

Kontakt • Contact

Prof. Michael Rychlik, Christian Schnurr, Eva Biehl; Technical University of Munich, <https://www.alc.wzw.tum.de>
 Prof. Milena Stranska, Marie Fenclova; University of Chemistry and Technology, Prague, <https://uapv.vscht.cz>

Neue „modifizierte/maskierte“ Fusariumtoxine in Malz und Bier

New ‘Modified/Masked’ Fusarium Toxins in Malt and Beer

Bedeutung von Fuariumtoxinen und ihren modifizierten Formen

Die Schimmelpilzfamilie *Fusarium* infiziert häufig Getreide wie Weizen, Mais und Gerste, was zu Kontaminationen mit Mykotoxinen führt (Fig.1). Unter diesen Toxinen ist Deoxynivalenol (DON) das wichtigste. Inzwischen gewinnen aber „modifizierte/maskierte“ Mykotoxine, d.h. Konjugate immer mehr an Bedeutung [1]. Unter letzteren ist Deoxynivalenol-3-glucosid (D3G), der Hauptmetabolit von DON in Pflanzen, am besten bekannt. Neben D3G wurde auch von Modifikationen durch Disaccharide in Getreideprodukten berichtet [2]. Für diese sind jedoch keine Referenzverbindungen verfügbar, und so war es das Ziel dieses Projektes, DON-3-maltosid (D3M) zu synthetisieren und in Lebensmitteln zu analysieren.



Fig. 1. Barley grains infected with *Fusarium*

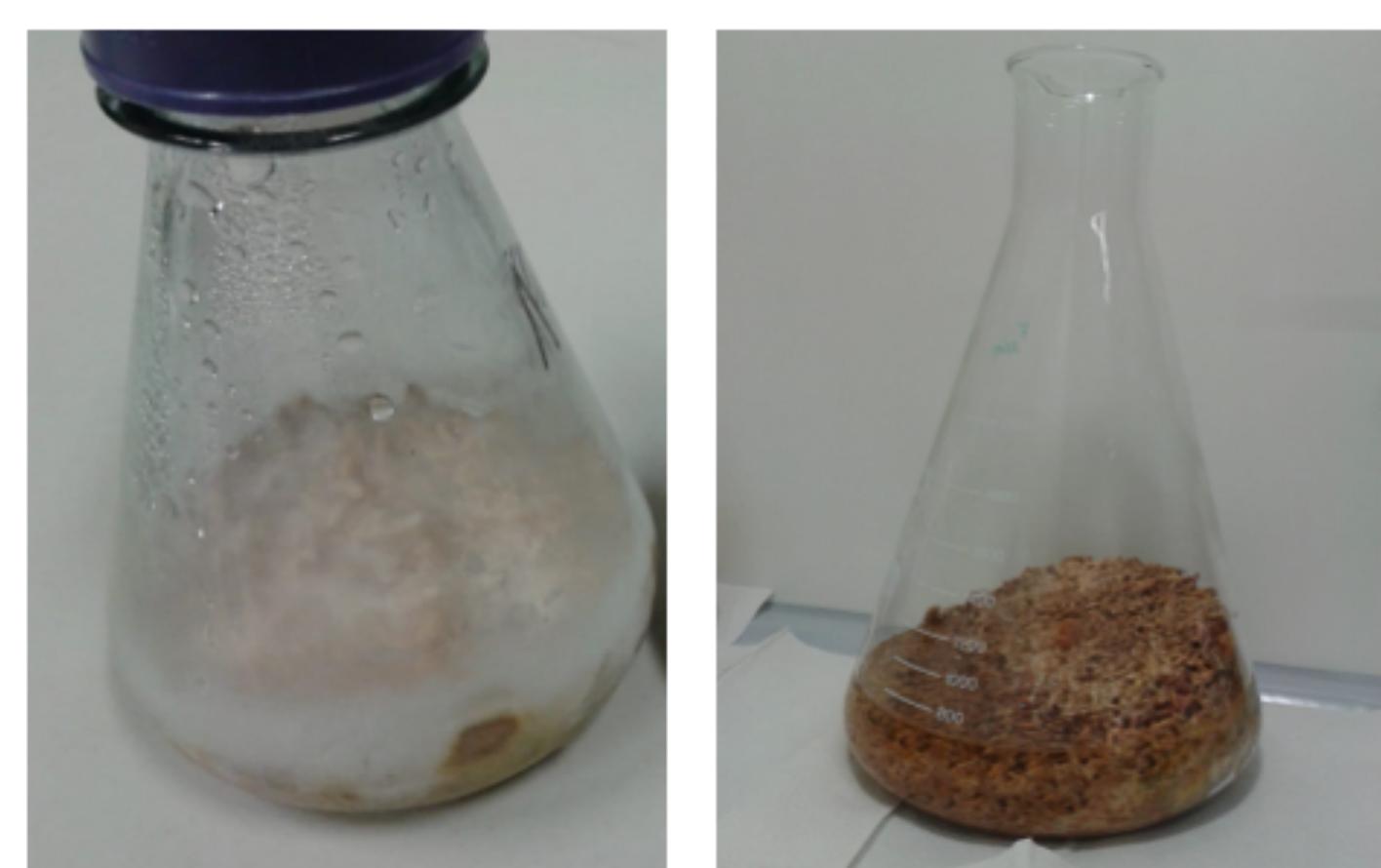


Fig. 2. Fungal synthesis of DON on agar and rice

Synthese und Analyse von Deoxynivalenol-3-Maltosid

Die Synthese von DON-3-maltosid erfolgte nach dem SCHMIDT-Donor Verfahren. Das aus Reiskulturen isolierte DON (Fig. 2) wurde acetyliert und dann mit peracetyliertem Maltosyltrichloroacetimidat umgesetzt. Während in der Literatur ein Umsatz von 32 % für das DON-15-gentioibiosid berichtet wird, konnte hier nur ein Umsatz von 1 % erreicht werden. Das 1H-NMR Spektrum von D3M (Fig. 3) zeigte noch Verunreinigungen, die eine vollständige Auswertung erschwerten. Jedoch waren die Signale der Trichothecen-Grundstruktur vorhanden. Zusammen mit HRMS- und MS/MS-Daten konnte die erfolgreiche Synthese von DON-3-maltosid bestätigt werden. Hinsichtlich der Regioselektivität der Synthese wiesen LC-MS/MS- und LC-HRMS-Daten darauf hin, dass ein kleiner Anteil des α -Anomers gebildet wurde (Fig.4). Die beiden Anomer konnten dann noch besser durch LC-Ionenmobilitäts-QToF-MS (Fig. 5) getrennt werden. Der synthetisierte Standard wurde schließlich eingesetzt, um das

Vorkommen von D3M in Gersten- und Malzproben zu untersuchen. Dies geschah durch verschiedene LC-MS/MS-Systeme. Erhebliche Gehalte an DON und D3G ergeben sich in Gerste (Fig. 6) und Malz (Fig. 7), die mit *Fusarium culmorum* infiziert waren.

Es konnte jedoch kein D3M nachgewiesen werden. Weitere Analysen von D3M in Bieren sind daher unterwegs.

Literatur/References:

- [1] Rychlik M., et al., Mycotoxin Res. (2014) 30: 197-205, open access, DOI: 10.1007/s12550-014-0203-5
- [2] Berthiller F., et al., Anal. Bioanal. Chem. (2009), 395: 1243-1252
- [3] Zachariasova M., et al., J. Agric. Food Chem. (2012), 60: 9280-9291, DOI: 10.1021/jf302069z

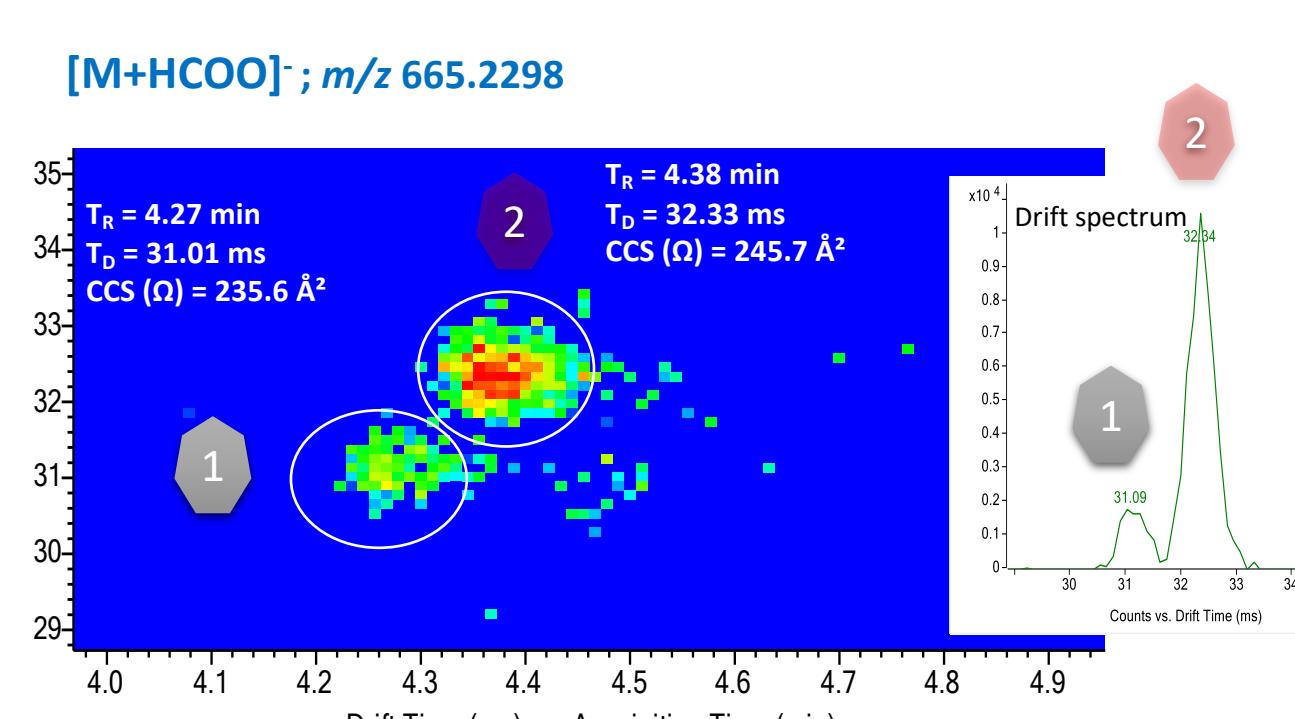


Fig. 5 LC-Ion mobility QToF analysis of synthetic D3M

Relevance of Fusarium Toxins and their Modified Forms

The fungal genus *Fusarium* is frequently affectioning cereals like wheat, corn and barley and leads to contaminations with mycotoxins (Fig. 1). Among these, deoxynivalenol (DON) is the most prevalent one. However, growing attention has been paid to ‘modified/masked’ mycotoxins, i.e. mycotoxin conjugates that are products of either plant detoxification processes, or products of food processing technologies [1]. Among these, the most well-known mycotoxin conjugate is deoxynivalenol-3-glucoside (D3G), the main plant metabolite of DON [2]. Besides D3G, Disaccharide modifications of DON have been reported in beer, malt and baked goods [3]. However, standard substances for DON-disaccharides are commercially unavailable to date. The aim of this work was to prepare DON-3-maltoside (D3M) and to analyse food samples for its presence.

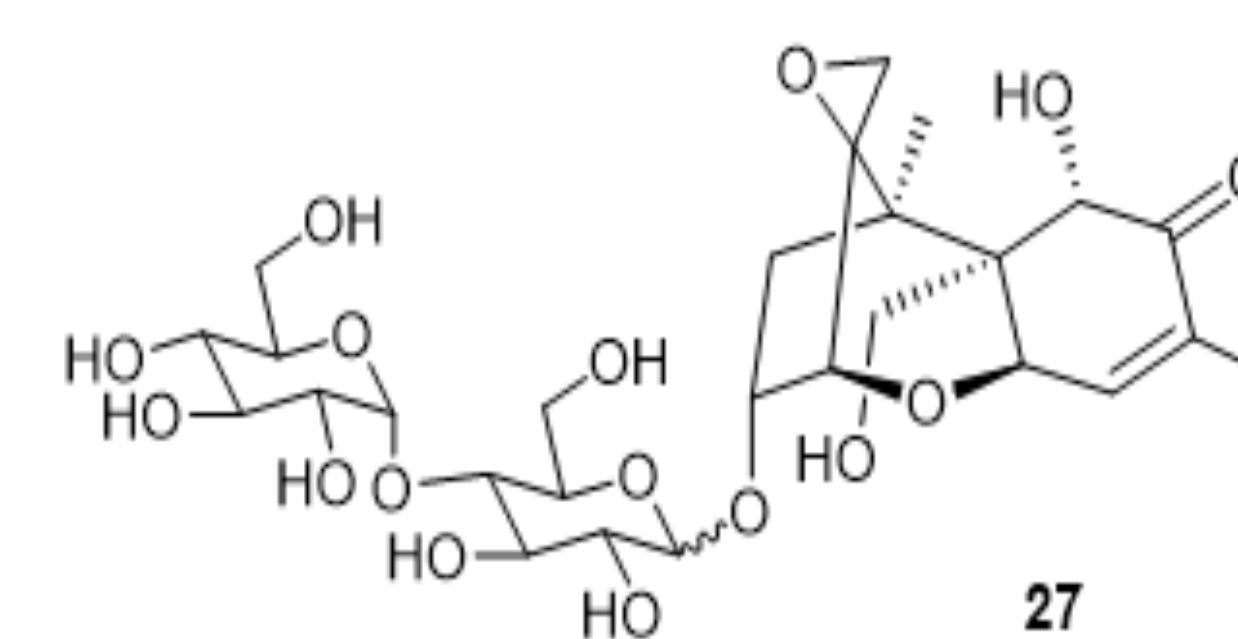


Fig. 3. Structure of DON-3-maltoside (D3M, 27)

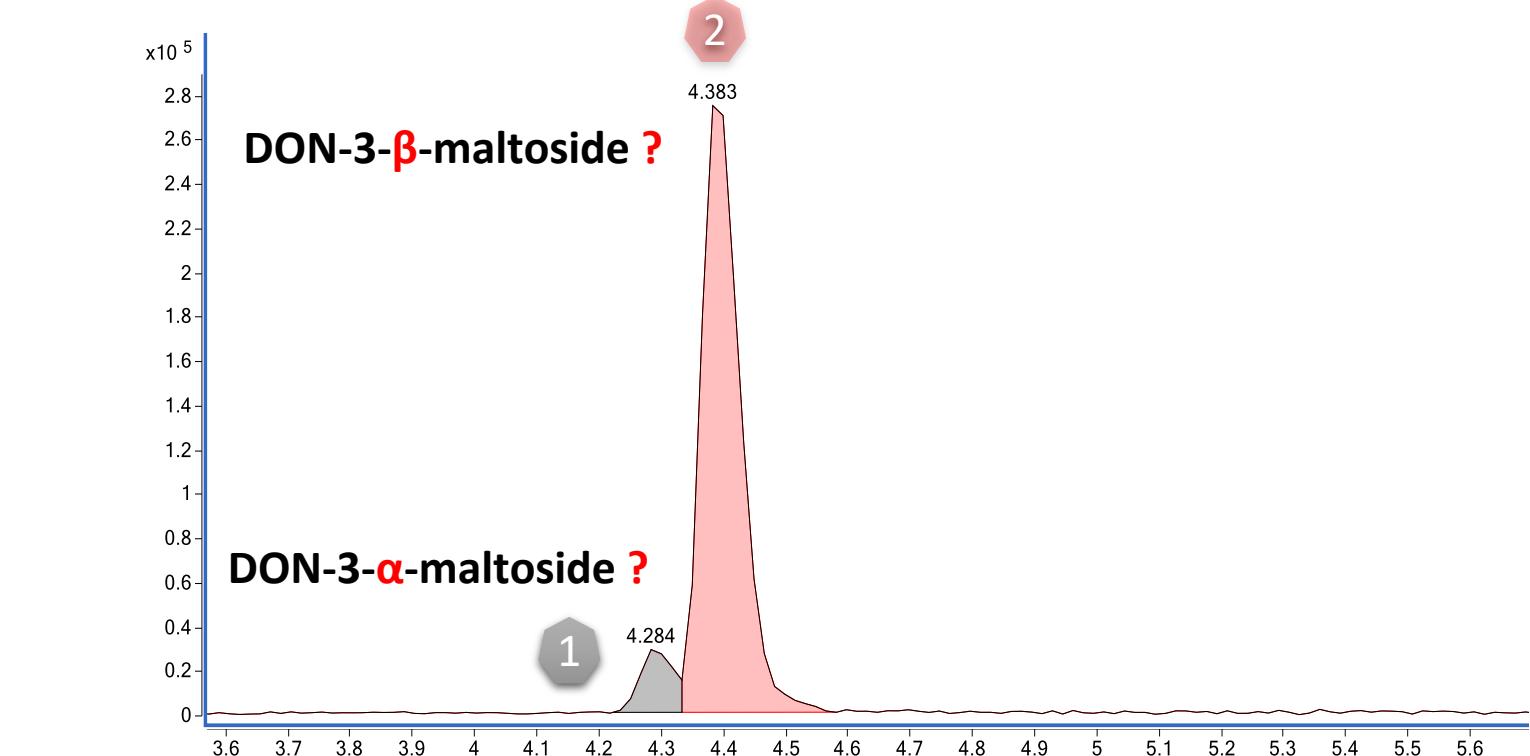


Fig. 4 LC-HRMS analysis of synthetic D3M

Synthesis and Analysis of Deoxynivalenol-3-maltoside

Synthesis of DON-3-maltoside was performed by following the SCHMIDT donor approach. DON isolated from fungal cultivations on rice (Fig. 2) was acetylated on its 15-OH group and then reacted with peracetylated maltosyl trichloroacetimidate. While 32 % overall yield are reported in the literature for the DON-15-gentioibioside, only 1 % could be achieved for the glycosylation step followed by deprotection in the presented work. The 1H NMR spectrum of D3M (Fig. 3) showed too many impurities for complete evaluation. However, relevant structural features of the DON nucleus could be found. Along with HRMS and MS/MS data, showing reasonable adducts and fragments of D3M, the successful synthesis of DON-3-maltoside was confirmed.

Regarding the regioselectivity of the synthesis, LC-MS/MS and LC-HRMS data indicated that a small percentage of the α -anomer could have been formed (Fig. 4). The two isomers were then separated more accurately by LC-Ion mobility QToF-MS (Fig. 5).

The synthesized standard was used to investigate the presence of D3M in barley and malt samples. Analyses were done by different LC MS/MS systems. Substantial DON and D3G amounts were found in barley (Fig.6) and malt (Fig. 7) inoculated with *Fusarium culmorum*. However, no D3M was found in these samples. Further analyses on D3M in beers and its formation during the brewing process are under way.

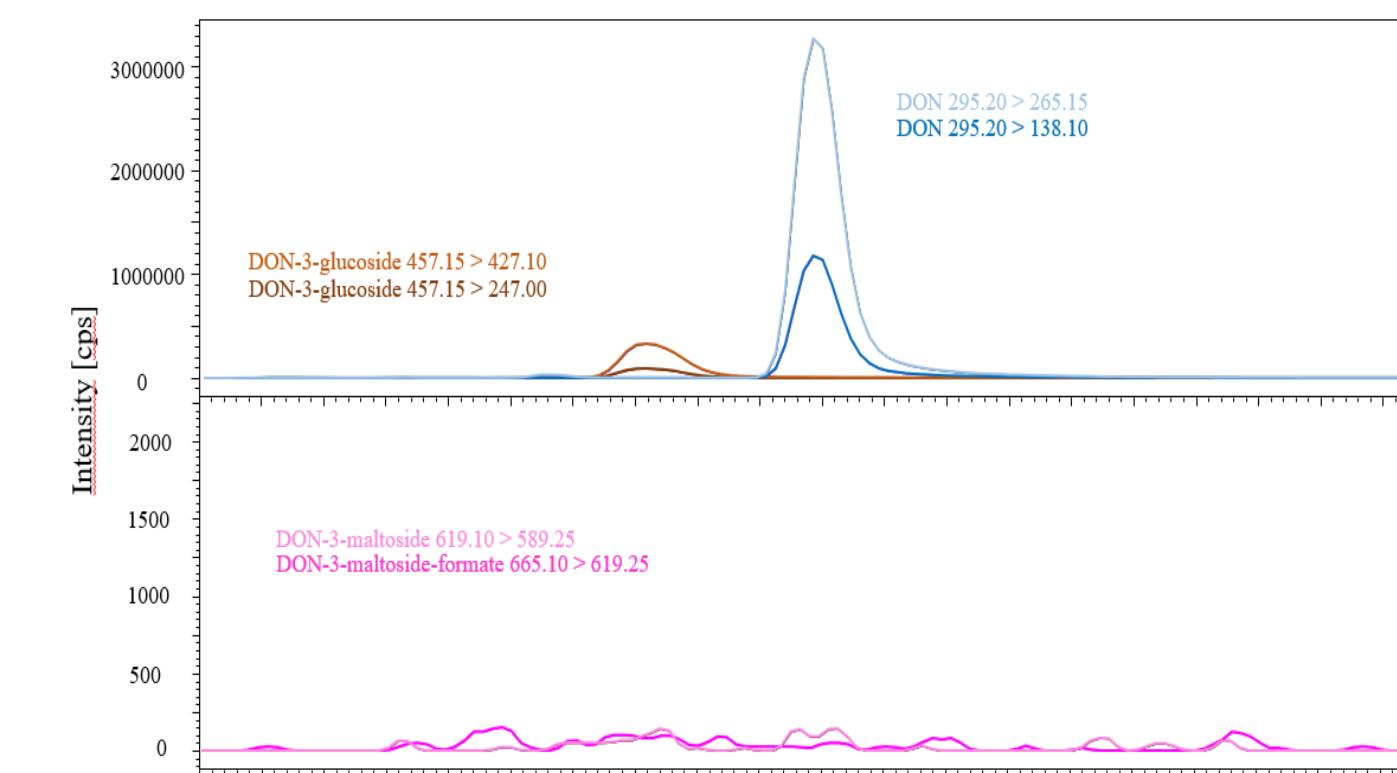


Fig. 6 LC-MS/MS of barley infected with *Fusarium*

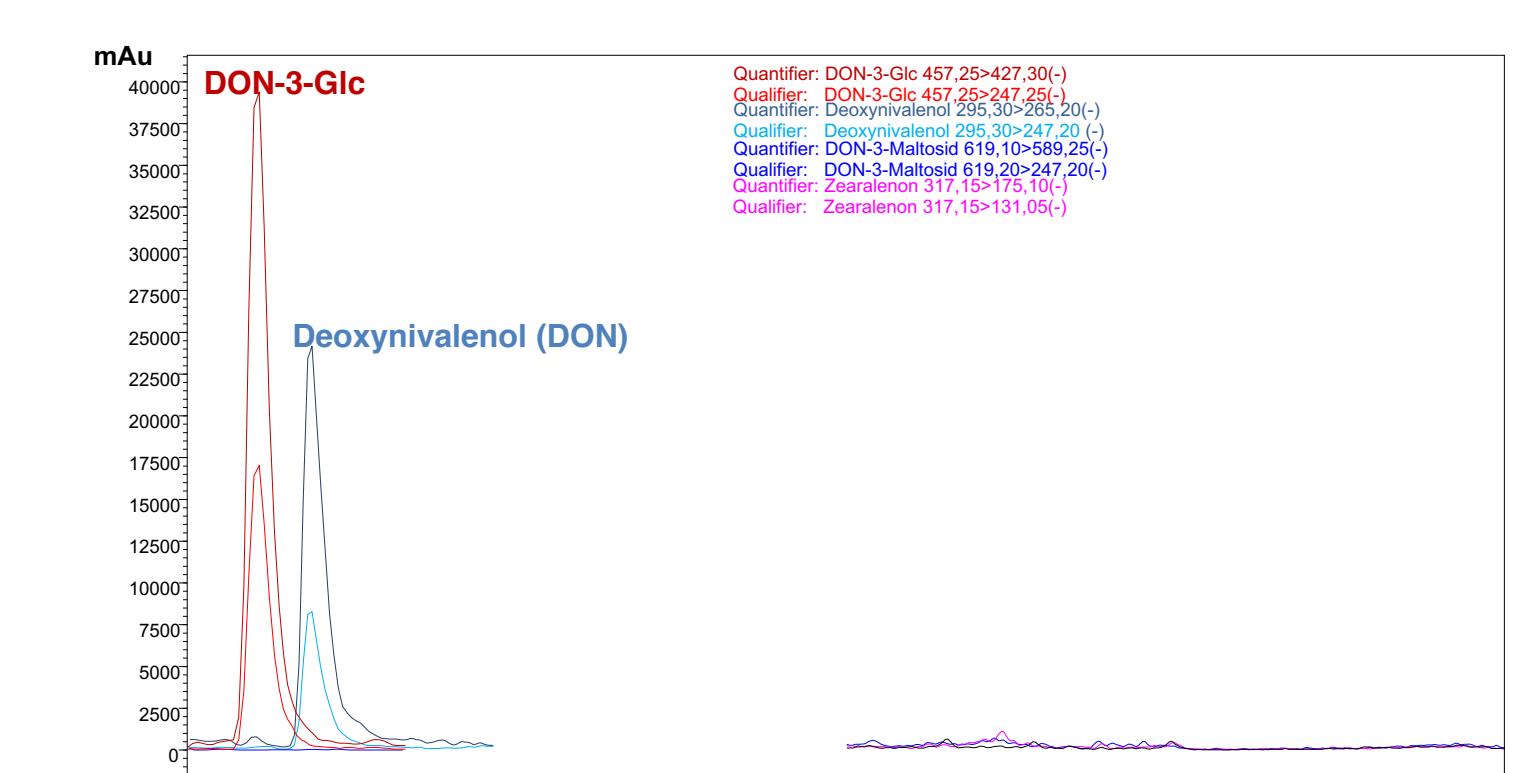


Fig. 7 LC-MS/MS of malt infected with *Fusarium*