衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
18 (2) 56-60 (1972)

食品中クロラムフェニコールの薄層クロマトグラフィーによる検出

竹下 隆三^{1a)}, 山下多恵子^{1b)}国立公衆衛生院,^{1a)} 関東学院女子短大^{1b)}

Detection of Chloramphenicol in Foods by Thin-Layer Chromatography

RYUZO TAKESHITA^{1a)} and TAEKO YAMASHITA^{1b)}Department of Public Health Pharmaceutics, The Institute of
Public Health^{1a)} and Kanto Gakuin Women's Junior College^{1b)}

(Received September 27, 1971)

A method was investigated for detection of chloramphenicol in foods by thin-layer chromatography. This method is composed of the following steps: Initial extraction of chloramphenicol from foods into suitable solvents, isolation of the compound from other interfering materials by alumina cleanup, and detection of chloramphenicol by thin-layer chromatography using silica gel. When the method was applied to milk, egg, and chicken to which the antibiotic had been added at levels of 0.1–1.0 ppm, the detection limits were 0.2, 1.0, and 0.5 ppm, respectively. It was moreover found that chlorinated pesticide residues in foods did not interfere with this detection.

緒 言

クロラムフェニコール (以下 CP と略す) は家畜の種々の疾病治療のために、直接投与されたり、疾病予防のために飼料に添加されるなどの利用が行なわれ、このことから CP が食品に残留する可能性がある。CP が食品中に残留することは、直接人に影響を与えるほか、R 因子伝達による耐性菌の拡大を惹起するとして W. H. O. はこれが食品中に残留するような使用をさねねばならないと勧告している。²⁾

食品中の抗生物質を分析する方法には、微生物学的方法が最も一般的に用いられている。すなわち、供試菌株の発育が阻害されるかどうかを知る方法で、色素の還元

状態の観察,³⁾ 検鏡下における細菌の形態学的変化の観察、培地における細菌の増殖阻止状態をディスク法により検出する方法⁴⁾ 等があげられるが、いずれも個々の抗生物質に特異的な方法でなく、他の細菌抑制物質と区別して判定することは困難である。しかも平板培養法によるときは、定量時の濃度 2.5ppm が限度であり、その感度は必ずしも優れているとは言えない。一方、CP の化学的分析方法も種々報告されているが、その微量を検出する方法としては、薄層クロマトグラフィーによる方法が一般的である。⁵⁻⁸⁾ 食品中 CP の化学的分析方法としては、すでに Bracey は、つぎの方法を述べている。⁹⁾ すなわち試料をトリクロル酢酸処理し、除タン白を行ない、

- 1) Location: a) Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo (東京都港区白金台); b) Mutsuura-machi, Kanagawa-ku, Yokohama (横浜市神奈川区六浦町).
- 2) Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser., **430**, 41 (1969).
- 3) 松井武夫, 佐野玲子, 赤尾頼幸, 神林三男, 食衛誌, **2** (1), 34 (1961).
- 4) 佐野玲子, 赤尾頼幸, 松井武夫, 神林三男, 食衛誌, **2** (3), 20 (1961).
- 5) M. A. Kassem, A. E. M. El-Nimir, *Pharm. Ztg.*, **111**, 1792 (1966).
- 6) I. Marinescu, C. Rezei, E. Florean, *Pharmazie*, **21**, 756 (1966).
- 7) U. Chandra, P. Pandey, *LABDEV*, **5**, 333 (1967).
- 8) S. Farkas, D. Zabrack, *Acta Pharm. Hung.*, **37**, 173 (1967).
- 9) A. Bracey, Food and Drug Administration, Washington, D. C., personal communication, 1969.

ろ液をイソオクタンと振り混ぜて脂肪を除き、ついで酢酸エチルで抽出したのち、抽出液を酸性およびアルカリ性の2種のセライトカラムに流し、クリーンアップしている。ここに分離したCPを還元したのち、ジアゾ化し、ついでN-1-ナフチルエチレンジアミンと反応させ、比色定量している。著者らは、上記クリーンアップの不完全な脂肪の除去方法に改良を加えるため、アルミナによるクリーンアップを行ない、さらに迅速定性分析を意図して薄層クロマトグラフィーによる検出を行ない、2, 3の知見を得たので報告する。

実験方法

試薬 (1) アルミナ——カラムクロマトグラフィー用 活性度1 (メルク社製)。

(2) シリカゲル——キーゼルゲルG (メルク社製)

(3) クロラムフェニコール——クロラムフェニコール末 (三共株式会社製) を蒸留水より再結晶したもの。

(4) クロラムフェニコール標準溶液——0.1% クロラムフェニコール・エタノール溶液。

(5) カラムクロマトグラフィー用溶出液——酢酸エチル-メタノール (2:3)。

(6) 薄層クロマトグラフィー用展開溶媒——①ベンゼン ②クロロホルム-メタノール (5:1)。

(7) 発色試薬——2%硝酸銀・メタノール溶液。

装置 (1) カラム管——直径1 cm, 高さ15 cm のコック付ビューレット型のもので、下部に少量の脱脂綿またはガラス綿をつめる。

(2) 薄層クロマトグラフィー用展開槽——ハンギング式 (東洋科学産業製)。

(3) 薄層クロマトグラフィー用 ガラス板——5×20 cm。

(4) 紫外線照射灯——シマダ低オゾン殺菌灯 (シマダガラス社製)。

操作 アルミナカラムの調製——アルミナ約3.8 g を小フラスコに入れ、これに酢酸エチル適量を加えて振り混ぜて懸濁液を調製し、これをカラム管に注ぎ、5.0 ± 0.2 cm の高さにつめる。

シリカゲル薄層の調製——常法に従い、0.25 mm に薄層を調製し、これを110°, 30分間乾燥する。

食品中からのCPの分離——試料50—100 g (CPとして25—50 μgを含有する量) を採取し、これを乳鉢に入れ、150 gの無水硫酸ナトリウムを少量宛加えて均一によくすりつぶす。さらにアセトン 150 ml を加えて混和し、暫く放置する。これを直径約9 cm のロートのくびれ部分に軽く綿せんをつめたものに注ぎ入れてろ過し、ろ液を 200 ml ナスフラスコに受ける。ロート上の試料

と無水硫酸ナトリウム混合物をアセトン約10 ml ずつで3回洗い、ろ液を先のろ液に合したのち、減圧下アセトンを留去する。濃縮液に塩化ナトリウム適量を加えて飽和したのち、酢酸エチル 30 ml を加え、せんをして振り混ぜる。ついで内容物を分液ロートに移し、よく振り混ぜ、酢酸エチル層を分取する。同様の操作を2回繰り返えし、酢酸エチル層を合する。酢酸エチル溶液に同量のベンゼンおよび無水硫酸ナトリウム約5 gを加え振り混ぜて10分間放置したのち、酢酸エチル-ベンゼン溶液をアルミナカラムにのせ、流出を行ない、流出液を捨てる。

つぎにアセトン 20 ml をカラムに注いで、同様に流出を続け流出液を捨てる。さらに溶出液酢酸エチル・メタノール (2:3) 18 ml をカラムに注ぎ、流出速度を毎分0.5—1 ml としてCPを溶出させ、溶離液をナスフラスコに受ける。これを濃縮し、残留物を最少可容量のアセトンに溶かし試験溶液とする (Chart 1)。

クロラムフェニコールの薄層クロマトグラフィーによる検出——シリカゲル薄層の下端から2 cm の位置に試験溶液全量およびCP標準溶液 1 μl を1—1.5 cm の間隔にそれぞれ塗布し風乾する。ただし脂肪の含有が見られる試験溶液は、試験溶液のみを薄層の下端から2 cm の位置に塗布し、風乾したのち、薄層の幅の短かい方向にベンゼンを展開溶媒として一次元展開を行なう。ついで風乾後展開方向と反対側に試験溶液塗布位置より1 cm 離してCP標準溶液を塗布する。

展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (5:1) を用い、展開槽内壁に紙を巻き溶媒に浸漬させる。薄層を下端部が溶媒に浸漬しないように15分間放置したのち、展開を開始し、10 cm の展開距離とした。展開終了後、薄層を風乾し、つぎの発色方法によりCPを検出する。すなわち、薄層を15分間紫外線照射したのち、2%硝酸銀メタノール溶液を噴霧し、ふたたび数分間紫外線照射を行なう。CPが存在するときは、灰褐色の背景に茶褐色のスポットを示す。

実験方法の検討および考察

アルミナカラムによるクロラムフェニコールのクロマトグラフィー

CP 10 mg を酢酸エチル 100 ml に溶かした溶液 1 ml をアルミナカラムにのせ、過量の液が流出したのち、酢酸エチル 10 ml を注ぎ、流出を続け、ついで溶出液に変えて、溶出を行ない、溶離液を 2 ml ずつ分取した。各分画液について、溶出液を対照としてCPの極大吸収波長 275 mμにおいて吸光度を測定し、CPの溶出曲線を作成した (Fig. 1)。この図に示される様にCP 100 μgは溶出液 18 ml により完全に溶出されることが知られた。

Chart 1. Extraction and Purification of Chloramphenicol in Foods

Fig. 1. Elution Pattern of Chloramphenicol
from the Alumina Column
chloramphenicol loaded : 100 μg

ーによる CP の検出方法には、塩化第一スズ、亜硝酸塩および β -ナフトールの各発色試薬を順次噴霧して呈色させる方法¹⁰⁾ アンモニア性硫酸銅試薬を噴霧する方法¹¹⁾ 塩化第一スズ試薬および Ehrlich 試薬を噴霧する方法¹²⁾ などがあるが、いずれも検出感度は低く、食品中の微量の CP を検出するには適当でないと考えられる。そこで筆者らは CP を紫外線照射により分解し、ついで硝酸銀メタノール溶液を噴霧する顕色方法を検討した。

CP 標準溶液 0.2 μl ずつを数枚のシリカゲル薄層に塗布し、実験方法に従い展開したのち、つぎの二方法により発色を調べた。すなわち、各薄層に 2%硝酸銀メタノール溶液を噴霧し、ついで紫外線を 5, 10, 15 および 20 分間照射する方法と、あらかじめ薄層を 5, 10, 15 および 20 分間紫外線照射したのち、2%硝酸銀メタノール溶液を噴霧し、ふたたび紫外線照射を行なう方法を行なった。

前者の方法によるときは、紫外線照射時間が長くなるにつれて、CP のスポットは黒褐色の呈色を強めるが、

クロラムフェニコールの薄層クロマトグラフィー

1) 検出方法について 従来薄層クロマトグラフィー

- 10) A. Brantener, J. Vamos, A. Vegh, I. Simonyi, *Acta Pharm. Hung.*, **37**, 49 (1967).
11) K. C. Guven, G. Ozsari, *Eczacilik Bul.*, **9**, 19 (1967).
12) Y-T. Lin, K-T. Wang, *J. Chromatog.*, **21**, 158 (1966).

15分および20分間の紫外線照射では背景も褐変し、必ずしも検出法として適するとは言えなかった。一方、後者の方法によるときは、紫外線照射による CP の分解を15分間行なった場合は、硝酸銀噴霧後2-3分間の紫外線照射により背景の褐変は少なく、明瞭に CP のスポットを観察することができた。つまり薄層を15分間紫外線照射したのち、2%硝酸銀メタノール溶液を噴霧し、ふたたび紫外線照射する方法が最も優れた検出方法であると考えられる。

2) 展開溶媒について シリカゲルを担体とした薄層クロマトグラフィーにおける CP の分離検出に適する展開溶媒の選定を行なうため、すでにこの分離検出に用いられている溶媒のうち、クロロホルム-メタノール系について CP の *Rf* 値を調べた。

CP 標準溶液 0.2 μ l を薄層に塗布し、展開溶媒として、メタノール、クロロホルム、クロロホルム-メタノール (4:1) およびクロロホルム-メタノール (5:1) を用いて展開し、上記検出方法による発色スポットの *Rf* 値を測定したところ、それぞれ 0.7, 0, 0.53 および 0.5 を示した。いずれもスポットの型は円形を示した。食品中から CP を分離し、薄層クロマトグラフィーにより検出する際は CP を他の妨害物質と分離し、再現性ある *Rf* 値を得ることが必要であるので、その *Rf* 値が 0.5 となるような展開溶媒クロロホルム-メタノール (5:1) を用いることとした。

3) 検出感度について CP 標準溶液を用いて、薄層に CP として 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 および 1 μ g をそれぞれ塗布し、実験方法に従い、展開したのち発色させて検出感度を調べた。

CP 0.1 μ g においてはスポットは観察されず、0.2 μ g 以上において明確にスポットが観察された。

4) 塩素系化合物の妨害について この方法によって食品中の CP を抽出分離する際に、同時に食品中に残留している農薬が抽出物に混入する可能性がある。そこで薄層クロマトグラフィーにおいて CP の検出を妨害すると考えられる塩素系農薬 5 種 γ -BHC, *p,p'*-DDT, アルドリン, エンドリンおよびペンタクロロフェノールについて妨害を調べた。なお *p,p'*-DDT がアルミナカラムにおいて DDT に変化することから、後者も合わせて検討した。

γ -BHC, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, アルドリンおよびエンドリンは和光純薬製標準品を、ペンタクロロフェノール (試薬 1 級) は、ヘキサンから再結晶したものをを用い、それぞれ 0.1% アセトン溶液とし、0.5 μ g を薄層に塗布し、実験方法に従い展開したのち、それぞれを発色

TABLE I. *Rf* Values of Chlorinated Pesticides on Silica Gel G Layers

Compound	<i>Rf</i> value
<i>p,p'</i> -DDT	0.75
<i>p,p'</i> -DDE	0.75
Aldrin	0.75
Endrin	0.75
γ -BHC	—
Pentachlorophenol	0.55

solvent system : chloroform-methanol (5:1)

させた。

各塩素系化合物の *Rf* 値は Table I に示すとおりである。

硝酸銀によるこの顕色方法では、 γ -BHC は呈色せず、スポットを見い出すことは出来なかった。また、ペンタクロロフェノールのスポットは CP のそれに最も近い *Rf* 値を示し、薄層クロマトグラフィーにおいて CP の検出を妨害するが、このものがアルミナカラムクロマトグラフィーにおいて溶出液酢酸エチル-メタノール (2:3) 20 ml によりカラムから流出しない事実から、薄層クロマトグラフィーにおける CP の検出において問題にする必要がないことが知られた。

食品中のクロラムフェニコールの検出

CP を各種食品 (牛乳、卵および鳥肉) に添加し、その検出限界を調べた。添加方法は CP の水溶液 50 μ g/ml を調製し、CP を牛乳に対しては、0.1, 0.25, 0.5 および 1 ppm, 卵に対しては 1.0 および 2.5 ppm, また鳥肉に対しては 0.5, 1.0 および 2.0 ppm となるように添加した。これらの試料を実験方法に従って処理し、CP の検出を行なった。

牛乳および卵については、酢酸エチル抽出物のアルミナカラムによるクリーンアップ段階で脂質類が除去され、クロロホルム-メタノール (5:1) を用いて展開したとき得られたクロマトグラムにおいて、試験溶液から得られたスポットの *Rf* 値は標準品のそれと良く一致した。しかしながら、鳥肉の場合には、クリーンアップを行なったにもかかわらず、多少の脂質が混入することが見い出された。そこで実験方法で記載したように、薄層クロマトグラフィーにおいて、あらかじめベンゼンを用いて一次元展開を行ない、ついでクロロホルム-メタノール (5:1) を用いて二次元展開し、CP の検出を行なった。ここにおいて、牛乳および卵にけると同様、試料から得られたスポットの *Rf* 値は、標準品のスポットのそれとよく一致した。なお、脂質類を多く含む試料はアセトンによる抽出以前に、ヘキサンを用い、試料中の

過量の脂質を除去すれば、このような二次元展開を行わず、CPを容易に検出できるのではないかと考えられる。かくして、牛乳、卵および鳥肉中CP検出限界は、それぞれ0.2, 1.0および0.5 ppmであった。

結 論

食品中に残留するクロラムフェニコールの薄層クロマトグラフィーによる検出方法として、①食品から有機溶媒によりクロラムフェニコールを抽出すること、②アルミナカラムを用いて抽出物をクリーンアップすること、③シリカゲル薄層を用いてクロラムフェニコールを分離検出することの各段階について検討を加えた。

抽出方法としては除タン白を兼ねて、アセトンによる抽出を行なうことが最も効率がよく、さらに酢酸エチルによる分配抽出操作を行ない妨害物質を除去した。しかしながら、この処理のみでは多量の脂質の混入はまぬがれず、カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップが必要であった。クリーンアップに用いるカラム吸着剤はアルミナが最も適当であり、かなりの脂質混入があった場合も見事にこれを除去することが出来た。シリカ

ゲルを担体とし、展開溶媒にクロロホルム-メタノール(5:1)を用いてCPを展開するとき、その R_f 値は0.50を示した。なおCPの発色方法としては、あらかじめ紫外線を照射して、これを分解させ、ついで硝酸銀試薬を噴霧し、ふたたび紫外線照射を行なう方法をとった。この方法によりCP 0.2 μ gまで検出することができた。

CPを0.1—1.0ppm添加した2, 3の食品(牛乳、卵および鳥肉)について、この方法によりCPの検出限界を調べたところ、牛乳については0.2 ppm、卵については1 ppmおよび鳥肉については0.5 ppmであった。

上記の通り食品中CPの化学的検出方法としては、ほぼ満足すべき結果が得られ、さらに、この様なCPの抽出法、抽出物のクリーンアップはCPを定量する際にも充分適用できるものと考えられる。

なお、塩素系化合物6種について、妨害があるかどうかについても調べたが、これらの共存は、クリーンアップおよび薄層クロマトグラフィーの各段階でCPと分離され、全く影響がないことが見いだされた。