ノート

畜水産食品中の残留オキシテトラサイクリンの分析法

(平成8年5月22日受理)

藤田和弘*¹ 伊藤嘉奈子*¹ 荒木恵美子*²
丹野憲二*² 村山三徳*³ 斎藤行生*³

Analytical Method for Residual Oxytetracycline in Livestock and Marine Products

Kazuhiro FUJITA*¹, Kanako ITO*¹, Emiko ARAKI*², Kenji TANNO*²,
Mitsunori MURAYAMA*³ and Yukio SAITO*³

(*¹)Japan Food Research Laboratories Nagoya Branch: 4-5-13, Osu, Naka-ku, Nagoya 460, Japan; *²)Japan Food Research Laboratories Head Office and Laboratory: 52-1, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151, Japan; *³)National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan)

An analytical method for residual oxytetracycline (OTC) in livestock and marine products was evaluated. OTC was extracted from a sample with McIlvaine buffer (pH 4.0) containing 0.01 mol/L EDTA-2 Na. The extract was washed with hexane, followed by a Sep-Pak Plus PS2 cartridge clean-up procedure. OTC was determined by HPLC. The results obtained by HPLC were well correlated with those of a microbioassay method. The average recovery at the tolerance limit levels established by the Food Sanitation Law of Japan was 90.4% and the determination limits were 0.02 ppm (muscle, seafood, milk), 0.04 ppm (liver, kidney, egg) and 0.002 ppm (fat).

(Received May 22, 1996)

Key words: オキシテトラサイクリン oxytetracycline; 微生物学的試験法 microbioassay; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; セップバックプラス PS2 カートリッジ Sep-Pak Plus PS2 cartridge

緒言

平成7年12月、食品衛生法が改正され畜水産食品中のオキシテトラサイクリン (OTC) の残留基準値が設定された^{1), 2)}。

従来、残留抗生物質の分析には、微生物に対する抗菌性を利用した平板法による微生物学的試験法が、複成分からなる場合が多い抗生物質をトータルに、かつ高感度に検出することが可能な方法として汎用されてきた³⁾。しかし、その原理は物質の抗菌性を検出する方法

であり、物質そのものを検出する方法ではないため、検出された抗菌性物質を特定するには、マイクロバイオオートグラフィーあるいはHPLCなどにより定性試験を併用する必要がある。

一方、近年抗生物質の機器分析における感度の向上と、OTCが単一成分であることなどから、OTCを含むテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) を直接HPLCにより定量する方法が数多く報告されている^{4)~10)}。しかし、今回の残留基準値の中には、肉などで0.1 ppm、脂肪で0.01 ppmとかなり低濃度に設定されているものもあり、これらの分析法をそのまま適用することは困難であると考えられた。

著者らは、OTCの迅速、簡便でなおかつ残留基準値を満足する分析法の確立を目的とし、Okaらの方法⁹⁾と

*¹ (財)日本食品分析センター名古屋支所: 〒460 名古屋市中区大須4-5-13

*² (財)日本食品分析センター東京本部: 〒151 東京都渋谷区元代々木町52-1

*³ 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1

前報¹⁷⁾で報告したスチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジの Sep-Pak Plus PS2 による精製を応用し、HPLC により定量する方法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

豚・牛・鶏肉、肝臓及び腎臓、ラード、牛脂肪、ぶり、えび、牛乳並びに鶏卵の市販品を用いた。

2. 試験菌株

Bacillus mycoides ATCC 11778 (以下 *B. mycoides* と略称) を使用した。

3. 試薬など

標準品: 動物医薬品検査所検定品の常用標準オキシテトラサイクリン (OTC) を使用した。

標準溶液: 標準品を 1,000 μ g/力価/mL (ppm) の濃度になるよう滅菌水で調製し、使用に際してはリン酸緩衝液で適宜希釈して標準溶液とした。

その他試薬: 和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

培地: ポリペプトン、細菌用肉エキス、寒天、Antibiotic Medium 8 は、それぞれ日本製薬(株)製、極東製薬(株)製、BBL 社製、Difco 社製を用いた。また、平板培地の調製などは、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」¹⁸⁾ の *B. mycoides* に関する調製法に準じた。なお、芽胞浮遊液の添加量は、培地の 1/1000 量とした。

リン酸緩衝液: リン酸一カリウム 13.6 g を滅菌水 1,000 mL に溶解し、水酸化カリウム溶液で pH を 4.5 に調整した。

吸着カラム: Waters 社製 Sep-Pak Plus PS2 を用い、メタノール 10 mL、水 10 mL 及び飽和 EDTA-2Na 溶液 5 mL を順に流して調製した。

1 mol/L イミダゾール緩衝液: 米田らの方法¹⁹⁾ に準じて調製した。

0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0): 「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法」¹⁹⁾ に従って調製した。

ペーパーディスク: Advantec 社製枝肉の抗菌物質検査用を使用した。

4. 装置

高速液体クロマトグラフ: Waters LC Moduel 1

検出器: (株)島津製作所製 RF-550 蛍光検出器

5. HPLC 測定条件¹⁰⁾

カラム: YMC-PACK ODS-AM AM-312 ((株)ワイエムシ社製 6.0 mm i.d.×150 mm)

移動相: 1 mol/L イミダゾール緩衝液-メタノール (77:23)

流量: 1.0 mL/min

測定波長: Ex 380 nm, Em 520 nm

カラム温度: 40°C

注入量: 20 μ L

6. 試験溶液の調製

6.1 豚・牛・鶏肉、ぶり、えび及び牛乳

試料 10 g を 250 mL の遠心管にはかりとり、0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL を加えてホモジナイズした後、ヘキササン 100 mL を加えて 5 分間振とうした。遠心分離 (3,500 rpm 10 分室温、以下同様) した後、下層をろ紙でろ過してろ液 50 mL を分取し、Sep-Pak Plus PS2 に負荷した。水 30 mL でカラムを洗浄した後、メタノール 10 mL で OTC を溶出し、溶出液を減圧下 40°C で濃縮乾固した。残留物をリン酸緩衝液 2.5 mL に溶解した後、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、試験溶液とした。

6.2 豚・牛・鶏肝臓及び腎臓並びに鶏卵

試料 5 g を 250 mL の遠心管にはかりとり、以下 6.1 と同様にを行い、試験溶液とした。

6.3 ラード及び牛脂肪

試料 20 g を 300 mL の遠心管にはかりとり、ヘキササン 200 mL を加えてホモジナイズした後、更に 0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 40 mL を加えて再度ホモジナイズした。遠心分離した後、下層をろ紙でろ過し、上層に再度 0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 20 mL を加えて同様に操作し、ろ液を合わせて Sep-Pak Plus PS2 に負荷した。水 30 mL でカラムを洗浄した後、メタノール 10 mL で OTC を溶出し、溶出液を減圧下 40°C で濃縮乾固した。残留物をリン酸緩衝液 1 mL に溶解した後、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、試験溶液とした。

7. 検量線の作成

7.1 HPLC

0.04, 0.2 及び 0.4 ppm の濃度の標準溶液を調製し、その 20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高を求めて検量線を作成した。

7.2 円筒平板法

平板培地にステンレススチール製円筒を置き、0.05, 0.1, 0.2, 0.4 及び 0.8 ppm の濃度に調製した標準溶液を満した後、30°C で 16~18 時間培養して円筒周辺に生じた阻止円直径から検量線を作成した。

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

Oka らの方法⁹⁾ に準じた UV 検出法と米田らの方法¹⁰⁾ に準じた蛍光検出法について検出感度の比較を行った。

その結果、ほぼ同じ保持時間における 0.04 ppm 濃度の標準溶液のピーク高を比較した場合、蛍光検出法の S/N 比は約 20、UV 検出法は 4~5 であり、蛍光検出法がより低濃度の OTC の検出法として有用であると考えられた。

Fig. 1. HPLC chromatograms of sample extracts and standard solution

(a): cattle muscle; (b): cattle liver; (c): cattle kidney; (d): yellowtail; (e): egg; (f): 4 ng of OTC

Table 1. Efficiency of Extraction Using McIlvaine Buffer (pH 4.0) Containing 0.01 mol/L EDTA-2Na

Sample	Spiked (ppm)	Volumes (mL)	Recovery (%)
Swine muscle	0.1	100	89.5
		40, 20	84.3
Swine liver	0.3	100	89.5
		40, 20	86.2
Swine kidney	0.6	100	93.0
		40, 20	91.5
Cattle fat	0.01	100	70.0
		40, 20	76.3

Fig. 1 に、蛍光検出法による牛肉、牛肝臓、牛腎臓、ぶり及び鶏卵のクロマトグラムを示した。いずれにおいても、UV 検出法の場合のように、OTC のピークが、早い保持時間の夾雑ピークのショルダーに重なることもなく、良好な分離を示した。

2. 試験溶液調製法の検討

畜水産食品中からの OTC の抽出には、マッキルベイン緩衝液-メタノール混液¹⁰⁾やメタリン酸-メタノール混液¹⁶⁾を用いている報告があるが、その場合、後のカラム操作のためにメタノールの除去を必要とする。

著者らは、Oka ら⁹⁾により報告され、更に「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法」で用いられている 0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) を抽出液とし、前報¹⁷⁾で報告した Sep-Pak Plus PS2 を精製に應用して、豚肉、肝臓、腎臓及び牛脂肪を用いて基準値レベルの添加濃度における抽出回数の検討を行った。その結果、Table 1 に示したように、豚肉、肝臓、腎臓については抽出回数による差はなく、1 回抽出で十分であると判断された。一方、牛脂肪は、添加濃度が低いためか、1 回抽出では不十分であり、2 回抽出が必要であると考えられた。

Table 2. Recoveries of OTC by the Developed Method

Sample	Spiked (ppm)	Recovery*1 (%)	RSD (%)
Cattle muscle	0.1	92.2	1.6
	0.02	84.1	8.1
Cattle liver	0.3	89.8	1.0
	0.04	102.6	9.9
Cattle kidney	0.6	94.6	2.3
	0.04	96.3	3.3
Swine muscle	0.1	89.5	0.9
Swine liver	0.3	89.5	3.2
Swine kidney	0.6	93.0	1.0
Chicken muscle	0.1	87.5	0.6
Chicken liver	0.3	96.3	5.9
Chicken kidney	0.6	92.9	3.2
Yellowtail	0.1	88.9	3.1
	0.02	81.3	7.3
Prawn	0.1	87.3	6.4
Egg	0.2	93.0	2.7
	0.04	100.8	4.3
Milk	0.1	85.5	0.5
	0.02	78.4	2.3
Lard	0.01	75.5	5.6
	0.002	88.7	5.2
Cattle fat	0.01	76.3	3.0
	0.002	86.1	2.2

The average of 3 replications

また、Oka らの報告⁹⁾では、抽出液をろ過後、直接 C₁₈ 系カートリッジにより処理をしているが、豚肉、肝臓及び腎臓について同様に行ったところ、豚肉のろ液に浮遊物が生じ、Sep-Pak Plus PS2 カートリッジの処理で目詰まりを起こした。そこで、抽出液をヘキサンにより洗浄したところ、浮遊物は除去され、カートリッジ処理の操作性も向上した。

3. 添加回収試験

Table 2 に示した各組織について添加回収試験を実施した。その結果、ラード及び牛脂肪の残留基準値レベルと牛乳の定量下限レベルの平均回収率が 70% 台であったが、それ以外は 80% 以上、相対標準偏差はいずれも 10% 以内と良好な結果が得られた。また、調製した試験溶液は 5℃ において 3 日間安定であった。

なお、本法における定量下限は、肉、魚介類、牛乳の場合 0.02 ppm、肝臓、腎臓、鶏卵の場合 0.04 ppm、脂肪の場合 0.002 ppm であった。

4. HPLC と円筒平板法の相関性

一般に抗生物質である OTC の残留分析には微生物学的試験法が公定法⁹⁾として採用されている。したがって、HPLC による本法と、微生物学的試験法との相関性を確認する必要がある。そこで、豚肉、肝臓及び腎

Fig. 2. Correlation between HPLC and Cup-plate method for OTC in swine muscle, liver and kidney

臓を用いて残留基準値レベルの添加濃度において、HPLCと円筒平板法の相関性を調べた。

その結果、Fig. 2 に示したように、両法の定量値の相関性は高く、相関係数は0.9979であった。

更に、円筒平板法よりも簡便なペーパーディスク法によっても残留基準値レベルの検出が可能であることを確認しており、多検体を効率良く処理するための簡易スクリーニング法として、微生物学的試験法は有用であると考えられた。

5. 市販食品の分析

本法により9種の市販品（牛・鶏肉、肝臓及び腎臓、ぶり、えび並びに鶏卵）計49試料について分析を行ったが、いずれの試料からもOTCは検出されず、OTCのピークの位置に夾雑物は見られなかった。

結 論

OTCの迅速、簡便な残留分析法の確立を目的として、HPLCにより定量する方法を検討し、以下の結論を得た。

1. UV検出法と蛍光検出法を比較した結果、蛍光検出法が有効であった。

2. 抽出液として0.01 mol/L EDTA-2Na 含有マッセルペイン緩衝液(pH 4.0)を用い、精製カラムとしてSep-Pak Plus PS2を用いたところ、迅速、簡便な方法が確立され、残留基準値レベルの添加回収試験の平均回収率は、90.4%であった。また、定量下限は、肉、魚介類、牛乳で0.02 ppm、肝臓、腎臓、鶏卵で0.04 ppm、脂肪で0.002 ppmであった。

3. 本法と微生物学的試験法（円筒平板法）の定量値の相関性は良好であった。

4. 市販試料（牛・鶏の肉、肝臓及び腎臓、ぶり、えび並びに鶏卵）の計49試料について分析を行ったが、OTCは検出されなかった。

付 記

本研究は、平成6年度厚生科学研究費（食品衛生調査研究事業）補助金で行ったものである。

文 献

- 1) 厚生省告示第218号：“食品、添加物の規格基準の一部改正”平成7年12月26日(1995)。
- 2) 厚生省令第62号：“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正”平成7年12月26日(1995)。
- 3) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：“畜水産食品中の残留物質検査法”(1990)。
- 4) Knox, H. J., Jurand, J.: J. Chromatogr. 186, 763~782 (1979)。
- 5) Eksborg, S., Ekqvist, B.: *ibid.* 209, 161~173 (1981)。
- 6) 岡 尚男, 宇野圭一, 原田健一, 鈴木真言: 薬誌. 103, 531~537 (1983)。
- 7) Oka, H., Uno, K., Harada, K., Yasaka, K., Suzuki, M.: J. Chromatogr. 298, 435~443 (1984)。
- 8) 寺田久屋, 麻野間正晴, 坂部美雄: 衛生化学 30, 138~143 (1984)。
- 9) Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K.: J. Chromatogr. 325, 265~274 (1985)。
- 10) 米田 豊, 古城典子, 安藤良吉: 食衛誌. 30, 42~47 (1989)。
- 11) 中屋謙一, 小林香夫, 棚橋寛康: 同上 32, 43~47 (1991)。
- 12) Fletouris, J. D., Psomas, E. J., Botsoglou, A. N.: J. Agric. Food Chem, 38, 1,913~1,917 (1990)。
- 13) Walsh, R. J., Walker, V. L., Webber, J. J.: J. Chromatogr. 596, 211~216 (1992)。
- 14) Iwaki, K., Okumura, N., Yamazaki, M.: *ibid.* 623, 153~158 (1992)。
- 15) 鎌倉和政, 長谷川眞住, 鯉口 智, 後藤郁夫, 白石祥吾, 平田賢志, 山名孝善, 外海泰秀: 食衛誌. 35, 310~314 (1994)。
- 16) 堀江正一, 斎藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之: 同上 36, 293~297 (1995)。
- 17) 藤田和弘, 伊藤嘉奈子, 高山正彦, 丹野憲二, 村山三徳, 斎藤行生: 同上 37, 222~225 (1996)。
- 18) 厚生省生活衛生局長通知：“平成6年度畜水産食品中の残留有害物質モニタリング検査の実施について 別添2「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」”平成6年7月1日, 衛乳第108号(1994)。
- 19) 同上, 別添3「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂)」平成6年7月1日, 衛乳第108号(1994)。