

CHROM. 9951

Note

Untersuchungen zur Bildung von Mykotoxinen und deren quantitative Analyse

IX. Sterigmatocystin

GÜNTER ENGEL

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

(Eingegangen am 29. November 1976)

Anfang der 50er Jahre wurde von Hatsuda *et al.*^{1,2} aus Kulturen von *Aspergillus versicolor* Sterigmatocystin isoliert und strukturell aufgeklärt. Holzapfel *et al.*³ sowie Dickens *et al.*⁴ wiesen die akute und cancerogene Wirkung dieser Substanz im Tierversuch nach. Weitere biologische, physikalische und chemische Daten wurden von Orth⁵ zusammengefasst. Nach dünnschichtchromatographischer (DC) Auftrennung erscheint Sterigmatocystin im langwelligen UV als ziegelrot fluoreszierender Fleck⁶ (Nachweisgrenze bei 0.5 µg)⁷, der nach Behandlung mit AlCl₃ im langwelligen UV hellgelb fluoresziert⁸ (Nachweisgrenze bei 0.02 µg)⁵.

Der semiquantitative, unzureichende Nachweis auf DC-Platten erfolgt derzeit durch visuellen Vergleich zwischen Fluoreszenzintensität des Probeflecks und bekannter Referenzkonzentration nach AlCl₃-Behandlung⁷⁻⁹. Nachfolgend wird eine Methode beschrieben, die eine exakte quantitative Analyse dieses Mykotoxins auf DC-Platten ohne Derivatisierung und wesentlichen Empfindlichkeitsverlust gegenüber der AlCl₃-Behandlung erlaubt und deren Auswertung nicht durch subjektive Beurteilung beeinflusst werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Sterigmatocystin

Sterigmatocystin (Calbiochem, Luzern, Schweiz) wurde bei Vorlage von ca. 10 µg/ml in Chloroform bei einer Wellenlänge von 247 bzw. 327 nm photometrisch überprüft: aus den gemessenen Extinktionen und den aus der Literatur bekannten Daten für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten^{5,10} errechnete sich eine Sterigmatocystinkonzentration von 10.3 µg/ml.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten G 1500 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.) bei einer Laufstrecke von 15 cm in Benzol-Äthanol (95:5)¹¹. Nach Behandlung mit AlCl₃ (25 g AlCl₃ + 100 ml 95% Äthanol) und 10 min Inkubation bei 105° bildet Sterigmatocystin ein nach Anregung mit langwelligem UV gelb fluoreszierendes Derivat⁸.

Spektraldensitometrische Bestimmungen

Die Messungen erfolgten mit einem Zweistrahl-Spektraldensitometer SD 3000 mit Funktionsrechner SDC 300, Flachsreiber SD 303 und Integrator SDR 304 (Schoeffel, West Wood, N.J., U.S.A.).

UV-Remissionsmessung. Die UV-Remissionsmessung wurde als Zweistrahlmessung durchgeführt, wobei mit dem Referenzstrahl der DC-Plattenuntergrund kompensiert wurde. Für die quantitative Analyse wurde der Messstrahl zunächst optimal auf einen Fleck von 0.5 µg Sterigmatocystin justiert. Durch schrittweise Veränderung der Wellenlänge wurde dann das Absorptionsspektrum von Sterigmatocystin auf der DC-Platte bestimmt.

Fluoreszenzmessung. Im Gegensatz zur UV-Remission erfolgte die Fluoreszenzbestimmung des AlCl₃-Derivates als Einstrahlungsmessung. Die ermittelten Werte sind abhängig von der Intensität der zur Anregung verwendeten Lichtquelle und von der am Elektronenvervielfacher zur Verstärkung angelegten Spannung, so dass auf jeder Platte eine Standardkonzentration als Referenz mitgeführt werden muss. Emissions- und Anregungsmaximum wurden durch schrittweise Veränderung einer Strahlungskomponente (z.B. Anregung) bei Konstanz der anderen (z.B. Emission) ermittelt.

Photometrische Bestimmungen

Die Messung der UV-Absorption der Sterigmatocystinlösungen erfolgte in 1-cm-Quarzküvetten mit dem Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen/Württemberg, B.R.D.). Dazu wurden etwa 10 µg Sterigmatocystin pro ml in Chloroform, Äthanol oder Benzol-Acetonitril (98:2) gelöst.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Sterigmatocystin besitzt in äthanolischer Lösung Absorptionsmaxima bei 205, 233, 246 und 325 nm (Lit. 5), nach eigenen Messungen bei 206, 247 und 324 nm, während bei 233 nm eine Schulter gefunden wurde. Benzol-Acetonitril (98:2) bzw. Chloroform als Lösungsmittel eignen sich wegen ihrer Eigenabsorption im kurzwelligen UV nicht zu Absorptionsmessungen. Daher konnten in der chloroformhaltigen Lösungen nur die Maxima bei 247 und 324 nm und im Benzol-Acetonitril nur das bei 320 nm ermittelt werden. Das Absorptionsspektrum eines Sterigmatocystinflecks auf der DC-Platte nach Chromatographie und vollständigem Abdampfen des Fließmittels (UV-Remission) wird in Fig. 1 dem Absorptionsspektrum einer äthanolischen Sterigmatocystinlösung gegenübergestellt. Für die quantitative Analyse auf der DC-Platte mittels UV-Remission eignen sich demnach Messungen bei 245 und 325 nm, die beide zusammen zur Identifizierung und Prüfung der Reinheit des zu messenden Sterigmatocystinflecks dienen können. Das Absorptionsspektrum des AlCl₃-Derivates auf der DC-Platte entsprach dem des unbehandelten Mykotoxins, jedoch waren die Maxima nicht so stark ausgeprägt.

Das Anregungs- und Emissionsspektrum dieses Derivates nach Dünnschichtchromatographie ist in Fig. 2 dargestellt. Als Anregungsmaximum wurden 360 nm, als Emissionsmaximum 500 nm ermittelt. Demnach können zur quantitativen Analyse eines Sterigmatocystinflecks drei verschiedene Messarten durchgeführt werden, mit

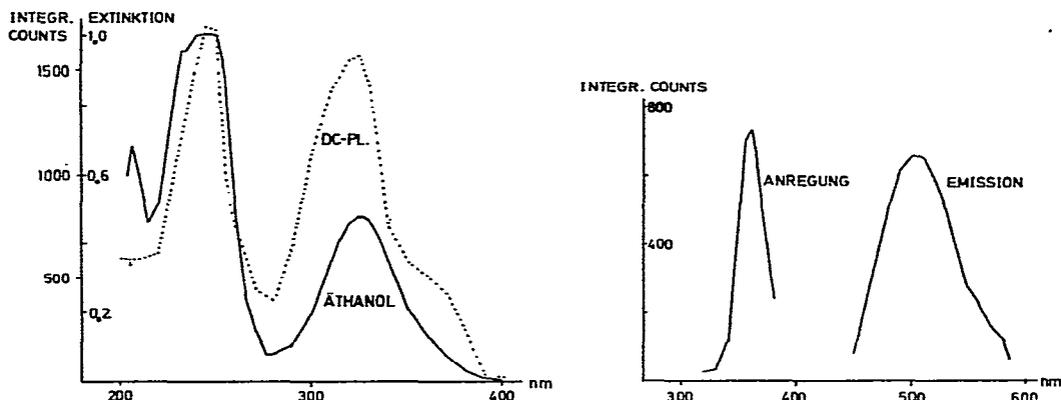


Fig. 1. Absorptionsspektren athanolischer Sterigmatocystinlösung (Äthanol) und eines Sterigmatocystinflecks auf der Dünnschichtplatte (DC-PL).

Fig. 2. Anregungs- und Emissionsspektrum von Sterigmatocystin auf der DC-Platte nach Behandlung mit AlCl_3 .

Hilfe derer die in Tabelle I gezeigten Beziehungen zwischen Recorder Signal (integrierte Counts) und aufgetragener Sterigmatocystinmenge hergestellt wurden.

Wie diese Tabelle darlegt, können mittels Fluoreszenzmessung $0.01 \mu\text{g}$ und mittels UV-Remission $0.02 \mu\text{g}$ Sterigmatocystin, wenn auch mit relativ grossem Fehler, nachgewiesen werden. Für Messungen von Mengen von mehr als $0.05 \mu\text{g}$ eignet sich die UV-Remissionsmessung bei 325 nm am besten, da hier für die einzelnen Konzentrationen die niedrigsten relativen Fehler ermittelt wurden, während die Mess-

TABELLE I

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AUFGETRAGENER STERIGMATOCYSTINMENGE UND UV-REMISSION BZW. FLUORESCENZ NACH ABGLEICHUNG GEGEN PLATTEN-UNTERGRUND

\bar{x} = Mittelwert der Messungen; n = Anzahl der Messungen; $v\%$ = prozentuale relative Fehler.

Vorgegebene Sterigmatocystinmenge (μg pro Fleck)	UV-Remission (integr. Counts)				Fluoreszenz (integr. Counts)	
	245 nm \bar{x} ($n=5$)	$v\%$	325 nm \bar{x} ($n=5$)	$v\%$	Anregung: 360 nm Emission: 500 nm \bar{x} ($n=7$)	$v\%$
0.01					60	27.4
0.02	63	24.4	54	15.1	233	15.1
0.05	181	20.4	174	10.3	732	18.9
0.75	323	20.1	280	4.9	1318	22.0
0.1	428	5.0	375	5.5	2007	26.9
0.2	847	7.5	752	4.7	3217	20.0
0.3	1311	5.6	1124	3.3	3684	13.4
0.4	1720	2.9	1469	1.5	4999	5.5
0.5	2001	5.8	1743	2.7	6390	8.2
0.6	2353	7.0	2039	5.1	8256	11.6
0.75	2808	6.0	2421	5.2	11241	20.0
1.0	3377	9.7	2856	8.3	14247	29.9

genauigkeit bei der Fluoreszenzmessung wegen der Abhängigkeit vom Gerät und vor allem wegen der Derivatisierung ungünstiger ist. Fehler beim Auftragen der Sterigmatocystinmengen wirken sich in gleichem Masse aus, da für die drei verschiedenen Messarten jeweils die selben Flecke verwendet wurden.

LITERATUR

- 1 Y. Hatsuda und S. Kuyama, *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 28 (1954) 989.
- 2 Y. Hatsuda, S. Kuyama und N. Terashima, *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 28 (1954) 992.
- 3 C. W. Holzapfel, J. H. F. Purchase, P. S. Steyn und L. Gouws, *S. Afr. Med. J.*, 40 (1960) 1100.
- 4 F. Dickens, H. E. H. Jones und H. B. Waynforth, *Brit. J. Cancer*, 20 (1966) 134.
- 5 R. Orth, *Inaugural-Dissertation*, Naturwissenschaftliche Gesamtfakultät der Universität Heidelberg, Heidelberg, 1973.
- 6 L. J. Vorster, *Analyst (London)*, 94 (1969) 136.
- 7 M. E. Stack und J. V. Rodricks, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 86.
- 8 L. Stoloff, S. Nesheim, L. Yin, J. V. Rodricks, M. Stack und A. D. Campbell, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 91.
- 9 M. E. Stack und J. V. Rodricks, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 1123.
- 10 J. V. Rodricks und Stoloff, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 92.
- 11 Z. Ďuračková, V. Betina und P. Nemeč, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 141.