ノート

HPLC による鶏・豚組織中のスペクチノ
マイシンの残留分析法

(平成 8 年 1 月 30 日受理)

大 口 克 志* 高 原 ひ ろ み* 松 本 真 里 子*
中 島 千 絵* 城 戸 靖 雅*Residue Analysis of Spectinomycin in Chicken and
Swine Tissues by HPLCKatsushi OHGUCHI, Hiromi TAKAHARA, Mariko MATSUMOTO,
Chie NAKAJIMA and Yasumasa KIDO(Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology:
3-7-11, Hashimoto-dai, Sagamihara City, Kanagawa 229, Japan)

A reversed-phase HPLC method using *p*-nitrophenyl hydrazine as a pre-column derivatizing reagent was developed for the residue analysis of spectinomycin (SPCM) in chicken and swine tissues. SPCM was extracted from samples with 10% trichloroacetic acid saturated with EDTA-2Na, and then cleaned up with a Sep-pak tC_{18} cartridge. The detection limit of SPCM was 0.05 μ g (potency)/g. Recoveries of SPCM ranged from 73% to 95% for chicken tissues and from 75% to 87% for swine tissues. The present method was applied to the analysis of tissues of chicken and swine given various doses of SPCM.

(Received January 30, 1996)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー HPLC; パラニトロフェニルヒドラジン *p*-nitrophenyl-hydrazine; スペクチノマイシン spectinomycin; 残留分析 residue analysis; 鶏 chicken; 豚 swine

緒 言

畜産分野では畜産物生産用家畜の疾病予防や治療の目的で、多種類の合成抗菌剤や抗生物質が使用されており、これら薬物の畜産物への残留は食品衛生上の観点から厳しく規制されている。アミノグリコシド系抗生物質のスペクチノマイシン (decahydro-4a,7,9-trihydroxy-2-methyl-6,8-bis (methylamino)-4H-pyrano [2,3-b][1,4] benzodioxin-4-one: SPCM) (Fig. 1) は、マイコプラズマ、大腸菌及びサルモネラに抗菌性を有し、家畜の呼吸器性マイコプラズマ症や大腸菌症の予防や治療に用いられている動物用医薬品である。SPCM の定量法には、微生物学的試験法¹⁾ が日本抗生物質医薬品基準²⁾ に規定

されているが、検出感度が低く、分析に長時間を要するため畜産物中の残留分析には適さない。GC³⁾ はトリメチルシリル化する必要があり、有効な UV 吸収発色団がない SPCM を HPLC で定量するために、様々な誘導体化法^{4)~7)} が報告されている。しかし、いずれも製剤分析又は血清試料の分析に適用されているのみで、畜産物 (筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、小腸、皮膚など) 中の SPCM の残留分析に用いた報告はない。また、最近、SPCM に対する特異抗体を用いた ELISA 法による鶏血清中の SPCM のモニタリング法の開発が報告されたが、血清以外の畜産物中の SPCM の定量への適用は報告されていない⁸⁾。

本研究では、SPCM 投与動物の休薬期間設定に適した簡便・迅速で精度のよい残留分析法を検討した。最初に、SPCM 構造中のカルボニル基に着目し、*p*-ニトロ

* (財)畜産生物科学安全研究所: 〒229 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

Fig. 1. Structure of spectinomycin

フェニルヒドラジン (*p*-NPH) をプレカラム誘導体化剤とする HPLC を用いた分離・定量法を検討した。次いで、臓器・組織に残留する SPCM を抽出し、クリーンアップする条件を検討して、初期の目的に合致した鶏、豚組織中の SPCM の残留分析法を確立した。

実験方法

1. 試薬及び試液

塩酸 SPCM 標準品 (637 μ g (力価)/mg) は、メルシャン(株)より入手した。他の試薬は、すべて和光純薬工業(株)製試薬特級を使用した。

p-NPH 飽和エタノール溶液: エタノール 30 ml に適量の *p*-NPH を加えて沸騰水浴中で加温して溶解した後、室温にまで放冷した。析出した結晶をガラスフィルターでろ過し、ろ液を *p*-NPH 飽和エタノール溶液とした。

抽出溶媒: EDTA-2Na 0.5 g/20 ml 水溶液を 10% トリクロロ酢酸 500 ml に加え、沸騰水浴中で加温して溶解した後、室温にまで放冷してその上清を用いた。

標準液: 塩酸 SPCM 標準品を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、1,000 μ g (力価)/ml の標準原液を調製し、同緩衝液で用時段階希釈して 0.4~24 μ g (力価)/ml の標準液を調製した。

2. 器具・器材及び測定装置

ホモジナイザー: 日音医理科器械製作所製 NS-50 型, Sep-pak tC₁₈ (ENV) カートリッジ: ミリポア社製, ポンプ: (株)島津製作所製 LC-10AD 型, 検出器: (株)島津製作所製 SPD-10A 型, オートインジェクター: (株)島津製作所製 SIL-10A 型, カラムオープン: (株)島津製作所製 CTO-10A 型, インテグレーター: (株)島津製作所製 C-R4A 型, カラム: 東ソー製 TSK-gel ODS-80T_M (4.6 mm i.d.×150 mm)

3. 試料溶液の調製

(1) 抽出及びクリーンアップ

均一に細切した試料 4.0 g に抽出溶媒 15 ml を加えて 1 分間ホモジナイズした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を分取した。残さに抽出溶媒 15 ml を加えて 10 分間振とうした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を先の上澄液に合わせた。この液に 10 M 水酸化ナトリウムを加えて pH 8.0 に調整した後、MeOH 5 ml, 蒸留水 10 ml, 次いで EDTA-2Na 飽和水

Fig. 2. Effects of reaction time and temperature on derivatization of spectinomycin with *p*-nitrophenylhydrazine

溶液 10 ml で前処理した Sep-pak tC₁₈ (ENV) カートリッジに負荷した。カートリッジを水 10 ml で洗浄した後、血漿試料は MeOH, 肝臓試料は 6% MeOH, その他の臓器・組織の場合は 15% MeOH のいずれも 8 ml ずつをカートリッジに流して SPCM を溶出させた。溶出液は減圧下、40°C 以下で蒸発乾固し、残留物を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml に溶解して誘導体化を行うための試料溶液とした。

(2) HPLC 試験溶液の調製

標準液及び試料溶液 0.2 ml に、*p*-NPH 飽和エタノール溶液 0.1 ml 及び 10% トリクロロ酢酸エタノール溶液 0.2 ml を加えて混和、密栓し、70°C の水浴中で 1 時間加熱した。これに HPLC 移動相 3.5 ml を加えて希釈し、HPLC 試験溶液とした。

4. HPLC 条件

HPLC は、カラムに TSK-gel ODS-80T_M を用い、移動相に MeCN-水-酢酸 (73:26:0.5, v/v/v) を用いて行った。カラム温度を 4°C, 流速を 1 ml/min に、検出波長を 420 nm に設定し、試験溶液 30 μ l を注入して測定した。

5. SPCM の投与実験

鶏試料は、当研究所で飼育した 4 週齢 (雌) のブロイラーに塩酸 SPCM を飲水及び皮下投与して採取した。飲水添加群では常用最高量 500 mg (力価)/L と 2 倍量 1,000 mg (力価)/L, 皮下注射群では常用最高量 20 mg (力価)/kg 体重/日と 2 倍量 40 mg (力価)/kg 体重/日を連続 7 日間投与して採取した。

豚試料は、56~66 日齢の LW 系去勢豚に塩酸 SPCM を添加した飼料を不断給餌し、7 日間連続経口投与して採取した。添加濃度は塩酸 SPCM として飼料 1 kg 当たり常用最高量群では 100 mg (力価), 2 倍量群では 200 mg (力価) とした。対照には無添加飼料を給餌した。経時的に血漿, 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓, 小腸及び皮膚 (ブロイラーのみ) を採取し、分析時まで -20°C で凍結保存した。

Fig. 3. Typical chromatograms of standard solution of spectinomycin (A), extracts of chicken muscle (B), chicken muscle spiked with 1 μg (potency)/g of spectinomycin (C), swine muscle (D) and swine muscle spiked with 0.5 μg (potency)/g of spectinomycin (E)

結果及び考察

SPCM は Fig. 1 に示すように、2級アミノ基、水酸基、カルボニル基を有するが、その構造中には強い UV 吸収発色団がないため、HPLC 分析を行うには誘導体化しなければならない。Mayers ら⁴⁾は SPCM をイオン対クロマトグラフィーで分離後、2級アミノ基を次亜塩素酸酸化し、*o*-フタルアルデヒドで蛍光誘導体化して検出するポストカラム誘導体化法を報告しているが、システムが複雑で残留分析には適さない。Tsuji ら⁵⁾は 2-ナフタレンスルホニルクロリドにより 2級アミノ基と水酸基を標識するポストカラム誘導体化法を開発したが、順相系カラムを用いているので生体試料の分析には適さない。Haagsma ら⁶⁾はこの方法を改良して感度を向上させたが、妨害ピークの除去のために 2本のカラムを用い、カラムスイッチング法を組み込んでいるためシステムが複雑であり、多数の試料分析を行うには実用性の点で問題がある。Burton ら⁷⁾は、SPCM の C4 位のカルボニル基に着目して 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) によるプレカラム誘導体化法を報告している。この条件では 2種類の誘導体が生成し、彼らはこれらが C4 位のカルボニル基によるモノヒドラゾン誘導体と、C4a 位で開環して C4 位のカルボニル基と

C4a 位の水酸基によるオサゾン型のビスヒドラゾン誘導体であると推定している。彼らは誘導体化の反応時間を長くし、反応生成物をビス体のみにする方法を確立した。しかし、その方法は迅速性に欠けるためルーチン分析には使いにくいという一面がある。

本研究では、Burton ら⁷⁾の用いた 2,4-DNPH の代わりに *p*-NPH をプレカラム誘導体化試薬として選定し、クロマトグラム上 1本のピークとなる誘導体化条件を検討した。

1. 誘導体化条件の検討

誘導体化反応には *p*-NPH 飽和エタノール溶液と酸触媒として 10% トリクロロ酢酸エタノール溶液を用いた。反応温度、反応時間について検討した結果を Fig. 2 に示す。反応温度 70°C で 60 分間以上反応させるとピーク高さはほぼ一定値に達した。以上の結果より、反応温度及び反応時間は 70°C、1 時間を選択した。本 HPLC 条件では Fig. 3 に示すように SPCM の *p*-NPH 誘導体のクロマトグラムは単一ピークであった。また、生成した誘導体は、室温で暗所に 2 日間放置しても HPLC クロマトグラムに変化は認められなかったことから、安定であることが確認された。

2. HPLC 条件の検討

カラムに逆相系 TSK-gel ODS-80T_M を使用し、移動相には MeCN, 水, 酢酸を用いて, SPCM の最適分離条件を検討した. その結果, 移動相には MeCN-水-酢酸 (73:26:0.5, v/v/v), 流速: 1 ml/min, カラム温度: 40℃ の条件で Fig. 3 (A) に示すように良好なクロマトグラムが得られた. 測定波長は, SPCM の *p*-NPH 誘導体の吸収極大波長である 420 nm に設定した.

3. 検量線

SPCM 標準液を誘導体化し, HPLC で分離して得られたピーク高さを基に検量線を作成した. その結果, 0.4~24 µg (力価)/ml の濃度範囲で良好な直線関係 ($r=1.000$) が認められた. クロマトグラム上の最小検出量は 0.6 ng (力価) ($S/N=3$ 以上) であった. また, 5 µg (力価)/ml 及び 10 µg (力価)/ml での CV% は 3.18% 及び 1.48% ($n=5$) であり, 良好な再現性が認められた.

4. 抽出及びクリーンアップ条件の検討

アミノグリコシド系抗生物質は水溶性が高いため, 肉などからの抽出には除タンパク効果も有するトリクロロ

酢酸水溶液が用いられている⁹⁾. そこで, 10% トリクロロ酢酸水溶液を用いて家畜組織に添加した SPCM の抽出を検討したが, 満足すべき回収率を得ることができなかった. その原因として, SPCM が試料中に含まれ

Table 1. Recoveries of Spectinomycin from Chicken and Swine Tissues

Tissue	Chicken ($n=3$)		Swine ($n=5$)	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Plasma	73	5.1	87	3.8
Muscle	97	5.5	84	5.4
Fat	74	2.1	81	4.4
Skin	80	5.1	—	—
Liver	95	3.8	75	3.3
Kidney	93	3.3	81	1.1
Small intestine	81	2.1	80	2.1

Addition levels of spectinomycin: 1 µg (potency)/g (chicken tissues); 0.5 µg (potency)/g (swine tissues)

Table 2. Results of the Residual Assay in Various Tissues of Chickens Treated with Spectinomycin-HCl *via* Drinking Water and Hypodermic Injection

(A) Dose group *via* drinking water

(µg spectinomycin (potency)/g)

	Withdrawal period (day)	Plasma	Muscle	Fat	Skin	Liver	Kidney	Small intestine
Max. usual dose group* ¹	0	0.11	—	—	—	—	—	—
	3	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.07	0.07	0.36
	5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.12
	7	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Two fold dose group* ²	0	0.13	—	—	—	—	—	—
	3	<0.05	<0.05	<0.05	0.08	0.09	0.10	0.17
	5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.06	0.06	0.12
	7	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

(B) Dose group *via* hypodermic injection

(µg spectinomycin (potency)/g)

	Withdrawal period (day)	Plasma	Muscle	Fat	Skin	Liver	Kidney	Small intestine	Injection site
Max. usual dose group* ³	0	3.75	—	—	—	—	—	—	—
	5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.20	0.18	<0.05	0.10
	7	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.10	0.09	<0.05	0.09
	10	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Two fold dose group* ⁴	0	5.71	—	—	—	—	—	—	—
	5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.23	0.22	<0.05	0.19
	7	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.09	0.09	<0.05	0.14
	10	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.10

*¹: 500 mg/L, *²: 1000 mg/L, *³: 20 mg/kg body weight/day, *⁴: 40 mg/kg body weight/day

Results: Average of 3 samples. <0.05: Below the determination limit, —: Not analyzed

Table 3. Results of the Residual Assay in Various Tissues of Swine Treated with Spectinomycin-HCL via Feed

(μg spectinomycin (potency)/g)

	Withdrawal period	Plasma	Muscle	Fat	Liver	Kidney	Small intestine
Max. usual dose group* ¹	3 hours	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.45	<0.05
	1 day	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.39	<0.05
	7 days	—	—	—	—	<0.05	—
	10 days	—	—	—	—	<0.05	—
Two fold dose group* ²	3 hours	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	1.02	<0.05
	1 day	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.91	<0.05
	7 days	—	—	—	—	<0.05	—
	10 days	—	—	—	—	<0.05	—

*¹: 100 mg/kg feed weight, *²: 200 mg/kg feed weight, Results: Average of 3 samples, <0.05: Below the determination limit, —: Not analyzed

ている金属イオンとキレートを形成して抽出阻害を起こしていることが推定された。そこで、キレート形成を防ぐ目的で EDTA-2Na を飽和させた 10% トリクロロ酢酸溶液を抽出溶媒に用いたところ良好な回収率を得ることができた。

抽出液のクリーンアップには分析操作の簡便、迅速化を図る目的で固相抽出法を採用した。固相抽出カートリッジには、操作性、再現性の点から C₁₈ タイプが最も適当であると考えられたが、SPCM とカートリッジ充てん剤の残留シラノール基との相互作用が懸念されたため、カートリッジにはエンドキャップ処理が施されている Sep-pak tC₁₈ (ENV) を用いた。しかし、pH 8.0 の緩衝液を用いて SPCM 標準品をカートリッジに保持させた後、15% MeOH を用いて回収実験を行ったところ、回収率及び再現性ともに不十分な結果しか得られなかった。著者らは、カートリッジ充てん剤中に不純物として含まれている金属と SPCM がキレート形成することがその原因と考えた。そこで、金属イオンとキレート形成することが知られているテトラサイクリン系抗生物質を、C₁₈ カートリッジでクリーンアップする場合¹⁰⁾と同様に、EDTA-2Na で前処理したカートリッジを用いたところ、回収率及び再現性を改善することができた。

上述した抽出溶媒及びカートリッジを用いて、家畜組織に添加した SPCM のクリーンアップを試みた。その結果、試料が血漿の場合には、カートリッジからの SPCM の溶出溶媒に MeOH を用いても良好な回収率及びクリーンアップ効果が認められたが、その他の組織に関しては、クロマトグラム上に多くの妨害ピークが出現し、残留レベルでの定量が困難であることが判明した。そこで、カートリッジから妨害成分が溶出するのを抑えるために、溶出溶媒として MeOH と水の混液を用いることを考え、組織ごとに MeOH の至適混合比を検討し

た。その結果、肝臓については 6%、その他の組織については 15% MeOH・水をそれぞれ溶出溶媒に用いることにより、Table 1 に示すような満足すべき回収率及び再現性を得ることができた。

5. 添加回収試験

SPCM 無投与の鶏（ブロイラー）の血漿、筋肉、脂肪、皮膚、肝臓、腎臓及び小腸に SPCM 1 μg（力価）/g を、豚では皮膚を除く前述の組織に 0.5 μg（力価）/g を添加して回収率を測定した。その結果を Table 1 に示す。ブロイラーの脂肪、血漿及び豚の肝臓からの回収率はそれぞれ 74%、73% 及び 75% とやや低かったが、他の組織からの回収率は 80～97% であった。また、検出限界は 0.05 μg（力価）/g であり、これらの数値は残留分析のガイドラインをクリアする満足すべきものであると評価できる。

Fig. 3 に SPCM 標準液、SPCM 無添加及び添加したブロイラー及び豚の筋肉のクロマトグラムを示す。SPCM のピーク付近には妨害ピークは認められず、本法は SPCM の残留分析法として使用できると判断し、本法を用いて以下の試験を実施した。

6. 残留試験及び調査

ブロイラー及び豚に SPCM を投与し、休薬後経時的に主要臓器・組織中の SPCM の残留の推移を検討した。

ブロイラーの残留試験では、Table 2 に示すように飲水添加群では、常用最高量及び 2 倍量群ともに休薬 7 日目以後では全試料が検出限界以下であった。最も高濃度の長期残留は小腸に観察された。皮下注射群では、常用最高量群は休薬 5 日目及び 7 日目の肝臓、腎臓及び注射部位皮膚の全試料から検出されたが、休薬 10 日目以後は全臓器・組織の全試料が検出限界以下であった。2 倍量群では、休薬 5 日目の肝臓、腎臓及び注射部位皮膚の残留レベルが常用最高量群より若干高く、また、注

射部位皮膚から休薬 10 日目にも検出された。常用最高量群, 2 倍量群ともに休薬 14 日目には全臓器・組織の全試料が検出限界以下となった。

豚の残留試験の結果を Table 3 に示す。常用最高量群では, 休薬 1 日目に腎臓に検出されたが, その他の臓器・組織ではすべて検出限界以下であった。腎臓も休薬 7 日目には検出限界以下となった。2 倍量群でも同様に休薬 1 日目に腎臓に検出されたが, その他の臓器・組織はすべて検出限界以下であり, 腎臓も休薬 7 日目には検出限界以下となった。ブロイラーと相違して, 豚の場合は腎臓が標的組織であることを顕著に示唆する結果を得た。

全国規模で農場から送付されたブロイラー筋肉 30 試料について本法により分析したが, すべて検出限界以下であった。

文 献

1) Hanka, L. J., Mason, D. J., Sokolski, W. T.: Antibiot.

Chemotherapy **11**, 123~126 (1961).

- 2) 厚生省薬務局監修日本抗生物質学術協議会: “日本抗生物質医薬品基準解説” p. 167~168 (1993) 薬業時報社.
- 3) Brown, L. W., Bowman, P. B.: J. Chromatogr. Sci. **12**, 373~376 (1974).
- 4) Mayers, H. N., Rindoler, J. V.: J. Chromatogr. **178**, 103~108 (1979).
- 5) Tsuji, K., Jenkins, K. M.: *ibid.* **333**, 365~380 (1985).
- 6) Haagsma, N., Keegstra, J. R., Scherpenisse, P.: *ibid.* **615**, 289~295 (1993).
- 7) Burton, S. D., Hutchins, J. E., Fredericksen, T. L., Ricks, C., Tyczkowski, J. K.: *ibid.* **571**, 209~216 (1991).
- 8) Tanaka, T., Ikebuchi, H., Sawada, J., Okada, M., Kido, Y.: J. AOAC Int. **79**, 426~430 (1996).
- 9) (財)畜産生物科学安全研究所編: “畜水産食品中の薬物残留とその分析法” p. 69, 71, 73 (1994) 近代出版社.
- 10) (財)畜産生物科学安全研究所編: 同上 p. 85 (1994) 近代出版社.