Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 75 (1984)

Heft: 4

Artikel: Amtliche Methoden zur Bestimmung von Patulin = Official methods of analysis for patulin

Autor: [s.n.]

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982720

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **75**, 506–513 (1984)
Eingegangen 6. August 1984. Angenommen 7. September 1984

Amtliche Methoden zur Bestimmung von Patulin

Official Methods of Analysis for Patulin

Arbeitsgruppe Toxine 2 der Eidgenössischen Lebensmittelbuch-Kommission

Einleitung

Patulin gehört in die Gruppe der Mykotoxine, welche seit der Entdeckung der Aflatoxine 1960 immer stärker in den Brennpunkt der Lebensmittelanalytik rückte. Die wichtigsten Patulinbildner sind unter verschiedenen Penicillien zu finden, insbesondere *P. expansum.* Diese Schimmelpilze können bei Kernobst, Steinobst und gewissen Gemüsesorten Braunfäule verursachen. *Frank* (1, 2) wies Patulin in folgenden Früchten und Gemüsen nach: Apfel, Birne, Quitte, Pfirsich, Aprikose, Pflaume, Erdbeere, Banane, Melone, Gurke, Paprika grün und rot, Möhre, Tomate. Es wurden Maximalwerte bis 1 mg Patulin/kg gemessen. Im Apfelsaft ist das Toxin hitzestabil.

Nachdem die von der Eidg. Lebensmittelbuch-Kommission gebildete Arbeitsgruppe für Toxine 2 eine erste amtliche Mykotoxinmethode für die Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 veröffentlichte (3), folgt nun die Bestimmungsmethode für Patulin. Die Arbeitsgruppe überprüfte im wesentlichen drei bewährte Arbeitsvorschriften (4–6). Zwei dieser Methoden wurden der Lebensmittelbuch-Kommission vorgelegt und von dieser zu amtlichen Methoden im Sinne des Lebensmittelbuches erklärt.

Analytik

Prinzip

Es werden zwei verschiedene Bestimmungsmethoden beschrieben:

Methode 1: Aufarbeitung mit Extrelut-Säulen mit anschliessender HPLC an Umkehrphasenmaterial (nach 5).
Überdies steht für diese Aufarbeitung eine DC-Bestätigung zur Verfügung, wobei die R_f-Werte – sowohl derjenige des Patulins wie auch derjenige des auf der DC-Platte hergestellten Acetylderivates – mit dem R_f-Wert vom Patulinstandard übereinstimmen müssen.

Methode 2: Aufarbeitung durch Ausschütteln im Reagenzglas mit anschliessender HPLC an Kieselgel-Material (nach 6).

Bei sinngemässer Anpassung des Standards und der Lösungsmittel der Probenextrakte (Kompatibilität mit Säulenmaterial und Eluens) können die beiden Aufarbeitungsvarianten wahlweise mit beiden HPLC-Varianten gekoppelt werden.

Reagenzien

Patulin rein, z.B. Art. 31630 Serva, Heidelberg BRD.
MBTH (2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methylbenzothiazol-hydrochlorid) z.B. Art. 4527 (Merck), Darmstadt BRD.
Essigsäureethylester destilliert.
Methanol reinst.
Toluol destilliert.
Wasser bidest.
Acetonitril (HPLC-Qualität).
n-Hexan z. A.
Dichlormethan z. A.
n-Butanol z. A.
Essigsäureanhydrid z. A.
Pyridin z. A.
Diisopropylether p. A. Art. 38270 (Fluka), kurz vor Gebrauch gereinigt über basischem Alox Typ W 200, Woelm.
Cyclohexan z. A.
Essigsäure z. A.
Natriumcarbonat (wasserfrei) z. A.
Ethanol abs. z. A.

Geräte und Materialien

Isokratische HPLC-Ausrüstung mit UV-Detektor (276 nm):
– Trennsäule Umkehrphase, z. B. RP-18 Art. 50334 (Merck)[1]
oder:
– Trennsäule Silicagel, z. B. Spherisorb S-5-W 250 x 5 mm.
Ausrüstung für die quantitative Dünnschichtchromatographie:
– Vorzugsweise ein Auftragegerät (z. B. Linomat III, Camag Schweiz)
– Densitometer (z. B. Camag).
Extrelut-Säulen Art. 11737 (Merck).
Extrelut-Nachfüllpackungen Art. 11738 (Merck).
Feinfilter 0,45 μm.
Kieselgel 60 Korngrösse 63-200 μm, Art. 7734 (Merck).
Dünnschichtplatten Kieselgel 60 F Art. 5715 (Merck).
Whirlimixer (z.B. Fisons).

[1] Andere erprobte Typen: μ-Bondapak C_{18} (Waters)
Ultrasphere ODS 5 μm (Beckman)

Herstellung des Patulinstandards

5 mg Patulin werden mit Essigsäureethylester quantitativ aus der Ampulle in einen 25-ml-Messkolben gespült und zur Marke aufgefüllt (= Stammlösung). Spektroskopische Bestimmung der Konzentration: 1,25 ml der Stammlösung werden in einen weiteren 25-ml-Messkolben pipettiert und bei 40 °C wird mit Stickstoff rasch das Lösungsmittel entfernt. Unmittelbar anschliessend wird mit absolutem Ethanol zur Marke aufgefüllt (= Messlösung). Von dieser Lösung wird bei 275 nm in 1 cm Quarzküvetten die Absorption (E_{275}) gegen absolutes Ethanol gemessen (7):

Patulinkonzentration in Messlösung (C_M):

$C_M = E_{275} \cdot 10{,}548\ \mu g/ml$

Patulinkonzentration in Stammlösung (C_S):

$C_S = C_M \cdot 20\ \mu g/ml$

Für die vier möglichen Kombinationen der Aufarbeitung und Bestimmung werden folgende Standardlösungen verwendet:

1. *Extrelut-Aufarbeitung mit Umkehrphasen-HPLC*
   Stammlösung mit Essigsäureethylester/Methanol (1 + 3) auf eine Konzentration von 2,5 µg Patulin/ml verdünnen.
2. *Extrelut-Aufarbeitung mit Kieselgel-HPLC*
   Stammlösung mit Diisopropylether auf eine Konzentration von 2,5 µg Patulin/ml verdünnen.
3. *Ausschüttel-Aufarbeitung mit Umkehrphasen-HPLC*
   Stammlösung mit Essigsäurethylester/Methanol (1 + 3) auf eine Konzentration von 0,625 µg Patulin/ml verdünnen.
4. *Ausschüttel-Aufarbeitung mit Kieselgel-HPLC*
   Stammlösung mit Diisopropylether auf eine Konzentration von 0,625 µg Patulin/ml verdünnen.

Diese Standardkonzentrationen entsprechen — bei gleichem Injektionsvolumen von Probe- und Standardlösung — einer Konzentration von 50 µg Patulin/l Probe.

Standardlösung für DC: Die Stammlösung wird mit Essigsäureethylester/Methanol (1 + 3) so verdünnt, dass eine Konzentration von 15,0 µg Patulin/ml resultiert.

Methode 1

Aufarbeitung mit Extrelut-Säule

Die Extraktionseinrichtung ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. 25 ml wässerige Probe werden auf die Extrelut-Säule gegeben. Nach 15 min wird mit 210 ml Toluol-Essigsäureethylester (3 + 1) und einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 3 ml/min auf die dicht angeschlossene Kieselgelsäule (7,5 g Kieselgel mit

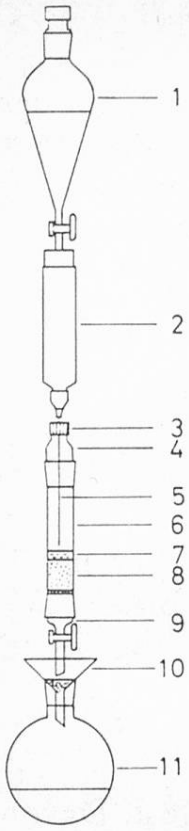

Abb. 1. Vorrichtung zur Extraktion des Patulins aus Fruchtsäften
1 = 250 ml Scheidetrichter mit NS 29/32 und PTFE-Küken
2 = Extrelut-Säule
3 = Sovirel-Durchführung mit Septum
4 = Übergangsstück Sovirel-NS 29/32
5 = Kanüle 19 cm x 1,4 mm I. D. mit Lueranschluss
6 = Glassäule 160 mm (Länge inkl. beiden Hülsen NS 29/32), 30 mm I. D.
7 = Lösungsmittel (Höhe ca. 8 mm über Kieselgel)
8 = Kieselgel
9 = Schliffkegelstück NS 29/32 mit eingesetzter Glasfritte g Null und PTFE-Küken
10 = Trichter mit kleinem Wattebausch
11 = 250-ml-Rundkolben

20 ml Eluens als slurry eingegossen) eluiert. Der Durchfluss wird so eingestellt, dass die Lösungsmittelschicht über dem Kieselgelbett nur ca. 8 mm beträgt. Das in einem 250-ml-Spitzkolben aufgefangene Eluat wird unter vermindertem Druck bei ca. 40 °C auf ca. 1 ml eingedampft (Vorsicht! Bei vollständigem Trocknen können Patulinverluste auftreten).

Das Konzentrat im Spitzkolben wird mit ca. 4 **ml** Essigsäureethylester portionenweise in ein Reagenzglas überführt. Falls die Probe nicht gleichentags chromatographiert werden kann, wird sie mit Stickstoff begast und bei –18 °C aufbewahrt. Andernfalls wird das Lösungsmittel bei ca. 40 °C mit Hilfe von Stickstoff entfernt und der Rückstand sofort in 500 µl Essigsäureethylester/Methanol (1 + 3) (für Umkehrphasen-HPLC) oder Diisopropylether (für Kieselgel HPLC) aufgenommen (= Probenextrakt).

Umkehrphasen-HPLC

Elutionsmittel:	Wasser/Acetronitril (9+1).
Durchflußrate:	1,4 ml min.
Retentionszeit Patulin:	ca. 8 min.
Chromatogrammlaufzeit total:	ca. 10 min.
UV-Detektion:	275 nm (evtl. auch simultan bei 254 nm) (8).
Injektionsvolumen:	30 µl.
Nachweisgrenze:	1–5 µg Patulin/l Probe.
Variationskoeffizient (Wiederholbedingungen):	ca. ± 2% (n = 9 und 60 µg Patulin/l).
Wiederfindungsrate:	ca. 90% (Apfelsaft).

Bestätigung mit Hilfe der DC

Patulinhaltige Probenextrakte, aufgearbeitet nach Methode 1, können mit der Dünnschichtchromatographie bestätigt werden. Überdies kann auf der Platte das Acetylderivat zur weiteren Absicherung hergestellt werden. Folgende Mengen werden aufgetragen:

Standard:	10 µl (= 150 ng), entsprechend 50 µg/l Probe.
Probenextrakt:	60 µl.
Acetylierungsgemisch:	Essigsäureanhydrid/Pyridin (2 + 1).
Standard:	10 µl (= 150 µg), entsprechend 50 µ/l Probe) + 5 µl Acetylierungsgemisch.
Probenextrakt:	60 µl + 5 µl Acetylierungsgemisch.

Nach dem Auftragen werden die mit dem Acetylierungsgemisch versetzten Auftragestellen während 15 min mit dem warmen Fön (ca. 50 °C) angeblasen. Die übrigen Auftragestellen werden währenddessen mit einer Glasplatte abgedeckt.

Anschliessend wird wie folgt entwickelt:

Fließmittel:	n-Hexan/Dichlormethan/n-Butanol (55 + 45 + 9) (aequilibriert mit Fließpapier).
Nachweis:	250 mg MBTH werden in 25 ml Wasser gelöst. Davon werden ca. 5 ml gleichmäßig auf die DC-Platte aufgesprüht und die Platte während 15 min im Trockenschrank bei 130 °C erwärmt.
R_f-Werte:	(HMF = Hydroximethylfurfurol)
Nicht acetyliert:	HMF: 0,3; Patulin: 0,4
Acetyliert:	HMF: 0,6; Patulin: 0,75.

Die Dünnschichtplatte kann mit Hilfe eines Densitometers bei 420 nm quantitativ ausgemessen werden.

(Nachweisgrenze ca. 10-20 µg Patulin/l).

Methode 2

Aufarbeitung durch Ausschütteln

5 ml der wässerigen Probe werden in einem Zentrifugenröhrchen dreimal mit je 5 ml Essigsäureethylester während 1 min auf einem Whirlimixer extrahiert. Bei schlechter Trennung wird zentrifugiert. Die vereinigten Essigsäureethylester-Phasen werden zur Reinigung mit 2 ml 1,4 %iger Na_2CO_3-Lösung geschüttelt (1 min auf dem Whirlimixer) und die organische Phase abpipettiert. Die wässerige Phase wird mit 5 ml Essigsäureethylester zurückgewaschen. Die in einem 25-ml-Spitzkolben vereinigten organischen Phasen werden sofort mit 5 Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert (Carbonatreste in Essigsäureethylester) und bei ca. 40 °C knapp zur Trockne eingedampft. (Vorsicht! Bei vollständigem Trocknen

können Patulinverluste auftreten.) Der Rückstand wird in 200 µl Essigsäureethylester/Methanol (für C_{18}-HPLC) oder Diisopropylether (für Kieselgel-HPLC) aufgenommen. Extrakte von Fruchtsaftkonzentraten, Apfelmus und Birnensäften sind vor der Einspritzung über wenig Celite zu filtrieren (= Probenextrakt).

Anmerkung: Da Patulin im basischen *pH*-Bereich instabil ist, muss bei den entsprechenden Schritten zügig gearbeitet werden.

Kieselgel-HPLC

Elutionsmittel:	Diisopropylether/Essigsäureethylester/ Cyclohexan/Essigsäure (83 + 3 + 14 + 0,1).
Durchflußrate:	2 ml/min.
Retentionszeit Patulin:	ca. 7 min.
Chromatogramm-Laufzeit total:	ca. 30 min.
UV-Detektion:	275 nm.
Injektionsvolumen:	20 µl.
Nachweisgrenze:	1–5 µg Patulin/l Probe.
Variationskoeffizient (Wiederholbedingungen):	ca. ± 2% (n = 9 und 60 µg Patulin/l).
Wiederfindungsrate:	ca. 83% (Apfelsaft).

Anmerkung: Die chromatographische Abtrennung von Patulin, vor allem in Apfelmus und Birnensäften, ist problematisch, da störende Peaks von Inhaltsstoffen in der Nähe des Patulins erscheinen können. Aus diesem Grunde müssen Extrakte von Fruchtsaftkonzentraten, Apfelmus und Birnensäften vor den Injektion über wenig Celite filtriert werden. Die chromatographische Abtrennung von Patulin kann durch Variation des Cyclohexan- und Essigsäureethylester-Gehaltes verbessert werden.

Bemerkungen zu beiden Methoden

1. Alle Lösungsmittelgemische sind als Volumenteile angegeben.
2. Die beschriebenen Methoden eignen sich für folgende Lebensmittel: Apfelsäfte, Birnensäfte, rote und weiße Traubensäfte, Fruchtsirupe und -saftkonzentrate werden gemäss Zubereitungsvorschrift mit Wasser verdünnt. Konfitüren und Apfelmus werden homogenisiert, 20 g mit 60 ml Wasser vermischt und durch ein Faltenfilter filtriert (Nachweisgrenze 10–40 µg/kg).
3. Die Arbeitsgruppe Toxine 2 hat alle vier möglichen Bestimmungsvarianten überprüft. Je nach Kombination schwankt die Wiederfindungsrate zwischen 80 und 90%.
4. Die quantitative Auswertung erfolgt mit der Methode eines externen Standards, indem die Peakfläche (oder -höhe) des Patulins im Probenextrakt mit derjenigen des Standards verglichen wird.

Zusammenfassung

Es werden zwei Bestimmungsmethoden für Patulin beschrieben:

- Aufarbeitung mit Hilfe von Extrelut-Säule und anschliessender HPLC an Umkehrphasen-Material und
- Aufarbeitung durch Ausschütteln und anschliessender HPLC an Kieselgel.

Beide Aufarbeitungen können wahlweise mit beiden HPLC-Systemen kombiniert werden, alle vier Möglichkeiten wurden überprüft. Die Nachweisgrenze der Methoden liegt bei 1–5 µg Patulin/l bzw. 10–40 µg/kg Konfitüre oder Apfelmus, die Wiederfindungsraten bei 80–90% (60 µg/l). Positive Patulinbefunde können dünnschichtchromatographisch bestätigt werden. Überdies ist die Herstellung des Acetylderivates auf der DC-Platte beschrieben.

Diese Analysenverfahren wurden von der Eidg. Lebensmittelbuch-Kommission zu amtlichen Methoden erklärt.

Résumé

Deux méthodes de dosage de la patuline sont décrites. Elles comprennent soit

- une purification de l'extrait sur une colonne Extrelut suivie d'un dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) en phase inversée

soit

- une extraction conventionnelle dans une ampoule à décanter suivie d'un dosage par HPLC sur gel de silice.

Les deux méthodes de préparation de l'extrait peuvent être associées indifféremment à l'un ou l'autre des systèmes HPLC; les quatre combinaisons possibles ont été examinées. La limite de détection des méthodes décrites est de 1–5 µg patuline/l (jus de pomme) ou de 10–40 µg/kg (confiture ou de purée de pomme). Le rendement est de 80–90% (60 µg/l). Les résultats positifs peuvent être confirmés par chromatographie sur couche mince. De plus la formation du dérivé acétylé de la patuline directement sur couche mince est décrite.

Ces méthodes d'analyse ont été reconnues comme méthodes officielles par la Commission fédérale du Manuel suisse des denrées alimentaires.

Summary

Two ways of determination of patulin are described:

- clean up with Extrelut-columns followed by HPLC on reverse-phase-adsorbents, and
- clean up by conventional extraction followed by HPLC on silica.

Both clean up procedures can be combined with both HPLC systems; all four possibilities have been checked. The detection limit of the described methods is 1–5 µg patulin/l, or 10–40 µg/kg for jellies, the recovery ist 80–90% (60 µg/l). Positive results can be confirmed by TLC, and moreover the formation of the derivative with acetic acid anhydride is described.

These methods have been accepted by the Federal Commission for the Swiss Food Manual as official methods.

Literatur

1. *Frank, H. K., Orth, R.* und *Herrmann, R.:* Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. 1. Kernobst und daraus hergestellte Produkte. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **162**, 149–157 (1976).
2. *Frank, H. K., Orth, R.* und *Figge A.:* Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. 2. Verschiedene Obstarten, Gemüse und daraus hergestellte Produkte. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **163**, 111–114 (1977).
3. Arbeitsgruppe «Toxine 2» der Eidg. Lebensmittelbuchkommission: Bestimmung der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **73**, 362–367 (1982).
4. *Tanner, H.* und *Zanier, C.:* Über eine neue Patulinbestimmung in Fruchtsäften und Konzentraten. Schweiz. Z. Obst- und Weinbau **112**, 656–662 (1976).
5. *Leuenberger, U., Gauch, R.* und *Baumgartner, E.:* Neue Bestimmungsmethode des Mykotoxins Patulin mit Hilfe der Dünnschicht- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie. J. Chromatogr. **161**, 303–309 (1978).
6. *Neukom, H. P., Romann, A.* und *Fröhlich, D.:* Modifizierte Methode zur Bestimmung von Patulin in Obstprodukten. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **175**, 342–344 (1982).
7. Methods of Analysis AOAC, 13. Edition Methode Nr. 26.113d. Washington D.C. 1980.
8. *Pfannhauser, W.* und *Blaicher, G.:* Patulin in Apfelsäften; Problematik und Analytik. Ernährung **2**, 523–525 (1978) (Oesterr. Spirituosen-Ztg. **77**).

Arbeitsgruppe Toxine 2

Dr. R. Battaglia, Kantonales Laboratorium Zürich (Präsident)
Dr. U. P. Buxtorf, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt
Dr. A. Etournaud, Laboratoire cantonal Vaud
Dr. H. Guggisberg, Kantonales Laboratorium Thurgau
Dr. U. Leuenberger, Kantonales Laboratorium Bern*
Dr. J. Lüthy, Institut für Toxikologie, Schwerzenbach
Dr. W. Steiner, Kantonales Laboratorium Zürich
Dr. W. Stutz, Kantonales Laboratorium Basel-Land
Dr. A. Cominoli, Laboratoire cantonal Genève
C. Wyss, Société d'assistance technique pour produits Nestlé SA, La Tour-de-Peilz

* Korrespondenzadresse: Postfach, CH-3000 Bern 9