

## Technical Review

## エビ試料中のテトラサイクリン系抗菌剤のHPLC分析

吉田貴三子、上森仁志

## HPLC analysis of Tetracyclines in Shrimp

Kimiko Yoshida and Hitoshi Uemori

Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Reagent Research Laboratories

6-1,Takadacho,Amagasaki Hyogo Pref. 661-0963 Japan

**Abstract**

Recently the food additive and the veterinary product that remains in food became a problem. Tetracyclines are one of such substances and analyzed by HPLC-fluorescence detection method. The extraction samples of foods were pretreated by solid phase extraction column (styrene divinyl benzene copolymer packed column). Pretreatment of the shrimp extracts was investigated. The simple two step extraction with Presep-C RPP(styrene divinyl benzene copolymer packed column) and Presep-CM (cation exchange column) improved effect of the cleanup and recovery rates of Tetracyclines efficiency compared with one step of styrene divinyl benzene copolymer packed column.

*Keywords : HPLC, Solid Phase Extraction, Tetracycline*

**緒言**

近年、食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分が社会的に問題となっており、厚生労働省より試験方法が示されている（通知試験法）<sup>1)</sup>。本試験法によれば、テトラサイクリン系抗菌剤（オキシテトラサイクリン：OTC、クロルテトラサイクリン：CTC、テトラサイクリン：TC、以下TC類）の分析は、抽出試料の前処理にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを用いた固相抽出による前処理とHPLC - 蛍光検出法が採用されている。

しかし、試料をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで前処理した場合、TC類の回収は良好であるが、試料によっては夾雑物を充分に除去できず、TC類の検出を妨害する場合がある。

そこでこれら夾雑物の除去を目的に、公定法の前処理後に弱酸性カチオン交換カラム処理を追加し検討した<sup>2)</sup>。その結果、TC類を選択的に測定することが可能になったので報告する。

**実験**

試料の前処理は公定法の“魚介類の場合”を参考として、

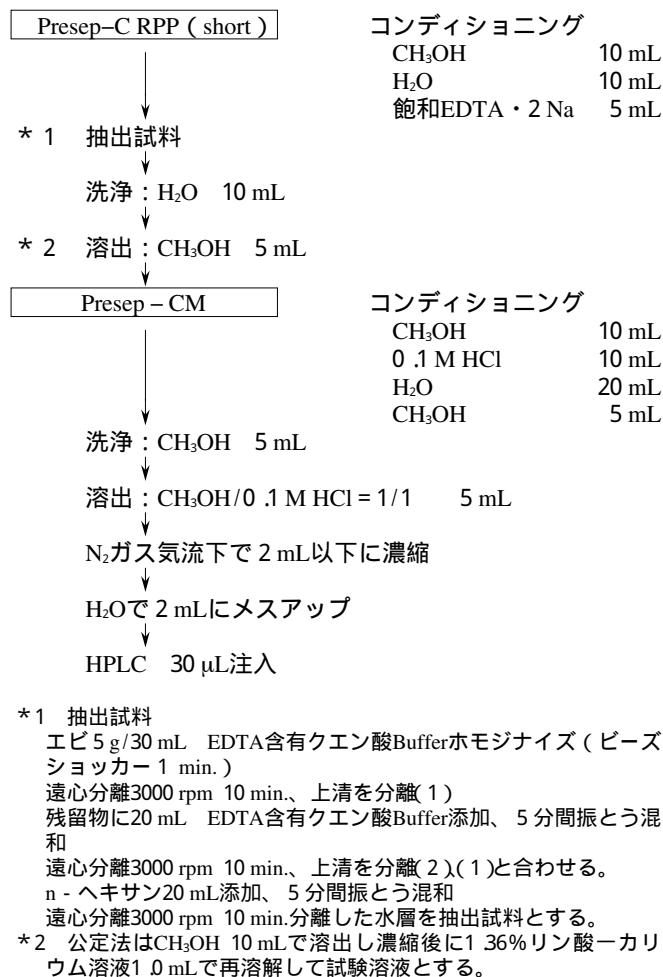
和光純薬工業株式会社 事業開発本部 試薬研究所  
兵庫県尼崎市高田町6 1 TEL 06 6499 1501 FAX 03 6499 2801

固相抽出条件を図1のように設定した。前処理用スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム相当品はPresep-C RPP (short) (和光純薬) を、弱酸性カチオン交換カラムはポリマー系イオン交換カラムPresep-CMを、また分析カラムはWakopak Navi C 18 5.4 6 I.D. × 150 mm (ODSカラム)(和光純薬)を使用した。コンディショニング処理したPresep-C RPP (short) に、エビをホモジナイス処理した抽出試料を添加、固相抽出カラムを洗浄後溶出した。さらに溶出液をPresep-CMで処理してHPLC用試料とした。

また固相抽出カラムのTC類の回収率は、エビをホモジナイス処理した抽出試料にTC類の標準品各1 µgを添加して、同様に処理した後HPLCで測定し求めた。

**結果と考察**

各試料をHPLCで分析した時のクロマトグラムを図2に示した。エビ抽出試料をPresep-C RPP (short) のみで前処理した場合(1)と、さらにPresep-CMで処理した場合(3)のクロマトグラムを比較したところ、Presep-CMでさらに処理した方がクリーンアップ効果が顕著であった。またTC類の回収率 (n = 4) は87.9~96.1%、CV(%)が1.2~2.5%と良好な



- \* 1 抽出試料  
エビ 5 g/30 mL EDTA含有クエン酸Bufferモジナイス(ビーズショッカー 1 min.)  
遠心分離3000 rpm 10 min.、上清を分離(1)  
残留物に20 mL EDTA含有クエン酸Buffer添加、5 分間振とう混和  
遠心分離3000 rpm 10 min.、上清を分離(2)(1)と合わせる。  
n - ヘキサン 20 mL添加、5 分間振とう混和  
遠心分離3000 rpm 10 min. 分離した水層を抽出試料とする。
- \* 2 公定法はCH<sub>3</sub>OH 10 mLで溶出し濃縮後に1 36%リン酸一カリウム溶液1.0 mLで再溶解して試験溶液とする。

Figure 1. Conditions of sample preparation

値を示した。

以上、HPLCによるエビ試料中のTC類の測定方法について報告したが、固相抽出カラムの試料調製に果たす役割は大きく、Presep-C RPPとPresep-CMの併用は、目的薬物と極性が近似した夾雑物の除去に有用であり、蛍光検出法で多数認められた妨害ピークのクリーンアップに効果的であった。操作は1段階増えるものの、前処理にPresep-CMを使用する事により分析精度は大幅に改善されるものと考える。

#### 文献・参考資料

- 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 和光純薬時報 Vol.71 No.1 (2003年)「ハチミツ中の残留抗菌性薬剤のHPLC分析」

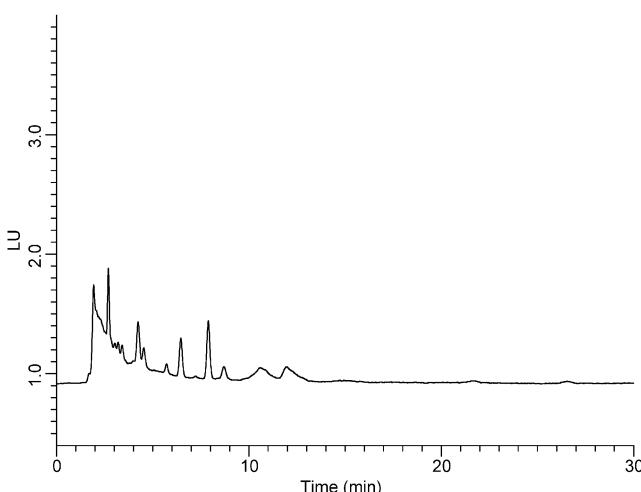


Figure 2-(1) Sample of Shrimp treated with Presep-C RPP (short) (Blank), inj. vol. ; 15 μL

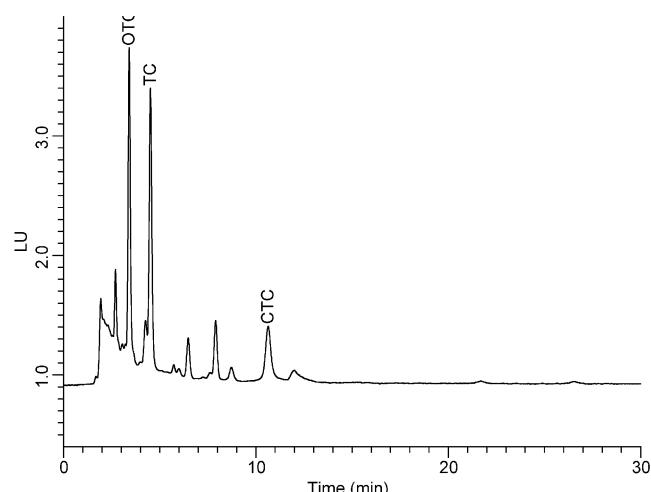
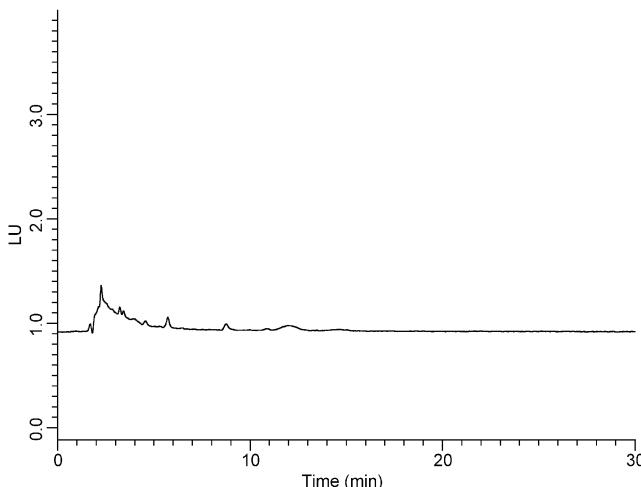
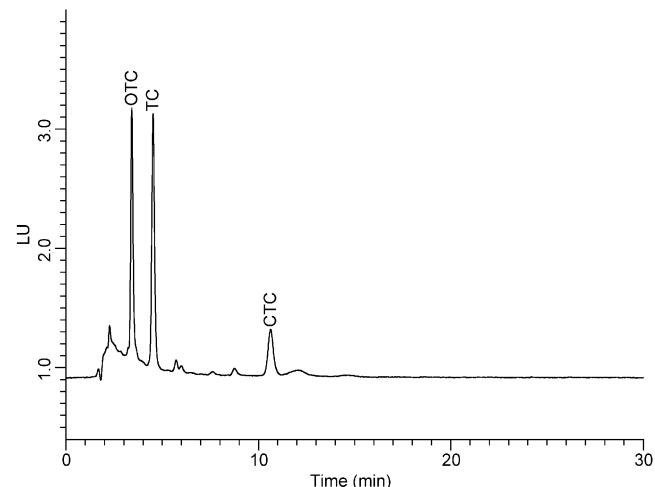


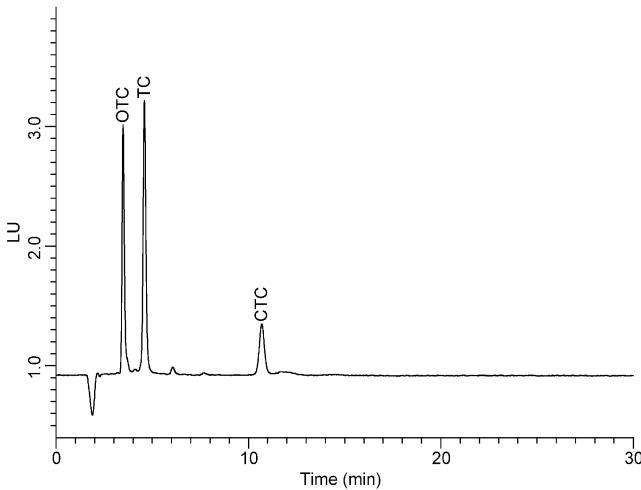
Figure 2-(2) Sample of Shrimp treated with Presep-C RPP (short) (Standard added), inj. vol. ; 15 μL



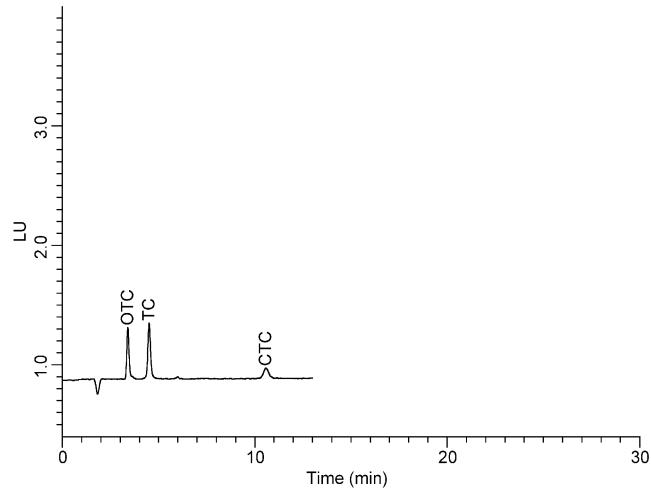
**Figure 2-(3)** Sample of Shrimp treated with Presep-C RPP (short) and Presep-CM (Blank), inj. vol. ; 30  $\mu$ L



**Figure 2-(4)** Sample of Shrimp treated with Presep-C RPP (short) and Presep-CM (Standard added), inj. vol. ; 30  $\mu$ L



**Figure 2-(5)** Standard Solution 1  $\mu$ g/mL , inj. vol. ; 15  $\mu$ L



**Figure 2-(6)** Standard Solution 0.2  $\mu$ g/mL , inj. vol. ; 15  $\mu$ L

HPLC conditions  
 Column : Wakopak Navi C18-5, 4.6 I.D. $\times$ 150 mm  
 Eluent : CH<sub>3</sub>OH/Imidazole Buffer = 25/75 (v/v)  
 Flow rate : 1.0 mL/min. at 40  
 Detection : FLD Ex.380 nm, Em.520 nm  
 Sample : 1. Oxytetracycline  
           2. Tetracycline  
           3. Chlortetracycline

**Figure 2.** Chromatogram of Tetracyclines