

牛肉中に残留する13種類のキノロン剤の蛍光検出器及び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, 長谷川康行, 芦澤 英一, 橋本 博之

Simultaneous determination of residual 13 kinds quinolone antibacterials in bovine muscle by high performance liquid chromatography with fluorescent and diode array detector

Tomoko NAGATA, Yasuyuki HASEGAWA, Eiichi ASHIZAWA
Hiroyuki HASHIMOTO

Summary

A 13 kinds quinolone antibacterials 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 dissolved with acetonitrile+water(2+8) and applied to high performance liquid chromatograph(HPLC). The drugs were detected with fluorescent and diode array detectors. HPLC was carried out on a TSK-gel ODS-80TM column using gradient elution with acetonitrile-0.05%trifluoroacetic acid. The recoveries of the drugs from bovine muscles spiked at 0.1 ppm were over 72.2% and the each quantitation limit was between 0.01 ppm and 0.002 ppm.

I はじめに

エノキサシン (ENX), ノルフロキサシン (NFX), ロメフロキサシン (RFX), シプロフロキサシン (CPFX), オルビフロキサシン (OBFX), サラフロキサシン (SRFX), オフロキサシン (OFLX), ダノフロキサシン (DNFX), エンロフロキサシン (ERFX) 等のニューキノロン剤 (ピリドンカルボン酸系抗菌性剤) はグラム陰性菌, グラム陽性菌, マイコプラズマなどに効力があり, またオキシリン酸 (OXA), ナリジクス酸 (NA), フルメキン (FMQ), ピロミド酸 (PMA) 等のオールドキノロン剤はグラム陰性菌に効力があることから, いづれも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16年10月現在, 上記の動物用医薬品の中で, SRFX及びDNFXについては, 牛, 鶏, 七面鳥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, NFX(10), CPFX (7, 8, 10), RFX (6, 8, 10), OFLX (5), DNFX (5, 10), ERFX (5-8, 10), OXA (4, 5), NA (1, 5), FMQ (1, 5, 9) 及びPMA (4) 等の報告があり, これらは, 畜産動物の組織 (4, 5, 9), 牛乳 (6-8) 及び卵 (10) を対象とした分析法である。測定は, すべて蛍光光度計付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量しており (4-10), さらに高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS) で確認を行っている報告 (9) もある。

これらの分析法の中で7種類のキノロン系医薬品を同時に分析している報告 (5) はあるが, 今度残留基準値のあるSRFX及びDNFXを含めた13種類のキノロン系動物用医薬品を蛍光検出器及び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, トリフルオロ酢酸, 水 (ミリQ水), 水酸化ナトリウム, 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。

0.05%トリフルオロ酢酸溶液 (pH2.5): 水1,000ml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。

2) 標準品:

エノキサシン (ENX), ノルフロキサシン (NFX), ロメフロキサシン塩酸塩 (RFX): シグマ社製, シプロフロキサシン (CPFX: 99.9%), オルビフロキサシン (OBFX: 99.9%), サラフロキサシン塩酸塩 (SRFX: 99.3%): 林純薬工業株式会社製, オフロキサシン (OFLX: 99.5%), メシル酸ダノフロキサシン (DNFX: 99.5%), エンロフロキサシン (ERFX: 99.5%), オキシリン酸 (OXA: 99.5%), ナリジクス酸 (NA: 98.5%), フルメキン (FMQ: 99.5%), ピロミド酸 (PMA: 99.5%): 関東化学株式会社製

3) 標準溶液の作成

OXA, NA, FMQ, PMA, NFXを各々10.0mg及びDNFX12.7mgを正確に採り0.2mol/l水酸化ナトリウム溶液10mlに溶かしてメタノールを加えて100.0mlとする。ENX, NFX, RFX, CPF, OBF, OFL, ERFを各々10.0mg及びSRFX10.9mgを正確に採りアセトニトリル+水(1+1)混液に溶解し100.0mlとする。

以上を保存用標準溶液として冷蔵庫で保存する。(各々100.0 μ g/ml)

混合標準溶液の作成：各保存用標準溶液(100.0 μ g/ml)を合わせ採り、アセトニトリル+水(2+8)混液で希釈し、混合標準溶液とする(各々1.0 μ g/ml)。この混合標準溶液を適宜、アセトニトリル+水(2+8)混液で希釈し、0.01~1.0 μ g/mlの希釈混合標準溶液を作成する。

4) 装置及び測定条件

装置

高速液体クロマトグラフ：LC-10A vp型ポンプ、FCV-10AL vp型ミキシングポンプ、DGU-11A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、RF-10A xL型蛍光検出器、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：0.05%トリフルオロ酢酸溶液(pH 2.5)

グラジエント条件：0 min：A液10%，B液90%，7 min：A液20%，B液80%，17min：A液60%，B液40%，25min：A液100%，B液100%，30min：A液100%，B液100%，31 min：A液10%，B液90%，1サイクル：45min

カラム：TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. x 15cm) 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：1.0ml/min

ダイオードアレイ波長スキャン：210~300nm,

定量用検出波長 270nm (ENX, PMA)

蛍光検出器：0 min 励起波長(EX) 295nm, 蛍光波長(EM) 450nm (ERFX, OFLX, CPF, DNFX, RFLX, ERFL, OBF, SRF)

15.6min EX 325nm, EM365nm (OXA, NA, FMQ)

恒温槽温度：50℃

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、2,500rpm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、2,500rpm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、50℃の水浴上でエバポレーターを用い減圧下濃縮乾固する。残渣にアセトニトリル+水(2+8)混液1mlを加え超音波にかけ溶解後、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、メタリン酸(0.2-0.3%)-メタノール混液(1, 5), 1%酢酸-エタノール混液(6, 7), 2%酢酸-メタノール混液(9), アセトニトリル(10)が報告されている。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

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、エーテル(9), n-ヘキサン(10), あるいは乳試料の場合、乳を冷後、上層の脂肪を除去する方法等の報告があるが、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。キノロン剤は、アルミナ等に不可逆的に吸着する。SPEに用いられている充填剤として、C18(1, 5, 7, 9)及びイオン交換カートリッジ(6)が報告されている。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、ODS系のオアシスHLBカートリッジ(6cc, 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、水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10mlで溶出したところ、100%溶出された。しかし、SPE操作して得られた試験溶液のクロマトグラムは、アセトニトリル-n-ヘキサン分配操作のみの場合と比較して、蛍光検出及びダイオードアレイ検出双方ともにSPEによる夾雑物ピークのクリーンアップ効果はほとんど認められず、SPE操作を行う利点が少なかったことから、検査の迅速性を優先する目的でSPE操作を行わず、クリーンアップ操作はアセトニトリル-n-ヘキサン分配のみとした。

3. HPLC条件

キノロン剤のHPLCによる分離には、逆相系のODS系カラム(1, 5, 7, 9, 10)及びフェニル系カラム(6, 8)が用いられている。移動相にはリン酸塩緩衝液-アセトニトリル系(1)、ピークのテーリングを防ぐため、移動相にイオンペア試薬(SDS)を添加した系(5, 7)、2%酢酸-アセトニトリル系(6, 8, 9)の報告がある。本試験での移動相組成は、アセトニトリルと0.05%トリクロロ酢酸溶液(pH2.5)系で検討した。ニューキノロン剤は、比較的極性が高いことから溶出が早い一方、オールドキノロン剤はカラムに長く保持された。そこで、極性のそれぞれ異なる13種類のキノロン剤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

ラジェント溶出法で行った。保持時間約 8 min 付近に生ずる試料由来の夾雑ピークとキノロン剤を分離し、また、試験溶液中の低極性の妨害物質をカラムから除去する目的で、最終段階でのアセトニトリル濃度を100%にした。

キノロン剤の多くは蛍光を有していることから、検出は選択性のある蛍光検出器で行った。ニューキノロン剤をEx 295nm, Em 415nmで検出し、次いで15.6minに励起及び蛍光波長をそれぞれEx 325nm, Em 365nmに切換え、オールドキノロン剤を検出した。ENX及びPMAの蛍光強度は、他のキノロン剤に比較すると弱い(約 1/100) ことからダイオードアレイ検出器で検出した。ENXは270nm付近に、PMAは280nm付近に極大吸収が認められた。ENXは、PMAに比較し感度が低いこと、また、PMAはいずれの波長でも感度がほぼ同じであることから両者とも270 nmで測定した。

キノロン剤は、その化学構造上、シリカゲルを器材としたODS系カラムに残存する金属イオンに配位能を示し、テーリングを起こすことが知られており(5)、本実験においても多少のテーリングが認められた。本HPLC条件においてはRMFXとDNFXのピーク保持時間が重なった以外、図1に示すように各ピークは分離した。各ピークの保持時間及び変動係数(n=6)は、ENX

10.97min (0.18%), NFX 11.63min (0.09%), OFLX 11.85min (0.11%), CPFX 12.19min (0.08%), DNFX 12.98min (0.09%), RMFX 12.98min (0.09%), ERFX 13.60min (0.06%), OBFX 14.04min (0.05%), SRFX 14.73min (0.06%), OXA 15.92min (0.05%), NA 18.30min (0.05%), FMQ 18.75min (0.04%), PMA 20.18min (0.04%) であり、再現性のよい結果が得られた。

図1に標準溶液及び牛肉ブランク試験溶液それぞれのダイオードアレイ検出器ならびに蛍光検出器によるクロマトグラムを示した。いずれのクロマトグラム上にも、試料からの妨害ピークは認められなかった。また、サルファ剤、マクロライド系及びβ-ペニシリン系動物用医薬品等(約40種)の測定上における妨害も認められなかった。

4. 添加回収実験

牛肉 5 gに、混合標準溶液1.0 µg/ml及び0.5 µg/mlをそれぞれ 1 ml添加し、上記 II 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、77.9%~92.5% (CV: 2.27%~8.90%)、0.1ppm添加では、72.2~94.3% (CV: 2.41%~7.16%)であった。

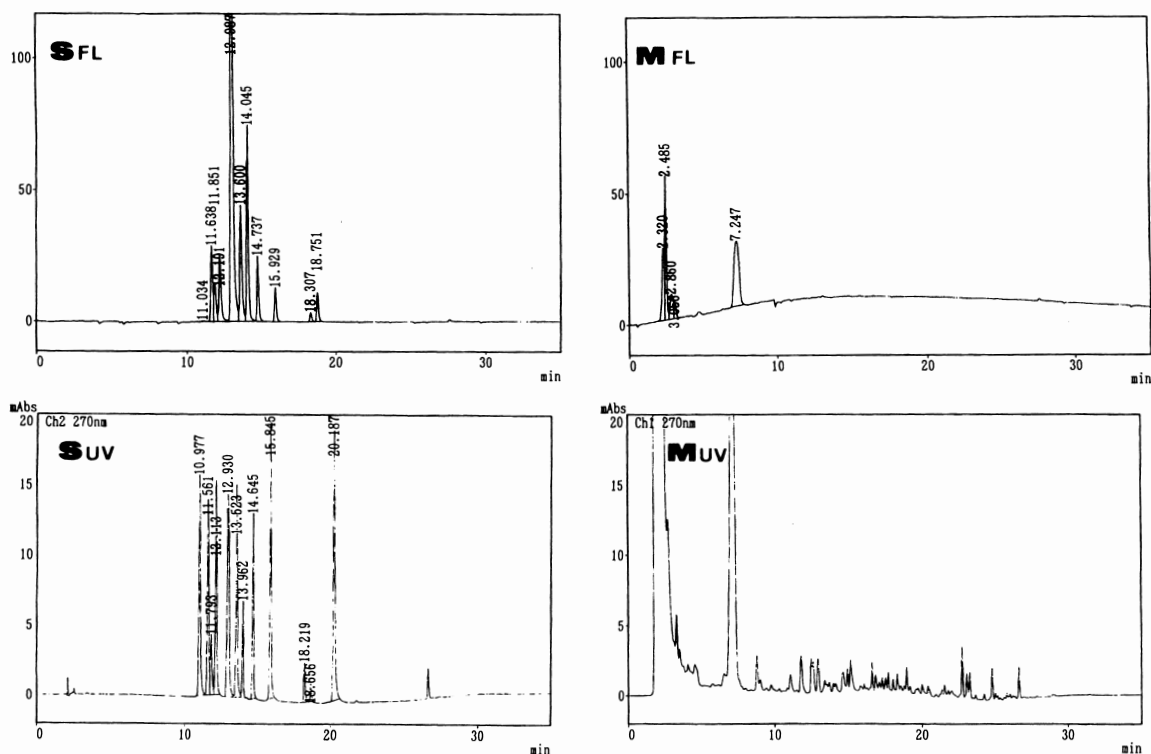


Figure 1. Liquid Chromatograms of the Mixed Standard Solution and Sample Extracts.

S (UV), S (FL): each 10 ng (Inject 20 µl of mixed standard solution of 1.0 µg/ml)
 1: ENX (UV: 10.97min), 2: NFX (FL: 11.63min), 3: OFLX (FL: 11.85min), 4: CPFX (FL: 12.19min),
 5: DNFX (FL: 12.98min), 6: RMFX (FL: 12.98min), 7: ERFX (FL: 13.60min), 8: OBFX (FL: 14.04min), 9: SRFX (FL: 14.73min), 10: OXA (FL: 15.92min), 11: NA (FL: 18.30min), 12: FMQ (FL: 18.75min), 13: PMA (UV: 20.18min)
 M (UV), M (FL): Control meat extract, (UV): diode array detector, (FL): fluorescent detector.

Table 1. Average recovery of each drug from fortified bovine muscles

Drug	Fortification level (ppm)	Mean* (%)	RSD (%)	Fortification level (ppm)	Mean* (%)	RSD (%)
ENX	0.1	85.9	5.05	0.2	89.5	4.70
NFX	0.1	72.2	6.58	0.2	89.3	6.20
OFLX	0.1	90.3	4.91	0.2	89.2	5.17
CPFEX	0.1	81.4	4.61	0.2	77.9	8.90
DNFX	0.1	83.2	7.16	0.2	90.6	4.62
RMFX	0.1	76.4	6.56	0.2	80.2	2.27
ERFX	0.1	90.2	3.62	0.2	92.5	3.84
OBFX	0.1	91.6	4.18	0.2	87.3	3.02
SRFX	0.1	82.1	2.44	0.2	82.7	8.41
OXA	0.1	86.5	6.82	0.2	87.2	4.53
NA	0.1	94.3	6.35	0.2	91.0	6.93
FMQ	0.1	80.8	3.31	0.2	88.0	6.73
PMA	0.1	79.6	5.60	0.2	88.5	5.61

* Average recoveries of 5 individual analyses (n=5).

5. 検量線及び定量下限値

検量線は、ピーク面積对各医薬品濃度をプロットして作成した。

DNFX, ERFX, OBFXは0.005 µg/ml~1.0 µg/ml, NFX, OFLX, CPFEX, RFX, SRFX, OXAは0.01 µg/ml~1.0 µg/ml, NAX, FLQ, PMA及びENXは0.025 µg/ml~1.0 µg/mlの範囲で直線性を示した。相関係数は、NFX及びRFXが $\gamma=0.997$, OBFX及びENXが $\gamma=0.998$, その他が $\gamma=0.999$ であった。

試料当たりの検出下限値は、S/N比の3倍でDNFX, ERFX, OBFXは0.0005ppm, NFX, OFLX, CPFEX, RFX, SRFX及びOXAは0.001ppm, NAX, FLQ, PMA及びENXは、0.002ppmであった。定量下限値は、DNFX, ERFX及びOBFXは0.002 ppm, NFX, OFLX, CPFEX, RFX, SRFX, OXAは0.005ppm, NAX, FLQ, PMA及びENXは0.01ppmであった。

IV まとめ

牛肉中のキノロン剤ENX, NFX, OFLX, CPFEX, DNFX, RMFX, ERFX, OBFX, SRFX, OXA, NA, FMQ 及びPMAをアセトニトリルで抽出後、n-ヘキサン分配でクリーンアップし、HPLCで定量する簡便な試験法を開発した。13種類のキノロン剤の添加回収率は、いずれも0.1ppm 添加レベルで72.2%以上、定量下限値は0.002~0.01ppm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, 92-105
- (2) 食品衛生研究会編: 平成11年度版食品衛生小六法, 288-326
- (3) 浦上憲治 (2004): 畜水産食品中の動物用医薬品等の残留基

準値の設定及び改正, 食品衛生研究, Vol.54, 17-24

- (4) 堀江正一, 齊藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之, (1992): 高速液体クロマトグラフィーによる魚肉及び食肉中のキノロン系抗菌剤の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 33, 442-448
- (5) 堀江正一, 齊藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之, (1995): 高速液体クロマトグラフィーによる食肉及び魚肉中のキノロン剤8種の同時定量, 食品衛生学雑誌, 36, 62-67
- (6) Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Turnipseed, S.B., Walker, C.C. & Hurlbut, J.A., (1997): Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 80, 982-987
- (7) 堀江正一, 齊藤貢一, 星野庸二, 寺田久屋, 中澤裕之, (1997): HPLCによる畜水産食品中のエンロフロキサシン及び主代謝物シプロフロキサシンの定量, 食品衛生学雑誌, Vol.38, 329-334
- (8) Holtzapfel, C.K., Buckley, S.A., & Stanker, L.H. (1999) Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by On-Line Immunoaffinity Capture Coupled with Reversed-Phase Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 82, 607-614
- (9) Plakas, S.M., El-Said, K.R., Benschath, F.A., Musser, S.M., & Walker, C.C., (1999): Determination of Flumequine in Channel Catfish by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 82, 611-619
- (10) Schneider, M.J., & Donoghue, D.J., (2000): Multiresidue Determination of Fluoroquinolones in Eggs, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 83, 1306-1312