

# 高速液体クロマトグラフィーによる豚肉中のカルバドックス及びオキシテトラサイクリンの同時定量

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	堀江,正一 齊藤,貢一 能勢,憲英 中澤,裕之
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	36巻2号
掲載ページ	p. 293-297
発行年月	1995年4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



# 高速液体クロマトグラフィーによる豚肉中のカルバドックス 及びオキシテトラサイクリンの同時定量

(平成6年10月28日受理)

堀江正一\*<sup>1</sup> 齊藤貢一\*<sup>1</sup>  
能勢憲英\*<sup>1</sup> 中澤裕之\*<sup>2</sup>

## Simultaneous Determination of Carbadox and Oxytetracycline in Swine Tissues by High Performance Liquid Chromatography

Masakazu HORIE\*<sup>1</sup>, Koichi SAITO\*<sup>1</sup>, Norihide NOSE\*<sup>1</sup>  
and Hiroyuki NAKAZAWA\*<sup>2</sup>

(\*<sup>1</sup>Saitama Prefectural Institute of Public Health: 639-1, Kamiokubo, Urawa, Saitama 338, Japan; \*<sup>2</sup>The National Institute of Public Health: 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan)

A simple, rapid and reliable high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of carbadox and oxytetracycline in swine muscle and liver has been developed. The drugs were extracted with 0.3% metaphosphoric acid-methanol (7:3), followed by a Bond Elut C<sub>18</sub> clean-up procedure. The HPLC separation was carried out on a Wakosil-II 5C18 RS column (150×4.6 mm i. d.) with 0.05 M sodium dihydrogenphosphate (pH 4.5)-acetonitrile (87:13) as the mobile phase at the flow-rate of 1.0 ml/min. The drugs were detected by UV absorbance measurement at 360 nm. The calibration graphs were rectilinear from 0.1 to 50 ng for carbadox, and from 1 to 50 ng for oxytetracycline. The recoveries of the drugs from swine muscle and liver fortified at the level of 0.1 µg/g were 83.7~85.6%, with high precision. The limits of detection were 0.002 µg/g for carbadox and 0.05 µg/g for oxytetracycline in swine muscle. The accuracy and reproducibility of the present method were sufficient for residue analysis.

(Received October 28, 1994)

**Key words:** カルバドックス carbadox; オキシテトラサイクリン oxytetracycline; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 残留抗菌性物質 residual antibacterials; 食肉 meat; 豚肝臓 swine liver

### 結 言

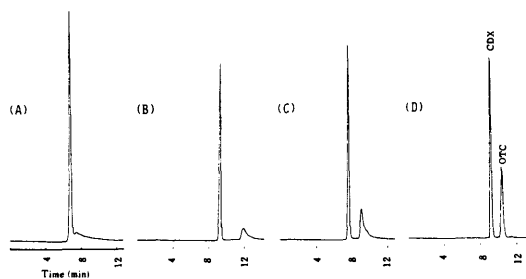
現在まで我が国では、「使用基準」を遵守して抗菌性物質を使用すれば“畜水産物中に残留することを防止できる”と言う考えのもとに「畜水産食品は抗菌性物質を含有してはならない」と規制してきた。しかし、食品流通の国際化や残留基準に関する諸外国の動向を考慮して、現在厚生省では薬物ごとの毒性の強さや、国際的な安全性評価に基づいた残留許容基準値の設定を計画している。本作業の第一段階として、1994年1月、オキシテ

ラサイクリン(OTC)及びカルバドックス(CDX)2種の抗菌性物質について、残留許容基準値設定の諮問が食品衛生調査会になされた。従って、近い将来、OTC及びCDXの残留基準値が設定されるものと考えられる。

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<sup>1),2)</sup>が公定法として採用されている。一方、合成抗菌剤であるCDXの分析には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィー(GC)を用いた化学的試験法<sup>3)~5)</sup>が汎用されている。しかし、畜産物の安全性を確保するためには迅速で精度の高い残留分析法の確立が必要であり、CDX及びOTCを同時に検出・定量できる方法の開発は有用である。CDXは日本を合

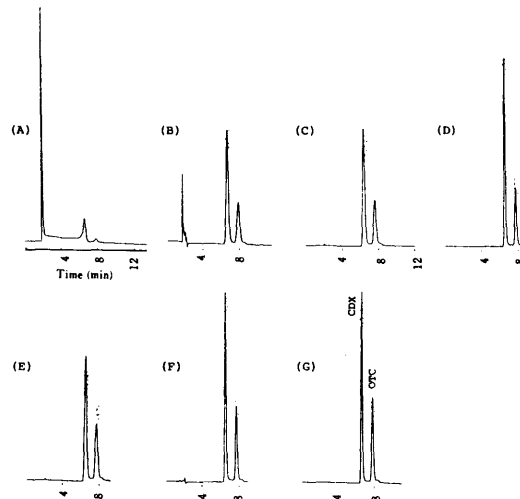
\*<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所: 〒338 埼玉県浦和市上大久保 639-1

\*<sup>2</sup> 国立公衆衛生院: 〒108 東京都港区白金台 4-6-1



**Fig. 1.** Typical chromatograms of carbadox and oxytetracycline

LC conditions: column, (A)=column A, (B)=column B, (C)=column C and (D) Wakosil-II 5C18 RS; mobile phase, 0.05 M sodium dihydrogenphosphate-acetonitrile (88:12); flow-rate, 1.0 ml/min; detection, UV (360 nm).



**Fig. 2.** Typical chromatograms of carbadox and oxytetracycline dissolved in (A) acetonitrile, (B) methanol, (C) 30% acetonitrile, (D) 13% acetonitrile, (E) 0.05 M sodium dihydrogenphosphate-acetonitrile (70:30), (F) 0.05 M sodium dihydrogenphosphate-methanol (70:30) and (G) mobile phase

LC conditions: column, Wakosil-II 5C18 RS; mobile phase, 0.05 M sodium dihydrogenphosphate-acetonitrile (87:13). Other conditions as in Fig. 1.

め諸外国においてブタ専用に、また、OTCはブタを含む畜水産動物に広く用いられている。そこで、今回HPLCによる豚肉、豚肝臓中のOTC及びCDXの同時定量法を検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料及び試薬

試料には埼玉県内で市販されている豚肉及び豚肝臓を用いた。

標準溶液: CDXはファイザー製薬(株)製、OTCはシグマ社製、各10 mgを精ひょうし、CDXはメタノール100 ml、OTCは蒸留水10 mlに溶解して標準原液とし、適宜HPLC移動相溶液で希釈して標準溶液とした。

除タンパク・抽出溶媒: 0.3% メタリン酸-メタノール(7:3)を使用した。

Bond Elut C<sub>18</sub> カートリッジ (500 mg, Varian) は、あらかじめメタノール5 ml及び蒸留水10 mlでコンディショニングした後使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

##### 2. HPLCの装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製PU-980型インテリジェントポンプに(株)島津製作所製SPD-6A型紫外(UV)検出器を接続、測定波長は360 nmに設定し、データ処理は(株)島津製作所製クロマトパックC-R3Aを用いた。分析カラムにはWakosil-II 5C18 RS (15 cm×4.6 mm, 和光純薬)を使用、移動相に0.05 Mリン酸-ナトリウム-アセトニトリル(87:13)を用い、流速は1.0 ml/minとした。

##### 3. 試験溶液の調製

前報<sup>6)</sup>におおむね準拠し、次のとおり調製した。試料5 gを採り、除タンパク・抽出溶媒100 mlを加えてホモジナイズした後、ろ過補助剤ハイフラスーパーセルを厚さ約2 mmに敷いた吸引ろ過器(桐山漏斗)を用いて

ろ過した。冷却水(約5°)を循環したロータリーエバポレーターを用い、ろ液を45°の水浴中で約20 mlに減圧濃縮した後、Bond Elut C<sub>18</sub> カートリッジに負荷した。カートリッジを蒸留水20 mlで洗浄後、メタノール10 mlで溶出した。溶出液を45°の水浴中で減圧乾固した後、残留物をHPLC移動相溶液1 mlに溶解して試験溶液とし、この10 µlをHPLCに注入した。なお、操作は褐色のガラス器具を用い、遮光して行った。

##### 4. 検量線の作成

CDXは0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0及び2.0 µg/ml、OTCは0.1, 0.2, 0.5, 1.0及び2.0 µg/mlとなるように標準溶液を調製し、その10 µlをHPLCに注入した。得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

##### 結果及び考察

##### 1. HPLC測定条件の検討

###### 1.1 分離条件の検討

OTCを含め、テトラサイクリン系抗生物質(TCs)は構造中にβ-ジケトン構造やカルボキシアミド基を有しており、従来から汎用されているシリカゲルを基材としたODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィーでは、

**Table 1.** Comparison of Retention Behaviour of Oxytetracycline and Carbadox on Disposable Reversed-Phase C<sub>18</sub> Cartridges

Drugs	Recovery <sup>1)</sup> (%)					
	Bond Elut C <sub>18</sub>		Sep-Pak C <sub>18</sub>		Baker C <sub>18</sub>	
	Untreated	Treated <sup>2)</sup>	Untreated	Treated	Untreated	Treated
OTC (A) <sup>3)</sup>	40.7	95.5	9.7	89.1	3.9	8.1
CDX (A)	95.3	95.1	93.5	95.1	95.7	97.2
OTC (B)	96.1	96.7	91.4	94.3	21.9	50.3
CDX (B)	97.1	96.3	95.0	94.7	97.1	97.5

<sup>1)</sup> Average of results of 3 replicates

<sup>2)</sup> The cartridge was treated with 10 ml of 0.2 M EDTA.

<sup>3)</sup> Recoveries of drugs from 20 ml of (A) standards solution and (B) swine muscle extract. Samples were added with 0.25 µg/ml of both drugs.

充てん剤中の金属不純物や残存シラノール基などの影響により強いテーリングを示すことが知られている<sup>7), 8)</sup>。本実験においても従来タイプのシリカゲルを基材とした ODS カラム (RoSiL C18 HL, LiChrospher RP-18, Nucleosil 5C18, µ-Bondapak) では OTC は強いテーリングを示した (Fig. 1)。

先に著者らはβ-ジケトン構造を有するキノロン剤<sup>9), 10)</sup>を、金属不純物の少ない高純度シリカゲルを基材とした ODS カラムを用いることにより、良好に分析できることを報告した。そこで、高純度シリカゲルを基材とした充てん剤を中心に分離用カラムを検討した結果、Wakosil II 5C18 RS を用いることによりピーク形状の優れたクロマトグラム (Fig. 1(D)) を得ることができた。

次に、移動相に水-アセトニトリル系及びリン酸塩緩衝液-アセトニトリル系を選び、保持時間、相互分離及びピーク形状などに及ぼす影響を検討した。リン酸塩を含まない水-アセトニトリル系では OTC は強いテーリングを示した。水-アセトニトリル系からなる移動相の pH は 7 前後であり、この pH 領域では残存シラノール基は解離して弱陽イオン交換基として作用しており、このことがテーリングの一因になっているものと思われる。そこで、水の代わりにリン酸塩緩衝液を用いて検討したところ、pH 未調整 (約 pH 4.5) の 0.05 M リン酸一ナトリウムを用いることにより OTC のテーリングを抑制できた。以上の結果から、移動相には 0.05 M リン酸一ナトリウム-アセトニトリル (87:13) を選定した。

### 1.2 測定波長の検討

CDX は 310 及び 370 nm 付近に、OTC は 270 及び 360 nm 付近に極大吸収を示したので、測定波長には相対的に最も感度が優れており、且つ夾雑物の影響の少ない 360 nm を選定した。なお、CDX は発蛍光性の物質であり<sup>11)</sup>、蛍光検出器 (Ex 380/Em 490 nm) により高感度で検出できるが、豚肝臓では夾雑物質の妨害のため、UV 検出器による測定が有効であった。

### 2. ピーク形状に及ぼす試験溶液組成の影響

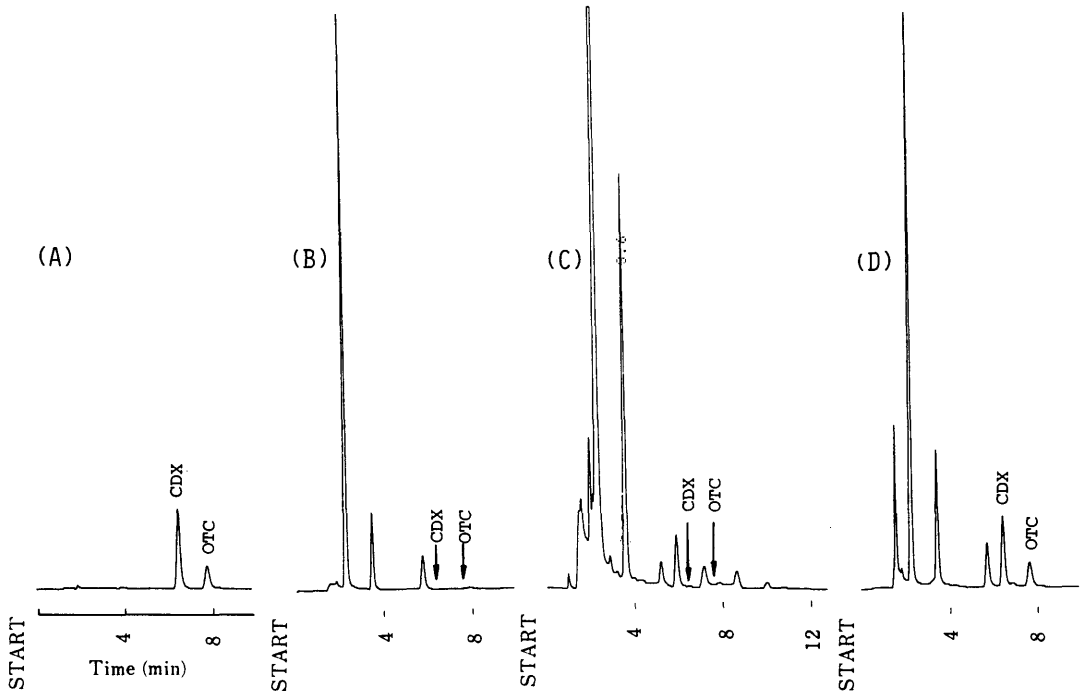
OTC 及び CDX のピーク幅の拡がりやピーク形状の歪み (テーリング、リーディング等) を少なくするために、試験溶液を調製する際に用いる溶媒の組成を変えてピーク形状に及ぼす影響を調べた<sup>12), 13)</sup> (Fig. 2)。100% アセトニトリルのクロマトグラム (A) に見られるように、移動相に比べ溶出力の強い溶媒で調製した場合、充てん剤先端における分析試料の拡散によりピークの拡がりやピーク形状の歪みは大きくなった。カラム充てん剤の先端において、分析対象薬物は可能な限り濃縮されて保持されることがその後のピーク幅の拡がり等を抑制する大きな因子になるものと考えられる。従って、通常試験溶液を調製する際には HPLC 移動相溶液あるいは移動相溶液より溶出力の弱い溶媒を用いることが好ましいと思われる。但し、分析対象薬物が十分溶解されることも要求される。

### 3. 前処理法の検討

OTC は水溶液中では双性イオン構造<sup>7)</sup>を形成し、水相から有機溶媒で抽出することが困難であることから、クリーンアップ法として C<sub>18</sub> (ODS) カートリッジを用いた固相抽出法<sup>7), 8)</sup>や Amberlite XAD-2 などを用いたカラムクロマトグラフィーが多用されている。

TCs のクリーンアップに ODS カートリッジを用いた場合、カートリッジ充てん剤中の金属不純物の影響を少なくするため、カートリッジを EDTA で処理することが有効とされている<sup>14)</sup>。そこで、EDTA 処理効果の有効性を検討した。OTC 標準溶液を用いた場合、Table 1 に示すとおり、EDTA 未処理のカートリッジでは OTC の回収率はいずれのカートリッジにおいても 50% 以下であった。しかし、0.2 M の EDTA 溶液 10 ml でカートリッジを処理することにより、回収率の向上が顕著に認められた。

標準溶液の代わりに実試料である豚肉抽出液を用いて EDTA 処理効果を検討した。標準溶液を用いた場合、



**Fig. 3.** Typical chromatograms of (A) standard mixture (5 ng), (B) swine muscle extract, (C) swine liver extract and (D) extract of swine muscle fortified at 0.1 µg/g  
LC conditions were the same as in Fig. 2.

**Table 2.** Recovery of Spiked Carbadox and Oxytetracycline from Swine Muscle and Liver

Antibacterials	Added (µg/g)	Recovery <sup>1)</sup> (%)	
		Muscle	Liver
Carbadox	0.01	90.1 ± 1.7	80.2 ± 3.2
	0.1	85.6 ± 0.7	85.0 ± 3.7
	1.0	86.9 ± 1.2	81.7 ± 2.3
Oxytetracycline	0.05	85.2 ± 4.0	75.2 ± 3.6
	0.1	84.2 ± 2.1	83.7 ± 4.7
	1.0	88.7 ± 1.7	81.1 ± 5.7

<sup>1)</sup> Values are mean ± S. D. (n=5).

カートリッジのEDTA処理は不可欠な操作であったが、実試料を用いた場合、Table 1に示すとおりBond Elut C<sub>18</sub>及びSep-pak C<sub>18</sub>に関しては、EDTA未処理でも満足できる回収率が得られた。抽出液中の試料成分が金属不純物や残存シラノール基などの影響を抑制しているものと思われるが、詳細については今後、更に検討したい。

以上の結果、Bond Elut C<sub>18</sub>を用いた場合、EDTA未処理でも実試料では十分な回収率が得られることから、操作の簡便性を考慮してクリーンアップ用カートリッジにはEDTA未処理のBond Elut C<sub>18</sub>を用いることにした。

先に著者らは、除タンパク・抽出溶媒にメタリン酸-

メタノール混液を用いることにより、畜水産物中のサルファ剤<sup>6)</sup>やキノロン剤<sup>9)</sup>を良好に回収できることを報告した。そこで、CDX及びOTCの前処理にも適用できるか検討したところ、0.3%メタリン酸-メタノール(7:3)を用いることにより満足すべき回収率を得た。なお、CDXは光に対して不安定<sup>5)</sup>であるため、操作は褐色のガラス器具を用いて可能な限り遮光して行った。褐色容器に入れ、冷蔵保存(4°)したCDX標準溶液(100 µg/ml)は1年経過しても分解は全く認められず、安定であった。

本法によって得られた豚肉及び豚肝臓抽出液のクロマトグラムをFig. 3に示す。試料が肝臓の場合、筋肉に比

へ夾雑物ピークが多く認められるが、CDX及びOTCを検出・定量する上で支障はなかった。

#### 4. 他の抗菌剤の影響

CDX及びOTCを分析する上で、動物用医薬品及び飼料添加物として汎用されている他の抗菌剤（サルファ剤、ニトロフラン剤、キノロン剤、ペニシリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質）の妨害性を調べた。本試料調製法ではアミノグリコシド系抗生物質を除く多くの抗菌剤が比較的良好に回収された。しかし、サルファ剤、ペニシリン系抗生物質及びマクロライド系抗生物質は360 nm付近にUV吸収を有せず支障なかった。一方、ニトロフラン剤（フラゾリドン、ジフラゾン）、キノロン剤（オキシリン酸、ナリジクス酸、ピロミド酸）及びOTC以外のTCs（テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン）は360 nm付近にUV吸収を有するが、本HPLC条件下ではOTC及びCDXと良好に相互分離されており、分析上問題とはならなかった。

#### 5. 添加回収実験

実験方法の部に記載した操作に従い検量線を作成したところ、CDXは0.1~50 ng、OTCは1~50 ngの範囲で良好な直線性を示した。豚肉及び豚肝臓にCDXを0.01, 0.1及び1.0 µg/g、OTCを0.05, 0.1及び1.0 µg/gの濃度で添加し、回収率を求めた (Table 2)。豚肝臓に0.05 µg/g添加したOTCの回収率を除き、いずれも80%以上回収され、標準偏差もほぼ5以内と残留分析法として満足すべき結果が得られた。本法による検出限界はCDXは豚筋肉で0.002 µg/g、豚肝臓で0.01 µg/g、OTCは筋肉及び肝臓とも0.05 µg/gであった。本法はFAO/WHOにより勧告されたOTC及びCDXの最大残留基準値<sup>15)</sup> (Maximum Residue Limit: MRL; OTCの筋肉部及び肝臓中でのMRLはそれぞれ0.1及び0.3 µg/g、CDXの豚筋肉部及び豚肝臓中でのMRLはそれぞれ0.005及び0.03 µg/g)をほぼ満足しており、日常

検査法として汎用されることが期待される。

#### 謝 辞

本研究は平成6年度(財)伊藤記念財団研究助成、食肉に関する調査研究の一環として行ったものであり、関係各位に深く感謝致します。

#### 文 献

- 1) 厚生省乳肉衛生課編: “畜水産食品中の残留物質検査法” 第1集(1977~1986).
- 2) “AOAC Official Methods of Analysis” Association Official Analytical Chemists, Arlington, VA, S. Williams ed., 15th Ed. p. 829~831 (1990).
- 3) 厚生省乳肉衛生課編: “畜水産食品中の残留物質検査法” 第2集の6 (1983).
- 4) Code of Federal Regulations (1993), Title 21, Section 556. 100.
- 5) Nagata, T., Saeki, M.: J. Liquid Chromatogr. **14**, 2,551~2,561 (1991).
- 6) 堀江正一, 斉藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 浜田尚樹, 中澤裕之: 食衛誌. **31**, 171~176 (1990).
- 7) Rouan, M. C.: J. Chromatogr. **340**, 361~400 (1985).
- 8) Barker, S. A., Walker, C. C.: J. Chromatogr. **624**, 195~209 (1992).
- 9) 堀江正一, 斉藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之: 食衛誌. **33**, 442~448 (1992).
- 10) Horie, M., Saito, K., Nose, N., Nakazawa, H.: J. Chromatogr. **653**, 69~76 (1994).
- 11) Graaf, G. J., Spierenburg, T. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 658~660 (1985).
- 12) Ng, T., Ng, S.: J. Chromatogr. **329**, 13~24 (1985).
- 13) Hoffman, N. E., Pan, S., Rustom, A. M.: J. Chromatogr. **465**, 189~200 (1989).
- 14) 岡 尚男, 宇野圭一, 原田健一, 鈴木真言: 薬誌. **103**, 531~537 (1983).
- 15) “Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food” WHO Technical Report Series No. 799 (1990).