

Fumonisine und deren Reaktionsprodukte in Lebensmitteln:

Vorkommen, Bedeutung, biologische Aktivität und Metabolismus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Walburga Seefelder
aus Bayreuth

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

Publikationsliste

Veröffentlichungen

„Determination of N-(carboxymethyl)fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry“

W. Seefelder, M. Hartl, H.-U. Humpf,

J. Agric. Food Chem. **2001**, *49*, 2146-2151.

“Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry”

W. Seefelder, M. Goßmann, H.-U. Humpf,

J. Agric. Food Chem. **2002**, *50*, 2778-2781.

„A simple liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) method for the quantification of sphingosine and sphinganine in cell cultures exposed to fumonisins“

W. Seefelder, G. Schwerdt, R. Freudinger, M. Gekle, H.-U. Humpf,

J. Chrom. B. **2002**, *780*, 137-144.

“Fumonisin B₁ induced apoptosis in cultured human proximal tubule cells is independent to ceramide-synthase inhibition”

W. Seefelder, G. Schwerdt, R. Freudinger, M. Gekle, H.-U. Humpf,

J. Pharmacol. Exp. Ther. zur Veröffentlichung eingereicht.

Posterbeiträge

„Bildung von Fumonisinartefakten in thermisch behandelten Lebensmitteln“

W. Seefelder, M. Hartl, H.-U. Humpf,

23. Mykotoxin-Workshop 2001,

Wien, **28.-30.8.2001**

„Mykotoxine in Lebensmitteln: Analytik, Absolutkonfiguration und Wirkungsmechanismus der Fumonisine“

GDCh-Tagung 2001,

H.-U. Humpf, W. Seefelder, M. Hartl,

Würzburg, **23.-29.10.2001**

„Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus der Fumonisine“

31. Deutscher Lebensmittelchemikertag,

H.-U. Humpf, W. Seefelder,

Frankfurt am Main, **9.-11.11.2002**

Vorträge

„Bildung von Fumonisin-Artefakten in thermisch behandelten Lebensmitteln“

52. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,

Kulmbach, **4.4.2001**

„Induktion von Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen durch Fumonisine und Fumonisinmetabolite“

23. Mykotoxin-Workshop 2001,

Wien, **28.-30.8.2001**

„Induktion von Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen durch Fumonisine und Fumonisinmetabolite“

53. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,

Erlangen, **7.3.2002**

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

A	EINLEITUNG	1
B	KENNTNISSTAND	5
1	TOXISCHE, FUNGALE METABOLITE: STRUKTUREN, VORKOMMEN UND BEDEUTUNG DER FUMONISINE	5
2	BIOSYNTHESE	10
3	TOXIKOKINETIK: AUFNAHME, VERTEILUNG, AUSSCHIEDUNG UND METABOLISMUS	12
4	TOXIKOLOGIE	13
5	ANALYTIK	17
6	ABBAU- UND REAKTIONSPRODUKTE DER FUMONISINE IN LEBENSMITTELN	19
C	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
1	REAKTIONSPRODUKTE VON FUMONISINEN IN THERMISCH BEHANDELTEN LEBENSMITTELN	23

1.1	ZIELSETZUNG _____	23
1.2	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE-TANDEM-MASSEN-SPEKTROMETRIE (HPLC-MS/MS) _____	23
1.2.1	<i>Einführung</i> _____	23
1.2.2	<i>Elektrospray-Ionisierung</i> _____	24
1.2.3	<i>Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie</i> _____	27
1.3	BEDEUTUNG VON N-CARBOXYMETHYL-FUMONISIN B ₁ (NCM-FB ₁) IN THERMISCH BEHANDELTEN LEBENSMITTELN _____	31
1.3.1	<i>N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁)</i> _____	31
1.3.2	<i>Problematik und Aufgabenstellung</i> _____	33
1.3.3	<i>Massenspektrometrische Detektion von NCM-FB₁</i> _____	36
1.3.4	<i>Quantifizierung von NCM-FB₁ mittels HPLC-ESI-MS</i> _____	38
1.3.5	<i>Diskussion der Ergebnisse</i> _____	46
1.4	NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG NEUER FUMONISIN B ₁ -KONJUGATE _____	48
1.4.1	<i>Modellumsetzungen von Fumonisin B₁ mit D-Glucose</i> _____	49
1.4.1.1	Nachweis von N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B ₁ in Heißextrudaten _____	54
1.4.2	<i>Modellumsetzungen von Fumonisin B₁ mit „Polysaccharid- und Proteinbausteinen“ und mit Saccharose</i> _____	55
1.4.2.1	Erhitzung von FB ₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid _____	57
1.4.2.2	Erhitzung von FB ₁ mit N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und BOC-L- Cysteinmethylester _____	61
1.4.2.3	Erhitzung von FB ₁ mit Saccharose _____	64
1.4.2.4	Diskussion der Ergebnisse _____	65
1.4.3	<i>Bestimmung des gebundenen Anteils an FB₁ in Heißextrudaten</i> _____	66
2	NACHWEIS VON FUMONISINEN IN NICHT MAISHALTIGEN LEBENSMITTELN _____	71
2.1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG _____	71

2.2	NACHWEIS VON FUMONISINEN IN <i>FUSARIUM PROLIFERATUM</i> - INFIZIERTEN SPARGELSPROSSEN UND KNOBLAUCHKNOLLEN _____	72
2.2.1	<i>Massenspektrometrische Detektion und Isotopenverdünnungsanalyse</i> ____	72
2.2.2	<i>Nachweis von Fumonisinen in deutschem Spargel</i> _____	74
2.2.3	<i>Fusarium proliferatum als Fumonisinproduzent in Knoblauch</i> _____	77
3	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER FUMONISINE _____	81
3.1	INDUKTION VON APOPTOSE IN HUMANEN PROXIMALEN TUBULUSZELLEN (IHKE) DURCH FUMONISINE UND FUMONISIN-METABOLITE _____	81
3.1.1	<i>Einleitung: Was ist Apoptose?</i> _____	81
3.1.2	<i>Aufgabenstellung</i> _____	83
3.1.3	<i>Apototisches Potenzial von Fumonisinen und Fumonisinmetaboliten</i> ____	84
3.1.4	<i>Diskussion der Ergebnisse</i> _____	87
3.2	ÄNDERUNG DER SPHINGOSIN- UND SPHINGANIN-KONZENTRATIONEN IN IHKE- ZELLEN DURCH FUMONISINE UND FUMONISINMETABOLITE _____	89
3.2.1	<i>Entwicklung einer einfachen Methode zur Erfassung von Sphingosin und Sphinganin in Zellkulturen</i> _____	89
3.2.2	<i>Sphingosin- und Sphinganin-Konzentrationen in IHKE-Zellen nach Exposition durch Fumonisine- und Fumonisinmetabolite</i> _____	95
3.2.3	<i>Diskussion der Ergebnisse</i> _____	97
4	STUDIE ZUM METABOLISMUS VON FUMONISIN B₁ _____	99
4.1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG _____	99
4.2	INKUBATION MIT SCHWEINEKOT: <i>IN VITRO</i> -METHODE ZUR UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION VON INTESTINALER MIKROFLORA UND FUMONISIN B ₁ _____	100
D	MATERIAL UND METHODEN _____	103
1	MATERIAL _____	103

1.1	CHEMIKALIEN _____	103
1.2	UNTERSUCHUNGSMATERIAL _____	104
1.3	ZELLKULTUR _____	104
1.4	SCHWEINEFÄZES _____	104
1.5	ADSORPTIONSMATERIAL _____	105
2	GERÄTE _____	105
2.1	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE-TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE (HPLC-MS/MS) _____	105
2.2	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR) _____	107
2.3	SONSTIGE GERÄTE _____	108
3	METHODEN _____	109
3.1	FUMONISIN-STAMMLÖSUNGEN _____	109
3.2	KALIBRIERUNG DES ISOTOPENSTANDARDS FB ₁ -D ₆ _____	109
3.3	SYNTHESE VON HYDROLYSIERTEM FUMONISIN FB ₁ (HFB ₁) _____	110
3.4	UNTERSUCHUNG VON HEIßEXTRUDATEN UND MAISHALTIGEN LEBENSMITTELN	111
3.4.1	<i>Systemkalibrierung</i> _____	111
3.4.2	<i>Aufarbeitung</i> _____	111
3.5	SYNTHESE VON N-(1-DEOXY-D-FRUCTOS-1-YL)-FUMONISIN B ₁ (NDF-FB ₁) _	112
3.6	ACETYLIERUNG VON FB ₁ _____	114
3.7	SYNTHESE DES N-BOC-GESCHÜTZTEN L-CYSTEINMETHYLESTERS _____	115
3.8	MODELLVERSUCHE _____	115
3.8.1	<i>Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit D-Glucose</i> _____	115
3.8.2	<i>Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit Saccharose oder Methyl-α-D-glucopyranosid</i> _____	116
3.8.3	<i>Erhitzung von acetyliertem FB₁-Anhydrid oder acetyliertem FB₁ mit Methyl-α-D-glucopyranosid</i> _____	116
3.8.4	<i>Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit Aminosäurederivaten</i> _____	116

3.9	SYNTHESE DES DIESTERS AUS ACETYLIERTEM FB ₁ UND METHYL- <i>a</i> -D-GLUCOPYRANOSID _____	117
3.10	ALKALISCHE HYDROLYSE DER HEIßEXTRUDATE _____	118
3.11	AUFARBEITUNG DER SPARGELPROBEN _____	119
3.12	AUFARBEITUNG DER KNOBLAUCHPROBEN _____	120
3.13	BESTIMMUNG DER CASPASE 3 AKTIVITÄT _____	121
3.14	BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTES _____	121
3.15	DNA LEITERBILDUNG _____	121
3.16	STAMMLÖSUNGEN VON SPHINGOSIN, SPHINGANIN UND PHYTOSPHINGOSIN ____	122
3.17	BESTIMMUNG VON SPHINGOSIN UND SPHINGANIN _____	123
	3.17.1 <i>Systemkalibrierung</i> _____	123
	3.17.2 <i>Aufarbeitung</i> _____	123
3.18	INKUBATIONEN VON FB ₁ MIT SCHWEINEFÄZES _____	124
	3.18.1 <i>Herstellung des Reduktionspuffers</i> _____	124
3.19	BESTIMMUNG DER α -D-GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT _____	126
E	LITERATUR _____	127

Abkürzungen

A	Amplitude
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
APCI	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (<i>atmodpheric pressure chemical ionisation</i>)
BCA	Bicinchonin-Säure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BOC	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
(BOC) ₂ O	Pyrokohlensäure-di- <i>tert.</i> -butylester
BP	Basenpaare
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CD ₃ CN	deuteriertes Acetonitril
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collission induced dissociation</i>)
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
Cys	Cystein
C18	unpolares Festphasenmaterial mit C18-Alkylketten
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
D	Deuterium
D ₂ O	deuteriertes Wasser
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEVD-AFC	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure-7-Amino-4-trifluoro- methyl-coumarin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELSD	Lichtstredetektion (<i>evaporative light scattering detection</i>)
ES	Elektrospray
ESI	Elektrospray-Ionisierung

eV	Elektronen-Volt
FB ₁	Fumonisin B ₁
FB ₂	Fumonisin B ₂
FB ₃	Fumonisin B ₃
FB ₁ -D ₆	sechsfach deuteriertes Fumonisin B ₁
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
h	Stunden
HFB ₁	hydrolisiertes Fumonisin B ₁
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity</i>
HMQC	<i>¹H-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
i.d.	Innendurchmesser
IHKE	humane proximale Tubuluszellen (<i>immortalized kidney epithelial cells</i>)
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KG	Körpergewicht
Konz	Konzentration
LC ₅₀	halbletale Konzentration
Lys	Lysin
m	Multipllett
M	Molarität, mol/l
MeCN	Acetonitril
MeGlc	Methyl- α -D-glucopyranosid
MeOH	Methanol
min	Minuten
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis

N	Normalität
NCM-FB ₁	N-Carboxymethyl-Fumonisin B ₁
NDF-FB ₁	N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B ₁
NMR	Magnetische Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
N-Pal-FFB ₁	N-Palmitoyl-hydrolysiertes Fumonisin B ₁
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
OTA	Ochratoxin
PNP-G	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid
PNP	<i>p</i> -Nitrophenol
ppm	Anteile pro Milliarde (<i>parts per billion</i>)
PSO	Phytosphingosin
Q	Quadrupol
RIC	Totalionenchromatogramm (<i>reconstructed ion chromatogramm</i>)
RP18	Umkehrphase mit C18-Alkylketten (<i>reversed phase</i>)
s	Singulett
SA	Sphinganin
SAX	starker Anionenaustauscher (<i>strong anion exchange</i>)
sec	Sekunden
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SO	Sphingosin
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
Suc	Saccharose
t	Triplet
Tab.	Tabelle
TCA	1,2,3-Propantricarbonsäure (<i>tricarballic acid</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumor Necrosis Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis

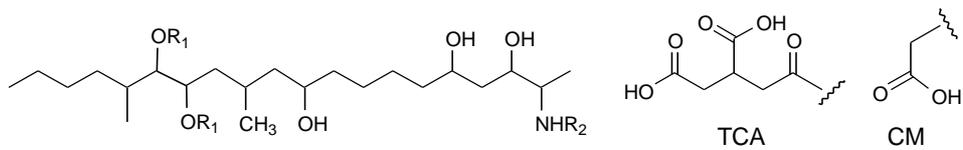
Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse zu Untersuchungen an Fumonisininen, einer erst seit 1988 bekannten Gruppe von kanzerogenen *Fusarium*-Mykotoxinen, vorgestellt. Die Schwerpunkte lagen dabei auf folgenden Aspekten:

- a) Qualitative und quantitative Erfassung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁, einem Reaktionsprodukt von Fumonisin B₁, in maishaltigen Lebensmitteln
- b) Charakterisierung weiterer Reaktionsprodukte der Fumonisine
- c) Vorkommen von Fumonisininen in Gemüse
- d) Zellkulturstudien zur biologischen Aktivität der Fumonisine
- e) Modellstudien zum Metabolismus von Fumonisin B₁ beim Menschen

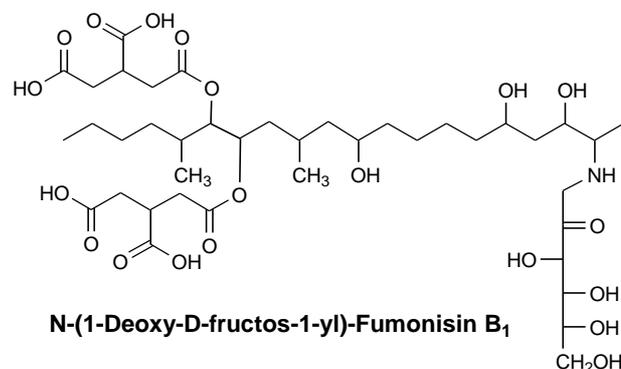
Basierend auf der *online* Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) wurde eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁), einem Maillard-ähnlichen Reaktionsprodukt von Fumonisin B₁ (FB₁), in thermisch behandelten, maishaltigen Lebensmitteln entwickelt. Die Verbindung ließ sich im positiven „selected ion monitoring“ (SIM)-Modus über ihr protoniertes Molekülion selektiv und sehr empfindlich erfassen (Nachweisgrenze 10 ng/g). Zur Probenvorbereitung wurden die Lebensmittel mit Methanol/Acetonitril/Wasser extrahiert und über RP18-Festphasen aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgte durch den Einsatz von sechsfach deuteriertem Fumonisin B₁ (FB₁-D₆) als interner Standard. Die Bedeutung von NCM-FB₁ in thermisch behandelten Lebensmitteln wurde in einer Modellstudie mit Heißextrudaten untersucht, die unter praxisnahen Bedingungen hergestellt worden waren. Dazu wurden Maisgrießproben mit FB₁ (2mg/kg) sowie mit D-Glucose (50 g/kg) oder Saccharose (50 g/kg) dotiert, auf einen bestimmten Feuchtigkeitsgehalt (16-20%) eingestellt und in einem Laborextruder unter Variation der Temperatur (160-180°C) zu Heißextrudaten verarbeitet. NCM-FB₁ war in allen Heißextrudaten, die mit D-Glucose und FB₁ dotiert worden waren in geringen Konzentrationen (29-97 ng/g) nachzuweisen. Hingegen enthielt von den

saccharosehaltigen Heißextrudaten nur eine Probe NCM-FB₁ (27 ng/g, Extrusionstemperatur 180°C). Weiterhin wurde der Gehalt an NCM-FB₁, FB₁ und hydrolysiertem FB₁ (HFB₁) in maishaltigen Lebensmitteln vom regionalen Markt bestimmt. Alle Proben waren mit FB₁ (22-194 ng/g) und HFB₁ (5-247 ng/g) kontaminiert. Sechs der neun Proben enthielten geringe Mengen an NCM-FB₁ (10-76 ng/g). Aufgrund dieser Daten und der geringen Toxizität kann die Bedeutung von NCM-FB₁ in Lebensmitteln als gering eingeschätzt werden.

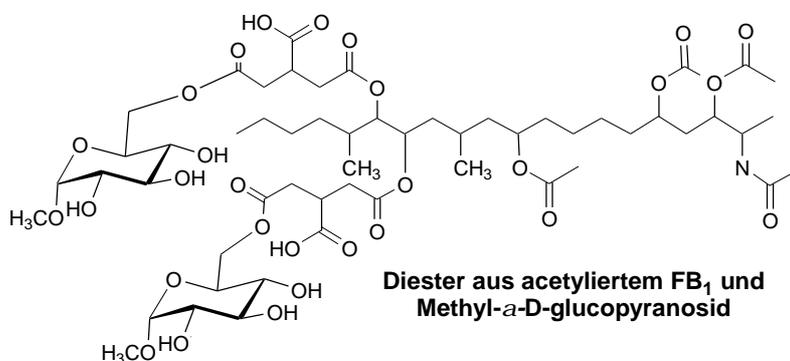


Auffallend war, dass der FB₁-Gehalt in allen Proben nach der Heißextrusion stark abnahm, wobei die Bildung von NCM-FB₁ die hohen Verluste an FB₁ (70-90%) nicht erklären konnte. Das große Defizit in der Bilanz lässt den Schluss zu, dass neben NCM-FB₁, noch weitere Abbau- und Reaktionsprodukte bzw. „gebundene“ Formen von FB₁ vorliegen müssen. Anhand von Modellstudien wurde daher (i) die Bildung weiterer FB₁-Reaktionsprodukte aus FB₁ und reduzierenden Zuckern (z.B. Glucose), sowie (ii) die Bindung von FB₁ an Matrixbestandteile (Stärke, Protein) und (iii) an nicht reduzierende Zucker (z.B. Saccharose) in thermisch behandelten Lebensmitteln untersucht. Die Modellstudien lieferten folgende Ergebnisse:

N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B₁ wurde mittels MS- und NMR-Studien als ein Maillard-ähnliches Reaktionsprodukt identifiziert, das bei der trockenen Erhitzung von FB₁ mit D-Glucose entsteht.



Der Einsatz der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) ermöglichte den Nachweis der Verbindung in den bereits erwähnten Heißextrudaten. Um mehr Informationen über das Bindungsverhalten von FB₁ gegenüber Polysacchariden zu erhalten wurde in einer weiteren Modellreaktion acetyliertes FB₁ mit dem „Stärkemodell“ Methyl- α -D-glucopyranosid trocken erhitzt. Der Nachweis, dass FB₁ über seine Tricarbonsäure (TCA)-Seitenketten unter dem Einfluss hoher Temperaturen (150°C) an Methyl- α -D-glucopyranosid bzw. Stärke bindet, gelang durch die Isolierung und die strukturelle Charakterisierung (MS- und NMR-Studien) eines in der Reaktionsmischung enthaltenen Diesters aus acetyliertem FB₁ und zwei Molekülen Methyl- α -D-glucopyranosid.

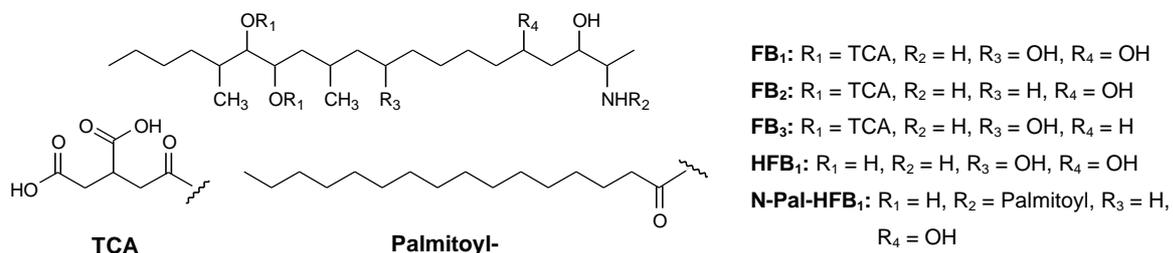


Mit Hilfe der HPLC-MS/MS-Technik und der Verwendung derivatisierter Aminosäuren (N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und *tert.*-Butyloxy-carbonyl(BOC)-geschützter L-Cysteinmethylester) als „Proteinbausteine“ ist in der folgenden Modellstudie belegt worden, dass eine Bindung von FB₁ an Aminosäurederivate bzw. Proteine unter dem Einfluss hoher Temperaturen (105°C) stattfindet. Ebenso wurde mittels HPLC-MS/MS die Bildung (Reaktionstemperatur 150°C) eines Glykokonjugates aus Saccharose und FB₁ detektiert.

Der Anteil an gebundenem FB₁ ist über die Freisetzung von gebundenem FB₁ als HFB₁ nach alkalischer Hydrolyse bestimmbar. Die auf diese Weise ermittelten Konzentrationen an gebundenem FB₁ in den bereits erwähnten Heißextrudaten lagen zwischen 3 und 9% des ursprünglich zugesetzten FB₁. Allerdings werden bei diesem Verfahren nur die über die TCA-Seitenketten gebundenen Fumonisine erfasst.

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Fumonisinen in nicht maishaltigen Lebensmitteln wie z.B. Gemüse wurde eine HPLC-MS Methode erarbeitet. Die Analyse der Gemüseproben (Spargelstangen und Knoblauchknollen) erfolgte nach saurer Extraktion (MeOH/0,1N HCl) und Aufreinigung über einen starken Anionenaustauscher (SAX-Festphasen) im SIM-Modus. Von den 10 mit *Fusarium proliferatum* befallenen Spargelproben enthielten 6 die Fumonisine FB₂ und FB₃. Fumonisin B₁ war in 9 der 10 Proben enthalten (36 bis 4514 ng/g bezogen auf das Trockengewicht). Damit gelang erstmalig der Beweis einer natürlichen Kontamination von deutschem Spargel mit Fumonisinen. Zudem wurde die Fähigkeit von *F. proliferatum* untersucht, Knoblauchknollen mit Fumonisinen zu kontaminieren. Dazu wurden Knoblauchknollen, die in mit *F. proliferatum* infizierter Erde kultiviert worden waren, untersucht. Alle Proben enthielten FB₁, FB₂ und FB₃. Die Konzentrationen an FB₁ lagen im Bereich von 26 bis 95 ng/g. Anhand dieses Ergebnisses muss auch von einer natürlichen Kontamination von Knoblauch mit Fumonisinen ausgegangen werden.

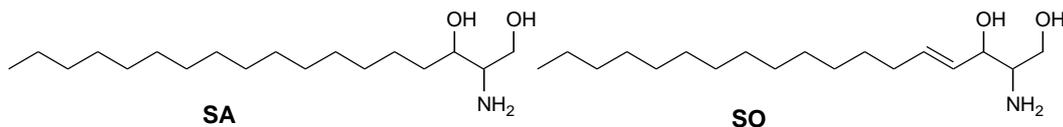
Neben diesen analytischen Fragestellungen wurden Arbeiten zur biologischen Aktivität der Fumonisine durchgeführt. Es ist allgemein bekannt, dass FB₁ in einer Reihe von verschiedenen Zellen und Geweben Apoptose auslöst, jedoch existierten bisher keine Studien, die sich mit dem apoptotischen Potenzial anderer Fumonisine und Fumonisinmetabolite auseinandersetzen. Es wurden daher humane proximale Tubuluszellen (IHKE, immortalized human kidney epithelial cells) mit den Fumonisinen FB₁, FB₂ und FB₃ sowie mit den Fumonisinmetaboliten HFB₁ und N-Palmitoyl-HFB₁ inkubiert.



Anschließend wurde durch eine Messung der Caspase 3 Aktivität sowie durch den Nachweis einer DNA-Fragmentierung das Auftreten von Apoptose in den Zellen untersucht. Nur die Exposition der Zellen mit FB₁ (10 µmol/l, 24h) führte zu einem signifikanten Anstieg der Caspase 3 Aktivität und zu einer DNA-Fragmentierung. Alle

anderen eingesetzten Verbindungen hingegen bewirkten weder eine Aktivierung der Caspase 3, noch eine Fragmentierung der DNA.

Des Weiteren sollte herausgefunden werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Sphinganine, die durch eine Hemmung der Ceramidsynthase hervorgerufen wird, und dem Auftreten von Apoptose besteht. Dazu wurde eine HPLC-MS Methode zur Quantifizierung von Sphinganine (SA) und Sphingosin (SO) entwickelt.



Die Zellkulturproben wurden nach Inkubation mit den verschiedenen Fumonisin lytiert, mit Methanol verdünnt, zentrifugiert und direkt mittels HPLC-MS analysiert. Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde durch eine Kalibrierung mit Phytosphingosin als interner Standard, sowie der Ermittlung von Wiederfindungsraten (> 90%) und Nachweisgrenzen (25 pg für SA, 10 pg für SO) gezeigt. Während sich die Sphingosin-Konzentrationen nach einer Inkubation der IHKE-Zellen mit den Substraten kaum erhöhten (max. 190% gegenüber Kontrollzellen), stiegen die Sphinganine-Konzentrationen hingegen bei allen verwendeten Substraten signifikant an (max. 7000% gegenüber Kontrollzellen). Das Ergebnis zeigt, dass die Aktivierung der Caspase 3 und folglich die Induktion von Apoptose in IHKE-Zellen durch FB₁ über einen Sphinganine-unabhängigen Mechanismus erfolgt.

Um den intestinalen Metabolismus von FB₁ beim Menschen abschätzen zu können, wurden in vitro Inkubationsversuche mit Schweinefäzes durchgeführt. Die intestinale Mikroflora vom Schwein ist mit der des Menschen vergleichbar und kann daher für solche Studien eingesetzt werden. Der frische Kot wurde dazu in einem Reduktionspuffer suspendiert und anschließend unter anaeroben Bedingungen mit FB₁ inkubiert. Um sicherzustellen, dass die enzymatische Aktivität der Mikroflora während der Inkubation erhalten bleibt, war es erforderlich, diese mit Hilfe eines Galaktosidase-Tests zu kontrollieren. Trotz der nachgewiesenen Funktionsfähigkeit des *in vitro*-Systems war mittels HPLC-MS/MS keine Metabolisierung von FB₁ nachweisbar.

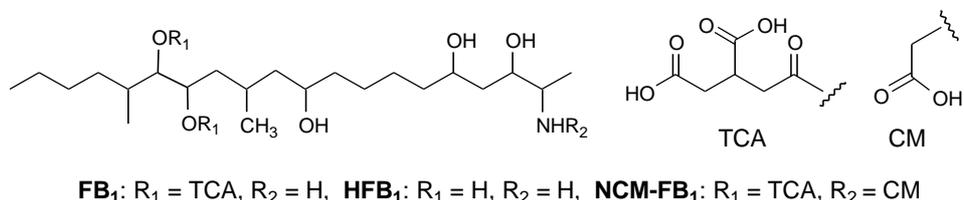
Summary

The present work presents results of investigations on fumonisins, a class of carcinogenic *Fusarium* mycotoxins discovered in 1988. Studies focused on following aspects:

- a) Qualitative und quantitative determination of N-(Carboxymethyl)fumonisin B₁, a reaction product of fumonisin B₁, in corn products
- b) Characterisation of further fumonisin reaction products
- c) Occurrence of fumonisins in vegetables
- d) Cell culture studies on the biological activity of fumonisins
- e) Model experiments on the metabolism of fumonisin B₁ in humans

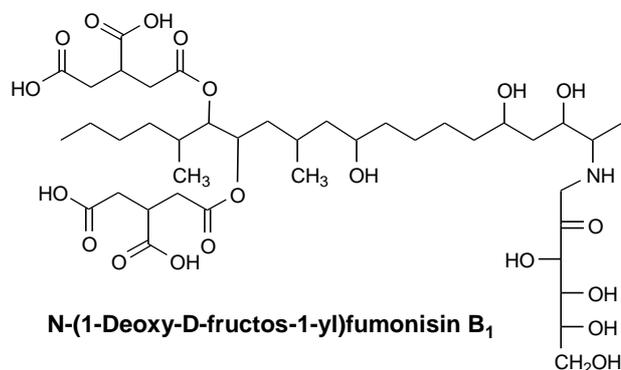
A high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) method using isotopically labelled fumonisin FB₁-D₆ as an internal standard was developed for the determination of N-(Carboxymethyl)fumonisin B₁ (NCM-FB₁), a Maillard-type reaction product of fumonisin B₁ (FB₁), in thermal treated food. The detection limit achieved with this method was 10 ng/g using the positive selected ion monitoring (SIM) mode. For sample preparation food samples were extracted with a mixture of acetonitrile/methanol/water and applied to C18 cartridges for subsequent cleanup. In order to determine the significance of NCM-FB₁ in thermal treated food model experiments were performed. Corn grits were spiked with FB₁ (2 mg/kg) and D-glucose (50 g/ kg) or sucrose (50 g/kg) and manufactured under practical conditions into extrusion products at various temperatures (160-180°C) and moisture levels (16-20%). Low concentrations of NCM-FB₁ (29-97 ng/g) were detected in all samples spiked with D-glucose and FB₁, whereas those spiked with FB₁ and sucrose showed only NCM-FB₁ in a single sample produced at 180°C (NCM-FB₁: 27 ng/g). Various corn-containing food samples from the German market were analysed on the presence of NCM-FB₁, FB₁ and hydrolysed fumonisin B₁ (HFB₁). All samples were contaminated with FB₁ (22-194 ng/g) and HFB₁ (5-247 ng/g). Six out of nine samples contained NCM-FB₁ in low concentrations

ranging from 10 to 76 ng/g. From these data and the low toxicity of NCM-FB₁ it can be concluded that the significance of NCM-FB₁ in food is a minor one.

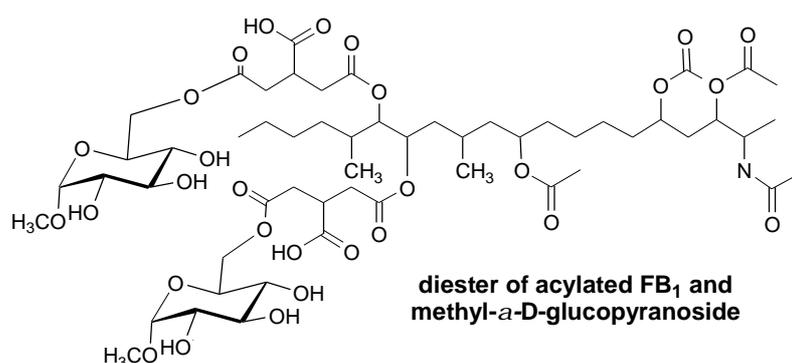


It is worth mentioning that the FB₁-concentrations decreased dramatically during the extrusion process, however the formation of NCM-FB₁ could not explain the high losses of FB₁ (70-90%). From the large discrepancy in the total FB₁ balance it could be deduced that further degradation and reaction products or “bound” forms of FB₁ have to be present in the extrusion products. In order to study (i) the formation of further fumonisin reaction products between FB₁ and reducing sugars (e.g. glucose) as well as (ii) the binding of fumonisins to matrix components (e.g. starch and protein) and to (iii) non reducing sugars (e.g. sucrose) in thermal treated food, model experiments were performed. The model experiments revealed the following results:

N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)fumonisin B₁ was identified as the product formed in a Maillard-type reaction of fumonisin B₁ and D-glucose by heating both compounds under dry conditions. The formation of this compound in extrusion products was proved by HPLC-MS/MS-studies.



To get more information about the binding of FB₁ to polysaccharides another model experiment was performed by heating acylated FB₁ with methyl- α -D-glucopyranosid, which can be seen as a starch model. The binding of FB₁ via its two tricarballic acid (TCA) groups to starch under high temperature (150°C) was shown by identifying a diester from the reaction mixture composed of acylated FB₁ and two molecules of methyl- α -D-glucopyranoside bound to each of the TCA side chains, respectively. The structure was identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and MS. Using HPLC-MS/MS and amino acid derivatives (N- α -acetyl-L-lysin-methylester and BOC L-cystein-methylester) as protein models, the binding of FB₁ under high temperature (105°C) to protein was shown. Furthermore a conjugate of sucrose and FB₁ formed under high temperature (150°C) was characterised by HPLC-MS/MS.

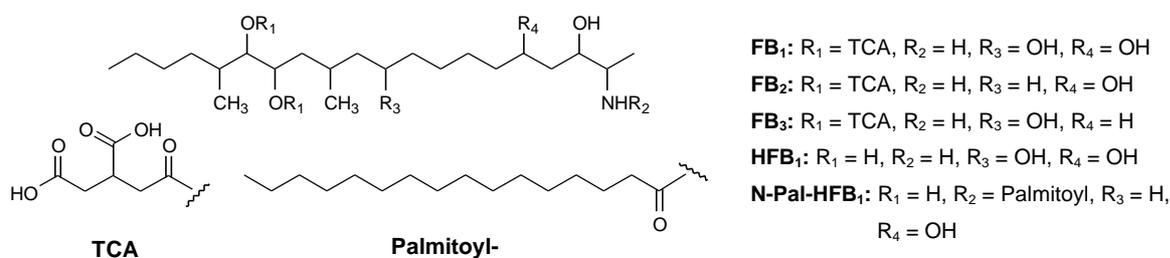


In order to quantify the amount of fumonisin bound to matrix components after thermal treatment, bound FB₁ was released as HFB₁ by alkaline treatment of the above mentioned extrusion products. The percentage of bound FB₁ determined with FB₁-D₆ as internal standard was approximately 3 to 9% of the original added FB₁. However, using this method only fumonisins bound via the TCA side chains are detectable.

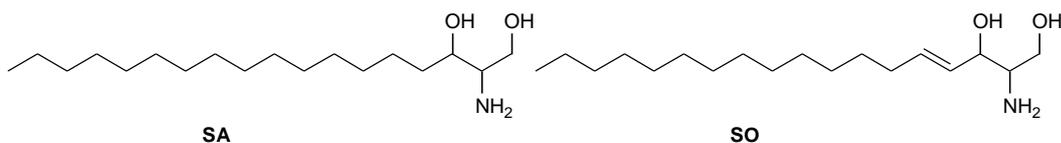
For the qualitative and quantitative determination of fumonisins in vegetables, a HPLC-MS method was developed. After extraction with a mixture of methanol/0.1M hydrochloric acid samples (asparagus spears and garlic bulbs) were cleaned up over strong anion exchanger (SAX) cartridges and analysed in the SIM mode. Fumonisin B₂ and FB₃ were found in 6 of 10 asparagus spears, which were infected by *Fusarium proliferatum*.

Fumonisin B₁ was detected in 9 of 10 samples in amounts ranging from 36 to 4514 ng/g (based on dry weight). These findings demonstrate for the first time the natural occurrence of FB₁ in German asparagus spears. Furthermore the capability of producing FB₁ by *F. proliferatum* in garlic bulbs was investigated. Therefore garlic bulbs were cultured in *F. proliferatum* contaminated soil and after they had grown to ripeness the occurrence of fumonisins was investigated by HPLC-MS in bulbs infected with *F. proliferatum*. All infected samples contained FB₁, FB₂ and FB₃. Fumonisin B₁ was quantified in amounts from 26 to 95 ng/g. The findings suggest a potential for the natural contamination of garlic bulbs with fumonisins.

Besides these analytical studies the present work reveals a new insight into the biological activities of fumonisins. It is well known that FB₁ causes apoptosis in a variety of cell types and tissues but the apoptotic potential of other fumonisins and fumonisin metabolites has not been determined to date. Therefore human proximal tubule-derived cells (IHKE, immortalized human kidney epithelial cells) were exposed to FB₁, FB₂, FB₃, HFB₁, and N-palmitoyl-hydrolysed fumonisin B₁ (N-Pal-HFB₁). Apoptosis was measured as Caspase 3 activation and DNA fragmentation.



Only exposure to 10 μmol/L FB₁ for 24h led to a significant increase in caspase 3 activity and to DNA fragmentation. All other tested compounds did not show any significant activation of caspase 3 nor DNA fragmentation. Furthermore it was examined whether an sphinganine accumulation is correlated with an induction of apoptosis in IHKE cells. Therefore a HPLC-MS method for the quantification of sphingosine and sphinganine using phytosphingosine as internal standard was developed.



For sample preparation, cell culture material was lysated, diluted with methanol, centrifuged and then directly used for HPLC-MS measurements. Quantification was carried out in the SIM mode, detection limits of 10 pg for SO and 25 pg for SA were established. The average recovery for SO and SA was higher than 90% for control IHKE-cells, respectively. Whereas SO levels nearly remained unchanged (increase up to 190% compared to control cells), all substrates caused a significant increase of SA (increase up to 7000%) compared to control cells. Therefore it must be concluded that exposure of IHKE cells to FB₁ can lead to caspase 3 activation and subsequently to apoptosis through a SA-independent mechanism.

In order to investigate the intestinal metabolism of FB₁ in humans, *in vitro* model experiments were carried out with pig faeces. Due to the similarity of the intestinal microflora of pig and human, results of the study are transferable to humans. Pig faeces was suspended in a reduction buffer and incubated with FB₁ under anaerobic conditions. To ensure that enzymatic activity of the microflora persists during incubation, α -D-galactosidase activity was examined. Although the efficiency of the *in vitro* system was proved, no formation of FB₁ metabolites was detectable by HPLC-MS/MS.

A Einleitung

Mykotoxine

Die Kontamination von Lebensmitteln und Futtermitteln durch Mykotoxine stellt ein weltweites Problem dar, dem aufgrund seiner Bedeutung für die menschliche Gesundheit in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Nach Angaben der FAO (Food and Agriculture Organization der UN) sind weltweit schätzungsweise bis zu 25% aller landwirtschaftlich angebauten Produkte mit Mykotoxinen belastet. Dabei ist das Auftreten von Mykotoxikosen kein Phänomen unserer Zeit, sondern vielmehr eine jahrtausende alte Begleiterscheinung des menschlich kultivierten Nahrungsmittelanbaus. Erste Anhaltspunkte für ein Wissen des Menschen um die gesundheitsgefährdenden Wirkungen von Schimmelpilzen, sind bereits im alten Testament zu finden. Später im Altertum und vor allem aber im Mittelalter führte der Genuss von Brot, das aus mütterkornhaltigem Roggenmehl hergestellt worden war, zu regelmäßigen Epidemien. Die Krankheit, die damals als „St. Antonius-Feuer“ bezeichnet wurde, wurde durch die Ergotalkaloide des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* ausgelöst und äußerte sich neben Krämpfen und Bewusstseinsstörungen, im schmerzhaften Absterben der Akren, insbesondere von Fingern und Zehen. Ende des 19. Jahrhunderts traten in Russland vermehrt tödliche Vergiftungsfälle beim Menschen auf, die durch den Verzehr von Brotgetreide, das in hohem Maße mit Pilzen der Gattung *Fusarium* und deren Toxinen kontaminiert war, hervorgerufen wurden. Welche großen gesundheitlichen Schäden und ökonomischen Verluste durch Mykotoxine verursacht werden können, zeigte die Massenvergiftung von Truthühnern in England Anfang der 60er Jahre. Die in damaliger Unkenntnis der Zusammenhänge als „Turkey X“ bezeichnete mysteriöse Krankheit, wurde durch ein neu entdecktes Toxin des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* ausgelöst, das man nach seiner Herkunft als Aflatoxin bezeichnete.

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte, die von bestimmten Pilzen – Micromyceten - beim Wachstum auf pflanzlichen Substraten in Abhängigkeit verschiedener äußerer Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Nährstoffangebot gebildet werden; ihre Funktion ist weitgehend ungeklärt. Bislang sind ca. 250 toxinbildende Schimmelpilzarten bekannt, die mehr als 400 verschiedene Mykotoxine produzieren können. Dabei sind aus Sicht des Verbraucherschutzes etwa 20 Mykotoxine von größerer Bedeutung, da sie in Nahrungsmitteln häufig, oder in höheren Konzentrationen auftreten können. Sie werden hauptsächlich von den Pilzgattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* und *Claviceps* gebildet.

Kennzeichnend für die Mykotoxine sind ihre vielfältigen toxischen Eigenschaften, die von Blutveränderungen, Alteration des Nervensystems, Leberschäden, Nierendysfunktion, Haut- und Schleimhautschäden bis hin zu hormonalen Störungen reichen. Daneben können subakute Konzentrationen krebserzeugend, erbgutschädigend oder teratogen wirken. Mykotoxikosen werden vor allem durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln hervorgerufen. Diese sind - wie auch Rohstoffe für deren Herstellung - durch ihre Zusammensetzung ein idealer Nährboden für das Wachstum von Schimmelpilzen. Durch ihre Fortpflanzungsform, den Sporen, sind Schimmelpilze in der Umgebungsluft praktisch allgegenwärtig. Vereinfacht lassen sich drei Wege unterscheiden, auf denen Mykotoxine in Lebensmittel gelangen können: Während bei der Primärkontamination die Lebensmittelrohstoffe direkt von toxinbildenden Schimmelpilzen befallen werden, spricht man hingegen von einer Sekundärkontamination, wenn das bereits verzehrfertige Lebensmittel verschimmelt ist. Beim sogenannten „carry over“ führt die Verfütterung von toxinhaltigem Futter an Nutztiere zu einer Speicherung der Mykotoxine im Tierkörper und damit zu einer Belastung von Lebensmitteln tierischer Herkunft wie z.B. Fleisch, Eier oder Milch. In der Europäischen Union werden die bis heute bekannten Mykotoxine in rund einem Fünftel der Getreideernte nachgewiesen. Um so problematischer ist deshalb die in der Regel sehr große Stabilität der Verbindungen, die so die bei der Nahrungsmittelherstellung üblichen Temperaturen und Erhitzungszeiten überstehen. Durch beispielsweise eine Oxidation oder Alkalibehandlung ist eine nachträgliche Dekontamination zwar bis zu einem gewissen Grad möglich, jedoch ist mit dem Abbau der Toxine zu Folgeprodukten nicht immer eine

Entgiftung verbunden. Das Bemühen einem Pilzbefall oder –wachstum vorzubeugen, stellt daher den wirksamsten Schutz dar. Hierzu zählen eine verletzungsfreie Ernte, kühle und trockene Lagerung, der Einsatz von Fungiziden oder pilzresistenten Pflanzenzüchtungen, sowie der Zusatz von Konservierungsstoffen zum Endprodukt.

Die Gefährdung durch Mykotoxine in Mitteleuropa ist witterungsbedingt und durch die hohen Standards der Nahrungsmittelproduktion und –verarbeitung eher als gering einzuschätzen. Jedoch nehmen die Probleme aufgrund des steigenden Imports von Lebensmitteln aus tropischen und subtropischen Gebieten, in denen sich Schimmelpilze als weitaus problematischer erweisen, hierzulande zu. Nicht zuletzt dadurch wurde in den letzten Jahren die Mykotoxinforschung intensiviert und führte zur Entdeckung immer wieder neuer Substanzklassen, die ein erhebliches Risiko für den Mensch darstellen können. Hierzu zählen auch die hauptsächlich von *Fusarium verticillioides* gebildeten Fumonisine.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war geplant, anhand einer Methodik beruhend auf der *on-line*-Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS), die Bedeutung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁, einem Maillard-ähnlichen Reaktionsprodukt von Fumonisin B₁, in thermisch behandelten Lebensmitteln zu bestimmen. Daneben wurden Modellstudien durchgeführt, um die Bildung von Fumonisinreaktionsprodukten, die bei der Lebensmittelherstellung entstehen können, zu untersuchen. Weiterhin sollten Fumonisine in Gemüse nachgewiesen und quantifiziert werden. Außerdem wurden Studien zur Zytotoxizität und zum Metabolismus der Fumonisine durchgeführt. Im Vordergrund stand hier das apoptotische Potenzial der Fumonisine.

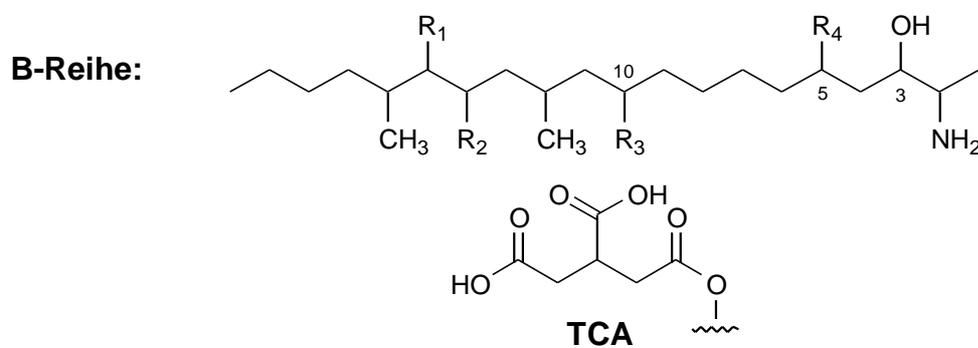
B Kenntnisstand

1 Toxische, fungale Metabolite: Strukturen, Vorkommen und Bedeutung der Fumonisine

Als 1988 die Isolierung der Fumonisine durch Gelderblom und Mitarbeiter (Gelderblom et al. 1988) in Tygerberg (Südafrika) gelang, stellte dies den Höhepunkt einer 18jährigen, intensiven Forschungsarbeit dar. Noch im gleichen Jahr konnten die Strukturen von FB₁ und FB₂ erfolgreich aufgeklärt werden (Bezuidenhout et al. 1988). Grund aller Bemühungen war ein in Süd Afrika flächendeckendes Auftreten der sogenannten „equine Leukoenzephalomalacia“ (ELEM), einer Viehkrankheit, die sich in einer Nekrose der weißen Gehirnmasse äußert. Als indirekter Auslöser von ELEM, wurde dabei verschimmelter Mais ausfindig gemacht, der mit dem Pilz *Fusarium verticillioides* Nirenberg (Synonym: *F. moniliforme* Sheldon) kontaminiert war. Gleichzeitig konnte *F. verticillioides* von Mais in der Region Transkei isoliert werden, in der ein vermehrtes Auftreten von Speiseröhrenkarzinomen zu verzeichnen war. Dem transkeiischem Isolat mit der Bezeichnung „MRC 826“ kam dabei eine besondere Bedeutung zu. Es vermochte ebenso ELEM auszulösen und gilt als jene Kultur, aus der zum erstenmal Fumonisine isoliert werden konnten. Diese zählen heute zu den bedeutendsten toxischen fungalen Metaboliten.

Strukturell gesehen handelt es sich bei Fumonisinen um langkettige, methylverzweigte Aminoalkohole, deren Kohlenwasserstoff-Grundgerüst in der Regel 20 C-Atome umfasst. Inzwischen sind insgesamt 15 verschiedene Isomere beschrieben worden, die sich vor allem durch ihr Hydroxylierungsmuster voneinander unterscheiden. Die einzelnen Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt (Cawood et al. 1991, Gelderblom et al. 1992a, Jackson et al. 1996a, Musser et al. 1996, Plattner und Shackelford 1992). Ein typisches

Merkmal der Fumonisine ist die Veresterung der OH-Gruppen in Position 14 und 15 mit 1,2,3-Propantricarbonsäure („tricarballic acid“; TCA). Wird eine der beiden Seitenketten abgespalten, so spricht man von teilweise hydrolysierten Fumonisin (PHFB_x) (Sydenham et al. 1995). Daneben führt eine zusätzliche Abspaltung der verbleibenden TCA-Seitenkette zur Bildung der entsprechenden vollständig hydrolysierten Fumonisine (HFB_x) (Thakur und Smith 1996). Der wichtigste Vertreter der Fumonisine, das Fumonisin FB₁, wird zur sogenannten B-Reihe gezählt, die aufgrund ihrer weiten Verbreitung die größte Bedeutung besitzt. Die Fumonisine der A-Reihe entsprechen denen der B-Reihe, sind jedoch an der Aminogruppe acetyliert. Zu dieser Reihe zählt auch das 15-Ketofunktionalisierte Fumonisin FAK₁ (Musser et al. 1995). Daneben existieren Isomere, die um die Methylgruppe in Position 1 verkürzt sind (Branham und Plattner 1993). Es handelt sich hierbei um die Fumonisine der C-Reihe, zu denen außerdem das unlängst entdeckte OH-FC₁, das eine zusätzliche OH-Funktion besitzt, gehört (Seo et al. 1996). Als weitere Isomere sind die Fumonisine der P-Reihe, die 1996 durch Musser und Mitarbeiter beschrieben wurden (Musser et al. 1996), zu nennen. Bei diesen Strukturen befindet sich in Position 2 anstelle der Aminogruppe eine 3-Hydroxypyridinium(3HP)-Einheit.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
FB₁	TCA	TCA	OH	OH
FB₂	TCA	TCA	H	OH
FB₃	TCA	TCA	OH	H
FB₄	TCA	TCA	H	H
HFB₁	OH	OH	OH	OH
HFB₂	OH	OH	H	OH
PHFB_{1a}	OH	TCA	OH	OH
PHFB_{1b}	TCA	OH	OH	OH

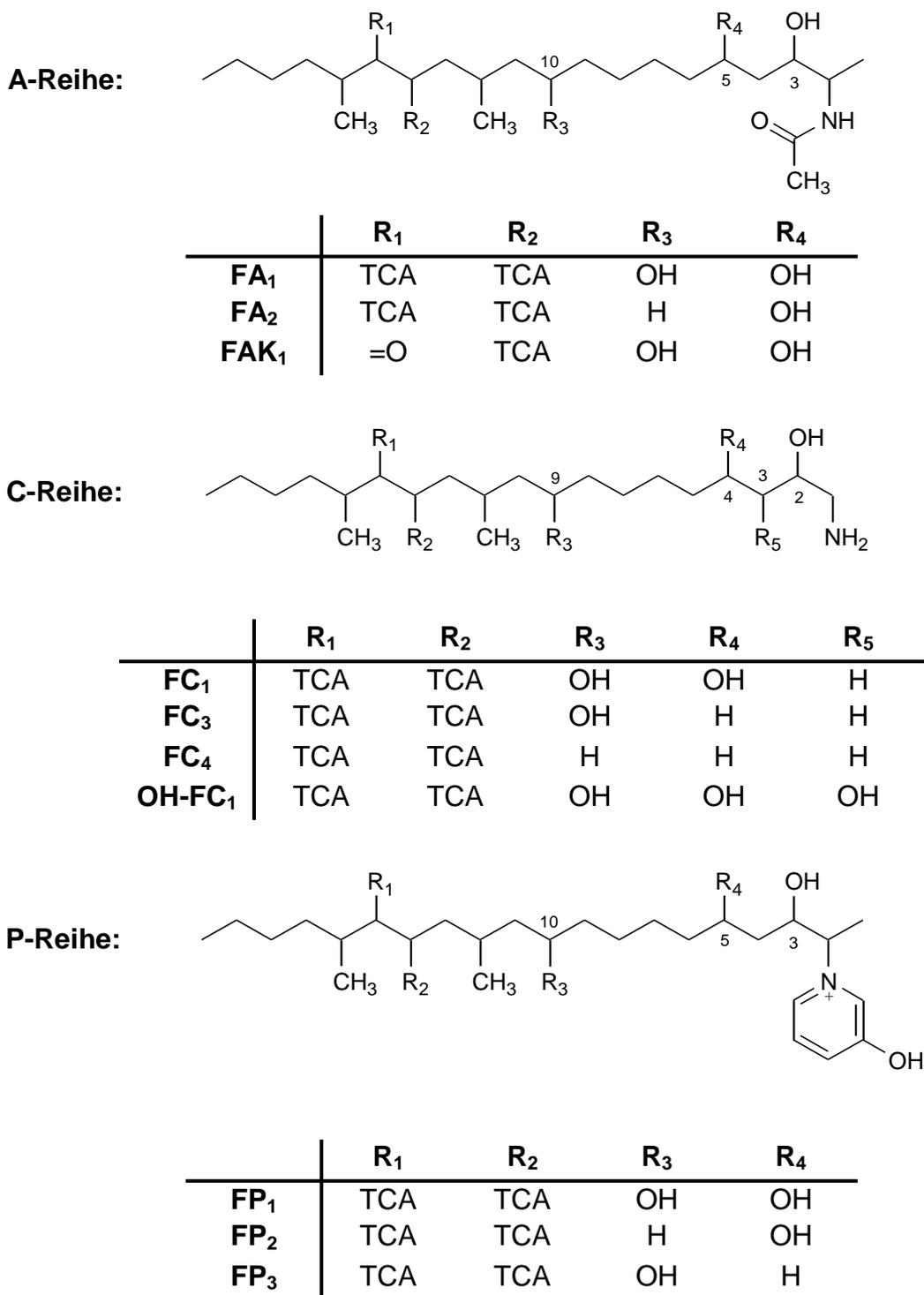


Abb. 1: Strukturen der Fumonisine.

Mit dem Vorhandensein von Hydroxygruppen, einer Aminogruppe und einem Grundgerüst, das aus 20 C-Atomen besteht, weisen Fumonisine eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Sphingosin und Sphinganin auf (Abb.2). Daher zählt man sie, zusammen mit einer Reihe anderer Mykotoxine, wie beispielsweise den von *Alternaria alternata* produzierten AAL-Toxinen, zu den „Sphinganin-analogen Mykotoxinen“ (Caldas et al. 1995).

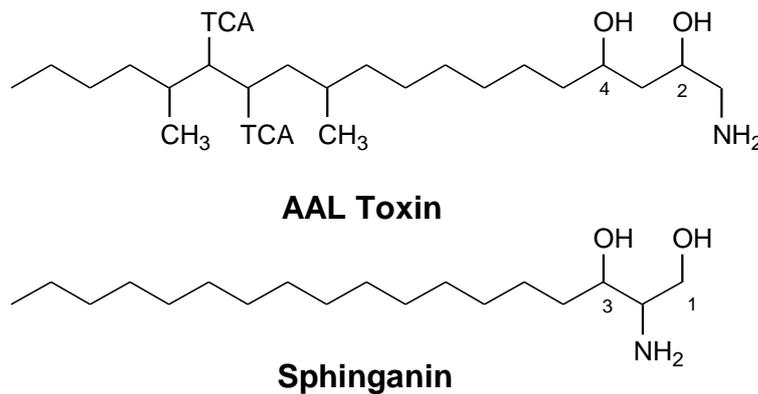


Abb. 2: Strukturen von Sphinganin und AAL-Toxin (TCA siehe Abb. 1).

Aufgrund ihrer Fähigkeit Fumonisine zu produzieren, sind derzeit drei Fusarienstämmen der Sektion Liseola von besonderer Bedeutung. Unter diesen gilt neben den beiden Stämmen *Fusarium proliferatum* und *Fusarium nygamai* (Nelson et al. 1992, Thiel et al. 1991) *Fusarium verticillioides* als bedeutenster Fumonisinproduzent. In über 90 % seiner Isolate konnten Fumonisine nachgewiesen werden (Bacon und Nelson 1994). Daneben kann Fumonisin FB₁, wenn auch weit seltener und in geringeren Mengen, von anderen Stämmen, wie *F. napiforme*, *F. anthophilum* und *F. dlamini* gebildet werden (Nelson et al. 1992). Zudem wurde die Bildung von Fumonisinen der B- und C-Reihe durch *F. oxysporum* nachgewiesen (Abbas et al. 1995, Seo et al. 1996).

Fusarien gehören nicht nur zu den Mykotoxin-produzierenden, sondern auch zu den Phytotoxin-produzierenden Pilzen. So ruft beispielsweise *F. verticillioides*, einer der wichtigsten Schimmelpilze, die weltweit in Verbindung mit Mais gebracht werden, auf diesem Kolben- und Stängelfäule (McGee 1988) hervor. Die Infektion erfolgt besonders

unter trockenen und warmen Bedingungen (Hitze- und Trockenstress) und führt in den meisten Fällen zu einer Kontamination der Maiskolben mit Fumonisin (Bacon und Williamson 1992). So ist *F. verticillioides* in der Lage eine wirtschaftliche Schädigung in doppelter Hinsicht zu verursachen. Neben Mais wurden Fumonisine hauptsächlich in Reis (Abbas et al. 1998), Weizen, Gerste, Sojabohne (Castella et al. 1999) und Hirse (Gamanya und Sibanda 2001) nachgewiesen.

Die natürliche Belastung von Mais und dessen Produkte mit Fumonisin stellt ein globales Problem dar, von dem unter anderem Argentinien, Botswana, Brasilien, Bulgarien, China, Deutschland, Frankreich, England, Indien, Italien, Japan, Kenia, Nepal, Peru, Polen, Zimbabwe, Kanada, Süd Afrika, Schweiz und die USA betroffen sind (Jackson et al. 1996a). Die bisher größten Mengen an Fumonisin FB₁ wurden in Maiskörnern nachgewiesen, wobei die höchsten durchschnittlichen Kontaminationen in China (Cixian, 1991) mit 93,8 mg/kg (Chu und Li 1994) und in Süd Afrika (Transkei, 1989) mit 53,7 mg/kg (Rheeder et al. 1992) ermittelt wurden. In anderen Ländern wie beispielsweise in den USA (Iowa, 1991) oder in Argentinien ist die bisher gemessene durchschnittliche höchste Kontamination mit 2,9 mg/kg (Murphy et al. 1993, Sydenham et al. 1993) als wesentlich geringer anzusehen. In Europa ist vor allem Italien betroffen. Hier wurden in den Jahren 1992/93 durchschnittliche Höchstmengen von 2,8 mg/kg in Maiskörnern nachgewiesen (Doko und Visconti 1994). In Deutschland wurden in den Jahren 1999 bis 2001 im Rahmen des Forschungsprojekts „Fumonisin-Aufnahme des deutschen Verbrauchers“, gefördert durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Lebensmittelproben auf den Gehalt an Fumonisin untersucht. Als mittlere FB₁-Belastung in den einzelnen Produktgruppen lagen dabei die höchsten Mengen in Maisgrieß bei 110 µg/kg im Jahr 2000 und in Maissnacks bei 100 µg/kg im Jahr 1999. Ebenso wurden im Rahmen des Projektes Proben zusätzlich auf den Gehalt an HFB₁ hin untersucht. Hier lag die höchste mittlere Belastung bei etwa 25 µg/kg in Maissnacks (Zimmer et al. 2002). Über die Gehalte an Fumonisin in anderen, nicht maishaltigen Lebensmitteln, existieren bis heute nur wenige Daten, die keine Aussagen über eine globale Gewichtung zulassen. Die vermehrte Untersuchung anderer, nicht maishaltiger Lebensmittel ist zusammen mit der Entwicklung einer angepassten,

zuverlässigen und sensitiven Analytik von besonderer Bedeutung (siehe Teil C Kapitel 2). In unpoliertem Reis aus den USA wurden Mengen an FB₁ von durchschnittlich 4,3 mg/kg detektiert, in weißem Reis hingegen konnten keine Fumonisine nachgewiesen werden (Abbas et al. 1998). Geringe Mengen an FB₁ wurden zudem in Bier und Spargelpflanzen ermittelt (Torres et al. 1998, Hlywka und Bullerman 1999, Logrieco et al. 1998). Von einer Belastung von Milch mit Fumonisin kann nicht ausgegangen werden, da kein FB₁ in Milch nachgewiesen werden konnte, die von Kühen stammte, denen FB₁ oral und intravenös verabreicht wurde (Scott et al. 1994). Ein Screening von 165 Milchproben lieferte nur eine sehr gering belastete Probe (1,29 µg/l) (Magros und Richard 1994).

Für einige Länder existieren bereits Daten, die versuchen die tägliche humane Fumonsinexposition abzuschätzen. Die Exposition liegt dabei für Kanada zwischen 0,017 und 0,089 µg/kg KG/Tag (KG = Körpergewicht). Die tägliche Dosis in der Schweiz wird auf 0,03 µg/Tag geschätzt. In den Niederlanden reicht die tägliche Exposition von 0,006 bis hin zu 7,1 µg/kg KG/Tag. In Süd Afrika liegt die tägliche Exposition zwischen 14 und 440 µg/kg KG und damit deutlich höher als in allen anderen Ländern, für die Abschätzungen getroffen wurden (EHC 2000).

2 Biosynthese

Fumonisine sind strukturell dem Grundgerüst der Sphingolipide sehr ähnlich, was die Vermutung nahe legt, dass auch die Biosynthesewege beider Substanzklassen ähnlich verlaufen (Plattner und Shackelford 1992). Die Biosynthese von Sphingosin erfolgt dabei über eine Kondensation von Palmitoyl-Coenzym A mit Serin. Inkorporationsversuche mit ¹³C-markierten Verbindungen konnten die vermutete Beteiligung von Acetat und verschiedener Aminosäuren am Aufbau von FB₁ bestätigen (ApSimon 2001).

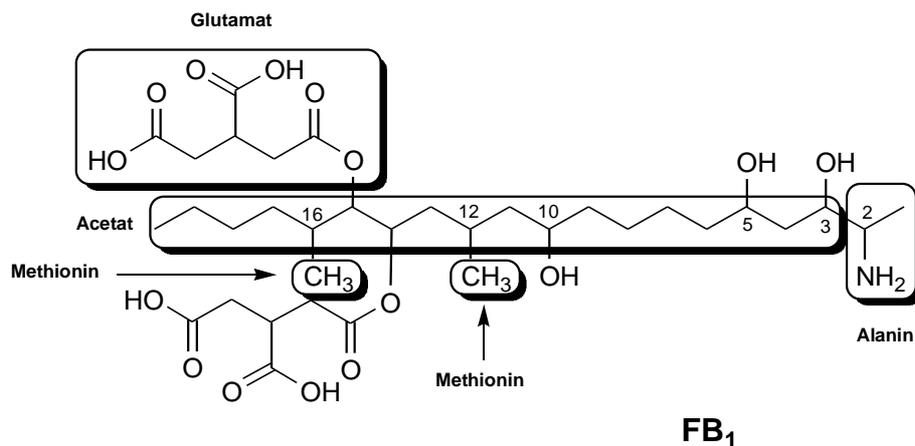


Abb. 3: Einbau verschiedener Prekursoren in Fumonisin B₁.

In Abbildung 3 sind die einzelnen, an der Biosynthese beteiligten Prekursoren dargestellt. Das Fumonisin-Rückgrat (C-Atome C3 bis C20) wird dabei von Acetat gebildet. Das Muster, das sich aus dem Einbau von Acetat ergibt, entspricht einer „Kopf-zu-Schwanz“-Kupplung, die typisch für eine Kondensation von Acetyl-Coenzym A Einheiten innerhalb der Fett- und der Polyketidbiosynthese ist. Das Muster alleine ermöglicht es nicht, zwischen den beiden Synthesewegen zu unterscheiden. Jedoch gelang kürzlich der Nachweis eines für die Fumonisin-Biosynthese erforderlichen Polyketidsynthase-Genes (Proctor et al. 1999) und dreier weitere Gene Fum 1 bis 3, die die Fähigkeit zur Fumonisin-Produktion festlegen und das Hydroxylierungsmuster kontrollieren (Desjardins et al. 1996). Die Aminogruppe und die Kohlenstoffatome C1 und C2 entstehen durch den Einbau von L-Alanin, während die Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen in Position 12 und 13 von L-Methionin gestellt werden. Die TCA-Seitenketten werden durch eine Inkorporation von L-Glutaminsäure gebildet. Die Reihenfolge der einzelnen Aufbauschritte, ist derzeit noch unklar und kann, ebenso wie der genaue Syntheseweg der Fumonisine FB₂ und FB₃, nur vermutet werden.

3 Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Metabolismus

Die Bioverfügbarkeit und Absorption von Fumonisin ist in vielfältigen Studien an Ratten, Schweinen und nichthumanen Primaten, meist durch den Einsatz von ^{14}C -markiertem FB_1 , untersucht worden (Hopmans und Murphy 1995, Norred et al. 1993, Shephard et al. 1992a, 1992b, 1994a, 1994b, 1994c, Prelusky et al. 1994, 1996a, 1996b). Die Studien ergaben, dass FB_1 nur schwach nach oraler Verabreichung absorbiert (weniger als 6%), und hauptsächlich sehr schnell über biliäre Exkretion ausgeschieden wird. Sehr kleine Mengen (weniger als 1%) werden mit dem Urin abgegeben. Ein kleiner Anteil des ^{14}C -markierten FB_1 verbleibt in Leber und Nieren. Für Ratten wird nach oraler Verabreichung eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 10-20 Minuten (Shephard et al. 1992a, 1992b), für Kühe eine von 15-18 Minuten (Prelusky et al. 1995), angegeben. In nichthumanen Primaten wurden 61% des oral aufgenommenen ^{14}C - FB_1 in den Fäzes und des Weiteren 15% im Intestinaltrakt, der Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Gehirn, Herz, den Erythrozyten und in der Galle wiedergefunden (Shephard et al. 1994c). Bei einem Vergleich der Bioverfügbarkeit von ^{14}C - FB_1 , ^{14}C - HFB_1 und ^{14}C - FB_1 -Fructoseaddukt nach peroraler Gabe stellte sich heraus, dass HFB_1 und das FB_1 -Fructoseaddukt stärker absorbiert und zu einem größeren Teil über den Urin ausgeschieden werden (Dantzer et al. 1999). In einer kürzlichen Studie an Caco-2 Zellen, einer humanen intestinalen Darmzelle, die als *in vitro* Modell für Untersuchungen zur Absorption und zum Metabolismus im intestinalen Epithelium allgemein Anerkennung findet, wurde die Absorption von FB_1 , teilweise hydrolysiertem PHFB_1 und vollständig hydrolysiertem HFB_1 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass von den untersuchten Fumonisinen nur HFB_1 von den Zellen absorbiert wurde (Caloni et al. 2002).

Zur Aufnahme von Fumonisinen durch Inhalation oder zur dermalen Exposition durch Fumonisine existieren keine Studien. Im Bezug auf den Metabolismus der Fumonisine liegen bisher ebenfalls nur wenige Daten vor. So konnten im Tierversuch an Ratten, unabhängig von der Art der Verabreichung, keine Metabolite nachgewiesen werden (Norred et al. 1996). Shephard und Mitarbeitern hingegen gelang der Nachweis von partiell

und vollständig hydrolysiertem FB₁ im Darm und Fäzes von nichthumanen Primaten (Shephard et al. 1994c, 1995). Dass ein ähnlicher Abbau der Fumonisine im Darm von Schweinen stattfindet, wurde von Prelusky und Mitarbeitern vermutet, konnte jedoch nicht bewiesen werden (Prelusky et al. 1994). Eine Metabolisierung von HFB₁, in Form einer Acylierung durch die Ceramidsynthase zum N-Palmitoyl- und N-Nervonoyl-HFB₁, wurde in einem *in vitro* Testsystem mit Rattenlebermikrosomen als Ceramidsynthasequelle nachgewiesen (Humpf et al. 1998, Hartl 2000). Die beiden Metabolite zeigten sich dabei im Zelltest an einer menschlichen Dickdarmzelllinie (HT29-Zellen) als stärker zytotoxisch als ihre Ausgangsverbindung HFB₁.

4 Toxikologie

Der Wirkungsmechanismus der Fumonisine ist sehr komplex und bis dato weitgehend ungeklärt. Der bedeutenste biochemische Effekt der Fumonisine beruht auf der Hemmung der Ceramidsynthase (Sphingosin- und Sphinganine-*N*-Acyltransferase), einem Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus, das für die Acylierung von Sphingosin und Sphinganine verantwortlich ist (Merrill et al. 2001, Wang et al. 1991). Die Inhibierung, die aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Fumonisinen mit Sphinganine bzw. Sphingosin möglich ist, führt zur Anreicherung von Sphinganine, wodurch zahlreiche weitere Effekte und Folgereaktionen induziert werden. Da Sphingolipide als wichtige Bestandteile bei der Zellkommunikation, beim Zellwachstum, sowie bei der Zelldifferenzierung gelten, geht man davon aus, dass es sich bei der Inhibierung der Ceramidsynthase um den Schlüsselschritt bei der Toxikogenese der Fumonisine handelt (Riley et al. 2001). Dabei ist eine freie primäre Aminogruppe, offensichtlich sowohl für die Hemmung der Ceramidsynthase, als auch für das Auslösen toxischer Effekte, eine wichtige Voraussetzung (Norred et al. 2001).

Während die Toxikogenese der Fumonisine noch viele Fragen offen lässt, so gibt es hingegen zur allgemeinen Toxikologie der Fumonisine eine Reihe von Studien und Informationen. So gelang 1988 und 1990 der Beweis, dass FB₁ bei intravenöser (Marasas

et al. 1988), bzw. bei oraler Verabreichung (Kellerman et al. 1990), bei Pferden ELEM (= equine Leukoenzephalomalacia) auslöst. Die Krankheit äußert sich in einer Nekrose der weißen Gehirnmasse, wobei die Tiere als erste äußere Symptome ein sehr ungewöhnliches Verhalten aufzeigen, das von Lethargie und ziellosem Umherirren geprägt ist. Die Schwellendosis, die zum Auslösen der Krankheit nötig ist, liegt bei 0,4 mg/kg KG/Tag und endet bei höheren Dosen tödlich (Kellerman et al. 1990, Wilson et al. 1990). Bei Schweinen hingegen führt die tägliche intravenöse oder orale Aufnahme von FB₁ in einer Konzentration von 4,5 mg/kg KG zur Entstehung eines pulmonalem Lungenödems (PPE, porcine pulmonary edema syndrome), das innerhalb von 4-7 Tagen auftritt und zum Tod der Tiere führt (Haschek et al. 1992, Motelin et al. 1994, Haschek et al. 2001, Harrison et al. 1990, Colvin et al. 1993). Die Toxizität von Fumonisin wurde zudem an zahlreichen anderen Tierspezies untersucht. So berichteten Espada und Mitarbeiter (Espada et al. 1994) über das Auftreten von Leberschäden bei Hühnern, denen Futter mit reinem FB₁ in einer Konzentration von 10 mg/kg verabreicht wurde. Außerdem wurden Studien an nichthumanen Primaten, Kaninchen, Hamstern, Welsen, Schafen, Nerzen und Rindern durchgeführt, bei denen reine Fumonisine oder mit Fumonisin kontaminierter Mais oral verabreicht wurden. In allen Fällen, führte die Aufnahme von Fumonisin zum Auftreten von Schädigungen an Leber und Niere (Kuiper-Goodman et al. 1996, Norred et al. 1996, EHC 2000, Gumprecht et al. 1995, Erdington et al. 1995).

Die Karzinogenität der Fumonisine in Ratten wurde erstmals durch Gelderblom und Mitarbeiter nachgewiesen (Gelderblom et al. 1991). Bei einer täglichen Dosis von 50 mg/kg Futter induzierte FB₁ nach 20 Monaten in 100% aller Versuchstiere Leberzirrhose und in 66% Leberkrebs. Die Rolle der Fumonisine FB₁, FB₂ und FB₃ als Tumorpromotoren und -initiatoren wurde in zahlreichen Arbeiten ebenfalls durch Gelderblom und Mitarbeiter belegt (Gelderblom et al. 1988, 1992b, 1993, 1994, 1995, 1996, 2001a, 2001b, 2001c). Die „International Agency for Research on Cancer“ (IRAC) hat die Fumonisine in die Gruppe 2B der „möglicherweise kanzerogenen Substanzen“ eingestuft (IRAC 1993). In einer zweijährigen Langzeitstudie des „National Center for Toxicological Research“ (NCTR) wurde kürzlich für FB₁ eine eindeutige kanzerogene

Aktivität in männlichen Ratten und weiblichen Mäusen nachgewiesen (Howard et al. 2001).

Bis heute haben Untersuchungen weitgehend gezeigt, dass FB₁, FB₂ und FB₃ nicht genotoxisch sind. Im Ames-Test erwiesen sich die Fumonisine gegenüber den Salmonella-Stämmen TA97a, TA98, TA100 und TA102 sowohl mit, als auch ohne metabolische Aktivierung als nicht mutagen (Gelderblom und Snyman 1991, Park et al. 1992). Im DNA-Reperaturtest mit primären Hepatozyten konnte weder *in vitro* noch *in vivo* Genotoxizität der Fumonisine FB₁ und FB₂ nachgewiesen werden (Gelderblom et al. 1989, 1992a). Zudem ruft FB₁ keine außerplanmäßige DNA-Synthese hervor (Norred et al. 1990, 1992). Jedoch berichteten Knasmuller und Mitarbeiter, dass FB₁ in Konzentrationen von 1,4 bis 144 µM zu chromosomalen Aberrationen in primären Ratten-Hepatozyten führt (Knasmuller et al. 1997). Ob FB₁ direkt oder indirekt über eine Lipidperoxidation für die Strangbrüche verantwortlich ist, bleibt bis dato ungeklärt. Nach einem Biolumineszenz-Test mit *Vibrio fischeri* wurde FB₁ zudem als direkt mutagen eingestuft (Sun und Stahr 1993). Missbildungen und verringertes Körpergewicht bei den Nachkommen, sowie reduzierte Gewichtszunahme und Hepatotoxizität bei den Muttertieren, konnte in einer Studie zum Einfluss von FB₁ auf die embryonale Entwicklung bei Mäusen beobachtet werden (Gross et al. 1994).

Die Zytotoxizität der Fumonisine und insbesondere die Fähigkeit von FB₁ Apoptose zu induzieren, wurde in verschiedenen Studien untersucht. Dabei erwiesen sich die Fumonisine bei Untersuchungen unter anderem an Ratten-Hepatomzellen (H4TG), Nierenepithelzellen von Hunden (MDCK) und Schweinen (LLC-PK₁), Hamster-Nierenzellen und Rattenhepatozyten stets als zytotoxisch (La Grenade und Bean 1990, Abbas et al. 1993, Gelderblom et al. 1993, Norred et al. 1992, Shier et al. 1991, Yoo et al. 1992). Ein apoptotisches Potenzial von FB₁ konnte *in vitro* an verschiedenen humanen Zelllinien (Schmelz et al. 1998, Tolleson et al. 1996b) sowie an Affen-Nierenzellen (Wang et al. 1991) und *in vivo* an Nieren- und Leberzellen von Ratten (Tolleson et al. 1996a) und Kaninchen (Bucci et al. 1998, Bucci und Howard 1996) nachgewiesen werden. Für eine ausführliche Beschreibung und eine Diskussion des apoptotischen Potenzials der

Fumonisine sei auf Teil C Kapitel 3 verwiesen. Die Auswirkungen von FB₁ auf die Lipidperoxidation und somit auf die Protein- und DNA-Synthese wurden an Affen-Nierenzellen untersucht (Vero Zellen). Dabei führte die Exposition mit FB₁ zu einem Anstieg von Malondialdehyd, einem Sekundärprodukt, das während der Lipidperoxidation gebildet wird (Abado-Becognee et al. 1998).

Die toxischen Wirkungen der Fumonisine sind prinzipiell *in vitro* und *in vivo* sehr unterschiedlich. Flynn und Mitarbeiter stellten eine um den Faktor 100 geringere Embryotoxizität von HFB₁ gegenüber FB₁ in kultivierten Rattenembryos fest (Flynn et al. 1997). Eine andere *in vitro*-Studie mit einer humanen Darmzelllinie (HT29) ergab für HFB₁ hingegen nur eine um den Faktor 10 geringere Toxizität als FB₁ (Schmelz et al. 1998). In primären Rattenleberzellen ist gezeigt worden, dass die beiden Hydrolyseprodukte HFB₁ und HFB₂ sogar stärker cytotoxisch wirksam sind, als FB₁ (Cawood et al. 1994, Gelderblom et al. 1993). In Tierstudien hingegen stellte man fest, dass das HFB₁ im Bezug auf das Krebspromotor-Potential etwa die gleiche Fähigkeit wie FB₁ besitzt, Leberkrebs zu induzieren. Auch die Auswirkungen auf Leber und Niere unterscheiden sich kaum (Hendrich et al. 1993, Voss et al. 1996).

Bisher existieren keine Daten, die eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch die Exposition mit Fumonisinen belegen. Jedoch wird eine Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von Speiseröhrenkarzinomen in einigen Regionen Südafrikas und Chinas, in denen FB₁ in Mengen von bis zu 118-155 mg/kg Mais nachgewiesen werden konnte, und der oralen Aufnahme von Fumonisinen vermutet (Chu und Li 1994, Rheeder et al. 1992). Daneben berichteten Bhat und Mitarbeiter von einem epidemieartigem Auftreten von Diarrhoe, Unterleibsschmerzen und Borborygmus in Indien (Deccan Plateau), was auf den Konsum von FB₁-haltigem Mais und FB₁-haltiger Hirse zurückgeführt wurde (Bhat et al. 1997). Nicht zuletzt aufgrund der fehlenden Beweise für ein tatsächliches toxikologisches Potenzial der Fumonisine im Menschen, existieren bis heute, weder auf nationaler noch auf EU-Ebene, keine gesetzlichen Grenzwerte für Höchstmengen an Fumonisinen in Lebens- und Futtermitteln. Auf nationaler Ebene liegt jedoch ein Höchstmengen-Entwurf vor, in dem für Mais und Maiseerzeugnisse (außer

Cornflakes) FB₁-und und FB₂ Konzentrationen von insgesamt maximal 500 µg/kg vorgeschlagen werden. für Cornflakes sowie für Mais und Maiserzeugnisse, die zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder eingesetzt werden, werden Grenzwerte von 100 µg/kg als sinnvoll erachtet (Rosner 2002). Für die Schweiz wird ein Toleranzwert von 1mg/kg Trockenmasse angegeben (Klemm 2000).

5 Analytik

Gleichzeitig mit der Anzahl an toxikologischen Studien, die immer mehr verdeutlichen, welche gesundheitlichen Risiken eine Belastung von Lebens- und Futtermitteln mit Fumonisinen in sich birgt, sind die Anforderungen an eine adäquate Analytik zum zuverlässigen und empfindlichen Nachweis von Fumonisinen in Nahrungsmitteln in den letzten Jahren stark gestiegen. Anfänglich wurden die Fumonisine mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit *p*-Anisaldehyd als Sprühreagenz sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Toxine erfolgte über eine Vermessung der Farbintensität am Spektrophotodensitometer (Cawood et al. 1991). Die Methode erwies sich jedoch aufgrund der hohen Nachweisgrenze von 100 µg/kg und der schlechten Eignung für Lebensmittelproben als wenig sinnvoll. Parallel wurden aufwendige Verfahren entwickelt, die auf der Analytik mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) beruhen, sich aber wegen des hohen Arbeitsaufwands nicht durchsetzen konnten. Die polare Molekülstruktur der Fumonisine macht es nämlich erforderlich die Verbindungen zunächst sauer oder alkalisch zu hydrolisieren, bevor ihr Grundgerüst oder die verbleibenden Tricarbonsäure (TCA-) Seitenketten einer Derivatisierung mit Silylierungs- oder Acetylierungs-Reagenzien unterzogen werden können (Plattner et al. 1990, Wilson et al. 1990). Die meisten der heute angewendeten Methoden basieren daher auf dem Einsatz der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), die mit unterschiedlichen Detektoren gekoppelt wird. Eines der ersten Verfahren basierte hierbei auf der Derivatisierung der Fumonisine mit Maleinsäureanhydrid und der Detektion im UV (Alberts et al. 1993, Sydenham et al. 1990). Der direkte Einsatz der UV-Detektion ist nicht möglich, da

Fumonisine keine UV-Aktivität besitzen. Der Nachweis der Fumonisine mittels Fluoreszenzdetektion hat sich inzwischen als Standardmethode etabliert. Zur Derivatisierung der Toxine wird meist *o*-Phthaldialdehyd (OPA) (Shephard et al. 1990, Zoller et al. 1994) verwendet. Hierbei wurden Nachweisgrenzen um die 50 µg/kg erreicht (Shephard et al. 1990, Stack und Eppley 1992, Duncan et al. 1998). Zum Teil finden aber auch andere Derivatisierungsreagenzien, wie 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat (Velazquez et al. 1995), Naphthalin-2,3-dicarbaldehyd (Ware et al. 1993, Bennett und Richard 1994), Fluorescamin (Wilson et al. 1990, Holcomb et al. 1993a), 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan (Scott und Lawrence 1992), 9-Fluorenmethylchloroformiat (FMOC) (Holcomb et al. 1993b) oder 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-F) (Akiyama et al. 1995), ihre Anwendung. Die Methoden zeichnen sich zwar im Allgemeinen durch eine hohe Empfindlichkeit und geringe Nachweisgrenzen, die im Bereich von 10 bis 100 µg/kg liegen, aus, weisen jedoch auch eine Reihe von Nachteilen auf, die eine akkurate Quantifizierung erschweren. Einer der Hauptnachteile ist dabei das Auftreten von Interferenzen mit Matrixbestandteilen, die ebenfalls derivatisiert werden. Kommt es zu einer Koelution von Analyt und Matrixbestandteilen führt dies zu falsch positiven oder inexakten Ergebnissen. Um dieses Problem zu umgehen, ist eine umfangreiche Probenvorbereitung erforderlich, die jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist. Daneben sind die gebildeten fluoreszierenden Derivate in der Regel nur sehr kurze Zeit stabil, was zu einer Beeinträchtigung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt. Da die Derivatisierung der Fumonisine zudem an deren primären Aminogruppe erfolgt, können Fumonisine nachgewiesen werden, die eine Aminogruppe in freier Form besitzen. Inzwischen kennt man jedoch eine Reihe von verarbeitungsbedingten Reaktionsprodukten der Fumonisine, in denen die Aminogruppe, aufgrund einer vorhergegangenen Maillard-ähnlichen Reaktion mit reduzierenden Zuckern, für eine Derivatisierung nicht mehr zur Verfügung steht. Um auch derartige Verbindungen erfassen zu können, ist das Ausweichen auf andere Analysenmethoden unumgänglich. Die Anwendung der Lichtstreuung (,,evaporative light scattering detector“, ELSD) erfordert zwar keine Derivatisierung der Toxine, aufgrund der mangelnden Linearität findet sie aber bisher nur Anwendung bei der Reinheitskontrolle von Fumonisin-Standards sowie für die Detektion von Fumonisinen bei deren Isolierung im präparativen Maßstab (Wilkes

et al. 1995, Poling und Plattner 1996). Im Bereich der Massenspektrometrie gibt es verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Techniken. Hierzu gehören unter anderem die Thermospray- (Korfmacher et al. 1991), die „Fast atom bombardment“- (Xie et al. 1997), die „Particle-beam“- (Young und Lafontaine 1993) und die Elektrospray-Massenspektrometrie (Doerge et al. 1994, Lukacs et al. 1996). Die Kombination der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) stellt eine vielfach erprobte Methode für den zuverlässigen quantitativen Nachweis von Fumonisin im Picogramm-Bereich dar (Lukacs et al. 1996, Hartl und Humpf 1999, Hartl et al. 1999, Doerge et al. 1994). Da bei dem Einsatz dieser Technik eine Derivatisierung der Aminogruppe der Fumonisine nicht erforderlich ist, ist sie auch für den empfindlichen Nachweis von Fumonisin, in denen die Aminogruppe in blockierter Form vorliegt, geeignet. Ebenso stellt die Tandem-Massenspektrometrie ein vielseitiges Instrument bei der Charakterisierung neuer derartiger Verbindungen dar.

Neben den chromatographischen, erwiesen sich immunochemischen Verfahren als effektive Nachweismethoden von Fumonisin. Hierbei werden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper eingesetzt (Azcona-Olivera et al. 1992, Usleber et al. 1994).

6 Abbau- und Reaktionsprodukte der Fumonisine in Lebensmitteln

Während bekannt ist, dass beim Erhitzen von Mais und Maismehl wesentliche Verluste an Fumonisin auftreten (Dupuy et al. 1993, Scott und Lawrence 1994), ist das Verhalten der Toxine bei der Verarbeitung von Lebensmitteln weitgehend ungeklärt. Bisher konnten nur einige wenige Abbau- und Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Bereits vor einigen Jahren wurde das sogenannte hydrolysierte Fumonisin FB₁ (HFB₁), das durch die Abspaltung der beiden Tricarbonsäure (TCA)-Seitenketten im alkalischen Milieu entsteht, als Abbauprodukt von FB₁ identifiziert (Hopmans und Murphy 1993). Die Verbindung ist vor allem in Lebensmitteln zu finden, die auf der Grundlage von nixtamalisiertem

Maismehl hergestellt werden. Im sogenannten Nixtamalisationsprozess wird Mais in einer Calciumhydroxid-Lösung gekocht, bevor er zu Lebensmitteln, wie beispielsweise den Knabberartikeln Tortillachips und Nachochips, weiterverarbeitet wird. Dass diese Art der chemischen Behandlung gleichzeitig eine Möglichkeit zur Detoxifizierung darstellt, widerlegten bereits die ersten Versuche an Ratten, in denen HFB₁ eine ähnliche Toxizität wie sein Prekursor FB₁ aufwies (Hendrich et al. 1993). Am Beispiel von HFB₁ ist somit gezeigt worden, dass auch von Abbauprodukten der Toxine eine Gefährdung ausgehen kann, und wie wichtig es ist, das Reaktionsverhalten der Fumonisine in Lebensmitteln zu kennen. Derzeit konzentrieren sich die meisten Studien jedoch weniger auf den weiteren Abbau von HFB₁, sondern beschäftigen sich vielmehr mit Reaktionsprodukten, die aus einer Maillard-ähnlichen Reaktion von Fumonisin FB₁ mit reduzierenden Zuckern hervorgehen (Abb. 4). Hierzu gehört unter anderem das N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁), das von Howard und Mitarbeitern 1998 entdeckt wurde (Howard et al. 1998). Daneben konnten Poling und Mitarbeiter die Existenz des sogenannten N-Deoxy-D-fructos-1-yl-Fumonisin B₁ beweisen, das aufgrund von Umlagerungen am Zuckerrest in verschiedenen isomeren Formen vorliegen kann (Poling et al. 2002). Lu und Mitarbeiter stellten erst kürzlich fest, dass bei der Umsetzung von FB₁ mit Glucose zahlreiche Verbindungen entstehen (> 10), von denen zwei als N-2-Hydroxy-2-Carboxyethyl-Fumonisin B₁ und N-3-Hydroxyacetyl-Fumonisin B₁ massenspektrometrisch identifiziert wurden (Lu et al. 2002). Erste toxikologische Studien derartiger Verbindungen lassen vermuten, dass eine Blockierung der primären Aminogruppe der Fumonisine zu einer Detoxifizierung führt (Liu et al. 2001). Des Weiteren existieren erste Hinweise, die auf eine Bindung der Fumonisine an Matrixbestandteile, wie Stärke oder Protein, hindeuten (Shier et al. 2000). In welcher Form ihre Bindung erfolgt, über ihre Bedeutung in Lebensmitteln sowie über ihre Beurteilung in toxikologischer Hinsicht wurden bisher nur Vermutungen angestellt. Die Erforschung derartiger Verbindungen ist aber von besonderer Bedeutung, da gebundenes Fumonisin im Magen-Darm-Trakt möglicherweise erneut freigesetzt wird, was zur Folge hätte, dass die tatsächliche Fumonisin-Belastung des Verbrauchers höher liegt, als bisher angenommen. Die bislang eingesetzten Methoden zur Bestimmung des Fumonisingehaltes in Lebensmitteln, sind nicht auf eine Erfassung des Anteils an gebundenem Fumonisin ausgerichtet. Daher ist ebenso eine geeignete Analytik

zur Bestimmung dieser „maskierten“ Fumonisine erforderlich, um ein eventuell erhöhtes Belastungsrisiko für den Verbraucher abschätzen zu können (vgl Teil C, Kapitel 1).

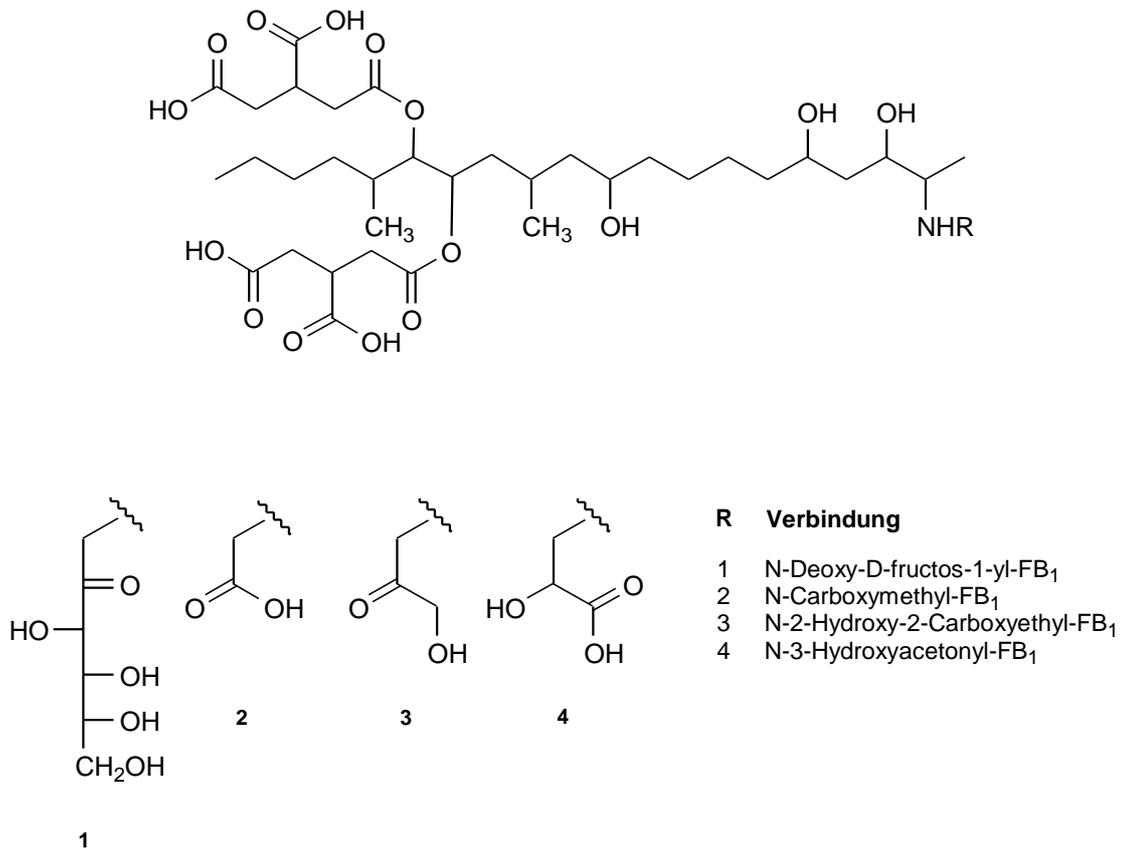


Abb. 4. Chemische Strukturen der bisher bekannten Verbindungen, die aus einer Maillard-ähnlichen Reaktion von Fumonisin FB₁ mit Glucose hervorgehen.

C Ergebnisse und Diskussion

1 Reaktionsprodukte von Fumonisin in thermisch behandelten Lebensmitteln

1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der direkten Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS), eine Methode zur Quantifizierung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁) - einem Maillard-ähnlichen Reaktionsprodukt aus FB₁ und einem reduzierenden Zucker (Howard et al. 1998) - in thermisch behandelten Lebensmitteln zu entwickeln und dessen Bedeutung bei der Lebensmittelverarbeitung zu bestimmen. Des Weiteren sollte die Bildung von neuen unbekanntem Fumonisin-Konjugaten untersucht werden.

1.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

1.2.1 Einführung

Die Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) hat sich innerhalb der letzten Dekade zu einem wertvollen analytischen

Werkzeug für den Nachweis polarer, schwer flüchtiger, oder thermisch labiler Verbindungen entwickelt. Aufgrund ihrer Selektivität und Sensitivität erreicht diese Technik geringe Nachweisgrenzen und erlaubt darüber hinaus die strukturelle Charakterisierung der Analyte anhand ihrer massenspektrometrischen Daten. Entscheidend für den routinemäßigen Einsatz der HPLC-MS-Kopplung war die Entwicklung von Ionenquellen, die bei Atmosphärendruck („Atmospheric-Pressure-Ionization“, API) arbeiten. Bei solchen API-Interfacetechniken wie der Elektrosprayionisierung (ESI) oder der chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization“, APCI) erfolgt die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer, sowie die Ionisierung der Analyte außerhalb des Hochvakuumbereichs. Das HPLC-Elutionsmittel wird vor dem Eintritt in das Spektrometer größtenteils abgetrennt, wodurch Eingriffe in das Hochvakuum in Folge von Verschmutzungen des Spektrometers weitgehend vermieden werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Elektrosprayionisierung in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (TSQ 7000) der Firma Finnigan für den Nachweis und die Identifizierung von Fumonisin-Artefakten eingesetzt. Im Folgenden sollen die Grundlagen näher erläutert werden.

1.2.2 Elektrospray-Ionisierung

Das Prinzip des Elektrospray, bei dem eine Flüssigkeit durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes in kleine Tröpfchen zerstäubt wird, wurde bereits 1917 von Zeleny erkannt. Der Einsatz dieser Technik zu analytischen Zwecken erfolgte jedoch erst Ende der sechziger Jahre von Dole und Mitarbeitern (Dole et al. 1968). Allerdings konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine Molekularmassenbestimmungen durchgeführt werden. Die Kombination von Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Massenspektrometrie wurde Anfang der achtziger Jahre von Fenn und Mitarbeitern zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Proteinen zum erstenmal eingesetzt (Yamashita und Fenn 1984). Hierfür und für die Entwicklung der ESI-MS wurde John Fenn 2002 mit dem Nobelpreis

für Chemie geehrt (Lehmann 2002). Die weitere Entwicklung, die Funktionsweise und den Stand der Technik fassen zahlreiche Übersichtsartikel zusammen (Bruins 1998, Gaskell 1997, Niessen und Tinke 1995, Niessen 1998). Im Elektrospray-Interface werden ionisierte Analyte in drei wesentlichen Schritten aus der Lösung in die Gasphase überführt. Zunächst wird durch das Anlegen einer Hochspannung an der Edelstahl-Probenkapillare ein starkes elektrisches Feld ausgebildet (als Gegenelektrode dient die beheizte Eingangskapillare) und dadurch die elektrophoretische Ladungstrennung der Ionen in der austretenden Probenlösung bewirkt. Ein Teil der negativen Ionen wird durch elektrochemische Oxidation an der Metallkapillare entfernt, und die Kationen reichern sich an der Oberfläche der Probenlösung an, die einen sogenannten „Taylor-Konus“ ausbildet (Bruins 1998). Im zweiten Schritt werden dann aus dessen Spitze geladene Tröpfchen emittiert, sobald die Coulombkräfte größer sind als die Oberflächenspannung und es entsteht ein feines Spray.

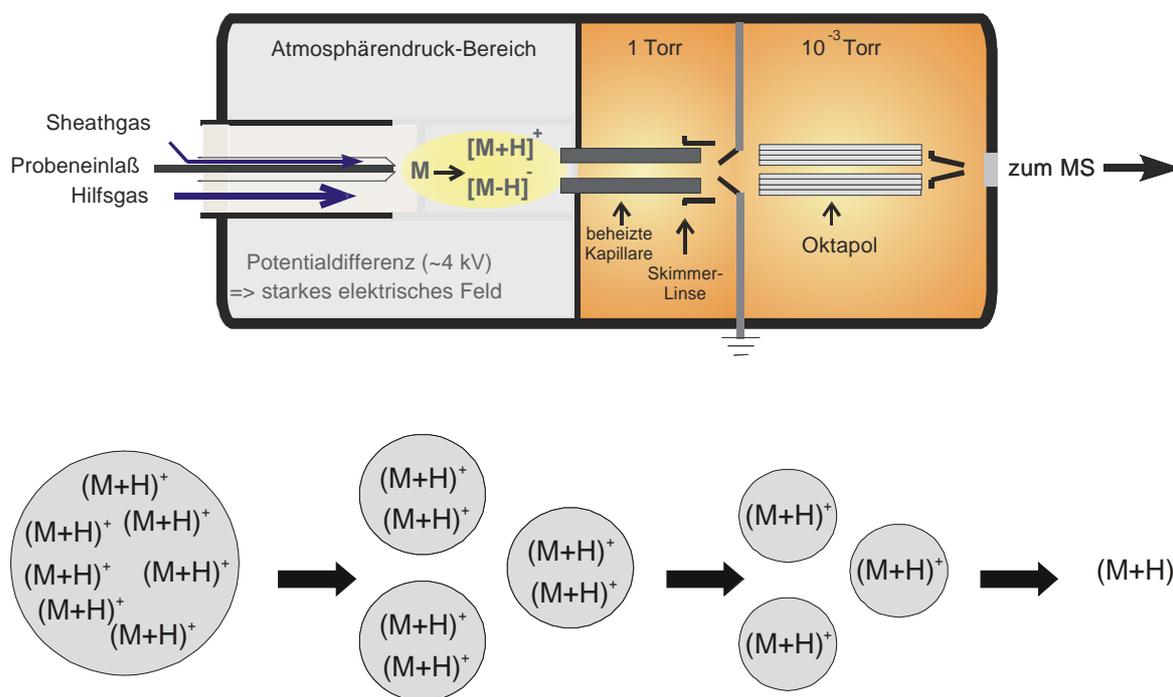


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Elektrospray (ESI)-Interface.

Das Verdampfen des Lösungsmittels führt zu einem Anstieg der Ladungsdichte an der Oberfläche der Primärtröpfchen. Übersteigen die Coulombkräfte die Oberflächenspannung des Tropfens, so kommt es zur Abschnürung kleiner Sekundärtröpfchen (Abb. 5). Dieser Prozess der abwechselnden Lösungsmittelverdampfung und Aufspaltung der Tröpfchen wiederholt sich mehrfach und es entstehen hochgeladene Mikrotröpfchen. Im letzten Schritt werden dann nach einem bisher noch nicht eindeutig geklärten Mechanismus freie Ionen gebildet, die dann in das Massenspektrometer eintreten.

Da es sich bei der ESI-Technik nicht um eine „aktive“ Ionisierung handelt, müssen die Analyte bereits in Lösung als Ionen vorliegen. Durch Variation des pH-Wertes sowie durch Adduktbildung mit Elektrolytionen aus der Lösung kann die Ionisation der Verbindungen gefördert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Effizienz der Elektrospray-Ionisierung ist eine niedrige Flussrate von maximal 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Eine verbesserte Toleranz gegenüber höheren Flussraten wurde durch das pneumatisch unterstützte Elektrospray erreicht (Bruins 1998). Weiterhin wird die Ionenausbeute bei der Elektrosprayionisierung entscheidend durch die Struktur des Analyten, die Zusammensetzung des Fließmittels, sowie die Konzentration von Elektrolyten bzw. koeludierenden Matrixbestandteilen beeinflusst. Die relevanten Parameter wurden von Kebarle und Tang 1993 in folgender Gleichung zusammengefasst (Kebarle und Tang 1993):

$$I_A = fp \frac{k_A [A^+]}{k_A [A^+] + k_B [B^+]} I$$

I_A ist dabei die massenspektrometrisch bestimmte Intensität des Messsignals der Analytionen A^+ . Das Produkt fp ist ein geräteabhängiger Parameter, der die Effektivität des ESI-MS-Systems beschreibt. $[A^+]$ und $[B^+]$ stehen für Konzentrationen des Analyten A und des „Background“-Elektrolyten B. Die Empfindlichkeitskonstanten k_A und k_B beschreiben die relativen Ionenausbeuten von A und B, und I ist der durch den Elektrosprayvorgang erzeugte Stromfluss im Interface. Üblicherweise werden dem

verwendeten Lösungsmittel zur Unterstützung der Ionisierung oder als Ionenpaarreagenz Säuren oder Puffer in millimolaren Konzentrationen zugesetzt. Damit ist $[B^+]$ sehr viel größer als $[A^+]$ und die obige Gleichung vereinfacht sich zu (Herderich 1998):

$$I_A = fp \frac{k_A [A^+]}{k_B [B^+]} I$$

Um eine maximale Signalintensität I_A zu erreichen, müssen also die Parameter $[A^+]$, k_B und $[B^+]$ optimiert werden. Bei der Wahl des Puffers oder des Ionenpaarreagenzes gilt es, die Konzentration an Elektrolyt möglichst gering zu halten, sowie Elektrolyte mit kleinen k_B -Werten zu verwenden (Kebarle und Tang 1993). Hinsichtlich der Optimierung von $[A^+]$ ist zu beachten, dass Analytkonzentrationen von über 10 μM zu einer Sättigung des Ionensignals führen (Bruins 1998).

1.2.3 Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erlaubt neben der Bestimmung des Molekulargewichtes, zusätzlich eine gezielte strukturelle Charakterisierung der Analyte. Bei einem Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer geschieht dies mit Hilfe von drei linear angeordneten Quadrupolen (Abb. 6). Der erste und der dritte Quadrupol (Q1 und Q3) dienen dabei als Massenanalysatoren. In ihnen wird in Abhängigkeit von der Wechsellspannung V und der Gleichspannung U ein Potenzial erzeugt, das nur Ionen mit einem definierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) auf einer stabilen Flugbahn hält, und deren Detektion ein Sekundärelektronenvervielfacher ermöglicht (Schröder 1991).

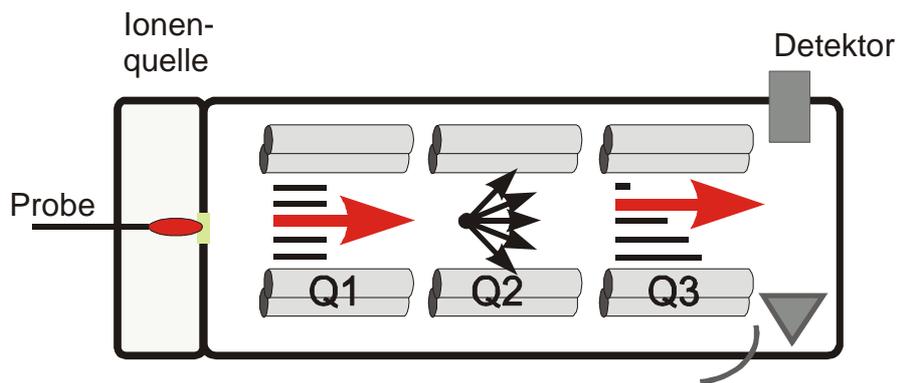


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometers.

Der zweite Quadrupol (Q2) hingegen wird als stark fokussierende Stoßkammer eingesetzt. Hier wird durch die Kollision der Prekursorionen mit einem inerten Stoßgas wie Argon, ein Teil ihrer kinetischen Energie in innere Energie umgewandelt. In der Folge zerfallen die angeregten Prekursorionen unimolekular in die Produktionen, die in Q3 detektiert werden können (Wysocki 1992). Dieser Vorgang wird als CAD („collision-activated dissociation“) oder CID („collision-induced dissociation“) bezeichnet. Da die kinetische Energie der Ionen, die über die Potenzialdifferenz zwischen Q1 und Q3 kontrolliert wird, im Bereich von 1 bis 200eV liegt, spricht man auch von Stoßaktivierung bei niedrigen Kollisionsenergien („low-energy-CID“).

Durch die lineare Anordnung von drei Quadrupolen im Tandem Massenspektrometer kann das Instrument in verschiedenen Scanmodi (Abb. 7) betrieben werden, die die Bearbeitung unterschiedlicher analytischer Fragestellungen erlauben (Johnson und Yost 1985, De Hoffmann 1996).

Scan-Modus	Symbol	Information
<i>Q1-/ Q3-Scan</i>		Molmasse
<i>Produktionen-</i>		Identifizierung & Strukturaufklärung
<i>Prekursorionen-</i>		Analytisches Screening
<i>Neutralverlust-</i>		Analytisches Screening
<i>Selected Reaction Monitoring SRM</i>		Quantitative Analytik

Abb. 7: Scantechniken eines Triple Quadrupol-Tandem-Massenspektrometers.

In einem **Q1-** oder **Q3-Scan** werden bei abgestellter Stoßgaszufuhr in Verbindung mit Elektrospray-Ionisierung Molekülonen wie $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ oder $[M-H]^-$ nachgewiesen; die Funktionsweise entspricht dabei der eines Single Quadrupol-Massenspektrometers.

Bei einem **Produktionen-Scan** (Tochterionen-Scan) wird in Q1 ein spezielles Molekülon als sogenanntes Prekursorion selektiert. Nach Stoßaktivierung im zweiten Quadrupol werden die entstandenen Produktionen im Q3 detektiert. Produktionenspektren stellen demnach Massenspektren ausgewählter Ionen dar und ermöglichen die Identifizierung und strukturelle Charakterisierung von Verbindungen.

Bei einem **Prekursorionen-Scan** (Elternionen-Scan) werden in Q1 alle Ionen erfasst, die nach Stoßaktivierung ein bestimmtes Fragmention abspalten. Dazu wird Q3 fest auf ein definiertes m/z -Verhältnis eingestellt und in Q1 ein breiterer Massenbereich gescannt. Experimente in diesem Modus erlauben Rückschlüsse auf die Entstehung von Ionen und Fragmentierungsmuster.

Werden Q1 und Q3 parallel mit einer konstanten Massendifferenz gescannt, so detektiert man dadurch die Abspaltung ungeladener Molekülbruchstücke; diese Betriebsart heißt deshalb **Neutralverlust-Scan**. Damit kann beispielsweise die Abspaltung von Wasser aus Alkoholen ($\Delta 18$ amu), von CO_2 aus Carboxylgruppen, CO aus Aldehyden oder auch HX aus Halogeniden erfasst werden. Auf diese Weise lassen sich aus komplexen Gemischen bestimmte Substanzklassen herausfiltern.

Beim „**Selected reaction monitoring**“ (SRM) oder „Multiple reaction monitoring“ (MRM) werden in Q1 Prekursorionen mit definiertem m/z -Verhältnis selektiert und ihre charakteristischen Produktionen ebenfalls durch ein festgelegtes m/z -Verhältnis exklusiv erfasst. Dieser Scan-Modus eignet sich in besonderem Maße zum selektiven und empfindlichen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Spurenverbindungen in komplexen Matrices, da eine positive Identifizierung die Detektion des eingestellten Ionenpaars zu einer bestimmten Retentionszeit erfordert. Falsch-positive Befunde werden zuverlässig ausgeschlossen und eine hohe Selektivität erreicht. Der zweidimensionale spektrale Filter eines SRM-Experimentes reduziert das chemische Rauschen exponentiell und führt zu einer hohen Empfindlichkeit. Ähnlich wie im SIM („selected ion monitoring“-)Modus lässt sich mit dem SRM-Modus eine schnelle und gezielte Analyse von Spurenkomponenten durchführen.

Ein Großteil der Arbeiten auf dem Gebiet der Elektrospray-Ionisierung wird im positiven Modus durchgeführt, d.h. es werden positive Ionen detektiert. Die Bildung von Ionen wird dabei durch den Zusatz geringer Mengen an Säure in das HPLC-Fließmittel zur Protonierung basischer Gruppen unterstützt. Im negativen Modus fördert man im Gegenzug die Deprotonierung saurer Gruppen und erfasst die negativ geladenen $[M-H]^-$ -Ionen. Die Fumonisine verfügen als Zwitterion sowohl über eine basische Aminogruppe als auch über vier Carboxylfunktionen in der Seitenkette, weshalb ihre Detektion grundsätzlich im positiven oder negativen Modus möglich ist.

1.3 Bedeutung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁) in thermisch behandelten Lebensmitteln

1.3.1 N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁)

Die Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatische Bräunung bezeichnet die komplexen Reaktionsfolgen, die bei der Umsetzung von Amino- mit Carbonylverbindungen ablaufen. Bei den Aminokomponenten kann es sich um Aminosäuren, Amine, Peptide und Proteine handeln, während als Carbonylverbindungen reduzierende Zucker, Aldehyde, Ketone und Ascorbinsäure in Frage kommen (Chuyen 1998). Bei der Maillard-Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern entsteht im ersten reversiblen Schritt durch nukleophile Addition der Aminofunktion an die Carbonylgruppe des Zuckers und anschließende Wasserabspaltung ein Imin (Schiff'sche Base), das zum entsprechenden Glykosylamin zyklisiert. Im Fall einer Aldose führt die protonenkatalysierte Umlagerung des primär entstandenen Aldosylamins über ein Enaminol-Intermediat zur stabileren 1-Amino-1-desoxyketose, dem Amadori Produkt. Im Fall einer Ketose führt die Umlagerung des primär entstandenen Ketosylamins zur Bildung des Heyns Produktes. Fumonisine besitzen ebenso wie die Aminosäuren eine primäre Aminogruppe, die ermöglicht, dass auch Fumonisine eine Maillard-ähnliche Reaktion mit reduzierenden Zuckern eingehen können. Bereits Murphy und Mitarbeiter sowie Lu und Mitarbeiter nahmen an, dass die nicht-enzymatische Bräunung eine Rolle bei der Inkubation von FB₁ mit Glucose oder Fructose spielt, charakterisierten jedoch keine Produkte (Lu et al. 1997, Murphy et al. 1995b). Erst Howard und Mitarbeitern gelang 1998 die Identifizierung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁) (Howard et al. 1998), das sie als Hauptreaktionsprodukt, das beim Erhitzen von FB₁ mit reduzierenden Zuckern entsteht, beschrieben. Über den Ablauf der Reaktion von FB₁ mit Glucose vermuteten sie, dass er dem Schema der Bildung einer Schiff'schen Base entspricht und dabei NCM-FB₁ aus dem oxidativen Abbau des Amadori Produktes hervorgeht (Abb. 8).

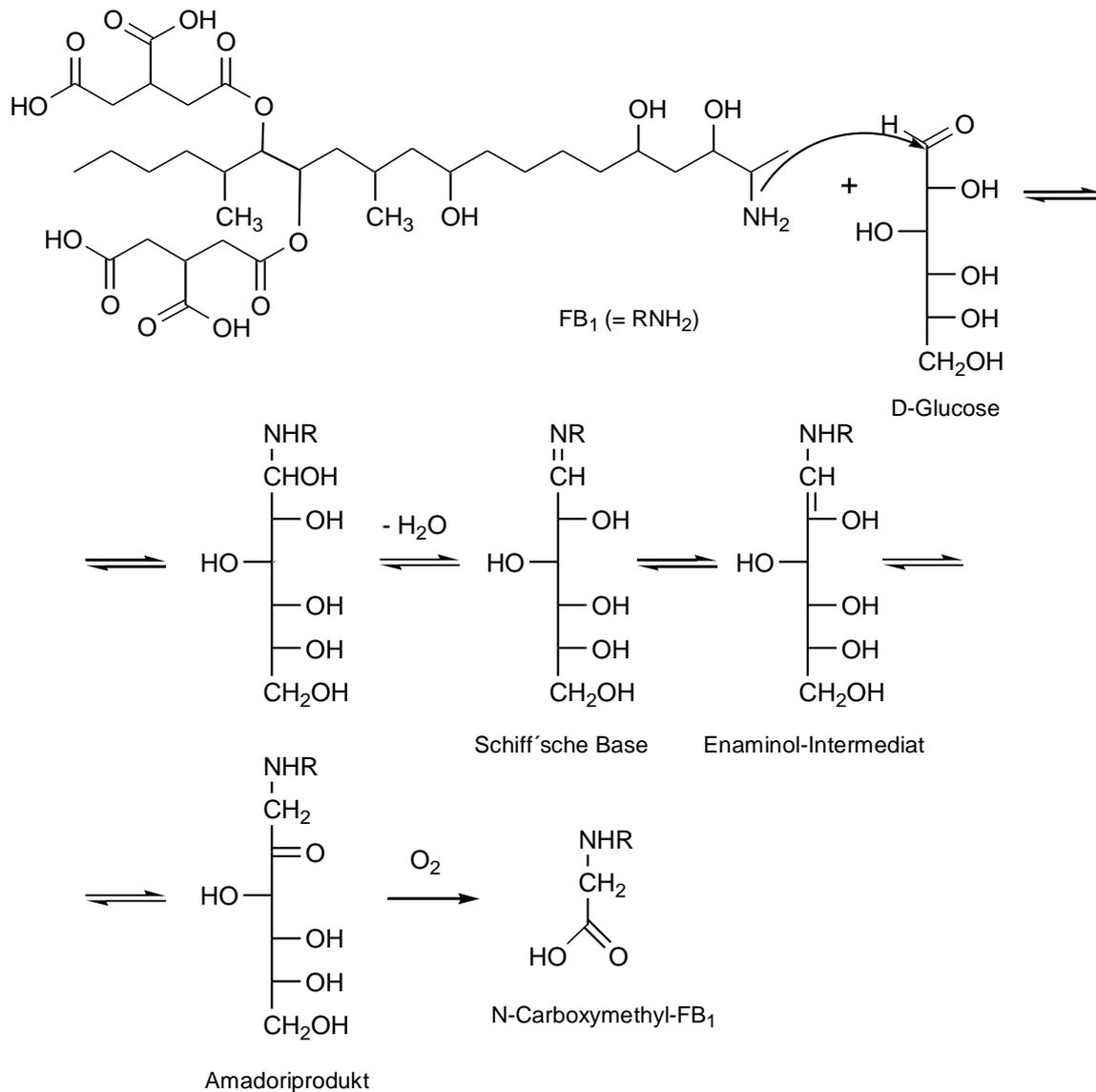


Abb. 8: Postulierter Reaktionsweg für die Bildung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ durch eine Maillard-ähnliche Reaktion von FB₁ mit D-Glucose (Howard et al. 1998).

Zur Toxikologie von NCM-FB₁ liegen bisher nur wenige Daten vor und es ist nicht bekannt, ob seine Entstehung die Toxizität von FB₁ vermindert oder verändert. Man geht jedoch davon aus, dass eine freie Aminogruppe für die Toxizität von Fumonisinen eine wichtige Rolle spielt. So konnten Norred und Mitarbeiter feststellen, dass N-acetyliertes

FB₁ im Gegensatz zu seinem Prekursor FB₁ nicht in der Lage ist, die Ceramidsynthase, ein Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus, zu hemmen (Norred et al. 1997). Frühere Studien über Struktur-Wirkungsbeziehungen der Fumonisine ergaben, dass in Bezug auf Karzinogenität und Zytotoxizität, die beiden N-Acylderivate von FB₁ und FB₂ ein geringeres toxisches Potenzial besitzen als FB₁ (Gelderblom et al. 1993). Bisher noch unbekannte Reaktionsprodukte aus FB₁ und Fructose führten im Tierversuch an Ratten zu keiner Veränderung der Leber (Lu et al. 1997), obwohl die FB₁-Fructose-Konjugate von Ratten in einem höheren Maße absorbiert werden als FB₁ selbst (Hopmans et al. 1997). Im Salinenkrebs („brine shrimp“)-Assay, erwies sich NCM-FB₁ zudem als 100 mal weniger wirksam als FB₁ (Hartl und Humpf 2000).

1.3.2 Problematik und Aufgabenstellung

Es ist allgemein bekannt, dass der Gehalt an FB₁ während der thermischen Behandlung im Herstellungsprozess von maishaltigen Lebensmitteln stark abnimmt. So berichteten unter anderem Scott und Lawrence (1994), dass die Konzentrationen an FB₁ und FB₂ während der Erhitzung von kontaminierten Maismehl bei einer Temperatur von 190°C um 60% gesenkt werden. Nach einer Erhitzung bei 220°C waren im Rahmen dieser Studie keine Fumonisine mehr nachweisbar. Auch Jackson und Mitarbeiter konnten beweisen, dass erhöhte Temperaturen sowie lange Erhitzungszeiten zu signifikanten Verlusten an FB₁ in maishaltigen Lebensmitteln führen und bemerkten außerdem, dass die Bildung von hydrolysiertem FB₁ (HFB₁) derart hohe Verluste nicht erklären kann (Jackson et al. 1997). Erst kürzlich konnten Katta und Mitarbeiter zeigen, dass bei der Herstellung sogenannter „Mais-Grits“ der Gehalt an FB₁ um bis zu 76% reduziert wird (Katta et al. 1999). Hingegen gelten Fumonisine beim Erhitzen in Lösung als relativ stabil (Jackson et al. 1996b). Erste Erklärungsversuche für das unterschiedliche Stabilitätsverhalten der Fumonisine in maishaltigen Matrices und in Pufferlösungen lieferte 1996 die Gruppe um Murphy (Murphy et al. 1995a). Sie vermutete, dass die nicht-enzymatische Bräunung von FB₁ für dessen hohe Verluste bei der Herstellung maishaltiger Produkte verantwortlich ist.

Das Verhalten von FB₁ bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln ist bis heute jedoch nicht geklärt. Howard und Mitarbeiter konnten die Bildung von NCM-FB₁ als Reaktion von FB₁ mit reduzierenden Zuckern im gepufferten Medium nachweisen und beschrieben damit zu diesem Zeitpunkt neben HFB₁ ein weiteres verarbeitungsbedingtes Reaktionsprodukt der Fumonisine (Howard et al. 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit die Erhitzung von FB₁ unter verschiedenen Bedingungen, wie sie bei der industriellen Herstellung von maishaltigen Lebensmittelprodukten Anwendung findet, die Bildung von NCM-FB₁ beeinflusst. Daneben sollte herausgefunden werden, ob die Bildung von NCM-FB₁ die bereits erwähnten Verluste an FB₁ bei der thermischen Behandlung von Maisprodukten erklären kann. Hierzu wurde eine Modellstudie an speziell angefertigten Heißextrudaten durchgeführt. Der sowohl mit hoher Temperatur als auch mit hohem Druck arbeitende Prozess der Heißextrusion wird meist auch als HTST(Hochtemperatur-Kurzzeit)-Extrusion bezeichnet. Dabei wird mit niedrigen Rohstofffeuchten (10-20%) sowie mit großen Scherkräften und Drücken gearbeitet, sodass das Produkt eine hohe Energieeinleitung erfährt. Die Extruder sind meist aus einer oder mehreren Schneckenwellen, die sich in einem eng anliegenden Gehäuse befinden, aufgebaut. Der am Anfang der Schnecke eingegebene Rohstoff (z.B. Maisgrieß) wird an deren Ende als Produkt durch eine Düse ausgepresst und evtl. geschnitten. Dazwischen wird die zu extrudierende Masse thermisch durch die Heizung des Gehäuses und mechanisch durch die Form und die Drehzahl der Schneckenwellen bearbeitet. Auf dem Gebiet der Lebensmittelproduktion zählt die Heißextrusion zu den am häufigsten angewendeten Extrusionsverfahren. Sie findet unter anderem Anwendung bei der Herstellung von direkt expandierten Snacks (Maisbällchen, Erdnussflips), Frühstückscerealien, Instant- und Paniermehlen, Flachbrot, Lakritze sowie von Stärkegelen für Suppen und Puddings. Extruder decken die Verfahrensschritte Mischen, Aufschließen, Kochen und Formen sowie Strukturieren und Sterilisieren ab und sind im Vergleich zu konventionellen Verfahren sehr kostengünstig. Aufgrund der geschilderten Eigenschaften der Extrudertechnik und des in den letzten Jahren stark expandierenden Marktes an Snackprodukten, gewinnt die Heißextrusion zunehmend an Bedeutung.

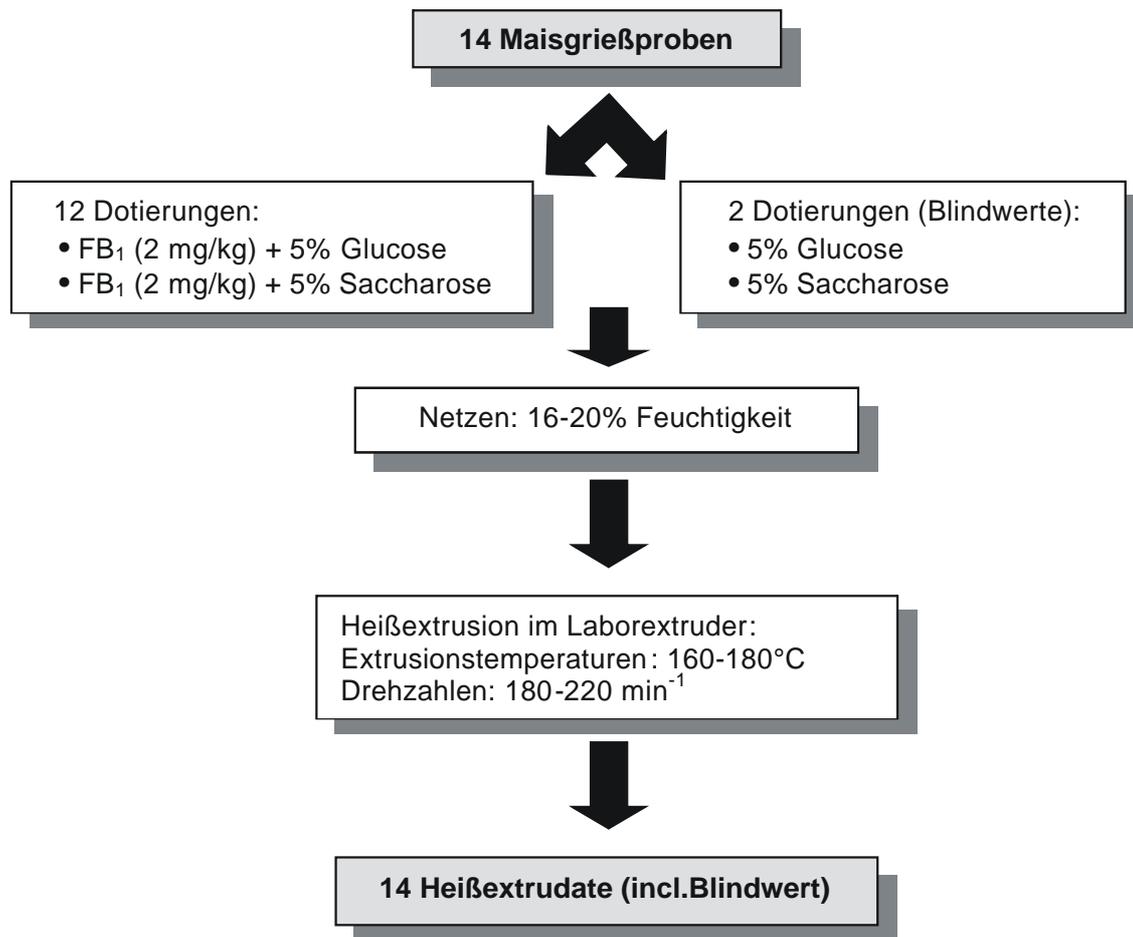


Abb. 9: Herstellung von Heißextrudaten aus Maisgrieß unter verschiedenen Extrusionsbedingungen.

Zur Herstellung der für die Modellstudie benötigten Heißextrudate wurden Maisgrießproben mit einer definierten Menge an FB_1 (2 mg/kg) und mit je 50 g/kg D-Glucose oder Saccharose versetzt (Abb.9). Die Proben wurden unter Einstellung eines bestimmten Feuchtigkeitsgehaltes (16-20%) benetzt und anschließend unter verschiedenen Extrusionsbedingungen zu Heißextrudaten verarbeitet. Dabei variierten die Temperaturen zwischen 160-180°C und die Drehzahlen der Extruderschnecke zwischen 180-220 min^{-1} . Daneben dienen Heißextrudate, die nur mit D-Glucose oder Saccharose (je 50 g/kg) vor

der Extrusion dotiert worden waren, als Blindproben (Abb. 9). Da die Heißextrudate unter Bedingungen hergestellt wurden, wie sie auch in der Lebensmittelindustrie zur Anwendung kommen, war es mit Hilfe dieser praxisnahen Studie möglich, die tatsächlichen Vorgänge und Reaktionen der Fumonisine in Handelsprodukten zu untersuchen. Die Konzentrationen an gebildetem NCM-FB₁ und HFB₁ sowie an verbleibendem FB₁ in den einzelnen Heißextrudaten, sollten mittels HPLC-MS bestimmt und anschließend verglichen werden. Hierzu war es zunächst notwendig eine geeignete Methode zu entwickeln, die den zuverlässigen, sensitiven und simultanen Nachweis der Analyten garantiert.

1.3.3 Massenspektrometrische Detektion von NCM-FB₁

Wie bereits unter Teil B Kapitel 5 diskutiert, ist eine Eignung der Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) für den qualitativen und quantitativen Nachweis von NCM-FB₁ naheliegend. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und auch andere Studien haben gezeigt, dass die Kombination von HPLC und MS ein sehr nützliches Werkzeug zum Nachweis von Fumonisinen darstellt (Lukacs et al. 1996, Hartl 2000, Hartl und Humpf 1999, Hartl et al. 1999, Doerge et al. 1994). Die Fumonisine FB₁, FB₂, FB₃ und HFB₁ werden dabei sehr gut im Elektrospray-Ionisationsprozess ionisiert, wobei hauptsächlich das Signal der protonierten Molekülonen [M+H]⁺ entsteht. Abbildung 10 (A) zeigt das typische Elektrospray-Massenspektrum von NCM-FB₁, mit einem [M+H]⁺-Signal bei einem *m/z*-Verhältnis von 780.

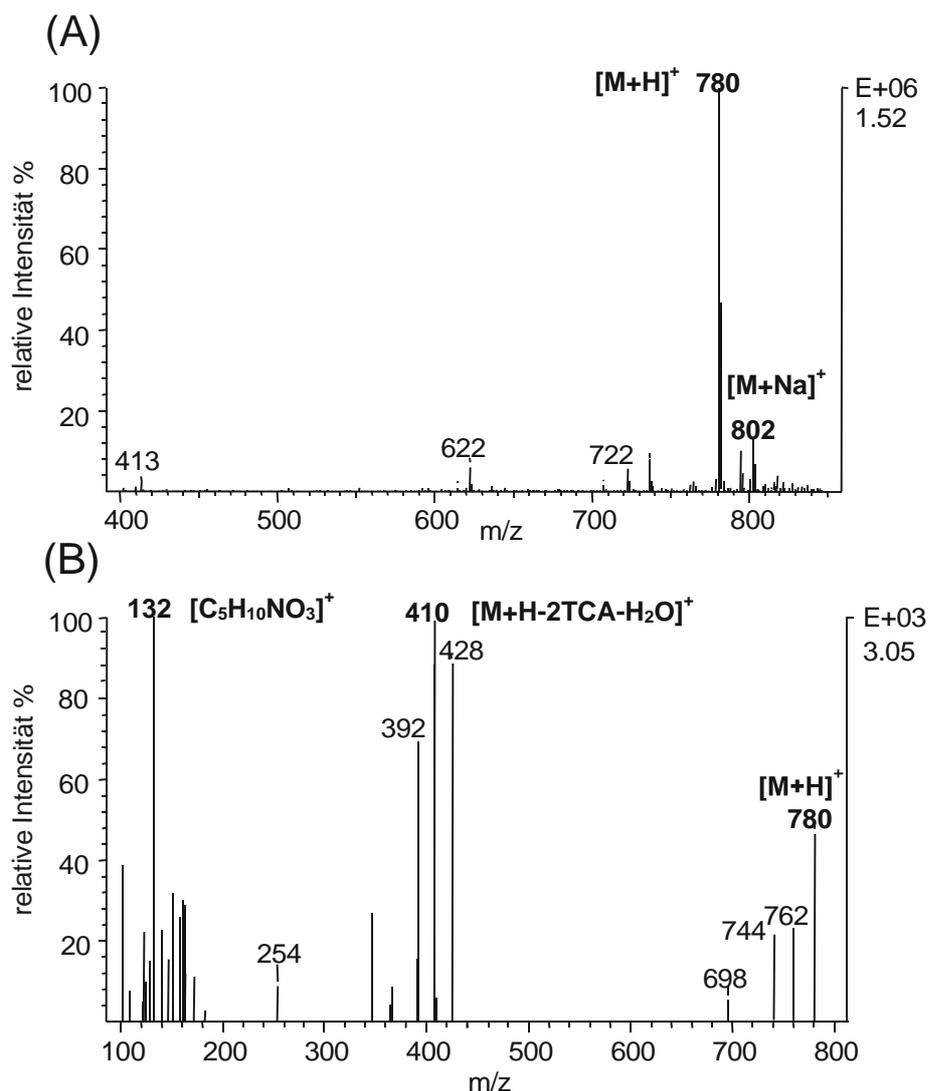


Abb. 10: (A) Elektrospray-Massenspektrum von NCM-FB₁ und dessen Produktionenspektrum (B) nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -35eV) im positiven Modus.

Daneben trat im Spektrum noch ein kleineres Signal bei m/z 802 auf, das dem $[M+Na]^+$ -Addukt entspricht. Es ist somit gezeigt worden, dass NCM-FB₁ im Elektrospray-Ionisationsprozess ein ähnliches Verhalten wie die anderen bereits mittels ESI-MS untersuchten Fumonisine aufweist. NCM-FB₁ ist damit ebenso für eine quantitative Bestimmung bei einer Detektion im positiven Modus geeignet. Das Produktionenspektrum,

das man durch die Kollision der Prekursorionen mit Argon als Stoßgas erhält, lieferte Signale bei m/z 428, 410 und 392 (Abb. 10 (B)). Die Signale gehen dabei auf einen sukzessiven Verlust von Wasser und den beiden Tricarbonsäure(TCA)-Seitenketten zurück. Des Weiteren trat ein intensives Signal bei m/z 132 auf, das einem Bruch des Kohlenstoffgerüsts zwischen C3 und C4 zugeordnet wurde. Trotz gleicher Intensität wurde jedoch das Signal bei m/z 410 aufgrund der höheren Masse und damit größeren Spezifität zu Experimenten im „selected reaction monitoring“(SRM)-Modus herangezogen.

1.3.4 Quantifizierung von NCM-FB₁ mittels HPLC-ESI-MS

Bei der quantitativen Analytik mittels Elektrospray-Massenspektrometrie treten vor allem bezüglich der Reproduzierbarkeit Probleme auf. Die ESI-MS-Technik ist zwar ein konzentrationsabhängiges Verfahren, jedoch hängt, wie bereits unter 1.2.2 erwähnt, die Signalintensität von verschiedenen Faktoren ab. Obwohl in den Chromatogrammen meist neben den Signalen der Analyten keine weiteren Signale zu sehen sind, enthalten Lebensmittelproben eine Vielzahl von Matrixbestandteilen, die als „background“-Elektrolyte [B⁺] (vgl. Teil C 1.2.2) die Ionisierung im Elektrospray-Interface stören und damit das Messergebnis beeinflussen. Eine wesentliche Rolle für die Ionenausbeute spielt neben dem Auftreten von koeluierenden Matrixkomponenten auch das im Interface herrschende Vakuum, welches wiederum durch die Fließmittelzusammensetzung, die Qualität des Sprays und vor allem durch den Niederschlag nicht-flüchtiger Kontaminanten in der beheizten Einlasskapillare beeinflusst wird und somit selbst innerhalb einer Analyse permanenten Schwankungen ausgesetzt ist (Herderich 1998). Für die quantitative Bestimmung von NCM-FB₁ wurde daher den Proben ein interner Standard zugesetzt. Hierfür wurde das sechsfach deuterierte Fumonisin B₁-D₆ (FB₁-D₆), das bereits bei der simultanen Bestimmung von FB₁ neben HFB₁ von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet wurde (Hartl 1999), verwendet. FB₁-D₆ ist ein biosynthetisiertes deuteriertes FB₁, das von *Fusarium verticillioides*-Kulturen unter Zusatz von L-Methionin-D₃

produziert und anschließend aus dem Kulturmedium isoliert worden war (Humpf 1998). Da Methionin die beiden Methylgruppen des Fumonisins lieferte, entstand ein sechsfach deuteriertes $\text{FB}_1\text{-D}_6$. Abbildung 11 zeigt die Struktur und das Elektrospray-Massenspektrum des Isotopenstandards $\text{FB}_1\text{-D}_6$.

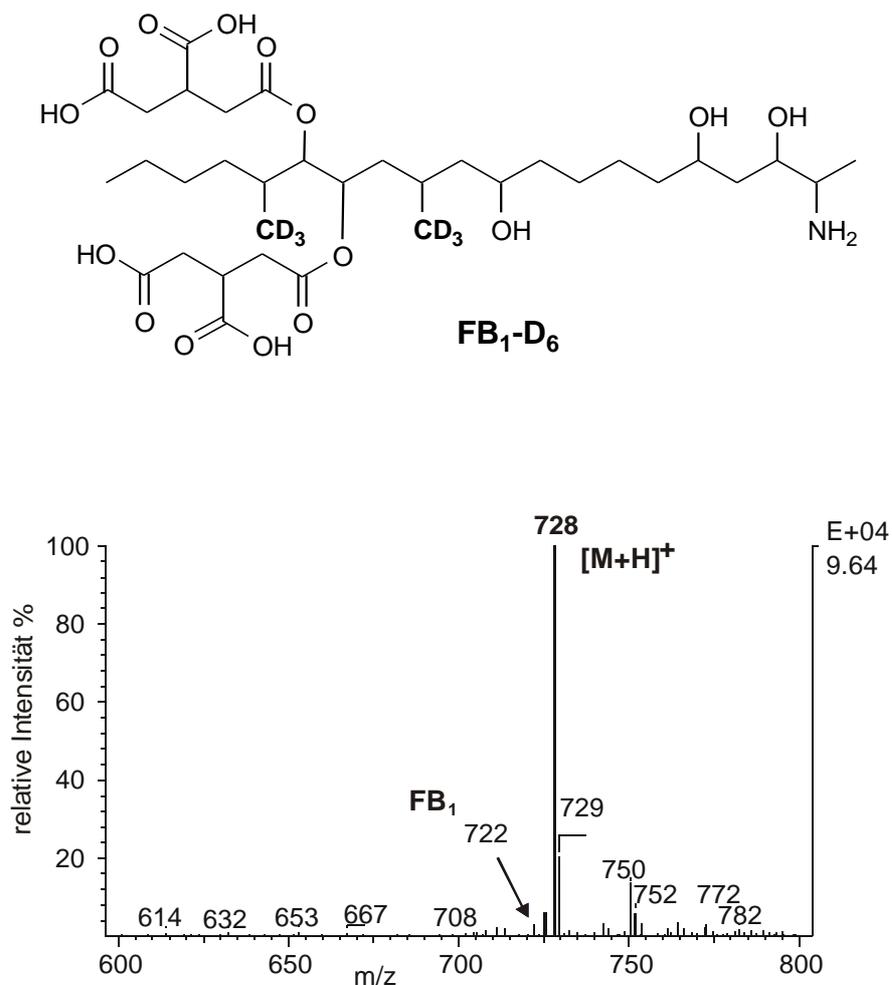


Abb. 11: Struktur und positives Elektrospray-Massenspektrum von Deuterium-markiertem FB_1 ($\text{FB}_1\text{-D}_6$).

Für den sensitiven Nachweis von Fumonisin B₁ und FB_2 in Lebensmittelproben wurde in vorhergehenden Arbeiten unter anderem ein SRM-Experiment erarbeitet (Lukacs et al. 1996). Das SRM-Experiment (vgl. 1.2.3) garantiert aufgrund der Tatsache, dass coeluerende und störende Matrixbestandteile von einer Detektion ausgeschlossen werden,

eine hohe Selektivität. Für eine positive Identifizierung der Analyte müssen das protonierte Molekülion und das dazugehörige Produktion bei der jeweiligen Retentionszeit an der HPLC vorliegen. Beim Nachweis von NCM-FB₁ wurde jedoch der SRM-Modus nur zur Bestätigung positiver Ergebnisse herangezogen. Die Quantifizierung erfolgte hingegen im „selected ion monitoring“ (SIM)-Modus. Dies war möglich, da die SIM-Methode die gleichen quantitativen Ergebnisse bei vergleichbarer Sensitivität lieferte wie die SRM-Methode. Die [M+H]⁺-Signale der Fumonisine liegen nämlich in einem Massenbereich, in dem nur wenige Störsignale auftreten. So wird trotz geringerer Selektivität ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht, das man normalerweise nur bei der Anwendung von SRM-Experimenten erzielt. Ein weiteres Kriterium für die Entwicklung eines SIM-Experiments war der Gedanke, eine Methode zu erarbeiten, die auch von Laboratorien angewendet werden kann, die - wie es derzeit meist der Fall ist - nur mit Single Quadrupol-Massenspektrometern ausgestattet sind. Für die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde das Verhältnis der Peakflächen von zugesetztem FB₁-D₆ zu NCM-FB₁ herangezogen. Um einen Zusammenhang zwischen dem Peakflächen- und Mengenverhältnis von NCM-FB₁ zu FB₁-D₆ zu ermitteln, wurde eine Systemkalibrierung durchgeführt.

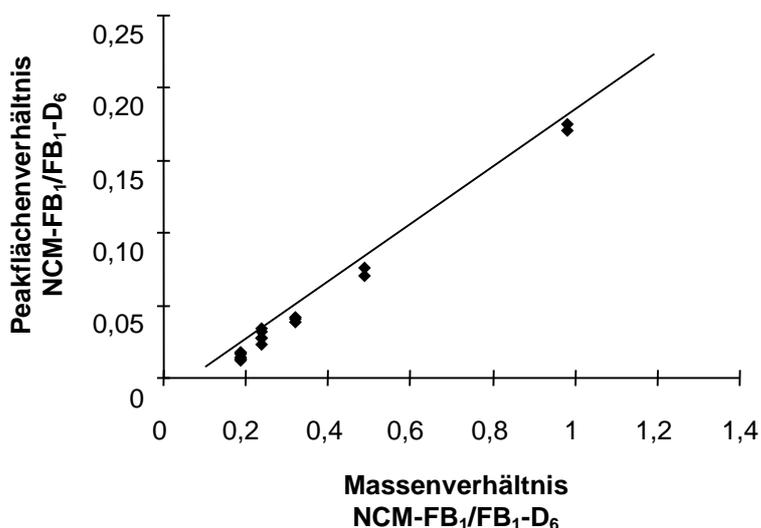


Abb. 12: Kalibrierfunktion für die Bestimmung von NCM-FB₁.

Für die Aufnahme der Kalibriergerade wurden unterschiedliche Mengen an Referenzlösungen von NCM-FB₁ und FB₁-D₆ in verschiedenen Massenverhältnissen (1:5, 1:4 ect. bis 1:1) gemischt und im SIM-Modus analysiert (siehe Teil D 3.4.1). Das resultierende Peakflächenverhältnis der Molekülonen m/z 780 und m/z 728 wurde anschließend gegen das Massenverhältnis aufgetragen. Abbildung 12 zeigt die resultierende lineare Funktion mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0.997$ und einem durchschnittlichen Responsfaktor von 5,38. Der relativ hohe Responsfaktor ist mit der Molekülstruktur von NCM-FB₁ zu begründen. Da die Aminogruppe hier in blockierter Form vorliegt, ist eine Ionisierung im Elektrospray-Ionisierungsprozess zwar möglich, jedoch erfolgt diese in einem geringen Umfang im Vergleich zu der von FB₁ oder FB₁-D₆. Zur Probenvorbereitung wurde eine Methode verwendet, die bereits von unserer Arbeitsgruppe zur Quantifizierung von HFB₁ neben FB₁ erfolgreich angewendet wurde (Hartl und Humpf 1999). Die Extraktion der Analyte erfolgte mit einer Mischung aus Acetonitril, Methanol und Wasser (25:25:50). Anschließend wurden die Extrakte über C18-Kartuschen aufgereinigt. Obwohl starke Anionenaustauscher (SAX-Material) eine größere Selektivität für NCM-FB₁ aufweisen, wurde zur Aufreinigung die weniger selektive C18-Festphase verwendet, da sie die gleichzeitige Isolierung von HFB₁ ermöglicht.

Die Trennung der Analyte erfolgte auf einer C18-HPLC-Säule. Da mit dem bisher von unserer Gruppe angewendeten Standardgradienten (Methanol/Wasser) keine zufriedenstellende Trennung der Fumonisine (Lukacs et al. 1996, Hartl et al. 1999, Hartl und Humpf 1999) erreicht werden konnte, wurde ein neuer Gradient (Acetonitril/Wasser) ausgearbeitet (siehe Teil D, Kapitel 2.1). Mit diesem wurde eine Basislinientrennung von NCM-FB₁ (6,81 min) und FB₁-D₆ (6,13 min) realisiert (Abb. 13).

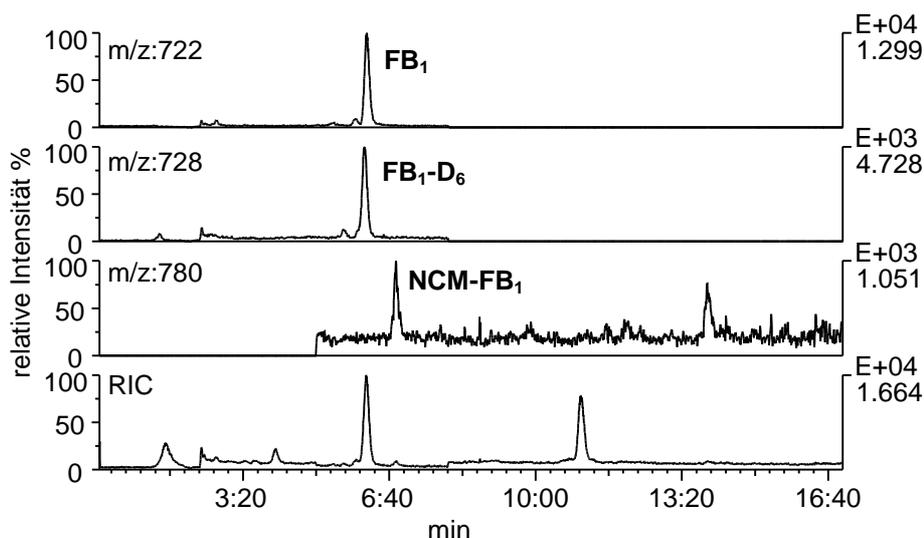


Abb. 13: HPLC-SIM-MS-Chromatogramm einer Heißextrudatprobe, die 45,9 ng/g NCM-FB₁ enthält. (SIM: „selected ion monitoring“, RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5µm), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200µl/min, SIM-Modus auf m/z 406 (HFB₁), 722 (FB₁), 728 (FB₁-D₆) und 780 (NCM-FB₁), (Methode 1, SIM-Experiment 1).

Neben der Aufnahme der Kalibrierfunktion wurde die Analysenmethode weiterhin durch die Ermittlung der Bestimmungsgrenze und der Wiederfindungsrate charakterisiert. Bei der Verwendung von Standardlösungen lag die Nachweisgrenze von NCM-FB₁ bei 400 pg. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze in Gegenwart von Matrix wurden Heißextrudatproben, die kein NCM-FB₁ enthielten mit definierten Mengen an NCM-FB₁ und FB₁-D₆ versetzt, anschließend aufgearbeitet und analysiert. Hierbei ist eine Nachweisgrenze von 10 ng/g NCM-FB₁ mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt worden. Bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate durch Aufsatzversuche, wiederum mit Heißextrudatproben, die kein NCM-FB₁ enthielten, lag der prozentuale Anteil an wiedergefundenem NCM-FB₁ zwischen 50 und 60%. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von SAX-Festphasen zu höheren Wiederfindungsraten führen würde, jedoch wäre mit deren Einsatz eine gleichzeitige Bestimmung von HFB₁ nicht möglich. Mit der erarbeiteten HPLC-Methode wurden im folgenden die bereits erwähnten Heißextrudate analysiert. Die Konzentrationen der

Fumonisine in den einzelnen Heißextrudaten sind in den Tabellen 1a und 1b wiedergegeben. Die Quantifizierung von FB₁ erfolgte dabei mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse, deren Prinzip in Kapitel 2 näher erläutert wird. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde eine für die Quantifizierung von FB₁ kalibrierte Methode aus früheren Arbeiten unserer Gruppe verwendet (Hartl 2000). Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus den Untersuchungen der glucosehaltigen Heißextrudate mit denen der saccharosehaltigen werden zwei Gemeinsamkeiten deutlich: Erstens weisen diejenigen Heißextrudate die höchsten Mengen an verbleibendem FB₁ auf, die bei der niedrigsten Temperatur verarbeitet wurden. Zweitens enthalten diejenigen Proben, die bei der höchsten Temperatur extrudiert wurden, auch die höchsten Konzentrationen an NCM-FB₁. Glucose und Saccharose wurden für die Studien aus dem Grund ausgewählt, da beide Zucker (i) bei der Lebensmittelherstellung (z.B. Cornflakes) eine Rolle spielen, und (ii) sich in ihrem Reaktionsverhalten gegenüber FB₁ unterscheiden: Während es sich bei Glucose um einen reduzierenden Zucker handelt, der in der Lage ist mit FB₁ eine Maillard-ähnliche Reaktion einzugehen, so ist hingegen Saccharose aufgrund der beiden blockierten anomeren C-Atome zu derartigen Reaktionen nicht befähigt. Dies konnten auch Howard und Mitarbeiter bestätigen indem sie zeigten, dass die Erhitzung von Saccharose mit FB₁ im gepufferten Medium zu keiner Bildung von NCM-FB₁ führt (Howard et al. 1998). Mit dem Einsatz von Glucose und Saccharose wurde so zusätzlich der Einfluss eines reduzierenden Zuckers auf das Stabilitätsverhalten von FB₁ und die Bildung von NCM-FB₁ während der Heißextrusion untersucht. In den Heißextrudaten, die mit Saccharose dotiert worden waren, wurde NCM-FB₁ (27,1 ng/g) nur in einer einzigen Probe nachgewiesen, die bei einer Temperatur von 180°C hergestellt wurde. Es ist davon auszugehen, dass bei derart hohen Temperaturen bereits Zersetzungsreaktionen von Saccharose sowie von höhermolekularen Polysacchariden, wie beispielsweise Stärke, eintreten. Sind die Bruchstücke in der Lage mit FB₁ in einer Maillard-ähnlichen Reaktion zu reagieren, kann dies zur Bildung von NCM-FB₁ führen. Im Gegensatz zu den saccharosehaltigen Heißextrudaten wurde hingegen NCM-FB₁ in allen glucosehaltigen Proben in Konzentrationen zwischen 29,6 und 96,8 ng/g nachgewiesen.

Tabelle 1a: Herstellungsparameter und Konzentrationen^a des gebildeten NCM-FB₁ und des verbleibenden FB₁ in Heißextrudaten aus Maisgrieß, die mit FB₁ (2 mg/kg) and Saccharose (50 g/kg) dotiert worden waren.

Probe	Feuchtigkeit %	Temperatur °C	FB ₁ ^b (ng/g)	NCM-FB ₁ ^c (ng/g)
1 ^d	18	170	26,0 ± 12,6	n.d. ^e
3	18	160	729,7 ± 9,6	n.d. ^e
5	16	170	522,3 ± 10,1	n.d. ^e
7	20	170	588,5 ± 6,5	n.d. ^e
9	18	170	563,9 ± 5,8	n.d. ^e
11	18	170	654,7 ± 12,3	n.d. ^e
13	18	180	501,8 ± 35,6	27,1 ± 4,8

Tabelle 1b: Herstellungsparameter und Konzentrationen^a des gebildeten NCM-FB₁ und des verbleibenden FB₁ in Heißextrudaten aus Maisgrieß, die mit FB₁ (2 mg/kg) and D-Glucose (50 g/kg) dotiert worden waren.

Probe	Feuchtigkeit %	Temperatur °C	FB ₁ ^b (ng/g)	NCM-FB ₁ ^c (ng/g)
2 ^d	18	170	11,0 ± 3,3	n.n. ^e
4	18	160	351,7 ± 9,1	45,9 ± 1,4
6	16	170	146,0 ± 4,5	44,7 ± 4,7
8	20	170	251,4 ± 13,6	88,6 ± 10,9
10	18	170	251,1 ± 15,6	53,4 ± 5,5
12	18	170	232,4 ± 9,6	29,6 ± 1,12
14	18	180	158,8 ± 16,3	96,8 ± 14,5

^a basiert auf Trockengewicht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± relative Standardabweichung aus 4 Bestimmungen dargestellt (doppelte Aufarbeitung und jeweils zweifache Injektion).

^b Quantifizierung und Auswertung nach Isotopenverdünnungsanalyse (Hartl 2000).

^c Quantifizierung von NCM-FB₁ mit FB₁-D₆ als interner Standard.

^d Blindprobe (Probe wurde nicht mit FB₁ dotiert).

^e nicht nachweisbar.

Obwohl aufgrund der hohen Kosten für die Herstellung von Heißextrudaten nur 14 Proben untersucht wurden, ist zu erkennen, dass der Versuchsparameter „Feuchtigkeit“ den Verlust von FB_1 und die Bildung von NCM- FB_1 beeinflusst. Vergleicht man alle Proben, die bei einer Temperatur von 170°C angefertigt wurden, so ist offensichtlich, dass diejenigen Proben, die auf den geringsten Feuchtigkeitsgehalt von 16% eingestellt wurden, die größten Verluste an FB_1 aufweisen. Innerhalb der glucosehaltigen Heißextrudate, die bei 170°C hergestellt wurden, enthält Probe 8 (20% Feuchtigkeit) die höchsten Konzentrationen an NCM- FB_1 (88,6 ng/g). Die Verwendung verschiedener Drehzahlen (180, 200 und 220 min^{-1}) bei der Extrusion zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Gehalte von FB_1 und NCM- FB_1 . Die Bildung von HFB₁ ist in keiner der Proben nachgewiesen worden, was mit den Ergebnissen früherer Arbeiten übereinstimmt, bei denen in Extruderprodukten keine bzw. nur sehr geringe Mengen (17,4 ng/g) an HFB₁ nachgewiesen werden konnten. Außerdem kann die fehlende Bildung von HFB₁ anhand früherer Untersuchungen zur Hitzestabilität von FB_1 erklärt werden. Es wurde nämlich gezeigt, dass zu einer merklichen Hydrolyse bei einer Temperatur von 150°C , Erhitzungszeiten von mehr als 40 Minuten nötig sind (Jackson et al. 1996a), die im Rahmen dieser Studie jedoch nicht erreicht wurden.

Zusätzlich zu den Heißextrudaten wurden maishaltige verarbeitete Lebensmittel vom regionalen Markt auf ihren Gehalt an FB_1 , HFB₁ und NCM- FB_1 untersucht. FB_1 und HFB₁ ist in allen Proben nachgewiesen worden. Die Konzentrationen der beiden Fumonisine FB_1 und HFB₁ reichten von 21,9 bis 194,0 ng/g für FB_1 und von 5,4 bis hin zu 246,5 ng/g für HFB₁. NCM- FB_1 hingegen war nur in sechs der zehn untersuchten Proben in relativ geringen Mengen (9,6 bis 76 ng/g) enthalten (Tab. 2).

Tabelle 2: Konzentrationen^a an FB₁, HFB₁ and NCM-FB₁ in verschiedenen maishaltigen verarbeiteten Lebensmitteln.

Probe	FB₁^b (ng/g)	HFB₁^c (ng/g)	NCM-FB₁^d (ng/g)
Tortillachips 1	21,9 ± 3,5	5,4 ± 0,8	n.n. ^e
Tortillachips 2	124,1 ± 4,8	165,6 ± 20,6	16,6 ± 4,5
Tortillachips 3	117,6 ± 5,5	246,5 ± 13,6	21,3 ± 7,8
Cornflakes 1	67,6 ± 6,3	56,1 ± 3,0	76,0 ± 0,8
Cornflakes 2	76,4 ± 4,4	102,0 ± 4,1	n.n. ^e
Cornflakes 3	45,5 ± 6,6	39,8 ± 5,8	n.n. ^e
Cornflakes 4	25,3 ± 2,9	79,6 ± 32,5	n.n. ^e
Nachochips 1	147,9 ± 6,8	15,5 ± 0,4	26,5 ± 4,8
Nachochips 2	194,0 ± 9,1	115,2 ± 3,7	18,3 ± 7,0
Nachochips 2	42,2 ± 2,6	60,3 ± 24,3	9,6 ± 1,0

^a Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± relative Standardabweichung aus 4 Bestimmungen dargestellt (doppelte Aufarbeitung und jeweils zweifache Injektion).

^b Quantifizierung und Auswertung nach Isotopenverdünnungsanalyse (Hartl 2000).

^c Quantifizierung von HFB₁ mit FB₁-D₆ als interner Standard Auswertung nach (Hartl 2000).

^d Quantifizierung von NCM-FB₁ mit FB₁-D₆ als interner Standard.

^e nicht nachweisbar.

1.3.5 Diskussion der Ergebnisse

Mit dem Einsatz der Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie gelang die Entwicklung einer empfindlichen Methode zum Nachweis von NCM-FB₁. Die exakte Quantifizierung wurde durch den Einsatz von deuteriertem Fumonisin FB₁ (FB₁-D₆) als interner Standard gewährleistet. Mit Hilfe der neuen Methode und den unter Praxisbedingungen angefertigten Heißextrudaten wurde die Bildung von NCM-FB₁ in Abhängigkeit von verschiedenen Extrusionsparametern untersucht. In Anlehnung daran können Rückschlüsse auf die Bedeutung von NCM-FB₁ in thermisch

behandelten Lebensmitteln gezogen werden. Abbildung 14 zeigt den prozentualen Anteil der nach Heißextrusion noch nachweisbaren Fumonisine bezogen auf die ursprüngliche Dotierung an FB_1 ($2 \text{ mg/kg} = 100\%$). Jeder Balken stellt dabei die Summe aus verbleibendem FB_1 und evtl. gebildetem NCM- FB_1 , (umgerechnet auf FB_1), dar (vgl. Tab. 1a und 1b). Der FB_1 -Gehalt nimmt nach der Heißextrusion in allen Proben stark ab. In den saccharosehaltigen Proben, in denen nahezu kein NCM- FB_1 detektiert werden konnte, wurden nur 23 bis 32% des zugesetzten FB_1 wiedergefunden. In den glucosehaltigen Proben lag der Anteil sogar nur bei 7 bis 15% und damit etwa bei der Hälfte der saccharosehaltigen Proben.

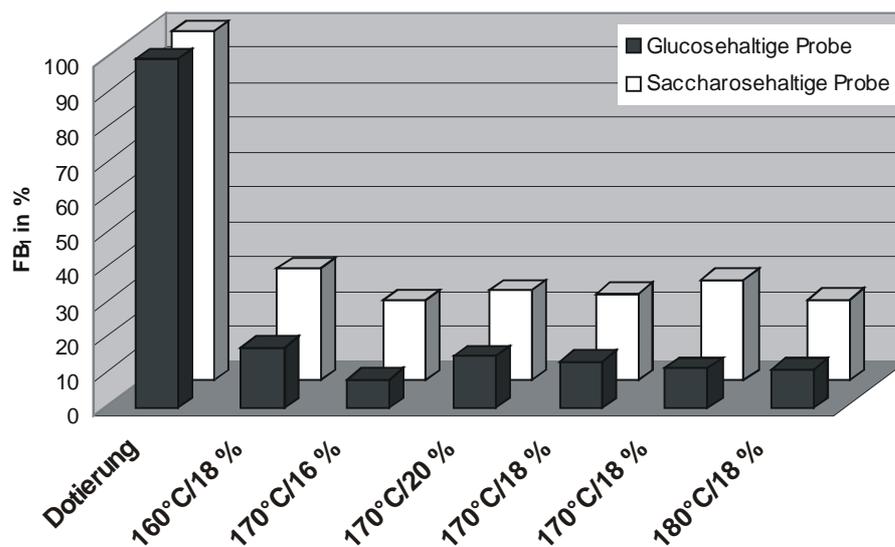


Abb. 14: Fumonisin FB_1 -Gehalt [%] (Summe aus FB_1 und NCM- FB_1 berechnet als FB_1) in Maisgrieß nach Heißextrusion in Abhängigkeit der Versuchsparameter. Ursprüngliche Dotierung: $2 \text{ mg/kg } FB_1$ (entspricht 100%)

Man kann der Graphik entnehmen, dass der Zusatz von Glucose (red. Zucker) den Gehalt an FB_1 während der Heißextrusion stärker beeinflusst, als der des nicht reduzierenden Zuckers Saccharose. Als Erklärung für die Diskrepanz zwischen den FB_1 -Gehalten in den saccharosehaltigen und glucosehaltigen Heißextrudaten ist - neben NCM- FB_1 - die Bildung weiterer Reaktionsprodukte aus FB_1 und Glucose denkbar. Ebenso ist anhand des Diagramms zu erkennen, dass die Bildung von NCM- FB_1 die hohen Verluste an FB_1 (70-90%) bei der Heißextrusion nicht erklären kann. Das große Defizit in der Bilanz lässt den Schluss zu, dass neben NCM- FB_1 , noch weitere Abbau- und Reaktionsprodukte bzw. „gebundene“ Formen an FB_1 vorliegen müssen. Dieser Fragestellung wurde im folgenden Kapitel nachgegangen. Zusammenfassend kann (1) aufgrund der geringen Toxizität von NCM- FB_1 , (2) der Modellstudie an den Heißextrudaten (max. 97 ng/g NCM- FB_1), sowie (3) anhand der Untersuchungen einiger maishaltiger Lebensmittel (max. 76 ng/g NCM- FB_1), die Bedeutung von NCM- FB_1 in Lebensmitteln als gering eingestuft werden.

1.4 Nachweis und Charakterisierung neuer Fumonisin B_1 -Konjugate

Wie in Abbildung 14 dargestellt, führt die Heißextrusion von FB_1 -dotiertem Maisgrieß zu hohen Verlusten an FB_1 (bis zu 90%), die nicht durch die Bildung von NCM- FB_1 oder HFB₁ erklärt werden können. Um das drastische „Verschwinden“ von FB_1 aufzuklären, wurden daher Modellumsetzungen mit Sacchariden und Aminosäurederivaten durchgeführt. Mit ihrer Hilfe sollte das Verhalten von Fumonisin gegenüber den beiden zugesetzten Zuckern D-Glucose und Saccharose sowie gegenüber den Hauptmatrixbestandteilen der Extrudate, nämlich den Polysacchariden (Stärke) sowie den Proteinen, während der thermischen Behandlung genauer untersucht werden.

1.4.1 Modellumsetzungen von Fumonisin B₁ mit D-Glucose

Mit der Identifizierung von NCM-FB₁ gelang 1998 Howard und Mitarbeitern erstmals der Beweis, dass Fumonisin B₁, durch das Vorhandensein einer primären Aminogruppe in der Lage ist, Maillard-ähnliche Reaktionen mit reduzierenden Zuckern einzugehen (Howard et al. 1998). Dabei wurde NCM-FB₁ als das Hauptprodukt beschrieben, das bei der Erhitzung von FB₁ mit reduzierenden Zuckern im wässrigen Milieu entsteht. Für die Bildung von NCM-FB₁ wurde der in Abbildung 8 dargestellte Bildungsweg postuliert, jedoch konnten zu dieser Zeit keine Intermediate nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt einen deutlichen Unterschied in der Bilanz zwischen saccharosehaltigen und glucosehaltigen Heißextrudaten auf. Da sich diese beiden Arten von Heißextrudaten in erster Linie durch das Vorkommen eines reduzierenden (D-Glucose) bzw. nichtreduzierenden (Saccharose) Zuckers unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass die Diskrepanz im FB₁-Gehalt zwischen beiden Heißextrudaten durch die Bildung weiterer Maillard-ähnlicher Produkte aus FB₁ und D-Glucose erklärt werden kann. Ziel der Modellumsetzungen war es daher, Zwischenverbindungen auf dem Bildungsweg von NCM-FB₁ nachzuweisen und zu charakterisieren. Hierzu wurde D-Glucose mit FB₁ sowie HFB₁ im trockenen Milieu bei 160°C 3 Minuten lang erhitzt. Auf Lösungsmittel wurde bewusst verzichtet, da die Modellstudie sich an den Bedingungen der Lebensmittelverarbeitung orientieren sollte. HFB₁ wurde eingesetzt, um eine mögliche Reaktion der beiden Tricarbonsäure(TCA)-Seitenketten mit D-Glucose ausschließen zu können. Die Reaktionsmischungen wurden nach dem Erhitzen in Lösungsmittel aufgenommen und mittels HPLC-MS/MS untersucht. Abbildung 15 zeigt das HPLC-ESI-MS Chromatogramm der Reaktionsmischung aus FB₁ und D-Glucose. Neben den beiden bekannten *m/z*-Signalen von FB₁ (*m/z* 722) und NCM-FB₁ (*m/z* =780), traten weitere intensive Signale bei einem *m/z*-Verhältnis von 884 auf.

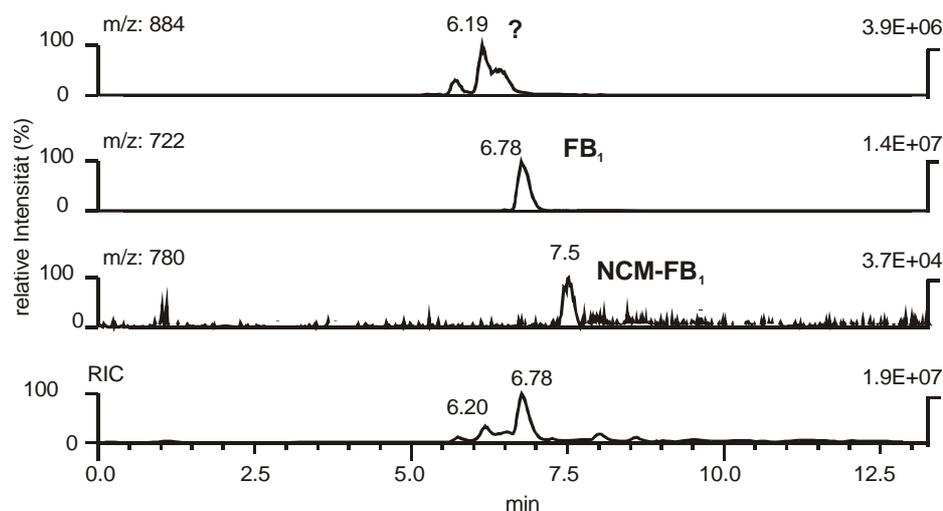


Abb. 15: HPLC-MS-Chromatogramm der durch die Erhitzung von FB_1 mit D-Glucose (160°C , 3min) entstandenen Reaktionsmischung (RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5 μm), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, Scan-Modus mit Scanbereich m/z 300-1000, (Methode 1).

Die unbekannt Komponenten wurden mit Hilfe der Tandem-Massenspektromie charakterisiert. Dabei lieferten alle Signale bei m/z 884 ein ähnliches Produktionenspektrum mit einem Signal bei m/z 334, das charakteristisch für die Fragmentierung von Fumonisin ist und normalerweise auf eine Abspaltung der beiden TCA-Reste sowie von zwei Wassermolekülen vom ursprünglichen Fumonisinmolekül zurückzuführen ist. Aufgrund dieses Fragmentes musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei den unbekannt Verbindungen um Moleküle handelt, die unter anderem FB_1 als Baustein tragen. Das Auftreten mehrere Verbindungen gleicher Masse aber unterschiedlicher Retentionzeiten wurde aufgrund der Ähnlichkeit der Produktionenspektren durch die Bildung von Isomeren erklärt. In Abbildung 16 ist das Produktionenspektrum des ersten Signals in der Ionenspur von m/z 884 dargestellt. Das Produktionenspektrum des folgenden breiteren Signals, wies ein vergleichbares Fragmentierungsmuster auf. Die Breite dieses Signals ließ annehmen, dass es sich bei dem detektierten Signal um mehrere Verbindungen handelt, die dicht nacheinander eluieren.

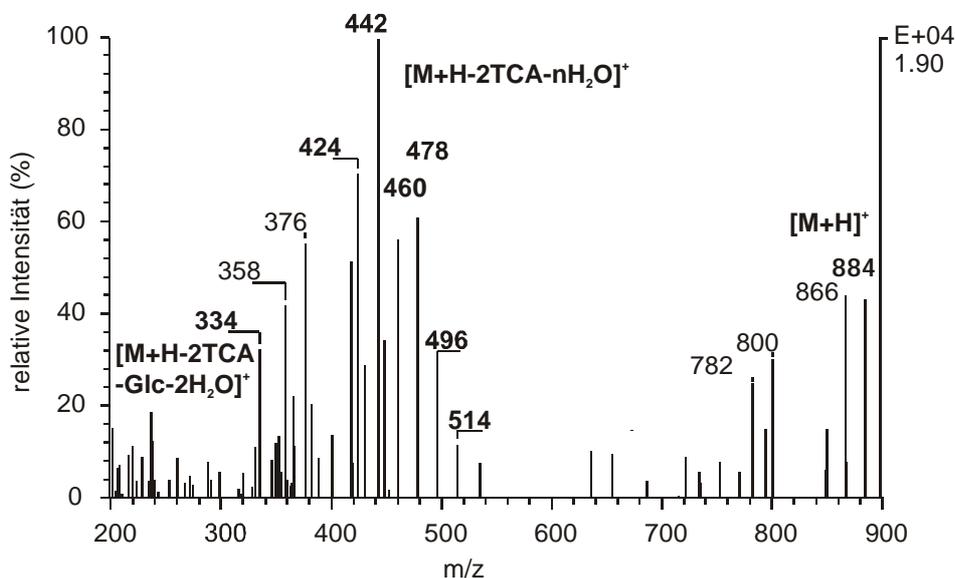


Abb. 16: Charakteristisches Produktionenspektrum der Verbindungen mit m/z 884 (Erhitzungsprodukt aus FB_1 und D-Glucose) nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -40eV) im positiven Modus.

Geht man davon aus, dass es sich bei den Signalen bei m/z 884 um das $[M+H]^+$ -Signal des Amadori Produktes handelt, das aus der nukleophilen Addition der Aminofunktion von FB_1 an die Carbonylgruppe des Zuckers und anschließender Wasserabspaltung entsteht, so lassen sich die Fragmentationen bei m/z 514, 496, 478, 460, 442 und 424 durch eine Abspaltung der beiden TCA-Seitenketten sowie von 1 bis 6 Molekülen Wasser erklären. Die Annahme wurde zusätzlich durch die Tatsache verstärkt, dass mindestens zwei Verbindungen mit gleichen Produktionenspektren detektiert wurden, die offensichtlich Isomere einer Verbindung darstellen. Das Auftreten mehrerer Verbindungen ist durch ein Verhalten erklärbar, das bereits aus der Maillardreaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern bekannt ist: Der Zuckerrest des Amadori Produktes kann zum einen offenkettig vorliegen aber auch zur Pyranose- bzw. Furanose-Form zyklisieren, wobei jeweils ein α - und ein β -Zustand existiert. Die Pyranose-Form ist in wässriger

Lösung dominant. Die offenkettige Form liegt hingegen nur in geringen Mengen vor und ist daher nur schwer nachweisbar (Röper et al. 1983, Mossine et al. 1994).

Der Verdacht, dass es sich bei den beschriebenen Komponenten um Maillard-ähnliche Verbindungen handelt, wurde zusätzlich durch die massenspektrometrische Analyse eines Reaktionsgemisches, das durch die Erhitzung (160°C, 3min) von HFB₁ mit D-Glucose entstand, verstärkt. Hier waren Signale, in der Ionenspur von m/z 568 zu detektieren, die wiederum identische Produktionenspektren lieferten. Die Masse m/z 568 entspricht dem entsprechenden Amadori Produkt aus HFB₁ und D-Glucose. In den Produktionenspektren traten wiederum zahlreiche Fragmente auf, die auf eine Abspaltung von Wassermolekülen vom Molekülion hindeuteten (Abb. 17). Daneben wurden Signale bei m/z 334, 352 und 316 als charakteristische Ionen einer Fumonisinfragmentierung detektiert. Da HFB₁ keine TCA-Seitenketten mehr besitzt und damit nicht mehr zu Reaktionen über diese befähigt ist, gilt die Bildung der Verbindungen mit m/z 568 als weiteres Indiz für die Bindung von D-Glucose über die Aminogruppe der Fumonisine.

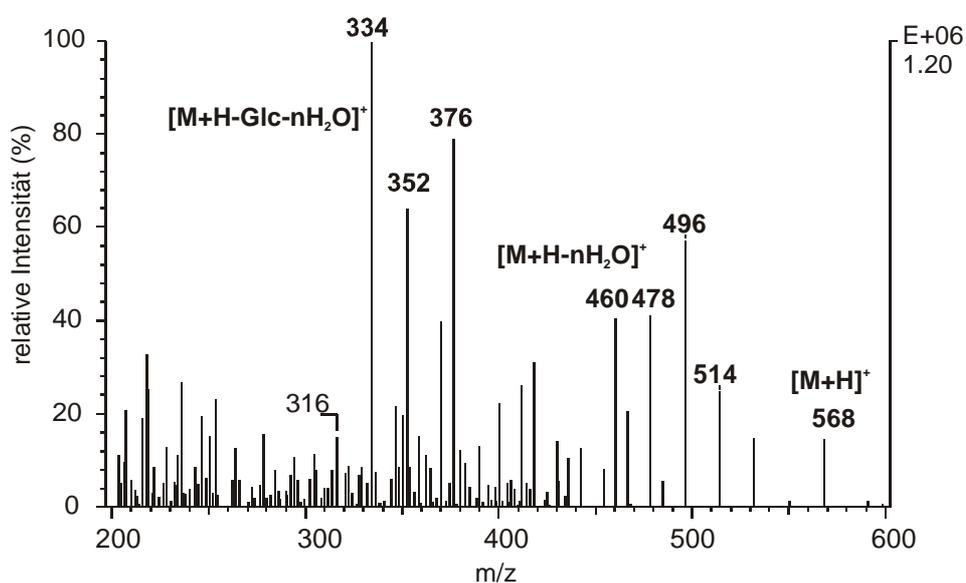


Abb. 17: Charakteristisches Produktionenspektrum der Verbindungen mit m/z 568 (Erhitzungsprodukt aus HFB₁ und D-Glucose) nach Stoßaktivierung des protonierten Molekülions mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -40eV) im positiven Modus.

Gleichzeitig mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen massenspektrometrischen Charakterisierung der Verbindung bei m/z 884 wurden von Poling und Mitarbeitern Verbindungen nachgewiesen, die nach der Inkubation von D-Glucose mit FB_1 bei 60°C in Methanol auftraten und die ebenfalls ein m/z -Verhältnis von 884 aufwiesen (Poling et al. 2002). Die Verbindungen wurden als Amadori Produkte, die aus der Reaktion von FB_1 mit D-Glucose hervorgehen, identifiziert und unter dem Namen N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B_1 zusammengefasst. Wie bereits oben diskutiert, führt die unterschiedliche Zyklisierung des Zuckerrestes zur Bildung von Isomeren. Ein Vergleich der Kernresonanz(NMR)-spektroskopischen Daten erbrachte den eindeutigen Beweis, dass es sich, wie bereits aufgrund der massenspektrometrischen Daten vermutet, auch bei den hier detektierten Verbindungen bei m/z 884 um N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B_1 handelt (Abb. 18). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Amadori Produkte aus der Reaktion von FB_1 und D-Glucose zeitgleich von unserer Arbeitsgruppe und von Poling und Mitarbeitern (2002) mittels spektroskopischer Techniken identifiziert wurden.

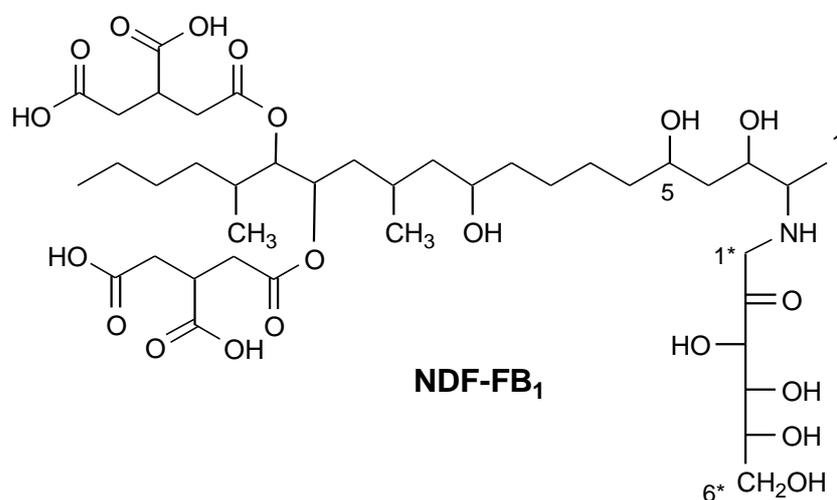


Abb. 18: Strukturformel von N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B_1 (NDF-FB₁; offenkettige Form).

1.4.1.1 Nachweis von N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B₁ in Heißextrudaten

Um festzustellen, ob N-(1-Deoxy-D-fructosyl)-FB₁ (NDF-FB₁) auch während der Heißextrusion von Maisgrieß gebildet werden kann und damit für die Lebensmittelverarbeitung von Bedeutung ist, wurden je zwei der bereits zur Quantifizierung von NCM-FB₁ herangezogenen glucosehaltigen und saccharosehaltigen Heißextrudatproben untersucht.

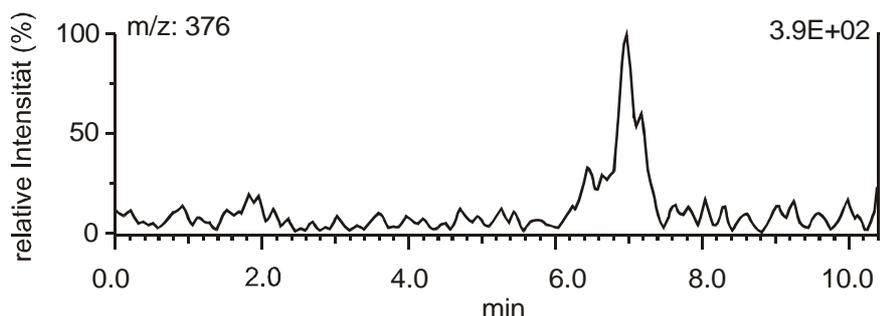


Abb. 19: Selected Reaction Monitoring (SRM)-Chromatogramm einer glucosehaltigen Heißextrudatprobe (Probe 8).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5µm), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200µl/min, SRM m/z 884 → m/z 376, (Methode 1, SRM-Experiment 1).

NDF-FB₁ wurde dabei unter Anwendung des „selected reaction monitoring“ (SRM)-Modus (vgl. 1.2.3) in den beiden glucosehaltigen Heißextrudaten, sowie in einem der beiden saccharosehaltigen Heißextrudate nachgewiesen (Tab. 3). Als charakteristisches Fragmentation (vgl. Produktionenspektrum Abb. 16) diente das Signal bei m/z 376 (Abb. 19). Somit wurde gezeigt, dass NDF-FB₁ während der Heißextrusion gebildet wird und somit von einer Belastung maishaltiger Lebensmittel mit NDF-FB₁ ausgegangen werden muss. Bereits die Tatsache, dass NDF-FB₁ nur in drei der vier untersuchten Heißextrudate nachgewiesen wurde, macht deutlich, dass auch diese Verbindung die hohen Verluste an FB₁ während der Heißextrusion nicht erklären kann. Aufgrund der geringen Signalintensitäten wurde auf eine weitere Quantifizierung verzichtet.

Tabelle 3: Nachweis von N-(1-Deoxy-D-fructosyl)-FB₁ in ausgewählten Heißextrudaten mittels SRM.

Heißextrudat- probe	SRM
8 (glucosehaltig)	+
10 (glucosehaltig)	+
7 (saccharosehaltig)	-
13 (saccharosehaltig)	+

1.4.2 Modellumsetzungen von Fumonisin B₁ mit „Polysaccharid- und Proteinbausteinen“ und mit Saccharose

Neben der primären Aminogruppe besitzen Fumonisine zwei TCA-Seitenketten als funktionelle Gruppen, mit deren Hilfe eine Bindung an Matrixkomponenten wie Polysacchariden oder Proteinen möglich ist. Dies konnte anhand der im Folgenden beschriebenen Modellversuche belegt werden. Erste Hinweise für die kovalente Bindung von FB₁ an Matrixbestandteile erhielten bereits Shier und Mitarbeiter (Shier et al. 1998). Nach der Erhitzung von Tritium-markiertem [³H]FB₁ mit Maismehl konnte kein Toxin mehr aus dem Maismehl extrahiert werden. Hingegen führte die alkalische Behandlung des Mehls zu einer Freisetzung großer Mengen an hydrolysiertem [³H]FB₁. Nach einer genaueren Untersuchung stellte man fest, dass nur ein kleiner Bruchteil des [³H]FB₁ zu mehr polarerer Verbindungen umgesetzt worden war, wie sie nach einer Maillard-ähnlichen Reaktion von FB₁ mit Stärke oder deren Abbauprodukten zu erwarten wären. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Teil des radioaktiv markierten FB₁ an Protein und an Stärke gebunden vorliegen muss. Es wurde jedoch vermutet, dass die Bindung von FB₁ an Stärke und Protein unter Temperatureinfluss über die TCA-Seitenketten erfolgt (Abb. 20). Für die Art der Bindung konnten jedoch keine Beweise erbracht werden. Als Mechanismus wurde zunächst die Bildung eines reaktiven Anhydrids unter Abspaltung von einem

Molekül Wasser vorgeschlagen, das anschließend mit den freien funktionellen Gruppen von Stärke (Hydroxygruppen) und Proteinen (z.B. Hydroxy-, Amino-, oder Thiolgruppen) unter der Bildung ester- und amidartiger Verbindungen reagiert.

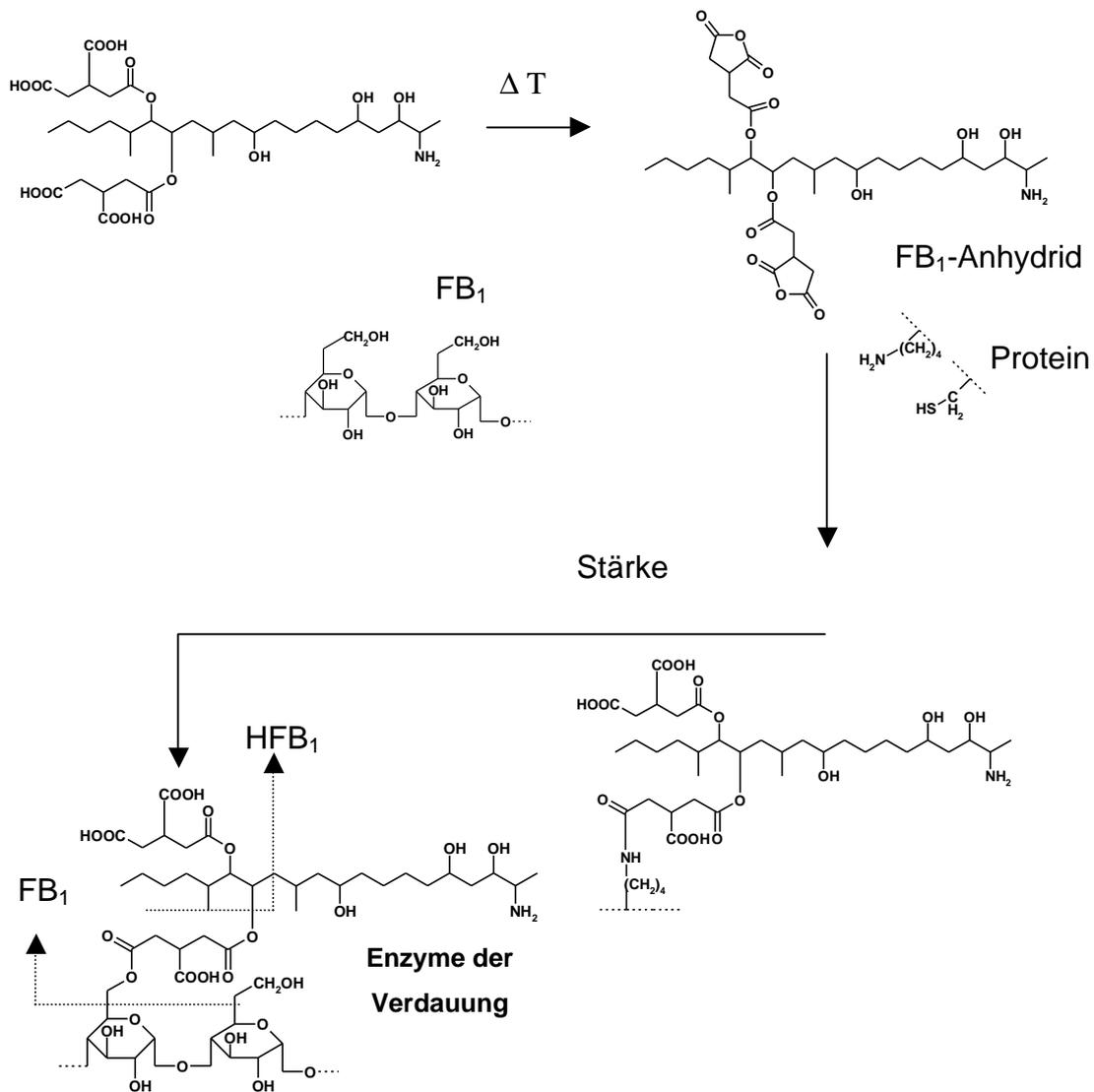


Abb. 20: Postulierter Reaktionsweg für die Bindung von FB₁ an Stärke und Protein unter Temperatureinfluss und die erneute Freisetzung als HFB₁ oder FB₁ im Gastro-Intestinal-Trakt (Shier et al. 1998).

Um mehr Informationen über das Bindungsverhalten von FB₁ gegenüber Polysacchariden und Proteinen zu erhalten wurden Modellreaktionen durchgeführt. Als „Stärkemodell“ wurde Methyl- α -D-glucopyranosid (Abb. 21) verwendet. Ähnlich wie bei Stärke liegt auch in dieser Verbindung das anomere C-Atom der Glucose in blockierter Form vor und ist damit nicht reaktionsfähig.

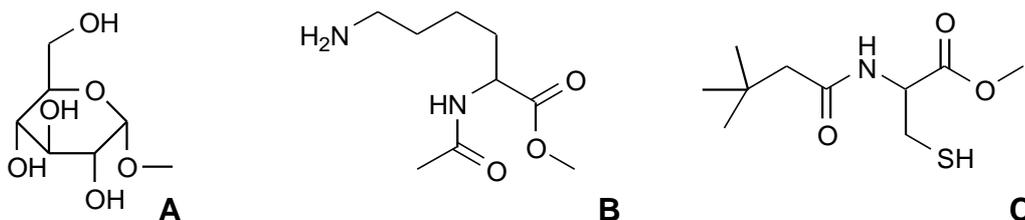


Abb. 21: Strukturformeln von Methyl- α -D-glucopyranosid (A), N- α -Acetyl-L-lysinmethylester (B) und BOC-L-Cysteinmethylester (C).

Als „Proteinmodell“ dienten die beiden Aminosäurederivate N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und der *tert.*-Butyloxycarbonyl(BOC)-geschützte L-Cysteinmethylester (Abb. 21). Bei beiden Derivaten liegen die α -Aminogruppen sowie die Carboxylgruppen, ähnlich wie bei der Einbindung in ein Protein, in geschützter Form vor und sind daher nicht in der Lage Reaktionen über diese einzugehen. Eine Bindung an Fumonisine ist – analog wie bei Proteinen – nur über die Seitenketten möglich (NH₂- und SH-Gruppe). Für die Studie wurden die genannten Verbindungen mit FB₁ wiederum trocken erhitzt und die Reaktionsmischung anschließend in Lösungsmittel aufgenommen und mittels HPLC-MS untersucht. Zusätzlich wurden Modellstudien mit Saccharose durchgeführt.

1.4.2.1 Erhitzung von FB₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid

Die trockene Erhitzung (150°C, 40 min) von Methyl- α -D-glucopyranosid mit FB₁ führte zur Bildung einer Verbindung mit einem Masse-Ladungsverhältnis von m/z 1074 (Abb. 22).

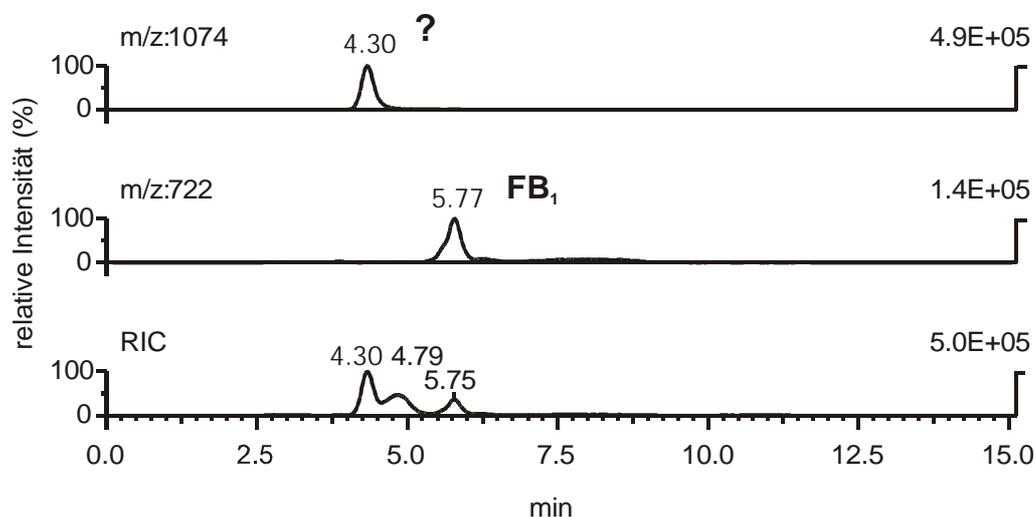


Abb. 22: HPLC-MS-Chromatogramm der durch die Erhitzung von FB₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid (150°C, 40 min) entstandenen Reaktionsmischung (RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters X-Terra C18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200 μ l/min, Scan-Modus mit Scanbereich m/z 400-1200, (Methode 1).

Rein rechnerisch betrachtet, entspricht dieses Masse-Ladungs-Verhältnis der protonierten Form ($[M+H]^+$ -Signal) einer Verbindung, die sich aus einem Molekül FB₁ und 2 Molekülen Methyl- α -D-glucopyranosid unter Verlust von zwei Molekülen Wasser zusammensetzt. Das Produktionenspektrum (Abb. 23) der unbekanntenen Verbindung wies mit m/z 352 und 334 zwei Signale auf, die charakteristisch für die Fragmentierung von Fumonisin sind und bestätigte somit die Beteiligung von FB₁ an der Molekülstruktur.

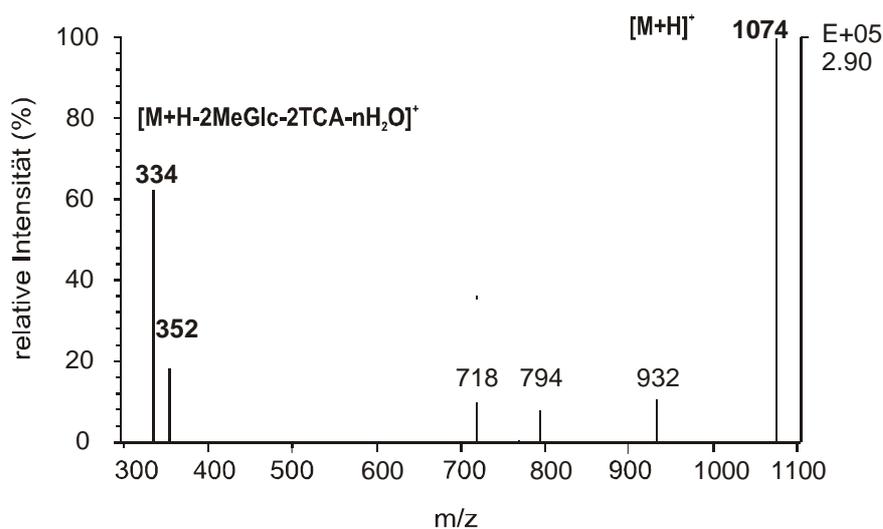


Abb. 23: Produktionenspektrum der unbekanntes Verbindung (Erhitzungsprodukt aus Methyl- α -D-glucopyranosid und FB₁) mit m/z 1074 nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -50eV) im positiven Modus.

Um nachzuweisen, dass die Bindung der beiden Moleküle Methyl- α -D-glucopyranosid unter thermischen Einfluss über die beiden TCA-Seitenketten von FB₁ erfolgt, wurde in einer zweiten Studie Methyl- α -D-glucopyranosid mit einem FB₁-Derivat erhitzt, in dem die Hydroxylgruppen des FB₁-Rückgrates sowie die Aminogruppe in acetylierter Form vorliegen. Bei der Acetylierung von FB₁ entstehen aus den beiden TCA-Seitenketten zwei an das FB₁-Grundgerüst gebundene Anhydride, die jedoch mit Hilfe von Wasser erneut freigesetzt werden können. Sowohl das acetylierte FB₁-Anhydrid, als auch dessen „freie Form“, führten nach der Erhitzung zur Bildung einer Verbindung mit m/z 1242. Dabei lieferte vor allem die Erhitzung (150°C, 40 min) von Methyl- α -D-glucopyranosid mit dem acetylierten FB₁-Anhydrid hohe Umsetzungsraten, die fast zur ausschließlichen Bildung des Produktes bei m/z 1242 führten. Nach Aufreinigung dieses Reaktionsgemisches über eine C18-Festphase wurde die Verbindung anhand von 1D und 2D NMR-Experimenten als der Diester zwischen FB₁ und zwei Molekülen Methyl- α -D-glucopyranosid identifiziert (Abb. 24). Als Bindungsstelle wurden die Positionen 5' und 5'' für FB₁ und die Positionen 6* für die beiden Moleküle Methyl- α -D-glucopyranosid, aufgrund intensiver HMBC

(Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity)-Korrelationen zwischen den Protonen H-6* (δ 4,2 bis 4,4 ppm) und der C-Atome C-5'/5'' (δ 173,4 ppm) des FB₁-Derivates ermittelt. Des Weiteren wurden die ¹³C-Spektren von FB₁, Methyl- α -D-glucopyranosid und der neuen Verbindung mit m/z 1242 miteinander verglichen. Es ließ sich eine leichte Hochfeldverschiebung der C-Atome C-4'/4'' von δ 37,78/37,51 ppm nach δ 36,64/36,53 ppm beobachten, die durch die Bindung der beiden Moleküle Methyl- α -D-glucopyranosid über die Positionen 5' und 5'' von FB₁ hervorgerufen wird. In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Yoshimoto et al. 1980) führte die Bindung des Methyl- α -D-glucopyranosids in Position 6* zu einer starken Hochfeldverschiebung des C-Atoms C-5* von δ 73,52 ppm nach δ 71,04 ppm und einer starken Tieffeldverschiebung des C-Atoms C-6* von δ 62,67 nach δ 64,98 ppm. Da es sich bei Methyl- α -D-glucopyranosid um eine Art „Stärkebaustein“ handelt, bei dem das anomere C-Atom in blockierter Form vorliegt, wurde somit gezeigt, dass es bei der Erhitzung von FB₁ in stärkehaltigen Matrices zu einer kovalenten Bindung des Toxins an die Stärke kommen kann.

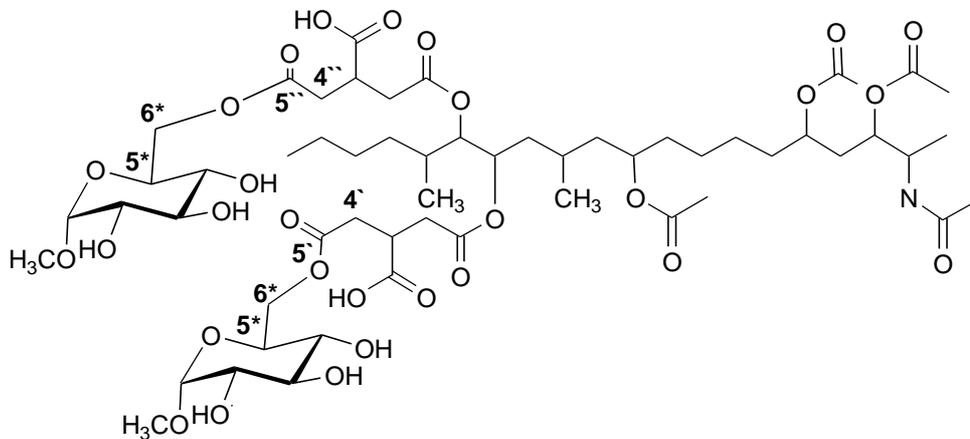


Abb. 24: Strukturformel des Reaktionsproduktes, das durch die Erhitzung (150°C, 40 min) von acetyliertem FB₁-Anhydrid mit Methyl- α -D-glucopyranosid entsteht.

1.4.2.2 Erhitzung von FB₁ mit N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und BOC-L-Cysteinmethylester

Nachdem wir gezeigt hatten, dass FB₁ in der Lage ist, über seine beiden TCA-Seitenketten mit den Hydroxylgruppen von Methyl- α -D-glucopyranosid (bzw. Stärke) unter der Bildung einer esterartigen Verbindung zu reagieren, wurde nachfolgend das Reaktionsverhalten von FB₁ gegenüber reaktiven Gruppen (Amino- und Thiolgruppen) von Proteinen untersucht. Wie bereits erwähnt wurden dazu die beiden Aminosäurederivate N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und BOC-L-Cysteinmethylester eingesetzt (Abb. 21). Wie bei einem Protein liegen auch hier die beiden Aminosäuren an ihrer α -Aminogruppe sowie an ihrer Carboxylgruppe in blockierter Form vor. Eine Reaktion ist daher nur noch über die ϵ -Aminogruppe im Fall von N- α -Acetyl-L-lysinmethylester sowie über die Thiolgruppe im Fall von BOC-L-Cysteinmethylester möglich. Eine Bindung der beiden Derivate an FB₁ ist basierend auf den Ergebnissen aus der Umsetzung von FB₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid mittels Tandem-Massenspektrometrie nachweisbar. Bei der Bindung eines der Aminosäurederivate mit FB₁ unter Wasserabspaltung ergeben sich rein rechnerisch Molekularmassen von 905 Da für die Bindung von N- α -Acetyl-L-lysinmethylester und 938 Da für die Bindung von BOC-L-Cysteinmethylester. Die trockene Erhitzung (105°C, 40 min) von N- α -Acetyl-L-lysinmethylester mit FB₁ führte zur Bildung einer Verbindung mit einem [M+H]⁺-Signal bei m/z 906, deren Produktionenspektrum in Abbildung 25 dargestellt ist. Deutlich zu erkennen ist die Abspaltung der derivatisierten Aminosäure (m/z 704) vom protonierten Molekül ([M+H]⁺ = m/z 906). Des Weiteren sind die Signale bei m/z 370, 352 und 334 zu erkennen, die typisch für das Produktionenspektrum von FB₁ sind. Diese Fragmente werden bei einer Beteiligung von FB₁ an der Molekülstruktur durch die Abspaltung der beiden TCA-Seitenketten (m/z 370) sowie einer zusätzlichen Abspaltung von einem (m/z 352) bzw. zwei Molekülen Wasser (m/z 334) vom FB₁-Gerüst hervorgerufen.

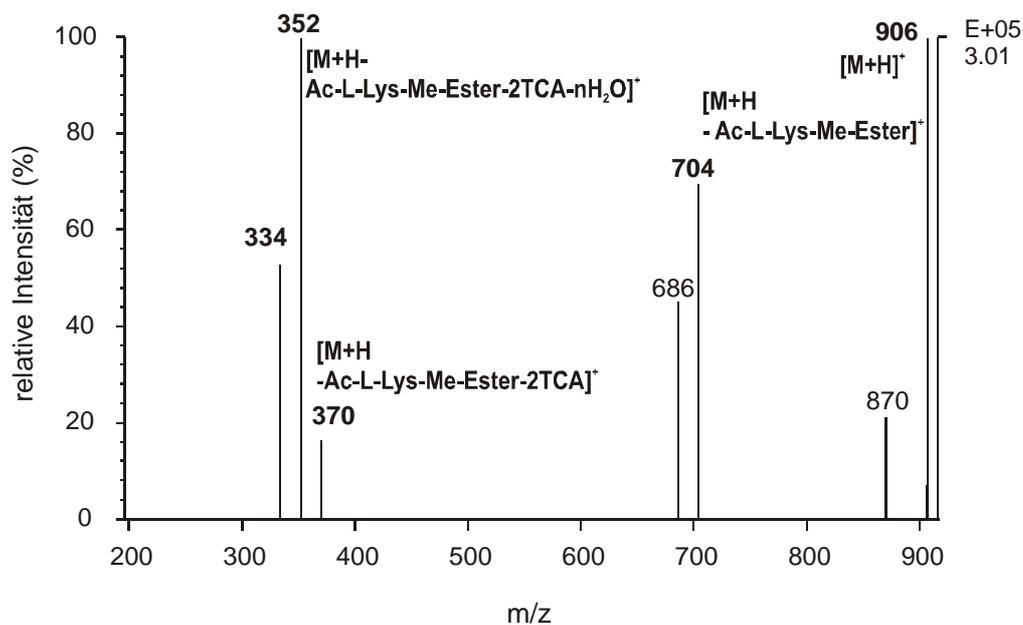


Abb. 25: Produktionenspektrum der Verbindung (Erhitzungsprodukt aus FB₁ und N- α -Acetyl-L-lysinmethylester) mit m/z 906 nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -35eV) im positiven Modus.

Eine Beteiligung von FB₁ am Aufbau des Moleküls wurde somit eindeutig bewiesen. Anhand dieser massenspektrometrischen Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass FB₁ durch den Einfluss erhöhter Temperatur nicht nur an Stärke, sondern auch an L-Lysin bzw. Proteine binden kann.

Bei der trockenen Erhitzung (105°C; 40 min) von BOC-L-Cysteinmethylester mit FB₁ ist ein Signal bei m/z 939 detektiert worden, das rechnerisch dem [M+H]⁺-Signal einer Verbindung entspricht, bei der der BOC-L-Cysteinmethylester unter Abspaltung von Wasser an FB₁ gebunden vorliegt. Das Produktionenspektrum (Abb. 26) lieferte mit den Signalen bei m/z 352 und 370 den Beweis, dass FB₁ an der Reaktion, die zur Bildung der neuen Komponente führte, beteiligt ist. Deutlich zu erkennen ist zudem die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe (m/z 839) sowie des gesamten BOC-L-Cysteinmethylesters (m/z 704).

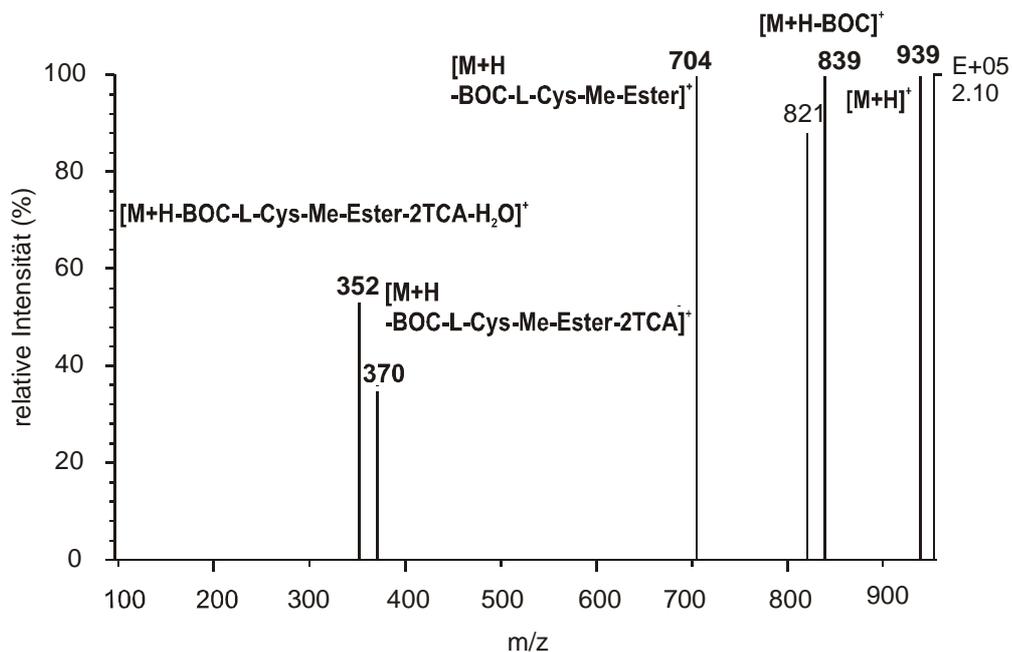


Abb. 26: Produktionenspektrum der Verbindung (Erhitzungsprodukt aus FB₁ und BOC-L-Cysteinmethylester) mit m/z 939 nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküliions mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -35eV) im positiven Modus.

Aufgrund der Tatsache, dass alle funktionellen Gruppen der Aminosäure ausgenommen der Thiolgruppe in geschützter Form vorliegen, muss die kovalente Bindung von FB₁ über diese erfolgt sein. Da unter dem Einfluss hoher Temperaturen die TCA-Seitenketten in reaktive Anhydride überführt werden können, stellen diese die wahrscheinlichste Bindungsstellen für FB₁ dar. Dass die Bindung beider Aminosäurederivate über die TCA-Seitenketten von FB₁ erfolgt, ist nicht zuletzt durch die Tatsache bestätigt worden, dass die Erhitzung von HFB₁ mit beiden Derivaten unter gleichen Bedingungen zu keiner Bildung vergleichbarer Produkte führte.

Die Umsetzungen der beiden Aminosäurederivate mit FB₁ zeigen, dass FB₁ in der Lage ist mit den Seitenketten von Aminosäuren (NH₂-, SH-Gruppe) zu reagieren und Bindungen auszubilden. Die offensichtlich amidartige Bindung erfolgt dabei wahrscheinlich über die TCA-Seitenkette des FB₁ mit der ε-Aminogruppe (L-Lysin) bzw. der Thiolgruppe (L-Cystein) der Aminosäure. Es muss aufgrund dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass FB₁ unter dem Einfluss erhöhter Temperaturen auch an die Proteinbestandteile in

Lebensmitteln binden kann. Auf weitere Untersuchungen bzw. eine Isolierung der Reaktionsprodukte wurde verzichtet, da die FB₁-Aminosäure-Konjugate im Vergleich zum Methyl- α -D-glucopyranosid-Konjugat nur in geringen Konzentrationen gebildet wurden.

1.4.2.3 Erhitzung von FB₁ mit Saccharose

Um die Ergebnisse aus der Studie von FB₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid zu bestätigen, wurde ein weiterer Erhitzungsversuch durchgeführt. Hierbei wurde FB₁ mit Saccharose trocken erhitzt (150°C, 40 min) und das Reaktionsgemisch ebenfalls mittels HPLC-MS/MS untersucht. Neben der Bildung von NCM-FB₁ wurde die Bildung einer neuen Verbindung bei m/z 1047 nachgewiesen. Geht man davon aus, dass die Saccharose in ähnlicher Weise, wie mit Methyl- α -D-glucopyranosid reagiert, ist das Signal bei m/z 1047 auf eine Verbindung zurückzuführen, die durch die esterartige Bindung von FB₁ an ein Molekül Saccharose entsteht. Das Produktionenspektrum der Verbindung ist in Abb. 27 dargestellt. Das Signal m/z 510 geht aus der Abspaltung der Saccharose mit einer TCA-Seitenkette und zwei Wassermolekülen hervor. Die Signale bei m/z 334, 352 und 316 gehen auf die zusätzliche Abspaltung der zweiten TCA-Seitenkette sowie weiterer Wassermoleküle zurück. Es wurde somit wiederum gezeigt, dass FB₁ in der Lage ist auch mit nichtreduzierenden Zuckern zu reagieren. Die Signalintensität der gebildeten Verbindung machte nur etwa 2-5% der Signalintensität des verbleibenden FB₁ im Reaktionsgemisch aus, obwohl die Erhitzungszeit des Zwei-Komponentengemisches 40 Minuten betrug. Es verwundert daher nicht, dass in den bereits beschriebenen Heißextrudaten, eine Bindung von Saccharose an FB₁ nicht nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde bestätigt, dass die Bindung wiederum über die TCA-Seitenketten erfolgt, da das Erhitzen von HFB₁ mit Saccharose unter gleichen Bedingungen zu keiner Bildung eines vergleichbaren Produktes führte.

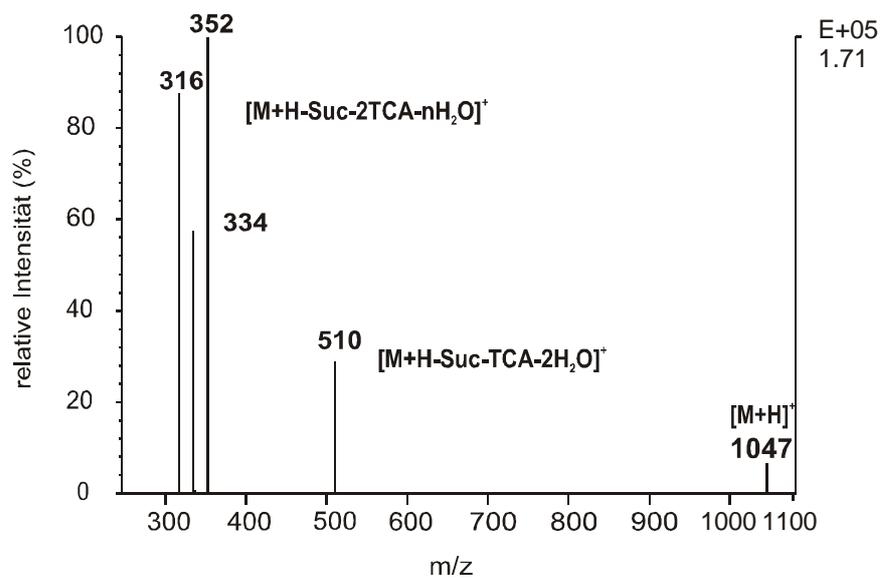


Abb. 27: Produktionspektrum der Verbindung (Erhitzungsprodukt aus FB₁ und Saccharose) mit m/z 1047 nach Stoßaktivierung des protonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Pa, Kollisionsenergie -50eV) im positiven Modus.

1.4.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Bei den durchgeführten Modellversuchen ist gezeigt worden, dass bei thermischen Lebensmittelverarbeitungsprozessen eine Bindung von FB₁ an Stärke, Protein und Saccharide erfolgen kann. Die Art der Bindung ist dabei von entscheidender Bedeutung. Wird nämlich das in Rohprodukten (Maismehl, Maisgrieß) enthaltene FB₁ während thermischer Verarbeitungsprozesse bei der Lebensmittelherstellung über die TCA-Seitenketten an Matrixbestandteile (Protein, Stärke) gebunden, so liegt es immer noch in einer für Menschen und Tiere verfügbaren Form vor, da es während der Verdauung im Gastrointestinal-Trakt zu einer Freisetzung des gebundenen FB₁ als HFB₁ oder „freies FB₁“ z.B. durch proteolytische Enzyme kommen kann (Abb. 20). Da sich die bisherigen Analysemethoden auf den Nachweis freier Fumonisine in Lebensmitteln beschränken, ist die Entwicklung neuer Methoden zur Erfassung des gebundenen Anteils an Fumonisinen essentiell um ein etwaiges Verbraucherrisiko abschätzen zu können. Aufgrund der

vorliegenden Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass in verarbeiteten Maisprodukten neben „freiem“ Fumonisin auch an Matrixbestandteile „gebundene“ Formen vorliegen. Eine Abschätzung des gebundenen Anteils an Fumonisinen gestaltet sich äußerst schwierig, da die Bildung von verschiedenen Prozessparametern (z.B. Temperatur, Druck, Erhitzungszeit usw.) abhängt. Im Folgenden wurde versucht den gebundenen Anteil nach einer alkalischen Hydrolyse zu ermitteln.

1.4.3 Bestimmung des gebundenen Anteils an FB₁ in Heißextrudaten

Um abschätzen zu können, welcher Anteil an FB₁ bei einer thermischen Behandlung von maishaltigen Lebensmittelrohstoffen (z.B. Maismehl, Maisgrieß) an die Matrixbestandteile (v.a. Stärke und Protein) gebunden wird, wurde basierend auf einer Methode von Hartl (2000), der Anteil an gebunden vorliegendem FB₁ in den zur Verfügung stehenden Heißextrudaten (vgl. 1.3.3) quantifiziert.

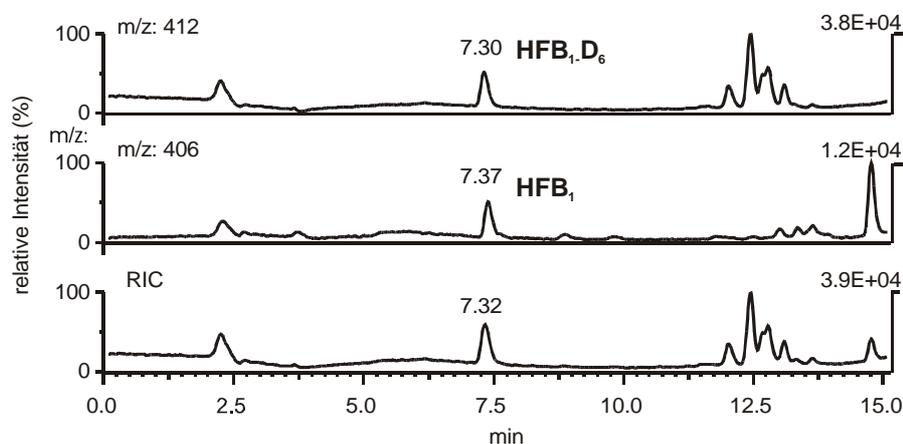


Abb. 28: HPLC-SIM-MS-Chromatogramm einer Heißextrudatprobe, die 87,6 ng/g gebundenes FB₁ enthält. (SIM: „selected ion monitoring“, RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5µm), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200µl/min, SIM-Modus auf m/z 406 (HFB₁) und 412(HFB₁-D₆), (Methode 2, SIM-Experiment 2).

Dazu wurden die Proben solange mit Methanol/0,1N Salzsäure 3:1 extrahiert, bis kein FB₁ mehr im Extrakt nachzuweisen war. Nach Zusatz von Isotopenstandard (FB₁-D₆) wurde der erhaltene Rückstand anschließend mit 2N methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung alkalisch hydrolysiert (50°C, 50 min) und über eine C18-Festphase aufgereinigt. Bei der alkalischen Behandlung der Proben wird das zugesetzte FB₁-D₆ vollständig in das hydrolysierte Analogon HFB₁-D₆ überführt. Das über die TCA-Gruppen gebundene FB₁ wird aufgrund des stark basischen Milieus unter Abspaltung der beiden TCA-Seitenketten von den Matrixkomponenten als HFB₁ freigesetzt und kann mit Hilfe des ebenfalls hydrolysierten Standards HFB₁-D₆ am HPLC-MS-Gerät quantifiziert werden (Abb. 28). Da für die Analytik mit HFB₁-D₆ als Standard im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen keine vollständige Kalibrierung mehr vorgenommen werden konnte, haben die ermittelten Werte (Tab. 4a und b) halbquantitativen Charakter, geben aber einen Anhaltspunkt über die zu erwartenden Größenordnungen.

Tabelle 4a: Prozentualer Anteil des „gebundenen“ FB₁ bezogen auf die ursprüngliche Dotierung mit FB₁ (2000 ng/g = 100%) in Heißextrudaten aus Maisgrieß, die mit Saccharose (50 g/kg) versetzt worden waren, in Abhängigkeit der Herstellungsparameter.

Probe	Feuchtigkeit %	Temperatur °C	FB ₁ ^a (%)
1 ^b	18	170	n.n. ^c
3	18	160	9,4
5	16	170	7,8
7	20	170	8,2
9	18	170	8,4
11	18	170	7,1
13	18	180	7,8

^a die Ergebnisse sind als Mittelwert aus 4 Bestimmungen dargestellt (doppelte Aufarbeitung und jeweils zweifache Injektion).

^b Blindprobe (Probe wurde nicht mit FB₁ dotiert).

^c nicht nachweisbar

Tabelle 4b: Prozentualer Anteil des „gebundenen“ FB₁ bezogen auf die ursprüngliche Dotierung mit FB₁ (2000 ng/g = 100%) in Heißextrudaten aus Maisgrieß, die mit Glucose (50 g/kg) versetzt worden waren, in Abhängigkeit der Herstellungsparameter.

Probe	Feuchtigkeit %	Temperatur °C	FB ₁ ^a (%)
2 ^b	18	170	n.n. ^c
4	18	160	3,0
6	16	170	4,4
8	20	170	4,9
10	18	170	5,6
12	18	170	3,7
14	18	180	3,3

^a die Ergebnisse sind als Mittelwert aus 4 Bestimmungen dargestellt (doppelte Aufarbeitung und jeweils zweifache Injektion).

^b Blindprobe (Probe wurde nicht mit FB₁ dotiert).

^b nicht nachweisbar

Mit der beschriebenen Methode wurden die Heißextrudate auf ihren Anteil an gebundenem FB₁ analysiert. Wie die Ergebnisse in Tabelle 4a und 4b zeigen, wurden maximal 9,4% an gebundenem Fumonisin B₁ nachgewiesen. Auffällig ist dabei der Unterschied zwischen glucosehaltigen (Tab. 4a) und saccharosehaltigen Proben (Tab. 4b). Während der Anteil an gebundenem FB₁ in den saccharosehaltigen Heißextrudaten zwischen 7 und 9% liegt, weisen glucosehaltige Proben dagegen einen geringeren Anteil (3-5%) auf. Der Unterschied ist durch den Zusatz des reduzierenden Zuckers Glucose erklärbar, der in einer Maillard-ähnlichen Reaktion, die als Konkurrenzreaktion zur Bindung von FB₁ an Matrixbestandteile auftritt, mit FB₁ reagiert. Die dabei gebildeten Glucose-FB₁-Konjugate werden durch eine alkalische Hydrolyse nicht freigesetzt, da die Bindung über die Aminofunktion erfolgt.

Um den Anteil an gebundenem Fumonisin in Maisprodukten verlässlich abschätzen zu können, sind weitere Modellstudien unter Variation verschiedener Versuchsparameter wie

Temperatur und Erhitzungszeit notwendig. Weiterhin ist es erforderlich, Handelsproben auf Vorkommen von gebundenem Fumonisin zu untersuchen.

2 Nachweis von Fumonisinen in nicht maishaltigen Lebensmitteln

2.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Aufgrund des fast ausschließlichen Vorkommens von *Fusarium verticillioides*, dem bedeutendsten Fumonisinproduzenten, auf Maispflanzen, werden Fumonisine oft eng in Verbindung mit Mais und maishaltigen Lebensmitteln gebracht. Daher beschränkten sich auch bisherige Untersuchungen von Lebensmitteln weitgehend auf diese Produkte. Inzwischen wird aber immer mehr deutlich, dass auch bei anderen, nicht maishaltigen Lebensmitteln von einer Fumonisinbelastung ausgegangen werden muss, die durch andere Fumonisinproduzenten wie z.B. durch *Fusarium proliferatum*, hervorgerufen werden kann. Um das Verbraucherrisiko abschätzen und minimieren zu können, ist es daher von Bedeutung zu wissen, welche lebensmittelrelevanten Pflanzen außer Mais noch von einer Kontamination mit Fumonisinen betroffen sein können. In Anlehnung daran ist auch die Entwicklung einer geeigneten Analytik erforderlich, um schnell und zuverlässig Fumonisine qualitativ und quantitativ in diesen Lebensmitteln nachweisen zu können. Die meisten der bisher existierenden Methoden zum Nachweis von Fumonisinen sind an maishaltige Matrices angepasst und beruhen größtenteils auf der Technik der Fluoreszenzdetektion, bei der die Fumonisine zuvor mit einem geeigneten Reagens (meist *o*-Phthaldialdehyd) derivatisiert werden müssen. Wie bereits schon unter 1.1 erwähnt, bringt die Anwendung dieser Technik eine Reihe von Nachteilen mit sich. Zu nennen sind hier insbesondere die Instabilität der Derivate und die durch ebenfalls derivatisierte Matrixbestandteile hervorgerufenen Interferenzen, die eine akkurate Analytik erschweren. Ziel der Arbeit war es daher Fumonisine in anderen lebensmittelrelevanten Pflanzen wie z.B. Gemüse nachzuweisen. Dazu sollte basierend auf der Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) eine Methode

entwickelt werden, die es ermöglicht, Fumonisine in verschiedenen Gemüsesorten zu analysieren. Die Effizienz der Methode wurde anhand von mit *F. proliferatum* infiziertem Spargel und Knoblauch überprüft.

2.2 Nachweis von Fumonisinen in *Fusarium proliferatum*-infizierten Spargelsprossen und Knoblauchknollen

2.2.1 Massenspektrometrische Detektion und Isotopenverdünnungsanalyse

Die Kombination der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) ist eine erwiesene zuverlässige Methode zum Nachweis von Fumonisinen (Lukacs et al. 1996, Doerge et al. 1994, Hartl et al. 1999, Hartl und Humpf 1999). Basierend auf den bisherigen Erfahrungen mit dieser Technik in unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Fumonisinen in Gemüse speziell in Spargel und in Knoblauch entwickelt. Die Isolierung der Fumonisine erfolgte durch eine Extraktion mit einem Gemisch aus Methanol/0,1N Salzsäure (3:1) und anschließender Aufreinigung über einem starken Anionenaustauscher (SAX-Material). Es handelt sich hierbei um eine Methode, die sich bereits für die Isolierung von Fumonisinen als höchst selektiv erwiesen hat (Lukacs et al. 1996). Die quantitative Bestimmung des bedeutendsten Vertreters der Fumonisine, dem Fumonisin B₁ erfolgte mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse, deren Prinzip im folgenden näher erläutert werden soll:

Die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) ist eine Methode zur exakten quantitativen Bestimmung, die auf der Verwendung von isotopenmarkierten Referenzsubstanzen beruht (Heumann 1986). Dabei wird ein Isotop-Isomeres der zu quantifizierenden Substanz als interner Standard zugesetzt. Die isotopenmarkierte Substanz ist in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften mit dem Analyten nahezu identisch und damit ein idealer

Standard. Die beiden Verbindungen zeigen beispielsweise gleiche Siedepunkte, Dampfdrücke, Nernst'sche Verteilungskoeffizienten, chromatographische Eigenschaften, chemische Reaktivität und Stabilität. Bei allen extraktiven und chromatographischen Aufreinigungsverfahren wird der isotonenmarkierte Standard gegenüber dem Analyten, und umgekehrt, nicht diskriminiert. Abbildung 29 verdeutlicht das Prinzip und die Funktionsweise der Isotopenverdünnungsanalyse. Der isotonenmarkierte Standard wird der Probe möglichst früh zugesetzt, wobei auf eine homogene Verteilung des Standards im Probenmaterial zu achten ist. Das sich einstellende Analyt/Isotopenstandard-Verhältnis bleibt durch alle Aufarbeitungsschritte hindurch konstant. Die Auswertung erfolgt nach massenspektrometrischer Analytik aus dem Verhältnis von Analyt zu Isotopenstandard.

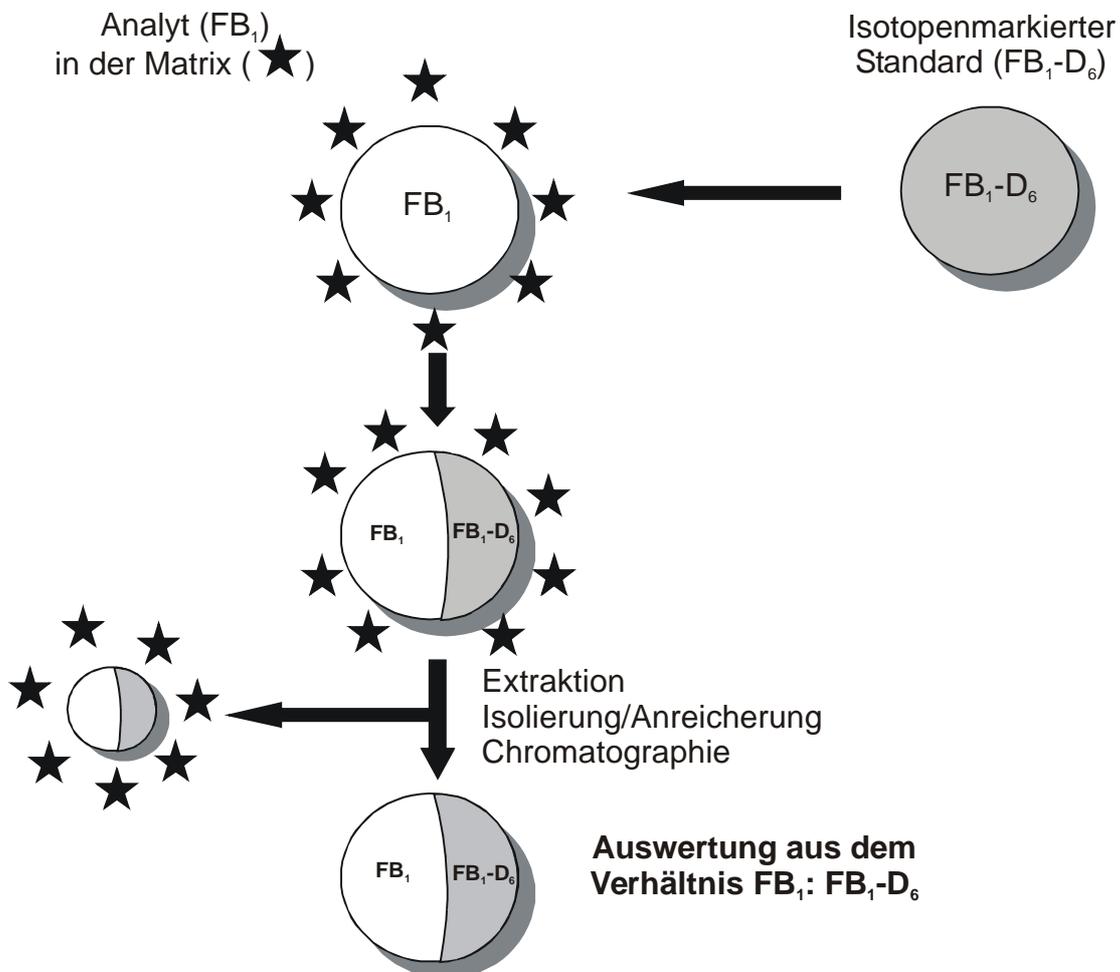


Abb. 29: Das Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse.

Als Isotopenstandard für die quantitative Bestimmung von FB₁ in den Gemüseproben wurde das sechsfach deuterierte Fumonisin B₁ (FB₁-D₆) eingesetzt, das aus früheren Untersuchungen noch zur Verfügung stand, und bereits in Kapitel C 1.3.4 näher beschrieben wurde, eingesetzt.

2.2.2 Nachweis von Fumonisin in deutschem Spargel

Fusarium proliferatum (Matushima) Nirenberg, ein Mitglied der *Liseola* Woll Sektion, ruft in einer Reihe verschiedener Nutzpflanzen schwerwiegende Krankheiten wie Fäulnis und Wachstumsdepressionen hervor. Von einem Befall sind vor allem Mais (Chulze et al. 1996) aber auch Weizen, Hirse (Leslie et al. 1992), Dattelpalme (Abdalla et al. 2000), Reis (Desjardins et al. 1997) und Spargel (*Asparagus officinalis* L.) (Logrieco et al. 1998) betroffen. Da *Fusarium proliferatum* ebenso wie *F. verticillioides* in der Lage ist, Fumonisine zu produzieren (Nelson et al. 1992) und als zweitwichtigster Fumonisinproduzent überhaupt gilt, stellt seine Gegenwart auf Nutzpflanzen ein potenzielles Risiko für den Menschen dar. Fumonisin B₁, das nach einem natürlichen *Fusarium proliferatum*-Befall auftrat, konnte bisher in Mais (Logrieco et al. 1995) (Bacon und Nelson 1994), Reis (Abbas et al. 1998) und Spargel (Logrieco et al. 1998) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Fumonisine in *Fusarium proliferatum*-Kulturen detektiert, die aus Weizen, Hirse (Leslie et al. 1992) und Dattelpalme (Abdalla et al. 2000) isoliert wurden.

In den letzten Jahren erfreut sich Spargel in Deutschland einer immer größeren Beliebtheit und die steigende Nachfrage führt zu einer starken Expansion der Anbauflächen. Gleichzeitig häufen sich jedoch auch die Berichte der Bauern von Anbauproblemen, die eng in Verbindung mit einem Pilzbefall gebracht werden, wie beispielsweise einer vorzeitigen Alterung der Spargelpflanzen. Es war daher von Interesse festzustellen, ob *F. proliferatum* in eine Schädigung der Spargelpflanzen verwickelt ist und wenn ja, ob infolgedessen die zum Verzehr verwendeten Teile der Pflanze, die Stängelsprosse, von einer Kontamination mit Fumonisin betroffen sind. Eine Infektion von Spargelpflanzen

alleine oder zusammen mit *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* und anderen Vertretern der Gattung *Fusarium* führt zu einer Krankheit, die man als *Fusarium*-bedingte Kronen- und Wurzelfäule bezeichnet (Elmer 1991, Lori et al. 1998). Für unsere Untersuchungen wurde daher Pflanzenmaterial gesammelt, das äußerlich von Fäulnis und Wachstumsdepressionen gekennzeichnet war. Der Spargel wurde hierbei von ausgewählten Standorten in Deutschland (Rheinland-Pfalz) entnommen. Insgesamt sind in Zusammenarbeit mit der Humoldt-Universität zu Berlin (Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät) drei *Fusarium*-Spezies von den Sprossen isoliert und identifiziert worden nämlich, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. sambucinum* (Goßmann et al. 2001). Die fungale Kontamination war dabei am unteren Ende der Spargelstangen am stärksten ausgeprägt. Um festzustellen, ob Fumonisine auch auf deutschem Spargel zu finden sind, wurden die mit *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen mittels HPLC-ESI-MS analysiert. Da Spargel einen hohen Anteil an Wasser besitzt (90-95%), wurden die Proben vor der Aufarbeitung gefriergetrocknet, um eine störende Verdünnung der Extraktionslösung zu vermeiden. Für die chromatographische Auftrennung wurde ein Methanol/Wasser-Gradient eingesetzt. Abbildung 30 zeigt das Chromatogramm einer Spargelprobe, das die deutliche Abtrennung der Fumonisine FB₁, FB₂ und FB₃ von den Matrixbestandteilen zeigt. Der ausgewählte Gradient erwies sich damit als sehr gut geeignet, um Fumonisine in Spargel nachzuweisen. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte im „selected ion monitoring“ (SIM)-Modus. Die [M+H]⁺-Signale der Fumonisine liegen nämlich in einem Massenbereich, in dem nur wenige Störsignale auftreten. So wird trotz geringerer Selektivität ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erzielt, das man normalerweise nur bei der Anwendung von „selected reaction monitoring“ (SRM)-Experimenten erzielt. Damit ist diese Methode auch Laboratorien zugänglich, die nur über ein Single Quadrupol-Massenspektrometer verfügen. FB₁ ist in neun der zehn untersuchten Proben nachgewiesen worden, FB₂ und FB₃ waren hingegen nur in sechs der zehn Proben vorhanden. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch bei deutschem Spargel von einer Kontamination mit Fumonisin ausgegangen werden muss.

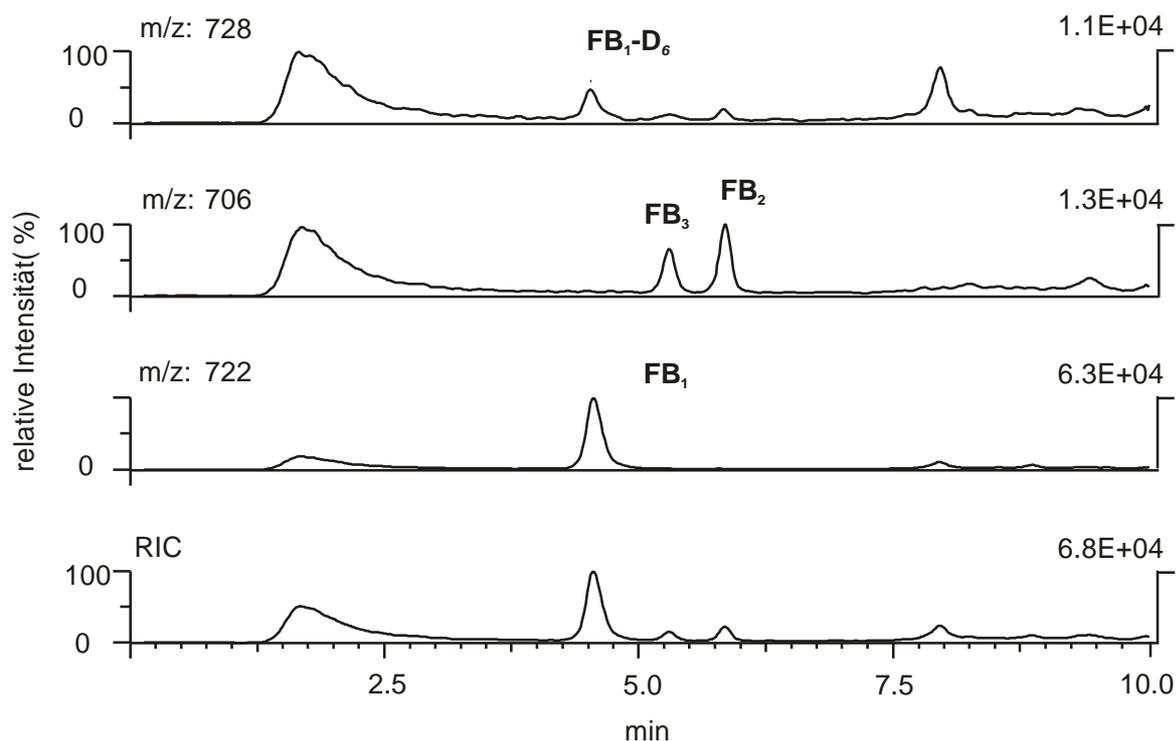


Abb. 30: HPLC-SIM-MS-Chromatogramm einer Spargelprobe (Tab. 3, Probe 3 B), die 285 ng/g FB₁ enthält. (SIM: „selected ion monitoring“, RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Lichrospher 60 RP select B (100 x 2 mm, 5µm), Fließmittel Methanol/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200µl/min, SIM-Modus auf *m/z* 706 (FB_{2/3}), 722 (FB₁), 728 (FB₁-D₆), (Methode 2, SIM-Experiment 1).

Neben der qualitativen Bestimmung der Fumonisine FB₁, FB₂ und FB₃ erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung des am häufigsten in den Proben vertretenen Fumonisin FB₁ mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse. Die Systemkalibrierung wurde analog wie bei früheren Arbeiten beschrieben durchgeführt (Hartl et al. 1999, Hartl und Humpf 1999, Hartl 2000). Die FB₁-Konzentrationen reichten von 36 bis 4514 ng/g (bezogen auf das Trockengewicht), wobei anzumerken ist, dass in einigen Fällen die Werte der A-Probe deutlich von denen der B-Probe differierten (Tab. 5). Dies ist damit zu begründen, dass der Fumonisin-bildende Pilz nicht homogen über den Spross verteilt ist. Wie angesprochen waren vor allem die unteren Teile der Spargelstange befallen. Die Proben A und B wurden

jedoch willkürlich von verschiedenen Teilen der Stange entnommen, was schließlich zu den unterschiedlichen Ergebnissen führte.

Tabelle 5: Belastung von deutschem Spargel mit FB₁^a.

Probe	A FB₁ (ng/g ± SD)^b	B FB₁ (ng/g ± SD)^b
1	315,9 ± 22	4513,7 ± 5,3
2	99,7 ± 5,6	43,24 ± 4,1
3	249,1 ± 1,3	285,4 ± 7,8
4	n.n. ^c	n.n. ^c
5	72,3 ± 6,1	77,8 ± 21,8
6	267,2 ± 17,8	131,2 ± 0,7
7	74,9 ± 3,4	50,7 ± 7,3
8	36,4 ± 1,8	597,0 ± 0,9
9	123,4 ± 5,0	1863,6 ± 15,3
10	366,5 ± 14,0	3444,8 ± 28,6

^a Quantifizierung und Auswertung mittels Isotopenverdünnungsanalyse (Hartl 2000).

^b bezogen auf das Trockengewicht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± relative Standardabweichung aus 2 Bestimmungen dargestellt.

^c nicht nachweisbar.

2.2.3 *Fusarium proliferatum* als Fumonisinproduzent in Knoblauch

Nachdem bereits der Befall von deutschen Knoblauchknollen (*Allium sativum* L.) durch *F. proliferatum* in einer vorhergehenden Studie erfolgreich nachgewiesen wurde (Goßmann et al. 2000), sollte untersucht werden, ob der Schimmelpilz bei einem Befall auch in der Lage ist, die Knollen mit Fumonisin zu kontaminieren. In einem Modellversuch wurden daher Knoblauchknollen in einer mit *F. proliferatum* durchsetzten Erde fünf Monate lang kultiviert. Nach Erreichen des Reifestadiums wurden die Knollen oberflächendesinfiziert

und danach auf einen *F. proliferatum*-Befall (Goßmann et al. 2000) untersucht. Die Knollen, in denen mit Hilfe der Methode von Nirenberg (Nirenberg 1976) eine Kontamination mit dem Pilz nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend mittels HPLC-ESI-MS auf das Vorkommen von Fumonisin untersucht.

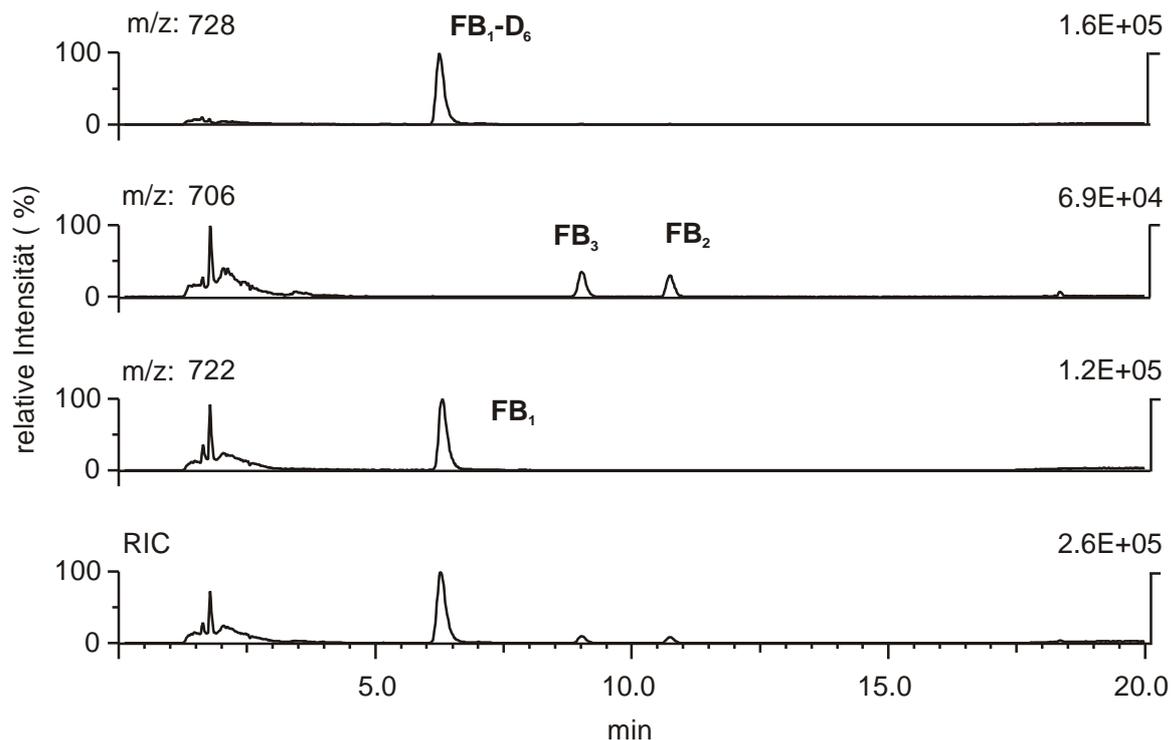


Abb. 31: HPLC-SIM-MS-Chromatogramm einer Knoblauchprobe (Tab. 4, Probe 1), die 95 ng/g FB_1 enthält. (SIM: „selected ion monitoring“, RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m), Fließmittel Acetonitril/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200 μ l/min, SIM-Modus auf m/z 406 (HFB₁), 722 (FB₁), 728 (FB₁-D₆) und 780 (NCM-FB₁), (Methode 1, SIM-Experiment 2).

Zur chromatographischen Trennung wurde ein Wasser-Acetonitril Gradient eingesetzt. Wie im Fall der Spargelproben wurden auch hier die Fumonisine ausreichend von den Matrixbestandteilen abgetrennt (Abb. 31). Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte aus den bereits genannten Gründen (siehe 2.2.2) im SIM-Modus. Von den vier

untersuchten Knollen ist in allen eine Kontamination mit den Fumonisin FB₁, FB₂ und FB₃ nachgewiesen worden. Somit wurde erstmals bewiesen, dass *F. proliferatum* in der Lage ist, Knoblauchknollen zu infizieren. Außerdem zeigt der Nachweis der Toxine, dass *F. proliferatum* auch ein Potenzial zur natürlichen Kontamination von Knoblauch mit Fumonisin besitzt. Dies wird verstärkt durch die Tatsache, dass die zur Kontamination der Erde verwendete Pilzkultur von kommerziell erhältlichen Knoblauchknollen isoliert wurde. Die wiederum mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse bestimmten FB₁-Konzentrationen (Systemkalibrierung vgl. (Hartl und Humpf 1999, Hartl et al. 1999, Hartl 2000)) lagen im Bereich von 26 bis 94 ng/g (Tab. 6). Um eine Belastung von Knoblauch mit FB₁ abschätzen zu können, ist die Untersuchung von Handelsproben erforderlich. Aus Zeitgründen konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Tabelle 6: Belastung von Knoblauch mit FB₁^a.

Probe	FB ₁ ^b (ng/g ± SD)
1	94,6 ± 2,5
2	26,0 ± 1,2
3	47,6 ± 1,1
4	27,7 ± 1,6

^a Quantifizierung und Auswertung nach Isotopenverdünnungsanalyse (Hartl 2000).

^b Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± relative Standardabweichung aus 2 Bestimmungen dargestellt.

^c nicht nachweisbar

3 Biologische Aktivität der Fumonisine

3.1 Induktion von Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen (IHKE) durch Fumonisine und Fumonisin-metabolite

3.1.1 Einleitung: Was ist Apoptose?

Als Apoptose bezeichnet man den genetisch programmierten Zelltod, der zur gezielten und kontrollierten Vernichtung von einzelnen Zellen bzw. Zellgruppen führt. Apoptose spielt in der Entwicklungsphase, zum Beispiel bei der Rückbildung der sogenannten Schwimmhäute der menschlichen Hand oder der neuralen Ausbildung des Gehirns, eine wichtige Rolle. Wichtige Funktionen des Immunsystems, Selektion der Lymphozyten, Verhinderung von Autoimmunerkrankungen und Virusbekämpfung beruhen auf apoptotischen Vorgängen. Das Gleichgewicht zwischen Zellerneuerung und Zellsterben, zum Beispiel der Hautzellen oder der Zellen der Darmzotten, wird durch Apoptose geregelt. Die Apoptose darf dabei nicht mit der Nekrose verwechselt werden, bei der der Zelltod durch äußere Umstände, wie physikalische oder chemische Schäden verursacht wird und eine inflammatorische Antwort auslöst. Die einzelnen Phasen der Apoptose und der Nekrose einer Zelle sind unter dem Mikroskop gut erkennbar (Abb. 32):

Wird Apoptose in einer Zelle (1) ausgelöst, so tritt zunächst eine definierte Kondensation des Chromatins zu Klümpchen ein, die sich in der Nähe der Kernhülle zusammenlagern (2). Die Form der Mitochondrien bleibt zunächst unverändert. Anschließend schrumpft die Zelle und es kommt zur Fragmentierung des Kerns und zur Abschnürung von Vesikeln, den sog. „apoptotic bodies“ (3). Diese sind charakteristisch für das Auftreten von Apoptose und werden meist durch Phagozytose entfernt (4). Bei der Nekrose hingegen erfolgt die

Kondensation des Chromatins in undefinierter Form (5). Die Zelle und die Organellen schwellen an, bis die Membranen schließlich zusammenbrechen und die Zelle platzt (6) (Tormei und Cope 1991).

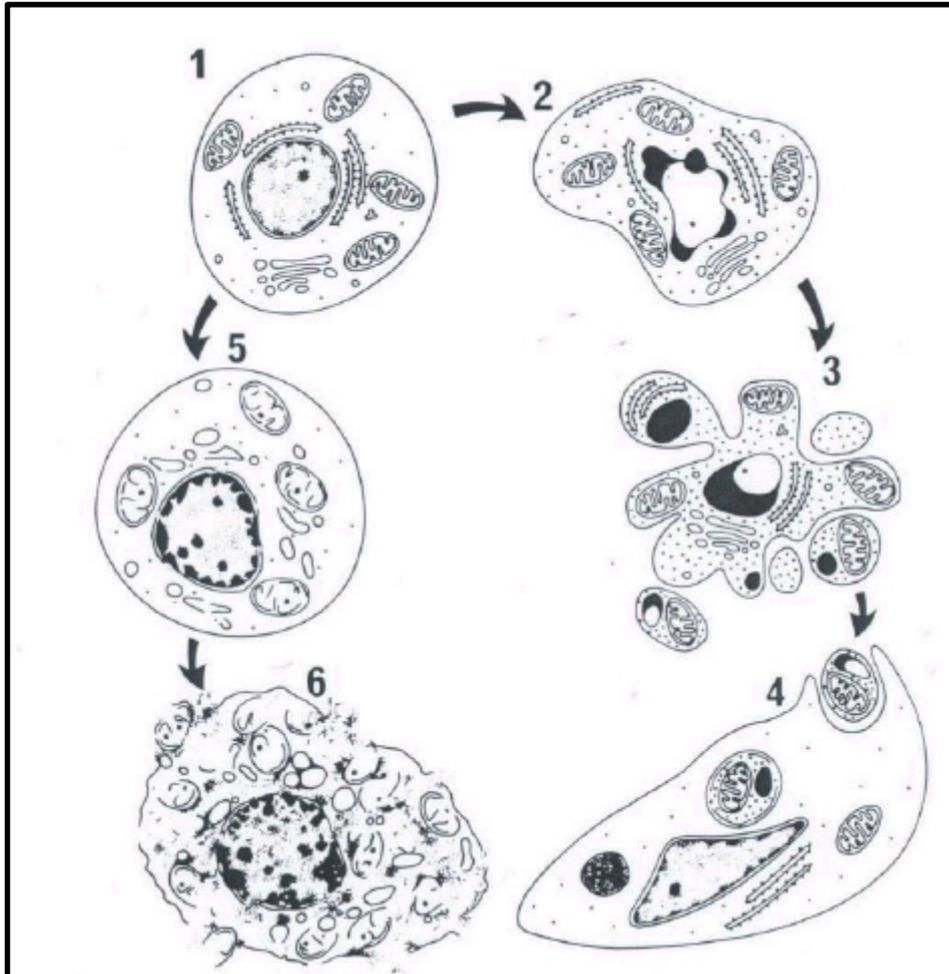


Abb. 32: Mikroskopisch sichtbare Phasen von Apoptose und Nekrose (Bildquelle: (Tormei und Cope 1991)).

Das Herz einer jeden Apoptose bildet die sogenannte „Caspasen-Kaskade“. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihre Substrate an der Carboxylseite von Aspartat-Resten spalten. Sie werden bereits als inaktive Vorstufen synthetisiert und später durch proteolytische Spaltung in die aktive Form überführt. In der Regel erfolgt diese Spaltung durch bereits

aktivierte Caspasen. Die Aktivierung der ersten Caspase in der Kaskade kann durch extrazelluläre Vorgänge, wie die Bindung eines Moleküls an einen „Apoptose-sensiblen“ Rezeptor oder durch intrazelluläre Effekte, wie eine Schädigung der Mitochondrien (zum Beispiel durch toxische Stoffe), ausgelöst werden. Caspase 8 startet meist die Kaskade, an deren Ende eine Vielzahl aktivierter Caspasen im Cytosol vorhanden ist. Von diesen ist besonders Caspase 3 von Bedeutung. Caspase 3 ist in der Lage Endonukleasen zu aktivieren, die die DNA in charakteristische Bruchstücke schneiden können (Wyllie 1980, Enari et al. 1996). Trennt man diese Bruchstücke mittels Gelelektrophorese auf, so erhält man ein für das Auftreten von Apoptose charakteristisches Bild einer Leiter. Bei Nekrose hingegen wird die DNA willkürlich zerteilt und man erhält nach der Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese eine bis zur Laufgrenze reichenden, breite Bande. Da es sich bei der Aktivierung der Caspase 3 sowie bei der „DNA-Leiterbildung“ um zwei für die Apoptose charakteristische Phänomene handelt, werden diese oft zum Nachweis von Apoptose herangezogen.

3.1.2 Aufgabenstellung

Es ist allgemein bekannt, dass Fumonisin FB₁ in der Lage ist Apoptose in einer Reihe von Zellen und Zellgeweben auszulösen. Dies beweisen sowohl *in vitro* Studien an verschiedenen humanen Zelllinien (Schmelz et al. 1998, Tolleson et al. 1996b) oder an Nierenzellen von Affen (Wang et al. 1996), als auch *in vivo* Studien an Niere und Leber von Ratten (Sharma et al. 1997, Tolleson et al. 1996a, Lim et al. 1996). Wenig ist jedoch bisher darüber bekannt, inwieweit auch andere Fumonisine oder ihre Hydrolyseprodukte Apoptose induzieren können. Von Interesse sind außerdem Fumonisinmetabolite wie zum Beispiel „Pseudoceramide“, die als Produkte aus der enzymatischen Umsetzung von hydrolysierten Fumonisinen und Fettsäuren mit Hilfe der Ceramidsynthase, einem Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus, hervorgehen (Humpf et al. 1998). Es wurde daher die Fähigkeit von Fumonisin FB₁, hydrolysiertem Fumonisin B₁ (HFB₁), Fumonisin B₂ (FB₂), Fumonisin B₃ (FB₃) und dem „Pseudeoceramid“ N-Palmitoyl-

hydrolysiertes Fumonisin B₁ (N-Pal-HFB₁) (Abb. 33) untersucht, Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen (IHKE, human kidney epithelial cells) zu induzieren. Dazu wurden IHKE-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit den genannten Substraten inkubiert. Zum Nachweis des Auftretens von Apoptose wurden der mit einem kommerziell erhältlichen Enzymtest durchführbare Caspase 3 Nachweis sowie die „DNA-Leiterbildung“ herangezogen.

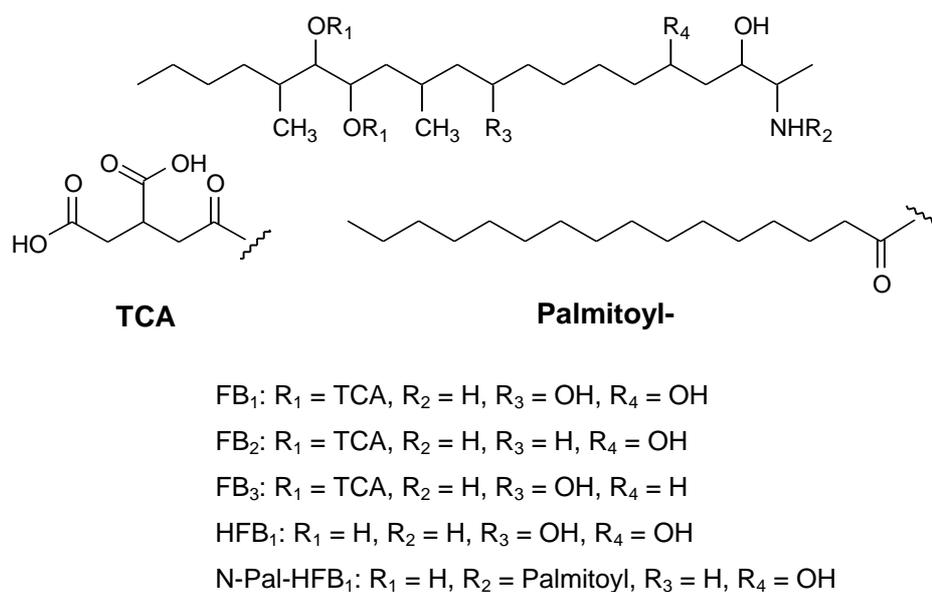


Abb. 33: Strukturformeln der verwendeten Substrate Fumonisin B₁ (FB₁), Fumonisin B₂ (FB₂), Fumonisin B₃ (FB₃), hydrolysiertes Fumonisin B₁ (HFB₁) und N-Palmitoyl-hydrolysiertes Fumonisin B₁ (N-Pal-HFB₁).

3.1.3 Apototisches Potenzial von Fumonisinen und Fumonisin-metaboliten

Der Nachweis der Aktivierung der Caspase 3 ist eine Methode, mit der Apoptose in ihrem frühesten Stadium nachgewiesen werden kann. Die Caspase 3 Aktivität kann dabei durch die Verwendung des Substrates DEVD-AFC bestimmt werden, das in das Tetrapeptid DEVD und in die fluoreszierende Komponente AFC (7-Amino-4-trifluormethylcoumarin)

gespalten wird. Es zeigte sich, dass bei einer 24-stündigen Inkubation der IHKE-Zellen mit FB₁ (10 µM), HFB₁ (10, 25 µM), FB₂ (10, 25µM), FB₃ (10 µM) und N-Pal-HFB₁ (10, 25 µM) nur die Exposition mit 10 µM FB₁ zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase 3 Aktivität gegenüber den Kontrollzellen führt (Abb. 34).

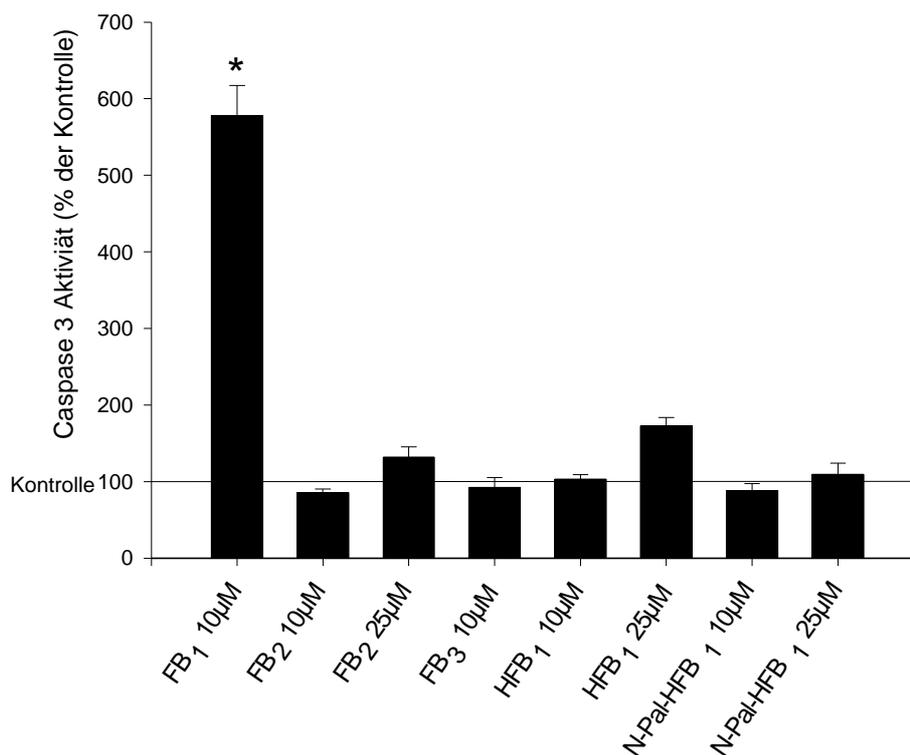


Abb. 34: Fumonisin-abhängige Caspase 3 Aktivität (gemessen als Spaltung von DEVD-AFC) pro ng Protein in IHKE-Zellen nach 24-stündiger Exposition. Die Zellen wurden mit den angegebenen Fumonisinkonzentrationen im serumfreien Medium inkubiert. Signifikante Aktivitäten sind mit „*“ gekennzeichnet („*“ = $P < 0,05$); $n = 6-10$ für jeden angegebenen Wert.

(Kontrolle = nur Medium, P = Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen signifikanten Aktivität, n = Anzahl der Petrischalen.)

Ein weiterer etablierter Marker für das Auftreten von Apoptose, ist der Nachweis von DNA-Fragmenten in der Größe von Mono- und Oligonukleosomen. Die DNA-

Fragmentierung wird durch Caspase 3-aktivierte DNasen hervorgerufen und ist charakteristisch für Zellen, in denen Apoptose induziert wird. Trennt man die gleichmäßigen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf, entsteht das Bild einer „Leiter“. Um die Ergebnisse des Caspase 3 Nachweises zu bestätigen, wurde die Bildung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Wie Abbildung 35 zeigt, führte die 24-stündige Exposition der IHKE-Zellen mit 10 μM FB₁ zu einer deutlich sichtbaren „Leiterbildung“ (Abb. 35 D). Zum Vergleich wurden in einem Parallelversuch Zellen mit 100 nM Ochratoxin (OTA) (Abb. 35 C) inkubiert. Von diesem Toxin ist bereits bekannt, dass es Apoptose in IHKE-Zellen auslöst (Schwerdt et al. 1999). Das aus der Inkubation mit OTA stammende Gel konnte somit als Positiv-Kontrolle verwendet werden.

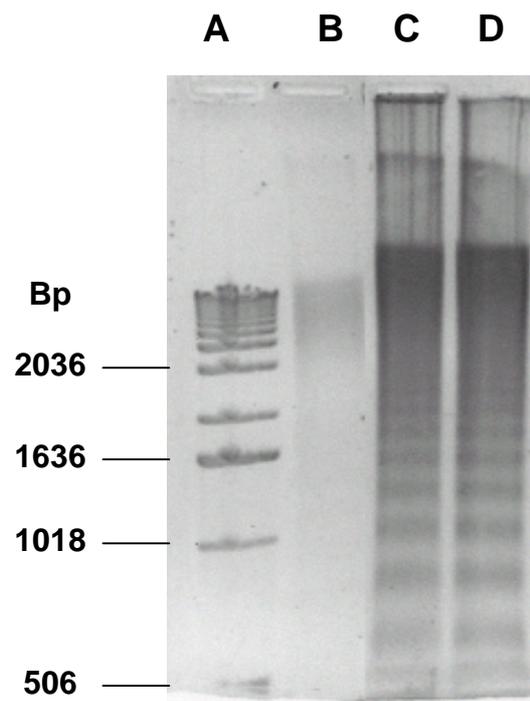


Abb. 35: DNA-Leiterbildung in IHKE-Zellen nach Exposition mit FB₁ und Ochratoxin (OTA). Die Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Bahn A: DNA-Längenstandard; Bahn B: Kontrolle = nur Medium; Bahn C: 100 nM OTA; Bahn D: 10 μM FB₁. (Bp = Basenpaare)

3.1.4 Diskussion der Ergebnisse

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, welcher Mechanismus der Induktion von Apoptose durch FB_1 zu Grunde liegt. Erste Erklärungsansätze vermuten einen Zusammenhang zwischen den beiden Eigenschaften von FB_1 zum einen in den Sphingolipidmetabolismus einzugreifen und zum anderen Apoptose zu induzieren (Schmelz et al. 1998, Tolleson et al. 1999). Fumonisin B_1 stellt nämlich einen potenten Inhibitor der Sphinganin-N-Acyltransferase (Ceramidsynthase) dar (Wang et al. 1991). Dieses Schlüsselenzym des Sphingolipid-Stoffwechsels katalysiert sowohl die Übertragung einer Fettsäure auf Sphinganin zur Bildung eines Dihydroceramides bei der *de novo*-Synthese von Sphingolipiden als auch die Reacylierung des Sphingosins, das aus dem Abbau komplexer Sphingolipide (Abb. 36) entsteht. Eine Blockierung dieses Stoffwechselvorganges ruft eine Reihe von Effekten hervor. Zum einen führt sie zu einer Anhäufung von freien Sphingoid-Basen und deren Abbauprodukten, also zu einem Anstieg des Sphinganin- und - wesentlich später - auch des Sphingosin-Gehaltes und der entsprechenden 1-Phosphate in der Zelle. Daneben kommt es zur Verarmung an komplexen Sphingolipiden und zu einer Beeinflussung anderer mit dem Sphingolipid-Stoffwechsel zusammenhängender Metabolismen. Die Inhibierung der Ceramidsynthase gilt als Schlüsselschritt in der Toxikogenese der Fumonisine (Riley et al. 2001). Auch die Induktion von Apoptose wird ihr zugeschrieben, indem die nach der Inhibierung der Ceramidsynthase auftretenden erhöhten Konzentrationen an Sphinganin in der Zelle den programmierten Zelltod herbeiführen sollen (Schmelz et al. 1998, Tolleson et al. 1999). Im Widerspruch zu dieser Aussage stehen jedoch die oben angeführten Ergebnisse. Bei den eingesetzten Substraten handelt es sich nämlich nicht nur bei FB_1 , sondern auch bei den übrigen Verbindungen um potente Hämmer der Ceramidsynthase (Norred et al. 1997, Humpf et al. 1998), die folglich auch einen Anstieg der Sphinganin-Konzentrationen in der Zelle bewirken sollten. Es war daher von Interesse herauszufinden, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Apoptose in den IHKE-Zellen und einer Erhöhung der Sphinganin-Konzentrationen in der Zelle besteht. Daher wurden in folgender Studie die Änderungen der Sphinganin- und der Sphingosin-Konzentrationen in den IHKE-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den oben genannten Substraten untersucht.

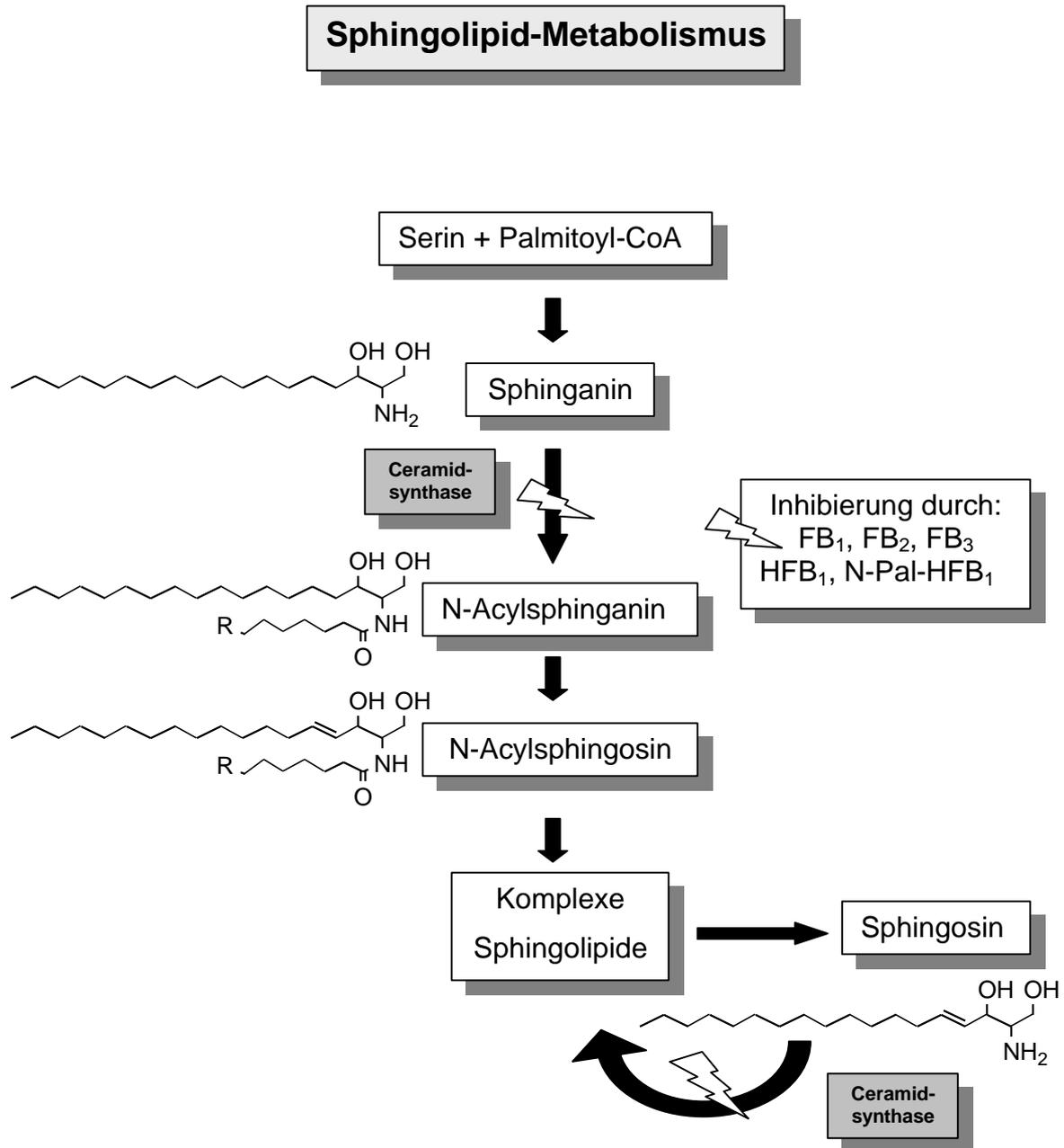


Abb. 36: Eingriff der Fumonisine und der Fumonisinmetabolite in den Sphingolipid-metabolismus (R = Alkylkette von variabler Länge) (Merrill et al. 1996).

3.2 Änderung der Sphingosin- und Sphinganin-Konzentrationen in IHKE-Zellen durch Fumonisine und Fumonisinmetabolite

3.2.1 Entwicklung einer einfachen Methode zur Erfassung von Sphingosin und Sphinganin in Zellkulturen

Um eventuelle Änderungen der Sphingosin(SO)- bzw. Sphinganin(SA)-konzentrationen (Abb. 37) in den IHKE-Zellen nach einer Inkubation mit Fumonisinen oder deren Metaboliten nachweisen zu können, wurde basierend auf der Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) eine Methode zum sensitiven und simultanen Nachweis der beiden Sphingoid-Basen (Abb. 37) in IHKE Zellen entwickelt. Eine derartige Methode ist jedoch nicht nur für diese Untersuchungen von Bedeutung. In zahlreichen Studien wurde bereits in der Vergangenheit immer wieder die Erhöhung der SA-Konzentration oder die Änderung des Verhältnisses von SA zu SO in verschiedenen Tierspezies untersucht, denen Fumonisine oral verabreicht wurden. Unter anderem waren dies Untersuchungen von Serum und Urin von Affen (Shephard et al. 1996, van der Westhuizen et al. 2001), Ponies (Wang et al. 1992), Hühnern (Weibking et al. 1993), Schweinen (Riley et al. 1993), Ratten (Riley et al. 1994a). Außerdem wurde auch Serum und Urin von Menschen untersucht (Qiu und Liu 2001, van der Westhuizen 1999). Diese Veränderung der Verhältnisse innerhalb der freien Sphingoid-Basen wurde auch in einer Reihe von Zellkulturen beobachtet wie beispielsweise in primären Rattenhepatocyten (Gelderblom et al. 1995), in renalen Zellen (Yoo et al. 1992) und in Neuronen (Merrill et al. 1993). Nicht zuletzt weil auch ein Einsatz des SA/SO-Verhältnisses als Biomarker für eine Fumonisinexposition diskutiert wird, ist das Interesse an einem quantitativen Nachweis von SO und SA in Geweben, Blut und Urin in den letzten Jahren stark gestiegen (Riley et al. 1993, Riley et al. 1994b). Für die Bestimmung von SA und SO stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die auf der Verwendung der HPLC beruhen und oft eine Modifikation der von

Merrill und Mitarbeitern entwickelten Methode (Merrill et al. 1988) darstellen: Nach einer Extraktion mit organischem Lösungsmittel, werden die beiden Basen als *o*-Phthaldialdehyd(OPA)-Derivate mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion nachgewiesen (Solfrizzo et al. 1997, Shephard und van der Westhuizen 1998, Castegnaro et al. 1998). Ein Hauptnachteil dieser Methode ist jedoch, dass es zu Interferenzen mit ebenfalls derivatisierten Matrixbestandteilen kommen kann, die eine akkurate quantitative Bestimmung erschweren. Andere Methoden beruhen auf der Verwendung anderer Derivatisierungsreagenzien wie Aminoquinolylcarbonyl (Lester und Dickson 2001), Biphenylcarbonyl (Jungalwala et al. 1983) oder *p*-Nitrophenylacetyl (Nishimura und Nakamura 1985), die stabilere Verbindungen entstehen lassen. Jedoch können auch diese Methoden ein Problem durch Interferenzen mit coeluerenden Matrixbestandteilen nicht eliminieren. Außer diesen Methoden existiert noch eine enzymatische Methode zur Quantifizierung der Sphingoid-Basen (Olivera et al. 1994). Die angeführten Methoden erweisen sich alle als zeitintensiv, da zur Probenvorbereitung mehrere Schritte notwendig sind. Daher war es Gegenstand dieser Arbeit eine schnelle Methode zur Bestimmung von SA und SO in Zellkulturen mittels HPLC-ESI-MS zu entwickeln, die sich gleichzeitig durch ihre Genauigkeit und Sensitivität auszeichnet.

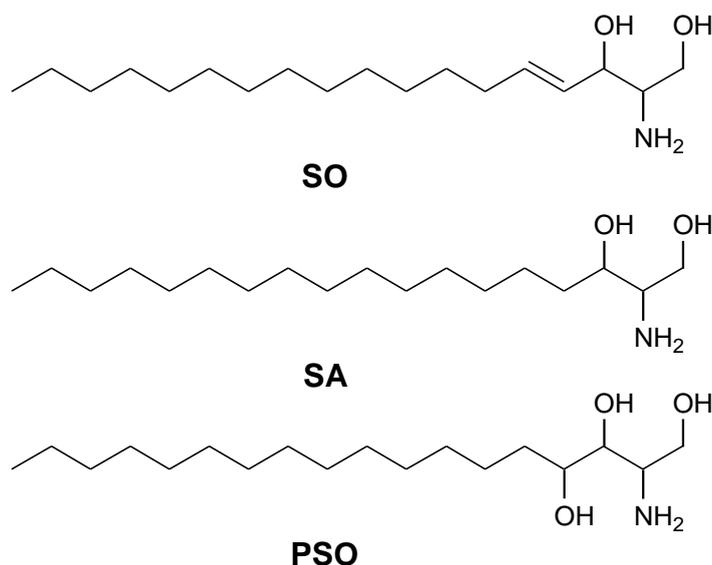


Abb. 37: Strukturformeln von Sphingosin (SO), Sphinganin (SA) und Phytosphingosin (PSO).

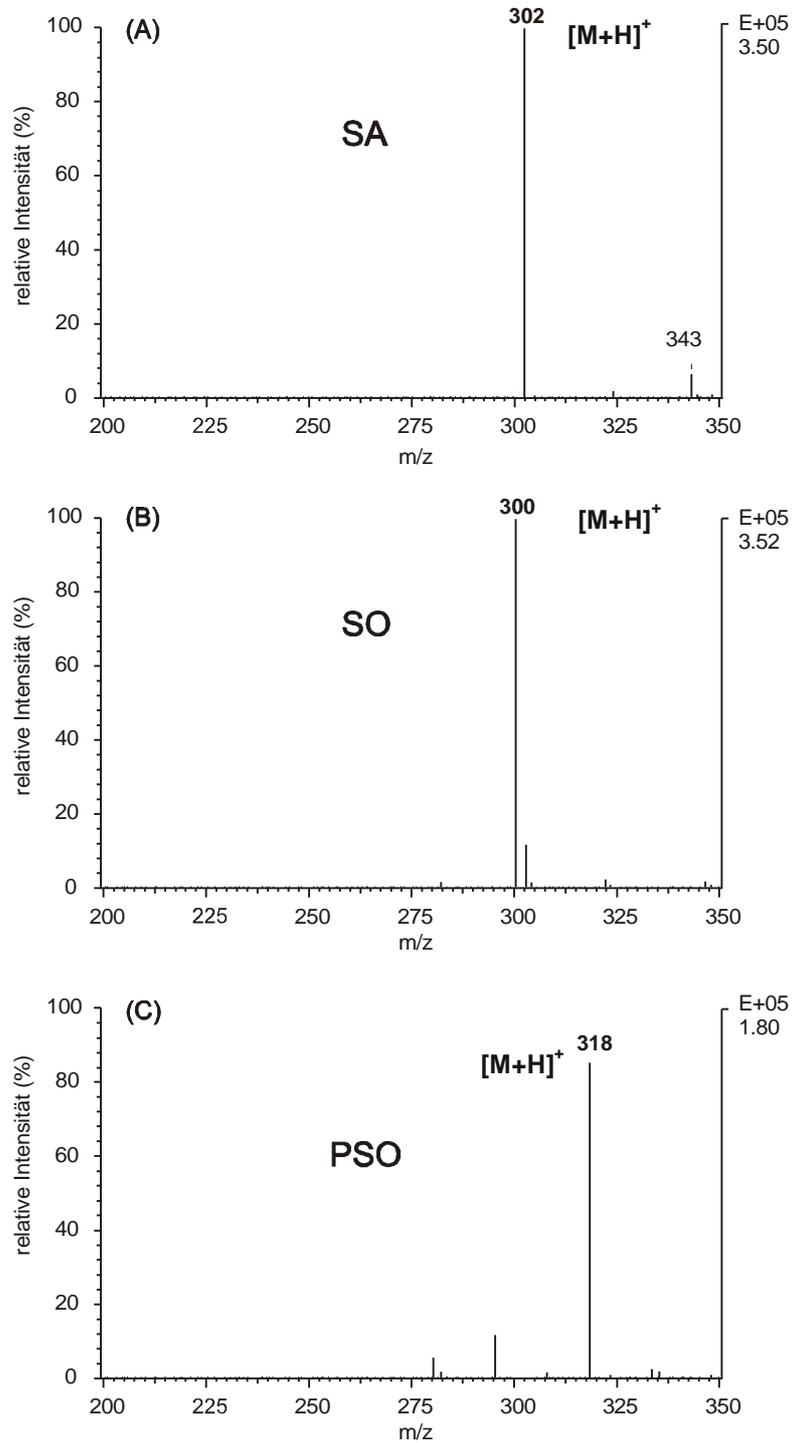


Abb. 38: Elektrospray-Massenspektren von (A) Sphinganin, (B) Sphingosin und (C) Phytosphingosin im positiven Modus.

Sphinganin SA und Sphingosin SO lassen sich sehr gut im Elektrospray ionisieren, wobei hauptsächlich die protonierten Molekülonen $[M+H]^+$ entstehen (Abb. 38). Ein ähnliches Verhalten im Elektrospray-Ionisationsprozess wurde auch für Phytosphingosin (PSO; Abb. 37 und Abb. 38) nachgewiesen, das als interner Standard verwendet wurde. Um eine kürzere Probenvorbereitung im Vergleich zu den bisher bekannten Methoden zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst mit Lysispuffer (Apo-Alert Caspase 3 Fluoreszenzkit, Clontech, Bad Soden) auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde mit dem internen Standard PSO versetzt und mit Methanol verdünnt. Die Sphingoid-Basen wurden anschließend nach einer weiteren Zentrifugation direkt mittels HPLC-MS analysiert.

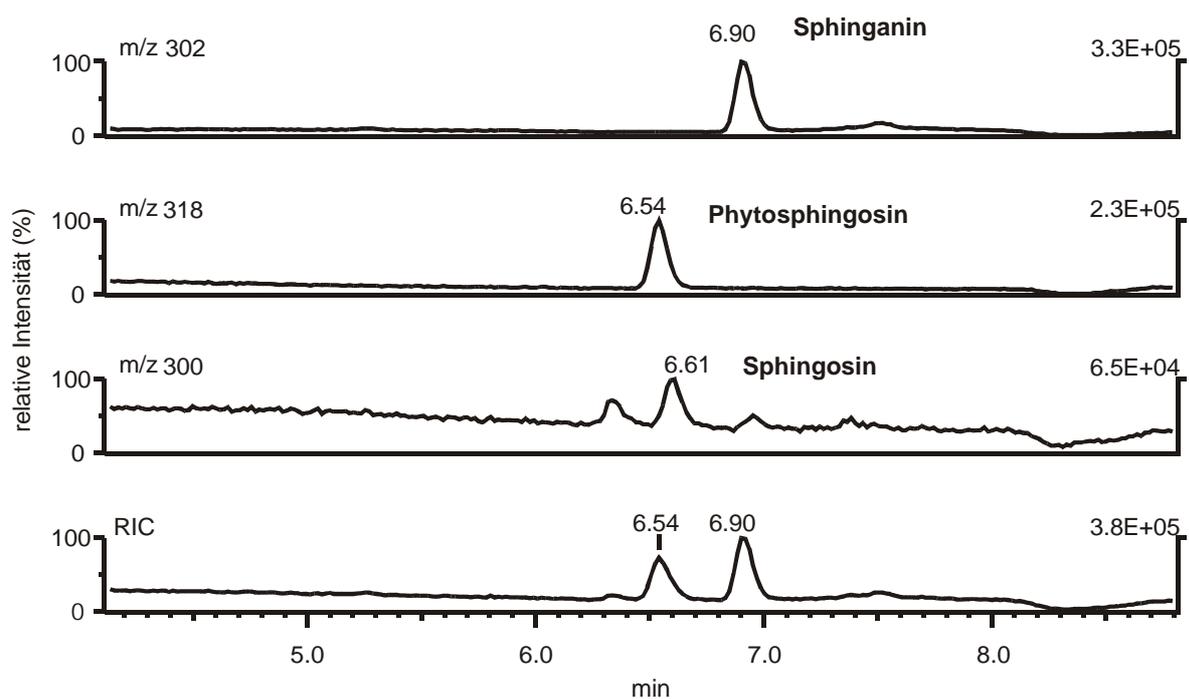


Abb. 39: HPLC-SIM-MS-Chromatogramm von IHKE-Zellen, die mit FB_1 (10 μ M, 24h) inkubiert wurden. (SIM: „selected ion monitoring“, RIC: „reconstructed ion chromatogram“).

Trennsäule Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m), Fließmittel Methanol/Wasser + 0,05% TFA (v/v), Fluss 200 μ l/min, SIM-Modus auf m/z 300 (Sphingosin), 302 (Sphinganin), und 318 (Phytosphingosin), (Methode 2, SIM-Experiment 2).

Die Verbindungen wurden an einer Umkehrphasen-(RP18)-HPLC-Mikrosäule mit einem Methanol/Wasser-Gradienten chromatographiert, der ursprünglich für die Analyse von Fumonisinen entwickelt worden war (Lukacs et al. 1996). Die Detektion der Analyte erfolgte im „selected ion monitoring“ (SIM)-Modus durch Scannen der m/z -Verhältnisse 300 für SO, 302 für SA und 318 für PSO. Abbildung 39 zeigt das HPLC-MS Chromatogramm eines Zelllysates von IHKE-Zellen, die über 24 Stunden mit FB_1 (10 μ M) inkubiert wurden. Dabei wurde SA (6,90 min) ausreichend von SO (6,61 min), das mit dem internen Standard PSO (6,54 min) coeluierte, getrennt. Da jedoch zur Quantifizierung die Flächen der Signale in den einzelnen Ionenspuren verwendet werden, ist eine Basislinientrennung nicht notwendig. Die analytische Methode wurde weiterhin durch die Aufnahme einer Kalibrierfunktion, sowie durch die Ermittlung der Bestimmungsgrenze und der Wiederfindungsrate charakterisiert. Für die Erstellung der Kalibrierfunktion wurden Mischungen aus Standardlösungen von PSO entweder mit SO oder SA in verschiedenen Massenverhältnissen hergestellt und jede der Mischungen mindestens dreimal analysiert. Die ermittelten Flächenverhältnisse (SO/PSO oder SA/PSO) wurden anschließend gegen die jeweiligen eingesetzten Massenverhältnisse aufgetragen. Die resultierenden linearen Kalibrierfunktionen mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,994$ für SO und $r = 0,995$ für SA sind in Abbildung 40 dargestellt. Die Nachweisgrenzen wurden ebenfalls mit Standardlösungen ermittelt. Dabei wurde für SO eine absolute Menge von 10 pg und für SA von 25 pg als Detektionslimit bei einem jeweiligen Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 festgelegt. Die Wiederfindungsraten von SA und SO waren mit Werten von $> 90 \%$ mehr als zufriedenstellend (Tab. 7).

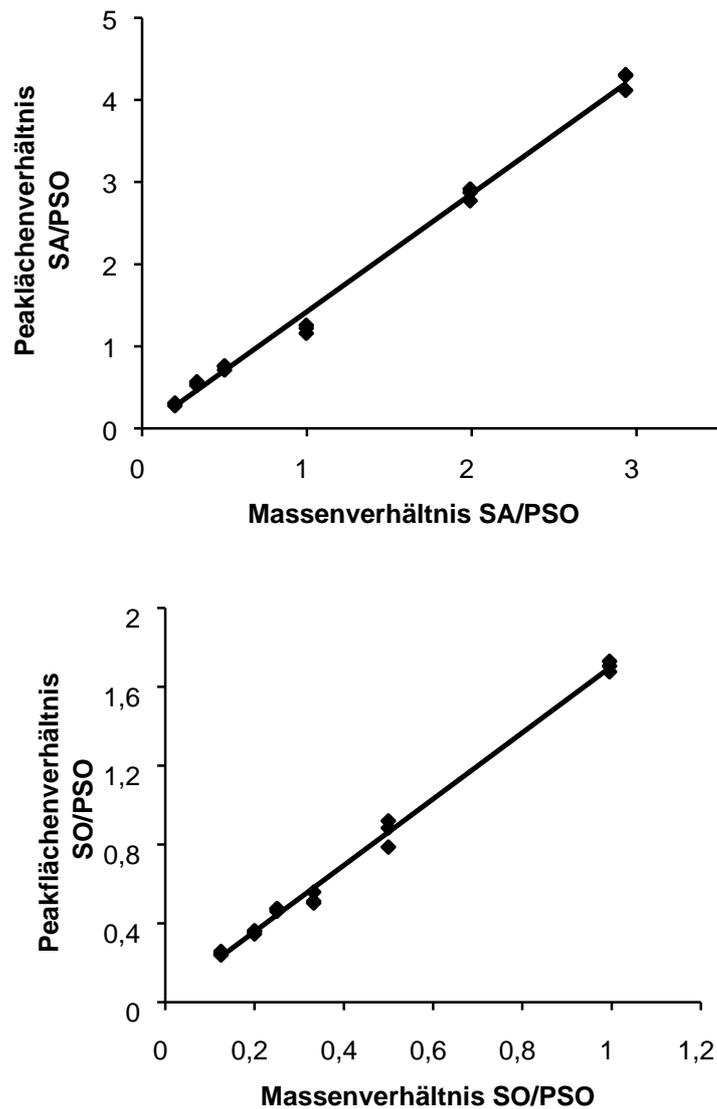


Abb. 40: Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Spinganine (SA) und Sphinganine (SO), aufgenommen mit reinen Standardlösungen. Dargestellt ist die Beziehung zwischen den Massenverhältnissen von SA oder SO mit Phytosphingosin (PSO) und den entsprechenden Peakflächenverhältnissen.

Tabelle 7: Wiederfindungsraten von Sphingosin und Sphinganin in IHKE-Zelllysaten.

Probe	Zusatz (ng/100 µl Zelllysate)	Wiederfindungs- raten ^a (%)
1	Sphingosin (5)	99 ± 2,0
2	Sphinganin (5)	101 ± 2,0
3	Sphingosin (25)	92 ± 1,0
4	Sphinganin (25)	102 ± 5,0

^a Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± relative Standardabweichung aus 2 Bestimmungen dargestellt (einfach Aufarbeitung und jeweils doppelte Injektion).

Nach Literaturangaben wurden bei der Verwendung der OPA-Derivate von SO und SA Wiederfindungsraten von 55% (Shephard und van der Westhuizen 1998) und 80-96% (Solfrizzo et al. 1997, Castegnaro et al. 1998) in Urin- und Serumproben erzielt. Ein Vergleich der Werte ist jedoch nur bedingt möglich, da die in beiden Fällen verwendeten analytischen Techniken sehr unterschiedlich sind.

3.2.2 Sphingosin- und Sphinganin-Konzentrationen in IHKE-Zellen nach Exposition durch Fumonisine- und Fumonisinmetabolite

Mit der oben entwickelten Analysenmethode wurden die Sphingosin- und Sphinganin-Konzentrationen in IHKE-Zellen nach einer Inkubation mit den unter 3.1.3 verwendeten Substraten bestimmt. Während die Sphingosin-Konzentrationen nur geringfügig anstiegen (Anstieg max. 190% gegenüber den Kontrollzellen), verursachten alle eingesetzten Substrate einen signifikanten Anstieg an Sphinganin (bis zu 7000%) gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 41). Damit wurde gezeigt, dass die Ceramidsynthese von allen Fumonisinen und Fumonisinmetaboliten gehemmt wird. Die Inkubation der Zellen mit den Fumonisinen FB₁, FB₂ und FB₃ (10 µM, 25µM) führte jeweils zu einem annähernd gleich hohen Anstieg an Sphinganin (ca. 6000% gegenüber den Kontrollzellen). Bei der

Inkubation mit HFB₁ und N-Pal-HFB₁ hingegen lagen die Sphingandin-Konzentrationen in den Zellen wesentlich niedriger (ca. 2000% gegenüber den Kontrollzellen). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate früherer Studien an HT29 Zellen, bei denen sich bei gleicher Konzentration FB₁ gegenüber HFB₁ als effektiveres Substrat zur Inhibierung des Sphingolipidmetabolismus erwies (Schmelz et al. 1998).

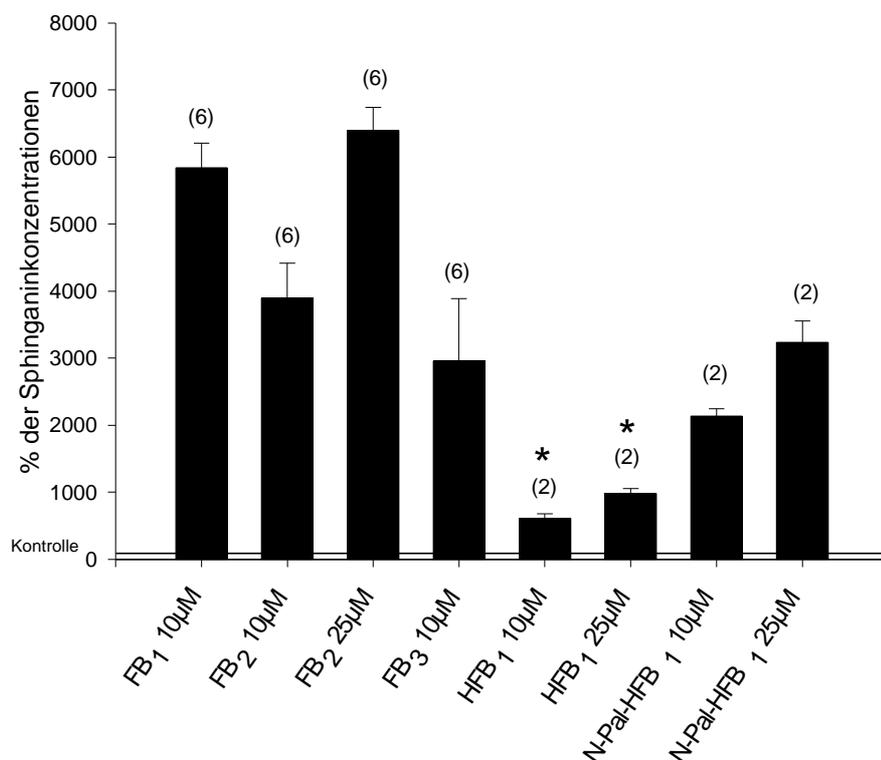


Abb. 41: Sphingandin-Konzentrationen in IHKE-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (100%) nach 24-stündiger Exposition mit verschiedenen Fumonisinen und Fumonisinmetaboliten. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen im serumfreien Medium inkubiert. Signifikante Werte sind mit „*“ gekennzeichnet („*“ = $P < 0,05$); $n = 2-6$ für jeden angegebenen Wert.

(Kontrolle = nur Medium, P = Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen signifikanten Aktivität, n = Anzahl der Petrischalen.)

3.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Wie bereits unter 3.1.4 erwähnt, wird die Hemmung der Ceramidsynthese und die dadurch bedingte Akkumulation von Sphingarin für das Auftreten von Apoptose nach einer FB₁-Exposition verantwortlich gemacht (Schmelz et al. 1998, Tolleson et al. 1999). Betrachtet man jedoch die in den inkubierten Zellen gemessenen Sphingarin-Konzentrationen (Abb. 41), so stellt man fest, dass IHKE-Zellen, die mit 10 µM FB₁, 25 µM FB₂ und 10 µM FB₃ inkubiert wurden, ähnliche Sphingarin-Konzentrationen aufweisen. Dabei ist von den drei Substraten jedoch nur FB₁ in der Lage die Caspase 3 zu aktivieren und damit Apoptose zu induzieren (Abb. 34). Dies zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Apoptose und der gleichzeitigen Erhöhung des Sphingarin - wie er in der Literatur beschrieben wird - diskutiert werden muss. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass FB₁ zwei Effekte in den IHKE-Zellen hervorruft. Erstens: Es induziert Apoptose. Zweitens: Es hemmt die Ceramidsynthese und führt damit zu erhöhten Konzentrationen an Sphingarin in der Zelle. Beide Effekte treten zwar gleichzeitig jedoch unabhängig voneinander auf. Der apoptotische Effekt von FB₁ (gemessen als Caspase 3 Aktivität und DNA-Leiterbildung) wird nicht nur durch einen Anstieg der Sphingarin-Konzentrationen verursacht. Der Eingriff in den Sphingolipidmetabolismus gilt als entscheidender Schritt bei der Toxikogenese von FB₁ (Merrill et al. 2001). Es treten jedoch neben dem Anstieg von Sphingarin noch eine Vielzahl anderer Effekte auf, die durch die Einwirkung von FB₁ hervorgerufen werden (Riley et al. 2001). Beeinflusst werden unter anderem Phosphoprotein Phosphatasen (Fukuda et al. 1996) und die Protein Kinase C (PKC) (Yeung et al. 1996), die unabhängig von einer Akkumulation von Sphingoid-Basen delokalisiert wird. Des Weiteren berichteten Ciacci-Zanella und Jones (Ciacci-Zanella und Jones 1999), dass die Induktion von Apoptose durch FB₁ über den Tumor Nekrosis Faktor (TNF)-Weg vermittelt wird. In Anlehnung daran konnte kürzlich gezeigt werden, dass die durch FB₁ verstärkt hervorgerufene TNF- α -Expression, unabhängig von einer Anreicherung von Sphingoid-Basen, die durch die Hemmung der Ceramidsynthese in LLC-PK₁-Zellen hervorgerufen wurde, verläuft (He et al. 2001). Bei TNF- α handelt es sich um einen sogenannten „Todesrezeptor“, der an der Zelloberfläche auftritt und dessen Aktivierung zu einer rezeptorvermittelten Induktion von Apoptose führt. Diese Studien

demonstrieren, dass es sich bei der Induktion von Apoptose durch FB₁ um einen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärten und komplexen Mechanismus handelt. Mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch gezeigt worden, dass eine Anreicherung an Sphingalin durch die Hemmung der Ceramidsynthase durch FB₁ keinen entscheidenden Schritt bei der Erklärung des apoptotischen Mechanismus darstellt. Obwohl alle getesteten Fumonisine die Ceramidsynthase inhibieren und die Sphingalin-Konzentrationen in den Zellen ansteigt, war nur FB₁ in der Lage Apoptose zu induzieren.

4 Studie zum Metabolismus von Fumonisin B₁

4.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Neben den Untersuchungen zur biologischen Aktivität sind Studien zur Toxikokinetik und zur Bioverfügbarkeit von entscheidender Bedeutung, um das toxikologische Potenzial risikoreicher Stoffklassen abschätzen zu können. Dabei ist es zunächst wichtig zu erkennen, in welcher Form und in welchen Mengen die toxische Komponente vom menschlichen Körper absorbiert wird. Da Fumonisine ausschließlich mit der Nahrung aufgenommen werden, sind hier die ersten Möglichkeiten zu einer Metabolisierung der Substanzen schon im Gastro-Intestinal-Trakt gegeben. In Studien an Affen konnten bereits das teilweise (PHFB₁) und das vollständig hydrolysierte FB₁ (HFB₁) als Metabolite von oral verabreichten FB₁ im Darm und in den Fäzes nachgewiesen werden (Shephard et al. 1994, Shephard et al. 1995). Dass ein ähnlicher Abbau der Fumonisine bei Schweinen stattfindet, wurde bisher nur vermutet (Prelusky et al. 1994). Daneben wird eine Metabolisierung von FB₁ im Darm von Ratten nicht erwähnt (Norred et al. 1993). Anhand dieser wenigen Daten gestaltet es sich schwierig, Rückschlüsse auf eine Metabolisierung von FB₁ im menschlichen Darm zu ziehen. Zwar konnten Metabolite im Darm und in Fäzes von Affen nachgewiesen werden, jedoch bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora von Menschen und der von nichthumanen Primaten. Um daher eine etwaige Metabolisierung beim Menschen abschätzen zu können, ist es wichtig Metabolisierungsversuche in einem adäquaten System durchzuführen. Der Gebrauch von Schweinezäkum gilt dabei als anerkannte *in vitro*-Methode um die Freisetzung von Medikamenten im menschlichen Darm zu testen (Sarlikiotis et al. 1992). Der Vergleich dieses Systems mit dem menschlichen Darm ist möglich, da der Darm des Menschen und der von Schweinen sehr ähnliche Mikrofloren aufweisen. Im Verlauf der hier beschriebenen Arbeiten wurde daher Fäzes von Schweinen unter anaeroben Bedingungen

mit FB₁ inkubiert und auf die Bildung von Metaboliten untersucht. Damit sollten Rückschlüsse auf eine Metabolisierung von FB₁ im menschlichen Darm gezogen werden.

4.2 Inkubation mit Schweinekot: *In vitro*-Methode zur Untersuchung der Interaktion von intestinaler Mikroflora und Fumonisin B₁

Neben den körpereigenen Organen ist auch die intestinale Mikroflora maßgeblich an der Metabolisierung von Fremdstoffen beteiligt. Sie enthält über 400 vorwiegend anaerobe Bakterienspezies. Im Gegensatz zum Fremdstoffmetabolismus der Leber, in dem Oxidations- und Konjugationsreaktionen überwiegen, dominieren im anaeroben Milieu des Darmlumens Reduktion und Hydrolyse. Zu den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der intestinalen Mikroflora gehören Galactosidasen, Glucuronidasen, Glucosidasen, Sulfatasen, Azo- und Nitroreduktasen (Laube et al. 2001, Sarlikiotis et al. 1992). Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, mit Hilfe eines *in vitro*-Systems die menschliche intestinale Mikroflora zu modellieren und damit Untersuchungen zur Umsetzung von FB₁ durchzuführen. Als *in vitro*-System wurde hierzu frischer Schweinekot verwendet, der in einem Puffer unter anaeroben Bedingungen suspendiert wurde. Unter Erhaltung der anaeroben Bedingungen wurde die so erhaltene Kot-Puffer-Suspension mit Fumonisin B₁ versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 4 bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor es mittels HPLC-MS auf die Bildung der beiden Hydrolyseprodukte PHFB₁ und HFB₁ bzw. anderer Abbauprodukte untersucht wurde. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben sterilfiltriert, zentrifugiert, der Überstand lyophilisiert und in Lösungsmittel aufgenommen. Die Aufrechterhaltung der anaeroben Bedingungen wurde durch den Farbindikator Resazurin (anaerob farblos, aerob blau) überprüft. Die enzymatische Aktivität der Mikroflora während der Inkubation wurde mit Hilfe eines Galactosidase-Tests kontrolliert. Hierzu wurden Proben nach einer 18-stündigen Inkubation (37°C) mit *p*-Nitrophenyl- α -D-

Galactopyranosid (PNP-G) versetzt und die enzymatische Reaktion nach 5, 10, 20 und 60 min durch Einfrieren der Proben gestoppt. Ist Galactosidase-Aktivität vorhanden, so wird *p*-Nitrophenol (PNP) freigesetzt, das bei einer Wellenlänge von 400 nm vermessen werden kann. Abbildung 42 zeigt die Aktivität der α -D-Galactosidase, dargestellt als die Menge an freigesetztem PNP in Aliquoten der Kot-Puffer-Suspensionen.

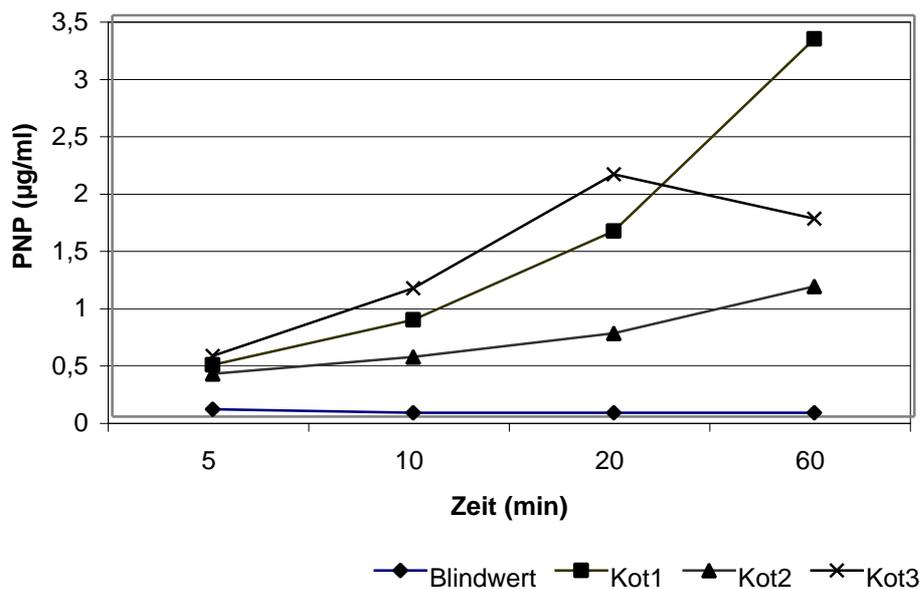


Abb. 42: Bestimmung der Galactosidase-Aktivität einzelner Schweinefäzesproben (Kot 1 bis 3) gemessen als die Menge an freigesetztem *p*-Nitrophenol (PNP) nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden ohne Substrat und anschließendem Substratzusatz über 5, 10, 20 und 60 Minuten. Jeder Punkt symbolisiert den Gehalt an PNP in einem verdünnten Aliquot (600 µl) der jeweiligen Kot-Puffer-Suspension.

(Blindwert = nur Inkubationspuffer mit Substrat)

Während im Kontrollversuch keine Bildung von PNP beobachtet werden konnte, wurde eine sukzessive Freisetzung an PNP in den Proben mit Schweinekot festgestellt (Abb. 42). Die nachgewiesene Galactosidase-Aktivität bestätigt damit die Funktionsfähigkeit des *in vitro*-Systems. Dennoch konnte mittels HPLC-MS keine Bildung von PHFB₁ oder HFB₁ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass entweder keine

Metabolisierung stattfindet oder dass der bereits ausgeschiedene Kot nicht für derartige Metabolismusstudien geeignet ist. Aus diesem Grund ist es bei der Weiterführung der Untersuchungen auf diesem Gebiet sinnvoll, die Ergebnisse der hier dargestellten Inkubationsversuche direkt mit Darminhalt aus Dünn- und Dickdarm bzw. Schweinezäkum zu wiederholen, um gänzlich eine Metabolisierung von FB_1 durch die Mikroflora des Schweines ausschließen zu können.

D Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Deisenheim) und Aldrich (Steinheim) bezogen. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert.

FB₁ und FB₂ wurden von den Firmen Sigma, Calbiochem (Bad Soden) oder Alexis Biochemicals (Grünberg) bezogen. Außerdem wurden FB₂ und FB₃ von Frau Dr. M. Trucksess, FAD, Washington, USA zur Verfügung gestellt.

NCM-FB₁ wurde nach einer Methode von Howard und Mitarbeitern (1998) synthetisiert und von Frau Dr. M. Hartl zur Verfügung gestellt.

HFB₁ wurde aus FB₁ synthetisiert (vgl. 3.2).

N-Pal-HFB₁ wurde nach Humpf und Mitarbeiter (1998) synthetisiert und von Herrn Prof. Dr. H.-U. Humpf zur Verfügung gestellt.

Sphingosin, Sphinganin und Phytosphingosin wurden von Sigma bezogen.

DMEM/Ham's-F12 Medium und fötales Kälberserum wurden von Biochrom KG (Berlin) bezogen. Der Caspase 3 Assay Kit wurde von Clontech Laboratories GmbH (Heidelberg) erworben.

1.2 Untersuchungsmaterial

Die Heißextrudatproben zur Untersuchung von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ wurden nach unseren Vorgaben (Variation von Temperatur, Drehzahl und Feuchtigkeit; vgl. Teil C 1.3) vom Institut für Lebensmittel und Umweltforschung e.V., Bergholz-Rehbrücke, hergestellt. Die Lebensmittelproben, zur Analytik von N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ wurden im örtlichen Einzelhandel erworben. Die Spargelproben aus Anbaugebieten in Rheinland-Pfalz sowie die Knoblauchproben wurden von der Humboldt-Universität zu Berlin (Frau Dr. M. Goßmann, Institut für Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin) zur Verfügung gestellt.

1.3 Zellkultur

Humane proximale Tubuluszellen (immortalized kidney epithelial cells, IHKE, Passage 170-180) wurden von S. Mollerup, National Institute of Occupational Health, Norwegen zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach Tveito und Mitarbeitern (Tveito et al. 1989) in einem DMEM/Ham's-F12 Medium (100 µl/cm² Wachstumsfläche) angereichert mit 13 mmol/l NaHCO₃, 15 mmol HEPES, 36 µg/l Hydrocortison, 5 mg/l humanes Apotransferrin, 5 mg/l Rinderinsulin, 10 µg/l epidermaler Maus Wachstumsfaktor, 5 µg/l Na-Selenit und 10% fötales Kälberserum (pH 7,3 bei 37°C in 5% CO₂) kultiviert.

1.4 Schweinefäzes

Der Schweinekot für Metabolismusstudien stammte von Versuchstieren (Göttinger Mini-Pigs) der Universitätsklinik Würzburg.

1.5 Adsorptionsmaterial

SAX- und RP18-Featphasen (je 500 mg) stammten von ICT (Bad Homburg).

2 Geräte

2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen)
HPLC-System:	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim)
Injektor:	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife 5 µl
Autosampler:	Spark Holland Triathlon (Emmen, Niederlande)
ESI-Koppelkapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.d.) (J&W, Folsom)
“Sheath“-Gas:	Stickstoff 5.0, 50-70 psi (1 psi ≈ 7 kPa)
Hilfgas:	Stickstoff 5.0, 10 l/min
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsdruck 1,8 – 2,2 mTorr (0,239 – 0,293 Pa)
Kollisionsenergie:	25 bis 50eV
Ionenquelle:	760 Torr (1013,24 hPa), Raumtemperatur
Eingangskapillare:	200 bis 230°C
Kapillarspannung:	3,5 bis 4,0 kV

Datenaufnahme und

-auswertung: DEC 500/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring)
ICIS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen)

Methode 1

Trennsäule 1: Symmetrie C18 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) (Waters, Eschborn)
Trennsäule 2: XTerra C18 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) (Waters, Eschborn)
Fließmittel: A: Wasser/0,05% Trifluoressigsäure (v/v)
B: Acetonitril/0,05% Trifluoressigsäure (v/v)
Gradient: 0 min 30% B, 15 min 45% B, 17 min 99% B, 20 min 99% B
Fluss: 0,2 ml/min
SIM-Experiment 1: 0,0 bis 5,5 min: m/z 406 (HFB₁), m/z 722 (FB₁),
 m/z 728 (FB₁-D₆)
5,5 bis 8,0 min: m/z 722 (FB₁), m/z 728 (FB₁-D₆).
 m/z 780 (NCM-FB₁)
8,0 bis 20 min: m/z 780 (NCM-FB₁), m/z 706 (FB₂, FB₃)
 m/z 390 (HFB₂, HFB₃)
SIM-Experiment 2: 0,0 bis 20 min: m/z 706 (FB₂, FB₃), m/z 722 (FB₁),
 m/z 728 (FB₁-D₆)
SRM-Experiment: 0,0 bis 20 min: m/z 884/376 (-40eV)
Scanzeit: 1 sec

Methode 2

Trennsäule 1: Waters C18 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) (Waters, Eschborn)
Trennsäule 2: Lichrospher 60 RP (100 x 2 mm i.d., 5 µm) (Knauer, Berlin)
Fließmittel: A: Wasser/0,05% Trifluoressigsäure (v/v)
B: Methanol/0,05% Trifluoressigsäure (v/v)
Gradient: 0 min 60% B, 1 min 60% B, 7 min 99% B, 10 min 99% B
Fluss: 0,2 ml/min

SIM-Experiment 1:	0,0 bis 10 min:	m/z 706 (FB ₂ , FB ₃), m/z 722 (FB ₁), m/z 728 (FB ₁ -D ₆)
SIM-Experiment 2:	0,0 bis 10 min	m/z 300 (Sphingosin), m/z 302 (Sphinganin) m/z 318 (Phytoshingosin)
SIM-Experiment 3:	0,0 bis 10 min:	m/z 722 (FB ₁), m/z 728 (FB ₁ -D ₆)

Methode 3

Trennsäule 1 :	Waters C18 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) (Waters, Eschborn)	
Trennsäule 2:	XTerra C18 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) (Waters, Eschborn)	
Fließmittel:	A: Wasser/0,05% Trifluoressigsäure (v/v) B: Acetonitril/0,05% Trifluoressigsäure (v/v)	
Gradient:	0 min 25% B, 15 min 45% B, 17 min 99% B, 20 min 99% B	
Fluss:	0,2 ml/min	
SIM-Experiment 1:	0,0 bis 20 min:	m/z 406 (HFB ₁), m/z 412 (HFB ₁ -D ₆)
SIM-Experiment 2:	0,0 bis 20 min	m/z 406 (HFB ₁), m/z 564 (PHFB ₁), m/z 722 (FB ₁)
Scanzeit:	1 sec	

2.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Geräte:	Bruker WM 400 (400 MHz) Bruker DMX 600 (600 MHz)
Standard:	CD ₃ CN, δ = 1,95 ppm ¹ H-NMR und 1,3 ppm für ¹³ C-NMR CD ₃ OD, δ = 3,5 ppm ¹ H-NMR und 49,3 ppm für ¹³ C-NMR
Lösungsmittel:	CD ₃ OD, D ₂ O, MeCN-D ₃ (Aldrich, Steinheim)

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: S = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen

Verschiebungen relativ zum Standard werden in ppm, die Kopplungskonstanten J in Herz ausgedrückt.

2.3 Sonstige Geräte

pH-Meter:	Labor pH-Meter, (Knick, Berlin) Einstabmesselektrode (Ingold)
Waagen:	Mettler PL 300, Mettler PN 163, Analysenwaage Mettler H 10 W (Mettler Gießen)
Mühle:	Krups Speedy
Ultraschallbad:	Branson 32
Rotavapor:	Büchi (Büchi, Konstanz)
Ultra-Turrax:	IKA Labortechnik (Typ T25) (Jahnke & Kunkel, Staufen)
Tischzentrifuge:	Hettich, Universal 16 (Hettich, Tuttlingen)
Kühlzentrifuge:	Heraeus Biofuge Fresco (Kendro, Asheville, USA)
Multilabel-Counter:	Wallac Victor ² 1420 (Wallac, Turku, Finland)
Lyophilisator:	Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode)
Hochauflösende Massenspektrome- trie (HRMS):	Bruker Reflex IV (Bruker, Rheinstetten)

3 Methoden

3.1 Fumonisin-Stammlösungen

Für massenspektrometrische Untersuchungen werden Stammlösungen von 1,0 mg FB₁, FB₂, FB₃, HFB₁ oder N-Carboxymethyl-FB₁ hergestellt und mit Acetonitril/Wasser 1:1 um den Faktor 100 (10 µg/ml) bzw. 1000 (1 µg/ml) verdünnt. Für die Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Fumonisine werden Lösungen (10 µM) in Acetonitril/Wasser 30:70 verwendet. Für Metabolismusstudien wird eine Stammlösung von 2 mg/ml FB₁ in H₂O hergestellt.

3.2 Kalibrierung des Isotopenstandards FB₁-D₆

Das aus Pilzkulturen isolierte, deuterierte Fumonisin FB₁-D₆ stand als wässrig-methanolische Stammlösung (Konzentration etwa 60 µg/ml) zur Verfügung. Für die Quantifizierung von FB₁ in Heißextrudaten und Lebensmittelproben wird eine 1:50-Verdünnung dieser Stammlösung mit Acetonitril/Wasser 1:1 eingesetzt (Konzentration ca. 1,2 µg/ml). Der Anteil an nicht-deutertem FB₁ wird massenspektrometrisch durch fünffache Injektion dieser Verdünnung und Vergleich der für FB₁ und FB₁-D₆ erhaltenen Peakflächen bestimmt (Analytik siehe 2.1, Methode 2, Trennsäule 2, SIM-Experiment 3). Der daraus erhaltene Wert (in der Regel zwischen 6 und 7%) wird bei der Auswertung der Proben mit berücksichtigt. Zur Ermittlung der exakten Konzentrationen der verdünnten FB₁-D₆-Lösung wird diese mit einer FB₁-Lösung (1 µg/ml) in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) gemischt, diese Mischung mehrfach massenspektrometrisch vermessen und der Isotopenstandard durch Vergleich der Peakflächen auf die FB₁-Lösung kalibriert.

3.3 Synthese von hydrolysiertem Fumonisin FB₁ (HFB₁)

Für die Synthese des hydrolysierten Fumonisin B₁ (HFB₁) werden 5 mg FB₁ (7 µmol) in 5,5 ml 2N Kaliumhydroxid gelöst und zwei Stunden lang unter Rückfluss erhitzt (Hopmans et al. 1995). Nach dem Abkühlen wird die Reaktionsmischung mit konzentrierter und 2N Salzsäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels Festphasenextraktion über RP18-Kartuschen (ICT, 500 mg). Um ein Überladen der Säulen durch eine zu hohe Salzkonzentration zu vermeiden, wird das Volumen der Lösung durch Verdünnen mit Wasser auf etwa 10 ml vergrößert, der Ansatz halbiert und auf zwei mit Methanol und Wasser konditionierte Festphasen aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Wasser (4 ml) wird das hydrolysierte Fumonisin mit 2-3 ml Methanol/Essigsäure 99:1 eluiert.

HFB₁: 2,4 mg (86 %)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm, *J* in Hz):

δ = 0.91 (d, *J* = 7.0, 3H), 0.92 (t, *J* = 7.7, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.6, 3H), 1.28 (d, *J* = 6.6, 3H), 1.0-1.75 (m, 20H), 1.70 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.19 (t, *J* = 5.9, 1H), 3.64 (m, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.81 (m, 1H)

ESI-MS: *m/z* 406 [M+H]⁺, 444 [M+K]⁺

ESI-MS/MS (-25eV): *m/z* 388 [M+H-H₂O]⁺, 370 [M+H-2H₂O]⁺, 352 [M+H-3H₂O]⁺, 334 [M+H-4H₂O]⁺

3.4 Untersuchung von Heißextrudaten und maishaltigen Lebensmitteln

3.4.1 Systemkalibrierung

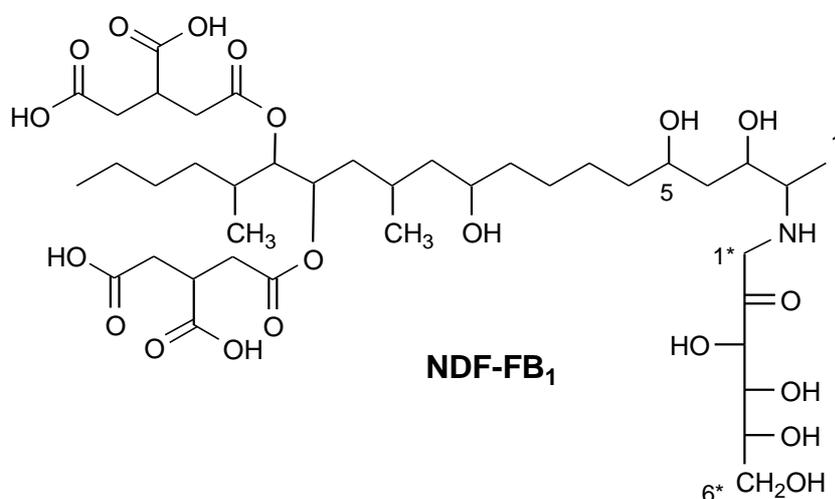
Für die Aufnahme der Kalibrierfunktion werden unterschiedliche Mengen einer FB₁-D₆-Stammlösung (ca. 1 ppm; Bestimmung der genauen Konzentration siehe 3.2) mit je 100 µl einer NCM-FB₁-Stammlösung (1 ppm) so versetzt, dass Mischungen mit unterschiedlichen Massenverhältnissen an NCM-FB₁ und FB₁-D₆ entstehen (1:5, 1:4, 1:3, 1:2, und 1:1). Diese werden anschließend im SIM-Modus analysiert. Jede Probe wird dabei mindestens 3 mal injiziert (Injektionsvolumen 10 µl). Die resultierenden Peakflächenverhältnisse der Molekülonen m/z 780 und m/z 728 werden gegen die entsprechenden Massenverhältnisse aufgetragen (siehe Teil C Kapitel 1, Abb. 12).

3.4.2 Aufarbeitung

Die Heißextrudate und die im örtlichen Handel erhältlichen Lebensmittelproben werden zunächst in einer Mühle zerkleinert und gut durchmischt. Jeweils 2,5 g oder 5 g der trockenen, pulverförmigen Proben werden in einen 50 ml-Zentrifugenbecher (Corning, New York) eingewogen und eine entsprechende Menge an Isotopenstandard FB₁-D₆ (10-100 ng/g) zugegeben. Nach Zugabe von 10 ml Extraktionslösung (Methanol/Acetonitril/Wasser 25:25:50) homogenisiert man exakt 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax. Anschließend wird bei 4000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 1N Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt. Zum besseren Sedimentieren der ausflockenden Substanzen wird das verbleibende Zentrifugat über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag enthält keine Fumonisine. Vom Überstand werden 4 ml auf eine RP18-Fesrphasenextraktionssäule (ICT, 500 mg) aufgegeben, die zuvor mit 2 ml Methanol und 1

ml Wasser konditioniert wurde. Man wäscht zuerst mit 2 ml Methanol/Wasser 1:3, danach mit 1 ml Methanol/Wasser 1:1 und eluiert schließlich mit 1 ml Methanol/Essigsäure 95:5. Das Eluat wird im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und der Rückstand in 100 μ l Acetonitril/Wasser (30:70) gelöst. Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 10 μ l injiziert (vgl. 2.1; Methode 1, Trennsäule 1, SIM-Experiment 1). Die Proben werden doppelt aufgearbeitet und je zweimal analysiert. Für die Quantifizierung von NCM-FB₁ wird die Kalibriergerade aus Abb. 12 (Teil C, Kapitel 1.3.4) herangezogen. Die Auswertung der Peakflächenverhältnisse von FB₁ bzw. HFB₁ und FB₁-D₆ erfolgt nach der Kalibrierung früherer Arbeiten (Hartl und Humpf 1999, Hartl 2000).

3.5 Synthese von N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-Fumonisin B₁ (NDF-FB₁)



In einem 1,5 ml Septum-Vial werden 5 mg FB₁ (7 μ mol) zusammen mit 5,5 mg D-Glucose (28 μ mol) in 1,2 ml Methanol gelöst und die Mischung anschließend bei 65°C für 36 Stunden in einem Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgezogen und der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels Festphasenextraktion über RP-18-

Kartuschen (ICT, 500 mg). Um ein Überladen einer Säule zu verhindern, wird das Volumen der Lösung halbiert und auf zwei Säulen verteilt, die zuvor mit je 4 ml Methanol und anschließend mit 6 ml Wasser konditioniert worden waren. Nach dem Waschen mit je 3 ml von Mischungen aus Wasser/Methanol (80:20 und 50:50) wird das Produkt mit einer weiteren Mischung aus Wasser/Methanol (30:70) eluiert und anschließend im Vakuum getrocknet.

N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-FB₁: 3,8 mg (61%)

ESI-MS: m/z 884 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (-45eV): m/z 866 [M+H-H₂O]⁺, 514 [M+H-2TCA-H₂O]⁺, 442 [M+H-2TCA-5H₂O]⁺, 334 [M+H-2 TCA-Glc-Rest-2H₂O]⁺

¹H NMR (600 MHz, MD₃CN/D₂O 30:70, ppm, *J* in Hz)(ausgewählte charakteristische Signale)^a:

δ = 0.91 (d, *J* = 6.9 3H), 0.92 (t, *J* = 7.7, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.6, 3H), 1.26 (d, *J* = 6.6, 3H), 1.0-1.75 (m, 20H), 4.85 (m, 1H), 5.05 (m, 1H)

¹³C NMR (600 MHz, MD₃CN/D₂O 30:70, ppm)(ausgewählte charakteristische Signale)^a:

12.6 (C1), 14.2 (C20), 15.8 (C21), 23.2 (C19), 32.2 (C17), 34.0 (C16), 35.8 (C2'/2''), 36.2 (C6/9/13), (38.0 (C3'/3''/4'/4''), 53.2 (C1*), 61.0 (C2), 64.9 (C6*), 68.1 (C4*), 69.7 (C5*), 71.3 (C3*), 72.9 (C14), 79.1 (C15), 96.0 (C2*), 175.7 (C1'/1''), 177.4 (C5'/5''/6'/6'')

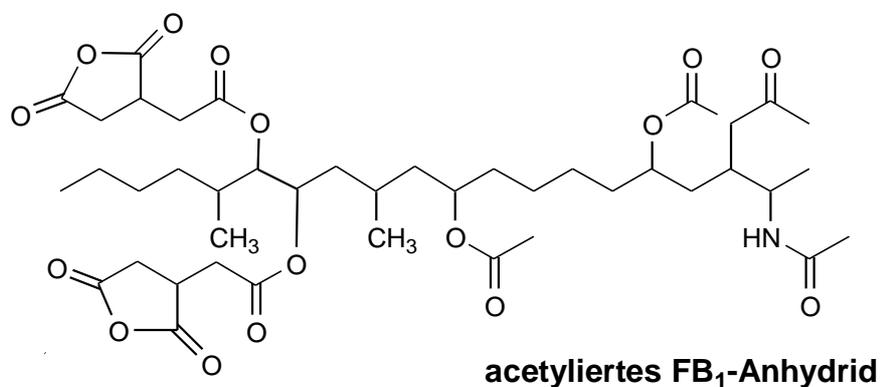
^a Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte zusätzlich mit Hilfe von HMQC, HMBC, COSY und DEPT-Experimenten. Aufgrund der geringen Menge, waren nur die Signale eines Zuckerisomeres nachweisbar.

3.6 Acetylierung von FB₁

Man löst 5 mg FB₁ (7 μmol) in 200 μl Pyridin und gibt 200 μl Acetanhydrid dazu. Die Mischung wird bei Raumtemperatur 16 Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom abgeblasen. Unter diesen Bedingungen liegen die Säuregruppen der TCA-Seitenketten als Anhydride vor.

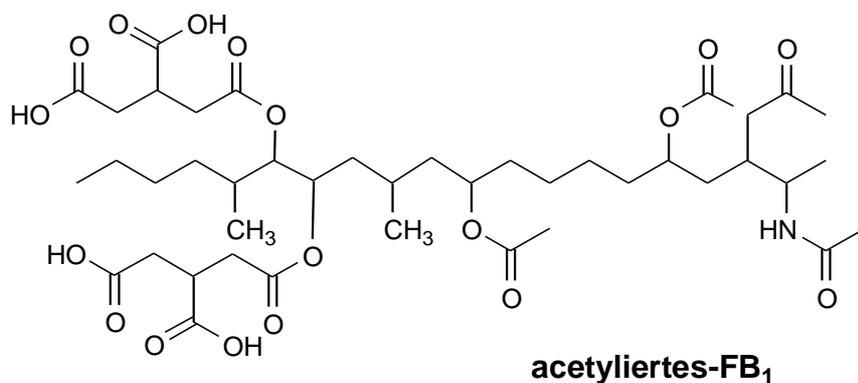
ESI-MS: m/z 854 [M+H]⁺

Ausbeute: 5,9 mg (98%)

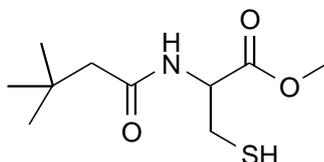


Zur Freisetzung des Anhydrids wird ein Teil des Rückstandes (0,1 mg; 0,12 μmol) in 200 μl Tetrahydrofuran/Wasser 1:1 über Nacht bei Raumtemperatur hydrolysiert. Das Lösungsmittel wird abgeblasen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

ESI-MS: m/z 890 [M+H]⁺, m/z 912 [M+H]⁺



3.7 Synthese des N-BOC-geschützten L-Cysteinmethylesters



Man löst 10 mg (74 μmol) L-Cysteinmethylester (Sigma, Steinheim) in 50 μl einer 10-prozentigen Lösung von Triethylamin in Methanol, verdünnt mit weiteren 500 μl Methanol und gibt unter kräftigem Rühren 32 mg (148 μmol) Pyrokolensäure-di-*tert*-butylester (BOC)₂O dazu. Das Gemisch wird für 15 Minuten auf 40-50°C erwärmt und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen, der Rückstand mit 500 μl eiskalter verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,15 eingestellt und nochmals 10 Minuten gerührt. Man extrahiert sofort mit Ethylacetat (5 x 500 μl) und trocknet die organische Phase über Natriumsulfat. Nach Abzug des Lösungsmittels erhält man den N-BOC-geschützten L-Cysteinmethylester.

Ausbeute: 10,7 mg (62%)

ESI-MS: m/z 235 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (-20eV): m/z 135 [M+H-BOC]⁺

3.8 Modellversuche

3.8.1 Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit D-Glucose

In einem geschlossenen 1,5 ml Septum-Vial wird eine Mischung aus 0,1 mg FB₁ (0,14 μmol) oder hydrolysiertem FB₁ (0,25 μmol) und 1 mg D-Glucose (5,6 μmol) in einem

Heizblock 3 Minuten bei 160°C ohne Lösungsmittel erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in 100 µl Wasser/Acetonitril (70:30) aufgenommen.

3.8.2 Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit Saccharose oder Methyl- α -D-glucopyranosid

In einem geschlossenem 1,5 ml Septum-Vial wird eine Mischung aus 0,1 mg FB₁ (0,14 µmol) oder hydrolysiertem FB₁ (0,25 µmol) mit je 1 mg Saccharose (2,9 µmol) oder Methyl- α -D-glucopyranosid (5,2 µmol) 40 Minuten bei 150°C in einem Heizblock ohne Lösungsmittel erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in 100 µl Wasser/Acetonitril (70:30) aufgenommen.

3.8.3 Erhitzung von acetyliertem FB₁-Anhydrid oder acetyliertem FB₁ mit Methyl- α -D-glucopyranosid

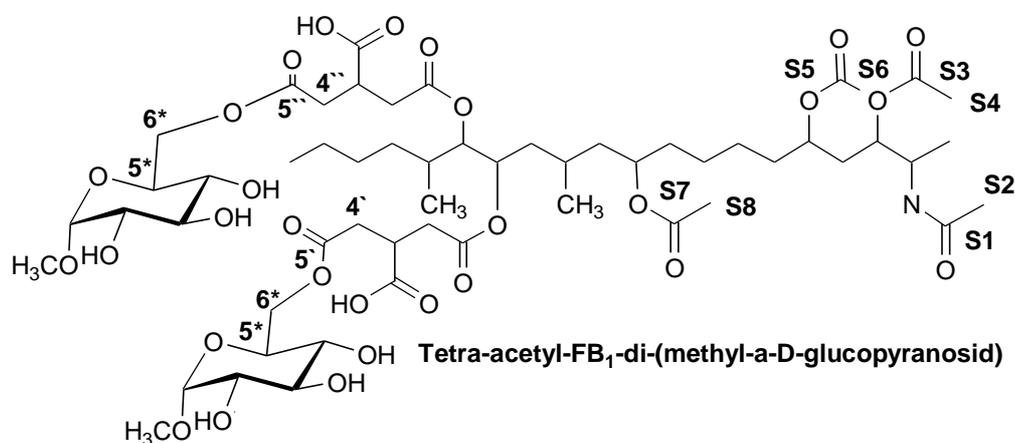
In einem geschlossenem 1,5 ml Septum-Vial wird eine Mischung aus 0,1 mg acetyliertem FB₁-Anhydrid (0,12 µmol) oder vierfach acetyliertem FB₁ (0,11 µmol), dessen Säuregruppen in freier Form vorliegen (siehe 3.5) und 1 mg Methyl- α -D-glucopyranosid (5,2 µmol) 40 Minuten bei 150°C in einem Heizblock ohne Lösungsmittel erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in 100 µl Wasser/Acetonitril (70:30) aufgenommen.

3.8.4 Erhitzung von FB₁ und HFB₁ mit Aminosäurederivaten

In einem geschlossenem 1,5 ml Septum-Vial wird eine Mischung aus 0,1 mg FB₁ (0,14 µmol) oder hydrolysiertem FB₁ (0,25 µmol) mit je 1 mg N- α -Acetyl-L-lysinmethylester

(4,9 μmol) oder BOC-L-Cysteinmethylester (4,2 μmol) in einem Heizblock 40 min bei 105°C ohne Lösungsmittel erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in 100 μl Wasser/Acetonitril (70:30) aufgenommen

3.9 Synthese des Diesters aus acetyliertem FB₁ und Methyl- α -D-glucopyranosid



5,9 mg (6,9 μmol) acetyliertes FB₁-Anhydrid (siehe 3.5) werden in einem 4,5 ml Septum-Vial zusammen mit 50 mg Methyl- α -D-glucopyranosid (260 μmol) 60 Minuten lang in einem Heizblock bei 150°C ohne Lösungsmittel erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in 1,5 ml Wasser (pH 3,5; eingestellt mit 0,1N Salzsäure) aufgenommen und in zwei Proben zu je 750 μl geteilt. Jede Probe wird auf eine RP-18-Kartuschen (ICT, 500 mg) aufgetragen, die zuvor mit 2 ml Methanol und 2ml Wasser (pH 3,5) konditioniert wurde. Nach dem Waschen mit 3 ml Wasser (pH 3,5) und mit je 1 ml der Mixturen aus Wasser (pH 3,5) und Methanol im Verhältnis 80:20 und 50:50 wird der Diester mit 2 ml einer Mischung aus Wasser (pH 3,5) und Methanol im Verhältnis 30:70 eluiert. Das Eluat wird anschließend lyophilisiert.

Tetra-acetyl-FB₁-di-(methyl- α -D-glucopyranosid): 4,8 mg (64%)

ESI-MS: m/z 1074 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (-50eV): m/z , 352 [M+H-2 TCA-2MeGlc-H₂O]⁺, 334 [M+H-2 TCA-MeGlc-2H₂O]⁺

HRMS: berechnet für C₅₆H₉₂NO₂₉ + Na: 1264.5574, gefunden: 1264.5606

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD, ppm, J in Hz)^a: δ = 0.91 (d, J = 6.9 3H), 0.92 (t, J = 7.2, 3H), 0.96 (d, J = 6.5, 3H), 1.07 (d, J = 6.9, 3H) 1.18-1.75 (m, 20H), 1.78 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.48-2.86 (m, 4H), 3.19 (q, 4H), 3.28-3.31 (m, 1H) 3.38-3.42 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.20-4.28 (m, 1H), 4.35-4.42 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.65 (d, J = 3.33, 1H), 5.00 (m, 1H)

¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD, ppm)^a: 14.4 (C20), 16.0 (C21), 17.4 (C1), 20.9 (C22), 21.2 (SC4/6/8), 22.6 (SC2), 23.9 (C19), 26.0 (C7), 26.2 (C8), 27.2 (C12), 29.7 (C18), 33.1 (C17), 34.9 (C16), 35.7 (C6/9/13), 36.5 (C2'/2''/4'/4''), 36.8 (C4), 39.2 (C3'/3''), 41.6 (C11), 48.5 (C2), 55.8 (C7*), 62.4 (C6*), 71.0 (C5*), 71.2 (C5), 71.8 (C4*), 73.0 (C14), 73.2 (C3/10), 73.4 (C2*), 75.1 (C3*), 78.8 (C15), 101.3 (C1*), 172.4 (CS3), 172.7 (CS7), 172.8 (CS1), 173.0 (CS5), 173.4 (C5'/5''), 173.8 (C1'/1''), 177.9 (C6'/6'')

^a Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte zusätzlich mit Hilfe von HMQC, HMBC, COSY und DEPT-Experimenten.

3.10 Alkalische Hydrolyse der Heißextrudate

In einen 50 ml-Zentrifugenbecher (Corning, New York) werden 2,5 g Heißextrudatprobe eingewogen. Nach Zugabe von 10 ml Extraktionslösung (Methanol/0,1N Salzsäure) homogenisiert man exakt 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax. Anschließend wird bei 4000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Der Vorgang wird 8 mal wiederholt um die Probe von frei vorliegendem FB₁ zu befreien. Nach der letzten Zentrifugation wird dem Rückstand FB₁-D₆ (120 ng/g) als interner Standard und 2N methanolischer

Kaliumhydroxid-Lösung zugesetzt. Man homogenisiert erneut exakt 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax und inkubiert anschließend das Gemisch eine Stunde im Trockenschrank (50°C). Dabei wird die Probe gelegentlich aufgeschüttelt. Danach wird bei 4000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 2N Salzsäure auf einen pH von 3,5 eingestellt. Zum besseren Sedimentieren der ausflockenden Substanzen wird das verbleibende Zentrifugat über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag enthält keine Fumonisine. Von diesem Überstand werden 9 ml auf eine RP18-Festphasenextraktionssäule (ICT, 500 mg) aufgegeben, die zuvor mit 2 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert wurde. Man wäscht zuerst mit 1 ml Methanol/Wasser 1:3, danach mit 1 ml Methanol/Wasser 1:1 und eluiert schließlich mit 1 ml Methanol/Essigsäure 95:5. Das Eluat wird im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und der Rückstand in 100 µl Acetonitril/Wasser (25:75) gelöst. Bei starker Trübung werden die Proben anschließend bei 11000 Umdrehungen 40 Minuten zentrifugiert. Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 27 µl injiziert (vgl. 2.1; Methode 3, SIM-Experiment 1). Die Proben werden doppelt aufgearbeitet und je zweimal analysiert.

3.11 Aufarbeitung der Spargelproben

Die Spargelstangen werden in kleine Stücke geschnitten (ca. 1 x 1 cm), in einem Mixer zerkleinert und anschließend lyophilisiert. Die Probe wird anschließend in zwei weitere Teilproben aufgeteilt (0,2-1,5 g getrocknete Probe, entspricht 3.1-24,4 g Normalgewicht) und jede dieser Proben wird mit einer bekannten Menge an FB₁-D₆ (100 ng/g) versetzt. Nach Zugabe von 15 ml Extraktionslösung (Methanol/0,1N Salzsäure) homogenisiert man exakt 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax. Anschließend wird bei 4000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 0,25N Natriumhydroxidlösung auf pH 5,8-6,2 eingestellt. Zum besseren Sedimentieren der ausflockenden Substanzen wird das verbleibende Zentrifugat über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag enthält keine Fumonisine. Von diesem Überstand werden 4 ml auf eine SAX-Festphasenextraktionssäule (ICT, 500 mg) aufgegeben, die zuvor mit 8 ml Methanol und 8

ml Methanol/Wasser (3:1, mit 0,1N auf pH 5,8 eingestellt) konditioniert wurde. Man wäscht zuerst mit 8 ml Methanol/Wasser (3:1, mit 0,1N auf pH 5,8 eingestellt), danach mit 8 ml Methanol und eluiert schließlich mit 10 ml Methanol/Essigsäure 99:1. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer bei 45°C im Wasserstrahlvakuum auf etwa 0,5 bis 1 ml eingengt und danach im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in 200 µl Methanol/Wasser (60:40) aufgenommen. Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 10 µl injiziert (siehe 2.1; Methode 2, Trennsäule 2, SIM-Experiment 1). Die Proben werden doppelt aufgearbeitet und je zweimal analysiert.

3.12 Aufarbeitung der Knoblauchproben

Die Knollen werden in einem Mixer zerkleinert und ein Teil davon (4-5 g) in einen Zentrifugenbecher eingewogen. Anschließend wird der Isotopenstandard FB₁-D₆ (100 ng/g) zugesetzt und nach Zugabe von 7 ml Extraktionslösung (Methanol/0,1N Salzsäure) homogenisiert man exakt 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax. Anschließend wird bei 4000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 0,25N Natriumhydroxidlösung auf pH 5,8-6,2 eingestellt. Zum besseren Sedimentieren der ausflockenden Substanzen wird das verbleibende Zentrifugat über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag enthält keine Fumonisine. Von diesem Überstand werden 4 ml auf eine SAX-Festphasenextraktionssäule (ICT, 500 mg) aufgegeben, die zuvor mit 8 ml Methanol und 8ml Methanol/Wasser (3:1, mit 0,1N auf pH 5,8 eingestellt) konditioniert wurde. Man wäscht zuerst mit 8 ml Methanol/Wasser (3:1, mit 0,1N auf pH 5,8 eingestellt), danach mit 8 ml Methanol und eluiert schließlich mit 10 ml Methanol/Essigsäure 99:1. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer bei 45°C im Wasserstrahlvakuum auf etwa 0,5 bis 1 ml eingengt und danach im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in 200 µl Acetonitril/Wasser (30:70) aufgenommen. Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 10 µl injiziert (vgl. 2.1; Methode 1, Trennsäule 1, SIM-Experiment 2). Die Proben werden je zweimal analysiert.

3.13 Bestimmung der Caspase 3 Aktivität

Die IHKE-Zellen (vgl. 1.3) werden zunächst 48 Stunden lang im serumhaltigen und danach 24 Stunden lang im serumfreien Medium kultiviert, bevor sie anschließend 24 Stunden lang im serumfreien Medium mit den einzelnen Substraten inkubiert werden. Die Caspase 3 Aktivität wird mittels DEVD-AFC nach Vorschrift des Herstellers gemessen (Clontech, Heidelberg). Hierzu wurden die Zellen mit 200 μ l Lysispuffer (Clontech) 10 Minuten lang auf Eis inkubiert, geerntet und zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4°C). Vom Überstand werden 60 μ l abgenommen und mit Caspase 3 Substrat (40 μ mol/l DEVD-AFC, Endkonzentration) bei 37°C in 96-well Platten inkubiert. Die Fluoreszenz des freigesetzten Produktes 7-Amino-4-trifluoromethyl-coumarin (AFC), wird bei 405 nm Anregungs- und 535 nm Emissionswellenlänge in einem Multilabelcounter gemessen. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe einer Kalibrierkurve, die mit bekannten AFC-Konzentrationen aufgenommen wird. Zur Kontrolle werden Zellextrakte wie beschrieben aber in Gegenwart des Caspase 3 Inhibitors zDEVD-CHO inkubiert.

3.14 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wird unter Anwendung des Bicinchonin-Säure (BCA) Assays (Smith et al. 1985) von Pierce (erhalten über KMF Laborchemie, Sankt Augustin) bestimmt.

3.15 DNA Leiterbildung

Die Zellen werden in Petrischalen (\varnothing 15 cm) kultiviert und mit den verschiedenen Fumonisin 24 Stunden lang im serumfreien Medium inkubiert. Wie von Gekle und Mitarbeitern beschrieben (Gekle et al. 2000), wird das Zellmedium abgenommen und die

darin enthaltenen Zellen durch kurze Zentrifugation abgetrennt. Festsitzende Zellen werden mittels Tritonpuffer geerntet (5 mmol/l Tris, 20 mmol/l EDTA pH 8,0, 0,5% Triton X-100), kurz auf Eis inkubiert und zusammen mit dem vorhergehenden Pellet zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4°C). Anschließend werden dem Überstand Proteinase K (50 µg/ml) und Rnase A (40 µg/ml) zugesetzt und dieser bei 37°C 60 Minuten lang inkubiert. Die DNA wird durch den Zusatz gleicher Menge an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1 in TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)] extrahiert. Nach Schütteln und Zentrifugieren (30 min, 3420 x g) wird die obere Phase abgenommen und weiter verwendet. Nun werden ein zehntel des Volumens Natriumacetatlösung (3 mol/l, pH 5,2) und das doppelte Volumen an eisgekühltem Ethanol (-20°C) zugesetzt und die Proben über Nacht im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4°C) wird das Pellet mit eisgekühltem 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wird in Wasser aufgenommen und ihre Konzentration bei 260 nm im Photometer bestimmt. Die DNA wird in 1,5%-igem Agarosegel nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese analysiert.

3.16 Stammlösungen von Sphingosin, Sphinganin und Phytosphingosin

Für massenspektrometrische Untersuchungen werden Stammlösungen von 1,0 mg Sphingosin, Sphinganin und Phytosphingosin in Ethanol hergestellt und diese um den Faktor 100 (10 µg/ml) bzw. 1000 (1 µg/ml) verdünnt.

3.17 Bestimmung von Sphingosin und Sphinganin

3.17.1 Systemkalibrierung

Für die Aufnahme der Kalibrierfunktionen werden unterschiedliche Mengen einer Phytosphingosin(PSO)-Stammlösung (1 ppm) mit je 100 µl einer Sphinganin(SA)-Stammlösung (1 ppm) oder einer Sphingosin(SO)-Stammlösung (1 ppm) so versetzt, dass Mischungen mit unterschiedlichen Massenverhältnissen an SA und PSI (1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1) oder SO und PSI (1:8, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1) entstehen. Diese werden anschließend im SIM-Modus analysiert. Jede Probe wird dabei mindestens 3 mal injiziert (Injektionsvolumen 10 µl). Die resultierenden Peakflächenverhältnisse der Molekülonen m/z 318 und m/z 302 oder m/z 300 werden gegen die entsprechenden Massenverhältnisse aufgetragen (siehe Teil C Kapitel 3, Abb. 40).

3.17.2 Aufarbeitung

Die Zellen werden mit 200 µl Lysispuffer (Apo-Alert Caspase 3 Fluoreszenzkit, Clontech, Bad Soden) 10 Minuten auf Eis inkubiert, gerntet und zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4°C). Zu 40 µl des Überstandes (90 µl für Kontrollproben) gibt man 50 µl Methanol (kein Methanolzusatz zu Kontrollproben) und 10 µl einer Phytosphingosinlösung (1 µg/ml). Die Mischung wird anschließend zentrifugiert (10 min, 8000 x g). Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 10 µl bzw. 20 µl (Kontrolle) injiziert (siehe 2.1; Methode 2, Trennsäule 1, SIM-Experiment 2). Die Proben werden doppelt (2 Petrischalen, Ø 3,5 cm) angesetzt und je zweimal analysiert. Für die Auswertung der Chromatogramme werden die Kalibriergeraden aus Teil C Kapitel 3 (Abb. 40) herangezogen.

3.18 Inkubationen von FB₁ mit Schweinefäzes

3.18.1 Herstellung des Reduktionspuffers

	mmol/l
1. NaCl	55
2. KCl	20
3. MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,5
4. CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5
5. NaHCO ₃	50
6. NaH ₂ PO ₄	1
7. NH ₄ Cl	5
8. Na ₂ SO ₄	2
9. Na ₂ HPO ₄	5
10. KH ₂ PO ₄	5
11. (NH ₄)HCO ₃	6
12. KHCO ₃	10

Zur Herstellung von 1l Reduktionspuffer:

13. Mikrolösung	125 µl einer Mischung von:	CaCl ₂ x 2H ₂ O (13,2 g/100 ml)
		MnCl ₂ x 4H ₂ O (10,0 g/100 ml)
		CoCl ₂ x 6H ₂ O (1,0 g/100 ml)
		FeCl ₃ x 6H ₂ O (8,0 g/100 ml)
14. Resazurin	1,25 ml (1 mg/ml)	
15. Reduktionslösung	H ₂ O	51,66 ml
	1N NaOH	2,16 ml
	Na ₂ S	311,0 mg (frisch aus Exsikkator)

Die Substanzen werden in der entsprechenden Menge *aqua bidest.* gelöst.

Der Reduktionspuffer wird zunächst ohne den Zusatz der Reduktionslösung hergestellt. Man entnimmt 8 ml und füllt diese in mit CO₂-geflutete Stuhlröhrchen (Merck, Darmstadt). Anschließend wird die Lösung 5 Minuten lang mit CO₂ begast bevor 1 ml der frisch hergestellten Reduktionslösung (luftdicht verschlossen) zugesetzt wird. Man verschließt zügig das Stuhlröhrchen und wartet bis sich unter Umschlag des Indikators von rosa nach farblos eine anaerobe Atmosphäre einstellt. In das Stuhlröhrchen wird anschließend von je drei bis vier verschiedenen Schweinen ca. 1 g frischer Kot eingewogen. Für den Transport der so erhaltenen Kot-Puffer-Suspensionen werden die Stuhlröhrchen zusammen mit Anaerocult A (Merck, Darmstadt) in einen Anaerobentopf gestellt. Anschließend werden Inkubationsversuche in mit Drehverschluss verschließbaren 2 ml Plastikgefäßen (Merck, Darmstadt) unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierzu werden Aliquote der Kotsuspension entnommen und mit je 20 µg FB₁ versetzt. Danach werden die fest verschlossenen Probengefäße in einen Trockenschrank gestellt und bei 37°C 4 bzw. 24 Stunden lang inkubiert. Parallel zu diesem Ansatz werden auch durch Autoklavieren deaktivierte Kotsuspensionen mit FB₁ (20 µg) 4 bzw. 24 Stunden lang bei gleicher Temperatur inkubiert. Daneben werden FB₁-freie Proben als Blindversuch angesetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Versuchsansatz für die Inkubation von FB₁ mit Schweinekot

Probe	
1	FB ₁ + 1,2 ml Reduktionspuffer
2	600 µl Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (sofort einfrieren)
3/4	FB ₁ + 600 µl Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (4h Inkubation)
5/6	FB ₁ + 600 µl Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (24h Inkubation)
7	FB ₁ + 600 µl deaktivierte Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (4h Inkubation)
8	FB ₁ + 600 µl deaktivierte Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (24h Inkubation)
9	600 µl Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (4h Inkubation)
10	600 µl Kotsuspension + 600 µl Reduktionspuffer (24h Inkubation)

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben eingefroren. Für die anschließende Aufarbeitung werden die Proben in Zentrifugenröhrchen mit Sterilfiltern umgefüllt und bis zur Abtrennung der gesamten Flüssigkeit von den Feststoffen zentrifugiert. Das so erhaltene Filtrat wird am Lyophilisator getrocknet und in 300 μl MeCN/H₂O (25:75) aufgenommen und nochmals 20 Minuten bei 10000 Umdrehungen zentrifugiert. Für die HPLC-MS-Untersuchungen werden jeweils 10 μl des Überstandes injiziert (siehe 2.1, Methode 3, Trennsäule 2, SIM-Experiment 2).

3.19 Bestimmung der α -D-Galactosidase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität der Mikroflora während der Inkubation wird mit Hilfe eines Galactosidase-Tests kontrolliert. Hierzu wird Kotproben (600 μl Kotsuspension + 600 μl Reduktionspuffer) nach einer 18-stündigen Inkubation (37°C) je 0,1 mg *p*-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid (PNP-G, Calbiochem, Bad Soden) zugesetzt und die enzymatische Reaktion nach 5, 10, 20 und 60 min durch Einfrieren der Proben gestoppt. Zusätzlich werden Blindproben angefertigt, denen kein PNP-G zugesetzt wird. Zur Quantifizierung des durch die α -D-Galactosidase freigesetzten *p*-Nitrophenols (PNP) werden die Proben mit 1N HCl angesäuert und mit 3 ml Ether ausgeschüttelt. Anschließend setzt man der organischen Phase 4 ml einer 0,5N Kaliumhydroxid-Lösung zu und schüttelt erneut aus. Das in der wässrigen Phase enthaltene PNP wird bei 400 nm am Photometer vermessen. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe einer Kalibrierkurve, die mit bekannten PNP-Konzentrationen aufgenommen wird.

E Literatur

- Abado-Becognee, K.; Mobio, T. A.; Ennamany, R.; Fleurat-Lessard, F.; Shier, W. T.; Badria, F. A.; Creppy, E. E. Cytotoxicity of fumonisin B₁: Implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. *Arch. Toxicol.* **1998**, *72*, 233-236.
- Abbas, H. K.; Gelderblom, W. C. A.; Cawood, M. E.; Shier, W. T. Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in jimsonweed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell cultures. *Toxicon* **1993**, *31*, 345-353.
- Abbas, H. K.; Shier, W. T.; Abouzie, M. M.; Bird, C.; Rice, L. D.; Ross, P. F.; L., S. G.; Meredith, F. Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* rot disease. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 22-25.
- Abbas, H. K.; Tanaka, T.; Shier, W. T. Biological Activities of Synthetic Analogues of *Alternaria Alternata* Toxin (Aal-Toxin) and Fumonisin in Plant and Mammalian Cell Cultures. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1681-1689.
- Abdalla, M. Y.; Al-Rokibah, A.; Moretti, A.; Mule, G. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease* **2000**, *84*, 321-324.
- Akiyama, H.; Miyahara, M.; Toyoda, M.; Saito, Y. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by precolumn derivatization with 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **1995**, *36*, 77-81.
- Alberts, J. F.; Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. *Mycol. Res.* **1993**, *9*, 2-12.
- ApSimon, J. W. Structure, synthesis, and biosynthesis of fumonisin B₁ and related compounds. *Environ. Health Perspec. Suppl.* **2001**, *109*, 245-249.

- Azcona-Olivera, J. I.; Abouzied, M. M.; Plattner, R. D.; Pestka, J. J. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, and B₃. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 531-534.
- Bacon, C. W.; Nelson, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* **1994**, *57*, 514-521.
- Bacon, C. W.; Williamson, J. W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia* **1992**, *117*, 65-71.
- Bennett, G. A.; Richard, J. L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 501-506.
- Bezuidenhout, S. C.; Gelderblom, W. C. A.; Gorst-Allman, C. P.; Horak, R. M.; Marasas, W. F. O.; Spiteller, G.; Vlegaar, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 743-745.
- Bhat, R. V.; Shetty, P. H.; Rao, P. A.; Rao, V. S. A Foodborne Disease Outbreak Due to the Consumption of Moldy Sorghum and Maize Containing Fumonisin Mycotoxins. *J. Clin. Toxicol.* **1997**, *35*, 249-255.
- Branham, B. E.; Plattner, R. D. Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1630-1633.
- Bruins, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 345-357.
- Bucci, T. J.; Howard, P. C. Effect of Fumonisin Mycotoxins in Animals. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **1996**, *15*, 293-302.
- Bucci, T. J.; Howard, P. C.; Tolleson, W. H.; Laborde, J. B.; Hansen, D. K. Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. *Toxicol. Pathol.* **1998**, *26*, 160-164.
- Caldas, E. D.; Jones, A. D.; Winter, C. K.; Ward, B.; Gilchrist, D. G. Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Sphinganine Analog Mycotoxins. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 196-207.
- Caloni, F.; Spotti, M.; Pompa, G.; Zucco, F.; Stamatii, A.; De Angelis, I. Evaluation of Fumonisin B₁ and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2. *Toxicon* **2002**, *40*, 1181-1188.

- Castegnaro, M.; Garren, L.; Galendo, D.; Gelderblom, W. C. A.; Chelule, P.; Dutton, M. F.; Wild, C. P. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J. Chromatogr. B* **1998**, *720*, 15-24.
- Castella, G.; Bragulat, M. R.; Cabanes, F. J. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4707-4710.
- Cawood, M. E.; Gelderblom, W. C. A.; Alberts, J. F.; Snyman, S. D. Interaction of ¹⁴C-labeled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 627-632.
- Cawood, M. E.; Gelderblom, W. C. A.; Vleggaar, R.; Behrend, Y.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1958-1962.
- Chu, F. S.; Li, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 847-852.
- Chulze, S. N.; Ramirez, M. L.; Farnochi, M. C.; Pascale, M.; Visconti, A.; March, G. Fusarium and Fumonisin Occurrence in Argentinian Corn at Different Ear Maturity Stages. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2797-2801.
- Chuyen, N. V. Maillard reaction and food processing: Application aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *434*, 213-235.
- Ciacci Zanella, J. R.; Jones, C. Fumonisin B₁, a mycotoxin contaminant of cereal grains, and inducer of apoptosis via the tumour necrosis factor pathway and caspase activation. *Food Chem Toxicol* **1999**, *37*, 703-712.
- Colvin, B. M.; Cooley, A. J.; Beaver, R. W. Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1993**, *5*, 232-241.
- Dantzer, W. R.; Hopper, J.; Mullin, K.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Excretion of ¹⁴C-fumonisin B₁, ¹⁴C-hydrolyzed fumonisin B₁, and ¹⁴C-fumonisin B₁-fructose in rats. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4291-4296.
- De Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 129-137.

- Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Nelson, P. E. Production of Fumonisin B₁ and Moniliformin by *Gibberella Fujikuroi* from Rice from Various Geographic Areas. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1838-1842.
- Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Proctor, R. H. Linkage among Genes Responsible for Fumonisin Biosynthesis in *Gibberella Fujikuroi* Mating Population A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2571-2576.
- Doerge, D. R.; Howard, P. C.; Bajic, S.; Preece, S. Determination of fumonisins using online liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 603-606.
- Doko, M. B.; Visconti, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Addit. Contam.* **1994**, *11*, 433-439.
- Dole, M.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular beams of macroions. *J. Phys. Chem.* **1968**, *49*, 2240-2249.
- Duncan, K.; Kruger, S.; Zabe, N.; Kohn, B.; Prioli, R. Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B₁, B₂ and B₃. *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 41-47.
- Dupuy, J.; Le Bars, P.; Boudra, H.; Le Bars, J. Thermostability of fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 2864-2867.
- EHC Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B₁, International Programme on Chemical Safety (IPCS, UNEP, ILO and WHO). WHO, Geneva, **2000**.
- Elmer, W. H. Vegetative compatibility groups of *Fusarium proliferatum* from asparagus and comparison of virulence, growth rates, and colonization of asparagus residues among groups. *Phytopathology* **1991**, *81*, 852-857.
- Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **1996**, *391*, 43-50.
- Erdington, T. S.; Kamps-Holtzapfel, C.; Harvey, R. B.; Kubena, L.; Elissalde, M. H.; Rottinghaus, G. Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *J Anim. Sci.* **1995**, *73*, 508-515.

- Espada, Y.; Ruiz de Gopegui, R.; Cuadradas, C.; Cabanes, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weight and serum chemistry modifications. *Avian Disease* **1994**, *38*, 454-460.
- Flynn, T. J.; Stack, M. E.; Troy, A. L.; Chirtel, S. J. Assessment of the embryotoxic potential of the total hydrolysis product of fumonisin B₁ using cultured organogenesis-staged rat embryos. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 1135-1141.
- Fukuda, H.; Shima, H.; Vesonder, R. F.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Katoh, S.; Tamura, S.; Sugimura, T.; Nagao, M. Inhibition of Protein Serine Threonine Phosphatases by Fumonisin B₁, a Mycotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 160-165.
- Gamanya, R.; Sibanda, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 145-149.
- Gaskell, S. J. Electrospray: Principles and practice. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 677-688.
- Gekle, M.; Schwerdt, G.; Freudinger, R.; Mildenerger, S.; Wilflingseder, D.; Pollack, V.; Dander, M.; Schramek, H. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 837-844.
- Gelderblom, W. C. A.; Abel, S.; Smuts, C. M.; Marnewick, J.; Marasas, W. F. O.; Lemmer, E. R.; Ramljak, D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001a**, *109*, 291-300.
- Gelderblom, W. C. A.; Cawood, M. E.; Snyman, S. D.; Marasas, W. F. O. Fumonisin B₁ dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 209-214.
- Gelderblom, W. C. A.; Cawood, M. E.; Snyman, S. D.; Vleggaar, R.; Marasas, W. F. O. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, *31*, 407-414.
- Gelderblom, W. C. A.; Galendo, D.; Abel, S.; Swanevelder, S.; Marasas, W. F. O.; Wild, C. P. Cancer initiation by fumonisin B₁ in rat liver - role of cell proliferation. *Cancer Lett.* **2001b**, *169*, 127-137.

- Gelderblom, W. C. A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vleggaar, R.; Kriek, N. P. J. Fumonisin B₁ - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1806-1811.
- Gelderblom, W. C. A.; Kriek, N. P. J.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 1247-1251.
- Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P.; Semple, E.; Farber, E. Possible non-genotoxic nature of active carcinogenic components produced by *Fusarium moniliforme*. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **1989**, *30*, 144.
- Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Vleggaar, R.; Thiel, P. G.; Cawood, M. E. Fumonisin B₁: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia* **1992a**, *117*, 11-16.
- Gelderblom, W. C. A.; Seier, J. V.; Snijman, P. W.; Van Schalkwyk, D. J.; Shephard, G. S.; Marasas, W. F. O. Toxicity of culture material of *Fusarium verticillioides* strain MRC 826 to nonhuman primates. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001c**, *109*, 267-276.
- Gelderblom, W. C. A.; Semple, E.; Marasas, W. F. O.; Farber, E. The cancer-initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. *Carcinogenesis* **1992b**, *13*, 433-437.
- Gelderblom, W. C. A.; Snyman, S. D. Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Mycotoxin Res.* **1991**, *7*, 46-52.
- Gelderblom, W. C. A.; Snyman, S. D.; Lebepe-mazur, S.; van der Westhuizen, L.; Kriek, N. P. J.; Marasas, W. F. O. The Cancer Promoting Potential of Fumonisin B₁ in Rat Liver Using Diethylnitrosamine as a Cancer Initiator. *Canc. Lett.* **1996**, *109*, 101-108.
- Gelderblom, W. C. A.; Snyman, S. D.; van der Westhuizen, L.; Marasas, W. F. O. Mitoinhibitory effect of fumonisin B₁ on rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 625-631.
- Goßmann, M.; Büttner, C.; Bedlan, G. Untersuchungen von Spargel (*Asperagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland und Österreich auf Infektion mit *Fusarium*-Arten. *Pflanzenschutzberichte* **2001**, *59*, 45-54.

- Goßmann, M.; Kadau, R.; Buddruss, G. Unveröffentlichte Daten, Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin. **2000**.
- Gross, S. M.; Reddy, R. V.; Rottinghaus, G. E.; Johnson, G.; Reddy, C. S. Developmental Effects of Fumonisin B₁-Containing *Fusarium moniliforme* Culture Extract in Cd1 Mice. *Mycopathologia* **1994**, *128*, 111-118.
- Gumprecht, L. A.; Marcucci, A.; Weigel, R. M.; Vesonder, R.; Riley, R. T.; Showker, J.; Beasley, V. R.; Haschek, W. M. Effects of intravenous fumonisin B₁ in rabbits: neurotoxicity and sphingolipid alterations. *Nat. Toxins* **1995**, *3*, 395-403.
- Harrison, L. R.; Colvin, B. M.; Greene, J. T.; Newman, L. E.; Cole Jr, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest* **1990**, *2*, 217-221.
- Hartl, M. Dissertation, Universität Würzburg, **2000**.
- Hartl, M.; Herderich, M.; Humpf, H. U. Rapid determination of fumonisin FB₁ in corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (LC-ESP-MS). *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 348-351.
- Hartl, M.; Humpf, H. U. Simultaneous determination of fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5087-5083.
- Hartl, M.; Humpf, H. U. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 1097-1102.
- Haschek, W. M.; Gumprecht, L. A.; Smith, G.; Tumbleson, M. E.; Constable, P. D. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001**, *109*, 251-257.
- Haschek, W. M.; Motelin, G.; Ness, D. K.; Harlin, K. S.; Hall, W. F.; Vesonder, R. F.; Peterson, R. E.; Beasley, V. R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* **1992**, *117*, 83-96.
- He, Q. R.; Riley, R. T.; Sharma, R. P. Fumonisin-induced tumor necrosis factor-alpha expression in a porcine kidney cell line is independent of sphingoid base accumulation induced by ceramide synthase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *174*, 69-77.

- Hendrich, S.; Miller, K. A.; Wilson, T. M.; Murphy, P. A. Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: Effect of nutritional status. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1649-1654.
- Herderich, M. Habilitationsschrift, Universität Würzburg, **1998**.
- Heumann, K. G. Isotope dilution mass spectrometry of inorganic and organic substances. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1986**, 325.
- Hlywka, J. J.; Bullerman, L. B. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. *Food Add. Cont.* **1999**, *8*, 319-324.
- Holcomb, M.; Sutherland, J. B.; Chiarelli, M. P.; Korfmacher, W. A.; Thompson, H. C., Jr.; Lay, J. O., Jr.; Hankins, L. J.; Cerniglia, C. E. HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J. Agric. Food Chem.* **1993a**, *41*, 357-360.
- Holcomb, M.; Thompson, H. C., Jr.; Hankins, L. J. Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **1993b**, *41*, 764-767.
- Hopmans, E. C.; Hauck, C. C.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Excretion of fumonisin B₁, hydrolyzed fumonisin B₁, and the fumonisin B₁-fructose adduct in rats. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2618-2625.
- Hopmans, E. C.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Bioavailability of FB₁, hydrolyzed fumonisin B₁, and the FB₁-fructose adduct. *The Toxicologist* **1995**, *15*, 215.
- Hopmans, E. C.; Murphy, P. A. Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1655-1658.
- Hopmans, E. C.; Murphy, P. A. Fumonisins : mycotoxins produced by *Fusarium* species. *Nat. Prot. Nat. Toxicants Food* **1995**, *1*, 61-78.
- Howard, P. C.; Churchwell, M. I.; Couch, L. H.; Marques, M. M.; Doerge, D. R. Formation of N-(Carboxymethyl)fumonisin B₁, following the reaction of fumonisin B₁ with reducing sugars. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3546-3557.
- Howard, P. C.; Eppley, R. M.; Stack, M. E.; Warbritton, A.; Voss, K. A.; Lorentzen, R. J.; Kovach, R. M.; Bucci, T. J. Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding

- study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001**, *109*, 277-282.
- Humpf, H. U. Habilitationsschrift, Universität Würzburg, **1998**.
- Humpf, H. U.; Schmelz, E. M.; Meredith, F. I.; Vesper, H.; Vales, T. R.; Wang, E.; Menaldino, D. S.; Liotta, D. C.; Merrill, A. H. Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase - Formation of N-palmitoyl-aminopentol produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin, AP₁, and a new category of ceramide synthase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19060-19064.
- IRAC International Agency for Research on Cancer (1993), IRAC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IRAC Lyon France. **1993**, *56*, 445-466.
- Jackson, L. S.; DeVries, J. W.; Bullerman, L. B. Fumonisin in Food. Plenum Press, New York, **1996a**.
- Jackson, L. S.; Hlywka, J. J.; Senthil, K. R.; Bullerman, L. B. Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996b**, *392*, 345-353.
- Jackson, L. S.; Hlywka, J. J.; Senthil, K. R.; Bullerman, L. B.; Musser, S. M. Effects of Time, Temperature, and pH on the Stability of Fumonisin B₁ in an Aqueous Model System. *J. Agric. Food Chem.* **1996c**, *44*, 906-912.
- Jackson, L. S.; Katta, S. K.; Fingerhut, D. D.; DeVries, J. W.; Bullerman, L. B. Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of corn-based foods. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4800-4805.
- Johnson, J. V.; Yost, R. A. Tandem mass spectrometry for trace analysis. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 758A-768A.
- Jungalwala, F. B.; Evans, J. E.; Bremer, E.; McCluer, R. H. Analysis of sphingoid bases by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Lip. Res.* **1983**, *24*, 1380-1388.
- Katta, S. K.; Jackson, L. S.; Sumner, S. S.; Hanna, M. A.; Bullerman, L. B. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion-cooked corn grits. *Cer. Chem.* **1999**, *76*, 16-20.
- Kebarle, P.; Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972-986.

- Kellerman, T. S.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A.; Cawood, M.; Coetzer, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Onderstepoort J. Vet. Res* **1990**, *57*, 269-275.
- Klemm, U. Die Durchführung der Lebensmittelkontrolle in der Schweiz im Jahre 1999: Tätigkeitsbericht der Facheinheit Lebensmittel und Gebrauchsgegenstände des Bundesamtes für Gesundheit. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2000**, *91*, 363-472.
- Knasmüller, S.; Bresgen, N.; Kassie, F.; Mersch-Sundermann, V.; Gelderblom, W.; Zohrer, E.; Eckl, P. M. Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1997**, *391*, 39-48.
- Korfmacher, W. A.; Chiarelli, M. P.; Lay, J. O., Jr.; Bloom, J.; Holcomb, M.; McManus, K. T. Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁: comparison of thermospray, fast-atom bombardment, and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 463-468.
- Kuiper-Goodman, T.; Scott, P. M.; McEwen, N. P.; Lambert, G. A. Approaches to the assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *392*, 369-393.
- La Grenade, C. E. F.; Bean, G. A. Cytotoxicity of *Fusarium moniliforme* metabolites. *Biodet. Res.* **1990**, *3*, 189-195.
- Laube, B.; Wiebel, F. J.; Schwarz, L. R.; Ladstetter, B. J. Neues *In-vitro*-Verfahren-Untersuchungen zum enterohepatischen Metabolismus von Fremdstoffen. *BIOforum* **2001**, *9*, 596-600.
- Lehmann, W. D. Nobelpreise 2002: Biomakromoleküle, Neutrinos und ein Wurm. *Nachrichten aus der Chemie* **2002**, *50*, 1208-1209.
- Leslie, J. F.; Plattner, R. D.; Desjardins, A. E.; Klittich, C. J. R. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* **1992**, *82*, 341-345.
- Lester, R. L.; Dickson, R. C. High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-

- aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal. Biochem.* **2001**, *298*, 283-292.
- Lim, C. W.; Parker, H. M.; Vesonder, R.; Haschek, W. M. Intravenous fumonisin B₁ induces cell proliferation and apoptosis in the rat. *Nat. Toxins* **1996**, *4*, 34-41.
- Liu, H. J.; Lu, Y.; Haynes, J. S.; Cunnick, J. E.; Murphy, P.; Hendrich, S. Reaction of fumonisin with glucose prevents promotion of hepatocarcinogenesis in female F344/N rats while maintaining normal hepatic sphinganine/sphingosine ratios. *J. Agricult. Food Chem.* **2001**, *49*, 4113-4121.
- Logrieco, A.; Doko, B.; Moretti, A.; Frisullo, S.; Visconti, A. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. *J. Agricult. Food Chem.* **1998**, *46*, 5201-5204.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Ritieni, A.; Bottalico, A.; Corda, P. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Dis.* **1995**, *79*, 727-731.
- Lori, G.; Wolcan, S.; Monaco, C. *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolated from crown and root rot of asparagus decline in Argentina. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 1405-1409.
- Lu, Y.; Clifford, L.; Hauck, C.; Hendrich, S.; Osweiler, G. D.; Murphy, P. Characterisation of fumonisin B₁-glucose reaction kinetics and products. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4726-4733.
- Lu, Z.; Dantzer, W. R.; Hopmans, E. C.; Prisk, V.; Cunnick, J. E.; Murphy, P. A.; Hendrich, S. Reaction with Fructose Detoxifies Fumonisin B₁ While Stimulating Liver Associated Natural Killer Cell Activity in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 803-809.
- Lukacs, Z.; Schaper, S.; Herderich, M.; Schreier, P.; Humpf, H. U. Identification and Determination of Fumonisin FB₁ and FB₂ in Corn and Corn Products by High Performance Liquid Chromatography: Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *Chromatographia* **1996**, *43*, 124-128.
- Magros, C. M.; Richard, J. L. Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk. *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 1162-1167.

- Marasas, W. F. O.; Kellerman, T. S.; Gelderblom, W. C. A.; Coetzer, J. A. W.; Thiel, P. G.; Van der Lugt, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1988**, *55*, 197-203.
- McGee, D. C. Maize diseases. A reference source for seed technologists. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, **1988**.
- Merrill, A. H., Jr.; van Echten, G.; Wang, E.; Sandhoff, K. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27299-27306.
- Merrill, A. H.; Liotta, D. C.; Riley, R. T. Fumonisin - Fungal Toxins That Shed Light on Sphingolipid Function. *Trends in Cell Biology* **1996**, *6*, 218-223.
- Merrill, A. H.; Sullards, M. C.; Wang, E.; Voss, K. A.; Riley, R. T. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001**, *109*, 283-289.
- Merrill Jr, A. H.; Wang, E.; Mullins, R.; Jamison, C.; Nimkar, S.; Liotta, D. C. Quantitation of free sphingosine in liver bei HPLC. *J. Chromatogr.* **1988**, *2697*, 373-381.
- Mossine, V. V.; Glinsky, G. V.; Feather, M. S. the preparation and characterisation of some Amadori compounds (1-amino-1-deoxy-D-fructosyl derivatives derived from a series of ω-amino acids. *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 257-270.
- Motelin, G.; Haschek, W. M.; Ness, D. K.; Harlin, K. S.; Hall, W. F.; Schaeffer, D. J.; Baesley, V. R. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia* **1994**, *126*.
- Murphy, P.; Hendrich, S.; Hopmans, E.; Hauck, C.; Lu, Z.; Buseman, G.; Munkvold, G. Effect of processing on fumonisin content in corn. In: Fumonisin in Food; L. S. Jackson; J. W. DeVries and J. A. Dudek, Eds.; Plenum: New York, **1995a**; 323-334.
- Murphy, P. A.; Hopmans, E. C.; Miller, K.; Hendrich, S. Can fumonisins in food be detoxified? *Nat. Prot. Nat. Toxicants Food* **1995b**, *1*, 105-117.

- Murphy, P. A.; Rice, L. G.; Ross, P. F. Fumonisin B₁, B₂, and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 263-266.
- Musser, S. M.; Eppley, R. M.; Mazzola, E. P.; Hadden, C. E.; Shockcor, J. P.; Crouch, R. C.; Martin, G. E. Identification of an N-Acetyl Keto Derivative of Fumonisin B₁ in Corn Cultures of *Fusarium proliferatum*. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1392-1397.
- Musser, S. M.; Eppley, R. M.; Mazzola, E. P.; Hadden, C. E.; Shockcor, J. P.; Crouch, R. C.; Martin, G. E. Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 970-972.
- Nelson, P. E.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D.; Desjardins, A. E. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 984-989.
- Niessen, W. M. A. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid introduction techniques. *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 407-435.
- Niessen, W. M. A.; Tinke, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A* **1995**, *703*, 37-57.
- Nirenberg, H. Untersuchungen über morphologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* **1976**, *169*, 1-117.
- Nishimura, K.; Nakamura, L. K. High performance liquid chromatographic analysis of long chain bases in intestinal glycolipids of adult and embryonic Japanese quails. *J. Biochem.* **1985**, *98*, 1247-1254.
- Norred, W.; Voss, K. A.; Riley, R. T.; Plattner, R. Fumonisin toxicity and metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *392*, 225-236.
- Norred, W. P.; Plattner, R. D.; Chamberlain, W. J. Distribution and excretion of [¹⁴C] fumonisin B₁ in male Sprague-Dawley rats. *Nat. Toxins* **1993**, *1*, 341-346.
- Norred, W. P.; Plattner, R. D.; Dombink Kurtzman, M. A.; Meredith, F. I.; Riley, R. T. Mycotoxin-induced elevation of free sphingoid bases in precision-cut rat liver slices: specificity of the response and structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *147*, 63-70.

- Norred, W. P.; Plattner, R. D.; Vesonder, R. F.; Bacon, C. W.; Voss, K. A. Effect of *Fusarium moniliforme* metabolites on unscheduled DNA synthesis (UDS) in rat primary hepatocytes. *The Toxicologist* **1990**, *10*, 165-170.
- Norred, W. P.; Plattner, R. D.; Vesonder, R. F.; Bacon, C. W.; Voss, K. A. Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 233-237.
- Norred, W. P.; Riley, R. T.; Meredith, F. I.; Poling, S. M.; Plattner, R. D. Instability of N-acetylated fumonisin B₁ (FA₁) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, *39*, 1071-1078.
- Olivera, A.; Rosenthal, J.; Spiegel, S. Sphingosine kinase from Swiss 3T3 fibroblasts: a convenient assay for the measurement of intracellular levels of free sphingoid bases. *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 306-312.
- Park, D. L.; Rua, S. M.; Mirocha, C. J.; Abd-Alla, E. A. M.; Weng, C. Y. Mutagenic potentials of fumonisins contaminated corn following ammonia decontamination procedure. *Mycopathologia* **1992**, *117*, 105-108.
- Plattner, R. D.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Voss, K. A.; Peterson, R.; Shackelford, D. D.; Weisleder, D. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia* **1990**, *82*, 698-702.
- Plattner, R. D.; Shackelford, D. D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* **1992**, *117*, 17-22.
- Poling, S. M.; Plattner, R. D. Rapid Purification of Fumonisins B₃ and B₄ with Solid Phase Extraction Columns. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2792-2795.
- Poling, S. M.; Plattner, R. D.; Weisleder, D. N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)fumonisin B₁, the initial reaction product of fumonisin B₁ and D-glucose. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1318-1324.
- Prelusky, D. B.; Miller, J. D.; Trenholm, H. L. Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B₁. *Food. Addit. Contam.* **1996a**, *13*, 155-162.

- Prelusky, D. B.; Savard, M.; Trenholm, H. L. Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B₁ in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. *Nat. Toxins* **1995**, *3*, 389-394.
- Prelusky, D. B.; Trenholm, H. L.; Rotter, B. A.; Miller, J. D.; Savard, M.; Yeung, J. M.; Scott, P. M. Biological fate of fumonisin B₁ in food-producing animals. In: Fumonisin in food; L. S. Jackson; J. W. DeVries and L. B. Bullerman, Eds.; Plenum Press: New York, **1996b**; 265-278.
- Prelusky, D. B.; Trenholm, H. L.; Savard, M. E. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labeled fumonisin B₁ in swine. *Nat. Toxins* **1994**, *2*, 73-80.
- Proctor, R. H.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Hohn, T. M. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* slating population A. *Fung. Gen. Biol.* **1999**, *27*, 100-112.
- Qiu, M.; Liu, X. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. *Food Add. Cont.* **2001**, *18*, 263-269.
- Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Shepard, G. S. V. S. D. *J. Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* **1992**, *82*, 353-357.
- Riley, R. T.; An, N. H.; Showker, J. L.; Yoo, H. S.; Norred, W. P.; Chamberlain, W. J.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr.; Motelin, G.; et al. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker of exposure to fumonisin - containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, *118*, 105-112.
- Riley, R. T.; Enongene, E.; Voss, K. A.; Norred, W. P.; Meredith, F. I.; Sharma, R. P.; Spitsbergen, J.; Williams, D. E.; Carlson, D. B.; Merrill, A. H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **2001**, *109*, 301-308.
- Riley, R. T.; Hinton, D. M.; Chamberlain, W. J.; Bacon, C. W.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr.; Voss, K. A. Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *J. Nutr.* **1994a**, *124*, 594-603.

- Riley, R. T.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC Int.* **1994b**, 77, 533-540.
- Röper, H.; Röper, S.; Heyns, K.; Meyer, B. N.M.R spectroscopy of *N*-(1-deoxy-D-fructosyl)-1-amino acids ("fructose-amino acids"). *Carbohydr. Res.* **1983**, 116, 183-195.
- Rosner, H. Mykotoxin-Workshop, Berlin. **2002**.
- Sarlikiotis, A. W.; Betzing, J.; Wohlschlegel, C.; Bauer, K. H. A new in-vitro method for testing colon targeting drug delivery systems or excipients. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1992**, 2, 62-65.
- Schmelz, E. M.; Dombink Kurtzman, M. A.; Roberts, P. C.; Kozutsumi, Y.; Kawasaki, T.; Merrill Jr, A. H. Induction of apoptosis by fumonisin B₁ in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, 148, 252-260.
- Schröder, E. Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen. Springer Verlag, Berlin, **1991**.
- Schwerdt, G.; Freudinger, R.; Mildenerger, S.; Silbernagl, S.; Gekle, M. The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, 15, 405-415.
- Scott, P. M.; Delgado, T.; Prelusky, D. B.; Trenholm, H. L.; Miller, J. D. Determination of fumonisins in milk. *J. Environ. Sci. Health* **1994**, B29, 989-998.
- Scott, P. M.; Lawrence, G. A. Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Int.* **1992**, 75, 829-834.
- Scott, P. M.; Lawrence, G. A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 541-545.
- Seo, J. A.; Kim, J. C.; Lee, Y. W. Isolation and Characterization of Two New Type C Fumonisins Produced by *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 1003-1005.
- Sharma, R. P.; Dugyala, R. R.; Voss, K. A. Demonstration of *in-situ* apoptosis in mouse liver and kidney after short-term repeated exposure to fumonisin B₁. *J Comp. Pathol.* **1997**, 117, 371-381.

- Shephard, G. S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 2077-2087.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B₁ in rats. *Food Chem. Toxicol.* **1992a**, *30*, 277-279.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Alberts, J. F. Biliary excretion of the mycotoxin fumonisin B₁ in rats. *Food Chem. Toxicol.* **1994a**, *32*, 489-491.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Alberts, J. F.; Cawood, M. E. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₁ in a nonhuman primate. *Toxicon* **1994b**, *32*, 735-741.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Alberts, J. F.; Gelderblom, W. C. A. Fate of a single dose of the carbon-14-labeled mycotoxin, fumonisin B₁, in rats. *Toxicon* **1992b**, *30*, 768-770.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Savard, M. E. Fate of a single dose of ¹⁴C-labelled fumonisin B₁ in vervet monkeys. *Nat. Toxins.* **1995**, *3*, 145-150.
- Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Vleggaar, R.; Alberts, J. F. Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the feces of non-human primates. *Food Chem. Toxicol.* **1994c**, *32*, 23-29.
- Shephard, G. S.; van der Westhuizen, L. Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum. *J. Chromat. B* **1998**, *710*, 219-222.
- Shephard, G. S.; van der Westhuizen, L.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Vanschalkwyk, D. J. Disruption of Sphingolipid Metabolism in Non-Human Primates Consuming Diets of Fumonisin-Containing Fusarium Moniliforme Culture Material. *Toxicon* **1996**, *34*, 527-534.
- Shier, W. T.; Abbas, H. K.; Mirocha, C. J. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B₁ and B₂ and *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologia* **1991**, *116*, 97-104.
- Shier, W. T.; Resch, P.; Badria, F. A.; Abbas, H. K. Biological consequences of fumonisins. *Bull. Inst. Compr. Agr. Sci. Kinki Univ.* **2000**, *8*, 67-74.

- Shier, W. T.; Tiefel, P. A.; Abbas, H. K. Current research on mycotoxins: Fumonisin. *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.* **1998**, *216*, 177-AGFD.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- Solfrizzo, M.; Avanti, G.; Visconti, A. Rapid Method to Determine Sphinganine/Sphingosine in Human and Animal Urine as a Biomarker for Fumonisin Exposure. *J. Chromat. B* **1997**, *692*, 87-93.
- Stack, M. E.; Eppley, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 834-837.
- Sun, T. S. C.; Stahr, H. M. Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test. *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 893-898.
- Sydenham, E. W.; Gelderblom, W. C. A.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 285-290.
- Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; Rheeder, J. P.; Peralta Sanhueza, C. E.; Gonzalez, H. H. L.; Resnik, S. L. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 891-895.
- Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Shephard, G. S.; Koch, K. R.; Hutton, T. Preparation and Isolation of the Partially Hydrolyzed Moiety of Fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2400-2405.
- Thakur, R. A.; Smith, J. S. Determination of Fumonisin B₁ and B₂ and Their Major Hydrolysis Products in Corn, Feed, and Meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1047-1052.
- Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Gelderblom, W. C. A.; Nieuwenhuis, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1089-1093.
- Tolleson, W. H.; Couch, L. H.; Melchior, W. B.; Jenkins, G. R.; Muskhelishvili, M.; Muskhelishvili, L.; McGarrity, L. J.; Domon, O.; Morris, S. M.; Howard, P. C. Fumonisin B₁ induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. *Int. J. Onc.* **1999**, *14*, 833-843.

- Tolleson, W. H.; Dooley, K. L.; G., S. W.; J., D. T.; Bucci, T. J.; Howard, P. C. The mycotoxin fumonisin B₁ induces apoptosis in cultured human cells and in livers and kidneys of rats. In: Fumonisin in Food (advances in Experimental Medicine and Biology); L. S. Jackson; J. W. DeVries and L. B. Bullerman, Eds.; Plenum Press: New York, **1996a**; 237-250.
- Tolleson, W. H.; Melchior, W. B.; Morris, S. M.; McGarrity, L. J.; Domon, O. E.; Muskhelishvili, L.; James, S. J.; Howard, P. C. Apoptotic and Anti-Proliferative Effects of Fumonisin B₁ in Human Keratinocytes, Fibroblasts, Esophageal Epithelial Cells and Hepatoma Cells. *Carcinogenesis* **1996b**, *17*, 239-249.
- Tormeï, D. L.; Cope, F. O. Apoptosis: The molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1991**.
- Torres, M. R.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *39*, 139-143.
- Tveito, G.; Hansteen, I.; Dalen, H.; Haugen, A. Immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel II. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1829-1835.
- Usleber, E.; Straka, M.; Terplan, G. Enzyme Immunoassay for Fumonisin B₁ Applied to Corn-Based Food. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1392-1396.
- Van der Westhuizen L, B. N. L. M. Sphinganine/sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 1153-1158.
- Van der Westhuizen, L.; Shephard, G. S.; van Schalkwyk, D. J. The effect of a single gavage dose of fumonisin B-2 on the sphinganine and sphingosine concentrations in vervet monkeys. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, *39*, 455-459.
- Velazquez, C.; Vanbloemendal, C.; Sanchis, V.; Canela, R. Derivation of Fumonisin B₁ and B-2 with 6-Aminoquinolyl N-Hydroxysuccinimidylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1535-1537.
- Voss, K. A.; Bacon, C. W.; Meredith, F. I.; Norred, W. P. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water extracted *Fusarium moniliforme* culture material. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 623-627.

- Wang, E.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Riley, R. T.; Merrill, A. H., Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins . Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14486-14490.
- Wang, E.; Ross, P. F.; Wilson, T. M.; Riley, R. T.; Merrill, A. H., Jr. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 1706-1716.
- Wang, H.; Jones, C.; Ciaccizanella, J.; Holt, T.; Gilchrist, D. G.; Dickman, M. B. Fumonisins and Alternaria Alternata Lycopersici Toxins - Sphinganine Analog Mycotoxins Induce Apoptosis in Monkey Kidney Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3461-3465.
- Ware, G. M.; Francis, O.; Kuan, S. S.; Umrigar, P.; Carman, A.; Carter, L.; Bennett, G. A. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 1751-1770.
- Weibking, T. S.; Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J.; Turk, J. R.; Rottinghaus, G. E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. *Poult. Sci.* **1993**, *72*, 456-466.
- Wilkes, J. G.; Sutherland, J. B.; Churchwell, M. I.; Williams, A. J. Determination of fumonisins B₁, B₂, B₃ and B₄ by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Chromatogr. A* **1995**, *695*, 319-323.
- Wilson, T. M.; Ross, P. F.; Rice, L. D.; Osweilwer, G. D.; Nelson, H. A. O. D. L.; Plattner, R. D.; Reggiardo, C.; Noon, T. H.; Pickrell, J. W. Fumonisins B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1990**, *2*, 213-216.
- Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **1980**, *284*, 555-556.
- Wysocki, V. H. Triple quadrupole mass spectrometry. In: Mass spectrometry in the biological sciences; M. L. Gross, Ed.; Kluwer: Dordrecht, **1992**; 59-77.
- Xie, W. P.; Mirocha, C. J.; Chen, J. P. Detection of Two Naturally Occurring Structural Isomers of Partially Hydrolyzed Fumonisin B₁ in Corn by on Line Capillary

- Liquid Chromatography Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1251-1255.
- Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
- Yeung, J. M.; Wang, H. Y.; Prelusky, D. B. Fumonisin B 1 Induces Protein Kinase C Translocation Via Direct Interaction with Diacylglycerol Binding Site. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *141*, 178-184.
- Yoo, H. S.; Norred, W. P.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr.; Riley, R. T. Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *114*, 9-15.
- Yoshimoto, K.; Itatani, Y.; Shibata, Y.; Tsuda, Y. Utilization of sugars in organic synthesis. Part IV. Carbon-13 nuclear magnetic resonance (NMR) of *O*-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidations. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *18*, 208-219.
- Young, J. C.; Lafontaine, P. Detection and characterization of fumonisin mycotoxins as their methyl esters by liquid chromatography/particle-beam mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 352-359.
- Zimmer, I.; Dietrich, R.; Klaffke, H.; Märklbauer, E.; Majerus, P.; Usleber, E.; Weber, R. Fumonisinbelastung von Lebensmitteln des deutschen Marktes, Mykotoxin-Workshop, Berlin. **2002**.
- Zoller, O.; Sager, F.; Zimmerli, B. Occurrence of fumonisins in food. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* **1994**, *85*, 81-99.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Oktober 2002 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die kompetente wissenschaftliche Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung und Förderung.

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier danke ich für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl promovieren zu können und für die dort herrschenden hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Gekle, Lehrstuhl für Physiologie der Universität Würzburg, möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor Studien zur Apoptose durchzuführen.

Bei Frau Dr. Monika Goßmann, Lehrstuhl für Phytomedizin der Humboldt Universität zu Berlin bedanke ich mich für die Kooperationsbereitschaft bei der Untersuchung der Spargel- und Knoblauchproben.

Bei Frau Elfi Ruckdeschel und Herrn Dr. Matthias Grüne bedanke ich mich für zahlreiche NMR-Messungen.

Für die Geduld bei der LC-MS-Einweisung bedanke ich mich bei Stefanie Diem, Dominique Kavvadias und Michaela Hartl.

Bei Thomas Raab bedanke ich mich für die Hilfe bei Computersorgen, für das große Engagement beim Korrekturlesen und seine Geduld.
Für die angenehme Arbeitsatmosphäre bei der Betreuung des NMR-Gerätes bedanke ich mich bei Tobias Hauck („The King of Shim“).

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Daniela Schraudt und Stephen Pikrahn.

Mein besonderer Dank gilt vor allem auch meinen Eltern, die mich stets und auf unschätzbare Weise unterstützt haben.

Schließlich danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Walburga Seefelder

Anschrift: Franz-Schubertstrasse 4a
97074 Würzburg

Geburtsdatum: 23.04.1976

Geburtsort: Sulzbach-Rosenberg

Eltern: Hartmut Seefelder, Forstpräsident
Sigrun Seefelder, geb. Schmidl, Hausfrau

Familienstand: ledig

Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung: 1982 bis 1983 Besuch der Grundschule Waldsassen
1983 bis 1986 Besuch der Grundschule Schalkhausen
1986 bis 1995 Besuch des Platen-Gymnasiums Ansbach

Studium: November 1995 bis November 1999
Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg
1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker im Dezember 1999

Promotion: Januar 2000 bis Dezember 2002
Anfertigung der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. H.-U. Humpf

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Fumonisine und deren Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung, biologische Aktivität und Metabolismus“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Walburga Seefelder

