

Untersuchungen zur „In vitro“-Adsorption von Mykotoxinen durch mineralischen Ballaststoff

Von Dipl.-Ing. Margit Werther und Prof. Dr. sc. Achim Strey, Berlin

1. Einleitung

Der Toxinbinder Fix-A-Tox*) ist ein adsorbierendes Pulver auf mineralischer Grundlage.

Mit einem Gehalt an

12% astbestfreien Kaolinit-Tonen,

73% gefällten und getrockneten Kieselsäuren,

8% Sepiolit-Ton und

7% chlorithaltigem Steatit

wurde die Zusammensetzung so gewählt, daß Mykotoxine und bakterielle Toxine in hohem Maße adsorbiert werden, hingegen die biologische Verfügbarkeit von Leistungsförderern, Kokzidiostatika, Fütterungsarzneimitteln und anderen essentiellen Nahrungsbestandteilen weitgehend erhalten bleiben soll. Diese spezifischen Bindungseigenschaften prädestinieren das Erzeugnis für den Einsatz als Futterzusatzstoff zur Vorbeugung von Erkrankungen und Leistungsminderungen durch die genannten Toxine, insbesondere in der Schweine- und Geflügelhaltung.

Dazu wird Fix-A-Tox dem Futter in Konzentrationen von 0,2–0,4% (2–4kg/t) beigemischt.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, die „In vitro“-Adsorption unterschiedlicher Mykotoxine an Fix-A-Tox vergleichend zu untersuchen und aus den Ergebnissen Schlußfolgerungen zur Wirksamkeit dieses Futterzusatzstoffes abzuleiten.

2. Material und Methoden

2.1 Prüf- und Testsubstanzen

Fix-A-Tox, Ch.-B.: 6952

Aflatoxin B₁ Sigma Lot. 25 44 041

Aflatoxin B₂ Sigma Lot. 51 H4 062

Aflatoxin G₁ Sigma Lot. 103 H4 060

Aflatoxin G₂ Sigma Lot. 89C-4012

Ochratoxin-A Sigma Lot. 63 H4 024

Zearalenon Sigma Lot. 104 H4 008

Sulfadimidin-Na Serva Referenzsubstanz Lot. 12121

2.2 Meßtechnik

Verwendet wurde eine Ausrüstung zur HPTLC der Firma Camag bestehend aus:

- automatischem Probenauftragegerät,
- Horizontalentwicklungskammer,
- TLC-Scanner 3 mit Auswerte-Software Cats 4.03.

2.3 Allgemeine Versuchsanordnung

Zu 5 g des Fix-A-Tox werden jeweils 50 ml einer Lösung der zu untersuchenden Substanzen gegeben. Der pH-Wert der verwendeten Lösungen liegt bei 2, 7 bzw. 9. Das Gemisch wird 24 Stunden unter ständigem Rühren bei 37 °C belassen. In Abständen von jeweils 6, 12 und 24 Stunden wird eine Probe von jeweils 2 ml entnommen und dem Analysengang unterworfen. Dazu wird der gesamte Ansatz vorher 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und aus dem Überstand die Untersuchungslösung entnommen. Um das Verhalten der Verbindungen unter dem Einfluß von Temperatur, pH und Zeit zu untersuchen sowie die Extraktionsfähigkeit aus der überstehenden Lösung zu überprüfen, werden in gleicher Weise Ansätze ohne Fix-A-Tox bereitgestellt. Die Analytik aller Verbindungen erfolgte mit Hilfe der HPTLC.

2.4 Extraktion der Verbindungen aus der überstehenden Lösung und Analytik

Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂

Die entnommenen 2 ml des Überstandes werden mit 2 ml Chloroform intensiv ausgeschüttelt. Bei der Untersuchungslösung des pH-Wertes 9 muß vorher mit 100 µl halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert

werden. Die Chloroformphase wird in einen Spitzkolben überführt und die Untersuchungslösung mit einem weiteren Milliliter Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen werden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, und der Trockenrückstand wird in 100 µl Chloroform aufgenommen. 10 µl werden zur Analyse verwendet.

Standardlösungen: 0,1 und 0,01 mg der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ in 100 ml Chloroform, davon 1–5 µl

Probeklösungen: 10 µl

Schicht: HPTLC-Fertigplatten KG 60, 20 x 10 cm

Laufmittel: Chloroform/n-Hexan/Aceton/Toluol (60/20/10/10)

Messung: Fluoreszenzmessung, Anregungswellenlänge 365 nm, Kantenfilter 400 nm

Ochratoxin-A

Die entnommenen 2 ml des Überstandes werden mit 2 ml Chloroform intensiv ausgeschüttelt. Bei der Untersuchungslösung der pH-Werte 7 und 9 muß vorher mit 100 µl halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert werden. Die Chloroformphase wird in einen Spitzkolben überführt und die Untersuchungslösung mit einem weiteren Milliliter Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen werden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, und der Trockenrückstand wird in 100 µl Chloroform aufgenommen. 10 µl werden zur Analyse verwendet.

Standardlösungen: 0,1 mg des Ochratoxins-A in 100 ml Chloroform, davon 20, 10, 5 und 2 ml

Probeklösungen: 10 µl

Schicht: HPTLC-Fertigplatten KG 60, 20 x 10 cm

Laufmittel: Benzen/Methanol/Essigsäure (18/1/1)

Messung: Fluoreszenzmessung, Anregungswellenlänge 313 nm, Kantenfilter 400 nm

Zearalenon

Die entnommenen 2 ml des Überstandes werden mit 2 ml Chloroform intensiv ausgeschüttelt, die Chloroformphase wird in einen Spitzkolben überführt und die Untersuchungslösung mit einem weiteren Milliliter Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen werden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, und der Trockenrückstand wird in 100 µl Chloroform aufgenommen. 10 µl werden zur Analyse verwendet.

Standardlösungen: 1 mg Zearalenon in 100 ml Chloroform, davon 1 bis 5 µl

Probeklösungen: 10 µl

Schicht: HPTLC-Fertigplatten KG 60, 20 x 10 cm

Laufmittel: Chloroform/Aceton (9/1)

Messung: Fluoreszenzmessung, Anregungswellenlänge 365 nm, Kantenfilter 400 nm

Sulfadimidin-Na

Die entnommenen 2 ml des Überstandes werden mit 2 ml Acetonitril und einer Spatelspitze Natriumchlorid intensiv ausgeschüttelt, ein Milliliter Dichlormethan wird dazugegeben und erneut ausgeschüttelt. Beim pH-Wert von 2 werden 100 µl 1-M-Natriumcarbonatlösung zugesetzt. Die Acetonitrilphase wird in einen Spitzkolben überführt, und die Untersuchungslösung mit einem weiteren Milliliter Acetonitril ausgeschüttelt. Die vereinigten Acetonitrilphasen werden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, und der Trockenrückstand wird in 100 µl Acetonitril aufgenommen. 10 µl werden zur Analyse verwendet.

Standardlösungen: 2 mg Sulfadimidin-Na in 100 ml Methanol, davon 10, 8, 5, 1 µl

Probeklösungen: 10 µl

Schicht: HPTLC-Fertigplatten KG 60, 20 x 10 cm

Laufmittel: Essigsäureethylester/Methanol/Ammoniak, 25%ig, wäbrig (10/1/0,5)

Messung: Absorptionsmessung, Meßwellenlänge 280 nm

*) Futterzusatzstoff der Werfft-Chemie Ges. m. b. H., Wien, Österreich

3. Ergebnisse

In den Tabellen 1 bis 7 sind die nach Adsorption mit dem mineralischen Bindemittel Fix-A-Tox (F) ermittelten Konzentrationen der untersuchten Substanzen den jeweiligen Kontrollwerten (ohne Behandlung mit Fix-A-Tox) gegenübergestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Aflatoxin G₂ in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 1 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	0,89 µg	0,04 µg	1,06 µg	0,06 µg	1,00 µg	0,03 µg
7	0,84 µg	0,03 µg	0,86 µg	0,05 µg	0,79 µg	0,02 µg
9	1,03 µg	0,04 µg	0,73 µg	0,07 µg	0,79 µg	0,04 µg

Tabelle 2: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Aflatoxin G₁ in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 1 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	0,80 µg	0,04 µg	0,89 µg	0,07 µg	0,83 µg	< 0,02 µg
7	0,76 µg	< 0,02 µg	0,79 µg	< 0,02 µg	0,74 µg	< 0,02 µg
9	0,86 µg	0,04 µg	0,63 µg	0,07 µg	0,69 µg	0,03 µg

Tabelle 3: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Aflatoxin B₂ in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 1 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	0,92 µg	0,04 µg	1,21 µg	0,07 µg	1,10 µg	0,04 µg
7	0,97 µg	0,04 µg	0,93 µg	0,06 µg	0,90 µg	< 0,02 µg
9	1,20 µg	0,05 µg	1,01 µg	0,07 µg	0,99 µg	0,04 µg

Tabelle 4: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Aflatoxin B₁ in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 1 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	0,81 µg	0,05 µg	0,98 µg	0,07 µg	1,07 µg	0,04 µg
7	0,92 µg	0,04 µg	0,83 µg	0,06 µg	0,81 µg	< 0,02 µg
9	0,99 µg	0,04 µg	0,95 µg	0,07 µg	0,93 µg	0,04 µg

Tabelle 5: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Ochratoxin-A in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 5 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	4,10 µg	0,75 µg	4,02 µg	< 0,25 µg	4,47 µg	< 0,25 µg
7	4,63 µg	4,83 µg	5,20 µg	4,91 µg	5,30 µg	2,75 µg
9	4,85 µg	4,16 µg	4,80 µg	2,58 µg	4,98 µg	2,08 µg

Tabelle 6: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Zearalenon in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 10 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	10,07 µg	4,23 µg	8,33 µg	0,89 µg	9,66 µg	0,83 µg
7	0,85 µg	7,24 µg	9,77 µg	6,61 µg	9,54 µg	5,80 µg
9	9,04 µg	9,10 µg	9,95 µg	4,90 µg	6,26 µg	4,19 µg

Tabelle 7: Übersicht über die ermittelte Konzentration an Sulfadimidin-Na in der überstehenden Lösung mit und ohne Fix-A-Tox (zugegebene Menge: 52,9 µg in 50 ml Lösung)

pH	Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h		Zeit nach Versuchsbeginn, h	
	ohne F	mit F	ohne F	mit F	ohne F	mit F
2	51,18 µg	50,09 µg	44,97 µg	39,91 µg	44,35 µg	39,43 µg
7	48,21 µg	45,43 µg	44,98 µg	38,82 µg	40,28 µg	32,74 µg
9	47,74 µg	43,79 µg	46,98 µg	40,54 µg	42,91 µg	35,08 µg

Aus den Meßwerten lassen sich die prozentualen Anteile der untersuchten Substanzen berechnen, die in den jeweiligen Versuchsansätzen von Fix-A-Tox adsorbiert wurden. Die dementsprechenden Werte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Relativer Anteil der von Fix-A-Tox adsorbierten Stoffmengen (in Prozent der insgesamt zugegebenen Konzentrationen)

Stoff	adsorbierte Stoffmenge, %								
	pH 2			pH 7			pH 9		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
Aflatoxin G ₂	95,5	94,3	97,0	96,4	94,1	97,5	96,1	90,4	94,9
Aflatoxin G ₁	95,0	92,1	100	100	100	100	95,3	88,9	95,7
Aflatoxin B ₂	95,7	94,2	96,4	95,9	93,5	97,8	95,8	93,1	96,0
Aflatoxin B ₁	99,4	92,9	96,3	95,7	92,7	100	96,0	92,6	95,7
Ochratoxin-A	81,7	100	100	0	5,6	48,1	14,2	46,3	31,5
Zearalenon	58,0	89,3	91,4	18,2	32,3	39,2	0	20,4	58,2
Sulfadimidin-Na	2,1	12,9	11,1	5,8	13,7	18,7	8,3	13,7	18,3

4. Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse bestätigen zunächst ganz allgemein die dem mineralischen Bindemittel Fix-A-Tox zugesprochene gute Adsorptionsfähigkeit für Mykotoxine. Dabei gibt es zwischen den unterschiedlichen Mykotoxinen graduelle Unterschiede. Am stärksten werden Aflatoxine adsorbiert. Unabhängig vom pH-Wert und der Dauer des Kontaktes mit Fix-A-Tox ist die Bindung bei allen Aflatoxinen fast quantitativ (zwischen 88,9% und 100%).

Ochratoxin A und Zearalenon werden im sauren Bereich (pH 2) ähnlich stark gebunden, wiederum ebenfalls unabhängig davon, ob die Kontaktdauer 6, 12 oder 24 Stunden betrug. Im neutralen bzw. alkalischen Bereich ist die Adsorption dieser Mykotoxine schwächer ausgeprägt. Außerdem vollzieht sie sich langsamer. Sie erreicht beim Ochratoxin A nach 24 Stunden 48% (pH 7) bzw. 31,5% (pH 9). Beim Zearalenon sind die Größenordnungen ähnlich (39,2% bei pH 7, 58,2% bei pH 9).

Mit den für die Versuchsanstellung ausgewählten pH-Werten sollten die unterschiedlichen pH-Verhältnisse im Magen-Darm-Trakt simuliert werden. Aus den Ergebnissen kann diesbezüglich geschlossen werden, daß die Aflatoxine in allen Abschnitten des Intestinums an das Adsorbens fixiert sein müßten, wohingegen bei Ochratoxin A und Zearalenon die größte Bindung im Magen zu erwarten wäre. Dessenungeachtet dürfte bei diesen Mykotoxinen auch im Darm ein nicht unbedeutendes Adsorptionspotential vorliegen.

Im Vergleich zu den Mykotoxinen wurde das ebenfalls in die Untersuchungen einbezogene Sulfadimidin-Na – unabhängig von den Versuchsbedingungen – nur geringfügig gebunden. Obwohl dieser Befund keineswegs für andere Arzneistoffe und Futterzusatzstoffe repräsentativ ist, unterstützt er die Ergebnisse anderer Autoren, wonach Fix-A-Tox weitgehend selektiv wirkt.

Aus den durchgeführten Modellversuchen wird insgesamt geschlossen, daß Fix-A-Tox ein gutes bis sehr gutes Adsorptionspotential für Mykotoxine besitzt. Dabei kommt insbesondere der Wirkung auf Aflatoxine eine herausragende Bedeutung zu.

Die Regensteinhöhle bei Blankenburg im Harz

wurde vermutlich im 12. Jahrhundert erbaut und bis ins 15. Jahrhundert betrieben. Danach verfiel sie. In den letzten Jahren wurde die Felsenmühle teilweise wieder freigelegt und restauriert, sie weist zwei Wasserräder auf. E. W.