

# Zearalenon: Untersuchungen zum *in vitro* und *in vivo* Metabolismus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

vorgelegte

**DISSERTATION**

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

**Georg Damm**

aus Bad Bergzabern

**Dekan:** Prof. Dr. Stefan Bräse

**Referent:** Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

**Korreferent:** Prof. Dr. Sabine Kulling

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14.07.2010



*Meinem Patenkind Mia-Fee*

*und*

*der Familie Taake*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung und theoretische Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1. Zearalenon (ZEN)	1
1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften von ZEN	1
1.3. Resorcyssäurelaktone vom ZEN-Typ	2
1.4. Vorkommen und Exposition	2
1.5. Erkenntnisse zur Toxikokinetik	5
1.5.1. Resorption und Verteilung	5
1.5.2. Untersuchungen zum hepatischen Metabolismus	7
1.5.3. Untersuchungen zum Metabolismus und Ausscheidung	8
1.6. Untersuchungen zur Toxikodynamik	10
1.6.1. Akute Toxizität	10
1.6.2. Estrogene Aktivität von ZEN	10
1.6.3. Reproduktions- und Entwicklungstoxizität	12
1.6.4. Subakute und subchronische Toxizität	13
1.6.5. Chronische Toxizität und Kanzerogenität	13
1.6.6. Genotoxizität	14
<b>2. Problemstellung</b>	<b>15</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>17</b>
3.1. Photochemie von ZEN	17
3.2. Biotransformation von ZEN durch menschliche Darmbakterien	19
3.2.1. Charakterisierung der Fäzessuspension	19
3.2.2. Inkubationen von ZEN mit Fäzessuspension	22
3.3. Oxidativer Metabolismus von ZEN	24
3.4. Charakterisierung und Strukturaufklärung oxidativ gebildeter ZEN-Metabolite	26
3.4.1. MS-Fragmentierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL	27
3.4.2. Peak 2/3 (15-HO-ZEN/13-HO-ZEN)	32
3.4.3. Peak B (15-HO- $\alpha$ -ZEL)	34
3.4.4. Peak 1 (6 $\alpha$ -HO-ZEN) und Peak 5 (6 $\beta$ -HO-ZEN)	37
3.4.5. Peak A (6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL) und Peak D (6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL)	39
3.4.6. Peak 4 (6-Keto- $\alpha$ -ZEL)	44
3.4.7. Peak 8 (Metabolit 8)	48
3.4.8. Peak 7 (5 $\alpha$ -HO-ZEN)	51
3.4.9. Peak 6 (10 $\alpha$ -HO-ZEN)	55
3.5. Oxidativer Metabolismus von cis-ZEN	61
3.6. Methylierung oxidativ gebildeter ZEN-Catechole	65
3.7. Glucuronidierung und Sulfatierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL	71
3.7.1. Glucuronidierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL	74
3.7.2. Sulfatierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL	75

3.7.2.1.	Enzymaktivitäten von Rattenleber- und Humanlebercytosol für die Sulfatierung . . . . .	77
3.7.2.2.	Enzymaktivitäten von rekombinanten humanen SULTs für die Sulfatierung . . . . .	80
3.7.3.	Mehrfache Konjugation von $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL . . . . .	83
3.8.	Metabolismusstudien in Präzisionsgewebeschnitten . . . . .	85
3.8.1.	Phase I Metabolismus in Leberschnitten . . . . .	86
3.8.2.	Phase II Metabolismus in Leberschnitten . . . . .	89
3.8.2.1.	Glucuronidierung ausgewählter oxidativer ZEN-Metabolite . . . . .	90
3.8.2.2.	Sulfatierung ausgewählter oxidativer ZEN-Metabolite . . . . .	95
3.8.2.3.	Identifizierung von Konjugaten mit Hilfe von MS <sup>3</sup> -Untersuchungen . . . . .	99
3.8.2.4.	Untersuchung von Leberschnittinkubaten . . . . .	103
3.9.	<i>in vivo</i> Metabolismus von ZEN . . . . .	109
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>113</b>
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b> . . . . .	<b>115</b>
5.1.	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	115
5.2.	Verbrauchsmaterial . . . . .	116
5.3.	Chemikalien . . . . .	116
5.3.1.	Versuchstiere und biologisches Material . . . . .	118
5.3.2.	Eluenten, Pufferlösungen und Kulturmedien . . . . .	118
5.3.2.1.	Eluenten . . . . .	118
5.3.2.2.	Allgemeine Pufferlösungen . . . . .	118
5.3.2.3.	Puffer für Präparation von Zellfraktionen . . . . .	119
5.3.2.4.	Puffer für Sulfotransferase-Assay mit SULT-Isoenzymen . . . . .	119
5.3.2.5.	Puffer und Kulturmedium für Präzisions-Gewebeschnitte . . . . .	120
5.4.	Methoden . . . . .	121
5.4.1.	Analytische Methoden . . . . .	121
5.4.1.1.	HPLC/DAD . . . . .	121
5.4.1.2.	HPLC/UV . . . . .	121
5.4.1.3.	LC-MS . . . . .	122
5.4.1.4.	GC-MS . . . . .	131
5.4.2.	Isolation und Darstellungen von ZEN-Metaboliten . . . . .	132
5.4.2.1.	Isolation von Metaboliten mit der HPLC . . . . .	132
5.4.2.2.	Photochemische Reaktionen . . . . .	132
5.4.2.3.	Chemische Hydrolyse . . . . .	133
5.4.2.4.	Enzymatische Reduktion / Oxidation . . . . .	133
5.4.2.5.	Chemische Reduktion . . . . .	135
5.4.2.6.	Katalytische Hydrierung . . . . .	135
5.4.3.	Fermentation mit intestinalen Bakterien . . . . .	136
5.4.3.1.	Bakteriengewinnung aus humanem Fäzes . . . . .	136
5.4.3.2.	Inkubationsbedingungen . . . . .	136
5.4.4.	Inkubationen in Zellfraktionen . . . . .	137
5.4.4.1.	Präparation von Zellfraktionen aus Lebergewebe . . . . .	137
5.4.4.2.	Bestimmung des Proteingehalts . . . . .	138
5.4.4.3.	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts . . . . .	138
5.4.4.4.	Oxidativer Metabolismus in Mikrosomen . . . . .	138
5.4.4.5.	COMT-Assay . . . . .	139
5.4.4.6.	Glucuronyltransferase-Assay . . . . .	140

5.4.4.7. Sulfotransferase-Assay . . . . .	141
5.4.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten für die Sulfatierung . . . . .	142
5.4.5.1. Enzymaktivität in Cytosol . . . . .	142
5.4.5.2. Enzymaktivität in SULTs . . . . .	143
5.4.6. <i>In vitro</i> -Studien mit Präzisions-Gewebeschnitten . . . . .	144
5.4.6.1. Präparation von Leberschnitten . . . . .	144
5.4.6.2. Inkubation von Leberschnitten . . . . .	145
5.4.6.3. Enzymatische Hydrolyse und Extraktion . . . . .	145
5.4.6.4. Identifikation und Quantifizierung . . . . .	146
5.4.6.5. Direkte Analyse des Inkubationsmediums . . . . .	147
5.4.7. Analyse von <i>in vivo</i> Gallenproben . . . . .	148
5.4.7.1. Aufarbeitung von Gallenproben . . . . .	148
5.4.7.2. Immunoaffinitätsäulenchromatographie . . . . .	148
5.4.7.3. Identifikation und Quantifizierung . . . . .	149
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>165</b>
A.1. Analytische Daten zu ZEN-Metaboliten . . . . .	165
A.1.1. Analytische Daten zu ZEN-Hydrolyseprodukten . . . . .	165
A.1.2. Analytische Daten zu ZEN-Konjugaten . . . . .	166
A.2. Externe Kalibrierungen . . . . .	166
A.3. Wiederfindungen . . . . .	166
A.3.0.1. Fäzessuspensionsinkubationen . . . . .	166
A.3.0.2. IASC Aufreinigung . . . . .	168
A.4. Oxidativer Metabolismus . . . . .	168
A.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten . . . . .	169
A.6. Leberschnittinkubationen . . . . .	170
A.7. LC-MS Tune Files . . . . .	170
<b>B. Publikationen und Poster</b>	<b>173</b>
<b>C. Danksagung</b>	<b>175</b>



# Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
amu	atomic mass unit
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CYP450	CytochromP450-haltige Monooxygenase
DAD	Diod Array Detector
DAI	Daidzein
DHD	Dihydrodaidzein
DMSO	Dimethylsulfoxid
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EHK	Enterohepatischer Kreislauf
ENL	Enterolacton
ESI	Elektrospray-Ionisation
ER	Estrogenrezeptor
EQ	Equol
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FKS	Fötales Kälberserum
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HD	High Dose
HO-	Hydroxy-
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IASC	Immunoaffinitätssäulenchromatographie
IARC	International Agency for Research on Cancer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KG	Körpergewicht
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LD	Low Dose
M	Metabolit
MAT	Matairesinol
Me	Methylgruppe
MeOH	Methanol
MP	Methylierungsprodukt
MS-TIC	Full Scan Total Ion Current
MW	Mittelwert
m/z	Masse-Ladungsverhältnis

NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NOEL	No Observed Effect Level
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
<i>O</i> -DMA	<i>O</i> -Desmethylangolensin
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
RAL	Resorcylsäurelactom
RPM	Rotations Per Minute
SAM	S-Adenosylmethionin
SCF	Scientific Committee on Food
SD	Standardabweichung
SRM-TIC	Single Reaction Monitoring-Total Ion Current
SULT	Sulfotransferase
SW	Spannweite
TCA	Trichloressigsäure
TDI	Tolerable Daily Intake
TMS	Trimethylsilyl
TMSOH	Trimethylsilanol
U	Unit
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UDPGA	Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid
ZAL	Zearalanol
ZAN	Zearalanon
ZEL	Zearalenol
ZEN	Zearalenon

# 1. Einleitung und theoretische Grundlagen

## 1.1. Zearalenon (ZEN)

Bei Zearalenon (ZEN) handelt es sich um ein Mykotoxin mit estrogenen Aktivität, das von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium*, z.B. *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, etc., produziert wird [Caldwell et al., 1970]. Fusarien gehören systematisch zur Familie der *Nectriaceae*, in die Klasse der echten Schlauchpilze (*Ascomycetes*) sowie zu den *Fungi imperfecti* und sind Teil der natürlich vorkommenden Feldschimmelpilze. Sie wachsen vorwiegend auf Mais, befallen aber auch andere Getreidearten und Futtermittel und sind deshalb ein häufiges und immer wiederkehrendes Problem in der Landwirtschaft. Fusarien leben parasitär und können ihren Wirt durch so genannte Phytotoxine töten. Einige der Fusarienspezies sind außerdem in der Lage für Mensch und Tier gefährliche Toxine wie z.B. Trichothecene oder ZEN zu bilden [Bosch und Mirocha, 1992].

## 1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften von ZEN

ZEN wurde zuerst von Urry [1966] charakterisiert und als weiße, kristalline Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 164-165°C beschrieben. Die Substanz besitzt die Summenformel  $C_{18}H_{22}O_5$  und ein Molekulargewicht von 318 g/mol. ZEN ist in Wasser unlöslich, jedoch in wässriger alkalischer Lsg., Petrolether, Hexan löslich und in Methylenchlorid, Essigsäureethylester, Acetonitril und Alkoholen gut löslich. Die chemische Struktur ist ein makrocyclisches Resorcyssäurelacton (RAL) mit einer trans-Doppelbindung zwischen den Positionen C11 und C12 und einer Carbonylgruppe an der C7 Position (Abb.: 1.2.1). Die UV-Absorptionsmaxima liegen bei 236 nm, 274 nm und 316 nm [Urry, 1966].

Die maximale Fluoreszenz in Ethanol tritt unter einer Anregung bei 314 nm, mit einer Emission bei 450 nm auf. Die Verbindung weist in Lebensmitteln eine hohe Stabilität während Lagerung, Mahlung, Konservierung und Kochen auf. Auch hohe Temperaturen führen nicht zu einer Degradierung [Zinedine et al., 2007]. Durch Bestrahlung mit UV-Licht kann die Doppelbindung zwischen C11 und C12 von der trans- in eine cis-Form isomerisieren (Abb.: 1.2.1). Daher sollte ZEN lichtgeschützt gelagert werden [Peters, 1972; Miles et al., 1996].

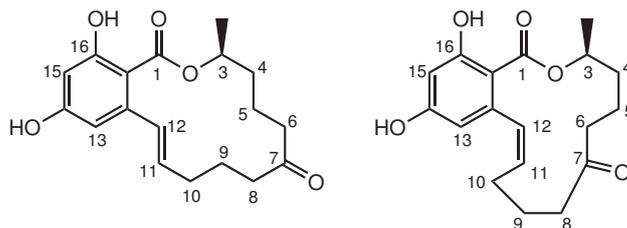


Abbildung 1.2.1.: Chemische Struktur von ZEN (links) und cis-ZEN (rechts)

### 1.3. Resorcyssäurelaktone vom ZEN-Typ

Neben ZEN existieren noch weitere RALs vom ZEN-Typ, die als Sekundärmetabolite in verschiedenen Fusarienspezies nachgewiesen wurden [Richardson et al., 1985]. Hierzu gehören  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol ( $\alpha$ - und  $\beta$ -ZEL), welche sowohl von Fusarien, wie auch durch reduktiven Metabolismus im Körper verschiedener Säugerspezies und Vögel gebildet werden [Malekinejad et al., 2006]. Zearalanon (ZAN) unterscheidet sich von ZEN ausschließlich durch das Fehlen einer Doppelbindung zwischen Position C11 und C12. Von ZAN leiten sich die reduzierten Verbindungen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalanol ( $\alpha$ - und  $\beta$ -ZAL) ab.  $\alpha$ -ZAL ist auch unter dem Namen Zeranol und  $\beta$ -ZAL unter Talernalol bekannt. Diese reduktiven Derivate von ZEN wurden bereits im Metabolismus in Wiederkäuern und Schafen nachgewiesen. Besondere Bedeutung kommt  $\alpha$ -ZAL zu, da dieses in den USA und Kanada als Masthilfsmittel eingesetzt wird (Strukturen siehe Abb.: 1.3.1) [Kennedy et al., 1995; Miles et al., 1996].

### 1.4. Vorkommen und Exposition

Fusarien wachsen hauptsächlich in den oberen Schichten des Bodens und sind in den Abbau zellulosehaltiger Pflanzenreste involviert [Nelson et al., 1994]. Sie benötigen eine hohe Luftfeuchtigkeit und bevorzugen ein gemäßigtes bis warmes Klima. Toxin produzierende Fusarienspezies treten in unterschiedlichen Klimazonen auf. Unabhängig von Kontinent, Klimazone und Bodenbeschaffenheit wird vorwiegend Getreide von Fusarien befallen und dadurch mit ZEN kontaminiert. Besonders häufig betroffen ist der Mais, aber auch Gerste und Weizen werden von Fusarien häufig angegriffen. Eine Reihe weiterer Pflanzen können den Pilzen ebenfalls als Nährstoffquelle dienen, wobei die befallenen Pflanzenteile je nach Fusarienart variieren. Fusarien verursachen bei Mais, Weizen und Gerste Ähren- beziehungsweise Kolbenfäulnis (head blight). Bei Mais kommt zusätzlich Wurzelfäulnis hinzu. Der Pilzbefall der Pflanzen erfolgt meist vor der Ernte, kann aber auch, abhängig von den Lagerbedingungen des Getreides nach der Ernte erfolgen [Zinedine et al., 2007]. Das Wachstum der Fusarien ist insbesondere vom Feuchtigkeitsgehalt der Getreidekörner sowie von Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängig [WHO, 2000]. Um das Fusarienwachstum nach der Ernte zu vermeiden, sollte die Feuchtigkeit der Getreidekörner bei der Lagerung von rohem, gut getrocknetem Getreide nicht mehr als 14% betragen [Sherwood und Peberdy, 1972].

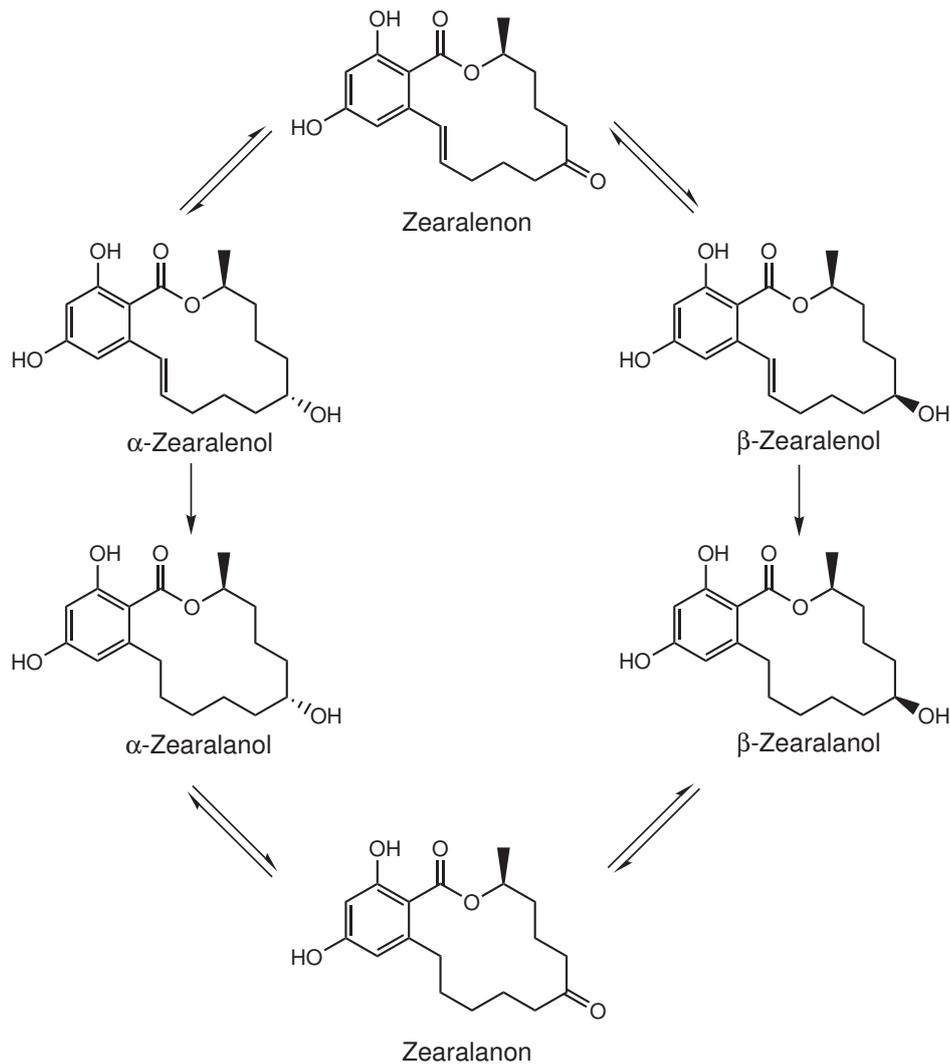


Abbildung 1.3.1.: ZEN und reaktiv gebildete ZEN-Derivate

Untersuchungen zur Bildung von ZEN haben gezeigt, dass diese einer Regulation im Pilz unterliegt, welche durch bestimmte Umwelteinflüsse beeinflusst wird. ZEN dient dem Pilz als Hormon zur Steuerung der sexuellen Entwicklungsphasen und reguliert die Bildung des Fruchtkörpers (Perithecium) [Mirocha und Pathre, 1979]. Die Biosynthese von ZEN erfolgt durch „Kopf-an-Schwanz-Kondensation“ von Acetateinheiten durch einen Polyketid-Biosyntheseweg [Hagler und Mirocha, 1980; Zinedine et al., 2007]. Abhängig von der ZEN-Konzentration wird die Bildung des Perithecium verstärkt oder inhibiert [Wolf und Mirocha, 1973]. Die Bildung von ZEN korreliert dadurch eng mit dem Wachstum des Pilzes und dessen Entwicklungsstadium. Die ZEN-Produktion in verschiedenen Fusarienspezies wurde unter verschiedenen Einflussfaktoren untersucht, wobei gezeigt wurde, dass Wachstumsmedium, Inkubationsdauer, Feuchtigkeit und Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Mykotoxinbildung haben [Sherwood und Peberdy, 1972; Eugenio et al., 1970]. Die ZEN-Produktion von z.B. *F. graminearum*, startet bei einer Wasseraktivität (aw-Wert) von 0,97 deutlich früher als bei einem niedrigeren aw-Wert von 0,95 [Jimenez et al., 1996; Montani et al., 1988]. Die

Temperaturabhängigkeit der ZEN-Produktion von Fusarien wurde ebenfalls untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl das Pilzwachstum, als auch die ZEN-Produktion bevorzugt bei einer Temperatur von 25°C stattfinden. Mit sinkender Temperatur nahm auch die Mykotoxinproduktion deutlich ab [Montani et al., 1988].

Die in Europa analysierten ZEN-Gehalte liegen in der Regel im Mikrogrammbereich. Von fast 5000 untersuchten Proben aus neun europäischen Ländern wurden ca. 30% positiv auf ZEN getestet. Es waren vor allem Mais- und Weizenprodukte betroffen. Ein hoher Gehalt von ZEN fand sich in Hafer aus Finnland, mit einer Konzentration  $>0,2$  mg/kg bei 47% der untersuchten Proben und einem maximalen Gehalt von 1,31 mg/kg. Ebenfalls stark belastet war Weizen aus Frankreich, in dem in 16% der untersuchten Proben Konzentrationen  $>0,2$  mg/kg und einem Spitzenwert von 1,817 mg/kg nachgewiesen wurde. Die höchsten Gehalte in Einzelproben fanden sich in Mais aus Italien mit bis zu 6,492 mg/kg. Insgesamt wiesen 14% der untersuchten Maisproben ZEN-Gehalte  $>0,2$  mg/kg auf. In anderen Erdteilen wurden deutlich höhere Spitzenkonzentrationen von bis zu 141 mg/kg ZEN (in kanadischem Futtermais) oder bis zu 600 mg/kg ZEN (in indischem Weizen und Reis) festgestellt [Zinedine et al., 2007]. Für die Expositionsabschätzung in Deutschland wurden im Rahmen eines Fusarienforschungsvorhabens verschiedene Analyseverfahren für ZEN validiert und eine Vielzahl von Proben auf ihren ZEN-Gehalt untersucht. Von 4556 Lebensmittelproben wiesen 84% der Maismehle und 53% der Maisgrieße eine mittlere und 95 Maiskeimöle eine hohe ZEN-Belastung auf. Mit Maiskeimöl hergestellte Säuglings- und Kleinkindernahrung waren ebenfalls stark belastet. Alle anderen aus Zerealien hergestellten Lebensmittel zeigten eine niedrige Belastung [Kappenstein et al., 2004]. Dem Jahresbericht 2006 der Chemisch Veterinären Untersuchungsanstalt (CVUA) Sigmaringen kann entnommen werden, dass ca. 20% der untersuchten Proben in Baden-Württemberg positiv auf ZEN getestet wurden, jedoch nur 2 Proben die damals geltende, gesetzlich erlaubten Höchstmengen an ZEN überschritten [CVUA Sigmaringen, 2006].

Die gesetzlichen Höchstwerte für Mykotoxine sind EU-weit in der Kontaminanten-Verordnung geregelt. National gilt die Mykotoxin-Höchstmengen-Verordnung (MHmV). Die festgelegten Werte für ZEN wurden vorsorglich festgelegt, da die Toxizität für den Menschen noch nicht ausreichend erforscht ist. Der höchste zulässige ZEN-Gehalt von 200 µg/kg gilt für Mais und Maisprodukte, für andere unverarbeitete Getreide ist ein Gehalt von 100 µg/kg zulässig. Getreide- und Getreidemehlprodukte, die für den unmittelbar menschlichen Verzehr gedacht sind, dürfen eine maximale ZEN-Konzentration von 75 µg/kg erreichen. Der niedrigste Wert gilt für Getreidebeikost und sonstige Beikost für Säuglinge und Kleinkinder, welche einen Gehalt von 20 µg/kg Trockenmasse an ZEN nicht überschreiten dürfen [Verordnung (EG) 1881/2006, 2006].

ZEN war in vielen untersuchten Proben enthalten und kann auch klimabedingt in machen Jahren vermehrt zur Überschreitung von Grenzwerten führen, doch weisen nur einzelne Proben stark erhöhte Werte auf. Trotzdem sollte die ZEN-Aufnahme möglichst gering gehalten werden, da die IARC ZEN als „möglicherweise krebserregend“ einstuft und daher das Minimierungsprinzip gilt. Die tägliche ZEN-Belastung ist von der individuellen Ernährung des Einzelnen abhängig und wird von der „Food and Agriculture Organization“ (FAO) auf durchschnittlich 0,03 bis 0,06 µg/kg KG

geschätzt. Eine Studie der “EU-Scientific-Cooperation” (EU-SCOOP), bei der die nahrungsbedingte ZEN-Aufnahme in verschiedenen europäischen Ländern untersucht wurden, ergab eine Streuung der täglichen Aufnahme von 1 ng bis 420 ng/kg KG [EFSA, 2004]. Bei einer 70 kg schweren Person entspricht dies einer durchschnittlichen ZEN-Aufnahme von 0,07-29,4 µg am Tag. Die ZEN-Belastung kommt in Europa hauptsächlich durch Brot und Getreideprodukte aus Weizen, Roggen und Hafer sowie durch Mais zustande, wobei das letztgenannte Getreide in den USA und Kanada einen weit größeren Anteil an der Ernährung ausmacht. Ein “Carry-over”-Effekt auf Milch, Eier und Fleisch von Nutztieren ist bereits erwiesen, wobei die ZEN-Gehalte im Spurenbereich liegen [EFSA, 2004; Dänicke et al., 2002].

Für die maximale ZEN-Aufnahme wurden sowohl vom “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JECFA) als auch vom “Scientific Committee on Food” (SCF) Werte festgesetzt. Der “Provisional maximum tolerable daily intake” (PMTDI), der von der JECFA festgelegt wurde, beträgt 0,5 µg/kg KG. Er basiert auf einem “No Observed Effect Level” (NOEL) -Wert von 40 µg/kg KG und Tag, der in einer 15-tägigen Studie an weiblichen Schweinen ermittelt wurde [Kuiper-Goodman et al., 1987]. Dies entspricht bei einem Körpergewicht von 70 kg einer maximalen ZEN-Aufnahme von 35 µg täglich. Der vom SCF festgelegte “temporary-Tolarable Daily Intake” t-TDI-Wert beträgt 0,2 µg/kg KG [EFSA, 2004]. Der SCF nutzt zur TDI-Berechnung einen doppelt so hohen Sicherheitsfaktor, da von einer mit Defiziten belasteten Datenlage ausgegangen wird. Die geschätzte durchschnittliche Aufnahme an ZEN von 0,03 bis 0,06 µg/kg KG unterschreitet sowohl den PMTDI der JECFA als auch den t-TDI des SCF [SCF, 2000].

## 1.5. Erkenntnisse zur Toxikokinetik

Untersuchungen von ZEN zur Aufnahme-Verteilung-Metabolismus und seiner Ausscheidung waren in den letzten Jahren Gegenstand einiger *in vitro* und *in vivo* Studien. Allerdings ist das Schicksal der Substanz innerhalb des Säugermetabolismus noch nicht hinreichend geklärt.

### 1.5.1. Resorption und Verteilung

Die intestinale Schicht aus Enterozyten ist die erste Barriere, die den Organismus vor dem Eindringen von Fremdstoffen schützt. Enterozyten sind nicht nur für die Resorption von Nährstoffen verantwortlich, sondern spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Bioverfügbarkeit von Substanzen. Neben ihrer Barrierefunktion besitzen Enterozyten fremdstoffmetabolisierende Enzyme und Transporterproteine um toxische Fremdstoffe unschädlich zu machen und abzutransportieren. Dadurch haben sie einen entscheidenden Einfluss auf die Resorption von Fremdstoffen [Schaut et al., 2008]. *In vitro*-Studien zur Resorption von ZEN im perfundierten Darm der Ratte zeigten, dass ZEN aufgrund seines lipophilen Charakters durch passive Diffusion die Zellmembran sehr schnell überwindet [Ramos et al., 1996]. In CACO-Zellen, einer humanen Darmkrebszelllinie,

konnte eine umfangreiche Metabolisierung von ZEN nachgewiesen werden. Sowohl die Reduktion durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) zu  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL als auch die Glucuronidierung von ZEN und den gebildeten reduktiven Derivaten konnten nachgewiesen werden [Schaut et al., 2008; Videmann et al., 2008]. Die gebildeten Metabolite werden mit Transportern aktiv aus der Zelle, sowohl zur Blutseite als auch zum Darmlumen hin, transportiert. Der Hauptmetabolit  $\alpha$ -ZEL wurde überwiegend auf der Blutseite nachgewiesen [Videmann et al., 2008 und 2009]. Untersuchungen zum Metabolismus von ZEN in der Darmschleimhaut von weiblichen Schweinen zeigten, dass alle Teile der Schleimhaut reduzierende und konjugierende Aktivitäten besitzen, welche im Duodenum und Jejunum am stärksten waren. Im Gegensatz hierzu zeigte der Darminhalt in dieser Studie keinerlei Aktivität. Mit Hilfe von Homogenisaten aus Duodenum bzw. Jejunum wurde gezeigt, dass ZEN in Gegenwart von NADPH zu  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL reduziert wird. Im Vergleich zu der Leber beträgt die reduzierende Aktivität der Darmschleimhaut nur ca. 20%. Trotz der geringen Aktivität des Darms wird durch seine enorm große Oberfläche ein quantitativer Einfluss auf die *in vivo*-Reduktion von ZEN angenommen [Olsen et al., 1987; Dänicke et al., 2005]. In weiteren *in vitro* Versuchen zum ZEN-Metabolismus von Darmbakterien wurde mittels dem Darminhalt von Schweinen gezeigt, dass die enthaltenen Mikroorganismen in der Lage sind ZEN zu  $\alpha$ -ZEL und einem weiteren nicht näher charakterisierten Metaboliten zu metabolisieren [Kollarzik et al., 1994]. Untersuchungen zur Biotransformation durch Pansenflüssigkeit aus Rindern zeigten, dass in Wiederkäuern der Metabolismus durch Mikroorganismen im Pansen eine Quelle für die Bildung von  $\alpha$ -ZEL sowie  $\beta$ -ZEL darstellt [Kiessling et al., 1984]. In *in vivo* Studien in Rindern konnte die Bildung beider reduktiver Derivate in, aus dem Duodenum entnommenen, Proben bestätigt werden [Seeling et al., 2005]. Die Metabolisierung von ZEN in den Enterocyten und der Rücktransport der Metabolite ins Darmlumen [Videmann et al., 2008] sowie die bevorzugte Ausscheidung über die Galle erschweren die präzise Bestimmung der Bioverfügbarkeit [Kuiper-Goodman et al., 1987]. In der Literatur finden sich für die orale Bioverfügbarkeit von ZEN in der Ratte beispielsweise sehr unterschiedliche Angaben. Kuiper-Goodman et al. [1987] leiteten aus Literaturdaten zur Ausscheidung von ZEN über den Urin der Ratte, Kaninchen und Menschen eine gute Bioverfügbarkeit ab. Dagegen publizierten Shin et al. [2009] in der Ratte eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit von 2,7%. Vermutlich präzipitierte hier ZEN aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit und somit kam es zu einer verlangsamten Resorption. Mallis et al. [2003] ermittelten in Sprague Dawley Ratten eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 30%. Die max. ZEN-Menge wurde hier bereits nach ca. 30 min erreicht und verteilte sich dann schnell im Organismus [Mallis et al., 2003]. Die höchsten ZEN-Konzentrationen wurden im Dünndarm gefolgt von Niere, Leber, Fettgewebe und Lunge nachgewiesen [Shin et al., 2009]. In Schweinen wurde dagegen eine orale Bioverfügbarkeit von 80-85% bestimmt [Biehl et al., 1993]. In untersuchten Leber- und Muskelproben von Schweinen konnten nur geringe Mengen an ZEN und seinen reduktiven Metaboliten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden im Muskelgewebe größere Mengen  $\alpha$ -ZAL detektiert [Zollner et al., 2002]. In Hennen wurden ebenfalls nur geringe ZEN-Gehalte im Muskelgewebe nachgewiesen. Im Fettgewebe waren die gemessenen Konzentrationen ebenfalls niedrig, zeigten hier jedoch eine ausgeprägte Persistenz, was die Ausscheidung von ZEN und seiner lipophilen Metabolite verzögerte [Dailey et al., 1980].

### 1.5.2. Untersuchungen zum hepatischen Metabolismus

Über den Metabolismus von ZEN ist bis heute nur wenig bekannt. Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen, gut untersuchten Phase I Metabolite im Säuger sind die reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL, welche bereits 1978 bei Umsetzungen von ZEN in Zellhomogenat und Mikrosomen aus der Rattenleber identifiziert wurden [Kiessling und Pettersson, 1978; Ueno und Tashiro, 1981]. Es konnte in einer Reihe von *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass die reduktiven Metabolite in Zellfraktionen verschiedener Tierspezies, abhängig von eingesetzten Cofaktoren und vom pH-Wert, gebildet werden [Ueno et al., 1983; Olsen und Kiessling, 1983]. Mit Hilfe von S9-Fractionen verschiedener Organe aus weiblichen Ratten wurde gezeigt, dass nicht nur die Leber zur Metabolisierung von ZEN befähigt ist, diese jedoch im Vergleich zu Niere, Milz und Gebärmutter die größte Aktivität bei der Reduktion von ZEN zu ZEL besitzt. Vollblut und daraus isolierte Erythrozyten sind ebenfalls in der Lage ZEN zu seinen reduzierten Derivaten zu metabolisieren. Zusätzlich wurde mit Zelllysaten aus den Erythrozyten neben der bekannten Reduktion von ZEN zu den ZEL-Derivaten auch die Oxidation von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zu ZEN gezeigt und damit, dass diese Metabolite in einem Redoxgleichgewicht abhängig von den vorhandenen Cofaktoren vorliegen [Chang und Lin, 1984]. In einer Untersuchung von Pompa et al. [1986] wurde der ZEN-Metabolismus in Zellfraktionen aus der Leber von Hühnern und Kaninchen untersucht. Der Vergleich des mikrosomalen zum zytosolischen Metabolismus von ZEN zeigte, dass die zytosolische Fraktion ZEN in Anwesenheit des Cofaktors NADPH schneller metabolisiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Kaninchenhepatozyten  $\alpha$ -ZEL als Hauptmetaboliten bilden im Gegensatz zu Hühnerhepatozyten, in denen  $\beta$ -ZEL als Hauptmetabolit identifiziert wurde [Pompa et al., 1986]. In einer *in vivo* Studie an Hühnern wurden  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL in ungefähr gleichen Mengen ausgeschieden [Mirocha et al., 1982]. Im Urin von Rindern wurde  $\beta$ -ZEL ebenfalls als Hauptmetabolit nachgewiesen, wogegen im Urin und in den Fäzes von Ratten nur geringe Mengen von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL nachgewiesen werden konnten [Mirocha et al., 1981].

Weitere beschriebene Formen der Metabolisierung von RALs sind die Glucuronidierung und Sulfatierung sowohl von ZEN als auch von den gebildeten reduktiven Derivaten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL [Mirocha et al., 1981]. Die *in vitro* Glucuronidierung wurde in verschiedenen Spezies untersucht, wobei die höchsten Raten für die Glucuronidbildung im Schwein und die niedrigste im Huhn gemessen wurde. Es zeigte sich außerdem eine Abnahme der Glucuronidbildung mit zunehmender Substratkonzentration von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL [Malekinejad et al., 2006]. Die effiziente Glucuronidierung von ZEN im Schwein konnte in *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Die über den Urin ausgeschiedenen ZEN-Metabolite lagen in dieser Studie fast vollständig glucuronidiert vor [Biehl et al., 1993]. In einer *in vivo* Studie im Huhn konnten ZEN und ZEN-Metabolite zu ca. 80% in glucuronidierter Form in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden [Dailey et al., 1980]. Die Strukturen der möglichen Glucuronide von sechs RALs des ZEN-Typ wurden von Stevenson et al. [2008] aufgeklärt und charakterisiert. Diese Strukturen wurden von Pfeiffer et al. [2010] bestätigt und deren Bildung *in vitro* in Mikrosomen verschiedener Tierspezies und im Menschen untersucht. Die ermittelten Enzymaktivitäten zeigten wenig Unterschiede für die unterschiedlichen Substrate,

jedoch große Unterschiede in den einzelnen Spezies [Pfeiffer et al. 2010]. Dies wurde auch in vergleichenden *in vivo* Untersuchungen im Schwein, Rind, Ratte, Kaninchen und Mensch nachgewiesen, in denen im Urin in allen Spezies Glucuronide von ZEN und z.T. auch der reduktiven Derivate nachgewiesen wurden, jedoch eine sehr unterschiedliche Effizienz in der Glucuronidierung festgestellt wurde. Mit Ausnahme der Ratte waren alle Spezies in der Lage RALs effizient zu glucuronidieren. In Rindern konnten neben den Glucuroniden auch größere Mengen an Sulfaten nachgewiesen werden [Mirocha et al., 1981]. Die höchste Aktivität für die Glucuronidierung von ZEN und seinen reduktiven Derivaten in humanen UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) wurde für die Isoenzyme gemessen, welche in Leber und im Dünndarm lokalisiert sind [Pfeiffer et al., 2010]. Die Glucuronidierung von RALs ist damit stark abhängig vom Gewebe. Ein Beispiel für ein Gewebe, welches ZEN und die in ihm gebildeten reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL nicht glucuronidieren kann ist die humane Prostata [Thouvenot et al., 1981].

Pfeiffer et al.[2007] führten *in vitro* Studien zum oxidativen Metabolismus von ZEN in der Ratte durch. Im CYP450-abhängigen Metabolismus in hepatischen Mikrosomen wurden 17 Metabolite nachgewiesen, die sich nach Charakterisierung mit Hilfe von GC-MS als oxidative Metabolite von ZEN und  $\alpha$ -ZEL darstellten. Dabei handelte es sich um einfach und mehrfach hydroxylierte ZEN- und ZEL-Metabolite, wobei eine sichere Identifikation der Hydroxylierungspositionen nicht möglich war [Pfeiffer et al., 2007a]. Oxidative ZEN-Metabolite waren vor dieser *in vitro* Studie nur als Sekundärmetabolite aus Pilzen bekannt [Bolliger und Tamm, 1972; Jackson et al., 1974; Steele et al., 1976; Stipanovic und Schroeder, 1975; Hagler et al., 1979; Pathre et al., 1980; Richardson et al., 1985].

### 1.5.3. Untersuchungen zum Metabolismus und Ausscheidung

Fremdstoffe werden nach ihrer Verweilzeit, die abhängig von der Verteilung der Substanz und der Möglichkeit der Metabolisierung ist, ausgeschieden. In der Leber metabolisierte Substanzen können über die Galle und dann über den Fäzes ausgeschieden werden. Im Blut befindliche Metabolite werden über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden. In Schweinen wird ZEN sehr langsam ausgeschieden. Dies wird zum einen durch die Persistenz von ZEN und ZEN-Metaboliten in Geweben erklärt [Ueno et al., 1977] und zum anderen durch einen umfangreichen enterohepatischen Kreislauf (EHK) in dem ZEN- und ZEL-Glucuronide im Darm durch Mikroorganismen gespalten und die Aglykone rückresorbiert werden [Biehl et al., 1993]. Mehrere Studien in Schweinen berichten über eine Ausscheidung von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL über die Galle [Doll et al., 2003, Meyer et al., 1997]. Aufgrund des starken EHKs in Schweinen erfolgte die Ausscheidung bevorzugt über den Urin (ca. 20% nach 72 h) und nur in deutlich geringerem Umfang über Fäzes (ca. 4% nach 72 h) [Biehl et al., 1993]. Detektierbare Metabolite im Plasma waren in dieser Studie  $\alpha$ -ZEL, ZEN-Glucuronid und  $\alpha$ -ZEL-Glucuronid.  $\beta$ -ZEL und Sulfat-Konjugate konnten nicht nachgewiesen werden. In der Studie von Dänicke et al. [2005] konnte in Schweinen ausschließlich  $\alpha$ -ZEL als Metabolit im Plasma detektiert werden. Andere Metaboliten waren entweder nicht enthalten oder unterhalb der Detektionsgrenze. In der Ratte konnte ebenfalls ein EHK nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit von

ZEN nach oraler Aufnahme betrug hier ca. 5,5 h [Mallis et al., 2003]. Weitere *in vivo* Studien in weiblichen Ratten zeigten, bis auf einen leichten Anstieg, der über den Fäzes ausgeschiedenen ZEN-Menge, eine dosisunabhängige (1 bzw. 100 mg/kg KG) Metabolisierung und Ausscheidung. Ca. 40-50% der verabreichten Dosis wurde innerhalb von 96 h über die Fäzes ausgeschieden, was dem zwei- bis vierfachen der über den Urin ausgeschiedenen Menge entsprach. 70-80% der eingesetzten Dosis von ZEN konnten in Fäzes und Urin nachgewiesen werden. Im Urin wurde freies ZEN als Hauptmetabolit nachgewiesen. Sowohl ZEN-Glucuronid als auch  $\alpha$ -ZEL und  $\alpha$ -ZEL-Glucuronid konnten nur in geringer Menge nachgewiesen werden. Im Fäzes wurde ca. 20% der eingesetzten Dosis als  $\alpha$ -ZEL nachgewiesen [Fitzpatrick et al., 1988]. Ähnliche Ergebnisse ergaben eine Studie von Mirocha et al. [1981]. In weiblichen Ratten konnten in einer Dosierung von 1,25 mg / Ratte (Low Dose Gruppe (LD)) bzw. 5 mg / Ratte (High Dose (HD)) im 72 h Urin in der LD Gruppe keine Konjugate detektiert werden. 60% der eingesetzten Dosis wurden als ZEN und ZEL ausgeschieden, wobei die beiden reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL lediglich 8% der Gesamtmetabolite ausmachten. In der HD Gruppe wurden nach 96 h im Urin im Mittel ca. 30% der eingesetzten ZEN Dosis ausgeschieden, wobei die Werte zwischen 20-60% stark schwankten.  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL sowie deren Glucuronide wurden z.T. gar nicht, nur in Spuren oder in geringen Mengen nachgewiesen. ZEN-Glucuronid wurde in einem Tier in größerer Menge nachgewiesen in den anderen Tieren dagegen gar nicht [Mirocha et al., 1981].

In legenden Hennen war die verabreichte ZEN Dosis nach 72 h fast vollständig über die Exkreta ausgeschieden. Berechnete Halbwertszeiten anhand der Blut- und Plasmakonzentration von ZEN ergeben Halbwertszeiten von 75 h und 89 h. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Galle nachgewiesen, was auch in dieser Spezies auf diesen Hauptausscheidungsweg schließen lässt. Ein geringer "carry over" auf die gelegten Eier von ca. 1% der verabreichten Dosis wurde nachgewiesen. Durch den lipophilen Charakter von ZEN und seiner Metabolite bindet ZEN gut an das Eigelb und lässt sich aus diesem nur schlecht eliminieren, so dass es dort eine ausgeprägte Persistenz aufweist. Daneben wurden aber auch im wässrigen Anteil nicht näher charakterisierte ZEN-Metabolite nachgewiesen, was auf eine Metabolisierung im Ei hindeutet [Dailey et al., 1980; Mirocha et al., 1982]. In Rindern wird ZEN bevorzugt über die Fäzes ausgeschieden. Im Urin konnten nur geringe Mengen von ZEN und seinen reduktiven Metaboliten nachgewiesen werden [Seeling et al., 2005]. Auch in Rindern wurde ein geringer "carry over" beobachtet, wo ca. 1% der verabreichten Dosis in der Milch nachgewiesen werden konnte [Mirocha et al., 1981].

## 1.6. Untersuchungen zur Toxikodynamik

### 1.6.1. Akute Toxizität

ZEN besitzt in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen bei oraler Verabreichung nur eine geringe akute Toxizität (Tab.: 1.1). Hühner zeigten bei einer Gabe von 15 g/kg KG keine adversen Effekte. In jungen Schweinen kann dagegen schon eine einmalige orale Gabe von ZEN zu geschwollenen und entzündeten Vulven führen, für die ein “No Observed Adverse Effect Level” (NOAEL) von 3,5 mg/kg KG abgeleitet wurde [Kuiper-Goodman et al., 1987].

Tabelle 1.1.: Zusammenfassung von LD<sub>50</sub>-Werten für ZEN [Kuiper-Goodman et al., 1987]

LD <sub>50</sub> (mg/kg KG)					
Spezies	Oral		Intraperitoneal		Literatur
	männl.	weibl.	männl.	weibl.	
Maus	>2000	>2000 >20000	-	>500	NTP (1982) Hidy et al. (1977) Hidy et al. (1977)
Ratte	>4000 >10000	>4000 >10000	5490	-	NTP (1982) Hidy et al. (1977)
Meerschwein	-	>5000	-	2500	Hidy et al. (1977)
Huhn	-	>15000			Chi et al. (1980)

### 1.6.2. Estrogene Aktivität von ZEN

ZEN bindet kompetitiv sowohl an den Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) als auch an ER $\beta$  in diversen Geweben wie, Uterus, Brustdrüse, Leber und Hypothalamus in einer Vielzahl von *in vitro* Systemen und *in vivo* [Zinedine et al., 2007; Takemura et al., 2007; Kuiper et al., 1998]. Je nach Testsystem und untersuchtem Gewebe ergaben sich unterschiedliche Sensitivitäten und relative Estrogenitäten für die RALs. In MCF7 humanen Brustadenokarzinomzellen stimulierten ZEN und seine reduktiven Derivate die Proliferation der Zellen über die Bindung an den ER $\alpha$ .  $\alpha$ -ZEL zeigt in diesem Assay eine ca. 90-fach höhere und  $\alpha$ -ZAL eine ca. 20-fach höhere relative Estrogenität als ZEN. Die relative Estrogenität der sechs untersuchten RALs wies die folgende Reihenfolge auf:  $\alpha$ -ZEL >>  $\alpha$ -ZAL >  $\beta$ -ZAL > ZAN > ZEN > cis-ZEN >  $\beta$ -ZEL [Shier et al., 2001; Malekinejad et al., 2005a]. Im “Uterotrophic Assay” in dem die Wirkung estrogener Substanzen auf das Uterusgewicht von ovariektomierten oder nicht geschlechtsreifen Ratten untersucht wurde, ergab sich folgende Reihenfolge relativer Estrogenität:  $\alpha$ -ZAL >  $\alpha$ -ZEL >  $\beta$ -ZAL > ZEN >  $\beta$ -ZEL [Ueno und Tashiro, 1981]. Mirocha et al. [1978] testeten trans-ZEN und cis-ZEN im “Uterotrophic Assay” und zeigten, dass cis-ZEN eine höhere relative Estrogenität als trans-ZEN besitzt [Mirocha et al., 1978]. Ähnliche Untersuchungen von Peters [1972] in Mäusen zeigten bei ZEN und cis-ZEN vergleichbare Aktivitäten, wobei die cis-ZEL-Derivate höhere Aktivitäten im “Uterotrophic Assay” zeigten und damit zur deutlichen Erhöhung der Uterusgewichte führten [Peters, 1972]. ZEN und seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL

wurden auf schnelle, nicht genomische, hormonelle Effekte getestet. Hierfür wurde die Wirkung der Mykotoxine auf die spontane Kontraktionsfähigkeit der glatten Gebärmuttermuskulatur von prä-pupertären Lämmern untersucht. ZEN zeigte wie  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ), eine konzentrationsabhängige Erhöhung der uterinen Aktivität, während für  $\beta$ -ZEL nur geringe Effekte beobachtet wurden und  $\alpha$ -ZEL eine signifikante Erniedrigung der spontanen Kontraktion des Myometriums zur Folge hatte [Giammarino et al., 2008]. ZEN konkurriert mit  $E_2$  um Bindungsstellen am ER. Die Bindung an den ER alleine reicht nicht für die Auslösung einer estrogenbedingt hormonellen Antwort aus. In einer Reihe weiterer Studien konnte gezeigt werden, dass ZEN und seine reduktiven Derivate nach Bindung an den ER als Rezeptorkomplex in den Zellkern transloziert und in Folge die Genexpression von estrogenabhängigen Proteinen bewirkt [Nikov et al., 2000]. Im Vergleich zu  $E_2$  besitzt ZEN je nach Assay eine um den Faktor 100-1000 fach geringere estrogen Aktivität [Kiang et al., 1978]. Untersuchungen zur Rezeptorbindung zeigten, dass die Reduktion zum  $\beta$ -Epimer die Aktivität verringert, während die Reduktion zum  $\alpha$ -Epimer die Aktivität erhöht. Die Reduktion der Vinyl-Gruppe führt ebenfalls zur Steigerung der Bindungsaffinität an den ER [Pathre und Mirocha, 1976]. Malekinejad et al. [2006] leiteten daraus ab, dass die Metabolisierung von ZEN zu  $\alpha$ -ZEL eine Toxifizierung, die von ZEN zu  $\beta$ -ZEL eine Detoxifizierung darstellt. Dieser unterschiedliche Metabolismus von ZEN ist ein möglicher Grund, dass das Schwein bezüglich der estrogenen Aktivität empfindlicher auf ZEN reagiert als das Huhn [Malekinejad et al., 2006]. In einer Fütterungsstudie an weiblichen Schweinen mit kontaminiertem Hafer, wurde nach 18 Tagen ein estrogener Effekt von ZEN gezeigt. Die Tiere nahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich stärker zu (10,5 kg gegenüber 5,4 kg). Außerdem waren bei den getesteten Tieren Veränderungen des Genitalbereichs zu beobachten [Zollner et al., 2002]. In einer Studie an weiblichen Ferkeln, die eine ZEN-haltige Ernährung erhielten verdoppelte sich das Uterusgewicht gegenüber der Kontrollgruppe [Doll et al., 2003]. Aufgrund der estrogenen Aktivität von ZEN wurden die meisten Studien an weiblichen Tieren durchgeführt, Daten zur homonellen Wirkung von ZEN in männlichen Tieren sind limitiert. In einer *in vitro* Studie wurde an Leydig-Zellen der Maus gezeigt, dass ZEN und  $\alpha$ -ZEL potente Inhibitoren der Testosteronproduktion in diesen Zellen sind [Yang et al., 2007a]. *In vivo* Studien an männlichen, 70 Tage alten Ratten, die 20 mg/kg KG ZEN verabreicht bekamen, zeigten erhöhte Prolactinwerte, jedoch keine weiteren adversen Effekte [Milano et al., 1995]. In männlichen Mäusen dagegen zeigten sich nach ZEN und  $\alpha$ -ZEL Gabe ein Vielzahl von adversen Effekten auf den männlichen Reproduktionstrakt, die zu einer Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit führten [Yang et al., 2007b]. Eine Studie an männlichen Ratten zeigte nach 14-tägiger Einnahme von ZEN-haltigem Futter ebenfalls erhöhte Unfruchtbarkeit [Ruzsas et al., 1979]. Filipiak et al. [2009] zeigten ebenfalls, dass die Gabe von ZEN (40  $\mu$ g/täglich, subcutan) zur Verringerung der Anzahl an Sertoli-Zellen und Spermatogonien führte. Die Effekte waren jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den parallel untersuchten Substanzen  $E_2$  und Diethylstilbestrol (DES) [Filipiak et al., 2009]. *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss der Exposition von ZEN und seiner reduktiven Derivate auf die Spermienqualität von Schweinen zeigten, dass ZEN und  $\alpha$ -ZEL die Stabilität der Chromatinstruktur und die Viabilität und  $\beta$ -ZEL die Motilität der Spermien negativ beeinflussten [Benzoni et al., 2008]. In *in vivo* Experimenten konnte in männlichen Schweinen nach Gabe von ZEN eine Verringerung des Serumtestosteronspiegels, des Hodengewichtes und der produzierten Samenmenge festgestellt werden, während gleichzeitig

Feminisierung und Libidoverlust induziert wurden [D'Mello et al., 1999].

Eine weitere biologische Wirkung von ZEN besteht in der kompetitiven Bindung an Enzyme des Steroidhormonstoffwechsels. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass ZEN mit Androstendion um die Bindung an  $3\alpha$ -HSD konkurriert und dadurch die Deaktivierung des Hormons supprimiert [Olsen et al., 1981]. Ebenfalls konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ZEN kompetitiv mit Pregnenolon um die Bindung an  $3\beta$ -HSD konkurriert und zur Inhibition von  $3\beta$ -HSD führen kann, was die Progesteronsynthese inhibiert [Malekinejad et al., 2005b; 2006]. Die kompetitive Hemmung von ZEN und  $\alpha$ -ZAL kann zur Hemmung von  $3\alpha$ -HSD und  $3\beta$ -HSD in der Prostata führen, was zu einem Anstieg der Konzentration des wachstumsfördernden Hormons  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron führte [Thouvenot et al., 1981]. ZEN kann demnach neben seiner direkten Interaktion mit den Estrogenrezeptoren auch als kompetitiver Inhibitor Einfluss auf die Bildung, Inaktivierung und Feinregulation von Steroidhormonen haben, wodurch die Hormonregulation und ihre Signalwege durch ZEN auf dem Prä-Rezeptor Level gestört werden können [Tiemann et al., 2003; Malekinejad et al., 2005b und 2006].

### 1.6.3. Reproduktions- und Entwicklungstoxizität

ZEN führt nachgewiesenermaßen zu einer Reihe von Veränderungen im Reproduktionstrakt von Nagern und Säugern. Die durch die estrogenen Wirkung auftretenden Symptome werden als Hyperestrogenismus zusammengefasst und umfassen verlängerten Estrus, Anestrus, Veränderungen der Libido, Brustdrüsenentzündungen, Vulvovaginitis und rektaler oder vaginaler Prolaps, verstärkte Entwicklung von Euter und Brustdrüsen und unnatürliche Laktation. Es können auch eine Reihe sekundärer Komplikationen auftreten, die als reproduktionstoxisch einzustufen sind, wie verringerte Fruchtbarkeit, erhöhte Anzahl an Embryonenresorptionen bzw. Tot- und Fehlgeburten, verringerte Wurfgröße, Unfruchtbarkeit und erhöhte Häufigkeit von Pseudoschwangerschaften. Ebenfalls führt ZEN zu einer Reihe entwicklungstoxischer Effekte worunter veränderte Gewichte von Nebenniere, Schilddrüse und Hypophyse beobachtet wurden [Kuiper-Goodman et al., 1987]. In einer Untersuchung zur Reproduktionstoxikologie wurde ZEN im Konzentrationsbereich von 1-8 mg/kg KG an schwangere weibliche Sprague-Dawley Ratten über die Gestationstage 6-19 verabreicht. ZEN zeigte toxische Effekte auf die Muttertiere und fetotoxische Effekte, wie verspätete fetale Entwicklung und verringertes Fetengewicht in allen Dosisgruppen, welche indirekt auf die maternale Toxizität zurückgeführt wurden. In der hohen Dosierungen von 8 mg/kg KG wurden verringerte Viabilität und verringerte Ossifikation bei 4 und 8 mg/kg KG beobachtet. Der fetale anogenitale Index war in allen Dosisgruppen erhöht, was auf einen androgenen Effekt von ZEN während der fetalen Entwicklung hindeutet. Der Effekt wurde auf den hormonellen Einfluss zurückgeführt und als nicht teratogen eingestuft [Collins et al., 2006]. Schweine reagierten unter den untersuchten Spezies am empfindlichsten auf die estrogenen Aktivität von ZEN, so dass reproduktions- und entwicklungstoxische Effekte direkt auf die estrogenen Aktivität zurückgeführt wurden [Tiemann und Dänicke, 2007]. In weiblichen Schweinen führte die orale Aufnahme von ZEN mit dem Futter zu Störungen im Östrus [Edwards et al., 1987]. Bei präpubertären weiblichen Schweinen wurden Entzündungen der Vulva, Schwellungen der Brustdrüsen und eine erhöhte Anzahl an vesikulären und zystischen

Vesikel an den Ovarien beobachtet [Bauer et al., 1987]. In männlichen Schweinen erniedrigte ZEN das Serumtestosteron, verringerte das Hodengewicht und die Spermatogenese und induzierte Verweiblichung mit einhergehendem Verlust der Libido. In Kühen wurden Unfruchtbarkeit, reduzierte Milchproduktion und Hyperestrogenismus in Verbindung mit der Aufnahme von ZEN beobachtet [D'Mello et al., 1999]. Schweine und Schafe scheinen sensitiver auf ZEN zu reagieren als Nager [Zinedine et al., 2007], während Hühner sich resistent gegen die Wirkungen von ZEN zeigten [Allen et al., 1981].

ZEN oder ZAL waren vermutlich Grund für eine Epidemie frühzeitiger Pubertät bei jungen Kindern in Puerto Rico zwischen 1978 und 1981. ZEN oder seine Metabolite wurden bei betroffenen Kindern im Blutplasma nachgewiesen, jedoch konnte ZEN nicht sicher als Auslöser identifiziert werden. Aus Ungarn wurde ebenfalls von Fällen von frühzeitiger Pubertät berichtet. ZEN konnte sowohl im Blut als auch in Nahrungsmitteln der Patienten nachgewiesen werden [SCF, 2000; Massart und Saggese, 2009].

#### 1.6.4. Subakute und subchronische Toxizität

Die in Toxizitätsstudien mit oraler Verabreichung beobachteten adversen Effekte beruhen in erster Linie auf der Interaktion von ZEN und von ZEN-Metaboliten mit dem Estrogenrezeptor [Zinedine et al., 2007]. Mäuse zeigten nach 13-wöchiger ZEN-Supplementation Atropien der Samenblase und Hoden, schuppenartige Metaplasien der Prostata, Osteoporose, Myelofibrose des Knochenmarks, zytoplasmatische Vakuolisierung der Nebenniere, Hyperkeratose der Vagina und Hyperplasien des Endometriums. Alle diese Effekte können auf die estrogene Wirkung von ZEN zurückgeführt werden [NTP, 1982]. Fischer Ratten reagierten in einer Studie zehnfach sensitiver auf ZEN als Mäuse. Schweine und Schafe reagierten noch empfindlicher als Nager. Für Schweine wurde ein NOEL-Wert von 40 µg/kg KG aufgrund estrogener Effekte festgelegt [Kuiper-Goodman et al., 1987].

#### 1.6.5. Chronische Toxizität und Kanzerogenität

In einer Langzeituntersuchungen von Fischer Ratten, die eine ZEN Dosis von 1 bzw. 2 mg/kg KG mit der Nahrung erhielten, zeigten sich keine neoplastischen Effekte. Es konnten jedoch mehrere andere Veränderungen beobachtet werden, wie Entzündungen der Prostata, Hodenathropie, Zysten im Brustgewebe und den Milchkanälen männlicher Tiere, zytoplasmatische Vakuolisierungen in der Leber in männlichen Tieren und eine erhöhte Anzahl an chronisch progressiven Nephropatien in männlichen und weiblichen Tieren [NTP, 1982]. Eine vergleichbare Studie an Wistar Ratten zeigte ebenfalls keine erhöhte Tumorzinzidenz [Becci et al., 1982]. Eine Kanzerogenitätsstudie an Mäusen, welche eine ZEN-Dosis von 7,9 bzw. 15,8 mg/kg KG mit der Ernährung erhielten, zeigte keine Effekte in männlichen Tieren, jedoch in den weiblichen Tieren Estrogen-bedingte Effekte in mehreren Geweben sowie Myelofibrose im Knochenmark. In dieser Studie traten eine erhöhte Anzahl an neoplastischen Läsionen in Leber und Hypophyse auf. Ebenso wurde eine signifikant gesteigerte

Anzahl an Adenomen der Hypophyse in männlichen und weiblichen Mäusen, sowie hepatozelluläre Adenome in weiblichen Tieren beobachtet [NTP, 1982]. Adenome der Hypophyse sind auch für andere estrogenwirksame Substanzen aus Langzeitstudien bekannt [Kuiper-Goodman et al., 1987]. Weitere *in vivo* Untersuchungen in Ratten haben gezeigt, dass ZEN hämatotoxisch ist und zu Fehlfunktionen in der Blutgerinnung sowie zu Veränderungen einzelner Blutwerte führt. Darunter waren auch Werte, die auf eine Lebertoxizität hindeuten [Maaroufi et al., 1996]. Die lebertoxischen Eigenschaften von ZEN konnten in weiteren Studien im Kaninchen bestätigt werden [Conkova et al., 2001]. ZEN wurde 1993 von der "International Agency for Research on Cancer" in Klasse 3 eingestuft (nicht klassifizierbar für Kanzerogenität gegenüber Menschen) [SCF, 2000].

### 1.6.6. Genotoxizität

ZEN wurde in mehreren Testsystemen auf seine Genotoxizität untersucht. Im Standard-Ames-Test, sowohl mit als auch ohne Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen, wurde ZEN mehrfach negativ getestet. Ebenso induzierte ZEN in *Escherichia coli* keine SOS-DNA-Reparatur oder Crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae*, wirkte jedoch bakterientoxisch in Gram-negativen Bakterien [Kuiper-Goodman et al., 1987; SCF, 2000]. Hinweise auf ein genotoxisches Potential ergaben *in vitro* Untersuchungen zur Genotoxizität in kultivierten Rinderlymphozyten, in denen ZEN DNA-Addukte bildete [Lioi et al., 2004], sowie in DOK, Vero und CACO Zellen [Abid-Essefi et al., 2003 und 2004] und in Vero Affennieren- und Mausknorpelmarkszellen, in denen DNA-Fragmentierung und Mikrokerne nachgewiesen wurden [Ouanes et al., 2005]. ZEN und seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zeigten Zytotoxizität und Induktion von oxidativem Stress in CACO Zellen.  $\beta$ -ZEL zeigte in diesen Untersuchungen gegenüber  $\alpha$ -ZEL eine deutlich höhere Aktivität. Alle drei Substanzen zeigten im COMET- und Diphenylamin-Assay DNA-Fragmentierung und damit ein genotoxisches Potential. Diese Effekte gingen mit einem Anstieg von Apoptosemarkern einher, welche im Vergleich der drei untersuchten RALs für ZEN die stärkste Aktivierung aufwiesen [Abid-Essefi et al., 2009]. Ebenfalls wurden *in vitro* ohne exogene Metabolisierung Chromosomen-Aberration, Schwester-Chromatid-Austausch und Polyploidien in Eizellen des chinesischen Hamsters gezeigt [Ghedira-Chekir et al., 1998]. *In vivo* Untersuchungen an Mäusen, die eine einmalige Dosis von 2 mg/kg KG i.p. verabreicht bekamen, führten zu DNA-Addukten die mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling in Niere und Leber nachgewiesen wurden [Pfohl-Leszkowicz et al., 1995]. In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die in Leber und Niere gebildeten DNA-Addukte durch gleichzeitige Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol signifikant vermindert werden konnten [Grosse et al., 1997, Zinedine et al., 2007]. Bis zu 15 verschiedene DNA-Addukte konnten insgesamt identifiziert werden, wobei die DNA-Addukt-Konzentration in der Leber höher waren als in der Niere. Außerdem war die Menge an DNA-Addukten nach i.p. Gabe deutlich höher als nach oraler Verabreichung. In Eizellen von Mäusen konnten nach wiederholter ZEN Gabe von 1 mg/kg KG, 6 verschiedene DNA-Addukte nachgewiesen werden [Pfohl-Leszkowicz et al., 1995]. Weitere toxische Einflüsse zeigte ZEN durch Schädigungen der Mitochondrien und/oder Lysosomen, Induktion von Lipidperoxidation, Zelltod und Inhibition der Proteinbiosynthese und DNA-Synthese [Kouadio et al., 2005].

## 2. Problemstellung

ZEN ist ein von Fusarien produziertes, weit verbreitetes Mykotoxin mit estrogener Wirkung, das auch in unseren Breiten häufig in Nahrungsmitteln nachgewiesen wird. Das gesundheitliche Risiko für den Menschen kann bisher nur unzureichend abgeschätzt werden, da für eine detaillierte Sicherheitsbewertung die Datenlage bisher als nicht ausreichend angesehen wird [SCF, 2000]. Ein großes Problem stellt die Kontamination von Futtermitteln dar, weshalb ZEN ein häufig wiederkehrendes Problem in der Landwirtschaft ist. Besonders Schweine reagieren sehr empfindlich auf das Mykotoxin, bei denen bereits geringe Kontaminationen zu Hyperestrogenismus und entwicklungs- und reproduktionstoxischen Effekten führen können. Andere Spezies wie z. B. Hühner scheinen gegen die toxischen Effekte von ZEN resistent zu sein. Die Ergebnisse mehrerer *in vivo* und *in vitro* Studien weisen darauf hin, dass der Metabolismus von ZEN einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität der Substanz hat. ZEN unterliegt in den meisten untersuchten Spezies einem reduktiven Metabolismus, welcher sehr gut untersucht ist. Neuere Erkenntnisse zeigen allerdings, dass ZEN auch oxidativ metabolisiert wird [Pfeiffer et al., 2007a].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des oxidativen Metabolismus von ZEN, cis-ZEN und der aus ZEN reduktiv gebildeten Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL. Neben der Untersuchung des hepatischen ZEN-Metabolismus wurde untersucht, inwieweit Mikroorganismen des menschlichen Verdauungstraktes ZEN modifizieren können und somit neuartige ZEN-Kongenere produzieren. Die hepatische Phase I und II der Metabolismusreaktionen von ZEN und seinen Metaboliten wurden *in vitro* mit Zellfraktionen untersucht. Mittels Inkubationen von ZEN in Leberschnitten sollten *in vivo* ähnliche Bedingungen hergestellt werden und untersucht werden, ob die in Zellfraktionen beobachteten oxidativen Metaboliten in Konkurrenz zu Phase II Metabolismusreaktionen in der Leber gebildet werden können. Die Untersuchungen von Gallenproben von mit ZEN behandelten männlichen Ratten sollten zeigen, ob oxidative Metabolite von ZEN *in vivo* gebildet werden.



## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Photochemie von ZEN

ZEN besitzt im Gegensatz zu seinem reduktiven Derivat ZAN eine trans-Doppelbindung zwischen C11 und C12. Es ist bekannt das Doppelbindungen durch UV-Licht isomerisieren können und somit die trans-Form in die cis-Form und umgekehrt umgewandelt werden kann. Die photochemische Isomerisierung von trans-ZEN zu cis-ZEN wurde unter Bestrahlung verschiedener Wellenlängen und Lichtquellen untersucht. Hierfür wurde ZEN (10  $\mu\text{M}$ ) in methanolischer Lösung in einer Quarzküvette UV-Licht der Wellenlängen 254 nm, 366 nm und bei Laborlichtverhältnissen ausgesetzt (Kap.: 5.4.2.2). Nach Ablauf definierter Reaktionszeiten wurde die Lösung mit Hilfe der HPLC-DAD analysiert (Kap.: 5.4.1.1). Zur Kontrolle wurde ZEN gleichermaßen, jedoch unter Lichtausschluss behandelt. Das gebildete cis-ZEN wurde isoliert, um es in weiteren Experimenten auf seinen Metabolismus mit Zellfraktionen zu untersuchen und somit Unterschiede in der Biotransformation im Vergleich zu trans-ZEN aufzuzeigen (Kap.: 3.5).

Die HPLC Analyse des Reaktionsansatzes von ZEN, bestrahlt mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm für 1 h (Abb.: 3.1.1 A) zeigte gegenüber der Kontrolle (Abb.: 3.1.1 B) die Bildung drei neuer Peaks. Neben dem Hauptprodukt, das kurz nach ZEN bei der Retentionszeit von 24,4 min eluierte, wurden zwei weitere Produkte in geringer Menge gebildet. Diese wurden bei den Retentionszeiten 25,1 min und 25,8 min detektiert. Das mit der HPLC isolierte Hauptprodukt lies sich nach erneuter photochemischer Isomerisierung wieder in ZEN umwandeln und zeigte in der LC-MS Analyse ein  $m/z$  von 317, so dass es sich hier um das gesuchte cis-ZEN handelt. Cis-ZEN hatte einem Anteil von 56% an der Gesamtmenge beider Isomere (Abb.: 3.1.1 C). Eine längere Reaktionszeit veränderten das gebildete Isomerenverhältnis nicht, so dass bei dieser Wellenlänge nach 1 h bereits ein Gleichgewicht gebildet worden war. Die photochemische Umwandlung von ZEN zu cis-ZEN wurde auch bei der größeren Wellenlänge von 366 nm und bei Laborlichtverhältnissen untersucht. Bei einer Wellenlänge von 366 nm wurde bei gleicher Reaktionszeit deutlich weniger cis-ZEN gebildet, das hier einen Anteil von 36% an den beiden Isomeren ausmachte. Unter Laborlichtverhältnissen konnte nach 5 h cis-ZEN detektiert werden, das hier einen Anteil von 8% aufwies (Abb.: 3.1.1 C). Unter beiden Reaktionsbedingungen konnten im HPLC-Chromatogramm keine weiteren Nebenprodukte detektiert werden.

Die Untersuchungen zur photochemischen Isomerisierung von ZEN haben gezeigt, dass durch Bestrahlung mit UV-Licht cis-ZEN gebildet wird. Energiereiche Strahlung bei kleinerer Wellenlänge

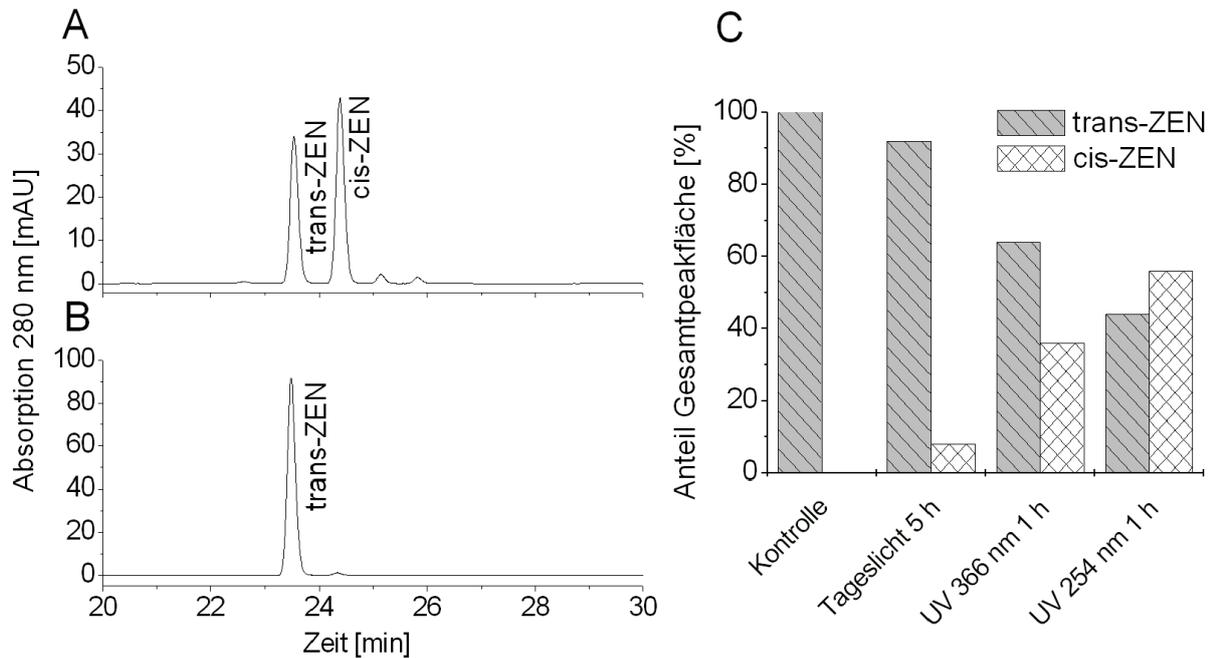


Abbildung 3.1.1.: Photochemische Umwandlung von ZEN. HPLC-Profil von ZEN (10 µM) **A:** nach Reaktion bei 254 nm für 1 h, **B:** Kontrolle unter Lichtausschluss, **C:** prozentuale Verteilung von ZEN und cis-ZEN bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.1

führte zur Bildung geringer Mengen von Nebenprodukten. Nach einer Stunde hatte sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Isomeren eingestellt. In Versuchen von Smyth und Frischkorn [1980] wurden bei Bestrahlung mit gleicher Wellenlänge erst nach sechs Stunden ein identisches Gleichgewicht zwischen beiden Isomeren erreicht. Peters [1972] erreichte durch Bestrahlungen von 72-96 h mit einer Quecksilberlampe fast vollständige Umsetzung zu cis-ZEN. Untersuchungen zur Isomerisierung von  $\alpha$ -ZEL haben gezeigt, dass auch hier das cis-Isomer gebildet wurde, was sich mit den Untersuchungen von Peters [1972] deckt, welcher neben cis-ZEN auch beide cis-ZEL-Derivate herstellte, diese auf ihre chemische Struktur hin jedoch nicht näher charakterisierte. Der Test aller ZEN- und ZEL-Isomere im "Uterothropic Assay" zeigte, dass cis-ZEN eine leicht geringere estrogenere Aktivität, beide cis-ZEL Derivate jedoch eine höhere estrogenere Aktivität gegenüber ihren trans-Isomeren zeigten, was in der Gewichtszunahme des Uterus gemessen wurde [Peters, 1972]. Unter normalen Laborlichtverhältnissen konnte ebenfalls die Isomerisierung von ZEN zu cis-ZEN beobachtet werden. Folglich sollten ZEN-Lösungen vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Ebenfalls kann davon ausgegangen werden, dass ZEN, welches durch Tageslicht z.T. zu cis-ZEN isomerisiert, neben den bekannten ZEN-Kongeneren, die von Fusarien gebildet werden, eine weitere Kontaminante auf von Fusarien befallenen Lebens- und Futtermitteln darstellt. Da die Isomerisierung zu den cis-Derivaten mit einer Erhöhung der estrogenen Aktivität verbunden ist, sind diese Metabolite von toxikologischer Bedeutung und werden in nachfolgenden *in vitro* Metabolismus Untersuchungen untersucht (Kap.: 3.5).

## 3.2. Biotransformation von ZEN durch menschliche Darmbakterien

Der menschliche Darm wird von ca.  $10^{14}$  Bakterien besiedelt, die sich aus ca. 300-400 verschiedenen Bakteriengattungen zusammensetzen. Neben fermentativen Prozessen zum Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden, sind die Bakterien auch zu biochemischen Reaktionen befähigt, welche Fremdstoffe und damit auch deren toxisches Potential modifizieren können. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war zu klären, ob ZEN durch Darmbakterien modifiziert werden kann und ob hierdurch neue, noch unbekannte Metabolite entstehen. Für die Untersuchungen wurde wie in Kap.: 5.4.3.1 beschrieben, aus humanen Fäzes eine Suspension hergestellt, in der ZEN (100  $\mu\text{M}$ ) und die verwendeten Referenzsubstanzen Matairesinol (MAT) und Daidzein (DAI) (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) über 48-72 h inkubiert wurden (Kap.: 5.4.3.2). Die Inkubate wurden nach der Aufarbeitung mit Hilfe der LC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.3 Methode 5).

### 3.2.1. Charakterisierung der Fäzessuspension

Für die Charakterisierung der hergestellten Fäzessuspension wurden die Referenzsubstanzen MAT und DAI eingesetzt, deren bakterielle Biotransformation bekannt und in der Literatur detailliert beschrieben ist (Abb.: 3.2.1 & 3.2.2).

#### Matairesinol

Das pflanzliche Lignan MAT wird von der mikrobiellen Darmflora in mehreren Schritten demethyliert und dehydroxyliert, so dass das Säugerglignan Enterolacton (ENL) gebildet wird [Clavel et al., 2006], (Abb.: 3.2.1).

MAT wurde durch die in der Fäzessuspension enthaltenen Bakterien innerhalb einer Inkubationszeit von 48 h zu ca. 75% zu zwei Hauptmetaboliten umgesetzt. Bei beiden Metaboliten ergab sich aus dem detektierten  $m/z$  im MS-TIC und der  $\text{MS}^2$ -Fragmentierung, dass es sich um Demethylierungsprodukte handelte. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde das eingesetzte MAT zu 100% in ENL metabolisiert (Abb.: 3.2.3 A).

Geringe Mengen von ENL konnten auch in den Kontrollinkubationen mit autoklavierter Fäzes nachgewiesen werden. Zusätzlich durchgeführte Kontrollinkubationen, die DMSO anstatt MAT enthielten, zeigten ebenfalls geringe Mengen an ENL. Somit kann angenommen werden, dass der MAT-Metabolit aus den Fäzesproben stammt und womöglich auf eine lignanhaltige Ernährung der Fäzesspender zurückzuführen ist. Die Quantifizierung der detektierten Flächen ergab unabhängig von Inkubationszeit und -art eine ENL-Konzentration von  $5,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ . Dies entspricht bei Inkubationen von MAT (100  $\mu\text{M}$ ) einem Fehler von ca. 5,7% und wurde als vernachlässigbar gewertet. ENL-Konzentrationen in der gleichen Größenordnung wurden auch in den Kontrollinkubationen von MAT nachgewiesen.

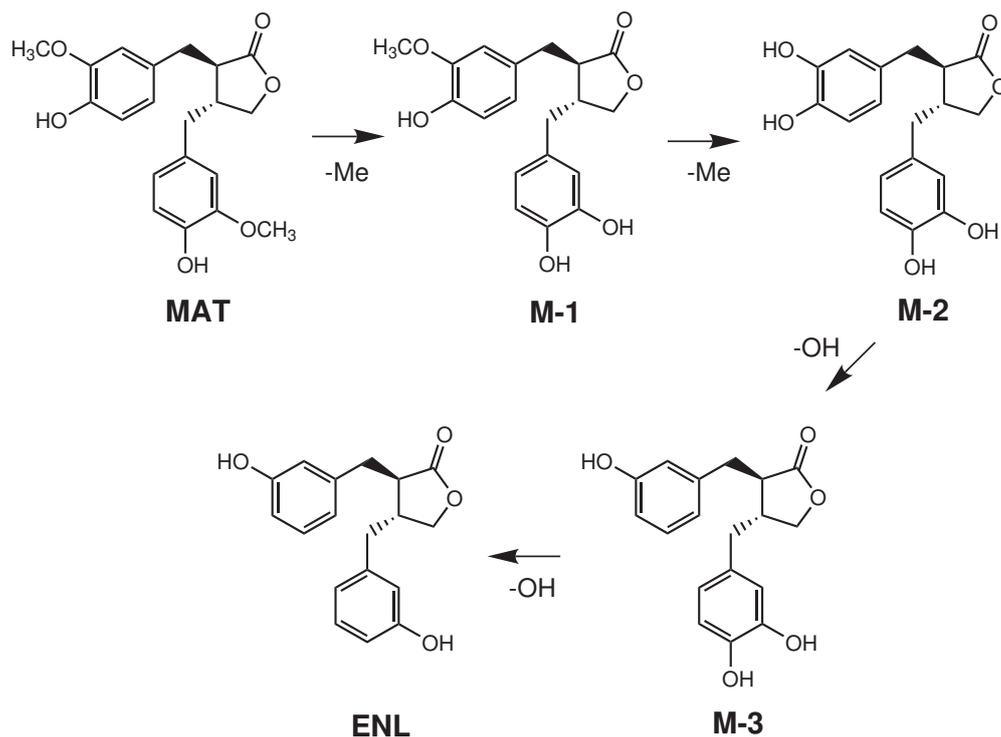


Abbildung 3.2.1.: Aus der Literatur bekannte, bakterielle Metabolismusreaktionen von MAT zu ENL. M=Metabolit, Me=Methylgruppe, OH=Hydroxylgruppe, ENL=Enterolaktone [Modifiziert nach Clavel et al., 2006; Wang et al., 2000].

### Daidzein

Vom Isoflavon DAI ist bekannt, dass es von Darmbakterien zu Dihydrodaidzein (DHD) reduziert wird. Dieses kann entweder durch weitere Reduktion und Wasserabspaltung zu Equol [Chang und Nair, 1995], oder nach Umlagerung bzw. Ringspaltung zu *O*-Desmethylangolensin (*O*-DMA) reduziert werden [Schoefer et al., 2002], (Abb.: 3.2.2).

DAI zeigte nur eine geringe Umsetzung von < 5% des Substrates zu den beiden Metaboliten DHD und *O*-DMA (Abb.: 3.2.3 B). Beide Metaboliten wurden anhand der von Rafii et al. [2003] publizierten Massenspektren identifiziert. Die von Chang und Nair [1995] beschriebene Bildung von Equol konnte in den durchgeführten Inkubationen mit humaner Fäzessuspension nicht beobachtet werden. Anhand der eingesetzten Referenzsubstanzen konnte gezeigt werden, dass die Fäzessuspension aktive Darmbakterien enthält. Diese sind zu Demethylierungs- und Dehydroxylierungsreaktionen sowie in geringem Umfang zu Reduktionen und Spaltungsreaktionen befähigt.

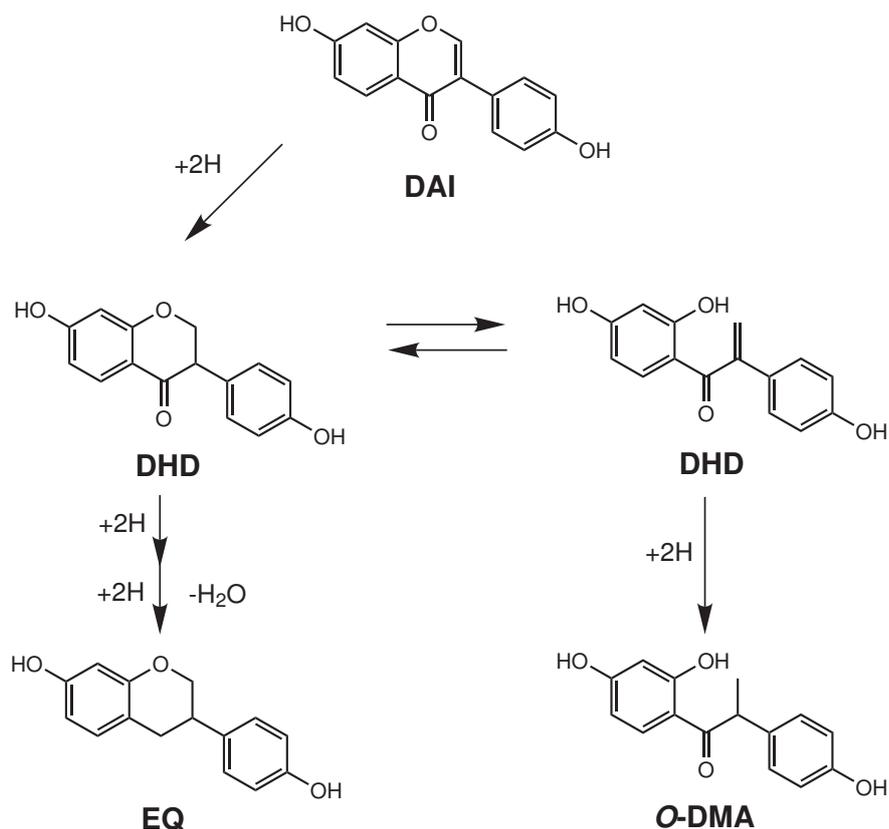


Abbildung 3.2.2.: Aus der Literatur bekannte bakterielle Metabolismusreaktionen von DAI. DHD=Dihydrodaidzein, O-DMA=O-Desmethylangolensin, EQ=Equol, H=Wasserstoff [Modifiziert nach Chang und Nair, 1995; Schoefer et al., 2002].

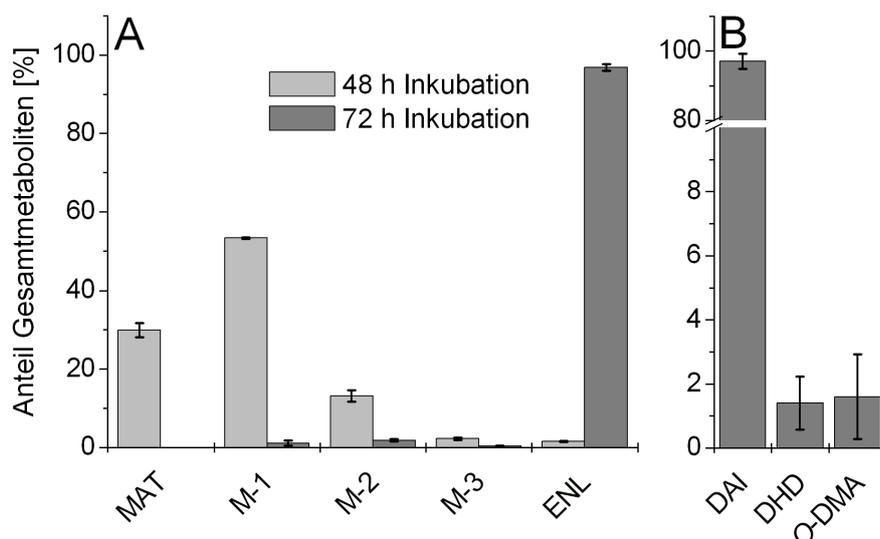


Abbildung 3.2.3.: Metabolitenverteilung nach Biotransformation von **A**: MAT und **B**: DAI (jeweils 100 µM) unter Inkubation mit humaner Fäzessuspension für 48 bzw. 72 h bei 37°C. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (MW) ± Spannweite (SW) aus zwei unabhängig durchgeführten Inkubationen.

## 3.2.2. Inkubationen von ZEN mit Fäzessuspension

Die Inkubation von ZEN (100  $\mu\text{M}$ ) in humaner Fäzessuspension zeigte nach 72 h einen geringen Umsatz von  $< 5\%$ . Die berechnete Wiederfindung aus dem ermittelten ZEN-Gehalt in der Kontrollinkubation im Vergleich zu einer ZEN-Lösung bekannter Konzentration beträgt  $62,4 \pm 11,1\%$ . Im Inkubationsmedium konnten die beiden reduktiv gebildeten Metabolite  $\alpha$ -ZEL mit einem Anteil von  $2,5 \pm 0,3\%$  und  $\beta$ -ZEL mit einem Anteil von  $1,0 \pm 0,3\%$  an der Gesamtmetabolitenmenge nachgewiesen werden (Abb.: 3.2.4 A).

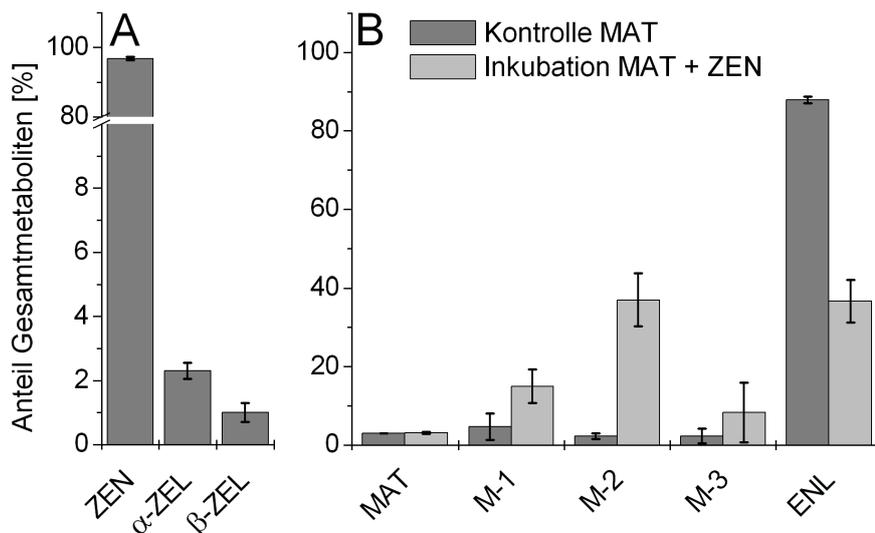


Abbildung 3.2.4.: Metabolitenverteilung der Inkubationen von **A**: ZEN (100  $\mu\text{M}$ ) für 72 h mit humaner Fäzessuspension bei 37°C. Dargestellt sind die MW  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus drei unabhängig durchgeführten Inkubationen. **B**: MAT nach Koinkubation von MAT (100  $\mu\text{M}$ ) und ZEN (100  $\mu\text{M}$ ) für 72 h mit humaner Fäzessuspension bei 37°C. Dargestellt sind MW  $\pm$  SW aus zwei unabhängig durchgeführten Inkubationen.

Mit Hilfe vorhandener Referenzsubstanzen wurden die beiden detektierten ZEN-Metaboliten anhand der Retentionszeit und der MS<sup>2</sup>-Fragmentierung bestätigt. Weitere detektierte Peaks konnten keinen ZEN-assoziierten Metaboliten zugeordnet werden. In Koinkubationen mit MAT wurde überprüft, ob die Darmbakterien in Anwesenheit von ZEN ihre Aktivität beibehalten. Es zeigte sich, dass die Darmbakterien aktiv sind, jedoch MAT im Vergleich zur Inkubation ohne ZEN geringer metabolisieren. Nach 72 h zeigte sich ein deutlicher Anstieg demethylierter Produkte und eine verringerte Bildung von ENL gegenüber der Inkubation ohne ZEN (Abb.: 3.2.4 B). Die Bildung von ENL scheint in den Koinkubationen verzögert zu sein, eventuell durch eine Hemmung der Dehydroxylierungsreaktionen.

Die teilweise nicht vollständigen Wiederfindungen von ZEN und DAI werden auf die Lipophile der beiden Testsubstanzen zurückgeführt (Anhang Tab.: A.2). ZEN und DAI binden wahrscheinlich gut an die Bakterienmembranen und die in der Suspension enthaltenen Feststoffpartikel. Ein Teil dieser Partikel sedimentiert und kann trotz Nachspülen mit MeOH nicht der späteren Extraktion

zugeführt werden. Somit steht nicht die gesamte Menge an ZEN und DAI sowie deren Metaboliten der Analytik zur Verfügung. Der geringe Umsatz zeigt trotzdem deutlich, dass nur eine sehr geringe Metabolisierung stattgefunden hat. Die geringe Menge an reduzierten ZEL-Derivaten ist auf eine geringe Aktivität an reduzierenden Metabolismusreaktionen zurückzuführen, was aus der in vorliegender Arbeit durchgeführten Charakterisierung der Fäzessuspension mit DAI bekannt ist. Reduktionsreaktionen von ZEN durch mikrobielle Spezies sind u.a. bereits in der Literatur beschrieben. Kiessling et al. [1984] beschrieben eine fast vollständige Umwandlung von ZEN zu  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL in Gegenwart von Bakterien und Protozoen aus dem Pansen von Schafen und Kühen. Studien von Kollarczik et al. [1994] zur Metabolisierung von ZEN durch Fäzessuspension aus Schweinen zeigten eine Reduktion von ZEN zu  $\alpha$ -ZEL und die Bildung eines unbekanntenen, nicht näher charakterisierten Metaboliten. Auch die mikrobielle Bildung weiterer Metabolite ist aus der Literatur bekannt. Altalhi [2007] z.B. beschrieb einen Pseudomonaden Stamm, der mit ZEN als alleiniger Kohlenstoffquelle leben kann und ein strukturell nicht charakterisiertes Abbauprodukt mit einem UV-Maximum von 400 nm bildete. Eine von Kakeya et al. [2002] und Vekiru et al. [2010] beschriebene mikrobielle Metabolisierungsreaktion ist die Spaltung des Laktorrings von ZEN durch das Enzym Laktonhydrolase aus dem Pilz *Clonostachys sp.*. Die Resorcyssäure decarboxylierte dabei spontan unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  (Abb.: 3.2.5).

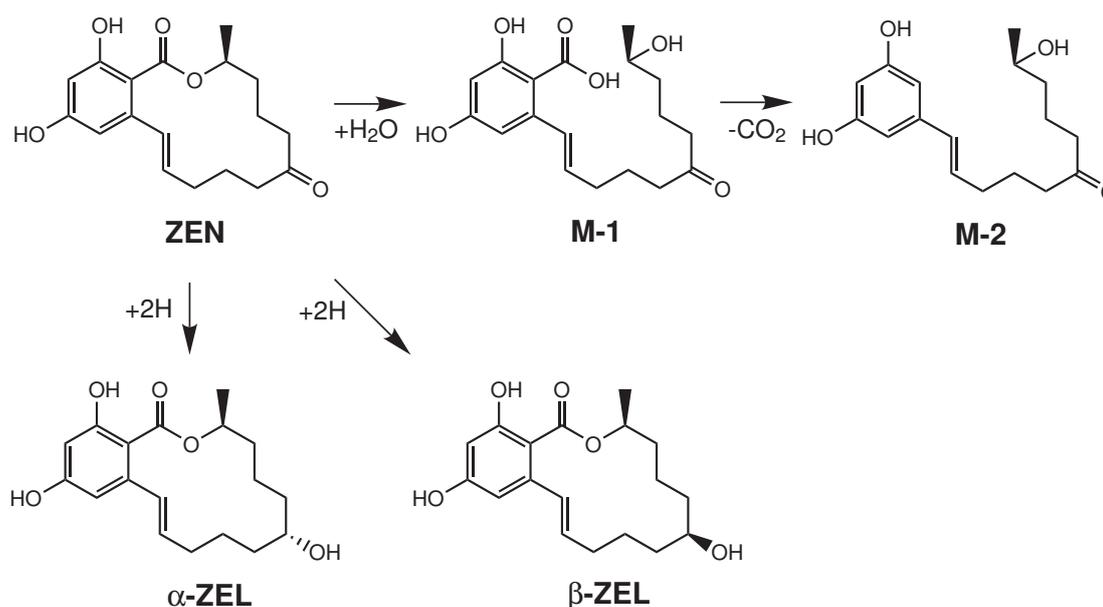


Abbildung 3.2.5.: Mikrobielle Metabolismusreaktionen von ZEN. M-1 = Hydrolyseprodukt 1, M-2 = Hydrolyseprodukt 2, H=Wasserstoff. [Modifiziert nach Kiessling et al., 1984 und Kakeya et al., 2002]

Diese Metabolisierung ist im Gegensatz zur Reduktion zu  $\alpha$ -ZEL mit einer Verringerung der estrogenen Aktivität verbunden [Kakeya et al., 2002]. Da dies eine Detoxifizierung darstellt sind diese Reaktion und vergleichbare Reaktionen für die Bewertung der Toxizität von ZEN relevant. Die Spaltung des Laktorrings von ZEN wäre auch für bakterielle Spezies denkbar, weshalb die Inkubate auf diese Abbauprodukte untersucht wurden. Als Referenz dienten aus ZEN chemisch hergestellte

Hydrolyseprodukte (Kap.: 5.4.2.3). Diese wurden anhand der Retentionszeit und der ESI-MS<sup>2</sup>-Spektren charakterisiert (Anhang Abb.: A.1.1). Die chemische Spaltung bei alkalischem pH-Wert führte zu einer Vielzahl von Produkten. Bei zwei dieser Produkte handelt es sich aufgrund der ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung vermutlich um die gesuchten Hydrolyseprodukte. Das sehr polare Hydrolyseprodukt M-1 besitzt ein Moleküllion von  $m/z$  335, was im Vergleich zu ZEN einer um 18 amu größeren Molekülmasse entspricht und auf eine Wasseranlagerung infolge der Hydrolysereaktion hindeutet. Das Massenspektrum zeigte Fragmentationen bei  $m/z$  273 und  $m/z$  261 sowie durch H<sub>2</sub>O- ( $m/z$  317) und CO<sub>2</sub>-Abspaltung ( $m/z$  291) entstandene Fragmentationen, die typisch für ZEN und seine Metabolite sind (Kap.: 3.3). Das weniger polare Hydrolyseprodukt M-2 zeigte das Moleküllion bei einem  $m/z$  von 291, was dem decarboxylierten Produkt von M-1 entspricht. Es zeigte im Massenspektrum keine Fragmentation einer CO<sub>2</sub>-Abspaltung, was nach bereits spontan erfolgter Decarboxylierung im Reaktionsansatz zu erwarten ist, jedoch die Fragmentationen bei  $m/z$  273,  $m/z$  231,  $m/z$  161 und  $m/z$  149, die auch im ZEN-Massenspektrum vorkamen. Beide Produkte konnten in den Inkubaten der Fäzesinkubationen nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass ZEN sich unter den verwendeten Inkubationsbedingungen als weitgehend stabil gegenüber den Darmbakterien verhält. Eine geringe Bildung der reduzierten Metaboliten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL konnte nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ZEN einen Einfluss auf humane Darmbakterien besitzt und die Umsetzung von MAT hemmen kann. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Metabolisierung von ZEN durch humane Darmbakterien *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### 3.3. Oxidativer Metabolismus von ZEN

Fremdstoffe können im Rahmen des Phase I Metabolismus oxidiert werden. Diese so genannte Funktionalisierungsreaktionen werden hauptsächlich von Cytochrom P450 haltigen Monooxygenasen (CYP450) durchgeführt. Diese Enzyme sind in vielen Geweben, wie z.B. Leber, Darm, Lunge, u.v.a. zu finden, besitzen jedoch ihre größte Aktivität in der Leber [Eisenbrand und Metzler, 2005]. CYP450 Enzyme sind membranständig und benötigen NADPH als Cofaktor [Nedelcheva und Gut, 1994]. Die Enzyme können aus Leberhomogenat durch differentielle Zentrifugation in Form von Mikrosomen gewonnen werden (Kap.: 5.4.4.1). Um den CYP450 vermittelten oxidativen Metabolismus von ZEN zu untersuchen wurde ZEN (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/NADPH inkubiert (Kap.: 5.4.4.4). Nach Ablauf der Inkubationszeit von 60 min wurde die Inkubation mit Ethylacetat abgestoppt und die Metabolite sowie die nicht metabolisierte Ausgangssubstanz extrahiert. Das so gewonnene Extrakt wurde mit Hilfe von LC-MS untersucht (Kap.: 5.4.1.3 Methode 1). Die Analyse des Extraktes aus der mikrosomalen Umsetzung zeigte eine Vielzahl neu entstandener Metabolite, welche gegenüber ZEN (RT=25,0 min) eine höhere Polarität unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen zeigten (Abb.: 3.3.1). Insgesamt wurden 26 Metabolite detektiert. Die beiden reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL (RT=20,3 min) und  $\beta$ -ZEL (RT=17,6 min) konnten in der UV-Detektion sowie im MS-TIC bei  $m/z$  319 detektiert werden. Beide reduktiv gebildeten Metabolite

waren sowohl in der Retentionszeit wie auch in den Massenspektren identisch zu den jeweiligen vorhandenen Referenzsubstanzen (Abb.: 3.3.1 B). Die weiteren Untersuchungen fokussierten sich auf die oxidativen Hauptmetaboliten, die in der UV-Detektion deutlich erkennbar waren. Das detektierte Metabolitenprofil war identisch mit dem Metabolitenspektrum, das Pfeiffer et al. [2007a] in Inkubationen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen detektiert hatten [Pfeiffer et al., 2007a]. Außerdem entsprachen die Peaks aus dem vorliegenden Metabolitenprofil Peaks, die mittels Inkubationen mit humanen Mikrosomen detektiert wurden [Pfeiffer et al., 2009]. Die Benennung der Peaks erfolgte wie in den Inkubationen mit humanen Mikrosomen und die zusätzlichen Peaks, welche mit Rattenlebermikrosomen gebildet wurden, wurden neu benannt.

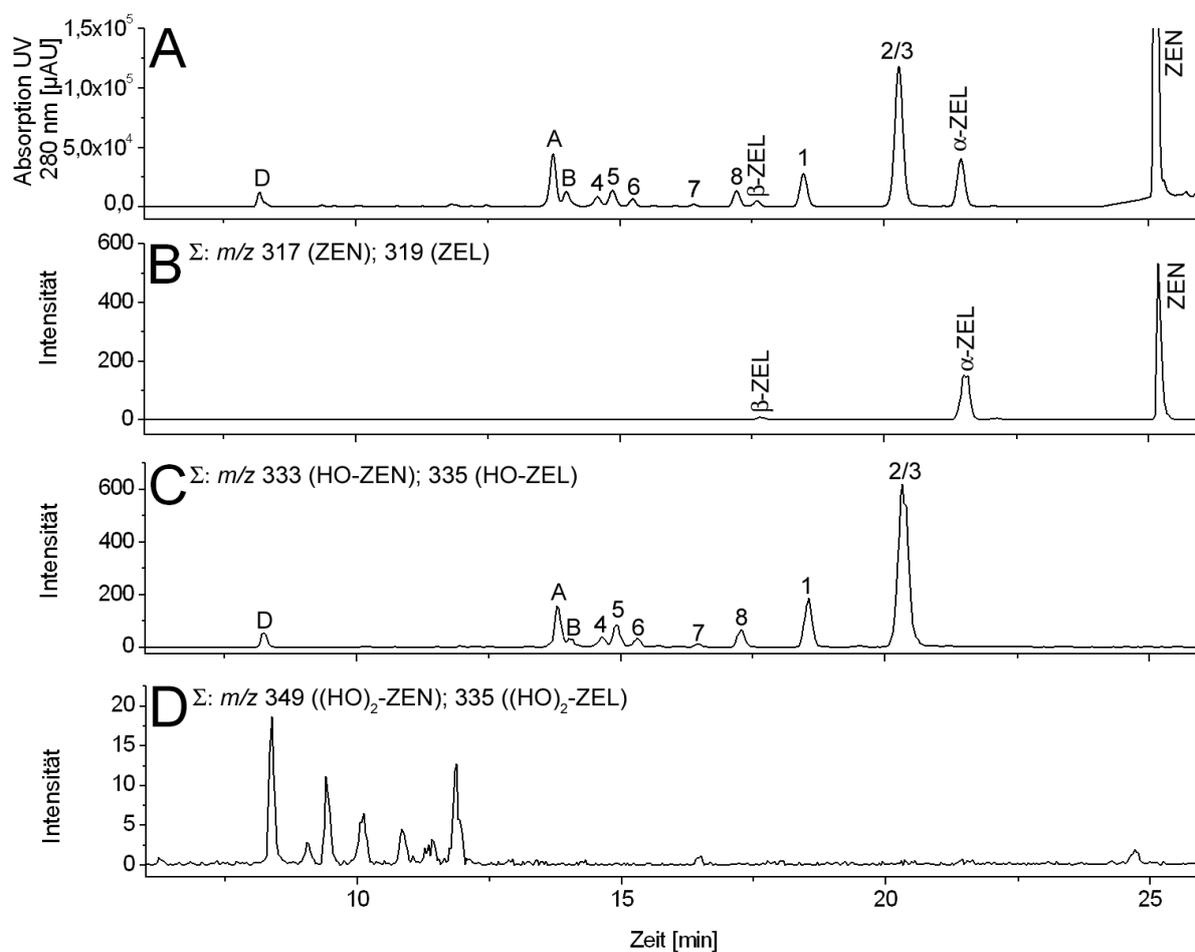


Abbildung 3.3.1.: Repräsentative LC-MS Chromatogramme einer oxidativen Umsetzung von ZEN (50  $\mu\text{M}$ ) mit Rattenlebermikrosomen/NADPH für 60 min: **A**: UV-Chromatogramm 280 nm und Massenspuren für **B**: ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL, **C**: monohydroxylierte ZEN- und ZEL- und **D**: dihydroxylierte ZEN- und ZEL-Metabolite. Oxidative Hauptmetabolite: HO-ZEN (1-8), HO-ZEL (A-D). Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1

Es zeigte sich, dass es sich bei dem Metaboliten 1-8 um monohydroxylierte ZEN-Metabolite (HO-ZEN) handelte. Bei den Metaboliten A-D handelte es sich um monohydroxylierte ZEL-Metabolite (HO-ZEL) (Abb.: 3.3.1 C). Die Massenspuren gaben auch Hinweise auf zweifache Hydroxylierung.

rungen sowohl von ZEN- wie auch von ZEL-Derivaten (Abb.: 3.3.1 D). Diese Metabolite fanden sich jedoch nur in Spuren, so dass sie in den weiteren Untersuchungen unberücksichtigt bleiben.

## 3.4. Charakterisierung und Strukturaufklärung oxidativ gebildeter ZEN-Metabolite

Zur näheren Charakterisierung der Peaks und um Hinweise auf die Strukturen der einzelnen Metabolite zu erlangen, wurden massenspektrometrische Untersuchungen mittels LC-MS ESI-MS<sup>2</sup>- und mittels GC-MS EI-Fragmentierungen durchgeführt (Kap.: 5.4.1.3 Methode 1). Hierfür wurden einzelne Peaks und Gruppen von Peaks mittels der HPLC isoliert (Kap.: 5.4.2.1). Nach einer erneuten Chromatographie zur Überprüfung, ob die Peaks unverändert waren, wurden sie mittels LC-MS direkt, bzw. nach Derivatisierung mit BSTFA bzw. mit deuteriertem BSA mit der GC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.4).

Die exakte Struktur und insbesondere die Position der neu eingefügten Hydroxylgruppe war aus den Massenspektren nicht eindeutig ersichtlich, weshalb die beiden ZEN-Analoga: 13, 15-D<sub>2</sub>-ZEN und 6,6,8,8,13,15-D<sub>6</sub>-ZEN (Abb.: 3.4.1) mit Rattenlebermikrosomen/NAPDH inkubiert wurden. D<sub>2</sub>-ZEN wurde von Cramer et al. [2007] aus ZEN-7-[1,3]dioxolan durch alkalischen Deuteriumaustausch in deuteriertem Wasser synthetisiert [Cramer et al., 2007]. In vorliegender Arbeit wurde D<sub>6</sub>-ZEN mit der gleichen Austauschreaktion in unserem Labor in Anlehnung an Miles et al. [1996] hergestellt.

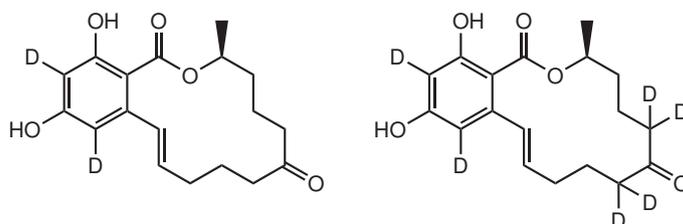


Abbildung 3.4.1.: Chemische Struktur von: links 13, 15-D<sub>2</sub>-ZEN und rechts: 6,6,8,8,13,15-D<sub>6</sub>-ZEN

Die Extrakte der Inkubationen mit D<sub>2</sub>-ZEN und D<sub>6</sub>-ZEN zeigten das gleiche Metabolitenprofil wie die Inkubation mit ZEN. Die Metabolite wurden ebenfalls mittels der LC-MS auf ihre MS<sup>2</sup>-Fragmentierung untersucht. Der Vergleich der Massenunterschiede im Molekülion [M-H]<sup>-</sup> von den deuterierten Metaboliten zu undeuteriertem ZEN zeigten umgehend das Einfügen einer Hydroxylgruppe an einer deuterierten Position. Das Deuterium wird in einer Hydroxylgruppe sehr schnell in einer Protonenaustauschreaktion gegen eine normales Proton ausgetauscht und wird damit als Deuteriumverlust sichtbar. Demzufolge zeigen die Metabolite, welche an einer deuterierten Position hydroxyliert wurden, eine um 1 amu kleinere Masse als normalerweise erwartet werden würde [Mutlib, 2008].

### 3.4.1. MS-Fragmentierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL

#### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

ZEN besaß im ESI-Massenspektrum bei negativer Ionisierung ein Molekülion  $[M-H]^-$  von  $m/z$  317. Davon ausgehend entstanden in der MS<sup>2</sup>-Fragmentierung primär drei Fragmentionen (Abb.: 3.4.2 A). Das Fragmention bei  $m/z$  299 zeigte eine Massendifferenz von 18 amu zum  $[M-H]^-$ , was der Abspaltung eines Wassermoleküls entspricht  $[M-H-H_2O]^-$ . Das Fragmention bei  $m/z$  289 war nur in sehr geringer Intensität vorhanden. Es zeigte einen Unterschied von 28 amu zur Masse des Molekülion, was einer CO-Abspaltung entspricht, die an verschiedenen Stellen im Molekül stattfinden kann  $[M-H-CO]^-$ . Das Fragmention bei  $m/z$  273 war das Basision im Massenspektrum und zeigte eine Massendifferenz von 44 amu vom  $[M-H]^-$ , was einer CO<sub>2</sub> Abspaltung entspricht  $[M-H-CO_2]^-$ . MS<sup>3</sup>-Untersuchungen haben gezeigt, dass diese drei Fragmentionen zu weiteren Fragmentionen im ZEN-Massenspektrum zerfallen können (Abb.: 3.4.3). Das Fragment  $[M-H-CO]^-$  zerfiel nach Abspaltung eines Wassermoleküls zu  $m/z$  271 und nach Abspaltung von CH<sub>2</sub>CO zu  $m/z$  247. Aus dem Fragmention  $[M-H-CO_2]^-$  entstanden nach Wasserabspaltung das Fragment bei  $m/z$  255 sowie zwei Fragmente bei  $m/z$  203 und  $m/z$  175, bei denen unterschiedlich lange Stücke der aliphatischen Seitenkette abgespalten wurden. Das Fragmention  $[M-H-H_2O]^-$  zeigte mit hohen Intensitäten bei  $m/z$  161,  $m/z$  255 und  $m/z$  149 ebenfalls Fragmentionen bei denen Teile der aliphatische Seitenkette abgespalten wurden (Abb.: 3.4.3).

$\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL besaßen identische Massenspektren, so dass hier die Fragmentierung exemplarisch anhand des Massenspektrums von  $\alpha$ -ZEL gezeigt wird. Im ESI-Massenspektrum bei negativer Ionisierung fand sich das  $[M-H]^-$  von  $\alpha$ -ZEL bei  $m/z$  319 (Abb.: 3.4.2 C). Das Massenspektrum zeigte bei hohen  $m/z$  ähnliche Fragmentierungsreaktionen wie ZEN, jedoch zeigten die Fragmente mit kleinen  $m/z$ , welche nach Laktoringöffnung durch Verkürzung der Seitenkette entstanden, deutlich geringere Intensitäten. Es fanden sich das  $[M-H-H_2O]^-$  bei  $m/z$  301 und das  $[M-H-CO_2]^-$  bei  $m/z$  275, welches im Massenspektrum von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL das Basision bildete. Aus  $[M-H-H_2O]^-$  bildete sich das Fragmention bei  $m/z$  187 analog der ZEN-Fragmentierung und ein für ZEL charakteristisches Fragment bei  $m/z$  233, was einem Bruch der Seitenkette zwischen C6 und C7 entsprach. Die Folgefragmentierung von  $[M-H-CO_2]^-$  zeigte die Wasserabspaltung bei  $m/z$  257, jedoch keine weiteren Fragmentionen wie sie bei der Fragmentierung von ZEN gebildet wurden. Das  $[M-H-CO]^-$  fand sich bei  $\alpha$ -ZEL in sehr geringer Intensität, was vermutlich in der fehlenden Carbonylgruppe an der C7 Position begründet ist. Aus diesem Fragmention entstandene Fragmentionen, die bei ZEN beobachtet wurden fanden sich daher hier auch nur in sehr geringen Intensitäten oder gar nicht.

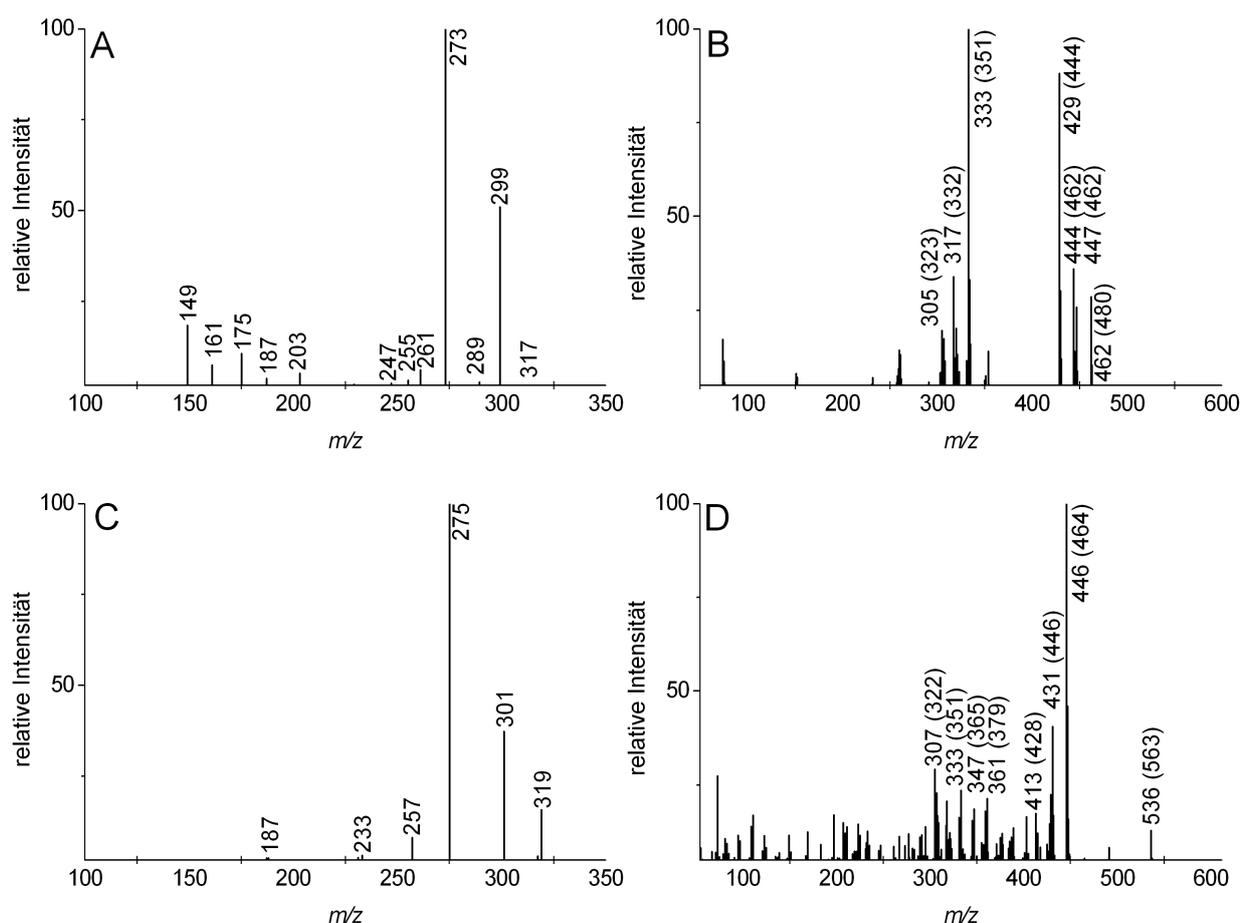


Abbildung 3.4.2.: Massenspektren von ZEN: **A:** ESI-MS<sup>2</sup> und **B:** EI -70 eV derivatisiert mit BSTFA und von  $\alpha$ -ZEL: **C:** ESI-MS<sup>2</sup> und **D:** EI -70 eV derivatisiert mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf  $m/z$  Werte aus einem Massenspektrum der Substanzen derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum von ZEN besaß das Molekülion  $[M]^+$  bei  $m/z$  462 (bzw. bei  $m/z$  480 wenn ZEN mit deuteriertem BSA derivatisiert wurde) und damit einen Massenunterschied von 18 amu zum ZEN mit deuterierten TMS-Gruppen, was auf zwei intakte TMS-Gruppen hindeutet (Abb.: 3.4.2 B). Zwei charakteristische Peaks der ZEN-Fragmentierung fanden sich bei  $m/z$  447 (462) und bei  $m/z$  444 (462). Das Fragmentation bei  $m/z$  447 besaß eine Differenz von 15 (18) amu und entsprach einer Abspaltung eines Methylradikals aus der TMS-Gruppe in Position C16  $[M-CH_3]^+$ . Diese wurde während der Bildung eines Dimethylsiloxanrings abgespalten, was eine gängige Fragmentierungsreaktion von phenolischen TMS-Derivaten mit ortho-ständigen Carbonylgruppen darstellt [Harvey, 1981; Pfeiffer et al., 2006; Pfeiffer et al., 2007b]. Das Fragmentation bei  $m/z$  444 (462) zeigte eine Differenz von 18 (18) amu zum Molekülion was einer Wasserabspaltung entspricht  $[M-H_2O]^+$ . Das Ion bei  $m/z$  429 (444) entstand durch die bereits beschriebene Wasserabspaltung und die Abspaltung des Methylradikals aus der TMS-Gruppe  $[M-H_2O-CH_3]^+$ . MS<sup>2</sup>-Untersuchungen

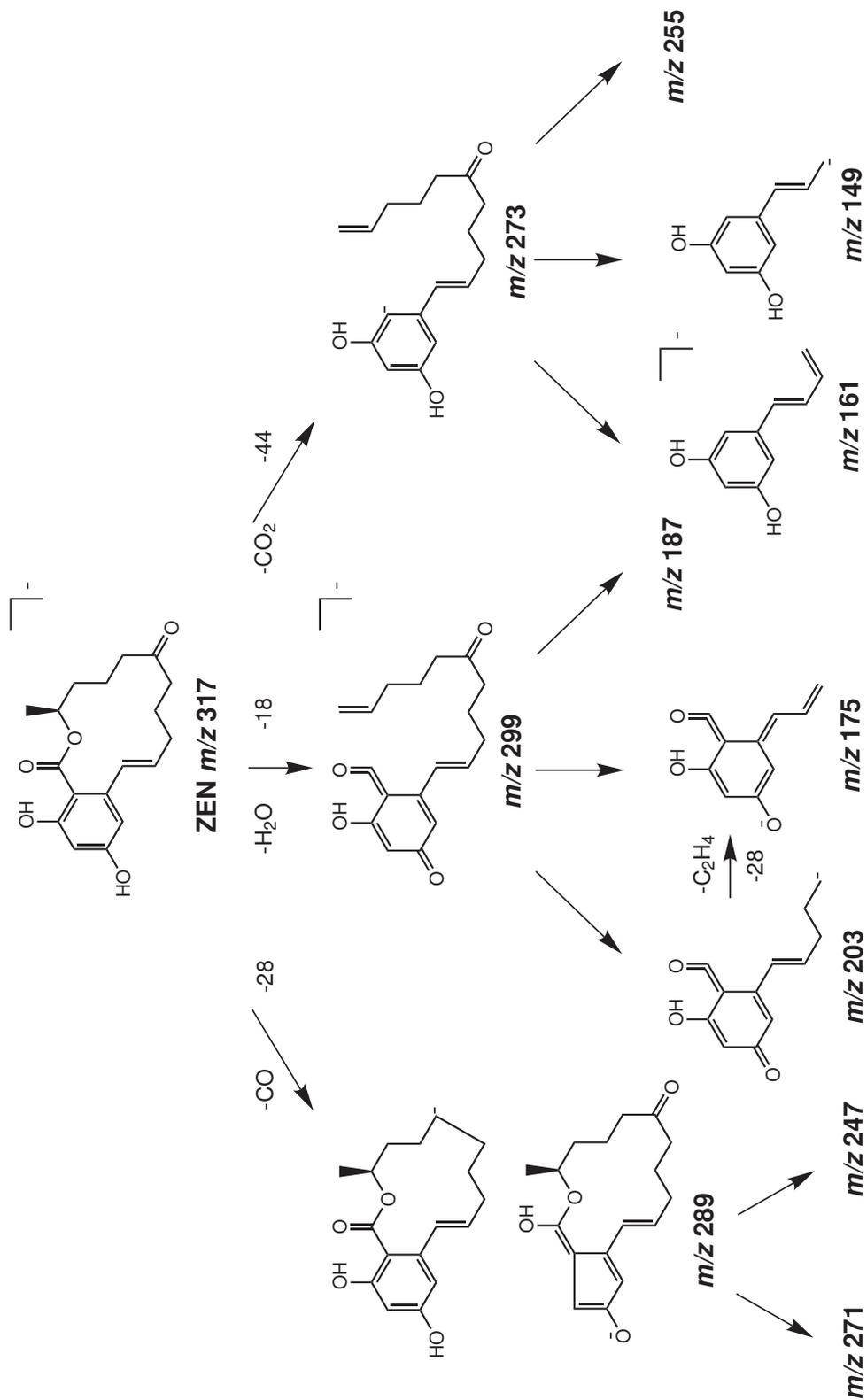


Abbildung 3.4.3.: Vorgeschlagenes ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierungsschema von ZEN

der Fragmentationen haben gezeigt, dass die Wasserabspaltung der Abspaltung des Methylradikals vorausgeht, da Fragmente nach Verlust radikalischer Fragmente stabiler sind und wenig weitere Fragmentierung zeigen. Zwei weitere charakteristische Ionen fanden sich bei  $m/z$  333 (351) und 305 (333), beide mit einer Massendifferenz von 18 amu zum ZEN mit deuterierten TMS-Gruppen, was bestätigt, dass beide TMS-Gruppen intakt waren und es sich um Fragmente handelt, die den aromatischen Ring beinhalten (Abb.: 3.4.4). MS<sup>2</sup>-Untersuchungen des Fragmentes  $m/z$  333 (351) haben gezeigt, dass aus diesem das Fragment bei  $m/z$  317 (332) entstand. Die Abspaltung von 16 (19) amu entspricht einer Neutralabspaltung von Methan, das aus einer TMS-Gruppe stammt.

Das EI-Massenspektrum von  $\alpha$ -ZEL zeigte, dass  $[M]^+$  bei  $m/z$  536 (563) und einen Massenunterschied von 27 amu zum  $\alpha$ -ZEL mit deuterierten TMS-Gruppen (Abb.: 3.4.2 D) aufweist. Dies entspricht drei intakten TMS-Gruppen, die auf drei Hydroxylgruppen im Molekül hinweisen. Im Gegensatz zu ZEN besitzt  $\alpha$ -ZEL eine aliphatische Hydroxylgruppe. Diese wurde während der Fragmentierung sehr schnell als TMSOH in einer Differenz von 90 (99) amu eliminiert, wobei das charakteristische Fragmentation bei  $m/z$  446 (464) entstand  $[M-TMSOH]^+$ . Aus diesem leiteten sich dann die charakteristischen Wasser- und Methylradikalabspaltungen analog der ZEN-Fragmentierung ab, wodurch  $[M-TMSOH-H_2O]^+$  bei  $m/z$  428 (446) und  $[M-TMSOH-CH_3]^+$  bei  $m/z$  431 (446) und in kombinierter Abspaltung das Ion bei  $m/z$  413 (428) entstanden  $[M-TMSOH-H_2O-CH_3]^+$ . Das Fragment  $[M-TMSOH-H_2O]^+$  bildete den Ausgangspunkt für viele Fragmentationen, die aus einer Verkürzung der Seitenkette hervorgingen, wie  $m/z$  389 (407),  $m/z$  375 (393),  $m/z$  361 (379),  $m/z$  347 (365),  $m/z$  333 (351) und  $m/z$  320 (338). Aufgrund der Doppelbindungen, die durch Öffnung des Laktonrings und die Abspaltung der TMSOH-Gruppe entstehen, findet keine regelmäßige Fragmentierung der Seitenkette statt. Dadurch entstanden viele weitere Fragmentationen mit ähnlichen  $m/z$  in diesem Bereich des Massenspektrums. Analog der ZEN-Fragmentierung finden sich auch hier die Ionen bei  $m/z$  333 (351) und  $m/z$  305 (333) sowie zusätzlich das Ion bei  $m/z$  307 (322). Letzteres zeigte durch eine Massendifferenz von 3 amu zum gleichen Fragment von mit deuteriertem BSA derivatisierten  $\alpha$ -ZEL, dass hier wieder eine Abspaltung einer Methangruppe stattgefunden hat, die zum Teil aus einer TMS-Gruppe stammte.

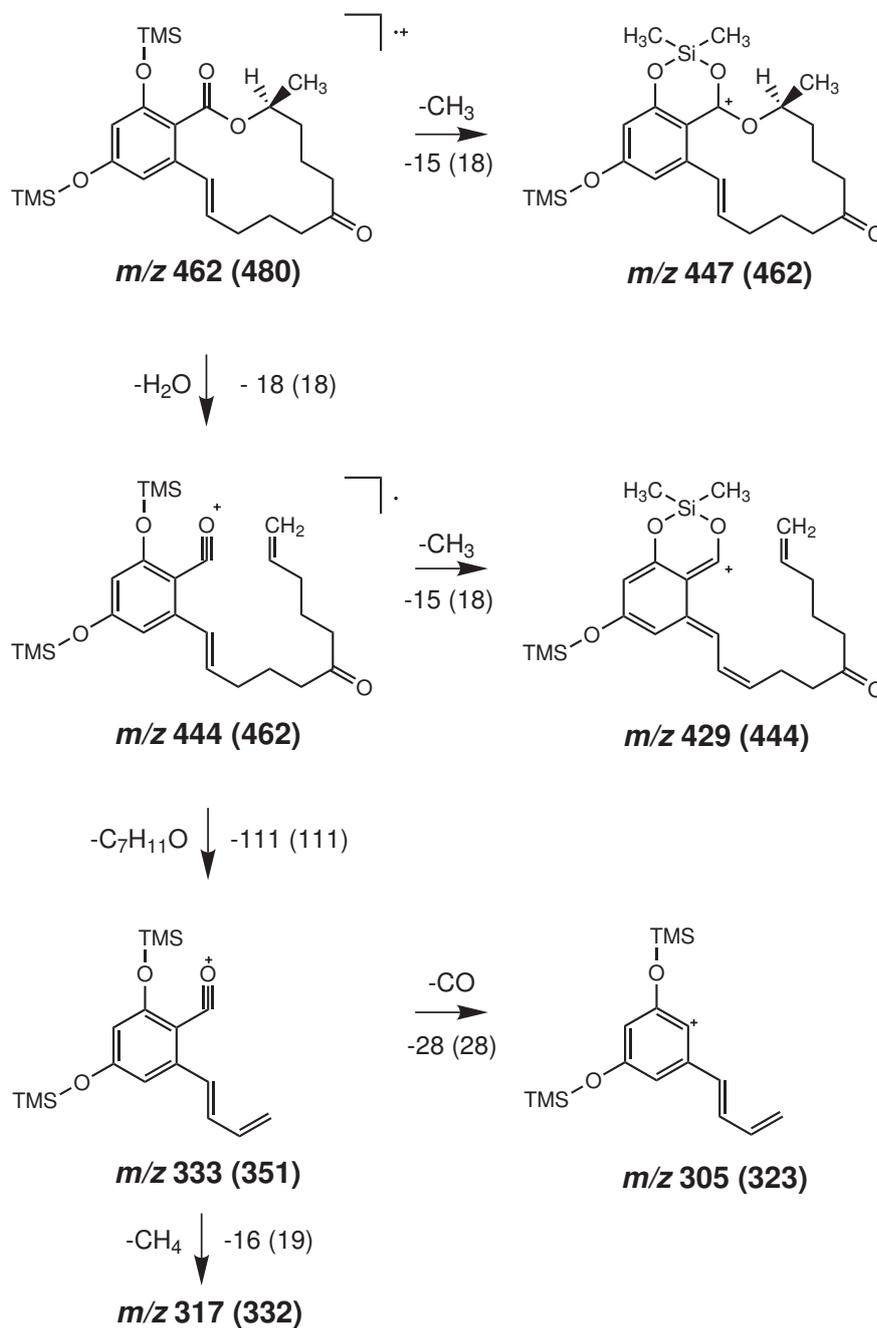


Abbildung 3.4.4.: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema von trimethylsilyliertem ZEN bei EI -70 eV. Zahlen in Klammer beziehen sich auf  $m/z$  Werte der Fragmentierung von deuteriertem-trimethylsilyliertem ZEN [modifiziert nach Pfeiffer et al., 2007a].

### 3.4.2. Peak 2/3 (15-HO-ZEN/13-HO-ZEN)

Bei Peak 2/3 handelte es sich um einen Peak, der in der LC-MS Analyse bei der Retentionszeit 20,4 min eluierte und im MS-TIC ein  $m/z$  von 333 besaß, was einem HO-ZEN Metaboliten entspricht (Abb.: 3.3.1 C). Die GC-MS Analyse des isolierten, mit BSTFA bzw. deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten zeigte, dass es sich bei dem Peak um ein Gemisch aus zwei Metaboliten handelte, das sich mit der HPLC nur schwer trennen ließ (Anhang Abb.: A.4.1). In der Ratte wurde Peak 2 nur in geringen Mengen gebildet und machte ca. 5% Anteil am Gesamtpeak aus. Die Analyse der ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektren aus der Inkubation von D<sub>2</sub>-ZEN zeigten einen Verlust von einem Deuterium, was deutlich darauf hindeutet, dass beide Metaboliten von Peak 2/3 am aromatischen Ring hydroxyliert sind. Die Massenspektren zeigten deutlich, dass die Hydroxylierung an Position C13 bzw. C15 erfolgt sein kann, jedoch war eine genaue Zuordnung der Hydroxylierungspositionen mit Hilfe der Massenspektren nicht möglich. Die exakten Strukturen von Peak 2/3 wurden aufgeklärt, indem 13-HO-ZEN und 15-HO-ZEN chemisch synthetisiert wurden (Abb.: 3.4.5). Anhand der Referenzsubstanzen konnte gezeigt werden, dass 13-HO-ZEN und Peak 2 identische Retentionszeiten und Massenspektren in der LC-MS wie auch der GC-MS zeigten. Ebenso zeigte 15-HO-ZEN und Peak 3 in der LC-MS und der GC-MS identische Retentionszeiten und Massenspektren [Pfeiffer et al., 2009]. 13-HO-ZEN wurde in Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen nur in geringer Menge gebildet, so dass in den nachfolgenden Experimenten nur der Hauptmetabolit 15-HO-ZEN untersucht wurde.

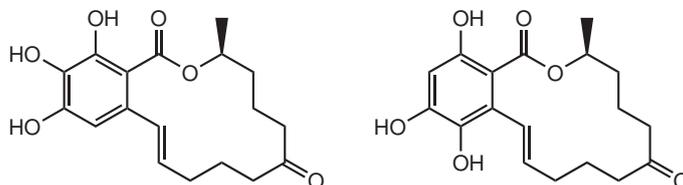


Abbildung 3.4.5.: Chemische Struktur von 15-HO-ZEN links und 13-HO-ZEN rechts.

15-HO-ZEN besitzt 3 aromatische Hydroxylgruppen, jeweils an Position C14, C15 und C16 und damit zweimal das Strukturmerkmal von Catecholen. Der Metabolit war in organischen Lösungsmitteln stabil, jedoch zeigten Stabilitätsuntersuchungen, dass der Metabolit in wässriger Lösung recht schnell in Abhängigkeit von zunehmend alkalischem pH-Wert zerfiel.

#### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum aus der LC-MS Analyse von 15-HO-ZEN zeigte nur wenig Fragmentierung (Abb.: 3.4.6 A). Das Molekülion bei  $m/z$  333 war auch gleichzeitig das Basision. Das Fragmention bei  $m/z$  315 entsprach dem  $[M-H-H_2O]^-$  und  $m/z$  289 dem  $[M-H-CO_2]^-$ . Zwei weitere Ionen, die für 15-HO-ZEN charakteristisch sind, fanden sich bei  $m/z$  191 und bei  $m/z$  219. Beide zeigten einen Massenunterschied von 16 amu zu den Fragmenten bei  $m/z$  175 bzw.  $m/z$  203, welche

aus dem ZEN-Massenspektrum bekannt sind und darauf hindeuten, dass diese Fragmente die im oxidativen Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe enthalten. Das Fragment bei  $m/z$  201 ist ein weiteres charakteristisches Fragmentation für 15-HO-ZEN (Abb.: 3.4.7).

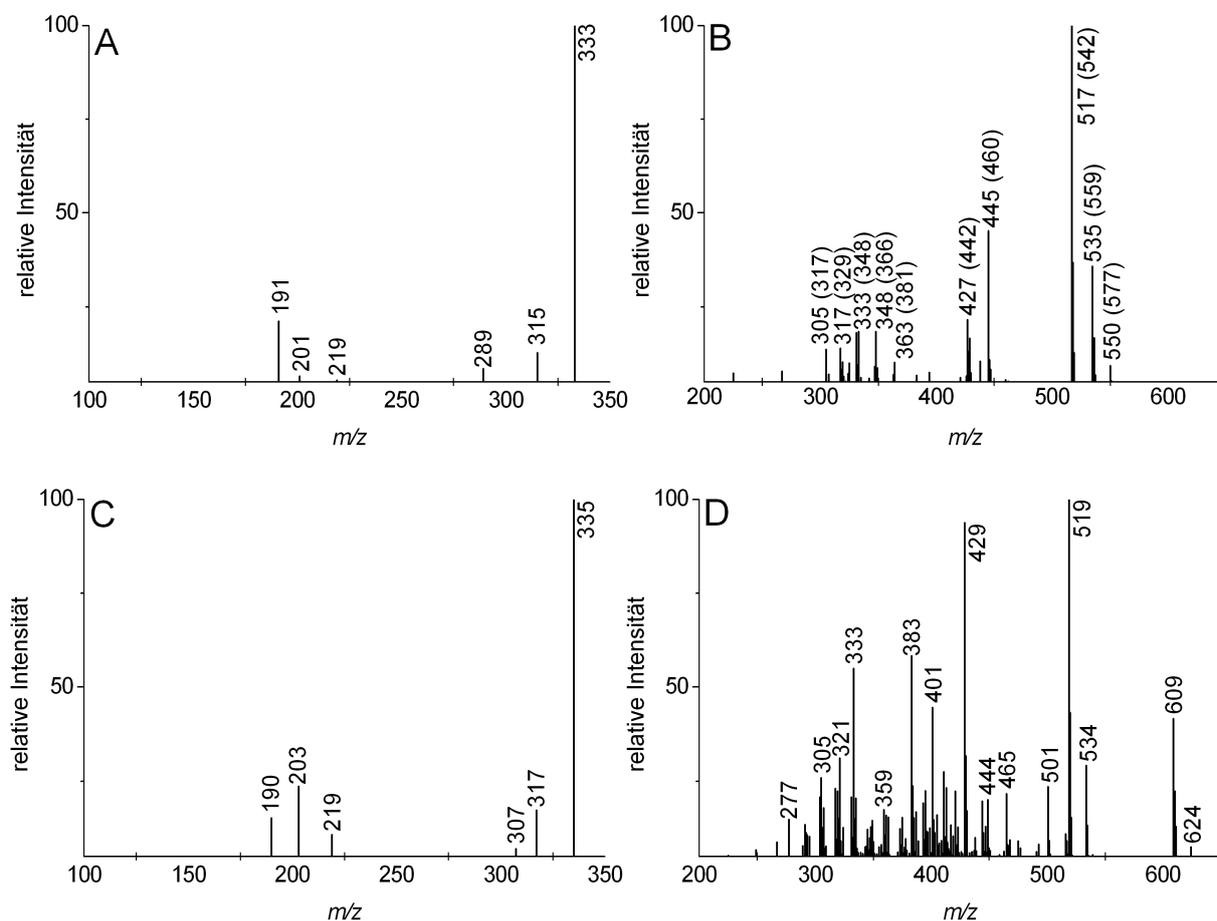


Abbildung 3.4.6.: Massenspektren von 15-HO-ZEN **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV nach Derivatisierung mit BSTFA und 15-HO- $\alpha$ -ZEL **C**: ESI-MS<sup>2</sup> und **D**: EI -70 eV nach Derivatisierung mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf ein Massenspektrum des Metaboliten derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum von Peak 3 (Abb.: 3.4.6 B) zeigte das  $[M]^+$  Ion bei  $m/z$  550 (577), was auf ein HO-ZEN hindeutet. Die Fragmentierung zeigte die von ZEN bekannten Fragmentierungsreaktionen anhand der Fragmentionen  $[M-CH_3]^+$  bei  $m/z$  535 (559) und  $[M-H_2O-CH_3]^+$  bei  $m/z$  517 (541), welches das Basision darstellte. Zwei weitere charakteristische Ionen fanden sich bei  $m/z$  445 (460) und  $m/z$  427 (442), beide mit einem Massenunterschied von 15 amu zum ZEN mit deutierten TMS-Gruppen und eine Differenz von 90 (99) amu zu den Ionen bei  $m/z$  535 (559) und  $m/z$  517 (542). Diese Fragmentierungen deuten auf den Verlust einer TMSOH-Gruppe hin und sind eine typische Reaktion aliphatischer Hydroxylgruppen. Da das Molekül keine aliphatischen Hydroxylgruppen besitzt wird vermutet, dass die TMS-Gruppe zu einem anderen Sauerstoffatom im Molekül

wandert und dieses dann als TMSOH eliminiert wird. Entsprechende Reaktionen sind in der Literatur beschrieben (McLafferty und Turecek, 1993). Diese Fragmentierung konnte in sehr geringer Intensität auch bei ZEN, jedoch nicht bei 13-HO-ZEN beobachtet werden. Demzufolge scheint die Position der silylierten Hydroxylgruppe entscheidend für deren Umlagerung zu sein. 15-HO- $\alpha$ -ZEL zeigte Fragmentationen dieser Umlagerung in gleicher Intensität, so dass vermutet werden kann, dass die Silylgruppe nicht zur Carbonylgruppe an der C7 Position wandert sondern zur Estergruppierung, woraus dann die TMSOH-Gruppe abgespalten wird. Weitere Fragmentationen fanden sich bei  $m/z$  333 (348),  $m/z$  317 (329) und  $m/z$  305 (317), welche identische  $m/z$  wie Fragmentationen aus dem Massenspektrum von ZEN besitzen. Das mit deuteriertem BSA derivatisierte 15-HO-ZEN zeigte dagegen für diese Fragmente keine identischen Ionen im Massenspektrum von ZEN, das mit deuteriertem BSA derivatisiert wurde. Folglich handelte es sich hier vermutlich um Fragmentationen mit einer anderen Struktur. Zwei weitere charakteristische Fragmentationen fanden sich bei  $m/z$  363 (381) und  $m/z$  348 (366) zu denen vermutet wird, dass es sich um Fragmente mit ähnlicher Struktur wie das Fragment bei  $m/z$  333 (348), jedoch mit längerer aliphatischer Seitenkette handelt.

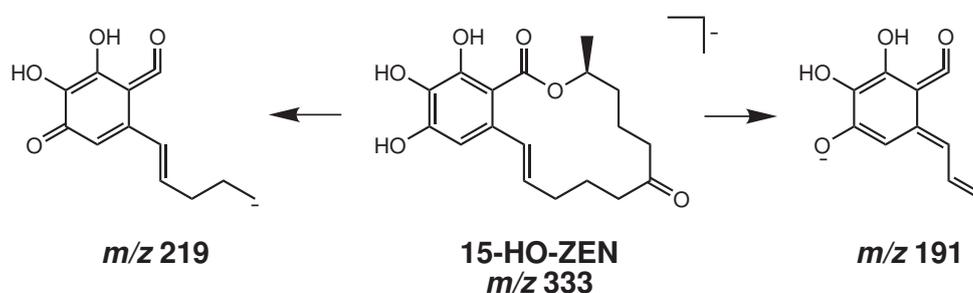
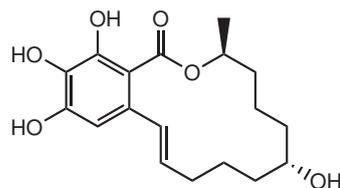


Abbildung 3.4.7.: Vorgeschlagene ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung und Fragmentationen von 15-HO-ZEN

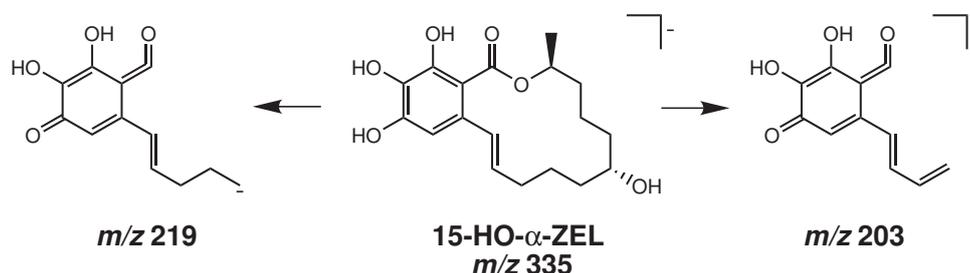
### 3.4.3. Peak B (15-HO- $\alpha$ -ZEL)

Peak B besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 13,8 min und zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 335 (Abb.: 3.3.1 C), was auf ein HO-ZEL hindeutet. Die Analyse der Massenspektren aus der Inkubation von D<sub>2</sub>-ZEN zeigten auch hier den Verlust von einem Deuterium. Dies deutet darauf hin, dass auch hier eine Hydroxylierung am aromatischen Ring stattgefunden hat. In einer Oxidation von Peak B mit 3 $\beta$ -HSD/NAD<sup>+</sup> wurde gezeigt, dass Peak B zu 15-HO-ZEN oxidiert wurde. 3 $\beta$ -HSD oxidiert stereospezifisch die  $\alpha$ -Form von ZEL-Metaboliten, so dass es sich hier um 15-HO- $\alpha$ -ZEL handelt (Pfeiffer et al., 2009). 15-HO- $\alpha$ -ZEL besitzt wie die oxidierte Form 15-HO-ZEN drei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring an den Positionen C14, C15 und C16, sowie eine aliphatische Hydroxylgruppe in  $\alpha$ -Position am C7 (Abb.: 3.4.8). Entsprechend besitzt 15-HO- $\alpha$ -ZEL Catecholstruktur und zeigte die gleiche chemische Instabilität wie 15-HO-ZEN in wässrigen Lösungen.

Abbildung 3.4.8.: Chemische Struktur von 15 HO- $\alpha$ -ZEL

### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum zeigte wie bei 15-HO-ZEN nur wenig Fragmentierung. Das  $[M-H]^-$  Ion war auch hier gleichzeitig Basision und wurde bei  $m/z$  335 detektiert (Abb.: 3.4.6 C). Das Massenspektrum zeigte typische Fragmentierungsreaktionen zu  $[M-H-H_2O]^-$  bei  $m/z$  317 und  $[M-H-CO]^-$  bei  $m/z$  307. Drei charakteristische Fragmentionen von 15-HO- $\alpha$ -ZEL zeigten sich bei  $m/z$  219,  $m/z$  203 und  $m/z$  190. Das Fragment bei  $m/z$  203 kann aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe am Ring nicht identisch sein mit dem Fragmention mit gleichem  $m/z$  aus der ZEN-Fragmentierung. Die Fragmente bei  $m/z$  219 und  $m/z$  203 hatten eine Massendifferenz von 16 amu zu den Fragmenten  $m/z$  203 und  $m/z$  187 aus der ZEN-Fragmentierung, was darauf hindeutet, dass die Fragmente bis auf die zusätzliche Hydroxylgruppe am Ring identisch sein könnten (Abb.: 3.4.9).

Abbildung 3.4.9.: Vorgeschlagene ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung und Fragmentionen von 15-HO- $\alpha$ -ZEL

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum zeigte das  $[M]^+$  bei  $m/z$  624, was einem HO-ZEL entspricht. Das Massenspektrum wurde dominiert von zwei TMSOH-Abspaltungen aus dem Molekülion und deren Fragmente, die durch Methylradikalabspaltungen entstanden. Eine der TMSOH-Abspaltungen muss hier analog der bei 15-HO-ZEN gedeuteten Abspaltung durch Umlagerung einer TMS-Gruppe verlaufen (Kap.: 3.4.2). Auf diesem Weg entstehen das Basision  $[M-TMSOH-CH_3]^+$  bei  $m/z$  519 und das Fragmention  $[M-(TMSOH)_2-CH_3]^+$  mit fast gleich hoher Intensität bei  $m/z$  429. Die Fragmentionen bei  $m/z$  333 und  $m/z$  305 sind identisch zu den Fragmentionen von 15-HO-ZEN. Weitere charakteristische Fragmentionen von 15-HO- $\alpha$ -ZEL fanden sich bei  $m/z$  465,  $m/z$  401,  $m/z$  383 und  $m/z$  321.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit haben gezeigt, dass in Inkubationen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH aromatische Hydroxylierungen am ZEN-Molekül stattfinden. Diese führt zur Bildung von Metaboliten mit Catecholstruktur. Der mikrosomale Hauptmetabolit konnte als 15-HO-ZEN identifiziert werden. Zusätzlich wurde durch Rattenlebermikrosomen/NADPH auch das aus ZEN reaktiv gebildete  $\alpha$ -ZEL aromatisch hydroxyliert und konnte als 15-HO- $\alpha$ -ZEL in moderater Menge nachgewiesen werden. Der Extrakt aus der mikrosomalen Inkubation wurde auch auf das Catechol von  $\beta$ -ZEL untersucht. 15-HO- $\beta$ -ZEL konnte ebenfalls, jedoch nur in sehr geringer Menge in den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen nachgewiesen werden. Catechole sind reaktive Verbindungen, die empfindlich gegenüber Autoxidation sind. Untersuchungen zur Stabilität bestätigten, dass 15-HO-ZEN chemisch instabil ist. In organischen Lösungsmitteln war das Catechol deutlich stabiler als in wässrigen Lösungen in denen es abhängig von steigendem pH-Wert sehr schnell zerfiel. Neben der Autoxidation können Catechole auch unter physiologischen Bedingungen durch Enzyme oxidiert werden. In einer ersten Reaktion entstehen z.B. katalysiert durch Peroxidasen Semiquinonen. Diese können ihr freies Elektron auf Sauerstoff übertragen, wodurch sie dann zu den Quinonen oxidiert werden. Quinone sind elektrophile und damit z.T. sehr reaktive Verbindungen, die mit nukleophilen Substanzen und nukleophilen Zellbestandteilen wie z.B. Proteinen und DNA-Basen reagieren können. Semiquinone, die als Zwischenprodukte in der enzymatischen Einelektronenübertragung in biologischen Systemen entstehen, haben radikalischen Charakter und können ebenfalls mit anderen Substanzen reagieren oder aufgrund chemischer Instabilität zerfallen (Abb.: 3.4.10) [Glatt et al., 1989].

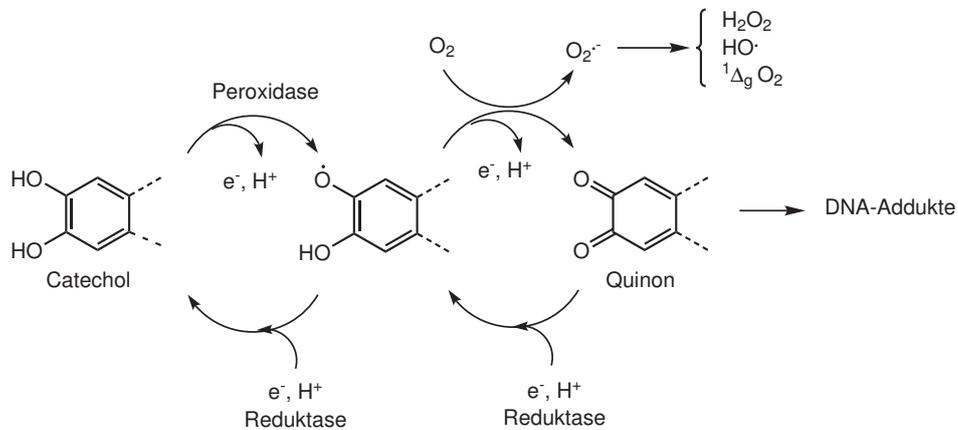


Abbildung 3.4.10.: Redox-Cycling von Catecholen [modifiziert nach Eisenbrand und Metzler, 2005]

### 3.4.4. Peak 1 (6 $\alpha$ -HO-ZEN) und Peak 5 (6 $\beta$ -HO-ZEN)

Peak 1 besaß in der LC-MS Analyse eine Retentionszeit von 18,5 min und Peak 5 eine von 14,9 min. Beide zeigten im Totalionenstrom ein  $m/z$  von 333, was einem HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.3.1 C). Beide Metabolite zeigten in der LC-MS Analyse identische und in der GC-MS Analyse sehr ähnliche Massenspektren, so dass angenommen wird das hier Stereoisomere vorliegen (Abb.: 3.4.12). Die Analyse der Massenspektren aus der Inkubation von D<sub>2</sub>-ZEN und D<sub>6</sub>-ZEN zeigten einen Deuteriumverlust in den Metabolitenspektren von D<sub>6</sub>-ZEN jedoch nicht in denen von D<sub>2</sub>-ZEN. Dies ist ein eindeutiger Hinweis, dass die eingefügte Hydroxylgruppe entweder am C6 oder am C8 lokalisiert sein muss [Pfeiffer et al., 2009]. Der Metabolit besitzt demnach zwei aromatische Hydroxylgruppen an Position C14 und C16 sowie eine aliphatische Hydroxylgruppe, benachbart zur Carbonylgruppe am C7. Die in der EI-Fragmentierung beobachtete Abspaltung von 55 amu deutet sehr stark darauf hin, dass die Hydroxylierungsposition an der C6-Position lokalisiert ist (Abb.: 3.4.13). Die genaue Orientierung der Hydroxylgruppe ist unklar, aufgrund der gebildeten Mengenverhältnisse und der Elutionsreihenfolge wird in Analogie zu den reduktiven Derivaten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL vermutet, dass es sich bei dem Metaboliten von Peak 1 um 6 $\alpha$ -HO-ZEN und bei dem Metaboliten von Peak 5 um 6 $\beta$ -HO-ZEN handelt (Abb.: 3.4.11).

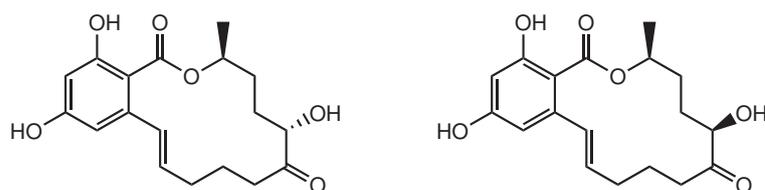


Abbildung 3.4.11.: Vorläufige chemische Struktur von: links 6 $\alpha$ -HO-ZEN und rechts 6 $\beta$ -HO-ZEN

### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Im ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum von 6 $\alpha$ -HO-ZEN (Abb.: 3.4.12 A) und 6 $\beta$ -HO-ZEN (Abb.: 3.4.12 C) war das [M-H]<sup>-</sup> Ion bei  $m/z$  333 nur in Spuren detektierbar. Das Fragmention [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> bildete das Basision und fand sich bei  $m/z$  315. Die Fragmentionen [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> bei  $m/z$  289 und [M-H-CO]<sup>-</sup> bei  $m/z$  305 zeigten beide verhältnismäßig hohe Intensitäten. Das Fragmentierungsspektrum enthielt weitere typische Wasserabspaltungen aus den genannten Fragmentionen. Auffällig waren die Fragmentionen bei  $m/z$  271,  $m/z$  247 und  $m/z$  187, welche im ZEN-Massenspektrum nicht oder nur in sehr geringer Menge detektiert wurden. Das Fragmention  $m/z$  271 ist charakteristisch für aliphatisch hydroxylierte ZEN-Metabolite, da hier nach der CO<sub>2</sub>-Abspaltung für die Wasserabspaltung die Hydroxylgruppe aus dem aliphatischen Teil des Moleküls zur Verfügung steht. Diese lässt sich leicht abspalten und führt zur Bildung des Fragmentions [M-H-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, was zu höheren Intensitäten führt als die analoge, aus der Fragmentierung von ZEN bekannte, Fragmentierungsreaktion. Die Fragmentionen bei  $m/z$  247,  $m/z$  187,  $m/z$  175 und  $m/z$  149 waren aus dem ZEN-Massenspektrum bekannt, zeigten hier aber zum Teil andere Intensitäten.

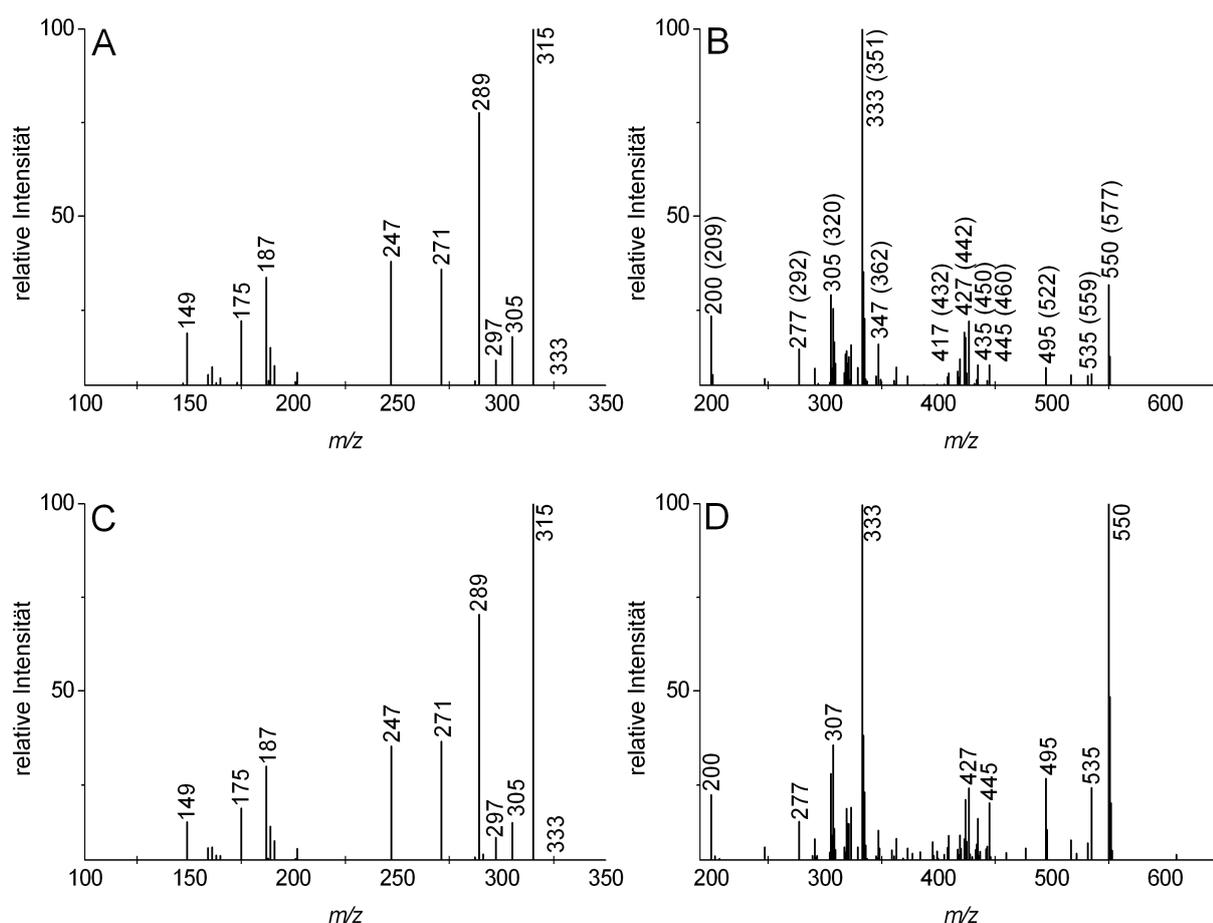


Abbildung 3.4.12.: Massenspektren von 6 $\alpha$ -HO-ZEN **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV, von 6 $\beta$ -HO-ZEN, **C**: ESI-MS<sup>2</sup> und **D**: EI -70 eV, Die GC-MS EI -70 eV Analyse erfolgte nach Derivatisierung mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf ein Massenspektrum des Metaboliten derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum der beiden Metaboliten enthielt das  $[M]^+$  bei  $m/z$  550 (577) und entspricht damit dem  $m/z$  eines HO-ZEN-Metaboliten mit drei intakten TMS-Gruppen (Abb.: 3.4.12 B und D). Beide Metaboliten zeigten qualitativ ein identisches Massenspektrum, jedoch zeigte 6 $\beta$ -HO-ZEN gegenüber 6 $\alpha$ -HO-ZEN höhere Intensitäten beim  $[M]^+$  und den Fragmentationen mit höherem  $m/z$ . Bei beiden Metaboliten wurde das aus der ZEN-Fragmentierung bekannte Basision bei  $m/z$  333 und dessen Folgefragment, welches durch CO-Abspaltung bei  $m/z$  305 entsteht gebildet. Zwei für diese Metaboliten charakteristische Fragmentationen fanden sich bei  $m/z$  495 (522) und  $m/z$  200 (209). Ersteres zeigte eine Massendifferenz von 27 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten, was drei intakten Trimethylsilylgruppen entspricht. MS<sup>2</sup>-Untersuchungen haben gezeigt, dass es direkt durch eine Abspaltung von 55 amu aus dem Molekülion gebildet wurde. Vermutlich findet die Abspaltung in Abhängigkeit der eingefügten Hydroxylgruppe statt, wobei ein Stück der aliphatischen Seitenkette abgespalten wird. Die Fragmentierung lässt sich aus der ringoffenen

Form durch  $\alpha$ -Spaltung der Bindung zwischen C6 und C5 erklären (Abb.: 3.4.13). Hierbei wird das Radikal mit dem Fragment abgespalten und dadurch ein stabiles Fragmention gebildet, was durch MS<sup>2</sup>-Untersuchungen bestätigt werden konnte. Das Fragment bei  $m/z$  200 (209) zeigte eine Massendifferenz von 9 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten HO-ZEN, was auf eine intakte TMS-Gruppe hinweist. Das Fragment kann durch eine McLafferty Umlagerung aus der ringoffenen Form entstehen, nach der es durch einen Bindungsbruch zwischen C8 und C9 gebildet wird (Abb.: 3.4.13).

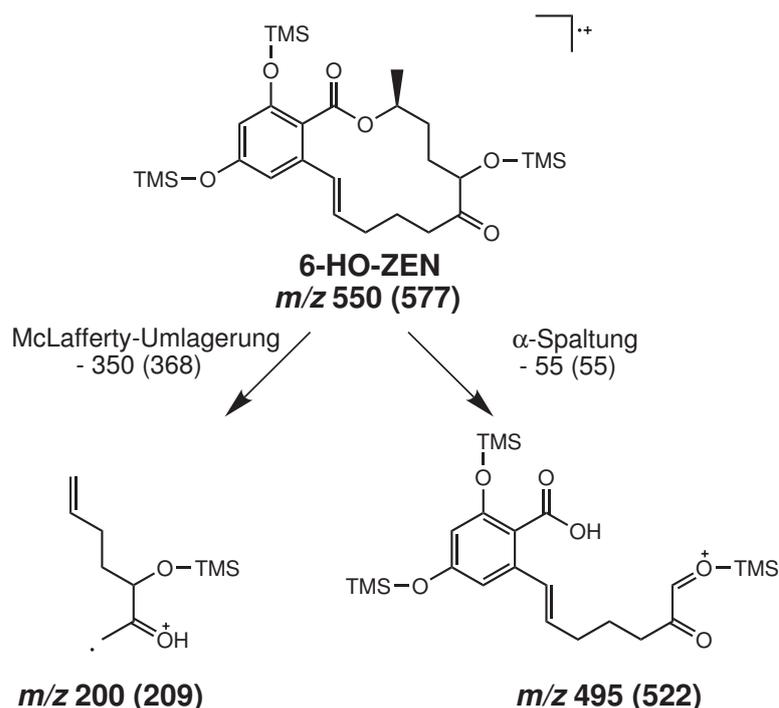


Abbildung 3.4.13.: Vorgeschlagene EI-Fragmentierung und Fragmentionen von 6-HO-ZEN

### 3.4.5. Peak A (6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL) und Peak D (6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL)

Der in der mikrosomalen Inkubation isolierte Peak A besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 13,7 min, und Peak D die Retentionszeit 8,1 min. Beide Metabolite zeigten im Totalionenstrom ein  $m/z$  von 335, was einem HO-ZEL entspricht (Abb.: 3.3.1 C). In der LC-MS Analyse konnten für beide Metaboliten identische und in der GC-MS sehr ähnliche Massenspektren detektiert werden, so dass auch hier angenommen wird, dass es sich bei beiden Metaboliten um Stereoisomere handelt (Abb.: 3.4.17). Die Massenspektren der Metaboliten aus den Inkubationen von D<sub>2</sub>-ZEN und D<sub>6</sub>-ZEN zeigten ausschließlich bei dem aus D<sub>6</sub>-ZEN gebildeten Metaboliten einen Deuteriumverlust. Dies ist ein eindeutiger Hinweis, dass die eingefügte Hydroxylgruppe entweder an der C6 oder der C8-Position lokalisiert sein muss [Pfeiffer et al., 2009].

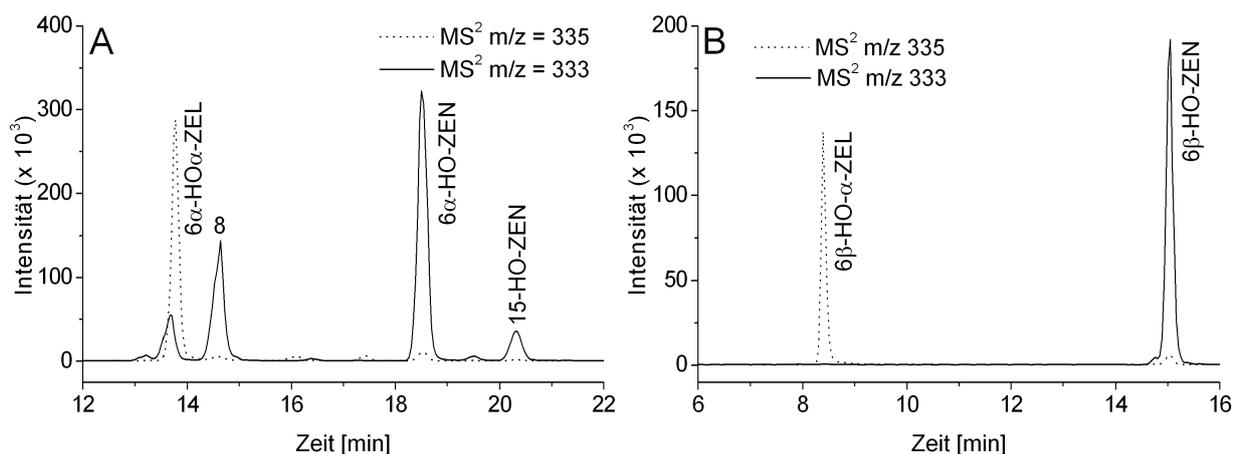


Abbildung 3.4.14.: LC-MS MS<sup>2</sup>-Chromatogramme eines Extrakts aus der Oxidation von **A**: Peak D und **B**: Peak A mit Rattenlebercytosol/NADP<sup>+</sup>. Eduktpeaks:  $m/z$  335, Produktpeaks  $m/z$  333. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1

Zur Aufklärung der oxidierten Vorläufer von Peak A und Peak D wurden beide Metabolite enzymatisch oxidiert. In Vorversuchen mit ZEN und den reduktiven Derivaten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL konnte gezeigt werden, dass Rattenlebercytosol/NADP<sup>+</sup> mit hohen Umsatzraten die C7 Position oxidiert. Die mittels der HPLC isolierten Metaboliten wurden mit Rattenlebercytosol/NADP<sup>+</sup> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 40 min wurden die Inkubate mit Ethylacetat abgestoppt, extrahiert und die Extrakte mit Hilfe der LC-MS untersucht (Kap.: 5.4.2.4).

Die Oxidation von Peak A zeigte drei Peaks, die im Totalionenstrom ein  $m/z$  von 333 besaßen. Dies entspricht dem  $m/z$  möglicher, aus Peak A gebildeter, HO-ZEN-Produkte (Abb.: 3.4.14 A). Der Peak bei der Retentionszeit 20,3 min besaß ein identisches Massenspektrum wie 15-HO-ZEN und wurde aus einer Verunreinigung von Peak A mit 15-HO- $\alpha$ -ZEL gebildet, welches direkt nach Peak A eluiert und sich nur schwer von diesem vollständig abtrennen lässt. Bei dem Peak bei der Retentionszeit 18,5 min handelt es sich um das Oxidationsprodukt von Peak A, das anhand der Retentionszeit und dem Massenspektrum als 6 $\alpha$ -HO-ZEN identifiziert werden konnte. Daraus geht hervor, dass es sich bei Peak A um 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL handelt. Das Produkt mit der Retentionszeit 14,6 min besaß eine identische Retentionszeit und ein identisches Massenspektrum wie Peak 4 und wurde aus 6 $\alpha$ -HO-ZEN durch Keto-Enol-Tautomerie gebildet (Kap.: 3.4.6). Die Oxidation von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL zu 6 $\alpha$ -HO-ZEN wurde auch mit  $\beta$ -HSD/NAD<sup>+</sup> gezeigt, welche stereoselektiv die  $\alpha$ -Form der C7 Hydroxylgruppe oxidiert [Becker, pers. Mitteilung].

Die Oxidation von Peak D mit Rattenlebercytosol/NADP<sup>+</sup> zeigte einen Produktpeak, der im Totalionenstrom das für HO-ZEN-Metabolite charakteristische  $m/z$  von 333 zeigte (Abb.: 3.4.14 B). Der Peak besaß eine Retentionszeit von 15,0 min und zeigte eine identische Retentionszeit und ein identisches Massenspektrum wie der Metabolit 6 $\beta$ -HO-ZEN. Reduktionen in mikrosomalen Umsetzungen führen bevorzugt zur Bildung der  $\alpha$ -ZEL Derivate, so dass auch hier mit großer Wahrscheinlichkeit

die Hydroxylgruppe der C7 Position in  $\alpha$ -Stellung positioniert ist. Demnach handelt es sich bei den beiden Metaboliten um die reduktiven Derivate der Stereoisomere  $6\alpha$ -HO-ZEN und  $6\beta$ -HO-ZEN, bei denen die Hydroxylgruppe an der C7 Position in  $\alpha$ -Stellung positioniert ist (Abb.: 3.4.15).

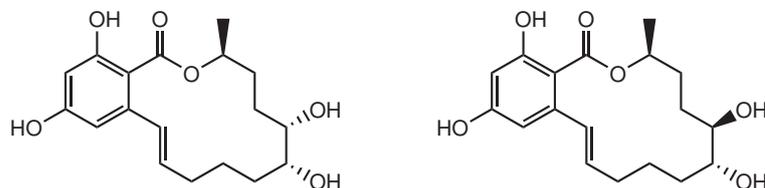


Abbildung 3.4.15.: Vorläufige chemische Struktur von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL

Die GC-MS Analyse des Peaks A zeigte außerdem, dass Peak A neben einem HO-ZEL noch aus einem HO-ZEN besteht (Abb.: 3.4.16). Der HO-ZEN-Metabolit zeigte ein identisches EI-Massenspektrum wie der Metabolit von Peak 6, so dass es sich hier wahrscheinlich um dessen Stereoisomer handelt (Kap.: 3.4.9). Die LC-MS Analyse des Peak D zeigte, dass das HO-ZEL mit einem  $(\text{HO})_2$ -ZEL coeluierte (Abb.: 3.4.16). Mikrosomale Umsetzungen von isoliertem 15-HO-ZEN und  $6\alpha$ -HO-ZEN haben gezeigt, dass neben den reduktiven Derivaten beider Metabolite auch bei beiden Inkubationen  $(\text{HO})_2$ -ZEL Metabolite gebildet wurden, die in Peak D identisch waren, so dass es sich hier wahrscheinlich um  $6\alpha,15$ -Di-HO- $\alpha$ -ZEL handelt [Heyting, pers. Mitteilung].

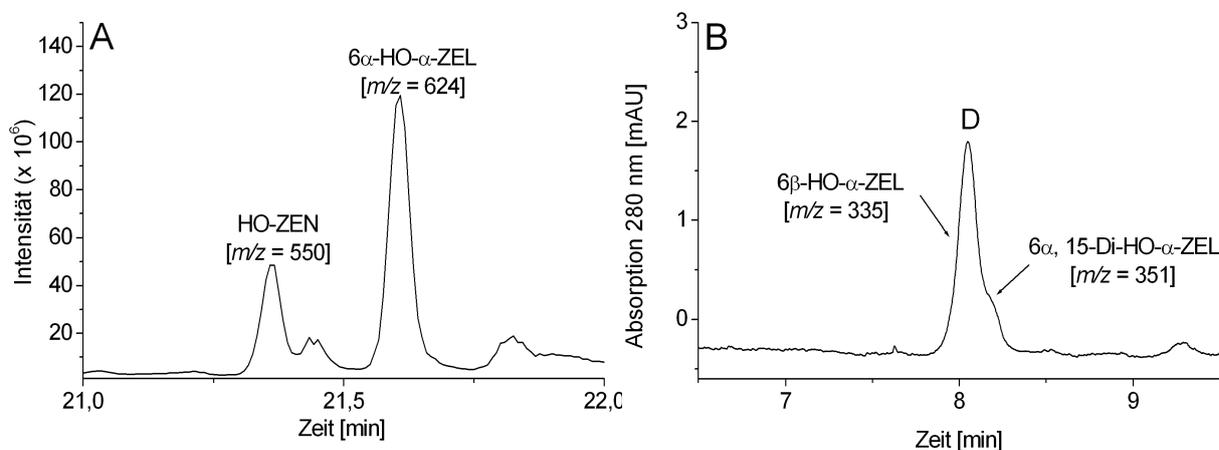


Abbildung 3.4.16.: **A**: Trennung des Peak A in der GC-MS und **B**: angetrennter Peak D im LC-MS Chromatogramm (UV-Detektion 280 nm). Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.4 und Kap.: 5.4.1.3 Methode 1

### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Die ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung der beiden 6-HO- $\alpha$ -ZEL Metabolite zeigte das  $[\text{M}-\text{H}]^-$  Ion bei  $m/z$  335, was einem HO-ZEL entspricht (Abb.: 3.4.17 A und C). Es folgte eine sehr untypische  $\text{H}_2$ -Abspaltung zum Fragmentation  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2]^-$  bei  $m/z$  333. Es zeigten sich die für hydroxylierten Metabolite typische Abspaltung von zwei Molekülen Wasser aus dem  $[\text{M}-\text{H}]^-$  Ion, wodurch die Fragmentationen

$[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$  bei  $m/z$  317 und  $[\text{M}-\text{H}-(\text{H}_2\text{O})_2]^-$  bei  $m/z$  299 gebildet wurden. Ebenso wurde das Fragmention  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$  bei  $m/z$  291 detektiert, welches das Basision darstellte sowie dessen Folgefragment  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^-$  bei  $m/z$  273. Neben dem aus dem Massenspektrum von ZEN typischen Fragmention bei  $m/z$  175 fanden sich zwei für beide Metabolite charakteristische Fragmentionen bei  $m/z$  189 und  $m/z$  163. Beide Fragmentionen sind um 2 amu größer als ihre analogen Fragmente aus der ZEN- bzw.  $\alpha$ -ZEL-Fragmentierung bei  $m/z$  187 und  $m/z$  161.

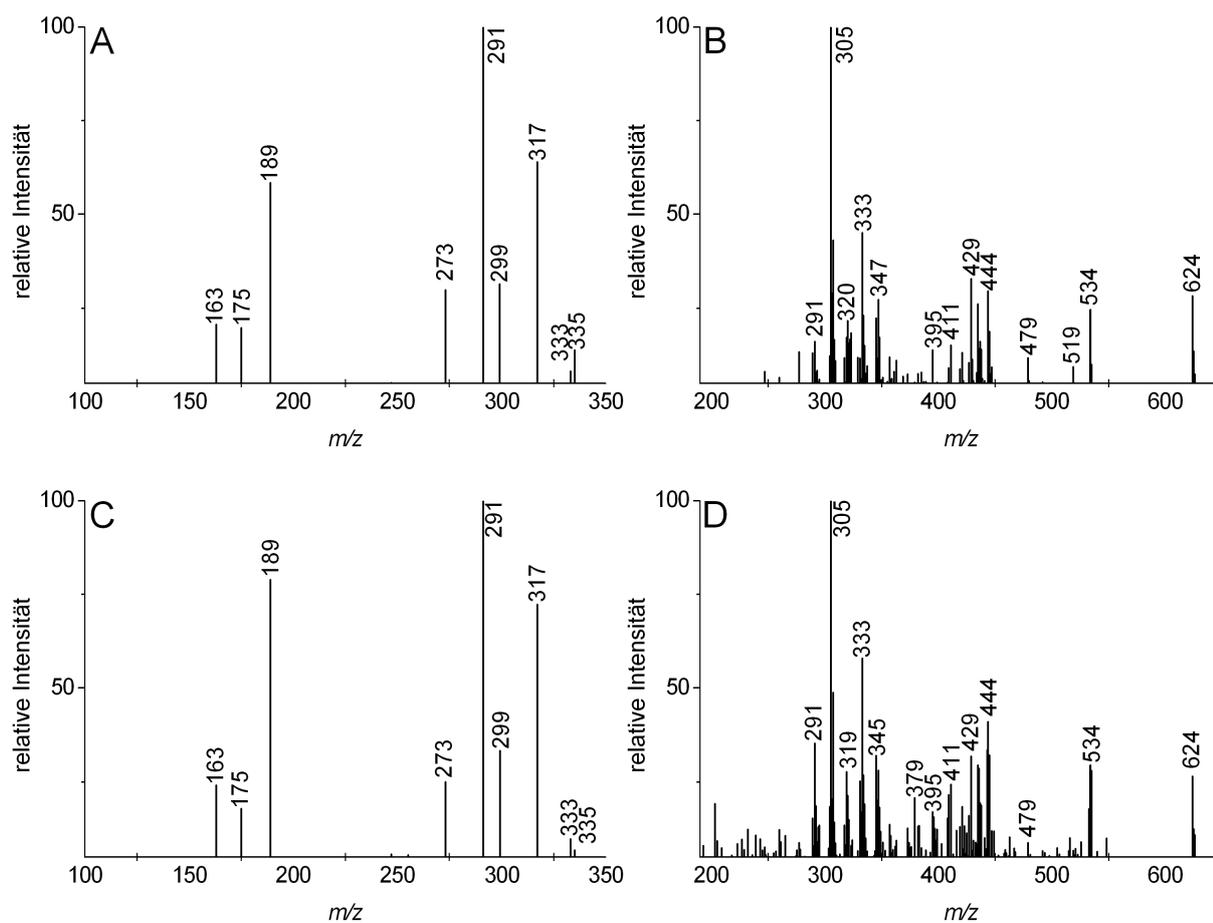


Abbildung 3.4.17.: Massenspektren von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV und  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL, **C**: ESI-MS<sup>2</sup> und **D**: EI -70 eV. Die GC-MS EI -70 eV Analyse erfolgte nach Derivatisierung mit BSTFA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum zeigte bei beiden Metaboliten das  $[\text{M}]^+$  Ion bei  $m/z$  624, was einem mit vier TMS-Gruppen verethertem HO-ZEL entspricht (Abb.: 3.4.17 B und D). Die EI-Massenspektren von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL waren sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch bei manchen Fragmentionen, die aus der Fragmentierung des aliphatischen Teils des Moleküls stammten. Vermutlich hat die Orientierung der Hydroxylgruppen einen Einfluss auf die Positionierung der Doppelbindung,

welche bei der Eliminierung von TMSOH-Gruppen entstehen. Die Doppelbindungen haben wiederum Einfluss auf die Intensität der Fragmentionen, die bei der Spaltung des aliphatischen Molekülteils entstehen. Ausgehend vom  $[M]^+$  Ion fanden zwei TMSOH-Abspaltungen von 90 (99) amu statt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich primär um die Eliminierung der aliphatischen TMSOH-Gruppen. Aus dem  $[M]^+$  Ion und den Fragmentionen  $[M-TMSOH]^+$  bzw.  $[M-(TMSOH)_2]^+$  kam es je nach Fragmentation zur Abspaltung des Methylradikals oder Wasser und der kombinierten Abspaltung. Ein charakteristisches Fragmentation fand sich bei  $m/z$  479, welches eine Abspaltung von 55 amu aus dem Fragmentation  $[M-TMSOH]^+$  bei  $m/z$  534 darstellt und dem Fragmentation bei  $m/z$  495 aus der Fragmentierung von 6 $\alpha$ -HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.4.18 und Abb.: 3.4.13). Beide Metabolite zeigten die aus der  $\alpha$ -ZEL-Fragmentierung bekannten Ionen bei  $m/z$  345 bzw.  $m/z$  347,  $m/z$  333 und  $m/z$  320 bzw.  $m/z$  319, die aus der Verkürzung der Seitenkette nach Ringöffnung stammen sowie das Fragmentation  $m/z$  291. Ebenso fand sich das aus  $m/z$  333 nach CO-Abspaltung gebildete Fragmentation bei  $m/z$  305, welches in beiden Massenspektren das Basision bildete.

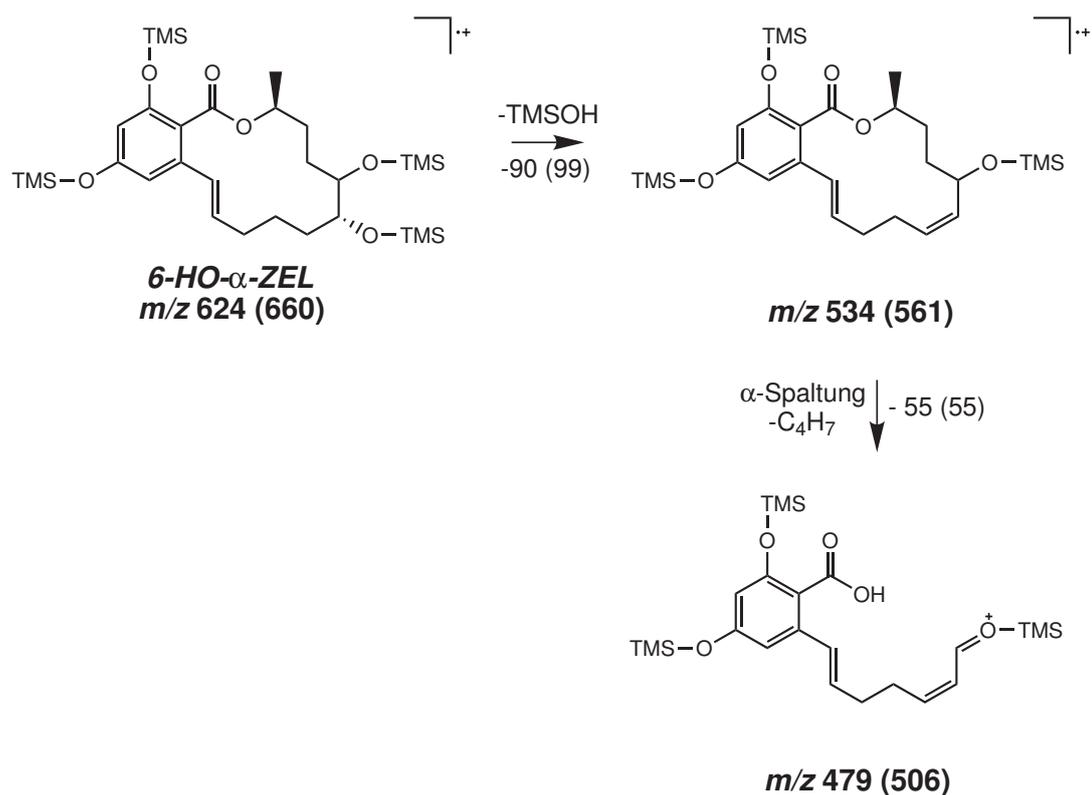


Abbildung 3.4.18.: Vorgeschlagene EI-Fragmentierung und Fragmentionen von 6-HO- $\alpha$ -ZEL

3.4.6. Peak 4 (6-Keto- $\alpha$ -ZEL)

Der in der mikrosomalen Inkubation isolierte Peak 4 besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 14,6 min und zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was dem eines HO-ZEN oder einer isomeren Struktur entspricht. Auch hier konnte ein Metabolit mit identischem Massenspektrum detektiert werden, der in Spuren bei der Retentionszeit 13,3 min eluierte. Es wird angenommen, dass es sich hier ebenfalls um das  $\beta$ -Stereoisomer handelt. Peak 4 wurde u.a. auch bei der Oxidation von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL durch Rattenlebercytosol/NADP<sup>+</sup> gebildet (Kap.: 3.4.5), so dass Metabolit 4 in Verbindung zu  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL oder dem oxidierten Metaboliten  $6\alpha$ -HO-ZEN steht. Aufgrund der Acyloin Struktur von  $6\alpha$ -HO-ZEN können in wässriger Lösung beide Gruppen durch Keto-Enol-Tautomerie ineinander umgewandelt werden, wodurch neue ZEN-Metabolite entstehen (Abb.: 3.4.19).

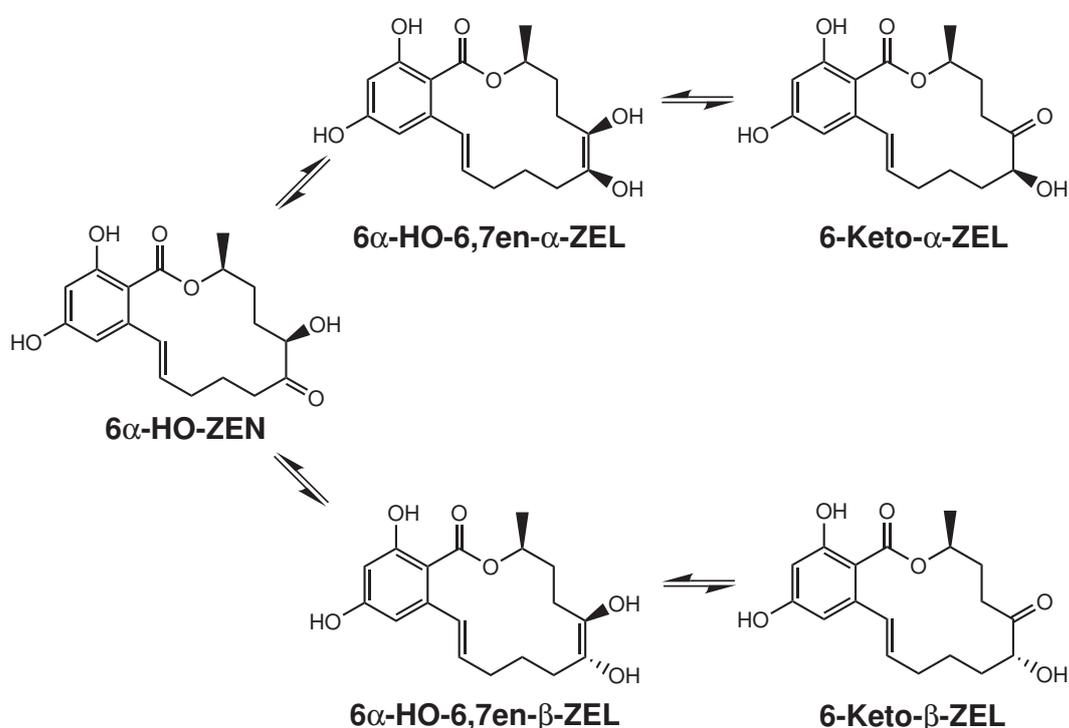


Abbildung 3.4.19.: Bildung von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL und 6-Keto- $\beta$ -ZEL durch Keto-Enol-Tautomerie aus  $6\alpha$ -HO-ZEN

Die Bildung tautomerer Derivate von  $6\alpha$ -HO-ZEN wurde deshalb überprüft.  $6\alpha$ -HO-ZEN wurde hierfür an der HPLC isoliert (Kap.: 5.4.2.1) und für 24 h in alkalischer Lösung bei Raumtemperatur zur Reaktion stehen gelassen. Nach Neutralisation wurde mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt mit Hilfe der LC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.3 Methode 1). Das LC-MS Chromatogramm zeigte gegenüber einer Kontrolle, welche unter identischen Reaktionsbedingungen bei neutralem pH-Wert hergestellt wurde, die Bildung von drei neuen Peaks (Abb.: 3.4.20), [Hildebrand, pers. Mitteilung].

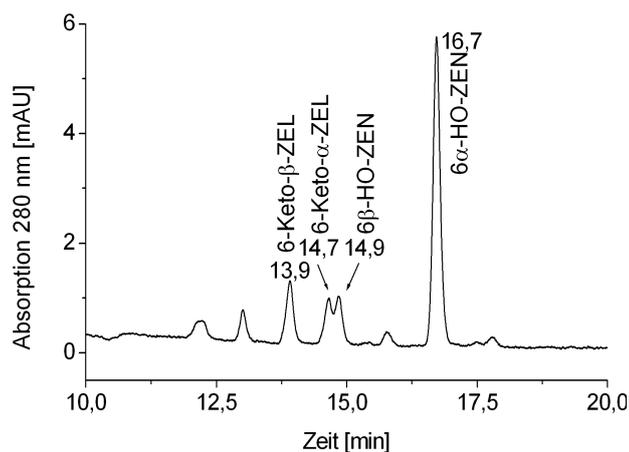


Abbildung 3.4.20.: HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion 280 nm) eines Extraktes einer Inkubation von 6 $\alpha$ -HO-ZEN in alkalischer Lösung für 24 h bei Raumtemperatur und nach anschließender Neutralisation. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1

Die drei Peaks wurden in einem Verhältnis von ca. 1:1:1 gebildet und alle drei zeigten im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was HO-ZEN-Derivaten oder isomeren Verbindungen entspricht. Die beiden Produktpeaks bei der Retentionszeit 13,9 min und 14,7 min besaßen beide identische Massenspektren, welche wiederum identisch waren mit dem Massenspektrum des Metaboliten von Peak 4 (Abb.: 3.4.21 A). Der dritte Produktpeak, bei der Retentionszeit 14,9 min, zeigte ein identisches Massenspektrum und eine identische Retentionszeit wie 6 $\beta$ -HO-ZEN, das ebenfalls durch das Gleichgewicht der Keto-Enol-Tautomerie gebildet wurde. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei beiden detektierten Produkten um die durch Keto-Enol-Tautomerie gebildeten Ketone 6-Keto- $\alpha$ -ZEL und 6-Keto- $\beta$ -ZEL. Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen zeigen die  $\beta$ -Isomere eine höhere Polarität, so dass es sich bei dieser Zuordnung bei dem Produkt mit der Retentionszeit 14,7 min um 6-Keto- $\alpha$ -ZEL und bei dem Produkt mit der Retentionszeit 13,9 min um 6-Keto- $\beta$ -ZEL handelt (Abb.: 3.4.20). Der Metabolit von Peak 4 entspricht demzufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit 6-Keto- $\alpha$ -ZEL, das in Spuren detektierte  $\beta$ -Stereoisomere bei 13,3 min entspricht 6-Keto- $\beta$ -ZEL.

### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL (Abb.: 3.4.21 A) zeigte das Molekülion bei  $m/z$  333. Das Fragmentation  $[M-H-H_2O]^-$  bildete das Basision bei  $m/z$  315. Das Massenspektrum enthält typische Fragmentationen, die von ZEN- und HO-ZEN- Metaboliten bekannt sind, wie  $[M-H-(H_2O)_2]^-$  bei  $m/z$  297,  $[M-H-CO_2]^-$  bei  $m/z$  289 und  $[M-H-CO_2-H_2O]^-$  bei  $m/z$  271. Bei kleineren  $m/z$  fanden sich ebenfalls aus der ZEN-Fragmentierung die bekannten Fragmentationen bei  $m/z$  175,  $m/z$  187 und  $m/z$  247. Auffällig sind die Fragmentationen bei  $m/z$  189,  $m/z$  245 sowie  $m/z$  165, welche für diesen Metaboliten charakteristisch sind.

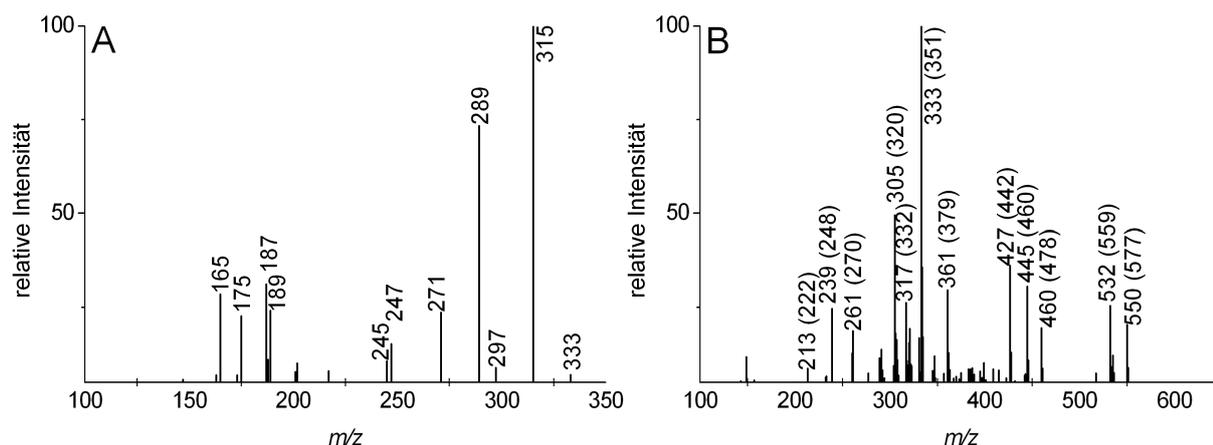


Abbildung 3.4.21.: Massenspektren von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL **A**: ESI-MS<sup>2</sup>, **B**: EI -70 eV derivatisiert mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf ein Massenspektrum von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL zeigte das  $[M]^+$  Ion bei  $m/z$  550 (577), was einem HO-ZEN-Metaboliten oder einem Isomer eines HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.4.21 B). Die Fragmentierung zeigte typische Fragmentationen, die aus den bekannten TMSOH, Wasser-, Methylradikalabspaltungen und Kombinationen aus diesen zustande kommen. Das Basision bildete das Fragmentation bei  $m/z$  333 (351) welches identisch mit dem Fragmentation aus dem ZEN-Massenspektrum ist. Aus diesem Fragmentation formuliert sich die typische CO-Abspaltung zum Fragmentation bei  $m/z$  305 (320), wie auch die Methanabspaltung von 16 (19) amu zum Fragmentation bei  $m/z$  317 (332). Ein für diesen Metaboliten charakteristisches Fragmentation fand sich bei  $m/z$  361 (379). Es besaß einen Massenunterschied von 18 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten, wo dieses Fragment in nur geringer Intensität zu finden war. Es enthält demnach zwei intakte TMS-Gruppen, was einem Fragment entspricht, das den aromatischen Ring enthält und einen Rest der aliphatischen Seitenkette. Ein plausibler Strukturvorschlag besitzt eine Kettenlänge, die sich bis zum C6 erstreckt und enthält in diesem Bereich eine Doppelbindung, so dass sehr wahrscheinlich die Hydroxylierungsposition zwischen aromatischem Ring und dem Carbonylkohlenstoff an Position C6 lokalisiert ist. Weitere charakteristische Ionen fanden sich bei  $m/z$  261 (270),  $m/z$  239 (248) und  $m/z$  213 (222). Alle Fragmentationen zeigten einen Massenunterschied von 9 amu zum Metaboliten, der mit deuteriertem BSA derivatisiert wurde. Dies deutet bei allen Fragmentationen auf eine intakte TMS-Gruppe hin und bei den Fragmenten bei  $m/z$  239 (248) und 213 (222) möglicherweise auch auf Fragmente aus der aliphatischen Seitenkette, welche die im oxidativen Metabolismus eingefügte, silylierte Hydroxylgruppe enthalten. Für das Fragmentation bei  $m/z$  261 (270) kann kein Fragment formuliert werden, das nur aus der aliphatischen Seitenkette besteht. Möglicherweise enthält es den aromatischen Ring dem eine TMS-Gruppe durch Umlagerung verloren ging (Abb.: 3.4.22).

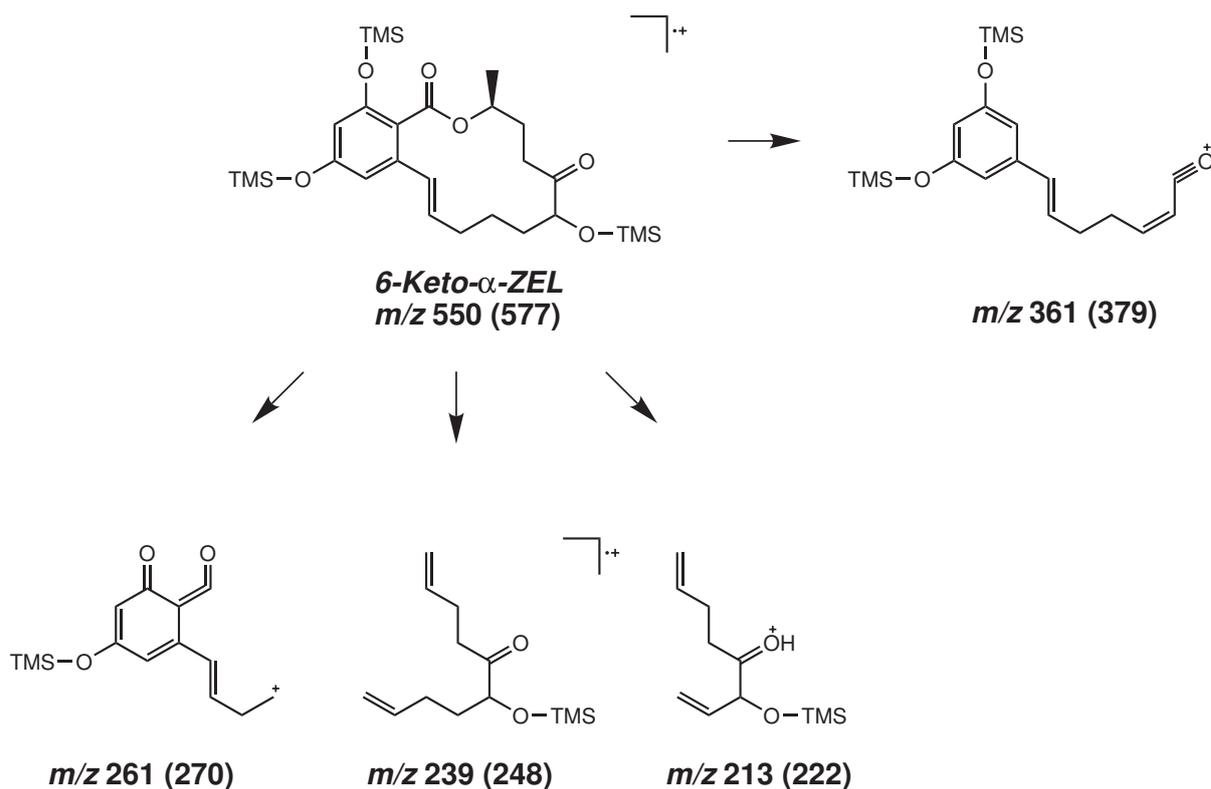


Abbildung 3.4.22.: Vorgeschlagene Fragmentierung und Fragmentationen von 6-Keto- $\alpha$ -ZEL, derivatisiert mit BSTFA

Der aliphatisch hydroxylierte Hauptmetabolit 6 $\alpha$ -HO-ZEN wurde in den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen/NADPH nach dem aromatisch hydroxylierten 15-HO-ZEN am stärksten gebildet. Es fanden sich sowohl das  $\beta$ -Isomer 6 $\beta$ -HO-ZEN, wie auch von beiden Stereoisomeren die reaktiv gebildeten  $\alpha$ -ZEL-Derivate in moderater Menge. Bedingt durch die Acyloinstruktur fanden sich in geringer Menge auch Isomere, die durch Keto-Enol-Tautomerie aus 6-HO-ZEN gebildet wurden. Die Literatur gibt keine Hinweise darauf, dass dieser Metabolit auch als Pilzmetabolit gebildet wird. Bravin et al. [2009] beschrieben im Säugermetabolismus ebenfalls einen aliphatisch hydroxylierten ZEN-Metaboliten. Der Metabolit wurde mit Rattenlebermikrosomen als Hauptmetabolit gebildet und besaß ein identisches ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum wie 6-HO-ZEN, jedoch wurde die Hydroxylgruppe aufgrund der Fragmentierung in den Massenspektren der C8-Position zugeordnet. Aufgrund der identischen Massenspektren wird angenommen, dass es sich bei dem in vorliegender Arbeit untersuchten HO-ZEN um den gleichen Metaboliten handelt, jedoch wird die Hydroxylierung der C6-Position als wahrscheinlicher angenommen und durch die EI-Massenspektren gestützt. Der Metabolit wurde in den Untersuchungen von Bravin et al. [2009] in größerer Menge mit Mikrosomen von Hunden und Affen gebildet. Weibliche human Mikrosomen führten zu einer sehr geringen Bildung und mit männlichen humanen Mikrosomen war der Metabolit nicht nachweisbar. Bravin et al. [2009] zeigten *in vivo* in der männlichen Ratten, dass dieser Metabolit gebildet wird und 10 h nach Substanzapplikation in höchster Konzentration in Leber und im Urin nachweisbar war. Die Untersuchung der estrogenen Aktivität des HO-ZEN-Metaboliten im Luziferase-Reporter-Gen-Assay zeigte,

dass dieser Metabolit eine geringere estrogene Aktivität sowohl über den ER $\alpha$ , wie auch über den ER $\beta$  als ZEN vermittelte [Bravin et al., 2009]. Die Hydroxylgruppe in der C6-Position, aber auch an der C8 Position kann über einen fünfgliedrigen Ring eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe in der C7-Position ausbilden. Dadurch wird die für die estrogene Aktivität wichtige zweite Hydroxylgruppe blockiert, was zu einer verminderten Affinität zum Estrogenrezeptor resultieren kann und die geringere estrogene Aktivität des Metaboliten gegenüber ZEN erklären könnte.

#### 3.4.7. Peak 8 (Metabolit 8)

Der in der mikrosomalen Inkubation isolierte Metabolit von Peak 8 (M-8) besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 17,3 min und zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was einem HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.3.1 C). Wie bei den zuvor beschriebenen Metaboliten existiert auch hier ein oxidativer Metabolit mit identischem Massenspektrum, der in Spuren bei der Retentionszeit 15,7 min detektiert wurde. Es wird angenommen, dass es sich auch hier um das entsprechende  $\beta$ -Stereoisomer handelt. Den Massenspektren (Abb.: 3.4.24) konnten keine konkreten Hinweise auf die Hydroxylierungsposition entnommen werden (Abb.: 3.4.23).

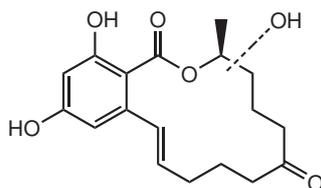


Abbildung 3.4.23.: Vorläufige chemische Struktur des Metaboliten von Peak 8

#### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des M-8 zeigte das  $[M-H]^-$  Ion in Spuren bei  $m/z$  333 (Abb.: 3.4.24 A). In geringer Intensität wurde das Fragment  $[M-H-H_2O]^-$  bei  $m/z$  315 detektiert. Einige der typischen Fragmentionen, die bei der ZEN- und der HO-ZEN-Fragmentierung in hoher Intensität vorlagen, fanden sich hier in sehr geringen Intensitäten oder fehlten vollständig im Massenspektrum. Darunter fallen die charakteristischen Fragmentionen  $[M-H-(H_2O)_2]^-$ ,  $[M-H-CO_2]^-$  und  $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ . Der Metabolit von Peak 8 zeigte bei  $m/z$  221,  $m/z$  203, welches das Basision bildete und bei  $m/z$  159, die für diesen Metaboliten charakteristischen Fragmentionen. Zusätzlich fand sich bei  $m/z$  175 ein Fragmention, das ein identisches  $m/z$  zu einem Fragment aus dem ZEN-Massenspektrum aufwies. Die für ZEN und seine Metabolite typischen und hier fehlenden Fragmentionen bei höheren  $m/z$  sind vielleicht ein Hinweis, dass die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe in der Nähe der Estergruppe sitzt. Dies könnte sowohl Ringöffnung, wie auch die anschließende Fragmentierung erschweren oder verändern und damit im Vergleich zu ZEN und anderen HO-ZEN-Metaboliten zu dieser sehr charakteristischen Fragmentierung führen.

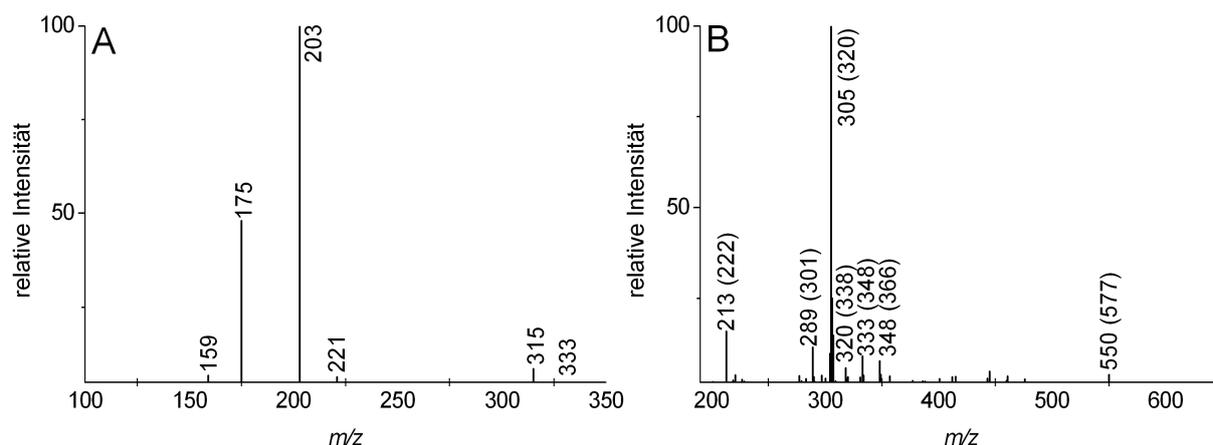


Abbildung 3.4.24.: Massenspektren des Metaboliten von Peak 8 **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV nach Derivatisierung mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf ein Massenspektrum des Metaboliten derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum des M-8 enthielt wie das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum nur wenige Fragmentionen (Abb.: 3.4.24 B). Das  $[M]^+$  Ion fand sich bei  $m/z$  550 (577) mit einem Massenunterschied von 27 amu zum gleichen Metaboliten, derivatisiert mit deuteriertem BSA. Dies deutet auf drei intakten TMS-Gruppen hin und damit auf einen HO-ZEN-Metaboliten. Das Basision fand sich bei  $m/z$  305 (320) mit einem Massenunterschied von 15 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten. Es war damit nicht identisch mit dem Fragmention mit gleichem  $m/z$  aus der ZEN-Fragmentierung und wird wahrscheinlich durch eine Methyradikalabspaltung aus dem Fragmention bei  $m/z$  320 (338) gebildet (Abb.: 3.4.25). Das Fragmention bei  $m/z$  320 (348) geht vermutlich aus dem Fragmention bei  $m/z$  348 (366) durch Abspaltung von  $C_2H_4$  hervor, aus dem auch durch Methyradikalabspaltung das Fragmention bei  $m/z$  333 (348) gebildet werden kann. Zwei weitere charakteristische Fragmente fanden sich bei  $m/z$  289 (301) und  $m/z$  213 (222). Das Fragmention  $m/z$  289 (301) zeigte eine Massendifferenz von 12 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten. Es entsteht aus dem Fragmention bei  $m/z$  305 (320) und zeigte zu diesem eine Massendifferenz von 16 (19) amu, was der bekannten Abspaltung eines neutralen Methanmoleküls entspricht. Das Fragmention bei  $m/z$  213 (222) liefert einen Hinweis auf die Hydroxylierungsposition, da es aus einem definierten Teil der aliphatischen Seitenkette besteht. Der Massenunterschied von 9 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten zeigte, dass eine TMS-Gruppe im Fragment enthalten sein muss. Die Positionen C10 bis C8 können aufgrund des Fragmentes bei  $m/z$  348 (366) ausgeschlossen werden. Die Position C4 ist fraglich, da in diesem Fall ähnliche Fragmente wie bei 5-HO-ZEN (Kap.: 3.4.8) erwartet werden würden, speziell das Fragment bei  $m/z$  377 (392). Die Positionen C6, C5 und C10 können ausgeschlossen werden, da diese Metabolite bekannt sind. Die Position C8 kann ausgeschlossen werden, da die Inkubation von D<sub>2</sub>-ZEN und D<sub>6</sub>-ZEN keine Hinweise auf einen Deuteriumverlust des M-8 ergeben hat. Die Position C3 und die Methylgruppe an C3 können ausgeschlossen werden, da die Hydroxylierung einer dieser Positionen keine

Stereoisomere hervorbringen würde. Nach dem Ausschlußprinzip bleiben damit nur die Positionen C9 und C4 übrig. Beide Positionen wären aufgrund des Fragmentations bei  $m/z$  213 (222) möglich, jedoch gibt es auch Hinweise, die gegen beide Positionen sprechen, so dass die Position der im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe nicht eindeutig bestimmt werden kann.

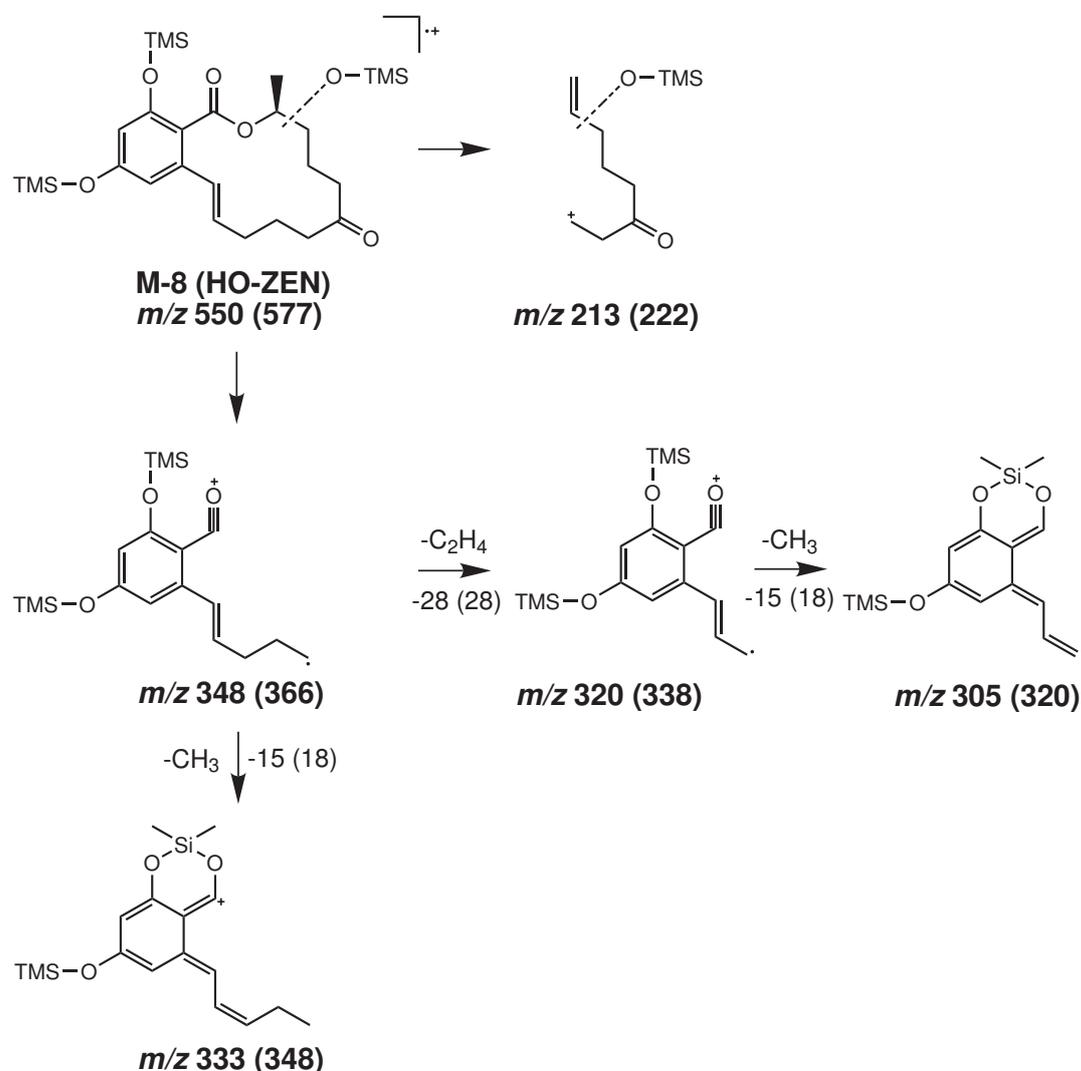


Abbildung 3.4.25.: Vorgeschlagene EI-Fragmentierung und Fragmentationen des Metaboliten von Peak 8 derivatisiert mit BSTFA

Der in der mikrosomalen Inkubation detektierte M-8 konnte als HO-ZEN-Metabolit identifiziert, jedoch in seiner Struktur nicht eindeutig aufgeklärt werden. Der Metabolit wurde in Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen/NADPH in moderater Menge gebildet, während sein polareres Stereoisomer nur in Spuren nachgewiesen werden konnte. Der HO-ZEN Metabolit zeigte sowohl in der ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung, wie auch in der EI-Fragmentierung sehr charakteristische Massenspektren, welche jedoch keine Hinweise auf die exakte Hydroxylierungsposition geben. Aufgrund des Ausschlußprinzip und der der Bildung von Stereoisomeren kann die Position, der im Metabolismus eingefügten Hydroxylgruppe, auf die Positionen C4 und C9 eingegrenzt werden.

### 3.4.8. Peak 7 (5 $\alpha$ -HO-ZEN)

Der in der mikrosomalen Inkubation isolierte Peak 7 besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 16,5 min und zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was einem HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.3.1 B). Auch hier existierte ein oxidativer Metabolit mit identischem Massenspektrum, der in Spuren bei der Retentionszeit 14,5 min detektiert werden konnte und bei dem es sich sehr wahrscheinlich um das  $\beta$ -Stereoisomer handelt. Peak 7 wurde chemisch zu seinem HO-ZAN Derivat reduziert (Kap.: 5.4.2.6) und zeigte eine identische Retentionszeit und ein identisches ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum wie die Referenzsubstanz 5-HO-ZAN, welche von Yang et al. [2008] zur Verfügung gestellt wurde [Hildebrand, pers. Mitteilung]. Demnach handelt es sich bei dem Metaboliten von Peak 7 um 5-HO-ZEN und mit großer Wahrscheinlichkeit um das  $\alpha$ -Stereoisomer (Abb.: 3.4.26). Hinweise aus den Massenspektren geben keinen direkten Hinweis auf die Hydroxylierungsposition. Aufgrund der bekannten Struktur konnte in der EI-Fragmentierung jedoch ein spezifisches Fragment bei  $m/z$  377 identifiziert werden, welches nach TMSOH-Abspaltung und  $\alpha$ -Spaltungen entsteht wenn sich die Hydroxylierungsposition an der C4 oder C5 Position befindet (Abb.: 3.4.28).

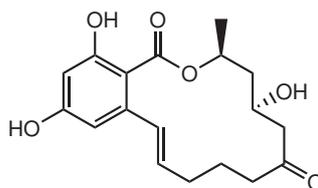


Abbildung 3.4.26.: Vorläufige chemische Struktur von 5 $\alpha$ -HO-ZEN

### ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum zeigte das  $[M-H]^-$  Ion in Spuren bei  $m/z$  333 (Abb.: 3.4.27 A). In hoher Intensität fand sich das Fragment  $[M-H-H_2O]^-$  bei  $m/z$  315. In geringen Intensitäten fanden sich auch  $[M-H-(H_2O)_2]^-$  bei  $m/z$  297, sowie  $[M-H-CO_2]^-$  bei  $m/z$  289 und dem daraus gebildeten Fragment  $[M-H-CO_2-H_2O]^-$  bei  $m/z$  271, welches eine vergleichbare Intensität besaß wie in Massenspektren von anderen HO-ZEN-Metaboliten. Charakteristisch für 5 $\alpha$ -HO-ZEN waren das Fragmentation bei  $m/z$  263, welches eine Massendifferenz von 16 amu zum aus der ZEN-Fragmentierung bekannten Fragmentation bei  $m/z$  245 hatte. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Fragment, die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe noch enthalten sein könnte. Diese kann dann als Wasser abgespalten werden, wobei das Fragmentation bei  $m/z$  245 entsteht, welches das Basision bildete. Das Fragmentation bei  $m/z$  219 besaß ebenfalls einen Massenunterschied von 16 amu zu dem aus der ZEN-Fragmentierung bekannten Fragmentation bei  $m/z$  203, hierbei kann es sich aber um kein Fragment handeln, das die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe enthält, da dies erfordert das die Hydroxylgruppe zwischen Position C10 und C8 lokalisiert wäre. In geringer Intensität fanden sich weitere Fragmente mit kleineren  $m/z$  bei  $m/z$  175,  $m/z$  161 und  $m/z$  149, die alle drei aus der Fragmentierung von ZEN bekannt sind.

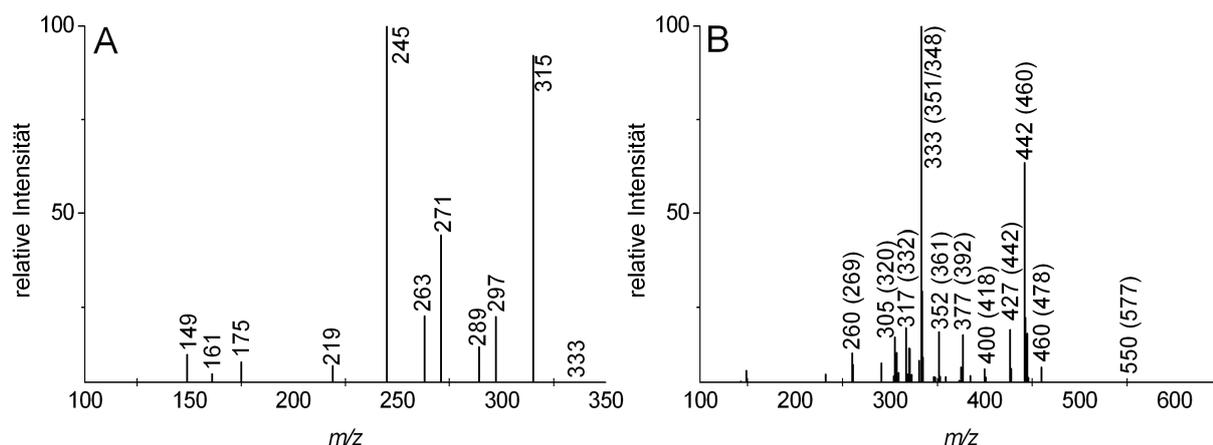


Abbildung 3.4.27.: Massenspektren von  $5\alpha$ -HO-ZEN **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV nach Derivatisierung mit BSTFA. Werte in Klammern beziehen sich auf ein Massenspektrum des Metaboliten derivatisiert mit deuteriertem BSA.

### EI-Fragmentierung

Das EI-Massenspektrum zeigte das  $[M]^+$  Ion bei  $m/z$  550 (577), was bei beiden Derivatisierungen einem HO-ZEN-Metaboliten entspricht (Abb.: 3.4.27 B). Die Fragmentierung zeigte die typischen Fragmentionen  $[M-TMSOH]^+$ ,  $[M-TMSOH-H_2O]^+$  und  $[M-TMSOH-H_2O-CH_3]^+$ . Das Basision bildete das Fragment bei  $m/z$  333 (351) welches zum Teil identisch mit dem Fragment aus dem ZEN-Massenspektrum war. Zusätzlich lies sich das gleiche Fragment noch einem unbekanntem Fragmentation mit einem Massenunterschied von 15 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten zuordnen bei  $m/z$  333 (348). Das Fragmentation bei  $m/z$  333 (351) zeigte die typische CO-Abspaltung zum Fragmentation bei  $m/z$  305 (320), wie auch die Methanabspaltung von 16 (19) amu zum Fragmentation bei  $m/z$  317 (332). Die für diesen Metaboliten charakteristischen Massen fanden sich bei  $m/z$  400 (418),  $m/z$  377 (392),  $m/z$  352 (361) und  $m/z$  260 (269).

Das Fragment bei  $m/z$  400 (418) enthält zwei TMS-Gruppen und entsteht sehr wahrscheinlich aus dem Molekülion durch Abspaltung eines Teils des makrocyclischen Rings von 42 amu. Die Fragmentierung beginnt durch  $\alpha$ -Spaltung, ausgehend vom Sauerstoff der im Metabolismus eingefügten Hydroxylgruppe und führt zur vollständigen Abspaltung des Fragments durch eine zweite  $\alpha$ -Spaltung. Anschließend findet eine Wasserabspaltung und die Abspaltung der im Metabolismus eingefügten Hydroxylgruppe als TMSOH statt, wodurch das Fragmentation bei  $m/z$  400 (418) entsteht (Abb.: 3.4.28). Das Fragmentation bei  $m/z$  377 (391) besitzt einen Massenunterschied von 15 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten, wonach es sich hier um ein Fragment mit Dimethylsiloxanring handeln muss, bei welchem die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe ebenfalls eliminiert wurde. Es lässt sich hier ein Fragment formulieren, das wie das Fragment bei  $m/z$  400 (418) ebenfalls durch eine Reihe von  $\alpha$ -Spaltung entsteht. Diese lassen sich formulieren wenn die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe als TMSOH eliminiert wurde und die dadurch entstehende Doppelbindung sich zwischen der C5 und C4 Position befindet (Abb.: 3.4.28).

Die beiden Fragmente bei  $m/z$  352 (361) und  $m/z$  260 (269) sind charakteristisch für 5-HO-ZEN. Sie besitzen beide einen Massenunterschied von 9 amu zum mit deuteriertem BSA derivatisierten Metaboliten, was darauf hindeutet, dass eine intakte TMS-Gruppe enthalten sein muss. Aufgrund ihrer detektierten Masse müssten diese auch den aromatischen Ring oder Teile davon enthalten, bei dem durch Umlagerung eine der TMS-Gruppe abgespalten wurde. Die Fragmente müssen zusätzlich noch einen Teil der aliphatischen Seitenketten enthalten, welche nach Eliminierung von TMSOH ein Doppelbindung enthalten. Konkrete Hinweise auf die Position der im Metabolismus eingefügten Hydroxylgruppe lassen sich aus den charakteristischen Fragmenten von 5-HO-ZEN nicht ableiten.

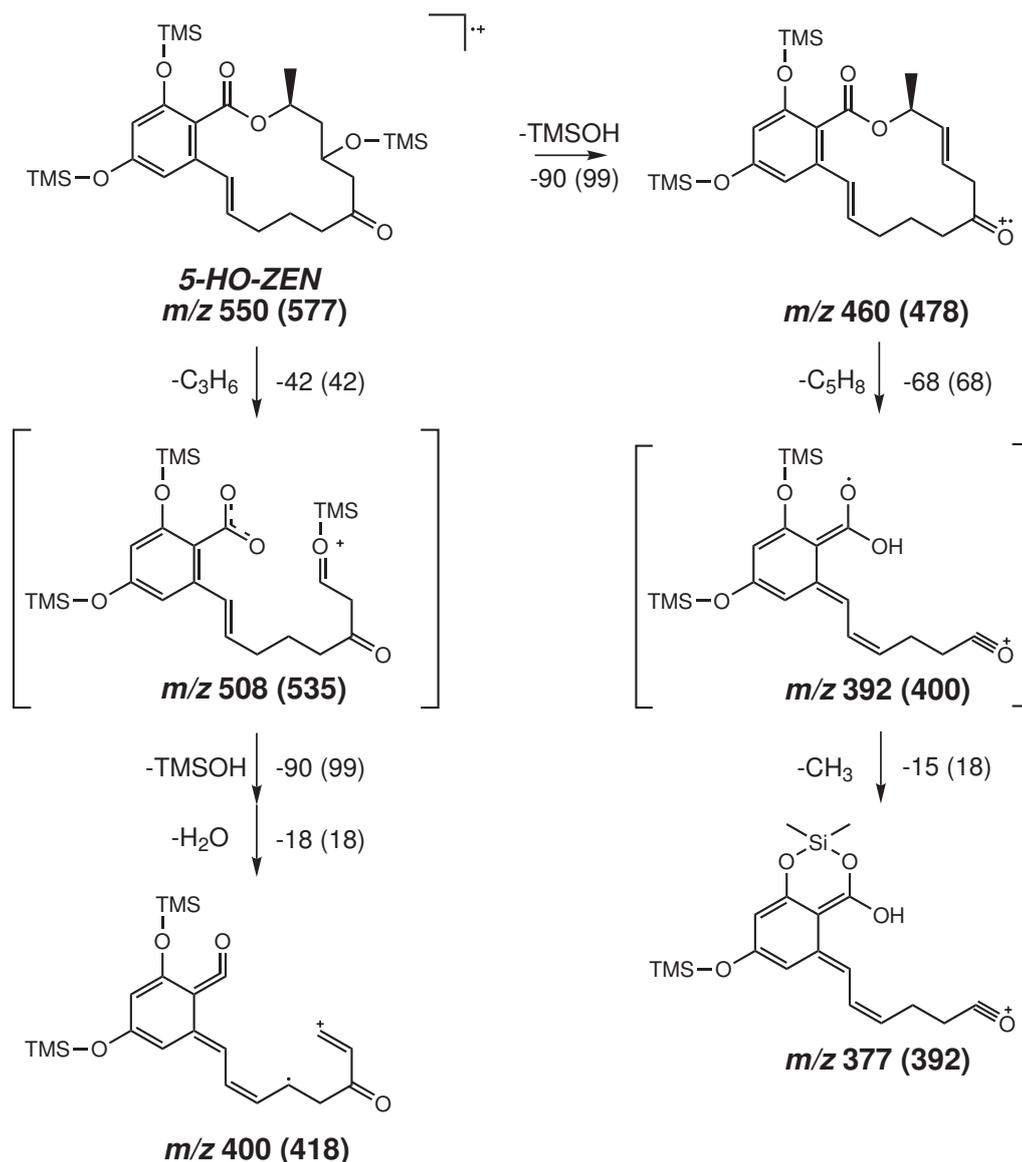


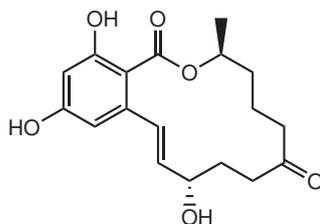
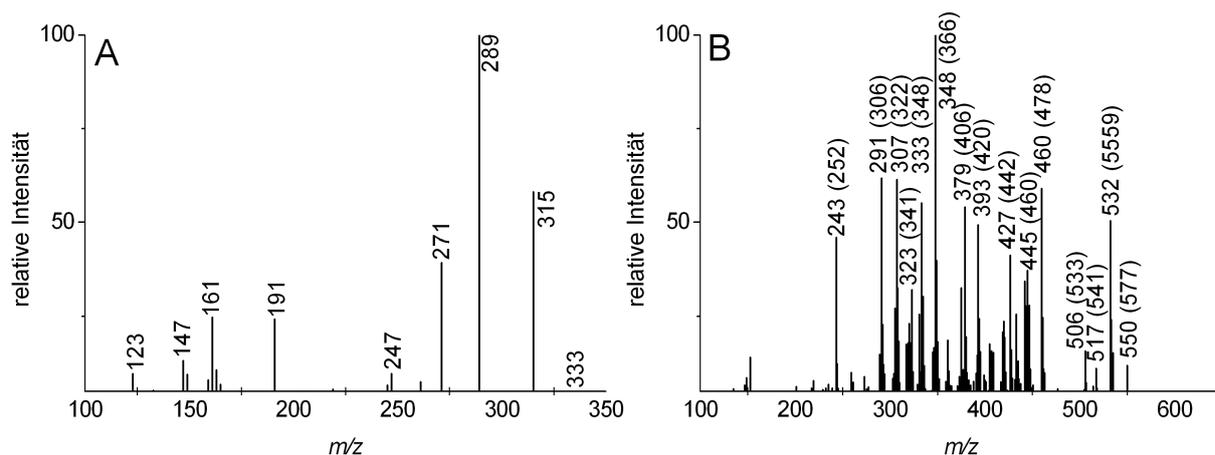
Abbildung 3.4.28.: Vorgeschlagene EI-Fragmentierung und Fragmentationen von 5-HO-ZEN nach Derivatisierung mit BSTFA

Im *in vitro* Metabolismus wurde 5 $\alpha$ -HO-ZEN in sehr geringer Menge in Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen/NADPH gebildet. Die Struktur wurde durch Reduktion zum ZAN-Derivat und Identifikation mit einer authentischen Referenzsubstanz aufgeklärt. Aus der massenspektrometrischen Untersuchung konnten dagegen keine Hinweise auf die Struktur abgeleitet werden. Es konnten in den EI-Massenspektren Fragmente nachgewiesen werden, die die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe enthielten, zu denen aber kein konkreter Strukturvorschlag formulierbar war. Fragmentierungsreaktionen von 5-HO-ZEN wie sie Bolliger und Tamm [1972], Jackson et al. [1974], Stipanovic und Schroeder [1975] und Steele et al. [1976] formulierten, konnten zum Teil ebenfalls beobachtet werden und führen zur Bildung eines identischen Basisions. Das von Bolliger und Tamm [1972] und Jackson et al. [1974] beschriebene, entscheidende Fragmention des aliphatischen macrocyclischen Rings, welches die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe enthält, konnte jedoch nicht detektiert werden, was auf die unterschiedlichen Derivatisierungen zurückzuführen sein kann. Die beiden Stereoisomere von 5-HO-ZEN wurden bereits 1972 von Bolliger und Tamm als Pilzmetabolite von *Giberella zeae* der sexuellen Form von *Fusarium graminearum* und später von Hagler et al. [1979] in *Fusarium roseum* beschrieben. Steele et al. [1976] vermutete, dass 5-HO-ZEN ein Metabolit im enzymatischen Abbau von ZEN in *Fusarium roseum* darstellte. Jackson et al. [1974] untersuchte beide Stereoisomere im "Uterotrophic-Assay" und stellte dabei fest, dass sowohl 5 $\alpha$ -HO-ZEN, wie auch 5 $\beta$ -HO-ZEN im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Erhöhung des Uterusgewichts führte und somit beide Stereoisomere keine estrogenen Aktivität besaßen [Jackson et al., 1974]. Dies wurde von Kiang et al. [1978] bestätigt, da in *in vitro* Untersuchungen gezeigt wurde, dass 5-HO-ZEN keine Affinität für den Estrogenrezeptor besaß [Kiang et al., 1978]. Die fehlende estrogenen Aktivität von 5-HO-ZEN gegenüber ZEN muss in der Struktur begründet liegen. Die Hydroxylgruppe in der C5-Position in 5-HO-ZEN kann über einen sechsgliedrigen Ring eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe in der C7-Position ausbilden, wodurch der macrocyclische Ring möglicherweise verzerrt wird. Ebenso ist die für die estrogenen Aktivität wichtige zweite Hydroxylgruppe blockiert, was in der von Kiang et al. [1978] beobachteten verminderten Affinität zum Estrogenrezeptor resultieren kann.

3.4.9. Peak 6 (10 $\alpha$ -HO-ZEN)

Der in der mikrosomalen Inkubation isolierte Metabolit von Peak 6 besaß in der LC-MS Analyse die Retentionszeit 15,3 min und zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was einem weiteren HO-ZEN entspricht. Hinweise aus den Massenspektren (Abb.: 3.4.30) deuten darauf hin, dass sich die Hydroxylierungsposition an der C10 Position befindet (Abb.: 3.4.29).

Die Struktur von 10 $\alpha$ -HO-ZEN wurde durch eine Oxidationsreaktion an einem identischen Pilzmetaboliten bestätigt. Die Oxidation mit Mangandioxid, welche bevorzugt allylständige Hydroxylgruppen in ihre Carbonylverbindungen überführt, führte zur Produktbildung. Die chemische Reduktion des Produktes führte zur Bildung beider Stereoisomere von 10-HO-ZEN [Hildebrand, pers. Mitteilung]. Peak 6 konnte folglich anhand der identischen Retentionszeit und dem identischen MS<sup>2</sup>-Massenspektrum als 10 $\alpha$ -HO-ZEN identifiziert werden und das  $\beta$ -Stereoisomer war identisch mit einem in Spuren detektierten Metaboliten bei der Retentionszeit 13,6 min, welcher zusammen mit 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL eluierte (Kap.: 3.4.5).

Abbildung 3.4.29.: Chemische Struktur von 10 $\alpha$ -HO-ZENAbbildung 3.4.30.: Massenspektren von 10 $\alpha$ -HO-ZEN, **A**: ESI-MS<sup>2</sup>, **B**: GC-MS -70 eV derivatisiert mit BSTFA

ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung

Das ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum von 10 $\alpha$ -HO-ZEN zeigte in Spuren das [M-H]<sup>-</sup> Ion bei  $m/z$  333. Das [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> bei  $m/z$  289 bildet bei diesem Metaboliten das Basision (Abb.: 3.4.30 A). Es fanden sich die typischen Fragmentationen [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> bei  $m/z$  315 und [M-H-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> bei  $m/z$  271. Das Fragmentation [M-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> konnte nicht detektiert werden, was darauf hindeutet, dass sich die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe nur schwer abspalten lässt. Die Fragmentationen bei  $m/z$  247,  $m/z$  191,  $m/z$  161,  $m/z$  147 und  $m/z$  123 waren für diesen Metaboliten charakteristisch. Ein Fragmentation mit  $m/z$  191 existiert auch bei 15-HO-ZEN, bei welchem die eingefügte Hydroxylgruppe am aromatischen Ring sitzt und welches analog zum Fragment bei  $m/z$  175 aus dem ZEN-Massenspektrum gebildet wird. Eine Position am aromatischen Ring kann ausgeschlossen werden, jedoch ist die Position am C10 ebenfalls noch in diesem Fragment enthalten und kann die im Metabolismus eingefügte Hydroxylgruppe enthalten (Abb.: 3.4.31).

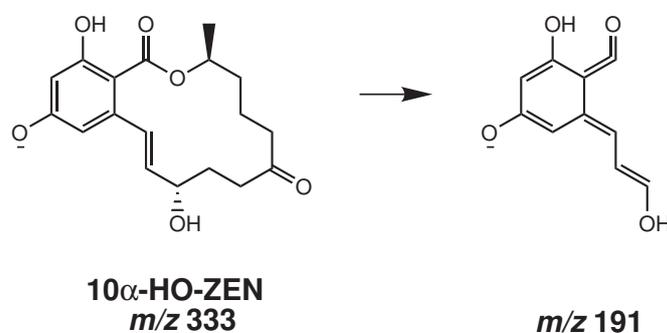


Abbildung 3.4.31.: Vorgeschlagene ESI- MS<sup>2</sup> Fragmentierung und Fragmentation von 10 $\alpha$ -HO-ZEN

## EI-Fragmentierung

Das mit der GC-MS erhaltene EI-Massenspektrum von 10 $\alpha$ -HO-ZEN zeigte im Vergleich mit Massenspektren anderer oxidativer HO-ZEN-Metabolite eine stärkere Fragmentierung mit hohen Intensitäten der gebildeten Fragmentationen (Abb.: 3.4.30 B). Das [M]<sup>+</sup> Ion fand sich bei  $m/z$  550 (577) mit einem Massenunterschied von 27 amu zum gleichen Metaboliten derivatisiert mit deuterierten BSA. Dies entspricht drei intakten TMS-Gruppen und damit einem HO-ZEN-Metaboliten. Es fanden sich die für ZEN-OH-Metabolite typische Fragmentationen, die durch Abspaltung von TMSOH, H<sub>2</sub>O, Methylradikale und Kombinationen aus diesen entstehen. Das Basision bildete ein Fragmention bei  $m/z$  348 (366). Eine Besonderheit stellten die drei Fragmentationen bei  $m/z$  506 (533),  $m/z$  393 (420) und  $m/z$  379 (406) dar, welche ebenfalls einen Massenunterschied von 27 amu zu ihren analogen Fragmenten aus dem Massenspektrum des mit deuteriertem BSA derivatisierten 10 $\alpha$ -HO-ZEN besaßen. Das Fragment bei  $m/z$  506 zeigte einen Massenunterschied von 44 amu zum Molekülion. MS<sup>2</sup>-Untersuchungen zeigten, dass es nur aus dem Molekülion entsteht und nicht aus dem Fragment bei  $m/z$  532 (559), so dass es sich um eine CO<sub>2</sub>-Abspaltung handeln könnte (Abb.: 3.4.32).

Das Fragment bei  $m/z$  393 (420) besaß einen Massenunterschied von 88 (97) amu zum aus der ZEN-Fragmentierung bekannten Fragment bei  $m/z$  305. Dies entspricht einer im Fragment enthaltenen TMS-Gruppe und weist darauf hin, dass die eingefügte Hydroxylgruppe an der Position C10 oder C9 sitzen könnte (Abb.: 3.4.32). Das entsprechende Ion mit zusätzlicher Carbonylgruppe bei  $m/z$  421 konnte nicht in größerer Intensität detektiert werden, da es vermutlich sehr schnell zum detektierten Fragment bei  $m/z$  393 weiterfragmentiert. Die underivatisierten Fragmente von  $m/z$  421 und  $m/z$  348 werden beide von Pathre et al. (1980) als mögliche Fragmente eines HO-ZEN mit Hydroxylierungspositionen an der C10 oder C9 Position beschrieben [Pathre et al., 1980].

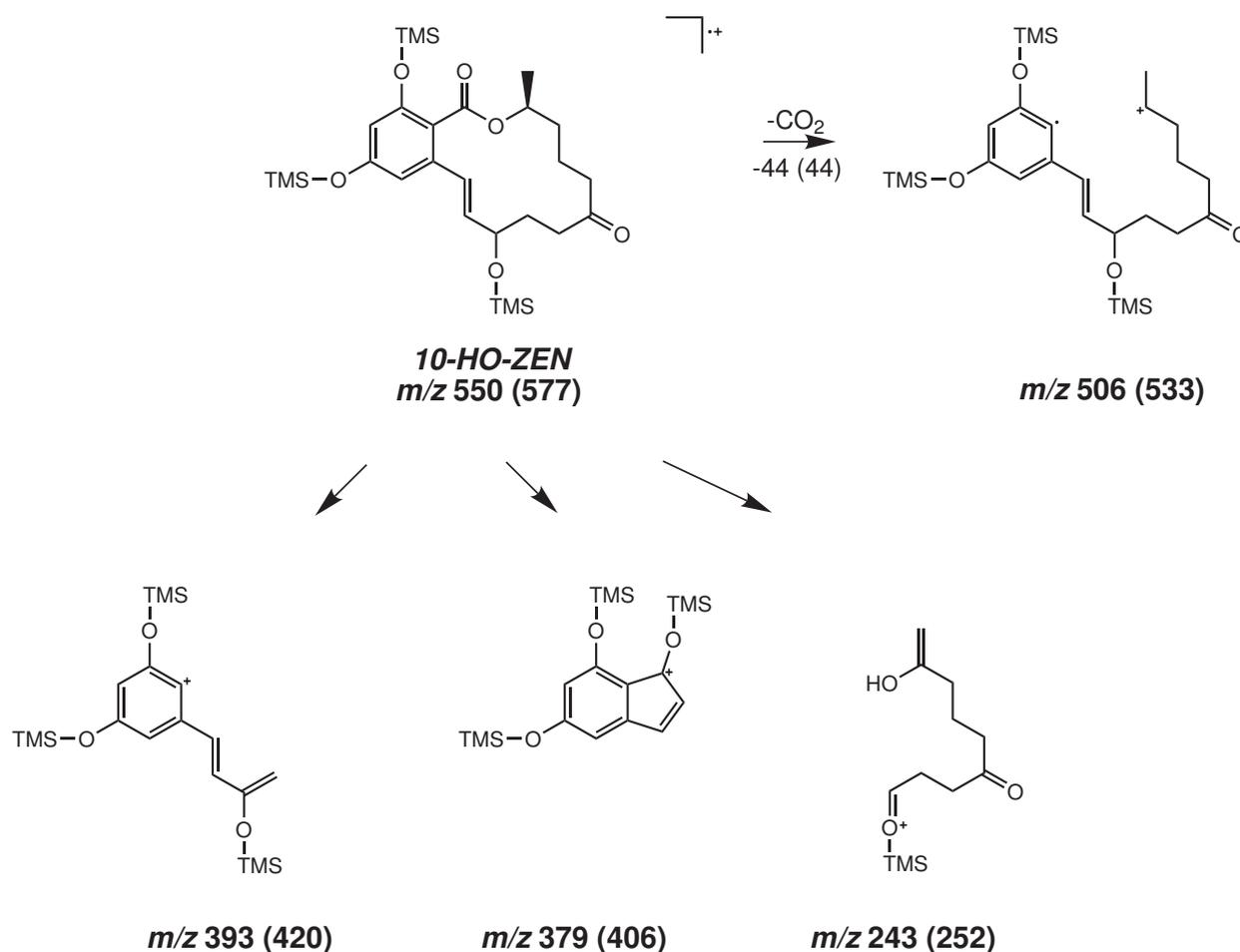


Abbildung 3.4.32.: Vorgeschlagene EI Fragmentierung und Fragmentionen des Metaboliten 10-HO-ZEN

Das Fragment bei  $m/z$  379 (406) besitzt ein  $\text{CH}_2$ -Gruppe weniger als das Fragment bei  $m/z$  393 (420) und kann nur durch Umlagerung und Ringschluss formuliert werden. Da dieses Fragment ebenfalls drei intakte TMS-Gruppen enthält ist es sehr wahrscheinlich, dass die vermutete Hydroxylierungsposition an der C10 Position sitzt (Abb.: 3.4.32). Ein weiteres charakteristisches Fragment fand sich bei  $m/z$  243 (252). Es zeigte einen Massenunterschied von 9 amu zum mit deuteriertem

BSA derivatisierten Metaboliten, was auf eine intakte TMS-Gruppe hinweist. Dieses Fragment entspricht dem aliphatischen Teil des Moleküls, welcher die im Metabolismus eingefügte und silylierte Hydroxylgruppe enthält. Ein möglicher Strukturvorschlag ist in Abb.: 3.4.32 dargestellt.

In Inkubationen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH wurde  $10\alpha$ -HO-ZEN in moderater Menge gebildet,  $10\beta$ -HO-ZEN dagegen nur in Spuren. Die massenspektrometrischen Untersuchungen gaben sowohl mit der ESI-MS<sup>2</sup>- wie auch mit der EI-Analyse deutliche Hinweise auf die Struktur des Metaboliten. Die von Pathre et al. [1980] beschriebenen Fragmentierungsreaktionen für 10-HO-ZEN, die für eine Hydroxylierung an Position C10 oder C9 sprechen, konnten trotz unterschiedlicher Derivatisierung ebenfalls beobachtet werden. Die für 10-HO-ZEN charakteristischen Fragmentierungsreaktionen konnten allerdings nicht beobachtet werden, jedoch ähnliche Reaktionen, die ein deutlicher Hinweis einer Hydroxylierung an der C10-Position sind. Die allylständige Hydroxylierung konnte durch eine spezifische Oxidationsreaktion eines identischen Pilzmetaboliten als  $10\alpha$ -HO-ZEN bestätigt werden [Hildebrand, pers. Mitteilung]. Die Stereoisomere von 10-HO-ZEN wurden erstmals von Pathre et al. [1980] als Pilzmetaboliten von *Fusarium roseum* beschrieben. Die allylständige Hydroxylierung ist von besonderer toxikologischer Bedeutung. Die Konjugation mit Sulfat führt hier zu reaktiven Metaboliten. Die gebildeten Sulfate sind in der Regel stabil gegen enzymatische oder pH-Wert abhängige Hydrolyse, werden im Organismus kaum rückresorbiert und schnell ausgeschieden [Eisenbrand und Metzler, 2005]. Die Sulfatierung wird deshalb oft assoziiert mit Inaktivierung und Detoxifizierung. Für die meisten stabilen Sulfat-Konjugate trifft dies zu, jedoch kann die *O*-Sulfatierung in bestimmten Positionen (z.B. allylständig, benzylständig) elektronenziehenden Charakter besitzen, was in einer guten Abgangsgruppe resultiert. Diese Reaktion ist immer dann bevorzugt wenn das entstehende Kation stabilisiert wird, z.B. durch Mesomerie (Abb.: 3.4.33). Viele Sulfat-Konjugate von benzyllischen und allyllischen Alkoholen sind deshalb instabil und bilden Elektrophile, die z.B. mit der DNA, aber auch mit anderen zellulären Nukleophilen reagieren können [Glatt et al., 2001].

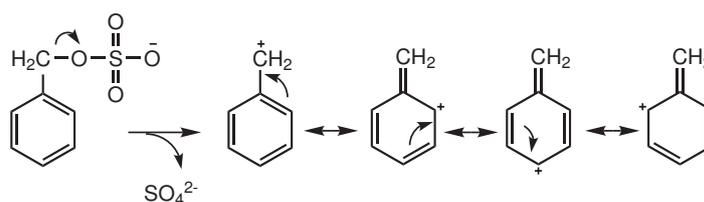


Abbildung 3.4.33.: Bildung von Elektrophilen aus *O*-Sulfat-Konjugaten [Glatt, 1997]

Über die aliphatische Hydroxylierung von ZEN im Säugermetabolismus wurde bis vor kurzem nicht berichtet. In der Literatur gibt es jedoch einige Hinweise, dass oxidative ZEN-Metabolite auch von Fusarien gebildet werden [Bolliger und Tamm, 1972; Jackson et al., 1974; Steele et al., 1976; Stipanovic und Schroeder, 1975; Hagler et al., 1979; Pathre et al., 1980; Richardson et al., 1985]. Einige dieser beschriebenen Pilzmetabolite waren identisch mit den in Zellfraktionen gebildeten oxidativen ZEN- und ZEL-Metaboliten (Abb.: 3.4.34).

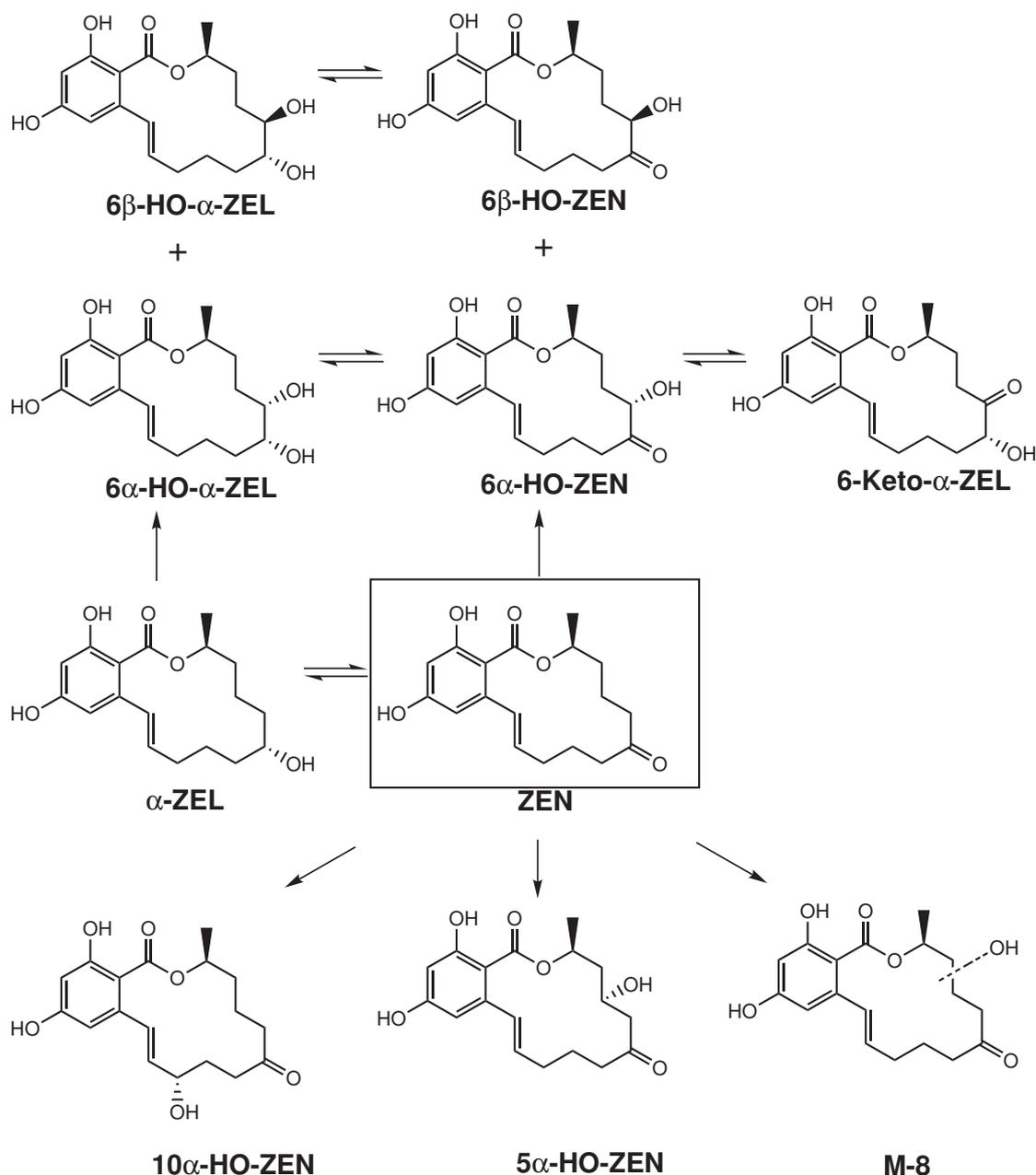


Abbildung 3.4.34.: Zusammenfassung aliphatisch hydroxylierter ZEN-Metabolite in der Ratte

Bis auf die Untersuchungen von 5-HO-ZEN in ER-Bindungsassay und im "Uterotrophic-Assay" und den Untersuchungen von Bravin et al. [2007] zur estrogenen Aktivität des aliphatisch hydroxylierten HO-ZEN Hauptmetaboliten aus Rattenlebermikrosomen ist nichts über die estrogenen Aktivität der oxidativ gebildeten ZEN-Metabolite bekannt. Untersuchungen zur Ligandenbindung von  $\beta$ -ZAL an den ER haben gezeigt, dass dieses über einen weiteren Bereich mit dieser Ligandenbindungsregion interagiert als  $17\beta$ -Estradiol und das hierfür der große und flexible makrocyclische, aliphatische Ring dafür verantwortlich ist (Abb.: 3.4.35) [Ekena et al., 1997]. Die Einführung weiterer Hydroxylgruppen in das ZEN-Molekül durch aliphatische Hydroxylierung könnte zu einer Optimierung der Interaktion zwischen Ligand und der Ligandenbindedomäne führen und folglich zu einer höheren Affinität und in Folge zu einem stärkeren estrogenen Potential. Im Gegenzug kann die Hydroxylierung jedoch auch zum Verlust der estrogenen Aktivität führen, wodurch ZEN detoxifiziert werden würde. Die Hydroxylierung von ZEN an der C5 Position stellt eine solche Detoxifizierung dar, da bei beiden Stereoisomeren des Metaboliten weder eine Affinität zum ER, noch eine estrogenen Aktivität im "Uterotrophic-Assay" nachgewiesen werden konnte [Kiang et al., 1978; Jackson et al., 1974].

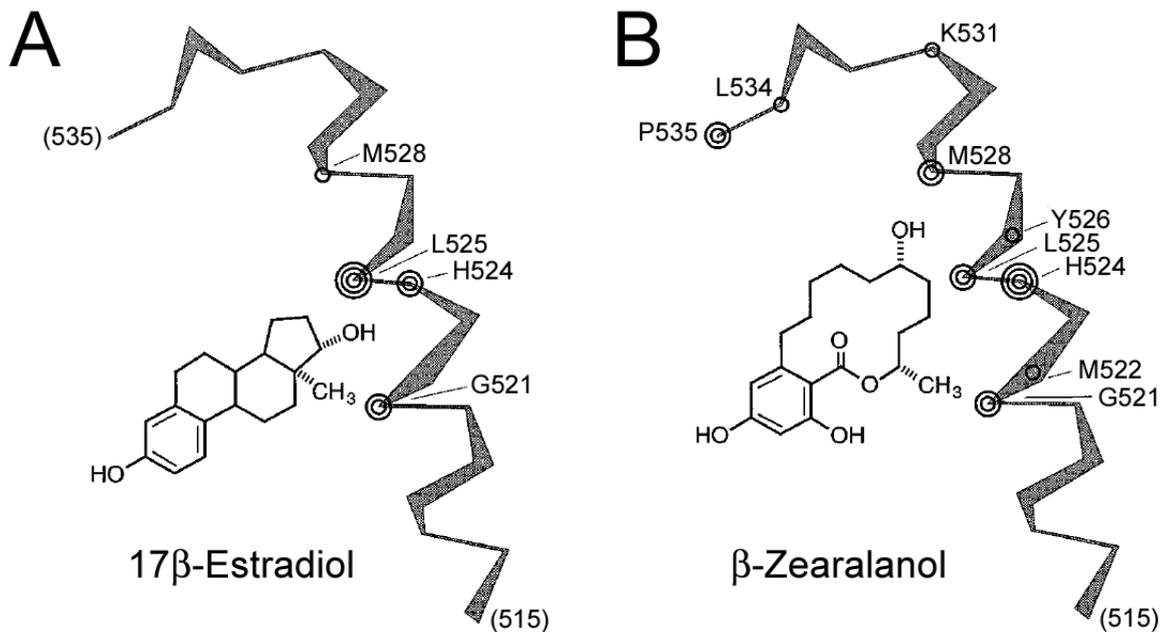


Abbildung 3.4.35.: Eine schematische Darstellung der Interaktion von zwei unterschiedlichen Liganden, A:  $17\beta$ -Estradiol, B:  $\beta$ -ZAL mit der 515-531 Region des ER, welche für die Ligandenbindung verantwortlich ist [Ekena et al., 1997].

### 3.5. Oxidativer Metabolismus von cis-ZEN

Wie in Kap.: 3.1 gezeigt können cis-ZEN-Derivate auf natürlichem Weg durch Bestrahlung mit UV-Licht aus ZEN-Derivaten gebildet werden und können somit ein Bestandteil der natürlichen ZEN-Kontaminanten darstellen, wenn diese Tageslicht ausgesetzt waren. Aus diesem Grund wurde auch cis-ZEN auf seinen oxidativen Metabolismus untersucht und mit dem von ZEN verglichen. Hierzu wurde cis-ZEN durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm für 2 h aus ZEN (10  $\mu$ M) hergestellt. Cis-ZEN und ZEN wurden mittels der HPLC isoliert (Kap.: 5.4.2.1). Ein Aliquot der isolierten Derivate wurde anschließend mit der HPLC auf Reinheit und Veränderungen hin untersucht. Die so überprüften ZEN-Isomere wurden dann mit Rattenlebermikrosomen/NADPH für 40 min inkubiert (Kap.: 5.4.4.4). Nach Inkubationsende wurden die Inkubate mit Ethylacetat abgestoppt und extrahiert und die Extrakte mit HPLC und LC-MS untersucht (Kap.: 5.4.1.1 und Kap.: 5.4.1.3 Methode 1). Die detektierten ZEN-Metabolite wurden anhand ihrer Elutionsreihenfolge und Retentionszeiten identifiziert (Kap.: 3.3).

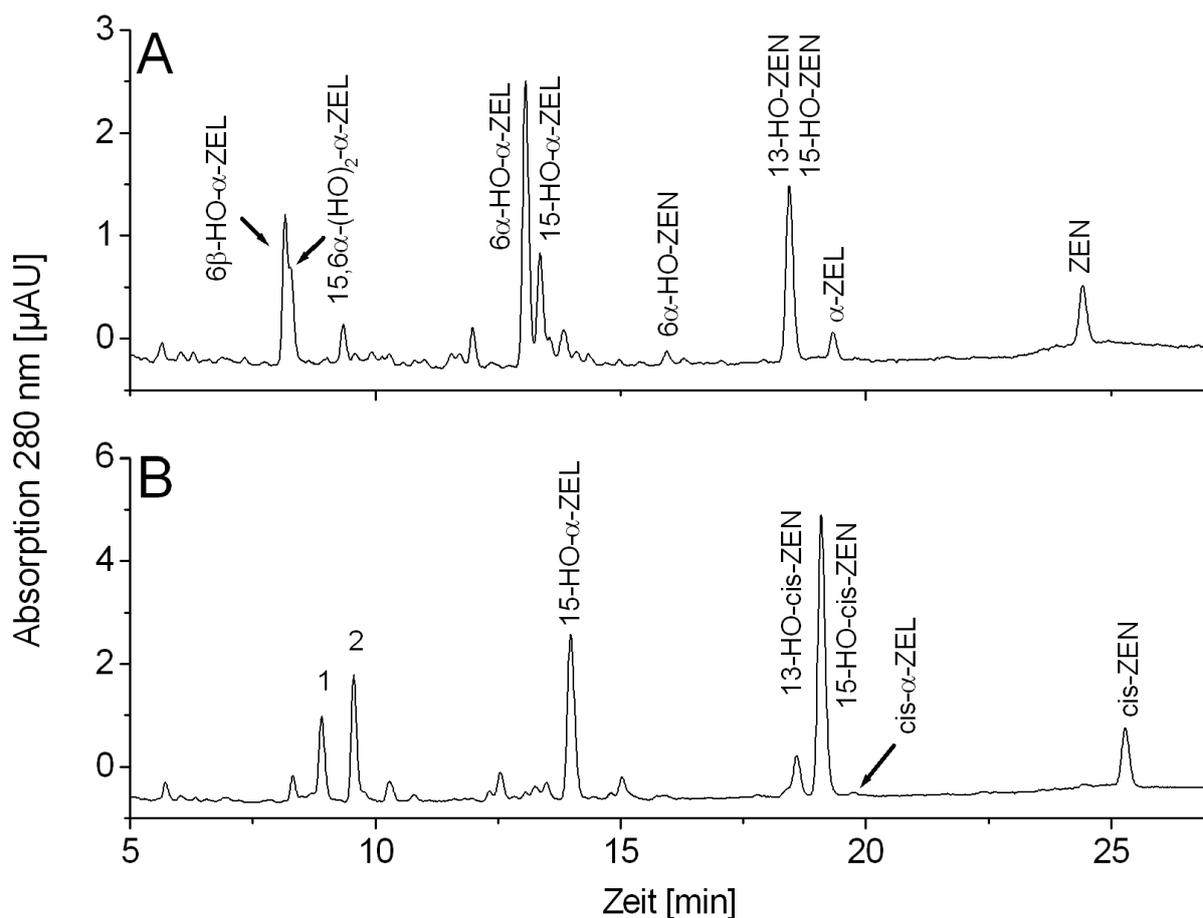


Abbildung 3.5.1.: Metabolitenprofile von Inkubationen von **A**: ZEN und **B**: cis-ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH für 40 min. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.1

Die detektierten cis-ZEN-Metabolite wurden anhand ihres  $m/z$  im MS-TIC charakterisiert und anhand der zwischen trans- und cis-ZEN-Derivaten gezeigten Retentionszeitverschiebung wurden die cis-Metabolite den trans-Metaboliten aus dem ZEN-Metabolitenprofil zugeordnet. Zusätzlich wurden die Peaks der Metabolite von cis-ZEN mit der HPLC isoliert und nach erneuter Charakterisierung mit der HPLC [Kap.: 5.4.2.1], mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm isomerisiert, so dass deren trans-Derivate ermittelt werden konnten.

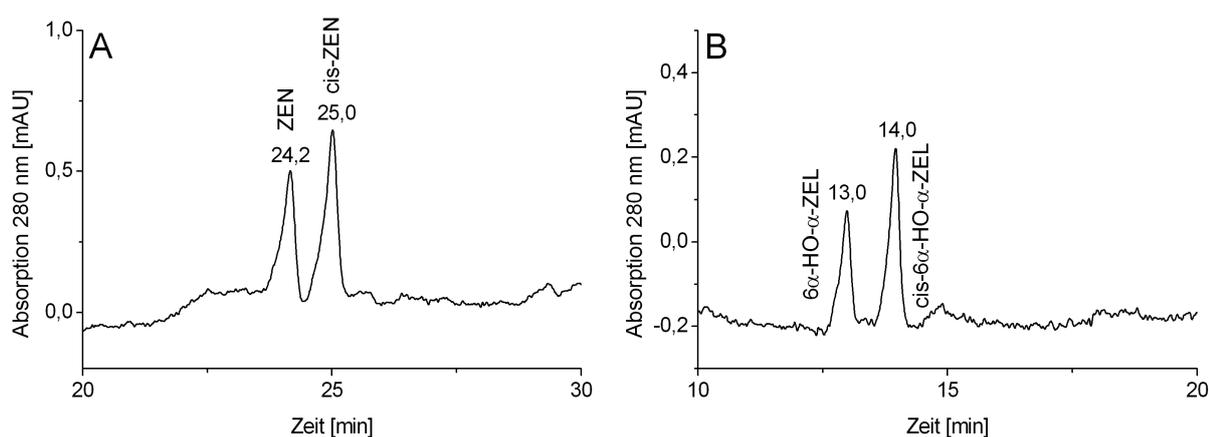


Abbildung 3.5.2.: HPLC-Chromatogramme von isolierten Metabolitenpeaks aus einer Inkubation von cis-ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH nach Isomerisierung durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. **A:** cis-ZEN und **B:** 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.1

Die HPLC-Analyse der Inkubation von cis-ZEN (Abb.: 3.5.1 B) zeigte im Vergleich zur Inkubation von ZEN (Abb.: 3.5.1 A) deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil. In beiden Inkubationen wurde das eingesetzte Substrat fast vollständig metabolisiert. Aufgrund der geringen Substratkonzentration wurden nur geringe Mengen der reduzierten Metabolite  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL gebildet oder zu hydroxylierten Folgemetaboliten weitermetabolisiert. Das Chromatogramm der Inkubation von cis-ZEN zeigte fünf Metaboliten, die im Vergleich zur Inkubation von ZEN als Metabolite des eingesetzten cis-ZEN identifiziert wurde. Die Analyse dieser isolierten und erneut mit UV-Licht isomerisierten Metabolite zeigte, dass mit Ausnahme der Isomere cis-ZEN und ZEN (Abb.: 3.5.2 A) und cis-6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL (Abb.: 3.5.2 B) alle anderen Isomere nicht mehr detektierbar waren. Stattdessen wurden z.T. viele unbekannte Peaks nachgewiesen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Zerfallsprodukte handelt. Dies deutet darauf hin, dass die isolierten Metabolite chemisch nicht stabil sind und hier vermutlich Metabolite mit Catechol- oder Hydrochinonstruktur vorliegen.

Um die Metabolite auf catecholische Strukturen zu überprüfen wurden der Inkubationsansatz zusätzlich mit Rattenlebercytosol/SAM umgesetzt [5.4.4.5]. Metabolite mit Catecholstruktur werden von der im Cytosol vorliegenden Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) methyliert, wodurch die Metabolitenflächen von Catecholen im Vergleich zur ohne Cofaktor inkubierten Kontrolle kleiner werden (Kap.: 3.6). Da Catechole und Hydrochinone autoxidationsempfindlich sind, wurden Inku-

bationen mit Ascorbinsäure als Oxidationsschutz durchgeführt. Dadurch können durch Autoxidation entstandene Chinone in größerer Menge ausgeschlossen werden, die z.T. anhand ihres  $m/z$  nicht von reduzierten ZEN-Metaboliten zu unterscheiden sind. Durch den Oxidationsschutz werden Catechole und Hydrochinone stabilisiert und die Peakflächen können gegenüber der Inkubation ohne Ascorbinsäure größer ausfallen. Außerdem können Artefaktpeaks, die durch Quinone entstehen, verhindert werden.

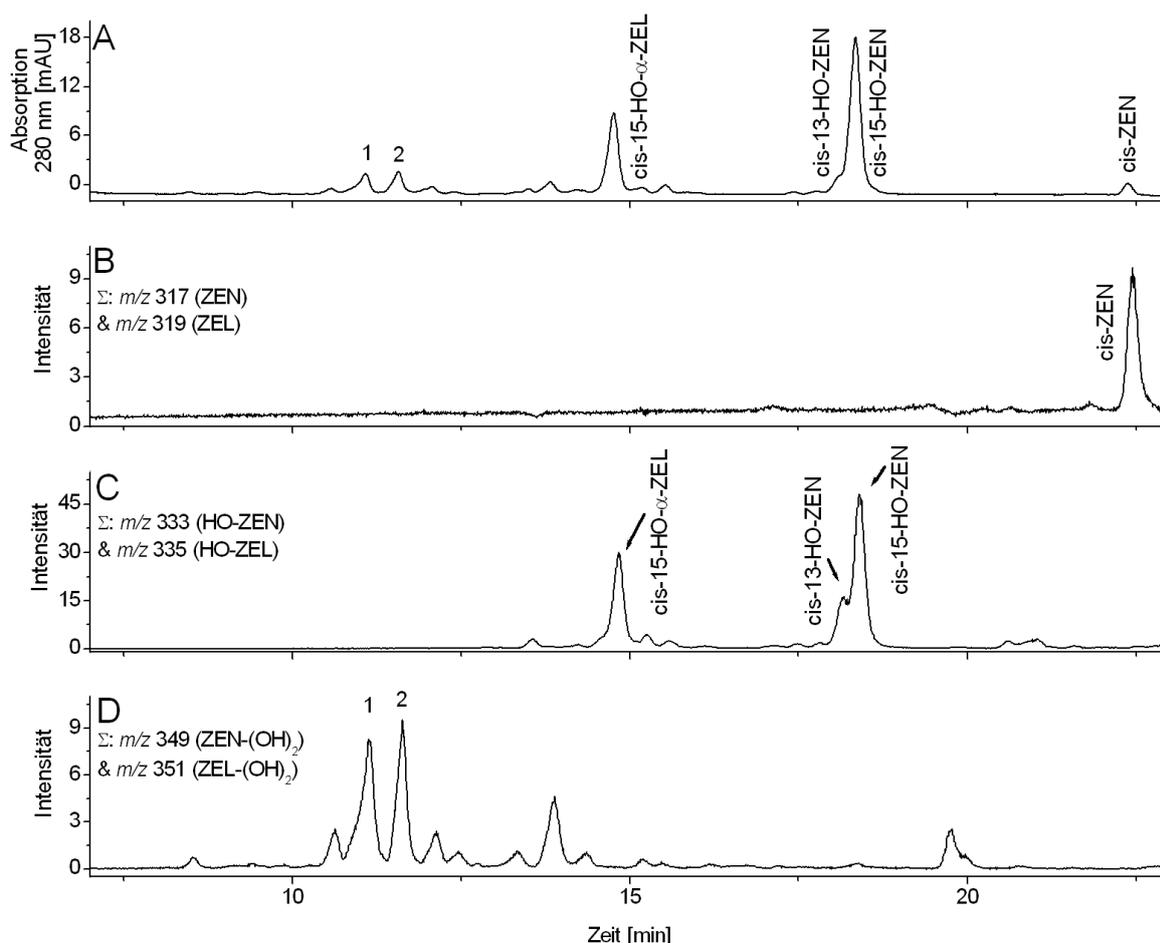


Abbildung 3.5.3.: LC-MS Chromatogramme eines Extrakts aus einer oxidativen Umsetzung von cis-ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH für 40 min. **A**: UV-Chromatogramm 280 nm und Massenspuren für **B**: ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL, **C**: HO-ZEN- und HO-ZEL- und **D**: (HO)<sub>2</sub>-ZEN- und (HO)<sub>2</sub>-ZEL- Metabolite. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1.

Der Hauptmetabolit bei der Retentionszeit 19,1 min zeigte in der LC-MS Analyse im MS-TIC ein  $m/z$  von 333, was einem HO-ZEN entspricht (Abb.: 3.5.3 C). Der Metabolit bei der Retentionszeit 18,6 min, der in der HPLC Analyse kurz vor dem Hauptmetaboliten eluierte zeigte ebenfalls ein  $m/z$  von 333 und wurde in der LC-MS Analyse von dem nachlaufenden Hauptmetaboliten nicht vollständig abgetrennt (Abb.: 3.5.3 C). Die beiden Metabolite zeigten eine identische Retentionszeit bzw. eine geringe Retentionszeitverschiebung zu größerer Retentionszeit im Vergleich zu dem

Hauptmetaboliten 15-HO-ZEN aus der Inkubation von ZEN. Zusätzlich zeigten beide Metabolite im ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum das Fragmention  $m/z$  191, was ein Hinweis auf einen aromatische hydroxylierten ZEN-Metaboliten sein kann (Kap.: 3.4.2). Hinweise auf eine Catechol- bzw. Hydrochinonstruktur ergeben sich aus der Inkubation, die zusätzlich mit Ascorbinsäure als Oxidationsschutz durchgeführt wurden, in welcher die Fläche beider Peaks zunahm. Im Gegensatz dazu nahmen in einer Inkubation mit Rattenlebercytosol/SAM die Flächen beider Metabolite ab, was darauf hindeutet, dass beide Substrate für COMT sind. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich demnach bei den beiden Metaboliten um die cis-ZEN-Derivate von 13-HO-ZEN und 15-HO-ZEN. Der zweite Hauptmetabolit, der bei der Retentionszeit 14,0 min detektiert wurde, besaß ein  $m/z$  von 335, was einem HO-ZEL entspricht (Abb.: 3.5.3 C). Der Peak lässt sich 15-HO- $\alpha$ -ZEL oder 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL im ZEN-Metabolitenspektrum zuordnen. Die Isolation des Peak und anschließende Isomerisierung zeigte den nicht isomerisierten cis-ZEN-Metaboliten bei einer Retentionszeit von 14,0 min und einen Produktpeak bei der Retentionszeit 13,0 min, der sich 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL aus dem Metabolitenspektrum von ZEN zuordnen lässt (Abb.: 3.5.2 B). Die ESI-MS<sup>2</sup>-Analyse des Peaks zeigte dagegen, dass es sich bei dem Peak um beide Metaboliten handelte, die in einem Peak coeluierten.

Zwei weitere cis-ZEN-Metabolite fanden sich bei höherer Polarität im Chromatogramm. Metabolit 1 eluierte bei einer Retentionszeit von 8,9 min. Zu diesem Peak existierte kein äquivalenter Metabolit im Metabolitenprofil von ZEN. Der Peak zeigte ein  $m/z$  von 349, was einem (HO)<sub>2</sub>-ZEN entspricht, aber auch der Quinonform eines am aromatischen Ring hydroxylierten (HO)<sub>2</sub>-ZEL entsprechen kann (Abb.: 3.5.3 D). Letzteres kann vermutlich ausgeschlossen werden, da der Peak auch in Anwesenheit von Ascorbinsäure in vergleichbarer Menge gebildet wurde. Die Peakfläche nahm in der Inkubation mit Rattenlebercytosol/SAM deutlich ab, was ein Hinweis auf eine catecholische Struktur des Metaboliten gibt (Kap.: 3.6). Folglich könnte es sich um ein Hydroxylierungsprodukt von cis-13-HO-ZEN oder cis-15-HO-ZEN handeln. Metabolit 2 eluierte bei der Retentionszeit 9,6 min. Er besaß ein  $m/z$  von 351, was einem (HO)<sub>2</sub>-ZEL entspricht. Hierbei könnte es sich um cis-15,6 $\alpha$ -(HO)<sub>2</sub>- $\alpha$ -ZEL handeln, dessen trans-Isomer zusammen mit 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL im ZEN-Metabolitenspektrum coeluiert (Abb.: 3.5.3 D). Sowohl Metabolit 1 wie auch Metabolit 2 zeigten im ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum ein Fragmention von  $m/z$  191, was als weiterer Hinweis für eine aromatische Hydroxylierung gewertet wird.

Die Umsetzung der oxidativen Metaboliten von cis-ZEN mit Rattenlebercytosol/SAM sowie Inkubationen mit Zusatz von Ascorbinsäure konnte z.T. bestätigen, dass vermehrt Metaboliten mit Catecholstruktur gebildet wurden. Vermutlich führt die Konformationsänderung in cis-ZEN, bedingt durch die cis-Stellung der Doppelbindung, zu einer veränderten Substratbindung im CYP450-Enzym und damit zu einer verminderten Bildung aliphatisch hydroxylierter Metabolite.

### 3.6. Methylierung oxidativ gebildeter ZEN-Catechole

Wie in Kap.: 3.4.2 und Kap.: 3.4.3 gezeigt findet im CYP450 abhängigen, oxidativen Metabolismus eine aromatische Hydroxylierung von ZEN und den reduktiven Derivaten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL statt. Dies führt zur Bildung von Metaboliten mit Catecholstruktur. Alle drei RAL-Catechole mit der Hydroxylierung an der C15-Position besitzen drei benachbarte Hydroxylgruppen und damit zweimal die Strukturmerkmale von Catecholen. Catechole sind reaktive Substanzen und können durch "Redoxcycling" Zellen durch oxidativen Stress schädigen. Zusätzlich stellen die daraus entstehenden Quinon-Derivate Elektrophile dar, welche mit nukleophilen Seitengruppen von Aminosäuren und Nukleinsäuren reagieren können [Glatt et al., 1989]. Um Catechole zu Entgiften verfügt die Zelle im Cytosol über das Enzym COMT. Dieses methyliert mit Hilfe des Cofaktors S-Adenosylmethionin (SAM) eine der vicinalen Hydroxylgruppen und kann so die Oxidierbarkeit der Catechole verhindern [Bai et al., 2007]. Um die Methylierbarkeit und die möglichen Methylierungsprodukte (MP) von ZEN- und ZEL-Catecholen zu untersuchen wurden die Metabolite mit Catecholstruktur aus den Extrakten von Inkubationen von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL mit Rattenlebermikrosomen/NADPH mit Hilfe der HPLC isoliert (Kap.: 5.4.2.1). Von den so isolierten Metabolitenpeaks wurde ein Aliquot mit der HPLC auf deren Reinheit und auf Veränderungen kontrolliert bevor der isolierte Metabolit mit Rattenlebercytosol/SAM inkubiert wurde (Kap.: 5.4.4.5). Die Inkubate wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Ethylacetat abgestoppt und die gebildeten Metabolite und das nicht metabolisierte Substrat extrahiert. Die Extrakte wurden dann mit Hilfe der LC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.3). Zusätzlich wurden einige der MPs wie oben beschrieben isoliert und nach Derivatisierung mit BSTFA mit der GC-MS untersucht (Kap.: 5.4.1.4).

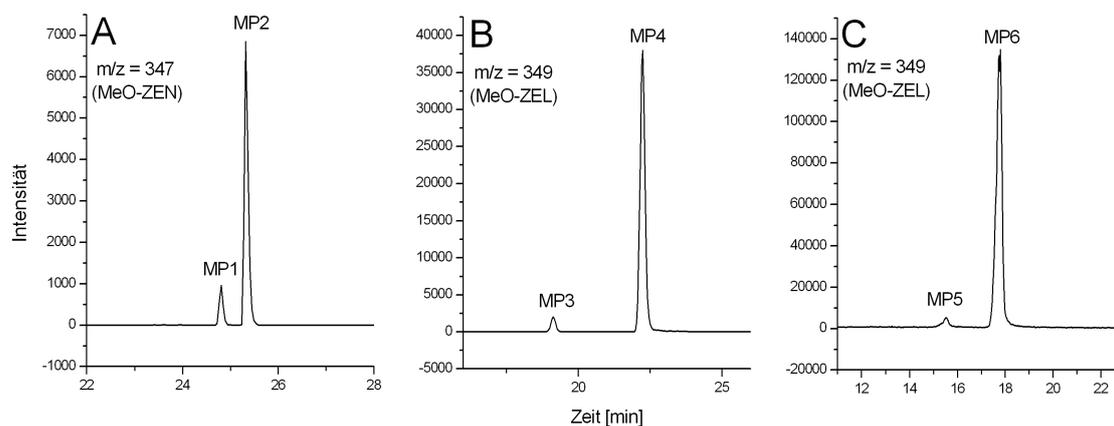


Abbildung 3.6.1.: LC-MS Chromatogramme von Extrakten aus Inkubationen von Rattenlebercytosol/SAM mit: **A:** 15-HO-ZEN, **B:** 15-HO- $\alpha$ -ZEL und **C:** 15-HO- $\beta$ -ZEL. Dargestellt sind jeweils die aus dem MS-TIC extrahierten Massenspuren der Methylierungsprodukte. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1.

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Umsetzung von 15-HO-ZEN mit Rattenlebercytosol/SAM zeigte zwei neu entstandene Peaks, welche sich in ihrer Retentionszeit noch deutlich unterscheiden (Abb.: 3.6.1 A). Der Hauptmetabolit, MP-2 eluierte bei einer Retentionszeit von 25,3 min mit einem Anteil von ca. 95% an der Gesamtmetabolitenmenge. Der in geringerer Menge gebildete Metabolit MP-1 besaß die Retentionszeit 24,8 min und hatte einen Anteil von ca. 5% an der Gesamtmetabolitenmenge. Der MS-TIC zeigte für beide Metabolite ein  $m/z$  von 347 und im EI-Massenspektrum der GC-MS ein  $m/z$  von 492, was in beiden Fällen einem methylierten HO-ZEN entspricht (MeO-ZEN).

Die ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektren von MP-1 und MP-2 waren qualitativ identisch (Abb.: 3.6.2 A). MP-2 zeigte jedoch mit Ausnahme des Basisions deutlich geringere Intensitäten und beide Metabolite bildeten nur wenige Fragmentionen. MP-1 und MP-2 besaßen in geringer Intensität das  $[M-H]^-$  Ion bei  $m/z$  347. Das Basision bildete ein Fragmention bei  $m/z$  322, was einer Massendifferenz von 15 amu zum Molekülion und damit der Abspaltung einer Methylgruppe entspricht  $[M-H-CH_3]^-$ . Diese Fragmentierung ist charakteristisch für die MPs und findet sich nicht bei oxidativen ZEN-Metaboliten. Es fand sich auch hier die für ZEN-Derivate typische Abspaltung von  $[M-H-CO_2]^-$  bei  $m/z$  303 sowie die kombinierte Abspaltung von  $[M-H-CO_2-CH_3]^-$  bei  $m/z$  288.

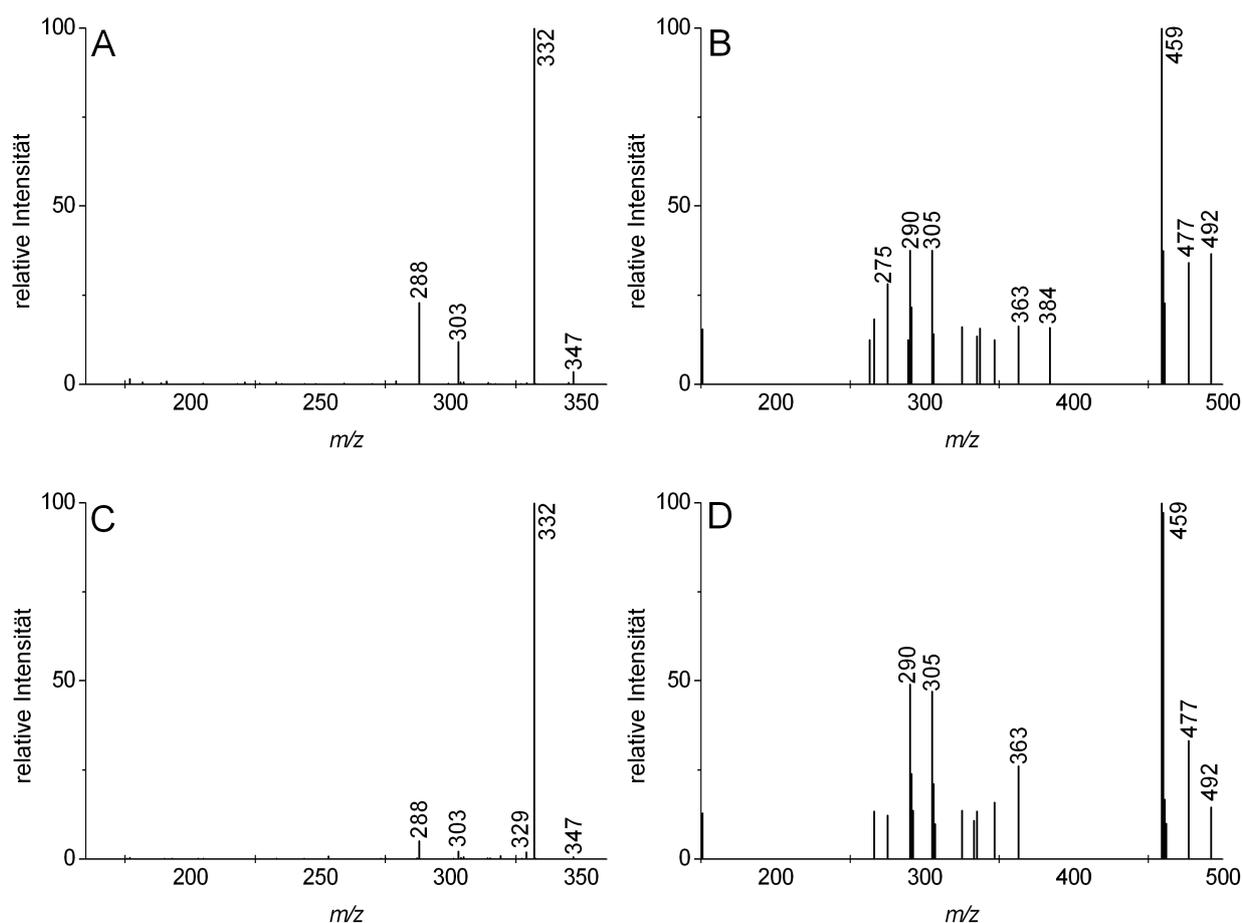


Abbildung 3.6.2.: Massenspektren von MP-1 **A**: ESI-MS<sup>2</sup> und **B**: EI -70 eV derivatisiert mit BSTFA und MP-2 **C**: ESI-MS<sup>2</sup> und **D**: EI -70 eV derivatisiert mit BSTFA

Die EI-Massenspektren beider MPs waren nahezu identisch (Abb.: 3.6.2 B). Es fanden sich die üblichen Methylradikal- und Wasserabspaltungen, die zu den Fragmentionen  $[M-CH_3]^+$  bei  $m/z$  477 und  $[M-H_2O-CH_3]^+$  bei  $m/z$  459 führten, wobei letzteres das Basision bildete. Das Fragmention bei  $m/z$  363 entspricht dem Fragmention bei  $m/z$  333 aus dem ZEN-Massenspektrum, welches zusätzlich noch eine Methoxygruppe enthält. Zwei weitere charakteristische Fragmente fanden sich bei  $m/z$  305 und  $m/z$  290.

Wie in Kap.: 3.4.2 gezeigt, bildete die Ratte nur wenig 13-HO-ZEN, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei beiden Metaboliten um MPs von 15-HO-ZEN handelt. MP-2 erwies sich als chemisch stabil, während MP-1 mit der Zeit zerfiel [Pfeiffer et al., 2009]. Die exakten Strukturen sind noch unklar, es wird aber vermutet, dass es sich aufgrund der unterschiedlichen chemischen Stabilität bei dem instabilen MP-1 um 14-MeO,15-HO-ZEN handelt, welches weiterhin Catecholstruktur besitzt und somit durch Autoxidation zerfallen kann. Bei MP-2 handelt es sich wahrscheinlich um 15-MeO-ZEN, welches keine Catecholstruktur mehr besitzt und dadurch stabil wäre. Die Methylierung an der C16 Position ist eher unwahrscheinlich, da die Hydroxylgruppe an C16 eine Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Carbonylgruppe ausbildet und dadurch in ihrer Reaktivität eingeschränkt ist. Ein weiterer Hinweis auf die Struktur der MPs zeigte sich in Inkubationen von chemisch synthetisiertem 14-MeO-ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH. Eines der entstandenen Produkte mit einem  $m/z$  von 347 besitzt eine identische Retentionszeit wie MP-1, so dass hier vermutlich 14-MeO,15-HO-ZEN gebildet wurde, Hildebrand (pers. Mitteilung). Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei MP-1 um 14-MeO,15-HO-ZEN handelt (Abb.: 3.6.3). Die Tatsache das 15-HO-ZEN ein Substrat für die COMT darstellt zeigt hier ebenfalls noch einmal, dass es sich bei 15-HO-ZEN um einen Metaboliten mit Catecholstruktur handelt.

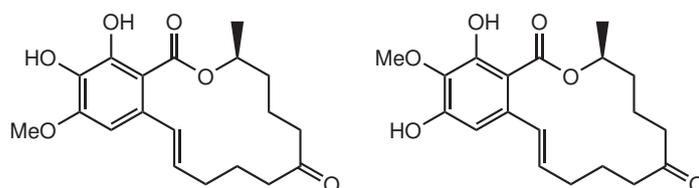


Abbildung 3.6.3.: Vorläufige chemische Struktur von links: MP-1 und rechts: MP-2

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Umsetzung von 15-HO- $\alpha$ -ZEL mit Rattenlebercytosol/SAM zeigte zwei neu entstandene Peaks (Abb.: 3.6.1 B). Der Hauptmetabolit, MP-4 eluierte bei einer Retentionszeit von 18,8 min mit einem Anteil von ca. 95% an der Gesamtmetabolitenmenge. Der in geringerer Menge gebildete Metabolit MP-3 besaß die Retentionszeit 16,4 min und hatte einen Anteil von ca. 5% an der Gesamtmetabolitenmenge. Der MS-TIC zeigte für beide Metabolite ein  $m/z$  von 349, was in beiden Fällen einem methylierten HO-ZEL entspricht (MeO-ZEL). Die ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung zeigte die gleichen Fragmentionen wie bei MP-1 und MP-2 jedoch mit einem Unterschied von 2 amu, was in der reduzierten Carbonylgruppe in Position C7 begründet liegt (Abb.: 3.6.4). Die Fragmentierung ist auch hier ein deutlicher Hinweis auf die durch die COMT eingeführte Methylgruppe.

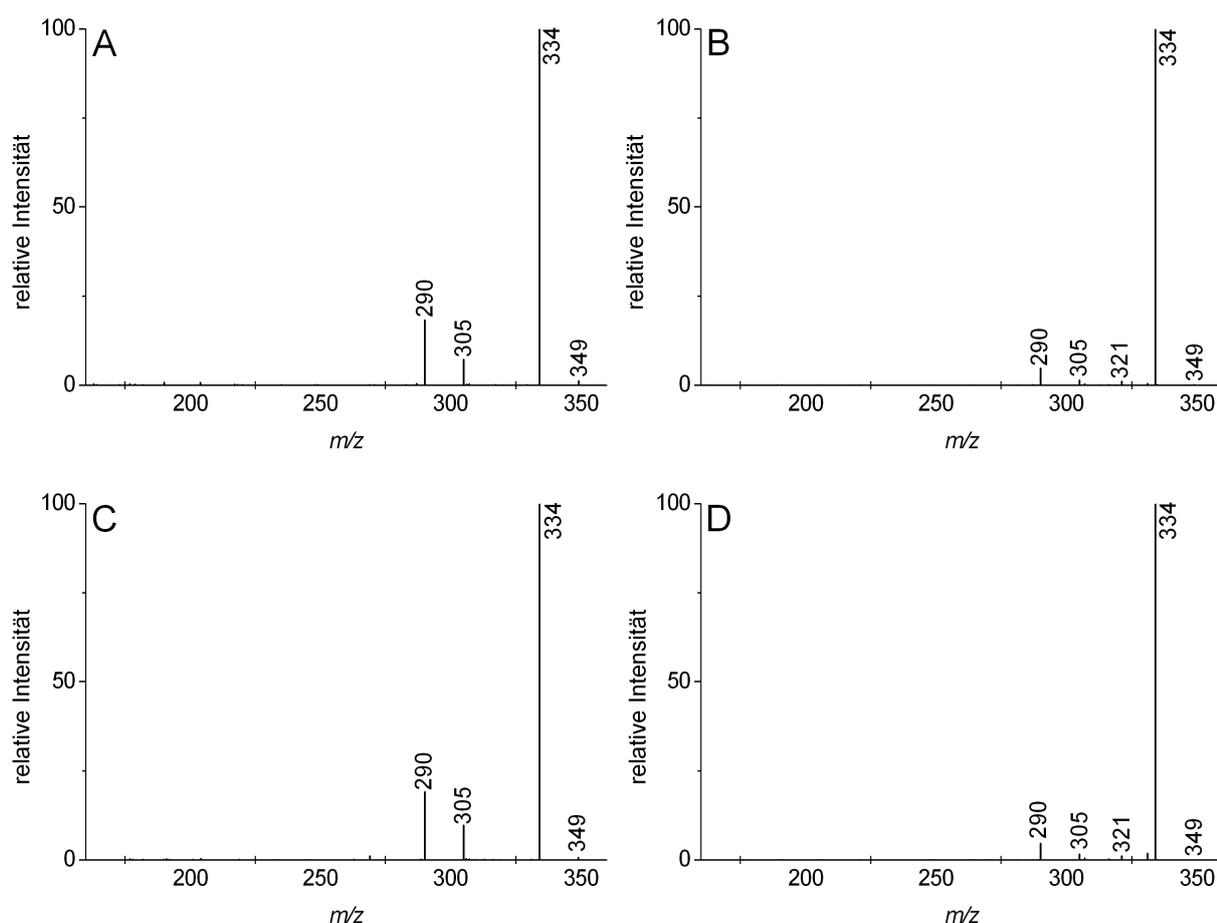


Abbildung 3.6.4.: ESI- MS<sup>2</sup> Massenspektren von A: MP-3, B: MP-4, C: MP-5 und D: MP-6

MP-3 war chemisch instabil, so dass der Metabolit sehr wahrscheinlich noch eine intakte Catecholgruppe trägt und somit anfällig für Autoxidation ist. Analog der Methylierung von 15-HO-ZEN handelt es sich hier wahrscheinlich um 14-MeO,15-HO- $\alpha$ -ZEL. MP-4 dagegen war chemisch stabil, weshalb vermutet wird, dass es sich hier um 15-MeO- $\alpha$ -ZEL handelt (Abb.: 3.6.5).

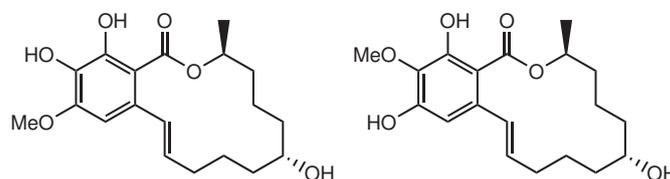


Abbildung 3.6.5.: Vorläufige chemische Struktur von links: MP-3 und rechts: MP-4

Die LC-MS Analyse des Extraktes aus einer Inkubation von 15-HO- $\beta$ -ZEL mit Rattenlebercytosol/SAM zeigte auch hier zwei Produktpeaks, die anhand des  $m/z$  von 349 im MS-TIC den MPs zugeordnet werden konnten (Abb.: 3.6.1). MP-5 besaß die Retentionszeit 17,7 min und MP-6 eine Retentionszeit von 15,5 min. MP-6 bildete mit einem Anteil von ca. 99% den Hauptmetabolit.

MP-5 wurde nur in geringer Menge von ca. 1% gebildet. Beiden Peaks zeigten eine identische Fragmentierung wie die beiden MPs von 15-HO- $\alpha$ -ZEL und damit typische Fragmentationen, die die von COMT eingefügte Methylgruppe kennzeichnen (Abb.: 3.6.4). MP-5 zeigte chemische Instabilität und verhält sich damit identisch wie die anderen MPs, die in geringer Menge gebildet wurden und bei kürzeren Retentionszeiten eluieren, was hier für die Struktur von 14-MeO,15-HO- $\beta$ -ZEL spricht. MP-6 zeigte wie alle anderen Hauptmetabolite der MPs chemische Stabilität, so dass hier sehr wahrscheinlich das 15-MeO- $\beta$ -ZEL gebildet wurde (Abb.: 3.6.6).

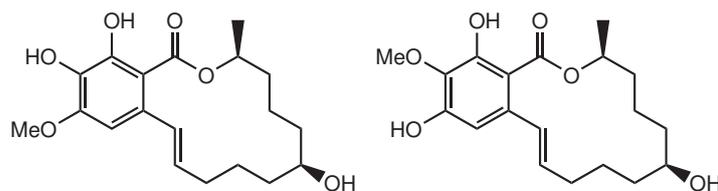


Abbildung 3.6.6.: Vorläufige chemische Struktur von links: MP-5 und rechts: MP-6

Die Catecholstruktur von 15-HO-ZEN, dem mikrosomalen Hauptmetaboliten in der Ratte, konnte durch Methylierung durch COMT bestätigt werden und führte zur Bildung von zwei MPs. Aromatische Hydroxylierungen von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL konnten ebenfalls in Inkubationen von ZEN mit Lebermikrosomen nachgewiesen werden und führten zur Bildung von 15-HO- $\alpha$ -ZEL und 15-HO- $\beta$ -ZEL.  $\beta$ -ZEL wird jedoch im Gegensatz zu  $\alpha$ -ZEL wesentlich schlechter weitermetabolisiert, so dass 15-HO- $\beta$ -ZEL in sehr geringer Menge gebildet wurde. Die Methylierung durch COMT führte auch bei 15-HO- $\alpha$ -ZEL und 15-HO- $\beta$ -ZEL zur Bildung von jeweils zwei MPs. Wie bei ZEN bestätigt dies die Catecholstruktur der beiden oxidative gebildeten Metabolite. Alle drei nachgewiesenen Catechole bildeten zwei MPs, wobei jeweils ein Hauptmetabolit mit einem Anteil von ca. 95-99% und ein in Spuren gebildeter Metabolit mit einem Anteil von ca. 1-5% der Gesamtmetabolitenmenge gebildet wurden. Der Hauptmetabolit zeigte chemische Stabilität, so dass hier die Catecholstruktur und damit die Reaktivität durch *O*-Methylierung der C15-Position eingeschränkt wurde. Der in geringer Menge gebildete Metabolit dagegen zeigte chemische Instabilität, da hier trotz *O*-Methylierung der C14 Position immer noch zwei vicinale Hydroxylgruppen und damit Catecholstruktur vorliegen. Der Metabolit ist somit anfällig für Autoxidation, kann zum Quinon oxidiert werden und mit anderen Substanzen abreagieren oder zerfallen. Die Methylierung der Hydroxylgruppe in der C16 Position konnte nicht beobachtet werden.

Die einzigen Hinweise in der Literatur zur Bildung von Catecholmetaboliten von ZEN wurde von Li et al. [1985] publiziert. In radioenzymatischen Untersuchungen wurden Catechole aus mikrosomalen Umsetzungen mit COMT und radioaktiv markiertem SAM inkubiert und in Folge MPs detektiert. Die Inkubation von ZEN mit Leber- und Nierenmikrosomen von Syrischen Hamstern führte zur Bildung eines Metaboliten, dessen Peak im Radioaktivitätsdetektor detektiert wurde. Bei diesen Peaks handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein MP eines Catecholmetaboliten von ZEN. Ähnliche Ergebnisse wurden für die beiden reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL erhalten. Die detektierten

Metaboliten wurden jedoch nicht weiter charakterisiert und die Studie nicht im Detail veröffentlicht [Li et al., 1985]. Die Bildung je eines, durch COMT methylierten Hauptmetaboliten, deckt sich mit den Ergebnissen von Li et al. [1985], so dass es sich bei denen in dieser Studie nicht näher charakterisierten MPs um die chemisch stabilen 15-MeO-ZEN und 15-MeO-ZEL Metabolite handeln könnte. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die aromatische Hydroxylierung und damit die Catecholbildung *in vitro* einen bedeutenden Metabolisierungsweg darstellt. Die Konjugation mit Methylgruppen durch COMT stellt dagegen einen wichtigen Metabolismusweg dar um die reaktiven Catechole zu inaktivieren.

ZEN und seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zeigen sowohl durch ihr estrogenes Potential als auch an der aromatischen Hydroxylierung und damit verbundenen Catecholbildung eine Analogie zum endogenen Steroidhormon E<sub>2</sub>. E<sub>2</sub> wird durch CYP1A1 und CYP1B1 aromatisch hydroxyliert, wobei die Catechole 2HO-E<sub>2</sub> und 4HO-E<sub>2</sub> gebildet werden. Für die E<sub>2</sub>-Catechole wurden in vielen Untersuchungen mehrere genotoxische Effekte, wie z.B. die Induktion von oxidativem Stress und damit vermehrte oxidative Schädigung der DNA sowie Generierung von DNA-Strangbrüchen, DNA-Adduktbildung und Depurinierung von DNA-Basen nachgewiesen und somit das genotoxische Potential dieser Metabolite detailliert beschrieben [Bolton und Thatcher, 2008]. Einige dieser toxischen Effekte, sind auch bereits für ZEN beschrieben. Die Bildung einer Vielzahl von DNA-Addukten wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für ZEN mit Hilfe des P<sup>32</sup>-Postlabeling gezeigt. Zusätzlich wurden DNA-Fragmentierung sowie Mikrokernbildung in verschiedenen Zelllinien von der Maus, dem Affen und dem Menschen beobachtet [Zinedine et al., 2007; SCF, 2000]. Diese genotoxischen Effekte von ZEN sind vermutlich wie bei E<sub>2</sub> auf die Bildung von reaktiven Catecholen zurückzuführen. Bedingt durch die Bildung reaktiver Metabolite durch den oxidativen Metabolismus besitzen diese Substanzen eine initiierende und durch die Affinität zum ER eine promovierende Wirkung auf den Kanzerogeneseprozess in estrogenabhängigen Zielgeweben, wie z.B. Brustdrüse und Gebärmutterschleimhaut [Bolton und Thatcher, 2008]. Die in Mäusen beobachteten Tumore in Leber und Hypophyse [Kuiper-Goodman et al., 1987] können demnach neben der hormonellen Wirkung von ZEN auch durch die Bildung reaktive ZEN-Metabolite mitverursacht sein.

### 3.7. Glucuronidierung und Sulfatierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL

Der Phase II Metabolismus spielt im Organismus eine zentrale Rolle um lipophile Substanzen in wasserlösliche Derivate zu überführen, was in Folge die Exkretion über Galle oder Urin ermöglicht. Mit Hilfe der *in vitro* Glucuronidierung/Sulfatierung wurde untersucht, inwieweit ZEN und seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL konjugiert werden können und welche Hydroxylgruppen dabei bevorzugt werden. Die Glucuronidierung/Sulfatierung der Substrate wurde mit hepatischen Mikrosomen/Cytosol von männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Die Substrate wurden mit den Zellfraktionen und in Anwesenheit der benötigten Cofaktoren (UDPGA/PAPS) inkubiert (Kap.: 5.4.4.6 und 5.4.4.7). Nach Inkubationsende wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und der Überstand nach Neutralisation ohne Extraktion mittels LC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.3 Methode 3 und 4). Kontrollinkubationen wurden identisch, jedoch ohne Zugabe des Cofaktors durchgeführt.

Zur Identifizierung der ZEN-*O*-Glucuronide und -*O*-Sulfate standen die Referenzsubstanzen ZEN-14-*O*-G und ZEN-14-*O*-S zur Verfügung. Die Zuordnung der Glucuronide von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL erfolgte anhand der Elutionsreihenfolge, die unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen identisch war mit der von Pfeiffer et al. [2010] publizierten Elutionsreihenfolge für die Glucuronide der ZEN-Derivate. Die Identifikation der Strukturen der ZEN-,  $\alpha$ -ZEL- und  $\beta$ -ZEL-*O*-Glucuronide erfolgte zusätzlich anhand der ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung, die von Stevenson et al. [2008] publiziert wurden.

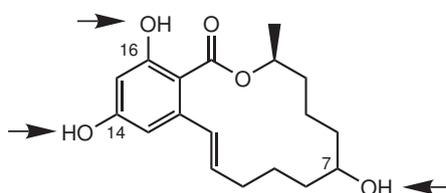


Abbildung 3.7.1.: Chemische Struktur von ZEL mit markierten möglichen Konjugationspositionen

Die ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektren der ZEN-Glucuronide zeigten je nach Konjugationsposition (Abb.: 3.7.1) Unterschiede in der Fragmentierung. 14-*O*-Glucuronide fragmentierten unter Abspaltung der Glucuronsäuregruppe zum  $[M-H-Gluc]^-$ , während die Konjugate der aliphatischen Hydroxylgruppe in der C7 Position stabiler waren und vorwiegend zu  $[M-H-CO_2]^-$  fragmentierten, was eine gängige Fragmentierungsreaktion von ZEN-Derivaten darstellt (Vgl. Abb.: 3.4.3). 16-*O*-Glucuronide zeigten beide Fragmentionen, wobei das Basision von  $[M-H-Gluc]^-$  gebildet wurde [Stevenson et al., 2008].

Die Analyse der Massenspektren der ZEN-,  $\alpha$ -ZEL- und  $\beta$ -ZEL-*O*-Sulfate zeigten für die 14-*O*-Sulfate, wie bei den 14-*O*-Glucuroniden, die Abspaltung des im Metabolismus eingefügten endogenen Substrates zum  $[M-H-Sulf]^-$  Ion. Das detektierte 7-*O*-Sulfat zeigte analog zu den

7-*O*-Glucuroniden, die Fragmentierung zum  $[M-H-CO_2]^-$  Ion (Abb.: 3.1). Die Fragmentierung der an der C16 Position konjugierten Sulfate zeigte eine identische Fragmentierung wie die an der C14 Position konjugierten Sulfate. Die anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte Zuordnung von 14-*O*- und 7-*O*-Sulfaten konnte zusätzlich anhand der UV-Spektren bestätigt werden.

Anhand der zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen von ZEN, ZEN-14-*O*-G und ZEN-14-*O*-S konnte gezeigt werden, dass die Konjugation mit Glucuronsäure oder mit Sulfat an der aromatischen Hydroxylgruppe in der C14 Position das UV-Spektrum verändert (Anhang Abb.: A.1.2). Dagegen zeigten die Glucuronide der aliphatischen Hydroxylgruppen in C7 Position keinen oder nur wenig Einfluss auf das UV-Spektrum des ZEN-Derivates. Das gleiche Verhalten zeigte  $\beta$ -ZEL-7-*O*-S, das als einziges an der aliphatische Hydroxylgruppe konjugierte Sulfat detektiert werden konnte (Tab.: 3.1). Der Vergleich der Sulfatkonjugate mit der ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung und der Elutionsreihenfolge der Glucuronidkonjugate zeigte, dass die Sulfatkonjugate analog der von Stevenson et al. [2008] für die Glucuronide publizierten Fragmentierungsreaktionen fragmentieren. Die so identifizierten Sulfatkonjugate zeigten, dass unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen die Sulfate in einer identischen Elutionsreihenfolge wie der von Pfeiffer et al. [2010] für die Glucuronidkonjugate veröffentlichten Reihenfolge eluieren.

Die Phase II Metabolite, welche an der C16 Position konjugiert waren, eluierten unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen bei auffällig kleinen Retentionszeiten und wiesen eine erhöhte Polarität auf. Die Hydroxylgruppe an der C16-Position von ZEN-Derivaten bildet normalerweise zur benachbarten Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung aus, wodurch die Hydroxylgruppe in ihrer Reaktivität eingeschränkt wird und dadurch die Lipophilie des Moleküls zunimmt. Wird die Wasserstoffbrückenbindung durch Konjugation aufgebrochen, ist dies folglich mit einer starken Zunahme der Polarität verbunden, was die kleinen Retentionszeiten erklärt. Dieser Effekt ist auch von anderen Resorcyssäurelaktone bekannt [Pfeiffer et al., 2009]. Die C16 Position wurde, wie anhand der Glucuronidierung und Sulfatierung von ZEN gezeigt werden konnte, konjugiert, jedoch fanden sich entsprechende Metabolite in sehr geringen Mengen (Abb.: 3.7.2).

Tabelle 3.1.: Charakterisierung der Konjugate von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL.

Substrat / Metabolit	RT <sup>a)</sup>		[M-H] <sup>-</sup>		MS <sup>2</sup> von M-H ( <i>m/z</i> , rel. Intensität)		[M-H-Konjugat] <sup>b)</sup>	UV-Maxima [nm]	Anteil [%] <sup>c)</sup>
	min	max	<i>m/z</i>	rel. Intensität	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	rel. Intensität			
ZEN	25,1		317		273			230, 275, 315	
ZEN-16-O-G	8,3		493		449 (45)		317 (100)	nicht bestimmt <sup>d)</sup>	1
ZEN-14-O-G	12,4		493		n.d.		317 (100)	234, 267, 315	99
ZEN-16-O-S	12,8		397		n.d.		317 (100)	226, 257, 297	1
ZEN-14-O-S	16,8		397		n.d.		317 (100)	234, 264, 315	99
$\alpha$ -ZEL	21,5		319		275			229, 274, 317	
$\alpha$ -ZEL-16-O-G	5,6		495		451 (42)		319 (100)	nicht bestimmt <sup>d)</sup>	<1
$\alpha$ -ZEL-14-O-G	9,0		495		n.d.		319 (100)	235, 269, 316	89
$\alpha$ -ZEL-7-O-G	11,0		495		451 (100)		319 (4)	238, 275, 315	11
$\alpha$ -ZEL-16-O-S	9,2		399		n.d.		319 (100)	nicht bestimmt <sup>d)</sup>	99
$\alpha$ -ZEL-14-O-S	13,8		399		355 (1)		319 (100)	230, 263, 320	1
$\beta$ -ZEL	17,6		319		275			240, 270, 312	
$\beta$ -ZEL-16-O-G	4,6		495		451 (31)		319 (100)	nicht bestimmt <sup>d)</sup>	4
$\beta$ -ZEL-14-O-G	6,5		495		n.d.		319 (100)	233, 261, 303	84
$\beta$ -ZEL-7-O-G	8,9		495		451 (100)		319 (4)	239, 264, 306	12
$\beta$ -ZEL-16-O-S	9,2		399		n.d.		319 (100)	nicht bestimmt <sup>d)</sup>	1
$\beta$ -ZEL-14-O-S	11,3		399		n.d.		319 (100)	234, 256, 304	82
$\beta$ -ZEL-7-O-S	12,6		399		355 (100)		319 (25)	236, 269, 312	17

n.d., nicht detektierbar (&lt;0,5% relative Intensität);

<sup>a)</sup> in der jeweilig verwendeten chromatographischen Methode; <sup>b)</sup> Konjugat: Glucuronsäure oder Sulfat; <sup>c)</sup> Anteil an der Gesamtmetabolitenfläche in der UV-Detektion bei 280 nm; <sup>d)</sup> nicht ausreichende Menge;

#### 3.7.1. Glucuronidierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL

Die LC-MS Analyse der Inkubation von ZEN (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA zeigte gegenüber der Kontrolle zwei neu entstandene Peaks welche den ZEN-Glucuroniden zugeordnet werden konnten (Abb.: 3.7.2 A). Der Hauptmetabolit mit der Retentionszeit 12,4 min wurde als ZEN-14-*O*-G identifiziert und machte ca. 99% der Gesamtmetabolitenmenge aus. ZEN-16-*O*-G wurde in geringer Menge bei der Retentionszeit 8,3 min detektiert und besaß einen Anteil von ca. 1% an der Gesamtmetabolitenmenge (Tab.: 3.1).

Das Chromatogramm der LC-MS Analyse aus der Inkubation von  $\alpha$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA zeigte gegenüber der Kontrollinkubation drei neu entstandene Produktpeaks (Abb.: 3.7.2 C). Alle drei konnten den Glucuroniden von  $\alpha$ -ZEL zugeordnet werden. Der Hauptmetabolit mit der Retentionszeit 9,0 min wurde als  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-G identifiziert und machte ca. 89% der drei Metabolite aus. Das aliphatisch konjugierte  $\alpha$ -ZEL-7-*O*-G wurde in moderater Menge mit einem Anteil von ca. 11% gebildet und wurde bei der Retentionszeit 11,0 min detektiert. Das  $\alpha$ -ZEL-16-*O*-G wurde wie bei ZEN ebenfalls in geringer Menge, kleiner ca. 1% gebildet und eluierte bei der Retentionszeit 5,6 min (Tab.: 3.1).

Die LC-MS Analyse der Inkubation von  $\beta$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA zeigte ebenfalls drei neue Produktpeaks, die Glucuroniden des  $\beta$ -ZEL zugeordnet werden konnten (Abb.: 3.7.2 E). Der Hauptmetabolit mit der Retentionszeit von 6,5 min konnte als  $\beta$ -ZEL-14-*O*-G identifiziert werden und macht mit ca. 84% den größten Anteil der gebildeten Glucuronide aus. Das aliphatisch konjugierte  $\beta$ -ZEL-7-*O*-G eluierte mit 8,9 min zu einer fast identischen Retentionszeit wie  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-G und konnte mit einem Anteil von ca. 12% an der Gesamtmetabolitenmenge bestimmt werden. Analog den Ergebnissen der ZEN- und  $\alpha$ -ZEL-Glucuronidierung handelte es sich bei dem mit einem Anteil von ca. 4% gebildeten Glucuronid bei der Retentionszeit 4,6 min um das an der Hydroxylgruppe an C16 konjugierte  $\beta$ -ZEL-16-*O*-G (Tab.: 3.1).

Unter den verwendeten Inkubationsbedingungen konnte bei allen drei ZEN-Derivaten die Glucuronidierung jeder der im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen beobachtet werden. Bei allen wurde die Glucuronidierung der aromatischen Hydroxylgruppe am C14 bevorzugt. Die zweite aromatische Hydroxylgruppe am C16 dagegen wurde aufgrund der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Carbonylgruppe bei allen drei ZEN-Derivaten schlecht konjugiert, so dass mit Ausnahme von  $\beta$ -ZEL die 16-*O*-Glucuronide nur in Spuren gebildet wurden. Bei beiden ZEL-Derivaten konnte die Glucuronidierung der aliphatischen C7 Position beobachtet werden. Die aliphatisch konjugierten Metabolite machten in beiden Fällen ca. 10% der Gesamtmetaboliten aus. Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen würden sich die Glucuronide von  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-G und  $\beta$ -ZEL-7-*O*-G in einem Gemisch nicht trennen lassen und würden gemeinsam eluieren.

### 3.7.2. Sulfatierung von ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL

Die LC-MS Analyse der Inkubation von ZEN (50  $\mu$ M) mit Rattenlebercytosol/PAPS zeigte gegenüber der Kontrolle zwei Produktpeaks (Abb.: 3.7.2 B). Der Hauptmetabolit, mit einem Anteil von ca. 99% an der Gesamtmetabolitenmenge, eluierte bei der Retentionszeit von 16,8 min und konnte mit Hilfe der Referenzsubstanz als ZEN-14-*O*-S identifiziert werden. Bei dem zweiten detektierten Sulfat bei der kürzeren Retentionszeit von 12,8 min kann es sich demnach nur um das an Position C16 sulfatierte ZEN handeln. Es wurde wie das Glucuronidanalogen in geringer Menge von ca. 1% gebildet und eluierte bei einer deutlich kleineren Retentionszeit (Tab.: 3.1).

Die LC-MS Analyse des Inkubates von  $\alpha$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit Rattenlebercytosol/PAPS zeigte gegenüber der Kontrollinkubation zwei neu entstandene Peaks (Abb.: 3.7.2 D). Der Hauptmetabolit wurde mit einem Anteil von ca. 99% bei der Retentionszeit 13,8 min detektiert und zeigte im ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum das [M-H-Sulf]<sup>-</sup> Ion bei  $m/z$  319 als vorherrschendes Fragmentation. Das UV-Spektrum zeigte eine Verschiebung zu kleinerer Wellenlänge gegenüber  $\alpha$ -ZEL. Beides deutet auf eine Konjugation an einer aromatische Hydroxylgruppe hin, so dass der Peak dem  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S zugeordnet wird. Das zweite Sulfat wurde in Spuren von ca. 1% gebildet und fand sich bei der Retentionszeit 9,2 min. Die ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung zeigte auch hier das [M-H-Sulf]<sup>-</sup> Ion bei  $m/z$  319 als vorherrschendes Fragmentation, was auf eine Konjugation an einer aromatische Hydroxylgruppe hindeutet. Aufgrund der geringen gebildeten Menge und der kleinen Retentionszeit wird der Peak analog den Ergebnissen der ZEN-Sulfatierung dem  $\alpha$ -ZEL-16-*O*-S zugeordnet. Das 7-*O*-Sulfat konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Eventuell handelt es sich bei dem kleineren Peak der  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S nachfolgt um das entsprechende Konjugat. Da der Metabolit aber nur in geringer Menge gebildet wurde und mit dem Peak von  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S eluiert und somit auch mit dessen Massenspektrum überlagert wurde, ist hier keine eindeutige Identifikation möglich (Tab.: 3.1).

Die LC-MS Analyse des Inkubates von  $\beta$ -ZEL (50  $\mu$ M), inkubiert mit Rattenlebercytosol/PAPS, zeigte drei Produktpeaks (Abb.: 3.7.2 F). Der Hauptmetabolit mit einem Anteil von ca. 82% an der Gesamtmetabolitenmenge eluierte bei einer Retentionszeit von 11,3 min. Das Sulfat zeigte im ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum das Fragmentation [M-H-Sulf]<sup>-</sup> bei  $m/z$  319, was auf eine Konjugation an einer aromatische Hydroxylgruppe hindeutet. Ebenfalls konnte die Verschiebung im UV-Spektrum beobachtet werden, so dass es sich hier um  $\beta$ -ZEL-14-*O*-S handelt. Ein weiteres Sulfat fand sich bei der Retentionszeit von 12,6 min und wurde mit einem Anteil von ca. 17% an der Gesamtmetabolitenmenge gebildet. Die ESI-MS<sup>2</sup>-Analyse zeigte als Basision das [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> Ion bei  $m/z$  255. Dies deutet auf ein aliphatisch konjugiertes ZEL-Derivat hin, so dass es sich hier um  $\beta$ -ZEL-7-*O*-S handelt. Bei dem mit ca. 1% Anteil an der Gesamtmetabolitenmenge detektierten Metabolit bei der Retentionszeit von 9,2 min handelt es sich um das  $\beta$ -ZEL-16-*O*-S, welches sich dadurch auszeichnet, dass es in geringer Menge gebildet wurde und bei kleiner Retentionszeit eluierte (Tab.: 3.1).

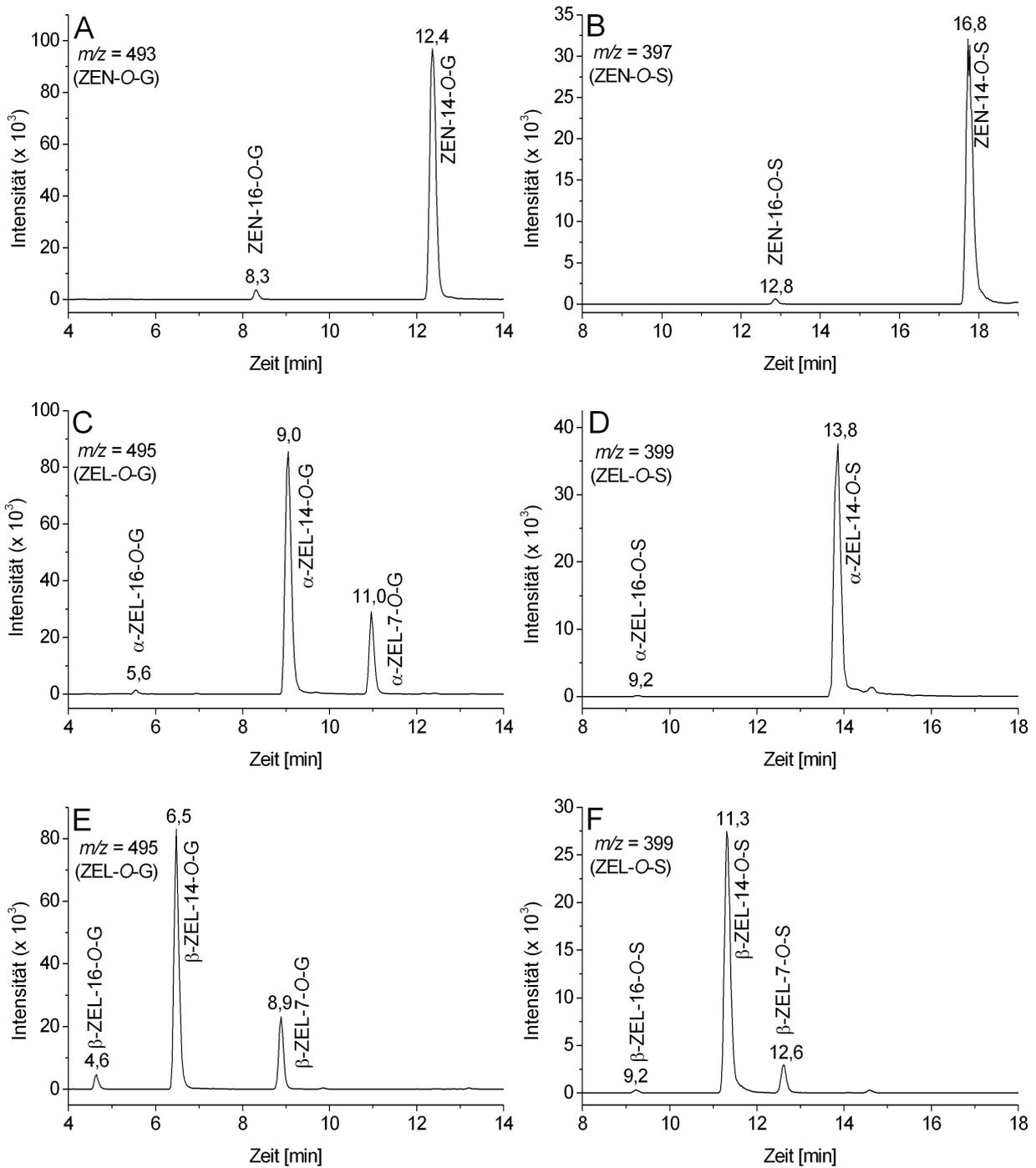


Abbildung 3.7.2.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation von ZEN (50  $\mu$ M) mit **A**: Rattenlebermikrosomen/UDPGA und **B**: Rattenlebercytosol/PAPS,  $\alpha$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit **C**: Rattenlebermikrosomen/UDPGA und **D**: Rattenlebercytosol/PAPS und  $\beta$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit **E**: Rattenlebermikrosomen/UDPGA und **F**: Rattenlebercytosol/PAPS. Dargestellt sind die aus dem MS-TIC extrahierten Massenspuren der Konjugationsprodukte. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 3 und 4.

Unter den verwendeten Inkubationsbedingungen wurde bevorzugt die aromatischen Hydroxylgruppen an der C14 Position sulfatiert. Die Konjugation an der zweiten aromatischen Hydroxylgruppe am C16 konnte auch bei allen drei ZEN-Derivaten in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Die Sulfatierung der aliphatischen Hydroxylgruppe konnte nur bei  $\beta$ -ZEL eindeutig nachgewiesen werden und macht hier jedoch einen größeren Anteil aus als das aliphatische Glucuronid von  $\beta$ -ZEL. Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen eluierten die 16-*O*-Sulfate von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zu identischen Retentionszeiten und würden sich in einem Gemisch nicht trennen lassen.

### 3.7.2.1. Enzymaktivitäten von Rattenleber- und Humanlebercytosol für die Sulfatierung

Die Aufklärung der chemischen Strukturen der Sulfaten von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL ermöglichte den Vergleich der Sulfatierung in hepatischem Ratten- und Humancytosol. Die Inkubationen wurden im linearen Bereich der Sulfatbildung durchgeführt, so dass die Enzymaktivitäten für die Sulfatierung berechnet werden konnten. Zusätzlich zur Sulfatierung von ZEN und seinen reduktiven Derivaten wurde 17 $\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) im Sulfatierungsassay eingesetzt.  $E_2$  ist ein endogenes Hormon mit estrogenen Aktivität, das im Rahmen seiner Homöostase durch Sulfatierung/Desulfatierung in der Leber und in Zielgeweben reguliert wird und dessen Sulfatierung bereits sehr gut untersucht ist (Abb.: 3.7.3) [Ruder et al., 1972, Hernandez et al., 1992, Harris et al., 2000].  $E_2$  wurde deshalb ebenfalls im Sulfatierungsassay eingesetzt und die Enzymaktivität seiner Sulfatierung mit den Aktivitäten der Sulfatierung von ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL verglichen.

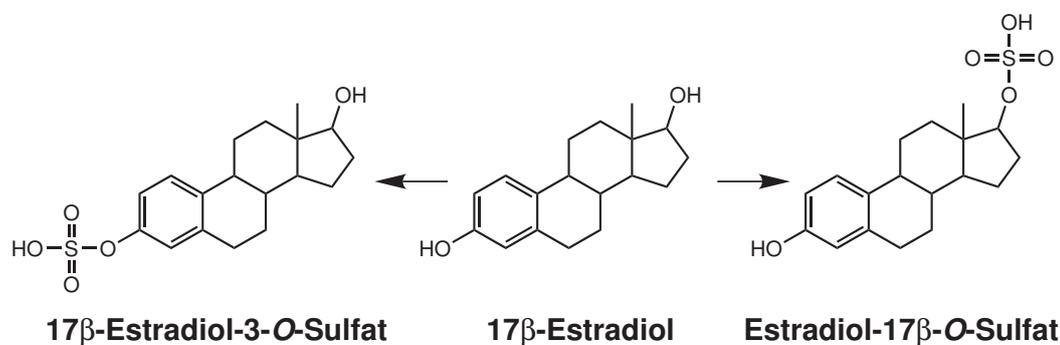


Abbildung 3.7.3.: Sulfatierung von 17 $\beta$ -Estradiol (Wang und James, 2007)

ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL und  $E_2$  wurden mit Rattenlebercytosol (RLC) und humanem Lebercytosol (HLC) in Anwesenheit des Cofaktors PAPS, wie in Kap.: 5.4.4.7 beschrieben inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde je nach Substrat abgestoppt und aufgearbeitet und mit der HPLC-UV bzw. LC-MS auf die gebildeten Sulfate untersucht (Kap.: 5.4.1.2 und 5.4.1.3 Methode 7). Die Quantifizierung erfolgte an erstellten Kalibriergeraden der RALs bzw.  $E_2$ -3-*O*-S. ZEN besitzt bei einer Wellenlänge von 260 nm einen identischen Extinktionskoeffizienten wie ZEN-14-*O*-Sulfat. Dies wurde in Kalibrationen mit den authentischen Referenzsubstanzen beider Verbindungen gezeigt. Die Differenzfaktoren zwischen den ZEL-Derivaten und ihren ZEL-14-*O*-Sulfaten wurden experimentell bestimmt. Für  $\alpha$ -ZEL und für  $\beta$ -ZEL beträgt der Faktor zwischen ZEL und ZEL-*O*-S jeweils 1,3.

Für alle vier Substrate wurde für den Einsatz einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  der lineare Bereich der Produktbildung in Abhängigkeit der Inkubationszeit überprüft. Es zeigte sich, dass ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL über einen weiten Bereich der Inkubationszeit in beiden Cytosolen linear umgesetzt wurden (Anhang Abb.: A.5.1). Alle drei RALs bildeten wie zuvor gezeigt das 14-*O*-Sulfat. Die Bildung des 7-*O*-Sulfates von  $\beta$ -ZEL konnte in diesen Inkubationen nicht beobachtet werden. Dies liegt sehr wahrscheinlich an den kürzeren Inkubationszeiten und der damit geringeren gebildeten Menge des  $\beta$ -ZEL-7-*O*-S. Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen, welche ein stärkeres Untergrundrauschen zeigten als die Analysen an der LC-MS, konnten geringe Mengen 7-*O*-Sulfat nicht detektiert werden. Aus diesem Grund wurde die Bildung des  $\beta$ -ZEL-7-*O*-S vernachlässigt und die Enzymaktivität nur für die Bildung der 14-*O*-Sulfate berechnet. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde anhand der linearen Bereiche für die Produktbildung eine Inkubationszeit von 45 min für alle drei ZEN-Derivate sowohl mit RLC wie auch mit HLC gewählt und diese in drei unabhängigen Inkubationen untersucht (Kap.: 5.4.5.1). In der Sulfatierung von  $\beta$ -ZEL traten in RLC und HLC jeweils eine stark abweichende Proben auf, die nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. Die Tab.: 3.2 fasst die Enzymaktivitäten für die Sulfatierung der RALs und  $\text{E}_2$  mit RLC und HLC zusammen.

Tabelle 3.2.: Aktivitäten für die Sulfatierung von ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL und  $\text{E}_2$  in Lebercytosol von Ratte und Mensch

		Aktivität [pmol/min/mg Protein]	
Substrat	Substratkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	RLC <sup>a</sup>	HLC <sup>a</sup>
ZEN	100	620 $\pm$ 36	380 $\pm$ 18
$\alpha$ -ZEL	100	413 $\pm$ 12	271 $\pm$ 20
$\beta$ -ZEL	100	171 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	140 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
$\text{E}_2$	20	16 $\pm$ 2	60 $\pm$ 6
$\text{E}_2$	5	♂ 43 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	
	20	♀ 76 $\pm$ 35 <sup>c</sup>	

<sup>a</sup> Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3)

<sup>b</sup> Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Mittelwertabweichung (n=2)

<sup>c</sup> Borthwick et al., 1993, Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3)

Die gemessenen Enzymaktivitäten zeigten, dass ZEN und seine reduktiven Derivate gute Substrate für die Sulfatierung in beiden Cytosolen sind. Der Unterschied zwischen dem RLC und HLC beträgt weniger als Faktor zwei für die untersuchten RAL. Größere Unterschiede zeigten sich in den Enzymaktivitäten für die Sulfatierung der einzelnen ZEN-Derivate. Für ZEN zeigte sich in beiden Cytosolen die höchste Aktivität gefolgt von  $\alpha$ -ZEL. Für  $\beta$ -ZEL wurde die geringste Aktivität gemessen, die in beiden Cytosolspezies ca. Faktor drei bis vier niedriger lag als die Aktivität für die Sulfatierung von ZEN.  $\text{E}_2$  zeigte in Inkubationen mit 100  $\mu\text{M}$  Substratkonzentration keinen linearen Anstieg der Produktbildung. Nach Zhang et al. [1998] führte eine hohe  $\text{E}_2$  Konzentration zur Bindung von jeweils zwei Molekülen  $\text{E}_2$  an die Estrogen-Sulfotransferase und damit zur Ausbildung eines inhibierten Enzymkomplexes [Zhang et al., 1998]. Gamage et al. [2006] zeigten, dass neben

einer hohen Substratkonzentration eine hohe PAP-Konzentrationen zur Bildung eines "dead-end" Komplexes und damit zur Inhibition der Sulfatierung führte. Für die Sulfatierung von E<sub>2</sub> durch hSULT1A1 wurde bereits ab einer Konzentration von 1,5  $\mu$ M E<sub>2</sub> eine Inhibition der Sulfatierung beobachtet [Gamage et al., 2006]. Diese inhibitorische Effekte wurde auch in Inkubationen mit E<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) in RLC/PAPS bzw. HLC/PAPS beobachtet. Unabhängig von der Inkubationszeit war in allen Inkubationen eine identische gebildete Produktmenge von E<sub>2</sub>-3-*O*-S detektierbar. Vermutlich wurde E<sub>2</sub> so lange sulfatiert bis eine ausreichende Menge PAP zur Inhibition der Reaktion führte. Aufgrund der Hemmung der Sulfatierung von E<sub>2</sub> durch zu hohe Substratkonzentrationen, wurden die Substratkonzentration auf 20  $\mu$ M reduziert und die Inkubationszeiten auf 4-10 min verkürzt (Anhang Abb.: A.5.2). Die Detektion der Sulfatmetabolite erschwerte sich durch die geringen Produktmengen und da E<sub>2</sub>-3-*O*-Sulfat eine um ca. Faktor 10 schlechtere Extinktion besitzt als E<sub>2</sub>. Aus diesem Grund wurde die Inkubate nicht mit Aceton abgestoppt, was zur Verdünnung der Inkubate geführt hätte sondern durch Extraktion nach Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat Zugabe aufkonzentriert. Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat dient als Ionenpaarreagenz und ermöglicht die Extraktion von E<sub>2</sub>-3-*O*-Sulfat. Die quantitative Extraktion bei einer Konzentration von 5 mM Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat wurde in Vorversuchen mit hohen und niedrigen Konzentrationen an der authentischen Referenzsubstanz E<sub>2</sub>-3-*O*-Sulfat überprüft. Bei den durchgeführten Sulfatierungen von E<sub>2</sub> traten regelmäßig Probleme mit der Reproduzierbarkeit von Experimenten auf, welche bei der Sulfatierung der RAL vom ZEN-Typ nicht auftraten. Es wird deshalb vermutet, dass die Probleme der Reproduzierbarkeit ein substratspezifisches Problem in der Sulfatierung des endogenen Substrates E<sub>2</sub> und seiner Eigenschaft die eigene Sulfatierung zu inhibieren, sind. Die Literatur zeigt, dass trotz der Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit die ermittelten Enzymaktivitäten im Bereich der Literaturdaten liegen [Borthwick et al., 1993]. Die ermittelte Aktivität für die Sulfatierung von E<sub>2</sub> ist im Gegensatz zur Sulfatierung von ZEN im humanen Cytosol höher als im Cytosol der Ratte. Die gemessenen Aktivitäten im Cytosol der Ratte liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Borthwick et al. [1993] gemessenen Aktivitäten für die E<sub>2</sub>-Sulfatierung. Im Vergleich zu den ZEN-Derivaten lag die gemessene Aktivität in beiden Cytosolspezies weit unter der von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL.

Glucuronidierung und Sulfatierung stellen zwei grundlegende Metabolismusreaktionen dar, um lipophile Substanzen in ausscheidbare Metaboliten zu überführen. In beiden Testsystemen konnte gezeigt werden, dass sich sowohl ZEN als auch seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL effizient glucuronidieren und sulfatieren lassen. Die Glucuronidierung der RALs vom ZEN-Typ ist bereits *in vitro* sehr gut untersucht. Die *in vitro* Glucuronidierung von ZEN und fünf weiteren RALs wurden von Pfeiffer et al. [2010] detailliert in hepatischen Mikrosomen verschiedener Tierspezies, in humanen Leber- und Darmmikrosomen sowie elf verschiedenen UGT-Isoformen untersucht. Es zeigte sich für ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL ein übereinstimmendes Bild, wobei bevorzugt das 14-*O*-Glucuronid gebildet wurde. Bei den reduktiven Derivaten konnte auch die Bildung des 7-*O*-Glucuronids beobachtet werden. Die gemessenen Enzymaktivitäten zeigten keine großen Unterschiede für die einzelnen RALs innerhalb einer Mikrosomenspezies, jedoch große Unterschiede in den Aktivitäten der Mikrosomenspezies untereinander. Der Unterschied zwischen hepatischen Mikrosomen der Ratte und humanen

Mikrosomen war weniger stark ausgeprägt, wie gegenüber anderen Spezies und betrug max. Faktor zwei, wobei die Mikrosomen der Ratte höhere Enzymaktivitäten für die Glucuronidierung der RALs zeigten als humane Mikrosomen [Pfeiffer et al., 2010]. Auch bei der Sulfatierung wurde bei allen untersuchten RALs bevorzugt die C14-Position konjugiert. Ebenfalls waren wie bei der Glucuronidierung die gemessenen Enzymaktivitäten für die Sulfatierung mit der humanen Zellfraktion niedriger als mit der der Ratte. Der Unterschied in den Enzymaktivitäten zwischen beiden untersuchten Spezies betrug ebenfalls max. Faktor zwei. Dieser Unterschied ist recht gering, obwohl die Speziesunterschiede in den SULT-Isoenzymen beider Säuger sehr stark ausgeprägt sind. Zum Beispiel besitzt der Mensch vier Vertreter der SULT1A Subfamilie, wogegen Nager nur ein Isoenzym besitzen. Im Gegensatz dazu besitzt die Ratte vier Vertreter der SULT2A Subfamilie, wogegen der Mensch nur ein Isoenzym aus dieser Subfamilie besitzt [Gamage et al., 2006; Dunn 2nd und Klaassen, 1998]. Es zeigen sich im Gegensatz zur Glucuronidierung große Unterschiede in den Enzymaktivitäten für die Sulfatierung der einzelnen RALs. Die Enzymaktivität für die Sulfatierung ist damit stärker vom jeweiligen Substrat abhängig als bei der Glucuronidierung. Der Vergleich der Sulfatierung des endogenen Substrates E<sub>2</sub> mit der der untersuchten RALs, zeigte höhere Aktivitäten für die Sulfatierung der ZEN-Derivate bei höheren Substratkonzentrationen, keine hemmenden Effekte auf ihre Sulfatierung sowie eine lineare Produktbildung über längere Inkubationszeiten. Die ZEN-Derivate stellen damit unter den verwendeten Versuchsbedingungen tendenziell bessere Substrate für die Sulfatierung als E<sub>2</sub> dar.

### 3.7.2.2. Enzymaktivitäten von rekombinanten humanen SULTs für die Sulfatierung

Die Metabolitenprofile der Sulfate von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL wurden zusätzlich mit rekombinanten SULT-Isoenzyme untersucht. Die Enzymfamilie der SULTs umfasst 13 bekannte Isoenzyme, die abhängig von ihrer Sequenzhomologie der Aminosäureabfolge in Familien und Unterfamilien unterteilt werden [Allali-Hassani et al., 2007]. Die SULT-Isoenzyme finden sich in vielen Geweben, wobei sich zum Teil eine ausgeprägte Gewebespezifität zeigt [Nishimura und Naito, 2006] (Tab.: 3.3).

Tabelle 3.3.: SULT-Isoenzyme und Isoenzymverteilung in humaner Leber [nach Glatt et al., 2001; Lindsay et al., 2008 und Teubner et al., 2007]

SULT	Substrate	Gewebeverteilung	Anteil [%]
SULT1A1	4-Nitrophenol, Paracetamol, Genistein, monocyclische Phenole	Leber, GI-Trakt, Blutplättchen, Plazenta	40
SULT1A2	2-Naphthol, 4-Nitrophenol	Leber	4
SULT1B1	DES, Iodothyronine	Leber, GI-Trakt	1
SULT1E1	E <sub>2</sub> , E <sub>1</sub> , Pregnenolon, 17-Ethinyl-E <sub>2</sub> DHEA, DES, Naringenin, Genistein	Leber und Endometrium	5
SULT2A1	Cholesterol, Gallensäuren, Pregnenolon, 17-Ethinyl-E <sub>2</sub>	Leber und Nebenniere	50

Aus diesem Grund wurden hSULT1A1\*1 als vorherrschendes Isoenzym in der Leber, hSULT1A3 als vorherrschendes Isoenzym im Darm und hSULT1E1 als Isoenzym, das in Organen des Reproduktionstraktes vorkommt ausgewählt. Die Isoenzyme (1  $\mu$ g/ml) wurden mit den ZEN-Derivaten (100  $\mu$ M) in einer Inkubation für 24 h zusammen mit dem Cosubstrat PAPS inkubiert (Kap.: 5.4.4.7). Der Inkubationsansatz wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Aceton abgestoppt. Nach Zentrifugation zur Abtrennung des Proteins wurde der Überstand mit Hilfe der LC-MS untersucht (Kap.: 5.4.1.3 Methode 4).

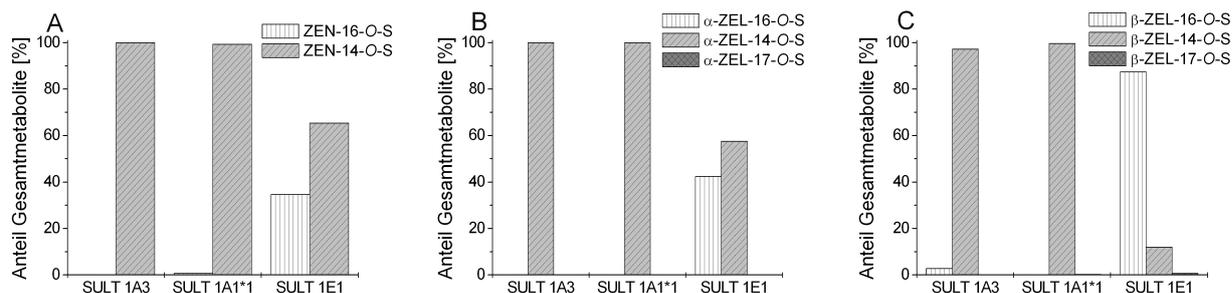


Abbildung 3.7.4.: Sulfatierung von **A:** ZEN, **B:**  $\alpha$ -ZEL und **C:**  $\beta$ -ZEL durch ausgewählte humane SULT-Isoenzyme in einer Inkubation von 24 h.

Die detektierten Metabolitenprofile aus den Inkubationen von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL mit SULT-Isoenzymen/PAPS zeigten, dass alle drei SULT-Isoenzyme in der Lage sind die RALs zu sulfatieren (Abb.: 3.7.4). hSULT1A3 und hSULT1A1\*1 bildeten bei allen drei ZEN-Derivaten bevorzugt das 14-*O*-Sulfat. hSULT1E1 sulfatierte neben der Hydroxylgruppe an der C14-Position auch die an der C16-Position. Der Anteil an gebildetem 16-*O*-Sulfat variierte dabei stark von ca. 35% bis 40% in der Inkubation von ZEN und  $\alpha$ -ZEL und 90% in der Inkubation von  $\beta$ -ZEL, wo es damit den Hauptmetaboliten bildete. Das 7-*O*-Sulfat konnte nur Spuren in den Inkubationen von hSULT1A1\*1 und hSULT1E1 mit  $\beta$ -ZEL detektiert werden.

Die Enzymaktivität der Sulfatierung von ZEN wurde in Inkubationen mit hSULT1E1 bestimmt. Da das Expressionslevel in rekombinanten Enzymen nicht vergleichbar ist mit der Expression von SULTs in Geweben, Zellen oder deren Gehalte in Zellfraktionen können die Enzymaktivitäten für die Umsetzung von Substraten nur mit Enzymaktivitäten von Modellsubstraten verglichen werden. Für hSULT1E1 stellt E<sub>2</sub> das Modellsubstrat dar. Aufgrund der bereits beschriebenen Hemmung der Sulfatierung bei höheren Konzentrationen von E<sub>2</sub> führte die Inkubation von E<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) auch bei höheren Proteinkonzentrationen von hSULT1E1 nicht zu einer reproduzierbaren Sulfatierung von E<sub>2</sub>. Für den Vergleich mit der Enzymaktivität der Sulfatierung von ZEN wurde deshalb die Enzymaktivität aus den Charakterisierungsdaten des Herstellers entnommen. Für ZEN (20  $\mu$ M) wurde der lineare Bereich der Sulfatbildung in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinkonzentration und in Abhängigkeit der Inkubationszeit bestimmt (Anhang Abb.: A.5.3). Aus drei Messwerten die im linearen Bereich der getesteten Inkubationszeiten lagen, wurde die Enzymaktivität für die Bildung des 16-*O*-Sulfates und des 14-*O*-Sulfates berechnet (Kap.: 5.4.5.2).

Tabelle 3.4.: Enzymaktivitäten der Sulfatierung von ZEN und E<sub>2</sub> durch hSULT1E1

		Enzymaktivität [pmol/min/µg Protein]	
	Subst. Konz. [µM]	16- <i>O</i> -Sulfat	14- <i>O</i> -Sulfat
ZEN	20	0,59±0,02	1,19±0,19
		Aktivität [pmol/min/µg Prot]	
	Subst. Konz. [µM]	3- <i>O</i> -Sulfat	17- <i>O</i> -Sulfat
E <sub>2</sub>	0,02	16,7 <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung

<sup>a)</sup> laut Hersteller Angaben

Die ermittelten Enzymaktivitäten für die Sulfatierung von ZEN durch hSULT1E1 sind in Tab.: 3.4 dargestellt. Es zeigte sich, dass das 14-*O*-Sulfat um ca. Faktor zwei schneller gebildet wird als das 16-*O*-Sulfat. Dies deckt sich mit dem Ergebnis, welches das Metabolitenprofil der Inkubation von ZEN mit hSULT1E1 zeigte, in dem das 16-*O*-Sulfat zum 14-*O*-Sulfat in einem Verhältnis von ca. 1:2 gebildet wurde (Abb.: 3.7.4 A). E<sub>2</sub> besitzt seinen linearen Bereich für die Produktbildung in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, der sehr wahrscheinlich bedingt ist durch die inhibierende Wirkung auf seine eigene Sulfatierung. Innerhalb des linearen Bereichs zeigt E<sub>2</sub> für die Sulfatierung durch hSULT1E1 höhere Werte für die Bildung des 3-*O*-Sulfates als für die Sulfatierung von ZEN. E<sub>2</sub> ist somit für hSULT1E1 ein besseres Substrat als ZEN.

Die Untersuchung der Sulfatierung von RALs mit einzelnen hSULT-Isoenzymen zeigte, dass das hepatische hSULT1A1\*1 und das intestinale hSULT1A3 wie die beiden untersuchten hepatischen Cytosole bevorzugt das 14-*O*-Sulfat bildeten. Das hSULT1E1, welches die SULT-Aktivität der Reproduktionsorgane repräsentiert, bildete neben dem 14-*O*-Sulfat auch das 16-*O*-Sulfat und unterscheidet sich dadurch deutlich zu hSULT1A1\*1 und hSULT1A3. Keins der untersuchten hSULT-Isoenzyme bildete in deutlichen Mengen das β-ZEL-7-*O*-Sulfat, welches in hepatischem Cytosol der Ratte in moderater Menge detektiert wurde. Demnach muss dieses Sulfat von einem anderen hepatischen SULT gebildet werden. Die untersuchten hSULTs waren alle in der Lage die untersuchten ZEN-Derivate zu sulfatieren, allerdings konnte gezeigt werden, dass das Metabolitenprofil isoenzymabhängig sehr stark variieren kann. Es ist daher anzunehmen, dass die Sulfatierung gewebeabhängig zur Bildung unterschiedlicher Konjugaten führt, wie z.B. auch im Fall von Tibolon, einem Medikament, das zur Behandlung von Menopausebeschwerden eingesetzt wird [Falany et al., 2004]. Die Untersuchung der Enzymaktivität von hSULT1E1 für die Sulfatierung von ZEN zeigte, dass ZEN mit einer geringeren Enzymaktivität als E<sub>2</sub> umgesetzt wurde. Dies stellt ein differenziertes Bild zur Sulfatierung von ZEN mit humanem hepatischem Cytosol dar in dem für ZEN eine höhere Enzymaktivität für die Sulfatierung gemessen wurde. hSULT1E1 das in extrahepatischen Geweben vor allem in Organen des Reproduktionstraktes vorkommt bevorzugt damit E<sub>2</sub> als Substrat während die Enzymaktivitäten in den untersuchten Lebercytosole zeigten, dass hier ZEN und seine beiden reduktiven Derivate α-ZEL und β-ZEL besser sulfatiert werden als E<sub>2</sub>.

3.7.3. Mehrfache Konjugation von  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL

Um eine mögliche, mehrfache Glucuronidierung zu untersuchen wurden 24 h-Inkubationen im Glucuronidierungsassay durchgeführt (Kap.: 5.4.4.6). Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Langzeitinkubation zeigte im Vergleich zur Kurzzeitinkubation neben den bekannten monoglucuronidierten Produkten drei neue Produktpeaks, die in Spuren detektiert werden konnten (Abb.: 3.7.5 A). Alle drei Produkte zeigten ein  $m/z$  von 671, was dem von diglucuronidiertem ZEL entspricht ( $ZEL-(O-G)_2$ ) und zeigten in der detektierten Fragmentierung des SRM-TIC mindestens eine Glucuronsäureabspaltungen. Der mengenmäßig größte Produktpeak bei der Retentionszeit 4,5 min zeigte im SRM-TIC zusätzlich auch die zweite Glucuronsäureabspaltung. Die Kombination aus beiden Abspaltungen weist sehr deutlich auf diglucuronidierte ZEL-Konjugate hin. Die beiden in geringerer Menge gebildeten Metabolite wurden bei einer Retentionszeit von 4,0 und 2,9 min detektiert. Die Detektion von drei Produkten deutet darauf hin, dass all drei möglichen Kombinationen von Di-Glucuroniden des  $\alpha$ -ZEL gebildet worden sind. Da die Hydroxylgruppe in C16 Position schlechter konjugierbar ist und Konjugate an der C16 Position zu kleinen Retentionszeiten eluieren, handelt es sich beim Hauptmetaboliten bei größerer Retentionszeit wahrscheinlich um  $\alpha$ -ZEL-14,7-( $O-G$ )<sub>2</sub>.

Für  $\beta$ -ZEL wurden ebenfalls 24 h-Inkubationen im Glucuronidierungsassay durchgeführt (Kap.: 5.4.4.6). Die Analyse der Inkubate mit LC-MS zeigte neben den bekannten monoglucuronidierten Produkten zwei weitere Produkte, die jedoch nur in Spuren detektiert werden konnten (Abb.: 3.7.5 B). Beide Produkte besaßen ein  $m/z$  von 671 und beide zeigten im SRM-TIC die Übergänge  $m/z$  671  $\rightarrow$  495 sowie  $m/z$  671  $\rightarrow$  319, welche für ein bzw. zwei Glucuronsäureabspaltungen stehen. Der weniger polare Metabolit besaß die Retentionszeit 4,1 min und der polare Metabolit die Retentionszeit 2,9 min.

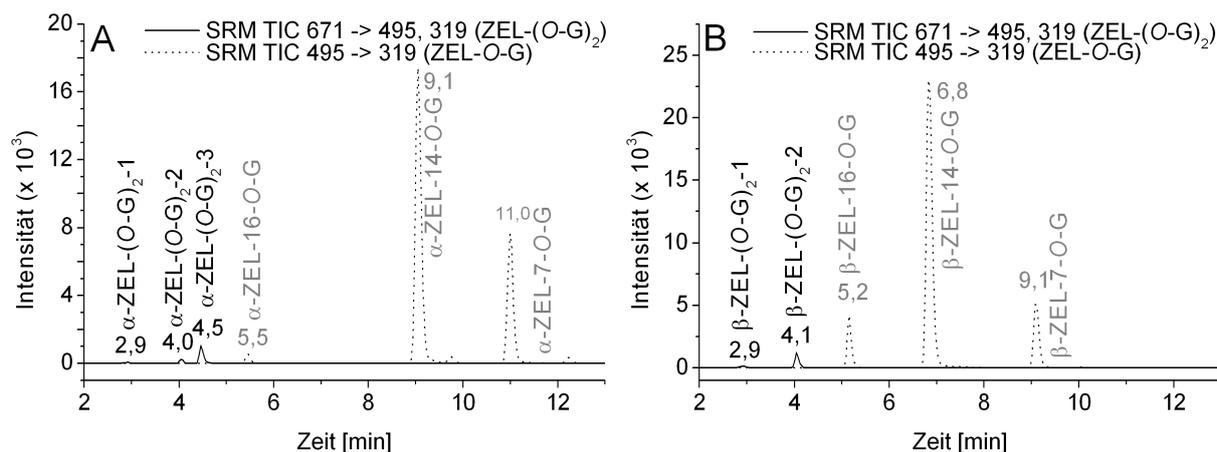


Abbildung 3.7.5.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation von **A:**  $\alpha$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA für 24 h und **B:** Inkubat aus einem Glucuronidierungsassay von  $\beta$ -ZEL (50  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA für 24 h. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 3.

Ebenfalls wurde die Bildung von gemischten Konjugaten, die sowohl glucuronidiert als auch sulfatiert vorliegen untersucht. Hierzu wurde ein zur Trockene eingedampftes Inkubats, welches alle drei  $\alpha$ -ZEL-Glucuronide und nicht metabolisiertes  $\alpha$ -ZEL enthielt im Sulfatierungsassay eingesetzt. Die LC-MS Analyse des Inkubates zeigte neben den nicht umgesetzten monoglucuronidierten Produkten und dem bekannten  $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S drei weitere, in Spuren detektierte, bisher unbekannte Produkte (Abb.: 3.7.6). Alle Produkte besaßen ein  $m/z$  von 575, welches einem gemischt konjugierten  $\alpha$ -ZEL entspricht. Zusätzlich zeigte die detektierte Fragmentierung im SRM-TIC typische Sulfat- und Glucuronsäureabspaltungen. Der Hauptmetabolit besaß die Retentionszeit 8,2 min und zeigte drei UV-Maxima, die identisch waren mit denen von ZEL-14-*O*-S. Die beiden weiteren Metabolite wurden bei den Retentionszeiten 9,2 und 5,0 min in sehr geringer Menge detektiert. Der Vergleich mit der durchgeführten Kontrolle, welche ohne Cofaktor inkubiert wurde, zeigte eine Abnahme des  $\alpha$ -ZEL-7-*O*-G Peaks und des  $\alpha$ -ZEL-16-*O*-G Peaks in der aktiven Inkubation, so dass wahrscheinlich diese Metabolite an der freien aromatischen Hydroxylgruppe am C14 sulfatiert wurden. Demnach handelt es sich wahrscheinlich beim Hauptmetaboliten um  $\alpha$ -ZEL-(14-*O*-S)-(7-*O*-G). Die Bildung von gemischten Konjugaten von  $\beta$ -ZEL wurde nicht untersucht.

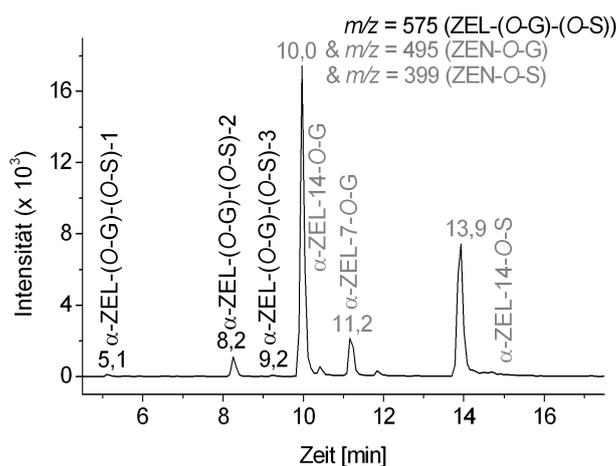


Abbildung 3.7.6.: LC-MS Profil des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation der  $\alpha$ -ZEL-Glucuronide, inkubiert mit Rattenlebercytosol/PAPS. Dargestellt sind die extrahierten Massenspuren der Edukte und Produkte. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 4.

Die Bildung von mehrfach konjugierten Metaboliten von ZEL-Derivaten ist *in vitro* möglich. Eine Bildung von gemischten Konjugaten wäre auch für die HO-ZEN-Metabolite denkbar, da diese wie die ZEL-Derivate ebenfalls eine Hydroxylgruppe im aliphatischen makrocyclischen Ring besitzen. Diese Konjugate könnten auch *in vivo* gebildet werden, wie dies bereits für das phytoestrogen Daidzein gezeigt wurde. In einer humanen Interventionsstudie zur Ernährung mit Isoflavonen wurden in geringer Menge im Urin der Teilnehmer Diglucuronide, Disulfate und Sulfoglucuronide von Daidzein detektiert [Clarke et al., 2002].

### 3.8. Metabolismusstudien in Präzisionsgewebeschnitten

Präzisionsgewebeschnitte besitzen eine intakte Gewebearchitektur und somit alle Zelltypen des verwendeten Gewebes. Der intakte Gewebeverband ermöglicht auch *in vitro* die Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Matrix-Interaktionen und bildet daher die *in vivo* Situation sehr gut ab. Die Gewebeschnitte aus der Leber besitzen intakte Hepatozyten, welche alle Enzyme des Phase I und Phase II Metabolismus enthalten. In Leberschnitten finden die Phase I und Phase II des Fremdstoffmetabolismus parallel statt. Es tritt daher die Oxidation und Reduktion in Konkurrenz zur Konjugation des Substrates. Oxidativ und reduktiv gebildete Metabolite werden ebenso konjugiert. Die Konjugate der Metabolite und der Muttersubstanz werden durch Transportproteine aktiv aus den Hepatozyten in das Inkubationsmedium abgeben (Phase III Metabolismus) [Lupp et al., 2001].

Der Metabolismus von ZEN wurde mit Präzisionsgewebeschnitt von Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten untersucht (Kap.: 5.4.6). Die hierfür verwendeten Leberschnitte wurden aus frischem Lebergewebe präpariert (Kap.: 5.4.6.1). Für die Untersuchung des Phase I Metabolismus wurden 200  $\mu\text{M}$  ZEN für 24 h mit frisch präparierten Leberschnitten einer männlichen Sprague Dawley Ratte in der Rotationskultur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Inkubationen durch Entfernen der Leberschnitte abgestoppt (Kap.: 5.4.6.2).

In weiteren Untersuchungen des Phase I Metabolismus sollte durch Hemmung der COMT-Aktivität in Leberschnitten gezeigt werden, dass Catechole gebildet werden. Hierzu wurden wie zuvor beschrieben, Leberschnitte mit 100  $\mu\text{M}$  ZEN für 5 h in der Rotationskultur unter Carbogen-Atmosphäre inkubiert. Zur Hemmung der COMT-Aktivität in Leberschnitten wurde der COMT-Inhibitor 2'-Fluoro-3,4-dihydroxy-5-nitrobenzophenon dem Inkubationsmedium zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Inkubationen durch Entfernen der Leberschnitte abgestoppt. Um hier die instabilen Catechole während der enzymatischen Hydrolyse der Konjugate und Aufarbeitung vor Oxidation zu schützen wurden die Leberschnittinkubate mit Ascorbinsäure versetzt. Die Kontrollinkubationen wurden ohne COMT-Inhibitor inkubiert (Kap.: 5.4.6.2).

Aus den durchgeführten Inkubationen wurde ein Aliquot des Inkubationsmedium von jeweils zwei Schnitten aus einem Experiment mit  $\beta$ -Glucuronidase und/oder Arylsulfatase aus *Helix Pomatia* inkubiert, um die darin enthaltenen Phase II Metabolite komplett oder selektiv zu spalten (Kap.: 5.4.6.3). Die freien Metabolite wurden dann mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte anschließend mit HPLC-DAD oder mit LC-MS analysiert (Kap.: 5.4.1.1 und 5.4.1.3 Methode 1). Die Identifikation der Metabolite erfolgte mit Hilfe der detektierten Massen im MS-TIC und mit den in Inkubationen mit Zellfraktion ermittelten Retentionszeiten. Die Semiquantitative Abschätzung der Gehalte erfolgte dann anhand der detektierten Flächen der Metaboliten in der UV-Detektion und mit Hilfe der Referenzsubstanzen ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL (Kap.: 5.4.6.4).

Desweiteren wurde das Inkubationsmedium auch direkt mit der LC-MS auf die darin enthaltenen Phase II Metabolite untersucht. Die Konjugationsmuster von ZEN, seiner reduktiven Derivate und

deren Oxidationsprodukte waren dabei von besonderem Interesse. Die Konjugate wurden im SRM-TIC detektiert und anhand der in den Versuchen mit Zellfraktionen ermittelten Retentionszeiten identifiziert (Kap.: 5.4.1.3 Methode 1-4). Die semi-quantitative Abschätzung der Gehalte erfolgte mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL (Kap.: 5.4.6.5).

### 3.8.1. Phase I Metabolismus in Leberschnitten

Unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurde ZEN in Leberschnitten metabolisiert. Das Metabolitenprofil, welches mit der Leberschnittinkubation von ZEN nach enzymatischer Hydrolyse der Konjugate erhalten wurde, zeigte Ähnlichkeit zum Metabolitenprofil aus der mikrosomalen Inkubation von ZEN (Abb.: 3.8.1).

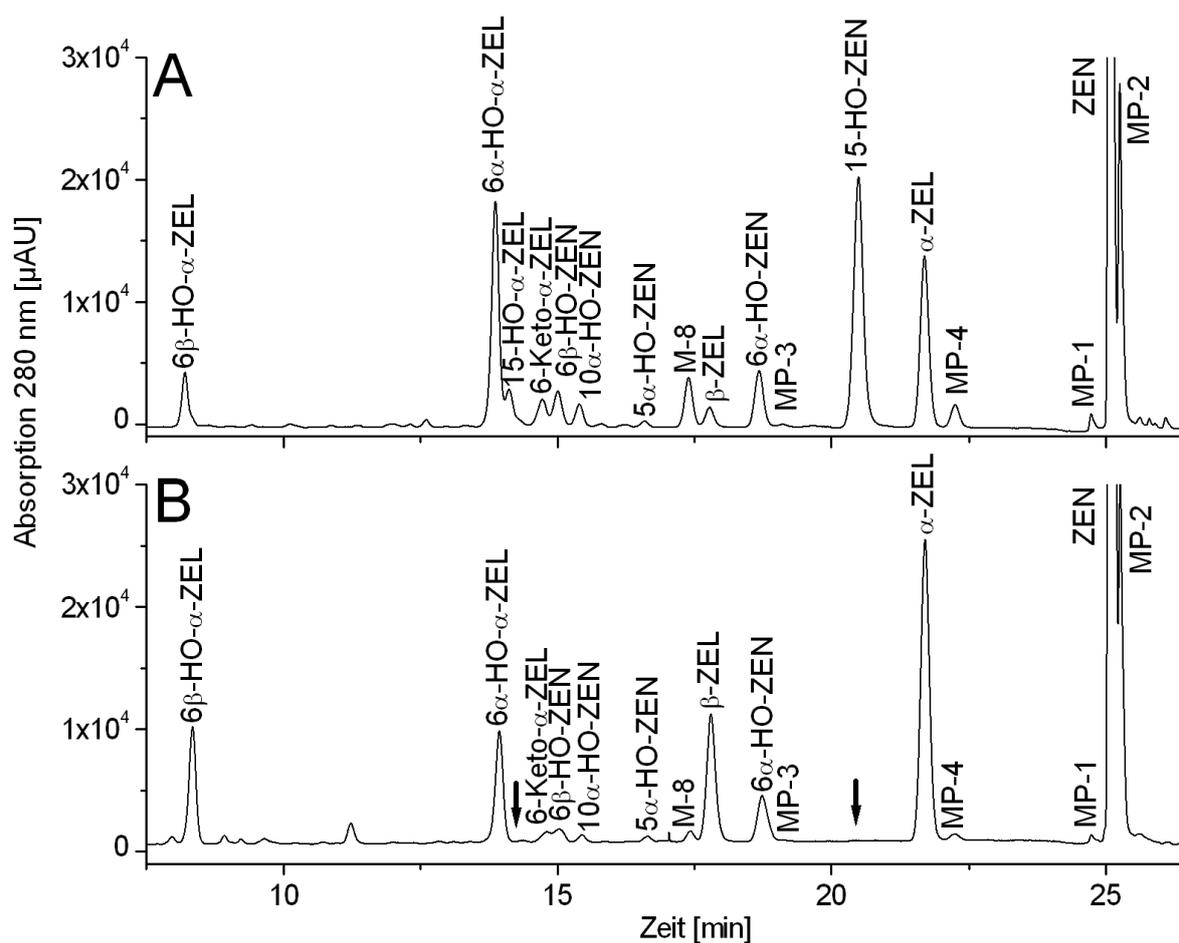


Abbildung 3.8.1.: Repräsentative LC-UV Profile von Extrakten aus einer Umsetzung von ZEN mit **A**: Rattenlebermikrosomen/NADPH und anschließender Methylierung eines Aliquots durch Rattenlebercytosol/SAM und **B**: Rattenleberschnitt nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia*. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1.

ZEN, seine reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL sowie die oxidativ gebildeten Metabolite:  $6\alpha$ -HO-ZEN,  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL,  $6\beta$ -HO-ZEN,  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL, M-8,  $5\alpha$ -HO-ZEN,  $10\alpha$ -HO-ZEN und 6-Keto- $\alpha$ -ZEL konnten in dem Extrakt nachgewiesen werden (Abb.: 3.8.1 B). Die aus Inkubationen mit Mikrosomen bekannten Catechole 15-HO-ZEN und 15-HO- $\alpha$ -ZEL konnten nicht detektiert werden (Abb.: 3.8.1 B, theoretische Position mit Pfeilen markiert). Jedoch konnte von beiden Catecholen die MPs: MP-1, MP-2 und MP-4 nachgewiesen werden (Abb.: 3.8.1 B). Die detektierten Metabolite konnten nicht in den Kontrollen ohne Gewebeschnitt (Substanzkontrolle) sowie den Kontrollen mit Leberschnitten und ohne Substanz (Leerwert) detektiert werden.

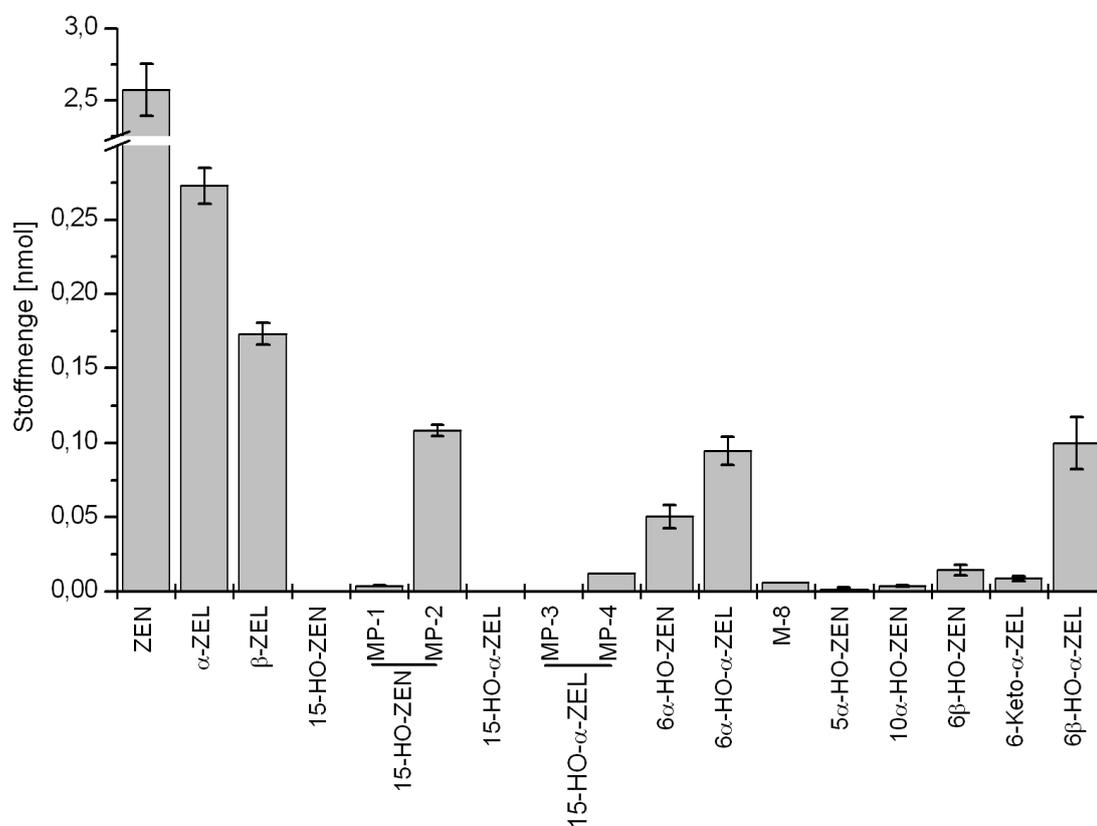


Abbildung 3.8.2.: Abgeschätzte Konzentrationen der Metabolite von ZEN (200  $\mu$ M) inkubiert mit Rattenleberschnitten für 24 h. Die Bestimmung der Metabolite erfolgte aus Aliquoten der Inkubationsmedien von zwei Leberschnitten eines Experimentes nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia*. Dargestellt sind MW  $\pm$  SW von zwei untersuchten Inkubationsmedien. Quantifizierung siehe Kap.: 5.4.6.4.

Die Abschätzung der Gehalte erfolgte aus den Inkubationsmedien von zwei Leberschnitten eines Experimentes. Aus den detektierten Flächen der UV-Detektion wurden die Gehalte der einzelnen Metabolite anhand von Kalibrationen von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL semiquantitativ abgeschätzt (Abb.: 3.8.2). Aus der Summe metabolisierter ZENs und seinen Metaboliten entfallen 71-77% auf ZEN, 12-13% auf die reduktive gebildeten Metabolite  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL und 11-12% auf oxida-

tive Metabolite. Die direkte Analyse des Inkubationsmediums ergab ähnliche Stoffmengen für die detektierten Metabolite. Insgesamt wurden ca. 94% der eingesetzten Substanz als Metabolite von ZEN wiedergefunden (bezogen auf Substanzkontrolle). Davon entfallen 79-81% auf ZEN, 11-13% auf  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL und ca. 8% auf oxidative Metabolite.

Der Vergleich der detektierten Metabolitenprofile mit und ohne Zugabe des COMT-Inhibitors zeigte im Fall der gebildeten reduktiven Metabolite  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL und der aliphatisch hydroxylierten Metabolite ein identisches Metabolitenprofil. Unterschiede im Metabolitenprofil wurden in den Mengen der oxidativen Metaboliten mit Catecholstruktur sowie ihren MPs beobachtet. In den Inkubationen mit COMT-Inhibitor konnten im Gegensatz zur Inkubation ohne COMT-Inhibitor keine MPs nachgewiesen werden (Abb.: 3.8.3). Im Gegensatz hierzu konnte ein deutlich höherer Gehalt der Catechole 15-HO-ZEN und 15-HO- $\alpha$ -ZEL gegenüber den Inkubationen ohne COMT-Inhibitor detektiert werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass Catechole von ZEN in Leberschnitten gebildet werden. Die ermittelten Gehalte der Catechole stellen jedoch nur einen Bruchteil der Gehalte an MPs in den Inkubationen ohne COMT-Inhibitor dar. Es wird vermutet, dass nur ein kleiner Teil der in Leberschnitten gebildeten Catechole nachgewiesen werden konnte.

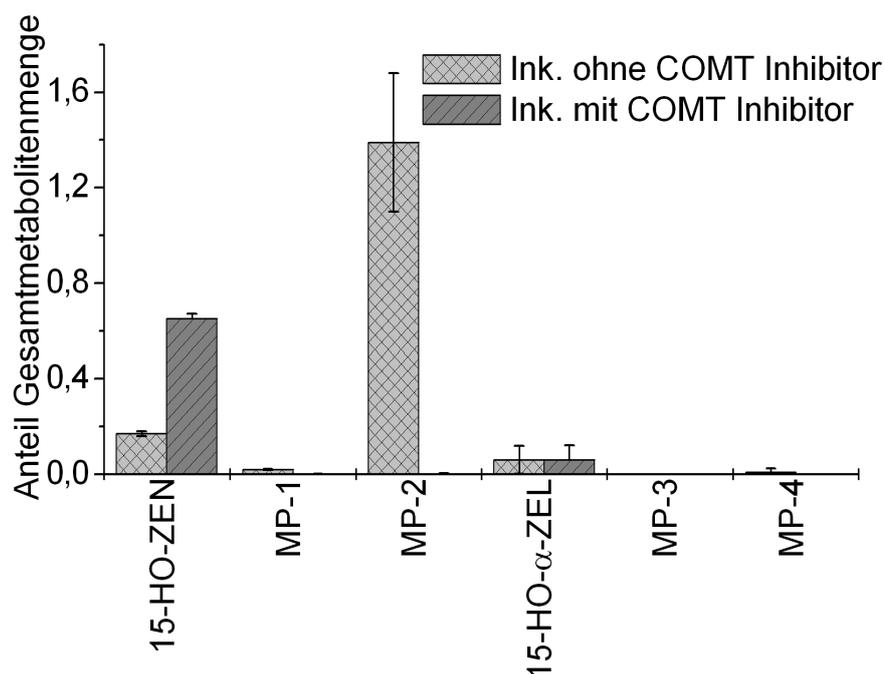


Abbildung 3.8.3.: Vergleich von Leberschnittinkubationen mit und ohne Zugabe des COMT-Inhibitors 2'-Fluoro-3,4-dihydroxy-5-nitrobenzophenon. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem mit LC-MS analysierten Metabolitenprofil nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia*. Die Abbildung reduziert sich auf die Metabolite im Metabolitenprofil, welche Unterschiede zwischen beiden Inkubationsarten zeigten. Dargestellt sind MW  $\pm$  SW von zwei untersuchten Inkubationsmedien.

Gegenüber den Inkubationen mit Zellfraktionen fällt in den Leberschnittinkubationen besonders auf, dass die beiden Catechole nicht detektiert wurden und auch die Gehalte ihrer in Folgemetabolisierung entstandenen MPs nicht an die Catecholmengen heranreichen, die in Inkubationen mit Mikrosomen detektiert wurden. Da die MPs der beiden Catechole detektiert wurden ist davon auszugehen dass die Catechole in Leberschnitten ebenfalls gebildet wurden. Dies konnte in Leberschnittinkubationen in denen die Methylierung durch COMT durch einen COMT-Inhibitor gehemmt wurde gezeigt werden. Catechole sind redoxreaktive Substanzen. Diese werden durch zelluläre Reduktasen, aber auch durch Sauerstoff zu den reaktiven Quinonen oxidiert. Diese können dann entweder über "Redoxcycling" oxidativen Stress induzieren oder mit Zellbestandteilen wie z.B. Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren abreagieren und stehen dadurch in der Analyse nicht mehr zur Verfügung. Es wird vermutet, dass die reaktiven Catechole schon während der Inkubation mit Zellbestandteilen abreagieren oder während der Spaltung und/oder der Aufarbeitung der Inkubate zerfallen und somit in der Analyse nicht mehr zur Verfügung standen. Ebenfalls auffällig sind die hohen Gehalte an  $\beta$ -ZEL und  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL im Verhältnis zu den Metabolitenprofilen, die mit mikrosomalen Inkubationen erhalten wurden.  $\beta$ -ZEL wird wesentlich schlechter folgemetabolisiert als  $\alpha$ -ZEL, was die hohen Gehalten von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL veranschaulichen. Ebenso besitzen Leberschnitte im Vergleich zu Mikrosomen aktive Dehydrogenasen im Cytosol, welche durch Oxidation und Reduktion für ein anderes Verhältnis der reduktiven Derivate sorgen können. In Folge verschiebt sich das Verhältnis der beiden reduktiven Derivate, was eine Erklärung für die auffällig große Menge an  $\beta$ -ZEL wäre.

### 3.8.2. Phase II Metabolismus in Leberschnitten

Um die Phase II Metabolite in Leberschnitten untersuchen zu können mussten zuerst die Glucuronide und Sulfate der oxidativen Metaboliten identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte oxidative Metabolite aus den Extrakten von Inkubationen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen/NADPH mit Hilfe der HPLC isoliert. Ebenso wurden die MPs aus Extrakten von Inkubationen von isolierten ZEN-Catecholen mit Rattenlebercytosol/SAM isoliert (Kap.: 5.4.2.1). Ein Aliquot des isolierten Metaboliten wurde erneut mit der HPLC analysiert und der detektierte Peak auf Reinheit und Veränderungen untersucht. Anschließend wurde der isolierte Metabolit mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA (Kap.: 5.4.4.6) bzw. mit Rattenlebercytosol/PAPS inkubiert (Kap.: 5.4.4.7). Die nach Proteinpräzipitation und Neutralisation abgestoppten Inkubate wurden mit LC-MS untersucht. Neben UV-Detektion und MS-TIC wurde mit einem SRM-TIC die Fragmentierungsreaktion der Abspaltung der metabolisch eingefügten Glucuronsäure- bzw. Sulfatgruppe zum Fragmention  $[\text{Substrat-H}]^-$  detektiert. Am aromatischen Ring konjugierte Hydroxylgruppen bilden im Gegensatz zu aliphatisch konjugierten Hydroxylgruppen das Fragmention  $[\text{Substrat-H}]^-$  [Stevenson et al., 2008] (Kap.: 3.7) und werden dadurch im SRM-TIC sehr gut detektiert. Da aliphatisch konjugierte Metabolite das Fragmention  $[\text{Substrat-H}]^-$  nur in sehr geringer Menge bilden, können diese nicht im SRM-TIC detektiert werden, erscheinen aber im MS-TIC und in der UV-Detektion. Der Unterschied in der Detektion zum SRM-TIC ist damit ein Hinweis auf deren Konjugationsposition.

### 3.8.2.1. Glucuronidierung ausgewählter oxidativer ZEN-Metabolite

#### 15-HO-ZEN

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem 15-HO-ZEN zeigte vier Produktpeaks (Abb.: 3.8.4 A). Alle Peaks zeigten im MS-TIC ein  $m/z$  von 509, was der Masse von glucuronidiertem HO-ZEN entspricht (HO-ZEN-*O*-G). Als Hauptmetabolite wurden zwei Metabolite bei der Retentionszeit von 9,1 min und 12,5 min identifiziert. Ein weiteres Glucuronid wurde in Spuren bei der Retentionszeit 7,4 min detektiert. Die geringe Menge des Glucuronids und die Elution bei einer höheren Polarität, im Vergleich zu den übrigen Konjugaten, deuten darauf hin, dass es sich um das 15-HO-ZEN-16-*O*-G handelt. Beide Peaks zeigten eine Verschiebung des mittleren UV-Maximums gegenüber 15-HO-ZEN und werden im SRM-TIC detektiert, was in beiden Fällen zeigt, dass es sich hier um Metabolite mit Konjugationen an aromatischen Hydroxylgruppen handelt. In Stabilitätsuntersuchungen wurde beobachtet, dass das Glucuronid bei der Retentionszeit 9,1 min wie 15-HO-ZEN chemische Instabilität in wässrigen Lösungen zeigte. Es handelt sich deshalb mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um 15-HO-ZEN-14-*O*-G, das nach der Konjugation noch Catecholstruktur besitzt und damit anfällig für Autoxidation ist. Das Glucuronid bei der Retentionszeit 12,5 min zeigte über den gleichen Zeitraum keinen Zerfall, so dass angenommen wird das es sich um ZEN-15-*O*-G handelt, welches keine Catecholstruktur mehr besitzt. Der in Spuren detektierte Metabolit mit der Retentionszeit 9,6 min konnte nicht eindeutig zugeordnet werden und könnte ein Metabolit von 13-HO-ZEN sein, da es mit dem isolierten 15-HO-ZEN coeluiert und deshalb im Inkubationsansatz enthalten gewesen sein könnte.

#### 15-HO- $\alpha$ -ZEL

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem 15-HO- $\alpha$ -ZEL zeigte drei Produktpeaks, die in sehr geringer Menge detektiert wurden (Abb.: 3.8.4 B). Alle drei wurden anhand des im MS-TIC detektierten  $m/z$  511 den Glucuroniden von HO-ZEL zugeordnet (HO-ZEL-*O*-G). Das Metabolitenspektrum zeigte Ähnlichkeit zum Metabolitenprofil von 15-HO-ZEN, so dass hier eine ähnliche Elutionsreihenfolge vermutet wird. Die drei Metabolite besaßen die Retentionszeiten 6,0 min, 6,4 min und 7,4 min. Bei dem Peak mit der Retentionszeit 6,0 min handelt es sich vermutlich um 15-HO-ZEN-16-*O*-G, da dieser im SRM-TIC eine deutlich geringere Intensität wie die beiden anderen Metabolite zeigte, was ein Hinweis auf die Glucuronidierung an der C16 Position ist (Kap.: 3.7). Bei den beiden anderen Metaboliten handelte sich analog der 15-HO-ZEN Glucuronidierung wahrscheinlich um 15-HO- $\alpha$ -ZEL-14-*O*-G bei der Retentionszeit 6,4 min und um  $\alpha$ -ZEL-15-*O*-G bei der Retentionszeit 7,4 min. 15-HO-ZEN-7-*O*-G konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Die UV-Detektion gibt Hinweise, dass ein weiterer, in geringer Menge detektierter Peak zusammen mit dem Peak bei Retentionszeit 7,4 min eluierte, bei dem es sich 15-HO-ZEN-7-*O*-G handeln könnte.

**MP-1**

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem MP-1 (14-MeO,15-HO-ZEN) zeigte im SRM-TIC einen Produktpeak bei der Retentionszeit 11,4 min (Abb.: 3.8.4 C). Der Peak zeigte anhand der Fragmentierung 523 -> 347 die Abspaltung des Glucuronsäurerestes und Bildung des Fragmentions [Substrat-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  347. Dies entspricht einem MeO-ZEN, so dass es sich bei dem detektierten Metaboliten um ein glucuronidiertes MeO-ZEN handeln muss (MeO-ZEN-*O*-G). Da die Hydroxylgruppe an Position C16 wie bei anderen ZEN-Derivaten vermutlich nicht sehr reaktiv ist wird vermutet, dass es sich bei dem detektierten Glucuronid um das 14-MeO-ZEN-15-*O*-G handelt.

**MP-2**

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem MP-2 (15-MeO-ZEN) zeigte einen Produktpeak bei der Retentionszeit 11,1 min (Abb.: 3.8.4 E). Der Peak zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 523, was dem  $m/z$  von MeO-ZEN-*O*-G entspricht. Da die Hydroxylgruppe an Position C16 wie bei den meisten ZEN-Derivaten nur sehr schwer glucuronidierbar ist wird vermutet, dass es sich bei dem detektierten Metabolite um das 15-MeO-ZEN-14-*O*-G handelt.

**MP-3**

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem MP-3 (14-MeO,15-HO- $\alpha$ -ZEL) zeigte drei Produktpeaks, die aufgrund der geringen gebildeten Menge nur im SRM-TIC anhand der Fragmentierung 525 -> 349 detektiert werden konnten (Abb.: 3.8.4 D). Das detektierte Fragmention [Substrat-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  349 entspricht einem MeO-ZEL, womit es sich bei den Produktpeaks um glucuronidierte MeO-ZEL handelt (MeO-ZEL-*O*-G). Analog zur Glucuronidierung von  $\alpha$ -ZEL wird davon ausgegangen, dass auch hier die Glucuronidierung der aliphatischen Hydroxylgruppe zu einer geringeren Polaritätsänderung führt, als die Glucuronidierung an der aromatischen Hydroxylgruppe. Demnach handelte es sich bei dem Glucuronid mit der Retentionszeit von 8,5 min sehr wahrscheinlich um das 14-MeO,15-HO- $\alpha$ -ZEL-7-*O*-G und bei den beiden Metaboliten bei höherer Polarität um Metabolite mit Glucuronidierungen an aromatischen Hydroxylgruppen. Bei dem in geringer Menge gebildeten Glucuronid mit höchster Polarität handelte es sich analog zu den Glucuronidierungen von ZEL und ZEL-Metaboliten um 14-MeO,15-HO- $\alpha$ -ZEL-16-*O*-G. Entsprechend handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei dem Glucuronid mit der Retentionszeit von 6,8 min um 14-MeO- $\alpha$ -ZEL-15-*O*-G.

**MP-4**

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem MP-4 (15-MeO- $\alpha$ -ZEL) zeigte zwei Produktpeaks, welche anhand des  $m/z$  von 525 den MeO-ZEL-*O*-G zugeordnet werden (Abb.: 3.8.4 F). Der Metabolit mit der Retentionszeit 8,5 min zeigte eine Verschiebung des mittleren UV-Maximums zu einer kleineren Wellenlänge gegenüber dem UV-Spektrum von MP-4, was

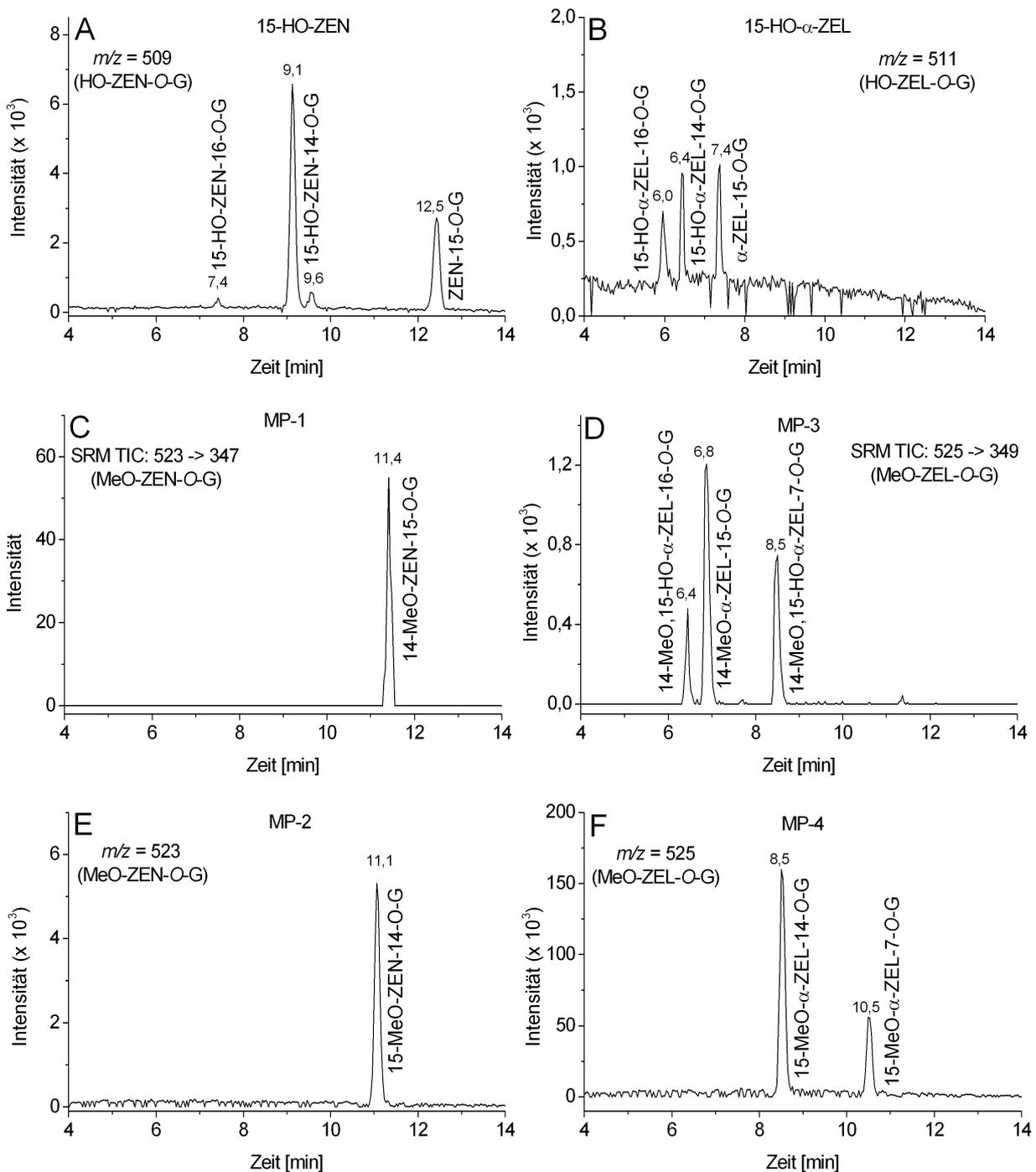


Abbildung 3.8.4.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubationen von **A**: 15-HO-ZEN, **B**: 15-HO- $\alpha$ -ZEL, **C**: MP-1, **D**: MP-3, **E**: MP-2 und **F**: MP-4 mit Rattenlebermikrosoemen/UDPGA. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 3.

auf eine aromatische Konjugation hindeutet. Das UV-Spektrum des Glucuronids mit der Retentionszeit 10,5 min dagegen war gegenüber dem UV-Spektrum von MP-4 unverändert, was auf eine aliphatische Konjugation hindeutet. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei dem Glucuronid mit der Retentionszeit von 8,5 min um 15-MeO- $\alpha$ -ZEL-14-*O*-G und bei dem Glucuronid mit der Retentionszeit von 10,5 min um 15-MeO- $\alpha$ -ZEL-7-*O*-G handelt.

### 6 $\alpha$ -HO-ZEN

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem 6 $\alpha$ -HO-ZEN zeigte drei Produktpeaks, welche ein  $m/z$  von 509 aufwiesen, was einem HO-ZEN-*O*-G entspricht (Abb.: 3.8.5 A). Der Hauptmetabolit war ein Glucuronid mit der Retentionszeit 7,8 min. Das UV-Spektrum des Hauptmetaboliten zeigte gegenüber 6 $\alpha$ -HO-ZEN eine Verschiebung des mittleren Maximums zu niedrigeren Wellenlängen, was auf eine Glucuronidierung einer aromatischen Hydroxylgruppe hindeutet. Da die 16-*O*-Glucuronide eher in Spuren gebildet werden wird angenommen, dass es sich bei dem Hauptmetaboliten um 6 $\alpha$ -HO-ZEN-14-*O*-G handelt. Zwei weitere Glucuronide wurden in Spuren bei den Retentionszeiten 8,2 min und 11,4 min detektiert, wobei es sich bei einem von beiden um das an der aliphatischen Hydroxylgruppe an der C6 Position konjugierte Glucuronid handeln könnte. Aufgrund der Acyloin Struktur kann diese Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Carbonylgruppe ausbilden wodurch die Konjugation erschwert wird. Dies würde erklären warum die Konjugation der aliphatischen Position von 6 $\alpha$ -HO-ZEN im Vergleich zu anderen HO-ZEN- und ZEL-Metaboliten hier vermindert stattgefunden hat. Das 16-*O*-Glucuronid findet sich in der Regel bei kleineren Retentionszeiten als das 14-*O*-Glucuronid, allerdings konnte es hier nicht eindeutig bestimmt werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Inkubation auch Konjugate von 6-Keto-ZEL detektiert wurden, welches in wässriger Lösung aus 6 $\alpha$ -HO-ZEN durch Keto-Enol-Tautomerie gebildet wird.

### 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL zeigte vier Produktpeaks, welche alle im MS-TIC ein  $m/z$  von 511 besaßen und damit den HO-ZEL-*O*-G zugeordnet werden (Abb.: 3.8.5 B). Die genaue Zuordnung aller gebildeten Glucuronide von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL ist nicht möglich, da bei der Isolation von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL die Metaboliten 15-HO- $\alpha$ -ZEL und 10 $\beta$ -HO-ZEN sich nicht vollständig abtrennen ließen. Zwei Hauptmetabolite, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Glucuronide von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL darstellen, wurden bei den Retentionszeiten 6,0 min und 7,2 min detektiert. Das UV-Spektrum des Metaboliten bei 5,9 min zeigte wie beim ZEN-15-*O*-G gegenüber ZEN eine Verschiebung des mittleren UV-Maximums zu niedrigeren Wellenlängen, was ein Hinweis ist, dass es sich um ein 14-*O*-Glucuronid handelt. Der zweite Hauptmetabolit bei der Retentionszeit von 7,1 min zeigte keine Veränderung des UV-Spektrums, so dass hier eine Glucuronidierung einer der aliphatischen Hydroxylgruppe vermutet wird. Die genaue Glucuronidierungsposition ist nicht bekannt und kann sowohl an der C7 wie auch an der C6 Position lokalisiert sein. Die beiden Metaboliten, die in geringerer Menge gebildet wurden, besitzen

die Retentionszeiten 6,6 min und 7,5 min. Die Retentionszeiten stimmten mit den Retentionszeiten der Glucuronide von 15-HO- $\alpha$ -ZEL überein, so dass es sich vermutlich um Artefakte handelt, die aus nicht vollständig abgetrenntem 15-HO-ZEN, das aus der Isolation von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL stammt, gebildet wurden. Das 16-*O*-Glucuronid konnte nicht identifiziert werden.

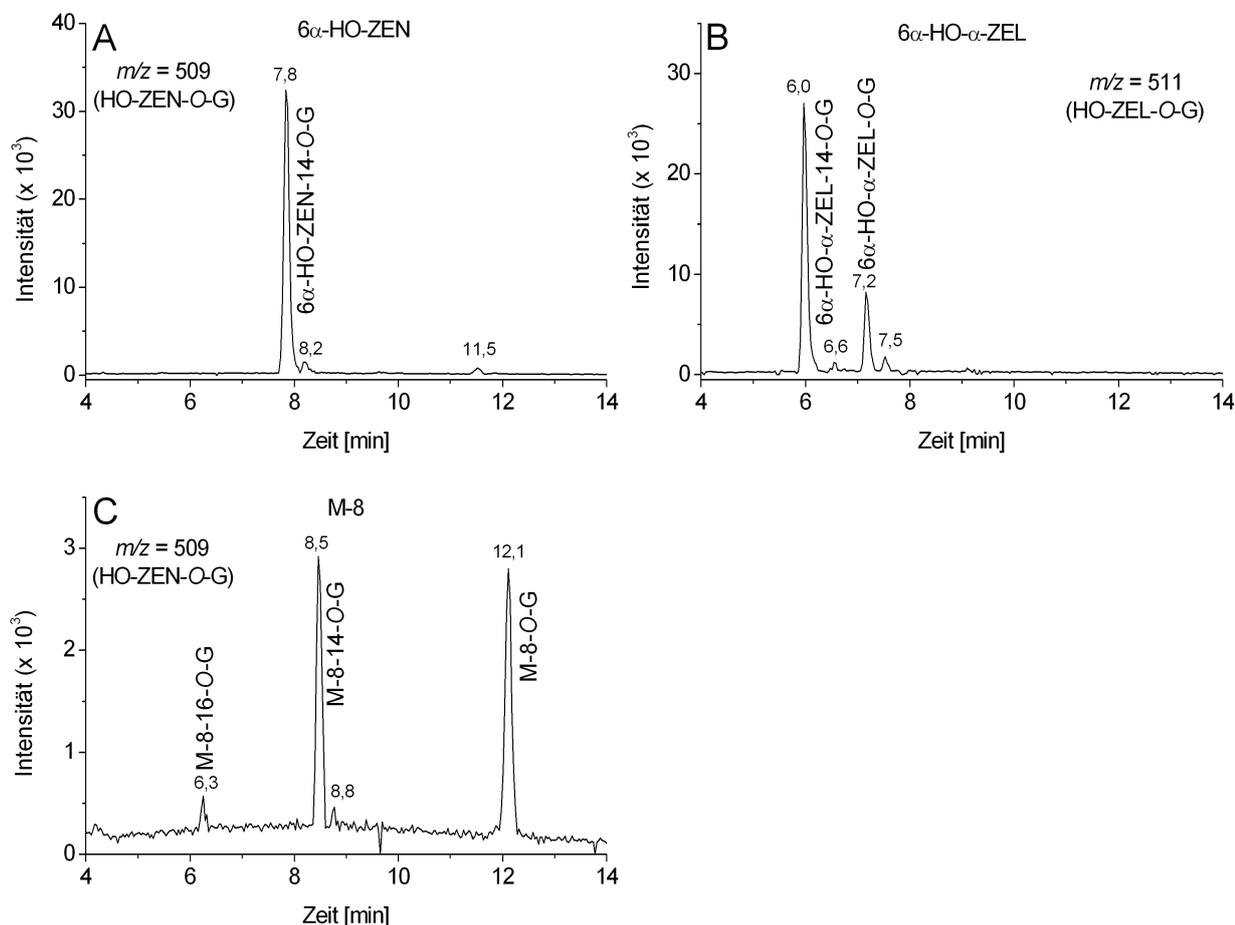


Abbildung 3.8.5.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubationen von **A:** 6 $\alpha$ -HO-ZEN, **B:** 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und **C:** M-8 mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 3.

### Metabolit 8

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung von isoliertem M-8 zeigte drei Produktpeaks, welche die Masse von HO-ZEN-*O*-G von *m/z* 509 besaßen (Abb.: 3.8.5 C). Es wurden zwei Hauptmetabolite gebildet, welche bei der Retentionszeit 8,5 min und 12,1 min detektiert wurden. Das UV-Spektrum des Hauptmetaboliten bei 8,5 min zeigte gegenüber M-8 eine Verschiebung des mittleren UV-Maximum zu niedrigeren Wellenlängen, was auf eine Glucuronidierung der aromatischen Hydroxylgruppe hinweist, so dass es sich hier um M-8-14-*O*-G handelt. Der zweite Hauptmetabolit bei 12,1 min zeigte keine Verschiebung im mittleren UV-Maximum und der Peak

wurde auch nicht im SRM-TIC detektiert, da kein [Substrat-H]<sup>-</sup> Ion gebildet wurde. Beides deutet auf die Glucuronidierung der aliphatischen Hydroxylgruppe hin (M8-O-G). Die aliphatische Hydroxylierungsposition ist hier der aromatischen bevorzugt, da die beiden Hauptmetabolite in der UV-Detektion in einem Flächenverhältnis von 2:1 gebildet wurden. Das 16-O-Glucuronid wurde der Retentionszeit 6,3 min zugeordnet.

### 3.8.2.2. Sulfatierung ausgewählter oxidativer ZEN-Metabolite

#### 15-HO-ZEN

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem 15-HO-ZEN zeigte zwei Hauptmetabolite und einen in Spuren detektierten Metaboliten (Abb.: 3.8.6 A). Alle drei Metabolite zeigten im MS-TIC ein  $m/z$  von 413, was einem sulfatierten HO-ZEN entspricht (HO-ZEN-O-S). Das Metabolitenprofil zeigte große Ähnlichkeit zum Metabolitenprofil der Glucuronidierung von 15-HO-ZEN (Abb.: 3.8.4 A). Der Vergleich der Glucuronidierung und Sulfatierung von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL hat gezeigt, dass die Elutionsreihenfolge der Konjugate und die identifizierten Konjugationspositionen identisch sind (Kap.: 3.7), so dass hier die gleichen Konjugationspositionen wie im Metabolitenprofil der Glucuronidierung von 15-HO-ZEN angenommen werden. Entsprechend handelt es sich bei den Hauptmetaboliten bei der Retentionszeit 17,3 min um 15-HO-ZEN-14-O-S und bei 21,5 min um ZEN-15-O-S und bei dem in Spuren gebildeten Metaboliten mit der Retentionszeit 16,8 min um 15-HO-ZEN-16-O-S.

#### 15-HO- $\alpha$ -ZEL

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von 15-HO- $\alpha$ -ZEL zeigte vier Produktpeaks, welche ein  $m/z$  von 415 besaßen und damit einem sulfatierten HO-ZEL entsprechen (HO-ZEL-O-S) (Abb.: 3.8.6 B). Das Metabolitenspektrum zeigte große Ähnlichkeit zum Metabolitenprofil der Glucuronidierung von 15-HO- $\alpha$ -ZEL, weshalb eine identische Elutionsreihenfolge angenommen wird (Abb.: 3.8.6 A). Bei den Hauptmetabolite handelt es sich demnach sehr wahrscheinlich um 15-HO- $\alpha$ -ZEL-14-O-S bei der Retentionszeiten 13,6 min und um  $\alpha$ -ZEL-15-O-S bei der Retentionszeit 16,3 min. Die Konjugation der aliphatischen C7 Position bei einem der beiden detektierten Hauptmetabolite wird ausgeschlossen, da die UV-Spektren keine deutliche Abweichung zu 15-HO- $\alpha$ -ZEL zeigten und beide Metaboliten im SRM-TIC deutlich detektiert wurden. Bei dem in geringer Menge detektierten Metaboliten bei der Retentionszeit 12,0 min handelt es sich vermutlich um ein Artefakt. Die Sulfate von 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL können ebenfalls in geringer Menge im Inkubat enthalten sein, da es sich bei der Isolation von 15-HO- $\alpha$ -ZEL nicht vollständig abtrennen lässt. Die Retentionszeit des Metaboliten bei 12,0 min stimmt mit 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL-14-O-S überein, das in MS<sup>3</sup>-Untersuchungen identifiziert werden konnte (Kap.: 3.8.2.3). Demnach handelt es sich wahrscheinlich bei dem in geringer Menge detektierten Metaboliten bei der Retentionszeit 12,5 min um 15-HO- $\alpha$ -ZEL-16-O-S .

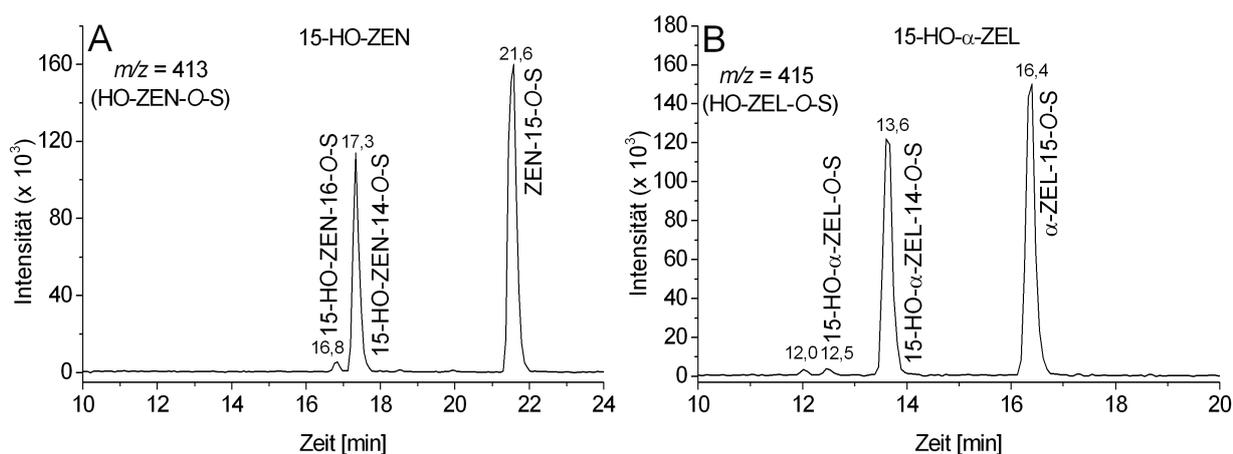


Abbildung 3.8.6.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation von **A**: 15-HO-ZEN und **B**: 15-HO- $\alpha$ -ZEL mit Rattenlebercytosol/PAPS. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 4.

### MP-1

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-1 (14-MeO,15-HO-ZEN) zeigte einen Produktpeak bei der Retentionszeit von 17,8 min (Abb.: 3.8.7 A). Der Peak zeigte im MS-TIC ein  $m/z$  von 427, was einem sulfatierten MP entspricht (MeO-ZEN-O-S). Da die Hydroxylgruppe an Position C16, wie bei den meisten ZEN-Derivaten vermutlich schlecht konjugierbar ist, wird angenommen, dass es sich bei dem detektierten Sulfat um 14-MeO-ZEN-15-O-S handelt.

### MP-2

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-2 (15-MeO-ZEN) zeigte einen Produktpeak bei der Retentionszeit 17,6 min (Abb.: 3.8.7 D). Der Peak zeigte ein  $m/z$  von 427, was einem MeO-ZEN-O-S entspricht. Die Sulfatierung der Position am C16 wird auch hier ausgeschlossen, da diese Position nur schwer konjugiert wird. Demnach handelt es bei dem detektierten Sulfat um das 15-MeO-ZEN-14-O-S. Wie ihre Glucuronid Analoga zeigten die beiden Sulfate von MP-1 und MP-2 nur wenig Unterschied in der Retentionszeit (Vgl. Abb.: 3.8.4). Dies war zu erwarten, da der Unterschied in der Struktur sehr gering ist und lediglich die Substituenten am aromatischen Ring vertauscht sind.

### MP-3

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-3 (14-MeO,15-HO- $\alpha$ -ZEL) zeigte einen Produktpeak bei der Retentionszeit 12,5 min, welcher ein  $m/z$  von 429 besaß (Abb.: 3.8.7 B). Dies entspricht einem sulfatiertem MeO-ZEL (MeO-ZEL-O-S). Die Konjugation

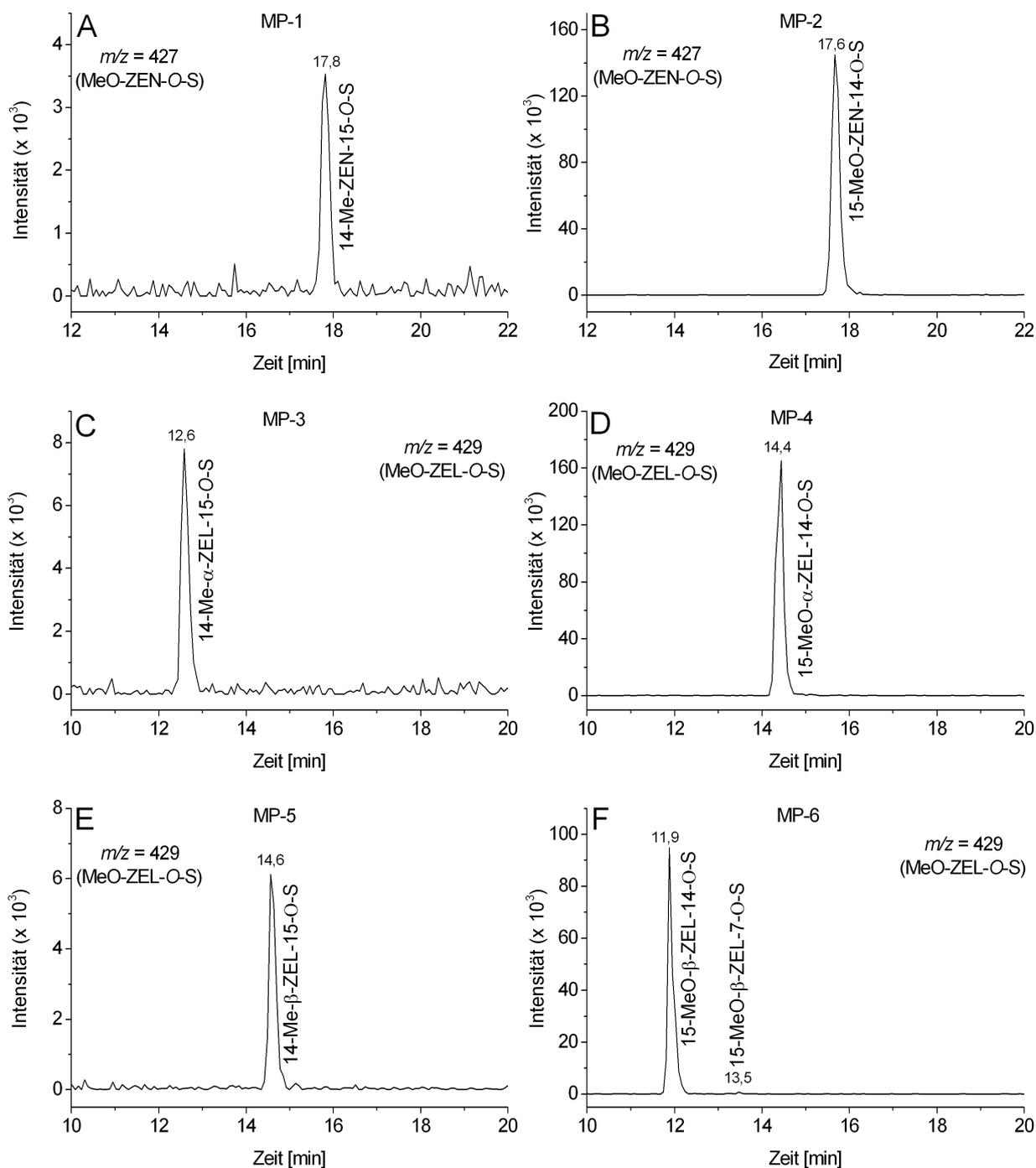


Abbildung 3.8.7.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubationen von **A**: MP-1, **B**: MP-3, **C**: MP-5, **D**: MP-2, **E**: MP-4 und **F**: MP-6 mit Rattenlebercytosol/PAPS. Chromatographiebedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 4.

der C16 Position ist hier unwahrscheinlich, da das Glucuronid in größerer Menge detektiert werden konnte. Ebenso wird die C7 Position ausgeschlossen, da bei der Sulfatierung von  $\alpha$ -ZEL gezeigt werden konnte, dass die aliphatische C7 Position nicht sulfatiert wurde. Demnach handelt es sich sehr wahrscheinlich bei dem detektierten Konjugat um 14-MeO- $\alpha$ -ZEL-15-*O*-S.

#### MP-4

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-4 (15-MeO- $\alpha$ -ZEL) zeigte einen Produktpeak bei der Retentionszeit 14,3 min (Abb.: 3.8.7 E). Dieser besaß im MS-TIC die Masse  $m/z = 429$  und entspricht damit einem MeO-ZEL-*O*-S. Die Konjugation der C16 Position wird hier ebenfalls ausgeschlossen, da der Metabolit in größerer Menge detektiert werden konnte. Die Konjugation der C7 Position ist ebenfalls unwahrscheinlich, da bei der Sulfatierung von  $\alpha$ -ZEL gezeigt wurde, dass die aliphatische C7 Position nicht sulfatiert wird. Demnach handelt es sich sehr wahrscheinlich bei dem detektierten Konjugat um 15-MeO- $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S. MP-3 und MP-4 besitzen die gleichen Unterschiede in den Substituenten am aromatischen Ring wie MP-1 und MP-2, zeigten jedoch im Gegensatz zu diesen keine ähnlichen sondern sehr unterschiedliche Retentionszeiten. Dies konnte bereits bei den Glucuroniden von MP-3 und MP-4 beobachtet werden (Vgl. Abb.: 3.8.4).

#### MP-5

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-5 (14-MeO,15-HO- $\beta$ -ZEL) zeigte einen Peak bei der Retentionszeit 14,5 min (Abb.: 3.8.7 C). Anhand des detektierten  $m/z$  von 429 konnte dieser einem sulfatierten MeO-ZEL zugeordnet werden. Die genaue Sulfatierungsposition ist unklar, jedoch wird die Konjugation der C16 Position ausgeschlossen, da entsprechende Metabolite meist nur in Spuren gebildet werden. Die C7 Position kann möglicherweise ausgeschlossen werden, da der entsprechende Metabolit dann aufgrund der vorhandenen Catecholstruktur und der damit verbunden Anfälligkeit gegenüber Autoxidation nur in sehr geringer Menge gebildet worden wäre. Es wird vermutet, dass es sich bei dem detektierten Metaboliten um 14-MeO- $\beta$ -ZEL-15-*O*-S handelt.

#### MP-6

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung von isoliertem MP-6 (15-MeO- $\beta$ -ZEL) zeigte zwei Produktpeaks bei der Retentionszeit 11,9 min und bei der Retentionszeit 13,5 min (Abb.: 3.8.7 F). Beide Peaks zeigten im MS-TIC ein  $m/z$  von 429 und entsprechen damit einem MeO-ZEL-*O*-S. Die genaue Sulfatierungsposition ist unklar. Auch hier wird aufgrund der gefundenen Menge des Metaboliten die Konjugation der C16 Position ausgeschlossen. Die Sulfatierung von  $\beta$ -ZEL hat gezeigt, dass die Konjugation der aliphatischen Hydroxylgruppe im Vergleich zur Konjugation der aromatischen Hydroxylgruppen zu einer geringeren Polaritätsänderung unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen führt. Demnach wird vermutet, dass es sich bei dem in Spuren, bei der Retentionszeit von 13,5 min, detektierten Peak um 15-MeO- $\beta$ -ZEL-7-*O*-S handelt.

Bei dem Hauptmetaboliten handelt es sich somit sehr wahrscheinlich um 15-MeO- $\beta$ -ZEL-14-*O*-S. Die Sulfate von MP-5 und MP-6 zeigten wie MP-3 und MP-4 einen größeren Retentionszeitunterschied, wie er aufgrund der Strukturähnlichkeit zu erwarten wäre. Besonders auffällig ist hier, dass das 15-MeO- $\beta$ -ZEL-14-*O*-S eine höhere Polarität aufweist wie 14-MeO- $\beta$ -ZEL-15-*O*-S und die beiden Sulfate damit in umgekehrter Reihenfolge eluierten wie die Sulfate von MP-3 und MP-4.

### 3.8.2.3. Identifizierung von Konjugaten mit Hilfe von MS<sup>3</sup>-Untersuchungen

Die Isolation der oxidativen Metabolite und deren Einsatz im Glucuronidierungs- bzw. Sulfatierungsassay war nicht für alle oxidativen Metabolite möglich. Einige der oxidativen Metabolite coeluierten mit anderen Metaboliten, was deren Isolation erschwerte und den Einsatz in den Konjugationsassays nur unter Bildung von unerwünschten Konjugaten möglich macht. Dies macht eine genaue Zuordnung unmöglich. Andere oxidative Metabolite ließen sich nicht in ausreichender Menge isolieren, um sie anschließend mit den Zellfraktionen umzusetzen. Wie bei den Konjugaten von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL beobachtet werden konnte fragmentieren die Glucuronid- und Sulfatkonjugate in der ESI-MS<sup>2</sup>-Analyse unter Abspaltung der metabolisch eingefügten Glucuronsäure bzw. Sulfat zum [Substrat-H]<sup>-</sup> Ion. Dieses ließe sich in einem MS<sup>3</sup>-Experiment weiterfragmentieren, wobei ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster wie das des eingesetzten Substrates gebildet wird. Voraussetzung für die Charakterisierung der Konjugate mit der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung ist die Bildung des [Substrat-H]<sup>-</sup> Fragmentions, das bevorzugt bei aromatisch konjugierten Hydroxylgruppen entsteht. Konjugate, die an aliphatischen Hydroxylgruppen konjugiert wurden, bildeten das [Substrat-H]<sup>-</sup> Fragmention nur in sehr geringer Menge, so dass diese Metabolite hier nicht, oder nur wenn sie in sehr großer Menge gebildet wurden, erfasst werden. Demnach wird es sich bei den mit der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung erfassten Konjugaten vorwiegend um 14-*O*-Glucuronide und 14-*O*-Sulfate handeln. Auf diese Weise wurden die Konjugate der oxidativen Metabolite und der MPs auf die gebildeten Glucuronide bzw. Sulfate untersucht. Hierzu wurde ZEN wie zuvor beschrieben mit Rattenlebermikrosomen/NADPH umgesetzt und nach Ende der Inkubationszeit die Inkubation mit Ethylacetat abgestoppt und die Metabolite extrahiert. Für die Herstellung der MPs wurde ein Aliquot des Extraktes mit Rattenlebercytosol/SAM umgesetzt. Auch hier wurden die Metabolite mit Ethylacetat extrahiert und anschließend mit dem Extrakt aus der mikrosomalen Umsetzung vereinigt. Der so hergestellte Metabolitenextrakt enthält alle oxidativen Metabolite und MPs. Hiervon wurden dann Aliquote wie zuvor beschrieben im Glucuronidierungs- bzw. Sulfatierungsassay eingesetzt (Kap.: 5.4.6.4). Die so erhaltenen Inkubate wurden dann mit der LC-MS in einer MS<sup>3</sup>-Analyse untersucht (Kap.: 5.4.1.3 Methode 3 und 4). Die Identifikation erfolgte dann im Vergleich mit den MS<sup>2</sup>-Massenspektren aus der Charakterisierung der oxidativen Metabolite und MPs (Kap.: 3.7, Kap.: 3.8.2.1 und Kap.: 3.8.2.2).

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Glucuronidierung des Metabolitenextraktes zeigte im Vergleich zur oxidativen Umsetzung eine Vielzahl neu entstandener Peaks. Alle wiesen unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen eine hohe Polarität auf und eluierten deutlich abgetrennt vor dem Großteil der oxidativen Metabolite und MPs. Die Glucuronide wurden anhand ihres *m/z* erfasst und durch ihre Retentionszeit und MS<sup>3</sup>-Fragmentierung identifiziert. Viele der

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Peaks konnten anhand der charakterisierten Konjugate aus Kap.: 3.7 und Kap.: 3.8.2.1 zugeordnet werden (Abb.: 3.8.8 A). Von besonderem Interesse waren die Konjugate von HO-ZEN- und HO-ZEL-Metaboliten, welche noch nicht durch Isolation des entsprechenden oxidativen Metaboliten und Einsatz im Konjugationsassay charakterisiert worden waren. Die Auswertung der Massenspur für HO-ZEN-*O*-G Metabolite bei  $m/z$  509 zeigte die bereits charakterisierten Konjugate von 15-HO-ZEN, 6 $\alpha$ -HO-ZEN und M-8 sowie drei unbekannte Konjugate, die mit Hilfe der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung als 5 $\alpha$ -HO-ZEN-*O*-G bei 6,1 min, 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL-*O*-G bei 5,9 min und 6-Keto-ZEL-*O*-G bei 5,0 min identifiziert wurden (Abb.: 3.8.8 B). Die Massenspur für HO-ZEL-*O*-G Metabolite bei  $m/z$  511 zeigte nur bekannte Konjugate, die sowohl in Retentionszeit, wie auch der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung den Konjugaten aus der Glucuronidierung der Einzelsubstanzen aus Kap.: 3.8.2.1 zugeordnet werden konnten (Abb.: 3.8.8 C).

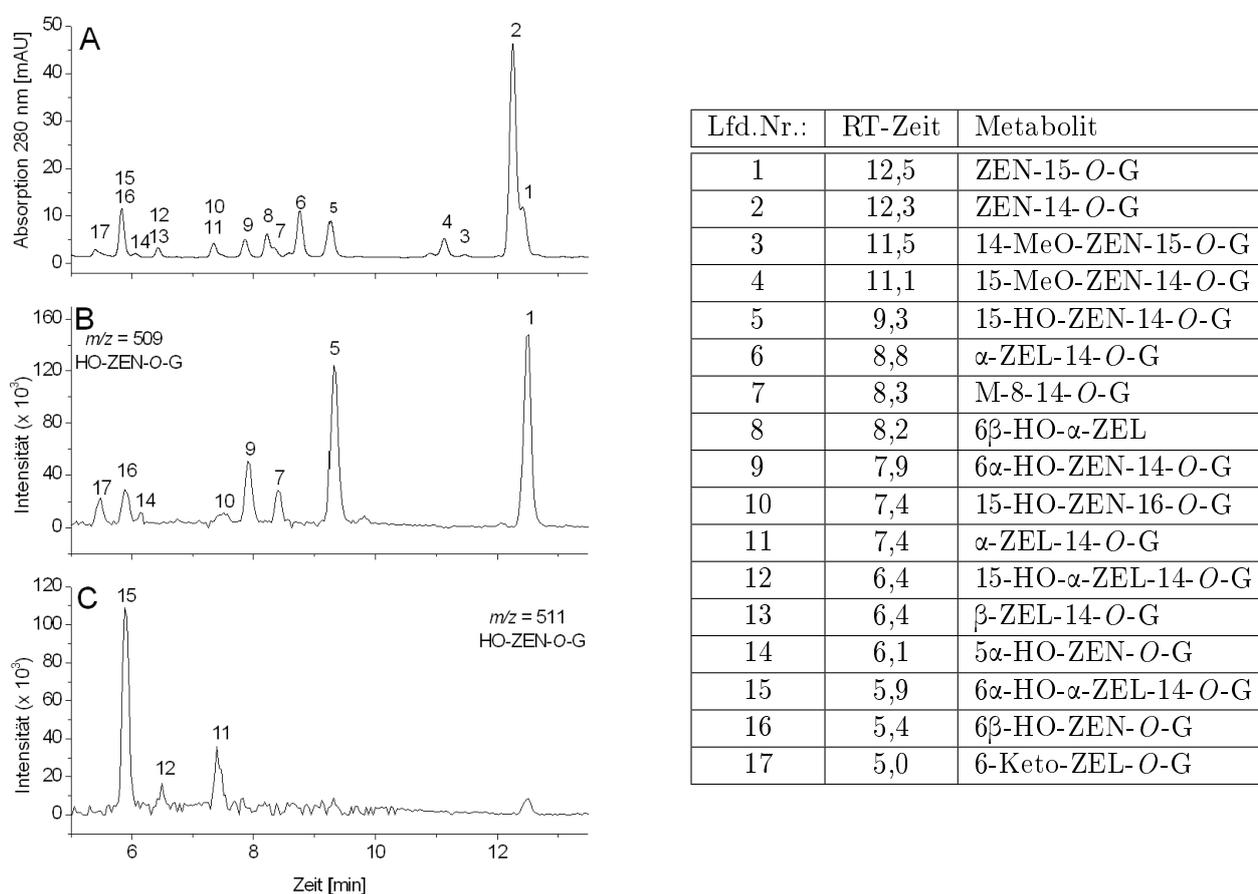


Abbildung 3.8.8.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation eines oxidativen Metaboliten und MPs enthaltenen Extraktes mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA. **A:** UV-Detektion, **B:** MS-TIC  $m/z$  509 und **C:** MS-TIC  $m/z$  511. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 3.

Die LC-MS Analyse des Inkubates aus der Sulfatierung des Metaboliten Extraktes zeigte, dass unter den verwendeten Inkubationsbedingungen die Sulfate nur in geringer Menge gebildet wurden. Die Retentionszeiten der Sulfate fielen zum Großteil mit den Retentionszeiten der oxidativen Metabolite aus dem nicht metabolisierten Metabolitengemisch zusammen und konnten in der UV-Detektion kaum oder gar nicht detektiert werden, so dass der SRM-TIC zur Auswertung verwendet wurde. Die Identifikation erfolgte auch hier anhand der Retentionszeiten und der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung. Einige der aus den Kap.: 3.7 und Kap.: 3.8.2.2 bekannten Hauptmetaboliten der Konjuate von ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, 15-HO-ZEN, 15-HO- $\alpha$ -ZEL und der MPs konnten im Metabolitengemisch detektiert werden. Von besonderem Interesse waren auch hier die Konjugate von HO-ZEN- und HO-ZEL-Metaboliten, welche noch nicht durch Isolation des entsprechenden oxidativen Metaboliten und Einsatz im Konjugationsassay erfasst worden waren. Die Auswertung des SRM-TIC der Fragmentierungsreaktion  $m/z$  413  $\rightarrow$  333, die HO-ZEN-*O*-S Metaboliten entspricht, zeigte die bereits charakterisierten Konjugate von 15-HO-ZEN sowie von drei unbekannte Konjugaten, die mit Hilfe der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung als M-8-*O*-S bei 14,6 min, 6 $\alpha$ -HO-ZEN-*O*-S bei 14,4 min und 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL-*O*-S bei 11,5 min identifiziert wurden (Abb.: 3.8.9 A). Der SRM-TIC für die Fragmentierungsreaktion  $m/z$  415  $\rightarrow$  335, die HO-ZEL-*O*-S Metaboliten entspricht, zeigte die bekannten Konjugate von 15-HO- $\alpha$ -ZEL (Kap.: 3.8.2.2) sowie ein unbekanntes Konjugat bei der Retentionszeit 11,9 min, das anhand der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung als 6-HO-ZEL-*O*-S identifiziert wurde (Abb.: 3.8.9 B). Da das Sulfat auch als Artefakt in der Sulfatierung von 15-HO- $\alpha$ -ZEL auftauchte handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL-14-*O*-S (Kap.: 3.8.2.2).

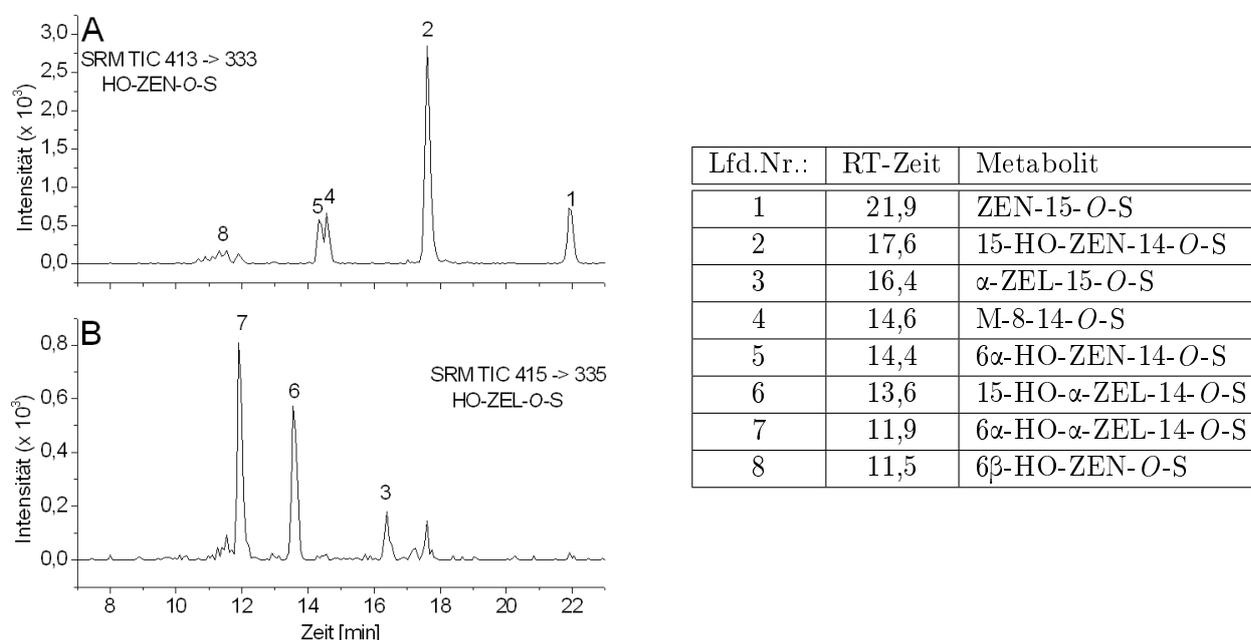


Abbildung 3.8.9.: LC-MS Profile des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation eines oxidative Metaboliten und MPs enthaltenden Extraktes mit Rattenlebercytosol/PAPS. **A**: SRM-TIC  $m/z$  413  $\rightarrow$  333 und **B**: SRM-TIC  $m/z$  415  $\rightarrow$  335. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 4.

Alle isoliert untersuchten oxidativ gebildeten ZEN-Metabolite liessen sich mit Glucuronsäure konjugieren. Die Glucuronidierungspositionen konnten zum Teil mit Hilfe der Elutionsreihenfolge der charakterisierten Glucuronide von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL, mit Hilfe der UV-Spektren und/oder mit dem SRM-TIC zugeordnet werden. Die Glucuronidierung von aromatischen Hydroxylgruppen ist in den meisten Fällen bevorzugt. Eine Ausnahme bildet hier die Hydroxylgruppe an der C16 Position, welche durch eine Wasserstoffbrückenbindung sterisch nur schwer zugänglich ist. Abhängig von der Position der Hydroxylgruppe lassen sich auch aliphatische Hydroxylgruppen besser oder schlechter glucuronidieren, wie am Beispiel von 6 $\alpha$ -HO-ZEN im Vergleich zu M-8 gezeigt werden konnte. Mit Hilfe von MS<sup>3</sup>-Untersuchungen konnten in einem Extrakt, der alle Metabolite aus der mikrosomalen Umsetzung inklusive ihrer MPs in Form ihrer Glucuronide enthielt weitere unbekannte Glucuronide detektiert werden.

Die auf eine mögliche Sulfatierung untersuchten Catechole aus dem oxidativen ZEN-Metabolismus und deren MPs liessen sich alle Sulfatieren. Die genaue Position der Sulfatierung ist nicht eindeutig geklärt, jedoch konnten auf Basis der bekannten Sulfatierungspositionen von ZEN und seiner reduktiven Derivate sowie im Vergleich zu den analog gebildeten Glucuronidkonjugaten mögliche Konjugationspositionen vorgeschlagen werden. Die Sulfatierung von aromatischen Hydroxylgruppen ist in den meisten Fällen bevorzugt mit Ausnahme der Hydroxylgruppe an der C16 Position, welche durch die ausgebildete Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Carbonylgruppe sterisch nur schwer zugänglich ist. Eine Konjugation der aliphatischen Hydroxylgruppen in Position C7 der reduzierten ZEN-Metabolite konnte bereits für  $\beta$ -ZEL jedoch nicht für  $\alpha$ -ZEL gezeigt werden und scheint somit abhängig von der Orientierung der Hydroxylgruppe zu sein. Demnach wäre die Sulfatierung aliphatischer Hydroxylgruppen auch für oxidative Metabolite denkbar, konnte jedoch nur für MP-6 in geringer Menge gezeigt werden. Mit Hilfe von MS<sup>3</sup>-Untersuchungen konnten in einem Extrakt, der alle Metabolite aus der mikrosomalen Umsetzung inklusive ihrer MPs in Form ihrer Sulfate enthielt weitere unbekannte Sulfate detektiert werden.

Die Untersuchungen zum Phase II Metabolismus der oxidativ gebildeten ZEN-Metabolite und ihrer MPs konnte einen Großteil ihrer Glucuronide und Sulfate identifizieren. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Vielzahl an Konjugaten entstehen, die ein komplexes Metabolitengemisch bildeten. Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen liessen sich die Metabolite nicht vollständig auftrennen, so dass für die Untersuchung komplexer Metabolitengemische, wie sie z.B. in Leberschnitten gebildet werden, die Detektion im SRM-TIC bewährt hat. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nicht alle Konjugate erfasst werden, da die verwendete SRM-Detektion nur Metabolite detektiert deren Fragmentierung bekannt ist. Ebenfalls können auch coeluiierende Metabolite mit gleicher Fragmentierung nicht getrennt erfasst werden.

### 3.8.2.4. Untersuchung von Leberschnittinkubaten

Mit Hilfe der hergestellten Referenzsubstanzen und der ermittelten Charakterisierungsdaten der Phase II Metabolite war es möglich das komplexe Phase II Metabolitenspektrum in Leberschnittinkubaten zu untersuchen. Für die Untersuchung wurde das Inkubationsmedium aus der Leberschnittinkubation direkt mit Hilfe der LC-MS untersucht (Kap.: 5.4.1.3 Methode 1-4). Zusätzlich wurde das Konjugationsmuster auch durch selektive Spaltung der Konjugate mit/ohne Arylsulfatase und /oder  $\beta$ -Glucuronidase untersucht. Das Inkubationsmedium wurde hierfür in vier gleiche Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde direkt mit Ethylacetat extrahiert (Fraktion A) während die anderen drei mit  $\beta$ -Glucuronidase (Fraktion B), Arylsulfatase (Fraktion C) und beiden Enzymen (Fraktion D) gespalten und dann mit Ethylacetat extrahiert wurden (Kap.: 5.4.6.3). Die erhaltenen Extrakte wurden dann mit HPLC-DAD auf ihre Metabolitenprofile untersucht (Kap.: 5.4.1.1). Die Differenz zwischen Fraktion B und A ergab die Menge an Glucuroniden und die Differenz zwischen Fraktion C und A die Menge an Sulfaten. Die Summe aus unkonjugierten Metaboliten, Glucuroniden und Sulfaten, die aus diesen Berechnungen erhalten wurden, stimmte nicht bei allen Metaboliten mit Fraktion D überein. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an den gemischten Konjugaten, die für die reduktiven ZEN-Metabolite  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL und qualitativ auch für HO-ZEL-Metabolite, in der direkten Analyse mit LC-MS im Inkubationsmedium nachgewiesen werden konnten und auch möglicherweise von HO-ZENs gebildet werden. Ebenfalls zeigten sich starke Schwankungen in den Mengen der detektierten Metaboliten innerhalb der beiden untersuchten Inkubationsmedien. Dies kann in der Qualität der Leberschnitte begründet liegen, welche experimentell bedingt schwanken kann.

Mittels der direkte Analyse der Leberschnittinkubate mit LC-MS konnte gezeigt werden, dass ZEN und die Metabolite  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, 15-HO-ZEN, MP-1, MP-2, 15-HO- $\alpha$ -ZEL, MP-3, MP-4, 6 $\alpha$ -HO-ZEN, 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und M-8 in Leberschnitten gebildet wurden und im Inkubationsmedium als freies Aglycon sowie in Form ihrer Glucuronid- und Sulfatkonjugate vorlagen. Diese identifizierten ZEN-Metabolite und deren Konjugate waren in nachweisbarer Menge im Leberschnittinkubat detektierbar, so dass ihre Gehalte semi-quantitativ abgeschätzt werden konnten (Abb.: 3.8.10). Qualitativ konnten zusätzlich weitere Metabolite und deren Konjugate identifiziert werden. Als Aglycon waren 5 $\alpha$ -HO-ZEN, 10 $\alpha$ -HO-ZEN, 6 $\beta$ -HO-ZEN, 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL und 6-Keto- $\alpha$ -ZEL nachweisbar und als Sulfatkonjugat konnten 6 $\beta$ -HO-ZEN-14-O-S sowie die Sulfate der MPs von 15-HO- $\beta$ -ZEL, MP-5 und MP-6 detektiert werden. Die Mengen an gebildeten Glucuroniden war generell sehr gering, so dass auch qualitativ keine Glucuronidkonjugate von weiteren oxidativen Metaboliten eindeutig zugeordnet werden konnten. Qualitativ wurden auch dikonjugierten HO-ZEL-Metabolite detektiert. Die im MS-TIC detektierten Massen der dikonjugierten HO-ZEL-Metabolite deuten darauf hin, dass diese mit Sulfat und Glucuronsäure konjugiert sind. Mangels Referenzsubstanzen konnten diese nicht identifiziert und den oxidativen Metaboliten zugeordnet werden. Die direkte Analyse der Inkubationsmedien zeigte für die Verteilung der quantifizierbaren Konjugate von ZEN und der im Phase I Metabolismus gebildeten oxidativen Metabolite, dass diese sowohl mit Glucuronsäure als auch mit Sulfat konjugiert vorlagen (Abb.: 3.8.10).

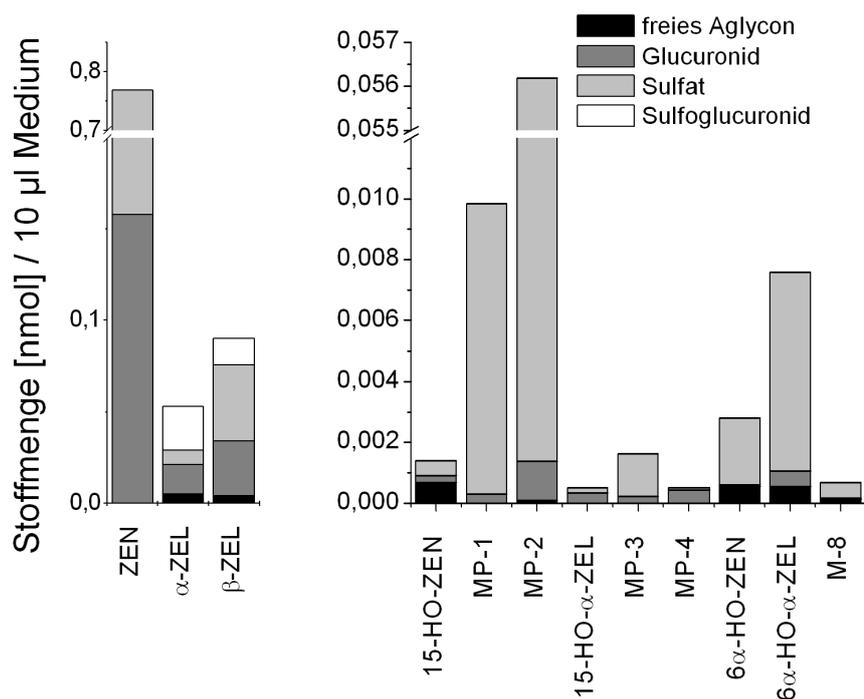


Abbildung 3.8.10.: Gebildete Konjugate von ZEN und ZEN-Metaboliten aus einer Inkubation von ZEN (200  $\mu$ M) inkubiert mit einem Leberschnitt einer männlichen Sprague Dawley Ratte für 24 h. Direkte Analyse des Inkubationsmediums mit LC-MS. Dargestellt sind jeweils die Gehalte als Mittelwerte aus zwei untersuchten Inkubationsmedien. Quantifizierung siehe Kap.: 5.4.6.4.

In fast allen Fällen überwiegt die Konjugation mit Sulfat gegenüber der Glucuronidierung und kann die Menge an Glucuroniden um ein vielfaches übersteigen. Die reduzierten Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL lagen z.T. auch doppelt konjugiert vor. Von beiden konnten gemischt konjugierte Metabolite nachgewiesen werden und von  $\beta$ -ZEL auch geringe Mengen Diglucuronid (Abb.: 3.8.10). Die Hauptmetabolite der oxidierten ZEN-Spezies waren die Sulfate der MPs von 15-HO-ZEN sowie 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL. Die Catechole 15-HO-ZEN und 15-HO- $\alpha$ -ZEL konnten in Spuren als Konjugate detektiert werden. Neben den Sulfaten und Glucuroniden der MPs von 15-HO-ZEN konnten auch die der MPs von 15-HO- $\alpha$ -ZEL und qualitativ auch von 15-HO- $\beta$ -ZEL detektiert werden, welche ebenfalls als Sulfate vorlagen (Anhang Abb.: A.7.1).

Die Analyse des Inkubationsmediums nach selektiver Spaltung mit/ohne Arylsulfatase und/oder  $\beta$ -Glucuronidase bestätigte, dass ZEN und die im Phase I Metabolismus gebildeten Metabolite sowohl mit Glucuronsäure wie auch mit Sulfat konjugiert vorliegen (Abb.: 3.8.11). Da die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen nicht direkt vergleichbar sind können die Ergebnisse beider Analysen nur qualitativ verglichen werden. Es zeigt sich jedoch auch nach der selektiven Spaltung der Konjugate, dass bis auf Ausnahme von  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL und MP-4 tendenziell mehr Sulfate gebildet wurden als Glucuronide.

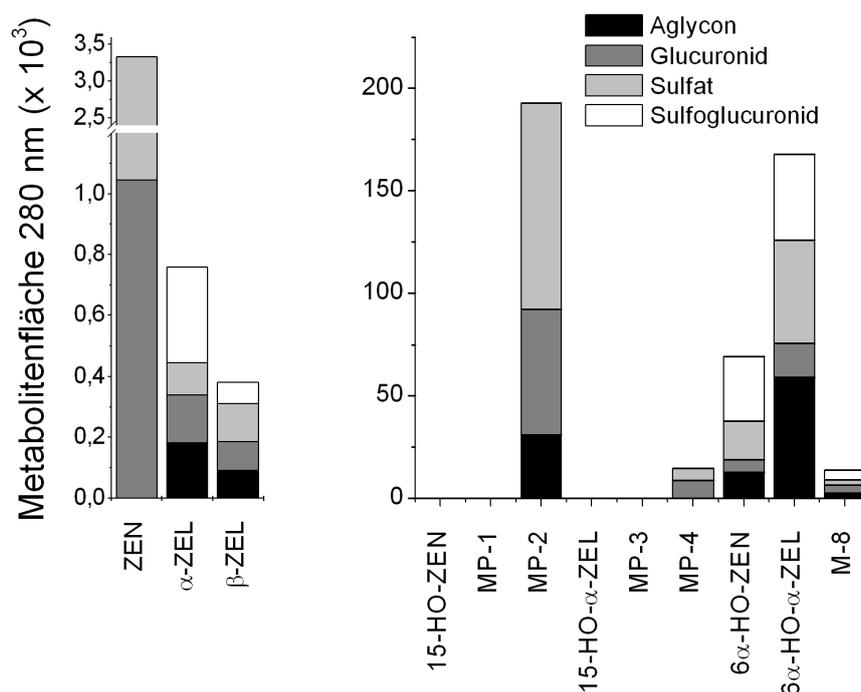


Abbildung 3.8.11.: Gebildete Konjugate von ZEN und ZEN-Metaboliten aus einer Inkubation von ZEN (200  $\mu$ M) inkubiert mit einem Leberschnitt einer männlichen Sprague Dawley Ratte für 24 h. Analyse der mit Ethylacetat extrahierten Extrakte nach selektiver Spaltung mit/ohne Arylsulfatase und/oder  $\beta$ -Glucuronidase mit HPLC-DAD. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei untersuchten Inkubationsmedien.

Geringere Mengen an Sulfaten werden auf die verwendete Sulfatase aus *Acetobacter aerogenes* zurückgeführt, die wie sich zeigte zum Teil die Sulfate von ZEN und ZEN-Metaboliten nicht quantitativ spaltete. Trotz möglicher Verluste einer nicht quantitativen Konjugatspaltung zeigten die detektierten oxidativen Metabolite und MPs ein qualitativ ähnliches Metabolitenprofil. MP-2 bildet auch hier den Hauptmetaboliten, gefolgt von  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und  $6\alpha$ -HO-ZEN. Die reaktiven Metabolitenspezies mit Catecholstruktur 15-HO-ZEN, 15-HO- $\alpha$ -ZEL sowie deren MPs MP-3 und MP-4 konnten nach Spaltung nicht detektiert werden. Dies liegt begründet in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Autoxidation, weshalb diese chemisch instabilen Metabolite während der Aufarbeitung des Inkubationsmediums sehr wahrscheinlich zerfallen. Die reduktiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zeigten gegenüber der direkten Analyse des Inkubationsmediums ein umgedrehtes Mengenverhältnis und damit einen höheren Gehalt an  $\alpha$ -ZEL gegenüber  $\beta$ -ZEL. Ein identisches Metabolitenverhältnis bei der reduktiver Derivate wurde auch bei der Analyse nach Spaltung mit Sulfatase/ $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix Pomatia* detektiert und ist in diesem Verhältnis auch aus Mikrosomeninkubationen bekannt (Abb.: 3.8.1). Dies lässt vermuten, dass in der direkten Analyse des Inkubationsmediums die reduktiven Derivate nicht vollständig detektiert wurden oder der Gehalt an  $\beta$ -ZEL zu hoch abgeschätzt wurde. Ebenfalls auffällig sind die detektierten Flächen der freien Aglycone und der gemischt konjugierten Metabolite, die von  $6\alpha$ -HO-ZEN,  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und M-8 detektiert wurden.

Die gemischt konjugierten Metabolite wurden zum Teil durch den qualitativen Nachweis gemischt konjugierter HO-ZEL-Metabolite in der direkten Analyse des Inkubationsmediums bestätigt. Eine mögliche Erklärung für die größere Menge an Aglyconen ist, dass durch Extraktion der Inkubationsmedien mit Ethylacetat, in den Analysen nach selektiver Spaltung, lipophile Metabolite besser von Reaktionsgefäßen, Oberflächen und im Medium enthaltenen Protein gelöst und der Analyse zugänglich gemacht werden, als in der direkten Analyse des Inkubationsmediums.

ZEN wurde mit Rattenleberschnitten inkubiert und die Inkubationsmedien sowohl durch direkte Analyse wie auch nach enzymatischer Hydrolyse mit Sulfatase/ $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix Pomatia* auf die gebildeten Metabolite hin untersucht (Vgl.: 3.8.2). Im Gegensatz zur Analyse nach vollständiger Spaltung der Konjugate des untersuchten Inkubationsmediums konnten in der Direktanalyse Catechole von ZEN und von  $\alpha$ -ZEL in Spuren nachgewiesen werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die reduktiven ZEN-Derivate und deren oxidativen Metaboliten gemischt konjugiert und damit glucuronidiert und sulfatiert vorliegen können. Quantitativ zeigte das detektierte Metabolitenprofil nach enzymatischer Hydrolyse mit Sulfatase/ $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix Pomatia* einige Unterschiede im Vergleich zur direkten Analyse des Inkubationsmediums. Dies könnten darin begründet liegen, dass in der Direktanalyse nicht alle gebildeten Konjugate erfasst wurden, wie z.B. Konjugate, die an aliphatischen Hydroxylgruppen konjugiert sind oder gemischt konjugierte Phase II Metabolite. Eine weitere Fehlerquelle besteht in der näherungsweise Berechnung der Gehalte, die zu Abweichungen führt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Gehalte der Analyse nach Spaltung zu hoch ausfallen, da sich Metabolite des Metabolitenprofils überlagern, welche in der Direktanalyse einzeln über ihre Konjugate erfasst werden und somit einen genaueren Wert wiedergeben. Für  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL z.B. ist aus LC-MS- und GC-MS-Untersuchungen bekannt, dass dieser sich mit weiteren Minormetaboliten überlagert (Kap.: 3.4.5). Die Catechole und ihre MPs konnten in der direkten Analyse des Inkubationsmediums mit höheren Gehalten detektiert werden. Dies liegt darin begründet, dass einige dieser Metabolite sehr reaktiv sind und während der Spaltung und Aufarbeitung der Inkubate zerfallen oder abreagieren. Im Gegensatz dazu sind viele der konjugierten MPs stabil, da sie keine Catecholstruktur mehr aufweisen. Auch ist bekannt, dass manche Konjugate der MPs sich schlecht spalten lassen und somit Anteile nicht vollständig in der folgenden LC-MS Analyse erfasst werden. Die direkte Analyse führt hier folglich zu genaueren Ergebnissen.

Die Abschätzung der Gehalte, sowohl durch die direkte Analyse des Inkubationsmediums, wie auch nach enzymatischer Hydrolyse mit Sulfatase/ $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix Pomatia* des Inkubationsmediums ergab, dass bezogen auf die Substanzkontrolle ca. 95% des eingesetzten ZEN als Muttersubstanz und Metabolite wiedergefunden wurden, wobei ein Anteil von 75% der detektierten Metabolite auf die Konjugate von ZEN entfallen. 12-13% entfallen auf die reduktiv gebildeten Metabolite  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL und 11-12% auf oxidative Metabolite. Die Bildung von einem Anteil von ca. 10% oxidativer Metabolite am Gesamtmetabolitenanteil in Leberschnitten der Ratte zeigte, dass die Hydroxylierung von ZEN und  $\alpha$ -ZEL auch in Anwesenheit von Konjugationsreaktionen stattfindet. Neben dem indirekten Nachweis der Catechole durch Detektion ihrer MPs konnten die oxidativ gebildeten ZEN-Metabolite:  $6\alpha$ -HO-ZEN,  $6\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL,  $6\beta$ -HO-ZEN,  $6\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL, M-8,  $5\alpha$ -HO-ZEN,  $10\alpha$ -HO-ZEN und 6-Keto- $\alpha$ -ZEL nachgewiesen werden. In Leberschnittinkubationen

von ZEN, die zusammen mit einem COMT-Inhibitor inkubiert wurden, konnten die Catechole auch direkt nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den Kontrollen ohne COMT-Inhibitor hat gezeigt, dass die gebildeten Catechole in Leberschnitten effizient durch COMT methyliert werden. Sowohl die Methylierung durch COMT wie auch die Konjugation der Catechole mit Glucuronsäure oder Sulfat führt abhängig von der konjugierten Position nur bedingt zu stabilen Produkten. Die *in vitro* Glucuronidierung von 15-HO-ZEN und anschließende Stabilitätsuntersuchung der Glucuronide hat gezeigt, dass je nach konjugierter Position chemisch stabile und instabile Konjugate entstehen, je nachdem ob die Catecholstruktur erhalten bleibt. Für die MPs zeigten sich je nach MP ähnliche Unterschiede in der Stabilität der Konjugate. Die reaktiven Konjugate könnten wie die Catechole mit nukleophilen Zellbestandteilen abreagieren oder zerfallen. Dies deutet darauf hin, dass die detektierte Catecholmenge vor allem dem stabilen Anteil an der gebildeten Gesamtcatecholmenge entsprechen, welche unter Umständen nur einen geringen Teil der tatsächlich gebildeten Catecholmenge ausmachen kann. Erst die Konjugation der instabilen MPs mit Glucuronsäure oder Sulfat führt zu chemisch stabilen und damit zu detoxifizierten Metaboliten. Die stabilen MPs eignen sich besonders gut als Biomarker für die Catecholbildung, da sie auch nach Spaltung und Aufarbeitung biologischer Proben noch nachgewiesen werden können. In *in vivo* Studien gibt es keine direkten Hinweise auf die Bildung oxidativer Metabolite von ZEN oder seiner reduktiven Derivate. In einer Studie von Fitzpatrick et al. [1988], die in weiblichen Ratten durchgeführt wurde, wurden 70-80% der eingesetzten ZEN-Dosis als ZEN und seiner Metabolite in Fäzes und Urin der Tiere nachgewiesen [Fitzpatrick et al., 1988]. Der Verbleib der nicht wiedergefundenen ZEN-Menge ist unklar und könnte den in Ratterleberschnitten gebildeten oxidativen Metaboliten entsprechen. Die im oxidativen Metabolismus gebildeten reaktiven Metaboliten, die zerfallen oder mit Zellbestandteilen, wie Proteinen und DNA abreagieren, wären in der Bilanz nicht mehr nachweisbar. Hinweise hierauf geben *in vivo* Studien zur Untersuchung der Bildung von DNA-Addukten. *In vivo* Untersuchungen an Mäusen, die eine einmalige ZEN Dosis von 2 mg/kg KG i.p. verabreicht bekamen, führten zur Bildung von DNA-Addukten, die mit  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling in Niere und Leber nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse wurden in Mäusen bestätigt in denen ZEN ebenfalls DNA-Addukte in Leber und Niere gebildet hat [Zinedine et al., 2007]. In einer weiteren Studie konnten bis zu 15 verschiedene DNA-Addukte identifiziert werden, wobei die DNA-Addukt-Konzentration in der Leber höher war als in der Niere und nach i.p. Gabe höher war als nach oraler Verabreichung [SCF, 2000].

Die in den Leberschnittinkubationen nachgewiesenen Phase I Metabolite von ZEN wurden in weiteren Experimenten auf ihr Konjugationsmuster untersucht. In den durchgeführten *in vitro* Vorversuchen zur Glucuronidierung und Sulfatierung von HO-ZEN- und HO-ZEL-Metaboliten in Zellfraktionen, konnte in beiden Systemen gezeigt werden, dass sich die eingesetzten Metabolite sowohl mit Glucuronsäure als auch mit Sulfat konjugieren lassen. Unter den *in vivo* ähnlichen Bedingungen in Leberschnitten, in denen beide Konjugationsreaktionen um das Substrat konkurrieren, ist die Sulfatierung deutlich effizienter als die Glucuronidierung, was tendenziell zu einer größeren Menge an Sulfaten führt. Die bevorzugte Bildung von sulfatierten Metaboliten konnte mit zwei unterschiedlichen analytischen Methoden gezeigt werden. Die gute Sulfatierung der ZEN-Derivate liegt womöglich in der Substratähnlichkeit zu den weiblichen Steroidhormonen, wie z.B.  $\text{E}_2$  und  $\text{E}_1$  be-

gründet, die innerhalb ihrer Homöostase durch Sulfatierung/Desulfatierung in der Leber und in Zielgeweben reguliert werden [Harris et al., 2000, Ruder et al., 1972]. *In vivo* werden die in der Leber gebildeten Konjugate über die Galle und dann mit dem Fäzes und/oder über den Blutweg über die Niere mit dem Urin ausgeschieden. Aus *in vivo* Versuchen ist bekannt, dass von weiblichen Ratten keine oder nur geringe Mengen an Glucuroniden über Fäzes oder Urin ausgeschieden werden und nur hohe Dosen zu stark schwankenden Mengen an Glucuronidkonjugaten im Fäzes führten [Fitzpatrick et al., 1988; Mirocha et al., 1981]. Der Mangel an Glucuroniden im Fäzes könnte auch anhand eines EHK erklärt werden, welcher für Ratten nachgewiesen wurde [Mallis et al., 2003]. Die Halbwertszeit von ZEN betrug in dieser Untersuchung nach oraler Aufnahme ca. 5,5 h. In einer weiteren Studie wurden in weiblichen Ratten nach 96 h ca. 40-50% der eingesetzten ZEN Dosis über die Fäzes und ca. 10-25% über den Urin ausgeschieden. Im Urin wurde freies ZEN als Hauptmetabolit nachgewiesen. Sowohl ZEN-Glucuronid, wie auch  $\alpha$ -ZEL und  $\alpha$ -ZEL-Glucuronid konnten nur in geringer Menge nachgewiesen werden [Fitzpatrick et al., 1988]. Dies deutet auf einen weniger starken EHK hin wie er z.B. aus Schweinen bekannt ist [Biehl et al., 1993], könnte jedoch bei einer geringen Glucuronidbildung dennoch zur vollständigen Spaltung der Glucuronide im Fäzes führen. Die in der Literatur beschriebene geringe Ausscheidung von Glucuronidkonjugaten korrelieren mit der in dieser Arbeit beobachteten geringen Bildung von Glucuroniden in Leberschnitten.

Sulfatmetabolite wurden bisher in wenigen *in vivo* Versuchen nachgewiesen. In zwei Studien wurden Sulfate von ZEN im Urin von Rindern [Mirocha et al., 1981] und in den Exkreta von Truthähnen beobachtet [Olsen et al., 1986]. Aufgrund der in vorliegender Arbeit gezeigten guten Sulfatierung von ZEN und ZEN-Metaboliten in Rattenleberschnitten würden diese Konjugate vermehrt in *in vivo* Studien erwartet werden. Die Bildung von Sulfatmetaboliten wird jedoch nicht immer untersucht, wie z.B. in einer *in vivo* Studie von Dänicke et al. [2001]. Die mögliche Bildung von Sulfaten wurde als eine Möglichkeit zur Erklärung der geringen Wiederfindung, von 58% der eingesetzten ZEN Dosis diskutiert [Dänicke et al., 2001]. Der analytische Nachweis von ZEN-Sulfaten gestaltet sich schwierig, da sich die Konjugate zum Teil schlecht spalten lassen und der direkte Nachweis der Konjugate einen hohen Aufwand an die Chromatographie und Detektion stellen. Dies kann dazu führen das ZEN-Sulfate trotz Bildung im Metabolitenspektrum nicht auftauchen oder übersehen werden. Eine weitere Möglichkeit warum ZEN-Sulfate bisher in wenigen *in vivo* Studien beschrieben wurden, könnte ein endogener Abbau von Sulfaten sein. Die Sulfatierung/Desulfatierung von endogenen Estrogenen dient zur Aktivierung und Inaktivierung sowie der Speicherung von Estrogenen [Ruder et al., 1972]. Da ZEN und seine Metabolite für viele Enzyme des Estrogenmetabolismus eine Affinität zeigen, könnten diese wie die Estrogensulfate von den Estrogensulfatasen aus deren Konjugaten in den Zielgeweben wieder freigesetzt werden [Miki et al., 2002]. Für die Isoflavone Genistein und Daidzein, welche ebenfalls im Phase II Metabolismus sulfatiert werden und Affinität zu den Enzymen der Estrogenhomöostase besitzen wurden ähnliche Mechanismen vermutet [Ronis et al., 2006; Shelnutt et al., 2002]. Die Spaltung der Sulfatmetabolite in den Zielgeweben würde zu einer verminderten Ausscheidung der in der Leber produzierten ZEN-Sulfatkonjugate führen, obwohl diese wie in den Experimenten in Leberschnitten gezeigt in großer Menge gebildet werden.

### 3.9. *in vivo* Metabolismus von ZEN

Der *in vivo* Metabolismus zeigt das komplexe Zusammenspiel aller metabolisch aktiven Gewebe eines Organismus. Fremdstoffe können nach erfolgter Biotransformation in den unterschiedlichen Geweben über die Niere mit dem Urin oder über die Gallen mit dem Fäzes ausgeschieden werden. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war die Bestätigung der in den *in vitro* Untersuchungen gefundenen Metabolite auf ihre *in vivo* Relevanz. Um den *in vivo* Metabolismus zu untersuchen wurden Gallenproben aus einer *in vivo* Studie mit Sprague Dawley Ratten untersucht (Kap.: 5.4.7). Die Tiere wurden vor Substanzapplikation mit einem Gallenkatheter versehen, so dass die Galle in 30 min Fraktionen über einen Zeitraum von 4 h gesammelt werden konnte. ZEN wurde in einer Dosis von 2 mg/Tier per Schlundsonde verabreicht. Die Substanzapplikation erfolgte nach einer halbstündigen Eingewöhnungsphase, in der die "Predose"-Galle, welche als Leerwert diente, gesammelt wurde. Die erhaltenen Gallenfraktionen wurden zur Hydrolyse von Konjugaten mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia* gespalten und anschließend mit Immunoaffinitätssäulen aufgereinigt und aufkonzentriert (Kap.: 5.4.7.1). Die so erhaltenen Extrakte wurden dann mit Hilfe der LC-MS auf die enthaltenen Metabolite untersucht (Kap.: 5.4.1.3 Methode 6). ZEN und die reduktiven Metabolite  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL wurden mit Hilfe der vorhandenen Referenzsubstanzen identifiziert. Die oxidativen Metabolite wurden anhand ihrer MS<sup>2</sup>-Fragmentierung identifiziert (Abb.: 3.9.2) und anhand ihrer Flächen in der UV-Detektion bzw. im SRM- oder MS<sup>2</sup>-TIC mittels der Referenzsubstanzen ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL quantifiziert. Für die Metabolismusuntersuchungen stand die Probe von einem Tier zur Verfügung. Dieses zeigte jedoch gegen Ende des Experimentes keinen kontinuierlichen Gallenfluss, was zu stark schwankenden Probenvolumina der einzelnen Fraktionen führte.

In allen Fraktionen konnten ZEN und sein reduktiver Metabolit  $\alpha$ -ZEL in moderaten Mengen detektiert werden.  $\beta$ -ZEL (Abb.: 3.9.1 A) sowie die oxidativ gebildeten Metabolite: 6 $\alpha$ -HO-ZEN, 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL (Abb.: 3.9.1 B) und die MPs: MP-2 und MP-4 (Abb.: 3.9.1 C) konnten in Spuren nachgewiesen werden. Die Abschätzung der Gehalte der detektierten Metabolite ergab, dass ca. 2% der eingesetzten Dosis wiedergefunden wurden.

Mit Hilfe des deuterierten ZEN-Standards D<sub>6</sub>-ZEN konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Probenvolumina zu Messungenauigkeiten führte. Mit abnehmendem Probenvolumen nimmt die Ionensuppression stark zu, wodurch die Peakflächen im MS-, SRM- und MS<sup>2</sup>-TIC und die damit durchgeführte Quantifizierung zu gering ausfallen. Ab der 1,5 h Fraktion betrug die Wiederfindung des zugesetzten internen Standards D<sub>6</sub>-ZEN weniger als 25%. Es wird vermutet, dass die Gallensalzkonzentration konstant bleibt während das exkretierte Gallenvolumen abnimmt. Die stark aufkonzentrierten Bestandteile in der Galle können die Ionisierung stören und zur Ionensuppression führen. Durch den nicht kontinuierlichen Gallenfluss ist auch keine kontinuierliche Ausscheidung der Metabolite gewährleistet, so dass es nicht möglich war kinetische Daten über die die Ausscheidung von ZEN und seinen Metaboliten über die Galle zu berechnen.

Die in vorliegender Arbeit gezeigten Ergebnisse aus der Untersuchung von Gallenproben zeigte, dass neben den bekannten reduktiven Metaboliten auch oxidative Metabolite *in vivo* gebildet werden.

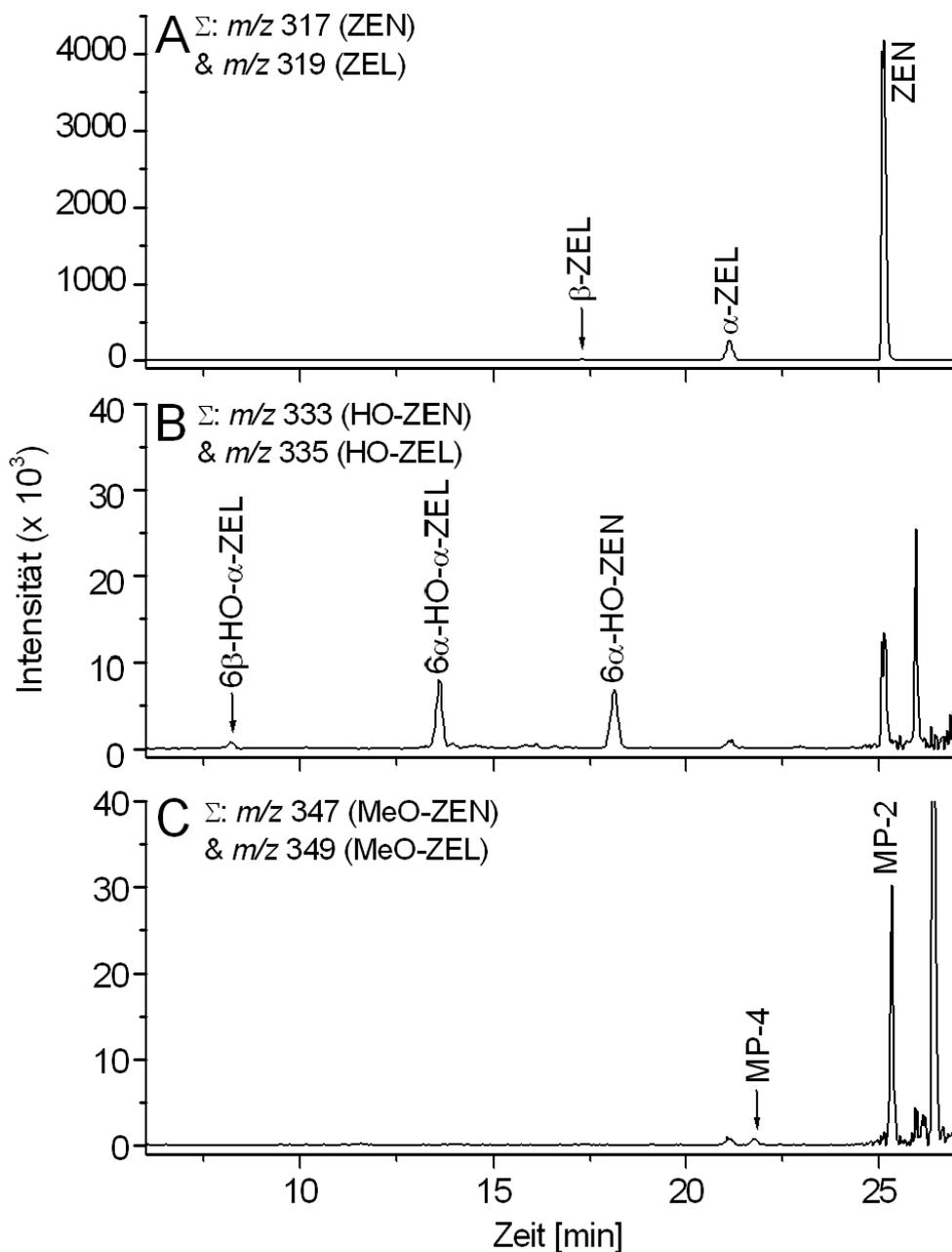


Abbildung 3.9.1.: Aus dem MS-TIC extrahierte Massenspuren von **A**: ZEN und reductiven Metaboliten, **B**: oxidativen Metaboliten und **C**: Methylierungsprodukten, detektiert in Galle einer Sprague-Dawley-Ratte, nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia*, 2,5 h nach Substanzapplikation. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 6.

Da es sich bei dem in der Galle detektierten oxidativen Hauptmetaboliten um das MP des Catechol 15-HO-ZEN handelt, ist dies ein indirekter Nachweis für die Bildung von reaktiven Catecholen *in vivo*. In der Literatur gibt es keine direkten Hinweise auf die Bildung oxidativer Metaboliten von ZEN oder seiner reduktiven Derivate. Allerdings könnten die nicht vollständigen Wiederfindungen in manchen Metabolismusuntersuchungen ein Hinweis auf nicht-detektierte oxidative Metabolite sein [Fitzpatrick et al., 1988; Dänicke et al., 2001]. Catechole, die zerfallen oder mit Zellbestandteilen, wie Proteinen und DNA abreagieren, können ebenfalls zu unvollständigen Wiederfindungen führen. Hinweise zur Catecholbildung *in vivo* finden sich in Untersuchungen zur Bildung von DNA-Addukten, welche in diesen Studien durch reaktive Catechole verursacht worden sein könnten [Zinedine et al., 2007; SCF, 2000].

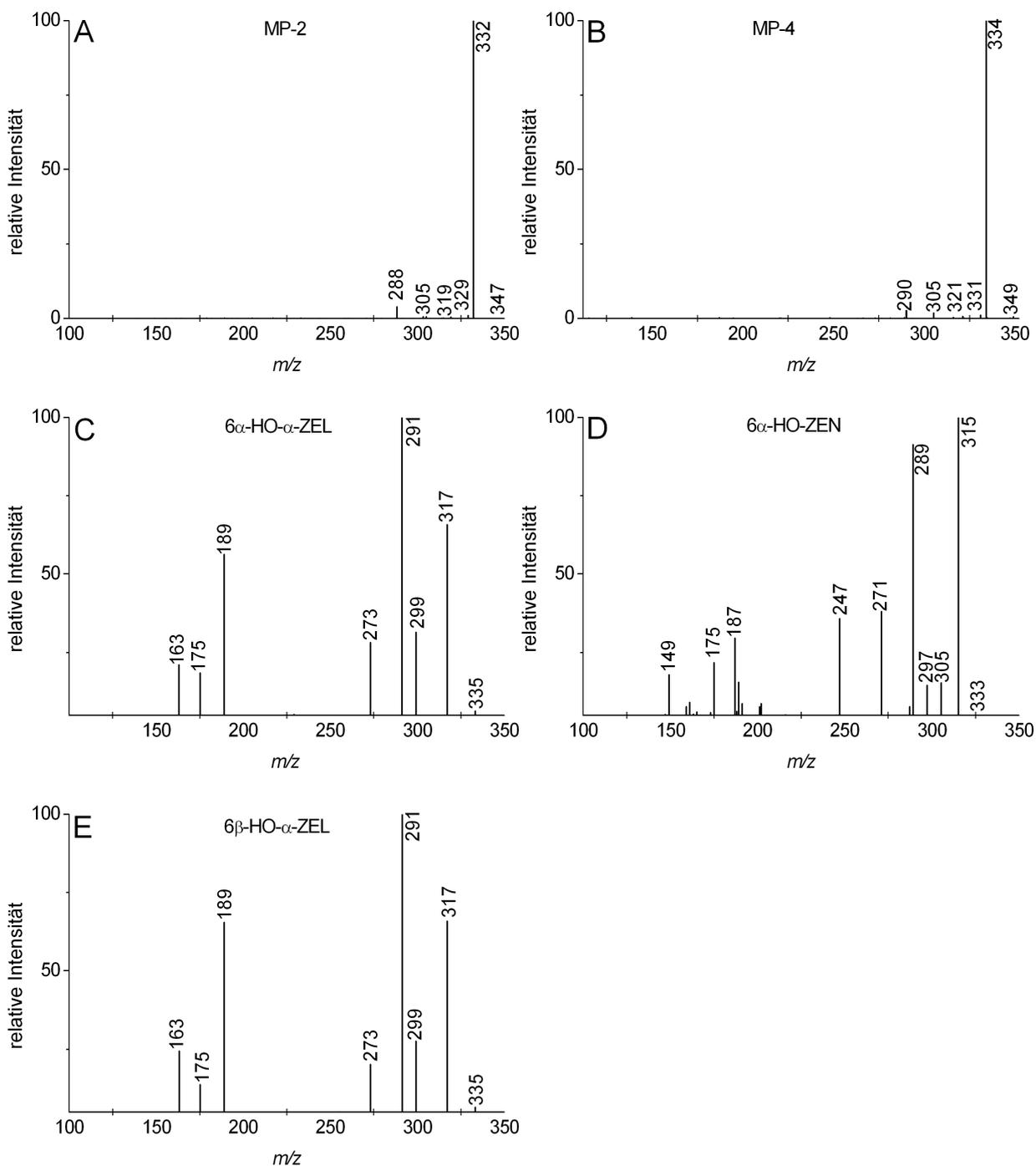


Abbildung 3.9.2.: APCI-MS<sup>2</sup>-Massenspektren der über die Galle ausgeschiedenen oxidativen Metaboliten nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix Pomatia*, **A**: MP-2, **B**: MP-4, **C**: 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL, **D**: 6 $\alpha$ -HO-ZEN und **E**: 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL

## 4. Zusammenfassung

Zearalenon (ZEN) ist ein von Fusarien produziertes, weit verbreitetes Mykotoxin mit estrogener Wirkung, das auch in unseren Breiten in Nahrungsmitteln, vor allem in Getreide und Getreideprodukten nachgewiesen wird. Das gesundheitliche Risiko für den Menschen kann bisher nur unzureichend abgeschätzt werden. Eine detaillierte Sicherheitsbewertung von ZEN ist derzeit nicht möglich, da die zuständigen Behörden die Datenlage als nicht ausreichend einschätzen. Die Ergebnisse von mehreren *in vivo* und *in vitro* Studien in verschiedenen Spezies weisen darauf hin, dass der Metabolismus einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität von ZEN hat. Bisher wurde in erster Linie der reduktive Metabolismus von ZEN untersucht, der zur Bildung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -ZEL führt. Ebenfalls gut untersucht ist der Phase II Metabolismus, der zur Konjugation von ZEN und seinen reduktiven Derivaten mit Glucuronsäure und Sulfat führt. Oxidativ gebildete Metabolite von ZEN sind bisher in erster Linie als Pilzmetabolite nachgewiesen worden und über deren Auftreten im Säugermetabolismus ist bisher nur sehr wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden der oxidative Metabolismus *in vitro* untersucht und seine *in vivo* Relevanz überprüft. In Inkubationen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen wurde gezeigt, dass neben den bekannten reduktiven Metaboliten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL zwei Hauptmetabolite und eine Vielzahl weiterer oxidativ gebildeter Metabolite entstehen. Mit Hilfe von authentischen Referenzsubstanzen konnte der mikrosomale Hauptmetabolit als 15-HO-ZEN identifiziert werden. Massenspektrometrische Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei dem zweiten Hauptmetaboliten um 6 $\alpha$ -HO-ZEN handelt. Für die chemischen Strukturen der übrigen, oxidativ gebildeten Metaboliten wurden mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen mögliche Strukturen ermittelt. Neben 6 $\alpha$ -HO-ZEN konnte das  $\beta$ -Stereoisomer dieses Metaboliten in moderater Menge nachgewiesen werden. Die Acyloinstruktur der 6-HO-ZEN Metabolite führt über eine Keto-Enol-Tautomerie bei physiologischem pH-Wert zur Bildung weiterer ZEN-Metabolite, von denen 6-Keto- $\alpha$ -ZEL in geringer Menge detektiert wurde. Eine Reduktionsreaktion an der Carbonylgruppe von ZEN bzw. die Hydroxylierung von ZEL-Derivaten führt zur Bildung monohydroxylierter ZEL-Metabolite. Von den mikrosomalen Hauptmetaboliten 15-HO-ZEN, 6 $\alpha$ -HO-ZEN und von 6 $\beta$ -HO-ZEN konnten die reduzierten  $\alpha$ -ZEL Derivate 15-HO- $\alpha$ -ZEL, 6 $\alpha$ -HO- $\alpha$ -ZEL und 6 $\beta$ -HO- $\alpha$ -ZEL in moderaten Mengen nachgewiesen werden. Weitere monohydroxylierte ZEN-Metabolite, die in geringeren Mengen detektiert wurden, waren 10 $\alpha$ -HO-ZEN, 5 $\alpha$ -HO-ZEN und ein HO-ZEN Metabolit mit unbekannter Hydroxylierungsposition. Die Catecholstruktur des mikrosomalen Hauptmetaboliten 15-HO-ZEN und seiner reduzierten ZEL-Derivate 15-HO- $\alpha$ -ZEL und 15-HO- $\beta$ -ZEL wurde durch Methylierung mit COMT bestätigt. Diese führt bei jedem Catechol zur Bildung von zwei Methylierungspro-

dukten (MP). Untersuchungen zum oxidativen Metabolismus von cis-ZEN zeigten, dass vorrangig die aromatischen Positionen hydroxyliert wurden. Neben 15-HO-cis-ZEN konnte hier auch 13-HO-cis-ZEN nachgewiesen werden, welches als ZEN-Äquivalent im ZEN-Metabolismus der Ratte in sehr geringen Mengen gebildet wurde.

Untersuchungen zum Phase II Metabolismus mit Zellfraktionen aus der Rattenleber zeigten, dass ZEN,  $\alpha$ - und  $\beta$ -ZEL effizient glucuronidiert und sulfatiert werden. Die aromatische Hydroxylgruppe an der C14-Position ist bei beiden Konjugationsreaktionen die bevorzugte Konjugationsposition. Die für die *in vitro* Sulfatierung gemessenen Enzymaktivitäten im Cytosol von Ratte und Mensch zeigten geringe Unterschiede in den Cytosolen beider untersuchten Spezies, jedoch stark unterschiedliche, substratabhängige Enzymaktivitäten der einzelnen ZEN-Derivate. Im Vergleich zum endogenen Substrat E<sub>2</sub> wurden die ZEN-Derivate von hepatischen Sulfotransferasen deutlich schneller sulfatiert und zeigten auch bei hohen Substratkonzentrationen keine inhibierenden Effekte auf die Sulfatierung. Die Untersuchung einzelner hSULT-Isoenzyme zeigte, dass das Metabolitenspektrum stark isoenzymabhängig sein kann. Die für ZEN gemessene Enzymaktivität für die Sulfatierung durch hSULT1E1 zeigte, dass ZEN von diesem Isoenzym schlechter sulfatiert wird als E<sub>2</sub>. Inwieweit die *in vitro* Sulfatierung von ZEN einen Einfluss auf die Sulfatierung endogener Substrate wie E<sub>2</sub> ausübt konnte nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Untersuchungen zum oxidativen Metabolismus von ZEN und cis-ZEN haben gezeigt, dass die Bildung von Catecholen *in vitro* einen Hauptmetabolisierungsweg in der Ratte darstellen. Unter *in vivo* Bedingungen tritt die Oxidation in Konkurrenz zu Reduktions- und Konjugationsreaktionen, so dass aus den *in vitro* Untersuchungen nicht abgeschätzt werden kann, inwieweit der oxidative Metabolismus von ZEN auch *in vivo* eine Relevanz besitzt. Die Bildung von ca. 10% oxidativen Metaboliten an der Gesamtmetabolitenmenge in Rattenleberschnitten zeigen, dass die Hydroxylierung von ZEN und  $\alpha$ -ZEL auch in Anwesenheit von Konjugationsreaktionen stattfindet. Die Untersuchung der in Rattenleberschnitten gebildeten Konjugate hat gezeigt, dass tendenziell vermehrt ZEN und seine Metabolite als Sulfatkonjugate vorlagen. Die Untersuchung von Gallenproben aus einem *in vivo* Versuch bestätigte, dass einige der im oxidativen *in vitro* Metabolismus nachgewiesenen Metaboliten auch *in vivo* gebildet werden. Dass die aromatische Hydroxylierung von ZEN und ZEL und damit die Bildung von Catecholen *in vivo* stattfindet, konnte indirekt durch den Nachweis der MPs gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten metabolischen Prozesse führten zur Identifikation von zwei toxiologisch relevanten Metabolitengruppen: die Catechole und Sulfatkonjugate von ZEN.

Catechole können zu reaktiven Quinonen oxidiert werden, welche elektrophile Substanzen darstellen, die mit Zellbestandteilen wie z.B. DNA, Proteinen, etc. reagieren können. Ebenfalls können Catechole durch "Redox-Cycling" oxidativen Stress induzieren und Zellen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies schädigen. Die Konjugation mit Sulfat kann bei allylständigen Hydroxylgruppen wie z.B. im Fall des oxidativ gebildeten Metaboliten 10 $\alpha$ -HO-ZEN, zur Bildung reaktiver Metabolite führen. Sulfat stellt bei diesen Metaboliten eine gute Abgangsgruppe dar, wobei ein elektrophiles Carbokation entsteht, das wie Quinone mit DNA, Proteinen, etc. reagieren kann.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Geräte und Hilfsmittel

<b>Biofreezer</b>	GFL, Burgwedel
<b>Kühlschrank</b>	Premium (Liebherr, Bulle, Schweiz)
<b>Evaporatorzentrifuge</b>	RC 10.10 mit Kühlfalle RCT 90 (Jouan GmbH, Unterhaching)
<b>N<sub>2</sub>-Abblas-Einheit</b>	Pierce Reakti-Therm Heating Module, No 18790
<b>pH-Meter</b>	CG 817 mit Elektrode BlueLine 12 (Schott AG, Mainz)
<b>Photometrie</b>	UV/Vis Photometer V-550 (Jasco); Software SpectraManager 1.53 M (Jasco, Groß-Umstadt); mit Thermostat Julabo 5 (Julabo Labortechnik, Seelbach); Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil R; Typ QS 1.000; Schichttiefe 10,00 mm (Hellma, Müllheim)
<b>UV-Lampe</b>	Camag (MuttENZ, Schweiz)
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 50 - 200 µl; 100 - 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
<b>Homogenisator</b>	Potter S, B. Braun (Biotech International)
<b>Schüttelinkubator</b>	Unitron, Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
<b>Zentrifuge</b>	Tischzentrifuge Mikroliter (Hettich GmbH und Co KG, Tuttlingen) NeoLab Mini-Zentrifuge
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf 5436 (Eppendorf, Hamburg)
<b>Magnetrührer</b>	IKAMAG RET-G (IKA Labortechnik, Staufen)
<b>Ultrazentrifuge</b>	Centrikon T-1080 (Kontron Instruments, (fixed angle) Rotor TFT 55.38)
<b>Megafuge</b>	1.0R (Heraeus, Hanau)
<b>Vortex</b>	Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
<b>Waagen</b>	Analysenwaage Sartorius handy; Typ H51 (Sartorius AG, Göttingen) Präzisionswaage Sartorius excellence; Typ E2000D (Sartorius AG, Göttingen)
<b>Zellfraktionierung</b>	Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Ultrazentrifuge (Beckman TL-100; Rotor TLA-45)
<b>Autoklav</b>	(RS Laborgeräte, Heidelberg)

<b>Tissue Slice-System</b>	Vitron Inc., Tucson, AZ, USA Schneideeinheit („Brendel/Vitron Tissue Slicer“) Rotationsinkubator („Dynamic Organ Culture Incubator“) Roller Inserts Typ A und C, Hohlzylinder
----------------------------	--

## 5.2. Verbrauchsmaterial

<b>Anaerocult</b>	Anaerocult A mini (Merck KGaA, Darmstadt) Anaerotest Stäbchen (Merck KGaA, Darmstadt)
<b>Halb-Mikro-Küvetten</b>	10 × 4 × 45 mm, Plastik (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Kryoröhrchen</b>	2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Mikrotiterplatten</b>	Nunclon 6-Well (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA)
<b>Pasteurpipetten</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Pipettenspitzen</b>	10, 100 und 1000 µl (Sarstedt, Nürnberg), 5000 µl (Eppendorf, Hamburg)
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 ml; 2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Sterilfilter</b>	0,22 und 0,45 µm (Roth, Karlsruhe)

## 5.3. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von Sigma/Aldrich/Fluka (Taufkirchen), VWR/Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Carl Roth (Karlsruhe) in der Reinheit mindestens „zur Analyse“ bezogen. Für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurde soweit nicht anders angegeben Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage (Serie Ultra Clear, SGWasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) verwendet.

**RAL Standards:**

<b>ZEN</b>	(Sigma/Aldrich/Fluka, Fermentek)
<b>ZEN-14-G</b>	Synthetisiert von Hannes Mikula, Uni Wien
<b>ZEN-14-S</b>	Synthetisiert von Hannes Mikula, Uni Wien
<b>D<sub>2</sub>-ZEN</b>	Synthetisiert von Benedikt Cramer, Uni Münster
<b>D<sub>6</sub>-ZEN</b>	Synthetisiert von Prof. M. Metzler
<b>α-ZEL</b>	(Sigma/Aldrich)
<b>β-ZEL</b>	(Sigma/Aldrich)
<b>5-HO-ZAN</b>	Yang et al., 2008

**Enzyme:**

<b>Isocitrat-Dehydrogenase</b>	Enzymsuspension, 127,5 U/ml (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>Lactat-Dehydrogenase</b>	aus Kaninchenmuskel, wässrige Lösung, 1071 U/ml (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>3α- und 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase</b>	(Serva)
<b>Alkohol-Dehydrogenase</b>	aus Pferdeleber (Roth)
<b>β-Glucuronidase Typ B-1</b>	aus Rinderleber, 1240000 U/g (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>Sulfatase Typ VI</b>	aus Acetobacter aerogenes, gepufferte wässrige Lösung, 10,85 U/ml (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>Sulfatase</b>	aus Helix Pomatia (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>hSULT1A1*1</b>	gepufferte wässrige Lösung, 10 µg/µl (Tebu-Bio)
<b>hSULT1A3</b>	gepufferte wässrige Lösung, 10 µg/µl (Tebu-Bio)
<b>hSULT1E1</b>	gepufferte wässrige Lösung, 10 µg/µl (Tebu-Bio)

**Gase:**

<b>Helium</b>	4.6 (Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Kohlendioxid</b>	(Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Kohlenmonoxid</b>	(Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Stickstoff</b>	5.0v (Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Wasserstoff</b>	5.0 (Air Liquide, Düsseldorf)

### 5.3.1. Versuchstiere und biologisches Material

Männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden in Standard-Käfigen unter einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h gehalten und bekamen Wasser und kommerzielles Labor-Futter ad libitum. Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g wurden für die Präparation von Präzisions-Gewebeschnitten und Zellfraktionen verwendet. Die Lebern von neun männlichen Wistar-Ratten, die für die Herstellung von Mikrosomen und Cytosol eingesetzt wurden, waren von der Abteilung für Bioanalytik der BASF-AG Ludwigshafen bereitgestellt.

### 5.3.2. Eluenten, Pufferlösungen und Kulturmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurde Aqua. bidest aus der Reinstwasseranlage verwendet.

#### 5.3.2.1. Eluenten

Für die Sulfatanalytik mit HPLC-DAD und LC-MS wurden gepufferte Eluenten in Anlehnung an Verheul et al. [2007] eingesetzt.

#### 5 mM Ammoniumacetatpuffer

0,386 g/l  $\text{NH}_4\text{Ac}$

in Aqua bidest. lösen und mit  $\text{HCOOH}$  auf pH 2,64 bzw. pH 4,0 einstellen.

#### 5.3.2.2. Allgemeine Pufferlösungen

#### 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 und pH 8,0

17,42 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

13,61 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Vorlegen der basischen Komponente und mit der sauren Komponente auf pH 7,4 bzw. pH 8,0 einstellen.

**0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0**

9,00 g/l HAc

14,72 g/l KAc

Vorlegen der basischen Komponente und mit der sauren Komponente auf pH 5,0 einstellen.

**5.3.2.3. Puffer für Präparation von Zellfraktionen****Mic-I-Puffer**

Reagenzien	mM	g/l
KCl	150	11,18
Tris	50	6,06
Na <sub>2</sub> EDTA × 2 H <sub>2</sub> O	1	0,372

Lösen, mit HCl konz. auf pH 7,4 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

**Mic-II-Puffer**

Reagenzien	mM	g/l
HEPES	25	5,960
Na <sub>2</sub> EDTA × 2 H <sub>2</sub> O	1,5	0,558
1,4-Dithiothreitol	1	0,154
NaCl	100	5,840

Lösen, mit NaOH auf pH 7,6 einstellen und nach Zugabe von 115 ml Glycerin (87%) mit entionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen.

**5.3.2.4. Puffer für Sulfotransferase-Assay mit SULT-Isoenzymen****0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4**8,70 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>6,80 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Vorlegen der basischen Komponente und mit der sauren Komponente auf pH 7,4 einstellen.

### Lagerpuffer für SULT-Isoenzyme

8,2 g/l NaCl + 1,42 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

8,2 g/l NaCl + 1,20 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Vorlegen der basischen Komponente und mit der sauren Komponente auf pH 7,4 einstellen.

### 5.3.2.5. Puffer und Kulturmedium für Präzisions-Gewebeschnitte

#### Krebs-Henseleit-Puffer (auf Natrium-Bicarbonat-Basis)

Reagenzien	mM	g/l
NaCl	118,0	6,9
KCl	4,8	0,36
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,95	0,13
NaHCO <sub>3</sub>	23,8	2,0
D-Glucose	25,0	4,5
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	1,2	0,295
CaCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	2,89	0,498
Gentamicin (50 mg/ml)	50 mg/l	1ml/l

Der pH-Wert wird mit NaOH oder HCl auf pH 7,2 eingestellt und sterilfiltriert (pH-Wert nach Sterilfiltration 7,4).

#### Kulturmedium nach Waymouth

Reagenzien	mM	g/l
Waymouth MB 752/1	-	13,84
NaHCO <sub>3</sub>	26,67	2,24
L-Glutamin	2,40	0,35
Gentamicin (50 mg/ml)	50 mg/l	1 ml/l

Lösen in Aqua bidest., sterilfiltrieren und gegebenenfalls Zusatz von 10% FKS je nach Inkubationsart und -zeit.

## 5.4. Methoden

### 5.4.1. Analytische Methoden

#### 5.4.1.1. HPLC/DAD

Diese Analysenmethode wurde eingesetzt für die Chromatographie und Detektion von ZEN, cis-ZEN, der reduktiven Metaboliten  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL sowie der oxidativen Metabolite und MPs

**Anlage:** Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie HP 1100 mit Degaser, binärer Pumpe und Dioden-Array-Detektor (DAD); die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software HP ChemStation, Version Rev.A.07.01 (Agilent Technologies, Waldbronn).

**Manueller Injektor:** Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)

**Vorsäulen:** SecurityGuard KJ0-4282, C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)

**Säule:** RP Luna 5u C18 (2), 250 × 4,6 mm i.d., 5  $\mu$ m Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 1 ml/min

**Eluent A:** Aqua bidest.; pH 3,0 mit konz. HCOOH eingestellt

**Eluent B:** Acetonitril (Acros Organics BVBA, Geel, Belgien)

**Gradient:**

Zeit (min)	0	30	33	39	40	42
Eluent A (%)	70	30	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	70	100	100	30	30

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 236 , 280 und 316 nm

#### 5.4.1.2. HPLC/UV

Diese Analysenmethode wurde eingesetzt für die Chromatographie und Detektion von ZEN-,  $\alpha$ -ZEL- und  $\beta$ -ZEL-Sulfaten.

**Anlage:** Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie Beckman System Gold mit binärer Pumpe (125 Solvent Module) und UV/Vis-Detektor (166); die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Beckman 32 Karat, Version 7.0.

**Manueller Injektor:** Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)

**Vorsäulen:** Uptight C-135B (Upchurch Scientific, Inc.), gefüllt mit VYDAC SC-201 RP, 30-40  $\mu\text{m}$  Partikelgröße (Macherey-Nagel)

**Säule:** RP Luna 5u C8 (2), 250  $\times$  4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 1 ml/min

**Eluent A:** 5 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4,0

**Eluent B:** MeOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	30	35	36	40
Eluent A (%)	70	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	100	100	30	30

**UV-Detektion:** ZEN-S: 260 nm,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL: 280 nm

#### 5.4.1.3. LC-MS

HPLC-System mit LC/MS-Komplettsystem Finnigan Surveyor, Thermo Electron Cooperation mit Autosampler; Massenspektrometer LXQ von Thermo Fischer. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software XKalibur (Thermo Fischer).

#### Methode 1

ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, oxidative Metabolite und MPs

**Vorsäulen:** SecurityGuard KJ0-4282, C18 (ODS), 4,0  $\times$  3,0 mm i.d. (Phenomenex)

**Säule:** RP Luna 3u C18 (2), 125  $\times$  4,6 mm i.d., 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500  $\mu\text{l}$ /min

**Eluent A:** H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH

**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	1	21	22	25	27	31
Eluent A (%)	70	70	50	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	30	50	100	100	30	30

**Detektion:**

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 236, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 1, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-800

**SRM-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z->det.m/z):** 317->273, 319->275, 333->191, 333->187, 333->203, 333->289, 335->219, 335->189, 335->291, 347->217, 349->219

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z):** 317, 319, 333, 335, 347, 349, 351, 363, 365

**Methode 2**

Untersuchung ZEN und MPs

**Vorsäulen:** SecurityGuard KJ0-4282, C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)

**Säule:** RP Luna 3u C18 (2), 125 × 4,6 mm i.d., 3 µm Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500 µl/min

**Eluent A:** H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH

**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	15	16	20	21	25
Eluent A (%)	30	30	0	0	30	30
Eluent B (%)	70	70	100	100	70	70

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 236, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 1, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-800

**SRM-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z->det.m/z):** 317->273, 347->217

**Methode 3**

Untersuchung Glucuronide

**Vorsäulen:** SecurityGuard KJ0-4282, C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)

**Säule:** RP Luna 3u C18 (2), 125 × 4,6 mm i.d., 3 µm Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500 µl/min

**Eluent A:** H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH

**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	1	21	22	25	27	31
Eluent A (%)	70	70	50	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	30	50	100	100	30	30

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 236, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 1, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-800

**SRM-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**SRM (m/z->det.m/z):** 317->273, 493->317, 495->319, 509->333, 511->335, 523->347, 525->349, 671->495->319

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.-1: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z):** 495

**MS<sup>3</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.-1: 30; Coll. E.-2: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z):** 493/317, 495/319, 509/333, 511/335, 523/347, 525/349

#### Methode 4

Untersuchung Sulfate

**Vorsäulen:** SecurityGuard KJ0-4282, C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)

**Säule:** RP Luna 5u C18 (2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500 µl/min

**Eluent A:** 5 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer, + HCOOH pH 2,63

**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH

#### Gradient:

Zeit (min)	0	30	35	35,1	40
Eluent A (%)	70	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	100	100	30	30

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 260, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 2, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-800

**SRM-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z->det.m/z):** 397->317, 399->319, 413->333, 415->335, 427->347, 429->349, 575->495/399->319

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.-1: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion (m/z):** 397, 399

**Für durchgeführte MS<sup>3</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.-1: 25; Coll. E.-2: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Aktivtion

**Detektion (m/z):** 397/317, 399/319, 413/333, 415/335, 427/347, 429/349

## Methode 5

Fäzessuspensionsinkubationen

**Vorsäulen:** Uptight C-135B (Upchurch Scientific, Inc.), gefüllt mit VYDAC SC-201 RP, 30-40 µm Partikelgröße (Macherey-Nagel)

**Säule:** RP Luna 5u C18 (2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500 µl/min

**Eluent A:** H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH

**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	30	35	35,1	40
Eluent A (%)	70	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	100	100	30	30

**Detektion für ZEN:**

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 236, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 1, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-800

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms

**Detektion (m/z):** 291, 317, 319, 321, 335

**Detektion für MAT:**

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 228, 282

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 3, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:**

**Detektion (m/z):** 100-500

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms

**Detektion (m/z):** 297, 311, 313, 325, 327, 329, 341, 343, 357

**Detektion für DAI:**

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 249, 301

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 4, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:****Detektion (m/z):** 100-500**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen:****Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms**Detektion (m/z):** 241, 253, 255, 257**Methode 6**ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, oxidative Metabolite und MPs in Gallenproben**Vorsäulen:** Uptight C-135B (Upchurch Scientific, Inc.), gefüllt mit VYDAC SC-201 RP, 30-40  $\mu$ m Partikelgröße (Macherey-Nagel)**Säule:** RP Luna 3u C18 (2), 125  $\times$  4,6 mm i.d., 3  $\mu$ m Partikelgröße (Phenomenex)**Flussrate:** 500  $\mu$ l/min**Eluent A:** H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH**Eluent B:** Acetonitril + 0,1% HCOOH**Gradient:**

Zeit (min)	0	1	21	22	25	27	31
Eluent A (%)	70	70	50	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	30	50	100	100	30	30

**DAD-Detektion:** 200-600 nm**UV-Detektion:** 236, 280, 315**MS-Detektion:** APCI mit negativer Ionisierung (Tune 5, siehe Anhang Tab.: A.4)**Full Scan Untersuchung:****Detektion (m/z):** 100-800

**SRM-Untersuchungen:**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Widht: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation

**Detektion** (m/z->det.m/z): 317->273, 319->275, 323->279 (Iso. Width: 5,2), 333->289, 335->291, 347->217, 349->219

**MS<sup>2</sup>-Untersuchungen**

**Fragmentierung:** CID; Iso. Widht: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms;

**Detektion** (m/z) 317, 319, 323 (Iso. Width 5,2), 333, 335, 347, 349

**Methode 7**

Untersuchung E<sub>2</sub>-Sulfate

**Vorsäulen:** Uptight C-135B (Upchurch Scientific, Inc.), gefüllt mit VYDAC SC-201 RP, 30-40 µm Partikelgröße (Macherey-Nagel)

**Säule:** RP Luna 5u C18 (2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex)

**Flussrate:** 500 µl/min

**Eluent A:** 5 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer, + HCOOH pH 4,0

**Eluent B:** MeOH

**Gradient:**

Zeit (min)	0	30	35	35,1	40
Eluent A (%)	70	0	0	70	70
Eluent B (%)	30	100	100	30	30

**DAD-Detektion:** 200-600 nm

**UV-Detektion:** 269, 280, 315

**MS-Detektion:** ESI mit negativer Ionisierung (Tune 6, siehe Anhang Tab.: A.4)

**Full Scan Untersuchung:****Detektion** (m/z): 100-800**SRM-Untersuchungen****Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.: 35; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Activation**Detektion** (m/z->det.m/z): 351->271**MS<sup>3</sup>-Untersuchungen:****Fragmentierung:** CID; Iso. Witdth: 1,2; Coll. E.-1: 35; Coll. E.-2: 60; Act.Q: 0,250; Act. time: 30000 ms; Wideband Aktivation**Detektion** (m/z): 351/271**5.4.1.4. GC-MS**

GC/MS-System GCQ der Firma Thermo-Finnigan mit Iontrap. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software XKalibur (Thermo Fischer).

**Trägergas:** Helium**Säule:** MDN-5S fused-silica, 29,3 m, 0,25 mm i. d., 0,25 µM Filmdicke**Injektorprogramm:** Splitless-Injektion, 1 min 30 sec  
Anfangstemperatur: 60°C  
Aufheizrate: 8°C/sec.  
Endtemperatur: 275°C**Transferdruck:** 83 kPA**Ionisation:** Electron Impact (EI) bei 70 eV**Massenbereich:** 50-800

**Temperaturprogramm (für MS- und MS/MS –Modus):**

Zeit [min]	0	1	3	17,5	27,5
Temperatur [°C]	60	60	150	295	295
Heizrate [°C/min]	0	30	10	0	0

**Derivatisierung:**

Ein Aliquot, der wie in Kap.: 5.4.2.1 beschrieben, isolierten Fraktion wird quantitativ in ein GC-Vial überführt. Das Lösungsmittel der fraktionierten Metabolite wird zunächst im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand mit 10 bis 20  $\mu\text{l}$  BSTFA bzw. 5  $\mu\text{l}$  deuteriertem BSA aufgenommen. Die Derivatisierungsreaktion verläuft mind. 3 h bei Raumtemperatur. Nach Verdünnung eines Aliquotes auf einen ungefähren Gehalt von 6 ppm mit n-Heptan wird die Lösung in die GC/MS injiziert.

**5.4.2. Isolation und Darstellungen von ZEN-Metaboliten**

**5.4.2.1. Isolation von Metaboliten mit der HPLC**

Für spektrometrischen Charakterisierung oder weitere enzymatische Biotransformationen wurden Peaks und die darin enthaltenen Metabolite mit der HPLC isoliert. Hierfür wurde die chromatographische Trennung im Vorfeld optimiert um möglichst den Peak isoliert zu fraktionieren. Für die Fraktionierung wurde die Probe dann mittels HPLC analysiert. Die einzelnen Fraktionen werden getrennt nach deren Elution und Detektion gesammelt. Am Evaporator wird anschließend das aus dem Eluenten stammende Acetonitril min. 30 min lang aus dem Acetonitril-Wasser-Gemisch entfernt und der wässrige Rückstand dreimal mit je 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden zur Trockene eingeeengt und der feste Rückstand in 50  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Anschließend erfolgt eine Reanalyse eines Aliquotes der Fraktion, um den Peak auf Veränderungen und Verunreinigungen zu überprüfen. Für den Einsatz zur spektrometrischen Charakterisierung mittels GC-MS oder LC-MS wird der methanolische Extrakt verwendet. Für den Einsatz in weiteren Umsetzungen mit Zellfraktionen wird das MeOH am Evaporator entfernt und der Rückstand in DMSO aufgenommen.

**5.4.2.2. Photochemische Reaktionen**

Für die photochemische Reaktion wurde in Anlehnung an Peters [1972] ZEN bzw.  $\alpha$ -ZEL (10  $\mu\text{M}$ ) in methanolischer Lösung in einer Quarzküvette UV-Licht der Wellenlängen 254 nm, 366 nm und

bei Laborlichtverhältnissen ausgesetzt und nach Reaktionszeiten von 1 h, 2 h und 6 h bzw. bei Laborlichtverhältnissen von 24 h, 48 h und 72 h nach Entfernung des Lösungsmittels und Aufnahme in 100  $\mu$ l MeOH mit Hilfe der LC-DAD analysiert. Zur Kontrolle wurde ZEN bzw.  $\alpha$ -ZEL (10  $\mu$ M) identisch jedoch unter Lichtausschluss behandelt.

#### 5.4.2.3. Chemische Hydrolyse

Die nach einer hydrolytische Spaltung des Laktorings zu erwartenden ZEN-Metaboliten wurden durch chemische Hydrolyse hergestellt. Hierfür wurden 50  $\mu$ M ZEN in 1 M NaOH für 2 h gespalten. Das Reaktionsgemisch wurde direkt und nach Neutralisation mit wässriger 1 M HCl mit  $3 \times 500$   $\mu$ l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Analyse des Extraktes erfolgt dann mit HPLC-DAD oder der LC-MS.

#### 5.4.2.4. Enzymatische Reduktion / Oxidation

##### Oxidationen und Reduktionen mit ADH und HSD

Oxidative und reduktive Umsetzungen von RALs wurden mit der ADH aus Pferdeleber und einem Gemisch aus  $3\alpha$ - und  $3\beta$ -HSDs untersucht. Das als Cofaktor benötigte NADH bzw.  $\text{NAD}^+$  wurde mit Hilfe eines NADH bzw.  $\text{NAD}^+$  generierenden Systems bereitgestellt:

Komponente	Konzentration	Volumen/Einwaage
NADH		3,3 mg
Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	74,8 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> Lsg	1 M	12,7 $\mu$ l
Pyruvat- bzw. Lactat-Lsg	2,33 M	11,4 $\mu$ l
Lactat-Dehydrogenase	127 U/ml	1,2 $\mu$ l
Gesamtansatz		100 $\mu$ l

Für Oxidationen wurde NADH und Milchsäure eingesetzt und für Reduktionen NADH und Pyruvat. Die Inkubation wird in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) durchgeführt. Der Inkubationsansatz unter Verwendung von  $3\alpha$ - und  $3\beta$ -HSD setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	905
Substanz in DMSO	10 mM	10
3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ -HSD	5 U/ml	50
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
NADH bzw/ NAD <sup>+</sup> generierendes System		35
Inkubation für 120 min bei 37°C		
Gesamtansatz		1000

Der Inkubationsansatz unter Verwendung von ADH setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	955
Substanz in DMSO	10 mM	10
ADH	1 mg	1 mg
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
NADH bzw. NAD <sup>+</sup> generierendes System		35
Inkubation für 40 min bei 37°C		
Gesamtansatz		1000

Die Inkubation wird durch Zugabe des NADH bzw. NAD<sup>+</sup> generierendes System gestartet und für 40 min bzw. 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Inkubationsansatz durch Zugabe von ca. 500  $\mu$ l Ethylacetat abgestoppt und mit 3 $\times$ 500  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Analyse des Extraktes erfolgt dann mit HPLC-DAD oder der LC-MS.

### Oxidationen und Reduktionen mit RLC

Da in hepatischem Cytosol ein Gemisch aus zahlreichen Oxido-Reduktasen vorhanden ist, kann für die Oxidation/Reduktion auch Cytosol aus der Leber männlicher Wistar-Ratten verwendet werden. Das als Cofaktor für die Reduktion benötigte NADPH wird mit einem NADPH generierenden System bereitgestellt:

Komponente	Konzentration	Volumen/Einwaage
NADPH		3,2 mg
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	66,3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> Lsg	1 M	12,7 $\mu$ l
Isocitrat-Lsg	2,33 M	11,4 $\mu$ l
Isocitrat-Dehydrogenase	127 U/ml	9,6 $\mu$ l
Gesamtansatz		100 $\mu$ l

Für die Oxidation von Metaboliten wurde ein NADP<sup>+</sup> generierendes System verwendet. Die Inkubation erfolgt in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Ein Ansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	926
Substanz in DMSO	10 mM	10
cytosolisches Protein Wistar Ratte $\sigma$	1 mg	29
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
NADPH oder NADP <sup>+</sup> generierendes System		35
Inkubation für 40 min bei 37°C		
Gesamtansatz		1000

Die Inkubation wird durch Zugabe des NADPH bzw. eines NADP<sup>+</sup> generierenden Systems gestartet und für 40 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Inkubationsansatz durch Zugabe von 500  $\mu$ l Ethylacetat abgestoppt und mit 3×500  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Analyse des Extraktes erfolgt dann mit HPLC-DAD oder der LC-MS.

#### 5.4.2.5. Chemische Reduktion

Die Reaktion wurde in 0,2 ml MeOH durchgeführt und durch Zugabe einer ca. zehnfach äquimolaren Menge Natriumborhydrid gestartet. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur bis zum Erliegen der Gasentwicklung stehengelassen und anschließend mit wässriger 1 M HCl neutralisiert. Der Reaktionsansatz wird mit 3×500  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Analyse des Extraktes erfolgt dann mit HPLC-DAD oder der LC-MS.

#### 5.4.2.6. Katalytische Hydrierung

Eine Lösung des zu hydrierenden Metaboliten 5 $\alpha$ -HO-ZEN gelöst in 2 ml MeOH wurde mit etwa 5 mg eines PtO<sub>2</sub>-Katalysators versetzt und unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei Raumtemperatur für ca. 18 h gerührt. Durch Zentrifugation wurde der Katalysator abgetrennt. Die Analyse und Charakterisierung der Produkte erfolgt mit LC-MS.

### 5.4.3. Fermentation mit intestinalen Bakterien

#### 5.4.3.1. Bakteriengewinnung aus humanem Fäzes

Die Präparationen der Fäzes-Suspensionen fand in Anlehnung an die Arbeiten von Meselhy et al. [1997] und Wang et al. [2000] statt. Der Fäzesanteil der Suspension betrug 5% (m/v), was etwa physiologischen Bedingungen im Dünndarm entspricht. Alle Arbeiten erfolgten auf Trockeneis, um während der gesamten Aufarbeitung eine anaerobe Atmosphäre zu garantieren. Die frischen Stuhlproben wurden schnellstmöglich in Anwesenheit von Trockeneis gelagert und das Gewicht der Fäzes bestimmt. Danach wurde die Fäzes mit Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,4; mit N<sub>2</sub> begast) im BRAUN-Potter homogenisiert und pro 5 g mit 50 ml Puffer aufgefüllt. Nach der Filtration durch eine Mullbinde wurde das Filtrat auf 100 ml aufgefüllt und zu je 2 ml aliquotiert. Diese Aliquote wurden bis zur Inkubation bei -80°C gelagert.

#### 5.4.3.2. Inkubationsbedingungen

Die anaerobe Inkubation der Fäzesproben erfolgte in 6-Well Platten bei 37°C in anaerober Atmosphäre eines Schwenkinkubators bei 100 rpm. Die Inkubationszeit betrug 24, 48 und 72 h [Karppinen et al., 2000].

#### Lösungen:

Spurenelementsuspension: 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O, 4 mM CoCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 30 mM FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O in 250 ml H<sub>2</sub>O lösen

Reduzierendes Medium: 25 mM Na<sub>2</sub>S × 9 H<sub>2</sub>O und 170 µl 1 M NaOH in 4 ml H<sub>2</sub>O lösen

#### Inkubationsansatz:

Reagenzien:	Volumen [µl]:
Kalium-Phosphat-Puffer	328
Testsubstanz in DMSO	10
Spurenelementlösung	2
Reduzierendes Medium	60
Fäzessuspension	600
Gesamtansatz	1000

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Fäzessuspension gestartet. Das anaerobe Millieu wurde mit Hilfe des Anaerocult A-Kits hergestellt und mit den dazugehörigen Anaerotest-Stäbchen (Merck, Darmstadt) kontrolliert. Die Fermentation wurde nach Inkubationsende durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  ortho-Phosphorsäure abgestoppt, die Probe in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Aceton versetzt, um lipophile Metabolite von den Feststoffen zu lösen. Anschließend wurden die festen Bestandteile der Suspension abzentrifugiert und abgetrennt. Das Aceton wurde im Evaporator aus dem Überstand entfernt. Die wässrige Phase wurde 3 $\times$  mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach dem Einengen zur Trockene am Evaporator wurde der Rückstand in 200  $\mu\text{l}$  MeOH aufgenommen und mittels LC-MS analysiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Parallel durchgeführte Kontrollinkubationen wurden sowohl mit DMSO (Leerwert) als auch mit autoklavierter Fäzessuspension (30 min bei  $121^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt (Substanzkontrolle). Die Wiederfindung in der Substanzkontrollen wurden in Relation zu einem externen Standard berechnet. Die Quantifizierung von ENL in den Leerwerten und den Substanzinkubationen von MAT erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die mit der authentischen Referenzsubstanz erstellt wurde. Für die Berechnung wurden die  $\text{MS}^2$ -Flächen verwendet. Der experimentiell ermittelte Faktor zur Umrechnung der  $\text{MS}^2$ -Fläche in eine theoretische UV-Fläche beträgt für eine ENL-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  0,23. Die Quantifizierung erfolgte mit den so berechneten theoretischen UV-Flächen an einer erstellten Kalibriergeraden für ENL (Anhang Tab.: A.1).

#### 5.4.4. Inkubationen in Zellfraktionen

##### 5.4.4.1. Präparation von Zellfraktionen aus Lebergewebe

Die Isolierung von Mikrosomen und Cytosol wurde aus Leber unbehandelter männlicher Wistar-Ratten (200-300 g Körpergewicht) in Anlehnung an Lake [1987] vorgenommen. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Rattenlebern wurde auf Eis aufgetaut und in eisgekühltem Mic-I-Puffer gewogen, mit einer Schere grob zerkleinert und mit der dreifachen Menge (W/V) Mic-I-Puffer unter Eiskühlung im BRAUN-Potter bei ca. 500 rpm homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenats bei  $9000 \times g$  (15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurden grobe Zellbestandteile (nicht aufgebrochene Zellen, Zellkerne, Mitochondrien etc.) abgetrennt. Ein kleiner Teil des Überstands (sog. S9-Fraktion) wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die S9-Fraktion wurde bei  $105000 \times g$  für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das erhaltene Mikrosomen-Pellet wurde resuspendiert. Der nicht aufschlammbare Glykogen-Rückstandes wurde verworfen. Die Suspension wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 60 min bei  $105000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand (Cytosol) abdekantiert und gemischt. Das Pellet (Mikrosomen) wurde in Mic-II-Puffer (0,75 ml/g Leber) aufgenommen und homogenisiert. Die Zellfraktionen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 5.4.4.2. Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung der Zellfraktionen wurde nach der Methode von Bradford [1976] durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in sauren Milieu an Proteine bindet und dies zu eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm führt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wird die Extinktionsänderung bei 595 nm gemessen.

#### Lösungen:

10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 5 ml Ethanol lösen, 10 ml ortho-Phosphorsäure (85%) zugeben und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen und filtrieren .

Eine geeignete Verdünnung der Proteinprobe wurde in 100 µl entionisiertem Wasser hergestellt und mit 1 ml der Farbstofflösung durchmischt. Die photometrische Messung erfolgte nach 5 min bei Raumtemperatur bei 595 nm gegen den Reagenzienblindwert. Die externe Kalibrierung erfolgte zwischen 1-150 µg/ml Protein mit BSA als Standard. Die Standardlösungen und die Proben wurden jeweils als Dreifachbestimmung ausgeführt.

#### 5.4.4.3. Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts

Der CYP-Gehalt der Lebermikrosomen wurde in Anlehnung an Omura und Sato [1964a und 1964b] anhand des Kohlenmonoxid-Differenzspektrums nach Dithionit-Reduktion bestimmt. Die Bestimmung beruht darauf, dass die Bindung von Kohlenmonoxid an das zweiwertige Eisen der prosthetischen Gruppe der Cytochrome eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm nach 450 nm bewirkt. Diese Verschiebung ist photometrisch messbar. 100 µl Mikrosomensuspension wurden mit 2,0 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 verdünnt und jeweils 850 µl dieser Lösung in zwei Halb-Mikro-Küvetten überführt, welche für 5 min im Photometer bei Raumtemperatur equilibriert wurden. Nach Aufnahme der Nulllinie zwischen 400-500 nm wurden beide Lösungen mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt und in die Messküvette zusätzlich 40 s lang Kohlenmonoxid eingeleitet und erneut ein Differenzspektrum zwischen 400-500 nm aufgenommen. Die Berechnung des Gesamt-Cytochrom-Gehalts erfolgte gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 91 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 5.4.4.4. Oxidativer Metabolismus in Mikrosomen

Für die Untersuchung des CYP450 abhängigen Phase-I-Metabolismus wurden Inkubation von ZEN und der reductiven Derivate  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Als Enzyme wirken hier diverse CYP450-Monooxygenasen, welche als Coenzym NADPH benötigen. Dies wird in Form eines NADPH generierendes System zur Verfügung gestellt (Kap.: 5.4.2.4).

Die Inkubation wird in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) durchgeführt. Der Inkubationsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [µl]</b>
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	920
Substanz in DMSO	10 mM	5
mikrosomales Protein Wistar Ratte ♂	1 mg	40
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
NADPH-generierendes System (frisch angesetzt)		35
Inkubation für 40 bzw. 60 min bei 37°C		
Gesamtansatz		1000

Die Endkonzentration an Substrat im Inkubationsansatz beträgt 50 bzw. 100 µM. Der DMSO-Gehalt beträgt 0,5 bzw. 1%. Phosphatpuffer, Mikrosomen und Substanz in DMSO werden bei 37°C im Thermomixer 5 min vorinkubiert. Anschließend erfolgt durch Zugabe des NADPH-generierenden Systems der Start der Reaktion. Die Inkubationsdauer beträgt 40 bzw. 60 min bei 37°C. Die Inkubation wird durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat abgestoppt. Die Inkubationslösung wird mit zweimal 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden am Evaporator zur Trockenheit eingengt und der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen. Es folgt die Analyse mit HPLC-DAD oder LC-MS. Kontrollansätze wurden entweder ohne Cofaktor, bei denen das NADPH-generierende System durch Puffer ersetzt wurde oder mit hitzdenaturierten Mikrosomen durchgeführt.

#### 5.4.4.5. COMT-Assay

Die Konjugation von oxidativ gebildeten Catecholmetaboliten mit SAM wurde im COMT-Assay untersucht. Das Enzym COMT ist im Cytosol enthalten, weshalb die hepatische Cytosolfraktion aus männlichen Wistar Ratten eingesetzt wurde. Die Catecholmetabolite wurden wie in Kap.: 5.4.2.1 beschrieben mit Hilfe der HPLC isoliert und in DMSO aufgenommen. Der Inkubationsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [µl]</b>
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	940
Substanz in DMSO	10 mM	5
cytosolisches Protein Wistar Ratte ♂	1 mg	30
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
SAM	20 mM	25
Inkubation für 40 bzw. 60 min bei 37°C		
Gesamtansatz		1000

In die entsprechende Menge Kaliumphosphatpuffer werden das Cytosol und die Substanz in DMSO zugegeben. Die Inkubationsansatz wird für 5 min bei 37°C vorinkubiert und durch Zugabe von SAM wird die Inkubation gestartet. Der vollständige Ansatz wird dann für 40. bzw 60 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienen Ansätze ohne SAM. Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von Ethylacetat abgestoppt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden am Evaporator bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand mit 50 µl MeOH aufgenommen. Die Analyse der Extrakte erfolgte dann mit HPLC-DAD bzw. LC-MS.

#### 5.4.4.6. Glucuronyltransferase-Assay

Der Glucuronyltransferase-Assay dient zur Glucuronidierung von Substraten unter Verwendung von Mikrosomen und UDPGA als Cofaktor. Um die Ausbeuten an Glucuroniden zu erhöhen, wurde der Porenbildner Alamethicin in Anlehnung an die Methode von Fisher et al. [2000] zugesetzt. Der Inkubationsansatz mit einem Endvolumen von 0,2 ml in Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M) pH 7,4 setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [µl]
Alamethicin-Stammlösung	(5x)	50
mikrosomales Protein Wistar Ratte ♂	1 mg	10
Inkubation für 10 min auf Eis		
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	130
Substanz in DMSO	10 mM	2
Mikrosomen in Alamethicin		48
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
UDPGA-Lsg	40 mM	20
Inkubation für 40 min bei 37°C		

Der Inkubationsansatz enthielt das Substrat (100 µM) in DMSO (Endkonzentration 1%). Die Mikrosomen werden mit dem Porenbildner Alamethicin 15 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend werden Phosphatpuffer, Mikrosomen/Alamethicin Lsg., Substanz in DMSO gemischt und nach Vorinkubation von 5 min bei 37°C im Thermomixer wird die Reaktion durch Zugabe von UDPGA-Lösung gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 40 min wird der Inkubationsansatz durch Zugabe von 25 µl 20%iger TCA-Lsg. abgestoppt. Die Mischung wird mit 25 µl 1 M NaOH rückneutralisiert. Alternativ wurde mit dem gleichen Volumen Aceton abgestoppt. Die ausgefällten Proteine werden abzentrifugiert und der Überstand zur Analyse in der LC-MS eingesetzt. Die Inkubationen erfolgen als Doppelbestimmungen. Es wird ein Blindwert mitgeführt, bei dem der Cofaktor UDPGA durch Puffer ersetzt wird.

#### 5.4.4.7. Sulfotransferase-Assay

Die Sulfatierungen mit Rattenlebercytosol fanden in Anlehnung an Asai und Miyazawa [2000] statt. Die Inkubationen wurden in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt und setzte sich z.B. für die Inkubation mit Rattencytosol wie folgt zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	186,9
Substanz in DMSO	10 mM	2,2
MgCl <sub>2</sub>	1 M	2,2
cytosolisches Protein, Wistar Ratte ♂	1 mg/ml	6,7
Gesamtansatz		198
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
180 $\mu$ l auf 20 $\mu$ l PAPS 4 mM pipettieren		
Inkubation für 2 bzw. 24 h bei 37°C		
Gesamtansatz		200

Der Inkubationsansatz enthielt das Substrat (100  $\mu$ M) in DMSO (Endkonzentration 1%), MgCl<sub>2</sub>-Lsg., das Protein (1 mg/ml für cytosolisches Protein und 1  $\mu$ g/ml für SULT-Isoenzyme) und wurde mit Kaliumphosphatpuffer auf 198  $\mu$ l aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 37°C vorinkubiert und gestartet indem 180  $\mu$ l auf die vorgelegte PAPS-Lösung pipettiert wurden. Je nach Experiment variierte die Inkubationszeit und die anschließende Aufarbeitungsmethode:

#### Method 1:

Für qualitative Untersuchungen in Ratten- und Humanlebercytosol wurde die Inkubation nach 2 bzw. 24 h durch Zugabe von 25  $\mu$ l 20%iger TCA-Lösung abgestoppt. Die Mischung wurde mit 25  $\mu$ l 1 M NaOH rückneutralisiert. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand zur Analyse in der HPLC-UV oder der LC-MS eingesetzt.

#### Method 2:

Für quantitative Untersuchungen und Inkubationen mit SULT-Isoenzymen wurde nach einer Inkubationszeit von 2 bzw. 24 h die Inkubation mit gleichem Volumen eisgekühltem Aceton abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand mit der HPLC-DAD oder der LC-MS analysiert.

### 5.4.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten für die Sulfatierung

#### 5.4.5.1. Enzymaktivität in Cytosol

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten in hepatischem Cytosol von Ratte und Mensch wurde der lineare Bereich der Produktbildung in Abhängigkeit der Inkubationszeit für die untersuchten Substrate ermittelt.

#### ZEN, $\alpha$ -ZEL und $\beta$ -ZEL

Wie in Kap.: 5.4.4.7 beschrieben wurde der Sulfatierungsassay durchgeführt und im Abstand von 15 min wurden ein 30  $\mu$ l Aliquot des Inkubationsansatzes entnommen und auf 30  $\mu$ l eisgekühltem Aceton abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurde abzentrifugiert und der Überstand mit HPLC-DAD untersucht. Die Quantifizierung erfolgte anhand der integrierten UV-Flächen der Sulfatmetabolitenpeaks an einer erstellten Kalibriergeraden für ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL (Anhang Tab.: A.1). Die linearen Bereiche der Produktbildung lagen bei allen drei Untersuchten RAL und in den Cytosolen beider untersuchter Spezies im Bereich von 0-60 min, so dass für die exakte Bestimmung der Enzymaktivität eine Inkubationszeit von 45 min gewählt wurde (Anhang Abb.: A.5.1). Für die exakte Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Sulfatierungsassay für alle drei untersuchten RALs (100  $\mu$ M) mit RLC und mit HLC mit jeweils 1 mg/ml cytosolischem Protein in einer 45 min Inkubation in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den quantifizierten Produktmengen wurde die Enzymaktivität in  $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung berechnet.

#### E<sub>2</sub>

Wie in Kap.: 5.4.4.7 beschrieben wurde der Sulfatierungsassay für E<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) mit RLC und HLC durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 4,6,8 und 10 min und wurden nach Zugabe von 1  $\mu$ l Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat (1 M) mit 500  $\mu$ l Ethylacetat abgestoppt. Die Inkubate wurden 3 $\times$  mit 500  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Extrakte wurden unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in 50  $\mu$ l MeOH aufgenommen. Die Extrakte wurden dann mit Hilfe der LC-MS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand der integrierten SRM-Flächen der Sulfatmetabolitenpeaks an erstellten Kalibriergeraden für E<sub>2</sub>-3-O-Sulfat (Anhang Tab.: A.1). Für beide untersuchten Cytosolspezies lag der Bereich der linearen Produktbildung im Bereich zwischen 4-8 min, weshalb für die exakte Untersuchung der Enzymaktivität eine Inkubationszeit von 5 min gewählt wurde (Anhang Abb.: A.5.2). Für die exakte Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Sulfatierungsassay für E<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) mit beiden Cytosolspezies mit jeweils 0,2 mg cytosolischem Protein in einer 5 min Inkubation in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den quantifizierten Produktmengen wurde die Enzymaktivität in  $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung berechnet.

### 5.4.5.2. Enzymaktivität in SULTs

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten von hSULT1E1 für die Sulfatierung von ZEN wurde der lineare Bereich der Produktbildung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit ermittelt. Hierfür wurden die Proteinkonzentrationen 0; 25; 37,5; 50 und 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei einer Inkubationszeit von 10 min getestet. Für die Inkubationszeit wurde eine Proteinkonzentration von 37,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt und die Produktbildung der Inkubationszeiten 0, 5, 10, 15 und 20 min untersucht. Der Sulfatierungsassay wurde mit Inkubationsansätzen gemäß den Herstellerangaben in einem Volumen von 0,2 ml durchgeführt und setzen sich wie folgt zusammen:

Komponente	Konzentration	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	0,05 M	variabel
Substanz in DMSO	2 mM	2,2
MgCl <sub>2</sub>	1 M	1,1
Dithioerythreol	1 M	2,2
hSULT1E1	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	variabel
Gesamtansatz		198
Vorinkubation 5 min bei 37°C		
180 $\mu\text{l}$ auf 20 $\mu\text{l}$ PAPS 4 mM pipettieren		
Inkubation für 4-10 min bei 37°C		
Gesamtansatz		200

Die Inkubationsansätze wurden nach Inkubationsende mit gleichem Volume eisgekühltem Aceton abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand mit LC-MS untersucht. Die Quantifizierung erfolgte anhand der integrierten UV-Flächen der Sulfatmetabolitenpeaks an einer erstellten Kalibriergeraden für ZEN (Anhang Tab.: A.1). Die ermittelten Bereiche der linearen Produktbildung lagen bei bei einer Proteinkonzentration von 25-75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und einer Inkubationszeit von 5-15 min (Anhang Abb.: A.5.3). Für die exakte Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Sulfatierungsassay für ZEN (20  $\mu\text{M}$ ) mit hSULT1E1 mit jeweils 37,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein und einer Inkubationszeit von 10 min in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den quantifizierten Produktmengen wurde die Enzymaktivität in  $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$  als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung berechnet.

### 5.4.6. *In vitro*-Studien mit Präzisions-Gewebeschnitten

Die Präparation und Inkubation von Präzisions-Gewebeschnitten wurde mit dem VITRON Tissue Slicer-System durchgeführt und ist in Abb.: 5.4.1 schematisch zusammengefasst.

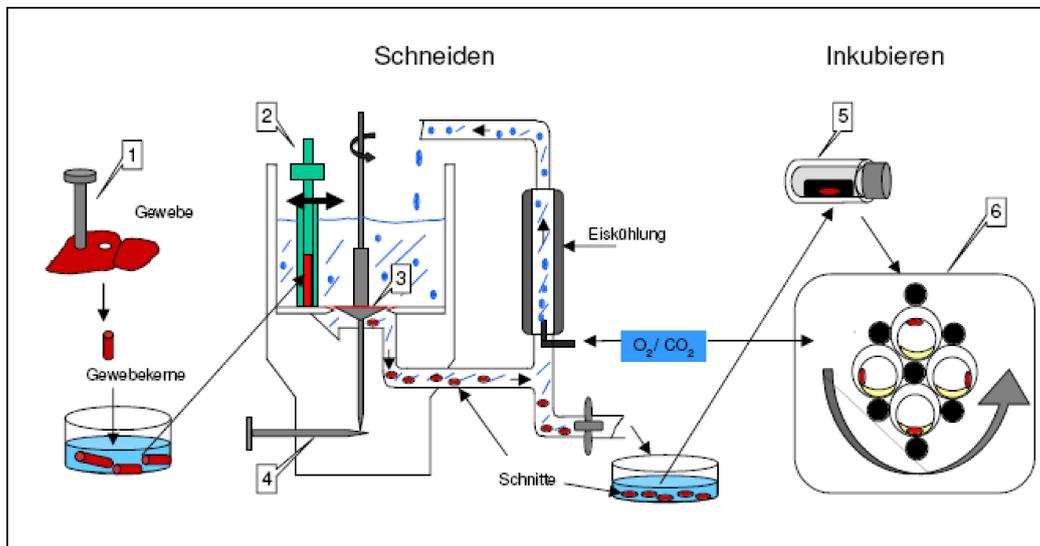


Abbildung 5.4.1.: VITRON Tissue Slicer-System. [1] Hohlzylinder zum Ausstanzen von Gewebezylinder; [2] zylindrischer Schneidearm; [3] rotierendes Messer; [4] Mikrometerschraube; [5] Szintillationsgläsern mit Leberschnitt auf Edelstahlnetz; [6] DOC-Rotationsinkubator.

#### 5.4.6.1. Präparation von Leberschnitten

Die Leber von männlichen unbehandelten Sprague-Dawley-Ratten wurde, nach dem Töten durch CO<sub>2</sub>, entnommen und sofort in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 (Schneide-Puffer) gelegt. Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 8 mm wurden mit einem geschärften Hohlzylinder unter ständigem Drehen und mäßigem Druck auf einer Korkunterlage aus den Leberlappen ausgestanzt (Abb.: 5.4.1 [1]). Die Gewebekerne wurden sofort wieder in den Schneide-Puffer gelegt und dort bis zum Schneiden belassen. Der gesamte Schneide-Prozess wurde in eisgekühltem und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begastem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Die Gewebekerne wurden in einen zylindrischen Schneidearm (Abb.: 5.4.1 [2]) eingebracht und mechanisch durch langsames Bewegen des Schneidehalters über ein rotierendes Messer (Abb.: 5.4.1 [3]) in Scheiben von 200 µm Dicke und 13-25 mg Nassgewicht geschnitten. Die Einstellung der Schnittdicke erfolgte mittels einer Mikrometerschraube (Abb.: 5.4.1 [4]).

#### 5.4.6.2. Inkubation von Leberschnitten

Für die Inkubation von ZEN wurden mehrere unabhängige Experimente mit Schnitten verschiedener Tiere durchgeführt. In jedem Experiment wurden drei Schnitte separat inkubiert. Die Inkubation erfolgte nach der Methode von Fisher et al. [1990]. Nach Entnahme der Schnitte mit dem Puffer am Auslasshahn der Scheideeinheit wurde jeweils ein einzelner Schnitt auf einem sterilen Edelstahl-Netz in einem Hohlzylinder aus Teflon platziert und dieser horizontal in ein steriles 20 ml Szintillationsgläschen, welches 1,7 ml Waymouth's Medium supplementiert mit 10% FKS und 50 g/ml Gentamicin enthielt, eingebracht (Abb.: 5.4.1 [5]). Die Gläschen wurden mit Plastikdeckeln in deren Mitte sich ein 2 mm großes Loch befand verschlossen, um den Gasaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten. Die Schnitte wurden in einem Rotationsinkubator (9 rpm) bei 37°C in einer Carbogen Atmosphäre mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieses sog. DOC-System gewährleistet, dass sich die beiden Schnittoberflächen während der gesamten Kultivierung abwechselnd im Medium und in der Gasphase befinden (Abb.: 5.4.1 [6]). Nach einer 30 min Vorinkubation wurden die Hohlzylinder mit den Schnitten in neue Gläschen, die frisches Kulturmedium und die Testsubstanzen in DMSO (Endkonzentration 1%) gelöst enthielten, überführt. Die Substanz-Endkonzentrationen waren 100 µM und 200 µM. Bei den Inkubationen in denen die COMT-Aktivität gehemmt wurde, wurde dem Inkubationsansatz zusätzlich der COMT-Inhibitor Ro 41-0960 (100 µM) zugegeben. Zwei Arten von Kontrollinkubationen wurden mitgeführt: Eine mit Substrat aber ohne Leberschnitt (Substanzkontrolle) und die andere mit Leberschnitt und DMSO anstelle der Testsubstanz (Leerwert). Die Schnitte wurden für 5 h oder 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden das Inkubationsmedium und die Leberschnitte getrennt in Cryogefäße überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

#### 5.4.6.3. Enzymatische Hydrolyse und Extraktion

Die Metabolismusuntersuchungen wurden aus jeweils einem Experiment mit zwei unterschiedlichen Leberschnittproben durchgeführt. Zwei verschiedene enzymatische Hydrolysemethoden wurden durchgeführt.

##### **Methode I:**

Für die Untersuchung des oxidativen Metabolitenprofils wurde ein 0,5 ml Aliquot des Mediums mit jeweils 0,5 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5 und 0,5 U/ml Sulfatase aus *Helix Pomatia* versetzt. Die verwendete Sulfatase enthält zusätzlich eine sehr hohe Sekundäraktivität an β-Glucuronidase, so dass Sulfate- und Glucuronidkonjugate gespalten werden. In Vorversuchen wurde die eingesetzte Enzymmenge und Inkubationszeit entsprechend optimiert, so dass eine möglichst quantitative Spaltung der Konjugate erreicht wurde. Der Spaltungsansatz wurde dann für 3 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert und anschließend mit 3 × 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden unter Vakuum an der Evaporatorzentrifuge verdampft, der Rückstand in 200 µl Methanol aufgenommen und ein 10 µl Aliquot mittels LC-MS analysiert. In den Leberschnittinkubationen die zusätzlich

mit COMT-Inhibitor inkubiert wurden, wurden dem Spaltungsansatz 10%ige Ascobinsäurelsg. als Oxidationsschutz zugesetzt, um die oxidationsempfindliche Catechole und Hydrochinone bei der Aufarbeitung der Inkubationsmedien zu schützen.

### **Methode II:**

Diese Hydrolysemethode ermöglichte es durch separate Behandlung des Mediums mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase die Art der Konjugate aufzuklären. Für die Analyse unkonjugierter Metabolite (Fraktion A) wurden 0,2 ml Medium mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 ohne Enzym vor der Extraktion mit Ethylacetat versetzt. Zur Hydrolyse der Glucuronide wurde ein weiteres 0,2 ml-Aliquot des Mediums mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt und mit 5000 Fishman U der  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber vor der Extraktion mit Ethylacetat inkubiert (Fraktion B). Zur Untersuchung der Sulfate wurden 0,2 ml Medium mit 0,2 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,1 und 0,1 U der Sulfatase Typ VI aus *Acetobacter aerogenes* inkubiert und extrahiert (Fraktion C). Für die Erfassung aller Metabolite (Fraktion D), wie z.B. unkonjugierten Produkten, Glucuroniden, Sulfaten und gemischt konjugierte Konjugate wurde ein 0,2 ml Aliquot des Mediums mit 5000 Fishman U der  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 und 0,1 U der Sulfatase Typ VI in 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 inkubiert. Alle enzymatischen Hydrolysen erfolgten bei 37°C für 2 h, gefolgt von der Extraktion mit Ethylacetat und der HPLC-DAD Analyse.

#### **5.4.6.4. Identifikation und Quantifizierung**

Die Peaks wurden durch Vergleich ihrer LC-MS Retentionszeiten und ihrer Elutionsreihenfolge in UV, MS-TIC und SRM-TIC identifiziert. Zu diesem Zweck wurde zusammen mit den Probenanalysen ein Extrakt analysiert, der alle oxidativen ZEN-Metabolite und deren MPs enthielt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Peakflächen in der UV-Detektion. Die Peakflächen wurden an Kalibriergeraden für ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL quantifiziert (Anhang Tab.: A.1). Für die oxidativen Metabolite und MPs wurden je nach RAL der entsprechende Extinktionskoeffizient von ZEN,  $\alpha$ -ZEL oder  $\beta$ -ZEL angenommen.

Die Wiederfindungen von ZEN in den Substanzkontrollen wurden nach Extraktion des Inkubationsmediums aus den detektierten UV-Flächen in Relation zur eingesetzten Stoffmenge berechnet und beträgt ca. 70%. Die Wiederfindungen in den Leberschnittinkubationen mit Testsubstanz wurde als Summe aus Muttersubstanz und Metabolite in Relation zur Substanzkontrolle berechnet und betragen ca. 99% .

#### 5.4.6.5. Direkte Analyse des Inkubationsmediums

##### Referenzstandards:

Für die Identifikation der Metabolite und die Bestimmung der Responsfaktoren wurden zeitnah vor den Probeanalysen Referenzstandards analysiert. Diese enthielten je nach Analyse das oxidative Metabolitenspektrum inklusive der MPs, deren Glucuronide oder Sulfate. Die Herstellung der Standards erfolgte mit Hilfe von Zellfraktionen. Basis bildete das oxidative Metabolitenspektrum das mit Inkubationen von ZEN mit NADPH/Rattenlebermikrosomen erhalten wurde. Ein Aliquot davon wurde mit SAM und Rattenlebercytosol umgesetzt zur Bildung der MPs. Die Extrakte der Inkubate wurden wieder vereinigt und der Gesamtextrakt enthielt in Folge alle oxidativen Metabolite und MPs. Aliquote davon wurden im Glucuronyltransferase- und im Sulfotransferase-Assay eingesetzt, wodurch Referenzstandards für das Glucuronid- und Sulfat-Metabolitenspektrum erhalten wurden. Die Charakterisierung der Referenzstandards erfolgte durch Identifikation der einzelnen Metabolite anhand der Retentionszeiten in UV, MS-TIC und SRM-TIC sowie den Massenspektren, die aus den Charakterisierungsdaten der Einzeluntersuchungen der jeweiligen oxidativen Metabolite bzw. MPs und ihrer Konjugate bekannt waren. Aus der Analyse der Referenzstandards wurden auch die Responsfaktoren zwischen SRM-TIC-Peakfläche und UV-Peakfläche berechnet. Da diese Analysen-abhängig schwanken können wurden die Referenzstandards immer zeitnah mit den Probenanalysen mitgemessen und die Responsfaktoren für das jeweilige Experiment berechnet.

##### Experimenteller Teil:

Für die Untersuchung der in Leberschnittinkubationen gebildeten Konjugate wurde das Inkubationsmedium direkt mit der LC-MS untersucht. Hierfür wurden für die Analyse oxidativ gebildeter Metabolite, Methylierungsprodukte, Glucuronide und Sulfate getrennte Analysen durchgeführt. Für jede Analyse wurden 10 µl Inkubationsmedium in die LC-MS eingespritzt. Die Identifikation der Metabolite erfolgte anhand der Elutionsreihenfolge und der Retentionszeiten der Referenzstandards, die den Probenanalysen vorausliefen. Die quantitative Abschätzung der Gehalte erfolgte anhand der Peakflächen im SRM-TIC. Die SRM-TIC Peakflächen wurden mit Hilfe von Responsfaktoren in theoretische UV-Flächen umgerechnet. Die Gehalte der einzelnen Metabolite wurden an einer Kalibriergeraden von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL quantifiziert. Für die oxidativen Metabolite und MPs wurden je nach RAL der entsprechende Extinktionskoeffizient von ZEN,  $\alpha$ -ZEL oder  $\beta$ -ZEL angenommen. Änderungen des Extinktionskoeffizienten durch Konjugation wurden durch einen Konjugationsfaktor ausgeglichen, der für die Glucuronide und Sulfate von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL experimentell im Glucuronyl- und Sulfotransferase-Assay ermittelt wurde (Kap.: 5.4.4.6 und Kap.: 5.4.4.7). Für die Konjugate der oxidativen Metabolite der RAL wurde dieser näherungsweise als identisch angenommen. Die Wiederfindungen von ZEN in den Substanzkontrollen wurden nach Extraktion des Inkubationsmediums aus den detektierten UV-Flächen in Relation zur eingesetzten Stoffmenge berechnet. Die Wiederfindungen in den Leberschnittinkubationen mit Testsubstanz wurde als Summe aus Muttersubstanz und Metabolite in Relation zur Substanzkontrolle berechnet.

### 5.4.7. Analyse von *in vivo* Gallenproben

Um den *in vivo* Metabolismus zu untersuchen, wurden Gallenproben von Sprague Dawley Ratten aus einer *in vivo* Studie des Institutes für Toxikologie der Universität Würzburg untersucht. Die Tiere wurden in einer Operation mit einem Gallenkatheter versehen. Hierfür wurden die Tiere narkotisiert, der Bauchraum geöffnet und der Gallengang durchtrennt. Der Gallengang zur Darmseite wurde abgebunden. Der Gallengang zur Leberseite wurde mit einem Gallenkatheter versehen. Der Bauchraum wurde anschließend wieder verschlossen. Die Substanzapplikation erfolgte nach einer halbstündigen Eingewöhnungsphase, in der die Predose Galle, welche als Leerwert dient, gesammelt wurde. ZEN wurde dann in einer Dosis von 2 mg/Tier per Schlundsonde verabreicht. Die Galle wurde nach der Eingewöhnungsphase in 30 min Fraktionen über einen Zeitraum von 4 h gesammelt.

#### 5.4.7.1. Aufarbeitung von Gallenproben

Ein maximal 100 µl Aliquot Gallenflüssigkeit wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl des internen Standards D<sub>6</sub>-ZEN (10 µM) versetzt und mit 0,15 M Acetatpuffer pH 5,0 auf 200 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 37°C vorinkubiert und mit 0,5 U/ml Sulfatase aus *Helix Pomatia* versetzt. Durch die hohe Sekundäraktivität von β-Glucuronidase der eingesetzten Sulfatase werden sowohl Sulfate als auch Glucuronide nahezu vollständig gespalten (Kap.: 5.4.6.3). In Vorversuchen wurde die Quantität der Spaltung in Gallenmatrix mit Hilfe von, mit Referenzstandards für Glucuronid- und Sulfat-Konjugate gespiketer Rindergalle überprüft (Kap.: 5.4.6.5). Der Inkubationsansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und auf Eis anschließend abgestoppt.

#### 5.4.7.2. Immunoaffinitätsäulenchromatographie

Zur Abtrennung störender Matrixsubstanzen aus der Galle und zur Aufkonzentrierung der in der Probe enthaltenen Metabolite wurde die Immunoaffinitätsäulenchromatographie (IASC) eingesetzt. In Vorversuchen wurden die Selektivität und das Bindevermögen des Antikörpers verschiedener IASC-Säulen überprüft, wobei die IASC-Säule Zearastar<sup>®</sup> von Coring die besten Eigenschaften zeigte. Die Überprüfung von Selektivität und Substratbindung erfolgte mit Hilfe eines Referenzstandards, der alle oxidative Metaboliten und MPs enthielt (Kap.: 5.4.6.5). Als Maß für die Selektivität und des Bindevermögens wurden die Wiederfindungen der einzelnen Metabolite herangezogen, die nach IASC in Relation zum eingesetzten Standard berechnet wurden. Die Überprüfung der IASC-Säule erfolgte sowohl mit ZEN und ZEN-Metaboliten in Puffer als auch in Rindergalle (Anhang Tab.: A.3).

Der komplette Spaltungsansatz wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 auf 10 ml aufgefüllt und auf die IASC Säule gegeben. Anschließend wurde 2× mit 10 ml Aqua bidest. gewaschen, mit Unterdruck die Restflüssigkeit aus der Säule gezogen und 3× mit 500 µl MeOH eluiert. Unter dem N<sub>2</sub>-Strom bei 50°C wurde das Lösungsmittel zur Trockene eingengt und der Rückstand in 50 µl MeOH aufgenommen. Davon wurden 20 µl mit der LC-MS analysiert.

### 5.4.7.3. Identifikation und Quantifizierung

Den Analysenproben der Gallen wurde ein Referenzstandard vorab analysiert, welcher alle oxidativen ZEN Metabolite und deren MPs enthielt. Diese Analyse diente der Berechnung der Responsefaktoren der Metabolite und als Referenz für die Elutionsreihenfolge und Massenspektren unter der verwendeten LC-MS Methode. ZEN und die reduktiven Metabolite  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL sowie die oxidativen Metabolite und MPs wurden anhand ihrer MS<sup>2</sup>-Spektren identifiziert. Der D<sub>6</sub>-ZEN Standard zeigte sehr stark schwankende Flächen in den einzelnen Analysen der Gallenproben und konnte deshalb nicht als interner Standard zur Quantifizierung verwendet werden. Berechnete Wiederfindungen anhand des deuterierten Standards zeigten, dass die Wiederfindungen in Abhängigkeit des eingesetzten Probenvolumens stark abnahmen. Mit abnehmendem Probenvolumen nimmt die Ionensuppression stark zu, wodurch die Peakflächen im MS-TIC und die damit durchgeführte Quantifizierung zu gering ausfallen. Ab der 1,5 h Fraktion beträgt die Wiederfindung des zugesetzten internen Standards D<sub>6</sub>-ZEN weniger als 25%. Eine näherungsweise Abschätzung der Gehalte wurde anhand UV-, SRM- oder MS<sup>2</sup>-Fläche mit Hilfe der Referenzsubstanzen ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL durchgeführt. ZEN,  $\alpha$ -ZEL wurden anhand der UV-Fläche,  $\beta$ -ZEL anhand der SRM- und die oxidativen Metabolite anhand der MS<sup>2</sup>-Flächen quantifiziert. Die Berechnung über die Massenspuren erfolgte durch Umrechnung der SRM und MS<sup>2</sup>-Flächen in theoretische UV-Flächen. Die UV-Flächen wurden an Kalibriergeraden für ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL quantifiziert (Anhang Tab.:A.1). Für die oxidativen Metabolite und MPs wurden je nach RAL der entsprechende Extinktionskoeffizient von ZEN,  $\alpha$ -ZEL oder  $\beta$ -ZEL angenommen.



## 6. Literaturverzeichnis

VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006. Verordnung der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union*.

S. Abid-Essefi, I. Baudrimont, W. Hassen, Z. Ouanes, T. A. Mobio, R. Anane, E. E. Creppy, und H. Bacha. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology*, 192(2-3):237–248, 2003.

S. Abid-Essefi, Z. Ouanes, W. Hassen, I. Baudrimont, E. Creppy, und H. Bacha. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol In Vitro*, 18(4):467–474, 2004.

S. Abid-Essefi, C. Bouaziz, E. E. Golli-Bennour, Z. Ouanes, und H. Bacha. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human caco-2 cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 23(4):233–243, 2009.

A. Allali-Hassani, P. W. Pan, L. Dombrowski, R. Najmanovich, W. Tempel, A. Dong, P. Loppnau, F. Martin, J. Thornton, A. M. Edwards, A. Bochkarev, A. N. Plotnikov, M. Vedadi, und C. H. Arrowsmith. Structural and chemical profiling of the human cytosolic sulfotransferases. *PLoS Biol*, 5(5):1063–1078, 2007.

N. K. Allen, C. J. Mirocha, S. Aakhus-Allen, J. J. Bitgood, G. Weaver, und F. Bates. Effect of dietary zearalenone on reproduction of chickens. *Poult Sci*, 60(6):1165–1174, 1981.

A. D. Altalhi. Plasmid-mediated Detoxification of Mycotoxin Zearalenone in *Pseudomonas* Sp. ZEA-1. *Am J Biochem Biotech*, 3(3):150–158, 2007.

A. Asai und T. Miyazawa. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci*, 67(23):2785–2793, 2000.

H. W. Bai, J. Y. Shim, J. Yu, und B. T. Zhu. Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases. *Chem Res Toxicol*, 20(10):1409–1425, 2007.

- J. Bauer, K. Heinritzi, M. Gareis, und B. Gedek. Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone. *Tierarztl Prax*, 15(1):33–36, 1987.
- P. J. Becci, K. A. Voss, F. G. Hess, M. A. Gallo, R. A. Parent, K. R. Stevens, und J. M. Taylor. Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *J Appl Toxicol*, 2(5): 247–254, 1982.
- E. Benzoni, F. Minervini, A. Giannoccaro, F. Fornelli, D. Vigo, und A. Visconti. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod Toxicol*, 25(4):461–467, 2008.
- M. L. Biehl, D. B. Prelusky, G. D. Koritz, K. E. Hartin, W. B. Buck, und H. L. Trenholm. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 121(1):152–159, 1993.
- G. Bolliger und Ch. Tamm. Four new metabolites from *Gibberella zeae*. 5-formylzearalenone, 7'-dehydrozearalenone, 8'-hydroxy- and 8'-epi-hydroxyzearalenone. *Helv Chim Acta*, 55(8):3030–3048, 1972.
- J. L. Bolton und G. R. Thatcher. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 21(1):93–101, 2008.
- E. B. Borthwick, A. Burchell, und M. W. Coughtrie. Purification and immunochemical characterization of a male-specific rat liver oestrogen sulphotransferase. *Biochem J*, 289 (Pt 3):719–725, 1993.
- U. Bosch und C. J. Mirocha. Toxin production by fusarium species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Appl Environ Microbiol*, 58(10):3233–3239, 1992.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- F. Bravin, R. C. Duca, P. Balaguer, und M. Delaforge. In vitro cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. *Int J Mol Sci*, 10(4):1824–1837, 2009.
- R. W. Caldwell, J. Tuite, M. Stob, und R. Baldwin. Zearalenone production by fusarium species. *Appl Microbiol*, 20(1):31–34, 1970.
- W. M. Chang und J. K. Lin. Transformation of zearalenone and zearalenol by rat erythrocytes. *Food Chem Toxicol*, 22(11):887–891, 1984.
- Y. C. Chang und M. G. Nair. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod*, 58(12):1892–1896, 1995.

- M. S. Chi, C. J. Mirocha, G. A. Weaver, und H. J. Kurtz. Effect of zearalenone on female white leghorn chickens. *Appl Environ Microbiol*, 39(5):1026–1030, 1980.
- D. B. Clarke, A. S. Lloyd, N. P. Botting, M. F. Oldfield, P. W. Needs, und H. Wiseman. Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [ $^{13}\text{C}$ (3)]isoflavone internal standards. *Anal Biochem*, 309(1):158–172, 2002.
- T. Clavel, D. Borrmann, A. Braune, J. Dore, und M. Blaut. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe*, 12(3):140–147, 2006.
- T. F. Collins, R. L. Sprando, T. N. Black, N. Olejnik, R. M. Eppley, H. Z. Alam, J. Rorie, und D. I. Ruggles. Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food Chem Toxicol*, 44(9):1455–1465, 2006.
- E. Conkova, A. Laciakova, B. Pastorova, H. Seidel, und G. Kovac. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicol Lett*, 121(3):145–149, 2001.
- B. Cramer, M. Bretz, und H. U. Humpf. Stable isotope dilution analysis of the fusarium mycotoxin zearalenone. *J Agric Food Chem*, 55(21):8353–8358, 2007.
- R. E. Dailey, R. E. Reese, und E. A. Brouwer. Metabolism of [ $^{14}\text{C}$ ]zearalenone in laying hens. *J Agric Food Chem*, 28(2):286–291, 1980.
- J. P. F. D’Mello, C. M. Placinta, und A. M. C. Macdonald. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 80(3-4):183–205, 1999.
- S. Dänicke, K. H. Ueberschar, I. Halle, H. Valenta, und G. Flachowsky. Excretion kinetics and metabolism of zearalenone in broilers in dependence on a detoxifying agent. *Arch Tierernahr*, 55(4):299–313, 2001.
- S. Dänicke, D. Gaden, K. H. Ueberschar, U. Meyer, und H. Scholz. Effects of fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Arch Tierernahr*, 56(4):245–261, 2002.
- S. Dänicke, E. Swiech, L. Buraczewska, und K. H. Ueberschar. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 89(7-8):268–276, 2005.
- S. Doll, S. Dänicke, K. H. Ueberschar, H. Valenta, U. Schnurrbusch, M. Ganter, F. Klobasa, und G. Flachowsky. Effects of graded levels of fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Tierernahr*, 57(5):311–334, 2003.

- R. T. Dunn 2nd und C. D. Klaassen. Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab Dispos*, 26(6):598–604, 1998.
- S. Edwards, T. C. Cantley, G. E. Rottinghaus, G. D. Osweiler, und B. N. Day. The effects of zearalenone on reproduction in swine. i. the relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology*, 28(1):43–49, 1987.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed, 28.07. 2004.
- G. Eisenbrand und M. Metzler. Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. 3. Auflage, 2005.
- K. Ekena, K. E. Weis, J. A. Katzenellenbogen, und B. S. Katzenellenbogen. Different residues of the human estrogen receptor are involved in the recognition of structurally diverse estrogens and antiestrogens. *J Biol Chem*, 272(8):5069–5075, 1997.
- C. P. Eugenio, C. M. Christensen, und C. J. Mirocha. Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. *Phytopathology*, (7):1055–1057, 1970.
- J. L. Falany, N. Macrina, und C. N. Falany. Sulfation of tibolone and tibolone metabolites by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 88(4-5):383–391, 2004.
- E. Filipiak, R. Walczak-Jedrzejowska, E. Oszukowska, A. Guminska, K. Marchlewska, K. Kula, und J. Slowikowska-Hilczer. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem Cytobiol*, 47(5):113–120, 2009.
- M. B. Fisher, K. Campanale, B. L. Ackermann, M. VandenBranden, und S. A. Wrighton. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos*, 28(5):560–566, 2000.
- R. Fisher, P. F. Smith, I. G. Sipes, A. J. Gandol, C. L. Krumdieck, und K. Brendel. Toxicity of chlorobenzenes in cultured rat liver slices. *In vitro Toxicol*, 3:181–194, 1990.
- D. W. Fitzpatrick, L. D. Arbuckle, und A. M. Hassen. Zearalenone metabolism and excretion in the rat: effect of different doses. *J Environ Sci Health B*, 23(4):343–354, 1988.
- N. Gamage, A. Barnett, N. Hempel, R. G. Duggleby, K. F. Windmill, J. L. Martin, und M. E. McManus. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci*, 90(1): 5–22, 2006.
- L. Ghedira-Chekir, K. Maaroufi, A. Zakhama, F. Ellouz, S. Dhouib, E. E. Creppy, und H. Bacha. Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chem Biol Interact*, 113(1):15–25, 1998.

- A. Giammarino, M. Manera, D. Robbe, M. Perugini, F. Minervini, und M. Amorena. Influence of mycotoxins on spontaneous contraction in myometrial strips of prepubertal lamb. *Res Vet Sci*, 84(3):471–476, 2008.
- H. Glatt. Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *Faseb J*, 11(5): 314–321, 1997.
- H. Glatt, R. Padykula, G. A. Berchtold, G. Ludewig, K. L. Platt, J. Klein, und F. Oesch. Multiple activation pathways of benzene leading to products with varying genotoxic characteristics. *Environ Health Perspect*, 82:81–89, 1989.
- H. Glatt, H. Boeing, C. E. Engelke, L. Ma, A. Kuhlow, U. Pabel, D. Pomplun, W. Teubner, und W. Meinl. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutat Res*, 482(1-2):27–40, 2001.
- Y. Grosse, L. Chekir-Ghedira, A. Huc, S. Obrecht-Pflumio, G. Dirheimer, H. Bacha, und A. Pfohl-Leszkowicz. Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett*, 114(1-2):225–229, 1997.
- W. M. Hagler und C. J. Mirocha. Biosynthesis of [14C]zearalenone from [1-14C]acetate by *Fusarium roseum* 'Gibbosum'. *Appl Environ Microbiol*, 39(3):668–670, 1980.
- W. M. Hagler, C. J. Mirocha, S. V. Pathre, und J. C. Behrens. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Appl Environ Microbiol*, 37(5):849–853, 1979.
- R. M. Harris, R. H. Waring, C. J. Kirk, und P. J. Hughes. Sulfation of 'estrogenic' alkylphenols and 17beta-estradiol by human platelet phenol sulfotransferases. *J Biol Chem*, 275(1):159–166, 2000.
- D. J. Harvey. The mass spectra of the trimethylsilyl derivatives of cis- and trans- hexahydrocannabinol and their hydroxy and acid analogues. *Biomed Mass Spectrom*, 8(8):366–372, 1981.
- J. S. Hernandez, R. W. Watson, T. C. Wood, und R. M. Weinshilboum. Sulfation of estrone and 17 beta-estradiol in human liver. catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Drug Metab Dispos*, 20(3):413–422, 1992.
- P. H. Hidy, R. S. Baldwin, R. L. Greasham, C. L. Keith, und J. R. McMullen. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv Appl Microbiol*, 22:59–82, 1977.
- R. A. Jackson, S. W. Fenton, C. J. Mirocha, und G. Davis. Characterization of two isomers of 8'-hydroxyzearalenone and other derivatives of zearalenone. *J Agric Food Chem*, 22(6):1015–1019, 1974.
- M. Jimenez, M. Manez, und E. Hernandez. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three fusarium species. *Int J Food Microbiol*, 29(2-3):417–421, 1996.

- H. Kakeya, N. Takahashi-Ando, M. Kimura, R. Onose, I. Yamaguchi, und H. Osada. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(12):2723–2726, 2002.
- O. Kappenstein, A. Brockmeyer, R. Dietrich, V. Curtui, H. Klaffke, J. Lepschy, E. Märtlbauer, E. Schneider, C. Seidler, G. Thielert, E. Uslenber, R. Weber, und J. Wolff. Zearalenone in food. *Mycotoxin Res*, 21(2):79–82, 2004.
- S. Karppinen, K. Liukkonen, A. Aura, P. Forssell, und K. Poutanen. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric*, 80:1469–1476, 2000.
- D. G. Kennedy, J. D. G. McEvoy, W. J. Blanchflower, S. A. Hewitt, A. Cannavan, W. J. McCaughey, und C. T. Elliott. Possible naturally-occurring zearanol in bovine bile in northern-ireland. *Journal Of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases And Veterinary Public Health*, 42(8):509–512, 1995.
- D. T. Kiang, B. J. Kennedy, S. V. Pathre, und C. J. Mirocha. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res*, 38(11 Pt 1):3611–3615, 1978.
- K. H. Kiessling und H. Pettersson. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 43(4):285–290, 1978.
- K. H. Kiessling, H. Pettersson, K. Sandholm, und M. Olsen. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 47(5):1070–1073, 1984.
- B. Kollarczik, M. Gareis, und M. Hanelt. In vitro transformation of the fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat Toxins*, 2(3):105–110, 1994.
- J. H. Kouadio, T. A. Mobio, I. Baudrimont, S. Moukha, S. D. Dano, und E. E. Creppy. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213(1-2):56–65, 2005.
- G. G. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, und J. A. Gustafsson. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10):4252–4263, 1998.
- T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, und H. Watanabe. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol*, 7(3):253–306, 1987.
- J.J. Li, S.A. Li, J.K. Klicka, und J.A. Heller. Some biological and toxicological studies of various estrogen mycotoxins and phytoestrogens. in: MacLachlan JA, editor. Estrogens in The Environment II: Influences on Development. (Ed). pages 168–181, 1985.

- J. Lindsay, L. L. Wang, Y. Li, und S. F. Zhou. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab*, 9(2):99–105, 2008.
- M. B. Lioi, A. Santoro, R. Barbieri, S. Salzano, und M. V. Ursini. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res*, 557(1):19–27, 2004.
- A. Lupp, M. Danz, und D. Muller. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 161(1-2):53–66, 2001.
- K. Maaroufi, L. Chekir, E. E. Creppy, F. Ellouz, und H. Bacha. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, 34(5):535–540, 1996.
- H. Malekinejad, R. F. Maas-Bakker, und J. Fink-Gremmels. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet Res*, 36(5-6):799–810, 2005a.
- H. Malekinejad, R. F. Maas-Bakker, und J. Fink-Gremmels. Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: ph and cofactor effects. *Arch Toxicol*, 79(10):547–553, 2005b.
- H. Malekinejad, R. Maas-Bakker, und J. Fink-Gremmels. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J*, 172(1):96–102, 2006.
- L. M. Mallis, A. B. Sarkahian, H. A. Harris, M. Y. Zhang, und O. J. McConnell. Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 796(1):71–86, 2003.
- F. Massart und G. Saggese. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *Int J Androl*, 33:369–376, 2009.
- F. W. McLafferty und F. Turecek. Interpretation of mass spectra. 3. Auflage, 1993.
- M. R. Meselhy, N. Nakamura, und M. Hattori. Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 45(5):888–893, 1997.
- K. Meyer, E. Usleber, E. Märtelbauer, und J. Bauer. Nachweis von Zearalenon-Metaboliten in Gallen von Zuchtsauen mit Fertilitätsstörungen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 110:281–283, 1997.
- Y. Miki, T. Nakata, T. Suzuki, A. D. Darnel, T. Moriya, C. Kaneko, K. Hidaka, Y. Shiotsu, H. Kusaka, und H. Sasano. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12):5760–5768, 2002.
- G. D. Milano, D. Becu-Villalobos, und M. O. Tapia. Effects of long-term zearalenone administration on spermatogenesis and serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin values in male rats. *Am J Vet Res*, 56(7):954–958, 1995.

- C. O. Miles, A. F. Erasmuson, A. L. Wilkins, N. R. Towers, B. L. Smith, I. Garthwaite, B. G. Scahill, und R. P. Hansen. Ovine metabolism of zearalenone to alpha-zearalanol (zeranol). *J. Agric. Food Chem.*, 44(10):3244–3250, 1996.
- C. J. Mirocha und S. V. Pathre. Mycotoxins - their biosynthesis in fungi: zearalenone biosynthesis. *J Food Protect*, 42(10):821–824, 1979.
- C. J. Mirocha, S. V. Pathre, J. Behrens, und B. Schauerhamer. Uterotropic activity of cis and trans isomers of zearalenone and zearalenol. *Appl Environ Microbiol*, 35(5):986–987, 1978.
- C. J. Mirocha, S. V. Pathre, und T. S. Robison. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol*, 19(1):25–30, 1981.
- C. J. Mirocha, T. S. Robison, R. J. Pawlosky, und N. K. Allen. Distribution and residue determination of [3H]zearalenone in broilers. *Toxicol Appl Pharmacol*, 66(1):77–87, 1982.
- M. L. Montani, G. Vaamonde, S. L. Resnik, und P. Buera. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. *Int J Food Microbiol*, 6(1):1–8, 1988.
- A. E. Mutlib. Application of stable isotope-labeled compounds in metabolism and in metabolism-mediated toxicity studies. *Chem Res Toxicol*, 21(9):1672–1689, 2008.
- V. Nedelcheva und I. Gut. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica*, 24(12):1151–1175, 1994.
- P. E. Nelson, M. C. Dignani, und E. J. Anaissie. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*, 7(4):479–504, 1994.
- G. N. Nikov, N. E. Hopkins, S. Boue, und W. L. Alworth. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect*, 108(9):867–872, 2000.
- M. Nishimura und S. Naito. Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(5):357–374, 2006.
- NTP. Carcinogenesis Bioassay of zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 235:1–155, 1982.
- M. Olsen, H. Pettersson, und K. H. Kiessling. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 48(2):157–161, 1981.
- M. Olsen, C. J. Mirocha, H. K. Abbas, und B. Johansson. Metabolism of high concentrations of dietary zearalenone by young male turkey poults. *Poult Sci*, 65(10):1905–1910, 1986.

- M. Olsen, H. Pettersson, K. Sandholm, A. Visconti, und K. H. Kiessling. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro. *Food Chem Toxicol*, 25(9):681–683, 1987.
- T. Omura und R. Sato. The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem*, 239:2379–2385, 1964b.
- T. Omura und R. Sato. The carbon monoxide-binding pigment of Liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239:2370–2378, 1964a.
- Z. Ouanes, I. Ayed-Boussema, T. Baati, E. E. Creppy, und H. Bacha. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17beta-estradiol, progesterone and vitamin e. *Mutat Res*, 565(2):139–149, 2005.
- S. V. Pathre und C. J. Mirocha. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Zearalenone and Related Compunds. *American Chemical Society, Washington, D.C.*, pages 178–227, 1976.
- S. V. Pathre, S. W. Fenton, und C. J. Mirocha. 3'-hydroxyzearalenones, two new metabolites produced by fusarium roseum. *J. Agric. Food Chem.*, 28(2):421–424, 1980.
- C. A. Peters. Photochemistry of zearalenone and its derivatives. *J. Med. Chem.*, 15(8):867–868, 1972.
- E. Pfeiffer, F. F. Heuschmid, S. Kranz, und M. Metzler. Microsomal hydroxylation and glucuronidation of [6]-gingerol. *J Agric Food Chem*, 54(23):8769–8774, 2006.
- E. Pfeiffer, A. Heyting, und M. Metzler. Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res*, 51(7):867–871, 2007a.
- E. Pfeiffer, N. H. Schebb, J. Podlech, und M. Metzler. Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Mol Nutr Food Res*, 51(3):307–316, 2007b.
- E. Pfeiffer, A. Hildebrand, G. Damm, A. Rapp, B. Cramer, H. U. Humpf, und M. Metzler. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res*, 53(9):1123–1133, 2009.
- E. Pfeiffer, A. Hildebrand, H. Mikula, und M. Metzler. Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mol Nutr Food Res*, 2010.
- A. Pfohl-Leszkowicz, L. Chekir-Ghedira, und H. Bacha. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16(10):2315–2320, 1995.
- G. Pompa, C. Montesissa, F. M. Di Lauro, und L. Fadini. The metabolism of zearalenone in subcellular fractions from rabbit and hen hepatocytes and its estrogenic activity in rabbits. *Toxicology*, 42(1):69–75, 1986.

- F. Rafii, C. Davis, M. Park, T. M. Heinze, und R. D. Beger. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch Microbiol*, 180(1):11–16, 2003.
- A. J. Ramos, E. Hernandez, J. M. PlaDelfina, und M. Merino. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal Of Pharmaceutics*, 128(1-2):129–137, 1996.
- K. E. Richardson, Jr. Hagler, W. M., C. L. Campbell, und P. B. Hamilton. Production of zearalenone, T-2 toxin, and deoxynivalenol by *Fusarium* spp. isolated from plant materials grown in North Carolina. *Mycopathologia*, 90(3):155–160, 1985.
- M. J. Ronis, J. M. Little, G. W. Barone, G. Chen, A. Radomska-Pandya, und T. M. Badger. Sulfation of the isoflavones genistein and daidzein in human and rat liver and gastrointestinal tract. *J Med Food*, 9(3):348–355, 2006.
- H. J. Ruder, L. Loriaux, und M. B. Lipsett. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest*, 51(4):1020–1033, 1972.
- C. Ruzsas, M. Biro-Gosztanyi, L. Woller, und B. Mess. Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. *Acta Biol Acad Sci Hung*, 30(4):335–345, 1979.
- SCF. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins part 2: Zearalenone (ZEA). pages 1–11, 2000.
- A. Schaut, S. De Saeger, T. Sergent, Y. J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, und C. Van Peteghem. Study of the gastrointestinal biotransformation of zearalenone in a caco-2 cell culture system with liquid chromatographic methods. *J Appl Toxicol*, 28(8):966–973, 2008.
- L. Schoefer, R. Mohan, A. Braune, M. Birringer, und M. Blaut. Anaerobic c-ring cleavage of genistein and daidzein by eubacterium ramulus. *FEMS Microbiol Lett*, 208(2):197–202, 2002.
- K. Seeling, S. Dänicke, K. H. Ueberschar, P. Lebzien, und G. Flachowsky. On the effects of fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Food Addit Contam*, 22(9):847–55, 2005.
- S. R. Shelnutt, C. O. Cimino, P. A. Wiggins, M. J. Ronis, und T. M. Badger. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr*, 76(3):588–594, 2002.
- R. F. Sherwood und J. F. Peberdy. Factors affecting the production of zearalenone by *Fusarium graminearum* in grain. *Journal of Stored Products Research*, 8(1):71–75, 1972.

- W. T. Shier, A. C. Shier, W. Xie, und C. J. Mirocha. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39(9):1435–1438, 2001.
- B. S. Shin, S. H. Hong, J. B. Bulitta, S. W. Hwang, H. J. Kim, J. B. Lee, S. D. Yang, J. E. Kim, H. S. Yoon, D. J. Kim, und S. D. Yoo. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *Journal Of Toxicology And Environmental Health-Part A-Current Issues*, 72(21-22):1406–1411, 2009.
- CVUA Sigmaringen. Lebensmittelüberwachung und Umweltschutz. *Jahresbericht 2006*, 2006.
- M.R. Smyth und C.G.B. Frischkorn. Simultaneous determination of the trans and cis forms of zearalenone in cereal products by high-performance-liquid-chromatography with voltammetric detection. *Analytica Chimica Acta*, 115:293–300, 1980.
- J. A. Steele, C. J. Mirocha, und S. V. Pathre. Metabolism of zearalenone by *Fusarium roseum* Graminearum. *J Agric Food Chem*, 24(1):89–97, 1976.
- D. E. Stevenson, R. P. Hansen, J. I. Loader, D. J. Jensen, J. M. Cooney, A. L. Wilkins, und C. O. Miles. Preparative enzymatic synthesis of glucuronides of zearalenone and five of its metabolites. *J Agric Food Chem*, 56(11):4032–4038, 2008.
- R. D. Stipanovic und H. W. Schroeder. Zearalenol and 8'-hydroxyzearalenone from *Fusarium roseum*. *Mycopathologia*, 57(2):77–78, 1975.
- H. Takemura, J. Y. Shim, K. Sayama, A. Tsubura, B. T. Zhu, und K. Shimoi. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zearanol in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103(2):170–177, 2007.
- W. Teubner, W. Meinel, S. Florian, M. Kretzschmar, und H. Glatt. Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem J*, 404(2):207–215, 2007.
- D. Thouvenot, R. Morfin, S. Di Stefano, und D. Picart. Transformations of zearalenone and alpha-zearalanol by homogenates of human prostate glands. *Eur J Biochem*, 121(1):139–145, 1981.
- U. Tiemann und S. Dänicke. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam*, 24(3):306–314, 2007.
- U. Tiemann, W. Tomek, F. Schneider, und J. Vanselow. Effects of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod Toxicol*, 17(6):673–681, 2003.
- Y. Ueno und F. Tashiro. alpha-zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an estrogenic mycotoxin of fusarium species. *J Biochem*, 89(2):563–571, 1981.

- Y. Ueno, S. Ayaki, N. Sato, und T. Ito. Fate and mode of action of zearalenone. *Ann Nutr Aliment*, 31(4-6):935–948, 1977.
- Y. Ueno, F. Tashiro, und T. Kobayashi. Species differences in zearalenone-reductase activity. *Food Chem Toxicol*, 21(2):167–173, 1983.
- W.H. Urry. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 27:3109–3114, 1966.
- E. Vekiru, C. Hametner, R. Mitterbauer, J. Rechthaler, G. Adam, G. Schatzmayr, R. Krska, und R. Schuhmacher. Cleavage of zearalenone by trichosporon mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite. *Appl Environ Microbiol*, 76(7):2353–2359, 2010.
- H. A. Verheul, C. J. Timmer, M. L. van Iersel, L. P. Delbressine, und H. J. Kloosterboer. Pharmacokinetic parameters of tibolone and metabolites in plasma, urine, feces, and bile from ovariectomized cynomolgus monkeys after a single dose or multiple doses of tibolone. *Drug Metab Dispos*, 35(7):1112–1118, 2007.
- B. Videmann, M. Mazallon, J. Tep, und S. Lecoeur. Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*, 46(10):3279–3286, 2008.
- B. Videmann, M. Mazallon, C. Prouillac, M. Delaforge, und S. Lecoeur. ABCC1, ABCC2 and ABCC3 are implicated in the transepithelial transport of the myco-estrogen zearalenone and its major metabolites. *Toxicol Lett*, 190(2):215–223, 2009.
- L. Q. Wang und M. O. James. Sulfonation of 17beta-estradiol and inhibition of sulfotransferase activity by polychlorobiphenyls and celecoxib in channel catfish, *ictalurus punctatus*. *Aquat Toxicol*, 81(3):286–292, 2007.
- L. Q. Wang, M. R. Meselhy, Y. Li, G. W. Qin, und M. Hattori. Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiol and enterolactone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48(11):1606–1610, 2000.
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 896:1–128, 2000.
- J. C. Wolf und C. J. Mirocha. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'graminearum') by F-2 (Zearalenone). *Can J Microbiol*, 19(6):725–734, 1973.
- J. Yang, Y. Zhang, Y. Wang, und S. Cui. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol In Vitro*, 21(4):558–565, 2007a.
- J. Y. Yang, G. X. Wang, J. L. Liu, J. J. Fan, und S. Cui. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol*, 24(3-4):381–387, 2007b.

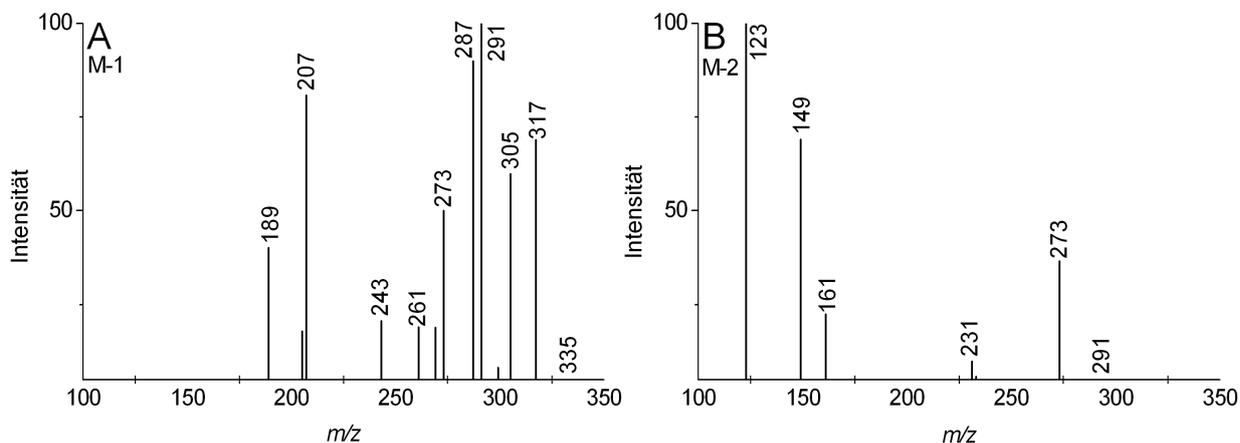
- X. Yang, T. T. Khong, L. Chen, H. D. Choi, J. S. Kang, und B. W. Son. 8'-Hydroxyzearalanone and 2'-hydroxyzearalanol: resorcylic acid lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 56(9):1355–1356, 2008.
- H. Zhang, O. Varlamova, F. M. Vargas, C. N. Falany, und T. S. Leyh. Sulfuryl transfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase. *J Biol Chem*, 273(18):10888–10892, 1998.
- A. Zinedine, J. M. Soriano, J. C. Molto, und J. Manes. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol*, 45(1):1–18, 2007.
- P. Zollner, J. Jodlbauer, M. Kleinova, H. Kahlbacher, T. Kuhn, W. Hochsteiner, und W. Lindner. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J Agric Food Chem*, 50(9):2494–2501, 2002.



# A. Anhang

## A.1. Analytische Daten zu ZEN-Metaboliten

### A.1.1. Analytische Daten zu ZEN-Hydrolyseprodukten



Produkt	RT-LC-MS (min)	ESI-MS (M-H)	Fragmentationen m/z
M-1	8,4	335	317; 305; 291; 287*; 273; 261; 243; 207; 189
M-2	12,0	291	273; 231; 221; 177; 161; 149; 123*

Abbildung A.1.1.: Chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften von ZEN-Hydrolyseprodukten nach chemischer Hydrolyse von ZEN in 1 M NaOH bei 95°C für 2 h. **A**: Hydrolyseprodukt M-1 und **B**: Hydrolyseprodukt M-1 nach spontaner Decarboxylierung zu M-2. LC/MS- Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 5

### A.1.2. Analytische Daten zu ZEN-Konjugaten

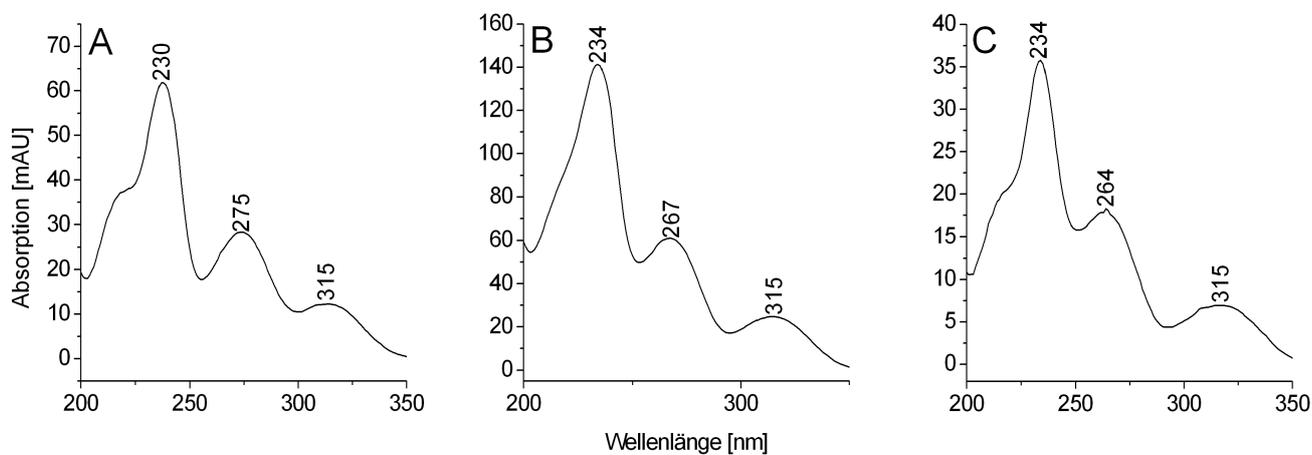


Abbildung A.1.2.: UV-Spektren von **A:** ZEN, **B:** ZEN-14-O-G und **C:** ZEN-14-O-S

## A.2. Externe Kalibrierungen

Siehe Tab.: A.1

## A.3. Wiederfindungen

### A.3.0.1. Fäzessuspensionsinkubationen

Tabelle A.2.: Berechnete Wiederfindungen aus den Fäzessuspensionsinkubationen

Inkubation	Wiederfindung [%]
MAT	100 ± 2*
DAI	86 ± 8*
ZEN	62 ± 11**

\* Dargestellt sind Mittelwerte ± Spannweite

\*\* Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung

Tabelle A.1.: Parameter zu den externen Kalibrierungen für untersuchte und quantifizierte Substanzen. Die Kurvenanpassung und Berechnung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Excel durch lineare Regressionsanalyse. A=integrierte Peakfläche; n=injizierte Stoffmenge.

Substanz	Methode	Wellenlänge [nm]	Masse [m/z]	Kalibrierbereich [nmol]	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
ENL	Kap.: 5.4.3.2	280		0,02 - 2	A=5794 n - 7258	R <sup>2</sup> =0,9996
ZEN	Kap.: 5.4.5.1	260		0,05 - 2,5	A = 380444 n - 13603	R <sup>2</sup> =0,9943
α-ZEL	Kap.: 5.4.5.1	280		0,05 - 2,5	A=543327 n - 21729	R <sup>2</sup> =0,9987
β-ZEL	Kap.: 5.4.5.1	280		0,05 - 2,5	A=308480 n - 9625	R <sup>2</sup> =0,9976
E <sub>2</sub> -3-O-S	Kap.: 5.4.4.7		351->271	0,02 - 1	A=1483617 n + 38016	R <sup>2</sup> =0,9826
E <sub>2</sub> -3-O-S	Kap.: 5.4.4.7		351->271	0,0002 - 0,2	A = 1584599 n + 3546	R <sup>2</sup> =0,9984
ZEN	Kap.: 5.4.5.2	260		0,002 - 0,2	A = 673836 n + 299	R <sup>2</sup> =0,9986
ZEN	Kap.: 5.4.6.4	280		0,001 - 1	A = 1129637 n + 1953	R <sup>2</sup> =1,0000
α-ZEL	Kap.: 5.4.6.4	280		0,001 - 1	A = 1066505 n + 1233	R <sup>2</sup> =1,0000
β-ZEL	Kap.: 5.4.6.4	280		0,001 - 1	A = 712908 n + 1690	R <sup>2</sup> =0,9999
ZEN	Kap.: 5.4.7.3	280		0,02 - 2	A= 1013533 n - 941	R <sup>2</sup> = 1,0000
α-ZEL	Kap.: 5.4.7.3	280		0,02 - 2	A= 958526 n + 363	R <sup>2</sup> = 1,0000
β-ZEL	Kap.: 5.4.7.3	280		0,002 - 2	A= 650287 n + 976	R <sup>2</sup> = 1,0000

## A.3.0.2. IASC Aufreinigung

Tabelle A.3.: Berechnete Wiederfindung von ZEN,  $\alpha$ -ZEL und  $\beta$ -ZEL sowie oxidativer Metabolite und MPs nach IASC Aufreinigung eines Standardgemisches aus wässriger Pufferlösung pH 7,4 und Galle.

<b>Metabolit</b>	<b>MP2</b>	<b>ZEN</b>	<b>MP1</b>	<b>MP4</b>
<b>Wdf. in Puffer [%]</b>	77,2	78,7	0	108,8
<b>Wdf. in Galle [%]</b>	87,0	90,9	0	63,5
<b>Metabolit</b>	<b><math>\alpha</math>-ZEL</b>	<b>15-HO-ZEN</b>	<b>6a-HO-ZEN</b>	<b><math>\beta</math>-ZEL</b>
<b>Wdf. in Puffer [%]</b>	84,1	0	38,4	29,3
<b>Wdf. in Galle [%]</b>	88,3	0	73,3	25,1
<b>Metabolit</b>	<b>M-8</b>	<b>5-HO-ZEN</b>	<b>10-HO-ZEN</b>	<b>6<math>\beta</math>-HO-ZEN</b>
<b>Wdf. in Puffer [%]</b>	23,1	4,6	0	6,9
<b>Wdf. in Galle [%]</b>	43,5	10,3	0	12,5
<b>Metabolit</b>	<b>6-Keto-a-ZEL</b>	<b>15-HO-a-ZEL</b>	<b>6a-HO-a-ZEL</b>	<b>6<math>\beta</math>-HO-a-ZEL</b>
<b>Wdf. in Puffer [%]</b>	16,6	0	53,4	8,3
<b>Wdf. in Galle [%]</b>	30,1	0	74,4	12,4

## A.4. Oxidativer Metabolismus

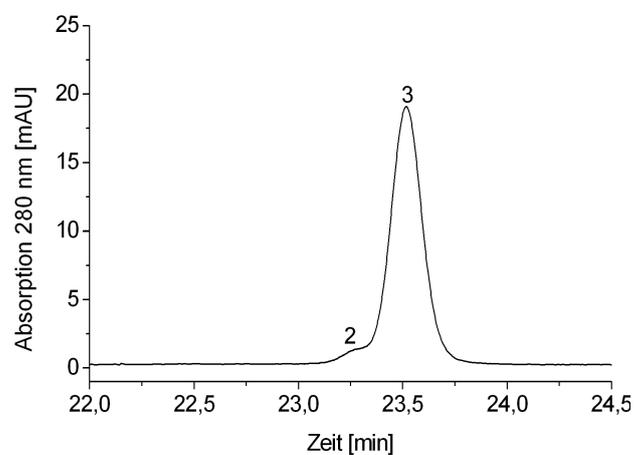


Abbildung A.4.1.: HPLC-UV Chromatogramm einer optimierten Trennung von Peak 2/3

## A.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten

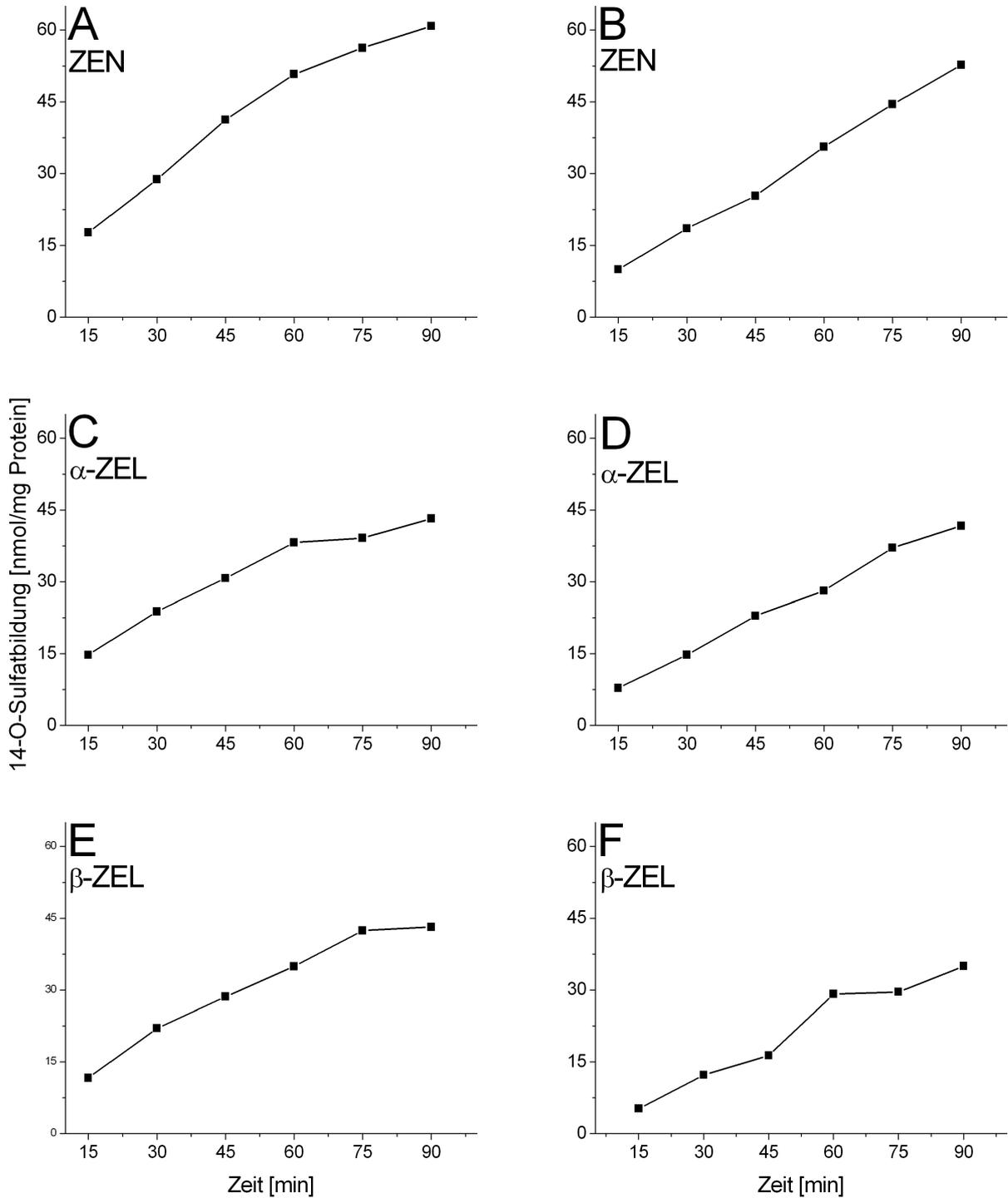


Abbildung A.5.1.: Gebildete Mengen 14-*O*-Sulfat der getesteten RALs in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Inkubationen des eingesetzten Substrates mit RLC (A,C,E) und HLC (B,D,E).

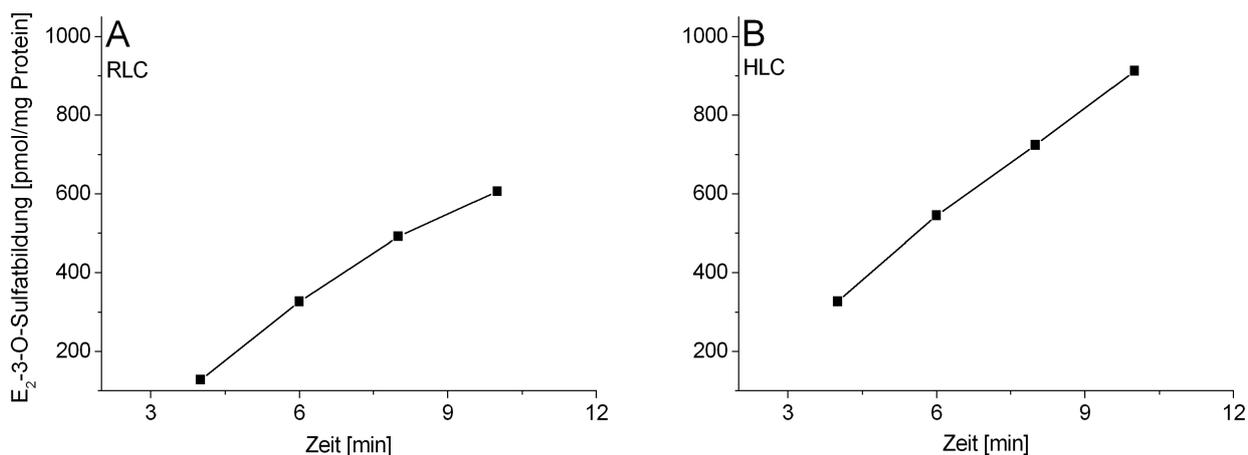


Abbildung A.5.2.: Gebildete Mengen E<sub>2</sub>-3-O-Sulfat in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Inkubationen von E<sub>2</sub> (20 µM) inkubiert in **A**: RLC und **B**: in in HLC.

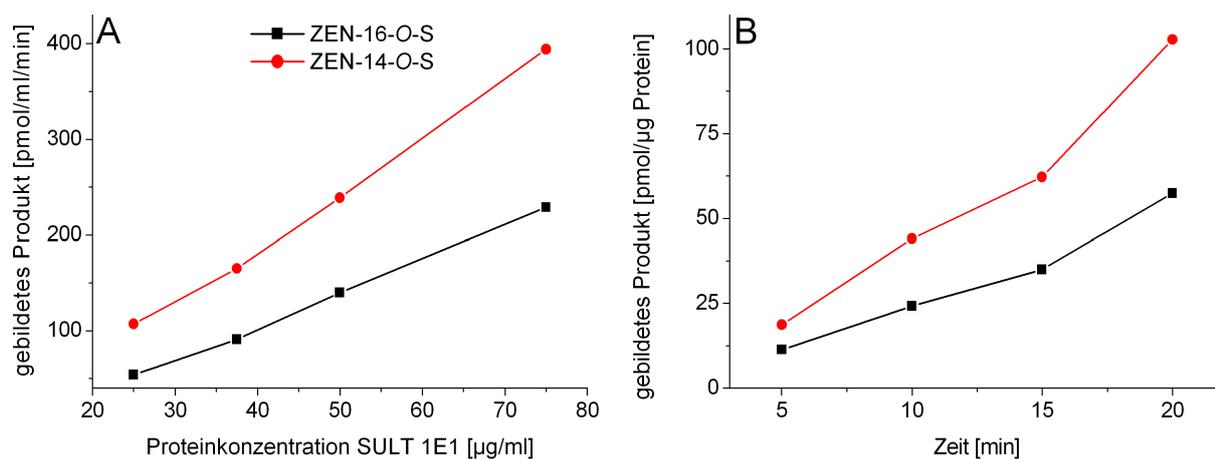


Abbildung A.5.3.: Gebildete Mengen von ZEN-16-O-S und ZEN-14-O-S in Inkubationen von hSULT1E1 mit ZEN [20 µM] in Abhängigkeit von **A**: der eingesetzten Proteinmenge hSULT1E1 und **B**: der Inkubationszeit.

## A.6. Leberschnittinkubationen

Siehe Tab.: A.7.1

## A.7. LC-MS Tune Files

Siehe Tab.: A.4

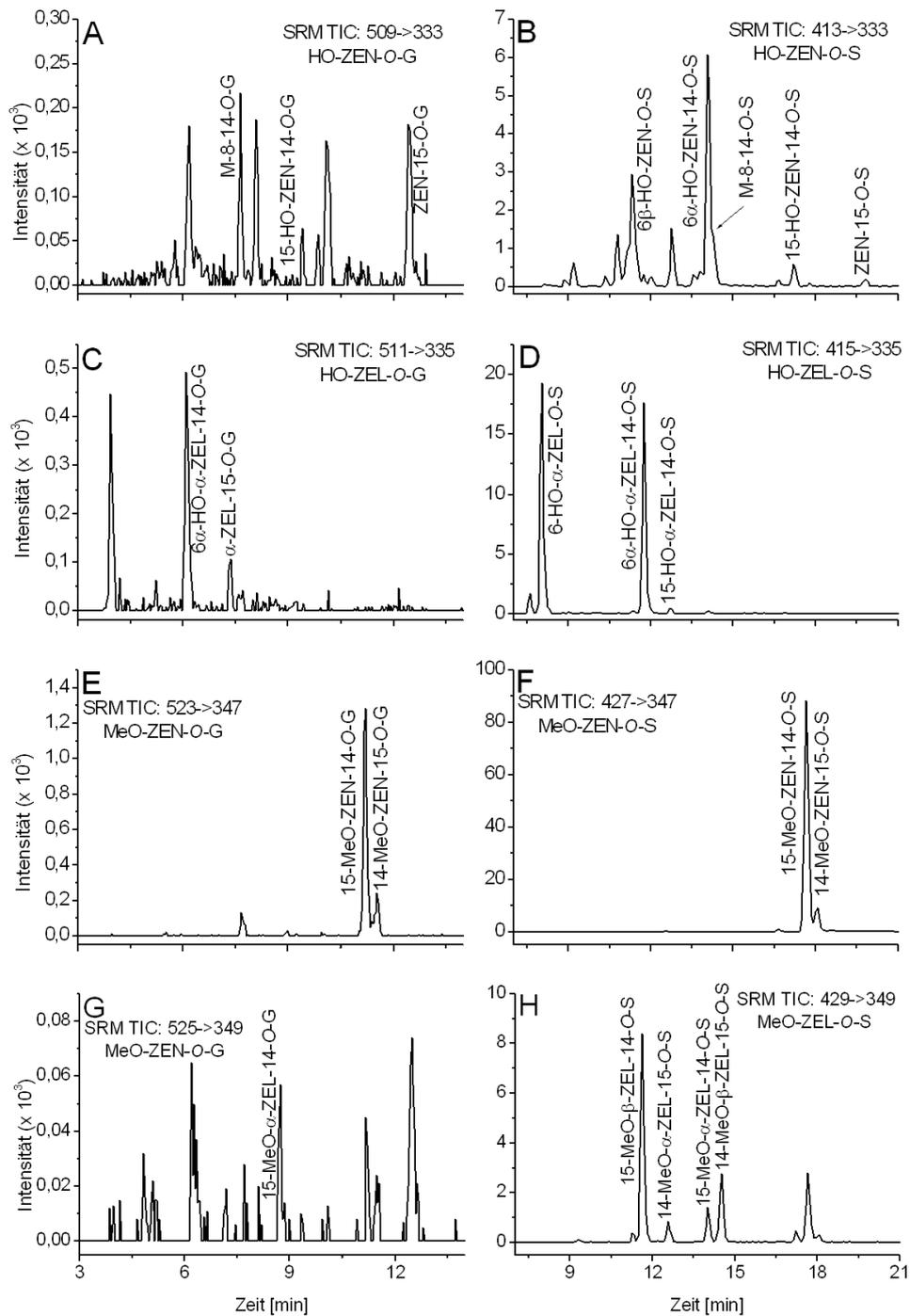


Abbildung A.7.1.: Repräsentative LC-MS Chromatogramme aus einer Inkubation von ZEN (200  $\mu$ M) mit einem Leberschnitt einer männlichen Sprague Dawley Ratte für 24 h (Kap.: 5.4.6). Dargestellt ist der SRM-TIC für **A**: HO-ZEN-O-G, **B**: HO-ZEN-O-S, **C**: HO-ZEL-O-G, **D**: HO-ZEL-O-S, **E**: MeO-ZEN-O-G, **F**: MeO-ZEN-O-S, **G**: MeO-ZEL-O-G **B**: HO-ZEN-O-S, und **H**: MeO-ZEL-O-S. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.: 5.4.1.3 Methode 1-4.

Tabelle A.4.: LC-MS Tuning Parameter

Tune 1, ZEN (10 $\mu$ M)		Tune 2, ZEN-3-O-S (10 $\mu$ M)		Tune 3, MAT (10 $\mu$ M)	
Parameter	Wert	Parameter	Wert	Parameter	Wert
Sheat Gas Flow Rate [arb]	30	Sheat Gas Flow Rate [arb]	35	Sheat Gas Flow Rate [arb]	35
Aux Gas Flow Rate [arb]	15	Aux Gas Flow Rate [arb]	10	Aux Gas Flow Rate [arb]	10
Sweep Gas Flow Rate [arb]	0	Sweep Gas Flow Rate [arb]	0	Sweep Gas Flow Rate [arb]	0
Ion Spray Voltage [kV]	4,5	Ion Spray Voltage [kV]	4,5	Ion Spray Voltage [kV]	4,0
Capillary Temperature [°C]	350	Capillary Temperature [°C]	350	Capillary Temperature [°C]	350
Capillary Voltage [V]	-45	Capillary Voltage [V]	-10	Capillary Voltage [V]	-41
Tube Lens Voltage [V]	-125	Tube Lens Voltage [V]	-80	Tube Lens Voltage [V]	-105
Ion Optic Tune	automatic	Ion Optic Tune	automatic	Ion Optic Tune	automatic
Tune 4, DAI (10 $\mu$ M)		Tune 5, ZEN (10 $\mu$ M)		Tune 6, E <sub>2</sub> -3-O-S (10 $\mu$ M)	
Parameter	Wert	Parameter	Wert	Parameter	Wert
Sheat Gas Flow Rate [arb]	30	Sheat Gas Flow Rate [arb]	8	Sheat Gas Flow Rate [arb]	30
Aux Gas Flow Rate [arb]	8	Aux Gas Flow Rate [arb]	0	Aux Gas Flow Rate [arb]	5
Sweep Gas Flow Rate [arb]	0	Sweep Gas Flow Rate [arb]	0	Sweep Gas Flow Rate [arb]	0
Ion Spray Voltage [kV]	4,0	Vaporisation Temp. [°C]	300	Ion Spray Voltage [kV]	4,5
Capillary Temperature [°C]	350	Ion Spray Voltage [kV]	5,0	Capillary Temperature [°C]	350
Capillary Voltage [V]	-24	Capillary Temperature [°C]	275	Capillary Voltage [V]	-50
Tube Lens Voltage [V]	-100	Capillary Voltage [V]	-35	Tube Lens Voltage [V]	-121
Ion Optic Tune	automatic	Tube Lens Voltage [V]	-110	Ion Optic Tune	automatic
		Ion Optic Tune	automatic		

## B. Publikationen und Poster

### Publikationen in Fachzeitschriften

E. Pfeiffer, A. Hildebrand, G. Damm, A. Rapp, B. Cramer, H. U. Humpf, and M. Metzler. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone *in vitro*. *Mol Nutr Food Res*, 53(9):1123–1133, 2009

### Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

G. Damm, E. Pfeiffer, M. Metzler: Biotransformation von Zearalenon in Gegenwart menschlicher Darmbakterien, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Berlin, 14. - 16. September 2009 , Abstract-Band, S. 249

G. Damm, E. Pfeiffer, M. Metzler: Metabolism of Zearalenone in Precision-Cut Tissue Slices from Rat Liver, 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 10. - 12. März 2009

G. Damm, E. Pfeiffer, M. Metzler: Metabolism of Zearalenone in Precision-Cut Tissue Slices from Rat Liver, 30. Mycotoxin-Workshop, Utrecht (NL), 28. - 30. April 2008, Abstract-Band, S. 146

G. Damm, E. Pfeiffer, A. Heyting, M. Metzler: Neue oxidativ gebildete *in vitro* Metabolite von Mykotoxinen des Zearalenon Types, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Nürnberg, 10. - 12. September 2007, Abstract-Band, S. 195

G. Damm, E. Pfeiffer, A. Heyting, M. Metzler: Novel oxidative *in vitro* Metabolites of Zearalenone-Type Mycotoxines, 29. Mycotoxin-Workshop, Fellbach, 14. - 16. Mai 2007, Abstract-Band, S. 121



## C. Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit in verschiedenster Art und Weise ihren Beitrag geleistet haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler für das Überlassen des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie für die hilfreichen Diskussionen und die wertvolle Kritik
- Frau Erika Pfeiffer für die fortwährende Unterstützung, zahlreichen Anregungen und ihre Geduld ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre
- Dr. Eric Fabian und Dr. Hennieke Kamp, die während der Diplomarbeit bei der BASF AG in Ludwigshafen den Grundstein für mein wissenschaftlichen Werdegang legten
- Doris Honig für ihre Hilfe und Unterstützung bei allen Fragestellungen im Zusammenhang mit der HPLC und der GC-MS
- Julia Dempe, Britta Burkhardt und Andreas Hildebrand für die umfangreiche Unterstützung und Hilfe während dem Zusammenschreiben und für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie den Mitdoktoranden Simon Göckler, Silke Gerstner, Jörg Wagner, Matthias Roth, Markus Zettner und Markus Fehr für das tolle Arbeitsklima, die viele Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Dauer meiner Promotion
- Anja Heyting, Christina Becker, Anne Kommer, Stefanie Kienzle und Christian Schnattinger für ihre Beiträge zum Forschungsschwerpunkt Zearalenon während ihrer Diplomarbeiten
- allen anderen Mitdoktoranden, Mitarbeitern, Diplomanten und Studenten der Abteilungen für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltoxikologie für eine tolle Zeit an der Universität Karlsruhe

Besonders danken möchte ich:

- meinen Eltern die mir das Studium ermöglicht haben, meiner Schwester, ihrem Mann Dennis und meinem Patenkind Mia-Fee für ihre ständige Unterstützung und Hilfe während der Endphase dieser Arbeit
- meinen Freunden Daniel Frisch, Armin Zundel, Hannes Rapp, Jan Breitenbruch, Christian Dengel, Konstantin von Fragstein, Marcel Gronemann, Anja Lochte, Martin Fritzsche, Christopher Krüger, Sima Payandeh, Elisabeth Bayer, Mirko Leschikar, Annabel Angus und Henrike Mall ohne deren Beitrag, Unterstützung, Aufmunterung und Hilfe dies alles nicht möglich gewesen wäre
- Christina Schneider für ihre liebevolle Fürsorge und Aufmunterung sowie für die wissenschaftliche Hilfestellung und abschließende Korrektur dieser Arbeit



# Lebenslauf

Name: Georg Damm  
Geburtsdatum: 23. Januar 1979  
Geburtsort: Bad Bergzabern  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

1985 - 1989 Grundschule Dörrenbach  
1989 - 1991 Orientierungsstufe Bad Bergzabern  
1991 - 1995 Realschule Bad Bergzabern  
Abschluss: Qualifizierter Sekundarabschluss I  
1995 - 1999 Gymnasium Bad Bergzabern  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Wehrdienst

1999 - 2000 Grundwehrdienst GebJgBtl 232,  
Bischofswiesen/Strub

### Hochschulausbildung

- Oktober 2000 - Juli 2003 Grundstudium Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)
- Oktober 2003 - Juli 2006 Studium Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
11. April 2003 Diplomvorprüfung Chemie
27. Oktober 2003 Erster Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
1. Januar 2006 - 31. Juli 2006 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. M. Metzler am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie, der Universität Karlsruhe (TH) in Zusammenarbeit mit der BASF AG Ludwigshafen  
Thema: Untersuchungen zum Einfluss möglicher metabolischer Toxifizierung / Detoxifizierung von Mitosehemmstoffen auf das Wachstum von V79 Zellen  
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker /  
Zweiter Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
- seit 01. Januar 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. M. Metzler