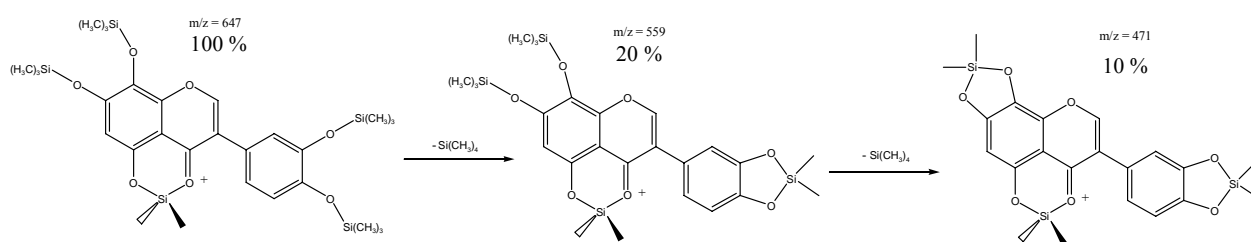


**Abb.43** Fragmentierungsreaktion von 7,8-Dihydroxyflavon: Bildung von  $[\text{M}-88]^+$  Ionen (Creaser et al., 1991).

Des Weiteren stellen die Autoren fest, dass Flavonoide mit drei oder mehr silylierten Hydroxygruppen, wovon zwei benachbart vorliegen, das  $[\text{M}-15-88]^+$  Ion bilden. Dabei zeigen jene Moleküle, von denen eine weitere der Hydroxygruppen in Position 5 ( $\beta$ -Stellung zur Ketogruppe) vorliegt, eine stärkere Bildung des  $[\text{M}-15-88]^+$  Ions als des  $[\text{M}-88]^+$  Ions. Dieses korreliert gut mit Reaktion I (s. Kap.3.6.1). Der Befund entspricht den für die HO-AOH-Metaboliten gefundenen Spektren und zeigt, dass sich die silylierten Dibenzo- $\alpha$ -pyron-Mykotoxine im GC-MS sehr ähnlich wie 5-HO-(Iso)flavone verhalten.

Deshalb wurde die Zahl der betrachteten Flavonoide erweitert und die GC-MS-Daten von Kulling et al. (2001) wurden herangezogen. Beim Vergleich der Ergebnisse ergibt sich allerdings ein uneinheitliches Bild:

Alle vollständig silylierten Isoflavone (IF) die sowohl zwei vicinale Hydroxygruppen als auch eine Hydroxygruppe in Position 5 aufweisen, zeigen eine deutliche Bildung des  $[M-15-88]^+$  Ions (Tab.9). Das 5,7,8,3',4'-Pentahydroxyisoflavon weist zusätzlich zu der Hydroxygruppe in Position 5 catecholische Strukturen in beiden Ringen auf und bildet auch das  $[M-15-88-88]^+$  Ion (Abb.44).



**Abb.44** Fragmentierungsreaktionen von trimethylsilylierten 5,7,8,3',4'-Pentahydroxyisoflavon: Bildung der  $[M-15-88]^+$  und  $[M-15-88-88]^+$  Ionen aus den  $[M-15]^+$  Ionen (Reaktion I) im EI-MS. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar. Daten aus Kulling et al. (2001).

Bilden drei Hydroxygruppen eine Pyrogallolstruktur – d.h. liegen sie also nebeneinander – hat dies keinen Einfluss auf die Bildung des  $[M-15-88]^+$  Ions, wie man an dem MS-Spektrum von trimethylsilyliertem 5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavon erkennt (Spektrum s. Kulling et al., 2001).

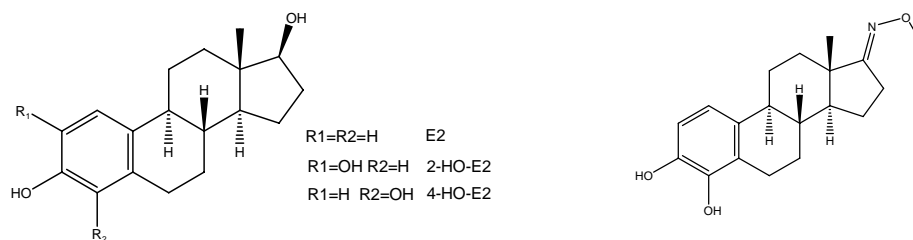
Die Ergebnisse für die 5-HO-Isoflavone stimmen also gut mit denen von Creaser et al. (1991) veröffentlichten überein. Auch werden - mit einer Ausnahme - für alle in 5-Position nicht hydroxylierten catecholischen IF  $[M-15-88]^+$  Ionen gefunden, wenn auch in geringerem Umfang.  $[M-88]^+$  Ionen werden nur in einem der von Kulling et al. (2001) veröffentlichten IF-Spektren gefunden, wohingegen die Ergebnisse von Creaser et al. 2001 das Auftreten des  $[M-88]^+$  Ions für dreifach oder höher hydroxylierte Flavonoide beinhalten. So zum Beispiel für 7,3',4'-Trihydroxyflavon und 6,7,4'-Trihydroxyisoflavon. Dieser Widerspruch könnte damit begründet werden, dass die Auflösung der verwendeten Spektren von Kulling et al. (2001) gering ist und so geringfügig gebildete  $[M-88]^+$  Ionen übersehen werden. Jedoch wurde für drei Isoflavone statt des  $[M-88]^+$  Ion das  $[M-89]^+$  Ion gefunden. Dies lässt vermuten, dass die Bildung ohne vorhergehende  $[M-15]^+$  Ionen-

Bildung anders verläuft. Um dieses zu klären, und weitere Vergleichspektren zu erhalten, wurden die oxidativen Metaboliten von Estradiol (17 $\beta$ -Estradiol, E2) (Abb.45) nach Silylierung mittels GC-MS betrachtet.

**Tab.9** Bildung der [M-15-88]<sup>+</sup> und [M-89]<sup>+</sup> Ionen aus verschiedenen vollständig trimethylsilylierten Isoflavonen mit vicinalen Hydroxygruppen im GC-EI-MS in Abhängigkeit von der Hydroxylierung in Position 5. Die Prozentangaben stellen die rel. Intensitäten der Ionen dar. Ein + bedeutet dass die entsprechenden Ionen gefunden wurden. Messdaten aus Kulling et al. (2001)

Isoflavone mit vicinalen OH	Pos.5	% [M] <sup>+</sup>	% [M-15] <sup>+</sup>	[M-15-88] <sup>+</sup>	[M-88] <sup>+</sup>	[M-89] <sup>+</sup>
7,3',4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	70	+	+	-
6,7,4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	60	+	-	+
7,8,4'-Trihydroxyisoflavon	H	100	70	+	-	-
7,8,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	40	+	-	-
6,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	70	-	-	+
6,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	H	100	40	+	-	+
5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	0	100	+	-	-
5,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	0	100	+	-	-
5,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon	OH	~3	100	+	-	-
5,7,8,3',4'-Pentahydroxyisoflavon	OH	0	100	+	-	-
5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavon	OH	~1	100	+	-	-

Das Spektrum von 4-HO-E2 zeigt hierbei deutlich das [M-89]<sup>+</sup> Ion neben dem dominierenden [M-89-90]<sup>+</sup> Ion. Die zusätzliche Abspaltung von m/z = 90 wird der Eliminierung von TMS-OH aus der aliphatischen Hydroxygruppe zugeordnet. Die Spektren von 2-HO-E2 entsprechen diesem Befund. Auch die von A. Schoch (2004) für die Estron (E1) Metabolite dargestellten Spektren von 4-HO-E1 und 2-HO-E1 zeigen für beide Substanzen das [M-89]<sup>+</sup> Ion als Hauptfragment. Die von Makin et al. (1998) veröffentlichten GC-EI Spektren für Methyloximderivate (Abb.45) von 2-HO-E1 und 4-HO-E1 (Estra-1,3,5(10)-triene-2,3-diol-17-on(17-o-methyloxim-2,3-di-trimethylsilylether) und Estra-1,3,5(10)-triene-3,4-diol-17-on(17-o-methyloxim-3,4-di-trimethylsilylether) zeigen ebenso deutlich die Bildung des [M-89] Ions.



**Abb.45** Strukturformeln: Estradiol (E2, in Abb. links) und seine oxidativen Metaboliten 4-HO-E2 und 2-HO-E2. Estron (E1) weist statt der aliphatischen Hydroxygruppe eine Ketogruppe auf. Rechts: Estra-1,3,5(10)-triene-3,4-diol-17-on (17-o-methyloxim)

Die Ergebnisse der Untersuchung der catecholischen Estrogenmetabolite zeigen, dass es sich bei der Bildung der  $[M-89]^+$  Ionen aus silylierten Catecholen nicht um eine auf einige Isoflavone begrenzte Reaktion handelt. Aufgrund der Ähnlichkeit der Masseunterschiede in den Fragmentierungen (89 zu 88) wird angenommen, dass es auch hier zur Ausbildung eines Siloxanrings kommt. Ein Modell, nachdem der zusätzliche Massenverlust von einem Wasserstoffatom ( $m/z = 1$ ) zustande kommt, kann nicht vorgeschlagen werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Reaktion, die zu einem rel. stabilen Kation führt, und so bei den schon aufgrund von Reaktion I geladenen  $[M-15]^+ \rightarrow [M-15-88]^+$  Ionen nicht stattfindet. Um die chemische Natur der aus silylierten Catecholen gebildeten  $[M-89]^+$  Ionen und ihre Bildung im Verhältnis zu  $[M-15-88]^+$  und  $[M-88]^+$  zu klären, sind weitere Untersuchungen – z.B. der Einsatz von deuteriertem Silylierungsmittel – notwendig.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Bildung von  $[M-15-88]^+$  Ionen für AOH-, AME- und 5-HO-IF-Metabolite eine gute Möglichkeit darstellt, Catechole zu erkennen. Ebenso stellt die Abspaltung von  $m/z = 88$  (89) aus silylierten Polyphenolen generell einen einfachen ersten Hinweis auf zwei vicinale Hydroxygruppen im Molekül dar. Diese Fragmentierung kann insbesondere bei der Identifizierung von Konstitutionsisomeren mit unterschiedlicher aromatischer Substitution an Hydroxygruppen sehr hilfreich sein.

Es gilt aber zu beachten, dass  $m/z = 88$  genau der Masse entspricht, die ein Molekül durch eine trimethylsilylierte Hydroxygruppe hinzugewinnt. Es muss also durch die Gaschromatographie gewährleistet sein, dass nur die Fragmente eines (vollständig) silylierten Analyten betrachtet werden und keinesfalls die abweichend substituiertere Verbindung gleichzeitig eluiert. Positive Befunde sind am besten durch MS-MS Untersuchungen und Einsatz von deuteriertem Silylierungsmittel zu bestätigen, da hier ein Massenunterschied zwischen dem Einfügen einer silylierten Hydroxygruppe ( $m/z = 96$ ) und der Abspaltung von  $Si(CD_3)_4$  ( $m/z = 100$ ) besteht.



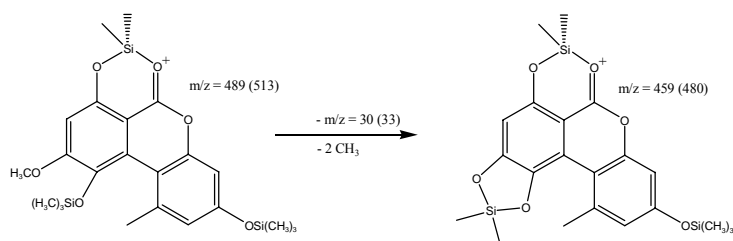
### 3.6.3 Reaktion III

#### Abspaltung von zwei Methylgruppen aus einer Methoxygruppe in ortho-Position zu einer trimethylsilylierten Hydroxgruppe

In MS-MS Untersuchungen bildeten nur zwei HO-AME (M4-M5) der vier HO-AME das  $[M-15-88]^+$  Ion (Reaktion II, s. Kap.3.2). Die zwei anderen HO-AME M2 und M3 bilden statt dessen dominierend das  $[M-15-30]^+$  Ion. Diese Fragmentierung wird der Abspaltung zweier Methylgruppen zugeordnet. Da die Massendifferenz beim Einsatz von deuterierten Silylierungsmittel bei  $m/z = 33$  liegt wird geschlussfolgert, dass eine Methylgruppe dabei aus dem TMS-Ether und eine aus dem Molekül – vermutlich der Methoxygruppe in Position 9 stammt.

M2 und M3 wurden als im A-Ring hydroxylierte Metabolite identifiziert (s. Kap.3.2.2). Nach Hydroxylierung im A-Ring liegt die Methoxygruppe in ortho-Stellung zu der Hydroxygruppe vor. Dieses Strukturelement ist auch in allen durch die COMT methylierten Catecholen enthalten. Da auch die Spektren der methylierten Catechole (s. Kap.3.3) dominierend die Bildung des  $[M-15-30]^+$  Ions ( $[M-18-33]^+$  Ion bei deuteriertem BSA) zeigen, wird diese Fragmentierung auf Nachbarschaft einer trimethylsilylierten Hydroxygruppe zu einer Methoxygruppe zurückgeführt.

In einem Analogieschluss zu Reaktion I und II wird für die Bildung des  $[M-15-30]^+$  Ions folgende Reaktion III vorgeschlagen (Abb.46):

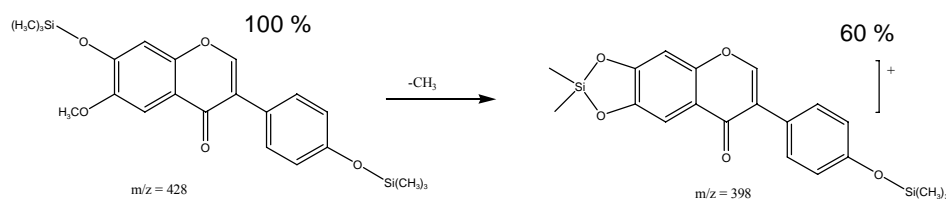


**Abb.46** Fragmentierungsreaktion von 10-HO-AME: Bildung von  $[M-15-30]^+$  Ionen aus den  $[M-15]^+$  Ionen im GC-EI-MS durch Abspaltung zweier Methylgruppen ( $m/z = 30$ ). Zahlen in Klammern geben Massen(-differenzen) bei Verwendung von deuteriertem BSA an.

Zunächst wird ein Phenoxyradikal durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe gebildet. Dieses reagiert mit der benachbarten TMS Gruppe unter Abspaltung eines weiteren Methoxyradikals zu einem cyclischen Siloxan unter Ausbildung eines Fünfrings.

Um zu überprüfen, ob das Trimethylsilylieren einer Hydroxygruppe in ortho Position zu einer Methoxygruppe im EI-MS stets zu der Abspaltung von  $m/z = 30$  führt, wurden auch hier die GC-MS Daten von Isoflavonen und Estrogenmetaboliten als Vergleich herangezogen:

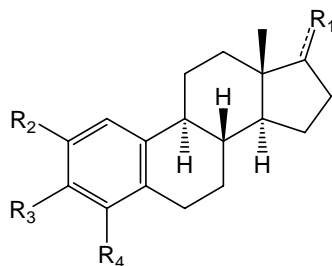
In dem von Kulling et al. (2001) für Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-Methoxy-IF) veröffentlichten GC-MS-Spektrum stellt das  $[M-30]^+$  Ion das Hauptfragment dar. (Abb.47).



**Abb.47** Fragmentierungsreaktion von Glycitein: Bildung von  $[M-30]^+$  Ionen im GC-EI-MS durch Abspaltung zweier Methylgruppe ( $m/z = 30$ ). % Zahlen geben die rel. Intensität der Ionen an. Messdaten aus Kulling et al. (2001).

Die in der Diplomarbeit von A. Schoch dargestellten GC-MS Spektren von methylierten Catecholen wurden für die Estrogenmetabolite herangezogen. Alle E2-Metabolite mit einer Hydroxygruppe in ortho-Stellung zu einer Methoxygruppe (methylierten Catecholen) bildeten das  $[M-30]^+$  Ion mit einer deutlichen Intensität von 30-65 % (Abb.48). Ebenso wird ein nennenswerter Anteil an  $[M-30-90]^+$  Produktionen durch zusätzliche Eliminierung von TMS-OH gebildet.

Während bei den E2 Metaboliten andere – hier nicht näher betrachtete – Ionen die Hauptfragmente darstellen, bilden die  $[M-30]^+$  Ionen der methylierten E1-Catecholen die Hauptfragmente, welche in der Intensität auch die Molekülionen übertreffen. (Abb.48)



Metabolit	R1	R2	R3	R4	rel. Intensität der Ionen im GC-EI-MS		
					$[M]^+$	$[M-30]^+$	$[M-30-90]^+$
2-CH <sub>3</sub> O-E2	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	HO	100	45	20
2-HO-3-CH <sub>3</sub> O-E2	HO	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	100	30	20
4-CH <sub>3</sub> O-E2	HO	HO	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	95	30	30
4-HO-3CH <sub>3</sub> O-E2	HO	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	100	65	30
2-CH <sub>3</sub> O-E1	O	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	HO	90	100	--
2-HO-3-CH <sub>3</sub> O-E1	O	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	70	100	--
4-CH <sub>3</sub> O-E1	O	HO	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	85	100	--
4-HO-3CH <sub>3</sub> O-E1	O	HO	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	HO	55	100	--

$$[M]^+ (E1) = 372; [M]^+ (E2) = 446$$

**Abb.48** Relative Intensitäten der Fragmente von trimethylsilylierten methylierten hydroxylierten E2 und E1 im GC-MS. Daten aus Schoch (2004).

Es kann festgestellt werden, dass die Bildung des  $[M-30]^+$ -Produktions (Reaktion III) sowohl bei den Dibenzo- $\alpha$ -pyron-Mykotoxin-Metaboliten, bei IF und ihren Metaboliten als auch bei den Estrogenmetaboliten in einem deutlichen Umfang auftritt. Gemeinsam ist diesen Phenolen eine Methoxygruppe in ortho-Stellung zu einer silylierten Methoxygruppe. Folglich kann die Bildung des  $[M-30]^+$  Ions im EI-MS silylierter Verbindungen generell als Hinweis auf diese Strukturelement gesehen werden. Die zusätzliche Verwendung von deuterierten Silylierungsmittel mit der charakteristischen Bildung des  $[M-33]^+$  Ions kann diese Vermutung bekräftigen.

## 4 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den *in vitro* Metabolismus der Mykotoxine Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME) zu untersuchen. Hierzu wurde die Konjugation mit Glucuronsäure und der oxidative Metabolismus in Lebermikrosomen untersucht. Ferner wurde die Methylierung der oxidativen Metabolite durch die Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) betrachtet.

Die entstehenden Metabolite wurden mittels HPLC-DAD analysiert. Hierbei zeigten AOH, AME und ihre Metabolite ein charakteristisches UV-VIS Spektrum, welches auf das Dibenzo- $\alpha$ -Pyron-Grundgerüst zurückgeführt wird.

Die weitere Charakterisierung der Metabolite erfolgte mittels HPLC-(ESI)-MS und im Falle der oxidativen – ggf. methylierten – Metabolite nach Trimethylsilylierung mit GC-MS-(MS). Auf Grundlage der GC-Massenspektren konnte ein Fragmentierungsmodell (s.u.) vorgeschlagen werden, welches Aussagen über die Position der Hydroxygruppen von Polyphenolen ermöglicht und so die Identifikation der oxidativen AME Metabolite erlaubt.

Die Glucuronidierung von AOH und AME durch Rattenlebermikrosomen führt jeweils zu zwei Glucuroniden. Dabei entstehen die zwei AOH Glucuronide bei nahezu vollständigem Umsatz im Verhältnis 1:2. Hingegen wird AME unter gleichen Bedingungen nur zu  $\frac{2}{3}$  konjugiert und die beiden Glucuronide im Verhältnis von 1:7 gebildet. Die fehlende Bildung eines dritten AOH Glucuronids und die geringe Bildung eines der AME Glucuronide wird auf eine sterische Hemmung der Konjugation von der Hydroxygruppe in Position 7 zurückgeführt. Untersuchungen mit Supersomen<sup>®</sup> zeigten, dass AME und AOH von einer Vielzahl humaner Glucuronyltransferasen (UGT) der Familie 1A umgesetzt werden. Die Glucuronidierung der Mykotoxine kann also in einer Vielzahl von Organen, v.a. in Leber und Darm, stattfinden. Da auch nennenswerte Anteile von AME und AOH nach Inkubation mit Gewebeschnitten als Glucuronide gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass die Konjugation durch UGTs eine wichtige Metabolisierungsrouten der Mykotoxine darstellt.

Die oxidative Umsetzung von AOH durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs) der Lebermikrosomen führt zu vier monohydroxylierten Produkten. GC-MS Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei um Catechole – also um aromatische Hydroxylierungsprodukte – handelt. Die Umsetzungen durch Lebermikrosomen von Ratte

(RLM), Schwein (SLM) und Mensch (HLM) ergab zwar deutliche Unterschiede in Umsatz und ihrer Verteilung dennoch qualitativ die gleichen Produkten.

Bei oxidativer Umsetzung von AME entstanden, neben AOH, ebenfalls vier monohydroxylierte Produkte. Durch RLM wurde zusätzlich ein dihydroxylierter Metabolit gebildet. Die Hydroxylierungspositionen der monohydroxylierten AME konnten mittels GC-MS-(MS) bestimmt werden. AOH entsprechend, sind alle Produkte aromatisch hydroxylierte AME, wobei nur 10-HO-AME kein Catechol ist. Die Umsätze und Verteilungen der Metabolite durch Mikrosomen verschiedener Spezies wiesen deutliche Unterschiede auf. 8-HO-AME wird durch RLM und SLM am stärksten gebildet, während 2-HO-AME der Hauptmetabolit in HLM ist.

Neben den Hydroxylierungsprodukte wurde durch alle Mikrosomen AOH und AME zu unpolaren Produkten umgesetzt. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um Polymere aus den Ausgangsverbindungen handelt.

Mit den durchgeführten mikrosomalen Umsetzungen konnte erstmals gezeigt werden, dass AME und AOH im Phase I Metabolismus hydroxyliert werden. Da Catechole gebildet werden, könnte dies eine metabolische Aktivierung darstellen. AME wurde stärker oxidativ umgesetzt als AOH. Somit ist AME – insbesondere auch aufgrund der deutlich geringen Glucurondierung – vom Metabolismus her aus toxikologischer Sicht kritischer als AOH zu bewerten.

Um die Inaktivierung der gebildeten Catechole zu verfolgen, wurde ihre Methylierung durch die COMT untersucht: Alle catecholischen HO-AME werden durch COMT methyliert. Der Methylierung von 2-HO-AME und 4-HO-AME erfolgte nahezu vollständig, die Ergebnisse für 8-HO-AME sind nicht einheitlich. Von vier der sechs methylierten HO-AME konnte die Methylierungsposition bestimmt werden. Dabei erwies sich eines der methylierten 4-HO-AME als Graphislacton A, dessen Vorkommen in Flechten beschrieben wird.

Die gleichzeitige Umsetzung der HO-AOH durch CYPs und COMT zeigte, dass alle HO-AOH durch COMT umgesetzt werden. Der oxidative Hauptmetabolit von AOH O3 in RLM wurde dabei nur zu geringem Anteil methyliert. Zusätzlich erwies sich O3 – wie auch O1 - als instabil, so dass eine Isolierung nicht möglich war. Interpretiert man Instabilität als Reaktivität so ist die Bildung von O3 kritisch zu bewerten. O3 wird aber in HLM und SLM so gut wie nicht gebildet.

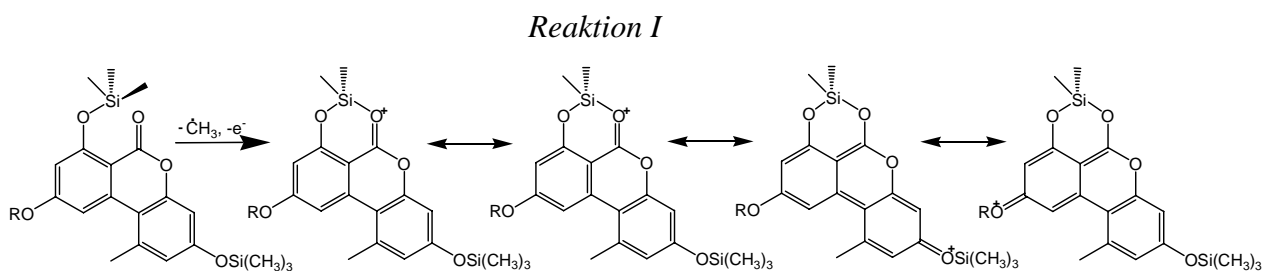
Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass AOH und AME *in vitro* einem ausgeprägten Metabolismus unterliegen. Inwiefern der Metabolismus für die Toxikologie dieser Mykotoxine relevant ist, kann auf Grundlage dieser Arbeit nicht bewertet werden. Allerdings kann die Bildung von Catecholen eine metabolische Aktivierung darstellen.

### Fragmentierung trimethylsilylierter Polyphenole im GC-EI MS

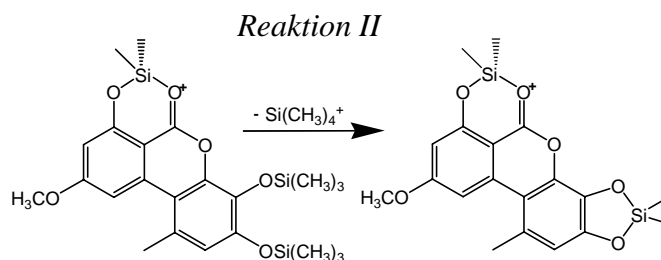
Die Strukturaufklärung der Metabolite nimmt in der Arbeit einen hohen Stellenwert ein. Diese erfolgte, sofern möglich, auf Grundlage von Fragmentierungsreaktionen der trimethylsilylierten Analyten im GC-MS-MS nach Elektronenstoßionisierung (EI).

Dabei konnten aufgrund der hohen Stabilität des Dibenzo- $\alpha$ -pyron Grundgerüsts Reaktionen der silylierten Hydroxygruppen erkannt und Fragmentierungsmodelle abgeleitet werden. Zentrales Element aller Reaktionen ist die Bildung eines fünf bzw. sechsgliedrigem Siloxanrings:

Reaktion I: Weist ein Polyphenol eine silylierte Hydroxygruppe in  $\beta$ -Stellung zu einer Ketogruppe auf, so kommt es zur dominierenden Bildung von  $[M-15]^+$  Ionen. Bei Isoflavonen und Dibenzo- $\alpha$ -pyron-Mykotoxinen findet diese Reaktion vollständig statt. Dieser Befund wird über die Bildung eines sechsgliedrigen Siloxanrings erklärt. Dabei entstehen mesomeriestabilisierte  $[M-15]^+$  Ionen deren Ladung über das gesamte Molekül delokalisiert ist.

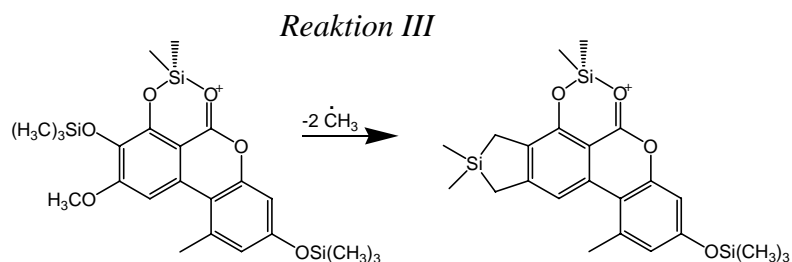


Reaktion II: Weist ein Polyphenol zwei silylierte vicinalen Hydroxygruppen auf, kommt es zu einer deutlichen Bildung von  $[M-88]^+$  Ionen. Sofern (eine) weitere silylierte Hydroxygruppe(n) im Molekül vorhanden sind, werden – u.a. in Kombination mit Reaktion I –  $[M-15-88]^+$  Ionen gebildet. Reaktion II wird auf die Bildung eines fünfgliedrigen Siloxanrings unter der Abspaltung von Tetramethylsilan ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) zurückgeführt. Findet die Reaktion aus ungeladenen Molekülen statt, werden bei vielen Molekülen  $[M-89]^+$  Ionen statt  $[M-88]^+$  Ionen gebildet.



### Reaktion III

Weist ein Polyphenol eine silylierte Hydroxygruppe neben einer Methoxygruppe auf, kommt es zu der Bildung von  $[M-30]^+$  Ionen. Reaktion III wird auf die Bildung eines fünfgliedrigen Siloxanrings unter der Abspaltung von zwei Methoxygruppen zurückgeführt.



## 5 Ausblick

Die durchgeführten Arbeiten können nur als Beginn der Untersuchung des Metabolismus von AME und AOH gesehen werden. Neben den vielen unbeantworteten Fragen, die in den einzelnen Kapiteln aufgeworfen wurden und unbeantwortet blieben, wie z.B.

- die Struktur der HO-AOH
- Umsetzung von den HO-AOH O1 und O3 mit COMT
- die Positionen der Glucuronidierung

wurden andere Bereiche noch gar nicht betrachtet. So z.B. die Konjugation von AOH, AME und ihrer Metabolite mit Glutathion und Sulfat.

Des Weiteren dienen die durchgeführten Untersuchungen nicht der Aktivitätsbestimmung von CYPs, UGT und COMT für die Umsetzung von AOH, AME und ihrer Metabolite. Das Wissen über die Enzymaktivitäten würde mit der Identifikation der einzelnen beteiligten Isoenzyme die Möglichkeit geben, die Biotransformation von AOH und AME im Gewebe abschätzen zu können. Um vorhersagen zu können, welche Metabolisierungsrouten dominieren, sind weitere *in vitro* Untersuchungen, v.a. die Arbeit mit Gewebeschnitten und Zellkultur notwendig.

Um die Biotransformation der Mykotoxine genau beurteilen zu sind Versuche *in vivo* vermutlich nicht zu umgehen. Spätestens an dieser Stelle, muss aber die Frage nach der Relevanz des Metabolismus für die Toxizität von AOH und AME überprüft werden. Zum jetzigen Zeitpunkt deuten weder die Ergebnisse zur Mutagenität *in vitro* auf eine Aktivierung durch den Metabolismus hin noch lässt die Verbindung von *Alternaria*-Toxinen mit der Ätiologie von Speiseröhrenkrebs diese vermuten.



## 6 Verwendete Methoden

### 6.1 Mikrosomale Umsetzungen

#### 6.1.1 Oxidative Umsetzung

Zur Untersuchung des Phase I Metabolismus *in vitro* werden die in DMSO gelösten Substanzen in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) mit den Lebermikrosomen inkubiert. Das von den CYPs als Cosubstrat benötigte NADPH wird in Form eines NADPH-generierenden Systems zugesetzt.

Die Umsetzungen erfolgen in 1 ml Gesamtvolumen, die folgendes enthalten:

Testsubstanz in DMSO (10 mM)	5 µl
Mikrosomen	40 - 100 µl
NADPH generierendes System	35 µl
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	ad 1000 µl

Das NADPH generierende System ist stets frisch herzustellen und setzt sich wie folgt zusammen:

Isocitrat-Dehydrogenase (200 U/ml)	50 µl
Isocitrat (2,33 M)	90 µl
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	100 µl
NADP <sup>+</sup>	25 mg
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	550 µl

Das Volumen der eingesetzten Mikrosomen ist abhängig von ihrem Proteingehalt. Im Falle von RLM werden 40 µl Mikrosomen eingesetzt (c(Protein) = 1 mg/ml) bei HLM und SLM sind es 100 µl (c(Protein) = 0,7 mg/ml).

Die Inkubationen werden wie folgt durchgeführt:

Die Testsubstanz und die Mikrosomen werden in die entsprechende Puffermenge pipettiert. Nach durchmischen erfolgt eine 5 min Vorinkubation im Thermomixer bei 37 °C. Anschließend wird das NADPH-generierende System dazu gegeben und für 40 min bei 37 °C inkubiert.

Die Inkubation wird durch Zugabe von ca. 500 µl Ethylacetat gestoppt und die Ansätze jeweils noch zweimal mit ca. 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden am Evaporator bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen. Aliquote dieser Lösung werden für die HPLC- und GC-Analyse eingesetzt.

Als Kontrolle dienen vollständige Ansätze, jedoch ohne Zugabe des Cosubstrates. Alternativ werden Kontrollen auch mit Cosubstrat, aber mit durch Hitze inaktivierten Mikrosomen durchgeführt.

### 6.1.2 Glucuronidierung

Zur Untersuchung der Glucuronidierung durch die UGTs der Rattenlebermikrosomen werden diese mit den Testsubstanzen in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) in Anwesenheit von UDPGA inkubiert. Dem Ansatz wird zusätzlich Alamethycin als Porenbildner und Saccharo-1,4-Lacton als Inhibitor für Glucuronidasen zugesetzt.

Die Inkubation erfolgt in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml. Nach Vorlage der angegebenen Menge Phosphatpuffer werden folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zugegeben.

Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	96 µl
Testsubstanz in DMSO (2,5 mM)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (0,1 M)	20 µl

*15 Minuten auf Eis vorinkubieren*

Alamethycin (125 µg/ml)	40 µl
Saccharo-1,4-Lacton	10 µl
RLM, verdünnt (10 mg Protein/ml)	10 µl

*5 Minuten bei 37 °C vorinkubieren*

UDPGA (20 mM)	20 µl
---------------	-------

*30 Minuten bei 37 °C inkubieren*

Die Inkubation wird bei wässriger Aufarbeitung durch den Zusatz von 20 µl Trichloressigsäure (20 %) gestoppt, anschließend mit 20 µl NaOH (1 M) neutralisiert und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wird direkt zu HPLC eingesetzt (Injektionsvolumen 20-40 µl)

Bei Aufarbeitung durch Extraktion wird der Ansatz mit 200 µl Glycin/HCl Puffer pH 1,2 versetzt und drei mal mit ca. 500 µl Ethylacetat extrahiert. Das Extrakt wird am Evaporator bis zur Trockene eingedampft und in 50 µl MeOH wieder aufgenommen. Aliquote dieser Lösung werden zu HPLC eingesetzt.

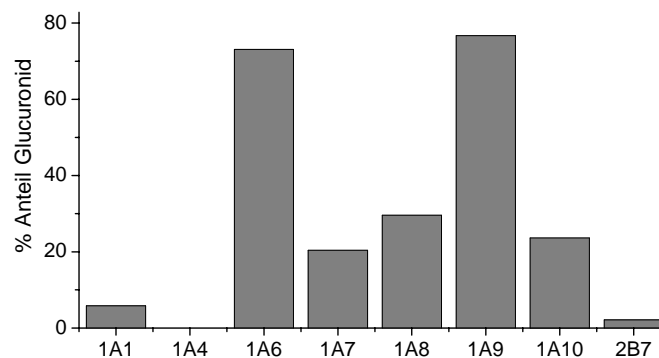
Als Kontrolle dienen analoge Ansätze jedoch ohne Zugabe des Cosubstrates.

### **Glucuronidierung durch Supersomen<sup>®</sup>**

Die Glucuronidierung durch Supersomen<sup>®</sup> erfolgt wie für RLM beschrieben mit folgenden Veränderungen:

- Es werden jeweils 15 µl der Supersomen (5 mg/ml) eingesetzt.
- Es werden nur 2 µl der Testsubstanzlösung (10 mM) verwendet.
- Die Inkubationszeit beträgt 60 min.

Zur Überprüfung der Aktivität der Supersomen<sup>®</sup> werden Inkubationen mit 4-(Triflourmethyl)umbiliferon (UMBE) (5 mM) durchgeführt und der glucuronidierte Anteil bestimmt. Wie aus Abb.49 ersichtlich setzten alle verwendeten Supersomen<sup>®</sup> UMBE um, außer UGT 1A4.



**Abb.49** Aktivitäten von Supersomen: Dargestellt ist der Anteil an glucuronidierten UMBE nach Umsetzung mit den einzelnen Supersomen. Das Ergebnis bezieht sich auf eine Bestimmung.

## 6.2 Umsetzung mit Meerrettich Peroxidase

Die Umsetzung mit Peroxidase erfolgt in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$ . Es wird die entsprechende Menge Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) vorgelegt und folgende Lösungen sind hinzuzugeben.

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4)	457,5 $\mu\text{l}$
Substanzlösung in DMSO (10 mM)	2,5 $\mu\text{l}$
Peroxidase-Lösung (4-40 U/ml)	10 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 %)	30 $\mu\text{l}$

*5 Minuten bei 37 °C inkubieren*

Katalase (65.000 U/mg Proteinsuspension)	ca. 1 $\mu\text{l}$
--	---------------------

Die Aufarbeitung erfolgt analog zur oxidativen Umsetzung.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung ist stets frisch aus konz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herzustellen. Die Peroxidase-Lösung wird durch Lösen von lyophilisierter Meerrettich-Peroxidase (400 U/mg) in Phosphatpuffer und Verdünnen (1 mg/ml Lösung) hergestellt und ist einige Tage bei 4 °C haltbar.

## 6.3 Isolierung der oxidativen Metabolite

Da es sich bei den oxidativen Metaboliten von AOH und AME um bisher nicht beschriebene Verbindungen handelt, sind diese nicht als Einzelsubstanzen verfügbar. Deshalb werden die Metabolite aus den oxidativen Umsetzungen mittels Fraktionierung mit HPLC wie folgt isoliert:

Die oxidative Umsetzung erfolgte wie beschrieben. Um eine größere Substanzmenge zu erhalten, wurde die Ansatzgröße auf 5 ml vergrößert:

Testsubstanz in DMSO (10 mM)	50 $\mu\text{l}$
Rattenlebermikrosomen	200 $\mu\text{l}$
NADPH generierendes System	200 $\mu\text{l}$
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	ad 5000 $\mu\text{l}$

Nach 30 –60 minütiger Inkubationszeit wird drei mal mit 2 ml Ethylacetat extrahiert. Der Rückstand des Extraktes wird in 100 µl MeOH aufgenommen und max. 50 µl zur Fraktionierung mittels HPLC eingespritzt.

Aus den Eluentenfraktionen wird das Acetonitril am Evaporator entfernt. Die verbliebene, wässrige Lösung wird mit Ethylacetat extrahiert, wie bei der oxidativen Umsetzung beschrieben. Eine alternative Aufarbeitung stellt die Gefriertrocknung der wässrigen Lösung statt der Extraktion dar.

Die erhaltenen Extrakte werden in MeOH aufgenommen und ein Aliquot mit HPLC analysiert. Nach erneutem Einrotieren werden sie wieder in DMSO aufgenommen.

## 6.4 COMT Assay

Bei allen Umsetzungen dient das Rattenlebercytosol (RCYT) – zur Gewinnung s. Herstellung der Mikrosomen – als Quelle für die cytosolische COMT. Als Cosubstrat der COMT wird *S*-Adenosyl-Methionin (SAM) zugesetzt.

### Einzelne Umsetzung:

Zur einzelnen Methylierung wird die DMSO Lösung der fraktionierten Substanzen verwendet. Aufgrund der geringen Konzentration der Metabolite erfolgt die Umsetzung in einem geringen Gesamtvolumen von 250 µl. Zum vorgelegten Puffer werden folgende Lösungen pipetiert:

Phosphatpuffer (0,1 M) pH 7,4	221,5 µl
Metabolit-Lösung in DMSO	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (0,1 M)	10 µl
Cytosol	10 µl

*5 Minuten bei 37 °C vorinkubieren*

SAM (20 mM)	7 µl
-------------	------

*30 Minuten bei 37 °C inkubieren*

Als Kontrollen dienen jeweils Umsetzungen ohne Cosubstrat.

Die Extraktion erfolgt analog zur Aufarbeitung der oxidativen Umsetzung (asd). Der MeOH gelöste Extrakt wird mit 10 µl für die GC- und 40 µl für die HPLC-Analyse eingesetzt. Quantitative Messungen wurden ausschließlich mit HPLC-DAD (254 nm) durchgeführt. Die Zuordnung der GC- zu den HPLC Peaks erfolgt über die Größe der Peaks. Dieses ist möglich da die Methylierungsprodukte zu deutlich unterschiedlichen Anteilen gebildet werden.

### Gemischte Umsetzung

Die parallele Umsetzung durch CYPs und COMT orientiert sich an der oxidativen Umsetzung. Die in DMSO gelösten Substanzen werden in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) mit RLM und RLYT in Anwesenheit der Cosubstrate NADPH und SAM inkubiert.

Die Umsetzungen erfolgen in 1ml Gesamtvolumen, die folgendes enthalten:

Testsubstanz in DMSO (10 mM)	5 µl
Rattenlebermikrosomen (25 mg Prot/ml)	40 µl
Rattenlebercytosol (26,7 mg Protein / ml)	40 µl
NADPH generierendes System	35 µl
SAM (20 mM)	25 µl
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	ad 1000 µl

Die Inkubationen werden wie folgt durchgeführt:

Die Testsubstanz und die Mikrosomen werden in die entsprechende Menge Puffer pipettiert. Nach Durchmischen erfolgt eine 5 min Vorinkubation (37 °C). Anschließend wird das NADPH-generierende System dazugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von SAM erfolgt entweder gemeinsam mit der Zugabe des NADPH-generierenden Systems oder um 30 min zeitversetzt.

Die Aufarbeitung nach Ende der Inkubation entspricht der oxidativen Umsetzung.

Als Kontrolle werden Inkubationen ohne Zusatz von SAM bzw. ohne SAM und NADPH-generierendes System durchgeführt.

Die Quantifizierung des Anteils zu dem die Catechole methyliert werden erfolgt ausschließlich über die verbliebene Konzentration der HO-AOH bzw. HO-AME im Vergleich zu Kontrolle. Eine Quantifizierung über die Methylierungsprodukte ist nicht möglich, da sie mit den Ausgangsverbindungen, den Catecholen bzw. den Polymeren coeluiert. Die GC-MS-(MS) liefert eine deutlich bessere Trennung, wird aber nur zur qualitativen Analyse eingesetzt.

### **6.5 Aufarbeitung der Metabolite aus Zellkulturmedium**

Die Analyse der Metabolite nach Inkubationen von AOH und AME mit Präzisionsrattenleberschnitten geschieht wie folgt:

1,2 ml des Mediums entnommen mit 10 µl Bisphenol A (10 mM in MeOH) als internen Standard (ISTD) versetzt und gut durchmischt. Die Lösung wird in zwei Aliquots zu je 500 µl aufgeteilt.

Das eine Aliquot wird direkt dreimal mit ca. 500 µl Ethylacetat extrahiert. Das Extrakt (Fraktion I) enthält die Metabolite, die so unpolar sind, dass sie sich extrahieren lassen. Die meisten Konjugate sind hierfür zu polar, so dass es sich hier in der Regel um „freie“ Metabolite handelt.

Die zurückgebliebene wässrige Phase wird am Evaporator von übriggebliebenem Ethylacetat befreit und nach Konjugatspaltung (Durchführung s.u.) durch Glucuronidase/Sulfatase erneut extrahiert (Fraktion II). In Fraktion (II) sind nur die gespaltenen Konjugate enthalten.

Das zweite Aliquot wird direkt der Konjugatspaltung unterzogen und im Anschluss extrahiert. (Fraktion III). Fraktion III enthält die „freien“ Metabolite und die gespaltenen Konjugate zusammen.

Um potentiell gebildete Glucuronide zu extrahieren, wird die wässrige Phase nach Extraktion statt der enzymatischen Spaltung mit 400 µM HCl/Glycin-Puffer (0,7 M) angesäuert und extrahiert. Als Fraktion II werden so die protonierten Glucuronide erhalten, sofern sie ausreichend polar sind.

Konjugatspaltung:

Die Konjugatspaltung erfolgt durch  $\beta$ -Glucuronidase/Sufatase aus *Helix pomatia*. Hierzu werden 500  $\mu$ l Medium mit 200  $\mu$ l Acetat-Puffer (0,15 M, pH 5) versetzt. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l  $\beta$ -Glucuronidase/Sufatase wird über Nacht inkubiert.

Der Anteil an konjugierten AME bzw. AOH ergibt sich aus dem Anteil der Konzentration des Substrates in Fraktion I zu Fraktion III (Gl. 1):

Gl. 1

$$\% \text{ Konjugate} = 100 - \left( \frac{c_{\text{Fraktion I (Substrat)}} * 100}{c_{\text{Fraktion III (Substrat)}}} \right)$$

Um eine höhere Genauigkeit zu erzielen und Schwankungen z.B. bei der Extraktion auszugleichen, werden die Anteile über den ISTD normiert. Dabei wurde die Fläche des ISTD bei 280 nm ermittelt. Mit dieser Erweiterung und unter Einbeziehung gleicher Volumina wird Gl. 1 zu Gl.2:

Gl. 2

$$\% \text{ Konjugate} = 100 - \left( \frac{F_{\text{Fraktion I (Substrat)}} * F_{\text{Fraktion III (ISTD)}} * 100}{F_{\text{Fraktion III (Substrat)}} * F_{\text{Fraktion I (ISTD)}}} \right)$$

Die Gehalte an AME bzw. AOH in Fraktion III muss der Gesamtmenge in Fraktion I und II entsprechen und der Anteil kann so überprüft werden (Gl.3). Da Bisphenol A als ISTD vollständig mit Ethylacetat extrahiert wird, dient er nicht der Normierung der Konzentration in Fraktion II.

Gl. 3

$$n_{\text{Fraktion III (Substrat)}} = n_{\text{Fraktion I (Substrat)}} + n_{\text{Fraktion II (Substrat)}}$$



## 6.6 Chromatographische Methoden

### 6.6.1 HPLC-DAD

Die Trennung der von AOH, AME und den Metaboliten erfolgte an der HPLC-DAD durch ein optimiertes Trennprogramm:

#### HPLC-DAD

Flussrate:	1 ml / min
Fließmittel A	Entsalztes Wasser pH 3 (eingestellt mit Ameisensäure)
Fließmittel B	Acetonitril
Wellenlänge	254 nm (zur Quantifizierung)

#### Gradient:

Zeit (min)	von % Fließmittel B	auf % Fließmittel B	in (min)
0	17	isokratisch	2
2	17	45	7
9	45	50	7
16	50	100	14
31	100	isokratisch	4
35	100	17	5
40			

(Alle weiteren Angaben s. Geräte)

#### Quantifizierung:

Die Quantifizierung erfolgt über die Absorption bei 254 nm. Da für die entstehenden Metabolite der Extinktionsfaktor nicht bekannt ist, wird für alle quantitativen Auswertungen der Extinktionsfaktor von AOH – bzw. die Kalibration mit AOH (s.u.) zugrunde gelegt.

Allerdings zeigt der Vergleich der von Tanahsi et al. (1997, 2003) für AOH und Graphislacton A veröffentlichten Extinktionsfaktoren in methanolischer Lösung, dass die Einführung zusätzlicher Hydroxy- bzw. Methoxygruppen das Absorptionsverhalten deutlich beeinflusst:

AOH	256 nm	42657 l/(mol cm)
Graphislacton A (4-Hydroxy-3-Methoxy-AOH)	259 nm	29512 l/(mol cm)
rel. Abweichung		30 %

Es ist also bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die Anteile der Metaboliten je nach ihrem Absorptionsverhalten bei 254 nm größer oder kleiner als angegeben sein können. Die Berechnung der % Anteile nach Umsetzung erfolgt aus dessen Flächenanteil an der Gesamtfläche. Der Anteil des Umsatzes ist die Differenz des Anteils der Ausgangssubstanz zu 100.

### Kalibration

Für AOH und AME wird eine Kalibration bei 254 nm für Mengen zwischen 0,04- 2 nmol durchgeführt. Daraus resultieren folgende Gleichungen der Kalibrationsgeraden:

$$\begin{array}{lll} \text{AOH:} & n = 4,36 \cdot 10^{-7} \cdot F & [\text{nmol}] \\ \text{AME} & n = 4,26 \cdot 10^{-7} \cdot F & [\text{nmol}] \end{array}$$

Mit  $n$  = Stoffmenge in nmol ;  $F$  = Flächeneinheiten

### **6.6.2 HPLC-MS**

Um Metabolite anhand ihrer Molekülmassen weiter charakterisieren bzw. anhand von charakteristischen Fragmentierungen ihre Struktur aufzuklären zu können, wird die HPLC-ESI-MS eingesetzt. Die Kopplung von HPLC und MS bietet den Vorteil, dass direkt ein Substanzgemisch auch nicht flüchtiger Verbindungen analysiert werden kann.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Übergang zwischen einer Flüssigkeit bei Normaldruck zum Vakuum im MS. Für die Überführung polarer Analyten in das MS wird die Elektronensprayionisation (ESI) Methode verwendet. Hierbei werden im positiven Modus positiv geladene Addukte detektiert, die zumeist aus Anlagerung von Protonen und Kationen resultieren. Im negativen Mode resultieren die Ionen fast immer aus der Abspaltung eines Protons. Von der Struktur her, kommen für AOH und AME – und damit für ihre Metabolite – beide Modi in Frage.

Jedoch ist eine negative Ionisierung aufgrund der Azidität des Protons in Position 7 als sinnvoll zu betrachten, da schon ein Teil der Moleküle geladen vorliegen. Auch beschreiben Lau et al. (2003), dass die  $[M-H]^-$  Ionen im LC-ESI-MS eine höhere Stabilität aufweisen als die im positiven Mode erzeugten  $[M+H]^+$  Ionen.

Da die verwendete HPLC-ESI-MS aber kontinuierlich im positiven ESI Modus betrieben wird (saure Fließmittel, etc.) findet diese Arbeitsweise Verwendung.

Die Trennung der Metabolite erfolgte mit folgendem Trennprogramm:

#### HPLC-(DAD)-ESI-MS

Flussrate:	0,6 ml / min
Fließmittel A	0,05 % Trifluoressigsäure in entsalztem Wasser.
Fließmittel B	Acetonitril
Wellenlänge	254 nm (DAD)
Fragmentorspannung:	75 V bzw. 175 V

#### Gradient:

Zeit (min)	von % Fließmittel B	auf % Fließmittel B	in (min)
0	17	45	12
12	45	55	18
30	50	90	15
45	90	isokratisch	4
49	90	17	1
50	17	isokratisch	2
52			

*(Alle weiteren Angaben s. Geräte)*

#### Charakterisierung / Identifizierung durch MS-Spektren:

Es wird jeweils mit einer niedrigen (50-75 V) und einer hohen Fragmentorspannung (160-175 V) gearbeitet, um zum einen deutliche Peaks der Molekülonen zum anderen eine handfeste Fragmentierung zu erzielen. Um die Peaks der HPLC-DAD den Peaks in der LC-ESI-MS zuzuordnen, werden neben dem Extrakt auch die fraktionierten Metabolite (s.o) eingesetzt.

### **6.6.3 GC-MS-(MS)**

Die gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bietet neben der Trennung und Quantifizierung von Analyten die Möglichkeit sie anhand ihrer Massenspektren zu charakterisieren bzw. sogar zu identifizieren.

Voraussetzung für die GC ist, dass die zu untersuchenden Substanzen unter den gewählten Bedingungen gasförmig vorliegen. Um polare - und damit wenig flüchtige - Substanzen zu

trennen, müssen diese zuvor derivatisiert werden. Am verbreitetsten ist hierfür die Umsetzung von Hydroxygruppen in Trimethylsilylether (TMS-Ether) durch Silylierungsreagenzien wie N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA).

MS Geräte mit Ionenfalle (Ion Trap) ermöglichen es hierüberhinaus, einzelne Ionen zu isolieren und gezielt zu fragmentieren.

Für die Analyse mittels GC-MS-(MS) werden ca. 30 nmol der Substanzen bzw. ein Aliquot der Extrakte (i.d.R. 10 µl von 50 µl) nach Umsetzung gelöst in Methanol eingesetzt. Die Lösungen werden in einem Autosampler-Vial unter dem Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft.

Zum Rückstand gibt man 30 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid BSTFA) bzw. deuterierten N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid. Nach Einwirkung über Nacht (Raumtemperatur) wurden 1 µl dieser Lösung direkt in die GC-MS injiziert. Die lange Reaktionszeit ist notwendig damit die Metabolite möglichst vollständig trimethylsilyliert werden. Vorversuche zeigten, dass die von Scott et al. (1997) beschriebenen teilweise silylierten AOH (Bis-TMS-AOH) und AME (Mono-TMS-AME) schon nach einer Stunde Reaktionszeit nur in marginalen Anteilen vorliegen.

Da keine Aufreinigung erfolgt und da die Metabolite im Verhältnis zu den Ausgangsverbindungen in geringen Konzentrationen entstehen, können die Peaks der Metabolite z.T im Totalionenstrom (TIC) nur erahnt werden. Da sich aber im Selected-Ion-Modus (SIM), im Besonderen im MS-MS, deutliche Peaks darstellen, wurde an dieser Arbeitsweise festgehalten. Zur Überprüfung auf Coelutionen von Verunreinigungen wird von allen Proben zunächst ein MS-Scan der Massen  $m/z = 50-650$  durchgeführt. Erst im Anschluss finden MS-MS-Untersuchungen statt.

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur	60 °C	1 min
Aufheizrate	15 °C/min	
Endtemperatur	290 °C	15 min

*(Alle weiteren Angaben s. Geräte)*

## 7 Verwendete Geräte und Materialien

### 7.1 Verwendete Geräte

#### GC-MS-MS

Finnigan GCQ (GC-MS mit Ionenfalle als Analysator)

Säule:	Kapillarsäure	Supelco MDN 5s 28,5 m Länge 0,25 mm Durchmesser Filmdicke 0,25 µm
Trärgas:		Helium
Fluß:		40 cm /s
Injektorprogramm:	Kaltaufgabe	
	Equilibrierungszeit	30 sek
	Aufheizrate	8°C/min
	Endtemperatur	275°C
	Splitless-Zeit	90 s
	Transferdruck	20 PSI
	Transferzeit	90 sek
	Anfangsdruck	10 PSI
	Enddruck	20 PSI
Ionenquellentemperatur:		250°C
Ionisierungsenergie:	EI	70 eV
Massenanalysator		Ionenfalle
Massenbereich		50-650 amu
Software		Finnigan GQ 2.31
Injektionsvolumen		1 µl

Im MS-MS-Modus wird eine zusätzliche Spannung von 1,5 V auf die Endkappen der Ionenfalle angelegt, um die Fragmentierung zu forcieren.

#### HPLC-DAD

Vorsäule:		Phenomenex SecurityGuard
Säule:	RP-Phase:	Phenomenex Luna 5u C8, 250 X 4,6 mm
Pumpe:	binäre Pumpe:	Beckmann System Gold 125, Solvent Modul
Detektor	DAD	Beckmann System Gold 168
Degaser:		Knauer Degasser
Injektor:	manuell	Rheodyne, Probenschleife 100 µl
Software:		Beckmann 32 Karat

**HPLC-ESI-MS**

Vorsäule:		Bischoff, Prontosil, 120-3-C18-ace-EPS
Säule:	RP-Phase	Bischoff, Prontosil, 120-3-C18-ace-EPS 3.0 µm, 150 x 3.0 mm
Pumpe:	binäre Pumpe	Agilent 1100 Series
Degaser:		Agilent 1100 Series
Injektor:	Autosampler	Agilent 1100 Series
Detektor:	DAD	Agilent 1100 Series
	MS	Agilent 1100 Series
	Ionisationsmodus:	API-ES positiv
	Kapillarspannung:	3500 V
	Fragmentorspannung:	50 - 175 V
	Trocknegasfluß:	12.5 L/min
	Trocknungsgastemperatur:	350 °C
	Massenbereich:	50-600 amu
Software:		Agilent ChemStation

**Weitere Geräte**

Waagen	Sartorius MC5
	Sarorius handy
Zentrifugen	Hettich Mikroliter
	Eppendorf centrifuge 5417 R
	Heraeus Megafuge 1.0 R
Termomixer	Eppendorf 5436
Evaporator:	Jovan RC10 mit Kühlfalle Jovan RCT 90
pH-Meter	Schott Geräte: C4 817 mit Elektrode Blue Line 12 pH
UV-VIS Spektrometer	Jasco V-550

**7.2 Verwendete Materialien****Mikrosomen**

Die verwendeten Mikrosomen wurden im Arbeitskreis hergestellt und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Protein- und Cytochromgehalt sind Tab.10 zu entnehmen.

**Tab.10** Charakterisierung der eingesetzten Mikrosomen: Protein- und Cytochromgehalt

Lebermikrosomen von	Proteingehalt [mg/ml]	Cytochromgehalt [nmol/mg Protein]
Sprague-DawleyRatten ♂	25	0,84
Schweine ♂	7	0,39
Mensch ♂	7	0,20

Das verwendete Rattenlebercytosol weist eine Proteinkonzentration von 27 mg/ml auf.

Die verwendeten Supersomen<sup>®</sup> stammen von der Firma BD Gentest<sup>™</sup>.

## Hersteller / Verkäufer verwendeter Chemikalien

**Tab.11** Hersteller bzw. Verkäufer der verwendeten Chemikalien und Enzymen

Substanz	Hersteller
Acetonitril	Acros
AME	Sigma
Alamethicin	Fluka
AOH	Eigensynthese AK Podlech Uni-Karlsruhe
L-Ascorbinsäure	Merck
Bier	Hoepfner
BHA	Merck
BHT	Roth
deuteriertes BSA N-O-Bis (Trimethyl-d9-silyl)acetamide	Campro Scientific GmbH Art. Nr. T82-08002
BSTFA	Fluka
Desmethoxygraphis lacton A	Eigensynthese AK Podlech Uni-Karlsruhe
Ethylacetat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka
DMSO	Sigma
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	Roche
Glutathion (GSH)	Sigma
Graphis lacton A	Eigensynthese AK Podlech Uni-Karlsruhe
Isocitrat (Trinatriumsalz)	Sigma
Isocitratdehydrogenase (200 U/ml)	Sigma
Katalase (65.000 U/mg Protein suspension)	Serva
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka
Magensiumchlorid	Sigma
Meerrettich-Peroxidase (lyophilisiert) (400 U/mg)	Serva
NADP <sup>+</sup>	Fluka
SAM	Sigma
Saccharo-1,4-Lacton (Monohydrat)	Sigma
TBHQ	Sigma
4-(Trifluormethyl)-Umbelliferon	Fluka
UDPGA, Trinatriumsalz	Fluka

Nicht aufgeführte verwendete Chemikalien und Lösemittel stammen von Roth, Fluka, Sigma, Aldrich oder Merck und sind von der höchsten oder eine akzeptablen Reinheit.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorptionseinheiten
amu	Atommasseneinheiten
AOH	Alternariol
AME	Alternariolmonomethylether
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BHA	<i>tert.</i> -Butylhydroxyanisol
BHT	<i>tert.</i> -Butylhydroxytoluol
BSA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CYP	Cytochrom P-450 Monooxygenase
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
DGLA	Desmethylgraphislacton
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E1	Estradiol
E2	Estron
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GLA	Graphislacton A
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HLM	Humanmikrosomen
HO-AOH	Hydroxyliertes Alternariol
HO-AME	Hydroxylierter Alternariolmonomethylether
IF	Isoflavon
ISTD	Interner Standard
KG	Körpergewicht
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
n.n.	nicht nachweisbar
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
RCYT	Rattenlebercytosol
rpm	Umdrehungen/Minute
RLM	Rattenlebermikrosomen
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SIM	Selected Ion Mode
SLM	Schweinelebermikrosomen
TBHQ	<i>tert.</i> -Butylhydrochinon
TIC	Totalionenstrom
TMS-	Trimethylsilyl-
TCA	Trichloressigsäure
UGT	Glucuronyltransferase
UDPGA	Uridindiphospho- $\beta$ -glucuronsäure
UV-VIS	ultraviolett -sichtbarer Bereich
ZAL	Zearalanon
ZAN	Zearalanol, Zeranol



## 9 Literaturverzeichnis

Ansari, A. A., and Shrivastava, A. K. (1990). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, India. *Food Addit Contam* 7, 815-820.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13, 135-160.

Bruger, E. (2005) Untersuchungen zum mutagenen Potenzial des Mykotoxins Alternariol. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe.

Bundesamt für Riskobewertung (BfR) Stellungnahme vom 30. Juli 2003: *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln.

Creaser, C. S., Koupai-Abyazani, M. R., and Stephenson, G. R. (1991). Mass Spectra of Trimethylsilyl Derivatives of Naturally Occurring Flavonoid Aglycones and Chalcones. *Organic Mass Spectrometry* 26, 157-160.

Creaser, C. S., Koupai-Abyazani, M. R., and Stephenson, G. R. (1992). Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of flavanones in citrus and grape juices. *Analyst* 117, 1105-1109.

Davis, V. M., and Stack, M. E. (1994). Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* 60, 3901-3902.

Delgado, T., and Gomez-Cordoves, C. (1998). Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *J Chromatogr A* 815, 93-97.

DiCosmo, F., and Straus, N. A. (1985). Alternariol, a dibenzopyrone mycotoxin of *Alternaria* spp., is a new photosensitizing and DNA cross-linking agent. *Experientia* 41, 1188-1190.

Dong, Z. G., Liu, G. T., Dong, Z. M., Qian, Y. Z., An, Y. H., Miao, J. A., and Zhen, Y. Z. (1987). Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis* 8, 989-991.

Gehring, T. (2005) Totalsynthese von Graphislactonen. Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe.

Griffin, G. F., and Chu, F. S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Appl Environ Microbiol* 46, 1420-1422.

Harwig, J., Scott, P. M., Stoltz, D. R., and Blanchfield, B. J. (1979). Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl Environ Microbiol* 38, 267-274.

- Hasan, H. A. (1996). *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **43**, 125-133.
- Hormazabal, E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodriguez, J., and Theoduloz, C. (2005). Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. *Z Naturforsch [C]* **60**, 11-21.
- Karlovsky, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins* **7**, 1-23.
- Kellert, M., W., B., and M., W. (1984). Gas-chromatographische-massenspektrometrische Bestimmung von *Alternaria*-Toxinen in Obst- und Gemüseerzeugnissen. *Fresenius Z Anal Chem* **318**, 419-424.
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., and Tephly, T. R. (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**, 143-161.
- Kulling, S.E. (2001) Phytoestrogene vom Isoflavontyp: Metabolismus und genetische Toxizität. Habilitationsschrift, Universität Karlsruhe.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., and Metzler, M. (2001). Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* **49**, 3024-3033.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J., and Metzler, M. (2000). Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem* **48**, 4963-4972.
- Lau, B. P., Scott, P. M., Lewis, D. A., Kanhere, S. R., Cleroux, C., and Roscoe, V. A. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *J Chromatogr A* **998**, 119-131.
- Lautala, P., Ulmanen, I., and Taskinen, J. (2001). Molecular mechanisms controlling the rate and specificity of catechol O-methylation by human soluble catechol O-methyltransferase. *Mol Pharmacol* **59**, 393-402.
- Lehmann, L., Wagner, J., and Metzler, M. (2005). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol*. (im Druck)
- Li, B., and Li, J. Y. (1980). National survey of cancer mortality in China. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* **2**, 1-10.
- Li, F., and Yoshizawa, T. (2000). *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. *J Agric Food Chem* **48**, 2920-2924.
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, W. H., Qi, Y. M., and Guo, H. T. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* **105**, 394-400.

Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, Z. M., Shi, Z. Y., Zhen, Y. Z., Miao, J., and Xu, Y. M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci Publ*, 258-262.

Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, Z. M., Shi, Z. Y., Zhen, Y. Z., Miao, J., and Xu, Y. M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci Publ*, 258-262.

Magan, N., Cayley, G. R., and Lacey, J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl Environ Microbiol* 47, 1113-1117.

Makin, H., Trafford, D., and Nolan, J.: *Mass Spectra and GC Data of Steroids*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, New York, Cichester, Brisbane, Singapore Toronto. 1. Auflage (2001)

Migdalof, B. H., Dugger, H. A., Heider, J. G., Coombs, R. A., and Terry, M. K. (1983). Biotransformation of zeranol: disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. *Xenobiotica* 13, 209-221.

Molina, P. G., Zón, M. A., and Fernández, H. (1998). Determination of the acid dissociation constants of some mycotoxins of the *Alternaria alternata* genus. *Can J Chem* 76, 576-582.

Müller, M., and Gagner, W. (2005). Mykotoxine in Getreidekörnern sowie in Lebens- und Futtermitteln im Land Brandenburg in den Jahren 2000-2003 (Poster). 27 Mykotoxin-Workshop 12-15.06.2005 in Dortmund. Abstract: Mycotoxin Research (Im Druck)

Nielsen, K. F., and Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* 1002, 111-136.

Olsen, M., and Visconti, A. (1987). Metabolism of alternariol monomethylether by porcine liver and intestinal mucosa in vitro. *Toxic in vitro* 2, 27-29.

Onocha, P. A., Okorie, D. A., Connolly, J. D., and Roycroft, D. S. (1995). Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo-a-pyrone from *Anthocleista djalensis*. *Phytochemistry* 40, 1183-1189.

Ostry, V., Skarkova, J., Ruprich, J., and Prochazkova, I. (2005). Searching of dietary exposure sources of *Alternaria* mycotoxins- the comparison of their occurrence in winter wheat from domestic crop in years 2003-2004 (Poster). 27 Mykotoxin-Workshop 12-15.06.2005 in Dortmund. Abstract: Mycotoxin Research (Im Druck).

Pero, R. W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D., and Spalding, J. W. (1973). Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". *Environ Health Perspect* 4, 87-94.

- Pollock, G. A., DiSabatino, C. E., Heimsch, R. C., and Coulombe, R. A. (1982). The distribution, elimination, and metabolism of <sup>14</sup>C-alternariol monomethyl ether. *J Environ Sci Health B* 17, 109-124.
- Pollock, G. A., DiSabatino, C. E., Heimsch, R. C., and Hilbelink, D. R. (1982). The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food Chem Toxicol* 20, 899-902.
- Raistrick, H., Stickings, C. E., and Thomas, R. (1953). Studies in the biochemistry of microorganisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*. *Biochem J* 55, 421-433.
- Robiglio, A. L., and Lopez, S. E. (1995). Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina. *Int J Food Microbiol* 24, 413-417.
- Sauer, D. B., Seitz, L. M., Burroughs, R., Mohr, H. E., West, J. L., Milleret, R. J., and Anthony, H. D. (1978). Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J Agric Food Chem* 26, 1380-1393.
- Schoch, A. (2004) Einfluss von Daidzein auf die Bildung von Catechol-Estrogenen in vitro. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Kalsruhe.
- Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., and Vijay, H. M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames Salmonella test. *Teratog Carcinog Mutagen* 21, 261-274.
- Scott, P. M., and Stoltz, D. R. (1980). Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutat Res* 78, 33-40.
- Scott, P. M., Weber, D., and Kanhere, S. R. (1997). Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *J Chromatogr A* 765, 255-263.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., and van den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *J AOAC Int* 87, 101-106.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., and van den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *J AOAC Int* 87, 101-106.
- Solfrizzo, M., Girolamo, A. D., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Szopinska, D., and Dorna, H. (2005). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Addit Contam* 22, 302-308.
- Song, Y. C., Huang, W. Y., Sun, C., Wang, F. W., and Tan, R. X. (2005). Characterization of graphisilactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol Pharm Bull* 28, 506-509.

Stack, M. E., Mislivec, P. B., Roach, J. A., and Pohland, A. E. (1985). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *J Assoc Off Anal Chem* 68, 640-642.

Stinson, E. E. (1985). Mycotoxins - their biosynthesis in *Alternaria*. *Journal of Food Protection* 48, 80-91.

Tanahashi, T., Kuroishi, M., Kuwahara, A., Nagakura, N., and Hamada, N. (1997). Four phenolics from the cultured lichen mycobiont of *Graphis scripta* var. *pulverulenta*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45, 1183-1185.

Tanahashi, T., Takenaka, Y., Nagakura, N., and Hamada, N. (2003). 6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis* spp. and their biosynthetic origin. *Phytochemistry* 62, 71-75.

Visconti, A., Bottalico, A., Solfrizzo, M., and Palmisano, F. (1989). Isolation and structure elucidation of isoaltenuene, a new metabolite of *Alternaria alternata*. *Mycotoxin Research* 5, 69-76.

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., and et al. (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer--Linxian, China. *IARC Sci Publ*, 253-257.

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	<b>Kurztitel</b>	<b>Seite</b>
<b>Abb.1</b>	Strukturformel AOH und AME	1
<b>Abb.2</b>	Strukturformel von Tenuazonsäure, Altenuen und Altertoxin I	1
<b>Abb.3</b>	Biosynthese von Alternariol	2
<b>Abb.4</b>	Strukturen einiger Graphis lactone	2
<b>Abb.5</b>	HPLC-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von AME durch RLM	12
<b>Abb.6</b>	HPLC-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von AOH durch RLM	12
<b>Abb.7</b>	HPLC-DAD UV-VIS Spektrum von AOH und AME	13
<b>Abb. 8</b>	Mögliche Positionen für Hydroxylierungen von AOH und AME	14
<b>Abb. 9</b>	Mögliche Dimerisierung von AOH über Chinonbildung	16
<b>Abb. 10</b>	Mögliche Dimerisierung von AOH: über Radikalbildung	16
<b>Abb. 11</b>	Produktanteile nach oxidativem Umsatz von AOH und AME mit RLM	18
<b>Abb.12</b>	Produktanteile nach ox. Umsetzung von AME durch RLM (Zusatz von Ascorbinsäure)	20
<b>Abb.13</b>	Rel. Verteilung der Hydroxylierungsprodukte nach ox. Umsetzung von AOH mit RLM, HLM und SLM	23
<b>Abb.14</b>	Rel. Verteilung der Hydroxylierungsprodukte nach ox. Umsetzung von AME mit RLM, HLM und SLM	23
<b>Abb.16</b>	Fragmentierungsreaktion von AOH (Reaktion I)	27
<b>Abb.17</b>	Fragmentierungsmuster von AOH	28
<b>Abb.18</b>	Fragmentierungsmuster von AME	29
<b>Abb.19</b>	GC-MS-MS Chromatogramm nach oxidativer Umsetzung von AME	30
<b>Abb.20</b>	Fragmentierungsmuster von M2 (8-HO-AME) und M3 (10-HO-AME)	32
<b>Abb.21</b>	Fragmentierungsmuster von M4 (4-HO-AME) und M5 (2-HO-AME)	33
<b>Abb.22</b>	GC-MS-MS Chromatogramm nach oxidativer Umsetzung von AOH	35
<b>Abb.23</b>	AOH Metabolite O1-O4, Fragmentierungsreaktionen	36
<b>Abb.24</b>	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Redoxcycling	37
<b>Abb.25</b>	Methylierungsprodukte von M2	40
<b>Abb.26</b>	Anteil nicht methylierter HO-AME Metabolite nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT	41
<b>Abb.27</b>	GC-MS-MS Chromatogramme der gemischten Umsetzung von AME mit CYPs und COMT	42

---

<b>Abb.28</b> Mögliche Bildungen von M3 (10-HO-AME)	44
<b>Abb.29</b> Anteil nicht-methylierter HO-AOH nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT	45
<b>Abb.30</b> GC-MS(MS) Chromatogramm der gemischten Umsetzung von AOH mit CYPs und COMT	46
<b>Abb.31</b> Letzter Schritt der Totalsynthese von GLA: (Gehring, 2005)	47
<b>Abb.32</b> Demethylierung von GLA	47
<b>Abb.33</b> Fragmentierungsmuster von GLA (4-HO-3-CH <sub>3</sub> O-AME)	48
<b>Abb.34</b> <i>In vitro</i> AME-Metabolismus: Umsetzung durch CYPs und COMT	49
<b>Abb.35</b> Mögliche Methylierungsprodukte von 8-HO-AOH durch COMT	51
<b>Abb.36</b> HPLC- Chromatogramm nach Glucuronidierung von AOH	52
<b>Abb.37</b> HPLC- Chromatogramm nach Glucuronidierung von AME	53
<b>Abb.38</b> Anteile nach Glucuronidierung von AOH und AME	54
<b>Abb.39</b> Fragmentierungsreaktionen von Hesperitin (Creaser et al., 1992)	61
<b>Abb.40</b> Fragmentierungsreaktion von Genistein und 8-HO-Daidzein	62
<b>Abb.41</b> Fragmentierungsreaktionen von ZAN und ZAL	63
<b>Abb.42</b> Fragmentierungsreaktion von 8-HO-AOH	64
<b>Abb.43</b> Fragmentierungsreaktion von 7,8-Dihydroxyflavon (Creaser et al., 1991)	64
<b>Abb.44</b> Fragmentierungsreaktionen von trimethylsilylierten 5,7,8,3'-Pentahydroxyisoflavon	65
<b>Abb.45</b> Strukturformeln: E2, 4-HO-E2, 2-HO-E2, E1 etc.	67
<b>Abb.46</b> Fragmentierungsreaktion von 10-HO-AME	68
<b>Abb.47</b> Fragmentierungsreaktion von Glycitein	69
<b>Abb.48</b> Relative Intensitäten der Fragmente von methylierten E2 und E1 Catecholen	70
<b>Abb.49</b> Aktivitäten von Supersomen	78

## 11 Anhang

### 11.1 Messdaten zu den im Text dargestellten Grafiken

#### Abb. 11 und 13

Oxidative Umsetzung von AOH durch RLM, HLM, SLM

*rel. Anteile (%) nach oxidativer Umsetzung*

<b>AOH</b>	<b>O1</b>	<b>O2</b>	<b>O3</b>	<b>O4</b>	<b>Poly</b>
<i>RLM</i>					
72,92	0,95	0,96	9,65	3,81	11,70
75,11	0,74	0,75	8,72	2,85	11,82
66,09	1,02	0,98	11,67	3,78	16,46
<i>HLM</i>					
89,59	0,31	1,10	0,00	4,42	4,58
90,41	0,26	1,05	0,06	3,94	4,29
91,34	0,29	1,05	0,00	4,04	3,28
<i>SLM</i>					
87,29	0,24	1,22	0,22	1,28	9,75
90,69	0,25	1,25	0,11	1,18	6,52
88,94	0,22	1,18	0,00	1,19	8,48

#### Abb. 11, 12 und 14

Oxidative Umsetzung von AME durch RLM, HLM, SLM

*rel. Anteile(%) nach oxidativer Umsetzung*

<b>AOH</b>	<b>AME</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>Poly</b>
<i>RLM</i>							
2,82	60,57	1,07	11,20	4,29	2,21	2,94	14,90
2,66	62,56	1,16	9,34	2,35	1,72	1,74	18,47
2,88	61,72	1,05	9,56	2,31	1,43	1,45	19,60
2,07	67,38	0,85	8,27	2,45	1,61	1,89	15,46
<i>RLM + 10 mM Ascorbinsäure</i>							
6,01	44,58	1,61	17,92	7,00	3,27	4,70	14,92
3,60	55,69	1,09	10,86	3,57	2,06	2,55	20,58
4,06	45,09	1,18	12,47	4,46	2,55	3,85	26,34
<i>HLM</i>							
1,05	81,60	0,00	2,06	0,26	1,68	3,63	9,74
1,00	86,57	0,00	1,51	0,21	1,40	3,00	6,31
0,96	88,73	0,00	1,55	0,24	1,34	2,81	4,37
<i>SLM</i>							
58,55	0,00	4,36	0,75	1,22	2,57	30,30	58,55
53,33	0,00	5,02	1,15	1,93	3,65	31,53	53,33
70,97	0,00	3,67	0,41	1,31	2,36	18,92	70,97
50,92	0,00	4,57	0,76	1,40	2,95	36,80	50,92



**Abb. 29** Anteil nicht methylierter HO-AME Metabolite nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT im Vergleich zur Kontrolle

*% Anteile der Fläche der Kontrollumsetzung*

<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>
0	28,3	102,3	0	0
0	27,1	83,9	0	0
0	24,8	92,4	0	0

**Abb. 31** Anteil nicht methylierter HO-AOH Metabolite nach gemischter Umsetzung durch CYPs und COMT im Vergleich zur Kontrolle

*% Anteile der Fläche der Kontrollumsetzung*

<b>O1</b>	<b>O2</b>	<b>O3</b>	<b>O4</b>
0	0	90,2	16,2
0	0	85,5	16,1
0	0	85,1	15,1

**Abb.38** Verteilung nach Glucuronidierung von AOH und AME

*rel. Anteile (%) nach Glucuronidierung*

<b>AOH/AME</b>	<b>Glc-1</b>	<b>Glc-2</b>
<i>AOH</i>		
5,59	61,67	32,75
7,60	58,64	33,76
6,12	59,82	36,74
3,05	59,31	37,13
<i>AME</i>		
31,26	9,94	58,78
30,07	8,34	81,59
29,44	8,48	62,82

**Tab.4** COMT-Umsetzung der HO-AME*rel. Anteile nach COMT- Umsetzung*

<b>HO-AME</b>	<b>CH<sub>3</sub>-1</b>	<b>CH<sub>3</sub>-2</b>	<b>Polare Verbindung</b>
<i>M1</i>			
10,8	63,2		26,1
19,2	53,8		27,0
10,94	59,0		30,0
<i>M2</i>			
5,5	69,8	5,7	18,9
3,5	72,1	6,0	18,4
4,0	65,9	8,1	22,0
<i>M4</i>			
0	11,8	88,2	
0	11,7	88,3	
4,4	15,7	79,8	
<i>M5</i>			
0	54,0	46,0	
3,39	55,4	41,2	

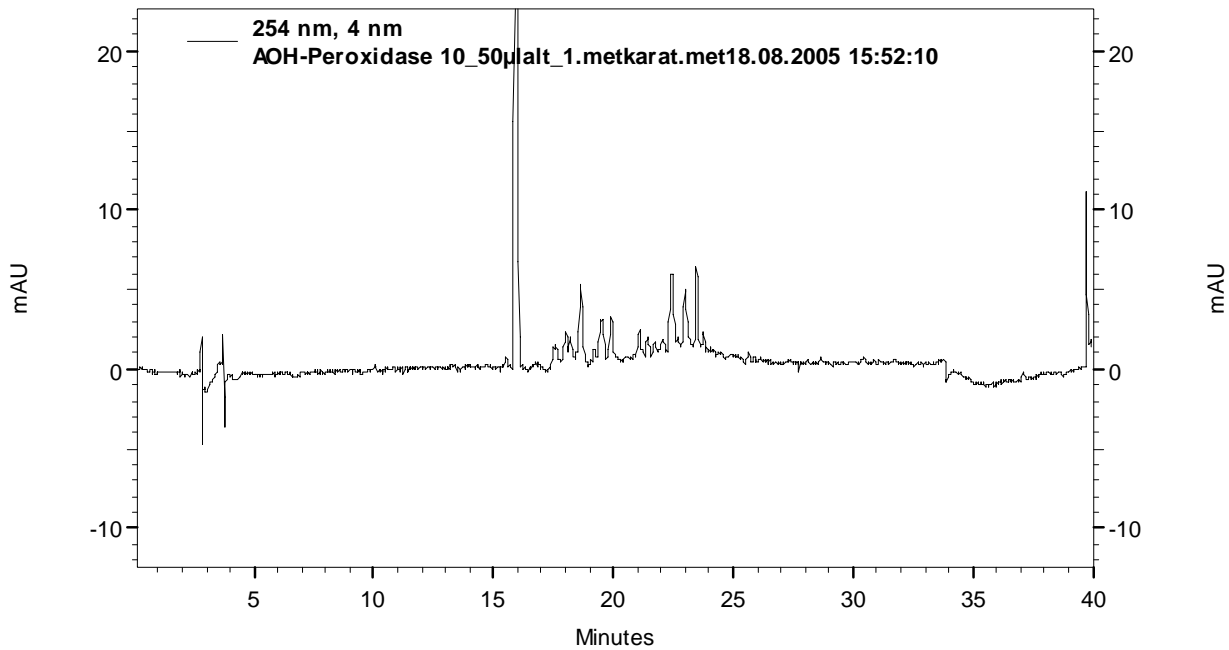
**Tab.5** COMT-Umsetzung der HO-AME*rel. Anteile (%) nach COMT- Umsetzung*

<b>HO-AOH</b>	<b>CH<sub>3</sub>-1</b>	<b>CH<sub>3</sub>-2</b>
<i>O2</i>		
13,1	7,0	79,8
6,4	9,2	84,3
<i>O4</i>		
0	87,8	12,2
0	82,1	17,9
0	81,2	18,8

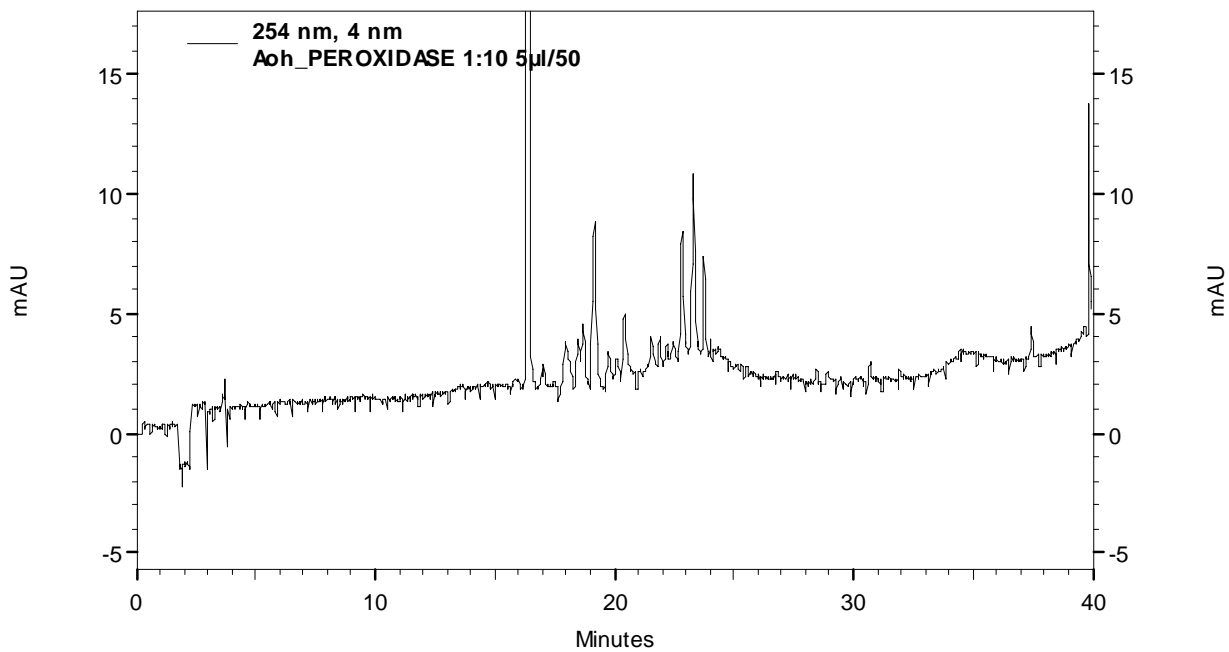
## 11.2 Chromatogramme

Chromatogramme nach Umsetzung von AOH mit Meerrettich Peroxidase:

4 U Peroxidase / ml Ansatz



40 U Peroxidase / ml Ansatz



### 11.3 Retentionszeiten der methylierten oxidativen Metabolite

#### AOH-Metabolite

HPLC- Retentionszeiten der methylierten HO-AME:

Metabolit	<i>Retentionszeit bei HPLC-DAD Trennung [min]</i>			
	HO-AME	M-1	M-2	Polares Produkt
<b>M1</b> (HO) <sub>2</sub> AME	11,7	14,7	-	10,4
<b>M2</b> 8-HO-AME	13,6	15,4	18,3	12,5
<b>M3</b> 10-HO-AME	17,4	-	-	
<b>M4</b> 4-HO-AME	18,2	22,4	22,6	
<b>M5</b> 10-HO-AME	20	23,2	24,1	

HPLC-Retentionszeiten der methylierten HO-AOH:

Metabolit	<i>Retentionszeit bei HPLC-DAD Trennung [min]</i>		
	HO-AOH	CH <sub>3</sub> -1	CH <sub>3</sub> -2
O2	13,5	15,4	18,3
O4	14,5	16,7	17,8

## 11.4 Tabellen der Intensitäten der Fragmentionen

### methylierte HO-AME

#### M2

MS-MS-Fragmentierung von M2-CH<sub>3</sub>-1 ([M]<sup>+</sup> Ionen) und M2-CH<sub>3</sub>-2 ([M-15]<sup>+</sup> Ionen).

M2-CH<sub>3</sub>-1 ([M]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 446 (deutertes BSA 464)

<i>BSTFA</i>			<i>deutertes BSA</i>		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
431	15	20	431	33	40
416	30	65	365	99	100
356	90	100	347	117	35
341	105	70	336	128	25
325	121	70	319	145	35
313	133	60	304	160	15
269	177	50	291	173	20
			275	189	20

M2-CH<sub>3</sub>-2 ([M-15]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 431 (deutertes BSA 446)

<i>BSTFA</i>			<i>deutertes BSA</i>		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
415	16	55	430	16	55
387	44	100	402	44	100
370	61	10	385	61	7

#### M4

MS-MS-Fragmentierung von M4-CH<sub>3</sub>-1 ([M-15]<sup>+</sup> Ionen) und M4-CH<sub>3</sub>-2 ([M-15]<sup>+</sup> Ionen).

M4-CH<sub>3</sub>-1 (GLA) ([M-15]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 431 (deutertes BSA 446)

<i>BSTFA</i>			<i>deutertes BSA</i>		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
401	30	100	413	<b>33</b>	100
358	73	4	370	<b>76</b>	7

M4-CH<sub>3</sub>-2 ([M-15]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 431 (deutertes BSA 446)

<i>BSTFA</i>			<i>deutertes BSA</i>		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
401	30	100	413	33	100
358	73	2	370	76	4

**M5**

MS-MS-Fragmentierung von M5-CH<sub>3</sub> ([M-15]<sup>+</sup> Ionen) mit T<sub>Ret</sub>= 22,1 (oben) und M5-CH<sub>3</sub> ([M-15]<sup>+</sup> Ionen) mit T<sub>Ret</sub>= 23,37 (unten)

M5-CH<sub>3</sub> ([M-15]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 431 (deutiertes BSA 446)

BSTFA			deutiertes BSA		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
401	30	100	413	33	100
358	73	3	370	76	5

M5-CH<sub>3</sub> ([M-15]<sup>+</sup> Ionen): m/z = 431 (deutiertes BSA 446)

BSTFA			deutiertes BSA		
Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil	Fragmentmasse	Massendifferenz	% Anteil
401	30	100	413	33	100
358	73	6	370	76	12

**methylierte HO-AOH**

MS-MS-Fragmentierung methylierter HO-AOH

Fragmentierung im GC-MS-MS: m/z = 489 (deutiertes BSA 513)

	m	Δ	%	m	Δ	%	m	Δ	%
Bezeichnung	<b>O1-CH3</b>			<b>2</b>			<b>O2-CH3</b>		
Retentionszeit	19,1			19,2			20,53		
<b>BSTFA</b>									
Fragmente	459	30	100	459	30	100	459	30	100
	387	102	1	446	43	1	387	102	5
				401	88	5			
<b>deut. BSA</b>									
Fragmente	480	33	100	480	33	100	480	33	100
	400	113	1				400	113	3

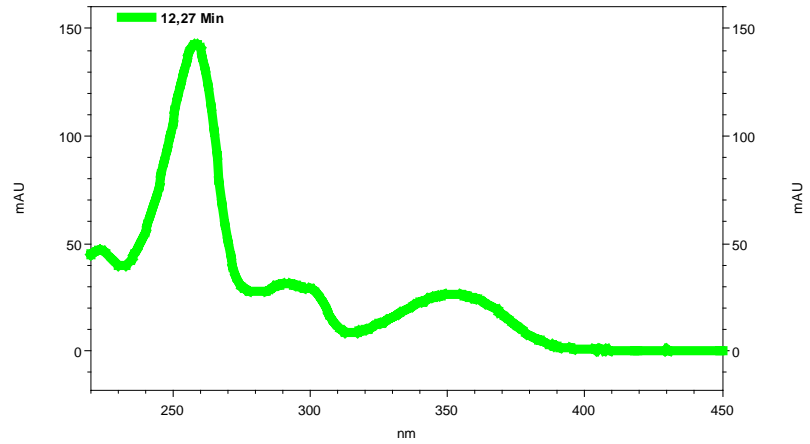
	m	Δ	%	m	Δ	%	m	Δ	%	m	Δ	%
Bezeichnung	<b>5</b>			<b>O4-CH3-1</b>			<b>7</b>			<b>O4-CH3-2</b>		
Retentionszeit	21,15			21,51			22,1			23,24		
<b>BSTFA</b>												
Fragmente	459	30	100	459	30	100	459	30	100	459	30	100
	387	102	1	387	102	1	387	102	3	387	102	3
<b>deut. BSA</b>												
Fragmente	480	33	100	480	33	100	498	15	3	480	33	100
	400	113	1	400	113	3	480	33	100	400	113	3
							455	58	1			
							400	113	1			

### **11.4 Spektren der oxidativen Metabolite**

Die UV-VIS, LC-ESI-MS und ggf. die GC-EI-MS-MS Spektren finden sich auf den folgenden (nicht nummerierte) Seiten.

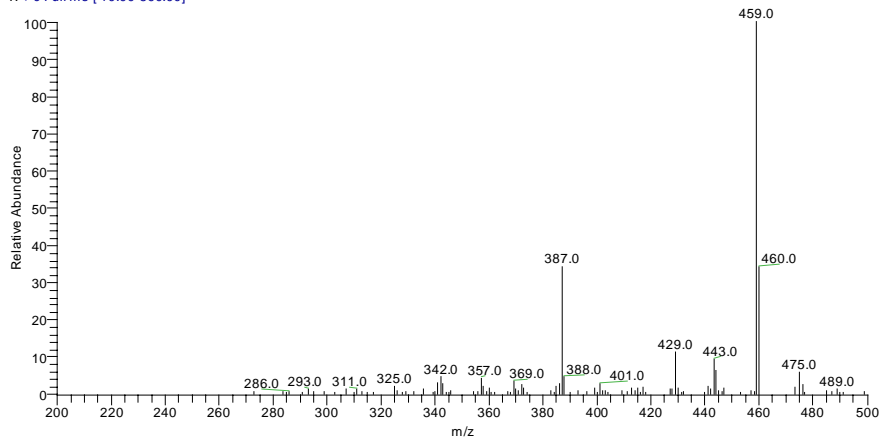
# Spektren von AOH-Metabolit O1

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



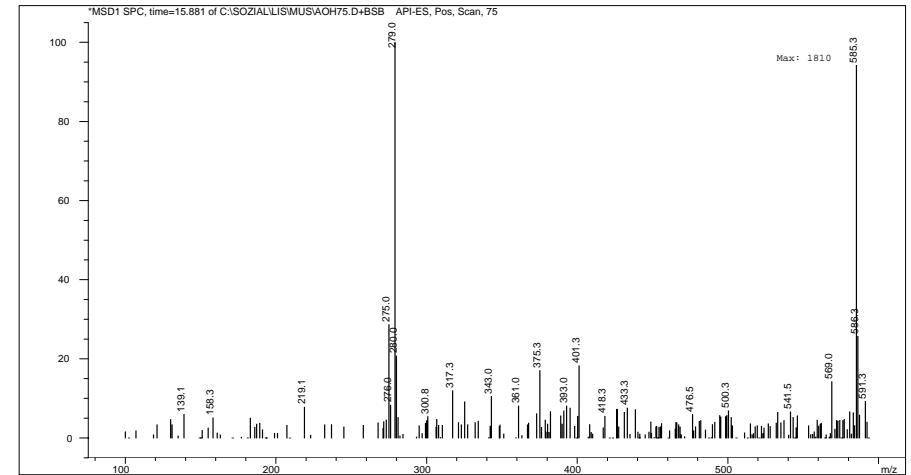
GC-MS-MS (m/z =547)

Nils062#1442 RT: 22.08 Av: 1 NL: 3.72E5  
T: + c Full ms [ 10.00-590.00]

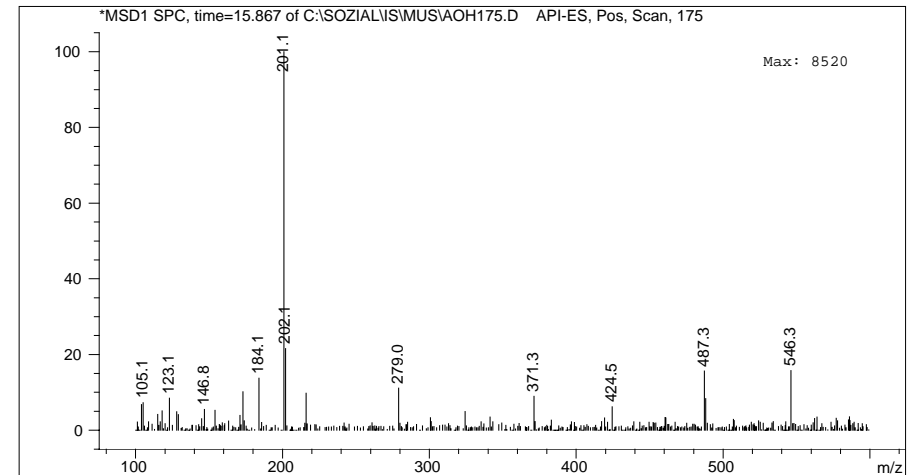


# Spektren von AOH-Metabolit O1

LC-ESI-MS (75 V)



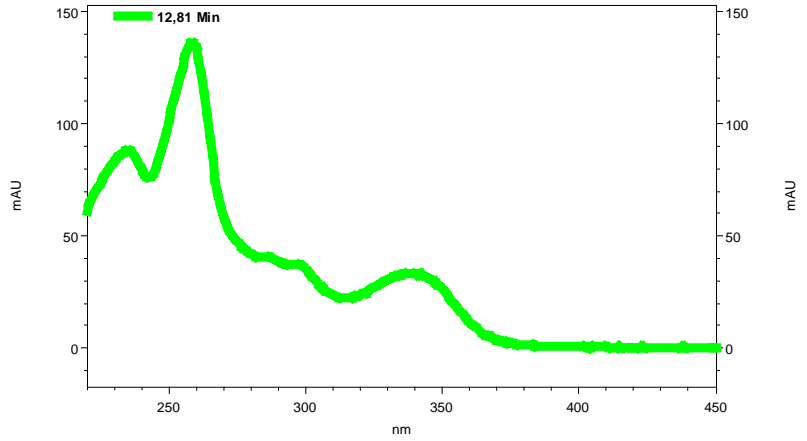
LC-ESI-MS (175 V)





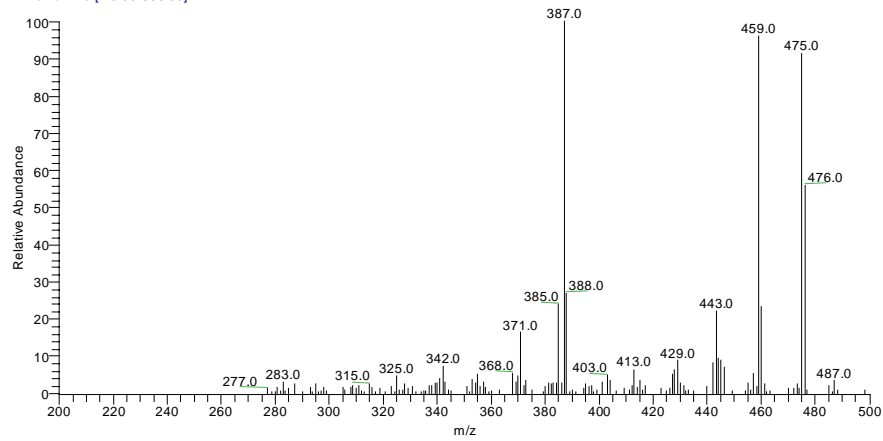
# Spektren von AOH-Metabolit O2

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



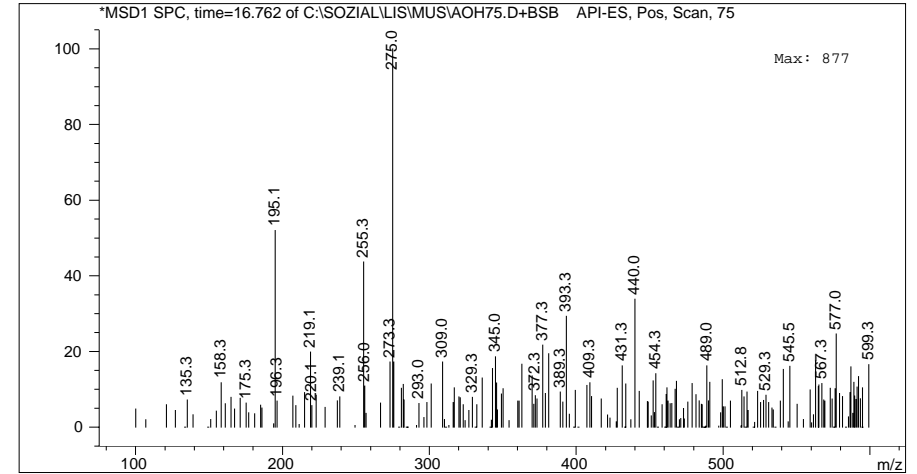
GC-MS-MS (m/z =547)

Nils062#1303 RT: 20.92 Av: 1 SB: 2 20.60, 21.20 NL: 3.80E5  
T: +c Full ms [ 10.00-590.00]

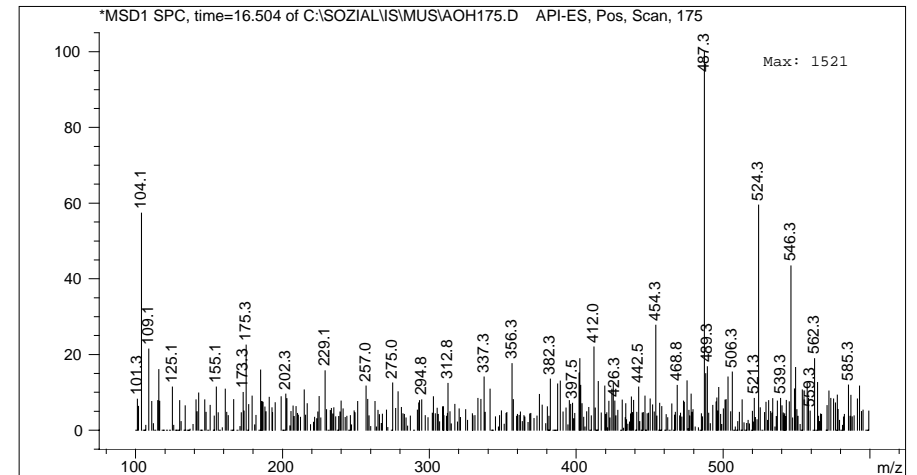


# Spektren von AOH-Metabolit O2

LC-ESI-MS (75 V)

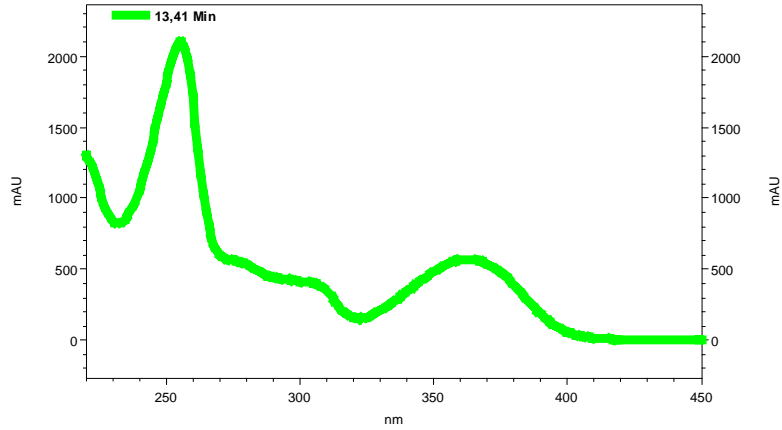


LC-ESI-MS (175 V)



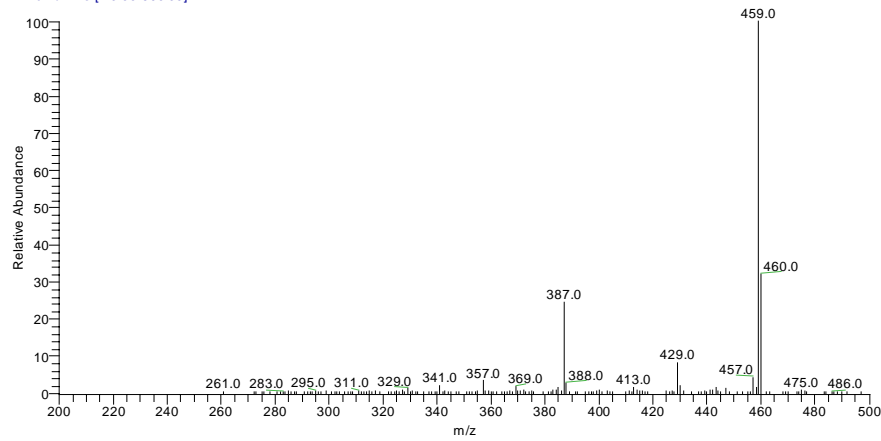
# Spektren von AOH-Metabolit O3

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



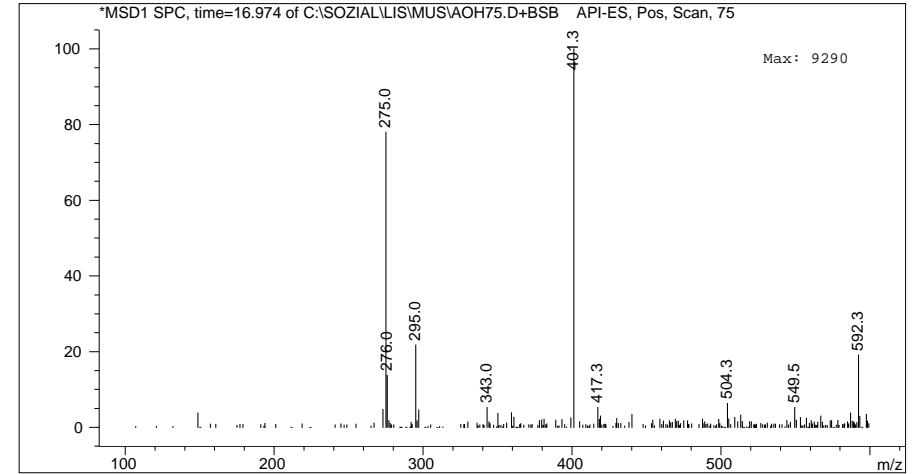
GC-MS-MS (m/z =547)

Nils062#1114 RT: 19.34 AV: 1 NL: 4.56E6  
T: + c Full ms [ 10.00-590.00]

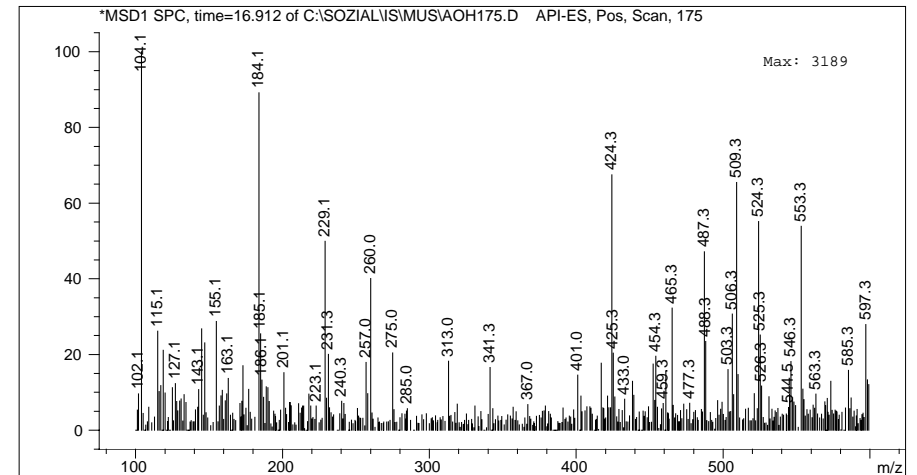


# Spektren von AOH-Metabolit O3

LC-ESI-MS (75 V)

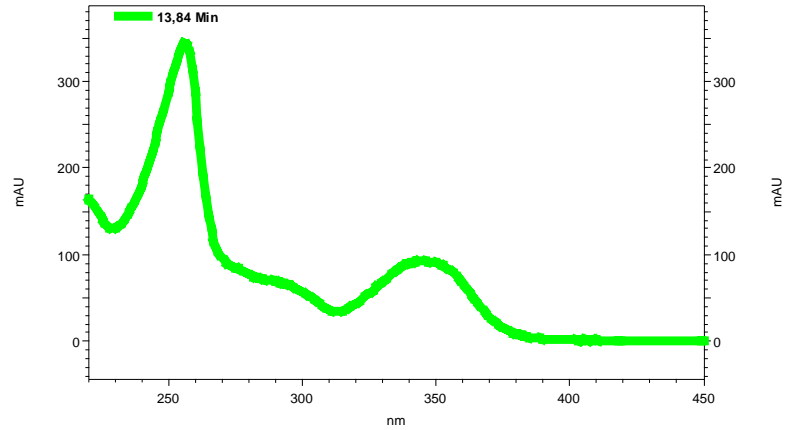


LC-ESI-MS (175 V)



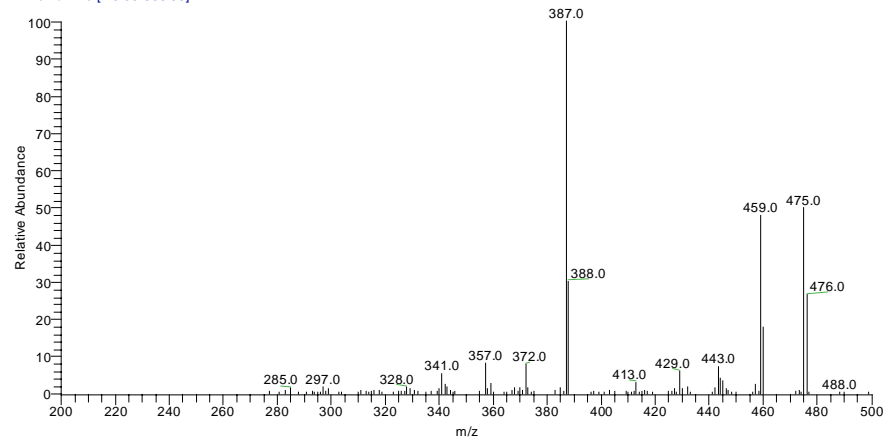
# Spektren von AOH-Metabolit O4

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



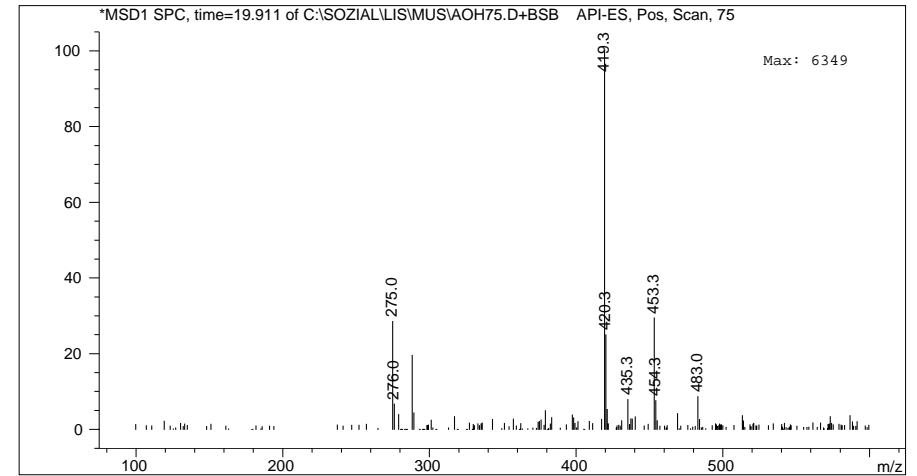
GC-MS-MS (m/z =547)

Nils062#1605 RT: 23.44 AV: 1 SB: 2 20.60, 21.20 NL: 6.92E5  
T: + c Full ms [ 10.00-590.00]

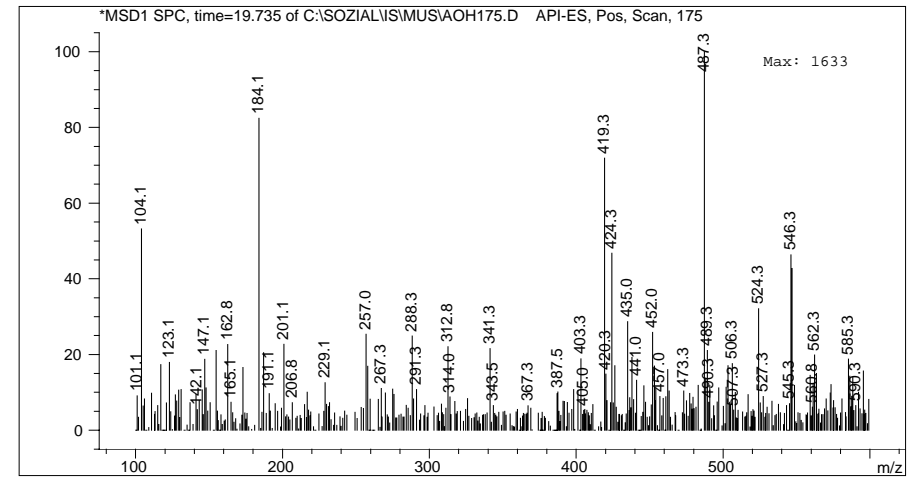


# Spektren von AOH-Metabolit O4

LC-ESI-MS (75 V)



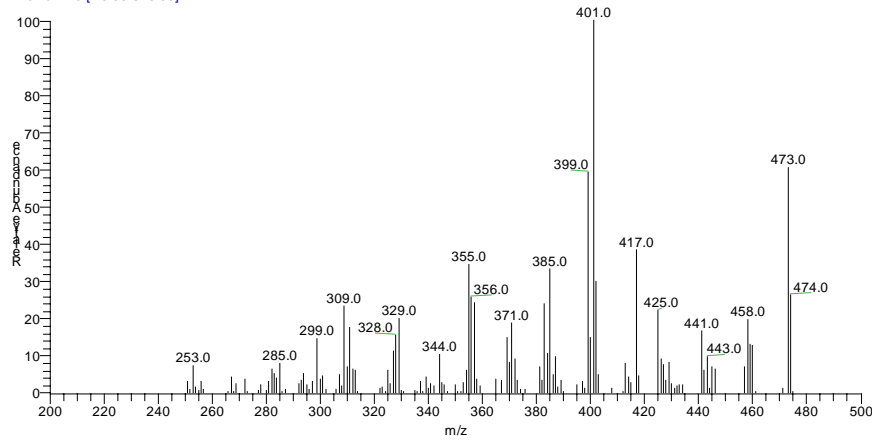
LC-ESI-MS (175 V)



# Spektrum von AME-Metabolit c

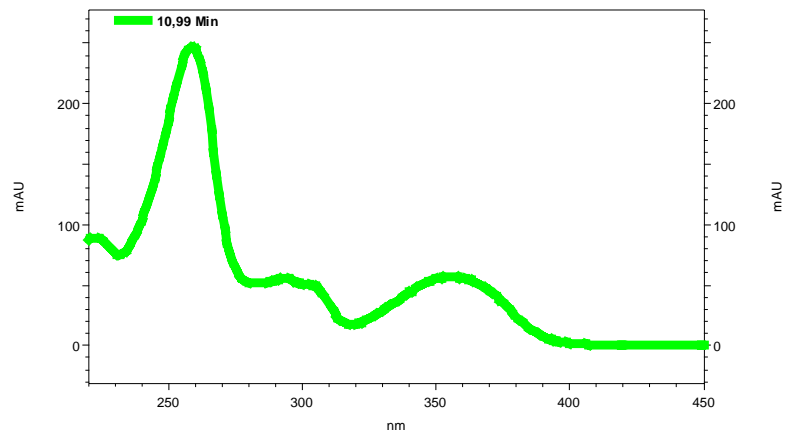
GC-MS-MS (m/z =489)

Nils060#1440 RT: 22.06 Av: 1 NL: 6.47E4  
T: + c Full ms [ 10.00-510.00]



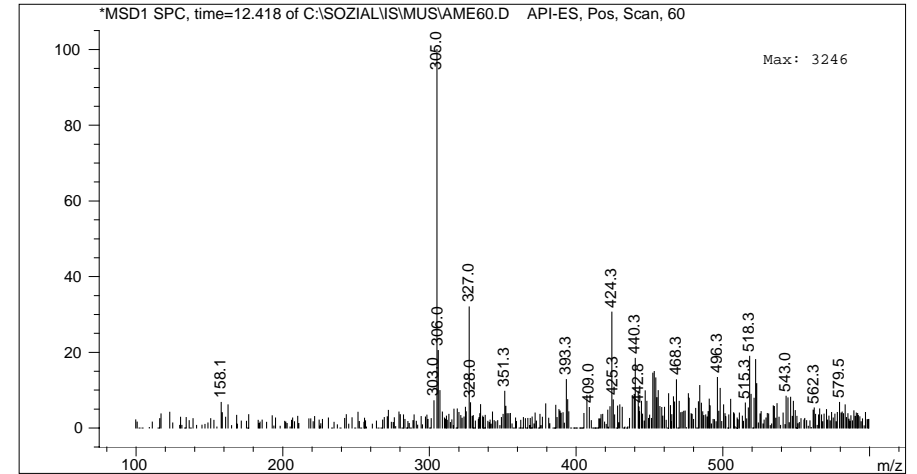
# Spektrum von AME-Metabolit M1

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD

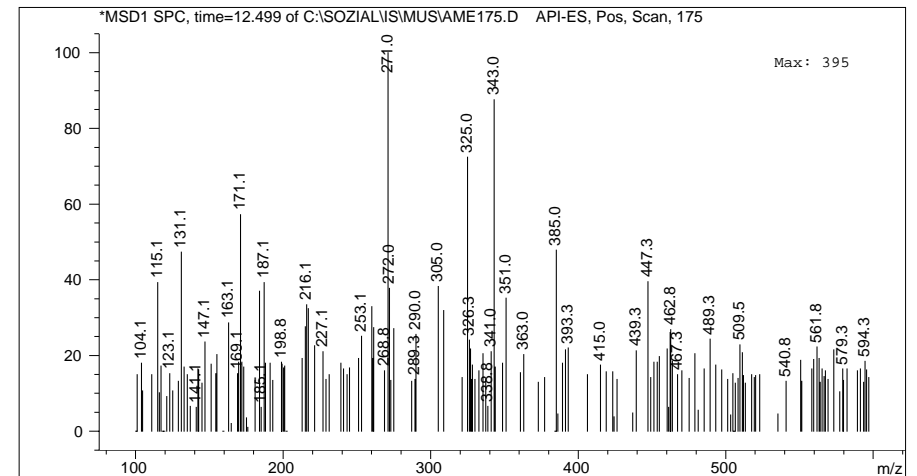


# Spektren von AME-Metabolit M1

LC-ESI-MS (60 V)

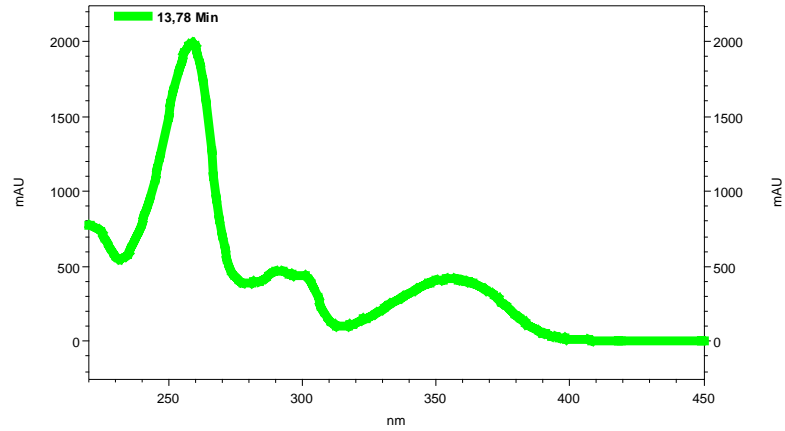


LC-ESI-MS (175 V)



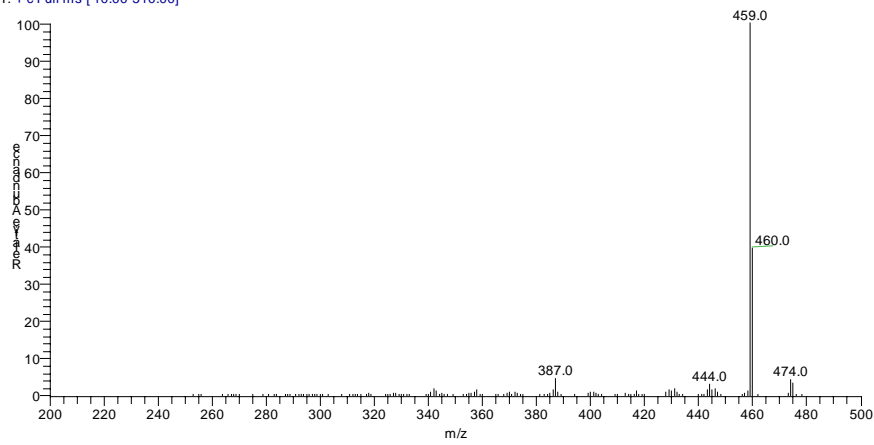
# Spektren von AME-Metabolit M2

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



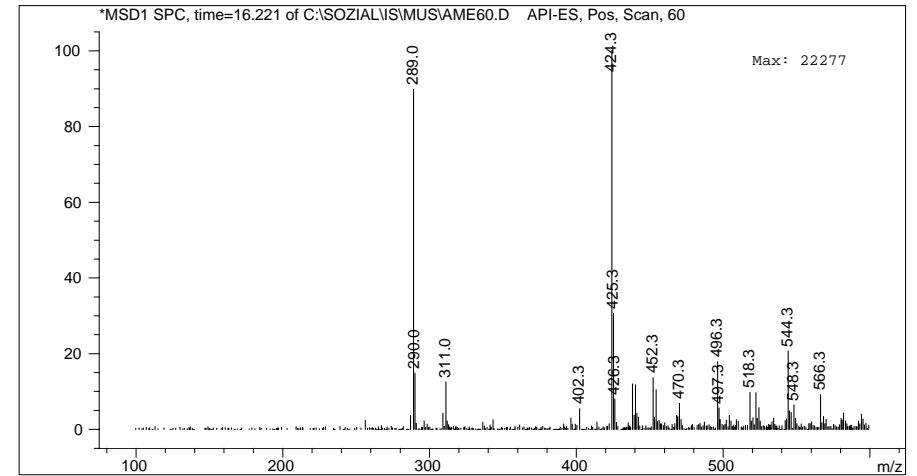
GC-MS-MS (m/z =489)

Nils060#1508 RT: 22.63 AV: 1 NL: 3.27E6  
T: + c Full ms [ 10.00-510.00]

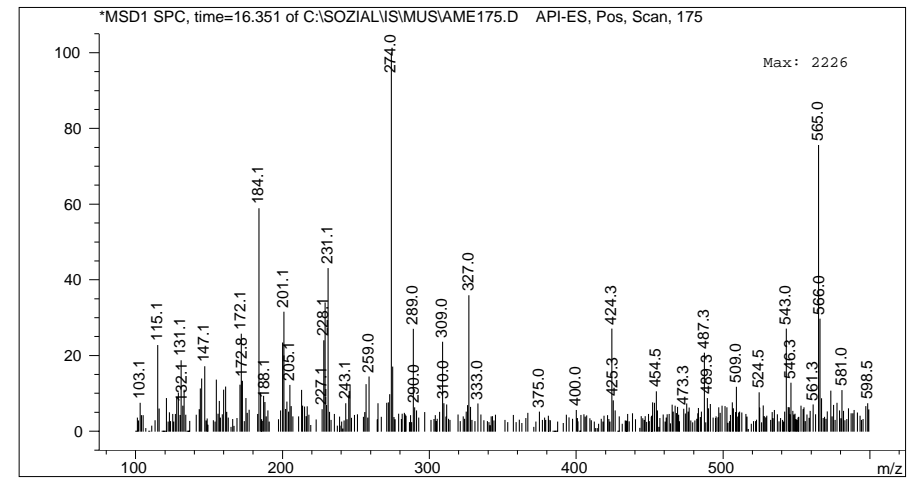


# Spektren von AME-Metabolit M2

LC-ESI-MS (60 V)

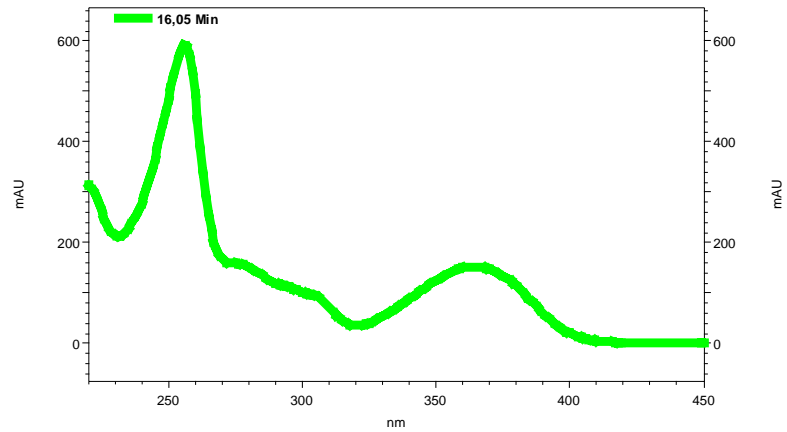


LC-ESI-MS (175V)



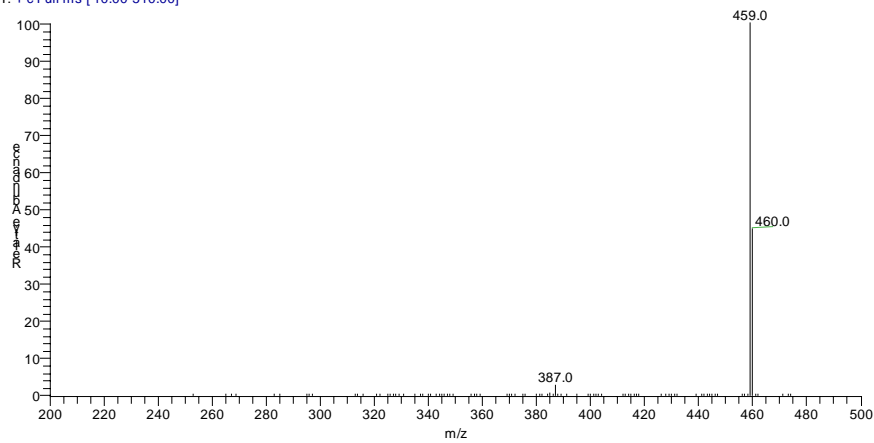
# Spektren von AME-Metabolit M3

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



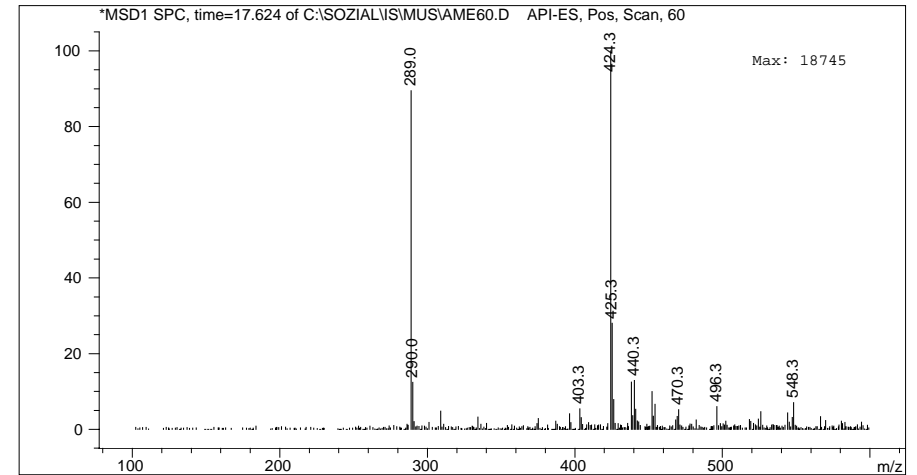
GC-MS-MS (m/z =489)

Nils060#1086 RT: 19.11 AV: 1 NL: 8.83E6  
T: + c Full ms [ 10.00-510.00]

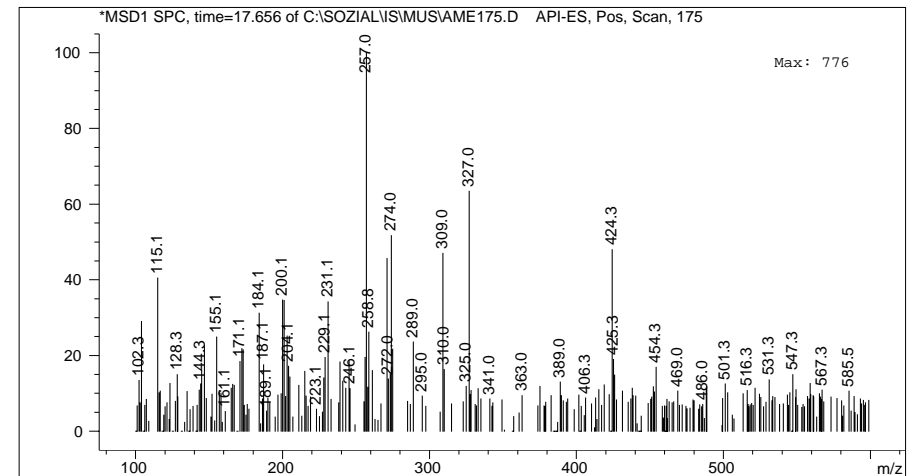


# Spektren von AME-Metabolit M3

LC-ESI-MS (60 V)

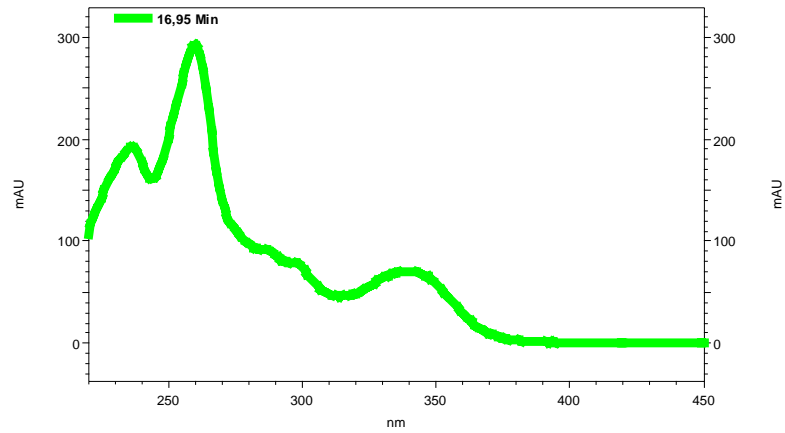


LC-ESI-MS (175 V)



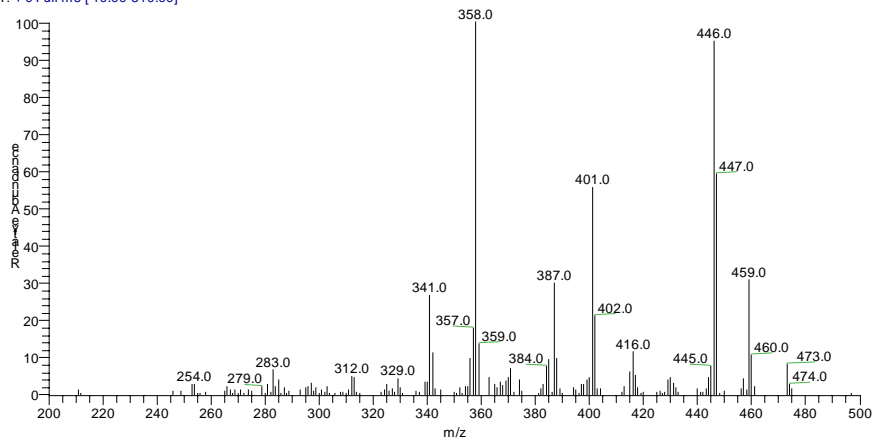
# Spektren von AME-Metabolit M4

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



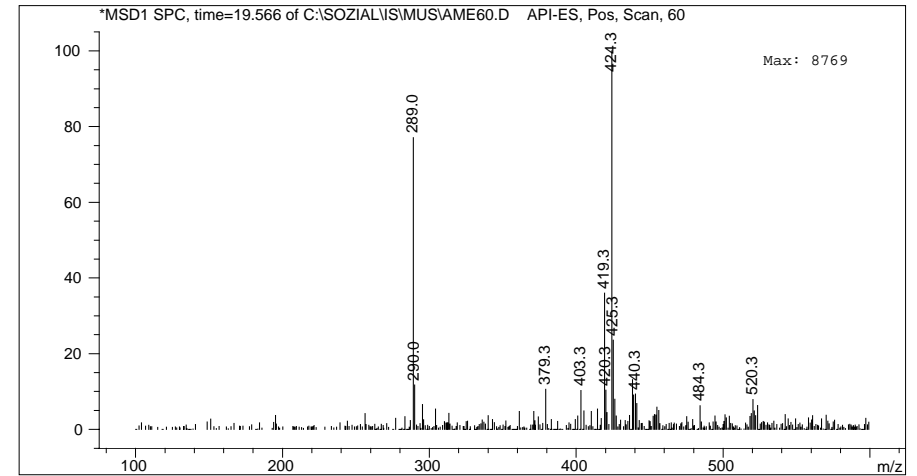
GC-MS-MS (m/z =489)

Nils060#1297 RT: 20.87 AV: 1 SB: 2 20.70, 21.05 NL: 3.52E5  
T: +c Full ms [ 10.00-510.00]

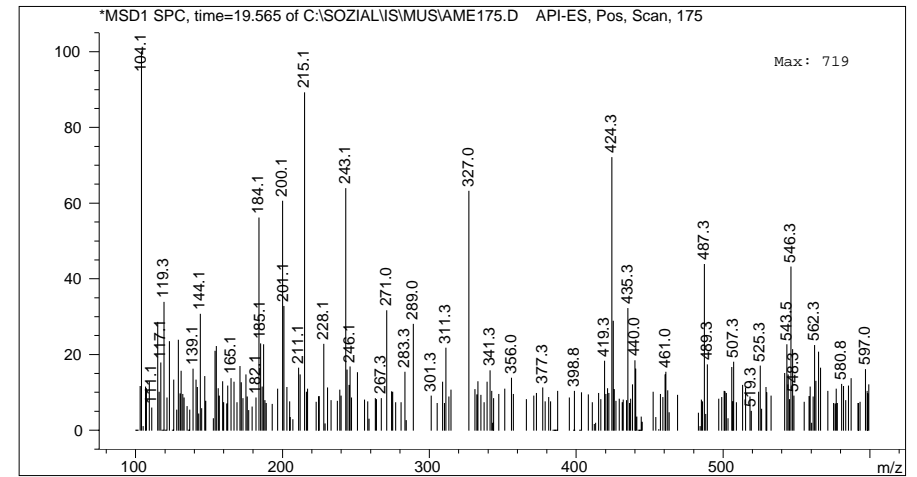


# Spektren von AME-Metabolit M4

LC-ESI-MS (60 V)

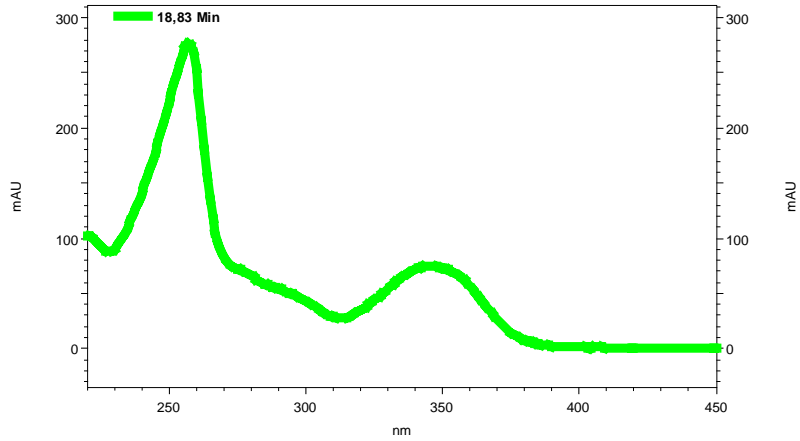


LC-ESI-MS (175 V)



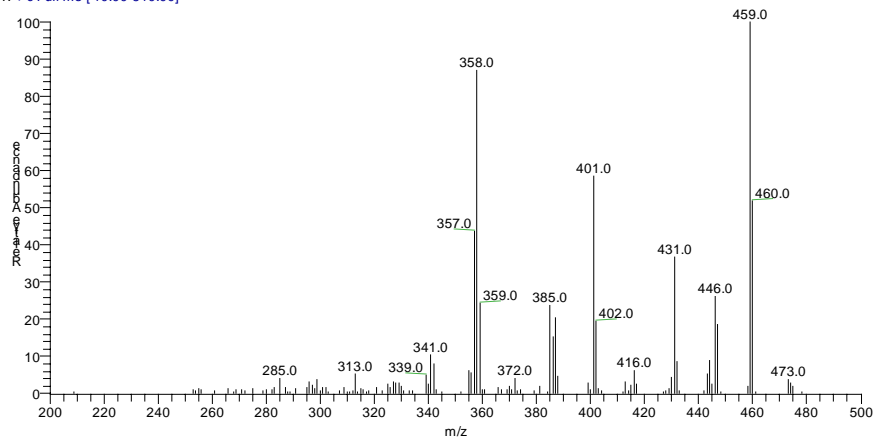
# Spektren von AME-Metabolit M5

UV-VIS-Spektrum aus HPLC-DAD



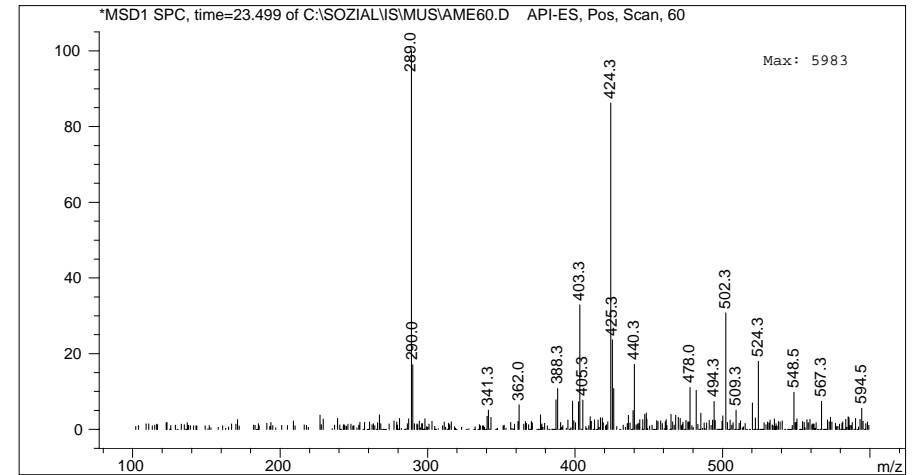
GC-MS-MS (m/z =489)

Nils060#1641 RT: 23.74 AV: 1 NL: 1.55E5  
T: + c Full ms [ 10.00-510.00]

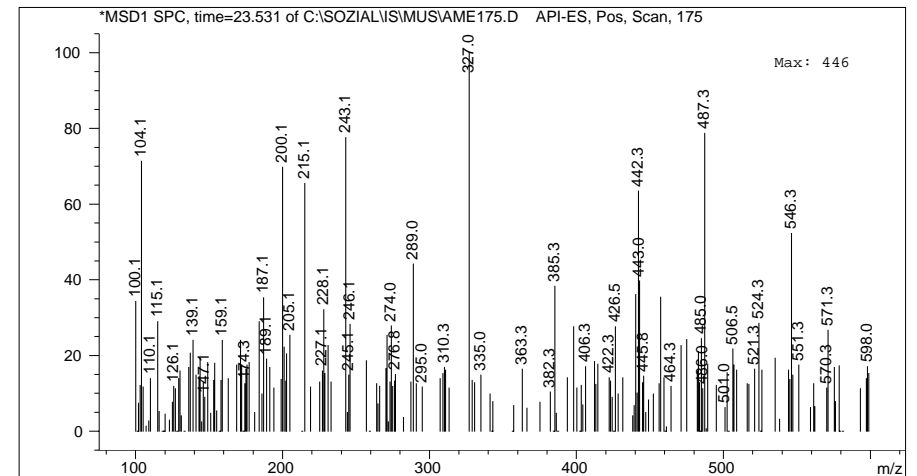


# Spektren von AME-Metabolit M5

LC-ESI-MS (60 V)



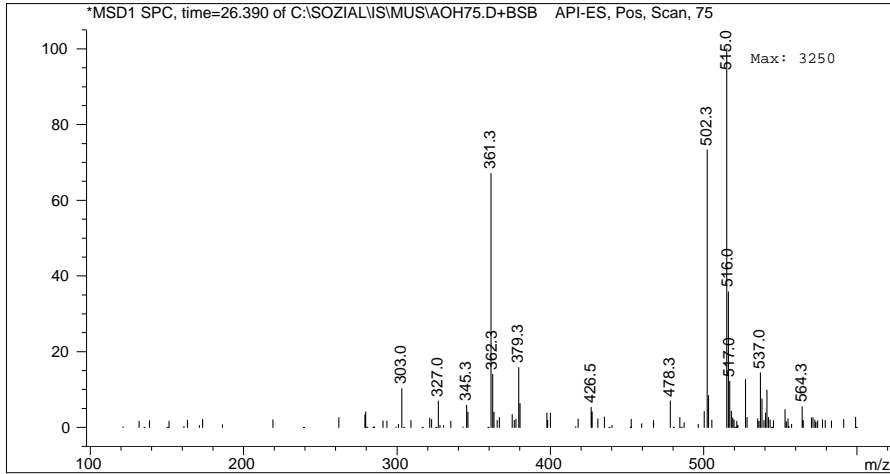
LC-ESI-MS (175 V)



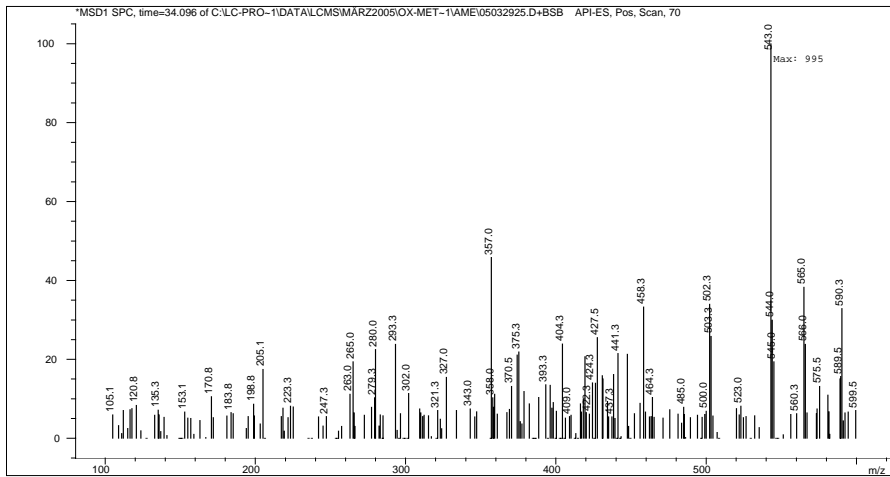


# Spektren von Polymeren

AOH-Polymere LC-ESI-MS (75 V)



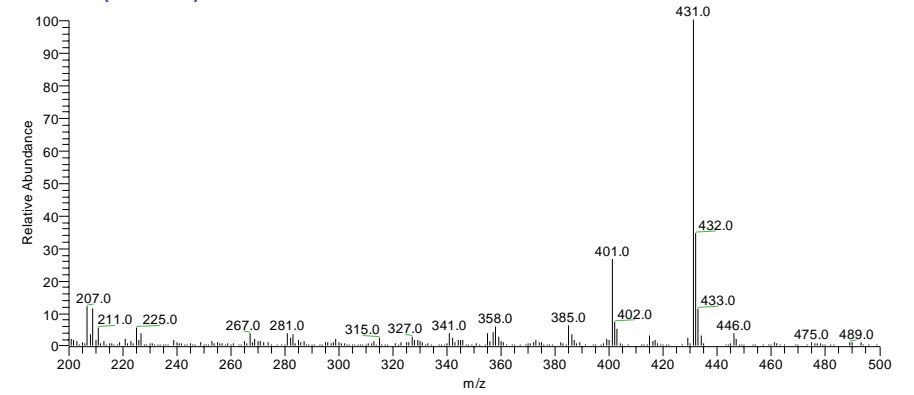
AME-Polymere LC-ESI-MS (70 V)



# GC-Spektren synthetischen von GLA und DGLA

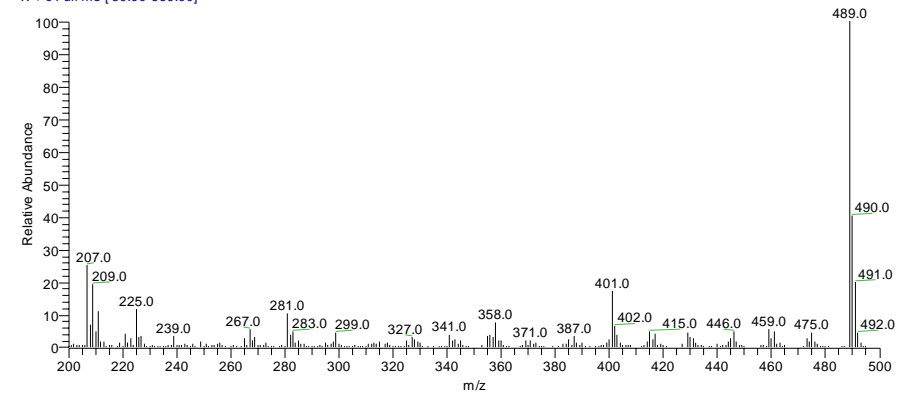
GC-EI-MS GLA

Nils075#1290 RT: 20.81 AV: 1 NL: 2.16E5  
T: + c Full ms [ 50.00-660.00]



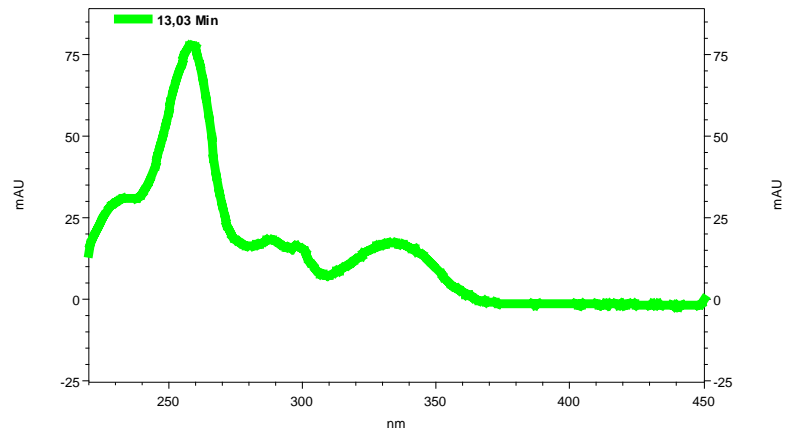
GC-EI-MS DGLA

Nils076#1308 RT: 20.96 AV: 1 NL: 1.13E5  
T: + c Full ms [ 50.00-660.00]



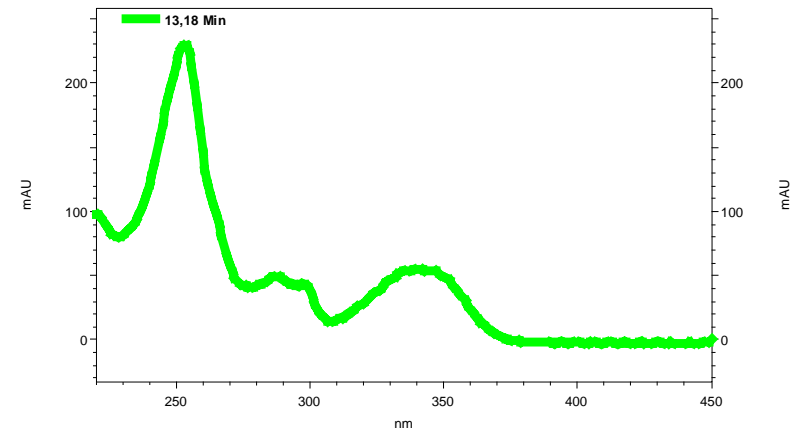
## UV-VIS Spektrum von AME-Glucuronid-1

UV-IS-Spektrum aus HPLC-DAD



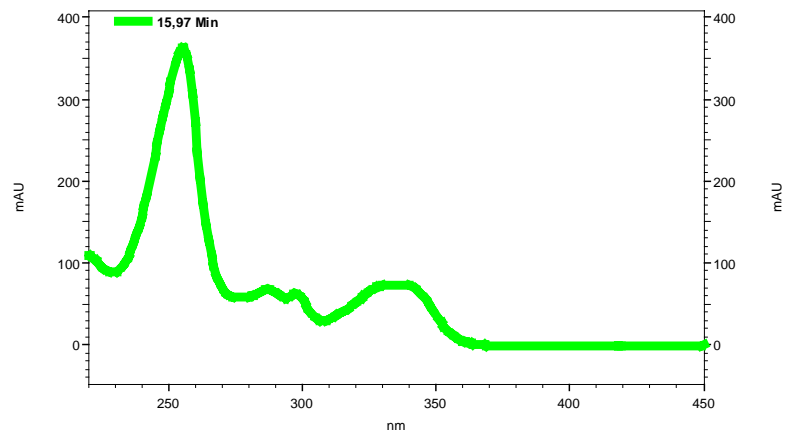
## UV-VIS Spektrum von AOH-Glucuronid-1

UV-IS-Spektrum aus HPLC-DAD



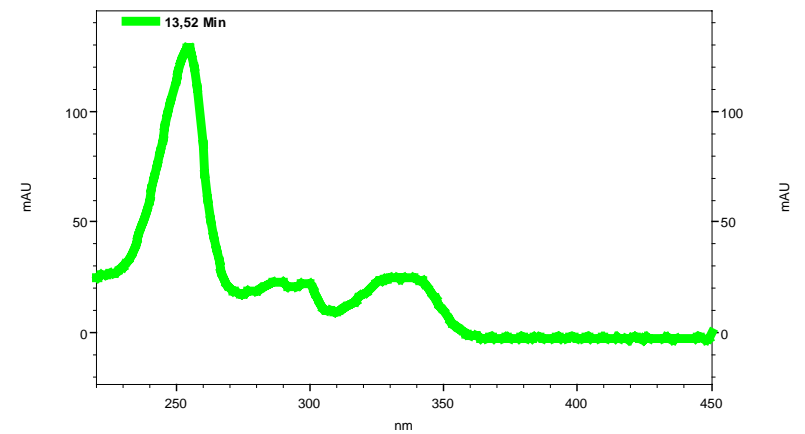
## UV-VIS Spektrum von AME-Glucuronid-2

UV-IS-Spektrum aus HPLC-DAD



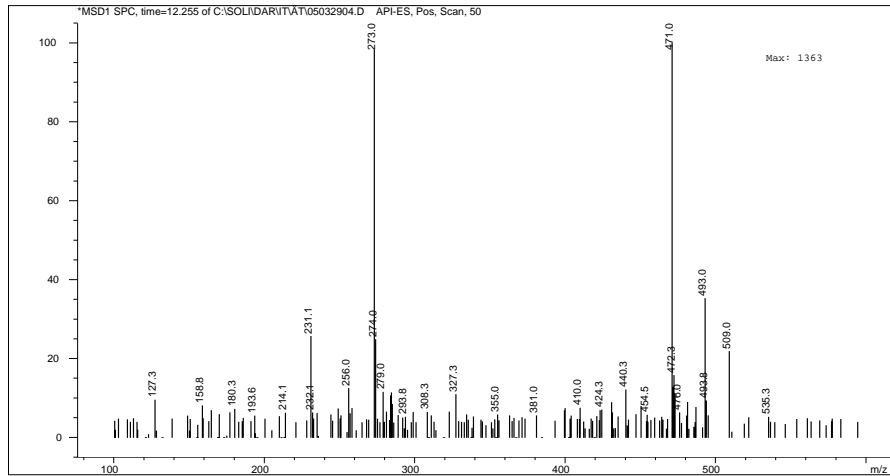
## UV-VIS Spektrum von AOH-Glucuronid-2

UV-IS-Spektrum aus HPLC-DAD



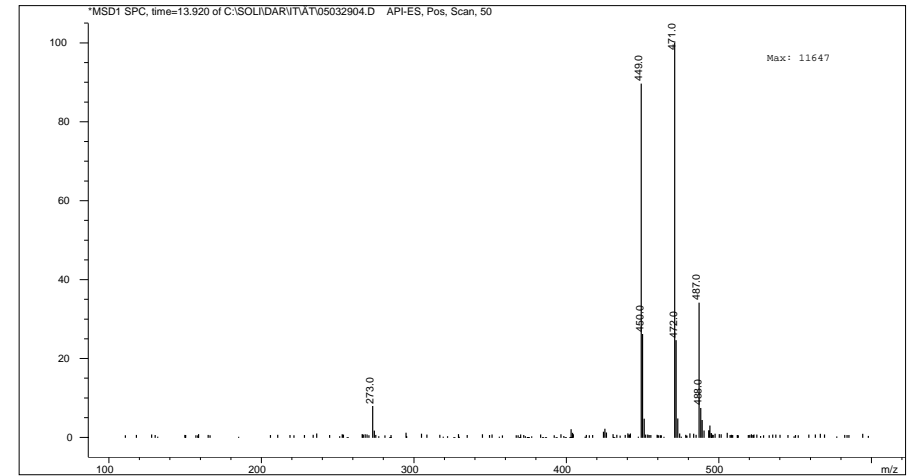
# Spektren von AME-Glucuronid-1

LC-ESI-MS (50 V)

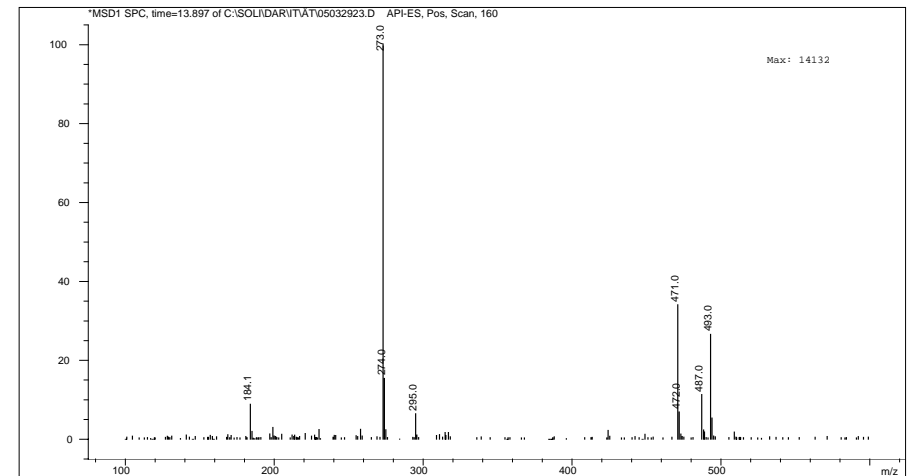


# Spektren von AME-Glucuronid-2

LC-ESI-MS (50 V)

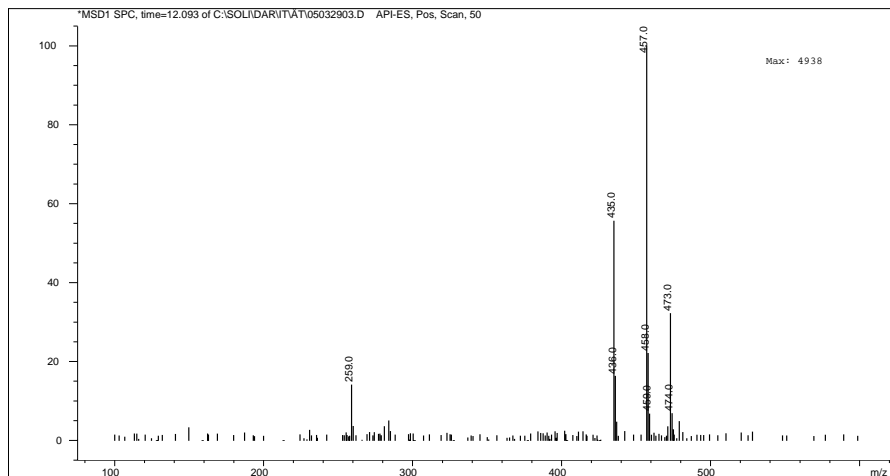


LC-ESI-MS (160 V)

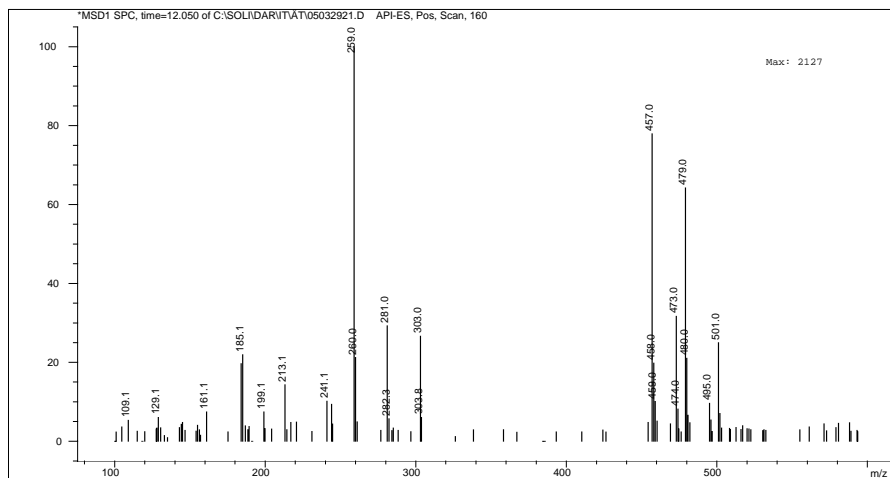


# Spektren von AOH-Glucuronid-1

## LC-ESI-MS (50 V)

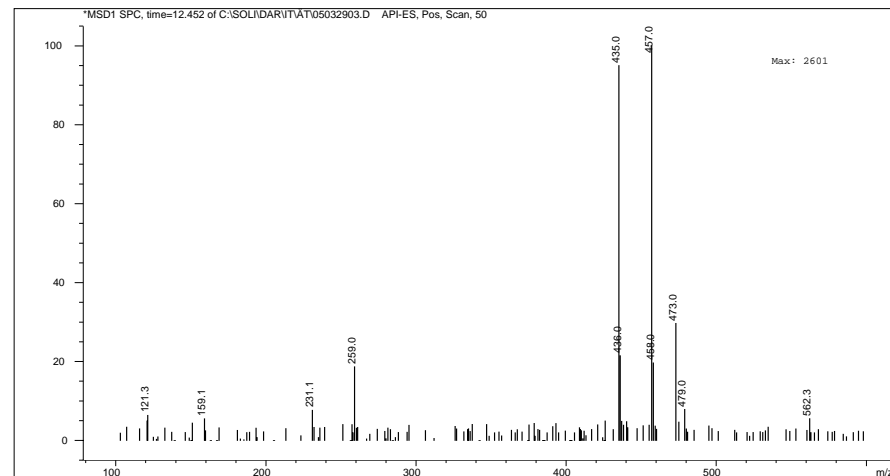


## LC-ESI-MS (160 V)



# Spektren von AOH-Glucuronid-2

## LC-ESI-MS (50 V)



## LC-ESI-MS (160 V)

