

# Mikotoxin vizsgálatok élelmiszerekben

## IV. Patulin meghatározása kapilláris gázkromatográfiával

BATA JÁRPÁD és LÁSZTITY RADOMIR  
BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1981. január 12.

Penicillium gombák által termelt szekunder metabolitot, a patulint antibiotikum kutatás során a 40-es évek elején fedezték fel. Az 1942–45 között megjelent publikációkban a patulin kémiai szerkezetének meghatározásáról, fermentációs előállításáról, kémiai szintéziséről olvashatunk. Gyógyászati felhasználásra való alkalmatlansága miatt hosszú ideig csak szórványosan találkozunk a vegyülettel. A 60-as évek közepétől újra megnőtt a patulin iránti érdeklődés. Ennek elsődleges oka az volt, hogy tesztvizsgálatokban mutagén anyagnak bizonyult és karcinogén anyagok közé sorolták be.

Az utóbbi években pontos, érzékeny analitikai meghatározási módszerek kidolgozása és használatának igénye merült fel, mivel a gyümölcslevek patulin tartalma a felhasznált nyersanyag minőségére ad felvilágosítást.

Jelen közleményben – rövid irodalmi áttekintést követően – patulin meghatározás egyes kérdéseivel foglalkozunk.

### A patulin biokémiája

Ma már nehéz eldönteni, hogy a patulin izolálásában, szerkezeti meghatározásában mely munkacsoportot, illetve laboratóriumot illeti az elsőbbség. *Chain* és munkatársai (1), továbbá *Wiesner* (2) a penicilliumok által termelt vegyület létét és kristályos előállítását végezték el. Ez az anyag volt az, amely később a patulin triviális nevet kapta. A szerkezeti azonosítást *Birkinhaw* és munkatársai (3), valamint *Anslow* és munkatársai (4) végezték el 1943-ban.

A vegyületet termelő gombák köre széles. Majd mindegyik penicillium törzs és néhány *Aspergillus* törzs is rendelkezik patulin szintetizáló képességgel. A *P. patulin* (3), a *P. expansum* (4), a *P. urticae* (5), a *P. divergens* (6), a *P. cyclopium* (13), a *P. clavifonne* (15) törzsekről állapították meg azt, hogy patulint szintetizálnak.

Az *Aspergillus*ok közül az *A. terreus* (5), az *A. giganteus* (7), valamint az *A. clavatus* (8, 9) képes patulint szintetizálni.

Mind az említett *Penicillium*, mind az *Aspergillus* gomba a táptalajjal szemben nem túlzottan igényes. Jobban szaporodik a szételtárt (oldott) alakban tartalmazó táptalajon, mint a keményítő vagy cellulóz alapú táptalajokon. A szaporodási optimumuk 20–25 °C között és magas, 85–100%-os relatív páratartalomnál van. Ez az optimum nemcsak a gomba növekedésére, hanem a toxin termelésre is vonatkozik. Az optimálisnál alacsonyabb hőmérsékleten a gomba

szaporodása csökken. A relatív páratartalom 80% alatti értékénél a gombák nem szaporodnak.

A patulin jól oldódik metanolban, etanolban, etilacetátban. Vizes alkáliákban nem stabil, de savakkal szemben meglehetősen ellenálló (1). Stabilan eltartható kloroformban, benzolban, diklórmétánban (11), de az oldószer elpárolgása után gyorsan bomlik (12).

### A patulin élettani hatása

Akut toxikus anyag. Jellegzetesen patulin mérgező hatás a tüdő és az agyvelő ödémája, vértódulás tüdőben, vesében, májban, lépben (11). Bőr alatti injekciózással nőstény patkányokban szarkoma megjelenését váltja ki (16). Embernél émelygést, gyomor irritációt vált ki. 1%-os kenőcsös kezeléssel bőr ödéma (37) váltható ki. Állatkísérletben mért LD<sub>50</sub> értékeit az 1. táblázatban mutatjuk be.

Mutagenitási tesztekben ellentmondó eredményt mutat. A *Bacillus subtilis* teszt esetében mutagen pozitív (21). *Salmonella typhimurium* esetében mutagen negatív (22) eredményt mutatott. Az 1976. évi IARC ajánlásban a karcinogén anyagok közé sorolták (23).

1. táblázat

A patulin LD<sub>50</sub> értékei

Teszt állat	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hivatkozás
Egér	8–10 sc.	Katzmann mts. (17)
	15 sc.	Broom mts. (18)
	15,6 iv.	Yamamoto mts. (19)
	25 iv.	Broom mts. (18)
	5,7 ip.	Ciegler mts. (19)
	15 ip.	Hofmann mts. (15)
Patkány	15 ip.	Broom mts. (18)
	15 ip.	Broom mts. (18)
	25 sc.	Katzmann mts. (17)
Tyúk	25 iv.	Broom mts. (18)
	170 iv.	Lovett (20)
Csírke embrió	2,35 µg/ embrió	Ciegler mts. (19)

sc. subcutális adagolás  
ip. intraperitoriális adagolás  
iv. intravénás adagolás

### A patulinnal szennyezett termékek detoxikálásáról

Több publikáció foglalkozik a patulin savas közegben és hőhatására bekövetkező bomlásával. Ezek között a közlemények között magyar szerzők nevei is megtalálhatók (38, 39). Az említett szerzők a PH hatására történő bomlás kinetikáját, valamint a PH és hőhatásra bekövetkező változások kinetikáját vizsgálták.

### A patulin kémiai kimutatása

A patulint tartalmazó minta extrahálására poláris vagy közepesen poláris szerves oldószert javasolnak. *Polzhofer* (24) acetonos extrakciót ajánl gyümölcsminták esetében. *Jesefsson és Möller* (25) gyümölcslevekekhez a kloroformos extrakciót találta megfelelőnek. Az AOAC módszerkönyv a minták extrahálására etilacetátot javasol (27).

A minta további feldolgozása a szerves fázis bepárlása, majd szilikagéles oszlopkromatográfiás tisztítás. A toxin eluálására benzol – etilacetát 75:25 elegyet javasol az AOAC módszer (27).

A toxintartalom meghatározására több futtató elegy keveréket javasolnak:

benzol	– metanol	9:1	(28)
etilacetát	– víz	10:1	(28)
kloroform	– metanol	97:3	(29)
kloroform	– aceton	2:1	(26, 27)
kloroform	– metanol	95:5	(26, 27)

A vékonyréteg lap kiértékelése UV lámpa alatt – mivel a patulin nem mutat fluoreszcenciát – nem lehetséges.

A kiértékelésre több permetezhető reagens használatos, ezek érzékenysége jelentősen eltér. Ismertebb reagenták a következők:

- O-dianisidin reagenssel lefűvés után a patulin vöröses-barna foltot ad, a kimutatási hatás  $0,2 \mu\text{g/folt}$  (32).
- N-metilbenztioazon-2-hidrozin reagenssel ugyancsak barna folt keletkezik a meghatározási határ  $0,1 \mu\text{g/folt}$  (32).
- 4%-os fenilhidrazinnal lefűjva, majd  $100^\circ\text{C}$ -os szárítószekrénybe helyezve a lapot 5 – 10 percre, sárga folt észlelhető, a meghatározási határ  $0,1 \mu\text{g/folt}$  (31).
- 1%-os vizes fenilhidrozin hidroklorid reagenssel lefűjva, majd  $100^\circ\text{C}$ -os szárítószekrénybe helyezve 3–5 percig lényegesen jobb érzékenységet lehet elérni, a patulin foltja narancssárga lesz, a detektálási határ  $0,02$  –  $0,05 \mu\text{g/folt}$  (12).

Gázkromatográfiás meghatározás közvetlenül a patulin vagy annak szililéter vagy acilezett származékának mérésével történik. Megosztófázisként nem, vagy kevésbé poláris fázisokat javasol az irodalom (35).

Nagynyomású folyadék kromatográfiás meghatározásra  $\text{C}_{18}$  reverz fázisú oszlopot ajánlanak (36).

### A kísérleti munka és eredményei

Munkánk céljaként egy megbízható analitikai módszer kidolgozását határoztuk meg. E módszert úgy választottuk meg, hogy  $10 \mu\text{g/kg}$  –  $1 \text{ mg/kg}$  koncentrációtartományban alkalmas legyen almalevek, almasüritmények toxintartalmának megbízható meghatározására.

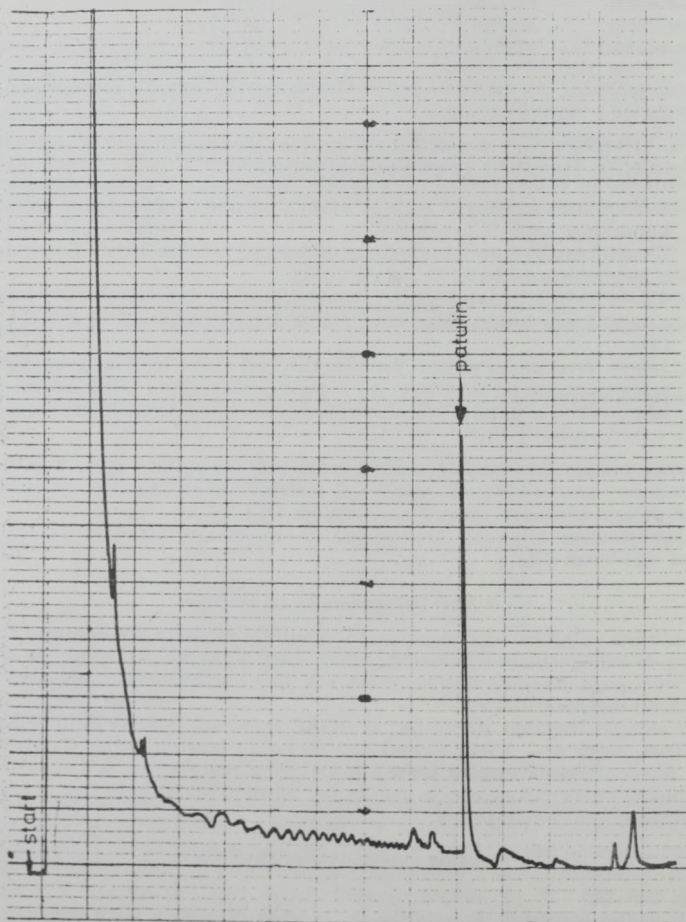
Az előzetes irodalmi áttekintés, az AOAC standard módszer kipróbálása után úgy láttuk, hogy a – VRK technikával  $50 \mu\text{g/kg}$  meghatározási határt tudunk elérni. Munkánkban  $10 \mu\text{g/kg}$  szinten kívántuk a patulint meghatározni, ezért a VRK módszernél érzékenyebb és pontosabb meghatározási módszert, a kapilláris gázkromatográfiát választottuk.

### A minta extrakciója és tisztítása\*\*

$20 \text{ cm}^3$  (25–26 g) almasüritményt  $3 \times 20 \text{ cm}^3$  etilacetáttal extraháltunk. Az etilacetátos fázisokat egyesítettük és 3 g vízmentes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -val megszártítottuk. Majd vákuum rotadeszten közel szárazra pároltuk. Az oldószer utolsó néhány  $\text{cm}^3$ -ét szobahőmérsékleten  $\text{N}_2$  áramban szárazra pároltuk. Az oldószermentes, ola-

\*\* Minden felhasznált oldószer kereskedelmi forgalomban kapható oldószer volt, felhasználás előtt kétszer desztilláltuk.

josan folyó maradékot 10 cm<sup>3</sup> 2% v/v etilacetátot tartalmazó benzolban feloldottuk és 10×1 cm Kieselgél 60 oszlopra vittük. 10 cm<sup>3</sup> benzollal eluáltuk a lipideket, majd 15 cm<sup>3</sup> benzol-etilacetát 2:1 arányú eleggyel eluáltuk a toxint. Ez utóbbi eluátumot N<sub>2</sub> áramban szobahőmérsékleten szárazra pároltuk és kúpos edényben 200 mm<sup>3</sup> etilacetátban feloldottuk.



1. ábra

20 ng patulin standard kromatogramja

Oszlop: OV 1-vel nedvesített 15 m hosszú 0.25 mm id. üveg kapilláris; Termosztát hőmérséklete: 60–140 °C 5 °C/min.; Injektor hőmérséklete: 140 °C; Detektor hőmérséklete: 160 °C; Vívógáz: H<sub>2</sub>; Vívógáz nyomása: 50 kPa; Split arány: 1:15; Erősítés: 1×10<sup>-11</sup> A; Kováts index: 15,75.



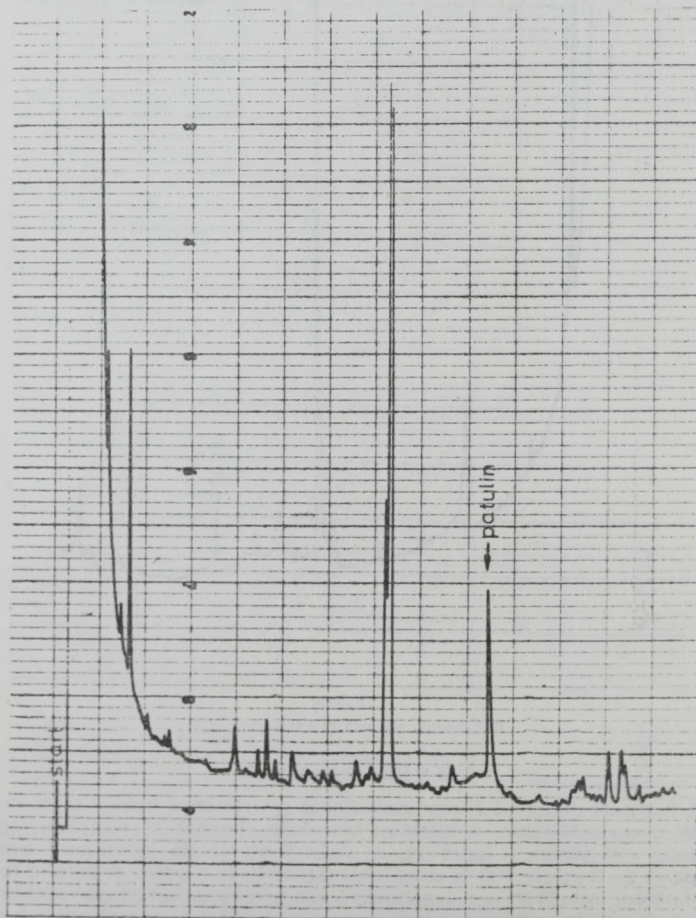
2. ábra  
Patulinmentes almálé kromatogramja

### A VRK meghatározás

A tisztított mintából 2 mm<sup>3</sup> csehszlovák gyártmányú Sylofol lapra cseppentettünk üvegapillárrissal. A futtatást kloroform-metanol 9:1 elegyben végeztük. A patulin előhívására a lapot 1%-os vizes fenilhidrozin hidroklorid reagenssel lefújtuk és 2–3 percere 100 °C-os szárítószekrénybe helyeztük. A patulin narancssárga foltként jött elő  $R_f = 0,5$  értéknél. A meghatározási határt ezen körülmények között 0,01 µg/folt értéknek találtuk. Ezzel a módszerrel 50 µg/kg legkisebb patulin koncentráció meghatározására nyílt lehetőség. Az 50 µg/kg értéknél nagyobb patulin koncentráció esetében szemikvantitatív kiértékelést végeztünk.

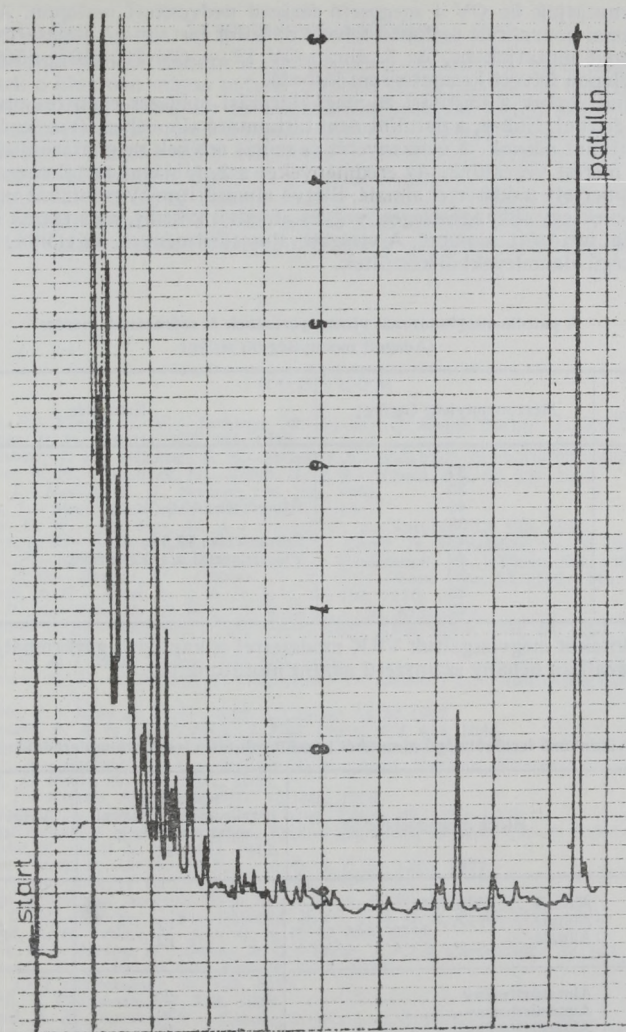
### A kapilláris gázkromatográfiás meghatározás

A tisztított és 200 mm<sup>3</sup> etilacetátban oldott mintából 100 mm<sup>3</sup>-t kivettünk és egy 1 cm<sup>3</sup>-es ampullába tettük. A mintát N<sub>2</sub> áramban szárazra pároltuk. A száraz maradékhoz 50 mm<sup>3</sup> BSTFA (N,O-Bis-trimetilszilil-trifluoracetamid) reagenst adtunk hozzá. Az ampullát leforrasztottuk 60 °C-on 2 percig tartottuk, utána az ampullát lehűtöttük és a reakcióelegyből 1 mm<sup>3</sup>-t injektáltunk be a készülékbe. Szemléltetésként néhány kromatogramot bemutatunk. A 2. ábrán patulin standard kromatogramja látható. A 3. ábrán egy patulint nem tartalmazó almálé kromato-



3. ábra

12 ppb patulintartalmú almálé minta kromatogramja



4. ábra

50 pp patulin tartalmú almálé minta kromatogramja

Oszlop: OV 17–OV 210 (50–50%) nedvesítővel töltött 15 m hosszú 0,25 id. üveg kapilláris;  
 Termosztát hőmérséklete: 80–140 °C 4 °C/min.; Injektor hőmérséklete: 140 °C; Detektor hő-  
 mérséklete: 150 °C; Vívógáz: H<sub>2</sub>; Vívógáz nyomása: 50 kPa; Split arány: 1:15; Erősítés:  $1 \times 10^{-11}$ ;  
 Kováts index: 17,71

gramját mutatjuk be OV 1 megosztó fázissal nedvesített oszlopon. A 4. ábrán OV 1 fázissal nedvesített oszlopon felvett patulint tartalmazó almasűrítmény kromatogramját mutatjuk be. Az 5. ábrán OV 17 – OV 210 (50%–50%) kevert fázisú oszlopon felvett kromatogram látható.

Meghatároztuk a tisztítási és meghatározási módszer együttes visszanyerési és szórás értékét. Ehhez, a patulint nem tartalmazó almaleéhez 50 µg/kg koncentrációban patulint adtunk. A visszanyerés és szórás értékek meghatározásához 9 párhuzamos mérést végeztünk. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

Az ismertett módszerrel almale, illetve almasűrítmény mintákat vizsgáltunk. Az almalevek egy része egészséges, vegyes almából készült, más részük különböző mértékben, fertőzött almából. A vizsgált almasűrítmények az előbbi, különböző fertőzöttségű almalevekből készültek.

A patulin-meghatározás visszanyerésének és szórásának mérése

2. táblázat

(Adagolt mennyiség 50 µg/kg)

Minta sorszám	Mért mennyiség (µg/kg)	Értékelés
1.	37	Átlagérték: 40,0 (µg/kg) Szórásérték: 12,5 % Visszanyerési százalék: 80 %
2.	35	
3.	40	
4.	39	
5.	43	
6.	47	
7.	39	
8.	38	
9.	42	

A mintákat megvizsgáltuk VRK módszerrel és kapilláris gázkromatográfiával. A 3. táblázatban néhány számszerű adatot mutatunk be.

3. táblázat

Különböző fertőzöttségű almából készült minták vizsgálatának eredményei

Minta sorszám	Minta megnevezése	Kapilláris gázkromatográfiával mért mennyiség µg/kg	VRK-val mért érték
1.	Almalé .....	..	–
2.	Almalé .....	13	–
3.	Almalé .....	12	–
4.	Almasűrítmény .....	20	–
5.	Almasűrítmény .....	30	–
6.	Almasűrítmény .....	45	– +
7.	Almasűrítmény .....	50	+
8.	Almasűrítmény .....	60	+
9.	Almasűrítmény .....	70	+
10.	Almasűrítmény .....	75	+
11.	Almasűrítmény .....	85	+
12.	Almasűrítmény .....	105	++
13.	Almasűrítmény .....	200	++

– negatív eredmény, folt nem látható  
 + van patulin folt  
 ++ erős patulin folt



## Az eredmények értékelése

A patulin meghatározására szolgáló módszerek közül a VRK meghatározási eljárás csak a kiugróan magas patulintartalmú (50 µg/kg feletti) minták vizsgálatára alkalmas. Sok országban az almasűrítvényekben legfeljebb 20–30 µg/kg patulint engedélyeznek. Ilyen koncentrációjú szennyezés meghatározása csak a VRK módszernél érzékenyebb analitikai módszerekkel történhet. E lehetséges módszer egyik változata a kapilláris gázkromatográfia.

Munkánkban 10 µg/kg szinten tudtuk kimutatni megbízhatóan a patulint. Mindezek alapján a kapilláris gázkromatográfias módszer alkalmas a legszigorúbb minőségi követelményeknek is eleget tevő levek és sűrítvények ellenőrző vizsgálatára.

## IRODALOM

- [1] Chain, E.—Florey, H. W.—Jennings, M. A.: Brit. J. Exptl. Pathol. 23, 202, 1942.
- [2] Wiesner, B. P.: Nature, 149, 356, 1942.
- [3] Birkinhaw, J. H.—Michael, S. E.—Bracken, A.—Raistrick, H.: LANCET, 245, 625, 1943.
- [4] Anslow, W. K.—Raistrick, H.—Smith, G.: J. Soc. Chem. Ind. 62, 236, 1943.
- [5] Kent, J.—Heatley, N. G.: Nature, 156, 295, 1945.
- [6] Barta, J.—Mecir, R.: Experientia, 4, 277, 1948.
- [7] Florey, H. W.—Jennings, M. A.—Philpot, F. J.: Nature, 153, 139, 1944.
- [8] Hooper, L. R.—Anderson, H. W.—Skell, P.—Carter, H. E.: Science, 99, 16, 1944.
- [9] Bergel, F.—Morrison, A. L.—Moss, A. R.—Rinderknerl, H.: J. Chem. Soc. 415, 1944.
- [10] Engel, B. G.—Brzeski, W.—Plastner, P. A.: Helv. Chim. Acta, 32, 1166, 1946.
- [11] Pohland, A. E.—Allen, R.: J. A. O. A. C. 53, 688, 1970.
- [12] Scott, P. M.—Kennedy, B. P. C.: J. A. O. A. C. 56, 813, 1973.
- [13] Efimenko, O. M.—Yakimov, P. A.: Tr. Leningr. Khim-Farm. Inst. 88, 1960. Chem. Abst. 55, 21470 f, 1961.
- [14] Bergel, F. A. L. et al: Nature, 152, 750, 1943.
- [15] Hofmann, K. H.—Mintzloff, J.—Alperden, J.—Leistner, L.: Fleischwirtschaft, 51, 1534, 1971.
- [16] Dickens, F.—Jones H. E. H.: Brit. J. Cancer, 15, 85, 1961.
- [17] Katzmann, P. A. és munkatársai: J. Biol. Chem. 154, 475, 1944.
- [18] Broom, K. A. és munkatársai: Brit. J. Exp. Pathol. 25, 195, 1944.
- [19] Ciegler, A.—Beckwith, A. C.—Jackson, L. K.: Appl. Environ. Microbiol. 37, 664, 1976.
- [20] Lovett, J.: Poultr. Sci. 51, 2097, 1972.
- [21] Ueno, J.—Kobuta, K.: Cancer Res. 36, 445, 1976.
- [22] Malaville, C.—Bartsch, H.: Pure and Appl. Chem. 49, 1753, 1977.
- [23] IARC Evaluation of the Carcinogen Risk of Chemicals to Man Vol. 10, IARC Lyon 1976.
- [24] Polzhofer, K.: Z. U. L. 163, 272, 1977.
- [25] Jeseffson B. G. E.—Möller, T. E.: J. A. O. A. C. 60, 1369, 1977.
- [26] Scott, P. M.: J. A. O. A. C. 57, 621, 1974.
- [27] Official Methods of Analysis 10-th Ed. A. O. A. C. Washington D. C. 1970.
- [28] Ware, C. M.—Thorpe, L. W.—Pohland, A. P.: J. A. O. A. C. 57, 1111, 1974.
- [29] Pohland, A. E.—Allen, R.: J. A. O. A. C. 53, 686, 1970.
- [30] Pero, R. W.—Harvan, D.—Owens, R. G.—Snow, J. P.: J. Chromatogr. 65, 501, 1972.
- [31] Yamamoto, T.: J. Pharm. Soc. Jap. 76, 1375, 1956.
- [32] Reiss, J.: J. Chromatogr. 86, 190, 1973.
- [33] Reio, L.: J. Chromatogr. 1, 338, 1958.
- [34] Pohland, A. E.—Sanders, K.—Tanabe, C. W.: J. A. O. A. C., 53, 692, 1972.
- [35] Scott, P. M.—Miles, W. F.—Toft, P.—Duba, J. G.: J. Agric. Food. Chem. 20, 450, 1972.
- [36] Blaicher, G.—Woidich, H.—Phannhauser, W.: Nutrition, 27, 201, 1980.
- [37] Freerksen, E.—Bönicke, R.: Exp. Med. Surg. 4, 274, 1951.
- [38] Farkas J.-né—Schreiner E.-né: ÉVIKE, 23, 16, 1977.
- [39] Farkas J.-né—Schreiner E.-né: ÉVIKE, 24, 35, 1978.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ МИКОТОКСИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТУЛИНОВ ПРИ ПОМОЩИ КАПИЛЛЯРНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*А. Бата — Р. Ласзитъ*

Из среди методов определения патулинов тонкослойнохроматографический (ТСХ) способ подходящий только для исследования яблочных соков и яблочных концентратов зараженных концентрацией выше 50  $\mu\text{г}/\text{кг}$ . Методом капиллярно-газовойхроматографии можно достигнуть 28  $\mu\text{г}/\text{кг}$  предельную величину обнаружения. Определение проводили на стеклянной капиллярной колоне собственного производства, по двум фазам, на одной неполярной OV 1 разделительной — и на одной среднеполярной OV 17—OV 210 (50—50) смешанной фазе. На обеих фазах определили индекс патулина согласно Ковачу. Разработанными методами исследовали яблочные соки и яблочные сгустки зараженных в неодинаковой степени. Капиллярный газохроматографический способ подходящий для высокочувствительной контрольной проверки продуктов.

#### MYCOTOXIN-UNTERSUCHUNGEN IN LEBENSMITTELN. IV. BESTIMMUNG VON PATULIN MITTELS KAPILLARER GASCHROMATOGRAPHIE

*Á. Bata und R. Lásztity*

Von den zur Bestimmung des Patulins dienenden Methoden ist das dünn-schicht-chromatographische Verfahren (TLC) nur zur Untersuchung von solchen Apfelsäften und Apfelkonzentraten geeignet, die mit einer Patulinkonzentration von mehr als 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  verunreinigt sind. Mit der kapillaren Gaschromatographischen Methode ist aber eine Nachweisgrenze von 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  erreichbar. Die Bestimmungen wurden mit einer im eigenen Laboratorium hergestellten glaskapillaren Kolonne durchgeführt, auf zwei Phasen, mit einem nichtpolaren OV 1 Verteiler und auf einer polaren OV 17—OV 210 (50—50) gemischten Phase durchgeführt. Auf beiden Phasen wurde der Kováts-Index des Patulins bestimmt. Mittels der entwickelten Methoden wurden solche Säfte und Konzentrate untersucht, die aus in unterschiedlichem Mass infizierten Apfelmustern bereitet wurden. Das kapillare Gaschromatographische Verfahren erwies sich dabei als geeignet zur hochempfindlichen Kontrolluntersuchung der Produkte.

#### MYCOTOXIN INVESTIGATIONS IN FOODS. IV. DETERMINATION OF PATULIN BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY

*Á. Bata and R. Lásztity*

Among the methods available for the determination of patulin the thin layer chromatographic method (TLC) is suitable only for the investigation of apple juices and apple concentrates contaminated with a patulin concentration over 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . However, by the capillary gas chromatographic method a detection limit of 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  can be attained. The determinations were carried out in a glass capillary column prepared in their own laboratory, on two phases, with a non-polar OV 1 distributor and a polar OV 17—OV 210 (50—50) mixed phase. The Kováts index of patulin was determined on both phases. Juices and concentrates obtained from apples infected in various degrees were investigated by the developed methods. The procedure based on capillary gas chromatography proved suitable, for a very sensitive control test of the products.