

高速液体クロマトグラフィーによるブリ魚肉中の フロルフェニコールの分析

永田 知子¹⁾, 佐伯 政信¹⁾, 岡 尚男²⁾, 中沢 裕之³⁾

Determination of Residual Florfenicol in Yellowtail by High Performance Liquid Chromatography

Tomoko NAGATA, Masanobu SAEKI, Hisao OKA
and Hiroyuki NAKAZAWA

I はじめに

フロルフェニコール, 2, 2-ジクロロ-N-[(α S, β R)- α -(フルオロメチル)- β -ヒドロキシ-P-(メチルスルフォニル)-フェネチル]アセタミド (図1) は, グラム陽性菌, グラム陰性菌等によってブリに引き起こされる種々の疾病に, 動物用医薬品として近年使用が認められたが¹⁾, その分析法については報告がなされていない。

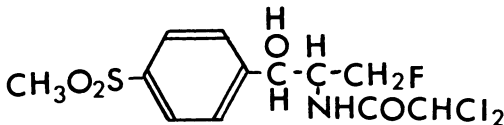


Figure 1. Chemical Structure of Florfenicol

今回, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてブリ魚肉中に残留するフロルフェニコールの簡便かつ高感度な分析法を確立したので報告する。

II 実験方法

1. 試料

市販のブリ魚肉を用いた。

2. 試薬及び標準品

酢酸エチル, n-ヘキサン, エチルエーテル, メタノール,

アセトニトリル及び塩化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)

Sep pakフロリジルカートリッジ: Waters社製, カートリッジは, あらかじめn-ヘキサン及びエチルエーテル各5mlずつで洗浄して使用した。

標準品: フロルフェニコール (武田薬品工業(株)の供与品) 標準品は, メタノールに適宜溶解して使用した。

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-P U型

UV検出器: 日本分光(株)製 875-U V型

インテグレーター: (株)島津製作所製 CR-6 A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. 試験溶液の調整法

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, 酢酸エチル40mlで同様に操作し, 上澄液を合わせ, 65°Cの水浴上で減圧下濃縮し2~3mlとした。

残渣に3%塩化ナトリウム溶液30mlを加え, 分液ロートに移し, n-ヘキサン30mlを加え, 2, 3回分液ロートを転倒した。静置して2層が分離した後, 下層を採り, 再度n-ヘキサン30mlを加え5分間激しく振とうした。静置して2層が分離した後, 下層を別の分液ロートに移し, 酢酸エチル30mlで2回抽出した。

得られた酢酸エチル抽出液を合わせ, 65°Cの水浴上で減圧下濃縮乾固し, 得られた残渣に, n-ヘキサン5mlを加え超音波で溶解した後, Sep pakフロリジルカートリッジに注入した。次いで, n-ヘキサン5ml, エチルエーテル5mlで順次先の容器を洗浄しながらSep pakフロリジカルカートリッジに注入し, カートリッジを洗浄した。次いでエチルエーテル-メタノール (7:3)

1) 千葉県衛生研究所

2) 愛知県衛生研究所

3) 国立公衆衛生院

(1992年12月20日受理)

5 mlで溶出した(以上の流速は2~3 ml/min)。溶出液を65°C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(15:85) 1 mlを加えて超音波で溶解し、0.5 μm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: Chromatorex ODS (5 μm) 150 x 4.6 mm i.d.
移動相: アセトニトリル-水 (15:85)

流速: 1.0 ml/min

カラム温度: 55°C

検出波長: 225 nm

感度: 0.01 AUFS

注入量: 10 μl

III 結果及び考察

1. 抽出溶媒の検討

フロルフェニコールの標準溶液(5 μg/ml) 1 mlを10%塩化ナトリウム溶液25 ml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、エチルエーテル及び石油エーテル各々50 mlと分配し、フロルフェニコールの各有機溶媒への移行率を比較したところフロルフェニコールの移行率は、酢酸エチル92%、ジクロロメタン83%、クロロホルム64%、エチルエーテル59%、石油エーテル6%、四塩化炭素0%であった。このことから、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

1) 液液分配によるクリーンアップ

試料の酢酸エチル抽出液は脂質を多く含んでいることから、抽出液を濃縮し得られた油状の残渣を3%塩化ナトリウム溶液に溶解した後、n-ヘキサンと分配して脂質を除去した。

また、クロマトグラム上の極性物質による夾雑ピークを除去するため、n-ヘキサンで脱脂後、3%塩化ナトリウム溶液と酢酸エチルを液液分配し、フロルフェニコールを酢酸エチルで抽出し、水溶性夾雑物質を除いた後、カートリッジによるクリーンアップを行った。

2) 固液抽出によるクリーンアップ

充填剤として塩基性及び中性アルミナ、エキストレルートカラム、Sep pakフロリジルカートリッジについて検討したが、両アルミナ及びエキストレルートカラムで処理した試験溶液は、クロマトグラム上夾雑ピークが多く見られたため、比較的回収率が良くかつクリーンアップ効果のみられたフロリジルカートリッジについてn-ヘキサン-エチルエーテル-メタノール系で、以下に示

したごとくにクリーンアップ法を検討した。

ブリ魚肉10 gにフロルフェニコール標準溶液(10 μg/ml) 1 ml添加し、上記4. 試験溶液の調整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5 mlに溶解し、Sep pakフロリジルカートリッジに注入した。

フロルフェニコールは、n-ヘキサン5 ml、エチルエーテル5 mlで溶出せず、エチルエーテル-メタノール(7:3) 5 ml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、次いでエチルエーテル5 mlで行い、カートリッジからの溶出は、エチルエーテル-メタノール(7:3) 5 mlで行った。

3. HPLC条件の検討

HPLCカラムにChromatorex ODS、移動相はアセトニトリル-水系で分離条件を検討した。フロルフェニコールは図2に示すように紫外、可視部に極大吸収波長が観察されなかった。

このことから、検出感度、試料からの妨害ピーク等を考慮し、移動相、アセトニトリル-水(15:85)、カラム温度、55°C、検出波長は225 nmに設定した。

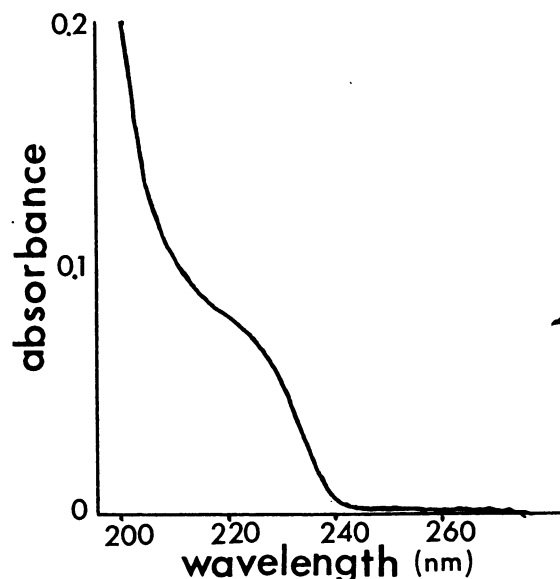


Figure 2. Absorption Spectrum of Florfenicol

4. 検量線の作成

フロルフェニコールの標準溶液を0.1~3.0 μg/mlの範囲で作成し、その10 μlをHPLCに供し、ピーク面積を求め検量線を作成した。その結果、フロルフェニコールは、1~30 ngの範囲で直線性を示した。

5. 添加回収実験

試料10gにフロルフェニコール標準溶液(1μg/ml) 1mlを添加し上記4. 試験溶液の調製法に従って操作し添加回収実験を行ったところ、表1に示すように1ppm及び0.5ppm添加で回収率78.1%及び72.9%と良好な結果を得た。

図3に標準物質、並びにブリのクロマトグラムを示した。ブリに使用される可能性のある薬剤、スルファメラジン、スルファモノメトキシシ、スルファジメトキシシ、フラゾリドン、オキシリン酸、ナリジクス酸及びピロミド酸等のクロマトグラム上の定量妨害は認められなかった。

Table 1. Recovery Study of Florfenicol from Fortified Yellowtails

Added (μg)	Found (μg)	Rec., (%)	Added (μg)	Found (μg)	Rec., (%)
0.5	0.33	66.0	1.0	0.78	78.0
	0.38	76.0		0.80	80.0
	0.39	78.0		0.77	77.0
	0.35	70.0		0.81	81.0
	0.37	74.0		0.74	74.0
Mean	0.729	72.9		0.781	78.1
SD	0.042			0.027	
CV(%)	5.8			3.5	

IV 結論

ブリ魚肉中に残留する恐れのあるフロルフェニコールを高感度、簡便かつ迅速に定量する方法を検討した。

試料から薬剤を酢酸エチルで抽出し、抽出液を乾固後、残渣を3%塩化ナトリウム溶液に溶解し、n-ヘキサンで脱脂後、酢酸エチルで抽出した。次いでSep pak フロリジルカートリッジでクリーンアップを行った後、HPLCで定量した。添加回収率は、フロルフェニコール0.1ppm添加で74%以上であった。また、定量限界値は0.01ppmであった。

謝辞

この研究を行うのに当たり標準物質を供与頂きました武田薬品工業(株)の小林恒夫氏に深謝致します。

また、本研究は平成3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)により行った。

文献

- 1) 日本動物薬事協会編：動物医薬品用具要覧 p206 (1991) 日本動物薬事協会(株)

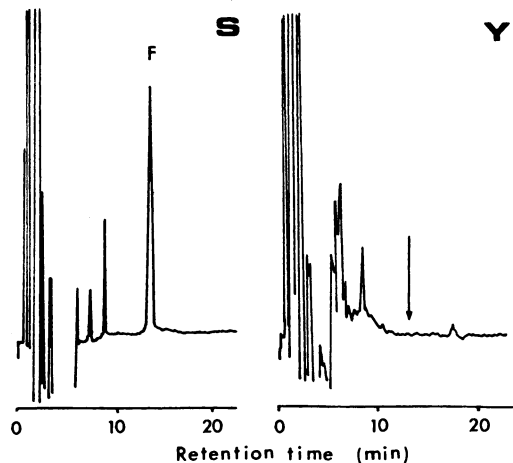


Figure 3. Liquid Chromatograms of Standard and Muscle Extracts

S : Florfenicol standard (F : 10ng)
Y : yellowtail muscle extracts