

Natamycin is an antifungal antibiotic used to combat the formation of yeasts and molds in food. Natamycin is not present in the list of permitted additives for wine in the Codex Alimentarius nor in the International Code Of Oenological practices of the International Wine Office (OIV). The addition of Natamycin is not allowed in our country nor in the countries of the European Union nor in other wine producing countries. Therefore, our laboratory is working on the determination of natamycin by liquid chromatography with different detectors, to ensure the absence of it. The aim of this work is to obtain a detection limit less than or equal to 5 ug / L, technological approach adopted internationally.

INTRODUCCIÓN

La Natamicina es un antibiótico antifúngico utilizado para combatir la formación de levaduras y hongos en alimentos. No figura en la lista de aditivos permitidos para el vino en el Codex Alimentarius ni en el Código Internacional de Prácticas Enológicas de la Organización Internacional del Vino (OIV). La adición de Natamicina no está permitida en nuestro país como tampoco en los países miembros de la Unión Europea ni en otros países vitivinícolas. Por ello, nuestro laboratorio está trabajando en la determinación de Natamicina por cromatografía líquida con distintos detectores, para poder controlar la ausencia de la misma. El objetivo del presente trabajo es obtener un límite de detección menor o igual a 5 ug/L, criterio tecnológico adoptado en normas internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPAMIENTO:

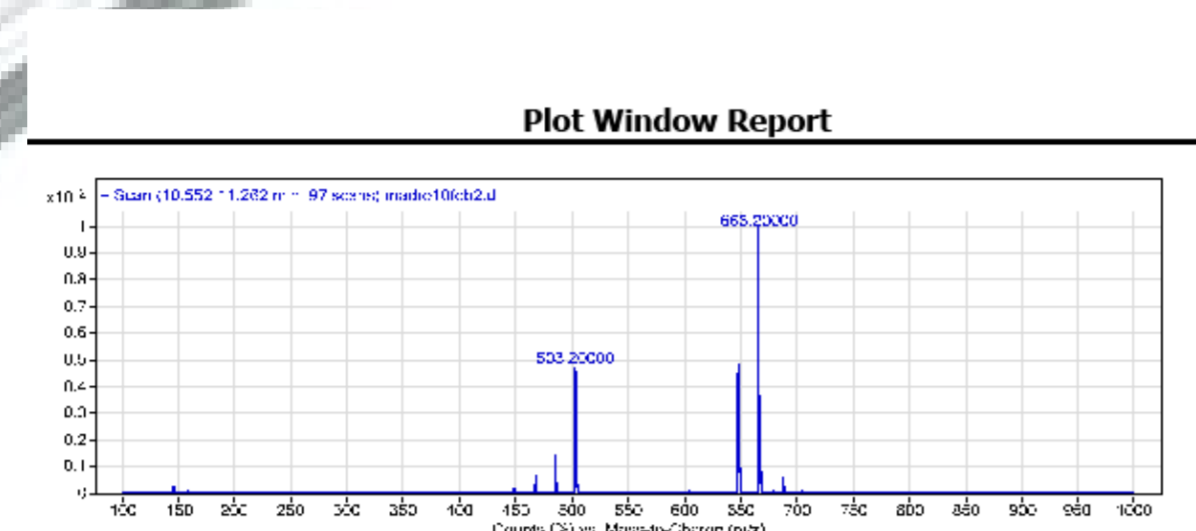
HPLC MS/MS

HPLC Agilent 1200
Volúmen inyección: 10 uL
Temperatura inyector: 4°C
Columna C18 de 15 cm x 4,6 mm x 5 um, marca Agilent
T horno: T ambiente
Flujo: 0,4 mL/min
Fase móvil:
A: H₂O (0,1 % de ácido fórmico)
B: ACN (0,1 % de ácido fórmico)

t (min)	%A
0	90
5	40
15	40
16	90
30	90

Detector: MS/MS Agilent 6410
T fuente ESI: 300 °C
Flujo N₂: 10 L/min
Nebulizador : 40 psi
Voltaje capilar: 4000 V
Temperatura cuadrupolos 1 y 2: 100 °C
Ión precursor: 666,3
Iones hijos: 503,2; 485,2; 467,2
Voltaje fragmentador: 120 V
Energía de colisión:
666,3 → 503,2 11 V
666,3 → 485,2 12 V
666,3 → 467,2 11 V

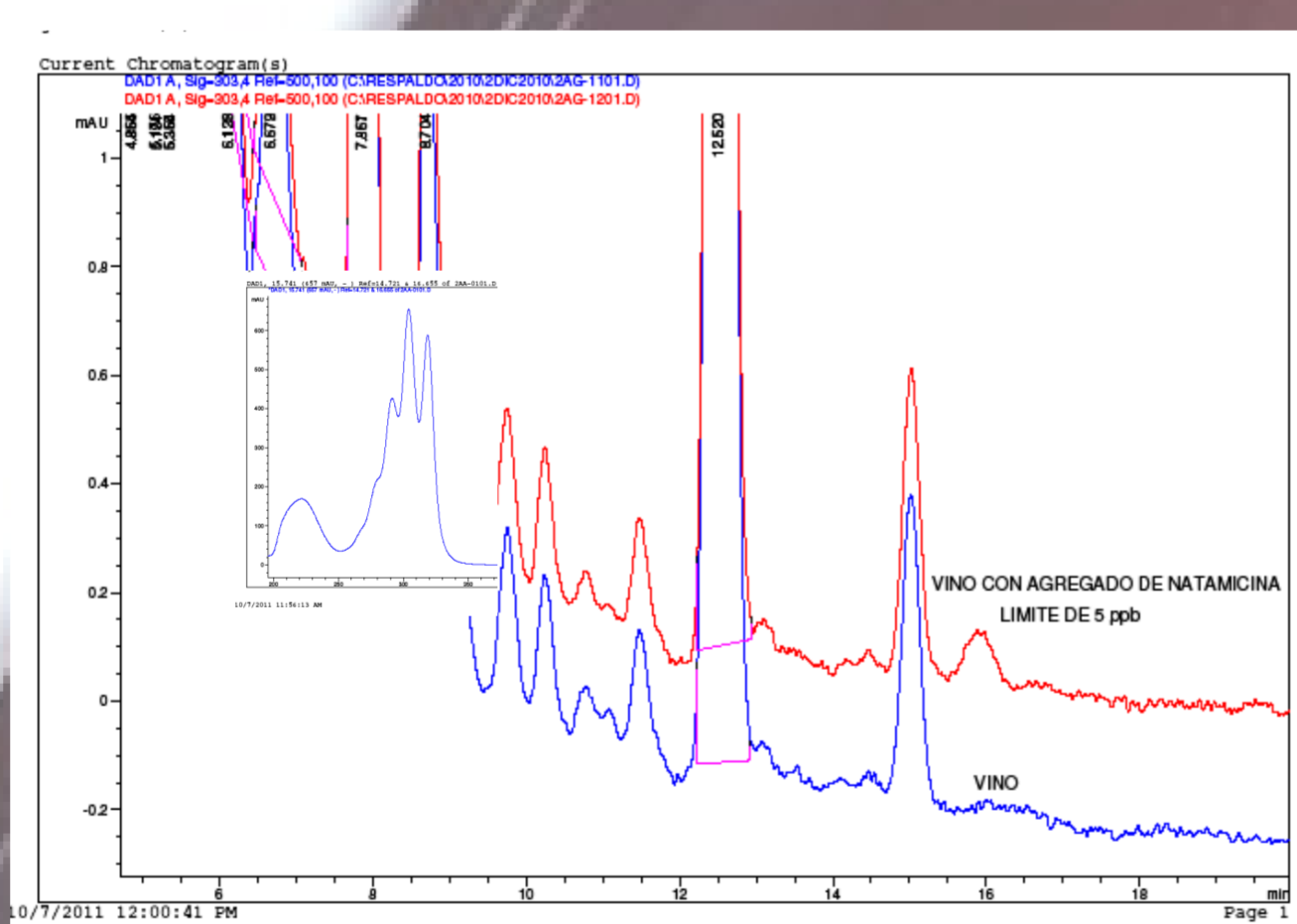
Figura N°1: espectro de masa obtenido para la natamicina:



HPLC/DAD

HPLC Agilent 1100
Volúmen de inyección: 100 uL
Columna C18 de 25cm x 4,6mm x 5um marca Agilent
T horno: T ambiente
Fase móvil: NH₄Ac (0,02 M ph=3):Metanol 45:55
Flujo: 1,0ml/min
Detector: DAD Agilent 1315
Longitud de onda=254,303 y 318

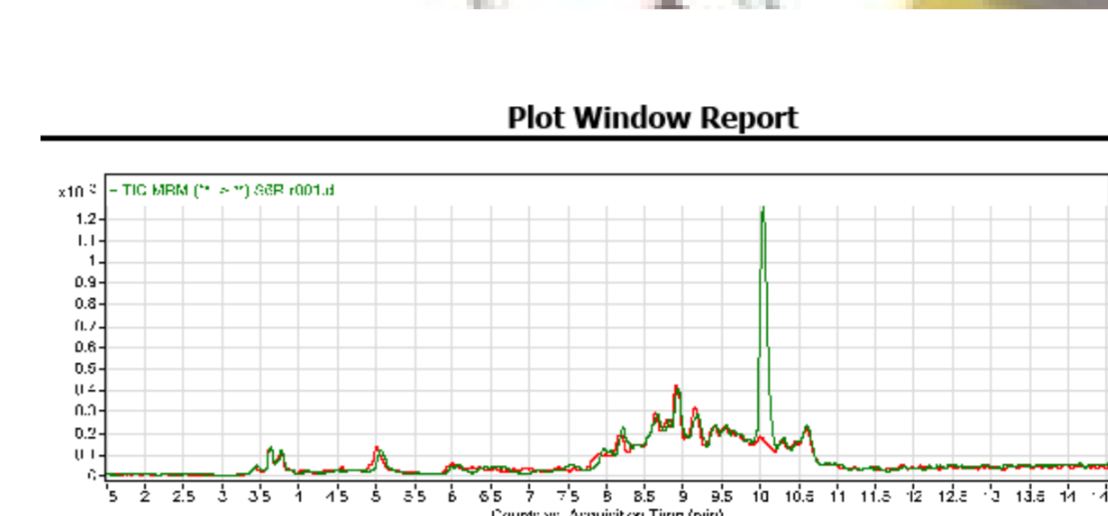
Figura N°2: cromatograma de un vino, superpuesto con un cromatograma del vino adicionado al nivel de 5 ppb. Ambos fueron obtenidos con DAD. Se incluye también el espectro UV de la natamicina



RESULTADOS

-Al no disponer de muestras positivas, se fortifica vino blanco, rosado y tinto a nivel de límite de detección target (5ppb), nivel target/2 (2,5 ppb) y nivel target x 1,5 (7,5ppb). Estas muestras se conservan en la heladera, en la oscuridad y con la tapa protegida con parafilm. Para los 3 tipos de vinos y para los 3 niveles en estudio, se observó una degradación de natamicina en el entorno a 40% al inyectar las muestras 25 días después de preparadas.

Figura N°3: cromatograma de un vino rosado, superpuesto con un cromatograma del vino adicionado al nivel de 5ppb. Transición: 666,3-503,2



Repetibilidad:

Debido a la degradación que sufrieron las primeras muestras fortificadas, se prepararon nuevas y se inyectaron dentro de los 5 días de preparadas. No se evidencia distinta repetibilidad entre niveles.

Vino tinto RSDr (n=8) 2,4-15,8%
Vino rosado RSDr (n=8) 3,6-21,2%
Vino blanco RSDr (n=8) 1,6-10,3%

Criterio de aceptación AOAC:
Para 1ppb=22%
Para 10 ppb=15%

Reproducibilidad intermedia:

Se realizaron curvas en matriz para cada tipo de vino (blanco, tinto, rosado) en tres días diferentes preparadas por diferentes analistas y se cuantificaron cada día las muestras fortificadas en tres niveles.

La iRSDR se encuentra entre 2,4-19,5%
Criterio de aceptación AOAC:
Para 1ppb=45%
Para 10ppb=32%

Exactitud:

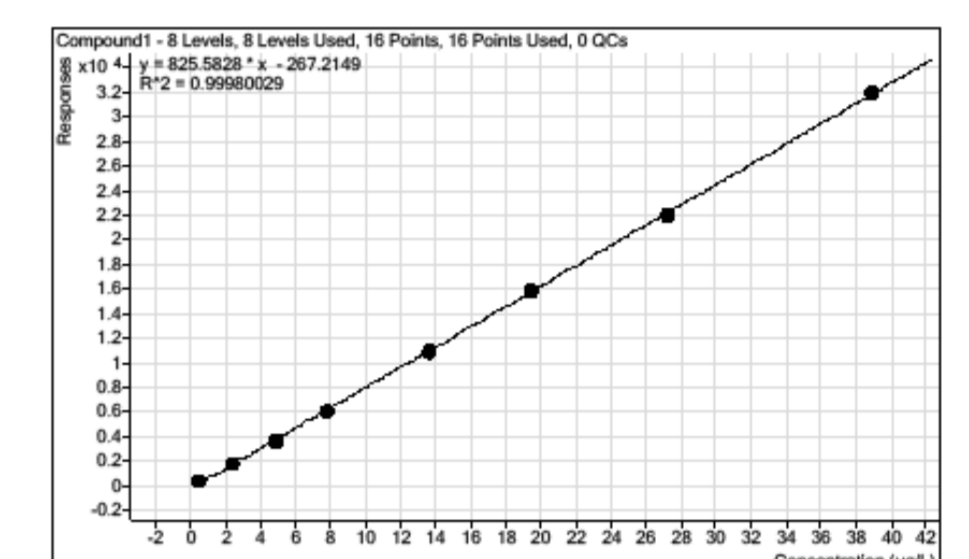
La recuperación promedio en los distintos vinos teniendo en cuenta que no se observan tendencias entre niveles es la siguiente:

Vino blanco: 111,5%
Vino Rosado: 112,9%
Vino Tinto: 112,0%

Criterio de aceptación AOAC: 70-125% para los niveles de trabajo.

Linealidad:

Se realizaron curvas de 8 puntos entre 0,5 y 40ug/L para cada tipo de vino y en etanol 10% acuoso. Los r² obtenidos están comprendidos entre 0,998 y 0,999.



Límite de cuantificación:
0,5 ug/L

Evaluación de efecto matriz:

Se realizaron curvas de calibración en vino blanco, rosado y tinto así como también en etanol 10% en agua. Se evidencia un importante efecto matriz por lo cual se concluye que cada tipo de vino debe ser cuantificado en curva preparada en matriz del mismo tipo. El efecto matriz, siempre mostró una disminución del área del pico de natamicina en vino, con respecto al área del pico preparado en solvente, evidenciando una supresión en la ionización.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

-Si bien se comenzó trabajando con HPLC/DAD pudiendo trabajar con el límite requerido de 5ug/L, algunas muestras presentaron interferencias trabajando en el DAD lo que nos llevó a validar la técnica por HPLC MS/MS. -La técnica validada es simple y rápida, con mínimo consumo de solvente orgánico y de alta especificidad, lo que permite incluso cuantificar por debajo del límite de detección requerido de 5 ug/L. -Debido al efecto matriz que presenta el analito, la cuantificación debe ser realizada en curva preparada en matriz. -Se continuará trabajando en estudiar la degradación que sufre la natamicina en las muestras fortificadas para análisis.