

薄層クロマトグラフィー/Flame Ionization
Detector 法による抗生物質の分析 (第2報)
ウシの胆汁および尿中のカナマイシンの簡易検出法

Analytical Method of Antibiotics by Thin-Layer
Chromatography/Flame Ionization Detector System (Part 2)
Simple Determination Method of Kanamycin in Bovine Bile and Urine

斎藤 富保 金島 弘恭 中野 道晴

Tomio Saito, Hiroyasu Kaneshima and Michiharu Nakano

われわれは、食肉および畜産食品に残留する抗生物質を迅速かつ簡易に分別、確認することを目的として、種々の抗生物質の分析法について検討を試みてきた。¹⁻⁵⁾

今回は、前報⁵⁾に引き続き、薄層クロマトグラフィー/Flame Ionization Detector 法 (TLC-FID) を用い、動物用医薬品あるいは飼料添加剤として広く使用されているアミノグルコサイド系抗生物質の一つであるカナマイシン (KM) について、屠畜より得られた胆汁および尿からの検出法について検討を行なった。

一方、厚生省では、昭和56年に食肉中の KM の検出法⁶⁾を通知している。しかし、胆汁および尿は筋肉とは異なり胆汁酸塩、脂肪酸などの複雑な成分を持つため、特有な前処理操作が必要ではないかと考えられる。そこで著者らは、Tox Elut (TE) および Bond Elut (BE) を用いた前処理法の検討を行なった結果、比較的良好な成績を得たので報告する。

1) 生体試料：札幌市近郊の食肉処理場より、抗生物質を使用していないウシの胆汁および尿を入手し試料とした。

2) 試薬および器具：KM は、国立予防衛生研究所より分与された硫酸カナマイシンの常用標準品を用いた。KM を蒸留水および塩酸メタノール (pH 0.8) に溶解 (1000 μ g (力価)/ml) し、必要に応じ適宜希釈して標準溶液とした。

前処理に用いるカラムは、TE および BE (いずれも Analytichem 社製)^{7,8)}を用いた。

TE は、TE-3120 (pH 9.0 に緩衝化, TE-9.0), TE-3220 (pH 4.5 に緩衝化, TE-4.5), および TE-3020 (未緩衝化, TE-7.5) を用いた。

BE は、BE-C₁₈ (octadecyl), BE-Si (unbonded silica) および BE-SCX (benzene sulfonic acid) を用いた。

除蛋白は、Centriflo CF-50 (CF, Amicon 社製)⁹⁾を用い、分子篩膜遠心法によって行なった。

前処理操作の各段階における KM の回収率は、SLFIA 法 (Substrate-Labeled Fluorescent Immunoassay) のトブラマイシンキット (Ames 社製)^{17,18)}を用い、KM との交叉反応性を利用して求めた。

3) TLC-FID 装置：Iatroscan-TH-10 Analyser (ヤマトロン社製) に、インテグレーター (SIC 社製 7000 AS) を組み合わせて用いた。

4) TLC-FID の分析条件：薄層棒は、外径 1 mm, 長さ 150 mm, 表面にシリカゲルを焼結した (クロマロッド-S II) を用いた。

検出器は、FID を用い、水素流量 155 ml/min, 空気流量 2000 ml/min, 薄層棒の送り速度 2.9 sec/cm, チャート速度 50 mm/min とした。

薄層棒は、メタノールで洗浄後、110°C で 3~5 分間乾燥し、測定時と同じ条件で空焼きして活性化した。また、測定後の薄層棒は、水素流量 240 ml/min で同様に空焼きし、再生した。

5) 分析法：生体試料の 4 ml を蒸留水で 5 倍希釈し、40%水酸化ナトリウム溶液で pH 8.0 に調整し、吸着カラム TE-7.5 に負荷した。つぎに、ヘキサソルおよびクロロホルム：酢酸イソプロピル (1:1) でカラムを洗浄し、脂肪分などを除いた後、1 N 塩酸で KM を溶出した。溶出液の pH を 8.0 に調整し、除蛋白の目的で CF を用いて分子量 5 万以下を分画した。ついで、KM は陽イオン交換樹脂によく吸着する¹⁹⁾ことから、分画液を BE-SCX に吸着させ、水洗の後、2.5 N 塩酸で溶出した。

以上述べた分析法を表 1 に示した。

表 1 胆汁および尿中のカナマイシンの分別精製法

	試料	胆汁および尿	4 ml
Tox Elut	5倍希釈 (H ₂ O)		
MeOH 40 ml で洗浄	pH 8.0		40% NaOH で調整
60°C で1夜乾燥	————— Tox Elut (TE 3020, TE-7.5)		20ml を負荷
	Hexane		20ml で洗浄
	CHCl ₃ : Isopropyl Acetate (1 : 1)		30ml で洗浄
	1 N HCl		40ml で溶出
Bond Elut SCX 活性化	pH 8.0		40% NaOH で調整
MeOH 5 ml で洗浄	Centriflo CF-50		4000rpm 15分間遠心
H ₂ O 5 ml で洗浄	————— Bond Elut SCX		吸着
	H ₂ O		30ml で洗浄
	2.5 N HCl		10ml で溶出
	蒸発乾固		
	HCl- MeOH (pH 0.8)		1 ml に溶解
	TLC-FID		

結 果

生体に投与された抗生物質の多くは、肝および腎で代謝、排泄される¹⁰⁻¹⁵⁾が、その種類により排泄臓器は異なる。KM は、胆汁および尿に長時間にわたり、高濃度に排泄されることが Ninomiya¹²⁾により明らかにされている。従って、今回の KM の分別確認法の検討には、生体試料として胆汁および尿を選んだ。

しかし、胆汁は胆汁塩酸などを含むため、通常の液々抽出法では、起泡、エマルジョンの形成などが起こり、溶媒層と水層との分離は困難であった。

そこで、今回は最近微量有機化合物の抽出あるいは精製に繁用されている TE および BE カラムを用いて、前処理操作を行なう方法の検討を行なった。

分別精製条件の検討：はじめに、吸着カラムの選定のため TE-9.0, TE-4.5 および TE-7.5 の3種類のカラムについて KM の溶出条件を検討した。KM の溶出には、1 N 塩酸、飽和食塩水および 10%アセトン水 (pH 2.0) を用いた。その結果、TE-7.5 カラムに良く吸着し、飽和食塩水または、1 N 塩酸で定量的に溶出されることが明らかとなったが、後述のように BE-SCX での KM の吸着に食塩の影響が認められることから、1 N 塩酸で溶出を行なうこととした。

つぎに、脱脂および胆汁色素を除去する目的で、TE-7.5

カラムを用いて各種の有機溶媒について検討を行なった。胆汁の 5 倍希釈液に 50 μ g(力価)/ml の濃度に KM を添加し、この 20 ml をカラムに負荷した。ついで、クロロホルム、酢酸エチル、四塩化炭素、酢酸イソプロピル、ベンゼン、アセトニトリル、ピリジン、ジクロロエタン、酢酸ブチルおよびブタノールの10種類の溶媒を単独あるいは種々組み合わせで用い、それぞれの溶媒 30 ml でカラムを洗浄した後、1 N 塩酸で KM を溶出した。この溶出液について、色素の除去および KM の回収率を検討した。回収率は SLFIA 法で測定した。その結果、クロロホルム：酢酸イソプロピル (1 : 1) で洗浄した溶出液で最も良く色素が除去され、KM の回収率も定量的であった。

つぎに、CF を用いた除蛋白操作による KM の損失を検討するため、KM の 25 μ g(力価)/ml を添加した 1 N 塩酸溶液 5 ml を 40%水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整した後、除蛋白操作を行なった結果、損失は認められなかった。

KM をさらに分別精製する目的で、BE カラムの検討を行なった。無極性相として BE-C₁₈、極性相として BE-Si、および陽イオン交換相として BE-SCX の3種類の BE について、25 μ g (力価)/ml の KM 標準液の 5 ml を通過させ吸着率を調べた。その結果、BE-C₁₈ では吸着せず、BE-Si および BE-SCX では、ほぼ定量的に吸着した。

さらに、BE-Si および BE-SCX カラムについては、胆汁

稿を終えるにあたり、本研究に御協力をいただいた(株)ヤ
トロン 高瀬和正氏、米田憲弘氏、(株)マイルス・三共 高
野保浩氏、試料の入手に御協力いただいた江別食肉検査事
務所 北野賢一所長、高橋俊之課長に深謝いたします。

文 献

- 1) 斎藤富保, 金島弘恭: 道衛研プロジェクト報告, 4, 18 (1982)
- 2) idem: *ibid.*, 5, 17 (1983)
- 3) 斎藤富保, 金島弘恭, 中野道晴: *ibid.*, 6, 18 (1984)
- 4) 斎藤富保, 金島弘恭: 道衛研所報, 32, 73 (1982)
- 5) 斎藤富保, 金島弘恭, 岡田迪徳: *ibid.*, 33, 131 (1983)
- 6) 厚生省環境衛生局乳肉課: 畜産物中の残留検査法第1集の3 (1981)
- 7) Analytichem International CMS アプリケーション集, 11, ユニフレックス社, 東京 (1983)
- 8) L. Yago et al: Analitichem International Current, 3 (1), 1, ユニフレックス社, 東京 (1984)
- 9) Amicon Technical Data Publication, No. 5113A, アミコン社, 東京
- 10) 米沢昭一: 畜産の研究, 36, (1), 147 (1982)
- 11) I. Ninomiya et al: J. Antibiotics SER B, X III(4), I (1960)
- 12) I. Ninomiya et al: *ibid.*, X III(4), II(1960)
- 13) idem: *ibid.*, X III(4), III(1960)
- 14) S. Yonezawa et al: *ibid.*, XX I(5), 250(1968)
- 15) 二宮幾代治他: 動薬検年報, 6, 118 (1969)
- 16) 名取信策他: 天然有機化合物実験法, 6, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1978)
- 17) 高杉昌幸他: 臨床検査・試薬, 6 (2), 543 (1983)
- 18) 西園寺克, 坂井幸江: *ibid.*, 5(4), 854 (1982)