

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Angefertigt am Analytikzentrum
des Departments für Agrobiotechnologie (IFA) Tulln,
Universität für Bodenkultur Wien
(Ass. Prof. Dr. Franz Berthiller)

Metabolismus des maskierten Mykotoxins
Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid (D3G) in Ratten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Veronika Birgit Nagl
aus Sankt Pölten, Österreich

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Für Antonie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Deoxynivalenol (DON)	3
1.1.	Allgemeines zu Mykotoxinen	3
1.2.	Allgemeines, Bildung und Vorkommen von DON	3
1.3.	Biologische Wirkung von DON	5
1.4.	Toxikokinetik und Metabolismus von DON	8
1.5.	Höchstmengenregelungen in der Europäischen Union	12
2.	Deoxynivalenol-3-β-D-Glukosid (D3G)	14
2.1.	Allgemeines zu maskierten Mykotoxinen	14
2.2.	Bildung und Vorkommen von D3G	15
2.3.	Biologische Wirkung von D3G	19
3.	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)	20
3.1.	Allgemeines	20
3.2.	Flüssigkeitschromatographie	21
3.3.	Massenspektrometrie	21
III.	ERGEBNISSE	25
IV.	DISKUSSION	49
1.	Bestimmung von DON und dessen Metaboliten mittels LC-MS/MS ..	49
2.	Metabolismus von DON	51
3.	Metabolismus von D3G	53
V.	ZUSAMMENFASSUNG	56
VI.	SUMMARY	57
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	58
VIII.	ANHANG	70
IX.	DANKSAGUNG	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion
DON	Deoxynivalenol
DON-GlcA	Deoxynivalenol-Glukuronid
DOM-1	Deepoxy-deoxynivalenol
DOM-1-GlcA	Deepoxy-deoxynivalenol-Glukuronid
D3G	Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid
ESI	Electrospray ionisation
FHB	Fusarium Head Blight
HPLC	High performance liquid chromatography
IgA	Immunglobulin-A
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KG	Körpergewicht
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake
Q	Quadrupol
QqLIT	Tandem quadrupole-linear ion trap
QTL	Quantitative Trait Locus
RP-HPLC	Reversed phase-high performance liquid chromatography
SPE	Solid phase extraction
SRM	Selected reaction monitoring mode
3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol
15-AcDON	15-Acetyldeoxynivalenol

I. EINLEITUNG

Mykotoxine – sekundäre Metabolite von Schimmelpilzen – weisen eine Vielzahl gesundheitsgefährdender Eigenschaften auf. Deoxynivalenol (DON), eines der wirtschaftlich bedeutsamsten Mykotoxine, verursacht in Tieren Toxizitätssymptome wie Futtermittelverweigerung, Erbrechen und Wachstumsdepression (zusammengefasst von Pestka, 2007). Bei Menschen wird DON mit Ausbrüchen von Gastroenteritis und einer Schwächung des Immunsystems in Zusammenhang gebracht (zusammengefasst von Pestka, 2010). Daher hat die Europäische Kommission Reglementierungen bzw. Empfehlungen bezüglich der Höchstmengen an DON in Lebens- und Futtermitteln eingeführt (Europäische Kommission, 2006a; Europäische Kommission, 2006b).

Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid (D3G), ein sogenanntes maskiertes Mykotoxin, ist bislang nicht in diesen EU-Höchstmengenregelungen inkludiert. D3G wird in Pflanzen durch enzymatische Konvertierung von DON gebildet und stellt für diese ein Detoxifikationsprodukt dar (Poppenberger et al., 2003; Berthiller et al., 2009b). Das Vorkommen von D3G konnte weltweit in verschiedenen Futterpflanzen (Sasanya et al., 2008; Berthiller et al., 2009a; Li et al., 2012) und Nahrungsmitteln (Malachova et al., 2011; De Boevre et al., 2012; Varga et al., 2013) nachgewiesen werden.

Die Gefahr der Aufnahme von Nahrungs- oder Futtermitteln, die D3G enthalten, besteht in der möglichen Hydrolyse des maskierten Mykotoxins zu dessen nativer Form innerhalb des Verdauungstraktes. In der Folge könnte das frei gewordene DON absorbiert werden und so zu einer Erhöhung der Gesamttoxinbelastung eines Individuums beitragen. Der FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) hat dieser Problematik kürzlich Rechnung getragen und explizit die Durchführung von *in vivo* Studien zur Abklärung von Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME) dieses maskierten Mykotoxins gefordert (JECFA, 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, erstmals den Metabolismus von D3G in Ratten zu bestimmen und mit jenem von DON in Beziehung zu setzen. Nach oraler Verabreichung der Toxine wurden D3G, DON, sowie die bekannten DON-Metaboliten Deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) und Deoxynivalenol-Glukuronid (DON-GlcA) mittels einer validierten LC-MS/MS-Analysemethode in Kot und Urin der Tiere quantifiziert. Die in dieser Studie erzielten Erkenntnisse sollten zur Risikobewertung von D3G beitragen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Deoxynivalenol (DON)

1.1. Allgemeines zu Mykotoxinen

Mykotoxine sind toxische sekundäre Metabolite von Schimmelpilzen. Diese Pilze können unterschiedlichste Getreidearten und Feldfrüchte während der Vegetationsperiode (Feldpilze) und/oder der Lagerung (Lagerungspilze) infizieren. Laut Schätzungen der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (Food and Agricultural Organisation of the United Nations, FAO) sind bis zu 25% der Getreideprodukte weltweit mit Mykotoxinen kontaminiert (Smith et al., 1994). Durch die Verfügbarkeit sensitiver analytischer Methoden und in Anbetracht aktueller Studienergebnisse (SCOOP, 2003; Streit et al., 2012) muss mittlerweile davon ausgegangen werden, dass der tatsächliche Prozentsatz kontaminierter Proben deutlich höher liegt.

Derzeit sind rund 300-400 verschiedene Mykotoxine bekannt (CAST, 2003), deren Aufnahme über die Nahrung vielfältige gesundheitsschädigende Effekte auslösen kann. Das Vorkommen von Mykotoxinen ist stark an Faktoren wie Klima, saisonale Umweltbedingungen oder Getreideart gebunden. Zu den weltweit am häufigsten auftretenden Mykotoxinen zählen Aflatoxine, Deoxynivalenol (DON), Fumonisine, Ochratoxin A und Zearalenon. In Europa weist DON eine hohe Prävalenz auf (zusammengefasst von Streit et al., 2012) und verursacht erhebliche wirtschaftliche Schäden (CAST, 2003), wodurch dieses Mykotoxin für mitteleuropäische Länder wie Österreich oder Deutschland große Relevanz besitzt.

1.2. Allgemeines, Bildung und Vorkommen von DON

DON gehört zur Gruppe der Trichothecene, welche eine Familie von über 200 strukturell verwandten Sesquiterpenoid-Mykotoxinen darstellt. Diese niedermolekularen Metabolite werden durch eine Doppelbindung zwischen C-9

und C-10 sowie durch einen Epoxidring an C-12,13 gekennzeichnet (Abbildung 1). Letzterer ist von essentieller Bedeutung für die biologische Wirkung der Trichothecene (Wei und McLaughlin, 1974; Sundstøl Eriksen et al., 2004). Anhand ihrer funktionellen Gruppen werden Trichothecene in 4 Gruppen (A-, B-, C-, D-Trichothecene) unterteilt (McCormick et al., 2011). DON wird zu den Typ B-Trichothecenen gezählt, welche charakteristischerweise an der C-8-Position eine Keto-Gruppe aufweisen. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise Nivalenol (NIV), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) oder 15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON).

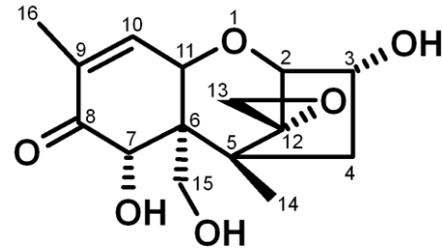


Abbildung 1: Chemische Struktur von Deoxynivalenol (DON)

DON wird von verschiedenen *Fusarium* Spezies, hauptsächlich jedoch von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum*, in Getreidearten wie Mais, Weizen, Gerste oder Hafer gebildet. Beide Pilzspezies stellen relevante Pflanzenpathogene dar, die Krankheiten wie Kolbenfäulnis in Mais oder Ährenfusariose (Fusarium Head Blight, FHB) in Weizen verursachen (Goswami und Kistler, 2004). Entscheidende Faktoren für eine Infektion um den Zeitpunkt der Blüte sind die lokal vorherrschende Temperatur und Feuchtigkeit, sowie der Zeitpunkt von Regenfällen. Dies erklärt auch, warum die Konzentration an DON in Getreide von Jahr zu Jahr bzw. von Region zu Region stark variieren kann (CCCF, 2011). Eine aktuelle Untersuchung wies für den europäischen und mediterranen Raum eine durchschnittliche DON-Kontamination von 1073 µg/kg (ppb) in Mais, 705 µg/kg in Weizen bzw. 394 µg/kg in Gerste nach (Binder et al., 2007). Prozesse während der Nahrungsmittelherstellung führen - in Abhängigkeit des angewandten Verfahrens - zu einer Reduktion, jedoch zu keiner vollständigen Eliminierung von DON (Hazel und Patel, 2004; Visconti et al., 2004). Daher kann dieses Mykotoxin in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln, die auf Getreide basieren, detektiert werden (Malachova et al., 2011; Varga et al., 2013). Die häufige Exposition von Nutztieren gegenüber DON konnte mit einer Studie, in welcher 56% der untersuchten Fertigfuttermittel mit DON belastet waren, untermauert werden (Binder et al., 2007).

1.3. Biologische Wirkung von DON

Im Folgenden soll ein Überblick über die biologische Wirkungsweise, sowie die von DON verursachten akuten und chronischen Krankheitserscheinungen gegeben werden. Für detailliertere Informationen sei an dieser Stelle auf verschiedene Übersichtsarbeiten verwiesen (Rotter et al., 1996; Pestka, 2007; Pestka, 2010).

Der primäre Wirkmechanismus von Trichothecenen besteht in einer Inhibierung der Proteinsynthese. Durch Interaktion mit der 60S Untereinheit eukaryotischer Ribosomen wird die Funktion der Peptidyl-Transferase gehemmt. DON blockiert die Elongationsphase und beeinflusst damit die Proteinsynthese in geringerem Maße als Inhibitoren der Initiationsphase (z.B. T2-Toxin) (Ehrlich und Daigle, 1987).

Darüber hinaus besitzt DON eine ausgeprägte immunmodulatorische Wirkung, bei deren Ausbildung den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) eine bedeutende Rolle zu Teil wird. Die MAPKs stellen einen wichtigen Signaltransduktionsweg der Zelle für Wachstum, Differenzierung und Apoptose dar (Pearson et al., 2001). Ihre DON-induzierte Aktivierung („ribotoxic stress response“) führt bei geringen Toxin-Konzentrationen zu einer gesteigerten Expression bestimmter Zytokine und proinflammatorischer Enzyme (z.B. Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α , Cyclooxygenase-2) und somit zu einer Stimulation des Immunsystems (zusammengefasst von Pestka, 2008). Hingegen lösen hohe Konzentrationen an DON in Leukozyten Apoptose aus, was eine Immunsuppression zur Folge hat (Abbildung 2).

Die Aufnahme von DON verursacht bei Tieren akute gastrointestinale Symptome, wie Anorexie und Erbrechen (zusammengefasst von Rotter et al., 1996). Bei oraler Verabreichung im Schwein wurde eine minimale emetische Dosis (MED) von 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) DON bestimmt (Forsyth et al., 1977). Es bestehen jedoch zwischen den einzelnen Tierarten große Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber DON, die wahrscheinlich auf speziesspezifischen Besonderheiten in der Metabolisierung von DON beruhen (siehe Kapitel 1.4.).

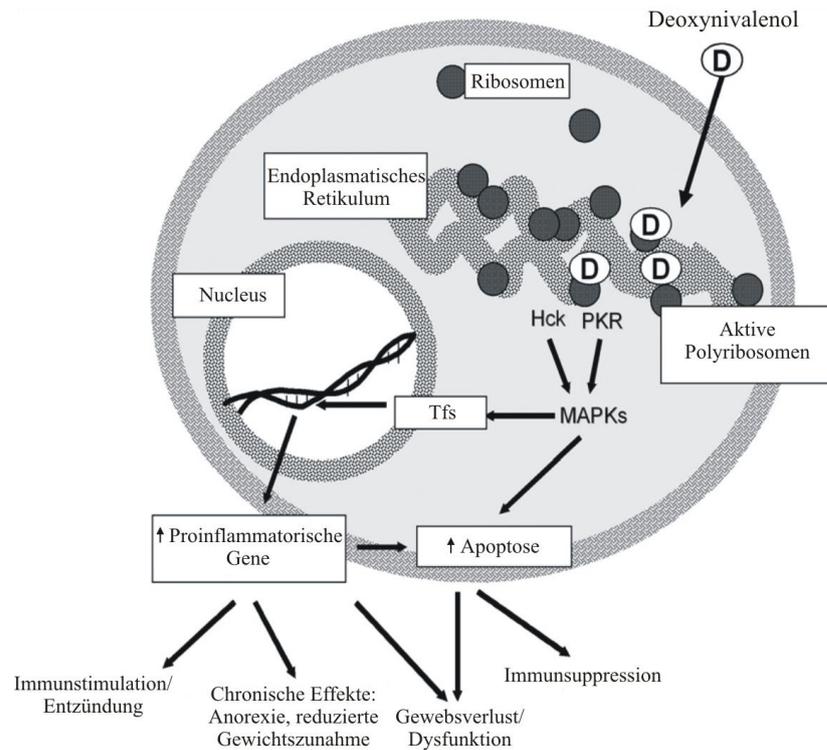


Abbildung 2: Molekularer Wirkmechanismus von DON (modifiziert nach Pestka, 2007). Nach Eintritt in die Zelle bindet DON an Ribosomen, die über bestimmte Signaltransduktoren (RNA-aktivierte Protein-Kinase, PKR; Hämopoetische Zell-Kinase, Hck) eine Aktivierung der MAPKs vermitteln. In der Folge kommt es (über Transkriptionsfaktoren, TFs) zur vermehrten Expression proinflammatorischer Gene bzw. zur Apoptose.

Im Allgemeinen gilt das Schwein als DON-sensitivste Tierart, gefolgt von Maus, Ratte, Geflügel und Wiederkäuer (Rotter et al., 1996). Welche Mechanismen den gastrointestinalen Effekten von DON zugrunde liegen, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Aktuelle Forschungsarbeiten führen eine Beteiligung von neuroendokrinen Botenstoffen (z.B. Serotonin) und Zytokinen (z.B. Interleukin-1 β , Interleukin-6, TNF- α) als mögliche Ursachen an (diskutiert in Flannery et al., 2011).

In entsprechend hohen Dosen verabreicht, kann DON zu ausgeprägten histopathologischen Veränderungen (Hämorrhagien/Nekrosen im Gastrointestinaltrakt, Nekrosen des Knochenmarks und von Lymphgeweben, Läsionen in Nieren und Herz), sowie Schock und in der Folge zum Tod führen (Forsell et al., 1987). Bei oraler Verabreichung reichen die Werte für die mittlere letale Dosis (LD₅₀) von 46 mg/kg KG in Mäusen (Yoshizawa und Morooka, 1974) bis zu 140 mg/kg KG in Broilern (Huff et al., 1981).

Die chronischen Wirkungen von DON sind durch eine reduzierte Futteraufnahme, geringeres Wachstum, Reproduktionsstörungen sowie Beeinträchtigung des Immunsystems gekennzeichnet.

Bei Schweinen kann ab einer Konzentration von 0,6-2 mg/kg (ppm) DON im Futter eine Reduktion der Futteraufnahme und der Gewichtszunahme beobachtet werden (EFSA, 2004). Basierend auf Literaturdaten kalkulierten Dänicke et al. (2008), dass der Futtermittelverzehr um 5,4% sinkt, wenn die DON-Konzentration im Futter um 1 mg/kg ansteigt. Zudem sind lokale Schädwirkungen von DON auf den Darm beschrieben (u.a. Villusatrophie, reduzierte Expression von Tight Junction-Proteinen), die als prädisponierend für Infektionen mit enteropathogenen Erregern angesehen werden können (Bracarense et al., 2011).

Hingegen führt bei Wiederkäuern die mehrtägige Aufnahme von Futter mit einer DON-Belastung von 66 mg/kg zu keiner messbaren Leistungsminderung (Côté et al., 1986). Bei Broilern wird im Allgemeinen erst ab einer Futterkontamination von 15 mg/kg DON von Leistungseinbußen ausgegangen (Awad et al., 2008). Dennoch liefern aktuelle Studien Hinweise, dass die chronische Aufnahme von niedrigen DON-Mengen auch bei diesen vergleichsweise als unempfindlich geltenden Tierarten negative Folgen aufweisen kann. So stellten Hildebrand et al. (2012) fest, dass eine DON-Belastung des Futters von 5 mg/kg bei Milchkühen eine Reduktion der Fermentationsleistung und der mikrobiellen Proteinsynthese bewirkt. Als weiteres Beispiel sei die Studie von Yunus et al. (2012) angeführt, die eine reduzierte Gewichtszunahme von Broilern bei einer Futterkonzentration von 1,7 mg/kg DON belegen konnte.

Die von DON induzierten reproduktiven und immunologischen Schädwirkungen sind für Labortiere ausführlich beschrieben (zusammengefasst von Pestka und Smolinski, 2005). Die reproduktiven Effekte inkludieren hierbei Fertilitätsstörungen, vermehrte Resorption von Embryonen, geringe Wurfgröße, erhöhte postnatale Sterblichkeit und teratogene Effekte, wie Malformationen des Skeletts. Die zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften von DON stehen in Zusammenhang mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber infektiösen Krankheiten. Zudem verursacht DON eine Überproduktion von Immunglobulin-A (IgA), die Analogien zur IgA-Nephropathie des Menschen aufweist (zusammengefasst von Pestka, 2003).

Für das Schwein existieren sowohl hinsichtlich einer Wirkung auf das humorale Immunsystem (in Form einer Erhöhung des Immunglobulin A Spiegels), als auch die Auswirkungen auf das Reproduktionssystem betreffend widersprüchliche Literaturdaten (zusammengefasst von Tiemann und Dänicke, 2007). Jedoch scheint die Immunantwort auf Vakzinationen durch eine chronische DON-Aufnahme beeinträchtigt zu sein (Pinton et al., 2008).

Beim Menschen wird die Aufnahme von DON mit akuten Ausbrüchen von Gastroenteritis in Verbindung gebracht. Diesbezügliche Berichte sind insbesondere für den Zeitraum von 1946-1991 aus dem asiatischen Raum vorhanden (zusammengefasst von Pestka, 2010). Gegenwärtig stellt allerdings die chronische DON-Exposition, die aus zahlreichen Nahrungsmitteluntersuchungen abgeleitet werden kann (SCOOP, 2003; JECFA, 2011), das primäre Gesundheitsrisiko dar. Obgleich bislang keine experimentell abgesicherten Daten vorhanden sind, besteht die Befürchtung, dass DON auch beim Menschen eine immunmodulierende Wirkung aufweist und folglich zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit führt (Pestka und Smolinski, 2005).

1.4. Toxikokinetik und Metabolismus von DON

Nach oraler Aufnahme wird DON rasch resorbiert, systemisch verteilt und eliminiert, wobei Urin der Hauptausscheidungsweg ist (zusammengefasst von Pestka, 2007). Maximale Plasmakonzentrationen von DON können in Mäusen 5-30 min nach oraler Toxin-Verabreichung detektiert werden (Azcona-Olivera et al., 1995; Pestka et al., 2008). Die Verteilungs- und Eliminationsvorgänge folgen dabei einem Zwei-Kompartiment-Modell mit einer Distributions- und Eliminationshalbwertszeit von 20,4 min bzw. 11,8 h (Pestka et al., 2008). Die Bedeutung eines Carry-overs von DON in Fleisch, Milch oder Eier ist für die öffentliche Gesundheit vernachlässigbar (Valenta und Dänicke, 2005; Seeling et al., 2006; Döll et al., 2008).

Die Metabolisierung von DON wird durch Faktoren wie Applikationsroute (zusammengefasst von Rotter et al., 1996) und Toxindosis (Goyarts und Dänicke, 2006) beeinflusst. Die größte Relevanz weisen in diesem Zusammenhang jedoch speziesspezifische Unterschiede auf, die im Folgenden näher dargelegt werden.

Im Allgemeinen werden zwei Möglichkeiten beschrieben, wie DON in Säugetieren detoxifiziert werden kann: Deepoxydierung durch anaerobe Bakterien oder Konjugation an Glukuronsäure.

Deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) wird von anaeroben ruminalen (King et al., 1984; Swanson et al., 1987) oder intestinalen (Swanson et al., 1988; Worrell et al., 1989) Mikroorganismen gebildet. Durch den Verlust der Epoxid-Gruppe (Abbildung 3) weist dieser Metabolit eine geringere Zytotoxizität als DON auf (Sundstøl Eriksen et al., 2004).

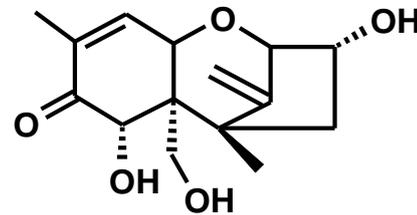


Abbildung 3: Chemische Struktur von Deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1)

Daher wird die Kapazität, DON zu DOM-1 zu detoxifizieren als Hauptursache für die speziesspezifischen Unterschiede in der Sensitivität gegenüber DON angesehen. DOM-1 kann entweder direkt über den Feces ausgeschieden werden, oder resorbiert und in biologischen Matrices wie Urin, Plasma (zusammengefasst von Rotter et al., 1996), Galle (Döll et al., 2008) und Milch (Seeling et al., 2006) detektiert werden.

Der zweite Weg, DON zu metabolisieren, besteht in einer Glukuronidierung. Obwohl ursprünglich ausgeschlossen (Côté et al., 1987), konnte nunmehr nachgewiesen werden, dass DON-Glukuronid (DON-GlcA) in der Leber synthetisiert wird (Wu et al., 2007; Maul et al., 2012b). Bislang wurden zwei DON-GlcA-Isomere, DON-3-GlcA und DON-15-GlcA, identifiziert (Warth et al., 2012; Abbildung 4). Neue Forschungsergebnisse deuten zudem auf das Vorhandensein eines dritten Isomers hin (Maul et al., 2012b). DON-GlcA ist der Hauptmetabolit von DON in Plasma und Urin (zusammengefasst von Wu et al., 2007). Darüber hinaus wurde die Existenz eines DOM-1-Glukuronids (DOM-1-GlcA) beschrieben (Côté et al., 1986; Lattanzio et al., 2011).

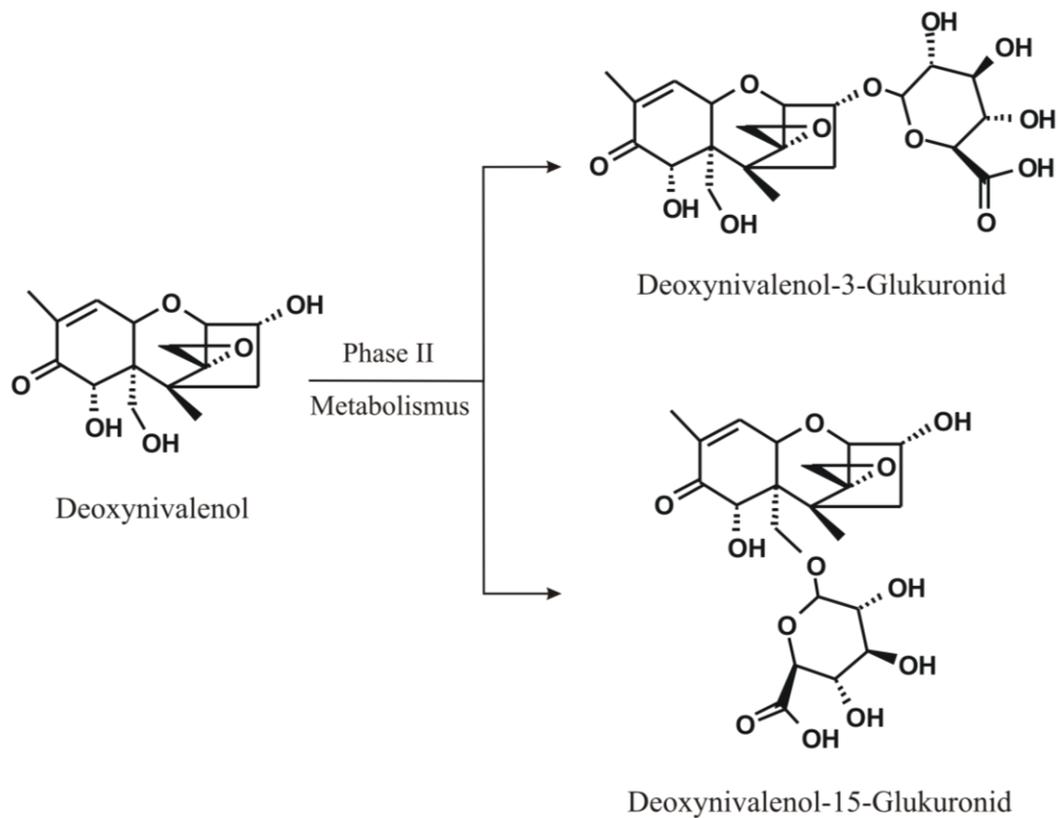


Abbildung 4: Struktur von DON und dessen Isomeren, DON-3- und DON-15-Glukuronid (modifiziert nach Warth et al., 2012).

In Ratten gelang Yoshizawa et al. (1983) die erstmalige Identifizierung von DOM-1. Nach oraler Verabreichung von DON (6 mg/kg KG) wurde innerhalb von 72 h 15% der verabreichten Dosis in Form von DON und DOM-1 in Urin und Kot wiedergefunden. DOM-1 repräsentierte dabei nahezu 50% der im Urin ausgeschiedenen Toxinmenge (Summe DON+DOM-1), was auf einen hohen Anteil des aus dem Darm absorbierten DOM-1 schließen lässt. Dieser Aspekt wird durch eine aktuelle Studie belegt, in welcher die im Urin von Wistar Ratten detektierten DOM-1-Konzentrationen jene von DON teilweise sogar überstiegen (Lattanzio et al., 2011). Im Gegensatz zur Arbeit von Yoshizawa et al. (1983) erzielten Studien, in welchen radiomarkiertes DON verwendet wurde, deutliche höhere Wiederfindungen von rund 90% (Lake et al., 1987; Worrell et al., 1989). So fanden Lake et al. (1987) nach oraler Verabreichung von 10 mg/kg KG [^{14}C]-DON 25% bzw. 64% der eingesetzten Dosis in Urin und Kot wieder. In einer weiteren Studie wurden 37% der applizierten [^{14}C]-DON Dosis im Urin detektiert, wobei DON-GlcA als primärer Metabolit bestimmt wurde (Meky et al., 2003).

Lattanzio et al. (2011) berichteten vom Auftreten zweier DON-GlcA-Isomere im Urin, deren chemische Struktur noch nicht abklärt werden konnte. Die Ergebnisse der angeführten Studien belegen das hohe Maß, in dem DON in Ratten biotransformiert wird.

In Schweinen werden rund 90% von einmalig oral appliziertem DON systemisch absorbiert (Goyarts und Dänicke, 2006). Durchschnittlich 51-55% der verabreichten Dosis werden über den Urin und lediglich 1-3% über den Kot ausgeschieden, wobei teilweise große individuelle Schwankungen zu beobachten sind (Dänicke et al., 2004b; Goyarts und Dänicke, 2006). Obwohl 9-60% der im Plasma detektierbaren DON-Menge in konjugierter Form vorliegen (Goyarts und Dänicke, 2006), fehlen Studien, die eine direkte Quantifizierung (und Identifizierung) von DON-GlcA im Urin von Schweinen durchführen.

Im Allgemeinen weisen Schweine ein geringes Vermögen zur Metabolisierung von DON auf. Dänicke et al. (2004a) konnten zeigen, dass die Deepoxydierung von DON hauptsächlich in distalen Teilen des Darmes stattfindet. Allerdings konnten die Autoren auch eine nahezu vollständige Absorption von DON im proximalen Dünndarm belegen, wodurch der Detoxifizierung zu DOM-1 aus mengenmäßiger Sicht eine beschränkte Bedeutung zugemessen wurde. Daten, die im Schwein eine geringe Ausscheidung von DOM-1 über den Urin aufzeigen (Razzazi-Fazeli et al., 2003; Dänicke et al., 2004b), bestätigen diese Ansicht. Darüber hinaus scheint es manchen Schweinen gänzlich an der Fähigkeit zur Bildung von DOM-1 zu fehlen (Sundstøl Eriksen et al., 2002).

Der Metabolismus von DON in Wiederkäuern und v.a. in Geflügel ist vergleichsweise wenig erforscht. Die geringe Sensibilität dieser Tierarten gegenüber DON scheint aber zum einen in der geringen Absorption des Mykotoxins (Prelusky et al., 1984; Prelusky et al., 1986) und zum anderen in dem hohen Vermögen zur Biotransformation begründet zu sein. So werden im Vormagensystem der Wiederkäuer wird bis zu 99% der aufgenommenen Toxinmenge zu DOM-1 verstoffwechselt (Seeling et al., 2006). Folglich repräsentieren DOM-1 und DOM-1-GlcA die primär detektierten Metabolite im Urin (Côté et al., 1986).

Da es im humanen Verdauungstrakt nicht bzw. nur in äußerst geringem Maße zur Bildung von DON-1 kommt (Turner et al., 2010a), gilt der Mensch gemeinhin als DON-sensitiv (Turner et al., 2008). Nach Aufnahme über die Nahrung werden rund 70% der DON-Menge über den Urin ausgeschieden, wobei dieser Wert sehr konstant zu sein scheint (Turner et al., 2010b; Warth B., persönliche Mitteilung). Die Elimination erfolgt dabei hauptsächlich in Form von DON-15-GlcA und DON-3-GlcA (Warth et al., 2012). Die kombinierte Quantifizierung von DON und DON-GlcA im menschlichen Urin gilt als validierter Biomarker für eine DON-Exposition (Turner et al., 2012).

1.5. Höchstmengenregelungen in der Europäischen Union

Aufgrund der gesundheitsgefährdenden Eigenschaften von Mykotoxinen existieren für diese in über 100 Ländern Regelungen für Höchstmengen in Lebens- und Futtermitteln (van Egmond et al., 2007). In der Europäischen Union (EU) sind die maximal zulässigen Konzentrationen an DON in Nahrungsmitteln und deren Ausgangsprodukten durch die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 reglementiert (Europäische Kommission, 2006a). Hingegen bestehen für Futtermittel bzw. für Getreide, das für die Futtermittelherstellung verwendet wird, nur Richtwerte (Europäische Kommission, 2006b; Tabelle 1).

Tabelle 1: DON-Richtwerte für zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse gemäß Empfehlung der Kommission 2006/576/EG. Die angegebenen Werte beziehen sich auf einen Trockensubstanzgehalt von 88%.

Zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse	DON mg/kg (ppm)
Futtermittelausgangserzeugnisse	
– Getreide und Getreideerzeugnisse außer Maisnebenprodukte	8
– Maisnebenprodukte	12
Ergänzungs- und Alleinfuttermittel außer	
– Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine	0,9
– Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Kälber (< 4 Monate), Lämmer und Ziegenlämmer	2

Zudem wurde 2001 von der JECFA eine vorläufig maximal duldbare tägliche Aufnahmemenge (provisional maximum tolerable daily intake – PMTDI) für Menschen von 1 µg DON/kg KG festgelegt (JECFA, 2001). Sowohl die Höchstmengenregelungen, als auch der PMTDI sind jedoch derzeit Gegenstand von intensiven Diskussionen (CCCF, 2011). Unter anderem bestehen Bedenken, dass auch die acetylierten und maskierten Formen von DON, welche in den bestehenden Regelungen nicht implementiert sind, eine Gesundheitsgefährdung darstellen. So konnte gezeigt werden, dass 3-AcDON und 15-AcDON *in vivo* rasch und zu großem Ausmaß deacetyliert werden und somit zur Gesamtbelastung an DON beitragen (zusammengefasst von Wu et al., 2010). Diese Erkenntnis führte zu einer Abänderung des PMTDI zu einem Summenwert von DON, 3-AcDON und 15-AcDON (JECFA, 2011). Um maskierte Formen von DON, und hier im speziellen Deoxynivalenol-3-β-D-Glukosid (D3G), in die Höchstmengenregelungen zu inkludieren, fehlen bislang ausreichende Daten bezüglich Exposition und potentielltem Gesundheitsrisiko dieser Substanz (JECFA, 2011).

2. Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid (D3G)

2.1. Allgemeines zu maskierten Mykotoxinen

Neben nativen Mykotoxinen (wie z.B. DON, Zearalenon oder Fumonisin) können Nahrungs- und Futtermittel auch so genannte maskierte Mykotoxine enthalten. Diese werden durch routineanalytische Methoden nicht erfasst und führen dadurch oftmals zu einer Unterschätzung des Gesamttoxingehalts einer Probe. Maskierte Mykotoxine werden in Pflanzen durch Konjugationsreaktionen gebildet oder entstehen während der Lebensmittelherstellung durch chemische Prozesse (zusammengefasst von Berthiller et al., 2012).

Pflanzen schützen sich gegen Xenobiotika, wie Mykotoxine, durch eine Reihe metabolischer Detoxifizierungsschritte. Für die Inaktivierung von Mykotoxinen sind dabei insbesondere Phase II- (enzymatische Konjugation) und Phase III-Reaktionen (Kompartimentierung) von Bedeutung (Berthiller et al., 2009b). Durch die enzymatische Konjugierung von Molekülen wie Glukose, Glutathion oder Malonsäure an das Toxin entstehen Verbindungen von höherer Polarität. Diese weisen für die Pflanzen im Regelfall keine bzw. geringere Toxizität als die Ausgangssubstanz auf (Coleman et al., 1997). In der Folge werden diese Konjugate entweder in löslicher Form in der Vakuole gespeichert oder in unlöslicher Form an Zellwandbestandteile gebunden (Berthiller et al., 2009b). Daraus leitet sich auch die Unterteilung in lösliche und unlösliche (gebundene) maskierte Mykotoxine ab. Während erstere der Analytik direkt zugänglich sind (bei Kenntnis der chemischen Struktur sowie Vorhandensein analytischer Standards), müssen letztere durch chemische oder enzymatische Behandlungen zuvor von ihrer Matrix freigesetzt werden (Berthiller et al., 2012).

Pflanzliche Metabolite sind bislang für die Mykotoxine DON, NIV, Fusarenon-X, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, ZON, Ochratoxin, Destruxin und Fusarinsäure identifiziert worden (Berthiller et al., 2012). So konnten Berthiller et al. (2006) in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) 17 verschiedene Stoffwechselprodukte von ZON nachweisen, darunter Glukoside, Diglukoside und Malonylglukoside. Obgleich das Vorkommen gebundener Fumonisine in Mais belegt wurde (Dall'Asta et al., 2009), fehlen bislang Informationen zu der chemischen Struktur von unlöslichen Mykotoxin-Metaboliten.

In der Nahrungsmittelherstellung können Prozesse wie Mälzen (Maul et al., 2012a; Zachariasova et al., 2012) oder Erhitzen zur Bildung maskierter Mykotoxine führen. So resultiert beispielsweise eine thermische Behandlung von Fumonisin B₁ (FB₁) in Verbindung mit einem reduzierenden Zucker in der Bildung N-(1-Deoxy-D-Fruktose-1-yl)-FB₁ (zusammengefasst von Humpf und Voss, 2004). Darüber hinaus kann ein enzymatischer Abbau von Polysacchariden während der Nahrungsmittelverarbeitung eine Freisetzung von maskierten Mykotoxinen bewirken (Zachariasova et al., 2012).

Ob maskierte Mykotoxine gesundheitsgefährdendes Potential besitzen, ist bislang kaum erforscht und stellt aktuell einen Fokus in der Mykotoxin-Forschung dar. Im Allgemeinen bestehen zwei Varianten, wie maskierte Mykotoxine, über Futter- oder Nahrungsmittel aufgenommen, eine schädigende Wirkung entfalten können. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass diese Toxine im Verdauungstrakt gespalten werden. Die Freisetzung und Absorption des nativen Mykotoxins würde somit zu einer Erhöhung der Gesamttoxinbelastung führen. Zum anderen könnten maskierte Mykotoxine per se eine toxische Wirkung besitzen, die aber nicht zwangsläufig jener des nativen Mykotoxins gleichen muss.

2.2. Bildung und Vorkommen von D3G

Bereits in den 1980er Jahren bestand die Vermutung, dass bestimmte Weizenpflanzen zur Bildung eines DON-Glukosids fähig sind (Miller und Arnison, 1986). Nach der chemischen Synthese (Savard, 1991) erfolgte im Jahre 1992 der erstmalige direkte Nachweis von Deoxynivalenol-3-β-D-Glukosid (D3G) in Mais-Zellsuspensionskulturen (Sewald et al., 1992). D3G stellt ein polares Stoffwechselprodukt von DON dar, das in Pflanzen im Zuge des Phase II-Metabolismus gebildet und anschließend in der Vakuole gespeichert wird (Berthiller et al., 2009b). Poppenberger et al. (2003) konnten in der Modellpflanze *A. thaliana* UDP-Glukosyltransferase als jenes Enzym identifizieren, welches den Transfer von Glukose (in Form von UDP-Glukose) an die Hydroxylgruppe des C-3-Atoms von DON katalysiert (Abbildung 5).

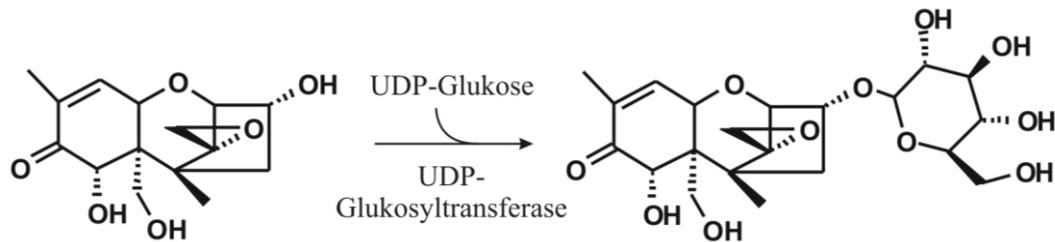


Abbildung 5: Bildung von Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid, katalysiert von dem Enzym UDP-Glukosyltransferase (modifiziert nach Poppenberger et al., 2003).

Die erstmalige Detektion von D3G in natürlich kontaminierten Getreidepflanzen gelang Berthiller et al. (2005), die dieses maskierte Mykotoxin in natürlich kontaminiertem Mais und Weizen aus Österreich, Deutschland und der Slowakei nachwies. Inzwischen wurde das Vorkommen von D3G zudem in Gerste (Lancova et al., 2008), Hafer und Sojabohnen (De Boevre et al., 2012), sowie für den nordamerikanischen (Sasanya et al., 2008) und asiatischen Raum (Li et al., 2012) bestätigt. Der Prozentsatz durch D3G kontaminierter Weizenproben reichte in diesen Studien von rund 40 bis zu 100%, wobei durchschnittliche Konzentrationen von 52 bis 393 μg D3G/kg (ppb) erhoben wurden (Sasanya et al., 2008; Berthiller et al., 2009a; Li et al., 2012). Zudem konnte in Getreideproben eine hohe Korrelation zwischen den Konzentrationen an D3G und DON festgestellt werden (Desmarchelier und Seefelder, 2011). Das molare Verhältnis dieser beiden Analyte (D3G/DON-Verhältnis) betrug hierbei durchschnittlich 0,2. Jedoch bleibt anzumerken, dass dieses Ratio in einzelnen Proben durchaus einen Wert von >1 erreichen kann (Sasanya et al., 2008; Li et al., 2012).

Lemmens et al. (2005) konnten zeigen, dass in Weizenpflanzen die Fähigkeit der Konvertierung von DON zu D3G an den Quantitativen Trait Locus (QTL) *Qfhs.ndsu-3BS* gekoppelt ist. Ebenjener QTL ist an der Ausbildung einer Resistenz gegenüber der Ährenfusariose (FHB) beteiligt. Der Forschergruppe um Lemmens gelang zudem der Nachweis, dass eine Resistenz gegenüber FHB mit einem steigenden D3G/DON-Verhältnis korreliert. Daher ist davon auszugehen, dass züchterische Strategien eine Erhöhung des D3G/DON-Verhältnisses in Getreidepflanzen mit sich bringen werden.

Bislang existieren erst wenige Untersuchungen, in welchen die Konzentration an D3G in Nahrungsmitteln erhoben wird. Tabelle 2 bietet eine Übersicht über diesbezüglich relevante Studien und deren Resultate. Analysiert wurden hierbei auf Getreide basierende Lebensmittel, wie Brot, Mehl, Nudeln oder Bier. Klar ersichtlich ist, dass – unabhängig von der untersuchten Produktgruppe oder Probenanzahl – in einem Großteil der Proben (48-93%) eine Kontamination mit D3G nachgewiesen wurde. Obgleich bedenklich hohe Maximalkonzentrationen von bis zu 844 ppb in einem Maisprodukt festgestellt wurden (Wang et al., 2012), lagen die durchschnittlich erhobenen D3G-Konzentrationen unter 40 ppb (Ausnahme: Maisprodukte 2009 in Wang et al., 2012). Sie befanden sich damit teilweise in einem ähnlichen oder sogar höheren Konzentrationsbereich als die in dem PMTDI aufgenommenen acetylierten Formen von DON (z.B. Li et al., 2012; Varga et al., 2013).

Da es während des Mälzens zu einer Freisetzung und Aufkonzentrierung von D3G kommt (Lancova et al., 2008), sind Biere häufig mit D3G belastet. Zudem konnten in diesem Lebensmittel neben D3G auch Di- und Polyglukoside von DON detektiert werden, die jedoch noch nicht mengenmäßig erfasst wurden (Zachariasova et al., 2012). In einer aktuellen Studie wurden D3G-Konzentrationen von durchschnittlich 7 µg/L Bier erhoben, wobei alkoholfreie Produkte die geringste Kontamination aufwiesen (Varga et al., 2013). Laut der Autoren ist gemäßigter Bierkonsum in Hinblick auf die Aufnahmen von DON und D3G lediglich von eingeschränkter Bedeutung. Dennoch bleibt zu beachten, dass unter ungünstigen Bedingungen der PMTDI allein durch den Konsum von Bier überschritten werden kann.

Kürzlich wurde erstmals Mischfutter für Geflügel, Schweine, Milchkühe und Pferde auf dessen D3G Konzentration analysiert (De Boevre et al., 2012). In rund 60-70% der Geflügel- und Schweinefutterproben konnte D3G detektiert werden. Da in dieser Studie bereits die Einzelkomponenten eine geringe Kontamination an D3G (und DON) aufwiesen, war in der Folge der Gehalt an D3G in den unterschiedlichen Mischfutterproben moderat (Mittelwerte ≤ 121 µg/kg).

Tabelle 2: D3G-Kontamination in Lebensmitteln – Übersicht aktueller Studienergebnisse.

Autoren	Analysierte Nahrungsmittel	Anzahl Proben (n)	Anzahl pos. Proben (%)	Mittelwert D3G (ppb)	Maximum D3G (ppb)	Mittelwert D3G/DON (molar, %)
Kostelanska et al., 2009	Bier	176	74	2-8 ^a	37	n.a.
Malachova et al., 2011	Produkte aus Weißmehl	17	82	15	30	n.a.
	Produkte aus unterschiedl. Mehlsorten	36	78	19	41	n.a.
	Frühstückscerealien	7	85	35	66	n.a.
	Snacks	34	82	32	94	n.a.
	Mehle	22	68	15	72	n.a.
De Boevre et al., 2012	Ballaststoff-angereichertes Brot	52	48	34	425	n.a.
	Kleie-angereichertes Brot	36	53	21	103	n.a.
	Cornflakes	61	50	13	63	n.a.
	Popcorn	12	67	33	96	n.a.
	Hafermehl	13	n.a.	28	97	n.a.
Li et al., 2012	Weizenmehl	30	63	11	39	10
	Weizen-Produkte (Nudeln)	505	71	14-22 ^b	235	9-22 ^b
Wang et al., 2012	Maisprodukte (Corn flakes, Mehl und Gries)	680	75	11-76 ^b	844	34
Varga et al., 2013	Bier	374	93	7	81	56

n.a., nicht angegeben

^a in Abhängigkeit von Biersorte (hell/dunkel) und Alkoholgehalt^b in Abhängigkeit von Jahr (Probenzeitraum 2009-2011)

2.3. Biologische Wirkung von D3G

Die zuvor angeführten Studien zeigen deutlich, dass sowohl Menschen als auch Tiere regelmäßig D3G über die Nahrung zu sich nehmen. Jedoch sind hinsichtlich der möglichen toxischen Effekte von D3G bislang nur Daten aus *in vitro* Studien vorhanden.

Poppenberger et al. (2003) untersuchten den Einfluss von D3G auf die Proteinbiosynthese in Weizenribosomen und verglichen ihn mit jenem von DON. Bereits bei der niedrigsten DON-Menge (1 μM) war eine signifikante Reduktion der Translationsleistung zu beobachten. Hingegen resultierte die höchste Menge an zugesetztem D3G (20 μM) nur in einer minimalen Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese. Die Autoren schlossen daraus, dass die Glykosylierung von DON mit einer deutlichen Reduktion der Toxizität einhergeht.

Im Gegensatz dazu beschäftigten sich Berthiller et al. (2011) mit einer möglichen Hydrolyse von D3G während der Verdauung. In ihrem *in vitro* Model imitierten sie verschiedene Verdauungsprozesse und stellten fest, dass D3G sowohl unter sauren Bedingungen, als auch unter Zusatz humaner Verdauungsenzyme stabil bleibt. Hingegen konnten bestimmte Milchsäurebakterien (z.B. *Enterococcus durans*, *Enterococcus mundtii* oder *Lactobacillus plantarum*) D3G spalten und DON freisetzen. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Hydrolyse von D3G *in vivo* wahrscheinlich ist, allerdings erst in distalen Abschnitten des Darmtraktes statt zu finden scheint. Ob es in diesen Segmenten noch zu einer signifikanten Absorption von freigesetzten DON kommen würde, bleibt abzuklären.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studien, so scheint eine potentielle Gesundheitsgefährdung von D3G vornehmlich in der Freisetzung von DON begründet zu liegen. Zur Verifizierung dieser Annahme bedarf es jedoch Studien, in welchen Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME) von D3G *in vivo* erhoben werden. Da solche Forschungsarbeiten bisher nicht existieren, wird deren Durchführung seitens Fachgremien wie der JECFA explizit gefordert (JECFA, 2011).

3. Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

3.1. Allgemeines

In ADME-Studien von Mykotoxinen kommt den analytischen Messmethoden eine große Bedeutung zu. Der Nachweis natürlicher Exposition, die Verabreichung geringer Toxinmengen in Tierversuchen und die teils niedrigen Konzentrationen einzelner Metabolite machen die Anwendung selektiver, sensitiver und verlässlicher Analysenmethoden notwendig. Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS) erfüllt diese Ansprüche, indem sie die hohe Trennleistung einer LC mit der selektiven Detektion eines Massenspektrometers kombiniert. Zudem bietet LC-MS die Möglichkeit, strukturelle Informationen über Metabolite zu generieren (Ardrey, 2003). Mittlerweile stellt LC-MS die am häufigsten angewendete Methode zum Nachweis von Trichothecenen dar (Shephard et al., 2012).

Der Quantifizierung von Proben mittels LC-MS geht jedoch die Extraktion und Aufreinigung der Mykotoxine aus der biologischen Matrix voran. Klassische Methoden der Probenaufarbeitung für die nachfolgende Analyse inkludieren Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction, LLE), Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE), die Verwendung von Immunoaffinitätssäulen (immunoaffinity columns, IACs) oder die simple Verdünnung von Proben (dilute-and-shoot) (De Saeger, 2011). Mit Hilfe dieser Methoden gilt es, all jene Matrixkomponenten (wie beispielsweise Proteine, Lipide, Harnstoff, Salze) zu reduzieren/eliminieren, die einen störenden Einfluss (Matrixeffekte) auf die nachfolgende Analyse mittels LC-MS ausüben können. Aufgrund der häufig unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der zu bestimmenden Analyte sowie durch die Besonderheiten der jeweiligen Probenmatrix stellt die Optimierung der Probenaufarbeitung oftmals eine große Herausforderung dar (Song et al., 2013).

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Grundlagen der LC-MS gegeben werden, wobei der Fokus auf für die vorliegende Arbeit relevante Aspekte gelegt wurde.

3.2. Flüssigkeitschromatographie

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography, HPLC) verteilen sich Analyte in unterschiedlichem Ausmaß zwischen einer stationären Phase (in Säulen gepackt) und einer flüssigen Phase (Eluent). Je nach Aufbau der stationären Phase bzw. dem Mechanismus der Auftrennung können u.a. Ionenaustausch-, Größenausschluss-, Immunoaffinitäts-, Normalphasen- (normal phase, NP; polare stationäre Phase, apolare mobile Phase) oder Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase, RP; apolare stationäre Phase, polare mobile Phase) unterschieden werden. Die polare Natur von Mykotoxinen und ihre Lösbarkeit in Wasser bzw. organischen Lösungsmitteln machen sie für die Auftrennung mittels RP-HPLC leicht zugänglich (Shephard et al., 2012). Bei dieser Technik wird die Polarität der stationären Phase (z.B. Kieselgel) durch Anbringen von apolaren Verbindungen, (z.B. Alkylsilyl-Verbindungen/Alkanen) umgekehrt. Die stetigen (technischen) Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der HPLC finden mittlerweile in der sogenannten Ultra-High-Performance-Flüssigkeitschromatographie (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) Ausdruck. Dies besitzt durch die Verwendung von stationären Phasen mit kleinerer Partikelgröße ($< 2 \mu\text{m}$) eine verbesserte Trennleistung und ermöglicht so beispielsweise die Separation von DON-GlcA-Isomeren im Urin (Warth et al., 2012).

3.3. Massenspektrometrie

Ogleich die mittels LC aufgetrennten Analyte durch eine Vielzahl unterschiedlicher Detektoren (z.B. Ultraviolett-, Fluoreszenz- oder Brechungsindex-Detektor) bestimmt werden können, hat sich in der Mykotoxin-Analytik die Kopplung an ein Massenspektrometer etabliert. Unter Massenspektrometrie wird die analytische Technik zum Nachweis der molekularen Masse freier Ionen im Hochvakuum verstanden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Der allgemeine Aufbau eines Massenspektrometers besteht aus einer Ionenquelle (Generierung von Ionen), einem Massenanalysator (Auftrennung der Ionen) und einem Detektor (Umwandlung in ein messbares Signal).

Die Grundvoraussetzung für die Kopplung von LC und MS besteht in der Überführung einer Probe von flüssiger in gasförmige Form. Hierbei hat die Entwicklung von Verfahren, welche die Ionisation unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure ionization, API) ermöglichen, einen großen Fortschritt mit sich gebracht. Zu den API-Techniken sind neben der Elektrospray-Ionisation (ESI), die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) und Photoionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure photoionisation, APPI) zu zählen, wobei das erstgenannte Verfahren die häufigste Anwendung findet (Holčapek et al., 2012).

Bei der ESI wird die flüssige Probe über eine Stahlkapillare, an welche Hochspannung angelegt ist, in die Ionenquelle eingebracht. Es kommt zur Vernebelung der Probe mit der Ausbildung von positiv oder negativ geladenen Tröpfchen (je nach Polung der Kapillare). Während der Beschleunigung der Tröpfchen zu einer gegensätzlich geladenen Elektrode kommt es durch Verdampfen zu einer kontinuierlichen Verkleinerung der Tröpfchen (bei gleichzeitiger Erhöhung der Oberflächenspannung). Dies hat eine Reihe sogenannter Coulomb-Explosionen zur Folge, welche die Größe der Tröpfchen weiter reduzieren (Ardrey, 2003; Abbildung 6). Der Mechanismus, wie schließlich aus diesen sehr kleinen geladenen Tröpfchen gasförmige Ionen gebildet werden, ist noch nicht hinlänglich geklärt und wird anhand unterschiedlicher Modelle diskutiert (zusammengefasst von Kebarle und Verkerk, 2009).

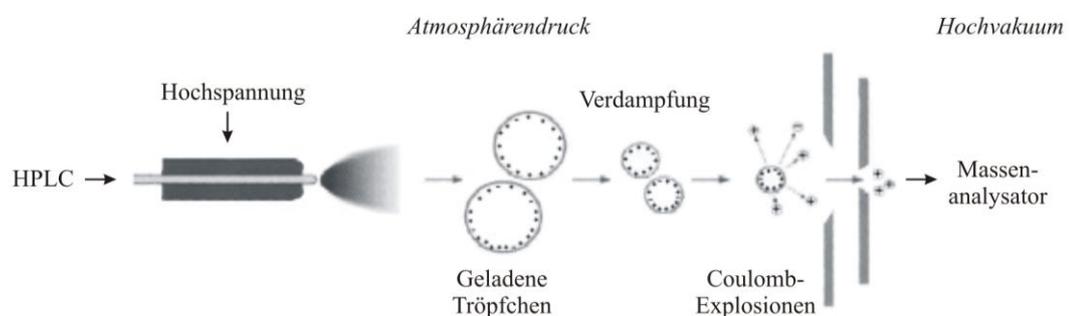


Abbildung 6: Prinzip der Elektrospray-Ionisation (modifiziert nach Applied Biosystems, 2002).

Neben protonierten ($[M+H]^+$, positiver ESI-Modus) und deprotonierten ($[M-H]^-$, negativer ESI-Modus) Molekülen werden Addukte gebildet, die durch Anlagerung der im Lösungsmittel vorhandenen Ionen (z.B. Na^+ , NH_4^+ oder Cl^- , CH_3COO^-) an die Analyte entstehen. In der Folge gelangen die Ionen zum Massenanalysator, wobei sie über das Interface von Atmosphärendruck in ein Hochvakuum überführt werden.

Im Massenanalysator erfolgt eine Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). Es existieren unterschiedliche Typen von Massenfiltern, wie beispielsweise Sektorfeld-, Quadrupol-, Ionenfallen- oder Time-of-flight (TOF)-Massenanalysatoren (Holčapek et al., 2012). In der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) werden zwei (oder mehrere) massenspektrometrische Analysen gekoppelt, zwischen welchen eine Fragmentierung der Ionen erfolgt. Die Massenfilter können hierfür entweder räumlich (z.B. Triple-Quadrupol, Quadrupol-Ionenfalle) oder zeitlich (z.B. Ionenfalle) hintereinander angeordnet sein bzw. eine Kombination beider Möglichkeiten darstellen. Die Anordnung mehrerer Massenfilter ermöglicht die Durchführung unterschiedlicher Scan-Modi, wodurch die Selektivität und Sensitivität der analytischen Methode weiter gesteigert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit kam ein Triple-Quadrupol mit linearer Ionenfalle (QqLIT) zur Anwendung. Dieses Gerät besteht aus 2 Quadrupol-Massenfiltern (Q1 und Q3), die durch eine Kollisionszelle (Q2) getrennt sind. Ein Quadrupol ist aus jeweils zwei Paaren von zylindrischen Elektroden aufgebaut, die entgegengesetztes elektronisches Potential besitzen. Elektrische Felder, die durch das Anlegen von Gleichspannung sowie phasenverschobener Wechselspannung entstehen, bewirken, dass nur Ionen mit einem gewissen m/z -Verhältnis den Quadrupol in wellenförmigen Bahnen passieren können (Abbildung 7).

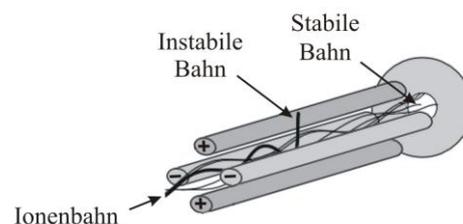


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Quadrupols (modifiziert nach Universität Münster, 2013).

Bei einem Triple-Quadrupol können Moleküle, die den Q1 passieren (Precursor-Ionen), im Q2 durch die Kollision mit einem Gas gespalten werden, wodurch charakteristische Produkt-Ionen entstehen. In der Folge können diese im Q3 neuerlich anhand ihres m/z -Verhältnisses selektiert werden (selected reaction monitoring mode, SRM; Abbildung 8). QqLiTs bilden alternativ die Möglichkeit, den Q3 als Ionenfalle zu nutzen, wodurch z.B. die Generierung kompletter Fragmentierungs-Spektren von Precursor-Ionen ermöglicht wird. Diese können wiederum für die Strukturaufklärung von Analyten (z.B. DON-GlcA-Isomere, Warth et al., 2012) genutzt werden. Eine Übersicht über alle Scan-Modi, die mit QqLiT ausgeführt werden können, bieten z.B. Hopfgartner et al. (2004).

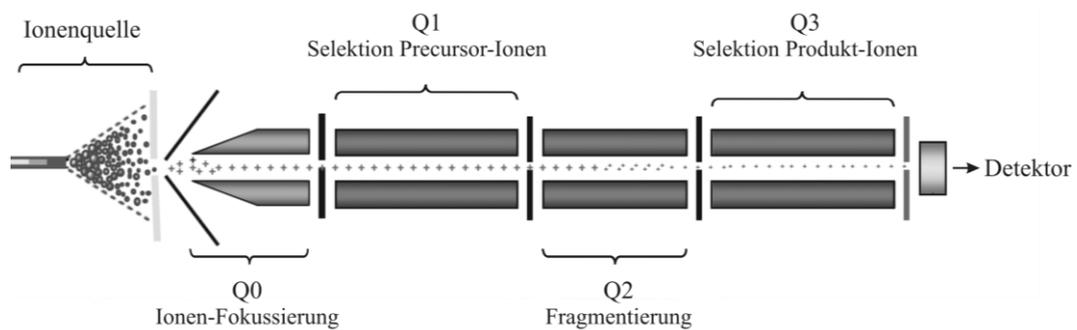


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupols und Funktion der einzelnen Quadrupole (Q) im selected reaction monitoring mode (modifiziert nach Spikett et al., 2011).

Schließlich werden die Ionen durch Detektoren wie Photomultiplier, Sekundärelektronenvervielfacher oder Faraday-Auffänger erfasst.

Umfangreichere Informationen zu LC-MS und Mykotoxin-Analytik können Übersichtsarbeiten (Krska und Molinelli, 2007; Schuhmacher et al., 2008; Gosetti et al., 2010; Holčapek et al., 2012; Shephard et al., 2012) oder themenspezifischen Lehrbüchern (z.B. Ardrey, 2003; Gross, 2004; Budzikiewicz und Schäfer, 2012) entnommen werden.

III. ERGEBNISSE

Nagl, V.; Schwartz, H.; Krska, R.; Moll, W.-D.; Knasmüller, S.; Ritzmann, M.; Adam, G.; Berthiller, F., 2012.

Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats.
Toxicol. Lett. 13, 367-373.

Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats

Veronika Nagl^a, Heidi Schwartz^a, Rudolf Krska^a, Wulf-Dieter Moll^b,
Siegfried Knasmüller^c, Mathias Ritzmann^d, Gerhard Adam^e, Franz Berthiller^{a,*}

^a Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism and Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Austria

^b Biomin Research Center, Technopark 1, 3430 Tulln, Austria

^c Institute of Cancer Research, Inner Medicine I, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8a, 1090 Vienna, Austria

^d Clinic for Swine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Sonnenstrasse 16, 85764 Oberschleißheim, Germany

^e Department of Applied Genetics and Cell Biology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Konrad Lorenz Str. 24, 3430 Tulln, Austria

* Corresponding author. Tel.: +43 2272 66280 413, fax: +43 2272 66280 403.
E-mail address: franz.berthiller@boku.ac.at

Abstract

Deoxynivalenol-3- β -D-glucoside (D3G), a plant metabolite of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON), might be hydrolyzed in the digestive tract of mammals, thus contributing to the total dietary DON exposure of individuals. Yet, D3G has not been considered in regulatory limits set for DON for foodstuffs due to the lack of *in vivo* data. The aim of our study was to evaluate whether D3G is reactivated *in vivo* by investigation of its metabolism in rats. Six Sprague-Dawley rats received water, DON (2.0 mg/kg b.w.) and the equimolar amount of D3G (3.1 mg/kg b.w.) by gavage on day 1, 8 and 15, respectively. Urine and feces were collected for 48 h and analyzed for D3G, DON, deoxynivalenol-glucuronide (DON-GlcA) and de-epoxy deoxynivalenol (DOM-1) by a validated LC-MS/MS based biomarker method. After administration of D3G, only $3.7 \pm 0.7\%$ of the given dose were found in urine in the form of analyzed analytes, compared to $14.9 \pm 5.0\%$ after administration of DON, and only $0.3 \pm 0.1\%$ were detected in the form of urinary D3G. The majority of administered D3G was recovered as DON and DOM-1 in feces. These results suggest that D3G is little bioavailable, hydrolyzed to DON during digestion, and partially converted to DOM-1 and DON-GlcA prior to excretion. Our data indicate that D3G is of considerably lower toxicological relevance than DON, at least in rats.

1. Introduction

The mycotoxin deoxynivalenol (DON), a secondary metabolite of several *Fusarium* species, is one of the most important mycotoxins in cereal crops worldwide, and the most frequently occurring type B trichothecene in Europe (SCOOP 2003). DON inhibits protein synthesis and modulates immune responses (reviewed by Pestka, 2010). In animals, toxicity symptoms include feed refusal, vomiting and growth depression (summarized by Pestka, 2007). Furthermore, DON causes inhibition of germination and growth retardation in plants (reviewed by Rocha et al., 2005). However, plants can metabolize DON to a variable extent through enzymatic conjugation to glucose (Berthiller et al., 2009b; Lemmens et al., 2005; Poppenberger et al., 2003). The resulting “masked” mycotoxin deoxynivalenol-3- β -D-glucoside (D3G) affects protein biosynthesis to a far lower extent than DON *in vitro* and is therefore regarded as a detoxification product of DON in plants (Poppenberger et al., 2003).

D3G was first detected in naturally contaminated wheat and maize in 2005 (Berthiller et al., 2005). Since then, the worldwide occurrence of D3G in different cereal crops has been reported (Berthiller et al., 2009a; De Boevre et al., 2012; Desmarchelier and Seefelder, 2011; Li et al., 2012; Sasanya et al., 2008). The molar percentages of D3G/DON varied strongly in these studies, but reached maximum levels of 46% (Berthiller et al., 2009a). This percentage may increase in the future as a consequence of plant breeding efforts to enhance *Fusarium* head blight resistance by introgression of resistance loci (Lemmens et al., 2005). Considerable amounts of D3G were found in foodstuffs such as breakfast cereals, snacks and beers (Kostelanska et al., 2009; Malachova et al., 2011). Despite its frequent occurrence, the toxicological relevance of D3G in humans and animals has not yet been evaluated. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) stressed the possibility that D3G is hydrolyzed in the digestive tract of mammals (JECFA, 2011). Although this assumption is not yet supported by *in vivo* data, a recent study showed that certain intestinal bacteria are capable of cleaving D3G to DON *in vitro* (Berthiller et al., 2011).

Numerous studies have examined the toxicokinetics of DON *in vivo*, revealing two major metabolic pathways: de-epoxidation by anaerobic bacteria and conjugation to glucuronic acid. De-epoxy deoxynivalenol (DOM-1), which is at least 50-fold less toxic than DON (Sundstøl Eriksen et al., 2004), is formed by anaerobic ruminal or intestinal microbes (summarized by Zhou et al., 2008). DOM-1 can be excreted via the faeces or it can be absorbed and detected in different biological samples of animals, like urine, plasma (reviewed by Rotter et al., 1996), and milk (Seeling et al., 2006). The ability to detoxify DON to DOM-1 in the upper gastrointestinal tract is considered a major cause for the differences regarding the susceptibility to DON among species (Pestka, 2007; Rotter et al., 1996).

The main metabolic pathway of mammals to detoxify resorbed DON is glucuronidation, a phase II reaction which reflects one of the most important mechanisms to inactivate xenobiotics by enhancing their polarity and excretability. Studies in different animal species showed that deoxynivalenol-glucuronide (DON-GlcA) is the major DON metabolite in plasma and urine (summarized by Wu et al., 2007). In humans, the measurement of urinary DON and DON-GlcA levels has been used successfully as a biomarker to assess DON exposure (Turner et al., 2011; Warth et al., 2012a). In addition, the formation of DOM-1-glucuronide (DOM-1-GlcA) in urine of rats has recently been reported (Lattanzio et al., 2011).

The presence of characteristic metabolites in urine and in feces allows conclusions regarding the absorption and metabolism of mycotoxins (Galtier et al., 1998). Studies determining the total recovery of orally administered DON in excreta of rats have been performed as early as in the 1980ies (Lake et al., 1987; Worrell et al., 1989; Yoshizawa et al., 1983). Depending on whether DON was applied in its pure form or as a radiolabeled compound, observed recoveries ranged from around 15 to 89 % of the applied toxin dose, respectively.

D3G has so far not been considered in the regulatory limits for cereal-based food established by the European Commission for DON (European Commission, 2006). Yet, JECFA stated that D3G might be an important contributor to dietary DON exposure and emphasized the need of *in vivo* data concerning the

absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) in order to evaluate the potential health risk of D3G (JECFA, 2011).

The aim of the present study was to determine the fate of orally administered D3G in rats and to compare it with the pattern of DON metabolism. To this end, urine and feces of D3G and DON treated rats were analyzed for D3G, DON, DON-GlcA and DOM-1 by a validated LC-MS/MS based biomarker method. This study provides the first insight into the metabolism and excretion of D3G *in vivo*, thus contributing to the risk assessment of this masked mycotoxin.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and standard solutions

Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) (both LC grade) and glacial acetic acid (p.a.) were purchased from VWR International GmbH (Vienna, Austria). Water was purified with a with a Purelab Ultra system (ELGA LabWater, Celle, Germany). DON and DOM-1 standards were obtained from Romer Labs GmbH (Tulln, Austria). D3G was previously purified from DON treated wheat plants (Berthiller et al., 2005) and DON-3-GlcA was chemically synthesized according to the method developed by Fruhmann et al. (2012). For use as analytical standards, solid compounds (DON, D3G, DON-3-GlcA) were dissolved in ACN. A mixed stock solution, containing 100 µg/mL DON, D3G, DOM-1 and DON-GlcA, was prepared in ACN and stored at -20 °C. Further dilutions for spiking experiments and liquid standards were prepared in MeOH/water (20/80, v/v; feces samples) and ACN/water (10/90, v/v; urine samples).

2.2. Animals and study design

Male Sprague-Dawley rats were obtained from the breeding facility of the Medical University of Vienna (Himberg, Austria) and allowed to acclimatize for one week. The rats (5 months old, 250-280 g b.w.) were housed individually in polycarbonate cages (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Germany) under controlled conditions (24 ± 1°C, humidity 50 ± 5%, 12 h light/dark cycle). Pelleted feed (R/M-H, Ssniff, Soest, Germany) and water were provided *ad libitum*. The rodent diet was analyzed for its concentrations of DON and D3G before the start of the experiment.

Using a repeated measures design, the rats (n=6) received water, DON (2.0 mg/kg b.w.) and the equimolar amount (6.8 µmol/kg b.w.) of D3G (3.1 mg/kg b.w.) by gavage on day 1, 8 and 15 of the experiment, respectively. Stock solutions of 400 µg/mL DON and 619 µg/mL D3G were prepared by dissolving the solid standards in water. Thereof, volumes of 1.4-1.8 mL were administered to the rats according to their weight. Feed was withdrawn 12 h before the treatment. After

administration, the animals were housed individually in polycarbonate metabolic cages (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Germany) for 48 h. Urine and feces were collected for the periods 0-24 h and 24-48 h after dosing and volumetrically measured or weighted, respectively. The samples were frozen at -20°C at the end of the 48 h period.

The study design was approved by both, the Ethics Committee of the Medical University of Vienna and the Austrian Ministry for Science and Research.

2.3. Sample preparation

Urine samples were centrifuged (10 min, 14000 x g), acidified with 1% of acetic acid and cleaned up by solid phase extraction (SPE) on Strata C18-T cartridges (200 mg, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). After conditioning of the cartridges with 5 mL of MeOH and 5 mL of MeOH/water/acetic acid (5/94/1, v/v/v), 500 µL of urine samples containing 1% of acetic acid were applied. Subsequently, the cartridges were washed with 1 mL of MeOH/water/acetic acid (5/94/1, v/v/v). The analytes were eluted with 2 mL of MeOH/water/acetic acid (70/29/1, v/v/v) and the eluates were evaporated to dryness under compressed air. The residues were reconstituted in 5 mL of ACN/water (20/80, v/v) for LC-MS/MS analysis.

Feces samples were freeze-dried, homogenized and 250 mg aliquots were extracted three times (40/40/20 min) with MeOH/water (50/50, v/v, 3/2/2 mL) on a GFL rotary shaker (Burgwedel, Germany). 500 µl aliquots of the pooled raw extracts were combined with 500 µl cold MeOH. Subsequently, the solutions were vortexed for 15 s and centrifuged at 9000 x g for 10 min. Finally, 300 µL of the supernatants were evaporated to dryness under compressed air and re-dissolved in 300 µL of MeOH/water (20/80, v/v). The samples were vortexed for 30 s and clarified by centrifugation (10 min, 14000 x g) for LC-MS/MS analysis.

Clean-up procedures for feces and urine as described above resulted in sample dilutions by a factor of 56 and 10, respectively.

2.4. HPLC-MS/MS Parameters

Analysis was performed on an 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTrap 4000 LC-MS/MS System (AB Sciex, Foster City, CA) equipped with a Turbo V electrospray ionization (ESI) source. Chromatographic separation was achieved on an Atlantis[®] T3 column (3.0 x 150 mm, 3 μ m, Waters, Vienna, Austria) equipped with a 4 x 3 mm C₁₈ security guard cartridge (Phenomenex, Torrance, California, USA). Eluent A was composed of water/acetic acid (99.9/0.1, v/v) and eluent B of ACN/acetic acid (99.9/0.1, v/v). After an initial period of 2 min at 5% B, the proportion of B was increased linearly to 25% (at 3 min), 90% (at 14.8 min) and 96% (at 15 min). After a hold-time of 2 min at 96% B, the column was re-equilibrated for 2 min at 5% B. The temperature of the column oven was 35 °C, while the flow rate was set to 600 μ L/min. The injection volume was 5 μ L.

Mass spectrometric analysis was performed in the selected reaction monitoring mode (SRM) after negative electrospray ionization. The following settings were used: source temperature 550 °C, curtain gas 20 psi, nebulizer gas (GS1) 50 psi, auxiliary gas (GS2) 50 psi, ion spray voltage -4,000 V, collision gas high, SRM dwell time 50 ms. Mass transitions used for the analysis as well as optimized analyte-dependent parameters are given in Table 1.

Table 1. Mass transitions and optimized SRM parameters of the target analytes. Values are given in the order quantifier ion, qualifier ion.

Analyte	t _R ^a (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP ^b (V)	CE ^c (V)
DON	6.29	355.3 [M+Ac] ⁻	59.1	-40	-30
		355.3 [M+Ac] ⁻	265.2	-40	-12
D3G	6.13	517.3 [M+Ac] ⁻	427.3	-60	-28
		517.3 [M+Ac] ⁻	457.3	-60	-18
DON-GlcA	6.18	471.3 [M-H] ⁻	112.9	-95	-44
		471.3 [M-H] ⁻	265.2	-60	-18
DOM-1	6.68	339.3 [M+Ac] ⁻	59.1	-45	-40
		339.3 [M+Ac] ⁻	249.1	-40	-18

^a Retention time

^b Declustering potential

^c Collision energy

2.5. Method validation

Validation of the method included determination of the apparent recovery (R_A), the signal suppression/enhancement (SSE), the recovery of the extraction step (R_E), the repeatability (RSD) as well as the limits of detection and quantification (LODs and LOQs). Feces and urine samples of the control group were spiked in triplicate with appropriate amounts of standard mixtures prior to and after extraction. Method validation for feces was performed for DON, DOM-1 and D3G at 8 different spiking levels, corresponding to a working range of 1-300 ng/mL in the measurement solutions. For urine, method performance characteristics were determined for DON, DOM-1, D3G and DON-GlcA in an working range of 1-500 ng/mL in the measurement solutions (9 spiking levels).

2.6. Data evaluation

All samples were analyzed using Analyst software version 1.5.2 (AB Sciex, Foster City, CA). By plotting the peak area versus the analyte concentration in MS Excel (2007), linear regressions curves were obtained for each analyte and sample type. Thereof, the performance characteristics R_A and SSE were calculated according to Sulyok et al. (2006). The R_E was calculated by dividing the obtained mean values for the R_A by the determined mean values for the SSE. The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation, was calculated from the triplicate analysis of the different spiking levels. The LODs and LOQs were calculated from the spiking levels closest to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3:1 and 10:1, respectively, and assessed for both, liquid standards and spiked samples. Urine and feces samples from treated rats were extracted and analyzed in duplicate. Sample concentrations were determined on the basis of peak areas using external calibration (Analyst). If samples showed signal-to-noise ratios lower than 3:1 and 10:1, respectively, half of the LOD and half of the LOQ values were used for further calculations. Obtained mean values were corrected for the R_A . The total amounts of excreted DON, D3G and their metabolites were calculated considering the volumes of the urine and the weights of the feces samples, respectively, which were collected from the individual rats per day.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation and method validation

An LC-MS/MS based method was developed for the direct quantification of DON, DON-GlcA, DOM-1 and D3G in urine and feces of rats. Results of the method validation are listed in Table 2.

Table 2. Method performance characteristics for the matrices urine (n=27) and feces (n=24)

Matrix	Analyte	$R_A^a \pm \text{RSD}$ (%)	$\text{SSE}^b \pm \text{RSD}$ (%)	$R_E^c \pm \text{RSD}$ (%)	LOD^d (ng/mL)	LOQ^e (ng/mL)
Urine	DON	34 ± 1	39 ± 5	88 ± 5	2.7	6.9
	D3G	45 ± 3	56 ± 10	81 ± 13	0.6	2.1
	DON-GlcA	89 ± 4	97 ± 3	92 ± 6	3.0	13.7
	DOM-1	24 ± 3	27 ± 9	89 ± 11	5.1	17.0
Feces	DON	77 ± 6	77 ± 2	100 ± 6	1.6	3.6
	D3G	56 ± 15	66 ± 5	86 ± 18	1.7	8.6
	DOM-1	69 ± 2	63 ± 2	108 ± 2	2.7	8.5

^a Apparent recovery

^b Signal suppression/enhancement

^c Extraction recovery

^{d,e} Limits of detection and quantification in spiked measurement solutions

Urine was cleaned-up by solid phase extraction (SPE) and diluted before injection. Initially we tried a dilute-and-shoot approach, as successfully performed by Warth et al. (2011). However, this procedure did not sufficiently reduce matrix interferences in our samples. Therefore, SPE was employed for sample clean-up. Acidification of the solutions used in SPE increased the extraction recoveries. Still, signal suppression could not be eliminated for all analytes determined in urine, especially for DOM-1 (27%) and DON (39%). Consequently, apparent recoveries ranged from 24% (DOM-1) to 89% (DON-GlcA) (see Table 2). In future methods, the use of [¹³C]-labeled internal standards could compensate for this limitation of the method. Still the repeatability of the method was excellent, with RSDs for all analytes ≤ 4%.

Feces samples were freeze-dried, extracted diluted and injected. During method development it became obvious that one-step extraction of feces samples resulted

in low and non-repeatable extraction recoveries. By performing three subsequent extractions, the recovery of the extraction step was increased to $\geq 86\%$ for all analytes. Besides protein precipitation with pure MeOH, dilution of the samples was needed in order to further decrease matrix effects. Finally, apparent recoveries ranging from 56% (D3G) to 77% (DON) were achieved.

Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) corresponded to S/N ratios of 3/1 and 10/1, respectively. In standard solutions, LODs ranged from 0.1 to 1.8 ng/mL, while LOQs were between 0.4 and 5.9 ng/mL. LODs and LOQs obtained in urine and feces were, however higher due to the dilution of the samples by a factor of 10 and 56, respectively. In urine, LODs for DON, D3G, DON-GlcA and DOM-1 were 27, 5.7, 30 and 51 ng/mL, respectively. Corresponding LOQs of 69, 21, 137 and 170 ng/mL were determined. In freeze-dried feces, LODs and LOQs for DON, D3G and DOM-1 were 90, 95 and 151 ng/g and 202, 482 and 476 ng/g, respectively. The obtained LODs and LOQs were sufficiently low for the measurements of the target analytes relevant in our study.

Altogether, an extensive validation of the employed method was performed, which ensured accurate quantification of the mycotoxins biomarkers in urine and feces samples.

3.2. DON, D3G and their metabolites in urine of treated rats

Concentrations of DON, D3G, DON-GlcA and DOM-1 in the analyzed urine samples were in the range of 97-2200 ng/mL, 143-239 ng/mL, 265-8750 ng/mL and 285-388 ng/mL, respectively. Daily volumes of urine varied between 11 and 33 mL per rat. Table 3 presents the total amounts of DON, D3G and their metabolites excreted in urine in the time periods 0-24 h and 24-28 h after oral application of water, DON and D3G, respectively. For better comparability of the results, data are expressed as molar amounts.

Table 3. Total amounts of recovered DON, D3G, DON-GlcA and DOM-1 in urine. Mean values \pm SD (n=6) are given for the indicated time periods after oral administration of water, 2.0 mg/kg b.w. DON and 3.1 mg/kg b.w. D3G, respectively (6.8 μ mol toxin/kg b.w.).

Treatment	Time period (h)	DON \pm SD (nmol)	D3G \pm SD (nmol)	DON-GlcA (nmol)	DOM \pm SD (nmol)
Water	0-24	1.3 \pm 0.7	n.d.	1.2 \pm 0.8	n.d.
	24-48	1.9 \pm 1.6	n.d.	1.1 \pm 0.7	n.d.
DON	0-24	79 \pm 28	n.d.	180 \pm 72	14 \pm 6.0
	24-48	10 \pm 2.0	n.d.	16 \pm 5.9	4.3 \pm 1.6
D3G	0-24	26 \pm 4.9	6.9 \pm 2.2	24 \pm 5.0	15 \pm 7.3
	24-48	2.4 \pm 1.7	0.2 \pm 0.1	1.9 \pm 1.1	4.7 \pm 1.7

n.d., not detected (analyte concentration in all samples <LOD)

Following oral application of water, we detected small amounts of DON and DON-GlcA in urine of rats. Several rodent diets were analyzed for DON and D3G already before the start of the experiment. One commercial rodent diet showed reasonably low DON and D3G concentrations (160 μ g/kg DON, < 30 μ g/kg D3G) and therefore was considered suitable for our study. Since concentrations of DON and DON-GlcA were smaller than the respective limit of quantification in the majority of the measured samples, dietary DON intake was not of major relevance for the outcome to the experiment.

In the urine samples of DON exposed rats, DON, DON-GlcA and DOM-1 were determined. Based on the molar amounts excreted on both days, 88.2 \pm 6.8% of the total urinary metabolites were eliminated within 24 h after administration. This is in accordance with previous kinetic studies in rats, where urinary DON excretion decreased after 24 h (Lake et al., 1987; Meko et al., 2003). High variations in the amounts of daily excreted analytes were observed. This effect is probably due to the low absorption of DON in one of the six rats. In detail, urinary DON excretion of rat number 2 was 26.8 nmol within 24 h after dosing, whereas values between 76.5 and 111 nmol were found with the other rats. Thus, besides parameters like species specificity, the route of administration (both reviewed by Rotter et al., 1996) and the dose (Goyarts and Dänicke, 2006) also variations between individuals and the status of their digestion can influence DON metabolism.

DOM-1 has been identified as a DON metabolite in rat urine already in 1983 (Yoshizawa et al., 1983). Since then, data concerning the presence and the amount of urinary DOM-1 excretion in rats have been inconsistent (Lattanzio et al., 2011; Meko et al., 2003). In the current experiment, we found elevated DOM-1 concentrations in urine from 5 out of 6 animals. However, considerably lower amounts of DOM-1 were detected in comparison to DON and DON-GlcA. Thus, elimination of DON in form of DOM-1 in urine seems to be of minor relevance, at least in our experiment.

The main urinary metabolite was found to be DON-GlcA, representing $63.4 \pm 6.4\%$ of the total analytes excreted in urine. Meko et al. (2003) implicated DON-GlcA as the major urinary metabolite on the basis of indirect quantification after hydrolysis of urine samples. In the study by Lattanzio et al. (2011), the presence of two DON-GlcA isomers in rat urine (without further details concerning their molecular structures) was postulated. Also Warth et al. (2012a) recently showed the occurrence of two DON-GlcA isomers in human urine after DON exposure, identifying both DON-3-GlcA and DON-15-GlcA. In contrast, *in vitro* synthesis of DON-GlcA by rat liver microsomes seemingly resulted only in formation of DON-3-GlcA (Wu et al., 2007). In our experiment, identical retention times and quantifier/qualifier-ratios were observed for DON-3-GlcA in standard solutions and for DON-GlcA in urine samples. Additionally, a minor second DON-GlcA peak at later retention time than DON-3-GlcA was found in the urine of rat number 2 and at even lower concentrations also in the urine of all other rats. Furthermore, urine samples were analyzed by the LC-MS/MS method developed by Warth et al. (2012a) which allows the separation and the quantification of DON-3-GlcA and DON-15-GlcA. The analysis confirmed the presence of DON-3-GlcA in rat urine, while DON-15-GlcA was not detected in any sample. The minor peak was investigated by MS/MS experiments and enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase (according to Warth et al., 2012a) and assumed to be another DON-GlcA isomer. Based on these findings, we conclude that DON is mainly metabolized to DON-3-GlcA in the used rat strain. Conjugation to a – yet unidentified – other DON-GlcA (which was not quantified in our experiments) occurred only to minor extent.

Recently, the occurrence of another DON-metabolite in rat urine, DOM-1-glucuronide (DOM-1-GlcA), was reported (Lattanzio et al., 2011). After enzymatic hydrolysis of urine samples, we observed an increase in the DOM-1 concentration of 2.0-3.2-fold, indicating the presence of DOM-1-GlcA. Yet, direct quantification of DOM-1-GlcA was not possible due to the lack of a suitable standard.

Following oral application of D3G, we detected D3G as well as DON, DON-GlcA and DOM-1 in rat urine. In principle, after oral administration an effective gastrointestinal absorption leads to high urinary excretion of a toxin or its metabolites, whereas fecal elimination indicates lack of absorption (Galtier et al., 1998). D3G was determined in all urine samples collected 0-24 h after administration, proving that this masked mycotoxin is bioavailable in rats. Yet, amounts of urinary excreted D3G/day did not exceed 9.9 nmol. Furthermore, only traces of D3G were found after 24 h. Thus, the absorption of D3G seems to be very limited. Currently, only one previous study evaluated the fate of mycotoxin glucosides *in vivo*. In a feeding experiment with a zearalenone-14- β -D-glucoside (Z14G), Gareis et al. (1990) did not detect Z14G in urine of swine. Seemingly, bioavailability of Z14G and D3G differs, as was to be expected.

In recent years concerns have been raised that cleavage of D3G could increase total DON intake of individuals. In the urine of the exposed rats, D3G was mainly eliminated in form of DON and DON-GlcA ($67.7 \pm 7.0\%$). Therefore, our findings demonstrate that DON is liberated from D3G *in vivo*, absorbed and subsequently metabolized to DON-GlcA. Yet, considerably lower amounts of DON and DON-GlcA were determined in the urine of D3G treated rats in comparison to DON treatment. Thus, DON exposure due to the ingestion of D3G seems to be marginal, at least in rats.

3.3. DON, D3G and their metabolites in feces of treated rats

Concentrations of DON and DOM-1 in the analyzed feces samples were between 217-17700 ng/mL and 819-7740 ng/mL, respectively. The daily amounts of freeze-dried feces/animal ranged from 3 to 9 g per animal. The total amounts of excreted DON, DOM-1 and D3G in feces are given in Table 4.

Table 4. Total amounts of recovered DON, D3G, DON-GlcA and DOM-1 in feces. Mean values \pm SD (n=6) are given for the indicated time periods after oral administration of water, 2.0 mg/kg b.w. DON and 3.1 mg/kg b.w. D3G, respectively (6.8 μ mol toxin/kg b.w.).

Treatment	Time period (h)	DON \pm SD (nmol)	D3G \pm SD (nmol)	DON-GlcA (nmol)	DOM \pm SD (nmol)
Water	0-24	1.9 \pm 0.9	n.d.	n.d.	n.d.
	24-48	1.8 \pm 0.4	n.d.	n.d.	n.d.
DON	0-24	77 \pm 57	n.d.	n.d.	120 \pm 29
	24-48	5.6 \pm 2.3	n.d.	n.d.	53 \pm 15
D3G	0-24	200 \pm 130	1.9 \pm 1.5	n.d.	120 \pm 33
	24-48	5.5 \pm 3.9	n.d.	n.d.	46 \pm 25

n.d., not detected (analyte concentration in all samples <LOD)

Independent of the treatment, DON-GlcA was not detected in any of the samples, as expected. Even if one presumes a significant enterohepatic recycling (biliary excretion of DON-GlcA to intestines) complete hydrolysis of the conjugate DON-GlcA by bacterial glucuronidase would occur before fecal excretion and before freezing of the fecal samples.

Similar to the results obtained from the analysis of urine, traces of DON were observed in rat feces after administration of water due to the dietary DON intake. DOM-1 was not detected in the feces samples of this group, which could be explained by the higher method's LODs and LOQs compared to DON and by only partial conversion.

Following DON application, DON and DOM-1 were found in rat feces. The de-epoxidation of DON by rat gut microbes was demonstrated by Worrell et al. (1989). Furthermore, DOM-1 was determined as the major DON-metabolite in feces (Lake et al., 1987; Worrell et al., 1989; Yoshizawa et al., 1983). In accordance, we observed DOM-1 amounts in feces exceeding those of DON in 5 out of 6 animals. Considerable amounts of DOM-1 (up to 78.1 nmol) were excreted even 24-48 after dosing.

In the feces of rats dosed with D3G, the vast majority of the metabolites (99.5 \pm 0.4%) was excreted in form of DON and DOM-1. Only traces of D3G were detected in three out of six samples 0-24 h after treatment. These findings prove that the non absorbed proportion of D3G is almost completely cleaved to DON

and subsequently metabolized to DOM-1 in the gut. Our results are in line with *in vitro* data from Berthiller et al. (2011), who showed that several intestinal bacteria have the capability to hydrolyze D3G to DON. Similarly, Gareis et al. (1990) demonstrated that Z14G is completely cleaved during digestion, indicating that mycotoxin glucosides in general can be deconjugated in the digestive tract of mammals.

We previously postulated that D3G is hydrolyzed to DON in distal parts of the intestine, since the toxin was found to be resistant to acidic conditions and several digestive enzymes (Berthiller et al., 2011). In total, we observed higher amounts of DON in rat feces after D3G treatment compared to DON treatment. As DON is mainly absorbed in the small intestine (Dänicke et al., 2004), our data lead to the assumption that D3G is hydrolyzed distal therefrom. However, detected amounts of DON in feces varied over a wide range (82-427 nmol), which impedes firm conclusions. Thus, further experiments with more specific study designs are necessary to verify this hypothesis.

3.4. Total amounts recovered

It should be emphasized here that the toxins were applied to the animals by gavage to ensure complete administration. These conditions are artificial, compared to the regular uptake of the compounds with feed. Further studies (e.g. with other animal species) shall take this into account, preferably delivering the compounds mixed into the diet.

After DON application, the overall amount of the recovered analytes was 554 ± 64 nmol, representing $27.6 \pm 3.6\%$ of the administered dose. In urine, $14.9 \pm 5.0\%$ of the applied dose were recovered, whereas detected analytes in feces accounted for $12.7 \pm 3.4\%$ (Fig. 1). The major metabolite was DON-GlcA (9.5%).

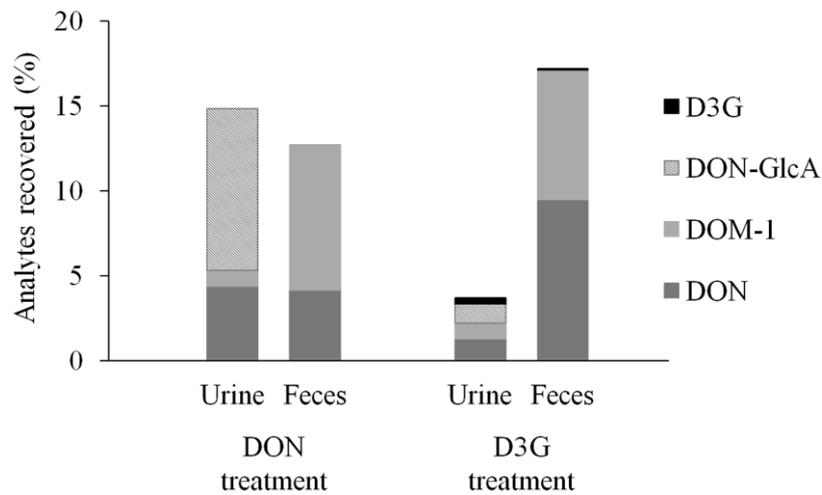


Figure 1: Excretion of DON, D3G and their metabolites in urine and feces of rats (n=6) treated with DON or D3G. Values are expressed as equivalent percentages of the administered dose.

Yoshizawa et al. (1983) recovered around 15% of the applied toxin dose after oral administration of 6 mg/kg DON. These data correlate well with our own findings, especially if taken into account, that analysis of DON-GlcA was not implemented in that study. In contrast, significantly higher recoveries of around 89% were observed after administration of 10 mg/kg [¹⁴C]-DON in rats (Lake et al., 1987; Worrell et al., 1989). Lake et al (1987) found 25% and 64% of the administered dose in urine and feces, respectively, while Meky et al. (2003) recovered 37% of the applied dose in urine. Hence, although we also obtained a lower recovery in urine, the differences regarding the detected amounts of analytes in feces are more striking. Several reasons may account for this phenomenon.

First, DON elimination via feces is not completed within 48 h after toxin application, as indicated by our own data and demonstrated by Lake et al. (1987). Therefore, the lower amounts recovered in feces can be explained to a certain degree by the short sampling period. Furthermore, the experimental setup, leading to freezing of feces samples with a delay of up to 48 h, might have an influence. Although the analytes included in our analysis are known to be stable under different cooling conditions (Warth et al., 2012b), microbial degradation of the analytes before freezing, resulting in the formation of unknown metabolites, cannot be excluded.

Above all, excretion was determined on the basis of radioactivity in the studies using [¹⁴C]-labeled DON. As a consequence, the obtained total recoveries could also include yet unidentified DON metabolites. The formation of such unknown

metabolites, most possibly in the distal end of the intestine, has been suggested before (Sundstøl Eriksen et al., 2003) and would explain the lower recoveries of our experiment. Therefore, an important task in the future will be the evaluation of such metabolites and their subsequent characterization on a high resolution mass spectrometer.

Nevertheless, by using a repeated measures study design we clearly focused on the metabolism of D3G in comparison to that of DON. The total recovery of administered D3G was $20.9 \pm 6.6\%$, with feces being the main excretory route ($17.2 \pm 6.6\%$; Fig. 1). Only $3.7 \pm 0.7\%$ of the applied dose were recovered in urine, with D3G representing $0.3 \pm 0.1\%$. Thus, our data show that D3G and its metabolites are considerably less absorbed than DON in rats and therefore most likely less bioavailable. A lower absorption of glycosylated plant metabolites in comparison to their parent aglycones has been described in the literature before, for instance for isoflavones (reviewed by Mortensen et al., 2009). DON and DON-GlcA found in the urine accounted for $1.3 \pm 0.3\%$ and $1.2 \pm 0.3\%$ of the administered dose, respectively ($2.5 \pm 0.1\%$ in total). The other urinary metabolites D3G and DOM-1 are assumed to possess a reduced protein synthesis inhibition or a lower cytotoxicity compared to DON (Poppenberger et al., 2003; Sundstøl Eriksen et al., 2004). In the DON treatment group, urinary DON and DON-GlcA represented $4.4 \pm 1.4\%$ and $9.5 \pm 3.6\%$, which sum up to $13.9 \pm 4.7\%$ of the administered dose. Therefore, D3G seems to be of reduced toxicological relevance compared to DON, at least in rats.

In conclusion, this study demonstrates that D3G is partly bioavailable in rats. However, the majority of administered D3G was cleaved during digestion and subsequently excreted in feces. Thus, D3G present in food and feed seems to have a significantly lower toxic equivalency compared to DON. Due to the differences regarding the anatomy and gut microbiota, the bioavailability and metabolization may be species dependent and should be experimentally determined in the future. In such follow-up studies, also the bioavailability of D3G should be monitored, by application of the substance both orally and into the bloodstream by injection, followed by the determination of its concentration. Currently, the limited availability of pure D3G precludes testing of larger animals such as swine.

Conflict of interest statement

The authors declare to have no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors thank the Federal Ministry of Economy, Family and Youth, the National Foundation for Research, Technology and Development, BIOMIN Holding GmbH and Nestec Ltd for funding the Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism. The financial support by the Austrian Science Fund (FWF projects F3706 and F3708) is greatly acknowledged. Furthermore, we express our gratitude to Alfred Dutter for the care of the animals and the administration of the toxins to the animals by gavage. We also thank Benedikt Warth for the additional MS/MS measurements of urine samples. Finally, we thank Oliver Greitbauer and Veronika Slavik for their help during sample preparation.

References

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R., 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3421-3425.

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G., Schuhmacher, R., 2009a. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit. Contam.* 26, 507-511.

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Krska, R., 2009b. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1243-1252.

Berthiller, F., Krska, R., Domig, K.J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., Adam, G., 2011. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicol. Lett.* 206, 264-267.

Dänicke, S., Valenta, H., Döll, S., 2004. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 169-180.

De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Maene, P., Audenaert, K., Deforce, D., Haesaert, G., Eeckhout, M., Callebaut, A., Berthiller, F., Van Peteghem, C., De Saeger, S., 2012. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. *Food Addit. Contam.* 29, 819-835.

Desmarchelier, A., Seefelder, W., 2011. Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *World Mycotox. J.* 4, 29-35.

European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20120401:EN:PDF> (retrieved 6th June 2012).

Fruhmann, P., Warth, B., Hametner, C., Berthiller, F., Horkel, E., Adam, G., Sulyok, M., Krska, R., Fröhlich, J., 2012. Synthesis of deoxynivalenol-3- β -D-O-glucuronide for its use as biomarker for dietary deoxynivalenol exposure. *World Mycotox. J.* 5, 127-132.

Galtier, P., 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Med. Vet.* 149, 549-554.

Gareis, M., Bauer, J., Thiem, J., Plank, G., Grabley, S., Gedek, B., 1990. Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *J. Vet. Med. B.* 37, 236-240.

Goyarts, T., Dänicke, S., 2006. Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol. Lett.* 163, 171-182.

JECFA, 2011. Evaluation of certain contaminants in food: Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 959. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_959_eng.pdf (retrieved 6th June 2012).

Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P.M., Berthiller, F., Krska, R., 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3- glucoside, in beer and some brewing intermediates. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3187-3194.

Lake, B.G., Phillips, J.C., Walters, D.G., Bayley, D.L., Cook, M.W., Thomas, L.V., Gilbert, J., Startin, J.R., Baldwin, N.C.P., Bycroft, B.W., Dewick, P.M., 1987. Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 25, 589-592.

Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Chulze, S.N., Torres, A.M., Visconti, A., 2011. LC-MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. *J. Chromatogr. B* 879, 707-715.

Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, Á., Krska, R., 2005. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1318-1324.

Li, F.Q., Yu, C.C., Shao, B., Wang, W., Yu, H.X., 2011. Natural occurrence of masked deoxynivalenol and multi-mycotoxins in cereals from China harvested in 2007 and 2008. *Chin. J. Prev. Med.* 45, 57-63.

Malachova, A., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Vaclavikova, M., Zachariasova, M., Hajslova, J., 2011. Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins: The major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12990-12997.

Meky, F.A., Turner, P.C., Ashcroft, A.E., Miller, J.D., Qiao, Y.-L., Roth, M.J., Wild, C.P., 2003. Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 41, 265-273.

Mortensen, A., Kulling, S.E., Schwartz, H., Rowland, I., Ruefer, C.E., Rimbach, G., Cassidy, A., Magee, P., Millar, J., Hall, W.L., Birkved, F.K., Sorensen, I.K., Sontag, G., 2009. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 266-309.

Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 283-298.

Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84, 663-679.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., Adam, G., 2003. Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278, 47905-47914.

Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M., 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam.* 22, 369-378.

Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 1-34.

Sasanya, J.J., Hall, C., Wolf-Hall, C., 2008. Analysis of deoxynivalenol, masked deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* pigment in wheat samples, using liquid chromatography-UV-mass spectrometry. *J. Food Prot.* 71, 1205-1213.

Scientific Cooperation on Questions Relating to Food (SCOOP), 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. SCOOP Task 3.2.10 Final Report. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf> (retrieved 6th June 2012).

Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., Flachowsky, G., 2006. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit. Contam.* 23, 1008-1020.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2649-2659.

Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Lindberg, J.E., 2003. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl don in pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 335-345.

Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Lundh, T., 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.* 42, 619-624.

Turner, P.C., Ji, B.T., Shu, X.O., Zheng, W., Chow, W.H., Gao, Y.T., Hardie, L.J., 2011. A biomarker survey of urinary deoxynivalenol in China: The Shanghai women's health study. *Food Addit. Contam.* 28, 1220-1223.

Warth, B., Sulyok, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Fruhmann, P., Hametner, C., Adam, G., Fröhlich, J., Krska, R., 2011. Direct quantification of deoxynivalenol glucuronide in human urine as biomarker of exposure to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 195-200.

Warth, B., Sulyok, M., Fruhmann, P., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Hametner, C., Adam, G., Fröhlich, J., Krska, R., 2012a. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method. *Toxicol. Lett.* 211, 85-90.

Warth, B., Sulyok, M., Fruhmann, P., Mikula, H., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Hametner, C., Angie Abia, W., Adam, G., Fröhlich, J., Krska, R., 2012b. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1-8.

Worrell, N.R., Mallett, A.K., Cook, W.M., Baldwin, N.C.P., Shepherd, M.J., 1989. The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats. *Xenobiotica* 19, 25-32.

Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., Hendrich, S., 2007. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1846-1855.

Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohi, T., 1983. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2133-2135.

Zhou, T., He, J., Gong, J., 2008. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotox. J.* 1, 23-30.

IV. DISKUSSION

1. Bestimmung von DON und dessen Metaboliten mittels LC-MS/MS

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Metabolismus von D3G erstmals in Ratten zu bestimmen und mit jenem von DON zu vergleichen. Um dies zu ermöglichen, war eine akkurate Quantifizierung der verabreichten Toxine bzw. ihrer Metabolite in tierischen Probenmaterialien erforderlich. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Selektivität ist LC-MS/MS die am häufigsten angewandte Technik zum Nachweis von Trichothecenen (Shephard et al., 2012). Daher wird dieses Verfahren auch verwendet, um DON in unterschiedlichen tierischen Probenmatrices, wie beispielsweise Blut, Urin, Kot, Galle, Milch oder inneren Organen, zu bestimmen (Razzazi-Fazeli et al., 2003; Valenta et al., 2003; Sørensen und Elbæk, 2005; Döll et al., 2008; De Baere et al., 2011; Lattanzio et al., 2011; Song et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf LC-MS/MS basierende Analysenmethode zur Quantifizierung der verabreichten Toxine bzw. ihrer Metabolite entwickelt und für die Probenmatrices Kot und Urin validiert. Aufgrund seiner toxikokinetischen Eigenschaften ist eine erfolgreiche Detektion von DON im Blut stark an den Probenahmezeitpunkt geknüpft und erfordert zudem sehr geringe Nachweisgrenzen der analytischen Methode (Dänicke et al., 2008). Demgegenüber bieten Urin und Feces als Probenmatrices die Vorteile, vergleichsweise hohe Konzentrationen an DON und dessen Metaboliten zu erhalten und darüber hinaus eine nicht invasive Probengewinnung zu ermöglichen. Goyarts und Dänicke (2006) erbrachten im Tiermodell den Beweis, dass über eine quantitative Bestimmung von DON (und dessen Metaboliten) im Urin eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit dieses Toxins erfolgen kann.

Die Mehrheit der in der Literatur beschriebenen Methoden umfasst die direkte Bestimmung von DON und DOM-1 in tierischen Probenmaterialien. Die Quantifizierung von DON-GlcA erfolgt in diesen Arbeiten auf indirekte Weise, d.h. durch enzymatische Hydrolyse der Proben und nachfolgende Bestimmung der Gesamtmenge an DON. Dieses Vorgehen ist zum größten Teil durch das Fehlen

eines kommerziell erhältlichen analytischen Standards für DON-GlcA bedingt. Es birgt jedoch die Gefahr einer unvollständigen Hydrolyse (Lattanzio et al., 2011 (DON-GlcA); Welsch und Humpf, 2012 (T2-Toxin-GlcA)) und somit einer Unterschätzung der tatsächlichen Toxinkonzentration einer Probe. Die in dieser Arbeit entwickelte Analysenmethode ermöglicht neben der Bestimmung von DON, D3G und DOM-1 auch erstmals die direkte Quantifizierung von DON-GlcA in Urin und Kot von Tieren. Vor kurzem wurde eine weitere LC-MS/MS Methode publiziert, welche die direkte Bestimmung von DON-GlcA in tierischen Probematrizes (Plasma, Darminhalt, innere Organe) beschreibt (Veršilovskis et al., 2012).

Neben vielen Vorteilen weist LC-MS/MS den Nachteil der sogenannten Matrixeffekte auf. Probenbestandteile (wie z.B. Salze, Proteine, Lipide) können die Ionisierung der Analyte reduzieren (ion suppression) oder erhöhen (ion enhancement) und somit deren Quantifizierung beeinflussen. Daher ist im Zuge der Entwicklung und Validierung LC-MS/MS basierender Analysemethoden die Bestimmung der Matrixeffekte von großer Bedeutung (zusammengefasst von Gosetti et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurden während der Methodenentwicklung Matrixeffekte in Form von „ion suppression“ für alle Analyte und beide Probenmatrices beobachtet. Die Beeinträchtigung der Bestimmung von DON mittels LC/MS-MS aufgrund von Matrixkomponenten, insbesondere solcher im Urin, ist aus der Literatur bekannt (Solfrizzo et al., 2011; Warth et al., 2011). Eine Möglichkeit der Minimierung von Matrixeffekten besteht in einer adäquaten Probenaufarbeitung, wobei diese oftmals eine große Herausforderung darstellt. Dies spiegelt sich auch in den zahlreichen unterschiedlichen Probenaufarbeitungstechniken wider, die in der Literatur für die Bestimmung von DON in biologischen Matrizes beschrieben sind (Valenta et al., 2003; Solfrizzo et al., 2011; Warth et al., 2011; Song et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten die Matrixeffekte durch Verdünnen der Proben und Aufreinigung mittels Festphasenextraktion reduziert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Durch einen umfangreichen Validierungsprozesses wurde das Ausmaß der Matrixeffekte für die jeweilige Analyt-Matrix-Kombination bestimmt und bei der Quantifizierung der Proben berücksichtigt. Insgesamt erwies sich die validierte LC-MS/MS Methode für eine akkurate Quantifizierung der Proben des Versuches geeignet.

2. Metabolismus von DON

Obgleich primär aus Vergleichszwecken in das Studiendesign implementiert, konnten durch die Verabreichung von DON zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Metabolisierung dieses Mykotoxins in Ratten gewonnen werden.

Aus der Literatur war bekannt, dass DON-GlcA den Hauptmetabolit von DON im Urin von Ratten darstellt (Meky et al., 2003). Zudem existieren Berichte über das Auftreten von zwei DON-GlcA-Isomeren im Urin dieser Spezies (Lattanzio et al., 2011). Unsere Studie bestätigte sowohl DON-GlcA als primären Metaboliten im Urin, als auch das Vorkommen von zwei Isomeren. Darüber hinaus konnten durch zusätzliche MS/MS-Experimente und Analysen der Proben (mit einer Methode nach Warth et al., 2012) Aufschlüsse über ihre chemische Struktur erlangt werden. So wurde in den Ratten die große Mehrheit an glucuronidiertem DON in Form von DON-3-GlcA ausgeschieden. Das zweite Isomer, welches in deutlich geringeren Mengen vorgefunden wurde, konnte weder als DON-3-GlcA, noch als DON-15-GlcA identifiziert werden. Da hingegen im humanen Urin primär DON-15-GlcA detektiert wird (Warth et al., 2012), wurden somit indirekt Unterschiede im Phase II-Metabolismus von DON zwischen Ratten und Menschen aufgezeigt. Die eindeutige Charakterisierung des unbekanntes DON-GlcA-Isomers hätte umfangreiche, weiterführende Untersuchungen (z.B. Kernspinresonanzspektroskopie, nuclear magnetic resonance, NMR) erfordert und wurde daher im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt. Aktuelle Forschungsarbeiten von Maul et al. (2012b) und Uhlig et al. (2013) liefern diesbezüglich entscheidende Erkenntnisse. In Übereinstimmung mit den vorliegenden *in vivo* Daten resultierte die Inkubation von Ratten-Lebermikrosomen mit DON in der Bildung von DON-3-GlcA und einer zweiten, unbekanntes Form (Maul et al., 2012b). Aufgrund der chemischen Struktur von DON vermuteten die Autoren, dass es sich bei dem nicht identifizierten Isomer um Deoxynivalenol-7-Glukuronid handelt. Diese Annahme wurde kürzlich von Uhlig et al. (2013) widerlegt, die mittels NMR eine Konjugierung der Glukuronsäure an die C-8-Position (Deoxynivalenol-8-Glukuronid) beweisen konnten.

Neben der Glukuronidierung in der Leber stellt die Deepoxydierung im Intestinaltrakt für Säugetiere die zweite Möglichkeit dar, DON zu detoxifizieren. In der vorliegenden Studie schieden die Ratten vergleichsweise nur geringe Mengen an DOM-1 über den Urin aus. Bei dieser Kalkulation wurde jedoch die glukuronidierte Form des Metaboliten, DOM-1-GlcA, nicht berücksichtigt. So erhöhte sich nach Zusatz des Enzyms β -Glukuronidase die Menge an DOM-1 in den Urinproben um einen Faktor 2-3,2. Lattanzio et al. (2011) konnten nach oraler Verabreichung von DON im Urin Konzentrationen an DOM-1 feststellen, die jene von DON sogar übertrafen. Somit werden in Ratten deutlich größere Mengen an DOM-1 über den Urin ausgeschieden als dies z.B. in Schweinen der Fall ist (5% der im Urin ausgeschiedenen Gesamtoxinmenge; Dänicke et al., 2004b). Sundstøl Eriksen et al. (2003) versuchten diesen Umstand durch Koprophagie (Verzehr von Kot) zu erklären, eine Verhaltensweise, die Ratten im Gegensatz zu Schweinen aufweisen. Tatsächlich repräsentierte in der vorliegenden Arbeit DOM-1 den Hauptmetaboliten im Kot von fünf der sechs Ratten. Selbst 24-48 h nach der Toxinverabreichung wurden noch signifikante Mengen dieses Metaboliten über den Kot ausgeschieden. Der Argumentation von Sundstøl Eriksen et al. (2003) muss jedoch entgegengehalten werden, dass die Tiere im vorliegenden Experiment während der Sammelperioden in Stoffwechsellkäfigen gehalten wurden und somit keinen Zugang zu abgesetzten Exkrementen hatten. Da Ratten ihren Kot nicht direkt aus dem Anus aufnehmen (Brown und Donnelly, 2004), scheint es unwahrscheinlich, dass Koprophagie die primäre Ursache für die vergleichsweise hohen DOM-1-Konzentrationen im Urin von Ratten darstellt. Vielmehr könnten dem speziesspezifische Unterschiede in der Bildung und/oder der Absorption von DOM-1 ursächlich zugrunde liegen.

Ein weiterer Aspekt, der anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde, waren die individuellen Unterschiede in der Absorption von verabreichtem Toxin. So konnte in Ratte Nr. 2 im Vergleich zu allen übrigen Versuchstieren ein deutlich geringerer Anteil der applizierten DON-Menge im Urin wiedergefunden werden. Dagegen war der Anteil der im Kot detektierten Toxinmenge merklich erhöht, was insgesamt auf eine verminderte DON-Absorption in diesem Tier schließen lässt. Offensichtliche Krankheitssymptome, die diese Beobachtung erklären würden (z.B. Durchfall), konnten nicht festgestellt werden. Individuelle Schwankungen hinsichtlich der Absorption bzw.

Ausscheidung von DON sind in der Literatur vermerkt. So variiert beispielsweise in Schweinen der Anteil der im Urin ausgeschiedenen Toxinmenge in einem Bereich von 32-66% der aufgenommenen DON-Menge (Goyarts und Dänicke, 2006). Diese individuellen Unterschiede erlaubten es bisher nicht, von einer gemessenen Toxinkonzentration in Urin (oder Blut) auf die Höhe der Toxin-Exposition eines Tieres rückzurechnen (Dänicke et al., 2008).

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie Vergleichsdaten aus der Literatur, so wird die Komplexität des Metabolismus von DON klar ersichtlich. Es besteht ein Bedarf an weiteren Forschungsarbeiten, die u.a. die Gründe für die speziesspezifischen und individuellen Unterschiede in der Metabolisierung von DON abklären. Hierfür sind adäquate analytische Methoden und die Verfügbarkeit analytischer Standards (DON-GlcA-Isomere, DOM-1-GlcA) wesentlich.

3. Metabolismus von D3G

Es bestehen große Bedenken, dass die Aufnahme von D3G zu einer Erhöhung der Gesamtoxinbelastung eines Individuums an DON führt (JECFA et al., 2011). Die Hydrolyse von D3G konnte bereits in einem *in vitro* Modell, welches verschiedene Abschnitte des Verdauungstrakts simuliert, nachgewiesen werden (Berthiller et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals Daten zur Metabolisierung dieses Mykotoxins in Säugetieren erhoben.

Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie ist der Nachweis einer Hydrolyse von D3G *in vivo*. Nach oraler Applikation von D3G wurden im Kot der Ratten DON und DOM-1 detektiert. Hingegen konnte D3G lediglich in Spuren und nur im Kot von drei der sechs Tiere nachgewiesen werden. Diese Resultate belegen somit neben einer nahezu vollständigen Hydrolyse von D3G im Intestinaltrakt der Ratten auch die Freisetzung und Deepoxydierung von DON.

Für die toxikologische Relevanz von D3G ist jedoch nicht nur dessen Hydrolyse entscheidend, sondern auch die systemische Verfügbarkeit von freigesetztem DON. Da letzteres vornehmlich im Duodenum absorbiert wird (Dänicke et al., 2004a), scheint der Lokalisation der Hydrolyse eine gewisse Bedeutung zuzukommen. Berthiller et al. (2011) demonstrierten in ihrem *in vitro* Modell,

dass D3G von bestimmten Darmbakterien gespalten werden kann. Jedoch erwies sich eine Hydrolyse in proximalen Abschnitten des Verdauungstrakts als unwahrscheinlich. Darüber hinaus zeigte eine humane Glukosidase (recombinant human cytosolic β -glucosidase), welche in Leber, Niere, Milz und Darm exprimiert wird (Berrin et al., 2002), keine Aktivität gegenüber D3G. Aktuelle Studien konnten eine Hydrolyse von D3G nach Inkubation mit humanen Fecesproben nachweisen (Dall'Erta et al., 2013; Gratz et al., 2013). De Nijs et al. (2012) stellten anhand eines *in vitro* Ansatzes mit humanen Caco-2 Zellen vor kurzem fest, dass es im Dünndarm zu keiner nennenswerten Absorption oder Hydrolyse von D3G kommt. Zusammenfassend lassen diese Daten erkennen, dass D3G primär in den distalen Darmsegmenten durch Bakterien gespalten wird. Die Ergebnisse der Urinalysen in der vorliegenden Studie, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, indizieren eine geringe Resorption von freigesetztem DON. Dies unterstützt die aus den *in vitro* Studien gewonnene Annahme. Jedoch muss angemerkt werden, dass aufgrund des angewendeten Studiendesigns keine abgesicherten Aussagen hinsichtlich der genauen Lokalisation einer Hydrolyse getroffen werden können.

Nach der Verabreichung von D3G konnten im Urin der Tiere sowohl D3G, als auch DON, DON-GlcA und DOM-1 detektiert werden. Der Nachweis von DON und dessen Metaboliten belegt somit die Absorption und Metabolisierung von freigesetztem DON. Jedoch entsprach die im Urin detektierte Gesamtoxinmenge durchschnittlich nur $3,7 \pm 0,7\%$ der verabreichten Dosis, was auf eine äußerst niedrige Absorption schließen lässt. Im Vergleich dazu wurden nach Applikation von DON $14,9 \pm 5,0\%$ der Toxinmenge im Urin wiedergefunden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass D3G in Ratten zu keiner relevanten Erhöhung der Gesamtoxinbelastung an DON führt. Die Menge an im Urin detektiertem D3G entsprach lediglich $0,3 \pm 0,1\%$ der verabreichten Dosis. Obwohl damit erstmals die Bioverfügbarkeit von D3G *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist deren Ausmaß aller Voraussicht nach vernachlässigbar.

Kürzlich wurde eine zweite Studie veröffentlicht, welche sich mit dem Metabolismus von D3G in Ratten beschäftigt. In dieser wurden nach oraler Verabreichung von jeweils $25 \mu\text{g}$ D3G an zwei Tiere die Konzentrationen an D3G, DON, DON-GlcA und DOM-1 in Serum (17 min nach Verabreichung), verschiedenen Darmabschnitten (Magen, Dünn-, Dickdarm; 55 min nach

Verabreichung) und inneren Organen (Leber, Niere, Milz, Lunge und Harnblase; 55 min nach Verabreichung) untersucht (Veršilovskis et al., 2012). Die größten Toxinmengen (37-51% der verabreichten Dosis) wurden in Form von D3G im Magen detektiert. Dieser Prozentsatz fiel im Dünndarm auf 2-3%. Die Autoren schlossen aus diesem starken Abfall auf eine Hydrolyse von D3G im Duodenum, wobei aber weder in Serum, noch in den Darmsegmenten DON (oder dessen Metabolite) detektiert wurden. In Niere (< 0,1% der applizierten Dosis) und Harnblase konnten geringe Spuren an D3G festgestellt werden. Die geringe Bioverfügbarkeit von D3G stimmt somit mit unseren Versuchsergebnissen überein.

In der vorliegenden Studie wurde der Beweis erbracht, dass D3G in Ratten zu keiner relevanten Erhöhung der Gesamtbelastung an DON führt. Dennoch bleibt abzuklären, ob D3G auf andere Weise biologische Wirkung entfalten kann. Die nachgewiesene lokale Schädigung von DON auf Darmepithelzellen (Bracarense et al., 2012) könnte beispielsweise durch eine Aufnahme von D3G und nachfolgende Freisetzung von DON verstärkt werden. Desweiteren ist bislang völlig unklar, ob D3G als solches eine Futterreduktion bewirkt oder sogar emetische Wirkung besitzt.

Darüber hinaus soll anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie weder auf das Ausmaß der Hydrolyse von D3G in anderen Tierarten, noch auf eine toxikologische Relevanz weiterer maskierter Mykotoxine in Ratten geschlossen werden. Ähnlich wie bei DON muss auch bei D3G von speziesspezifischen Unterschieden im Metabolismus ausgegangen werden. Von besonderem Belang wären hierbei Kenntnisse über den Metabolismus von D3G im Schwein, da diese Tierart durch kontaminierte Futterpflanzen regelmäßig D3G ausgesetzt ist (Berthiller et al., 2009a; De Boevre et al., 2012) und zudem eine erhöhte Sensitivität gegenüber DON aufweist (Pestka, 2007). Für das maskierte Mykotoxin Zearalenon-14- β -D-Glukosid existieren bereits *in vivo* Daten im Schwein. Diese deuten – im Gegensatz zu D3G – auf eine Hydrolyse in den proximalen Abschnitten des Verdauungstrakts hin (Gareis, 1994). Selbiges konnte kürzlich in Ratten bestätigt werden (Veršilovskis et al., 2012).

Die angeführten Beispiele heben die zahlreichen Aspekte hervor, die bei zur Abschätzung des gesundheitsgefährdenden Potentials von maskierten Mykotoxinen im Allgemeinen, und D3G im Speziellen, beachtet werden müssen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Fusarium Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) löst in Tieren zahlreiche Krankheitssymptome aus und verursacht beträchtliche wirtschaftliche Schäden. Pflanzen besitzen einen wirksamen Verteidigungsmechanismus gegenüber diesem Toxin, indem sie Glukose an DON konjugieren. Das resultierende maskierte Mykotoxin Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid (D3G) wurde sowohl in Nahrungs- als auch in Futtermitteln nachgewiesen. Eine mögliche Hydrolyse von D3G im Verdauungstrakt von Säugetieren könnte zu einer Erhöhung der Gesamtbelastung an DON führen und somit gesundheitsschädigende Wirkung aufweisen. Aufgrund fehlender *in vivo* Daten wurde dieses maskierte Mykotoxin bislang nicht in die EU-Höchstmengenregelungen für DON inkludiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher abzuklären, ob oral verabreichtes D3G in Ratten hydrolysiert wird und ob es in der Folge zu einer Absorption von freigesetztem DON kommt.

In einem Messwiederholungsdesign wurde sechs Sprague-Dawley Ratten Wasser, DON (2,0 mg/kg KG) und die äquimolare Menge an D3G (3,1 mg/kg KG) an den Tagen 1, 8 und 15 oral verabreicht. Nach jeder Applikation wurden die Tiere für 48 h einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten, um Kot und Urin zu sammeln. Die darin enthaltenen Mengen an D3G, DON, Deoxynivalenol-Glukuronid (DON-GlcA) und Deepoxy-deoxynivalonol (DOM-1) wurden anhand einer validierten LC-MS/MS Analysenmethode bestimmt.

Nach Verabreichung von D3G konnten sowohl das maskierte Mykotoxin selbst, als auch DON, DON-GlcA und DOM-1 im Urin der Ratten detektiert werden. D3G repräsentierte hierbei lediglich $0,3 \pm 0,1\%$ der verabreichten Dosis, was eine äußerst geringe Bioverfügbarkeit indiziert. Insgesamt konnten im Urin nach Applikation von D3G und DON $3,7 \pm 0,7\%$ und $14,9 \pm 5,0\%$ der verabreichten Toxinmengen wiedergefunden werden. Der Hauptteil an verabreichtem D3G wurde in Form von DON und DOM-1 im Kot der Tiere wiedergefunden.

Die Studie konnte belegen, dass D3G im Verdauungstrakt von Ratten hydrolysiert und DON freigesetzt wird. Dieses wird zum Teil zu DON-GlcA und DOM-1 metabolisiert, jedoch nur in geringen Mengen resorbiert. Unsere Daten weisen daher darauf hin, dass D3G in Ratten eine geringere toxikologische Relevanz als DON besitzt.

VI. SUMMARY

The *Fusarium* mycotoxin Deoxynivalenol (DON) leads to numerous adverse health effects in animals and causes serious economic losses. Plants can defend themselves against this toxin by conjugating glucose to DON. The resulting masked mycotoxin deoxynivalenol-3- β -D-glucoside (D3G) is frequently occurring in food and feed. There are major concerns that D3G is hydrolyzed in the digestive tract of mammals, thus increasing the total DON load of an individual. Due to a lack of *in vivo* data D3G has not been included in the regulatory limits established by the European Commission for DON. Therefore, the aim of our study was to clarify whether orally administered D3G is hydrolyzed in rats and liberated DON is subsequently absorbed.

Using a repeated measures design, six Sprague-Dawley rats received water, DON (2.0 mg/kg body weight; bw) and the equimolar amount of D3G (3.1 mg/kg bw) by gavage on days 1, 8 and 15, respectively. After each application, the animals were housed individually for 48 h in metabolic cages to collect urine and feces. The concentrations of D3G, DON, deoxynivalenol-glucuronide (DON-GlcA) and de-epoxydeoxynivalenol (DOM-1) in the excreta were determined by a validated LC-MS/MS based method.

After administration of D3G, the masked mycotoxin itself as well as DON, DON-GlcA and DOM-1 were detected in the urine of rats. In total, $3.7 \pm 0.7\%$ and $14.9 \pm 5.0\%$ of the administered dose were recovered in urine after application of D3G and DON, respectively. Urinary eliminated D3G represented only $0.3 \pm 0.1\%$ of the given dose, thus indicating a very low bioavailability of this masked mycotoxin in rats. The majority of administered D3G was recovered as DON and DOM-1 in feces.

This study clearly demonstrated that D3G is hydrolyzed in the digestive tract of rats. The liberated DON is metabolized to DOM-1 and DON-GlcA, but only poorly absorbed. Our data indicate that D3G is of considerably lower toxicological relevance than DON in rats.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Applied Biosystems, MDS Sciex, 2002. QTrap: Application in Metabolism Studies. ASMS User Meeting, Orlando, Florida, USA.

Ardrey, R.E., 2003. Liquid chromatography - mass spectrometry: An introduction. 1. Auflage, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

Awad, W.A., Ghareeb, K., Böhm, J., Razzazi, E., Hellweg, P., Zentek, J., 2008. The impact of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 7, 827-842.

Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y., Murtha, J., Chu, F.S., Pestka, J.J., 1995. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 109-120.

Berrin, J.G., McLauchlan, W.R., Needs, P., Williamson, G., Puigserver, A., Kroon, P.A., Juge, N., 2002. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur. J. Biochem.* 269, 249-258.

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R., 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3421-3425.

Berthiller, F., Werner, U., Sulyok, M., Krska, R., Hauser, M.T., Schuhmacher, R., 2006. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit. Contam.* 23, 1194-1200.

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G., Schuhmacher, R., 2009a. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit. Contam. A* 26, 507-511.

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Krska, R., 2009b. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1243-1252.

Berthiller, F., Krska, R., Domig, K.J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., Adam, G., 2011. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicol. Lett.* 206, 264-267.

Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2012. Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 165-186.

Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 265-282.

Bracarense, A.P., Luciola, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W.D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br. J. Nutr.* 107, 1776-1786.

Brown, C.J., Donnelly, T.M., 2004. Rodent husbandry and care. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 7, 201-225.

Budzikiewicz, H., Schäfer, M. 2012. *Massenspektrometrie: Eine Einführung.* 6. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology Task Force), 2003. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems.* Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 139, Iowa, USA.

CCCF (Codex Committee on Contaminants on Foods), 2011. Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives in cereals and cereal based products CX/CF 11/5/6. ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCCF/CCCF5/cf05_06e.pdf, letzte Einsichtnahme: 2013-02-12.

Coleman, J., Blake-Kalff, M., Davies, E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144-151.

Côté, L.M., Dahlem, A.M., Yoshizawa, T., Swanson, S.P., Buck, W.B., 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69, 2416-2423.

Côté, L.M., Buck, W., Jeffery, E., 1987. Lack of hepatic microsomal metabolism of deoxynivalenol and its metabolite, DOM-1. *Food Chem. Toxicol.* 25, 291-295.

Dall'Asta, C., Mangia, M., Berthiller, F., Molinelli, A., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Krska, R., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2009. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1335-1345.

Dall'Erta, A., Cirlini, M., Dall'Asta, M., Del Rio, D., Galaverna, G., Dall'Asta, C., 2013. Masked mycotoxins are efficiently hydrolysed by the human colonic microbiota, releasing their toxic aglycones. *Chem. Res. Toxicol.*, *in press*.

Dänicke, S., Valenta, H., Döll, S., 2004a. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 169-180.

Dänicke, S., Valenta, H., Goyarts, T., Razzazi, E., Böhm, J., 2004b. On the effects of increasing deoxynivalenol (DON) concentrations in pig feed on growth performance and utilization of nutrients and on DON metabolism. *J. Anim. Feed Sci.* 13, 539-556.

Dänicke, S., Döll, S., Goyarts, T., Valenta, H., Ueberschär, K.H., Flachowsky, G., 2008. Zur Beurteilung des Vorkommens der Fusarium-Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sowie ihrer Metaboliten in physiologischen Substraten des Schweins. *Tierärztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere* 36, 35-47.

De Baere, S., Goossens, J., Osselaere, A., Devreese, M., Vandenbroucke, V., De Backer, P., Croubels, S., 2011. Quantitative determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC-MS/MS detection. *J. Chromatogr. B* 879, 2403-2415.

De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G., De Saeger, S., 2012. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotox. J.* 5, 207-219.

De Nijs, M., Van den Top, H.J., Portier, L., Oegema, G., Kramer, E., Van Egmond, H.P., Hoogenboom, L.A.P., 2012. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3- β -glucoside in in vitro models. *World Mycotox. J.* 5, 319-324.

De Saeger, S., 2011. Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. In: *Determining mycotoxins and mycotoxigenetic fungi in food and feed*. 1. Auflage, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 203, Cambridge, United Kingdom.

Desmarchelier, A., Seefelder, W., 2011. Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *World Mycotox. J.* 4, 29-35.

Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H., 2008. Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 727-734.

EFSA (European Food Safety Authority), 2004. EFSA Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal 73, 1-42. <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/73.pdf>, letzte Einsichtnahme: 2013-02-12.

Ehrlich, K.C., Daigle, K.W., 1987. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim. Biophys. Acta* 923, 206-213.

Europäische Kommission, 2006a. Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:DE:PDF>, letzte Einsichtnahme: 2013-02-12.

Europäische Kommission, 2006b. Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:DE:PDF>, letzte Einsichtnahme: 2013-02-12.

Flannery, B.M., Wu, W., Pestka, J.J., 2011. Characterization of deoxynivalenol-induced anorexia using mouse bioassay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1863-1869.

Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F₁ mouse. *Food Chem. Toxicol.* 25, 155-162.

Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N., Tuite, J., 1977. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 547-552.

Gareis, M., 1994. Maskierte Mykotoxine. *Übersichten zur Tierernährung* 22, 104-113.

Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C., 2010. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3929-3937.

Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515-525.

Goyarts, T., Dänicke, S., 2006. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol. Lett.* 163, 171-182.

Gratz, S.W., Duncan, G., Richardson, A.J., 2013. Human fecal microbiota metabolize deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary de-epoxy deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, *in press*.

Gross, J. H., 2004. *Mass spectrometry - A Textbook*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, Deutschland.

Hazel, C.M., Patel, S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.* 153, 51-59.

Hildebrand, B., Boguhn, J., Dänicke, S., Rodehutsord, M., 2012. Effect of Fusarium toxin-contaminated triticale and forage-to-concentrate ratio on fermentation and microbial protein synthesis in the rumen. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 307-318.

Holčapek, M., Jirásko, R., Lída, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1217, 3908-3921.

Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschäppät, V., Grivet, C., Bourgoigne, E., Leuthold, L.A., 2004. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J. Mass Spectrom.* 39, 845-855.

Huff, W.E., Doerr, J.A., Hamilton, P.B., Vesonder, R.F., 1981. Acute toxicity of vomitoxin (Deoxynivalenol) in broiler chickens. *Poult. Sci.* 60, 1412-1414.

Humpf, H.U., Voss, K.A., 2004. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 255-269.

JECFA, 2001. Evaluation of certain mycotoxins in food: Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf, letzter Zugriff: 2013-02-12.

JECFA, 2011. Evaluation of certain contaminants in food: Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 959. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_959_eng.pdf, letzter Zugriff: 2013-02-12.

Kebarle, P., Verkerk, U.H., 2009. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 898-917.

King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D., Greenhalgh, R., 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1181-1183.

Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P.M., Berthiller, F., Krska, R., 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3- glucoside, in beer and some brewing intermediates. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3187-3194.

Krska, R., Molinelli, A., 2007. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 145-148.

Lake, B.G., Phillips, J.C., Walters, D.G., Bayley, D.L., Cook, M.W., Thomas, L.V., Gilbert, J., Startin, J.R., Baldwin, N.C.P., Bycroft, B.W., Dewick, P.M., 1987. Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 25, 589-592.

Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostálek, P., Sachambula, L., 2008. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Addit. Contam. A* 25, 732-744.

Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Chulze, S.N., Torres, A.M., Visconti, A., 2011. LC-MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. *Food Addit. Contam. B* 879, 707-715.

Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, Á., Krska, R., 2005. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1318-1324.

Li, F.Q., Wang, W., Ma, J.J., Yu, C.C., Lin, X.H., Yan, W.X., 2012. Natural occurrence of masked deoxynivalenol in Chinese wheat and wheat-based products during 2008-2011. *World Mycotox. J.* 5, 221-230.

Lottspeich F, Zorbas H, 1998. Massenspektrometrie. In: *Bioanalytik*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

Malachova, A., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Vaclavikova, M., Zachariasova, M., Hajslova, J., 2011. Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins: The major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12990-12997.

- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F.J., Nehls, I., 2012a. Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chem.* 131, 274-279.
- Maul, R., Warth, B., Kant, J.S., Schebb, N.H., Krska, R., Koch, M., Sulyok, M., 2012b. Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2715-2717.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J., 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814.
- Meky, F.A., Turner, P.C., Ashcroft, A.E., Miller, J.D., Qiao, Y.L., Roth, M.J., Wild, C.P., 2003. Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 41, 265-273.
- Miller, J.D., Arnison, P.G., 1986. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Can. J. Plant Pathol.* 8, 147-150.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.
- Pestka, J.J., 2003. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.* 140, 287-295.
- Pestka, J.J., Smolinski, A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8, 39-69.
- Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 283-298.
- Pestka, J.J., 2008. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam.* 25, 1128-1140.
- Pestka, J.J., Islam, Z., Amuzie, C.J., 2008. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. *Toxicol. Lett.* 178, 83-87.
- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84, 663-679.
- Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., 2008. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. Lett.* 177, 215-222.

- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., Adam, G., 2003. Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278, 47905-47914.
- Prelusky, D., Trenholm, H., Lawrence, G., Scott, P., 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B.* 19, 593-609.
- Prelusky, D.B., Hamilton, R.M., Trenholm, H.L., Miller, J.D., 1986. Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fundam. Appl. Toxicol.* 7, 635-645.
- Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Jarukamjorn, K., Zentek, J., 2003. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Addit. Contam. B* 796, 21-33.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 1-34.
- Sasanya, J.J., Hall, C., Wolf-Hall, C., 2008. Analysis of deoxynivalenol, masked deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* pigment in wheat samples, using liquid chromatography-UV-mass spectrometry. *J. Food Prot.* 71, 1205-1213.
- Savard, M.E., 1991. Deoxynivalenol fatty acid and glucoside conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 39, 570-574.
- Schuhmacher, R., Sulyok, M., Krska, R., 2008. Recent developments in the application of liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of organic residues and contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 253-256.
- SCOOP (Scientific Cooperation on Questions Relating to Food), 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. SCOOP Task 3.2.10 Final Report. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>, letzte Einsichtnahme: 2013-02-12.
- Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., Flachowsky, G., 2006. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit. Contam.* 23, 1008-1020.

Sewald, N., Lepschy von Gleissenthall, J., Schuster, M., Müller, G., Aplin, R.T., 1992. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron: Asymmetry* 3, 953-960.

Shephard, G.S., Berthiller, F., Burdaspal, P.A., Crews, C., Jonker, M.A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, R.J., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Van Egmond, H.P., Whitaker, T.B., 2012. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. *World Mycotox. J.* 5, 3-30.

Smith JE, Solomons GL, Lewis CW, Anderson JG, 1994. Mycotoxins in human nutrition and health. European Commission Directorate General XII.

Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Lattanzio, V.M.T., Powers, S., Visconti, A., 2011. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M 1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B 1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2831-2841.

Song, S., Ediage, E.N., Wu, A., De Saeger, S., 2013. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, *in press*.

Sørensen, L., Elbaek, T., 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 820, 183-196.

Spickett, C.M., Reis, A., Pitt, A.R., 2011. Identification of oxidized phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry and LC-MS using a QQLIT instrument. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 2133-2149.

Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Johnsen, K., Lindberg, J.E., 2002. Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 56, 263-274.

Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Lindberg, J.E., 2003. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl don in pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 335-345.

Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Lundh, T., 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.* 42, 619-624.

Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., Oswald, I.P., 2012. Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed - Focus on Europe. *Toxins* 4, 788-809.

Swanson, S.P., Nicoletti, J., Rood, H.D., Buck, W.B., Côté, L.M., Yoshizawa, T., 1987. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J. Chromatogr. B* 414, 335-342.

Swanson, S., Helaszek, C., Buck, W., Rood, H., Haschek, W., 1988. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* 26, 823-829.

Tiemann, U., Dänicke, S., 2007. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit. Contam.* 24, 306-314.

Turner, P.C., Burley, V.J., Rothwell, J.A., White, K.L., Cade, J.E., Wild, C.P., 2008. Deoxynivalenol: Rationale for development and application of a urinary biomarker. *Food Addit. Contam.* 25, 864-871.

Turner, P.C., Hopton, R.P., Lecluse, Y., White, K.L.M., Fisher, J., Lebailly, P., 2010a. Determinants of urinary deoxynivalenol and de-epoxy deoxynivalenol in male farmers from Normandy, France. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5206-5212.

Turner, P.C., White, K.L., Burley, V.J., Hopton, R.P., Rajendram, A., Fisher, J., Cade, J.E., Wild, C.P., 2010b. A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults. *Biomarkers* 15, 553-562.

Turner, P.C., Flannery, B., Isitt, C., Ali, M., Pestka, J., 2012. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutr. Res. Rev.* 25, 162-179.

Uhlig, S., Ivanova, L., Faeste, C.K., 2013. Enzyme-Assisted Synthesis and Structural Characterization of the 3-, 8- and 15-Glucuronides of Deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2006-2012.

Universität Münster, 2013. Ionenanalyse im Quadrupol. Massenspektrometrie im Organisch Chemischen Institut der Universität Münster. <http://www.uni-muenster.de/Chemie.oc/service/mass/Methoden/Quadrupol/quadrupol.html>, letzte Einsichtnahme: 2013-02-14.

Valenta, H., Dänicke, S., Döll, S., 2003. Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column. *Mycotoxin Res.* 19, 51-55.

Valenta, H., Dänicke, S., 2005. Study on the transmission of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 779-785.

Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A., 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 147-157.

Varga, E., Malachova, A., Schwartz, H., Krska, R., Berthiller, F., 2013. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Addit. Contam. A* 30, 137-146.

Veršilovskis, A., Geys, J., Huybrechts, B., Goossens, E., De Saeger, S., Callebaut, A., 2012. Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World Mycotox. J.* 5, 303-318.

Visconti, A., Haidukowski, E.M., Pascale, M., Silvestri, M., 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicol. Lett.* 153, 181-189.

Wang, W., Ma, J.J., Yu, C.C., Lin, X.H., Jiang, H.R., Shao, B., Li, F.Q., 2012. Determination of Masked Deoxynivalenol and Some Important Type B Trichothecenes in Chinese Corn Kernels and Corn-Based Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11638-11646.

Warth, B., Sulyok, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Fruhmann, P., Hametner, C., Adam, G., Fröhlich, J., Krska, R., 2011. Direct quantification of deoxynivalenol glucuronide in human urine as biomarker of exposure to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 195-200.

Warth, B., Sulyok, M., Fruhmann, P., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Hametner, C., Adam, G., Fröhlich, J., Krska, R., 2012. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method. *Toxicol. Lett.* 211, 85-90.

Wei, C.M., McLaughlin, C.S., 1974. Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes. Novel inhibitors of protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 838-844.

Worrell, N.R., Mallett, A.K., Cook, W.M., Baldwin, N.C.P., Shepherd, M.J., 1989. The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats. *Xenobiotica* 19, 25-32.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Yuan, Z., 2010. Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metab. Rev.* 42, 250-267.

Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., Hendrich, S., 2007. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1846-1855.

Yoshizawa, T., Morooka, N., 1974. Studies on the toxic substances in the infected cereals, 3: Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins: Deoxynivalenol and its monoacetate. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 15, 261-269.

Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohi, T., 1983. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2133-2135.

Yunus, A.W., Ghareeb, K., Twaruzek, M., Grajewski, J., Böhm, J., 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Effects on bird performance and response to common vaccines. *Poult. Sci.* 91, 844-851.

Zachariasova, M., Vaclavikova, M., Lacina, O., Vaclavik, L., Hajslova, J., 2012. Deoxynivalenol-oligoglycosides: New "Masked" Fusarium Toxins Occurring in Malt, Beer and Breadstuff. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9280-9291.

VIII. ANHANG

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Deoxynivalenol (DON)	4
Abbildung 2: Molekularer Wirkmechanismus von DON (modifiziert nach Pestka, 2007)	6
Abbildung 3: Chemische Struktur von Deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1)	9
Abbildung 4: Struktur von DON und dessen Isomeren, DON-3- und DON-15-Glukuronid (modifiziert nach Warth et al., 2012)	10
Abbildung 5: Bildung von Deoxynivalenol-3- β -D-Glukosid, katalysiert von dem Enzym UDP-Glukosyltransferase (modifiziert nach Poppenberger et al., 2003)	16
Abbildung 6: Prinzip der Elektrospray-Ionisation (modifiziert nach Applied Biosystems, 2002).	22
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Quadrupols (modifiziert nach Universität Münster, 2013)	23
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupols und Funktion der einzelnen Quadrupole (Q) im selected reaction monitoring mode (modifiziert nach Spikett et al., 2011)	24

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DON-Richtwerte für zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse gemäß Empfehlung der Kommission 2006/576/EG	12
Tabelle 2: D3G-Kontamination in Lebensmitteln – Übersicht aktueller Studienergebnisse	18

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München verfassen zu dürfen, ganz herzlich bedanken. Vielen Dank für deine hilfsbereite, sowie Staats- und Sprachgrenzen übergreifende Betreuung in den vergangenen Jahren.

Ein besonderer Dank gilt Ass. Prof. Dr. Franz Berthiller, der mir die Chance gegeben hat, bei einem großartigen Projekt mitwirken zu dürfen. Durch deine fachliche Expertise hast du einen wichtigen Teil zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Danke, dass ich unter deiner Leitung so viel Neues lernen durfte, für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und den Schulterklopfer in Rotterdam.

Bei Dr. Heidi Schwartz möchte ich mich für ihre kompetente und humorvolle Unterstützung bedanken. Ich weiß deine stetige Hilfsbereitschaft, deine Geduld und deine Ratschläge sehr zu schätzen.

Ein spezieller Dank gilt meiner Kollegin Elisabeth, die mir bei kleineren und größeren technischen Schwierigkeiten mit diversen analytischen Geräten helfend zur Seite gestanden hat. Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kollegen vom Analytikzentrum und BIOMIN Holding GmbH, insbesondere bei Benedikt, Elsa, Geraldo, Irene, Marco, Michi, Simone und Vroni für die moralische Unterstützung und die spannenden Wuzzelpartien bedanken.

Der Christian Doppler Forschungsgesellschaft, BIOMIN Holding GmbH und Nestec Ltd möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung aussprechen.