

高速液体クロマトグラフィーによる畜水産食品に 残留するクロラムフェニコールの分析法

永田 知子, 佐伯 政信

Determination of Residual Chloramphenicol in Animal Products by High Performance Liquid Chromatography

Tomoko NAGATA and Masanobu SAEKI

I はじめに

クロラムフェニコール (CAP) はわが国では、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマ等によって牛、豚、鶏及び魚類におこる種々の疾病に動物用医薬品として使用されているが、食品衛生法により、これら畜水産食品に残留してはならないと定められている。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた CAP の分析法には、血液について報告があるが¹⁾²⁾⁵⁾⁷⁾、いずれも感度が低く、また、前処理をしていないことから妨害物質等の問題がある。豚組織についての報告もあるが³⁾⁴⁾、回収率が低いこと³⁾また、操作が繁雑であること⁴⁾など問題がある。

今回、多種類の畜水産食品に適用できる簡便かつ高感度な CAP の HPLC による分析法を確立することを目的に検討した。

II 研究方法

1. 試料

市販の牛肉、豚肉、鶏肉及び魚肉

2. 試薬及び標準品

酢酸エチル、n-ヘキサン、ジエチルエーテル、メタノール、アセトニトリル、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは、いずれも特級品を用いた。(和光純薬(株)製、関東化学(株)製)

フロリジルカラムの作成：フロリジル (カラムクロマトグラフ用、100~200メッシュ、関東化学(株)製) を130℃で15時間活性化し、その4gをn-ヘキサンを用いてクロマト管 (内径15mm、長さ300mm) に湿式充填し、その上に無水硫酸ナトリウム1gをのせ、n-ヘキサン40

mlで洗浄した。

標準品：クロラムフェニコール (CAP) (Sigma社製)

内部標準物質：5-Ethyl-tolylbarbituric acid (Al-dlich社製)

標準品及び内部標準物質は、いずれもアセトニトリルに溶解して使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ用ポンプ：日本分光(株)製880-PU型

UV検出器：日本分光(株)製 875-UV型

インテグレーター：(株)島津製作所製 CR-6A型

ホモジナイザー：ウルトラトラックス JANKE & KUNKEL IKAWERK製 Tp 18/2型

4. 試験溶液の調製法

ホモジナイズした試料10gを量り、酢酸エチル40mlを加え5分間ホモジナイズした後、3000rpmで10分間遠心分離し上澄液を分取した。再度エチル40mlで同様に操作し、上澄液を合わせた。これに3%塩化ナトリウム溶液50mlを加え、5分間振とう後静置し2層が分離した後、上層を65℃の水浴上で減圧下濃縮乾固した。残渣に、n-ヘキサン5mlを加え超音波に約5秒間かけた後、フロリジルカラムに負荷した。さらに、n-ヘキサン5ml、40mlで順次先の容器を洗いながらフロリジルカラムに負荷し、カラムを洗浄した。次いでジエチルエーテル：n-ヘキサン (8 : 2) 40mlでカラムを洗浄後ジエチルエーテル：メタノール (9 : 1) 40mlで溶出した。溶出液を65℃の水浴上で減圧下濃縮乾固した後、残渣にアセトニトリル：水 (3 : 7) 1mlを加えて超音波に約5秒間かけ、0.5μmのメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試験溶液とした。

5. HPLC測定条件

カラム：Inertsil ODS-2 (5μm) 150×4.6mm i.d.

ガードカラム：Inertsil ODS-2 (5μm) 10×4.0

千葉県衛生研究所

(1991年12月20日受理)

mm i. d.

移動相：アセトニトリル：水（3：7）

流速：0.7ml/min

カラム温度：45℃

検出波長：270nm

感度：0.01AUFS

注入量：10 μ l

III 結果及び考察

1. 抽出溶媒の検討

CAP標準溶液（5 μ g/ml）を10%塩化ナトリウム溶液25mlに添加し、クロロホルム、ジクロロメタン、四塩化炭素、酢酸エチル及びジエチルエーテル各々50mlと分配し、CAPの各有機溶媒への移行率を比較したところ、酢酸エチルが81%と最も高く、次いでジエチルエーテル76%、ジクロロメタン57%、クロロホルム38%の順で、四塩化炭素にはCAPの移行が認められなかった。このことから試料からのCAPの抽出溶媒は、酢酸エチルとした。

2. クリーンアップ法の検討

カラムによるクリーンアップ法を検討した。充填剤として塩基性及び中性アルミナ、セップパックC18カートリッジ及びフロリジルについて検討したが、CAPは塩基性及び中性両アルミナ、セップパックC18カートリッジに吸着し、回収率が65%と低いため、比較的回収率の良いフロリジルカラムについてn-ヘキサン-ジエチルエーテル-メタノール系で、以下クリーンアップ法を検討した。

1) 溶出溶媒の検討

鶏肉10gにCAP標準溶液（10 μ g/ml）を1ml添加し、上記4. 試験溶液の調製法の項に従って操作し、抽出液を乾固したものをn-ヘキサン5mlに溶解し、フロリジル3gを充填したカラムに負荷した。

CAPは、n-ヘキサン50ml、n-ヘキサン-ジエチルエーテル（2：8）50mlで溶出せず、ジエチルエーテル50mlで約80%溶出し、ジエチルエーテル-メタノール（9：1）50mlでほぼ100%溶出した。このことからカラムの洗浄をn-ヘキサン-ジエチルエーテル（2：8）で行いCAPのカラムからの溶出は、ジエチルエーテル-メタノール（9：1）で行った。

2) フロリジル量の検討

フロリジル1, 2, 3, 4, 5及び6gをカラムに充填し、フロリジル量について上記1)の条件で検討したところ、フロリジルが2g以下の場合、CAPはカラム

に全量保持されず、全量のCAPを保持するには3g以上必要であったことからフロリジル量を4gとした。

3) CAP溶出量の検討

カラムにフロリジル4gを充填し溶出液量について検討したところ、CAPは溶出液の最初の10ml中に約10%、次の10ml中に約90%溶出したことから溶出液ジエチルエーテル-メタノール（9：1）の量を40mlとした。

4) 水溶性物質の除去

上記フロリジルカラムによるクリーンアップでは、クロマトグラム上に極性物質の夾雑ピークが多く観察されたことから、酢酸エチル抽出液を3%塩化ナトリウム溶液と分配し、水溶性夾雑物質を除いた後、フロリジルカラムに負荷することとした。

3. HPLC条件並びに内部標準物質の検討

HPLCカラムにInertsil ODS-2、移動相はアセトニトリル-水系で分離条件を検討した。

その結果、検出感度、試料からの妨害ピーク等を考慮し、移動相はアセトニトリル-水（3：7）、検出波長270nm、カラム温度45℃とした。

また、内部標準物質としてThiabendazole及び5-Ethyl-tolybarbituric acidを検討したが、前者は、保持時間がCAPより短く、試料によってはクロマトグラム上夾雑ピークと重なる懸念があることから保持時間がCAPより長い後者を内部標準物質とした。

4. 検量線の作製

5-Ethyl-tolybarbituric acidをそれぞれ10 μ g/mlの濃度で含有するCAP標準溶液を0.1~4.0 μ g/mlの範囲で作成し、その10 μ lをHPLCに供し、後者の前者に対するピーク面積比を求め検量線を作成した。その結果、CAPは1~40ngの範囲で直線性を示した。

5. 添加回収実験

牛肉、ブリ及び鶏肉（後肢筋）各5検体それぞれ10gにCAP標準溶液（1 μ g/ml）1ml及び内部標準溶液（10 μ g/ml）1mlを添加し上記4. 試験溶液の調製法に従って操作し回収率を求めたところ、表1に示すように牛肉86.8%、ブリ89.2%及び鶏肉94.4%と良好な結果を得た。また豚肉82.4%（n=1）、鯉86.1%（n=1）、鶏肉（胸筋）95.5%（n=1）の回収率であった。図1にCAPの標準物質、鶏肉（後肢筋、胸筋）、牛肉、豚肉、ブリ及び鯉のクロマトグラムを示した。

Table 1. Recovery of CAP from fortified beef, yellowtail and chicken thigh muscle.

Sample	(μg)		
	beef	yellowtail	chicken
No.1	0.86	0.87	0.95
2	0.88	0.88	0.97
3	0.84	0.85	0.99
4	0.93	0.97	0.95
5	0.83	0.90	0.86
Rec.(%)	86.8	89.4	94.4
SD	0.039	0.046	0.049
CV (%)	4.49	5.14	5.28

(1 μg of CAP was added to 10 g of each tissue)

IV 結論

牛肉、豚肉、鶏肉及び魚肉に残留するCAPを高感度、簡便かつ迅速に定量する方法を検討した。

試料からCAPを酢酸エチルで抽出し、液液分配後、カラム処理を行いHPLCで定量した。添加回収率は、CAP0.1ppm添加で82.4%以上、定量限界値は0.01ppmであった。

なお、この研究は平成2年度厚生科学研究費補助金対称課題（汎用抗生物質の化学的分析法に関する研究）として行った。

参考文献

1) Wiese, B., Martin, K., (1982) : Determination of chloramphenicol and monosuccinate ester in piglet plasma using HPLC, *Chromatographia*, 15, 737-742.

2) Lee, J. J., Rijsbergen, H. B. J., Tjaden, U. R., Bennekon, W. P., (1983) : A liquid chromatographic method for chloramphenicol and its nitro degradation products with deductive amperometric detection at a mercury electrode, *Anal. Chim. Acta.*, 149, 29-38.

3) Johannes, B., Korfer, K. H., Schad, J., Ulbrich, I., (1986) : Bestimmung von chloramphenicol ruckstanden in essbaren gewebe, *Archiv fur Lebensmittel hygiene*, 34, 1-28.

4) Haagsma, N., Schreuder, C., Rensen, R. A., (1986) : Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high performance liquid chromatography, 363, 353-359.

5) Tyczkowska, K., Hedeon, K. M., Aucoin, D. P., Aronson, A. L., (1988) : Simple LC method for determination of chloramphenicol in equine, canine and feline serum, *Journal of Chromatographic Science*, 26, 533-536.

6) Wong, S. H. Y., Cudny, B., Aziz, O., Marzouk, N., Sheehan, S. R., (1988) : Microbore liquid chromatography for pediatric and neonatal therapeutic drug monitoring and toxicology, *Journal of liquid chromatography*, 11, 1143-1158.

7) Ashton, M. (1989) : HPLC determination of chloramphenicol, chloramphenicol mono succinate and chloramphenicol glucuronide in biological matrices, *ibid*, 12, 1719-1732.

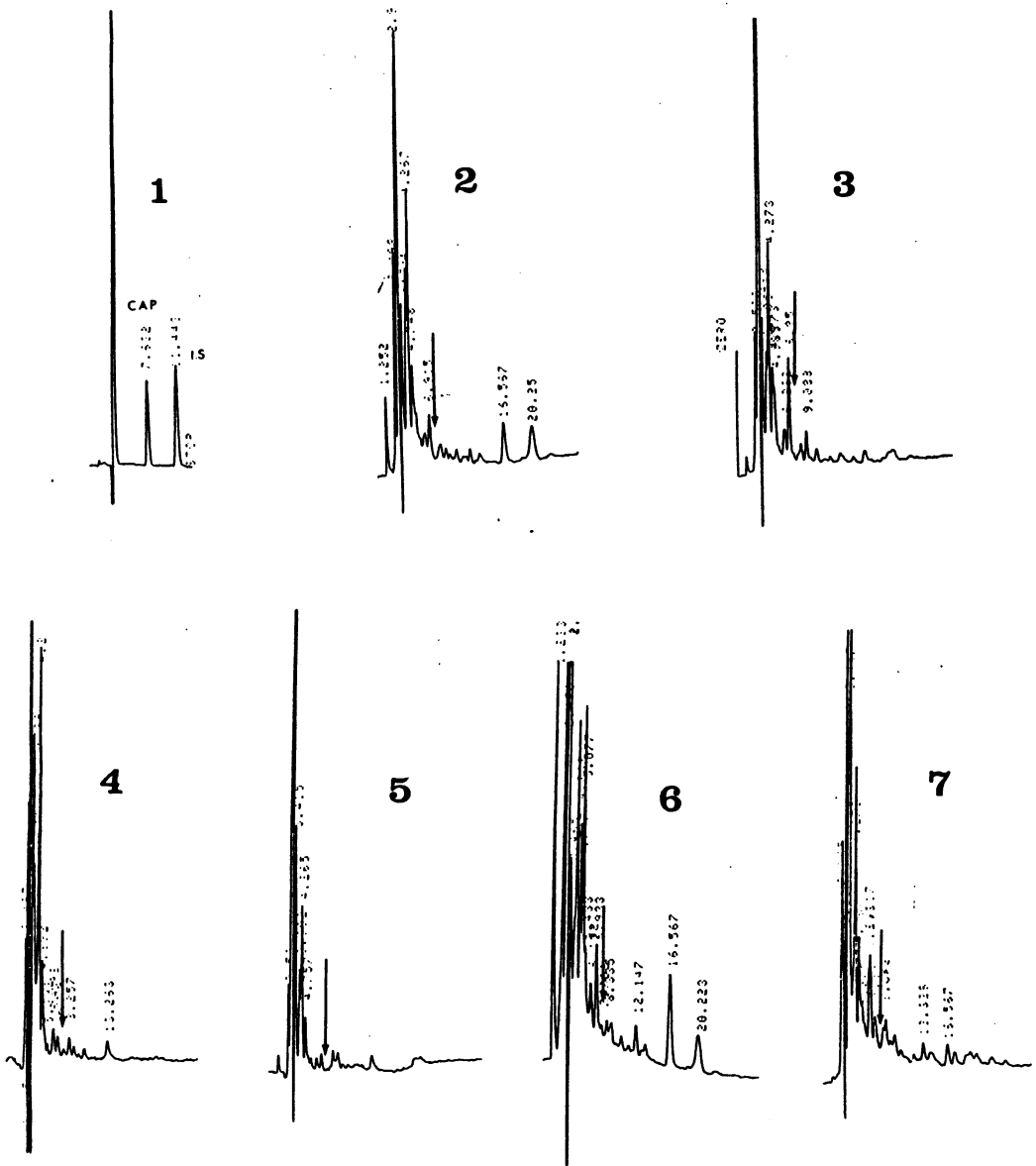


Fig. 1 Chromatograms of CAP standard and tissue extracts

1 : CAP standard (10ng) and IS : internal standard (100ng),
 2 : thigh muscle of chicken, 3 : breast muscle of chicken,
 4 : beef muscle, 5 : swine muscle 6 : yellow tail meat, 7 :
 carp meat