

高效液相色谱法测定乳品中的纳他霉素残留

王丽丽*

(兴安职业技术学院, 乌兰浩特 011500)

摘要: **目的** 建立一种高效液相色谱法测定乳品中那他霉素残留的分析方法。**方法** 样品经提取、超声和离心分离后, 采用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)进行分离, 高效液相色谱法测定。检测波长为 302 nm, 流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 10 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。对样品的提取溶剂和色谱流动相进行了优化, 并于国标测定方法的结果进行了比较。**结果** 选择 10%的冰乙酸水溶液和 0.1%的 BHT-甲醇溶液作为样品提取溶剂, 甲醇-水-冰乙酸(60:40:6, V:V:V)作为流动相。本方法可以在 7 min 内完成对目标物的分离, 纳他霉素的标准曲线方程为 $Y=1.0058X+0.0715$, 相关系数 $r=0.9995$, 方法检出限为 0.1 mg/kg。纳他霉素在 3 个添加水平下的回收率在 96.8%~100%之间, 测定的相对标准偏差均小于 1.18%。本方法与国标方法相比, 缩短了前处理时间, 提高了方法的回收率。**结论** 该方法快速、准确、精密度好, 适用于检测批量乳品中纳他霉素的残留量。

关键词: 乳品; 纳他霉素; 高效液相色谱法

Determination of natamycin residue in milk products by high performance liquid chromatography

WANG Li-Li*

(Xing'an Vocational and Technical Institute, Wulanhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of natamycin residue in milk products by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** After extraction, ultrasonic processing and centrifugal separation, the samples were detected by HPLC with C_{18} chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m). The detection wavelength was 302 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the sample volume was 10 μ L, and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. Meanwhile, the extraction solvent of sample and chromatographic mobile phase were optimized, and the detection results were compared with that of standard method. **Results** The 10% glacial acetic acid aqueous solution and 0.1% BHT-methanol solution were selected as extraction solvent of sample, methanol-water-acetic acid (60:40:6, V:V:V) was selected as the chromatographic mobile phase. The separation of the target could be completed within 7 min. The standard curve equation of natamycin was $Y=1.0058X+0.0715$ ($r=0.9995$). Limit of detection of the method was 0.1 mg/kg. And the recoveries of natamycin at 3 spiked levels ranged from 96.8% to 100% with the relative standard deviation less than 1.18%. Compared with the national standard method, this method shorten the pretreatment time and increased the recovery. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and precise, which is suitable for the detecting of natamycin residue in numerous milk products.

KEY WORDS: milk products; natamycin; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 王丽丽, 讲师, 主要研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: 610653923@qq.com

*Corresponding author: WANG Li-Li, Lector, Xing'an Vocational and Technical Institute, Wulanhot 011500, China. E-mail: 610653923@qq.com

1 引言

纳他霉素(natamycin, pimaricin)是一种多烯大环内酯类抗生素,由球孢链霉菌(*Streptomyces glvosporues*)和恰塔努加链霉菌(*Streptomyces chatanoogensis*)等链霉菌合成,其抗菌机制是与微生物细胞膜上的甾醇化合物反应,破坏细胞膜的架构或改变细胞膜的通透性,使微生物体内的酶类和代谢产物溢出细胞外,导致微生物因正常的生理平衡被破坏而失活^[1]。自1955年被Brik等^[2]发现以来,纳他霉素以其优越的抗霉菌、酵母菌和真菌毒素效果和安全、低剂量、高效率等优点而被广泛用于食品防腐保鲜以及抗真菌治疗领域。纳他霉素对细菌没有抑制作用,因此它不影响酸奶、奶酪等的口感和风味,通常被用于食品的表面防腐^[3]。1982年,美国食品药品监督管理局正式批准纳他霉素用作食品防腐剂^[4]。1997年,我国卫生部正式批准纳他霉素作为食品防腐剂。目前,纳他霉素已成为在30多个国家广泛使用的天然生物食品防腐剂和抗菌添加剂^[5]。我国国家标准GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》^[6]规定,纳他霉素在干酪和再制干酪及其类似制品中的最大使用量为0.3 g/kg,残留量要求小于10 mg/kg。

目前已报道的纳他霉素的检测方法有生物检测法、薄层层析法、紫外分光光度法、高效液相色谱法和超高效液相色谱-串联质谱法等^[7-14]。其中生物检测法不能排除基质干扰,难以精确定量,应用范围窄;薄层层析法主要用于定性分析;紫外分光光度法作为常规对照,若用于定量分析,对实验条件要求较高;高效液相色谱法准确度高,应用最广泛;超高效液相色谱-串联质谱法具有超高分离度、快速、高灵敏度等优点,但设备昂贵,用于纳他霉素的检测研究较少。本研究采用高效液相色谱法建立一种测定批量乳品中那他霉素残留的方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Dinox 3000 液相色谱仪(配备紫外检测器,美国 Thermo 公司); KQ-500 B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Neofuge 13R 台式高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); MT/VORTEX 涡旋混合仪(上海五相仪器仪表有限公司)。

纳他霉素标准品:纯度 98.0%, Dr 公司生产。

乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司); 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT, 纯度 > 99%, 美国 Sigma 公司); 冰乙酸、磷酸、乙酸铵(优级纯,天津市科密欧化学试剂开发中心); Agela C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m, 博纳艾杰尔科技公司); 0.45 μ m 有机系滤膜(天津津滕公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

0.1% BHT-甲醇溶液:称取 0.1 g BHT 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至 100 mL。

纳他霉素标准储备液:精确称取 0.01001 g 纳他霉素标准品到 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.1% BHT-甲醇溶液超声溶解后定容,充分混匀后转移到棕色试剂瓶中 4 $^{\circ}$ C 避光保存,浓度为 100 μ g/mL。

纳他霉素标准溶液:准确吸取 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 纳他霉素标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.1% BHT-甲醇溶液定容后混匀,配制浓度为 0.1、0.5、1、2、4、5 μ g/mL 的标准工作液。

10%冰乙酸水溶液:取 10 mL 冰乙酸于 100 mL 容量瓶中,用超纯水定容至 100 mL。

0.05 mol/L 乙酸铵溶液:称取 3.8542 g 乙酸铵,溶解于 1000 mL 容量瓶中,用超纯水定容至 1000 mL。

2.2.2 样品提取溶剂比例的选择

液体样品:选择纯牛奶、乳饮料、核桃奶和高钙奶为实验样品,分别准确称取 4 份纳他霉素加标量为 2 mg/kg 的 4 种样品于离心管中,每份 5 g (精确到 0.01 g),向 4 种样品中分别加入 5、10、10、15 mL 10%冰乙酸水溶液,剧烈振摇 2 min,充分混匀后再分别加入 10、10、15、10 mL 0.1% BHT-甲醇溶液,超声提取 10 min, 4000 r/min 离心 5 min,所得上清液用 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待用。上述过程需避光操作。

固体和半固体样品:选择酸奶、奶酪、奶片和奶粉为实验样品,分别准确称取 4 份纳他霉素加标量为 2 mg/kg 的 4 种样品于三角瓶中,每份 10 g,向 4 种样品中分别加入 5、10、10、15 mL 10%冰乙酸水溶液,剧烈振摇 2 min,充分混匀后再分别加入 10、10、15、10 mL 0.1% BHT-甲醇溶液,超声提取 10 min, 4000 r/min 离心 5 min,所得上清液用 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待用。上述过程需避光操作。

2.2.3 检测波长的确定

将 5 μ g/mL 的纳他霉素标准溶液用紫外分光光度计在 200~400 nm 波长范围内进行全波长扫描,确定最佳检测波长。

2.2.4 液相色谱条件

采用天津博纳艾吉尔 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),分别选取甲醇-水-冰乙酸(60:40:6, V:V:V)、甲醇-水-磷酸(70:30:0.5, V:V:V)和 0.05 mol/L 乙酸铵-乙腈(80:20, V:V)作为流动相进行实验;流速为 1.0 mL/min,进样体积为 10 μ L,柱温为 30 $^{\circ}$ C。

3 结果与分析

3.1 样品提取溶剂比例的选择

由于纳他霉素在甲醇和冰乙酸中的溶解性较好,在

极端 pH 值、紫外光和氧化剂存在的条件下不稳定^[15,16], 因此, 所有样品采用 4 种不同比例的甲醇和冰乙酸溶液提取, 结果如表 1 所示。从表 1 可以看出, 液体样品、固体样品和半固体样品提取效果最好的溶剂组成均为: 10 mL 10% 冰乙酸水溶液和 15 mL 0.1% BHT-甲醇溶液。

3.2 检测波长的确定

以 5 $\mu\text{g/mL}$ 的纳他霉素标准溶液作为样品, 用紫外分光光度计在 200~400 nm 波长范围内进行全波长扫描, 得到的结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 纳他霉素的吸收最大吸收波长为 302 nm, 故选择 302 nm 作为检测波长。

3.3 液相色谱流动相的选择

以奶酪为样品, 经过多次实验后得出, 3 种流动相都能将样品中的纳他霉素和杂峰分离开(图 2), 且纳他霉素的保留时间均为 7 min 左右。但甲醇-水-磷酸用做流动相时, 纳他霉素的保留较弱, 且进样后出现基线漂移, 保留时间波动较大。考虑到乙腈价格较高, 故选择甲醇-水-冰乙酸(60:40:6, V:V:V)作为流动相。

3.4 方法的线性范围及检出限

将纳他霉素标准工作液注入液相色谱仪中, 得到纳他霉素的色谱图, 纳他霉素标准品的浓度和对应的峰面积

如表 2 所示, 二者的线性关系如图 3 所示。结果表明, 纳他霉素在 0.1~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的线性关系良好, 纳他霉素标准品的浓度和对应的峰面积间的回归方程为 $Y=1.0058X+0.0715$, 相关系数 $r=0.9995$ 。

称取 3 份酸奶样品, 配制成那他霉素含量分别为 0.1、0.2、0.5 mg/kg 的样品溶液, 按照优化后的方法进行测定, 以 S/N (信噪比)=3 计算方法的检出限(limit of detection, LOD), 得出本方法的检出限为 0.1 mg/kg。

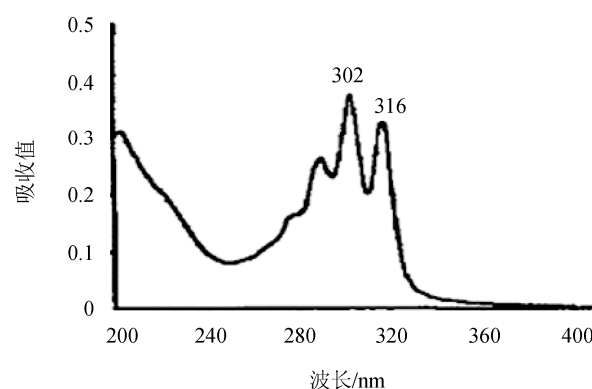


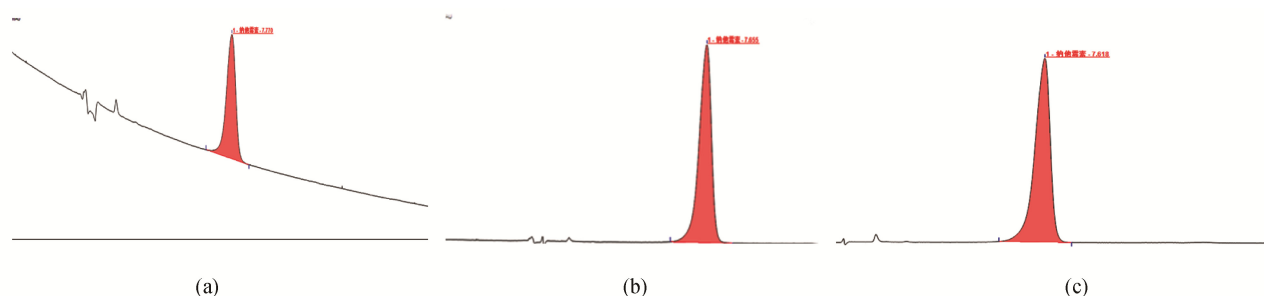
图 1 纳他霉素的全波长扫描图

Fig. 1 Full wavelength scanogram of natamycin

表 1 不同比例提取溶剂的提取效果

Table 1 Extraction effect of different proportions of extraction solvent

10%冰乙酸: 0.1% BHT-甲醇溶液(V:V) 5:10	纳他霉素含量(mg/kg)							
	纯牛奶	核桃奶	高钙奶	乳饮料	奶粉	奶片	酸奶	奶酪
5:10	1.50	1.61	1.70	1.66	1.55	1.68	1.73	5.90
10:10	1.55	1.62	1.75	1.69	1.65	1.69	1.75	6.00
10:15	1.95	1.90	1.92	1.90	1.98	1.97	1.99	6.80
15:10	1.60	1.82	1.80	1.84	1.84	1.78	1.84	6.10



横坐标: 保留时间/min; 纵坐标: 响应值/mAU

a: 甲醇-水-磷酸; b: 乙酸铵溶液-乙腈; c: 甲醇-水-冰乙酸

a: methanol-ultra pure water-phosphoric acid; b: ammonium acetate solution-acetonitrile; c: methanol-ultra pure water-glacial acetic acid

图 2 不同流动相条件下纳他霉素色谱图

Fig. 2 Spectrograms of natamycin using different mobile phases

表2 那他霉素标准品的浓度及峰面积
Table 2 Concentration and peak area of natamycin standard

标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0	5.0
峰面积	0.1025	0.5084	1.0333	2.1051	4.1252	5.2339

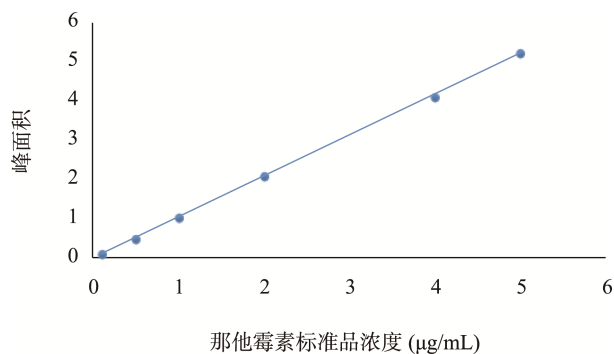


图3 那他霉素的标准曲线图
Fig.3 Standard curve of natamycin

3.5 回收率及精密度实验

以马苏里拉奶酪为样品,向其中添加 3.0、4.0、5.0 mg/kg 3 个浓度水平的那他霉素,每个加标水平重复测定 6 次。样品的本底值及回收率如表 3 所示,从表 3 可以看出,那他霉素的回收率范围在 96.8%~100%之间,测定的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 1.18%,表明方法的准确度和精密度较好。

3.6 与国标方法的对比

3.6.1 那他霉素标准溶液配制溶剂对比

那他霉素标准品分别用国标推荐的甲醇和本研究选用的 0.1% BHT-甲醇溶液溶解后,配制成 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液,用 0.45 μm 有机滤膜过滤后上机测定。每个样品平行测定 5 次,结果如表 4 所示,用甲醇溶解的那他霉素标准品的峰面积呈明显降低趋势,RSD 为 22.4%;用 0.1% BHT-甲醇溶液溶解的那他霉素标准品所得峰面积的 RSD 为 1.81%,较为稳定。

3.6.2 样品测定结果对比

分别用本研究中优化得到的方法和国标方法^[17]对市售的纯牛奶、酸奶、奶片、乳粉、早餐奶酪和马苏里拉奶酪样品进行检测,结果如表 5 所示。

4 结论

本研究通过优化样品的提取溶剂,有效提高了那他霉素的回收率,通过在前处理溶剂中加入抗氧化剂 BHT 防止氧化,样品中那他霉素的回收率从 64.5%提高到了 101%,通过对比实验确定了最适流动相比例,建立了一种简单、

快速,且准确度和精密度良好的乳品中那他霉素残留的检测方法。本方法与国标方法比较,缩短了前处理的时间,提高了稳定性和回收率,适合大批量样品的同时检测。然而本方法只适用于 1 种防腐剂的检测,针对多种防腐剂的同时快速检测方法还有待研究。

表3 回收率和精密度实验结果($n=6$)
Table 3 Results of tests for recovery and precision($n=6$)

加标量 (mg/kg)	试样本底 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
3.0	4.5	7.45	99.3	1.18
3.0	4.5	7.30	97.3	1.18
3.0	4.5	7.40	98.7	1.18
3.0	4.5	7.49	99.9	1.18
3.0	4.5	7.39	98.5	1.18
3.0	4.5	7.26	96.8	1.18
4.0	4.5	8.47	99.6	0.62
4.0	4.5	8.43	99.2	0.62
4.0	4.5	8.39	98.7	0.62
4.0	4.5	8.51	100	0.62
4.0	4.5	8.37	98.5	0.62
4.0	4.5	8.49	99.9	0.62
5.0	4.5	9.50	100	0.54
5.0	4.5	9.45	99.5	0.54
5.0	4.5	9.40	98.9	0.54
5.0	4.5	9.38	98.7	0.54
5.0	4.5	9.50	100	0.54
5.0	4.5	9.44	99.4	0.54

表4 不同溶剂溶解的那他霉素标准品的峰面积
Table 4 The peak areas of natamycin standard dissolved by different solvents

	峰面积					
	0.1% BHT-甲醇	1.0124	1.0335	1.0447	1.0575	1.0274
甲醇	1.0148	0.9945	0.8754	0.8076	0.6298	0.4352

表 5 样品检测结果
Table 5 The test results of samples

样品名称	本底含量(mg/kg)	加标量(mg/kg)	本方法结果(mg/kg)	平均回收率(%)	国标法结果(mg/kg)	平均回收率(%)
纯牛奶	0	2	1.98	99	1.8	88.8
	0	2	1.99		1.75	
酸奶	0	2	1.97	99	1.6	78.5
	0	2	1.99		1.54	
奶片	0	2	2.01	101	1.53	75.2
	0	2	2.02		1.48	
乳粉	0	2	2.01	100	1.6	78.8
	0	2	1.99		1.55	
马苏里拉	4.6	2	6.5	98	4.2	65.9
	4.5	2	6.4		4.5	
早餐奶酪	0	2	1.98	99	1.24	64.5
	0	2	1.97		1.34	

参考文献

- 梁琪. 绿色食品用添加剂与禁用添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Liang Q. Green food additive and additive disabled [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- Brik H. Analytical profiles of drug substances [M]. New York: Academic Press, 1981.
- 雷德柱, 李青嵘, 黄永健. 纳他霉素效价测定方法的改良及含量的快速测定[J]. 现代食品科技, 2014, (11): 251-255.
Lei DZ, Li QR, Huang YJ. An improved method for natamycin titer measurement and the rapid determination of its content [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, (11): 251-255.
- Enshasy HA, Faridm A, Sayed SA. Influence of inoculum tyband cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces Natalensis* [J]. J Basic Microbiol, 2000, 40(5/6): 333-342.
- 袁亦丞. 纳他霉素[J]. 中国食品用化学品, 1997, 1(3): 37.
Yuan YZ. Natamycin [J]. Chin Food Chem, 1997, 1(3): 37.
- GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard for uses of food additives [S].
- 乔春明, 刘坤, 葛菁萍, 等. 发酵液中纳他霉素的生物检测法[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 159-161.
Qiao CM, Liu K, Ge JP, *et al.* Bioassay method of natamycin in fermentation broth [J]. Food Sci, 2009, 30(7): 159-161.
- 张慧, 吴颖, 朱蕾, 等. 超高效液相色谱法检测饮料中纳他霉素的含量[J]. 食品科学, 2012, (8): 48-49.
Zhang H, Wu Y, Zhu L, *et al.* Determination of natamycin in various drinks by UPLC method [J]. Food Sci, 2012, (8): 48-49.
- 黄孟基, 郭新东, 王永华, 等. 高效液相色谱法测定月饼中那他霉素残留[J]. 食品与发酵工业, 2006, (5): 125-127.
Huang MJ, Guo XD, Wang YH, *et al.* Determination of natamycin residues in moon cake by high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2006, (5): 125-127.
- 周莉莉, 祝建华, 张卉, 等. 乳制品中那他霉素的超高效液相色谱-串联质谱法快速测定[J]. 分析测试学报, 2010, (1): 83-85.
Zhou LL, Zhu JH, Zhang H, *et al.* Rapid determination of natamycin in dairy products by UPLC-MS [J]. J Instrum Anal, 2010, (1): 83-85.
- 李艳芬. 超高效液相色谱法测定乳制品中纳他霉素含量[J]. 食品工业, 2013, (8): 240-242.
Li YF. Determination of natamycin in dairy products by UPLC [J]. Food Ind, 2013, (8): 240-242.
- 吴旭, 张雪峰, 其其格, 等. 高效液相色谱法检测酸奶与奶酪中那他霉素残留[J]. 中国动物检疫, 2010, (11): 46-47.
Wu X, Zhang XF, Qi QG, *et al.* Determination of natamycin residue in yoghurt and cheese by high performance liquid chromatography [J]. China Animal Health Inspect, 2010, (11): 46-47.
- 魏宝东, 郑凤娥, 孟宪军, 等. 发酵液中纳他霉素含量快速检测方法研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 132-136.
Wei BD, Zheng FE, Meng XJ, *et al.* Study on rapid determination of natamycin in fermentation broth [J]. Food Res Dev, 2007, 28(2): 132-136.
- 刘峰, 骆健美, 刘丹, 等. 基于抑菌活性的纳他霉素微孔板生物检测法[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 142-145.
Liu F, Luo JM, Liu D, *et al.* Bioassay of natamycin microplate based on antibacterial activity [J]. Food Ferment Ind, 2009, 35(2): 142-145.
- 骆健美, 金志华, 岑沛霖, 等. 纳他霉素在不同溶剂中溶解度的测定与关联[J]. 高效化学工程学报, 2008, 22(5): 733-737.
Luo JM, Jin ZH, Cen PL, *et al.* Determination and correlation of solubility of natamycin in different solvents [J]. J Chem Eng Chin Univ, 2008, 22(5): 733-737.
- 胡海洋, 乔春明, 葛菁萍, 等. 纳他霉素的特性和生产研究状况[J]. 中国现代药物应用, 2009, (2): 206-207.

Hu HX, Qiao CM, Ge QP, *et al.* Characteristics of natamycin and its production [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2009, (2): 206-207.

[17] GB/T 21915-2008 中华人民共和国国家标准 食品中那他霉素测定-液相色谱法[S].

GB/T 21915-2008 National standard Determination of natamycin in food-High performance liquid chromatography [S].

(责任编辑: 刘丹)

作者简介



王丽丽, 讲师, 主要研究方向为农产品加工与贮藏工程。

E-mail: 610653923@qq.com

《食品贮藏保鲜与品质控制专题》征稿函

食品主要来源于农业、林业、水产业、养殖业, 食品贮藏保鲜与加工是这些产业体系的延伸, 食品的贮藏保鲜与品质控制有利于发展农村经济, 改善人民的膳食结构和营养结构, 提高人们的生活和健康水平, 保持社会稳定。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品贮藏保鲜与品质控制专题”专题, 由大连海洋大学食品学院赵前程院长担任专题主编, 围绕(1)果蔬、粮油、肉制品和水产品等食品保鲜的新工艺开发与应用; (2)栅栏技术、生物酶技术、可食性包装膜、超高压、辐照、冰温等新型保鲜技术在食品杀菌与保鲜方面的研究与应用; (3)食品贮藏、抑菌保鲜机制分析; (4)食品保鲜包装容器/材料、食品流通中的保鲜技术; (5)食品卫生质量控制和检测方法等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在2017年1月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 赵前程院长和主编吴永宁研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在2016年12月31日前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部