〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (5) 301-308 (1984)

ニジマス及びウナギの筋肉と肝臓中に残留するメチレンブルー及び マラカイトグリーンの定量分析とその挙動について

中川満夫,^a 村田 剛,^a 下川晃彦,^a 本田俊哉,^a
児島昭次,^a 内山 充^b
熊本大学薬学部,^a 国立衛生試験所^b

Determination of Residual Methylene Blue and Malachite Green in Muscle and Liver of Rainbow Trout and Eel

MITSUO NAKAGAWA,^a KATASHI MURATA,^a
TERUHIKO SHIMOKAWA,^a TOSHIYA HONDA,^a
SHOJI KOJIMA^a and MITSURU UCHIYAMA^b
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,^a
5-1, Ohe-honmachi, Kumamoto 862, Japan and National
Institute of Hygienic Sciences,^b 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan*

(Received April 27, 1984)

The methods for analyzing residual methylene blue and malachite green in the muscle and liver of rainbow trout and eel were established.

Since methylene blue and malachite green in the muscle and liver homogenates were effectively extracted by *n*-butanol in the presence of ZnSO₄, the recoveries of methylene blue and malachite green were determined by measuring the optical density (665 nm for methylene blue, 620 nm for malachite green) of butanol solution extracted from the liver and muscle homogenates containing the dyes. However, the optical density of malachite green in butanol solution extracted from the liver homogenates was measured at 500 nm, 620 nm and 700 nm, and was then calculated from the following equation;

$$\text{Net OD}_{620} = (\text{MOD}_{620} - \text{OD}_{700}) - [(\text{OD}_{500} - \text{OD}_{700}) \times 0.4815 - 0.0033]$$

MOD₆₂₀: OD observed at 620 nm: malachite green + pigments of liver homogenates

The recoveries of methylene blue and malachite green added to the muscle homogenates were 80–87% and 80–88%, respectively. The limits of detection in the muscle were 0.1 µg/g for both dyes. Also, the recoveries of methylene blue and malachite green added to the liver homogenates were approximately 85–87% and 88–95%, respectively. As little as 0.5 µg/g of both dyes in the liver was detectable.

On the other hand, when rainbow trout were exposed to 0.5, 1.0 and 2.0 ppm of malachite green solution at 16°C for 1 h, residual amounts of malachite green in the muscle and liver were 1.41±0.28 µg/g (muscle) and 5.9±1.2 g/g (liver), 2.41±0.11 µg/g (muscle) and 10.1±1.4 µg/g (liver), and 5.90±1.61 µg/g (muscle) and 19.1±2.8 µg/g (liver), respectively. Also, when eel were exposed to 3.0 ppm of methylene blue solution at 16°C for 1, 2 and 3 h, residual amounts of methylene blue in the liver was 1.20±0.3 µg/h, 1.10±0.5 µg/2 h and 0.90±0.2 µg/3 h, respectively, and residual methylene blue in the muscle could not be detected.

Keywords — rainbow trout; eel; methylene blue; malachite green

緒 言
水産用医薬品としてメチレンブルー C₆H₁₈ClN₃S

(Methylene Blue, M・B と略す) 及びマラカイトグリー
ン C₂₃H₂₅ClN₂ (Malachite Green, M・G と略す) は

魚類（マス、アユ、コイ及びウナギなど）の水カビ病、カラムナリス症、ワタカブリ病、白点病などの予防や治療に利用されており、¹⁻⁹⁾ この両塩基性色素は、食品衛生法で許可されている食品添加物（人工着色料）には含まれていない。したがって、食用に供する時点で、M・B や M・G で処理した魚の筋肉や肝臓などの可食部中に両色素が残留していない方がよい。

ところで、Disant と Wagner は、動物に M・B を投与後、尿及び血漿中の M・B の定量法として、NaCl 添加後にジクロロメタンで抽出し、得られたジクロロメタン層の吸光度を測定する方法を報告しており、¹⁰⁾ また、Nakamura らは、動物の小腸中の M・B の定量法として、小腸を 0.1 N HCl 中でホモジナイズし、NaCl 添加後にイソアミルアルコールで抽出し、得られたイソアミルアルコール層の吸光度を測定する方法を報告している。¹¹⁾ 更に、山崎は、ニジマスの肝臓中の M・G の定量法として、肝臓を 10% 酸性ホルマリンで固定化した後、pH 4—5 とした 70% 酸性エタノールで抽出し、得られたエタノール層の吸光度を測定する方法を報告している。¹²⁾ しかし、現在、魚の筋肉や肝臓中に残留する両色素を比較的簡単に再現性よく抽出定量する方法については、一定したものが見当らない。

本研究では、まずニジマス及びウナギの筋肉と肝臓中の M・B と M・G を簡単に抽出定量する方法について検討し、更に、ニジマス及びウナギの成長魚を M・B または M・G 溶液に浸漬した後、両成長魚の筋肉と肝臓中の M・B と M・G の残留と消失について検討した。

実験方法

1. 試薬 M・B（顕微鏡用）及び M・G（蔭酸塩、顕微鏡用）は、メルク社製のものを使用した。

その他の試薬は、すべて試薬特級を使用した。

2. 器具 振盪抽出器——V-SN 型 KM-Shaker（イワキ社製）を使用した。

ホモジナイザー——ラボディスプレイザー X1020 型アイラード社製、西独）を使用した。

分光光度計——556S 型 2 波長分光光度計（日立社製）、100-60 型分光光度計（日立社製）を使用した。

3. 試料 ニジマス及びウナギは、熊本県内（柿原養鰻場、田中養鰻場）で養殖している成長魚（ニジマス体重 90—140 g、ウナギ体重 180—210 g）を使用した。

ニジマス及びウナギの筋肉と肝臓への M・B と M・G の残留実験には、魚を一定濃度の色素溶液に 1—3 時間遊泳させた後、体表面を水でよく洗浄し、試料とした。更に、筋肉及び肝臓中に取り込まれた色素の消失実験には、上記のような薬浴処理を施した魚を天然水中で一定

時間遊泳させた後、体表面を水でよく洗浄し、試料とした。

4. 筋肉及び肝臓ホモジネートの調製 ニジマス及びウナギの筋肉は、皮膚を除いた筋肉の 4 倍量の 0.15 M KCl 溶液を加え、氷冷下でホモジナイズし、20% 筋肉ホモジネートとした。

ニジマス及びウナギの肝臓は、肝臓 0.2 g に 0.15 M KCl 溶液 4.8 ml を加え、氷冷下でホモジナイズ（乳鉢を使用）し、4% 肝臓ホモジネートとした。

5. 色素の添加実験 15 ml のキャップ付試験管に、筋肉または肝臓ホモジネート 5 ml と蒸留水または色素溶液 0.4 ml を加えた試験液を 18°C で 60 分間振盪放置した後、抽出操作の試料とした。

6. 色素の抽出と測定法 試験溶液 5.4 ml に各種の無機塩溶液 1 ml を加えた後、*n*-ブタノール（ブタノール）5 ml を加えて 30 分間激しく振盪抽出した。その後、1000 rpm で 10 分間遠心し、ブタノール層を別の試験管に取り、得られたブタノール層の吸光度を 665 nm（M・B）と 620 nm（M・G）で測定した。ただし、肝臓ホモジネートから抽出した M・G を含むブタノール層は、500 nm 及び 620 nm での吸光度を測定した。また、ブタノール層に「濁り」のある場合には、500 nm、620 nm 及び 700 nm での吸光度を測定し、得られた各波長での吸光度は、次式に代入し、M・G の 620 nm での正味の吸光度（Net OD₆₂₀）を算出した。この式の誘導の経過については本文中に詳述する。

$$\text{Net OD}_{620} = \text{M} \cdot \text{OD}_{620} - \text{C} \cdot \text{OD}_{620}$$

$$\text{C} \cdot \text{OD}_{620} = \text{OD}_{500} \times 0.4815 - 0.0033$$

M・OD₆₂₀：実測値＝M・G と肝由来の生体色素の吸光度

C・OD₆₂₀：算出された 620 nm での吸光度＝肝由来の生体色素の吸光度

OD₅₀₀：実測値

「濁り」のある場合

$$\text{Net OD}_{620} = (\text{M} \cdot \text{OD}_{620} - \text{OD}_{700}) - [(\text{OD}_{500} - \text{OD}_{700}) \times 0.4815 - 0.0033]$$

OD₇₀₀：実測値

なお、抽出回収率は、上記と同様に試験溶液（筋肉または肝臓ホモジネート 5 ml に蒸留水 0.4 ml を加えたもの）5.4 ml をブタノール抽出し、得られたブタノール層（5 ml）に M・B または M・G を添加し、その吸光度と比較することによって求めた。

7. ブタノール抽出液の洗浄実験 上記と同様にし、試験溶液をブタノールで抽出し、得られたブタノール層 5 ml に 50% ZnSO₄ 1 ml と 0.15 M KCl 5 ml を加

TABLE I. Effects of Some Chemicals on Butanol Extraction of Methylene Blue and Malachite Green from Muscle Homogenates of Rainbow Trout

Addition	Optical density (665 or 620 nm)			
	Methylene blue (5 μ g)		Malachite green (5 μ g)	
	Addition ^{a)}	Extraction ^{b)}	Addition ^{a)}	Extraction ^{b)}
ZnSO ₄ (25%)	0.238 $\pm$ 0.002 (100)	0.194 $\pm$ 0.003 (82)	0.232 $\pm$ 0.006 (100)	0.188 $\pm$ 0.003 (81)
Pb (CH ₃ COO) ₂ (25%)	0.234 $\pm$ 0.001 (100)	0.186 $\pm$ 0.001 (79)	0.160 $\pm$ 0.004 (100)	0.119 $\pm$ 0.001 (74)
CuCl ₂ (25%)	0.221 $\pm$ 0.001 (100)	0.190 $\pm$ 0.003 (86)	0.199 $\pm$ 0.002 (100)	0.185 $\pm$ 0.003 (93)
ZnCl ₂ (25%)	0.232 $\pm$ 0.000 (100)	0.184 $\pm$ 0.002 (79)	0.211 $\pm$ 0.002 (100)	0.183 $\pm$ 0.000 (83)
CaCl ₂ (50%)	0.229 $\pm$ 0.004 (100)	0.185 $\pm$ 0.001 (81)	0.201 $\pm$ 0.006 (100)	0.126 $\pm$ 0.008 (63)
MgCl ₂ (50%)	0.234 $\pm$ 0.002 (100)	0.179 $\pm$ 0.005 (76)	0.145 $\pm$ 0.006 (100)	0.046 $\pm$ 0.005 (32)
NaCl (25%)	0.234 $\pm$ 0.002 (100)	0.175 $\pm$ 0.004 (75)	0.075 $\pm$ 0.002 (100)	0.011 $\pm$ 0.003 (15)
Na ₂ SO ₄ (25%)	0.234 $\pm$ 0.002 (100)	0.167 $\pm$ 0.000 (71)	0.026 $\pm$ 0.002 (100)	0.007 $\pm$ 0.002 (27)
ZnSO ₄ (12.5%)	0.240 $\pm$ 0.002 (100)	0.184 $\pm$ 0.001 (77)	0.203 $\pm$ 0.011 (100)	0.162 $\pm$ 0.003 (80)
ZnSO ₄ (50%)	0.230 $\pm$ 0.002 (100)	0.190 $\pm$ 0.004 (83)	0.215 $\pm$ 0.002 (100)	0.173 $\pm$ 0.002 (80)

a) Addition: methylene blue or malachite green was added to butanol solution extracted muscle homogenates.

b) Extraction: methylene blue or malachite green was extracted from muscle homogenates added the dye.

The values were means $\pm$ S.D. of three experiments. The values in parentheses are percentages of the values obtained without extraction (taken as 100%).

えて振盪し、遠心後下層の水層を除去した。更に、この洗浄操作をくり返して行った後、得られたブタノール層の吸光度を測定した。

結果と考察

1. 筋肉ホモジネートへの M・B と M・G の添加回収実験

ニジマス及びウナギの筋肉可食部に残留する M・B と M・G の定量分析を行うに先立ち、一定量 (5 μ g) の M・B と M・G を添加したニジマスの筋肉ホモジネートに各種の無機塩をタンパク質沈澱剤として加え、ブタノールで抽出した時の両色素の回収率について検討した。

Table I に示したように、25% ZnSO₄、Pb (CH₃COO)₂、CuCl₂ 及び ZnCl₂ 溶液を添加した時の M・B の抽出回収率は 79—86%、M・G の回収率は 74—93%であった。また、25% ZnCl₂ と ZnSO₄ 溶液添加時の両色素の回収率にはほとんど差は認められなかった。更に、50% CaCl₂ 及び MgCl₂ 溶液を添加した時の M・B の回収率は 81% と 76%、M・G の回収率は 63% と 32% であり、M・G の回収率は可成り低下した。また、25% NaCl と Na₂SO₄ 溶液を添加した時の M・B の回収率は 75% と 71%、M・G の回収率は 15% と 27% と極めて低い値を示した。

ところで、CuCl₂ 溶液添加時の回収率は最も高い値を示すが、両色素をニジマス筋肉ホモジネートのブタノール抽出液に添加した時の吸光度は、ZnSO₄ や ZnCl₂ 溶液添加時に比べて低く、また、CuCl₂ 溶液は両色素と同様な色を有しているため取扱いに難点がある。そこで、

抽出効果がよく、溶解性にも優れている ZnSO₄ について、抽出溶液に加える ZnSO₄ 溶液の濃度を 12.5% と 50% に変えた時の M・B と M・G の回収率について検討したが、25% ZnSO₄ 溶液を添加した時の値とほとんど差は認められなかった。しかし、添加する ZnSO₄ 溶液の濃度が高いほど、タンパク質の変性は容易であり、また、ブタノール層との分離も良好であった。

一般に、タンパク質の沈澱剤としては、トリクロロ酢酸 (TCA) や酢酸などの有機酸がよく使用される。しかし、我々は、M・B や M・G を含有するニジマスやウナギの筋肉ホモジネートに TCA や酢酸溶液を添加すると、両色素の大部分はタンパク質に結合して沈澱し、この共沈した色素はエタノールやブタノールで完全に抽出されないことと、ブタノール抽出後の両色素の呈色度も微妙に変化することを観察している。同様な現象は、山崎によっても報告されている。¹²⁾ 特に、彼は、M・G の呈色度は溶液の pH に大きく左右され、呈色度の最も高い溶液の pH は 4—5 の範囲にあることも報告している。現実験でも Pb(CH₃COO)₂、CuCl₂、CaCl₂、MgCl₂、NaCl 及び Na₂SO₄ 溶液を添加した筋肉ホモジネートをブタノール抽出した後、そのブタノール層に M・G を添加した時の呈色度は、ZnSO₄ 及び ZnCl₂ 溶液を添加したものに比べて低い (Table I, Addition)。これは、主にブタノール抽出後の液性の差に起因するものと推定される。事実、Table II に示したように、各種の塩溶液を加えた時のウナギの筋肉ホモジネートの pH は、無添加時の pH 6.36 に比べ、3.32—6.28 と変化

TABLE II. Relationship between pH and Optical Density of Malachite Green Extracted Eel Muscle Homogenates in the Presence of Various Salts

Addition	pH ^{a)}	Optical density of malachite green (5 μ g)			
		No washing		Washing ^{d)}	
		Addition ^{b)}	Extraction ^{c)}	Addition ^{b)}	Extraction ^{c)}
ZnSO ₄ (50%)	4.30	0.213 $\pm$ 0.002(100)	0.173 $\pm$ 0.001(80)	0.223 $\pm$ 0.002(100)	0.185 $\pm$ 0.000(83)
Pb(CH ₃ COO) ₂ (25%)	5.41	0.165 $\pm$ 0.004(100)	0.123 $\pm$ 0.009(75)	0.237 $\pm$ 0.003(100)	0.170 $\pm$ 0.004(72)
CuCl ₂ (25%)	3.32	0.232 $\pm$ 0.009(100)	0.197 $\pm$ 0.002(85)	0.236 $\pm$ 0.007(100)	0.209 $\pm$ 0.002(86)
ZnCl ₂ (25%)	4.34	0.225 $\pm$ 0.003(100)	0.180 $\pm$ 0.002(80)	0.223 $\pm$ 0.002(100)	0.185 $\pm$ 0.002(83)
CaCl ₂ (50%)	5.28	0.197 $\pm$ 0.004(100)	0.130 $\pm$ 0.006(66)	0.224 $\pm$ 0.002(100)	0.140 $\pm$ 0.001(63)
MgCl ₂ (50%)	5.48	0.155 $\pm$ 0.008(100)	0.104 $\pm$ 0.001(67)	0.212 $\pm$ 0.002(100)	0.138 $\pm$ 0.000(65)
NaCl (25%)	6.12	0.099 $\pm$ 0.007(100)	0.047 $\pm$ 0.002(47)	0.211 $\pm$ 0.005(100)	0.094 $\pm$ 0.001(45)
Na ₂ SO ₄ (25%)	6.28	0.058 $\pm$ 0.009(100)	0.021 $\pm$ 0.004(36)	0.210 $\pm$ 0.006(100)	0.071 $\pm$ 0.000(34)

a) pH: pH of the mixture of muscle homogenates (homogenates 5 ml + water 0.4 ml) and various salt solutions (1 ml) before butanol extraction.

b) Addition: malachite green was added to butanol solution extracted muscle homogenates.

c) Extraction: malachite green was extracted from muscle homogenates added the dye.

d) Washing: butanol solution containing malachite green was washed with 50% ZnSO₄ (1 ml)-0.15 M KCl (5 ml) solution. The values were means $\pm$ S.D. for three experiments. The values in parentheses are percentages of the values obtained without extraction (taken as 100%).

TABLE III. Butanol Extraction of Methylene Blue and Malachite Green from Muscle Homogenates of Rainbow Trout and Eel

Addition	Optical density (665 or 620 nm)			
	Rainbow trout		Eel	
	Addition ^{a)}	Extraction ^{b)}	Addition ^{a)}	Extraction ^{b)}
Methylene blue				
5 μ g	0.230 $\pm$ 0.002 (100)	0.191 $\pm$ 0.005 (83)	0.227 $\pm$ 0.004 (100)	0.178 $\pm$ 0.001 (78)
25 μ g	1.093 $\pm$ 0.003 (100)	0.949 $\pm$ 0.004 (87)	1.125 $\pm$ 0.002 (100)	0.986 $\pm$ 0.002 (80)
Malachite green				
5 μ g	0.215 $\pm$ 0.002 (100)	1.173 $\pm$ 0.002 (80)	0.214 $\pm$ 0.002 (100)	0.171 $\pm$ 0.001 (80)
25 μ g	0.965 $\pm$ 0.017 (100)	0.846 $\pm$ 0.007 (88)	1.009 $\pm$ 0.017 (100)	0.810 $\pm$ 0.019 (80)

a) Addition: methylene blue or malachite green was added to butanol solution extracted muscle homogenates.

b) Extraction: methylene blue or malachite green was extracted from muscle homogenates added the dye.

The values were means $\pm$ S.D. of five experiments. The values in parentheses are percentages of the values obtained without extraction (taken as 100%).

する。そこで、ウナギの筋肉ホモジネートから得たブタノール層に 5 μ g の M・G を添加し、この溶液を 50% ZnSO₄ 溶液 1 ml と 0.15 M KCl 溶液 5 ml で振盪洗浄した。このように洗浄した後のブタノール層の吸光度 (Washing, Addition) は、すべてほぼ等しい値 (0.210-0.237) を示すようになり、M・G の呈色度は抽出後のブタノール層の液性に大きく左右されるようである。しかし、M・G (5 μ g) と各種のタンパク質沈澱剤を加えたウナギの筋肉ホモジネートを抽出して得たブタノール層を同様にして振盪洗浄した場合 (Washing, Extraction), 全体的に洗浄前 (No washing, Extraction) の吸光度より上昇することが認められるが、抽出回収率

には大差はなかった。したがって、タンパク質に結合した M・G は、Pb(CH₃COO)₂, CaCl₂, MgCl₂, NaCl 及び Na₂SO₄ 溶液を添加しても容易にタンパク質から遊離されることはなく、抽出回収率も低いものと解釈される。

以上のような結果を基に、抽出効果もよく、呈色度も安定な ZnSO₄ 溶液を用い以下の実験を行った (以下、ZnSO₄-ブタノール抽出と呼ぶことにする)。

Table III に示したように、5 及び 25 μ g の M・B と M・G を添加した ニジマスとウナギの筋肉ホモジネートからの両色素の抽出回収率について検討した。M・B の抽出回収率は、ニジマスで 83%-87%、ウナギで 78%-

80% であり, M・G の回収率は, ニジマスで 80%—88%, ウナギで 80% であった.

また, 我々は, 両色素の検出は, 0.1 $\mu\text{g/g}$ 筋肉 (0.1 ppm) まで可能であることを認めている.

2. 肝臓ホモジネートへの M・G と M・B の添加回収実験

Table IV に示したように, ウナギの肝臓ホモジネートに 1 μg と 10 μg の M・B を添加した時の抽出回収率は 85% と 87% であった. また, 検出限界は 0.1 $\mu\text{g}/0.2\text{g}$ 肝臓 (0.5 ppm) であった. しかし, この値は, 分析に供する肝臓をより多く使用すれば, 0.5 ppm 以下にすることは可能である.

一方, 肝臓からの M・G の定量分析は, 肝臓ホモジネートを ZnSO_4 -ブタノール抽出した場合, 肝由来の生体色素の極大吸収が 500 nm と 620 nm に存在し, この波長は M・G の極大吸収 (620 nm に一致する (Fig. 1).

そこで, ニジマス 20 匹から得られた肝臓を ZnSO_4 -ブタノール抽出し, そのブタノール層の吸光度を 500 nm と 620 nm で測定した. Fig. 2 に示したように, 500 nm と 620 nm での吸光度は一定の比をもって増減し, この両者間には $Y=0.4815X-0.0033$ という直線関係が存在する. 同様なことは, ウナギの肝臓でも観察された. したがって, 肝臓中に存在する正味の M・G の吸光度 (Net OD_{620}) は, 500 nm の吸光度 (実測値) から算出される 620 nm の吸光度 ($\text{C}\cdot\text{OD}_{620}$, 肝由来の生体色素の吸光度) を, 実測した 620 nm の吸光度 ($\text{M}\cdot\text{OD}_{620}$, M・G と肝由来の生体色素の吸光度) から減じることによって求めることが可能である.

$$\text{Net OD}_{620} = \text{M}\cdot\text{OD}_{620} - \text{C}\cdot\text{OD}_{620}$$

$$\text{C}\cdot\text{OD}_{620} = \text{OD}_{500} \times 0.4815 - 0.0033$$

更に, 検体に「濁り」のある場合には, 生体色素及び M・G の吸光度が存在しない波長 (700 nm) での吸光度

TABLE IV. Butanol Extraction of Methylene Blue from Liver Homogenates of Eel

Addition	Optical density (665 nm)	
	Addition ^{a)}	Extraction ^{b)}
1 μg	0.045 $\pm$ 0.002 (100)	0.039 $\pm$ 0.002 (87)
10 μg	0.459 $\pm$ 0.003 (100)	0.388 $\pm$ 0.010 (85)

a) Addition: methylene blue was added to butanol solution extracted liver homogenates of eel.

b) Extraction: methylene blue was extracted from liver homogenates added the dye.

The values were means $\pm$ S.D. of five experiments. The values in parentheses are percentages of the values obtained without extraction (taken as 100%).

Fig. 1. Absorption Spectra of Butanol Solution Extracted Liver Homogenates of Rainbow Trout (A) and Eel (B) with or without Malachite Green

Fig. 2. Relationship between Optical Density at 500 nm and 620 nm of Pigments Extracted from Rainbow Trout Liver Homogenates

を測定し, 求めることが出来る.

$$\text{Net OD}_{620} = (\text{M}\cdot\text{OD}_{620} - \text{OD}_{700}) - [(\text{OD}_{500} - \text{OD}_{700}) \times 0.4815 - 0.0033]$$

実際に, 3 例のニジマスの 4% 肝臓ホモジネートに一定量 (1 μg と 2 μg) の M・G を添加し, ZnSO_4 -ブタノール抽出した後のブタノール層の吸光度を測定した. その結果, Table V に示したように, 実測値 (F) と計算値 (H) とはよく一致した値が得られ, この 3 例の抽出回収率は $91 \pm 2.4\%$ であった.

3. ニジマスの筋肉及び肝臓中の M・G の残留と消失

ニジマス 0.5—2.0 ppm の M・G 溶液に 16°C で 1 時間浸漬した後, ニジマスの筋肉中に残留する M・G 量を ZnSO_4 -ブタノール抽出法で定量した. なお, 検量線

TABLE V. Extraction of Malachite Green from Liver Homogenates of Rainbow Trout

Expt. No.	Addition	Observation (Extraction) ^{a)}	Observation (Extraction) ^{a)} at OD ₆₂₀		Observation (Extraction) ^{a)}	Observation (Addition) ^{b)}
		at OD ₅₀₀ (A)	-MB (B)	+MB (C)	at OD ₇₀₀ (D)	at OD ₆₂₀ (E)
I	None	0.158	0.087		0.026	
	1 μ g			0.118		0.122
	2 μ g			0.150		0.158
II	None	0.097 $\pm$ 0.003	0.051 $\pm$ 0.002		0.014 $\pm$ 0.000	
	1 μ g			0.078 $\pm$ 0.000		0.081 $\pm$ 0.001
	2 μ g			0.112 $\pm$ 0.002		0.115 $\pm$ 0.001
III	None	0.056 $\pm$ 0.001	0.027 $\pm$ 0.001		0.002 $\pm$ 0.000	
	1 μ g			0.054 $\pm$ 0.000		0.058 $\pm$ 0.000
	2 μ g			0.083 $\pm$ 0.001		0.093 $\pm$ 0.000

Expt. No.	Addition	Δ OD ₆₂₀	Δ OD ₆₂₀	Calculation	Recovery (%)	
		(F=C-B)	(G=E-B)	(H) ^{c)}	F/G $\times$ 100	H/G $\times$ 100
I	None					
	1 μ g	0.031	0.035	0.032	89	91
	2 μ g	0.063	0.071	0.064	89	90
II	None					
	1 μ g	0.027	0.030	0.027	90	90
	2 μ g	0.061	0.064	0.061	95	95
III	None					
	1 μ g	0.027	0.031	0.029	87	94
	2 μ g	0.056	0.066	0.058	85	88

The values in Experiment I were the average of duplicate experiments. The values in Experiments II and III were means $\pm$ S.D. of three experiments.

a) Extraction: malachite green was extracted from liver homogenates added the dye.

b) Addition: malachite green was added to butanol solution extracted liver homogenates.

c) Optical density of malachite green at OD₆₂₀ (H)=(C-D)-[(A-D) $\times$ 0.4815-0.0033].

は、薬浴しないニジマスの筋肉ホモジネートに一定量の M・G を添加し、ZnSO₄ 存在下でブタノール抽出し、作製した。

Fig. 3 に示したように、筋肉中の M・G 量は、浸漬した M・G 溶液の濃度の増加と共に増加し、この時の筋肉 1g 当りの M・G 量は、0.5 ppm 溶液の場合で 1.41 $\pm$ 0.28 μ g, 1 ppm 溶液の場合で 2.41 $\pm$ 0.11 μ g, 2 ppm 溶液の場合で 5.90 $\pm$ 1.61 μ g であった。一方、肝臓中の M・G 量も浸漬した M・G 溶液の濃度と共に増加し、肝臓 1g 当りの M・G 量は、0.5 ppm 溶液の場合で 5.9 $\pm$ 1.2 μ g, 1 ppm 溶液の場合で 10.1 $\pm$ 1.4 μ g, 2 ppm 溶液の場合で 19.1 $\pm$ 2.8 μ g であった。したがって、肝臓 1g 当りの M・G 量は、筋肉 1g 当りの量の約 3-5 倍程度高濃度に残留するが、ニジマスの筋肉可食部は、体重の約 50% を占めている。この値から筋肉重量当りの M・G 量を算出すると、体重 90-140 g のニジマスでは、筋肉

Fig. 3. Accumulation of Malachite Green in Liver and Muscle of Rainbow Trout

TABLE VI. Accumulation of Methylene Blue in Liver and Muscle of Eel

Exposure (h)	Expt. No.	Body weight (g)	Liver weight (g)	Methylene blue		
				Muscle ($\mu\text{g/g}$)	Liver	
					($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/liver}$)
1	3	180.6 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.2	ND	1.20 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.7
2	3	210.2 $\pm$ 4.9	2.4 $\pm$ 0.4	ND	1.10 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.9
3	3	181.3 $\pm$ 7.2	3.1 $\pm$ 0.4	ND	0.90 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.6

ND: Not detected.

Eel were exposed to methylene blue (3 mg/l) solution at 18°C for each time.

可食部中に約 270—420 μg の M・G が残留していることになる。同様に、ニジマスの肝重量は、体重 90—140 g のニジマスで 1.0—1.5 g であり、この値から肝重量当りの M・G 量を算出すると約 20—30 μg という値となり、筋肉可食部中の M・G の残留量は、肝臓の約 15 倍程度多いことになる。

次に、ニジマスの筋肉及び肝臓に取り込まれた M・G の消失について、次のような実験を行った。すなわち、先の場合と同様に、2 ppm の M・G 溶液に 16°C で 1 時間浸漬したニジマスを、天然水中に 3, 6, 24 及び 72 時間遊泳させ、その時の筋肉及び肝臓中の M・G の残留量について検討した。

Fig. 4 に示したように、筋肉 1 g 中に残留する M・G 量 (5.90 $\pm$ 1.61 μg) は、ニジマスを天然水に遊泳させると速やかに消失し、3 時間で 2.04 $\pm$ 0.87 μg 、6 時間で 1.70 $\pm$ 0.35 μg 、24 時間で 0.34 $\pm$ 0.04 μg 、72 時間で 0.16 $\pm$ 0.10 μg にまで減少した。この時のニジマス筋肉中の M・G の消失半減期は約 3 時間であった。

ところで、72 時間後の M・G の残留量は、天然水に遊泳させた時点での残留量の約 2.7% に相当し、この時のニジマスの筋肉可食部中の M・G 量を求めると、体重 90—140 g のニジマスでは 7.2—12.6 μg (80—86 ppb) と極めて微量なものとなる。したがって、ニジマスの成長魚を M・G (2 ppm, 1 時間浸漬) 溶液に薬浴した場合には、少なくとも薬浴後 3 日以上天然水に遊泳させた後、食用に供することが望ましい。

同様に、肝臓中に残留する M・G (19.1 $\pm$ 2.8 μg) も天然水に遊泳させると速やかに消失し、72 時間後の M・G の残留量は、天然水に遊泳させる時点での残留量の約 2% に相当する。また、ニジマス肝臓中での M・G の消失半減期も約 3 時間であった。

以上述べたように、ニジマスの筋肉及び肝臓中の M・G は、可成り早い速度で消失しているが、この消失

Fig. 4. Elimination of Malachite Green Accumulated in Liver and Muscle of Rainbow Trout

が排泄によるものか、代謝によるものかは不明である。

4. ウナギの筋肉及び肝臓中の M・B の残留と消失

M・B は、主にウナギの水生菌病などの予防や治療に使用されている。¹⁾ それ故、ウナギを 3 ppm の M・B 溶液に 1, 2 及び 3 時間浸漬し、その時の筋肉及び肝臓に残留する M・B を抽出定量した。

Table VI に示したように、M・G (2 ppm, 1 時間浸漬) のニジマス筋肉への残留に比べ、浸漬する M・B 溶液の濃度も高く、浸漬時間も長いにもかかわらず、ウナギの筋肉への M・B の残留は検出されなかった。一方、肝臓 1 g 中には、浸漬 1 時間で 1.20 $\pm$ 0.3 μg 、2 時間で 1.10 $\pm$ 0.5 μg 、3 時間で 0.90 $\pm$ 0.2 μg であり、M・G のニジマス肝臓への残留に比べて極めて低い。

このような結果は、M・B のウナギへの取り込みが低いか、ウナギでは取り込まれた M・B の排泄と代謝が早いことによるものと予想される。

引用文献

- 1) 野口 博, 角皆英明, 水産増殖, **5**, 40 (1958).
- 2) 鈴木 栄, 大渡 斉, 田中深貴男, 埼玉県水産試験所報告, **39**, 66 (1980).
- 3) 保科利一, 千葉胤和, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 199 (1957).
- 4) 大屋善延, 水産孵化報告, **10**, 109 (1955).
- 5) W.H. Hublou, *Prog. Fish Cult.*, **20**, 129 (1958).
- 6) H.A. Loyacano, J.S. Crane, *Prog. Fish Cult.*, **37**, 39 (1977).
- 7) R.E. Burrows, *Prog. Fish Cult.*, **29**, 97 (1949).
- 8) D.J. O'Donnell, *Trans. Am. Fish. Soc.*, **74**, 26 (1944).
- 9) F.J. Foster, *Prog. Fish Cult.*, **18**, 7 (1936).
- 10) A.R. Disanto, J.G. Wagner, *J. Pharm. Sci.*, **11**, 598 (1972).
- 11) J. Nakamura, Y. Shizaki, M. Yasuhara, T. Kimura, S. Muranishi, H. Sezaki. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 683 (1976).
- 12) 山崎隆義, 長野水指研報, 魚病, 1976, p. 9.