

Aflatoxine B und G, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A in Trockenfeigen mit BGY-Fluoreszenz = Aflatoxin B and G, cyclopiazonic acid kojic and ochratoxin A in dried figs showing BGY-fluorescence

Autor(en): **Steiner, W. / Brunschweiler, K. / Leimbacher, E.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 5

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982145>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aflatoxine B₁ und G₁, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A in Trockenfeigen mit BGY-Fluoreszenz

Aflatoxin B₁ and G₁, Cyclopiazonic Acid, Kojic Acid and Ochratoxin A in Dried Figs Showing BGY-Fluorescence

W. Steiner

Migros-Genossenschafts-Bund, Zürich

K. Brunschweiler, E. Leimbacher und R. Schneider

Kantonales Laboratorium Zürich, Zürich

Einleitung

Nach der Neuentdeckung aflatoxinhaltiger Trockenfeigen im Jahre 1985 wurden in der Türkei beträchtliche Massnahmen getroffen, um die Situation zu verbessern. Die Entfernung von Trockenfrüchten mit BGY-(bright greenish yellow) Fluoreszenz reduziert den Gesamtgehalt an Aflatoxinen in einer Charge im allgemeinen auf ein Mass, das für den Konsumenten nur noch ein geringes Risiko darstellt. Ein Argument gegen das Aussortieren von fluoreszierenden Trockenfeigen betrifft jedoch die Häufigkeit, mit welcher diese Früchte hochkontaminiert auftreten. Wenn auf einer Einzelfrucht 100 µg/kg Aflatoxin B₁ und mehr als eine kritische Konzentration betrachtet werden, so erreichten 58% der von uns untersuchten Trockenfeigen mit Fluoreszenz (1) und 77% jener in einer anderen Studie (2) diese Grenze nicht. Dies bedeutet, dass eine erhebliche Menge der Früchte nicht zum direkten Konsum freigegeben werden kann, obwohl diese keine besonders hohen oder gar keine Aflatoxinkontaminationen aufweisen. Es ist aber andererseits bekannt, dass Schimmelpilze, welche Aflatoxine bilden, noch weitere Toxine produzieren können, wie z. B. Cyclopiazonsäure (3, 4) und Kojisäure (5). Letztere wird auch als Vorläufer der Substanz betrachtet, welche bei Licht von 360 nm Wellenlänge mit BGY-Fluoreszenz leuchtet (6–8). Da auch Ochratoxin bildende Pilzstämme Kojisäure synthetisieren können (9), ist es möglich, dass fluoreszierende Früchte auch dieses Toxin enthalten. Weitere Toxine in ähnlichen Konzentrationen wie die Aflatoxine dürften den Einwand entkräften, fluoreszierende Trockenfeigen seien nicht alle derart verdorben, dass sie in jedem Falle eine spezielle Verarbeitung oder gar Beseitigung benötigen.

Material und Methoden

Chemikalien

Aceton, p.a., Merck, 14

Acetonitril, HPLC-Qualität und analysenrein (Ac 327, Scharlau)

Acetanhydrid, Merck, 41

Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, Serva, 77020, 77021, 77022, 77023

Standardmischung für die DC: Aflatoxine B₁ und G₁ je 0,5 µg/ml, Aflatoxine B₂ und G₂ je 0,25 µg/ml in Toluol/Acetonitril (98+2). Überprüfung der Standards nach (10).

Ameisensäure, Merck, 264

Chloroform, p.a., Merck, 2445

Cyclohexan rein, Siegfried, 128040

Cyclopiazonsäure, Sigma, C-1530

Standardlösung: 10,82 µg/ml Methanol/Wasser 85 + 15. Diese Lösung blieb im Kühlschrank über zwei Monate stabil. Spektroskopische Überprüfung des Standards nach (11).

Dichlormethan, p.a., Merck, 6050

Diethylether, wasserfrei, peroxidfrei, Fluka, 31680

Ethylacetat, p.a., Merck, 9623

Kochsalz (Merck 6404.1000)

Kojisäure, Fluka, 60890

Standardlösung: 1,72 mg/10 ml Acetonitril wurden in mobiler Phase (Wasser/Acetonitril 90 + 10) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Diese Lösung blieb während mindestens eines Monats stabil.

Methanol, Merck p.a., Mächler, 9001

Natriumhydrogencarbonat, Merck, 6329

Natriumsulfat, Merck, 6649

Ochratoxin A, Serva, 77640

Standardlösung: 35,6 µg/ml Toluol/Essigsäure 99 + 1. Von dieser Lösung wurde mit Stickstoff ein Aliquot zur Trockne eingengt und der Rückstand in mobiler Phase (vgl. Messbedingungen, Ochratoxin) aufgenommen, so dass eine Konzentration von 25 ng/ml erhalten wurde. Diese Lösung wurde portioniert und tiefgefroren. Überprüfung des Standards nach (12).

Phosphorsäure, Merck, 573

Pyridin, Fluka, 60890

Salzsäure, Merck, 317

Tetrahydrofuran, HPLC-Qualität, Fisons, T/0706-15

Toluol, p.a., Merck, 8325

Wasser, bidestilliert

Zinksulfat, Merck 8883

Geräte und Materialien

GC-MS: Carlo Erba 4160/Finnigan 4021
Fluoreszenzdetektor F 1050 (Merck, Hitachi). UV-Detektoren: Kratos Spectroflow 773 und Linear UVIS 204
Camag Scanner TLC II
HPLC-Pumpen: Modelle 665A-12 und L-6200A (Merck, Hitachi), Kontron T 414
Einkolbenpumpe
Ultraschallbad, Bandelin, Sonorex, RK 100H
Mixer mit stufenlos einstellbarer Geschwindigkeit (Turmix)
Reamix 2789
Blak-Ray UV-Lampe (Model B-100 A, 360 nm). Zum Aussortieren der fluoreszierenden Früchte wurden Einweghandschuhe getragen und die Augen wurden mit Blak-Ray-UV-Brillen geschützt.
Faltenfilter 593 1/2, 24 cm (Schleicher & Schuell)
Einwegfilter, 0,45 µm Porendurchmesser, Macherey-Nagel, 718005
Dünnschicht-Aluminiumfolien (Merck 5553)
Extrelut, Nachfüllpackung, Merck, 11737, Säule auf 6,5 cm gekürzt.

Proben

948 g türkische Feigen der Ernte 1992 und zwei bei ca. 5 °C gelagerte Feigen der Ernte 1991 wurden untersucht. Alle diese Trockenfeigen zeigten deutliche BGY-Fluoreszenz, wenn sie mit UV-Licht von 360 nm Wellenlänge bestrahlt wurden. Die 52 Früchte wiesen ein durchschnittliches Gewicht von $19 \pm 4,7$ g auf, das geringste Gewicht war 11 g, das höchste 29,4 g.

Extraktion

Jeweils eine Feige wurde in 100 ml Acetonitril/Wasser (85 + 15) 3 min im Mixer homogenisiert. Der Mixerinhalt wurde über ein Faltenfilter filtriert und dieses Filtrat für die verschiedenen Toxinbestimmungen aufgeteilt. Die Filtratmengen schwankten zwischen 58 und 83 ml.

Aufarbeitung

Aflatoxine B und G

30 ml Filtrat wurden in einem Scheidetrichter mit 10 ml Kochsalzlösung 1% und 45 ml Dichlormethan versetzt und 3 min geschüttelt. Von der organischen Phase, die in den Versuchen zwischen 67 und 75 ml schwankte, wurden 40 ml für die Ochratoxinbestimmung abgezweigt und jeweils 25 ml für die Aflatoxinbestimmung mit Natriumsulfat getrocknet. Die filtrierte Lösung wurde bei 40 °C und 20 mbar zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Toluol/Acetonitril (98 + 2) aufgenommen und ein Teil dieser Lösung zur Dünnschichtanalyse verwen-

det. Bei hohen Konzentrationen wurden die Proben so weit verdünnt, dass höchstens 5–10 ng auf die Kieselgelschicht aufgetragen wurden.

Cyclopiazonsäure (modifiziert nach 13)

30 ml Filtrat (bzw. in zwei Fällen 28 und 29 ml Filtrat) wurden mit 150 ml Natriumhydrogencarbonatlösung 10% versetzt. Die Lösung wurde zweimal mit 50 ml Cyclohexan extrahiert, bei starker Färbung der organischen Phase wurde eine weitere Extraktion mit Cyclohexan angeschlossen. Die abgetrennte wässrige Phase wurde mit 6 n Salzsäure angesäuert. Dieser Schritt musste infolge der Kohlendioxidbildung sehr sorgfältig durchgeführt werden. Die angesäuerte wässrige Phase wurde dreimal mit 50 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde bei 50 °C und 100 mbar zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Beschallung in 3 ml Methanol/Wasser (85 + 15, mobile Phase A) aufgenommen. Diese Lösung wurde zur HPLC-Analyse verwendet.

Kojisäure

100 µl Extraktions- bzw. Standardlösung (1,72 µg/ml bzw. 100 µg/ml für die GC-MS-Bestimmungen) wurden bei 40 °C mit Stickstoff zur Trockne eingengt. Dem Rückstand wurden je 100 µl Acetanhydrid und Pyridin (für die GC-MS-Bestimmung je 300 µl) zugesetzt und Kojisäure während 30 min bei Raumtemperatur acetyliert. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C mit Stickstoff zur Trockne eingengt und unter Beschallung in 1 ml mobiler Phase aufgenommen (GC-MS-Bestimmung: 1 ml Ethylacetat). Die in mobiler Phase verdünnte Probe wurde zur HPLC-Analyse eingesetzt. Der Gehalt an acetylierter Kojisäure kann sich in diesen Lösungen innert 24 h verändern.

Ochratoxin A (leicht modifiziert nach 14)

40 ml organische Phase (vgl. Aufarbeitung Aflatoxine B und G) wurden auf 3,5 g Extrelut aufgetragen, das zuvor mit 5 ml Natriumhydrogencarbonat 1% benetzt, in eine verkürzte Säule eingefüllt und 30 s auf einem Reamix dichter gepackt worden war. Die Durchlaufzeit des Dichlormethans betrug 10–15 min. Nach zwei weiteren Durchläufen von je 20 ml Dichlormethan wurde restliches Lösungsmittel mit Stickstoff ausgeblasen und die Eluate verworfen. Bei geschlossenem Säulenauslauf wurde der Säulinhalt mit 15 ml Dichlormethan/Ameisensäure (15 + 0,5) versetzt und mit einem Glasstab gut durchgemischt. Das zugesetzte Lösungsmittelgemisch wurde in einem Kolben aufgefangen und die Säule zweimal mit 20 ml Dichlormethan gespült. Die vereinigten Eluate wurden bei 40 °C und 20 mbar zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde unter Beschallung in 2 ml mobiler Phase (siehe Messbedingungen, Ochratoxin) aufgenommen und durch ein Einwegfilter mit 0,45 µm Porendurchmesser filtriert. Diese Lösung diente als Basis für die HPLC-Analyse.

Messbedingungen

Aflatoxine (Dünnschicht)

50 µl Probenextrakt bzw. – je nach abgeschätzter Konzentration, vgl. Aufarbeitungen – entsprechend verdünnter Probenextrakt sowie 2, 5 und 10 µl Standardlösung wurden auf eine Alufolie aufgetragen, die zuvor 30 min bei 100 °C vorgetrocknet worden war. Die Auftraghöhe auf der Folie war jeweils 12 cm, die aufgetragene Bandbreite 8 mm. Die erste Entwicklung erfolgte in Diethylether, mit den aufgetragenen Substanzen in 12 cm Entfernung vom Wannenboden. In 13–14 cm Laufstrecke, ca. 1 cm oberhalb der Aflatoxinbanden, wurde die mit einem Fön kurz getrocknete Alufolie entzweigeschnitten. Der Teil der Folie, der die Aflatoxine enthielt, wurde so in die Entwicklungskammer gestellt, dass sich die Aflatoxinbanden knapp oberhalb der Wannenflüssigkeit befanden und die Chromatographie in Gegenrichtung zur ersten Entwicklung erfolgte. Das zweite Fließmittel setzte sich aus Chloroform/Aceton/Wasser 88 + 12 + 0,2 zusammen. Beide Entwicklungen wurden ohne Kammersättigung durchgeführt. Mit einem Densitometer wurden die Aflatoxingehalte der Proben im Vergleich zu den aufgetragenen Standards fluorimetrisch ausgewertet. Die Anregungswellenlänge war 365 nm, das Gerät war mit einem Kantenfilter versehen, das für Licht mit Wellenlängen oberhalb 400 nm durchlässig war.

Cyclopiazonsäure (HPLC, 13)

Stationäre Phase:	250 · 4 mm Lichrospher RP 18 mit Vorsäule (20 · 4 mm), beide 5 µm (Stahlsäulen)
Mobile Phase:	A: Methanol/Wasser 85 + 15 (v/v) B: Methanol/Wasser 85 + 15 (v/v) mit 4 mM Zinksulfat Gradient: 0–20 min 100% A–100% B (linear) 5 min 100% B 5 min 100% A
Injektionsvolumen:	20 µl
Fluss:	1 ml/min
UV-Detektion:	279 nm
Quantifizierung:	Konzentrationsvergleich mit externem Standard

Kojisäure (HPLC)

Stationäre Phase:	125 · 4 mm Hypersil ODS mit Vorsäule (20 · 4 mm), beide 5 µm (Stahlsäulen)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser 10 + 90 (v/v)
Injektionsvolumen:	20 µl
Fluss:	1 ml/min
UV-Detektion:	250 nm
Quantifizierung:	Konzentrationsvergleich mit externen Standards, die gleichzeitig mit den Proben derivatisiert wurden.

Kojisäure (GC-MS)

Gaschromatographie:	
Kapillarsäule:	0,75 µm OV 1, 13 m/0,32 mm
Trägergas:	Helium, 0,8 bar
Injektion:	Splitlos, 40 s, 250 °C
Ofentemperatur:	1 min, 40 °C isotherm. Temperaturprogramm: 5 °/min von 180–250 °C
Massenspektrometrie:	CI pos.: Methan als Reaktantgas, 70 eV, Elektronenstrom: 150 µA, Ionenquellentemperatur: 210 °C, Transferline: 210 °C
Quantifizierung:	Flächenvergleich der Totalionenstromsignale von Standard und Probe.

Ochratoxin A (HPLC)

Stationäre Phase:	250 · 4,6 mm Deltabond Octyl mit Vorsäule (10 · 4,6 mm), beide 5 µm (Stahlsäulen)
Mobile Phase:	Wasser/Tetrahydrofuran/2 M Phosphorsäure (65 + 30 + 5)
Fluss:	1 ml/min
Fluoreszenzdetektion:	Anregungswellenlänge: 330 nm Emission: 460 nm
Quantifizierung:	Konzentrationsvergleich mit externem Standard. Bei hohen Ochratoxinkonzentrationen wurde die Probe soweit verdünnt, dass das Probensignal ein dem externen Standard vergleichbares Signal aufwies.
Ochratoxin A (TLC)	100 µl Extrakt für die HPLC-Bestimmung wurden mit Toluol verdünnt und nach (15) chromatographiert.

Resultate

Der Nachweis von Cyclopiazonsäure in Trockenfeigen erwies sich mit dem von uns üblicherweise für Aflatoxine verwendeten Extraktionsmittel Methanol/Wasser (15) als sehr schwierig. Aus diesem Grunde wurde auf Acetonitril/Wasser umgestellt, welches wesentlich reinere Extrakte lieferte. Die Wiederfindungsraten von Aflatoxinen und von Ochratoxin A aus Feigen mussten jedoch mit diesem neuen Lösungsmittelgemisch überprüft werden. Tabelle 1 gibt die ermittelten Wiederfindungsraten für Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A wieder.

Die Trockenfeigen mit den Analysennummern 1 und 2 (Tabelle 2) stammten aus der Ernte 1991. Sie wurden in die Untersuchung miteinbezogen, um zu prüfen, ob hohe Toxinkonzentrationen auch in länger gelagerten Früchten nachgewiesen werden können, und sie wurden ausgewählt, weil sie mit Licht von 360 nm

Tabelle 1. Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen von Aflatoxin B₁, G₁, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A in Trockenfeigen

Verbindung	Zusatz	Zusatzart	Wiederfindung (%)	Nachweisgrenze
Aflatoxin B ₁	8 µg/kg	1	83, 85, 90, 96, 102	5 µg/kg
	100 µg/kg	2	86	
Aflatoxin G ₁	8 µg/kg	1	80, 85, 91, 98, 100	5 µg/kg
	100 µg/kg	2	85	
Cyclopiazonsäure	220 µg/kg	2	81, 81, 95, 108	100 µg/kg
	870 µg/kg	2	71, 84, 91, 95, 98	
Kojisäure	10 mg/kg	2	95, 109	5 mg/kg
	20 mg/kg	2	95, 98, 107, 110, 111	
Ochratoxin A	10 µg/kg	1	81, 87	5 µg/kg
	100 µg/kg	1	91, 93	

1 = Standardzugabe in Extraktionsmittel mit anschliessender Homogenisierung im Mixer.
 2 = Standardzugabe auf Feige mit anschliessender Homogenisierung im Mixer.

Wellenlänge bestrahlt, eine besonders intensive BGY-Fluoreszenz zeigten. Die Analysennummern 3 bis 52 stehen für Trockenfeigen der Ernte 1992 (Tabelle 2).

In keiner der Früchte konnte Cyclopiazonsäure nachgewiesen werden, hingegen enthielten alle Kojisäure (Tabelle 2, Abb. 1). Die Konzentrationen von Kojisäure lagen wie bei Maiskörnern im mg/kg bis Promille-Bereich (16). Kojisäure der Proben mit den höchsten Werten wurde mittels GC-MS qualitativ und quantitativ überprüft (Tabelle 2). In Tabelle 3 sind die 5 intensivsten Signale eines CI⁺ Massenspektrums für einen derivatisierten Kojisäure-Standard und Probe 32 aufgeführt. In 5 Fällen waren die GC-MS-Resultate zwischen 0 und 37% tiefer als die mit HPLC ermittelten Werte, für Probe 32 ergab die GC-MS-Bestimmung gegenüber der HPLC-Bestimmung eine um 69% höhere Konzentration. Bei der HPLC-Analyse war die eingesetzte Menge Derivatisierungsreagenz für die hohen Konzentrationen knapp. Der Vergleich mit den Analysenwerten der GC-MS-Bestimmung zeigt aber, dass das Reagenz, vermutlich mit Ausnahme von Probe 32, kaum für weitere im Extrakt vorhandene Substanzen, sondern weitgehend für die Acetylierung von Kojisäure verbraucht wurde. Da mit dem GC-MS-Verfahren keine Reproduzierbarkeitsbestimmungen durchgeführt wurden, werden für die Diskussion die Resultate des HPLC-Verfahrens als relevant betrachtet.

Aflatoxin B₁ war in 71%, Aflatoxin G₁ in 29% der Trockenfeigen zu finden. Die Trockenfeige mit der Analysennummer 17 enthielt 57 mg/kg Aflatoxin B₁, jene mit der Nummer 39 180 mg/kg Aflatoxin G₁ und jene mit der Nummer 46 76 mg/kg Aflatoxin B₁. Diese Toxine waren in den drei Früchten in so hohen Konzentrationen vorhanden, wie sie in unserem Laboratorium bisher nicht nachgewiesen worden waren.

Tabelle 2. Konzentrationen von Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁, Kojisäure und Ochratoxin A auf 52 fluoreszierenden Trockenfeigen der Ernten 1991 (1 und 2) und 1992 (3–52)

Analysennummer	Aflatoxin B ₁ (µg/kg)	Aflatoxin G ₁ (µg/kg)	Kojisäure (HPLC) (mg/kg)	Kojisäure (GC-MS) (mg/kg)	Ochratoxin A (HPLC) (µg/kg)	Ochratoxin A (TLC) (µg/kg)
1	11	<5	370		2500	
2	14 00	<5	2500		<5	
3	60	<5	4400	4400	<5	
4	1000	4000	1100		6	
5	240	960	50		<5	
6	<5	<5	650		4100	4400
7	350	<5	1200		<5	
8	<5	<5	110		12	
9	13	<5	8		7	
10	<5	<5	1100		<5	
11	<5	<5	1600		<5	
12	<5	<5	15		<5	
13	2100	<5	1200		<5	
14	12 000	<5	2800		<5	
15	150	24	1300		<5	
16	11 000	<5	6900	*	<5	
17	57 000	<5	3800	2600	<5	
18	<5	<5	120		6	
19	1400	<5	450		<5	
20	15 000	4100	700		100	
21	<5	<5	1700		<5	
22	<5	<5	1400		<5	
23	210	<5	240		<5	
24	<5	<5	1700		<5	
25	<5	<5	1400		<5	
26	94	170	210		<5	
27	4800	2800	260		<5	
28	400	<5	1100		<5	
29	<5	<5	490		<5	
30	<5	<5	1600		<5	
31	17 000	<5	3400	2000	<5	
32	2400	15 000	5100	8600	<5	
33	370	990	360		<5	
34	<5	<5	920		12	
35	530	<5	1900		<5	
36	1400	<5	1800		<5	
37	5500	<5	810		<5	
38	2800	4300	1500		<5	
39	6900	180 000	1250		<5	
40	8800	2000	510		<5	

Analyse- nummer	Aflatoxin B ₁ (µg/kg)	Aflatoxin G ₁ (µg/kg)	Kojisäure (HPLC) (mg/kg)	Kojisäure (GC-MS) (mg/kg)	Ochratoxin A (HPLC) (µg/kg)	Ochratoxin A (TLC) (µg/kg)
41	16	<5	710		<5	
42	2400	<5	4600	2900	<5	
43	5	5	650		<5	
44	7	<5	220		1100	1500
45	300	168	300		<5	
46	76 000	<5	1900		<5	
47	920	2700	340		<5	
48	<5	<5	180		<5	
49	8	<5	1700		12 300	16 300
50	<5	<5	3000	2100	5	
51	17	44	870		9	
52	2000	<5	340		<5	

* Zur Überprüfung mit GC-MS war kein Extrakt mehr vorhanden.

Ochratoxin A trat in den untersuchten Früchten wesentlich weniger häufig auf als die Aflatoxine B und G. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm einer mit Ochratoxin A kontaminierten Probe. Vier Trockenfeigen (7,7%) enthielten Och-

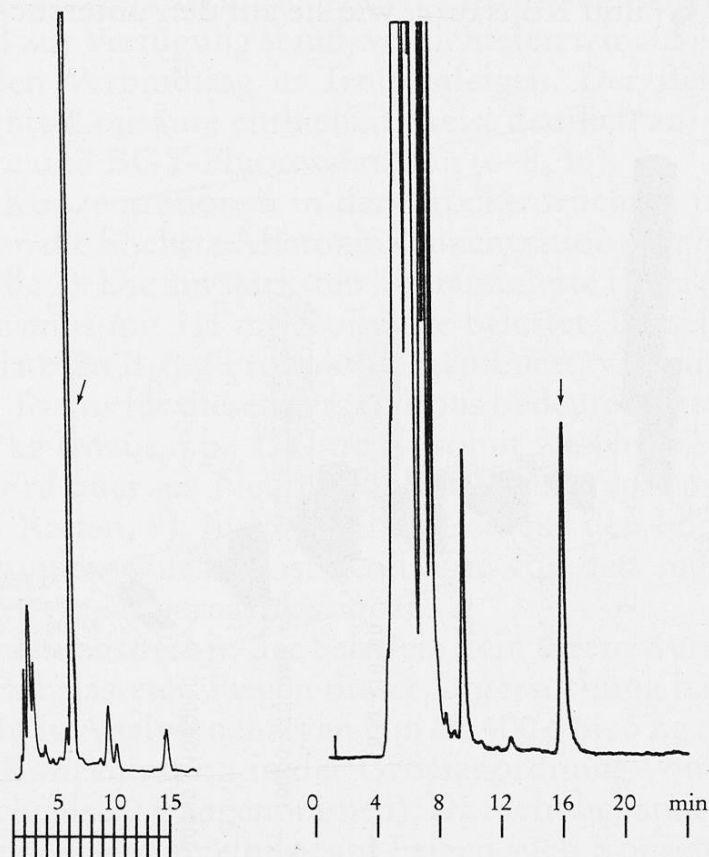


Abb. 1. Chromatogramme von acetylierter Kojisäure aus Probe 44, die 220 mg/kg Kojisäure enthielt (links), und von Ochratoxin A aus Probe 20, in der 100 µg/kg nachgewiesen wurden (rechts)

Tabelle 3. Vergleich der 5 höchsten Signale aus Massenspektren (CI pos.) von acetylierter Kojisäure, welche aus einer Standardsubstanz und aus einem Feigenextrakt hergestellt wurde

Massensignal m/z	Standard Int. (%)	Probe Int. (%)	Interpretation
227	46	45	MH ⁺
213	11	11	MH ⁺ -14 (CH ₂)
185	100	100	MH ⁺ -42 (Keten)
184	12	11	185-H ⁺
61	46	45	Acetat

ratoxin in Konzentrationen über 1 mg/kg (Tabelle 2). Die Anwesenheit dieses Toxins wurde in den Proben 6, 44 und 49 mit einem dünn-schichtchromatographischen Verfahren verifiziert und die Konzentrationen stimmten innerhalb einer Streuung von 7–36% miteinander überein. Die vier stark Ochratoxin-A-haltigen Feigen waren nur gering oder gar nicht mit Aflatoxinen kontaminiert. Andererseits wiesen Früchte mit hohen Aflatoxinkonzentrationen nur minimale oder keine Ochratoxin-A-Mengen auf (Tabelle 2).

Abbildung 2 zeigt die Häufigkeiten der vier Mykotoxine Ochratoxin A, Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁ und Kojisäure, wie sie auf den untersuchten Trockenfeigen

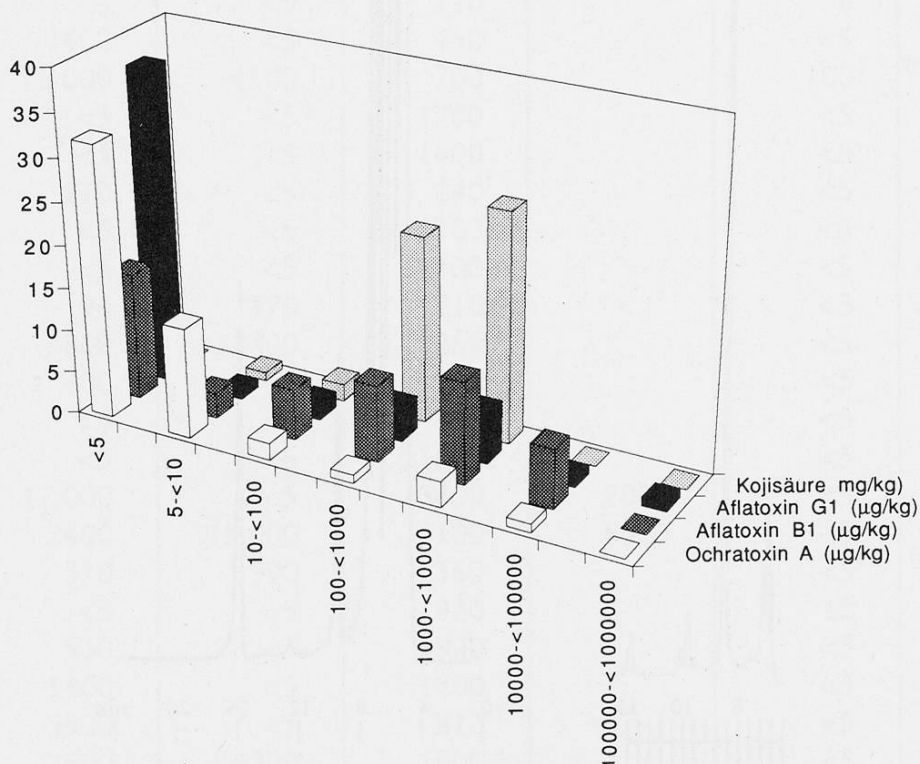


Abb. 2. Häufigkeitsverteilungen von Ochratoxin A, Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁ und Kojisäure in 52 fluoreszierenden Trockenfeigen bei Wahl eines logarithmischen Massstabs für die Toxinkonzentrationen

auftraten. Mit Ausnahme der Kojisäure waren die Toxine nur auf wenigen Früchten in hohen Konzentrationen zu finden. Alle vier Substanzen waren über die hochkontaminierten Trockenfeigen nach einem ähnlichen Muster verteilt.

Diskussion

In der Türkei waren im Jahr 1992 keine günstigen Witterungsbedingungen für eine qualitativ besonders hochwertige Feigenernte. Diese Aussage wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die von uns untersuchten fluoreszierenden Trockenfeigen dieses Jahres ausserordentlich hohe Aflatoxinmengen enthielten (Tabelle 2, Abb. 2). Es zeigte sich auch einmal mehr, dass in fluoreszierenden Trockenfeigen hohe Aflatoxinkonzentrationen vorkommen, und dass auch in einem offenbar für die Aflatoxinbildung günstigen Jahr nicht alle fluoreszierenden Früchte mit diesen Toxinen kontaminiert sein müssen.

Sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Trockenfeigen waren fluoreszierend. Mittels einer analytischen Bestimmung von BGY-Fluoreszenz in Mais war gezeigt worden, dass die Konzentrationen der Aflatoxine und jene der fluoreszierenden Substanz in einem schwer auszumachenden Zusammenhang stehen (16). Da uns auch kein Standard zur Verfügung stand, verzichteten wir auf eine HPLC-Analyse der fluoreszierenden Verbindung in Trockenfeigen. Der Befund aber, dass alle untersuchten Früchte Kojisäure enthielten, weist deutlich auf die enge Beziehung zwischen Kojisäure und BGY-Fluoreszenz hin (6–8, 16).

Die Kojisäure-Konzentrationen in den Trockenfrüchten übertrafen mit Ausnahme von 4 Proben die höchste Aflatoxinkonzentration von Probe 59 (180 mg/kg Aflatoxin G₁, Tabelle 2). Die am stärksten kontaminierte Feige (Probe 16, Tabelle 2) hätte einen Organismus mit 111 mg Kojisäure belastet. Dieselbe Frucht war aber auch mit 11 mg Aflatoxin B₁/kg Produkt kontaminiert, was eine zusätzliche Dosis von 0,18 mg dieses Toxins für diesen Organismus bedeutet hätte. Kojisäure hat eine LD 50 von 10 mg/kg (Maus, i.p., 17) und ist somit wesentlich weniger toxisch als Aflatoxin B₁, es wird aber als Neurotoxin eingestuft (epilepsieartige Symptome nach i.p. Gabe bei Ratten, 9). In Mengen, wie sie bei den höchst kontaminierten Trockenfeigen gefunden wurden, ist Kojisäure für den menschlichen Verzehr möglicherweise nicht mehr vernachlässigbar.

Für Ochratoxin A existiert in der Schweiz kein Grenzwert. Die einzelnen mit Ochratoxin A stark belasteten Feigen dieser Untersuchung hätten je nach Kontamination der Frucht in Analysenchargen von ca. 400 g bis 5 kg ein Analysenresultat bewirkt, das eine Konzentration in der Grössenordnung von 50 µg/kg angezeigt hätte (Feigengewicht als 20 g angenommen). Da nicht bekannt ist, ob alle ochratoxin-A-produzierenden Schimmelpilze auf Feigen auch Kojisäure bilden und somit nur auf Feigen mit BGY-Fluoreszenz vorkommen, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass auch Feigen ohne Fluoreszenz Ochratoxin A in beträchtlichen Mengen enthalten können.

Gewisse Stämme von *Aspergillus flavus* scheinen neben der Fähigkeit, die Aflatoxine B₁ und B₂ zu bilden, auch noch in beträchtlichem Masse zur Synthese von Cyclopiazonsäure befähigt zu sein. Aus Getreide isolierte Stämme produzierten Cyclopiazonsäure mit Aflatoxinen und/oder Kojisäure (3, 4). *Bauer* und *Gedek* (3) konnten unter 39 toxinogenen *Aspergillus flavus*-Stämmen 14 ermitteln, die Cyclopiazonsäure und die Aflatoxine B₁ und B₂ gemeinsam produzierten, *Lee et al.* (18) stellten bei 11 von 19 isolierten *Aspergillus flavus*-Kulturen die Fähigkeit fest, die beiden Toxine gemeinsam produzieren zu können. Auch in Getreide- und in Erdnussproben wurden sowohl Cyclopiazonsäure als auch die Aflatoxine B₁ und B₂ nachgewiesen (13, 18, 19). *Cole* (20) stellte nun die Hypothese auf, dass die «Turkey 'X' disease» im Jahre 1960 nicht allein auf eine Aflatoxin-B₁-Vergiftung zurückzuführen sei, sondern dass gewisse beobachtete klinische Symptome nur mit gleichzeitiger Wirkung von Cyclopiazonsäure zu erklären seien. Offenbar sind aber nur *Aspergillus flavus*- und keine *Aspergillus parasiticus*-Stämme zur Bildung von Cyclopiazonsäure befähigt (21).

In den von uns untersuchten 52 Trockenfeigen konnte keine Cyclopiazonsäure nachgewiesen werden, obwohl 36 dieser Untersuchungsobjekte Aflatoxine enthielten. Zieht man von dieser Gesamtzahl aflatoxinhaltiger Früchte jene Anzahl von Feigen ab, die neben den Aflatoxinen B₁ und B₂ auch die Aflatoxine G₁ und G₂ enthielten (Stoffwechselprodukte von *Aspergillus parasiticus*), so bleiben immer noch 22 Feigen, welche sehr wahrscheinlich von *Aspergillus flavus*-Stämmen befallen gewesen waren. Die Frage, ob die aflatoxinbildenden Schimmelpilze auf den untersuchten Feigen keine Cyclopiazonsäurebildner waren oder ob diese Früchte ein ungeeignetes Nährsubstrat für die Bildung von Cyclopiazonsäure seien, bleibt offen.

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um weitere Argumente für die Aussortierung von fluoreszierenden Trockenfeigen anzuführen. Die Untersuchungsobjekte waren aber alle in der Türkei aussortiert und somit aus dem Verkehr gezogen worden. Wenn das Verfahren beibehalten wird, Trockenfeigen mit Fluoreszenz auszusondern, stellen diese Früchte kein Problem dar. Sofern diese aber einer weiteren Verarbeitung zugeführt werden, ist der mögliche Übergang von Toxinen auf das verarbeitete Produkt in Betracht zu ziehen.

Dank

Für die GC-MS-Bestimmungen und Interpretation der Massenspektren danken wir *A. Artho* und *P. Nägeli*.

Zusammenfassung

In der Türkei aussortierte fluoreszierende Trockenfeigen der Ernten 1991 und 1992 wurden auf das Vorkommen von Aflatoxinen, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A überprüft. Alle 52 Trockenfeigen enthielten Kojisäure in Konzentrationen zwischen 8 und 6900 mg/kg. Mit einer Nachweisgrenze von 5 µg/kg waren 37 (71%) Früchte mit Aflatoxin

B₁ in Konzentrationen zwischen 5 µg/kg und 76 mg/kg, 15 (29%) mit Aflatoxin G₁ in Konzentrationen zwischen 5 µg/kg und 180 mg/kg kontaminiert. Ochratoxin A war mit derselben Nachweisgrenze in 12 (23%) Trockenfeigen in Konzentrationen von 5 µg/kg und 12 mg/kg vorhanden. In keiner der fluoreszierenden Früchte war jedoch Cyclopiazonsäure nachzuweisen (Nachweisgrenze: 100 µg/kg). Die verschiedenen Toxinkonzentrationen zeigten in den hochkontaminierten Früchten ein ähnliches Verteilungsmuster. Diese Resultate zeigen, dass alle Trockenfeigen mit BGY-Fluoreszenz als sehr kritisch zu beurteilen sind und, sofern sie weiter verarbeitet werden, ein möglicher Übergang von Toxinen auf das verarbeitete Produkt berücksichtigt werden muss.

Résumé

Des figes séchées (récolte 1991 et 1992 en Turquie), avec BGY-fluorescence, ont été analysées pour voir si elles contiennent des aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique, de l'acide kojique et de l'ochratoxine A. Toutes les 52 figes avaient de l'acide kojique en concentrations de 8 µg/kg à 6900 mg/kg. 37 (71%) des fruits ont été contaminés avec aflatoxine B₁ en concentrations de 5 µg/kg à 76 mg/kg, et 15 (29%) avec aflatoxine G₁ en concentrations de 5 µg/kg à 180 mg/kg (limite de détection: 5 µg/kg). L'ochratoxine A a été détectée dans 12 (23%) des figes séchées en concentrations de 5 µg/kg à 12 mg/kg (limite de détection: 5 µg/kg). Aucun des fruits contient de l'acide cyclopiazonique (limite de détection: 100 µg/kg). Les concentrations des différentes toxines dans les figes très contaminées montrent une distribution similaire. Ces résultats indiquent que toutes les figes fluorescentes doivent être jugées comme contaminées. Si on les utilise pour faire d'autres produits, il faut s'attendre à une transition de toxines dans ces produits.

Summary

Fluorescent dried figs from Turkey (crop 1991 and 1992) were analyzed for aflatoxins, cyclopiazonic acid, kojic acid and ochratoxin A. All 52 figs contained kojic acid in concentrations between 8 and 6900 mg/kg. 37 (71%) fruits were contaminated with aflatoxin B₁ in concentrations between 5 µg/kg and 76 mg/kg, and 15 (29%) fruits were contaminated with aflatoxin G₁ in concentrations between 5 µg/kg and 180 mg/kg (detection limits: 5 µg/kg). Ochratoxin A could be detected in 12 (23%) of the dried figs in concentrations between 5 µg/kg and 12 mg/kg (detection limit: 5 µg/kg). However, none of the fruits contained cyclopiazonic acid (detection limit: 100 µg/kg). In the highly contaminated fruits, the different toxin concentrations showed a similar distribution pattern. These results demonstrate that all dried figs with BGY-fluorescence are to be judged as very critical. If they are processed to other products, a possible transition of toxins has to be kept in mind.

Literatur

1. Steiner, W., Rieker, R.B. and Battaglia, R.: Aflatoxin contamination in dried figs: distribution and association with fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 88–91 (1988).
2. Reichert, N., Steinmeyer, S. und Weber, R.: Z. Bestimmung von Aflatoxin B₁ in Trockenfeigen durch visuelles Screening, Dünnschichtchromatographie und ELISA. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **186**, 505–508 (1988).

3. *Bauer, J. und Gedek, B.*: Zum Vorkommen toxinbildender Schimmelpilze in Cerealien unterschiedlicher Herkunft. *Landw. Forsch.* **35** (Kongressband), 562–569 (1978).
4. *Oeschlmüller, R.*: Toxinogene *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*-Stämme auf Mais und Getreide in Österreich. Dissertation, Technische Universität Wien 1987.
5. *Parrish, F.W., Wiley, B.J., Simmons, E.G. and Long, L.Jr.*: Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Appl. Microbiol.* **14**, 139 (1966).
6. *Marsh, P.B., Simpson, M.E., Ferretti, R.J., Merola, G.V., Donoso, J., Craig, G.O., Trucksess, M.W. and Work, P.S.*: Mechanism of formation of a fluorescence in cotton fiber associated with aflatoxins in the seeds at harvest. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 468–472 (1969).
7. *Fennell, D.I., Bothast, R.J., Lillehoj, E.B. and Peterson, R.E.*: Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin. *Cereal Chem.* **50**, 404–415 (1973).
8. *Shotwell, O.L., Goulden, M.L. and Hesselstine, C.W.*: Aflatoxin: Distribution in contaminated corn. *Cereal Chem.* **51**, 492–499 (1974).
9. *Roth, Frank, Kormann*: Giftpilze, Pilzgifte; Schimmelpilze, Mykotoxine; Vorkommen, Inhaltsstoffe, Pilzallergien, Nahrungsmittelvergiftungen. Landsberg am Lech: ecomed, S. 169 (1990).
10. *Scott, P.*: Natural poisons. In: Official methods of analysis, Helrich, K., Ed. AOAC, Arlington, VA, S. 1185–1186 (1990).
11. *Pohland, A.E., Schuller, P.L., Steyn, P.S., van Egmond, H.P.*: Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure and Appl. Chem.* **54**, 2236 (1982).
12. *Scott, P.*: Natural poisons. In: Official methods of analysis, 15. Ausgabe, Helrich, K., Ed. AOAC, Arlington, VA, S. 1207 (1990).
13. *Urano, T., Trucksess, M.W. and Matusik, J.*: Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**, 319–322 (1992).
14. *Baumann, U. und Zimmerli, B.*: Eine einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **79**, 151–158 (1988).
15. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 54, Toxische Stoffe, 1.4. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1992.
16. *Steiner, W., Pacciarelli, B. und Battaglia, R.*: Aflatoxin B₁, BGY-Fluoreszenz und Kojisäure in Maiskörnern: eine Untersuchung auf Mais schweizerischer Herkunft. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **82**, 457–474 (1991).
17. *Macholz, R., Lewerenz, H.J.*: Lebensmitteltoxikologie, S. 511. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1989.
18. *Lee, Y. and Hagler, W., Jr.*: Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. *J. Food Sci.* **56**, 871–872.
19. *Lansden, J.A. and Davidson, J.I.*: Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 766–769 (1983).
20. *Cole, R.J.*: Etiology of Turkey «X» disease in retrospect: a case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Res.* **2**, 3–7 (1986).
21. *Dorner, J.W., Cole, R.J. and Diener, U.L.*: The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia* **87**, 13 (1984).

Dr. W. Steiner
Migros-Genossenschafts-Bund
Zentrallaboratorium
Postfach 266
CH-8031 Zürich