

## 7. 規格基準案

性 状 本品は白～乳白色の結晶状粉末で、殆ど無臭である。

確認試験 (1) 本品に塩酸一滴を加えると青色を呈する。また、リン酸一滴を加えると緑色を呈し、数分後には淡赤色に変色する。

(2) 本品 5 mg を酢酸のメタノール溶液 (1→1000) に溶かし、1000 ml とする。この液につき、吸収度測定法により吸収スペクトルを測定するとき、290、303、318 nm 付近に極大吸収、280 nm 付近にショルダーがある。

(3) 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定し、本品のスペクトルを参照スペクトルと比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。

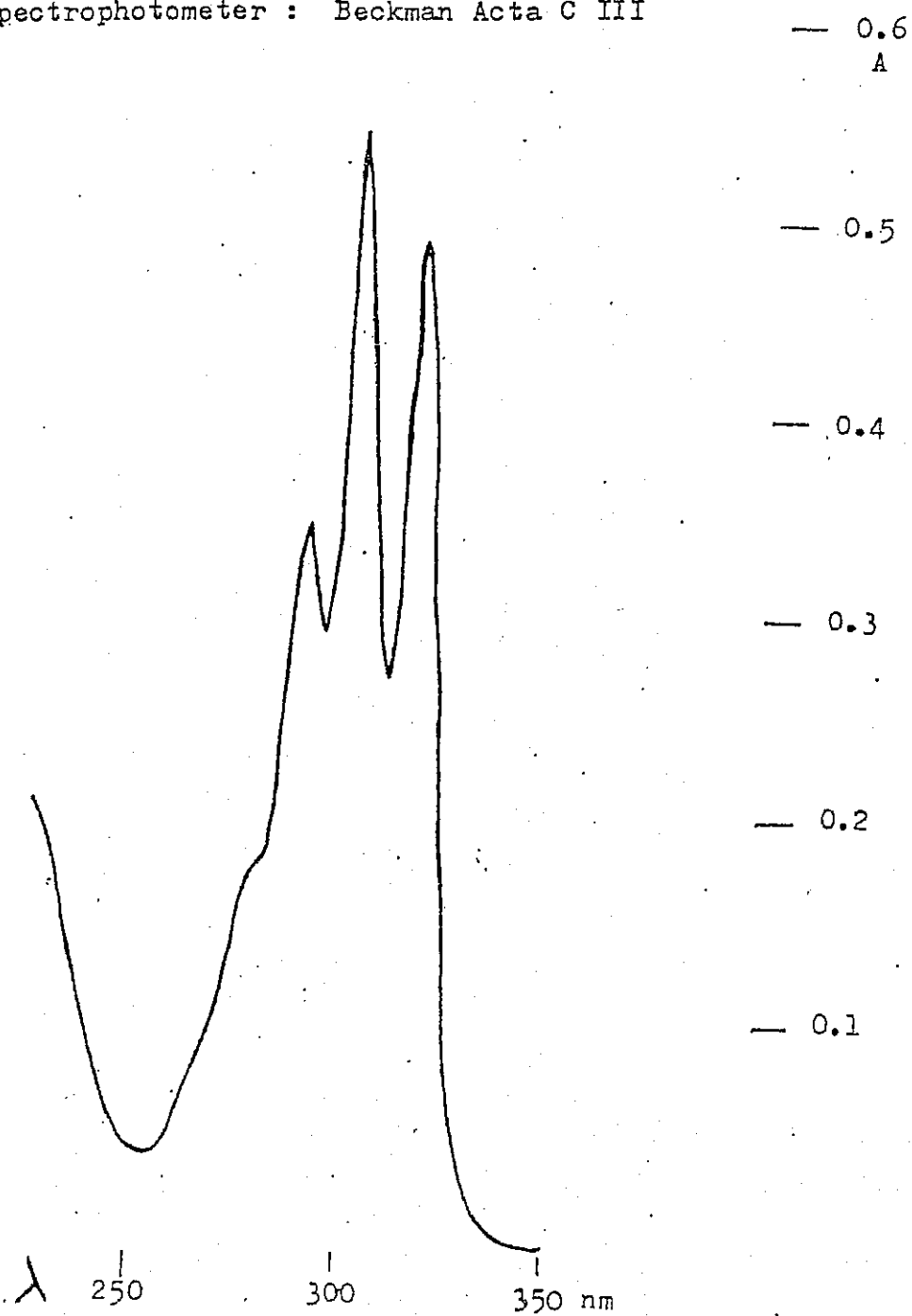
# 吸収スペクトル

concentration : 5  $\mu$ g/ml in methanol/  
glacial acetic acid mixt.

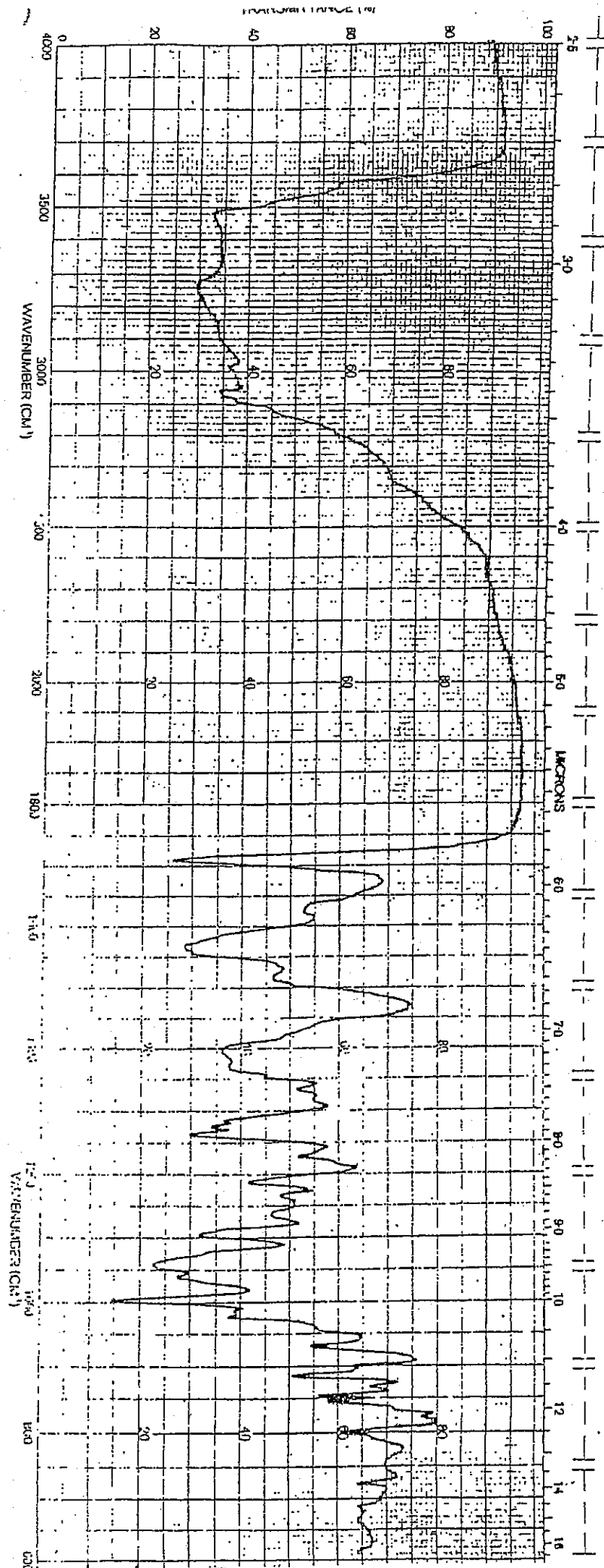
scan speed : 0.2 nm/sec

band width : 2 - 3 nm

spectrophotometer : Beckman Acta C III



赤外線スペクトル



Pimaricin - Reference Infrared Spectrum (1.3 mg solid in 300 mg potassium bromide).

#### 純度試験<sup>5)</sup>

(1) 液性     pH   5.5 ~ 7.5

20部のジメチルホルミアミドと80部の水を混合して中和した溶液に本品を1.0%(w/v)の濃度で溶解した液について測定する

(2) 比旋光度    $[\alpha]_D^{20}$  : +250° 及び +295° の間

本品を純酢酸液に1%(w/v)の濃度で溶解した液について20℃で測定し乾燥物に換算する。

(3) 硫酸塩    $\text{SO}_4$  として0.5%以下

本品2gを試料とする。

(4) 重金属   Pb として30ppm以下

検体0.67gを第2法で分析する。標準は鉛(Pb) 20μg。

(5) ヒ素      $\text{As}_2\text{O}_3$  として3ppm以下

乾燥減量   8.0%以下 (検体を  $\text{P}_2\text{O}_3$  の上に置き、5mmHg以下の真空中で60℃で乾燥)

強熱残分   0.5%以下 (乾燥物 2g)

#### 定量法<sup>5)</sup>

##### A. 原理

ナタマイシンに敏感な微生物を培養する寒天培地で平行線分析が行われた。

含有量の精度は次のようにした。即ち、評価含量のエラーの基準限界

( $P=0.95$ ) は評価含量の95%以上、105%以下とする。

評価含量のエラーの基準上限は乾燥物に関しては95%以上とする。

##### B. 資材と装置

ガラス板—平面で並行したもの、16\*16 cm。

ペトリ皿—径 9 cm, 平面底。

寒天用ピペット—広口 ; 20ml で 2.5ml の目盛りがあるもの。

広口 ; 60ml で 10ml の目盛りがあるもの。

ピペット—5 及び 25ml、50μl。

ガラス製品—使用されるすべてのガラス器具は褐色でなければならない。

(注 : ナタマイシンの希釈液が光に非常に敏感であるためである)

ウォーター・バス — 45℃

インキュベーター — 30℃

定 規—白色、mm 表示

### C. 試験微生物

*Saccharomyces cerevisiae* : ATCC 9763

試験微生物を麦芽寒天斜面培地に維持する。

これを4週間毎に植え継ぐ；植え継ぎ後、25～30℃で24時間培養し、次に5～15℃で保管する。接種準備として1白金耳を30mlの液体麦芽抽出物を含む100mlのフラスコに移し、26℃で約48時間培養する（静止状態で）。

接種物を6℃で24時間以上保持してはならない。

### D. 培地と緩衝液

#### a. Whiffen 寒天培地

|               |         |
|---------------|---------|
| 酵母抽出物 (Difco) | : 2.5g  |
| リン酸2水素カリウム    | : 6.8g  |
| 水酸化ナトリウム      | : 0.6g  |
| 寒天            | : 15.0g |

諸原料を十分な蒸留水に溶解し、100～110℃で30分間加熱して1,000mlを作成する。熱い当該溶液をろ過し、pHを1N-水酸化ナトリウムで6.6に調整して適度なフラスコに充填する。110℃で30分間滅菌する。pHをチェックする；6.5とすべきである。

#### b. 液体麦芽抽出物

麦芽抽出物を蒸留水で12° Balling (L当たり125gのDifco麦芽抽出物に等しい)に希釈する。110℃で1時間滅菌し、ろ過して120℃で20分間滅菌する。再度ろ過して100mlのフラスコに30mlずつ充填し、110℃で30分間滅菌する。

#### c. 麦芽寒天培地（当該試験微生物の維持用）

麦芽抽出物を蒸留水で10° Balling (L当たり100gのDifco麦芽抽出物に等しい)に希釈してL当たり20gの寒天を加える。当該寒天を100～110℃で30分間加熱して溶解し、ろ過して110℃で30分間滅菌する。冷却後の最終pHは5.4である。

#### d. グルコース-蔗糖 糖蜜溶液

蒸留水に溶かした50%w/vのグルコース（デキストロース）溶液をSeitzろ過により無菌にする。蒸留水に溶かした50%w/vの蔗糖蜜溶液5mlを無菌的に加える。蔗糖蜜は使用前に110℃で30分間加熱により滅菌する。

#### e. pH 6.8の0.05Mリン酸バッファの滅菌

4.35gのリン酸水素2カリウムと3.4gのリン酸2水素カリウムを蒸留水に溶解し、1Lにメス・アップして、溶液のpHを1N-水酸化ナトリウムにて

6.8に調整する。100℃で30分間滅菌し、pHを再度チェックする。

#### E. 手順

##### a. 試験プレートの調整

溶解して45℃に冷却した300mlのWhiffen寒天培地に6mlのグルコース—蔗糖糖蜜溶液と十分な接種物を加えて、1mlの寒天培地当たり微生物が100,000の濃度になるようにする。

十分に振盪し、寒天用ピペットで、接種された寒天培地60mlを四角い平面で並行したプレートに注ぐか、ペトリ皿に20mlを注ぐ。

寒天が固化してから図示したようにプレートの寒天に5mm径の孔を12個あけるか、ペトリ皿の寒天に5.7cm径の環状に一定間隔で5mm径の孔を6個あける。

##### b. 対照溶液

約50mgのナタマイシン対照品を正確に計量し、100mlのメタノールに溶解して褐色の200ml計量フラスコに入れる。滅菌したpH6.8の0.05Mリン酸バッファーでメス・アップして混合する。当該保存溶液は正確に250μgナタマイシン/mlを含有していなくてはならない。当該保存溶液をメタノールと滅菌したpH6.8の0.05Mリン酸バッファーの1:1混合液で5、10及び20倍に希釈し、濃度を正確に50、25及び12.5μg/mlとする。

##### c. サンプル溶液

約55mgのサンプルを正確に計量し、100mlのメタノールに溶解して褐色の200ml計量フラスコに入れる。滅菌したpH6.8の0.05Mリン酸バッファーでメス・アップして混合する。この溶液は大体250μgナタマイシン/mlを含有している。この溶液をメタノールと滅菌したpH6.8の0.05Mリン酸バッファーの1:1混合液で5、10及び20倍に希釈し、濃度を大体50、25及び12.5μg/mlとする。

##### d. サンプル溶液及び対照溶液の投入

50μlのピペットで3種のサンプル溶液及び対照溶液を取り、図示したようにプレートの孔に2孔ずつ入れるかペトリ皿に1孔ずつ入れる。サンプル当たり最低4枚のペトリ皿か2枚のガラス板を使用する。所定の分析用にはバッチ当たり2種の計量品を使用する。

##### e. 培養

当該プレートを30℃で18時間培養する。

##### f. 阻止領域の測定

培養に続いて、2つの直角方向で定規でほぼ0.5mm以上の阻止領域の径を測定する。“平行線分析”原理に基づいて各プレートのサンプル濃度の値を

計算する。

F. 保 存

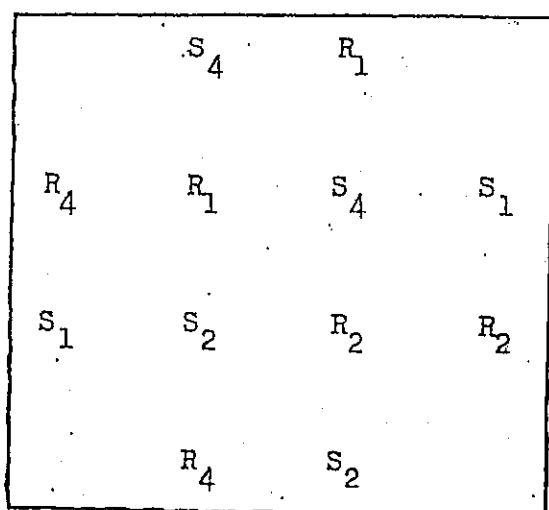
十分に密封した容器に保存し、光を遮断して温度は 15℃を超えてはならない。

ペトリ皿のパターン

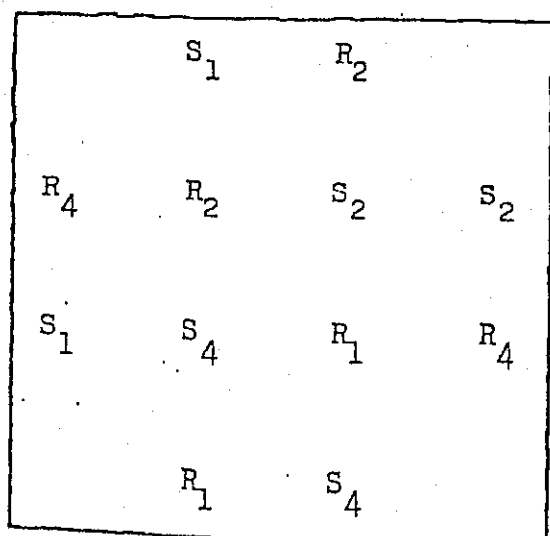
$S_1$   
 $R_2$        $R_4$   
 $S_4$        $S_2$   
 $R_1$

ガラス・プレートのパターン

プレート 1



プレート 2



ガラス・プレート上の孔の間隔は3 cm である。外側の孔と外周との間隔は3.5 cm である (すべて孔の中心から測定)。  
 注: プレートを測定時に引っ張らない。

R = 対照溶液

$R_1$  = 12.5  $\mu$ g/ml

$R_2$  = 25  $\mu$ g/ml

$R_4$  = 50  $\mu$ g/ml

S = サンプル溶液

$S_1$  = 約12.5  $\mu$ g/ml

$S_2$  = 2 \*  $S_1$

$S_4$  = 4 \*  $S_1$