

Project: Methode voor het aantonen en bepalen van conserveermiddelen en desinfectiemiddelen.

Onderwerp: De bepaling van natamycine in kaas op residu-niveau m.b.v. HPLC.

Doel:

Ontwikkelen en testen van een snelle methode voor de bepaling van natamycine in kaas op lage niveau's.

Samenvatting en conclusie:

Een vroeger ontwikkelde en ook gevoelige HPLC methode bleek niet zo goed reproduceerbaar te zijn. Door een methanol extract van de kaas aan koeling met vloeibare stikstof te onderwerpen werd een gezuiverd extract verkregen dat na verdere concentratie, centrifugering en filtratie zonder problemen geïnjecteerd kon worden op het HPLC systeem. Detectiegrens ligt beneden de 0,05 mg/kg kaas. Recoveries zijn ca 100%. Deze methode is vooral ontworpen om de doordringing van de natamycine in de kaas te bepalen.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra *LB*

Medewerkers/samenstellers: W.A. Traag; G. v. Bruchem.
W.A. Traag *G. v. Bruchem*

L.G.M.Th. Tuinstra,

W.A. Traag,

G. van Bruchem.

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten

Inleiding

Natamycine (pymaricine) is een antibioticum tegen schimmels. Het wordt gebruikt in de geneeskunde, in kleine mate in de diergeneeskunde, maar de laatste jaren ook als schimmelwerend middel in kaas- en worstsoorten. Ook zijn er voorstellen tot gebruik en toepassingen bij hammen, wijnen (1) e.d.

Doordat de vorming van schimmels wordt tegengegaan is de kans op mycotoxine produktie verlaagd, terwijl ook het uiterlijk en de smaak van het produkt verbeterd wordt. Vooral wat dit laatste betreft hebben andere conserveermiddelen (sorbinezuur) niet helemaal aan de verwachtingen voldaan (2).

In Nederland is het gebruik van natamycine op kaas toegestaan.

In een nieuw ontwerp Kaasbesluit (versie dec. 1978) wordt aangegeven dat er op de korst van de kaas en in de 1 mm dikke buitenlaag van de kaas, 2 mg natamycine aanwezig mag zijn per vierkante decimeter kaasoppervlak wanneer het produkt de consument bereikt.

Binnen de EEG is een rapport van het wetenschappelijk comité voor de menselijke voeding over natamycine uitgebracht (oktober 1979) met daarin o.a. de eis dat het residu van natamycine in kaas per vierkante decimeter niet meer dan 1 mg mag bedragen, en dat natamycine op een diepte beneden de 5 mm niet meer aantoonbaar mag zijn.

Men mag verwachten dat de natamycineconcentratie in de kaas afneemt met toenemende afstand tot de kaaskorst, tenminste wanneer de natamycine op de buitenkant van de kaas is aangebracht. Dit gegeven en een tolerantie uitgedrukt in mg per oppervlakte eenheid brengt toch wel enkele problemen met zich mee.

De detectiegrens van de analyse wordt beïnvloed door de hoeveelheid in bewerking genomen monster, door de absolute gevoeligheid van het detectiesysteem en door de invloed van de matrix op de absolute gevoeligheid. De twee laatste factoren beïnvloeden de signaal/ruis verhouding.

De tolerantie in mg/dm^2 zou in eerste instantie uitnodigen tot het analyseren, bij een gegeven kaas oppervlak, van een dikke kaasplak om alle, eventueel aanwezige natamycine te extraheren en te bepalen.

Echter hoe dikker de in bewerking genomen kaaslaag, hoe lager de relatieve bijdrage aan natamycine resp. hoe hoger de relatieve bijdrage aan matrix effecten. Alleen in het geval men matrix storingen volledig zou kunnen uitschakelen speelt de dikte van de kaasplak geen rol.

In het geval men vanaf een bepaalde afstand onder de kaaskorst geen natamycine meer mag aantonen is het zaak op die afstand een zo dun mogelijke laag te verzamelen met een zeer groot oppervlak.

Deze twee manieren van aanpak zullen resulteren in een detectiegrens die onderling behoorlijk afwijkend kunnen zijn, ongeacht of men de grens uitdrukt in mg/dm^2 of mg/kg kaas.

Als we het soortelijk gewicht van kaas op $1,2 \text{ g}/\text{cm}^3$ stellen kan de detectiegrens in mg/kg kaas makkelijk naar mg/dm^2 kaas omgerekend worden, door het gehalte in mg/kg te vermenigvuldigen met: $1,2 \cdot 10^{-2}$, waarin d de kaasplakdikte in mm is.

Door Frede (3) worden een aantal analyse mogelijkheden aangegeven. De statistische spectroscopische U.V.-methode zou zonder matrix storingen een detectiegrens in de orde van $0,01 \text{ mg}/\text{dm}^2$ bereiken bij een laagdikte van 2 - 3 mm. Als deze als screening bedoelde U.V.-methode een verdacht monster zou signaleren dan zou een chromatografische techniek nodig zijn voor confirmatie en quantificatie. Om met HPLC een zelfde detectiegrens te bereiken moest Frede zijn oorspronkelijk extract ten minste 10x concentreren. De door Frede met HPLC gerealiseerde detectiegrens (naar kaas omgerekend ca. $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$ kaas) is o.i. niet voldoende om de afwezigheid in een bepaald deel der kaas aan te tonen (EEG eis). M.a.w. de concentrering zou veel groter moeten zijn dan in het geval van Frede.

Een experiment conform het voorschrift van Frede was voldoende om matrix storingen aan te tonen m.a.w. een zuiveringstap zou noodzakelijk zijn om het gewenste doel te bereiken.

Experimenten

Allereerst werd getracht de HPLC bepaling met alleen natamycine na te werken. Frede (3) gebruikt een Lichrosorb 10 RP 8 kolom. Volgens Gist-Brocades (4) zou ook met 10 RP 18 gewerkt kunnen worden. In ons geval was deze fase gebonden aan Nucleosil. Echter natamycine was in het systeem methanol-water niet van de kolom te elueren. Op een Lichrosorb 10 RP 8 kolom werd een goede retentie verkregen met als eluens methanol-water (60-40), echter de piek vertoonde nogal staartvorming. Door toevoeging van 5% ijsazijn (4) werd een symmetrische piek verkregen.

In eerste instantie wilden we een detectiegrens onder de 1 mg/kg kaas bereiken. Daartoe moest het extract gezuiverd worden. Een in de zuivel bekende procedure is het klaren met Carrez I en II oplossingen, waardoor eiwitten verwijderd kunnen worden uit het methanolisch extract (5). Na enkele experimenten werd tot onderstaande methode besloten.

Snij het monster fijn. Breng 20 gram van het monster (het hiermee overeenkomend kaasoppervlak moet bekend zijn) in een hoog bekeerglas van 300 ml. Voeg toe 10 ml water en na 15 minuten 40 ml methanol. Macereer dit mengsel gedurende 2 à 3 minuten met een Ultra-Turrax.

Voeg achtereenvolgens 1 ml Carrez I en 1 ml Carrez II oplossing toe, schud krachtig en verdun na ca. 30 min. met 40 ml methanol, waarna het mengsel gecentrifugeerd wordt bij 3000 toeren per minuut.

Filtreer de bovenstaande vloeistoflaag af en concentreer hiervan 25 ml aan de roterende vacuumverdamer bij een temperatuur van 40°C tot een volume kleiner dan 5 ml. Vul dit aan tot 5,0 ml met methanol en centrifugeer gedurende 10 min.

Van de bovenstaande vloeistof wordt een aliquot gefiltreerd m.b.v. een filterspuit, waarna 40 µl van het heldere extract geïnjecteerd wordt in de vloeistofchromatograaf.

De recoveries waren tijdens de eerste experimenten goed (> 80%). De detectiegrens lag in de orde van 0,2 mg/kg kaas. Er werd eenmaal meegedaan aan een vergelijkend onderzoek van gemalen gemengde kaaskorst (6) waarbij de analysemethode zelf gekozen kon worden. Op het 20 mg/kg niveau werden overeenstemmende resultaten verkregen t.o.v. de spectroscopische U.V.-methode. Op het niveau van ca 150 mg/kg werden met de HPLC methode duidelijk hogere waarden gevonden.

Echter toen op een gegeven ogenblik nagegaan werd op welke manier natamycine fabrieksmatig het beste aangebracht kon worden op de kaas (7) en er monsters seriematig geanalyseerd moesten worden bleek toch dat de recovery van aan kaas toegevoegde natamycine grote spreiding vertoonde. De toegevoegde natamycine werd misschien ingesloten door het met Carrez ontstane neerslag?

Anderzijds werden de HPLC als de statische U.V.-methode intern onderling vergeleken. Fabrieksmatig met natamycine behandelde kaas werd met beide methoden onderzocht. Over het algemeen waren de HPLC resultaten duidelijk hoger. Deze metingen werden uitgevoerd op niveaus tussen 10 en 50 mg/kg. Een ander idee (8) was het methanol extract te koelen bijvoorbeeld in de diepvriezer, waarbij inderdaad een neerslag ontstaat dat door centrifugeren en filtratie te verwijderen is. Aangezien wij de beschikking hebben over vloeibare stikstof werd dit gebruikt om het extract drastisch te koelen tot bevroren toe.

Een uitvoerige beschrijving is in bijgaand voorschrift gegeven. Deze methode is (o.a. door de beschikbaarheid van vloeibare N₂) sneller dan de methode met Carrez klaring.

Om een indruk te krijgen over de herhaalbaarheid van de methode werden enkele kazen gebruikt die met natamycine behandeld waren. Voldoende kaaskorst materiaal werd verzameld en door langdurig malen gehomogeniseerd om op twee besmettingsniveau's metingen te verrichten en wel op het 10 mg/kg en ca. 0,5 mg/kg niveau (zie ook fig. 1).

In tabel I staan de resultaten vermeld.

Er zijn ook enkele (10) recovery experimenten in de tijd uitgevoerd door aan fabrieksmatig behandelde kaas 1 mg/kg toe te voegen. Gemiddeld recovery 107%, standaarddeviatie 4,6%. Het aantal experimenten is misschien te beperkt en zeker in een te korte tijd verzameld om er een verdragende conclusie aan te verbinden. Anderzijds is e.e.a. afhankelijk van het doel wat men zich stelt. Is men geïnteresseerd in een gevoelige methode die de afwezigheid van natamycine plausibel maakt dan is o.i. de methode geschikt. Voor natamycine gehalte hoger dan 1-2 mg/kg kan volstaan worden met de veel eenvoudiger statische U.V.-methode.

Tabel 1.

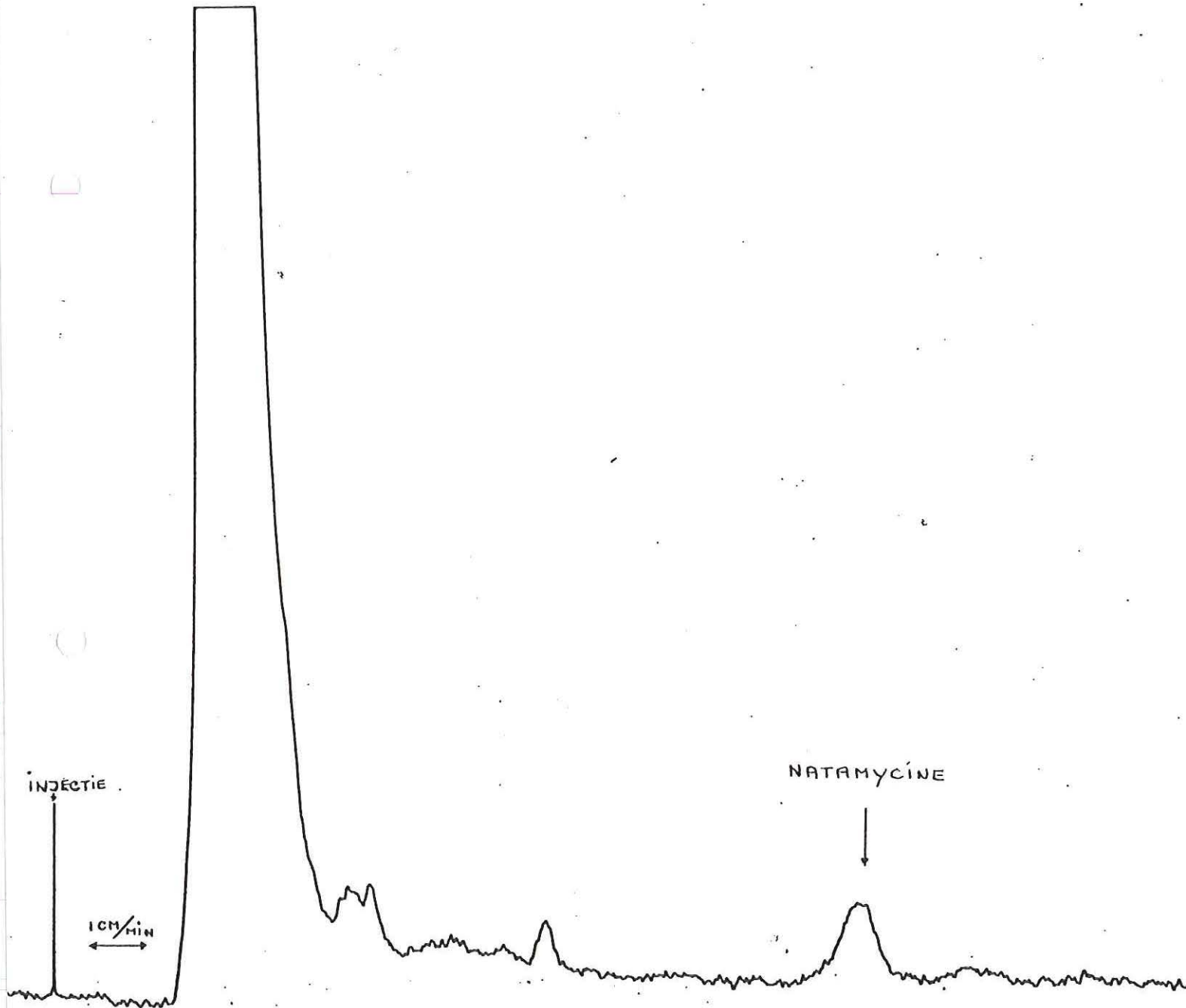
Reproduceerbaarheid van het natamycine gehalte in kaas op het 10 mg/kg en het 0,5 mg/kg niveau.

Gehalte aan natamycine in mg/kg niveau ca. 10 mg/kg	gehalte aan natamycine in mg/kg niveau 0,5 mg/kg
10,7	0,37
11,8	0,29
11,9	0,36
11,3	0,35
11,0	0,32
12,2	0,39
10,9	0,30
10,1	0,34
9,9	0,38
10,8	0,37
gemiddeld gehalte 11,1 mg/kg	0,35 mg/kg
variatie coefficient 7 %	11 %

Literatuur:

1. R. de Jong, F.J.F. Bruin. Ware (n) Chemikus 9 (1979).
2. Joint Report. Investigations on the behaviour of cheese coatings containing sorbates and natamycine.
W.G. de Ruig - G. van den Berg Dec. 1979.
3. W. Frede. Milchwissenschaft 32 (1977) 66-67.
4. H.S. Tan. Gist Brocades Delft. Persoonlijke mededeling.
5. Carrez. Annale de Chimie Analytique 14 (1909) 187.
6. Ringtest "Vergelijkend onderzoek 1979".
J. Leenheer, Zuivel Controle Instituut, Leusden.
7. G. van den Berg; W.G. de Ruig: nog te publiceren in Nederlands Melk- en Zuiveltijdschrift.
8. J. Leenheer. Zuivel Controle Instituut Leusden.
Persoonlijke mededeling.

Fig. 1 Extrakt van fabrieksmatig besmette kaas, natamycine gehalte 0,3 mg/kg.



INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT nr. F. 52

1e oplage (1980-09-03).

DE VLOEISTOFCHROMATOGRAFISCHE BEPALING VAN NATAMYCINE IN KAAS; CLEANUP
M.B.V. VLOEIBARE STIKSTOF

1. PRINCIPE

Na bevochtigen van de kaaskorst wordt natamycine (=pimaricine) geëxtraheerd met methanol. Om matrix storingen volledig te verwijderen wordt een aliquot van het na centrifugeren verkregen (heldere) extract drastisch gekoeld met vloeibare stikstof en aansluitend gefiltreerd. Afhankelijk van de te bereiken detectiegrens (0,5 resp. 0,05 mg/kg kaas) wordt geconcentreerd. Na filtreren over een microfilter wordt 20 µl geïnjecteerd in de vloeistofchromatograaf. De recovery voor de bepaling bedraagt op het niveau van 0,5 mg/kg ca 90%. De methode is zowel geschikt voor natuurlijke kaaskorst als voor plastic kaaskorst.

2. REAGENTIA

2.1 Methanol P.A.

2.2 Azijnzuur gec. P.A.

2.3 Vloeibare stikstof.

2.4 Standaard Natamycine 3 aq. (Gist Brocades).

Concentratie 0,5 µg/ml (in bruine maatkolf) in methanol.

2.5 Vouwfilters

3. APPARATUUR

3.1 Ultra-Turrax.

3.2 Centrifuge (tafelmodel).

3.3 Centrifugebuizen 250 ml.

3.4 Hoge bekerglazen van 300 ml.

3.5 Filterspuit (b.v. Satorius, filters: Whatman GF/A 2,5 µm of millipore filters FH 0,5 µm).

3.6 Roterende vacuumverdamer.

3.7 Vloeistofchromatograaf met U.V. detector.

3.8 Schaaf met instelbare schaaft dikte, bijv. Davidschaaf.

3.9 Kolom: roestvrij staal, lengte 15 cm, inwendige diameter 4,6 mm,
uitwendige diameter 6,4 mm.

Pakking: Lichrosorb 5 RP 8.

3.10 Voorkolom: Roestvrij staal, lengte 10 cm, inwendige diameter 2,1 mm,
uitwendige diameter 6,4 mm.

Pakking: Perisorb RP 8 (30-40 um).

4. INSTELLING VLOEISTOFCHROMATOOGRAAF

Eluens: Methanol-water 6:4 + 5% azijnzuur.

Flow: 1 ml/min.

Golflengte: 303 nm.

Gevoeligheid: 0,005 AU

Recorder: 10 mV

Papiersnelheid: 1 cm/min.

5. WERKWIJZE

N.B. De bepaling moet zoveel mogelijk geschieden onder uitsluiting van
daglicht.

5.1 Met behulp van de schaaf word een bekend oppervlak met een gegeven laag-
dikte van de kaas afgehaald.

Snij het monster fijn. Breng 20 gram van het monster (het hiermee over-
eenkomend kaasoppervlak moet bekend zijn) in een hoog bekerglas van
300 ml.

Voeg toe 10 ml water en na 15 minuten 80 ml methanol.

Macereer dit mengsel tot de kaas zeer fijn homogeen verdeeld is met
een Ultra-Turrax, waarna het mengsel kwantitatief wordt overgebracht
in een centrifugebuis en gecentrifugeerd wordt bij 3000 toeren per
minuut.

Pipetteer 25 ml van de bovenstaande vloeistoflaag af in een dikke glazen
buis en koel de inhoud met vloeibare stikstof tot bevroren. Na ontdooien
wordt de inhoud van de buis over een vouwfilter gefiltreerd. Voor ge-
halten hoger dan 0,5 mg/kg kaas kan nu volstaan worden door een deel
van het filtraat over een microfilter te zuiveren van eventuele onge-
rechtigheden en 20 ul te injecteren in de vloeistofchromatograaf.

Voor gehalten lager dan 0,5 mg/kg kaas moet het filtraat geconcen-
treerd worden tot 5,0 ml m.b.v. een roterende verdamer bij 40°C. Dit
concentraat wordt bij 4000 toeren per minuut gecentrifugeerd. Na zuive-
ring over het microfilter wordt 20 ul geïnjecteerd in de vloeistof-
chromatograaf.

5.2 Het maken van de ijklijn

Injekter achtereenvolgens in de vloeistofchromatograaf 2,5-5,0-10,0-15,0-20,0 nanogram natamycine, meet van de pieken het oppervlak (in mm^2) en zet de gevonden waarde uit op de y-as tegen de geïnjecteerde hoeveelheden in nanogrammen op de x-as.

6. BEREKENING

Door interpolatie op de ijklijn kan de hoeveelheid natamycine gevonden worden welke in het geïnjecteerde aliquot aanwezig is.

7. BEVESTIGING

Bij een positief resultaat kan m.b.v. een pneumatisch geschakelde driewegkraan, die na de UV-detektor is gemonteerd, de fractie welke de natamycine bevat uitgevangen worden, waarna de aanwezigheid van natamycine bevestigd kan worden met een van de volgende technieken:

- Microbiologisch;
- Spectrofotometrisch (UV);
- Massaspectrometrisch.

Wageningen, 1980-09-10. *W*

W.

F41.3