

技術レポート

1 飼料中のフロルフェニコールの液体クロマトグラフによる定量法
(中間報告)小野 雄造^{*1}, 渡部 千会^{*2}

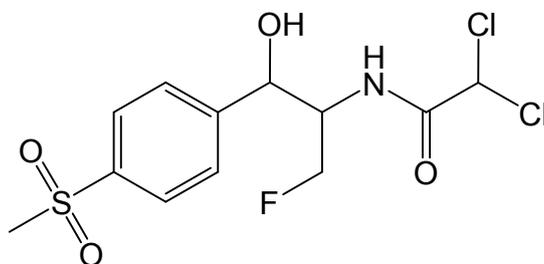
1 緒 言

フロルフェニコールは、構造的、作用的にクロラムフェニコールと類似しており、広い抗菌スペクトルを持つ合成抗菌剤である。効果は一部の菌種を除いて静菌的であり、細菌の 70S リボゾームの 50S サブユニットに結合することにより、ペプチド転移酵素を阻害し、たん白質合成を阻害する。フロルフェニコールを主剤とする動物用医薬品は、国内では牛、豚、鶏といった家畜の他、一部の魚類にも使用されている。米国、EU 諸国においても牛、豚、鶏、羊及び魚類 (finfish) に対して使用が認められている。ヒト用医薬品としての使用はない¹⁾。

フロルフェニコールは飼料添加物として指定されていない抗菌性物質であり、飼料安全法に基づく成分規格では飼料に含んではならないこととされている²⁾。

今回、平成 19 年度「飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した飼料中のフロルフェニコールの分析法³⁾ (以下「分析センター法」という。) を基に飼料分析基準への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、フロルフェニコールの構造式を Fig. 1 に示した。



2,2-dichloro-*N*-((1*R*,2*S*)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)propan-2-yl) ethanamide
C₁₂H₁₄Cl₂FNO₄S MW: 358.2 CAS No.: 76639-94-6

Fig. 1 Chemical structure of florfenicol

2 実験方法

2.1 試 料

市販の国産魚粉、輸入魚粉及び配合飼料 (大すう育成用及びにじます育成用) をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 同福岡センター

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2.2 試 薬

1) フロルフェニコール標準液

フロルフェニコール ($C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$) 標準品 (和光純薬工業製, 純度 98.0 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてフロルフェニコール標準原液を調製した (この液 1 mL はフロルフェニコールとして 0.5 mg ($f=0.98$) を含有する.).

使用に際して, 標準原液の一定量を水-アセトニトリル (17+3) で正確に希釈し, 1 mL 中に 0.05~5 μ g を含有するフロルフェニコール標準液を調製した.

2) アセトニトリル, アセトン, ヘキサン及び酢酸エチルは残留農薬分析用を用いた. 液体クロマトグラフに用いるアセトニトリル及び水並びにメタノールは, 液体クロマトグラフ用を使用した.

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ: Agilent Technologies 製 1100 シリーズ

2) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカーSR-2DW

3) ロータリーエバポレーター: BÜCHI 製 R-200

4) 多孔性ケイソウ土カラム: Varian 製 Extube Extraction Columns Chem Elut (5 mL 容)

5) シリカゲルミニカラム: Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの

6) グラファイトカーボンミニカラム: Supelco 製 Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL)

7) メンブランフィルター: ゲルマンラボラトリー製 Ekicrodisc 13CR (孔径 0.45 μ m, PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL を加えて潤し, 30 分間静置した後, アセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間かき混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し, 洗液をろ液に合わせた. 更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた. 試料溶液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

試料溶液に水 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 10 分間静置した. 100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き, 試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 3 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下して, フロルフェニコールを溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した.

ヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理 II に供する試料溶液とした.

3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL であらかじめ洗浄した.

試料溶液をシリカゲルミニカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた.

試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次シリカゲルミニカラムに加え、同様に流出させた。

先のシリカゲルミニカラムの下に、あらかじめヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラムを連結した。50 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 20 mL をシリカゲルミニカラムに加えてフロルフェニコールを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-アセトニトリル (17+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、液体クロマトグラフによる測定に供する試料溶液とした。

4) 液体クロマトグラフによる測定

試料溶液及び各フロルフェニコール標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、表 1 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

表 1 液体クロマトグラフ測定条件

検出器	紫外吸光度検出器(測定波長225 nm)
カラム	L-column ODS (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 µm)
カラム槽温度	40 °C
溶離液	水-アセトニトリル(17+3)
流速	1.0 mL/min

5) 計算

得られたピーク面積又は高さより検量線を作成し、試料中のフロルフェニコール量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液をそれぞれ 20 µL ずつ液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は 1~100 ng の範囲で直線性を示した。

3.2 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

分析センター法では、試料溶液に 5 %塩化ナトリウム溶液 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10 分間静置した後、ヘキサン洗浄を行い、酢酸エチルによりフロルフェニコールを溶出させている。しかしながら、筆者らが検討したところ、国産魚粉を用いて調製した試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに負荷したところ、ヘキサン洗浄の際、流出速度が著しく遅く、かつフロルフェニコールが流出することが確認された。このことから、ヘキサン洗浄によるフロルフェニコールの損失を防ぐため、この操作を省くこととした。また、5 %塩化ナトリウム溶液については、塩化ナトリウムの析出により多孔性ケイソウ土カラム処理以降の操作の妨げになることから、水に変更することとした。

以上のことから、国産魚粉にフロルフェニコールとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、2.4 の 1) に従って調製した試料溶液に水 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、

10 分間静置した後，酢酸エチルによる溶出画分の確認を行った。

その結果，表 2 のとおり，フロルフェニコールは 0~20 mL の画分に溶出し，それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から，本法では安全をみて酢酸エチル 30 mL で溶出することとした。

表 2 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

溶出画分 (mL)	酢酸エチル				合計
	0~10	~20	~30	~40	
フロルフェニコール回収率 ^{a)}	81	12	0	0	93

a) $n=2$ の平均回収率

3.3 精製方法の検討

筆者らが分析センター法に従い輸入魚粉中のフロルフェニコールの定量を行ったところ，その定量を妨害する物質の存在が確認された。分析センター法ではシリカゲルミニカラムを用いた精製を行っているが，Hayes⁴⁾は，魚粉の配合割合の多い養魚用飼料中のフロルフェニコールの定量にグラファイトカーボンミニカラムを用いた精製を行っていることから，シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムを組み合わせた精製方法が妨害物質の除去に効果があるか検討を行った。

その結果，精製方法として，フロルフェニコールをシリカゲルミニカラムに保持させた後，シリカゲルミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し，フロルフェニコールを溶出させる方法が，妨害物質の除去に効果があることが確認された。以上の結果から，本法ではシリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムを組み合わせた精製方法を用いることとした。

3.4 シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの溶出画分の検討

シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムについて溶出画分の検討を行った。輸入魚粉にフロルフェニコールとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 2.4 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製した。2.4 の 3)のカラム処理 II において，溶出液であるヘキサノーアセトン (7+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。以下，本法に従い，各溶出画分中のフロルフェニコール量を算出し，溶出画分を確認した。

その結果，表 3 のとおり，フロルフェニコールは 0~10 mL の画分に溶出し，それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から，本法では安全をみてヘキサノーアセトン (7+3) 20 mL で溶出することとした。

表 3 シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの溶出画分の検討

溶出画分 (mL)	ヘキサノーアセトン (7+3)				合計
	0~10	~20	~30	~40	
フロルフェニコール回収率 ^{a)}	103	0	0	0	103

a) $n=2$ の平均回収率

3.5 妨害物質の検討

国産魚粉（1 種類），輸入魚粉（2 種類）及び配合飼料（幼すう育成用，大すう育成用，ほ乳期子豚育成用，豚数種用，あゆ育成用，にじます育成用，ぶり育成用及びまだい育成用）を用い，本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し，定量を妨げるピークの有無を確認したところ，妨害ピークは認められなかった。

3.6 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

国産魚粉，輸入魚粉及び配合飼料（鶏用及び養魚用）に，フロルフェニコールとしてそれぞれ 1 及び 10 mg/kg 相当量添加し，本法に従って 3 回分析を行い，その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果，表 4 のとおり，フロルフェニコールの平均回収率は 102~117 %，その繰返し精度は RSD として 6.0 % 以下であった。

なお，標準液及び添加回収試験で得られた輸入魚粉におけるクロマトグラムの一例を図 1 に示した。

表 4 添加回収試験結果

試料の種類 添加量		国産魚粉		輸入魚粉		大すう育成用 配合飼料		にじます育成用 配合飼料	
		回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}						
1 mg/kg		103	(5.0)	117	(1.1)	105	(6.0)	102	(3.4)
10 mg/kg		103	(4.0)	106	(4.2)	103	(4.6)	103	(3.8)

a) $n=3$ の平均回収率

b) 相対標準偏差

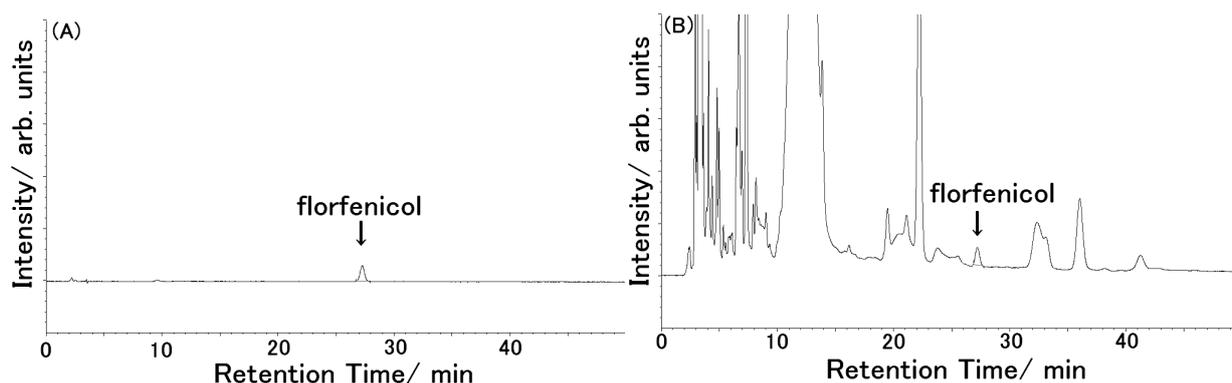


図 1 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例

(A) 標準液（フロルフェニコールとして 4 ng 相当量）

(B) 試料溶液（輸入魚粉，試料中 1 mg/kg 相当量添加）

3.7 検出下限

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験を実施し，得られるピークの SN 比並びに回収

率及び繰返し精度を求めた。

国産魚粉及び大すう育成用配合飼料にフロルフェニコールとして 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は表 5 のとおりであり、また、得られたピークの SN 比はいずれの試料においても 10 程度となったことから、本法は試料中 0.5 mg/kg のフロルフェニコールを検出可能と考えられた。

表 5 フロルフェニコールの検出下限付近の添加回収試験結果 (%)

試料の種類 添加量	国産魚粉		大すう育成用 配合飼料	
	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5 mg/kg	96.3	(10.8)	102	(1.4)

a) $n=3$ の平均回収率

b) 相対標準偏差

4 今後の検討項目

本法の検討に当たっては、汎用性の観点から液体クロマトグラフを用いて、飼料原料（魚粉）及び配合飼料中のフロルフェニコールの定量法を検討したところである。

今後、魚粉以外の飼料原料でも検討を行う予定であるが、その場合、夾雑物質の影響の低減等の更なる検討が必要と考えられた。また、飼料添加物に指定されていない他の抗菌性物質（クロラムフェニコール等）の分析法が既に飼料分析基準⁵⁾に収載されており、迅速性の観点から分析操作の共通化を考慮する必要があると考えられた。

以上のことから、今後は、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた方法について更に検討を行う予定である。

文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 19 年 8 月 30 日，府食第 822 号 (2007).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発）(2008).
- 4) John M. Hayes: J. AOAC Int., **88**, 1777 (2005).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).