

## 金属キレート樹脂を用いた前処理法によるウナギ蒲焼き中 エンロフロキサシンの分析法

武田 信幸\*

### Determination of Enrofloxacin in Eel-Kabayaki using Metal Chelate Resin for Cleanup

Nobuyuki TAKEDA\*

*Life Sciences Division, Hyogo Prefectural Institute of  
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29,  
Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

A rapid and reliable quantitative screening procedure was developed for analysis of enrofloxacin (ENR) in Unagi kabayaki. The procedure involves clean-up using metal chelate resin preloaded with ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$  cartridge). Kabayaki sample was extracted with acetonitrile and applied on the cartridge. After wash with acetonitrile and water, ENR was eluted with EDTA/McIlvaine buffer for a direct injection on HPLC system with fluorescence detection at ex 280nm/em 440nm. The procedure effectively removed coextractive peaks and gave no interfering peaks for the determination of ENR in kabayaki. Recoveries at 0.05 $\mu\text{g/g}$  fortification level were  $81.8 \pm 6.7\%$  (CV% 8.2) and the quantification limit was 0.004 $\mu\text{g/g}$ .

#### I はじめに

近年、動物用医薬品が家畜や養殖魚介類の疾病予防と成長促進に使用されるようになり、畜水産食品の生産性が大きく向上した。その反面、種々の理由でこれら医薬品が食品に残留することがあり、食品衛生上の問題となる場合がある。とくに中国からの輸入ウナギ蒲焼きからはフルオロキノロン系合成抗菌剤であるエンロフロキサシン (ENR) が比較的高頻度に検出されるため、厚生労働省 (厚労省) による命令検査の対象となっており、用いる試料としては、たれのしみ込んでいない内部のみを採取しなければならないと指定されている<sup>1)</sup>。しかし、

この作業は必要部分を器具で掻き取る必要があるため、多数検体を処理する場合は多大の手間と時間を要する。また、試料ごとに個別操作が必要なヘキサシによる脱脂操作およびエバポレータを用いた濃縮操作も煩雑である。検査の効率化を図るには、たれを含有したままの検体に適用でき、しかも多数検体を同時処理できる前処理法が必要である。著者らは、既にウナギ蒲焼き中オキシテトラサイクリン (OTC) およびオキシリン酸 (OXA) の測定にMCAC法 (Metal Chelate Affinity Chromatography) を適用して、妨害物の影響を除去した効果的な前処理法を報告した<sup>2, 3)</sup>。ENR (Fig. 1) は、OTCおよびOXAと同様に分子内にキレート形成能を有する $\beta$ -ジケトン構造 (隣接するカルボキシル基およびオキソ基) を含んでいるため、同法の適用が可能と考えられた。そこで、用いる金属イオン種や溶出条件、HPLCでの検出条件などを検討し、たれがしみ込んだままの蒲焼き試料にも適用できる迅速・簡便で選択性の高い分析法を確立したの

健康科学部

\* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究センター  
健康科学部 武田 信幸

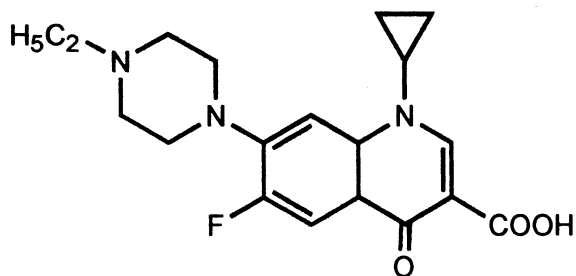


Fig. 1 Structures of enrofloxacin (ENR)

で報告する。

## II 材料および方法

### 1. 試料及び試薬

試料は兵庫県内で市販されていたウナギ蒲焼きを用いた。

標準原液：ENR（関東化学㈱製）の25mgを精秤し、メタノール（MeOH）100mLに溶解して標準原液とした。

MEN緩衝液は、クエン酸一水和物12.9g、リン酸水素二ナトリウム 10.9g、EDTA・2Na 37.2g及びNaCl 29.2gを水に溶解して1Lとした<sup>2)</sup>。

100mmol/L金属イオン溶液は、硫酸銅（CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O）2.5gおよび硝酸第二鉄(Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>・9H<sub>2</sub>O) 4.0gをそれぞれ水100mLに溶解して調製した。

鉄イオンキレートカートリッジ(Fe<sup>3+</sup>カートリッジ)：金属キレート(Amersham Biosciences社製 Chelating Sepharose Fast Flow)を20%エタノールに懸濁してスラリー(1:1, v/v)とした。その0.5mLをカートリッジ(内径5.6mm x 65mm)に注入し、樹脂を沈降させた後ポリエチレン製フリットを装填して水洗した(ベッド容量0.25mL)。100mmol/L硝酸鉄溶液(Fe<sup>3+</sup>) 100μLを負荷し、水1mLで洗浄後使用した(Fe<sup>3+</sup>カートリッジ)。使用後はMEN緩衝液及び水で洗浄し、20%エタノールを充填して冷蔵庫保存した。再使用が可能である。

### 2. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフは島津製作所製LC-10Aを用いた。検出は蛍光検出器(RF-10A)を用い、励起波長280nm/蛍光波長440nmで測定した。分析はカラムにInertsil ODS3(15cm x 4.6mm, 5μm, GL Science), 移動相に(85:15)アセトニトリル-マキルベン緩衝液(pH 3.0)混液を用い、カラム温度40°C, 流速1mL/minで行った。試験溶液は25μLをHPLC装置に注入した。LC定量用標準溶液は標準原液を鉄イオン溶液とMEN緩衝液の(1:9)混液で希釈して調製した。

### 3. 試験溶液の調製

ウナギ蒲焼き(約100g)に付着しているたれを水道水で洗い流してガーゼなどで水分を除去し、フードプロセッサ(National製:MK-K58型)で均一化して供試した。その5gを採り、無水硫酸ナトリウム10gとアセトニトリル50mLを加えてホモジナイズし(Janke & Kunkel製:Ultra-TURRAX), 5Aろ紙でろ過する。ろ液1mLをFe<sup>3+</sup>カートリッジに負荷した後、アセトニトリルおよび水の各1mLで洗浄し、MEN緩衝液0.5mLで溶出して試験溶液とした。

## III 結果および考察

### 1. HPLC条件の検討

移動相組成は、通知法に準じて(15:85)アセトニトリル-マキルベン緩衝液(pH3.0)混液を用いた<sup>1)</sup>。1mL/minの流速で分析した場合、ENRの保持時間は11.8分で、その他のフルオロキノロン剤7種と保持時間は重なることなく測定可能であった(Fig. 2)。これら抗菌剤はノフロキサシン及びオフロキサシンがほぼ同一時間(7.4分)に溶出した以外は全てベースライン分離し、その保持時間はダノフロキサシン10.1分、オルビフロキサシン13.0分、サラフロキサシン18.2分、ジフロキサシン19.4分であった。

測定波長は、通知法では励起285nm/蛍光460nmであるが、本法では蛍光検出器のオンライン・スペクトル機能で測定したλ<sub>max</sub>(280nm/440nm)を用いて測定した。その結果、検出感度が約1.4倍向上した。

### 2. 抽出法の検討

通知法では試料の3倍量(v/w)のアセトニトリルによる抽出を2回行っている。本法では、操作の簡略化を図る目的で、10倍容量で1回抽出とした。その際、試料の

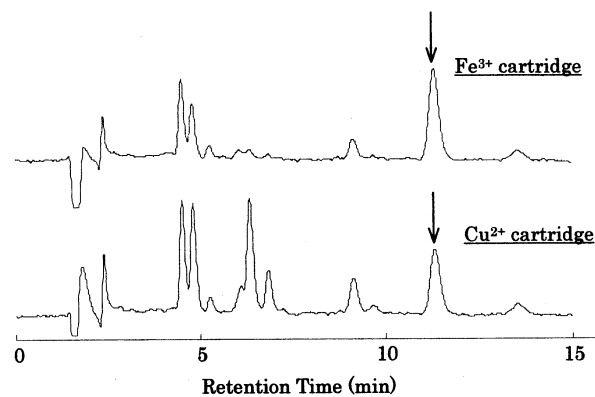


Fig. 2 Chromatograms of Unagi kabayaki extracts cleaned-up by Fe<sup>3+</sup>/Cu<sup>2+</sup> cartridge. Arrows indicate the peak of ENR.

大部分がホモジナイザー・シャフトに付着して十分に分散せず、実分析時には測定値の変動をもたらす可能性が考えられた。そこで、試料の2倍量(w/v)の無水硫酸ナトリウムを加えて操作し、シャフトへの付着を防止して均一分散化を可能とした。

### 3. MCAC法による前処理法の検討

キレート樹脂に負荷する金属イオンとして、 $\text{Cu}^{2+}$ および $\text{Fe}^{3+}$ を検討した<sup>3)</sup>。 $\text{Cu}^{2+}$ は樹脂を青色に、 $\text{Fe}^{3+}$ は黄色に着色する。そのため、イオンの負荷量や溶出状況、樹脂の劣化程度などの目視に適している。また、これらのイオンはOTC及びOXAを効果的に樹脂上に捕捉することが分かっている。そこで、『試験溶液の調製』の項に従って得た蒲焼のアセトニトリル抽出液に0.05ng/g濃度となるようにENRを添加して試料溶液を調製し、その1mLを $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ カートリッジに負荷し、洗浄後MEN緩衝液1mLで溶出し、ENR捕捉効率および夾雑ピーク除去効果を比較検討した。Fig. 2に示したように、 $\text{Fe}^{3+}$ カートリッジは負荷したENRの約88%を捕捉したが、 $\text{Cu}^{2+}$ では約60%であり、また精製効果も $\text{Fe}^{3+}$ が優れていた。従って、キレート樹脂に用いる金属イオンとして $\text{Fe}^{3+}$ を採用することとした。

つぎに、 $\text{Fe}^{3+}$ カートリッジへの負荷可能試料量を検討した。カートリッジに5ngのENRを添加した抽出液0.5mL~5mLを負荷し、ピーク高を測定した。負荷量3mLを超えると捕捉率が低下してくることが判明したため、抽出液添加容量は1mLとした。抽出液1mLにENRを5~50ng添加した場合は、捕捉率は低下することなく、添加量とピーク高との間に良好な直線性( $r=0.999$ )が得られた。また、カートリッジからのENR溶出位置を確認したところ、500 $\mu\text{L}$ までに全て溶出していることが分かった。試料溶液1mLを負荷して、最終検液0.5mlとし、2倍濃縮を行った。

### 4. 添加回収実験及び定量下限値

蒲焼き5gに、ENRを0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し、『試験溶液の調製』の項に従って操作した。この5回試行の平均回収率 $\pm\text{SD}$ は $81.8\pm 6.7\%$  (CV%8.2)であった。また、ENRを0.0125~0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ の範囲で添加したところ、用量-反応関係は良好な直線性( $r=0.998$ )を示し、本法が広い濃度範囲で適用可能であることがわかった(Fig. 2)。このときの5段階濃度での回収率は83.2~95.5%の範囲で、平均値 $\pm\text{SD}$ は $88.9\pm 5.2\%$  (CV%5.9)であった。定量下限値を「ブランクの平均値+10 $\times$ ブランク測定値のSD」とすれば、本法では0.004 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

Table 1. Double blind test on ENR in Unagi Kabayaki

No	Added ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Found ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Recovery (%)
1	0.05	0.043	86.0
2	none	—	—
3	none	—	—
4	none	—	—
5	0.12	0.106	88.3
6	none	—	—
7	none	—	—
8	none	—	—
9	none	—	—
10	0.005	0.0034	68.0

最後に、二重盲検試験を行って本法の有効性を確かめた。即ち、試験法作製実施者以外の第三者に盲検試験用試料作製を依頼し、標準品添加の有無および添加の際の量を知らせず、回収率など分析法評価に必要なパラメータ類の測定に実施者の予断を与えないようにして試験を行い、終了後に分析値を照合した。その結果を、Table 1に示した。10試料のうち3試料からENRを検出した。測定値は、0.043 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.106 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び0.0034 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、添加濃度はそれぞれ、0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.12 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び0.005 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。0.0034 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度を示した試料は、本法の定量下限値以下であるが、ENRの保持時間周辺には夾雑ピークは存在せず、痕跡程度の濃度でもENRピークの存在が確認可能であった。検出濃度はいずれも添加量とよく近似した値であり、回収率として計算すると86%および88.3%と良好な結果が得られた。以上のように、本法では検出の精度及び分析値の正確性において、誤りの確率は十分に許容範囲内にあり、ウナギ蒲焼き中ENR測定に適合していると結論した。

本法では10試料の前処理(抽出及び $\text{Fe}^{3+}$ MCAC)は約1時間程度で終了する。たれ部分を除去する通知法が要した多大の時間と手間を省略できるようになり、多数検体分析時の労力が大幅に削減できるものと思われる。

また、 $\text{Fe}^{3+}$ カートリッジは再使用が可能である。今回、すでに10回以上使用したカートリッジを用いたが、回収率低下や他試料からのクロスコンタミネーションなどは観察されていない。極めて堅牢・安価で、操作しやすく、20%エタノール中冷蔵庫保存すれば通年使用が可能である。使用していると流速が低下することがある。試料中の不溶性物質またはゲル状粒子に固着したタンパク質による目詰まりと考えられる。このような場合は、説明書に従って、1N-NaOH(タンパク質の可溶化)、2M食塩水(イオン結合性物質の溶出)、70%エタノール(脂溶性物質の溶出)で洗浄すれば性能は回復する。

## 5. 残留実態調査

本法を用いて市販ウナギ蒲焼き5検体を分析したが、ENRは検出しなかった。

## IV 要 旨

現行のウナギ蒲焼き中エンロフロキサシン (ENR) 分析法は、たれのしみ込んでいない部分のみを採取しなければならぬため、試料の前処理に多大の時間と労力を要する。そこで、簡便かつ効率的に測定できる分析法に改善した。試料をアセトニトリル抽出し、鉄イオンを結合させたキレート樹脂に負荷し、EDTA含有緩衝液で溶出後、蛍光検出/HPLC分析する。本法はENRが金属イオンとキレート形成する特性を利用しているため、選択性が極めて高い。そのため、夾雑物の多いたれを含有したままの蒲焼き試料にも適用可能である。添加濃度0.05 $\mu$ g/gでの回収率は81.8 $\pm$ 6.7% (CV%8.2)、定量下限値は0.004 $\mu$ g/gであった。

## 謝 辞

二重盲検試験実施に御協力を頂いた当研究センター健康科学部吉岡直樹主任研究員に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 食安監発第0703005号 平成15年7月3日厚生労働省医薬品局食品安全部監視安全課 うなぎにおけるエンロフロキサシン分析法について
- 2) 武田信幸, 西海弘城: 金属キレート樹脂を用いた前処理法による畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの分析, 食衛誌, **41**, 364-367 (2000)
- 3) 武田信幸: 金属キレート樹脂を用いた水産食品中のオキシテトラサイクリンおよびオキソリン酸の同時定量法, 兵庫衛研報, **34**, 91-95 (1999)