ナチュラルチーズ中ナタマイシン分析法における高速液体クロマトグラフィー測定条件の改良と妥当性確認

羽石　奈穂子[a]，林　真輝[a]，鈴木　理央[a]，山嶋　裕季子[a]，大塚　健治[a]，神田　真軌[a]

ナチュラルチーズ中のナタマイシン分析に用いられる通知法は，高速液体クロマトグラフィー測定時の移動相中の酢酸濃度が約5%と高く，ピークリーディング及び保持時間の変動が生じる場合がある．これらは定量値の再現性低下につながることから，日常検査への影響が懸念される．そこで，移動相中の酢酸濃度を0.1%に低減した条件について，保持時間の安定性及びピーク面積再現性を検証するとともに，行政検査への適用の可能性を評価するため妥当性確認試験を実施した．さらに，カラムの種類により保持挙動や夾雑成分の分離状況が異なる可能性があることから，3種類のカラムを用い，4種類のチーズを対象に2濃度を添加し試験を行った．その結果，いずれの条件においても真度及び精度は目標値を満たし，通知法と比較して保持時間の変動率が低減するとともに，ピーク面積に基づく定量値の再現性が向上し，より安定した定性及び定量が可能となった．以上より，本条件はチーズ中ナタマイシンの行政検査に適用可能であると考えられた．

キーワード：ナタマイシン，ナチュラルチーズ，食品添加物，HPLC，酢酸，移動相，妥当性確認

は　じ　め　に

ナタマイシンは，ストレプトマイセス・ナタレンシス（*Streptomyces natalensis*）の培養により産生されるポリエンマクロライド系抗生物質であり，かび及び酵母の生育を特異的に阻害する[1]．現在，ナタマイシンは50カ国以上で食品添加物としてチーズ等への使用が認められている．日本においても抗菌目的の表面処理剤としてナチュラルチーズ（ハード及びセミハードの表面部分に限る）に使用が認められており，残存量は0.020 g/kg未満と規定されている[2]．

ナチュラルチーズ（以下，チーズとする）中のナタマイシン分析法として，メタノール抽出後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定する通知法が示されており[3]，本法は国際酪農連盟IDF STANDARD 140に準拠した方法である[4]．本法におけるHPLC測定条件では，移動相として水，メタノール及び酢酸の混液が用いられ，酢酸濃度は約5%に設定されている．

一方，高濃度の酢酸を含む移動相はカラムの劣化や保持挙動に影響する可能性が指摘されており，古庄らは酢酸濃度約14%の条件において保持時間の変動や再現性への影響を報告している[5]．このような知見を踏まえると，通知法の移動相条件についても分析性能の観点から検討の余地がある．実際に日常分析においても，高濃度の酢酸を含む移動相では保持時間の変動やピーク形状の不安定化がみられ，分析結果の再現性への影響が懸念された．このため，本研究では酢酸濃度を低減した測定条件を検討した．

さらに，令和6年3月には，食品分析法の国際整合性の確保を目的として，「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」[6]が発出され，食品衛生法に規定される使用基準への適合を判定する分析法については，妥当性確認の実施が求められるようになった．加えて，分析法の測定条件を変更する場合には，変更後の方法が妥当性確認の各パラメータに影響を及ぼさず，変更前と同等の性能を有することを確認することが必要である．

行政検査においては食品の種類により夾雑成分の影響がみられる場合がある．この影響を低減するため，同じ逆相カラムであってもカラムメーカーにより表面処理法等が異なることを利用して分離条件の検討が行われることがある．このような条件変更においても，妥当性確認パラメータに影響が生じるかどうかを評価することが重要である．

そこで本研究では，チーズ中ナタマイシン分析における移動相中の酢酸濃度を低減した条件について，保持挙動及び定量性能の観点から検討するとともに，複数のHPLCカラムを用いた評価を行い，測定条件の妥当性及び日常検査への適用可能性について検討することを目的とした．

実　験　方　法

1. 試料

都内に流通していたチーズ4種類を用いた（表1）．

表1. 試料内訳

品名	種類	原産国
ゴーダ	セミハード	オランダ
パルミジャーノ	ハード	イタリア
チェダー	セミハード	アイルランド
グリエール	ハード	スイス

[a] 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

これらのうち，チェダーチーズではナタマイシンの保持時間付近にピークを認める測定条件もあったが，その面積は添加濃度相当の7%未満であることからブランク値を差し引いた補正を行った．試験に供する前に，チーズはフードプロセッサーで粉砕して均質化した．

2. 試薬・装置等

1) ナタマイシン標準品及び標準溶液

（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製を用いた．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て20 mLに定容し，標準原液とした．標準原液を用いて，通知法に記載された手順でメタノール・水混液（2：1）を用いて希釈して，0.1–10.0 μg/mLの検量線用標準溶液，添加用標準溶液（20及び200 μg/mL）を調製した．標準原液の保存は冷蔵庫で期限は1週間とし，検量線用標準溶液と添加用標準溶液は全て用時調製した．

2) 試薬等

メタノール：HPLC用，富士フイルム和光純薬（株）製

酢酸：特級，富士フイルム和光純薬（株）製

水：Merck Millipore社製 Milli-Q®超純水装置で精製された超純水

ろ紙：No.5A 150 mm，Advantec製

メンブランフィルター：0.45 μm，メルクミリポア製

3. HPLC装置及び測定条件

装置：島津製作所製 Prominence（検出器：PDA）

カラム：サイズ4.6 mm i.d.×150 mm，粒子径5 μm

内訳は表2に示す通り

移動相及び使用カラム：表3に示す通り

流速：1.0 mL/min，注入量：10 μL，検出波長：304 nm

カラム温度：40°C

表2. 分析カラム内訳

	カラム名	メーカー名	エンドキャップ
I	ZORBAX Eclipse XDB-C18	アジレント・テクノロジー	有
II	L-column2 ODS	化学物質評価研究機構	有
III	Inertsil ODS 80A	GLサイエンス	有

表3. 各分析法の分析カラム及び移動相比率

分析法	分析カラム	水・メタノール・酢酸比率
通知法	I	50:50:5
改良法A	I	50:50:0.1
改良法B	II	54:46:0.1
改良法C	III	52:48:0.1

4. ピーク形状の検証

前項3. に示す装置及びIのカラムを用いて1 μg/mLの標準溶液を測定し，そのピーク形状，保持時間及びシンメトリ係数を確認した．移動相は，メタノール・水・酢酸の比率が，50:50:5，50:50:3，50:50:1及び50:50:0.1の4種類を用い．その他のHPLC条件は3. に従った．

5. 保持時間の変動の検証

図1に示すように，標準溶液及び試験溶液を交互に測定し，測定開始時の標準溶液（X_n）の保持時間（x分）及び4–5時間後に測定した標準溶液（Y_n）の保持時間（y分）から，変動率（（x-y）/ x ×100）を算出した．

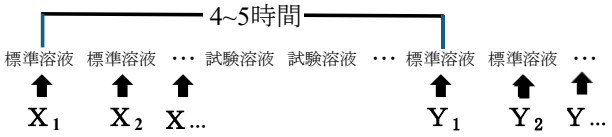


図1. 標準溶液及び試験輸液の測定順序

6. ピーク面積再現性の検証

図1に示す標準溶液（X_1，X_2，$X_{…}$，Y_1，Y_2，$Y_{…}$）のピーク面積より検量線を作成し，個々の標準溶液（X_n，Y_n）の濃度を算出した．この測定を3日間実施し，各標準溶液（（測定前半＋測定後半）×3日間，合計6試行）の濃度の併行精度を算出した．

7. 試験溶液の調製

試料約10 gを精密に量り，100 mLのホモジナイザーカップに入れ，正確に量ったメタノール50 mLを加え，ホモジナイズ（5分間，10,000回転/分）した．正確に量った水25 mLを加えて混和し，−20°Cの冷凍庫で1時間冷却した．冷却後，抽出液をろ紙でろ過し，ろ液の最初の5 mLを捨て，続いて採取したろ液を，さらにメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

8. 妥当性確認試験

「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」[6]に従い，表3に示す改良法AからCにおける妥当性確認試験を行った．添加濃度は2濃度とし，定量限界の2倍（0.002 g/kg）及び基準値（0.020 g/kg）とした．試験品としてチーズ4種類について，分析者2名，2併行，3日間で行った．測定には表2に示す3種類のODS系カラムを用いた．なお，評価の目標値は回収率70–120%，併行精度10%以下，室内精度15%以下とした．

結果及び考察

1. ピーク形状の検証

日常検査で通知法に従いナタマイシンを分析する際，顕著なピークリーディングが確認される．通知法では移動相の酢酸濃度は約5%に設定されているが，一般的に用いら

れる移動相の酢酸濃度は0.1–1%といわれている[7]．一方，通知法に規定された確認分析法[3]では，移動相は水・メタノール・酢酸混液（50:50:0.1）と，酢酸濃度は約0.1%であり，そのピークの形状は良好である．そこで，水及びメタノールの比率は50:50に固定して酢酸濃度を変化させた移動相を用いて標準溶液（1 μg/mL）を測定した．その結果，水・メタノール・酢酸の比率が 50:50:1 及び50:50:0.1 の条件では保持時間7分付近となり通知法の移動相に比較して十分に保持され，ピークリーディングは改善した（図2）．また，シンメトリ係数もそれぞれ0.959及び1.062と良好であった（表4）．このことから，HPLC用移動相は，酢酸濃度を0.1–1%程度に低減しても分析可能であると考えられた．さらに0.1%条件（改良法A）について，他の要因も含めて有用性を検証した．

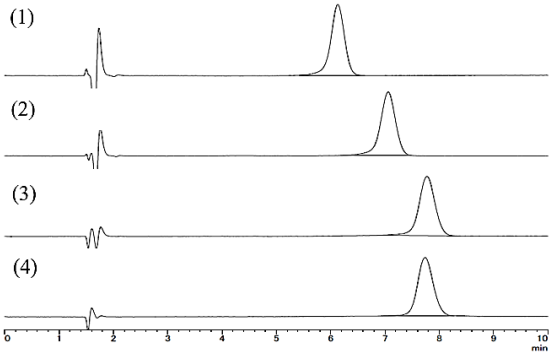


図2. 移動相酢酸濃度の異なる標準溶液（1 μg/mL）のクロマトグラム
移動相（メタノール・水・酢酸混液）の組成
(1) 50:50:5　(2) 50:50:3　(3) 50:50:1　(4) 50:50:0.1

表4. 移動相中酢酸濃度の違いによるナタマイシンのシンメトリ係数

	水・メタノール・酢酸比率			
	50:50:5	50:50:3	50:50:1	50:50:0.1
シンメトリ係数	0.885	0.889	0.959	1.062

2. 保持時間の変動の検証

通知法では測定前に十分な安定化を図ったにもかかわらず，ナタマイシンの保持時間が時間経過とともに早まる傾向が認められた．そこで，酢酸濃度の異なる2種類の分析法（通知法及び改良法A）について，保持時間の経時的な変動を比較した．日常検査では，最長でも4–5時間に1回標準溶液を測定し，保持時間やピーク強度を確認している．そこで，測定開始時間が4–5時間異なる2種類の標準溶液について，各々のピークの保持時間から変動率を算出した．これらの測定を3日間実施し，結果を表5に示した．

通知法では，一連の測定において保持時間の変動率は最大で約4%を超えていた．一方，改良法Aでは通知法と比較して変動率が小さく，再現性に優れる傾向が認められた．このことから，酢酸濃度の低い移動相を用いることで，保持時間の安定性が向上することを示した．

表5. 移動相中酢酸濃度の違いによるナタマイシンの保持時間変動率

	測定ごとの変動率 (%)	平均 (%)
通知法	4.55，2.86，2.36	3.26
改良法A	1.85，1.47，1.03	1.45

3. ピーク面積再現性の検証

通知法では，ピークテーリングや保持時間の変動が顕著であることから，ピーク面積に基づく定量値の再現性低下が懸念された．そこで，通知法及び改良法Aについて，標準溶液のピーク面積から検量線を作製し，各標準溶液の濃度を算出した．これらの測定を3日間実施し，各標準溶液（6試行）の濃度の併行精度を算出した（表6）．いずれの標準溶液濃度においても，改良法Aは通知法と比較して併行精度が良好であり，濃度のばらつきが小さいことから，より安定した定量が可能であると考えられた．

表6. 移動相中酢酸濃度の違いによるナタマイシン濃度の併行精度

		標準溶液濃度（μg/mL）			
		0.1	0.5	1	2.5
併行精度(%)	通知法	7.9	2.7	3.1	2.6
	改良法A	7.2	0.8	1.1	0.8

4. 3種類の測定条件における妥当性確認試験

前述の検討結果を踏まえ，ナタマイシン分析における移動相中の酢酸濃度を0.1%に低減した条件について，日常検査への導入を目的として妥当性確認試験を実施した．本分析法はハードチーズ及びセミハードチーズのみが対象であり，夾雑成分や水分含量の違いが妥当性確認パラメータに及ぼす影響を考慮し，異なる4種類のチーズを用いて実施した．分析カラムは，ピーク面積再現性等の検討を行った改良法Aで用いたカラムに加え，カラムサイズ及び粒子径が同一でありながら，表面処理（エンドキャップ）等が異なる3種類のODSカラムを選択した．カラムの種類によりナタマイシン保持強度が異なり，保持時間が変動したため，いずれのカラムにおいても保持時間が6–10分となるよう，移動相中のメタノール濃度を調整した．

1) 選択性の確認

改良法AからCを用いた標準溶液，ブランクまたはトレース試料ならびに添加試料のクロマトグラムを図3–5に示した．ゴーダ，パルミジャーノ及びグリエールチーズでは，ナタマイシン保持時間付近に妨害となるピークは認められなかった．チェダーチーズについては，改良法Bにおいて，ナタマイシンと完全に分離されない微小ピークが認められ

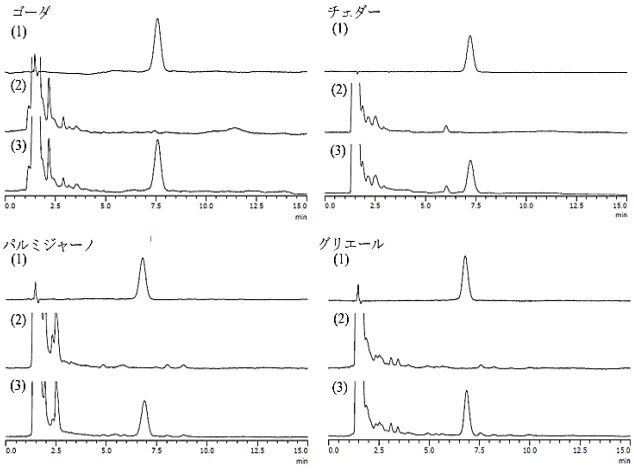


図3. 分析法Aによるクロマトグラム
(1) 標準溶液 0.25 μg/mL　(2) チーズ無添加溶液
(3) チーズ添加溶液（0.002 g/kg相当）

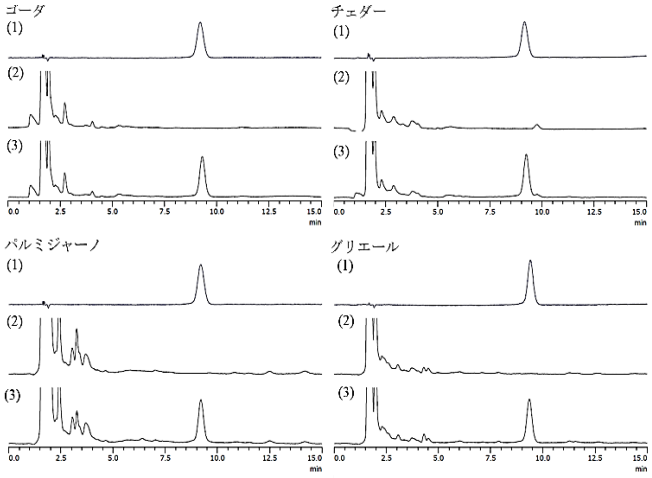


図4. 分析法Bによるクロマトグラム
(1) 標準溶液 0.25 μg/mL　(2) チーズ無添加溶液
(3) チーズ添加溶液（0.002 g/kg相当）

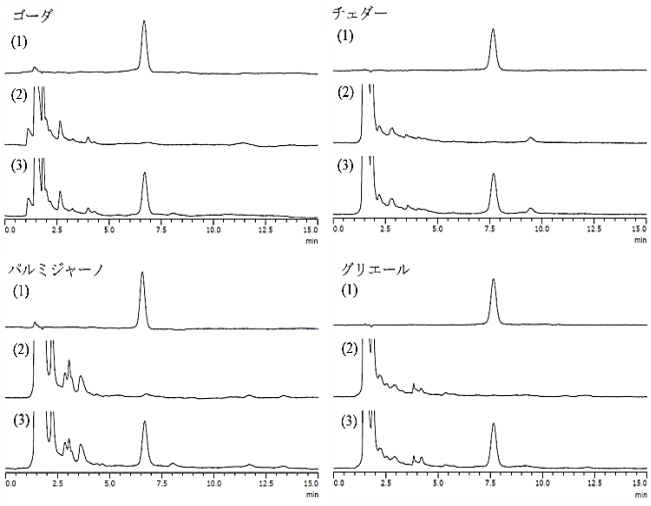


図5. 分析法Cによるクロマトグラム
(1) 標準溶液 0.25 μg/mL　(2) チーズ無添加溶液
(3) チーズ添加溶液（0.002 g/kg相当）

たが，その強度は定量限界値の7%未満であった．そこでブランク値を差し引くことで補正した．ブランク値は3回測定したピーク面積の平均値を用いた．なお，ブランク値のばらつきは小さく，補正に影響する程度の変動は認められなかった．

2) 妥当性確認試験結果

改良法A，B及びCの妥当性確認結果を表7に示した．いずれの分析法においても，パルミジャーノチーズにおいて真度がやや低い傾向が認められたものの，すべての項目は妥当性ガイドライン[6]の目標値を満たしていた．これらの結果から，酢酸濃度を低減した移動相条件においても，行政検査に適用可能な分析性能を有することが示された．

表7. 各分析法における妥当性確認試験結果

分析法	チーズ	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
A	ゴーダ	0.002	89.0	3.3	5.5
		0.02	86.3	1.4	6.3
	パルミジャーノ	0.002	79.7	1.7	7.6
		0.02	81.4	0.6	3.5
	チェダー	0.002	90.2	3.4	4.7
		0.02	88.7	1.1	2.8
	グリエール	0.002	87.3	1.9	2.7
		0.02	87.6	2.2	2.2
B	ゴーダ	0.002	88.2	1.3	2.2
		0.02	87.1	2.1	3.4
	パルミジャーノ	0.002	83.1	1.1	3.8
		0.02	82.5	0.9	4.4
	チェダー	0.002	93.3	2.2	4.1
		0.02	90.6	1.3	2.0
	グリエール	0.002	88.0	3.1	4.1
		0.02	87.0	2.4	2.4
C	ゴーダ	0.002	82.3	3.8	5.2
		0.02	83.2	2.1	7.3
	パルミジャーノ	0.002	77.2	1.7	5.6
		0.02	77.5	0.9	5.3
	チェダー	0.002	90.5	1.7	3.3
		0.02	89.9	0.9	1.5
	グリエール	0.002	87.4	3.1	4.7
		0.02	86.9	2.6	2.6

また，逆相カラムの種類により保持挙動に差は認められたものの，分離条件の調整により妥当性確認パラメータへの影響は小さく，適切な条件設定により同等の分析性能が確保されると考えられる．

ま　と　め

通知法における高濃度酢酸を含む移動相条件について検討し，酢酸濃度を0.1%に低減した場合でも，ピーク形状，保持時間及び定量の性能が改善または維持されることを明らかにした．さらに，複数のチーズ試料及び異なるODSカラムを用いた妥当性確認試験の結果，各評価パラメータはいずれも目標値を満たし，カラム特性の違いに応じて分離条件を調整した場合でも，同等の分析性能が確保されることが示された．以上のことから，本法は条件変更に対する柔軟性と汎用性を有しており， チーズ中ナタマイシンの行政検査に適用可能な分析法であると考えられる．

文　　献

1) 第9版食品添加物公定書解説書，D-162，廣川書店，東京
2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発第1128002 号，食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件について（通知），平成17年11月28日．
3) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長，厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長：薬生食基発0624第1号，薬生食監発0624第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正について（通知），令和3年6月24日．
4) ISO 9233-2:2018 | IDF 140-2:2018：Cheese, cheese rind and processed cheese — Determination of natamycin content — Part 2: High-performance liquid chromatographic method for cheese, cheese rind and processed cheese.
5) 古庄紀子，久保田浩樹，佐藤恭子，他：国立医薬品食品衛生研究所報告，**129**, 100–104, 2011.
6) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長，厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：健生食基発0308第1号，健生食監発0308第1号， 「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第２版 食品中の食品添加物分析法」の改正について（通知），令和6年3月8日．
7) （社）日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会：液クロ文の巻，65–67，2006，筑波出版会，茨城．

利益相反（COI）利益相反はない．

Improved HPLC Conditions and Validation of a Modified Analytical Method for Natamycin in Natural Cheese

Nahoko HANEISHI [a], Masaki HAYASHI[a], Rio SUZUKI[a],
Yukiko YAMAZIMA[a], Kenji OTSUKA[a], and Maki KANDA[a]

The modified method for identifying natamycin in natural cheese uses a mobile phase containing approximately 5% acetic acid in high-performance liquid chromatography (HPLC), which causes peak tailing and instability in retention time. These issues may adversely affect the reproducibility of quantitative results. In this study, the acetic acid concentration in the mobile phase was reduced to 0.1%, and the analytical performance of the modified method was assessed. Retention time stability and peak area reproducibility were evaluated, and a validation study was conducted to assess its applicability for routine monitoring. Further, three different octadecylsilyl columns were examined to assess the robustness of the method. The results revealed that reducing the acetic acid concentration improved peak shape and reduced variation in retention time, leading to better reproducibility of peak areas. In the validation study utilizing four types of cheese at two spiking levels, all performance parameters, including accuracy and precision, met the acceptance criteria. Appropriate adjustment of the mobile phase composition enabled equivalent analytical performance across all columns despite differences in retention behavior among the columns. These results indicate that the modified method using a reduced acetic acid concentration provides reliable analytical performance and is suitable for routine monitoring of natamycin in cheese.

Keywords: natamycin, natural cheese, food additive, HPLC, acetic acid, mobile phase, validation

[a] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan