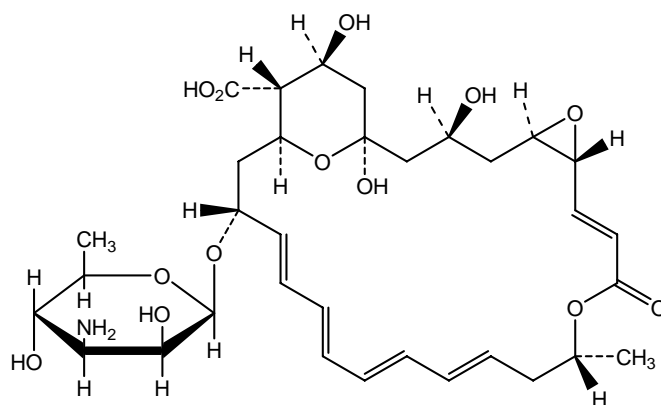


別添

ナタマイシン

Natamycin

別名 ピマリシン



$C_{33}H_{47}NO_{13}$: 665.75

1. 試験法の概要

チーズ中のナタマイシンは、メタノールで抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより定量する（試験法A）。ワイン中のナタマイシンは、逆相系固相カートリッジを用いて抽出精製し、高速液体クロマトグラフィーにより定量する（試験法B）。

ナタマイシンを特定する必要がある場合には、別紙に参考として示す試験法を用いることができる。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

試験法A（チーズ中の分析法）¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾。なお、チーズ³⁾から検体を採取する際には、次の諸点にも留意すること。

- 1 ロットの中から1容器又は1包装のチーズを採取する際には、そのチーズの重量に対する表皮（リンド）の面積の割合が、ロット中のチーズの中で平均的なものを選定すること。

- 2 ロットの中から選定したチーズから、その一部を採取する際には、チーズ全体の重量に対する採取した重量の割合と、チーズ全体に含まれる表皮の面積に対する採取した部分に含まれる表皮の面積の割合が、大きく異ならないようにすること。
- 3 粉碎又は細切し均一とする前に、パラフィン等、明らかな非可食部を除くこと。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、100mL のホモジナイザーカップ又は 200mL の共栓付三角フラスコに入れ、メタノール 50mL を加え、10,000rpm で 5 分間ホモジナイズ又は振とう器で 90 分間振とうした後、水 25 mL を加えて混和し、 -20°C の冷凍庫で 1 時間冷却する。冷却後、抽出液をろ紙でろ過し、ろ液の最初の 5 mL を捨てる。残ったろ液を $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過したものを、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ナタマイシン標準品 0.010g を正確に量り、メタノールを加えて溶かして正確に 20mL とし、保存用標準原液とする⁴⁾ (この液 1mL は、ナタマイシン $500\mu\text{g}$ を含む)。保存用標準原液 1mL を正確に量り、メタノール・水混液 (2 : 1) を加えて正確に 50mL とし、検量線用標準原液とする (この液 1mL は、ナタマイシン $10\mu\text{g}$ を含む)⁵⁾。検量線用標準原液を適宜メタノール・水混液 (2 : 1) で希釈して、 $0.1\sim 5.0\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の検量線用標準液とする⁶⁾。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤⁷⁾ : オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 : 内径 4.6mm 、長さ 150mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : メタノール・水・酢酸混液 (50 : 50 : 5)

流速 : $1.0\text{mL}/\text{分}$

測定波長 : 304nm

② 検量線^{8), 9)}

検量線用標準液それぞれ $20\mu\text{L}$ ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積からナタマイシンの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 $20\mu\text{L}$ を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試料液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって検体中のナタマイシン含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{ナタマイシン含量 (g/kg)} = \frac{75 \times C}{1,000 \times W}$$

C : 試料液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

試験法B (ワイン中の分析法)¹¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾.

(2) 試料液の調製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (900mg)¹²⁾に, 試料 10mLを正確に量り, 注入した後, 水・メタノール混液(1:1)10mLを注入し, 流出液は捨てる¹³⁾. 次いでメタノール 2.5mLを注入し, 溶出液を採取し¹⁴⁾, 水を加えて正確に5mLとし, 試料液とする¹⁵⁾.

(3) 検量線用標準液の調製

ナタマイシン標準品 0.010gを正確に量り, メタノールを加えて溶かして正確に20mLとし, 保存用標準原液とする⁴⁾ (この液 1mLは, ナタマイシン 500 μg を含む). 保存用標準原液 1mLを正確に量り, メタノール・水混液(1:1)を加えて正確に50mLとし, 検量線用標準原液とする(この液 1mLは, ナタマイシン 10 μg を含む)⁵⁾. 検量線用標準原液を適宜メタノール・水混液(1:1)で希釈して, 0.1~2.0 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用標準液とする¹⁶⁾.

(4) 測定法

①測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い, 次の条件によって測定する.

カラム充てん剤¹⁷⁾: オクタデシルシリル化シリカゲル, 粒径 5 μm

カラム管: 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

移動相¹⁸⁾: 水・メタノール・アセトニトリル・酢酸混液 (60:20:15:5)

流速: 1.0 mL/分

測定波長¹⁹⁾: 304nm

②検量線^{8), 20)}

検量線用標準液それぞれ 20 μL ずつを正確に量り, 液体クロマトグラフに注入し, 得られたピーク面積から検量線を作成する.

③定量

試料液 20 μL を正確に量り, 液体クロマトグラフに注入し, 得られたピーク面積と検量線から試料液中のナタマイシン濃度($\mu\text{g/mL}$)を求め, 次式によって検体中のナタマイシン含量(μ

g/mL) を計算する^{21)~23)}.

$$\text{ナタマイシン含量 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{C \times V}{W}$$

C : 試料液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

V : 試料液量 (mL)

W : 検体の採取量 (mL)

試薬・試液等

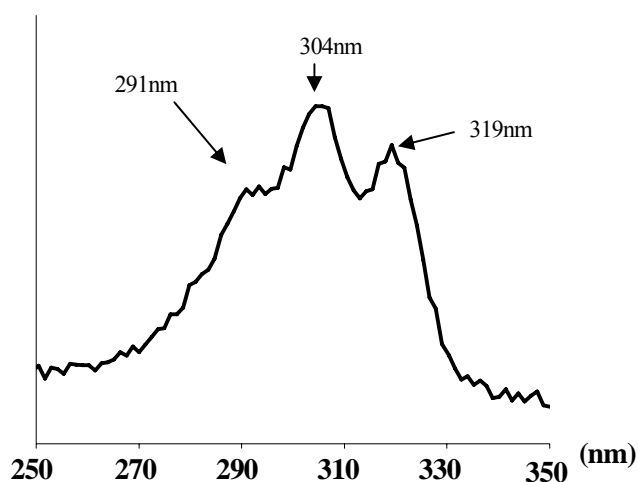
1. アセトニトリル : [高速液体クロマトグラフ用]
2. 酢酸 : [特級]
3. ナタマイシン : ナタマイシン標準品 (厚生労働大臣登録機関が製造したもの)
4. 水 : 超純水 (逆浸透膜処理装置による精製, イオン交換樹脂による脱塩及びメンブランフィルターによるろ過等により, 比抵抗値 $17\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上まで精製した水)
5. メタノール : [高速液体クロマトグラフ用]
6. メンブランフィルター¹⁸⁾ : 孔径 $0.45\mu\text{m}$, 直径 25mm , 溶媒系
7. ろ紙 : 5種 A (直径 185mm)

[注]

- 1) 本法は, チーズ中のナタマイシンの分析に適用できる.
- 2) ナタマイシンは光により分解するので, 操作中に直射日光あるいは紫外線が当たらないよう注意すること.
- 3) ナタマイシンはチーズの熟成過程における表面処理剤として用いられた場合, 通常, チーズの内部に浸透せず, 表面に残存する.
- 4) 保存用標準原液は, 遮光して冷蔵保存すれば少なくとも 1 週間は安定である.
- 5) 分析に支障のないことが確認できれば, 調製量を変更してもよい.
- 6) 3 濃度以上の検量線用標準液調製する. 例えば, 検量線用標準原液 1mL を正確に量り, メタノール・水混液 (2 : 1) を加えて正確に 100mL とし, また, 検量線用標準原液 $1, 2, 5\text{mL}$ 及び 10mL をそれぞれ正確に量り, メタノール・水混液 (2 : 1) を加えてそれぞれ正確に 20mL とし, 検量線用標準液とする (これらの液 1mL は, それぞれナタマイシン $0.1, 0.5, 1.0, 2.5$ 及び $5.0\mu\text{g}$ を含む).
- 7) YMC-Pack ODS-AM-302 (株)ワイエムシィ), Inertsil ODS-3V (ジーエルサイエンス株), Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (関東化学株) 等のオクタデシルシリル化シリカゲルが充てんされている分析カラムが使用できる. カラムによりソルビン酸, デヒドロ酢酸等の保存料がナタマイシンのピークと重なる場合があるので, あらかじめ重ならないことを確認す

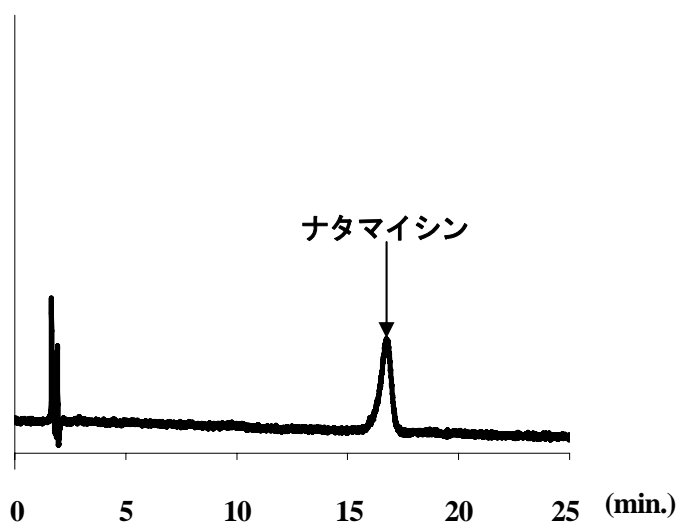
ること。

- 8) 共存成分によりピーク高さが影響されるので、定量はピーク面積で行う。
- 9) 検量線用標準液の調製に用いた水・メタノール混液（2：1）を注入し、ナタマイシンの保持時間にピークが現れないことを確認する。
- 10) 本法によるナタマイシンの定量限界は、0.001g/kg とする。
- 11) ワインへのナタマイシンの使用は禁止されている。
- 12) 日本ウォーターズ株式会社製 Sep-pak Plus tC18 Environmental が使用できる。ミニカラムは、あらかじめメタノール及び水各 10mL でコンディショニングしておく。また、ミニカラムは乾固させない。
- 13) 流下速度は 0.5～2mL/分程度とし、ミニカラムは乾固させない。
- 14) 流下速度は 0.5～2mL/分程度とする。この際、減圧吸引等によりミニカラム内のメタノールをできるだけ回収する。
- 15) 試料液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、試料液に濁りが観察されない場合でも、試料液をメンブランフィルター（孔径 0.45 μ m, 溶媒系）を用いてろ過を行うことが望ましい。
- 16) 3 濃度以上の検量線用標準液調製する。例えば、検量線用標準原液 1mL 及び 2.5mL をそれぞれ正確に量り、メタノール・水混液（1：1）を加えてそれぞれ正確に 100 mL とする。また、検量線用標準原液 1, 2mL 及び 4mL をそれぞれ正確に量り、メタノール・水混液（1：1）を加えてそれぞれ正確に 20mL とし、検量線用標準液とする（これらの液 1mL は、それぞれナタマイシンを 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 μ g 及び 2.0 μ g を含む）。
- 17) 化学物質評価研究機構製 L-column ODS が使用できる。カラムにより、ソルビン酸、デヒドロ酢酸等の保存料あるいはその他のピークがナタマイシンのピークと重なる場合があるので、あらかじめ重ならないことを確認すること。
- 18) 妨害ピークが出現した場合は、水・酢酸・メタノール・アセトニトリル混液（300：65：65：50）を使用することにより分離できる場合がある。この場合、ナタマイシンのピークは 27 分程度に出現する。
- 19) ナタマイシンは、特徴的な吸収スペクトルを持つため、フォトダイオードアレイ検出器により、定性が可能である（注図 1）。試料液では十分な感度が得られない場合には、試料 50mL を（2）試料液の調製により処理し、得られた試料液を分析する。

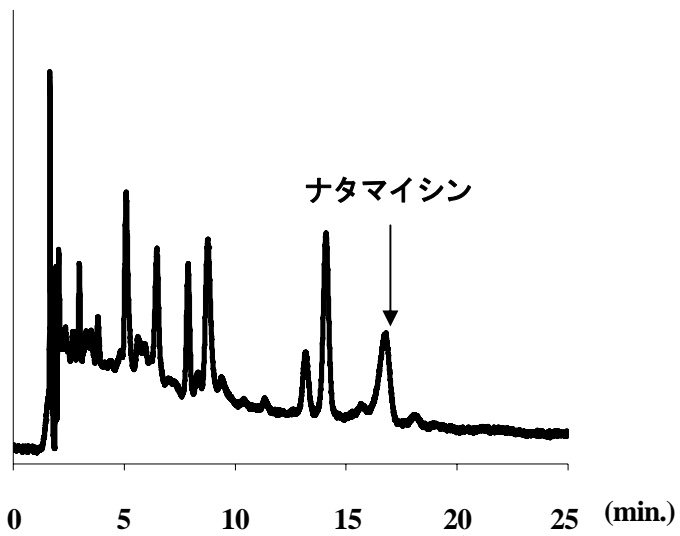


注図1 検量線用標準液 (ナタマイシン 0.5 $\mu\text{g/mL}$) の
吸収スペクトル

- 20) 検量線用標準液の調製に用いた水・メタノール混液 (1 : 1) を注入し、ナタマイシンの保持時間にピークが現れないことを確認する。
- 21) 本法によるナタマイシンの定量限界は、0.05 $\mu\text{g/mL}$ とする。
- 22) 定量下限値相当量 (0.05 $\mu\text{g/mL}$) のナタマイシンを添加した赤ワインからの回収率は 90.7 %，相対標準偏差は 2.3% (試行数 5 回) であった。
- 23) 検量線用標準液 (ナタマイシン 0.1 $\mu\text{g/mL}$) 及び赤ワイン (ナタマイシン 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 添加) から得られた試料液のクロマトグラムを注図2 及び注図3 に示す。



注図2 検量線用標準液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラム



注図3 ナタマイシンを添加 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) した赤ワインから得られた試料液の
クロマトグラム

参考

ナタマイシン確認試験法

1. 試験法の概要

チーズ又はワイン中のナタマイシンは、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析(LC/MS/MS)により確認を行う。

2. 試験法

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)～(3)については、ナタマイシンの試験法を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件

LC/MS/MSを用い、次の条件によって測定する¹⁾。

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2mm, 長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・水・酢酸 (50 : 50 : 0.1) ²⁾

流速：0.2ml/分

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン(m/z)：プリカーサーイオン666, プロダクトイオン503, 95, 91または79³⁾

② 定性

試料液及び標準液2 μ L⁴⁾ずつを量り、LC/MS/MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準液と一致することを確認する。

試薬・試液等

ナタマイシンの試験法を準用する。

[注]

- 1) 測定条件は各測定機器に従い、標準液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 2) 酢酸濃度が高いとイオン化が阻害され、感度が低下する可能性があるため、酢酸の割合を0.1とした。移動相の組成は、使用する分析カラム等により適宜変更する。

- 3) 各測定機器において最適な測定条件を選択する.
- 4) 注入量は適宜調整する。