

高速液体クロマトグラフによる 食品中のテトラサイクリン系抗生物質の迅速分析

久保記久子・赤木浩一・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Rapid HPLC Analysis of Tetracyclines in Foods

Kikuko KUBO, Kouichi AKAKI and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

テトラサイクリン系抗生物質であるオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンおよびテトラサイクリンの迅速スクリーニング法を検討した。抽出には公定法で用いられているエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を用い、抽出液を分画分子量 5,000 の遠心式フィルターユニットでろ過し、得られたろ液を試験溶液として HPLC で測定した。牛乳、食肉、鶏卵および魚介類各 10g に 4 μ g を添加したとき、いずれも回収率が 65 ~ 98 % と良好に回収された。フィルターでろ過するだけの簡易な精製方法でありながら、試料由来成分による妨害もみられなかった。

Key Words : 高速液体クロマトグラフ HPLC , テトラサイクリン系抗生物質 tetracyclines
オキシテトラサイクリン oxytetracycline , クロルテトラサイクリン chlortetracycline ,
テトラサイクリン tetracycline

はじめに

畜水産業に使用されている抗生物質や合成抗菌剤は生産性の向上や病気の予防および治療のために使用されており、今日の食料生産を支える上で重要な役割を担っている。しかし一方では、これら薬剤の畜水産物中への残留が懸念されている。オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)およびテトラサイクリン(TC)などのテトラサイクリン系抗生物質は、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おり、平成 15 年度の残留物質モニタリング検査においても、養殖魚介類で 3 件の成分規格違反が報告されている¹⁾。

公定法²⁾の OTC、CTC および TC の試験法では、ポリマー樹脂による精製後加熱濃縮するため、操作が煩雑で、熱による分解も懸念される。このため当所では、高速液体クロマトグラフ(HPLC)の条件の改良により分離と感度を向上させることで、カラム精製および加熱濃

縮の操作を省いた迅速分析法³⁾を開発し、スクリーニング検査を行っている。しかしこの方法では、HPLC に使用する分離カラムのロットの違いや劣化などによって、鶏卵など一部の試料において、夾雑ピークが定性・定量に支障をきたすことがある。

今回 OTC、CTC および TC について、分画分子量 5,000 の遠心式フィルターユニットを用いた簡易な精製方法により、夾雑物を除去するスクリーニング法を検討した。

実験方法

1. 試料

福岡市内で市販されていた牛乳、牛肉、豚肉、鶏肉、鶏卵、カンパチ、カキおよびエビを用いた。

2. 試薬等

標準品：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，塩酸テトラサイクリンのいずれも Riedel-de Haën 社製を用いた．

標準原液：蒸留水で濃度 100mg/L に調製した．

混合標準溶液：標準原液を 1.36%リン酸－カリウム溶液で適宜希釈し調製した．

イミダゾール緩衝液：イミダゾール 68.08g，エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.37g および酢酸マグネシウム 10.72g を水に溶かして 800mL とした．これに酢酸を加えて pH7.2 に調製し，水を加えて 1,000mL とした．

エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液：第 1 液；クエン酸 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 71.6g を水に溶かして 1,000mL とした．エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 1.86g に第 1 液 307mL と第 2 液 193mL を混和したものを加えて溶かした．

遠心式フィルターユニット：MILLIPORE 社製 Amicon Ultra-15, 5,000 Nominal Molecular Weight Limit (NMWL) を使用した．

その他の試薬：HPLC 用または特級を使用した．

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した．

超音波装置：NEY 社製 208H を使用した．

遠心機：(株)コクサン製 H103-NR を使用した．

4. 測定条件

既報³⁾に準じて次のとおりとした．

高速液体クロマトグラフ

分析カラム：ナカライテスク(株)製 COSMOSIL 3mm i.d. × 100mm, 5μm

移動相：A 液；イミダゾール緩衝液:メタノール(9:1)，B 液；80%メタノール，グラジエント条件；B 液 5%で 7 分間保持，13 分間のリニアグラジエントで B 液 90%，5 分間保持（測定終了後，B 液 5%で 15 分間保持）

流速：0.38mL/min

カラム温度：30

注入量：50 μL

検出器：励起波長 380nm 蛍光波長 520nm

5. 試験溶液の調製

1)抽出

公定法²⁾に準じて次のとおり行った．

(1)牛乳

試料 10g にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を加え 50mL とし，5 分間振とう後，超音波装置に 30

秒かけ，毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行い水層を抽出液とした．

(2)食肉，鶏卵および魚介類

試料 10g にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 30mL を加え，5 分間振とうし，超音波装置に 30 秒かけた後，毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行った，水層を採取後，残留物にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 10 ～ 20mL を加え，1 分間激しく振り混ぜ，超音波装置に 30 秒かけた後，上記と同様の条件で遠心分離を行い，水層を先に採取した水層に合わせ，50mL に定容し抽出液とした．

2)精製

1)で得られた抽出液約 5mL を遠心式フィルターユニットに移し，毎分 3,000 回転で 15 分間遠心分離を行い，得られたろ液を試験溶液とした．

結果および考察

試料を公定法²⁾に準じて抽出後，分画分子量 5,000 の遠心式フィルターユニットで精製を行う方法を用いて，添加回収および夾雑物の除去効果について検討した．

牛乳，食肉，鶏卵および魚介類に各薬剤を 400ng/g 添加して回収試験を行った．結果を表 1 に示す．いずれの試料においても 65 ～ 98%と良好に回収され，また相対標準偏差も 5%未満であった．

表 1 添加回収試験結果

試料名	回収率 (%)		
	OTC	CTC	TC
牛乳	98.0(1.0)	82.2(2.0)	89.6(0.6)
牛肉	86.0(1.1)	97.5(3.7)	96.6(0.7)
豚肉	79.5(1.7)	96.3(2.0)	94.9(0.4)
鶏肉	77.9(0.8)	93.4(1.8)	92.6(0.8)
鶏卵	77.4(2.5)	65.1(2.4)	81.9(0.8)
カンパチ	82.8(1.3)	76.3(3.2)	84.3(2.3)
カキ	88.5(2.4)	65.9(3.4)	83.3(0.7)
エビ	74.0(3.0)	67.9(4.2)	71.5(2.6)

* () の値は相対標準偏差 (n=5)

また鶏卵のクロマトグラムを図 1 に，鶏卵の添加回収試験のクロマトグラムを図 2 に示す．定性・定量に支障をきたすような夾雑ピークは検出されなかった．

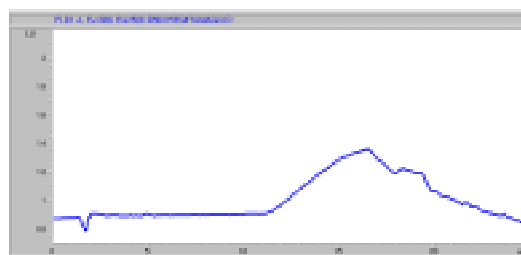


図 1 鶏卵のクロマトグラム

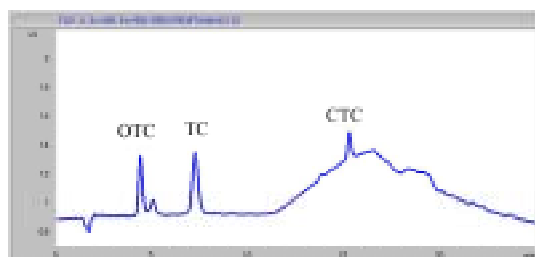


図2 鶏卵に各薬剤を 400ng/g 添加したときの
クロマトグラム

以上の結果から，本法はスクリーニング検査として適

用できるものと思われる．

文 献

- 1)厚生労働省通知食安監発第 1022001 号：畜水産食品の
残留物質対策について，平成 16 年 10 月 22 日
- 2)厚生労働省通知食安発第 0124001 号：食品に残留する
農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の
試験法について，平成 17 年 1 月 24 日
- 3)赤木浩一：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，福岡市保健環境研究所報, 26, 135 ~ 137, 2001