

ポリオキシンD亜鉛塩・生物検定法（農産物）

1. 分析対象化合物

・ポリオキシンD（ポリオキシンDの標準品を用いて力価を測定するが、ポリオキシンD亜鉛塩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、リン酸一カリウム、塩化ナトリウム、L-アスパラギン酸、メタノール、エタノール、アセトン、アニリン、しょ糖	：	残留農薬試験用
肉エキス	：	
ペプトン	：	
V-8ジュース	：	
寒天末	：	
馬鈴薯	：	
ガーゼ	：	
ガラス繊維 濾紙	：	$\phi 47 \text{ mm}$
セルロース 濾紙	：	$\phi 90 \text{ mm}$
石英ガラスウール	：	6~10 μm
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

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

細切均一化した試料100 gを分取する。メタノール150 mLを加えて15分間攪拌（旋回/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。0.3 mol/L塩酸200 mL（0.7 mL/min）で通し、ポリオキシンD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

pH6.0に調整した試料溶液を、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D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、残渣に0.07 mol/Lリン酸緩衝液 (pH6.0) を正確に10mL加えて溶解し、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Dの濃度が0.5 PsDu/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*Pellicularia filamentosa* ACI-1134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、28°Cで10~14日間培養して胞子を着生させる。

この斜面からニクロム鉤で菌核をかきとり、振とう三角フラスコに入れた②増殖用培地100 mLに移植し、28°Cで65~70時間振とう培養を行う。培養液を滅菌したガーゼでろ過し、ガーゼ上の菌糸体をホモジナイザーのステンレスカップに適当量採取し、滅菌した生理食塩水を約20 mL加え、14,000 rpmで3分間処理して、菌糸体を細分し、菌糸浮遊液を調製する。

明瞭な阻止帯を得るために③検定用培地に加える菌糸体の量は、常用標準品ポリオキシシンD希釈液の0.25 PsDu/mL及び0.5 PsDu/mLの示す阻止円の直径がそれぞれ約18 mm、約20 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

馬鈴薯煎汁液 300 g*1
しょ糖 20 g
寒天末 15 g
水を加えて1000 mLとする。

(滅菌後のpH:6.2)

*1馬鈴薯300 gを1cm角に切り、水1000 mLを加えてオートクレーブで110°C (0.5 kg/cm²) 30分間加温し、抽出滅菌後、ガーゼでろ過し、ろ液を使用する。

② 増殖用培地

しょ糖 30 g
肉エキス 5 g
ペプトン 5 g
塩化ナトリウム 5 g

水を加えて1000 mLとする
(滅菌後のpH:6.0)

③ 検定用培地

しよ糖 10 g
L-アスパラギン酸 0.5 g
リン酸一カリウム 0.5 g
V-8ジュース*2 20 mL
寒天末 13 g
水を加えて1000 mLとする

(滅菌後のpH:5.8)

*2ガーゼでろ過して使用する。

2) 寒天培地の調製

滅菌した検定用培地を46~47°Cに冷却後、細分した菌糸浮遊液を検定用培地に全量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。

3) 常用標準ポリオキシシンD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シンD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 PsDu/mLの原液を調製する。原液を滅菌水で希釈して、2.0 PsDu/mL、1.0 PsDu/mL、0.5 PsDu/mL、及び0.25 PsDu/mLの希釈液を調製して力価検定用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 PsDu/mLとする。

- ①常用標準希釈液 2.0 PsDu/mL
- ②常用標準希釈液 1.0 PsDu/mL
- ③常用標準希釈液 0.5 PsDu/mL
- ④常用標準希釈液 0.25 PsDu/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 PsDu/mLを、残りの2個の円筒には試験品の0.5 PsDu/mL (推定値) 液をそれぞれ満たす。この平板を直ちに28°Cの恒温器に収めて20時間培養した後、各々の阻止円の直径を0.1 mmまで正確に測る。

(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Dの濃度を求める。

(4) 試料中のポリオキシシンD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D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。