

# フォトダイオードアレイ-UV 検出器付 HPLC による合成抗菌剤の多成分分析法

## Simultaneous Analysis of Synthetic Antibacterials by High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array UV-Detector

山本 優 大内 格之 富澤 政 菊地由生子  
高杉 信男

Masaru Yamamoto, Kakuyuki Ōuchi, Masasi Tomisawa,  
Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

### 要 旨

畜産食品中における合成抗菌剤14種類についてUV検出器付HPLCによる簡易で迅速な多成分分析法を検討するとともに、ピークの確認同定法として、フォトダイオードアレイ検出器の応用を試みた。

この結果、14種類の薬剤を単一の方法により前処理することが可能となるとともに、UV-HPLCによる分析時間も、グラジェント法を用いることにより、35分前後に短縮された。

さらにUV-HPLC法による分析でR.T (保持時間) の一致したピークの確認同定手段としてフォトダイオードアレイ検出器の有する種々の定性機能を用いたところ、ピークの同定精度が向上しその有効性が明かとなった。

### 1. 緒 言

近年、動物用医薬品及び、飼料添加物として使用される抗菌性物質の開発は家畜の生産効率を向上させるとともに、集団飼育に伴う疾病の発生を予防することにより、わが国の畜産業の多大な発展に寄与している。

一方、これら抗菌性物質の大量使用及び濫用は畜産食品への残留という事態を引き起こし、食品衛生上の重大な問題となっている。

このような問題の実態把握のためには多種類の薬剤を同時に分析することが可能でしかも迅速な分析法の開発が必要である。

抗菌性物質のうち合成抗菌剤については、高速液

体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法が厚生省法<sup>1)</sup>を始めとして多数、報告されているが、単成分分析法が多いことから、分析には多大の時間と労力を要し、実態調査には実用性に欠ける面がある。

又、いくつか報告されている多成分分析法<sup>2,3,4)</sup>も試料調製法及び、HPLC条件が単一でなく操作が煩雑になり分析に長時間を要する等問題点が多い。

さらにこれらの分析法はUV検出器付HPLCを用いた例が多いが、UV検出器は感度、分離度の面では優れている反面、ピークの確認手段としては十分ではない。

今回、我々は、飼料添加物及び動物用医薬品とし

て使用されている合成抗菌剤のうち14種類について畜産食品を対象とし、単一の方法で、しかも簡便な試料調製法を開発するとともに、スクリーニング法としてグラジェント法を用いたUV-HPLCの分析条件を検討し、分析時間の短縮化を試みた。

さらに、最近、実用化されるようになった、種々の定性的機能を有するフォトダイオードアレイ検出器をピークの最終的な確認同定手段として用いる方法を検討したところ、非常に有効であったので報告する。

## 2. 方法

### 2-1 試料

鶏卵、豚肉、鶏肉は市内の小売店から購入し、ホモジナイザーで均一にした。

### 2-2 試薬

#### 標準品

クロピドール (CLP) : ダウケミカル日本(株)

スルファメラジン (SMR) : シグマ(株)

スルファジミジン (SDD), フラゾリドン (FZ) : 上野製薬(株)

スルファモノメトキシシン (SMMX), ジニトルミド (DMT) : 三共化成工業(株)

スルファメトキサゾール (SMX), ピリメタミン (PYR) : 福寿製薬(株)

スルファジメトキシシン (SDMX) : 富士薬品工業(株)

ジフラゾン (DFZ), カルバドックス (CDX) : 台糖フアイザー(株)

ナイカルバルジン (NCZ), スルファキノキサリン (SQ), エトパペート (ETB) : ①大日本製薬(株)

#### アルミナカラム

塩基性活性度 I のカラムクロマトグラフ用アルミナ (Woelm 社製) : 5g を内径 15mm, 長さ 300mm のクロマト管にアセトニトリルを用いて湿式充填し、アセトニトリル 30ml, 85%アセトニトリル溶液 30

ml で順次、洗浄した。

#### Sep-PakC<sub>18</sub>カラム

Waters 社製、使用前にあらかじめ、メタノール、水で洗浄した。

#### アセトニトリル、メタノール、n-ヘキサン

和光純薬(株)、残農用試薬

#### 酢酸、n-プロパノール

和光純薬(株)、試薬特級

#### 緩衝液

McIlvaine 緩衝液 pH4.5

### 2-3 装置

高速液体クロマトグラフ : 日立製作所(株)製 L-6200

UV-検出器 : 日立製作所(株)製 L-4200

フォトダイオードアレイ-UV検出器 : 島津製作所(株)製 SPD-M6A

データ処理装置 : 島津製作所(株)製クロマトパック C-R4A

### 2-4 HPLC条件

測定条件は Table 1 に示した。

### 2-5 試料溶液の調製

Scheme 1 に試料調製法の概要を示した。

Table 1 Condition of HPLC

Column	NucleosilC <sub>18</sub> (4mm I.D. × 250mm)
Mobile Phase	A : CH <sub>3</sub> CN · CH <sub>3</sub> COOH · H <sub>2</sub> O (18 · 1 · 81) B : CH <sub>3</sub> CN · CH <sub>3</sub> COOH (99 · 1)
Flow rate	1ml/min
Column Temp	40°C
Injection Volume	10µl
Detector	270nm 360nm

#### Gradient Condition

Time (min)	0	→ 5	→ 18	→ 22	→ 30	→ 40	
Composition (%)	A	100	100	82	82	30	30
	B	0	0	18	18	70	70

均一化された試料 10g に 50ml のアセトニトリルを加え、5 分間、ホモジナイザーで抽出した後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。残留物にアセトニトリル 30ml を加え、同様に処理した後、上澄液を合わせ、300ml の分液ロートに移し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 30ml を加えて 5 分間振とうし、脱脂した。アセトニトリル層に突沸防止のため、n-プロピルアルコール 15ml を加え、ロータリーエバポレーターにより 40℃ の水浴中で減圧下、濃縮乾固した。

濃縮残留物に 85% アセトニトリル 5ml を加えて溶解し、アルミナカラムに負荷し、40ml の 85% アセトニトリル溶液で溶出した。

溶出液に 10ml の n-プロピルアルコールを加え、40℃ の水浴中で減圧下、濃縮乾固した。

濃縮残留物に 5ml の緩衝液 (pH 4.5) を加え超音波水浴中で 10 分間、溶解した後、Sep-Pak C<sub>18</sub> に負荷し、3ml の水でカラムを洗浄後、25ml の 1% 酢酸加 40% アセトニトリルで溶出した。

溶出液を 55℃ の水浴中で減圧下、濃縮乾固し、1ml のメタノールに溶解し、その 10μl を HPLC に注入した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 試料溶液の調製法の検討

##### (1) 抽出法

合成抗菌剤の抽出溶媒としては、メタノール、温メタノール、アセトニトリルが、報告<sup>2,3,4)</sup>されているが、メタノールは突沸しやすく、又、一部の薬剤が溶解しにくい等の問題があることからアセトニトリルを用いた。

なお、n-ヘキサンによる脱脂処理操作中における n-ヘキサンへの薬剤の移行は認められなかった。

##### (2) クリーンナップ法の検討

クリーンナップ法としては、クロロホルムを用いた液液分配による方法、フロリジル、アルミナによるカラムクロマトグラフィーによる方法<sup>2,3,4)</sup>が報告

#### Sample 10g

Homogenize for 5min with CH<sub>3</sub>CN (50ml, 30ml)  
Centrifuge for 10min at 3,000rpm

#### Supernatant

Wash with n-hexane saturated with CH<sub>3</sub>CN 30ml

#### CH<sub>3</sub>CN layer

Add n-propanol 10ml

Evaporate to dryness at 40°C

#### Residue

Dissolve in 85% CH<sub>3</sub>CN 5ml

#### Alumina column (15mmφ 5g)

Elute with 85% CH<sub>3</sub>CN 40ml

#### 85% CH<sub>3</sub>CN eluate

Add n-propanol 5ml

Evaporate to dryness at 40°C

#### Residue

Dissolve in buffer Solution (pH 4.5) 5ml

#### Sep-pak-C<sub>18</sub>

Wash with water 3ml

Elute with CH<sub>3</sub>CN : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O (40 : 1 : 60) 25ml

#### CH<sub>3</sub>CN · CH<sub>3</sub>COOH · H<sub>2</sub>O (40 · 1 · 60) eluate

Evaporate to dryness at 50°C

#### Residue

Dissolve with MeOH 1ml

#### HPLC

### Scheme 1 Analytical procedure for antibacterials

されているが、液液分配による方法は一部の薬剤の回収率が低くなる等の問題があることから、アルミナカラムを用いて検討した。溶出液としてアセトニトリル単独では極性の高いスルファ剤が溶出されにくいので、水を加えて極性を高めた 85% アセトニトリルを用いた。

85% アセトニトリルの溶出液量を求めるために、アルミナカラムに各薬剤の標準品 10μg を含む混合溶液を負荷した後、85% アセトニトリルで溶出し、その 5ml 毎の分画について各薬剤の溶出量を測定したところ、Fig 1 に示すような溶出曲線が得られた。この結果、約 30ml で全薬剤が溶出されたことから、安全を見て、溶出液量は 40ml とした。

しかしながら、この段階の HPLC クロマトグラム上には依然として夾雑ピークが見られ、又、鶏卵、鶏肉については黄色色素が除去されないことから、

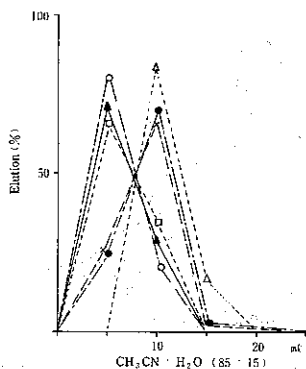


Fig. 1 Elution pattern of antibacterials from alumina column

○ · CLP ▲ · ETB □ · DMT  
× · SMR △ · PYR ● · SQ

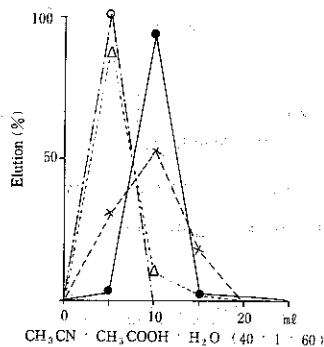


Fig. 2 Elution pattern of antibacterials from Sep-pakC<sub>18</sub>

△ · DFZ × · NCZ  
● · PYR ○ · Others

Sep-PakC<sub>18</sub>によるクリーンアップを試みた。

最初にアルミナカラム溶出液の残留乾固物の溶解液について検討したところ、水を用いた場合は、乾固後のNCZ、DFZの溶解性が悪く、又、アセトニトリル・水の混合液では溶解性は良好であったが、Sep-PakC<sub>18</sub>カラムに負荷する時、NCZ以外の薬剤が溶解液とともに溶出し、カラムに保持されなかった。

さらにアルミナカラム溶出液を乾固せずに、1ml

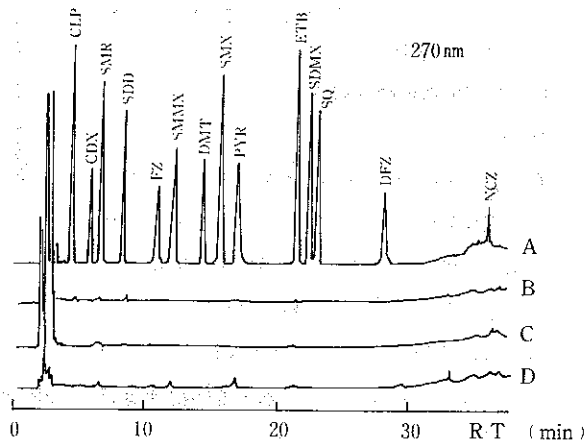
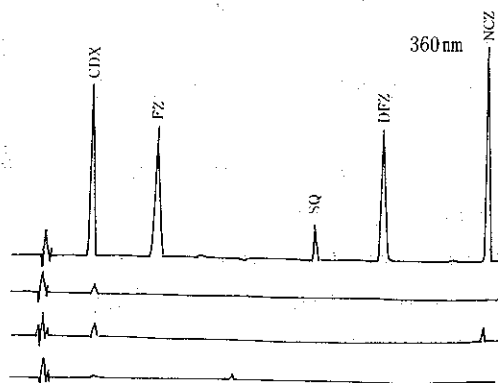


Fig 3 Liquid chromatograms of antibacterials

A · Mixed standards (FZ, PYR · 5.0 μg/ml, others · 2.5 μg/ml)  
B · Pork muscle extract C · Chicken muscle extract  
D · Egg extract

前後に濃縮後、水を加えてSep-PakC<sub>18</sub>カラムに負荷した場合もNCZ、DFZ以外の薬剤が保持されなかった。

このため、溶解液としてpH4.5の緩衝液5mlを用い、さらに超音波水浴中で10分間前後溶解したところ、NCZ、DFZも溶解し、全薬剤が保持された。

Sep-PakC<sub>18</sub>カラムからの溶出液としてアセトニトリル・水の混合溶液を用いた場合は、NCZが溶出されにくいので、酢酸を1%加えた40%アセトニ

トリル溶液で溶出実験を行ったところ、Fig 2 に示す溶出曲線が得られ、20ml前後の溶出液量で全薬剤が溶出された。

また、溶出液の濃縮乾固時における酢酸による薬剤の分解も見られなかった。

以上のクリーンアップ法により14種類の薬剤を単一の操作で処理することが可能となり、又、この方法により鶏卵、鶏肉、豚肉を処理して得た、HPLCクロマトグラムにはFig. 3に示すように測定上妨害となるピークは見られなかった。

### 3-2 UV-HPLCによる分析法（スクリーニング）の検討

#### (1) HPLC測定条件の検討

##### 1) 移動相

合成抗菌剤のHPLC分離条件として、カラムにはODS系、移動相として、アセトニトリル・水系又はメタノール・水系による逆相モードでの分析例<sup>2,3,4)</sup>が多数、報告されている。

今回は、カラムとしてNucleosil5C<sub>18</sub>、移動相としてはアセトニトリル・水・酢酸混合溶液を用いて検討した。

アセトニトリル・水の混合比についてはNCZ, DFZのK'（キャパシティーファクター）が他の薬剤に比べ非常に大きく同一組成では保持時間が非常に長くなり、分析が不可能になることから、グラジエント法によりアセトニトリル含量を徐々に増大させ、移動相の溶出力を高めて、K'を減少させ、DFZ, NCZの保持時間を短縮した。

又、PYRは塩基性の官能基を持つため、酢酸を加えて、pHを下げ、解離度を増してK'を減少させることにより、保持時間を短縮した。

この結果、Table 1に示すグラジエント条件によりアセトニトリル含量を増加させ、酢酸を1%加えた移動相により分析したところ、Fig. 3に示す通り35分前後で14薬剤が全て溶出し分

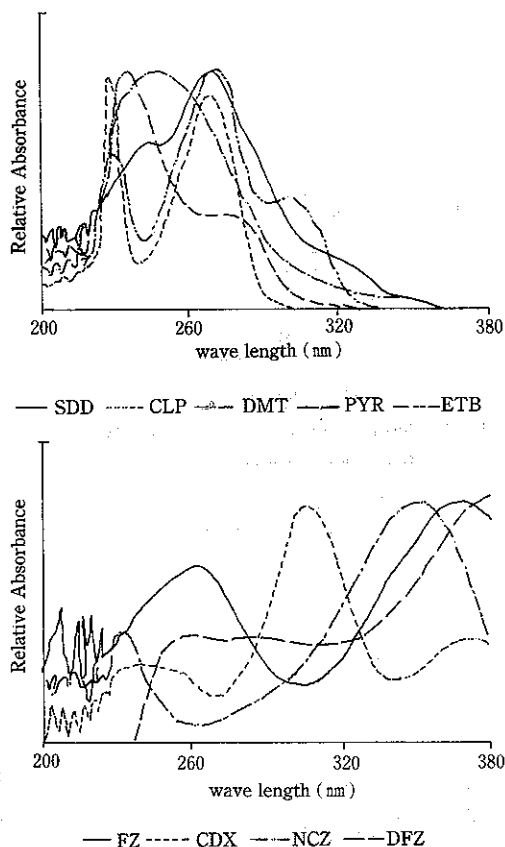


Fig. 4 UV-Spectra of antibacterials

析時間が短くピーク形状も良好なクロマトグラフが得られた。

##### 2) 検出波長

UV検出器の測定波長はFig. 4のUVスペクトルに示すようにスルファ剤（6種類）、CLP, DMT, ETB, PYRは270nm, NCZ, DFZ, FZ, CDXは360nm付近に極大波長があることから、270nm, 360nmの2波長による同時検出とした。

##### (2) 検量線

各薬剤の標準液をメタノールで数段階に希釈して、濃度列を作成し、ピーク面積法により検量線を作成した。

この結果、Fig. 5に示すようにSMR, CLP, FZは5ngから50ngまでその他は5ngから100ngまで原点

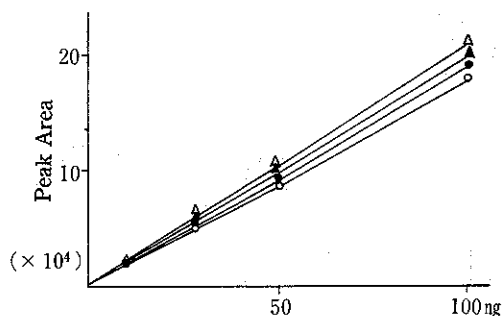


Fig. 5 Calibration curve

○ · DMT △ · ETB ▲ · SMMX ● · CDX

を通る直線性が得られた。

試料を10gとした場合の検出限界は0.05 $\mu$ g/gであった。

### (3) 添加回収試験

豚肉、鶏肉、鶏卵10gに各薬剤1 $\mu$ gから10 $\mu$ gの範囲で添加して回収試験を行ったところ Table. 2 に示す通り全て、70%以上の回収率であった。

なお、CDX、FZの回収率の低下は分析操作中の光分解によるものと、考えられたので操作中は可能な限り遮光する必要があった。

### 3-3 フォトダイオードアレイ-UV 検出器による確認同定法

UV 検出器により標準品と R.T. が一致したピークの確認同定法として、従来は極性の異なるカラムによる再分析、あるいはガスクロ法等他の方法による確認が必要であったがいずれも時間と労力を要した。

近年、これらの UV-HPLC の欠点を補完するため実用化されたフォトダイオードアレイ検出器は任意に設定可能な波長域の吸光スペクトルを継時的に測定し R.T. と吸光スペクトルからなる 3 次元クロ

Table 2 Recovery of antibacterials added to livestock products

	Added ( $\mu$ g/10g)	Recovery $\pm$ S. D (%)*		
		Chicken		Pork
		Egg	Muscle	Muscle
CLP	1	89.6 $\pm$ 2.1	92.1 $\pm$ 2.1	95.0 $\pm$ 0.9
	5	93.3 $\pm$ 2.5	97.7 $\pm$ 0.7	97.5 $\pm$ 1.0
CDX	1	71.6 $\pm$ 2.2	71.4 $\pm$ 2.0	72.2 $\pm$ 1.4
	5	73.5 $\pm$ 3.1	72.1 $\pm$ 1.3	71.4 $\pm$ 1.8
SMR	1	80.1 $\pm$ 1.8	76.4 $\pm$ 1.5	81.1 $\pm$ 1.5
	5	85.5 $\pm$ 1.9	75.6 $\pm$ 3.6	82.1 $\pm$ 1.6
SDD	1	80.2 $\pm$ 1.3	82.4 $\pm$ 1.7	83.7 $\pm$ 2.0
	5	85.7 $\pm$ 3.5	83.7 $\pm$ 1.9	78.7 $\pm$ 2.1
FZ	2	70.8 $\pm$ 1.3	80.3 $\pm$ 1.7	78.9 $\pm$ 2.6
	10	74.9 $\pm$ 4.5	81.6 $\pm$ 2.4	83.4 $\pm$ 0.9
SMMX	1	84.5 $\pm$ 2.9	75.8 $\pm$ 2.4	73.4 $\pm$ 1.7
	5	85.7 $\pm$ 1.3	78.6 $\pm$ 2.5	80.7 $\pm$ 1.6
DMT	1	91.9 $\pm$ 1.1	90.1 $\pm$ 2.0	83.5 $\pm$ 0.7
	5	91.5 $\pm$ 2.9	96.1 $\pm$ 2.3	92.4 $\pm$ 1.5
SMX	1	83.2 $\pm$ 1.4	82.5 $\pm$ 1.5	78.0 $\pm$ 3.5
	5	84.2 $\pm$ 2.1	87.3 $\pm$ 2.7	85.7 $\pm$ 2.1
PYR	2	84.5 $\pm$ 4.9	92.5 $\pm$ 1.6	94.8 $\pm$ 1.3
	10	92.3 $\pm$ 2.5	93.7 $\pm$ 1.9	91.6 $\pm$ 2.2
ETB	1	93.6 $\pm$ 1.5	93.8 $\pm$ 1.8	93.6 $\pm$ 2.2
	5	97.8 $\pm$ 0.9	96.0 $\pm$ 2.2	94.8 $\pm$ 1.5
SDMX	1	80.1 $\pm$ 2.6	82.2 $\pm$ 1.9	76.4 $\pm$ 1.7
	5	84.3 $\pm$ 1.7	83.5 $\pm$ 2.1	83.4 $\pm$ 0.9
SQ	1	70.3 $\pm$ 2.2	72.5 $\pm$ 2.4	75.6 $\pm$ 1.3
	5	75.7 $\pm$ 3.9	73.3 $\pm$ 1.7	79.7 $\pm$ 1.8
DFZ	1	70.5 $\pm$ 2.2	73.3 $\pm$ 2.5	72.6 $\pm$ 1.3
	5	75.8 $\pm$ 2.5	73.5 $\pm$ 1.7	71.5 $\pm$ 0.6
NCZ	1	71.6 $\pm$ 1.1	76.2 $\pm$ 1.6	71.7 $\pm$ 1.5
	5	74.5 $\pm$ 1.6	75.7 $\pm$ 2.1	83.2 $\pm$ 1.3

\* Mean  $\pm$  Standard Deviation of 5 Analysis

マトグラムをリアルタイムに表示できる他、分析終了後、コンピューターにより記憶されたクロマトグラムを様々角度から再現し、得られたピークを解析することが可能である。

このようなフォトダイオードアレイ検出器の持つ種々の定性的機能について UV-HPLC によるスクリーニング法で検出されたピークの確認同定法として、その有効性を検討するため、豚肉に SDD、CDX をそれぞれ、添加して本法により試料を調製し、フォトダイオードアレイ検出器で分析したところ、Fig. 6 に示すような 3 次元クロマトグラムが得られた。

このように R.T. の他、ピークのスペクトル形状

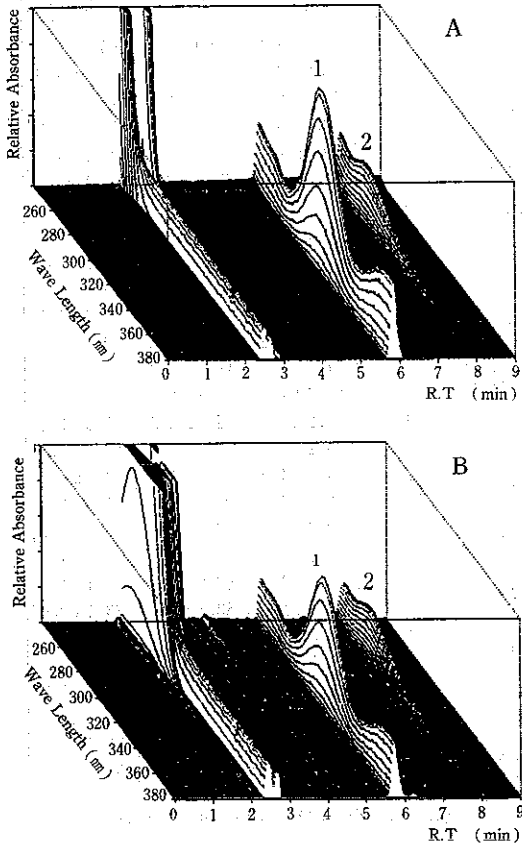


Fig. 6 3-Dimensional chromatograms of CDX, SDD

A : Standards (2.5 µg/ml)

B : Pork muscle extract spiked with 2.5 µg/10g of CDX, SDD (1 · CDX, 2 · SDD)

も同時に標準品と比較することが可能となるため検出ピークに関する確認同定の精度は飛躍的に向上した。

同時に、各ピークからスペクトルを採取し、それぞれの標準品のスペクトルとディスプレイ上で比較するとともに、Fig. 7 に示すようにピークのスペクトル形状の一致度 (R) を数量的に計算し、ピークの同一性を客観的に判定することが可能となった。

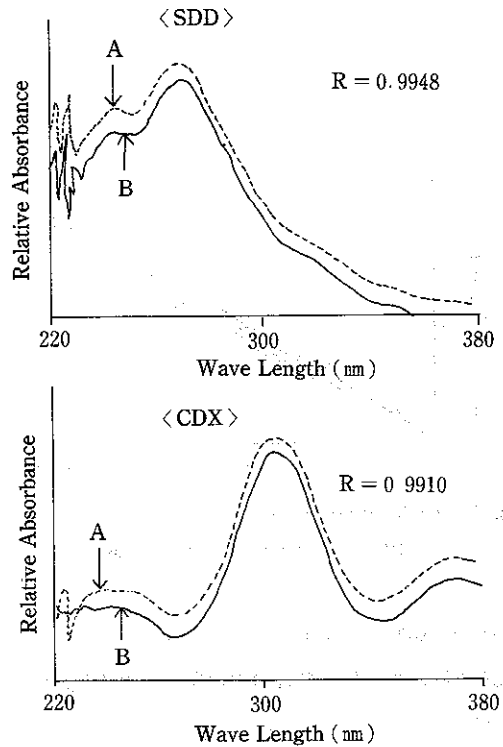


Fig. 7 Similarity of UV spectra

A : standard

B : spiked pork muscle extract

このようにフォトダイオードアレイ-UV 検出器は R.T. の他、ピークに関する多角的な情報が得られ、又ピークの同一性を数値化することも可能であり、ピークの最終的な確認同定手段として非常に有効であることが明らかとなった。

しかしながら、フォトダイオードアレイ-UV 検出器は感度の面で UV-検出器に劣ることから検出限界レベルでのピークの同定には試料の濃縮等の操作が必要である。従って、分析手順としては最初に UV-検出器でスクリーニングを行った後、標準品と R.T. の一致した検体についてフォトダイオードアレイ-UV 検出器による確認同定を行う方が効率的であると思われた。

#### 4. 結 語

- (1) 畜産食品中の合成抗菌剤のHPLCによる残留分析法の簡易迅速化を検討した。

この結果、前処理法としてアルミナカラム及びSep-PakC<sub>18</sub>を用いることにより、単一の方法で試料調製が可能となり、また、グラジェント法を用いたHPLC分析により14種類の薬剤を35分前後で分析することが可能となった。

- (2) 検出ピークの確認同定手段としてフォトダイオードアレイ-UV検出器を用いたところ、3次元クロマトグラムを始めとするピークに関する多角的な情報が得られ、同定の精度が格段に向上し、

確認同定手段として非常に有効であることが明らかとなった。

#### 5. 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課・畜産食品中の残留物質検査法第2集
- 2) 寺田久屋, 他: 日本食品衛生学会第52回学術講演講演要旨集, **38**, 1988.
- 3) 永田知子, 他: 食衛誌, **29**(1), 13-20, 1988.
- 4) 堀 義宏, 他: 食衛誌, **24**(5), 447-456, 1983.