

CHROM. 11 510

Note

UV-densitometrische Analyse von Roquefortin und PR Toxin

GÜNTER ENGEL

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

(Eingegangen am 26. Mai 1978; geänderte Fassung eingegangen am 7. September 1978)

Roquefortin und PR Toxin sind Metaboliten von *Penicillium roqueforti*¹⁻³. Während Roquefortin grösstenteils im Pilzmycel lokalisiert bleibt, wird PR Toxin überwiegend in die Kulturlösung ausgeschieden⁴. In Edelschimmelkäse wurde Roquefortin in Konzentrationen bis zu 6.8 ppm nachgewiesen⁵; über das Vorkommen von PR Toxin in Käse gibt es bisher keine positiven Befunde.

Die semiquantitative Bestimmung dieser Substanzen erfolgt derzeit nach Chloroformextraktion und nach dünnschichtchromatographischer (DC) Auftrennung durch visuellen Vergleich der Farbintensitäten der mit H₂SO₄ sichtbar gemachten Flecke mit denen bekannter Referenzkonzentrationen.

Nachfolgend wird eine Methode beschrieben, die quantitative Analysen beider Substanzen auf der Dünnschichtplatte ohne Derivatisierung und Empfindlichkeitsverlust erlaubt.

MATERIAL UND METHODEN

Roquefortin und PR Toxin

Roquefortin und PR Toxin wurden nach Scott *et al.*⁴ aus Pilzmycel bzw. Kulturlösung von *P. roqueforti* isoliert. Referenzsubstanzen erhielten wir dankenswerterweise von Dr. P. M. Scott (Health and Welfare, Ottawa, Canada) und Dr. S. Moreau (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villeneuve-d'Ascq, Frankreich).

Die Konzentrationen dieser Verbindungen in Lösung wurden aus den bekannten Daten für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient ermittelt^{2,6}.

Dünnschichtchromatographie

DC erfolgte auf Kieselgelplatten G 1500 (Schleicher und Schüll, Dassel, B.R.D.) bei einer Trennstrecke von 15 cm aufsteigend für Roquefortin in Chloroform–Methanol–28% NH₄OH (90:10:1)⁵, für PR Toxin in Toluol–Äthylacetat–Essigsäure (5:4:1), wobei die Platten vor dem Auftragen der Proben 15 min bei 120° behandelt wurden.

Spektraldensitometrische Analyse

Gemessen wurde mit einem Zweistrahl-Spektraldensitometer SD 3000 mit Funktionsrechner, Flachsreiber und Integrator (Schoeffel, Westwood, N.J., U.S.A.).

Die quantitative Analyse wurde mittels UV-Remissionsmessung durchgeführt; dazu wurde der Messstrahl zunächst optimal auf einen Fleck von $0.6 \mu\text{g}$ Roquefortin bzw. $2.0 \mu\text{g}$ PR Toxin justiert und durch schrittweise Veränderung der Wellenlänge die Absorptionsspektren beider Substanzen auf der Dünnschichtplatte bestimmt.

Spektralphotometrische Analyse

Die Messung der UV Absorption der Roquefortin- bzw. PR Toxinlösungen sowie die Ermittlung der UV Spektren mit dem registrierenden Zweistrahl-Photometer UV 210 A (Shimadzu, Kyoto, Japan) erfolgte in 1-cm-Quarzküvetten. Dazu wurden $5 \mu\text{g}$ Roquefortin bzw. $8 \mu\text{g}$ PR Toxin pro 1 ml Äthanol gelöst.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Roquefortin weist nach Scott *et al.*² in Äthanol UV Maxima bei 209, 240 und 328 nm auf, was mit den eigenen Befunden (207, 240 und 327 nm) übereinstimmt. In Fig. 1 werden die UV Absorptionsspektren in Äthanol und nach DC auf der Platte dargestellt. Bemerkenswert ist, dass in Äthanol mit 327 nm und auf der Dünnschichtplatte mit 310 nm die Lagen der Maxima beträchtlich differieren. Scott *et al.*⁵ beobachteten, dass in 96% Äthanol durch Exposition in Tageslicht das UV Maximum von 328 nach 314 nm verschoben wurde. Nach Aufbewahren im Dunkeln konnte eine solche Veränderung nicht festgestellt werden. Eine derartige Verschiebung wurde auf der Dünnschichtplatte nicht beobachtet. Für quantitative Analysen direkt auf der Platte (Chloroform-Methanol-28% NH_4OH , 90:10:1; $R_F \approx 0.4$) eignen sich Messungen bei 310 nm. In Tabelle I werden die Beziehungen zwischen Messdaten und auf-

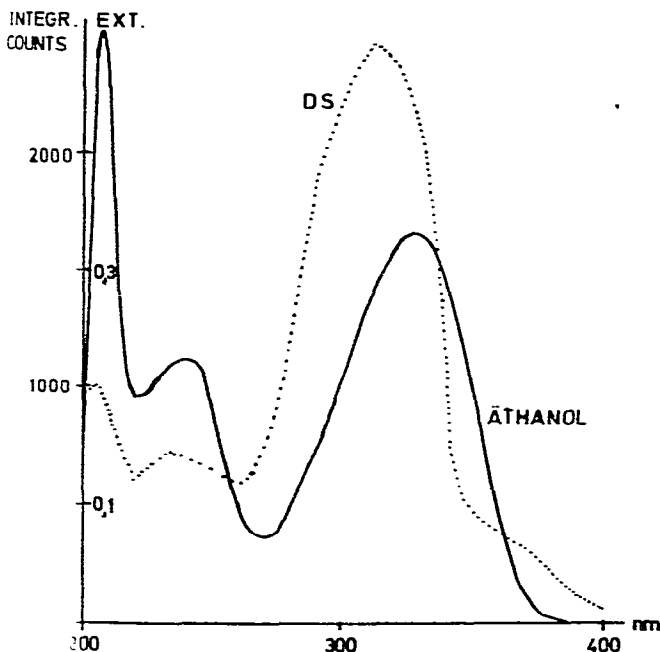


Fig. 1. Absorptionsspektrum äthanolischer Roquefortinlösung (Äthanol) und eines Roquefortinflecks auf der Dünnschichtplatte (DS) nach Chromatographie.

TABELLE I

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AUFGETRAGENER ROQUEFORTINMENGE UND UV-REMISSION (INTEGRIERTE COUNTS) NACH ABGLEICHUNG GEGEN PLATTEN-UNTERGRUND

\bar{x} = Mittelwert aus jeweils 4 Einzelmessungen; s = Standardabweichung.

Vorgegebene Roquefortinmenge (μg pro Fleck)	UV-Remission, $\lambda = 310 \text{ nm}$	
	$\bar{x} \pm s$	$s (\%)$
0.009	61 ± 6	10.2
0.024	105 ± 22	21.9
0.048	237 ± 18	7.5
0.061	328 ± 17	5.0
0.121	556 ± 19	3.4
0.182	815 ± 39	4.7
0.242	1021 ± 12	1.1
0.454	1769 ± 122	6.9
0.605	2244 ± 138	6.2
0.908	2890 ± 55	1.9
1.210	3568 ± 54	1.5
2.270	5163 ± 53	1.0

getragener Roquefortinmenge dargestellt. Nachgewiesen wurden durch UV-Remission noch $0.02 \mu\text{g}$ Roquefortin, während nach Sichtbarmachen durch Besprühen mit $50\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ und anschließender Behandlung bei 120° $0.15 \mu\text{g}$ Roquefortin gefunden werden konnte.

PR Toxin besitzt in äthanolischer Lösung nach Wei *et al.*³ ein UV Maximum bei 247, nach eigenen Untersuchungen bei 250 nm. Sobald die äthanolische Lösung

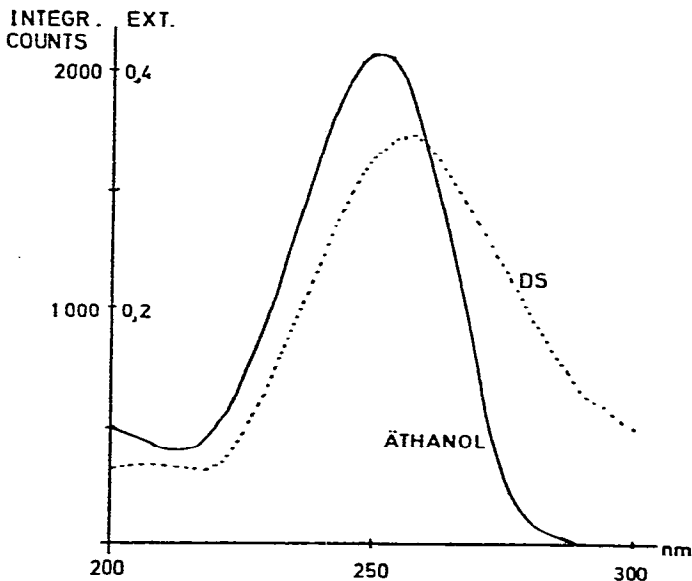


Fig. 2. Absorptionsspektrum äthanolischer PR Toxinlösung (Äthanol) und eines PR Toxinflecks auf der Dünnschichtplatte (DS) nach Chromatographie.

UV Licht ausgesetzt wird, entsteht eine breite Bande um 247 nm und ein neuer Peak bei 400 nm; die Lösung wird gelb³. Das Absorptionsspektrum von PR Toxin auf der Dünnschichtplatte nach DC und vollständigem Abdampfen des Laufmittels wird in Fig. 2 dem Absorptionsspektrum einer äthanolischen Lösung gegenübergestellt. Das auf der Platte ermittelte UV Maximum bei 257.5 nm erscheint gegenüber dem in Äthanol (250 nm), welches mit dem in Chloroform identisch ist, leicht verschoben.

Für quantitative Analysen auf der Dünnschichtplatte (Toluol-Äthylacetat-Essigsäure, 5:4:1; $R_f \approx 0.7$) eignen sich Messungen bei 257.5 nm. Nach Abdecken der Kieselgelschicht ist PR Toxin auf der Platte mindestens eine Woche stabil. Die Beziehungen zwischen chromatographierter PR Toxinmenge und Recorder Signal sind in Tabelle II dargestellt; 0.1 μg können nachgewiesen werden. Nach Besprühen mit 50% H_2SO_4 und 10 min Inkubation bei 120° lag die Nachweisgrenze des sichtbar gewordenen Flecks bei 0.15 μg .

TABELLE II

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AUFGETRAGENER PR TOXINMENGE UND UV-REMIS-SION (INTEGRIERTE COUNTS) NACH ABGLEICHUNG GEGEN PLATTENUNTER-GRUND

\bar{x} = Mittelwert aus jeweils 4 Einzelmessungen; s = Standardabweichung.

Vorgegebene PR Toxinmenge (μg pro Fleck)	UV-Remission, $\lambda = 257.5 \text{ nm}$	
	$\bar{x} \pm s$	s (%)
0.08	180 \pm 21	11.8
0.20	397 \pm 26	6.6
0.40	785 \pm 56	7.2
0.67	1275 \pm 69	5.4
1.005	1859 \pm 61	3.3
1.508	2337 \pm 76	3.2
2.01	2736 \pm 134	4.9
3.01	3350 \pm 120	3.6
4.02	3955 \pm 66	1.7

LITERATUR

- 1 S. Ohmomo, T. Sato, T. Utagawa und M. Abe, *Agr. Biol. Chem.*, 39 (1975) 1333.
- 2 P. M. Scott, M. A. Merrien und J. Polonsky, *Experientia*, 32 (1976) 140.
- 3 R. D. Wei, P. E. Still, E. B. Smalley, H. K. Schnoes und F. M. Strong, *Appl. Microbiol.*, 25 (1973) 111.
- 4 P. M. Scott, B. P. C. Kennedy, J. Harwig und B. J. Blanchfield, *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 (1977) 249.
- 5 P. M. Scott und B. P. C. Kennedy, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976) 365.
- 6 R. D. Wei, H. K. Schnoes, P. A. Hart und F. M. Strong, *Tetrahedron*, 31 (1975) 109.