

Project: Methoden voor het aantonen en bepalen van schimmelwerende mid-  
delen.

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek tussen spectrofotometrische en HPLC bepa-  
ling van natamycine.

---

Doel:

Het vergelijken van de bepalingsmethode voor natamycine volgens de Interne  
Voorschriften G160 en F41 resp. spectrofotometrisch en HPLC.

Samenvatting:

Het onderzoek omvat vier verschillende onderwerpen:

1e opbrengst bepaling

2e vergelijking extractie vlgs. G160 en F41

3e vergelijking extractie vlgs. G160 en gewijzigde methode F41

4e reproduceerbaarheid (binnen het RIKILT).

Conclusie:

Tussen de uitkomsten van het natamycinegehalte in kaas(korst) verkregen  
volgens de spectrofotometrische- en de HPLC-bepaling bestonden en bestaan  
verschillen. De hier beschreven vergelijkende onderzoeken vormen geen  
voldoende basis om deze verschillen op te heffen of te verkleinen.

---

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig.

Medewerker/Samensteller: J.J. van Oostrom



### Inleiding:

Naar aanleiding van het onderzoek naar de indringing van natamycine in Edammer kaas (zie Nota 80 R 20) zijn de uitkomsten van de spectrofotometrische methode G160 en de HPLC methode F41 onderling vergeleken. Deze uitkomsten klopten niet onderling, ook de toegevoegde standaardoplossing natamycine werd bij de HPLC methode bijzonder onreproduceerbaar teruggevonden (recovery 13-88%).

Dit was aanleiding om diverse proeven uit te voeren in onderlinge samenwerking tussen de afdeling Contaminanten en de afdeling Additieven. Van de diverse onderlinge overlegvergaderingen zijn nota's verschenen onder de nrs. 80 R 27 en 80 R 49. Dit verslag beschrijft de uitgevoerde onderzoeken met de resultaten.

#### 1. Opbrengst

Naar aanleiding van de slechte opbrengsten die met de HPLC methode gevonden werden en de slechte reproduceerbaarheid werd besloten om opbrengstproeven uit te voeren met zowel de HPLC als de spectrofotometrische methode.

Er werd een natamycine-oplossing gemaakt m.b.v. devocid instant; het theoretisch gehalte was 0,01 mg/ml.

Deze oplossing is volgens intern voorschrift G160 gemeten om het exacte natamycinegehalte te bepalen. Dit bleek 0,0105 mg/ml te zijn.

Vervolgens is vijfmaal 10 g gemalen kaas afgewogen waaraan 0-1-5-10 en 15 ml standaardoplossing is toegevoegd.

Het natamycinegehalte in de verschillende porties kaas was dus 0 - 1,05 - 5,25 - 10,50 - 15,75 mg/kg. De kaas is geëxtraheerd volgens de extractiemethode uit intern voorschrift G160 en vervolgens gefiltreerd volgens ditzelfde voorschrift.

In het filtraat is het natamycinegehalte bepaald volgens de voorschriften G160 en F41.

De meting met de spectrofotometrische methode kan volgens twee manieren berekend worden, met het maximum bij 303 nm en met dat bij 318 nm.

De cijfers volgens beide berekeningen zijn in de volgende tabel opgegeven.

Toegevoegd gehalte in mg/kg	Teruggevonden		Teruggevonden volgens HPLC methode
	volgens spectro- fotometrische methode 1e piek	2e piek	
1,05	142%	83%	80%
5,25	106%	97%	101%
10,50	96%	96%	109%
15,75	96%	96%	112,5%

Het volgende kan worden geconcludeerd:

1. het reeds bekende feit dat bij de spectrofotometrische methode lage gehalten beter met de 2e piek berekend kunnen worden is bevestigd
2. de tendens dat hoge gehalten een te hoge uitkomst geven met de HPLC methode is ook hier aanwezig
3. met de huidige extractiemethode (hoeveelheid afgewogen stof en gebruikt oplosmiddel) blijkt de detektiegrens voor de spectrofotometrische methode 1 mg/kg
4. voor wat betreft de uitkomsten van de HPLC methode moet opgemerkt worden dat de extractie volgens voorschrift G160 is uitgevoerd.

## 2. Vergelijking extractie volgens G160 en F41

Aangezien de extractiemethoden van de beide bepalingmethoden totaal verschillend zijn was het wenselijk om de resultaten te vergelijken. Een korte beschrijving van de uitvoering van deze proef:

### a. Extractie volgens F41:

10 g kaas fijngesneden + 10 ml H<sub>2</sub>O

na 15 min. + 40 ml methanol, 2 1/2 min. mixen in ultra torrax + 1 ml Carrez 1 en 2 en schudden.

Na 30 min. + 48 ml methanol en mengen.

Centrifugeren en filtreren.

### b. Extractie volgens G160:

10 g kaas fijngesneden + 100 ml methanol,

1 1/2 uur schudden in schudmachine, filtreren.

Voor deze proeven is een monster kaaskorst van een Edammer kaas genomen en, zo goed als mogelijk was, gehomogeniseerd.

De filtraten die verkregen werden met de beide extractiemethoden zijn gemeten volgens de spectrofotometrische U.V. meting.

Met de spectrofotometrische bepaling is het natamycinegehalte weer op twee manieren berekend nl. met de pieken bij 303 nm en 318 nm.

	max. 303 nm	max. 318 nm
extractiemethode a	65,9 ppm	71,7 ppm
extractiemethode b	61,4 ppm	64,3 ppm

Het filtraat, verkregen volgens methode a, moest hierbij 1:5 verdund worden en het filtraat van methode b 1:1 om een heldere meetoplossing te verkrijgen.

### 3. Vergelijking extractie volgens G160 en F41 gewijzigd

De afdeling Contaminanten heeft, op aanraden van de afdeling Additieven, de extractie procedure van voorschrift F41 gewijzigd. Besloten werd om de klaring met Carrez 1 en 2 achterwege te laten.

Het bovenstaande onderzoek (2) is herhaald zonder de klaring met Carrez, de hoeveelheid methanol is aangepast zodat het totaal volume gelijk bleef. Voor de afgewogen porties kaas voor methode a en b is andere kaas gebruikt zodat de uitkomsten wel onderling maar niet met de cijfers van proef 2 zijn te vergelijken.

	piek 303 nm	piek 318 nm
extractiemethode a	46,6 ppm	53,9 ppm
extractiemethode b	54,9 ppm	54,7 ppm

Aangezien het hier in proef 2 en 3 om slechts enkele test bepalingen ging zijn er geen vergaande conclusies aan het cijfermateriaal te verbinden.

Het is bekend dat verontreiniging in het extract vooral bij 303 nm een sterke verhoging van de achtergrond veroorzaakt, en daardoor een onnauwkeurigere meting met een uitkomst, die een te laag gehalte aanwijst t.o.v. de juistere meting bij 318 nm. Bij een "schoon" extract stemmen uitkomsten bij 303 nm en 318 nm overeen.

Op grond van deze ervaring kan geconcludeerd worden dat de methode b uit proef 2 en proef 3 een schoner extract opleveren dan methode a.

#### 4. Reproduceerbaarheid

Hiervoor zijn op de afdeling Additieven 2 monsters kaaskorst samenge-  
steld van kazen die behandeld waren met een natamycine bevattend kaas-  
korstbedekkingsmiddel en die ca. 50 resp. ca. 2 mg/kg natamycine  
bevatten.

Beide monsters zijn zowel door de afdeling Contaminanten als de afdeling  
Additieven tien maal onderzocht op het natamycinegehalte respectievelijk  
volgens F41 en G160. De extracten zijn uitgewisseld en gemeten.

#### Resultaten:

kaas	extractiemethode	meetmethode	$\bar{x}$	S
1	F41	F41	81,4	11,9
		G160	79,2	4,1
	G160	G160	57,1	1,4
		F41	71,9	3,8
-----				
2	F41	F41	11,1	0,74
		G160	niet gemeten	----
	G160	G160	6,6	0,43
		F41	8,6	0,60

De verkregen cijfers geven geen enkele informatie en zijn op verschil-  
lende punten met elkaar in tegenspraak.

Wel kan geconcludeerd worden dat de standaardafwijking voor methode G160  
gunstiger is.