

# 高速液体クロマトグラフィーによる鶏卵及び鶏組織中の アンプロリウムとハロフジノンの分析

木内 佳伸<sup>1</sup>・藤本 喬<sup>1</sup>

## Analytical Method of Residual Amprolium and Halofuginone in Chicken Eggs and Tissues by High Performance Liquid Chromatography

Yoshinobu KIUCHI and Takashi FUJIMOTO

A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of residual amprolium (APL) and halofuginone (HF) in chicken eggs and tissues (meat, gizzard, kidney, liver).

APL and HF were extracted with acetonitrile from the homogenized sample and washed with n-hexane (saturated with acetonitrile before use) to remove fat and then evaporated to dryness after added 1-propanol. The residue was dissolved with methanol and cleaned up by alumina column chromatography. APL was eluted with 30% methanol-acetonitrile (Eluent I) and HF was eluted with 85% acetonitrile (Eluent II). Each fraction was detected at UV-250nm by high performance liquid chromatography (HPLC).

HPLC conditions were follows : analytical column ; wakosil II 5C18 AR (250mm×4.6mmi.d.), mobile phase ; acetonitrile-McIlvaine buffer (pH3.4) containing 10 mM sodium 1-dodecylsulfate mixture (4 : 6 v/v).

The recovery of APL in chicken eggs and tissues at the level of 0.05 μg/g was more than 76.1%, in the case of HF, was more than 74.1%. The detection limits of APL and HF in this analytical procedure were 0.02 μg/g and 0.04 μg/g in the test samples, respectively.

**Key Words :** アンプロリウム amprolium, ハロフジノン halofuginone,  
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography,  
アルミナカラム alumina column, 鶏卵 chicken egg, 鶏肉 chicken meat,  
鶏砂ずり chicken gizzard, 鶏腎臓 chicken kidney, 鶏肝臓 chicken liver

### I は じ め に

近年、食鳥の飼育形態は大規模多頭羽飼育となり疾病の予防や成長促進などの目的で抗菌性物質が用いられている。一方これらの抗菌性物質の残留が問題となり食生活の安全性を確保するうえで抗菌性物質の残留検査は重要性を増している。これに伴い平成2年度より有害残留物質の統一国内モニタリング検査の実施、また平成4年度から食鳥肉検査制度が施行されている。

食鳥の飼育においては、特にコクシジウム対策が重要

で従来クロピドール、ナイカルバジン等が使用されてきたが、その残留が指摘され現在ではアンプロリウム (APL) やハロフジノン (HF) が抗コクシジウム剤として繁用されている。

APLの分析法としては、蛍光検出による厚生省法<sup>1)</sup> やHPLC法<sup>2, 3)</sup> が、HFの分析法としては、飼料を対象とした石黒らの方法<sup>4)</sup> や鶏肉を対象としたA.ANDERSON<sup>5)</sup> や山本らの方法<sup>6)</sup> がある。また、山本らは鶏肉におけるAPLとHFの同時分析法として厚生省通知の一斉分析法<sup>7)</sup> を用いたイオン対クロマトグラフィー法<sup>8)</sup> を報告している。しかし、この方法を用い鶏卵や臓器 (腎臓、肝臓等) の分析を行ったところ夾雑物質に対する精

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

製が不十分で鶏肉と同等の定量下限を得ることは困難であった。

そこで、著者らは、鶏卵や臓器におけるAPLとHFの分析法の開発を試みた。前処理においてアルミナカラムによる精製法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料

平成4年2月から平成5年1月にかけて福岡市内流通の鶏卵33件、鶏肉11件、鶏砂ずり5件及び福岡市内の食鳥処理業者で解体処理された鶏腎臓12件、鶏肝臓8件の計69件を用いた。

### 2. 試薬

- ・アンプロリウム (APL) : 大日本製薬(株)製
- ・ハロフジノン (HF) 臭化水素酸塩 : 日本ユクラフ(株)より供与
- ・1-ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) : ジーエルサイエンス(株)イオンペアクロマト用
- ・1-プロパノール : 和光純薬工業(株), 特級
- ・アルミナ : MERCK Alumina 90 塩基性活性度 I (1076)
- ・酢酸緩衝液 : 酢酸アンモニウム 4.85g と酢酸 7.5 ml を水に溶かして 1 l とし, 酢酸を用いて pH 4.3 に調整した。
- ・McIlvaine緩衝液 (pH 3.4) : 0.2 M リン酸二ナトリウム 285 ml と 0.1 M クエン酸 715 ml を合わせ 1 l とした。
- ・5%メタノール-アセトニトリル : メタノール-アセトニトリル (5 : 95)
- ・30%メタノール-アセトニトリル : メタノール-アセトニトリル (30 : 70)
- ・50%アセトニトリル : アセトニトリル-水 (50 : 50)
- ・85%アセトニトリル : アセトニトリル-水 (85 : 15)
- ・APL標準原液 : APL 10 mg を 50%アセトニトリル 100 ml に溶解し, 標準原液 (100  $\mu$ g/ml) とした。
- ・HF標準原液 : HF臭化水素酸塩 10 mg を酢酸緩衝液 100 ml に溶解し, 標準原液 (100  $\mu$ g/ml) とした。
- ・標準溶液 : 各標準原液を適宜 50%アセトニトリルで希釈して用いた。
- ・アルミナカラム : 内径 10 mm のガラスカラム管にアルミナ 5 g を 5%メタノール-アセトニトリルを用い湿式充填し, 5%メタノール-アセトニトリル 80 ml (途中 1 時間放置) で洗浄後使用した。
- ・0.20  $\mu$ m メンブランフィルター : 東洋濾紙(株)製,

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Column : Wakosil-II 5C18 AR 250mm $\times$ 4.6mm i.d.

Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN-McIlvaine buffer (pH 3.4)  
containing 10mM SDS = 4 : 6

Flow rate : 0.8ml/min

Column temp. : 40°C

Detector : UV 250nm

Sensitivity : 0.01AUFS

Sample size : 15  $\mu$ l

DISMIC-13HP

・その他の試薬は、和光純薬工業(株)製の特級または HPLC分析用を用いた。

### 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

分光光度計 : 島津製作所(株)製, UV-240

高速液体クロマトグラフ

ポンプ : 日本分光(株)製, TRI ROTAR

紫外検出器 : 島津製作所(株)製, SPD-6 A

カラム恒温槽 : スガイ化学工業(株)製, U-620PSH

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 n-ヘキサン (アセトニトリル飽和) 30 ml を加え振とうした。静置後、上層の n-ヘキサンを除去し、再度 n-ヘキサン 30 ml を加え同様に操作した。下層のアセトニトリル層を分取し、1-プロパノール 30 ml を加えロータリーエバポレーターにより減圧乾固 (水浴 45~50°C) し、窒素ガスにより完全に溶媒を除去した。残留物にメタノール 1 ml を加え超音波洗浄器中で溶解しアルミナカラムに負荷した。

5%メタノール-アセトニトリル 20 ml (肝臓は 15 ml) でカラムを洗浄後、30%メタノール-アセトニトリル 20 ml で溶出し溶出液 I とした。さらに 85%アセトニトリル 20 ml で溶出し溶出液 II とした。両溶出液は、それぞれエタノールを 10~15 ml 加えロータリーエバ

ポレーターで減圧乾固（水浴 45 ~ 50 °C）し、50 % アセトニトリル 1 ml に溶解した。0.20  $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過後、HPLC 用試験溶液とした。

### 6. 検量線の作成

各標準品の濃度が 0.2, 0.5, 0.8 及び 1  $\mu$ g/ml である混合標準溶液を調整し、その 15  $\mu$ l を HPLC に注入した。得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

## III 結果および考察

### 1. 前処理方法の検討

APL は、アルミナカラムにおいて APL 標準液のみと、試料に添加した場合とで溶出パターンに明かな差がみられたので以下の検討は全て鶏卵からのアセトニトリル抽出液に APL と HF を添加して行った。

#### 1) カラムに負荷するまでの前処理について

試料からの抽出は、厚生省の一斉分析法<sup>7)</sup>と同様のアセトニトリルを用いた。抽出液に n-ヘキサン（アセトニトリル飽和）を加え液-液分配による脂肪の除去を行った。脱脂後のアセトニトリル抽出液をアルミナカラムに負荷するため減圧乾固後、残留物をメタノール 1 ml に溶解しアルミナカラムに負荷した。この減圧乾固の工程で突沸防止のために加える溶媒の種類や量によって回収率に大きな差がみられた。（Table 2）

Table 2. Recovery of added solvent to prevent bumping

Solvent	n	Recovery (%)	
		APL	HF
1-propanol 20ml	8	53~86	59~76
〃 30ml	5	81~90	73~79
〃 50ml	2	46, 51	73, 75
Ethanol 30ml	1	0	74

Extract of chicken egg spiked with APL and HF  
(1  $\mu$ g/10g)

この結果より突沸防止の溶媒として 1-プロパノール 30 ml を加えることとした。

#### 2) アルミナカラムによる精製について

脱脂のみの精製では夾雑物の影響で低濃度の測定が困難であったのでアルミナカラムによる精製法を検討した。

アルミナカラムに吸着された APL と HF はメタノール含有アセトニトリルにより溶出されたが、夾雑物を除去するためメタノールの比率を 5 %, 10 % とし、夾雑物と APL と HF の溶出パターンをみた。夾雑物は両比率とも 0 ~ 10 ml 分画に溶出された。5 % メタノール-アセ

トニトリルでは、APL は 40 ~ 100 ml の分画に 38 % 溶出したが、HF は 0 ~ 100 ml の分画では溶出しなかった。10 % メタノール-アセトニトリルでは、APL が 10 ~ 70 ml 分画に 83 % 溶出され HF は 60 ~ 100 ml 分画に 5 % 溶出された。そこで妨害物の除去として 5 % メタノール-アセトニトリル 20 ml を洗浄操作とした。

洗浄操作後、APL と HF の溶出のためメタノールの比率を 20 %, 30 %, 50 %, 100 % と上げその溶出パターンをみた。（Table 3）

Table 3. Elution profile of Eluent I (APL&HF) from alumina column with MeOH-CH<sub>3</sub>CN

fraction (ml)	Ratio of MeOH in CH <sub>3</sub> CN							
	20%		30%		50%		100%	
	A	H	A	H	A	H	A	H
0~10	47	—	89	10	92	21	89	27
10~20	42	10	3	13	—	10	—	10
20~30	—	7	—	4	—	4	—	4
30~40	—	4	—	3	—	3	—	t
40~50	—	3	—	3	—	t	—	t
50~60	—	t	—	3	—	t	—	t
60~70	—	t	—	t	—	t	—	t
70~100	—	—	—	—	—	—	—	—
total%	89	24	92	36	92	38	89	41

A : amprolium H : halofuginone t : trace  
Extract of chicken egg spiked with APL and HF  
(2  $\mu$ g/10g)

APL は、20 % 及び 30 % メタノール-アセトニトリルにおいて 0 ~ 20 ml 分画に約 90 % 溶出され、また 50 % メタノール-アセトニトリル及び 100 % メタノールにおいては 0 ~ 10 ml の分画に約 90 % 溶出された。一方 HF は、いずれの溶出液においても 25 ~ 41 % と満足のいく回収率が得られなかった。そこで、APL と HF の一部の溶出として 30 % メタノール-アセトニトリル 20 ml を溶出液 I とした。

次にアルミナカラムに残った HF の溶出のため、溶出液の極性を上げアセトニトリル水溶液（95 ~ 80 %）とし HF の溶出パターンをみた。（Table 4）

Table 4. Elution profile of Eluent II (HF) from alumina column with CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O

fraction (ml)	Ratio of CH <sub>3</sub> CN in H <sub>2</sub> O			
	95%	90%	85%	80%
0~10	2	42	58	57
10~20	33	4	3	3
20~30	2	t	—	—
30~40	t	—	—	—
40~50	—	—	—	—
total%	37	46	61	60

t : trace  
Extract of chicken egg spiked with HF (2  $\mu$ g/10g)

HFの溶出は85%及び80%アセトニトリルとも差がなく0~20 ml分画において約60%溶出され溶出液Iと合わせると約80%溶出された。80%アセトニトリルは、85%アセトニトリルに比べクロマトグラム上の夾雑ピークが増えたので85%アセトニトリル20 mlを溶出液IIとした。

### 3) 鶏組織における前処理法

前述の鶏卵試料による前処理法を用い、鶏の肉、砂ずり、腎臓、肝臓の各試料について検討した。

肉、砂ずり、腎臓においては卵と同様な結果が得られたが肝臓ではAPLの回収率が低下した。そこで肝臓におけるアルミナカラムの溶出パターンをみたところ、5%メタノール-アセトニトリルによる洗浄操作においてAPLが15 mlから溶出し始めた。肝臓は、夾雑物の多い検体であるが洗浄操作による夾雑物の除去と回収率を考慮して肝臓におけるアルミナカラムでの洗浄操作を5%メタノール-アセトニトリル15 mlとした。

なお、溶出液IとIIは鶏卵と同様の操作を行った。

## 2. HPLC測定条件

### 1) 測定波長について

APLとHFの紫外外部吸収スペクトルを測定したところAPLは、230 nm及び270 nm付近に、HFは240 nm付近に吸収極大が認められた。本法では、APLとHFを単一波長で測定すること、両物質を同程度の感度で測定すること、またベースラインが安定していることを考慮し2

50 nmで測定することにした。

### 2) 分離用カラム及び移動相について

山本ら<sup>8)</sup>は、分離用カラムにInertsil ODS-2 (250 mm×4.6 mm i.d.), 移動相にアセトニトリル-10 mM SDS含有McIlvaine緩衝液 (pH3.4) = (4 : 6) を用いている。

今回、著者らは、分離用カラムにInertsil ODS-2 と同等のWakosil II 5 C18-AR (250 mm×4.6 mm i.d.) を用い、山本らの示した上記移動相を使用した。APLとHFの分離また他の夾雑ピークとの分離も良好であった。ただ、イオンペア試薬 (SDS) を添加しているからかAPLのピークの高さが安定するまでに約一週間程要した。

## 3. 検量線

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、APLとHFは3~15 ngの範囲で原点を通る直線性を示した。

## 4. 添加回収及び定量限界

各試料10g相当のアセトニトリル抽出液にAPLとHFを0.5 µg, 1 µg, 2 µg添加し、本法に従って操作し回収率を求めた。その結果をTable 5に示した。また、その時得られた標準品及び各検体のクロマトグラムをFig. 1~6に示した。

APLは、76.1%~96.1%の良好な回収率が得られた。

Table 5. Recovery rate of APL and HF from chicken eggs and tissues

Sample	spiked (µg)	R e c o v e r y <sup>a)</sup> (%)		
		A P L	H F	(El.-1 <sup>b)</sup> + El.-2 <sup>c)</sup>
egg	0.5	86.3±2.0	74.7±3.0	(21.7±0.5 + 53.0±3.3)
	1.0	88.0±0.0	76.7±4.1	(22.1±0.6 + 54.6±3.6)
	2.0	92.3±2.0	92.3±2.0	(21.7±0.5 + 61.3±1.2)
meat	0.5	95.8±1.6	77.1±6.6	(9.7±4.0 + 67.4±10.3)
	1.0	95.6±2.6	85.7±2.4	(15.9±2.5 + 69.8±3.0)
	2.0	96.1±1.5	86.3±3.1	(13.2±2.3 + 73.1±4.1)
gizzard	0.5	92.2±3.1	86.1±6.2	(20.0±3.9 + 66.1±6.7)
	1.0	93.4±2.7	85.4±2.4	(19.2±4.0 + 66.2±3.7)
	2.0	94.5±1.7	88.6±3.9	(19.5±3.7 + 69.1±4.9)
kidney	0.5	87.8±1.9	76.6±2.4	(22.3±1.8 + 54.3±0.7)
	1.0	87.0±2.7	81.7±1.4	(23.4±1.0 + 58.3±1.8)
	2.0	89.1±2.8	82.1±1.1	(23.2±1.0 + 58.9±2.0)
liver	0.5	76.1±2.3	74.1±4.1	(24.5±0.9 + 49.6±3.8)
	1.0	84.6±4.9	75.5±5.2	(27.0±5.1 + 48.5±8.0)
	2.0	84.6±1.7	76.6±3.3	(23.0±1.3 + 53.6±2.4)

a) mean±S.D. for 3 samples

b) El.-1: Eluent I from alumina column

c) El.-2: Eluent II from alumina column

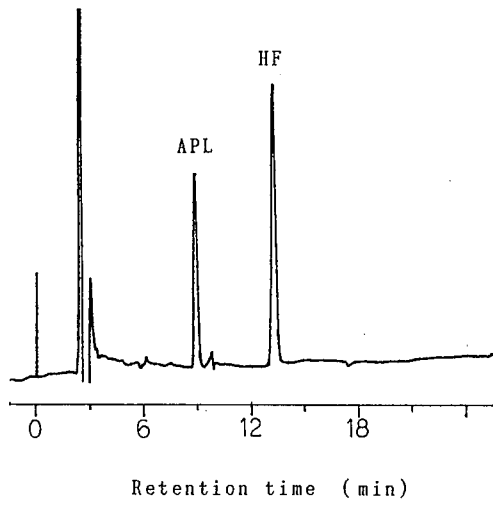


Fig. 1. HPLC chromatogram of APL and HF standard spiked with 7.5ng each of APL and HF

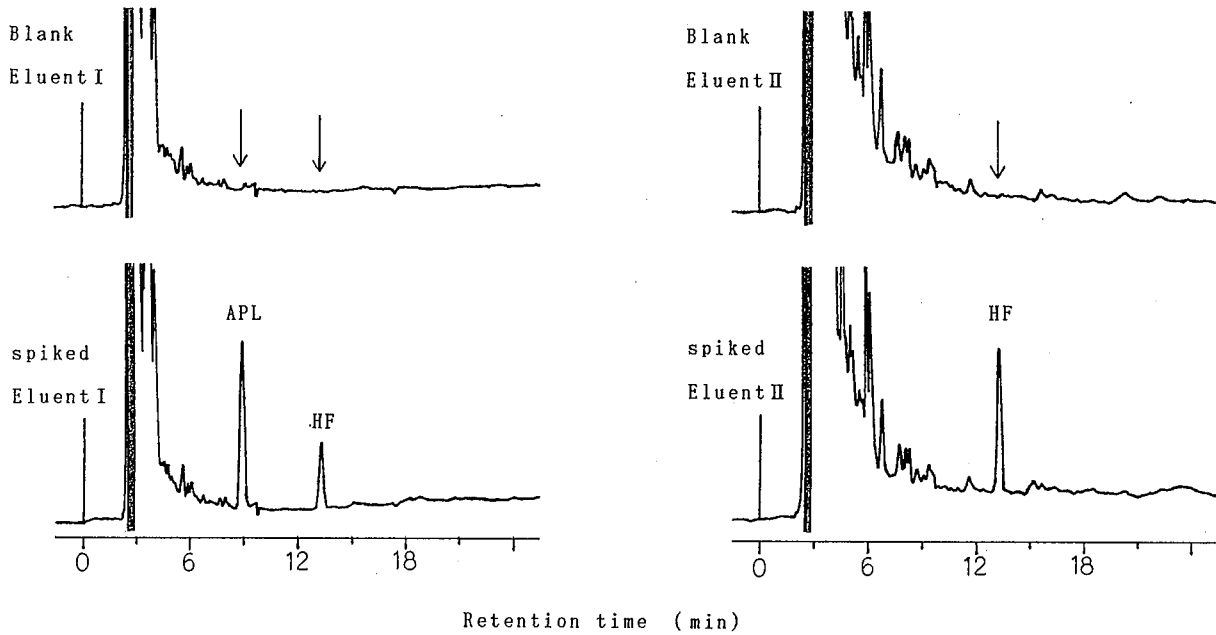


Fig. 2. HPLC chromatograms of chicken egg extracts blank and spiked with APL and HF ( $0.5\mu\text{g}/10\text{g}$ )

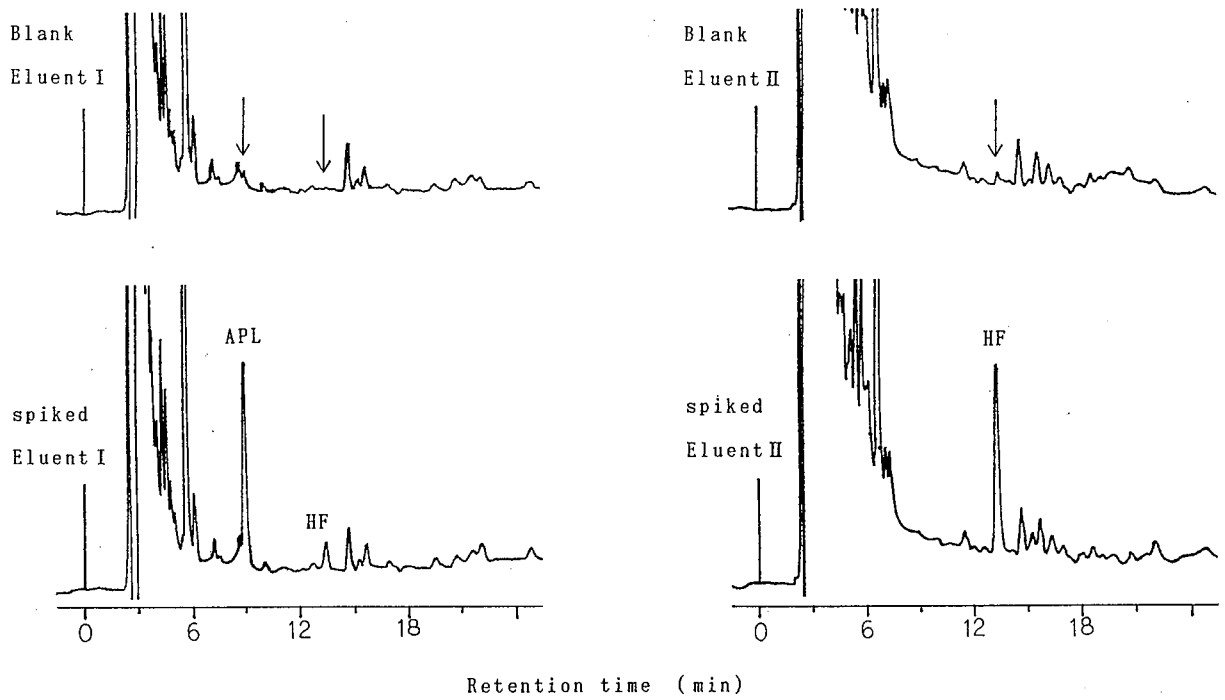


Fig. 3. HPLC chromatograms of chicken meat extracts  
blank and spiked with APL and HF ( $0.5\mu\text{g}/10\text{g}$ )

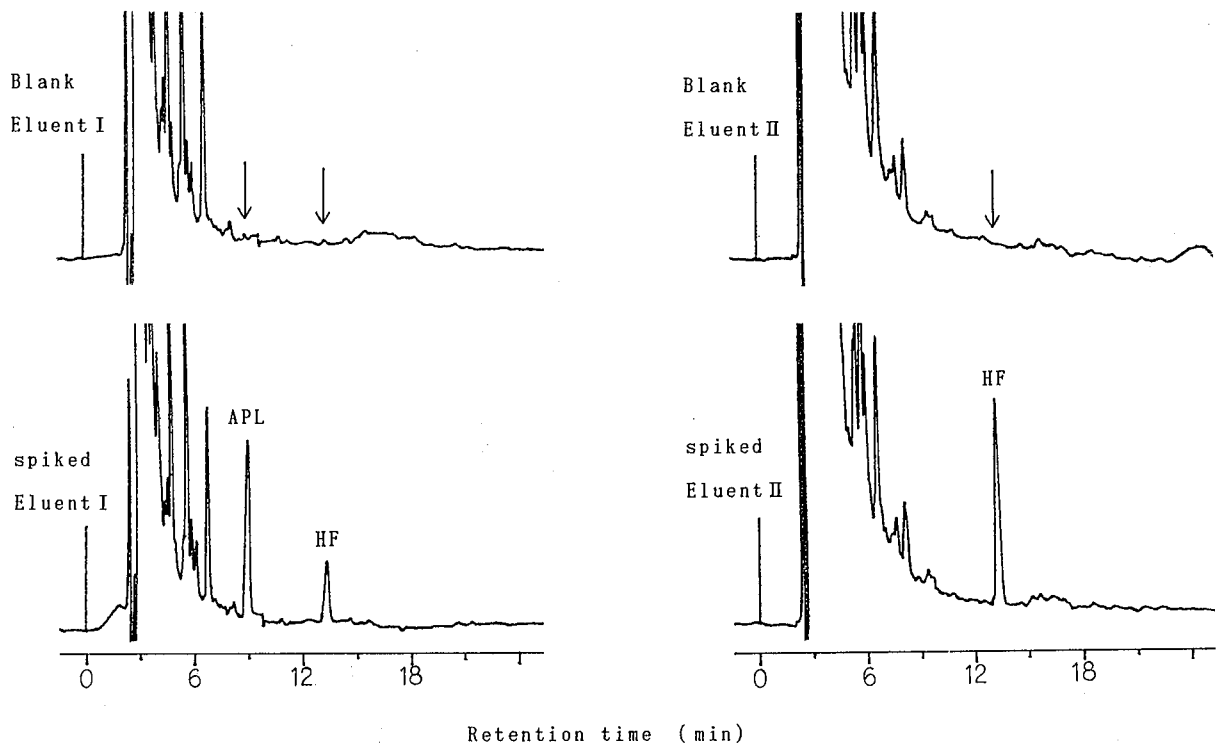


Fig. 4. HPLC chromatograms of chicken gizzard extracts  
blank and spiked with APL and HF ( $0.5\mu\text{g}/10\text{g}$ )

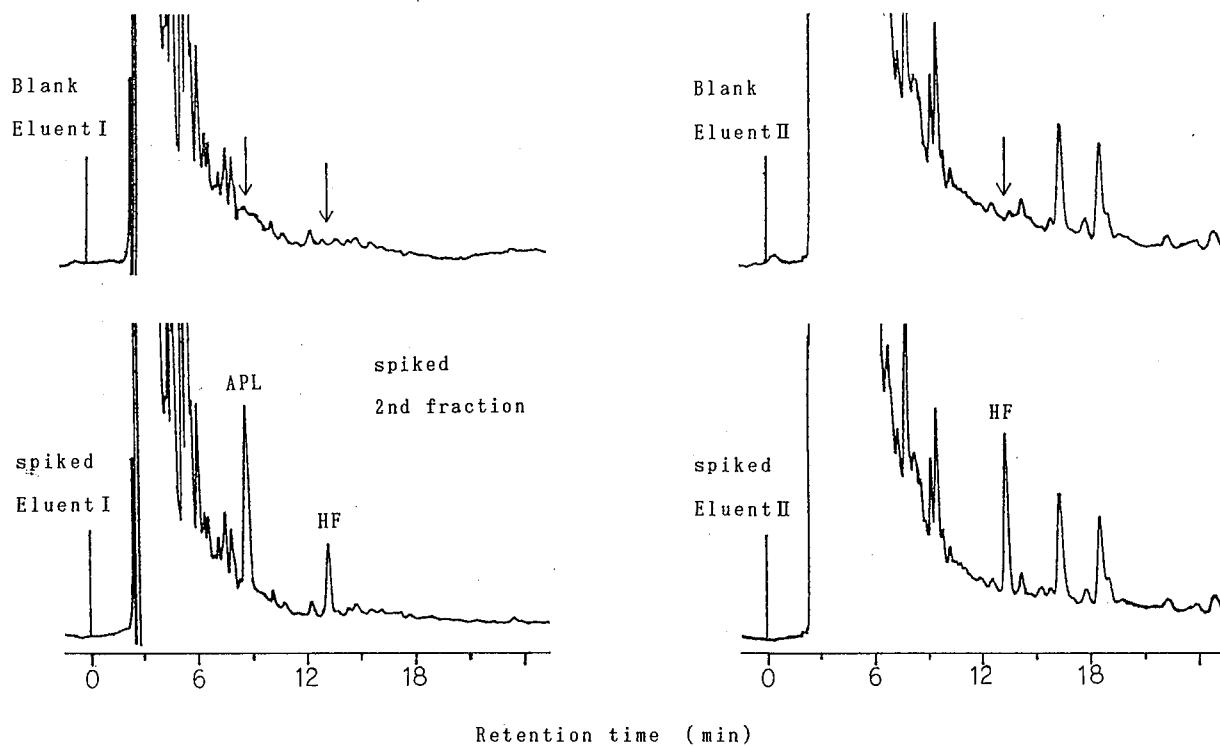


Fig. 5. HPLC chromatograms of chicken kidney extracts blank and spiked with of APL and HF ( $0.5\mu\text{g}/10\text{g}$ )

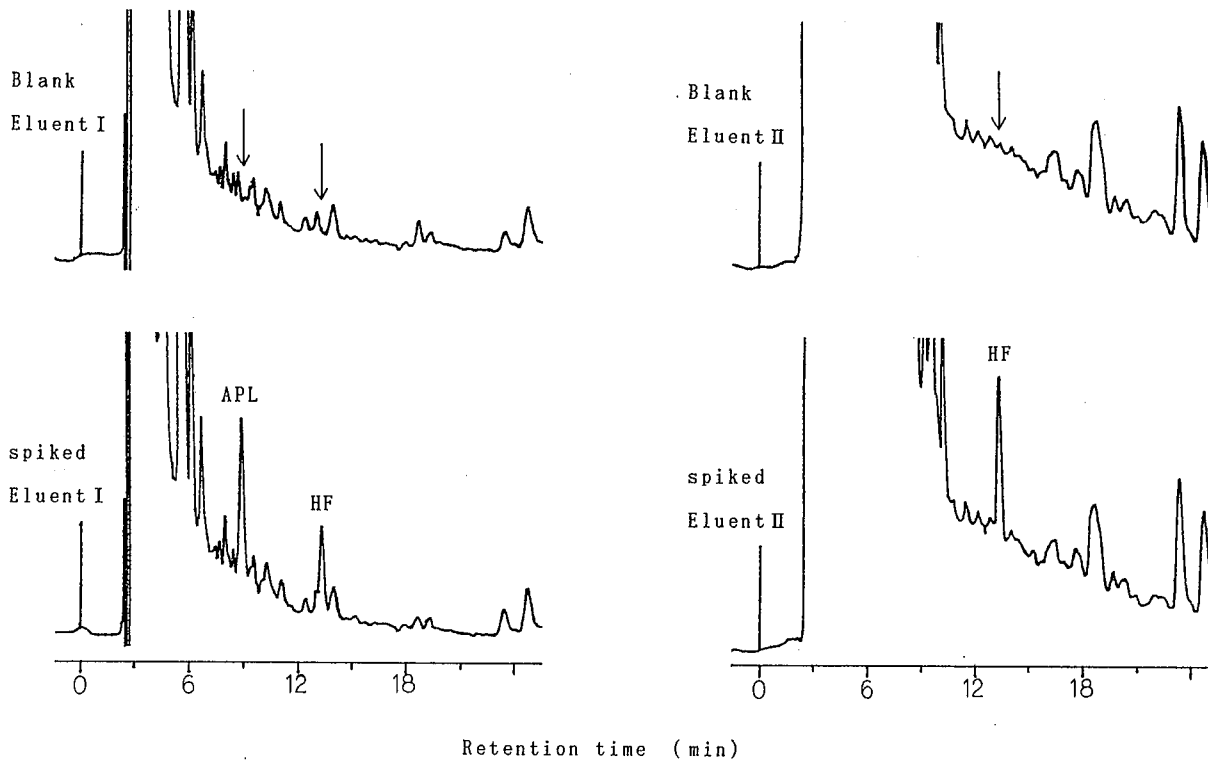


Fig. 6. HPLC chromatograms of chicken liver extracts blank and spiked with APL and HF ( $0.5\mu\text{g}/10\text{g}$ )

HFは、アルミナカラム処理において溶出液ⅠとⅡにそれぞれ溶出され、溶出液Ⅰが9.7%～27.0%、溶出液Ⅱが48.5%～73.1%でその合計での回収率は74.1%～92.3%であった。溶出液ⅠとⅡ、それぞれの回収率は検体の種類によって差がみられた。これはアルミナカラムにおける各種検体のマトリックスが影響していると考えられた。

本法における定量下限は、APLが0.02 ppmであった。HFはアルミナカラムにおいて主に溶出される溶出液Ⅱの画分のみを考えた場合0.04 ppmであった。

本法を用い実験方法1. 試料に示した鶏の卵、肉、砂ずり、腎臓、肝臓の計69検体についてAPLとHFの分析を行ったが、いずれも検出されなかった。

本法は、アルミナカラムによりAPL及びHFを夾雑物質と分離分画する方法で簡便性にやや欠ける面があるが夾雑物質の多い鶏の卵や臓器(腎臓、肝臓)においても鶏肉と同レベルの定量下限が得られることから有効な方法であるといえる。

APLとHFは鶏の抗コクシジウム剤として使用されている薬剤であるが厚生省の一斉分析法<sup>7)</sup>の分析対象薬剤ではない。広範囲の合成抗菌剤を分析するうえで、一斉分析法の分析対象外の薬剤の分析をまとめていくことは業務の効率化をはかるうえで重要だと考える。

#### IV ま と め

HPLCによる鶏卵及び鶏組織(肉、砂ずり、腎臓、肝臓)中のAPLとHFの分析法を検討し、次の結果を得た。

1. 試料からアセトニトリルでAPLとHFを抽出し、n-ヘキサンによる脱脂を行った後、1-プロパノールを加え減圧乾固した。残留物をメタノールに溶解しアルミナカラムによる精製を行った。
2. アルミナカラムによる精製は、5%メタノール-アセトニトリルで夾雑物を除去した後、30%メタノール-アセトニトリルでAPLを溶出し、さらに85%アセトニトリルでHFを溶出した。
3. HPLCカラムは、Wakosil II 5 C18-AR (250 mm × 4.6 mm i.d.)、移動相は、アセトニトリル-10 mM SDS含有McIlvaine緩衝液(pH 3.4) = (4 : 6)を用いた。測定波長は、UV-250 nmであった。
4. 本法による回収率は、0.05、0.1及び0.2 ppm添加

でAPLが76.1～96.1%、HFが74.1%～92.3%であった。

定量限界値は、APLが0.02 ppm、HFが0.04 ppmであった。

5. 鶏の卵、肉、砂ずり、腎臓、肝臓について本法を適用した結果いずれの検体からもAPL及びHFは検出されなかった。

この報告の要旨は、第30回全国衛生化学技術協議会年会(1993年 熊本市)において発表した。

#### 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：畜水産食品中の残留物質検査法，136～139，中央法規出版（東京），1990
- 2) 山口敏幸，他：高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉及び鶏卵中のアンプロリウムの定量，食衛誌，25(6)，499～504，1984
- 3) T. NAGATA, et al : Liquid Chromatographic Determination of Amprolium in Chicken Tissues, Using Post-Column Reaction and Fluorometric Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69(6), 941～943, 1986
- 4) 石黒瑛一，他：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの定量法（第1報），飼料研究報告，12，69～78，1987
- 5) A. ANDERSON, et al : Analysis of The Anti-Coccidial Drug, Halofuginone, in Chicken Tissue and Chicken Feed Using High-Performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 212, 347～355, 1981
- 6) 山本雄三，他：高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中ハロフジノンの簡易定量法，食衛誌，32(5)，444～447，1991
- 7) 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
- 8) 山本雄三，他：畜水産物中の残留合成抗菌剤の分析法の検討（第1報），宮崎衛環研年報，2，65～69，1990