高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中 ハロフジノンの簡易定量法

(平成3年4月19日受理)

山本雄三^{*1} 橋口玲子^{*1}
荒木桂子^{*1} 串間奉文^{*2}

Simple Determination of Halofuginone in Chicken Tissue by High Performance Liquid Chromatography

Yuzo YAMAMOTO^{*1}, Reiko HASHIGUCHI^{*1}, Keiko ARAKI^{*1} and Hirofumi KUSHIMA^{*2}

(^{*1}Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment: 2-3-2, Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki, Japan; ^{*2}Miyazaki Prefectural Miyakonojo Health Office: 7-3, Hirae-cho, Miyakonojo, Miyazaki, Japan)

A simple and practical method was developed for quantitative analysis of halofuginone (HF) in chicken tissue by high performance liquid chromatography (HPLC). After extraction with acetate buffer (pH 4.3)-methanol (1:1) from a homogenized sample, the extract was concentrated. HF in the concentrated solution was extracted with ethyl acetate in a centrifuge tube with stopper. The ethyl acetate extract was evaporated to dryness. The residue was dissolved in HPLC mobile phase and the resulting solution was subjected to chromatography. HF was separated on a LiChrosorb RP-18 column (4.0 mm×25 cm) by using an acetonitrile-acetate buffer (pH 4.3)-water (1:1:4) containing 0.05 M tetra-*n*-butylammonium bromide as a mobile phase.

The recovery of HF in chicken muscle at the level of 1 µg/g was 87.4±1.8% (n=4). The lower limit of determination was 0.03 µg/g in chicken tissue.

(Received April 19, 1991)

Key words: ハロフジノン halofuginone; 飼料添加物 feed additives; 高速液体クロマトグラフィー - high performance liquid chromatography

はじめに

ブロイラーなどの大規模多数羽飼養においては、疾病予防、成長促進などの目的で、抗菌性物質が飼料添加物あるいは動物用医薬品として使用されているが、近年、とくに抗コクシジウム作用を有する合成抗菌剤クロビドール、ナイカルバジンなどの鶏肉中の残留が指摘され、新しい薬物への移行がすすめられてきている。ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム (HPS) は1979年にハロフジノン (HF) の新しい誘導体として開発されたもので、現在ナイカルバジンに代わって、繁用されているブロイラーの飼料添加物の一つである。

しかし、飼料中の HF の分析法としては石黒ら^{1), 2)}の方法があるものの、鶏肉中の HF の従来からの分析法³⁾は、3時間の酵素処理を行うなど繁雑であり、日常的な分析業務に適する分析法の確立が望まれている。

そこで、著者らは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による HF の定量法の検討をすすめてきた⁴⁾が、今回さらに種々の溶媒を用いて鶏肉中 HF の抽出条件を検討するとともに、HPLC 測定条件にも検討を加え、さらに迅速で簡便な定量法を確立できたので報告する。

実験方法

1. 試料

添加回収実験には、昭和63年8月から平成元年2月にかけて宮崎県下で生産され、あらかじめ HF の残留のないことを確認した鶏肉、鶏卵、鶏レバーを用いた。あ

^{*1} 宮崎県衛生環境研究所: 宮崎県宮崎市学園木花台西 2-3-2

^{*2} 宮崎県都城保健所: 宮崎県都城市平江町 7-3

Scheme 1. Analytical procedure for halofuginone in chicken tissue

わせて行った HF の残留検査には、昭和 63 年 8 月から平成元年 12 月にかけて宮崎県下で飼料添加物として HPS を使用し、生産された鶏肉を用いた。

2. 試薬・試液

ハロフジノン臭化水素酸塩：日本ユクラフ(株)製 (95%以上)

臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBA-Br)：関東化学(株)製、関東化学 1 級

酢酸緩衝液：酢酸アンモニウム 4.85 g と酢酸 7.5 ml を水に溶かして 1L とし、酢酸を用いて pH 4.3 に調整した。

HF 標準液：適量のハロフジノン臭化水素酸を酢酸緩衝液に溶解し、500 μ g/ml の標準原液とし、HPLC 移動相で適宜希釈して用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製、LC-3A 型

検出器：(株)島津製作所製、SPD-2A 型

4. 分析操作

4.1 試験溶液の調製

Scheme 1 に示す方法により調製した。すなわち、細切した鶏肉 10 g をビーカーにとり、酢酸緩衝液-メタノール (1 : 1) 70 ml を加え、ホモジナイズし、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) した。上澄液をとり、残留物に再び

Table 1. Comparison of Solvent for Extraction of Halofuginone in Chicken Tissue

Extracting solvent	Recovery (%)
1 N Hydrochloric acid	72.8
0.1% Citric acid-methanol (1 : 2)	59.9
0.1% Citric acid-methanol (1 : 1)	77.2
0.1% Citric acid-methanol (2 : 1)	74.4
Acetate buffer-methanol (1 : 1)	87.4
Acetate buffer-methanol (2 : 1)	82.8
Acetate buffer-ethanol (1 : 1)	39.0
Acetate buffer-ethanol (2 : 1)	74.0

抽出溶媒 40 ml を加え、再度同様の抽出操作を繰り返し上澄液を合わせ、ろ紙にてろ過した。この抽出溶液を 40° の水浴上で約 20 ml になるまで減圧濃縮した。

濃縮液を共栓付遠心管に移し、20%Na₂CO₃10 ml と酢酸エチル 10 ml を加えて振とうし、エマルジョンを形成するので、遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) し抽出を行った。同様の操作を 3 回繰り返し、酢酸エチルを合わせて減圧濃縮乾固し、残留物を HPLC 移動相 1.0 ml に溶解し、HPLC 用の試験溶液とした。

4.2 HPLC 測定条件

カラム：LiChrosorb RP-18 (5 μ m) 4 mm i.d.×25 cm

Fig. 1. Chromatograms of halofuginone standard and halofuginone in tissue extracts

(1): standard (50 ng)

(2): muscle extract (spiked with 10 µg/10 g of HF)

(3): liver extract (spiked with 10 µg/10 g of HF)

カラム温度: 40°

移動相: 0.05 M 臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム含有アセトニトリル-酢酸緩衝液 (pH 4.3)-水 (1:1:4) 混液

流速: 1.0 ml/min

検出器波長: 243 nm

試料注入量: 5 µl

結果及び考察

1. 抽出溶媒の検討

鶏肉 10 g に HF 10 µg を添加し, 8 種類の抽出溶媒を用いて回収率を比較した (Table 1). その結果, 酢酸緩衝液-メタノール (1:1) が最も回収率が高く, 夾雑ピークの少ないクロマトグラムが得られたのでこれを選択した。

2. 精製操作の検討

著者らのこれまでの方法では⁴⁾, XAD-2 カラムを用いて精製を行ったが, この方法は夾雑ピークが多いため有機溶媒による抽出を試みた。

20% Na₂CO₃ 10 ml でアルカリ性にした 50 ml の酢酸緩衝液層から 50 ml のヘキサン, クロロホルム HF 10 µg の抽出を試みたところ, ほとんど抽出されないが, 酢酸エチル 50 ml で 99% 抽出された。しかし, 鶏肉の抽出液を酢酸エチルと振とうすると, タンパク質が析出し, 分離が困難になった。そこで, 抽出液を濃縮した後, 酢酸エチルを加え振とうし, 遠心分離して抽出すると良

好な回収率 87.4% が得られた。

3. HPLC 測定条件の検討

HPLC による HF の測定条件については Anderson ら³⁾, 石黒ら¹⁾などの報告があるが, 著者らはテーリングをおさえ分離度をさらに高めるよう検討を行った。

石黒らはすでに 1-ペンタスルホン酸ナトリウム及び 1-ヘキサスルホン酸ナトリウムを用いる方法を検討し, イオンペア試薬を使わない方が分離が良好であったと報告しているが¹⁾, 検討の結果, 著者らは TBA-Br を加えることにより, 分離のよいクロマトグラムを得ることができた (Fig. 1)。

4. 検量線及び検出限界

HF 標準原液を HPLC 移動相で希釈して 0.3~10 µg/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, 本法による試料の定量限界は 0.03 µg/g (最小検出量 1.5 ng, 試料採取量 10 g, 最終液量 1.0 ml) であった。

5. 添加回収実験

鶏肉, 鶏肝臓, 鶏卵, 各 10 g に HF 10 µg (10 µg/ml 溶液 1 ml) を添加し, 本法による回収率 (平均±標準偏差) を求めた結果, それぞれ 87.4±1.8 (n=4), 64.1±6.8 (n=4), 64.3±11.8 (n=5) であった。鶏卵, 鶏肝臓についてはさらに試験法の検討が必要と思われる。

あわせて著者らは, 宮崎県下で, 飼料添加物として HPS を使用し, 生産された鶏肉 38 検体について HF の

検査を行ったところ、いずれからとも HF は検出されなかった。

ま と め

酢酸緩衝液-メタノール (1:1) を用いて抽出した抽出液を減圧濃縮した。これを酢酸エチルで抽出し、HPLC に供することにより HF の定量が可能であった。

HPLC の移動相として 0.05 M 臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム含有アセトニトリル-酢酸緩衝液 (pH 4.3)-水 (1:1:4) 混液を用い、良好な分離を得た。

本法による鶏肉中からの HF の回収率は 87% であっ

た。分析所要時間は約 5 時間であり、簡便かつ迅速な定量法を確立することができた。

文 献

- 1) 石黒瑛一, 佐藤康宏: 飼料研究報告 **12**, 69~78 (1987).
- 2) 飼料分析基準研究会編: “飼料分析基準注解 (第二版)” p. 156~159 (1987).
- 3) Anderson, A., Goodall, E., Bliss, G. W., Woodhouse, R. N.: J. Chromatography **212**, 347~355 (1981).
- 4) 山本雄三, 橋口玲子, 串間奉文: 宮崎県衛生研究所報 **30**, 39~41 (1989).