

HPLC による畜水産食品中のテトラサイクリン系 抗生物質の簡易分析法の検討

水谷 直樹・青柳由美子・佐藤 繁・白井 文雄

Keywords : テトラサイクリン系抗生物質 ; 高速液体クロマトグラフィー ; 畜水産食品.

1 はじめに

畜水産食品の生産性向上のため、家畜等の疾病の治療又は予防策として数多くの抗生物質が動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されている。中でもテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、抗菌域が広いことから汎用されており¹⁾、このため当該物質の畜水産食品中への残留が懸念される。残留 TCs の分析は、従来より微生物学的方法²⁾によって行われているが、操作性及び簡便性に難点があるため、最近では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法が幾つか検討されている³⁻⁶⁾。HPLC による残留 TCs の分析では、TCs が蛋白質と結合し抽出されにくいことから³⁾、通常、酸性の緩衝液又は除蛋白液などの水系溶媒で抽出を行い、その後ミニカラムで精製し測定するものである。しかしこの方法では、ミニカラムで精製するための濃縮操作やミニカラムのコンデショニングに手間がかかるとともに、食品種によっては回収率が低下することなどを経験している。

そこで著者らは、残留 TCs を水系溶媒で抽出した後、有機溶媒で再抽出することにより精製する簡易な HPLC 法について、テトラサイクリン (TC)、オキシテトラサイクリン (OTC) 及びクロルテトラサイクリン (CTC) を対象に検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

2 方 法

2.1 試薬及び試薬の調製

標準物質：和光純薬工業(株)製の「テトラサイクリン塩酸塩」「オキシテトラサイクリン塩酸塩」及び「クロルテトラサイクリン塩酸塩」を 0.01M リン酸一ナトリウム-アセトニトリル (1 : 4) で 100 µg/ml に調製し、使用時に適宜希釈した。

有機溶媒：アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業(株)製 HPLC 用を、酢酸エチルは関東化学(株)製 HPLC 用を、ヘキサンは和光純薬工業(株)製残留農薬分析用を用いた。

その他の試薬：和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

2.2 抽出溶媒

3.0% メタリン酸-アセトニトリル (1 : 1) 溶液

2.3 分析装置

HPLC : 日本分光工業(株)製 LC-800 シリーズ

検出器 : 日本分光工業(株)製フォトダイオードアレイ検出器 MD-910

2.4 試料溶液の調製法

細切した試料 5 g をホモジナイザーカップにとり抽出溶媒 70 ml を加え、1 分間ホモジナイズした後ハイフロスーパーセルを適量加え吸引ろ過した。残渣を抽出溶媒で洗浄し、先のろ液に合わせた。このろ液に塩化ナトリウム 15 g を加え、5 分間振とう後、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、塩析によりアセトニトリル層を分取した。更に水層にアセトニトリル 20 ml を加え振とう後、アセトニトリル層を分取し、先のアセトニトリル層に合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水した。これにメタノールを適量加え減圧乾固し、残留物を 0.01M リン酸一ナトリウム-アセトニトリル (1 : 4) 溶液 1 ml を加え超音波洗浄器中で溶解した。溶解液にアセトニトリル飽和ヘキサン 0.5 ml を積層し、3000 rpm で 5 分間遠心分離した後⁷⁾、下層を取り出し 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過し、HPLC の試料溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 HPLC の測定条件

HPLC による TCs の測定には、検出器に蛍光検出器^{4,5)}又は UV 検出器^{3,6,8)}を用いた方法があるが、物質の同定確認を同時に行うためフォトダイオードアレイ検出器を用いることとした。そして、この検出器を使用する測定法の検討には、UV 検出器を使用した測定方法が参考になると考えられた。一般に UV による測定には、移動相にリン酸緩衝液-アセトニトリル系^{3,6)}又は水-アセトニトリル-酢酸系⁸⁾を、分離カラムに Nucleosil 5-CN³⁾、ODS-2⁶⁾、ODS-80Ts⁸⁾などの逆相カラムを用いる方法が報告されている。そこでこれら二系統の移動相におけるそれぞれの分離カラムについて、TCs の分離を試みた。

その結果、移動相には 0.01M リン酸一ナトリウム-アセトニトリル (pH2.5) を、分離カラムには ODS-2 カラ

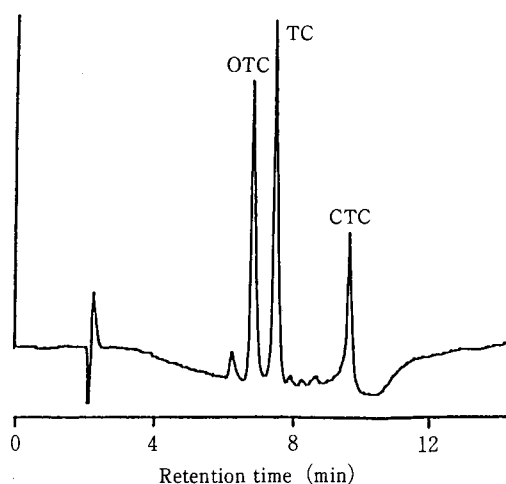


Fig. 1. HPLC chromatogram of TC, OTC and CTC mixture (100ng each).

ム (150mm×4.6mm I.D.) を用いてグラジエント溶出を行った場合に最も良好なクロマトグラムを得ることができた。

また、定量には、3物質とも270nm及び360nm付近に最大吸収を示すが、妨害ピークの影響を考慮し測定波長を360nmとした。

なお、この波長における標準物質のクロマトグラムをFig. 1に示した。

(HPLCの測定条件)

流 速: 1.0ml/min

カラム温度: 40℃

試料注入量: 20 μ l

(グラジエント溶出)

0min → 8min アセトニトリル 10%→35% (Concave)

8min → 10min アセトニトリル 35%→35% (Linear)

10min → 12min アセトニトリル 35%→10% (Linear)

3.2 TCsの有機溶媒による再抽出

試料中に残留するTCsの抽出には、一般に酸性の緩衝液又は除蛋白液などの水系溶媒が用いられているが、これらの水系溶媒に抽出されたTCsを有機溶媒で再抽出する方法について検討を行った。水系溶媒には、他報でTCsの抽出溶媒として用いられている0.1N塩酸⁵⁾、0.5%メタリン酸溶液³⁾、0.05Mクエン酸溶液⁶⁾及び0.1M EDTA含有マキルベン緩衝液 (pH4.0)¹⁾を、また、有機溶媒にはTCsの物性などを考慮し、アセトニトリル及び酢酸エチルを使用した。

それぞれの水系溶媒30mlにTCsを4 μ g添加し、そこへ同量のアセトニトリル又は酢酸エチルを加え、塩化ナトリウムを過飽和量加え振とうした後、有機溶媒層を分取し、抽出率を調べた。なお、抽出は2回行った。

その結果、Table 1に示すとおり、酢酸エチルを用いた場合には、いずれの水系溶媒とも3物質の抽出率が低かった。

一方、アセトニトリルを用いた場合には、酢酸エチルの

Table 1. Recoveries of organic solvents used for re-extraction

Solutions for extraction	pH	(n = 2)					
		Recoveries (Av.) %					
		TC		OTC		CTC	
		A	E	A	E	A	E
0.1N Hydrochloric acid	1.3	77.8	16.7	67.0	15.7	86.5	32.7
0.5% Metaphosphoric acid	1.9	90.7	22.4	81.1	25.0	91.2	34.4
0.05M Citric acid	2.2	83.0	20.2	78.4	21.7	92.3	37.3
0.01M EDTA, Mcllvaine buffer	4.0	62.4	14.5	48.9	15.1	82.2	36.7

A: Acetonitrile, E: Ethyl Acetate

TC: Tetracycline, OTC: Oxytetracycline, CTC: Chlortetracycline

場合に比べ3物質とも高い抽出率を示し、中でもCTCはいずれの水系溶媒からも良好に抽出された。また、TC及びOTCは0.5%メタリン酸溶液及び0.05Mクエン酸溶液からの抽出率が良好であり、両溶媒ともpH値が2付近であることから、これらの再抽出には、水系溶媒のpH値が影響していると考えられた。

以上から、有機溶媒にアセトニトリルを、水系溶媒に3物質の抽出率が良好であったメタリン酸溶液を用い、以後の検討ではアセトニトリルが水溶性溶媒であることから、操作の簡便性も考慮し、予め両溶媒の等量混合液を抽出溶媒として調製し行うこととした。

3.3 メタリン酸溶液の濃度

実試料を用いて本法の至適メタリン酸濃度を検討した。0.5% (pH1.9)、1.0% (pH1.8)、2.0% (pH1.7)、3.0% (pH1.6) 及び4.0% (pH1.5) メタリン酸溶液をそれぞれ調製し、実試料に細切した豚肉及び牛肉各5gにTCsを4 μ g添加したものをを用いて「2.4試料溶液の調製法」に従って回収試験 (n = 2) を行った。

その結果、Fig. 2に示したとおり、両試料ともTCはメタリン酸溶液の濃度が1.0～4.0%の範囲で、OTC及びCTCは2.0～4.0%の範囲で良好に回収された。また、0.5%溶液を用いた場合には、3物質とも回収率が低い結果となったが、これはこの溶液の除蛋白作用が不十分であったためと、TC、OTCにあつては3.2の検討結果から、試料によりpH値がアルカリ側に変動し再抽出に影響したものと推察された。

以上のことから、本法では2.0～4.0%のメタリン酸溶液を用いることが適当と考えられたが、試料によるpH値の変動を考慮し、3.0%溶液 (pH1.6) を用いることとした。

3.4 添加回収試験

細切した豚肉、豚肝、牛肉、牛肝、鳥肉及びえび各5gにTCsを4 μ g添加し、「2.4試料溶液の調製法」に従って回収試験 (n = 3) を行った結果をTable 2に示した。いずれの試料も妨害なく3物質を測定することができ、それぞれTCは82～91%、OTCは73～86%、CTCは75～86%の範囲でほぼ良好に回収された。このことから、本法が残留TCs分析に適用できることが分かった。

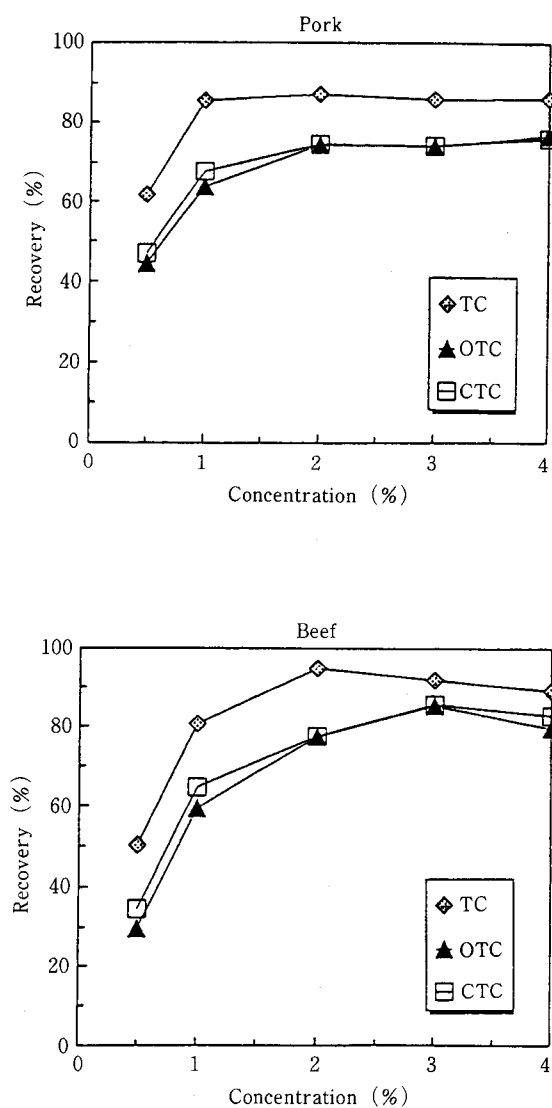


Fig. 2. Effect of concentration of metaphosphoric acid on recoveries.

なお、豚肉試料におけるクロマトグラムを例を Fig. 3 に示した。

また、本法での定量下限値は、 $S/N = 3$ とした場合、OTC 及び TC は $0.05 \mu\text{g/g}$ 、CTC では $0.10 \mu\text{g/g}$ であった。

Table 2. Recoveries of tetracyclines
($n = 3$)

Sample	Recoveries (Av. $\pm$ S.D.) %		
	TC	OTC	CTC
Pork	88.7 ± 2.6	76.5 ± 2.6	75.3 ± 3.9
Liver of swine	89.2 ± 2.3	77.0 ± 1.7	86.4 ± 1.9
Beef	91.0 ± 2.5	85.7 ± 2.3	83.0 ± 3.7
Liver of cattle	82.1 ± 2.8	74.3 ± 0.6	79.9 ± 3.9
Chicken	87.2 ± 3.8	74.9 ± 3.2	76.2 ± 4.3
Shrimp	87.1 ± 3.8	72.6 ± 3.4	79.7 ± 2.7

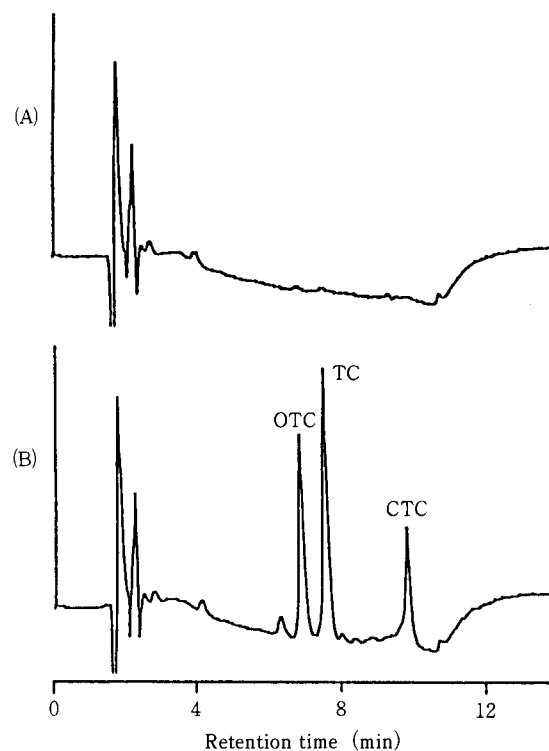


Fig. 3. HPLC chromatograms of sample solution prepared from normal pork (A) and added tetracyclines (B).

3.5 TCs 残留試料への適用

TCs 残留試料における本法の適用について、動物用医薬品であるアクロマイシン末[®]（日本レダリー(株)製の TC 製剤）を10日間、計58.7mg 経口投与したうさぎ（雄）の筋肉、肝臓及び腎臓を試料とし、微生物学的方法（厚生省法）⁹⁾と比較検討した。

その結果、Table 3 に示したとおり、いずれの試料からでも TC を検出し定量することができ、厚生省法による半定量値と比べても、腎臓については若干高かったものの、筋肉及び肝臓はほぼ同様な値が得られた。また、それぞれ検出したピークをフォトダイオードアレイ検出器を用いて UV スペクトルを測定した結果、検出したピークのスペクトルは、標準 TC のそれと概ね一致していた。

なお、筋肉試料のクロマトグラムと240nm から400nm の波長範囲における UV スペクトルの測定結果をそれぞれ Fig. 4, Fig. 5 に示した。

Table 3. Determination of tetracycline

Sample (Rabbit)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	Proposed method	Bioassay
Muscle	0.21	0.17
Liver	0.24	0.19
Kidney	0.55	0.39

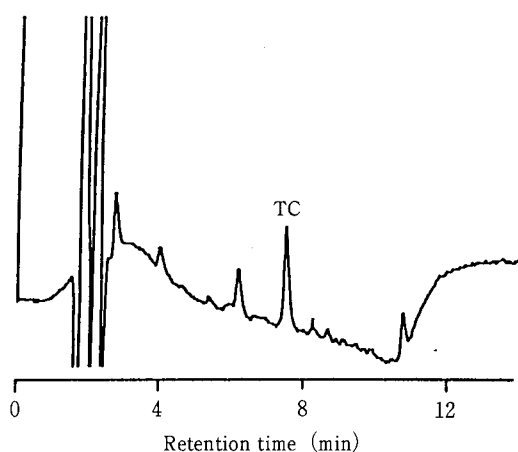


Fig. 4. HPLC chromatogram of sample solution prepared from muscle of rabbit.

4 ま と め

HPLCによる畜水産食品中の残留TCsの分析では、通常、酸性の緩衝液又は除蛋白液などの水系溶媒を用いて抽出を行い、その後ミニカラムで精製し測定する。今回、著者らは水系溶媒で残留TCs (TC, OTC, CTC) を抽出した後、有機溶媒で再抽出して精製する簡易なHPLC法について検討した。

- 1) 水系溶媒中のTCsを有機溶媒で再抽出する検討では、有機溶媒にアセトニトリルを、水系溶媒にpH 2付近の0.5%メタリン酸溶液又は0.05Mクエン酸溶液を用いた場合の抽出率が良好であった。
- 2) 本法の水系溶媒であるメタリン酸溶液の実試料を用いた場合の至適濃度について検討したところ、2.0~4.0%溶液で良好な結果が得られた。
- 3) 操作の簡便性を考慮し、3.0%メタリン酸-アセトニトリル(1:1)混合溶液を抽出溶媒とし、細切した豚肉などを試料に添加回収試験を行ったところ、いずれの試料も妨害なく3物質を測定でき、回収率も概ね良好であった。
- 4) TCs残留試料への適用として、TC製剤を経口投与したうさぎの筋肉、肝臓及び腎臓についてのTCの検出定量を行ったところ、微生物学的方法による結果とはほぼ一致した。

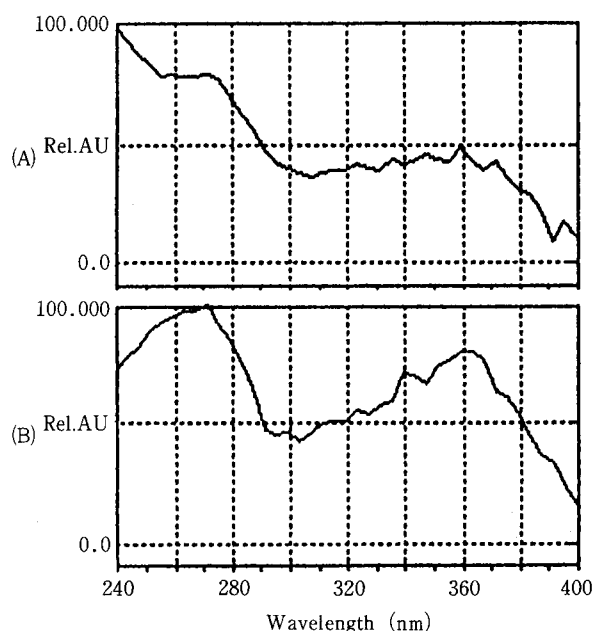


Fig. 5. Comparison for UV spectra of sample solution (A) and TC standard (B) by photodiode array detector.

- 5) 本法は全操作が2時間以内で完了する簡易なHPLC法として、十分実試料に応用できると考えられた。

文 献

- 1) 財畜産生物科学安全研究所編：畜水産食品の薬物残留とその分析法，近代出版，(1994)。
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：畜水産食品中の残留物質検査法，中央法規出版，(1990)。
- 3) 星野庸二，堀江正一，能勢憲英，岩崎久夫：食衛誌，**25**, 430 (1984)。
- 4) 米田 豊，古城典子，安藤良吉：食衛誌，**30**, 42 (1989)。
- 5) 中野謙一，小林香夫，棚橋宣康：食衛誌，**32**, 43 (1991)。
- 6) 新井芳典，他：群馬県中央食肉検査所事業概要(平成4年度)，96 (1992)。
- 7) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(改訂法)，(1993)。
- 8) 鎌倉和政，他：食衛誌，**35**, 310 (1994)。
- 9) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂)，(1994)。