1 Einleitung

Schimmelpilzgifte, wissenschaftlich als Mykotoxine bezeichnet, begleiten den Menschen seit jeher. Mykotoxine finden sich in erster Linie in der Nahrung und in Wohnräumen, jedoch auch in Böden und anderen Örtlichkeiten. Trotz des jahrtausendelangen Kontakts der Menschen mit Schimmelpilzgiften sind die Mykotoxine erst in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Wissenschaft gelangt. Inzwischen hat man viele Mykotoxine und ihre Bildner identifiziert, und auch viele negative gesundheitliche Auswirkungen dieser Gifte sind bekannt. Mykotoxine entfalten ihre toxischen Wirkungen einerseits akut, von Erbrechen bis Leberzirrhose. Viel gefährlicher sind andererseits jedoch die chronischen Effekte von Mykotoxinen, sie können beispielsweise hochgradig krebserregend sein oder den Hormonhaushalt beeinflussen.

Mit dem beständig wachsenden Wissen über Bildung, Vorkommen und Toxikologie von Mykotoxinen wächst auch das Interesse der Analytiker und des Gesetzgebers an diesen Substanzen. Die beiden Seiten hängen voneinander ab, da der Festsetzung eines neuen Höchstgehalts durch den Gesetzgeber die Entwicklung einer entsprechend empfindlichen und zuverlässigen Analysemethode durch die Wissenschaft vorausgehen muss. Gerade in den letzten Jahren sind von der Europäischen Union und dem deutschen Gesetzgeber diverse neue Höchstmengen für Mykotoxine in Lebensmitteln festgesetzt worden.

Als Folge der wachsenden Anzahl festgeschriebener Grenzwerte werden Analysen in erheblicher Größenordnung sowohl seitens der Lebensmittelüberwachung als auch seitens der Lebensmittelindustrie benötigt. Für letztere kann in Zeiten der Globalisierung und der Just-in-time-Logistik die Zeit, die eine Mykotoxin-Analyse erfordert, zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und damit unter Umständen zu einem großen Kostenfaktor werden, der weit über den vom Labor berechneten Preis hinausgeht. Neben der Schnelligkeit spielen natürlich auch die Kosten selbst sowie die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des Ergebnisses eine entscheidende Rolle.

An dieser Stelle knüpft die vorliegende Dissertation an. Sie beschäftigt sich mit der Entwicklung von Analysemethoden für die beispielhaft ausgewählten Mykotoxine Aflatoxine und Patulin. Beide spielen eine besondere Rolle unter den Mykotoxinen: Die Gruppe der Aflatoxine ist nicht nur der giftigste Vertreter der Mykotoxine, sie ist zugleich das am weitesten verbreitete Schimmelpilzgift. Patulin hingegen findet sich bevorzugt in Früchten, einer Matrix, die sonst eher unanfällig für Mykotoxine ist. Das Molekül ist darüber hinaus relativ klein und unspezifisch, d.h. seine Molekülstruktur bietet wenig Ansätze (funktionelle Gruppen, dreidimensionale Strukturen) für eine selektive Analytik, beispielsweise für die in der Mykotoxin-Analytik eingesetzten Immunoaffinitätssäulen.
Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Methoden zur Mykotoxin-Analytik unter Verwendung der online-Kopplung von Festphasenextraktion mit Flüssigchromatographie. Diese als online-SPE-LC bezeichnete Technik verfügt über eine Reihe von Vorteilen, insbesondere durch die Automatisierung der Probenvorbereitung. Online-SPE-LC-Methoden sind im Allgemeinen schneller, kostengünstiger und genauer als die manuell durchgeführten Varianten. Die Übertragung dieser Vorteile auf die Mykotoxin-Analytik und ihre Anwendung in der Laborroutine standen im Zentrum der durchgeführten Entwicklungsarbeiten.

1.1 Guter Schimmel – böser Schimmel

Jedem ist das schon einmal passiert – weißer oder grüner Flaum überzieht das Brot, das man gestern noch mit Genuss gegessen hat. Das Brot ist verschimmelt, und man erinnert sich an „Omas Legenden“ über Schimmel und seine Giftigkeit.

Mit dem umgangssprachlichen Begriff „Schimmel“ sind dabei Mikropilze gemeint, die sich z.B. in Lebensmitteln entwickeln und zu deren Verderb führen. Nach wissenschaftlicher Definition zeichnen sich Schimmelpilze durch die in Tab. 1-1 zusammengefassten Eigenschaften aus.

Tab. 1-1. Definition Schimmelpilze (nach WEIDENBÖRNER, 2000, S. 127)

Definition Schimmelpilze
ruderale Lebensstrategie
filamentöse Wuchsform
hohe Wachstumsgeschwindigkeit
hohe Sporulationsfähigkeit
überwiegend vegetative Vermehrung
parasexueller Zyklus
Empfindlichkeit gegenüber Bodenfungistasis
ubiquitäres Vorkommen
universelle geographische Verbreitung
ausgeprägte **Metabolit**bildung (→ Mykotoxine)

Schimmelpilze begleiten den Menschen seit jeher, teils zu seinem Nutzen, teils zu seinem Schaden. „Guter Schimmel“ veredelt Lebensmittel und ermöglicht erst den Genuss von Camembert oder bestimmten Salami-Sorten. „Böser Schimmel“ hingegen führt zu Lebensmittelverderb (spontan verschimmelte Lebensmittel) und kann gesundheitsschädlich sein, sei es durch Auftreten in feuchten Räumen oder durch Bildung toxischer Stoffe in Lebensmitteln.

Letztere sind die sogenannten Mykotoxine, abgeleitet von den Begriffen Myko = Pilz (griechisch) und Toxin = Gift (griechisch-neulateinisch) (DUDEN FREMDWÖRTERBUCH, 1990). Bei diesen Schimmelpilzgiften handelt es sich um Sekundärmetabolite (vergl. Tab. 1-1), die nicht der Aufrechterhaltung der primären Lebensfunktionen der Pilze dienen (TRUCKSESS et al., 2001, S. 4). Vielmehr haben diese Substanzen den Zweck, konkurrierende Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien zu schädigen, um sich selbst besser entwickeln zu können.

Wie BENNETT et al. (2003) darlegen, ist der Begriff „Mykotoxin“ allerdings erst 1962 als Folge der von Aflatoxinen verursachten Turkey X-Krankheit geprägt worden, davor waren die entsprechenden toxischen Substanzen wie Ergotalkaloide (Mutterkorn) als Pilzgifte („fungal toxins“) bezeichnet worden.

Das Interesse des Menschen an diesen Mykotoxinen, dokumentiert durch die Anzahl von einschlägigen Internet-Seiten (Tab. 1-2), beruht dabei auf ihrer unangenehmen Eigenschaft, nicht nur toxisch für Mikroorganismen zu sein, sondern auch Menschen, Tieren und Pflanzen erheblichen Schaden zufügen zu können, vergl. 1.2.

Aus diesem Grund interessieren sich Wissenschaftler einerseits für die Bedingungen, unter denen Mykotoxine gebildet werden, andererseits ist die Neu- und Weiterentwicklung von Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen ein großes Forschungsgebiet.

Tab. 1-2. Treffer für Schimmelpilz-bezogene Begriffe auf der Internet-Suchmaschine Google
(www.google.de, Stand: 02.04.06)

Begriff	Treffer
Mykotoxin	44.200
Mycotoxin	586.000
Schimmel[1]	5.920.000
Mould[2]	12.200.000
Mold[3]	57.900.000
Schimmelpilz	625.000
Schimmelpilzgift	13.600
Aflatoxin	1.440.000
Patulin	141.000

[1] Anm.: hierunter fallen auch Treffer für Klaviere und Pferde
[2] Britisches Englisch: Schimmel
[3] Amerikanisches Englisch: Schimmel

1.2 Eine kurze Geschichte der Mykotoxine

Wie in 1.1 dargestellt, begleiten Mykotoxine die Menschheit seit jeher. Auch die potentielle Giftigkeit von Schimmel gehört schon lange zum Wissen der Menschen (KRÄMER, 1997).
Am längsten bekannt ist dabei die Gefährlichkeit des **Mutterkorns**, der Dauerform des Pilzes *Claviceps purpurea*, der vor allem Roggen befällt. Mutterkorn enthält 0,25 bis 1 % Mutterkorn-Alkaloide, die die Krankheit „Ergotismus“ auslösen. Ergotismus äußert sich in Nervenschäden und absterbenden Gliedmaßen und war im Mittelalter als „St. Antonius-Feuer“ oder „Brennend schmerzhaftes Höllenfeuer“ bekannt. Die Zuordnung der Erkrankung zum Mutterkorn gelang im 18. Jahrhundert (WEIDENBÖRNER, 2000, 2001; KRÄMER, 1997; TASCHAN, 2005).

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde in der damaligen UdSSR mit der **Alimentären toxischen Aleukie** (ATA) eine weitere von Mykotoxinen verursachte Krankheit beschrieben. Sie trat vermutlich zuerst im Jahre 1891 auf und forderte bis in die Jahre nach dem Zweiten Weltkrieg mehrere Hunderttausend Menschenleben. Die Krankheit äußert sich in einer Verringerung der Leukozytenzahl, einer Schädigung des Knochenmarks sowie Hautnekrosen. Verursacht wurde die Krankheit damals durch den Verzehr von auf dem Feld überwintertem Getreide, das mit Schimmel der Gattung Fusarien befallen war. Die Fusarien bildeten eine Reihe von Mykotoxinen der Gruppe der Trichothecene wie T-2 Toxin, Nivalenol, HT-2 Toxin etc. (WEIDENBÖRNER, 2000, 2001).

In den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde erstmals eine Erkrankung namens **Balkan endemic nephropathy** (BEN; Balkan endemische Nephropathie) beschrieben, die in der bulgarischen Provinz Vratza auftrat. BEN äußert sich in Nierenschäden, einhergehend mit einer stark erhöhten Nierentumorrate. Eine genaue Ursache konnte damals nicht ermittelt werden, jedoch scheinen Schimmelpilze (*Aspergillus, Penicillium* und andere*)* und die von ihnen produzierten Mykotoxine, insbesondere Ochratoxin A (OTA), die Verursacher der Krankheit zu sein (WEIDENBÖRNER, 2001).

Kurz nach BEN trat eine sehr giftige Substanzklasse ins Interesse der Öffentlichkeit – die **Aflatoxine**. Im Jahre 1960 starben in Großbritannien rund 100.000 Truthähne an der sogenannten „Turkey X“-Krankheit. Als Verursacher wurde das Futter ermittelt: brasilianisches Erdnussmehl. Man erkannte, dass die Schimmelpilze der Art *Aspergillus* für das Sterben verantwortlich waren, genauer gesagt die von ihnen produzierten Substanzen, denen man den Namen „Aflatoxine“ gab, abgeleitet vom Namen des verursachenden Pilzes ***A**spergillus **fla**vus* und dem Wort **Toxin**, dem Fachbegriff für Gift (WEIDENBÖNER, 2001, S. 245, 4ff).

Dieser Vorfall zog auch die Bildung des Begriffs „Mykotoxin“ im Jahre 1962 nach sich, der den fast synonymen Begriff „Pilzgift“ für die unter 1.1 beschriebene Gruppe von Substanzen ablöste. Unter diesem Begriff fasste man nun alle niedermolekularen Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen zusammen, zur genauen Definition siehe 1.1. Neben den Aflatoxinen wurden beispielweise auch das zuerst als Antibiotikum eingestufte Patulin und die lange bekannten Mutterkornalkaloide jetzt als „Mykotoxine“ klassifiziert, in Abgrenzung zu den Pilzgiften, die von Ständerpilzen und anderen giftigen Makropilzen gebildet werden, beispielweise vom Fliegenpilz oder vom Knollenblätterpilz (BENNETT et al., 2003).

Eine weitere Folge des Ausbruchs der tödlichen Aflatoxikose im Jahre 1960 war das explosionsartig steigende Interesse an Mykotoxinen, so dass der Zeitraum zwischen 1960 und 1975 auch als „Mykotoxin-Goldrausch“ bezeichnet wird (MAGGON et al., 1977). Die hohe Anzahl an Wissenschaftlern, die sich „im Goldrausch“ mit der finanziell gut ausgestatteten Mykotoxin-Forschung beschäftigten, kann heute noch an der relativ großen Zahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu diesem Thema im o.g. Zeitraum abgelesen werden.

Eine „Karriere“ vom Antibiotikum zum Mykotoxin erlebte das **Patulin**: Im Jahre 1943 wurde die Substanz als Antibiotikum beispielsweise gegen Erkältung in klinischen Versuchen (PATULIN CLINICAL TRIALS COMMITTEE, 1943) erprobt. Jedoch wurde in den Versuchen offensichtlich, dass Patulin toxische Nebenwirkungen hervorrief, so dass die Substanz in den 60er Jahren unter dem neu definierten Begriff „Mykotoxin“ re-klassifiziert wurde (BENNETT et al., 2003), vergl. 1.4.1.

Das aktuelle Wissen über Mykotoxine ist sehr umfangreich und umfasst viele wissenschaftliche Fachbereiche, von der Toxikologie über biochemische Bildungswege bis hin zu einer Vielzahl an Analysemethoden. Der Forschung sind heute rund 400 Mykotoxine bekannt, die von etwa 350 verschiedenen Schimmelpilz-Spezies gebildet werden (WEIDENBÖRNER, 2001, S. 172). Dabei sind die Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* und *Alternaria* die bedeutendsten.
Tab. 1-3 zeigt die sieben wichtigsten in Lebensmitteln auftretenden Mykotoxine bzw. Mykotoxingruppen und die Haupt-Risikolebensmittel; ihre Eigenschaften sind in Tab. 1-4 zusammengestellt (mit Ausnahme von Patulin und Aflatoxin). Die Eigenschaften dieser Mykotoxine, mit denen sich diese Doktorarbeit befasst, sind unter den jeweiligen Unterkapiteln (Aflatoxine: 1.3.2, Tab. 1-6; Patulin: 1.4.2, Tab. 1-12) zu finden.

Tab. 1-3. Die sieben wichtigsten in Lebensmitteln auftretenden Mykotoxine

Mykotoxin(gruppe)	**Wichtigste Risiko-Lebensmittel**[1]
Aflatoxine	Nüsse und Samen (Erdnüsse, Mandeln, Pistazien etc.), Gewürze (Paprika, Pfeffer usw.), Mais und Maisprodukte; Milch und Milchprodukte
Citrinin	Reis und andere Getreidearten
Fumonisine	Mais und Maisprodukte
Ochratoxin A	Getreide und Getreideprodukte, Wein, Trauben, Kakao, Kaffee
Patulin	Früchte und Fruchtprodukte, in erster Linie Äpfel und Apfelprodukte, auch Pfirsiche, Birnen etc.
Trichothecene (DON, T-2 Toxin etc.)	Getreide und Getreideprodukte
Zearalenon	Getreide und Getreideprodukte, v.a. Mais

[1] nach WEIDENBÖRNER (2001), JELINEK et al. (1989), EU-KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTS-VERORDNUNG 466/2001, MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG (MHmV)

Die unter dem Begriff Mykotoxine zusammengefassten Substanzen sind dabei chemisch sehr heterogen, so dass analytische Methoden den spezifischen chemisch-physikalischen Eigenschaften sowohl des jeweiligen Mykotoxins als auch der entsprechenden Matrix angepasst werden müssen.

Die im Rahmen der Forschung erkannte Gefährlichkeit von Mykotoxinen für Menschen und Tiere in Verbindung mit der Entwicklung immer empfindlicherer und genauerer Analysemethoden führte weltweit zur Festsetzung von Grenzwerten. Die Europäische Union (EU) hat in der Kontaminanten-Höchstgehaltsverordnung 466/2001 Grenzwerte für Aflatoxine, Deoxynivalenol (DON), Ochratoxin A (OTA), Zearalenon und Patulin festgelegt; Höchstgehalte für Fumonisine sowie für T-2 und HT-2 Toxin sind in Vorbereitung. Diese Höchstgehalte werden im deutschen Recht um Grenzwerte in der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung (MHmV) und der Diätverordung ergänzt. Für Aflatoxine und Patulin wird in den jeweiligen Kapiteln (1.3.6 und 1.4.6) auf die rechtliche Situation detaillierter eingegangen. Einen Überblick über die zum Zeitpunkt der Dissertation in Deutschland geltenden Höchstgehalte für die übrigen Mykotoxine gibt Tab. 1-5.

Tab. 1-4. Steckbriefe der wichtigsten Mykotoxine (s. auch Tab. 1-3; Aflatoxine: Tab. 1-6; Patulin: Tab. 1-12) (nach WEIDENBÖRNER, 2001; MERCK, 2006)

Mykotoxin	Chem. Struktur	Summen-formel	Mol-gewicht	Wichtigste Produzenten	Toxizität	LD_{50} (oral)	Anmer-kungen
Ochratoxin A (OTA)		$C_{20}H_{18}O_6NCl$	402 g/mol	*A. ochraceus, A. alutaceus, P. verrucosum*	Stark nieren-schädigend, cancerogen, mutagen, teratogen	20-22 mg/kg Körperge-wicht (Ratte)	tritt auch in gemäßigten Breiten häufiger auf
Deoxy-nivalenol (DON)		$C_{15}H_{20}O_6$	296 g/mol	Fusarien-Spezies: *F. culmorum, F. graminearum*	Erbrechen, Gewichtsverlust, Hämorrhagien, immuno-suppressiv	46 mg/kg Körperge-wicht (Maus)	Synonym: Vomitoxin
Zearalenon		$C_{18}H_{22}O_5$	318 g/mol	div. Fusarien: *F. graminearum, F. culmorum*	Hormonähnliche Wirkungen: Veränderungen an Uterus, Vagina; Unfruchtbarkeit	> 4000 mg/kg* Körpergewicht (Ratte)	*keine akute Toxizität
T-2 Toxin (s. Abb.) HT-2 Toxin		$C_{24}H_{34}O_9$ (T-2) $C_{22}H_{23}O_8$ (HT-2)	466 (T-2), 415 (HT-2) g/mol	*F. graminearum, F. acuminatum*	Dermatotoxisch, Erbrechen	T-2: 4 mg/kg Körperge-wicht (Ratte)	
Citrinin		$C_{13}H_{14}O_5$	250 g/mol	div. *Aspergillus*- und *Penicillium*-Spezies, *M. purpureus*	Fötotoxisch, nieren- und leber-schädigend	50 mg/kg Körperge-wicht (Ratte)	Möglicher synergistischer Effekt mit OTA
Fumonisine B_1 (Abb.), B_2, B_3		$C_{34}H_{59}O_{15}N$ (B_1) $C_{34}H_{59}O_{14}N$ (B_2) $C_{34}H_{59}O_{14}N$ (B_3)	721 (B_1), 705 (B_2), 705 (B_3) g/mol	*Fusarium moniliforme, F. proliferatum*	Leuko-encephalomacie, Leberkrebs, Lungenödeme	-	

Eine Übersicht über die in den einzelnen Staaten der Erde geltenden Grenzwerte liefert der FAO-Bericht aus dem Jahre 1997 (Food and Nutrition Paper 64), modifiziert wiedergegeben von WEIDENBÖRNER (2001). Diese Darstellung wurde inzwischen aktualisiert und auf den Stand von 2003 gebracht (FAO, 2004: Food and Nutrition Paper, 84). Die FAO stellt dabei fest, dass die Anzahl an Ländern, die spezifische Bestimmungen für Mykotoxine erlassen haben, mit den Jahren stark gewachsen ist.

Tab. 1-5: In Deutschland geltende Höchstgehalte für die wichtigsten Mykotoxine (Stand 01.10.2006) (außer: Aflatoxine: Tab. 1-9; Patulin: Tab. 1-13)

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	Rechtliche Grundlage
OCHRATOXIN A		
Rohe Getreidekörner (einschließlich Rohreis und Buchweizen)	5,0	466/2001
Alle aus Getreide gewonnenen Erzeugnisse	3,0	466/2001
Getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen)	10,0	466/2001
Getrocknete Feigen	2	MHmV
Sonstiges Trockenobst	8	MHmV
Geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlener gerösteter Kaffee außer löslicher Kaffee	5,0	466/2001
Löslicher Kaffee (Instant-Kaffee)	10,0	466/2001
Wein sowie andere Getränke auf Wein- und/oder Traubenmostbasis	2,0	466/2001
Traubensaft, Traubensaftzutaten in anderen Getränken, einschließlich Traubennektar und konzentrierter rekonstituierter Traubensaft	2,0	466/2001
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,50	466/2001
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0,50	466/2001
DEOXYNIVALENOL (DON)		
Andere unverarbeitete Getreide als Hartweizen, Hafer und Mais	1250	466/2001
Unverarbeiteter Hartweizen und Hafer	1750	466/2001
Getreidemehl, einschließlich Maismehl, Maisgrits und Maisschrot	750	466/2001
Brot, Feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückscerealien	500	466/2001
Brot, Kleingebäck und Feine Backwaren	350[1]	MHmV
Andere Getreideerzeugnisse	500[1]	MHmV
Teigwaren (trocken)	750	466/2001
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	200	466/2001
Getreideerzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	100[1]	DiätV
ZEARALENON		
Andere unverarbeitete Getreide als Mais	100	466/2001
Getreidemehl, ausgenommen Maismehl	75	466/2001
Brot, Feine Backwaren, Kekse	50	466/2001
Getreide-Snacks und Frühstückscerealien (nicht aus Mais)	50	466/2001
Getreideerzeugnisse	50[1]	MHmV
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (nicht aus Mais)	20	466/2001
Getreideerzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge & Kleinkinder	20	DiätV

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	Rechtliche Grundlage
FUMONISINE B_1 und B_2		
Maiserzeugnisse, ausgenommen Cornflakes	500	MHmV
Cornflakes	100	MHmV
Maiserzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	100	DiätV

[1] Achtung: teilweise Widerspruch zum EU-Recht
[2] Rechtsgrundlagen:
466/2001: KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001
MHmV: MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG
DiätV: DIÄTVERORDNUNG

1.3 Aflatoxine

Aflatoxine genießen eine Sonderstellung unter den Mykotoxinen. Auch wenn ihre Bedeutung verhältnismäßig spät entdeckt wurde (1.3.1), sorgt eine Reihe von herausragenden Eigenschaften dafür, dass dieser Substanzgruppe besonderes Augenmerk von Wissenschaftlern und Gesetzgebern zuteil wird:

• **ubiquitäre Verbreitung**: Schimmelpilze, die potenziell Aflatoxine bilden können, kommen grundsätzlich weltweit vor. Jedoch ist der Anteil an belasteten Lebensmitteln in warmen Regionen der Erde deutlich höher. Durch den weltweiten Handel mit Lebensmitteln werden immer wieder auch Aflatoxin-belastete Lebensmittel in gemäßigte Breiten importiert.

• **sehr hohe Toxizität**: Aflatoxine zeigen eine Reihe von toxischen Eigenschaften. Während die akute Toxizität heutzutage nur eine geringe Rolle spielt, wird besondere Aufmerksamkeit der Aufnahme von sub-akuttoxischen Aflatoxin-Mengen geschenkt. Die chronische Toxizität äußert sich einerseits in Leberschädigungen, anderseits in der „unangenehmen“ Eigenschaft von Aflatoxinen, Krebs auslösen zu können. So gilt das am weitesten verbreitete Aflatoxin B_1 als stärkstes natürliches Cancerogen. Näheres findet sich unter 1.3.5.

• **Vorkommen in Nestern**: Die inhomogene Verteilung von Aflatoxinen in vielen Lebensmitteln durch die Bildung von Schimmelnestern (1.3.4) stellt besondere Herausforderungen an die Probenahme. Bereits einzelne verschimmelte Nüsse können eine signifikante Kontamination einer ganzen Partie verursachen.

Diese unerwünschten Eigenschaften sorgen zum einen für eine erhöhte Aufmerksamkeit des Gesetzgebers (1.3.6), zum anderen sind Aflatoxine ein beliebtes Forschungsgebiet für Analytiker, Mikrobiologen, Toxikologen, Veterinäre, Biochemiker und andere Fachrichtungen, wie die hohe Zahl von 7495 Fach-Publikationen* in der Primärliteratur verdeutlicht.

*Stand: 22.07.2006, Stichwort: „Aflatoxin“, Seite www.pubmed.gov der US-amerikanischen National Library of Science

1.3.1 Historisches: Der Truthahn-Tod

Bereits im Jahre 1910 wurde die Toxizität von Aflatoxinen von Kühl beschrieben (WEIDENBÖRNER, 2000). In das Interesse der Öffentlichkeit traten die Aflatoxine jedoch erst im Jahre 1960 (vergl. 1.2), als mehr als 100.000 Truthähne in Großbritannien qualvoll verendet sind. Als Ursache wurde schließlich das Futter ermittelt: Erdnussmehl aus Brasilien. Dieses Nebenprodukt der Erdnussöl-Produktion, das auch unter dem Namen Rosettimehl bekannt ist, war belastet mit Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus flavus* Link bzw. *Aspergillus parasiticus* Speare. Das Mehl enthielt vier Substanzen, die grüne und blaue Fluoreszenz zeigten: die Aflatoxine waren entdeckt, benannt nach einem der toxinbildenden Pilze ***A**spergillus **fla**vus*. Die von diesen Toxinen ausgelöste Aflatoxikose, auch als „Turkey X“-Krankheit bzw. -Syndrom bekannt, äußerte sich in Hämorrhagien, Leber- und Nierenschäden. In diese Zeit fällt auch das Auftreten von Lebertumoren bei Regenbogenforellen in den USA, verursacht durch Aflatoxin-kontaminierte Baumwollsamen im Futter (JAIMEZ et al., 2000).

Nicht nur bei Truthähnen, sondern auch beim Menschen sind Ausbrüche einer akuten Aflatoxikose bekannt, insbesondere in unterentwickelten Ländern. Wie das CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (1992, laufend aktualisiert) der FDA berichtet, sind mindestens zwei ältere Fälle einer akuten Aflatoxin-Vergiftung bei einer Gruppe von Menschen bekannt. Im Herbst 1974 erkrankten 397 Personen aus 150 Dörfern in einem Gebiet

im Nordwesten Indiens an einer akuten Aflatoxikose. Von diesen Erkrankten starben 108, entsprechend 27 %. Die Krankheit äußerte sich in hohem Fieber, rasch fortschreitender Gelbsucht, Ödemen an den Gliedmaßen, Schmerzen, Erbrechen und Leberschwellungen. Eine histopathologische Untersuchung ergab folgende Befunde: fortgeschrittene Wucherungen der Gallenkanäle, periportale Leber-Fibrosen, gastrointestinale Hämorrhagien. Ursache für diese Vergiftungserscheinungen war der Konsum von Aflatoxin-belastetem Mais, der gemäß späteren Untersuchungen zwischen 250 und 15.000 µg/kg (!) Aflatoxine enthielt – der derzeit gültige Grenzwert in der EU für Gesamt-Aflatoxine liegt bei 4 µg/kg. Die tägliche Aflatoxin B_1-Aufnahme der betroffenen Personen wurde auf mindestens 55 µg/kg Körpergewicht geschätzt, für eine unbestimmte Anzahl von Tagen. Eine zehn Jahre später durchgeführte Nachuntersuchung der Überlebenden ergab allerdings eine vollständige Erholung von den Krankheitssymptomen.
Ein zweiter Fall wurde im Jahr 1982 aus Kenia gemeldet, wo 20 Menschen in ein Krankenhaus eingewiesen wurden, von denen 60 % (zwölf Personen) starben. Die tägliche Aflatoxin-Aufnahme wurde auf mindestens 38 µg/kg Körpergewicht geschätzt, für eine unbestimmte Dauer.

In den letzten Jahren sind wieder vermehrt akute Fälle von Aflatoxikosen in Folge der herrschenden Wetterbedingungen in Afrika aufgetreten. Im Jahr 2004 erkrankten im Osten Kenias 317 Menschen an akuter Aflatoxikose, von denen 125 starben (AZZIZ-BAUMGARTNER et al., 2005). Im Rahmen dieses Ausbruchs wurden Maisproben von örtlichen Märkten und aus Eigenanbau analysiert. Es zeigte sich, dass die Proben erheblich mit Aflatoxinen kontaminiert waren: 55 % der Proben überschritten den in Kenia geltenden Gesamt-Aflatoxin-Grenzwert von 20 µg/kg (zum Vergleich: EU-Grenzwert 4 µg/kg), 35 % zeigten Gehalte > 100 µg/kg und 7 % gar Gehalte > 1.000 µg/kg. In den Gegenden mit der höchsten Anzahl von Aflatoxikose-Fällen wurde auch eine höhere durchschnittliche Aflatoxin-Belastung festgestellt als in Gegenden mit nur wenigen Fällen (Mittelwerte 53 µg/kg gegenüber 8 µg/kg). Auch zeigte die Belastung der Lebensmittel in Patientenhaushalten signifikant höhere Werte als die in Kontrollhaushalten (355 µg/kg gegenüber 44 µg/kg). Da zugleich virale Leberinfektionen als Krankheitsursache ausgeschlossen werden konnten, stehen die Krankheitsfälle in direktem Zusammenhang mit der nachgewiesenen sehr hohen Aflatoxin-Belastung der Nahrung (LEWIS et al., 2005).
Als Ursache für diese Kontamination des Mais wurde eine von Trockenheit verursachte schlechte Ernte ermittelt, die geschädigten Mais hervorbrachte, welcher wiederum anfällig für Schimmelpilze ist. Aus Angst vor Dieben wurde der Mais darüber hinaus vermehrt zu Hause statt wie sonst in Kornkammern gelagert. Wegen der größeren Feuchte und Wärme in den Häusern entwickelten sich die Schimmelpilze noch besser (BARRETT, 2005).

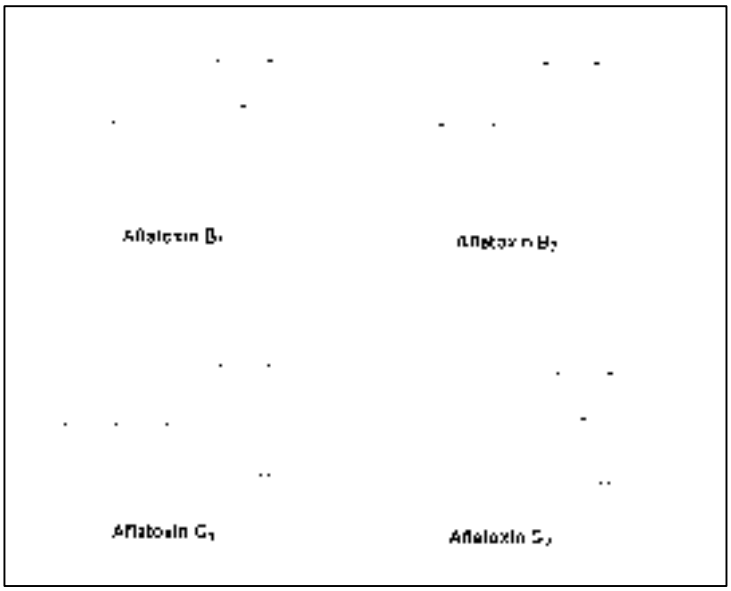
Aufgrund der im Folgenden beschriebenen Eigenschaften von Aflatoxinen ist jedoch davon auszugehen, dass diese Mykotoxine den Menschen seit jeher begleiten – und schädigen. Der Verzehr von verschimmelten Lebensmitteln, ob bewusst (z.B. in Notzeiten) oder unbewusst (wenn der Schimmel in verarbeiteten Lebensmitteln nicht mehr sichtbar ist), wird insbesondere in warmen Klimaten seit langem zu Leberschäden und Krebserkrankungen geführt haben.

Skurriles am Rande: Toxikologisches Selbst-Experiment

Die o.g. Quelle (CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION, 1992, laufend aktualisiert) berichtet darüber hinaus von einem Selbstmordversuch durch Aflatoxin-Aufnahme: Ein Labormitarbeiter mit entsprechendem Zugang zu Chemikalien hat versucht, sich mit der zweitägigen Aufnahme von jeweils 12 µg Aflatoxin B_1 je Kilogramm Körpergewicht das Leben zu nehmen, sechs Monate später hat er den Versuch mit täglich 11 µg/kg Köpergewicht über 14 Tage wiederholt. Außer vorübergehendem Ausschlag, Übelkeit und Kopfschmerzen konnten keine weiteren Krankheitssymptome beobachtet werden. In einer Nachuntersuchung 14 Jahre später wurden keine Auffälligkeiten, auch nicht der Leberfunktionen, festgestellt.

1.3.2 Chemisches: Blaue und grüne Fluoreszenz

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Aflatoxinen um Difurancumarin-Derivate. Abb. 1-1 zeigt die chemischen Strukturen der wichtigsten Aflatoxine. Die übrigen Aflatoxine sind Derivate der abgebildeten Grundformen.



Aus der Gruppe der Aflatoxine sind derzeit rund 20 Toxine bekannt, u.a. Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2, B_{2a}, G_{2a}, B_3, GM_1, M_4, P_1 und Q_1. Von Schimmelpilzen natürlich gebildet werden jedoch nur die Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2, darüber hinaus spielen die Aflatoxine M_1 und M_2 mengenmäßig eine wichtige Rolle. Die M-Aflatoxine sind wie auch die übrigen Aflatoxine Metabolisierungsprodukte der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2.

Abb. 1-1.
Chemische Struktur der wichtigsten Aflatoxine

Die Benennung der Aflatoxine erfolgt dabei nach folgendem Muster:

- Aflatoxine B und G: Die Buchstaben bezeichnen die Farbe der Fluoreszenz unter UV-Licht, die von den Substanzen emittiert wird. Die Aflatoxine B_1 und B_2 fluoreszieren **b**lau (blue), die Aflatoxine G_1 und G_2 hingegen **g**rün (green).
- Aflatoxin M: Bei den M-Aflatoxinen handelt es sich um Metabolite, die vom Säugetierkörper gebildet werden und sich dementsprechend unter anderem in der **M**ilch (milk) nach Aufnahme von Aflatoxin-belastetem Futter nachweisen lassen.
- Der Index bezeichnet die relative chromatographische Mobilität bezogen auf ein Normalphasensystem. Daraus folgt, dass auf einer Umkehrphase (s. 1.7 Flüssigchromatographie) Aflatoxin B_1 später als B_2 eluiert, ebenso G_1 später als G_2.

(WEIDENBÖRNER 2000, 2001)

Tab. 1-6 fasst die wichtigsten Eigenschaften der o.g. relevanten Aflatoxine zusammen. Die Aflatoxine B_1 und G_1 unterscheiden sich von den jeweiligen Varianten mit dem Index 2 durch eine zusätzliche Doppelbindung. Diese Substanzen zeigen eine deutlich geringere Fluoreszenz. Verursacht wird dieser Effekt augenscheinlich durch eine geringere Starrheit (vergl. MAIER, 1992): Die Substituenten an der C-C-Doppelbindung liegen planar, d.h. es wirken geringere Abstoßungskräfte. Vermutlich wird das Molekül dadurch weniger sterisch gehindert, immitierte Strahlungsenergie in Schwingungsenergie statt in Emissionsstrahlung (Fluoreszenz) umzuwandeln. Erst nach Derivatisierung beispielsweise mit Brom oder Iod und der damit verbundenen Sättigung der Doppelbindung weisen auch die Aflatoxine B_1 und G_1 hinreichende Fluoreszenz auf und können sehr gut mittels LC-FLD detektiert werden.