高速液体クロマトグラフィーによる魚肉中 ナリジクス酸の定量法

(昭和 56 年 4 月 6 日受理)

春日 洋二* 大塚 公人*
杉 谷 哲* 山田 不二造*

Determination of Nalidixic Acid in Fishes by High-Performance Liquid Chromatography

Yoji KASUGA, Kimihito OTSUKA, Akira SUGITANI and Fujizo YAMADA

(Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4-chome, Gifu)

A high-performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of nalidixic acid (NA) in fishes has been established.

NA was extracted from fish homogenate in 0.2 M phosphate buffer (pH 6.0) with ethyl acetate. The extract was concentrated under a vacuum on a rotary evaporator and the residue was transferred to a separating funnel containing 2% sodium chloride soln. After removal of fat with *n*-hexane, NA was extracted with chloroform. The extract was concentrated and the residue was transferred to a glass-stoppered centrifuge tube containing 0.1 M borate buffer (pH 10.0). The tube was shaken, then centrifuged, and the upper phase was injected into a liquid chromatograph. NA was separated in approximately 5 min by using a Zipax SAX column (2.6×500 mm) with 0.01 M tetraborate soln. (pH 9.1) containing 0.006 M sodium sulfate as the mobile phase. The UV detector was set at 258 nm. The quantity of NA was calculated from the peak height ratio of NA to piromidic acid used as an internal standard.

The calibration curve was linear over the range from 1 to 100 µg/ml.

The recoveries of NA added to the fishes were 96.6 to 100.4% and the detection limit was 0.05 µg/ml.

(Received April 6, 1981)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high-performance liquid chromatography; 水産用医薬品 drug for fish; ナリジクス酸 nalidixic acid; ピロミド酸 piromidic acid; 魚肉 fish

緒 言

近年我が国では魚の養殖が盛んになり、これに伴い養殖魚に発生する病害を防ぐために各種水産用医薬品が使われている。

動物用医薬品の食肉への残留が食品衛生上問題視され、昭和54年4月16日厚生省告示第60号により「食肉、食鳥卵類及び魚介類は抗生物質の他、化学合成品たる抗菌性物質を含有してはならない」ことが規定された。

これに伴い畜産用医薬品では「畜産物中の残留物質検査法」により、それぞれの分析法が定められた。

しかしながら、水産用医薬品では抗生物質以外はまだ

定められていない。

水産用医薬品中ナリジクス酸（以下 NA と略す）はアユおよびサケ、マス類のせつそ病、ビブリオ症の治療薬として用いられている。

NA の分析法は医薬品製剤¹⁾、ヒトの尿^{2),3)}および血清^{2),4)}中の NA についてはあるが動物組織中の NA については数少ない。この内微生物学的定量法は薬物に対する特異性に欠け⁵⁾、感度も良くない⁵⁾。

理化学的定量法として唯一報告されている蛍光法⁶⁾も精度の点で満足のものではない。

これらのことから我々は高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）による魚肉中 NA の分析法を検

* 岐阜県衛生研究所：岐阜市野一色 4-6-3

討し、上述の欠点を補う良好な成績を得たので報告する。

実験方法

1. 材料

ニジマスは岐阜県水産試験場より NA 無処理のものを入手し、アユは長良川より採取し実験に供した。

2. 試薬

ナリジクス酸 (NA): 第一製薬 (株) からの供与品 (純度 99.2%) を用いた。

ナリジクス酸標準溶液: ナリジクス酸 10 mg を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) 100 ml に溶解し、標準溶液 (100 μ g/ml) とした。

ピロミド酸 (PA): 大日本製薬 (株) からの供与品 (純度 100.0%) を用いた。

内部標準溶液: ピロミド酸 2 mg を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) 100 ml に溶解し、標準溶液 (20 μ g/ml) とした。

0.2 M リン酸緩衝液リン酸一ナトリウム 31.2 g を約 600 ml の蒸留水に溶解し、1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.0 に調整後、蒸留水を加え 1 L にした。

0.1 M ホウ酸緩衝液: ホウ酸 6.183 g を約 600 ml の蒸留水に溶解し、1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH を 10.0 に調整後、蒸留水を加えて 1 L にした。

HPLC 用移動相: ホウ酸ナトリウム 3.814 g, 硫酸ナトリウム 0.852 g を蒸留水に溶解し、1 L とした (0.006 M 硫酸ナトリウムを含む 0.01 M ホウ酸ナトリウム溶液, pH 9.1)。

その他の試薬はすべて和光純薬工業 (株) 特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: (株) 日立製作所製 635 形
検出器: (株) 日立製作所製波長可変流動光度計
カラム: デュボン社製 Zipax SAX (2.6 $\times$ 500 mm)
自記分光光度計: (株) 日立製作所製 200-20 形
ホモジナイザー: 日本精機 (株) 製ユニバーサルホモジナイザー

4. 試験溶液の調製

細切したニジマスまたはアユの筋肉部 10 g に 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 100 ml を加え、3 分間ホモジナイズした。これを 500 ml の分液漏斗に移し、酢酸エチル 300 ml を加え、10 分間振とうした。酢酸エチル層を 500 ml の三角フラスコに移し、無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過した。

ろ液を 500 ml のナス形フラスコに移し、ロータリーエバポレーター (35 $^{\circ}$ 以下) で酢酸エチルを留去した。残渣はあらかじめ 2% 塩化ナトリウム溶液 500 ml を入れた 1 L の分液漏斗にアセトニトリル 10 ml および *n*-ヘキサン 50 ml を用いて洗い込み、激しく振とうし、2 層に分離するまで静置した後、*n*-ヘキサン層は捨て、再

度 *n*-ヘキサン 50 ml を加え激しく振とうし、*n*-ヘキサン層は捨てた。次いでクロロホルム 50 ml を加え、激しく振とう後、クロロホルム層は 200 ml の三角フラスコに移した。この操作を 2 回行い、クロロホルム層を三角フラスコに合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター (35 $^{\circ}$ 以下) で約 1 ml に濃縮し、共栓付き遠心管に移した後、窒素気流下でクロロホルムを除去した。これにクロロホルム 0.2 ml および内部標準溶液 1 ml を加え激しく振とうし、3,000 rpm で 5 分間遠心後、上澄液を HPLC に供した。

5. HPLC 測定条件

カラム: Zipax SAX (2.6 $\times$ 500 mm), 移動相: 0.006 M 硫酸ナトリウムを含む 0.01 M ホウ酸ナトリウム溶液 (pH 9.1), カラム温度: 室温, 流速: 0.8 ml/min, 検出器: UV (258 nm), 感度: 0.04 AUFS, 注入量: 10 μ l の各条件で操作した。

6. 検量線の作製

0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 100 ml に 1~100 μ g/ml の濃度範囲で NA を添加し、以下試験溶液と同じ方法に従って検液を調製し、前述の HPLC 測定条件で得られたクロマトグラムから、内部標準物質として用いた PA のピーク高に対する NA のピーク高の比を縦軸に、NA の濃度を横軸にとり検量線を作製した。

結果および考察

1. 試料からの抽出条件の検討

魚肉細切試料から NA の抽出は Browning らの方法⁶⁾ (0.2 M リン酸緩衝液 pH 6.0 100 ml, 酢酸エチル 300 ml) を追試した。

すなわち、まず 0.2 M リン酸緩衝液の pH を検討したところ、pH 3~7 の範囲では抽出率 (85~88%) にほとんど差がなかった。

酢酸エチル量は 100~400 ml の範囲で検討したが 200 ml 以上は抽出率 (88%) に差がなかった。

これらの結果から、試料からの抽出は Browning らの方法をそのまま用いることにした。

2. 試験溶液のクリーンアップ

酢酸エチル抽出液のクリーンアップ条件を以下検討した。

酢酸エチル留去後、残渣を 2% 塩化ナトリウム溶液中に洗い込む際、残渣中の脂肪を除くために加える *n*-ヘキサンに NA が溶けないため、NA が易溶でその上、水にも溶解するアセトニトリルを洗い込みに用いることにしたが、この際用いるアセトニトリルがクロロホルムによる NA の再抽出に影響を及ぼすことが予想されたので、その量を検討した。

その結果、10 ml で回収率が最高 (98%) となり (Fig. 1), NA の損失はほとんどなかった。

次に脂肪除去後の 2% 塩化ナトリウム溶液からのクロロホルムによる NA の抽出条件を検討した結果、50

Fig. 1. Relationship between recovery rate and volume of acetonitrile

Fig. 2. Relationships between recovery rate and extraction times with 50 ml of chloroform

Fig. 3. Relationship between recovery rate and volume of chloroform

ml 2 回で十分な抽出率 (98%) が得られた (Fig. 2).

クロロホルム留去後の残渣を 0.1 M ホウ酸緩衝液に溶解し、これをそのまま HPLC に注入したところ、共存物質による妨害がみられた。そこで著者らは妨害物質除去のため、残渣を再度少量のクロロホルムに溶解し、この溶液から 0.1 M ホウ酸緩衝液を用いて NA を再抽

Fig. 4. Relationship between recovery rate and pH of 0.1 M borate buffer

出する方法を試みた。

まず残渣の溶解に用いるクロロホルム量を検討したところ、0.2 ml で妨害物質は完全に除去され、良好なクロマトグラムが得られた。

しかも 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) 1 ml による NA の再抽出時の損失は最も少なかった (Fig. 3)。

また、この際用いた 0.1 M ホウ酸緩衝液の pH が NA の抽出率に影響を及ぼすため、pH を検討したところ、pH 10.0~11.0 の範囲で最高の抽出率 (94%) が得られた (Fig. 4)。したがって以後本操作には pH 10.0 を用いることにした。

3. HPLC 測定条件

カラム: 医薬品製剤および血清、尿中 NA の分析にはイオン交換樹脂 Zipax SAX^{1),3)}、逆相分配カラム μ Bondapak C₁₈⁴⁾、Lichrosorb RP-8²⁾ が使われている。逆相分配カラムを使うには NA をメチル化する⁴⁾ か、移動相にカウンターイオン²⁾ を使わなければならない。著者らの経験では前者は操作が複雑になり、後者はカラムの劣化が激しい。その上、逆相分配カラムはピークのテーリングが生じやすい。これに対してイオン交換樹脂カラムは NA を誘導体化する必要がなく、カラムの劣化も比較的少ない。またピークのテーリングはほとんど生じない。

これらのことから著者らは Zipax SAX を 2.6×500 nm のステンレス管に充てんし用いた。

移動相: Sondack ら¹⁾ が医薬品製剤中 NA の分析に用いた条件 (0.003 M 硫酸ナトリウムを含む 0.01 M ホウ酸ナトリウム溶液、内部標準物質は用いず) は、著者らが内部標準物質として用いた PA のピークが広がり、分析時間も長くなるため硫酸ナトリウム濃度 0.006 M とした。

測定波長: Fig. 5 は NA および PA (内部標準物質) の吸収曲線である。

本図から NA は 258 nm に極大吸収をもつことが示されたので測定波長は 258 nm に設定した。

上記条件での NA, PA の標準溶液およびニジマス、

Fig. 5. Absorption spectra of NA and PA
—: NA (2 µg/ml); ---: PA (2 µg/ml)

Fig. 6. Liquid chromatograms of (A) mixture of NA (5 µg/ml) and PA (20 µg/ml); (B) rainbow trout blank; and (C) sweet smelt blank

Chromatographic conditions: Column, 2.6×500 mm packed with Zipax SAX; Mobile phase, 0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution containing 0.006 M Na_2SO_4 ; Column temp., ambient; Flow rate, 0.8 ml/min; Detector, UV (258 nm); Sensitivity, 0.04 AUFS; Sample size, 10 µl

アユブランクのクロマトグラムを Fig. 6 に示した。本結果は共存物質による妨害がなく、短時間に NA が分離できることを示している。

4. 検量線

標準溶液を繰返し (10 回) HPLC に注入し、絶対検量線法および内部標準法で得られた変動係数はそれぞれ 0.5%, 0.2% であり、内部標準法の方が精度が優れていることを示した。この理由から本法により検量線を作製したところ、少なくとも 1~100 µg/ml の範囲で良好な

Fig. 7. Calibration curve for nalidixic acid
Chromatographic conditions were same as those of Fig. 6.

Table 1. Recovery of Nalidixic Acid from Fishes

Sample	No. of samples	Added (µg/g)	Mean (%)	C.V. (%)
Rainbow trout	5	0.1	98.4	2.0
		0.5	100.4	0.9
Sweet smelt	5	0.1	98.4	0.9
		0.5	96.6	1.4

直線性を示した (Fig. 7)。

5. 添加回収実験

ニジマスまたはアユの均質化試料 10 g に NA (100 µg/ml 0.1 M ホウ酸ナトリウム溶液, pH 10.0) を 1

μg および $5\mu\text{g}$ 添加し、回収実験を行った結果を Table 1 に示した。

平均回収率は添加量が $1\mu\text{g}$ ではニジマス、アユともに 98.4%, 変動係数はそれぞれ 2.0%, 0.9% であった。添加量が $5\mu\text{g}$ では平均回収率はニジマス 100.4%, アユ 96.6%, 変動係数はそれぞれ 0.9%, 1.4% と満足のいく結果が得られた。

ま と め

HPLC による魚肉中 NA の分析法を検討し、次の結果を得た。

1) 数種の溶媒による抽出および濃縮操作の組み合わせだけで迅速なクリーンアップができた。

2) HPLC 用カラムに陰イオン交換樹脂 Zipax SAX ($2.6\times 500\text{ mm}$), 移動相に 0.006 M 硫酸ナトリウムを含む, 0.01 M ホウ酸溶液を用い, 共存物質の妨害なく NA および PA (内部標準物質) の短時間 (15 分以内) の分離ができた。

検量線は $1\sim 100\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性を示した。

3) ニジマスおよびアユについて添加回収実験を行っ

たところ, 再現性良く (変動係数 0.9~2.0%) 微量 (検出限界 $0.05\mu\text{g/ml}$) の NA が定量できた。

謝 辞

医薬品無処理の試料を提供下さった岐阜県水産試験場 石井重男場長ならびに荒井真技師に深謝します。

文 献

- 1) Sondack, D. L., Koch, W. L.: J. Chromatogr. **132**, 352~355 (1977).
- 2) Cuisinaut, G., Ferry, N., Seccia, M., Bernard, N., Sassard, J.: *ibid.*, **181**, 399~406 (1980).
- 3) Shargel, L., Koss, R. F., Crain, A. V. R., Boyle, V. J.: J. Pharm. Sci. **62**, 1452~1454 (1977).
- 4) Sorel, R. H. A., Roseboon, H.: J. Chromatogr. **162**, 461~465 (1979).
- 5) 北本 治, 深谷一太, 輪島豊子: Chemotherapy, **121**, 384~389 (1964).
- 6) Browning, R. S., Pratt, E. L.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **53**, 464~468 (1980).