

KRYSTYNA RYBIŃSKA, JACEK POSTUPOLSKI, MAŁGORZATA SZCZĘSNA

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI NATAMYCZYNY W SERACH DOJRZEWAJĄCYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

DETERMINATION OF NATAMYCIN RESIDUES IN RIPENING CHEESES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. K.Karłowski

Przedstawiono metodę oznaczania natamycyny w serach dojrzewających z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Sprawdzono jej podstawowe parametry analityczne. Może być ona stosowana w rutynowej kontroli badania zawartości natamycyny w serach dojrzewających.

WSTĘP

Polienowy antybiotyk natamycyna (syn. pimarycyna) jest stosowana w wielu krajach do ochrony serów dojrzewających oraz wędlin przed pleśnieniem, w Polsce dopuszczona jest od 1983 r. Przepisy Unii Europejskiej przewidują jej powierzchniowe użycie do powlekania serów twardych, półtwardych i półmiękkich oraz suchych kielbas w ilości 1 mg/dm² powierzchni, pod warunkiem nieobecności antybiotyku na głębokości 5 mm [3]. W kraju stosowanie natamycyny do powlekania serów dojrzewających reguluje obecnie zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 31 marca 1993 r. w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i użytkach oraz zezwolenia Głównego Inspektora Sanitarnego [9]. Możliwe jest również użycie natamycyny (roztwór 0,2%) do ochrony wędlin typu krakowska sucha oraz kabanosów przeznaczonych do długotrwałego przechowywania, produkowanych przez Zakłady Mięsne w Kościerzynie, wyłącznie na zaopatrzenie statków.

W projekcie nowelizowanego ww. zarządzenia MZiOS przewiduje się stosowanie tego antybiotyku tylko do ochrony serów dojrzewających, zgodnie z udzielonymi do tej pory zezwoleniami Głównego Inspektora Sanitarnego: w powłoce z polioctanu winylu (0,05%), w roztworze wodnym o stężeniu natamycyny - 0,1% dla serów dojrzewających w folii termokurczliwej lub próżniowej oraz - 0,2% dla serów dojrzewających bez powłok ochronnych. Natamycyna może być stosowana w produkcji serów, których czas dojrzewania wynosi co najmniej 4 tygodnie, z wyłączeniem serów dojrzewających miękkich. Zabieg może być powtarzany maksymalnie 3 razy; sery mogą być przekazy-

wane do obrotu po 25 dniach od ostatniego zastosowania antybiotyku. Natamycyna nie może być obecna w powierzchniowej 2 mm warstwie sera.

Wykonana w 1994 roku, pod kierunkiem Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH¹, kontrola serów dojrzewających (pobieranych od producenta) na zawartość natamycyny wykazała nieprawidłowe, niezgodne z przepisami stosowanie tego antybiotyku w przemyśle mleczarskim. Stwierdzono jego obecność w jadalnej części sera, co powinno dyskwalifikować produkt [10].

Do oznaczenia natamycyny w serach stosuje się głównie metody spektrofotometryczne oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej [2, 4, 5], a także technikę chromatografii cienkowarstwowej i metody immunoenzymatyczne [6, 7].

W związku z koniecznością kontrolowania użycia natamycyny w przemyśle mleczarskim oprócz rutynowej metody spektrofotometrycznej [8] wydaje się zasadne zastosowanie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Celem pracy była ocena przydatności metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej w rutynowej kontroli oznaczania natamycyny w serach dojrzewających.

MATERIAŁY I METODYKA

Przedmiotem badania był ser dojrzewający „Edamski” bez antybiotyku oraz fortyfikowany natamycyną w zakresie stężeń 0,05 - 8,0 mg/kg. Pozostałość natamycyny w serze oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą stacjonarną C-8 oraz detekcją UV [5].

Aparatura

1) Chromatograf cieczowy E 600 firmy Waters, USA; 2) detektor UV-VIS 486 Waters; 3) integrator 746 Waters; 4) kolumna Nova-Pak C 8, 3,9x150 mm, Waters; 5) prekolumna Resolve C 18, Waters; 6) wytrząsarka Elpan 357.

Odczynniki i materiały

Odczynniki: 1) metanol, HPLC Grade, Riedel-de Haën, Niemcy; 2) natamycyna - preparat Delvocid firmy Gist-Brocades, Holandia, o oznaczonej zawartości antybiotyku 51, 2%: roztwór podstawowy I (stężenie 0,5 mg/ml) - 50 mg natamycyny rozpuszczono w 100 ml metanolu, roztwór podstawowy II (stężenie 50 µg/ml) - do kolby 50 ml dodano 5 ml roztworu I i uzupełniono mieszaniną metanol, woda w stosunku 2 : 1; 3) kwas octowy cz. d. a. POCh Gliwice.

Materiały: 1) kolumny do ekstrakcji Sep-Pack C₁₈, Waters; 2) sączi Whatmann No 2; 3) sączi strzykawkowe Millex HV 0,45 µm, Millipore.

Do oznaczeń stosowano wodę oczyszczoną przez odwróconą osmozę i dejonizowaną.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotowano krzywą wzorcową w zakresie stężeń od 0,1 do 0,8 µg/ml. Do kolby miarowej 50 ml odpipetowano 5 ml roztworu natamycyny II i uzupełniono mieszaniną metanolu z wodą (2 : 1), a następnie odpipetowano 1, 2, 4, 6, 8 ml do serii kolb miarowych o pojemności 50 ml. Uzyskano roztwory wzorcowe antybiotyku o stężeniu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 µg/ml. Na kolumnę chromatografu podawano po 20 µl każdego roztworu i rejestrowano pole powierzchni pików, a następnie sporządzano krzywą wzorcową w układzie stężenie-pole powierzchni pików.

Natamycynę i jej roztwory należy chronić przed światłem.

Warunki pracy chromatografu

Faza ruchoma: metanol, woda, kwas octowy w stosunku 70 : 30 : 5;

¹ Udział brały Wojewódzkie Stacje Sanitarно-Epidemiologiczne w Białej Podlaskiej, Olsztynie i Poznaniu.

przepływ 1 ml/min;
liczba pól teoretycznych kolumny ok. 1600;
długość fali detektora 303 nm;
objętość próbki podawanej na kolumnę 20 μ l.

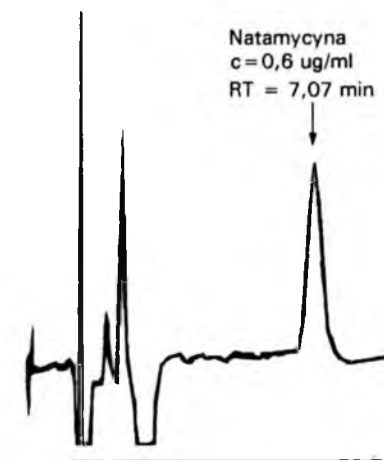
Wykonanie oznaczenia

Do 5 g rozdrobnionego sera umieszczonego w kolbie stożkowej (pojemność 200 ml) dodano 50 ml metanolu i wzorzec o stężeniu 50 μ g/ml (roztwór II) w odpowiedniej ilości wg tabeli I. Kolbę wytrząsano na wytrząsarce mechanicznej (amplituda 5, 250 cykli na min.), chroniąc przed światłem, przez 90 min., a następnie dodawano 25 ml wody i przez godzinę przechowywano w zamrażarce w temp. -18°C . Zimny ekstrakt sączono przez sączek bibułowy, odrzucając pierwsze 5 ml przesączu. Po doprowadzeniu przesączu do temperatury pokojowej, ekstrakt przepuszczano przez filtr strzykawkowy 0,45 μ m i podawano na kolumnę chromatografu.

Dla zawartości natamycyny w serze od 0,05 do 0,4 mg/kg stosowano zagęszczenie wyciągu metodą ekstrakcji do fazy stałej: do 50 ml przesączonego ekstraktu dodano 100 ml wody i wymieszano. Kolumnę Sep-Pak C₁₈ kondycjonowano przepuszczając (za pomocą strzykawki) 3-5 ml metanolu i 10 ml wody. Następnie na kolumnę podawano rozcieńczony ekstrakt z szybkością 25 ml/min., po czym przepuszczano 10 ml wody, kolumnę wysuszano przepuszczając 10 ml powietrza i wymywano natamycynę 3 ml metanolu. Roztwór ten podawano na kolumnę chromatografu jak wyżej opisano.

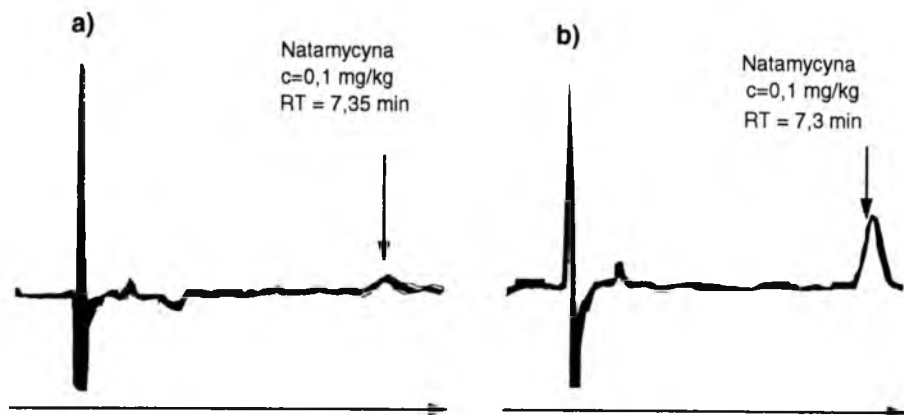
Stężenie natamycyny odczytywano z krzywej wzorcowej.

Przykładowe chromatogramy dla wzorca natamycyny oraz fortyfikowanych próbek sera przedstawiono na rycinach 1 i 2.



Ryc. 1. Przykładowy chromatogram wzorca zawierającego 0,6 μ g/ml natamycyny

Example of chromatogram of a standard solution containing 0,6 μ g/ml of natamycin



Ryc. 2. Przykładowe chromatogramy próbki sera zawierającego 0,1 mg/kg natamycyny: a) próbka bez zagęszczania, b) próbka zagęszczana metodą ekstrakcji do fazy stałej
 Example of chromatograms of samples containing 0,1 mg/kg natamycin: a) without concentration, b) after concentration by solid-phase extraction

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane w pracy wyniki z zastosowaniem metody HPLC do oznaczania natamycyny w serach przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Oznaczanie natamycyny w próbkach fortyfikowanych
 Determination of natamycin content in fortified samples

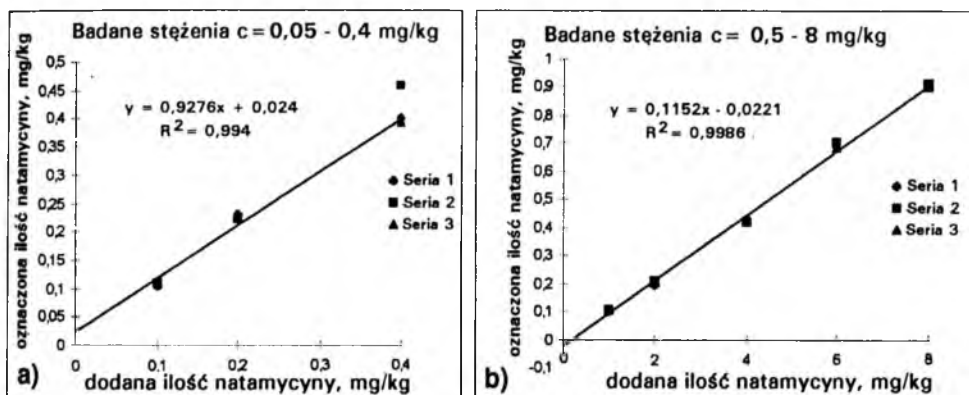
lp.	Dodana ilość natamycyny		Oznaczona ilość natamycyny* (mg/kg)	Względne odchylenie standardowe (%)	Odzysk (%)
	objętość roztworu wzorca, c=50µl/ml [ml]	stężenie w próbce (mg/kg)			
1	0,05**	0,05	0,046	3,1	92
2	0,1**	0,1	0,093	2,4	93
3	0,2***	0,2	0,178	2,9	89
4	0,4**	0,4	0,378	2,4	95
5	0,5	0,5	0,450	2,7	90
6	1,0	1,0	0,975	1,3	98
7	2,0	2,0	1,940	3,6	97
8	4,0	4,0	3,468	2,8	87
9	6,0	6,0	5,364	4,3	89
10	8,0	8,0	7,710	7,3	88

* wartość średnia z trzech oznaczeń

** próbki zagęszczone 10 razy

Odzyski dla badanych próbek fortyfikowanych natamycyną w zakresie od 0,5 do 8 mg/kg wynosiły od 87 do 98 %. Są one porównywalne z wynikami uzyskanymi metodą spektrofotometryczną [8, 11]. Odzyski dla zakresu stężeń od 0,05 do 0,4 mg/kg (zagęszczanych z zastosowaniem SPE) wynosiły od 89 do 95%; należy uznać je za dobre. Zarówno względne odchylenie standardowe w zakresie 1,3 - 7,3%, jak i granica oznaczalności (0,5 mg/kg oraz 0,05 mg/kg z zastosowaniem SPE) są zgodne z danymi piśmiennictwa [1, 5].

Stwierdzono również liniową zależność ilości dodanej natamycyny do oznaczanej dla badanych zakresów. Współczynniki korelacji dla stężeń 0,05 - 0,4 mg/kg wynosiły 0,994, a dla stężeń 0,5 - 8 mg/kg - 0,998, co przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 3. Wykres zależności pomiędzy dodaną a oznaczoną ilością natamycyny: a) z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej, b) bez zagęszczania
Plot of correlation between added and determined natamycin: a) after concentration by solid-phase extraction, b) without concentration

Zaletą opisaną metody jest możliwość jej znacznego zautomatyzowania przy zastosowaniu podajnika próbek (autosamplera) oraz krótszy czas analizy w porównaniu z metodą spektrofotometryczną. Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej wpływa na poprawę oznaczalności metody. Sposób ten może być zastosowany zarówno przy oznaczeniu techniką HPLC, jak również metodą spektrofotometryczną.

WNIOSEK

Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej, z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej, może znaleźć zastosowanie w kontroli serów dojrzewających na obecność natamycyny.

K. Rybińska, J. Postupolski, M. Szczęsna

DETERMINATION OF NATAMYCIN RESIDUES IN RIPENING CHEESES BY
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary

The purpose of the study was to determine the usefulness of high performance liquid chromatography (HPLC) for natamycin determination in routine control of ripening cheeses. In the method the antibiotic is extracted from the studied sample with a 2:1 methanol/water solution, freezing of contaminants at -18°C and determination of HPLC using a RP C_8 column and UV detection. In case of low concentrations of the antibiotic the extract was condensed by extraction to solid phase (SPE).

In the study of the fortified samples the basic analytical parameters of the method were tested (determinability, repeatability, recovery) and its usefulness in the 0.05 - 0.4 mg/kg concentration range (by SPE) and above 0.5 mg/kg of cheese was checked. Recovery was from 87 to 98%, repeatability was 1.3 - 7.3% and determinability was 0.5 mg/kg (using SPE 0.05 mg/kg).

The obtained results demonstrated a good usefulness of HPLC for routine control of natamycin content in ripening cheeses. It seems recommendable to apply HPLC for natamycin determination in ripening cheese by sanitary-epidemiological stations.

PIŚMIENNICTWO

1. *De Ruig W. G.*: Determination of natamycin in cheese and cheese rind: interlaboratory collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1987, 70, 949. - 2. *De Ruig W. G., Van Oostrom J. J., Leenher K.*: Spectrometric and liquid-chromatographic determination of natamycin in cheese and cheese rind. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1987, 70, 944. - 3. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives, other than colours and sweeteners. *Official Journal of the European Communities*, 1995, L 61. - 4. *Fletouris D. J., Botsoglou N. A., Mantis A. J.*, Rapid spectrophotometric method for analysing natamycin in cheese and cheese rind. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1024. - 5. ISO 9233:1991 Cheese and cheese rind - Determination of natamycin content - Method by molecular absorption spectrometry and by high-performance liquid chromatography. - 6. *Lehmann G., Ganz J., Grucza G.*: Rapid determination of natamycin in cheese. *Lebensmittelschem. Gerichtl. Chem.*, 1987, 41, 12. - 7. *Maertlbauer E., Ali H., Dietrich R., Terplan G.*: Enzyme immunoassay for the detection of natamycin in cheese rind. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 1990, 41, 112. - 8. Metody badania antybiotyków i innych leków w środkach spożywczych. Oznaczenie pozostałości natamycyny. Wydawnictwa Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, 1985. - 9. Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 31 marca 1993 r. w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i używkach. *Monitor Polski* nr 22 poz. 233. - 10. *Rybińska K., Postupolski J., Szczęsna M.*: Oznaczenie pozostałości natamycyny w serach dojrzewających. *Materiały V Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej*. Gdańsk, 1995, 422. - 11. *Rybińska K.*: Oznaczenie pozostałości natamycyny w serach dojrzewających. *Roczn. PZH*, 1985, 36, 467.

Otrzymano: 1996.10.26