

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーによる豚および 鶏肉中のバシトラシンの定量

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
巻/号	4512
掲載ページ	p. 961-964
発行年月	1992年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーによる豚および 鶏肉中のバシトラシンの定量

森田幸雄 荒木妙子 浅見成志 下田雅昭

松本寿男 亀田三男 栗原 貯

群馬県中央食肉衛生検査所 (佐波郡玉村町樋越 1834-1 〒370-11)

(平成 4 年 2 月 6 日受付・平成 4 年 8 月 21 日受理)

Determination of Bacitracin in Pork and Chicken by High Performance
Liquid Chromatography with Fluorescence Detector
YUKIO MORITA, TAEKO ARAKI, SEIJI ASAMI, MASAOKI SHIMODA, TOSHIO MATSUMOTO,
MITSUO KAMEDA and OSAMU KURIHARA
Chuo Meat Inspection Center Gunma Prefecture, Tamamura-machi,
Sawa-gun, Gunma-ken 370-11

SUMMARY

A method for detecting residual bacitracin (BC) in pork and chicken by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. Fluorescence of BC was used for this detection. BC was extracted from samples with 33% pyridine solution, and the extracted solution was deproteinized with methanol. The deproteinized solution was evaporated to 3 ml, and then injected into an Inertsil ODS-2 (6 mm I.D. × 125 mm) HPLC column. BC was separated with a solution containing 40% methanol as a mobile phase and measured with a fluorescence detector (EX 270 nm, EM 350 nm). The recoveries of BC added to pork and chicken at 0.5 u/g were 84% and 81%, respectively. The limit of detection was 0.0375 u/ml.

This method is applicable to monitoring of residual BC in pork and chicken inspection.

—Key Words : bacitracin, fluorescence, high performance liquid chromatography, meat, residue.

.....J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 45, 961~964 (1992)

要 約

豚肉および鶏肉に残留するバシトラシン (BC) の蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法を検討した。筋肉中の BC は 33%ピリジン水溶液で抽出後、その抽出液はメタノールで除蛋白した。除蛋白液はさらに 3ml まで濃縮したものを Inertsil ODS-2 (6mm I.D.×125mm) を装着した HPLC に注入した。40%メタノール水溶液の移動相で BC を分別し、蛍光検出 (EX 270nm, EM 350nm) により定量した。豚肉および鶏肉に 1g 当たり BC を 0.5u 添加したものの回収率はそれぞれ 84%、81%であり、検出限界値は 0.0375u/ml であった。

BC の天然蛍光を利用する本方法は、と畜検査における豚肉および食鳥検査における鶏肉の BC 残留モニタリング検査法として有用であると思われた。

—キーワード : バシトラシン, 蛍光, 高速液体クロマトグラフィー, 食肉, 残留物質。

.....日獣会誌 45, 961~964 (1992)

バシトラシン (BC) は主にグラム陽性菌に作用するほか、グラム陰性球菌、レプトスピラ属および放線菌に有効なペプチド系抗生物質である。本薬剤は動物への経口投与においてほとんど消化管から吸収されず、抗生物質の食肉中への残留を認めない食品衛生法との関係から、有利な一面をもつ抗菌性物質の 1 つである。そのため、飼料添加物として発育に有害な細菌の抑制、細菌性下痢の予防等、生産性を阻害する要因を取り除いて発育促進

をはかり、飼料効率を向上させる目的として使用されることが多い。しかし、多量の経口投与により体内へ残留することが否定できず¹⁰⁾、米国では、牛、豚、鶏の可食臓器および鶏卵の残留基準値を 0.5ppm としている⁹⁾。

畜産物中の BC の検査法は、昭和 52 年厚生省乳肉衛生課長通知「畜産物中の抗菌性物質検出法・第 1 集の 1」(厚生省法)¹⁾ に準拠し検査することとなっており、BC の残留により廃棄等の行政処分をする場合は、厚生

省法の成績に基づかなければならない。厚生省法は試料から除蛋白、濃縮等の処理によってBCを抽出し、*Micrococcus flavus* ATCC 10240 (*M. flavus*)を用いて発育阻止帯の有無を確認する微生物学的検出法であり、最終判定まで1~2日を要するものである。

近年、食品中の有害残留物質の排除が食肉衛生行政の重要課題となっていることから、多くの検体を短時間に検査する方法をみいだすことは行政検査上重要である。そこで、著者らは筋肉中のBCの有無を検査するため、厚生省法による前処理の過程にある試料を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により迅速に検出する方法(HPLC法)を検討した。

材料および方法

試 薬

試薬としてBC標準品(食品衛生指定機関協議会配布品)を用いた。蒸留水およびメタノールは関東化学製HPLC用、その他の試薬もすべて試薬特級品を用いた。

装 置

装置として高速液体クロマトグラフはL-6200型、蛍光検出器はF-1050型、インテグレーターはD-2500型、カラムオーブンはL-665A-52型(以上、(株)日立製作所)およびノイズクリーンはUNI-1型((株)ユニオン)を用いた。

HPLC測定条件

カラムはInertsil ODS-2, 6.0mm i.d.×125mm ((株)

GLサイエンス)、カラム温度は40℃とした。移動相は蒸留水:メタノール(60:40)であり、その他流速1ml/min、励起波長270nm、蛍光波長350nm、検出感度100、タイムコンスタット3秒、注入量30μlとした。

前 処 理 法

試料10gに対し33%ピリジン水溶液を17ml加えホモジナイズ後遠心分離(3,000rpm, 20min)し、上清を10ml採取する。さらに、その上清にメタノールを30ml加え良く混和後遠心分離(4,000rpm, 20min)し、その上清を再び採取する。これを除湿空気を吹き付け3mlまで濃縮したものを30μlをHPLC法の試験溶液とした(図1)。厚生省法は、この後乾固し5%リン酸緩衝液(pH 6.5)を3ml加えた後、1N水酸化ナトリウムを加えpH 6.5に調整したものをを用いている。

検量線の作製

BC濃度0, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2, 38.4, 76.8, 153.6および200.0u/ml水溶液を作製し、各30μlをHPLC分析に供し、ピーク面積により検量線を作製した。

添加回収実験方法

筋肉1g当たり、米国の残留限界濃度である0.5uのBCを添加した。10gの筋肉に5u/ml濃度のBC水溶液を1ml添加したものを試料として、図1に従い前処理を実施しHPLC法で測定した。このHPLC測定値およびBC濃度0.5u/ml水溶液のHPLC測定値により回収率を求めた。

HPLC溶出ピークの採取と酵素抗体法によるBCの証明

BCが天然蛍光を有することを確認するため、HPLC法での溶出液を採取し、市販酵素抗体測定キットによりBCの同定試験を実施した。前述の添加回収実験で使用したもの、すなわち筋肉1g当たり0.5uのBCを添加しHPLC法の前処理を実施したもの、およびBC濃度0.5u/ml水溶液を検体としてHPLC法を実施し、溶出液を1分ごとに試験管に採取した。それに除湿空気を吹き付け乾固後pH 7.2リン酸緩衝液で溶解したものを供試検液とし、EIAキット[®](対象薬剤:BC, 検出限界濃度:0.01u/ml, (株)三菱油化BCL)を用いてBCの同定検査を行った。

厚生省法¹⁾および簡易検査法²⁾による検出限界濃度

検量線作製時と同濃度のBC水溶液をバルブディスク(直径10mm, 吸水量0.08ml)に浸潤させ、厚生省法の*M. flavus*および簡易検査法の*M. luteus* ATCC 9341(*M. luteus*), *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. cereus*)および*B. subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*)の混積平板培地にのせ、37℃, 18時間好気培養する。それぞれ試験菌の発育阻止帯の直径が12mmを超えるものを陽性とし、検出限界濃度を求めた。

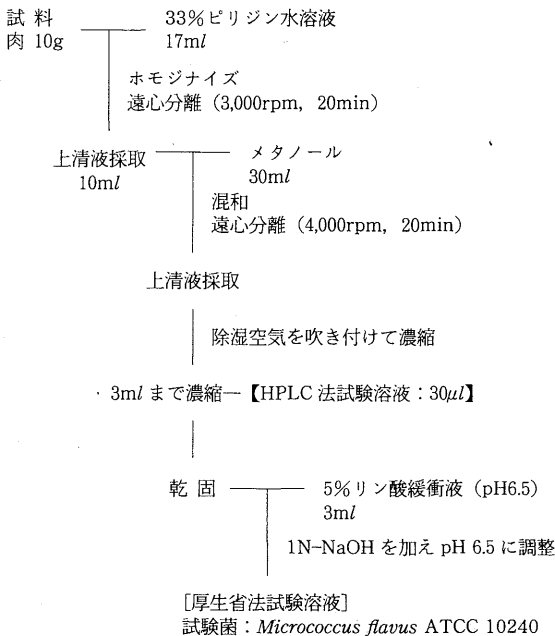


図1 HPLC法および厚生省法による前処理法

成 績

測定波長の選定

BC 濃度 10u/ml 水溶液について励起波長を 270nm に固定して蛍光波長を測定したところ、最大蛍光波長 350nm を示したため測定波長とした (図 2)。

検量線および定量限界

BC の検量線は 0.0375~76.8u/ml の範囲で良好な直線性を示した (回帰直線式: $Y=550,534X-1872.1$, 標準偏差: 0.87, $p>0.05$)。定量限界は 0.0375u/ml であり, BC の平均保持時間は 12.78 分 (n=27) であった。

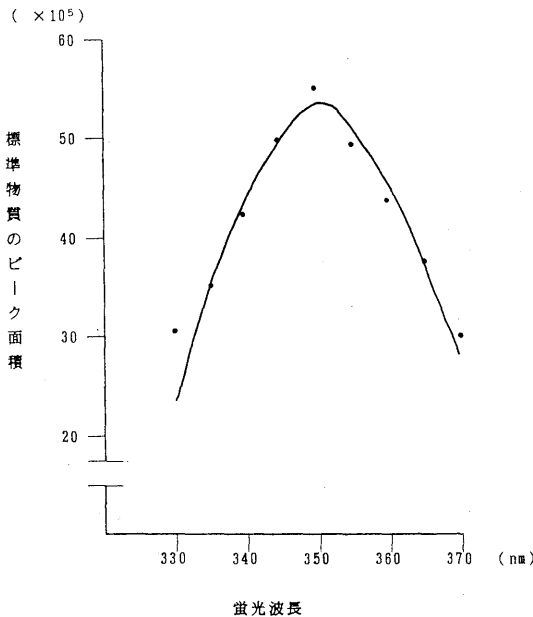


図 2 蛍光波長とピーク面積の変化

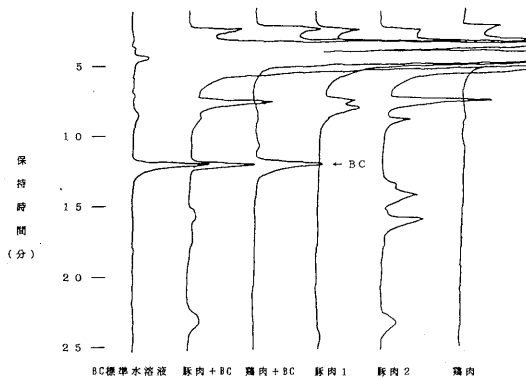


図 3 バシトランシン標準水溶液, 豚肉および鶏肉に添加されたバシトランシンのクロマトグラム (各 0.5u/ml, g) と無添加の豚肉 (豚肉 1, 2) および鶏肉のクロマトグラム

添加回収実験

豚肉および鶏肉の平均回収率はそれぞれ 84% (n=8), 81% (n=9) であり, それらのクロマトグラムを図 3 に示した。供試検体のうち豚肉において BC の保持時間付近に大きな妨害ピークが出現する検体が認められた (豚肉 2)。

酵素免疫学的検出法での確認

HPLC の溶出液のうち, 11, 12, 13 分台の供試験液が EIA キット® と反応し, BC の検出ピークがある 12 分台の溶出液が最も強い呈色反応を示した。

厚生省法および簡易検査法の検出限界濃度

厚生省法である *M. flavus* の検出限界濃度は 0.15u/ml であり, 簡易検査法の *M. luteus*, *B. cereus*, *B. subtilis* の検出限界濃度はそれぞれ 2.4u/ml, 9.6u/ml, > 200.0u/ml であった。

考 察

ペプチド系薬剤である BC の紫外線吸収極大波長は 220nm 付近であり, 従来報告されている HPLC を用いる BC の検出法はこの 220nm 付近の紫外線吸収を使用するものである^{4,5,7,8)}。検出物の紫外線吸収波長が短い場合, 各種の前処理を実施しなければ当該物質の測定は困難である場合が多い。BC の紫外線吸収波長は 220nm 付近であり, 筋肉等の残留を調べるには十分な抽出・精製操作が必要である。しかし, BC は天然蛍光を有していたため, 簡易な前処理で検出が可能であった。芳香族アミノ酸類は天然蛍光を有しており, 特に水溶液中でトリプトファン, チロシンは比較的強い蛍光を, その次にフェニルアラニンが蛍光を発することやフェニルアラニンは励起波長 260nm, 蛍光波長 282nm で蛍光量子収率 4% を示すことを MINKES ら³⁾ は報告している。また, これら天然蛍光団の蛍光スペクトルは蛋白質間の会合や共存物質のような環境の変化によって移動することや弱くなることが知られている⁹⁾。BC はフェニルアラニンを構造中に含んでいること, および BC の天然蛍光がフェニルアラニンの蛍光に比べ若干低値であることから, BC の天然蛍光はフェニルアラニン由来と推定される。いずれにせよ BC が天然蛍光を有するという報告はみあたらず, 新知見であると思われる。

食品衛生法において抗菌性物質が残留する食品は食用不適として処分されている。その検出法は厚生省が示す方法に基づいているため, 現在はその検出限界濃度が残留基準濃度となっている。BC のように検出法が微生物学的検出法の場合操作法は簡単であるが, 薬剤を特定することはほとんど不可能である。食肉検査の場合, 通常, 使用された薬剤が事前に特定できない場合がほとんどである。特に抗菌性物質が飼料に添加して使用されている場合は, 一般健康畜として食肉処理場へ搬入されている

ため、対象薬剤名および実施期間等を定め搬入畜の薬剤残留監視（モニタリング）を行っている。モニタリングに用いられる検査法（モニタリング検査）は短時間に多くの検体を測定することができ、さらに1検体当たりの経費が安価なことが望まれる。操作面では市販のELISAキットが優れていると思われるが、現在では価格が高価であり、また使用期限や検出薬剤名等の面でモニタリング検査として多数の検体に使用することは不適である。HPLCを使用する本法は厚生省法や簡易検査法に比べ低濃度のBC残留を検出することができる。また、厚生省法の前処理操作の途中でHPLC供試検体が得られ、薬剤の同定や残留量を測定することが可能であり、その結果、BCの残留が推定される場合や妨害ピーク等によりBCの残留の有無が不明の場合は前処理を継続して厚生省法を行い、厚生省法の結果により行政的な対応をすることができる。

迅速かつ確かな行政対応が求められている食肉検査において、本法は有効な検査法になり得ると思われる。

終わりに、本研究を実施するにあたって、多大なご協力をいただいた(株)ユニオン、技術開発室室長阿部修三氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：畜産物中の抗菌性物質検出法、第1集の1, 7 (1977)
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：畜産食品の有害物質モニタリング検査の実施について、別紙1、畜産食品中の残留抗菌性物質簡易検査法、平成3年10月、9~12 (1991)
- 3) MINKES M, STANFORD N, CHI M et al: J Clin Invest, 59, 449~455 (1979)
- 4) OKA H, IKAI Y, KAWAMURA N, YAMADA M: J Chromatogr, 462, 315~322 (1989)
- 5) PAVLI V, SOKOLIC M: J Liq Chromatogr, 13, 303~318 (1990)
- 6) SCHWEDT G, 一瀬典夫, SCHNEPEL F M: 蛍光分析化学, 第1版, 17~18, 培風館, 東京 (1987)
- 7) SOKOLIC M, PAVLI V: J Liq Chromatogr, 14, 1977~1981 (1991)
- 8) TSUJI K, ROBEITSON J H: J Chromatogr, 112, 663 (1975)
- 9) United States Department of Agriculture: Compound Evaluation and Analytical Capability National Residue Program Plan 1989, 2, 3 (1989)
- 10) 米沢昭一: 家畜の抗生物質と化学療法, 二宮幾代治編, 第1版, 124~129, 養賢堂, 東京 (1980)

人と動物とが共存できる社会を・・・

社団法人日本動物保護管理協会は提案しています。

特別会員募集のお知らせ

昭和48年に「動物の保護及び管理に関する法律（法律第105号）」が施行されて既に18年の歳月が経過いたしておりますが、我が国においては未だ動物愛護に対する関心が薄く、十分な理解が得られていない現況も見受けられ、弱い者への思いやり、さらには生命尊重の欠如が原因と思われる社会的問題も発生しております。

このような現況を踏まえ、本年で本会も法人化10周年を迎え、動物愛護思想の普及啓蒙等の事業活動を積極的に展開し、目的達成に邁進してまいりたいと考えており、一般の方、または団体・企業各位におかれましても本会の趣旨にご賛同いただき、特別会員として、是非とも本会の活動にご協力いただきたいと思います。

入会方法等詳しいことにつきましては、本会事務局までご連絡ください。

社団法人 日本動物保護管理協会 〒107 東京都港区南青山1-1-1

担当 駒田

新青山ビルディング西館23階 03 (3475) 1601