高速液体クロマトグラフィーによる豚肉中のデストマイシン A, ハイグロマイシン B の定量

(昭和 62 年 7 月 2 日受理)

中屋 謙一* 杉谷 哲* 河合 信*

Determination of Destomycin A and Hygromycin B in Pork by High Performance Liquid Chromatography

Ken-ichi NAKAYA, Akira SUGITANI and Makoto KAWAI

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

A sensitive and simple method for simultaneous determination of destomycin A (DM) and hygromycin B (HM) in pork by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector was developed.

DM and HM was extracted with 10% trichloroacetic acid, and the extract was applied to an Amberlite CG-50 column (NH₄ form) followed by a Dowex 1-X8 column (OH form) to obtain a test solution. A portion of the test solution was treated with *o*-phthalaldehyde to derivatize DM and HM. The derivatives were 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 DM and HM added to pork at levels of 0.25 and 0.5 µg/g and at 0.5 and 1.0 unit/g were 73.8 and 82.5%, and 77.4 and 81.6%, respectively. The detection limits were 0.1 µg/g for DM and 0.3 unit/g for HM in the sample.

(Received July 2, 1987)

Key words: デストマイシン A destomycin A; ハイグロマイシン B hygromycin B; 豚肉 pork; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; *o*-フタルアルデヒド *o*-phthalaldehyde; 蛍光検出器 fluorescence detector

はじめに

飼料添加物は、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的としているが、このうち抗生物質は疾病の予防、発育促進剤、抗コクシジウム剤、寄生虫駆除剤としての用途¹⁾が考えられ現在使用が認められているものは19種類である。このうちアミノグリコシド系抗生物質では、デストマイシン A (DM)、ハイグロマイシン B (HM) の 2 種類のみがブタ、ニワトリの寄生虫駆除の目的で使用され需要も多い²⁾。また両者の併用は禁止されている。

DM, HM を含めアミノグリコシド系抗生物質の食品中残留検査は、従来一般的に微生物学的方法^{3), 4)}により行われているが、特異性、定量性の点で必ずしも優れた

方法とは言い難い。このため最近では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^{6), 7)} (HPLC) あるいは蛍光基質免疫測定法⁸⁾などの化学的分析法が開発されて来ている。著者らは前報⁹⁾で残留カナマイシンの HPLC による定量法を報告したが、今回この方法に若干の改良を加え、DM と HM を同時に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。

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ブタの筋肉部を用いた。

2. 試薬

常用標準デストマイシン A (DM): 農林水産省東京肥飼料検査所配布品, 997 µg/力価/mg

常用標準ハイグロマイシン B (HM): 武田薬品工業

* 岐阜県衛生研究所: 岐阜県岐阜市野一色 4-6-3

(株)製, 1137 unit/mg

DM, HM 標準溶液: DM 及び HM を精秤し水に溶解し, 各 100 μ g 力価/ml, 100 unit/ml の混合標準原液を調製し 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-フタルアルデヒド試薬: 前報⁶⁾に準じて調製した.

CG-50 樹脂カラム: 前報⁶⁾に準じて調製した.

Dowex 1-X8 樹脂カラム: Dowex 1-X8 樹脂を水洗後, 各 2 N 濃度のアンモニア水, 硫酸アンモニウム, 塩酸, 硫酸アンモニウム, 水酸化ナトリウムで順次処理し, 最後に中性になるまで水洗した後, 10×300 mm のガラスカラムに 5 cm 高になるよう充て込んで用いた.

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, 高速液体クロマトグラフ, 蛍光検出器: 前報⁶⁾に同じ

データ処理装置: (株)島津製作所製 C-R3A Chromatopac

4. 試験溶液の調製

前報⁶⁾に準じ細切試料 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, 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.5 に調整し, CG-50 カラムに通し, 水 100 ml で洗浄後 1 N アンモニア水で溶出する. 得られた溶出液を Dowex 1-X8 カラムに通し素通り画分を捕集し, さらに水 10 ml でカラムを洗浄し洗液を得る. この両液を合せて濃縮乾固し, 0.05 M 水酸化カリウム 1 ml に溶解し試験溶液とした.

5. 誘導体化

試験溶液 0.5 ml を 10 ml 共栓試験管にとり, 以下前報⁶⁾に準じ *o*-フタルアルデヒド試薬 0.5 ml を加え密栓後速かに 20 秒間攪拌混合する. 30°, 10 分間誘導体化反応を行い, 更に 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いた.

6. 定 量

5. の方法により得られた *o*-フタルアルデヒド誘導体に移動相 4 ml を加え, Table 1 の条件で HPLC に供した. なお定量は面積による絶対検量線法で行った.

7. 検量線の作製

DM 1.0~20 μ g/ml, HM 3.0~40 unit/ml となるよう標準混合溶液を調製し, 各 0.5 ml を 5. 及び 6. の方法

により操作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

DM, HM の抽出には前報⁶⁾と同様 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 カラムからの溶出挙動

DM 10 μ g, HM 20 unit をカラムに吸着し, 1 N アンモニア水による溶出挙動について検討した. DM, HM とも 10~30 ml の溶出画分に 97.3%, 96.1% 回収されたが確実性を考慮して 50 ml で溶出し, 全量を捕集することにした (Fig. 1).

3) Dowex 1-X8 カラムによる妨害物質の除去

試料抽出液の CG-50 カラムからの溶出物には, 極性の高い物質と思われるピークがクロマトグラム先端に現われ DM の検出に影響を及ぼす. そこで陰イオン交換樹脂である Dowex 1-X8 (OH 型) カラムを通したところこれらのピークは除かれクリーンアップ効果が認められた. また DM, HM の吸着による損失は認められなかった.

2. 誘導体化条件の検討

1) 反応条件

前報⁶⁾と同一条件で DM 及び HM の誘導体生成量について検討した. Fig. 2, Fig. 3 に示すように DM, HM とも同様な傾向を示し, また前報⁶⁾の結果ともほぼ

Fig. 1. Elution pattern of destomycin A and hygromycin B from CG-50 column (70 mm×15 mm i.d.) with 1 N NH₄OH
 □: destomycin A
 ▨: hygromycin B

Table 1. Operating Condition of HPLC

Instrument	Japan Spectroscopic TRIROTAR-V
Column	TSK gel ODS-120T 250 mm×4 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 Spectrofluorometer FP-210 (Ex. 335 nm, EM. 440 nm)
Sample size	5 μ l

Fig. 2. Effect of reaction time and temperature on *o*-phthalaldehyde derivatization of destomycin A

—△—: 30°C; —□—: 50°C; —○—: 30°C→50°C (heated at 30°C for timed intervals and at 50°C for 5 min)

Fig. 3. Effect of reaction time and temperature on *o*-phthalaldehyde derivatization of hygromycin B

—△—: 30°C; —□—: 50°C; —○—: 30°C→50°C (see Fig. 2)

同一であった。このため反応条件は 30°, 10 分反応後更に 50°, 5 分反応を継続することにした。

2) 誘導体の安定性

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. 4 に示した。氷冷状態では DM, HM とも 120 分まではほとんど変化が見られなかったが、室温放置した場合は DM で 70%, HM で 65% に低下した。このため反応終了後 HPLC に供するまで氷冷しておくことにした。

Fig. 4. Stability of *o*-phthalaldehyde derivative of destomycin A and hygromycin B

—○—: destomycin A in ice bath;
—●—: hygromycin B in ice bath;
—□—: destomycin A at room temp.;
—■—: hygromycin B at room temp.

3. HPLC 測定条件の検討

1) カラム及び移動相の組成

TSK gel ODS 120T, Nucleosil C₁₈ の両充填剤について、また移動相はメタノール-水-アセトニトリル (65:30:5)⁶⁾ を用い DM と HM の分離を検討した。いずれの充填剤でも分離は可能であったが、Nucleosil C₁₈ では比較的吸着が強く分析時間が長くなる傾向が見られたこと、カラム圧が高くなることなどの理由により TSK gel ODS 120T を使用することにした。またカラム長は DM, HM 相互の分離を良くするため 250 mm とした。更に TSK gel ODS 120T を用いリン酸緩衝液-メタノール系での分離を検討した。標準溶液では 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)-メタノール (52:48) で分離可能であったが、試験溶液では夾雑ピークが多数出現し実用的ではなかった。

2) 測定波長

DM, HM 誘導体の蛍光スペクトルを測定したところ前報⁶⁾と同様最大励起波長 335 nm, 最大蛍光波長 440 nm を示したため本条件を採用した。

3) 妨害物質

試料からの妨害物質は認められなかった。また本法において他のアミノグリコシド系抗生物質 (カナマイシン, フラジオマイシン, 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) は定量の妨害とはならなかった。

4. 検量線の精度及び検出限界

DM 0.5~10 ng, HM 1.5~20×10⁻³ unit の範囲で原点を通る良好な直線性を示した。DM 5 ng, HM 20×10⁻³ unit を用い繰返し測定した場合の変動係数は、各々 1.72% (n=5), 1.20% (n=5) であった。また検出限界は DM 0.5 ng, HM 1.5×10⁻³ unit であった。

5. 添加回収実験

市販の豚肉各 10 g に DM 2.5, 5 µg, HM 5, 10 unit

Table 2. Recovery of Destomycin A and Hygromycin B from Pork

	Added	Found (μg)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D. (%)
Destomycin A (μg)	2.5	1.89	75.4	73.8 $\pm$ 5.1
		1.85	74.4	
		1.82	72.8	
		2.01	80.3	
		1.64	66.3	
	5.0	4.33	86.6	82.5 $\pm$ 2.9
		3.93	78.5	
		4.07	81.4	
		4.13	82.7	
		4.17	83.3	
Hygromycin B (unit)	5.0	3.67	73.3	77.4 $\pm$ 11.8
		4.81	96.2	
		3.96	79.1	
		3.22	64.4	
		3.69	73.8	
	10.0	8.36	83.6	81.6 $\pm$ 2.9
		8.30	83.0	
		8.31	83.1	
		7.66	76.6	
		8.17	81.7

Fig. 5. High performance liquid chromatogram of standard (A), extracts from pork (B) and blank pork (C)
Destomycin A and hygromycin B were added 1 $\mu\text{g/g}$ and 2 unit/g sample respectively.

を添加し回収率を求めた。Table 2 に示すように DM 73.8, 82.5%, HM 77.4, 81.6% の平均回収率が得られた。またそのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

市販の豚肉 5 検体について本法を適用した結果、いずれの検体からも DM, HM は検出されなかった。

ま と め

豚肉中の残留 DM, HM を *o*-フタルアルデヒド試薬により蛍光誘導体とし、HPLC で同時に定量する方法を検討し以下の結果を得た。

1) 試料からの DM, HM の抽出は、10% トリクロロ酢酸によった。抽出液をエーテル洗浄後 pH 7.5 に調整し、CG-50 カラム次いで Dowex 1-X8 カラムにより精製し、一部を *o*-フタルアルデヒド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 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) 本法の豚肉での回収率は DM 0.25 $\mu\text{g/g}$, 0.5 $\mu\text{g/g}$ 添加で 73.8, 82.5%, HM 0.5 unit/g, 1.0 unit/g 添加で 77.4, 81.6% であった。定量限界は DM 0.1 $\mu\text{g/g}$, HM 0.3 unit/g であった。

4) 市販の豚肉 5 検体に本法を適用した結果、いずれの検体からも DM, HM は検出されなかった。

本報告の一部は第52回日本食品衛生学会学術講演会 (1986年11月, 高知) で発表した。

文 献

- 1) (財) 畜産生物化学研究所編: “動物用医薬品・飼料添加物の畜・水産物への残留とその分析法” p. 1~24 (1985) 近代出版。
- 2) 矢ヶ崎忠夫: 食衛誌, **27**, 451~465 (1986).
- 3) 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. 23~24 (1977).
- 4) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課: “畜水産食品中の残留物質検査法” 第1集の3 p. 1~5 (1981).
- 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, 床鍋嘉昭, 城石将幸, 吉本善次郎: 同上 **27**, 369~374 (1986).
- 8) 堀江正一, 斉藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 中沢裕之, 藤田昌彦: 同上 **27**, 413~416 (1986).