

# 蛍光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる 食肉中の残留サルファ剤の定量について

河合 正暁 木原 敏博 西尾香奈子 久保下 誠  
佐藤 稔 大谷 崇 菊地由生子

## 要 旨

食肉中に残留するサルファ剤 10 種類について蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析を試みた。試料からの抽出にはアセトニトリルを用い、クリーンナップにはアルミナカラムと Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを使用した。蛍光誘導体化試薬にフルオレスカミンを用いることにより高感度な定量が可能となった。各サルファ剤の添加回収率は、それぞれ 70%以上の結果が得られた。

## 1. 緒 言

サルファ剤は、広範囲な抗菌スペクトルを持つ抗菌性薬剤で多くの原虫性疾患に有効であることから、家畜の疾病の予防・治療に、日本を初め諸外国でも広く用いられている<sup>1)</sup>。また、一般に安定性が高く、組織移行性に優れていることから、その使用方法によっては畜産物中に残留する可能性が高い<sup>2)</sup>。

食品衛生法により「抗菌性物質」は食品中に「含有してはならないこと」と定められており、サルファ剤をはじめ、これらの物質の残留検査にあたっては、その定量と確認に十分留意する必要がある。

従来、畜産食品中に残留するサルファ剤の定量法としては、比色法、TLC法、ジアゾメタンによるメチル化誘導体を測定するGC法等<sup>3,4)</sup>があるが、近年は、迅速性、簡便性に優れているUV吸収を利用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による検出法の報告<sup>5,6,7,8)</sup>が多く見られており、平成2年度より実施している畜水産食品中の有害残留物質の統一全国モニタリング調査における測定法<sup>9)</sup>もHPLCが採用されている。

しかし、この方法は特異性に乏しく、また試料や前処理法によっては妨害ピークが多く見られる場合もあり、物質の同定のため、再度、質量分析装置やフォトダイオードアレイ検出器等<sup>5,6,7)</sup>による確認が行われることもある。

今回我々はフルオレスカミン (フロレサミン) による蛍光誘導体化を行う岸原らの方法<sup>10)</sup>に改良を加え、10種のサルファ剤の多成分分析法を検討したので報

告する。

## 2. 方 法

### 2-1 試 料

市内で販売されている牛肉、豚肉、鶏肉をホモジナイザーで均一化し試験に供した。

### 2-2 試 薬 等

#### 標準品

サルファメラジン (SMR) : SIGMA 社  
サルファジミジン (SDD) : 上野製薬(株)  
サルファモノメトキシシ (SMMX) : 第一製薬(株)  
サルファジメトキシシ (SDMX) : 第一製薬(株)  
サルファキノキサリン (SQ) : 大日本製薬(株)  
スルフィソミジン (SID), スルファチアゾール (STZ),  
スルファドキシシ (SDOX), スルファメトキシピリダジン (SMPZ), スルファクロルピリダジン (SCPZ) : Riedel-de Haën 社

なお、標準液はそれぞれメタノールにより適宜希釈したものを用いた。

#### アルミナカラム

カラムクロマトグラフ用アルミナ (塩基性活性度 I ICN BIOMEDICALS 社製) 5g を内径 15 mm, 長さ 300 mm 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 30 ml, 85%アセトニトリル溶液 30 ml で順次洗浄した。

#### Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジ

Waters 社製

あらかじめメタノール, 水, McIlvaine 緩衝液それぞれ 10 ml を順次洗浄した。

### Mcllvaine 緩衝液

0.2 M リン酸水素二ナトリウム溶液と 0.1 M クエン酸溶液を混合し pH 5.5 に調製した。

### フルオレスカミン・アセトン溶液

フルオレスカミン (東京化成製) 8 mg をアセトン 1 ml に溶解した。

### 0.05 M リン酸緩衝液

0.05 M リン酸一カリウム溶液と 0.05 M リン酸二カリウム溶液を混合し pH 8.0 に調製した。

### その他の試薬

残留農業試験用, 特級もしくは HPLC 用を用いた。

### 2-3 装置

使用した HPLC 装置は全て (株) 日立製作所製を用いた。

ポンプ: L-6200

蛍光検出器: F-1150

データ処理装置: D-2500

### 2-4 測定条件

測定条件は表 1 に示した。

### 2-5 試料溶液の調製

あらかじめ均一化した試料 5 g に 25 ml のアセトニトリルを加え、2 分間ホモジナイザーにより抽出した後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上澄液をナス型フラスコにとった。

残留物にアセトニトリル 25 ml を加え、超音波洗浄器中で 5 分間抽出した後、同様に遠心分離し、上澄液を合わせた。突沸防止のため、n-プロピルアルコール 15 ml を加えロータリーエバポレーターにより、40°C の水浴中で減圧下、濃縮乾固した。この濃縮残留物に 85%アセトニトリル 5 ml を加え溶解しアルミナカラムに負荷し、さらに 35 ml の 85%アセトニトリルで溶出した。再び溶出液を減圧乾固し、残留物に Mcllvaine 緩衝液 5 ml を加え、超音波洗浄器中で 5 分間溶解した後 Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジに負荷し、水 10 ml で

表 1 HPLC の測定条件

カラム	Nucleosil 5 C <sub>18</sub> (4.6mm I.D.×250mm)
移動相	0.05M リン酸緩衝液 (pH6.0) : アセトニトリル (8 : 3)
流量	1.0ml/min 注入量 10 $\mu$ l
測定波長	励起波長 415nm 蛍光波長 490nm

洗浄後、メタノール 15 ml で溶出した。この溶出液を乾固し、0.05 M リン酸緩衝液 1 ml とフルオレスカミン・アセトン溶液 0.2 ml を加え、超音波洗浄器中で 2 分間反応させたものを試験液とし、10  $\mu$ l 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

食肉から残留サルファ剤を抽出する有機溶媒としては、メタノール<sup>8)</sup>、アセトン、アセトニトリル<sup>7,9)</sup>等やこれに除タンパク剤としてメタリン酸<sup>6)</sup>、トリクロロ酢酸等を加えたもの等、種々のものが報告されているが、今回は山本らの方法<sup>5)</sup>によりアセトニトリルで試みた。

#### (2) クリーンアップ法の検討

クリーンアップ法としては、液液分配による方法、カラムクロマトグラフィーによる方法、また近年では C<sub>18</sub> カートリッジを利用した固相抽出による方法等が報告されている。

当初、前処理操作の簡略化のため n-ヘキサンによる脱脂と C<sub>18</sub> カートリッジのみによるクリーンアップを試みたが、夾雑ピークが見られたため、有機溶媒による脱脂操作の代わりにアルミナカラムを用い、これに C<sub>18</sub> カートリッジを組み合わせるにより妨害ピークは除去することができた。なお、アルミナカラムの調製等については、永田ら<sup>8)</sup>及び山本らの方法<sup>5)</sup>によった。

また、カートリッジのサルファ剤に対する保持能力を比較検討した。つまり C<sub>18</sub> カートリッジとして Sep-Pak C<sub>18</sub> 500 mg, Bond Elut C<sub>18</sub> 500 mg, Adsorbex RP-18 400 mg 及び Baker C<sub>18</sub> 500 mg の 4 種類、またサルファ剤として使用頻度の高い SMMX, SMR, SDD, SQ 及び SDMX の 5 種類を用いた。

その結果については表 2 に示したとおり Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジが保持能力に優れていた。

### 3-2 蛍光反応についての検討

サルファ剤の定量に用いられる蛍光化試薬には、OPA 等がありフルオレスカミンについても、岸原ら<sup>10)</sup>により検討されている。

また、AOAC 法においても、シリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開後、フルオレスカミン処理し、蛍

表2 C<sub>18</sub> カートリッジの比較

C <sub>18</sub> カートリッジ名	回収率 (%)				
	SMMX	SMR	SDD	SQ	SDMX
Sep-Pak C <sub>18</sub> 500mg	72.5	68.2	68.5	72.2	77.6
Bond Elut C <sub>18</sub> 500mg	17.2	6.9	13.7	44.5	44.9
Adsorbex RP-18 400mg	35.8	9.0	40.6	70.3	75.9
Baker C <sub>18</sub> 500mg	24.6	10.7	18.7	60.9	63.6

\* 豚バラ肉に各サルファ剤を1μg添加 (n=2)

光デンシトメーターで定量する方法がとりいられている<sup>14)</sup>。しかし10種のサルファ剤について検討した報告はみられていない。

岸原らは、試料を酢酸エチル抽出し乾固後の残留物を直接フルオレスカミン処理し、3種のサルファ剤を定量している。我々も当初この方法を試みたが、共存物質の影響のためか蛍光反応が低下することがあり、測定値にばらつきが見られたため、前記(2)に示したクリーンアップを行ったところ良好な結果が得られた。

その他の測定条件等については基本的に岸原らの方法に準拠したがフルオレスカミン・アセトン溶液については8mg/mlの濃度のものを、リン酸緩衝液についても0.05Mの濃度のものを用いた。

反応生成物の安定性については、図1のとおり、室温下長時間にわたり安定であった。

### 3-3 HPLC 測定条件の検討

フルオレスカミンは、一級アミンと中性-弱アルカリ域で蛍光物質を生成する。

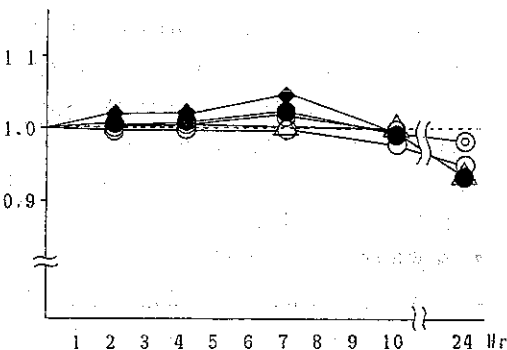


図1 反応生成物の蛍光強度の経時変化 (25°C)  
○-○ SMMX ○-○ SDD △-△ SDMX  
●-● SMR ◆-◆ SQ

今回は、カラムとして Nucleosil 5 C<sub>18</sub>、移動相としてアセトニトリル・リン酸混合溶液を用いて検討した。一般に逆相系カラムについては、その使用可能pH範囲はpH 2~8であり、反応条件ともあわせみると出来る限り中性域でのpHが望ましい。

検討の結果、表1の条件下において、図2に示すように10種のサルファ剤を約25分で良好に分離することができた。

また、食肉への添加回収試験結果は、表2のとおりである。それぞれ70%以上の結果が得られている。

### 3-4 定量限界

UV検出器による定量限界は試料量を5g採取した場合、0.02~0.03ppmであるが<sup>15)</sup>であるが、本法では7種(SID, STZ, SMMX, SMR, SDD, SCPZ, SDMX)

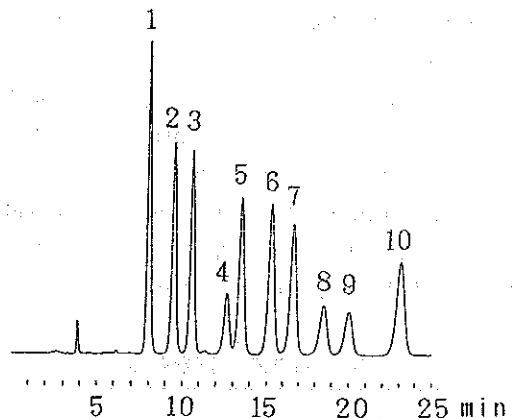


図2 鶏肉に標準品を添加したクロマトグラム (標準品添加濃度: 1μg/5g)

1. SID 2. SCPZ 3. SMMX 4. SDOX  
5. SMR 6. STZ 7. SDD 8. SQ  
9. SMPZ 10. SDMX

検出器 SENS 1 データ処理装置 ATT 7

表3 食肉への添加回収試験

サルファ剤名	回収率 (%)		
	鶏肉 (ササミ)	牛肉 (バラ)	豚肉 (ロース)
Sulfisomidine (SID)	76.2±4.6	77.4±3.3	83.7±7.0
Sulfachlorpyridazine (SCPZ)	75.6±4.3	77.4±2.5	81.5±7.1
Sulfamonomethoxine (SMMX)	88.4±1.6	78.5±7.3	83.1±7.1
Sulfadoxine (SDOX)	77.0±7.7	79.3±2.3	80.2±7.1
Sulfamerazine (SMR)	88.5±1.7	75.9±7.0	82.4±6.9
Sulfathiazole (STZ)	71.3±7.1	71.6±1.6	79.8±8.5
Sulfadimidine (SDD)	89.6±1.8	79.2±7.2	84.8±7.1
Sulfaquinoxaline (SQ)	85.6±2.9	72.3±7.6	81.1±7.6
Sulfamethoxypyridazine (SMPZ)	72.5±5.5	76.3±2.5	77.2±8.1
Sulfadimethoxine (SDMX)	91.2±1.6	78.4±8.3	83.4±7.9

\*各食肉 5g にサルファ剤を 1 $\mu$ g 添加 (n=5)

が 0.005 ppm, 他の 3 種 (SDOX, SQ, SMPZ) についても 0.01 ppm と非常に高感度に検出が可能であった。

また, 検量線の直線性の範囲は 7 種が 0.02~16 ppm, 3 種が 0.04~16 ppm の範囲だった。

よって, UV 検出器においてサルファ剤と思われるピークが得られた場合の確認法として, また個々のサルファ剤の定量法としても十分有効であると思われる。

#### 4. 結 語

食肉中の残留サルファ剤 10 種の蛍光検出器付 HPLC による分析法を検討した。

既報の方法<sup>10)</sup>にクリーンアップとしてアルミナカラム及び SeP-Pak C<sub>18</sub> カートリッジによる処理を追加した結果, 妨害ピークを除去することができ, 高感度での分析が可能となった。

#### 文 献

1) 吐山豊秋・新編家畜薬理学, 290-294, 養賢堂,

東京, 1989.

2) 厚生省生活衛生局監修・食品衛生検査指針化学編, 417-427, (社)日本食品衛生協会, 東京, 1991.

3) Horwitz: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64**, 104-130, 1981.

4) 厚生省生活衛生局編集・畜水産食品中の残留物質検査法, 85-107, 中央法規出版, 東京, 1990

5) 山本優, 他・札幌市衛研年報, **16**, 80-87, 1988.

6) 堀江正一, 他・食衛誌, **31**, 171-176, 1990.

7) 寺田久屋, 他・名古屋市衛研年報, **35**, 101-105, 1989.

8) 永田知子, 他・食衛誌, **29**, 13-20, 1988.

9) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課, 衛乳第 105 号, 平成 2 年 12 月 21 日, 「畜水産食品中の有害物質モニタリング検査の実施について」

10) 岸原 聡, 他・石川衛公研年報, **20**, 198-204, 1983.

11) Assoc. Off. Anal. Chem. Official Methods of Analysis, 15th ed, 634, 1990

# Determination of Residual Sulfa Drugs in Meats by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection

Masaaki Kawai, Satohiro Kihara, Kanako Nishio,  
Makoto Kuboshita, Minoru Sato, Takashi Otani and Yuko Kikuchi

Sulfonamides are an important class of antibacterial compounds used in veterinary practice and animal production.

A sensitive method for determination of 10 sulfa drugs in meats has been developed by high performance liquid chromatographic method (HPLC) with fluorometric detection.

In our study, the drugs were extracted from the meat using acetonitrile, followed by an aluminium column and Sep-pak C<sub>18</sub> clean-up procedure. The extracted drugs were added to 1ml of buffer solution (pH8.0) and 0.2ml of fluorescamine-aceton solution. These were mixed up and injected into an HPLC.

The recovery of the drugs from meats fortified at 1.0 $\mu$ g/5g averaged more than 70%. The detection limits of SID, STZ, SMMX, SMR, SDD, SCPZ and SDMX were 0.005ppm, while those for SDOX, SQ and SMPZ were 0.01ppm.