

CHROM. 11,198

NEUE BESTIMMUNGSMETHODE DES MYKOTOXINS PATULIN MIT HILFE DER DÜNNSCICHT- UND HOCHDRUCKFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

U. LEUENBERGER, R. GAUCH und E. BAUMGARTNER

Kantonales Laboratorium, Postfach, CH-3000 Bern 9 (Schweiz)

(Eingegangen am 9. Mai 1978)

SUMMARY

The quantitative analysis of the mycotoxin patulin in fruit juices by high-pressure liquid or thin-layer chromatography

A new method of determining patulin in apple and grape juice is proposed. The juice is extracted with an Extrelut[®] column and the quantitative determination is made by high-pressure liquid or thin-layer chromatography with lower limits of 5 and 20 ppb (10⁹), respectively. The recovery is more than 90%. Compared with other methods the proposed procedure is faster, needs less solvents and is therefore suitable for serial investigations.

EINLEITUNG

Patulin (Fig. 1) (4-Hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2-(6H)-on) gehört in die Gruppe der Mykotoxine, die seit der Entdeckung der Aflatoxine 1960 immer grössere Aktualität erlangte. 1943 wurde Patulin von Anslow *et al.*, innerhalb der Forschungsgruppe Raistrick¹, in England entdeckt. Wegen seiner guten antibiotischen Wirkung und der vielen Pilzarten, die diesen Stoff bilden können, wurde es unabhängig von diesem ersten Befund wiederholt isoliert und mit verschiedenen Namen belegt²: Clavicin, Clavitin, Claviformin, Expansin, Leucopin, Mycoin *c*, Penicidin, Tercinin. Die wichtigsten Patulinbildner sind *Penicillium expansum* (*P. glaucum*), *P. urticae* (*P. patulum*, *P. griseofulvum*) und *Byssoschlamys nivea* (*pae cilomyces varioti*). *Penicillium expansum* kann bei Kernobst, Steinobst und manchen Gemüsearten Braunfäule verursachen^{3,4}. *Penicillium urticae* kommt häufig in verrottendem Pflanzenmaterial vor und *B. nivea* ist ein gefürchteter Verderber von Obst- und Gemüsesäften. Frank *et*

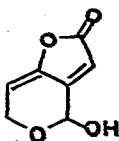


Fig. 1. Patulin.

*al.*³ wiesen Patulin in folgenden Früchten und Gemüsen nach: Apfel, Birne, Quitte, Pfirsich, Aprikose, Reineclaude, Erdbeere, Banane, Honigmelone, Gurke, Gemüsepaprika grün und rot, Möhre, Tomate. Spontanbefunde mit bis 1 ppm Patulin können vorliegen in Äpfeln, Birnen, Aprikosen, Pfirsichen, in Apfelsaft, Schimmelweizen. Im Apfelsaft ist das Toxin hitzestabil, soll aber durch Schwefeldioxid-Behandlung zerstört werden⁵.

Die übliche Extraktion von Patulin im Scheidetrichter geschieht mit Essigsäure-äthylester, die Reinigung des Extraktes mit Säulenchromatographie auf Kieselgel. Die quantitative Bestimmung auf Dünnschichtplatten ist mehrfach beschrieben^{6,7}. An Stelle der Dünnschichtchromatographie (DC) schlagen Ware *et al.*⁸ eine Hochdruckflüssigchromatographische (HPLC) Methode mit Kieselgelsäulen vor, währenddem Scott *et al.*⁹ und Rosen und Pareles¹⁰ die Bestimmung von Patulin mit Hilfe der Gaschromatographie durchführen.

Bei allen erwähnten Methoden wird eine Extraktion im Scheidetrichter durchgeführt, was relativ arbeits- und lösungsmittelintensiv ist. Aus diesem Grunde wird hier eine einfache Extraktion mit Hilfe von Extrelut[®]-Säule (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) vorgeschlagen, die das Aufarbeiten von Obstsaften ganz wesentlich vereinfacht und den Probendurchsatz erhöht. Gleichzeitig wird ein neues HPLC-System mit modifizierter Phase beschrieben, das eine quantitative Auswertung bis 5 ppb (10⁹) Patulin in Apfelsaft gewährleistet. Zur Bestätigung steht eine neue DC-Methode zur Verfügung, die es erlaubt, Patulinkontaminationen von mehr als 20 ppb quantitativ zu erfassen. Anschliessend kann eine zusätzliche Bestätigung durch *in situ* Derivierung des Patulins auf der DC-Platte erhalten werden.

EXPERIMENTELLES

Prinzip

Das wässrige Untersuchungsgut (z.B. Apfelsaft) wird direkt auf die Extrelut-Säule gegeben und dort adsorbiert. Das Trägermaterial besteht aus Diatomeenerde von körniger Struktur und grossem Porenvolumen¹¹. Mit einem organischen Lösungsmittelgemisch wird die Patulinfraction eluiert und direkt auf eine kurze Kieselgelsäule geleitet, um dort von weiteren störenden Begleitstoffen befreit zu werden. Das eingedampfte Eluat wird zur quantitativen Bestimmung mit HPLC oder DC in Essigester aufgenommen.

Aufarbeitung

Die Extraktionseinrichtung ist in Fig. 2 schematisch dargestellt. 25 ml wässrige Probe werden auf die Extrelutsäule gegeben und während 15 min adsorbiert. Anschliessend wird mit 210 ml Toluol-Essigester (3:1) und einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 3 ml/min auf die dicht angeschlossene Kieselgelsäule [7.5 g Kieselgel 60 (Art. 7734 Merck) mit 20 ml Eluens als slurry eingegossen], eluiert. Das in einem 250-ml Rundkolben aufgefangene Eluat wird unter vermindertem Druck bei ca. 40° bis nahezu zur Trockne eingedampft und unmittelbar anschliessend mit wenig Essigester quantitativ in ein kleines Reagenzglas überführt.

Das Lösungsmittel wird sodann bei ca. 40° unter einem Stickstoffstrom vollständig entfernt und sofort in 0.50 ml Essigester aufgenommen. Vor der flüssigchromatographischen Analyse wird die Probe durch ein 0.45- μ m Filter feinfiltriert.

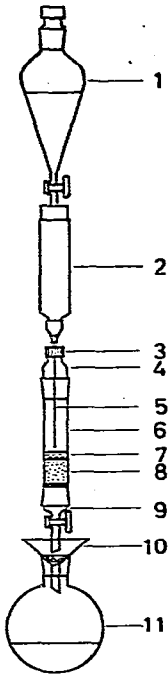


Fig. 2. Vorrichtung zur Extraktion des Patulins aus Fruchtsäften. 1 = 250 ml Scheidetrichter mit NS 29/32 und PTFE-Küken; 2 = Extrelut[®]-Säule; 3 = Sovirel[®]-Durchführung mit Septum; 4 = Übergangsstück mit NS 29/32; 5 = Kanüle 19 cm × 1.4 mm I.D. mit Lueranschluss; 6 = Glassäule 160 mm (Länge mit Schliffansätzen oben und unten), 30 mm I.D. 7 = Lösungsmittel; 8 = Kieselgel; 9 = Schliffkegelstück NS 29/32 mit eingesetzter Glasfritte GO und PTFE-Küken; 10 = Trichter mit kleinem Wattebausch; 11 = 250-ml Rundkolben.

Hochdruckflüssigchromatographie

Das HPLC-System bestand aus zwei Pumpen Modell 740, dem solvent programmer Modell 744 (Spectra Physics, Santa Clara, Calif., U.S.A.), dem Injektor U6K (Waters Assoc., Milford, Mass., U.S.A.), der Trennsäule μ Bondapak-CN (Waters Assoc.) mit einer mittelpolaren, chemisch gebundenen Cyanopropyl-Phase, dem UV-Detektor LC-55 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., U.S.A.) und dem Integrationssystem SP4000 (Spectra Physics). Der Gesamtfluss war 2 ml/min bei einem Säulenvordruck von ca. 600 p.s.i. Pumpe A förderte *n*-Hexan (Lichrosolv[®]; Merck), Pumpe B 5% (v/v) Butanol-1 in Dichlormethan (beides p.A. Merck). Der Gradient durchlief ein leicht konvexes Programm (Stellung 4 am solvent programmer) von 10 bis 50% B in 7 min, um nach weiteren 3 min die Säule während 5 min auf Anfangsbedingungen zu aequilibrieren. Der UV-Detektor arbeitete bei einer Wellenlänge von 275 nm.

Patulin-Standardlösung

5 mg Patulin rein (Art. 31630, Serva, Heidelberg, B.R.D.) werden mit Essigester quantitativ aus der Ampulle in einen 25-ml Messkolben gespült und zur Marke aufgefüllt (Lösung A). 1.25 ml der Lösung A werden in einen weiteren 25-ml Messkolben pipettiert und bei 40° rasch mit Stickstoff zur Trockne eingeblasen. Unmittelbar

anschliessend wird mit absolutem Aethanol zur Marke aufgefüllt (Lösung B). Von der Lösung B wird bei 275 nm in 1-cm Quarzküvetten die Absorption gegen absolutes Aethanol gemessen. Patulin-Konzentration in Lösung B = $E_{275 \text{ nm}} \cdot 10.548$ ($\mu\text{g/ml}$), in Lösung A = $E_{275 \text{ nm}} \cdot 10.548 \cdot 20$ ($\mu\text{g/ml}$) wobei $\epsilon = 14600$ (Lit. 7).

Die Lösung A wird mit Essigester so verdünnt, dass eine Patulinkonzentration von 2.5 $\mu\text{g/ml}$ resultiert (HPLC-Standardlösung). Je nach Patulingehalt der Probe werden 10–30 μl der Probelösung eingespritzt, was eine Nachweisempfindlichkeit bei Apfelsaft von ca. 5 ppb ergibt.

Im interessierenden Bereich von 0–600 ng pro Injektion besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Patulinmenge und Peakfläche. Die Fig. 3–5 illustrieren den Gradientenverlauf, die ungefähre Nachweisgrenze und den Nachweis von 6 ppb bzw. 50 ppb Patulin in Apfelsaft.

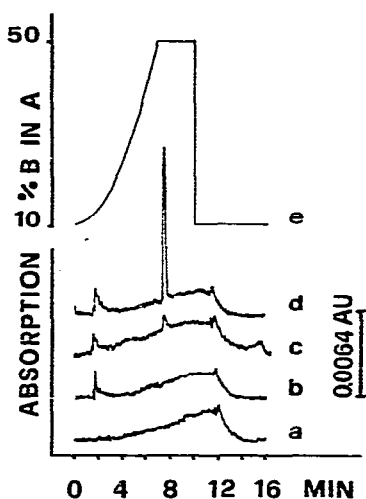


Fig. 3. HPLC-Chromatogramme von Standard-Lösungen (Bedingungen: siehe Text): a = Gradient ohne Injektion; b = 30 μl Essigsäureäthylester; c = 30 μl Essigsäureäthylester mit 8 ng Patulin; d = 30 μl Essigsäureäthylester mit 127 ng Patulin; e = Gradientform.

Dünnschichtchromatographie

Es werden DC-Alufolien Kieselgel 60 F (Merck, Art. 5554) mit dem Fliessmittel *n*-Hexan–Dichlormethan–Butanol (55:45:9) (p.A. Merck) verwendet. Die Patulin-Lösung A wird mit Essigester so verdünnt, dass eine Patulinkonzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ resultiert (DC-Standardlösung).

Auf die DC-Platte werden aufgetragen: (a) 30 μl Probeextrakt, (b) 30 μl Probeextrakt + 5 μl DC-Standardlösung, (c) 5 μl DC-Standardlösung (enthaltend 75 ng Patulin, entsprechend 50 ppb in der Probe). Nach dem Chromatographieren wird die Platte mit ca. 10 ml MBTH-Reagens [250 mg 2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methylbenzothiazolhydrochlorid (Merck, Art. 4527) in 25 ml Wasser gelöst] besprüht und während 15 min bei 130° erhitzt: Der R_f -Wert von Patulin beträgt in diesem System ca. 0.4.

Die quantitative Ausmessung geschah mit Hilfe eines Chromatogramm-Spektral-Fotometers (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) mit Messanordnung Monochro-

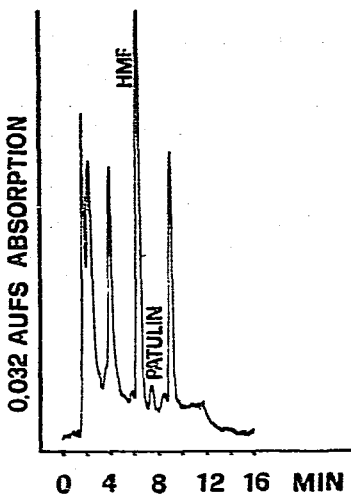


Fig. 4. HPLC-Chromatogramm eines Apfelsaftextraktes mit 6 ppb Patulin. Bedingungen: siehe Text. HMF = Hydroxymethylfurfurol.

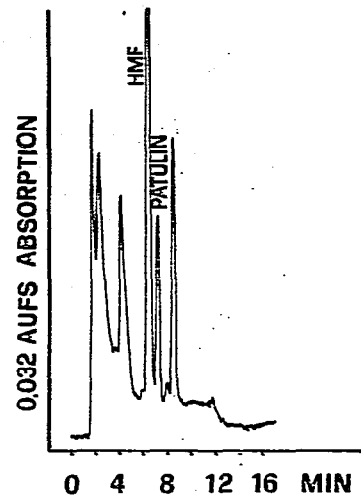


Fig. 5. HPLC-Chromatogramm eines Apfelsaftextraktes mit 50 ppb Patulin Bedingungen siehe Text. HMF = Hydroxymethylfurfurol.

mator-Probe (Remission) bei einer Wellenlänge von 420 nm und dem Integrations-system SP4000. Der Zusammenhang zwischen Patulinkonzentration und Peakfläche ist im uns interessierenden Bereich von 0 bis 75 ng pro Fleck linear; bei höheren Konzentrationen wird die Eichkurve leicht konvex gekrümmt.

Aus Fig. 6 sind Chromatogramm-Ausschnitte von Apfelsaft-Extrakten ohne und mit 20 bzw. 50 ppb Patulin ersichtlich.

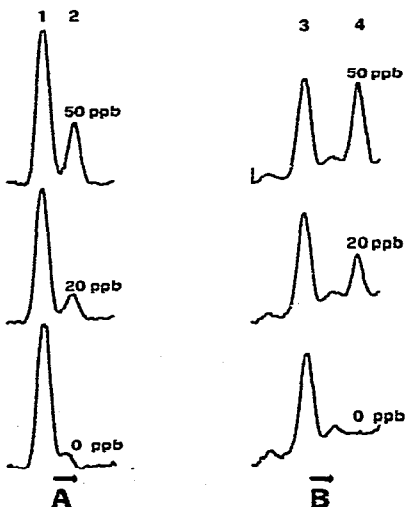


Fig. 6. Ausschnitte von Dünnschichtchromatogrammen eines Apfelsaftextraktes. (A) Nichtacetyliert: 1 = Hydroxymethylfurfurol mit $R_F = 0.3$, 2 = Patulin mit $R_F = 0.4$. (B) Acetyliert: 3 = Acetyl-Hydroxymethylfurfurol mit $R_F = 0.6$, 4 = Acetyl-Patulin mit $R_F = 0.75$. Bedingungen: siehe Text.

Bestätigung durch Derivatbildung

Falls die Patulinkonzentration 50 ppb (= Beanstandungsgrenze) übersteigt, kann zur Identifizierung eine weitere DC-Platte angesetzt werden, wobei jedoch 60 μ l aufgetragen werden. Zusätzlich werden auf jede Auftragsstelle 5 μ l Acylierungsgemisch, Essigsäureanhydrid-Pyridin (2:1, v/v), dosiert. Die Platte wird vor dem Chromatographieren 5 min liegengelassen und anschliessend 15 min mit dem warmen Fön (ca. 50°) angeblasen. Schicht: DC-Alufolie Kieselgel 60 F (Merck, Art. 5554); Fließmittel: Dichlormethan-Essigester (95:5); Nachweis: MBTH wie oben angegeben; R_F von Patulin: ca. 0.15; R_F von Acetyl-Patulin: ca. 0.75. Das Acetyl-Derivat von HMF und ein vom Acetylierungsgemisch stammender Fleck (nur bei 365 nm sichtbar) weisen R_F -Werte von ca. 0.6 auf.

RESULTATE UND DISKUSSION

Extraktion

Die beschriebene Extraktion von Patulin über käufliche Extrelut-Säulen erwies sich bei Serieuntersuchungen der bis anhin üblichen Extraktion im Scheidetrichter hinsichtlich Zeitaufwand als deutlich überlegen. Die Wiederfindungsrate beider Extraktionsmethoden ist etwa gleich; sie liegt bei $97 \pm 4\%$ wenn der Patulingehalt 50 ppb beträgt und die Bestimmung mit Hilfe der HPLC erfolgt (gemessen an acht Aufarbeitungen).

Bestimmung des Patulins im Extrakt

Bedingt durch bessere Auflösung, geringere Störung durch Begleitstoffe, niedrigere Nachweisgrenze und bessere Reproduzierbarkeit ist die quantitative Auswertung mittels HPLC derjenigen mittels DC vorzuziehen. Die relative Standardabweichung betrug bei einem Patulingehalt von 50 ppb und Bestimmung mittels HPLC $\pm 4\%$; mittels Densitometrie der DC-Platte $\pm 6\%$.

Wurde die besprühte DC-Platte durch Transmissions- bzw. Simultan-Messung bei 420 nm ausgewertet, so stieg die Empfindlichkeit um ca. das dreifache an, hingegen nahm auch die relative Standardabweichung zu. Störungen durch die Schichtstärke des Adsorbens, Glasdicke, Raumbeleuchtung wirkten sich nachteilig aus. Noch schlechtere Ergebnisse werden durch direkte Messung der Fluoreszenzlösung bei 254 nm erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Bestimmungsmethode von Patulin in Apfel- und Traubensäften beschrieben. Mit Hilfe von Extrelut®-Extraktionssäulen wird das Mykotoxin rasch und mit hoher Ausbeute ($97 \pm 4\%$) extrahiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch HPLC mit einer Nachweisgrenze von 5 ppb oder durch Densitometrie von Dünnschichtchromatogrammen (Nachweisgrenze ca. 20 ppb). Durch Vergleich des acetylierten Patulins mit DC oder HPLC kann qualitativ der Nachweis bestätigt werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden ist die vorliegende Extraktion weniger arbeits- und lösungsmittelintensiv und somit für Reihenuntersuchungen geeignet.

LITERATUR

- 1 W. K. Anslow, A. Raistrick und G. Smith, *J. Soc. Chem. Ind.*, 62 (1943) 236.
- 2 D. M. Wilson, in J. V. Rodricks (Editor), *Mycotoxins and other related food problems*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1977, Ch. 6, p. 90.
- 3 H. K. Frank, R. Orth und R. Hermann, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 162 (1976) 149.
- 4 H. K. Frank, R. Orth und A. Figge, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 163 (1977) 111.
- 5 A. E. Pohland und R. Allen, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 688.
- 6 H. Tanner und C. Zanier, *Obst-Weinbau*, 112 (1976) 656.
- 7 W. Horwitz (Editor), *Official Methods of Analysis of the Ass. Offic. Anal. Chem.*, Washington, D.C., 1975, Ch. 26, p. 21.
- 8 G. M. Ware, C. W. Thorpe und A. E. Pohland, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 1111.
- 9 P. M. Scott, W. F. Miles, P. Toft und J. Cr. Dubé, *J. Agr. Food Chem.*, 20 (1972) 450.
- 10 J. D. Rosen und S. R. Pareles, *J. Agr. Food Chem.*, 22 (1974) 1024.
- 11 J. Breiter, R. Helger und H. Lang, *Forensic Sci.*, 7 (1976) 131.