

畜産食品中の合成抗菌剤の残留に関する 研究(第1報)

— 滴定法によるカプリロヒドロキサム酸の定量法 —

Studies on Residues of Synthetic Antibacterials in Livestock Products (Part I)

— Determination of Caprylohydroxamic Acid by Titration Method —

大森 茂 中島 純夫 藤森 裕悟
川越 章善 富所 謙吉

Shigeru Omori, Sumio Nakajima, Yugo Fujimori,
Fumiyoshi Kawagoe and Kenkichi Tomidokoro

I 諸 言

近年、畜産食品の食品衛生上の問題として、飼料添加物が、注目されている。我が国においても昭和51年7月に「合成抗菌剤等の飼料添加物としての基準」がもうけられ、飼料添加物の使用が大幅に制限された。しかしながら合成抗菌剤の分析法の報告が少ない。合成抗菌剤の一つであるカプリロヒドロキサム酸(以下CHAと略す)の定量法は、ヒドロキサム酸が植物および微生物由来のウレアーゼに対し強力に阻害する事を利用した比色法^{1) 2) 3)}(肉眼的測定)がある。しかしながら従来ウレアーゼの活性値の測定に、より精度の良い滴定法³⁾があることに注目し、CHAの定量法に応用し、検討を行ったところ良好な結果を得たので報告する。

II 実験方法

1 試薬の調製

1) 尿素緩衝溶液: 尿素 3 g および EDTA 16.8 mg を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 mL に溶かす。

2) ブロムクレゾールグリーン (BCG) 溶液: BCG 0.1 g をエタノール 100 mL に溶かし、ろ

過する。

3) ホウ酸溶液: ホウ酸 4 g を水 100 mL に溶かす。

4) 飽和炭酸カリウム溶液: 炭酸カリウム 90 g を水 100 mL に溶かす。

5) ウレアーゼ溶液: ナタメ粉末(半井製ウレアーゼ)に5倍量の0.1 M トリス塩酸緩衝液を加え、37°C、30分間かきまぜて抽出し、冷却速心分離(10,000 G、15分間)して得られる上澄液を用いる。この溶液(原液)は、ウレアーゼ活性値(サマナーユニット/mL)は、約36である。この原液の希釈は、0.1 M トリス塩酸緩衝液で行う。

6) CHA標準液: CHA 30 mg をエチルアルコール 15 mL に溶かし、水で 100 mL とし原液とする。この原液を 0.1 M トリス塩酸緩衝液で希釈し、各濃度の希釈溶液を作る。

2. 器具および装置

1) 冷却速心分離器: KUBOTA KR/180 B

2) ハンディースピレーター: ヤマト製 MO DEL WP-45

3) 恒温水槽: TABAI MODEL TS-23

4) 流量計: 草野科学器械製 微小流量計

3. 測定法

洗浄管 (A) 反応管 (B) およびアンモニア補集管 (C) を用意し、(A) 及び (C) に次の割合で試薬を加え、図 1 のごとくセットする。

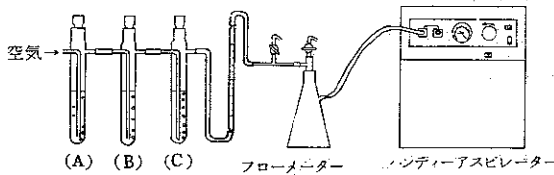


図 1. アンモニア補集装置

(A) : 5% 硫酸 20 ml

(C) : { 4% ホウ酸 20 ml
BCG 溶液 2 滴
オクチルアルコール 1 滴

反応管 (B) に希釈したウレアーゼ (10 倍希釈) 溶液 1 ml および CHA 標準溶液 1 ml を入れ、37°C の恒温水槽で正確に 30 分間加温する。次にオクチルアルコール 2 滴、および尿素緩衝溶液 5 ml を加え、直ちに栓をして反応液を充分混合する。混合時の時間を読み、正確に 15 分後飽和炭酸カリウム溶液 10 ml 加え、素早く栓をしてから水流ポンプで通気 (通気量は、400 ml/min) し、アンモニアを補集管 (C) に補集する。45 分間後通気を終え、内 10 ml を 0.02 N 塩酸で滴定する。別に (B) 管にウレアーゼ溶液 1 ml、および 0.1 M トリス塩酸緩衝液 1 ml を入れ同様に操作し、空試験を行い滴定値を求める。

標準溶液で得た滴定値 (T_{CHA}) と空試験で得た滴定値 (T_U) から次式によりウレアーゼ阻害率 (%) を求める。

$$\text{ウレアーゼ阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{T_{CHA}}{T_U}\right) \times 100$$

III 結果および考察

1 検量線の測定

CHA の標準溶液 0.3 μg から 1.5 μg を反応管 (B) にとり、上記と同じ操作を行い、図 2 の

ごとく検量線を作った。阻害率 20% から 60% で直線性を示し、くりかえし精度も良かった。なお、飽和炭酸カリウム 10 ml 入れることによりアンモニアの生成は、完全におさえられた。

この滴定法は、ウレアーゼの活性値の測定法として、迅速度および精度の点で最も良く用いられる方法であり、比色法は、精度の点でやや落ちるとされている。³⁾

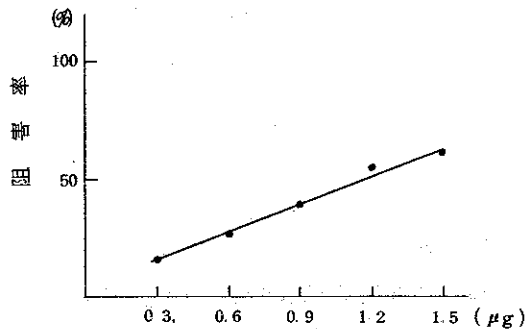


図 2. CHA の検量線

2 加温時間による CHA のウレアーゼに対する阻害率

CHA は、ウレアーゼが尿素を加水分解するのを阻害するが、ウレアーゼの活性を弱めるのにとどのぐらいの時間を要するか、CHA の濃度を 0.9 μg 、加温温度を 37°C で、以下上記と同じ操作を

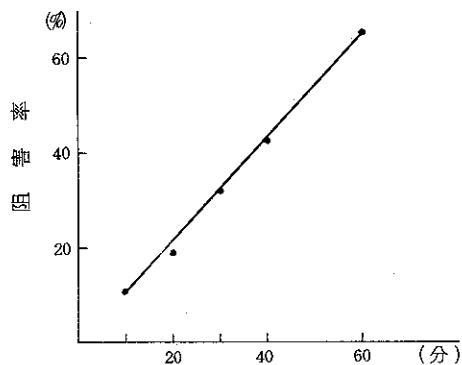


図 3. 加温時間による CHA のウレアーゼに対する阻害率

行い、加温時間によるCHAのウレアーゼに対する阻害率を調べた。図3に示したごとく加温時間に比例して、ウレアーゼを阻害しているのがわかり、この機構について、今後も検討したい。

3. 酵素反応によるアンモニアの生成量

ウレアーゼにより尿素が加水分解してアンモニアを生成するが、その生成量を図4に示した。アンモニア生成量は、時間に比例した。

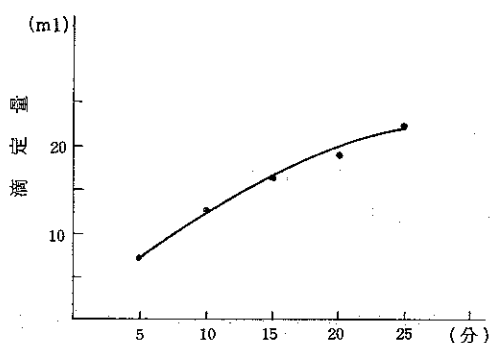


図4. 酵素反応によるアンモニアの生成量

4. 通気時間とアンモニア補集量の関係

尿素の加水分解により反応管(B)中に生じたアンモニアは、通気により、図5のごとく初めの10分間で80%が補集管(C)に移り、40分間で全量が補集された。なお毎分400mlの通気量では、1本の補集管で充分であった。

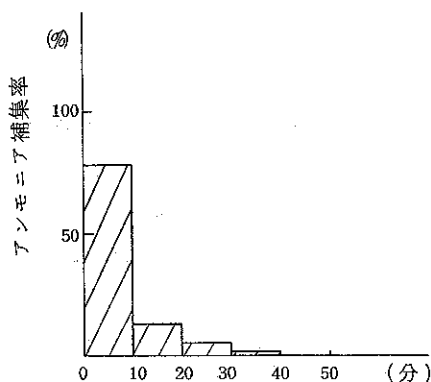


図5. 通気時間とアンモニア補集量の関係

IV. 結 語

- 1) ウレアーゼの測定法として、迅速度および精度の点で最も良いとされている滴定法を応用してCHAの定量をおこなったところ、良好な結果を得た。
- 2) CHAの検量線は、 $0.3 \mu\text{g}$ から $1.5 \mu\text{g}$ の範囲で直線を示した。
- 3) CHA $0.9 \mu\text{g}$ 、加温温度 37°C の条件で、ウレアーゼに対するCHAの阻害率を調べた結果、10分から1時間の範囲で直線性を示した。この機構については、今後検討を要する。

V. 参考文献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法(第2集)，14，(1977)。
- 2) 小橋恭一，竹部幸子，長谷純一．薬学雑誌，93，1564，(1973)。
- 3) 赤堀四郎：酵素研究法 第2巻，227，(1963)，朝倉書店。