

Afd. Contaminanten 1982-05-06
VERSLAG 82.36 Pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Literatuuronderzoek omtrent
patuline

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.
Contaminanten (4x), Normalisatie (Humme), Projektbeheer,
Projektleider.

Projekt: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van
microbiële toxinen

Onderwerp: Literatuuronderzoek omtrent patuline

Doel:

Dit verslag heeft tot doel een literatuuroverzicht te geven omtrent het voorkomen van patuline en methoden voor het aantonen en bepalen van patuline in verschillende produkten.

Samenvatting:

Patuline is een toxische uitscheidingsstof dat door verschillende penicillium- en aspergillus-schimmelsoorten geproduceerd wordt. Patuline bezit ook carcinogene en mutagene eigenschappen, wanneer ratten gedurende vijftien maanden met patuline worden ingespoten (onder de huid) (33, 1, 73, 39). *P.expansum* kan patuline vormen in o.a.: druiven, perziken, peren, abrikozen, pruimen of rozijnen, kersen, komkommers, worteltjes, tomaten, bananen, ananas en appels die rotte plekken vertonen. Na enten met *P.expansum*, *P.urticae* of *Byssochlamys* niveau kan er ook patuline gevormd worden in reineclaude, aardbei, dauw meloenen, rode en groene paprika, maar er wordt geen patuline gevormd in selderie, koolrabie, bloemkool, rode kool, radijs, paarde radijs, uien, vruchtvlees van een kalebas (als groente), aardappels en pootaardappels (22). Patuline komt vooral voor in appelprodukten zoals: appelsap, appelmoes en appelstroop.

Vroeger werd patuline het meest bepaald m.b.v. dunnelaagchromatografie met als detectiereagens MBTH hydrochloride. Het MBTH hydrochloride wordt na het ontwikkelen van de silicagel plaat in toluen-ethylacetaat-90% mierzuur (5+4+1), op de plaat gespoten. Het patuline derivaat is dan onder invloed van langgolvig UV-licht als geel-bruine fluorescerende vlek waarneembaar, met een detectiegrens van 20-25 µg/l appelsap (64, 63, 14).

De laatste jaren gebruikt men bij de DLC methode ook wel het benzidin detectiereagens. Het benzidin reagens wordt op de plaat gespoten, nadat de plaat is ontwikkeld in achtereenvolgens I tolueen-ethylacetaat-mierezuur (5+4+1) en II benzeen-methanol-ijsazijn (90+5+5). Het patuline derivaat is dan onder invloed van UV-licht (360 nm) als geel fluorescerende vlek waarneembaar, met als detectiegrens van 5 µg/l sap of 5 µg/kg fruit of groente (34). Tegenwoordig gebruikt men het meest de HPLC methode met een µ-bondapak-CN kolom, met als elutievloeistof een gradiënt van A: n-hexaan met B: 5% butanol-1 in dichloormethaan. Als detector wordt een UV-detector van 275 nm gebruikt. Deze methode heeft een detectiegrens van 5 µg/kg met als recovery meer dan 90%. Dit is een snelle methode en heeft weinig oplosmiddel nodig en daardoor een goede methode voor seriemonsters (36).

Er kan ook een GLC methode worden gebruikt met als detector een massaspectrometer (high resolution single ion monitoring), deze methode heeft als detectiegrens 0,2 µg/l appelsap (57).

Conclusie:

Patuline is een toxische uitscheidingsstof dat door verschillende penicillium- en aspergillus-schimmelsoorten geproduceerd wordt en dus meestal voorkomt op beschimmelde en verrotte produkten.

Patuline bezit waarschijnlijk ook carcinogene en mutagene eigenschappen. De meest geschikt combinatie voor het bepalen van patuline is HPLC met een Straight phase kolom en UV-detectie. De detectiegrens is bij deze methode 5 µg/kg met een recovery van meer dan 90% (36).

Er kan ook een GLC methode worden gebruikt met als detector een massaspectrometer (high resolution single ion monitoring). Deze methode heeft als detectiegrens 0,2 µg/l appelsap (57).

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerker/samensteller: J. Hulstein

Projectleider: W. Haasnoot

1. Inleiding

Schimmelgroei op voedsel voor mens en dier komt algemeen voor. Het kan resulteren in een zodanig bederf van deze voedingsmiddelen, dat deze een gevaar kunnen vormen voor de volksgezondheid. Vele schimmels produceren namelijk toxische stofwisselingsprodukten, die bekend zijn als mycotoxinen. Ziektes bij mens en dier, die veroorzaakt worden door vergiftigingen met deze mycotoxinen, worden mycotoxicoses genoemd (4). Het verschijnsel van de mycotoxicose is ongeveer honderd jaar bekend en werd uitvoerig beschreven in diverse diergeneeskundige publikaties, waarbij het verband tussen consumptie van beschimmeld voedsel en het ontstaan van de ziekte bij de mens en dier werd gelegd. Bekende vormen van mycotoxicose bij de mens zijn het reeds uit de middeleeuwen bekende ergotisme of St. Anthonusvuur en de gele rijst ziekte. Het ergotisme ontstaat door het eten van granen, waarin toxische alkaloiden voorkomen als gevolg van besmetting met de schimmel Claviceps purpurea. De gele rijst ziekte in Japan wordt veroorzaakt door diverse Penicillium-soorten. In Rusland kwam in 1940 onder meer dan 10% van de bevolking een ziekte voor, die bekend staat als Alimentary Toxic Aleukia (= A.T.A.). Deze ziekte werd veroorzaakt door het eten van graan dat gedurende de winter op het land had gestaan en beschimmeld was met Fusarium- en Cladosporium-stammen (13).

De laatste grote uitbraak van mycotoxicose bij dieren was in 1960 in Groot-Brittannië, bekend geworden als Turkey-X-disease, waarbij meer dan 100.000 kalkoenen het slachtoffer werden. De oorzaak van deze ziekte werd toegeschreven aan de aanwezigheid van de schimmel Aspergillus flavus, die een zeer toxische metaboliet produceert, het aflatoxine (15).

Naar aanleiding van deze laatste epidemie nam de belangstelling voor de bestudering van de aanwezigheid van aflatoxine-producerende schimmels en hun metabolieten in levensmiddelen enorm toe. Het onderzoek bleef niet beperkt tot aflatoxine, ook andere mycotoxinen zoals citrinine, ochratoxine en penicillinezuur werden onderzocht.

De laatste jaren kwam patuline voorkomende in o.a. appelsap (78) in de belangstelling te staan. De vraag kan worden gesteld of patuline ook in appelmoes kan voorkomen.

De appelmoesconsumptie in Nederland bedraagt 7 kg per persoon per jaar; het is vooral een geliefd produkt bij kinderen. Het is derhalve van belang te weten of appelmoes en appelsap een potentieel gevaar kunnen vormen voor de volksgezondheid.

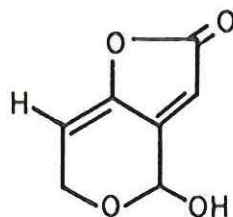
Het doel van dit onderzoek is:

Het zoeken naar een geschikte kwalitatieve analysemethode voor de bepaling van patuline in verschillende produkten zoals o.a.: verrotte appels, appelsap, appelmoes, appelstroop.

Deze methode moet tevens een lage detectiegrens (ppb-niveau) en een redelijke recovery-waarde bezittten (> 80%).

2. Chemische- en fysische eigenschappen en de stabiliteit van patuline

Patuline is een onverzadigd β -lacton met de empirische formule $C_7H_6O_4$.



Patulin

4-hydroxy-4H-furo (3,2-C) pyran
-2(6H)-1
= patuline
(80, 81)

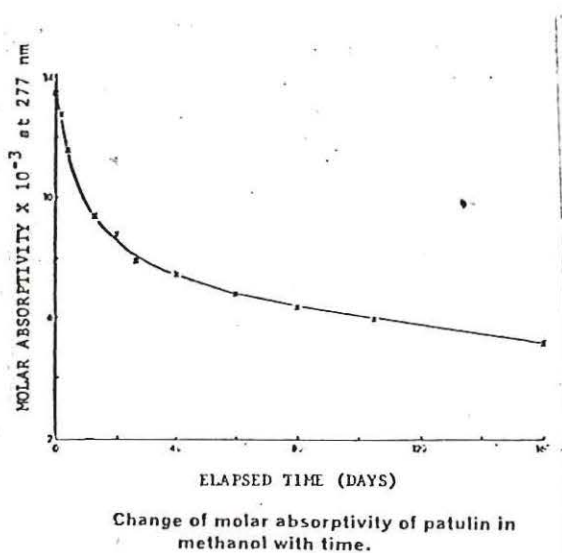
De vaste stof, die uit kleurloze rombische plaatjes of prisma's bestaat heeft een smeltpunt van $110,5^{\circ}\text{C}$. Het absorptie-maximum van patuline in het UV-gebied ligt bij 275 (16), 277 (53) en 276 nm (33,80).

Patuline is goed oplosbaar in methanol, ethanol, aceton en warm water en matig oplosbaar in ethylacetaat, benzeen, chloroform en koud water, terwijl het niet oplosbaar is in Petroleum-ether $60-80^{\circ}$ (50).

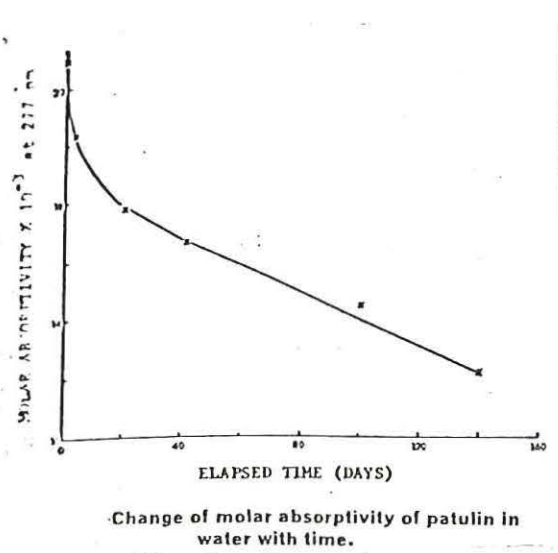
Patuline is niet stabiel in alkalisch milieu. Het toxine verliest zijn biologische activiteit bij een pH boven 6,9. Patuline is wel stabiel in zuur milieu (15).

Wanneer SO_2 door een waterige oplossing van patuline wordt geleid, treedt zeer snel een verandering in het absorptiespectrum van patuline in het UV gebied op.

Dit wijst op een totale wijziging in de moleculaire structuur (53). Patuline, opgelost in benzeen, chloroform of methyleenchloride is gedurende langere tijd stabiel, terwijl het mycotoxine in methanol of water langzaam ontleedt (53) (zie resp. fig. 1 en 2).



figuur 1

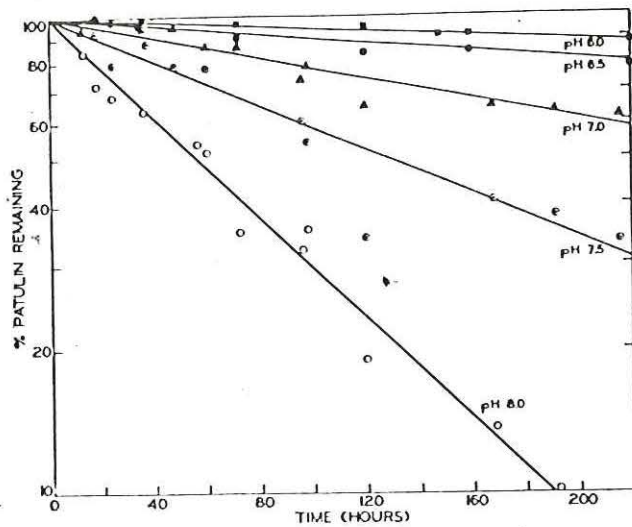


figuur 2

Scott (66) toonde aan dat patuline stabiel is in appel- en druivensap, maar niet in sinasappelsap. Dit laatste verklaren zij met het feit dat patuline geïnactiveerd wordt door sulfhydrylgroepen bevattende verbindingen. Bij verhitting van de vruchtensappen tot 80°C gedurende 10 en 20 minuten wordt 50% van de aanwezige patuline afgebroken. Patuline wordt niet volledig afgebroken door verhitting boven 100°C bij een pH die varieert van 3,5 tot 5,5. Het blijkt dat patuline een grotere stabiliteit bezit bij lage pH (38).

De chemische reactiviteit van patuline ten opzichte van sulfhydrylgroepen wordt bepaald door patuline met glutathion te laten reageren bij verschillende pH's. Scott (66) vindt bij een pH van 6,9; 3,0; 2,3 een patulinereductie tot resp. 10% na 1 dag, 27% na 7 dagen en 45% na 7 dagen.

Brackett (7) vindt bij de pH-waarde 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 en 8,0 resp. een snellere afname van patuline met de tijd (bij een temperatuur van 25°C) (zie figuur 3).



Decrease of patulin content at pH values of 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0

figuur 3

De verdwijning van patuline is een schijnbare eerste orde reactie

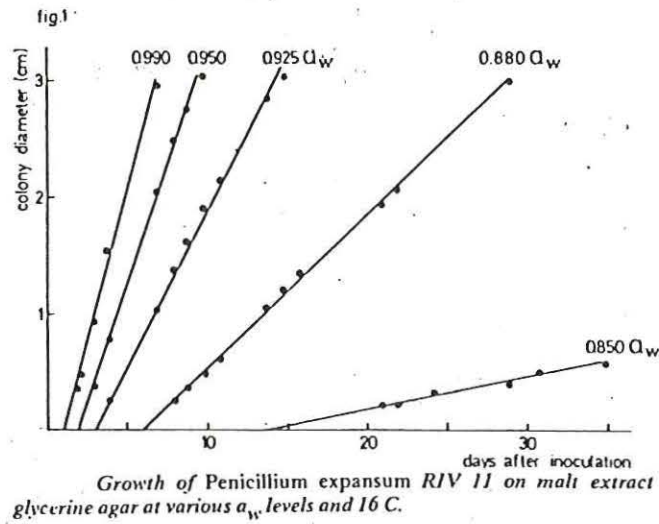
$$dc/dt = -K [H^+]^{-0,67} [C] \quad t = \text{tijd} \quad C = \text{concentratie patuline.}$$

In vlees- en vleeswaren zal de aanwezige patuline waarschijnlijk worden afgebroken door reactie met sulfhydrylgroepen, waarbij het reactieproduct niet meer aantoonbaar is met een chemische bepalingsmethode voor patuline. Uit proeven met kuikenembryo's, muizen en de konijnenhuidtest blijkt dat het reactieproduct niet toxisch is (31).

Direct na het toevoegen van patuline aan cheddar kaas treedt een sterke vermindering van de hoeveelheid patuline op (73).

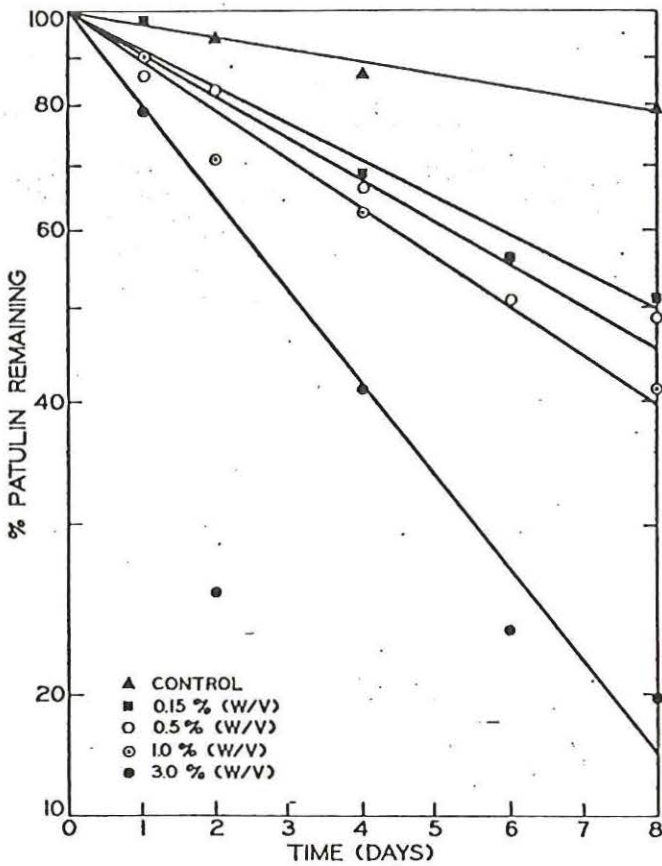
Bewaartemperatuur en sterilisatie hebben geen invloed op de hoeveelheid uit de kaas geextraheerde patuline. Waarschijnlijk treedt ook hier reactie op tussen patuline en componenten in de kaas (SH-groepen?) die het verdwijnen van patuline tot gevolg heeft.

De groei van *Penicillium-expansum* wordt minder naar mate de wateractiviteit omlaag gaat (zie figuur 4) (47).



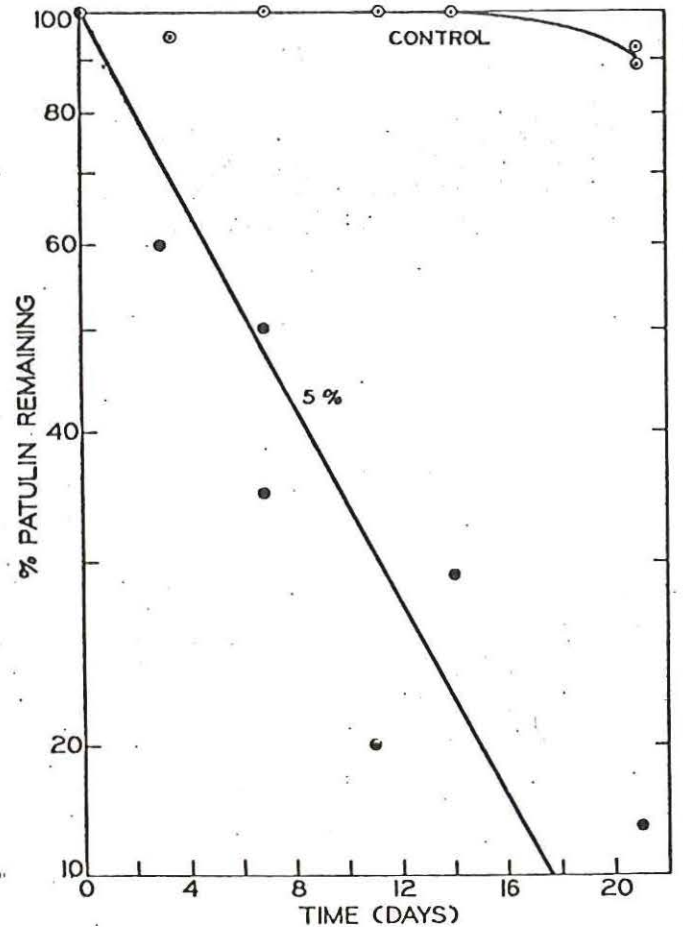
figuur 4

Brackett (5) vindt dat, door toevoeging van vitamine C aan een patuline bevattende buffer met een pH van 3,5, de patulinehoeveelheid sneller minder wordt met de tijd (zie figuur 5) en na toevoegen van 5% vitamine C aan appelsap, neemt de patulinehoeveelheid sterk af (zie figuur 6).



Decrease of patulin content in a buffer at pH 3.5 to which 3.0, 1.0, 0.5, 0.15 and 0% Vit C was added.

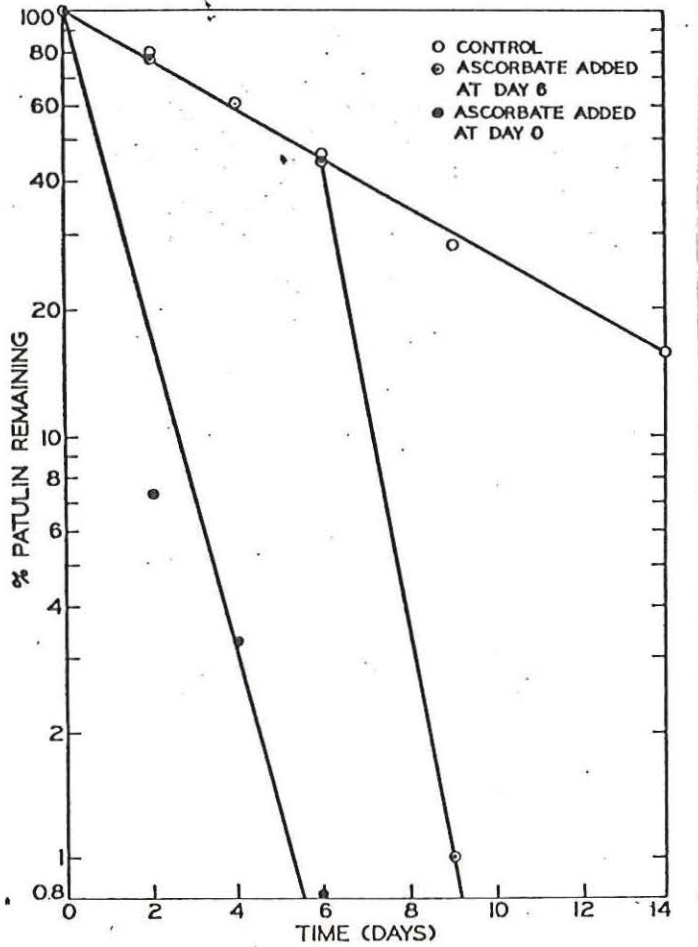
figuur 5



Decrease of patulin in apple juice to which 5.0% Vit C was added.

figuur 6

Toevoeging van natriumascorbaat heeft een snelle verdwijning van patuline tot gevolg, maar het tijdstip waarop het toegevoegd wordt heeft geen invloed, of het Na ascorbaat nu bij het begin of na 6 dagen wordt toegevoegd het heeft beide dezelfde snelheid van verdwijning van patuline tot gevolg (zie figuur 7).



Decrease of patulin content in a buffer at pH 7.5 to which 2% ascorbic acid was added on Day 0 and Day 6.

figuur 7

De organochloorbeschrijdingsmiddelen Naled en Dichlorvos (bij een concentratie van 100 mg/l) beletten de patuline-productie voor resp. 100 en 89%.

De organofosfaat insecticides Malathion en Diazinon (bij een concentratie van 100 mg/l) beletten de patuline-produktie voor 0-52%. De carbamaat insecticides Landrin en Sevin beletten de patuline-produktie voor resp. 85 en 100% en bij een concentratie van 100 mg/l beletten ze de sporenvorming, maar ze beletten niet de groei van *P.urticae* (17).

3. Toxiciteit van patuline

In het begin was de belangstelling voor patuline vooral gericht op zijn therapeutische eigenschappen. Het mycotoxine remt in zuur milieu (tussen pH = 3,3 en pH = 6,3) de ademhaling van zowel gram-positieve als gram-negatieve bacteriën (1, 28).

Patuline voorkomt de groei van gisten en schimmels (het heeft een fungistatische werking) en het toxine remt de kieming van schimmelsporen (59, 15).

Patuline is toxisch voor hogere planten. Tarwe planten, die in patulinehoudende grond gekweekt worden, komen niet volledig tot ontwikkeling. De tarwezaden kiemden niet, nadat de grond met 20 ppm patuline besmet was (48, 19).

Na verder onderzoek bleek dat patuline waarschijnlijk ook carcinogene en mutagene eigenschappen bezit (39, 33, 1, 73).

Patuline, ingespoten bij muizen, verhoogt de doorlaatbaarheid van bloed- en lymfevaten, waardoor oedemen gevormd worden. Tevens veroorzaakt het remming van de vochtuitscheiding en verhoging van het bloedsuikergehalte (33).

Verder kunnen long- en hersenoedemen, inwendige bloedingen en een vergroting van de capillaire doorlaatbaarheid van de lever voorkomen (1).

Wanneer gedurende vijftien maanden tweemaal per week subcutaan patuline ingespoten wordt bij ratten, wordt de vorming van kwaadaardige tumoren waargenomen (33, 1, 73, 39).

De intraveneuze LD 50-waarde voor ratten en muizen ligt tussen 0,3 en 0,7 mg patuline per 20 g lichaamsgewicht, terwijl 1,0 mg patuline per muis altijd dodelijk was (9, 15).

De LD 50-waarde bij orale opname van patuline door muizen is 0,7 mg per 20 g lichaamsgewicht, terwijl dan 2,5 mg steeds dodelijk is (9).

Ook andere dieren zijn gevoelig voor patuline. Bij kuikens, die gedurende zes weken dagelijks 0,2 mg patuline via hun voedsel toegediend kregen, traden ernstige leverbeschadigingen op (43).

Bij wit-leghornhaantjes werd een LD 50-waarde van 170 mg per kg lichaamsgewicht waargenomen. Sublethale hoeveelheden patuline gaven aanleiding tot bloedingen in het spijsverteringskanaal (37).

4. Aanwezigheid van patuline-producerende schimmels en patuline in levensmiddelen

Patuline is een giftige uitscheidingsstof van verschillende *Penicillium*- en *Aspergillus*-schimmelsoorten, waaronder *Penicillium claviforme*, *P. Patulum*, *P. expansum*, *P. melanii*, *P. equinum*, *P. novae-zeelandiae*, *P. divergens*, *P. urticae*, *P. leucopus*, *P. cyclopium*, *P. lapidosum* (21).

Aspergillus davatus, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssochlamys nivea*, *Paezilomyces* sp.

P. expansum kan patuline vormen in o.a. druiven, perziken, peren, abrikozen, pruimen of rozijnen, kersen, komkommer, worteltjes, tomaten, bananen en ananas.

P. expansum en patuline komen tevens voor in verrotte appels.

Patuline werd aangetoond in reinclaude, aardbei, dauwmeloenen, rode en groene paprika na enten met *P. expansum*, *P. urticae* of *Byssochlamys nivea*.

De kunstmatige infectie faalde bij selderie, koolrabie, bloemkool, rode kool, radijs, paarde radijs, uien, vruchtvlees van een kalebas (als groente), aardappels en pootaardappels (22).

Slechts 1% van de van meel en brood geïsoleerde *Pencillia* waren in staat in vitro aantoonbare hoeveelheden patuline te vormen (11).

Mintzloff (44) ontdekte dat 1,4% van de van worst geïsoleerde stammen patuline produceerden.

Bullerman (12) vond dat 4% van de van Cheddar kaas afkomstige schimmels patuline vormden. Daarentegen werden bij een screening van Zwitserse kazen in het geheel geen patuline producenten aangetroffen (10).

Diverse levensmiddelen, waarvan patuline producerende schimmels werden geïsoleerd, werden op de aanwezigheid van patuline onderzocht.

Reiss (58) toonde de aanwezigheid van patuline in beschimmeld brood en gebak aan (0,1-0,3 mg/kg brood of gebak). In een latere publicatie (60) beschreef hij dat brood, dat beënt werd met een *P.expansum* stam, na tien dagen incubatie patuline bevatte, terwijl die hoeveelheid na twintig dagen weer verdwenen was.

Enige van rookworst, vlees en vleeswaren geïsoleerde *P.expansum* stammen produceren in synthetische voedingsoplossingen aanzienlijke hoeveelheden patuline. Na beënting van het vleesprodukt zelf, komt daarentegen slechts zeer weinig patuline voor, zoals werd aangetoond bij rookworst (2, 31, 35, 45).

Stott (73) ontdekte dat *P.Patulum*, indien deze werd geënt op Cheddar kaas, na twee weken incubatie bij 25°C, patuline had gevormd (0,2-1,3 µg patuline per g kaas en mycelium). Dit toxine was echter na zes weken incubatie niet meer in aantoonbare hoeveelheden aanwezig.

Harwig (29) isoleerde schimmels van op natuurlijke wijze gerotte appels en vond dat 66% van deze stammen patuline produceerde (vooral *P.expansum*).

P.expansum veroorzaakt dikwijls bederf van appels bij bewaring (8, 76).

Het sap van dit rottend fruit bevat patuline, soms tot 1000 mg per liter sap (8).

Daar bij de produktie van appelsap en appelwijn ook wel rotte appels verwerkt worden, werden deze dranken op hun patuline gehalte onderzocht. Zowel in appelsap als in ongegiste appelwijn werd patuline aangetoond (zie tabel 1).

5. Voor de bepaling van patuline worden de volgende technieken het meest gebruikt

5.1 Microbiologische analyse.

5.2 Dunnelaagchromatografie (DLC).

5.3 Gas-vloeistofchromatografie (GLC).

5.4 Hogedruk-vloeistofchromatografie (HPLC).

5.1 Microbiologische analyse van patuline.

Bacillus megaterium is gevoelig voor patuline en is een geschikt testorganisme voor een nauwkeurige, kwantitatieve microbiologische analyse voor het patuline. De resultaten van het testorganisme zijn lineair tussen 2 en 80 µg/schaaltje.

De microbiologische analyse is vergeleken bij dunnelaagchromatografie en de spectrofotometrische methode vergelijkbaar in de nauwkeurigheid, maar minder in de gevoeligheid. De detectiegrens voor patuline is 1,7 µg (73).

5.2 Dunnelaagchromatografische bepaling van patuline in verschillende produkten.

Het patuline wordt met de in tabel 2 genoemde extractievloeistoffen uit de verschillende produkten geëxtraheerd. Indien vermeld zijn er bij deze extractie hulpmiddelen gebruikt.

Deze patuline-extracten worden m.b.v. verschillende methoden, of helemaal niet, gezuiverd. Deze methoden zijn vermeld in tabel 3.

In tabel 4 zijn de verschillende DLC methoden en de verschillende detectiemethoden vermeld.

5.3 Gas-vloeistofchromatografische bepaling van patuline in verschillende produkten.

Het patuline wordt met de in tabel 5 genoemde extractievloeistoffen uit de verschillende produkten geëxtraheerd.

Deze patuline-extracten worden m.b.v. verschillende methoden, of helemaal niet, gezuiverd. Deze methoden zijn vermeld in tabel 6.

In tabel 7 zijn de verschillende GLC methoden met de verschillende detectoren vermeld.

5.4 Hogedruk-vloeistofchromatografische bepaling van patuline in verschillende produkten.

Het patuline wordt met de in tabel 8 genoemde extractievloeistoffen uit verschillende produkten geëxtraheerd. Indien vermeld zijn er bij deze extractie hulpmiddelen gebruikt.

Deze patuline-extracten worden m.b.v. verschillende methoden of helemaal niet, gezuiverd. Deze methoden zijn vermeld in tabel 9.

In tabel 10 zijn de verschillende HPLC methoden met de verschillende detectoren vermeld.

6. Samenvatting

6.1 De microbiologische methode is wel nauwkeurig, maar heeft een veel te hoge detectiegrens, namelijk 1,7 µg (73).

6.2 DLC-methode

Het detectiereagens benzidin geeft de laagste detectiegrens voor sap en fruit en of groente, namelijk 5 µg/l en 5 µg/kg.

De extracten van fruit- en groenteproducten worden gezuiverd over een florisil kolom met als elutievloeistof aceton-dichloormethaan. De gezuiverde extracten worden op een kieselgel G plaat, met als eluentia I toluen-ethylacetaat-mierezuur (5+4+1) II benzeen-methanol-ijsazijn (90+5+5), gechromatografeerd. Na de DLC wordt de plaat bespoten met een benzidinoplossing. Het patuline derivaat is onder invloed van UV-licht (360 nm) als geel fluorescerende vlekken waarneembaar met een detectiegrens van 5 µg/l sap en 5 µg/kg fruit of groente (34).

Hierna volgen het chlor-o-tolidin en het chlor-o-dianisidin. De appel- en vlees-extracten worden op een kieselgel G plaat, met als eluens chloroform-aceton-85% mierezuur (66+31+3), gechromatografeerd. De plaat wordt na de DLC bespoten met de twee detectiereagentia chlor-o-tolidin en het chlor-o-dianisidin. Het patuline derivaat is onder invloed van UV-licht (366 nm) bij beide reagentia als groen-gele fluorescerende vlekken waarneembaar met een detectiegrens van 5 ng. Het chlor-o-tolidin is bij zichtbaar licht nog bij een hoeveelheid van 30 ng als gele vlek waarneembaar en het chlor-o-dianisidin nog bij een hoeveelheid van 10 ng (40).

Het meest gebruikte detectiereagens is het 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone hydrochloride (het MBTH-hydrochloride).

Het appelsapextract wordt gezuiverd over een silicagel kolom met als elutievloeistof benzeen-ethylacetaat (75+25).

Het gezuiverde appelsap extract wordt op een silicagel plaat met als eluens toluen-ethylacetaat-90% mierezuur (5+4+1), gechromatografeerd. De plaat wordt na de DLC bespoten met 0,5% MBTH hydrochloride oplossing. Het patuline derivaat is onder invloed van langgolvig UV-licht als geel-bruine fluorescerende vlek met een detectiegrens van 10 ng.

Door middel van visuele vergelijking met een standaardreeks van bekende concentratie is 20-25 µg patuline/l appelsap nog aantoonbaar (64, 63, 14). Deze methode heeft ook bevredigende recoveries. Het MBTH detectiereagens heeft voor respectievelijk appelmoes, appelstroop, druivesap, wijn en mengvoeder de volgende detectiegrenzen: 50-100 µg/kg, 250 µg/kg, 60 µg/l, 30 µg/l en 750-800 µg/kg (14, 67, 27). Als hulpmiddel bij het meten van de platen wordt er soms gebruik gemaakt van een densitometer.

Andere detectiereagentia zijn minder gevoelig.

Fenylhydrazine-hydrochloride en 2,4-dinitrofenylhydrazine-hydrochloride maken patuline zichtbaar als gele vlek met een detectiegrens van 100 ng (42).

Het p.anisaldehyde maakt patuline zichtbaar als geel-bruine fluorescerende vlek met een detectiegrens van 100 ng (20).

Het diëthylamine maakt het patuline in kaas zichtbaar als grijs-blauwe fluorescerende vlekken met een detectiegrens van 20 µg/kg (68).

Verder kan het patuline worden aangetoond met het anthron, aniline imines, aniline acetaten en fluorescentiemeting op platen met fluorescentie (254 nm) indicator (20, 3, 69, 52, 62, 55, 56, 24, 26).

Om van storingen zoals: 5-hydroxymethylfurfural af te komen wordt meestal tweedimensionale DLC uitgevoerd.

De stoorvlek 5-hydroxymethylfurfural komt meestal voor in appelsap (34).

6.3 GLC methode

Het patuline kan in de vorm van verschillende derivaten m.b.v. een GLC methode worden bepaald namelijk als: trimethylsilylether (TMS)-, chlooracetaat-, of acetaatderivaat. Deze derivaten worden gedetecteerd m.b.v. een waterstofvlamionisatiedetector (FID). De detectiegrens voor de kwantitatieve meting van de derivaten is 100, 60 en 40 ng voor resp. TMS-, acetaat- en chlooracetaatderivaat. Wanneer het chlooracetaatderivaat bepaald wordt met een electron capture detector (ECD) is de detectiegrens 12 ng. Bepaling van patuline in appelsap als acetaatderivaat geeft een recovery van 90% en een bepalinglimiet van 700 µg/l; er is geen voorafgaande zuivering van het extract vereist (54).

De TMS derivaten van het patuline kunnen het beste op een 3% Dexsil 300 kolom worden bepaald met een temperatuurprogrammering van 100-250°C met een programmeringssnelheid van 8°C/min.

De temperatuurprogrammering 75°-250°C met een programmeringssnelheid van 4°C/min heeft tot grote variatie in de retentietijd geleid (51).

De TMS derivaten, afkomstig van appelsap, kunnen ook worden bepaald op een 3% OV-17 kolom met als detectie massafragmentografie. Bij deze methode is de detectiegrens 10 µg/l appelsap met een recovery van 100-114% (61).

Door een 10% QF-1 kolom te gebruiken om de TMS derivaten te bepalen, met een FID als detector, verkrijgt men een detectiegrens van 12 mg/l (18).

Als er een GLC met een 5% OV-17 kolom en een massaspectrometer als detector gebruikt wordt verkrijgt men een zeer lage detectiegrens. Wanneer er een massaspectrometer met een high resolution single monitoring wordt gebruikt, is de detectiegrens namelijk 0,2 µg/l appelsap en wanneer er een massaspectrometer met een low resolution multiple ion monitoring wordt gebruikt, is de detectiegrens 5 µg/l appelsap. Bij de laatste methode kunnen 10 µg/l appelsap betrouwbaar gemeten worden (57).

De TMS derivaten kunnen met verschillende reagentia worden bereid, namelijk:

- 1) N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide(BSA)-benzeen (1:25)
- 2) BSA-trimethylchlorosilane(TMCS)-benzeen (1:1:25)
- 3) hexamethyldisilazane(HMDS)-TMCS-benzeen (1:1:25)
- 4) N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide(BSTFA)-benzeen (1:25)
- 5) N-trimethylsilylimidazole (SIM)-benzeen (1:25).

De reagentia 1 en 2 geven goede derivaten dus ook goede chromatogrammen. Het reagens 3 reageert langzamer dan de reagentia 1 en 2. Het reagens 5 heeft het patuline zelfs na 24 uur niet volledig tot derivaten gevormd. De reagentia 4 en 5 geven pieken naast de piek van het TMS derivaat, dat suggereert, dat er bijprodukten worden gevormd (25, 74).

6.4 HPLC methode

De hogedrukvloei-stofchromatografie met als kolom een Zorbax Sil en als elutievloei-stof iso-oktaan-methyleenchloride-methanol (84+15+1) heeft als detectiegrens voor appelsap 11 µg/l.

Bij deze methode wordt een UV-detector van 254 nm gebruikt. De recovery bij deze methode is groter dan 85% (78, 5, 6).

Bij gebruik van dezelfde opstelling, alleen nu met als elutievloeistof iso-oktaan-ethylether-azijnzuur (750+250+0,5) is de detectiegrens voor appelstroop 30 µg/kg met als recovery 89,0-112,1%. Bij deze methode wordt patuline voor het storende 5-hydroxymethylfurfural gedetecteerd (77).

Voor de patuline bepaling in druivesap wordt een µ-Bondapak-CN met als elutievloeistof een gradiënt van A n-hexaan met B 5% Butanol-1 in dichloormethaan, van 10 tot 50% B in 7 minuten. De detectiegrens voor druivensap is 5 µg/kg met een recovery van meer dan 90%. Bij deze methode wordt een UV-detector van 275 nm gebruikt. Het storende 5-hydroxymethylfurfural wordt voor het patuline gedetecteerd (36).

Door gebruik te maken van een reverse phase kolom (partisil-10 ODS) en een UV-detector van 280 nm in plaats van 254 nm is de detectiegrens voor appelsap verlaagd van 11 µg/l naar 1 µg/l met een recovery van $82,6 \pm 2,8\%$ (71).

Door gebruik te maken van een Spherisorb-5 µm kolom met als elutievloeistof gedestilleerd water en als detector een UV-detector van 276 nm te gebruiken, wordt een detectiegrens voor appelsap verkregen van 5 µg/l met als recovery 70-75% (46).

7. Conclusie

Patuline is een toxische uitscheidingsstof dat door verschillende Penicillium- en Aspergillus-schimmelsoorten geproduceerd wordt en dus meestal voorkomt op beschimmelde en verrotte produkten.

Patuline bezit waarschijnlijk ook carcinogene en mutagene eigenschappen. De meest geschikte combinatie voor het bepalen van patuline is HPLC met een straight phase kolom en UV-detectie. De detectiegrens is bij deze methode 5 µg/kg met een recovery van meer dan 90% (36).

Er kan ook een GLC methode worden gebruikt met als detector een massaspectrometer (high resolution single ion monitoring). Deze methode heeft als detectiegrens 0,2 µg/l appelsap (57).

8. Referenties

1. Abraham, E.P. and Florey, H.W. 1949
Substances produced by Fungi Imperfekti and Ascomycetes. In
"Antibiotics" Vol. I, edited by Florey, H.W., Chain, E., Heatley,
N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. and Florey,
M.E., Oxford University Press, London. p. 273-283.
2. Alperden, I., Mintzlaff, H.J., Tauchmann, F. und Leistner, L. 1973
Untersuchungen über die Bildung des Mykotoxins Patulin in Rohwurst.
Fleischwirtschaft 53: 566.
3. Anderson M.S., Dutton, M.F., and Harding, K. 1979
Production and Degradation of Patulin by Paecilomyces Species, a
Common Contaminant of Silage
J. Sci. Food Agric. 30: 229.
4. Arrhenius, E. 1973.
Mycotoxinoses: An old Health Hazard with new Dimensions.
Ambio 2: 49.
5. Brackett, R.E. and Marth, E.H. 1979
Ascorbic Acid and Ascorbate Cause Disappearance of Patulin from
Buffer Solutions and Apple Juice.
Journal of Food Protection 42: 864.
6. Brackett, R.E. and Marth, E.H. 1979
Patulin in Apple Juice from Roadside Stands in Wisconsin.
Journal of Food Protection 42: 862.
7. Brackett, R.E. and Marth, E.H. 1979
Stability of Patulin at pH 6,0-8,0 and 25°C.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 169: 92.
8. Brian, P.W., Elson, G.W. and Löwe, D. 1956
Production of Patulin in Apple Fruits by Penicillium expansum.
Nature 178: 263.

9. Broom, W.A., Bülbring, E., Chapman, C.J., Hampton, J.W.F., Thomson, A.M., Ungar, J., Wien, R., and Woolfe, G. 1944.
The pharmacology of patulin.
Brit. J. Exp. Pathol. 25: 195.
10. Bullerman, L.B. 1976.
Examination of Swiss cheese for incidence of mycotoxin producing mold.
J. Food Science 41: 26.
11. Bullerman, L.B. and Hartung, T.E. 1973.
Mycotoxin producing potential of molds from flour and bread.
Cereal Sci. Today 18: 346.
12. Bullerman, L.B. and Olivigni, F.J. 1974.
Mycotoxin producing potential of molds isolated from Cheddar cheeses.
J. Food Science 39: 1166.
13. Campbell, T.C. and Stoloff, L. 1974.
Implication of mycotoxins for human Health.
J. Agr. Food Chem. 22: 1008.
14. Cats, H. en Kruyt, J. 1976.
De bepaling van patuline in appelsap, appelmoes en appelstroop met behulp van dunnelaag-chromatografie en/of hogedrukvloeistof-chromatografie .
De Ware(n) Chemicus 6: 12.
15. Ciegler, A., Detroy, R.W. and Lillehoy, E.B. 1971.
Patulin, Penicillic Acid and other carcinogenic lactones. In "Microbioal Toxins". A comprehensive treatise. Vol. VI, Fungal Toxins. Edited by Ciegler, A., Kandis, S. and Ajl, S.J. Academic Press, New York and London.
p. 409 - 414.

16. Dauben, H.J. and Weisenborn, F.L. 1949.
The structure of patulin.
J. Amer. Chem. Soc. 71: 3853.

17. Draughon, F.A. and Ayres, J.C. 1979.
Insecticide Inhibition of Growth and Patulin Production by
Penicillium Urticae.
J. Food Science 44: 1232.

18. Ehman, J. and Gaucher G.M. 1977.
Quantitation of Patulin Pathway Metabolites Using Gas Liquid
Chromatography.
J. Chromatogr. 132: 17.

19. Ellis, J.R. und McCalla, T.M. 1973.
Wirkungen von Patulin und Art der Einwirkung auf das Wachstum von
Weizen.
Appl. Microbiol. 25: 562.

20. Engel, G., Reimerdes, E.H., Lembke, A., Klostermeyer, H. und
Behnert, J. 1975.
Untersuchung zur Bildung von Mycotoxinen und deren quantitative
Bestimmung. II Die Bildung von Patulin durch Penicillium exapnsum,
P.claviforme, P.patulum (urticae) und Aspergillus clavatus.
Milchwissenschaft 30: 129.

21. Frank, H.K., Orth, R. und Hermann R. 1976.
Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft.
1 Kernobst und daraus hergestellte Produkte.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 162: 149.

22. Frank, H.K., Orth, R. und Figge A. 1977.
Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft.
2. Verschiedene Obstarten, Gemüse und daraus hergestellte Produkte
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163: 114.

23. Frank, H.K. 1977.
Occurrence of Patulin in Fruit and Vegetables.
Ann. Nutr. Alim. 31: 459.

24. Fritz, W., Buthig, Cl. und Engst R. 1979.
Zur Analytik und Lebensmittelhygienisch-toxikologischen Bedeutung
von Patulin in Obst und Obstprodukten.
Nahrung 23: 159.

25. Fujimoto, Y., Suzuki, T. and Hoshino, Y. 1975.
Determination of Penicillic Acid and Patulin by Gas-Liquid
Chromatography with an Electron-Capture Detector.
J. Chromatogr. 105: 199.

26. Gertz, C. und Böschmeyer 1980.
Verfahren zur Bestimmung verschiedener Mykotoxine in Lebensmitteln.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 171: 335.

27. Gimeno A. 1979.
Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxins,
Ochratoxins, Sterigmatocystin, Zearalenone, Citrinin, T-2 Toxin,
Diacetoxyscirpenol, Penicillic Acid, Patulin and Penitrem A.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 579.

28. Glister, G.A. 1941.
A new antibacterial agent produced by a mould.
Nature 148:470.

29. Harwig, J., Chen, Y.K., Kennedy, B.P.C. and Scott, P.M. 1973 a.
Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium*
expansum in natural rots of apple in Canada.
J. Can. Food Sci. Technol. 6: 22.

30. Harwig, J., Scott, P.M., Kennedy, B.P.C. and Chen Y.K. 1973 b.
Disappearance of patulin from apple juice fermented by
Saccharomyces spp.
J. Can. Food Sci. Technol. 6: 45.

31. Hofmann, K., Mintzlaff, H.J., Alperden, I., und Leistner, L. 1971
Untersuchungen über die Inaktivierung des Mykotoxins Patulin durch
Sulphydrylgruppen.
Die Fleischwirtschaft 51: 1534.
32. Josefsson, B.G.E. and Möller, T.E. 1977.
Screening Method for the Detection of Aflatoxins, Ochratoxin,
Patulin, Sterigmatocystin and Zearalenone in Cereals.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 60: 1369.
33. Katzmann, P.A., Hays, E.E., Cain, C.K., van Wijk, J.J., Reithel,
F.J., Thayer, S.A., Doisy, E.A., Wade, N.J., Gaby, W.L., Carroll,
C.J., Muir, R.D. and Jones, L.R. 1944.
Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*.
J. Biol. Chem. 154: 475.
34. Koch, Ch.E., Thurm, V. und Paul, P. 1979.
Zur hygienischen Bedeutung von Patulin in Lebensmitteln.
1. Mitt. zum analytischen Nachweis von Patulin.
Nahrung 23: 125.
35. Leistner, L. und Mintzlaff, H.J. 1973.
Mykotoxine in Fleischwaren.
Z. Lebensm. Unters. und Forsch. 151: 241.
36. Leuenberger, U., Gauch, R. und Baumgartner, E. 1978.
Neue Bestimmungsmethode des Mykotoxins Patulin mit Hilfe der
Dünnschicht- und Hochdruckflüssigchromatographie.
J. Chromatogr. 161: 303.
37. Lovett, J. 1972.
Patulin toxicosis in poultry.
Poult. Sci. 51: 2097.
38. Lovett, J. and Peeler, J.T. 1973.
Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in
aqueous solution.
J. Food Science 38: 1094.

39. Mayer, V.W. and Legator, M.S. 1969.
Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin.
J. Agr. Food Chem. 17: 454.
40. Meyer, R.A. 1976.
Chlor-Tolidin und Chlor-Dianisidin als dünnschichtchromatographische Detektionsreagenzien für Patulin.
Nahrung 20: 79.
41. Meyer, R.A. 1977.
Chlor-Benzidin als dünnschichtchromatographisches Nachweisreagenz für Patulin in Apfelsaft.
Nahrung 21: 85.
42. Meyer, R.A. 1978.
Dünnschichtchromatographische Bestätigungsreaktionen für den Nachweis von Patulin in Apfelsaft.
Nahrung 22: 75.
43. Mintzlauff, H.J. und Christ, W. 1971.
Biologischer Mykotoxin-Nachweis mit Hühnerküken unter besonderer Berücksichtigung von Leberschäden.
Die Fleischwirtschaft 51: 1802.
44. Mintzlauff, H.J., Ciegler, A. and Leistner, L. 1972.
Potential mycotoxin problems in mould-fermented sausage.
Z. Lebensm. Unters. und Forsch. 150: 133.
45. Mintzlauff, H.J. und Leistner, L. 1971.
Untersuchung über die Eignung von *Penicillium expansum* (LINK THOM) als Starterkultur für die Rohwurst-Herstellung.
Die Fleischwirtschaft 51: 1077.
46. Möller, T.E. and Josefsson E.
Rapid High Pressure Liquid Chromatography of Patulin in Apple Juice.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 1055.

47. Northolt, M.D., van Egmond, H.P. and Paulsch, W.E. 1978.
Patulin Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature.
J. Food Protection 41: 885.
48. Norstadt, F.A. and McCalla, T.M. 1963.
Phytotoxic substance from a species of *Penicillium*.
Science 140: 410.
49. Paul, P. 1978.
Zur Derivatisierung von Patulin auf der Dünnschichtplatte.
Nahrung 22: K 21.
50. Pei, Y.C., Wang, Y. and Huang, W.Y. 1957.
Isolation of patulin from *Penicillium expansum* culture.
K'o Hsüeh T'ung Paa 19: 588.
51. Pero, R.W., Harvan, D. and Owens, R.G. 1972.
A Gas Chromatographic Method for the Mycotoxin Penicillic Acid.
J. Chromatogr. 65: 501.
52. Pohland, A.E. and Allen, R. 1970a.
Mycotoxins. Analysis and Chemical confirmation of patulin in grains.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 53: 686.
53. Pohland, A.E. and Allen, R. 1970b.
Stability studies with patulin.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 53: 688.
54. Pohland, A.E., Sanders, K. and Thorpe, C.W. 1970.
Determination of patulin in apple juice.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 53: 692.
55. Polzhofer, K. 1977.
Patulinbestimmung in Lebensmitteln Teil I: Patulinbestimmung in Apfelsaft.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163: 183.

56. Polzhofer, K. 1977.
Patulinbestimmung in Lebensmitteln Teil II: Patulinbestimmung in Tomaten, Birnen, Äpfeln, Gurken, Pflaumen.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163: 272.
57. Price, K.R. 1979.
A Comparison of two Quantitative Mass Spectrometric Methods for the Analysis of Patulin in Apple Juice.
Biomedical Mass Spectrometry 6: 573.
58. Reiss, J. 1972.
Mykotoxine in Nahrungsmitteln II. Nachweis von Patulin in spontan verschimmeltem Brot und Gebäck.
Naturwissenschaften 59: 57.
59. Reiss, J. 1973b.
Influence of the mycotoxins patulin and diacetoxyscirpenol on fungi.
J. Gen. Appl. Microbiol. 19: 415.
60. Reiss, J. 1973c.
Mykotoxinen in Nahrungsmitteln III. Mitteilung: Bildung von Patulin auf verschiedene Schnittbrotarten durch *Penicillium expansum*.
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2: 171.
61. Rosen, J.D. and Pareless, S.R. 1974.
Quantitative analysis of patulin in apple juice.
J. Agr. Food Chem. 22: 1024.
62. Roberts, B.A. and Patterson, D.S.P. 1975.
Detection of Twelve Mycotoxins in Mixed Animal Feedstuffs, Using a Novel Membrane Clean-up Procedure.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 58: 1178.

63. Scott, P.M. 1974.
Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 57: 621.
64. Scott, P.M. and Kennedy, B.P.C. 1973.
Improved method for the thin-layer chromatographic determination of patulin in apple juice.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 56: 813.
65. Scott, P.M. Lawrence, J.W. and Walbeek, W.v. 1970.
Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts.
Appl. Microbiol. 20: 839.
66. Scott, P.M. and Somers, E. 1968.
Stability of patulin and penicillic-acid in fruit juices and flour.
J. Agr. Food Chem. 16: 483.
67. Scott, P.M., Fuleki, T. and Harwig J. 1977
Patulin content of Juice and Wine Produced from Moldy Grapes.
J. Agric. Food Chem. 25: 434.
68. Siriwardana M.G. and Lafont P. 1979.
Determination of Mycophenolic Acid, Penicillic Acid, Patulin, Sterigmatocystin and Aflatoxins in Cheese.
J. Dairy Sci. 62: 1145.
69. Siriwardana, M.G. et Lafont P. 1979.
Méthode densitométrique de dosage de la patuline dans les jus de fruits.
J. Chromatogr. 173: 425.

70. Stinson, E.E., Huhtanen, C.N., Zel, T.E., Schwartz, D.P. and Osman, S.F. 1977.
Determination of Patulin in Apple Juice Products as the 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivative.
J. Agric. Food Chem. 25: 1220.
71. Stray, H. 1978.
High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Patulin in Apple Juice.
72. Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J.V., Stack, M. and Campbell, A.d. 1971.
A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 54: 91.
73. Stott, W.T. and Bullerman, L.B. 1975a.
Microbiological assay of patulin using *Bacillus megaterium*.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 58: 497.
74. Suzuki, T., Fujimoto, Y., Hoshino, Y. and Tanaka, A. 1975.
Trimethylsilylation of Penicillic Acid and Patulin and the Stability of the Products.
J. Chromatogr. 105: 95.
75. Tauchmann, F., Toth, L. und Leistner, L. 1971.
Eine halbquantitative Methode für die Bestimmung von Patulin in Fleisch und Fleischwaren.
Die Fleischwirtschaft 51: 1079.
76. Walbeek, W.v. 1973.
Fungal toxins in foods.
J. Can. Inst. Food Sci. Technol. 6: 45.
77. Ware, G.M. 1975.
High-pressure liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple butter.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 58: 754.

78. Ware, G.M., Thorpe, C.W. and Pohland, A.E. 1974.
Liquid chromatographic method for determination of patulin in
apple juice.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 57: 1111.
79. Wilson, D.M. and Nuovo, G.J. 1973.
Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*.
Appl. Microbiol. 26: 124.
80. Woodward, R.B. and Singh, G. 1949.
The structure of patulin.
J. Amer. Chem. Soc. 71: 758.
81. Woodward, R.B. and Singh, G. 1950.
The synthesis of patulin.
J. Amer. Chem. Soc. 72: 1428.
82. Young, J.C. 1979.
Fluorescence Detection and Determination of Patulin by Thin-Layer
Chromatography of its Aniline Imine.
J. Environ. Sci. Health B14: 15.

Tabel 1 Het voorkomen van patuline in appelsap en appelwijn (23)

produkt	aantal monsters	% postieve monsters	max. patuline gehalte	methode	referenties
appelsap	1	100	1 mg/l	DLC, GLC MS	Scott et al (1972)
appelsap	13	61	0,3 mg/l	HPLC	78
appelwijn	95	4	25 mg/l	DLC	79
	5	100	45 mg/l	DLC	
appelwijn	12	0,8	1 mg/l	DLC	29

Tabel 2 Extractie van patuline uit verschillende producten (DLC-methode)

monster	extractiemiddel	hulpmiddelen	referenties
graan	acetonitril-hexaan (4+1)	-	52
appelsap	ethylacetaat	-	64, 63, 14, 41, 70, 42, 3, 82
mengvoeder	acetonitril-4% KCl-opl. (9+1)	-	62, 27
appelmoes	ethylacetaat	mechanische mixer	14
appelstroop	water met ethylacetaat	mechanische mixer + centrifuge	14
graan	0,1 M H ₃ PO ₄ + chloroform	Celite 545	32
appelsap	chloroform	Celite 545 + aceton + chromatografiebuis	55
tomaten + peren + appels + augurken + pruimen	chloroform	aceton + Celite 545 mixer chromatografiebuis	56
druivesap + wijn	ethylacetaat	centrifuge	67
appel	acetonitril + chloroform	ultra-turrax + centrifuge	24
fruit en groentemonsters	ethylacetaat	-	34
kaas	chloroform + ethylacetaat	blendor centrifuge	68
appelsap	iso-propanol + ethylacetaat (60+40)	-	69
levensmiddel-producten	ethylacetaat	Celite 545	26

Tabel 3 Clean-up van de patuline extracten voor de DLC methode

monster	soort	stationaire fase	elutie-vloeistof	referenties
graan	preparatieve DLC	silicagel GF	benzeen-methanol- azijnzuur (90+5+5)	52
appelsap	kolomchrom.	silicagel	benzeen-ethyl- acetaat (75+25)	64, 63, 14, 82, 69
mengvoeder	membrane	-	iso-octaan	62, 27
appelmoes	kolomchrom.	silicagel 60	ethylacetaat- benzeen	14
appelstroop	kolomchrom.	silicagel 60	ethylacetaat- benzeen	14
graan	kolomchrom.	sephadex LH 20	chloroform- methanol (2+1)	32
appelsap	-	-	-	55
tomaten + peren + appels + augurken + pruimen	vloeistof- vloeistof- extractie	-	n-hexaan	56
druivesap + wijn	kolomchrom.	silicagel	benzeen-ethyl- acetaat (75+25)	67
appelsap	DLC		tolueen-ethyl- acetaat (1+1)	70
appelsap	DLC	silicagel G	chloroform- azijnzuur (9+1)	3
appelsap	kolomchrom.	kieselgel	benzeen-ethyl- acetaat (75+25)	41, 42
appelsap + appels	kolomchrom.	kieselgel	chloroform	24
fruit en groente	kolomchrom.	florisil	aceton-dichloor- methaan (5+95)	34
kaas	kolomchrom.	kieselgel H	ether-n-hexaan mierzuur (60+20+5)	68
levensmid- delprodukten	kolomchrom.	kieselgel	ethylacetaat- methanol (90+10)	26

Tabel 4 Patulinebepaling m.b.v. de DLC met

monster	stationaire fase	mobile fase	detectie-(reagens)	vorm van de detectie	detectiegrens	recovery	referenties	
graan	silicagel GF	benzeen-methanol azijnzuur (90+5+5)	W-licht	donkere vlekken tegen fluorescerende achtergrond	40 µg/kg	-	52	
			3% ammonium- hydroxide+4% phenyl- hydrazine	licht gele vlek op witte achtergrond	40 µg/kg	-	52	
appelsap	silicagel	tolueen-ethylacetaat- 90% mierzuur (5+4+1)	0,5% MBTH hydrochloride-opl.	onder langgolvig W-licht geel-bruin fluorescerende vlek	20-25 µg/l 0,01 µg/vlek	bevredigend	64, 63	
patuline afkomstig van schimmel stammen (geïsoleerd)	silicagel G	tolueen-ethylacetaat- 90% mierzuur (10:3:1)	W-licht				20	
			254 nm					
			p-anisaldehyd	zichtbaar licht: zwak bruin W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie				20
			anthron	zichtbaar licht: licht geel W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie				20
			benzidín	zichtbaar licht: geel-bruin W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie				20
			hydrazonohydro- methylbenzothiazo- hydrochlorid (MBTH)	zichtbaar licht: geel W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie	0,05 µg		20	
mengvoeder	silicagel 60 F254	tolueen-ethylacetaat- 90% mierzuur(60+30+10)	kortgolvige	absorberende vlek		-	62	
			W-licht					
			langgolvig W-licht	zwak blauw fluorescerende vlekken			-	62
			MBTH	zichtbaar licht: geel W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie	0,5 mg/kg 2,0 mg/kg	50% 80%	62	
appelsap + appelmoes + appelstroop	silicagel G	I chloroform-(1) aceton (9:1) II tolueen-ethyl- acetaat-mierzuur 90% (5:4:1)			appelsap 25 µg/kg appelmoes appelstroop 250 µg/kg			
			0,5% MBTH hydro- chloride	langgolvig W-licht geel-bruin fluorescerende vlekken	50-100 µg/kg	-	14	
appel + vlees	kieselgel G	Chloroform-aceton- 85% mierzuur (66:31:3)	Chlor-o-tolidín	W-licht 366 nm: groen-gele fluorescentie	5 ng	-	40	
			Chlor-o-dianisidín	W-licht 366 nm: groen-gele fluorescentie	5 ng	-	40	
graan	silicagel G HR	benzeen-ethylacetaat- mierzuur (80+20+0,5)	0,5% MBTH hydro- chloride	langgolvig W-licht geel-bruine fluorescentie	50 µg	-	32	
appelsap	kieselgel G	isopropylether-85% mierzuur (88+12)	benzidín	W-licht 366 nm: geel-groene - fluorescentie		-	41	
appelsap	kieselgel fertigplatten	I n-hexaan-ether (1:4) II diethylether	densitometrie 273 nm		100 µg/kg	82-90%	55	

Vervolg Tabel 4 Parulinebepaling m.b.v. de DLC methode

monster	stationaire fase	mobiele fase	detectie-(reagens)	vorm van de detectie	detectiegrens	recovery	referenties
tomaten + peren + appel + augurken + pruimen	kieselgel fertigplatten	I n-hexaan-diethyl- ether (1+4) II diethylether	densitometrisch 273 nm	-	40 µg/kg	86-95%	56
druivensap wijn	silicagel	I chloroform-aceton (9+1) II toluen- ethylacetaat-90% mierzuur (5:4:1)	5X MBTH hydrochloride	W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescentie	wijn 30 µg/l druivensap 60 µg/l	-	67
appelsap	-	-	2,4-dinitrophenyl- hydrazonen m.b.v. spectrofotometer	W 375 nm E = 18250	-	bevredigend	70
appelsap	silicagel	I-tolueen-ethylacetaat 85% mierzuur(50+40+10) II chloroform-aceton (68+32)	phenylhydrazin chlor/2,4-dinitro phenylhydrazin	zichtbaar licht: gele vlekken zichtbaar licht: gele vlekken	100 ng 100 ng	-	42 42
appelsap	-	-	spectrofotometrisch aniline imine	W-licht: 275 nm E=14540	-	-	3
appelsap	silicagel	3 of 4x ontwikkelen met benzeen	meet emissie bij 485 nm	meet emissie bij 485 nm	-	-	82
fruit + fruitproducten	kieselgel G	I chloroform- (2) methanol (96+4) II toluen-ethylacetaat mierzuur (50+50+10)	W 366 nm densitometrisch	donkere vlekken op geel- groene ondergrond	50 ng 10 µg/kg	90% 86-92%	24 24
fruit + groenteproducten	kieselgel G	I toluen-ethylacetaat mierzuur (5+4+1) II benzeen-methanol- ijsazijn (90+5+5)	Benzidin-oplossing	W-licht 360 nm: geel fluorescerende vlekken	5 µg/l sap 5 µg/kg fruit of groente	-	34
mengvoeder	silicagel G	tolueen-ethylacetaat- chloroform (100+50+50)	MBTH hydro- chloride	W-licht 366 nm: geel-bruine fluorescerende vlekken	750-800 µg/kg	87-90%	27
kaas	kieselgel 60	I pentaan-ethylacetaat- (9+6) II isopropylether-(3) pentaan-ethylalcohol- pyridine (42:6:24)	diethylamine	langgolvig W-licht grijs-blauwe fluorescentie	20 µg/kg	82%	68
appelsap	silicagel 60	I pentaan-ethylacetaat (9+6) II isopropylether- pentaal-ethanol- pyridine (84+12+4+0,8)	densitometrisch anilineacetaten	W-licht: geel-groene fluorescentie	fluorescentie 4 ng densitometrie 10 ng	91%	69
levensmiddel- producten	kieselgel 60	I benzeen-methanol (1) azijnzuur (90+5+5) II toluen-ethylacetaat 90% mierzuur(60+30+30)	densitometrisch W 273 nm		densitometrisch 10 ng W-licht 25 ng	-	26

Opmerkingen voor tabel 4

- 1) De plaat wordt ontwikkeld met loopvloeistof II, maar er worden betere resultaten verkregen door tweedimensionale DLC uit te voeren.
- 2) Om verwisseling van patuline en op patuline lijkende stoffen zoals 5-hydroxymethylfurfural uit te sluiten wordt er nog een plaat ontwikkeld met de loopvloeistoffen I chloroform-azijnzuur-ether (68+4+12) en II chloroform-aceton (90+10). De densitometer sluit deze verwisseling ook uit.
- 3) Indien er verontreiniging optreedt bij de tweede keer ontwikkelen van de plaat, kan als tweede loopmiddel ook gebruikt worden chloroform-aceton-water (93+7+1) of ether-hexaan-90% mierzuur (60+20+0,4).

Tabel 5 Extractie van patuline uit verschillende produkten voor de GLC methode

monster	extractiemiddel	hulpmiddel	referenties
appelsap	ethylacetaat	-	54, 61, 57
graan + rijst	3% methanol in chloroform	-	51
mengvoer	ethylacetaat	-	25

Tabel 6 Clean-up van de patuline extracten voor de GLC methode

monster	soort	stationaire fase	elutievloeistof	referenties
appelsap	-	-	-	54, 61
graan + rijst	DLC	silicagel G	methanol-chloroform (10:90)	51
mengvoer	DLC	silicagel GF	benzeen-methanol-azijnzuur (18:1:1)	25
appelsap	kolomchrom.	silicagel	-	57

Tabel 7 GLC-bepaling van patuline

monster	stationaire fase	GLC condities	derivaat	detectie	detectiegrens	recovery	referenties
appelsap	3% JXR op Gas Chrom. W	temperatuur: 110°C gevoeligheid: 3×10^{-11}	acetaat	vlamionisatie detector (FID)	60 ng	90%	54
	3% JXR op Gas Chrom. W	temperatuur: 130°C gevoeligheid: 3×10^{-11}	chlooracetaat	FID: electron capture detector (ECD)	40 ng 12 ng	- -	54
	1% SE 30 op Gas Chrom. Q	temperatuur: 110°C gevoeligheid: 3×10^{-11}	silylether	FID	100 ng	-	54
graan + rijst	3% OV-17	(1) temp.pr. 100-250°C (met 8°C/min) temp.pr. 75-250°C (met 4°C/min) isotherm. 125°C (gevoeligheid 10^{-11})	trimethylsilyl (TMS)	FID	(2)	-	51
	3% Dexsil 300	idem	TMS	FID		-	51
	3% OV-25	idem	TMS	FID		-	51
appelsap	3% OV-17 op Gas Chrom. Q	temperatuur 175°C	TMS	massafragmentografie	10 µg/l	100-114%	61
mengvoer	een mengsel (1:1) van 10% DC 200 en 15% QF-1 elk op Gas Chrom. Q	temperatuur 175°C	TMS (3)	ECD	20 µg/kg	85-98%	25, 74
-	10% QF-1 op Gas Chrom. Q	temp.pr. 2 minuten 120°C dan 4°C/min tot 200°C	TMS	FID	12 µg/l	-	18
appelsap	5% OV-17 op diatomite CQ of 3% SP 2250 op supelcoport	temperatuur OV-17: 200°C temperatuur SP 2250: 190°C	TMS	massaspectrometer - High resolution single ion monitoring - low resolution multiple ion monitoring	0,2 µg/l 5 µg/l betrouwbaar 10 µg/l	- -	57 57

Opmerkingen voor tabel 7

- 1) De beste temperatuurprogrammering bij de GLC methode is 100-250°C met 8°C/min. De temperatuurprogrammering van 75-250°C met 4°C/min resulteerde tot grote variatie in de retentietijden en de isotherme run bij 125°C resulteerde tot een erg zwakke respons voor patuline.
- 2) De detectiegrenzen zijn afhankelijk van de kolom.
- 3) Als trimethylsilyleringsreagens kan worden gebruikt:
 - 1) N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide(BSA)-benzeen (1:25) [25] [18]
 - 2) BSA-trimethylchlorosilane(TMCS)-benzeen (1:1:25) [18] [51] [25]
 - 3) hexamethyldisilazane(HMDS)-TMCS-benzeen (1:1:25)
 - 4) N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide(BSTFA)-benzeen (1:25)
 - 5) N-trimethylsilylimidazole(SIM)-benzeen (1:25).

Tabel 8 Extractie van patuline uit verschillende produkten voor de HPLC methode

monster	extractiemiddel	hulpmiddel	referenties
appelsap	ethylacetaat	-	78, 71, 56, 46
appelstroop	ethylacetaat	-	77
druivensap	tolueen-ethylacetaat (3:1)	extrelut- kolom	36

Tabel 9 Clean-up van de patuline extracten voor de HPLC methode

Monster	soort	stationaire fase	elutievloeistof	referenties
appelsap	kolomchrom.	silicagel	ethylacetaat- benzeen (25+75)	78, 6
appelstroop	kolomchrom.	silicagel	ethylacetaat- benzeen (25+75)	77
druivesap	kolomchrom.	kieselgel 60	ethylacetaat- tolueen (1:3)	36
appelsap ()	kolomchrom.	silicagel	ethylacetaat- tolueen (30+70)	71
buffermonster appelsap	-	-	-	5
appelsap	vloeistof-vloeistof extractie	-	natriumcarbonaat- oplossing	46

Tabel 10 Patuline bepaling met behulp van HPLC methode

monsters	stationaire fase	elutievlloeistof	detectie	detectiegrens	recovery	refrenties
appelsap	Zorbax-Sil	iso-oktaan-methyleen-chloride-methanol (8+15+1)	UV-licht 254 nm	11 µg/l	> 85%	78, 5, 6
appelstroop	Zorbax-Sil	iso-oktaan-ethyl-ether-azijnzuur (750+250+0,5) 1)	UV-licht 254 nm	15 ng	89,0-112,1%	77
druivesap	µ Bondapak-CN	pomp A: n-hexaan pomp B: 5% butanol-1 in dichloormethaan 2)	UV-licht 275 nm	5 µg/kg	> 90%	36
appelsap	Partisil-10 ODS	ethylacetaat-methanol (10+90)	UV-licht 280 nm	1 µg/l	82,6 ± 2,8%	71
appelsap	Spherisorb-5 µm ODS	gedestilleerd water	UV-licht 276 nm	5 µg/l	70-75%	46

Opmerkingen

- 1) Patuline wordt voor het storende 5-hydroxymethylfurfural gedetecteerd.
- 2) Patuline wordt na het storende 5-hydroxymethylfurfural gedetecteerd.