

CHROM. 11,752

Note

Méthode densitométrique de dosage de la patuline dans les jus de fruits

M. G. SIRIWARDANA et P. LAFONT

I.N.S.E.R.M., S.C.R. 8, Microbiologie Appliquée à l'Alimentation et à la Nutrition, 44 Chemin de Ronde, B.P. No. 40, 78110 Le Vesinet (France)

(Reçu le 22 janvier 1979)

La patuline est un métabolite commun à plusieurs espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, de *Gymnoascus* et à *Byssochlamys nivea*¹. Ce produit, qui fut d'abord étudié pour ses propriétés bactériostatiques, s'est avéré être un toxique: par injection sous-cutanée, il induit la formation de tumeurs²; d'autre part ses propriétés mutagènes ont été mises en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*³.

Les micromycètes producteurs de patuline sont largement représentés dans la mycoflore de denrées alimentaires diverses. Au cours des dernières années, la myco-toxine a été mise en évidence dans du jus de pomme^{4,5}, dans des fruits (pommes, poires, pêches, abricots, raisins, bananes, ananas)⁶. Différentes méthodes analytiques ont été proposées permettant de définir les taux de contamination^{4,7}; celle retenue par l'*Association of Official Analytical Chemists* a fourni, pour 20 laboratoires travaillant sur les mêmes échantillons, des résultats hétérogènes⁸. Cette observation nous a conduits à élaborer une méthode de dosage de la patuline utilisant un solvant organique miscible à l'eau, l'alcool isopropylique, et, comme agent de révélation sur chromatographie sur couche mince (CCM), l'acétate d'aniline.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillons

La méthode a été appliquée à l'analyse de jus de pomme soit industriels, soit préparés par nous-mêmes à partir de fruits sains ou altérés, et à celle de jus de raisin.

Le rendement du procédé d'extraction a été établi en utilisant des jus de pomme artificiellement contaminés par de la patuline cristallisée (Serva Feinbiochem, Heidelberg, R.F.A.).

Extraction

50 ml du jus de pomme sont additionnés de 50 ml du mélange isopropanol-acétate d'éthyle (60:40, v/v). Après une agitation de quelques minutes, on ajoute 10 g de chlorure de sodium et on poursuit l'agitation 3 min à température du laboratoire. L'adjonction de chlorure de sodium provoque une séparation de la phase organique et de la phase aqueuse. La première est soutirée, desséchée sur sulfate de sodium anhydre, concentrée, sous volume de 2 ml, sous vide en chauffant à 50° au maximum, puis reprise par 25 ml d'acétate d'éthyle et 75 ml de benzène.

Purification de l'extrait

Cette purification, par passage sur colonne de silice, est effectuée dans les conditions décrites par Scott⁸ (colonne de 15 g de silica gel 60, 200 mesh, Merck, Darmstadt, R.F.A.; élution par benzène-acétate d'éthyle (75:25, v/v); récupération de l'effluent correspondant à un volume d'élution compris entre 100 et 300 ml; concentration sous vide à 50°; solubilisation dans 500 ml de chloroforme).

Chromatographie sur couche mince

L'extrait et des dilutions successives d'une solution de patuline cristallisée à 1 µg/ml en chloroforme sont déposés sur couche mince de silice (silica gel 60). Une première élution est réalisée avec le mélange pentane-acétate d'éthyle (96:4, v/v); après évaporation, une seconde élution, dans la même direction, utilise le mélange éther isopropylique-pentane-éthanol-pyridine (84:12:4:0.8, v/v) en cuve à atmosphère non saturée. Après développement, les chromatogrammes sont laissés 1 h, à température ambiante, dans une pièce ventilée obscure, pour assurer l'élimination des solvants. Ils reçoivent ensuite, en pulvérisation, le réactif, préparé extemporanément: acide acétique glacial (0.9 ml), eau distillée (8.1 ml), aniline (1 ml). Les chromatogrammes sont chauffés 10 min à 80° et examinés sous irradiation UV (lampe Philips HPW 125). L'intensité de la fluorescence jaune-verdâtre de la patuline peut être appréciée à l'oeil nu, ou mesurée par densitométrie.

Dosage densitométrique

Il a été réalisé sur un fluorodensitomètre PH I 5, Vernon (Paris, France), pourvu d'une source "Mercure" (longueur d'onde de la lumière d'excitation: 256 nm; filtre Wratten 4A).

RÉSULTATS

La fiabilité de la méthode d'extraction par le mélange isopropanol-acétate d'éthyle a été étudiée en utilisant des jus de pomme commerciaux ou préparés au laboratoire et des jus de raisin, additionnés de patuline à des taux variant de 10 à 200 µg/l. Les résultats enregistrés au cours de cinq essais figurent dans le Tableau I. Dans l'ensemble de notre expérimentation la moyenne du pourcentage de récupération de la mycotoxine a été supérieure à 91 % (les résultats d'un certain nombre d'essais figurent dans le Tableau I).

La détection en CCM de la patuline par le réactif que nous employons correspond vraisemblablement à la formation d'une base de Schiff⁹ sous l'action de l'acétate d'aniline. La plus faible quantité de mycotoxine visible, dans ces conditions, sous irradiation UV, à l'oeil nu, est 0.004 µg.

Le dosage fluorodensitométrique apparaît possible dans les limites de concentration où la loi de Beer s'applique; ainsi que l'indiquent les valeurs portées dans le Tableau II, ces limites sont 0.010 et 0.1 µg.

Les mesures fluorodensitométriques doivent être effectuées dans l'heure suivant l'application du réactif sur le chromatogramme; pour pouvoir les faire ultérieurement, il convient de conserver le chromatogramme à l'obscurité, la couche mince étant couverte par une autre plaque de verre. En l'absence de ces précautions, une couleur brune se développe.

TABLEAU I

POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION DE LA PATULINE

Moyenne du pourcentage de récupération: 91.2; écart type: 5.2.

Quantité de toxine ajoutée ($\mu\text{g/l}$)	Quantité de toxine extraite (exprimée en % de la quantité de toxine ajoutée)				
	Jus de pomme commercial		Jus de pomme, non clarifié, fabriqué au laboratoire		Jus de raisin commercial
	1	2	1	2	
10	90	90	90	95	85
20	88	90	95	88	92
50	92	85	87	84	90
75	83	90	93	87	104
100	92	102	90	95	85
200	95	100	88	95	98

TABLEAU II

DOSAGE DENSITOMÉTRIQUE DE LA PATULINE

Quantité (Q) de patuline déposée (μg)	Moyenne (M) de surface de pic (mm^2) (n = 6)	Coefficient de variation (%)	$\frac{Q}{M}$
0.010	7.8	16.6	1.28
0.015	11.8	9.3	1.27
0.020	15.8	3.2	1.26
0.025	20.2	3.9	1.24
0.050	39.1	3.3	1.27
0.060	47.9	2.9	1.25
0.080	64.0	3.0	1.25
0.100	80.1	3.9	1.25
0.150	107.7	4.5	1.39
0.200	140.5	4.0	1.42

Différents solvants ont été utilisés pour développer les chromatogrammes sur couche mince. Ainsi que l'indiquent les données rassemblées dans le tableau III, le mélange éther isopropylique-pentane-éthanol-pyridine (84:12:4:0.8, v/v) présente l'avantage de séparer nettement la patuline de l'acide pénicillique; or ce dernier métabolite, produit par de nombreuses espèces fongiques, risque d'être présent dans des jus de fruit et réagit avec l'acétate d'aniline comme la patuline. D'autre part ce solvant d'éluion ne permet qu'une migration chromatographique limitée de substances absorbantes en UV normalement présentes dans l'extrait de jus de pomme.

TABLEAU III

VALEURS R_f DE LA PATULINE ET DE L'ACIDE PÉNICILLIQUE

Systèmes utilisés: 1, éther isopropylique-pentane-éthanol-pyridine (84:12:4:0.8); 2, toluène-acétate d'éthyle-90% acide formique (50:40:10); 3, chloroforme-acétone (90:10); 4, chloroforme-méthanol (95:5); 5, pentane-acétate d'éthyle (96:4).

	Système				
	1	2	3	4	5
Patuline	0.32	0.39	0.42	0.35	0
Acide pénicillique	0.23	0.41	0.40	0.35	0

DISCUSSION

Dans la méthode décrite ci-dessus, la concentration de l'extrait organique de jus de fruit est réalisée sans chauffage à une température supérieure à 50°. Dans des séries d'essais nous avons observé que le respect de telles conditions expérimentales évite la formation de substances fluorescentes sous irradiation UV, pouvant perturber le dosage de la patuline, et une perte apparente, partielle, de cette dernière. Il est vraisemblable que ces deux phénomènes, liés l'un à l'autre, correspondent à une réaction d'addition entre la mycotoxine à fonction lactone et des composés aminés, une réaction de ce type étant favorisée par l'élévation de la température¹⁰.

L'extraction par le mélange isopropanol-acétate d'éthyle permet de recouvrer 91 % de la patuline introduite dans un jus de fruit; d'autre part la répétition des essais a fourni des résultats quantitativement homogènes. Il semble qu'en matière de rendement cette méthode d'extraction est meilleure que celle préconisée par l'*Association of Official Analytical Chemists*⁸.

Reiss¹¹, ultérieurement Scott⁸, ont utilisé le chlorure de 3-méthyl-2-benzothiazolinone-hydrazone pour mettre en évidence la patuline en CCM.

La limite inférieure de détection de la mycotoxine, avec ce réactif, est de 0.010 µg, alors qu'avec l'aniline en milieu acétique elle atteint 0.004 µg. L'utilisation de ce dernier réactif permet d'autre part de ne pas avoir de coloration de la couche mince de silice ce qui facilite un dosage de la mycotoxine par densitométrie. Nous avons d'autre part noté que sous irradiation par un rayonnement UV non filtré, le spot de patuline présente une absorption après vaporisation d'aniline; cette absorption est visible en superposant le chromatogramme et une plaque de cellulose. Certaines observations nous conduisent à estimer que ce phénomène pourrait servir de base à un mode de confirmation de la présence de patuline dans un produit alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE*

- 1 D. M. Wilson, in J. V. Rodricks (Editor), *Mycotoxins and fungal related food problems*, Amer. Chem. Soc., Washington, 1976.
- 2 F. Dickens et H. E. H. Jones, *Brit. J. Cancer*, 15 (1961) 85.
- 3 V. W. Mayer et M. S. Legator, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 454.
- 4 P. M. Scott, W. F. Miles, P. Toft et J. G. Dube, *J. Agr. Food Chem.*, 20 (1972) 450.
- 5 D. M. Wilson et G. J. Nuovo, *Appl. Microbiol.*, 26 (1973) 124.
- 6 H. K. Frank, *Ann. Nutr. Alim.*, 31 (1978) 459.
- 7 W. T. Stott et L. B. Bullerman, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 58 (1975) 497.
- 8 P. M. Scott, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 621.
- 9 H. Schiff, *Chem. Ber.*, 20 (1887) 540.
- 10 C. H. Lea et R. S. Hannan, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 313.
- 11 J. Reiss, *J. Chromatogr.*, 86 (1973) 190.

* Voir aussi U. Leuenberger et R. Gauch, *J. Chromatogr.*, 161 (1978) 303 (*Rédacteur Journal of Chromatography*).