

高速液体クロマトグラフィーによるワイン中のナタマイシン分析法について

古庄紀子, 久保田浩樹, 佐藤恭子[#], 穂山 浩, 河村葉子

Analytical Method for Natamycin in Wine using High-Performance Liquid Chromatography

Noriko Furusho, Hiroki Kubota, Kyoko Sato[#], Hiroshi Akiyama and Yoko Kawamura

An analytical method was developed for determining amount of natamycin in wine using a C18 mini-cartridge column and high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array (PDA) detection.

Natamycin purified from wine was identified in accordance with the retention time and UV spectrum obtained from PDA detection. The limit of quantification of natamycin in wine was estimated as 0.05 µg/ml. Recovery of natamycin in wine was acceptable at 91.0% with low relative standard deviation (2.3%).

Keywords: natamycin, wine, HPLC, PDA

緒言

ナタマイシンはピマリシン (pimaricin) とも呼ばれ, *Streptomyces natalensis* により生産されるポリエンマクロライド系の抗生物質で, 1955年南アフリカのナタール地方の土壤中から単離され, 地方名に因んで命名された。カビ, 酵母の生育を特異的に阻害し, 現在, 欧州連合 (EU) や米国など50か国以上においてチーズなどの表面処理剤としての使用が許可されており¹⁾, 我が国でも2005年11月にナチュラルチーズ (ハード及びセミハードの表面処理剤として) のみに使用が許可された²⁾。

アルゼンチン産ワインへのナタマイシンの混入が, 2010年に韓国で報告された³⁾。日本国内においても2008年に製造されたアルゼンチン産のワインが輸入業者によって自主回収され, また医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知 (平成22年4月30日食安輸発0430第2号) として自主検査の指導について示されたことから, 監視のためにワイン中のナタマイシンの分析法が必要になった。

ナタマイシンの分析法としては, チーズ中のナタマイシンの定量法が, 医薬食品局食品安全部基準審査課長通

知 (平成17年11月28日食安基発第1128001号) (通知法) として示され, 衛生試験法・注解⁴⁾にも収載されているが, ワイン中の分析には適用できず, 新たな分析法の確立が要求された。

本研究では, フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたワイン中のナタマイシンの分析法について確立したので報告する。

方法

1. 試料

赤ワイン3種 (アメリカ産, アルゼンチン産, チリ産), 白ワイン3種 (スペイン産, 南アフリカ共和国産, 日本産) は都内の小売店で購入した。

2. 試薬など

ナタマイシン標準品は (財) 日本公定書協会 (現, 一般財団法人 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団) の食品添加物公定書標準品を購入した。メタノール及びアセトニトリルは Merck 社製の高速液体クロマトグラフィー用を, 酢酸は和光純薬工業 (株) 製特級品 (K8355) を使用した。

水は超純水製造装置 (Millipore 社製 Milli-Q[®] Gradient A10型) により精製した18.2MΩ・cm以上の純水を用いた。

3. 器具など

固相カートリッジは Waters 社製 Sep-pak[®] Plus tC18

[#] To whom correspondence should be addressed:

Kyoko Sato; Division of Foods Additives, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 333; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: ksato@nihs.go.jp

Environmental cartridges をメタノール及び水各10 ml であらかじめコンディショニングしたものを使用した。メンブランフィルターはMillipore社製 Millex[®]-LH (0.45 µm, 13 mm) を使用した。固相抽出用マニホールはジーエルサイエンス (株) 製を使用した。HPLC カラムはジーエルサイエンス (株) 製 Inertsil ODS3V (4.6 mm i. d. × 150 mm) 及び (財) 化学物質評価研究機構製 L-Column ODS (4.6 mm i. d. × 150 mm) を用いた。

4. 装置

高速液体クロマトグラフは、(株) 島津製作所製 Prominence UFLC (オンラインデガッサ: DGU-20A3, 送液ユニット: LC-20AD, カラムオープン: CTO-20 AC, 紫外可視吸光度検出器: SPD-20AV, フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器: SPD-M20A, オートサンプラー: SIL-20ACHT, システムコントローラー: CBM-20A) を使用した。

5. 試験操作

5.1 試料液の調製⁵⁾

試料10 ml を正確に量り、固相カートリッジに全量負荷した。試料負荷後、メタノール-水 (1 : 1) 10 ml を通過させて、流液は廃棄し、更にメタノール2.5 ml 負荷し、減圧吸引して溶出液をメスフラスコに回収した。水を加えて5 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過し、通過液を試料液とした。

5.2 確認試験用試料液の調製

試料50 ml を正確に量り、以下試料液の調製法に準じて処理を行い、確認試験用試料液とした。

5.3 標準液の調製

ナタマイシン標準品0.010 g を正確に量り、メタノールを加えて溶かし、正確に20 ml とし、保存用標準原液 (500 µg/ml) とした。

保存用標準原液1.0 ml にメタノール-水 (1 : 1) を加えて正確に50 ml とし、検量線用標準原液 (10 µg/ml) とした。

検量線用標準原液を0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0及び10.0 ml をそれぞれ正確に測り、メタノール-水 (1 : 1) を加えて正確に20 ml とし、検量線用標準液 (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 µg/ml) とした。

5.4 測定条件

カラム: L-Column ODS (4.6 mm i. d. × 150 mm)

カラム温度: 40°C

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

流速: 1.0 ml/min

測定波長: 304 nm

5.5 定量

試料液20 µl を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから保持時間から、ナタマイシンに相当するピークの面積を求め、あらかじめ作成しておいた検量線 (0.1~5.0 µg/ml) から、試料液中のナタマイシン濃度を求め、次式によって検体中のナタマイシン濃度 (µg/ml) を算出した。

$$\text{ナタマイシン濃度 (µg/ml)} = \frac{C \times V}{W}$$

C : 試料液中のナタマイシン濃度 (µg/ml)

V : 試料液量 (ml)

W : 検体の採取量 (ml)

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

通知法 (移動相にメタノール-水-酢酸 (50 : 50 : 5) を用いたアイソクラティック法) の条件で、Inertsil ODS3V 及び L-Column ODS の両カラムを用いて分析を行ったところ、いずれのカラムでも通知法の移動相条件では赤ワインからの夾雑成分とナタマイシンとの分離が困難であった。

次に、高山らの報告⁵⁾ (A法) における移動相条件 (A法移動相; 水-メタノール-酢酸-アセトニトリル (300 : 65 : 65 : 50)) で分析を行った。Inertsil ODS3V を用いた分析では、夾雑成分とナタマイシンとの分離が不十分であったが、L-Column ODS では、Fig. 1 に示すように分離が可能であった。

しかし、A法の移動相条件で夾雑成分とナタマイシンは分離するものの、移動相中の酢酸濃度が約14%と高いため、HPLC カラムの劣化が早く、ナタマイシンの保持時間が日単位で早くなり、ナタマイシン分析の再現性に問題があった。そこで、ナタマイシンと夾雑成分が良好に分離し、A法で設定された定量下限値 (試料換算値で0.05 µg/ml) を満たすことを目標に検討を行った。移動相中の酢酸濃度を通知法と同様に約5%に固定し、アセトニトリルとメタノールを混合した溶媒の濃度を、A法の約24%から通知法の約48%までの間とし、アセトニトリルとメタノールと比率を種々検討した結果、水-メタノール-アセトニトリル-酢酸 (60 : 20 : 15 : 5) で HPLC 分析を行った場合に、Fig. 2 に示すようにナタマイシンと夾雑成分との分離が良好であった。

2. 検量線と定量下限値

Fig. 3 に示すように、検量線は標準液の0.1~5.0 µg/ml の範囲において、良好な直線性 ($R^2=1.000$) を示した。

日本工業規格 (JIS) K0124高速液体クロマトグラフィー通則⁶⁾に基づき、シグナル-ノイズ比 (S/N) から

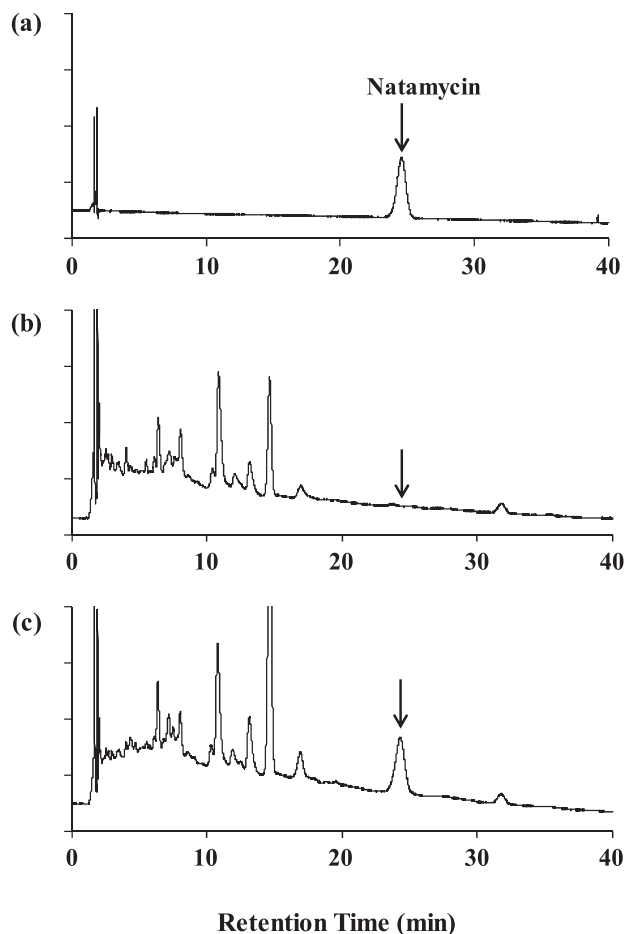


Fig. 1 Typical chromatograms from HPLC with a previously reported mobile phase

- (a) natamycin standard solution (0.1 µg/ml)
 (b) blank sample solution prepared from red wine
 (c) sample solution prepared from red wine spiked at 0.05 µg/ml

HPLC column: L-column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm), column temperature: 40°C, mobile phase: water-methanol-acetic acid-acetonitrile (300:65:65:50), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 304 nm

The arrows indicate the natamycin peak.

定量下限値を推定した。S/N=10を定量下限値とした場合、試料液中のナタマイシン濃度として0.1 µg/ml、ワイン中のナタマイシン濃度として0.05 µg/mlであった。

3. 添加回収試験

HPLC 条件検討に用いたナタマイシンを含まない赤ワインに、ワイン中の定量下限値相当量 (0.05 µg/ml) のナタマイシンを添加し、添加回収試験を行った。試行回数5回における回収率は91.0%、相対標準偏差は2.3%と良好な回収率と併行精度が得られた。

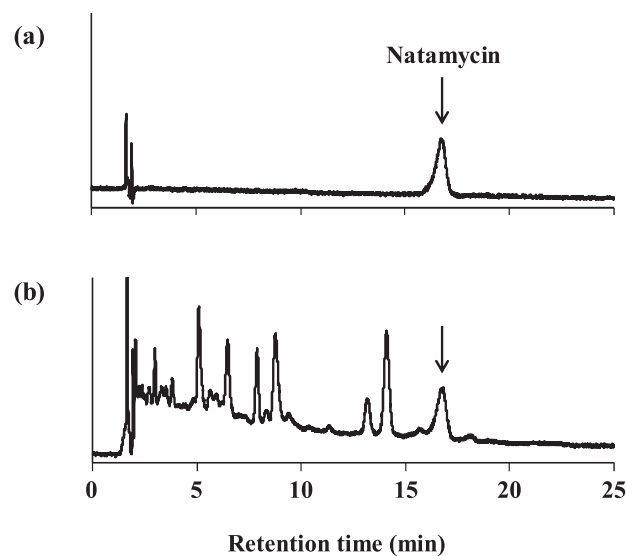


Fig. 2 Typical chromatogram from HPLC with the developed mobile phase

- (a) natamycin standard solution (0.1 µg/ml)
 (b) sample solution prepared from red wine spiked at 0.05 µg/ml

HPLC column: L-column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm), column temperature: 40°C, mobile phase: water-methanol-acetonitrile-acetic acid (60:20:15:5), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 304 nm

The arrows indicate the natamycin peak.

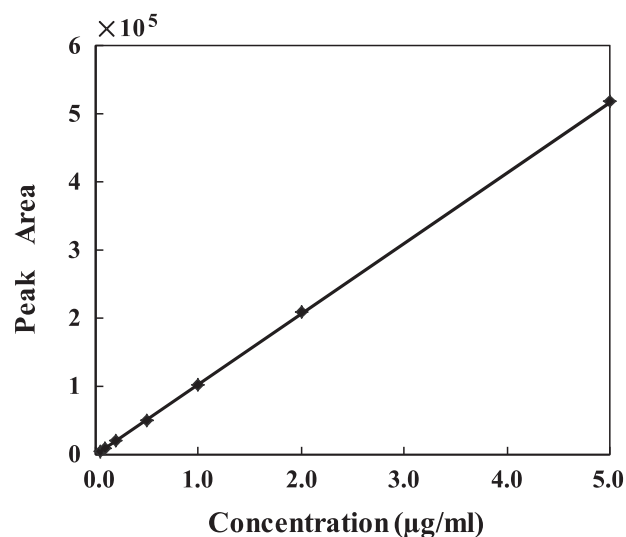


Fig. 3 Calibration curve for natamycin determination.

The concentration of natamycin in 50% methanol was 0.1-5.0 µg/ml

HPLC conditions were identical to those described in Fig. 2.

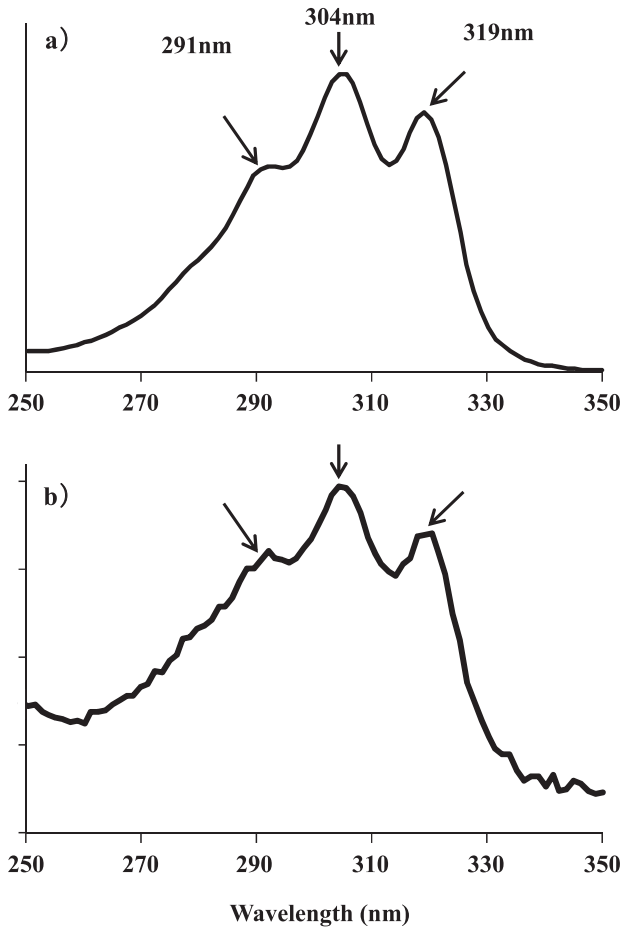


Fig. 4 PDA spectra of natamycin peak
 (a) natamycin standard solution (5.0 µg/ml)
 (b) sample solution prepared from red wine spiked at 0.05 µg/ml (2.5 µg/50 ml)
 HPLC conditions were identical to those described in Fig. 2.

4. 確認試験

ワイン中にナタマイシンが検出された場合、食品衛生法違反になり、行政措置の対象になる。その社会的な影響が大きいことから、HPLCによる保持時間の一致だけではなく、ほかの分析法による確認試験が必要になる。ワイン中のナタマイシンの確認試験法としては、高速液体クロマトグラフィー-質量分析法が考えられるが、機器が高価なため、分析機関によっては所有していないことがある。そこで、PDAによるスペクトルの確認法の検討を行った。

まず、検量線用標準液 (5.0 µg/ml) についてPDAスペクトルを確認したところ、Fig. 4 a) に示すとおり、291, 304及び319 nmの3つの吸収極大が見られるナタマイシンの特徴的なスペクトルが得られた。さらに、ナタマイシンの確認が可能な最低濃度を調べたところ、0.5 µg/mlであった。したがって、定量下限値相当

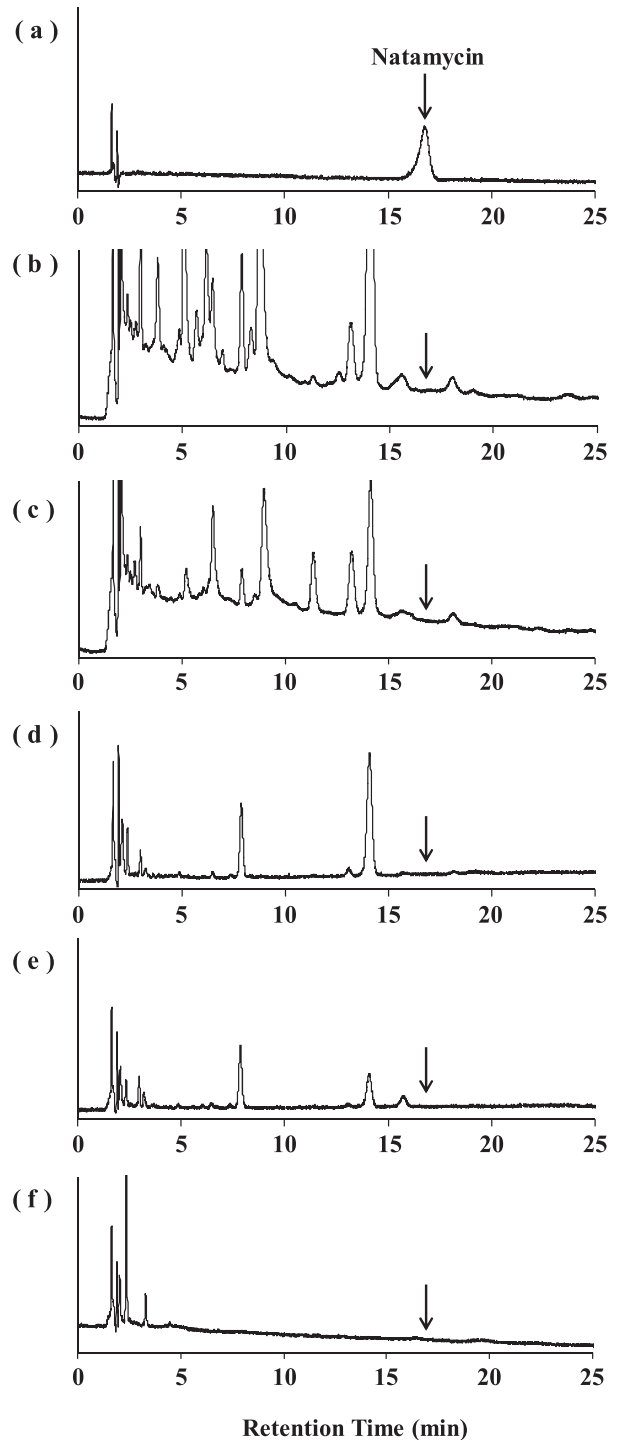


Fig. 5 HPLC chromatograms of sample solutions prepared from five different wines
 (a) natamycin standard solution (0.1 µg/ml)
 (b) red wine made in Argentina
 (c) red wine made in Chile
 (d) white wine made in Spain
 (e) white wine made in South Africa
 (f) domestic white wine
 HPLC conditions were identical to those described in Fig. 2.

The arrows indicate the natamycin peak.

(試料液中のナタマイシン濃度として0.1 µg/ml) のナタマイシンの確認には、試料液を5倍濃縮する必要があると考えられた。そこで、定量下限値相当のナタマイシンを添加したワイン50 mlを固相カートリッジに負荷し、試料液の場合と同様に処理し、分析を行った。その結果、ナタマイシンの保持時間にピークが出現し、そのピークのPDAスペクトルは、Fig. 4 b)のようにナタマイシンに特徴的なスペクトルと一致した。

5. 市販製品の分析

赤ワイン2種及び白ワイン3種について分析を行ったクロマトグラムをFig. 5に示す。いずれのワインにおいても、ナタマイシンの保持時間付近に妨害ピークは見られず、またナタマイシンは定量下限値未満であった。

謝 辞

本研究は平成22年度厚生労働省食品等試験検査費により行われた。本検討結果は、医薬食品局食品全部基準審査課長通知(平成22年10月7日食安基発1007第2号)の別添、ナタマイシンの試験法B(ワイン中の分析法)の基礎データとしたものである。

分析法の検討に当たりご助言賜りました大阪検疫所検査課の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) "ANTIMICROBIALS IN FOOD," 3rd ed., eds. by Davidson, P., M., Sofos, J., N. and A., L., Branen, CRC Press, Florida, 275-289 (2010)
- 2) 谷村顕雄, 棚元憲一監修, "第8版食品添加物公定書解説書", 東京, 廣川書店, D1220-D1226 (2007)
- 3) 韓国食品医薬品安全庁 (Korea Food and Drug Administration; KFDA)
http://kfda.korea.kr/gonews/branch.do?act=detailView&dataId=155433293§ionId=p_sec_1&type=news&flComment=1&flReply=0
- 4) 日本薬学会編, "衛生試験法・注解2010", 東京, 金原出版株式会社, 321-323 (2010)
- 5) Takayama, N., Sasano, M., Chijiwa, K., Hirano, H., Sato, Y. and Imura, S.: *Journal of the Japan Quarantine Medical Association* (submitted)
- 6) 日本工業標準調査会 審議, "JIS K0124:2002高速液体クロマトグラフィー通則", 東京, 日本規格協会, p.22-24 (2002)