

ポリオキシシン複合体分析法（農産物）

1. 分析対象化合物

・ポリオキシシン複合体（ポリオキシシンBの標準品を用いて力価を測定するが、ポリオキシシン複合体全体の力価が求められる。）

2. 装置

インキュベーター
ステンレス製円筒 $\phi 8 \text{ mm} \times H10 \text{ mm}$
ペトリ皿 $\phi 90 \text{ mm}$

3. 試薬、試液

塩酸、水酸化ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、硝酸ナトリウム、リン酸一カリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、メタノール、エタノール、アセトン、アニリン、しょ糖
乾杏 : 甘味料等、無添加品
寒天末 :
ガーゼ :
ガラス繊維 濾紙 : $\phi 47 \text{ mm}$
セルロース 濾紙 : $\phi 110 \text{ mm}$
石英ガラスウール : $6 \sim 10 \mu\text{m}$
ダウエックス50W-X4 : 100~200メッシュ
粒状活性炭 : カラムクロマト用
セルロース : カラムクロマト用

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

細切均一化した試料50 gを分取する。メタノール150 mLを加えて15分間攪拌（回転/150 rpm）し、減圧ろ過する。ろ過残渣をビーカーに移し、80%メタノール水溶液200 mLを加えて10分間攪拌後、減圧ろ過する。

濃縮液を希塩酸でpH2.0に調整し冷蔵庫に一夜放置した後、生じた沈殿物を自然ろ過によって除去して試料濃縮液とする。

2) イオン交換樹脂による分離・精製

試料濃縮液を、ダウエックス50W-X4カラムに流速1.5 mL/minで通す。その後、水60 mL（1.5 mL/min）、50%アセトン水溶液1000 mL（1 mL/min）、水60 mL（1.5 mL/min）を順次流す。0.3mol/L塩酸200 mL（0.7 mL/min）で通し、ポリオキシシンBを溶出する。溶出液のpHを水酸化ナトリウム溶液で6.0に調製する。

3) 活性炭による分離・精製

2) の試料溶液を、予めクロマト用活性炭を充填したカラムに、2 mL/min で通す。その後、同じ流速 (2 mL/min) で水50 mLと5%エタノール水溶液100 mLを流してから、あらかじめpH3.0に調整した40%アセトン水溶液200 mLを1.5 mL/minで通しポリオキシシンBを溶出する。

この溶出液をナス型フラスコにとり、浴温40°C以下のロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (乾固) して、80%エタノール水溶液10 mLに溶解する。

4) セルロースによる分離・精製

3) の試料溶液を、予めセルロースを充填したカラムに0.4 mL/minで通す。その後、同じ流速 (0.4 mL/min) で80%エタノール水溶液15 mLを流してから、あらかじめpH3.0に調整した50%アセトン水溶液150 mLを0.4 mL/minで通し、ポリオキシシンBを溶出する。

この溶出液をナス型フラスコにとり、浴温40°C以下のロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (乾固) して、生物検定用の最終試料溶液とする。

但し、最終試料溶液中のポリオキシシンBの濃度が0.5 AmBu/mLを超える場合には、適当量に希釈する。

5. 生物検定法

1) 試験菌液の調製

試験菌には*Alternaria mali* AKI-3を用いる。

試験菌を①継代保存用培地の寒天斜面に接種し、斜面から約20 cmの距離に設置した殺菌灯で紫外線を照射しながら22°Cで10~14日間培養して胞子を着生させる。

この斜面に滅菌水5 mLを加え白金耳でかきとり、ホモジナイザーのステンレスカップに移す (胞子のかきとり操作を3回繰り返す)。13,000 rpm/分で1分間ホモジナイズした後、滅菌した20 mL目盛付き試験管に4重層の滅菌ガーゼでろ過する。

ろ過残渣を滅菌水5 mLで2回洗い1~2時間放置して、胞子が沈降した後に上澄液を滅菌したピペットで除去して、全量10 mLの胞子浮遊液を調製する。

明瞭な阻止帯を得るために②検定用培地に加える胞子浮遊液は、常用標準ポリオキシシンB希釈液の0.25 AmBu/mL及び0.5 AmBu/mLの示す阻止円の直径がそれぞれ約20 mm、約25 mmになるように予め適当量を定めておく。

① 継代保存用培地

乾あんず煎汁液 *

寒天末 15 g

水を加えて1000 mLとする。

(滅菌後のpH:5.3)

*1 L三角フラスコに、5 mm角位に刻んだ乾あんず25 gをとり、水約700 mLを加えて1時間沸騰水浴に浸漬した後、2重層ガーゼでろ過する。

② 検定用培地

しよ糖	10 g
硝酸ナトリウム	0.25 g
リン酸一カリウム	2 g
塩化カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	0.5 g
硫酸第一鉄	0.01 g
寒天末	13 g
水を加えて1000 mLとする (滅菌後のpH:6.0)	

2) 寒天培地の調製

滅菌した検定用培地を46～47℃に冷却後、培地に孢子浮遊液の適当量を加えてよく混和する。この混和液10 mLを滅菌したペトリ皿に注ぎ、固化させて寒天平板を調製する。

この寒天平板は冷蔵庫に入れ、調製当日に使用する。

3) 常用標準ポリオキシンB希釈液の調製

200 mLのメスフラスコに約20 mgの常用標準ポリオキシンBを精秤する。滅菌した0.07 mol/Lリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し100 AmBu/mLの原液を調製する。原液を滅菌水で希釈して、2.0 AmBu/mL、1.0 AmBu/mL、0.5 AmBu/mL、及び0.25 AmBu/mLの希釈液を調製して力価検定の常用標準希釈液を調製する。

6. 試験法

試験に使用する力価試験用寒天平板数は、標準曲線は10枚、試料液は5枚を使用する。

(1) 日本抗生物質医薬品基準、一般試験法の標準曲線法に準じて実施するが、常用標準希釈液は等比的に以下の4段階の希釈とし、中心常用標準希釈液は0.5 AmBu/mLとする。

- ①常用標準希釈液 2.0 AmBu/mL
- ②常用標準希釈液 1.0 AmBu/mL
- ③常用標準希釈液 0.5 AmBu/mL
- ④常用標準希釈液 0.25 AmBu/mL

(2) 検定に使用するに第1、第3の円筒には常用標準希釈液の0.5 AmBu/mLを、残りの2個の円筒には試験品の0.5 AmBu/mL (推定値) 液をそれぞれ満たす。予めプログラム運転中の恒温器に収めて31℃に達してから30～40時間培養する。培養後、各々の阻止円の直径を0.1 mmまで正確に測る。

恒温器のプログラム運転

第1段階：4°Cで6時間（試験液を満たした後、約5時間冷却）

第2段階：31°Cで40時間

(3) 各濃度の常用標準希釈液の示す阻止円直径から標準曲線を用いて、各試料液の示す阻止円直径に、中心常用標準希釈液の阻止円直径より計算して求めた補正係数を乗じたものを試料液の阻止円直径とし代入し、各試料液中のポリオキシシンBの濃度を求める。

(4) 試料中のポリオキシシンBの残留量を、次式により求める。

$$\text{残留量(ppm)} = \frac{\text{Pu} \times 10 \text{ mL (最終試料液量)} \times \text{希釈倍数}}{\text{試料採取量(g)}}$$

Pu：標準曲線より求めた最終試料溶液のポリオキシシンBの濃度

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。