

高速液体クロマトグラフィーによる 養殖ブリ中のフロルフェニコールの定量

上野隆二・寺門弘悦・青木恭彦

三重大学生物資源学部

Determination of Florfenicol in Cultured Yellowtail by High Performance Liquid Chromatography

Ryuji UENO, Hiroyoshi TERAKADO and Takahiko AOKI

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

High performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of florfenicol (FF) in muscle, serum, liver, kidney and bile of cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* was developed.

Analysis was conducted in 3 steps: (A) in muscle and serum, FF was extracted with acetonitrile and then *n*-hexane. The sample was subjected to HPLC analysis. (B) in liver and kidney, the sample was dissolved in *n*-hexane and cleaned up by Sep-pak florisil cartridge after treated by step (A). (C) in bile, the sample was dissolved in acetonitrile and cleaned by Sep-pak florisile cartridge after (A).

The average recovery and coefficient of variation of FF from yellowtail were determined as be 90.2-103% and 3.9-9.1%, respectively. The detection (a signal-to-noise ratio of 3) was 0.03 ppm for muscle and serum, 0.04 ppm for liver and kidney and 0.1 ppm for bile.

Key Words : florfenicol, yellowtail, HPLC

1. 緒 言

フロルフェニコール [D-d-threo-3-fluoro-2-dichloro-acetamide-1-(4-methylsulfonylphenyl)-1-propanol, 以下FFと略す。] はグラム陽性菌・陰性菌に幅広い抗菌スペクトルを示すクロラムフェニコールの合成抗菌剤で、水産用医薬品として使用されている (Fig.1)。その抗菌作用としては、ブリの連鎖球菌症・類結節症、ウナギのパラコロボの原因細菌である

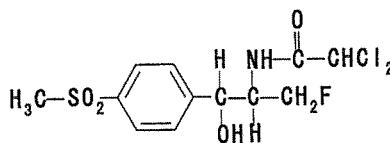


Fig.1. Structure of florfenicol.

Enterococcus seriolicida, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda* のリボゾムの蛋白合成を阻害することが知られている。

FF の分析法として、バイオアッセイ法^{1,2)}、ガスクロマトグラフィー (GC)³⁾ および高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{4,12)} による方法が報告されている。バイオアッセイ法は一般的に感度も低く、特異性にも欠ける。GC による方法は誘導体化を必要とし、操作も煩雑である。一方、HPLC による方法は、高感度で特異性に優れ、操作も迅速かつ簡便である。HPLC 法による生体組織中の FF の定量に関していくつか報告がある。すなわち、哺乳類では、ウシの血漿^{4,6,10-12)}、腎臓、肝臓などの臓器¹⁰⁾ の報告があり、魚類では、Nagata ら⁹⁾ のハマチの筋肉、Hormazabal ら⁷⁾ のニジマスの筋肉、肝臓、Martinsen ら⁸⁾ の大西洋サケの血漿についての報告がある。

本研究では、薬物速度論的解析で用いる血清、主要な薬物代謝器官である肝臓、腎臓および胆嚢中の胆汁、可食部である筋肉中の FF の定量を試みたところ、上記の方法では妨害物質が多く、定量は困難であった。そこで、本研究では養殖ブリの筋肉、血清、肝臓、腎臓および胆汁中の FF の定量を行うための抽出方法および HPLC 分析条件を検討した。

2. 実験方法

1. 試料

三重県科学技術振興センター水産技術センター尾鷲分場より入手したブリ *Seriola quinqueradiata* (平均魚体重 699 ± 98.4 g) を用いて筋肉、血清、肝臓、腎臓および胆汁を採取した。

2. 試薬

フロルフェニコール (純度 98.8%) には武田工業薬品株式会社より分譲されたものを用いた。Sep-pak フロリジルカートリッジは Waters 社製、 $0.20 \mu\text{m}$ PTFE メンブレンフィルターは Advantec 社製をそれぞれ用いた。その他の試薬は和光純薬工業製の特級、または、HPLC 用を用いた。

3. 装置および HPLC 分析条件

高速液体クロマトグラフィーは LCSS-905 型システム (日本分光製)、分光光度計は U-1100 型分光光度計 (日立製作所) をそれぞれ用いた。

FF 標準溶液には FF 10 mg をメタノール 100 ml に溶解して標準溶液 ($100 \mu\text{g/ml}$) とし、使用直前にはメタノールで希釈したものを用いた。なお、溶液は冷暗所で保存した。最終的に採用した HPLC 分析条件は Fig.2-1 の通りである。

4. 抽出方法

筋肉、血清、肝臓、腎臓および胆汁の各組織をそれぞれ 1.0 g, 1.0 ml, 0.5 g, 0.5 g および 0.5 ml ずつ用いた。血清は、ブリの尾部血管より採取した血液を 4°C で一晩静置した後 $3,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離し、得られた上澄みを用いた。他の組織については採取後直ちに -30°C で保存した。

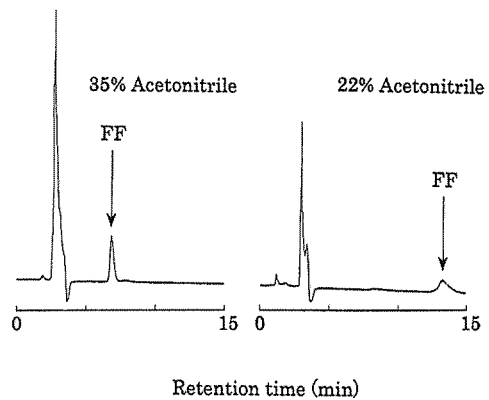


Fig.2-1. Typical chromatograms of florfenicol with $2 \mu\text{g/ml}$. Chromatographic conditions was as follows. The analytical column was a YMC-Pack ODS-A, $250 \times 4.6 \text{ mm}$ I.D., $5 \mu\text{m}$ particle size (YMC, Japan), protected with a guard column, YMC-Pack ODS-A Guard Cartridge. The mobile phase was 35% acetonitrile but 22% acetonitrile was used for bile. The flow-rate was 1.0 ml/min , and the UV detector was set at 225 nm and 0.02 a.u. . The sample volume injected onto the column was $20 \mu\text{l}$. The analysis was performed at ambient temperature.

(A) 筋肉および血清

筋肉 1.0 g および血清 1.0 ml に無水硫酸ナトリウム 2 g, アセトニトリル 30 ml を加え, 1 分間ヒスコトロン (マイクロテックニチオン製) で, ホモジナイズし, 得られた溶液を 15,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上清液を 500 ml 容分液ロートに移した。残った沈殿にさらにアセトニトリル 30 ml を加えて攪拌し, 遠心分離後, 上清液を分液ロートに移した。集められた上清液に, *n*-ヘキサン 60 ml を加え 5 分間激しく振盪した後, アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層にさらに *n*-ヘキサン 30 ml を加え 5 分間激しく振盪した後, アセトニトリル層を分取した。得られたアセトニトリル層を集め, これに *n*-プロパノール 10 ml を加え, 40°C の水浴中で減圧乾固した。得られた残渣を 35% アセトニトリル 1 ml に溶解し, *n*-ヘキサン 1 ml を添加して攪拌した。その溶液を 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し, 得られたアセトニトリル層を 0.20 μ m PTFE メンブレンフィルターで濾過し, これを HPLC 用試料とした。

(B) 肝臓および腎臓

試料のアセトニトリル抽出から減圧乾固までは, (A) と同じ方法で実施した。乾固後, 得られた残渣を *n*-ヘキサン 5 ml で溶解し, その溶液をあらかじめ *n*-ヘキサン 5 ml とジエチルエーテル 5 ml で平衡化した Sep-pak フロリジルカートリッジに添加した。*n*-ヘキサン 5 ml でカートリッジを洗浄後, メタノール-ジエチルエーテル (3:7, v/v) で FF を溶出した。溶出液を減圧乾固 (40°C) し, 残渣を 35% アセトニトリル 1 ml に溶解した後, その溶液に *n*-ヘキサン 1 ml を添加して, 攪拌後, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し, 得られたアセトニトリル層を 0.20 μ m PTFE メンブレンフィルターで濾過し, これを HPLC 用試料とした。

(C) 胆汁

(B) と同様に, (A) ステップに続き, 得られた残渣をアセトニトリル 5 ml に溶解し, あらかじめ *n*-ヘキサン 5 ml とジエチルエーテル 5 ml で平衡化した Sep-pak フロリジルカートリッジに添加した。溶出液を減圧乾固 (40°C) し, 残渣を 22% アセトニトリル 1 ml に溶解した後, その溶液に *n*-ヘキサン 1 ml を添加して攪拌した。3,000 rpm で 5 分間遠心分離後, 得られ

たアセトニトリル層を 0.20 μ m PTFE メンブレンフィルターで濾過し, これを HPLC 用試料とした。

5. 添加回収試験

FF を 2 μ g/ml or g となるように各組織に添加し, 回収試験を行った。なお, 回収試験は 5 回行い, それぞれの平均回収率, 標準偏差および変動係数を求めた。

3. 結果および考察

1. HPLC 移動相と検出波長

通常 FF の定量に用いられる HPLC 用カラムは, 広範な化合物に適用し, 移動相の選択が比較的容易である逆相カラムが用いられている。本方法でも YMC Pack C₁₈カラムを用いた。また, FF の移動相としてはメタノール, アセトニトリル系が多く用いられているが, 本実験では上記溶媒を種々の濃度で検討した結果, 35% アセトニトリルを移動相として採用した (Fig.2-1)。また, 吸光スペクトルの測定結果から検出波長は FF の吸収極大の 225 nm とした。なお, 最終的に得られた各組織からの抽出方法は Fig.3-1 に示した通りである。

2. 抽出方法

FF と同系の合成抗菌剤であるチアンフェニコール (以下, TP と略す) の定量について熊野ら¹⁵⁾ の報告による抽出法を用いたところ, 大部分の妨害物質が除去できたので, 本実験ではこの方法に準じて検討を行った。

(A) 筋肉および血清

一般に養殖ブリの場合, 天然ブリに比べ脂質含量が多いことが知られており, これらの脂質による分析の妨害が多い。そこで筋肉からの脱脂方法を検討した。その結果, *n*-ヘキサンによる脱脂操作を 2 回行ったところ, かなりの妨害成分の除去効果がみられた。上記の操作によってより高い回収率, 良好な分離が得られた。なお, 血清についても同様の結果が得られたので, この方法を採用した。

(B) 肝臓および腎臓

5- (A) のステップを用いて, 肝臓および腎臓からの FF の分析を行ったところ, 多大な妨害物質の影響のた

め定量は不可能であった。そこで、とくに妨害物質が多く定量困難であった腎臓を用いて抽出およびクリーンアップについて検討した。

上述の脱脂処理により良好なクロマトグラムは得られなかったため、固相抽出によるクリーンアップを検討した。固相抽出には操作が極めて簡便である Sep-pak カートリッジがよく用いられている。Nagataら⁹⁾による魚

類の筋肉からの FF の抽出、Nagataら¹³⁾による鶏肉中、Otsukaら¹⁴⁾によるブリ中の TP の抽出で Sep-pak フロリジルカートリッジが用いられている。そこで、Sep-pak フロリジルカートリッジを用いて検討した。すなわち、試料をヘキサン処理後減圧乾固した残渣を *n*-ヘキサンで溶解した。その溶液を Sep-pak フロリジルカートリッジに通し、*n*-ヘキサン、ジエチルエーテルで洗浄

Muscle 1.0 g or Serum 1.0 ml (A), Liver 0.5 g or Kidney 0.5 g (B), Bile 0.5 ml (C)

Added 2 g of Na₂SO₄ and 30 ml of acetonitrile
Homogenized for 1 min.

Homogenate

Centrifuged at 15,000 rpm for 20 min

Supernatant

Residue

Added 30 ml of acetonitrile
Centrifuged at 15,000 rpm for 20 min

Supernatant

Transferred to a separatory funnel
Added 60 ml of *n*-hexane
Shaken vigorously for 5 min

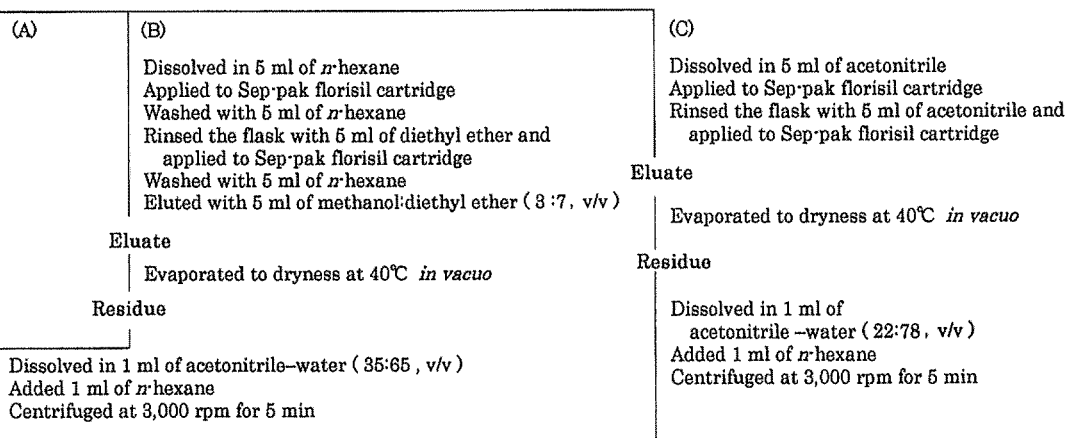
Acetonitrile layer

Added 30 ml of *n*-hexane
Shaken vigorously for 5 min

Acetonitrile layer

Added 10 ml of *n*-propanol
Evaporated to dryness at 40°C *in vacuo*

Residue



Acetonitrile-water layer

Filtered the solution through a 0.20 μm PTFE membrane filter

HPLC

Fig.3-1. Analytical procedures for florfenicol in muscle or serum (A), liver or kidney (B) and bile (C) of yellowtail.

後、メタノール-ジエチルエーテル (3 : 7, v/v) で溶出することにより、腎臓中の妨害物質を効率よく除去できた。また、この方法は肝臓においても有効であった。

(C) 胆汁

5- (A), (B)のステップを用いて胆汁からのFFの分析をおこなったところ、かなりの妨害物質が存在し、低い回収率であったため定量は不可能であった。そこで、腎臓のクリーンアップの際用いた *n*-ヘキサンの代わりに、アセトニトリルを用いたところ、胆汁中の妨害物質の大部分はカートリッジ内に吸着され、FFを高い回収率で回収できた。しかしながら、移動相として筋肉、血清、肝臓および腎臓で使用している35%アセトニトリルを用いた場合、FFのピーク付近に未知の妨害ピークが存在し、正確な定量は困難であった。そこで、移動相の再検討を試みた。

FFの保持時間は移動相のアセトニトリル濃度に依存していることが知られている。そこで、アセトニトリル濃度を変え、FFのピークと未知のピークの相関性について調べた。その結果をTable3-1に示した。2つのピークの分離を知る指標として分離度 (R_s) と保持比 (k') があり、 R_s は1.1以上、 k' はおよそ1から10の間が妥当とされる¹⁵⁾。ここではその妥当性を考慮し、移動相として22%アセトニトリルを採用した。

Table 3-1 Capacity factor (k') and Resolution (R_s) between unknown peak and florfenicol peak

Acetonitrile Concentration (%)	k'	R_s
20	11.3	1.35
22	9.10	1.17
25	6.80	0.56
35	2.9	—

3. 添加回収率

Table 3-2 に示したように、FFの平均回収率は各組織で90.2~103%であった。また、標準偏差は3.90~8.62%および変動係数は3.9~9.1であった。本方法で得られた各組織のクロマトグラムをFig.3-2に示した。

Table 3-2 Recovery of florfenicol from various tissues of yellowtail

Tissues	Recovery (%)
Muscle	97.7* ¹ ± 6.97* ² (7.1)* ³
Serum	103 ± 4.02 (3.9)
Liver	102 ± 4.18 (4.1)
Kidney	94.4 ± 8.62 (9.1)
Bile	90.2 ± 3.90 (4.3)

- *1 The average of 5 replicates
- *2 The standard deviation
- *3 The coefficient of variation

4. 検量線

FFの標準溶液から0.05~100 μ g/mlの濃度のFF溶液を調製した後HPLCに供し、波長225nmにおけるクロマトグラムのピーク高さを測定して検量線を作成した。Fig.3-3に示したように、検量線は相関係数0.999となり、良好な直線性が得られた。

5. 検出限界

Table3-3に示したように、FFの検出限界は筋肉、血清、肝臓、腎臓および胆汁でそれぞれ0.03, 0.03, 0.04, 0.04, 0.1 ppmであった。

以上、今回開発した方法は、再現性・感度において優れたものであり養殖ブリ中の組織・器官においてFFの定量は可能であった。しかしながら、いずれの方法を用いても、全ての組織・器官に適用できなかった。そこで汎用性のある定量法については開発中である。

4. 参考文献

- ARRET, B., D.P. JHONSON and A. KIRSHAUM. Outline of details of microbiological assays of antibiotics: Second revision. *Journal of Pharmaceutical Science*, 60 : 1489-1694 (1971).
- BENNETT, J.V., J.L. BRODIE, E.J. BENNETT and W.M.M. KIRBY. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied*

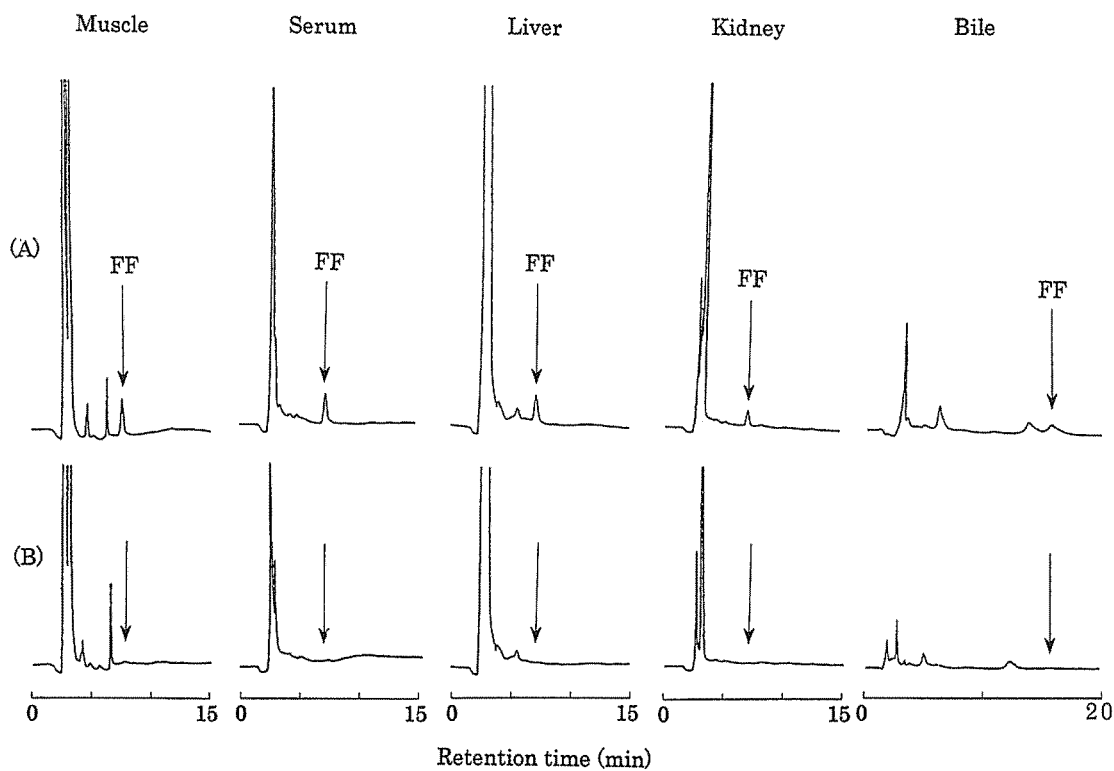


Fig.3-2. Typical chromatograms of florfenicol from various tissues of yellowtail by HPLC.
 (A) Addition of florfenicol at the level of 2 ppm
 (B) Control

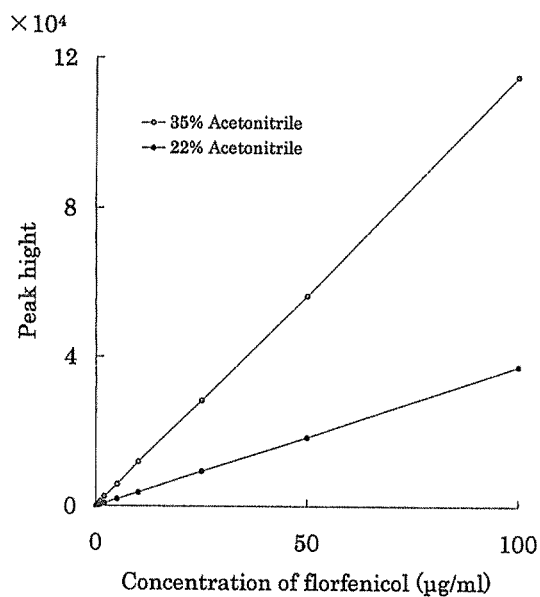


Fig.3-3. Calibration curve of florfenicol.

Table 3-3 Detection limit of florfenicol from various tissues of yellowtail

Tissues	Detection limit (ppm)
Muscle	0.03
Serum	0.03
Liver	0.04
Kidney	0.04
Bile	0.1

- Microbiology*, 14: 170-177 (1966).
3. PFENNING, A.P., M.R.MADSON, J.E.ROYBAL, S.B. TURNIPSEED, S.A.GONZALES, J.A.HURLBUT, G.D. SALMON. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.*, 81 (4): 714-720 (1998).
 4. de CRAENE, D.A., P.DEPREZ, E.D'HAESE, H. J. NELIS, W.VAN den BOSSCHE and A.P.de LEENHEER. Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. *American Society for Microbiology*, 41 (9): 1991-1995 (1997).
 5. SOBACK, S., M.J.PAAPE, R.FILEP and K.J.VARMA. Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18: 413-417 (1995).
 6. LOBELL, R.D., K.J.VARMA, J.C.JOHNSON, R.A. SAMA, D.F.GERKEN, S.M.ASHCRAFT. Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17: 253-258 (1994).
 7. HORMAZABAL, V., I.STEFFENAK and M.YNDESTAD. Simultaneous determination of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 616: 161-165 (1993).
 8. MARTINSEN, B., T.E.HORSBERG, K.J.VARMA and R.SAMS. Single dose pharmacokinetics study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C. *Aquaculture*, 112: 1-11 (1993).
 9. NAGATA, T. and M.SAEKI. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography*, 15 (12): 2045-2056 (1992).
 10. ADAMS, P.E., K.J.VARMA, T.E.POWERS and J.F. LAMENDOLA. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *American Journal of Veterinary Research*, 48 (12): 1725-1732 (1987).
 11. BRETZAFF, K.N., C.A.NEFF-DAVIS, R.S.OTT, G.D. KORITZ, B.K.GUSTAFSSON and L.E.DAVIS. Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins, and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 233-240 (1987).
 12. VARMA, K.J., P.E.ADAMS, T.E.POWERS, J.D. POWERS, and J.F.LAMENDOLA. Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9, 412-425: (1986).
 13. 永田知子, 佐伯政信, 中澤裕之, 藤田昌彦, 高島英伍. 高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中のチアンフェニコールの定量, 食品衛生学雑誌, 26 (1): 46-49 (1996).
 14. 大塚公人, 堀部京子, 杉谷哲, 山田不二造. 高速液体クロマトグラフィーによるブリ中のチアンフェニコールの定量, 食品衛生学雑誌, 27 (3): 263-266 (1984).
 15. 熊野眞佐代, 佐藤佐由利, 伊豫屋偉夫. HPLC法による長崎県養殖魚中の合成抗菌剤分析, 長崎県衛生公害研究所報, 33, 57-58 (1990).
 16. SNYDER, L.R. and J.J.KIRKLAND. 高速液体クロマトグラフィー, 小島次雄, 春木達郎ほか訳, 東京化学同人, pp.36-67 (1976).