

# Einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln = A simple determination of ochratoxin A in foods

Autor(en): **Baumann, U. / Zimmerli, B.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **79 (1988)**

Heft 2

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982580>

## **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.

## Einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln

A Simple Determination of Ochratoxin A in Foods

*U. Baumann* und *B. Zimmerli*

Bundesamt für Gesundheitswesen, Bern

### Einleitung

Verschiedene *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten sind in der Lage, Ochratoxine zu bilden. Als toxikologisch bedeutsamstes Ochratoxin erwies sich das Ochratoxin A. Gegenüber allen eingesetzten Testtieren zeigte Ochratoxin A eine ausgeprägte Nephrotoxizität (1). Auch teratogene und immunsuppressive Eigenschaften werden dem Ochratoxin A nachgesagt (2, 3). Ob Ochratoxin A zusätzlich noch eine kanzerogene Potenz aufweist, ist sehr umstritten (4).

Ochratoxin bildende Pilze wie *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium viridicatum* sind ubiquitär und können häufig aus Lebens- und Futtermitteln isoliert werden. Für die Ochratoxinbildung in kühleren Klimazonen scheinen die psychrotrophen Vertreter der Gattung *Penicillium* vorwiegend verantwortlich zu sein (5). Als kritische Lebensmittel erwiesen sich die Cerealien und die Nüsse (6). Durch die Verfütterung von mit Ochratoxin A kontaminierten Futtermitteln konnten nicht unerhebliche Rückstände in Schlachtschweinen nachgewiesen werden (1). Die höchsten Ochratoxin-A-Konzentrationen wurden in den Nieren gefunden. *Krogh* (7, 8) gelang es, die im skandinavischen Raum häufig auftretende Nephropathie bei den Schweinen mit dem Vorkommen von Ochratoxin in den Futtermitteln zu korrelieren. In Dänemark führten diese Erkenntnisse zu einer gesetzlichen Regelung. Danach wird der gesamte Schlachttierkörper verworfen, wenn der Ochratoxin-A-Gehalt der Nieren über 25 µg/kg liegt. Beträgt der Ochratoxin-A-Gehalt der Nieren mehr als 10 µg/kg, werden nur die Nieren und die Leber verworfen (16).

*Krogh* (9, 10) war es denn auch, der 1976 einen Zusammenhang zwischen der Ochratoxinkontamination der Nahrungsmittel mit den in Jugoslawien, Rumänien und Bulgarien häufig auftretenden fatalen Nierenschäden beim Menschen (endemische Nephropathie des Balkans) postulierte.

Der saure Charakter des Ochratoxins A sowie seine intensive Fluoreszenz begünstigen dessen spurenanalytische Erfassung in Lebens- und Futtermitteln. Die nachfolgend publizierten Methoden wurden in Anlehnung an die Arbeit von

Bauer et al. (11) sowie die AOAC-Methode 26.096 (1980) entwickelt. Mit Hilfe dieser Methoden wurden verschiedene pflanzliche und tierische Lebensmittel des Schweizer Marktes auf die Anwesenheit von Ochratoxin A untersucht.

## Experimentelles

### *Analysenmethode*

#### *Aufarbeitung von pflanzlichen Lebensmitteln*

40,0 g fein zerkleinertes Probematerial werden in eine 250-ml-Serumflasche eingewogen, mit 150 ml Chloroform und 20 ml 0,1 M Phosphorsäure versetzt und kräftig gemixt. Durch Zentrifugieren wird eine saubere Phasentrennung erreicht. 100,0 ml der klaren Chloroformlösung werden gewonnen und auf eine wie folgt beschrieben vorbereitete Extrelutsäule aufgegeben:

Bereitung der Extrelutsäule: 7 g Extrelut-Nachfüllmaterial werden in einem Becherglas mit 10 ml wässriger 1%iger Natriumbicarbonatlösung gleichmässig benetzt. Das befeuchtete Adsorbens wird in eine verkürzte Extrelutsäule eingefüllt, durch Klopfen verdichtet und der Stempel aufgesetzt. Am Ausfluss wird ein Hahn angebracht.

Nach dem langsamen Durchfliessen des Chloroformextraktes wird die Säule noch 2mal mit je 40 ml Chloroform gespült und hernach ausgeblasen. Die erhaltenen Eluate werden verworfen. Der Ausflusshahn wird verschlossen, der Stempel entfernt und eine Mischung aus 30 ml Chloroform und 1 ml 100%iger Ameisensäure auf die Säule gegeben und mit einem Glasstab vollständig gemischt. In einen Spitzkolben wird die Lösung ablaufen gelassen. Nach dem Aufsetzen des Stempels und leichter Komprimierung der Säulenpackung wird 2mal mit je 40 ml Chloroform gespült. Die Spüllösungen werden ebenfalls im Spitzkolben auffangen. Die vereinigten Eluate werden am Rotavap bei 40 Grad Celsius und Wasserstrahlvacuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 1,00 ml Methanol aufgenommen und ist bereit für die HPLC-Analyse.

#### *Aufarbeitung von tierischen Lebensmitteln*

In eine 500-ml-Serumflasche werden 25,0 g tierisches Lebensmittel eingewogen, mit einer Mischung aus 190 ml dest. Wasser, 10 ml 1 n Salzsäure und 4 g Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) versetzt. Nach Zugabe von 100 ml Chloroform wird 10 Minuten gemixt. Die Serumflasche wird 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und die klare wässrige Lösung verworfen. Das Chloroform enthaltende Gel wird in einen 250-ml-Zentrifugenbecher übergeführt und 20 Minuten bei 10 000 U/min zentrifugiert. 50,0 ml der klaren Chloroformphase werden auf eine wie im vorgehenden Kapitel beschrieben hergestellte Säule aufgegeben und wie dort beschrieben weiter verarbeitet.

### *HPLC-Bedingungen*

Säule:	Spherisorb ODS 2, Korngrösse 5 $\mu\text{m}$ , 4,6 $\times$ 250 mm (Bischoff, Leonberg)
Vorsäule:	LiChrosorb RP-18 Kartusche, 4,6 $\times$ 30 mm (Kontron)
Mobile Phase:	45% Acetonitril, 55% Wasser/Essigsäure (41:2 v/v)
Fluss:	1 ml/min
Detektor:	Perkin-Elmer Spektralfluorimeter 650-10S (flow-cell); Anregungswellenlänge 330 nm, Emmissionswellenlänge 460 nm
Injektionsvol.:	10 Mikroliter bei Cerealienproben 20 Mikroliter bei tierischen Proben
Schreiber/ Integrator:	Integrator 3390 A, Hewlett Packard
Standard-Vergleichslösung:	0,1 ng Ochratoxin A (Sigma)/Mikroliter Methanol
Retentionszeit:	13 Minuten
Auswertung:	mit Hilfe der externen Standard-Vergleichslösung

### *Bestätigung positiver Befunde*

Zur Absicherung positiver Befunde wurde das Ochratoxin A in den Methyl-ester übergeführt und erneut der HPLC-Analyse unterworfen. Die Veresterung erfolgte exakt nach der von *Bauer* et al. (11) publizierten Methode. Dazu wurden 500 Mikroliter, die Hälfte des methanolischen Probenextraktes, mit 5 ml Chloroform und 10 ml Bortrifluorid-Methanol-Komplex (Merck Art. 801663) versetzt und 5 Minuten am Rückfluss im Wasserbad gekocht. Anschliessend wurde 30 ml dest. Wasser zugefügt und die Probe dreimal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformextrakte wurden vereinigt und zweimal mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde eingedampft, der Rückstand in 500 Mikroliter Methanol aufgenommen und der HPLC-Analyse unterworfen. Ochratoxin-A-Methylester hat unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen eine Retentionszeit von 32 Minuten.

## **Resultate und Diskussion**

Die Wiederfindung von Ochratoxin A aus den verschiedensten Matrices betrug immer mehr als 80%. Die Nachweisgrenze der Methode beträgt weniger als 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3mal Rauschen).

Abbildung 1 zeigt ein für Cerealienproben typisches Chromatogramm.

### *Pflanzliche Lebensmittel*

In Tabelle 1 sind die in pflanzlichen Lebensmitteln gefundenen Ochratoxin-A-Gehalte zusammengestellt.

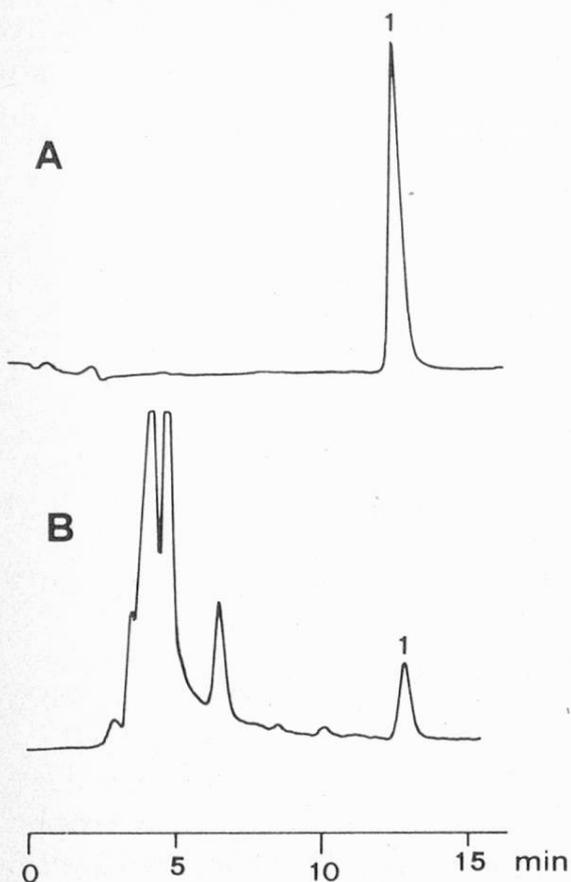


Abb. 1. HPLC, Bedingungen siehe Text  
 1 = Ochratoxin A  
 A Standard-Vergleichslösung, enthaltend 1,2 ng Ochratoxin A  
 B Hartweizenprobe mit einer Ochratoxin-A-Konzentration von 1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Den Daten aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass in Weizenruchmehl regelmässig Ochratoxin A nachgewiesen werden konnte, jedoch lediglich in äusserst geringen Konzentrationen. Auch in 3 von 5 Weizenkleieproben war Ochratoxin A eben nachweisbar. Dass dann Brot Ochratoxin A enthalten kann, ist nicht weiter überraschend, da Ochratoxin A als thermostabiles Mycotoxin bekannt ist (12). Geringfügig höhere Ochratoxin-A-Konzentrationen als im Weizenruchmehl wurden in Hartweizengriess festgestellt. Es war dann auch nicht weiter erstaunlich, dass in Teigwaren ebenfalls regelmässig Ochratoxin A im tiefen  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich angetroffen wurde.

Die punktuellen Untersuchungen weiterer Cerealienproben wie Haferflocken, Gerste, Mais und Reis ergaben ausschliesslich negative Ergebnisse.

Auch die stichprobenweise Untersuchung von Nüssen (13 Proben) zeigten lediglich negative Befunde.

Von 9 Feigenproben erwiesen sich 8 als nicht kontaminiert, wogegen eine Probe mit 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  total aus dem Rahmen fiel. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Angaben von Müller (13), der ebenfalls bei der Untersuchung von Feigen vereinzelt auf beachtliche Ochratoxin-A-Konzentrationen stiess.

### *Tierische Lebensmittel*

Tabelle 2 fasst die Resultate der Ochratoxin-A-Konzentrationen in tierischen Lebensmitteln zusammen.

Tabelle 1. Ochratoxin-A-Konzentration in pflanzlichen Lebensmitteln

Probe	Nr.	Ochratoxin-A-Konz. µg/kg
Weizenruchmehl	1	nn <sup>1</sup>
Weizenruchmehl	2	0,1
Weizenruchmehl	3	0,1
Weizenruchmehl	4	0,3
Weizenruchmehl	5	0,3
Weizenruchmehl	6	0,3
Weizenruchmehl	7	0,3
Weizenruchmehl	8	0,4
Weizenruchmehl	9	0,4
Weizenruchmehl	10	0,4
Weizenruchmehl	11	0,5
Weizenruchmehl	12	0,9
Weizenruchmehl	13	1,9
Weizenkleie	1	nn
Weizenkleie	2	nn
Weizenkleie	3	0,2
Weizenkleie	4	0,2
Weizenkleie	5	0,8
Brot	1	nn
Brot	2	0,2
Hartweizengriess	1	0,8
Hartweizengriess	2	1,5
Hartweizengriess	3	1,6
Hartweizengriess	4	2,7
Teigwaren	1	0,2
Teigwaren	2	0,3
Teigwaren	3	0,6
Teigwaren	4	1,0
Teigwaren	5	1,0
Teigwaren	6	1,2
Teigwaren	7	1,3
Teigwaren	8	1,5
Teigwaren	9	3,1
Teigwaren	10	3,5
Haferflocken	1-2	nn
Gerste	1-6	nn
Maisgriess	1-4	nn
Pop Corn	1-2	nn
Vollreis	1	nn
Erdnüsse	1-3	nn
Haselnüsse gemahlen	1-5	nn
Mandeln gemahlen	1-5	nn
Feigen	1-8	nn
Feigen	9	160
Datteln	1-2	nn

<sup>1</sup> nn = nicht nachweisbar, das heisst weniger als 0,1 µg/kg

Table 2. Ochratoxin-A-Konzentration in tierischen Lebensmitteln

Produkt	Nr.	Ochratoxin-A-Konz. $\mu\text{g}/\text{kg}$
Brühwürste	1–11	nn <sup>1</sup>
Brühwürste	12	0,8
Nieren	1–24	nn
Nieren	25–35	0,1–0,2
Nieren	36	0,3

<sup>1</sup> nn = nicht nachweisbar, das heisst kleiner als  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$

Lediglich in einer von zwölf Brühwürsten konnte Ochratoxin A mit  $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$  nachgewiesen werden. Über das Vorkommen von Ochratoxin A in Brühwürsten berichteten auch *Scheurer* und *Leistner* (14). Sie konnten zeigen, dass das Auftreten von Ochratoxin A in Brühwürsten durch die Verwendung von kontaminiertem Blutplasma bedingt ist.

Bei den Nieren war in einem Drittel der Proben Ochratoxin A eben nachweisbar. Die festgestellten Gehalte lagen im Durchschnitt eher tiefer als die von *Scheurer* und *Leistner* (15) bei einer Untersuchung in Deutschland gefundenen Ochratoxin-A-Konzentrationen.

#### Dank

Für die Beschaffung der Nieren möchten wir Herrn Dr. *G. Hunyady* herzlich danken.

Dank gebührt auch Frau *J. Schmid* für die gewissenhafte Durchführung der praktischen Arbeiten.

#### Zusammenfassung

Mit Hilfe einfacher Probenaufbereitungsverfahren und HPLC wurden pflanzliche und tierische Lebensmittel des Schweizer Marktes auf die Anwesenheit von Ochratoxin A untersucht. Praktisch in allen Weizenruchmehlen konnte das Toxin eben nachgewiesen werden (Nachweisgrenze  $< 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Hartweizengriess sowie Teigwaren enthielten im Durchschnitt ca. 3mal höhere Ochratoxin-A-Gehalte als Weichweizenruchmehl. In Feigen konnte punktuell eine beachtliche Ochratoxin-A-Konzentration von  $160 \mu\text{g}/\text{kg}$  beobachtet werden. Bei den tierischen Lebensmitteln (Brühwürste und Nieren) konnte in 27% der Proben Ochratoxin A nachgewiesen werden, jedoch lagen alle positiven Werte unter  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

#### Résumé

Pour la détermination de l'ochratoxine A (OA) dans les denrées alimentaires, une méthode rapide par HPLC, avec détection par fluorescence est décrite. Elle est basée sur une simple purification au moyen d'Extrelut<sup>®</sup>, en exploitant les propriétés acides de l'OA (taux

de récupération  $> 80\%$ , limite de détection  $\leq 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Pour confirmer les résultats, l'OA est convertie en son ester méthylique, qui est alors dosé quantitativement.

Cette méthode a été appliquée à l'analyse d'un total 121 échantillons de denrées alimentaires surtout prélevés chez le détaillant (céréales, noix, rognons de porc, saucisses, figues séchées et dattes). Les concentrations d'OA dans la plupart des farines bisées ( $n = 13$ ), proches de la limite de détection, étaient en moyenne de  $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  (entre  $< 0,1$  et  $1,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Dans les farines de blé dur ( $n = 14$ ), la concentration moyenne mesurée était env. 3 fois supérieure (entre  $0,2$  et  $3,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). La plus haute concentration d'OA ( $160 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) a été trouvée dans un échantillon de figues séchées, alors que dans les autres échantillons de figues ( $n = 8$ ), l'OA n'a pas été détectée. Seulement  $\frac{1}{3}$  environ des produits carnés analysés (rognons de porc ( $n = 36$ ), saucisses ( $n = 12$ )) contenaient de l'OA, les teneurs de tous les échantillons positifs étant inférieures à  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

### Summary

For the determination of ochratoxin A (OA) in foods a rapid HPLC method with fluorescence detection is described. It is based on a simple clean-up procedure with Extrelut<sup>®</sup> which profits of the acid properties of OA (recovery  $> 80\%$ , detection limit  $\leq 0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). For confirmation purposes OA is converted to the methyl ester and measured quantitatively as such.

The method has been applied to the analysis of a total of 121 food samples mainly taken at the retail level (cereals, nuts, kidneys, sausages, dried figs and dates).

Most of the brown flour samples ( $n = 13$ ) contained OA in amounts near the detection limit, on an average  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  (range  $< 0.1$ – $1.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). In products made from durum ( $n = 14$ ) the average concentration as measured was about 3 times higher (range  $0.2$ – $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). The highest measured OA concentration was found in one sample of dried figs ( $160 \mu\text{g}/\text{kg}$ ); in the rest of the fig samples ( $n = 8$ ) OA was not detectable. In only about  $\frac{1}{3}$  of the analyzed meat products (pig kidney,  $n = 36$ ; sausages,  $n = 12$ ) OA was detectable. The concentrations of all positive samples were below  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

### Literatur

1. WHO Environmental Health Criteria: 11, Mycotoxins, p. 86. WHO, Geneva 1979.
2. Szczech, G. M. and Hood, R. D.: Brain necrosis in mouse fetuses transplacentally exposed to the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**, 127–137 (1981).
3. Rösenthaler, R., Creppy, E.-E., Lorkowski, G. und Dirkheimer, G.: Ochratoxin A – Die Wirkungsweise eines Mycotoxins. *Forum Mikrobiol.* **4**, 262–270 (1981).
4. Bendele, A. M., Neal, S. B., Oberly, T. J., Thompson, C. Z., Bewsey, B. J., Hill, L. E., Rexroat, M. A., Carlton, W. W. and Probst, G. S.: Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food. Chem. Toxic.* **23**, 911–918 (1985).
5. Hesseltine, C. W.: Natural occurrence of mycotoxins in cereals. *Mycopath. Mycol. Appl.* **53**, 141–153 (1974).
6. Kiermeier, F.: Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**, 389–393 (1985).

7. Krogh, P.: Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. Nord. Vet.-Med. **29**, 402–405 (1977).
8. Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyltdgaard-Jensen, J., Larsen, A. E., Madsen, A., Mortensen, H. P., Moller, T., Petersen, O. K., Ravnskov, U., Rostgaard, M. and Aalund, O.: Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure induced by ochratoxin-A-contaminated feed. Acta path. microbiol. Scand. Sect. A, Suppl. No. 246, 1–21 (1974).
9. Krogh, P. and Elling, F.: Fungal toxins and endemic (Balkan) nephropathy. Lancet **2**, 40 (1976).
10. Krogh, P., Hald, B., Plestina, R. and Ceovic, S.: Balkan (endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: Preliminary results of a survey of foodstuffs. Acta path. microbiol. Scand. Sect. B. **85**, 238–240 (1977).
11. Bauer, J., Gareis, M. und Gedek, B.: Zum Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A bei Schlachtschweinen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **97**, 279–283 (1984).
12. El-Banna, A. A. and Scott, P. M.: Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs. III. Ochratoxin A during cooking of faba beans and polished wheat. J. Food Protection **47**, 189–192 (1984).
13. Mitteilung von Müller U., Kantonales Laboratorium Bern.
14. Scheuer, R. und Leistner, L.: Vorkommen von Ochratoxin A bei Schlachtschweinen und Fleischerzeugnissen. Mittbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach Nr. 88, 6436–6439 (1985).
15. Scheuer, R. and Leistner, L.: Occurrence of ochratoxin A in pork and pork products. Proceedings European Meeting Meat Research Workers No. 32, Vol. I, **4**, 191 (1986).
16. Büchmann, N. B. and Hald, B.: Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidneys. Food Add. Contam. **2**, 193–199 (1985).

Dr. U. Baumann  
 Dr. B. Zimmerli  
 Bundesamt für Gesundheitswesen  
 Abteilung Lebensmittelkontrolle  
 Sektion Lebensmittel- und Radiochemie  
 Postfach  
 CH-3000 Bern 14