

2 ダノフロキサシン及びエンロフロキサシン試験法の検討

豊橋市食肉衛生検査所 ○山口貴宏 吉田亜希子 大島由美
細井美博 石山 登

はじめに

ダノフロキサシン (DFX)、エンロフロキサシン (ERFX) はニューキノロン系に分類される広域で強力な抗菌力を有する合成抗菌剤である。実際、臨床現場では ERFX はバイトリルとして牛や豚に広く使用されている。

当検査所では DFX 通知試験法により過去 3 回、ERFX の収去検査を行った。しかし通知に示されたとおりの方法では①抽出液の有機溶剤の比率が低い為、濃縮に長時間を要する。②ろ過補助剤にケイソウ土を用いた場合、クリンアップが十分でないため夾雑ピークによる影響を受け易い。③カートリッジの負荷液量が約 30ml と一定していないため、残存する有機溶剤により薬剤の保持が阻害され、十分な回収率が安定して得られない、という問題点がある。

今後、ポジティブリスト制が導入されるにあたって現在規格基準値が定められている DFX に加え、ERFX についても基準値が定められることが予想される。以上のことからこれらの薬剤を正確且つ迅速に定量する必要があると考え、現在の DFX 通知試験法を改良した試験法について検討したので報告する。

材料及び方法

(1) 試料

当該管轄内のと畜場に搬入・処理された牛、豚の筋肉を用いた。なお、各筋肉はあらかじめ DFX、ERFX 未検出であることと、薬剤ピークに夾雑ピークが影響しないことを確認したものを使用した。

(2) 試薬

標準品はメシル酸 DFX (林純薬工業社製)、ERFX (関東化学社製) を使用した。通知試験法と同様、移動相に使用するアセトニトリル及び蒸留水は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用、その他試薬は特級品を用いた。

(3) HPLC 及び測定条件

装置: (株)島津製作所 LC-VP システム (蛍光検出器 RF-10AxL、UV 検出器 SPD-10Avp、多波長検出器 SPD-M10Avp)

カラム：TSK-GEL ODS-80TS (5 μ m) 4.6mmID \times 150mm (東ソー社製)

移動相：アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸 (1:4)

流速：1.0ml/min

測定波長 (DFX)：励起：280nm 蛍光 460nm

(ERFX)：励起：278nm 蛍光 445nm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 注入量：10 μ l

(4) 試験溶液の調製

試験溶液の作製は DFX 通知試験法を右図のように改良し、添加回収試験を行った。

添加回収試験は試料 5.0 g に 0.1 および 1.0 μ g/ml に希釈した各 DFX、ERFX 標準溶液を 1 ml 添加した。

< 改良点 >

- 抽出液について、通知試験法アセトニトリル-0.3%メタリン酸溶液 (4:1) を除タンパク効果を維持し、かつ、濃縮乾固時間を短縮するため、メタリン酸の最終濃度は変えずに、アセトニトリル量を増したアセトニトリル-3.0%メタリン酸溶液 (19:1) に変更した。
- 通知試験法のろ過補助剤のケイソウ土をよりろ過能の高いハイフロスーパーセル (ケイソウ土を精製したもの) に変更した。
- 抽出液のアセトニトリル量を多くすることで完全に濃縮乾固し、カートリッジ処理することなく、この残留物をアセトニトリルと水の混液 (1:4) で溶出したものを HPLC 試験溶液とした。

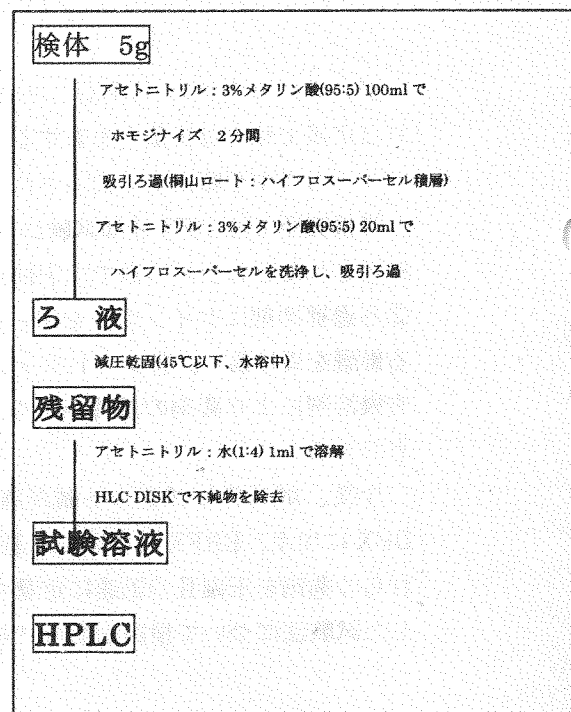


図 DFX 通知試験改良法

成績

添加回収試験 (n=5) の回収率及び変動係数は 0.1 μ g および 1.0 μ g 添加のいずれもコーデックス規格を満たしていた。(表)

検体の多波長スペクトルの一致度 (検出波長：(DFX、ERFX)：190~450nm) は DFX1.0 μ g 添加では 91.3~94.9%、ERFX1.0 μ g 添加ではいずれも 98.0%以上であった。しかし、0.1 μ g 添加ではすべてにおいて標準品を含め、一致度を求めることができなかった。

表 DFX、ERFX の回収率

試料	回収率(平均値±変動係数、n=5)(%)			
	DFX (0.1 μg)	DFX (1.0 μg)	ERFX (0.1 μg)	ERFX (1.0 μg)
牛筋肉	94±3.6	70±12.4	95±8.5	100±2.4
豚筋肉	83±8.6	76±6.4	80±2.6	87±3.6

考察

通知試験法を改良した本法では抽出液の濃縮乾固時間が約 150 分から約 40 分に短縮でき、クロマトグラムで夾雑物が殆ど無いため、夾雑物ピークの影響を受け難くなった。また抽出液を完全に濃縮乾固することにより、回収率が向上した。

添加回収試験 (n=5) の回収率及び変動係数はいずれもコーデックス規格を満たしていた。

しかし、本法はカートリッジ処理を行っていないので当初、蛍光検出器での測定だけでなく、多波長検出器でのスペクトルの一致度を確保しようと考えていた。だが 0.1 μg の添加回収試験では DFX、ERFX ともに標準品の一致度を得ることができなかった。これは当検査所で使用している HPLC において通知試験法の HPLC 条件 (移動相、カラム、注入量など) では定量下限を下回っている可能性があり、多波長検出器によるスペクトルの検出は困難な為であると考えられる。

なお、通知試験法の HPLC 分析条件と異なる当検査所のスクリーニング検査では多波長検出器による DFX、ERFX の定量下限 (検出波長: 190~450nm、一致度 98.0%以上) がそれぞれ 0.03 μg、0.04 μg であった。