〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
35 (1) 63-67 (1989)

高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉、豚肉中の バージニアマイシンの定量

斉藤貢一,^a 堀江正一,^a 星野庸二,^a 能勢憲英,^a
中澤裕之,^b 藤田昌彦^b
埼玉県衛生研究所,^a 国立公衆衛生院^b

Determination of Virginiamycin in Chicken or Swine Tissues by High Performance Liquid Chromatography

KOICHI SAITO,^a MASAKAZU HORIE,^a YOUJI HOSHINO,^a NORIHIDE NOSE,^a
HIROYUKI NAKAZAWA,^b and MASAHICO FUJITA^b

*Saitama Institute of Public Health,^a 639-1 Kamiokubo-higashi,
Urawa 338, Japan and the National Institute of Public Health,^b
4-6-1 Shirokanedai, Minatoku, Tokyo 108, Japan*

(Received July 25, 1988)

A simple and rapid determination of virginiamycin (VGM) in chicken and swine tissues by quantitation of virginiamycin M₁ (M₁), which is a main component of VGM, was developed.

M₁ was extracted from the tissues with a mixture of methanol-3% phosphotungstic acid (7:3), and the extract was cleaned up by liquid-liquid partitioning with chloroform. The chloroform extract was further cleaned up on a Sep-Pak silica cartridge using chloroform-methanol (97:3) as an eluent.

M₁ was determined by reversed phase HPLC which was performed on a Kaseisorb LC-ODS-300-5 column with acetonitrile-water (35:65) solution as a mobile phase, and M₁ was monitored with UV detection at 235 nm.

The calibration curve was rectilinear in the range from 0.5 to 10.0 µg/ml. The average recoveries were 93.6% and 95.2% for VGM added to chicken and swine tissues at the level of 1.0 µg/g, respectively.

A good correlation obtained between the HPLC method and the bioassay method shows that the present method will be applicable to determine VGM with the detection limit of 0.05 µg/g.

Keywords — virginiamycin; antibiotic; Sep-Pak silica; HPLC; bioassay

緒 言

バージニアマイシン (VGM) は、複数の成分より構成される環状ポリペプチド系の抗生物質で、家畜の成長促進や飼料効率の改善などを目的に、動物用医薬品及び飼料添加物として畜産業界で多用されている。このため、畜産食品中への残留が懸念されており、食品衛生上その残留分析法が必要とされている。

従来、VGM の分析法としては、バイオアッセイ

法¹⁾や比濁法²⁾が報告されているが、これらは培地や試験菌調製などの操作が煩雑な上、結果の判定に時間を要し、更に特異性や精度の点で問題がある。また、最近、化学的分析法の1つとして、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法³⁾も報告されているが、この報告ではVGMの構成成分の内、2成分をそれぞれ測定しているだけで、この2成分とVGM全体の抗菌活性との関係については何ら言及していない。

先に著者らは、VGMの主成分であるバージニア

マイシン M_1 (M_1) を単離精製し、 M_1 と VGM との抗菌活性を比較検討した。⁴⁾ その結果、 M_1 と VGM との間には、その抗菌力において良好な相関性があることを見だし、 M_1 を指標とすることによって VGM としての定量分析が可能であることを報告した。また、HPLC を用いて premix と飼料中の M_1 を測定して、VGM の分析法を報告した。⁵⁾

今回、この分析法⁵⁾ を鶏肉や豚肉を対象とした残留分析に適用するため、抽出及びクリーンアップ操作等、試料の前処理法を検討し、簡便で迅速な VGM の残留試験法を確立した。

実験方法

1. 試料 埼玉県内で市販されている鶏肉及び豚肉を用いた。

2. 試薬 VGM：日本全薬工業製、1990 μg (力価)/mg。

VGM 標準溶液：VGM をメタノールに溶解して 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の標準原液を調製し、適宜、蒸留水及びメタノールを用いて、そのメタノール濃度が 50% になるように希釈して、所要濃度の標準溶液を調製した。

M_1 ：前報⁴⁾ に準じて調製した。

抽出用溶液：メタノールと 3% リンタングステン酸 (PTA) 溶液を 7:3 の割合で混合した。

Sep-Pak シリカ：Waters 社製；使用前にクロロホルム 10 ml を流して、充てん剤を湿潤させた。

3. 装置 高速液体クロマトグラフ：島津製作所製、LC-6A, UV 検出器：SPD-6A。

高速ホモジナイザー：ヒスコトロン、日音医理科機械製作所製。

4. HPLC 測定条件 カラム：Kaseisorb LC-ODS-300-5 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm)，東京化成製。

移動相：アセトニトリル-水 (35:65)。

流速：0.7 ml/min。

感度：0.04 AUFS。

流入量：10 μl 。

5. 試験溶液の調製 試料 10 g に抽出用溶液 50 ml を加え、高速ホモジナイザーを用いて 2 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過 (東洋ろ紙, No. 4) した。残留物を抽出用溶液 20 ml で洗浄し、ろ液及び洗液を合わせ、これに 2% 食塩水 40 ml を加えて分液ロートに移した。クロロホルム 30 ml を加えて 5 分間振とう抽出し、静置後、有機相を分取し、更に水相にクロロホルム 30 ml を加えて同様に操作して有機相を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水

した。これを 40°C の水浴中で減圧下濃縮乾固し、残留物をクロロホルム 10 ml に溶解して Sep-Pak シリカに通塔した。クロロホルム 5 ml でカートリッジを洗浄後、クロロホルム-メタノール (97:3) 8 ml を流した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、残留物を

sample 10 g

add CH_3OH -3% phosphotungstic acid (PTA) (7:3) 40 ml

homogenize for 2 min

filter through filter paper No. 4

wash residue with CH_3OH -3% PTA (7:3) 20 ml

filtrate

add 2% NaCl 40 ml

extract with CHCl_3 30 ml ($\times 2$)

CHCl_3 layer

dehydrate on anhydrous Na_2SO_4

evaporate to dryness

dissolve in CHCl_3 10 ml

pass through Sep-Pak silica cartridge

wash with CHCl_3 5 ml

elute with CHCl_3 - CH_3OH (97:3) 8 ml

eluate

evaporate to dryness

dissolve with 50% CH_3OH 1 ml

HPLC

Chart 1. Analytical Procedure for Virginiamycin in Chicken or Swine Tissues

50%メタノール溶液 1 ml に溶解したものを試験溶液とした。

6. 検量線の作成 VGM 標準溶液 (0.5—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の 10 μl を HPLC に注入し、得られた M_1 のピーク高を縦軸に、VGM の濃度を横軸にプロットして検量線を作成した。

7. バイオアッセイ “動物用抗生物質製剤検定一般基準”⁶⁾ に従って、試験菌には *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、培地の調製及び力価の測定も同基準に準拠して行った。

結果及び考察

1. 前処理法の検討

1) 抽出用溶液 先に著者らは、premix 及び飼料からの抽出にメタノールを用いた。⁵⁾ しかし、畜肉を試料とした場合には、その前処理において除タンパク操作が必要である。そこで、著者らは畜肉からの抽出用溶液として、メタノールに除タンパク剤として PTA を混合したものを用いることにした。

Fig. 1. Effect of Phosphotungstic Acid and Methanol Concentration on Extraction of Virginiamycin from Swine Tissue

○····○ 8:2 (Methanol: Phosphotungstic acid solution),
●····● 7:3, ▲····▲ 6:4, △····△ 5:5, ×····×
4:6.

抽出効率を調べるために、PTAの濃度、及びメタノールとPTAとの至適混合比について検討を行った。すなわち、メタノールと、1–15%の濃度に調製したPTAとを、各々8:2–4:6の割合に混合した溶液を抽出用溶液として用い、また、試料にはVGMを1 $\mu\text{g/g}$ の濃度に添加した豚肉を用いて、その回収率を調べた。Fig. 1に示すように、メタノールとPTAを7:3の割合に混合した抽出溶液で最も高い回収率が得られた。またこの場合、PTA濃度は1–3%の間で90%以上の良好な回収率が得られ、その後、PTAの濃度が増すにつれて回収率は低下する傾向がみられた。以上の結果から、メタノール–3%PTA混液(7:3)を抽出用溶液として用いた。

2) 妨害物質の除去 試料抽出液中には夾雑物が多く、これらはHPLCのクロマトグラム上妨害となった。そこで、クリーンアップ操作として、クロロホルムによる液-液分配抽出操作について検討した。試料抽出液にクロロホルムを加えて振とう抽出を行うと、分液ロート内でエマルジョンを生成して二相分離が不十分となった。そこで、試料抽出液に2%塩化ナトリウム溶液40 mlを加えて、振とう抽出を行ったところ、エマルジョンを生成することなく二相分離が良好となった。

この操作で得られたクロロホルム抽出液を濃縮乾固し、残留物を50%メタノール溶液に溶解してHPLCに供したところ、クロマトグラム上には M_1 の他にまだ多くの夾雑物ピークが認められた (Fig. 2-A)。これらのピークは M_1 の検出に際して直接妨害にはならないが、夾雑物ピークの中には、その保

持時間が M_1 より非常に遅いものがあり、1つの試料の分析に長時間を要するため、多数の試料を処理するには不都合であった。また、これらの夾雑物は、HPLCカラムの劣化を促進することも懸念された。そこで、これらの夾雑物を除くために、Sep-Pakシリカによるクリーンアップについて検討を行った。すなわち、VGM 20 μg を保持させたSep-Pakシリカにクロロホルム–メタノール(97:3)の混合溶媒を流して M_1 を溶出した。その結果、Fig. 1に示すように、 M_1 は溶出液6 ml中に100%溶出された。そこで、以下の実験では溶出液8 mlを分取した。

Fig. 2. Liquid Chromatograms of Virginiamycin Obtained from Untreated (A) or Treated (B) Extracts with Sep-Pak Silica Cartridge

Sample: swine extract fortified virginiamycin at 5 $\mu\text{g/g}$.
HPLC operating conditions, column: Kaseisorb LC-ODS-300-5;
mobile phase: acetonitrile-water (35:65); flow rate: 0.7 ml/min;
detection: UV 235nm (0.04 a.u.f.s.); injection volume: 10 μl .

Fig. 3. Elution Pattern of M_1 from Sep-Pak Silica Cartridge

Eluent: chloroform-methanol (97:3).
Virginiamycin: 20 μg .

TABLE I. Recoveries of Virginiamycin Added to Chicken and Swine Tissues

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%) ^{a)}	C.V. (%)
Chicken muscle	1.0	99.4	2.6
Chicken liver	1.0	87.8	1.6
Swine muscle	1.0	97.0	2.3
Swine liver	1.0	93.3	2.1

C.V. : Coefficient of variation.

a) Average of 5 determinations.

VGM を添加した試料抽出液をクロロホルムで液-液分配抽出した後, Sep-Pak シリカによるクリーンアップを行ったところ, クロマトグラム上に夾雑物による妨害ピークはほぼ消失した (Fig. 2-B). なお, 本分析法において, VGM の他の構成成分 (S_1) や, 他の飼料添加物として使われる主な抗生物質は, M_1 の確認に際して妨害とはならなかった.⁵⁾

2. HPLC 測定条件及び検量線

HPLC の測定条件は, 前報⁵⁾ に準拠した.

この条件に従って, M_1 のピーク高と VGM 濃度から検量線を作成したところ, VGM として 0.5—10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性が得られた.

3. 添加回収実験

鶏筋肉, 鶏肝臓, 豚筋肉及び豚肝臓それぞれ 10 g に, VGM を 1 $\mu\text{g/g}$ の濃度になるように添加し, 本法に従って回収率を求めた.

その結果, Table I に示すように, いずれの試料についても良好な平均回収率が得られた. また, 変動係数はいずれも 3 % 以内であり, 残留分析法として満足できる値が得られた. なお, 本法における定量

限界は 0.05 $\mu\text{g/g}$ であった.

4. HPLC 法とバイオアッセイ法との比較

本法では, M_1 の測定をもって VGM の残留分析を目的としており, その妥当性を評価するためにバイオアッセイ法との相関性を検討した. 試料には VGM を 0.05—1.0 $\mu\text{g/g}$ の各濃度になるように添加した豚肉を使用した.

Fig. 4 に示すように, HPLC 法により定量した値とバイオアッセイ法により定量した値との間には, 相関係数 $r=0.994$ と高い相関性が認められた.

5. 残留調査

市販の鶏筋肉, 鶏肝臓, 豚筋肉及び豚肝臓の各 5 検体について, 本法を用いて VGM の残留調査を行ったところ, いずれの検体からも検出されなかった.

結 語

鶏肉及び豚肉に残留している VGM の簡単・迅速な分析を目的として, HPLC による定量法を検討し, 次の結果を得た.

1) 飼料中の VGM は, メタノール-3 %PTA (7 : 3) 混液で抽出後, 液-液分配抽出及び Sep-Pak シリカを用いた前処理操作により, クリーンアップを行った.

2) 定量は VGM の主成分 M_1 を指標として, HPLC でモニターすることにより行った. 1 $\mu\text{g/g}$ に添加した鶏肉及び豚肉からの平均回収率は, それぞれ 93.6% 及び 95.2% であり, 定量限界は 0.05 $\mu\text{g/g}$ であった.

3) 本法は, バイオアッセイ法との間に高い相関性が認められたことから, 化学的残留分析法として日常分析に利用できるものと考えられる.

なお, 本論文の一部は, 日本食品衛生学会第 51 回学術講演会 (1986 年 5 月, 東京) において発表した.

謝辞 本研究の遂行に当たり, VGM を提供して下さいました日本全薬工業㈱に深謝致します.

Fig. 4. Correlation between HPLC Method and Bioassay Method on the Determination of Virginiamycin in Swine Tissue

引用文献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課編, “畜水産食品中の残留物質検査法,” 第1集, 1977, p.20 ; H.S. Ragh-
eb, L.J. Black, D.L. Waisner, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 671 (1979) ; S.E. Katz, J.M. Katz, J.A.
Miller, R. Wang, R. Shapiro, *ibid.*, **67**, 569 (1984).
- 2) D.M. Brennecke, S.J. Reed, J.A. Barkate, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 312 (1981).
- 3) 永瀬 誠, 深町和美, 分析化学, **36**, 297 (1987).
- 4) 日本薬学会第106年会講演要旨集, 千葉, 1986年4月, p.643 ; K. Saito, M. Horie, Y. Hoshino, N.
Nose, H. Nakazawa, M. Fujita, Y. Shida, *J. Chromatogr.*, **454**, 387 (1988).
- 5) K. Saito, M. Horie, Y. Hoshino, N. Nose, H. Nakazawa, *J. Liq. Chromatogr.*, “in press”.
- 6) 農林水産省告示第1437号, 1979年10月17日, p.2900.