

Determinazione della Patulina nel succo di mela torbido

Introduzione

Un numeroso gruppo di funghi del genere *Apergillus*, *Penicillium* e *Byssochlamys* produce, come metabolita secondario, la tossina Patulina. La sua presenza è soprattutto correlata alla contaminazione di un patogeno (*Penicillium expansum*) comunemente presente nella frutta, soprattutto nelle mele. Poiché questa micotossina è resistente ai processi industriali di lavorazione della frutta, la si può riscontrare nei prodotti derivati.

Lo scopo di questo lavoro è quello di mettere a punto un metodo che consenta di determinare la Patulina, in diverse tipologie di matrici, utilizzando una metodica analitica specifica, rapida, semplice e sensibile. Per lo sviluppo del metodo si è seguito lo schema fornito insieme alle colonnine di purificazione EASIMIP™ PATULIN utilizzando come matrice succo di mela torbido. La validazione del metodo è stata effettuata come riportato di seguito:

- Selettività: non ci sono interferenze di matrice in prossimità del picco della Patulina.
- Recupero: sono stati effettuati 3 livelli di contaminazione, 1 ppb, 10 ppb e 30 ppb, successivamente determinati i recuperi.
- Ripetibilità: sono state effettuate 10 prove per ogni livello.

Metodo

1. Per il condizionamento della colonna, far passare 2 ml di acetonitrile al 100 % attraverso la colonna utilizzando un flusso di 1 ml al minuto. Successivamente far passare 1 ml di acqua.
2. Pesare 5 g di campione in una provetta da centrifuga, aggiungere 5 ml di acido acetico al 2 %, agitare mediante vortex per 20 secondi e centrifugare a 3000 rpm per 5 minuti.
3. Far passare 4 ml del campione così preparato attraverso la colonna mantenendo un flusso di 0,5 ml al minuto. E' indispensabile utilizzare un flusso lento e costante affinché la tossina possa essere trattenuta quantitativamente dal polimero di riempimento della colonna.
4. Lavare la colonna facendo passare 1 ml di bicarbonato di sodio all'1% utilizzando un flusso di 1 ml al minuto. Successivamente far passare 2 ml di acqua e rimuovere i residui dei liquidi di lavaggio facendo passare aria attraverso la colonna. Infine lavare la colonna con 1 ml di etere etilico al 100% mantenendo il flusso sempre ad 1 ml al minuto.
5. Eluire la tossina dalla colonna utilizzando 2 ml di acetato di etile al 100% con un flusso di 1 ml al minuto e raccogliere l'eluato in una provetta di vetro da 5 ml.
6. Portare a secco l'eluato sotto azoto in un bagno a secco termostato a 35°C – 40°C per un tempo massimo di 20 minuti. Ricostituire con 1 ml di acido acetico allo 0,1% e agitare con il vortex per 20 secondi. Iniettare il campione così preparato nel sistema HPLC.

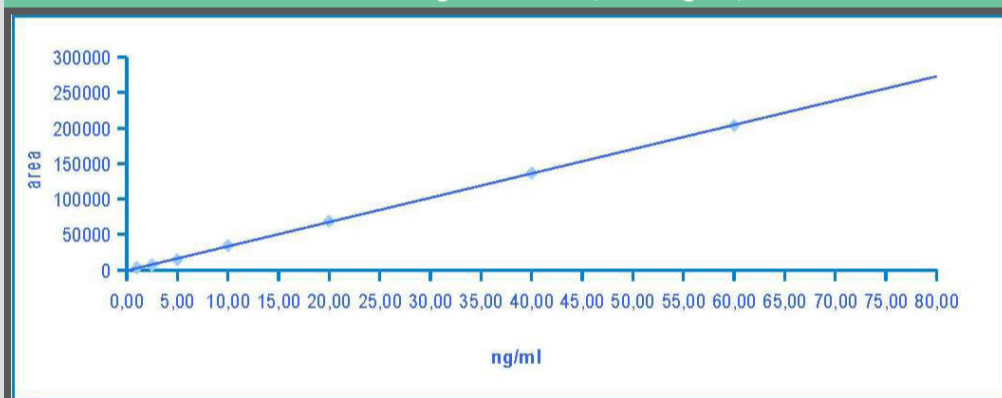
Risultati

La linearità è stata calcolata iniettando standard a diverse concentrazioni. I campioni di succo di mela torbido sono stati contaminati a 3 livelli di concentrazione 1 ppb, 10 ppb e 30 ppb e purificati utilizzando le colonne EASIMIP™ PATULIN. Inoltre si sono analizzati un campione di succo di mela torbido come bianco e uno standard di HMF. Tutti i risultati conseguiti sono poi stati confrontati con le analisi effettuate su un estratto di succo di mela torbido non purificato. Per poter utilizzare il metodo internamente è necessario che i risultati soddisfino i parametri di validazione determinati da ChemService.

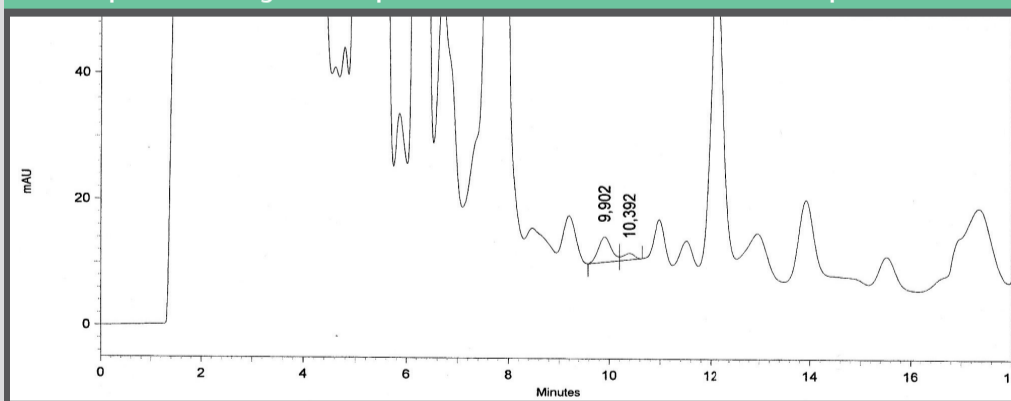
Parametri di Validazione testati ed ottenuti utilizzando EASIMIP™ PATULIN per l'analisi di succo di mela

Parametri	Specifiche / valore ottenuto		
Linearità	1 - 80 ng/ml		
Limite di Rilevazione (LdR)	1 ng/ml		
Limite di Quantificazione (LdQ)	1 ng/g		
Livelli di Contaminazione	1 ppb	10 ppb	30 ppb
Recupero (Accuratezza)	88 %	78 %	71 %
Precisione	0.14	0.82	2.62
Incertezza di Misura	± 0.3 ng/g	± 1.1 ng/g	± 3.3 ng/g
Limite di Ripetibilità	0.44	2.62	8.55

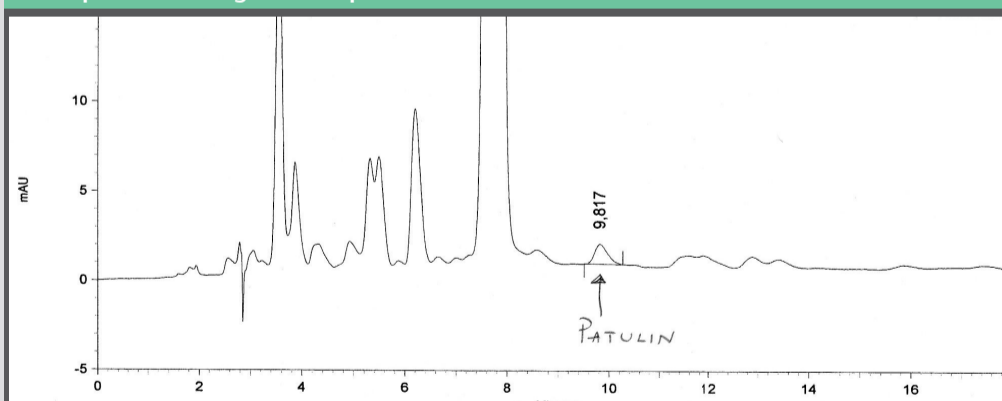
Linearità degli standards (1 - 80 ng/ml)



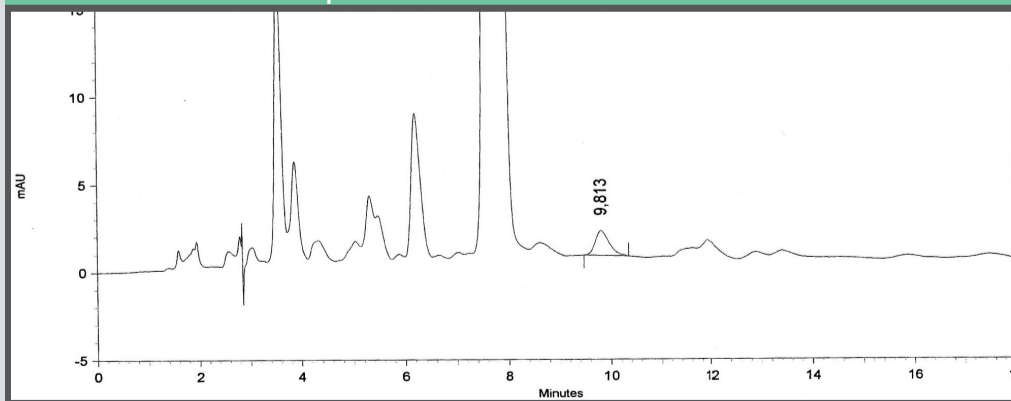
Esempio di cromatogramma per l'analisi di succo mela torbido senza purificazione



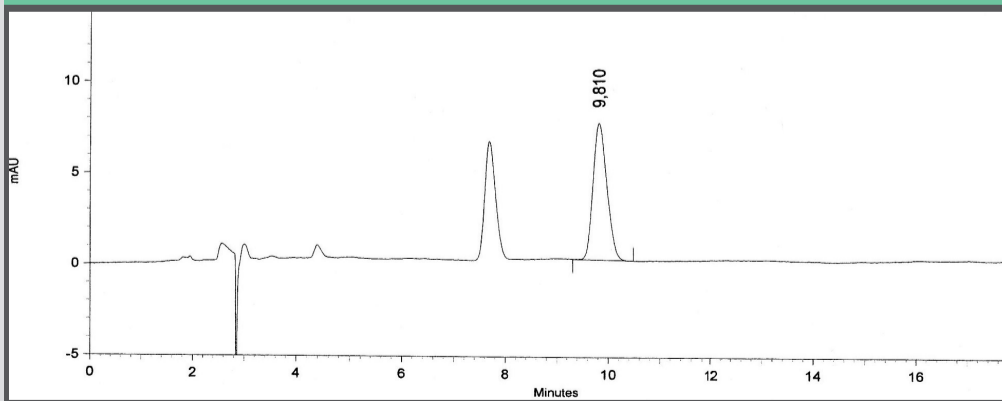
Esempio di cromatogramma per l'analisi di succo mela torbido con EASIMIP™ PATULIN



Esempio di cromatogramma per l'analisi di succo mela torbido arricchito a 1 ppb e purificato con EASIMIP™ PATULIN



Esempio di cromatogramma dello standard di Patulina a 40 ppb



Conclusioni

- Lo scopo di questo metodo è stato raggiunto e i risultati di validazione confermano le buone prestazioni delle colonne EASIMIP™ PATULIN.
- Il risultato più importante è il Limite di Quantificazione (LdQ) che può essere raggiunto, ovvero 1 ng / g.
- Il LdQ dovrebbe essere 10 volte inferiore al livello stabilito dalle attuali Legislazioni Europee (CE 1881/2006 e successivi aggiornamenti) per gli alimenti per l'infanzia (10 ng/g).
- Il metodo è risultato essere specifico, preciso, veloce, semplice e sensibile.