

Untersuchungen über den Einfluß von Hydrogensulfitionen auf das Schimmelpilzgift Patulin

1. Versuche in wäßrigen Lösungen

Von R. Adam, W.-D. Koller

1. Einleitung

Das Mykotoxin Patulin kann von einer ganzen Reihe von Schimmelpilzen, hauptsächlich *Penicilium*- und *Aspergillus*arten, gebildet werden³⁾. Von zahlreichen Autoren wird berichtet, daß Patulin auf vielen einheimischen Obst- und Gemüsearten oder daraus hergestellten Produkten, auf verschiedenen Südfrüchten, unter bestimmten Bedingungen sogar auf Getreide gebildet werden kann^{3, 4, 8, 11)}. Wegen seiner Giftigkeit für Pflanze und Tier^{7, 14)}, erhebt sich die Frage, wie Patulin aus Lebensmitteln, z. B. Säften, auf einfache Weise beseitigt werden kann. Da die Beständigkeit dieses Mykotoxins auch bei höheren Temperaturen^{5, 11)} eine Zerstörung durch Erhitzen ausschließt, liegt die Suche nach geeigneten chemischen Umsetzungen nahe. Die Reaktionsbereitschaft von Patulin mit SH-Gruppen, wie sie in Cystein, Dimercaptopropanol, Glutathion und einigen anderen in Lebensmitteln vorkommenden chemischen Verbindungen enthalten sind, ist schon seit längerem bekannt^{1, 10)}. Als Reaktionspartner kommen wegen der Nucleophilie des vierwertigen Schwefels auch Sulfit- und Hydrogensulfitionen in Frage^{2, 7, 9)}. Untersuchungen über die Beständigkeit von Patulin gegenüber schwefliger Säure oder Hydrogensulfit wurden bisher nur mit verhältnismäßig hohen Schwefeldioxid- bzw. Patulinkonzentrationen durchgeführt^{2, 9)}. Für Untersuchungen in Wasser oder Säften sollten jedoch Patulinkonzentrationen im Bereich der WHO-Toleranz von 50 ppb nicht wesentlich überschritten werden, um praxisnahe Verhältnisse zu simulieren^{6, 13)}. Als Orientierungswerte für die Schwefeldioxid-Konzentrationen kommen die bei Wein zugelassenen Zusatzmengen von wenigen Hundert ppm in Frage (Fruchtsäfte dürfen in der Bundesrepublik Deutschland z. Z. nicht geschwefelt werden).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Klärung der Frage, wie Patulin durch Hydrogensulfitionen in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen beeinflusst wird. Zur Ausschaltung von Störsubstanzen, die die Reaktionen unübersichtlich gestalten könnten, wurden die Untersuchungen zunächst nur mit Wasser als Lösungsmittel durchgeführt (Untersuchungen über das Verhalten von Patulin in Apfelsaft sind im Gange).

2. Versuchsbeschreibung

Im einzelnen werden neutrales Wasser, Wasser von pH 3,5 und Natriumhydrogensulfit enthaltendes Wasser von pH 3,5 mit Patulin versetzt und dessen zeitliche Abnahme untersucht. Die für die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendete Standardlösung von Patulin in Essigsäureäthylester wurde ebenfalls in bestimmten Zeitabständen überprüft.

2.1 Chromatograph

Hochdruck-Flüssigkeitschromatograph der Firma Waters Associates Ltd., Filter: 254 nm; Trennsäule μ -Porasil (Firma Waters Associates Ltd.), Länge 300 mm, Innendurchmesser 3,9 mm, Teilchendurchmesser 10 μ m, Mindestbodenzahl 3000; Integrator Autolab System IV (Firma Spectra-Physics).

2.2 Reagenzien

Extraktionsmittel: Essigsäureäthylester p. a.
Fließmittel: Diisopropyläther und Tetrahydrofuran (95:5) mit 0,1% Eisessig.

Patulin-Standardlösung: 5,1 mg Patulin in 250 ml Essigsäureäthylester.

Patulin-Versuchslösung Nr. 1: 204 μ g Patulin in 2000 ml frisch bidestilliertem Wasser.

Patulin-Versuchslösung Nr. 2: 204 μ g Patulin in 2000 ml frisch bidestilliertem Wasser, mit 0,1 N Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt.

Patulin-Versuchslösung Nr. 3: 204 μ g Patulin und 593,5 mg Natriumdisulfit (200 ppm SO₂) in 2000 ml frisch bidestilliertem Wasser, mit 0,1 N Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt.

Bei allen Versuchslösungen wurde der Kopfraum der Vorratsflaschen mit Stickstoff gespült.

2.3 Versuchsdurchführung

Um die Wiederfindungsrate für Patulin zu überprüfen, wurde zunächst die von *Tanner* und *Zanier*¹²⁾ angegebene Bestimmungsmethode, bei der Patulin mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt wird, nachvollzogen. Die Autoren fanden mit Hilfe der HPLC z. B. bei einem Apfelsaft mit 0,1 mg Patulin/1000 ml 90% Patulin wieder. Deshalb wurde eine wäßrige Lösung mit einer Patulin-Konzentration von 0,1 mg/1000 ml und einem — mit 0,1 N Salzsäure eingestellten — pH-Wert von 3,5 verwendet.

Die nach¹²⁾ erreichten Wiederfindungsraten lagen bei 30%. Daraufhin wurde die dort angegebene Methode wie im folgenden beschrieben etwas abgeändert:

Jeweils 50 ml der Patulinlösung wurden in Mischzylinder (100 ml Inhalt) pipettiert und in 4 Anteilen mit 30, 20, 20 und 15 ml Essigsäureäthylester je 4 min lang geschüttelt. Die überstehenden Extrakte wurden mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und in Rundkölbchen (100 ml Inhalt) am Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Essigsäureäthylester aufgelöst; hiervon wurden 10 μ l in den Chromatographen eingespritzt (Fließgeschwindigkeit 2 ml/min; Verstärkung 0,05; Säulendruck 3000 psi; Retentionszeit bei 300 sec).

Mit diesem Verfahren wurden 95 bis 100% Patulin wiedergefunden. Durch Erhöhung des eingesetzten Volumens der zu untersuchenden Patulinlösung, durch Auflösen des Rückstandes in nur 0,5 ml Essigsäureäthylester sowie durch Erhöhung der am Chromatographen eingespritzten Lösungsmenge konnte die Bestimmungsgrenze auf unter 1 ppb gesenkt werden.

Mit dieser Methode wurden die Patulinbestimmungen im Laufe der Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit von Patulin durch Hydrogensulfit durchgeführt. In den bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrten Versuchslösungen (siehe Abschnitt 2.2) wurde der Patulingehalt am Tage der Herstellung der Lösungen sowie in entsprechenden Zeitabständen bestimmt. (Bei der Lösung Nr. 3 wurde vor dem Ausschütten mit 0,1 N Natronlauge neutralisiert, um zu verhindern, daß freie schweflige Säure aus dem in wäßriger Lösung vorliegenden Gleichgewicht in den Essigsäureäthylester-Extrakt übergehen und dabei mit bereits extrahiertem Patulin reagieren konnte.)

3. Versuchsergebnisse und Diskussion

In allen 3 Lösungen verringerte sich der Patulingehalt im Laufe der Lagerung.

In der neutralen wäßrigen Lösung (Versuchslösung Nr. 1) betrug die Abnahme innerhalb von 150 Tagen

um 50 % (Abb. 1). Der Patulingehalt in der Versuchslösung Nr. 2 verringerte sich in der gleichen Zeitspanne um etwas weniger als 40 % (Abb. 1). Offensichtlich ist Patulin auch bereits in verdünnten wäßrigen Lösungen nicht beständig, wobei die Abnahme im leicht sauren Bereich (pH 3,5) etwas langsamer vor sich geht als im neutralen. Allerdings nimmt die Patulinkonzentration sehr langsam ab: Eine Extrapolation der Kurven in Abb. 1 deutet auf eine Abnahme bis unterhalb 10 % erst innerhalb ein bis zwei Jahren hin.

In der für die HPLC verwendeten Standardlösung von Patulin in Essigsäureäthylester wurde während der gesamten Versuchsdauer keine Abnahme der Patulinkonzentration beobachtet.

Zusammenfassung

Die Abnahme des Patulingehalts in neutralem Wasser, in saurer Lösung sowie in hydrogensulfithaltiger angesäuerter Lösung im Verlauf der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde untersucht. Die Patulinbestimmungen erfolgten mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. Bei einem Einsatz von rund 100 ppb Patulin

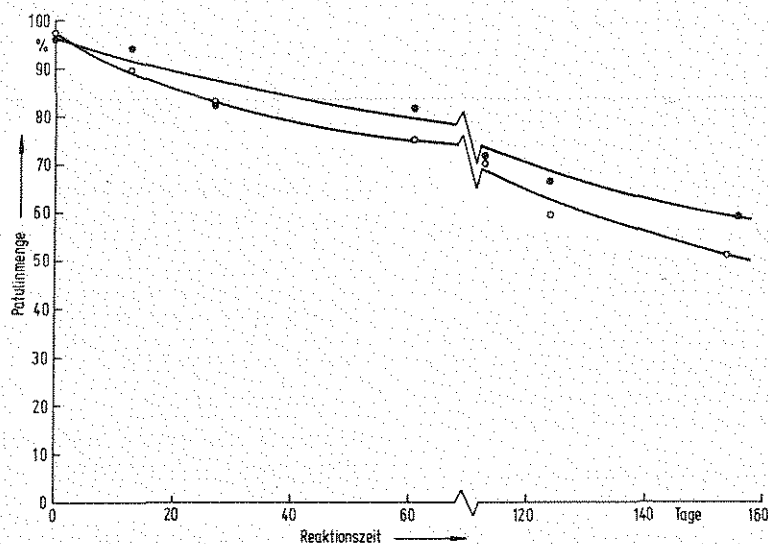


Abb. 1. Zeitliche Abnahme des Patulingehalts in angesäuerter wäßriger Lösung (obere Kurve) und in neutralem Wasser (untere Kurve).

Der Zusatz von 200 ppm SO_2 (als $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) zu der auf pH 3,5 eingestellten Versuchslösung Nr. 3 bewirkte schon am Tage der Herstellung eine Patulinabnahme von mehr als 10 % (Abb. 2). Nach 5 Tagen Lagerzeit lag die Patulinkonzentration bei 50 %, nach 50 Tagen unter 1 %. Bei der Wiederholung des Versuchs wurde praktisch die gleiche Abklingkurve der Patulinkonzentration erhalten.

Die Standardabweichungen der Meßwerte lagen zwischen 0,1 und 1,8 %.

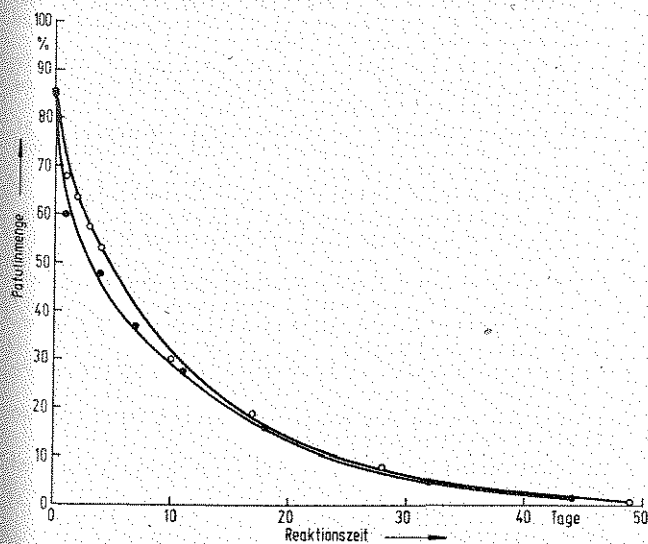


Abb. 2. Zeitliche Abnahme des Patulingehalts in angesäuerter wäßriger Hydrogensulfid-Lösung (Doppelversuch).

konnte eine Wiederfindungsrate von 95 bis 100 % erreicht werden. In der angesäuerten Lösung verringerte sich der Patulingehalt verhältnismäßig langsam, in neutralem Wasser etwas schneller. Relativ rasch verlief die Abnahme in Hydrogensulfid-Lösung: Nach 50 Tagen war nur noch unter 1 % des eingesetzten Patulins zu finden. Die Bestimmungsgrenze für Patulin lag unter 1 ppb.

Summary

Investigated was the decrease of the patulin content in neutral water, in acid solution and in acid solution containing bisulfite, all kept at room temperature. The patulin was determined by means of high pressure liquid chromatography. When using about 100 ppb patulin, recoveries were as high as 95—100 %. The patulin content was found to decrease relatively slowly in the acid solution and somewhat more rapidly in neutral water. In bisulfite solution, the decrease was relatively rapid: after 50 days, only less than 1 % of the patulin could still be recovered. The limit of determination for patulin was below 1 ppb.

Résumé

On a recherché la diminution de la teneur en patuline dans de l'eau neutre, dans une solution acide ainsi que dans une solution acidifiée contenant du bisulfite, pendant la conservation à la température ambiante. Les dosages de patuline ont été réalisés à l'aide de la chromatographie en phase liquide à haute pression. Pour une charge d'environ 100 ppb de patuline, on a pu obtenir un taux de récupération de 95 à 100 %. Dans la solution acidifiée, la teneur en patuline se réduisit relativement lentement, dans l'eau neutre un peu plus vite. La diminution a été relativement rapide dans la solution du bisulfite: au bout de 50 jours, il ne restait plus que moins de 1 % de la patuline introduite. La limite de dosage de la patuline se situait au-dessous de 1 ppb.

Herrn Prof. Dr. H. K. Frank, Institut für Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, sei an dieser Stelle für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für die Überlassung einer Patulinprobe sowie zahlreicher Literatur gedankt.

LITERATUR

- 1) Atkinson, N., N. F. Stanley: Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci. 21 (1943) S. 249—53 u. 255—57.
- 2) Burroughs, L. F.: J. Assoc. Off. Analyt. Chemist 60 (1977) 1, S. 100—03.
- 3) Frank, H. K., R. Orth, R. Hermann: Z. Lebensm. Unters./Forsch. 162 (1976) S. 149—57.
- 4) Frank, H. K., R. Orth, A. Figge: Z. Lebensm. Unters./Forsch. 162 (1977) S. 111—14.

- 5) Heatley, N. G., F. J. Philot: J. Gen. Microbiol. 1 (1947) S. 232—37.
- 6) Josefsson, E., A. Andersson: Var föda 8 (1976) S. 189—96.
- 7) Osswald, H., H. K. Frank, D. Komitowski, H. Winter: Fd. Cosmet. Toxicol. 16 (1978) S. 243—47.
- 8) Pohland, A. E., R. Allen: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists 53 (1970) 4, S. 686—87.
- 9) Pohland, A. E., R. Allen: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists 53 (1970) 4, S. 688—91.
- 10) Rondanelli, E. G., P. Gorini, E. Stroselli, D. Picorari: Haematologia (Pavia) 42 (1975) S. 1427—40.
- 11) Scott, P. M., E. Somers: Agric. Fd. Chem. 16 (1968) 3, S. 483—85.
- 12) Tanner, H., C. Zanier: Schweiz. Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau 112 (1976) 26, S. 656—62.
- 13) Ware G. M., C. W. Thorpe A. E. Pohland: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists 57 (1974) 5, S. 1111—13.
- 14) Ware, G. M.: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists 58 (1975) 4, S. 754—56.

GESETZE, VERORDNUNGEN, BEHÖRDLICHE VERLAUTBARUNGEN

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Ausnahmegenehmigung nach § 37 Abs. 2 Nr. 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes. Bezug: Bek. d. BMJFG vom 5. 5. 1970 (GMBl. S. 296). Bek. d. BMJFG vom 4. April 1979 (GMBl. S. 123).

Die Geltungsdauer der gemäß Bekanntmachung vom 5. Mai 1970 (GMBl. S. 296 *) zugelassenen Ausnahme ist nach § 37 Abs. 5 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes vom 15. August 1974 (BGBl. I S. 1946) im Einvernehmen mit den Bundesministern des Innern und der Verteidigung bis zum 5. Mai 1981 verlängert worden.

*) Vgl. DLR 66 (1970) S. 302 (Wasserentkeimungstabletten).

Ausnahmegenehmigung nach § 37 LMBG für die Verwendung von Strontiumchlorid in kosmetischen Mitteln. Bek. d. BMJFG vom 9. April 1979 (GMBl. S. 123).

Der Firma Block Drug Company Inc., Ratingen, ist nachstehende Ausnahmegenehmigung erteilt worden:

Aufgrund des § 37 Abs. 1 und 2 Nr. 1 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) vom 15. August 1974 (BGBl. I S. 1945, 1946) lasse ich im Einvernehmen mit den Bundesministern für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten und für Wirtschaft zur Erprobung unter amtlicher Beobachtung abweichend von § 26 Abs. 2 LMBG in Verbindung mit § 1 und Anlage 1 Teil B Nr. 3 der Kosmetik-Verordnung vom 16. Dezember 1977 (BGBl. I S. 2589) in Verbindung mit § 47 Abs. 1 LMBG ausnahmsweise zu, daß die von der Firma Stafford Miller Continental S. A. in Belgien unter Verwendung von Sfrontiumchlorid bis zu einer Höchstkonzentration von 3 %, bezogen auf Strontium, hergestellte Zahnpaste mit der Bezeichnung „Sensodyne“ von Ihnen in die Bundesrepublik Deutschland eingeführt und in den Verkehr gebracht werden darf. Die Einfuhr muß über die Zolldienststelle Aachen erfolgen.

Die amtliche Beobachtung obliegt dem Chemischen und Lebensmitteluntersuchungsamt des Kreises Mettmann. Alle mit der amtlichen Beobachtung im Zusammenhang stehenden Kosten sind von Ihnen zu tragen.

Die Ausnahmegenehmigung wird für die Zeit bis zum 31. Dezember 1979 erteilt; sie kann jederzeit aus wichtigem Grunde vor Ablauf dieser Frist widerrufen werden.

Bekanntmachung des BMJFG einer Veröffentlichung der Weltgesundheitsorganisation über eine Liste 41 von vorgeschlagenen internationalen gesetzlich nicht geschützten Bezeichnungen (Proposed International Nonproprietary Names) für Substanzen, die für pharmazeutische Zwecke verwendet werden, mit einer Berichtigung früherer Listen. Vom 11. April 1979 (BAnz. Nr. 95 vom 22. 5. 1979, S. 4).

Ausnahmegenehmigung nach § 37 LMBG für die Mitverwendung von Cysteinhydrochlorid in Backmitteln für Weizenbäck. Bek. d. BMJFG vom 8. Mai 1979 (GMBl. S. 130).

Die der Firma Ulmer Spatz, Ulm/Donau, erteilte Ausnahmegenehmigung (s. GMBl. 1976 S. 686) *) ist bis 31. Oktober 1980 verlängert worden.

*) Vgl. DLR 73 (1977) S. 85.

Ausnahmegenehmigung nach § 37 LMBG für die Mitverwendung von L-Cysteinchloridmonohydrat in Backmitteln. Bek. d. BMJFG vom 15. Mai 1979 (GMBl. S. 130).

Die der Firma Gebr. Jung GmbH & Co. KG, Frankfurt/Main, erteilte Ausnahmegenehmigung (s. GMBl. 1977 S. 293) *) ist um weitere 2 Jahre, d. h. bis 15. Mai 1981 verlängert worden.

*) Vgl. DLR 73 (1977) S. 296.

BADEN-WÜRTTEMBERG

Fundstellen der Rechts- und Verwaltungsvorschriften des Landes Baden-Württemberg nach dem Stand vom 31. Dezember 1978.

Das Fundstellenverzeichnis kann von der Versandstelle des Gemeinsamen Amtsblatts, Postfach 85 (Augustenstraße 13), 7000 Stuttgart 1, Fernruf (07 11) 66 76 - 27 27, zum Preis von 10 DM + 2 DM Versandkosten (Vorauszahlung auf Postscheckkonto Nr. 96 66 - 708 beim Postscheckamt Stuttgart) bezogen werden.

HESSEN

Vorzugsmilch. Erl. d. HMLULF vom 7. Mai 1979 (StAnz. S. 1194).

I. Bei der Gewinnung und dem Inverkehrbringen von Vorzugsmilch finden folgende Rechtsvorschriften Anwendung:

1. Lebensmittelrechtliche Vorschriften:

- a) Milchgesetz vom 31. Juli 1930 (RGBl. I S. 421), zuletzt geändert durch Gesetz vom 2. März 1974 (BGBl. I S. 469, 601)
- b) Erste Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. Mai 1931 (RGBl. I S. 150), zuletzt geändert durch Verordnung vom 18. April 1975 (BGBl. I S. 967)
- c) Verordnung zur Durchführung des Milchgesetzes vom 16. Dezember 1931 (PRGs S. 259), zuletzt geändert durch Verordnung vom 16. Dezember 1974 (GVBl. I S. 672)
- d) Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz vom 15. August 1974 (BGBl. I S. 1946), zuletzt geändert durch Gesetz vom 24. August 1974 (BGBl. I S. 2445)
- e) Höchstmengenverordnung tierische Lebensmittel vom 15. November 1973 (BGBl. I S. 1710), geändert durch Verordnung vom 29. August 1978 (BGBl. I S. 1525)
- f) Hygiene-Verordnung für Milch-ab-Hof-Abgabe vom 24. Mai 1973 (BGBl. I S. 477), geändert durch Verordnung vom 16. Mai 1975 (BGBl. I S. 1281)

2. Viehseuchenrechtliche Vorschriften, hier insbesondere:

- a) Tuberkulose-Verordnung vom 16. Juni 1972 (BGBl. I S. 915), geändert durch Verordnung vom 27. Februar 1978 (BGBl. I S. 375)
- b) Brucellose-Verordnung vom 26. Juni 1972 (BGBl. I S. 1046)
- c) Leukose-Verordnung-Rinder vom 10. August 1976 (BGBl. I S. 2100), zuletzt geändert durch Verordnung vom 24. November 1978 (BGBl. I S. 1825)
- d) Rinder-Salmonellose-Verordnung vom 6. Januar 1972 (BGBl. I S. 7)

II. Zur Durchführung der vorgenannten Rechtsvorschriften ergehen folgende Verwaltungsanweisungen:

1. Milchtierbestände, in denen Vorzugsmilch gewonnen werden soll, müssen
 - a) amtlich als tuberkulosefrei und brucellosefrei anerkannt
 - b) leukoseunverdächtig und
 - c) frei von übertragbaren Krankheiten wie Salmonellose u. a. m. sein.