高速液体クロマトグラフィーによる養殖魚中 合成抗菌剤の定量法

(昭和 58 年 10 月 31 日受理)

堀 義 宏^{*1}

Determination of Synthetic Antibacterials in Cultured Fish by High Performance Liquid Chromatography

Yoshihiro HORI

(Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome, Kita 19-jo, Kita-ku, Sapporo,
Hokkaido, Japan)

A high performance liquid chromatographic method for determination of furazolidone, difurazone, sulfamonomethoxine and sulfadimethoxine in cultured fishes has been developed.

Synthetic antibacterials extracted from samples were adsorbed on an alumina column and were eluted with 20 ml of 95% acetonitrile as fraction I (nitrofurans) and then with 30 ml of 85% acetonitrile as fraction II (sulfa drugs). Each fraction was injected into an HPLC column packed with Nucleosil 5 C₁₈. Fractions I and II were eluted with acetonitrile-acetic acid-water=70:0.1:30 and 30:0.05:70, with detection at 380 and 272 nm, respectively.

The recoveries of furazolidone, difurazone, sulfamonomethoxine and sulfadimethoxine were in the ranges of 95.5~99.7%, 84.0~90.0%, 96.7~101.3% and 95.3~99.0%, respectively. The limit of detection of each drug was 0.03 ppm in the test samples.

(Received October 31, 1983)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 養殖魚 cultured fish; 合成抗菌剤 synthetic antibacterials; フラゾリドン furazolidone; ジフラゾン difurazone; スルファモノメトキシソ sulfamonomethoxine; スルファジメトキシソ sulfa-dimethoxine

緒 言

水産用医薬品で使用基準が定められている合成抗菌剤は5種類あり、これらは Table 1 に示した養殖魚を対象に飼料に添加して用いられている。

従来、これら合成抗菌剤の測定には、ガスクロマトグラフィー^{1)~3)}、薄層クロマトグラフィー・デンシトメトリー²⁾ が用いられてきた。近年、貫山ら⁴⁾ はサルファ剤を、また、永田ら⁵⁾ はニトロフラン誘導体を高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略す) を用いて測定している。

今回、著者はフラゾリドン、ジフラゾン、スルファモノメトキシソ、スルファジメトキシソの4種類を系統的に分離し、HPLC を用いて定量する方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

北海道内で養殖されているウナギ、コイ及びニジマス⁶⁾ の筋肉部を用いた。

2. 試 薬

アセトン、クロロホルム、アセトニトリル、メタノール、*n*-ヘキサン、*n*-プロパノール、塩化ナトリウム、酢酸：和光純薬工業(株)製特級
フラゾリドン：上野製薬(株)製

^{*1} 北海道立衛生研究所：札幌市北区北 19 条 西 12 丁目

Table 1. Drugs for Fish Restricted by Standard of Using

Cultured fish	Drug
Rainbow trout (Nijimasu)	Sulfamonomethoxine
Sweet fish (Ayu)	Sulfamonomethoxine Furazolidone
Carp (Koi)	Furazolidone
Eel (Unagi)	Sulfamonomethoxine Sulfadimethoxine Furazolidone
Yellow tail (Buri)	Sulfamonomethoxine Sulfadimethoxine Furazolidone Difurazone Thiamphenicol
Red sea bream (Madai)	Furazolidone

Table 2. HPLC Conditions for Determination of Synthetic Antibacterials

	Fraction I	Fraction II
Column	Nucleosil 5 C ₁₈ (4 mm I.d.×250 mm) acetonitrile-acetic acid-water	
Mobile phase	70:0.1:30	30:0.05:70
Flow rate	0.8 ml/min	0.9 ml/min
Detector	380 nm	272 nm
Sensitivity	4×10 ⁻² AUFS	8×10 ⁻² AUFS
Column temp.		40°C
Chart speed		5 mm/min
Sample size		10 µl

ジフラゾン：台糖ファイザー(株)製

スルファモノメトキシン，スルファジメトキシン：富士薬品工業(株)製

標準溶液：いずれも 10 mg を精秤し，フラゾリドン，スルファモノメトキシン，スルファジメトキシンはアセトンに，ジフラゾンはメタノールに溶解し，100 µg/ml の原液を作製し，原液をアセトンで適宜希釈して用いた。

アルミナカラム：塩基性活性度 I のカラムクロマトグラフ用アルミナ (Woelm 社製) 6 g を内径 15 mm，長さ 300 mm のガラス管にアセトニトリルを用いて詰め，アセトニトリル 20 ml，さらに 95% アセトニトリル 30 ml で順次洗浄した。

4. 装 置

高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-4A 型

検出器：(株)島津製作所製紫外可視分光光度計検出器 SPD-1 型

分光光度計：(株)島津製作所ダブルビーム分光光度計 UV-180

5. HPLC の測定条件

測定条件は，Table 2 に示した。

6. 試験溶液の調製

試料 10 g をホモジナイザーカップにとり，アセトン 50 ml を加え 5 分間ホモジナイズした後，桐山漏斗を用いて吸引ろ過し，さらに残留物をアセトン 50 ml で洗いながらろ過する。ろ液に *n*-プロパノール 15 ml を加え，ロータリーエバポレーターを用い，45° の水浴で約 15 ml まで減圧濃縮する。濃縮液を 100 ml の分液漏斗に移し，アセトン 20 ml，*n*-ヘキサン 30 ml 及び 3% 塩化ナトリウム溶液 60 ml を加え，軽く振とうする。上層の *n*-ヘキサンを除去し，再び *n*-ヘキサン 30 ml を加えて激しく振とうする。下層を別の分液漏斗に移し，クロロホルム 25 ml を加え振とうした後，クロロホルム層を分取し，100 ml のナス型フラスコにとる。これをさらに 2 回繰返し，クロロホルム層を合し，ロータリーエバポレーターで約 1 ml まで濃縮する。濃縮液をアルミナカラムに入れ，95% アセトニトリル 20 ml で溶出する (フラクション I)。さらに 85% アセトニトリル 30 ml で溶出する (フラクション II)。溶出液を減圧濃縮乾固し，フラクション I はアセトニトリル-酢酸-水 (70:0.1:30) 混液 1 ml，フラクション II はアセトニトリル-酢酸-水 (30:0.05:70) 混液 1 ml に溶解し，Table 2 に示した HPLC の測定条件下で，その 10 µl を注入する。

以上，試験操作の概略を Scheme 1 に示した。なお，操作は，褐色のガラス器具を用い，遮光して行った。

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

1.1 測定波長

各薬剤を HPLC に用いた溶離液中で吸収スペクトルを測定したとき (Fig. 1)，フラゾリドンは 365 nm，ジフラゾンは 380 nm，スルファモノメトキシンは 274 nm 及びスルファジメトキシンは 272 nm に吸収極大を示した。この結果からみて一定波長による同時分析は不可能なので測定波長をニトロフラン誘導体は 380 nm，サルファ剤は 272 nm に設定した。

1.2 カラム及び溶離液

カラムは Nucleosil 5 C₁₈ を用い，また，溶離液はアセトニトリル-水の組合せで検討した。フラクション I のニトロフラン誘導体については，フラゾリドンはアセトニトリル濃度の増加につれ保持時間が短縮し，また，ジフラゾンは，アセトニトリル-水系に酢酸を添加することにより保持時間の短縮が見られた。一方，フラクション II のサルファ剤は，フラクション I の溶離液ではニトロフラン誘導体に比べて溶出が早いため使用できなかった。また，アセトニトリル-水系のみでは各ピークの分離能が悪いので，酢酸を添加したところ，分離能が高

Scheme 1. Analytical procedure for synthetic antibacterials

くなり、かつ感度も上昇した。

以上の結果から、溶離液としてフラクション I は、アセトニトリル-酢酸-水=70:0.1:30、フラクション II は 30:0.05:70 を用いた。フラクション I 及び II の標準液のクロマトグラムは Fig. 2-(A) 及び Fig. 3-(A) に示すとおりで、いずれも 10 分以内に測定することができた。

2. 検量線及び検出限界

各フラクションの標準溶液をそれぞれの薬剤として 0.25~10 µg 相当量の範囲でとり乾固した後、各溶離液 1 ml に溶解し、その 10 µl を HPLC に注入し、ピーク高さにより検量線を作成した。その結果、フラゾリドンは 2.5~100 ng、また、他の薬剤は 5.0~100 ng の範囲で良好な直線性が得られた。なお、試料 10 g を用いた場合の検出限界はいずれも 0.03 ppm であった。

3. 試料からの抽出及びクリーンアップ

3.1 前処理

脂肪が存在すると HPLC で測定する際、妨害物質による感度の低下、カラムの劣化などを招くので、あらかじめ脱脂する必要がある。鶏肉及び鶏卵では、アセトニトリル抽出液を *n*-ヘキサンで洗浄することにより脱脂できたが⁶⁾、魚の場合、この操作では脱脂が不十分であった。そこで今回、試料から抗菌剤の抽出溶媒としてアセトンを用い、このアセトン抽出液を一旦濃縮し、濃縮液にアセトン及び 3% 塩化ナトリウム溶液を加え、*n*-ヘキサンで 2 回洗浄後、クロロホルムで再抽出した。この操作により、抗菌剤を損失することなく脱脂することができた。

アセトン抽出液を濃縮する際、泡立ちや突沸のため、濃縮操作が困難であり、また、回収率にバラツキが生じた。中澤ら⁷⁾はこれらを防止するため、抽出液に *n*-ブ

Fig. 1. Absorption spectra of synthetic antibacterials in mobile phase

—, furazolidone
 ----, difurazone
 ●—●, sulfamonomethoxine
 ●---●, sulfadimethoxine

Fig. 2. Liquid chromatograms of fraction I

A) mixed standard

1) furazolidone (2.5 $\mu\text{g/ml}$)

2) difurazone (5 $\mu\text{g/ml}$)

B) rainbow trout C) eel D) carp

ロパノールを添加した後濃縮する方法を用いている。また、脱脂後、クロロホルムで再抽出する際、*n*-プロパノール及びアセトン存在量により、抗菌剤の回収率にバラツキが見られた。そこで *n*-プロパノール及びアセトンの添加量について検討したところ、抽出液に *n*-プロパノール 15 ml 添加後、約 15 ml まで濃縮しアセトンをほとんど留去した後、再びアセトン 20 ml を加えクロロホルムで抽出した場合、泡立ちもなく濃縮でき、かつ回収率が最も良く、バラツキも少なかった。

Fig. 3. Liquid chromatograms of fraction II

A) mixed standard

1) sulfamonomethoxine (5 $\mu\text{g/ml}$)

2) sulfadimethoxine (5 $\mu\text{g/ml}$)

B) rainbow trout C) eel D) carp

3.2 アルミナカラムからの溶出

アルミナカラムによる不純物の除去及び薬剤の溶出条件を検討した。結果は Fig. 4 に示すように 95% アセトニトリル 20 ml でフラゾリドン及びジフラゾンが完全に溶出し (フラクション I)、さらに 85% アセトニトリル 30 ml でスルファモノメトキシシン及びスルファジメトキシシンが完全に溶出した (フラクション II)。このフラクション I 及び II の HPLC のクロマトグラムは Fig. 2 (B, C, D) 及び Fig. 3 (B, C, D) に示すとおりで、いずれのフラクションについてもクロマトグラム上に抗菌剤の妨害となる物質は見られず、ウナギ、コイ及

Table 3. Recovery of Synthetic Antibacterials from Cultured Fishes

Drug	Added μg/g	Eel	Carp	Rainbow trout
		Recovery*		
Furazolidone	0.1	99.7±1.5	97.7±2.1	98.3±2.9
	0.5	98.2±3.1	98.2±1.8	95.5±0.87
Difurazone	0.2	84.0±2.0	89.3±1.4	89.2±0.94
	1.0	90.0±2.0	87.0±2.6	89.0±1.0
Sulfamonomethoxine	0.2	97.0±1.0	101.3±1.2	98.7±1.2
	1.0	98.3±0.58	100.3±0.58	96.7±1.4
Sulfadimethoxine	0.2	95.3±1.5	99.0±1.7	95.7±1.2
	1.0	97.3±0.58	98.8±1.3	96.7±1.9

* Mean±S.D. for 3 samples

Fig. 4. Elution patterns of synthetic antibacterials from alumina column

びニジマスは同じ操作で前処理ができた。

4. 添加回収実験

本法による添加回収実験の結果については Table 3 に示すように、フラゾリドンは 95.5~99.7%, ジフラゾン は 84.0~90.0%, スルファモノメトキシンは 96.7~101.3%, スルファジメトキシンは 95.3~99.0% の回収率が得られ、また、標準偏差も 0.58~3.1% の範囲で行うことができた。なお、水産用医薬品で使用基準のあるチアンフェニコールについて本法による測定を試みたが、チアンフェニコールの吸収極大が 226 nm 付近にあり、272 nm 及び 380 nm に吸収がないこと、また、226 nm で測定したとき、試料中の妨害物質により定量できないため本法から除外した。

5. 養殖魚の残留試験

本法により北海道内で養殖されているニジマス 4 検体、ウナギ 3 検体、コイ 3 検体について残留量を測定したが、4 薬剤についてはいずれも定量範囲内において検出されなかった。

まとめ

HPLC による養殖魚中フラゾリドン、ジフラゾン、スルファモノメトキシン及びスルファジメトキシンの定量法を検討した。

アセトンで抽出、脱脂後、クロロホルムで再抽出し、アルミナカラムにより 2 分画し、これを HPLC で定量した。本法による回収率は、フラゾリドン 95.5~99.7%、ジフラゾン 84.0~90.0%、スルファモノメトキシン 96.7~101.3%、スルファジメトキシン 95.3~99.0% であり、また、検出限界はいずれも 0.03 ppm であった。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第 2 集の 2 (1978)。
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：同上，第 2 集の 3 (1979)。
- 3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：同上，第 2 集の 4 (1981)。
- 4) 貫山道子，渡辺重信，伊藤和敏：神奈川県衛生研究所報，No. 11, 61~62 (1981)。
- 5) 永田知子，宮本文夫，佐伯政信：食衛誌，23, 278~282 (1982)。
- 6) 堀 義宏：同上，24, 447~453 (1983)。
- 7) 中澤裕之，高島英伍，日野誠二，Canutte A. Mtema: 分析化学，32, 179~183 (1983)。