

食品中のテトラサイクリン・オキシテトラサイクリン クロルテトラサイクリンの迅速分析法の検討

赤木 浩一¹

Rapid HPLC Analysys of Tetracycline, Oxytetracycline and Chlortetracycline in Foods

Kouichi AKAKI

要旨

テトラサイクリン系抗生物質の迅速スクリーニング法を開発した。前処理にメタノールまたは EDTA2Na を使い HPLC 溶離液で抽出し、ろ過する簡易な操作で高い回収率(0.2ppm 添加時に 96 ~ 102%)を得た。HPLC の条件を検討することにより定量下限値は 0.01ppm(試料換算 0.05ppm)であった。

Key Words : テトラサイクリン Tetracycline, オキシテトラサイクリン Oxytetracycline
クロルテトラサイクリン Chlortetracycline

I はじめに

動物用医薬品として使用されているテトラサイクリン系の抗生物質は、飼料安全法および薬事法でその使用することができる動物の種類、用法、用量ならびに使用期間が食品衛生上の安全性を考慮して規定されている。

しかしこれらの規定に違反して不正に使用された場合、食肉、養殖魚、卵、乳中に残留することがある。

公定法である理化学的検査方法¹⁾は、畜水産物中の抗生物質を単離して定性・定量する方法で、抗生物質同定に欠くことのできない方法であるが、微生物学的検査方法に比べて検出感度が悪く、かつ、試験操作が煩雑であるという欠点がある²⁾。抗生物質は、分解速度が速いものが多く、加熱処理等の煩雑な操作により回収率が減少することもある。またテトラサイクリン系抗生物質は、検出頻度も高く迅速な検査結果に基づく適切な行政措置が必要である。

そこで、テトラサイクリン系抗生物質のテトラサイクリン(TC)、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)について HPLC の分析条件を検討し検出感度を上げることでカラム抽出などの煩雑な操作を省簡易で高い回収率を得るスクリーニング法を開発したので報告する。

II 方 法

1. 試薬

抽出液 イミダゾール 68.08 g, EDTA2Na 0.37g, 酢酸マグネシウム 4 水和物 16.1g を蒸留水約 0.8 l に溶解し、酢酸で pH7.2 にして蒸留水で 1l にする。

EDTA2Na 飽和溶液 EDTA2Na 15g に蒸留水 100ml を加えよく振り混ぜた後上澄みを使用する。

2. 検査方法

前処理 肉・魚・卵の場合

遠心管 50ml に試料 10g をとりメタノール 10ml を加え 10 分間振とうし、抽出液を加え 50ml とする。再び 10 分間振とうし、遠心機で 20 分 3000rpm で遠心後、水層を 0.45 μ m カートリッジフィルターでろ過し、ろ液を HPLC 検液とする。

乳の場合

遠心管 50ml に試料 10g をとり蒸留水 8ml, EDTA2Na 飽和溶液 2ml を加え 10 分間振とうし、遠心機で 20 分 3000rpm で遠心後、水層を分取する。比色管に水層 4ml をとり抽出液で 10ml とし 0.45 μ m カートリッジフィルターでろ過し、ろ液を HPLC 検液とする。

3. 装置及び測定条件

HPLC HP1100

1. 福岡市保健環境研究所理化学課
(現所属：衛生化学部門)

カラム	4.6mm i. d. × 100mm(3C18MS)	
カラム温度	30℃	
溶離液 A	抽出液：メタノール= 9 : 1	
溶離液 B	80%メタノール	
励起波長	380nm	
蛍光波長	520nm	
流量	0.4ml/min	
溶離液	A	B
0min	90%	10%
8min	90%	10%
30min	10%	90%
35min	90%	10%
45min	90%	10%
注入量	40 μl	

III 結果と考察

1. 抽出溶液の検討

公定法¹⁾のリン酸塩 EDTA 溶液での抽出液は、ろ過時の負荷が高くとろ過に時間がかかる。そこで肉・魚・卵にはメタノール、牛乳には EDTA2Na 溶液を加えタンパク質を凝固させた後 HPLC 溶離液を加えることで容易にろ過することができた。

メタノール量は、多くなると HPLC のピークがブロードになり定量が悪くなるため影響を及ぼさない抽出液量の 25%以下とした。

EDTA2Na 量は、ベンジルペニシリン分析法で使われている抽出法を用いた。

2. HPLCの溶出条件の検討

OT, TC, CTC のチャートを図 1 に示す。HPLC でグラジュエントをすることによりリテンションタイムの遅い CTC の検出感度を上げることができるがベースラインの上昇を来すので OT, TC のベースに影響しない 8 分からグラジュエントを始めベースの上昇が安定したところで CTC のピークが出る条件にした。

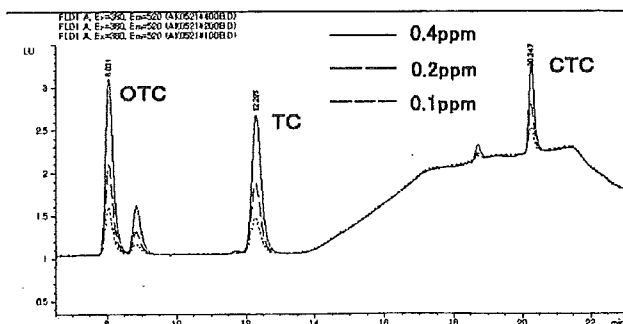


図 1 OT, TC, CTCのHPLCのチャート

また、OTC とそのすぐ後に出てくる分解物のピークを分離するためカラムの理論段数を高いものにし流量を抑え、グラジュエント混合比を検討したところ感度があり従来半分の廃液量となった。

3. 標準液の直線性と定量下限値の検討

0.01 ~ 1.0ppm の検量線を図 2 に、相関係数を表 1 に示す。直線性のよい相関が得られた。

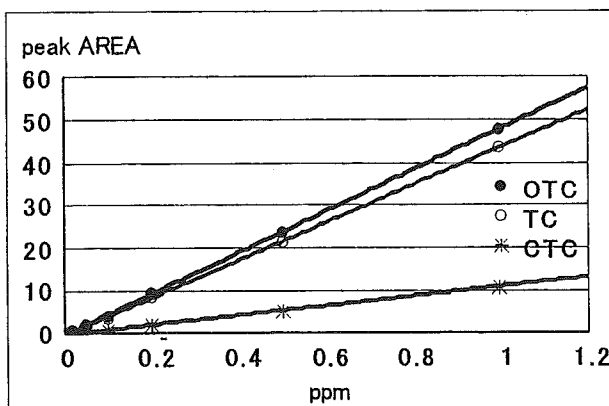


図 2 OTC, TC, CTCの検量線(0.01~1.0ppm)

表 1 OTC, TC, CTCの相関係数

	OTC	TC	CTC
相関係数	0.9986	0.9999	0.9992

表 2 スタandarドの RSD (n=5)

	RSD		
	OTC	TC	CTC
1ppm	0.74	0.39	1.07
0.1ppm	1.54	2.23	1.58
0.01ppm	1.96	7.39	8.96
0.01ppm S/N	10	7	3

表 2 の S/N, RSD および図 3 のチャートから HPLC への注入濃度を 0.01ppm とした。また SOP の定量下限値が 0.05ppm であることから試料の希釈率を 5 倍とした。

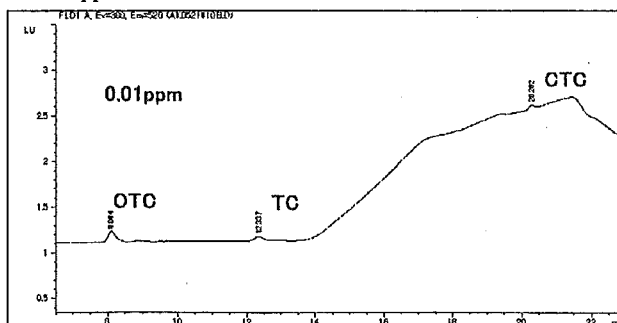


図 3 OTC, TC, CTCの定量下限値相当のチャート

4. 添加回収

表4に示すように牛乳にスタンダードを添加したところほぼ100%を回収した。CTCの前にある妨害ピークを分離したチャートを図4に示す。

表4 牛乳による添加回収率

	OTC	TC	CTC
回収率	102.6%	96.2%	98.0%

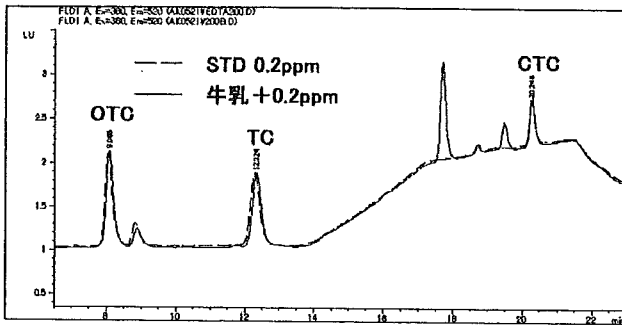


図4 牛乳による添加回収のチャート

IV まとめ

公定法によるリン酸緩衝液への溶解・カラム吸着処理・クリーンアップおよび濃縮処理を行うことなく、液体クロマトグラフの溶離液で抽出しろ過する簡易な方法で、迅速に高い回収率で測定することができた。収去当日に本法によるスクリーニングをし、検出されたものについては公定法で確認試験が行うことができるようになった。

文献

- 1) 食品, 添加物等の規格基準 食品D 1053 1071
- 2) 食品衛生検査指針理化学編 1991 社団法人日本食品衛生協会