ノート

鶏肉中アボパルシンの UV 吸収および電気化学検出 HPLC による分析

(平成 14 年 7 月 29 日受理)

門田 実^{*1,†} 今中雅章^{*1} 日野 誠二^{*1}
難波 順子^{*1} 武 志保^{*1} 中澤 裕之^{*2}Determination of Residual Avoparcin in Chicken Muscle by HPLC with
Ultraviolet and Amperometric DetectionMinoru KADOTA^{*1,†}, Masaaki IMANAKA^{*1}, Seiji HINO^{*1}, Junko NANBA^{*1},
Shiho TAKE^{*1} and Hiroyuki NAKAZAWA^{*2}(*¹Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health: 739-1,
Uchio, Okayama 701-0298, Japan; *²Hoshi University: 2-4-41, Ebara,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan; †Corresponding author)

An analytical method was developed for determination of residual avoparcin in chicken muscle by measuring α - and β -avoparcin, major components of the pharmaceutical preparation avoparcin, using HPLC with UV and amperometric detectors. The analytical HPLC was run on a Cosmosil 5C18-AR column (4.6 mm $\times$ 25 cm) with a gradient formed from A: 2.5% acetic acid, 0.01 mol/L sodium heptane sulfonic acid-acetonitrile (88.5:11.5) (pH 4.0) and B: 2.5% acetic acid-acetonitrile (10:90), using UV and amperometric detection (AMD) with glassy-carbon electrode (+900 mV). Avoparcin was extracted from chicken muscle by homogenization with methanol-0.2 mol/L sulfuric acid (6:4) followed by centrifugation after pH adjustment to 4 with 1 mol/L sodium hydroxide. The supernatant was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in water. The aqueous layer was adjusted to pH 4 by adding 1 mol/L sodium hydroxide. Then it was purified on a Sep-Pak tC18 plus ENV cartridge. The cartridge was washed with water, and retained substances were eluted with 50% methanol. The eluate was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in water and determined by HPLC. Recoveries of avoparcin spiked in chicken muscle were 73.1~88.1% at levels of 2~10 μ g/g. The detection limits were 0.5 μ g/g (UV) and 0.2 μ g/g (AMD).

(Received July 29, 2002)

Key words: 糖ペプチド系抗生物質 glycopeptide antibiotics; アボパルシン avoparcin; 飼料添加物 feed additive; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; UV 検出器 UV detector; 電気化学検出器 amperometric detector (AMD); 鶏肉 chicken muscle

緒 言

アボパルシン (以下 AVP と略す) は *Streptomyces can-*
didus の産生する糖ペプチド系抗生物質で、 α -アボパルシン (29%, 以下 α -AVP と略す) および β -アボパルシン (71%, 以下 β -AVP と略す) を主成分とする^{1)~3)}。AVP はグラム陽性菌に作用し、また家畜の成長促進効果を有しており^{4), 5)}、我が国では昭和 60 年 10 月養鶏用飼料添加物に指定された^{6), 7)}。米国など世界十数か国⁵⁾ で使用されてきたが、その後、耐性菌の出現問題があるとして平成 9 年 3 月、農林水産省では AVP の飼料添加物の指定を取り

消し、その使用を禁止した。しかし、平成 10 年と 11 年に、ほとんどの抗生物質が効かないバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)⁸⁾ が輸入鶏肉から検出されたことから、国内におけるヒトへの感染の可能性が示唆され⁹⁾、その原因として、ニワトリに対するバンコマイシン類似の抗生物質 AVP の給与が考えられている¹⁰⁾。このように、輸入食品による違反事例が近年増加しており、国内で使用禁止となった抗生物質であっても、食品中への残留が危惧され、正確で迅速な残留分析法の必要性はますます高まっている。

AVP の定量法としては、配合飼料中の AVP 定量法^{5), 7)} と畜肉中残留 AVP 試験法¹¹⁾ が報告されているが、いずれもディスク法に基づくバイオアッセイであり、菌株の維持管理が煩雑で分析に長時間要すること、また確認同定法と

† 連絡先

^{*1} 岡山県環境保健センター: 〒701-0298 岡山県岡山市内尾 739-1^{*2} 星薬科大学: 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

して難点を有することから、化学的分析法の開発が望まれてきた。そこで著者らは主要成分 α -AVP と β -AVP を指標とした HPLCUV 検出による鶏肉中 AVP 定量法を報告した^{12), 13)}。しかし、その検出感度はバイオアッセイの 1/8 であった。今回、フェノール性官能基に対して高感度な電気化学検出 (AMD) による分析法を検討した結果、AMD は AVP を既報¹³⁾ の約 3 倍の分析感度で測定可能であることを確認したので報告する。

実験方法

1. 試料

岡山県内で市販されている鶏肉に AVP を標準添加して試料とした。

2. 試薬

AVP 標品: 日本レダリー(株)製, 953 mcg/mg

AVP 標準原液 (100 μ g/mL): AVP 標品 5.24 mg を精ひょうし、蒸留水に溶かして 50 mL とした。

メタノール、アセトニトリル: 液体クロマトグラフィー用、片山化学工業(株)製

酢酸、アンモニア水、硫酸、塩酸: 試薬特級、和光純薬工業(株)製

1-ヘプタスルホン酸ナトリウム: イオンペークロマトグラフィー用、和光純薬工業(株)製

1 mol/L 水酸化ナトリウム: 容量分析用、片山化学工業(株)製

AVP 抽出溶媒: 0.2 mol/L 硫酸-メタノール (4:6) 混合溶液

3. 装置および器具

高速液体クロマトグラフ:

デュアルポンプ: CCPD, (株)東ソー製

カラム恒温槽: CO-8010, (株)東ソー製

冷却装置: LAB COOL LC-25E, 東洋科学産業(株)製

低圧グラジエーター GE-8000, (株)東ソー製

スベルコ移動相脱気システム, スベルコ社製

流路切り替え 6 方バルブ: MV-8010, (株)東ソー製

システムコントローラー: SC-8010, (株)東ソー製

UV 検出器: UV-8010, (株)東ソー製

電気化学検出器: AMD E-502, (株)医理化製

Sep-Pak tC18 plus ENV カートリッジ (900 mg): (株)日本ウォーターズ製

その他の装置は既報¹³⁾と同じものを使用した。

4. HPLC 分析条件

Table 1 に示した。

5. 試料溶液の調製法

試料 5.0 g を 50 mL 褐色遠心管に採り、AVP 抽出溶媒 25 mL を加えてホモジナイズし、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH 4 に調整した。次に 3,000 rpm, 10 分間遠心分離し、上澄液を分取した。残留物に AVP 抽出溶媒 25 mL を加え、同様に操作し、先の上澄液と合わせた。上澄液をワットマンろ紙 No. 41 で 200 mL ナスフラスコにろ過した。次に *n*-プロパノール 10 mL を加え、40°C 以下で溶媒を減圧留去した。残留物に水 5 mL を加え、約 30 秒間超音波抽出をした後、pH 4 に調整した。この溶液をメタノール 10 mL, 水 20 mL でコンディショニングした Sep-Pak tC18 plus ENV カートリッジに負荷し、水 10 mL で洗浄後、50% メタノール水溶液 25 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を正確に水 1 mL に溶解して試験液とし、この 5 μ L を HPLC 装置に注入した (Scheme 1)。

6. 検量線の作成

AVP 標準原液を蒸留水で希釈し、1~80 μ g/mL の標準液を調製した。その 5 μ L を HPLC 装置に注入して得られたクロマトグラムより α -AVP, β -AVP それぞれのピーク面積を求め、その総和により検量線を作成した。

結果および考察

1. HPLC 分析条件の検討

AMD はフェノール性官能基に高感度なことから酸化電位を +600~+1,000 mV まで切り替えて AVP を分析し、安定したクロマトグラムの得られた +900 mV を測定電位とした。しかし、AMD は通常のアイソクラティック分析を繰り返して行くと、酸化物が電極へ蓄積し、急激な感度低下が起きた。そこで AVP 主要 2 成分を AMD で検出後、移動相の流路を AMD から廃液側に切り替え、カラム残留成分の迅速な溶出と蒸留水による電極の洗浄を同時に行えば、AMD の感度低下を抑制できると考え、種々検討した結果、Table 1 に示した分析条件とした。ポンプ 2 台を使用し、1 台のポンプに分析用移動相 A, カラム残留成分溶出用移動相 B, 低圧グラジエーターおよびデガッサーを取り付け、ステップワイズグラジエント分析を行っ

Table 1. HPLC Conditions for Determination of Avoparcin in Chicken Muscle

Column:	COSMOSIL 5C18 AR (4.6 mm i.d.×250 mm)
Mobile phase:	A=0.01 mol/L sodium heptane sulfonic acid, 2.5% acetic acid (pH 4 with ammonium hydroxide solution)-acetonitrile (88.5:11.5) B=2.5% acetic acid (pH 4)-acetonitrile (10:90)
A and B gradient:	100% A over 30 min, then 100% B over 10 min
Flow rate:	1.00 mL/min
Column temp.:	40°C
Detection:	AMD Ox+900 mV vs. Ag/AgCl with 320 nA/FS UV 280 nm
Injection size:	5 μ L

Scheme 1. Extraction and clean-up procedure for determination of avoparcin

Fig. 1. Calibration curve of avoparcin by the proposed method

—○— $Y = 28.9X - 5.75$ ($r_2 = 0.998$, $n = 7$) AMD
 —●— $Y = 0.275X + 0.19$ ($r_2 = 0.996$, $n = 7$) UV

た。別の1台に蒸留水を取り付け、6方バルブを介してAMDに接続し、電極の洗浄を行った。分析は移動相Aで30分間行った後、AMDを分析ラインより切り離し、AMDの水洗を行い、電極の感度低下を防いだ。また、分析ラインを移動相Bに切り替え、カラム温度を40°Cから50°Cに上げてカラム残留成分の溶出を10分間行った。その後、再び移動相Aに切り替え、カラム温度を40°Cに下げ、クロマトグラムベースラインを安定化させた。これらはすべてタイムプログラムで実行し、分析サイクルは約100分であった。なお、UV検出器の測定波長は既報¹³⁾に従い280 nmに設定した。

2. 検量線の作成

既報¹³⁾に従い、 α -AVPと β -AVPのピーク面積の和を

AVPの指標として検量線を作成したところ、5~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性を示した (Fig. 1)。標準溶液5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5回測定による各検出器の検出限界 (3σ) と定量限界 (10σ) は、UV 17 ng, 58 ng, AMD 3 ng, 11 ngであり、AMDがUVより高い感度を与えた。

3. 試料の前処理および添加回収試験

試料の前処理は既報¹³⁾を一部変更して実施した。妨害成分をさらに除去するため、固相カートリッジをカーボン含有率の高いSep-Pak tC18 Plus ENVに変更した。また、抽出条件を検討した結果、AVPの安定性がpH 4の液性で最も安定であったので、抽出後直ちに1 mol/L NaOHでpH 4に調整し、Scheme 1の操作を行った。この方法で得られたクロマトグラムをFig. 2に示した。測定対象の α -AVP、 β -AVPが共存物質の影響もなく測定可能であった。鶏肉にAVPとして2および10 $\mu\text{g}/\text{g}$ を添加し、Scheme 1に従って操作し、回収率を求めた。その結果、特にAMDは妨害成分の影響が少ない良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 2)。鶏肉に対する回収率は2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加のときAVPとして73.1%、変動係数2.9% ($n = 3$)、10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加のとき88.1%、変動係数2.5% ($n = 3$)であった。本法の検出限界 (3σ) は0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、定量限界 (10σ) は0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ (AMD)であった。

本法はバイオアッセイに比べて分析操作が容易で、分析前処理も4時間以内で可能で、フェノール性官能基に高感度なAMDと検出原理の異なるUV検出器の併用により、AVPの確認同定がより確かなものとなり、日常的残留分析法として利用可能である。

しかし、バイオアッセイの検出限界は0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ ⁹⁾であ

Fig. 2. HPLC chromatograms of chicken muscle spiked with avoparcin preparation

(A) Extract of chicken muscle spiked with avoparcin preparation (10 µg/g)

(B) Extract of chicken muscle, blank

(C) Standard solution of avoparcin preparation (50 µg/mL)

Peaks: 1=α-deristosaminyl-avoparcin; 2=β-deristosaminyl-avoparcin; 3=α-avoparcin; 4=β-avoparcin

り、また他の抗菌剤の残留分析法と比較しても感度不足であるため、前処理法のさらなる改良とラベル化による高感度分析法などさらに検討する必要がある。

文 献

- Budavari, S., ed. "The merck index", 13th ed., Merck & Co., Inc., Rahway, 2001, p. 891.
- McGahren, W. J., Leese, R. A., Barbatschi, F., Morton, G. O., Kuck, N. A., Ellestad, G. A., Components and degradation compounds of the avoparcin complex. J. Antibiot., **36**(12), 1,671-1,682 (1983).
- Kunstmann, M. P., Mitscher, L. A., Porter, J. N., Shay, A. J., Darken, M. A., LL-AV290, a new antibiotic I. Fermentation, isolation, and characterization. Antimicrob. Agents Chemother., 242-245 (1969).
- Redin, G. S., Dornbush, A. C., LL-AV290, a new antibiotic II. Antibacterial efficacy in mice and *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother., 246-248 (1969).
- Kinosita, M., Quantitative analysis of avoparcin contained in the feed premix: Microbiological method of quantitative analysis and bioautography. Chikusan No Kenkyu, **42**, 1,035-1,041 (1988).
- 農林省告示第750号(1976) "飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づく飼料添加物" 昭和51年7月24日.
- 農林省令第35号(1976) "飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令" 昭和51年7月24日.
- Ararestrup, F. M., Ahrens, P., Maedsen, M., Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of animal and human origin and PCR identification of gene within the VanA cluster. Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 1,938-1,940 (1996).
- Ike, Y., Tanimoto, K., Ozawa, Y., Nomura, T., Fujimoto, S., Tomita, H., Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. Lancet, **353**, 1,854 (1999).
- Ozawa, Y., Tanimoto, K., Nomura, T., Yoshinaga, M., Arakawa, Y., Ike, Y., Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 6,457-6,461 (2002).
- 畜産生物科学研究所編 "動物用医薬品・飼料添加物の畜産産物への残留とその分析法" 東京, 近代出版, 1985, p. 248. (ISBN 4-87402-612-5)
- Kadota, M., Imanaka, M., Ogawa, N., Kumashiro, K., Mori, T., Oka, H., Ikai, Y., Horie, M., Nakazawa, H., The detection of the avoparcin of glycopeptide-type antibiotics by high performance liquid chromatography. (1) Isolation and purification of α-AV and β-AV from the avoparcin complex. Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, **15**, 7-12 (1991).
- Kadota, M., Imanaka, M., Ogawa, N., Kumashiro, K., Mori, T., Oka, H., Ikai, Y., Horie, M., Suzuki, S., Nakazawa, H., Determination of residual avoparcin in chicken muscle by high performance liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **35**, 23-27 (1994).