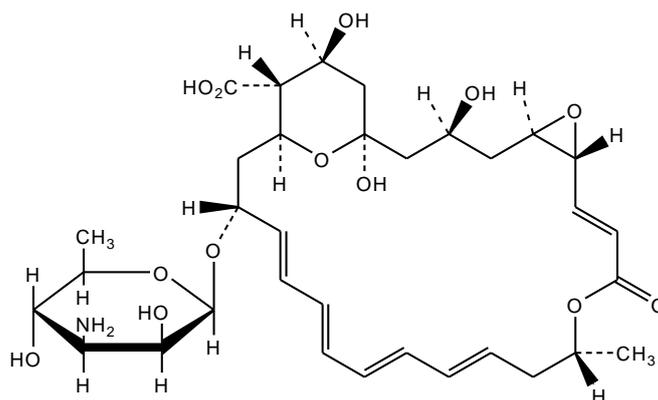


保存料

ナタマイシン

Natamycin

別名 ピマリシン



$C_{33}H_{47}NO_{13}$: 665.73

1. 分析法の概要

チーズ中のナタマイシンは、メタノールで抽出し、液体クロマトグラフィーにより定量する（分析法A）。ワイン中のナタマイシンは、逆相固相抽出カラムを用いて抽出精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する（分析法B）。

ナタマイシンを特定する必要がある場合には、参考として示す分析法を用いることができる。（2005年設定、2010年改正、2019年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

分析法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、次の諸点にも留意すること³⁾。

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、そのチーズの質量に対する表皮（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、チーズ全体の質量に対する採取した質量の割合と、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) 試験溶液の調製

試料約 10 g 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、ホモジナイズ（5 分間、10000 回転/分）又は振とう器で 90 分間振とうした後、水 25mL 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 5mL を捨てる。残ったろ液をメンブランフィルター（ $0.45\mu\text{m}$ 、溶媒系）でろ過したものを、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ナタマイシン標準品 10.0mg を量り、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⁵⁾（濃度 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。保存用標準原液 1 mL を正確にとり、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（濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。検量線用標準原液 1 mL を正確にとり、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 mL 及び 10mL をそれぞれ正確にとり、メタノール/水混液（2 : 1）を加えてそれぞれ正確に 20mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 $0.1\sim 5.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(4) 測定法

① 測定条件⁶⁾

紫外可視吸光光度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。

カラム充填剤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：1.0mL/分

測定波長：304nm

注入量：20 μL

② 検量線^{8、9)}

検量線用標準溶液をそれぞれ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

試験溶液を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験溶液中のナタマイシン濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量（ g/kg ）を計算する。

$$\text{ナタマイシン含量 (g/kg)} = \frac{C \times 75}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.001 g/kg

分析法B (ワイン中の分析法) ¹⁰⁾

(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) 試験溶液の調製

逆相固相抽出カラムに、試料 10mL を正確にとり、負荷し、流出液は捨てる。次いで水/メタノール混液 (1 : 1) 10mL を注入し、洗液は捨てる ¹¹⁾。次いでメタノール 2.5mL を注入し、溶出液を採取し ¹²⁾、水を加えて正確に 5 mL とし、試験溶液とする ¹³⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製 ⁴⁾

ナタマイシン標準品 10.0mg を量り、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 ⁵⁾ (濃度 $500\mu\text{g}/\text{mL}$)。保存用標準原液 1 mL を正確にとり、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 (濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)。検量線用標準原液 1 mL 及び 2.5mL をそれぞれ正確にとり、メタノール/水混液 (1 : 1) を加えてそれぞれ正確に 100mL とし、また、検量線用標準原液 1、2 mL 及び 4 mL 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、検量線用標準溶液とする (濃度約 $0.1\sim 2.0\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(4) 測定法

① 測定条件 ⁶⁾

紫外可視吸光度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。

カラム充填剤 ¹⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 $5\mu\text{m}$)

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度： 40°C

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

流速：1.0mL/分

測定波長 ¹⁶⁾：304nm

注入量：20 μL

② 検量線 ^{8、17)}

検量線用標準溶液をそれぞれ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^{18, 19)}

試験溶液を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験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量 (mg/L) を計算する。

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

C : 試験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 試験溶液量 (mL)

W : 試料の採取量 (mL)

④ 定量限界 0.00005g/L

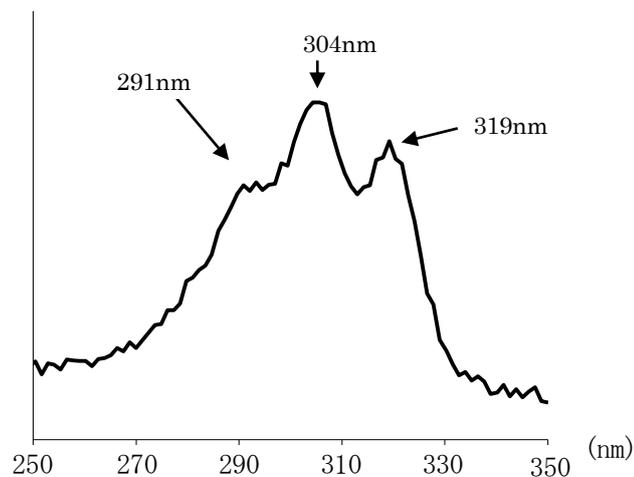
試薬・試液等

1. ナタマイシン標準品 : [食品添加物公定書標準品]
2. メタノール : [高速液体クロマトグラフィー用]
3. ろ紙 : 5種 A (直径 185mm)
4. 酢酸 : [特級]
5. 逆相固相抽出カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (900mg)。あらかじめメタノール 10mL 及び水 10mL でコンディショニングしておく。また、固相抽出カラムは乾固させない。
6. アセトニトリル : [高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

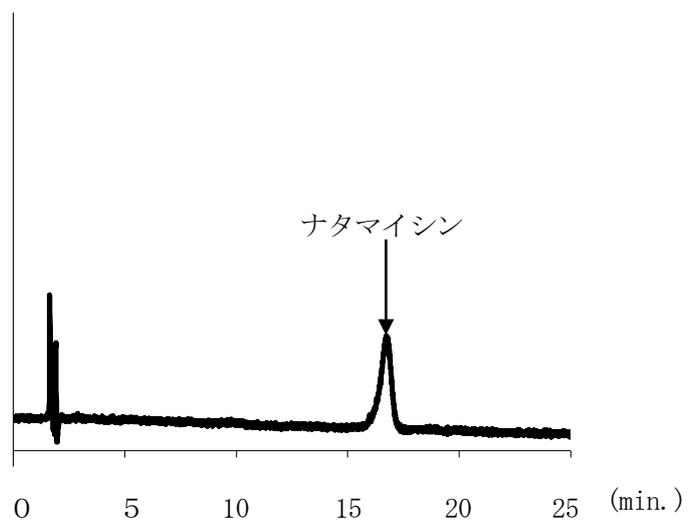
- 1) 本法は、チーズ中のナタマイシンの分析に適用できる。
- 2) ナタマイシンは光により分解するので、操作中に直射日光あるいは紫外線が当たらないよう注意すること。
- 3) ナタマイシンはチーズの熟成過程における表面処理剤として用いられた場合、通常、チーズの内部に浸透せず、表面に残存する。
- 4) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調製してもよい。
- 5) 保存用標準原液は、遮光して冷蔵保存すれば少なくとも 1 週間は安定である。
- 6) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 7) 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) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いたメタノール/水混液 (2 : 1) を分析

- し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 10) ワインへのナタマイシンの使用は禁止されている。
 - 11) 流下速度は 0.5～2 mL/分程度とし、固相抽出カラムは乾固させない。
 - 12) 流下速度は 0.5～2 mL/分程度とする。この際、減圧吸引等により固相抽出カラム内のメタノールをできるだけ回収する。
 - 13) 試験溶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、試験溶液に濁りが観察されない場合でも、試験溶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。
 - 14) 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。
 - 15) 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。
 - 16) 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）。試験溶液では十分な感度が得られない場合には、試料 50mL を（2）試験溶液の調製により処理し、得られた試験溶液を分析する。

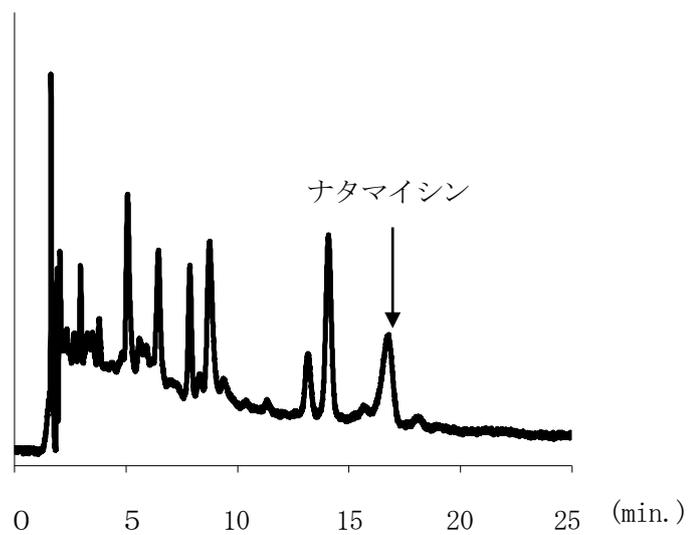


注図 1 検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.5 μ g/mL）の吸収スペクトル

- 17) 検量線用標準溶液の調製に用いたメタノール/水混液（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。
- 18) 定量限界相当量（0.05mg/L）のナタマイシンを添加した赤ワインからのナタマイシンの回収率は 90.7%、相対標準偏差は 2.3%（試行数 5 回）であった。
- 19) 検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.1 μ g/mL）及び赤ワイン（ナタマイシン 0.05mg/L 添加）から得られた試験溶液のクロマトグラムを注図 2 及び注図 3 に示す。



注図2 検量線用標準溶液 (0.1 μ g/mL) のクロマトグラム



注図3 ナタマイシンを添加 (0.05mg/L)した赤ワインから得られた試験溶液の
クロマトグラム

参考

ナタマイシン確認分析法

1. 分析法の概要

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質量分析により確認を行う。(2010年設定、2021年改正)

2. 分析法(液体クロマトグラフィータンデム質量分析)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試験溶液の調製

(3) 標準溶液の調製

上記(1)～(3)については、ナタマイシン分析法を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁾

液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径2mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相²⁾：メタノール/水/酢酸混液(50:50:0.1)

流速：0.2ml/分

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン³⁾：プリカーサーイオン m/z 666、プロダクトイオン m/z 503、95、91又は79

注入量⁴⁾：2 μ L

② 定性

試験溶液及び標準溶液を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溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

1. ナタマイシン分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。測定条件は各測定機器に従い、標準溶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。