

CHROM. 9304

UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON MYKOTOXINEN UND DEREN QUANTITATIVE ANALYSE

VI. CITREOVIRIDIN

GÜNTER ENGEL

Institut für Mikrobiologie, Bundesanstalt für Milchforschung, Hermann-Weigmann-Strasse 1-27
D-2300 Kiel (B.R.D.)

(Eingegangen am 2. Februar 1976; geänderte Fassung eingegangen am 23. April 1976)

SUMMARY

Investigations on the production of mycotoxins and their quantitative analysis. VI. Citreoviridin

UV-densitometric and fluorodensitometric evaluations of the mycotoxin citreoviridin on thin-layer plates are described. The UV maximum is at 360 nm on thin-layer plates and at 388 nm in ethanolic solution. Its emission maximum has been found to be at 525 nm both in chloroform and on thin-layer plates. The two procedures are similar in their sensitivity. Since the UV-densitometric evaluation is more reliable, it is preferred to fluorodensitometric procedure.

EINLEITUNG

Citreoviridin wird unter bestimmten Bedingungen von *Penicillium toxicarium* Miyake, *Penicillium citreoviride* Biourge und *Penicillium ochrosalmoneum* Udagawai auf Reis während der Lagerung gebildet¹. Es bewirkt bei Mäusen, Ratten und anderen Vertebraten eine Paralyse des zentralen Nervensystems, die schliesslich zum Tode durch Atmungsstillstand führen kann^{2,3}. Weitere biologische sowie chemische und physikalische Daten sind in der Literatur beschrieben^{1,3-6}.

Nach dünn-schichtchromatographischer (DC) Auftrennung erscheint Citreoviridin im sichtbaren Licht als gelber, im langwelligen UV als gelb fluoreszierender Fleck³. Die quantitative Analyse von Citreoviridin nach DC Trennung erfolgt derzeit nach Elution mit Äthanol durch anschliessende photometrische Analyse bei 388 nm^{3,6,7}. Bei der direkten densitometrischen Analyse auf der DC-Platte würde eine Eluierung aus dem Kieselgel erübrigt und eine höhere Empfindlichkeit der Nachweismethode erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit soll daher geprüft werden, ob eine direkte Analyse von Citreoviridin auf der DC-Platte mittels Fluorodensitometrie und UV-Remissionsmessung (UV-Densitometrie) zu brauchbaren Ergebnissen führt.

MATERIAL UND METHODEN

Citreoviridin

Die Isolierung und Reinigung erfolgte nach Züchtung von *Penicillium citreoviride* in Ushinsky-Medium^{3,6,7}. Citreoviridin-Referenzsubstanz und der mykotoxinbildende Schimmelpilzstamm wurden dankenswerterweise von Dr. Yoshio Ueno (Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt.

Das gewonnene Citreoviridin wurde bei Vorlage von 5 µg/ml in äthanolischer Lösung bei einer Wellenlänge (λ) von 392 nm photometrisch geprüft; aus der gemessenen Extinktion sowie den aus der Literatur bekannten Daten für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten^{1,3-6} errechnete sich ein Citreoviridingehalt von 98%.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten G 1500 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.) bei einer Laufstrecke von 15 cm in Äthylacetat-Toluol (3:1)³. Für die Erstellung der Eichkurven wurde die Stammlösung (100 µg/ml) mit Chloroform so verdünnt, dass 10 µl Auftragvolumen jeweils 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 und 1.0 µg enthielten. 2 µg wurden in 20 µl Chloroform aufgetragen.

Spektraldensitometrische Bestimmungen

Die Messungen erfolgten mit dem Zweistrahl-Spektral-Densitometer SD 3000 mit Funktionsrechner, Flachsreiber SD 303 und Integrator SDR 304 (Schoeffel, West Wood, N.J., U.S.A.).

UV-Remissionsmessung. Die UV-Remissionsmessung wird als Zweistrahlmessung durchgeführt, wobei mit dem Referenzstrahl der DC-Untergrund kompensiert wird. Für die quantitative Analyse wurde der Messstrahl zunächst optimal auf einen Fleck von 2 µg Citreoviridin justiert. Durch schrittweise Veränderung der Wellenlänge wurde dann das Absorptionsspektrum von Citreoviridin auf der DC-Platte bestimmt.

Fluoreszenzmessung. Im Gegensatz zur UV-Remission erfolgt die Fluoreszenzbestimmung als Einstrahlungsmessung. Die so ermittelten Werte sind abhängig von der Intensität der zur Anregung verwendeten Lichtquelle und von der am Elektronenvervielfacher zur Verstärkung angelegten Spannung. Daher wird zweckmässig auf jeder Platte eine Standardkonzentration als Referenz mitgeführt. Für die Fluoreszenz von Citreoviridin wurde im vorliegenden System ein Anregungsmaximum bei $\lambda = 362$ nm gefunden. Das Fluoreszenzspektrum von Citreoviridin auf der DC-Platte und das des Plattenuntergrundes wurde mit Hilfe des Gittermonochromators GM 100 (Schoeffel) aufgenommen. Für die Erstellung einer Bezugskurve, Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Substanzmenge, wurde anstelle von GM 100 ein InterferenzverlaufsfILTER mit einem Spalt verwendet, da mit letzterem wegen geringerer Lichtverluste kleinere Mengen nachzuweisen sind.

Photometrische Bestimmungen

Die Messungen von UV-Absorption und Fluoreszenz der Citreoviridinlösungen erfolgte in 1 cm-Küvetten mit dem Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen/Württemberg, B.R.D.). Bei der Fluoreszenzmessung wurde der Fluoreszenzzusatz ZFM 4 verwendet, wobei das Erregerlicht ein Monochromatfilter M 365 passierte.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Citreoviridin besitzt in äthanolischer Lösung nach Sakabe *et al.*⁵ UV-Absorptionsmaxima bei $\lambda = 204, 234, 286, 294$ und 388 nm, nach eigener Messung bei $232, 288, 296$ und 392 nm. Das Absorptionsspektrum eines Citreoviridinflecks auf der DC-Platte nach Chromatographie und vollständiger Verdampfung des Fließmittels (UV-Remission) wird in Fig. 1 dem Absorptionsspektrum einer äthanolischen Lösung gegenübergestellt. Ersteres zeigt deutliche Verschiebungen der Maxima. Die für die quantitative Analyse von Citreoviridin in äthanolischer Lösung verwendeten λ -Werte von 392 oder 388 nm sind für die Messung der UV-Remission auf der Platte ungeeignet, da das hier entsprechende Maximum bei 360 nm liegt; eine gleichsinnige Verschiebung ist auch für das zweite ausgeprägte Maximum (296 nm) zu verzeichnen. Die Verwendung eines anderen Fließmittels Aceton-*n*-Hexan (1:1)³ hatte auf das Remissionsspektrum des Citreoviridins keinen Einfluss.

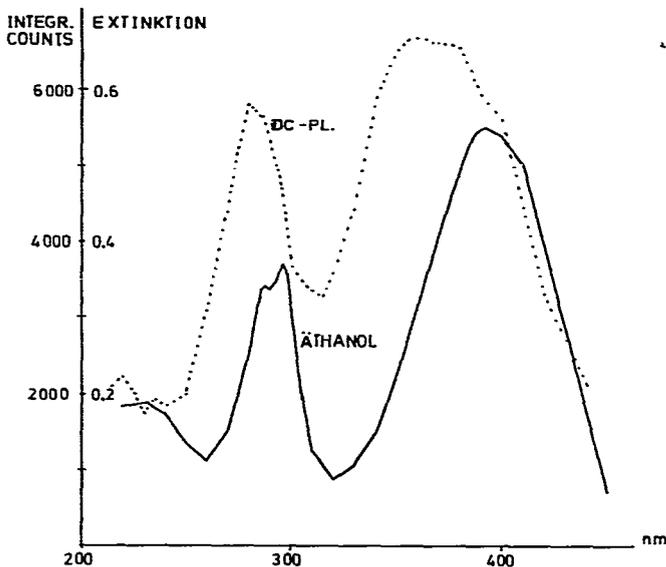


Fig. 1. Absorptionsspektrum äthanolischer Citreoviridinlösung und eines Citreoviridinflecks auf der Platte (DC-Pl.).

Das unseres Wissens bis jetzt nicht beschriebene Fluoreszenzspektrum des Citreoviridins wurde an Lösungen in Chloroform nach Anregung bei $\lambda = 365$ nm ermittelt und ist in Fig. 2 dargestellt. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda = 525$ nm. Die bei dieser Wellenlänge gemessene Intensität wurde nach Abzug des Chloroformleerwertes als 100% Fluoreszenzintensität zum Bezugswert gewählt. Äthanolische Lösungen von Citreoviridin lieferten im Bereich des Emissionsmaximums nur 20–25% Fluoreszenzintensität einer gleich konzentrierten Lösung in Chloroform.

Fig. 3 zeigt die Fluoreszenzspektren von Citreoviridin nach DC auf der Platte (Cit.) sowie des Plattenuntergrundes (DS-Pl.) nach Anregung bei $\lambda = 362$ nm. Während der Messung beider Spektren wurden am Densitometer und Schreiber

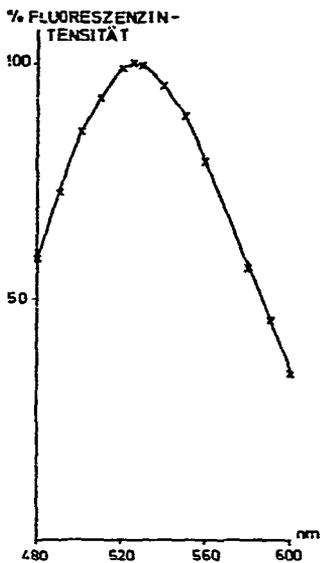


Fig. 2. Fluoreszenzspektrum von Citreoviridin in Chloroform; Anregung bei 365 nm.

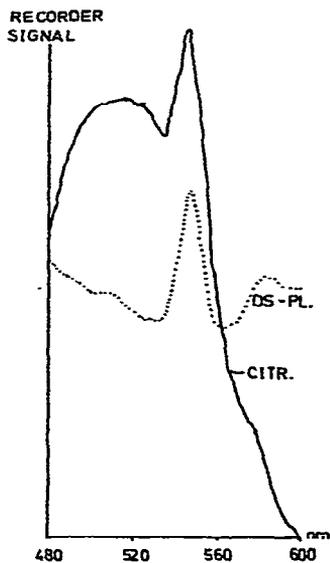


Fig. 3. Fluoreszenzspektrum eines Citreoviridinflecks auf der Platte (Citr.) sowie des Plattenuntergrundes (DS-Pl.); Anregung bei 362 nm.

keine Veränderungen vorgenommen mit Ausnahme der Wellenlängeneinstellung für die Emission am Gittermonochromator. Im Bereich $\lambda > 560$ nm wird allem Anschein nach durch den Citreoviridinleck eine Löschung der Fluoreszenz des Plattenuntergrundes herbeigeführt, da die Fluoreszenzintensität des Citreoviridins unter die des Plattenuntergrundes abfällt. Zwischen $\lambda = 545$ und 550 nm erscheint im Spektrum sowohl des Plattenuntergrundes als auch des Citreoviridins ein Intensitätsmaximum,

so dass für die Intensität der Citreoviridinfluoreszenz in diesem Bereich ein stetiger Abfall anzunehmen ist. Das Fluoreszenzmaximum für Citreoviridin auf der Platte ist wegen unsicherer Wechselwirkungen zwischen Plattenuntergrund- und Citreoviridinfluoreszenz nur zu vermuten und liegt wahrscheinlich bei 510–520 nm. Nach Abzug des Plattenuntergrundes ergibt sich ein Maximum zwischen 520 und 525 nm; dies entspricht dem in Chloroformlösung ermittelten Wert.

Die nach DC bestehenden Beziehungen zwischen aufgetragener Citreoviridinmenge und Messdaten der UV-Remission und Fluoreszenz sind in der Tabelle I aufgeführt. Beide Messungen wurden an jeweils vier Flecken pro Citreoviridinmenge durchgeführt. Beide Bezugskurven zeigen einen zu höheren Mengen sich stark abflachenden Verlauf. Diese Tendenz ist bei Fluoreszenzmessung ausgeprägter als bei UV-Remission. Letztere erweist sich auch in bezug auf die Streuung der Messwerte als zuverlässiger und ist daher für quantitative Analysen besser geeignet.

TABELLE I

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AUFGETRAGENER CITREOVIRIDINMENGE UND UV-REMISSION (INTEGRIERTE COUNTS) BZW. FLUORESZENZ (INTEGRIERTE COUNTS NACH ABGLEICHUNG GEGEN PLATTENUNTERGRUND)

| Vorgegebene Citreoviridinmenge (μg pro Fleck) | UV-Remission | | Fluoreszenz | |
|---|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| | \bar{x} ($n = 4$) | s (%) | \bar{x} ($n = 4$) | s (%) |
| 0.05 | 354 \pm 18 | 5.0 | 347 \pm 29 | 8.4 |
| 0.075 | 562 \pm 16 | 3.0 | 573 \pm 74 | 12.9 |
| 0.1 | 754 \pm 24 | 3.3 | 763 \pm 77 | 10.0 |
| 0.25 | 1858 \pm 88 | 4.7 | 1737 \pm 106 | 6.1 |
| 0.5 | 3108 \pm 125 | 4.0 | 2826 \pm 124 | 4.4 |
| 0.75 | 4249 \pm 115 | 2.7 | 3628 \pm 135 | 3.7 |
| 1.0 | 4871 \pm 112 | 2.3 | 4029 \pm 307 | 7.6 |
| 2.0 | 7284 \pm 332 | 4.6 | 5597 \pm 368 | 6.6 |

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden UV-densitometrische und fluorodensitometrische Analysemethoden für das Mykotoxin Citreoviridin auf Dünnschichtplatten beschrieben. Ein UV-Maximum wurde auf Dünnschichtplatten bei 360 nm und in äthanolischer Lösung bei 388 nm gefunden. Sowohl in Chloroform als auch auf der Dünnschichtplatte betrug das Emissionsmaximum 525 nm. Beide Verfahren erwiesen sich als gleich empfindlich. Da die UV-densitometrische Bestimmung zuverlässiger ist, ist sie dem fluorodensitometrischen Verfahren vorzuziehen.

LITERATUR

- 1 K. Uraguchi, in A. Ciegler, S. Kadis und S. J. Ajl (Herausgeber), *Microbial Toxins*, Vol. 6, *Fungal Toxins*, Academic Press, New York, 1971, Kap. 4, S. 367.
- 2 K. Uraguchi, *Nisshin Igaku*, 34 (1947) 155.
- 3 Y. Ueno, *Proceedings of the Symposium on Mycotoxins in Human Health*, Pretoria, 1970, S. 115.
- 4 K. Uraguchi, *J. Stored Prod. Res.*, 5 (1969) 227.
- 5 N. Sakabe, T. Goto und Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.*, 27 (1964) 1825.
- 6 Y. Ueno und I. Ueno, *Jap. J. Exp. Med.*, 42 (1972) 91.
- 7 Y. Ueno, *Jap. J. Exp. Med.*, 42 (1972) 107.