高速液体クロマトグラフィーによる牛肉及び牛腎臓 中のカナマイシンの定量

(昭和 60 年 11 月 26 日受理)

中 屋 謙 一* 杉 谷 哲* 山田不二造*

Determination of Kanamycin in Beef and Kidney of Cattle by High Performance Liquid Chromatography

Ken-ichi NAKAYA, Akira SUGITANI and Fujizo YAMADA

(Gifu Prefectural Institute of Public Health:
6-3, Noishiki 4-chome, Gifu, Japan)

A sensitive and simple method for determination of kanamycin (KM) in muscle and kidney of cattle by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector was developed.

KM was extracted with trichloroacetic acid, and the extract was applied to an Amberlite CG-50 (NH₄ form) column to obtain a test solution. A portion of the test solution was treated with *o*-phthalaldehyde to derivatize KM. The derivative was separated on a TSK gel ODS-120T column with methyl alcohol-water-acetonitrile (65:30:5) as the mobile phase, and quantitated by fluorometry.

Recoveries of KM added to muscle and kidney at levels of 0.2, 0.5, 1.0 ppm and 0.5 ppm were 85.4, 91.0, 94.8% and 80.0%, respectively. The limit of detection was 0.04 ppm in the samples.

In cattle given KM injection, the drug content in the muscle was found to be in the range of 0.05 to 0.23 ppm, while that in the binary kidneys determined by bioassay was 17.6 ppm on average.

(Received November 26, 1985)

Key words: カナマイシン kanamycin; 牛肉 beef; 牛腎臓 kidney of cattle; *o*-フタルアルデヒド *o*-phthalaldehyde; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 蛍光検出器 fluorescence detector

はじめに

カナマイシン (KM) は、グラム陽性及び陰性菌に対し広範な抗菌スペクトルを有する抗生物質として、家畜の疾病予防、治療に広く用いられており、畜産食品中に残留している可能性も高い。

畜産食品中の残留 KM の検査法としては、現在微生物学的方法^{1), 2)} がとられているが、検定用試験菌の維持管理、培地あるいは芽胞浮遊液の調整等が繁雑で、また抗菌性物質が検出されても同定あるいは定量は困難である。

一方、KM の理化学的検査法としては、ガスクロマト

グラフィー³⁾、高速液体クロマトグラフィー⁴⁾があるが、いずれも血清あるいは製剤を対象としたものであり食品中に残留する KM に応用することは難しいと考えられる。このため著者らは、ECD ガスクロマトグラフィーによる食肉中の KM の定量法⁵⁾を報告した。しかしこの方法は、*N*-アシル化とトリメチルシリル化の2段階の誘導体化を必要とすること、また誘導体化試薬が高価でしかも入手困難であることなど、操作性、経済性に若干の難点がみられた。

そこでこれらの欠点を解決すると共にさらに高感度な定量法とするため、牛肉あるいは牛腎臓中に残留する KM を *o*-フタルアルデヒド (*o*-PA) で蛍光誘導体とし、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量する方法

* 岐阜県衛生研究所: 岐阜県岐阜市野一色 4-6-3

を検討し良好な結果が得られたので報告する。

材料及び方法

1. 試料

岐阜県内で購入した抗生物質残留の認められないウシの筋肉部と腎臓を試料とした。

また、急性腹膜炎の診断により屠殺当日までの6日間に各3g 合計3回のKM及び100万単位、300万単位各1回のペニシリンG投与を受けたウシの筋肉部(左右頸部筋、左右大腿部筋、縦隔膜部筋)及び腎臓も試料とした。なおこのウシの注射部位は明らかにできなかった。各部位の微生物学的試験^{1),2)}では腎臓にのみ抗菌性物質が検出された。

2. 試薬

硫酸カナマイシン(硫酸KM)標準溶液: 常用標準グレード品、明治製菓(株)製、硫酸KMを精秤し、水に溶解し、100 µg 力価/mlの標準原液を調製し、4°以下に保存した。使用の都度標準原液を0.05 M水酸化カリウムで所要濃度に希釈して用いた。

o-フタルアルデヒド(*o*-PA)試薬⁶⁾: 蛍光分析用特製試薬、半井化学薬品(株)製、*o*-PA 200 mgを95%エタノール200 mlに水酸化カリウム溶液(450 g/L) 50 µlを加えて作った溶液40 mlに溶解し、2-メルカプトエタノール0.4 mlを加えて作製した。用時調製した。

2-メルカプトエタノール: 半井化学薬品(株)製、試薬特級

CG-50樹脂カラム: 前報⁵⁾に準じ樹脂をH型とした後、2 Nアンモニア水でNH₄型とし、洗液が中性になるまで十分水洗した。この樹脂を15×300 mmのガラス管に7 cm高に充てんし用いた。

その他の試薬はいずれも市販特級品を用いた。

3. 装置

ホモジナイザー: 日音医理科製作所(株)製ヒスコトロ

高速液体クロマトグラフ: (株)日本分光工業社製 TRIOTAR-V 型

蛍光検出器: (株)日本分光工業社製 Japan Spectroscopic Spectrofluorometer FP-210

4. 試験溶液の調製

前報⁵⁾と同様、細切試料10 gに10%トリクロロ酢酸20 mlを加え抽出及び除タンパクを行う。上澄液をエーテル洗浄後残存するエーテルは留去する。以後の操作は前報⁵⁾の操作に若干の変更を加えた。すなわち1 N水酸化ナトリウム溶液でpH 7.5に調整し、CG-50カラムに流速3 ml/分で通した。100 mlの水で洗浄後、1 Nアンモニア水50 mlを用い流速3 ml/分で溶出した。溶出液はロータリーエポレーターにより40°以下で濃縮乾固し、0.05 M水酸化カリウム溶液1 mlに溶解し試験溶液とした。

Sample 10 g

homogenize with 20 ml of 10% trichloroacetic acid
centrifuge for 10 min at 3,000 rpm
filter with Toyo No. 1 filter paper

Filtrate

wash with 20 ml of ether, twice
evaporate to remove ether
adjust to pH 7.5 with 1 N NaOH

CG-50 (NH₄ form) resin column

wash with 100 ml of water
elute with 50 ml of 1 N NH₄OH

Elute

evaporate to dryness *in vacuo* at 40°C
dissolve in 1 ml of 0.05 M KOH

Test solution

50 µl of test solution

add 0.5 ml of *o*-PA reagent
mix for 20 sec
warm at 30°C for 10 min
warm at 50°C for 5 min
cool in an ice bath

HPLC

Scheme 1. Analytical method for kanamycin in beef and kidney of cattle

5. 誘導体化

試験溶液 50 µl を 10 ml 共栓遠沈試験管にとり、*o*-PA 試薬 0.5 ml を加え密栓後速やかに 20 秒間攪拌混合する。30°及び50°に設定した恒温水槽をあらかじめ用意しておき、30°、10 分間誘導体化反応を行いさらに50°、5 分間反応を継続する。反応終了後 HPLC に供するまで氷冷しておく。

以上、4. 試験溶液の調製及び 5. 誘導体化操作の概略を Scheme 1 に示した。

6. 定量

蛍光検出器付 HPLC により Table 1 に示す条件で定量した。なお定量はピーク高による絶対検量線法で行った。

Table 1. Operating Condition of HPLC

Instrument	Japan Spectroscopic TRIROTAR-V
Column	TSK gel ODS-120T 150 mm × 4.0 mm i.d.
Mobile phase	CH ₃ OH-H ₂ O-CH ₃ CN (65:30:5)
Flow rate	0.8 ml/min
Detector	Japan Spectroscopic Spectro-fluorometer FP-210 (EX. 335 nm, EM. 440 nm)
Attenuator	16
Sample size	5 μl

7. 検量線の作製

KM 濃度 0.4, 1, 2, 4, 6, 10, 20 μg/ml 溶液を調製し, 各 50 μl を 5. の方法により誘導体化後 5 μl を HPLC に供し検量線を作製した。

結果及び考察

1. 前処理方法の検討

1) 抽出溶媒について

前報⁵⁾と同様 KM の抽出には 10% トリクロロ酢酸を用いたが, クロマトグラム上定量の妨害となる物質は認められなかった。

2) CG-50 カラムの検討

H 型, Na 型, NH₄ 型に調整した各樹脂カラムを用いクリーンアップの検討を行った。牛肉 10 g に KM 10 μg を添加し, 上記 4. 試験溶液の調製及び 5. 誘導体化に従って操作した。妨害ピークはいずれのタイプのものからも出現しなかったが, 回収率の最も良かったのは NH₄ 型であり次いで Na 型, H 型の順であった。Na 型, H 型は樹脂調整時にアンモニア水による洗浄を行っておらず, このため試験溶液中に不溶物が認められ, これらの物質が誘導体化効率を減少させたと考えられる。

NH₄ 型カラムについてさらに溶出条件を検討した。

Fig. 1. Elution pattern of kanamycin from CG-50 column with 1 N NH₄OH

Fig. 2. Effect of reaction time and temperature on *o*-phthalaldehyde derivatization
—Δ—: 30°C; —×—: 50°C;
—○—: 30°C→50°C

Fig. 3. Stability of *o*-phthalaldehyde derivative of kanamycin
—Δ—: ice bath; —○—: room temperature

1 N アンモニア水 10~30 ml の溶出画分に 99% 回収されたが, 安全性をみて 50 ml で溶出し, 全量を捕集することにした (Fig. 1).

2. 誘導体化条件の検討

1) 反応条件

反応温度を 30° 及び 50° とし, 反応時間を 2, 5, 10, 30, 60 分に設定した。また反応温度 30° で 2, 5, 10, 30, 60 分反応後さらに 50°, 5 分反応を行い誘導体生成量を比較した (Fig. 2).

30° では 30 分, 50° では 10 分で最高の生成量を示し以後減少した。一方, 30° で反応後さらに 50°, 5 分反応させた場合, 30° の反応時間は 5 分から 10 分で最高の生成量を示し, また各時間での生成量の変動も最も少なかった。以上の結果より誘導体化は, 30°, 10 分反応後さらに 50°, 5 分反応を継続することとした。

2) 誘導体の安定性

30°, 10 分反応後さらに 50°, 5 分反応させ, 生成した誘

導体を氷冷状態に保った場合と、室温に放置した場合の安定性を比較し、Fig. 3 に示した。

氷冷状態では誘導体の変化は 120 分までほとんどみられなかったが、室温に放置した場合徐々に減少し、120 分でもとの 66% に低下したため、反応終了後 HPLC に注入するまで氷冷しておくことにした。

3. HPLC 測定条件の検討

1) カラム及び移動相の組成

血清中アミカシン⁶⁾、ゲンタマイシン⁷⁾の測定において逆相系カラムが用いられており、また移動相にはメタノール-水-アセトニトリル、メタノール-水系に対イオンを添加して用いている。そこで逆相系カラム Lichrosorb RP 18, Nucleosil C₁₈ 及び TSK gel ODS-120T 各カラムについて検討した。いずれのカラムもほぼ同様な分離を示したため、最もカラム充てんの容易な TSK gel ODS-120T を用いることとした。

移動相は、メタノール-水-アセトニトリル (75:20:5, 70:25:5, 65:30:5, 60:35:5, 55:40:5) の各種比率混液について検討したが、65:30:5 混液とすることで比較的良好なクロマトグラムが得られた。なお対イオン添加による効果は認められなかった。

2) 測定波長の検討

KM を *o*-PA 試薬により誘導体化し、蛍光スペクトルを測定したところ、最大励起波長 335 nm、最大蛍光波長 440 nm を示したため、検出は励起波長 335 nm、蛍光波長 440 nm に設定した。

3) 妨害物質

試料からの妨害物質は認められなかった。他のアミノグリコシド系抗生物質の保持時間は、KM の 15.0 分に対しフラジオマイシン 29.3, 35.3 分、デストマイシン 17.7, 25.5 分、ハイグロマイシン B 21.7, 27.5 分であり KM の定量に影響を与えなかった。またカスガマイシン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシンは本条件では検出されなかった。ペニシリン G 及びテ

Fig. 4. Calibration curve of kanamycin

The coefficient of variation was 1.48% and the detection limit was 0.18 ng.

Table 2. Recovery of Kanamycin from Beef and Kidney of Cattle

	Added (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D.
Beef	2.0	1.65	82.5	85.4 $\pm$ 6.4
		1.72	86.0	
		1.55	77.5	
		1.72	86.0	
		1.90	95.0	
	5.0	4.83	96.6	91.0 $\pm$ 4.0
		4.31	86.2	
		4.66	93.2	
		4.48	98.6	
		4.48	98.6	
	10.0	9.60	96.0	94.8 $\pm$ 6.1
		9.40	94.0	
		9.70	97.0	
		10.20	102.0	
		8.52	85.2	
Kidney	5.0	4.22	84.4	80.0 $\pm$ 4.4
		3.78	75.6	
		4.00	80.0

Fig. 5. High performance liquid chromatogram of standard (A), extracts from beef (B) and blank beef (C)

Kanamycin was added in beef at 1 ppm level.

トラサイクリン類はクリーンアップ操作により除去された。

4. 検量線の精度及び検出限界

KM 0.18 ng から 9.1 ng の範囲で原点を通る良好な直線性を示した (Fig. 4)。KM 4.5 ng を用い繰返し測定した場合の変動係数は、1.48% ($n=5$) であった。また検出限界は 0.18 ng であった。

5. 添加回収実験

市販の牛肉 10 g に KM 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g, また腎臓 10 g に KM 5 μ g を添加し回収率を求めた. Table 2 に示すように, それぞれ 85.4, 90.0, 94.8% 及び 80.0% の平均回収率が得られた. そのクロマトグラムを Fig. 5 に示した.

6. 牛肉及び腎臓中の KM の測定

KM 投与が明らかであるが, 微生物学的方法^{1), 2)}では腎臓からのみ抗菌性物質が検出されたウシの筋肉部 (左右頸部筋, 左右大腿部筋, 縦隔膜部筋) 及び左右腎臓について本法を適用したところ, 左右頸部筋各 0.07 ppm, 左大腿部筋 0.05 ppm, 右大腿部筋 0.23 ppm, 縦隔膜部筋 0.06 ppm, 左腎臓 16.2 ppm, 右腎臓 19.0 ppm の KM が検出された.

市販の牛肉 5 検体からはいずれも KM は検出されなかった.

ま と め

牛肉, 牛腎臓中の残留 KM を *o*-PA 試薬により蛍光誘導体とし, HPLC で定量する方法を検討し以下の結果を得た.

1) 試料からの KM の抽出は 10% トリクロロ酢酸によった. エーテルで洗浄後 pH 7.5 に調整した. CG-50 カラムによるクリーンアップ後 *o*-PA 試薬により蛍光誘導体とし, HPLC に供した. 検出は蛍光検出器 (励起波長 335 nm, 蛍光波長 440 nm) を用いた.

2) HPLC のカラムは, TSK gel ODS-120T, 移動相はメタノール-水-アセトニトリル (65:30:5) 混液とし

た.

3) 牛肉での回収率は 0.2, 0.5, 1 ppm 添加で 85.4, 91.0, 94.8% また腎臓では 0.5 ppm 添加で 80.0% であった. 定量限界は 0.04 ppm であった.

4) KM 投与が明らかであるが, 微生物学的方法では腎臓からのみ抗菌性物質が検出されたウシの筋肉各部 (左右頸部筋, 左右大腿部筋, 縦隔膜部筋) すべてより残留 KM を検出し, 最高は右大腿部筋 0.23 ppm であった. また左右腎臓からは各々 16.2, 19.0 ppm 検出された. なお市販の牛肉からはいずれも KM は検出されなかった.

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課: “畜産物中の残留物質検査法” 第 1 集 p. 13 (1977).
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課: “畜産食品中の残留物質検査法” 第 1 集の 3 p. 6~35 (1981).
- 3) Mayhew, J. W., Gorbach, S. L.: J. Chromatogr. **151**, 133~146 (1978).
- 4) Mays, D. L., Van Apeldoorn, R. J., Lanback, R. G.: *ibid.* **120**, 93~102 (1976).
- 5) 中屋謙一, 杉谷 哲, 山田不二造: 食衛誌. **26**, 443~447 (1985).
- 6) Maitra, S. K., Yoshikawa, T. T., Steyn, C. M., Guze, L. B., Schotz, M. C.: Antimicrob. Agents Chemother. **14**, 880~885 (1978).
- 7) Anhalt, J. P.: *ibid.* **11**, 651~655 (1977).