高速液体クロマトグラフィーによる動物組織中の クレンブテロールの定量

(平成6年12月1日受理)

宮崎 奉之*¹ 中 島 勉*²
橋 本 常 生*¹ 小久保彌太郎*¹

Determination of Clenbuterol in Animal Tissues by High Performance Liquid Chromatography

Tomoyuki MIYAZAKI*¹, Tsutomu NAKAJIMA*², Tsuneo HASHIMOTO*¹
and Yataro KOKUBO*¹

(*¹ The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan; *² Yokohama City
Aobaku Health Center: 4-2, Moegino, Aoba-ku,
Yokohama 227, Japan)

A high performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection was developed for the determination of clenbuterol (CBL) in animal tissues. CBL was extracted with 3% metaphosphoric acid in the presence of dichloromethane. After adjustment of the pH of the extract to above 9.0, CBL was reextracted with *n*-hexane-ethyl acetate (1:1), followed by a Polyspher RP-18 clean-up procedure. The HPLC separation was carried out on an L-column ODS using 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5)-acetonitrile (7:3) as the mobile phase at flow rate of 0.9 ml/min. Ultraviolet detection was operated at the wavelength of 209 nm or 242 nm. The recovery of CBL from tissues spiked at the level of 0.2 µg/g was 75.1~86.4%, and the detection limit was 0.005 µg/g.

(Received December 1, 1994)

Key words: β -作動薬 β -agonist; クレブテロール clenbuterol; 残留 residue; 高速液体クロマト
グラフィー high performance liquid chromatography

緒 言

近年、肉用牛に成長促進の目的でゼラノール、エストラジオールなどのタンパク同化剤が多くの国々で使用されており、著者らはこれらの薬剤の残留分析法を報告してきた^{1), 2)}。ウシ、ブタに投与して、タンパク質の多い赤身肉を増やすとともに増体効果を示すものに β -作動薬があるが、これらもタンパク同化剤と同様に成長促進剤に分類される。 β -作動薬は成長促進剤として現在許可されていないが、不法に使用した β -作動薬のクレブテロール(CBL)が残留した食肉類を摂取することにより生じた中毒例がヨーロッパなどで発生しており、1991

年にはスペインにおいて135人が入院した事件があった^{3), 4)}。このような状況下、輸入食肉類中のCBLを調査するため、残留分析法の検討を開始した。動物組織中のCBLの化学的分析法としてはポストカラム誘導体化法による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)^{5)~7)}、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー^{8)~11)}などが報告されている。ここではこれらの報告より簡易に測定するため、操作が容易で汎用されている紫外外部吸収(UV)検出器を用いたHPLCによる分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

食肉類(牛肉、牛肝臓、豚肉、豚肝臓)は市販品。
CBL・塩酸塩標準品: Sigma社製品。ジクロロメタン、

*¹ 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町3-24-1

*² 横浜市青葉区保健所: 〒227 横浜市青葉区もえぎ野4-2

n-ヘキサン, 酢酸エチル, アセトニトリルは HPLC 用。無水炭酸ナトリウム, メタリン酸, リン酸, ホウ酸, 濃塩酸, リン酸二水素ナトリウム・2 水和物, 無水硫酸ナトリウム及び水酸化ナトリウムは試薬特級品。固相抽出 (SPE) カートリッジは Polyspher RP-18 (100 mg, E. Merck 社) (現在, Polyspher RP-18 は販売が中止され, Polysorb MP-1 (100 mg, Interaction Chemicals Inc.) は同等品) 及び Bond Elut C₁₈ (200 mg, Varian). 0.01 M リン酸塩緩衝溶液 (pH 3.5) はリン酸二水素ナトリウム・2 水和物 1.56 g を精製水に溶かし, 10% リン酸にて pH 3.5 に調整し, 1 L とした。

CBL 標準溶液の調製: CBL-塩酸塩 (95%) 29.78 mg を精製水 50 ml に溶解して, 500 µg/ml 溶液とし, この 2 ml を HPLC 移動相に溶解して 100 ml とした。検量線の作成及び添加回収実験には本溶液を移動相で適宜希釈して使用した。

2. 器具及び装置

ホモジナイザー: Ultra-Turrax T 25 (Janke Kunkel Ika-Labortechnik 製), SPE 処理装置: Visiprep D-L (Supelco Co.), HPLC カラム: L-column ODS (5 µm, 4.6 i.d. × 250 mm, (財) 化学品検査協会), LiChrosorb RP-Select B (7 µm, 4.0 i.d. × 250 mm, 関東化学(株)), 遠心器: RL-601 型 ((株) トミー精工), 自記分光光度計: 220A 型 ((株) 日立製作所), HPLC 装置: ポンプ; 880-PU 型, オートサンプラー; 851-AS 型, UV 検出器; 875-UV 型 (以上は日本分光工業(株) 製), 脱気装置: Shodex DEGAS KT-25 (昭和電工(株))。

3. 試験溶液の調製及び HPLC 測定

3.1 抽出法

細切した試料 5.0 g を遠心管に採り, ジクロロメタン 7 ml, 3% メタリン酸 60 ml を加え, ホモジナイズした。2,500 rpm で 10 分間遠心分離し, 上層を分取した。再度, 3% メタリン酸 40 ml で抽出し, 抽出液を合わせた。この抽出液に 20% 炭酸ナトリウム 20 ml を加え, pH 9 以上とし, *n*-ヘキサン-酢酸エチル (1:1) 60 ml で抽出した。この抽出液を無水硫酸ナトリウムにて脱水後, 減圧下にて濃縮乾固した。

3.2 クリーン・アップ法

SPE 処理装置を用いて, メタノール 4 ml, 水 4 ml, 5 mM NaOH-メタノール (7:3) 約 4 ml であらかじめコンディショニングした Polyspher RP-18 カートリッジに, 上記残留物を 5 mM NaOH-メタノール (7:3) 約 1 ml ずつ 3 回でカートリッジに負荷した。5 mM NaOH-メタノール (7:3) 4 ml で洗浄し十分に吸引した後, アセトニトリル 4 ml で溶出した。この溶液を室素気流下にて, 濃縮乾固し, 移動相 1.0 ml に溶解して, HPLC 測定溶液とした。

3.3 HPLC 測定法

HPLC 測定条件: カラム; L-column ODS, 注入量; 20

Fig. 1. Chemical structure of clenbuterol

Table 1. Effect of Extracting Solvents on the Recovery of Clenbuterol from Bovine Tissues

Extracting solvent	Recovery (%)	
	Muscle	Liver
0.5% MPA	84.5	71.0
1.0% MPA	81.3	81.5
2.0% MPA	84.7	81.2
3.0% MPA	87.3	86.1
5.0% MPA	84.6	87.2
0.5 N HCl	83.6	84.7

Recovery of clenbuterol (2 µg) added to bovine tissues.

Average of results of three replicates.

MPA = metaphosphoric acid

µl, カラム温度; 40°, 流速; 0.90 ml/min., 移動相; 0.01 M リン酸塩緩衝溶液 (pH 3.5)-アセトニトリル (7:3), 測定波長; 209 nm (陽性の場合, 242, 295 nm で測定する)。

結果及び考察

β-作動薬の構造はいずれも phenylethanolamine を基本骨格としたものである。CBL の化学構造式は Fig. 1 に示すように, この基本骨格の芳香環に 2 個の塩素とアミノ基が置換している塩基性物質であり, この性質を考慮して分析法を検討した。

1. 前処理法の検討

1.1 抽出法

CBL は塩基性物質であることから, 塩酸, リン酸, ホウ酸, メタリン酸などの無機酸が抽出溶媒として使用できると考えた。既に, 動物組織からの抽出法として, 希塩酸を使用した報告があるため^{6,7)}, これも含めてこれらの酸による抽出法を予備的に調査した。その結果, 希塩酸及び除タンパク作用があるメタリン酸が比較的良好であったことから, これについて更に検討を加えた。動物組織から, これらの酸で直接抽出するより, ジクロロメタンを加え, ホモジナイズした方が, タンパク質の変性, 脂質の除去に有効であり, 次の段階の有機溶媒抽出による分離も良好であったことから, 抽出前にジクロロメタンを加えることとした。抽出液に CBL を加え, pH 9 以上に調整し, *n*-ヘキサン-酢酸エチル (1:1) 抽出によ

Table 2. Recoveries of Clenbuterol from the SPE Cartridges

SPE Cartridge	Recovery (%)	
	Muscle	Liver
Polyspher RP-18	100.9	100.3
Bond Elut C ₁₈	74.2	76.7

Recovery of clenbuterol (2 µg) added to bovine tissue extracts.

Average of results of three replicates.

Fig. 2. Effect of pH of mobile phase on capacity factor (k') values of clenbuterol

(A): Select B column; phosphate (p.) buffer-acetonitrile (MeCN) (7:3), (B): Select B column; p. buffer-MeCN (8:2), (C): L-column, p. buffer-MeCN (7:3), (D): L-column, p. buffer-MeCN (8:2)

り、CBL はほぼ定量的に回収された。

メタリン酸及び塩酸抽出法について検討した。Table 1 に示すように、メタリン酸濃度が 0.5, 1% では回収率が若干低く、抽出液が濁る傾向にあった。また、*n*-ヘキサン-酢酸エチル抽出の分離状態は 0.5 *N* 塩酸抽出はメタリン酸に比べエマルジョンの形成が多かった。メタリン酸濃度が高いほど、抽出の分離状態及び回収率は良いが、pH 調整に多量の塩基が必要で液量も多くなるため、最終的に 3% メタリン酸抽出とした。なお、本抽出法は塩基性物質の分析の際の抽出法として、応用が期待できる。

1.2 SPE カートリッジによるクリーン・アップ

上記抽出液を HPLC にて測定したとき、CBL ピークの近くに数 ppb レベルで妨害ピークが存在するため、更に SPE (Polyspher RP-18 及び Bond Elut C₁₈) について検討した。

Table 2 に示すように、Polyspher RP-18 では CBL はほぼ定量的に回収されたが、Bond Elut C₁₈ では約

Fig. 3. UV spectra of clenbuterol in mobile phase

10 ppm sol.: —, 5 ppm sol.: - - -

75% の回収率しか得られなかった。更に、Polyspher RP-18 はクリーン・アップ効果も良好であることから、これを使用することとした。

2. HPLC 測定条件の検討

2.1 HPLC カラム, 移動相及び測定波長

HPLC カラムとして、CBL 分離の報告例が多い逆相系の LiChrosorb RP-Select B (内容は C₈)^{6), 11)~13)}、及び塩基性物質の分離に良いと言われる高純度シリカゲルを使用した L-column ODS の 2 種を用いた。移動相として、10 mM リン酸塩緩衝溶液を使用し、最適な pH 及び緩衝溶液とアセトニトリルとの混合比について検討した。

Fig. 2 に示すように、Select B の場合、移動相が中性側ほど、 k' (Capacity Factor) は急激に大きくなった。一方、L-column では k' はほとんど変化しなかった。いずれのカラムとも、逆相系の特徴であるアセトニトリルの比率が高いほど、 k' は小さい値を示した。また、いずれの測定波長 (209, 242, 295 nm) でも、移動相の pH が中性に近づく程、ベースラインのノイズが高くなり、CBL ピークのテーリングが大きくなった。以上の結果から、分析カラムには L-column を使用し、移動相として 10 mM リン酸塩緩衝溶液 (pH 3.5)-アセトニトリル (7:3) を用いることとした。

CBL の UV スペクトルを Fig. 3 に示す。測定波長 295, 242, 209 nm におけるピークの面積比は 1:3.5:15 で、これは UV スペクトルの強度比とほぼ一致した。実際の牛肉、牛肝臓、豚肉、豚肝臓試料を測定したところ、

Table 3. Recoveries of Clenbuterol from Animal Tissues

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
Bovine muscle	0.2	81.6 ± 2.0
Bovine liver	0.2	77.3 ± 5.9
Porcine muscle	0.2	86.4 ± 5.2
Porcine liver	0.2	75.1 ± 4.0

Recoveries are mean $\pm$ standard deviations ($n=4$).

209 nm のクロマトグラムではピークがベースラインより下がる場合が見られるが、感度が高く妨害ピークも問題とならないことから、測定波長とした。しかし、209 nm においてピークが検出された場合、242, 295 nm にて測定を行い、そのピーク面積比が標準品に一致することを確認できれば、定性の信頼度はより向上すると考える。このことから CBL の測定にはフォトダイオードアレイ検出器の使用は有効と考えられるため、今後、検討の予定である。

2.2 検量線

測定波長 209 nm にて、CBL 標準品を用い 0.2~500

Fig. 4. Typical chromatograms of bovine tissue extracts

(A): an extract of bovine muscle fortified with $0.2 \mu\text{g/g}$ of clenbuterol (CBL), (B): an extract of bovine muscle, (C): an extract of bovine liver fortified with $0.2 \mu\text{g/g}$ of CBL, (D): an extract of bovine liver

HPLC conditions: column, L-column ODS; mobile phase, $0.01 M$ phosphate buffer (pH 3.5)-acetonitrile (7 : 3), UV detection: 209 nm, flow rate: 0.9 ml/min

Fig. 5. Typical chromatograms of porcine tissue extracts

(A): an extract of porcine muscle fortified with $0.2 \mu\text{g/g}$ of CBL, (B): an extract of porcine muscle, (C): an extract of porcine liver fortified with $0.2 \mu\text{g/g}$ of CBL, (D): an extract of porcine liver

See Fig. 4 for HPLC conditions.

ng まで測定し、検量線を求めたところ、ピーク面積と量
の間に高い相関性と良好な直線性が得られた。この時の
最少検出量は 0.2 ng (S/N=3 以上) であった。一方、
242 nm においても同様に検量線は良好な直線性を示
し、その最少検出量は 0.5 ng (S/N=3 以上) であった。

3. 添加回収実験

CBL の残留が認められなかった市販の牛肉、牛肝臓、
豚肉、豚肝臓を用い、添加回収実験を実施した。Table 3
に示すように平均回収率は 75.1~86.4% であり、肝臓
試料で少し回収率が低かったが、いずれも 75% を越え
ており残留分析法として、満足できるものと思われる。
また、標準の CBL と同じ保持時間に一致するピークは
認められなかった。試料から得たクロマトグラムを Fig.
4, 5 に示す。本分析法の最少検出濃度は 2 ppb である
が、測定波長 242 nm では、5 ppb となった。信頼性が
高まることから 5 ppb を検出限界値とした。

4. 市販食肉類中の残留調査

都内で市販されていた牛肉、牛肝臓、豚肉、豚肝臓各
4, 2, 2, 2 検体の計 10 検体を用いて、実態調査を実施し
たが、検出限界の 5 ppb を越えて検出されなかった。

本研究の要旨は日本食品衛生学会第 66 回学術講演会
(1993 年 10 月, 仙台) にて発表したものである。

文 献

1) 宮崎奉之, 橋本常生, 丸山 務, 松本昌雄, 中澤裕之: 食

衛誌. 30, 384~389 (1989).

- 2) 橋本常生, 宮崎奉之, 伊藤 武, 松本昌雄, 丸山 務, 中
澤裕之: 同上 34, 211~215 (1993).
- 3) Food Chemical News, p. 32, April (1991).
- 4) WHO, Weekly Epidemiological Record, No. 37 (11,
September, 1992, 67th year).
- 5) Degroodt, J.-M. Wyhowski de Bukanski, B., Beernaert,
H., Courtheyn, D.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 189, 128
~131 (1989).
- 6) Degroodt, J.-M. Wyhowski de Bukanski, B., De Groof, J.,
Beernaert, H.: *ibid.* 192, 430~432 (1991).
- 7) Courtheyn, D., Desaver, C., Verhe, R.: J. Chromatogr.
564, 537~549 (1991).
- 8) Girault, J., Fourtillan, J. B.: *ibid.* 518, 41~52 (1990).
- 9) Leyssens, L., Criessen, C., Jacobs, A., Czech, J., Raus, J.:
ibid. 564, 515~527 (1991).
- 10) Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A., Cannavan, A., Elliott,
C. T., Kennedy, D. G.: Biol. Mass Spectrom. 22, 326~
330 (1993).
- 11) Qureshi, G. A., Eriksson, A.: J. Chromatogr. 441, 197~
205 (1988).
- 12) Haasnoot, W., Ploum, M. E., Plaulussen, R. J. A., Schilt,
R., Huf, F. A.: *ibid.* 519, 323~335 (1990).
- 13) Meyer, H. H. D., Rinke, L., Dursch, I.: *ibid.* 564, 551~
556 (1991).