

プロポリス中の残留テトラサイクリン系抗生物質の分析法

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	藤田, 和弘 伊藤, 嘉奈子 高山, 正彦 丹野, 憲二 村山, 三徳 斎藤, 行生
巻/号	37巻4号
掲載ページ	p. 222-225
発行年月	1996年8月

ノート

プロポリス中の残留テトラサイクリン系抗生物質の分析法

(平成7年12月21日受理)

藤田和弘*¹ 伊藤嘉奈子*¹ 高山正彦*¹
 丹野憲二*² 村山三徳*³ 斎藤行生*³

Biological Method for Residual Tetracyclines in Propolis

Kazuhiro FUJITA*¹, Kanako ITO*¹, Masahiko TAKAYAMA*¹, Kenji TANNO*²,
 Mitsunori MURAYAMA*³ and Yukio SAITO*³

(*¹)Japan Food Research Laboratories Nagoya Branch: 4-5-13, Osu, Naka-ku, Nagoya 460, Japan; *²)Japan Food Research Laboratories Head Office and Laboratory: 52-1, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151, Japan; *³)National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan)

A biological method for residual tetracyclines (TCs) in propolis was evaluated. Oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) were extracted from a sample with 5% citric acid containing 0.001 M EDTA-2Na. The extract was washed with hexane and diethyl ether, followed by a Sep-pak Plus PS2 cartridge clean-up and TCs adsorbed in the cartridge were eluted with methanol. The eluate was concentrated to dryness, and the residue was redissolved in a phosphate buffer (pH 4.5) and treated with polyamide resin to remove antibacterial substances originating from propolis. The cup-plate method was employed for quantitative determination, and microbioautography for identification of TCs. The recoveries were 97.6% (OTC), 92.7% (TC) and 86.3% (CTC), and the detection limits were 0.1 µg/g (OTC, TC) and 0.02 µg/g (CTC).

(Received December 21, 1995)

Key words: プロポリス propolis; テトラサイクリン系抗生物質 tetracycline; 微生物学的方法 microbioassay; セップパックプラス PS2 カートリッジ Sep-pak Plus PS2 cartridge; ポリアミド樹脂 polyamide resin; マイクロバイオオートグラフィー microbioautography

緒言

近年の健康食品ブームにより、養蜂関連食品としてはちみつのみならずローヤルゼリー、花粉、プロポリスも多数販売されるようになってきている。一方、養蜂の際に腐蝕病の予防薬として汎用される¹⁾テトラサイクリン系抗生物質 (TCs) の養蜂関連食品への残留が懸念される。はちみつ中の TCs の分析法に関してはすでに微生物学的方法²⁾、HPLC³⁾、TLC⁴⁾ などにより検討がなされている

が、ローヤルゼリー、花粉、プロポリスについては分析法の報告はない。また、微生物学的方法においてはローヤルゼリー中の 10-ヒドロキシデセン酸、プロポリス中のフラボノイドなどの抗菌性成分^{5), 6)} の影響で、その分析は困難であった。

著者らは、市販のプロポリスを用いて、スチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジの Sep-pak Plus PS2 及びポリアミド樹脂により抗菌性成分の除去を試み、良好な結果が得られたので報告する。

実験材料

1. 試料

市販のブラジル産プロポリスを用いた。

*¹ (財)日本食品分析センター名古屋支所: 〒460 名古屋市中区大須 4-5-13

*² (財)日本食品分析センター東京本部: 〒151 東京都渋谷区元代々木町 52-1

*³ 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2. 試験菌株

円筒平板法には *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (以下 *B. mycoides* と略称) を, マイクロバイオオートグラフィーには *Bacillus cereus* ATCC 19637 (以下 *B. cereus* と略称) を用いた。

3. 試薬など

標準品: 動物医薬品検査所検定品の常用標準オキシテトラサイクリン (OTC), テトラサイクリン (TC) 及びクロルテトラサイクリン (CTC) を使用した。

標準溶液: 各標準品を 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように滅菌水で調製し, 使用に際しては円筒平板法ではリン酸緩衝液で, マイクロバイオオートグラフィーではメタノールで適宜希釈した。

その他の試薬: 和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

培地: ポリペプトン, 細菌用肉エキス, 寒天, Antibiotic Medium 8 は, それぞれ日本製薬(株)製, 極東製薬(株)製, BBL社製, Difco社製を用いた。また, 孢子形成用培地, 試験用培地, 孢子浮遊液, 定量用平板培地の調製などは, 丹野らの方法⁷⁾に準じた。

リン酸緩衝液: リン酸一カリウム 13.6 g を滅菌水 1,000 ml に溶解し, 水酸化カリウム溶液で pH を 4.5 に調整した。

吸着カラム: Waters社製 Sep-pak Plus PS2 及び Sep-pak Plus C18 は, メタノール 10 ml, 水 10 ml 及び飽和 EDTA-2Na 溶液 5 ml を順に流して調製した。(株)オルガノ製アンバーライト XAD-2 樹脂は, メタノールで洗浄後, 十分に水洗し, この樹脂 5 ml を 10 mm i.d. \times 300 mm のガラス製カラムに充てんし, 飽和 EDTA-2Na 溶液 20 ml を流して調製した。

ポリアミド樹脂: 和光純薬工業(株)製薄層クロマトグラフ用ポリアミド B-0 を用いた。

TLC プレート: E. Merck 社製セルロースプレート (Art. 5716) にリン酸緩衝液を均一に噴霧した後, 風乾して使用した。

展開溶媒: 1-ブタノール-酢酸-水 = 10 : 1 : 2 (A) 及びクロロホルム-メタノール-リン酸緩衝液 = 60 : 20 : 5, 下層 (B) を使用した。

実験方法

1. 試料の調製

試料をコーヒーミルにより, 粉碎して供試した。

2. 試験溶液の調製

試料 5 g を 250 ml の遠心管にはかりとり, 0.001 M EDTA 含有 5% クエン酸溶液 100 ml とヘキサン 100 ml を加え, 10 分間振とう抽出を行った。遠心分離 (3,500 rpm, 10 分, 5° 以下同様) した後, 水層をろ紙でろ過してろ液 50 ml を分取し, ジエチルエーテル 100 ml を加えて 5 分間振とうした。遠心分離した後水層を分取し, 減圧下 30° で残留するジエチルエーテル

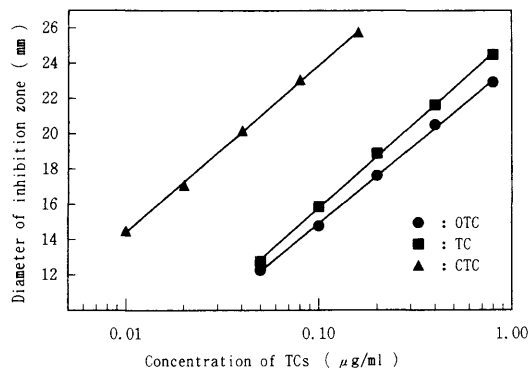


Fig. 1. Calibration curve for TCs

を留去して Sep-pak Plus PS2 に負荷した。水 30 ml でカートリッジを洗浄した後, メタノール 10 ml で TCs を溶出し, 溶出液をメタノールで 20 ml に定容してその 10 ml を減圧下 40° で濃縮乾固した。残留物をリン酸緩衝液 2.5 ml に溶解し, ポリアミド樹脂 0.05 g を加えて 5 分間振とうした後, メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過してろ液を円筒平板法用試験溶液とした。一方, 残りの 10 ml は同様に濃縮乾固した後, 残留物をメタノール 0.25 ml に溶解し, マイクロバイオオートグラフィー用試験溶液とした。

結果及び考察

1. TCs の標準曲線

標準曲線の一例を Fig. 1 に示した。標準溶液を用いた場合の検出限界は, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (OTC, TC) 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CTC) であり, 各標準曲線は 0.05~0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (OTC, TC), 0.01~0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CTC) の濃度において良好な直線性が得られた。また, 検出感度は TC と OTC はほぼ同等であり, CTC はそれらの 5 倍程度であった。

2. 吸着カラムの検討

TCs は 2 価の金属イオンとキレートを生成することが知られている⁸⁾。そのため, これまで TCs の分析には, 金属イオンの影響を受けにくいスチレンジニルベンゼン共重合体樹脂である XAD-2⁷⁾ や簡便性の面から EDTA 処理をした C18 系のカートリッジ⁹⁾ が用いられてきた。今回これらのカラムと最近農薬の分析¹⁰⁾ で使用されているスチレンジニルベンゼン共重合体のカートリッジ Sep-pak Plus PS2 との比較を, 米田らの方法¹¹⁾ に準じて HPLC により行った。

その結果, Table 1 に示すように Sep-pak Plus PS2 は, 添加濃度 OTC, TC 2.5 μg , CTC 12.5 μg において, 回収率がそれぞれ 98.1%, 98.5%, 95.1% であり, 残留分析を行ううえで吸着カラムとして適していることが確認された。

Sep-pak Plus PS2 は, 充てん剤の基材がスチレンジニルベンゼン共重合体であり, カートリッジに残存す

Table 1. Comparison of Pre-treatment Columns on the Recovery of TCs

Column	Recovery* (%)		
	OTC	TC	CTC
Sep-pak Plus PS2	98.1	98.5	95.1
Sep-pak Plus C18	81.1	77.8	75.0
XAD-2	84.6	85.4	77.9

* Standard solution of TCs containing 2.5 μg of OTC, TC and 12.5 μg of CTC was applied to the column duplicatedly.

Table 2. Comparison of Extraction Solvents for TCs Using CTC

Extraction solvents	Recovery* (%)
Macllvain buffer (pH 4.0) containing 0.01 M EDTA	59.7
0.1 M Citrate buffer (pH 4.0)	44.1
Citric acid soln. (0.1%)	37.9
Citric acid soln. (0.5%)	47.1
Citric acid soln. (2.0%)	58.2
Citric acid soln. (5.0%)	78.2
Citric acid soln. (2.0%) containing 0.001 M EDTA	63.5
Citric acid soln. (5.0%) containing 0.001 M EDTA	87.7

* CTC standard solution was spiked in each sample at a level of 1 $\mu\text{g}/\text{g}$.

る金属イオンが少なく、TCsと結合しやすいシラノール基も存在していない。そのため、他の充てん剤よりも回収率が優れており、またカートリッジタイプであるため簡便性にも優れていると考えられた。

3. 抽出溶媒の検討

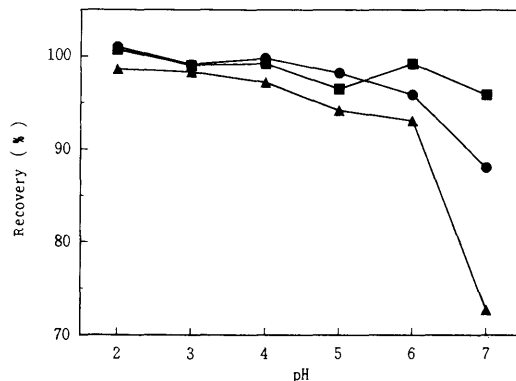
実験方法 2. 試験溶液の調製に従い 8 種類の抽出溶媒について、TCs の中で比較的不安定である CTC⁽¹²⁾ を用いて、その抽出効率を調べた。その結果、Table 2 に示したように EDTA-2Na 含有 5% クエン酸溶液が最も良好な結果を示した。

4. ポリアミド樹脂の精製条件の検討

プロポリス中にはフラボノイドなどの抗菌性成分が含まれており⁽⁶⁾、低濃度に残留する TCs を検出するにはそれらの影響を除去する必要があった。

ポリアミド樹脂は、スルホネート及びカルボキシレート有する合成着色料の分析⁽¹³⁾ に使用されているように酸性基と結合する性質を有する。一方、フラボノイドはフェノール性的水酸基を有することから、これらの除去にはポリアミド樹脂が有効ではないかと考えられた。

各 pH の混合標準溶液 (OTC, TC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CTC 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 5 ml について検討したところ、Fig. 2 に示す

**Fig. 2.** Effect of pH on the recoveries of TCs from polyamide resin

●—●: OTC; ■—■: TC; ▲—▲: CTC

Table 3. Recoveries of TCs by the Present Method

Antibiotics	Spiked ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Recovery*1 (Av. \pm SD) %
OTC	0	ND*2
	0.1	detectable*3
	1	97.6 \pm 2.6
TC	0	ND
	0.1	detectable
	1	92.7 \pm 2.7
CTC	0	ND
	0.02	detectable
	0.2	86.3 \pm 1.4

*1 The average of 3 replicates

*2 Inhibition zone was not formed.

*3 Inhibition zone was recognized.

ように OTC 及び TC はポリアミド樹脂にほとんど吸着されなかったが、CTC は pH が 6 を越えると吸着されることが示唆された。次に、試験溶液を用いて pH 4.5 でポリアミド樹脂による精製を行ったところ、抗菌性成分は除去され、阻止円の形成は見られなかった。

この結果より、pH 4.5 のリン酸緩衝液でポリアミド樹脂による精製を行うことにより、プロポリスに含まれる抗菌性成分の除去が可能であり、かつ TCs の回収率に影響を及ぼさないと判断された。

5. 添加回収試験及び検出限界

添加回収試験結果を Table 3 に示した。OTC, TC (1 $\mu\text{g}/\text{g}$), CTC (0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$) の平均回収率はそれぞれ 97.6%, 92.7%, 86.3% であり、無添加試料の場合には阻止円形成が認められなかった。

また、OTC, TC 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$, CTC 0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加して同様に回収試験をした場合、それぞれの阻止円

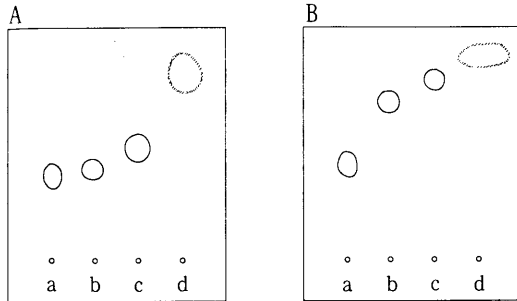


Fig. 3. Microbioautograms of TCs and blank sample

a: OTC (10 ng), b: TC (10 ng), c: CTC (2.5 ng), d: blank sample

Solvent system A: 1-BuOH-AcOH-water (10:1:2), B: CHCl_3 -MeOH-0.1 M phosphate buffer (pH 4.5) (60:20:5, lower layer)

が形成され十分に検出可能であった。従って本試験法の検出限界は、OTC, TC で $0.1 \mu\text{g/g}$, CTC で $0.02 \mu\text{g/g}$ と判断した。

6. マイクロバイオオートグラフィー

検出される試料中の抗菌性成分の確認のために Kline らの方法¹⁴⁾ に準じてマイクロバイオオートグラフィーを実施した。

TCs について、逆相系プレートを用いて分離している報告⁴⁾があるが、展開溶媒として抗菌性のあるシュウ酸を使用していることから、本試験ではセルロースプレートを用いることとした。

その結果、Fig. 3 に示すように丹野ら⁷⁾が用いた展開溶媒 A では、OTC と TC の分離が不十分ではあるが、これらと CTC の分離は十分であり、岡山ら²⁾が用いた展開溶媒 B では、TC と CTC の分離が不十分であるが、これらと OTC の分離は十分であった。従って、この 2 種の展開溶媒を用いることにより、TCs の分別が可能であった。また、試料由来の抗菌性成分の Rf 値は TCs と異なり、TCs には影響しなかった。

また、試験菌は、*B. mycoides* の場合抗菌スポットが不明瞭であったため、より集落の形成が密である *B. cereus* で行ったところ、良好な結果が得られた。

なお、本試験法の試料中の最小検出量は、 $0.1 \mu\text{g/g}$ (OTC, TC) 及び $0.02 \mu\text{g/g}$ (CTC) であった。

結 論

市販のブラジル産プロポリスを用いて残留 TCs の分析法を検討し、以下の結論を得た。

1. 精製に用いる吸着カラムを検討した結果、スチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジの Sep-pak Plus PS2 が有効であった。

2. 抽出溶媒を検討したところ、 0.001 M EDTA-2 Na 含有 5% クエン酸溶液が最適であった。

3. 抗菌性成分の除去には、ポリアミド樹脂が有効であった。

4. 最適条件にて添加回収試験を試みた結果、平均回収率は 97.6% (OTC), 92.7% (TC), 86.3% (CTC) であった。また、検出限界は $0.1 \mu\text{g/g}$ (OTC, TC) $0.02 \mu\text{g/g}$ (CTC) であった。

5. マイクロバイオオートグラフィーにより、TCs の分別が可能であった。このときの最小検出量は、 $0.1 \mu\text{g/g}$ (OTC, TC), $0.02 \mu\text{g/g}$ (CTC) であった。

文 献

- 1) 中澤裕之, 藤田昌彦, 堀江正一, 竹葉和江: 畜産の研究 **45**, 135~139 (1992).
- 2) 岡山明子, 梅迫誠一, 山本安純, 青木喜也, 岩本サカエ, 小野泰美, 西井保司: 奈良県衛生研究所年報 **21**, 114~116 (1986).
- 3) Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K.-I., Suzuki, M.: J. Chromatogr. **400**, 253~261 (1987).
- 4) 岡 尚男, 猪飼誉友, 早川順子, 原田健一, 益田勝吉, 鈴木真言, 姫井るり子, 堀江正一, 中澤裕之: 食衛誌. **34**, 517~523 (1993).
- 5) 越後多嘉志, 松香光夫: フレグランスジャーナル **83**, 13~19 (1987).
- 6) 水野瑞夫, 飯沼宗和, 加藤久幸: 同上 **83**, 20~28 (1987).
- 7) 丹野憲二, 岡崎真紀子, 斎藤文一, 内部博泰: 食衛誌. **23**, 259~264 (1982).
- 8) 石野正蔵, 坂口武一, 森本 功, 興津知明: 薬誌. **101**, 118~124 (1981).
- 9) 岡 尚男, 宇野圭一, 原田健一, 鈴木真言: 同上 **103**, 531~537 (1983).
- 10) 大谷仁己, 林 治裕, 秋山重太郎: 水環境学会誌 **18**, 148~151 (1995).
- 11) 米田 豊, 古城典子, 安藤良吉: 食衛誌. **30**, 42~47 (1989).
- 12) 二宮幾代治編: “家畜の抗生物質と化学療法” p. 56~65 (1976) 養賢堂.
- 13) 角田光淳, 井上典子, 青山光雄, 長谷部昭久: 食衛誌. **28**, 473~479 (1987).
- 14) Kline, R. M., Golab, T.: J. Chromatogr. **18**, 409~411 (1965).