Datum: 1980-09-24

Pr.nr.: 7.476

LABORATORIUM ADDITIEVEN

VERSLAG 80 G 17 80/49

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van schimmelwerende middelen

Onderwerp: Methoden voor het bepalen van natamycine

Bijlagen: Intern voorschrift "Leusden"(1) + G 160(2)

Doel:

Het testen en becommentariëren van de door het Zuivelcontrole-Instituut te Leusden voorgestelde bepalingsmethode voor natamycine in kaaskorst.

Samenvatting:

Een monster fijngesneden kaaskorst afkomstig van het Zuivelcontrole-instituut is onderzocht:

- volgens de voorgestelde methode;
- volgens een enigszins gewijzigde "methode Leusden";
- volgens RIKILT intern voorschrift (G 160).

Tevens is de opgegeven factor gecontroleerd aan de hand van oplossingen van delvocid.

Conclusie:

De voorgestelde methode is voor beperkte aantallen monsters bruikbaar, voor grotere aantallen monsters (> 4 à 5) is de methode bijzonder arbeidsintensief. Dit kan voor een deel worden ondervangen met de door ons voorgestelde wijzigingen.

RIKILT voorschrift G 160 geeft hogere uitkomsten en is eenvoudiger toe te passen dan het aangeboden voorschrift van de Z.C.I.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/samensteller: J.J. van Oostrom

Inleiding:

Op 1980-09-23 werd een monster fijngesneden kaaskorst ontvangen. De dikte van deze kaaskorst bedroeg volgens opgave in schrijven L 795 d.d. 1980-09-16, 5 mm.

Er werd gevraagd het monster te onderzoeken volgens een bijgevoegd analysevoorschrift.

Het monster is met deze methode onderzocht en tevens volgens een gewijzigde methode. Bovendien is de methode vergeleken met de RIKILT methode (G 160).

1 Onderzoek volgens "methode Leusden" (zie bijlage 1)

Dit voorschrift is zo veel mogelijk nauwgezet gevolgd. Op praktische gronden moesten enige kleine wijzigingen aangebracht worden.

De voorgestelde verkleining van het monstermateriaal met behulp van een koffiemolen is uitgevoerd met een moulinex.

Het centrifugeren bij 600 x g is uitgevoerd bij 4800 rpm.

Het mengen met een "paddle" is overbodig bij gebruik van cuvetten met een inhoud van 3 ml, het is dan voldoende om de met een teflon stop afgesloten cuvet enige malen om te schudden.

Voor het overige is het voorschrift exact gevolgd vanaf punt 5.5. Als blanco is methanol gebruikt, hierover zijn geen gegevens opgenomen in het voorschrift.

De verkregen uitslagen zijn vermeld in de tabel (onder nr. 1).

2 Onderzoek volgens gewijzigde "methode Leusden"

Uitgaande van het RIKILT voorschrift G 160, waarbij wordt gewerkt met fijngesneden in plaats van gemalen kaas(korst), werd besloten om het aangeboden monster direct af te wegen en te extraheren.

Voor het overige is de werkwijze van 1 gevolgd.

Zie voor de uitslagen de tabel (onder nr. 2).

3 Onderzoek volgens intern voorschrift G 160 (zie bijlage 2)

Bij deze bepaling is gemeten bij de opgegeven golflengten en is ook als blanco methanol gebruikt. De uitslagen zijn vermeld in de tabel (onder nr. 3).

4 Bepalen van de te gebruiken factor

Door het Zuivelcontrole-instituut is als factor 12.12 opgegeven. Aangezien deze factor afhankelijk is van de exacte golflengten waarbij wordt gemeten en de golflengte-instelling weer afhankelijk van

1e het gebruikte apparaat

2e de voorhanden zijnde oplossing

was het wenselijk om de factor onder de eigen meetomstandigheden vast te stellen.

Hiertoe zijn 5 oplossingen van Delvocid Instant gemaakt van verschillend gehalte.

Van deze oplossingen is eerst het exacte gehalte bepaald aan de hand van voorschrift G 160, dus met de z.g. "eerste piek".

Hierna is gemeten bij de door het ZCI opgegeven golflengten en is de factor berekend. De factor bleek onder onze omstandigheden gemiddeld 12,45 te zijn in plaats van 12,12.

Alle metingen zijn ook met deze factor berekend en verzameld in de tabel (onder nr. 4).

5 Meting bij 330 nm in plaats van 329.

Het z.g. 2e minimum bij meting van de piek bij ca. 318 nm is in werkelijkheid géén minimum.

Het ZCI schrijft 329 nm voor, wij gebruiken 330 nm. De keuze is arbitrair

Bij 330 nm is de factor door ons in het verleden vastgesteld: F = 12,39

Alle monsters zijn tevens bij 330 nm gemeten en berekend met genoemde factor. Deze uitslagen zijn eveneens vermeld in de tabel (onder nr. 5)

Tabel: uitslagen opgegeven in mg/dm^2

		Leusden methoden	gewijzigde Leusden methoden	G-160	
	2e min.	1 ↓	2 ↓	3 ↓	HPLC
Factor 12,12	329	1,99	1,87	2,23	2,66
Factor 12,45	329				
4 ⟶		2,05	1,92	2,29	
Factor 12,39					
5 ⟶	330	2,07	1,94	2,32	

Overwegingen en conclusies:

1 Principe: Het principe van de methode is aantrekkelijk, de voorgestelde monsterneming volgens NEN 3751 geeft inderdaad de grootste kans op een representatief monster.
Ook de bereiding van het analysemonster is aantrekkelijk.

2 Apparaten: Het schilapparaat 3.5 moet nader gedefinieerd worden.
De koffiemolen, die volgens het begeleidend schrijven gebruikt moet worden, is niet vermeld in het voorschrift.

3 Verkleiningsmethode: In de voorgestelde methode geschiedt dit met een koffiemolen, in voorschrift G 160 wordt hiervoor een mes gebruikt.
Het is de vraag of een koffiemolen tijdwinst oplevert, wanneer men ook het schoonmaken tussen de opeenvolgende monsters meerekent, Bij grotere aantallen zal dit zeker niet het geval zijn.
Een ander punt is of een gemalen monster door een fijnere verdeling beter extraheerbaar is, of anders gezegd of de stukjes bij een met een mes gesneden monster niet te groot zijn voor volledige extractie.
Dit is door ons nagegaan door de beide methoden naast elkaar toe te passen. Om een goede vergelijking mogelijk te maken is de meting volgens het ontvangen voorschrift uitgevoerd.
Uit de cijfers in de tabel onder nrs. 1 en 3 blijkt dat de voorbereiding van het monster volgens voorschrift G 160 hogere uitkomsten geeft dan de voorbereiding met het ZCI voorschrift, voorbereiding met een mes volgens G 160 levert een gehalte op van 37,21 mg/kg, voorbereiding met een koffiemolen/moulinex volgens ZCI voorschrift 33,23 mg/kg.
Statistisch blijken de uitkomsten ook significant te verschillen.
Dit kan twee oorzaken hebben, een volledige extractie en/of een meer geconcentreerde meetoplossing.

4 Meting: Volgens het voorschrift van de ZCI wordt het verkregen extract in een cuvet verdund.
Dat heeft twee nadelen:
1e Er kunnen verdunningsfouten ontstaan
2e Cuvetten moeten na elke meting gereinigd en gedroogd worden.
De extractiemethode volgens voorschrift G 160 levert een helder en direct meetbaar extract op.
Tevens is ruim voldoende extract voorhanden om cuvetten voor te spoelen zodat reinigen en drogen achterwege kan blijven.

Een ander voordeel is dat de meetoplossing meer geconcentreerd is dan de meetoplossing volgens ZCI voorschrift.

5 Omrekeningsfactor: Deze is zoals beschreven van verschillende factoren afhankelijk.
Het is noodzakelijk dat deze factor per apparaat eerst bepaald wordt.

6 Tweede minimum: Aangezien hier geen echt minimum optreedt moet dit dwingend voorgeschreven worden. In 5.8 ware dit duidelijk te maken door te lezen: "bij circa 310 en bij 329 nm".
In het voorschrift wordt voor dit tweede minimum 329 nm voorgesteld.
Wij gebruiken 330 nm, met als factor 12,39.
Het voordeel van 330 nm is dat het meetpunt lager op de helling van de piek ligt en dus op een minder steil gedeelte.
Een tweede voordeel voor ons is dat 330 nm nauwkeuriger is in te stellen op onze spectrofotometer.
Uit het cijfermateriaal in de tabel blijkt dat zowel de voorbereiding als meting volgens voorschrift G 160 de hoogste uitkomst geeft.
Verkleining van het monster volgens voorschrift G 160 en extractie met ZCI voorschrift blijkt niet te voldoen, de cijfers in kolom 2 zijn het laagst.

JvO/MA

De bepaling van het natamycinegehalte van kaas.

1. Principe

Het natamycinegehalte van kaaskorst wordt bepaald door kaaskorst te extraheren met methanol en van het verkregen extract de extincties te meten bij: het absorbtiemaximum, circa 317 nm en de absorbtieminima, circa 310 en 329 nm. Met behulp van deze extincties wordt het natamycinegehalte, uitgedrukt in mg/dm^2, berekend.

2. Reagentie

2.1 methanol, chemisch zuiver.

3. Apparatuur

3.1 balans, tot op 1 mg nauwkeurig.
3.2 spectrofometer, waarmee in het UV-gebied kan worden gemeten en kwartscuvetten met een weglengte van 1 cm.
3.3 ultrason-bad.
3.4 centrifuge (600 x g) en centrifugebuizen van circa 30 ml met glazen stop.
3.5 schilapparaat, waarmee een kaaskorst van 5 mm dikte kan worden afgesneden.
3.6 mal van 5 x 5 cm; van kunststof (b.v. perspex of roestvrijstaal)

4. Monsterneming

4.1 Neem een sektormonster kaas volgens NEN 3751.

5. Werkwijze

5.1 Snijd, indien nodig, de sektor in "dunnere" sektoren, waarvan de maximale dikte (gemeten aan de ronde buitenzijde) circa 5 cm bedraagt.
5.2 Snijd van de gehele sektor(en) de korst met een dikte van 5 mm.
5.3 Snijd uit de verkregen korst met behulp van de mal een stuk korst van 25 cm^2. De 25 cm^2 eventueel samenstellen uit diverse stukken korst. Weeg de 25 cm^2 kaaskorst.
5.4 Snijd alle kaaskorst - inclusief de 25 cm^2 gewogen korst - tot kleine stukjes van 1 à 2 mm dikte en homogeniseer het gesneden onderzoekmateriaal.
5.5 Weeg zoveel gesneden kaaskorst in als ongeveer overeenkomt met 25 cm^2 en breng dit over in een bruine erlenmeyer van 250 ml. Voeg 50 ml methanol toe en extraheer 30 minuten met behulp van het ultrason-bad.
5.6 Plaats de erlenmeyer gedurende circa 15 minuten in het diepvriesvak van de koelkast Giet een deel van het extrakt (circa 10-20 ml) over in de centrifugebuis en centrifugeer gedurende 10 minuten bij circa 600 x g.
5.7 Breng 0.5 ml van de bovenstaande oplossing over in een cuvet./Voeg 2 ml methanol to Meng de inhoud van de cuvet met behulp van een "paddle".
5.8 Meet de minimale- en maximale extincties bij circa 310 en 329 nm, respectievelijk circa 317 nm.

6. Berekening

6.1 Bereken het natamycinegehalte van de kaaskorst, in mg/dm^2, met behulp van de formul

$$12{,}12 \{ E_1 - \tfrac{1}{2} (E_2 + E_3)^- \}$$

hierin is

E_1 = maximale extinctie bij circa 317 nm

E_2 = minimum extinctie bij circa 310 nm

E_3 = minimum extinctie bij circa 329 nm

7. Opmerkingen

7.1 De faktor 12,12 dient te worden vastgesteld met behulp van een standaardoplossing van natamycine. Maak daartoe een oplossing van zuivere natamycine in methanol van circa 4 µg/ml. Meet de extincties E_1, E_2 en E_3 van deze oplossing bij de in punt 6.1 genoemde golflengten ten opzichte van methanol.
Bereken de faktor f uit de vergelijking

$$f = \frac{m}{E_1 - \frac{1}{2}(E_2 - E_3)}$$

hierin is m het aantal µg natamycine/ml van de gemeten oplossing.

7.2 Bij 329 nm wordt geen miniumextinctie van natamycine waargenomen.

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

Intern Analyse voorschrift Nr. G. 160 (kaasdekmiddelen).

1e oplage(1980-04-29).

BEPALING VAN NATAMYCINE IN KAAS EN KAASKORST.

1. Beginsel

Natamycine wordt uit kaas of kaaskorst geëxtraheerd en spectrofotometrisch bepaald.

2. Reagentia

2.1. Methanol p.a.

3. Apparatuur en glaswerk

3.1. Erlenmeyers 150 - 200 ml.
3.2. Maatcylinders 50 - 100 ml.
3.3. Schudapparaat voor erlenmeyers.
3.4. Trechters ϕ 8 cm.
3.5. Filters Whatman 540.
3.6. Spectrofotometer geschikt voor U.V.
3.7. Cuvetten, kwarts 1 cm.

4. Werkwijze

Snij de kaas of kaaskorst in kleine stukjes.
Weeg nauwkeurig 5 of 10 g af in een erlenmeyer.
Voeg respectievelijk toe 50 of 100 ml methanol.
Plaats de erlenmeyer in een schudappparaat en laat 1½ uur schudden.
Dit moet in een verduisterde ruimte geschieden.
Filtreer de oplossing door een Whatman 540 filter, eventueel een tweede maal als het filtraat niet helder is.
Meet het filtraat bij 295,5 en 311 nm (minima) en 303 nm (maximum) in een 1 cm kwartscuvet.
Deze golflengten dienen gecontroleerd te worden.
Gebruik als blanco een extract van natamycinevrije kaas.

5. Berekening

$$C = A\{E_1 - \tfrac{1}{2}(E_2 + E_3)\}$$

Waarin:

C = concentratie natamycine in µg/ml.
A = constante factor 15,7.
$E_1 = E_{303}$
$E_2 = E_{295,5}$
$E_3 = E_{311}$

Wageningen, 1980-05-13.

Paraaf scheikundige : dr W.G. de Ruig. dR
Paraaf samensteller/medewerker: J.J. van Oostrom. vO

c.c. De Ruig,
Van Oostrom,
Van Doesburgh,
Circulatie.

Oo/W