〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
31 (6) 371-376 (1985)

高速液体クロマトグラフィーによる養殖魚中の水産用医薬品の一斉分析

堀江正一,^a 星野庸二,^a 能勢憲英,^a 岩崎久夫,^a 中澤裕之^b
埼玉県衛生研究所,^a 国立公衆衛生院^b

Simultaneous Determination of Antibiotics and Synthetic Antibacterials in Fish by High Performance Liquid Chromatography

MASAKAZU HORIE,^a YOUJI HOSHINO,^a NORIHIDE NOSE,^a

HISAO IWASAKI^a and HIROYUKI NAKAZAWA^b

Saitama Prefectural Institute of Public Health,^a 639-1 Kamiokubo-higashi,

Urawa 338, Japan and The Institute of Public Health,^b 4-6-1

Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

(Received May 14, 1985)

A high performance liquid chromatographic method (HPLC) was developed for the simultaneous determination of oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), chloramphenicol (CP), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfadimethoxine (SDMX), furazolidone (FZ) and difurazone (DFZ) in cultured fish.

The drugs were extracted from fish with 0.5% metaphosphoric acid-methanol (8:2), and the extract was filtered and concentrated. The concentrated solution was passed through a Sep-pak C₁₈ cartridge. The cartridge was washed with water and eluted with methanol. The eluate was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in acetonitrile-water (3:7). The sample solution was analysed by HPLC using a Nucleosil 5 C₁₈ column as a column and acetonitrile 0.05 M monobasic sodium phosphate (35:65), pH 2.5 as a mobile phase.

The average recoveries of OTC, CTC, CP, SMMX, SDMX and FZ from rainbow trouts, yellowtails and red sea breams fortified at 1.0 µg/g were 68.9–91.7%. The limits of detection were 0.05 µg/g for OTC, CP, SMMX, SDMX and FZ, 0.1 µg/g for CTC and 1.0 µg/g for DFZ.

Keywords — oxytetracycline; chlortetracycline; chloramphenicol; sulfamonomethoxine; sulfadimethoxine; furazolidone; difurazone; fish; HPLC

緒 言

近年我が国では水産養殖業が盛んとなり、これに伴い養殖魚に発生する疾病の予防と治療のため、種々の抗生物質及び合成抗菌剤が使用されている。このため、これら抗菌剤の養殖魚中への残留を監視するために、迅速かつ容易で精度の高い分析法が要求されている。

現在、「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」¹⁾により、水産用医薬品として使用基準が定められている抗菌剤は、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロルテトラサイクリン (CTC)、スピラマイシン (SPM)、スルファモノメトキシソ (SMMX)、スルファジメトキシソ (SDMX) 及びチアンフェニコール (TP) の6種類ある。また、クロラムフェニコール (CP)、フラゾリドン (FZ)

及びジフラゾン (DFZ) の3種類は、最近まで同省令により水産用医薬品として使用基準が定められていたものであり、これら9種類の抗菌剤は養殖魚に対して使用される可能性が高いものと考えられる。

従来、畜水産物中に残留する抗菌剤の分析は、個別あるいは種類別に行われており、²⁻⁵⁾ 残留の可能性の高い数種類の抗菌剤を検査するには長時間を必要とする。最近、数種類の抗菌剤を系統的に分析する方法⁶⁾が報告されているが、著者らは養殖魚中に残留が懸念され、260 nm 付近に紫外吸収を有する OTC, CTC, CP, SMMX, SDMX, FZ 及び DFZ を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定する、迅速で簡易な一斉分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料 埼玉県内で市販されていたハマチ、ニジマス、マダイ及びウナギの筋肉可食部を用いた。

2. 試薬 抗生物質：OTC 及び CTC；シグマ社製 (940 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 及び 900 $\mu\text{g}/\text{mg}$)，CP；国立予防衛生研究所検定品 (1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$)，SPM；(株)協和醗酵工業製 (1070 $\mu\text{g}/\text{mg}$)。

合成抗菌剤：SMMX；第一製薬(株)製，SDMX；日本メルク社製，FZ；上野製薬(株)製，DFZ；台糖ファイザー(株)製，TP；(株)エーザイ製を用いた。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

1) 標準溶液——いずれも 10 mg を精秤し，OTC，CTC，CP 及び SPM は蒸留水に，SMMX，SDMX，FZ，TP 及び DFZ はメタノールに溶解して標準原液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を調製し，適宜アセトニトリル-蒸留水 (3:7) 溶液で希釈して使用した。この際，溶解性の低い CP 及び SPM にあつては，あらかじめ必要最小限度のメタノールを，DFZ にあつてはジメチルホルムアミドを用いて溶解した後，蒸留水あるいはメタノールに溶解した。

2) 除タンパク及び抽出用溶媒——0.5% メタリン酸とメタノールを (8:2) の割合に混合した。

3) Sep-pak C_{18} カートリッジ——Waters 社製，カートリッジはあらかじめメタノール 20 ml で洗浄後，十分水洗して使用した。

3. 装置 高速液体クロマトグラフ；(株)島津製作所製 LC-5A，検出器；(株)島津製作所製 SPD-2AS，クロマトグラム用データ処理装置；(株)島津製作所製 CR-3A，分光光度計；(株)日立製作所製 330型自記分光光度計，ホモジナイザー；(株)日音医理科器械製作所製 ヒスコロン。

4. HPLC 測定条件 カラム；Nucleosil 5 C_{18} (25 $\text{cm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$)，移動相；アセトニトリル-0.05 M リン酸-ナトリウム (35:65) pH 2.5，流速；0.5 ml/min，測定波長；265 nm，検出感度；0.04 a.u.f.s.，試料注入量；10 μl 。

5. 試料溶液の調製 前報⁷⁾に準拠し，次の通り調製した。

試料 5 g をとり，除タンパク及び抽出用溶媒 60 ml を加えて高速ホモジナイザーで 2 分間混合した。この混合液を吸引ろ過し，約 35°C の水浴中で約 30 ml まで減圧濃縮した。次に，濃縮液をヘキサン 15 ml で洗浄後，Sep-pak C_{18} カートリッジに通し，蒸留水 30 ml で洗浄した後，メタノール 10 ml で溶出した。溶出液は減圧下

で溶媒を留去し，残留物をアセトニトリル-蒸留水 (3:7) 混液 1 ml に溶解して試料溶液とし，この 10 μl を HPLC に注入した。

6. 検量線の作成 各抗菌剤の濃度が 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である混合標準溶液を調製し，その 10 μl を HPLC に注入して得られたクロマトグラムより，ピーク高さによる絶対検量線法で検量線を作成した。なお，混合標準溶液は各濃度の標準溶液を 5 ml ずつ加え，溶媒を留去後，アセトニトリル-蒸留水 (3:7) 溶液 5 ml に溶解して調製した。

7. 添加回収実験 市販のハマチ，マダイ，ニジマス及びウナギの筋肉可食部各 5 g に各抗菌剤を 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し，前記(5)の試料溶液の調製法に従い試料溶液を調製し，その 10 μl を HPLC に注入し，得られたクロマトグラムのピーク高から回収率を求めた。

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

1.1 測定波長の選定 OTC，CTC，SPM，CP，SMMX，SDMX，FZ，DFZ 及び TP の 9 種類の抗菌剤を HPLC の移動相に溶解し，紫外吸収スペクトルを測定した結果，Fig. 1 に示す通り OTC，CTC，CP，SMMX，SDMX 及び FZ は，いずれも 260—270 nm 付近に吸収極大を示した。また，DFZ も 260 nm 付近で強い吸収を有していることが認められた。SPM 及び TP は 232 nm 及び 225 nm 付近にそれぞれ吸収極大を示したが，260 nm 付近では吸収が認められなかった。

以上の結果から，今回は 260 nm 付近に紫外吸収を有する OTC，CTC，CP，SMMX，SDMX，FZ 及び DFZ の 7 種類の抗菌剤について一斉分析法を試みた。検出波長は相対的に最も優れている 265 nm を選定した。

1.2 カラム充てん剤及び移動相の検討 HPLC による畜水産物中のサルファ剤²⁾，ニトロフラン剤³⁾，テトラサイクリン系抗生物質⁴⁾ (TCs) 及び CP⁵⁾ の分析については，単独あるいは類別に分析する報告がなされている。カラム充てん剤は ODS カラムを中心にアセトニトリル-リン酸塩緩衝液系やメタノール-水系を移動相とした逆相分配系が用いられている。そこで，著者らはカラム充てん剤に Nucleosil 5 C_{18} 及び LiChrosorb RP-18 の 2 種類，移動相にアセトニトリル-リン酸塩緩衝液系を用いて 7 成分の相互分離について検討を行った。

DFZ を除く他の 6 成分に関しては，Nucleosil 5 C_{18} 及び LiChrosorb RP-18 の分離能，保持時間に有意差は認められなかった。しかし，DFZ に関しては Nucleosil 5 C_{18} では約 25 分で溶出されるものが，LiChrosorb RP-

Fig. 1. Absorption Spectra of Drugs in Mobile Phase

CTC=chlortetracycline; OTC=oxytetracycline; CP=chloramphenicol; SMMX=sulfamonomethoxine; SDMX=sulfadimethoxine; FZ=furazolidone; DFZ=difurazone, CTC, OTC, CP, SMMY and SDMX; 20 $\mu\text{g/ml}$, FZ and DFZ; 10 $\mu\text{g/ml}$.

18では倍近く溶出時間がかかるため、カラム充填剤には Nucleosil 5 C₁₈ を用いることにした。

次に、移動相であるアセトニトリル-リン酸塩緩衝液の混合比、塩濃度及び pH の変化による各抗菌剤の保持比 (k') に及ぼす影響と相互分離について検討を行った。移動相中のアセトニトリル含量の変化による各抗菌剤の k' に及ぼす影響は、Fig. 2 に示す通り各抗菌剤ともアセトニトリルの含量が増加するにつれて k' は減少する傾向を示した。アセトニトリルの含量が35%の時、各抗菌剤の分離が良好に達成されたため、以後、本実験ではアセトニトリル-リン酸塩緩衝液の混合比を35:65とした。

次に、この混合比でリン酸塩緩衝液中の塩濃度を 0.1M まで変え、 k' に及ぼす影響を調べると、DFZ 以外の各抗菌剤の k' はほとんど変化を示さなかった。DFZ は移動相にリン酸塩を含まない場合には2時間経過しても溶出されず、 k' は塩濃度が高くなるほど減少を示した。7成分の相互分離と分析時間を考慮して、リン酸塩濃度は 0.05 M とした。

更に、アセトニトリル-0.05M リン酸塩緩衝液(35:65)混液の pH を 2.5-5.5 の範囲に調整し、各抗菌剤の相互分離やピーク形状に及ぼす影響を調べると、CTC 及び DFZ 以外の抗菌剤の k' 及びピーク形状はほとんど

Fig. 2. Effect of Acetonitrile Concentration on Capacity Factor of Drugs

△---△: CTC. ■---■: OTC. ●---●: CP.
▲---▲: SMMX. ○---○: SDMX. ○---○: FZ.
●---●: DFZ.

変化がなかった。CTC は pH が3以上になるとピークが拡がる傾向を示した。DFZ は k' が pH に大きく影響され、pH が低くなるに従い k' は顕著に減少した。

TABLE I. Effect of Methanol in Extracting Solvent on Extraction of Drugs

Extracting solvent	Recovery ^{a)} (%)						
	OTC	CTC	SMMX	FZ	CP	SDMX	DFZ
0.5% metaphosphoric acid	74.3	81.8	61.7	53.3	56.5	51.2	8.0
0.5% metaphosphoric acid-methanol (9:1)	80.5	79.0	85.5	83.0	85.5	70.9	8.0
0.5% metaphosphoric acid-methanol (8:2)	81.1	78.3	89.6	83.9	87.5	82.3	9.7
0.5% metaphosphoric acid-methanol (7:3)	81.1	79.0	87.9	85.3	88.6	78.0	11.0
0.5% metaphosphoric acid-methanol (6:4)	79.3	74.9	91.4	82.2	87.3	83.5	15.6
0.5% metaphosphoric acid-methanol (5:5)	^{-b)}	75.0	90.7	88.7	90.7	77.0	25.7

a) Average of results of 3 replicates. Samples were fortified at 1 µg/g of each drug.

b) Quantitative determination is impossible.

以上の結果から、相互分離、保持時間及びピーク形状等を考慮して、移動相は pH 2.5 のアセトニトリル-0.05 M リン酸-ナトリウム (35:65) 混液を用いた。

この HPLC 測定条件で得られた混合標準溶液のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

2. 検量線の作成

ピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成したところ、各抗菌剤とも 10 ng から 100 ng の範囲で良好な直線性を示した。

3. 試料溶液の調製

HPLC を用いた畜水産物中に残留する抗菌剤の個別あるいは類別に分析する方法ではさまざまな試料調製法が実施されている。サルファ剤^{2b-d)} ニトロフラン剤^{3e-d)} 及び CP⁵⁾ の試料調製法としてはクロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、アセトン等の有機溶媒抽出後、液-液分配によりクリーンアップを行う方法が報告されている。また、TCs では希塩酸^{4a)} や 5% 過塩素酸溶液^{4b)} により抽出後、アンバーライト XAD-2 及び Sep-pak C₁₈ を用いたクリーンアップを行う方法が報告されている。

液-液分配法による前処理法はエマルジョンが形成され易く、最近、分液漏斗に代る液-液分配法として連続液-液分配法を用いた魚肉中サルファ剤の分析⁶⁾ が報告されている。また、従来のカラム操作によるクリーンアップは、吸着樹脂調製の煩雑性や再現性の点で問題があり、これに代るクリーンアップ並びに濃縮手段として Sep-pak C₁₈ を利用した方法^{2a, 3a-b, 4b, 7)} が報告されている。

先に著者らは、0.5% メタリン酸-メタノール液 (8:2) 混液を除タンパク及び抽出用溶媒として用い、Sep-pak C₁₈ カートリッジによりクリーンアップを行う方法⁷⁾ により畜肉中の TCs 及びタイロシンの分析法を報告した。しかし、畜水産物中に残留する抗菌剤の分析法を簡単、迅速しかも系統的分析法として確立するためには、なる

Fig. 3. Typical Chromatogram of Mixed Standards

HPLC conditions: column, Nucleosil 5 C₁₈ (25 cm×4.6 mm i.d.); mobile phase, acetonitrile-0.05 M monobasic sodium phosphate (35:65) pH 2.5; detector, UV photometer (265 nm); sensitivity, 0.04 a.u.f.s.; injection size, 10 µl (50 ng).

Peaks: 1=oxytetracycline; 2=chlortetracycline; 3=sulfamonomethoxine; 4=furazolidone; 5=chloramphenicol; 6=sulfadimethoxine; 7=difurazone.

べく抽出-クリーンアップ操作を統一することが必要で、前報に報告した前処理法が脂質の多い養殖魚に、かつ 7 成分の一斉分析に適用可能かを検討した。ハマチに各抗菌剤を 1 µg/g の濃度で添加し回収率を調べた結果、Table I に示す通り、DFZ を除き回収率は平均で 80-90% であり、DFZ を除いた 6 種類の抗菌剤の一斉分析法として適用可能と考えられる。

DFZ の回収率が 9.7% と著しく低い原因として、DFZ はジメチルホルムアミド以外の溶媒に対し溶解度が極めて低く、特に水に対する溶解性の低いことが回収率の低い原因の 1 つであると考えられる。そこで、抽出溶媒中

TABLE II. Recoveries of Drugs from Cultured Fish

Sample	Recovery ^{a)} (%)						
	OTC	CTC	SMMX	FZ	CP	SDMX	DFZ
Yellowtail	77.6±5.6	77.5±3.1	88.7±6.6	80.8±6.6	87.7±6.8	80.3±5.6	9.1±4.8
Red sea bream	81.8±4.3	77.0±7.5	82.5±2.3	80.2±1.5	75.4±4.3	76.8±4.1	8.5±0.6
Rainbow trout	75.0±3.1	77.8±8.2	91.7±1.8	69.7±4.0	83.8±9.2	80.1±2.1	8.1±2.5
Eel	-b)	72.7±7.5	86.8±2.8	68.9±4.7	75.0±6.6	73.1±1.5	6.3±1.6

a) Mean±S.D. for 5 samples. Samples were fortified at 1 µg/g of each drug.

b) Quantitative determination is impossible.

のメタノール含量を変え、回収率に及ぼす影響を調べたところ、Table I に示す通り、メタノールの含量が多くなるに従い、DFZ の回収率が徐々に向上している。しかし、メタノールの含量が多くなるに従いクロマトグラム上、夾雑物に由来する妨害ピークが大きくなり、メタノール含量が50%では夾雑物ピークのため OTC の分析が不可能となった。

以上の結果、混合比 8:2 のものが総合的に最も優れており、前報に従い0.5%メタリン酸-メタノール(8:2)混液を除タンパク及び抽出用溶媒として用いた。Fig. 4 に市販のニジマス、ハマチ、ウナギ及びマダイの筋肉可食部のクロマトグラム及び各抗菌剤を 1 µg/g の濃度に添加したもののクロマトグラムを示した。

4. 添加回収実験

市販のハマチ、マダイ、ニジマス及びウナギに各抗菌剤を 1 µg/g の濃度に添加し、回収率を求めた (Table II)。

DFZ はすべての魚種を通じて回収率が10%以下と、非常に低い回収率であった。また、ウナギではクリーンアップが十分でなく、夾雑物ピークのため OTC の分析が不可能であった。しかし、以上の2点を除き、他の抗菌剤の回収率は平均で68.9—91.7%であった。また、変動係数はいずれも10%以下であり、一斉分析法としてはほぼ満足できる結果であると思われる。

なお、本法における検出限界はウナギにおける OTC を除き、OTC、CP、SMMX、SDMX 及び FZ が 0.05 µg/g、CTC が 0.1 µg/g、DFZ が 1 µg/g であった。

5. 市販養殖魚の残留試験

本法を用いて埼玉県内で市販されていたハマチ、ニジマス、マダイ及びウナギ各5検体を分析した結果、いずれの抗菌剤も検出されなかった。

結 語

脂質の多い魚肉試料に対し、除タンパク及び抽出用溶媒に0.5%メタリン酸-メタノール混液を用い、クリーンアップに Sep-pak C₁₈ カートリッジを用いた前処理法

Fig. 4. Typical Chromatograms of Extract from Cultured Fish

A, rainbow trout; B, yellowtail; C, eel; D, red sea bream; — control, fortified at 1 ppm.

Peaks: 1=oxytetracycline; 2=chlortetracycline; 3=sulfamonomethoxine; 4=furazolidone; 5=chloramphenicol; 6=sulfadimethoxine; 7=difurazone.

は、DFZ の低回収率及びウナギにおける OTC の分析不能等の点で検討の余地を残している。しかし、従来の液-液分配法及び XAD-2 などのカラム操作を用いた個別あるいは種類別の分析法に比べ、簡単かつ迅速に養殖魚中に残留する可能性の高い抗菌剤を同時に分析することが可能であり、一斉分析法であることを考慮すれば、ほぼ満足できる分析法であると考えられる。

また、本法により得られた添加回収実験の結果は、DFZ とウナギにおける OTC を除き「飼料添加物の評価基準に基づく試験の手引」⁹⁾に示されている検出限界 0.1 µg/g 以下、1—2 µg/g の添加回収率 70% 以上、変動係数10%程度という残留分析法確立のための基準にほぼ適合する数値であると考えられる。

今後、DFZ 及びウナギにおける OTC も分析できる方法を確立するために、更に抽出-クリーンアップ操作を検討する必要があると考える。

引用文献

- 1) 農林水産省令第42号 昭和55年9月30日.
- 2) a) 寺田久屋, 麻野間正晴, 坪内春夫, 石原利克, 坂部美雄, 衛生化学, **29**, 226 (1983); b) J. Fellig, J. Westheimer, *J. Agric. Food Chem.*, **16**, 738 (1968); c) K.L. Johnson, D.T. Jeter, R.C. Claiborne, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1657 (1975); d) D.P. Goodspeed, R.M. Simpson, R.B. Ashworth, H.R. Cook, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 1050 (1978).
- 3) a) 永田知子, 宮本文夫, 佐伯政信, 食衛誌, **23**, 278 (1982); b) W. Winterlin, G. Hall, C. Mourer, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1055 (1981); c) B.A. Hoener, G. Lee, W. Lundergan, *ibid.*, **62**, 257 (1979); d) G.F. Ernst, A.V. Kaaden, *J. Chromatogr.*, **198**, 526 (1980).
- 4) a) Y. Onji, M. Uno, K. Tanigawa, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 1135 (1984); b) 寺田久屋, 麻野間正晴, 坪内春夫, 衛生化学, **30**, 138 (1984).
- 5) J.M. Wal, J.C. Peleran, G.F. Bories, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1044 (1980); G.F. Bories, J.M. Wal, J.C. Peleran, *ibid.*, **66**, 1521 (1983); M. Becheiraz, A. Haldemann, R. Etter, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **74**, 147 (1983).
- 6) a) 堀 義宏, 食衛誌, **24**, 447 (1983); b) *Idem, ibid.* **25**, 158 (1984).
- 7) 星野庸二, 堀江正一, 能勢憲英, 岩崎久夫, 食衛誌, **25**, 430 (1984).
- 8) 中澤裕之, 四宮一総, 藤田昌彦, 北田善三, 山本政利, 永田知子, 込山茂久, 高嶋英伍, 食衛誌, **26**, 7 (1985).
- 9) 農林水産省畜産局編, 『飼料添加物の評価基準に基づく試験の手引』1980.