

CHROM. 8333

UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON MYKOTOXINEN UND DEREN QUANTITATIVE BESTIMMUNG

I. DIE BILDUNG VON PENICILLINSÄURE DURCH *PENICILLIUM CYCLOPIUM*

E. H. REIMERDES

Institut für Chemie, Bundesanstalt für MilCHForschung, D-23 Kiel (B.R.D.)

G. ENGEL

Institut für Mikrobiologie, Bundesanstalt für MilCHForschung, D-23 Kiel (B.R.D.)

und

J. BEHNERT

Schoeffel Instrument-Corp., D-2351 Trappenkamp (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. November 1974; geänderte Fassung eingegangen am 24. März 1975)

SUMMARY

*Investigations on the production of mycotoxins and their quantitative evaluation. I. The production of penicillic acid by *Penicillium cyclopium**

A convenient thin-layer chromatographic screening procedure for the analysis of mycotoxins produced by *Penicillium cyclopium* is described. The production of penicillic acid is followed during a growth period of 44 days at two different temperatures. Quantitative evaluation is performed by UV densitometry at 234 nm. A biological profile is recorded showing the different ratios of four metabolites produced by *Penicillium cyclopium* and the definite effect of the growth temperature on the formation of penicillic acid in relation to the other metabolites.

EINLEITUNG

In den letzten Jahren sind die Mykotoxine, Stoffwechselprodukte bestimmter, auch auf Lebensmitteln verbreiteter Schimmelpilze, genauer untersucht worden¹. Ihre besondere Bedeutung liegt in teils extrem toxischen (vergl. Lit. 1-3 u.a.) und in potentiell karzinogenen^{2,4} Eigenschaften. Hierin ist das wachsende Interesse an Untersuchungsmethoden, welche die Überprüfung von Nahrungsmitteln auf bestimmte Mykotoxine ermöglichen, begründet¹. Zu den im Moment besonders studierten Mykotoxinen gehören die Aflatoxine, Patulin, Citrinin, Rubratoxin und Penicillinsäure.

Die Abtrennung dieser Verbindungen aus dem Untersuchungsgut geschieht

derzeit in der Regel durch relativ aufwendige Extraktionen und chromatographische Verfahren. Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Densitometrie⁵⁻¹⁰ ermöglichen es nun, quantitative Bestimmungen geringer Substanzmengen direkt auf Dünnschichtchromatogrammen durchzuführen.

Die quantitative Bestimmung von Mykotoxinen ist fluorodensitometrisch (Eigenfluoreszenz, Fluoreszenzlöschung, fluoreszierende Derivate) schon durchgeführt worden¹¹⁻¹⁹, wobei die Empfindlichkeit gegenüber spektrophotometrischen Methoden wesentlich erhöht werden konnte. Die direkte UV-densitometrische Bestimmung von Mykotoxinen ist dagegen u.W. bisher noch nicht beschrieben, bietet aber folgende Vorteile: die Identifizierung nichtfluoreszierender Metaboliten, und im Fall der Penicillinsäure ist die Derivatisierung wie vor der fluorodensitometrischen Messung nicht erforderlich. Wir haben nun mit dieser neuen Technik (Extraktion-Dünnschichtchromatographie-UV-Spektraldensitometrie) die Bildung von Penicillinsäure durch *Penicillium cyclopium* in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur verfolgt.

MATERIAL UND METHODEN

Schimmelpilzkultur

Die Bebrütung erfolgte bei 16 und 27° im Raulin-Thom-Medium nach Beimpfung mit *Penicillium cyclopium* Westling, Stamm-Nr. 6759.

Probengewinnung

Nach 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25 und 43 Tagen wurden aus beiden Ansätzen jeweils 60 ml Kulturmedium entnommen und auf Penicillinsäure untersucht. Dazu werden die Proben 20 min bei 20 000 g zentrifugiert, 50 ml des Überstandes mit 1 N HCl auf pH 1.5 eingestellt und zweimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden am Rotationsverdampfer im Vakuum bis zur Trockne eingengt, in 1.0 ml Chloroform aufgenommen und die Lösung zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgelplatten G 1500 und G 1500 LS (Schleicher und Schüll) bei einer Laufstrecke von 15 cm durchgeführt. Als Fließmittel dienten: (a) Toluol-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (90%ig) (6:3:1) und (b) Chloroform-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (60:40:1)¹⁸.

Für die Erstellung der Eichkurve wurde eine Standardlösung von 0.27 mg/ml Penicillinsäure in Benzol-Acetonitril (98:2) hergestellt und so verdünnt, dass 10 μ l jeweils 0.1, 0.3, 0.54, 0.675, 0.9, 1.35 und 2.7 μ g Penicillinsäure enthielten. Zur direkten quantitativen Messung der Penicillinsäurekonzentration im Nährmedium wurde eine Lösung hergestellt, die 16.2 μ g Penicillinsäure pro ml Nährmedium enthielt, und wie oben extrahiert. Die Penicillinsäure wurde mittels Fluoreszenzlöschung, durch die hellblaue Fluoreszenz nach Ammoniakbehandlung (15 min) und Reaktion mit *p*-Anisaldehyd im UV bei 365 nm identifiziert.

Quantitative densitometrische Bestimmung

Die Messungen wurden mit dem Zweistrahl-Spektraldensitometer SD 3000

mit Funktionsrechner, Flachsreiber SD 303 und Integrator SDR 304 durchgeführt*. Das Gerät ist sowohl für Transmissions- als auch für Remissionsmessungen geeignet. Die Verwendung eines Referenzstrahles ermöglicht die vollständige Kompensation des Dünnschichtplattenuntergrundes und ergibt eine stark verbesserte Reproduzierbarkeit der Messwerte⁶⁻⁹.

Bei der Densitometrie unterscheidet man zwischen durchsichtigen, fluoreszierenden und diffusen Proben. Die quantitative Messung der Extinktion von Substanzen auf Dünnschichtplatten bedient sich der Technik für diffuse Proben. Gemessen wird im Zweistrahlverfahren das Log Reflexionsverhältnis: $\text{Log } P/R = \text{Integr.-Wert}$ mit R als Referenz- oder Blindwert und P als Extinktions- oder Probenwert. Eine Verbesserung der Messgenauigkeit haben wir durch Berücksichtigung des Verhältnisses $\text{Maximalwert/Durchschnittswert} = S/N$ erzielt.

Um die Bestimmung quantitativ durchzuführen wurde der Messtrahl zunächst optimal auf einem Penicillinsäurefleck mittlerer Konzentration justiert. Durch schrittweise Veränderung der Wellenlänge wurde dann das UV-Spektrum der Penicillinsäure auf der Dünnschichtplatte bestimmt (Fig. 1). Danach haben wir das Ammoniakderivat (15 min) hergestellt und das Absorptionsspektrum auf der Dünnschichtplatte bestimmt (Fig. 2). Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei den aus diesen beiden Spektren entnommenen Extinktionsmaxima wurden die Eichkurven für die quantitative Penicillinsäurebestimmung direkt oder über das Ammoniakderivat gemessen (Fig. 3 und 4). Auf die gleiche Weise wurde die Penicillinsäurekonzentration im Nährmedium von *Penicillium cyclopium* Westling, Stamm-Nr. 6759, während einer Wachstumszeit von 43 Tagen ermittelt (Fig. 5 und 6).

Für die Darstellung der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der im Chloroformextrakt enthaltenen Stoffwechselprodukte wurde der Messtrahl auf dem Penicillinsäurefleck beim Absorptionsmaximum der Penicillinsäure optimal justiert und das Spektrum vom Startfleck in Richtung Fließmittelfront bei automatischem Plattenvorschub registriert (Fig. 7a und b).

Bei der Extraktion aus dem Nährmedium geht Penicillinsäure verloren. Für die Bestimmung des wirklichen Penicillinsäuregehaltes ist deshalb ein Korrekturfaktor erforderlich, der aus dem Verhältnis der Penicillinsäurekonzentration bei Messung in der Standardlösung und im Chloroformextrakt auf der Dünnschichtplatte erhalten wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Penicillinsäure hat in methanolischer Lösung ein UV-Maximum von 221 nm, während das Maximum des Ammoniakderivates bei 328 nm liegt¹⁹. Wir haben zunächst die UV-Spektren von Penicillinsäure und des Penicillinsäure-Ammoniakderivates nach der Dünnschichtchromatographie direkt bestimmt (s. Fig. 1 und 2). Bei Penicillinsäure wurde eine Verschiebung des UV-Maximums von 221 nm in methanolischer Lösung nach 234 nm auf der Dünnschichtplatte nach vollständigem Abdampfen des Fließmittels gemessen. Durch Behandlung der Penicillinsäure mit Ammoniakdämpfen (15 min) auf der Dünnschichtplatte wurde diese in das Ammoniakderivat überführt und das UV-Spektrum densitometrisch gemessen (Fig. 2). Das direkt ge-

* Hersteller: Schoeffel Instr.-Corp., Westwood, N.J., U.S.A.

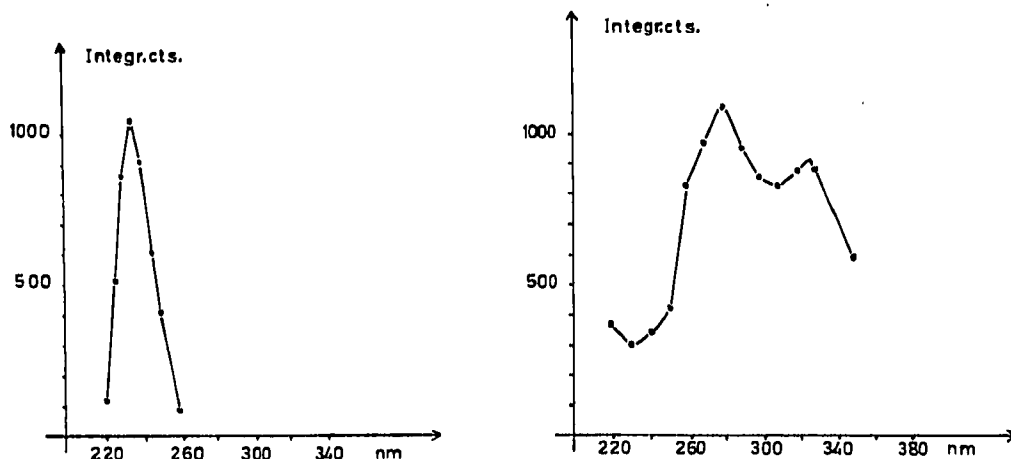


Fig. 1. Die densitometrische Bestimmung des UV-Spektrums von Penicillinsäure nach der Dünnschichtchromatographie mit Toluol-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (90%) (6:3:1).

Fig. 2. Die densitometrische Bestimmung des UV-Spektrums von Penicillinsäure nach NH₃-Behandlung (15 min) und Dünnschichtchromatographie mit Toluol-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (90%) (6:3:1).

gemessene UV-Spektrum weist zwei Maxima bei 278 und 325 nm auf und unterscheidet sich deutlich vom UV-Spektrum in Lösung.

Zur Bestimmung der Penicillinsäurekonzentration auf der Dünnschichtplatte im UV-Bereich eignet sich nur die Remissionsmessung, da bei der Transmissionsmessung der Plattenträger (Glas) die Messgenauigkeit durch Eigenabsorption von UV-Licht beeinträchtigt. In Fig. 3 und 4 sind die Eichkurven der densitometrischen Bestimmung von Penicillinsäure bei 234 nm und des Penicillinsäure-Ammoniakderivates

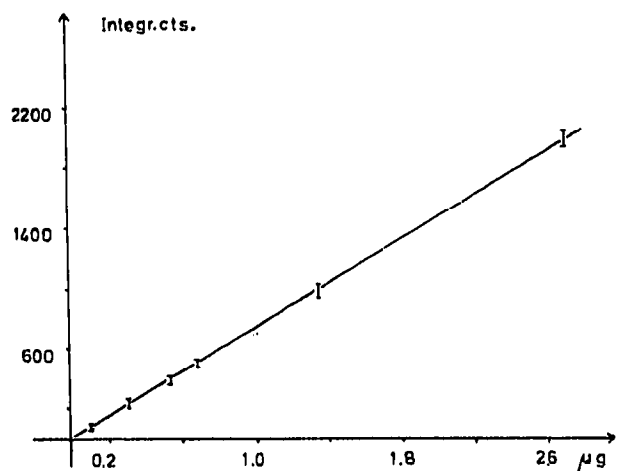


Fig. 3. Die densitometrisch gemessene Eichkurve von Penicillinsäure (bei 234 nm) im Bereich von 0,1–2,7 µg pro 10 µl Probelösung. Dünnschichtchromatographie s.o. mit Fließmittel a.

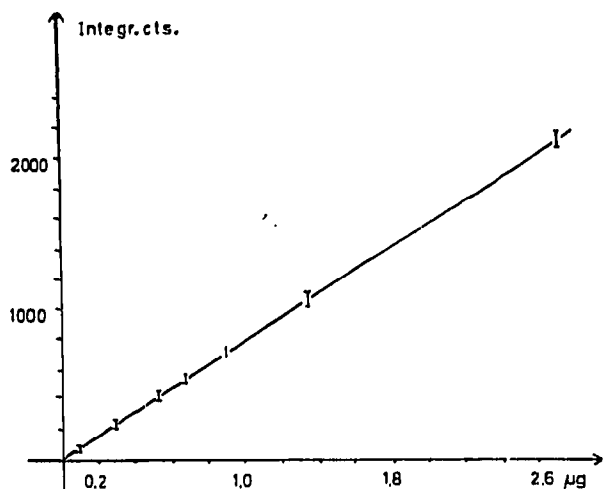


Fig. 4. Die densitometrisch gemessene Eichkurve des Penicillinsäure-Ammoniakderivates (bei 278 nm) im Bereich von 0.1–2.7 μg pro 10 μl Probelösung. Dünnschichtchromatographie s.o. mit Fließmittel a.

bei 278 nm nach der Dünnschichtchromatographie im Konzentrationsbereich von 0.1–2.7 μg dargestellt. Beide Eichkurven zeigen die Penicillinsäurebestimmung ausreichende Empfindlichkeit und sehr gute Reproduzierbarkeit bei Dreifachbestimmungen. Der Verlauf der Eichkurven ist in diesem Konzentrationsbereich linear. Bei der Verwendung von Fließmittel a muss darauf geachtet werden, dass dieses vollständig abgedampft wird, da Toluol die UV-Messungen, besonders bei 278 nm, stören kann.

Die Penicillinsäurebildung durch *Penicillium cyclopium* Westling, Stamm-Nr. 6759, bei 16 und 27° wurde durch Untersuchung von Proben, die durch Chloroformextraktion des Nährmediums hergestellt wurden, für den Zeitraum von 0–43 Tagen bestimmt (Fig. 5, gemessen bei 234 nm, Fig. 6 bei 278 nm). Die Bildung von Penicil-

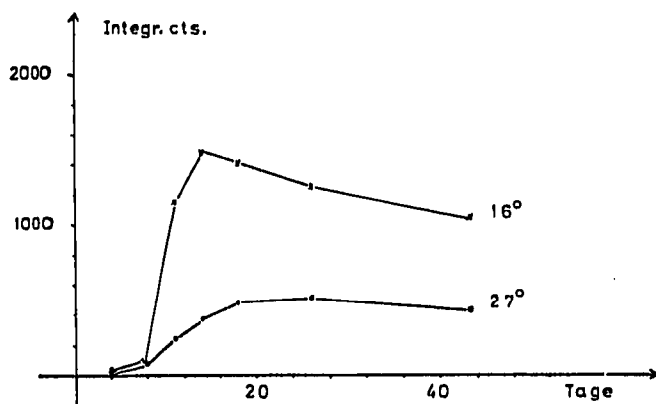


Fig. 5. Die Bildung von Penicillinsäure im Nährmedium von *Penicillium cyclopium* Westling bei 16 und 27°. Densitometrische Bestimmung bei 234 nm. Aufgetragen wurden 10 μl Extrakt.

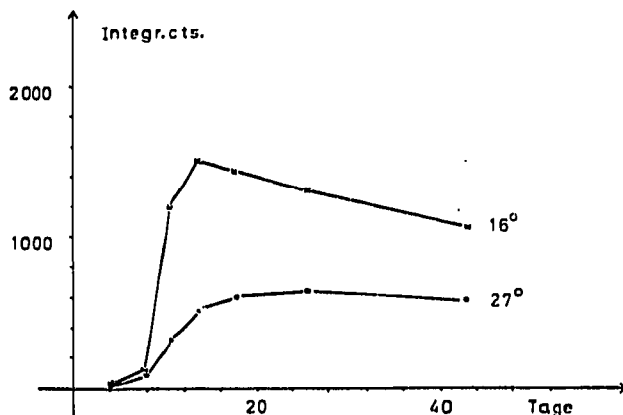


Fig. 6. Die Bildung von Penicillinsäure im Nährmedium von *Penicillium cyclopium* Westling bei 16 und 27°. Densitometrische Bestimmung des Penicillinsäure-Ammoniakderivates bei 278 nm. Aufgetragen wurden 10 μ l Chloroformextrakt.

linsäure differierte bei den Bebrütungstemperaturen von 16 und 27° sehr stark. Die Menge an gebildeter Penicillinsäure ist bei 16° mehr als doppelt so hoch wie bei 27°. Während bei 27° die maximale Penicillinsäurekonzentration nach etwa 30 Tagen erreicht wurde und dann langsam abnahm, wurde das Maximum bei 16° nach 18 Tagen erreicht. Danach fiel die Konzentration des Metaboliten schnell ab. Dieser Befund stimmt mit den Angaben von Kurtzman und Ciegler¹⁹ überein, die für *Penicillium martensii* bei niedrigen Temperaturen (5–10°) eine stärkere Bildung von Penicillinsäure fanden. Die densitometrische Messung der Penicillinsäure selbst (234 nm) und ihres Ammoniakderivates (278 nm) ergeben fast identische Wachstumskurven, d.h., beide Bestimmungen eignen sich zur Erfassung der Penicillinsäurekonzentration im biologischen Material.

Für die Angaben der absoluten Konzentration an Penicillinsäure muss die bei der Chloroformextraktion verlorengegangene Substanzmenge berücksichtigt werden. Diese haben wir durch Penicillinsäurezusatz zum Nährmedium und Dünnschichtchromatographie der durch Extraktion gewonnenen Proben bestimmt. Bei Zugabe von 16.2 μ g Penicillinsäure pro ml Nährmedium wurde für die Probe nach Extraktion $13.95 \pm 0.85 \mu$ g/ml bestimmt. Der daraus berechnete Korrekturfaktor ist $K = 1.25 \pm 0.08$. Mit diesem sind die nach der Chloroformextraktion gemessenen Werte zu multiplizieren. Neben der Penicillinsäure konnten nach der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung des Chloroformextraktes densitometrisch drei weitere, noch nicht näher identifizierte Metaboliten mit UV-Absorption bei 234 nm festgestellt werden. Fig. 7a und b geben die Densitogramme dieser Metaboliten, im weiteren Verlauf als biologische Profile bezeichnet, nach Inkubation bei 16 und 27° für 18 Tage wieder. Die Stoffwechselprodukte, in Richtung Fließmittelfront mit I–IV bezeichnet, zeichnen sich durch ein bestimmtes Verhältnis zueinander aus. III wurde als Penicillinsäure mit einer Referenzsubstanz sowie durch Bildung des fluoreszierenden Ammoniakderivates und durch Besprühen mit *p*-Anisaldehyd identifiziert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bebrütungstemperatur für den Stoffwechsel von wesentlicher Bedeutung ist.

Nach einem Vergleich der biologischen Profile bei den anderen Wachstums-

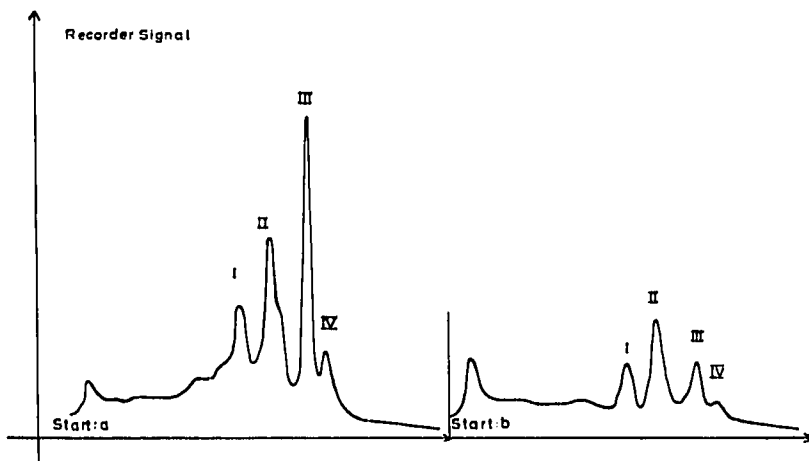


Fig. 7. Die densitometrische Bestimmung (234 nm) von Metaboliten im Nährmedium von *Penicillium cyclopium* Westling nach 18 Tagen Bebrütung (a) bei 16° und (b) bei 27°. Aufgetragen wurden 10 μ l Chloroformextrakt. Gemessen wurde vom Startfleck in Richtung Fließmittelfront.

abschnitten zeigt sich das enge Verhältnis der Stoffwechselprodukte besonders deutlich: Mit der Abnahme der Penicillinsäurekonzentration nehmen die Mengen der anderen Stoffwechselprodukte, besonders II, zu. Intraspezifische Korrelationen solcher biologischen Profile können sicherlich für die Identifizierung von Nutzen sein bezüglich weiterer Metaboliten. Ciegler *et al.*⁴ haben bei einigen *Penicillium*-stämmen mehrere Mykotoxine gleichzeitig gefunden, wie bei *Penicillium expansum* Penicillinsäure, Patulin und Citrinin. Untersuchungen über einen Zusammenhang zu den biologischen Profilen sind in Vorbereitung. Die Untersuchung der biologischen Profile, z.B. der Bildung und Abnahme der Penicillinsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit, können wertvolle Hinweise auf die Lagerungsbedingungen zur Vermeidung toxischer Metaboliten geben. Vielleicht lässt sich aus den densitometrischen biologischen Profilen eine Art "Fingerprinting-Prinzip" mit Hilfe charakteristischer Metaboliten ableiten.

Die direkte densitometrische Messung stellt somit eine wertvolle Hilfe bei der Routineuntersuchung biologischer Proben und bei der Produktkontrolle dar. Besondere Vorteile sind durch die hohe Genauigkeit, die gute Reproduzierbarkeit und den geringen Zeitaufwand gegeben. So ist die Messgrenze der Penicillinsäure mit dem kolorimetrischen Verfahren bei 200 μ g¹⁹, während densitometrisch mit unserer Instrumentation exakte Messungen im Bereich von 0.25–2 μ g möglich sind. Damit ist man in der Lage, Mykotoxinbestimmungen direkt aus dem Nährmedium vorzunehmen. Die direkte Messung im UV-Bereich ist den fluorodensitometrischen Bestimmungen vorzuziehen, weil (a) eine Derivatisierung nicht erforderlich ist und (b) Metaboliten, welche keine fluoreszierenden Derivate bilden oder Eigenfluoreszenz besitzen, ebenfalls erfasst werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein dünnschichtchromatographisches Screening-Verfahren für die

Analyse der Mykotoxine von *Penicillium cyclopium* beschrieben. Die Bildung von Penicillinsäure wird über eine Wachstumsperiode von 44 Tagen bei zwei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels UV-Densitometrie bei 234 nm. Ein biologisches Profil wird aufgezeichnet, welches das unterschiedliche Verhältnis von vier Metaboliten zueinander und die Bedeutung der Inkubationstemperatur für die bevorzugte Bildung von Penicillinsäure zeigt.

LITERATUR

- 1 A. Ciegler, R. W. Detroy und E. B. Lillehoy, in A. Ciegler, S. Kadis und S. J. Ajl (Herausgeber), *Microbial Toxins*, Vol. 6, Academic Press, New York, 1971, Ch. 6, p. 414.
- 2 F. Dickens und H. E. H. Jones, *Brit. J. Cancer*, 19 (1965) 392.
- 3 J. C. Munro, P. M. Scott, C. A. Moodie und R. F. Willes, *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 163 (1973) 1269.
- 4 A. Ciegler, H. J. Mintzlaß, W. Machnik und L. Leistner, *Fleischwirtschaft*, 52 (1972) 1311.
- 5 M. S. Lefar und A. D. Lewis, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 79A.
- 6 S. Ebel und G. Herold, *Z. Anal. Chem.*, 266 (1973) 281.
- 7 L. R. Treiber, R. Nordberg und S. Lindstedt, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 211.
- 8 W. Grimm, *J. Chromatogr.*, 89 (1974) 39.
- 9 S. Ebel und H. Kussmaul, *Z. Anal. Chem.*, 268 (1974) 268.
- 10 V. Novacek, *Amer. Lab.*, Dez. (1969).
- 11 W. A. Pons, Jr., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 870.
- 12 D. H. Liem und P. R. Beljaars, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 1064.
- 13 P. R. Beljaars, F. H. M. Fabry, M. M. A. Pickot und M. J. Peeters, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 1310.
- 14 M. Yamazaki, Y. Maebayashi und K. Miyaki, *Appl. Microbiol.*, 20 (1970) 452.
- 15 W. A. Pons, Jr., A. F. Cucullu und F. O. Anthony, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 768.
- 16 P. R. Beljaars, A. H. Verhülsdonk, W. E. Paulsch und D. H. Liem, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 1444.
- 17 P. R. Beljaars und F. H. M. Fabry, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 775.
- 18 A. Ciegler und C. P. Kurtzman, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 511.
- 19 C. P. Kurtzman und A. Ciegler, *Appl. Microbiol.*, 20 (1970) 204.