

〔資 料〕

魚介類中のテトラサイクリン類分析法の検討

石川県保健環境センター健康・食品安全科学部 吉村 瑞江・山岸 喜信

キーワード：テトラサイクリン類, 魚介類

1 はじめに

厚生労働省まとめの輸入食品等の食品衛生法違反事例中、動物用医薬品に関するものでは、魚介類中からのテトラサイクリン類の検出事例が多く見られる。¹⁾²⁾

テトラサイクリン類について、当センターでは、食肉及び卵を対象に標準作業書を作成し検査を行っているが、例えば平成16年度に行った添加回収試験ではテトラサイクリン (TC) 55～67%, オキシテトラサイクリン (OTC) 62～80%, クロルテトラサイクリン (CTC) 45～64%と、その回収率は概して低い。今回、魚介類に適用した場合にも、必要な回収率を確保できるよう試験方法を検討した。

2 試験方法

2・1 試料及び試薬

(1) 試料

違反事例のみられたうなぎ、冷凍えび、しじみについて、通知法に従って添加回収試験を行ったところ、うなぎ及びえびについては、TC, OTC, CTC いずれも70%以上の回収率を確認したが、しじみでは、特に CTC の回収率が低かったため、市販のしじみを用いた。

(2) 標準品

塩酸テトラサイクリン、塩酸オキシテトラサイクリン、塩酸クロルテトラサイクリンは、Riedel-deHaen 社製を使用した。

(3) 標準溶液

各標準品10.8mg (TC, OTC, CTC 各10mg 相当) を秤取し、メタノールを加えて10mL としたものを標準原液とし、1.36%リン酸一カリウム溶液で適宜希釈して標準溶液とした。

(4) クエン酸緩衝液

下記の第1液と第2液を307:193の割合で混和し調製した (pH4.0マッキルベイン緩衝液)。

第1液：クエン酸・一水和物21.0g を水に溶かして1,000mL とした。

第2液：リン酸二ナトリウム・十二水和物71.6g を水に溶かして1,000mL とした。

(5) EDTA 含有クエン酸緩衝液

EDTA-2Na・二水和物1.86g にクエン酸緩衝液500mL を加えて溶かした (0.01M EDTA 含有マッキルベイン緩衝液 (pH4.0))。

(6) 精製用カートリッジカラム

スチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジカラム Sep-pak Plus PS2 (265mg, Waters 社製) を、あらかじめメタノール10mL, 水10mL, 飽和 EDTA-2Na 水溶液 5 mL で処理した後、使用した。

(7) イミダゾール緩衝液

イミダゾール68.08g, EDTA-2Na・二水和物0.37g, 酢酸マグネシウム・四水和物10.72g を水に溶かし、800 mL とし、これに酢酸を加えて pH を7.2に調整後、さらに水を加えて1,000mL とした。

メタノール, n-ヘキサン, アセトニトリル及び水は、HPLC用を、その他の試薬は試薬特級品を用いた。

2・2 装置及び測定条件

蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ

使用機器：島津 LC9A

カラム：L-column ODS (4.6×150mm)

カラム温度：40℃

移動相：(1)メタノール-イミダゾール緩衝液 (17:83) (7.5分間)

(2)メタノール-イミダゾール緩衝液 (25:75)

Determination of Tetracyclines in Corbicula, by YOSHIMURA Mizue and YAMAGISHI Yoshinobu (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words: Tetracyclines, Corbicula

表1 1日後の濃度変化の割合

	減少率(%)		
	OTC	TC	CTC
EDTA含有クエン酸緩衝液	5.6%	13.6%	20.2%
5mMクエン酸溶液	1.8%	12.1%	13.8%
水	13.9%	7.1%	22.1%

(9分間)

(3)メタノール-イミダゾール緩衝液(60:40)

(10.5分間)

(4)メタノール-イミダゾール緩衝液(17:83)

(21分間)

流速:0.7mL/min

注入量:20 μ L

測定波長:励起波長 380nm, 蛍光波長 520nm

2・3 試験溶液の調製

(1) 抽出

細切均一化した試料5gにEDTA含有クエン酸緩衝液30mLを加え、1分間細切した後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、水層を100mLの分液ロート中に移した。遠心分離管の残留物にEDTA含有クエン酸緩衝液20mLを加え、振とう機を用いて1分間激しく振り混ぜた後、先と同様の条件で遠心分離を行い、水層をその分液ロート中の水層に合わせた。これに、n-ヘキサン20mLを加え、5分間激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、水層を分取した。

(2) 精製

2・1(6)の前処理済みのカートリッジカラムに(1)で抽出した溶液を負荷し、クエン酸緩衝液2mLで洗浄し、さらに、水3.5mLで3回洗浄した。その後、0.01mol/Lシュウ酸含有メタノール10mLで溶出し、減圧下40°C以下でメタノールを除去した。この残留物に1.36%リン酸一カリウム溶液1.0mLを加えて溶かし、これを試験溶液とした。

3 結果及び考察

3・1 添加溶液の検討

添加溶液の安定性を確認するため、EDTA含有クエン酸緩衝液、5mMクエン酸溶液、及び水を用いて、それぞれ1ppmの標準溶液を調製し、調整当日及び翌日に測定し、濃度の変化を比較した。EDTA含有クエン酸緩衝液については、水溶液よりも濃度変化は小さいが、5mMクエン酸溶液に比べ、減少の割合が大きかった。テトラサイクリン類は酸性下で比較的安定とされているが、EDTA存在下での長時間の保存は不適当と考えら

れ、添加溶液は用時調整すべきと考えられた。また、試料からの抽出には、EDTA含有クエン酸緩衝液が用いられるが、精製までの操作を速やかに行い、抽出溶媒の状態で長時間置くことのないようにする必要があると考えられる。(表1)

3・2 精製方法の検討

(1) カートリッジカラムの前処理方法

通知法では、シリカゲル中の金属イオンをマスキングするため、カートリッジカラムをあらかじめ飽和EDTA-2Na溶液で処理した後使用することとされているが、3.1の結果からテトラサイクリン類は、EDTA存在下では不安定であると考えられた。そこで、岡ら³⁾の前処理方法を参考にし、EDTAの濃度の低い0.1mol/L EDTAクエン酸緩衝液を用い前処理を行ったカラム(カラムa)と飽和EDTA-2Na溶液を用いて処理したカラム(カラムb)について、添加回収試験を行った。OTCはカラムaの方が回収率はわずかに高かったが、CTCは逆にカラムbのほうが高く、CTCの回収率を考慮すると、飽和EDTA-2Naで処理した方がよいことを確認した。(表2)

表2 カラム前処理方法の違いによる回収率の比較

	回収率(%)		
	OTC	TC	CTC
カラムa	83.9	67.3	61.8
カラムb	79.4	67.5	64.1

前処理方法)

カラムa:0.01mol/L EDTAクエン酸緩衝液処理

カラムb:飽和EDTA-2Na溶液処理

(2) カラム洗浄方法の検討

カラム洗浄に用いる水の注入量の違いによる、回収率への影響を検討した。あらかじめ、テトラサイクリン類0.02ppmとなるように調製した標準溶液(EDTA含有クエン酸緩衝液)50mLを用い、冷水5mL、3回の注入で、回収率への影響がないことを確認した。その後、標準品を各1 μ g添加した試料を用い、試験溶液の調製に従って抽出し、前処理済みのカートリッジカラムに負荷後、水5mLで3回洗浄した後で溶出し(条件b)、水3.5mLで3回洗浄し溶出したもの(条件a)とを比較した。条件aでの平均回収率は、三物質とも75%以上と高い値ではあるが、相対標準偏差はいずれも10%を超え、バラツキが大きくよい結果は得られなかった。(表3)

(3) 溶出条件の検討

溶出液の違いによる影響をみるため、標準品を各1

表 3 カラム洗浄方法と溶出条件の相違による添加回収試験

洗 浄 方 法	溶 出 方 法	回収率 (平均) (相対標準偏差 (%) (n=3))		
		OTC	TC	CTC
水3.5mL×3	メタノール	84.2% (5.8)	69.2% (5.4)	64.9% (5.2)
水5mL×3	メタノール	93.7%(12.7)	82.6%(11.9)	75.1%(11.4)
クエン酸緩衝液 2 mL, 水3.5mL×3	0.01mol/L シュウ酸メタノール	88.9% (5.9)	76.2% (7.0)	77.5% (7.3)

μg 添加した試料を用い、岡ら³⁾の溶出方法を参考にし、前処理済みのカートリッジカラムに負荷後、水3.5mLで3回洗浄した後、0.01mol/L シュウ酸メタノール10mL又はメタノール10mLで溶出し、回収率を比較したところ、0.01mol/L シュウ酸メタノールを用いると、メタノールを用いた場合に比べ5～8%程度回収率が向上した。この結果を参考に、70%以上の回収率で、バラツキの少ない溶出条件を検討した。標準品を各1 μg 添加した試料を用い、試験溶液の調製に従って抽出し、前処理済みのカートリッジカラムに負荷後、クエン酸緩衝液 2 mLで1回、水3.5mLで3回洗浄した後、0.01mol/L シュウ酸メタノール10mLで溶出し (条件 c)、(2)の条件 a 及び条件 b と比較した。条件 c の平均回収率は、三物質とも76%以上で、条件 b に比べると OTC、TC の回収率は5%程度低い十分な回収率であり、相対標準偏差は条件 a には劣るもののいずれも10%以内と、条件 b に比べバラツキが少なく、良い結果が得られた。(表 3)

4 ま と め

EDTA 含有クエン酸緩衝液中ではテトラサイクリン類の濃度減少がみられるため、回収率への影響を抑えるには、添加溶液は用時調整とし、また、抽出溶媒の状態

で長時間置かないようにする必要があることがわかった。

精製用カラムの前処理については、通知法のとおりでよかったが、溶出条件を、クエン酸緩衝液 2 mL で1回、水3.5mL で3回の洗浄後、0.01mol/L シュウ酸メタノール10mLでの溶出に変えることで回収率の向上が認められ、結果のばらつきも少なく実用に耐える条件であることが確認できた。

文 献

- 1) 平成17年度輸入食品監視指導計画監視結果 (中間報告)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/11/dl/h1107-1a.pdf>
- 2) 輸入届出における食品衛生法違反事例 (速報)
(平成17年4月～6月)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/1-4/0504.html>
(平成17年1月～3月)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/1-4/0501.html>
- 3) 岡 尚男, 猪飼啓友, 早川順子, 石川直久, 柴田重昭, 斎藤富士雄, 大見 信, 安藤毅欣, 川田正之, 中西和夫: 食衛誌, 36, 759—762 (1995)