

马苏里拉奶酪中纳他霉素含量的测定优化

刘美霞*, 李 红, 王 佳, 袁凤琴, 张慧萍, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘 要: **目的** 建立一种马苏里拉奶酪中纳他霉素含量的检测方法。**方法** 马苏里拉奶酪经甲醇提取, 采用离心的方式净化, 采用液相色谱-紫外检测器测定, 外标法定量。**结果** 纳他霉素在 1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 浓度与峰面积采用幂函数方程绘制标准曲线, 相关系数大于 0.99; 方法定量检出限为 0.2 mg/kg; 样品的加标平均回收率为 89.9%~101.2%; 相对标准偏差为 0.008%~0.054%; **结论** 本文研究的检测方法, 样品前处理步骤简单, 快速, 离心后蛋白沉淀效果好, 检测结果及仪器条件稳定, 检测结果准确, 满足实验需求。

关键词: 奶酪; 纳他霉素; 测定; 优化

Optimization of determination of natamycin in Mozzarella cheese

LIU Mei-Xia*, LI Hong, WANG Jia, YUAN Feng-Qin, ZHANG Hui-Ping, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co.Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of natamycin in Mozzarella cheese. **Methods** Mozzarella is extracted from methanol. Purification by centrifugation, A liquid chromatography-ULTRAVIOLET detector was used for determination, External standard method of quantification. **Results** Natamycin ranged from 1.0 to 5.0 $\mu\text{g/mL}$, The standard curve of concentration and peak area was drawn by power function equation, The correlation coefficient is greater than 0.99; **Methods** The quantitative detection limit was 0.2 mg/kg; The average recovery of the samples was 89.9%–101.2%; Relative standard deviation is 0.008% to 0.054%. **Conclusion** The detection method studied in this paper, Sample pretreatment procedure is simple, fast, The protein precipitation effect was good after centrifugation, The test result and instrument condition are stable, Accurate detection results, Meet the experimental requirements.

KEY WORDS: cheese; natamycin; determination; optimization

1 引 言

纳他霉素是由纳塔尔链霉菌(streptomyces natalensis)受控发酵后提取的具有抗真菌功能的多烯物质。纳他霉素分子式: $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{13}$ 。抑菌针对性强, 高效抑制各种霉菌和

酵母的生长繁殖, 能抑制真菌毒素的产生^[1-3]。对细菌没有抑制作用, 因此它不影响酸奶、奶酪、生火腿、干香肠的自然成熟过程。溶解性低, 不易进入食品内部, 有很高的表面防霉效果。在 pH 3~9 范围内都能起到很好的防腐保鲜效果, 适用于各种酸性、中性、偏碱性食品^[4-10]。纳他

基金项目: 呼和浩特科技计划项目(2019-计-1)

Fund: Supported by Huhhot Science & Technology Plan (2019-计-1)

*通讯作者: 刘美霞, 高级工程师, 主要研究方向为食品理化检测及仪器分析检测。E-mail: liumeixia@mengniu.cn

*Corresponding author: LIU Mei-Xia, Senior Engineer, Central Laboratory of Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Shengle Economic Park, Helingeer County, Hohhot 011500, China. E-mail: liumeixia@mengniu.cn

霉素是国际上唯一获准的抗真菌生物防腐剂, GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[11] 规定了纳他霉素在食品中的应用范围。

国内目前关于奶制品中纳他霉素含量的检测方法有 GB/T 21915-2008《食品中纳他霉素的测定液相法》^[12], 其测定原理是奶制品经甲醇提取, 采用加水冷冻去除奶制品中的脂肪成分净化, 采用反相液相色谱-紫外检测器测定, 外标法定量^[6]。但是实验过程中加水冷冻净化沉淀效果比较差, 存在沉淀不完全的现象, 对检测结果造成很大的影响。因而, 检测奶制品中纳他霉素含量的方法仍有待开发和改进^[13-17]。

本研究在国家标准的基础上, 将奶酪中纳他霉素含量的检测方法进行改进, 以期达到检测结果准确、检测快速、满足实验需求的目的。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

戴安 3000 高效液相色谱仪、Venusil XBP C₁₈(L) 色谱柱(戴安中国有限公司); XP205DR 万分之一天平(瑞士 mettler 公司); Neofuge 15R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); 1 mL 移液器(美国 Thermo 公司); 200 μ L 移液器(德国 Transferpette 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

冰乙酸(优级纯, 天津福晨化学试剂厂); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 实验室用水为去离子水(一级水); 纳他霉素标准品(纯度 $\geq 89\%$, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

纳他霉素标准储备液(100 μ g/mL): 准确称取适量的纳他霉素标准品, 用甲醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。在 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光保存 3 个月;

纳他霉素标准工作液: 准确吸取 1、2、3、4、5 mL 纳他霉素标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度混匀, 配成浓度为 1、2、3、4、5 μ g/mL 的标准工作液。

2.2.2 色谱参考条件

色谱柱: Venusil XBP C₁₈(L), (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) (或相当型号色谱柱); 流动相: 甲醇+水+冰乙酸(60+40+5, V:V:V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 305 nm; 进样量: 10 μ L。

2.2.3 样品前处理

称取奶酪 10 g(精确至 0.1 mg)于三角瓶或离心管中, 加入 25 mL 甲醇, 用封口膜密封, 超声 30 min 后转入 50 mL 离心管中, 在常温下以 4000 r/min 离心 6 min。取上清液待测。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

分别准确吸取 1、2、3、4、5 mL 纳他霉素标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度混匀, 配成浓度分别为 1、2、3、4、5 μ g/mL 的标准工作液。以峰高(或峰面积)为纵坐标, 以标准系列工作液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 如图 1 所示。纳他霉素标准曲线线性良好, 线性方程为 $S=1.0419C-0.0004$, 相关系数 r^2 为 0.9998, 满足检测需求。

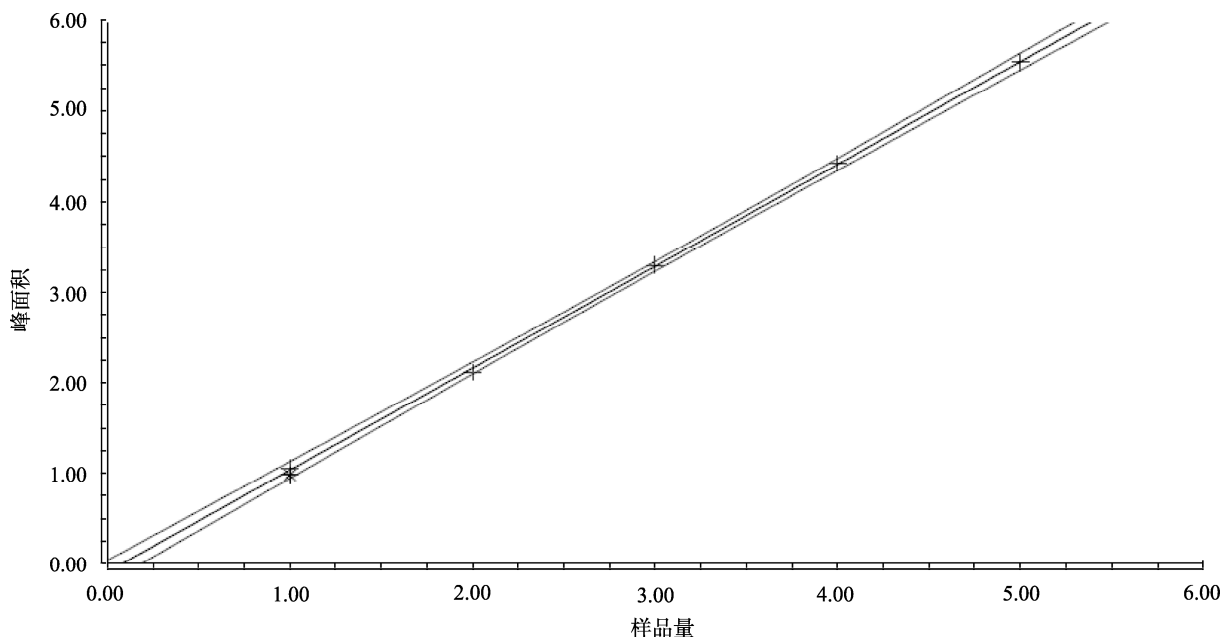


图 1 纳他霉素标准曲线

Fig.1 Standard curve of natamycin

3.2 方法回收率验证

取本底样品分别以加入浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的纳他霉素标准储备液 0.5、1.0、2.5 mg/kg, 进行加标回收实验。以下是空白样品及加标样品纳他霉素测定结果及回收率测定结果, 如表 2 所示。纳他霉素回收率在 89.9%~101.2%之间, 回收率符合检测需求。

表 2 纳他霉素回收率测定结果
Table 2 Recovery of natamycin

加标浓度/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%
0.0	0.00	/
0.0	0.00	/
0.5	0.48	96.8
0.5	0.48	96.4
0.5	0.48	96.4
0.5	0.50	99.2
0.5	0.50	97.2
0.5	0.50	97.5
0.05	0.49	98.2
0.05	0.51	101.2
1.0	0.99	99.3
1.0	0.93	93.4
1.0	0.90	90.5
1.0	0.90	89.9
1.0	0.91	91.0
1.0	0.91	91.0
2.5	2.32	92.8
2.5	2.39	95.6
2.5	2.40	95.8
2.5	2.40	96.0
2.5	2.48	99.2
2.5	2.44	97.6

3.3 方法精密度验证:

取空白基质样品分别加入浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的纳他霉素标准储备液 0.5、1.0、2.0 mg/kg, 进行加标回收实验, 以验证方法精密度, 以下是测定结果精密度, 如表 3 所示。

3.4 方法稳定性验证

对同一样品, 放置不同时间, 进行纳他霉素含量稳定性试验, 检测结果如表 4 所示。

表 3 纳他霉素精密度测定结果
Table 3 Results of precision determination of natamycin

项目	纳他霉素		
加标量/(mg/kg)	0.500	1.000	2.00
	0.484	0.993	2.32
	0.482	0.934	2.39
	0.482	0.905	2.40
	0.496	0.899	2.40
	0.486	0.910	2.48
测定值/(mg/kg)	0.488	0.910	2.44
	0.491	/	/
	0.506	/	/
平均值/(mg/kg)	0.489	0.925	2.40
标准偏差 SD/%	0.008	0.035	0.054
精密度(RSD)/%	1.700	3.830	2.23

表 4 纳他霉素稳定性验证
Table 4 Stability verification of natamycin

样品编号	放置时间/d	纳他霉素含量/(mg/kg)
1	1	3.8
2	3	3.7
3	5	3.6
4	7	3.6
5	10	3.8
6	14	3.7
7	18	3.6
8	20	3.7
9	23	3.7
10	25	3.5
11	27	3.8
12	30	3.8
相对偏差/%		5.40

由表 4 可知, 纳他霉素放置不同时间进行检测, 检测结果最大偏差 0.2 g/kg, 相对偏差为 5.40%, 符合方法要求。

3.5 方法检出限验证

将纳他霉素标液无限稀释后, 用高效液相色谱仪进行测定, 直至信噪比(S/N)为 10, 得出纳他霉素定量检出限为 0.2 mg/kg, 与国标定量检出限一致。

4 结 论

经过结果分析, 纳他霉素的定量检出限为 0.2 mg/kg, 回收率在 89.9%~101.2%之间, 测定精密度均小于 5%, 符合国标要求(精密度<10%), 放置不同时间进行检测, 检测结果最大偏差 0.2 g/kg, 相对偏差为 5.40%, 符合方法要求。因此, 该方法的稳定性比较好。

通过以上的数据分析与结果讨论, 依其检验所得结果准确可行, 该方法样品前处理步骤简单, 快速, 离心后蛋白沉淀效果好, 检测结果稳定, 仪器条件稳定, 达到了检测结果准确、检测快速、满足实验需求的目的, 可用于马苏里拉奶酪中纳他霉素含量的检测。

参考文献

- [1] 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 standards-standards for use of food additives [S].
- [2] GB/T 21915-2008 食品中纳他霉素的测定 液相色谱法[S]. GB/T 21915-2008 Determination of natamycin in food by HPLC [S].
- [3] 盛春, 吴彬, 王爱敏, 等. 食品中纳他霉素残留量变化的分析检测研究[J]. 中国食品添加剂, 2010, (6): 197-204.
Sheng C, Wu B, Wang AM, *et al.* Analysis and detection of the change of natamycin residue in food [J]. *China Food Addit*, 2010, (6): 197-204.
- [4] 陈永艳, 李彩瑞, 杨秀敏, 等. 高效液相色谱法测定果酱中的纳他霉素[J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 115-118.
Chen YY, Li CR, Yang XM, *et al.* Determination of natamycin in jam by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Food*, 2008, 8(1): 115-118.
- [5] 官咏仪, 邱志超, 金梦, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中纳他霉素和富马酸二甲酯的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2246-2250.
Guan YY, Qiu ZC, Jin M, *et al.* Simultaneous determination of natamycin and dimethyl fumarate in foods by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8 (6): 2246-2250.
- [6] 鄂志强, 王克新, 卢雁. 乳制品中纳他霉素的测定[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(7): 54-56.
E ZQ, Wang KX, Lu Y. Determination of natamycin in dairy products [J]. *Chin Dairy Ind*, 2008, 36(7): 54-56.
- [7] 闫磊, 刘宁, 孙亚范, 等. 乳制品中纳他霉素的液相色谱检测方法[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 111-112.
Yan L, Liu N, Sun YF, *et al.* Liquid chromatographic detection of natamycin in dairy products [J]. *Food Res Dev*, 2010, 31(4): 111-112.
- [8] 马君刚, 任水英, 劳斐. UPLC 法测定乳制品中的纳他霉素[J]. 食品研究与开发, 2014, (13): 129-132
Ma JG, Ren SY, Lao F. UPLC method for determination of natamycin in dairy products [J]. *Food Res Dev*, 2014 (13): 129-132.
- [9] 张日生, 晏会英. 霉克在调味品-耗油中的防霉作用[J]. 食品工业科技, 2000, 21(5): 66.
Zhang RS, Yan HY. Mildew's anti-mildew effect in condiment-oil consumption [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2000, 21(5): 66.
- [10] 陈晓丽, 吕振岳. 新型天然食品防腐剂纳他霉素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(4): 23-24.
Chen XL, Lv ZY. Research progress of the new natural food preservative natamycin [J]. *Food Res Dev*, 2002, 23(4): 23-24.
- [11] 张红艳, 林凯, 阎春娟. 国内外天然食品防腐剂的研究进展[J]. 粮食加工, 2004, (3): 57-60.
Zhang HY, Lin K, Yan CJ. Research progress of natural food preservatives at home and abroad [J]. *Food Proc*, 2004, (3): 57-60.
- [12] 李红缨, 杨辉荣, 欧国勇. 安全高效的新型食品保存剂的研究进展[J]. 江苏化工, 2001, (4): 18-22.
Li HY, Yang HR, Ou GY. Research progress of safe and efficient new food preservatives [J]. *Jiangsu Chem Ind*, 2001, (4): 18-22.
- [13] 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, 30(11): 251-255.
Lei DZ, Li QR, Huang YJ. Improvement of natamycin potency determination method and rapid determination of content [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(11): 251-255.
- [14] 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]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 86-87, 91.
Zhang H, Wu Y, Zhu L, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography for the determination of natamycin in beverage [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2012, 33(8): 86-87, 91.
- [15] 刘莹, 王晓蕾, 李伟, 等. 变波长高效液相法同时测定糕点中的丙酸钙和纳他霉素[J]. 食品工业科技, 2015, (1): 316-318, 323
Liu Y, Wang XL, Li W, *et al.* Simultaneous determination of calcium propionate and natamycin in cakes by variable wavelength high performance liquid method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, (1): 316-318, 323
- [16] 于瀛, 张晶, 刘洪涛, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定果酱中纳他霉素残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(6): 489-493.
Yu Y, Zhang J, Liu HT, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry determination of natamycin residues in jam [J]. *Chin J Food Hyg*, 2009, 21(6): 489-493.
- [17] 黄孟基, 郭新东, 王永华, 等. 高效液相色谱法测定月饼中纳他霉素残留[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 121-123.
Huang MJ, Guo XD, Wang YH, *et al.* Determination of natamycin residues in mooncakes by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ferment Ind*, 2006, 32(5): 121-123.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

刘美霞, 高级工程师, 主要研究方向为食品理化检测及仪器分析检测。
E-mail: liumeixia@mengniu.cn