

牛肉中に残留するスピラマイシン、チルミコシン、タイロシン、ミロサマイシン、 ジョサマイシン及びキタサマイシンのダイオードアレイ検出器付き 高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析法

永田 知子, 芦澤 英一, 橋本 博之

Simultaneous determination of residual spiramycin, tilmicosin, tylosin, mirosamicin, josamycin and kitasamycin in bovine muscle by high performance liquid chromatography with diode array detector

Tomoko NAGATA, Eiichi ASHIZAWA, Hiroyuki HASHIMOTO

Summary

Spiramycin, neo-spiramycin, tilmicosin, tylosin, mirosamicin, josamycin and kitasamycin in bovine muscle were extracted with acetonitrile and the extract was partitioned with n-hexane to remove fat. The extract was evaporated to dryness and the residues was cleaned up by Oasis HLB cartridge. High performance liquid chromatography was carried out on a TSK-gel ODS-80TM column using gradient elution with acetonitrile-0.02%trifluoroacetic acid. The recoveries of the drugs from bovine muscles spiked at 0.1ppm were over 60% and the each quantitation limit was 0.04 ppm.

I はじめに

スピラマイシン (SP), チルミコシン (TM), タイロシン (TS), ミロサマイシン (MRM), ジョサマイシン (JM) 及びキタサマイシン (KM) は, 14あるいは16員環のラクトン環を持つマクロライド系抗生物質で, グラム陽性菌, マイコプラズマや連鎖球菌などに効力があることから, 畜産動物や養殖魚の感染症治療薬として使用されている¹⁾。畜水産動物に抗生物質等動物用医薬品を使用する場合, 医薬品ごとに対象動物, 用法及び用量, 使用禁止期間等の使用基準を遵守することが義務付けられている。しかし,

畜水産食品にこれら医薬品が残留する可能性は必ずしも否定できず, 耐性菌を生じることが懸念されている。平成15年10月現在, 上記の6医薬品の中で, SP及びTMについては, 牛, 鶏, 羊, 豚, 養殖魚を対象として残留基準値が定められている²⁾。

上記の動物用医薬品の残留分析法については, SP (2, 12, 14, 19-21), TM (2, 8, 14, 15, 17, 18, 20, 22), TS (3, 4, 5-8, 10, 13, 14, 19, 20), MRM (9, 19), JM (11, 14, 16, 19), 及びKM (16, 19)等の報告がある。これらは, 畜水産動物の組織 (2-5, 7-12, 14, 16, 19-22), 牛乳 (4, 15, 21), 飼料 (6, 13, 17) 及び血清 (4, 18)を対象とした分析法である。測定には, 紫外部吸光度計付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量する方法 (2-9, 13, 15-22), あるいは誘導体化後, 蛍光光度計付きHPLCで定量する方法 (11) や高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS) で確認及び定量を行う報告 (10, 12, 14) がある。

これらの分析法の中で2~5種類の医薬品を同時に分析している報告は僅かであることから, 残留基準値のあるSP, その代謝物であるネオスピラマイシン (N-SP) 及びTMを含めた7種類のマクロライド系動物用医薬品をダイオードアレイ検出器付きHPLCを用い, 迅速・簡便に一斉分析する方法を検討した。

II 実験方法

1. 試料

試料は市販の牛肉を用いた。

2. 試薬, 標準品及び装置

1) 試薬等:

アセトニトリル (HPLC用, 特級), メタノール, n-ヘキサン, n-プロピルアルコール, テトラヒドロフラン, トリフルオロ酢酸, 水 (ミリQ水), 無水硫酸ナトリウム。HPLC用アセトニトリル以外の試薬は, すべて特級品を用いた。

n-ヘキサン-アセトニトリル飽和溶液: n-ヘキサン300mlとアセトニトリル30mlを振とう機で振とうし, 静置後上層を用いる。

0.02%トリフルオロ酢酸溶液(pH2.5): 水1000mlを攪拌子で攪拌しながら, トリフルオロ酢酸を滴下し (約0.5ml), pHメーターを用いてpH2.5に調整する。

オアシスHLBカートリッジ (6 cc, 500mg): ウォーターズ社製, カートリッジは, 予めメタノール5 ml, 次いで水5 mlで前処理して用いた。

2) 標準品:

ネオスピラマイシン (N-SP): 林純薬工業株式会社製 (98.5%), スピラマイシン (SP): 林純薬工業株式会社製 (98.5%), チルミコシン (TM): イーライリリー社製 (90.7%), タイロシン酒石酸塩: 和

光純薬株社製 (82%), ミロサマイシン (MRM): 農林水産省動物用医薬品検査所製 (力価98.6%), ジョサマイシン (JM): 和光純薬株社製 (90%), キタサマイシン (KM): 農林水産省動物用医薬品検査所製 (力価176.9%)

3) 標準溶液の作成:

SP, N-SP, TM, RM, JM各々10.0mgを正確に採りメタノールに溶かして10.0mlとする。タイロシン酒石酸塩116.5mgをメタノールに溶かして100.0mlとする。KM29.0mgをメタノールに溶かして50.0mlとする。以上を保存用標準溶液として冷凍庫で保存する。(各々1000 μ g/ml)

混合標準溶液の作成: 各保存用標準溶液 (1000 μ g/ml)を合わせ採り、適宜メタノールで希釈し、混合標準溶液とする(各々1 μ g/ml)。さらに、その1.0ml, 2.5ml, 5.0mlを採り、それぞれメタノールで10.0mlとする(各々0.1 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, 0.5 μ g/ml)。

4) 装置及び測定条件

装置

カートリッジ用マニホールド: エキストラクションマニホールド (ウォーターズ社製)

高速液体クロマトグラフ: LC-10A vp型 ポンプ, FCV-10 AL vp型 ミキシングポンプ, DGU-14A 型 デガッサー, SIL-10AxL型 オートインジェクター, CTO-10Avp 型恒温槽, SPD-M10A vp型 ダイオードアレイ検出器, CBM-10A型 コミュニケーションバスモジュール, CLASS-10型 データー処理機 (島津製作所製)

測定条件

移動相: A液:アセトニトリル, B液: 0.02%トリフルオロ酢酸溶液 (pH2.5)

グラジエント条件: 0 min: A液25%, B液75%, 10min: A液10%, B液60%

15min: A液95%, B液5%, 19min: A液25%, B液75%, 1サイクル34min

カラム: TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. x 15 cm) 東ソー株式会社製

ガードカラム: TSKguardgel ODS-80TM (3.2mm i.d. x 1.5cm) 東ソー株式会社製

流速: 1 ml/min

波長スキャン: 210~300nm (N-SP, SP, MRM, KM, JM定量用検出波長: 230nm, TM, TS定量用検出波長: 287nm)

恒温槽温度: 50 $^{\circ}$ C

注入量: 20 μ l

3. 試験溶液の調製

細切した試料 5gを100mlの遠沈管に秤り採り、無水硫酸ナトリウム10g及びアセトニトリル25mlを加え、3分間ホモジナイズし、2500rpmで10分間遠心分離する。上澄液を、予めn-ヘキサン-アセトニトリル飽和溶液25mlの入った100mlの分液ロートに移し、5分間振とう後、静置する。次いで下層を200mlのナス型フラスコに入れる。先の残渣の入った遠沈管に、新たにアセトニトリル25mlを加え、3分間ホモジナイズし、2500rpmで10分間遠心分離する。上澄液を先のn-ヘキサン-アセトニトリル飽和溶液25mlの入った100mlの分液ロートに移し、5分間振とう後、静置す

る。次いで下層を先の200mlナス型フラスコに合わせ入れる。n-プロピルアルコール10mlを加え、40 $^{\circ}$ Cの水浴上でエバポレーターを用い減圧下濃縮乾固する。

残渣に水2mlを加え、超音波装置に5秒掛け、パスツールピペットを用いてオアシスHLBカートリッジに負荷する。負荷液がカートリッジの上面1mmになるまで溶出する。次いで先のナス型フラスコの残渣に水2mlを加え、超音波装置に掛け上記の操作を行う。この操作を、さらにもう1回行う。次いで先のナス型フラスコにメタノール-水(1+9)を5ml加え、超音波装置に5秒掛け、パスツールピペットを用いてカートリッジに負荷する。負荷液がカートリッジの上面1mmになるまで溶出する。(以上の操作による溶出液はすべて不要)次いで先のナス型フラスコにメタノール-水混液(9+1)10ml加え超音波装置に5秒掛け、パスツールピペットを用いてカートリッジに負荷し、この溶出液を50mlのナス型フラスコに採り、次いで40 $^{\circ}$ Cの水浴上でエバポレーターを用い減圧下濃縮乾固する。残渣にメタノール-水混液(9+1)1mlを加え溶解後、その20 μ lをHPLCに供する。

III 結果及び考察

1. 抽出操作

試料からの抽出溶媒として、リン酸緩衝液 (PB) と有機溶媒の混合溶液を用いた報告には、PB (pH2.2) - アセトニトリル-ジクロロメタン混液³¹⁾, PB (pH8) - メタノール混液³²⁾, PB (pH2.5) - メタノール混液²²⁾, PB(pH2.5) - アセトニトリル混液³⁾, PB (pH6) - アセトニトリル混液¹¹⁾, PB (pH8.5) - クロロホルム混液^{10,12,13)}がある。抽出溶媒に、ジプチルアンモニウムPB - アセトニトリル混液¹⁷⁾, アセトニトリル²⁰⁾, ジクロロメタン⁷⁾あるいは、メタリン酸 (0.1-1.2%) - メタノール混液^{2,3,9,19,21)}なども用いられている。本実験においては、他の動物用医薬品も含めた一斉分析における抽出を考慮し、抽出溶媒はアセトニトリルとした。

2. クリーンアップ操作

試料からの抽出液のクリーンアップ操作で液々分配操作を用いた方法には、石油エーテル-アセトニトリル分配³³⁾, n-ヘキサン-脱脂操作、水-イソオクタン分配¹¹⁾, PB (pH8.5) - ジクロロメタン³⁾分配などの報告があるが、本法では、アセトニトリル - n-ヘキサン分配による脱脂操作を行った。

さらに、抽出液をクリーンアップする目的で、固相抽出 (SPE) 操作を検討した。SPEに用いられている充填剤の種類には、シリカゲル⁷⁾, 酸性アルミナ^{6,13)}, C18^{8,15,18,20,22)}, SCX^{9,16,19,21)}, Diol^{10,12,11)}などがある。本実験では、アセトニトリル - n-ヘキサン分配による脱脂操作後、アセトニトリル層を濃縮乾固し、オアシスHLBカートリッジ (6 cc, 500mg)でさらにクリーンアップする方法を検討した。

濃縮残渣を超音波装置を用いて、水 (2ml x 3回) に溶解し、順次カートリッジに負荷した後、メタノール-水 (1+9) 5mlでカートリッジを洗浄した。洗浄液には、いづれの動物用医薬品も溶出しなかった。次いで、メタノール-水 (2+8) 5mlで溶出したところ、一部の医薬品の溶出が認められた。7種類の医薬品はメタノール-水 (9+1) 10mlではほぼ100%溶出された。従って、抽出濃縮液をカートリッジに負荷後、メタノール-水 (1+

牛肉中に残留するスピラマイシン、チルミコシン、タイロシン、ミロサマイシン、ジョサマイシン及びキタサマイシンのダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析法

9) 5 mlでカートリッジを洗浄し、メタノール-水 (9+1) 10 mlで溶出した。このSPE操作により、クロマトグラム上の夾雑物を除くことができた。

3. HPLC条件

移動相組成は、アセトニトリルと0.02%トリクロロ酢酸溶液 (pH2.5) 系で検討した。N-SP及びSPは、比較的極性が高いことから溶出が早い一方、KM及びJMは、カラムに長く保持され、MRM、TM及びTSはその中間であった。そこで、極性のそれぞれ異なる7種類の医薬品を同時にシャープなピークとして検出し、かつ短時間で溶出させるために、15cmのODS系カラムを用い、グラジエント溶出法で行った。各ピークの保持時間及び変動係数 (n=10)は、N-SP6.48min (1.39%), SP8.8min (3.09%), MRM12.51 min (0.74%), TM13.52min (0.88%), TS15.79min (0.44%), KM 16.6min (1.34%) 及びJM17.68min (0.95%) であり、再現性のよい結果が得られた。

ダイオードアレイ検出器の検出波長は、N-SP、SP、MRM、KM及びJMについては230nmで測定し、TM及びTSは286及び288 nm付近に極大吸収があることから、287nmで測定した。図1に

標準溶液、牛肉ブランク及び牛肉に混合標準溶液を添加し得られた試験溶液のクロマトグラムを示した。図に示すようにクロマトグラム上、妨害ピークは認められなかった。サルファ剤、トリメトプリム等合成抗菌剤 (約40種) のうち、スルファドキシシとN-SP、ピリメタミン及びスルファジメトキシシとSPの保持時間が重なったが、230nmと287nmにおけるそれぞれのピーク面積を比較することで判別は可能であった。

牛肝臓に本法を適用した場合、図1に示すように、肉抽出物と異なり、肝臓抽出物のクロマトグラムには、夾雑ピークが多く認められた。肝臓抽出物について、クロマトグラム上の夾雑ピークを除去する目的で、別途アルミナ及び強陽イオン交換 (SCX) カートリッジを用いたクリーンアップ法を検討したが、夾雑ピークは除去はできたが、良好な添加回収率が得られなかった。肝臓の残留基準値は、SPは0.6ppm、TMは1.5ppm (筋肉の残留基準値: SP0.2ppm、TM0.1ppm) であることから残留基準値を念頭に置いたスクリーニング法として、本法を使用することは可能であると考えられる。

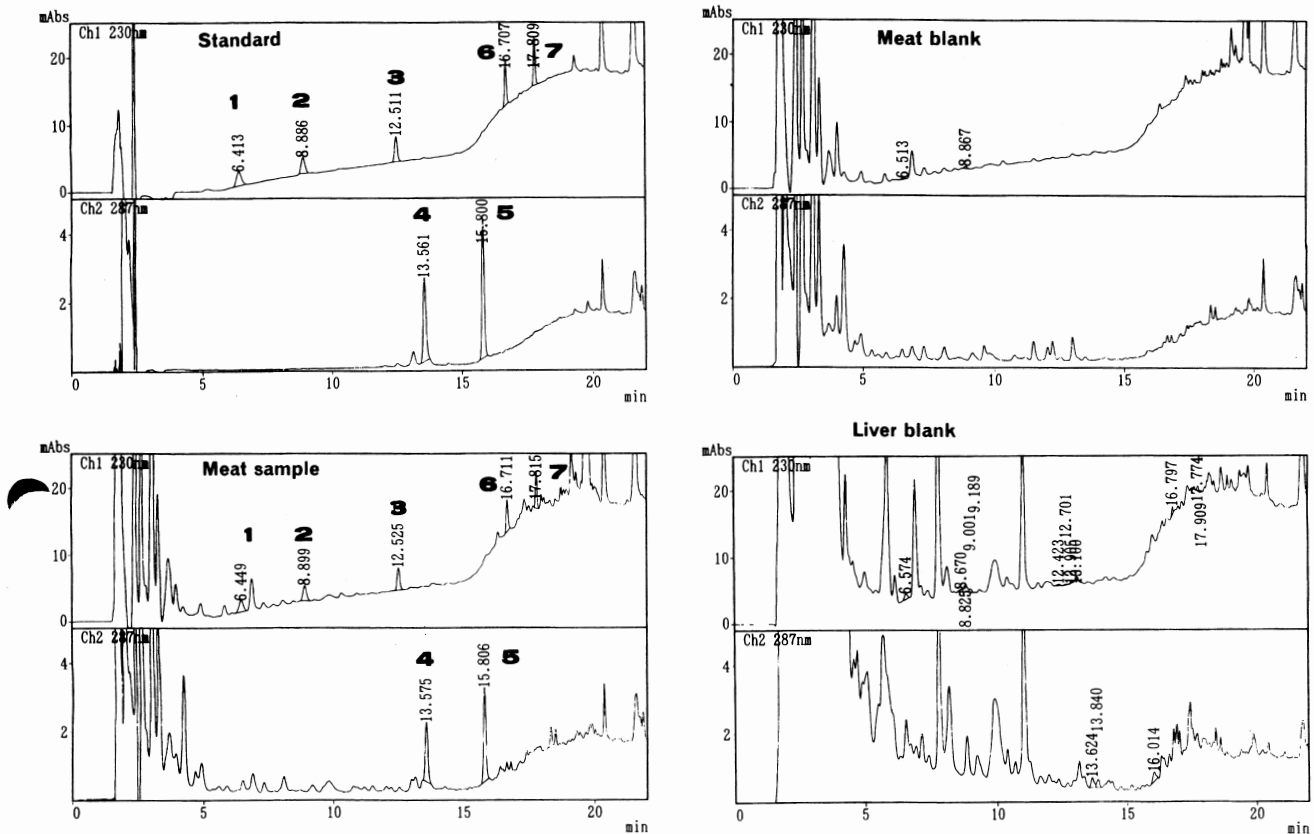


Figure 1. Liquid Chromatograms of the Mixed Standard Solution and Sample Extracts.

Standard : each 10 ng (Inject 20 μ l of mixed standard solution of 1.0 μ g/ml)

1 : neo-spiramycin, 2 : spiramycin, 3 : mirosamicin, 4 : tilmicosin,

5 : tylosin, 6 : kitasamycin, 7 : josamycin

Meat blank : Control meat extract

Meat sample : Control meat added 1 ml of mixed standard solution of 1.0 μ g/ml

Liver blank : Control liver extract

Table 1 Recoveries of 7 Drugs from Bovine Muscle Samples

Fortification level	Found (μg)						
	N-SP	SP	MRM	TM	TS	KM	JM
1.0 (μg)	0.810	0.608	0.914	0.896	0.950	0.830	0.930
	0.800	0.692	0.928	0.909	0.780	0.812	0.880
	0.858	0.746	0.964	0.909	0.869	0.960	0.890
	0.900	0.638	0.964	0.981	0.822	0.950	0.860
	0.858	0.631	0.971	0.909	0.862	0.800	0.920
mean	0.845	0.663	0.948	0.921	0.856	0.870	0.896
SD	0.0406	0.0556	0.0254	0.0341	0.0631	0.0780	0.0288
CV(%)	4.81	8.39	2.69	3.70	7.38	8.97	3.21
0.5 (μg)	0.330	0.280	0.443	0.359	0.366	0.370	0.370
	0.335	0.290	0.457	0.448	0.365	0.380	0.407
	0.360	0.285	0.454	0.426	0.348	0.380	0.377
	0.374	0.300	0.425	0.431	0.380	0.357	0.374
	0.354	0.320	0.419	0.381	0.350	0.382	0.374
mean	0.351	0.295	0.439	0.409	0.362	0.374	0.380
SD	0.0181	0.0158	0.0170	0.0373	0.0131	0.0105	0.0151
CV(%)	5.17	5.35	3.82	9.13	3.62	2.81	3.97

4. 添加回収実験

牛肉 5gに、混合標準溶液 $1\mu\text{g/ml}$ 及び $0.5\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1ml添加し、上記の 3. 試験溶液の調製に従って操作し、得られた回収率を表1に示した。0.2ppm添加した 5回試行の平均回収率は、66.3%~94.8% (CV: 2.69%~8.97%)、0.1ppm添加では、59.0~87.8% (CV: 2.81%~9.13%)であった。

5. 検量線及び定量下限値

検量線は、ピーク面積対各医薬品濃度をプロットして作成した。N-SP, SP, MRM, TM, TS, KM及びJMは、いずれも $0.1\mu\text{g/ml}$ ~ $1\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示した。相関係数は、それぞれ $\gamma=0.998$, $\gamma=0.999$, $\gamma=0.999$, $\gamma=0.995$, $\gamma=0.999$, $\gamma=0.999$ 及び $\gamma=0.999$ であった。検出下限値は、S/N比の 3倍で $0.05\mu\text{g/ml}$ (試料相当0.01ppm)、定量下限値は、約10倍の $0.2\mu\text{g/ml}$ (試料当り0.04ppm)であった。

IV まとめ

牛肉中のSP, N-SP, TM, TS, MRM, JM及びKMをアセトニトリルで抽出後、液液分配及び固相抽出法でクリーンアップし、HPLCで簡便に定量できる試験法を開発した。添加回収率は、7種類の動物用医薬品は、いずれも0.1ppm添加レベルで60%、定量下限値は0.04ppmであった。

参考文献

- 1) 中澤裕之, 伊藤裕子, 岡尚男, 竹葉和江, 永田知子, 堀江正一, 宮崎泰之編: 動物用医薬品 データブック 25-32
- 2) 食品衛生研究会編: 平成14年度版食品衛生小六法 254-266
- 3) Moats, W. A., Harris, E.W., & Steele, N.C., (1985): Comparison of Liquid Chromatographic and Bioassay Procedures for Determining Depletion of Intramuscularly Injected Tylosin, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 413-416
- 4) Moats, W. A. (1985): Chromatographic Methods for Determination of Macrolide Antibiotic Residues in

Tissues and Milk of Food-Producing Animals, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 980-984

- 5) 堀江正一, 齊藤貞一, 星野庸二, 能勢憲英, 中澤裕之, (1988): 高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉, 豚肉及び牛肉中のタイロシンの定量 衛生化学, 34, 128-134
- 6) Coleman, M.R. (1989): Improved Turbidimetric Assay of Tylosin in Premix and Animal Feeds not Containing Urea, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, 454-456
- 7) Keng, L.J.Y., & Boison, J.O. (1992): High-performance Liquid-Chromatographic Determination of Tylosin in Bovine Muscle, Kidney and Liver, J. Liq. Chromatogr. 15, 2025-2034
- 8) Chan, W., Gerhardt, G.C., & Salisbury, C. D.C. (1994): Determination of Tylosin and Tilmicosin Residues in Animal Tissues by Reversed-Phase Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77, 331-333
- 9) Horie, M., Saito, K., Nose, N., Oka, H., & Nakazawa H. (1994): Determination of Miroamicin in Animal Tissues by High-performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 655, 47-52
- 10) Delepine, B., Hurtaud, D., & Sanders, P. (1994): Identification of Tylosin in Bovine Muscle at the Maximum Residue Limit Level by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Using a Particle Beam Interface, Analyst, 119, 2717-2721
- 11) Leroy, P., Decolin, D., & Nicolas, A. (1994): Determination of Josamycin Residues in Porcine Tissues Using High-performance Liquid Chromatography with Pre-column Derivatization and Spectrofluorimetric Detection, Analyst, 119, 2743-2747
- 12) Sanders, P., & Delepine, B. (1994): Confirmatory Analysis for Spiramycin Residue in Bovine Muscle by Liquid Chromatography/Particle Beam Mass Spectrometry, Biol. Mass Spectrom., 23, 369-375

- 13) Houghlum, J.E., & Tasler, M.K. (1996) : Liquid Chromatographic Assay of Tylosin in Animal Feeds, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 79, 369-374
- 14) Delepine, B., Hurtaud, P.D., & Sanders, P. (1996) : Multiresidue Method for Confirmation of Macrolide Antibiotics in Bovine Muscle by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 79, 397-404
- 15) Ngoh, M.A. (1996) : Determination of Tilmicosin in Bovine Milk by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 79, 652-655
- 16) 堀江正一, 斉藤貢一, 中澤裕之, (1996) : 高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキタサマイシン及びジョサマイシンの定量, 分析化学, 45, 1089-1094
- 17) Readnor, R.S., Helton, G.S.L. & Dixon, S.S. (1997) : Determination of Tilmicosin in Swine Feeds by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 80, 1161-1170
- 8) Moran, J.W., Turner, J.M., & Coleman, M.R. (1997) : Determination of Tilmicosin in Bovine and Porcine Sera by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 80, 1183-1188
- 19) Horie, M., Saito, K., Ishii, R., Yosshida, T., Haraamaki, Y., & Nakazawa, H. (1998) : Simultaneous Determination of Five Macrolide Antibiotics in Meat by High-performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 812, 295-302
- 20) Juhel, G.M., Anger, B., & Laurentie, M. (1999) : Multiresidue Chromatographic Methods for the Determination of Macrolide Residues in Muscle by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 82, 1046-1053
- 21) 堀江正一, 城戸靖雅, 村山三徳, 豊田正武, 中澤裕之, (1999) : HPLCによる畜水産食品中のスピラマイシン I 及び主代謝物ネオスピラマイシン I の定量, 食品衛生学雑誌, 40, 401-406
- 22) Stobba, W.C.M., Chang, J.P., Elsbury, D.T., Moran, J.W., Turner, J.M., & Readnor, R.S. (2000) : Determination of Tilmicosin Residues in Chicken, Cattle, Swine and Sheep Tissues by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 83, 837-846