

資 料

## 高速液体クロマトグラフィーによる食肉及び魚肉中の 親水性合成抗菌剤の一斉分析法

中村 寿夫 信宗 正男

### Rapid Determination of Hydrophilic Synthetic Antibacterial Drugs in Meat and Fish by High Performance Liquid Chromatography

KAZUO NAKAMURA and MASAO NOBUSO

(Received Oct. 29, 1993)

#### 緒 言

近年、我が国をはじめとして世界各国で、家畜の飼育や魚の養殖において、生産性向上を目的として種々の薬剤が使用されている。そのため、これら残留薬剤の検査、監視はますます重要になっている。そのような状況の中で、性質の異なる多数の薬剤を迅速に同時分析する方法が種々検討されているが [1-6]、極性の大きく異なる薬剤多数を同時に同じ手法で前処理しているため、妨害物質の除去、回収率等に若干の問題点を残している。それらの問題点を解決するため、著者らは薬剤を親水性の強いものと親油性のものに大別して分析することとし、今回は親水性の強い薬剤について、迅速で簡易な同時分析法を確立し、市販の食肉及び魚肉の残留薬剤の調査を行ったので報告する。

#### 実験方法

1. 試料 広島県内で市販されている牛肉、豚肉、鶏肉、タイ及びブリを使用した。

2. 試薬及び試液 アセトニトリル、メタノール、水：片山化学工業(株)製、高速液体クロマトグラフ用  
ジクロロメタン：片山化学工業(株)製、残留農薬分析用  
アンプロリウム (AP)：大日本製薬(株)製  
クロビドール (CL)：ダウケミカル日本(株)製  
オラキンドックス (ODX)：Bayer Japan製  
チアンフェニコール (TP)：エーザイ(株)製  
フラゾリドン (FZ)：上野製薬(株)製  
スルファメラジン (SMR), スルファジミジン (SDD), スルフィソゾール (SIZ), スルファモノメトキシ (SMM)：Sigma製

標準原液：APについては50.0mgを、CL, ODX, TP, FZ, SMR, SDD, SIZ及びSMMについては各10.0mgをそれぞれアセトニトリル-水 (10:90) に溶解して100mlとした。

標準溶液：標準原液をHPLC用移動相で適宜希釈して用いた。

その他の試薬はすべて特級品を使用した。

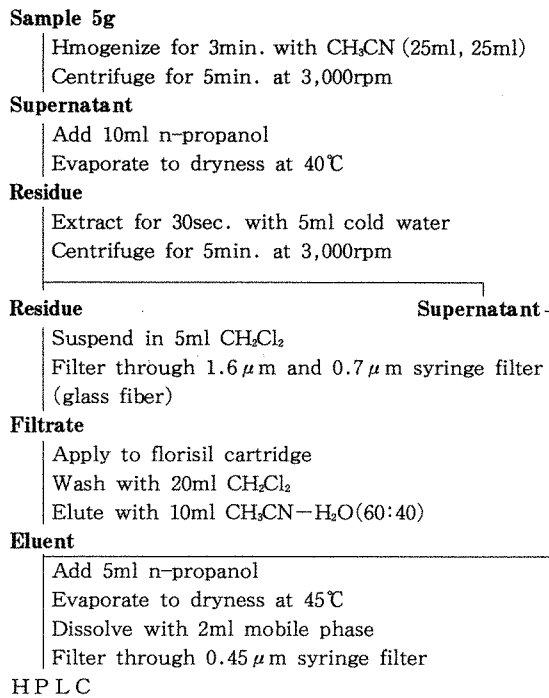
3. 装置及び器具 高速ホモジナイザー：Biotron製、Biotron, 遠心分離機：(株)久保田製作所製, 8010型, ロータリーエバポレーター：東京理科器械(株)製, N-1型, 高速液体クロマトグラフ：東ソー(株)製デュアルプランジャーポンプCCPE, 紫外吸収検出器UV8020型

4. HPLC条件 ガードカラム：東ソー(株)製, TSK GUARDGEL ODS-80T<sub>M</sub> (3.2mm i.d.×15mm), 分離カラム：東ソー(株)製, TSK ODS-80T<sub>M</sub> (4.6mm i.d.×150mm)

カラム温度：40℃, 移動相流速：1.0ml/min., 試料溶液注入量：20μl, 移動相組成：アセトニトリル-0.05Mリン酸一ナトリウム (14:86), 紫外吸収検出器波長：225, 264又は360nmとした。検出感度：0.01 AUFS

5. 試験溶液の調整 Scheme 1に試料調整法の概要を示した。

試料5gに25mlのアセトニトリルを加え、ホモジナイザーで3分間抽出した後、3000rpmで5分間遠心分離した。残留物にアセトニトリル25mlを加え、同様に処理した後、上澄液を合わせて、n-プロピルアルコール10mlを加えロータリーエバポレーターを使用



し、40℃の水浴中で減圧下濃縮乾固した。  
 残留物に氷冷した蒸留水5mlを加えて冷却しながら抽出した後、抽出液を3000rpmで5分間遠心分離した。  
 沈澱物及びナスフラスコ中の残留物はジクロロメタン5mlを加えて無水硫酸ナトリウムで脱水し、懸濁した後、グラスファイバーフィルターを用いて濾過した。濾液をSep-pak フロリジルに負荷し、ジクロロメタン20mlで洗浄し、アセトニトリル-水 (60:40) 10mlで溶出した。溶出液と遠心分離した上澄液を合わせて、n-プロピルアルコール5mlを加え、ロータリーエバポレーターを使用し、45℃の水浴中で減圧下濃縮乾固した。残留物に移動相2mlを加え、超音波水浴中で1分間溶解し、メンブランフィルターを用いて濾過し、HPLC用試料とした。

**結果及び考察**

1. HPLC測定条件の検討 厚生省通知 [7] ではグラジエント溶出法が示されているが、今回検討した水溶性薬剤については単一の溶離液でも良好な分離を得たので、より簡便な方法として採用した。カラムは汎用されているODS系カラムのうち今回はTSK ODS-80T<sub>M</sub>について検討したところAPについてはテーリングが見られたが、他の薬剤については良好な結果であったのでこれを使用することにした。移動相についてはアセトニトリル-水系又はメタノール-水系での分析

例が多数報告 [1-10] されているが、種々検討した結果アセトニトリル-0.05Mリン酸-ナトリウム (14:86) で良好な分離を得た。検出器としては、感度及び妨害ピークの影響を考慮し、波長可変型紫外吸収検出器を使用し、分析途中で波長を切り替えて分析することにした。

2. 前処理法の検討

1). 抽出溶媒の検討 畜水産物中の残留薬剤分析の抽出溶媒としては、アセトニトリル、メタノール、アセトン、ジクロロメタン、酢酸エチル等の有機溶媒を用いる方法が多数報告されている [3-13]。これらの有機溶媒について種々検討した結果、回収率ではメタノールがAPについて良好であったが、夾雑物質による妨害がみられたので、抽出溶媒としては今回検討した薬剤すべてについて回収率が比較的良好であり、夾雑物質の移行の少ないアセトニトリルを使用することにした。

2). 精製操作の検討 溶媒抽出後、液-液分配によるクリーンアップを行う方法が多数報告されているが [1,6-8,10-12]、エマルジョンの形成や、操作性の良くないことなどから、最近では、ミニカートリッジによるクリーンアップ法が報告されるようになって来た [2-5,13]。ミニカートリッジとしては、シリカゲル、アルミナ、ODS等が使用されているが、いずれも薬剤によっては夾雑物質の除去が不充分あるいは回収率が悪い等の問題がある。著者等は夾雑物質を除去するため、フロリジルカートリッジを使用し、n-ヘキサン、ジクロロメタン及び酢酸エチルの3種の溶媒について洗浄効果を検討したところ、ジクロロメタンを使用することにより良好な結果を得た。次に、薬剤の溶出溶媒について検討したところ、親水性の最も高いAPを溶出させるためには非常に極性の強い溶媒が必要であり、その使用によって、妨害物質が増大し、分析が不可能となった。そこで、APはアセトニトリル抽出物をカートリッジに負荷する前に別に抽出する方法を検討した。その結果APの抽出溶媒には水が良いことがわかったが、室温で抽出すると、妨害物質も抽出されてしまったので、0-5℃で抽出することにした。それにより、妨害物質も減少し、冷水抽出物中の夾雑物質による他の薬剤の分析の妨害はみられなかった。

他の薬剤の溶出溶媒はアセトニトリルを検討したが、単独ではFZが溶出出来なかったため、極性を上げるためにアセトニトリルに水を加えることを検討した結果、アセトニトリル-水 (60:40) 10mlでほぼ全量溶出出来、夾雑物質による薬剤の分析の妨害もみられな

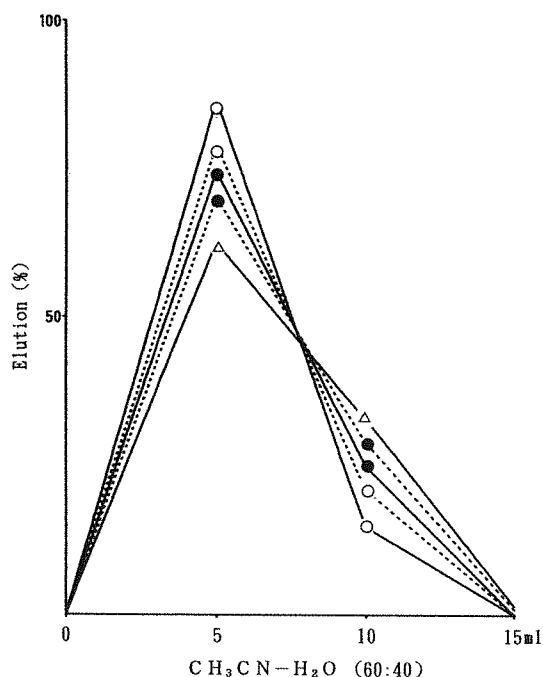


Fig.1 Elution Pattern of Antibacterial Drugs from Sep-pak Florisil

○—○ sulfadimidine, sulfamonomethoxine;  
 ○····○ thiamphenicol; ●—● sulfamerazine,  
 sulfisozole, olaquinox; ●····● clopidol; △—△  
 furazolidone

かった。

Fig. 1 に薬剤のフロリジルカートリッジからの溶出状況を示した。

AP と親水性の他の薬剤との同時分析は今まで困難であったが、このように、AP は冷水抽出で回収し、他の薬剤はフロリジルカートリッジで精製し、HPLC 分析の前に両者を混合することにより、同時分析が可能となった。

### 3. 検量線の作成

ピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成

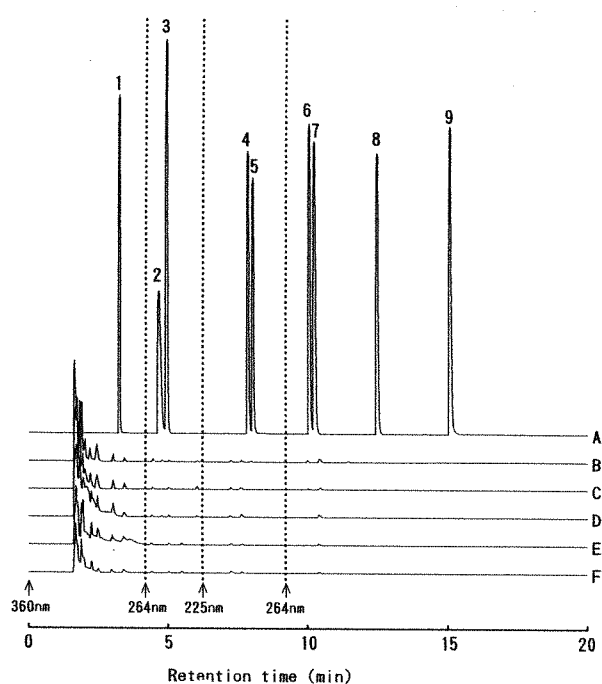


Fig.2 Liquid Chromatograms of Mixed Standards and Samples

HPLC conditions: column; TOSO ODS-80T<sub>M</sub>;  
 mobile phase, acetonitrile-0.05<sub>M</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (14:86);  
 detector, UV photometer; sensitivity, 0.01 a.u.f.s.;  
 injection size, 20 μl

Mixed standard: A

Samples: B=beef; C=pork; D=chicken; E=sea bream; F=yellowtail

Peaks: 1=ODX (10ng); 2=AP (50ng); 3=CL (10ng); 4=SMR (10ng); 5=TP (10ng); 6=SDD (10ng); 7=SIZ (10ng); 8=FZ (10ng); 9=SMM (10ng)

したところ、AP については50ngから200ngその他の薬剤については10ngから100ngの範囲で良好な直線性を示した。

Table 1 Recoveries of Drugs from Samples Fortified at 1.0ppm

Drugs	Recovery(%) [RSD(%) <sup>a</sup> (n=5)]				
	Beef	Pork	Chicken	Seabream	Yellowtail
ODX	90.3[6.2]	91.5[6.8]	88.7[7.5]	92.4[5.8]	89.1[6.3]
AP	84.6[8.7]	82.3[8.4]	80.2[9.0]	85.8[7.2]	83.5[7.6]
CL	96.8[3.6]	94.4[5.8]	91.3[5.7]	93.2[4.5]	95.6[5.2]
SMR	94.1[4.8]	95.2[4.5]	91.4[5.6]	93.5[3.9]	92.7[5.3]
TP	93.0[3.5]	91.6[4.3]	90.8[5.8]	92.2[5.3]	91.1[6.0]
SDD	95.2[4.3]	93.5[4.6]	92.1[5.4]	90.6[4.9]	93.8[6.2]
SIZ	96.3[5.1]	92.8[5.5]	95.7[6.2]	94.0[4.7]	89.9[6.4]
FZ	90.5[6.9]	88.6[6.2]	87.3[7.1]	91.2[6.5]	89.0[6.6]
SMM	92.6[5.7]	91.4[6.3]	94.5[7.0]	92.3[5.6]	90.2[6.5]

a) Relative standard deviation

#### 4. 添加回収実験

市販の牛肉、豚肉、鶏肉、タイ及びブリに各薬剤を1 $\mu$ g/gの濃度に添加し、回収率を求めた。

Table 1 に示したように、各薬剤の回収率は平均で80.2-96.8%であった。また、相対標準偏差はいずれも10%以下であり、一斉分析法としてはほぼ満足できる結果と考える。

なお、本法における検出限界はAPが0.3 $\mu$ g/g、SMR、TPC及びFZが0.03 $\mu$ g/g、その他の薬剤が0.02 $\mu$ g/gであった。

#### 5. 市販食肉及び魚肉の残留試験

本法を用いて広島県内で市販されていた牛肉、豚肉及び鶏肉各10検体、タイ及びブリ各4検体を分析した結果、いずれの合成抗菌剤も検出されなかった。

### 結 語

畜水産食品中のAPを含む比較的親水性の強い合成抗菌剤のHPLCによる残留分析法の簡易迅速化について検討した。

その結果、アセトニトリル抽出乾固後、前処理法としてAPを冷水で再抽出し、残留した薬剤はSep-pakフロリジルを用い、ジクロロメタンで洗浄後アセトニトリル-水(60:40)で溶出することにより、夾雑物質による妨害も少なく、簡易な試料調整が可能となり、波長可変型紫外吸収検出器を用いたHPLC分析により、APを含めた9種の親水性合成抗菌剤を迅速に同

時分析することが可能であった。

### 文 献

- [1] 村山三徳, 内山貞夫, 斎藤行生: 食衛誌, **32**, 155~160(1991)
- [2] 堀江正一, 斉藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 浜田尚樹, 中澤裕之: 食衛誌, **31**, 171~176(1990)
- [3] 寺田久屋, 永井祐治, 山本勝彦, 坂部美雄: 名古屋市衛生研究所報, **35**, 101~105(1989)
- [4] 鈴木裕: 石川県衛生公害研究所年報, **26**, 499~503(1989)
- [5] 山本優, 大内格之, 冨澤政, 菊地由生子, 高杉信男: 札幌市衛研年報, **16**, 80~87(1988)
- [6] 永田知子, 佐伯政信: 食衛誌, **29**, 13~20(1988)
- [7] 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知, 衛乳第79号(1993)
- [8] 高槻圭悟, 菊池格: 宮城県保健環境センター年報, **8**, 77~80(1990)
- [9] 永田知子, 佐伯政信, 中澤裕之, 藤田昌彦, 高島英伍: 食衛誌, **26**, 46~49(1985)
- [10] 堀義宏: 食衛誌, **25**, 158~162(1984)
- [11] 春日洋二, 杉谷哲, 山田不二造: 食衛誌, **24**, 484~487(1983)
- [12] 中澤裕之, 高島英伍, 日野誠二, Canutte A. MTEMA: 分析化学, **32**, 179~183(1983)
- [13] 堀義宏: 食衛誌, **24**, 447~453(1983)