高速液体クロマトグラフィーによる畜産物中の残留サルファ剤の12薬剤一斉分析法

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	森田,幸雄 中曽根,由かり 荒木,妙子 福田,二三男 松本,寿男 栗原,貯 松本,尚武 飯塚,義之
発行元	日本獣医師会
巻/号	45巻5号
掲載ページ	p. 339-343
発行年月	1992年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

〔原　著〕

日本獣医公衆衛生学会

高速液体クロマトグラフィーによる畜産物中の残留サルファ剤の12薬剤一斉分析法

森田幸雄[1)]　中曽根由かり[1)]　荒木妙子[1)]　福田二三男[1)]

松本寿男[1)]　栗原　貯[1)]　松本尚武[2)]　飯塚義之[2)]

1）群馬県中央食肉衛生検査所（佐波郡玉村町樋越1834-1，〒370-11）

2）群馬県畜産試験場（勢多郡富士見村小暮2425，〒371-01）

（平成3年8月20日受付・平成4年2月7日受理）

Identification and Quantification of 12 Sulfa Drugs in Livestock Products by High Performance Liquid Chromatography

YUKIO MORITA[1)], YUKARI NAKASONE[1)], TAEKO ARAKI[1)], FUMIO FUKUDA[1)], HISAO MATSUMOTO[1)], OSAMU KURIHARA[1)], NAOTAKE MATSUMOTO[2)] and YOSHIYUKI IIZUKA[2)] ([1)] Chuou Meat Inspection Center Gunma Prefecture, Tamamura-machi, Sawa-gun, Gunma 370-11, [2)] Gunma Animal Husbandry Experiment Station, Gunma Prefecture, Kogure, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma 371-01)

SUMMARY

A simple quantitative method for the simultaneous determination of residual sulfa drugs in livestock products by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The 12 sulfa drugs were sulfaguanidine (SGD), sulfadiazine (SDZ), sulfasetamaid (SCA), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SDD), sulfamethoxypyridazine (SMPD), sulfachloropyridazine (SCPD), sulfamethoxazole (SMZ), sulfisoxazole (SIX), sulfadimethoxine (SDMX), sulfamonomethoxine (SMMX) and sulfisomidine (SID). Livestock products included pork, the liver, urine, serum, and kidney of swine, as well as chicken meat, cow milk and eggs.

Samples were deproteinized with trichloroacetic acid. Then, they were extracted with chloroform. The extracted supernatants from the samples were reacted with o-phthalaldehyde, and injected into an Inertsil C-8 (4mm I.D. × 250mm) HPLC column. Sulfa drugs were separated with a solution containing 1% acetic acid and acetonitrile as a mobile phase and detected with a spectrofluorometric detector (EX 285nm, EM 445nm).

The recoveries of drugs added to livestock products fortified at 100ng/g (m*l*) were from 70.0 to 168.0%. The detection limits were 2ng/m*l* for SMPD, 1ng/m*l* for SIX and SCPD, and 0.1ng/m*l* for other drugs. The fraction of (SDD and SDMX) that were picked by HPLC were able to react with the enzyme immunolinked analysis.

In an experimental SDD administration to swine, the SDD concentration in the muscles was about 10% of SDD concentration in the urine. Therefore, it was confirmed that the determination of SDD in the urine was a useful indicator for estimating the residual SDD concentration in muscles.

——**Key Words**：high performance liquid chromatography, residual sulfa drugs, livestock products.

----------*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 45, 339～343 (1992).

要　　約

畜産物中に残留する12種類のサルファ剤の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による定量法を検討した．12種類のサルファ剤は，スルファグアニシン（SGD），スルファジアジン（SDZ），スルファセタミド（SCA），スルファメラジン（SMR），スルファジミジン（SDD），スルファメトキシピリダジン（SMPD），スルファクロロピリダジン（SCPZ），スルファメトキサゾール（SMZ），スルフイソキサゾール（SIX），スルファジメトキシン（SDMX），スルファモノメトキシン（SMMX）とスルフイソミジン（SID）であり，畜産物は豚筋肉・肝臓・尿・血清・腎臓，鶏肉・鶏卵および牛乳である．

検体はトリクロロ酢酸で除蛋白処理し，次にクロロホルムによりサルファ剤を抽出する．抽出された検体はオルトフタルアルデヒドと反応させ，イナートシルC-8を装置したHPLCで測定した．

サルファ剤は溶離条件が0.1%酢酸水溶液とアセトニトリルにおいて解離し，蛍光検出（励起波長285nm，蛍光波長445nm）により検出した．

サルファ剤を畜産物に1g（m*l*）当たり100ng添加後の回収率は70.0～168.0%を示していた．検出限界値はSMPDで2ng/m*l*，SIXとSCPDで1ng/m*l*，他の薬剤は0.1ng/m*l*であった．HPLCを用いて分取されたSDDとSDMXの溶出ピークは，酵素免疫学的検出法に反応した．

豚を用いたSDDの投与実験では，豚筋肉のSDD残留量は尿からの検出量の約10%量を示した．よって，尿中のSDDを測定することは豚筋肉中のSDDの残留量を推定する指標となることが判明した．

——キーワード：高速液体クロマトグラフィー，残留サルファ剤，畜産物．

日獣会誌　45，339～343（1992）

サルファ剤は化学療法剤として広く用いられており，家畜，家禽および養殖魚の疾病予防や治療のほかに発育促進の目的で用いられる薬剤である．しかし，それら薬剤が畜水産食品中に残留し社会的な問題となっている[13,18~20]．

従来，畜産食品中のサルファ剤の検出には微生物学的簡易検査法，比色法，薄層クロマトグラフィー法やガスクロマトグラフィー法が用いられていた[6,9~11,24]．近年，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた方法[1~5,7,8,12,14~17,22,23,25]が報告されている．HPLCを用いた検出法の多くは紫外線吸収検出器により同定を行うものであり；除蛋白，薬剤の抽出や濃縮等煩雑な操作を行うものが多い．

著者らは前処理操作を簡易化する目的でサルファ剤の1つであるスルファジミジンをオルトフタルアルデヒド（o-PA）で蛍光誘導体とし，HPLCで定量分析する簡便法を開発し前報[14]により報告した．今回，この方法に改良を加え，12種類のサルファ剤について同時に定量する方法を検討したところ良好な結果が得られた．

材料および方法

試　　料

試料は群馬県内のと畜場に健康畜として搬入された豚の筋肉，肝臓，腎臓，血清，尿および市販の鶏肉，鶏卵，牛乳を使用した．

試　　薬

標準試薬として，Sigma社製のスルファグアニジン（SGD），スルファジアジン（SDZ），スルファセタミド（SCA），スルファメラジン（SMR），スルファジミジン（SDD），スルファメトキシピリダジン（SMPD），スルファクロロピリダジン（SCPZ），スルファメトキサゾール（SMZ），スルフイソキサゾール（SIX），スルファジメトキシン（SDMX），第一製薬㈱製のスルファモノメトキシン（SMMX）および大日本製薬㈱製のスルフイソミジン（SID）を用いた．標準試薬はすべて試薬品特級を用いた．

o-PA試薬はo-PA（関東化学）0.05gをメタノール2m*l*に超音波を約5分間かけ溶解し，30%アセトニトリル水溶液150m*l*，硫酸0.7m*l*を加えたものであった．

装　　置

装置として，HPLCは㈱日立製作所製L-6200型，蛍光検出器は㈱日立製作所製F-1050型，インテグレーターは㈱日立製作所製D-2500型，カラムオーブンは㈱日立製作所製L-665A-52型，を用いた．

HPLC操作条件

カラムはInertsil C-8,4mm i.d.×250mm（ジーエルサイエンス㈱）であり，温度は45℃とした．移動相は0.1%酢酸水溶液とアセトニトリルの混合液で，測定開始後20分までは混合比75：25とし，20分から30分にかけて混合比が次第に30：70になるようにグラジエントを変え，30分から35分までこの比を維持し，さらに35分から45分にわたってグラジエントをかけ，はじめの混合比75：25に戻した．

その他，流速1m*l*/min，蛍光検出器の励起波長285nm，蛍光波長445nm，感度は100倍，タイムコンスタット3秒とし，注入量は30μ*l*とした．

供試材料の前処理法

筋肉，肝臓，腎臓，卵黄，卵白については20g（m*l*）に対して0.01M Kp緩衝液（0.01Mリン酸二ナトリウム溶液と0.01Mリン酸二水素カリウムを1：1に混合し，pH 7.2に調整したもの）を等量加えホモジナイズ後遠心分離（3,000rpm，10min）し，上清を5m*l*採取する．さらに，その上清に10%トリクロロ酢酸水溶液を5m*l*加えよく混和後，遠心分離（3,000rpm，10min）し上清を再び採取する．この上清に3倍量のクロロホルムを加え十分に混和後，遠心分離（3,000rpm，10min）する．キャピラリーでクロロホルム層（下層）のみを採取し，除湿空気を吹き付け乾固する．

血清，牛乳，尿については，5m*l*採取し10%トリクロロ酢酸による除蛋白処理から実施する（図1）．

誘導体化

クロロホルム層を乾固したものにo-PA試薬を1m*l*加えて，60℃，30分間誘導体化反応を行う．

筋肉
肝臓
腎臓 20g ─┬─ 0.01M Kpバッファー　20ml
卵黄　　│　ホモジナイズ
卵白　　│　遠心分離（3,000rpm　10分）
　　└
血清 上清 ─┬─ 10%TCA　5ml
牛乳 5ml　　│　混和
尿　　│　遠心分離（3,000rpm　10分）
　　└
上清 ─┬─ クロロホルム　上清の3倍量
　　│　混和
　　│　遠心分離（3,000rpm　10分）
　　└
クロロホルム層
　　│ 除湿空気を吹き付け乾固
o-PA 試薬　1ml
　　│ 反応（60℃　30分）
試験溶液

図1　試験溶液の調整法

検量線の作成

12薬剤について，それぞれの濃度が0，0.25，0.05，0.1，0.2，0.5，1，2，5，10，50，100，200，400，600，800ng/ml となるように30%アセトニトリル水溶液に溶解して調整し，除湿空気を吹き付け乾固後，o-PA試薬を等量加え，60℃，30分誘導体化反応後，HPLC分析に供し，ピーク面積により検量線を作成した．

酵素免疫学的検出法による確認

SDDおよびSDMXについてHPLCでの溶出ピークを分取し，除湿空気を吹き付け乾固する．さらに，PBSで溶解したものを供試検液とし，EIAキット®（対象薬剤：SDMX，三菱油化BCL）ならびにEZスクリーン®（対象薬剤：SDD, Environmental Diagnostics Inc.）を用い，それぞれの操作法に基づき定性検査を実施した．

添加回収実験

各試料にそれぞれの薬剤を100ng/g（ml）になるように添加し，本法に従って操作し回収率を求めた．

豚を用いた投与実験

飼料添加剤および添加量：オーロファックS®（武田薬品工業，1kg中に塩酸クロルテトラサイクリン20g力価，SDD20gを含有）を，説明書指示用量の最大値である飼料1kg当たり10g（SDD量0.2g）に添加し均一に混和して使用した．

投与方法：生後約6カ月齢の健康な豚11頭について上記薬剤量を含む飼料を午前7時と午後5時にそれぞれ1.5kgがつ計3kg/日（SDD量0.6g/日）を1週間連続給与した．

供試材料の採取：休薬期間なし（Ⅰ群：3頭），休薬期間2日（Ⅱ群：2頭），4日（Ⅲ群：3頭）および6日（Ⅳ群：3頭）の豚を対象に，と殺，解体し，筋肉（頸部，臂部，横隔膜），肝臓，腎臓，血清（放血液）および尿（膀胱の残尿）を採取した．

成　　績

o-PA誘導化条件の検討と測定波長の選定

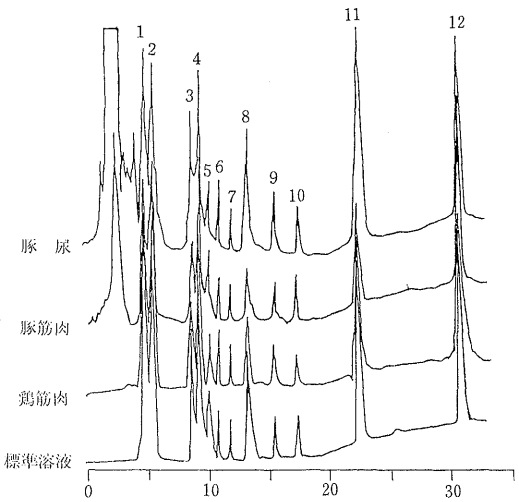
12薬剤混合（各々100ng/ml濃度の30%アセトニトリル水溶液）に調整したものと同量のo-PA試薬を60℃で0，5，10，20，30，40，60分反応させ，サルファ剤とo-PAの誘導体生産量を比較した．また，各試料にそれぞれの薬剤を100ng/g（ml）になるように添加後，本法による前処理，誘導化反応を実施し，励起波長を285nmに固定し，蛍光波長を測定した．

結果は前法[14]と同様であり，o-PA誘導化反応は30分で最高の生産量を示し平衡状態に達したため，反応時間は30分と定めた．蛍光波長は405nmで最大感度を示したが，試料中の妨害も大きくなるため薬剤の検出には不適である．そこで薬剤の面積も大きく，しかも妨害の面積が比較的少ない445nmを検出蛍光波長と定めた．

溶離液の検討

サルファ剤の検出にあたりクロマトグラム上の各試料の妨害物質が問題となる．

そこで，各試料ごとの妨害物質の保持時間と薬剤の保持時間を検討した．0.1%酢酸水溶液：アセトニトリルが75：25の比において，多くの試料の妨害は約4分以内で析出し，その後，12種のサルファ剤が各々検出された．20分以降にピークが得られる薬剤はSIX（保持時間27分）およびSDMX（保持時間38分）であり，



1　SGD，2　SID，3　SDZ，4　SCA，
5　SMR，6　SDD，7　SMPD，8　SMMX，
9　SCPD，10　SMZ，11　SIX，12　SDMX

図2　サルファ剤標準溶液12種類および鶏肉，豚筋肉，豚尿中に添加された同種のサルファ剤のクロマトグラム（各100ng/ml，g）

その検出波形は鋭さを欠いていた．よって，移動相は測定開始後20分までは65：25で，20分から30分にかけて35：65になるようにグラジエントを変え，35分以内で全ての薬剤の検出を終了させるように設定した．そのクロマトグラムを図2に示した．

以上の結果から，試料あるいはサルファ剤にo-PA試薬を60℃で30分反応させた後Inartsil c-8カラムで溶出させ，励起波長285nm，蛍光波長445nmで測定することとした．

検量線および検出限界

検出限界は，SMPDが2ng/ml，SIXとSCPDが1ng/ml，SDDが0.1ng/mlであり，他の8薬剤は0.05ng/mlであった．検出限界値から800ng/mlの範囲では検量線は原点を通る良好な直線性を示した．

添加回収実験

回収率はすべて試料および薬剤で70%以上を示していた（表1）．

酵素免疫学的検出法での確認

SDDとSDMXについてはo-PAとの誘導化後も抗原性を失っておらず，市販キットに良好に反応した．

豚投与実験結果

SDDの平均残留量はI群で最も高い値を示した．尿の残留量は全ての検体で最も多く，筋肉の残留量はNo.11の豚を除いていずれも尿の残留量の10%以下を示していた．また，筋肉のうち，頸部，臀部および横隔膜はほぼ同様な値であった（表2）．

表1 各薬剤の添加回収率（%）

薬剤名	保持時間（分）	豚					鶏			牛乳
		筋肉	腎臓	肝臓	血清	尿	筋肉	卵黄	卵白	
SGD	4.96	70.7	72.5	73.9	103.9	178.0	71.4	86.4	72.3	109.5
SID	5.54	85.0	117.0	84.0	104.0	123.0	81.8	87.1	87.1	113.4
SDZ	8.93	71.9	72.6	88.7	118.7	168.0	114.0	86.6	74.8	102.3
SCA	9.36	75.1	89.4	89.7	119.7	132.5	97.6	85.2	73.4	102.5
SMR	10.08	76.2	73.9	70.9	103.0	121.0	85.0	109.6	120.2	120.9
SDD	11.01	79.4	78.7	75.7	105.7	122.7	77.2	87.6	77.4	101.5
SMPD	12.02	79.1	84.6	73.8	103.8	113.7	73.2	82.0	73.4	107.7
SMMX	13.28	95.5	92.1	90.6	120.6	133.7	105.0	120.0	123.5	119.4
SCPD	15.73	70.0	70.0	70.0	100.0	110.0	70.0	83.3	87.8	101.5
SMZ	17.60	98.7	78.9	74.6	104.6	123.1	73.0	86.2	76.7	117.7
SIX	22.66	85.7	70.0	70.0	100.0	120.0	70.0	89.8	90.3	100.8
SDMX	30.80	73.4	79.9	80.1	110.1	147.1	97.1	97.7	105.7	102.7

各試料にそれぞれの薬剤を100ng/g(ml)になるように添加した場合の回収率．

表2 SDDの豚組織内の残留試験成績

群	休薬期間	豚No.	尿	血清(%)	肝臓(%)	腎臓(%)	筋肉		
							横隔膜(%)	頸部(%)	臀部(%)
I	0日	1	7.52	6.73(89.5)	1.53(20.3)	0.55(7.3)	0.67(8.9)	0.65(8.6)	0.59(7.8)
		2	15.09	7.00(44.0)	1.53(10.2)	1.10(7.3)	0.57(3.8)	0.46(3.0)	0.48(3.2)
		3	11.94	7.31(61.2)	1.33(11.1)	1.43(12.0)	0.62(5.2)	0.54(4.5)	0.55(4.6)
		A.V	11.52	7.01(63.5)	1.46(12.7)	1.03(8.9)	0.62(5.4)	0.55(4.8)	0.54(4.7)
II	2日	4	4.80	—(—)	0.76(18.8)	0.16(3.3)	0.28(5.8)	0.22(4.6)	0.21(4.4)
		5	6.69	5.52(82.5)	0.64(9.6)	0.16(2.4)	0.28(4.2)	0.21(3.1)	0.25(3.7)
		A.V	5.75	5.52(96.0)	0.70(12.2)	0.16(2.8)	0.28(4.9)	0.22(3.8)	0.23(4.0)
III	4日	6	3.06	0.66(21.6)	0.71(23.2)	0.17(5.6)	0.16(5.2)	0.15(4.9)	0.17(5.6)
		7	3.92	—(—)	0.36(9.2)	0.12(3.1)	0.17(4.3)	0.11(2.8)	0.12(3.1)
		8	5.61	2.82(50.3)	0.83(14.8)	0.23(4.1)	0.30(5.3)	0.20(3.6)	0.19(3.4)
		A.V	4.20	1.74(41.4)	0.63(15.0)	0.17(4.1)	0.21(5.0)	0.15(3.6)	0.16(3.8)
IV	6日	9	—	1.11(—)	0.35(—)	0.27(—)	0.12(—)	0.11(—)	0.11(—)
		10	1.56	0.63(40.4)	0.16(10.3)	0.20(12.8)	0.07(4.5)	0.07(4.5)	0.00(0.0)
		11	1.13	0.05(4.4)	0.00(0.0)	0.27(23.9)	0.00(0.0)	0.17(12.6)	0.15(13.3)
		A.V	1.35	0.60(44.4)	0.17(12.6)	0.25(18.5)	0.06(4.4)	0.12(8.9)	0.09(6.7)

単位：μg/ml(g)　(%) 尿を100とした

考　　察

安全な畜産物を供給するために行う検査は従来から行われている疾病畜や病変部の排除を目的とするのみではなく，畜産物中の残留有害物質の排除が重要とされ行われてきた．そのため，国においては平成2年度から畜水産物中の残留有害物質に関する全国規模のモニタリング検査を実施するに至っている[10~12]．

食肉中の残留有害物質の監視はと畜場および食鳥処理場での食肉検査（と畜検査および食鳥検査）時に実施されることが望まれる．検査法は簡単な操作法で多くの薬剤が同時に検出可能であることが理想である．今回，改良したサルファ剤の検出方法は前処理操作が比較的簡便であること，多種類の検体が測定できること，12種のサルファ剤が同時に検出可能であること，そしてHPLCによる測定の後，酵素免疫学的検査法により成績の再確認ができること等から，食肉検査の現状に極めて有効な検査法であると思われた．

抗菌性物質が残留する食肉および内蔵は，食品衛生法第7条の規定に基づき廃棄処分されている．また，飼料添加剤の残留は，その他の投薬法による個別の治療薬によるものと異なり，飼育群全体が食用不適となる場合がある．よって，生体時での採取が比較的容易な尿を採取し，その薬剤量を測定することは家畜の体内における薬剤残留の有無が確認できるため，安全な食肉を確保するだけでなく，生産者の経済的損失を未然に防止することが可能である．

モニタリング検査が重要視される今日，本法は実際の食肉検査以前のスクリーニング検査法として使用可能であると思われる．

終わりに本研究を行うにあたり，多大なご協力をいただいた㈱ユニオン商会技術部の阿部修三氏に深謝いたします．

引　用　文　献

1) 堀　孝美，渡部健二郎，木川　寛，ほか：食品衛生研究，40，87～91（1990）．
2) 堀　義宏：食衛誌，24，447～453（1983）．
3) Haagsma N. and Van De Water C.: *J. Chromatogr.* 333, 256～261 (1985).
4) 堀江正一，星野庸二，能勢憲英，ほか：衛生化学，31，371～376（1985）．
5) 堀江正一，斉藤貢一，星野庸二，ほか：食衛誌，31，171～176（1990）．
6) Horwotz W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 104～130 (1981).
7) Johnson K. L., Jeter D. T. and Claiborne R. C.: *J. Pharm. Sci.*, 64, 1657～1660 (1975).
8) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第2集の8，1～6（1989）．
9) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法，第2集の3，1～6（1980）．
10) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：平成2年12月21日付（衛乳第105号）畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査の実施について，別添1，食肉の抗菌性物質簡易検査法（1990）．
11) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：平成2年12月21日付（衛乳第105号）畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査の実施について，別添2，抗生物質のミニカラムによる系統別推定法（1990）．
12) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：平成2年12月21日付（衛乳第105号）畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査の実施について，別添3，合成抗菌剤の一斉分析法（1990）．
13) 松本昌雄：食品衛生研究，39，83～96（1989）．
14) 中曽根由かり，森田幸雄，大澤一之，ほか：日獣会誌，43，896～900（1990）．
15) 永田知子，佐伯政信：食衛誌，29，13～20（1988）．
16) 中澤裕之，四宮一総，藤田昌彦，ほか：食衛誌，26，7～12（1985）．
17) Nose N., Hoshino Y., Kikuchi Y., et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 714～717 (1987).
18) 小野浩臣：畜産の研究，43，74～78（1989）．
19) 小野浩臣：畜産の研究，43，431～434（1989）．
20) 小野浩臣：畜産の研究，43，527～532（1989）．
21) Randecker V. W., Reagan J. A., Engel R. E., et al.: *J. Food Prot*, 50, 115～122 (1987).
22) 高井　透，大関江美子，長谷川敏子，ほか：新潟衛公研年報，5，83～87（1989）．
23) 寺田久屋，麻野正晴，坪内春夫，ほか：衛生化学，29，226～231（1983）．
24) Thomas M. H., Soroka K. E. and Thomas S. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 881～883 (1983).
25) Vilim A. B., Larocque L. and Macintosh A. I.: *J. Liq. Chromatogr.*, 3, 1725～1736 (1980).