

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierhygiene

**Nachweis und Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffeln und
Kartoffelprodukten**

Julia Melanie Matthes

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät *Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt* der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 02.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät *Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt* am 02.02.2012 angenommen.

© 2012 by Lehrstuhl für Tierhygiene

Alle Rechte, auch die der Übersetzung und des Nachdrucks sowie jede Art der photomechanischen Wiedergabe oder der Übernahme auf Datenträger, auch auszugsweise, bleiben vorbehalten.

Technische Universität München
Lehrstuhl für Tierhygiene
Weihenstephaner Berg 3
D-85354 Freising

Herstellung: Hieronymus Verlag, Neuried

Eine elektronische Version der Dissertation ist im Netz der Universitätsbibliothek der Technischen Universität München veröffentlicht und unter der Internetadresse <http://mediatum.ub.tum.de> zu finden.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
B	Literatur	3
1	Vorkommen und Relevanz von Fusarientoxinen in Lebensmitteln	3
1.1	Trichothecene	3
1.1.1	Biochemische Wirkungsweise	4
1.1.2	Vorkommen in Lebensmitteln	6
1.1.3	Fallberichte zu Trichothecenintoxikationen beim Menschen	7
1.2	Zearalenon	8
1.2.1	Biochemische Wirkungsweise	8
1.2.2	Vorkommen in Lebensmitteln	9
1.2.3	Fallberichte zu Zearalenonintoxikationen beim Menschen	9
2	Vorkommen und Relevanz von Fusarien und Fusarientoxinen in Kartoffeln	10
2.1	Bedeutung von Kartoffeln und Kartoffelprodukten als Lebensmittel	10
2.2	Erreger und Symptomatik der Fusariumtrockenfäule	11
2.3	Bildung von Fusarientoxinen in Kartoffeln mit Trockenfäulesymptomen	12
3	Bildung von pflanzlich konjugierten Fusarientoxinen	15
3.1	Detoxifikationsreaktionen in der Pflanze	15
3.2	Konjugatbildung bei Mykotoxinen	15
3.3	Pflanzenzellkulturen als Modell für die Bildung von metabolisierten Fusarientoxinen	17
C	Material und Methoden	19
1	Probenmaterial	19
1.1	Toxinscreening	19
1.2	Inokulationsversuche	19
1.3	Metabolisierung von Typ A Trichothecenen in Kartoffelzellkulturen	19
2	Gebrauchsmaterial	20
3	Technisches Gerät	20
4	Verbrauchsmaterial	21
4.1	Standardsubstanzen	21
4.2	Chemikalien	22
4.3	Kulturmedien und Pufferlösungen	23
5	Vorversuche	25
5.1	Entwicklung einer Analysenmethode mittels HPLC-MS/MS	25
5.1.1	Chromatographische Auftrennung der Toxine mittels HPLC	25
5.1.2	Detektion der Toxine mittels MS/MS	25

5.2 Vorversuche zum Toxinscreening bei Kartoffeln und Kartoffelprodukten aus dem Einzelhandel	25
5.2.1 Extraktionsversuche	25
5.2.2 Aufreinigung	26
5.3 Vorversuche zur Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen	26
5.3.1 Extraktionsversuche	26
5.3.2 Aufreinigung	26
5.3.3 HPLC-MS/MS Analyse	27
6 Toxinstandardgewinnung	27
6.1 Standardgewinnung mittels <i>Fusarium sambucinum</i>	27
6.2 Standardgewinnung durch chemische Modifikation	28
7 Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen	29
7.1 Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen	29
7.1.1 Filterkulturen	29
7.1.2 Suspensionskulturen	29
7.1.3 „Vitalität“ der Pflanzenzellen	29
7.2 Gewinnung von Typ A Trichothecenkonjugat Standardsubstanzen	30
7.3 Identifizierung der Typ A Trichothecenkonjugate	31
7.3.1 Fragmentierungsmuster	31
7.3.2 Saure Hydrolyse	31
7.3.3 Enzymatische Spaltung	32
7.4 Metabolisierungsversuche in Kartoffelzellkulturen	32
7.5 Extraktion und Reinigung von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffelzellkulturen	32
7.6 Extraktion von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffelzellmedien und Filterbrücken	33
7.7 HPLC-MS/MS Analyse	33
7.8 Validierung der Analysenverfahren	34
8 Methode zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	35
8.1 Probenvorbereitung	35
8.2 Extraktion	35
8.3 Aufreinigung	35
8.4 HPLC-MS/MS Analyse	35
8.5 Validierung der Analysenverfahren	38
9 Bildung und Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln mit Symptomen der Fusariumtrockenfäule	38
9.1 Inokulation von Kartoffeln der Sorte `Lady Christl´ mit <i>Fusarium</i> spp.	38

9.2 Beurteilung der inokulierten Kartoffelknollen und anschließende Probenvorbereitung	38
9.3 Extraktion, Reinigung und HPLC-MS/MS Analyse	39
9.4 Validierung der Analysenverfahren	39
10 Nachweis von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	40
D Ergebnisse	41
1 Methodenentwicklung	41
1.1 Entwicklung einer Analysenmethode mittels HPLC-MS/MS	41
1.2 Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Typ A Trichothecenen und deren Metaboliten in Kartoffelzellkulturen	42
1.3 Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	43
2 Toxinstandardgewinnung	45
3 Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen	49
3.1 Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen für die Metabolisierungsversuche	49
3.1.1 Filterkulturen	49
3.1.2 Suspensionskulturen	53
3.2 Identifizierung von möglichen Typ A Trichothecenmetaboliten	56
3.2.1 Fragmentierungsmuster	56
3.2.2 Saure Hydrolyse	60
3.2.3 Enzymatische Spaltung	60
3.3 Validierung der Analysemethoden zur Bestimmung von Typ A Trichothecenen in Kartoffelzellen und -medien	61
3.4 Metabolisierungsversuche mit T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol in Kartoffelzellkulturen	63
3.4.1 Nachweis von T-2 Toxin, 4,15-Diacetoxyscirpenol und deren Glucosidmetaboliten in Filterkulturen	63
3.4.2 Nachweis von T-2 Toxin, 4,15-Diacetoxyscirpenol und deren Glucosidmetaboliten in Suspensionskulturen	68
4 Vorkommen von Fusarientoxinen in artifiziell und natürlich mit <i>Fusarium</i> spp. infizierten Kartoffelknollen	75
4.1 Ausbreitung von <i>Fusarium</i> spp. in der Kartoffelknolle	75
4.2 Trockensubstanzbestimmung	77
4.3 Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffelstiften	77
4.4 Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Fusarientoxinen	78
4.5 Vorkommen von Fusarientoxin-Glucosidkonjugaten in artifiziell oder natürlich mit <i>Fusarium</i> spp. infizierten Kartoffelknollen	80

5	Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	86
5.1	Trockensubstanzbestimmung	86
5.2	Methodenkennzahlen zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	86
5.3	Vorkommen von Fusarientoxinen in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten	88
5.3.1	Kartoffelknödel/Kloßteig	89
5.3.2	Kartoffelpüree	90
5.3.3	Kartoffeln, roh	90
5.3.4	Pommes Frites/Wedges	91
5.3.5	Kartoffelpuffer	91
5.3.6	Kartoffeln, gekocht	91
5.4	Fusarientoxin-Mehrfachbelastungen in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten	92
5.6	Vorkommen von Fusarientoxin-Glucosidkonjugaten in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten	94
E	Diskussion	97
1	Analysenmethode zur Bestimmung von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	97
2	Identifizierung von Typ A Trichothecen Standardsubstanzen	98
3	Bildung und Identifizierung von T-2 Toxin- und 4,15-Diacetoxyscirpenol-metaboliten in Pflanzenzellkulturen	100
4	Vorkommen von Fusarientoxinen und Fusarientoxin-Glucosiden in Kartoffeln und Kartoffelprodukten	105
F	Zusammenfassung	115
G	Summary	117
H	Literatur	119
I	Anhang	131

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
amu	Atomare Masseneinheit
ATA	Alimentäre Toxische Aleukie
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CAD	Collision Activated Dissociation Gas
CE	Collision Energy
CEP	Collision Cell Entrance Potential
cm	Zentimeter
counts	Einheit der Peakfläche
cps	Counts per Second
CUR	Curtain Gas
CXP	Collision Cell Exit Potential
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP	Declustering Potential
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrospray Ionisation
EU	Europäische Union
FG	Frischgewicht
FI	Fäuleindex
FS	Faulstelle
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GS1	Gas 1
GS2	Gas 2
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IC	Inhibitorische Konzentration
ID	Innendurchmesser
Ig	Immunglobulin
i.p.	Intraperitoneal
IQR	Interquartilsabstand
IS	Ion Spray Voltage
J	Jahre
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LD	Letale Dosis
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)

LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
M	Molar
MASE	Mikrowellenunterstützte Extraktion
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS/MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
n	Anzahl
n.d.	Nicht detektierbar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NMR	Magnetische Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
P	Perzentile
pg	Pikogramm
psi	Pound per Square Inch
r ²	Bestimmtheitsmaß
(m)RNA	(messenger) Ribonucleinsäure
RP	Reversed-Phase
R _t	Retentionszeit
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
S/N	Signal-to-Noise Ratio
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
(t)TDI	(temporary) Tolerable Daily Intake
TEM	Temperatur
TIC	Total Ion Current
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U	Enzyme unit
V	Volt
\bar{X}	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur von Zearalenon	8
Abbildung 2:	Fäulesymptome einer Kartoffelknolle inokuliert mit <i>Fusarium</i> sp.	11
Abbildung 3:	Mittlere Diacetoxyscirpenolkonzentrationen [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in verschiedenen Gewebeabschnitten von Kartoffeln mit Fusariumtrockenfäule	13
Abbildung 4:	Schema zur Probennahme von Kartoffelstiften aus Kartoffelknollen mit Fusariumtrockenfäule	39
Abbildung 5:	Linearität und Präzision des Detektors am Beispiel von T-2 Toxin	42
Abbildung 6:	Vergleich unterschiedlicher Extraktions- und Reinigungsmethoden zum Nachweis von Typ A Trichothecenmetaboliten in Kartoffelzellen	43
Abbildung 7:	Vergleich unterschiedlicher Extraktions- und Reinigungsmethoden zum Nachweis von Trichothecenen und Zearalenon in Kartoffeln	44
Abbildung 8:	Product-Ion-Scan des hergestellten Triacetoxyscirpenols	45
Abbildung 9:	Product-Ion-Scan des hergestellten 4-Monoacetoxyscirpenols	46
Abbildung 10:	Product-Ion-Scan des hergestellten Scirpentriols	47
Abbildung 11:	Product-Ion-Scan des hergestellten Acetyl-T-2 Toxins	48
Abbildung 12:	Relative Spaltungsaktivität von Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Agria´ gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)	50
Abbildung 13:	Relative Spaltungsaktivität von Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Desiré´ gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)	50
Abbildung 14:	Konzentrationen an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Agria´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	51
Abbildung 15:	Konzentrationen an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Desiré´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	51
Abbildung 16:	Konzentrationen an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenolmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Agria´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	52
Abbildung 17:	Konzentrationen an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenolmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Desiré´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	52
Abbildung 18:	Relative Spaltungsaktivität von Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agria´ gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe von T-2 Toxin und DAS in verschiedenen Konzentrationen	53
Abbildung 19:	Zellmasse von Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agria´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)	54

Abbildung 20: Konzentrationen an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffel-suspensionskulturen der Sorte `Agria´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	54
Abbildung 21: Konzentrationen an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenolmetaboliten in Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agria´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen	55
Abbildung 22: Massenspektrum von Scirpentriol-Glucosid	57
Abbildung 23: Massenspektrum von Scirpentriol-Diglucosid	57
Abbildung 24: Massenspektrum von 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid	58
Abbildung 25: Massenspektrum von HT-2 Toxin-Glucosid	59
Abbildung 26: Massenspektrum von HT-2 Toxin-Diglucosid	59
Abbildung 27: Enzymatische Spaltung von Glucosidkonjugaten durch die Enzyme Amyloglucosidase und β -Glucosidase	60
Abbildung 28: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von Agria-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g T-2 Toxin/ml Kulturmedium	64
Abbildung 29: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g T-2 Toxin/ml Kulturmedium	64
Abbildung 30: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Agria-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g DAS/ml Kulturmedium	65
Abbildung 31: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g DAS/ml Kulturmedium	65
Abbildung 32: Nachweis von T-2 Toxin in Zellkulturmedien von Agria- und Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g T-2 Toxin/ml Kulturmedium	66
Abbildung 33: Nachweis von 4,15-Diacetoxyscirpenol in Zellkulturmedien von Agria- und Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g DAS/ml Kulturmedium	67
Abbildung 34: Nachweis von Typ A Trichothecen-Glucosidkonjugaten in Filtermaterial von Agria- und Desiré-Filterkulturen nach Zugabe von 5 μ g T-2 Toxin bzw. DAS/ml Kulturmedium und einer Inkubationsdauer von 8 bzw. 12 Tagen	68
Abbildung 35: Nachweis von T-2/HT-2 Toxin in der Zellfraktion von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g T-2 Toxin/ml Kulturmedium	69
Abbildung 36: Nachweis von Toxinen der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 μ g DAS/ml Kulturmedium	70

Abbildung 37: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium	70
Abbildung 38: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium	71
Abbildung 39: Nachweis von T-2/HT-2 Toxin in Zellkulturmedien von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium	72
Abbildung 40: Nachweis von Toxinen der Scirpentriol-Gruppe in Zellkulturmedien von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium	72
Abbildung 41: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in Zellkulturmedien von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium	73
Abbildung 42: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in Zellkulturmedien von <i>Agria</i> -Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium	74
Abbildung 43: Trockensubstanzgehalte von gesundem Knollengewebe sowie von Faulstellengewebe aus inokulierten und natürlich infizierten Kartoffeln	77
Abbildung 44: Nachweis von Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Faulstellen von artifiziell und natürlich mit <i>Fusarium</i> spp. inokulierten Kartoffelknollen	81
Abbildung 45: Diffusionsverhalten von Monoacetoxyscirpenol-Glucosid und Scirpentriol-Glucosid in artifiziell mit <i>Fusarium</i> spp. inokulierten Kartoffelknollen	83
Abbildung 46: Diffusionsverhalten von Deoxynivalenol-Glucosid in artifiziell mit <i>Fusarium</i> sp. No K30 inokulierten Kartoffelknollen	84
Abbildung 47: Nachweis von Trichothecenen der Typen A und B sowie deren Glucosidmetaboliten in scheinbar gesundem Gewebe von artifiziell mit <i>Fusarium</i> spp. inokulierten Kartoffelknollen	85
Abbildung 48: Verteilung der Trockensubstanzgehalte von Kartoffeln und Kartoffelprodukten	86
Abbildung 49: Verteilung der positiven Proben auf die Produktgruppen	88
Abbildung 50: Häufigkeit von Fusarientoxinen in Kartoffeln/Kartoffelprodukten	89
Abbildung 51: Verteilung von Fusarientoxin-Mehrfachbelastungen	92
Abbildung 52: Häufigkeit von Typ A Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Kartoffelpüree und rohen Kartoffeln	94
Abbildung 53: Nachweis von Typ A Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Kartoffelpüree und rohen Kartoffeln	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturen der Typ A und B Trichothecene	3
Tabelle 2: Toxizität diverser Trichothecene	5
Tabelle 3: Vorkommen von Trichothecenen in europäischen Getreideprodukten	6
Tabelle 4: Tägliche Aufnahme an Trichothecenen [%] TDI durch die europäische Bevölkerung	7
Tabelle 5: Tägliche Aufnahme an Zearalenon [%] TDI durch die europäische Bevölkerung	9
Tabelle 6: Tägliche Verzehrsmengen von Kartoffeln (inkl. Kartoffelerzeugnisse*) durch Säuglinge und Kleinkinder in Deutschland	10
Tabelle 7: Tägliche Verzehrsmengen von Kartoffeln/Kartoffelerzeugnissen durch Kinder ab sechs Jahre, Jugendliche und Erwachsene in Deutschland	10
Tabelle 8: Erreger der Fusariumtrockenfäule bei Kartoffeln	11
Tabelle 9: Fusarientoxine in Kartoffeln inokuliert mit <i>Fusarium</i> spp.	12
Tabelle 10: Fusarientoxine in Kartoffeln aus dem Einzelhandel	13
Tabelle 11: Fusarientoxine in Kartoffelprodukten aus dem Einzelhandel	14
Tabelle 12: Nachweis von konjugierten Fusarientoxinen	16
Tabelle 13: Zusammensetzung der Kulturmedien für Kartoffelzellkulturen	23
Tabelle 14: Sabouraud-Agar zur Kultivierung von <i>Fusarium</i> spp.	23
Tabelle 15: Gradientenprogramm zur Standardgewinnung	28
Tabelle 16: Gradientenprogramm zur Gewinnung von Metaboliten der Scirpentriol-Gruppe	31
Tabelle 17: Gradientenprogramm zur Gewinnung von HT-2 Toxinmetaboliten	31
Tabelle 18: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ A Trichothecenkonjugaten	33
Tabelle 19: MRM-Übergänge für mögliche Typ A Trichothecenmetabolite	33
Tabelle 20: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ A Trichothecenkonjugaten	34
Tabelle 21: Gradientenprogramm für Typ A Trichothecene	36
Tabelle 22: Gradientenprogramm für Typ B Trichothecene und Zearalenon	36
Tabelle 23: MRM-Übergänge von Typ A Trichothecenen	36
Tabelle 24: MRM-Übergänge der Typ B Trichothecene und Zearalenon/Zearalanon	37
Tabelle 25: Quellenparameter und CAD-Gas für Typ A Trichothecene	37
Tabelle 26: Quellenparameter und CAD-Gas Typ B Trichothecene/Zearalenon	37
Tabelle 27: Beurteilung der Pathogenität von <i>Fusarium</i> spp. in Kartoffelknollen	38
Tabelle 28: MRM-Übergänge von Deoxynivalenol- und Zearalenonmetaboliten	40
Tabelle 29: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ B Trichothecen- und Zearalenonmetaboliten	40
Tabelle 30: Richtigkeit und Präzision der Bestimmung von Typ A Trichothecenen und ihrer Glucoside in Kartoffelzellen	61
Tabelle 31: Richtigkeit und Präzision von Typ A Trichothecenen in Filterbrücken	62

Tabelle 32: Virulenz von verschiedenen <i>Fusarium</i> spp. gegenüber der Kartoffelsorte 'Lady Christl'	75
Tabelle 33: Beurteilung von Faulstellen natürlich infizierter Kartoffelknollen mit Trockenfäulesymptomen	76
Tabelle 34: Richtigkeit und Präzision der Analysemethoden zur Bestimmung von Fusarientoxinen in Kartoffelstiften	78
Tabelle 35: Vorkommen von Fusarientoxinen in den Faulstellen von Kartoffelknollen inokuliert mit verschiedenen <i>Fusarium</i> spp.	79
Tabelle 36: Vorkommen von Trichothecen-Glucosidkonjugaten in den Faulstellen von Kartoffelknollen inokuliert mit verschiedenen <i>Fusarium</i> spp.	82
Tabelle 37: Richtigkeit und Präzision der Methode zur Analyse von Fusarientoxinen in Kartoffelpulver	87
Tabelle 38: Aufstellung der untersuchten Proben	88
Tabelle 39: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelknödel/Kloßteig	89
Tabelle 40: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelpüree	90
Tabelle 41: Vorkommen von Fusarientoxinen in rohen, ungeschälten Kartoffeln	91
Tabelle 42: Vorkommen von Fusarientoxinen in Pommes Frites/Wedges	91
Tabelle 43: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelpuffern	91
Tabelle 44: Vorkommen von Fusarientoxinen in gekochten Kartoffeln	92
Tabelle 45: Mehrfachbefunde von Typ A Trichothecenen	93
Tabelle 46: Mehrfachbefunde Typ A Trichothecene/DON, ZON	93
Tabelle 47: Mittlere Gehalte verschiedener Fusarientoxine in den Kartoffeln und Kartoffelerzeugnissen der Stichprobe	109
Tabelle 48: Tägliche Aufnahmen an 4,15-Diacetoxyscirpenol und 15-Monoacetoxyscirpenol durch Kartoffeln und Kartoffelerzeugnisse	110

A Einleitung

Während der Lagerung von Kartoffeln kommt es nach einem Befall mit Schimmelpilzen, speziell mit Vertretern der Gattung *Fusarium*, häufig zur Ausbildung einer Trockenfäule. Als Infektionserreger der Fusariumtrockenfäule sind in Mitteleuropa in erster Linie die Arten *Fusarium sambucinum* Fuckel f.6 Wollenweber und *Fusarium coeruleum* (Lib.) Sacc. von Bedeutung (Stachewicz 2000). Hierbei ist die Bildung von Mykotoxinen durch die Fusarien möglich, welche von der Faulstelle aus weiter in die Kartoffel diffundieren können (Ellner 2002).

Fusarientoxine können einen negativen Einfluss auf die Gesundheit des menschlichen und tierischen Organismus ausüben. So hemmen Toxine aus der Gruppe der Trichothecene unter anderem die Proteinsynthese und beeinflussen Funktionen des Immunsystems (Pestka et al. 2004; Thompson u. Wannemacher 1986). Zearalenon, ein weiteres durch *Fusarium* spp. gebildetes Mykotoxin, hat eine hohe Affinität zum zytosolischen Östrogenrezeptor und aktiviert dadurch östrogenabhängige Signalkaskaden (Katzenellenbogen et al. 1979).

Die Belastung von Lebensmitteln mit Fusarientoxinen ist bisher vor allem bei Getreide und Getreideprodukten in zahlreichen Arbeiten untersucht worden und hat zur Festsetzung von Grenzwerten für Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B₁ und B₂ in Getreide und Getreideerzeugnissen einschließlich Mais und Maiserzeugnissen geführt. Angesichts der großen Bedeutung von Kartoffeln und –produkten für die Ernährung in Deutschland mit einem jährlichen pro-Kopf-Verbrauch von 61 kg, ist es für die Abschätzung eines möglichen Verbraucherrisikos geboten, die Belastung dieser Produkte mit Fusarientoxinen näher zu betrachten (ZMP 2008). Über die Toxinbelastung von Kartoffelknollen mit Fusariumtrockenfäule gibt es bislang nur wenig gesicherte Erkenntnisse: Lafont et al. (1983) untersuchten ausschließlich artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierte Knollen, die Belastung von Kartoffelprodukten wurde bisher kaum näher betrachtet (Schollenberger et al. 2005). Aufgrund der relativ großen Stabilität der Toxine während der Prozessierung ist aber auch eine Kontamination von Kartoffelprodukten ohne weiteres denkbar (Hazel u. Patel 2004).

Da die Kartoffelknolle auch nach ihrer Ernte noch stoffwechselaktiv ist (Desjardins u. Plattner 1989), wäre insbesondere auch die verstärkte Bildung von konjugierten Fusarientoxinmetaboliten denkbar. Die Konjugation stellt in Pflanzen eine übliche Reaktion zur Entgiftung endogen und exogen gebildeter Substanzen dar und wurde bereits für eine Vielzahl von Stoffen nachgewiesen. So wurden etwa in Weizen und Mais, aber auch in prozessierten Lebensmitteln wie Bier bereits glucosidierte Fusarientoxine nachgewiesen (Kostelanska et al. 2009; Berthiller et al. 2005b; Schneweis et al. 2002). Diese Metaboliten können im menschlichen und tierischen Organismus, beispielsweise durch enzymatische Hydrolyse, allerdings zumindest teilweise wieder gespalten werden und somit ihre ursprüngliche Toxizität zurückerlangen. Dies wurde

bereits für Zearalenon-Glucosid im porcinen Organismus nachgewiesen (Gareis et al. 1990).

Der Schwerpunkt dieses Forschungsvorhabens lag zunächst darin, ein umfassendes Bild über die Belastungssituation von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten zu erhalten. Für den Nachweis von Typ A und B Trichothecenen sowie Zearalenon sollten Produkte aus dem Lebensmitteleinzelhandel stichpunktartig untersucht werden. Ferner wurden Daten zur Diffusion von gebildeten Fusarientoxinen in augenscheinlich gesundem Knollengewebe ermittelt. Hierzu wurde eine geeignete HPLC-MS/MS Methode entwickelt und validiert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Identifizierung und Erfassung von im pflanzlichen Organismus umgewandelten Toxinen. Aus diesem Grund sollten zunächst ausgewählte Fusarientoxine in Kartoffelzellkulturen prozessiert werden, um anschließend etwaige gebildete Metaboliten, speziell Glucosidkonjugate mit dem Ziel zu isolieren, diese Substanzen in die Analysemethode zur Untersuchung von Kartoffelproben aufnehmen zu können.

B Literatur

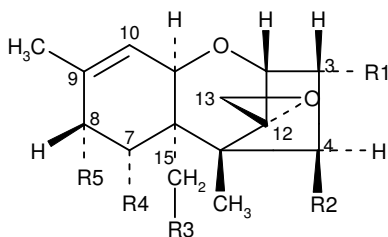
1 Vorkommen und Relevanz von Fusarientoxinen in Lebensmitteln

Zahlreiche Vertreter der Pilzgattung *Fusarium* bilden in ihrem Sekundärstoffwechsel Mykotoxine. Zu diesen sogenannten Fusarientoxinen zählen unter anderem die Gruppe der Trichothecene sowie Zearalenon und seine Metaboliten (Desjardins u. Proctor 2007; Turner 1975).

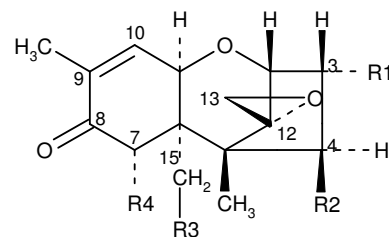
1.1 Trichothecene

Trichothecene sind niedermolekulare, zyklische Sesquiterpene. Sie haben eine Epoxidgruppe zwischen C₁₂ und C₁₃, und in der Regel eine Doppelbindung bei C_{9,10}. Trichothecene lassen sich in vier Gruppen unterteilen. Die Gruppen A und B (Tabelle 1) unterscheiden sich lediglich am C₈-Atom. Typ A Trichothecene haben an dieser Position eine Esterbindung bzw. ein H-Atom, Typ B Trichothecene eine Ketogruppe.

Tabelle 1: Strukturen der Typ A und B Trichothecene (Cole et al. 2003; Swanson et al. 1987)



Typ A Trichothecen



Typ B Trichothecen

Typ A Trichothecene	MW	Rest 1	Rest 2	Rest 3	Rest 4	Rest 5
3,4,15-Triacetoxyscirpenol	408,2	OAc	OAc	OAc	H	H
4,15-Diacetoxyscirpenol	366,2	OH	OAc	OAc	H	H
4-Monoacetoxyscirpenol	324,2	OH	OAc	OH	H	H
15-Monoacetoxyscirpenol	324,2	OH	OH	OAc	H	H
Scirpentriol	282,1	OH	OH	OH	H	H
Acetyl-T-2 Toxin	508,2	OAc	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Toxin	466,2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 Toxin	424,2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Triol	382,5	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Tetraol	298,1	OH	OH	OH	H	OH
Neosolaniol	382,2	OH	OAc	OAc	H	OH
Verrucarol	266,2	H	OH	OH	H	H
4,15-Diacetylverrucarol	350,2	H	OAc	OAc	H	H
Typ B Trichothecene	MW	Rest 1	Rest 2	Rest 3	Rest 4	
Deoxynivalenol	296,1	OH	H	OH	OH	
3-Acetyldeoxynivalenol	338,1	OAc	H	OH	OH	
15-Acetyldeoxynivalenol	338,1	OH	H	OAc	OH	
Nivalenol	312,1	OH	OH	OH	OH	
Fusarenon X	354,1	OH	OAc	OH	OH	

Bei der dritten Gruppe, den Typ C Trichothecenen (z.B. Crotocin) befindet sich eine zusätzliche Epoxidgruppe zwischen C₇ und C₈, oder den Kohlenstoffatomen 9 und 10. Typ D Trichothecene (z.B. Satratoxine, Verrucarine, Roridine) besitzen einen makrozyklischen Ring zwischen C₄ und C₁₅ (WHO 1990).

Gebildet werden Trichothecene von unterschiedlichen Pilzarten wie *Fusarium* spp., *Stachybotrys* spp., *Myrothecium* spp., *Trichothecium* spp. und *Cephalosporium* spp. (Sudakin 2003; Ishii 1983).

1.1.1 Biochemische Wirkungsweise

Wichtig für die biologische Aktivität der einzelnen Trichothecene ist der Epoxidring an C_{12,13}, die Doppelbindung zwischen C₉ und C₁₀ und die Substituenten an C₃, C₄, C₈, und C₁₅. Diese Substituenten sind einerseits verantwortlich für die Polarität und damit für die Aufnahme des jeweiligen Moleküls in die Zelle. Andererseits bestimmen sie die Affinität eines Trichothecens gegenüber der aktiven Seite der ribosomalen Peptidyltransferase (Madhyastha et al. 1994; Richardson u. Hamilton 1990; Thompson u. Wannemacher 1986; Wei u. McLaughlin 1974). Diese spielt eine zentrale Rolle bei der Toxizität von Trichothecenen durch die nicht kompetitive Hemmung der Proteinbiosynthese, die in verschiedenen Zellsystemen beobachtet werden konnte (Ehrlich u. Daigle 1987; Cundliffe et al. 1974). Trichothecene greifen in die Synthese der Proteine ein, indem sie an die 60S Untereinheit der Ribosomen binden und - abhängig von ihrer Struktur - die Initiation, die Elongation oder die Termination der Polypeptidkette inhibieren (Ehrlich u. Daigle 1987; Cundliffe u. Davies 1977; Cundliffe et al. 1974; Wei u. McLaughlin 1974; Carrasco et al. 1973).

Die toxische Wirkung von Trichothecenen ist bei verschiedenen Zellarten unterschiedlich stark ausgeprägt und bei einer Gabe *in vivo* zudem abhängig von der Verabreichungsart der Toxine (Tabelle 2). Letztere ist auf eine Metabolisierung sowie eine Clearance der einzelnen Toxine während der Passage durch den tierischen Organismus zurückzuführen (Thompson u. Wannemacher 1986). Beispielsweise wurde in Schweinen nach Gabe von Deoxynivalenol die Bildung eines Glucuronidkonjugats beobachtet (Goyarts et al. 2006). Dieser Metabolit zeigte im Gegensatz zu Deoxynivalenol (IC₅₀=1,31 µM) bis zu einer Konzentration von 270 µM keinen Einfluss auf die Vitalität von humanen Leukämiezellen (Zelllinie K562) (Wu et al. 2007). Außerdem kann es zur Bildung von Deepoxiden durch die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes kommen. Diese deepoxidierten Trichothecene haben wiederum eine weitaus geringere Toxizität als die jeweiligen Ausgangssubstanzen und wurden in einem Fütterungsversuch mit Schweinen kaum absorbiert (Dänicke et al. 2004). Allerdings ist die Bildung tierspezifisch und konnte beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden (Eriksen u. Pettersson 2003; Swanson et al. 1988).

Tabelle 2: Toxizität diverser Trichothecene

Mykotoxin	LD ₅₀ [mg/kg KG]		Inhibitorische Dosis ₅₀ [mg/l]	
	Maus, i.p. ^a	Maus, s.c. ^a	HEK-Zellen ^b	HL-Zellen ^b
4,15-Diacetoxyscirpenol	15,3	19,5	0,01	0,001>
15-Monoacetoxyscirpenol	4,5	7,8	0,1	0,3
Acetyl-T-2 Toxin	7,2	7,2	0,8	0,03
T-2 Toxin	9,1	3,3	0,02	0,0003>
HT-2 Toxin	10,1	6,7	0,1	0,01
T-2 Triol		75,3		
T-2 Tetraol	11,0	15,7		
Neosolaniol	14,8	9,7		
Deoxynivalenol	43,0	45,0	3,0	0,5
3-Acetyldeoxynivalenol	54,0	59,0	10	10
Nivalenol	9,6	7,3	1,0	0,3
Fusarenon X	5,6	5,5		

a: Thompson und Wannemacher (1986)

b: Tanaka et al. (1977)

HEK: human embryonic kidney

HL: human lymphocyte

Neben der unmittelbaren toxischen Wirkung konnte für einige Trichothecene ein zusätzlicher Einfluss auf das Immunsystem nachgewiesen werden. Insbesondere wurden zahlreiche Untersuchungen bei Typ B Trichothecenen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass unter dem Einfluss von Deoxynivalenol MAP-Kinasen in verschiedenen humanen Zellsystemen aktiviert werden (Casteel et al. 2010; Sergent et al. 2006; Pestka et al. 2004). In der Folge kann es durch diese Aktivierung in zahlreichen Zellsystemen zu Veränderungen kommen, die sich unter anderem durch die vermehrte Expression unterschiedlicher Zytokine bemerkbar machen (Pestka et al. 2005; Zhou et al. 2003; Ouyang et al. 1995; Dong et al. 1994). Desweiteren kann eine Aktivierung von MAP-Kinasen Signalkaskaden auslösen, die den programmierten Zelltod einleiten (Shifrin u. Anderson 1999).

Weiterhin nehmen Trichothecene, abhängig von der induzierten Dosis, Einfluss auf die Bildung von Antikörpern in menschlichen Lymphozyten. Bei hohen Konzentrationen wird ihre Bildung inhibiert (10 nM DAS, T-2; bzw. 1000 nM DON, NIV), bei niedrigeren (2 nM DAS, 1 nM T-2; bzw. 200 nM DON, 100 nM NIV) konnte ein Anstieg der IgA-, in geringerem Umfang auch der IgM- und IgG-Level beobachtet werden (Thuvander et al. 1999). Niedrige Antikörpertiter könnten zusammen mit einer verminderten Lymphozytenproliferation, bedingt durch die Sensitivität humaner Lymphozyten gegenüber zahlreichen Trichothecenen, zu einer vermehrten Infektanfälligkeit beitragen (Tanaka et al. 1977). Bei dauerhaft erhöhten IgA-Spiegeln konnten bei Mäusen mesangiale IgA Ablagerungen in der Niere sowie eine Hämaturie beobachtet werden (Banotai et al. 1999). Beides sind Symptome, die ebenfalls bei der humanen IgA-Nephropathie auftreten (Emancipator 1992).

Schließlich beeinflussen Fusarientoxine zahlreiche Neurotransmitter wie Serotonin, 5-Hydroxyindolessigsäure, Dopamin, Norepinephrin und Homovanillinsäure in unterschiedlichen Gehirnregionen von Schweinen, Geflügel und Ratten. Die Änderungen der Neurotransmitterlevel bei den einzelnen Tierarten waren sehr unterschiedlich. Es wird jedoch angenommen, dass die veränderte Neurotransmitterzusammensetzung beim Schwein in Zusammenhang mit einer verminderten Futteraufnahme steht (Swamy et al. 2004; Fitzpatrick et al. 1988).

1.1.2 Vorkommen in Lebensmitteln

Ausführliche Untersuchungen zum Vorkommen von Trichothecenen wurden bisher vor allem in Getreideprodukten durchgeführt. In einer umfassenden Studie wurde 2003 das Vorkommen von Fusarientoxinen in Getreideprodukten europaweit erfasst (SCOOP 2003). Am häufigsten wurde dabei Deoxynivalenol (57 %) nachgewiesen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vorkommen von Trichothecenen in europäischen Getreideprodukten (SCOOP 2003)

Trichothecen	Anzahl der untersuchten Proben	Positive Proben [%]
4,15-Diacetoxyscirpenol	1886	4
15-Monoacetoxyscirpenol	853	1
T-2 Toxin	3490	20
HT-2 Toxin	3032	14
T-2 Triol	1389	6
Neosolaniol	1323	1
Verrucarol	121	0
Deoxynivalenol	11022	57
3-Acetyldeoxynivalenol	3721	8
15-Acetyldeoxynivalenol	1954	20
Nivalenol	4166	16
Fusarenon X	1872	10

Die Daten zur Toxizität einiger am häufigsten vorkommenden Trichothecene wurden vom Scientific Committee on Food (EU) im Hinblick auf ein mögliches Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung evaluiert. In diesem Rahmen wurden (temporäre) tolerierbare tägliche Aufnahmen ((t)TDIs) für T-2/HT-2 Toxin, Deoxynivalenol und Nivalenol festgelegt (Scientific Committee on Food 2001, 2000b, 1999). Gemeinsam mit den Daten der SCOOP Studie konnte eine Bestandsaufnahme zur Belastung der europäischen Bevölkerung mit Trichothecenen erstellt werden (Tabelle 4). Besonders kritisch stellte sich hier die Situation bei Kindern heraus. Hier wurde der (t)TDI für T-2/HT-2 Toxin im ungünstigsten Fall um mehr als ein fünffaches überschritten. Auch die Zufuhr an Deoxynivalenol konnte in dieser Bevölkerungsgruppe mitunter einen grenzwertigen Bereich erreichen.

Tabelle 4: Tägliche Aufnahme an Trichothecenen [%] TDI durch die europäische Bevölkerung (SCOOP 2003)

	(t)TDI [µg/kg Körpergewicht]	Gesamtbevölkerung [%]	Erwachsene [%]	Kinder [%]
Deoxynivalenol	1	0,8 - 34	14 - 46	11 - 96
Nivalenol	0,7	4,2 - 11	0,8 - 8,2	3,7 - 23
T-2 + HT-2 Toxin	0,06	18 - 250	62 - 172	27 - 563

In der EU wurden inzwischen einheitliche Deoxynivalenol-Grenzwerte für Getreide (1250-1750 µg/kg), Mais (1750 µg/kg) und prozessierte Getreide- bzw. Maisprodukte (200-1250 µg/kg) eingeführt (Europäische Union 2007). Grenzwerte für T-2/HT-2 Toxin sollen folgen.

Inwieweit andere Lebensmittel die tägliche Toxinaufnahme steigern, ist bisher noch nicht abzuschätzen. Da *Fusarium* spp. sehr häufig vorkommen, können auch andere pflanzliche Lebensmittel einen Beitrag leisten, nicht zuletzt auch Kartoffeln. Trichothecene sind hitzestabil und bleiben in leicht saurem Milieu intakt, daher könnten sie auch in prozessierten Lebensmitteln wie Kartoffelprodukten vorkommen (Beyer et al. 2009; Hazel u. Patel 2004).

1.1.3 Fallberichte zu Trichothecenintoxikationen beim Menschen

Akute Intoxikationen mit Trichothecenen werden beim Menschen nur sehr selten und vor allem in Verbindung mit Lebensmittelengpässen und drohenden Hungersnöten beobachtet. Bezeichnenderweise traten zahlreiche Fälle in Teilen der ehemaligen UDSSR während der 40er Jahre des vorigen Jahrhunderts mit Mortalitätsraten bis zu 80 % auf. Ursächlich dafür war mit hoher Wahrscheinlichkeit der Verzehr von verschimmeltem Getreide, das kriegsbedingt über den Winter auf dem Feld stehen blieb. Die betroffenen Personen zeigten vielfältige klinische Symptome, die unter dem Begriff „Alimentäre Toxische Aleukie“ (ATA) zusammengefasst wurden. Kennzeichnende Merkmale dafür waren Entzündungen der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, Erbrechen, Durchfall, Veränderungen des blutbildenden Systems (Leukopenie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Lymphozytose und Anämie), eine vermehrte Infektanfälligkeit, hämorrhagische Blutungen und nekrotische Veränderungen (Joffe 1986; Mayer 1953). Mirocha und Pathre (1973) wiesen schließlich T-2 Toxin in einem Extrakt von *Fusarium sporotrichioides* als möglicher Auslöser der ATA nach.

Auch in Asien traten regional gehäuft wiederholt Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts auf, die ebenfalls in Zusammenhang mit dem Verzehr von mit Fusarien verschimmeltem Reis bzw. Getreide gebracht wurden. Bei der Analyse von charakteristischen Proben in den betreffenden Regionen (Reis, Weizen) konnten häufig hohe Werte an T-2 Toxin, Deoxynivalenol und Acetyldeoxynivalenol gefunden werden (Wang et al. 1993; Bhat et al. 1989; Yoshizawa 1983). Beispielsweise wiesen Li et al. (2002) in einer der ehemals betroffenen Provinzen während eines Erntejahrs in 97 % der untersuchten Weizenproben hohe Deoxynivalenolkonzentrationen (max. 14000 µg/kg; Median 3450 µg/kg) nach. Kennzeichnend für die betroffene Anbau-

periode waren unter anderem vergleichsweise hohe Niederschläge während der Blüte des Weizens, was den Befall von Getreide mit *Fusarium* spp. begünstigt (Lacey et al. 1999).

1.2 Zearalenon

Zearalenon ist ein β -Resorcylnsäurelacton, das von verschiedenen *Fusarium* spp. gebildet werden kann (Abbildung 1). Durch die Reduktion der Ketogruppe am C₆-Atom entstehen die beiden isomeren Hauptmetaboliten α - und β -Zearalenol (Kiessling u. Pettersson 1978).

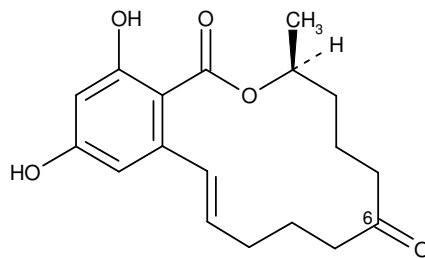


Abbildung 1: Struktur von Zearalenon

1.2.1 Biochemische Wirkungsweise

Anders als bei Trichothecenen ist für Zearalenon die akute Toxizität (LD₅₀ Maus i.p. >500 mg/kg KG) von untergeordneter Bedeutung (Hidy et al. 1977).

Wesentlich ist hingegen die östrogene Wirksamkeit von Zearalenon und einiger seiner Metaboliten. Die Affinität von Zearalenon, α -Zearalenol und β -Zearalenol zum zytosolischen Östrogen-Rezeptor wurde im Zellmodell nachgewiesen. Der Komplex aus Rezeptor und östrogenen Substanz induziert im Zellkern vermehrt die Expression von mRNA, erhöht die RNA-Polymeraseaktivität und die Bildung eines uterinen Proteins, das als Indikator für die östrogene Wirksamkeit einer Substanz herangezogen werden kann (Kuiper-Goodman et al. 1987; Katzenellenbogen et al. 1979).

Im tierischen Organismus sind die 3 α - und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDs) an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt. Es wurde vermutet, dass sie ebenfalls in der Lage sind, Zearalenon zu α - bzw. β -Zearalenol zu reduzieren (Olsen 1989). In humanen intestinal Caco-2 Zellen konnte schließlich bewiesen werden, dass Zearalenon als Substrat für die HSDs dient (Videmann et al. 2008). Im tierischen Organismus sind α - und β -Zearalenol die bedeutendsten Zearalenonmetaboliten. Die Metabolisierung ist spezifisch für die einzelnen Tierarten. Rinder bilden überwiegend β -Zearalenol, während bei Schweinen und dem Menschen in erster Linie α -Zearalenol gefunden wird (Massart et al. 2008; Malekinejad et al. 2006; Meyer et al. 2002). α -Zearalenol besitzt eine höhere Affinität zum zytosolischen Östrogenrezeptor als Zearalenon, β -Zearalenol hingegen eine geringere. Insgesamt ist die östrogene Wirkung von Zearalenon und seiner Derivate jedoch um ein 100-1000 faches geringer verglichen mit 17 β -Östradiol (Katzenellenbogen et al. 1979).

1.2.2 Vorkommen in Lebensmitteln

Die wichtigsten Zearalenonquellen in der menschlichen Ernährung sind Getreide und Mais. Aus diesem Grund wurden für diese Lebensmittel Grenzwerte in der EU eingeführt. Diese liegen zwischen 20 µg/kg für Kindernahrung und 400 µg/kg für raffiniertes Maisöl (Europäische Union 2007).

Neben Trichothecenen wurden bei der SCOOP-Studie (2003) auch Daten bezüglich des Vorkommens an Zearalenon erfasst. Von insgesamt 5018 untersuchten Proben (Getreide, Getreideprodukte, Mais, Maisprodukte, Milch) waren 32 % positiv. Der festgelegte TDI von 0,2 µg/kg Körpergewicht für Zearalenon (Scientific Committee on Food 2000a) wird laut den vorliegenden Daten nicht überschritten (Tabelle 5).

Tabelle 5: Tägliche Aufnahme an Zearalenon [%] TDI durch die europäische Bevölkerung (SCOOP 2003)

	TDI [µg/kg Körpergewicht]	Gesamtbevölkerung [%]	Erwachsene [%]	Kinder [%]
Zearalenon	0,2	13	5,3 – 15	3,0 – 28

1.2.3 Fallberichte zu Zearalenonintoxikationen beim Menschen

Die Wirkungen von Zearalenon auf den menschlichen Organismus sind im Gegensatz zum tierischen weitestgehend undokumentiert. Es gibt jedoch einige Daten, die einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Zufuhr an Zearalenon und einer vorzeitigen Geschlechtsreife (Pubertas praecox) vermuten lassen. So häuften sich in Puerto Rico zwischen 1978 und 1981 Fälle von jungen Mädchen mit vorzeitiger Thelarche, verfrühter Pubertät und Ovarialzysten. Als Auslöser wurde der Verzehr von verschimmeltem Getreide oder von Milchprodukten bzw. Fleisch, die mit anabolen Wachstumspromotoren (z.B. α-Zearalanol) kontaminiert waren, vermutet (Schoental 1983; Comas 1982; Sáenz de Rodríguez u. Toro-Solá 1982). Ähnliche Berichte kommen aus Italien. So konnten bei 32 Mädchen mit Pubertas praecox in sechs Fällen erhöhte Serumspiegel an Zearalenon (724-1144 pg/ml) und α-Zearalanol (105-109 pg/ml) nachgewiesen werden. Die betroffenen Mädchen stammten alle aus einer bestimmten Region der Toskana. Im Gegensatz zu Pubertas praecox-Patientinnen ohne nachweisbaren Zearalenonspiegel konnte bei dieser Gruppe trotz medikamentöser Behandlung ein erhöhtes Körperwachstum beobachtet werden (Massart et al. 2008).

2 Vorkommen und Relevanz von Fusarien und Fusarientoxinen in Kartoffeln

Neben *Phytophthora* spp., *Phoma* spp. und *Alternaria* spp. zählen unter anderem auch Fusarien zu den pathogenen Schimmelpilzen, die Kartoffeln infizieren. Letztgenannte können die Kartoffelpflanze bereits auf dem Feld befallen und die Fusarium-Welke auslösen. Diese Krankheit tritt hauptsächlich in wärmeren Gebieten wie etwa in Griechenland oder Indien auf (Thanassouloupoulos u. Kitsos 1985). Demgegenüber ist in Mitteleuropa der Befall von Kartoffelknollen mit *Fusarium* spp. während der Lagerung und die daraus entstehenden Trockenfäule von Bedeutung (Boyd 1972).

2.1 Bedeutung von Kartoffeln und Kartoffelprodukten als Lebensmittel

Kartoffeln und Kartoffelprodukte spielen in der Ernährung der deutschen Bevölkerung eine bedeutende Rolle. Mit einem jährlichen pro Kopf Verbrauch von insgesamt 60,7 kg (26,9 kg Kartoffeln, 33,8 kg Veredlungsprodukte; bezogen auf die Frischmasse) zählen sie in Deutschland zu den Grundnahrungsmitteln (ZMP 2008).

Im Rahmen verschiedener nationaler Verzehrsstudien (Max Rubner-Institut 2008; Mensink et al. 2007; Vohmann et al. 2005) wurde der tägliche Verzehr an Kartoffeln und Kartoffelprodukten abhängig vom Geschlecht für zahlreiche Altersgruppen ermittelt (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 6: Tägliche Verzehrsmengen von Kartoffeln (inkl. Kartoffelerzeugnisse*) durch Säuglinge und Kleinkinder in Deutschland (Vohmann et al. 2005)

Alter [Jahre]	\bar{x} [g]	P10 [g]	P50 [g]	P90 [g]
0,5-<1	29	3	25	61
1	31	6	28	61
2	40	6	34	78
3	42	6	39	84
4	42	9	40	80

* Keine genauere Differenzierung der Kartoffelprodukte

Tabelle 7: Tägliche Verzehrsmengen von Kartoffeln/Kartoffelerzeugnissen durch Kinder ab sechs Jahre, Jugendliche und Erwachsene in Deutschland

Alter [Jahre]	Männer/Tag				Frauen/Tag			
	\bar{x} [g]	P5 [g]	P50 [g]	P95 [g]	\bar{x} [g]	P5 [g]	P50 [g]	P95 [g]
6*	54	0	45	154	45	0	39	134
7-9*	57	0	47	165	55	0	53	144
10-11*	60	0	53	161	53	0	47	131
12*	93	26	73	217	86	19	65	220
14-18**	80	10	70	175	61	7	56	137
19-24**	89	3	76	197	56	0	47	135
25-34**	73	4	64	181	62	2	51	161
35-50**	80	4	68	184	61	6	55	131
51-64**	81	13	75	174	66	9	62	134
65-80**	97	25	89	192	78	20	73	154

* Mensink et al. (2007), keine genauere Differenzierung der Kartoffelprodukte

** Max Rubner-Institut (2008), Kartoffelprodukte beinhalten: vorgegarte Kartoffeln, Pommes frites, Kartoffelpuffer, -püree, -knödel

2.2 Erreger und Symptomatik der Fusariumtrockenfäule

Bei der Fusariumtrockenfäule handelt es sich um eine Lagerfäule der Kartoffel. Sporen von *Fusarium* spp. können sich auf der Oberfläche von Knollen, in Staub oder Schmutzresten befinden. Sie dringen über Verletzungen in die Kartoffel ein. Befallene Stellen verfärben sich braun. Auf der Oberfläche bilden sich konzentrische Gewebefalten um die Infektionsstelle. Durch den Verlust von Wasser mumifiziert das Knollengewebe und es entstehen Hohlräume in denen sich Mycelpolster bilden können (Abbildung 2). In vielen Fällen kommt es zudem zu Mischinfektionen, überwiegend mit *Erwinia* sp., dem Erreger der Kartoffelnassfäule. Hier beginnt sich das Kartoffelgewebe aufzulösen und die typischen Symptome der Trockenfäule bleiben aus (Radtke et al. 2000; Boyd 1972).



Abbildung 2: Fäulesymptome einer Kartoffelknolle inokuliert mit *Fusarium* sp.

Eine Infektion kann durch eine Reihe von *Fusarium* spp. ausgelöst werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Erreger der Fusariumtrockenfäule bei Kartoffeln

<i>Fusarium</i> sp.	Infektion	Referenz
<i>Fusarium acuminatum</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium aquaeductum</i>	natürlich	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	natürlich	Schultz et al. (2007)
<i>Fusarium avenaceum</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium coeruleum</i> *	natürlich/inokuliert	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium crookwellense</i> *	natürlich/inokuliert	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium culmorum</i>	natürlich/inokuliert	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium equiseti</i>	natürlich	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium graminearum</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium heterosporum</i>	inokuliert	Lafont et al. (1983)
<i>Fusarium oxysporum</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>redolens</i> *	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel*	natürlich/inokuliert	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i>	natürlich/inokuliert	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium solani</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium subglutinans</i>	natürlich	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
<i>Fusarium trichothecioides</i>	natürlich	Seppänen (1981a)
<i>Fusarium tritinctum</i>	natürlich	Seppänen (1981a)

* Alternative Bezeichnung: *Fusarium coeruleum*: *Fusarium solani* var. *coeruleum*
Fusarium crookwellense: *Fusarium cerealis*
Fusarium oxysporum var. *redolens*: *Fusarium redolens*
Fusarium sambucinum Fuckel: *Fusarium sulphureum* Schlecht

In Mitteleuropa sind dabei überwiegend *Fusarium sambucinum* Fuckel f.6 Wollenweber und *Fusarium coeruleum* (Lib.) Sacc. von Bedeutung (Stachewicz 2000).

2.3 Bildung von Fusarientoxinen in Kartoffeln mit Trockenfäulesymptomen

Da es sich bei *Fusarium* spp. um potentielle Mykotoxinbildner handelt, wurden bereits Untersuchungen an inokulierten Kartoffelknollen durchgeführt, insbesondere mit dem bei Kartoffeln häufig auftretenden Stamm *Fusarium sambucinum*. Abhängig vom Pilzisolat, der Kartoffelsorte, Lagertemperatur und -dauer resultierten Unterschiede in der Anzahl und Konzentration der gebildeten Toxine (Schultz et al. 2007; Ellner 2002). Keinem Pilzstamm konnte ein eindeutiges Toxinmuster zugeordnet werden. In inokulierten Kartoffelknollen wurde, wie in Tabelle 9 aufgeführt, am häufigsten Diacetoxyscirpenol (DAS), Deoxynivalenol (DON), HT-2 Toxin, T-2 Toxin und 15-Monoacetoxyscirpenol (MAS) nachgewiesen.

Tabelle 9: Fusarientoxine in Kartoffeln inokuliert mit *Fusarium* spp.

Toxine	<i>Fusarium</i> sp.	Kartoffelsorte	Referenz
FX, ZON	<i>F. crookwellense</i> *	Bryza	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
DAS	<i>F. culmorum</i>	Bintje	Lafont et al. (1983)
DON, 3-AcDON, ZON	<i>F. culmorum</i>	Bryza	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
DAS, DON	<i>F. graminearum</i>	Bintje	Lafont et al. (1983)
T-2, DON	<i>F. sambucinum</i>	Bintje	Lafont et al. (1983)
HT-2, <u>DON</u> , <u>NIV</u>	<i>F. sambucinum</i>	Shepody, Russett Burbank	EL-Banna et al. (1984)
<u>DAS</u> , <u>MAS</u> , NEO, T-2, HT-2	<i>F. sambucinum</i>	Russett Burbank	Desjardins und Plattner (1989)
<u>DAS</u> , <u>MAS</u> , NEO	<i>F. sambucinum</i>	Bryza	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
DAS	<i>F. sambucinum</i>	Combi, Tomensa	Ellner (2002)
<u>DAS</u> , T-2, HT-2	<i>F. sambucinum</i>	Berber, Sieglinde	Schultz et al. (2007)
DAS	<i>F. sulphureum</i> *	Bintje	Lafont et al. (1983)
DAS, MAS	<i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i>	Bryza	Latus-Zietkiewicz et al. (1995)
HT-2, <u>DON</u> , AcDON	<i>F. solani</i> var. <i>coeruleum</i> *	Shepody, Sebago, Russett Burbank	EL-Banna et al. (1984)

* Alternative Bezeichnung: *Fusarium crookwellense*: *Fusarium cerealis*
Fusarium solani var. *coeruleum*: *Fusarium coeruleum*
Fusarium sulphureum: *Fusarium sambucinum*

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit inokuliertem Material gibt es zum Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffeln aus dem Handel nur wenige Daten. Lediglich zwei Arbeitsgruppen untersuchten natürlich infizierte Kartoffeln (Delgado et al. 2009; Lafont et al. 1983). Letztere konnten bei einer Anzahl von 50 betroffenen Knollen in 40 Proben Mykotoxine, insbesondere Diacetoxyscirpenol (0,05-140 mg/kg) in der Faulstelle bestimmen (Tabelle 10). Weiterhin konnten Acetyl-T-2 Toxin, T-2 Toxin, Neosolaniol und Deoxynivalenol in Konzentrationen bis zu 0,6 mg/kg nachgewiesen werden.

Darüber hinaus gelangen Lafont et al. (1983) zudem erstmalig der Nachweis von Mykotoxinen in dem der Faulstelle angrenzenden Kartoffelgewebe, das selbst keine Anzeichen von Fäulesymptomen aufwies. In 17 Kartoffeln konnte Diacetoxyscirpenol, in zwei Knollen Spuren von Acetyl-T-2 Toxin nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Fusarientoxine in Kartoffeln aus dem Einzelhandel (Lafont et al. 1983)

Toxine	Anzahl der Knollen [n]	Konzentrationsbereich Σ der Toxine [mg/kg]	
		in der Faulstelle	in gesundem Gewebe
DAS, T-2, NEO, DON	15	0,05 – 1	< 0,05
DAS, Ac-T-2, T-2, DON	18	> 1 – 20	0,05 - 1,3
DAS, T-2, DON	7	> 20-140	0,4 - 11

Andere Arbeiten bestätigten diese Ergebnisse. So wiesen Desjardins und Plattner (1989) in einer mit *Fusarium sambucinum* inokulierten Kartoffel sowohl in der Faulstelle (1,8 mg/kg FG) als auch in symptomfreiem Gewebe (0,1 mg/kg FG) Diacetoxyscirpenol nach. Auch geringe Mengen an Deoxynivalenol konnten (<0,04-0,54 µg/ml FG) nachgewiesen werden, während in den Faulstellen der untersuchten Knollen Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol und Nivalenol bestimmt werden konnten. Bei dieser Untersuchung gelang zudem ein Nachweis des Erregers (*Fusarium graminearum*) bis hin zu einer Entfernung von 3 cm ausgehend von der Faulstelle (Delgado et al. 2010).

Weiterführend ermittelte Ellner (2002) die Verteilung der Toxinkonzentrationen im angrenzenden Gewebe einer Faulstelle. Demnach nahm die Konzentration an Diacetoxyscirpenol ausgehend von der Faulstelle ($\bar{\mu}$ 1580 µg/kg) im augenscheinlich gesunden Gewebe zunächst stark ab. In einer Entfernung von 10-15 mm konnten aber noch immer Gehalte von durchschnittlich 100 µg/kg (FG) nachgewiesen werden (Abbildung 3).

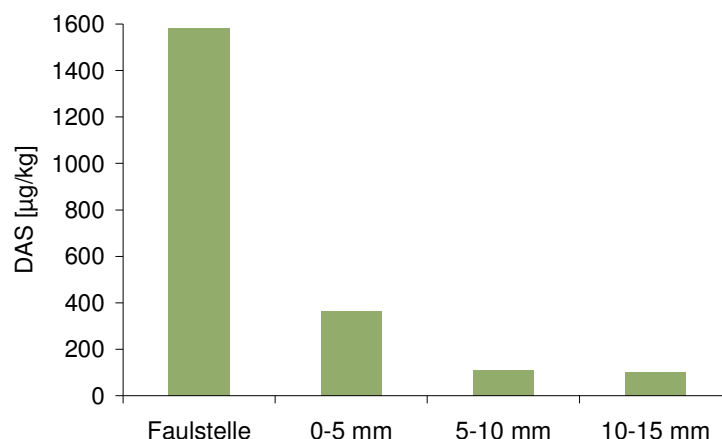


Abbildung 3: Mittlere Diacetoxyscirpenolkonzentrationen [µg/kg] in verschiedenen Gewebeabschnitten von Kartoffeln mit Fusariumtrockenfäule (Ellner 2002)

Wenige Daten gibt es bisher hinsichtlich des Vorkommens von Fusarientoxinen in verarbeiteten Kartoffeln. Lediglich 21 Kartoffelprodukte wurden in einer Studie von Schollenberger et al. 2005 untersucht, darunter Kartoffelpüree (n=7), Kartoffelknödel (n=9) und Kartoffelpuffer (n=4). In vier Proben konnten, wie in Tabelle 11 aufgeführt, Toxine gefunden werden. Dabei handelte es sich vor allem um Vertreter der Scirpentriol-Gruppe (dazu zählen TAS, DAS, 4-MAS, 15-MAS und SCRП), aber auch HT-2 Toxin und Zearalenon konnten nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Fusarientoxine in Kartoffelprodukten (n=21 getestet; n=4 positiv) aus dem Einzelhandel (Schollenberger et al. 2005)

Toxin	nachgewiesen in [n] Proben	Konzentrationsbereich [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
DAS	1	21
15-MAS	3	5-26
SCRП	2	23-35
HT-2	1	5
ZON	1	2

3 Bildung von pflanzlich konjugierten Fusarientoxinen

3.1 Detoxifikationsreaktionen in der Pflanze

Die Metabolisierung von Xenobiotika lässt sich bei Pflanzen in drei verschiedene Stufen unterteilen. Zunächst werden die Substanzen in der Regel durch oxidative Prozesse (z.B. Hydroxylierung, Sulfoxydierung, Dealkylierung) modifiziert (Cole 1994). Diese erlauben in einer zweiten Stufe die Konjugation des Analyten an Zuckermoleküle, Aminosäuren, Sulfat oder Gluthathion (Edwards u. Owen 1989; Ibrahim u. Abul-Hajj 1989; Scheel u. Sandermann 1981). Infolge der Konjugation ändern sich biologische und chemische Eigenschaften der Stoffe wie Wasserlöslichkeit, Reaktivität oder Stabilität (Jones u. Vogt 2001). Einige Substanzen, beispielsweise solche mit freien Hydroxylgruppen, können auch direkt konjugiert werden (Cole 1994).

Im Gegensatz zu Tieren werden Xenobiotika in Pflanzen in der Regel nicht durch ihre Ausscheidung eliminiert. Es wurden stattdessen Strategien zur Speicherung dieser Substanzen entwickelt (Sandermann 1987). Deshalb kann in einer dritten Stufe entweder eine sekundäre Konjugation stattfinden (z.B. an Malonat, Glucose) oder es kommt zur Inkorporation in Bestandteile der Zellmatrix (durch Bindung an Lignine, Pektine, Hemizellulose, Proteine, Stärke, Zellulose) und damit zu einer Immobilisierung der Substanzen (Suga u. Hirata 1990; Langebartels u. Harms 1985; Schmitt et al. 1985). Die gebildeten Konjugate können aus dem stoffwechselaktiven Zytoplasma in die Vakuole überführt werden, welche als Speicher für konjugierte Pflanzeninhaltsstoffe und Xenobiotika gilt (Bartholomew et al. 2002).

Ferner ist die Sekretion von Konjugaten aus der Pflanzenzelle in Kulturmedien bzw. den Apoplast beobachtet worden (Lao et al. 2003; Sandermann 1994).

3.2 Konjugatbildung bei Mykotoxinen

Zahlreiche Fusarientoxine besitzen freie Hydroxylgruppen und können direkt konjugiert werden. In erster Linie wurden Konjugationen an Zuckermoleküle beobachtet, aber auch an Sulfat- und Malonylgruppen (Tabelle 12). Aufgrund veränderter Eigenschaften, wie der anderen Molekülmasse, des hydrophileren Charakters oder einer Inkorporation in Zellmatrixbestandteile, ist der analytische Nachweis der Konjugate bei routinemäßig durchgeführten Untersuchungen oft nicht möglich (Engelhardt 1991). Lediglich Deoxynivalenol-3- β -D-glucosid wird inzwischen teilweise mit Hilfe von MS/MS Systemen mitbestimmt, da hierfür ein zertifizierter Kalibrierstandard verfügbar ist (Desmarchelier u. Seefelder 2011).

Da die Bildung der Glucoside von Deoxynivalenol und Zearalenon ohne vorherige Modifikation des Ausgangsmoleküls stattfinden, können diese wieder leicht hydrolysiert werden und infolgedessen als wirksames Toxin vorliegen. Dies wurde bereits für das Zearalenon-Glucosid nachgewiesen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die Freisetzung von konjugiertem Zearalenon im Darm des Schweines beobachtet werden (Gareis et al. 1990; Kollarczik 1990).

Da die Fusarientoxinkonjugate auch in Lebensmitteln wie Weizen, Mais und Bier nachgewiesen wurden (Tabelle 12), könnte die tägliche Aufnahme des Menschen an Fusarientoxinen bisher unterschätzt worden sein.

Tabelle 12: Nachweis von konjugierten Fusarientoxinen

Toxin	Toxinkonjugat	Quelle/Konjugat- bildung durch:	Referenz
Monoacetoxyscirpenol	MAS-4- α -D-glucosid	Maismehl ^o	Gorst-Allman et al. (1985)
Deoxynivalenol	DON-3- β -D-glucosid	Bier Mais* Weizen* Zellkulturen	Lancova et al. (2008) Kostelanska et al. (2009) Berthiller et al. (2005b) Berthiller et al. (2005b) Schuster (1988) Sewald et al. (1992)
Zearalenon	ZON-4- β -D-glucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Mucor bainieri</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Thamnidium elegans</i> Weizen Zellkulturen	Berthiller et al. (2006) El-Sharkawy u. Abul-Hajj (1987) Kamimura (1986) El-Sharkawy und Abul-Hajj (1987) Schneweis et al. (2002) Zill et al. (1990)
	ZON-2,4- β -D-diglucosid (bzw. ZON-dihexose ⁺)	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Thamnidium elegans</i>	Berthiller et al. (2006) El-Sharkawy (1989) El-Sharkawy (1989)
	ZON-hexose-pentose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	ZON-malonylglucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	ZON-4-sulfat	<i>Aspergillus niger</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> Autoklavierter Reis ^o <i>Rhizopus arrhizus</i>	Jard et al. (2010) Berthiller et al. (2006) Plasencia u. Mirocha (1991) El-Sharkawy et al. (1991)
α-Zearalenol	α -ZOL-glucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkulturen	Berthiller et al. (2006) Zill et al. (1990)
	α -ZOL-dihexose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	α -ZOL-hexose-pentose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	α -ZOL-malonylglucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
β-Zearalenol	β -ZOL-glucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkulturen	Berthiller et al. (2006) Zill et al. (1990)
	β -ZOL-dihexose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	β -ZOL-trihexose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	β -ZOL-hexose-pentose ⁺	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)
	β -ZOL-malonylglucosid	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berthiller et al. (2006)

* Mit *Fusarium* spp. inokulierte und natürlich infizierte Proben^o Mit *Fusarium* spp. inokulierte Proben⁺ Bei der Hexose handelt es sich laut den Autoren wahrscheinlich um Glucose, bei der Pentose um Xylose

3.3 Pflanzenzellkulturen als Modell für die Bildung von metabolisierten Fusarientoxinen

Pflanzenzellkulturen werden als Modell eingesetzt, um unter standardisierten Bedingungen die Reaktionen von Pflanzen auf Fremdstoffe zu untersuchen bzw. um bestimmte Pflanzenmetaboliten zu produzieren (Kieran et al. 1997; Sandermann et al. 1984). Durch ihre Totipotenz sind die Einzelzellen theoretisch in der Lage, sämtliche Stoffwechselfvorgänge der Pflanze abzurufen (Ramachandra Rao u. Ravishankar 2002). Aufgrund genetischer Instabilität, vor allem in älteren Pflanzenzellkulturen, konnte jedoch ein allmählicher Verlust gewisser Fähigkeiten beobachtet werden, beispielsweise bestimmte Metaboliten bilden zu können (Cole 1994). Da jedoch die Aufnahme und Metabolisierung von Fremdstoffen vor allem in Suspensionskulturen sehr hoch ist, können hier bislang unbekannte Metaboliten leichter entdeckt werden (Scheel u. Sandermann 1981).

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen von Mykotoxinen in Pflanzenzellkulturen durchgeführt. So zeigten beispielsweise Untersuchungen mit Ochratoxin A, dass Zellkulturen verschiedener Pflanzensorten unterschiedlich auf das zugesetzte Toxin reagierten. Für die nahezu vollständige Umsetzung von Ochratoxin A (2,5 µg Ochratoxin A/ml Zellsuspension) benötigten die Zellkulturen unterschiedliche Zeiträume (zwischen 1-13 Tagen). In allen Zellsorten wurden überwiegend die gleichen Metaboliten gefunden, doch variierte ihr jeweiliger Anteil erheblich (Ruhland et al. 1996).

Weiterhin wurden Untersuchungen zum Abbau von Zearalenon in Maiszellen durchgeführt. Dabei wurde die Metabolisierung von ¹⁴C-markiertem Zearalenon über 12 Tage hinweg verfolgt. Während des ersten Tages kam es in den Zellen zu einem starken Abfall der Zearalenonkonzentration und einem Anstieg an α-Zearalenol, β-Zearalenol, sowie den Glucosiden der drei Substanzen. Zum Ende der Untersuchung konnten diese Substanzen allerdings nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden. Hingegen waren 54 % des eingesetzten Zearalenons an Lignin, Hemizellulose, Stärke, Pektin, Proteine und Zellulose gebunden (Zill et al. 1990).

C Material und Methoden

1 Probenmaterial

1.1 Toxinscreening

Als Ausgangsmaterial für die Vorversuche zur Methodenentwicklung, -validierung und zur Herstellung von Matrixstandards wurden ausgewählte, gesunde Kartoffelknollen aus dem Einzelhandel verwendet.

Für das Toxinscreening wurden Kartoffeln und Kartoffelprodukte (n=206) aus dem Einzelhandel herangezogen.

1.2 Inokulationsversuche

Für die Durchführung von Tests zum Diffusionsverhalten von Fusarientoxinen in Kartoffelgewebe wurde die Kartoffelsorte 'Lady Christl' gewählt und mit unterschiedlichen Pilzstämmen inokuliert:

- Fusarium coeruleum* (DSM 62178; Kartoffelknolle)
- Fusarium culmorum* (No. 3; institutseigene Stammsammlung; Kartoffel)
- Fusarium sambucinum* (No. 29; institutseigene Stammsammlung; unbekannt)
- Fusarium sambucinum* (DSM 62397; Kartoffelknolle)
- Fusarium sambucinum* var. *coeruleum* (DSM 62186; Boden)
- Fusarium sulphureum* (No. 33; institutseigene Stammsammlung; Kartoffel)
- Fusarium sulphureum* (No. 34; institutseigene Stammsammlung; Kartoffel)
- Fusarium* sp. (No. K30; institutseigene Stammsammlung; Kartoffelknolle)

1.3 Metabolisierung von Typ A Trichothecenen in Kartoffelzellkulturen

Um die Metabolisierung von ausgewählten Typ A Trichothecenen in Kartoffelzellkulturen zu verfolgen, wurden Zelllinien zweier verschiedener Kartoffelsorten herangezogen:

- Solanum tuberosum* L. cv. 'Agria' (Protokoll nach Lindl u. Gstraunthaler (2008))
- Solanum tuberosum* L. cv. 'Desiré' (DSM PC-1182)

Es wurden sowohl Untersuchungen an Kalluskulturen (Filterkulturen 'Agria', 'Desiré'), als auch an Suspensionskulturen ('Agria') durchgeführt. Sämtliche Zellkulturen wurden im abgedunkelten Raum bei einer Raumtemperatur von 24-27°C aufbewahrt.

Für die Initiation einer Suspensionskultur wurde Kallusgewebe in das entsprechende Kulturmedium (1/10) (w/v) überführt und die Kultur anschließend kontinuierlich geschwenkt. Das Kulturmedium wurde turnusmäßig alle 14 Tage erneuert.

2 Gebrauchsmaterial

Büchner-Trichter	Haldenwanger	127C-1
Erlenmeyerkolben (100 ml) mit Kapsenbergkappen	Schott	2149124 2901011
HPLC-Säulen:		
Atlantis T3 (C ₁₈ , 150 × 2,10 mm, 3 µm)	Waters	186003719
Gemini (C ₁₈ , 150 × 2,00 mm, 5 µm)	Phenomenex	00F-4435-B0
Luna (C ₈ , 150 × 2,00 mm, 3 µm)	Phenomenex	00F-4248-B0
Onyx Monolithic (C ₁₈ , (2 ×) 100 × 3,00 mm, 2 µm)	Phenomenex	CHO-8158
Sunfire (C ₁₈ , 150 × 2,10 mm, 3,5 µm)	Waters	186002535
Sunfire (C ₁₈ , 150 × 10 mm, 5 µm), semi-präparativ	Waters	186002563
Synergi (Polar-RP, 150 × 2,00 mm, 4 µm)	Phenomenex	00F-4336-B0
Synergi (Hydro-RP, 250 × 2,00 mm, 4 µm)	Phenomenex	00G-4375-B0
Korkbohrer (5 mm)	VWR	217-9690
Kulturkolben mit Metallkappe (Erlenmeyerform mit Weithals, 1000 ml)	Schott	2177154 2901324
Schieblehre (DIN 862)		
Saugflasche (vakuumfest, 1000 ml)	Schott	2120154
Zentrifugengläser 15 ml	Brand	114115
Zentrifugengläser 50 ml	Schott	21 601 17

3 Technisches Gerät

Horizontalschüttler	GFL 3005; Gesellschaft für Labortechnik
HPLC	PerkinElmer Series 200 mit automatischem Probenaufnahmengerät, Degasser und Säulenofen
Kühlfalle	Christ CT 04-50
Laborschüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries G-560 E; Bender & Hohbein
Lyophilisator	Christ Alpha I-5
Membran-Vakuumpumpe	Typ N 022 AT.18; KNF Neuberger
Mikrowellen-Aufschlussgerät	MARSX Version 045062; CEM Corporation
pH-Meter	pH 535 MultiCal; WTW
Plate Reader (Photometer)	MRX revelation; Dynex Technologies
Stickstoffevaporator	Vapotherm mobil FN 4578; Barkey
Thermo-Hygrograph-Trommelschreiber	Serie 252; Wilh. Lambrecht GmbH

Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	API 3200 mit Turbo-V-Ionisierungsquelle; AB SCIEX
Ultraschallgerät	RK 255 H; Bandelin Sonorex
Ultra-Turrax	T 25; IKA-Werke
Vakuumpzentrifuge	RVC 2-50; Christ
Waage	R200D; Sartorius XB 620C; Precisa
Wasserbad	GFL 1002; Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Hermle Z 383; Hermle Labortechnik
Zerkleinerer	La Moulinette; Tefal

4 Verbrauchsmaterial

96 Loch-Mikrotiterplatte	Greiner	655.160
Cellulosefilterpapier 1602 N; 580 x 580 mm	Munktell	2.342.580580
Crimp-Cap with Septa 11 mm	BGB Analytik	11031201
Crimp-Top Vial 1,1 ml	BGB Analytik	110411
Einwegspritze 2 ml	Becton Dickinson	300928
Festphasenextraktionssäulen:		
BondElut Mycotoxin	Varian	12165001B
MycoSep #226	RomerLab	1004025
MycoSep #227	RomerLab	1004005
Millex-HV Spritzenfilter 4 mm; 0,45 µm	Millipore	SLHV R04 NL
Millex-HV Spritzenfilter 13 mm; 0,45 µm	Millipore	SLHV 013 NL
PP-Zentrifugenröhrchen 12 ml	Greiner	163.270
PP-Zentrifugenröhrchen 50 ml	Geiner	227.261
PTFE-Spritzenfilter 25 mm; 0,20 µm	Macherey-Nagel	729007
Rundfilter 595, Ø 55 mm	Schleicher & Schuell	10311607

4.1 Standardsubstanzen

3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON, Toxinstandard)	Sigma	A 6166
15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON, Toxinstandard)	Sigma	A 1556
3,15-Diacetylverrucarol (DacVOL, Toxinstandard)	Sigma	D 6154
Deoxynivalenol (DON, Toxinstandard)	Sigma	D 0156
Deoxynivalenol-3-glucosid (DON-G, Toxinmetabolit-Standard)	LGC	B-MYC0335
¹³ C ₁₅ -Deoxynivalenol (¹³ C-DON, interner Kalibrierstandard)	Fluka	34128
4,15-Diacetoxyscirpenol (DAS, Toxinstandard)	Sigma	D 0761
Fusarenon X (FX, Toxinstandard)	Fluka	34130

HT-2 Toxin (Toxinstandard)	Sigma	T 4138
¹³ C ₂₂ -HT-2 Toxin (interner Kalibrierstandard)	Biopure	3009146
15-Monoacetoxyscirpenol (15-MAS, Toxinstandard)	Sigma	A 8905
Neosolaniol (NEO, Toxinstandard)	Sigma	N 1761
Nivalenol (NIV, Toxinstandard)	Sigma	N 7769
T-2 Toxin (Toxinstandard)	Sigma	T 4887
¹³ C ₂₄ -T-2 Toxin (interner Kalibrierstandard)	Biopure	3009109
T-2 Tetraol (Toxinstandard)	Sigma	T 3888
T-2 Triol (Toxinstandard)	Sigma	T 4013
Verrucarol (VOL, Toxinstandard)	Sigma	V 1628
Zearalanon (ZAN, interner Kalibrierstandard)	Sigma	Z 0167
α-Zearalenol (α-ZOL, Toxinmetabolit-Standard)	Sigma	Z 0166
β-Zearalenol (β-ZOL, Toxinmetabolit-Standard)	Sigma	Z 2000
Zearalenon (ZON, Toxinstandard)	Sigma	Z 2125

Fusarium sambucinum Fuckel f. 6 Wollenweber (DSM 62397) wurde für die Gewinnung der Standardsubstanzen 4-Monoacetoxyscirpenol (4-MAS) und Scirpentriol (SCRP) kultiviert.

Die internen Kalibrierstandards ¹³C₄-Diacetoxyscirpenol und ¹³C₂-15-Monoacetoxyscirpenol wurden freundlicherweise von Prof. Rychlik, Bioanalytik Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der TU München, zur Verfügung gestellt.

Zearalenon-Glucosid (ZON-G) wurde im Rahmen früherer Studien mit Pflanzenzellkulturen am Lehrstuhl für Tierhygiene (TUM) hergestellt. Die Identität wurde durch die Spaltung mit β-Glucosidase sowie Massenspektren bestätigt.

4.2 Chemikalien

Aceton	Merck	1.01849
Acetonitril (HPLC-Grade)	J.T. Baker	B 9017.2504
Aktivkohle	Merck	1.02183
α-Glucosidase (EC 3.2.1.20)	Sigma	G 0660
Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral	Merck	1.01077
Ammoniumformiat (MS-Grade)	Fluka	70221
Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3)	Sigma	A 7420
β-Glucosidase (EC 3.2.1.21)	Fluka	49290
Celite Typ 545	Merck	1.02693
Ethanol	Merck	1.00983
Essigsäureanhydrid	Sigma	A 6404

Hexan	Merck	1.04368
Methanol (HPLC-Grade)	J.T. Baker	B 8402.2504
Natronlauge	Merck	1.06498
Pyridin	Merck	1.09728
Salzsäure	Sigma	30723
Stickstoff 99,8 %	Westfahlengas	
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma	T 8877

4.3 Kulturmedien und Pufferlösungen

Kulturmedien:

Tabelle 13: Zusammensetzung der Kulturmedien (1 l) für Kartoffelzellkulturen

Chemikalien			Agria	Desiré
Gamborgs B5 Basal Medium	Sigma	G 5893	-	3,2 g
MS Medium (with minimal organics)	Sigma	M 6899	4,4 g	-
Caseinhydrolysat	Oxoid	LP 0041	-	2,0 g
Saccharose	Merck	1.07651	30 g	20 g
Phytohormone				
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Sigma	D 7299	-	2,0 mg
Indol-3-Essigsäure	Sigma	I 2886	5,0 mg	0,5 mg
Kinetin	Sigma	K 0753	2,0 mg	0,2 mg
1-Naphthylessigsäure	Sigma	N 0640	-	0,5 mg
Reinstwasser			1,0 l	1,0 l
pH-Wert (vor dem Autoklavieren)			5,8	6,2

Tabelle 14: Sabouraud-Agar (1 l) zur Kultivierung von *Fusarium* spp.

Chemikalien			
Sabouraud-Agar Basis	Merck	1.07315	47 g
Agar-Agar	Oxoid	L 11	2,0 g
Antibiotika			
Penicillin G	Sigma	PENNA	0,59 g
Streptomycin-Sulfat	Sigma	S 6501	0,5 g
Reinstwasser			1,0 l

Pufferlösungen:

0,05 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 6,8) zur Herstellung der TTC-Lösung:

Teile A: Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 Merck 1.06586): 7,089 g/l

Teile B: Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 Merck 1.04873): 6,804 g/l

Sörensen-Puffer (pH 6,8 und pH 5,0): zum Lösen der α - und β -Glucosidase:

Teile A: Citronensäuremonohydrat 0,1 M ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ Sigma C 1909): 21,014 g/l

Teile B: Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M (Na_2HPO_4 Merck 1.06586): 28,392 g/l

5 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5) zum Lösen der Amyloglucosidase:

Teile A: Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$ Merck 1.06268): 410,15 g/l

Teile B: Salzsäure (1 M HCL Merck 1.09057)

5 Vorversuche

5.1 Entwicklung einer Analysenmethode mittels HPLC-MS/MS

Zum sensitiven und selektiven Nachweis von Typ A Trichothecenen, Typ B Trichothecenen sowie Zearalenon in Kartoffeln, Kartoffelprodukten und Pflanzenzellkulturen wurde zunächst eine geeignete Analysenmethode entwickelt und anschließend optimiert.

5.1.1 Chromatographische Auftrennung der Toxine mittels HPLC

Die Auftrennung der Analyten erfolgte chromatographisch über die HPLC. Um eine möglichst gute Auftrennung zu erreichen, wurden zwei verschiedene Gradientenprogramme für Typ A (Tabelle 21) und Typ B Trichothecene/Zearalenon (Tabelle 22) entwickelt. Die Gradientenprogramme wurden anschließend mit verschiedenen HPLC-Säulen (Atlantis, Gemini, Luna, Onyx, Sunfire, Synergi) getestet.

5.1.2 Detektion der Toxine mittels MS/MS

Zunächst wurden Kalibrierstandards ($c = 500 \text{ ng/ml}$) der jeweiligen Toxine direkt über eine Spritzenpumpe in die MS/MS injiziert, um so die beste Ionisierungsweise der Toxine zu ermitteln. In der Ionenquelle werden die Moleküle in einem elektrischen Feld entweder positiv (ESI^+) oder negativ (ESI^-) ionisiert, wobei Quasimolekülionen ($[\text{M}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{M}-\text{H}]^-$) entstehen. Zusätzlich können sich nach Zugabe von Ammoniumformiat je nach Ionisierung Ammonium- oder Formiat-Addukte ($[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ bzw. $[\text{M} - \text{HCOO}]^-$) bilden.

In einem nächsten Schritt kommt es in der Kollisionskammer zur Fragmentierung der Ionen. Für eine hinreichend genaue Identifizierung der Toxine wurden für jeden Analyten zwei Fragmente ausgewählt. Anschließend wurden für alle Quasimolekül-/Fragmentationenübergänge (MRM-Übergänge) die spezifischen MS/MS-Parameter (DP, EP, CE, CEP, CXP, CUR, IS, TEM, GS1, GS2, CAD) optimiert (Tabelle A 1 und Tabelle A 2).

5.2 Vorversuche zum Toxinscreening bei Kartoffeln und Kartoffelprodukten aus dem Einzelhandel

5.2.1 Extraktionsversuche

Für die Extraktionsvorversuche musste zunächst toxfreies Kartoffelpulver hergestellt werden. Dazu wurden gesunde, rohe Kartoffeln mit einem Zerkleinerer homogenisiert und anschließend lyophilisiert. 10 g des erhaltenen Kartoffelpulvers wurde jeweils artifiziell mit Fusarientoxinen ($c = 50 \text{ } \mu\text{g/kg}$ Trockengewicht) kontaminiert. Als Extraktionsmittel wurden zwei verschiedene Acetonitril/Reinstwasser-Gemische (21/4) (v/v) und (4/1) (v/v) getestet.

5.2.2 Aufreinigung

Durch gelöste Matrixkomponenten aus der Kartoffel kann es zu Signalstörungen während der HPLC-MS/MS Analyse kommen. Aus diesem Grund war eine Reinigung der Extrakte erforderlich. Hierzu wurden Festphasenextraktionssäulen von zwei verschiedenen Herstellern getestet: die MycoSep-Kartuschen #226 und #227 (RomerLab) sowie BondElut Mycotoxin (Varian). Beide Systeme sollten einen Großteil der Matrixkomponenten aus den Proben (wie Proteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren) im Säulenmaterial binden, während die Toxine passieren können. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan eine weitere Verbesserung der Aufreinigung darstellt.

5.3 Vorversuche zur Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen

Da für mögliche Metaboliten von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin keine Standardsubstanzen vorhanden waren, wurde für die Methodenentwicklung Zellmaterial aus dem Versuch zur Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen (Abschnitt C 7.1) homogenisiert (Desiré: Konzentrationsstufen 1-5 µg Toxin/ml Kulturmedium). Die Extraktions- und Reinigungsversuche aus diesem Zellmaterial erfolgten jeweils im Dreifachansatz.

5.3.1 Extraktionsversuche

Für die Extraktion der Pflanzenzellen wurden 0,5 g mit 4 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) versetzt. Der Aufschluss der Pflanzenzellen erfolgte entweder durch eine mikrowellenunterstützte Extraktion (MASE) (Abschnitt C 7.5) oder mit Hilfe einer zehnmütigen Extraktion im Ultraschallbad. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4696 g, 10 min) und 3 ml des Überstands abgenommen.

5.3.2 Aufreinigung

Die verschiedenen Rohextrakte der Kartoffelzellen wurden durch eine zweimalige Flüssig-Flüssig-Trennung mit 1 ml Hexan aufgereinigt. Ein Ansatz der MASE extrahierten Proben wurde zusätzlich mit 96 mg Celite für 30 min auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Anschließend wurden diese Proben bei 4696 g für 10 min zentrifugiert und 1,5 ml des Überstands abgenommen. Sämtliche aufgereinigten Proben wurden schließlich in der Vakuumzentrifuge bei 40°C zur Trockne evaporiert und in 300 µl (Hexanaufreinigung) bzw. 150 µl (Celiteaufreinigung) Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert. Die Extrakte wurden über Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm für Hexan, 4 mm; 0,45 µm für Celite) in HPLC-Vials überführt.

5.3.3 HPLC-MS/MS Analyse

Da für möglicherweise auftretende Metaboliten keine Standardsubstanzen vorhanden waren, wurden für die MS/MS Analyse plausible MRM-Übergänge für die Konjugation an Glucose, Malonat und Glutathion postuliert (Tabelle A 3).

6 Toxinstandardgewinnung

Da einige der zur analytischen Bestimmung vorgesehenen Substanzen nicht käuflich zu erwerben sind, wurden diese Standards (Scirpentriol (MW=282,1), 4-Monoacetoxyscirpenol (MW=324,2), Triacetoxyscirpenol (MW=408,2) und Acetyl-T-2 Toxin (MW=508,2)) selbst produziert.

6.1 Standardgewinnung mittels *Fusarium sambucinum*

Die Mykotoxinstandards Scirpentriol und 4-Monoacetoxyscirpenol wurden mit Hilfe eines *Fusarium sambucinum* Stammes (DSM 62397) hergestellt.

Dafür wurden 50 g Reis autoklaviert und mit 5 ml Pilzsuspension inokuliert. Nach einer Inkubationsdauer von 28 Tagen im abgedunkelten Raum bei ca. 24 °C erfolgte die Extraktion. Dazu wurde die Reis-Pilz-Mischung mit 200 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) versetzt und mit dem Ultra-Turrax zunächst für drei Minuten bei 10000 min⁻¹, danach für zwei Minuten bei 13500 min⁻¹ extrahiert und zuletzt zentrifugiert (15 min; 4696 g). Die Reinigung des Extraktes erfolgte in Anlehnung an Schuster (1988) über eine 200 ml Glassäule gepackt mit 15 g Säulenmaterial bestehend aus Aktivkohle (33,3 %), Aluminiumoxid (46,7 %) und Celite (20 %). Zunächst wurde das Säulenmaterial mit 100 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) gereinigt, verdichtet und anschließend mit Hilfe einer Vakuumpumpe getrocknet. Nach dem Probenauftrag wurde eine Flussrate von ca. 3 ml/min eingestellt. Zuletzt wurden nochmals 100 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) auf die Säule gegeben. Die Eluate der zweiten und dritten Fraktion wurden vereint und in der Vakuumzentrifuge bei 50 °C vollständig evaporiert. Der Trockenrückstand wurde in 1 ml Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) aufgenommen, über einen Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm) in HPLC-Vials überführt und bis zur Trennung mittels HPLC bei -20 °C aufbewahrt.

Die HPLC-MS/MS Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Fließmittel A:	Reinstwasser	
Fließmittel B:	Methanol	
Trennsäule:	Sunfire (semi-präparativ; C ₁₈ , 150 × 10 mm, 5 µm), Waters	
Säulentemperatur:	40 °C	
Injektionsvolumen:	900 µl	
Ionisierung:	ESI ⁺ ; MRM-Übergänge	
	4-MAS [324+NH ₄] ⁺	<u>342,3/216,9</u> ; 342,3/228,9
	SCRP [282+NH ₄] ⁺	<u>300,5/107,0</u> ; 300,5/247,1
Retentionszeit:	4-MAS	35,6 min
	SCRP	28,8 min

Das Gradientenprogramm zur Gewinnung von Standardsubstanzen ist Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Gradientenprogramm zur Standardgewinnung

Dauer [min]	Gradienten- profil	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	isokratisch	85	15	1
2	isokratisch	85	15	1
35	linear	35	65	1
80	isokratisch	35	65	1

Vor Beginn der präparativen Trennung wurden 10 µl der Extrakte injiziert, um mittels HPLC-MS/MS Analyse die Retentionszeiten der Toxine zu überprüfen.

Zur Gewinnung der Standards wurden, nach einer chromatographischen Trennung mit einer semi-präparativen Säule (ID 10 mm, Sunfire), die jeweiligen Analyten gesondert nach ihrer spezifischen Retentionszeit aufgefangen. Die Fraktionen wurden in der Vakuumzentrifuge bei 50 °C vollständig eingeeengt und anschließend in Acetonitril gelöst. Zur weiteren Identifizierung der Substanzen wurde eine MS/MS-Fragmentierung (Product-Ion-Scan) durchgeführt.

6.2 Standardgewinnung durch chemische Modifikation

Die Herstellung von Acetyl-T-2 Toxin (Ac-T-2) und 3,4,15-Triacetoxyscirpenol (TAS) erfolgte durch die Acetylierung von T-2 Toxin bzw. Diacetoxyscirpenol.

Hierfür wurden 2,4 mg T-2 Toxin mit jeweils 25 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter N₂ vollständig evaporiert (Ohta et al. 1978). Auf die gleiche Weise wurde 1,1 mg Diacetoxyscirpenol mit jeweils 5 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid umgewandelt. Zur Reinigung und Trennung von eventuell nicht umgewandeltem Toxin wurde der Trockenrückstand in 1 ml Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) gelöst und wie in Kapitel C 6.1 beschrieben chromatographisch getrennt.

Ionisierung	ESI ⁺ ; MRM-Übergänge	
	TAS [408+NH ₄] ⁺	<u>426,4/229,1</u> ; 426,4/247,2
	Ac-T-2 [508+NH ₄] ⁺	<u>526,4/287,1</u> ; 526,4/245,1
Retentionszeit	TAS	50,5 min
	Ac-T-2	75,2 min

7 Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen

7.1 Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen

Um Versuche an Pflanzenzellen durchführen zu können, wurden zunächst die dafür optimal geeigneten Toxinkonzentrationen in Filter- und Suspensionskulturen ermittelt.

7.1.1 Filterkulturen

Für die Anlage von Filterkulturen wurden 9 ml Kulturmedium in ein 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer Filterbrücke aus Cellulosepapier (80 x 80 mm) bedeckt. Anschließend wurde nach dem Autoklavieren (121 °C, 15 min) des Röhrchens Kallusmaterial (‘Agria’, ‘Desiré’) mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm auf die Filterbrücke gegeben. Nach einer Anwuchsphase von zehn Tagen wurden die Pflanzenzellen im Dreifachansatz mit verschiedenen Konzentrationen an T-2 Toxin bzw. 4,15-Diacetoxyscirpenol versetzt. Dazu wurden die Toxine in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums gelöst, sterilfiltriert und in die Röhrchen gegeben. Die Konzentrationen betragen im einzelnen 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml Kulturmedium.

Nach 12 Tagen Inkubation wurde die Vitalität der Pflanzenzellen (Abschnitt C 7.1.3) getestet, sowie die Extrakte der Zellen (Abschnitt C 7.5) mittels HPLC-MS/MS auf mögliche Toxinkonjugate untersucht.

7.1.2 Suspensionskulturen

Zusätzlich zu den Filterkulturen wurden jeweils 20 ml Suspensionskultur der Zelllinie ‘Agria’ (entspricht ca. 2 g Zellmaterial) in Kapsenbergkölbchen überführt und für 48 h im abgedunkelten Raum geschwenkt. Anschließend erfolgte die Zugabe der einzelnen Toxine, jeweils gelöst in 100 µl Aceton (Dreifachansatz). Parallel dazu wurden ein Leerwert und ein weiterer Ansatz mit 100 µl Aceton als Wachstumskontrolle angesetzt. Die Konzentrationen von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol betragen analog zu den Filterkulturen 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml Kulturmedium. Die Zellen der Suspensionskulturen wurden wie die Filterkulturen in Abschnitt C 7.1.1 nach 12 Tagen auf ihre Vitalität getestet, sowie mittels HPLC-MS/MS auf Mykotoxinkonjugate untersucht.

7.1.3 „Vitalität“ der Pflanzenzellen

Um die „Vitalität“ der dotierten Kartoffelzellen zu überprüfen, wurde sowohl bei Filter- als auch bei Suspensionskulturen ein Vitalitätstest in Anlehnung an Towill und Mazur (1975) durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze einer Konzentrationsstufe gepoolt und davon 150 mg (Dreifachansatz) mit jeweils 750 µl TTC-Lösung (2 %) und Kulturmedium versetzt. Nach einer Inkubationsphase von 18-22 h (Raumtemperatur) im abgedunkelten Raum wurden die Kartoffelzellen zentrifugiert (3005 g, 10 min) und der

Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Wasser gewaschen, mit 5 ml Ethanol versetzt und für 15 Minuten im Wasserbad bei 60 °C extrahiert. Nach einer Abkühlungsphase wurden die Proben geschüttelt, bis sich der gebildete Farbstoff vollständig aus den Zellen gelöst hatte und anschließend erneut zentrifugiert (3005 g, 10 min). Zuletzt wurden 200 µl des Überstands in eine Kavität einer 96 Loch-Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 490 nm photometrisch bestimmt. Die optische Dichte [OD] der verschiedenen Ansätze wird als relative Spaltungsaktivität bezeichnet und zum Kontrollansatz (Leerwert; 100 %) ins Verhältnis gesetzt.

Als weiterer Hinweis für die Vitalität der Kartoffelzellen konnte in den Suspensionskulturen der Gewichtszuwachs der Zellen über 12 Tage hinweg in Abhängigkeit zur Toxinkonzentration bestimmt werden.

7.2 Gewinnung von Typ A Trichothecenkonjugat Standardsubstanzen

Zur Gewinnung von Typ A Trichothecenkonjugat Standardsubstanzen wurden zunächst Filterkulturen wie in Abschnitt 7.1.1 beschrieben mit 5 µg 4,15-Diacetoxyscirpenol bzw. T-2 Toxin pro ml Kulturmedium inkubiert und nach 12 Tagen extrahiert. Dazu wurden dem Kartoffelkallus pro 0,5 g Zellmaterial 4 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) hinzugefügt und mittels MASE extrahiert (vergleiche Abschnitt C 7.5). Die Extrakte eines Toxins wurden in Einheiten von 30 ml aliquotiert und mit jeweils 10 ml Hexan eine zweimalige Flüssig-Flüssigtrennung durchgeführt. Die gereinigten Extrakte wurden in der Vakuumzentrifuge bei einer Temperatur von 40 °C vollständig evaporiert und anschließend in 3 ml Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert. Nach der Passage über einen Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm) wurde der Extrakt schließlich in jeweils zwei HPLC-Vials überführt. Die Gewinnung dieser Standardsubstanzen erfolgte chromatographisch über eine Auftrennung mittels HPLC.

Dazu wurden zunächst die genauen Retentionszeiten der einzelnen Substanzen ermittelt. Die Gradientenprogramme zur Gewinnung von Metaboliten der Scirpentriol-Gruppe und von HT-2 Toxin sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführt.

Fließmittel A:	Reinstwasser		
Fließmittel B:	Methanol		
Trennsäule:	Sunfire (semi-präparativ; C ₁₈ , 150 × 10 mm, 5 µm), Waters		
Säulentemperatur:	40 °C		
Injektionsvolumen:	900 µl		
Ionisierung:	ESI ⁺ ; MRM-Übergänge		
<u>MAS-Konjugat:</u>	15-MAS-G [M+NH ₄] ⁺	504,0/325,3; 106,9; 228,9; 265,0; 247,0; 307,0	
<u>SCRP-Konjugate:</u>	SCRP-G [M+NH ₄] ⁺	462,0/283,5; 107,0; 247,1; 229,0; 265,0; 427,0; 415,0	
	SCRP-DG [M+NH ₄] ⁺	624,0/283,5; 107,0; 247,1; 229,0; 265,0	

<u>HT-2-Konjugate:</u>	HT-2-G	[M+NH ₄] ⁺	604,0/425,0; 365,0; 323,0; 305,0; 263,0; 245,0; 227,0; 215,0
	HT-2-DG	[M+NH ₄] ⁺	766,0/425,0; 323,0; 305,0; 263,0; 245,0; 215,0
Retentionszeit:	MAS-G		25,0 min
	SCRP-G		15,0 min
	SCRP-DG		12,1 min
	HT-2-G		31,2 min
	HT-2-DG		28,9 min

Tabelle 16: Gradientenprogramm zur Gewinnung von Metaboliten der Scirpentriol-Gruppe

Dauer [min]	Gradientenprofil	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	isokratisch	65	35	1
10	isokratisch	65	35	1
30	linear	35	65	1
40	isokratisch	0	100	1

Tabelle 17: Gradientenprogramm zur Gewinnung von HT-2 Toxinmetaboliten

Dauer [min]	Gradientenprofil	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	isokratisch	70	30	1
10	isokratisch	70	30	1
40	linear	0	100	1
50	isokratisch	0	100	1

Danach wurden die einzelnen Substanzen wie in Abschnitt C 6.1 beschrieben nach ihren Retentionszeiten gesondert aufgefangen, bei 40 °C vollständig evaporiert und bis zur Analyse bei -20 °C in Acetonitril gelagert.

7.3 Identifizierung der Typ A Trichothecenkonjugate

7.3.1 Fragmentierungsmuster

Zur Identifizierung der Typ A Trichothecenkonjugate wurden zunächst die selbst gewonnenen Standardsubstanzen sowie ihre Aglucone während der MS/MS-Analyse fragmentiert (Product-Ion-Scan). Dafür wurden alle Substanzen in Methanol + 5 mM Ammoniumformiat/Reinstwasser + 5 mM Ammoniumformiat (1/1) (v/v) gelöst und direkt in das Massenspektrometer injiziert.

7.3.2 Saure Hydrolyse

Zur Durchführung einer sauren Hydrolyse wurden jeweils 60 µl eines Extrakts, der die möglichen Toxinmetaboliten enthielt vollständig unter einem stetigen N₂-Strom bei 40 °C

evaporiert und anschließend mit 60 µl 2,4 M Salzsäure bzw. einer Verdünnung hiervon (1:10, 1:100, 1:1000) versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 2 h bei 90 °C im Wasserbad wurden die Extrakte abgekühlt und anschließend zur Inaktivierung der Säure mit 60 µl 2,4 M Natronlauge bzw. der entsprechenden Verdünnung versetzt. Die neutralisierten Extrakte wurden schließlich wie in Abschnitt C 7.7 beschrieben analysiert.

7.3.3 Enzymatische Spaltung

Zur weiteren Identifizierung wurde die Existenz einer glucosidischen Bindung nachgewiesen. Zur Spaltung dieser Bindung wurden die Enzyme α -Glucosidase, β -Glucosidase und Amyloglucosidase ausgewählt. Die Enzyme α - und β -Glucosidase wurden in Sörensen Puffer (α : pH 6,8; β : pH 5,0) mit einer Konzentration von 100 U/ml Puffer gelöst. Die Amyloglucosidase wurde in der gleichen Konzentration in einem 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5 gelöst.

Von den potentiell glucosidierte Substanzen enthaltenen Proben wurden Aliquote von 10 µl unter einem stetigen Stickstoffstrom evaporiert. Der Rückstand wurde mit jeweils 100 µl der Enzymlösungen, des jeweiligen Puffers oder Reinstwasser resuspendiert und für 24 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (37 °C: α -Glucosidase, Sörensen Puffer pH 6,8, Reinstwasser; 35 °C: β -Glucosidase, Sörensen Puffer pH 5,0, Reinstwasser; 55 °C: Amyloglucosidase, Natriumacetatpuffer pH 4,5, Reinstwasser). Zuletzt wurden alle behandelten Proben wie in Abschnitt C 7.7 aufgeführt analysiert.

7.4 Metabolisierungsversuche in Kartoffelzellkulturen

Um die Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu untersuchen, wurden Filter- (‘Agria’, ‘Desiré’) und Suspensionskulturen (‘Agria’) im Dreifachansatz zunächst mit jeweils 5 µg 4,15-Diacetoxyscirpenol bzw. T-2 Toxin pro Milliliter Kulturmedium dotiert (Vorgehensweise wurde in den Abschnitten C 7.1.1 und C 7.1.2 beschrieben). Die verschiedenen Ansätze (3fach) wurden nach 0, 1, 2, 4, 8, 16 h und 2, 5, 8, 12 d Einwirkungszeit jeweils vereinigt und unmittelbar tiefgefroren (-20 °C).

7.5 Extraktion und Reinigung von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffelzellkulturen

Die Extraktion der Pflanzenzellen erfolgte mittels MASE. Dazu wurde pro 0,5 g Zellmaterial 4 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) zugegeben und die Ansätze bei 60 °C in der Mikrowelle behandelt (2 min Erhitzungsphase; 5 min Temperatur beibehalten; 5 min Abkühlungsphase). Dann wurden die Proben 10 min (4696 g) zentrifugiert. Mit 3 ml des Extrakts wurde anschließend zweimal eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit je 1 ml Hexan durchgeführt. Der aufgereinigte Extrakt wurde bei 40 °C in der Vakuumzentrifuge evaporiert, in 300 µl Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert, über einen Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm) in ein HPLC-Vial überführt und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

7.6 Extraktion von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffelzellmedien und Filterbrücken

Für die Analyse der Kulturmedien wurden diese lediglich im Verhältnis (1/10) (v/v) mit Methanol/Reinstwasser (1/4) (v/v) verdünnt und durch einen Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm) von nicht gelösten Verunreinigungen befreit.

Die Filterbrücken wurden mit 24 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) auf dem Horizontalschüttler (300 rpm) für 15 min extrahiert. 10 ml des Extrakts wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge bei einer Temperatur von 40°C vollständig evaporiert, in 500 µl Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert und über einen Spritzenfilter (13 mm; 0,45 µm) in ein HPLC-Vial überführt.

7.7 HPLC-MS/MS Analyse

Die HPLC-MS/MS Analysen wurden prinzipiell wie ausführlich in Abschnitt C 8.4 dargestellt durchgeführt. Für die Analyse der Proben zur Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen (Abschnitt C 7.1) wurden jedoch alle Messperioden entfernt, um sämtliche auftretenden Toxinmetaboliten zu erfassen. Die dadurch geänderten Parameter sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die Messung erfasste alle postulierten MRM-Übergänge für Typ A Trichothecenkonjugate, die in Tabelle A 3 aufgeführt sind.

Tabelle 18: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ A Trichothecenkonjugaten

	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
Typ A	30	3500	300	40	20	5

Für alle weiteren Analysen auf Typ A Trichothecenkonjugate wurde die Analysenmethode zusätzlich modifiziert. Mit Hilfe von selbst hergestellten Standardsubstanzen (Abschnitt C 7.2) wurden für alle der gefundenen Typ A Trichothecenmetaboliten die genauen MRM-Übergänge ermittelt (Tabelle 19), sowie die substanzspezifischen Parameter (DP, EP, CE, CEP, CXP) optimiert (Tabelle A 1).

Tabelle 19: MRM-Übergänge für mögliche Typ A Trichothecenmetabolite

Toxinmetabolit	MW [amu]	Quasimolekülion [M+NH ₄] ⁺	Fragment 1 (Quantifier)	Fragment 2 (Qualifier)
15-MAS-Glucosid	486	504,4	265,0	107,0
SCRP-Glucosid	444	462,5	216,9	107,0
SCRP-Diglucosid	606	624,2	217,1	265,1
HT-2-Glucosid	586	604,3	215,0	263,0
HT-2-Diglucosid	748	766,4	263,1	245,0

Weiterhin konnten zusätzliche Messperioden in die Analysenmethode eingefügt werden, deren Parameter in Tabelle 20 aufgelistet sind.

Tabelle 20: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ A Trichothecen-konjugaten

	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
Periode 1*	30	3500	400	40	30	5
Periode 2^	20	3000	400	40	60	5
Periode 3°	30	5500	400	40	30	3

*T-2 Tetraol, TAS, DAS, 4-MAS, 15-MAS, MAS-G, SCRP, SCRP-G, SCRP-DG, HT-2, HT-2-G, HT-2-DG, T-2 Triol, NEO, VOL, DacVOL

^T-2

°Ac-T-2

Die Quantifizierung der Trichothecene und der möglichen Typ A Trichothecen-Metaboliten erfolgte mittels eines externen Matrixstandards.

7.8 Validierung der Analysenverfahren

Die Überprüfung der Präzision und Richtigkeit dieser Analysemethoden für Typ A Trichothecene erfolgte im Fünffachansatz. Dazu wurden abgetötete Pflanzenzellen (5 µg/kg, 50 µg/kg, 500 µg/kg) und Filterbrücken (50 µg/kg, 500 µg/kg) mit verschiedenen Toxinkonzentrationen dotiert. Zusätzlich wurden, für die Überprüfung von Präzision und Richtigkeit der Typ A Trichothecen-Glucoside, Pflanzenzellen im Dreifachansatz mit den selbst hergestellten Metaboliten versetzt. Sämtliche Proben wurden wie in den Abschnitten C 7.5 und C 7.6 beschrieben aufbereitet und parallel zu einem Leerwert analysiert.

8 Methode zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

8.1 Probenvorbereitung

Da bei Kartoffeln je nach Sorte, Alter und Umwelteinflüssen der Trockensubstanzgehalt sehr variabel ist, wurde zunächst, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Proben zu erreichen, deren Trockenmasse bestimmt. Gleiches gilt auch für Kartoffelprodukte, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Herstellungsweise ebenfalls erhebliche Differenzen bezüglich ihres Trockensubstanzgehaltes aufweisen können. Um die Trockenmasse zu bestimmen, wurde eine bestimmte Menge der jeweiligen Probe homogenisiert, lyophilisiert und anschließend gewogen. Aus dem Quotienten zwischen Trockenmasse und Ausgangsgewicht konnte der Trockensubstanzgehalt [%] bestimmt werden.

8.2 Extraktion

Für die Extraktion wurden jeweils 10 g des Trockenprodukts mit 90 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) versetzt, anschließend 3 min mit einem Ultra-Turrax (13500 min^{-1}) homogenisiert und zentrifugiert (4696 g, 15 min).

8.3 Aufreinigung

Für die Festphasenextraktion wurden 8 ml des Überstands abgenommen und über eine MycoSep #226-Kartusche gereinigt. Anschließend wurde ein Aliquot von 2 ml bei 50 °C in einer Vakuumzentrifuge vollständig eingeengt. Der Trockenrückstand wurde in 200 µl Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) gelöst und für die Analyse über einen Spritzenfilter (4 mm; 0,45 µm) in ein HPLC-Vial überführt.

8.4 HPLC-MS/MS Analyse

Die HPLC-MS/MS Analysen von Kartoffeln und Kartoffelprodukten wurden - wie im Folgenden dargestellt - durchgeführt:

Fließmittel A:	Reinstwasser + 5 mM Ammoniumformiat (Typ A) Reinstwasser (Typ B, ZON)
Fließmittel B:	Methanol + 5 mM Ammoniumformiat (Typ A) Methanol (Typ B, ZON)
Trennsäule:	Atlantis T3, Waters; Synergi Hydro, Phenomenex (Typ A) Onyx, Phenomenex (Typ B, ZON)
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	10 µl; 20 µl (Diffusionsversuch)
Ionisierung:	ESI ⁺ (Typ A); ESI ⁻ (Typ B, ZON)

Die Gradientenprogramme für Typ A und Typ B Trichothecene/Zearalenon sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 beschrieben.

Tabelle 21: Gradientenprogramm für Typ A Trichothecene

Zeit [min]	Gradienten- profil	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	isokratisch	90	10	0,2
20	konkav	35	65	0,2
28	isokratisch	35	65	0,2
40	isokratisch	0	100	0,2

Tabelle 22: Gradientenprogramm für Typ B Trichothecene und Zearalenon

Zeit [min]	Gradienten- profil	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	isokratisch	90	10	0,4
10	linear	0	100	0,4
15	isokratisch	0	100	0,4

Zur Identifizierung der Toxine wurden die Retentionszeiten sowie je zwei ausgewählte MRM-Übergänge herangezogen (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die Quantifizierung erfolgte über die Berechnung des Verhältnisses der Peakfläche eines festgelegten MRM-Übergangs (Quantifier) von Probe und Kalibrierstandard.

Tabelle 23: MRM-Übergänge von Typ A Trichothecenen

Toxin	MW [amu]	Quasimolekülion [M+NH ₄] ⁺	Fragment 1 (Quantifier)	Fragment 2 (Qualifier)
TAS	408,2	426,4	229,1	247,2
4,15-DAS	366,2	384,4	307,3	247,1
[¹³ C ₄]-DAS	370	388,3	309,0	247,0
4-MAS	324,2	342,3	216,9	228,9
15-MAS	324,2	342,4	106,9	265,0
[¹³ C ₂]-MAS	326	344,2	107,0	264,8
SCRP	282,1	300,5	107,0	247,1
Ac-T-2	508,2	526,4	287,1	245,1
T-2	466,2	484,4	305,2	215,0
[¹³ C ₂₄]-T-2	490,4	508,6	229,2	211,2
HT-2	424,2	442,4	215,1	263,0
[¹³ C ₂₂]-HT-2	446,3	464,6	278,1	156,1
T-2 Triol	382,5	400,3	214,9	232,9
T-2 Tetraol	298,1	316,2	215,0	281,1
NEO	382,2	400,4	305,2	215,2
VOL	266,2	284,4	231,1	219,1
DacVOL	350,2	368,4	291,1	248,9

Tabelle 24: MRM-Übergänge der Typ B Trichothecene und Zearalenon/Zearalanon

Toxin	MW [amu]	Quasimolekülion [M-H] ⁺	Fragment 1 (Quantifier)	Fragment 2 (Qualifier)
DON	296,1	295,3	264,7	137,8
[¹³C₁₅]-DON	311,2	310,2	278,9	144,9
3-AcDON	338,1	337,3	307,0	172,6
15-AcDON	338,1	337,2	150,0	219,0
NIV	312,1	311,3	280,6	191,0
FX	354,1	353,3	262,8	186,6
ZON	318,1	317,3	175,1	131,0
ZAN	320,4	319,3	205,1	160,9

Die optimierten spezifischen MS/MS-Parameter für sämtliche MRM-Übergänge sind in Tabelle A 1 und Tabelle A 2 im Anhang aufgeführt. Um die Bedingungen während der Messung optimal zu gestalten, wurden für die Analyse Kombinationen der Quellenparameter (CUR, IS, TEM, GS1, GS2) und des CAD-Gases festgesetzt, die in verschiedene Messperioden unterteilt wurden (Tabelle 25 und Tabelle 26).

Tabelle 25: Quellenparameter und CAD-Gas für Typ A Trichothecene

	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
Periode 1*	30,0	4000,0	300,0	50,0	40,0	9,0
Periode 2[^]	30,0	3500,0	300,0	40,0	30,0	5,0
Periode 3[°]	20,0	3000,0	300,0	40,0	60,0	5,0
Periode 4[´]	30,0	5500,0	300,0	40,0	30,0	3,0

* T-2 Tetraol

[^] TAS, DAS, 4-MAS, 15-MAS, SCRIP, HT-2, T-2 Triol, NEO, VOL, DacVOL

[°] T-2

[´] Ac-T-2

Tabelle 26: Quellenparameter und CAD-Gas Typ B Trichothecene/Zearalenon

	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
Periode 1*	25,0	-4500,0	450,0	50,0	40,0	5,0
Periode 2[^]	30,0	-4500,0	450,0	50,0	60,0	5,0

* DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV, FX

[^] ZON, ZAN

Um matrixbedingte Änderungen der Signalintensität zu erfassen, wurde für die Quantifizierung der Vorversuchsproben ein externer Kalibrierstandard in der Probenmatrix gelöst (Matrixstandard). Bei der Analyse der Kartoffel- und Kartoffelproduktproben konnte aufgrund der unterschiedlichen Probenmatrices kein Matrixstandard für die Quantifizierung herangezogen werden. Aus diesem Grund wurden bei der Analyse der Kartoffeln und Kartoffelprodukte bzw. der Validierung anstatt eines Matrixstandards die Gehalte einzelner Toxine mit internen Standards korrigiert. Dabei handelte es bei Diacetoxyscirpenol, 15-Monoacetoxyscirpenol, T-2 Toxin, HT-2 Toxin und Deoxynivalenol um ¹³C-isotopenmarkierte Toxine, sowie um Zearalanon als interner Standard für Zearalenon. Sämtliche interne Standards wurden aufgrund ihrer sehr geringen Verfügbarkeit mit einer Konzentration von 50 ng/ml dem Probenlösungsmittel zugesetzt.

8.5 Validierung der Analysenverfahren

Für die Evaluation der Präzision und Richtigkeit der Analysemethoden wurde selbst hergestelltes Kartoffelpulver (Kapitel C 8.1) in einem fünffachen Ansatz artifiziiell mit den zu untersuchenden Toxinen in unterschiedlichen Konzentrationen (100 µg/kg, 50 µg/kg, 10 µg/kg, 1 µg/kg) kontaminiert. Die dotierten Proben, sowie eine Nullprobe, wurden wie in den Kapiteln C 8.2 bis C 8.4 beschrieben vorbereitet und analysiert.

9 Bildung und Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln mit Symptomen der Fusariumtrockenfäule

9.1 Inokulation von Kartoffeln der Sorte `Lady Christl` mit *Fusarium* spp.

Für diesen Versuch wurden gesunde, unverletzte Kartoffelknollen selektiert, gründlich mit Wasser gereinigt und mit 80 % Ethanol desinfiziert. Die *Fusarium* spp. wurden zehn Tage auf Sabouraud-Agar bei Raumtemperatur kultiviert. Im fünffachen Ansatz wurden Knollen mit jeweils einem Pilzstamm inokuliert. Dazu wurde mit einem Korkbohrer (Ø 5 mm) ein ca. 5 mm tiefes Loch in die Knollen gestanzt, das mit einem pilzbewachsenen Agarplättchen des gleichen Durchmessers verschlossen wurde. Die Knollen wurden anschließend bei einer durchschnittlichen Temperatur von 15,5°C und einer mittleren relativen Luftfeuchte von 87,9 % 28 Tage in einem abgedunkelten Raum aufbewahrt.

9.2 Beurteilung der inokulierten Kartoffelknollen und anschließende Probenvorbereitung

Nach Beendigung der Lagerphase konnten die Kartoffelknollen und die entstandenen Faulstellen mit einer Schieblehre (DIN 862) vermessen werden. Die durchschnittliche Fäuleausdehnung oder Fäuleindex (FI) wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet (Zott 1982):

$$FI = \sqrt{\text{Faulstellenbreite} \times \text{Faulstellentiefe}}$$

Für die Beurteilung der Pathogenität von verschiedenen *Fusarium* spp. gegenüber der Kartoffelsorte `Lady Christl` wurde das Ausmaß der Fäule mit Hilfe der Fäuleausdehnung in verschiedene Kategorien unterteilt (Schultz et al. 2007). Diese sind in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27: Beurteilung der Pathogenität von *Fusarium* spp. in Kartoffelknollen (Schultz et al. 2007)

Fäuleausdehnung	Beurteilung
< 10 mm	schwach virulent
10 mm < x < 15 mm	mäßig virulent
> 15 mm	stark virulent

Anschließend wurden mit dem Korkbohrer (\varnothing 5 mm) in regelmäßigen Abständen 2 cm lange Kartoffelstifte aus gesundem Knollengewebe ausgestanzt. So wurden bis zu vier Proben gewonnen: vom gesunden Gewebe das direkt an die Faulstelle grenzte, bis hin zu einer Entfernung von ca. 3 cm (Abbildung 4).



Gewebeprobe 1: Abstand von der Faulstelle ca. 0,25 – 0,75 cm

Gewebeprobe 2: Abstand von der Faulstelle ca. 1,0 – 1,5 cm

Gewebeprobe 3: Abstand von der Faulstelle ca. 1,75 – 2,25 cm

Gewebeprobe 4: Abstand von der Faulstelle ca. 2,5 – 3,0 cm

Abbildung 4: Schema zur Probennahme von Kartoffelstiften aus Kartoffelknollen mit Fusariumtrockenfäule

Im Anschluss wurden zusätzlich noch die Faulstellen aus der Kartoffelknolle entfernt. Zuletzt wurden die Kartoffelstifte und Faulstellen lyophilisiert und jeweils der Trockensubstanzgehalt [%] bestimmt.

9.3 Extraktion, Reinigung und HPLC-MS/MS Analyse

In Anlehnung an die zuvor beschriebene Extraktions- und Aufreinigungsmethode für Kartoffeln und Kartoffelprodukte wurden die Kartoffelstifte und 0,1 g der Faulstellen mittels Ultra-Turrax (3 min; 13500 min^{-1}) mit 5 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) extrahiert. Nach der Zentrifugation (10 min; 4696 g) wurden 2,25 ml des Extrakts abgenommen, mit 2,75 ml Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) verdünnt und über eine #226 MycoSep-Kartusche aufgereinigt. Ein Aliquot von 2 ml des gereinigten Extrakts wurde abgenommen. Anschließend wurde die MycoSep-Kartusche mit 6 ml Extraktionsmittel gespült, 5 ml des Überstands abgenommen und mit dem aufgereinigten Extrakt vereinigt. Die Proben wurden zunächst bei einer Temperatur von 50°C in der Vakuumzentrifuge eingeengt, über einen Spritzenfilter (13 mm; $0,45 \mu\text{m}$) in ein Crimp-Vial überführt und schließlich unter einem stetigen Stickstoffstrom vollständig evaporiert. Der Rückstand wurde mit $400 \mu\text{l}$ Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert und für die HPLC-MS/MS Analyse bereitgestellt. Diese erfolgte wie in Abschnitt C 8.4 beschrieben. Für die Quantifizierung der Substanzen wurde ein externer Kalibrierstandard in der Probenmatrix gelöst.

9.4 Validierung der Analysenverfahren

Für die Überprüfung der Präzision und Richtigkeit dieser Methode wurden lyophilisierte, toxische Kartoffelstifte mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen kontaminiert

(50 µg/kg; 250 µg/kg; 500 µg/kg). Die dotierten Proben sowie der Leerwert (jeweils Fünffachansatz) wurden analog zu den Proben extrahiert und analysiert.

10 Nachweis von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Für den Nachweis von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffeln und Kartoffelprodukten wurden diese wie in den Abschnitten C 8.1 und C 8.2 beschrieben aufbereitet und extrahiert. Im Anschluss wurden 6 ml des unaufgereinigten Überstands abgenommen und eine zweimalige Flüssig-Flüssig-Trennung mit 1 ml Hexan durchgeführt. Der Extrakt konnte danach bei einer Temperatur von 40°C in der Vakuumzentrifuge evaporiert, in 1 ml Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) resolviert und über einen Spritzenfilter in ein HPLC-Vial überführt werden.

Entsprechend wurde dies auch mit den Kartoffelstiften aus mit *Fusarium* spp. inokulierten Knollen durchgeführt. Die Stifte wurden wie in Abschnitt C 9.3 aufgeführt extrahiert und 2,25 ml des Überstands abgenommen. Anstatt einer Aufreinigung mit MycoSep #226-Kartuschen wurde hier jedoch analog zu dem Nachweis von Fusarientoxinmetaboliten in Kartoffeln und Kartoffelprodukten eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan durchgeführt. Der Rückstand des evaporierten Extrakts wurde hier in 600 µl Methanol/Reinstwasser (1/9) (v/v) gelöst.

Die HPLC-MS/MS Analyse für Kartoffeln, Kartoffelprodukte sowie Kartoffelstifte auf Typ A Trichothecenkonjugate erfolgte wie in Abschnitt C 7.7 dargestellt.

Zusätzlich wurden Deoxynivalenol-3-Glucosid sowie einige Zearalenonmetaboliten in die Analysenmethode für Typ B Trichothecene (siehe Abschnitt C 8.4) aufgenommen. Dazu mussten die unterschiedlichen Messperioden dieser Analysenmethode entfernt werden. Die MRM-Übergänge der Deoxynivalenol- und Zearalenonmetaboliten, sowie die Quellenparameter/CAD-Gas der Messperiode sind in den folgenden Tabellen 28 und 29 aufgeführt.

Tabelle 28: MRM-Übergänge von Deoxynivalenol- und Zearalenonmetaboliten

Toxinmetabolit	MW [amu]	Quasimolekülion [M-H] ⁻	Fragment 1 (Quantifier)	Fragment 2 (Qualifier)
DON-Glucosid	458,5	457,0	426,7	247,0
ZON-Glucosid	480	479,1	317,1	161,1
α-ZOL	320,4	319,3	275,4	159,7
β-ZOL	320,4	319,3	159,6	130,0

Tabelle 29: Quellenparameter und CAD-Gas zum Nachweis von Typ B Trichothecen- und Zearalenonmetaboliten

	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
Typ B/ZON	25	-4500	450	50	40	5

D Ergebnisse

1 Methodenentwicklung

1.1 Entwicklung einer Analysenmethode mittels HPLC-MS/MS

Für die Analyse von Fusarientoxinen wurden zwei verschiedene Analysenmethoden entwickelt, jeweils eine für Typ A Trichothecene sowie eine für Typ B Trichothecene und Zearalenon.

Bei der Gruppe der Typ A Trichothecene wurde in der Ionenquelle des Massenspektrometers eine positive Ionisierung (ESI⁺) durchgeführt, Typ B Trichothecene sowie Zearalenon wurden im negativen Modus (ESI⁻) gemessen. Sämtliche Typ B Trichothecene ionisierten dabei effektiver ohne Ammoniumformiat als Puffersubstanz. Bei Typ A Trichothecenen zeigte hingegen eine Adduktbildung mit Ammoniumionen bessere Ergebnisse. Auf dieser Grundlage konnten mit Hilfe von Standardsubstanzen die genauen MRM-Übergänge anhand der Fragmentierungsmuster der einzelnen Substanzen ermittelt sowie die substanzspezifischen Parameter (Tabelle A 1) optimiert werden.

Weiterhin waren für die parallel analysierten Substanzen Kombinationen der zuvor optimierten Quellenparameter und des CAD-Gases (Tabelle A 2) innerhalb eines Analysenganges festzusetzen. Um die Bedingungen möglichst optimal zu gestalten, wurden die Messzeiten innerhalb der Methoden durch Perioden begrenzt. Je nach Versuchsziel wurden diese nach Bedarf geändert sowie neue MRM-Übergänge für mögliche Mykotoxinmetaboliten hinzugefügt. Die quellenspezifischen Parameter sowie das CAD-Gas mussten jeweils diesen veränderten Bedingungen angepasst werden. Sämtliche Bedingungen der Messmethoden sind in den Abschnitten C 8.4, C 7.7 und C 10 aufgelistet.

Die Linearität und Präzision des Detektors wurde für sämtliche untersuchten Toxine mit Hilfe von Standardlösungen überprüft. Dazu wurden je nach Detektierbarkeit des Analyten bis zu sieben Konzentrationsstufen (0,5 ng/ml, 1,0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml) in fünffacher Wiederholung analysiert. Für die jeweils festgelegten Bereiche konnte, wie das Beispiel von T-2 Toxin (Abbildung 5) zeigt, eine hohe Linearität festgestellt werden (Tabelle A 4).

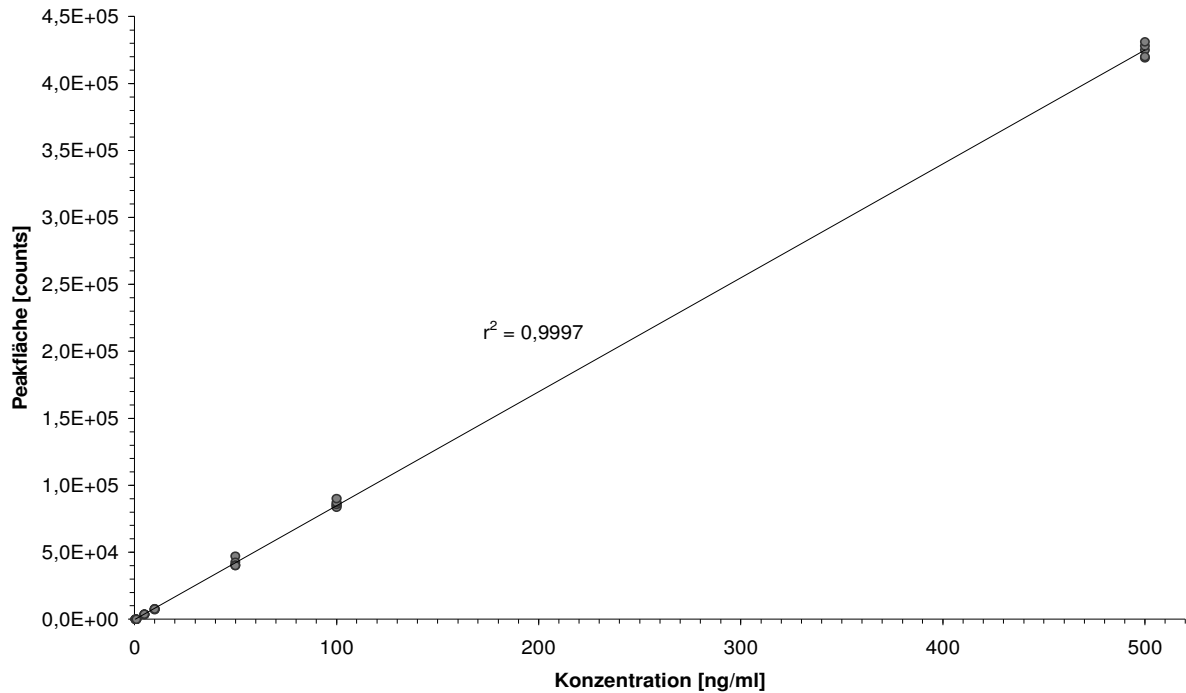


Abbildung 5: Linearität und Präzision des Detektors am Beispiel von T-2 Toxin

1.2 Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Typ A Trichothecenen und deren Metaboliten in Kartoffelzellkulturen

Zum Nachweis von Typ A Trichothecenmetaboliten wurden zwei verschiedene Extraktions- und zwei Aufreinigungsverfahren miteinander verglichen. Als Probenmaterial wurden Kartoffelzellen benutzt, die mit T-2 Toxin bzw. 4,15-Diacetoxyscirpenol versetzt und danach über 12 Tage hinweg inkubiert worden waren. Wie Abbildung 6 verdeutlicht, konnten die Toxinmetaboliten aus Pflanzenzellen sowohl mit Mikrowellen- als auch Ultraschallverfahren erfolgreich extrahiert werden. Alle Extrakte wurden zunächst einer Flüssig-Flüssig Trennung mit Hexan unterworfen, um hydrophobe Zellbestandteile zu eliminieren. Im direkten Vergleich zeigte sich die mikrowellenunterstützte Extraktion etwas effektiver als die Extraktion im Ultraschallbad. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt mit Celite führte nicht zu einer Verbesserung der Methoden Kennzahlen, vielmehr kam es sogar zu einem Verlust an Analyten während dieses Aufreinigungsschrittes.

Letztendlich wurde für Pflanzenzellen eine mikrowellenunterstützte Extraktion mit anschließender Flüssig-Flüssig-Trennung ausgewählt.

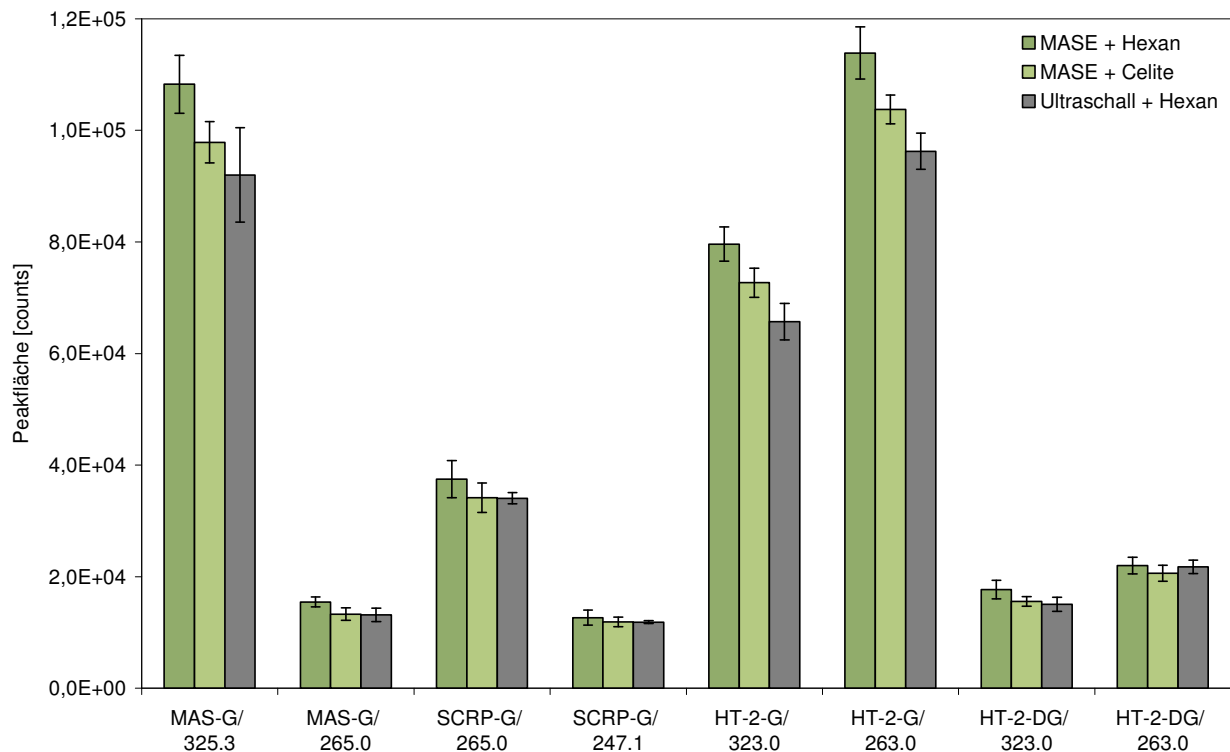


Abbildung 6: Vergleich unterschiedlicher Extraktions- und Reinigungsmethoden zum Nachweis von Typ A Trichothecenmetaboliten in Kartoffelzellen (Dreifachansatz ($\bar{x} \pm SD$ [%]))

1.3 Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Die Ergebnisse unterschiedlicher Extraktions- und Aufreinigungsversuche sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Wahl eines Acetonitril/Reinstwasser-Gemisches mit einem höheren Wasseranteil (4/1) (v/v) wäre hinsichtlich der Extraktion von polareren Toxinen (z.B. NIV, T-2 Tetraol) von Vorteil, führte jedoch bei den BondElut-Säulen nicht zu einer verbesserten Wiederfindung der fraglichen Toxine. Zudem eignete es sich nicht für den Nachweis von Zearalenon.

Durch die Reinigung der Proben mit MycoSep-Säulen wurden in den meisten Fällen höhere Wiederfindungsraten erzielt als mit BondElut-Säulen. Alle drei Reinigungskartuschen wurden mit identischen Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) Extrakten getestet, um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Der Reinigungserfolg beider Systeme war zufriedenstellend, da bei der Analyse der Proben keine Interferenzen festgestellt werden konnten. Für die Reinigung der Trichothecene war insgesamt gesehen die MycoSep #227-Kartusche am besten geeignet, Zearalenon war hingegen kaum mehr nachzuweisen.

Für die Extraktion und Reinigung von Kartoffelproben wurde schließlich das Extraktionsmittel Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) sowie eine Festphasenextraktion mit MycoSep #226-Kartuschen mit durchschnittlichen Wiederfindungsraten von 55 % bis 101 % gewählt.

Eine zusätzliche Flüssig-Flüssig-Reinigung mit Hexan im Anschluss an die Extraktion führte zu keiner Verbesserung der Methodenkennezahl.

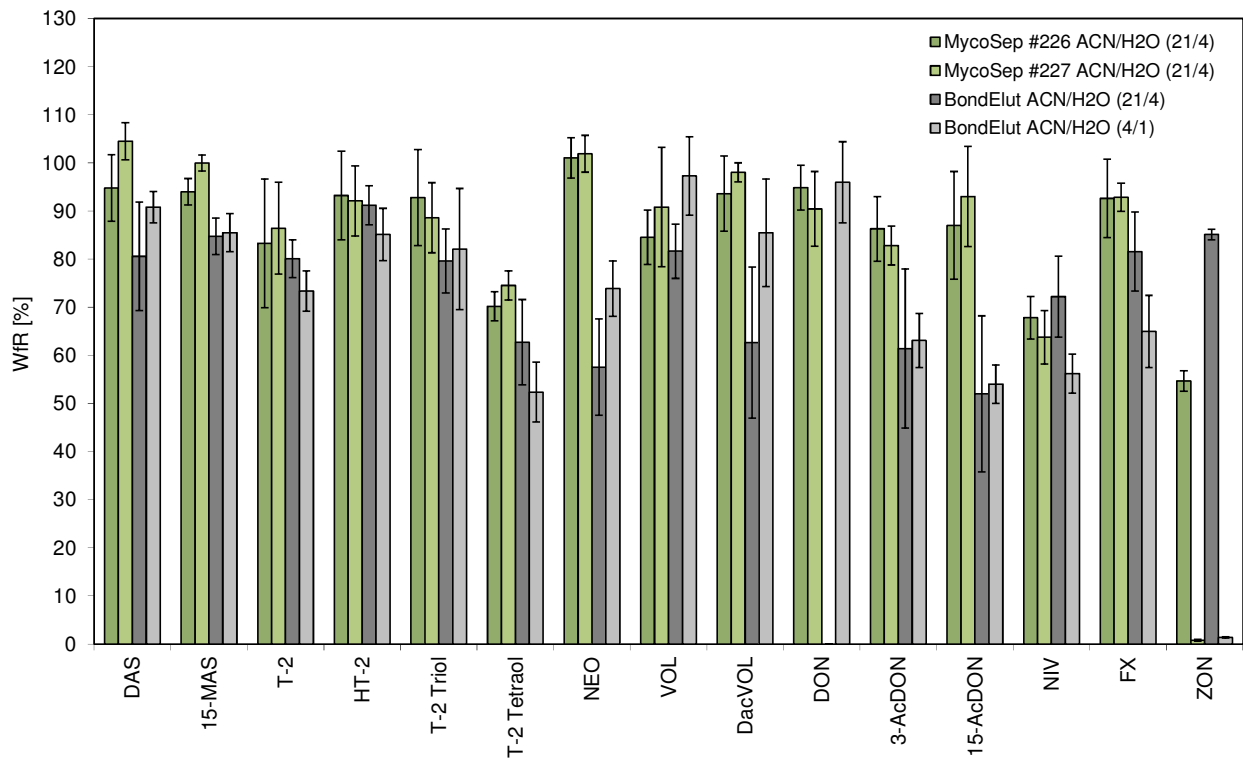


Abbildung 7: Vergleich unterschiedlicher Extraktions- und Reinigungsmethoden zum Nachweis von Trichothecenen ($c=50 \mu\text{g}/\text{kg}$) und Zearalenon ($c=5 \mu\text{g}/\text{kg}$) in Kartoffeln (Fünffachansatz ($\bar{x} \pm SD$ [%]))

2 Toxinstandardgewinnung

Aus mit *Fusarium sambucinum* (DSM 62397) inokuliertem Reis konnten zwei zusätzliche Standardsubstanzen gewonnen werden. Bei positiver Ionisierung wurden Quasimoleküllionen mit m/z 300 und m/z 342 nachgewiesen. Bei diesen Substanzen könnte es sich um die Ammoniumadduktionen von Scirpentriol bzw. 4-Monoacetoxy-scirpenol handeln.

Zudem entstanden durch die Acetylierung von Diacetoxy-scirpenol bzw. T-2 Toxin zwei Substanzen, deren m/z -Verhältnisse auf die Ammoniumaddukte von Triacetoxy-scirpenol (m/z 426) und Acetyl-T-2 Toxin (m/z 526) hindeuten. Bei allen vier Substanzen wurde zur weiteren Identifikation ein Product-Ion-Scan durchgeführt.

In den Spektren von Triacetoxy-scirpenol, 4-Monoacetoxy-scirpenol und Scirpentriol fanden sich mehrere Fragmente die ebenfalls im Product-Ion-Scan von anderen Vertretern der Scirpentriol-Familie auftraten. Im Einzelnen handelte es sich hier um die Fragmente mit m/z 307 (außer bei SCRP), 265, 247, 229 und 107.

Für **Triacetoxy-scirpenol** (Abbildung 8) wurden die charakteristischen Fragmente m/z 229 und m/z 247 als Identifikationskriterium für spätere MS/MS-Analysen ausgewählt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Fragmente $[M - 3\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ (m/z 229) und $[M - 2\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{CO}]^+$ (m/z 247).

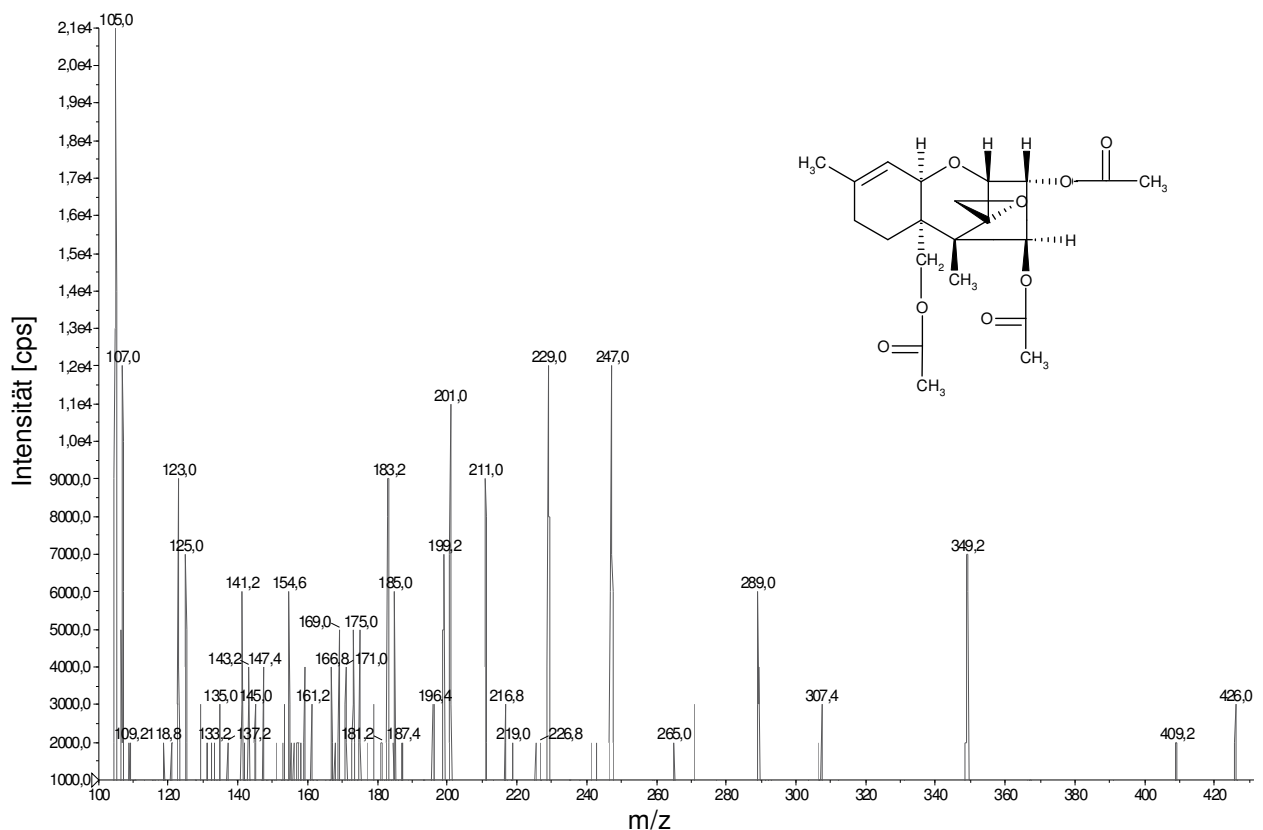


Abbildung 8: Product-Ion-Scan des hergestellten Triacetoxy-scirpenols

Im Fall von **4-Monoacetoxyscirpenol** (Abbildung 9) waren unter anderem die Fragmente m/z 217 und m/z 157 dominant. Für quantitative MS/MS-Analysen wurde allerdings neben dem Fragment m/z 217 (möglicherweise $[M - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^+$ oder $[M - \text{C}_7\text{H}_8\text{O}]^+$) mit m/z 229 (evtl. $[M - \text{CH}_3\text{COOH} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$) ein weiteres kennzeichnendes Fragment als Qualifier gewählt.

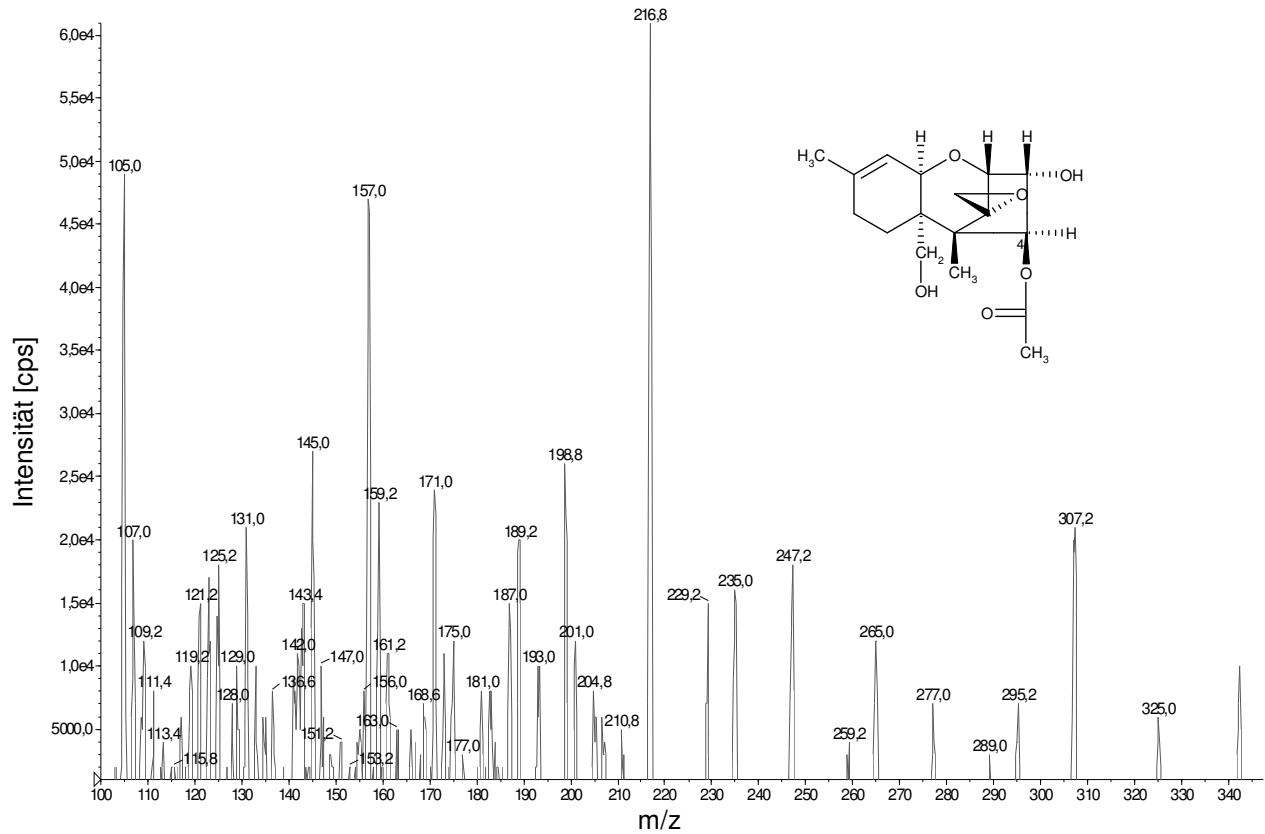


Abbildung 9: Product-Ion-Scan des hergestellten 4-Monoacetoxyscirpenols

Das Fragment mit der größten Intensität, das beim Produkt-Ion-Scan von **Scirpentriol** (Abbildung 10) gemessen wurde, war m/z 107 (möglicherweise $[C_7H_8O - H]^+$) (Cavaliere et al. 2005). Weitere Fragmente wiesen wesentlich geringere Signalstärken auf. Für die MS/MS-Analyse wurde neben m/z 107 als Qualifier m/z 247 gewählt. Dieses Fragment entstand höchstwahrscheinlich durch die Abspaltung von Wasser aus zwei Hydroxylgruppen $[M - 2H_2O]^+$.

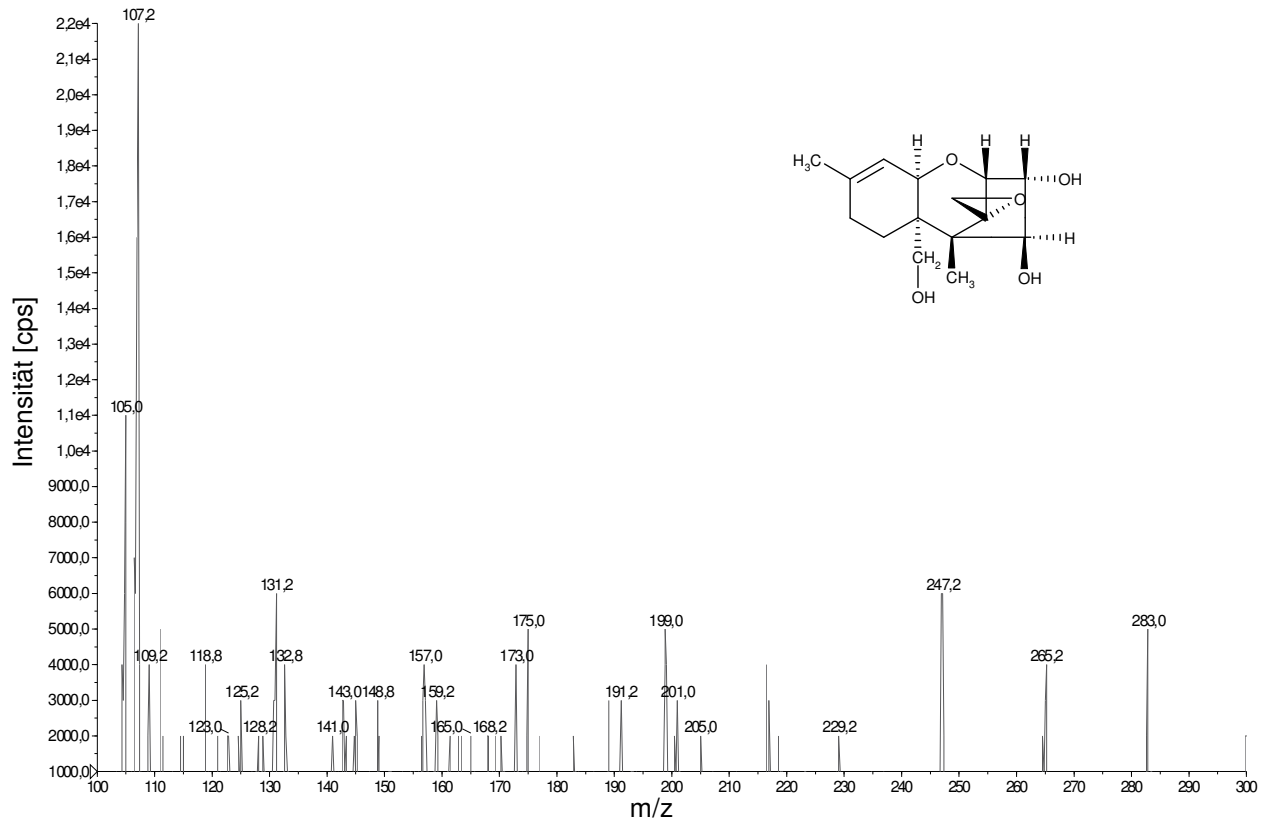


Abbildung 10: Product-Ion-Scan des hergestellten Scirpentriols

Beim Vergleich des Product-Ion-Scans des möglichen Acetyl-T-2 Toxins (Abbildung 11) mit denen der strukturell ähnlichen Toxine T-2 und HT-2 konnten zahlreiche gemeinsame Fragmente gefunden werden. Beispiele dafür sind m/z 365, 305, 257, 245, 227, 215 und 197.

Für die Identifizierung von **Acetyl-T-2 Toxin** in der MS/MS-Analyse wurden die Fragmente m/z 287 und m/z 245 gewählt. Eventuell handelte es sich hier um die beiden Fragmentationen $[M - (CH_3)_2CHCH_2COOH - 2CH_3COOH]^+$ (m/z 287) sowie $[M - (CH_3)_2CHCH_2COOH - 2CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (m/z 245).

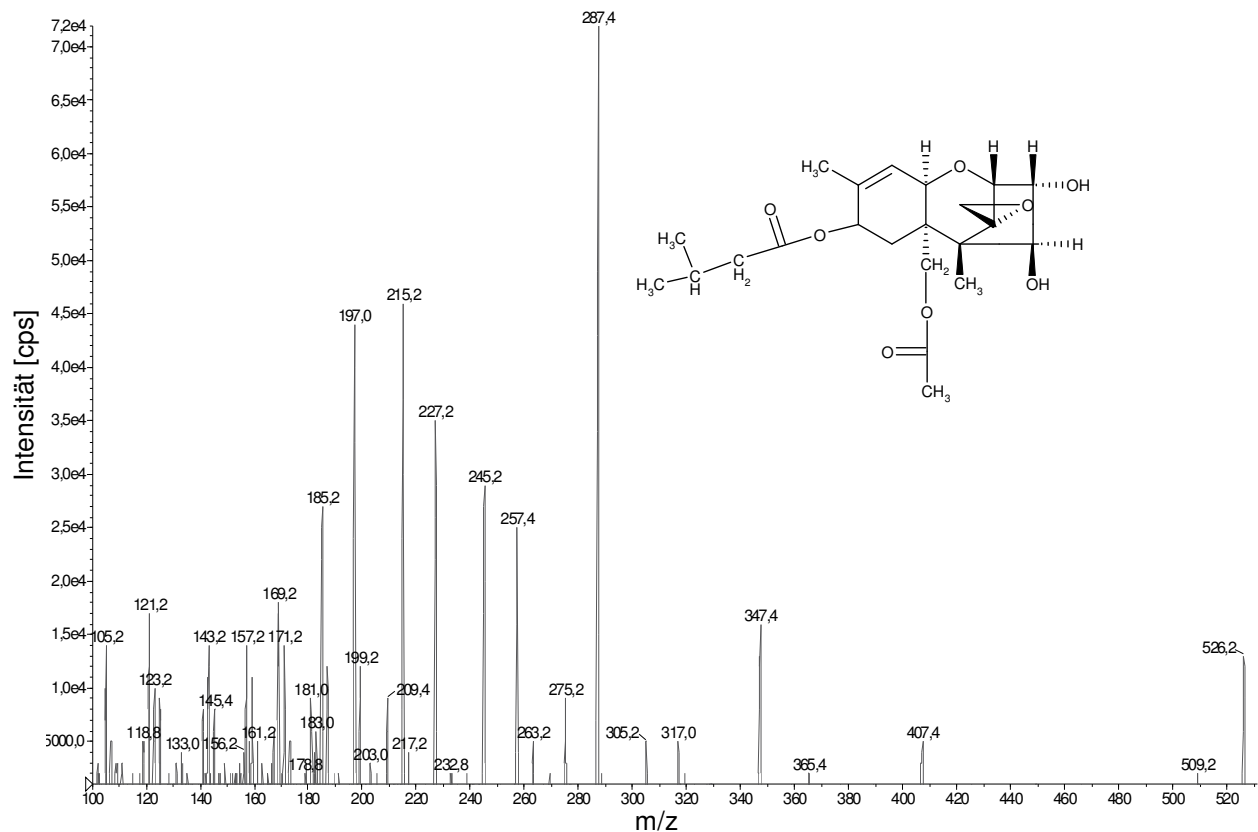


Abbildung 11: Product-Ion-Scan des hergestellten Acetyl-T-2 Toxins

3 Metabolisierung von 4,15-Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin in Kartoffelzellkulturen

3.1 Ermittlung der einzusetzenden Toxinkonzentrationen für die Metabolisierungsversuche

Um eine optimale Toxinkonzentration für die Durchführung von Metabolismusstudien zu ermitteln, wurden Pflanzenzellen zunächst verschiedene Konzentrationen an Toxinen zugesetzt. Sowohl die Vitalität der dotierten Pflanzenzellen, gemessen an ihrer mitochondrialen Aktivität, als auch ihre Fähigkeit, bei den eingesetzten Toxingehalten Konjugate zu bilden wurde bei der Wahl der geeigneten Konzentration berücksichtigt.

3.1.1 Filterkulturen

Zunächst wurde versucht, die „Vitalität“ der dotierten Filterkulturzellen anhand ihrer mitochondrialen Aktivität mit Hilfe des TTC-Testes zu ermitteln. Die Aktivität der Zellkontrolle wurde hierbei mit 100 % festgesetzt.

Die Ergebnisse des TTC-Testes mit aus Kartoffeln der Sorten `Agria´ und `Desiré´ gewonnenen Filterkulturen sind in den Abbildungen 12 und 13 zusammengefasst. Sowohl bei den Agria- als auch bei den Desiré-Kulturen konnten dabei kaum eindeutige Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Dies war zum Teil bedingt durch die starken Schwankungen innerhalb dieses Testes. Nicht nur bei den dotierten Zellkulturen sondern auch bei den jeweiligen Zellkontrollen traten erhebliche Standardabweichungen auf, die die Aussagekraft des TTC-Testes stark einschränken.

Tendenziell kam es aber bei T-2 Toxin kontaminierten Agria-Zellen im Vergleich zu der Zellkontrolle zunächst zu einer gesteigerten mitochondrialen Aktivität und erst mit ansteigender Konzentration zu einem Abfall der Vitalität. Bei einer Zugabe von 4,15-Diacetoxyscirpenol hingegen kam es allenfalls ab einer Konzentration von 5 µg/ml Kulturmedium zu einer Abnahme der Vitalität (Abbildung 12).

Desiré-Kulturen wiesen sowohl nach Zugabe von geringen Konzentrationen (0,1-0,5 µg/ml Kulturmedium) an T-2 Toxin als auch an 4,15-Diacetoxyscirpenol eine gesteigerte mitochondriale Aktivität auf. Während sich die Vitalität der mit T-2 Toxin versetzten Zellen bei steigenden Konzentrationen in etwa auf dem Niveau der Zellkontrolle einpendelte, kam es bei 4,15-Diacetoxyscirpenolkonzentrationen bis 2,0 µg/ml Medium zunächst zu einem Abfall, dann, bei einem Toxingehalt von 5,0 µg/ml Medium, wieder zu einem leichten Anstieg der mitochondrialen Spaltungsaktivität (Abbildung 13).

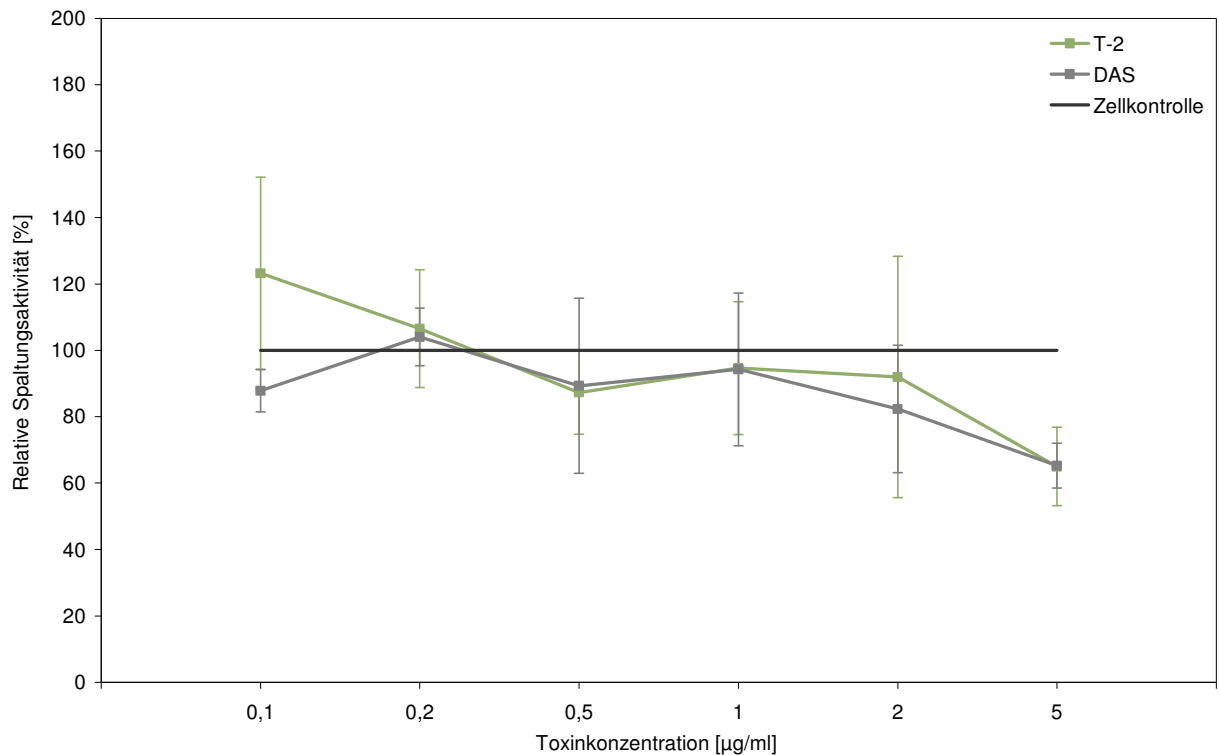


Abbildung 12: Relative Spaltungsaktivität [%] von Kartoffelfilterkulturen der Sorte 'Agria' gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxin-konzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)

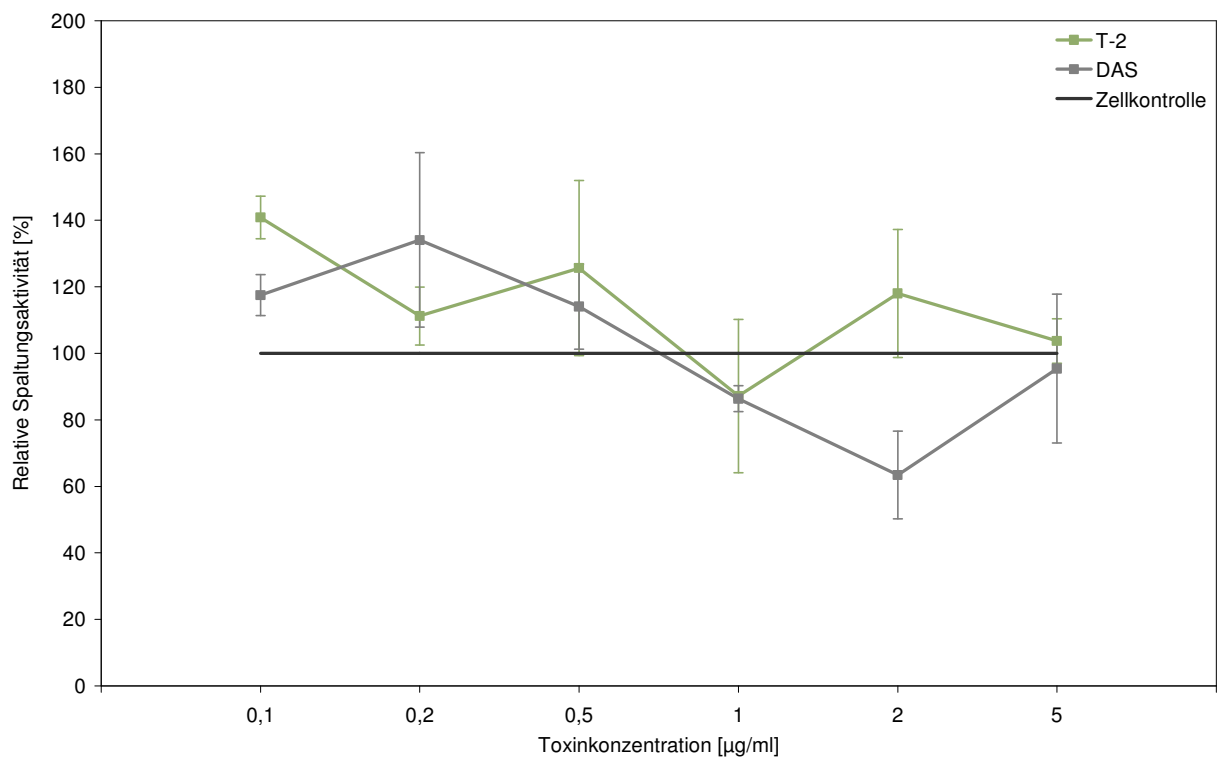


Abbildung 13: Relative Spaltungsaktivität [%] von Kartoffelfilterkulturen der Sorte 'Desiré' gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxin-konzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)

Bei der Analyse der dotierten Kartoffelzellen wurden zahlreiche postulierte Übergänge für ein- oder zweifach glucosidiertes HT-2 Toxin, Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol detektiert. In undotierten Zellen wurden diese Signale dagegen nicht beobachtet.

Mit Ausnahme der beiden niedrigsten Gehalte an T-2 Toxin (0,1 µg und 0,2 µg T-2/ml Medium) in Agria-Kalli bzw. den Konzentrationen 0,2 µg und 0,5 µg T-2/ml Medium in Desiré-Kalli stieg der Gehalt der postulierten Metaboliten mit zunehmender Toxin-konzentration an (Abbildung 14 und Abbildung 15). Bei diesen Untersuchungen, wie auch bei den Ergebnissen anderer Filterkulturen der Versuchsreihe, wurden zum Teil erhebliche Standardabweichungen beobachtet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auf eine intensive Homogenisierung des Kallusmaterials aufgrund der Gefahr mechanischer Schädigungen der Pflanzenzellen verzichtet werden musste.

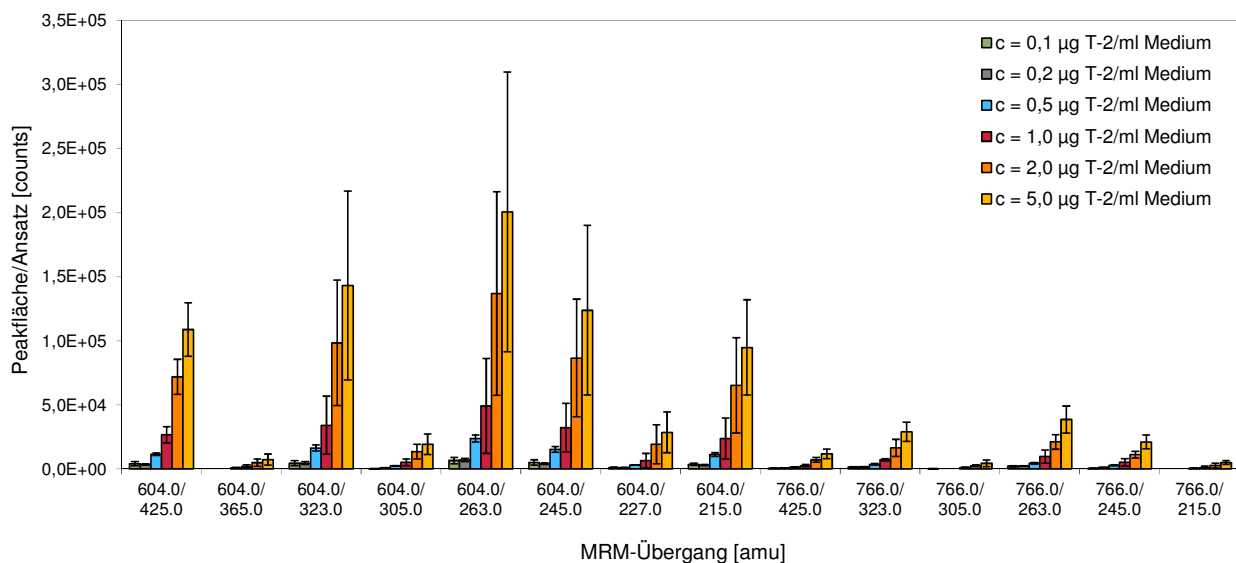


Abbildung 14: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Agria` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

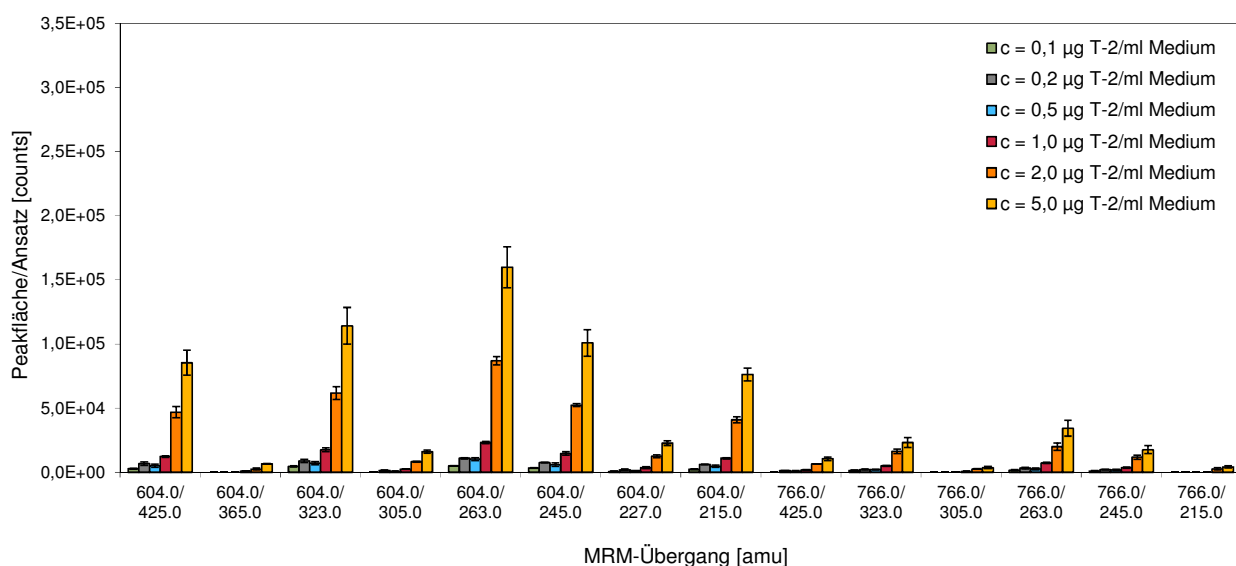


Abbildung 15: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Desiré` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

Auch nach Zugabe von 4,15-Diacetoxyscirpenol in Kallusmaterial konnten nach 12 Tagen Inkubation die Massenübergänge von mehreren möglichen Konjugaten nachgewiesen werden. Die höchsten mittleren Signalintensitäten wurden in Agria-Kulturen bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml Medium detektiert, allerdings waren die Abweichungen in dieser Stufe erheblich (Abbildung 16). In Desiré-Zellen war hingegen, wie Abbildung 17 zeigt, die Konzentrationsstufe 5,0 µg DAS/ml Medium die „Ertragreichste“ hinsichtlich der Bildung von glucosidierten Konjugaten.

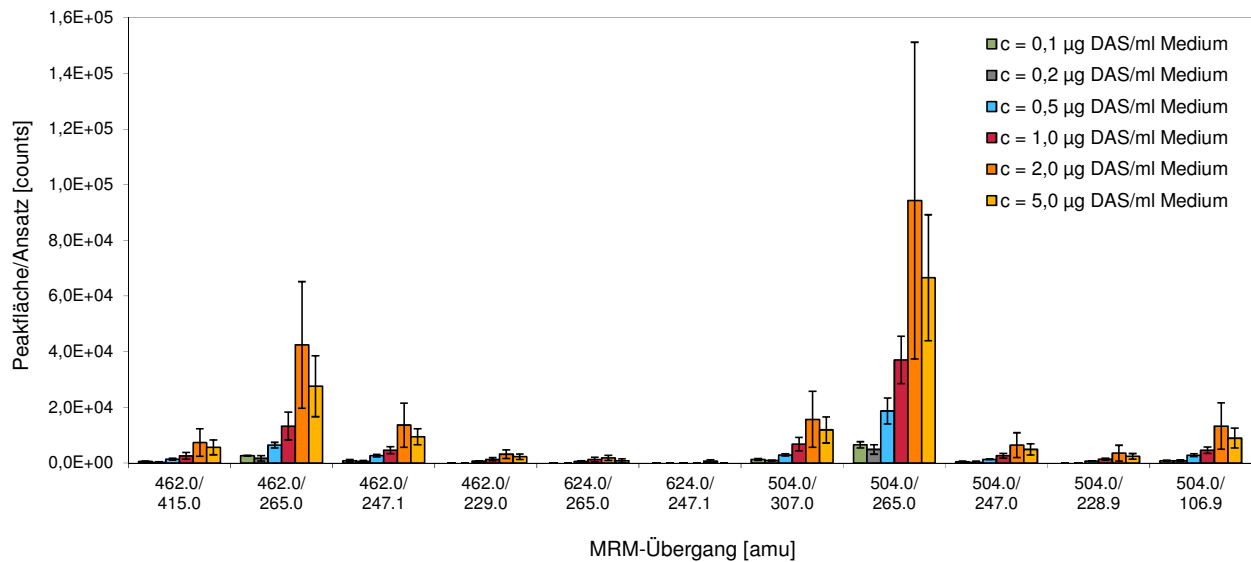


Abbildung 16: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenol-metaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Agria` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

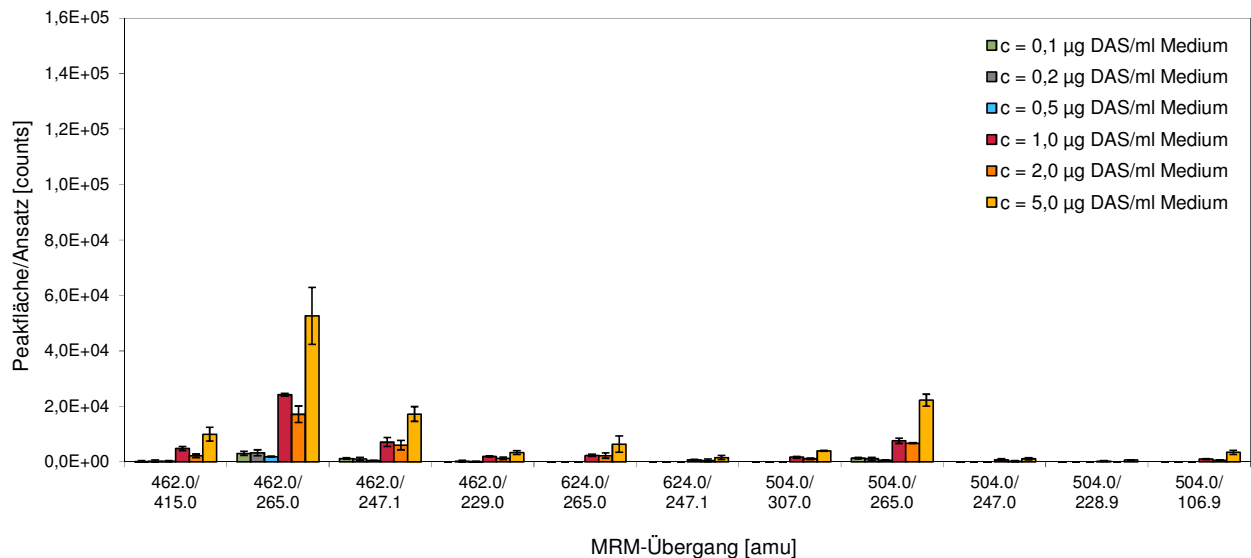


Abbildung 17: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenol-metaboliten in Kartoffelfilterkulturen der Sorte `Desiré` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

3.1.2 Suspensionskulturen

Analog zu Abschnitt D 3.1.1 wurde die „Vitalität“ der dotierten Suspensionszellen mittels eines TTC-Testes überprüft. Zusätzlich konnte hier, aufgrund des einheitlichen Ausgangsmaterials der Suspensionskultur, die Zellmasse der einzelnen Ansätze nach 12 Tagen als Vitalitätskriterium herangezogen werden.

Da die Toxine in dieser Versuchsreihe den Zellen in Aceton gelöst hinzugefügt wurden, wurde zusätzlich zu einer Zellkontrolle mit Aceton eine weitere völlig unbehandelte Zellkontrolle mitgeführt, um einen Einfluss des Acetons auf die Zellen auszuschließen. Wie die folgenden beiden Abbildungen verdeutlichen, hatte das Aceton keinen negativen Einfluss auf die mitochondriale Spaltungsaktivität der Pflanzenzellen oder ihr Wachstum.

Wie Abbildung 18 aufzeigt, konnte in Agria-Zellen - verglichen mit der Zellkontrolle - sowohl durch die Zugabe von T-2 Toxin als auch 4,15-Diacetoxyscirpenol eine erhöhte relative Spaltungsaktivität beobachtet werden.

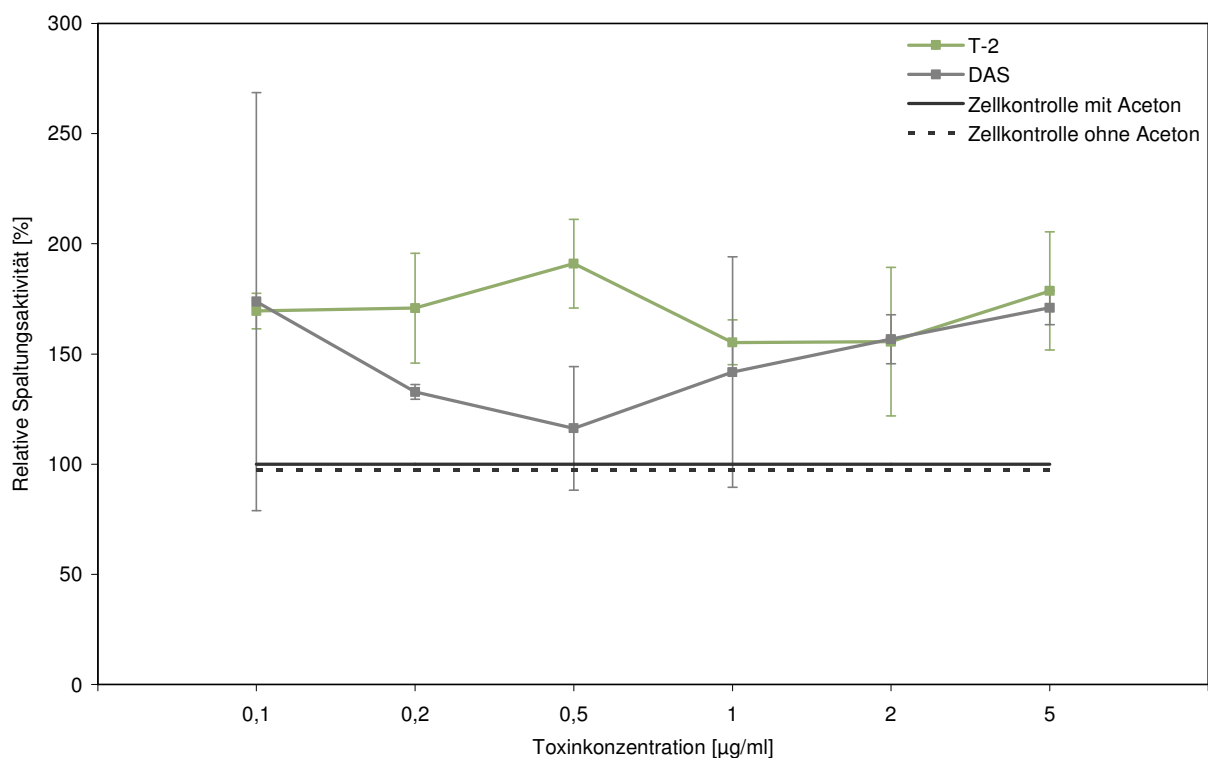


Abbildung 18: Relative Spaltungsaktivität [%] von Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agria´ gegenüber TTC 12 Tage nach Zugabe von T-2 Toxin und DAS in verschiedenen Konzentrationen

Die Zunahme an Zellmasse, ausgehend von ursprünglich 2,3 g nach Zugabe von T-2 Toxin bzw. 4,15-Diacetoxyscirpenol war weitestgehend vergleichbar mit dem der Zellkontrolle (Abbildung 19). Lediglich nach Zugabe von 4,15-Diacetoxyscirpenol kam es bei einigen Konzentrationen (0,2 µg/ml Medium und 0,5 µg/ml Medium) zu einer verstärkten Zunahme an Zellmasse.

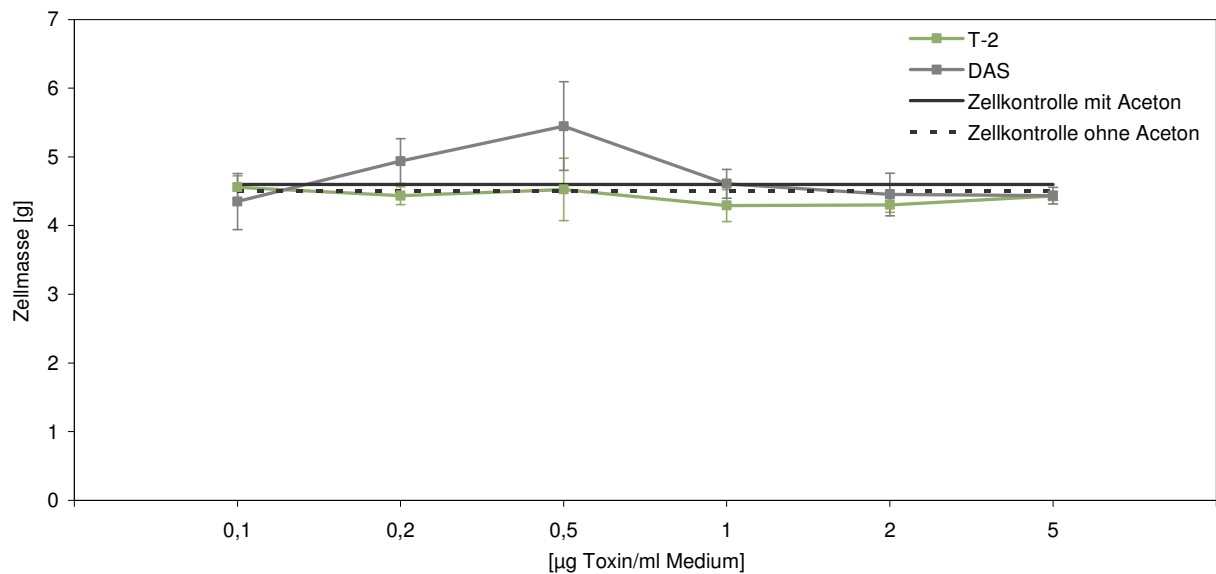


Abbildung 19: Zellmasse [g] von Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agrida` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen (T-2 Toxin bzw. DAS)

Aufgrund der großen Standardabweichungen in den Filterkulturen, die möglicherweise auf eine Ungleichverteilung der Toxine in der Zellkultur zurückzuführen sind (vgl. Abschnitt D 3.1.1), wurde in den Suspensionskulturen der gesamte homogenisierte Ansatz jeder Konzentrationsstufe extrahiert und vor der Weiterverarbeitung aliquotiert. Wie in den folgenden Abbildungen 20 und 21 aufgezeigt wird, konnte nach der Zugabe beider Toxine ein konzentrationsabhängiger Anstieg der potentiellen Metaboliten bis zu einer Konzentration von 5,0 µg/ml Medium beobachtet werden.

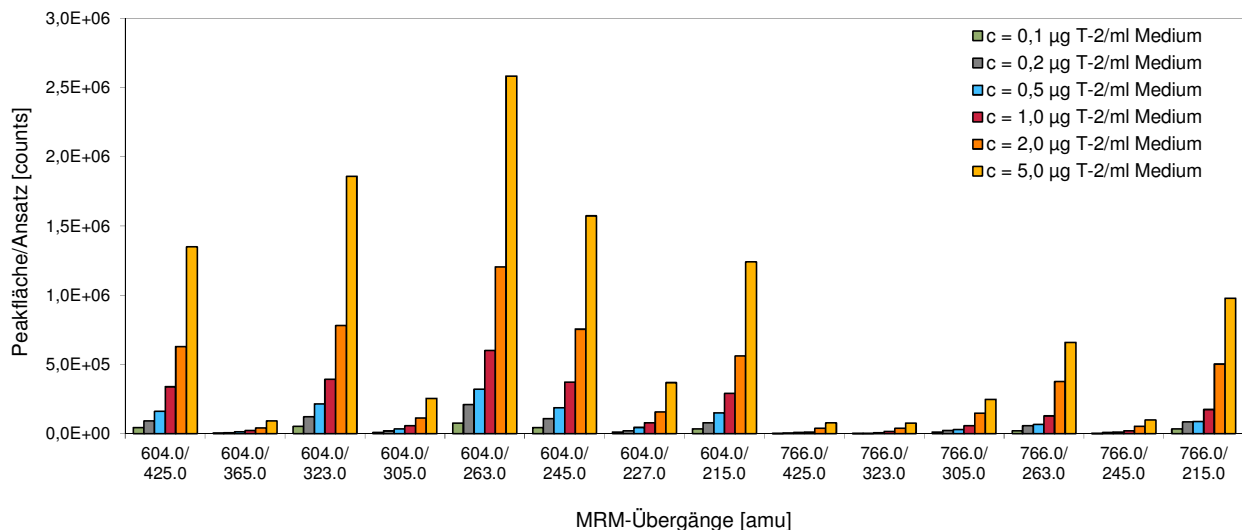


Abbildung 20: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen T-2 Toxinmetaboliten in Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agrida` 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

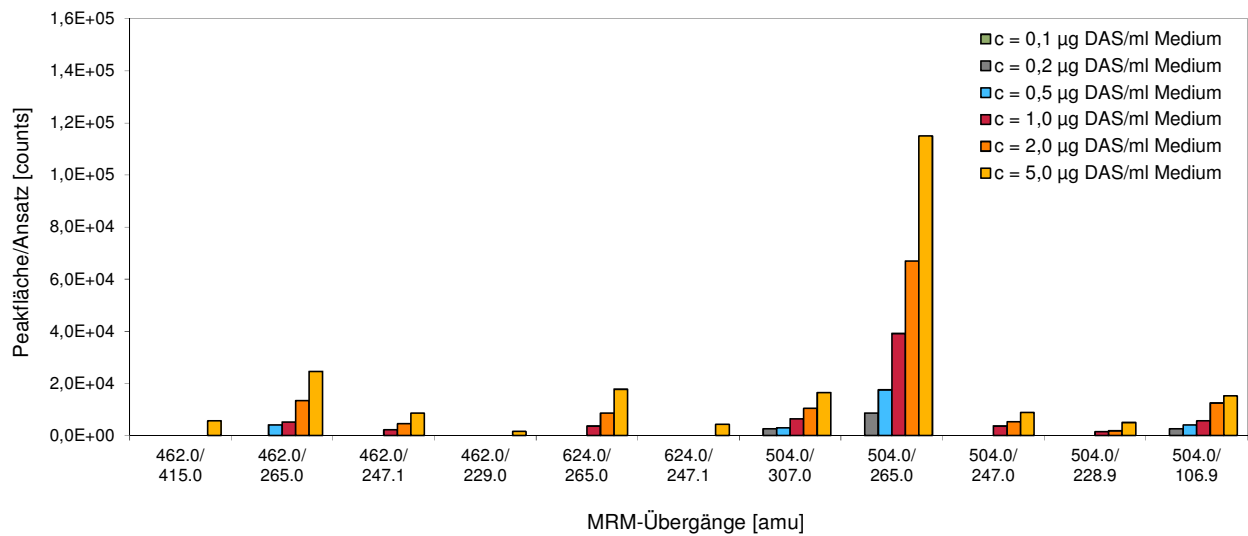


Abbildung 21: Konzentrationen [counts]/Ansatz an möglichen 4,15-Diacetoxyscirpenol-metaboliten in Kartoffelsuspensionskulturen der Sorte `Agrida´ 12 Tage nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen

3.2 Identifizierung von möglichen Typ A Trichothecenmetaboliten

Nach der Detektion von möglichen glucosidierten Typ A Trichotheceninen in kultivierten Kartoffelzellen (Abschnitt D 3.1) wurden diese Substanzen mit Hilfe der Zellkulturen gezielt produziert und die erhaltenen Extrakte mittels präparativer Chromatographie aufgereinigt. Sämtliche Konjugate eluierten bei der chromatographischen Auftrennung (RP-C₁₈) früher als ihre Aglucone, was auf einen hydrophileren Charakter der gebildeten Metaboliten schließen ließ.

Um die Identität der Substanzen weiter zu klären, wurden mit den jeweiligen HPLC-Fractionen die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.2.1 Fragmentierungsmuster

Aus den dotierten Pflanzenzellen konnten fünf verschiedene Substanzen isoliert werden, durch positive Ionisierung wurden die mutmaßlichen Glucoside als Ammoniumaddukte detektiert. Hierbei wurden die Quasimolekülonen m/z 462,5 (Scirpentriol-Glucosid), m/z 624,2 (Scirpentriol-Diglucosid), m/z 504,4 (15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid), m/z 604,3 (HT-2 Toxin-Glucosid) und m/z 766,4 (HT-2 Toxin-Diglucosid) erfasst. Die Identität der gewonnenen Substanzen wurde durch die Aufnahme von Massenspektren (Product-Ion-Scans) weiter bestätigt.

Analog zu den Ergebnissen aus Abschnitt D 2 traten in den Spektren der glucosidierten Scirpentriol- und Monoacetoxyscirpenolkonjugate Fragmente auf, die für Vertreter der Scirpentriol-Gruppe als charakteristisch anzusehen sind. Dabei handelt es sich um die Fragmente m/z 307 (nur 15-MAS-Glucosid), 265, 247, 229 und 107. Zusätzlich wurden mit m/z 283 (SCR-P-G; SCR-P-DG) und m/z 325 (15-MAS-G) bei allen drei Substanzen das Fragment des jeweiligen Aglucons nachgewiesen.

Im Spektrum von **Scirpentriol-Glucosid** (Abbildung 22) war vor allem das Fragment mit m/z 217 sehr dominant. Dieses Fragment trat auch bei dem Spektrum von 4-Monoacetoxyscirpenol auf. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um $[\text{SCR-P} - \text{CH}_2\text{O} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$. Weiterhin wiesen die Fragmente mit m/z 235 (evtl. $[\text{SCR-P} - \text{CH}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^+$) und m/z 109 vergleichsweise starke Signale auf. Als weiteres kennzeichnendes Fragment für spätere MS/MS-Analysen wurde jedoch m/z 107 (möglicherweise $[\text{C}_7\text{H}_8\text{O} - \text{H}]^+$) gewählt, welches ein charakteristisches Fragment der Scirpentriol-Gruppe ist (Cavaliere et al. 2005).

Auch im Spektrum des potentiellen **Scirpentriol-Diglucosids** (Abbildung 23) trat das Fragment m/z 217 (evtl. $[\text{SCR-P} - \text{CH}_2\text{O} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$) vermehrt auf. Ferner wurde das Fragment m/z 265, wobei es sich wahrscheinlich um $[\text{SCR-P} - \text{H}_2\text{O}]^+$ handelt, als Identifikationskriterium für MS/MS Analysen gewählt.

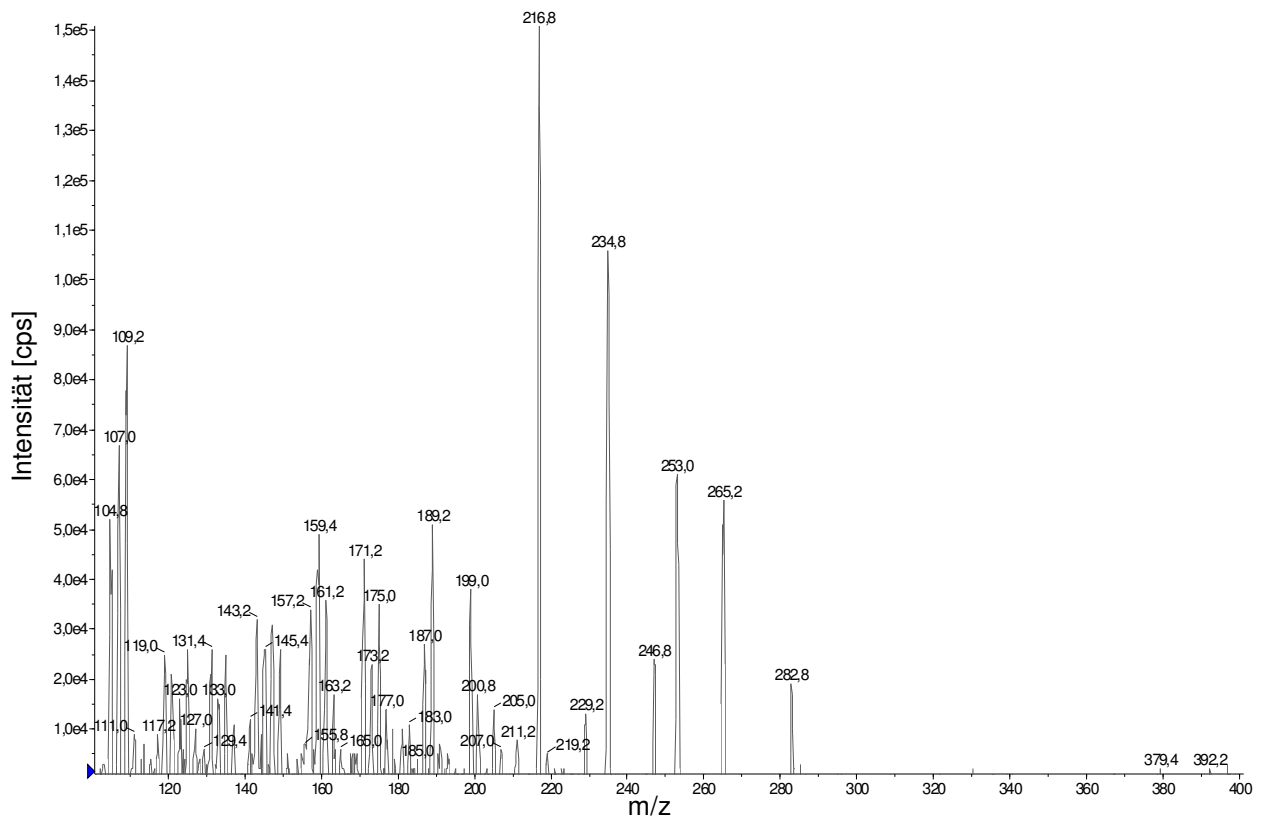


Abbildung 22: Massenspektrum von Scirpentriol-Glucosid (MW 444 amu)

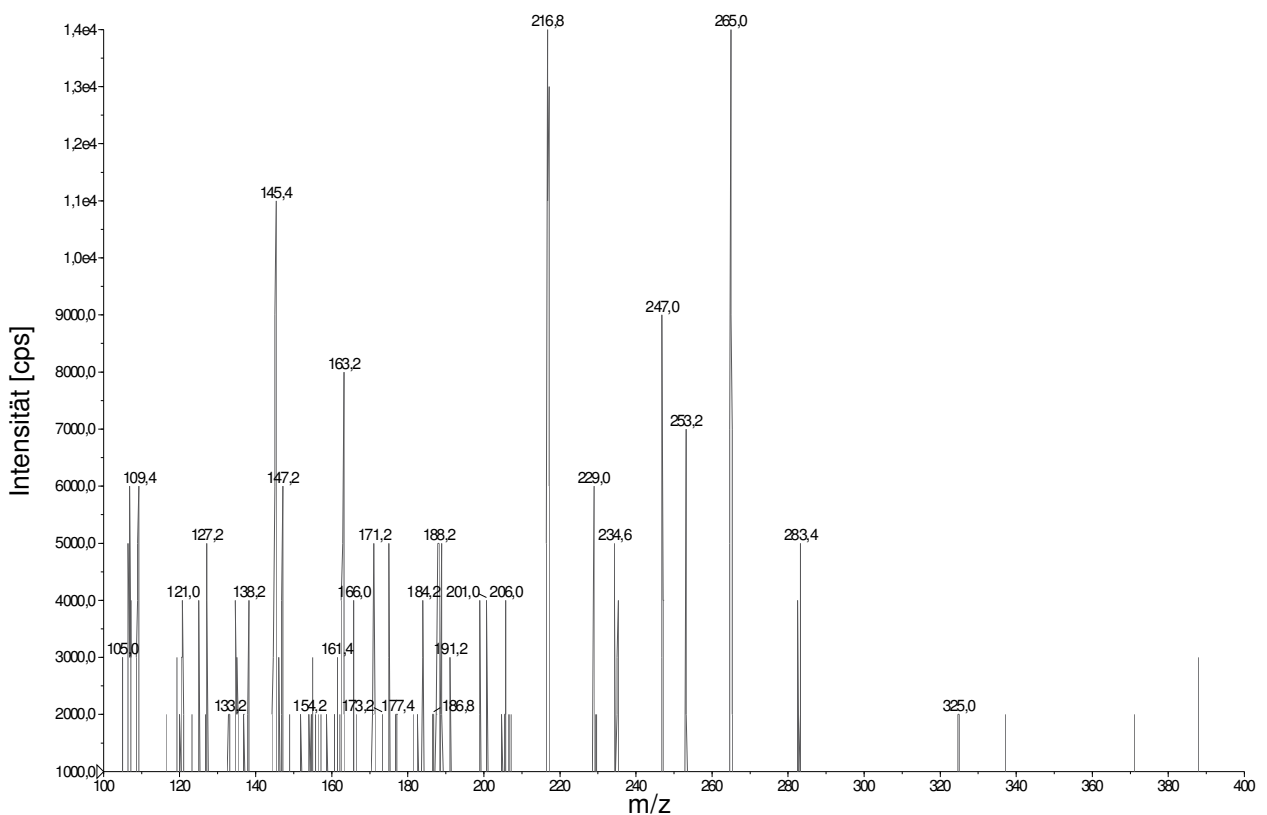


Abbildung 23: Massenspektrum von Scirpentriol-Diglucosid (MW 606 amu)

Für die Identifizierung von **15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid** (Abbildung 24) wurden die Fragmentionen m/z 265 (evtl. $[15\text{-MAS} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$) und m/z 107 (evtl. $[\text{C}_7\text{H}_8\text{O} - \text{H}]^+$) gewählt. Weitere Fragmente kamen nur mit vergleichsweise geringen Signalstärken vor. Auch das Spektrum von 15-Monoacetoxyscirpenol wies diese Eigenschaft auf. Weiterhin traten weder hier noch im Spektrum von 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid die Fragmente m/z 217 und m/z 157 hervor; diese waren dominierende Fragmente im Spektrum von 4-Monoacetoxyscirpenol.

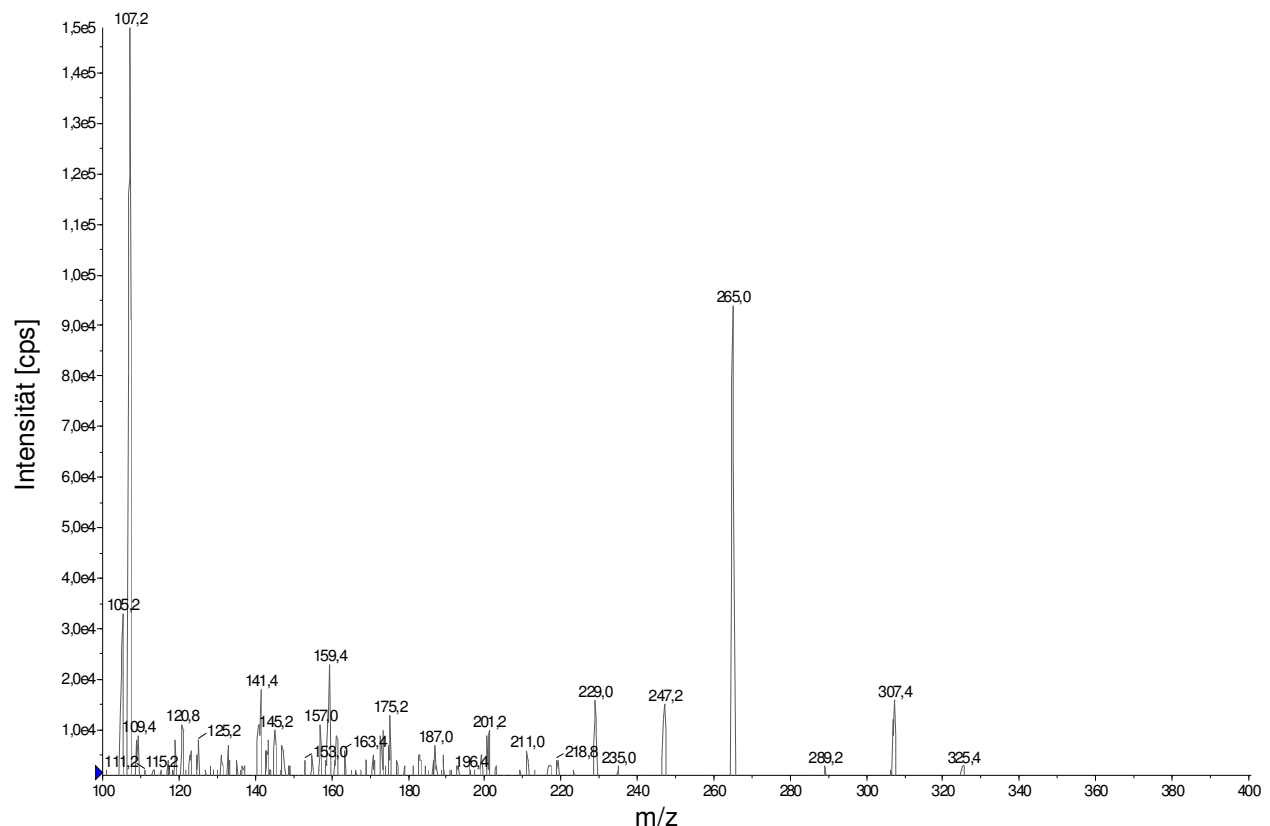


Abbildung 24: Massenspektrum von 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid (MW 486 amu)

Beim Vergleich der Massenspektren der beiden gewonnenen HT-2 Toxin-Glucosid-konjugate und ihres Aglucons konnten zahlreiche gemeinsame Fragmentationen detektiert werden. Relevante Beispiele hierfür sind die Fragmente m/z 323, m/z 305, m/z 263, m/z 245, m/z 227, m/z 215 und m/z 197. Auch m/z 425 $[\text{M} + \text{H}]^+$, das Quasimoleküllion des Aglucons konnte in den Spektren beider Metaboliten nachgewiesen werden.

Bei dem Spektrum von **HT-2 Toxin-Glucosid** (Abbildung 25) waren die Fragmentionen m/z 215 und m/z 263 vorherrschend. Hierbei handelte es sich vermutlich um die Fragmente $[\text{HT-2} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^+$ und $[\text{HT-2} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$.

Für die Identifizierung von **HT-2 Toxin-Diglucosid** (Abbildung 26) mittels MS/MS Analyse wurden die Fragmente m/z 263 (evtl. $[\text{HT-2} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$) und m/z 245 (evtl. $[\text{HT-2} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}]^+$) gewählt. Zwar war die Signalstärke des Fragments m/z 145 stärker, bei m/z 245 handelt es sich jedoch um ein für HT-2 Toxin charakteristisches Fragment.

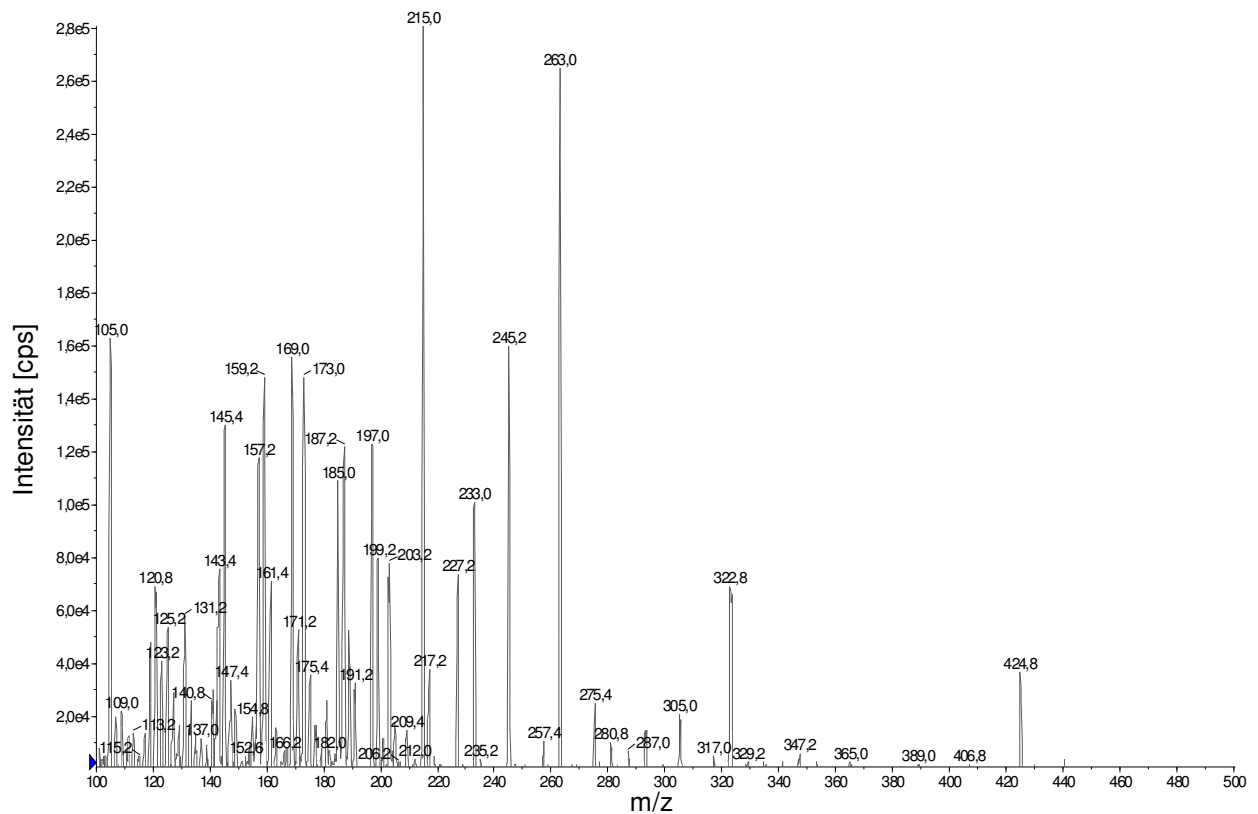


Abbildung 25: Massenspektrum von HT-2 Toxin-Glucosid (MW 586 amu)

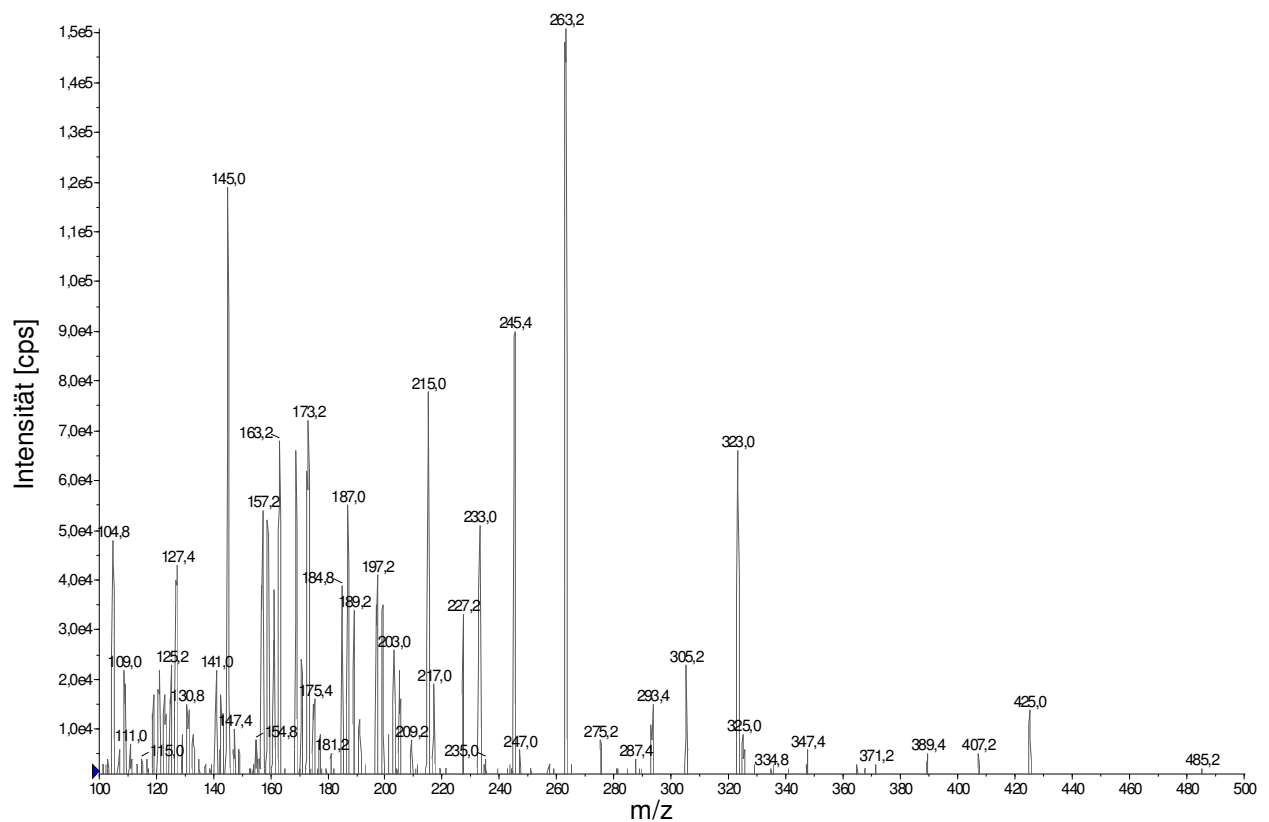


Abbildung 26: Massenspektrum von HT-2 Toxin-Diglucosid (MW 748 amu)

3.2.2 Saure Hydrolyse

Bei den Versuchen zur Spaltung der Typ A Trichothecenkonjugate durch saure Hydrolyse, wurden ihnen verschieden konzentrierte Säuren zugesetzt. Bei den Verdünnungen 1:1000 (pH 2,66) und 1:100 (pH 1,68) einer 2,4 M Salzsäure konnten die Konjugate nicht gespalten werden. Nach Zugabe der unverdünnten 2,4 M Säure und der 1:10 Verdünnung (pH 0,78) konnten hingegen keine Glucosidübergänge mehr nachgewiesen werden. Allerdings wurde in diesen Proben auch kein Aglucon detektiert.

3.2.3 Enzymatische Spaltung

Abschließend wurden zum Nachweis einer glucosidischen Bindung sämtliche gewonnenen Metaboliten mit verschiedenen Glucosidasen behandelt. Nach Zugabe des Enzyms α -Glucosidase kam es unter den gewählten Bedingungen nicht zur Spaltung von einer der gewonnenen Substanzen. Anders war dies nach der Inkubation der Metaboliten mit β -Glucosidase oder Amyloglucosidase. Wie Abbildung 27 zeigt, konnten die Enzyme zwei bzw. alle fünf Substanzen partiell spalten.

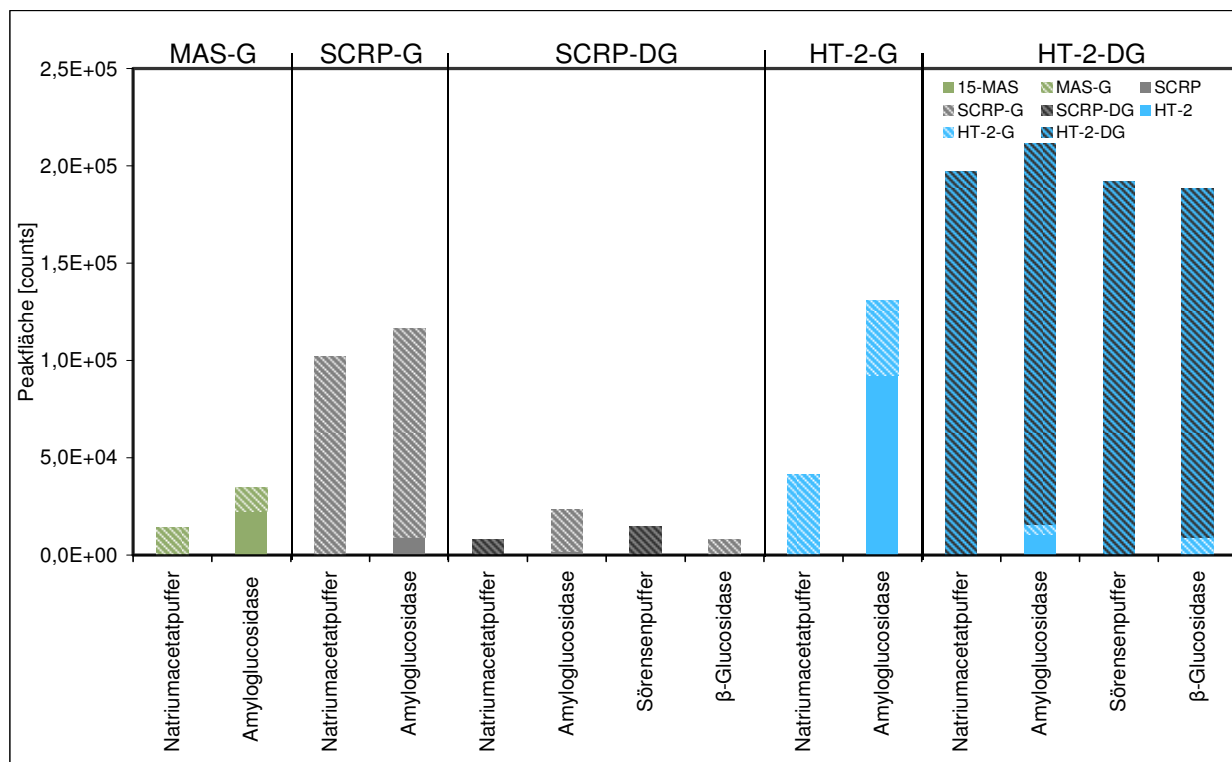


Abbildung 27: Enzymatische Spaltung von Glucosidkonjugaten durch die Enzyme Amyloglucosidase und β -Glucosidase

Bei 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, Scirpentriol-Glucosid und HT-2 Toxin-Glucosid konnte nach Zugabe von Amyloglucosidase das jeweilige Aglucon nachgewiesen werden, während sich andererseits die Peakfläche des Glucosid-Übergangs im Vergleich zum Vergleichsstandard kaum veränderte.

Scirpentriol-Diglucosid konnte sowohl nach der Inkubation mit β -Glucosidase als auch mit Amyloglucosidase nicht mehr nachgewiesen werden, sondern lediglich die Über-

gänge von Scirpentriol-Glucosid und im Falle der Amyloglucosidase zusätzlich geringe Mengen an Scirpentriol. Nach dem Verdau mit Amyloglucosidase konnten neben HT-2 Toxin-Diglucosid auch geringe Mengen des Aglucons und HT-2 Toxin-Glucosid nachgewiesen werden, während durch die β -Glucosidase lediglich etwas HT-2 Toxin-Glucosid freigesetzt werden konnte.

3.3 Validierung der Analysemethoden zur Bestimmung von Typ A Trichothecenen in Kartoffelzellen und -medien

Zum Nachweis von Typ A Trichothecenen wurde eine Reihe von Substanzen dieser Gruppe für die Matrix Kartoffelzellen auf Richtigkeit und Präzision der Messungen überprüft. Die Kennzahlen der selbst gewonnenen Substanzen konnten mangels zertifizierter Kalibrierstandards lediglich mit Hilfe ihrer Peakfläche relativ bestimmt werden.

Die Nachweisgrenzen (LOD: S/N = 3:1; Tabelle A 7) lagen zwischen 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Neosolaniol und 27,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für T-2 Tetraol bzw. zwischen $7,5 \times 10^2$ counts (Scirpentriol-Diglucosid) bis $1,5 \times 10^3$ counts (Scirpentriol-Glucosid) bei den konjugierten Toxinen. Die Ergebnisse der Methodvalidierung sind in Tabelle 30 aufgeführt. Die mittleren Wiederfindungsraten von sämtlichen Typ A Trichothecenen lagen, mit Ausnahme von Acetyl-T-2 Toxin (49 %), zwischen 77 % (TAS) und 97 % (DAS/HT-2).

Tabelle 30: Richtigkeit und Präzision der Bestimmung von Typ A Trichothecenen (n=5) und ihrer Glucoside (n=3) in Kartoffelzellen ($\bar{x} \pm SD$ [%])

Toxin	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Stammlsg.*)	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1:10*)	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1:100*)
3,4,15-Triacetoxyscirpenol*	72 \pm 7,2	87 \pm 4,2	72 \pm 11,8
4,15-Diacetoxyscirpenol	81 \pm 1,4	113 \pm 8,4	<LOQ
4-Monoacetoxyscirpenol*	84 \pm 4,4	87 \pm 3,9	86 \pm 14,4
15-Monoacetoxyscirpenol	81 \pm 2,7	95 \pm 1,5	<LOQ
Scirpentriol*	78 \pm 7,0	110 \pm 5,6	n.d.
Acetyl-T-2 Toxin*	41 \pm 3,1	56 \pm 4,3	50 \pm 10,4
T-2 Toxin	70 \pm 2,0	103 \pm 4,6	<LOQ
HT-2 Toxin	88 \pm 6,3	106 \pm 10,9	n.d.
T-2 Triol	86 \pm 8,2	93 \pm 7,0	<LOQ
T-2 Tetraol	81 \pm 8,6	<LOQ	n.d.
Neosolaniol	75 \pm 4,9	98 \pm 4,8	91 \pm 21,3
Monoacetoxyscirpenol-Glucosid*	79 \pm 4,9	-	-
Scirpentriol-Glucosid*	74 \pm 9,0	-	-
Scirpentriol-Diglucosid*	62 \pm 15,8	-	-
HT-2 Toxin-Glucosid*	104 \pm 1,5	-	-
HT-2 Toxin-Diglucosid*	81 \pm 9,1	-	-

* Durchführung der Validierung, sowie Bestimmung des LOQ mittels nicht zertifizierter Standards
LOQ: DAS: 5,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 15-MAS: 5,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2: 6,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2 Triol: 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2 Tetraol: 91 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

Für die Kulturmedien der Pflanzen wurden keine Validierungen durchgeführt, da sämtliche Proben lediglich verdünnt wurden und es somit bei der Aufarbeitung zu keinen Verlusten kommen konnte. Die Nachweisgrenzen (LOD: S/N = 3:1; Tabelle A 8)

in Kulturmedien lagen zwischen 1,6 µg/kg (T-2 Toxin) und 37,2 µg/kg (HT-2 Toxin) bzw. $1,2 \times 10^4$ counts (MAS-G) und $3,3 \times 10^4$ counts (SCRIP-G). Sämtliche Proben wurden mit Matrixstandards quantifiziert um matrixbedingte Fehlquantifizierungen zu vermeiden.

Für Filterbrücken wurde die Präzision und Richtigkeit der Messung von fünf Typ A Trichothecenen ermittelt (Tabelle 31). Die mittleren Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 93 % (15-MAS) bis 117 % (DAS), die Nachweisgrenzen (LOD: S/N = 3:1; Tabelle A 9) zwischen 0,3 µg/kg (T-2 Toxin) und 4,7 µg/kg (HT-2 Toxin).

Tabelle 31: Richtigkeit und Präzision von Typ A Trichothecenen in Filterbrücken (n=5, $\bar{x} \pm SD$ [%])

Toxin	500 µg/kg (Stammlsg.*)	50 µg/kg (1:10*)
4,15-Diacetoxyscirpenol	97±2,1	136±12,5
15-Monoacetoxyscirpenol	92±3,0	94±7,3
Scirpentriol*	95±8,7	105±12,1
T-2 Toxin	92±4,0	112±15,5
HT-2 Toxin	92±2,6	114±10,8

* Durchführung der Validierung mittels nicht zertifizierter Standards

3.4 Metabolisierungsversuche mit T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol in Kartoffelzellkulturen

Um Kenntnisse über das Verhalten von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol in Kartoffeln zu erhalten, wurden ausführliche Untersuchungen zur Aufnahme und dem Abbau der Toxine in Kartoffelzellkulturen, mit dem Schwerpunkt der Bildung von Glucosidkonjugaten, durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden dafür einheitlich mit 5,0 µg/ml T-2 Toxin bzw. 4,15-Diacetoxyscirpenol dotiert und über verschiedene Zeiträume hinweg inkubiert.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der untersuchten Proben wurden in den folgenden beiden Abschnitten Konzentrationen, die unter der Bestimmungsgrenze lagen mit einbezogen und durch rote Markierungen in den Abbildungen kenntlich gemacht.

3.4.1 Nachweis von T-2 Toxin, 4,15-Diacetoxyscirpenol und deren Glucosidmetaboliten in Filterkulturen

Um einen umfassenden Überblick über die Metabolisierung der Toxine in den Filterkulturen zu erhalten, wurden neben den Zellfraktionen zusätzlich die Zellkulturmedien sowie das Filterpapier (nach 8 und 12 Tagen) analysiert.

Zellfraktion

Weder in Desiré- noch in Agria-Zellen konnten über den Versuchszeitraum hinweg T-2/HT-2 Toxin bzw. 4,15-Diacetoxyscirpenol nachgewiesen werden. Weitere Vertreter der Scirpentriol-Gruppe wie 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol konnten zwar zu mehreren Zeitpunkten in geringen Mengen in den Kartoffelzellen nachgewiesen werden, die Gehalte befanden sich aber zum großen Teil unter der Bestimmungsgrenze (Tabelle A 20 und Tabelle A 21). Dafür konnten bereits kurze Zeit nach der Toxinzugabe (1 h) in beiden Zelllinien Konzentrationen an HT-2 Toxin-Glucosid detektiert werden (Abbildung 28 und Abbildung 29). Eine vermehrte Produktion sowie die Bildung von HT-2 Toxin-Diglucosid wurden allerdings erst ab dem zweiten Tag beobachtet. Während die Konzentrationen der Konjugate in den Agria-Zellen bis zum 12. Versuchstag anstiegen, konnte man bei den Desiré-Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits wieder einen Abfall beobachten. Zusätzlich wurden in Agria-Zellen, ähnlich wie auch schon in den Vorversuchen, höhere Glucosidkonjugatkonzentrationen als in Desiré-Zellen beobachtet, insbesondere war auch der Anteil an HT-2 Toxin-Glucosid gegenüber HT-2 Toxin-Diglucosid deutlich gesteigert.

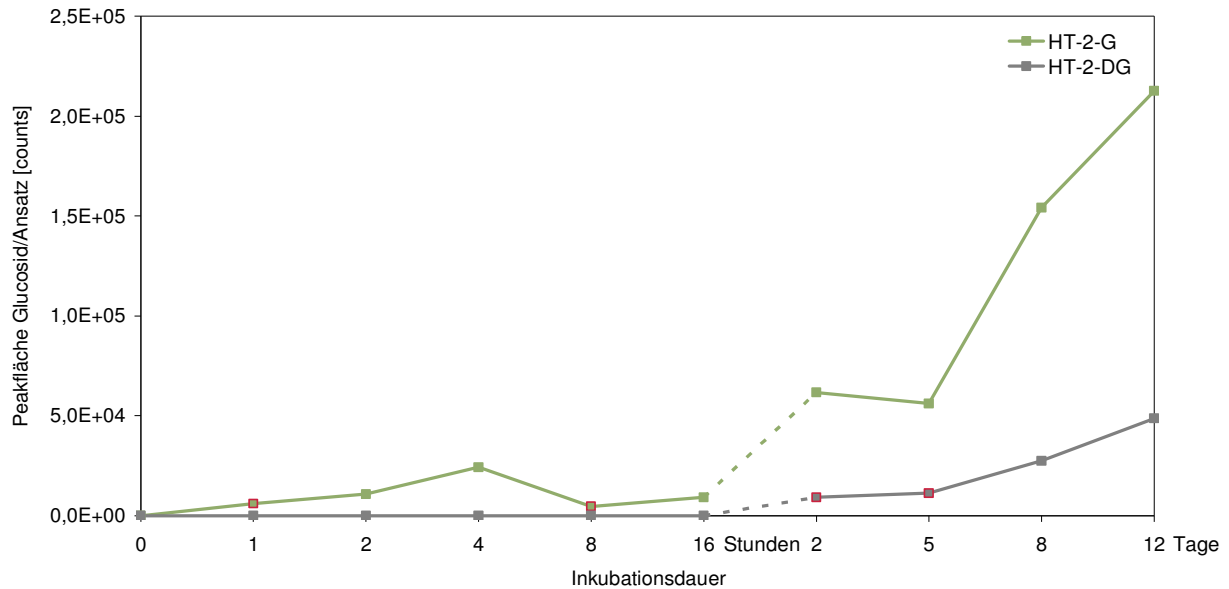


Abbildung 28: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von Agria-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium (□ LOD<c<LOQ)

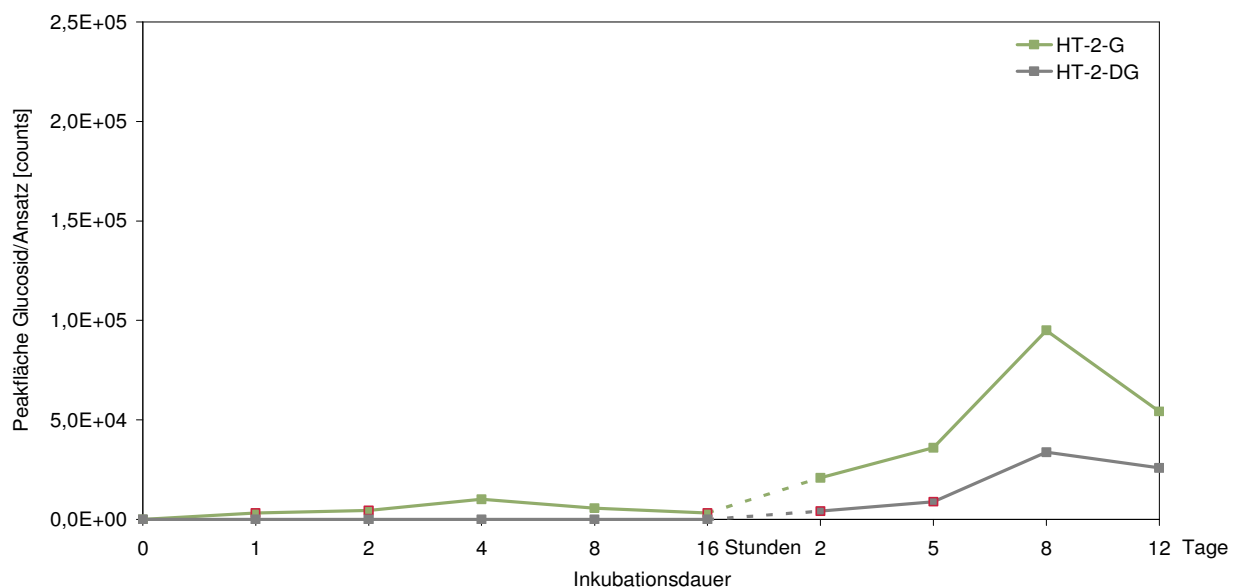


Abbildung 29: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium (□ LOD<c<LOQ)

Auch in Kartoffelzellen, die mit 4,15-Diacetoxyscirpenol versetzt wurden, konnten bereits nach zwei Stunden die ersten Glucosidkonjugate nachgewiesen werden. Während in Agria-Zellen MAS-Glucosid und SCRPs-Glucosid detektiert werden konnten, produzierten Desiré-Zellen zunächst SCRPs-Glucosid und SCRPs-Diglucosid. Erst nach zwei Tagen konnten in beiden Zelllinien alle drei Metabolite nachgewiesen werden. Ihre Konzentrationen stiegen ab diesem Zeitpunkt bis zum Versuchsende nach 12 Tagen zunehmend an (Abbildung 30 und Abbildung 31).

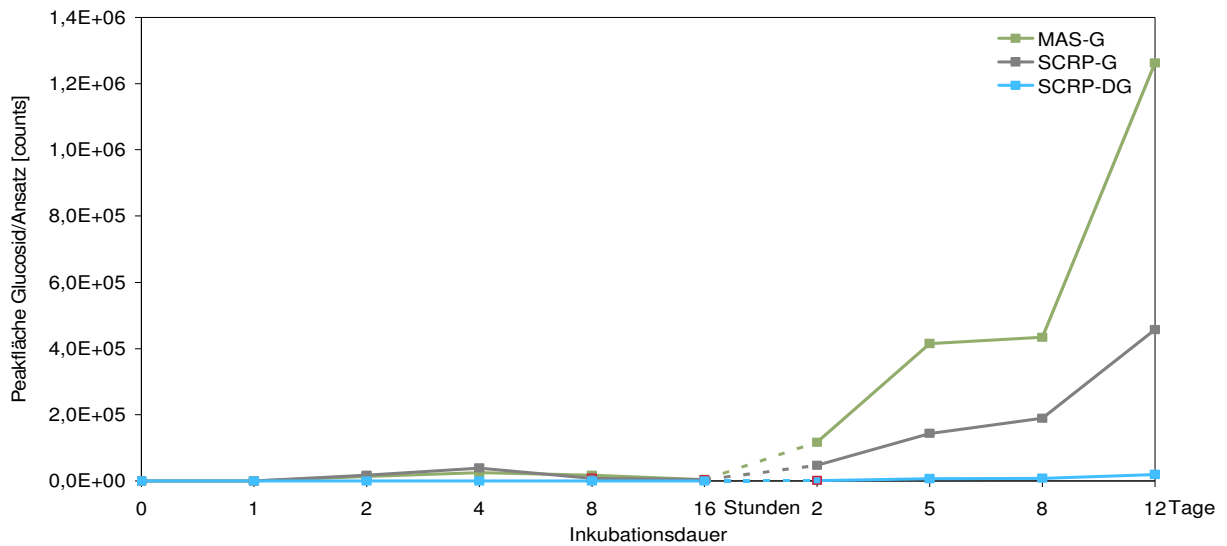


Abbildung 30: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Agria-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium (□ LOD < c < LOQ)

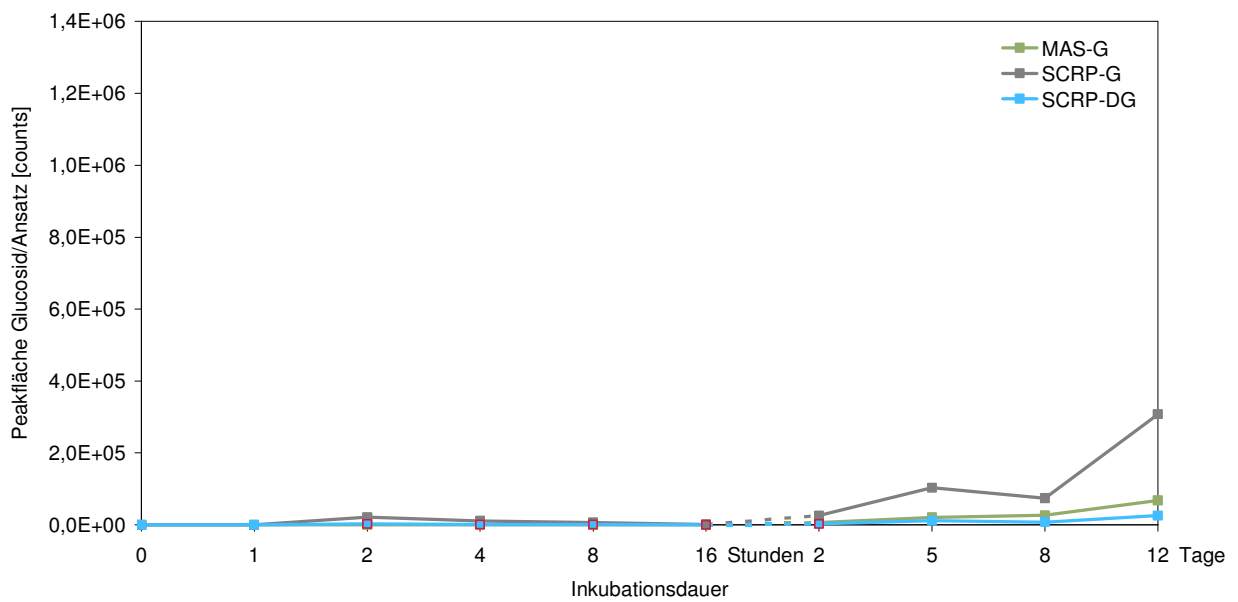


Abbildung 31: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium (□ LOD < c < LOQ)

Kulturmedium

Im Unterschied zu den Kartoffelzellen konnten in den Kulturmedien mit einer einzigen Ausnahme (c von MAS-G nach 8 d < LOQ) lediglich die dotierten Toxine nachgewiesen werden. In den Medien der mit 4,15-Diacetoxyscirpenol versetzten Kartoffelzellen wurden zusätzlich Spuren (c < LOQ) von T-2 Toxin detektiert. Dies konnte allerdings auf eine Verunreinigung des Toxinstandards zurückgeführt werden.

Unmittelbar nach Zugabe (0 h) lagen die Gehalte an T-2 Toxin in den Kulturmedien bei 19 % (Agria) bzw. 14 % (Desiré) der eingesetzten Toxinmengen. Bis zum Versuchsende unterlagen die Gehalte zwar Schwankungen, es kam jedoch zu keiner eindeutigen Reduktion der Toxinkonzentrationen. So wurden nach 12 Tagen noch 13 % (Agria) und 12 % (Desiré) des eingesetzten Toxins in den Kulturmedien nachgewiesen (Abbildung 32).

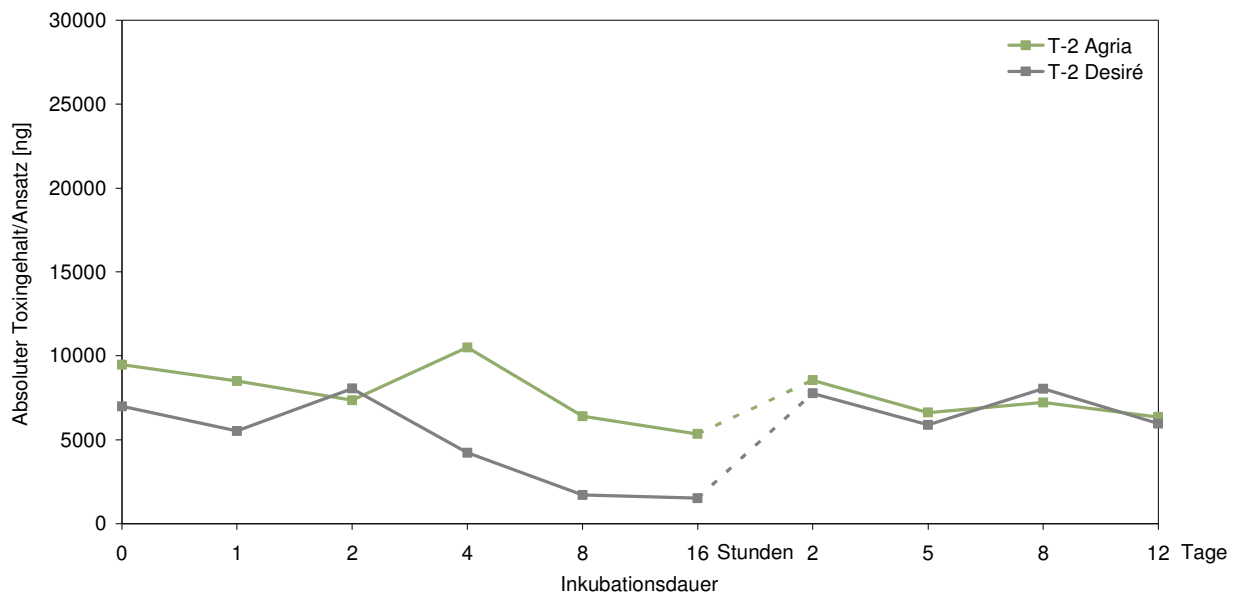


Abbildung 32: Nachweis von T-2 Toxin in Zellkulturmedien von Agria- und Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium

Im Unterschied zu den relativ geringen T-2 Toxin-Gehalten in den Kulturmedien der Filterkulturen wurden direkt nach der Zugabe von 4,15-Diacetoxyscirpenol noch 53 % des eingesetzten Toxins im Medium der Agria-Filterkulturen und 45 % in Medien der Desiré-Filterkulturen gefunden. Nach einer Inkubationsdauer von 12 Tagen waren die Gehalte mit 41 % (Agria-Medium) und 29 % (Desiré-Medium) geringer als zu Beginn, jedoch konnte lediglich eine tendenzielle Reduktion der Gehalte, aufgrund der aufgetretenen Schwankungen über den ganzen Versuchszeitraum hinweg, erkannt werden (Abbildung 33).

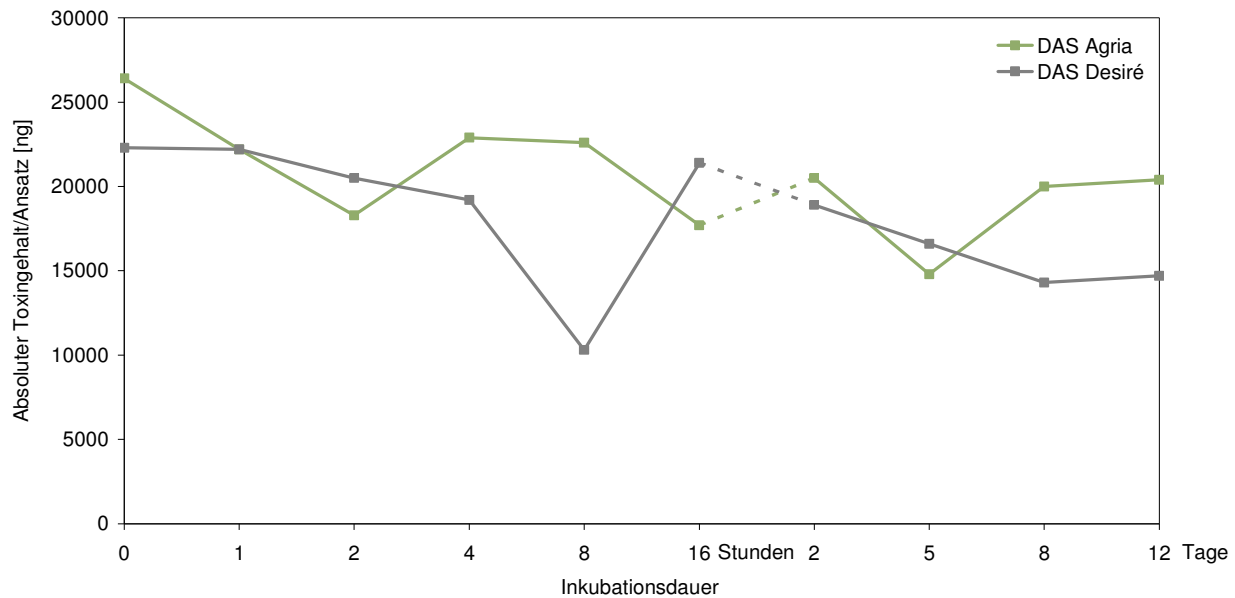


Abbildung 33: Nachweis von 4,15-Diacetoxyscirpenol in Zellkulturmedien von Agria- und Desiré-Filterkulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium

Filtermaterial

Im Gegensatz zu den Zellfraktionen und Medien der Filterkulturen konnten in den untersuchten Filterbrücken nach 8 und 12 Tagen mehrere Toxine und Metaboliten gleichzeitig nachgewiesen werden. Neben T-2 Toxin mit Gehalten zwischen 1363 ng und 2602 ng/Filter und 4,15-Diacetoxyscirpenol (3517 ng bis 5935 ng/Filter) konnten zusätzlich geringe Konzentrationen an HT-2 Toxin, 4-Monoacetoxyscirpenol, 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass beide für sämtliche Metabolisierungsversuche eingesetzten Standards (T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol) geringe Mengen des jeweils anderen Toxins enthielten.

Weiterhin konnten in den untersuchten Filtermaterialien alle fünf in Frage kommenden Glucosidkonjugate nachgewiesen werden, wenn auch in geringerer Konzentration als in den entsprechenden Zellfraktionen (Abbildung 34). Bei diesen Proben ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Zellmaterial der Kartoffelkulturen aus technischen Gründen nicht vollständig von den Filterbrücken entfernt werden konnte.

Im Unterschied zu den Zellfraktionen der Agria-Kulturen nahm die Konzentration sämtlicher Glucosidkonjugate in den Filtermaterialien zwischen dem 8ten und 12ten Tag ab.

Hinsichtlich der Abnahme der beiden HT-2 Toxin-Glucoside bzw. der Zunahme von Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, Scirpentriol-Glucosid und Scirpentriol-Diglucosid stimmten bei den Desiré-Kulturen die Ergebnisse der Filterbrücken mit den Resultaten der Zellfraktionen überein.

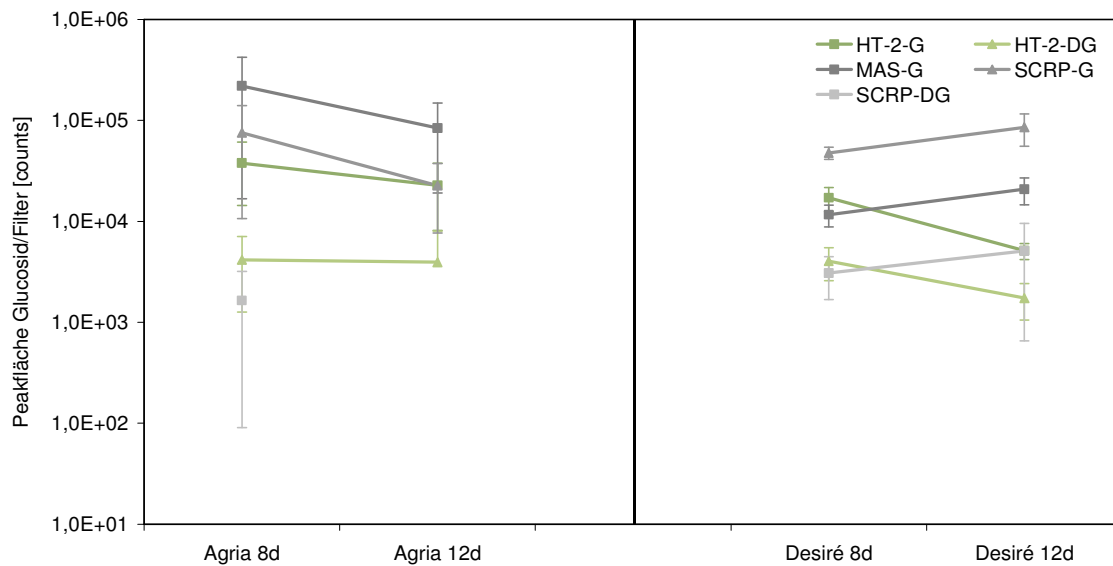


Abbildung 34: Nachweis von Typ A Trichothecen-Glucosidkonjugaten in Filtermaterial von Agria- und Desiré-Filterkulturen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin bzw. DAS/ml Kulturmedium und einer Inkubationsdauer von 8 bzw. 12 Tagen

3.4.2 Nachweis von T-2 Toxin, 4,15-Diacetoxyscirpenol und deren Glucosidmetaboliten in Suspensionskulturen

Für die Durchführung von Metabolisierungsversuchen in Suspensionskulturen wurde - aufgrund der deutlich geringeren Glucosidierungsrate von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol in den Filterkulturen der Kartoffelsorte Desiré - ausschließlich die Zelllinie Agria verwendet. Sämtliche Ansätze wurden abermals mit Toxin-konzentrationen von jeweils 5 µg/ml Kulturmedium dotiert.

Zellfraktion

Im Gegensatz zu den Filterkulturen konnten in den Zellfraktionen der Suspensionskulturen auch Gehalte an T-2 Toxin bzw. HT-2 Toxin nachgewiesen werden (Abbildung 35). Während zu Beginn (0 Stunden) insgesamt 2,7 % des eingesetzten Toxins (Σ T-2/HT-2) als Aglucon in den Zellen vorlag, nahmen die Konzentrationen im Laufe der ersten 16 Stunden beträchtlich ab (0,1 % Σ T-2/HT-2). Nach zwei Tagen konnten auch in den Suspensionskulturen keine nicht metabolisierten Toxine mehr erfasst werden.

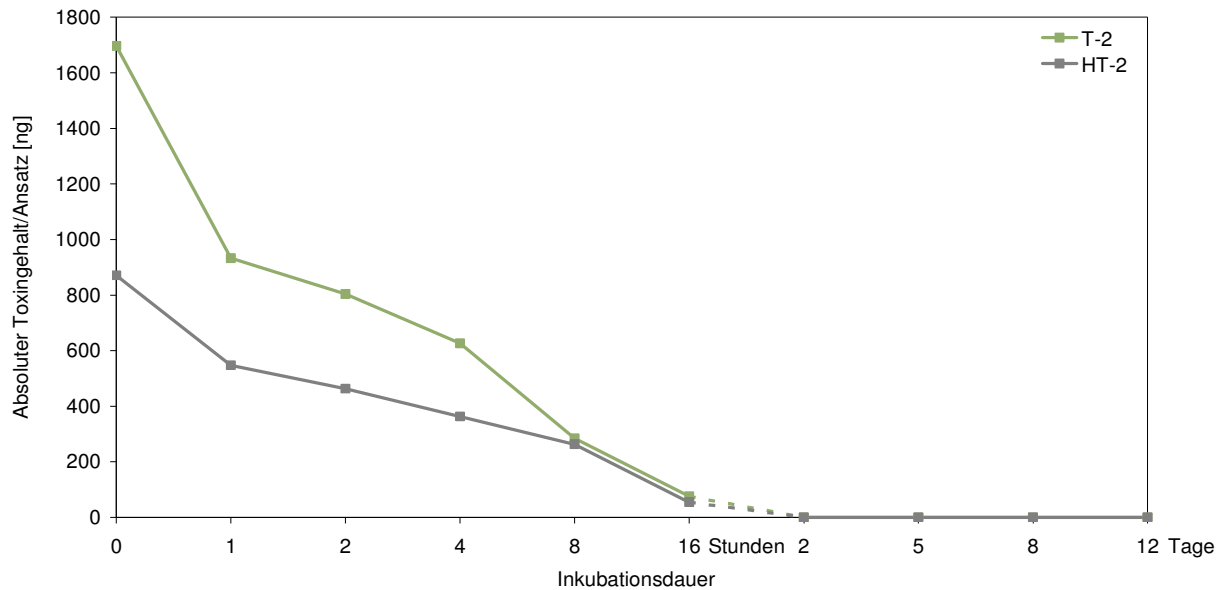


Abbildung 35: Nachweis von T-2/HT-2 Toxin in der Zellfraktion von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium

Im Vergleich dazu konnten nach einer Inkubation mit 4,15-Diacetoxyscirpenol deutlich niedrigere Gehalte (0,2 %) in den Agria-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 36). Unmittelbar nach Zugabe des Toxins (0 Stunden) wurden dagegen bereits mehrere Metaboliten von 4,15-Diacetoxyscirpenol nachgewiesen, unter anderem 4-Monoacetoxyscirpenol, 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol. Während die Gehalte an Diacetoxyscirpenol stetig abnahmen und nach acht Stunden nicht mehr nachweisbar waren und auch 4-Monoacetoxyscirpenol lediglich bei dem Zeitpunkt 0 Stunden gefunden werden konnte, stiegen die Gehalte an 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol zunächst an. Die höchsten Signalintensitäten der Extrakte aus Agria-Zellen wurden nach einer Stunde für Scirpentriol (max. 7×10^5 counts) gefunden. Danach kam es aber auch hier zu einer Abnahme der Toxingehalte ebenso wie bei 15-Monoacetoxyscirpenol. Die Skalierung der y-Achsen der nicht quantitativ standardisierten Toxine 4-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol erfolgte mit Hilfe der Signalintensität von 15-Monoacetoxyscirpenol, dessen mittlere Peakfläche bei einer Konzentration von 100 ng/ml (in Kartoffelzellmatrix) $9,0 \times 10^4$ counts entsprach.

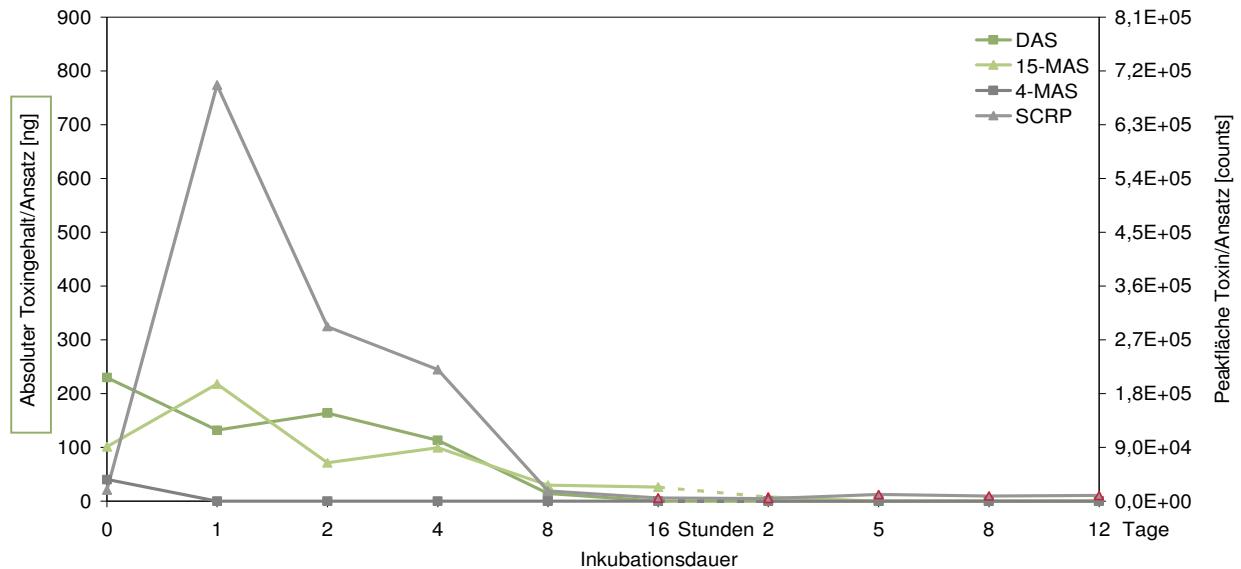


Abbildung 36: Nachweis von Toxinen der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium (□ LOD < c < LOQ)

Anders als in Filterkulturen konnten in den Zellen der Suspensionskulturen direkt nach Zugabe des jeweiligen Toxins (0 h) Glucosidkonjugate nachgewiesen werden. Die Konzentrationen beider HT-2 Toxin-Glucosidkonjugate erreichten hier bereits die maximal gefundenen Gehalte in den Filterkulturen der Zelllinie. Im weiteren Verlauf stiegen die Konzentrationen der Glucoside bis zum fünften Tag (HT-2 Toxin-Glucosid; $8,9 \times 10^6$ counts) bzw. bis zum achten Tag (HT-2 Toxin-Diglucosid; $4,6 \times 10^6$ counts) kontinuierlich an, danach waren die Konzentrationen wieder rückläufig (Abbildung 37).

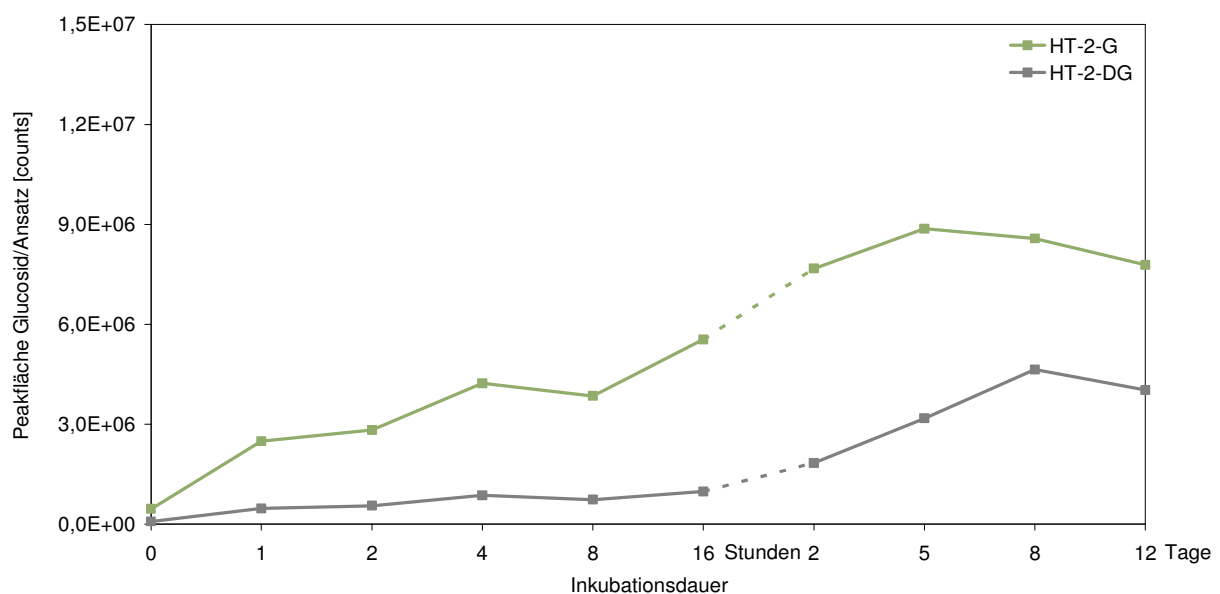


Abbildung 37: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in der Zellfraktion von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium

Auch die Glucosidkonjugate von Vertretern der Scirpentriol-Gruppe wurden bereits zu Beginn des Versuchs in relativ hohen Konzentrationen nachgewiesen. Vergleichbare Gehalte konnten in Filterkulturen erst nach acht bis 12 Tagen erreicht werden. Während der ersten Stunde des Versuchs stiegen die Konzentrationen an Monoacetoxyscirpenol-Glucosid ($8,8 \times 10^6$ counts), Scirpentriol-Glucosid ($2,5 \times 10^6$ counts) und Scirpentriol-Diglucosid ($1,3 \times 10^5$ counts) zunächst rapide an. Danach verringerte sich die Zuwachsrate aller drei Glucosidkonjugate zwar, die Gehalte der Substanzen konnten sich jedoch nach weiteren 15 Stunden (MAS-G: $1,5 \times 10^7$ counts; SCR-P-DG: $2,5 \times 10^5$ counts) bzw. zwei Tagen (SCR-P-G: $4,0 \times 10^6$ counts) beinahe verdoppeln. Bis zum Ende des Versuchszeitraums nahmen die Konzentrationen der Glucoside anschließend wieder leicht ab (Abbildung 38).

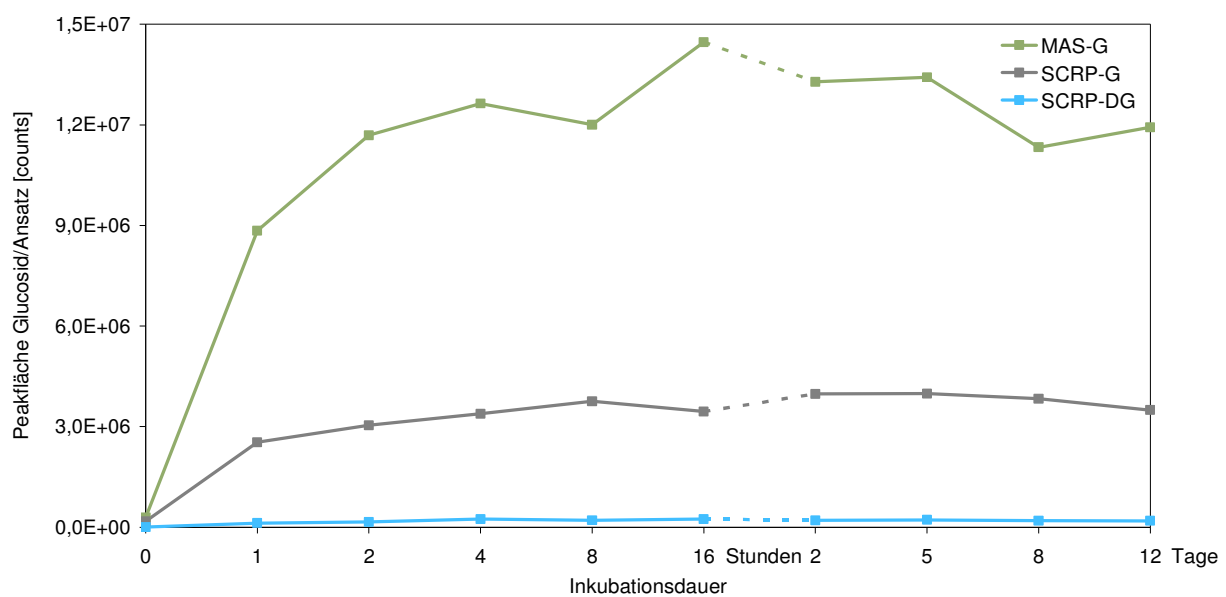


Abbildung 38: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in der Zellfraktion von *Agria*-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von $5 \mu\text{g}$ DAS/ml Kulturmedium

Kulturmedium

In den Kulturmedien der Suspensionskulturen konnte im Gegensatz zu den Filterkulturen eine starke Abnahme der zugesetzten Toxine über den Versuchszeitraum hinweg beobachtet werden.

Wie Abbildung 39 zeigt, kam es während der ersten zwei Stunden des Versuchs zu einer Abnahme des eingesetzten T-2 Toxins von anfangs 35,4 % auf 3,4 %. Neben T-2 Toxin konnte ebenfalls HT-2 Toxin nachgewiesen werden. Letzteres allerdings nach einer Stunde Inkubation in weitaus geringeren Konzentrationen von maximal 5,6 % des eingesetzten T-2 Toxins. Nach zwei Tagen wurden schließlich keine nicht glucosidierten Toxine mehr im Kulturmedium gefunden.

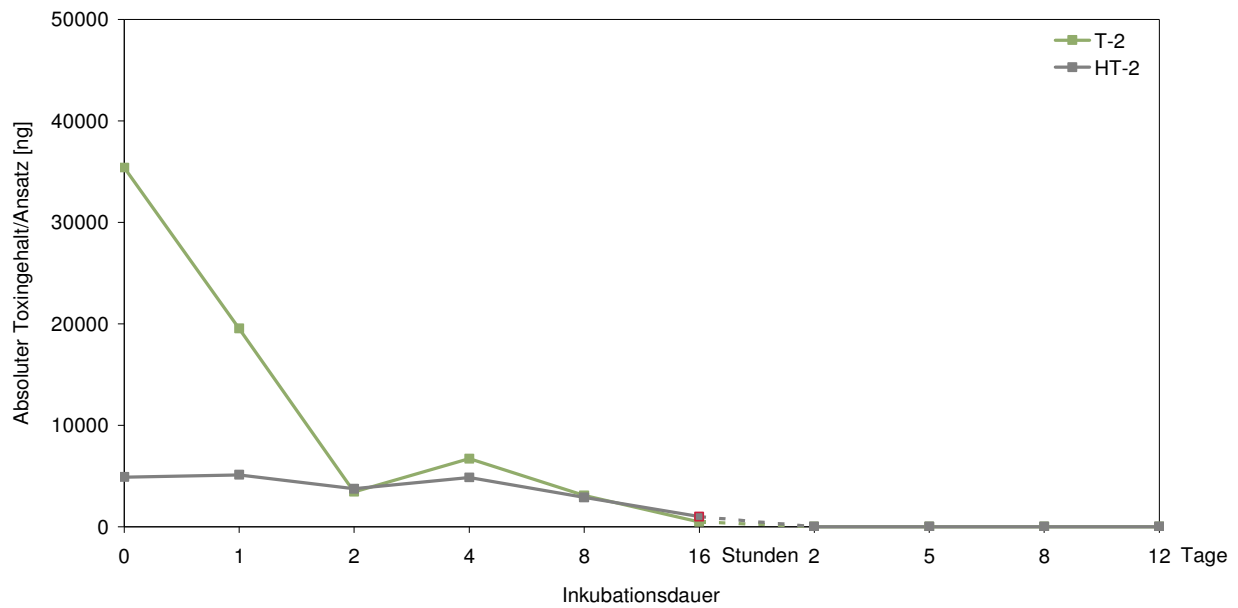


Abbildung 39: Nachweis von T-2/HT-2 Toxin in Zellkulturmedien von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg T-2 Toxin/ml Kulturmedium (□ LOD<c<LOQ)

Ähnliche Daten konnten für Diacetoxy-scirpenol ermittelt werden (Abbildung 40). Hier fielen die Konzentrationen von anfangs 47,2 % des eingesetzten Toxins bis auf 3,4 % nach 4 h Inkubationsdauer ab. Anschließend konnte kein unkonjugiertes Toxin mehr detektiert werden. Gleichzeitig wurden aber bereits unmittelbar nach Versuchsbeginn 4- sowie 15-Monoacetoxy-scirpenol und nach 1 h Scirpentriol nachgewiesen. Während die Gehalte an 4- und 15-Monoacetoxy-scirpenol nach 16 h bzw. 5 d nicht mehr nachzuweisen waren, konnte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg Scirpentriol im Kulturmedium detektiert werden.

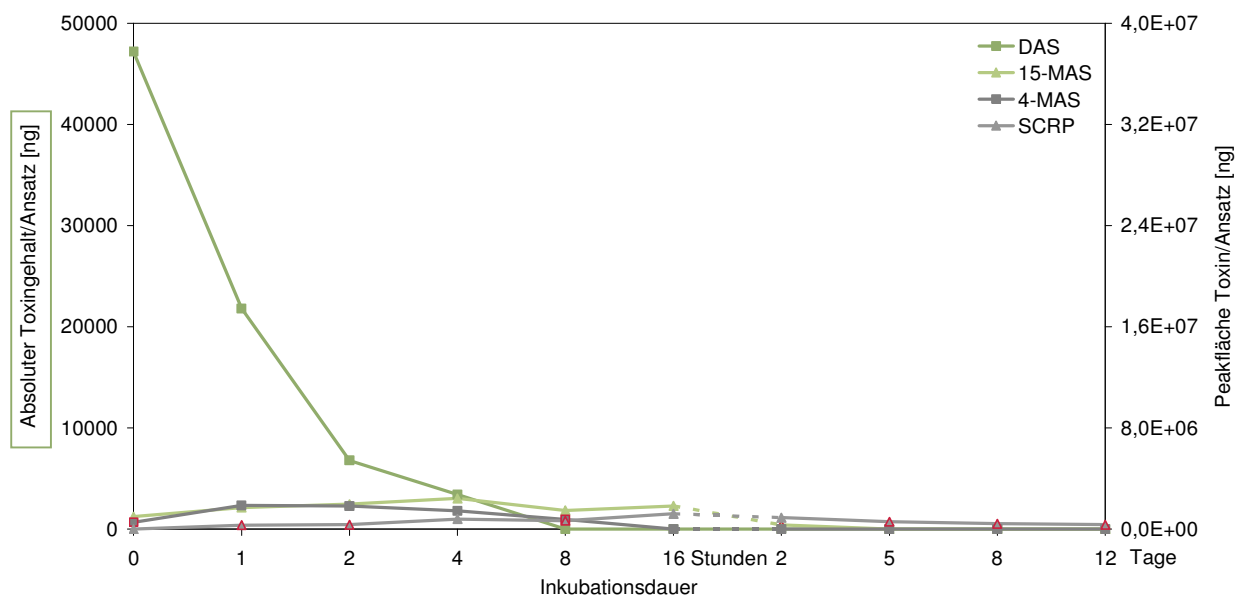


Abbildung 40: Nachweis von Toxinen der Scirpentriol-Gruppe in Zellkulturmedien von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium (□ LOD<c<LOQ)

Neben nicht glucosidierten Toxinen konnten in den Kulturmedien der Suspensionskulturen auch Glucosidkonjugate nachgewiesen werden. So wurden bereits eine Stunde nach Zugabe von T-2 Toxin Gehalte an HT-2 Toxin-Glucosid im Medium detektiert (Abbildung 41). Im Folgenden stiegen die Konzentrationen bis zu der Inkubationsdauer von 16 Stunden auf $1,8 \times 10^7$ counts. Danach fiel die Konzentration bis zum zweiten Tag deutlich ab, nach acht Tagen konnte schließlich kein HT-2 Toxin-Glucosid mehr im Medium gefunden werden.

Daneben wurde ab einer Inkubationszeit von vier Stunden zusätzlich HT-2 Toxin-Diglucosid nachgewiesen, mit einer maximalen Signalstärke von $2,0 \times 10^6$ counts nach zwei Tagen.

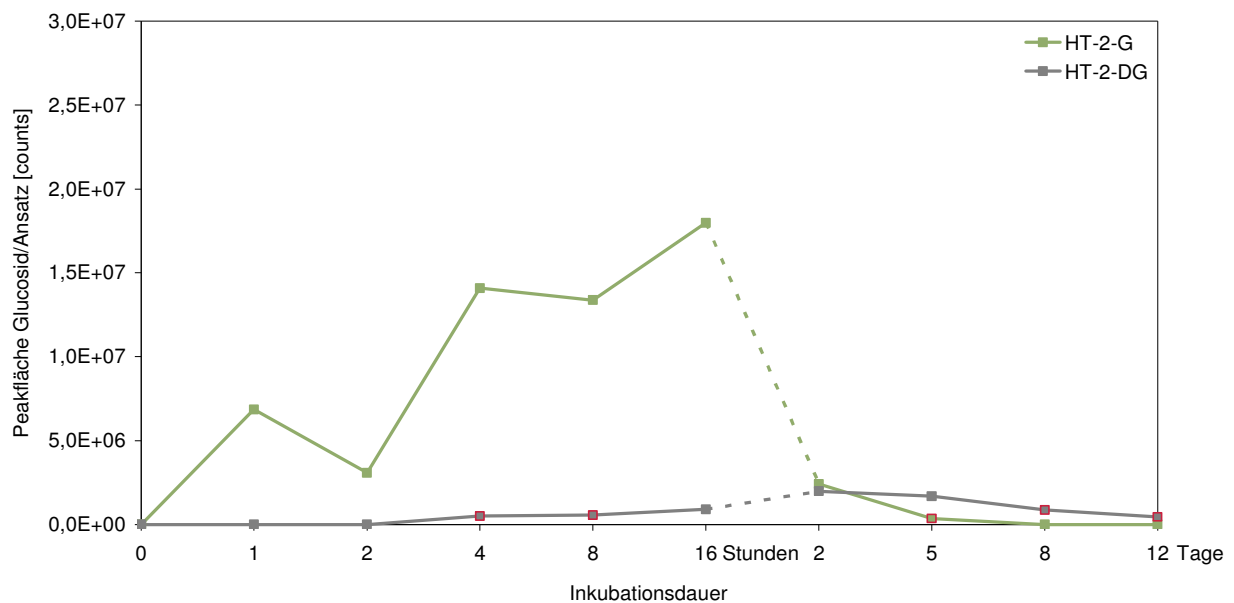


Abbildung 41: Nachweis von HT-2 Toxin-Glucosidkonjugaten in Zellkulturmedien von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von $5 \mu\text{g}$ T-2 Toxin/ml Kulturmedium (\square LOD < c < LOQ)

Analog dazu konnten bereits nach einer Stunde Inkubation mit 4,15-Diacetoxyscirpenol Gehalte an Monoacetoxyscirpenol-Glucosid und nach acht Stunden an Scirpentriol-Glucosid nachgewiesen werden (Abbildung 42). Die Konzentrationen beider Glucosidkonjugate stiegen kontinuierlich an, bevor sie nach maximalen Werten nach fünf (SCR-P-G; $7,3 \times 10^6$ counts) bzw. acht Tagen (MAS-G; $2,7 \times 10^7$ counts) wieder abnahmen. Scirpentriol-Diglucosid konnte zu keinem Zeitpunkt im Kulturmedium der Agria-Suspensionskulturen nachgewiesen werden.

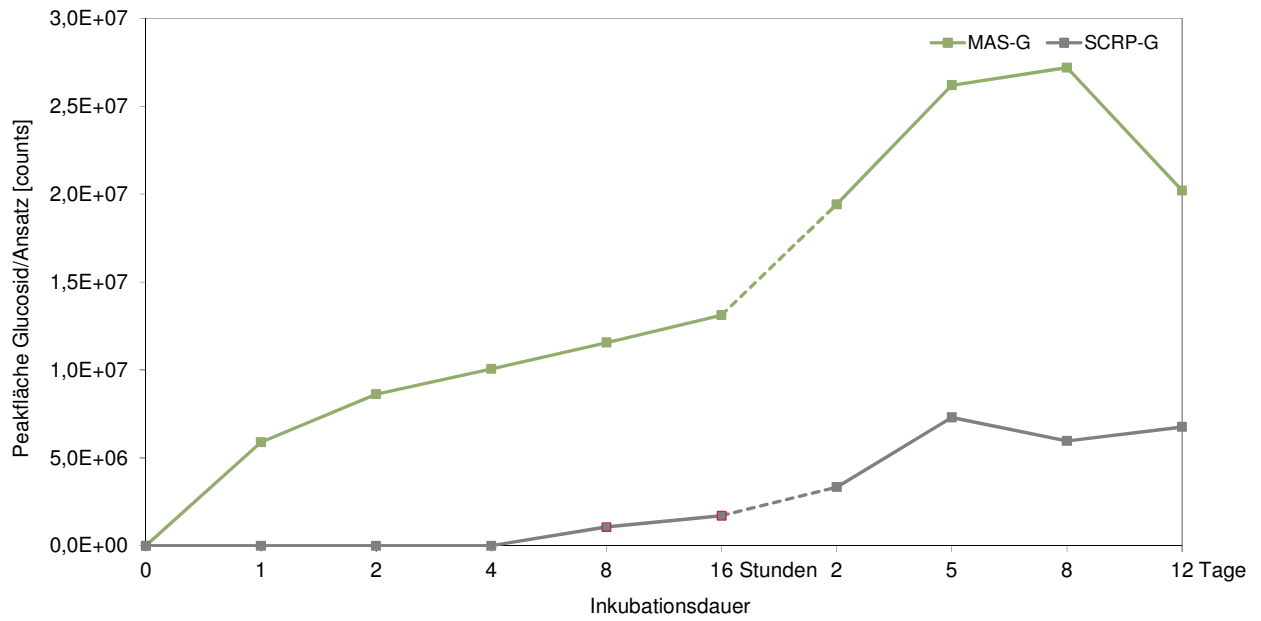


Abbildung 42: Nachweis von Glucosidkonjugaten der Scirpentriol-Gruppe in Zellkulturmedien von Agria-Suspensionskulturen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Zugabe von 5 µg DAS/ml Kulturmedium (□ LOD < c < LOQ)

4 Vorkommen von Fusarientoxinen in artifiziiell und natürlich mit *Fusarium* spp. infizierten Kartoffelknollen

4.1 Ausbreitung von *Fusarium* spp. in der Kartoffelknolle

Die Faulstellen der mit verschiedenen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen wurden nach einer Lagerdauer von 28 Tagen vermessen und hinsichtlich ihrer Anfälligkeit beurteilt. Sämtliche verwendeten Stämme waren für die Kartoffelsorte 'Lady Christl' mäßig bis stark virulent (Tabelle 32). Einige der inokulierten Kartoffelknollen bildeten während der Lagerdauer zusätzlich Symptome einer Nassfäule aus. Bei diesen Knollen konnte, im Vergleich zu den Knollen der gleichen Gruppe ohne Nassfäule, eine starke Zunahme der Fäuleausdehnung beobachtet werden (z.B. *F. sambucinum* DSM 62397, *F. sulphureum* No. 34).

Tabelle 32: Virulenz von verschiedenen *Fusarium* spp. gegenüber der Kartoffelsorte 'Lady Christl' (n=42)

Isolat	Knollen ohne Nassfäule		Knollen mit Nassfäule	
	n	\bar{x} Fäuleausdehnung [mm] (Virulenz)*	n	\bar{x} Fäuleausdehnung [mm] (Virulenz)*
<i>Fusarium coeruleum</i> (DSM 62178)	5	27,0 (+++)	0	-
<i>Fusarium culmorum</i> (No. 3)	0		5	48,1 (+++)
<i>Fusarium sambucinum</i> (No. 29)	5	10,3 (++)	0	
<i>Fusarium sambucinum</i> (DSM 62397)	3	14,3 (++)	3	41,5 (+++)
<i>Fusarium sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> (DSM 62186)	5	16,3 (+++)	0	
<i>Fusarium sulphureum</i> (No. 33)	5	20,9 (+++)	0	
<i>Fusarium sulphureum</i> (No. 34)	2	13,4 (++)	3	48,3 (+++)
<i>Fusarium</i> sp. (No. K30)	5	23,3 (+++)	0	-

* Virulenz: + schwach, ++ mäßig, +++ stark

Außerdem wurden 12 weitere Kartoffelknollen aus dem Einzelhandel untersucht, die Symptome einer Trockenfäule aufwiesen (Tabelle 33). Ein großer Teil dieser Knollen hatte stark ausgeprägte Faulstellen, aber auch einige Knollen mit vergleichsweise niedriger Fäuleausdehnung wurden untersucht. Wie auch bei den inokulierten Kartoffeln bildeten hier einige Knollen zusätzlich eine Nassfäule aus. Diese Knollen besaßen allesamt eine große Fäuleausdehnung.

Tabelle 33: Beurteilung von Faulstellen natürlich infizierter Kartoffelknollen mit Trockenfäulesymptomen

Probe (Sorte)	\bar{x} Fäuleausdehnung [mm] (Virulenz)*	Nassfäule
N1 (Agata)	25,9 (+++)	-
N2 (Agata)	44,4 (+++)	-
N3 (unbekannt)	36,8 (+++)	+
N4 (Karlana)	15,8 (+++)	-
N5 (Satina)	14,6 (++)	-
N6 (Satina)	5,2 (+)	-
N7 (unbekannt)	x(+++)	+
N8 (unbekannt)	x(+++)	+
N9 (Lady Christl)	7,8 (+)	-
N10 (Lady Christl)	6,8 (+)	-
N11 (Sieglinde)	6,0 (+)	-
N12 (Sieglinde)	26,9 (+++)	-

x Berechnung nicht möglich, da Knolle weitgehend verrottet

* Virulenz: + schwach, ++ mäßig, +++ stark

4.2 Trockensubstanzbestimmung

Um einheitliches Probenmaterial für die massenspektrometrischen Untersuchungen zu erhalten, wurden die ausgestanzten Kartoffelstifte und die Faulstellen sämtlicher Kartoffelknollen lyophilisiert und die Trockensubstanzgehalte [%] bestimmt (Abbildung 43). Dabei waren die Trockensubstanzgehalte des gesunden Kartoffelgewebes (Kartoffelstifte) mit Medianen von 19 % (inokulierte Knollen; n=147) und 21 % (natürlich infizierte Knollen; n=38) vergleichbar mit dem Ergebnis für rohe Kartoffeln aus Abschnitt D 5.1 (Median 20 %). Der Trockenmassegehalt der Faulstellen lag mit 34 % (inokulierte Knollen; n=41) bzw. 33 % (natürlich infizierte Knollen; n=12) über den Werten des gesunden Gewebes. Bedingt durch das Auftreten der Kartoffelnassfäule gab es in den Faulstellen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Trockenmassegehalte: zwischen 17-55 % bei inokulierten Kartoffeln und 3,3-57 % bei natürlich infizierten Knollen.

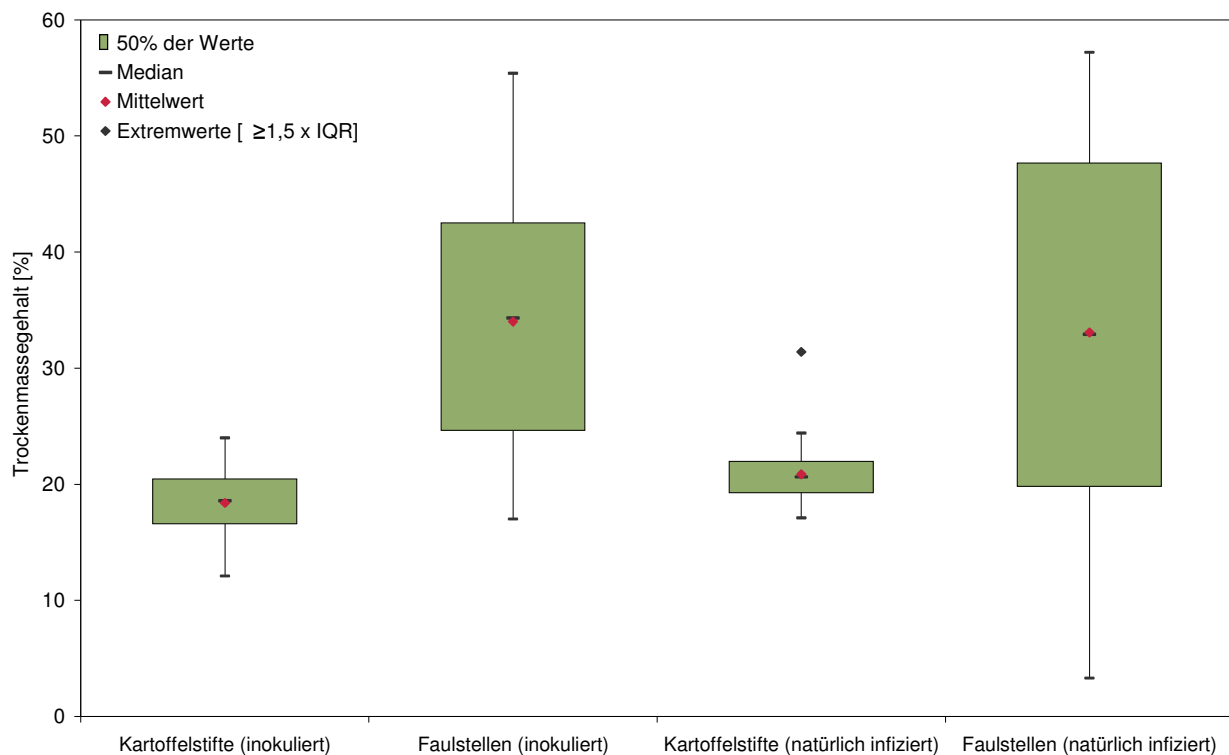


Abbildung 43: Trockensubstanzgehalte [%] von gesundem Knollengewebe sowie von Faulstellengewebe aus inokulierten und natürlich infizierten Kartoffeln

4.3 Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffelstiften

Die Richtigkeit und Präzision der Analysen von Typ A und B Trichothecenen sowie Zearalenon in Kartoffelpulver wurde für geringe Probenmengen überprüft. Dazu wurde toxisches Kartoffelpulver mit 19 zertifizierten oder selbst hergestellten Kalibrierstandards dotiert. Die selbst gewonnenen Analyten wurden lediglich anhand ihrer Peakfläche quantitativ erfasst. Die Quantifizierung aller Substanzen erfolgte mittels eines externen Matrixstandards. Die ebenfalls mit Hilfe von Standardsubstanzen (Matrixstandard) ermittelten Nachweisgrenzen (LOD: S/N = 3:1; Tabelle A 6) lagen zwischen

3,6 µg/kg für T-2 Toxin und 90,7 µg/kg für Verrucarol bzw. zwischen $2,2 \times 10^3$ counts (Ac-T-2) und $1,8 \times 10^4$ counts (TAS und 4-MAS).

Die Ergebnisse der Methodvalidierung sind in Tabelle 34 aufgeführt. Die mittleren Wiederfindungsraten lagen zwischen 79 % (ZON) und 146 % (4-MAS).

Tabelle 34: Richtigkeit und Präzision der Analysemethoden zur Bestimmung von Fusarientoxinen in Kartoffelstiften (n=5, $\bar{x} \pm SD$ [%])

Toxin	500 µg/kg (Stammlsg.*)	250 µg/kg (1:2*)	50 µg/kg (1:10*)
3,4,15-Triacetoxyscirpenol*	136±3,0	154±10	145±9,3
4,15-Diacetoxyscirpenol	127±5,3	126±8,0	<LOQ
4-Monoacetoxyscirpenol*	150±11	151±13	136±12
15-Monoacetoxyscirpenol	107±5,1	106±7,4	116±8,8
Scirpentriol*	130±11	131±28	n.d.
Acetyl-T-2 Toxin*	122±6,9	128±10	118±7,2
T-2 Toxin	126±3,6	123±12	107±4,1
HT-2 Toxin	132±7,3	125±16	<LOQ
T-2 Triol	143±8,8	129±19	<LOQ
T-2 Tetraol	115±2,7	108±8,9	<LOQ
Neosolaniol	115±5,8	113±12	91±17
Verrucarol	103±9,9	<LOQ	n.d.
Diacetylverrucarol	124±14	118±15	114±7,0
Deoxynivalenol	125±2,3	114±6,7	<LOQ
3-Acetyldeoxynivalenol	106±7,5	105±7,4	117±11
15-Acetyldeoxynivalenol	121±2,7	132±7,7	<LOQ
Nivalenol	90±13	97±7,6	<LOQ
Fusarenon X	117±9,7	96±8,5	<LOQ
Zearalenon	77±3,4	74±4,1	87±6,5

* Durchführung der Validierung, sowie Bestimmung von LOD und LOQ mittels nicht zertifizierter Standards

LOD: SCRP: $9,2 \times 10^3$ counts; VOL: 90,7 µg/kg

LOQ: DAS: 90,8 µg/kg; HT-2: 115,7 µg/kg; T-2 Triol: 68,5 µg/kg; T-2 Tetraol: 51,8 µg/kg; VOL: 302,4 µg/kg; DON: 119,3 µg/kg; 15-AcDON: 86,5 µg/kg; NIV: 123,2 µg/kg; FX: 54,6 µg/kg

4.4 Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Fusarientoxinen

Um die möglicherweise stattfindende Diffusion von Fusarientoxinen aus der Faulstelle in angrenzendes Gewebe zu untersuchen wurde sowohl befallenes als auch gesundes Knollengewebe von künstlich inokulierten und natürlich befallenen Kartoffeln untersucht. Die im Folgenden angegebenen Toxingehalte beziehen sich allesamt auf den Trockenmassegehalt der Probe.

In den inokulierten Knollen zweier Isolate (*Fusarium coeruleum* DSM 62178; *Fusarium sambucinum* No. 29) wurden keine Toxingehalte nachgewiesen. Bei Knollen die mit einem der fünf weiteren Isolate inokuliert waren (*Fusarium culmorum* No. 3; *Fusarium sambucinum* DSM 62397; *Fusarium sambucinum* var. *coeruleum* DSM 62186; *Fusarium sulphureum* No. 33; *Fusarium sulphureum* No. 34) fanden sich in den Faulstellen vorwiegend Typ A Trichothecene. Am häufigsten traten dabei 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol auf, aber auch andere Vertreter der Scirpentriol-Gruppe (Triacetoxyscirpenol, Diacetoxyscirpenol, 4-Monoacetoxyscirpenol) sowie Nivalenol

konnten nachgewiesen werden. Kartoffelknollen die zusätzlich zur Fusariumtrockenfäule Symptome einer Nassfäule aufwiesen, enthielten im Faulgewebe - abgesehen von einer Ausnahme (Knolle 1, Isolat: *Fusarium culmorum*) - deutlich geringere Toxingehalte als entsprechende Knollen ohne Mischfäule. In den Knollen eines weiteren Isolats (*Fusarium* sp. No. K30) konnten ausschließlich Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol und Zearalenon detektiert werden. In Tabelle 35 sind jeweils Konzentrationsbereiche und Mediane von gebildeten Toxinen eines Isolats aufgeführt, die in den Faulstellen der Kartoffelknollen ermittelt werden konnten. Der Median wurde nur dann gebildet, wenn mindestens 50 % der Proben einen positiven Befund für das in Frage kommende Toxin aufwiesen. Toxingehalte unter der Nachweisgrenze wurden mit einer Konzentration von $\frac{LOD}{2}$ in diesen Wert miteinbezogen.

Tabelle 35: Vorkommen von Fusarientoxinen in den Faulstellen von Kartoffelknollen inokuliert mit verschiedenen *Fusarium* spp.

Isolat	inokulierte Knollen [n]	Toxin + FS/“gesundes Gewebe“ [n/n]	Toxin in FS	Median (FS) [µg/kg] bzw. [%]*	Bereich (FS) [µg/kg] bzw. [%]*
<i>Fusarium coeruleum</i> DSM 62178	5	0/0	n.d.	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> No. 3	5	5/0	DAS	-	1800
			15-MAS	447	>LOQ-53900
			T-2	-	231
			4-MAS*	-	198*
			SCRP*	7990*	190-651000*
<i>Fusarium sambucinum</i> No. 29	5	0/0	n.d.	-	-
<i>Fusarium sambucinum</i> DSM 62397	6	6/0	15-MAS	9,6	LOD/2-87
			SCRP*	2005*	>LOQ-4700*
<i>Fusarium sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> DSM 62186	5	5/0	DAS	173	>LOQ-527
			15-MAS	450	213-801
			NIV	132	LOD/2-390
			TAS*	5,0*	LOD/2-5,0*
			4-MAS*	-	64*
			SCRP*	4940*	2040-27900*
<i>Fusarium sulphureum</i> No. 33	5	5/1	DAS	160	LOD/2-298
			15-MAS	2820	112-34300
			TAS*	5,6*	>LOQ-11*
			4-MAS*	81*	LOD/2-336*
			SCRP*	103000*	3620-653000*
<i>Fusarium sulphureum</i> No. 34	6	6/0	15-MAS	12	LOD/2-43
			SCRP*	747*	349-17400*
<i>Fusarium</i> sp. No. K30	5	5/3	DON	96300	39400-199000
			3-AcDON	393	253-687
			ZON	196	LOD/2-2300

Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 6 aufgeführt.

* %-Anteil an der Peakfläche der nicht zertifizierten Standards der Messreihe (Median (Peakfläche) TAS: $1,1 \times 10^6$ counts; 4-MAS: $4,6 \times 10^5$ counts, SCRCP: $1,2 \times 10^4$ counts)

+ Positiv getestet

Von allen inokulierten Kartoffelknollen, die zudem Toxingehalte in den Faulstellen aufwiesen ($n_{\text{pos.}}=30$), konnte lediglich bei vier der Nachweis einer Diffusion von Trichothecenen in angrenzendes symptomfreies Knollengewebe erbracht werden. Die Gehalte wurden allerdings nur in Proben, die direkt an die Faulstellen grenzten (Entfernung von der Faulstelle ca. 0,25-0,75 cm) gefunden. Es handelte sich dabei im Einzelnen um eine Knolle mit dem Isolat *Fusarium sulphureum* No. 33, die 15-Monoacetoxyscirpenol (114 µg/kg) und Scirpentriol (4010 % der Peakfläche des nicht zertifizierten Standards der Messreihe: Median (Peakfläche) SCRP $1,2 \times 10^4$ counts) enthielt und um drei Knollen, die zuvor mit *Fusarium* sp. No. K30 inokuliert worden waren. Letztere enthielten Deoxynivalenol in Konzentrationen von <LOQ bis 247 µg/kg.

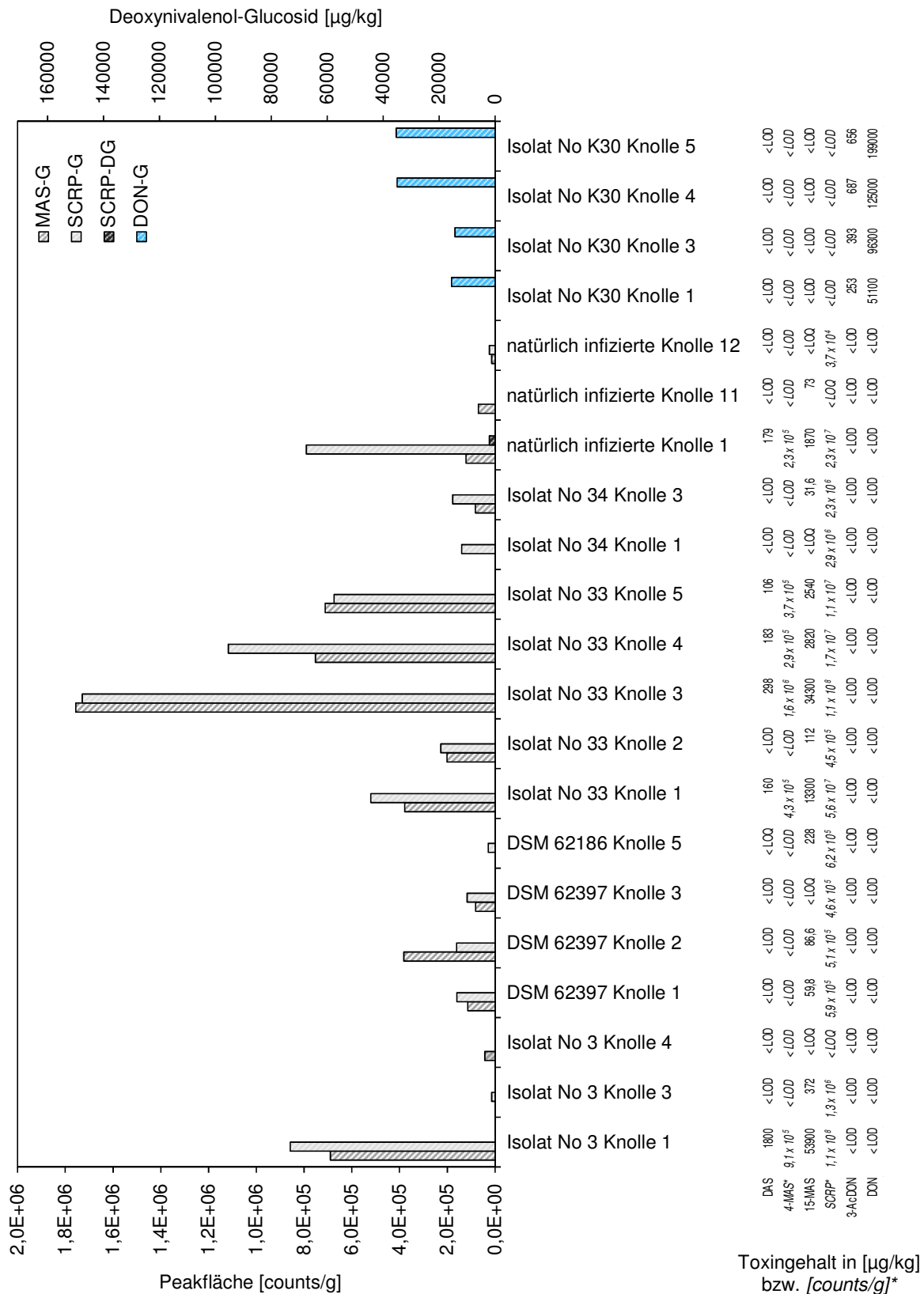
Weiterhin konnten bei vier der 12 natürlich infizierten Kartoffelknollen Toxingehalte in der Faulstelle nachgewiesen werden. Bei den betreffenden Proben handelte es sich um die Knollen N1 (Agata; TAS 5,4 %* (* = relativ zum nicht quantifizierten Standard, siehe Legende von Tabelle 35), DAS 179 µg/kg, 4-MAS 202 %*, 15-MAS 1870 µg/kg, SCRP 139000 %*, T-2 Tetraol 974 µg/kg, NIV 454 µg/kg), N8 (unbekannt; ZON>LOQ), N11 (Sieglinde; 15-MAS 73 µg/kg, SCRP>LOQ) und N12 (Sieglinde; 15-MAS>LOQ, SCRP 299 %*). Bei keiner dieser Proben konnte eine Toxindiffusion in benachbartes Knollengewebe beobachtet werden.

4.5 Vorkommen von Fusarientoxin-Glucosidkonjugaten in artifiziell oder natürlich mit *Fusarium* spp. infizierten Kartoffelknollen

Neben Fusarientoxinen wurden die artifiziell mit verschiedenen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffeln und die natürlich infizierten Knollen zusätzlich auf das Auftreten von glucosidierten Metaboliten untersucht. Dazu wurden zunächst lediglich die Faulstellen von Pilzisolaten überprüft. Bei den natürlich inokulierten Kartoffeln wurden dabei nur die Faulstellen der Knollen untersucht, in denen zuvor bereits Toxingehalte nachgewiesen werden konnten.

Dabei wurden in den artifiziell inokulierten Kartoffelknollen die Glucosidkonjugate Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, Scirpentriol-Glucosid und Deoxynivalenol-Glucosid detektiert. Weiterhin konnten auch in den Faulstellen von natürlich infizierten Kartoffelknollen Glucosidgehalte von Trichothecenen des Typs A gefunden werden, unter anderem auch erstmals auch Scirpentriol-Diglucosid.

Die Toxinkonjugate wurden stets nur in den Faulstellen von Kartoffelknollen (inokuliert oder natürlich infiziert) nachgewiesen, in denen ebenfalls das entsprechende, nicht glucosidierte Fusarientoxin detektiert werden konnte (Abbildung 44).



Die Bestimmungsgrenzen der Toxine (LOQs) sind im Anhang in Tabelle A 6 aufgeführt.

Der Median von 100 ng 15-MAS entspricht einer Peakfläche von $2,3 \times 10^5$ counts (Median der Standardsubstanzen der Messreihe)

Abbildung 44: Nachweis ([µg/kg] bzw. [counts/g]*) von Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Faulstellen von artifizuell und natürlich mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen

Insgesamt konnten in 44 % der untersuchten, artifiziiell inokulierten Faulstellen Gehalte an Glucosidkonjugaten gefunden werden. Die Mediane der positiv getesteten Proben eines Isolats sowie die Konzentrationsbereiche der Glucoside sind in Tabelle 36 aufgeföhrt.

Tabelle 36: Vorkommen von Trichothecen-Glucosidkonjugaten in den Faulstellen von Kartoffelknollen inokuliert mit verschiedenen *Fusarium* spp.

Isolat	Knollen [n]	+ Knollen [n]	Glucosid in FS	Median (+ Knollen) [µg/kg] bzw. [counts]*	Bereich (+ Knollen) [µg/kg] bzw. [counts]*
<i>Fusarium coeruleum</i> DSM 62178	5	0	n.d.	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> No. 3	5	3	MAS-G* SCRIP-G*	4x10 ⁵ * 4x10 ⁵ *	4x10 ⁴ -7x10 ⁵ * 1x10 ⁴ -9x10 ⁵ *
<i>Fusarium sambucinum</i> No. 29	5	0	n.d.	-	-
<i>Fusarium sambucinum</i> DSM 62397	6	3	MAS-G* SCRIP-G*	1x10 ⁵ * 2x10 ⁵ *	8x10 ⁴ -4x10 ⁵ * 1x10 ⁵ -2x10 ⁵ *
<i>Fusarium sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> DSM 62186	5	1	MAS-G* SCRIP-G*	- -	- 3x10 ⁴ *
<i>Fusarium sulphureum</i> No. 33	5	5	MAS-G* SCRIP-G*	7x10 ⁵ * 7x10 ⁵ *	2x10 ⁵ -2x10 ⁶ * 2x10 ⁵ -2x10 ⁶ *
<i>Fusarium sulphureum</i> No. 34	5	2	MAS-G* SCRIP-G*	- 2x10 ⁵ *	8x10 ⁴ * 1x10 ⁵ -2x10 ⁵ *
<i>Fusarium</i> sp. No. K30	5	4	DON-G	25250	14300-35300

* Erfassung der gemessenen Substanzen durch Angabe der jeweiligen Peakfläche [counts]

+ Positiv getestet

Von zwölf untersuchten, natürlich infizierten Knollen die Symptome einer *Fusarium*-trockenfäule aufwiesen konnten in den Faulstellen von drei Kartoffeln Glucosidkonjugate entdeckt werden. Dabei handelte es sich um Monoacetoxyscirpenol-Glucosid (Knollen N1: 1x10⁵ counts, N11: 7x10⁴ counts, N12: 1x10⁴ counts), Scirpentriol-Glucosid (Knollen N1: 8x10⁵ counts, N12: 2x10⁴ counts) und Scirpentriol-Diglucosid (Knolle N1: 2x10⁴ counts).

Anschließend wurde bei sämtlichen Kartoffelknollen, in deren Faulstellen Glucosidgehalte nachgewiesen werden konnten, zusätzlich scheinbar gesundes Kartoffelgewebe untersucht. Hier konnte, ähnlich wie bei Trichothecenen in Abschnitt D 4.4, eine Diffusion der Glucosidkonjugate aus der Faulstelle in scheinbar gesundes Kartoffelgewebe nachgewiesen werden. In 20 % der artifiziiell inokulierten Kartoffelknollen wurden Glucosidkonjugate außerhalb der eigentlichen Faulstelle nachgewiesen. In den untersuchten natürlich infizierten Kartoffelknollen konnte hingegen keine Diffusion beobachtet werden.

Bei der überwiegenden Anzahl der Knollen wurden diese Gehalte im Gewebestück angrenzend zur Faulstelle gefunden (Entfernung von der Faulstelle ca. 0,25-0,75 cm).

Es gab jedoch auch Knollen bei denen auch noch im zweiten oder dritten Gewebestück (Entfernung von der Faulstelle ca. 1,0-1,5 cm bzw. 1,75-2,25 cm) Glucoside detektiert werden konnten. In Abbildung 45 wird das Diffusionsverhalten von Typ A Trichothecen-Glucosiden in inokulierten Kartoffeln veranschaulicht. Ausgehend von der Faulstelle kam es in der Regel zu einer starken Abnahme der Glucosidgehalte. So lässt beispielsweise das Diffusionsverhalten des Monoacetoxyscirpenol-Glucosids in Kartoffeln mit *Fusarium sulphureum* No. 33 erkennen, dass die Diffusion nicht ausschließlich von den vorliegenden Glucosidkonzentrationen anhängig ist. Während es bei den Knollen vier und fünf des Isolats zu keiner Diffusion von Monoacetoxyscirpenol-Glucosid kommt, findet dies trotz geringer Konzentrationen bei Knolle eins statt. Bei dieser Knolle gab es zudem weitere Unterschiede zu den anderen inokulierten Knollen, in denen eine Diffusion nachgewiesen werden konnte. So wurden hier geringere Konzentrationen an Monoacetoxyscirpenol-Glucosid und Scirpentriol-Glucosid im ersten Gewebestück nach der Faulstelle (Entfernung von der Faulstelle ca. 0,25-0,75 cm) als im zweiten Gewebestück (Entfernung von der Faulstelle ca. 1,0-1,5 cm) nachgewiesen. Zudem konnte im ersten Gewebestück zusätzlich Scirpentriol-Diglucosid (3×10^4 counts) detektiert werden, ein Metabolit der sonst weder in der dazugehörenden Faulstelle noch in anderen inokulierten Kartoffelknollen des gleichen Pilzisolats gefunden werden konnte.

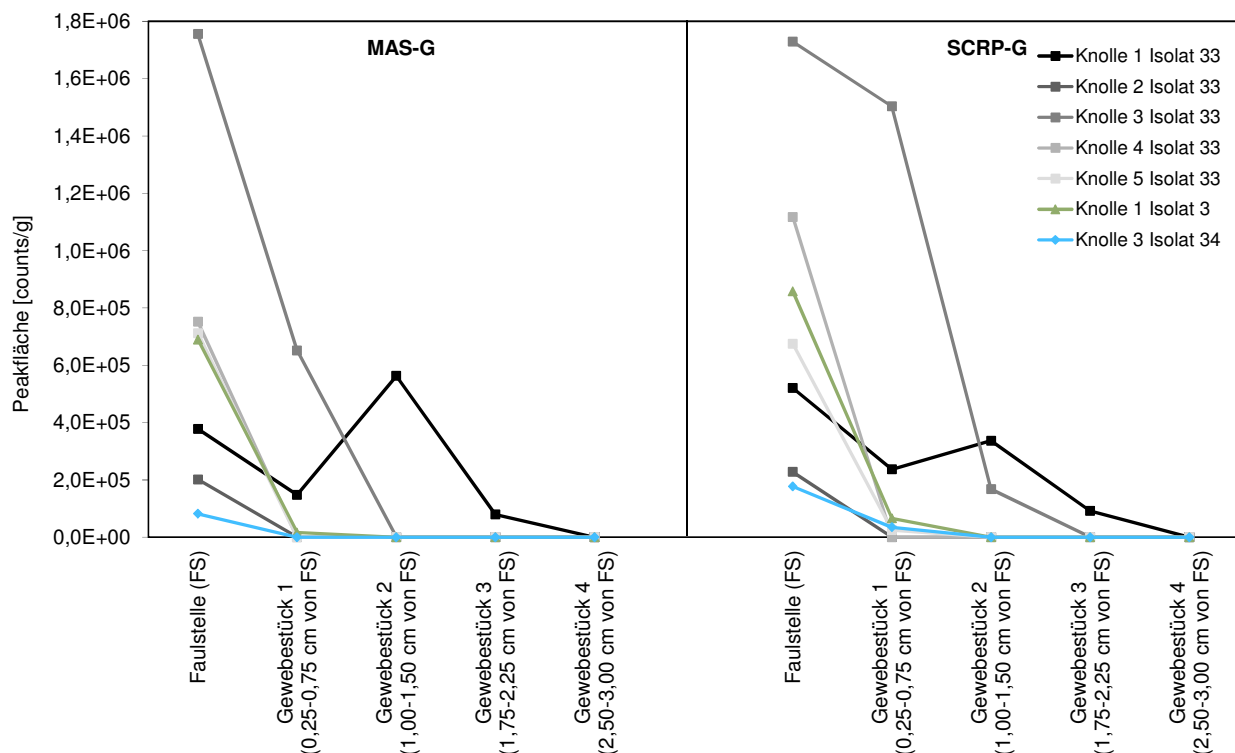


Abbildung 45: Diffusionsverhalten von Monoacetoxyscirpenol-Glucosid und Scirpentriol-Glucosid in artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen

In Abbildung 46 sind das Vorkommen und die Diffusion von Deoxynivalenol-Glucosid in inokulierten Kartoffelknollen (*Fusarium* sp. K30) dargestellt. Auch hier kam es bei Knollen mit nachgewiesenen Glucosidgehalten ausgehend von der Faulstelle zu einer starken Abnahme der Konzentrationen. Die nachgewiesenen Konzentrationen des Deoxynivalenol-Glucosids in den symptomfreien Gewebeabschnitten beliefen sich aber immer noch auf Werte zwischen 715 µg/kg und 2570 µg/kg. Deoxynivalenol-Glucosid konnte in den untersuchten Kartoffelknollen maximal bis zum zweiten Gewebeabschnitt (Entfernung von der Faulstelle ca. 1,0-1,5 cm) detektiert werden.

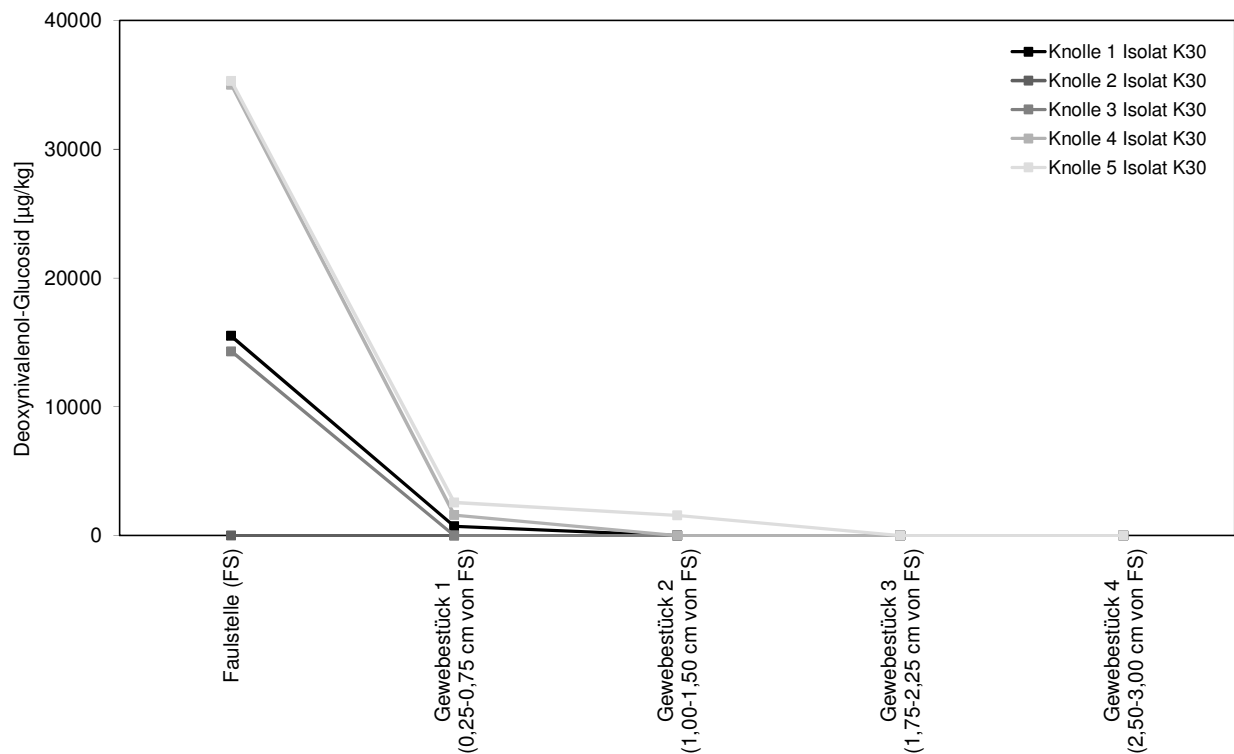
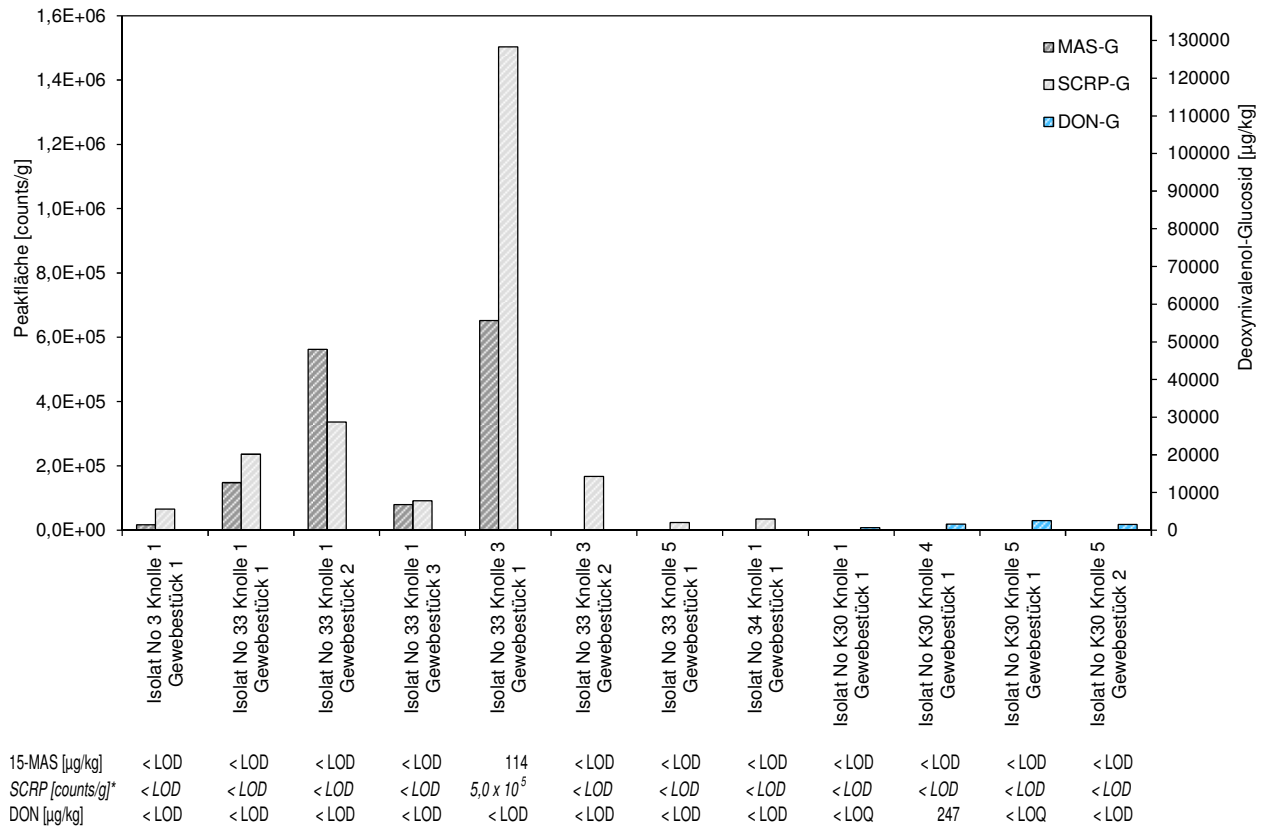


Abbildung 46: Diffusionsverhalten von Deoxynivalenol-Glucosid in artifizell mit *Fusarium* sp. No K30 inokulierten Kartoffelknollen

Die Mehrzahl der untersuchten Proben (66,7 %), die Gehalte an Glucosidkonjugaten aufwiesen und aus dem scheinbar gesunden Knollengewebe von Kartoffeln mit Fusariumtrockenfäule stammten, enthielten nicht die entsprechenden Aglucone (Abbildung 47). Im Gegensatz dazu konnten in dem untersuchten Faulgewebe aus Kartoffelknollen mit Fusariumtrockenfäule die Glucosidgehalte aufwiesen (siehe Abbildung 44), jeweils auch das entsprechende unglucosilierte Toxin gefunden werden.



Die Bestimmungsgrenzen der Toxine (LOQs) sind im Anhang in Tabelle A 6 aufgeführt.

Der Median von 100 ng 15-MAS entspricht einer Peakfläche von $2,3 \times 10^5$ counts (Median der Standardsubstanzen der Messreihe)

Abbildung 47: Nachweis ($[\mu\text{g/kg}]$ bzw. $[\text{counts/g}]^*$) von Trichothecenen der Typen A und B sowie deren Glucosidmetaboliten in scheinbar gesundem Gewebe von artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen

5 Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

5.1 Trockensubstanzbestimmung

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden bei Proben (n=116) aus sechs Produktgruppen (Bratkartoffeln, rohe Kartoffeln, gekochte Kartoffeln, Kartoffelpuffer, Kloßteig/Kartoffelknödel, Pommes Frites/Wedges) der Trockensubstanzgehalt bestimmt (Abbildung 48). Dabei fanden sich Werte im Bereich zwischen 14 % und 54 %. Der mittlere Trockensubstanzgehalt lag zwischen 16 % bei gekochten Kartoffeln und 34 % bei der Gruppe Pommes Frites/Wedges (Kartoffelspalten) (Median: 16 %- 33 %).

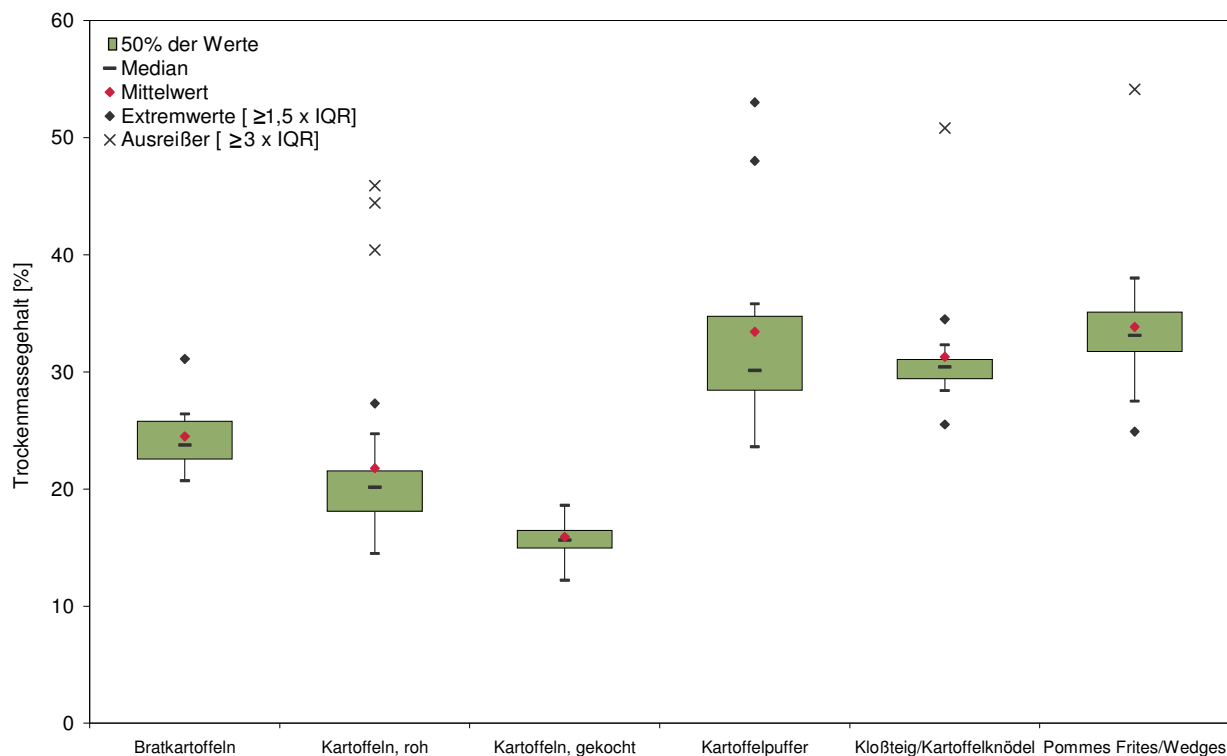


Abbildung 48: Verteilung der Trockensubstanzgehalte [%] von Kartoffeln und Kartoffelprodukten

5.2 Methodenkenzahlen zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Alle Fusarientoxine, die für dieses Toxinscreening ausgewählt wurden, konnten in der Probenmatrix Kartoffel mittels HPLC-MS/MS Analyse nachgewiesen werden. Die Konzentrationen nachfolgender Untersuchungen beziehen sich auf das Trockengewicht der Probe.

Triacetoxyscirpenol, 4-Monoacetoxyscirpenol, Scirpentriol und Acetyl-T-2 Toxin konnten aufgrund des kommerziell nicht erhältlichen zertifizierten Kalibrierstandards nur durch die relative Peakfläche [counts] quantitativ erfasst werden. Die Peakflächen positiver Proben wurden prozentual in Bezug zu den jeweiligen gemessenen Standardsubstanzen gesetzt.

Als Nachweisgrenze (LOD) der jeweiligen Toxine wurde ein Verhältnis von 3:1 zwischen maximaler Signalthöhe des Quantifiers und dem Grundrauschen definiert (Signal to Noise Ratio, S/N). Die LODs (Tabelle A 5) lagen im Bereich zwischen 0,1 µg/kg (ZON) und 5,2 µg/kg (HT-2, VOL). Die Bestimmungsgrenzen (LOQ) der zertifizierten Toxine (S/N=10:1) variierten von 0,2 µg/kg für ZON bis 17,5 µg/kg (HT-2). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die nicht zertifizierten Toxine wurden in Peakflächeneinheiten [counts] berechnet und lagen bei $1,3 \times 10^2$ - $6,4 \times 10^2$ (LOD) bzw. $4,5 \times 10^2$ - $2,1 \times 10^3$ (LOQ). Sämtliche LOD- und LOQ-Werte wurden mit Hilfe von Standardsubstanzen, gelöst in Kartoffelmatrix (Extrakt einer Nullprobe), bestimmt.

Die Ergebnisse der Methodvalidierung zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der Gehalte von Typ A und Typ B Trichothecenen sowie Zearalenon in Kartoffelpulver sind Tabelle 37 zu entnehmen. Die mittleren Wiederfindungsraten der Typ A Trichothecene lagen mit Ausnahme von T-2 Tetraol und Diacetylverrucarol in einem Bereich zwischen 61 und 103 %. Die Wiederfindung des polarsten Typ A Trichothecens T-2 Tetraol lag mit 47 % bis 57 % unter diesen Werten. Gleiches gilt für Diacetylverrucarol mit einer mittleren Wiederfindungsrate von 52%.

Bei den Typ B Trichothecenen waren die mittleren Wiederfindungsraten im Allgemeinen in einem Bereich von 71 % bis 97 % anzusetzen. Doch auch hier konnte man bei dem polarsten Toxin Nivalenol eine deutlich geringere Wiederfindung von nur 44 % beobachten. Die mittlere Wiederfindung von Zearalenon betrug 41 %.

Tabelle 37: Richtigkeit und Präzision der Methode zur Analyse von Fusarientoxinen in Kartoffelpulver (n=5, $\bar{x} \pm SD$ [%])

Toxin	100 µg/kg (Stammlsg.*)	50 µg/kg (1:2*)	10 µg/kg (1:10*)	1 µg/kg (1:100*)
3,4,15-Triacetoxyscirpenol*	73±3,1	67±3,9	65±3,1	77±7,6
4,15-Diacetoxyscirpenol	74±6,2	73±6,5	75±5,2	<LOQ
4-Monoacetoxyscirpenol*	95±2,9	91±4,0	86±4,0	103±9,2
15-Monoacetoxyscirpenol	86±6,8	91±4,6	95±8,9	<LOQ
Scirpentriol*	61±5,1	68±8,3	n.d.	n.d.
Acetyl-T-2 Toxin*	64±4,7	61±4,7	60±2,7	59±4,6
T-2 Toxin	68±3,0	67±3,5	60±2,5	<LOQ
HT-2 Toxin	90±7,1	90±8,6	<LOQ	n.d.
T-2 Triol	89±3,0	86±8,0	<LOQ	n.d.
T-2 Tetraol	57±6,0	56±7,4	47±12,5	n.d.
Neosolaniol	104±6,1	103±1,5	103±5,0	n.d.
Verrucarol	92±1,8	89±8,7	<LOQ	n.d.
Diacetylverrucarol	51±3,8	48±4,5	55±4,5	56±5,7
Deoxynivalenol	69±4,7	83±5,0	61±5,8	<LOQ
3-Acetyldeoxynivalenol	79±2,9	72±5,5	81±2,4	<LOQ
15-Acetyldeoxynivalenol	87±3,2	85±7,1	92±8,6	n.d.
Nivalenol	46±3,4	44±5,3	42±7,2	n.d.
Fusarenon X	97±3,0	98±12,5	96±12,7	n.d.
Zearalenon	41±5,5	44±10,6	33±12,1	45±4,5

* Durchführung der Validierung, sowie Bestimmung von LOD und LOQ mittels nicht zertifizierter Standards

LOQ: DAS: 3,8 µg/kg; 15-MAS: 2,3 µg/kg; T-2: 2,5 µg/kg; HT-2: 17,5 µg/kg; T-2 Triol: 12,7 µg/kg; VOL: 17,3 µg/kg; DON: 2,1 µg/kg; 3-AcDON: 4,2 µg/kg

5.3 Vorkommen von Fusarientoxinen in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten

Um einen Überblick über die Häufigkeit und das Ausmaß der Kontamination von Kartoffeln und Kartoffelprodukten mit Fusarientoxinen zu erhalten, wurden 206 Proben aus dem Einzelhandel untersucht. In Tabelle 38 sind die verschiedenen Lebensmittelgruppen, die Anzahl der jeweils untersuchten sowie die der belasteten Proben ($c > LOD$) aufgeführt. Das Hauptaugenmerk der Untersuchung lag auf Kartoffelknödeln, Kartoffeln, Kartoffelpüree und Pommes Frites. Insgesamt wurden 30,6 % ($n_{\text{pos.}}=63$) aller Proben positiv auf mindestens eines der gesuchten Toxine getestet.

Tabelle 38: Aufstellung der untersuchten Proben ($n=206$)

Lebensmittel	Untersuchte Proben [n_u]	Positive Proben [$n_{\text{pos.}}$]	Nachgewiesene Toxine
Bratkartoffeln	8	0	-
Kartoffelchips	9	0	-
Kartoffelknödel/Kloßteig	58	26	ZON, 15-MAS, DON, SCRCP
Kartoffeln (roh, ungeschält)	40	7	SCRCP, 15-MAS, 4-MAS, DAS, T-2, HT-2, NEO, ZON, DON
Kartoffeln, gekocht	11	1	SCRCP
Kartoffelpuffer	13	2	ZON, 15-MAS
Kartoffelpüree	38	24	ZON, DAS, 15-MAS, DON, SCRCP, 4-MAS
Pommes Frites/Wedges	29	3	DON, ZON

Ein Großteil der positiven Proben traten in den Lebensmittelgruppen Kartoffelknödel/Kloßteig (41,3 %) und Kartoffelpüree (38,1 %) auf. Zudem konnten in unprozessierten Kartoffeln (11,1 %), Pommes Frites/Wedges (4,8 %), Kartoffelpuffer (3,2 %) und in gekochten Kartoffeln (1,6 %) Toxingehalte nachgewiesen werden (Abbildung 49).

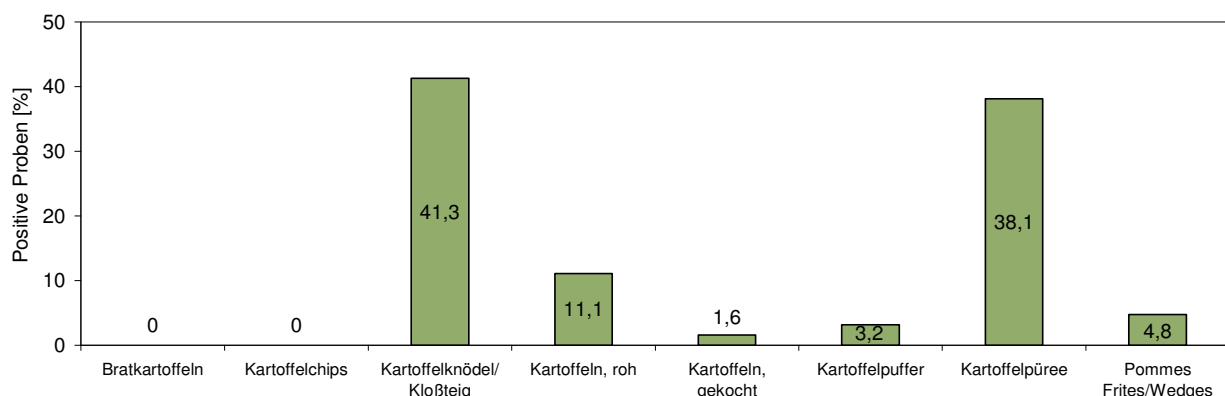
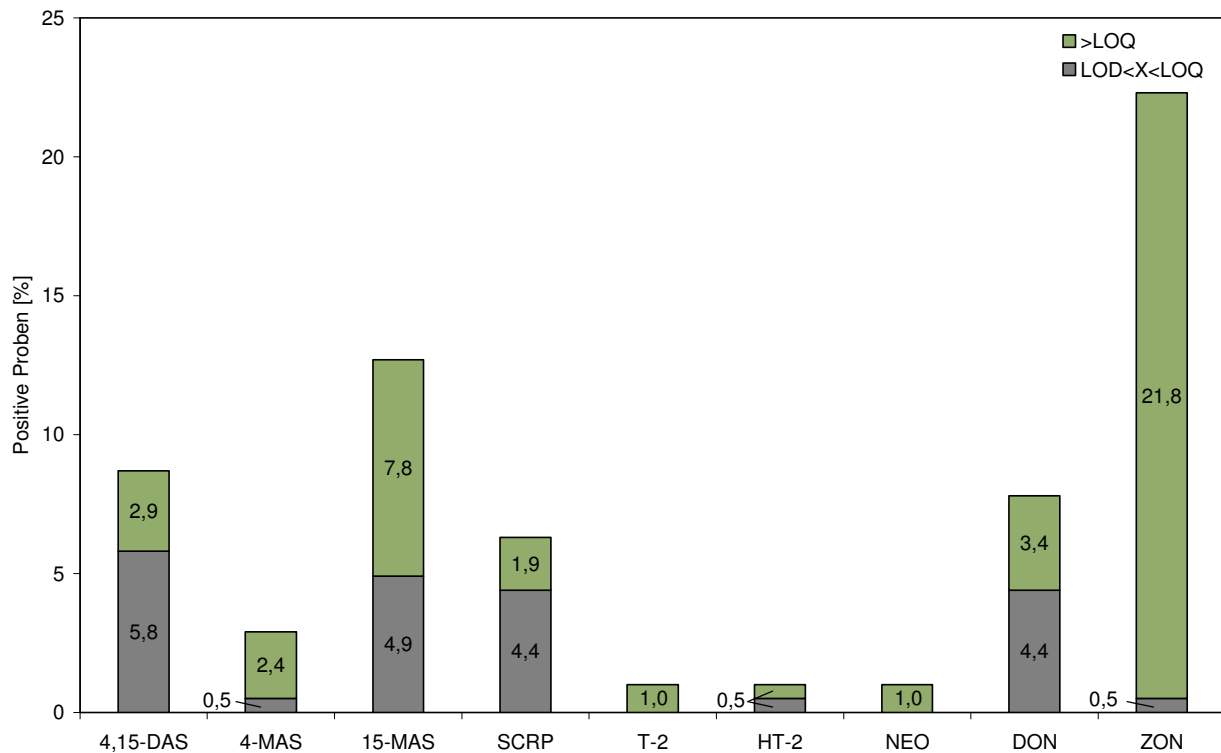


Abbildung 49: Verteilung [%] der positiven Proben ($n_{\text{pos.}}=63$) auf die Produktgruppen

Insgesamt konnten neun der 19 untersuchten Toxine in Kartoffeln und Kartoffelprodukten nachgewiesen werden (Abbildung 50).

Am häufigsten traten die Toxine Zearalenon (22 %), 15-Monoacetoxyscirpenol (13 %) und Diacetoxyscirpenol (8,7 %) auf. Im Ganzen gab es 131 positive Befunde, von denen 67 % über der Bestimmungsgrenze lagen. Die Gehalte einiger Toxine, wie Diacetoxyscirpenol, Scirpentriol, HT-2 Toxin und Deoxynivalenol, lagen jedoch zu einem Anteil von 50 - 69 % unter der Bestimmungsgrenze.



Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

Abbildung 50: Häufigkeit [%] von Fusarientoxinen in Kartoffeln/Kartoffelprodukten (n=206)

5.3.1 Kartoffelknödel/Kloßteig

Die größte Anzahl positiver Proben gab es in der Lebensmittelkategorie Kartoffelknödel/Kloßteig. Dies war im Wesentlichen auf das Auftreten eines Toxins zurückzuführen. In 40 % aller untersuchter Knödel-/Kloßproben konnte Zearalenon in einem Bereich von 0,2 - 1,6 µg/kg (Median 0,4 µg/kg) nachgewiesen werden (Tabelle 39). Es traten zwar noch andere Toxine aus der Scirpentriol-Gruppe (DAS, 15-MAS, SCRP) sowie Deoxynivalenol auf, diese befanden sich aber zumeist unter der Bestimmungsgrenze.

Tabelle 39: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelknödel/Kloßteig (n_U=58)

Toxin	LOD ° < X < LOQ °	> LOQ °	Median (n > LOQ)	Bereich (n > LOQ)
	[n]	[n]	[µg/kg] bzw. [%]*	[µg/kg] bzw. [%]*
15-MAS	4	1	-	2,5
DON	3	1	-	2,3
ZON	-	23	0,4	0,2-1,6
SCRP*	1	-	-	-

° Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

* %-Anteil an der Peakfläche der nicht zertifizierten Standards der Messreihe (Median (Peakfläche) SCRP: 4,7x10³ counts)

5.3.2 Kartoffelpüree

In Kartoffelpüree wurden vor allem Vertreter der Scirpentriol-Gruppe und Zearalenon nachgewiesen. 47 % der Kartoffelpürees enthielten zwischen 0,2 µg/kg und 7,2 µg/kg Zearalenon (Median 0,4 µg/kg). 15-Monoacetoxyscirpenol konnte in 29 % der Proben in einem Bereich von 2,6 µg/kg bis 25 µg/kg (Median 5,2 µg/kg) detektiert werden und war damit das am häufigsten quantifizierbare Toxin der Scirpentriol-Gruppe. Bei Diacetoxyscirpenol, Scirpentriol und Deoxynivalenol lag ein Großteil der Proben unter der Bestimmungsgrenze.

In 10,5 % (DON), 7,9 % (DAS) bzw. 5,3 % (4-MAS, SCRP) der Kartoffelpürees befanden sich die Toxingehalte über dem LOQ. Median und Streubereich dieser Toxine sind Tabelle 40 zu entnehmen.

Tabelle 40: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelpüree (n_u=38)

Toxin	LOD°<X<LOQ°	>LOQ°	Median (n>LOQ)	Bereich (n>LOQ)
	[n]	[n]	[µg/kg] bzw. [%]*	[µg/kg] bzw. [%]*
DAS	11	3	7,1	3,8-8,6
15-MAS	5	11	5,2	2,6-25,0
DON	5	4	2,6	2,2-3,6
ZON	1	18	1,0	0,2-7,2
4-MAS*	-	2	1,0*	0,9-1,1*
SCRP*	5	2	117*	114-119*

° Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

* %-Anteil an der Peakfläche der nicht zertifizierten Standards der Messreihe (Median (Peakfläche) 4-MAS: 2,97x10⁵ counts, SCRP: 4,7x10³ counts)

5.3.3 Kartoffeln, roh

Bei Kartoffeln (roh, ungeschält) erfolgte der Toxinnachweis in einem homogenisierten Aliquot einer handelsüblichen Verkaufseinheit (0,7-4,0 kg). In dieser Lebensmittelgruppe konnte die höchste Anzahl an nachgewiesenen Fusarientoxinen gefunden werden. Am häufigsten waren dabei Vertreter der Scirpentriol-Gruppe. So konnten in 10 % der Kartoffeln 15-Monoacetoxyscirpenolgehalte in einem Bereich von 2,8 µg/kg bis 254 µg/kg nachgewiesen werden (Median 15 µg/kg). Diacetoxyscirpenol und 4-Monoacetoxyscirpenol konnten in 7,5 % der Kartoffeln quantifiziert werden, Scirpentriol in 5 % der Fälle. Median und Streubereich sind in Tabelle 41 aufgelistet.

Neben den Mitgliedern der Scirpentriol-Gruppe konnten auch T-2 Toxin und die verwandten Toxine HT-2 Toxin und Neosolaniol nachgewiesen werden. In 5 % (T-2, NEO) bzw. 2,5 % (HT-2) der Kartoffeln lagen die Gehalte dieser Toxine in einem quantifizierbaren Bereich.

Zudem konnte in 5 % der Kartoffelproben Zearalenon mit Gehalten zwischen 0,2 µg/kg und 1,4 µg/kg nachgewiesen werden. Deoxynivalenol konnte in einer Probe in Spuren detektiert werden.

Tabelle 41: Vorkommen von Fusarientoxinen in rohen, ungeschälten Kartoffeln ($n_U=40$)

Toxin	LOD $^{\circ} < X < \text{LOQ}^{\circ}$	$> \text{LOQ}^{\circ}$	Median ($n > \text{LOQ}$)	Bereich ($n > \text{LOQ}$)
	[n]	[n]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [%]*	[$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [%]*
DAS	1	3	85	10-89
15-MAS	-	4	15	2,8-254
T-2	-	2	14	3,6-25
HT-2	1	1	-	55
NEO	-	2	9,0	8,3-9,7
DON	1	-	-	-
ZON	-	2	0,8	0,2-1,4
4-MAS*	1	3	4,0*	0,8-8,4*
SCRIP*	2	2	1567*	153-2980*

$^{\circ}$ Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

* %-Anteil an der Peakfläche der nicht zertifizierten Standards der Messreihe (Median (Peakfläche) 4-MAS: $2,97 \times 10^5$ counts, SCRIP: $4,7 \times 10^3$ counts)

5.3.4 Pommes Frites/Wedges

In der Lebensmittelgruppe Pommes Frites/Wedges konnte kein Typ A Trichothecen nachgewiesen werden, sondern ausschließlich Deoxynivalenol (6,9 %) und Zearalenon (3,4 %). Die Toxingehalte befanden sich in einem Bereich von 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DON) bzw. bei 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Zearalenon (Tabelle 42).

Tabelle 42: Vorkommen von Fusarientoxinen in Pommes Frites/Wedges ($n_U=29$)

Toxin	LOD $^{\circ} < X < \text{LOQ}^{\circ}$	$> \text{LOQ}^{\circ}$	Median ($n > \text{LOQ}$)	Bereich ($n > \text{LOQ}$)
	[n]	[n]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]
DON	-	2	39	32-45
ZON	-	1	-	0,6

$^{\circ}$ Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

5.3.5 Kartoffelpuffer

Mit 15-Monoacetoxyscirpenol und Zearalenon konnten zwei Toxine in Kartoffelpuffern gefunden werden (Tabelle 43). Davon befand sich eine Probe mit einem Zearalenon-Gehalt von 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im quantifizierbaren Bereich.

Tabelle 43: Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffelpuffern ($n_U=13$)

Toxin	LOD $^{\circ} < X < \text{LOQ}^{\circ}$	$> \text{LOQ}^{\circ}$	Median ($n > \text{LOQ}$)	Bereich ($n > \text{LOQ}$)
	[n]	[n]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]
15-MAS	1	-	-	-
ZON	-	1	-	0,2

$^{\circ}$ Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

5.3.6 Kartoffeln, gekocht

In vorgekochten Kartoffeln aus dem Handel konnte lediglich in einer Probe Scirpentriol detektiert werden. Der Gehalt des Toxins befand sich zudem unter der Bestimmungsgrenze (Tabelle 44).

Tabelle 44: Vorkommen von Fusarientoxinen in gekochten Kartoffeln ($n_U=11$)

Toxin	LOD ° $X < LOQ$ °	$> LOQ$ °	Median ($n > LOQ$)	Bereich ($n > LOQ$)
	[n]	[n]	[%]*	[%]*
SCRIP*	1	-	-*	-*

° Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

* %-Anteil an der Peakfläche der nicht zertifizierten Standards der Messreihe (Median (Peakfläche) SCRIP: $4,7 \times 10^3$ counts)

5.4 Fusarientoxin-Mehrfachbelastungen in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten

In einigen Produktkategorien konnte das gemeinsame Auftreten mehrerer Fusarientoxine ($> LOD$) beobachtet werden. Dazu gehörten Kartoffelknödel/Kloßteig, Kartoffelpüree und rohe Kartoffeln.

Wie in Abbildung 51 ersichtlich, konnte in sämtlichen der positiv getesteten Kartoffelpuffer, Pommes Frites/Wedges und gekochten Kartoffeln maximal ein Fusarientoxin pro Probe gefunden werden. Bei Kartoffelknödel/Kloßteig enthielten zwar 77 % ($n_{1 \text{ Toxin}}=20$) der positiven Proben auch nur ein Toxin, insgesamt konnten jedoch in dieser Kategorie immerhin bis zu drei Toxine nachgewiesen werden.

In den Gruppen Kartoffelpüree (66,7 %, $n_{>1 \text{ Toxin}}=16$) und Kartoffeln (roh) (71 %, $n_{>1 \text{ Toxin}}=5$) enthielten die Mehrzahl der positiven Proben mehr als ein Toxin. So konnten in Kartoffelpüree bis zu fünf und in rohen Kartoffeln sogar sieben Fusarientoxine detektiert werden. Bei rohen Kartoffeln waren außerdem gleich viele Proben (je 29 %, $n_{1 \text{ Toxin}}=2$, $n_{7 \text{ Toxine}}=2$) mit einem Toxin wie mit sieben Toxinen belastet.

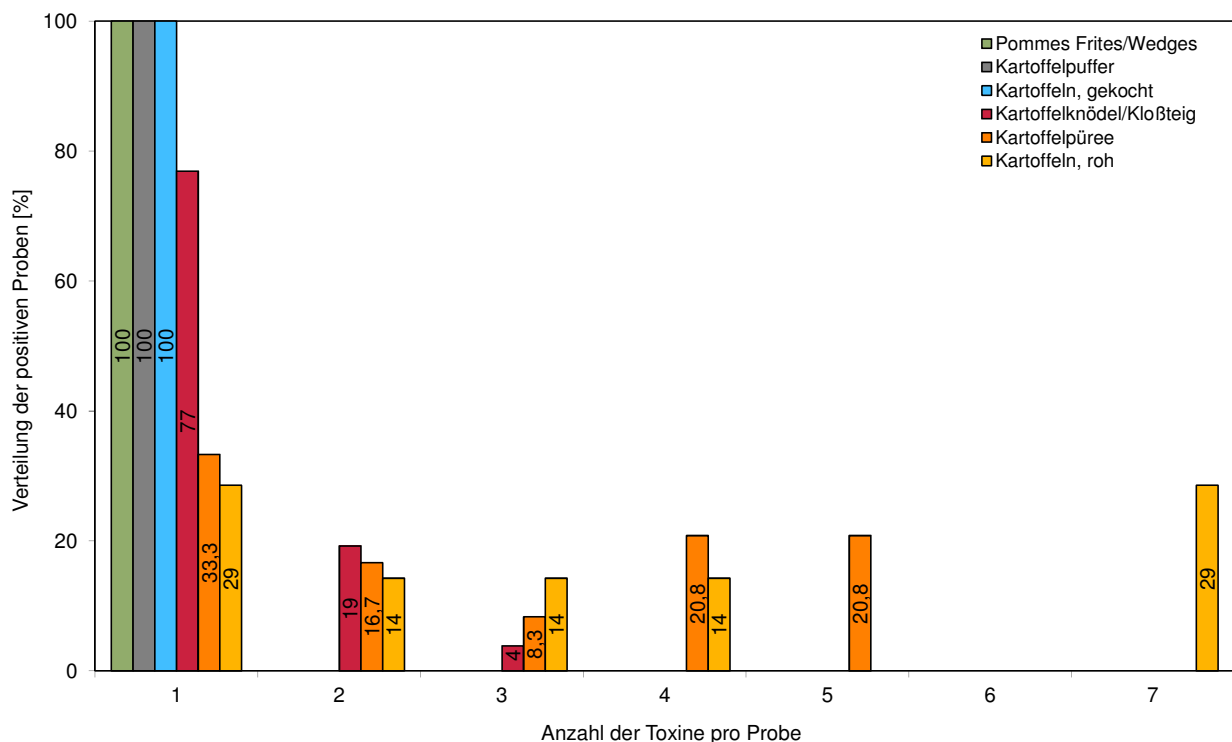


Abbildung 51: Verteilung [%] von Fusarientoxin-Mehrfachbelastungen

Die folgenden Tabellen (Tabelle 45 und Tabelle 46) zeigen die Anzahl der Toxine aus den unterschiedlichen Toxingruppen bei Mehrfachbelastungen von Kartoffeln und Kartoffelprodukten.

Bei 68 % ($n_{>1 \text{ Toxin}}=19$) der Scirpentriol-Gruppe positive getesteten Proben traten mehrere (bis zu sieben) Toxine gleichzeitig auf. T-2, HT-2 und Neosolaniol wurden nur gemeinsam und in Anwesenheit von vier Vertretern der Scirpentriol-Gruppe gefunden.

Tabelle 45: Mehrfachbefunde von Typ A Trichothecenen (Anzahl [$n_{\text{pos.}}$])

	1 Toxin	2 Toxine	3 Toxine	4 Toxine
	aus der Scirpentriol-Gruppe			
T-2/HT-2/NEO (-)	10	8	6	3
T-2/HT-2/NEO (+)	-	-	-	2

In 61 % ($n_{1 \text{ Toxin}}=28$) der Proben, in denen Zearalenon gefunden wurde, kamen keine weiteren Fusariantoxine vor. Bei 30 % ($n_{>1 \text{ Toxin}}=15$) der auf Deoxynivalenol bzw. Zearalenon positiven Proben konnten zusätzlich Typ A Trichothecene detektiert werden.

Tabelle 46: Mehrfachbefunde Typ A Trichothecene/DON, ZON (Anzahl [$n_{\text{pos.}}$])

	kein Toxin	1 Toxin	2 Toxine	3 Toxine	4 Toxine
	aus der Gruppe der Typ A Trichothecene				
DON	3	-	1	-	-
ZON	28	3	1	1	1
DON/ZON	4	1	3	4	-

5.6 Vorkommen von Fusarientoxin-Glucosidkonjugaten in Speisekartoffeln und Kartoffelprodukten

Für eine umfassende Untersuchung der Speisekartoffeln und Kartoffelprodukte aus dem Einzelhandel wurde neben Fusarientoxinen zusätzlich das Vorkommen einiger ihrer Glucosidkonjugate untersucht. Dabei wurden ausschließlich die Proben überprüft, bei denen zuvor nicht glucosidierte Toxine nachgewiesen werden konnten.

In keiner der untersuchten Proben konnten Metaboliten von Typ B Trichothecenen und Zearalenon detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden in zwei Produktgruppen Glucosidkonjugate von Typ A Trichothecenen nachgewiesen. In Abbildung 52 wird das Vorkommen von Vertretern der Scirpentriol-Gruppe, T-2/HT-2 Toxin und deren Glucosidmetaboliten in den Produktgruppen Kartoffelpüree und Kartoffeln (roh und ungeschält) dargestellt. In Kartoffelpüree (n=38) wurden zuvor vor allem 15-Monoacetoxyscirpenol (42 %), 4,15-Diacetoxyscirpenol (37 %) und Scirpentriol (18 %) nachgewiesen. Daneben konnten in 13 % der Kartoffelpüreeproben Gehalte an Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, bzw. in 5 % an Scirpentriol-Glucosid detektiert werden. Beide Glucoside konnten auch in rohen Kartoffeln (n=40) nachgewiesen werden, wengleich nur in 3 % (MAS-G) bzw. 5 % (SCRP-G) der untersuchten Kartoffelproben. Doch auch die Toxine der Scirpentriol-Gruppe wurden hier nur in jeweils 10 % der untersuchten Proben nachgewiesen. Gleichzeitig konnten auch in 5 % der Kartoffeln T-2 Toxin sowie HT-2 Toxin und in 3 % HT-2 Toxin-Glucosid detektiert werden.

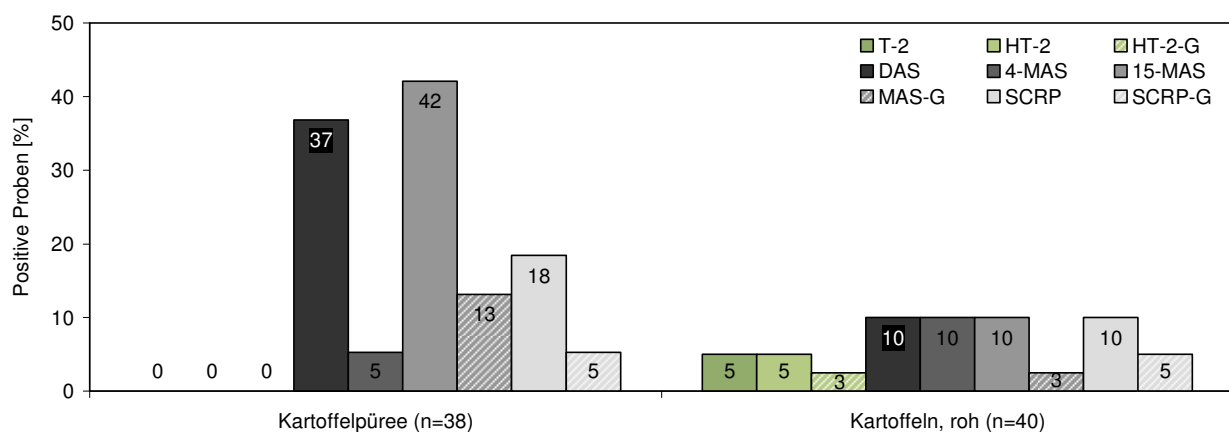
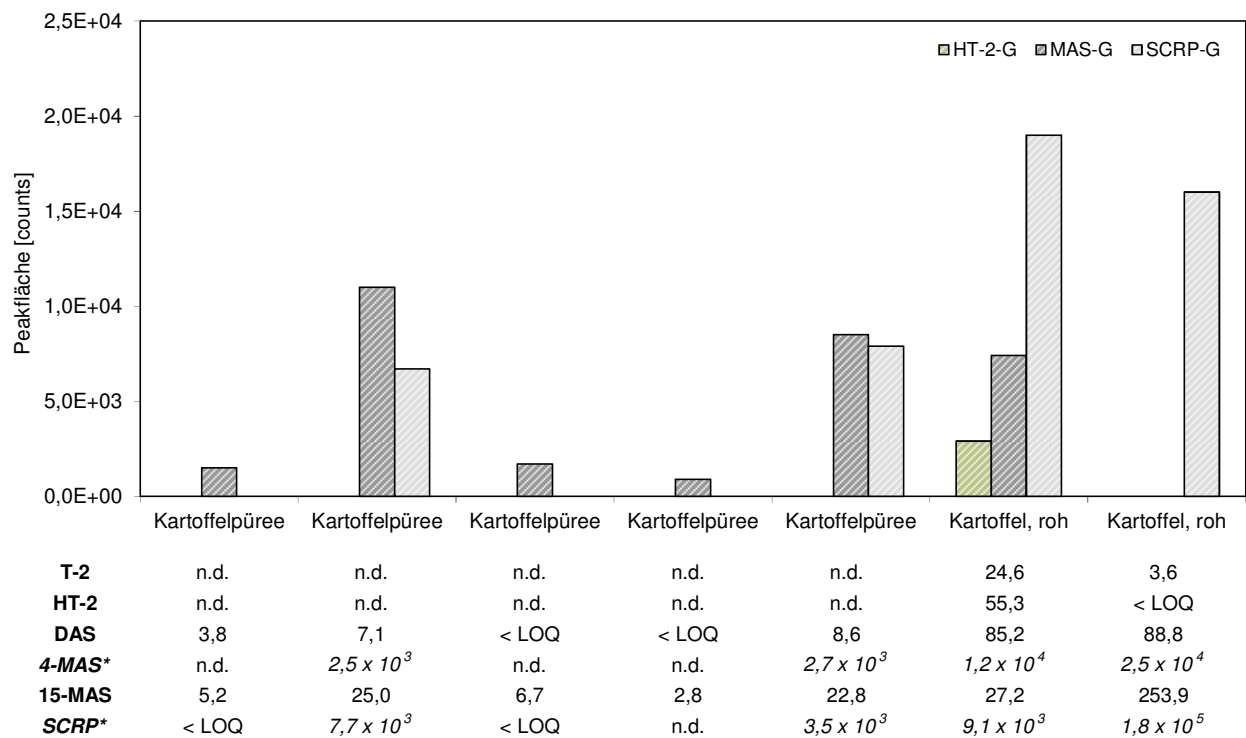


Abbildung 52: Häufigkeit [%] von Typ A Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Kartoffelpüree und rohen Kartoffeln

Grundsätzlich konnte in jeder Probe, die einen Glucosidmetaboliten enthielt auch das entsprechende Aglucon nachgewiesen werden (Abbildung 53). Sämtliche gemessenen Gehalte beziehen sich auf die Trockenmasse der jeweiligen Probe.

Im Einzelnen konnten in fünf Kartoffelpüreeproben Gehalte an Monoacetoxyscirpenol-Glucosid in einem Bereich von 9×10^2 - 1×10^4 counts (Median 2×10^3 counts) und in zwei Proben Scirpentriol-Glucosid (7×10^3 - 8×10^3 counts) detektiert werden. Weiterhin wurden in zwei Kartoffelproben Scirpentriol-Glucosid (je 2×10^4 counts) und in einer Probe zusätzlich HT-2 Toxin-Glucosid (3×10^3 counts) sowie Monoacetoxyscirpenol-Glucosid

(7×10^3 counts) nachgewiesen. Während sonst bei allen untersuchten Proben mit einer 15-Monoacetoxyscirpenolkonzentration über $22,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ Monoacetoxyscirpenol-Glucosid detektiert wurde, konnte bei der Kartoffelprobe mit der höchsten gemessenen Konzentration ($254 \mu\text{g}/\text{kg}$) kein Glucosid gefunden werden.



Die Bestimmungsgrenzen (LOQs) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

Abbildung 53: Nachweis ($[\mu\text{g}/\text{kg}]$ bzw. $[\text{counts}]^*$) von Typ A Trichothecenen sowie deren Glucosidmetaboliten in Kartoffelpüree und rohen Kartoffeln

E Diskussion

1 Analysenmethode zur Bestimmung von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Zum Nachweis von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten wurden zwei HPLC-MS/MS Methoden für insgesamt 19 Typ A und Typ B Trichothecene sowie Zearalenon entwickelt. Für die Extraktion der Proben wurde Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) gewählt, ein erprobtes Extraktionsmittel, das in zahlreichen Arbeiten für die Fusarientoxinanalytik genannt wird (Gottschalk et al. 2007; Berthiller et al. 2005a; Klötzel et al. 2005; Razzazi-Fazeli et al. 2002; Berger et al. 1999). Die Aufreinigung der Extrakte erfolgte mit MycoSep #226-Kartuschen, die eine schnelle und effektive Aufbereitung der Proben erlaubten.

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten der Toxine in Kartoffelpulver lagen mit Ausnahme von Nivalenol (44 %), Zearalenon (41 %), T-2 Tetraol (53 %) und Diacetylverrucarol (53 %) zwischen 61 % und 103 % (\pm SD [%] 3,0-9,4). Die Wiederfindungsraten einer vergleichbaren Arbeit von Berthiller et al. (2005a), in der Typ B Trichothecene, T-2/HT-2, Diacetoxyscirpenol, und Zearalenon in Mais untersucht wurden, befanden sich in einem ähnlichen Bereich (50 % NIV – 99 % ZON).

Die Probleme bei der Extraktion von polaren Toxinen wie Nivalenol oder T-2 Tetraol mit einem System aus Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) und MycoSep #226- oder #227-Kartuschen sind bereits mehrfach beschrieben worden (Klötzel et al. 2006; Berthiller et al. 2005a). Für eine bessere Extraktion polarer Toxine aus der Probenmatrix wäre ein höherer Wassergehalt im Extraktionsmittel wünschenswert, dadurch würde aber gleichzeitig die Extraktion von Matrixbestandteilen ansteigen, was wiederum zu Störungen bei der Ionisation der Toxine in der MS/MS führen würde (Klötzel et al. 2006). Die niedrigsten Wiederfindungsraten wurden für Zearalenon gefunden. Auch Berthiller et al. (2005a) fanden nach der Aufreinigung von Maisextrakten mit MycoSep #226-Kartuschen nur 30 % des Toxins wieder, erst nach der Korrektur mit dem internen Standard Zearalanon wurden Werte von 99 % erzielt. Zwar beinhaltet die Wiederfindungsrate für Zearalenon (Mittelwert 41 %) auch in der vorliegenden Arbeit eine Korrektur mit diesem internen Standard, jedoch ist Zearalanon als interner Standard nur bedingt geeignet, da die Retentionszeit mit der des Zearalenons nicht genau übereinstimmt. Somit können Matrixeffekte nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Vorversuche, in denen matrixassistierte Standards zur Quantifizierung verwendet wurden, zeigten verglichen mit den Ergebnissen der Validierung, für fast alle untersuchten Toxine höhere Wiederfindungsraten. Matrixstandards werden im Allgemeinen herangezogen um Fehler durch Änderungen der spezifischen Signalintensität der Analyten zu vermindern. Änderungen der Signalintensität können entstehen, indem mitextrahierte Bestandteile der Matrix die Ionisation der Toxine in der Quelle der MS/MS beeinflussen (Klötzel et al. 2005). Der Einsatz eines Matrixstandards

ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn Proben mit gleicher Zusammensetzung und Beschaffenheit verwendet werden. Für jedes Kartoffelprodukt müsste somit ein eigener Matrixstandard hergestellt werden, was aufgrund der Heterogenität der Proben wenig praktikabel erschien. Stattdessen wurden ^{13}C -markierte Toxine verwendet; diese sind jedoch nur für wenige Analyten verfügbar.

Die Empfindlichkeit der Typ B Trichothecen/Zearalenon Methode liegt mit Nachweisgrenzen von $0,1 \mu\text{g/kg}$ bis $1,3 \mu\text{g/kg}$ im Bereich vergleichbarer Arbeiten, wie von Berthiller et al. (2005a) (Typ B Trichothecene $0,5 \mu\text{g/kg}$ - $1,6 \mu\text{g/kg}$) und Klötzel et al. (2005) (Typ B Trichothecene/ZON $0,3 \mu\text{g/kg}$ - $3,1 \mu\text{g/kg}$). Die Nachweisgrenzen der quantifizierbaren Typ A Trichothecene lagen mit $0,2 \mu\text{g/kg}$ bis $5,2 \mu\text{g/kg}$ meist etwas über den Werten von Klötzel et al. (2005) ($0,2 \mu\text{g/kg}$ - $4,5 \mu\text{g/kg}$), waren aber für den Nachweis in Kartoffeln und Kartoffelprodukten geeignet.

In Anlehnung an diese Methode für Speisekartoffeln und -produkte wurde zudem lyophilisiertes Material aus mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen aufbereitet, um so das Diffusionsverhalten der Fusarientoxine nachverfolgen zu können. Da jedoch nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial ($0,1 \text{ g}$) vorhanden waren, wurden die MycoSep #226-Kartuschen nach der Aufreinigung, für eine möglichst vollständige Rückgewinnung des Extrakts, nochmals mit Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) gespült. Zudem konnte in diesen Proben ein Matrixstandard zur Quantifizierung der Toxine eingesetzt werden. Auf diese Weise wurden mittlere Wiederfindungsraten von 79 % (ZON) bis 146 % (4-MAS) erreicht ($\pm\text{SD} [\%]$ 4,5-19,5). Die Nachweisgrenzen dieser Methode lagen mit $3,6 \mu\text{g/kg}$ T-2 Toxin – $90,7 \mu\text{g/kg}$ Verrucarol vergleichsweise hoch, was in erster Linie dem hohen Verdünnungsfaktor (12,1) zuzurechnen war. Da jedoch in den Faulstellen der Kartoffelknollen, im Falle der Bildung von Mykotoxinen, höhere Konzentrationen als in Kartoffelprodukten erwartet wurden, kann die Methode für den avisierten Zweck als gut geeignet angesehen werden.

2 Identifizierung von Typ A Trichothecen Standardsubstanzen

Für eine umfassende Analyse der Kartoffeln und Kartoffelprodukte auf relevante Fusarientoxine mussten zunächst vier Standardsubstanzen durch chemische Modifikation oder mit Hilfe des Schimmelpilzes *Fusarium sambucinum* hergestellt werden.

Ein erster Schritt zur Identifizierung der Analyten ist die Durchführung eines Product-Ion-Scans. Für Typ A Trichothecene gibt es typische Molekülgruppen, die sich bei der Fragmentierung der Toxine bevorzugt abspalten. Dazu gehört unter anderem die Abspaltung von Wassermolekülen aus Hydroxylgruppen (-18 amu), Formaldehyd (-30 amu), CH_2CO aus einer Acetylgruppe (-42 amu) und Acetylgruppen (-60 amu). Desweiteren können typische Abspaltungen bei Vertretern der Scirpentriol-Gruppe sowie bei T-2 Toxin, HT-2 Toxin und Acetyl-T-2 Toxin beobachtet werden. Bei der Scirpentriol-Gruppe wurde ein Fragment beschrieben, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um $[\text{Kresol} - \text{H}]^+$ (m/z 107) handelt. T-2 Toxin, HT-2 Toxin und

Acetyl-T-2 Toxin verlieren am C₈-Atom eine Isovaleryl-Seitenkette (-102 amu) (Cavaliere et al. 2005; Berger et al. 1999).

Mit Hilfe der oben beschriebenen Abspaltungen konnten die für die HPLC-MS/MS Analyse ausgewählten Fragmente der vier Standardsubstanzen interpretiert werden. Für Triacetoxyscirpenol wurden die Fragmente m/z 229,1 (Quantifier) und m/z 247,2 (Qualifier) zur Identifikation für spätere Analysen gewählt. Hierbei könnte es sich um folgende Fragmente handeln: $[M - 3\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ (m/z 229,1) und $[M - 2\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{CO}]^+$ (m/z 247,2). Im Falle von 4-Monoacetoxyscirpenol wurden m/z 216,9 als Quantifier und m/z 228,9 als Qualifier festgelegt. Möglicherweise könnte es sich dabei um die Fragmente $[M - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^+$ bzw. $[M - \text{C}_7\text{H}_8\text{O}]^+$ (m/z 216,9) und $[M - \text{CH}_3\text{COOH} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 228,9) handeln. Die Wahl der Fragmente fiel bei Scirpentriol auf m/z 107,0 (Quantifier) und m/z 247,1 (Qualifier). Eventuell könnte es sich beim Quantifier um $[\text{Kresol} - \text{H}]^+$, sowie bei m/z 247,1 um $[M - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ handeln. Bei Acetyl-T-2 Toxin wurden m/z 287,1 und m/z 245,1 als Quantifier bzw. Qualifier bestimmt. Diese Masse/Ladungsverhältnisse deuten auf die Fragmente $[M - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - 2\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ (m/z 287,1) und $[M - (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} - 2\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{CO}]^+$ (m/z 245,1) hin.

Zudem konnten Gemeinsamkeiten in den Product-Ion-Scans verwandter Toxine festgestellt werden. Bei allen untersuchten Vertretern der Scirpentriol-Gruppe konnten die Fragmente m/z 307 (Ausnahme SCRP: MW=282 amu), 265, 247, 229 und 107 gefunden werden. Da sich die Vertreter der Scirpentriol-Gruppe nur durch die Substitution von Acetyl- und Hydroxylgruppen an C₃, C₄ und C₁₅ unterscheiden, lassen sich Strukturen mit Hilfe der beschriebenen Fragmentierungsmöglichkeiten ableiten (Cavaliere et al. 2005; Berger et al. 1999). So könnte es zu einem charakteristischen Verlust verschiedener Acetyl- und Hydroxylgruppen kommen. Ähnliches konnte man auch im Fall von Acetyl-T-2 Toxin beobachten. Die Fragmente m/z 365, 305, 257, 245, 227, 215 und 197 waren ebenso bei T-2 Toxin und HT-2 Toxin zu finden. Auch hier wäre die sequentielle Abspaltung der Substituenten bestehend aus Isovaleryl-, Acetyl- und Hydroxylgruppen denkbar. Bei den Fragmenten m/z 257, 215 und 197 kam es, wie auch bei Berger et al. (1999) beschrieben, wahrscheinlich noch zu einer Abspaltung der CH₂O-Gruppe aus dem Epoxidring.

Die zweifelsfreie Identifizierung der exakten Struktur ist jedoch bei allen vier Toxinen nur durch eine NMR-Analyse zu erreichen. Besonders bei 4-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol, die durch einen *Fusarium sambucinum* Stamm (DSM 62397) hergestellt wurden, wäre eine abschließende Aufklärung der Struktur wünschenswert. Die Produktion von Triacetoxyscirpenol und Acetyl-T-2 Toxin erfolgte hingegen durch die Acetylierung von zertifiziertem Diacetoxyscirpenol bzw. T-2 Toxin. Da beide Toxine jeweils nur eine freie Hydroxylgruppe für die Acetylierung besitzen, ist ihre Identität vergleichsweise sicher. Die Herstellung von Triacetoxyscirpenol wurde von Ohta et al. (1978) bereits durch eine NMR-Analyse bestätigt.

3 Bildung und Identifizierung von T-2 Toxin- und 4,15-Diacetoxyscirpenol-metaboliten in Pflanzenzellkulturen

Um den Verlauf der Metabolisierung von Typ A Trichothecenen durch Kartoffelzellen nachverfolgen zu können, wurden Zellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-5,0 µg/ml Kulturmedium) an T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol über 12 Tage hinweg inkubiert. Um eine möglichst optimale Metabolisierung der Toxine zu gewährleisten wurden Vitalität und Wachstum (nur Suspensionskulturen) der Kartoffelzellen in Anwesenheit der Toxine überprüft. Dabei wurden weder Wachstum noch Vitalität der Zellkulturen signifikant durch die eingesetzten Toxinkonzentrationen beeinträchtigt. In einer ähnlichen durchgeführten Studie von Schuster (1988) war das Wachstum einer Maiszelllinie nach einer 14-tägigen Inkubation mit 5 µg Deoxynivalenol/ml Kulturmedium bereits geringfügig beeinträchtigt (90 %). Im Vergleich dazu war das Wachstum der *Agria*-Suspensionskultur nach einer 12-tägigen Inkubation mit T-2 Toxin oder 4,15-Diacetoxyscirpenol (jeweils 5 µg/ml Kulturmedium) immer noch bei 96 % der Zellkontrolle. Die Phytotoxizität von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol ist, anders als im tierischen Organismus (Thompson u. Wannemacher 1986), geringer als die des Deoxynivalenols. So wurde beispielsweise das Wachstum von Weizenkoleoptilen durch Deoxynivalenol um ein vielfaches stärker gehemmt als durch T-2 Toxin, HT-2 Toxin oder 4,15-Diacetoxyscirpenol (Eudes et al. 2000).

Aufgrund seiner geringen Präzision konnte der Vitalitätstest aber nicht als verlässlicher Marker für die Aktivität der Kartoffelzellen betrachtet werden. Die Schwankungen der Testresultate waren vornehmlich auf die Inhomogenität des Pflanzenzellmaterials zurückzuführen, vor allem bei Kallusmaterial. Durch die Bildung von Zellklumpen, die durch eine unvollständige Trennung nach der Zellteilung entstanden (Taticek et al. 1991), kam es im Laufe des TTC-Tests oft zu unvollständigen Färbungs- bzw. Entfärbungsreaktionen. Den Versuch, die Kulturen im Voraus durch das Aussieben der Zellklümpchen zu homogenisieren, führte in der Regel, wahrscheinlich bedingt durch die mechanische Beanspruchung, zum Absterben der Kultur.

Aus diesem Grund wurde das dotierte Zellmaterial direkt einem Screening hinsichtlich der Bildung von möglichen Metaboliten unterzogen. Dafür wurden Addukt- und Fragmentationen für die Konjugation von 4,15-Diacetoxyscirpenol, T-2 Toxin und verwandter Toxine an Glucose, Malonsäure und Gluthathion postuliert. In Frage kommende Substanzen wurden anschließend aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens und dem Auftreten mehrerer postulierter MRM-Übergänge zu den entsprechenden spezifischen Retentionszeiten ausgewählt. Auf diese Weise konnten mögliche Glucoside von 15-Monoacetoxyscirpenol, Scirpentriol und HT-2 Toxin sowie Diglucoside von Scirpentriol und HT-2 Toxin identifiziert werden. Die Konjugation von Glucose oder Diglucosiden an Mykotoxine wurde bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen (Berthiller et al. 2006; Sewald et al. 1992; El-Sharkawy 1989). Die Bildung der Glucoside findet durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion statt. So konnten in *Arabidopsis thaliana* UDP-glucosyltransferasen nachgewiesen werden, die

diese Reaktionen für Deoxynivalenol und Zearalenon katalysieren (Poppenberger et al. 2006; Poppenberger et al. 2003).

Mit zunehmenden Toxinkonzentrationen in den Kartoffelzellen konnte auch ein Anstieg der jeweiligen potentiellen Metaboliten beobachtet werden. Dies wies zusätzlich darauf hin, dass die Bildung der betreffenden Substanzen im Zusammenhang mit der vorherigen Toxingabe stand.

Um die Identität der gefundenen Metaboliten zu bestätigen, wurden hiervon Product-Ion-Scans durchgeführt. Dabei konnte bei allen Substanzen ein Fragment mit dem Masse/Ladungsverhältnis des jeweiligen Aglucons $[M + H]^+$ beobachtet werden sowie - mit Ausnahme des möglichen HT-2 Toxin-Glucosids - ein Fragment mit m/z 163. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ein Fragment der Hexose $[M - OH]^+$ (Kamimura 1986). Die Tatsache, dass das Signal dieses Fragments bei beiden Diglucosiden im Verhältnis gesehen stärker war als bei den Monoglucosiden unterstützt diese Vermutung. Desweiteren wurden bei allen fünf Glucosidmetaboliten zahlreiche charakteristische Fragmente - entweder für Vertreter der Scirpentriol-Gruppe (m/z 307 (15-MAS-G), 265, 247, 229, 107) oder für T-2/HT-2 (m/z 305, 245, 227, 215, 197) - gefunden. Diese wurden bereits in Abschnitt E 2 genauer besprochen (Cavaliere et al. 2005; Berger et al. 1999).

Von allen diesen möglichen Glucosidkonjugaten wurde bisher lediglich das 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid beschrieben. Gorst-Allman et al. (1985) isolierten dieses aus einem mit *Fusarium sulphureum* MRC 514 inokulierten Maismehl und konnten dessen Struktur durch NMR Untersuchungen bestätigen. Das Glucosidkonjugat besitzt eine α -glucosidische Bindung am C_4 -Atom des Toxins. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb kein Diacetoxyscirpenol-Glucosid gefunden werden konnte. Diacetoxyscirpenol hat im Gegensatz zu 15-Monoacetoxyscirpenol am C_4 -Atom keine freie OH-Gruppe, es befindet sich an dieser Stelle eine zusätzliche Acetyl-Gruppe. Vergleichbares könnte auch bei T-2 Toxin vorliegen. T-2 Toxin ist an dieser Position ebenfalls acetyliert während bei HT-2 Toxin eine freie Hydroxylgruppe vorhanden ist.

Für den Nachweis, dass es sich bei der konjugierten Hexose tatsächlich um Glucosemoleküle handelt, wurden alle fünf isolierten Konjugate mit verschiedenen Glucosidasen inkubiert. Sowohl α -Glucosidase wie auch die Amyloglucosidase spalten terminale Glucosemoleküle ab, wobei sie laut Spezifikation des Herstellers in der Lage sind, eine ganze Reihe von α -glucosidischen Bindungen zu hydrolysieren. Während die Inkubation der möglichen Glucosidkonjugate mit α -Glucosidase keine Wirkung zeigte, kam es nach der Behandlung mit Amyloglucosidase zu einer geringfügigen Freisetzung des Aglucons von 15-Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, Scirpentriol-Glucosid und HT-2 Toxin-Glucosid. Dies deutet auf das Vorhandensein einer α -glucosidischen Bindung hin, auch wenn die Spaltungsaktivität der Amyloglucosidase gegenüber den Glucosidkonjugaten gering zu sein scheint. Bei den potentiellen Diglucosid-Molekülen kam es hingegen zusätzlich zu einer teilweisen Freisetzung des Aglucons zur vollständigen (SCR-P-DG) bzw. zu einer partiellen (HT-2-DG) Umwandlung in das entsprechende Glucosid. Da die Hydrolyse vom Diglucosid zum Glucosid im gleichen

Umfang auch durch die Inkubation mit einer β -Glucosidase erzielt werden konnte, ließ sich hier die Art der glucosidischen Bindung nicht ermitteln.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist mit einiger Sicherheit davon auszugehen, dass es sich bei den Konjugaten um die zuvor postulierten Metaboliten handelt. Letzte Sicherheit kann aber nur eine Strukturaufklärung mittels NMR-Untersuchungen geben.

Um einen ersten Anhaltspunkt bezüglich der Metabolisierung von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol in Kartoffeln zu erhalten, wurde zunächst die Reaktion von Zelllinien zweier unterschiedlicher Kartoffelsorten getestet. Dabei wurden die Kartoffelsorten 'Desiré' und 'Agrida' ausgewählt. Bei beiden Sorten handelt es sich um mittelfrühe, vorwiegend festkochende Speisekartoffeln, mit einer ähnlichen Beschädigungsanfälligkeit ('Desiré': niedrig bis mittel, 'Agrida': mittel) während der Ernte. Letzteres gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer Lagerfäule (so auch der Fusariumtrockenfäule) (Bundessortenamt 2010). Die Resistenz der Kartoffelsorte 'Desiré' gegenüber *Fusarium culmorum* wird als mittel bis hoch, gegenüber *Fusarium* spp. als mittel bis hoch bzw. sehr hoch eingestuft. Die Kartoffelsorte 'Agrida' weist hingegen nur eine mittlere Resistenz gegenüber *Fusarium* spp. auf (European Cultivated Variety Data Base).

Für die Extraktion von Fusarientoxinen und ihrer Glucoside aus Kartoffelzellen wurden zwei verschiedenen Verfahren getestet. Sowohl die mikrowellen- wie auch die ultraschallunterstützte Extraktion sind etablierte Verfahren zum Aufschluss von Pflanzenzellen (Vongsangnak et al. 2004; Schmidt u. Schuphan 2002). Auch im Bereich der Mykotoxinanalytik wurde eine mikrowellenunterstützte Extraktion bereits angewandt (Liazid et al. 2007; Pallaroni et al. 2002). Beide Verfahren waren dazu geeignet Typ A Trichothecene einschließlich der Glucosidkonjugate aus Kartoffelzellen zu extrahieren. Die Extraktion mittels Mikrowelle führte allerdings zu etwas besseren Resultaten, deshalb erfolgte die Isolierung dieser Substanzen aus kultivierten Pflanzenzellen durch ein mikrowellenunterstütztes Aufschlussverfahren mit Acetonitril/Reinstwasser (21/4) (v/v) als Extraktionsmittel, gefolgt von einer Flüssig-Flüssig-Aufreinigung mit Hexan, um lipophile Matrixsubstanzen zu eliminieren. Auf weitere Aufreinigungsverfahren wurde verzichtet, um einen möglichen Verlust an polaren Metaboliten zu vermeiden. Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten der Typ A Trichothecene lagen bei dieser Methode zwischen 49 % für Acetyl-T-2 Toxin und 97 % für 4,15-Diacetoxyscirpenol bzw. HT-2 Toxin (\pm SD [%] 2,1-10,3). Auch für die Glucoside schien diese Probenaufbereitung geeignet, als Wiederfindungsraten wurden Werte zwischen 62 % (SCRPDG) und 104 % (HT-2-G) (\pm SD [%] 1,5-15,8) ermittelt.

Für die Extraktion der Pflanzenzellen wurde, anstatt eines Aliquots einer gepoolten Probe, das gesamte Zellmaterial verwendet. Grund dafür waren zum Teil erhebliche Konzentrationsschwankungen bei der mehrmaligen Analyse des gleichen Probenmaterials. Ursächlich hierfür war vermutlich, wie auch beim Vitalitätstest, die Bildung von Zellklumpen und die dadurch ungenügende Homogenisierbarkeit des Materials.

Hierdurch könnte zudem die Nährstoffaufnahme und damit verbunden die Aufnahme des dotierten Toxins in die Zellen vermindert worden sein (Taticek et al. 1991).

Die ersten Untersuchungen wurden an Kalluskulturen durchgeführt, da diese sich als robuster und einfacher in der Handhabung erwiesen. Bei diesem System kam es jedoch nur zu einer unzureichenden Aufnahme der untersuchten Toxine in die Zellen. Ungebundene Toxine konnten nur vereinzelt in Spuren nachgewiesen werden, erste Glucosidmetabolite in geringen Mengen nach einer Stunde.

Weiterhin konnten in den beiden Zelllinien Unterschiede in der Metabolisierung der eingesetzten Toxine beobachtet werden. In Desiré-Kulturen waren die Gehalte der Glucosidmetaboliten von HT-2 Toxin geringer als in den Agria-Kulturen. Ebenso konnte MAS-Glucosid als Hauptmetabolit von Diacetoxyscirpenol in Agria-Zellen erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt (2 d Desiré; 2 h Agria) in vergleichsweise geringen Konzentrationen beobachtet werden. Schließlich war die Ausbeute an Glucosiden nach einer Versuchsdauer von 12 Tagen in den Agria-Zellen durchweg größer als in den Desiré-Kulturen, deren Gehalte zu diesem Zeitpunkt zum Teil wieder rückläufig waren. Auch Ruhland et al. (1996) fanden Unterschiede in der Metabolisierung von Ochratoxin A in Zellkulturen verschiedener Gemüsesorten, was sie unter anderem auf die genetische Ausstattung der unterschiedlichen Pflanzen zurückführten. Dies scheint bei Kartoffeln auch auf Sortenebene stattzufinden. Möglicherweise findet bei Desiré-Zellen auch eine Konjugation an andere, bisher nicht untersuchte Molekülgruppen statt, oder es kam zu einer vermehrten Eliminierung der Toxinmoleküle beispielsweise durch eine Inkooperation in Bestandteile der Matrix. Dieses Phänomen konnte bereits bei radioaktiv markiertem Zearalenon beobachtet werden. Nach zwölf Tagen Inkubation in einer Maiszellkultur war ca. 54 % der Radioaktivität an Zellwandbestandteile wie Lignin, Hemicellulose, Stärke, Pectin, Cellulose, Proteine gebunden (Zill et al. 1990).

Da die Kalluskulturen aufgrund der mangelnden Toxinaufnahme in die Zellen als Modell für die Metabolisierung von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol nicht optimal geeignet waren, wurde von der Agria-Kultur - die im Vergleich zu der Desiré-Kultur eine höhere Glucosidierungsrate aufwies - zusätzlich eine Suspensionskultur angelegt. Die Untersuchungen zur Metabolisierung von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol durch die Suspensionszellen wurde analog zu den Kallusversuchen durchgeführt. In dieser Kultur kam es zu einer schnellen Aufnahme der Toxine aus dem Medium. Bereits nach zwei Tagen konnte weder T-2 Toxin noch Diacetoxyscirpenol im Medium nachgewiesen werden. Dagegen konnten in der Zellfraktion der Suspensionskulturen, im Gegensatz zum Kallus, nicht konjugierte Toxine nachgewiesen werden. Neben Gehalten an T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol wurden ebenfalls die deacetylierten Metaboliten HT-2 Toxin, 4- und 15-Monoacetoxyscirpenol sowie Scirpentriol nachgewiesen. Diese Transformation wurde bereits in früheren Untersuchungen mit verschiedenen Pflanzen beobachtet. In Kartoffeln, die mit *Fusarium sambucinum* NRRL 13711 infiziert waren konnte die Deacetylierung von Diacetoxyscirpenol zu 15-Monoacetoxyscirpenol beobachtet werden (Desjardins u. Plattner 1989). Weiterhin wurde die Transformation

von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol durch *Baccharis* spp. nachgewiesen, unter anderem zu HT-2 Toxin, 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol (Mirocha et al. 1988).

Sämtliche in Frage kommenden glucosidierten Toxinmetaboliten konnten bereits zum ersten Messzeitpunkt, unmittelbar nach der Applikation der Toxine, in der Zellfraktion nachgewiesen werden, was zeigt, dass diese Stoffwechselreaktionen sehr schnell ablaufen. Glucosidierungs- aber auch Hydroxylierungsreaktionen zu denen auch die Deacetylierung zählt, stellen Versuche der Pflanzen dar, toxische Stoffe zu entgiften (Cole 1994; Mirocha et al. 1988). Beispielsweise können glucosidierte Toxine anschließend in der Zellvakuole gespeichert und somit aus der stoffwechselaktiven Zytoplasma entfernt werden (Bartholomew et al. 2002).

Die Sekretion von toxischen Stoffen aus der Zelle ist eine weitere Möglichkeit für die Pflanzenzelle toxische Substanzen zu eliminieren (Lao et al. 2003; Sandermann 1994). Anders als bei den Kalluskulturen konnten in diesem Versuchsmodell im Kulturmedium sowohl glucosidierte als auch deacetylierte Toxinmetaboliten nachgewiesen werden. Die Exkretion der Glucosidkonjugate (HT-2-G, MAS-G, SCR-P-G) aus den Pflanzenzellen ins Kulturmedium begann bis acht Stunden nach Versuchsbeginn. Scirpentriol-Diglucosid war als einzige Substanz während der Versuchsdauer lediglich in der Zellfraktion nachzuweisen.

4 Vorkommen von Fusarientoxinen und Fusarientoxin-Glucosiden in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

In Deutschland wurden im Wirtschaftsjahr 2007/2008 pro Kopf 27 kg frische Speisekartoffeln und 12 kg Kartoffelprodukte verzehrt (ZMP 2008). Um das Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten zu beurteilen sowie eine mögliche Risikoabschätzung für den Verbraucher vorzunehmen, wurden 206 Einzelproben aus dem Handel auf Typ A Trichothecene, Typ B Trichothecene und Zearalenon untersucht. Insgesamt konnte in 31 % der Proben mindestens ein in Frage kommendes Toxin nachgewiesen werden. Schollenberger et al. (2005) konnten nur in 19 % der Kartoffelprodukte Fusarientoxine nachweisen. Die Vergleichbarkeit dieser Arbeit ist jedoch sehr begrenzt, da abgesehen von den unterschiedlichen Analysemethoden lediglich 21 Proben untersucht wurden.

Nicht in allen betrachteten Lebensmittelgruppen traten positive Befunde auf, sondern ausschließlich in Kartoffelknödel/Kloßteig (41 %), Kartoffelpüree (38 %), rohen Kartoffeln (11 %), Pommes Frites/Wedges (4,8 %), Kartoffelpuffer (3,2 %) und vorgekochten Kartoffeln (1,6 %). Keine Toxine konnten somit in den Gruppen Bratkartoffeln und Kartoffelchips nachgewiesen werden. Möglicherweise hängt die Befallshäufigkeit mit der jeweiligen Verarbeitung der Produkte zusammen. Kartoffelknödel/Kloßteig und Kartoffelpüree werden aus homogenisierten Kartoffeln hergestellt (Scheffel 2004). Knollen mit Faulstellen, die eventuell während der Verarbeitung übersehen wurden, können daher bei einer abschließenden Kontrolle im Endprodukt nicht mehr erkannt werden. Dagegen bleibt bei Bratkartoffeln und gekochten Kartoffeln ($n_{\text{pos.}}=1$) die Struktur weitestgehend erhalten. Eine nicht vollständig entfernte Faulstelle kann somit bis zum Ende des Herstellungsprozesses erkannt und entfernt werden, was das Risiko einer Kontamination mit Mykotoxinen verkleinert. Anders stellt sich die Situation bei rohen Kartoffeln dar. Da es sich bei der Fusariumtrockenfäule um eine Lagerkrankheit handelt, werden die Knollen vor dem Ausliefern aus dem Lagerbetrieb kontrolliert (Uhlmann et al. 2003). Die Symptome dieser Trockenfäule können sich aber auch erst im Einzelhandel oder beim Endverbraucher ausbilden, wenn Sporen aus dem Staub bzw. der Kartoffeloberfläche über Verletzungen ins Innere der Knolle gelangen (Stachewicz 2000).

Bei der Analyse aller Proben aus dem Einzelhandel konnten insgesamt neun verschiedene Fusarientoxine nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich im Einzelnen um Diacetoxyscirpenol (8,7 %), 4-Monoacetoxyscirpenol (2,9 %), 15-Monoacetoxyscirpenol (13 %), Scirpentriol (6,3 %), T-2 Toxin (1,0 %), HT-2 Toxin (1,0 %), Neosolaniol (1,0 %), Deoxynivalenol (7,8 %) und Zearalenon (22 %).

Nahezu alle dieser Toxine konnten auch in artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelproben nachgewiesen werden (Schultz et al. 2007; Latus-Zietkiewicz et al. 1995; Desjardins u. Plattner 1989; El-Banna et al. 1984; Lafont et al. 1983). Die Ausnahme bildete hierbei 4-Monoacetoxyscirpenol. Der Nachweis dieses Toxins erfolgte bisher lediglich in verschiedenen Fusarienstämmen, künstlich mit Fusarien

inokuliertem Getreide und verschimmeltem Mais (Nielsen u. Thrane 2001; Jelen u. Kaminski 1997; Richardson et al. 1989; Steyn et al. 1978).

In den untersuchten Kartoffelproben (n=40) aus dem Handel traten acht verschiedene Fusarientoxine im quantifizierbaren Bereich auf. Der Median der positiven Befunde für Diacetoxyscirpenol lag bei 85 µg/kg, die am höchsten belastete Probe enthielt 89 µg/kg. Außerdem gelang der Nachweis von 4-Monoacetoxyscirpenol (Median 4 % des Kalibrierstandards; max. 8,4 %), 15-Monoacetoxyscirpenol (Median 15 µg/kg; max. 254 µg/kg), Scirpentriol (Median 1567 % des Kalibrierstandards; max. 2980 %), T-2 Toxin (Median 14 µg/kg; max. 25 µg/kg), HT-2 Toxin (55 µg/kg), Neosolaniol (Median 9,0 µg/kg; max. 9,7 µg/kg) und Zearalenon (Median 0,8 µg/kg; max. 1,4 µg/kg). Bislang gelang der Nachweis von Fusarientoxinen fast ausschließlich in künstlich inokulierten Kartoffeln (Schultz et al. 2007; Latus-Zietkiewicz et al. 1995; El-Banna et al. 1984). Lafont et al. (1983) untersuchten zusätzlich natürlich infizierte Kartoffeln. Dabei konnten mit Maximalwerten von 140000 µg/kg Diacetoxyscirpenol, 600 µg/kg T-2 Toxin und 200 µg/kg Neosolaniol sehr hohe Toxinkonzentrationen nachgewiesen werden. Jedoch bezogen sich die angegebenen Ergebnisse auf Faulstellen einzelner Kartoffeln. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen zunächst homogenisierte Aliquote ganzer Verkaufseinheiten (0,7-4,0 kg) untersucht ohne die Knollen davor auf Trockenfäulesymptome zu selektieren. Die Toxine einzelner befallener Knollen konnten sich so gleichmäßig in der gesamten Probe verteilen. Diese Art der Probenbehandlung ist zwar nicht unmittelbar praxisrelevant lässt aber wichtige Rückschlüsse auf die zu erwartende Qualität bei der Herstellung von Kartoffelprodukten ziehen, in erster Linie hinsichtlich der Reduktion der Mykotoxingehalte durch den Verdünnungseffekt.

In der haushaltlichen Praxis besteht bei einem Befall einer Kartoffel mit *Fusarium* spp. die Möglichkeit die Knolle entweder auszusortieren oder die Faulstelle auszuschneiden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die in der Faulstelle gebildeten Toxine auch in angrenzendes, symptomfreies Gewebe diffundieren können (Delgado et al. 2010; Ellner 2002; Desjardins u. Plattner 1989; Lafont et al. 1983). Um weitere Daten zu dieser Thematik zu erhalten wurden Kartoffelknollen der Sorte 'Lady Christl' mit acht verschiedenen *Fusarium* spp. Isolaten inokuliert. Nach einer Inkubationsdauer (15,5°C) von 28 Tagen wurden in allen untersuchten Kartoffelknollen Symptome einer Trockenfäule beobachtet; die Virulenz der untersuchten Stämme gegenüber der Sorte 'Lady Christl' war mäßig bis stark. Trotzdem produzierten nicht alle Stämme Toxine in den Faulstellen der untersuchten Kartoffelsorte, z.B. ein Isolat des Stammes *Fusarium sambucinum* und ein *Fusarium coeruleum* Isolat. Letzteres wies die größte Virulenz in den Knollen ohne zusätzliche Knollennassfäule auf. Auch Latus-Zietkiewicz et al. (1995) konnten in Kartoffelknollen die mit *Fusarium coeruleum* Isolaten inokuliert worden waren keine Mykotoxine nachweisen, im Gegensatz zu El Banna et al. (1984), die HT-2 Toxin, Deoxynivalenol und Acetyldeoxynivalenol in Faulstellen von Kartoffeln infiziert mit *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Synonym: *Fusarium coeruleum*) fanden.

Insgesamt konnten in vorliegender Arbeit in 71 % der inokulierten Kartoffelknollen Mykotoxine nachgewiesen werden; zudem in 33 % der natürlich infizierten Kartoffeln.

Im Vergleich dazu fanden Lafont et al. (1983) sogar in 80 % natürlich infizierter Kartoffelknollen einer Untersuchungsreihe Gehalte an Trichothecenen; zudem konnte erstmals die Diffusion von Diacetoxyscirpenol aus der Faulstelle beobachtet werden und zwar in 34 % der untersuchten Knollen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Toxindiffusion lediglich in 9,5 % der inokulierten Knollen beobachtet. Neben 15-Monoacetoxyscirpenol (114 µg/kg) konnten im ersten der Faulstelle angrenzenden, symptomfreien Gewebestück (Entfernung von der Faulstelle ca. 0,25-0,75 cm) Gehalte an Scirpentriol und Deoxynivalenol (<LOQ-247 µg/kg) detektiert werden. Auch die Diffusion von Deoxynivalenol konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden (Delgado et al. 2010; Delgado et al. 2009). Während bei Knollen, die mit *Fusarium graminearum* infiziert wurden und über drei Wochen bei 10 bis 12°C gelagert wurden, in einer Entfernung von 1 cm von der Faulstelle nur vergleichsweise geringe Gehalte (0,05 µg/ml) an Deoxynivalenol nachzuweisen waren, konnten die Autoren bereits eine deutlich höhere Konzentration (0,54 µg/ml) bei einer Lagertemperatur von 20°C messen. Insgesamt wurden in beiden Studien Deoxynivalenol bis zu einer Entfernung von 3 cm von der Faulstelle detektiert. Ähnliches wurde zuvor bereits bei einem Inokulationsversuch mit *Fusarium sambucinum* und der Kartoffelsorte 'Combi' beobachtet, bei dem ein Anstieg der Lagertemperatur von 10°C auf 20°C mit einem Anstieg der Diacetoxyscirpenolkonzentration einherging (Ellner 2002). Jedoch ist nicht davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Lagertemperatur zwingend zu einer gesteigerten Toxinproduktion führen muss. So wie die Wachstumsoptima für Temperatur und Luftfeuchte bei verschiedenen *Fusarium* species unterschiedlich sind (Seppänen 1981b), so darf angenommen werden, dass ähnliches auch für die Toxinproduktion zutrifft.

Weiterhin können auch Faktoren der Resistenzausbildung Einfluss auf die Produktion von Trichothecenen in Kartoffeln haben. Beispielsweise wurden bei der Inokulation von jeweils zwei Kartoffelsorten mit *Fusarium* spp. unter gleichen Lagerbedingungen mehrfach geringere Toxingehalte in der resistenteren Sorte gefunden; sowohl in der Faulstelle als auch im angrenzenden, augenscheinlich gesunden Knollengewebe (Schultz et al. 2007; Ellner 2002).

Aufgrund dieser zahlreichen Faktoren, die einen Einfluss auf eine mögliche Diffusion von Toxinen aus der Faulstelle in symptomfreies Knollengewebe haben könnten, kann nicht allgemeingültig abgeschätzt werden, wie weit eine Faulstelle mindestens ausgeschnitten werden müsste um eine Reduzierung des Toxingehalts unter die Nachweisgrenze zu erreichen. Für eine bestmögliche Qualität bei der Herstellung von Kartoffelprodukten wäre daher von einem Ausschneiden von Faulstellen aus Kartoffelknollen abzuraten.

Bei der Untersuchung der Kartoffelprodukte (n=166) konnten mit Diacetoxyscirpenol (3,8 µg/kg-8,6 µg/kg), 4-Monoacetoxyscirpenol (0,9-1,1 % des Kalibrierstandards), 15-Monoacetoxyscirpenol (2,6 µg/kg-25 µg/kg), Scirpentriol (114-119 % des Kalibrierstandards), Deoxynivalenol (2,2 µg/kg-45 µg/kg) und Zearalenon (0,2 µg/kg-7,2 µg/kg) sechs verschiedene Toxine nachgewiesen werden. Schollenberger et al. (2005) fanden

in 21 Kartoffelprodukten jeweils einmal Diacetoxyscirpenol (21 µg/kg), HT-2 Toxin (5,0 µg/kg) und Zearalenon (2,0 µg/kg), zweimal Scirpentriol (23 µg/kg-35 µg/kg), sowie in drei Proben 15-Monoacetoxyscirpenol (5 µg/kg-26 µg/kg). Die Ergebnisse beider Untersuchungen sind jedoch nicht unmittelbar vergleichbar, da sich die Ergebnisse von Schollenberger et al. (2005) auf die Ausgangsgewichte der Kartoffelprodukte beziehen, die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse jedoch auf die Trockenmasse. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, müssen die auf die Trockenmasse bezogenen Ergebnisse (außer bei Trockenprodukten) dieser Arbeit im Mittel mit einem Faktor von 0,16 - 0,34 multipliziert werden, so dass die Toxingehalte der ursprünglichen Proben festgestellt werden können. Nimmt man eine derartige Anpassung vor, sind die Konzentrationen von Fusarientoxinen in den Kartoffelprodukten dieser Arbeit tendenziell geringer.

Vertreter der Scirpentriol-Gruppe wurden in Kartoffelprodukten fast ausschließlich in der Lebensmittelgruppe Kartoffelpüree nachgewiesen. Die Gehalte dieser Toxine waren hier etwa um das 3-10-fache geringer als in rohen Kartoffeln. In den Produktgruppen Kartoffelknödel/Kloßteig, Kartoffelpuffer und Pommes Frites/Wedges konnte im quantifizierbaren Bereich hauptsächlich Deoxynivalenol (3 %) und Zearalenon (25 %) detektiert werden. Da in nativen Kartoffeln lediglich Zearalenon (5 %) bestimmbar war, gelangten Deoxynivalenol und in gewissem Ausmaß auch Zearalenon möglicherweise über andere Zutaten in die Kartoffelprodukte. Mögliche Quellen dafür wäre Weizenmehl, das beispielsweise in Kartoffel-Wedges enthalten ist, oder der Einsatz von pflanzlichen Speiseölen, wie Maiskeim-, Weizenkeim- oder Sojaöl, in denen bereits Zearalenon nachgewiesen werden konnte (Kappenstein et al. 2005).

Die Gründe für die geringeren Toxingehalte in Kartoffelerzeugnissen liegen in der Verarbeitung der Kartoffeln. Mit Hilfe von Verlesebändern werden schadhafte Knollen automatisch aussortiert und die Faulstellen danach teilweise manuell ausgeschnitten (Scheffel 2004). Die Mykotoxine einzelner Knollen, die möglicherweise trotz einer bestehenden Faulstelle im Produktionsprozess verbleiben bzw. die Toxine, die durch Diffusion von den Faulstellen in scheinbar gesundes Gewebe zurückbleiben, verteilen sich anschließend auf die gesamte Charge. Durch diesen Verdünnungseffekt sinken die Konzentrationen im Kartoffelerzeugnis relativ zum Ausgangsprodukt. Eine weitere Möglichkeit, die zu einer Reduktion von Toxingehalten in Kartoffelprodukten führen könnte, ist das Kochen in Wasser. Bei der Herstellung von Kartoffelprodukten werden nach dem Schälen der Kartoffel diese zunächst einige Minuten blanchiert (Scheffel 2004). Da Trichothecene wasserlöslich sind, könnte es zu einer Ausschwemmung von Toxinen ins Kochwasser kommen. So wurden beispielsweise bei der Nassmüllerei von Getreide oder Mais Fusarientoxine im Einweichwasser gefunden (Lauren u. Ringrose 1997; Abbas et al. 1985; Collins u. Rosen 1981).

Die ermittelten Daten bezüglich des Vorkommens von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten wurden anschließend hinsichtlich eines möglichen Gesundheitsrisikos für die Bevölkerung evaluiert. Die positiven Befunde wurden zunächst mit Hilfe der mittleren Wiederfindungsraten der jeweiligen Toxine in der Matrix Kartoffel korrigiert

und anschließend auf das Frischgewicht umgerechnet. Dazu wurden entweder die jeweiligen Trockenmassegehalte herangezogen oder im Falle von Trockenprodukten der Median des Trockenmassegehalts der dazugehörigen Gruppe.

Verzehrdaten zu Kartoffeln und Kartoffelerzeugnissen wurden verschiedenen, in Deutschland durchgeführten Verzehrsstudien entnommen (Max Rubner-Institut 2008; Mensink et al. 2007; Vohmann et al. 2005, siehe Abschnitt B 2.1). Zu den Kartoffelerzeugnissen zählen laut Max Rubner-Institut (2008) lediglich gekochte Kartoffeln, Kartoffelpuffer, Kloßteig/Kartoffelknödel, Pommes Frites/Wedges und Kartoffelpüree. Aus diesem Grund wurden 188 der insgesamt 206 untersuchten Proben in die Berechnung einbezogen.

Da die positiven Befunde für die einzelnen Mykotoxine in der untersuchten Stichprobe (n=188) vergleichsweise gering waren und mit Ausnahme von Zearalenon (24 %) unter 20 % lagen, konnte für sie kein Median gebildet werden. Nach den Empfehlungen des „GEMS/Food-EURO on Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food Workshops“ (WHO 1995) wurden stattdessen ein oberer und ein unterer Schätzwert des Mittelwertes gebildet. Für den oberen Mittelwert wurden alle Ergebnisse <LOD gleich dem LOD gesetzt, Gehalte zwischen dem LOD und LOQ gleich dem LOQ. Für den unteren Mittelwert wurden LOD und LOQ gleich null gesetzt. Die Mittelwerte für alle in Kartoffeln und Kartoffelerzeugnissen vorkommenden und quantifizierbaren Toxine (Tabelle 47) lagen zwischen 0,02 µg/kg und 0,47 µg/kg (unterer Mittelwert) bzw. 0,19 µg/kg und 1,66 µg/kg (oberer Mittelwert).

Tabelle 47: Mittlere Gehalte [µg/kg] verschiedener Fusarientoxine in den Kartoffeln und Kartoffelerzeugnissen der Stichprobe (n=188)

	DAS [µg/kg]	15-MAS [µg/kg]	T-2 [µg/kg]	HT-2 [µg/kg]	NEO [µg/kg]	DON [µg/kg]	ZON [µg/kg]
unterer \bar{x}							
x<LOD=0, x<LOQ=0	0,29	0,47	0,04	0,06	0,02	0,23	0,14
oberer \bar{x}							
x<LOD=LOD, x<LOQ=LOQ	0,75	0,69	0,34	1,66	0,31	0,49	0,19

° Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind im Anhang in Tabelle A 5 aufgeführt.

Die Berechnung verschiedener Szenarien für die tägliche Zufuhr an Fusarientoxinen erfolgte in Anlehnung an das Modell von Cholmakov-Bodechtel et al. (2000). Diese definierten folgendes Berechnungsmodell:

- Best case: 50. Perzentile Toxin x niedrige Verzehrsmenge
- Mean case: 50. Perzentile Toxin x mittlere Verzehrsmenge
- Bad case: 90. Perzentile Toxin x mittlere Verzehrsmenge
- Worst case: 90. Perzentile Toxin x hohe Verzehrsmenge

Da jedoch aufgrund der wenigen positiven Proben anstatt eines Medians zwei Schätzwerte des Mittelwertes (unterer und oberer Mittelwert) vorlagen wurde dieses Modell folgendermaßen abgeändert.

Best case: unterer Mittelwert des Toxins x 5. (bzw. 10.) Perzentile Verzehr

Mean case: unterer Mittelwert des Toxins x 50. Perzentile Verzehr

Bad case: oberer Mittelwert des Toxins x 50. Perzentile Verzehr

Worst case: oberer Mittelwert des Toxins x 95. (bzw. 90.) Perzentile Verzehr

Tabelle 48 zeigt beispielhaft zwei Szenarien für die täglichen Aufnahmen der Toxine 4,15-Diacetoxyscirpenol und 15-Monoacetoxyscirpenol. Sowohl bei einem durchschnittlichen (Mean Case) als auch bei einem ungünstigen Fall (Bad Case) würden demnach nur geringe Gehalte an 4,15-Diacetoxyscirpenol (max. 0,067 µg, Männer 65-80 Jahre) und 15-Monoacetoxyscirpenol (max. 0,062 µg, Männer 65-80 Jahre) durch den Verzehr von Kartoffeln und Kartoffelerzeugnissen aufgenommen.

Tabelle 48: Tägliche Aufnahmen an 4,15-Diacetoxyscirpenol und 15-Monoacetoxyscirpenol [µg] durch Kartoffeln und Kartoffelerzeugnisse

Alter [Jahre]	DAS/Tag [µg]				15-MAS/Tag [µg]			
	Männer		Frauen		Männer		Frauen	
	Mean case	Bad case	Mean case	Bad case	Mean case	Bad case	Mean case	Bad case
0,5-<1*	0,007	0,019	Keine getrennte Erhebung (Ergebnisse siehe Männer)		0,012	0,017	Keine getrennte Erhebung (Ergebnisse siehe Männer)	
1*	0,008	0,021			0,013	0,019		
2*	0,010	0,025			0,016	0,024		
3*	0,012	0,029			0,018	0,027		
4*	0,012	0,030			0,019	0,028		
6**	0,013	0,034	0,012	0,029	0,021	0,031	0,018	0,027
7-9**	0,014	0,035	0,016	0,040	0,022	0,033	0,025	0,037
10-11**	0,016	0,040	0,014	0,035	0,025	0,037	0,022	0,033
12**	0,022	0,055	0,019	0,049	0,034	0,051	0,031	0,045
14-18	0,021	0,053	0,017	0,042	0,033	0,049	0,026	0,039
19-24	0,022	0,057	0,014	0,035	0,036	0,053	0,022	0,033
25-34	0,019	0,048	0,015	0,038	0,030	0,044	0,024	0,035
35-50	0,020	0,051	0,016	0,041	0,032	0,047	0,026	0,038
51-64	0,022	0,056	0,018	0,047	0,035	0,052	0,029	0,043
65-80	0,026	0,067	0,022	0,055	0,042	0,062	0,034	0,051

Mean case: unterer Mittelwert des Toxins x 50. Perzentile des Verzehrs an Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Bad case: oberer Mittelwert des Toxins x 50. Perzentile des Verzehrs an Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Verzehrsdaten aus den Studien Max Rubner-Institut (2008); **Mensink et al. (2007); *Vohmann et al. (2005) siehe Abschnitt B 2.1

Weiterhin wurde für einige Altersstufen (<1-4 J, 6 J, 12 J, 14-80 J) überprüft, welchen Anteil die in Kartoffeln und Kartoffelprodukten enthaltenen Fusarientoxingehalte zu den bestehenden Werten der tolerierbaren täglichen Aufnahmen (TDI) von ΣT-2 Toxin/HT-2 Toxin (0,06 µg/kg KG), Deoxynivalenol (1 µg/kg KG) und Zearalenon (0,2 µg/kg KG) beitragen (Europäische Union 2006). Die dazu benötigten Gewichtsangaben sind in Tabelle A 13 und Tabelle A 14 aufgeführt.

Da bei Kartoffeln und Kartoffelprodukten aber in erster Linie die Vertreter der Scirpentriol-Gruppe von Bedeutung sind, wurden aufgrund vergleichbarer LD_{50} -Werte für eine erste grobe Einschätzung eines möglichen Risikos in dieser Arbeit der temporäre TDI von $\Sigma T-2/HT-2$ für die Summe von Diacetoxyscirpenol und 15-Monoacetoxyscirpenol übernommen. Die Größenordnung der LD_{50} -Werte für Diacetoxyscirpenol (15 mg/kg), 15-Monoacetoxyscirpenol (4,5 mg/kg), T-2 Toxin (9,1 mg/kg) und HT-2 Toxin (10 mg/kg) bei Mäusen (intraperitoneale Gabe) lassen diese Vereinfachung zulässig erscheinen. Für Deoxynivalenol wird zum Vergleich ein LD_{50} -Wert von 43 mg/kg angegeben (Thompson u. Wannemacher 1986). Doch selbst im ungünstigsten Fall konnte in keiner Altersgruppe, auch nicht in der wegen ihres geringen Körpergewichtes am stärksten gefährdeten Gruppe der Kleinkinder, durch den Verzehr von Kartoffeln und Kartoffelprodukten mehr als 3,2 % ($\Sigma T-2/HT-2$; Mädchen <1 Jahr) eines der TDIs der oben aufgeführten Fusarientoxine erreicht werden.

Wird als Beispiel für ein „worst case“ Szenario die am höchsten belastete Kartoffelproduktprobe betrachtet, ein Kartoffelpüree, so enthielt diese insgesamt 7,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diacetoxyscirpenol und 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 15-Monoacetoxyscirpenol. Um das ursprüngliche Frischgewicht der Probe zu ermitteln, wurde das Trockengewicht mit der mittleren Trockenmasse (25,4 %) von lyophilisierten Kartoffelpürees (Tabelle A 12) korrigiert. Unter der Annahme eines tTDIs von 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg KG d}$ für $\Sigma DAS/15-MAS$ müsste eine Person mit 70 kg Körpergewicht an einem Tag 4,2 μg der Toxine zuführen, um diesen Wert zu erreichen, was 515 g dieses Kartoffelpürees entspräche. Ein Kleinkind mit einem Körpergewicht von 10,8 kg (Mädchen 1 Jahr; Vohmann et al. (2005)) würde den tTDI schon mit einer Zufuhr von 0,9 μg $\Sigma DAS/15-MAS$ erreichen. Dies entspräche dem Verzehr von 79,5 g des hoch belasteten Kartoffelpürees. Allerdings beträgt selbst der ungünstigste Fall (90. Perzentile) des Verzehrs an Kartoffeln und Kartoffelprodukten in diesem Alter 61 g (Vohmann et al. 2005). Lediglich bei Einbeziehung von 4-Monoacetoxyscirpenol ($2,5 \times 10^3$ counts) und Scirpentriol ($7,7 \times 10^3$ counts), die ebenfalls in dieser Probe vorkamen und deren Konzentrationen aufgrund des fehlenden zertifizierten Kalibrierstandards nicht zu ermitteln war, könnte aus der Summe von Diacetoxyscirpenol, 4- und 15-Monoacetoxyscirpenol sowie Scirpentriol diese Konzentration erreicht werden.

Ebenfalls berücksichtigt werden sollte, dass in 42 % aller positiven Proben mehr als ein Fusarientoxin detektiert werden konnte. Vor allem Vertreter der Scirpentriol-Gruppe (29 %) traten häufiger gemeinsam auf. Hier besteht die Möglichkeit von synergistischen Effekten der Toxine. In dieser Hinsicht wurden in der Vergangenheit jedoch wenige Studien durchgeführt (Tajima et al. 2002; Thuvander et al. 1999; Groten et al. 1998; Madhyastha et al. 1994). Diese wiesen nach, dass mehrere gleichzeitig auftretende Toxine in der Regel additiv, seltener antagonistisch wirken. In einigen Testsystemen konnte aber auch eine synergistische Wirkung beobachtet werden. Beispiele dafür sind die Interaktionen von T-2/HT-2 und DON/NIV in einem Hefe-Bioassay oder von Nivalenol jeweils mit T-2 Toxin, Deoxynivalenol oder Zearalenon in einem DNA-

Synthese Inhibitionsassay. Diese Wirkungen sind jedoch stark abhängig vom Versuchsaufbau, teilweise auch von der induzierten Toxinkonzentration.

Insgesamt gelang in 31 % der analysierten Kartoffeln und Kartoffelprodukte der Nachweis von Fusarientoxinen. Im Vergleich dazu gibt es in anderen Lebensmitteln wie Hafer und Haferprodukten für einige Typ A Trichothecene Befallshäufigkeiten von bis zu 100 % (Gottschalk et al. 2007). Die analysierten Konzentrationen in den praxisrelevanten Produkten (abgesehen von rohen Kartoffeln) waren überwiegend gering, sodass auch das Auftreten von Mehrfachbelastungen vernachlässigbar scheint. Letztendlich ist es aufgrund der in dieser Studie ermittelten Daten zwar bei Kleinkindern denkbar, erhöhte Mengen an Vertretern der Scirpentriol-Gruppe aufzunehmen, grundsätzlich ist aber nicht von einer Gesundheitsgefährdung durch den Verzehr von Kartoffelprodukten auszugehen.

Neben der Aufnahme an Fusarientoxinen könnten beim Verzehr von Kartoffeln und Kartoffelprodukten auch metabolisierte Toxine zugeführt werden, beispielsweise die zuvor in Kartoffelzellkulturen beobachteten Typ A Trichothecen-Glucoside. Unterstützt wurde diese Annahme durch den bereits geglückten Nachweis von glucosidiertem Deoxynivalenol und Zearalenon unter anderem in Weizen (Berthiller et al. 2005b; Schneewis et al. 2002).

Deshalb wurden zunächst die Kartoffelknollen mit Fusariumtrockenfäule auf diese Substanzen untersucht. In den inokulierten Kartoffelproben aus dem Diffusionsversuch konnten in den Faulstellen in 43,9 % der Proben Glucosidkonjugate, in 71,4 % nicht glucosidierte Toxine nachgewiesen werden. Daneben gelang in drei der 12 untersuchten, natürlich infizierten Knollen der Nachweis. Zudem konnte in einer dieser Proben auch erstmals Scirpentriol-Diglucosid detektiert werden.

Abschließend wurde ermittelt, ob die im Faulstellengewebe gefundenen Glucosidkonjugate ähnlich wie die entsprechenden Trichothecene in angrenzendes, scheinbar gesundes Kartoffelgewebe diffundieren können. Dabei konnte in den Knollen von vier verschiedenen Pilzisolaten eine Diffusion aus dem Faulgewebe festgestellt werden. In 20 % aller untersuchten Knollen wurden Glucosidgehalte auch im angrenzenden Gewebe nachgewiesen, die Diffusion von Toxinen war dagegen mit 9,5 % vergleichsweise gering. Zudem drangen die Glucoside deutlich weiter ins symptomfreie Gewebe vor. Während die Toxingehalte lediglich im ersten untersuchten Gewebeabschnitt (\varnothing 5 mm) nachzuweisen waren, konnten Glucoside bis zum dritten untersuchten Gewebeabschnitt (Entfernung von der Faulstelle ca. 1,75-2,25 cm) gefunden werden. Dies könnte bedeuten, dass die Diffusion durch die Glucosidierung der Toxine erleichtert wird, möglicherweise durch die erhöhte Polarität der Konjugate. Die Glucosidierung der Toxine könnte aber auch erst nach der Diffusion der Toxine in gesunden Kartoffelzellen stattfinden, in denen die Glucosidkonjugate dann wie von Bartholomew et al. (2002) beschrieben in der Vakuole gespeichert würden.

Nach dem geglückten Nachweis in Kartoffeln mit Trockenfäulesymptomen wurden anschließend auch alle Speisekartoffeln und Kartoffelprodukte, die mindestens ein Fusarientoxin enthielten, zusätzlich auf Glucosidkonjugate untersucht. Tatsächlich

gelang der Nachweis für Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, Scirpentriol-Glucosid und HT-2 Toxin-Glucosid. Diglucoside konnten in Kartoffeln und Kartoffelprodukten aus dem Einzelhandel hingegen nicht gefunden werden. Insgesamt wurde in 3,4 % der untersuchten Proben aus dem Einzelhandel mindestens ein Glucosidkonjugat nachgewiesen, im Vergleich dazu enthielten 30,6 % der Proben mindestens eines der untersuchten Fusarientoxine.

Für eine erste grobe Einschätzung hinsichtlich der Relevanz der gefundenen Glucosidkonjugatkonzentrationen wurden die Peakflächen der Quantifier dieser Analyten mit Hilfe der Peakfläche eines zertifizierten Deoxynivalenol-Glucosidstandards ($c=500$ ng/ml, gelöst in Kartoffelmatrix) quantifiziert. Danach enthielten die positiven Proben der Kartoffeln mit Fusariumtrockenfäule (bezogen auf die Trockenmasse) zwischen 1,29 und 160 mg/kg Monoacetoxyscirpenol-Glucosid bzw. 1,13 – 144 mg/kg Scirpentriol-Glucosid. In den Lebensmittelproben aus dem Handel (rohe Kartoffeln und Kartoffelpüree) wurden dagegen Gehalte von 0,08 bis 0,96 mg/kg Monoacetoxyscirpenol-Glucosid, 0,56 bis 1,56 mg/kg Scirpentriol-Glucosid und in einer Probe von 0,32 mg/kg HT-2 Toxin-Glucosid ermittelt. Bei einer vollständigen Freisetzung der Aglucone käme man somit in den Proben aus dem Lebensmittelhandel auf Konzentrationen bis zu 0,64 mg/kg Monoacetoxyscirpenol, 0,99 mg/kg Scirpentriol und 0,23 mg/kg HT-2 Toxin (bezogen auf die Trockenmasse der Lebensmittel). Die Gehalte würden somit die der ursprünglich gefundenen, unkonjugierten Toxine um ein vielfaches übersteigen.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft der angewandten Quantifizierungsmethode sehr begrenzt ist. Die Effizienz der Ionisierung in der Ionenquelle des Massenspektrometers und damit auch die Größe der Peakfläche ist für jedes Toxin spezifisch und zudem abhängig von mitextrahierten Matrixbestandteilen (Klötzel et al. 2005). Verglichen mit unkonjugierten Toxinen wie 15-Monoacetoxyscirpenol, HT-2 Toxin aber auch Deoxynivalenol besaß Deoxynivalenol-Glucosid gelöst in Kartoffelmatrix eine niedrigere Sensitivität. Deshalb wäre es wichtig anhand eines zertifizierten Kalibrierstandards die Konzentrationen der Konjugate genau ermitteln zu können. So könnte festgestellt werden, welche zusätzlichen Toxingehalte während der Verdauung im menschlichen Organismus maximal freigesetzt werden könnten. Denn die Bedeutung der Glucosidkonjugate besteht in erster Linie darin, dass sie sich im tierischen und menschlichen Organismus wieder zum Aglucon umwandeln können und somit ihre ursprüngliche Toxizität wieder erlangen. Die Freisetzung von β -Glucosiden im tierischen Organismus konnte bereits nachgewiesen werden (Gareis et al. 1990; Kollarzik 1990). Bei Monoacetoxyscirpenol-Glucosid und aller Wahrscheinlichkeit nach auch bei den restlichen Typ A Trichothecen-Glucosidkonjugaten handelt es sich allerdings um α -Glucoside (Gorst-Allman et al. 1985). Doch obwohl die untersuchten Glucoside durch die α -Glucosidase von *Saccharomyces cerevisiae* nicht gespalten werden konnten, und auch die Amyloglucosidase nur eine geringe Spaltungsaktivität zeigte, besteht die Möglichkeit, dass diese Verbindungen während der Verdauung im menschlichen Körper durch α -Glucosidasen, welche sich auf der Bürstensaummembran

des Dünndarms befinden, gespalten werden (Sim et al. 2008; Quezada-Calvillo et al. 2007). Klarheit darüber könnten aber lediglich Verdauungsversuche geben.

F Zusammenfassung

Obwohl es sich bei der Fusariumtrockenfäule um eine weltweit verbreitete Lagerkrankheit der Kartoffel handelt bei deren Verlauf es unter anderem auch zur Bildung von Mykotoxinen kommen kann, wurden bisher nur wenige Studien zum Vorkommen von Fusarientoxinen in Kartoffeln und Kartoffelprodukten veröffentlicht. Aus diesem Grund wurde eine umfassende Untersuchung in diesen Lebensmitteln durchgeführt. Weiterhin wurde das Ausmaß der Bildung von möglichen Toxinkonjugaten in Kartoffelknollen überprüft.

Zur Untersuchung der Kartoffeln und Kartoffelprodukte auf ihre Belastung mit Fusarientoxinen mussten zunächst zwei HPLC-MS/MS Methoden für insgesamt 19 Fusarientoxine (Typ A und B Trichothecene, Zearalenon) entwickelt und validiert werden. Die Bestimmungsgrenzen der Toxine dieser Nachweismethoden lagen zwischen 0,2 µg/kg und 18 µg/kg.

Zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos für den Verbraucher wurden verschiedene im Einzelhandel erhältliche Kartoffelsorten und Kartoffelprodukte untersucht (n=206). Insgesamt konnten dabei in 30,6 % der Proben Mykotoxine nachgewiesen werden, in 13,1 % trat eine Mehrfachbelastung mit Fusarientoxinen (bis zu 7) auf. Die höchsten Konzentrationen konnten bei rohen Kartoffeln gemessen werden. Hier fanden sich neben Diacetoxyscirpenol (bis zu 89 µg/kg) und 15-Monoacetoxyscirpenol (bis zu 254 µg/kg) unter anderem auch die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens isolierten Toxine Scirpentriol und 4-Monoacetoxyscirpenol sowie T-2 Toxin (bis zu 25 µg/kg), HT-2 Toxin (bis zu 55 µg/kg) und Neosolaniol (9,7 µg/kg). Da jedoch vor einem Verzehr durch den Verbraucher die besonders belasteten Faulstellen üblicherweise entfernt werden ist davon auszugehen, dass sich die durchschnittliche Toxinkonzentration vor dem Verzehr beträchtlich reduziert. Eine Diffusion von Toxinen aus der Faulstelle in angrenzendes, symptomfreies Knollengewebe konnte lediglich in 9,5 % aller artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen (n=42) beobachtet werden.

Auch in Kartoffelpüreeproben (42 %) wurden Toxine der Scirpentriol-Gruppe (DAS, 4-MAS, 15-MAS, SCRP) nachgewiesen. Die am höchsten belastete Probe enthielt neben 4-Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol Diacetoxyscirpenol (7,1 µg/kg) sowie 15-Monoacetoxyscirpenol (25 µg/kg). Deoxynivalenol und Zearalenon konnten ebenfalls in zahlreichen Produktgruppen wie Kartoffelknödel/Kloßteig, Kartoffelpüree, rohen Kartoffeln, Kartoffelpuffer und Pommes Frites bzw. Kartoffel-Wedges gefunden werden. In Bratkartoffeln und Kartoffelchips wurden hingegen keine der untersuchten Toxine nachgewiesen.

Die Umsetzung von T-2 Toxin und 4,15-Diacetoxyscirpenol durch Kartoffelzellkulturen ermöglichte die Isolierung von fünf Toxinmetaboliten. Dabei handelte es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein- und zweifach glucosidierte Konjugate von HT-2 Toxin und Scirpentriol sowie ein einfach glucosidiertes 15-Monoacetoxyscirpenolkonjugat. Bei den Toxinen handelte es sich um deacetylierte Metaboliten der eingesetzten Typ A

Trichothecene (T-2 bzw. DAS). Die Identität dieser Konjugate wurde durch Massenspektren (Product-Ion-Scans) der isolierten Substanzen und einer partiellen Spaltung durch Glucosidasen bestätigt.

Ein Großteil dieser Konjugate sowie Deoxynivalenol-Glucosid konnte in der Folge erstmals in Kartoffeln und Kartoffelprodukten aus dem Einzelhandel sowie in artifiziell mit *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffelknollen nachgewiesen werden. Insgesamt waren dabei gegenüber dem Aglucon erhöhte Konzentrationen der jeweiligen Toxinkonjugate in Geweben abseits der Faulstellen zu beobachten. Ob und inwieweit diese Toxin-Glucoside letztendlich die Zufuhr an Typ A Trichothecenen in relevantem Umfang erhöhen, kann zu diesem Zeitpunkt aufgrund fehlender quantifizierter Standards und mangelnder Daten über die Spaltung der Metaboliten im menschlichen Organismus nicht abgeschätzt werden.

Auf Grundlage dieser Daten, dem heutigen Kenntnisstand über die Toxizität der untersuchten Substanzen und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verzehrsgewohnheiten hinsichtlich Kartoffeln und –produkten gibt es in Deutschland derzeit keinen Hinweis auf eine Gesundheitsgefährdung der Bevölkerung durch Trichothecene der Typen A und B sowie Zearalenon aufgrund des Verzehrs von Kartoffeln und Kartoffelprodukten.

G Summary

Fusarium dry rot of potato is a disease that is spread worldwide. Although mycotoxins can be produced during infection, only few studies were published so far concerning the incidence of *Fusarium* toxins in potatoes and potato based products. For this reason an investigation of these samples was performed. In addition, the extent of possible mycotoxin conjugates produced by the potato tuber was examined.

Two HPLC-MS/MS methods including a total of 19 *Fusarium* toxins (type A and B trichothecenes, zearalenone) were established and validated to determine their occurrence and quantity in potatoes and potato based products. The limits of quantification ranged between 0.2 µg/kg and 18 µg/kg.

To estimate the health risk of consumers, a total of 206 samples from retail markets were analysed. In 30.6 % of all samples certain levels of *Fusarium* toxins were detected. More than one single toxin (up to seven) could be found in 13.1 % of those samples.

Maximum concentrations were observed in raw potato tubers. Beside diacetoxyscirpenol (up to 89 µg/kg), 15-monoacetoxyscirpenol (up to 254 µg/kg), T-2 toxin (up to 25 µg/kg), HT-2 toxin (up to 55 µg/kg) and neosolaniol (up to 10 µg/kg) also scirpentriol and 4-monoacetoxyscirpenol could be detected. It must be noted though, that the removal of the rotted tissue, which is usually done before consumption, reduces average toxin concentrations considerably. Toxin diffusion from the rotted part of the tuber into adjacent symptom-free tissue was detected in only 9.5 % of all potato tubers (n=42) artificially inoculated with different *Fusarium* species.

Several toxins of the scirpentriol-group (DAS, 4-MAS, 15-MAS, SCRIP) were also detected in mashed potatoes (42 %). The sample with the highest toxin level contained diacetoxyscirpenol (7.1 µg/kg), 15-monoacetoxyscirpenol (25 µg/kg) as well as 4-monoacetoxyscirpenol and scirpentriol.

Deoxynivalenol and zearalenone also occurred in numerous potato based products such as potato dumplings/dumpling dough, mashed potatoes, raw potatoes, potato fritter and chips/potato wedges.

None of the analysed mycotoxins were observed in fried potatoes and crisps.

The transformation of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in potato cell cultures enabled the isolation of five toxin metabolites. These were most likely mono- and di-glucosylated conjugates of HT-2 toxin and scirpentriol as well as a mono-glucosylated 15-monoacetoxyscirpenol. The aglucons of all these conjugated toxins were deacetylated forms of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. The identity of these conjugates could be confirmed by mass spectra (product-ion-scans) and the incubation with glucosidases.

For the first time, a majority of these conjugates as well as deoxynivalenol-glucoside could either be detected in potatoes and potato based products or in potato tubers inoculated with *Fusarium* species. Compared to their respective aglucone, increased

concentrations of glucosylated trichothecenes could be observed apart from rotted tuber tissue. To what extent these mycotoxin glucosides will increase the daily intake of type A trichothecenes could not be estimated up to date due to the lack of quantified standard materials and data concerning the metabolism and cleavage of these glucosides within the mammalian organism.

Based on the data of this study, the current level of knowledge about the toxicity of these substances and taking into account the current consumption habits in Germany there is no evidence of a health risk to the population by trichothecenes of type A and B and zearalenone as a consequence of the consumption of potatoes and potato based products.

H Literatur

- Abbas, H. K.; Mirocha, C. J.; Pawlosky, R. J. u. Pusch, D. J. (1985): Effect of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat.
Applied and Environmental Microbiology 50 (2): 482–486.
- Banotai, C.; Greene-McDowelle, D. M.; Azcona-Olivera, J. I. u. Pestka, J. J. (1999): Effects of intermittent vomitoxin exposure on body weight, immunoglobulin levels and haematuria in the B6C3F₁ mouse.
Food and Chemical Toxicology 37 (4): 343–350.
- Bartholomew, D. M.; van Dyk, D. E.; Lau, S. M.; O'Keefe, D. P.; Rea, P. A. u. Viitanen, P. V. (2002): Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates.
Plant Physiology 130 (3): 1562–1572.
- Berger, U.; Oehme, M. u. Kuhn, F. (1999): Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (10): 4240–4245.
- Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Buttinger, G. u. Krska, R. (2005a): Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 1062 (2): 209–216.
- Berthiller, F.; Dall'Asta, C.; Schuhmacher, R.; Lemmens, M.; Adam, G. u. Krska, R. (2005b): Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (9): 3421–3425.
- Berthiller, F.; Werner, U.; Sulyok, M.; Krska, R.; Hauser, M. T. u. 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 Additives and Contaminants 23 (11): 1194–1200.
- Beyer, M.; Ferse, I.; Mulac, D.; Würthwein, E. U. u. Humpf, H. U. (2009): Structural elucidation of T-2 toxin thermal degradation products and investigations toward their occurrence in retail food.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 1867–1875.
- Bhat, R. V.; Beedu, S. R.; Ramakrishna, Y. u. Munshi, K. L. (1989): Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India.
The Lancet 333 (8628): 35–37.
- Boyd, A. E. W. (1972): Potato storage diseases.
Review of Plant Pathology 51 (5): 297–321.
- Bundessortenamt (2010): Beschreibende Sortenliste Kartoffeln.
Hannover. <http://www.bundessortenamt.de/internet30/fileadmin/Files/PDF>
- Carrasco, L.; Barbacid, M. u. Vazquez, D. (1973): The trichodermin group of antibiotics, inhibitors of peptide bond formation by eukaryotic ribosomes.
Biochimica et Biophysica Acta 312: 368–376.

- Casteel, M.; Nielsen, C.; Didier, A.; Dietrich, R. u. Märtlbauer, E. (2010): Induction of MAPK-dependent transcription factors by deoxynivalenol in human cell lines. *Mycotoxin Research* 26 (1): 9–14.
- Cavaliere, C.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R. u. Laganà, A. (2005): Development of a multiresidue method for analysis of major *Fusarium* mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (14): 2085–2093.
- Cholmakov-Bodechtel, C.; Wolff, J.; Gareis, M.; Bresch, H.; Engel, G.; Majerus, P.; Rosner, H. u. Schneider, R. (2000): Ochratoxin A: representative food consumption survey and epidemiological analysis. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51: 81–128.
- Cole, D. J. (1994): Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science* 42 (3): 209–222.
- Cole, J. C.; Jarvis, B. B. u. Schweikert, M. A. (2003): Handbook of secondary fungal metabolites. Volume III. Academic Press San Diego, London.
- Collins, G. J. u. Rosen, J. D. (1981): Distribution of T-2 toxin in wet-milled corn products. *Journal of Food Science* 46: 877–879.
- Comas, A. P. (1982): Precocious sexual development in Puerto Rico. *The Lancet* 319 (8284): 1299–1300.
- Cundliffe, E.; Cannon, M. u. Davies, J. (1974): Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (1): 30–34.
- Cundliffe, E. u. Davies, J. E. (1977): Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11 (3): 491–499.
- Dänicke, S.; Valenta, H. u. Döll, S. (2004): On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Archives of Animal Nutrition* 58 (2): 169–180.
- Delgado, J. A.; Schwarz, P. B.; Gudmestad, N.; Gillespie, J.; Rivera, V. u. Secor, G. A. (2009): Production and distribution of mycotoxins in potato tubers affected with dry rot caused by *Fusarium graminearum*. Sociedad Chilena Fitopatología, Santiago, Chile.
- Delgado, J. A.; Schwarz, P. B.; Gillespie, J.; Rivera-Varas, V. V. u. Secor, G. A. (2010): Trichothecene mycotoxins associated with potato dry rot caused by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 100 (3): 290–296.
- Desjardins, A. E. u. Plattner, R. D. (1989): Trichothecene toxin production by strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in liquid culture and in potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 388–392.
- Desjardins, A. E. u. Proctor, R. H. (2007): Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* (119): 47–50.

- Desmarchelier, A. u. Seefelder, W. (2011): Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal* 4 (1): 29–35.
- Dong, W.; Azcona-Olivera, J. I.; Brooks, K. H.; Linz, J. E. u. Pestka, J. J. (1994): Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, and 6 during exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127 (2): 282–290.
- Edwards, R. u. Owen, W. J. (1989): The comparative metabolism of the S-triazine herbicides atrazine and terbutryne in suspension cultures of potato and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 34: 246–254.
- Ehrlich, K. C. u. Daigle, K. W. (1987): Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochimica et Biophysica Acta* 923 (2): 206–213.
- El-Banna, A. A.; Scott, P. M.; Lau, P. Y.; Sakuma, T.; Platt, H. W. u. Campbell, V. (1984): Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (5): 1169–1171.
- Ellner, F. M. (2002): Mycotoxins in potato tubers infected by *Fusarium sambucinum*. *Mycotoxin Research* 18 (2): 57–61.
- El-Sharkawy, S. u. Abul-Hajj, Y. (1987): Microbial transformation of zearalenone, I. Formation of zearalenone-4-O- β -glucoside. *Journal of Natural Products* 50 (3): 520–521.
- El-Sharkawy, S. H. (1989): Microbial transformation of zearalenone III. Formation of 2,4-O- β -diglucoside. *Acta Pharmaceutica Jugoslavia* 39: 303–310.
- El-Sharkawy, S. H.; Selim, M. I.; Afifi, M. S. u. Halaweish, F. T. (1991): Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (2): 549–552.
- Emancipator, S. N. (1992): Aspects of the pathogenesis of IgA nephropathy. *Clinical Immunology Newsletter* 12 (10/11): 149–155.
- Engelhardt, G. (1991): Zearalenonglucosid - ein "maskiertes Mykotoxin" aus Pflanzenzellen. *SuB 3: III-13*.
- Eriksen, G. S. u. Pettersson, H. (2003): Lack of de-epoxidation of type B trichothecenes in incubates with human faeces. *Food Additives and Contaminants* 20 (6): 579–582.
- Eudes, F.; Comeau, A.; Rioux, S. u. Collin, J. (2000): Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22 (3): 286–292.
- European cultivated potato database.
www.europotato.org/
- Fitzpatrick, D. W.; Boyd, K. E. u. Watts, B. M. (1988): Comparison of the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin for their effects on brain biogenic monoamines in the rat. *Toxicology Letters* 40: 241–245.

- Gareis, M.; Bauer, J.; Thiem, J.; Plank, G.; Grabley, S. u. Gedek, B. (1990): Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *Journal of Veterinary Medicine* 37 (3): 236–240.
- Gorst-Allman, C. P.; Steyn, P. S.; Vleggaar, R. u. Rabie, C. J. (1985): Structure elucidation of a novel trichothecene glycoside using ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 1553–1555.
- Gottschalk, C.; Barthel, J.; Engelhardt, G.; Bauer, J. u. Meyer, K. (2007): Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (12): 1547–1553.
- Goyarts, T. u. Dänicke, S. (2006): Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicology Letters* 50 (2): 550–552.
- Groten, J. P.; Tajima, O.; Feron, V. J. u. Schoen, E. D. (1998): Statistically designed experiments to screen chemical mixtures for possible interactions. *Environmental Health Perspectives* 106 (Suppl 6): 1361–1365.
- Hazel, C. M. u. Patel, S. (2004): Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153 (1): 51–59.
- Hidy, P. H.; Baldwin, R. S.; Greasham, R. L.; Keith, C. L. u. McMullen, J. R. (1977): Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Advances in Applied Microbiology* 22: 59–82.
- Ibrahim, A. u. Abul-Hajj, Y. (1989): Aromatic hydroxylation and sulfation of 5-hydroxyflavone by *Streptomyces fulvissimus*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (12): 3140–3142.
- Ishii, K. (1983): Chemistry and bioproduction of non-macrocylic trichothecenes. In: Ueno, Y. (Hrsg.): *Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects*. Kodansha LTD.; Elsevier. Tokyo; Amsterdam, Oxford, New York: 7–19.
- Jard, G.; Liboz, T.; Mathieu, F.; Guyonvarc'h, A.; André, F.; Delaforge, M. u. Lebrihi, A. (2010): Transformation of zearalenone to zearalenone-sulfate by *Aspergillus* spp. *World Mycotoxin Journal* 3 (2): 183–191.
- Jelen, H. u. Kaminski, E. (1997): Formation of scirpentriol and its derivatives by *Fusarium sambucinum* strains. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 1 (30): 79–86.
- Joffe, A. Z. (1986): Effects of fusariotoxins in humans. In: *Fusarium species: their biology and toxicology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: 225–292.
- Jones, P. u. Vogt, T. (2001): Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213 (2): 164–174.
- Kamimura, H. (1986): Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (3): 515–519.

- Kappenstein, O.; Klaffke, H. S.; Mehltitz, I.; Tiebach, R.; Weber, R.; Lepschy, J. u. Wittkowski, R. (2005): Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit GPC und LC-ESI-MS/MS. *Mycotoxin Research* 21 (1): 3–6.
- Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. u. Mordecai, D. (1979): Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. *Endocrinology* 105 (1): 33–40.
- Kieran, P. M.; MacLoughlin, P. F. u. Malone, D. M. (1997): Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59: 39-52.
- Kiessling, K. H. u. Pettersson, H. (1978): Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 43 (4): 285–290.
- Klötzel, M.; Gutsche, B.; Lauber, U. u. Humpf, H. U. (2005): Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (23): 8904–8910.
- Klötzel, M.; Lauber, U. u. Humpf, H. U. (2006): A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS. *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (3): 261–269.
- Kollarczik, B. (1990): Transformation von Mykotoxinen durch die Darmflora des Schweines. Dissertation. München.
- Kostelanska, M.; Hajslova, J.; Zachariasova, M.; Malachova, A.; Kalachova, K.; Poustka, J.; Fiala, J.; Scott, P. M.; Berthiller, F. u. Krska, R. (2009): Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (8): 3187–3194.
- Kuiper-Goodman, T.; Scott, P. M. u. Watanabe, H. (1987): Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7 (3): 253–306.
- Lacey, J.; Bateman, G. L. u. Mirocha, C. J. (1999): Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* 134: 227–283.
- Lafont, P.; Girard, T.; Payen, J.; Sarfati, J. u. Gaillardin, M. (1983): Contamination de pommes de terre de consommation par des fusariotrichothecenes. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 1: 147–152.
- Lancova, K.; Hajslova, J.; Poustka, J.; Krplova, A.; Zachariasova, M.; Dostalek, P. u. Sachambula, L. (2008): Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants* 25 (6): 732–744.
- Langebartels, C. u. Harms, H. (1985): Analysis for nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 10 (2): 268–279.

- Lao, S. H.; Loutre, C.; Brazier, M.; Coleman, J. O. D.; Cole, D. J.; Edwards, R. u. Theodoulou, F. L. (2003): 3,4-dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean. *Phytochemistry* 63 (6): 653–661.
- Latus-Zietkiewicz, D.; Perkowski, J. u. Chelkowski, J. (1995): Mycotoxins production, pathogenicity and toxicity of *Fusarium* species isolated from potato tubers with dry rot injuries. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 13: 87–100.
- Lauren, D. R. u. Ringrose, M. A. (1997): Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants* 14 (5): 435–443.
- Li, F. Q.; Li, Y. W.; Luo, X. Y. u. Yoshizawa, T. (2002): *Fusarium* toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. *Food Additives and Contaminants* 19 (2): 163–167.
- Liazid, A.; Palma, M.; Brigui, J. u. Barroso, C. G. (2007): Investigation on ochratoxin A stability using different extraction techniques. *Talanta* 71: 976–980.
- Lindl, T. u. Gstraunthaler, G. (2008): Pflanzenzellkultur. In: Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Labortechnik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg: 335–358.
- Madhyastha, M. S.; Marquardt, R. R. u. Abramson, D. (1994): Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicon* 32 (9): 1147–1152.
- Malekinejad, H.; Maas-Bakker, R. u. Fink-Gremmels, J. (2006): Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal* 172 (1): 96–102.
- Massart, F.; Meucci, V.; Saggese, G. u. Soldani, G. (2008): High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *The Journal of Pediatrics* 152 (5): 690–695.
- Max-Rubner Institut (2008): Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht, Teil 2. Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen. Karlsruhe. http://www.was-esse-ich.de/uploads/media/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf
- Mayer, C. F. (1953): Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. Part one: the clinical aspects of Alimentary Toxic Aleukia (ATA). *Military Surgeon* 113: 173–189.
- Mensink, G.; Hesecker, H.; Richter, A.; Stahl, A. u. Vohmann, C. (2007): Ernährungsstudie als KiGGS-Modul (EsKiMo). http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/EsKiMoStudie.pdf?__blob=publicationFile
- Meyer, K.; Usleber, E.; Dietrich, R.; Märtilbauer, E. u. Bauer, J. (2002): Zearalenone metabolites in bovine bile. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 53 (5): 115–117.

- Mirocha, C. J. u. Pathre, S. (1973): Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin.
Applied Microbiology 26 (5): 719–724.
- Mirocha, C. J.; Abbas, H. K.; Treeful, L. u. Bean, G. (1988): T-2 toxin and diacetoxyscirpenol metabolism by *Baccharis* spp.
Applied and Environmental Microbiology 54 (9): 2277–2280.
- Nielsen, K. F. u. Thrane, U. (2001): Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 929 (1-2): 75–87.
- Ohta, M.; Matsumoto, H.; Ishii, K. u. Ueno, Y. (1978): Metabolism of trichothecene mycotoxins. II. Substrate specificity of microsomal deacetylation of trichothecenes.
The Journal of Biochemistry 84: 697–706.
- Olsen, M. (1989): Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. (Hrsg.): *Fusarium. Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: 167–177.
- Ouyang, Y. L.; Azcona-Olivera, J. I. u. Pestka, J. J. (1995): Effects of trichothecene structure on cytokine secretion and gene expression in murine CD4⁺ T-cells.
Toxicology 104: 187–202.
- Pallaroni, L.; Holst, C. von; Eskilsson, C. S. u. Björklund, E. (2002): Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn.
Analytical and Bioanalytical Chemistry 374 (1): 161–166.
- Pestka, J. J.; Zhou, H. R.; Moon, Y. u. Chung, Y. J. (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox.
Toxicology Letters 153 (1): 61–73.
- Pestka, J. J.; Uzarski, R. L. u. Islam, Z. (2005): Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes.
Toxicology 206 (2): 207–219.
- Plasencia, J. u. Mirocha, C. J. (1991): Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp.
Applied and Environmental Microbiology 57 (1): 146–150.
- Poppenberger, B.; Berthiller, F.; Lucyshyn, D.; Sieberer, T.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Kuchler, K.; Glössl, J.; Luschnig, C. u. Adam, G. (2003): Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*.
The Journal of Biological Chemistry 278 (48): 47905–47914.
- Poppenberger, B.; Berthiller, F.; Bachmann, H.; Lucyshyn, D.; Peterbauer, C.; Mitterbauer, R.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Glössl, J. u. Adam, G. (2006): Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside.
Applied and Environmental Microbiology 72 (6): 4404–4410.

- Quezada-Calvillo, R.; Robayo-Torres, C. C.; Opekun, A. R.; Sen, P.; Ao, Z.; Hamaker, B. R.; Quaroni, A.; Brayer, G. D.; Wattler, S.; Nehls, M. C.; Sterchi, E. E. u. Nichols, B. L. (2007): Contribution of mucosal maltase-glucoamylase activities to mouse small intestinal starch α -glucogenesis.
The Journal of Nutrition 137: 1725–1733.
- Radtke, W.; Riekmann, W. u. Brendler, F. (2000): Trockenfäule (Weißfäule) - *Fusarium* spp. In: Kartoffeln - Krankheiten, Schädlinge, Unkräuter.
Verlag Th. Mann. Gelsenkirchen: 46–47.
- Ramachandra Rao, S.; Ravishankar, G. A. (2002): Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites.
Biotechnology Advances 20: 101-153.
- Razzazi-Fazeli, E.; Rabus, B.; Cecon, B. u. Böhm, J. (2002): Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 968 (1-2): 129–142.
- Richardson, K. E.; Toney, G. E.; Haney, C. A. u. Hamilton, P. B. (1989): Occurrence of scirpentriol and its seven acetylated derivatives in culture extracts of *Fusarium sambucinum* NRRL 13495.
Journal of Food Protection 52 (12): 871–876.
- Richardson, K. E. u. Hamilton, P. B. (1990): Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives.
Poultry Science 69 (3): 397–402.
- Ruhland, M.; Engelhardt, G. u. Wallnöfer, P. R. (1996): Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants.
Mycopathologia 134 (2): 97–102.
- Sáenz Rodríguez, C. A. de u. Toro-Solá, M. A. (1982): Anabolic steroids in meat and premature telarche.
The Lancet 319 (8284): 1300.
- Sander mann, H.; Scheel, D. u. Trenck T. V. D. (1984): Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals.
Ecotoxicology and Environmental Safety 8: 167-182.
- Sander mann, H. (1987): Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus.
Naturwissenschaften 74: 573-578.
- Sander mann, H. (1994): Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept.
Pharmacogenetics 4 (5): 225–241.
- Scheel, D. u. Sander mann, H. (1981): Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.).
Planta 152: 248–252.
- Scheffel, W. (2004): Kartoffelerzeugnisse. In: Heiss, R. (Hrsg.): Lebensmitteltechnologie - Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung.
Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York: 294–302.

- Schmidt, B. u. Schuphan, I. (2002): Metabolism of the environmental estrogen bisphenol A by plant cell suspension cultures. *Chemosphere* 49: 51–59.
- Schmitt, R.; Kaul, J.; van der Trenck, T.; Schaller, E. u. Sandermann, H. (1985): β -D-glucosyl and O-malonyl- β -D-glucosyl conjugates of pentachlorophenol in soybean and wheat: identification and enzymatic synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 24: 77–85.
- Schneweis, I.; Meyer, K.; Engelhardt, G. u. Bauer, J. (2002): Occurrence of zearalenone-4- β -D-glucopyranoside in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (6): 1736–1738.
- Schoental, R. (1983): Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic mycotoxins (zearalenone). *The Lancet* 321 (8323): 537.
- Schollenberger, M.; Müller, H. M.; Rühle, M.; Suchy, S.; Planck, S. u. Drochner, W. (2005): Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 97 (3): 317–326.
- Schultz, B.; Ellner, F. M.; Goßmann, M. u. Büttner, C. (2007): Untersuchungen zur Pathogenität und Mykotoxinbildung von *Fusarium sambucinum*, dem Erreger der Trockenfäule an Kartoffeln. *Mycotoxin Research* 23 (2): 78–84.
- Schuster, M. (1988): Analytik und Vorkommen ausgewählter Fusarientoxine sowie Bildung und Abbau von [14 C] Deoxynivalenol. Dissertation. Regensburg.
- Scientific Committee on Food (1999): Opinion on *Fusarium* toxins part 1: deoxynivalenol (DON). Brüssel.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf
- Scientific Committee on Food (2000a): Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins part 2: zearalenone (ZEA).
<http://www.fhi.no/dav/2aa9ef2c33.pdf>
- Scientific Committee on Food (2000b): Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins part 4: nivalenol. Brüssel.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf
- Scientific Committee on Food (2001): Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins part 5: T-2 Toxin and HT-2 Toxin. Brüssel.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf
- SCOOP (2003): Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States.
<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>
- Seppänen, E. (1981a): *Fusariums* of the potato in Finland I. On the *Fusarium* species causing dry rot in potatoes. *Annales Agriculturae Fenniae* 20: 156–160.
- Seppänen, E. (1981b): *Fusariums* of the potato in Finland II. On the growth optima of *Fusarium* species in tubers of cv. Bintje. *Annales Agriculturae Fenniae* 20: 161–176.

- Sergent, T.; Parys, M.; Garsou, S.; Pussemier, L.; Schneider, Y. J. u. Larondelle, Y. (2006): Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicology Letters* 164 (2): 167–176.
- Sewald, N.; Lepschy Gleissenthall, J. von; Schuster, M.; Müller, G. u. Aplin, R. T. (1992): Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron: Asymmetry* 3 (7): 953–960.
- Shifrin, V. I. u. Anderson, P. (1999): Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 13985–13992.
- Sim, L.; Quezada-Calvillo, R.; Sterchi, E. E.; Nichols, B. L. u. Rose, D. R. (2008): Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of Molecular Biology* 375 (3): 782–792.
- Stachewicz, H. (2000): Fusarium-Trockenfäule. In: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig (Hrsg.): Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt Teil 2. Resistenzprüfungen von Kulturpflanzen im Acker- und Gartenbau gegen Pilze, Bakterien und Viren. Parey Buchverlag. Berlin: 58–59.
- Steyn, P. S.; Vlegaar, R.; Rabie, C. J.; Kriek, N. P. J. u. Harington, J. S. (1978): Trichothecene mycotoxins from *Fusarium sulphureum*. *Phytochemistry* 17: 949–951.
- Stolzenberg, H.; Kahl, H. u. Bergmann, K. (2007): Körpermaße bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Ergebnisse des Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 50: 659–669.
- Sudakin, D. L. (2003): Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143 (2): 97–107.
- Suga, T. u. Hirata, T. (1990): Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry* 29 (8): 2393–2406.
- Swamy, H. V. L. N.; Smith, T. K. u. MacDonald, E. J. (2004): Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens. *Journal of Animal Science* 82: 2131–2139.
- Swanson, S. P.; Rood, H. D. Jr; Behrens, J. C. u. Sanders, P. E. (1987): Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol, and deepoxy scirpentriol. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (12): 2821–2826.
- Swanson, S. P.; Helaszek, C.; Buck, W. B.; Rood, H. D. u. Haschek, W. M. (1988): The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology* 26 (10): 823–829.

- Tajima, O.; Schoen, E. D.; Feron, V. J. u. Groten, J. P. (2002): Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions.
Food and Chemical Toxicology 40 (5): 685–695.
- Tanaka, T.; Matsuda, Y.; Toyasaki, N.; Ogawa, K.; Matsuki, Y. u. Ueno, Y. (1977): Screening of trichothecene-producing *Fusarium* species from river sediments by mammalian cell culture techniques.
Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology 5/6: 50–53.
- Taticek, R. A.; Moo-Young, M. u. Legge, R. L. (1991): The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24 (2): 139–158.
- Thanassouloupoulos, C. C. u. Kitsos, G. T. (1985): Studies on *Fusarium* wilt of potatoes. 1. Plant wilt and tuber infection in naturally infected fields.
Potato Research 28: 507–514.
- Thompson, W. L. u. Wannemacher, R. W. (1986): Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality.
Toxicol 24 (10): 985–994.
- Thuvander, A.; Wikman, C. u. Gadhasson, I. (1999): *In vitro* exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function.
Food and Chemical Toxicology 37 (6): 639–648.
- Towill, L. E. u. Mazur, P. (1975): Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures.
Canadian Journal of Botany 53: 1097–1102.
- Turner, W. B. (1975): Biosynthetic origins of mycotoxins.
The International Journal of Environmental Studies 8: 159–164.
- Uhlmann, S.; Leppack, E. u. Sauer, N. (2003): Aufbereitung von Kartoffeln.
Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. Darmstadt.
- Videmann, B.; Mazallon, M.; Tep, J. u. Lecoecur, S. (2008): Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells.
Food and Chemical Toxicology 46: 3279–3286.
- VO Nr. 1881 (2006): Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. VO (EG) Nr. 1881/2006.
- VO Nr. 1126 (2007): Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen. VO (EG) Nr. 1126/2007.
- Vohmann, C.; Oepping, A. u. Hesecker, H. (2005): Lebensmittelverzehr und Nährstoffaufnahme im Säuglings- und Kleinkindalter. Das VELS-Projekt. In: Hesecker, H. (Hrsg.): Neue Aspekte der Ernährungsbildung.
Umschau Zeitschriftenverlag. Frankfurt am Main: 71–78.
- Vongsangnak, W.; Gua, J.; Chauvatcharin, S. u. Zhong, J. J. (2004): Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*.
Biochemical Engineering Journal 18: 115–120.

- Wang, Z. G.; Feng, J. N. u. Tong, Z. (1993): Human toxicosis caused by moldy rice contaminated with fusarium and T-2 toxin.
Biomedical and Environmental Sciences 6 (1): 65–70.
- Wei, C. M. u. McLaughlin, C. S. (1974): Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes. Novel inhibitors of protein synthesis.
Biochemical and Biophysical Research Communications 57 (3): 838–844.
- WHO (1990): Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot.
Environmental health criteria 105. Genf.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm>
- WHO (1995): GEMS/Food-EURO second workshop on low-level contamination of food. Report on a workshop in the frame of GEMS/Food-EURO. Kulmbach.
http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/lowlevel_may1995.pdf
- Wu, X.; Murphy, P.; Cunnick, J. u. Hendrich, S. (2007): Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol.
Food and Chemical Toxicology 45: 1846–1855.
- Yoshizawa, T. (1983): Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. In: Ueno, Y. (Hrsg.): Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects.
Kodansha LTD.; Elsevier. Tokyo; Amsterdam, Oxford, New York: 195–209.
- Zhou, H. R.; Islam, Z. u. Pestka, J. J. (2003): Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin.
Toxicological Sciences 72 (1): 130–142.
- Zill, G.; Engelhardt, G.; Wohner, B. u. Wallnöfer, P. R. (1990): The fate of the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures.
Mycotoxin Research 6 (1): 31–40.
- ZMP (2008): ZMP-Marktbilanz Kartoffeln 2008. Deutschland, EU, Welt.
Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH. Bonn.
- Zott, A. (1982): Untersuchungen zur Phoma-Trockenfäule der Kartoffel unter besonderer Berücksichtigung des Wirt-Parasit-Verhältnisses. Dissertation. Berlin.

I Anhang

Tabelle A 1: Optimierte substanzspezifische Parameter von Fusarientoxinen

Toxin	MRM-Übergang	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
TAS	426,4/229,1	16,0	4,0	12,0	25,0	20,0
	426,4/247,2	16,0	4,0	12,0	17,0	22,0
DAS	384,4/307,3	21,0	3,5	16,0	15,0	8,0
	384,4/247,1	21,0	3,5	16,0	17,0	8,0
[¹³C₄]-DAS	388,3/309,0	21,0	5,0	14,0	15,0	28,0
	388,3/247,0	21,0	5,0	14,0	17,0	22,0
4-MAS	342,3/216,9	11,0	4,0	12,0	15,0	18,0
	342,3/228,9	11,0	4,0	12,0	19,0	6,0
15-MAS	342,4/106,9	16,0	4,0	12,0	19,0	6,0
	342,4/265,0	16,0	4,0	12,0	13,0	8,0
15-MAS-G	504,4/265,0	16,0	6,0	18,0	15,0	8,0
	504,4/107,0	16,0	6,0	22,0	25,0	6,0
[¹³C₂]-MAS	344,2/107,0	16,0	3,0	14,0	17,0	4,0
	344,2/264,8	16,0	3,0	14,0	11,0	8,0
SCRIP	300,5/107,0	11,0	3,5	12,0	15,0	4,0
	300,5/247,1	11,0	3,5	12,0	11,0	8,0
SCRIP-G	462,5/216,9	11,0	5,5	18,0	19,0	8,0
	462,5/107,0	11,0	5,5	18,0	23,0	6,0
SCRIP-DG	624,2/265,1	26,0	8,0	20,0	21,0	8,0
	624,2/217,1	26,0	7,5	20,0	23,0	8,0
Ac-T-2	526,4/287,1	21,0	5,0	22,0	19,0	26,0
	526,4/245,1	21,0	5,0	22,0	21,0	22,0
T-2	484,4/305,2	16,0	4,5	18,0	17,0	10,0
	484,4/215,0	16,0	4,5	18,0	21,0	8,0
[¹³C₂₄]-T-2	508,6/229,2	21,0	5,0	18,0	19,0	22,0
	508,6/211,2	21,0	5,0	18,0	21,0	20,0
HT-2	442,4/215,1	21,0	3,5	16,0	17,0	6,0
	442,4/263,0	21,0	3,5	16,0	17,0	8,0
HT-2-G	604,3/263,0	26,0	7,0	22,0	21,0	8,0
	604,3/215,0	26,0	7,0	22,0	23,0	8,0
HT-2-DG	766,4/263,1	26,0	8,0	26,0	21,0	8,0
	766,4/245,0	26,0	8,0	26,0	21,0	8,0
[¹³C₂₂]-HT-2	464,6/278,1	16,0	5,0	14,0	15,0	30,0
	464,6/156,1	16,0	5,0	14,0	31,0	16,0
T-2 Triol	400,3/214,9	11,0	3,5	16,0	17,0	6,0
	400,3/232,9	11,0	3,5	16,0	13,0	6,0
T-2 Tetraol	316,2/215,0	11,0	3,0	12,0	13,0	6,0
	316,2/281,1	11,0	3,0	12,0	13,0	8,0
NEO	400,4/305,2	21,0	4,0	14,0	15,0	8,0
	400,4/215,2	21,0	4,0	14,0	19,0	8,0
VOL	284,4/231,1	11,0	2,5	12,0	13,0	8,0
	284,4/219,1	11,0	2,5	12,0	13,0	6,0

Tabelle A 1: Optimierte substanzspezifische Parameter von Fusarientoxinen (Fortsetzung)

Toxin	MRM-Übergang	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
DacVOL	368,4/291,1	16,0	3,5	14,0	13,0	8,0
	368,4/248,9	16,0	3,5	14,0	17,0	8,0
DON	295,3/264,7	-30,0	-4,0	-12,0	-12,0	-22,0
	295,3/137,8	-30,0	-4,0	-12,0	-20,0	-14,0
DON-G	457,0/426,7	-35,0	-5,0	-18,0	-14,0	-58,0
	457,0/247,0	-35,0	-5,0	-18,0	-16,0	-22,0
[¹³C₁₅]-DON	310,2/278,9	-45,0	-4,0	-20,0	-10,0	-20,0
	310,2/144,9	-30,0	-8,0	-12,0	-20,0	-12,0
3-AcDON	337,3/307,0	-35,0	-6,5	-18,0	-12,0	-22,0
	337,3/172,6	-35,0	-6,5	-18,0	-12,0	-18,0
15-AcDON	337,2/150,0	-30,0	-9,0	-12,0	-14,0	-12,0
	337,2/219,0	-30,0	-9,0	-12,0	-10,0	-6,0
NIV	311,3/280,6	-35,0	-6,0	-14,0	-10,0	-22,0
	311,3/191,0	-35,0	-6,0	-14,0	-22,0	-6,0
FX	353,3/262,8	-35,0	-6,0	-12,0	-12,0	-6,0
	353,3/186,6	-35,0	-6,0	-12,0	-26,0	-16,0
ZON	317,3/175,1	-55,0	-3,0	-12,0	-32,0	-14,0
	317,3/131,0	-55,0	-3,0	-12,0	-34,0	-12,0
ZON-G	479,1/317,1	-55,0	-4,0	-20,0	-12,0	-32,0
	479,1/179,2	-55,0	-4,0	-20,0	-14,0	-6,0
α-ZOL	319,3/275,4	-50,0	-3,0	-18,0	-16,0	-22,0
	319,3/159,7	-50,0	-3,0	-18,0	-28,0	-14,0
β-ZOL	319,3/159,6	-55,0	-4,0	-18,0	-30,0	-12,0
	319,6/130,0	-55,0	-4,0	-18,0	-36,0	-10,0
ZAN	319,3/205,1	-55,0	-4,0	-18,0	-28,0	-18,0
	319,3/160,9	-55,0	-4,0	-18,0	-32,0	-16,0

Tabelle A 2: Optimierte Quellenparameter und CAD-Gase von Fusarientoxinen

Toxin	MRM-Übergang	CUR [psi]	IS [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CAD [psi]
DAS	384,4/307,3	30,0	2000,0	400,0	40,0	20,0	5,0
	384,4/247,1	30,0	2000,0	350,0	40,0	60,0	5,0
15-MAS	342,4/106,9	30,0	4500,0	300,0	40,0	20,0	5,0
	342,4/265,0	30,0	3500,0	300,0	40,0	20,0	5,0
SCRIP	300,5/107,0	30,0	5500,0	250,0	40,0	40,0	5,0
	300,5/247,1	25,0	3500,0	200,0	40,0	40,0	5,0
Ac-T-2	526,4/287,1	30,0	5500,0	350,0	40,0	30,0	3,0
	526,4/245,1	20,0	5500,0	400,0	60,0	30,0	3,0
T-2	484,4/305,2	20,0	3000,0	300,0	40,0	60,0	5,0
	484,4/215,0	20,0	5000,0	350,0	40,0	60,0	5,0
HT-2	442,4/215,1	15,0	3500,0	350,0	20,0	20,0	5,0
	442,4/263,0	25,0	5500,0	300,0	20,0	20,0	5,0
T-2 Triol	400,3/214,9	10,0	4000,0	300,0	50,0	40,0	7,0
	400,3/232,9	30,0	4500,0	250,0	40,0	20,0	5,0
T-2 Tetraol	316,2/215,0	25,0	4000,0	200,0	50,0	40,0	9,0
	316,2/281,1	30,0	5500,0	300,0	40,0	40,0	5,0
NEO	400,4/305,2	10,0	2000,0	400,0	40,0	60,0	5,0
	400,4/215,2	25,0	2000,0	350,0	40,0	30,0	5,0
VOL	284,4/231,1	10,0	5500,0	150,0	30,0	10,0	5,0
	284,4/219,1	10,0	5500,0	200,0	40,0	10,0	9,0
DacVOL	368,4/291,1	30,0	2500,0	300,0	40,0	60,0	5,0
	368,4/248,9	30,0	2000,0	300,0	40,0	60,0	5,0
DON	295,3/264,7	15,0	-4500,0	450,0	50,0	40,0	5,0
	295,3/137,8	25,0	-4500,0	450,0	50,0	30,0	5,0
3-AcDON	337,3/307,0	30,0	-4500,0	300,0	40,0	40,0	5,0
	337,3/172,6	20,0	-4500,0	300,0	50,0	40,0	5,0
15-AcDON	337,2/150,0	30,0	-4500,0	250,0	50,0	20,0	5,0
	337,2/219,0	20,0	-4500,0	350,0	50,0	40,0	5,0
NIV	311,3/280,6	20,0	-4500,0	450,0	40,0	30,0	5,0
	311,3/191,0	20,0	-4500,0	450,0	40,0	40,0	5,0
FX	353,3/262,8	20,0	-4500,0	450,0	50,0	30,0	5,0
	353,3/186,6	25,0	-4500,0	450,0	50,0	20,0	5,0
ZON	317,3/175,1	30,0	-4500,0	500,0	50,0	60,0	5,0
	317,3/131,0	30,0	-4500,0	500,0	50,0	60,0	5,0

Tabelle A 3: Postulierte MRM-Übergänge für Typ A Trichothecenkonjugate

Mykotoxin-	[M+NH ₄] ⁺	Mögliche Fragmentationen
Glucosid		
DAS	546	511 499 469 409 384 379 367 307 247 229
MAS	504	469 427 410 392 342 325 307 265 247 229 217 107
SCRP	462	427 415 409 300 283 265 247 229 228 107
T-2	646	467 407 356 305 263 245 227 215 168 159
HT-2	604	425 365 323 307 305 263 245 227 215
T-2 Triol	562	383 263 245 233 227 215
T-2 Tetraol	478	299 281 263 245 215
Diglucoosid		
DAS	708	673 661 631 571 541 529 384 367 307 247 229
MAS	666	631 619 589 571 553 487 342 325 307 265 247 229 217 107
SCRP	624	589 577 571 500 445 300 283 265 247 229 107
T-2	808	629 467 365 305 263 245 227 215
HT-2	766	587 425 365 323 305 263 245 227 215
T-2 Triol	724	545 383 263 245 233 227 215
T-2 Tetraol	640	461 299 281 263 245 215
Malonylglucosid		
DAS	632	597 585 555 529 495 465 384 367 307 247 229
MAS	590	555 543 513 495 487 477 342 325 307 265 247 229 217 107
SCRP	548	513 501 495 445 424 300 283 265 247 229 107
T-2	732	629 467 365 305 263 245 227 215
HT-2	690	587 425 365 323 305 263 245 227 215
T-2 Triol	648	545 383 263 245 233 227 215
T-2 Tetraol	564	461 299 281 263 245 215
GSH		
DAS	690	384 367 307 247 229
MAS	648	342 325 307 265 247 229 217 107
SCRP	606	300 283 265 247 229 107
T-2	790	629 467 365 305 263 245 227 215
HT-2	748	587 425 365 323 305 263 245 227 215
T-2 Triol	706	545 383 263 245 233 227 215
T-2 Tetraol	622	461 299 281 263 245 215

Tabelle A 4: Auf Linearität überprüfte Konzentrationsbereiche verschiedener Fusarien-toxine

Toxin	überprüfter Konzentrationsbereich [ng/ml] bzw. (Anteil an der Stammlösung.)	r²
TAS*	0,5 (Stammlsg.* 1:200) - 100 (Stammlsg.*)	≤ 0,99
DAS	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
4-MAS*	1,0 (Stammlsg.* 1:100) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
15-MAS	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
SCRP*	50 (Stammlsg.* 1:2) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
Ac-T-2*	0,5 (Stammlsg.* 1:200) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
T-2	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
HT-2	50 (Stammlsg.* 1:2) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
T-2 Triol	50 (Stammlsg.* 1:2) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
T-2 Tetraol	10 (Stammlsg.* 1:10) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
NEO	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
VOL	50 (Stammlsg.* 1:2) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
DacVOL	1,0 (Stammlsg.* 1:100) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
DON	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
3-AcDON	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
15-AcDON	10 (Stammlsg.* 1:10) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
NIV	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
FX	5,0 (Stammlsg.* 1:20) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99
ZON	0,5 (Stammlsg.* 1:200) - 500 (Stammlsg.* 1:0,02)	≤ 0,99

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard; Konzentrationsangabe relativ zur Stammlösung (entspricht Konzentration der jeweiligen Toxine, in der sie standardmäßig in einem 100 ng/ml Kalibrierstandard enthalten sind)

Tabelle A 5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Fusarientoxine in Kartoffeln und Kartoffelprodukten

Toxin	LOD (S/N=3)	LOQ (S/N=10)
	[µg/kg] bzw. [counts] [*]	[µg/kg] bzw. [counts] [*]
DAS	1,1	3,8
15-MAS	0,7	2,3
T-2	0,7	2,5
HT-2	5,2	17,5
T-2 Triol	3,8	12,7
T-2 Tetraol	2,3	7,6
NEO	1,1	3,6
VOL	5,2	17,3
DacVOL	0,2	0,7
DON	0,6	2,1
3-AcDON	1,3	4,2
15-AcDON	1,2	3,8
NIV	1,2	3,9
FX	0,8	2,5
ZON	0,1	0,2
<hr/>		
<i>TAS*</i>	$6,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$
<i>4-MAS*</i>	$5,6 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
<i>SCRP*</i>	$5,9 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$
<i>Ac-T-2*</i>	$1,3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Fusarientoxine in Kartoffelstiften

Toxin	LOD (S/N=3)	LOQ (S/N=10)
	[µg/kg] bzw. [counts] [*]	[µg/kg] bzw. [counts] [*]
DAS	27,2	90,8
15-MAS	8,4	27,9
T-2	3,6	11,9
HT-2	34,7	115,7
T-2 Triol	20,6	68,5
T-2 Tetraol	15,5	51,8
NEO	9,3	31,1
VOL	90,7	302,4
DacVOL	3,7	12,3
DON	35,8	119,3
3-AcDON	12,3	41,1
15-AcDON	26,0	86,5
NIV	37,0	123,2
FX	16,4	54,6
ZON	5,8	19,4
<hr/>		
<i>TAS*</i>	$1,8 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
<i>4-MAS*</i>	$1,8 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$
<i>SCRP*</i>	$9,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$
<i>Ac-T-2*</i>	$2,2 \times 10^3$	$7,2 \times 10^3$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Fusarientoxine in Kartoffelzellen

Toxin	LOD (S/N=3) [µg/kg] bzw. [counts]*	LOQ (S/N=10) [µg/kg] bzw. [counts]*
DAS	1,8	5,9
15-MAS	1,6	5,3
T-2	1,9	6,3
HT-2	4,0	13,3
T-2 Triol	5,7	18,9
T-2 Tetraol	27,3	90,9
NEO	1,5	5,0
TAS*	$2,5 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$
4-MAS*	$2,7 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$
SCRP*	$1,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$
AcT-2*	$2,8 \times 10^2$	$9,4 \times 10^2$
SCRP-G*	$1,5 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$
SCRP-DG*	$7,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$
MAS-G*	$1,3 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$
HT-2-G*	$1,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$
HT-2-DG*	$1,4 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 8: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Fusarientoxine in Kulturmedien

Toxin	LOD (S/N=3)	LOQ (S/N=10)
	[µg/kg] bzw. [counts]*	[µg/kg] bzw. [counts]*
DAS	24,0	80,1
15-MAS	11,4	38,1
T-2	1,6	5,3
HT-2	37,2	124,0
4-MAS*	$2,1 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$
SCRP*	$1,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
SCRP-G*	$3,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
SCRP-DG*	$1,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
MAS-G*	$1,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$
HT-2-G*	$1,4 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
HT-2-DG*	$1,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Fusarientoxine in Filterbrücken

Toxin	LOD (S/N=3)	LOQ (S/N=10)
	[µg/kg] bzw. [counts]*	[µg/kg] bzw. [counts]*
DAS	0,9	3,0
15-MAS	0,6	2,2
T-2	0,3	0,8
HT-2	4,7	15,8
4-MAS*	$3,0 \times 10^3$	$9,8 \times 10^3$
SCRP*	$1,1 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 10: Fusarientoxingehalte in Kartoffeln und Kartoffelprodukten bezogen auf die Trockenmasse [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]* (Fortsetzung)

Lebensmittel	DAS	4-MAS*	15-MAS	SCRP*	T-2	HT-2	NEO	DON	ZON
Kartoffelpüree	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,0
Kartoffelpüree	<LOQ	n.d.	5,4	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	7,2
Kartoffelpüree	<LOQ	n.d.	9,8	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3
Kartoffelpüree	8,6	$2,7 \times 10^3$	22,8	$3,5 \times 10^3$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4
Kartoffel (gekocht)	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (Deutschland)	<LOQ	$2,4 \times 10^3$	2,9	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (Deutschland)	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (Deutschland)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2
Kartoffeln roh (Deutschland)	88,8	$2,5 \times 10^4$	253,9	$1,8 \times 10^5$	3,6	<LOQ	8,3	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (Frankreich)	85,2	$1,2 \times 10^4$	27,2	$9,1 \times 10^3$	24,6	55,3	9,7	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (Ägypten)	10,4	<LOQ	2,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1,4
Kartoffelpuffer	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2
Kartoffelpuffer	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pommes Frites/Wedges	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6
Pommes Frites/Wedges	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44,8	n.d.
Pommes Frites/Wedges	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32,1	n.d.

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 11: Typ A Trichothecene und deren Glucosidkonjugate in Kartoffelpüree und rohen Kartoffeln, bezogen auf die Trockenmasse [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Lebensmittel	DAS	4-MAS*	15-MAS	MAS-G*	SCRP*	SCRP-G*	T-2	HT-2	HT-2-G*
Kartoffelpüree	3,8	n.d.	5,2	$1,5 \times 10^3$	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffelpüree	7,1	$2,5 \times 10^3$	25,0	$1,1 \times 10^4$	$7,7 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffelpüree	<LOQ	n.d.	6,7	$1,7 \times 10^3$	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffelpüree	<LOQ	n.d.	2,8	$8,9 \times 10^2$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffelpüree	8,6	$2,7 \times 10^3$	22,8	$8,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$	n.d.	n.d.	n.d.
Kartoffeln roh (D)	88,8	$2,5 \times 10^4$	253,9	n.d.	$1,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	3,6	<LOQ	n.d.
Kartoffeln roh (F)	85,2	$1,2 \times 10^4$	27,2	$7,4 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	24,6	55,3	$2,9 \times 10^3$

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 12: Tiefkühl-Kartoffelpüree lyophilisiert (n=2)

	Trockenmassegehalt [%]
Kartoffelpüree 1	26,4
Kartoffelpüree 2	24,4

Tabelle A 13: Körpergewicht (Median) von Säuglingen und Kleinkindern in Deutschland
(Vohmann et al. 2005)

Alter [Jahre]	Körpergewicht Median [kg]	
	Jungen	Mädchen
<1	9,4	8,0
1	11,4	10,8
2	14,2	13,8
3	16,3	15,5
4	18,5	18,0

Tabelle A 14: Mittleres Körpergewicht von Kindern ab 6 Jahren, Jugendlichen und Erwachsenen in Deutschland

Alter [Jahre]	Mittleres Körpergewicht [kg]	
	Jungen/Männer	Mädchen/Frauen
6*	23,7	23,2
12*	47,3	50,3
14-17**	68,5	59,8
19-80**	84,6	69,9

*Stolzenberg et al. (2007)

**Max Rubner-Institut (2008)

Tabelle A 15: Fusarientoxingehalte in Faulstellen von artifiziiell mit unterschiedlichen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffeln (bezogen auf die Trockenmasse) [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Isolat	15-		T-2		3-		15-		ZON			
	TAS*	DAS	4-MAS*	MAS	SCRPP*	T-2	Tetraol	DON		AcDON	AcDON	NIV
<i>F. coeruleum</i> DSM 62178	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. culmorum</i> No. 3	$1,2 \times 10^5$	1800	$9,1 \times 10^5$	53900	$3,0 \times 10^7$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	447	$3,3 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	372	$8,3 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	737	$1,1 \times 10^6$	231	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> No. 29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> DSM 62397	n.d.	n.d.	n.d.	59,8	$5,9 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	86,6	$5,1 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	$4,6 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> DSM 62186	<LOQ	112	n.d.	213	$2,6 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<LOQ	173	n.d.	450	$4,6 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
	<LOQ	469	$2,9 \times 10^5$	801	$1,7 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	390	n.d.
	$1,8 \times 10^5$	527	n.d.	749	$1,1 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	198	n.d.
	n.d.	<LOQ	n.d.	228	$6,2 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132	n.d.
<i>F. sulphureum</i> No. 33	<LOQ	160	$4,3 \times 10^5$	13300	$1,8 \times 10^7$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	$6,2 \times 10^4$	n.d.	n.d.	112	$4,5 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	$1,2 \times 10^5$	298	$1,6 \times 10^6$	34300	$2,7 \times 10^7$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	$8,3 \times 10^4$	183	$2,9 \times 10^5$	2820	$5,7 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<LOQ	106	$3,7 \times 10^5$	2540	$3,6 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 15: Fusarientoxingehalte in Faulstellen von artifiziiell mit unterschiedlichen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffeln (bezogen auf die Trockenmasse) [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]* (Fortsetzung)

Isolat	TAS*	DAS	4-MAS*	15-MAS	SCRPP*	T-2	T-2		DON	3-AcDON	15-AcDON	NIV	ZON
							Tetraol	n.d.					
<i>F. sulphureum</i> No. 34	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	$1,1 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	42,8	$1,1 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	31,6	$1,2 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$5,4 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$4,3 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$8,2 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sp. No. K30</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51100	253	n.d.	1000	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	39400	264	n.d.	34,1	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	96300	393	n.d.	2300	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	125000	687	n.d.	196	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	199000	656	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 16: Fusarientoxingehalte (bezogen auf die Trockenmasse) in Faulstellen von natürlich infizierten Kartoffeln mit Verdacht auf Fusariumtrockenfäule [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Knolle	TAS*		DAS		4-MAS*		MAS		SCRPP*		T-2		Tetraol		DON		3-AcDON		15-AcDON		NIV		ZON	
N1 (Agata)	$6,0 \times 10^4$	179	$9,3 \times 10^5$	1870	$7,7 \times 10^6$	n.d.	974	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N2 (Agata)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N3 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N4 (Karlana)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N5 (Satina)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N6 (Satina)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N7 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N8 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
N9 (Lady Christl)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N10 (Lady Christl)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N11 (Sieglinde)	n.d.	n.d.	n.d.	73	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N12 (Sieglinde)	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	$3,7 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 17: Fusarientoxin-Glucosidgehalte in Faulstellen von artifizuell mit unterschiedlichen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffeln (bezogen auf die Trockenmasse) [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Isolat	MAS-G*	SCRP-G*	SCRP-DG*	DON-G
<i>F. coeruleum</i> DSM 62178	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. culmorum</i> No. 3	6,9x10 ⁵	8,6x10 ⁵	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	1,4x10 ⁴	n.d.	n.d.
	4,3x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> No. 29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> DSM 62397	1,1x10 ⁵	1,6x10 ⁵	n.d.	n.d.
	3,8x10 ⁵	1,6x10 ⁵	n.d.	n.d.
	8,1x10 ⁴	1,2x10 ⁵	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> DSM 62186	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	2,9x10 ⁴	n.d.	n.d.
<i>F. sulphureum</i> No. 33	3,8x10 ⁵	5,2x10 ⁵	n.d.	n.d.
	2,0x10 ⁵	2,3x10 ⁵	n.d.	n.d.
	1,8x10 ⁶	1,7x10 ⁶	n.d.	n.d.
	7,5x10 ⁵	1,1x10 ⁶	n.d.	n.d.
	7,1x10 ⁵	6,7x10 ⁵	n.d.	n.d.
<i>F. sulphureum</i> No. 34	n.d.	1,4x10 ⁵	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	8,2x10 ⁴	1,8x10 ⁵	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sp.</i> No. K30	n.d.	n.d.	n.d.	15500
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	14300
	n.d.	n.d.	n.d.	35000
	n.d.	n.d.	n.d.	35300

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 18: Fusarientoxin-Glucosidgehalte (bezogen auf die Trockenmasse) in Faulstellen von natürlich infizierten Kartoffeln mit Verdacht auf Fusariumtrockenfäule [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Knolle	MAS-G*	SCRP-G*	SCRP-DG*	DON-G
N1 (Agata)	$1,2 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	n.d.
N2 (Agata)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N3 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N4 (Karlana)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N5 (Satina)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N6 (Satina)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N7 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N8 (unbekannt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N9 (Lady Christl)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N10 (Lady Christl)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N11 (Sieglinde)	$7,0 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.
N12 (Sieglinde)	$1,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	n.d.	n.d.

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 19: Vorkommen von Trichothecenen deren Glucosiden außerhalb der Faulstellen von artifiziiell mit unterschiedlichen *Fusarium* spp. inokulierten Kartoffeln (bezogen auf die Trockenmasse) [$\mu\text{g}/\text{kg}$] bzw. [counts]*

Isolat	Knolle No.	Gewebsabschnitt No.	15-MAS	MAS-G*	SCRIP*	SCRIP-G*	SCRIP-DG*	DON	DON-G
<i>F. culmorum</i> No. 3	1	1	n.d.	$1,7 \times 10^4$	n.d.	$6,6 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.
	1	1	n.d.	$1,5 \times 10^5$	n.d.	$2,4 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.
	1	2	n.d.	$5,6 \times 10^5$	n.d.	$3,4 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sulphureum</i> No. 33	1	3	n.d.	$7,9 \times 10^4$	n.d.	$9,2 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.
	3	1	114	$6,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	n.d.	n.d.
	3	2	n.d.	n.d.	n.d.	$1,7 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.
	5	1	n.d.	n.d.	n.d.	$2,4 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.
<i>F. sulphureum</i> No. 34	3	1	n.d.	n.d.	n.d.	$3,5 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.
	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	715
	4	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	247	1590
<i>F. sp. No. K30</i>	5	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	2570
	5	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1570

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 20: Vorkommen von Typ A Trichothecenen und deren Glucosiden in der Zellfraktion von Agra-Filterkulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR-P* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR-P-G* [counts]	SCR-P-DG* [counts]	
T-2 Toxin												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 h	n.d.	n.d.	1,1x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4 h	n.d.	n.d.	2,4x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
16 h	n.d.	n.d.	9,2x10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 d	n.d.	n.d.	6,2x10 ⁴	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5 d	n.d.	n.d.	5,6x10 ⁴	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 d	n.d.	n.d.	1,5x10 ⁵	2,8x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
12 d	n.d.	n.d.	2,1x10 ⁵	4,9x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
DAS												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	1,4x10 ⁴	1,8x10 ⁴	n.d.	
4 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	2,6x10 ⁴	3,9x10 ⁴	n.d.	
8 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
16 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	
2 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2x10 ⁵	4,8x10 ⁴	<LOQ	
5 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	4,2x10 ⁵	1,4x10 ⁵	7,4x10 ³	
8 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,3x10 ⁵	1,9x10 ⁵	8,3x10 ³	
12 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1,3x10 ⁶	4,6x10 ⁵	2,0x10 ⁴	

* Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard; Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 21: Vorkommen von Typ A Trichothecen und deren Glucosiden in der Zellfraktion von Desiré-Filterkulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR* [counts]	SCR-P-G* [counts]	SCR-P-DG* [counts]
T-2 Toxin												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4 h	n.d.	n.d.	1,0x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 h	n.d.	n.d.	5,7x10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 d	n.d.	n.d.	2,1x10 ⁴	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 d	n.d.	n.d.	3,6x10 ⁴	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 d	n.d.	n.d.	9,5x10 ⁴	3,4x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12 d	n.d.	n.d.	5,4x10 ⁴	2,6x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DAS												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	2,2x10 ⁴	<LOQ
4 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2x10 ⁴	<LOQ
8 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,6x10 ³	<LOQ
16 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
2 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,6x10 ³	n.d.	2,6x10 ⁴	<LOQ
5 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	2,1x10 ⁴	n.d.	1,0x10 ⁵	1,2x10 ⁴
8 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	2,7x10 ⁴	n.d.	7,5x10 ⁴	7,9x10 ³
12 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	7,6x10 ³	6,8x10 ⁴	n.d.	3,1x10 ⁵	2,6x10 ⁴

*Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 22: Vorkommen von Typ A Trichothecenen und deren Glucosiden in der Zellfraktion von *Agria*-Suspensionskulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR-P-G* [counts]	SCR-P-DG* [counts]	
T-2 Toxin												
0 h	1697	871,2	4,5x10 ⁵	7,7x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,0x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
1 h	932,4	547,3	2,5x10 ⁶	4,7x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,0x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
2 h	803,8	463,1	2,8x10 ⁶	5,5x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,9x10 ⁴	1,2x10 ⁴	n.d.	
4 h	626,3	363,1	4,2x10 ⁶	8,6x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,2x10 ⁴	1,5x10 ⁴	n.d.	
8 h	284,1	262,9	3,9x10 ⁶	7,4x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,6x10 ⁴	1,3x10 ⁴	n.d.	
16 h	75,7	54,2	5,6x10 ⁶	9,8x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,2x10 ⁴	1,5x10 ⁴	n.d.	
2 d	n.d.	n.d.	7,7x10 ⁶	1,8x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,9x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
5 d	n.d.	n.d.	8,9x10 ⁶	3,2x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,8x10 ⁴	2,5x10 ⁴	n.d.	
8 d	n.d.	n.d.	8,6x10 ⁶	4,6x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,0x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
12 d	n.d.	n.d.	7,8x10 ⁶	4,0x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,1x10 ⁴	<LOQ	n.d.	
DAS												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	229,8	3,6x10 ⁴	101,4	1,9x10 ⁴	3,0x10 ⁵	1,8x10 ⁵	5,5x10 ⁵	
1 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	131,9	n.d.	217,7	7,0x10 ⁵	8,8x10 ⁶	2,5x10 ⁶	1,3x10 ⁵	
2 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	163,9	n.d.	71,3	2,9x10 ⁵	1,2x10 ⁷	3,0x10 ⁶	1,6x10 ⁵	
4 h	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	113,4	n.d.	99,3	2,2x10 ⁵	1,3x10 ⁷	3,4x10 ⁶	2,5x10 ⁵	
8 h	n.d.	n.d.	1,2x10 ⁴	n.d.	14,5	n.d.	29,8	1,7x10 ⁴	1,2x10 ⁷	3,8x10 ⁶	2,1x10 ⁵	
16 h	n.d.	n.d.	1,6x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	26,3	<LOQ	1,5x10 ⁷	3,5x10 ⁶	2,5x10 ⁵	
2 d	n.d.	n.d.	2,2x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	1,3x10 ⁷	4,0x10 ⁶	2,1x10 ⁵	
5 d	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1,3x10 ⁷	4,0x10 ⁶	2,2x10 ⁵	
8 d	n.d.	n.d.	<LOQ	1,1x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1,1x10 ⁷	3,8x10 ⁶	2,0x10 ⁵	
12 d	n.d.	n.d.	<LOQ	1,0x10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1,2x10 ⁷	3,5x10 ⁶	1,9x10 ⁵	

Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 23: Vorkommen von Typ A Trichothecenen und deren Glucosiden im Kulturmedium von Agria-Filterkulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR*G* [counts]	SCR*DG* [counts]	
T-2 Toxin												
0 h	9480	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	8500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 h	7350	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4 h	10500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 h	6400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
16 h	5350	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 d	8550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5 d	6620	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 d	7220	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
12 d	6360	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
DAS												
0 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	26400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	22200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	18300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	22900	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	22600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
16 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	17700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	20500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	14800	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	20000	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	
12 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	20400	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	

Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 24: Vorkommen von Typ A Trichothecenen und deren Glucosiden im Kulturmedium von Desiré-Filterkulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR* [counts]	SCR-G* [counts]	SCR-DG* [counts]
T-2 Toxin												
0 h	6990	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1 h	5520	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 h	8050	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4 h	4230	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 h	1710	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16 h	1520	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 d	7760	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 d	5890	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 d	8040	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12 d	5960	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DAS												
0 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	22300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	22200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	20500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	19200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16 h	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	21400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	18900	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	16600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	14300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12 d	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	14700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Tabelle A 25: Vorkommen von Typ A Trichothecenen und deren Glucosiden im Kulturmedium von Agria-Suspensionskulturen während einer 12 tägigen Inkubation mit 5 µg/ml Toxin (T-2 bzw. DAS)

Inkubationsdauer	T-2 [ng]	HT-2 [ng]	HT-2-G* [counts]	HT-2-DG* [counts]	DAS [ng]	4-MAS* [counts]	15-MAS [ng]	SCR* [counts]	MAS-G* [counts]	SCR*G* [counts]	SCR*DG* [counts]	
T-2 Toxin												
0 h	35400	4900	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	19540	5120	6,9x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 h	3440	3740	3,1x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4 h	6720	4860	1,4x10 ⁷	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 h	3080	2880	1,3x10 ⁷	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
16 h	486,0	<LOQ	1,8x10 ⁷	9,0x10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 d	n.d.	n.d.	2,4x10 ⁶	2,0x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5 d	n.d.	n.d.	<LOQ	1,7x10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8 d	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
12 d	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
DAS												
0 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47200	<LOQ	1230	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21800	1,9x10 ⁶	2140	<LOQ	5,9x10 ⁶	n.d.	n.d.	
2 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6780	1,8x10 ⁶	2480	<LOQ	8,6x10 ⁶	n.d.	n.d.	
4 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3420	1,4x10 ⁶	3040	8,0x10 ⁵	1,0x10 ⁷	n.d.	n.d.	
8 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	1848	<LOQ	1,2x10 ⁷	<LOQ	n.d.	
16 h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2300	1,2x10 ⁶	1,3x10 ⁷	<LOQ	n.d.	
2 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	9,1x10 ⁵	1,9x10 ⁷	3,3x10 ⁶	n.d.	
5 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	2,6x10 ⁷	7,3x10 ⁶	n.d.	
8 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	2,7x10 ⁷	6,0x10 ⁶	n.d.	
12 d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	2,0x10 ⁷	6,8x10 ⁶	n.d.	

Toxine ohne zertifizierten Kalibrierstandard: Angabe der Peakfläche [counts]

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München in Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt und durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Johann Bauer, der mich mit der Durchführung dieser Arbeit betraute und durch freundliche Unterstützung und wertvolle Anregungen den Fortgang meiner Arbeit mit viel Interesse begleitet hat.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Karl-Heinz Engel für das Koreferat und Prof. Ralph Hückelhoven für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission dieser Dissertation bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Karsten Meyer für die Betreuung dieser Dissertation, für zahlreiche fachliche Ratschläge, interessante Besprechungen und die gute Zusammenarbeit in allen Phasen meiner Arbeit.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und für viele lehrreiche Gespräche danken. Ein ganz großes Dankeschön an Dr. Katrin Harms, René Mamet und Monika Held, meinen Kollegen in der Analytik, die mir durch ihre engagierte und kompetente Unterstützung vieles erleichtert haben.

Prof. Rychlik danke ich für die Überlassung von ^{13}C -markierten Standards. Bei Prof. Treutter bedanke ich mich für die Hilfe im Umgang mit Pflanzenzellkulturen.

Herrn Dr. Brunner, Frau Dr. Lange und Herrn Dr. Rapp vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim danke ich für die Unterstützung meines Projekts und für die Hilfe bei der Fertigstellung der Forschungsberichte.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützt und die mir alles erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Melanie Matthes
Geboren: 21.05.1982 in Balingen
Wohnhaft in: 85354 Freising
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung

08/1988 – 07/1992 Grund- und Hauptschule Frommern
08/1992 – 06/2001 Gymnasium Balingen
Abschluss Abitur

Hochschulstudium

10/2001 - 09/2004 Bachelorstudiengang Ernährungswissenschaften,
Technische Universität München
Abschluss Bachelor of Science
10/2004 - 06/2006 Masterstudiengang Ernährungswissenschaften,
Fachrichtung Lebensmittelwissenschaften,
Technische Universität München
Abschluss Master of Science

Berufliche Tätigkeiten

Seit 01/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tierhygiene,
Freising (Technische Universität München)