

ANALIZA PATULINA U JABUČNOM SOKU

S. Duraković¹, B. Radić², F.V. Golem³, Z. Duraković³, T. Beritić⁴,
Lj.M. Lalić¹

Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu¹,
Institut za medicinsku istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu², Medicinski
fakultet Sveučilišta u Zagrebu³, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti⁴, Zagreb, Hrvatska

Primljeno 13. listopada 1992.

Istraživana je mogućnost kvantitativnog određivanja patulina u jabučnom soku. Postupak je uključivao ekstrakciju patulina iz soka s pomoću etil-acetata, pročišćavanje ekstrakata kromatografijom na stupcu silikagela te kvalitativno i kvantitativno određivanje s pomoću tankoslojne kromatografije. Izlaganjem ploča za tankoslojnu kromatografiju koncentriranim parama amonijaka dobiveni su derivati s intenzivnijom fluorescencijom, što je olakšalo kvantitativno fluorodenzitometrijsko određivanje patulina. Granična koncentracija, što se s pomoću upotrijebljene metode mogla odrediti, bila je 200 ng čistog patulina i 100 µg patulina na litru soka. Djelotvornost postupka bila je od 78 do 110%, a prosječna vrijednost djelotvornosti bila je 98%.

Cljučne riječi: analitičke metode, fluorodenzitometrijska metoda, kromatografska tehnika, mikotoksini, plijesni

Patulin, uz aflatoksine i penicilinsku kiselinu pripada karcinogenim metabolitima različitih vrsta plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Ti mikroorganizmi često kontaminiraju velik broj namirnica, pa je rast plijesni i sinteza njihovih toksičnih metabolita (mikotoksina) u namirnicama potencijalna opasnost za zdravlje ljudi (1-8). Biosinteza mikotoksina u namirnicama ovisi o temperaturi okoliša, vrsti namirnice, vrsti plijesni i o ostalim okolišnim uvjetima. Između njih, temperatura i supstrat opisani su kao najvažniji parametri što utječu na rast plijesni i biosintezu mikotoksina. Niska temperatura, primjerice, inhibira rast nekih plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* i sprečava sintezu aflatoksina, dok velik broj sojeva plijesni iz roda *Penicillium* može rasti pri niskim temperaturama i sintetizirati patulin i penicilinsku kiselinu (6, 9-11). Velik broj različitih supstrata osnova je fungalnog rasta i sinteze mikotoksina do različitih opsega (2, 3, 7, 8, 10-14).

Patulin, jedna od najmanjih, ali ne i najjednostavnijih molekula među mikotoksinima, mnogo je obećavao kao antibiotik širokog spektra prije nego što mu je dokazana toksičnost. Kao kemijski spoj patulin je nestabilan, ali mu se stabilnost povećava pri niskim pH vrijednostima (npr. u voćnim sokovima). Osobito je stabilan u jabučnom soku, pa

su u komercijalnim sokovima pronađene koncentracije patulina i do $1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (15, 16). Tako visoke koncentracije patulina posljedica su kontaminacije plodova izrazitim producentom toga mikotoksina – plijesni *Penicillium expansum* (16). Patulin je toksičan za mnoge biološke sustave, ali njegovo značenje u izazivanju bolesti u ljudi i životinja nije još sasvim objašnjeno (17). Oralna doza (LD_{50}) u miševa iznosi $35 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ tjelesne mase a, injicirane pod kožu, subletalne doze inducirale su u štakora potkožne sarkome (18, 19).

Prisutnost patulina i ostalih toksičnih i karcinogenih mikotoksina u namirnicama i krmivima dovela je do široko koncipiranih istraživanja povezanih s kemijskim spojevima što inhibiraju rast plijesni i/ili sintezu mikotoksina i razvoj metoda za njihovo određivanje (20-26). Metode analize patulina uključuju spektrofotometriju (15), tankoslojnu kromatografiju (26, 27), plinsku kromatografiju (8, 28) i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (12, 29, 30).

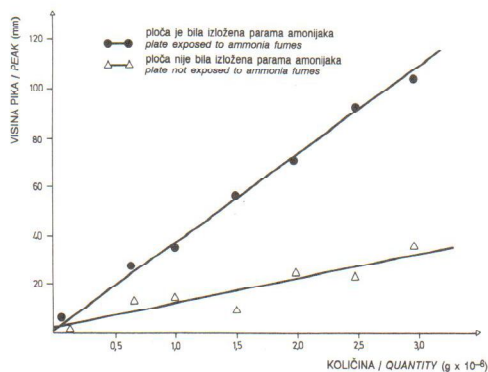
Jabuke, a i proizvodi od njih dobiveni, uvelike se upotrebljavaju u prehrani stanovništva u nas. Imajući na umu da je plijesan *Penicillium expansum* glavni uzročnik kvarenja uskladištenih jabuka, a da je patulin izoliran iz kontaminiranih plodova i jabučnog soka, zadatak ovih istraživanja bio je da se istraži mogućnost fluorodenzitometrijskog određivanja patulina u jabučnom soku, i da se procijeni veličina pogreške tijekom kvantitativnog određivanja patulina tom metodom.

MATERIJAL I METODE

Pripravljene su otopine standarda patulina (Sigma Chemical Co, St. Louis) u kloroformu ($c = 20\text{--}200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) i na ploče za tankoslojnu kromatografiju nanoseno je u trostrukom pokusu $5\text{--}20 \text{ } \mu\text{l}$ takvih standarda (ploče Merck - Darmstadt, $20 \times 20 \text{ cm}$; sloj silikagela F_{254}). Ploče su razvijene u sustavu otapala benzen : metanol : octena kiselina (90:5:5), a suvišak otapala bio je uklonjen s ploča u struji vrućeg zraka (26). Osvjetljavanjem kratkovalnom UV lampom zabilježene su razvijene crvenoljubičaste mrlje patulina koje su imale R_f vrijednosti od 0,18. Koncentracija patulina u mrljama određena je s pomoću fluorodenzitometra »Camag« - T-Scanner s W + W pisačem, metodom gašenja fluorescencije (24). Maksimum apsorpcije dobiven s pomoću primarnog filtra bio je 254 nm, a maksimum emisije, dobiven s pomoću sekundarnog filtra bio je 415 nm. Odziv fluorodenzitometra bio je udešen na nulu na površini prazne ploče za tankoslojnu kromatografiju sa slojem silikagela F_{254} . Izmjerene su u milimetrima visine vrhova kojih su se R_f vrijednosti podudarale i, kao srednje vrijednosti serija od po tri usporedna pokusa ucrtane su u koordinatni sustav. Potom su ploče izložene parama koncentriranog amonijaka u kadi za razvijanje, da se dobiju mrlje s intenzivnijom fluorescencijom (4). Nakon izlaganja parama koncentriranog amonijaka, mrlje patulina su fluorescirale plavo pod dugovalnim UV svjetlom. Fluorodenzitometrijskim mjerenjem zabilježeni su vrhovi kojih su visine (srednje vrijednosti tri usporedna vrha) ucrtane u koordinatni sustav u ovisnosti o količini patulina nanosenog na tanki sloj. Tako su dobivene baždarne krivulje za određivanje patulina na tankom sloju (slika).

Analiza patulina u jabučnom soku

U deset uzoraka od po litru jabučnog soka dobavljena iz trgovine, dodan je standard patulina u rasponu koncentracija od 100 do $1500 \text{ } \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (tablica). Nakon homogeniziranja preneseno je po 100 ml svakog uzorka u 10 Erlenmeyerovih tikvica od 500 ml. Patulin je ekstrahiran i pročišćen prema metodi što su je opisali Scott i Kennedy (26). Ekstrakcija



Slika. Baždarna krivulja za fluorodenzitometrijsko određivanje patulina
Figure. Calibration curve for fluorodensitometric determination of patulin

Tablica. Dodane i ponovno određene koncentracije patulina u jabučnom soku
Table. The recoveries of added patulin concentrations in apple juice

Dodano / Added ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	\bar{X} ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	S ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	CV (%)	R (%)
0	0	0	0	0
100	78	39,3	50	78
200	163	71,8	44	81,5
400	342,5	158	46,1	85,6
500	461	242,4	48,5	96,2
600	605,5	365	60,8	101
800	833,5	420	52,5	104,2
1000	1096	572	57,2	109,6
1100	1251	437,7	39,8	110,4
1200	1266	662	55,2	105,5
1500	1596	644	43	106,4

Aritmetička sredina / Arithmetic mean $\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n$

Standardna devijacija / Standard deviation $S = \left[\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \right)^2}{n-1} \right]^{1/2}$

Koeficijent varijabilnosti / Coefficient of variability: C.V.% = (S/X) x 100

Utvrđeno od dodane količine / Recovery: R = (X/c) x 100

c = dodana količina toksina / amount of toxin added

je provedena s po 200 ml etil-acetata tresenjem uzoraka na laboratorijskoj tresilici s 20-30 pomaka u minuti, tijekom 60 minuta. Ekstrakti su potom profiltrirani preko naboranog filter papira i pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela. Eluati što su dobiveni nakon stupne kromatografije, dodatno su pročišćeni postupkom preparativne kromatografije. Nakon koncentriranja, eluati su kvantitativno preneseni u staklene bočice volumena po 20 ml, otapalo je otpareno u vakumu pri 20 mm Hg stupca, a ostatak je otopljen u po 500 μ l kloroforma. Pojedinačni ekstrakti bili su nanoseni u liniji preko ploče za preparativnu tankoslojnu kromatografiju (sloj silikagela debljine 2 mm). Nakon razvijanja u sustavu otapala benzen : metanol : octena kiselina (90:5:5) (26) mrlje kojih je R_f vrijednost bila 0,18 ostrugane su i eluirane s kloroformom, a potom je kloroform otparen. Ostatak je otopljen u 250 μ l kloroforma i upotrijebljen za kvantitativno određivanje fluorodenzitometrom.

REZULTATI I RASPRAVA

Ni u jednom od deset izvornih uzoraka jabučnoga soka dobavljenih iz trgovine nije, s pomoću upotrijebljenih metoda, dokazan patulin. Određivanjem različitih količina patulina dodanih u jabučni sok, uočeno je da intenzitet razvijenih mrlja često nije bio dovoljno jak za kvantitativno mjerenje, pa su razvijene ploče za kromatografiju bile izlagane parama koncentriranoga amonijaka. Naime, prema Ciegleru i Kurtzmanu (4) mrlje patulina na ploči za tankoslojnu kromatografiju intenzivnije će fluorescirati ako se ploča nakon razvijanja stavi u atmosferu para koncentriranog amonijaka. Budući da su istraživanja provedena na pločama silikagela s fluorescentnim slojem (F_{254}), upotrijebljena je za kvantitativno određivanje patulina metoda gašenja fluorescencije ploče, što su je opisali Pohland i Allen (31) i Radić (32). Rezultati naših istraživanja pokazuju da je granica određivanja patulina s pomoću fluorodenzitometra bila 200 ng čistog standarda (slika). U pokusima određivanja standarda patulina što je u poznatim koncentracijama bio dodavan u jabučni sok, taj je mikotoksin bio ponovo dokazan u rasponu 78-110% od dodanih koncentracija. Granica određivanja bila je 100 μ g patulina na litru soka, a prosječna vrijednost djelotvornosti postupka bila je 98%.

ZAKLJUČCI

Ni u jednom uzorku jabučnoga soka dobavljena iz trgovine patulin nije dokazan.

Tankoslojna kromatografija na sloju silikagela F_{254} može poslužiti kao preliminarni pokazatelj prisutnosti patulina u jabučnom soku, budući da nakon razvijanja ploča u atmosferi zasićenoj parama amonijaka, taj mikotoksin ima jasnu fluorescenciju.

Fluorodenzitometrijsko određivanje količine patulina na pločama silikagela F_{254} uspješno se može provesti metodom gašenja fluorescencije. Ovakvo određivanje ne zahtijeva skupe instrumente, nije nužno veliko iskustvo analitičara, a vrijeme analize kraće je nego u analitičkih metoda kao što su npr. spektrofotometrijska metoda ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Metodika se može brzo prilagoditi rutinskoj analizi i pogodna je za laboratorije koji nisu opremljeni vrlo preciznim, ali i znatno skupljim instrumentima.

Zbog osjetljivosti i pouzdanosti (mogu se s velikom sigurnošću određivati i nanogramske količine) i zahvaljujući tome što se može vrlo brzo prilagoditi za kvantitativno određivanje niza mikotoksina, fluorodenzitometrijska metoda vrlo je prikladna za provjeru kvalitete u industriji hrane.

LITERATURA

1. Abraham EP, Florey HW. Substances Produced by Fungi Imperfecti and Ascomycetes. In: Florey HW, Chain E, Heatley NG, et al, eds. Antibiotics, London; Oxford University Press 1949;1:132-9.
2. Bullerman LB, Olivigni FJ. Mycotoxin production potential of molds isolated from Cheddar cheese. J Fd Sci 1974;39:1166-9.
3. Bullerman LB. Examination of Swiss cheese for incidence of mycotoxin producing molds. J Fd Sci 1976;41:26-8.
4. Ciegler A, Kurtzman CP. Fluorodensitometric assay of penicillic acid. J Chromatogr 1970;51:511-3.
5. Draughon FA, Ayres JC. Insecticide inhibition of growth and patulin production in *Penicillium expansum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus* and *Byssosclamyces nivea*. J Agric Food Chem 1980;28:1115-7.
6. Kurtzman CP, Ciegler A. Mycotoxin from a blue-eye mold of corn. Appl Microbiol 1970;20:204-6.
7. Moler T, Josefson E. Rapid HPLC of patulin in apple juice. J Assoc Off Anal Chem 1980;63:1055-6.
8. Scott PM, Miles WT, Toft I, Dube JG. Occurrence of patulin in apple juice. J Agric Food Chem 1972;2:450-2.
9. Dickens F, Jones HEH. Carcinogenic activity of series of reactive lactones and related substances. Br J Cancer 1961;15:85-8.
10. Harwing J, Chen YK, Kennedy BPC, Scott PM. Occurrence of patulin and patulin producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. Can Inst Food Sci Technol 1973;6:22-6.
11. Sanchis V, Pons E, Vinas J, Torres M. Effects of potassium sorbate on patulin production by strains of *P. griseofulvum* and *P. expansum*. Rev Iberoam Micol 1991;3:66-9.
12. Jimenez M, Mateo R, Mateo JJ, Huerta T, Hernandez E. Effect of the incubation conditions on the production of patulin by *P. griseofulvum* isolated from wheat. Mycopatologia 1991;3:163-8.
13. Stoloff L. Patulin, a contaminant in apple juice. NY State Agric Exp Sta Special Report 1975;19:51-3.
14. Torres M, Canelu R, Riba M, Sanchis V. Production of patulin and griseofulvin by a strain of *Penicillium griseofulvum* in three different media. Mycopathologia 1987;99:85-9.
15. Forbito PR, Babski NE. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. J Assoc Off Anal Chem 1985;5:950-1.
16. Moss MO. Patulin production in apples stored in a control atmosphere. Int Environ Studies 1975;8:165-7.
17. Miyake M, Saito M. Liver injury and liver tumors induced by toxins of *Penicillium islandicum* Sopp growing of yellowed rice. In: Wogan GN, ed. Mycotoxins in Foodstuffs. Proc Symp held at The Massachusetts Institute of Technology, 1964. Cambridge, Mass, MIT Press, 133-46.
18. Ciegler A. Patulin. In: Rodricks JW, Hesseltine CW, Mehlman M. eds. Mycotoxins, Park Forest South, Illinois: Pathotox Publishers Inc 1977:610-24.
19. Enomoto M, Saito M. Carcinogens produced by fungi. Ann Rev Microbiol 1972. 26 Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA.
20. Graham HD, Graham EJE. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and toxin production by garlic. J Food Safety 1987;8:101-8.
21. Land CJ, Hult K. Mycotoxin production by some wood associated *Penicillium spp.* Lett Appl Microbiol 1987;4:41-4.
22. Liven MB, Marth EH. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid. J Food Prot 1985;48:364-75.
23. Mortimer DN, Parker I, Shepherd MJ, Gilbert J. A limited survey of retail apple juice and grape juice for the mycotoxin patulin. Food Add Contam 1985;2:165-70.
24. Rosen JD, Pareles SR. Quantitative analysis of patulin in apple juice. J Agric Food Chem 1974;6:1024-6.
25. Scott PM, Sommers E. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. J Agric Food Chem 1968;3:483-6.
26. Scott PM, Kennedy BPC. Improved method for the thin-layer chromatographic determination of patulin in apple juice. J Assoc Off Anal Chem 1973;4:813-5.
27. Subramanian T. Colorimetric determination of patulin produced by *Penicillium patulum*. J Assoc Off Anal Chem 1982;1:5-7.

28. Pero RW, Harven D, Owens RG. A gas chromatographic method for the mycotoxin penicillic acid. *J Chromatogr* 1972;65:501-3.
29. Jimenez M, Sanchis V, Mateo R, Hernandez E. Detection and quantification of patulin and griseofulvin by high pressure liquid chromatography in different strains of *Penicillium griseofulvum* Dierickx. *Mycotoxin Res* 1988;4:59-66.
30. Priest RW, Light RJ. Applications of high-performance liquid chromatography to quantitation of metabolites and enzymes of the patulin from *Penicillium patulum*. *J Chromatogr* 1990;513:237-46.
31. Pohland AE, Allen R. Analysis and chemical confirmation of patulin in grains. *J Assoc Off Anal Chem* 1970;53:686-7.
32. Radić B. Comparison of fluorescence measurement and fluorescence quenching in quantitative determination of zearalenone by TLC. *Prehrambeno tehnol biotehnol rev* 1989;4:209-12.

Summary

THE DETERMINATION OF PATULIN IN APPLE JUICE

A quantitative method for the determination of patulin in apple juice was examined. The procedure involved patulin extraction from apple juice with ethyl acetate, clean-up with column chromatography and preparative thin-layer chromatography. Fluorescent derivatives, obtained by exposure of patulin on chromatographic plates to concentrated ammonia fumes, permitted a convenient quantitative fluorodensitometric assay of patulin by means of the fluorescence quenching method. The detection limits were 200 ng of pure patulin and 100 µg of patulin per litre of apple juice. The recoveries of added patulin ranged from 78 to 110.4 per cent, with a mean recovery of 97.8 per cent.

*Institute of Biochemical Engineering, Faculty of Nutrition and Biotechnology
University of Zagreb, Zagreb, Croatia¹, Institute for Medical Research and
Occupational Health University of Zagreb, Zagreb, Croatia², Medical Faculty
University of Zagreb, Zagreb, Croatia³, Croatian Academy of Sciences and
Arts, Zagreb, Croatia⁴*

Key terms: analytical methods, fluorodensitometric method, chromatographic technique, moulds, mycotoxins