

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA EN JUGOS Y PURÉS DE FRUTAS POR HPLC

Eyda Otero Fernández-Trejejo,¹ José Antonio Arias Verdés² y Ramón Sersa Espinosa³

RESUMEN

Se validó el método de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para la determinación de patulina en jugo de manzana por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector ultravioleta a 275 nm y una columna RP18, para jugo de manzana y puré de frutas. Se empleó como fase móvil una mezcla al 10 % acetonitrilo-agua con una velocidad de flujo de 2,7 mL/min. La patulina presentó un tiempo de retención de $14,8 \pm 0,3$ min. La ecuación de regresión fue $Y = 1952,5X + 1673,5$ y el coeficiente de correlación lineal de 0,9991. Se obtuvo un recobrado medio del 82,51 % y un coeficiente de variación del 3,33 % para los niveles de contaminación ensayados. La repetibilidad de una muestra contaminada con 33 $\mu\text{g/L}$ de patulina fue de 3,12 $\mu\text{g/L}$. Se estableció para los jugos el límite de detección en 1,72 $\mu\text{g/L}$ y el de cuantificación en 5,2 $\mu\text{g/L}$. Los purés de frutas fueron previamente diluidos y centrifugados, proponiéndose para el mango una purificación adicional por columna. Fue diseñado un control de calidad interno para el procesamiento de las muestras.

DeCS: PATULINA; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION; ANALISIS DE REGRESIÓN.

La patulina es una micotoxina producida como metabolito secundario por un gran número de hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, entre los que se encuentra incluido el *P. expansum*. Se le confiere alta toxicidad para células de plantas y animales. Presenta carácter hepatotóxico, nefrotóxico e inmunotóxico. Aunque su carcinogenicidad no ha sido demostrada, los expertos proponen continuar

los estudios en animales de experimentación en especies de no roedores.

La patulina puede detectarse en frutas, hortalizas, cereales enmohecidos y piensos, no obstante, no puede excluirse la presencia de esta micotoxina en las frutas aparentemente sanas. El grado de contaminación está relacionado con el grado de podredumbre y la patulina apenas se extiende fuera de los tejidos alterados; por

¹ Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

² Licenciado en Química. Investigador Auxiliar.

³ Técnico en Química.

consiguiente, la exposición humana no es posible sino a partir de frutas elaboradas.^{1,2}

Estudios realizados en diferentes países indican una moderada a alta incidencia de patulina, particularmente en productos de manzana, aunque los niveles de contaminación son generalmente bajos. Ocasionalmente, altas concentraciones de patulina se han encontrado, alcanzando 1 000 µg/L o más. Varios países han establecido un límite regulatorio de 50 µg/L, valor que recomienda la Organización Mundial de la Salud.

Varios métodos analíticos han sido publicados entre los que se encuentran la cromatografía de capa delgada³⁻⁵ con revelado de color, la cromatografía de gases con agentes derivatizantes y más recientemente la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV o arreglo de diodo.^{6,7}

El objetivo de este trabajo fue establecer y validar un método de análisis de patulina en jugos y compotas de manzanas por HPLC con detección ultravioleta.

MÉTODOS

Se realizó la validación del método oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para la determinación de patulina en jugo de manzana por HPLC,⁶ según los principios del Codex.

Este método es aplicado para la detección y cuantificación de patulina en jugo de manzana y fue extrapolado a otras matrices como puré de peras y mango. La patulina fue extraída con acetato de etilo y purificada por partición en una solución de carbonato de sodio. La muestra extraída se secó con sulfato de sodio anhidro.

Después de evaporar el acetato de etilo, la patulina se redisolvió en 300 µL de fase móvil (10 % acetonitrilo-agua). Para la

identificación y cuantificación se inyectaron 20 µL de extracto en un cromatógrafo líquido de alta presión Knauer, con una bomba isocrática de doble pistón acoplado a un detector Shimadzu UV-visible modelo SPD-6AV y un integrador Shimadzu modelo C R6A Chromatopac. Se empleó una columna cromatográfica de 25 cm x 4 mm, rellena con Spherisol C18 de 100 Å y 5 µg de tamaño de partícula. La columna se almacenó con el 80 % de acetonitrilo agua bidestilada. Se trabajó con el flujo de la fase móvil en 2,7 mL/min. Se estableció la longitud de onda del detector UV a 275 nm y la sensibilidad a 0,04 unidades de absorbancia en la escala completa.

Para verificar la linealidad de la respuesta del detector UV con respecto a la concentración de patulina, se construyó una curva de calibración con 4 puntos por triplicado a partir de una solución intermedia de 8,26 µg/mL en frascos volumétricos de 10 mL con las concentraciones siguientes: 0,248; 0,496; 1,24 y 2,478 µg/mL. La determinación de la concentración del patrón de patulina para la construcción de la curva fue realizada según procedimiento de la AOAC.⁸

Para ensayar el método se emplearon muestras de 1 kg de jugo de manzana y de puré de mango, las cuales son representativas de otras frutas como pera, melocotón y fruta bomba en cuanto a las interferencias presentes. Las muestras se dividieron en 5 porciones, una porción fue utilizada como blanco muestra y las restantes fueron contaminadas con 33; 103,16; 51, 63 y 21,16 µg/L. La primera porción contaminada se utilizó para los estudios de repetibilidad y el resto para conocer la exactitud del método. Cada porción de ensayo fue subdividida en muestras de 5 mL cada una. Se estableció el límite de detección como la cantidad que equivale a 3 veces la desviación causada por el ruido de fondo de una muestra de

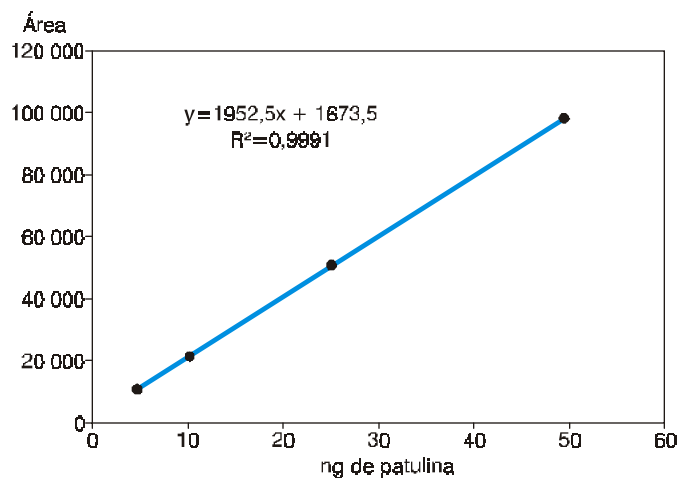


FIG. 1. Curva de calibración.

jugo de manzana sin contaminar y el de cuantificación como 3 veces el límite de detección del método y se implantó un sistema de control interno de la calidad.

Los resultados fueron sometidos a tratamientos estadísticos. Se realizó una prueba de Student para determinar los límites superiores e inferiores de la pendiente de la curva de calibración, y una prueba de Duncan con un nivel de significación del 5 %, para determinar si existían diferencias significativas entre los valores de recobrado obtenidos para los 3 niveles de contaminación empleados en los estudios de exactitud.

RESULTADOS

La figura 1 presenta la curva de calibración y la ecuación de regresión que relaciona las áreas promedio de cada pico calculadas por integración electrónica y la cantidad de patulina en el intervalo de 4,96 a 49,6 ng, con un coeficiente de regresión lineal de 0,9991. Los límites superior e inferior de la pendiente fueron de 2 085 a 1 820 respectivamente, con una varianza de 41,66.

Bajo las condiciones descritas en este artículo, 24,8 ng de patulina producen la señal, con un tiempo de retención de $14,8 \pm 0,3$ min (fig. 2).

En la figura 3 se presenta un cromatograma de una muestra de jugo de manza-

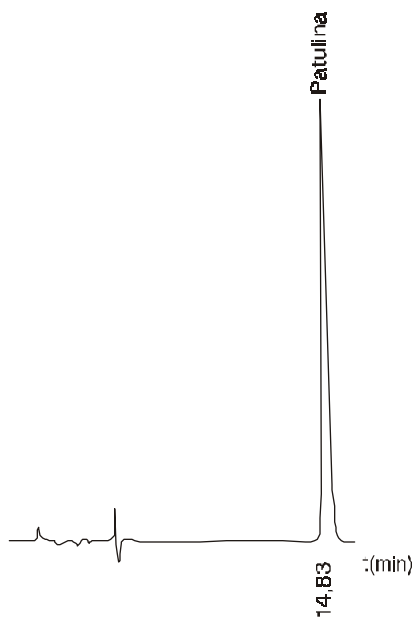


FIG. 2. Cromatograma de un patrón de 24,8 ng de patulina.

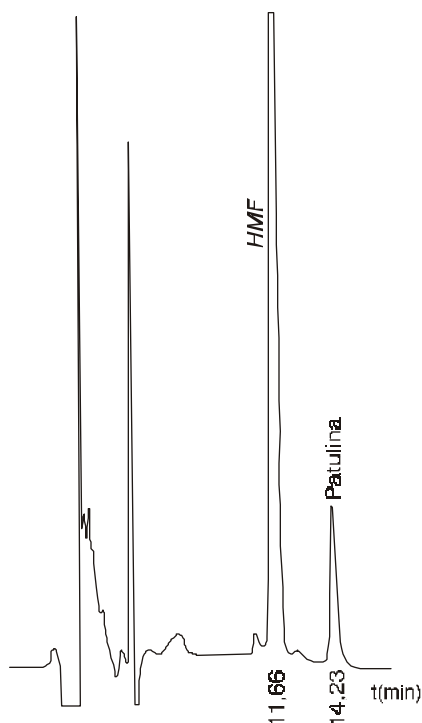


FIG. 3. Cromatograma de una muestra de jugo de manzana contaminada con 3 $\mu\text{g/L}$.

na contaminada con 33 $\mu\text{g/L}$, donde se observa una buena resolución entre los picos del hidroximetilfurfural (contaminante natural de las frutas), la patulina y otras interferencias provenientes de la matriz y los solventes, con una repetibilidad de 3,12 $\mu\text{g/L}$ y un coeficiente de variación del 5,33 %.

En la tabla aparecen los recobrados de las muestras de jugo de manzana contaminadas con patulina en recorrido entre 21,16 a 103,26 $\mu\text{g/L}$. Los valores de recuperación media se encontraron entre 81,09 y 83,54 %, con un coeficiente de variación máximo del 3,49 %. Entre las medias de los 3 niveles de contaminación, no hubo diferencias significativas, estableciéndose un recobrado medio 82,51 %, una desviación típica de 2,74 y un coeficiente de variación de 3,33 %.

El límite de detección y cuantificación se estableció en 1,72 y 5,16 $\mu\text{g/L}$ de patulina, respectivamente para los jugos de manzana, pera y melocotón.

Una muestra de jugo de manzana de 25 $\mu\text{g/L}$ de patulina enviada como material de referencia, para el estudio intercalibración FAPAS, dio como resultado 25,3 $\mu\text{g/L}$ de patulina, muy cercano al valor real, lo cual demuestra la competencia técnica del método.¹⁰

En el procesamiento de las muestras de puré de mango y pera fue necesario diluir con 5 mL de agua y centrifugar a 3 000 r.p.m. durante 15 min para eliminar los sólidos disueltos y otras interferencias previo a la extracción; a pesar de ello, en el mango continuaron presentes interferencias asociadas con determinados pigmentos que impedían una adecuada separación de los picos, por lo que fue necesario realizar una segunda purificación de los extractos mediante cartuchos de 1 g de silicagel. El extracto se pasó por columna disuelto en 2 mL de tolueno. La patulina fue eluida con una mezcla tolueno-acetato de etilo 70:30. Después de evaporar el solvente, se reconstruyeron las muestras en 600 μL de fase móvil. Los límites de detección y cuantificación establecidos para estos casos fueron de 3,45 y 10,4 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

DISCUSIÓN

El tiempo de retención de la patulina se retrasó debido a cambios en la composición de la fase móvil dados por la evaporación del acetonitrilo al ser sometido a la desgasificación, lo cual se resolvió ajustando la concentración de dicha fase.

El método validado muestra mejor precisión que el informado en otro estudio (8,6 %) que utilizó una muestra de jugo de

TABLA: *Recobrados de patulina en jugo de manzana*

Parámetros	Niveles de contaminación		
	103,26 µg/L	51,63 µg/L	21,16 µg/L
Valor medio (µg/L)	85,71	42,81	17,16
Porcentaje de recuperación	83,54	82,91	81,09
DE	1,96	2,89	1,78
CV (%)	2,36	3,49	2,19

manzana contaminada con 30 µg/L de patulina, determinada por HPLC con detector de arreglo de diodo.⁹

Dicho método presentó porcentajes de recuperación similares a los informados por otros autores,^{3,4,6} que incluyen la cromatografía en capa fina. Recuperaciones entre 90 y 101 % aparecen en la literatura, pero con coeficientes de variación más elevados.⁹⁻¹¹

El límite de cuantificación es similar al del método oficial suizo¹ y está por debajo del método oficial francés¹ que utiliza en la purificación columnas de silicagel.

En las muestras contaminadas de jugos y purés que permanecieron un tiempo mayor de 2 min en contacto con la solución de carbonato de sodio, se presentaron recobrados con valores entre 50 y 60 %. Otras

pérdidas fueron observadas cuando la evaporación del solvente llegaba a sequedad en un evaporador rotatorio, siendo más conveniente una segunda etapa de secado bajo corriente de nitrógeno. Estas 2 afectaciones en el recobrado se establecieron como los puntos críticos de control del método.

Para determinar patulina en jugos y puré de frutas, el método descrito es rápido, simple, sensible, confiable y adecuado. Se recomienda que para procesar 10 muestras de jugo o puré se realice en paralelo 1 blanco y 2 duplicados de una muestra contaminada con un nivel de 50 µg/L de patulina, cuyos recobrados deben encontrarse entre 79 y 85 % con un coeficiente de variación entre los duplicados menor del 5 %.

SUMMARY

The method used by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) for the determination of patulin in apple juice by high pressure liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector at 275 nm and a RP18 column for apple juice and fruit puree was validated. 10 % acetonitrile-water mixture with a flow velocity of 2.7 mL/min. was used as a mobile phase. Patulin presented a time of retention of 14.8 ± 0.3 min. The regression equation was $Y = 1952.5X + 1673.5$ and the coefficient of lineal correlation was 0.9991. It was obtained a mean recovery of 82.51 % and a variation coefficient of 3.33 % for the tested contamination levels. The repeatability of a contaminated sample with 33 µg/L of patulin was 3.12 µg/L. A limit of detection of 1.72 µg/L and a limit of quantification of 5.2 µg/L were established for juices. The fruit purees were previously diluted and centrifuged. An additional purification per column was proposed for mango. An internal quality control was designed for processing samples.

Subject headings: PATULIN; CHROMATOGRAPHY, HIGH PRESSURE LIQUID; REGRESSION ANALYSIS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes en los alimentos 29ª reunión, La Haya, Países Bajos Marzo 17-21 de 1997:1-7 Documento de Síntesis Relativo a la Patulina. Oficina Conjunta: Vía delle Terme di Caracalla 00100 Roma. CX/FAC 97/23-Parte II Enero de 1997.
2. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes en los alimentos. 30ª reunión, La Haya, Países Bajos Marzo 5-13 de 1998:1-9 Documento de Síntesis Relativo a la Patulina. Oficina Conjunta: Vía delle Terme di Caracalla 00100 Roma CX/FAC 98/17. Enero de 1998.
3. Scott PM, Kenedy BPC. Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *JAOAC* 1973;56(4):813-6.
4. Scott PM. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin apple juice. *JAOAC* 1974;57(3):621-5.
5. Siriwardana MG, Lafont P. Determination of mycophenolic acid, penicillic acid, patulin, sterigmatocystin and aflatoxin in chesse. *J Dairy Sci* 1979;2(7):1145-8.
6. Brauce AR, Burke J, Tanner A, Hammack S, Woodward BB, Post S, et al. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography *JAOAC Int* 1996;79(2):451-5.
7. Stray H. High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J Assoc Off Anal Chem* 1978;61(6):1359-62.
8. Helrich K, ed. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 5 ed. Arlington: AOAC, 1990;t2:1185-6, 1209-10.
9. Machinski JM, Flavio MA. Validation of a simple and sensitive HPLC method for patulin in apple juice. *Alimentaria* 1998;23:3-5.
10. Report to Participants in the Food Analysis Performance Assessment Scheme FAPAS. Patulin Analysis. Series XVI, Round 8, No. 1608. Distributed by Ken Mathieson. Central Science Laboratory, Sand, Hutton, York YO41 1LZ, UK. April 2000.
11. ISO 8128-2: 1993 International Standard Organization (1993). Apple juice, apple juice concentration and drinks containing apple juice. Determination of patulin content. Part 2: Method using thin layer chromatography.

Recibido: 24 de octubre del 2000. Aprobado: 28 de noviembre del 2000.

Lic. *Eyda Otero Fernández-Trevejo*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta No. 1158, municipio Centro Habana, Ciudad de La Habana 10300, Cuba.