

Ochratoxin A im Kaffee: Neue Erkenntnisse und Toxikologie

Ochratoxin A in coffee: New evidence and toxicology

J. Studer-Rohr, D.R. Dietrich, J. Schlatter*, Ch. Schlatter

Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, CH-8603 Schwerzenbach

* Fachstelle Toxikologie, Abteilung Lebensmittelwissenschaft des Bundesamtes für Gesundheitswesen (BAG)

Ochratoxin A (OA) ist ein Mycotoxin, welches von zwei ubiquitären Schimmelpilzarten produziert wird (*Aspergillus* und *Penicillium*). OA ist vor allem nierentoxisch aber auch ein potentes Nierenkanzerogen. In Lebensmitteln kann OA häufig nachgewiesen werden, vor allem in Cerealien, aber auch z.B. in Bier, Dörrfrüchten und Kaffeebohnen. Widersprüchliche Daten sind publiziert worden über den Einfluss des Röstens und der Kaffeegetränkherstellung auf den Ochratoxin A-Gehalt. In der vorliegenden Studie wurde in 13 von 25 untersuchten Rohkaffeeproben OA nachgewiesen. Der Röstprozess hatte auf den OA-Gehalt praktisch keinen Einfluss. Auch konnte gezeigt werden, dass OA zu einem grossen Teil von den gerösteten Bohnen ins Getränk übergeht. In 16 von 40 untersuchten Kaffeegetränkproben, hergestellt aus Kaffeebohnen vom Schweizer Detailhandel, wurde Ochratoxin A gefunden. Auf Grund dieser – allerdings noch unvollständigen – Resultate muss der Schluss gezogen werden, dass der Kaffeekonsum einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zur Belastung des Menschen mit Ochratoxin A leisten kann. Mit Hilfe der vorliegenden Daten wurde eine erste Risikoabschätzung durchgeführt. Im Moment ist es jedoch schwierig, das aus der Ochratoxin A-Belastung resultierende kanzerogene Risiko für den Menschen zufriedenstellend zu beurteilen, da über den Wirkungsmechanismus noch praktisch keine Daten vorliegen.

*Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin which is produced by ubiquitous fungal species (*Aspergillus* and *Penicillium*). OA is mainly toxic to the kidney but also a potent carcinogen. OA is found in foodstuff, predominantly in cereals but also e.g. in beer, dried fruit and coffee. Inconsistent results have been published regarding the influence of the roasting and brewing process on the OA content in coffee. In this study, Ochratoxin A was found in green beans in 13 of 25 analysed samples. Roasting of green coffee beans resulted only in a small reduction of the OA level and OA was also found to be eluted almost completely into the brew. OA was further detected in 16 of 40 analysed brews prepared of coffee samples from the Swiss retail market. These preliminary data suggest, therefore, that regular coffee consumption may contribute significantly to human OA exposure. A preliminary risk assessment based on these data is carried out. However, it is difficult to evaluate the carcinogenic risk of human OA exposure as only very limited data on the mechanism of OA are available.*

1. Einleitung

Das Mycotoxin Ochratoxin A wurde 1965 von van der Merwe et al. (1965) erstmals beschrieben. Die Ochratoxine sind Stoffwechselprodukte von Pilzen, die aus Phenylalanin und einem Dihydroisocumarin-Derivat zusammengesetzt sind (Abbildung 1). Die hauptsächlichsten Produzenten sind ubiquitäre *Aspergillus* und *Penicillium*-Arten, wie zum Beispiel *A. ochraceus* (auch *A. alutaceus* genannt) oder *P. verrucosum*. Neben Ochratoxin A (OA), der häufigsten Verbindung, die in Le-

bens- und Futtermitteln gefunden wird, spielen die anderen Ochratoxine (B, C, Abbildung 1) eine unbedeutende Rolle, da ihre Toxizität (Roth et al., 1989) bzw. die Konzentration in den Produkten zu vernachlässigen sind. Bei optimalen a_w-Werten (zw. 0,95–0,99) können diese Pilze im Temperaturbereich von 12–37 °C (*A. ochraceus*) respektive zwischen 4–31 °C (*P. verrucosum*) Ochratoxin A produzieren (Krogh, 1987). Dies unterscheidet sie unter anderem von den Aflatoxin-Produzenten, die vorwiegend in subtropischem Klima gedeihen.

Man findet Ochratoxin A hauptsächlich in Getreide und Mais (Frank, 1991; Rühl et al., 1992), aber auch in Dörrobst (Steiner et al., 1993; Zohri und Abdel-Gawad, 1993), Kaffee (Studer-Rohr et al., 1995;

Tsubouchi et al., 1988) und Bier (El-Desouki, 1992) oder in sekundär kontaminiertem Schweinefleisch nach Verfütterung von verschimmelter Ware (Hult et al., 1980).

In dieser Arbeit werden zuerst ein paar allgemeine Erläuterungen über Ochratoxin A gemacht. In einem zweiten Teil wird auf das Problem von Ochratoxin A in Kaffee eingegangen und eigene Daten diskutiert. Zum Schluss folgt eine Risikoabschätzung bezüglich der Aufnahme von OA und des daraus resultierenden Krebsrisikos.

2. Allgemeine Ausführungen

Toxikologie von Ochratoxin A

Die akute Toxizität von Ochratoxin A wurde vor allem mittels LD₅₀ an verschiedenen Spezies bestimmt. Wie in Tabelle 1 zu sehen, sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies gross und differieren bis zu einem Faktor 100. Maus und Ratte scheinen wesentlich weniger empfindlich zu sein als Kaninchen oder Schwein. Die akut toxische Wirkung von Ochratoxin A beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Proteinsynthese, die durch gleichzeitige Behandlung mit hohen Dosen Phenylalanin teilweise wieder aufgehoben werden kann (DFG, 1990).

Bei der chronischen und subchronischen Toxizität von Ochratoxin A steht die nierenschädigende Wirkung im Vordergrund. Bei allen bisher untersuchten Tierarten – Schwein, Hund, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Hamster, Huhn und Forelle – führte die subchronische und chronische Einwirkung in verhältnismässig geringen Dosen zu Nierenschädigungen. Die nephrotoxische Wirkung von OA wurde nicht nur experimentell beobachtet. Spontan auftretende Nephropathien bei Schweinen und Geflügel werden auf die gelegentlich hohe Verunreinigung von Futtermitteln mit OA zurückgeführt (Dwivedi und Burns, 1986; Harwig et al., 1983). Die Halbwertszeiten von Ochratoxin A im Plasma unterscheiden sich bei den einzelnen Tierarten sehr. Sie wird nach oraler Gabe für Hühner mit 4,1 h (Galtier et al., 1979), für Mäuse mit 39, für Ratten mit 120, für Schweine mit 150 und für Affen

Tier	LD 50 (mg/kg KG)
Maus	46–58
Ratte	21–30
Meerschweinchen	8–9
Schaf	2
Schwein	0,6–1
Katze	0,55
Kaninchen	0,3
Hund	0,2–1

Tab. 1: LD 50-Daten verschiedener Spezies von Ochratoxin A bei oraler Verabreichung (DFG, 1990).

Vortrag gehalten am 24.5.94 im Rahmen der Lebensmittelwissenschaftlichen Kolloquien der ETH.

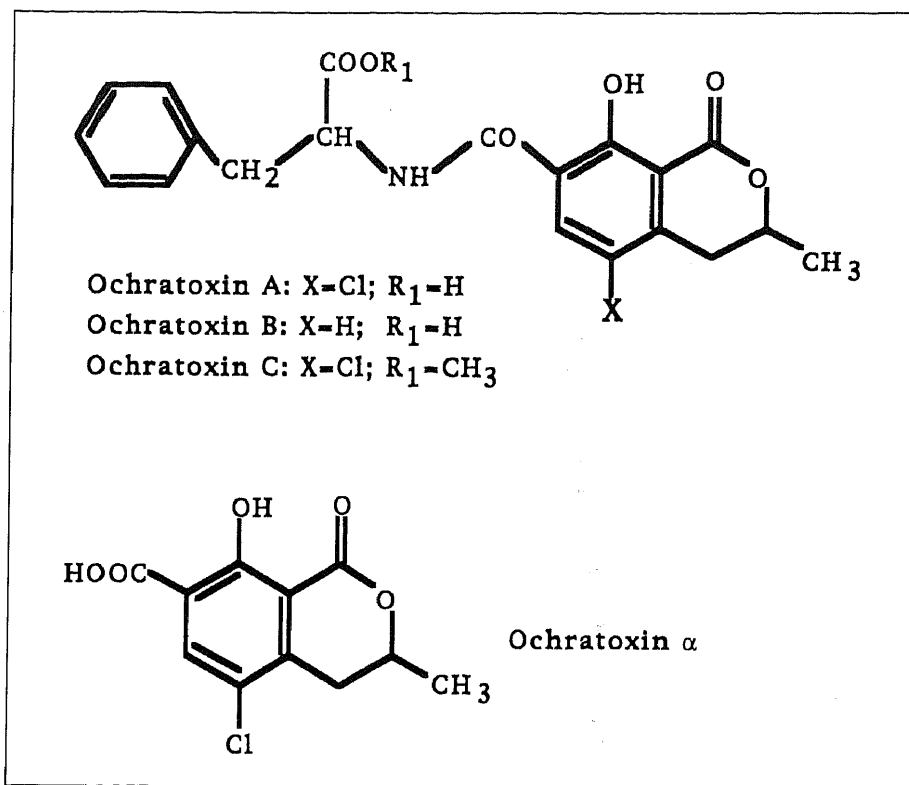


Abb. 1: Chemische Struktur von Ochratoxin A, B, C und α .

mit 510 h angegeben (Hagelberg et al., 1989). Die langsame Elimination von OA ist u.a. auf seine starke Bindung an Plasmaproteine zurückzuführen (Chang und Chu, 1977; Galtier et al., 1979; Hagelberg et al., 1989). Der Abbau erfolgt über eine hydrolytische Abspaltung von Phenylalanin in das weniger toxische Ochratoxin α (Abbildung 1) (Galtier et al., 1979). Im Rattenharn wurden neben Ochratoxin A und Ochratoxin α auch noch kleinere Mengen von (4R)-4-Hydroxy-OA und weitere nicht identifizierte Metaboliten gefunden (Galtier et al., 1979).

Neben der nierentoxischen Wirkung wurde bei Ochratoxin A auch eine stark krebserregende Wirkung bei Ratten festgestellt (Boorman, 1989). Die in Tabelle 2 aufgelisteten Daten eines 2 Jahres-Versuchs mit Ratten zeigen, dass bei einer täglichen Dosis von 210 $\mu\text{g/kg KG}$ bei 80% der männlichen Tiere und bei 20% der weiblichen Tiere ein Nierenadenom oder -karzinom gefunden wurde. Über den Wirkungsmechanismus weiss man bis heute allerdings noch kaum etwas. Ebenso sucht man noch nach Erklärungen für den auffälligen Unterschied der Tumorzinzidenz

zwischen den beiden Geschlechtern. Umstritten ist auch die Genotoxizität von Ochratoxin A. Zahlreiche Tests zur Abklärung der genotoxischen Wirkung von OA wurden durchgeführt (Übersicht siehe bei IARC, 1993). Die Mehrheit der Tests fiel negativ aus. Einzelstrangbrüche und DNA-Addukte konnten jedoch in kleiner Zahl nachgewiesen werden (IARC, 1993; Pfohl-Leszkowicz et al., 1991; Pfohl-Leszkowicz et al., 1993a; Pfohl-Leszkowicz et al., 1993b).

Eine fruchtschädigende Wirkung durch Ochratoxin A hat man bei Mäusen, Ratten und Hamstern beobachtet (IARC, 1993). Keine teratogene Wirkung hingegen wurde in einem Versuch mit 2 Schweinen gefunden (Shreeve et al., 1977).

Auch durch Ochratoxin A verursachte Immuneffekte wurden verschiedentlich beschrieben (DFG, 1990).

Ochratoxin A und die endemische Balkannephropathie (BEN = Balkan endemic nephropathy)

Die endemische Balkannephropathie ist ein Nierenleiden, welches in der Region

von Bulgarien, Rumänien und dem heutigen Ex-Jugoslawien auftritt und oft zum Tode führt. Betroffen ist nur die ländliche Bevölkerung in den entsprechenden Gebieten. Endemische Dörfer, das heisst Orte wo die Krankheit gehäuft auftritt, und nicht-endemische Dörfer sind oft benachbart. Betroffen sind alle ethnischen Gruppen und beide Geschlechter, wobei innerhalb von Familien die Fälle gehäuft auftreten können. Kinder sind von der Krankheit nicht betroffen. Die Inzidenz beginnt im 3. Lebensjahrzehnt und steigt proportional zum Alter an. Urothelial-Tumore sind in den Endemiegebieten bis zu 100x häufiger als in benachbarten, nicht-endemischen Regionen. Immigranten, welche über 20 Jahre in den von der Krankheit betroffenen Dörfern leben, können ebenfalls BEN entwickeln (Plestina, 1992; Radovanovic, 1989).

Ochratoxin A wird seit vielen Jahren mit BEN in Verbindung gebracht und – neben anderen möglichen Ursachen – als krankheitsauslösende Substanz kontrovers diskutiert. Gründe, die für diese These sprechen, gibt es einige. So ist zum Beispiel die diffuse Fibrose, die man beim Menschen findet, ähnlich der Pathologie bei Schweinen, die an einer durch Ochratoxin A verursachten Nephropathie erkrankt sind. OA kann in Lebensmitteln der betroffenen Region nachgewiesen werden und ebenso wird OA in Humanblutproben aus den endemischen Gebieten gefunden. Zusätzlich ist in den betroffenen Regionen die Inzidenz von Urothelaltumoren sehr hoch. Als Gegenargumente sind jedoch anzuführen, dass der Gehalt an OA in Lebensmitteln in den endemischen Gebieten nicht sehr viel höher ist als in den nicht endemischen benachbarten Regionen. Das gleiche gilt für die OA-Gehalte im Blut, die nicht stark erhöht sind gegenüber den Blutgehalten in den nicht betroffenen Regionen. Die Ochratoxikose bei Schweinen, die vor allem in Nord- und Osteuropa verbreitet ist, gibt es in den mit BEN betroffenen Gebieten nicht. Umgekehrt ist BEN nicht bekannt in den Teilen der Welt, wo vor allem Schweine und Hühner von der Ochratoxikose betroffen sind. Während Ochratoxin A überall nachgewiesen werden kann, ist BEN nur im Balkan bekannt (Bach et al., 1992; Harwig et al., 1983). Es ist daher zu vermuten, dass OA – falls überhaupt – nur eine Nebenrolle in der Entwicklung der endemischen Balkannephropathie spielt.

Ochratoxin A in Lebensmitteln

Über das Vorkommen von OA in Lebensmitteln sind schon viele Untersuchungen gemacht worden. Ochratoxin A findet man häufig in Getreide und den daraus hergestellten Produkten wie Brot und Teigwaren, aber auch in Mais und Maisprodukten und in Kaffee. Bei Getreide und Mais waren zwischen 5 und 80% der Proben kontaminiert, wobei der durchschnittliche Gehalt von OA (aller untersuchten Proben)

Dosis	Adenome ($\mu\text{g OA/kg Körpergewicht}$)				Karzinome ($\mu\text{g OA/kg Körpergewicht}$)			
	0	21	70	210	0	21	70	210
männliche Tiere	1/51	1/51	6/51	10/50	0/50	0/50	16/50	30/50
weibliche Tiere	0/50	0/50	1/51	5/50	0/50	0/50	1/51	3/50

Tab. 2: Daten einer 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie mit Ochratoxin A an Ratten (Boormann, NTP 1989).

sowohl in Getreide wie auch in Mais zwischen 0,1 und 1,5 µg/kg lag (Anonymous, 1992; Baumann und Zimmerli, 1988; DFG, 1990; Rühl et al., 1992; eigene Daten). OA-Werte bis zu 280 µg/kg hat man teilweise in einzelnen Dörrfrüchteproben gefunden (Baumann und Zimmerli, 1988; Zohri und Abdel-Gawad, 1993). In einer Untersuchung von 56 verschiedenen Bieren waren 10 Proben positiv, wobei 9 davon Starkbiere waren. Der Gehalt bei den positiven Proben lag zwischen 0,35 und 1,53 µg OA/l (El-Dessouki, 1992). Wegen des Übergangs von OA aus kontaminiertem Futter ins Blut und Gewebe von Nutztieren kann Ochratoxin A auch in Lebensmitteln tierischer Herkunft nachgewiesen werden. Bei Schweinenieren fand man bis zu 33 % positive Proben mit mittleren Gehalten von 0,1–1,4 µg/kg (Baumann und Zimmerli, 1988; Hofmann, 1983; Scheuer und Leistner, 1986). In Blut-, Leber- und Brühwürsten wurde in 18 % der Proben mittlere OA-Gehalte von 0,1–0,2 µg/kg gefunden (Maximum: 3,4 µg/kg) (Scheuer und Leistner, 1986). Im Pansen von Rindern kann Ochratoxin A problemlos metabolisiert werden. Bei Kälbern allerdings ist mit ähnlichen Rückstandsmengen zu rechnen wie bei monogastrischen Tieren (DFG, 1990). Umfassende Zusammenstellungen der bisher publizierten Daten finden sich bei IARC, (1993) und Kuiper-Goodman und Scott (1989). Auf Grund dieser Daten wird die tägliche Aufnahme von Ochratoxin A für den Menschen auf ca. 125 ng geschätzt, wobei nur etwa 2 % davon aus tierischen Lebensmitteln stammen (DFG, 1990; Rühl et al., 1992; Studer-Rohr et al., 1995).

Ochratoxin A in Humanblutproben

In den frühen 80er Jahren wurden mehrere zum Teil umfangreiche Untersuchungen von menschlichen Blutseren vor allem in den Gebieten der endemischen Balkan-nephropathie unternommen. Es wurden OA-Gehalte zwischen 1–40 µg/l gefunden (Hult et al., 1982; Petkova-Bocharova et al., 1988). In neueren Untersuchungen aus Schweden und der Schweiz hat man bei einer Nachweisgrenze von <0,05 µg/l in sämtlichen Proben Ochratoxin A im Bereich von 0,09–0,94 µg/l Blut (n=39) (Breitholz-Emanuelsson et al., 1993) bzw. 0,06–6,02 µg/l Serum (n=368) (Tätigkeitsbericht BAG 1993, 1994) nachweisen können.

3. Ochratoxin A und Kaffee

Kurzer Literaturüberblick

Die Literaturdaten über Rohkaffee sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die ersten Untersuchungen mit Rohkaffee wurden bereits 1974 unternommen, jedoch meist mit bereits verschimmelten Proben. Die Nachweisgrenze lag bei 20 µg OA/kg. Durch verbesserte Nachweismethoden, respektive durch das Erreichen von tiefe-

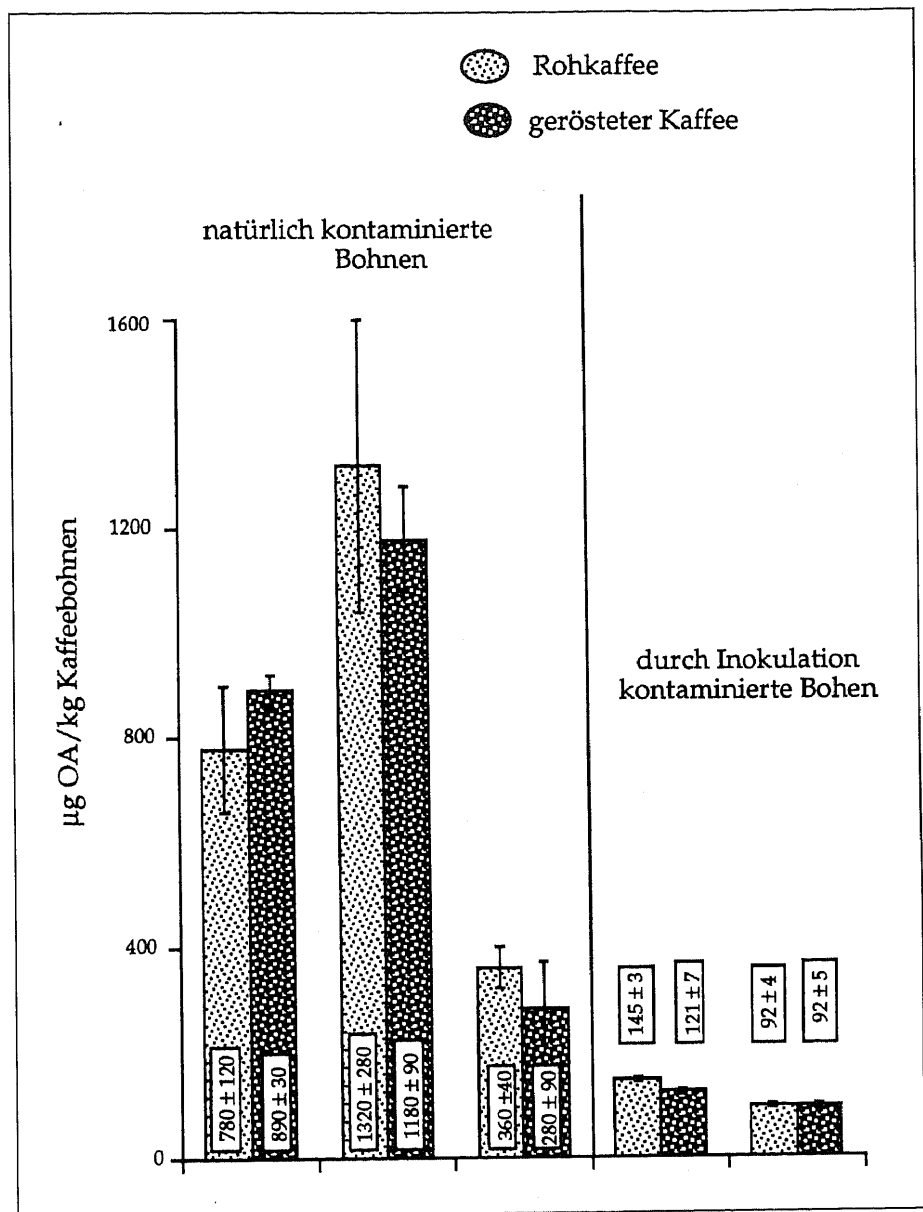


Abb. 2: OA-Gehalt von drei natürlich kontaminierten und zwei durch Inokulation mit einer Sporensuspension von *A. ochraceus* und anschließender Bebrütung kontaminierten Kaffeeproben vor (Rohkaffee) und nach (gerösteter Kaffee) der Röstung (die OA-Gehalte wurden auf der Basis des Rohkaffee-gewichts berechnet) (arithmetisches Mittel von 3–6 Aliquots/Probe ± Standardfehler).

ren Nachweisgrenzen wurde in den letzten Jahren Ochratoxin A viel öfter (18–60%) auch in kommerziellen (also nicht nur in bereits verdorbenen) Rohkaffeeproben gefunden und zwar im Bereich von 0,2–96 µg/kg.

Die aus der Literatur bekannten Daten über die Zerstörung von Ochratoxin A während des Röstprozesses sind sehr kontrovers (Tabelle 4). In vier von fünf Studien lag die Zerstörung von OA zwischen 50 und 100 %. Tsubouchi und Mitarbeiter (1987) hingegen fanden eine Zerstörung um die 10 %. Ebenfalls widersprüchliche Daten liegen über den Übergang von OA aus dem Kaffeepulver ins Getränk vor. Micco et al., (1989) fand kein OA in Gebräu das aus künstlich kontaminiertem Kaffee zubereitet worden war. Tsubouchi et al. (1987) hingegen fand praktisch 100 % des OA wieder im Ge-

tränk, das er aus Kaffee hergestellt hatte, der durch Inokulation mit einer Sporensuspension von *A. ochraceus* und anschließender Bebrütung kontaminiert worden war.

In Röstkaffeeproben aus dem Handel wurde in Japan (Tsubouchi et al., 1988) in 5 von 68 Proben (=7 % positiv) Ochratoxin A im Bereich von 3,2–17 µg/kg (Nachweisgrenze: 2 µg/kg Kaffee) gefunden.

Analytisches Vorgehen

Ochratoxin A wurde aus gemahlenem Rohkaffee und gemahlenem geröstetem Kaffee mit Methanol/Natriumbicarbonat extrahiert, mit Isooctan entfettet und nach Überführung in die Chloroformphase mittels einer Celite-Säule gereinigt und der Extrakt anschließend via HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors quantifi-

Proben Art	Anzahl Proben	Kontaminierte Proben			Referenz
		Anzahl	(%)	Gehalt $\mu\text{g/kg}$	
verschimmelte Proben	267	23	8,6%	< 20	Levi et al., 1974
		5	1,9%	30–50	
		1	0,4%	360	
kommerziell	68	2	2,9%	20	Levi et al., 1974
		1	1,5%	80	
2 Jahre alte Proben, eine Probe verschimmelt	502	0	0,0%		Illycaffe (via Levi)
kommerziell	201	1	0,5%	24	FDA USA (via Levi)
		1	0,5%	96	
kommerziell	40	9	22,5%	0,5–23,5	Cantafora et al., 1983
kommerziell	22	4	18,2%	9,9–46,0	Tsubouchi et al., 1984
kommerziell	28	17	60,7%	0,2–15,0	Micco et al., 1989

Tab. 3: Literatur-Daten über das Vorkommen von Ochratoxin A in Rohkaffee.

ziert. Zur Herstellung des Getränks wurde ein normaler Kaffeefilter aus Papier benutzt. Das Gebräu wurde im folgenden mit Chloroform ausgeschüttelt und anschliessend wie die gemahlten Proben weiter aufgearbeitet.

Zur Bestätigung der Identität von OA in den verschiedenen Kaffee-Extrakten wurden mehrere Methoden angewandt. Eine Methylierung des Extraktes mit Methanol in saurem Milieu mit nochmaliger HPLC-Analyse, in der der methylierte OA-Peak etwas später erscheint als der nicht methylierte OA-Peak, wurde für Extrakte von Rohkaffee und gerösteten Kaffee-Proben angewandt. Eine Methylierung mit Diazomethan und anschliessender Identifikation durch GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) wurde für Extrakte von Rohkaffee angewandt. Die zusätzliche Reinigung von gerösteten Kaffee-Extrakten und von Extrakten des Getränks mittels einer Immunoaffinitätsäule (IAS) und anschliessender Quantifizierung mittels HPLC/Fluoreszenz erwies sich als sehr spezifisch und effizient. Auch nach der Reinigung via IAS konnte die Identität des OA zusätzlich noch mit einer Methylierung und anschliessender HPLC-Analyse oder einer Methylierung (mit Diazomethan) und anschliessender GC-MS-Analyse bestätigt werden. Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion der Methode findet sich bei (Studer-Rohr et al., 1995).

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$) angewandt. Der maximale mögliche Verlust von OA während des Röstens

oder der Getränkezubereitung wurde mit Hilfe einer einfachen Regressionsanalyse ($< 0,05$) ermittelt.

Resultate und Diskussion

Ochratoxin A in kommerziellen Rohkaffeeproben: 25 Proben unterschiedlicher Herkunft, die uns von der Kaffeeindustrie

zur Verfügung gestellt worden waren, wurden analysiert. In 13 Proben (52 %) konnte OA im Bereich von 1,2–56 $\mu\text{g/kg}$ nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: 0,5 $\mu\text{g/kg}$). Anzumerken ist, dass die Probe mit dem höchsten OA-Gehalt einen verdorbenen Eindruck machte. Diese Resultate stimmen mit den neueren Daten aus der Literatur (Tabelle 3) gut überein.

Zerstörung von Ochratoxin A während des Röstprozesses in verdorbenen Kaffee-Proben: Drei natürlich kontaminierte Muster roher Kaffeebohnen mit einem hohen Ochratoxin A-Gehalt (400–1500 $\mu\text{g/kg}$) und zwei Rohkaffeeproben, welche vorgängig mit einer *A. ochraceus*-Sporensuspension überimpft und bebrütet worden waren (90–140 $\mu\text{g/kg}$), wurden je in zwei Hälften geteilt. Von der einen Hälfte wurden nach dem Mahlen mehrere Aliquote à 30 g direkt auf ihren OA-Gehalt analysiert, die andere Hälfte (100–500 g) wurde während 100–190 Sekunden (je nach Gewicht) bei 252 °C geröstet und anschliessend ebenfalls analysiert. Die Resultate sind in **Abbildung 2** gezeigt. Es konnte, mit einer Ausnahme, kein statistisch signifikanter Verlust von Ochratoxin A während der Röstung nachgewiesen werden. Auf Grund der grossen Inhomogenität innerhalb der einzelnen Proben (grosse Standardfehler des Mittelwertes) muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei den 3 natürlich kontaminierten Proben ein Verlust von 14 bis maximal 62 % (je nach Probe) nicht mit statistischer Sicherheit hätte erfasst werden können. Die zwei künstlich kontaminierten Proben wiesen eine sehr homogene OA-Verteilung auf (kleine Standardfehler). In einer Probe

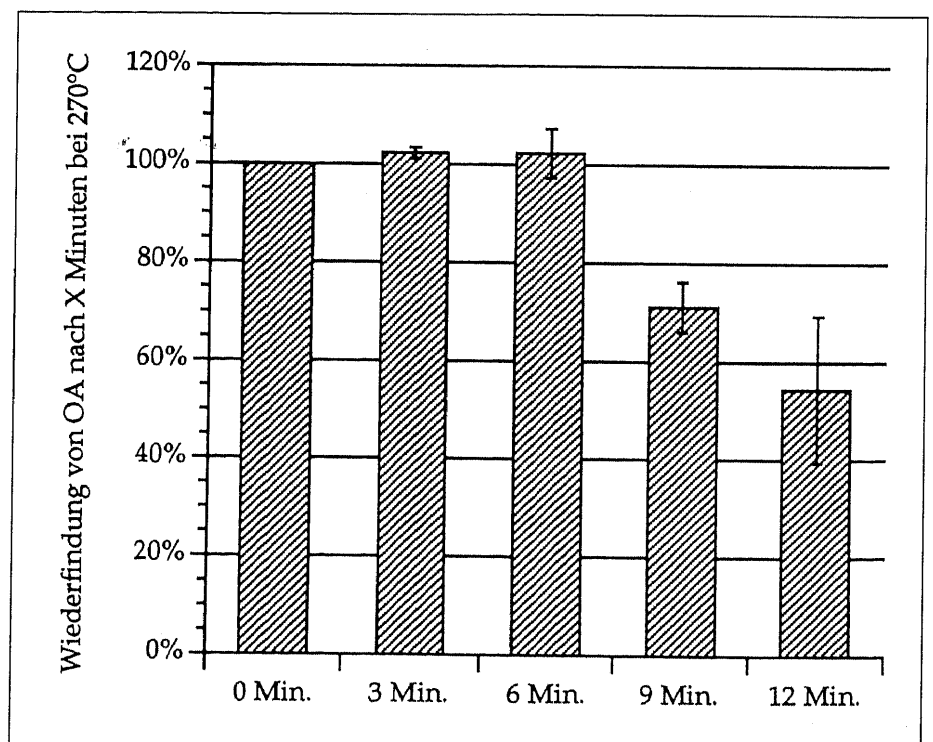


Abb. 3: Hitzestabilität von OA nach 3, 6, 9 und 12 Minuten bei 270 °C (arithmetisches Mittel von je 3 Experimenten \pm Standardfehler).

konnte überhaupt keine Abnahme des Ochratoxin A-Gehaltes festgestellt werden, in der anderen wurde eine statistisch signifikante Reduktion zwischen 2 und maximal 29 % errechnet. Es ist daher zu schliessen, dass durch den Röstprozess der OA-Gehalt in Kaffee um weniger als 30 % reduziert wird.

Dieses Ergebnis bestätigt somit die Befunde von Tsubouchi et al. (1987) (**Tabelle 4**). Die zu unseren Resultaten in Widerspruch stehenden Ergebnisse von Cantafora et al. (1983), Gallaz und Stadler (1976), Levi et al. (1974), und Micco et al. (1989) (**Tabelle 4**) können teilweise durch die unterschiedlichen Konatminationsarten und teilweise durch die grosse Inhomogenität der OA-Verteilung innerhalb der einzelnen Proben erklärt werden. Wird bei Rohkaffeebohnen das Ochratoxin A lediglich zugegeben, so bleibt es an der Oberfläche hängen. Da beim Rösten aber die äusserste Haut der Kaffeebohnen, die sogenannte Silberhaut, abfällt, geht damit vermutlich auch der grösste Teil des zugegebenen OA verloren. Dieses Problem ist bei mit Pilz inkulierten oder natürlich kontaminierten Proben wegen des Durchwachsens der Bohnen mit Mycel nur in geringerem Ausmasse vorhanden. Hier stellt sich aber, vor allem bei natürlich kontaminierten Bohnen, das Problem der inhomogenen Toxin-Verteilung (Studer-Rohr et al., 1995). Es ist daher schwierig, bei schwach kontaminierten Proben (<25 µg/kg) und nur einer sehr kleinen Anzahl analysierter Aliquots die Menge zerstörten OA genau zu quantifizieren. Die Hitzestabilität von Ochratoxin A wurde zusätzlich wie folgt getestet: Reines OA wurde während 0 bis 12 Minuten bei 270 °C gehalten. (Normale Röstbedingungen für 500 g Kaffee sind 250–270 °C während 120–150 Sek.). Die Resultate dieses Versuchs sind in **Abbildung 3** dargestellt. Bis zu sechs Minuten konnte keine Ochratoxin A-Abnahme festgestellt werden. Nach 12 Minuten wurde immer noch 50 % des Anfangsgehaltes von OA gefunden. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse unserer Röstversuche.

Übergang von OA aus kommerziellen Rohkaffeeproben ins Getränk: Ähnliche Resultate (und ähnliche Probleme) wie beim Rösten ergaben sich auch beim Übergang von Ochratoxin A aus dem Rohkaffee ins Getränk (**Abbildung 4**). Ochratoxin A wird auch im tiefen Kontaminationsbereich (<25 µg/kg) beim Rösten kaum zerstört und bei der Zubereitung des Getränks fast vollständig ins Gebräu eluiert. Keine statistisch signifikante Differenz konnte zwischen den Gehalten in rohen Bohnen und den (nach Rösten) daraus hergestellten Getränken festgestellt werden. Um eine statistisch signifikante Differenz bei diesen Proben zu erhalten, hätte jedoch die Abnahme (auf Grund des grossen Standardfehlers, der durch die inhomogene OA-Verteilung innerhalb der Pro-

ben bedingt ist) in den drei Proben 52 %, 64 % und 74 % sein müssen. Da die Inhomogenität in diesen niedrig kontaminierten Proben gross ist und nur eine kleine Anzahl Analysen durchgeführt wurde, kann – gestützt auf diese Daten – lediglich gesagt werden, dass mindestens 25–50 % des OA, das in Rohkaffee gefunden wird, auch im daraus hergestellten Getränk nachgewiesen werden kann. Tsubouchi et al. (1987) berichtet, dass das OA nahezu vollständig aus dem gerösteten Kaffee ins Getränk übergeht.

Ochratoxin A in Gebräu aus kommerziell geröstetem Kaffee: Auf dem Schweizer Detailhandel wurden 40 verschiedene geröstete Kaffeemuster gekauft und das daraus hergestellte Getränk analysiert. In 16 Proben (= 40 %) wurde OA im Bereich von 1,0–7,8 µg/kg gefunden (Nachweisgrenze: 1,0 µg/kg). Der Mittelwert aller analysierten Proben lag bei 1 µg/kg. Der höhere Prozentsatz an positiven Proben in dieser Studie im Vergleich zu jener von Tsubouchi et al. (1988) (7 % positiv, n=68) ist durch die höhere Nachweisgrenze bei Tsubouchi (2,0 µg/kg) zu erklären. Auch in unserem Material weisen lediglich 10 % der Proben eine OA-Konzentration >2 µg/kg auf.

Abschätzung und Beurteilung des Risikos

Die tägliche OA-Aufnahme über das Essen wird auf ca. 80–100 ng/Person geschätzt (DFG, 1990; Rühl et al., 1992). Die tägliche Aufnahme via Kaffee wurde auf Grund der hier vorliegenden Daten auf ca. 25 ng/Person berechnet (OA-Gehalt in

Kaffee: 1 µg/kg; geschätzter täglicher Kaffeeconsum: 25 g, entspricht 3–4 Tassen). Daraus ergibt sich eine tägliche Aufnahme via Essen und Kaffee von ca. 125 ng oder 2 ng/kg KG (Körpergewicht). Aus diesen Zahlen geht hervor, dass der Kaffeeconsum deutlich zur Belastung des Menschen mit OA beitragen kann.

Die FAO/WHO (joint FAO/WHO expert committee on food additives) hat 1991 eine provisorisch tolerierte wöchentliche Aufnahmen (provisional tolerable weekly intake = PTWI) von 112 ng/kg KG/Woche oder 16 ng/kg KG/Tag festgesetzt. Dieser PTWI liegt rund einen Faktor 8–10 über der geschätzten Aufnahme. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass dieser Wert lediglich für das nierenschädigende Potential von OA ausgelegt ist und Daten über die Kanzerogenität nicht in die Beurteilung miteinbezogen wurden. Kuiper-Goodman und Scott (1989) haben unter Berücksichtigung der Daten der Kanzerogenitätsstudie von Boorman (1989) mit Hilfe zweier verschiedener Risikoextrapolations-Ansätze eine täglich tolerierbare Aufnahme berechnet. Der eine Ansatz ergab einen Wert von 4,2 ng/kg KG/Tag, wobei die Dosis, bei der in der Rattenstudie kein Effekt beobachtet wurde (no observed effect level = NOEL) durch einen Sicherheitsfaktor von 5000 dividiert wurde. Beim anderen Modell wird diejenige Menge errechnet, bei deren lebenslangen Aufnahme ein zusätzlicher Tumor/10⁶ zu erwarten ist. Diese Dosis (virtually safe dose = VSD) wird aus den tierexperimentellen Daten linear extrapoliert und ergab für OA eine täglich tolerierbare Menge von 0,2 ng/kg KG. Die-

Art der Kontaminierung	Anzahl Proben	OA-Gehalt (µg/kg)	Rösbedingungen	Zerstörung	Referenz
Mycotoxin zugegeben	4	210–350	198–210 °C 5–20 min.	80–90%	Levis et al., (1974)
Inokulation mit A. ochraceus	2	17,43	keine Angaben	80–90%	Gallaz und Stadler, (1976)
Mycotoxin zugegeben	3	80	keine Angaben	90%	
natürlich kontaminiert	2	3,8, 23	keine Angaben	90%	Cantafora et al., (1983)
natürlich kontaminiert	2	4,0, 8,6	keine Angaben	90–100%	Micco et al., (1989)
Mycotoxin zugegeben	3	45	keine Angaben	50–87%	
Inokulation mit A. ochraceus	4	200–140 000	200 °C 10–20 min.	0–12%	Tsubouchi et al., (1987)

Mycotoxin zugegeben = Zugabe von reinem Toxin auf die Bohnen.

Inokulation mit A. ochraceus = Beimpfung der Bohnen mit einer Sporensuspension und nachfolgendem Bebrüten.

Tab. 4: Literaturdaten über die Zerstörung von Ochratoxin A während des Röstprozesses.

ses Modell dürfte für genotoxische Kanzerogene eine gewisse Berechtigung haben; es sollte jedoch nicht zur Beurteilung von nicht genotoxischen Kanzerogenen angewendet werden, da bei diesen höchstwahrscheinlich ein Schwellenwert im Bereich des NOEL existiert. Da OA, falls überhaupt, nur sehr schwach genotoxisch ist, ist die Dosis von 0,2 ng/kg KG/Tag vermutlich ein zu konservativer Wert.

Im Moment ist es schwierig, auf Grund der vorhandenen Daten das Krebsrisiko von Ochratoxin A für den Menschen genauer abzuschätzen, da weder über den kanzerogenen Mechanismus von OA noch etwas über die Kinetik im Menschen bekannt ist. Wird jedoch das konservativste Modell (wie für die VSD) einer linearen Dosisextrapolation der Daten von Boorman (1989) angewendet, ergibt sich für Ochratoxin A ein Nierenkrebsrisiko von $12/10^6$ bei einer lebenslangen täglichen Exposition von 2 ng/kg KG. Die kumulative Nierentumor-Inzidenz in der Schweiz beträgt für Männer $1.3/10^2$ und für Frauen $0.6/10^2$ (IARC, 1992). Dies bedeutet theoretisch, dass lediglich jeder 500–1000ste Nierentumor in der Schweiz durch Ochratoxin A verursacht wird. Daraus ergibt sich, dass OA nur eine sehr geringe Rolle unter den Nierentumor-auslösenden Faktoren spielt. Andererseits sollte nicht vergessen werden, dass bezüglich der OA-Kinetik grosse Speziesunterschiede vorhanden sind und es sehr wohl möglich ist, dass OA, im Vergleich zu der Ratte, wesentlich länger

im menschlichen Körper verbleibt. Solange all diese Fragen unbeantwortet sind, sollte die Exposition von OA vor allem in Hinblick auf die nierentoxischen und -kanzerogenen Eigenschaften möglichst tief gehalten werden. Dies kann nur durch vermehrte Anstrengungen zur Reduktion der OA-Kontamination (z.B. unmittelbar nach der Ernte, während des Transportes sowie im Bereich der Lagerhaltung) erreicht werden.

Literaturverzeichnis

- Anonymous (1992) Kantonales Laboratorium Aargau, Jahresbericht 1992.
- Bach P.H., Gregg N.J. and Delacruz L. (1992) Relevance of a rat model of papillary necrosis and upper urothelial carcinoma in understanding the role of ochratoxin A in balkan endemic nephropathy and its associated carcinoma. *Food and Chemical Toxicology* 30, 205–211.
- Baumann U. and Zimmerli B. (1988) Einfache Ochratoxin A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 79, 151–158.
- Boorman G.A. (1989) Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP Technical Report NTP TR 358.
- Breitholz-Emanuelsson A., Olsen M., Oskarsson A., Palminger I. and Hult K. (1993) Ochratoxin A in cow's milk and in

human milk with the corresponding human blood samples. *Journal of the AOAC* 76, 842–846.

Cantafora A., Grossi M., Miraglia M. and Benelli L. (1983) Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. *La rivista della società di Scienza dell'Alimentazione* 12, 103–108.

Chang F.C. and Chu F.S. (1977) The fate of ochratoxin A in Rats. *Food Cosmetics and Toxicology* 15, 199–204.

DFG (1990) Ochratoxin A, Vorkommen und toxikologische Bewertung. Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG.

Dwivedi P. and Burns R.B. (1986) The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review Part I. *Epidemiology and Toxicity. World's Poultry Science Journal* 42, 32–47.

El-Dessouki S. (1992) Ochratoxin A in Bier. *Deutsche Lebensmittelrundschau* 88, 354–355.

Frank H.K. (1991) Food contamination by ochratoxin A in Germany. In *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications 115, Edited by M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch. pp. 77–81. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Gallaz L. and Stadler R. (1976) Ochratoxin A im Kaffee. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 4, 147–149.

Galtier P., Charpentreau J.-L. Alvinerie M. and Labouche C. (1979) The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism and Disposition* 7, 429–434.

Hagelberg S., Hult K. and Fuchs R. (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9, 91–96.

Harwig J., Kuiper-Goodman T. and Scott P.M. (1983) Microbial Food Toxicants: Ochratoxins. In *CRC Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*. CRC. Edited by M.J. Rechcigl. pp. 193–238. CRC Press, Florida.

Hofmann G. (1983) Vorkommen von Ochratoxin A in Blut und Nieren von Schweinen. *Mitteilungen der Bundesanstalt für Fleischforschung* 80, 5547–5551.

Hult K., Hökby E., Gatenbeck S. and Rutqvist L. (1980) Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: Use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 828–830.

Hult K., Plestina R., Habazin-Novak V., Radic B. and Ceovic S. (1982) Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Archives of Toxicology* 51, 313–321.

IARC (1992) In *Cancer incidences in five continents*. IARC Scientific Publications. 120, Edited by D.M. Parkin, C.S. Muir, S.L.

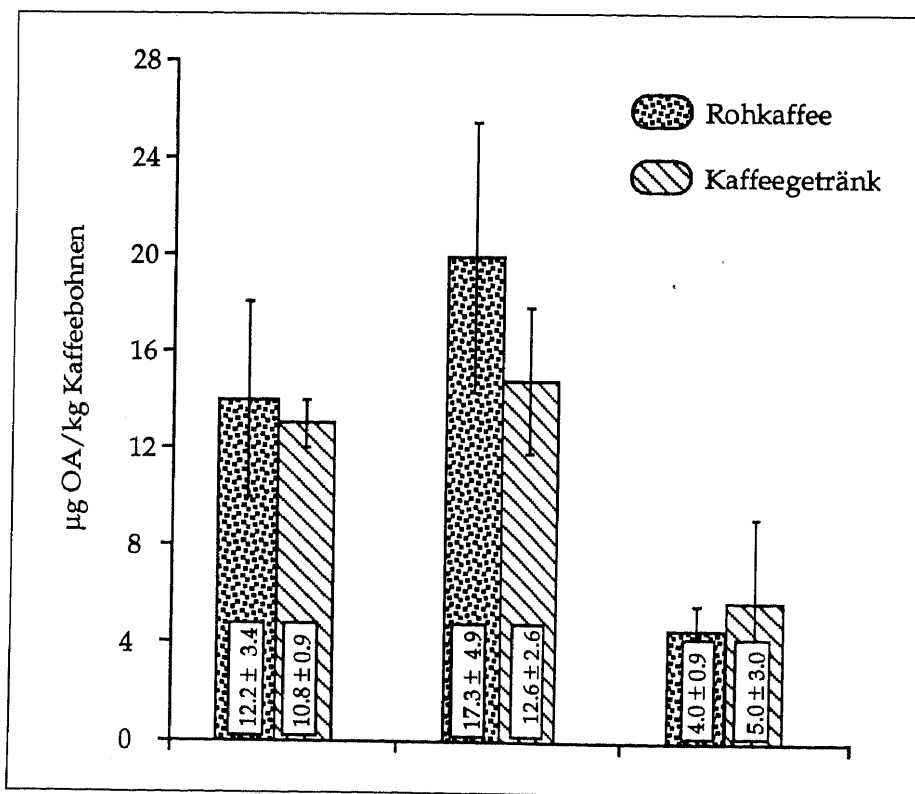


Abb. 4: Übergang von OA aus Rohkaffee in das nach der Röstung daraus hergestellte Getränk anhand dreier Rohkaffeeproben (die OA-Gehalte wurden auf der Basis des Rohkaffeegehwichts berechnet) (arithmetisches Mittel von 4–6 Aliquots/Probe ± Standardfehler).

Whelan, Y.-T. Gao, J. Ferlay and J. Powell. pp. 767-769 (Switzerland, Zürich). International Association of Cancer Registries, Lyon.

IARC (1993) Ochratoxin A. In Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 56, Edited by IARC and WHO. pp. 489-521. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Krogh P. (1987) Ochratoxins in food. In Mycotoxins in food. Food Science and Technology. Edited by P. Krogh. pp. 97-121. Harcourt Brace Jovanovich, London.

Kuiper-Goodman T. and Scott P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomedical and Environmental Sciences 2, 179-248.

Levi C.P., Trenk H.L. and Mohr H.K. (1974) Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. Journal of the AOAC 57, 866-870.

Micco C., Grossi M., Miragli M. and Brera C. (1989) A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Additives and Contaminants 6, 333-339.

Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N. and Castegnaro M. (1988) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary systems tumours in Bulgaria. Food Additives and Contaminants 5, 299-301.

Pfohl-Leszkwicz A., Chakor K., Creppy E.E. and Dirheimer G. (1991) DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications 115, Edited by M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch. pp. 245-253. In-

ternational Agency for Research on Cancer, Lyon.

Pfohl-Leszkwicz A., Grosse Y., Castegnaro M., Nicolov I.G., Chernozemsky I.N., Bartsch H., Betbeder A.M., Creppy E.E. and Dirheimer G. (1993a) Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. In Postlabeling methods for detection of DNA adducts. IARC Scientific Publications. 124, Edited by E.H. Phillips, M. Castegnaro and H. Bartsch. pp. 141-148. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Pfohl-Leszkwicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E. and Dirheimer G. (1993b) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. Mutation Research 289, 265-273.

Plestina R. (1992) Some features of Balkan endemic nephropathy. Food and Chemical Toxicology 30, 177-181.

Radovanovic Z. (1989) Aetiology of Balkan nephropathy: a reappraisal after 30 years. European Journal of Epidemiology 5, 372-377.

Roth A., Creppy E.E., Kane A., Bacha H., P.S. S., Rösenthaller R. and Dirheimer G. (1989) Influence of ochratoxin B on the ochratoxin A inhibition of phenylalanyl-tRNA formation in vitro and protein synthesis in hepatoma tissue culture cells. Toxicology Letters 45, 307-314.

Rühl C., Weber R. and Jiao Y. (1992) Ochratoxin A Aufnahme mit Cerealien. Tätigkeitsbericht Bundesgesundheitsamt 1991, 214-215.

Scheuer R. and Leistner L. (1986) Occurrence of ochratoxin A in pork and pork products. Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers 32, 191.

Shreeve B.J., Patterson S.P., Pepin G.A., Roberts B.A. and Wrathall A.E. (1977) Ef-

fect of feeding ochratoxin to pigs during early pregnancy. British Veterinary Journal 133, 412-417.

Steiner W., Brunschweiler K., Leimbacher E. and Schneider R. (1993) Aflatoxine B1 und G1, Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Ochratoxin A in Trockenfeigen mit BGY-Fluoreszenz. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 84, 523-526.

Studer-Rohr J., Dietrich D.R., Schlatter J. and Schlatter C. (1995) The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food and Chemical Toxicology in press.

Tätigkeitsbericht BAG 1993 (1994) Tätigkeitsbericht der Abteilung Vollzug Lebensmittelrecht und Lebensmittelwissenschaft des Bundesamtes für Gesundheitswesen 1993, Abteilung Lebensmittelwissenschaften, Sektion Lebensmittelchemie, c) Ochratoxin in Humanblutserum. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 85, 428-429.

Tsubouchi H., Terada H., Yamamoto K., Hisada K. and Sakabe Y. (1988) Ochratoxin A found in commercial roast Coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry 36, 540-542.

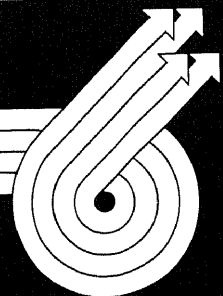
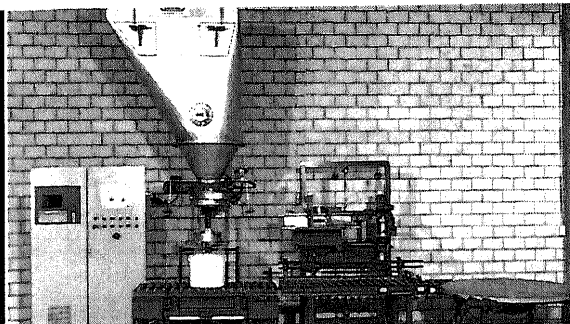
Tsubouchi H., Yamamoto K., Hisada K., Sakabe Y. and Udagawa S. (1987) Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with Aspergillus ochraceus. Mycopathologia 97, 111-115.

van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B. and Theron J.J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh. Nature 205, 1112-1113.

Zohri A.A. and Abdel-Gawad K.M. (1993) Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. Journal of Basic Microbiology 33, 279-288.

Ihr Partner für Dosieren und Wägen

Mit unseren Einzel- und Mehrkomponenten-Dosieranlagen, **ANAG Multi Dosimat**, beherrschen wir das Austragen, Dosieren und Verwägen von leicht- bis zähfließenden Schüttgütern. Zusammen mit der freiprogrammierbaren ANAG-Abfüllsteuerung erfüllt der ANAG-Dosimat die höchsten Ansprüche bei der Dosierung von Gross-, Klein- und Kleinstkomponenten. ANAG, Ihr Partner für die Zukunft. . .



ANAG
R. NUSSBAUMER AG

ANAG
Bonnstrasse 18
CH-3186 DÜDINGEN
Telefon 037-43 26 26
Telefax 037-43 30 85

ANAG + Co.KG
Im Schlot 7
D-74219 Möckmühl
Telefon 06298/5075
Telefax 06298/3370