



UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

Vakgroep Bioanalyse

Laboratorium voor Bromatologie

Academiejaar 2010-2011

SYNTHESE, ZUIVERING EN ANALYSE VAN DON- EN ZEN-GLUCURONIDE

Freya VANDENBROECK

Eerste Master in Farmaceutische Zorg

Promotor

Prof. S. De Saeger

Commissarissen

Dr. José Diana Di Mavungu

Dr. Alfons Callebaut

AUTEURSRECHT

“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit deze masterproef.”

Gent, mei 2011

Promotor

Prof. S. De Saeger

Auteur

Freya Vandenbroeck

*Via deze weg wens ik iedereen te bedanken
die mij geholpen heeft deze masterproef te realiseren.*

*Vooreerst bedank ik het Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie.
Zij gaven me de kans de wetenschappelijke wereld buiten onze faculteit te ontdekken.*

*Dank je wel Prof. S. De Saeger,
voor het nalezen en corrigeren van mijn thesis.*

*Daarnaast bedank ik ook Dr. A. Callebaut,
voor het luisterend oor en het antwoord op vele vragen.*

*Bedankt Dr. ir. A. Versilovskis,
om mij te betrekken in jouw doctoraatsonderzoek
en voor de begeleiding en samenwerking hierbinnen.*

INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

1. INLEIDING	1
2. LITERATUURSTUDIE.....	3
2.1. DEOXYNIVALENOL	3
2.1.1. Regelgevingen	4
2.1.2. Effecten DON.....	5
2.1.3. Metabolisatie.....	5
2.2. ZEARALENONE.....	6
2.2.1. Regelgevingen	6
2.2.2. Effecten ZEN	7
2.2.3. Metabolisatie.....	8
2.3. GECONJUGEEERDE MYCOTOXINEN.....	9
2.3.1 Conjugaten aangemaakt door schimmels	9
2.3.2. Conjugaten aangemaakt door planten.....	10
2.3.3. Conjugaten aangemaakt tijdens voedselverwerking	10
2.3.4. Conjugaten aangemaakt door zoogdieren	10
2.3.5. Analysemethoden voor geconjugeerde mycotoxinen	11
2.4. GLUCURONIDATIE.....	12
2.4.1. Glucuronidatie deoxynivalenol	14
2.4.2. Glucuronidatie zearalenone.....	15
2.4.3. Synthese van DGU en ZGU	16

2.5. ANALYSE EN ZUIVERING VAN DGU EN ZGU	17
2.5.1. <i>Reversed phase</i> vloeistofchromatografie	17
2.5.2. <i>Photodiode array</i> detector	18
2.5.3. Massaspectrometrische detector.....	18
3. OBJECTIEVEN	20
4. MATERIALEN EN METHODEN	22
4.1. SYNTHESE VAN DGU EN ZGU	22
4.1.1. Materialen.....	22
4.1.2. Methoden.....	23
4.2. ANALYSE EN ZUIVERING VAN DGU EN ZGU	25
4.2.1. Materialen.....	25
4.2.2. Methoden.....	26
4.3. β -HYDROLYSE VAN DGU EN ZGU	28
4.3.1. Materialen.....	28
4.3.2. Methoden.....	28
4.3.3. β -hydrolyse DGU in serum	30
4.4. LYOFILISATIE EN SPECTROFOTOMETRISCHE CONCENTRATIEBEPALING DGU.....	30
5. RESULTATEN	31
5.1. SYNTHESE DGU	31
5.1.1. Met behulp van microsomen in ratio 1/50.....	31
5.1.1.1. Identificatie DGU met HPLC-PDA	31
5.1.1.2. Identificatie DGU met UPLC-PDA-MS.....	34
5.1.1.3. Opzuivering DGU.....	36
5.1.2. Met behulp van microsomen in ratio 1/5.....	36

5.1.3 Met behulp van UGT2B4.....	37
5.1.4. Spectrofotometrische concentratiebepaling DGU.....	37
5.1.5. β -hydrolyse DGU.....	38
5.1.6. β -hydrolyse DGU in serum	41
5.2. SYNTHESE ZGU.....	42
5.2.1. Met behulp van microsomen ratio 1/50.....	42
5.2.1.1. Identificatie ZGU met HPLC-PDA.....	42
5.2.1.2. Identificatie ZGU met UPLC-PDA-MS	45
5.2.1.3. Opzuivering ZGU	47
5.2.2. Met behulp van microsomen in ratio 1/5.....	49
5.2.3. Met behulp van UGT2B4.....	49
5.2.4. β -hydrolyse ZGU	50
6. DISCUSSIE EN BESLUIT	51
7. LITERATUURLIJST	54

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

15-ADON	15-acetyl-deoxynivalenol
3-ADON	3-acetyl-deoxynivalenol
D3G	Deoxynivalenol-3-glucoside
DGU	Deoxynivalenol-glucuronide
DOM-1	De-epoxy deoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
ESI	Electrospray ionisatie
ESI ⁺	Positieve electrospray ionisatie
GA	Glucuronic acid - glucuronzuur
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
m/z	Massa-ladingsverhouding
min	Minuten
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massaspectrometrie
nm	Nanometer
NMR	Nucleaire Magnetische Resonantie
PDA	Photodiode Array detector
ppm	Parts per million
RIC	Reconstructed ion chromatogram
rpm	Revolutions per minute
R _t	Retentietijd
s	Seconde

TDI	Tolerable daily intake
TIC	Totaal ionenchromatogram
UDP	Uridine Diphosphate
UDPAG	Uridine Diphosphate Acetyl Glucosamine
UDPGA	Uridine Diphosphate Glucuronic Acid
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UGT2B4	UDP-glucuronosyltransferase 2B4
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
eV	Elektronvolt
V	Voltage
ZAN	Zearalanone
ZEN	Zearalenone
ZGU	Zearalenone-glucuronide
α -ZAL	α -Zearalanol
α -ZEL	α -Zearalenol
β -ZAL	β -Zearalanol
β -ZEL	β -Zearalenol

1. INLEIDING

Mycotoxinen zijn toxische secundaire metabolieten die door vele schimmels worden aangemaakt, maar niet alle toxische producten geproduceerd door schimmels duidt men aan met de term mycotoxinen. Enkel de secundaire metabolieten die schadelijk zijn voor dieren en mensen worden mycotoxinen genoemd. Wanneer schimmels toxische metabolieten tegen bacteriën vormen, krijgen deze de naam antibiotica. Stoffen die schadelijk zijn voor planten noemt men fytotoxinen (*Bennett & Klich, 2003*).

Aspergillus, Fusarium en Penicillium zijn voorbeelden van schimmelgeslachten die de meest voorkomende mycotoxinen produceren. Wanneer dergelijke schimmels landbouwgewassen besmetten, kunnen de mycotoxinen via de voeding het lichaam binnendringen en verschillende toxische effecten veroorzaken. Zo zijn bepaalde mycotoxinen toxisch voor de lever, het gastro-intestinaal stelsel of het immuunsysteem en zijn ze vaak mutageen of teratogeen. Mycotoxicose is de algemene term die deze toxische aandoeningen omvat. De ernst van een mycotoxicose hangt nauw samen met het type toxine, de hoeveelheid en de duur van blootstelling. Orale inname is de meest voorkomende oorzaak van mycotoxicose, maar ook respiratoir en dermaal kunnen mycotoxinen aanleiding geven tot diverse gezondheidsproblemen (*Bennett & Klich, 2003*).

Mycotoxinen producerende schimmels delen zich op in twee groepen. Zo zijn er schimmels die gewassen reeds op het veld besmetten met mycotoxinen. Ze krijgen de naam *pre-harvest* schimmels omdat ze planten reeds infecteren voordat deze geoogst worden. *Fusarium* is hier een voorbeeld van. Anderzijds zijn er schimmels die gewassen pas besmetten na de oogst gedurende de opslagperiode. *Aspergillus* en *Penicillium* zijn voorbeelden van dit type schimmels en noemt men *post-harvest* schimmels.

Omgevingsfactoren zoals temperatuur, vochtigheid en droogte beïnvloeden de aanmaak van mycotoxinen. Een koudere, vochtige omgeving is ideaal voor schimmels van het *Fusarium* geslacht om mycotoxinen te produceren. *Aspergillus* daarentegen, verkiest warme, droge omgevingen voor de aanmaak van aflatoxine (*Richard, 2007*). Daarnaast spelen ook genetische factoren een belangrijke rol in de aanmaak van mycotoxinen (*Ward et al., 2002*).

Er werden reeds verschillende methoden vooropgesteld om de hoeveelheid mycotoxinen in voeding en veevoeder te reduceren. De stabiliteit van mycotoxinen maakt deze uitdaging heel wat moeilijker dan verwacht. Chemische behandeling van voedingsmiddelen kan een ideale oplossing zijn voor het controleren van mycotoxinen, maar dit resulteert vaak in ongewenste bijwerkingen (*Sudakin, 2003*).

Aangezien mycotoxinen een gevaar vormen voor de volksgezondheid en contaminatie van veevoeder en voedingsmiddelen niet uit te sluiten is, stelde de Europese Unie richtlijnen op waarin de hoeveelheid mycotoxinen die maximaal aanwezig mogen zijn in bepaalde voedingsmiddelen en veevoerders wordt beschreven.

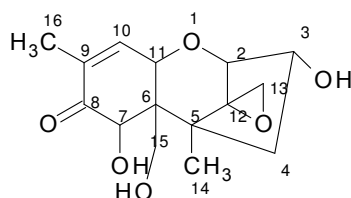
Mycotoxinen onderscheiden zich van elkaar in chemische structuur, biologisch effect, biosynthetische oorsprong en soort schimmel die ze aanmaakt. Enkele belangrijke mycotoxinen zijn aflatoxines, fumonisines, ochratoxine A, citrinine, ergot alkaloiden, trichothecenen en zearalenone. Trichothecenen, fumonisinen en zearalenone worden door schimmels van het *Fusarium* geslacht aangemaakt waardoor deze fusariotoxinen genoemd worden (*Bennet & Klich, 2003*).

Het onderzoek van deze thesis gaat voornamelijk over de mycotoxinen deoxynivalenol en zearalenone. In de volgende hoofdstukken worden deze fusariotoxinen uitgebreider besproken.

2. LITERATUURSTUDIE

2.1. DEOXYNIVALENOL

Deoxynivalenol (DON) is een voorbeeld van een type B trichotheceen dat hoofdzakelijk aangemaakt wordt door schimmels van het *Fusarium* geslacht zoals *F. graminearum* en *F. culmorum*. Vomitoxine is een alternatieve benaming voor DON. Het kreeg deze naam omdat het in staat is een braakreflex uit te lokken (Canady et al., 2001).



Figuur 2.1: Deoxynivalenol (DON)

DON komt voornamelijk voor in verschillende graangewassen zoals gerst, maïs, tarwe en haver (Trucksess et al., 1995). Ook afgeleide producten zoals ontbijtgranen, bier en brood kunnen deoxynivalenol in lage concentraties bevatten (Wolf-Hall and Schwarz, 2002; Schollenberger et al., 1999). Onderstaande Tabel 2.1 geeft een overzicht van gemiddelde en maximale hoeveelheden DON gemeten in verschillende graansoorten. Hieruit kan afgeleid worden dat maïs, gerst en tarwe de hoogste concentraties DON bevatten.

Tabel 2.1: Gehalte DON in verschillende graansoorten (Codex Alimentarius Commission, 2011)

Grondstof	Aantal stalen (*)	Gemiddelde conc. µg/kg	Maximale conc. µg/kg
Gerst	1 353	442	10 000
Maïs	2 643	625	17 500
Haver	238	79	5 000
Rijst	462	12	320
Rogge	909	63	1 095
Tarwe	9 997	367	14 000

(*)De gegevens zijn afkomstig van de 72^{ste} vergadering van JECFA in 2010 en omvatten info over het voorkomen van DON in allerlei graansoorten uit Oostenrijk, België, Brazilië, China, Finland, Hongarije, Japan, Nederland, Noorwegen, Singapore, en het Verenigd Koninkrijk. Ook data uit gepubliceerde artikels tussen 2001 en 2009 werden gebruikt.

2.1.1. Regelgevingen

Deoxynivalenol is, net zoals andere mycotoxinen, toxisch vanaf een bepaalde concentratie. Dit leidde tot het opstellen van regelgevingen door de Europese Commissie waarin het maximumgehalte van DON in verschillende voedingsmiddelen wordt beschreven. Zo zijn de aanbevolen richtwaarden voor DON in granen en maïsproducten bestemd voor veevoerders, 8 en 12 ppm (mg/kg). Ook de concentratie van DON in grondstoffen voor menselijke voedingsmiddelen is gereguleerd: Tabel 2.2 geeft de maximumgehalten (in µg/kg) weer (*Official Journal of the European Union, 2006*).

De toelaatbare dagelijkse inname (tolerable daily intake, TDI) van DON bedraagt 1 µg per kilogram lichaamsgewicht. Volwassenen bereiken zelden een waarde hoger dan deze TDI, maar de kans is groter dat kinderen, door hun lagere lichaamsgewicht, deze waarde toch overschrijden. Dit is de reden waarom het maximumgehalte van DON in babyvoeding zoveel lager moet zijn (zie Tabel 2.2) (*Official Journal of the European Union, 2006*).

Tabel 2.2: Gereguleerde maximumgehalten DON (µg/kg) in levensmiddelen.

(Official Journal of the European Union, 2006)

Deoxynivalenol	DON (µg/kg)
Onbewerkte granen, met uitzondering van harde tarwe, haver en maïs	1250
Onbewerkte harde tarwe en haver	1750
Onbewerkte maïs	1750
Granen die bestemd zijn voor rechtstreekse menselijke consumptie, meel en bloem van granen, zemelen verkocht als eindproduct voor rechtstreekse menselijke consumptie en kiemen.	750
Deegwaren (droge)	750
Brood (met inbegrip van kleine bakkerijproducten), gebak, koekjes, granensnacks en ontbijtgranen	500
Bewerkte voedingsmiddelen op basis van granen en babyvoeding voor zuigelingen en peuters	200

2.1.2. Effecten DON

Na acute blootstelling veroorzaakt DON voornamelijk twee karakteristieke toxicologische effecten: verminderde voedingsopname (anorexia) en braken. Een verhoogde centrale serotoninerge activiteit lijkt hiervan de oorzaak te zijn. De inductie van een braakreflex door DON is tot vandaag de dag nog niet onderzocht bij mensen en primaten. Wel geldt de veronderstelling dat mensen even gevoelig zijn voor DON als varkens. Een dosis van 50-100 µg per kilogram lichaamsgewicht kan bij varkens reeds een braakreflex uitlokken. Daarnaast is DON ook immunotoxisch. Afhankelijk van de dosis en frequentie van blootstelling kan DON zowel het immuunsysteem stimuleren als onderdrukken (*Pestka, 2010*).

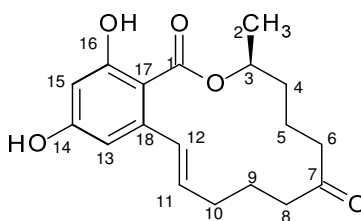
2.1.3. Metabolisatie

DON wordt na orale inname voornamelijk via twee routes gemetaboliseerd. Enerzijds zijn microben uit de darmflora in staat de-epoxy deoxynivalenol (DOM-1) te vormen door het openen van de epoxide ring (*Wu et al., 2007*). Via deze metabolisatieweg kan dus zowel DON als DOM-1 opgenomen worden uit het gastro-intestinaal stelsel (*Pestka and Smolinski, 2005*). Voornamelijk dieren zijn in staat DON op deze manier te metaboliseren. In voorafgaande onderzoeken werd DOM-1 gedetecteerd in de urine van schapen en koeien alsook in de faeces van ratten en varkens (*Prelusky et al., 1986; Cote et al., 1986; Worrell et al., 1989; Danicke et al., 2004*). De mens is waarschijnlijk niet in staat DON op deze manier te metaboliseren. Recent werd echter DOM-1 gedetecteerd in de urine van Franse boeren. Men veronderstelt dat de overdracht van dierlijke microben naar deze boeren hiervan de oorzaak is (*Turner et al., 2010*). Een studie op 3T3 cellen van muizen toonde aan dat DOM-1 55 keer minder toxisch is dan DON. Hieruit werd besloten dat de-epoxidatie een detoxificatie reactie is (*Eriksen et al., 2004*).

Een andere mogelijkheid is dat DON een conjugaat vormt met glucuronzuur waardoor deoxynivalenol-glucuronide (DGU) ontstaat. Glucuronidatie is de belangrijkste fase 2 metabolisatiereactie bij mensen en dieren en verhoogt de wateroplosbaarheid van DON zodanig dat dit makkelijker het lichaam verlaat via de urine. Dit conjugaat in de urine is bruikbaar als biomerker ter beoordeling van de totale blootstelling aan DON (*Wu et al., 2007*).

2.2. ZEARALENONE

Zearalenone (ZEN) is een niet-steroïdaal oestrogeen mycotoxine dat, net zoals DON, wordt aangemaakt door verschillende soorten *Fusarium* schimmels waaronder *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, en *F. cerealis*. Deze schimmels contamineren onder andere granen zoals maïs, gerst, haver en rijst (Bennett & Klich, 2003). De benaming zearalenone is samengesteld uit de naam van de schimmel die het aanmaakt (*G. Zeae*) en enkele typische structuur eigenschappen: het is een resorcyclic acid lactone en het bevat een dubbele binding (**ene**) alsook een ketogroep (**one**) (Urry et al., 1966). Figuur 2.2 verduidelijkt deze karakteristieke structuur eigenschappen. Zearalenone heeft een uitgesproken hormonale werking waardoor sommige wetenschappers liever de term myco-oestrogeen gebruiken dan mycotoxine (Metzler, 2010). Nadat varkens symptomen van het oestrogeen syndroom vertoonden, werd ZEN voor het eerst gedetecteerd en geïsoleerd uit beschimmeld veevoeder (Stob et al., 1962).



Figuur 2.2: Zearalenone (ZEN)

2.2.1. Regelgevingen

Net zoals voor DON, stelt de Europese Commissie maximumwaarden voor ZEN in veevoeders en voeding op. De aanbevolen richtwaarden voor ZEN in granen en maïsproducten bestemd voor veevoeders, zijn 2 en 3 ppm (mg/kg). In *the official Journal of the European Union* (2006) worden ook de maximale gehalten van ZEN voor menselijke voedingsmiddelen weergegeven (zie Tabel 2.3). De TDI voor ZEN bedraagt 0,2 µg per kilogram lichaamsgewicht voor mensen. (*Official Journal of the European Union*, 2006)

Tabel 2.3: Gereglementeerde maximumgehalte ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in levensmiddelen.

(Official Journal of the European Union, 2006)

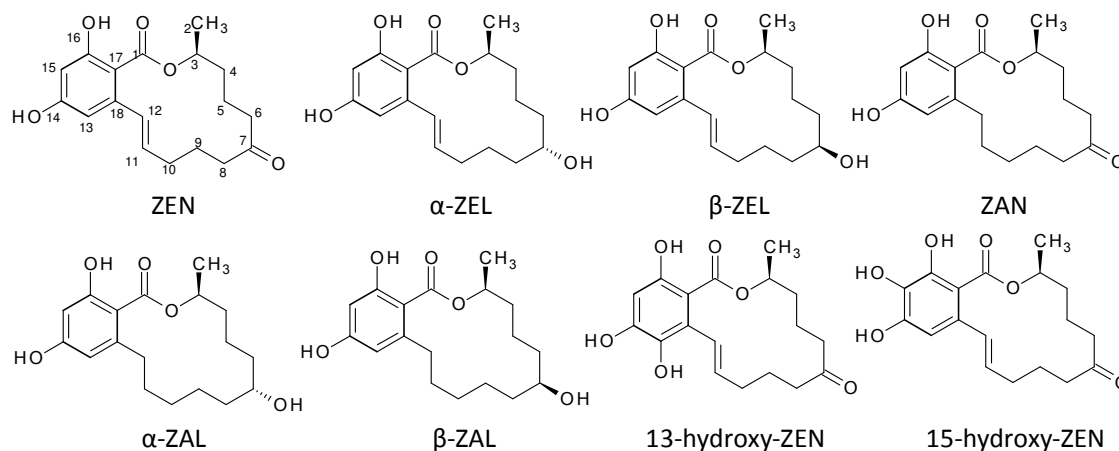
Zearalenone	ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Onbewerkte granen, met uitzondering van maïs	100
Onbewerkte maïs	200
Granen die bestemd zijn voor rechtstreekse menselijke consumptie, meel en bloem van granen, zemelen verkocht als eindproduct voor rechtstreekse menselijke consumptie en kiemen.	75
Maïs die bestemd is voor rechtstreekse menselijke consumptie, maïsbloem, maïsmeel, maïsgrutten, maïskiemen en geraffineerde maïsolie	200
Brood (met inbegrip van kleine bakkerijproducten), gebak, koekjes, granensnacks en ontbijtgranen, met uitzondering van maïssnacks en ontbijtgranen op basis van maïs	50
Maïssnacks en ontbijtgranen op basis van maïs	50
Bewerkte voedingsmiddelen op basis van granen (met uitzondering van bewerkte voedingsmiddelen op basis van maïs) en babyvoeding voor zuigelingen en peuters	20
Bewerkte voedingsmiddelen op basis van maïs voor zuigelingen en peuters	20

2.2.2. Effecten ZEN

De structuur van ZEN lijkt zeer goed op deze van 17β -estradiol. Dit is een hormoon dat in de eierstokken wordt aangemaakt. Door deze structurele gelijkens is het mogelijk dat ZEN en zijn metabolieten interacties aangaan met oestrogenreceptoren die gelokaliseerd zijn in de baarmoeder, borstklier, lever en hypothalamus. Voornamelijk varkens zijn zeer gevoelig voor ZEN door deze interactie. Hyperoestrogenisme is een gevolg van deze binding en kan leiden tot verminderde vruchtbaarheid (*Malekinejad et al., 2005*). Doordat ZEN inwerkt op de oestrogenreceptoren, had het vroeger enkele farmaceutische toepassingen. Zo werd het gebruikt ter behandeling van postmenopauzale klachten en als contraceptivum (*Bennett & Klich, 2003*).

2.2.3. Metabolisatie

Na inname kan zearalenone fase 1 en fase 2 metabolisatiereacties ondergaan. Hydroxylatie en reductie van ZEN behoren tot de fase 1 reacties. Figuur 2.3 illustreert de fase 1 metabolieten van ZEN. Door reductie van de ketogroep op C₇ ontstaan α -zearalenol (α -ZEL) en β -zearalenol (β -ZEL). Het enzym 3 α - en 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is in staat deze reactie te katalyseren. De ratio α - en β -ZEL die gevormd wordt uit ZEN hangt af van de diersoort. Zo blijkt dat varkens meer de α -vorm aanmaken en runderen een hogere hoeveelheid β -ZEL produceren. Indien de macrocyclische dubbele binding van ZEN gereduceerd wordt, ontstaat zearalanone (ZAN). Sommige diersoorten kunnen α - en β -ZEL nog verder reduceren tot α -zearalanol (α -ZAL) en β -zearalanol (β -ZAL). α -ZAL en α -ZEL hebben een hogere oestrogene activiteit dan ZEN. α -ZAL is bruikbaar als groeibevorderend middel voor runderen, al is in Europa het gebruik ervan sinds 1989 verboden (*Malekinejad et al., 2005*). Uit *in vitro* experimenten blijkt dat ook op de aromatische ring van ZEN hydroxylaties kunnen plaatsvinden waardoor 13-hydroxy-ZEN en 15-hydroxy-ZEN ontstaan (*Pfeiffer et al., 2009*).



Figuur 2.3: Fase 1 metabolieten ZEN

Een andere mogelijkheid is dat ZEN en de bovenstaande metabolieten (ZEL, ZAL, ZAN) via conjugatie met glucuronzuur worden omgezet tot glucuroniden (zearalenone-glucuronide ZGU) (*Stevenson et al., 2008*). Dit is een van de meest voorkomende fase 2 metabolisatiewegen. Glucuronidatie wordt later in dit werk meer uitgebreid behandeld.

2.3. GECONJUGEEERDE MYCOTOXINEN

Mycotoxinen kunnen door de schimmel zelf, door planten, zoogdieren en tijdens de bereiding van voedsel en voeders worden omgezet tot conjugaten van het natieve mycotoxine. De meest voorkomende chemische omzettingen zijn acetylatie, glycosylatie, glucuronidatie en sulfatatie. Glucosiden zijn typische mycotoxine conjugaten aangemaakt door planten, terwijl enkel dieren en mensen glucuroniden aanmaken. Het doel van deze omzettingen is het vormen van minder toxische verbindingen. Door deze chemische wijzigingen neemt ook de wateroplosbaarheid toe, wat de eliminatie via de urine bevordert (*Berthiller et al., 2009*).

Tijdens onderzoek naar de aanwezigheid van mycotoxinen in voedsel en veevoeders, worden deze conjugaten vaak niet opgemerkt. Voedsel mag dus niet als veilig beschouwd worden als het geen natieve mycotoxinen bevat. Het is mogelijk dat ze aanwezig zijn in een geconjugeerde vorm die de courante analysetechnieken niet detecteren. De Europese regelgevingen zijn enkel opgesteld voor de natieve mycotoxinen en niet voor hun conjugaten. Deze conjugaten kunnen in het gastro-intestinaal stelsel terug worden omgezet tot de natieve mycotoxinen en dragen zo bij tot de toxiciteit. Daarom is het van belang ook de aanwezigheid van conjugaten te bepalen (*Berthiller et al., 2009*).

Young et al. (1984) rapporteerden dat de hoeveelheid DON in gist bevattende donuts hoger was dan het besmette meel dat gebruikt werd voor deze voedingsmiddelen. Reeds toen suggereerde men dat er conjugaten van DON bestaan. Steeds meer en meer gewijzigde mycotoxinen worden ontdekt, maar betrouwbare analysemethoden staan nog niet volledig op punt. Eén van de redenen hiervan is dat vaak geen standaarden van deze geconjugeerde mycotoxinen beschikbaar zijn. Het ontbreken van deze standaarden maakt het ook moeilijk de toxiciteit van de geconjugeerde mycotoxinen te voorspellen (*Berthiller et al., 2009*).

2.3.1 Conjugaten aangemaakt door schimmels

Uit 3,15-diacetyl-deoxynivalenol, een biosynthetische precursor van DON, kunnen *Fusarium* species 3-acetyl-deoxynivalenol (3-ADON) en 15-acetyl-deoxynivalenol (15-ADON) vrijstellen (*Berthiller et al., 2009*). Eriksen et al. (2004) toonden aan dat 3-ADON minder toxisch is dan DON en dat 15-ADON even toxisch is als DON.

Fusarium species en *Rhizopus arrhizus* kunnen zearalenone omzetten tot de gesulfateerde vorm ZEN-14-*O*-sulfaat. Sulfatasen zijn in staat ZEN-14-*O*-sulfaat terug om te zetten tot ZEN waardoor dit ook oestrogene activiteit vertoont. Verschillende fungi kunnen ZEN ook glycosyleren tot ZEN-14- β -D-glucoside (Berthiller et al., 2009).

2.3.2. Conjugaten aangemaakt door planten

Planten die besmet zijn met een schimmel, verdedigen zich tegen de aangemaakte mycotoxinen door deze te modifieren. In een studie werd aangetoond dat, met behulp van het enzym UDP-glucosyltransferase, DON tot DON-3- β -D-glucoside (D3G) kan worden omgezet in maïs, tarwe en gerst. Doordat dit glucoside meer polair is dan DON, kan het worden opgenomen in de vacuoles van de plant (Berthiller et al., 2009). Maïs celsuspensieculturen kunnen uit ZEN het conjugaat ZEN-14- β -D-glucoside vormen (Engelhardt et al., 1988). Naast glucosiden kan de plant *Arabidopsis thaliana* ook malonylglucosiden, dihexosiden en pentosylhexosiden als conjugaten van ZEN en α -en β -ZEL aanmaken (Berthiller et al., 2009).

2.3.3. Conjugaten aangemaakt tijdens voedselverwerking

Gedurende de verwerking van voedsel kunnen ook conjugaten van natieve mycotoxinen aangemaakt worden. Dit gebeurt voornamelijk onder invloed van warmte en tijdens de fermentatie van bier. Tijdens het mouten begint gerst te ontkiemen en kunnen glucosiden van DON gevormd worden, zo neemt de hoeveelheid D3G tijdens het brouwen toe. Wanneer deze vorm van DON in rekening wordt gebracht, is het mogelijk dat de toelaatbare dagelijkse inname van DON overschreden wordt bij een gemiddelde bierconsumptie (Berthiller et al., 2009).

2.3.4. Conjugaten aangemaakt door zoogdieren

Tijdens de metabolisatie van mycotoxinen ontstaan conjugaten van de natieve toxinen die nadien in de urine worden uitgescheiden. Zowel glucuroniden als sulfaten van DON en ZEN werden reeds gedetecteerd in de urine van verschillende zoogdieren (Berthiller et al., 2009).

2.3.5. Analysemethoden voor geconjugeerde mycotoxinen

De voorkeursmethode voor de analyse van mycotoxinen en hun afgeleide conjugaten is vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MS). Mycotoxinen in voedingsmiddelen dienen geanalyseerd te worden om na te gaan of de vooropgestelde maxima niet overschreden worden. De analyse van de hoeveelheid mycotoxinen of hun metabolieten in urine en plasma zou ook een idee kunnen geven over de blootstelling aan bepaalde mycotoxinen. In beide gevallen is het noodzakelijk rekening te houden met de geconjugeerde vormen (*Berthiller et al., 2009*).

Er zijn twee mogelijke methoden om conjugaten te bestuderen. Enerzijds is het mogelijk ze indirect te bepalen door ze vooraf via hydrolyse om te zetten in hun natief mycotoxine, waarna het totaal gehalte mycotoxinen via LC-MS wordt bepaald. Een voordeel van indirecte analysemethoden is dat er geen meetstandaarden van de geconjugeerde mycotoxinen nodig zijn. Maar indirecte analysemethoden hebben ook hun nadelen. Zo is de efficiëntie van de hydrolysereactie niet meetbaar wanneer er geen standaarden van de geconjugeerde mycotoxinen voor handen zijn. Het is dus mogelijk dat niet alle conjugaten hydrolyseren in hun natief mycotoxine wat leidt tot foutieve interpretaties van de bekomen resultaten. Indirecte analyse methoden zijn ook niet aan te raden bij routine analyses omdat ze veel tijd in beslag nemen (*Berthiller et al., 2009*).

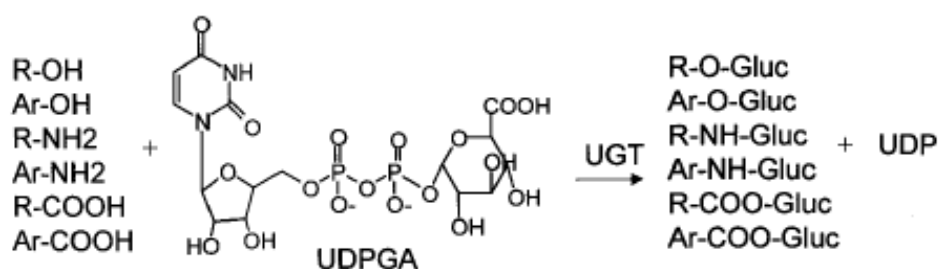
Directe analyses lijken de beste oplossing te zijn om geconjugeerde mycotoxinen te analyseren. Voor nauwkeurige kwantificaties zijn meetstandaarden van deze conjugaten noodzakelijk. Van DON zijn de conjugaten D3G, 3-ADON en 15-ADON reeds commercieel beschikbaar, maar van de glucuroniden DGU en ZGU zijn nog geen standaarden bestaande. Het is dus niet mogelijk om rechtstreeks de hoeveelheid DGU en ZGU in urinestalen of plasma te kwantificeren hoewel het nut hiervan groot is: deze conjugaten zouden informatie kunnen leveren over de blootstelling aan de natieve mycotoxinen DON en ZEN. Om analytische methoden voor deze glucuroniden te ontwikkelen, moeten deze eerst gesynthetiseerd worden vertrekkende van DON of ZEN (*Berthiller et al., 2009*). Bovenstaande nadelen van indirecte analysemethoden zijn redenen waarom het noodzakelijk is standaarden en directe analysemethoden te ontwikkelen voor conjugaten zoals DGU en ZGU. Dit is dan ook het doel van dit onderzoek.

2.4. GLUCURONIDATIE

Glucuronidatie is één van de belangrijkste fase 2 metabolisatiereacties die gekatalyseerd wordt door het enzym UDP-glucuronosyltransferase (UGT). Door conjugatie van glucuronzuur aan mycotoxinen en andere xenobiotica, ontstaan verbindingen die meer hydrofiel zijn en bijgevolg makkelijker uit het lichaam elimineerbaar zijn. Vaak zijn de gevormde conjugaten minder toxisch, maar er bestaan ook uitzonderingen. Reeds verschillende UGT iso-enzymen, die zich onderscheiden in structuur en substraatspecificiteit, werden geïdentificeerd. Op basis van hun coderende genen worden ze opgedeeld in twee families: UGT1 en UGT2 (Ritter, 2000).

De enzymen van de UGT1A familie spelen een belangrijke rol in de metabolisatie van onder andere fenolen en geneesmiddelen. Ook de glucuronidatie van bilirubine en iodothyronines nemen zij voor hun rekening. De enzymen van de UGT2B familie zijn voornamelijk betrokken bij de metabolisatie van galzuren, fenolderivaten, catechol oestrogenen en steroïden (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/8/u3133dat.Par.0001.Fil.tmp/u3133dat.pdf> : ProductInformation Sigma-Aldrich).

Uit UDP-glucose maakt het lichaam uridinedifosfaat-glucuronzuur (UDPGA) aan. Deze reactie wordt gekatalyseerd door het enzym UDP-glucose dehydrogenase. UDPGA bevat glucuronzuur en staat dit af aan de te metaboliseren verbinding. De substraten van de UGT enzymen dienen een geschikte functionele groep te bevatten om een conjugaat te vormen met glucuronzuur zoals geïllustreerd in Figuur 2.4 Dit zijn voornamelijk elektronrijke nucleofiele heteroatomen zoals O, N of S. Naargelang deze accepterende functionele groep, maakt men een onderscheid tussen O-, N-, en S-glucuroniden (Ritter, 2000).

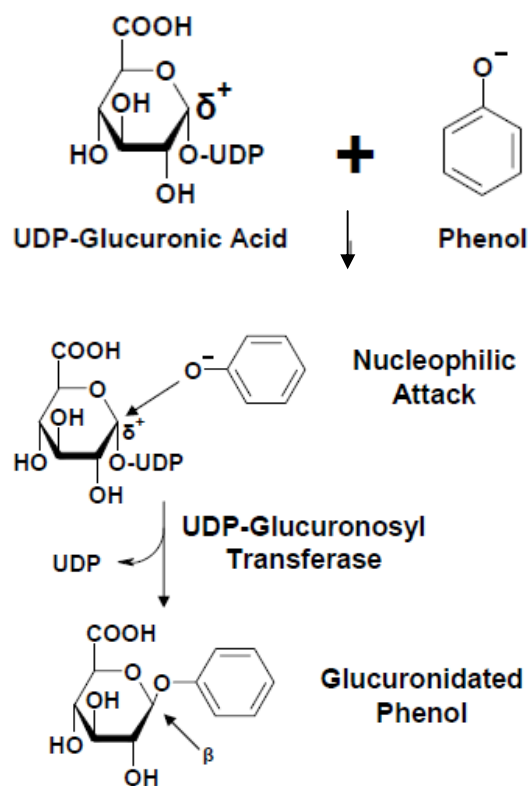


Figuur 2.4: Schema glucuronidatie reactie (Ritter, 2000)

Onderstaande Figuur 2.5 geeft weer hoe glucuronzuur aan een alcoholgroep wordt gekoppeld. Eerst induceert UDP een partieel positieve lading op het koolstofatoom van glucuronzuur. Door deprotonatie van de alcoholgroep is deze in staat een nucleofiele aanval uit te voeren op dit partieel positief koolstofatoom. Vervolgens katalyseert UDP-glucuronosyltransferase de volledige reactie en uiteindelijk wordt UDP afgesplitst en ontstaat een O-glucuronide.

Oorspronkelijk is glucuronzuur in een α -configuratie verbonden met UDP. De overdracht van glucuronzuur naar de alcoholgroep gaat echter gepaard met een inversie van de configuratie, waardoor uiteindelijk β -glucuroniden ontstaan (Jancova et al., 2010).

DON en ZEN vormen conjugaten met glucuronzuur op een analoge manier. Een alcoholfunctie van ZEN of DON ondergaat conjugatie met glucuronzuur waardoor de wateroplosbaarheid toeneemt en de verbinding makkelijk het lichaam verlaat via de urine.



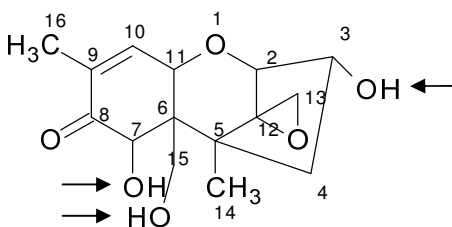
Figuur 2.5: Alcohol glucuronidatie
 (<http://www.tiehh.ttu.edu/mhooper/Docs/Phase%20I%20Metabolism.pdf>)

2.4.1. Glucuronidatie deoxynivalenol

Uit verschillende dierproeven blijkt dat deoxynivalenol-glucuronide (DGU) het voornaamste metaboliet van DON in urine en plasma is (Wu *et al.*, 2007). De vraag is of DGU wel degelijk een detoxificatieproduct van DON is. Aangezien 3-ADON minder toxisch is dan DON, lijkt de hydroxylfunctie op C₃ deels verantwoordelijk te zijn voor de toxiciteit van DON (Eriksen *et al.*, 2004). Wanneer dus deoxynivalenol-3-β-O-D-glucuronide (DGU) gevormd wordt, zou dit theoretisch minder toxisch moeten zijn.

Wu *et al.* (2007) vergeleek de immunotoxiciteit van DON met DGU gebruikmakende van K562-cellen. Om dit te onderzoeken, werd DGU enzymatisch gesynthetiseerd door DON te incuberen met microsomen, afkomstig van rattenlevers, en UDPGA. Nadien analyseerden ze de structuur van het gevormde DGU waaruit ze afleidden dat deoxynivalenol-3-β-O-D-glucuronide gevormd werd en niet het C₇- of C₁₅-glucuronide. Op welke positie een glucuronzuur gekoppeld wordt, hangt voornamelijk af van de specificiteit van de enzymen en de toegankelijkheid van de te glucuronideren positie (zie Figuur 2.6).

De wetenschappers vergeleken de toxiciteit van dit gesynthetiseerde DGU met DON waaruit werd besloten dat glucuronidatie op koolstofatoom 3 een detoxificatieroute is.

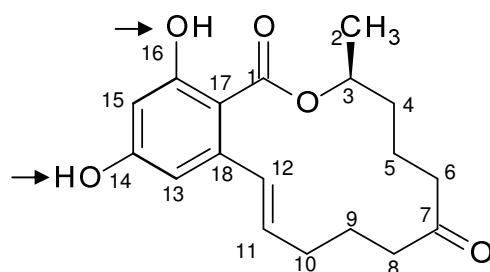


Figuur 2.6: Mogelijke glucuronidatie posities DON

2.4.2. Glucuronidatie zearalenone

Zowel zearalenone als zijn metabolieten kunnen glucuroniden vormen. Het is zelfs mogelijk dat uit ZEN meer dan één monoglucuronide gevormd wordt aangezien het 2 hydroxylgroepen bevat waaraan het glucuronzuur kan binden. Hierdoor kan zowel ZEN-14-*O*-glucuronide als ZEN-16-*O*-glucuronide zich vormen. Glucuronidatie van beide hydroxylfuncties kan ook optreden en geeft aanleiding tot 14-16-ZEN-*O*-diglucuronide (zie Figuur 2.7). Wanneer de ketogroep op C₇ gereduceerd wordt tot een hydroxylfunctie, zoals bij ZEL en ZAL, kan ook deze hydroxylfunctie een aangrijpingspunt vormen voor glucuronidatie (Stevenson *et al.*, 2008).

Pfeiffer *et al.* (2010) onderzochten de verschillende glucuronidaties van ZEN met verschillende soorten UGT's en microsomen afkomstig van allerlei diersoorten zoals runderen, varkens en ratten. Uit hun onderzoek bleek dat glucuronidatie bij voorkeur op de sterisch ongehinderde C₁₄ plaatsvond. Zij toonden ook aan dat het humane UGT1A1 en microsomen afkomstig van de vrouwelijke varkenslever de hoogste hoeveelheid ZEN-14-*O*-glucuronide synthetiseerden. UGT1A1 heeft een goede enzymatische activiteit voor 17β-estradiol wat zijn hoge activiteit voor ZEN kan verklaren.

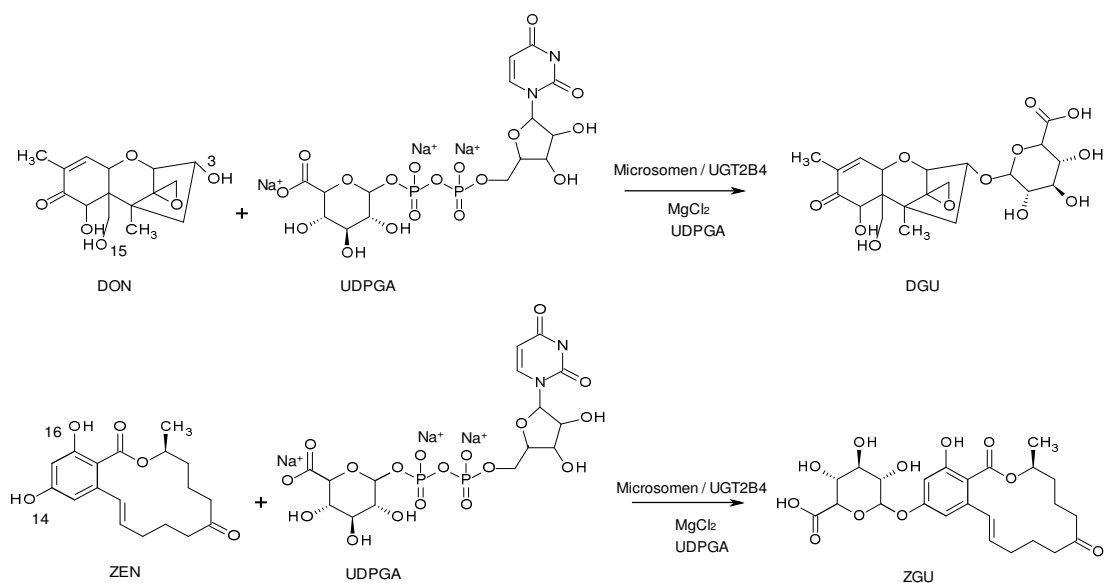


Figuur 2.7: Mogelijke glucuronidatie posities ZEN

2.4.3. Synthèse van DGU en ZGU

Om standaarden van DGU en ZGU te synthetiseren, wordt gebruik gemaakt van de commerciële standaarden DON en ZEN. Door deze afzonderlijk te incuberen met glucuronzuur (UDPGA) en microsomen afkomstig van mannelijke rattenlevers, zouden de glucuroniden DGU en ZGU moeten gevormd worden (zie Figuur 2.8). De gebruikte microsomen zijn een bron van metaboliserende enzymen waaronder UDP-glucuronosyltransferasen. Deze enzymen katalyseren de binding van glucuronzuur aan DON of ZEN. Ter vergelijking wordt de reactie ook uitgevoerd met een specifiek enzym, het humaan UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (UGT2B4). Aan het reactiemengsel wordt ook $MgCl_2$ en UDPAG (uridinedifosfaat-acetylglucosamine) toegevoegd. $MgCl_2$ treedt op als cofactor van de microsomale enzymen en UDPAG beïnvloedt de opname van UDPGA in de microsomen (Bossuyt *et al.*, 1995).

De volledige reactieprocedure is gebaseerd op bestaande informatie uit de literatuur (Wu *et al.*, 2007). Er wordt niet gezocht naar optimale reactiecondities, wel wordt geprobeerd DGU en ZGU te synthetiseren door een kleinere hoeveelheid UDPGA te gebruiken, omwille van de hoge kostprijs.



Figuur 2.8: Synthèse DGU (boven) en ZGU (onder)

2.5. ANALYSE EN ZUIVERING VAN DGU EN ZGU

Om de gevormde reactieproducten DGU en ZGU aan te tonen in het reactiemengsel, wordt gebruik gemaakt van *reversed phase* vloeistofchromatografie gekoppeld aan een *Photodiode Array* (PDA) detector en een massaspectrometer.

2.5.1. *Reversed phase* vloeistofchromatografie

Met behulp van vloeistofchromatografie kunnen componenten in een mengsel gescheiden worden. Nadat het te scheiden mengsel op de kolom gebracht wordt, verdelen de aanwezige moleculen zich tussen de mobiele en stationaire fase. De verschillende analyten zullen een verschillende affiniteit voor de stationaire fase vertonen, waardoor ze op verschillende tijdstippen de kolom verlaten en van elkaar gescheiden worden.

Bij *reversed phase* vloeistofchromatografie bestaat de kolom uit een apolaire stationaire fase. In het kader van deze masterproef wordt een kolom met silica gebruikt die chemisch gemodificeerd is met C₁₈-ketens. De mobiele fase is polair en bevat water met een minder polaire modifier zoals methanol of acetonitril. Indien de mobiele fase gedurende de scheiding constant dezelfde samenstelling heeft, spreekt men van een isocratische scheiding. Het is ook mogelijk dat men de polariteit van de mobiele fase gedurende de scheiding wijzigt door toevoeging van een andere mobiele fase. Door over te schakelen van een zwakker naar een sterker eluens, zullen alle componenten elueren en worden lange retentietijden vermeden. Dit noemt men gradiëntelutie. Wanneer de analyten de kolom verlaten, visualiseert een detector het scheidingsproces in een chromatogram. Dit chromatogram geeft het signaal van de detector in functie van de tijd weer.

Tijdens de analyses wordt zowel *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) als *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) gebruikt. Gedurende deze twee scheidingsprocessen wordt het eluens onder druk gezet. Omdat bij UPLC de stationaire fase uit kleinere deeltjes bestaat dan bij HPLC, zal de mobiele fase meer weerstand ondervinden. Hierdoor wordt bij UPLC gewerkt met een hogere druk op de kolom.

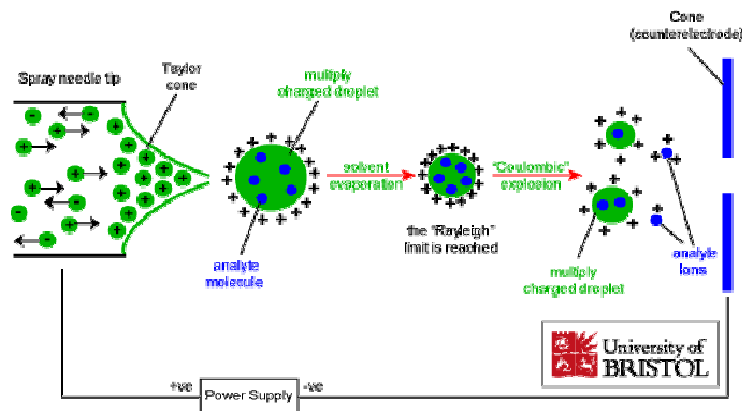
2.5.2. Photodiode array detector

Een PDA detector meet de absorptantie bij verschillende golflengten tegelijkertijd. Wanneer de absorptiemaxima van een component gekend zijn en deze teruggevonden worden in het absorptiespectrum, kan dit een indicatie zijn voor de aanwezigheid van het component. Er is echter één vereiste om dit te kunnen besluiten: de piek moet zuiver zijn en mag dus slechts één product bevatten.

2.5.3. Massaspectrometrische detector

Nadat de componenten van de kolom elueren, kan ook een massaspectrometer ze detecteren. Van deze eluerende moleculen worden eerst ionen gevormd in de ionisatiebron. Nadien is de massaspectrometer in staat deze ionen te scheiden op basis van hun massaladingsverhouding (m/z) waarna ze gedetecteerd worden. Het resulterende massaspectrum geeft de intensiteit van de gevormde ionen in functie van de m/z -waarden weer.

De toegepaste ionisatietechniek is *electrospray* ionisatie (ESI) en deze techniek wordt schematisch weergegeven in Figuur 2.9. Nadat de componenten van de kolom elueren, worden deze via een capillair naar de ionisatiebron geleid. Door een potentiaalverschil tussen deze capillair en de *sample cone* (= ingang MS) aan te leggen, ontstaat er een spray van geladen druppels. Tegelijkertijd wordt een stroom van warme stikstof (het *desolvation* gas) op de spray gericht waardoor het solvent verdampt en er zich kleinere druppeltjes vormen met een grotere ladingsdichtheid. Door Coulombse repulsiekrachten spatten deze druppels nog verder uiteen en uiteindelijk ontstaan naakte, individueel geladen analytioneen in de gasfase (<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>).



Figuur 2.9: Positieve electrospray ionisatie

Naast het *desolvation* gas stroomt er ook stikstof rondom de ionisatiernaald. Deze geeft richting aan de ionenspray en noemt men het *nebuliser* gas. Door het potentiaalverschil tussen de capillair en de *sample cone*, worden de gevormde ionen doorgelaten naar de massaspectrometer.

Na de productie van ionen, is een quadropool in staat deze te scheiden op basis van hun massa-ladingsverhouding. Bij een quadropool in de scan-modus varieert de radiofrequentie op de quadropool continu waardoor ionen met een toenemende m/z gescheiden en doorgelaten worden naar de detector. Nadien registreert de detector de relatieve intensiteit van elk ion. Naast het scannen van alle m/z -waarden, kan een quadropool ook afzonderlijke massa's selecteren en doorlaten naar de detector.

Tijdens dit onderzoek wordt een triple quadropool gebruikt. Deze bestaat uit een eerste quadropool, een *collision cell* waarin fragmentatie kan optreden en een tweede quadropool. We spreken ook wel van tandem massaspectrometrie (MS/MS). Na de selectie van een precursor ion met een bepaalde m/z in de eerste quadropool, kan dit ion in de *collision cell* gefragmenteerd worden tot producties die in de daaropvolgende quadropool geselecteerd worden. Deze methode noemt MRM of *Multiple Reaction Monitoring* en heeft een hogere selectiviteit dan een quadropool in de scan-modus. Het meest abundante en specifieke product dat MRM detecteert, kan gebruikt worden ter kwantificatie, terwijl andere ionen dienen ter bevestiging van de molecule.

3. OBJECTIEVEN

Aangezien mycotoxinen in bepaalde concentraties schadelijk zijn voor zowel dieren als mensen, dient hun concentratie in voedingsmiddelen en veevoeders opgevolgd te worden. Voor de mycotoxinen DON en ZEN bestaan reeds regelgevingen die de concentraties weergeven welke maximaal toelaatbaar zijn in bepaalde voedingsmiddelen en veevoeders. Deze regelgevingen houden enkel rekening met de natieve mycotoxinen. Voedingsmiddelen zijn echter vaak gecontamineerd met zowel het natieve mycotoxine als chemische gemodificeerde mycotoxinen. De laatstgenoemden duidt men aan met de term geconjugeerde mycotoxinen. Het is van belang beide in rekening te brengen tijdens analyses omdat de geconjugeerde vormen tijdens de vertering zich terug kunnen omzetten tot de natieve toxinen en zo aanleiding geven tot schadelijke effecten.

Een andere manier om de blootstelling aan mycotoxinen te meten, is de analyse van mycotoxinen in urinestalen en plasma. Daarom wordt er gezocht naar een geschikte biomarker voor mycotoxine blootstelling. Dit kan zowel het natieve mycotoxine als een metaboliet zijn (voorbeeld: glucuronzuur-derivaat). Na inname is het mogelijk dat mycotoxinen geglucuronideerd worden waarna ze onder deze vorm het lichaam via de urine verlaten. Deze glucuroniden zijn meer polair dan de natieve mycotoxinen, waardoor klassieke analysemethoden ze niet detecteren. Wel is het mogelijk het natieve toxine vrij te stellen van het glucuronide door vooraf het staal te behandelen met het enzym β -glucuronidase. Aangezien de efficiëntie van deze reactie lager dan 100 % kan zijn, is het nog steeds mogelijk dat de hoeveelheid mycotoxinen in de urine onderschat wordt.

Om geconjugeerde mycotoxinen direct te kunnen analyseren en kwantificeren, zijn er referentiestandaarden van deze geconjugeerde mycotoxinen nodig. Van de conjugaten 3-ADON, 15-ADON en D3G zijn reeds standaarden beschikbaar, van DGU en ZGU nog niet. De synthese van deze glucuroniden voor verdere kwantificatie is het hoofddoel van dit onderzoek. Deze standaarden kunnen ook gehanteerd worden ter evaluatie van de toxiciteit van deze metabolieten.

Deze glucuroniden worden gesynthetiseerd door DON of ZEN te incuberen met microsomen afkomstig van mannelijke rattenlevers en glucuronzuur (UDPGA). Deze microsomen zijn een bron van metaboliserende enzymen, waaronder UDP-glucuronosyltransferasen die in staat zijn de binding van glucuronzuur aan DON of ZEN te katalyseren. Ter vergelijking wordt de synthese uitgevoerd met een specifiek transferase, het humaan UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (UGT2B4). Ook wordt onderzocht hoeveel DGU of ZGU gevormd wordt wanneer glucuronzuur (UDPGA) in een lagere hoeveelheid wordt toegevoegd aan het reactiemengsel.

Na de synthese van DGU en ZGU, wordt nagegaan of de correcte reactieproducten gevormd werden. Met behulp van *reversed phase* vloeistofchromatografie worden de componenten die aanwezig zijn in het reactiemengsel van elkaar gescheiden, waarna ze worden opgespoord met een geschikte detector. Er wordt gebruik gemaakt van de Atlantis T3 kolom aangezien deze door het bedrijf Waters wordt aangeraden om polaire componenten te analyseren.

DGU en ZGU vertonen beide UV-absorbantie, waardoor het mogelijk is aan de hand van een absorptiespectrum de aanwezigheid van DGU of ZGU in het reactiemengsel aan te tonen. Met een *photodiode array* (PDA) detector die de absorbantie tussen 200 en 450 nm registreert, wordt het reactiemengsel geanalyseerd. Als extra bevestiging wordt gebruik gemaakt van een massaspectrometer als detector. Na UPLC-MS analyse wordt er een signaal verwacht bij een m/z die 176 massa eenheden groter is dan de m/z van het oorspronkelijke mycotoxine DON of ZEN, wat wijst op glucuronidatie.

Na de reactie van DON of ZEN met UDPGA zijn er nog verschillende andere componenten in het reactiemengsel aanwezig. Daarom worden DGU en ZGU gezuiverd uit het reactiemengsel met behulp van de Atlantis T3 kolom en PDA als detector.

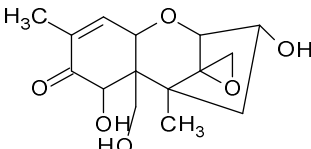
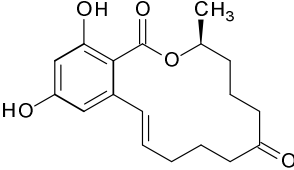
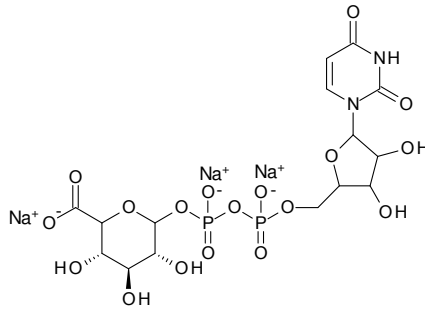
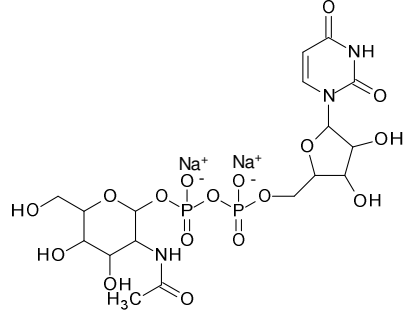
Aangezien de extinctiecoëfficiënt van DGU in methanol gekend is, kan de concentratie opgezuiverd DGU spectrofotometrisch bepaald worden. Als laatste bewijs dat de correcte producten gevormd zijn, worden deze glucuroniden geïncubeerd met het enzym β -glucuronidase. Dit enzym splitst glucuronzuur af waardoor DON en ZEN weer worden vrijgesteld. Ook wordt nagegaan hoe efficiënt deze hydrolyse reactie in serum is.

4. MATERIALEN EN METHODEN

4.1. SYNTHESE VAN DGU EN ZGU

4.1.1. Materialen

Tabel 4.1: Reagentia synthese DGU en ZGU

Product	Structuur	Eigenschappen
Deoxynivalenol DON		Moleculaire massa: 296,32 g/mol
Zearalenone ZEN		Moleculaire massa: 318,36 g/mol
Uridine- 5'- diphosphoglucuronic acid trisodium salt UDPGA		Moleculaire massa: 646,23 g/mol
Uridine- 5'- diphospho-N- acetylglucosamine disodium salt UDPAG		Moleculaire massa: 651,32 g/mol

Gebruikte reagentia:

- DON oplossing, solvent: acetonitril (Biopure, IFA, Tulln, Oostenrijk) – 100 µg/mL
- ZEN oplossing, solvent: acetonitril (Biopure, IFA, Tulln, Oostenrijk) – 100 µg/mL
- UDPGA poeder ≥ 98% (Sigma-Aldrich, Bornem, België) – 250 mg
- UDPAG ≥ 98% (Sigma-Aldrich) – 100 mg
- MgCl₂ anhydrous ≥ 98% (Sigma-Aldrich) – 250 mg
- TRIS BioUltra ≥ 99,8% (Sigma-Aldrich) – 250 g
- Microsomen uit mannelijke rattenlever (Sigma-Aldrich- M9066)- 500 µL/vial
- UDP-glucuronosyltransferase 2B4 Supersomes, humaan recombinant: UGT2B4 (Sigma-Aldrich U3133)- 500 µL/vial
- HCl ACS reagent, 37% (Sigma-Aldrich)
- TRIS-HCL buffer 0,05 M (TRIS: 6,057 g/L, pH regulatie met 0,1 N HCl tot pH 7,4)
- Methanol (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)

Gebruikte toestellen:

- Weegschaal (Precisa 240 A, Zurich, Zwitserland)
- Evaporator: (Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, België)
18823 Reacti-Therm III Heating/Stirring Module
18826 Reacti-Vap Evaporator (27-port)
- Centrifugator (Sigma 1-13 rotor nr. 12034, Osterode am Harz, Duitsland)
- Finnpiptetten (VWR International, Leuven, België)

4.1.2. Methoden

Onderstaande Tabel 4.2 geeft weer hoeveel DON en ZEN gebruikt wordt voor 1 reactie.

Tabel 4.2: Hoeveelheid DON en ZEN nodig voor 1 reactie

	DON	→	DGU
Moleculair gewicht	296,32 g/mol		472,44 g/mol
Hoeveelheid voor 1 reactie	88,90 µg		141,73 µg

	ZEN	→	ZGU
Moleculair gewicht	318,36 g/mol		494,49 g/mol
Hoeveelheid voor 1 reactie	95,51 µg		148,35 µg

Om 0,3 μ M DGU (141,73 μ g) of 0,3 μ M ZGU (148,35 μ g) te verkrijgen uit 1 reactie, zijn volgende hoeveelheden nodig:

1. 0,3 μ M DON (88,90 μ g = 889 μ L) of 0,3 μ M ZEN (95,51 μ g = 955 μ L)
2. 15 μ M UDPGA (9,69 mg) of 1,5 μ M (0,969 mg) in 200 μ L TRIS-HCl buffer
3. 0,25 μ M UDPAG (162,83 μ g) in 100 μ L TRIS-HCl buffer
4. 5 μ M $MgCl_2$ (476,05 μ g) in 100 μ L TRIS-HCl buffer
5. Microsomen (100 μ L ~ 2 mg) of UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (100 μ L)

Er wordt voldoende UDPGA gebruikt om een zo hoog mogelijk rendement te bekomen. De ratio DON of ZEN-UDPGA is 0,3 μ M/15 μ M wat gelijk is aan 1/50. Omdat UDPGA zeer duur is, wordt de reactie ook uitgevoerd in een ratio 1/5 (0,3 μ M/1,5 μ M).

De reactieprocedure verloopt als volgt:

1. Voeg DON of ZEN toe in een eppendorf vial en evaporeer tot droog
2. Voeg UDPAG, $MgCl_2$ en UDPGA toe
3. Verwarm het reactiemengsel (totaal volume 400 μ L) bij 37°C
4. Voeg de microsomen of het transferase toe (totaal volume 500 μ L)
5. Meng en incubeer het reactiemengsel gedurende 90 minuten
6. Beëindig de reactie door toevoeging van 1 mL methanol (totaal volume 1500 μ L)
7. Centrifugeer het reactiemengsel gedurende 10 minuten bij 13000 rpm (revolutions per minute)

Bovenstaande procedure wordt verschillende keren uitgevoerd en nadien worden alle reactiemengsels samengevoegd. Neem hiervan 100 μ L en voeg vervolgens 100 μ L water toe. Dit wordt gebruikt in de analyse met HPLC-PDA en UPLC-MS.

De rest van de reactiemengsels wordt verdampt onder stikstof bij een temperatuur van 40°C. Het residu wordt opgelost in water voor DGU en in 40 % methanol voor ZGU. Dit wordt opgezuiverd met de preparatieve Atlantis T3 kolom. Om aan te tonen dat de reactie specifiek is, worden er ook twee blanco's aangemaakt die alle ingrediënten bevatten zonder UDPGA of microsomen.

4.2. ANALYSE EN ZUIVERING VAN DGU EN ZGU

4.2.1. Materialen

Voor de analyse en zuivering van DGU en ZGU wordt een HPLC-PDA systeem van Waters gebruikt. (Waters Corp., Milford, MA. USA) Het HPLC-PDA systeem bestaat uit:

- Waters 600 Controller
- Waters 717 Plus Autosampler
- Injectiespuit 200 µL
- Atlantis T3 Column, 4.6 x 150 mm, 5µm (analytische kolom)
- Atlantis Prep OBD T3 Column, 10 x 150 mm, 5 µm (preparatieve kolom)
- 2996 photodiode array detector (PDA)
- Software: Empower

Solventen:

- Ammoniumacetaat (Sigma-Aldrich, Bornem, België) buffer 0,01M pH 5,25
- Acetonitril HPLC grade (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)
- Milli-Q water (Millipore SA, Brussel, België)

Voor verdere analyses wordt een LC-MS systeem gehanteerd: Acquity UPLC - Quattro Premier XE (Waters Corp., Milford, MA. USA) bestaande uit:

- Binary solvent manager
- Sample manager
- 50 µL loop
- Column manager
- Acquity UPLC HSS T3 Column, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm
- Mass Spectrometer (MS) Quattro Premier XE (Waters, Zellik, België)
- Software: MassLynx

Solventen:

- Methanol UPLC-MS grade (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)
- Mierenzuur (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)
- Milli-Q water (Millipore SA, Brussel, België)

4.2.2. Methoden

HPLC-PDA condities DON-DGU

Analytische kolom: Atlantis T3 Column, 4.6 x 150 mm, 5µm (injectievolume : 25 µL)

Preparatieve kolom: Atlantis Prep OBD T3 Column, 10 x 150 mm, 5 µm (injectievolume: 200 µL)

Kolom temperatuur: 35°C

Mobiele fase: A: Acetonitril/water (95/5)

B: Ammoniumacetaat buffer 0,01 M pH 5,25/acetonitril (95/5)

Tabel 4.3: Gradiënt voor analyse DON en DGU

Tijd (min)	Debiet (mL/min)		%A	%B
	Analytische kolom	Preparatieve kolom		
0	1	5	0	100
6	1	5	0	100
16	1	5	100	0
18	1	5	100	0
19	1	5	0	100
25	1	5	0	100

PDA: scannen van 200 tot 450 nm

HPLC-PDA condities ZEN-ZGU

Analytische kolom: Atlantis T3 Column, 4.6 x 150 mm, 5µm (injectievolume: 25 µL)

Kolom temperatuur: 35°C

Mobiele fase: A: Acetonitril/water (95/5)

B: Ammoniumacetaat buffer 0,01 M pH 5,25/acetonitril (95/5)

Tabel 4.4: Gradiënt voor analyse ZEN en ZGU

Tijd (min)	Debiet (mL/min)	%A	%B
0	1	0	100
5	1	0	100
20	1	100	0
21	1	100	0
22	1	0	100
27	1	0	100

PDA: scannen van 200 tot 450 nm

UPLC-MS condities

Kolom: Acquity UPLC HSS T3 Column, 2.1 x 150 mm, 1,7 µm (injectievolume: 10 µL)

Kolom temperatuur: 40°C

Mobiele fase: A: 0,1% mierenzuur in water

B: 0,1% mierenzuur in methanol

Tabel 4.5: Gradiënt UPLC-MS

Tijd (min)	Debiet (mL/min)	%A	%B
0	0,4	90	10
8	0,4	90	10
8,5	0,4	65	35
17	0,4	15	85
18	0,4	0	100
18,5	0,4	0	100
19	0,4	90	10
20	0,4	90	10

Tabel 4.6: Parameters MS Scan-mode

Ion mode	ES +	ES -
Start massa	100	100
Einde massa	520 (DGU) – 1000 (ZGU)	520
Scan tijd (sec)	0,20	0,20
Interscan tijd (sec)	0,01	0,01
Start tijd (min)	0	0
Stop tijd (min)	20	20
Cone Voltage (V)	15	30

Tabel 4.7: MS parameters

Capillary, Kv	3	Desolvation temperature, °C	450
Extractor, V	3	Cone gas flow, L/Hr	50
RF lens, V	0,3	Desolvation gas flow, L/Hr	1000
Source temperature, °C	140	Collision gas flow, mL/min	0,15

4.3. β -HYDROLYSE VAN DGU EN ZGU

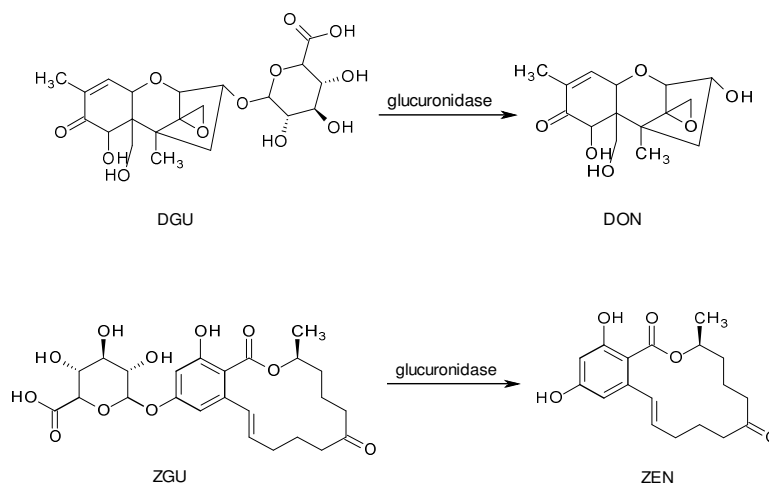
4.3.1. Materialen

Gebruikte reagentia:

- β -Glucuronidase uit de lever van runderen, Type B-1, $\geq 1,000,000$ units/g (Sigma-Aldrich- G0251)
- Natriumacetaat trihydraat buffer $\geq 99\%$ BioXtra (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
- Gesynthetiseerd DGU (231,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ opgelost in methanol: hiervan werd een standaard van 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gemaakt)
- gesynthetiseerd ZGU (2,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ opgelost in methanol)
- Methanol (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)

4.3.2. Methoden

Om na te gaan of de microsomen de vorming van DGU en ZGU katalyseerden en om te bewijzen dat de β -vorm werd gevormd, worden de glucuroniden gehydrolyseerd gebruikmakende van het specifiek enzym β -glucuronidase.



Figuur 4.1: β -hydrolyse DGU en ZGU

Indien de reactie voor 100 % doorgaat, wordt uit 1 µg DGU, met behulp van β-glucuronidase, 0,627 µg DON vrijgesteld. 1 µg ZEN wordt theoretisch omgezet in 0,650 µg ZEN. Voor deze hydrolysereactie zijn onderstaande hoeveelheden nodig:

- 1 µg gesynthetiseerd DGU of 1 µg gesynthetiseerd ZGU
- 5 mg β-glucuronidase opgelost in 250 µL natriumacetaat buffer 0,1 M pH 5 (5000 units / 5 mg)

De hydrolysereactie verloopt als volgt:

1. Neem 1 µg (100 µL) DGU of 1 µg (370 µL) ZGU en evaporeer
2. Voeg 250 µL β-glucuronidase toe
3. Incubeer bij 37 °C gedurende 24 uur
4. Stop de reactie door toevoeging van 750 µL methanol
5. Centrifugeer bij 13 000 rpm gedurende 10 minuten
6. Neem de bovenste laag en injecteer 10 µL in UPLC-MS/MS systeem

Voor DGU verlopen de laatste stappen anders: centrifugeer het reactiemengsel en neem hiervan 950 µL. Verdamp dit onder stikstof en voeg 950 µL 10% methanol toe. Injecteer 10 µL in het UPLC-systeem en analyseer de resultaten. Om de stalen te onderzoeken wordt gebruik gemaakt van de triple quadrupool in MRM-mode. Onderstaande Tabel 4.8 geeft de gebruikte parameters weer.

Tabel 4.8: MRM condities DON, DGU, ZEN en ZGU

Verbinding	Precursor ion	Cone, v	Product ion	Dwell, s	Collision eV
DON	[M+H] ⁺ : 297	20	203	0,025	15
DON	[M+H] ⁺ : 297	20	231	0,025	14
DON	[M+H] ⁺ : 297	20	249	0,025	10
DGU	[M+H] ⁺ : 473	15	297	0,025	15
DGU	[M+NH ₄] ⁺ : 490	15	249	0,025	15
DGU	[M+NH ₄] ⁺ : 490	15	297	0,025	15
ZEN	[M+H] ⁺ : 319	20	187	0,025	22
ZEN	[M+H] ⁺ : 319	20	203	0,025	12
ZGU	[M+H] ⁺ : 495	20	283	0,015	20
ZGU	[M+H] ⁺ : 495	20	319	0,025	10
ZGU	[M+NH ₄] ⁺ : 512	15	319	0,025	15

4.3.3. β -hydrolyse DGU in serum

Naast de β -hydrolyse van DGU in de buffer, wordt ook de β -hydrolyse van DGU in serum onderzocht. Op deze manier kan de blootstelling aan mycotoxinen worden nagegaan. Er wordt gecontroleerd of het serum invloed heeft op de efficiëntie van de hydrolysereactie. De reactieprocedure verloopt als volgt:

1. Neem 1 mL serum (in dit geval serum afkomstig van een kalf)
2. Spike het serum met 0,62 μg DON of 1 μg DGU
3. Voeg hieraan 1 mL methanol en 2 mL acetonitril toe
4. Centrifugeer dit gedurende 10 minuten bij 13000 rpm
5. Neem 3 mL van het supernatans
6. Evaporeer onder stikstof tot droog
7. Voeg hieraan 250 μL β -glucuronidase (zie vorige) toe, meng en incubeer 24 u bij 37°C
8. Stop de reactie door toevoeging van 750 μL methanol
9. Centrifugeer opnieuw en neem 950 μL van het supernatans
10. Verdamp dit tot droog en los dit op in 950 μL 10% methanol
11. Injecteer 10 μL in het UPLC-MS/MS systeem

Door te spiken met 0,62 μg DON of 1 μg DGU zal uiteindelijk 0,47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON of 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DGU in het reactiemengsel aanwezig zijn. Er wordt een standaard DON van 0,47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en een standaard DGU van 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aangemaakt. Als blanco wordt bovenstaande reactieprocedure uitgevoerd zonder toevoeging van β -glucuronidase.

4.4. LYOFILISATIE EN SPECTROFOTOMETRISCHE CONCENTRATIEBEPALING DGU

Na de zuivering van DGU kan de opgezuiverde concentratie spectrofotometrisch bepaald worden aangezien de extinctiecoëfficiënt van DGU in methanol gekend is. Omdat DGU zich na de zuivering in een mengsel van buffer en acetonitril bevindt, wordt eerst het product gedroogd via lyofilisatie. Nadien wordt dit droog product opgelost in methanol en wordt de absorbantie met een spectrofotometer bepaald.

- Lyofylisator: LYOVAY GT2 (Steris, Mentor, Ohio, USA)
- Spectrofotometer: Genesys 6 (Thermo Scientific, Erembodegem, België)

5. RESULTATEN

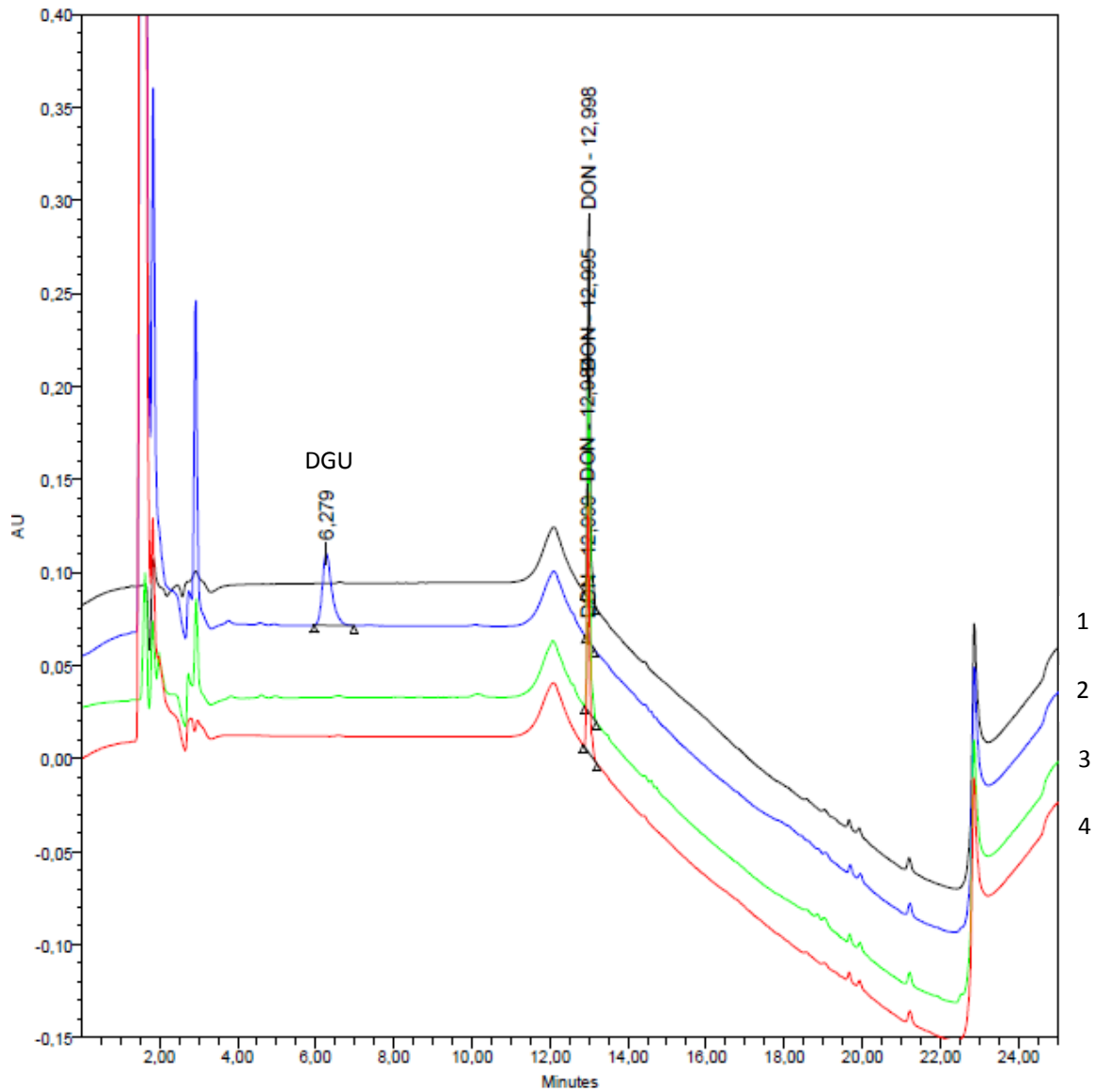
5.1. SYNTHESE DGU

5.1.1. Met behulp van microsomen in ratio 1/50

5.1.1.1. Identificatie DGU met HPLC-PDA

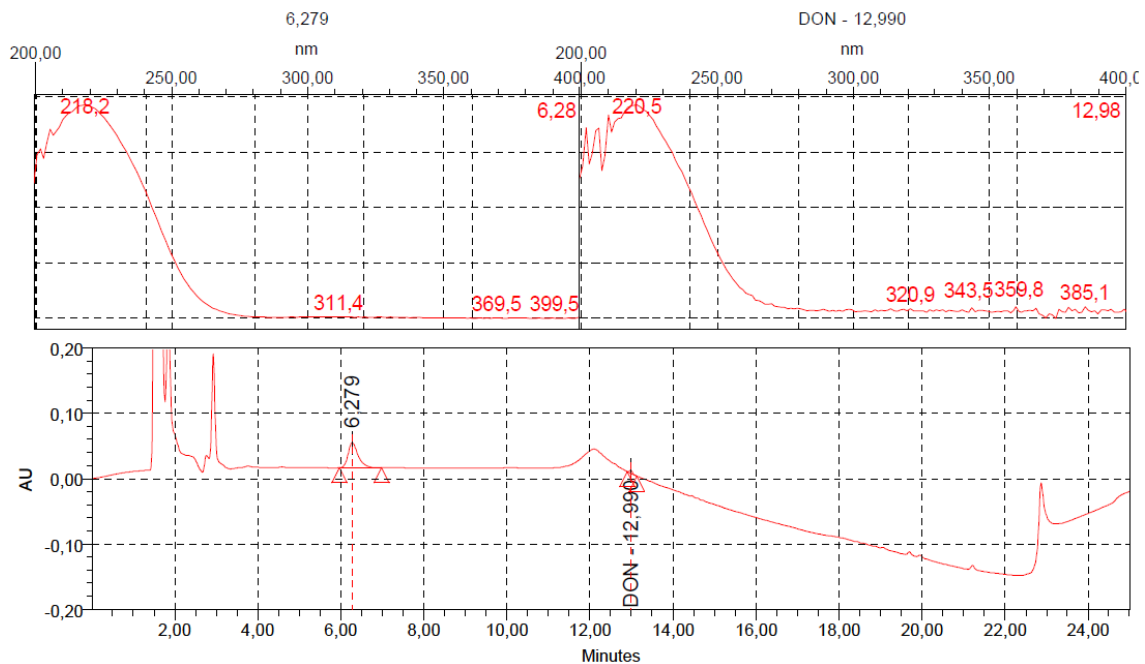
Met behulp van de analytische Atlantis T3 kolom en PDA als detector, die de absorptie tussen 200 en 450 nm registreert, wordt het reactiemengsel geanalyseerd. Om een idee te hebben hoeveel DON er na de reactie overblijft en om na te gaan wanneer DON elueert, wordt een standaard DON van 30 µg/ml geïnjecteerd. De retentietijd (R_t) van DON is 12,99 minuten. Vervolgens worden de twee blanco's, die geen glucuronzuur of microsomen bevatten, geïnjecteerd. Ook hier wordt enkel een signaal van DON verwacht aangezien zonder glucuronzuur of microsomen geen DGU gevormd kan worden. Figuur 5.1 (nr. 1, 3 en 4) geeft de chromatogrammen van de standaard DON en de twee blanco's weer. Bij deze drie is er duidelijk 1 piek waarneembaar na 12,99 minuten, namelijk DON. Er worden ook enkele grote pieken gedetecteerd in het begin van de chromatogrammen. Deze pieken zijn waarschijnlijk reactieproducten zoals UDPGA en UDPAG. Doordat ze zo polair zijn, worden ze niet goed op de kolom vastgehouden en elueren ze zeer snel.

Na injectie van het reactiemengsel zijn in het chromatogram twee pieken zichtbaar (zie Figuur 5.1 nr.2 en Figuur 5.2). Eén grote na 6,279 minuten en één hele kleine na 12,990 minuten. In Figuur 5.2 worden de bijhorende absorptiespectra weergegeven. DGU en DON vertonen een gelijkaardig absorptiespectrum met één absorptiemaximum rond 218 nm en 220 nm. Op basis van deze gegevens is het moeilijk een onderscheid te maken tussen DON en DGU. Wel wordt verwacht dat het glucuronide voor DON zal elueren omdat het meer polair is. De standaard DON bevestigt dat DON na 12,99 minuten elueert. Hieruit wordt besloten dat DGU na 6,279 minuten elueert.



Figuur 5.1: Overzicht chromatogrammen synthese DGU bij 218 nm

1. DON standaard 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2. Reactiemengsel
3. Blanco 1 : reactie zonder glucuronzuur
4. Blanco 2 : reactie zonder microsomen



Figuur 5.2: Chromatogram van het reactiemengsel bij 218 nm (onder) en absorptiespectra DGU - DON (boven)

Met behulp van de standaard DON 30 µg/mL wordt een calibratiecurve opgesteld (één-punts calibratie $y = 31927 x$). Hierbij stelt y de piekoppervlakte van DON voor en x de concentratie DON in µg/mL. Aan de hand van deze vergelijking wordt de concentratie DON bepaald die overblijft na glucuronidatie.

De piekoppervlakte van DON na glucuronidatie bedraagt 19708. Door deze y -waarde in bovenstaande vergelijking in te vullen, bekomen we dat de concentratie DON die overblijft na de reactie 0,617 µg/mL is. Ermee rekening houdend dat voor deze analyse 100 µL van het staal verdund werd met 100 µL water, bedraagt de overblijvende concentratie DON 1,234 µg/mL. Dit is 2,08 % van de totale concentratie DON (59,27 µg/mL) die aan het reactiemengsel werd toegevoegd (zie Tabel 5.1), wat aangeeft dat 97,92 % van de beginconcentratie DON werd omgezet naar DGU.

Tabel 5.1: Reactiegegevens synthese DGU met behulp van microsomen

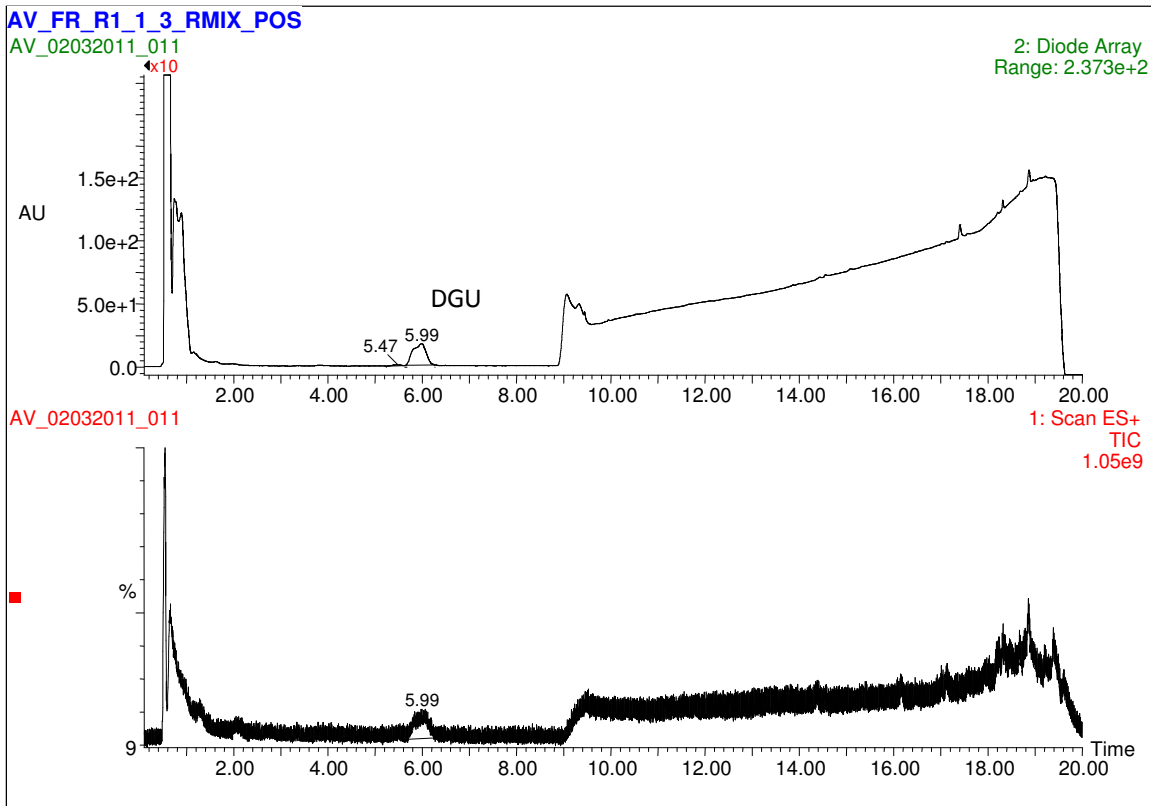
Ratio DON – UDGA	# reacties	Hoeveelheid DON	Volume	[DON] start	Piekoppervlakte DON
1/50	10	889 µg	15 mL	59,27 µg/mL	19708

5.1.1.2. Identificatie DGU met UPLC-PDA-MS

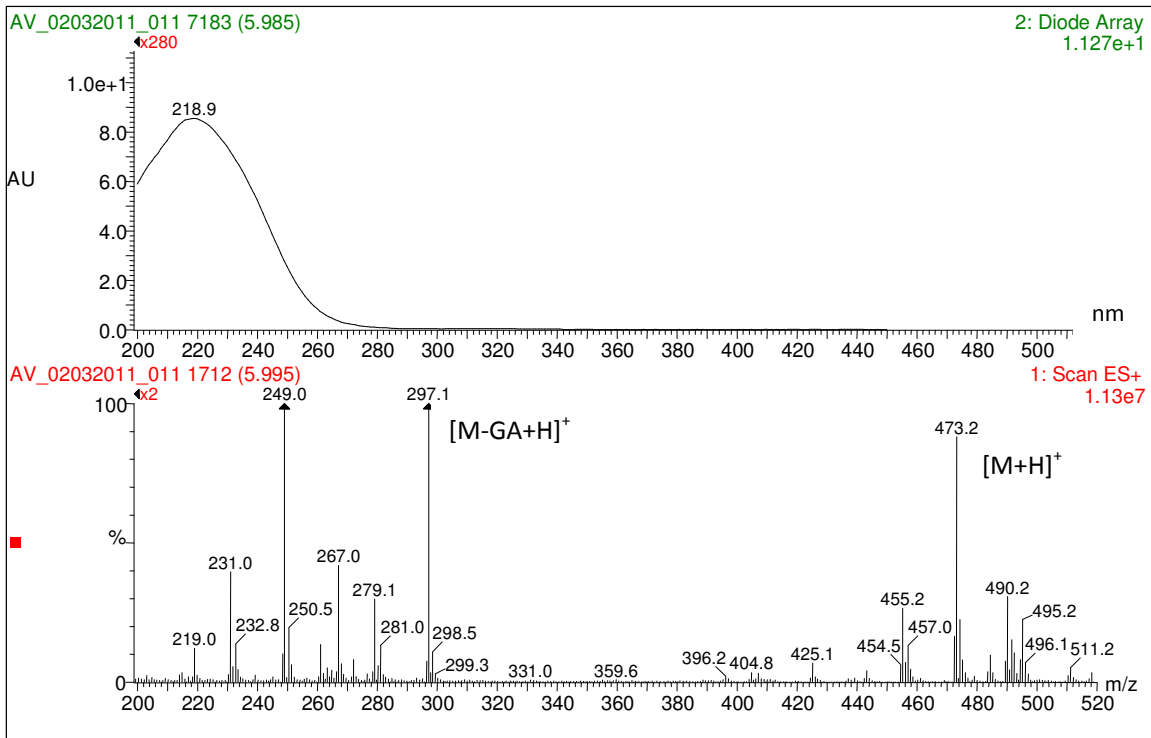
Na de analyse met het HPLC-systeem wordt overgeschakeld op een UPLC-systeem en massaspectrometer als detector. Als extra bevestiging wordt het UPLC-systeem verbonden met een PDA als detector. De massaspectrometer wordt in full-scan modus gebruikt en positieve *electrospray* ionisatie (ESI^+) wordt steeds uitgevoerd. Enkel het reactiemengsel wordt ook in de negatieve mode onderzocht.

Na injectie van de standaard DON 30 $\mu\text{g/mL}$ en de twee blanco's wordt er steeds een piek na 5,47 minuten gedetecteerd. In de bijhorende massaspectra is telkens een signaal zichtbaar bij m/z 297. De mono-isotoop massa van DON bedraagt 296,13 g/mol. Een signaal bij m/z 297 in ESI^+ is dus een indicatie voor DON. De absorptiespectra vertonen een maximum bij 220 nm waaruit kan besloten worden dat DON na 5,47 minuten elueert. ($R_t = 5,47$ min)

Het PDA- en totaal ionenchromatogram (TIC) van het reactiemengsel worden in Figuur 5.3 weergegeven. Een kleine piek na 5,47 minuten en een grotere na 5,99 minuten worden gedetecteerd. Aangezien de standaard DON een retentietijd van 5,47 minuten heeft, kan besloten worden dat het eerste kleine signaal DON is. Dit suggereert dat de tweede piek na 5,99 minuten DGU is. Het bijhorende absorptie- en massaspectrum is geïllustreerd in Figuur 5.4. Het absorptiespectrum vertoont een maximum bij 218,9 nm, wat reeds kan duiden op DGU. Door conjugatie van DON met glucuronzuur, wordt een signaal in het massaspectrum verwacht bij een m/z die 176 massa eenheden groter is dan de m/z van DON. Er wordt dus een signaal bij m/z 473 ($297+176$) verwacht. Dit pseudo-moleculair ion $[M+H]^+$ is duidelijk zichtbaar in het massaspectrum (zie Figuur 5.4). Naast dit signaal zijn er nog twee andere signalen opmerkelijk aanwezig in dit massaspectrum. Deze ontstaan door *in source* fragmentatie van het pseudo-moleculair ion. Door afsplitsing van glucuronzuur $[M-GA+H]^+$ wordt DON vrijgesteld en is er een signaal zichtbaar bij m/z 297. DON kan nog verder fragmenteren waardoor het ion $[M-GA-CH_2O-H_2O+H]^+$ bij m/z 249 gedetecteerd wordt (zie Figuur 5.4). De gegevens uit het absorptie- en massaspectrum bevestigen dat DON eerst elueert en vervolgens DGU. Na negatieve ionisatie is er in het massaspectrum een signaal bij m/z 471 zichtbaar waaruit kan besloten worden dat DGU wel degelijk werd aangemaakt.



Figuur 5.3: PDA-chromatogram (boven) en totaal ionenchromatogram TIC (onder) van het reactiemengsel



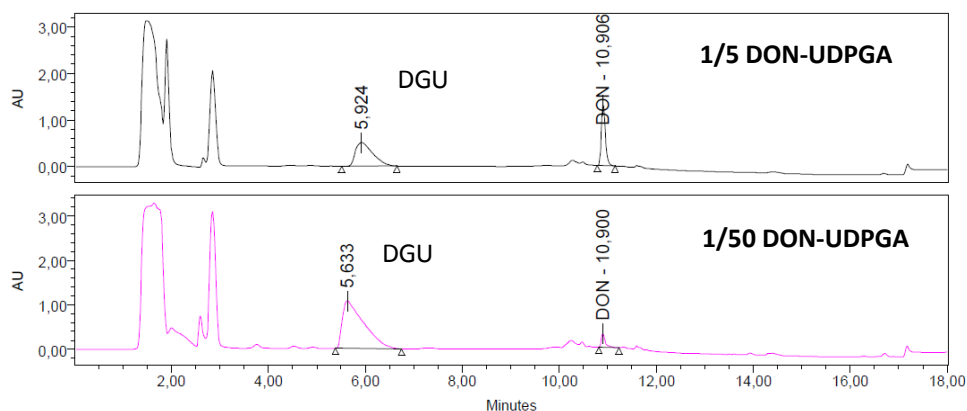
Figuur 5.4: Absorptiespectrum (boven) en massaspectrum (onder) van DGU

5.1.1.3. Opzuivering DGU

Na deze dubbele bevestiging, wordt DGU opgezuiverd met behulp van het HPLC-systeem en de preparatieve Atlantis T3 kolom. Elke DGU-piek wordt gecollecteerd.

5.1.2. Met behulp van microsomen in ratio 1/5

Gezien de hoge kostprijs van UDPGA, wordt nagegaan hoeveel DGU gevormd wordt wanneer een lagere hoeveelheid glucuronzuur gebruikt wordt. Opnieuw wordt DGU gesynthetiseerd, maar nu wordt DON geïncubeerd met UDPGA in een verhouding van 1/5. De reactie wordt 4 maal uitgevoerd en nadien worden alle reactiemengsels samengevoegd. Dit geheel wordt geëvaporeerd en opgelost in 800 μL water. Om te vergelijken wordt ook DGU aangemaakt in een verhouding 1/50 DON-UDPGA. Deze reactie wordt 7 keer uitgevoerd. Beide stalen worden geanalyseerd en gezuiverd met HPLC-PDA.



Figuur 5.5: Chromatogram reactiemengsel 1/5 (boven) en 1/50 DON-UDPGA (onder)

Wanneer beide chromatogrammen vergeleken worden (zie Figuur 5.5), is op het eerste zicht al duidelijk dat bij een ratio 1/5 minder DGU gevormd wordt en meer DON overblijft. Aan de hand van een standaard DON, die 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bevat, wordt berekend hoeveel DON van de toegevoegde beginconcentratie overblijft en hoeveel DGU gevormd wordt. Onderstaande Tabel 5.2 vat de resultaten samen.

Tabel 5.2: Vergelijking ratio 1/5 en 1/50 DON-UDPGA

Ratio	# reacties	Hoeveelheid DON	Volume	[DON] start	[DON] in 800 μL	[DON] na	% DON na	% DGU gevormd
1/50	7	622,3 μg	10,5 mL	59,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$	778 $\mu\text{g}/\text{mL}$	29 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3,7	96,3
1/5	4	355,6 μg	6 mL	59,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$	444,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	130 $\mu\text{g}/\text{mL}$	29,2	70,8

5.1.3 Met behulp van UGT2B4

Analoog aan de synthese van DGU met behulp van microsomen, wordt DGU ook gesynthetiseerd met behulp van een specifiek transferase, namelijk het UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (UGT2B4). De reactie wordt zowel in een ratio 1/50 DON-UDPGA als een ratio 1/5 DON-UDPGA uitgevoerd. Nadien worden de stalen geanalyseerd met UPLC-MS. Na analyse van de chromatogrammen en massaspectra wordt geconcludeerd dat geen DGU gevormd werd met behulp van dit specifiek UGT2B4 transferase.

5.1.4. Spectrofotometrische concentratiebepaling DGU

Aangezien de extinctiecoëfficiënt van DGU in methanol gekend is (*Wu et al., 2007*), kan de concentratie van het opgezuiverd DGU spectrofotometrisch bepaald worden door onderstaande formule toe te passen. Na opzuivering is DGU aanwezig in een mengsel van water en acetonitril en niet in methanol. Om DGU in methanol te verkrijgen, wordt het gezuiverd DGU gevriesdroogd waarna het droog product opgelost wordt in 7,1 mL methanol. Hiervan wordt de absorbantie bij 220 nm bepaald aangezien bij deze golflengte de extinctiecoëfficiënt van DGU gekend is (4715,7 L/mol*cm). De gemiddelde absorbantie na drie metingen bedraagt 2,310. Wanneer alle factoren in onderstaande vergelijking worden ingevuld, bedraagt de concentratie DGU 231,4 µg/mL, wat gelijk is aan 1,643 mg DGU in 7,1 mL. In totaal werd dus 1,643 mg DGU opgezuiverd.

$$C = \frac{A * M * f * 1000}{\epsilon * d}$$

Waarin:

C: concentratie DGU (mg/L = µg/mL)

A: absorbantie bij 220 nm (2,310)

M: moleculaire massa DGU (472,44 g/mol)

f: verdunningsfactor (1)

1000: coëfficiënt voor omrekening g naar mg

ε: molaire extinctiecoëfficiënt (4715,7 L/mol*cm)

d: optische weglengte (1 cm)

Wanneer echter de zuiverheid van DGU na vriesdroging onderzocht wordt met UPLC-MS, zijn nog enkele onzuiverheden zichtbaar. Er wordt besloten DGU een tweede keer op te zuiveren. Spectrofotometrisch wordt bepaald dat na deze tweede zuivering nog 0,994 mg DGU overblijft. Door deze tweede zuivering ging veel DGU verloren.

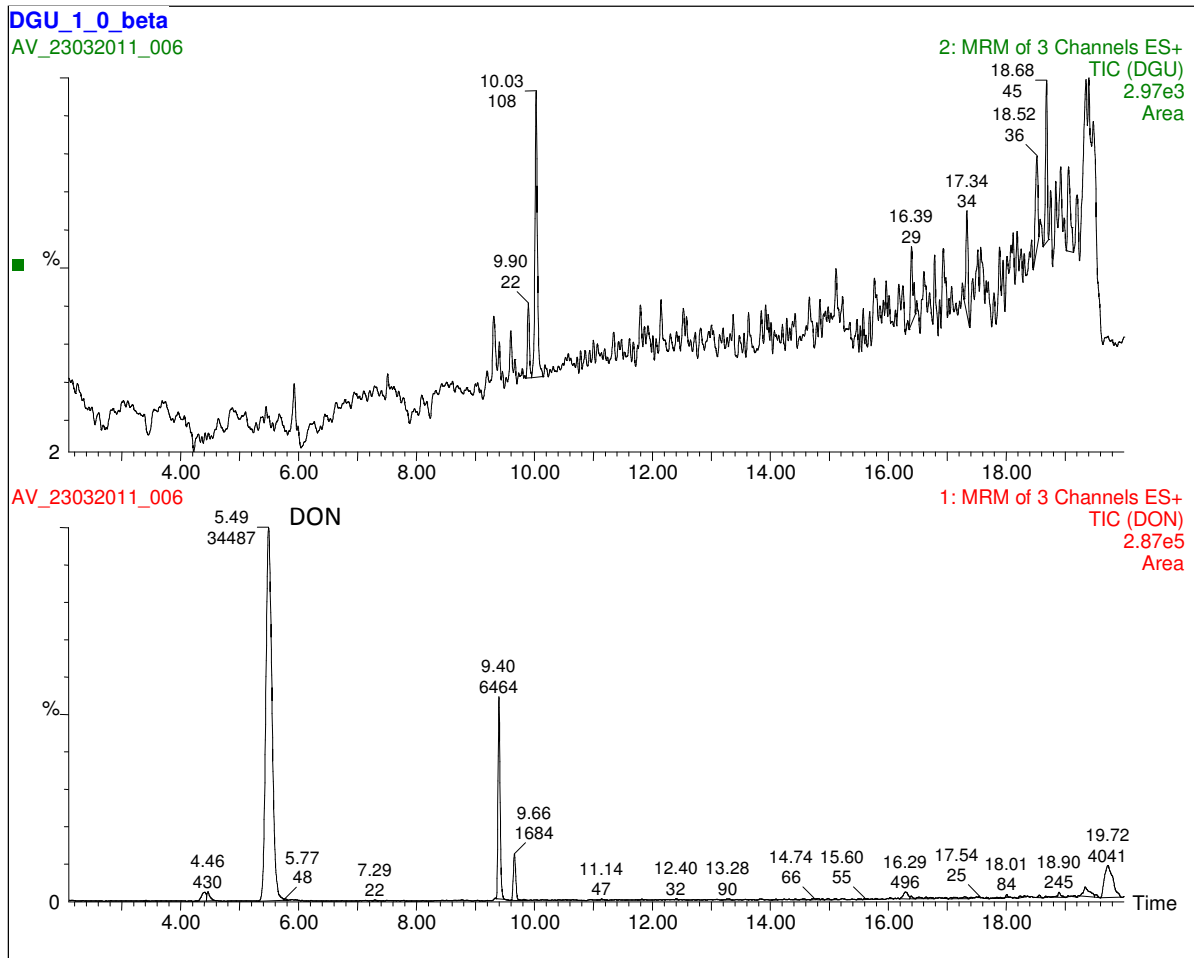
5.1.5. β -hydrolyse DGU

Na β -hydrolyse moet 1 μg DGU aanleiding geven tot 0,627 μg DON indien de hydrolyse voor 100 % doorgaat. Dit wordt onderzocht door 1 μg DGU te incuberen met het enzym β -glucuronidase. De stalen worden geanalyseerd met UPLC-MS/MS en de detector wordt in MRM-modus gebruikt om te kwantificeren hoeveel DON er na de hydrolyse reactie wordt vrijgesteld. Om matrixeffecten na te gaan, wordt ook de standaard DON met het enzym β -glucuronidase geïncubeerd. Tabel 5.3 vat alle chromatografische gegevens samen.

Tabel 5.3: Chromatografische gegevens β -hydrolyse DGU

	Retentietijd DON (minuten)	Retentietijd DGU (minuten)	Piekoppervlakte 297>249	[DON] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
DON 0,627 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5,47	-	29886	0,627
DGU 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	5,97	-	-
DON 0,627 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + β-glucuronidase	5,51	-	27268	0,627
DGU 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + β-glucuronidase	5,49	-	16938	?

DGU heeft een R_t van 5,97 minuten (zie Tabel 5.3), maar na incubatie van DGU met β -glucuronidase wordt in het totaal ionenchromatogram (TIC) van DGU dit signaal niet meer teruggevonden (zie Figuur 5.6 boven). In het TIC van DON daarentegen is wel een signaal na 5,49 minuten zichtbaar (zie Figuur 5.6 onder). Hiermee wordt aangetoond dat wel degelijk DGU werd aangemaakt en dat al deze glucuroniden via hydrolyse werden omgezet naar DON.



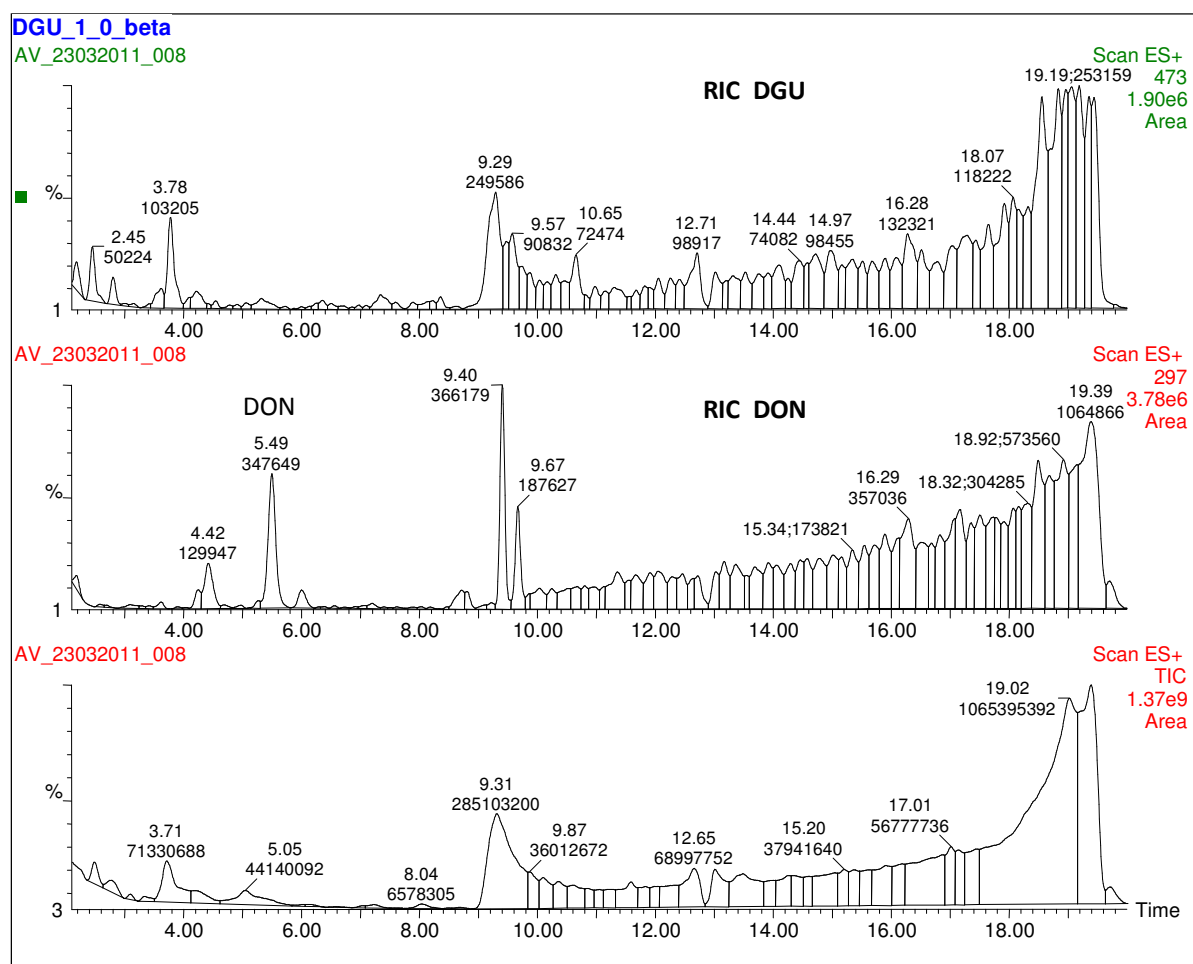
Figuur 5.6: TIC's van DGU (boven) en DON (onder) na β -hydrolyse van DGU

Om de hoeveelheid vrijgesteld DON te kwantificeren, wordt gebruik gemaakt van het meest abundante en specifieke fragment ion van DON bij m/z 249 (= quantifier). Bij de standaard DON 0,627 $\mu\text{g/ml}$, die geïncubeerd werd met β -glucuronidase, bedraagt de piekoppervlakte van dit fragment 27268. Na β -hydrolyse van DGU bedraagt de piekoppervlakte van de quantifier 16938 (zie Tabel 5.3). Met behulp van deze waarden kan de hoeveelheid DON, die door β -hydrolyse wordt vrijgesteld, gekwantificeerd worden. De berekeningen zijn als volgt:

$$0,627 \mu\text{g/mL} : (27268 : 16938) = 0,389 \mu\text{g/mL DON}$$

Er wordt verwacht dat 0,627 μg DON vrijgesteld wordt uit 1 μg DGU, maar er wordt slechts 0,389 μg DON gedetecteerd. Dit stemt overeen met een omzetting van 62 %. Toch bedraagt de efficiëntie van de hydrolyse 100 % aangezien geen DGU meer gedetecteerd wordt.

Om extra aan te tonen dat geen DGU meer overblijft na de hydrolyse, wordt het reactiemengsel ook in de scan-modus onderzocht. In het TIC (zie Figuur 5.7 onderaan) wordt geen signaal gedetecteerd bij R_t 5,51 min (DON) of R_t 5,97 min (DGU). Om aan selectiviteit te winnen, wordt het pseudo-moleculair ion van DON (m/z 297) en DGU (m/z 473) in een *reconstructed ion chromatogram* (RIC) geplot (Figuur 5.7). Het RIC van DGU geeft geen signaal na 5,97 minuten waaruit wordt besloten dat geen DGU meer aanwezig is. Het RIC van DON daarentegen vertoont een signaal na 5,49 minuten.



Figuur 5.7: TIC en RIC na β -hydrolyse van DGU

5.1.6. β -hydrolyse DGU in serum

Uit 0,75 μg DGU zou na β -hydrolyse 0,47 μg DON moeten vrijgesteld worden indien de hydrolysereactie efficiënt is. Na UPLC-MS/MS analyse van het serum, dat gespiket werd met DGU (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en geïncubeerd werd met β -glucuronidase, wordt er zowel een signaal van DON als van DGU gedetecteerd. Aangezien nog DGU teruggevonden wordt, is de hydrolysereactie niet voor 100 % doorgegaan. De hoeveelheid DGU die overblijft en de hoeveelheid DON die vrijgesteld wordt na β -hydrolyse worden berekend. Onderstaande Tabel 5.4 geeft de resultaten weer.

Tabel 5.4: Resultaten β -hydrolyse DGU in serum

	Piekoppervlakte 490>297	[DGU] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Serum + DGU 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2269	0,75
Serum + DGU 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + β-glucuronidase	2199	0,73

	Piekoppervlakte 297>249	[DON] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Serum + DON 0,47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + β-glucuronidase	24996	0,47
Serum + DGU 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + β-glucuronidase	696	0,013

Na β -hydrolyse van DGU blijft nog 0,73 μg DGU over en wordt slechts 0,013 μg DON vrijgesteld (zie Tabel 5.4). De hydrolyse geeft dus aanleiding tot 2,8 % DON en 97 % DGU is niet gehydrolyseerd.

5.2. SYNTHESE ZGU

5.2.1. Met behulp van microsomen ratio 1/50

5.2.1.1. Identificatie ZGU met HPLC-PDA

De synthese van ZGU verloopt op dezelfde manier als de synthese van DGU, enkel verschilt de incubatietijd. 3 reacties worden uitgevoerd dewelke gestopt worden na 3, 4 en 5 uur incubatie om te vergelijken welke reactie het meeste ZGU opbrengt. Steeds wordt 100 µL van elk reactiemengsel genomen en verdund met 100 µL water. Dit wordt geanalyseerd met behulp van de analytische Atlantis T3 kolom en PDA als detector, die de absorptie tussen 200 en 450 nm registreert. Ook een standaard van 30 µg/mL ZEN wordt geïnjecteerd. Op basis van de drie typische absorptiemaxima van ZEN (zie Tabel 5.5) wordt ZEN in de reactiemengsels opgespoord.

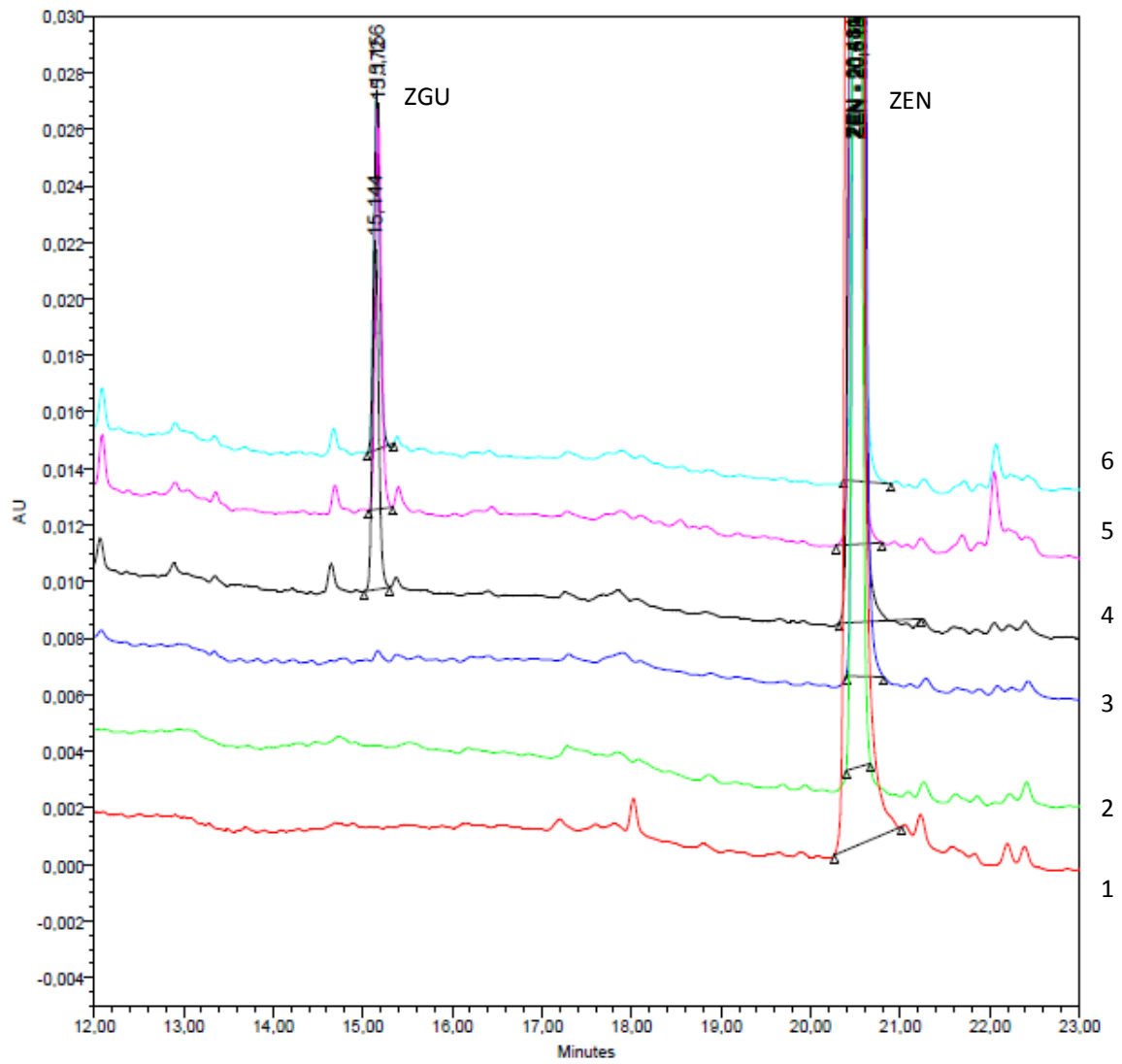
Tabel 5.5: Absorptiemaxima ZEN (Pfeiffer et al., 2010)

Verbinding	UV maxima (nm)
ZEN	236, 274, 314

Tabel 5.6: Reactiegegevens synthese ZGU met behulp van microsomen

Ratio ZEN- UDPGA	# reacties	Hoeveelheid ZEN	Volume	[ZEN] start	100 µL reactiemengsel + 100 µL water
1/50	1	95,51 µg	1,5 mL	63,67 µg/mL	31,84 µg/mL

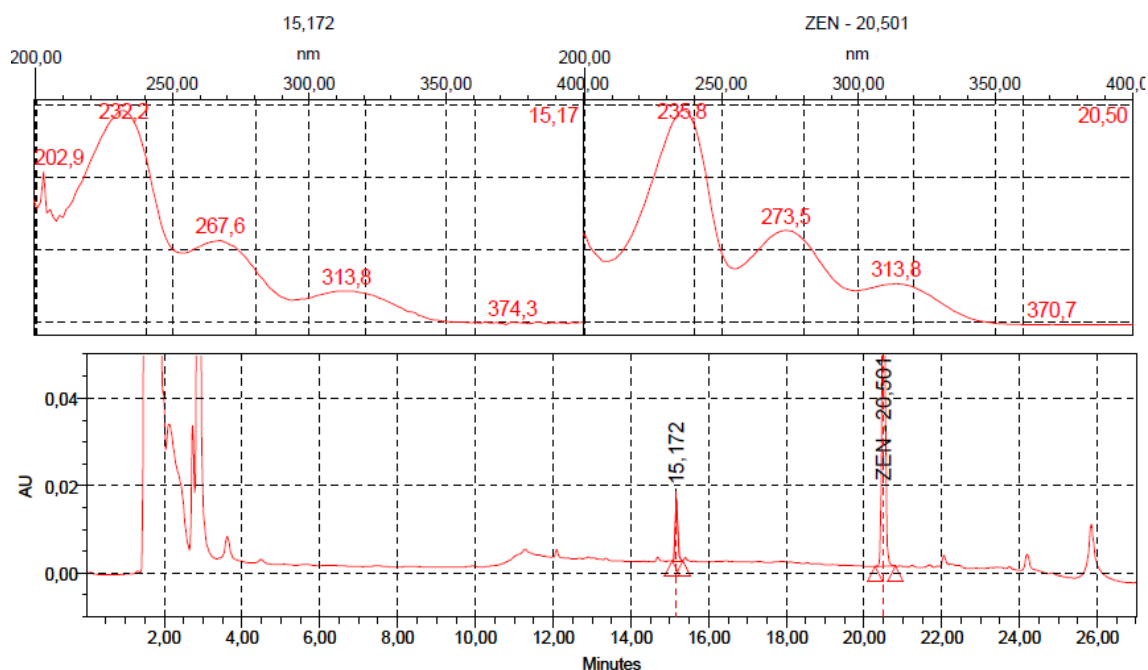
Vooreerst worden de standaard ZEN (30 µg/mL) en de 2 blanco's geïnjecteerd. De verkregen chromatogrammen (zie Figuur 5.8 nr. 1, 2 en 3) vertonen duidelijk slechts één signaal na 20,5 minuten. Wanneer de bijhorende absorptiespectra onderzocht worden, kan besloten worden dat deze piek ZEN is aangezien de drie typische absorptiemaxima (236, 274, en 314 nm) zichtbaar zijn. De blanco's geven aan dat slechts 2,047 µg/mL ZEN overblijft, terwijl verwacht wordt dat ZEN (31,84 µg/mL: zie bovenstaande Tabel 5.6) niet wegreageert. ZEN is lichtgevoelig en wordt waarschijnlijk omgezet. Hierdoor is het moeilijk de efficiëntie van de glucuronidatie na te gaan.



Figuur 5.8: Overzicht chromatogrammen synthese ZGU bij 235 nm

1. ZEN standaard 30 µg/mL
2. Blanco 1: reactie zonder microsomen
3. Blanco 2: reactie zonder UDPGA
4. Reactiemengsel na 3 uur incubatie
5. Reactiemengsel na 4 uur incubatie
6. Reactiemengsel na 5 uur incubatie

Wanneer ZEN geïncubeerd wordt met microsomen in de aanwezigheid van UDPGA en dit geanalyseerd wordt met *reversed phase* HPLC, wordt er een product dat meer polair is dan ZEN gedetecteerd na 15,172 minuten (zie Figuur 5.8 nr. 4, 5 en 6 en Figuur 5.9). Dit signaal wordt niet teruggevonden bij de blanco's. Het absorptiespectrum dat bij deze eerste piek hoort ($R_t = 15,172$ min), heeft als maxima 232, 268 en 314 nm (zie Figuur 5.9). Ter controle wordt ook het absorptiespectrum van ZEN onderzocht (zie Figuur 5.9). De maxima 236, 274 en 314 nm bevestigen dat het tweede signaal ($R_t = 20,5$ min) ZEN is. Het eerste signaal ($R_t = 15,172$ min) is dus ZGU aangezien het net zoals ZEN drie typische absorptiemaxima vertoont.



Figuur 5.9: Chromatogram van het reactiemengsel bij 235 nm (onder) en absorptiespectra ZGU en ZEN (boven)

Onderstaande Tabel 5.7 geeft de oppervlakten van de bekomen ZGU-pieken na 3, 4 en 5 uur incubatie weer. Hieruit kan afgeleid worden dat de ZGU oppervlakte het hoogste is na 4 uur incubatie. Er kan geen concreet besluit genomen worden omdat de reactie slechts eenmaal werd uitgevoerd. Herhaling is noodzakelijk om te kunnen concluderen dat na vier uur incubatie de grootste hoeveelheid ZGU gevormd wordt.

Tabel 5.7: Piekoppervlakte ZGU

	Oppervlakte ZGU
Na 3 uur	57936
Na 4 uur	66848
Na 5 uur	59031

Zoals reeds eerder vermeld, wordt ZEN waarschijnlijk tijdens de reactie omgezet tot andere metabolieten. De PDA is niet in staat deze te detecteren omdat ze in een te lage concentratie gevormd worden. Met behulp van de standaard ZEN 30 µg/mL wordt geschat dat de drie reacties samen (na 3, 4 en 5 uur incubatie) aanleiding geven tot de vorming van 2,7 µg ZGU.

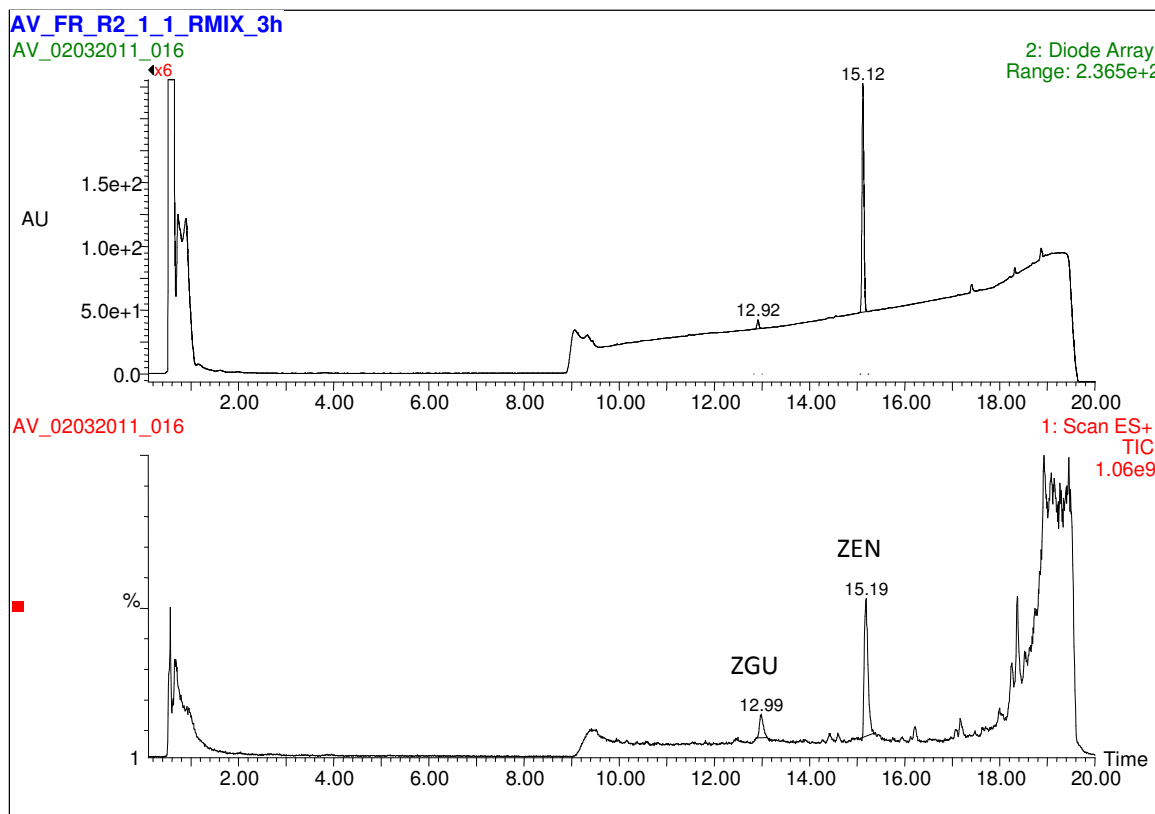
5.2.1.2. Identificatie ZGU met UPLC-PDA-MS

Na de analyse met het HPLC-systeem, wordt overgeschakeld op een UPLC-systeem en massaspectrometer als detector. De massaspectrometer wordt in full-scan modus gebruikt en positieve *electrospray* ionisatie (ESI⁺) wordt steeds uitgevoerd. Enkel de reactiemengsels wordt ook in de negatieve mode onderzocht.

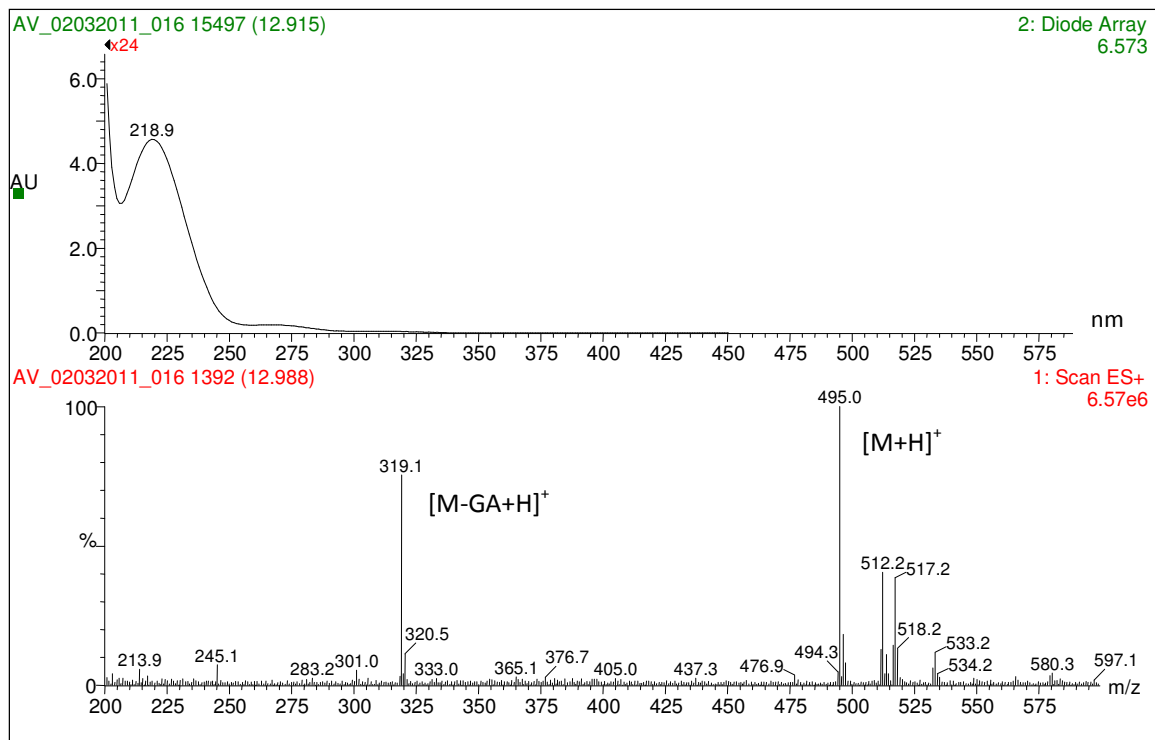
De standaard ZEN en de twee blanco's geven een signaal na 15,19 minuten. De bijhorende massaspectra tonen een piek bij m/z 319. Aangezien de mono-isotoop massa van ZEN 318,15 g/mol is, wordt besloten dat ZEN na 15,19 minuten elueert. ($R_t = 15,19$ min)

Wanneer het TIC van de reactiemengsels bestudeerd wordt (zie Figuur 5.10), zijn niet één maar twee pieken zichtbaar. Eén na 12,99 minuten en één na 15,19 minuten. De standaard ZEN elueerde na 15,19 minuten waardoor kan besloten worden dat de tweede piek ZEN is. Het eerste signaal na 12,99 minuten zou dus ZGU moeten zijn. Om dit na te gaan wordt het massaspectrum van deze piek onderzocht (zie Figuur 5.11 onder). Een duidelijke signaal is zichtbaar bij m/z 495. ZGU heeft een mono-isotoop massa van 494,18 g/mol en zodus is een signaal bij m/z 495 een indicatie voor het pseudo-moleculair ion $[M+H]^+$ van ZGU. Het spectrum toont ook aan dat dit ion verder fragmenteert, waardoor het $[M-GA+H]^+$ ion bij m/z 319 gedetecteerd wordt.

Na negatieve ionisatie is er in het massaspectrum een signaal bij m/z 493 zichtbaar. Hieruit kan geconcludeerd worden dat wel degelijk ZGU gevormd werd.



Figuur 5.10: PDA-chromatogram (boven) en totaal ionenchromatogram TIC (onder) van het reactiemengsel

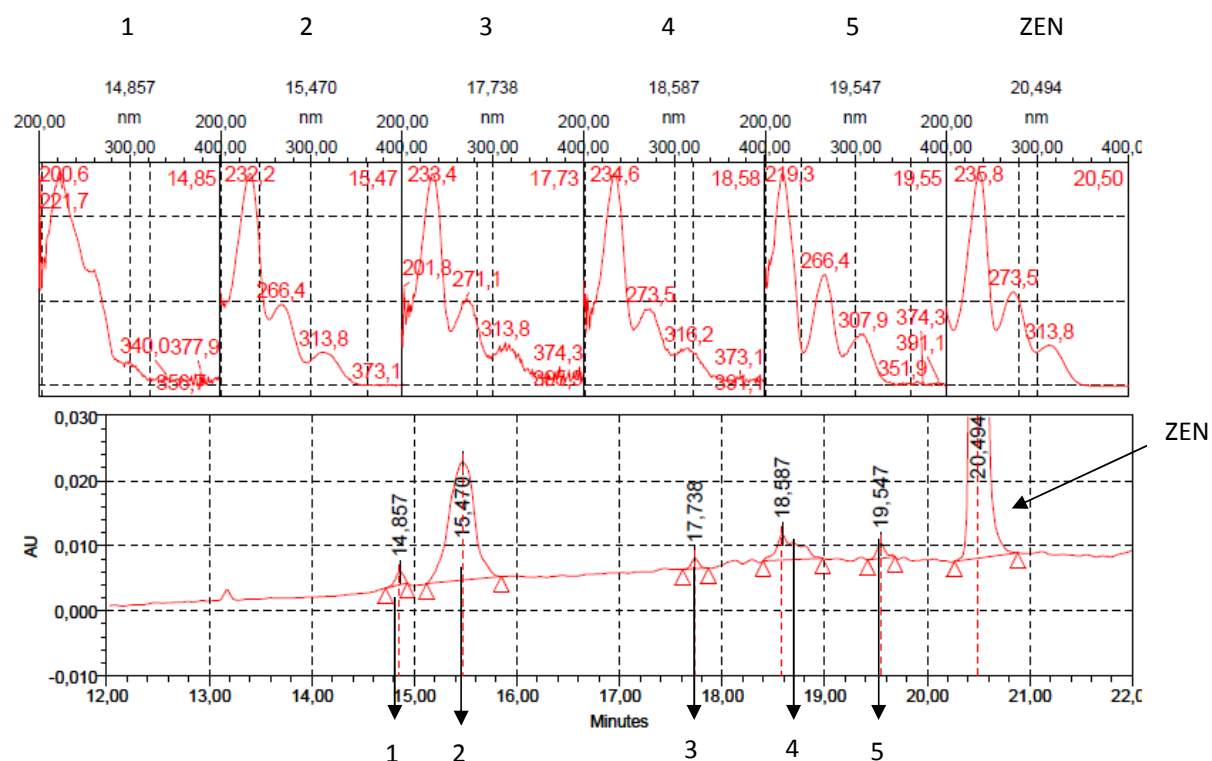


Figuur 5.11: Absorptiespectrum (boven) en massaspectrum (onder) van ZGU

5.2.1.3. Opzuivering ZGU

ZGU wordt gezuiverd uit het reactiemengsel met het HPLC-systeem en de analytische Atlantis T3 kolom. De reactiemengsels (na 3, 4 en 5 uur incubatie) worden samengevoegd, geëvaporeerd en opgelost in 40 % methanol. Er wordt steeds 200 µL op de kolom geïnjecteerd en elke ZGU-piek wordt gecollecteerd.

Figuur 5.12 illustreert het chromatogram dat bekomen wordt tijdens de opzuivering. Merkwaardig genoeg worden buiten de retentiepieken van ZGU (nr. 2) en ZEN nog vier andere kleine pieken (nr. 1, 3, 4 en 5) waargenomen die vooraf niet zichtbaar waren. Deze vier pieken worden nu pas gedetecteerd omdat het reactiemengsel nu meer geconcentreerd is.

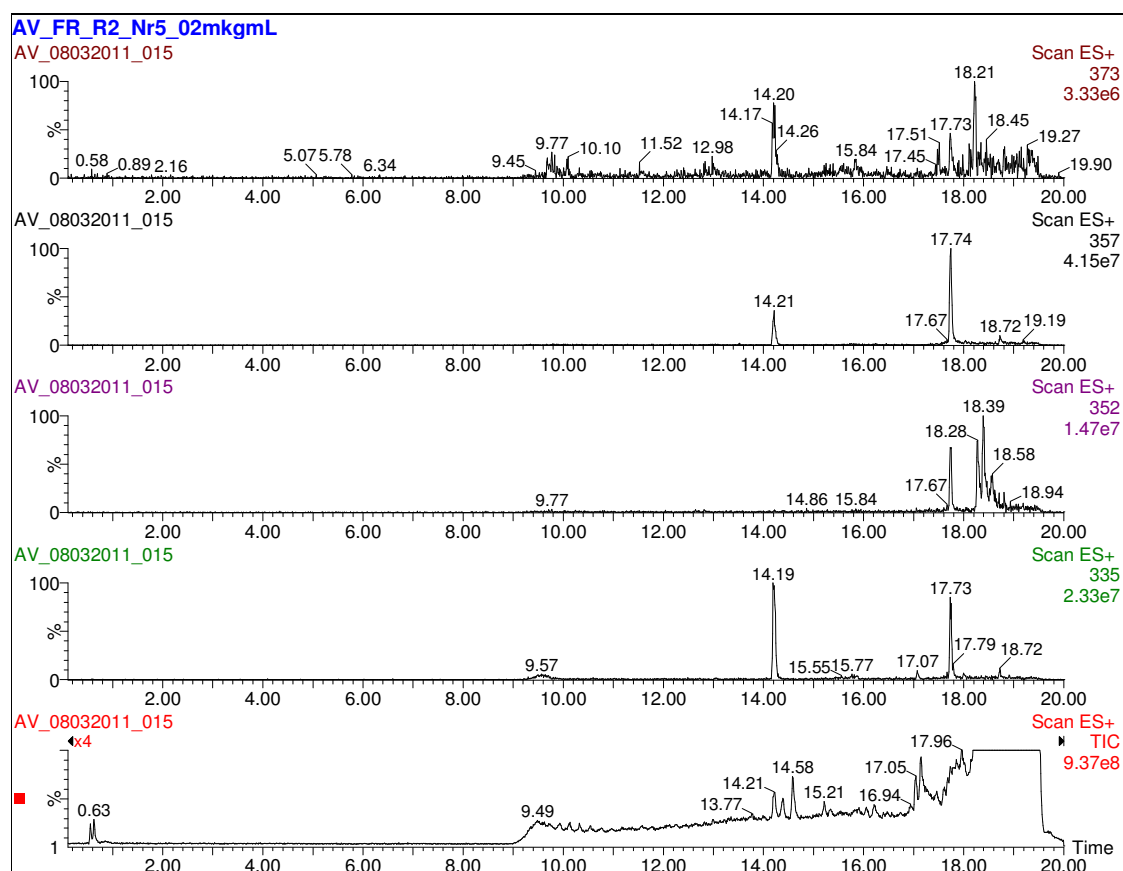


Figuur 5.12: Chromatogram reactiemengsel ZGU bij 235 nm tijdens opzuivering (onder) en absorptiespectra van de verschillende pieken (boven).

De vraag kan gesteld worden of deze componenten onzuiverheden zijn of andere reactieproducten die uit ZEN gevormd werden. Het is namelijk zo dat zearalenone 2 hydroxylfuncties heeft waaraan glucuronzuur gekoppeld kan worden. Hierdoor is het mogelijk dat zowel ZEN-14-O-glucuronide als ZEN-16-O-glucuronide gevormd worden.

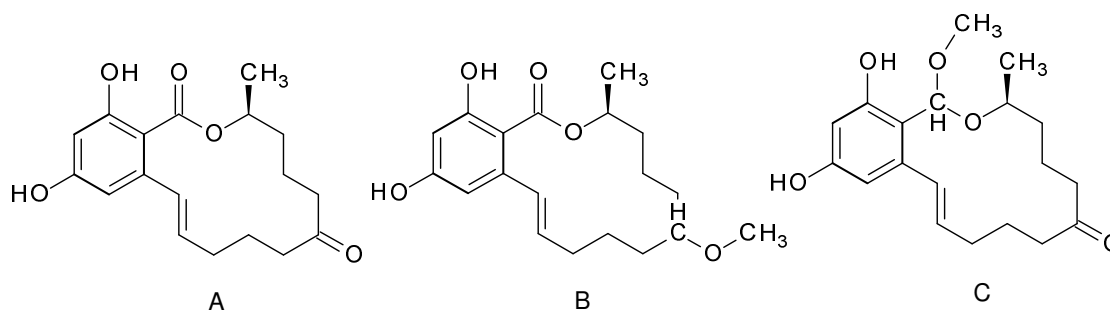
Pfeiffer et al. (2010) toonden aan dat, na incubatie van ZEN met microsomen, glucuronidatie bij voorkeur op de sterisch ongehinderde 14-hydroxylgroep plaats vind. Omdat de tweede piek in het chromatogram (zie Figuur 5.12, $R_t = 15,47$ min) de hoogste intensiteit heeft, zal dit ZEN-14-*O*-glucuronide zijn. Ook reductieproducten van ZEN zoals ZEL, ZAL en ZAN zouden glucuroniden kunnen vormen. Om verder te onderzoeken wat deze vier andere pieken representeren, worden buiten piek 2 ook de andere pieken afzonderlijk gecollecteerd. Na UPLC-MS analyse in de scan-modus kunnen enkel piek 1, 2 en 5 geïdentificeerd worden omdat de concentratie van de andere pieken te laag was om te analyseren met UPLC-MS.

Piek 1 vertoont hetzelfde massaspectrum als ZEN-14-*O*-glucuronide met signalen bij m/z 495 en m/z 319. Maar omdat het absorptiespectrum verschillend is van dat van ZEN-14-*O*-glucuronide (zie Figuur 5.12), zal deze eerste piek ZEN-16-*O*-glucuronide zijn. De analyseresultaten van de vijfde piek worden in onderstaande Figuur 5.13 weergegeven.



Figuur 5.13: TIC (onder) en RIC (335, 352, 357, 373) van piek 5

In het RIC van het ion met m/z 335 wordt een signaal gedetecteerd na 14,19 minuten (zie Figuur 5.13). Dit zou gemethyleerd ZEN kunnen zijn (zie Figuur 5.14). De m/z van ZEN bedraagt 319 bij ESI^+ . Door methylatie van de ketongroep (+15 van CH_3 en + 1 door verlies van de dubbele binding en binding van een H) ontstaat er een ion met m/z 335 ($319 + 16$). Wanneer deze gemethyleerde vorm een adduct vormt met kalium of natrium, wordt een signaal bij m/z 373 en 357 verwacht. In het RIC van deze twee ionen wordt een signaal gedetecteerd na 14,2 minuten (zie Figuur 5.13). Dit suggereert dat deze vijfde piek een gemethyleerd ZEN is die waarschijnlijk door de microsomen gevormd werd.



Figuur 5.14: ZEN (A) en gemethyleerd ZEN (B en C)

5.2.2. Met behulp van microsomen in ratio 1/5

Opnieuw wordt ZGU gesynthetiseerd, maar nu wordt ZEN geïncubeerd met UDPGA in een verhouding van 1/5. Na de analyse van deze stalen wordt besloten dat geen ZGU gevormd werd.

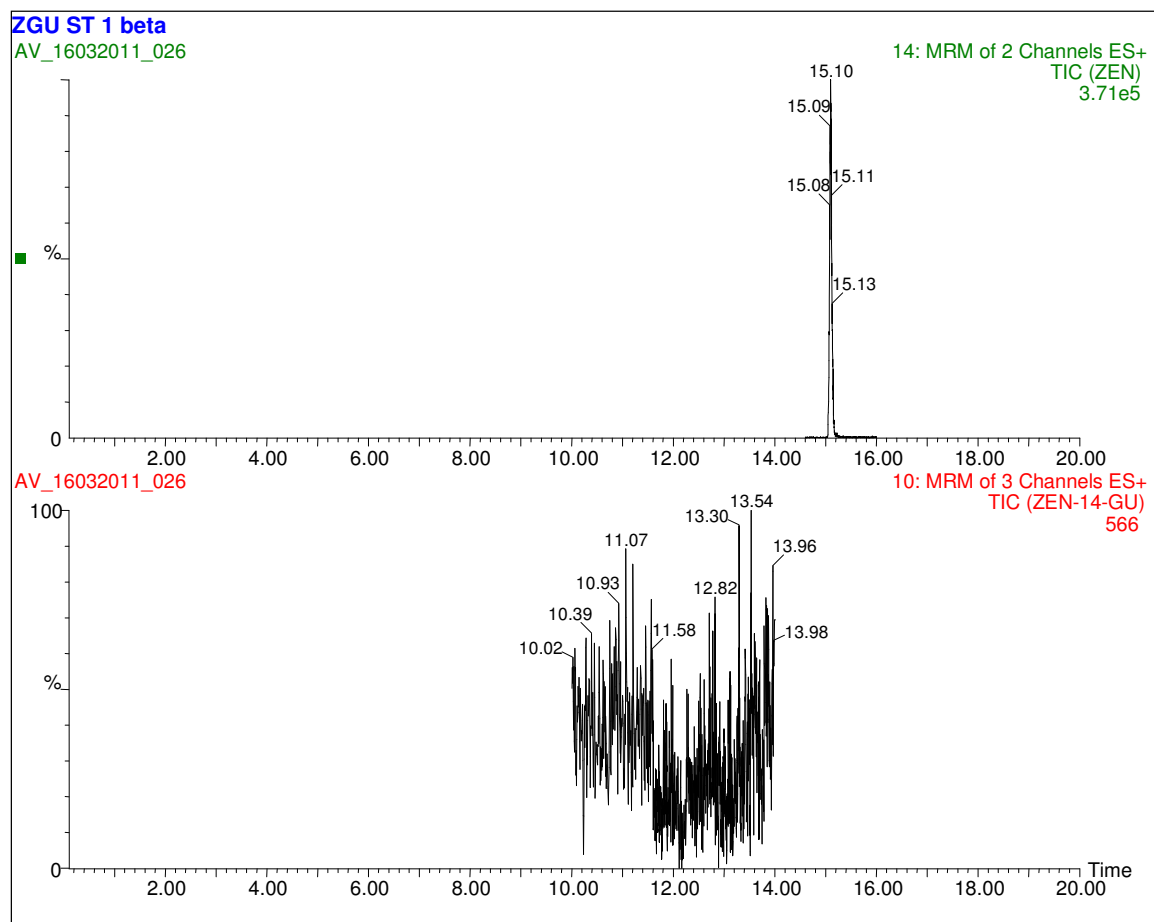
5.2.3. Met behulp van UGT2B4

Om na te gaan of het specifieke UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (UGT2B4) in staat is ZEN te glucuronideren, wordt ZEN geïncubeerd met dit transferase. Analooq aan de synthese met behulp van microsomen, wordt de reactie zowel in een ratio 1/50 ZEN-UDPGA als in een ratio 1/5 ZEN-UDPGA uitgevoerd. De chromatogrammen en massaspectra, na UPLC-MS analyse, tonen aan dat geen ZGU gevormd werd met behulp van dit specifiek UGT2B4 transferase.

5.2.4. β -hydrolyse ZGU

Theoretisch gezien zou 1 μg ZGU na β -hydrolyse moeten aanleiding geven tot 0,650 μg ZEN. Dit wordt onderzocht door 1 μg ZGU te incuberen met het enzym β -glucuronidase. De stalen worden geanalyseerd met UPLC-MS/MS en de detector wordt in MRM-modus gebruikt. Omdat de extinctiecoëfficiënt van ZGU niet gekend is, kan de exacte concentratie opgezuiverd ZGU niet bepaald worden en kan ook de efficiëntie van de hydrolysereactie niet worden nagegaan. Enkel kan aangetoond worden dat ZGU omgezet wordt in ZEN.

De standaard ZGU 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ toonde aan dat ZGU na 12,88 minuten elueert, maar na incubatie van dit glucuronide met β -glucuronidase wordt in het TIC van ZGU dit signaal niet meer teruggevonden (zie Figuur 5.15 onder). In het TIC van ZEN daarentegen is wel een signaal na 15,10 minuten zichtbaar (zie Figuur 5.15 boven). Er wordt verondersteld dat alle glucuroniden werden omgezet naar ZEN.



Figuur 5.15: TIC's van ZEN (boven) en ZGU (onder) na β -hydrolyse van ZGU

6. DISCUSSIE EN BESLUIT

In het kader van deze masterproef werd DGU gesynthetiseerd gebruikmakende van rattenlever microsomen. Met behulp van *reversed phase* chromatografie, een PDA detector en een massaspectrometer werd aangetoond dat de synthese van DGU geslaagd is. Deze glucuronidatie reactie had een hoog rendement aangezien 97,92 % DON wegreageerde. De hoeveelheid DGU die gevormd wordt, hangt af van de batch microsomen. Het kan zijn dat een bepaalde batch meer UGT enzymen bevat en zo aanleiding geeft tot de vorming van meer DGU. Ook is het mogelijk dat andere enzymen, die aanwezig zijn in de microsomen, invloed hebben op de activiteit van UGT.

De synthese waarbij 10 keer minder glucuronzuur gebruikt werd, gaf aanleiding tot de vorming van 70,8 % DGU. Wegens de hoge kostprijs van UDPGA, zou dit interessant kunnen zijn indien men DGU op grote schaal wenst te synthetiseren. Er moet wel rekening gehouden worden met kostprijs van de hoeveelheid DON die niet gereageerd heeft. Na zuivering van DGU werd spectrofotometrisch bepaald dat 0,994 mg DGU gesynthetiseerd werd.

Een specifiek transferase dat in staat is DON te glucuronideren, zou de ideale oplossing zijn om DGU te synthetiseren. Omdat er zoveel verschillende UGT iso-enzymen bestaan, is het moeilijk het specifieke transferase te vinden dat DON optimaal glucuronideert binnen de tijd die beschikbaar is voor dit werk. Er werd geprobeerd DON te glucuronideren met behulp van het humane UGT2B4 iso-enzym, maar het resultaat was negatief. Het is mogelijk dat dit type UGT niet in staat is DON te glucuronideren. Ook kan het zijn dat de gebruikte reactiecondities niet optimaal waren aangezien dezelfde parameters gebruikt werden als deze voor de synthese met behulp van microsomen. In de literatuur staat niets beschreven over welk specifiek UGT de beste enzymatische activiteit voor DON vertoont. Verder onderzoek, met verschillende soorten UGT iso-enzymen, kan in de toekomst worden uitgevoerd om na te gaan welk specifiek transferase DON optimaal glucuronideert.

Verder werd aangetoond dat DON werd vrijgesteld na incubatie van DGU met het enzym β -glucuronidase. Dit levert, naast de PDA- en MS-analysen, een extra bewijs dat wel degelijk DGU werd aangemaakt. Na deze β -hydrolyse werd geen DGU meer gedetecteerd, waaruit blijkt dat de hydrolysereactie voor 100 % doorging. Toch werd maar 62 % DON gedetecteerd. Dit kan meerdere oorzaken hebben: het is mogelijk dat de toegevoegde beginconcentratie van DGU lager dan 1 μ g was, waardoor er minder DON dan verwacht werd vrijgesteld. Ook is het mogelijk dat DON werd afgebroken tot andere producten zodat minder DON gedetecteerd werd.

Ook werd de β -hydrolyse van DGU in serum onderzocht, maar dit verliep niet zoals verwacht: na incubatie van DGU met β -glucuronidase bleef nog 97% DGU over en werd slechts 2,8 % DON vrijgesteld. Ook hier zijn meerdere redenen mogelijk: enerzijds kan het zijn dat de gebruikte methode en reactiecondities niet optimaal waren. Anderzijds is het mogelijk dat er inhibitors van β -glucuronidase aanwezig waren in het serum, waardoor de enzymatische activiteit onderdrukt werd en DGU niet hydrolyseerde.

De hoeveelheid DON na β -hydrolyse kan dus onderschat worden, ook al is de hydrolysereactie efficiënt en wordt er geen DGU meer gedetecteerd. Hierdoor is het niet aan te raden DON indirect te kwantificeren door vooraf het serum te behandelen met β -glucuronidase. De directe analyse van DGU is de beste oplossing, maar dit vereist standaarden van DGU. De synthese van deze standaarden was het hoofddoel van deze studie.

Op dezelfde manier als voor DGU, werd ook ZGU gesynthetiseerd. Met behulp van een PDA detector en MS werd aangetoond dat ZGU werd aangemaakt. Uit de blanco's bleek dat de hoeveelheid ZEN na de incubatie veel lager was dan de hoeveelheid die aan de reactiemengsels werd toegevoegd. Mogelijks werd ZEN omgezet tot andere producten. Anderzijds is het mogelijk dat de wateroplosbaarheid van ZEN tijdens de reactie werd overschreden en het een neerslag vormde, waardoor het niet in staat was glucuroniden te vormen. De efficiëntie van de glucuronidatie kon hierdoor niet worden nagegaan. Na de analyse van de reactiemengsels werd geschat dat ongeveer 2,7 μ g ZGU werd aangemaakt.

Aangezien de exacte concentratie ZGU niet gekend is, was het moeilijk de efficiëntie van de β -hydrolyse van ZGU te bepalen. Wel kon uit de β -hydrolyse van ZGU afgeleid worden dat alle glucuroniden weggeageerden en ZEN overbleef.

Tijdens de zuivering van ZGU werd opgemerkt dat nog andere reactieproducten, buiten ZGU, gevormd werden. Wanneer deze geïsoleerd en geanalyseerd werden met UPLC-MS, werd duidelijk dat ZEN-14-*O*-glucuronide en ZEN-16-*O*-glucuronide (in lagere hoeveelheid) gesynthetiseerd werden. Ook werd aangetoond dat een gemethyleerd ZEN door de microsomen werd aangemaakt.

Net zoals voor DGU, werd ook getracht ZGU te synthetiseren met UGT2B4. Na de analyse met UPLC-MS werd geen ZGU gedetecteerd. Waarschijnlijk is dit enzym niet in staat ZEN te glucuronideren. Pfeiffer et al. (2010) onderzochten de glucuronidatie van ZEN met behulp van allerlei soorten UGT's. Ook zij besloten dat er met behulp van UGT2B4 weinig tot geen ZGU gevormd werd.

Algemeen kan besloten worden dat DGU en ZGU gesynthetiseerd werden met behulp van rattenlever microsomen. De synthese met behulp van UGT2B4 daarentegen gaf geen aanleiding tot de vorming van DGU en ZGU. Verder onderzoek kan in de toekomst worden uitgevoerd om na te gaan welk specifiek UGT iso-enzym in staat is DON optimaal te glucuronideren. Alvorens de gesynthetiseerde DGU en ZGU commercieel kunnen gemaakt worden, dienen ze eerst nog verder gekarakteriseerd te worden (o.a. via NMR, infrarood, smeltpunt...).

Aangezien indirecte analyses van glucuroniden met behulp van β -glucuronidase onbetrouwbaar zijn, kan besloten worden dat (zolang er geen standaarden van deze glucuroniden commercieel beschikbaar zijn) de synthese van DGU en ZGU noodzakelijk blijft om deze componenten te kunnen analyseren en kwantificeren.

7. LITERATUURLIJST

<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/8/u3133dat.Par.0001.Fil.F.tmp/u3133dat.pdf> : ProductInformation Sigma-Aldrich

<http://www.tieh.ttu.edu/mhooper/Docs/Phase%20II%20Metabolism.pdf>

Canady, R. A.; Coker, R. D.; Rgan, S. K.; Krska, R.; Kuiper-Goodman, T.; Olsen, M.; Pestka, J. J.; Resnik, S; Schlatter, J. (2001). Deoxynivalenol. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. *Fifty-Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 420-555.

Bennett, J. W.; Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497-516.

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

Bossuyt, X.; Blanckaert, N. (1995). Mechanism of stimulation of microsomal UDP-glucuronosyltransferase by UDP-N-acetylglucosamine. *Biochem. J.*, 305, 321-328.

Codex Alimentarius Commission. (2011). Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol and its acetylated derivatives in cereals and cereal-based products. Codex Committee on Contaminants in foods.

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

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

Engelhardt, G.; Zill, G.; Wohner, B.; Wallnöfer, P. R. (1988). Transformation of the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 75, 309-310.

- Eriksen, G. S.; Pettersson, H.; Lundh, T. (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 619-624.
- Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 154, 103-116.
- Malekinejad, H.; Maas-Bakker, R. F.; Fink-Gremmels, J. (2005). Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet. Res.*, 36, 799-810.
- Metzler, M. (2010). Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites. *Mycotox. Res.*, 27, 1-3.
- Pestka, J. J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.*, 84, 663-679.
- Pestka, J. J.; Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 8, 39-69.
- Pfeiffer, E.; Hildebrand, A.; Damm, G.; Rapp, A.; Cramer, B.; Humpf, H. U.; Metzler, M. (2009). Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 1123-1133.
- Pfeiffer, E.; Hildebrand, A.; Mikula, H.; Metzler, M. (2010). Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 1-9.
- Prelusky, D. B.; Veira, D. M.; Trenholm, H. L.; Hartin, K. E. (1986). Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intravenous administration to sheep. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 6, 356-363.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.
- Ritter, J. K. (2000). Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 171-193.

Schollenberger, M.; Suchy, S.; Jara, H. T.; Drochner, W.; Muller, H. M. (1999). A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 147, 49-57.

Stevenson, D. E.; Hansen, R. P.; Loader, J. I.; Jensen, D. J.; Cooney, J. M.; Wilkins, A. L.; Miles, C. O. (2008). Preparative Enzymatic Synthesis of Glucuronides of Zearalenone and Five of Its Metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4032-4038.

Stob, M.; Baldwin, R. S.; Tuite, J.; Andrews, F. N.; Gillette, K. G. (1962). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196, 1318.

Sudakin, D. L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143, 97-107.

The Commission of the European Communities. (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal Of The European Union*, 364, 5-24.

Trucksess, M. W.; Thomas, F.; Young, K.; Stack, M. E.; Fulgueras, W. J.; Page, S. W. (1995). Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.*, 78, 631-636.

Turner, P. C.; Hopton, R. P.; Lecluse, Y.; White, Kay, L. M.; Fisher, J.; Lebailly, P. (2010). Determinants of Urinary Deoxynivalenol and De-epoxy Deoxynivalenol in Male Farmers from Normandy, France. *J. Agric. Food. Chem.*, 58, 5206-5212.

Urry, W. H.; Wehrmeister, H. L.; Hodge, E. B.; Hidy, P. H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Lett.*, 27, 3109-3114.

Ward, T. J.; Bielawski, J. P.; Kistler, H. C.; Sullivan, E.; O'Donnell, K. (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *PNAS*, 99, 9278-9283.

Wolf-Hall, C. E.; Schwarz, P.B. (2002). Mycotoxins and fermentation – beer production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 504, 217-226.

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

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

Young, J. C.; Fulcher, R. G.; Hayhoe, J. H.; Scott, P. M.; Dexter, J. E. (1984). Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern canadian wheats. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 659-664.