

短報

金属キレートカラム精製法を用いた 高速液体クロマトグラフィーによる 畜産物中の抗生物質の分析

小菅教仁, 脇ますみ, 甲斐茂美, 岸 弘子

Analysis of antibiotics in livestock products by high-performance liquid chromatography using clean up with metal chelate solid phase extraction column

Norihito KOSUGE, Masumi WAKI,
Shigemi KAI and Hiroko KISHI

緒 言

抗生物質は、畜産動物の疾病予防及び治療を目的に用いられており、畜産物の生産性の向上に大きく貢献している。

畜産物に用いられる抗生物質の1種であるテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、抗菌域が広く安価であることから、飼料添加物あるいは動物用医薬品として牛・豚などの家畜に汎用されている¹⁾。

畜産物中のTCsの分析法は、これまでに様々な方法が検討され²⁾、通知法として、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法III(畜産物)」³⁾及び「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法」³⁾ (個別法)が示されている。

しかしながら、個別法による畜産物中クロルテトラサイクリン(CTC)の添加回収試験の結果は精度管理の一般ガイドライン⁴⁾で示された目標値を下回ることがあり、日常の検査に苦慮している。また、畜産物の肝臓及び腎臓は夾雑物質の影響が大きいため、通知法による分析は困難である。これまでに、TCs分析における精製法として、金属キレートカラム精製法を用いた蜂蜜製品中TCsの分析法の報告⁵⁾はあるが、畜産物の肝臓及び腎臓についての報告はほとんどみられない。

そこで著者らは、CTCの分析精度の向上を目的に個別法における前処理方法を検討した。さらに豚筋肉、豚肝

臓及び豚腎臓を対象に、過去に検出事例があるドキシサイクリン (DOXY) を加えたTCs4薬剤について、金属キレートカラム精製法を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法を検討したので報告する。

方 法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県農業技術センター畜産技術所から提供された豚筋肉、豚肝臓及び豚腎臓を分析対象とした。

オキシテトラサイクリン(OTC)塩酸塩及びCTC塩酸塩標準品は和光純薬工業(株)製のHPLC用を、テトラサイクリン(TC)塩酸塩標準品はDr.Ehrenstorfer GmbH社製の残留農薬試験用を、塩酸DOXY標準品はFluka社製を用いた。

各標準品を精秤し、メタノールに溶解して1,000 μ g/mlとしたものを標準原液とした。これらの標準原液を混合し、0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)で適宜希釈し、各濃度の混合標準溶液を調製した。

抽出溶液はクエン酸一水和物12.9g、リン酸水素二ナトリウム27.64g及びNa₂EDTA 3.72gを水で溶解して1,000mlとした。

溶出緩衝液はクエン酸一水和物1.29g、リン酸水素二ナトリウム2.76g、NaCl 2.92g及びNa₂EDTA 3.72gを水で溶解し100mlとした。

1mol/lイミダゾール緩衝液はイミダゾール68.08g、Na₂EDTA 0.37g及び酢酸マグネシウム10.72gを約800mlの水に溶解し、酢酸でpH7.2に調整後、水を加えて1,000mlとした。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムはGL Sciences社製Inert Sep PLS-2(265mg/6ml)カートリッジ(PLS-2)を用い、あらかじめメタノール、水及び飽和Na₂EDTA溶液でコンディショニング後に使用した。

金属キレートカラムはGL Sciences社製InertSep ME-1 (60mg/3ml)(ME-1)、(株)日立ハイテックフィールドイング製NOBIAS CHELATE- PA1(250mg/6ml) (PA1)及びGEヘルスケア・ジャパン(株)製Chelating Sepharose Fast Flow(Chelating Sepharose FF)を用いた。ME-1及びPA1カートリッジは、あらかじめメタノール、水及び0.1mol/l硫酸銅溶液でコンディショニング後に使用した。Chelating Sepharose FFは20%エタノールに懸濁し、0.9mlをエンプティリーザーバーに注入して水洗し、0.1mol/l 硫酸銅溶液でコンディショニング後に使用した。

メタノールは残留農薬・PCB試験用及びLC/MS用、アセトニトリルはLC/MS用、n-ヘキサンは残留農薬・PCB試験用、その他の試薬は特級を使用した。

2. HPLC装置及び測定条件

HPLCはWaters社製 alliance2695を用いた．分析カラムはYMC社製 YMC-triart C18 (3.0mm i.d. × 150 mm, 3 μ m) を用い，カラム温度40℃，流速0.3ml/min, 注入量10 μ l, 移動相はイミダゾール緩衝液－メタノール (78 : 22) 及び (87 : 13) とし，検出波長は励起波長380nm及び蛍光波長520nmで分析した．

3. 試験溶液の調製

細切均一化した試料の5.00gを遠沈管に量り採り，抽出溶液70mlを加えホモジナイズ後，毎分3,000回転で遠心分離し，水層を採った．さらに残留物に抽出溶液30mlを加えて抽出し，得られた水層を合わせた．これにn-ヘキサンを加えて振とう後，毎分6,000回転で遠心分離して水層を分取した．この溶液をPLS-2に負荷し，水10mlで洗浄後，メタノール10mlで溶出した．得られた溶出液を金属キレートカラムに負荷し，水2ml，メタノール2ml，水2mlで洗浄後，溶出緩衝液4mlで溶出した．この溶出液をPLS-2に負荷し，水10mlで洗浄後メタノール10mlで溶出した．得られた溶出液を40℃以下で減圧濃縮・窒素乾固し，残留物に0.1%ギ酸:アセトニトリル (9:1)1.0mlを加えて溶解し，毎分13,000回転で遠心分離後，上澄を採取し，試験溶液とした．

4. 妥当性評価試験

検討した試験法について，「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁶⁾ (妥当性ガイドライン) に従い，選択性，真度，併行精度及び室内精度を評価し，定量限界を求めた．

添加濃度はTCsの基準値 (OTC, TC及びCTCは豚筋肉0.2 μ g/g, 豚肝臓0.6 μ g/g, 豚腎臓1.2 μ g/g, DOXYはいずれも0.05 μ g/g) とし，検量線は各基準値の50%～150%に調製した混合標準溶液を用いて作成した．

結果及び考察

1. 前処理方法の検討

個別法の前処理工程をホモジナイズ及び遠心分離による抽出，n-ヘキサンによる脱脂，PLS-2による精製，濃縮と1.36%リン酸一カリウム溶液による定容の4つの工程に区分し，各工程におけるTCsの損失状況を確認した (表1)．その結果3薬剤 (OTC, TC及びCTC) に共通して抽出工程で損失がみられた．さらにCTCは濃縮・定容工程でも損失していることが示された．そこで，これらの工程について検討することとした．

(1) 抽出工程の検討

TCsは試料中のタンパク質と結合し抽出されにくく，その構造に β -ジケトン構造を有しており (図1)，二価の金属イオンとキレート形成しやすい⁷⁾．このため，遠心

分離後の残留物とともに残存し，個別法の抽出溶液量では十分に抽出されていないことが推察された．

そこで，豚筋肉を用い，抽出溶液量を70ml及び100mlに変更し，個別法に準じて分析し，比較検討した結果，回収率が最も良好であった100mlを抽出溶液量とした (表2)．

表1 TCs損失状況

前処理工程	OTC (%)	TC (%)	CTC (%)
抽出	-16.3	-26.3	-13.4
脱脂	-4.7	-9.3	0.0
精製	0.0	0.0	0.0
濃縮・定容	-4.6	0.0	-23.4

n=各工程1

添加量:OTC,TC 0.02 μ g/g, CTC 0.03 μ g/g

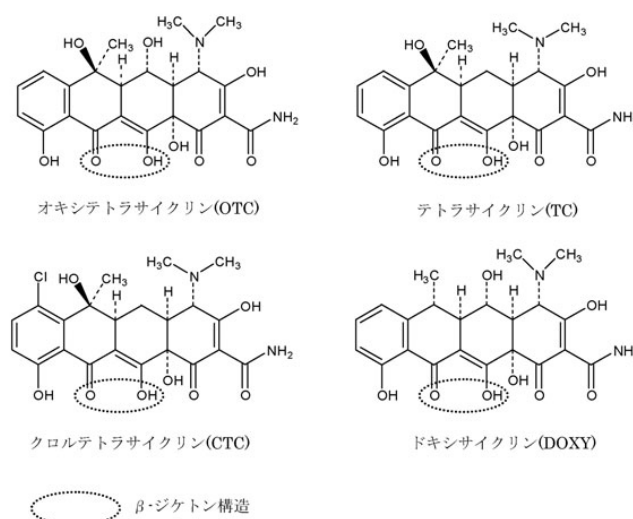


図1 テトラサイクリン系抗生物質の構造式

表2 抽出溶液量による回収率の比較

	抽出溶液量		
	50ml* (%)	70ml (%)	100ml (%)
OTC	78.5	82.5	84.4
TC	71.0	75.1	78.6
CTC	60.2	65.5	70.8

n=1, 添加量:0.2 μ g/g

* 個別法の抽出液量

(2) 濃縮・定容工程の検討

濃縮・定容工程でCTCが損失する原因としては、CTCの水への溶解性が低く⁸⁾、個別法で示された定容溶液では十分に溶解できていない可能性が考えられた。また、TCsの確認試験は質量検出器付き高速液体クロマトグラフ (LC/MS, LC/MS/MS) を用いることとされており、個別法の定容溶液は不揮発性の塩であるため、イオン化が不十分となり感度低下を引き起こす。このため、不揮発性の塩を用いない分析法の検討が必要である。これら

のことから、特にCTCの溶解性が高くHPLCによる分析が可能でLC/MS/MSにも適用できる定容溶液として、0.1%ギ酸溶液、0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)及び0.1%ギ酸：メタノール(9：1)の3種類について比較検討した。豚筋肉抽出液を精製後、TCs3薬剤を添加し、個別法に準じて分析した結果、3薬剤の回収率が最も良好であった0.1%ギ酸：アセトニトリル(9:1)を定容溶液とした(表3)。

表3 定容溶液による回収率の比較

定容溶液	OTC		TC		CTC	
	回収率 (%)	RSD* (%)	回収率 (%)	RSD* (%)	回収率 (%)	RSD* (%)
0.1%ギ酸溶液	110.6	5.7	81.3	1.4	89.8	2.9
0.1%ギ酸：アセトニトリル(9：1)	112.3	0.6	82.3	0.8	92.2	3.2
0.1%ギ酸：メタノール(9：1)	112.4	1.4	79.1	1.3	87.5	2.7

n=3, 添加量:0.1 μ g/g

*RSD=相対標準偏差

2. DOXYを加えた試験法の検討

混合標準溶液を分析したところ、DOXYは他の薬剤と明確に分離された(図2-a)。次に試料中の夾雑物質の影響を確認するため、抽出溶液量を100ml、定容溶液を0.1%ギ酸：アセトニトリル(9:1)に変更し、豚筋肉及び豚肝臓を用い個別法に準じて分析した。その結果、豚筋肉ではDOXYに、豚肝臓では4薬剤すべてに夾雑物質の影響が認められた(図2-b)。このため、さらなる精製が必要であると考えられた。

3. 金属キレートカラムの検討

TCsが二価の金属イオンとキレート形成しやすいという特性を利用し、銅イオンを配位させた金属キレートカラムにより特異的に分離できることから、ME-1、PA1及びChelating Sepharose FFの3種類の金属キレートカラムによる精製法について比較検討した。

豚肝臓を用い本試験法に従い分析したところ、ME-1及びPA1の回収率は著しく低く、溶出緩衝液量を50mlに増量しても十分な結果を得ることができなかった(表4)。これは、金属キレートカラムに対する銅イオンの保持が強く、今回用いた溶出液では十分溶出できないためと考えられた。一方、Chelating Sepharose FFはTCsを特異的に保持し、本試験法で用いた溶出緩衝液で十分溶出可能であり、妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた(図2-c)。これらの結果から金属キレ-

表4 金属キレートカラムによる回収率の比較

溶出緩衝液量	ME-1		PA1		Chelating Sepharose FF*
	5ml (%)	50ml (%)	5ml (%)	50ml (%)	4ml (%)
OTC	34.6	38.7	11.4	80.4	112.3
TC	25.0	30.3	12.4	78.2	107.8
CTC	10.2	18.1	0.0	39.9	108.6
DOXY	14.1	29.2	0.0	16.5	108.8

n=1, 添加量:0.2 μ g/g

*豚肝臓抽出液を用いた

トカラムにChelating Sepharose FFを用いることとした。

4. 妥当性評価試験

検量線はOTC、TC及びCTCは0.1 μ g/g～1.8 μ g/gで相関係数 $r > 0.999$ 、DOXYは0.025 μ g/g～0.075 μ g/gで相関係数 $r > 0.998$ と良好な直線性を示した。選択性、真度、併行精度及び室内精度はいずれも妥当性ガイドラインを満たす値であった(表5)。定量限界値(S/N=10)は、OTC：0.0020～0.0022 μ g/g、TC：0.0023～0.0031 μ g/g、CTC：0.0097～0.0123 μ g/g、DOXY：0.0111～0.0172 μ g/gであり、OTC、TC及びCTCは残留基準値よりも十分に低い値であった。一方、DOXYは残留基準値を下回る値ではあったが、さらに感度の高い

表5 妥当性評価結果

豚筋肉						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度 ^{*1} (%)	併行精度 ^{*2} (%)	室内精度 ^{*3} (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	0.2	○	98.8	3.0	7.3	0.0022
TC	0.2	○	80.9	5.3	2.5	0.0023
CTC	0.2	○	78.1	3.8	0.6	0.0097
DOXY	0.05	○	96.7	9.7	7.0	0.0172
豚肝臓						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度 ^{*1} (%)	併行精度 ^{*2} (%)	室内精度 ^{*3} (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	0.6	○	94.5	4.7	11.8	0.0020
TC	0.6	○	76.4	6.1	4.9	0.0031
CTC	0.6	○	76.1	5.8	6.7	0.0123
DOXY	0.05	○	85.4	7.8	13.3	0.0111
豚腎臓						
分析対象	添加量 (μ g/g)	選択性	真度 ^{*1} (%)	併行精度 ^{*2} (%)	室内精度 ^{*3} (%)	定量限界 (S/N=10) (μ g/g)
OTC	1.2	○	112.3	1.3	5.0	0.0021
TC	1.2	○	88.1	1.1	3.9	0.0024
CTC	1.2	○	84.5	1.3	4.8	0.0101
DOXY	0.05	○	101.6	4.5	6.0	0.0133

n=5

*1 真度=回収率, 目標値:70~120%

*2 併行精度=併行条件下の精度(RSD)

目標値:添加量0.1 μ g/g<の時10%未満, 0.05 μ g/gの時15%未満

*3 室内精度=室内条件下の精度(RSD)

目標値:添加量0.1 μ g/g<の時15%未満, 0.05 μ g/gの時20%未満

LC/MS/MSを用いた試験法の確立が必要であると考えられた。

今後は、分析条件を検討しLC/MS/MSによる感度の高いTCsの確認試験法を確立するとともに、TCsを特異的に分離できる本試験法を応用し、様々な成分を含む加工食品など幅広い食品に対する適用性を検討していきたい。

なお、本研究は平成23年度産学公連携共同研究事業の一環として実施した。

(平成24年8月1日受理)

文 献

- 1) 岡尚男：食品安全の事典，日本食品衛生学会編，pp. 318-321，朝倉書店，東京（2009）
- 2) 神田真軌，草野友子，小山内たか，牛山慶子，竹葉和江，坂本美穂ら：微生物学的スクリーニング，HPLCおよびLC/MS/MSによる食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質4薬剤の迅速分析，食衛誌，**49**，37-44（2008）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1129002号（平成17年11月29日）
- 4) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：衛食第117号（平成9年4月1日）
- 5) 藤田和弘，伊藤裕信，石原三知代，犬飼沙知，田中廣行，谷口誠：ポリマー系カートリッジおよび金属キレートクロマトグラフィーを用いた高速液体クロマトグラフィーによる濃厚蜂蜜中のテトラサイクリン系抗生物質の残留分析法，食衛誌，**49**，196-203（2008）
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1224第1号（平成22年12月24日）

7) 石野正蔵, 坂口武一, 森本功, 興津知明: 酸性溶液中におけるTetracycline類の Cu^{2+} への配位, 薬学雑誌, 101, 118-124 (1981)

8) The merck index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, ed. by Susan Budavari, 339-1450, Merck&Co., Inc., U. S. A. (1989)

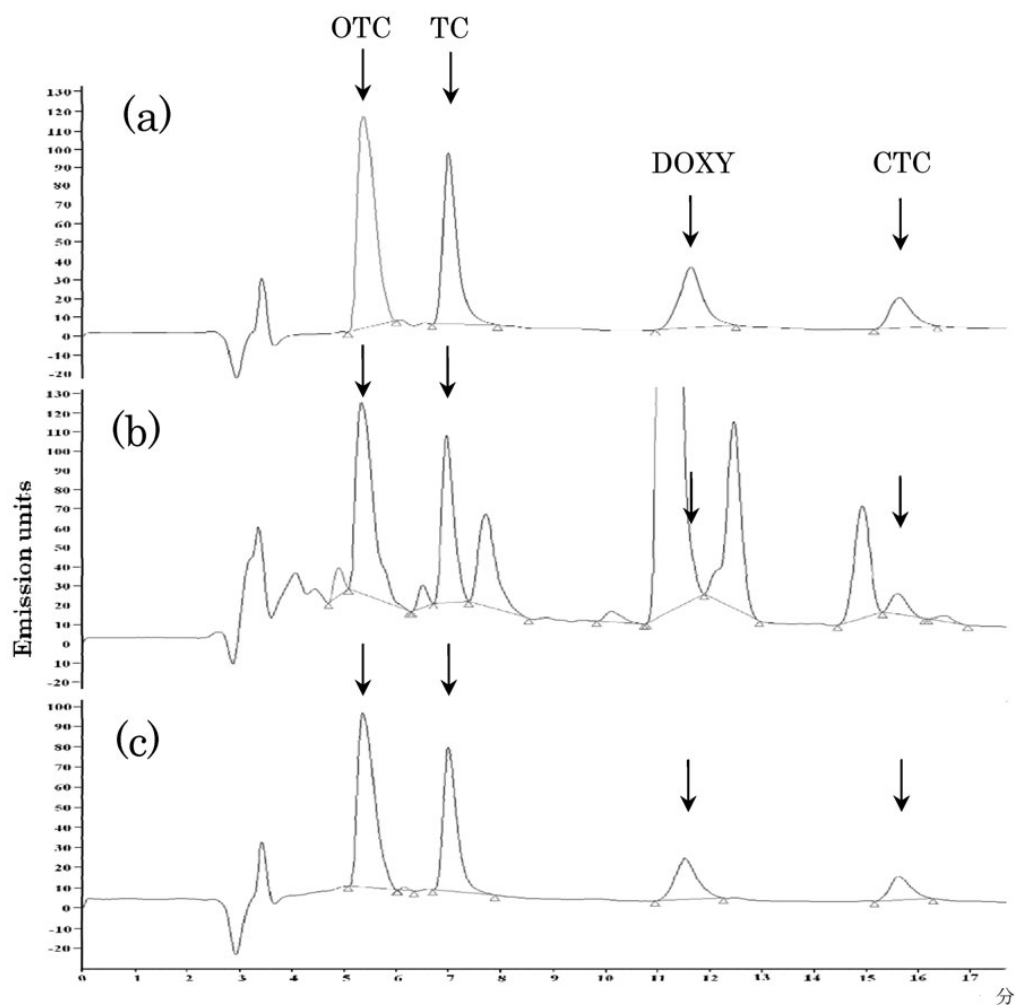


図2 テトラサイクリン系抗生物質のHPLC クロマトグラム

(a) 混合標準溶液

(b) 混合標準溶液を添加した豚肝臓抽出液 (金属キレートカラム処理なし)

(c) 混合標準溶液を添加した豚肝臓抽出液 (金属キレートカラム処理あり)

*濃度はいずれも検体中 $0.2 \mu\text{g/g}$ 相当