

報 文

酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる
食肉中のキノロン系抗菌剤の分析岩崎 雄介¹, 伊 東 岳¹, 北 村 渉¹, 加藤美穂子², 小 平 司²,
堀江 正一³, 伊藤 里恵¹, 斉藤 貢一¹, 中澤 裕之^{®1}

キノロン系抗菌剤は人や動物に対して治療を目的に幅広く使用されている。しかし、畜水産食品においてキノロン系抗菌剤の残留が数多く検出されていることから、薬物残留を評価するのに簡便且つ迅速に分析可能な市販 ELISA キットによるスクリーニングが期待される。酵素免疫測定法 (ELISA) 法は多数の検体を一度に処理できるが、交差反応性に起因する同定能力等に課題を有する。そこで、ELISA 法として開発された New Quinolone Kit の有用性を検証するために、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) を用いた高精度な機器分析法を構築し、比較検討した。HPLC/FL による検出限界及び定量限界はエンロフロキサシンにおいて 2 ng/g 及び 10 ng/g であった。エンロフロキサシン 50 ng/g を添加したところ、回収率は 107.8% と良好な結果を得ることができた。ELISA 法との相関性を検討するため、同一食肉を試料として HPLC/FL 及び ELISA 法をそれぞれ適用したところ、両者の値に相関性が認められた。HPLC/FL では煩雑な前処理及び約 120 分の分析所要時間を必要とするため、ELISA 法は 1 次スクリーニング法として有用であると考えられる。

1 緒 言

近年、粉卵やハチミツなどの輸入食品を中心に抗菌性物質の残留が数多く検出されている¹⁾²⁾。これらの薬剤は、主に疾病の治療を目的とした動物用医薬品を目的として使用されており、法的に規制された用法用量、休薬期間等が遵守されずに使用された場合、畜水産食品中に残留するといわれている。更に、キノロン系に代表される抗菌剤の一部は生体内においても代謝されにくく、未変化体として土壌や環境水に流出されている³⁾⁴⁾。そして、環境中に残留した抗菌剤による、生態系への影響や、抗生物質が効かない薬剤耐性菌を引き起こすことが懸念されている。

抗菌性物質の定量には液体クロマトグラフィー等の機器分析が主に使用されており、キノロン系抗菌剤の分析法も数多く報告されている^{5)~7)}。しかし、測定対象薬剤や試料によって前処理方法を変えなければならず、更に測定時間が長いことを考慮すると、多数の検体を簡便に測定するためには適当でないと考えられる。

一方、多数の検体を対象に医薬品の残留を評価するのに簡便且つ迅速に分析可能な Enzyme-linked immunosor-

bent assay (ELISA) 法が有用であると考えられる。ELISA 法は抗原抗体反応を利用した免疫化学的な測定法の一つで、特定の物質に対して特異的に検出することが可能なため、比較的簡単な前処理操作で、短時間に多数の検体を分析することができる。しかし、ELISA 法は十分な免疫原性と酵素活性を保持した標識抗原の作製が難しいことや、固相化の作業などが煩雑であるため、残留分析の領域では普及が進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、市販 ELISA キットの 1 次スクリーニング法としての有用性を検証することを目的として、畜産食品に残留するキノロン系抗菌性物質を対象とした高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) と ELISA 法による分析を実施し、その値の相関性を評価した。

2 実 験

市販 ELISA キットの有用性を検証するため、畜産食肉中キノロン系抗菌剤に関して HPLC/FL による残留分析法を構築して検証を行った。

2.1 試 薬

キノロン系抗菌剤である、ノルフロキサシンは和光純薬製を用い、エノキサシン、オフロキサシン及びロメフロキサシンは Sigma 製を使用した。シプロフロキサシンは MP Biomedicals 製を使用し、ダノフロキサシン及びエンロフ

¹ 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

² 株式会社フロンティア研究所: 061-3241 北海道石狩市新港西 1-777-12

³ 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

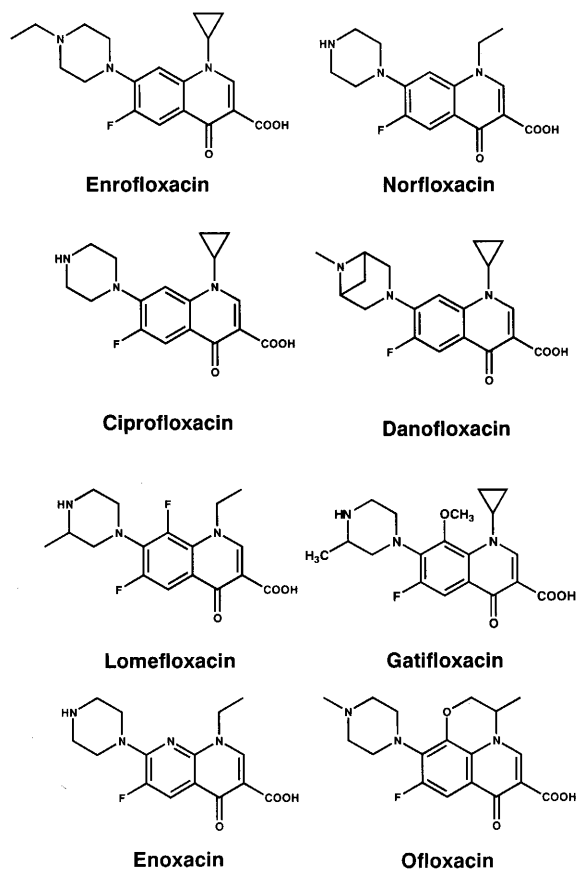


Fig. 1 Structures of fluoroquinolone

ロキサシンは関東化学製を用いた。ガチフロキサシンはLKT Laboratories 製を使用した。アセトニトリルは和光純薬製（HPLC 用）を用いた。超純水は日本ミリポア製 Milli-Q の超純水装置で調製したものを用いた。

2.2 ELISA キット

フロンティア研究所製 New Quinolone Kit を用い、キノロン系抗菌剤の測定を行った。定量値は反応率が 100% であるエンロフロキサシン量に換算することで求めた。

2.3 HPLC 条件

機器分析によるキノロン系抗菌剤の測定には、HPLC/FL を使用した。分析用ポンプとして島津製作所製 LC-10AS 及び蛍光検出器には RF-10A_{XL} を用いた。移動相は 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH = 3.0) : アセトニトリル = 83 : 17 (v : v) を調製し、イオンペアー試薬として Nonafluoropentanoic acid (NFPA) を 0.2% になるように加え、流量 0.2 ml/min で送液した。分析カラムには Waters 製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長は励起波長 270 nm、蛍光波長 447 nm に設定して測定を行った。

Table 1 Cross-reactivity of fluoroquinolones by ELISA

	Cross-reactivity, %
Enoxacin	20
Norfloxacin	100
Ofloxacin	1.4
Ciprofloxacin	100
Danofloxacin	80
Lomefloxacin	30
Enrofloxacin	100
Gatifloxacin	0.9

2.4 前処理方法

細切した食肉約 5 g を精密に量り取り、アセトニトリル 15 ml を加えた後に、ホモジナイズした。その後、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) により得られた上清を回収し、残渣にアセトニトリル 15 ml を加え、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) を再度行った。アセトニトリル層を 40℃、減圧下で乾固させ、得られた残渣に 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) を加えて再溶解させた。その後、Oasis MCX[®] (30 mg) を用いた固相抽出法を適用した。固相抽出条件は、洗浄溶媒にメタノール (1 ml) と 50 mM 炭酸アンモニウム (2 ml) を使用し、5% アンモニア含有メタノール (3 ml) で固相カートリッジからキノロン系抗菌剤の溶出を行った。溶出液を 40℃、減圧下で乾固し、得られた残渣に 50 mM PBS (phosphate buffered saline) を加えて再溶解させ、HPLC/FL 及び ELISA の測定に供した。

3 結果及び考察

3.1 ELISA における交差反応性の評価

キノロン系抗菌剤の構造式を Fig. 1 に示す。New Quinolone Kit における交差反応性について、キノロン系抗菌剤標準品を用いて求めたところ、エンロフロキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンは抗体と 100% 反応する結果を得ることができた。また、ダノフロキサシンは 80%、ロメフロキサシンは 30% 前後で交差反応性を示した (Table 1)。また、ELISA キットによるエンロフロキサシンの定量限界値は 8 ng/g であった。

3.2 蛍光波長の最適化

測定対象キノロン系抗菌剤の移動相中における励起及び蛍光スペクトルを測定したところ、Fig. 2 に示すように発蛍光性が確認された。そこで、本分析法においては動物用医薬品として主に使用されているエンロフロキサシンに着目し、キノロン系抗菌剤が検出できる波長 270 nm 及び 447 nm に設定し、以後の実験を行った。キノロン系抗菌剤の蛍光強度は移動相の pH 及び塩濃度に依存して変化することから、それぞれの最適条件を検討した。その結果、

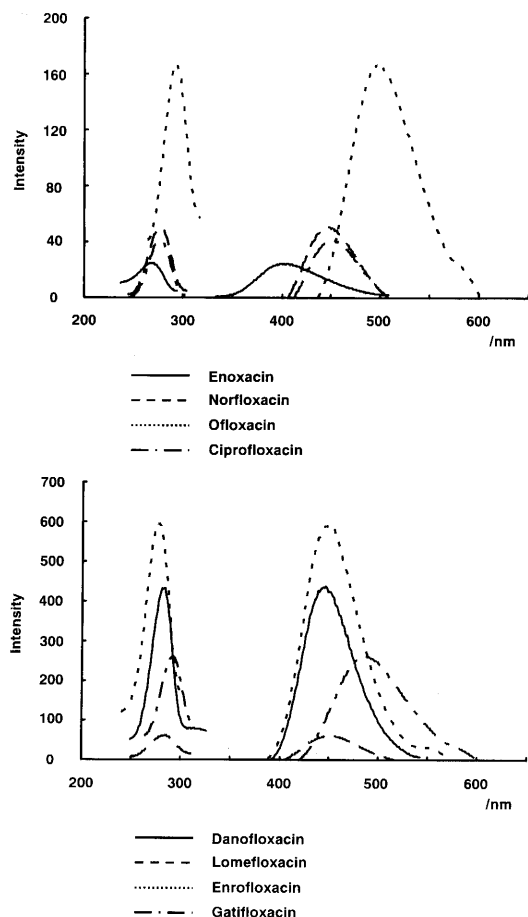


Fig. 2 Optimal excitation and emission wavelengths for detection of fluoroquinolones

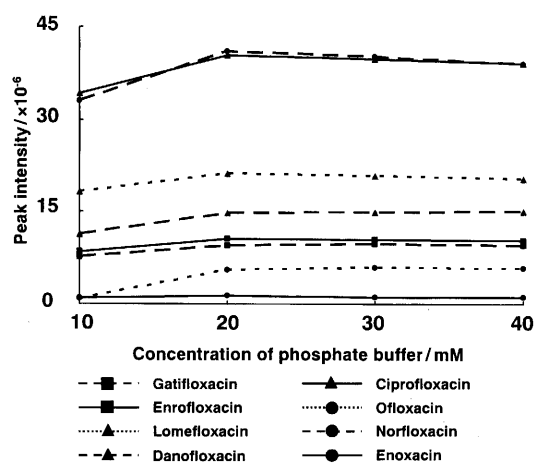


Fig. 3 Optimal concentration of formate buffer in the mobile phase

キノロン系抗菌剤は pH 7 以上で蛍光を示さず, 中性から酸性条件化で一定の蛍光強度が得られたことから, キノロン系抗菌剤の測定には液性を pH 3.0 に調整した. 同様に, 最大の強度を示した, 塩濃度 20 mM を最適条件とした (Fig. 3).

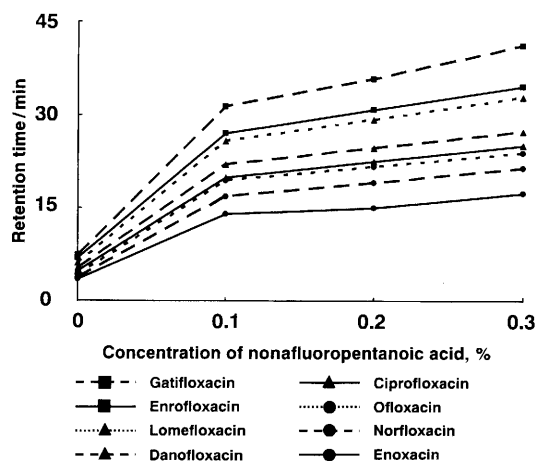


Fig. 4 Optimal concentration of nonafluoropentanoic acid and

Table 2 Recoveries of fluoroquinolones in meat sample using MCX cartridge

Analytical compound	Amount spiked/ ng g ⁻¹	Recovery, % (mean ± S.D., n = 6)
Enoxacin	1000	105.7 ± 5.7
Norfloxacin	50	105.6 ± 4.3
Ofloxacin	500	106.3 ± 4.0
Ciprofloxacin	50	107.7 ± 6.1
Danofloxacin	50	109.2 ± 4.0
Lomefloxacin	125	105.0 ± 4.9
Enrofloxacin	50	107.8 ± 4.2
Gatifloxacin	500	104.2 ± 4.5

3.3 キノロン系抗菌剤の分離検討

キノロン系抗菌剤標準品を用い, HPLC/FL における分離条件をリン酸塩緩衝液で検討したところ, すべてのキノロン系抗菌剤の相互分離が不十分であった. そこで, NFPA をイオンペアー試薬として添加し, 分離条件を検討したところ, NFPA が 0.2% で良好な相互分離が達成された (Fig. 4). これらの結果より, イオンペアー試薬を用いたことで, 構造が類似している 8 種類のキノロン系抗菌剤を一斉分析することが可能となった.

3.4 試料の前処理方法

試料に含まれる他の共存物質の影響を取り除くため, Oasis HLB[®] 及び Oasis MCX[®] を使用した前処理方法を検討した. Oasis HLB[®] を使用した場合, 平均回収率が 50% と低く, HPLC/FL においても共存物質の影響を完全に除去することができなかった. しかし, 陽イオン交換系カートリッジである Oasis MCX[®] を用いた場合, 標準品添加における平均回収率は 106% と良好な結果を得ることができた (Table 2).

Table 3 Validation of the HPLC/FL method

	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
Limit of detection	20	2	20	2	1	5	2	20
Limit of quantification	200	10	100	10	5	25	10	100
Resolution	1.38	1.39	1.08	1.49	1.90	1.71	4.97	
Correlation coefficient	0.998 (200 ~ 20000)	0.999 (10 ~ 1000)	0.999 (100 ~ 10000)	0.999 (10 ~ 1000)	0.999 (5 ~ 500)	0.999 (25 ~ 2500)	0.999 (10 ~ 1000)	0.999 (100 ~ 10000)

(ng g⁻¹)

Table 4 Intraday and interday precision of quantifying fluoroquinolones using HPLC/FL

Intraday			
Analytical compound	Actual concentration/ ng g ⁻¹	Detected concentration/ng g ⁻¹ (mean ± S.D., n = 5)	Precision (R.S.D.), %
Enoxacin	200	205 ± 13.1	6.6
	20000	20043 ± 1364	6.8
Norfloxacin	10	11.0 ± 1.1	10.9
	1000	1053 ± 116	11.6
Ofloxacin	100	88.9 ± 8.2	8.2
	10000	10364 ± 714	7.1
Ciprofloxacin	10	10.4 ± 1.1	10.7
	1000	1033 ± 99.4	9.9
Danofloxacin	10	9.7 ± 1.2	12.3
	1000	1026 ± 19.5	2.0
Lomefloxacin	25	23.7 ± 1.7	6.8
	2500	2558 ± 196	7.9
Enrofloxacin	10	9.8 ± 1.2	12.0
	100	1007 ± 69.0	6.9
Gatifloxacin	100	82.6 ± 8.1	8.1
	10000	10574 ± 833	8.3
Interday			
Analytical compound	Actual concentration/ ng g ⁻¹	Detected concentration/ng g ⁻¹ (mean ± S.D., n = 5)	Precision (R.S.D.), %
Enoxacin	200	209 ± 1.6	0.8
	20000	18931 ± 919	4.6
Norfloxacin	10	11.2 ± 1.1	10.9
	1000	984 ± 61	6.1
Ofloxacin	100	97.4 ± 11.9	11.9
	10000	9636 ± 599	6.0
Ciprofloxacin	10	9.1 ± 1.3	13.0
	1000	972 ± 60.9	6.1
Danofloxacin	10	9.5 ± 1.2	12.2
	1000	1019 ± 13.5	1.3
Lomefloxacin	25	25.4 ± 3.2	12.9
	2500	2367 ± 209	8.4
Enrofloxacin	10	12.3 ± 1.2	12.2
	100	938 ± 68.3	6.8
Gatifloxacin	100	85.2 ± 6.2	6.2
	10000	9980 ± 953	9.5

3・5 HPLC/FL の分析法バリデーション

本分析法の、食肉中における検出限界、定量限界及び分離度を求めた⁸⁾。検出限界は1～20 ng/g、定量限界は5～200 ng/gであり、各キノロン系抗菌剤の相互分離が達成

された (Table 3)。本分析法の日内及び日間変動を求めたところ、定量限界付近にてバラツキと回収率の低下が見られたものの、13% 以下と良好な結果が得られた (Table 4)。これらの結果より、本分析法は食肉中キノロン系抗菌

Table 5 Concentration of fluoroquinolones in meat samples by ELISA and HPLC/FL

	ELISA	HPLC/FL							
	Enrofloxacin equivalent	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
Round	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Liver-1	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Liver-2	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sirloin	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sasami	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Norfloxacin (50 ng g ⁻¹)	44.2	N.D.	53.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Ciprofloxacin (50 ng g ⁻¹)	50.2	N.D.	N.D.	N.D.	59.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Danofloxacin (50 ng g ⁻¹)	43.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	49.5	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Enrofloxacin (50 ng g ⁻¹)	53.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	58.4	N.D.

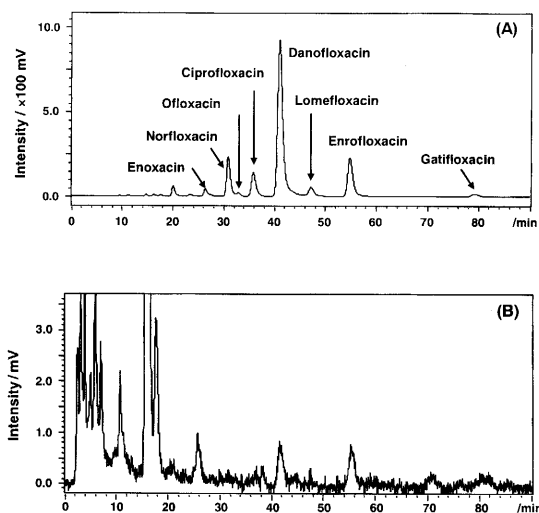
(ng g⁻¹), N.D.: Not detection

Fig. 5 Chromatograms of (A) fluoroquinolone standard and (B) meat sample

The mobile phase was 20 mM phosphate buffer (pH = 3.0)/acetonitrile (83:17, v/v) containing 0.2% nona-fluoropentanoic acid. Flow rate was 0.2 ml/min.

剤の分析に適用可能であると考えられる。

3・6 実試料の測定結果

キノロン系抗菌剤標準品及び実試料のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。キノロン系抗菌剤は他の共存物質の影響を受けることなく良好に分離された。本分析法を用いて、食肉中キノロン系抗菌剤を測定した。その結果、HPLC/FL において、すべての食肉からは検出限界未満であった。また、同一の試料を ELISA で測定したところ、同様に定量限界値 (8 ng/g) 未満となった。更に、食肉に既知の濃度のキノロン系抗菌剤を添加し、HPLC/FL 及び ELISA で測

定したところ、両者の間に有意な相関性が得られた (Table 5)。

4 結 言

ELISA 法は簡便な方法で、多検体を測定できる利点を有している。しかしながら、交差反応性などの問題から、定性能力に欠け、はん用性に乏しかった。そこで、キノロン系抗菌剤を対象薬剤として、HPLC/FL と ELISA 法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料へと適用したところ、両者の値に相関性が認められた。

HPLC/FL における前処理等煩雑な操作及び約 120 分の分析所要時間を考慮すると、ELISA キットは 1 次スクリーニング法としての有用性を示唆することができ、今後、更なる研究を進めていく必要があると思われる。

文 献

- 1) J. Roybal, C. C. Walker, A. P. Pfenning, S. B. Turnipseed, J. M. Storey, S. A. Gonzales, J. A. Hurlbut: *J. AOAC Int.*, **85**, 1293 (2002).
- 2) J. H. Shim, J. Y. Shen, M. R. Kim, C. J. Lee, I. S. Kim: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7528 (2003).
- 3) I. Steffenak, V. Hormazabal, M. Yndestad: *Food Addit. Contam.*, **8**, 777 (1991).
- 4) G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, A. R. Rodriguez: *J. Chromatogr. A*, **952**, 121 (2002).
- 5) C. K. Holtzapple, E. J. Pishko, L. H. Stanker: *Anal. Chem.*, **72**, 4148 (2000).
- 6) V. F. Samanidou, C. E. Demetriou, I. N. Papadoyannis: *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 623 (2003).
- 7) J. E. Renew, C. H. Huang: *J. Chromatogr. A*, **1042**, 113 (2004).
- 8) E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders: *J. AOAC Int.*, **88**, 1179 (2005).

Analysis of Fluoroquinolones in Meat Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and HPLC

Yusuke IWASAKI¹, Takeshi ITO¹, Wataru KITAMURA¹, Mihoko KATO², Tsukasa KODAIRA²,
Masakazu HORIE³, Rie ITO¹, Koichi SAITO¹ and Hiroyuki NAKAZAWA¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

² Frontier science cooperation, Ltd., 1-777-12, Shinko-nishi, Ishikari-shi, Hokkaido 061-3241

³ Saitama Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

(Received 21 July 2006, Accepted 20 October 2006)

Fluoroquinolones (FQs) are an important group of synthetic antibacterial, which are widely used to treat human and veterinary diseases. In recent years, FQs residues were detected in several samples. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is useful to determine many samples simultaneously. However, there is a problem of not having qualification because of cross-reactivity. In the present study, we developed an analytical method using HPLC/FL for a comparative study with ELISA. Moreover, an HPLC/FL system was applied to the determination of FQs residues in meat samples. The LOD and LOQ of HPLC/FL were 2 ng/g and 10 ng/g for enrofloxacin, respectively. The extraction recovery of enrofloxacin spiked concentration of 50 ng/g was 107.8%. The HPLC method and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of fluoroquinolones in meat samples were compared. FQs were detectable in meat samples added FQs standard by HPLC/FL and ELISA. Moreover, there was a correlation between HPLC/FL and ELISA. In conclusion, ELISA may be useful to rapid monitoring of residues for FQs instead of HPLC/FL, which requires analytical times of 120 min in meat samples.

Keywords : fluoroquinolones; enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC/FL.