九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

クロルテトラサイクリンの化学的定量法 : 1.酸比色法の改良(クロルテトラサイクリンによる魚の鮮度保持に関する研究-I)

米, 康夫
九州大学農学部水産学教室

https://doi.org/10.15017/21571

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 19 (1), pp.141-149, 1961-11. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

クロルテトラサイクリンの化学的定量法
1. 酸比色法の改良*

(クロルテトラサイクリンによる魚の鮮度保持に関する研究－I)

米　康夫

Improvement of Levine's acid colorimetric method for determination of chlortetracycline
(Studies on keeping quality of fish by use of chlortetracycline-I)

Yasuo Yone

化学的定量法は比較的容易に操作でき，且つ迅速に実施できるので，CTC を含有する氷および水溶液中の CTC を定量するに適している．しかし CTC 氷には CTC の外にカーボキシメチル繊維素，脱塩素剤および食塩などを添加するので，蒸溜水や水道水にとかした CTC の定量がうまくできる方法であつても，この種の氷の場合に良い方法とは断定できない．因つてまず従来発表されている数多くの化学的定量法が CTC 氷の定量に適しているか否かを吟味し，次いでその結果に基づき酸比色法を氷中の CTC を定量するに適するように変改した．

A. 定量法の吟味

本研究では FDA および厚生省が公定法として採用している塩化第二鉄による比色法,[1] iso-CTC の螢光による方法[2]および酸比色法,[3] また Upham 氏らが CTC 氷の定量に用いた紫外部吸光法[4]および坂口氏ら[5] の CTC とトリウムのキレート化合物の吸光度による方法が氷中の CTC を定量するに適するか否かを吟味した．塩化第二鉄による CTC の発色はきわめて弱く，CTC 氷の場合のように 5 mcg/cc 以下の CTC を定量するには不適当であつた．その他の定量法もすべてそれぞれ欠点があつた．

研究結果および考察

1) iso-CTC の螢光による方法[2]

本法は厚生省が Levine 氏らの方法[3] を氷中の CTC 定量に適するように変改した方法で，アルカリ性で加熱して生ずる iso-CTC の螢光を利用した方法である．まず本法で水溶液中の CTC を定量したところ紫外線照射下の iso-CTC の螢光は Fig. 1 に示すよ

* 九州大学農学部水産化学教室業績．

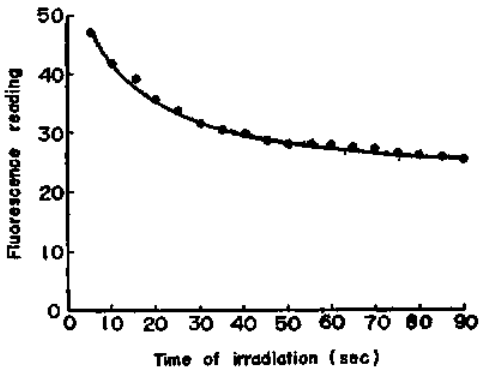

Fig. 1. The change in fluorescence of iso-CTC prepared by Japan FDA method[2] on irradiation with the excitation light of 360 mμ.

Table 1. A comparison between values for CTC obtained when melted ice, tap water and distilled water solutions of CTC were analyzed by Japan FDA method and the cylinder plate method.

	Japan FDA method[2]	Cylinder plate method
CTC in distilled water	4.4	4.6
	4.5	3.8
	4.0	4.0
	4.1	4.6
	1.8	1.0
	1.3	0.8
CTC in tap water	2.7	4.4
	1.8	3.3
	0.5	1.0
CTC in ice*	2.3	4.7
	2.3	4.7
	2.4	4.3
	2.3	3.9
	3.5	2.2
	2.5	2.5
	1.1	1.4

* The ice was so prepared that it would contain CTC (5 ppm), carboxymethylcellulose (15.2 ppm), $NaHSO_3$ (1.9 ppm), and NaCl (77.9 ppm).

うに不安定であつた．しかし1分経過後の変化は比較的緩慢であつたので，次に3分経過後測定の条件で水溶液および氷中の CTC 量を定量した．この方法による値と微生物検定値との比較は Table 1 に示す通りで，蒸溜水中では両法による値が比較的よく一致したが，井戸水および氷中ではこの変改法による値の大半は，微生物検定値より低かつた．この理由は恐らく市水中の金属とキレートした CTC は，厚生省の方法では完全に iso-CTC に変化しないと考え，次のように吟味してみた．すなわち蒸溜水および市水にそれぞれ 4 ppm 溶解した CTC 液に n/5 EDTA (ethylendiaminetetraacetic acid Na_2 salt) を加えたところ，EDTA を加えない市水中の CTC 量は蒸溜水中のそれの約 1/4 であつたが，市水 100 cc 中に n/5 EDTA を 1 cc 加えた場合の CTC 量は蒸溜水中のそれと全く同じ値を示した (Table 2).

Table 2. The effect of sodium salt of ethylendiaminetetraacetic acid on Japan FDA value for CTC assayed on a tap water solution.

cc of N/5 EDTA added to 100 cc of 4 ppm CTC solution	Fluorescence reading	
	In distilled water	In tap water
0	82.5	20.0
1	89.0	89.0
1.5	86.7	87.5
2	88.0	86.9
2.5	86.5	87.8

2) 紫外部吸光法[4]

この方法は Upham 氏らが氷中の CTC 定量に用いたもので，融解水を 0.05 n HCl 液として 370 mμ の吸光度を測定し CTC 量に換算する方法である．本法で氷中の CTC を定量した値と pad plate assay 法でえた値とを比較した結果を Table 3 に示した．紫外部吸光法による値は微生物検定値よりきわめて高い値を示した．この原因は活性塩素による

Table 3. A comparison between values for CTC in ice determined by the Upham et al's method,[4] the Sakaguchi et al's method[5] and the pad plate microbiologic method.
The ice possesses the same composition as given in Table 1.

Microbiologic method	Sakaguchi et al's method		Upham et al's method
	Before filtration	After filtration	
mcg/cc	mcg/cc	mcg/cc	mcg/cc
2.6	4.4	3.3	
2.0	4.2	3.7	
1.4	5.0	3.2	
1.6	2.7	2.0	
3.3	5.1		
2.9			5.4
3.4			5.8
3.5			5.8
2.6			4.3
3.1			5.7

CTC の破壊生産物が 380 mμ に最大吸収部をもつので，おそらくそのような CTC の分解物や溶けた氷水中の微細な浮遊物質が吸光度に影響したためであろう．

3) 坂口氏らのトリウム法[5]

この定量法は CTC のトリウム・キレート化合物の吸光度による方法である．氷中の CTC 量をトリウム法によつて定量した値を微生物検定値と比較すると，Table 3 に示すように前者は微生物検定値よりも常にはるかに高い値を示した．なお坂口氏らの方法ではトリウム試薬の添加後に濾過してから定量すると，濾過前の値に比べてかなり低くなるが，微生物検定値よりもまだかなり高い値を示した．坂口氏らの方法ではキレートの吸光度を測定しているので，微細な浮遊物の存在は見かけの値を高くするのが当然であり，濾過により値が低下したのもこのような理由であろう．

4) 酸比色法

蒸溜水および井戸水中に CTC を 5 ppm の濃度になるように溶解し，14～19°C に放置した場合の CTC 量の経日変化を Levine の方法[3] に従い定量し，他方 *Bac. cereus* No. 5 を用いた pad plate assay 値と比較した．その結果は Table 4 に示すように原法による定量値と pad plate assay 値との間には殆んど差がなかつた．

Table 4. A comparison between values for CTC estimated by the acid colorimetric method* and the pad plate assay method.†

Samples	Method	CTC, ppm		
		Initial	24 hrs.	72 hrs.
CTC in distilled water	acid	5.4	5.2	4.0
	pad	5.2	4.5	4.0
CTC in tap water	acid	5.2	5.1	2.8
	pad	4.8	3.1	2.8

CTC solutions were left standing at 14-19°C. * Levine's method.[3]
The absorbancy was measured by Beckman spectrophotometer.
† Test organisms used was *Bacillus cereus* #5.

B. 酸比色法の改良

A項の研究で Levine の酸比色法[3]による水中の CTC 定量値は微生物検定値と比較的によく一致し，また容易に CTC の概略値がえられることを知つた．しかし Levine の酸比色法では小量（2 cc）の試料をとり，光電比色計を用いて測定するため，CTC 水中のような低濃度（5 mcg/cc 以下）の CTC 定量の場合には，定量値の精度が悪い．因つて本研究では基礎的定量条件を吟味し，水中の CTC を定量できるように Levine 法を変改した．

変改定量法

a) 試　　薬

20 % 塩酸：約 20 % 工業用あるいは試薬1級品の塩酸を常圧で蒸溜すれば 20 % のものがえられるが，初溜分を除かねばならない．特級の試薬以外は遊離塩酸を含むので，この蒸溜精製は省略しえない．

標準 CTC 液：CTC 80 mg（塩酸塩として 86 mg）を蒸溜水にとかし 100 cc に定容する．この液を 1 cc ずつ小型試験管に分注し，ポリエチレン膜で蓋をして凍結し保存する．凍結状態では1カ月間効力の低下はないが，融解したものは再び凍結保存してはならない．定量時に小試験管の内容を蒸溜水で稀釈して 100 cc に定容し，8 mcg/cc の液をつくる．更に蒸溜水で稀釈して 6, 5, 4, 3, 2 および 1 mcg/cc の標準系列をつくる．

b) 試料の調製

氷をビーカーあるいはポリエチレンの袋に入れ，流水中で融解し蒸溜水で 8 mcg/cc 以下の CTC 濃度になるように稀釈する．試料が濁つている場合はそのまま濾過することなく，定量操作にしたがつて塩酸酸性で加熱処理した後に濾過する．

c) 盲検液の調製

標準用盲検液としては蒸溜水を用いる．試料用盲検液には CTC を含まない製氷用水を用いるべきであるが，止むを得ざる場合には試水の成分組成に近い水道水を用いればよい．

d) 操　　作

50 cc の試料，標準液および盲検液を 100 cc の三角フラスコあるいは 100 cc のメスフラスコにとり，これにそれぞれ 20 cc の 20 % 塩酸を加える．よく振盪した後すべてのフラスコをなるべく同時に 80°C の湯煎に入れて約 20～30 分間（フラスコ内の液温が 80°C に達してから 5～15 分間）加熱したのちにとり出す．直ちに流水で冷却し，蒸溜水で 100 cc に定容したのち分光光度計の長吸収管（長さ 100 mm）を用い 440 mμ の吸光度を読む．まず標準 CTC 液の濃度と吸光度との関係を示す標準直線を描いておく．次に試料の吸光度より盲検液の吸光度を差し引いた値を求め，この値に相当する CTC 量を標準直線より求める．

実　験　の　部

1) 加熱温度および加熱時間

Levine 法では沸騰水中で5分間加熱したのち，直ちに冷却するように指示している．因つて本研究では 5 mcg/cc の CTC 液 50 cc に 17.7 cc の蒸溜塩酸を混和してから沸騰

水中で加熱し，加熱後 3, 5, 8, 12 および 17 分の吸光度を測定したところ吸光度の変化が激しく，最高吸光度を示したのは短時間であつた．多数の試料を測定する場合は 5 分間加熱という条件は厳守し難いので，その測定値は不定となる恐れがある．因つて 80°C の湯煎中で加熱したところ加熱 12 分後に最高吸光度を示し，27 分後もほとんど同じ値を示した (Fig. 2)．次に初液温の異なる試料を 80°C の湯煎中で加熱した場合の液温および吸光度の変化をみたところ，初液温 20°C の試料は加熱後 15 分から 30 分までの間，また初液温 6°C の試料は加熱後 25 分から 35 分までの間ほとんど一定の最高吸光度を示した (Fig. 3)．また Figs 2 および 3 のいずれの実験でもフラスコ内の液温が 80°C に達する時間と，最高吸光度に達する時間がほとんど同じであつた．以上の結果から著者は加熱温度を 80°C とし，加熱を液温が 80°C に達してから更に 5～15 分加熱を続け，約 20～30 分の間に中止するように決めた．

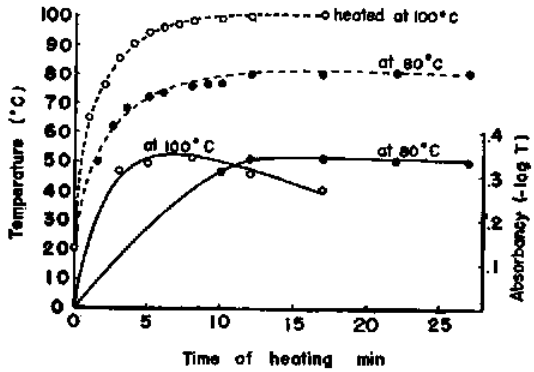

Fig. 2. Change in the absorbancy at 440 $m\mu$ with the time of heating at 80°C or 100°C.

To 50cc of CTC solution were added 17.7 cc of a distilled HCl. The absorbancy was measured with Beckman spectrophotometer. Temp. of sample, ·····, absorbancy, ——.

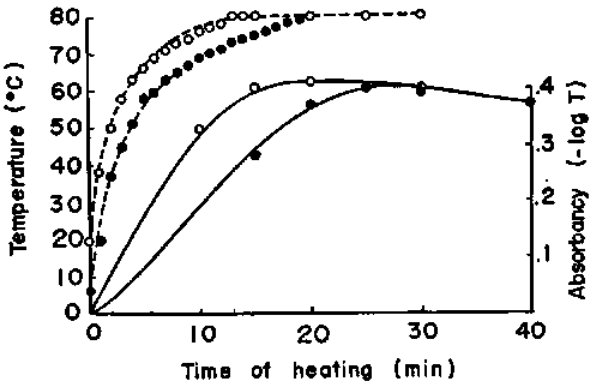

Fig. 3. Change in temperature and absorbancy of the sample having different initial-temperatures with the time of heating at 80°C.

20°C at start, ○; 6°C at start, ●. Temp. of sample, - - -; absorbancy, ——.

2) 塩酸の純度

CTC は遊離塩素で破壊されるので，定量の際に使用する塩酸中に遊離塩素が存在したならば，過小な測定値が得られる懸念がある．したがつて本研究では 1.2 ppm の遊離塩素を含む工業用塩酸および 0.3 ppm の遊離塩素を含む塩酸（試薬 1 級品）を用いて，既知濃度の CTC 液を anhydro-CTC として吸光度を測定した結果，遊離塩素を含む塩酸を用いると定量値は常に小さく，また遊離塩素量が多いほど CTC 量が小さくなつた．しかし遊離塩素を含む塩酸でも蒸溜すれば遊離塩素を除去できるので誤差はみられなかつた．因つて蒸溜塩酸（20 %）を用いることを推奨したい (Table 5)．

3) 塩酸添加量

Table 5. The effect of active chlorine on acid colorimetric method.

HCl	CTC, ppm			
	10	7.5	5.0	2.5
Guaranted reagent grade	10.2	8.1 7.8	5.2 5.0	2.7
Regular reagent grade*	9.3	6.6	4.1	1.5
Grade for industrial use†	8.2	5.6	3.0	0.8
Distilled		7.9	5.2	

* Regular reagent grade contained 0.3ppm active Cl_2. † 1.2 ppm active Cl_2.

Levine 法では 2 cc の試料に 5 cc の 2 n 塩酸を添加して加熱するように指示している．したがつて 50 cc の試料と蒸溜塩酸を用いる本法では，17.7 cc の蒸溜塩酸を添加しなければならない．しかしなるべく蒸溜塩酸を採取しやすい量にするために塩酸濃度と吸光度との関係を検討した．その結果は Table 6 に示すように，17.7 cc より 25 cc までの添加量では同じ最高吸光度を示した．因つて 50 cc の試料に 20 cc の蒸溜塩酸を添加することにした．

4) CTC 濃度と吸光度との関係

以上の実験で基礎条件が決定したので，次に CTC 濃度と本法でえた吸光度との関係を

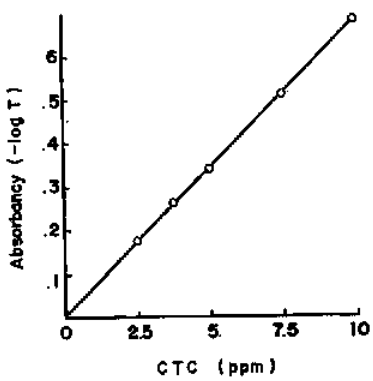

Fig. 4. The relation between CTC concentration and absorbancy of anhydro-CTC.

Table 6. Optimum amount of 20% HCl required for maximum yield of anhydro-CTC.

cc of 20% HCl added to 50 cc sample	Absorbancy, -log T
10	0.330
15	0.330
17.7	0.333
20	0.332
25	0.333
30	0.323

Table 7. Absorbancy (-log T) of anhydro-CTC yield by the hot acid treatment of CTC in distilled water or in well water.

mcg/cc CTC	Distilled water	Well water
10	0.61	0.62
7.5	0.43	0.43
5	0.285	0.290
2.5	0.125	0.130

みた．蒸溜水および井戸水に種々の量の CTC を溶解した試料を本法によつて定量したところ，Table 7 に示すように蒸溜水と井戸水の間には差がなかつた．また Fig. 4 に示すように CTC 濃度と吸光度との関係は Lambert-beer の法則にしたがうことが明らかである．

5) CTC および CTC 分解物の吸光曲線

水中の CTC 分解物として考えられるものに，iso-CTC，遊離塩素および 3 価の鉄イオ

ンによる酸化分解物などがある．これらの分解物の塩酸酸性で加熱したものが 440 mμ の光を吸収するならば，氷中の CTC の定量値に誤差を生ずる原因となる．したがつてこれらの分解物にもとづく誤差の程度を検討してみた．この場合に用いた iso-CTC は 5 mcg/cc の CTC 液 10 cc に 2 cc の pH 7.5 の燐酸緩衝液を加え，煮沸水中で 5 分間熱分解したものであり，遊離塩素および Fe^{3+} による CTC の酸化分解液は，1000 mcg/cc の CTC 液 5 cc に 6 ppm の Cl_2 を含む水，あるいは 20 ppm の Fe^{3+} を含む塩化第二鉄液を加え 1 L に定容したもので CTC は完全に分解されていた．これらの CTC 分解液および CTC 液を本法で発色し吸光曲線を描くと，Fig. 5 に示すように anhydro-CTC の吸光曲線と各 CTC 分解物のそれとは非常に異なり，anhydro-CTC の最大吸収波長である 440 mμ では，Fe^{3+} による分解物を除き他の分解物はほとんど吸光を示さなかつた．Fe^{3+} による分解物の吸光値には，添加した Fe^{3+} 自身の 440 mμ における多少の吸光が加わつている．一般の製氷用水（水道水）中には Fe が 1 ppm 以上も含まれることはないので，Fe による誤差はほとんどないといえる．

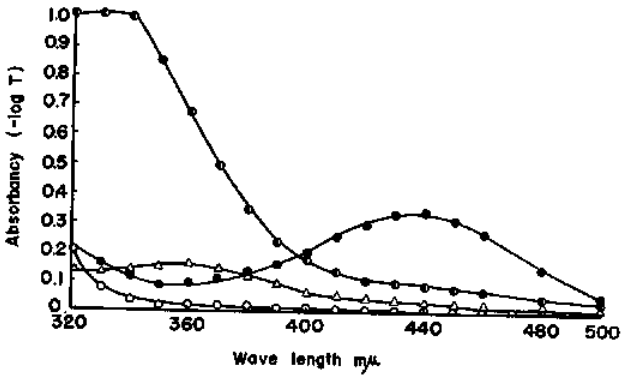

Fig. 5. Absoption curves for CTC and degraded CTC. ● anhydro-CTC, ○ iso-CTC, △ degraded CTC with Cl_2, ◐ degraded CTC with Fe^{3+}.

6）本法および pad plate assay 法による氷中の CTC 定量値の比較

まず初めに CTC 16.4 %，Carrageen 59.7 %，Ca-acetate 23.9 % の組成をもつ氷用 CTC 剤を用いてつくつた氷中の CTC 量を本法および pad plate assay 法で定量した．Fig. 6 に示した結果から明らかなように，本法による値は pad plate assay 値に近似していた．

次に CTC 5.0 %，CMC 11.4 %，$Na_2S_2O_3$（あるいは $NaHSO_3$）2.8 %，および食塩 80.8 % から成る氷用 CTC 剤を用いてつくつた氷中の CTC 量を本法で定量した値を，pad plate assay 値と比較した．Fig. 7 に示した結果から明らかなことは，$Na_2S_2O_3$ を添加した CTC 氷では本法値は pad plate assay 値より僅かに高かつたが，$NaHSO_3$ を添加した氷では本法値は pad plate assay 値よりも常に高い値を示した．

摘　　要

A．iso-CTC の螢光による方法，トリウム法，紫外線吸光法および酸比色法によつて水および氷中の CTC を定量し，微生物検定値と比較した結果を要約すると次の通りである．

1．厚生省指示の iso-CTC 螢光法で氷中の CTC を定量すると，多くの場合微生物検定値よりも低い値を示し，Upham 氏らの方法および坂口氏らの方法はいずれも著しく高

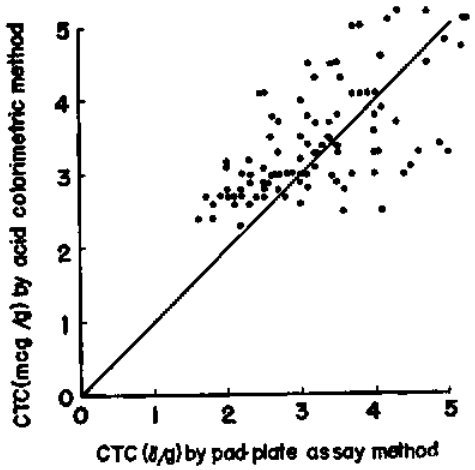

Fig. 6. Comparison between values for CTC in ice which were determined by the modified acid colorimetric and pad plate microbiologic method.

The ice originally contains CTC (5 ppm), carrageen (18.2 ppm) and Caacetate (7.3 ppm).

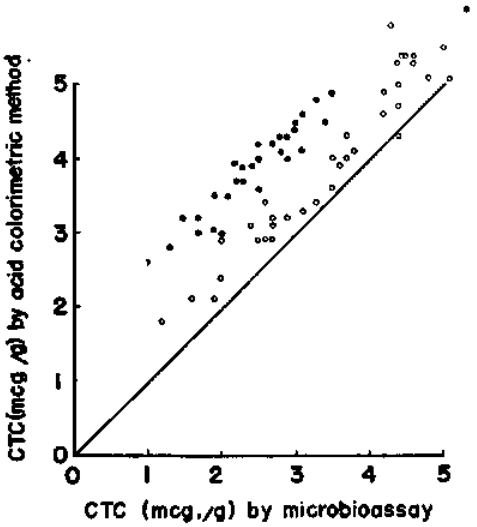

Fig. 7. A comparison between values for CTC in ice containing either $NaHSO_3$ or $Na_2S_2O_3$ which were determined by the modified acid colorimetric and pad plate microbiologic method.

The ice originally contains CTC (5 ppm), carboxymethylcellulose (11.4 ppm) $NaHSO_3$ or $Na_2S_2O_3$ (2.8 ppm) and NaCl (80.8 ppm). ○ contained $Na_2S_2O_3$, ● $NaHSO_3$.

い値を示した.

2. Levine の酸比色法によつて蒸溜水および井戸水中の CTC を定量したところ，酸比色法による値と微生物検定値との間に差が殆んどなかつた.

B. Levine の酸比色法の基礎条件を吟味し，氷中の CTC を定量できるように変改した. 変改した根拠は次のような点に基礎をおいている.

3. 試料を 50 cc とり，分光光度計を用いることによつて 5 mcg/cc 以下の CTC を感度および精度高く定量できた.

4. 80°C で約 20～30 分間の加熱で安定な 440 mμ における最高吸光度を得た.

5. 塩酸中の微量遊離塩素による CTC の破壊は蒸溜塩酸を用いることによつて防ぎ得た.

6. Iso-CTC，遊離塩素および鉄による CTC 分解物の存在は定量に影響しない.

7. 本法により氷中の CTC を定量した値は $NaHSO_3$ を含む CTC 氷の場合を除き pad plate assay 値に近似した.

文 献

1) Monastero, F. et al. 1951. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.) **40**: 241. Grove, D. C. and Randall, W. A. 1955. Assay method of antibiotics, A laboratory manual (Antibiotics monographs No. 2) p. 56, New York, N. Y., Medical Encyclopedia Inc.

2) 厚生省公衆衛生局. 1958. 氷および魚肉のクロルテトラサイクリンの定量試験について，衛発第314号（昭和33年4月）.
3) Levine, J., Garlock, Jr. E. A. and Fischbach, H. 1949. The chemical assay of aureomycin. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), **38** : 473.
4) Upham, S. D., Stirn, F. E., Weidenheimer, J. F., Callahan, F. M. and Ritter, L. 1954. Method of dispersing aureomycin in ice. Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute, seventh annual session, Havana, Cuba.
5) Sakaguchi, T. and Taguchi, K. 1955. Metal chelate compounds with tetracycline derivatives. II. Colorimetric determination of aureomycin with thorium (IV). Pharm. Bull., **3** : 166.

Summary

Since CTC-ice containing carboxymethylcellulose, sodium chloride and sodium bisulfite or sodium thiosulfate is widely used for keeping the freshness of fish in Japan, a practical field method is required for the determination of the concentration, distribution and destruction of the antibiotic in ice.

The present study was undertaken to determine whether the chemical methods are applicable to the determination of the CTC concentration in ice, and to improve the acid colorimetric method.

1) When CTC values in ice assayed by the chemical methods were compared with that obtained by the microbiologic method, higher values were always obtained by the Upham et al's method[4] and the Sakaguchi et al's method[5], and lower values by the Japan FDA method.[2] The Levine's acid colorimetric method[3] gave a comparable value to that obtained by the microbiologic method (Tables I–1, I–3 and I–4).

2) The acid colorimetric method was improved with respect to its sensitivity and accuracy. The improvement involves using the Beckman spectrophotometer and heating at 80°C. This method was found to yield comparable values to the microbiologic assay values in case of a CTC ice containing sodium thiosulfate, as contrasted to higher values in case of a CTC ice containing sodium bisulfite (Figs. I–6 and I–7).

The improved method is as follows: Place a 50 cc aliquot of sample and of each of standard solution series (1～8 mcg/cc) in separate 100 cc flask and add each a 20 cc aliquot of 20 % hydrochloric acid. Heat for 20 to 30 minutes in a water bath at 80°C. After cooling in running water, fill the mixture up to the mark of flask with distilled water. Measure the absorbancy of the sample by the Beckman spectrophotometer at wave length of 440 mμ using a cuvette of 100 mm light path. Prepare a standard curve by plotting the absorbancies of the standard CTC solutions against the corresponding concentrations of CTC. A representative standard curve is presented in Fig. I–4. From the standard curve find the CTC concentration of the sample solution.

Fisheries Laboratory,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University