

高速液体クロマトグラフィーによる牛・豚・鶏の 腎臓中のチアンフェニコールの分析

木内佳伸¹・藤本 喬¹

Analytical Method of Residual Thiamphenicol in Kidney of Cattle, Swine and Chicken by High Performance Liquid Chromatography

Yoshinobu KIUCHI and Takashi FUJIMOTO

A high performance liquid chromatographic method (HPLC) was developed for the determination of residual thiamphenicol (TP) in animal tissues. TP was extracted with acetonitrile from the homogenized sample and transferred to ethyl acetate and then evaporated to dryness. The residue was dissolved with acetonitrile and washed with n-hexane to remove fat and then evaporated to dryness. The residue was dissolved with chloroform and cleaned up by silicagel column chromatography. TP was eluted with 3% methanol-chloroform and detected at 230nm. HPLC conditions were as follows: analytical column, wakosil II 5C18 AR (4.6 × 250 mm); mobile phase, acetonitrile-water-5% citric acid-ethanol mixture (75 : 25 : 3 : 1 v/v%).

The mean recovery levels of TP were more than 82.1% when TP was added to each kidney at the levels of 0.05, 0.1 and 0.5ppm. The detection limit of TP in this analytical procedure was 0.03ppm in the test samples. This method was considered to be suitable for the residue analysis of TP in kidney of cattle, swine and chicken.

Key words: チアンフェニコール thiamphenicol, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, シリカゲルカラム silicagel column, 牛腎臓 kidney of cattle, 豚腎臓 kidney of swine, 鶏腎臓 kidney of chicken

I はじめに

近年、輸入畜水産物の増加にともない、食品の安全性への関心が高まり残留抗菌性物質の検査の重要性が増している。当試験所においては、従来から残留抗菌性物質の検査を実施し、また、平成2年度より「畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査」に参加している。

このモニタリング検査実施要領^{1),2)}に基づき腎臓中のチアンフェニコール (TP) の分析を行ったところ妨害

ピークが多く測定が困難な検体が多くみられた。

TPの分析法としては、すでにフロリジルカラムを用いる方法^{3),5)}や、シリカゲルカラムを用いる方法⁶⁾が報告されている。

今回、著者らは、シリカゲルカラムを用い、腎臓における前処理方法及びHPLC測定条件を検討し、腎臓中の残留TPの測定を行ったところ良好な結果を得たので報告する。

II 実験方法

1. 試料

福岡市食肉市場で屠剥解体された牛と豚の腎臓各15件、および福岡市内の食鳥処理業者で解体処理された鶏の腎臓9件の計39件を用いた。

2. 試薬および標準品

- ・チアンフェニコル (TP) : エーザイ(株)製
- ・クエン酸 : 和光純薬工業(株)製、アミノ酸自動分析用クエン酸一水和物

Table 1. HPLC Conditions for Determinations of Thiamphenicol

Column : Wakosil-II 5 C18 AR 4.6 mm × 250 mm
Mobile phase : CH ₃ CN : H ₂ O : 5% Citric Acid : C ₂ H ₅ OH (75 : 25 : 3 : 1 V/V%)
Flow rate : 0.5 ml/min
Column temp. : Ambient
Detector : 230 nm
Sensitivity : 0.01 AUFS
Sample size : 10 μl
Chart speed : 20 cm/min

・シリカゲル : 和光純薬工業(株)製、ワコーゲルC-200を130℃、一晚(15時間)活性化し、シリカゲルデシケーターで放冷後を用いた。

・TP標準溶液 : TP 10 mgをメタノール 100 mlに溶解し、標準原液(100 μg/ml)とした後、適宜アセトニトリル-水(25 : 75)の混液で希釈して用いた。

・シリカゲルカラム : 活性化したシリカゲル 3 gを内径10 mmのガラスカラム管にクロロホルムを用いて湿式充填し無水硫酸ナトリウム 1 gを積層した。さらにクロロホルム 100 mlで洗浄後使用した。

・その他の試薬は、残留農薬分析用またはHPLC用を用いた。

3. 装置

調理用電動カッター : 松下電器産業(株)製、MK-K3型

振とう機 : イワキ産業(株)製、V-DX型

ロータリーエバポレーター : 東京理科器械(株)製、N-4型

高速液体クロマトグラフ

ポンプ : 島津製作所(株)製、LC-3A

検出器 : 島津製作所(株)製、SPD-6A

インジェクター : RHEODYNE 7125

4. HPLC条件

測定条件はTable-1に示した。

5. 試験溶液の調整

調理用電動カッターで細切した試料 50 gにアセトニトリル 100 mlを加え振とう後、一晚放置し、上澄み液をNo.5 Cの口紙を用いて口過した。さらにアセトニトリル 40 mlで2回抽出し、先の口液と合わせ 200 mlとし抽出液とした。

抽出液 40 ml(試料 10 g相当)に3%塩化ナトリウム水溶液 150 ml、酢酸エチル 150 mlを加え10分間振とう後、酢酸エチル層を分取した。再度、酢酸エチル 100 mlを加え同様に操作し、分取した酢酸エチル層を合わせエタノール 20 mlを加えロータリーエバポレーターで減圧下乾固した。

残留物をアセトニトリル 40 mlに溶解し、アセトニトリルで飽和したn-ヘキサン 15 mlを加え10分間振とう後、遠心分離(1000 rpm、5 min)し、上層のn-ヘキサンを除去した。再度n-ヘキサン 10 mlで同様に操作した後、アセトニトリル層をロータリーエバポレーターで減圧下乾固した。残留物をクロロホルム 3 mlに溶解しシリカゲルカラムに負荷した。クロロホルム 100 mlでカラムを洗浄後3%メタノール含有クロロホルム溶液 50 mlを加え、その溶出液の25~50 mlの分画を採りロータリーエバポレーターで減圧下乾固した。残留物にアセトニトリル-水(25 : 75)の混液 1 mlを加えて溶解し、HPLC用試験溶液とした。

6. 検量線の作成

TP標準溶液を用いて0.3~5.0 μg/ml溶液を調整し、その10 μlをHPLCに注入した。検量線はTPのピーク高により作成した。

III. 結果及び考察

1. 前処理方法の検討

1) 抽出溶媒の選択及び液-液分配による精製についてTPの抽出溶媒の選択に際して、その溶解性⁷⁾からみてアセトニトリル、メタノール、酢酸エチル、アセトン等が適しているが今回アセトニトリル及びメタノールについて比較検討した。それぞれの抽出液をHPLCに供したところアセトニトリルの方がメタノールに比べ夾雑ピークが少なかったためアセトニトリルを抽出溶媒として用いた。

腎臓はその生体における機能からか筋肉部に比べ水溶性の夾雑物が多く含まれている。そこでこれら夾雑物を除去するためアセトニトリル抽出液に3%塩化ナトリウムと酢酸エチルを加え液-液分配を行いTPを酢酸エチルに転溶した。続いて酢酸エチル層を減圧下乾固し残留物をアセトニトリルに溶解した。そしてn-ヘキサンに

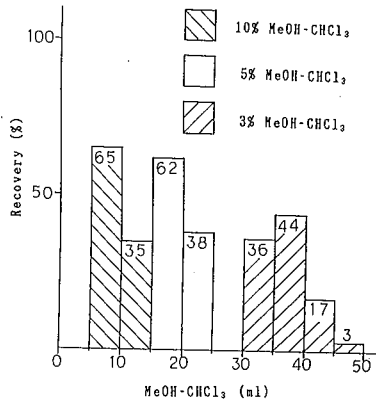


Fig. 1. Elution pattern of thiamphenicol from silicagel column with MeOH-CHCl₃.
Added thiamphenicol: 5 μg

よる脱脂を行った。この脱脂操作は、アセトニトリル抽出液に n-ヘキサンを加え脱脂操作を行うとエマルジョンを形成するため酢酸エチルとの液-液分配後に行った。

2) 前処理カラムの検討

上記、液-液分配による精製を行った液を濃縮後 HPLC に供したところ妨害ピークが多く出現し、TP の測定は困難であった。そこで前処理法としてすでに報告されているフロリジルカラム⁴⁾とシリカゲルカラム⁶⁾について比較検討した。

腎臓のアセトニトリル抽出液を先に述べた試験溶液の調整法に従って 3% 塩化ナトリウム、酢酸エチルとの液-液分配、n-ヘキサンによる脱脂操作を行い大塚ら⁴⁾の示したフロリジルカラムによる精製を行った。n-ヘキサン 50 ml、エチルエーテル 50 ml による洗浄を行った後、アセトン 50 ml で TP を溶出した。しかし、クロマトグラム上 TP の保持時間付近に妨害ピークが多く現れ測定は困難であった。フロリジルカラムからの良い溶出条件が見いだせなかったためシリカゲルカラムによる腎臓抽出液の妨害物質の除去法を検討した。シリカゲルカラムに保持された TP はクロロホルム 100 ml では溶出されなかったがメタノール含有クロロホルムで溶出された。そこでメタノールの比率を 10%、5%、3% とし TP の溶出パターンをみた。(Fig. -1) TP 5 μg をカラムに負荷し、クロロホルム 100 ml で洗浄後、各比率のメタノール含有クロロホルムで溶出した。10% メタノール含有クロロホルムでは 5~15 ml の分画に、5% メタノール含有クロロホルムでは 15~25 ml の分画に、3% メタノール含有クロロホルムでは 30~50 ml の分画に溶出された。次に腎臓抽出液を用いて HPLC クロマトグ

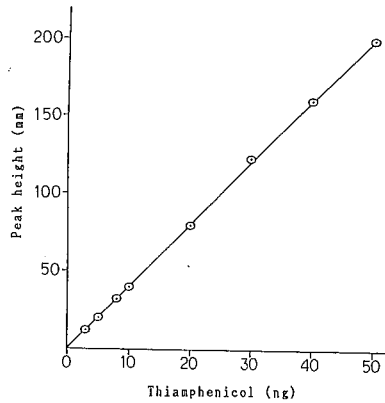


Fig. 2. Calibration curve of thiamphenicol

ラム上妨害となるピークの溶出パターンをみたところ 10% 及び 5% メタノール含有クロロホルムでは妨害物と TP の溶出パターンが一部重なってしまい低濃度の測定が困難であった。3% メタノール含有クロロホルムにおいては妨害物が 0~20 ml の分画に溶出され TP との分離が可能となった。そこで腎臓における TP の分析において 3% メタノール含有クロロホルムを用い、TP の分画として 25~50 ml の分画を用いることとした。

なお、シリカゲルカラムにおける TP の溶出パターンは、TP 添加の腎臓抽出液と TP 標準液のみの場合において差はみられなかった。

2. HPLC 測定条件

1) 測定波長

TP を HPLC 移動相に溶解し紫外外部吸収スペクトルを測定したところ TP は 225 nm 付近に極大吸収が認められたが HPLC クロマトグラムにおいてベースラインが安定している 230 nm で測定することとした。

2) HPLC カラム及び移動相の組成について

HPLC カラムとして Unisil Q5C18, TSKgel ODS-80TM, Wakosil II 5C18 AR の 3 メーカーのカラムについて比較した。また、移動相としてメタノール-水系、アセトニトリル-水系さらに酢酸または有機酸 (クエン酸) を添加したものについて比較検討した。

いずれの条件においても TP の分析は可能であったがメタノール-水系の方が TP のピークが若干テーリングみであったのでアセトニトリル-水系を用いることにした。TP は、検出波長が短波長であることから腎臓における夾雑物のピークが多く観察されたが、カラムに Wakosil II 5C18 AR を用いアセトニトリル-水系の移動相に有機酸 (クエン酸) を加え pH を調整することにより TP と夾雑物との分離及びピーク形状において一番

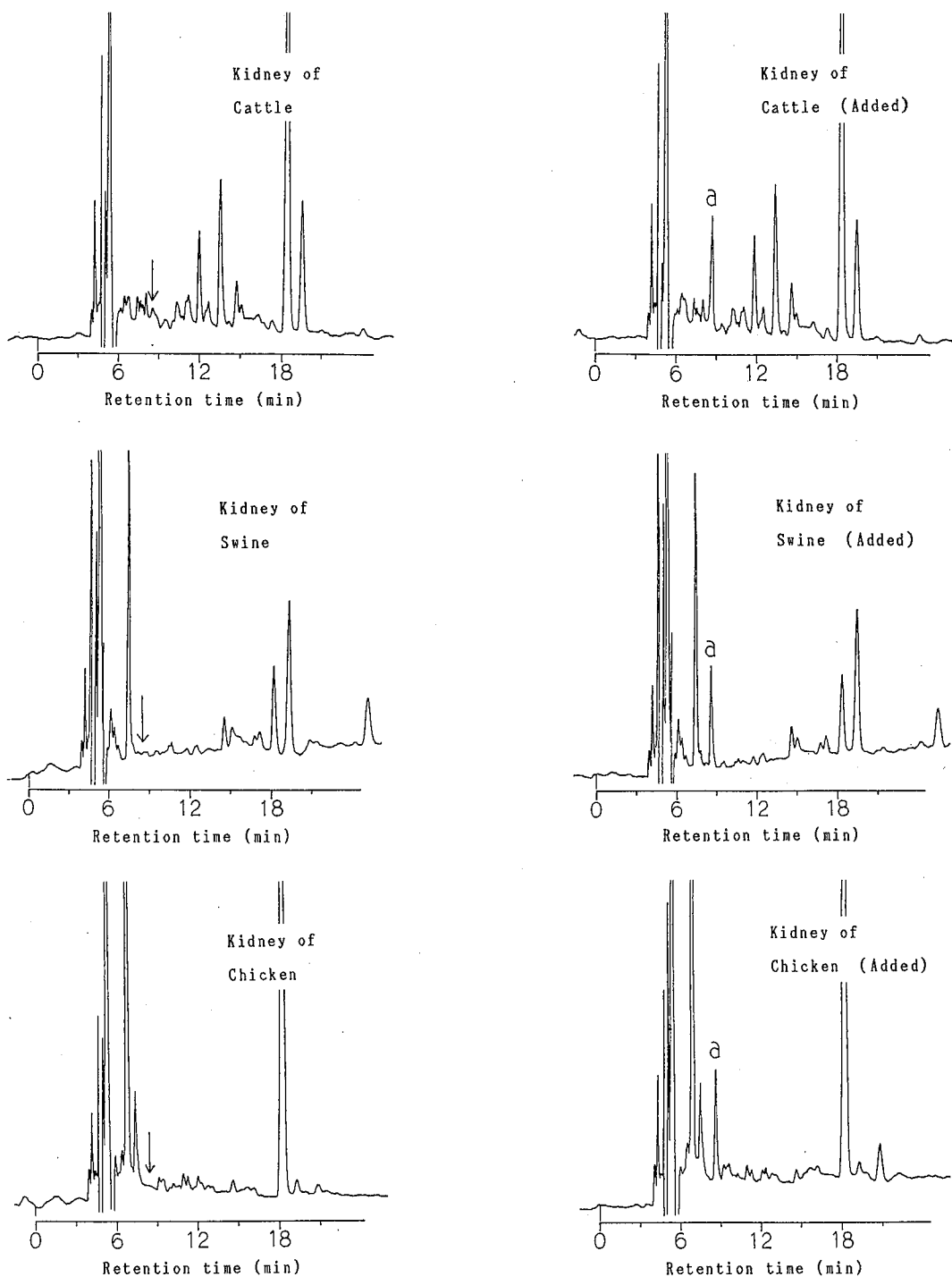


Fig. 3. Liquid chromatograms of thiamphenicol in kidney of cattle, swine and chicken. HPLC conditions were the same as indicated Table 1.

Added: each samples added with $0.5 \mu g$ of thiamphenicol
 a: thiamphenicol

良好なクロマトグラムを得ることができた。

そこで、Table-1 に示したHPLCカラムと移動相を用いることにした。

3. 検量線及び検出限界

実験方法6. に述べた方法に従って検量線を作成した結果、TP 3~50 ngの範囲で原点を通る直線性を示した。(Fig.-2) シリカゲルカラム処理を行うことによって検体(腎臓)において0.03 ppmまで測定が可能となった。

Table 2. Recovery rate of thiamphenicol in kidney of cattle, swine and chicken

Sample	Added (μ g)	Recovery (%)			Average (%)
Kidney of cattle	0.5	84.6	80.8	80.8	82.1
	1.0	88.9	86.7	91.1	88.9
	5.0	89.3	90.0	90.0	89.8
Kidney of swine	0.5	85.7	83.9	87.5	85.7
	1.0	88.9	86.7	90.0	88.5
	5.0	88.3	91.8	90.0	90.0
Kidney of chicken	0.5	87.9	87.9	89.7	88.5
	1.0	91.9	88.7	90.3	90.3
	5.0	92.6	94.8	93.3	93.6

4. 添加回収実験

各腎臓抽出液10 g相当にTPをそれぞれ0.5 μ g、1 μ g及び5 μ g添加後、本法に従って操作し回収率を求めた。その結果をTable-2に示した。また、その時得られたクロマトグラムをFig.-3に示した。平均回収率は82.1~93.6%と良好な結果を得た。

牛、豚の腎臓各15件及び鶏の腎臓9件について本法を適用した結果いずれの検体においても妨害物が除かれ測定が可能となった。

いずれの検体においてもTPは検出されなかった。

今回検討を行った方法は、シリカゲルカラムによりTPと妨害成分とを分離分画することから労力を要するので通常の分析方法としては適していないが、一斉分析等において妨害ピークにより測定困難な検体においては有効な方法であるといえる。また今後は、セップ・バック等のミニカートリッジカラムを用いた簡易分析法について検討していきたいと考える。

IV ま と め

HPLCによる牛、豚、鶏の腎臓中TPの分析を検討

し、次の結果を得た。

1. 試料からアセトニトリルでTPを抽出し、3%塩化ナトリウム-酢酸エチル分配で水溶性夾雑物の除去、さらにn-ヘキサンによる脱脂を行い、シリカゲルカラムによる精製を行うことにより測定が可能となった。
2. シリカゲルカラムによる精製は、クロロホルムによる洗浄を行った後、溶離液を3%メタノール含有クロロホルムに変えTPと妨害成分とを分離分画した。そのTPの溶出分画をHPLCに供した。
3. HPLCのカラムは、Wakosil-II 5C 18 AR (ϕ 4.6 \times 250 mm)、移動相は、アセトニトリル-水-5%クエン酸-エタノール (25:75:3:1 V/V%)を使用した。測定波長は、230 nmであった。
4. 本法による回収率は、0.05、0.1及び0.5 ppm添加で82.1%~93.6%であった。定量限界値は0.03 ppmであった。
5. 牛の腎臓15件、豚の腎臓15件、鶏の腎臓9件の計39件について本法を適用した結果いずれの検体からもTPは検出されなかった。
この報告の一部は、第28回全国衛生化学技術協議会(1991年広島市)において発表した。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：衛乳第105号、平成2年12月21日付、畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査について、別紙検査実施要領
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：衛乳第94号、平成3年10月11日付、畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査について、別紙検査実施要領
- 3) 永田知子、他：高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中のチアンフェニコールの定量、食衛誌、26(1)、46~49、1985
- 4) 大塚公人、他：高速液体クロマトグラフィーによるブリ中のチアンフェニコールの定量、食衛誌、27(3)、263~266、1986
- 5) 財畜産生物科学安全研究所編：動物用医薬品・試料添加物の畜・水産物への残留とその分析法、275~277、近代出版、1985
- 6) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：畜水産食品中の残留物質検査法、202~206、中央法規出版、1990
- 7) 森部昌江、藤本喬：各種抗菌性物質の溶解性と抽出溶媒の選択および検出状況について、福岡市衛生報、10、30~36、1985