高速液体クロマトグラフィーによるウシの尿及び胆汁中の カナマイシン、フラジオマイシンの定量法

(昭和 62 年 1 月 14 日受理)

斎藤 富保* 金島 弘恭*
中野 道晴* 高橋 哲夫*

Determination of Kanamycin and Fradiomycin in the Urine and Bile of Cattle by High Performance Liquid Chromatography

Tomio SAITO, Hiroyasu KANESHIMA, Michiharu NAKANO and Tetsuo TAKAHASHI

(Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome, Kita 19-jo,
Kita-ku, Sapporo, Japan)

A rapid and sensitive method for determination of kanamycin (KM) and fradiomycin (FM) in the urine and bile of cattle by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed.

A urine or bile sample was diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), and a portion of the diluted sample was adsorbed on an SP-Sephadex C-25 mini-column (SO₃H form) and eluted with 0.07% sodium hydroxide. KM and FM in the eluate were derivatized with 2,4-dinitrofluorobenzene and determined by HPLC using a TSK80TM-ODS column with 60% acetonitrile containing 0.1% acetic acid as the mobile phase (UV monitoring at 365 nm).

The recoveries of KM and FM added to the urine and bile of cattle at the level of 25 µg/ml were 97.3 and 90.8 (KM), and 92.2 and 83.3% (FM), respectively. The limit of determination was 0.3 µg/ml for KM and FM.

By this method, KM and FM in biological samples can be determined simultaneously.

(Received January 14, 1987)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; ウシ cattle; 尿及び胆汁 urine and bile; カナマイシン kanamycin; フラジオマイシン fradiomycin; アミノグリコシド系抗生物質 aminoglycoside antibiotics; 2,4-ジニトロフルオロベンゼン 2,4-dinitrofluorobenzene; SP-セファデックス C-25 カラム SP-Sephadex C-25 column

はじめに

アミノグリコシド系抗生物質 (AG) は、グラム陽性及び陰性菌を始めとして幅広い抗菌スペクトルを有し、ヒトの医療用薬ばかりでなく、その一部は動物用医薬品や飼料添加剤として使用されている。

現在、我が国では、食肉や畜産食品中に残留する AG の分析法として微生物学的方法¹⁾ が用いられているが、この方法は複雑でしかも抗菌性物質の同定が難しいなどの欠点を有する。

著者らは、食肉、畜産食品及び生体試料中に残留する AG を迅速かつ簡易に検出するための化学的分析法の確

立を目的として薄層クロマトグラフィー (TLC)²⁾ 及び TLC-FID 法^{3), 4)} について検討を行ってきた。

化学的分析法としては、最近我が国でも食肉中の AG をガスクロマトグラフィー⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{6), 7)} を用いて定量した報告がみられるが、前処理の簡便化などに、なお検討すべき点があると考えられる。

生体に投与された AG は、その大部分は腎糸球体ろ過により尿中に、また、一部は肝から胆汁中に、比較的長時間にわたり排泄されることが知られている⁸⁾⁻¹⁰⁾。このことは、GA の飼料への添加、又は生体への残留が疑われる場合の同定には、好適な生体試料であると考えら

* 北海道立衛生研究所: 札幌市北区北 19 条西 12 丁目

れる。

そこで今回は、試料としてウシの尿及び胆汁を選択し、カナマイシン (KM)、フラジオマイシン (FM) の分析について、より簡便でかつ精度の高い方法を開発するため、SP-Sephadex カラムを用いたクリーンアップ法の検討を行った。また、KM 及び FM を 2,4-dinitro-fluorobenzene (FDNB) と反応させて誘導体とした後、HPLC により定量する方法について検討し、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

札幌市近郊の食肉処理場より、厚生省法¹⁾で抗生物質の残留が認められないウシの尿及び胆汁を入手して実験に供した。

2. 試薬

KM 及び FM 標準溶液: 国立予防衛生研究所より供与を受けた常用標準硫酸 KM (790 μg (力価)/mg) 及び硫酸 FM (646 μg (力価)/mg) を精秤し、それぞれ水に溶解して 1,000 μg (力価)/ml の標準原液を調製した。使用に際し、標準原液を水で任意の濃度に希釈して KM 及び FM 標準溶液とした。

0.1 M リン酸緩衝液 (0.1 M PB): リン酸水素二ナトリウム・12水塩 35.8 g を水 900 ml に溶解し、これにリン酸を加えて pH 8.0 とし、水で 1,000 ml とした。

0.5 M トリス緩衝液 (0.5 M Tris B): トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 6 g を水 80 ml に溶解し、18% 塩酸で pH 8.0 とした後、水で 100 ml とした。

FDNB 試薬: FDNB (半井化学社製) をアセトニトリルに溶解し、180 mg/ml とした。

3. SP-Sephadex カラムの調製

SP-Sephadex C-25 (陽イオン交換体 スルホン酸型, Pharmacia 社製) を常法により 0.1 M PB で平衡化し、注射針 (0.45×13 mm, Terumo 社製) を装着したポリプロピレンカラム (7×60 mm, 室町化学社製) に 0.7 ml を充てん (高さ約 2 cm) して用いた。

4. 装置

高速液体クロマトグラフ: 日立製作所製 LC 655A-11 に日立 638-0410 型 UV モニター、日立 D-2000 型クロマトインテグレイターを接続して使用した。

5. 試験溶液の調製

試料 (尿及び胆汁) を 1.0 ml 採り、0.1 M PB で 3 倍に希釈した後、その 1.0 ml を SP-Sephadex C-25 カラムに負荷した。カラムは、0.1 M PB 及び水の各 1.0 ml で洗浄した後、0.07% 水酸化ナトリウム溶液で溶出し、初液 0.4 ml を除去後、次の 0.5 ml を分取し試験溶液とした。

6. 誘導体化の条件

試験溶液 50 μl に 0.5 M Tris B 100 μl , アセトニトリル 150 μl , FDNB 試薬 30 μl を順次加えて密栓し、

Clean-up

Sample (urine, bile) 1.0 ml

↓ dilute with 2.0 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)

Diluted solution 1.0 ml

↓ SP-Sephadex C-25 column (0.7 ml, 2.0 cm height)

↓ wash with 1.0 ml of phosphate buffer and 1.0 ml of water
elute with 0.07% NaOH remove 0.4 ml of first eluate

Eluate 0.5 ml

Derivatization

Eluate 50 μl

↓ add 100 μl of 0.5 M Tris buffer (pH 8.0), 150 μl of CH_3CN , and 30 μl of FDNB solution (180 mg/ml CH_3CN), warm at 80° for 20 min

10 μl for HPLC

Scheme 1. Analytical procedure for kanamycin and fradiomycin in the urine and bile of cattle

振とうした後、80° 20 分間加温して誘導体化反応を行い、HPLC に供した。

以上の分析操作の概要を Scheme 1 に示した。

7. HPLC の測定条件

カラム: TSK80TM-ODS (東洋ソーダ (株) 社製) 4 mm i.d.×250 mm

移動相: アセトニトリル:水:酢酸 (60:40:0.1)

流速: 1.0 ml/min

カラム温度: 50°

検出波長: 365 nm

試料注入量: 10 μl

8. 検量線の作成

KM 及び FM の 0.5~25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をそれぞれ調製し、各 50 μl を 6. に記載した方法により誘導体化後、その 10 μl を HPLC に供し、ピーク面積により検量線を作成した。

結果及び考察

1. クリーンアップ法の検討

AG は、塩基性で水に溶けやすく、また、ウシの尿及び胆汁は複雑な成分を有するため、通常の液-液抽出法での抽出分離は気泡などを生じ困難であった。AG の分離精製には陽イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどを用いたカラムクロマトグラフィーが広く用いられている¹¹⁾。そこで今回、著者らは、Bond Elute-CBA, SAX, Si (Analytichem 社製), SP- 又は CM-Sephadex C-25, C-50 (Pharmacia 社製) 及び Bio-Rex 70 (Bio-rap 社製) を用いたクリーンアップを行う方法を検討した。溶出溶媒には、リン酸、ホウ酸、酢酸塩などの緩衝液 (pH

Fig. 1. Elution pattern of kanamycin and fradiomycin in the urine and bile of cattle from SP-Sephadex C-25 column with 0.07% NaOH

KM: kanamycin; FM: fradiomycin

Kanamycin and fradiomycin were added to the urine and bile at 5 μ g/ml level.

7~12) 及び 0.01~1.00% 水酸化ナトリウムについて検討した。

その結果, SP-Sephadex C-25 カラムを用いると, 他のカラムに見られた洗浄時における AG の流出や, 非特異的な吸着による溶出量の減少もなく, 特異的にカラムと結合し, 0.07% 水酸化ナトリウム溶液により KM, FM とも 95% を越える高い回収率で溶出した。

この際, 溶出の前に, カラムをあらかじめ 0.1 M PB 及び水で洗浄することにより, 後述の FDNB 修飾反応時の塩類の影響も少なくなり, また, HPLC による分析時の妨害ピークを除去することができた。

試料 1.0 ml に KM, FM 各 5 μ g を添加し, Scheme 1 に従って処理し, SP-Sephadex C-25 カラムからの KM, FM の溶出について検討した結果を Fig. 1 に示した。

0.07% 水酸化ナトリウム溶液で溶出し, 150 μ l ごとに分画したところ, 尿及び胆汁中の KM, FM はいずれも第 1~第 3 画分には溶出しないが, 第 4~第 6 画分でシャープな溶出を示した。この結果から, 最初の溶出液 0.4 ml を除き, 次の 0.5 ml を分取して試験溶液とした。

2. 誘導体化条件の検討

KM 及び FM は, 紫外外部吸収を持たないため, 通常の UV モニターを用いた HPLC によって分析する際, 発色試薬により誘導体として検出する必要がある。

FDNB は, AG のアミノ基と反応して紫外外部吸収をもつ誘導体を与える¹²⁾が, 既に著者らは, ジベカシンの FDNB による誘導体化反応について, 反応条件を詳細に検討し, 報告している¹³⁾。そこで今回も, FDNB を発色剤として用い, KM, FM について同様の検討を行っ

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of 2,4-dinitrofluorobenzene derivatives of kanamycin and fradiomycin

Kanamycin and fradiomycin were added to the urine and bile at 1 μ g/ml level.

たところ, Scheme 1 に示したように, FDNB 溶液 (180 mg/ml) を 30 μ l 添加することとした他は, 既報⁹⁾と同じく, 反応の pH は 8.0 (0.5 M Tris B) で, 80° 20 分間加温することにより, 再現性のよい誘導体を得ることができた。

なお, 反応溶液中にリン酸塩, 酢酸塩などの塩類が共存すると誘導体の収率の低下が見られたが, 0.5 M Tris B (pH 8.0) を用いることにより反応は定量的に進行了。生成した誘導体は, 室温で数日間安定であった。

3. HPLC 測定条件の検討

FDNB で誘導体化した AG の HPLC 分析について

Table 1. Recoveries of Kanamycin and Fradiomycin in the Urine and Bile of Cattle

	Kanamycin				Fradiomycin			
	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)
Urine	5	86.0	84.5 $\pm$ 4.0	4.7	5	99.5	99.7 $\pm$ 1.8	1.8
		87.5				101.5		
		80.0				98.0		
	25	95.5	97.3 $\pm$ 2.4	2.4	25	97.0	92.2 $\pm$ 4.8	5.2
		100.0				87.5		
		96.5				92.0		
Bile	5	85.0	85.8 $\pm$ 1.4	1.7	5	83.0	81.7 $\pm$ 1.5	1.9
		87.5				82.0		
		85.0				80.0		
	25	90.5	90.8 $\pm$ 1.0	1.1	25	83.0	83.3 $\pm$ 2.3	2.7
		92.0				85.5		
		90.0				81.0		

は、既に順相系¹⁴⁾及び逆相系カラム¹¹⁾を使用した例が報告されている。そこで順相系として Nucleosil 50-10 (Nagel 社製)、逆相系として TSK80TM-ODS (東洋ソーダ(株)社製)、Lichrosorb RP-18 (Merk 社製)、 μ Bondapak C18 (Waters 社製) の各カラムについて検討したところ、TSK80TM-ODS カラムが最も良い分離ピークを示した。

移動相としては、メタノール-水、アセトニトリル-水の各種比率混液について検討したが、アセトニトリル-水-酢酸 (60:40:0.1) の混液で Fig. 2 に示す良好なクロマトグラムが得られ、試料からの妨害物質は認められなかった。

また、測定波長 365 nm、カラム温度 40° は著者が先に報告¹³⁾したものと同一条件を用いた。

なお、この条件では、KM, FM が他の AG (アミカシン、トブラマイシン、ジベカシン、ゲンタマイシン) のピークとは完全に分離したクロマトグラムを与えた¹³⁾。

4. 検量線

KM, FM の標準溶液を用い、Scheme 1 に従い検量線を作成した結果、Fig. 3 に示すとおり KM, FM とも 0.5~25.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性を示した。

5. 添加回収実験

ウシの尿及び胆汁各 1.0 ml に KM, FM をそれぞれ 5 μg , 25 μg 添加し、Scheme 1 の方法により添加回収実験を 3 回繰り返し行った結果を Table 1 に示した。

全般的に 5 μg より 25 μg 添加の方が高い平均回収率を示したが、いずれも再現性のある良好な回収率が得られた。

また、ウシの尿、胆汁での KM, FM の定量限界は、いずれも 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 3. Calibration curve on kanamycin and fradiomycin

KM: kanamycin; FM: fradiomycin

なお、Scheme 1 に示した分析操作は 2 時間以内で終了することが可能であり、本法は生体試料中の KM 及び FM の簡易で迅速な分析法として、十分実用に供しうるものと考えられる。

まとめ

生体試料 (ウシの尿、胆汁) 中の KM, FM の HPLC による同時定量法について検討し、次の結果を得た。

1) 試料 1.0 ml を 0.1 M PB で 3 倍に希釈し、その一部を SP-Sephadex C-25 カラムに負荷してクリーンアップした後、FDNB 試薬により誘導体化反応を行い、HPLC に供した。

2) HPLC のカラムは TSK80TM-ODS、移動相はアセトニトリル-水-酢酸 (60:40:0.1) 混液とし、検出には UV モニター (365 nm) を用いた。

3) ウシの尿、胆汁での平均回収率は、5 $\mu\text{g/ml}$ 添加で KM 84.5~85.8%, FM 81.7~99.7%, 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加では KM 90.8~97.3%, FM 83.3~92.2% で、いずれも良好であった。

定量限界は、KM, FM とも 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であり、本法は短時間で分析可能なこととあわせて、生体試料中の KM 及び FM の定量法として十分実用に供しうるものと考えられる。

なお、本研究の要旨は第23回全国衛生化学技術協議会年会 (1986年10月、長崎市) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課: “畜水産物中の残留物質検査法” 第1集の3 (1981).
- 2) 斎藤富保, 金島弘恭: 道衛研所報, **32**, 73~76 (1982).
- 3) 斎藤富保, 金島弘恭, 岡田迪徳: 同上 **33**, 131~133 (1983).
- 4) 斎藤富保, 金島弘恭, 中野道晴: 同上 **35**, 111~114 (1985).
- 5) 中屋謙一, 杉谷 哲, 山田不二造: 食衛誌, **26**, 443~447 (1985).
- 6) 中屋謙一, 杉谷 哲, 山田不二造: 同上 **27**, 258~262 (1986).
- 7) 米田 豊, 岡田紀子, 溝口省三, 他: 同上 **27**, 369~374 (1986).
- 8) 高橋 勇: 畜産の研究 **36**, 298~302 (1982).
- 9) 二宮幾代治, 佐藤修司, 他: J. Antibiotics, SER B-XIII 4 (1960).
- 10) 米沢昭一: 畜産の研究 **36**, 147~152 (1982).
- 11) 名取信策, 池川信夫, 鈴木真言編: “天然有機化合物実験法” p. 5~12 (1978) 講談社.
- 12) Barends, D. M., Blauw, J. S., Mijnsbergen, C. W., Govers, C. J. L. R., Hulshoff, A.: J. Chromatogr. **322**, 321~331 (1985).
- 13) 中野道晴: 道衛研所報, **36**, 78~80 (1986).
- 14) Tsuji, K., Goetz, J. F., Van Meter, W., Gusciora, K. A.: J. Chromatogr. **175**, 141~152 (1979).