蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる鶏組織中の ラサロシドナトリウムの定量

(昭和63年10月21日受理)

石黒 瑛一*

Determination of Lasalocid Sodium in Chicken Tissues by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection

Eiichi ISHIKURO

(Fukuoka Fertilizer and Feed Inspection Station, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries: 3-11-15, Chihaya, Higashi-ku, Fukuoka, Japan)

A high performance liquid chromatographic method (HPLC) is described for determining lasalocid sodium residues in chicken tissues. Lasalocid was extracted from tissues by homogenizing them with acetonitrile. The supernatant was washed with *n*-hexane saturated with acetonitrile, then applied to a Sep-pak silica cartridge. After evaporation, the residue was dissolved in methanol and determined by HPLC. Lasalocid was separated on a UNISIL PACK 5C18 column (4.6 mm×25 cm) by using a methanol-20 mM phosphate buffer, pH 3.0 (9 : 1) as a mobile phase. Lasalocid was detected with a spectrofluorometer (excitation and emission wavelengths set at 310 nm and 420 nm, respectively). Recoveries of lasalocid sodium added to chicken muscles and chicken livers were in the ranges of 89.4~92.3% and 85.3~89.0%, respectively. The detection limit is 0.005 ppm, which is adequate for residual analysis.

(Received October 21, 1988)

Key words: ラサロシドナトリウム lasalocid sodium; 鶏組織 chicken tissue; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; セップパックシリカ Sep-pak silica

緒 言

ラサロシドナトリウム (LS) はニワトリの抗コクシジウム剤として配合飼料に添加が認められている¹⁾ポリエーテル系の抗生物質であり、米国では肉牛の肥育効果を高める目的でも使用されているが、食品衛生法では食品に含有してはならないこととなっている。しかし最近市販のブロイラー肉中から LS が検出され^{*1}食品衛生上問題となっている。

このため、配合飼料中の LS の鶏組織中への移行状況を調査する必要上、高感度の LS の定量法が要求されている。現在、LS の残留分析は厚生省法²⁾をはじめとしてバイオアッセイ法で実施されているが、迅速性及び簡易性を考慮して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法を検討した。

HPLC による LS の定量法は Weiss ら³⁾, Martinez

ら⁴⁾の牛肝臓中の報告があるが、前処理方法や HPLC の移動相などに難点があった。著者はアセトニトリルで LS を抽出し、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンで脱脂操作を行った後、セップパックシリカカートリッジを用いてクリーンアップを行う簡易で迅速かつ高感度な定量法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

昭和63年8月から10月にかけて福岡市内で市販された鶏肉 (ブロイラー) の筋肉部及び内臓部 (肝臓) を用いた。

2. 試 薬

1) アセトニトリル, *n*-ヘキサン, クロロホルム, メタノール, リン酸二水素カリウム: 和光純薬工業(株)製 (特級)

2) ラサロシドナトリウム: 日本ロシュ(株)製 (純度 96.9%)

* 農林水産省福岡肥飼料検査所: 福岡市東区千早 3-11-15

*¹ 朝日新聞: 昭和61年12月21日朝刊(1986).

Sample 10 g (chicken muscle or liver)

- homogenized twice with 30 ml of acetonitrile
- centrifuged for 5 min at 3,000 rpm
- filtered through cotton plug

Filtrate

- washed with 50 ml of *n*-hexane saturated with acetonitrile

Acetonitrile layer

- evaporated to dryness

Residue

- dissolved in 5 ml CHCl_3

Sep-pak silica cartridge

- applied CHCl_3 solution
- washed with 8 ml of CHCl_3
- eluted with 10 ml of CHCl_3 -methanol (9 : 1)

CHCl_3 -methanol solution

- evaporated to dryness
- dissolved in 2.0 ml methanol

Test solution for HPLC

Scheme 1. Analytical procedure for LS in chicken muscle or liver

3) ラサロシドナトリウム標準溶液: ラサロシドナトリウム 10 mg を精ひょうし, メタノールに溶解して 100 ml としたものを標準原液とした. 標準原液をメタノールで希釈し, 0.1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を調製した.

4) シリカゲルカートリッジ: Sep-pak シリカカートリッジ (Waters 社製) をあらかじめクロロホルム 5 ml で洗浄したものをを用いた.

3. 装 置

1) ホモジナイザー: (株)日本精機製作所製ユニバーサルホモジナイザー

2) 高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 ALC/GPC コンパクト型

3) 検出器: (株)日立製作所製蛍光分光光度計 650-10LC 型

4) インテグレーター: (株)島津製作所製クロマトパック CR-3A 型

4. 試験溶液の調製

細切した鶏肉又は鶏肝臓 10 g をブレンダーカップにひょう取し, アセトニトリル 30 ml を加えて 5 分間ホモジナイズし, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後, 分液漏斗に綿栓ろ過した. 残留物にアセトニトリル 30 ml を加えて同様に操作し, ろ液を合わせた. ろ液にアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 50 ml を加え, 5 分間振り混ぜた後静置し, 下層 (アセトニトリル相) をナス型フラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて 40° の水浴中で減圧乾固した. 残留物をクロロホルム 5 ml に溶解してシリカゲルカートリッジに供する試料溶液とした. シリカゲルカートリッジに試料溶液全量を負荷した後, 少量のクロロホルムで容器を洗浄して洗液もカートリッジに負荷した. クロロホルム 8 ml でカートリッジを洗浄した後, クロロホルム-メタノール (9 : 1) 10 ml を用

Table 1. Operating Conditions for HPLC

Column	UNISIL PACK 5C18 (4.6 mm × 25 cm)
Mobile phase	CH_3OH -20 mM potassium phosphate, monobasic, pH 3.0 (9 : 1)
Column temp.	40°C
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	Hitachi spectrofluorometer 650-10 LC Ex. 310 nm, Em. 420 nm
Sensitivity	SENS 3
Sample size	20 μl

いて 50 ml のナシ型フラスコに溶出した. 溶出液を 40° の水浴中で減圧乾固した後, 残留物をメタノール 2.0 ml に溶解し, 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して HPLC に供した. この操作の概略を Scheme 1 に示した.

5. HPLC の測定条件

測定条件は Table 1 に示した. なお, 定量はピーク高さによる絶対検量線法で行った.

結果及び考察

1. 前処理方法の検討

1) 試料からの抽出

LS の抽出にはメタノール²⁾, アセトニトリル³⁾, メタノール-水⁴⁾が用いられている. そこでメタノール及びアセトニトリルを用いて抽出率を検討したところ両者には差が認められなかったため, クロマトグラム上に夾雑ピークの少なかったアセトニトリルを抽出溶媒に用いることにした.

2) セットアップカートリッジによる妨害物質の除去
抽出液をアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン振とうで油

Fig. 1. Elution pattern of lasalocid from Sep-pak silica cartridge with CHCl_3 -methanol (9:1)

Fig. 2. Fluorescence and excitation spectra of LS in mobile phase

分を除去しただけでは HPLC のクロマトグラム上のラサロシドの溶出位置に妨害ピークを生じるため、カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを検討した。当初、菅野⁵⁾のオープンカラムでのシリカゲルカラムクロマトグラフィーで検討を行ったが、多量の有機溶媒を使用するためセップパックシリカカートリッジで検討を行うこととした。試料抽出液をカートリッジに負荷した後クロロホルム 8 ml で洗浄し、クロロホルム-メタノール (9:1) でラサロシドを溶出し、1 ml ずつ分取し測定したときの溶出パターンを Fig. 1 に示した。ラサロシドは 1 ml から溶出し始め 7 ml で終了した。そこで安全を見込んで溶出液は始めから 10 ml までを取り試験溶液とすることとした。

Fig. 3. Effect of phosphate buffer concentration on fluorescence intensity of lasalocid

Fig. 4. Effect of pH in phosphate buffer on capacity factor (k') of lasalocid

2. HPLC 測定条件の検討

1) 測定波長の選定

LS 標準原液を移動相で希釈して LS の蛍光スペクトルを測定した結果、Fig. 2 に示したように励起極大波長は 310 nm に、蛍光極大波長は 420 nm にそれぞれ認められたため、本法の測定波長を励起波長 310 nm、蛍光波長 420 nm に設定することとした。

2) 移動相の検討

移動相はメタノール及びリン酸塩緩衝液（リン酸二水素カリウム）の混液を用いて、リン酸塩緩衝液の塩濃度及び pH の検討を行った。リン酸塩緩衝液の pH を 3.0 と一定にし、塩濃度を 2.5, 5, 10, 20, 30 及び 50 mM とし、メタノール-リン酸塩緩衝液 (9:1) 混液を作製し、これらを移動相として HPLC により LS 標準溶液のピークを観察した。Fig. 3 に示したとおり、ラサロシドのピーク高さは 20 mM でほぼ一定の高さに達したため、本法のリン酸塩緩衝液の塩濃度を 20 mM に設定した。

次に 20 mM リン酸塩緩衝液の pH を 2.0, 2.5, 3.0, 3.5,

Table 2. Recoveries of LS Spiked to Chicken Muscle and Liver

Sample	Spiked ($\mu\text{g}/10\text{ g}$)	Recovery (%) [*] Mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)
Chicken muscle	0.5	92.3 $\pm$ 4.5	4.9
	1	89.4 $\pm$ 6.9	7.7
	5	89.7 $\pm$ 6.7	7.5
Chicken liver	0.5	89.0 $\pm$ 3.9	4.4
	1	88.9 $\pm$ 5.5	6.2
	5	85.3 $\pm$ 3.6	4.2

* Average of five trials

4.0 及び 4.5 とし、移動相をメタノール-20 mM リン酸塩緩衝液 (9 : 1) 混液として HPLC により LS 標準溶液のピークを観察した。Fig. 4 に示したとおりラサロシドのキャパシティーファクター (k') はリン酸塩緩衝液の pH により変化し、pH 増加に従い k' は減少し、ラサロシドは早く溶出されるが、夾雑物との分離が悪くなった。そこで夾雑物との分離が良好な pH 3.0 を用いることとした。以上の結果から本法の移動相をメタノール-20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) (9 : 1) に設定することとした。

3. 検量線及び検出限界

LS 標準原液をメタノールで希釈して 0.025~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液を調製し、ピーク高さにより検量線を作成した結果、この範囲で直線性が得られた。また本法による LS の検出限界は 0.005 ppm (最小検出量は 0.5 ng, 試料採取量 10 g, 最終液量 2 ml) であった。

4. 添加回収実験

あらかじめ LS が入っていないことを確認した市販の鶏肉 (筋肉部) 及び鶏肝臓 10 g に LS をそれぞれ 0.5, 1 及び 5 μg 添加し、上記試験法に従って回収率を求めたところ、Table 2 に示したとおり良好な結果が得られた。なお、クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。また、本法により市販の鶏肉及び鶏肝臓各々 5 及び 4 検体について試験したところ、いずれの検体からも LS は検出されなかった。

Fig. 5. High performance liquid chromatograms of lasalocid standard and lasalocid in tissue extracts

(1): standard (10 ng)

(2): muscle extract (spiked with 1 $\mu\text{g}/10\text{ g}$ of LS)(3): liver extract (spiked with 1 $\mu\text{g}/10\text{ g}$ of LS)

ま と め

鶏肉及び鶏肝臓中の LS の HPLC による定量法を検討した。試料中の LS をアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンで振とうして脱脂した後、セップパックシリカカートリッジでクリーンアップし HPLC に供した。本法による回収率は鶏肉 89.4~92.3%, 鶏肝臓 85.3~89.0% であった。また、本法による分析所要時間は約 3 時間であった。

文 献

- 1) 農林省令第 35 号: “飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令” (1976).
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課: “畜産物中の残留物質検査法” 第 1 集の 6 (1986).
- 3) Weiss, G., Felicito, N., Kaykaty, M., Chen, G., Caruso, A., Hargroves, E., Crowley, C., MacDonald, A.: J. Agric. Food Chem. **31**, 75~78 (1983).
- 4) Martinez, E., Shimoda, W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69**, 637~641 (1986).
- 5) 菅野 清: 飼料研究報告 **9**, 53~64 (1984).