ノート

HPLC による畜産食品中の 5 種動物用医薬品の迅速定量

(平成 12 年 6 月 15 日受理)

長 南 隆 夫* 西 村 一 彦* 平 間 祐 志*

Rapid Determination of Residues of Five Kinds of Veterinary
Drugs in Livestock Products by HPLC

Takao CHONAN, Kazuhiko NISHIMURA and Yuzi HIRAMA

(Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome,
Kita 19-jo, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan)

A simple and rapid method has been developed for simultaneous determination of five veterinary drugs and a derivative (5-propylsulfonyl-1*H*-benzimidazole-2-amine, thiabendazole, 5-hydroxythiabendazole, panazon, pyrimethamine and trimetoprim) in meat, liver, kidney and milk.

The drugs were extracted from a sample by homogenizing with acetonitrile and then the mixture was filtered. The extracted solution of meat was poured onto an alumina column. The extracted solution of liver, kidney or milk was partitioned between saturated ammonium sulfate solution (pH 7.0) and ethyl acetate-*n*-hexane (4:1). The organic solvent layer was poured onto an alumina column. The solution containing the drugs was evaporated to dryness under reduced pressure.

The HPLC analysis was carried out on a CAPCELL PAK C18 UG120 column (4.6 mm i.d.×150 mm) with a gradient system of 0.1% phosphate buffer (pH 7.0)-acetonitrile as the mobile phase. The drugs were measured with ultraviolet and fluorescence detectors. The recoveries of the drugs at the level of 0.1 µg/g were 62.3~100.0%. The detection limits were in the range of 0.005~0.05 µg/g.

This method should be useful to determine the above veterinary drugs in livestock products.

(Received June 15, 2000)

Key words: 動物用医薬品 veterinary drugs; 5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン 5-propylsulfonyl-1*H*-benzimidazole-2-amine; チアベンダゾール thiabendazole; 5-ヒドロキシチアベンダゾール 5-hydroxythiabendazole; パナゾン panazon; ピリメタミン pyrimethamine; トリメトプリム trimetoprim; 肝臓 liver; 腎臓 kidney; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

残留基準値の設定される動物用医薬品(医薬品)の増加に伴い、畜水産食品中に残留するこれらの医薬品の検査業務が増大している。基準の設定に伴って示される告示分析法^{1)~3)}は個別分析法であるため、この分析法を用いて検査を行うには多くの時間と労力を必要とする。このため、スクリーニングに活用できる簡便・迅速な多成分分析法の開発が強く求められている。

多成分分析法には、既に幾つかの報告^{4), 5)}があるが、これらには肝臓・腎臓への適用が困難であるなどの問題点がある。著者らは、肉・肝臓・腎臓など畜水産食品全般に適用でき、医薬品の残留の有無を容易に判定できる簡便・迅速な多成分分析法を開発するため、医薬品を化学的性質に

より分類して、そのグループの医薬品の一斉分析法を検討している。既に、スルファジミジン、フルベンダゾールなど 10 種の医薬品については、その一斉分析法を報告⁶⁾した。今回は、塩基性の医薬品と水溶性の高い医薬品について検討した。対象とした医薬品は、アルベンダゾール代謝物である 5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン(ABZ-M)、チアベンダゾール(TBZ)、TBZ 代謝物である 5-ヒドロキシチアベンダゾール(TBZ-M)、トリメトプリム(TMP)、パナゾン(PNZ)及びピリメタミン(PYR)の 5 種(6 化合物)で、牛、豚、鶏の肉・肝臓・腎臓及び牛乳について検討し、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試 料

平成 11 年度に北海道内の食肉衛生検査所から供与され

* 北海道立衛生研究所: 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目

た肉 (牛, 豚, 鶏), 肝臓及び腎臓 (牛, 豚) 並びに札幌市内の食品販売店で購入した牛乳を用いた。

2. 試 薬

標準品: ABZ-M, TBZ-M は林純薬工業(株), TBZ は和光純薬工業(株), TMP, PYR は Sigma 社, PNZ はファイザー製薬(株)の標準品を用いた。

標準原液: 各標準品 10.0 mg をメタノールに溶解して, 100 mL とした。

標準溶液: 標準原液を各医薬品の含量が 0.05~5 µg/mL となるようにメタノール-水 (6:4) で希釈して調製した。

有機溶媒及びその他の試薬: 有機溶媒は, いずれも和光純薬工業(株)特級試薬を用いた。アルミナは, メルク社製酸化アルミニウム 90 (中性) を, その他の試薬は, 市販特級品を用いた。水は, 脱イオン水を用いた。

アルミナカラム: アルミナ 5 g (肉の場合は 2 g) を内径 2 cm, 長さ 30 cm のカラム管に乾式法で充てんした。

3. 装 置

ストマッカー: オルガノ社製

高速液体クロマトグラフ: (株)日立製作所製 高速液体クロマトグラフ L-7000 シリーズを用いた。検出には紫外検出器と蛍光検出器を直列に接続し, Table 1 に示す条件で分析を行った。

4. 試験溶液の調製

4.1 抽出法

4.1.1 肉

試料 10 g をストマッカー 80T 用ポリ袋にひょう取し, 無水硫酸ナトリウム 10 g, アセトニトリル 25 mL を加え, 1 分間ホモジナイズした後, ろ紙でろ過した。残留物にアセトニトリル 25 mL を加え, 同様の操作を繰り返して, ろ液を合わせた。次いでアセトニトリル 10 mL でろ紙上の残留物を洗い, ろ液を合わせた。ろ液にアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 50 mL を加え, 5 分間激しく振とうした。2 層に分離後, アセトニトリル層を分取した。

4.1.2 肝臓及び腎臓

試料 10 g をストマッカー 80T 用ポリ袋にひょう取し, 無水硫酸ナトリウム 10 g, アセトニトリル 25 mL を加え, 1 分間ホモジナイズした後, ろ紙でろ過した。残留物にアセトニトリル 25 mL を加え, 同様の操作を繰り返して, ろ液を合わせた。次いで, アセトニトリル 10 mL でろ紙上の残留物を洗い, ろ液を合わせた。ろ液に 1% 酢酸アンモニウム 10 mL, *n*-ヘキサン 50 mL を加え, 5 分間激しく振とうした。2 層に分離後, 含水アセトニトリル層を分取し, これに, 硫酸アンモニウム 10 g, 酢酸エチル-*n*-ヘキサン (8:2) 50 mL を加えて 5 分間激しく振とうした。2 層に分離後, 有機溶媒層を分取し, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。

4.1.3 牛乳

試料 10 g をストマッカー 80T 用ポリ袋にひょう取し, アセトニトリル 40 mL を加え, 1 分間ホモジナイズした。

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Column	CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. × 150 mm)		
Mobile phase	Linear gradient system		
	A: 0.1% phosphate buffer (pH 7.0) B: acetonitrile		
	time (min)	0→30→35→40	
	B (%)	10→40→50→10	
Detection	Ultraviolet	300 nm	
	Fluorescence	Ex 280 nm	Em 320 nm (0~12 min)
		Ex 300 nm	Em 370 nm (12~35 min)
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection	50 μL		
Column temp.	40°C		

後, ろ紙でろ過した。次いで, アセトニトリル 10 mL でろ紙上の残留物を洗い, ろ液を合わせた。ろ液に *n*-ヘキサン 50 mL を加え, 5 分間激しく振とうした。2 層に分離後, 含水アセトニトリル層を分取し, これに硫酸アンモニウム 10 g, 酢酸エチル-*n*-ヘキサン (8:2) 50 mL を加えて 5 分間激しく振とうした。2 層に分離後, 有機溶媒層を分取し, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。

4.2 精製法

アルミナカラムに 4.1 抽出法で得られた溶液を注入した。流出後, アセトニトリル 30 mL をカラムに注入し, 流出液を合わせた。流出液を 40°C の水浴上で約 2 mL に減圧濃縮し, 窒素ガス気流下乾固した。残留物にメタノール 1.2 mL を加えて溶解した後, 水 0.8 mL を加え混和した。これを, 遠心分離 (4°C, 15,000 rpm, 4 分間) し, 得られた上清を試験溶液とした。

実験結果及び考察

1. 試験溶液の調製方法の検討

1.1 肉

はじめに, 豚肉をアセトニトリルで抽出し, 脱脂後, 濃縮して HPLC で分析したところ, クロマトグラム上に分析の障害となる夾雑ピークが認められた。そこで, アルミナカラムを用いて精製する方法を検討した。メルク社の中性, 酸性, 塩基性のアルミナ各 2 g を乾式法で充てんしたカラムに豚肉のアセトニトリル抽出液を注入したところ, 夾雑ピークの除去についてはいずれも良好な結果が得られた。一方, 回収率は中性アルミナのとき最も高かったため, 中性アルミナを用いて精製することとした。アルミナカラムへの注入方法については, 濃縮操作を必要最少限にするため脱脂した抽出液をそのまま注入することとした。アルミナカラムで精製した抽出液には, 濃縮時の突沸が認められず, 濃縮操作は容易であった。

1.2 肝臓及び腎臓

はじめに, 牛の肝臓及び腎臓に肉の試験溶液の調製方法を適用したところ, クロマトグラム上に多くの夾雑ピークが認められた。夾雑ピークの多くは, 水溶性の化合物と考

えられたので、アセトニトリル抽出液に緩衝液、塩及び有機溶媒を加えて液-液分配を行い、医薬品を有機溶媒で抽出後、アルミナカラムで精製する方法を検討した。

本研究では、塩基性及び水溶性の高い医薬品を対象としているため、①液-液分配時の水層の pH (pH 1.5, 4.5, 7.0, 8.9), ②水層に加える塩 (飽和硫酸アンモニウム, 飽和塩化ナトリウム), ③抽出に用いる有機溶媒 (酢酸エチル, 酢酸エチル-*n*-ヘキサン混液 (8:2) 及び (6:4)), ④カラムに用いるアルミナの量 (2 g, 5 g) について、夾雑ピークの除去と得られる回収率を検討した。その検討結果から、実験方法 4. 試験溶液の調製 の項に記した調製法を作成した。この方法で得られた肝臓及び腎臓のクロマトグラム上には試料由来のピークが若干認められたが、それらは医薬品のピークと分離していて定量に影響はなかった。一例

Fig. 1. Chromatograms of Veterinary Drugs
(I) chromatograms obtained by UV detector
(II) chromatograms obtained by FL detector
(A) standard solution (each 0.5 µg/mL)
(B) extract of cattle kidney
Peak identification, 1: 5-hydroxythiabenzazole (TBZ-M); 2: 5-propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine (ABZ-M); 3: trimetoprim (TMP); 4: thiazibenzazole (TBZ); 5: pyrimethamine (PYR); 6: panazon (PNZ)

として、牛・腎臓のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

1.3 牛乳

牛乳に 4 倍量のアセトニトリルを加えて除タンパク後、脱脂した。この抽出液を肝臓及び腎臓の方法 (液-液分配以降) で試験溶液を調製したところ、良好な結果が得られた。ただし、牛乳抽出液の pH は 6.6 前後と酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) とほぼ同じ pH であるため、1% 酢酸アンモニウム溶液は加えないこととした。

2. HPLC 条件の検討

HPLC で今回対象とした医薬品を分析すると、PNZ と PYR、特に PNZ のピーク面積の再現精度と直線性の精度はカラムにより大きく異なった。そこで、数種類の市販カラム (CAPCELLPAK C18 UG120, Inertsil ODS-80A, L-column ODS, LiChroCART RP-18, TSK SuperODS) について検討し、再現精度が高く、良好な直線性が得られた CAPCELL PAK C18 UG120 を用いた。Table 1 の条件で医薬品を分析したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

定量に際しては、TBZ-M, TMP, PYR, PNZ は紫外検出器 (測定波長 300 nm), ABZ-M, TBZ は蛍光検出器 (ABZ-M: Ex 280 nm, Em 300 nm, TBZ: Ex 300 nm, Em 370 nm) を用いた。この条件で ABZ-M, TBZ, TBZ-M の検量線は 0.05~5.0 µg/mL の範囲で、TMP, PNZ, PYR の検量線は 0.25~5.0 µg/mL の範囲で良好な直線性が認められた。

3. 添加回収実験

牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、豚肝臓、牛腎臓、豚腎臓及び牛乳各 10 g に各医薬品 1 µg を添加して本法の回収率を求めた。結果は、Table 2 に示すとおり、5 種医薬品 (6 化合物) とともに 60% 以上の回収率が得られた。

本法の検出限界値は、TBZ で 0.005 µg/g, ABZ-M と TBZ-M で 0.01 µg/g であり、残留基準値に十分対応できた。一方、残留基準値の設定されていない TMP, PNZ, PYR の検出限界値は 0.05 µg/g であり、既報⁷⁾ とほぼ同じレベルであった。

Table 2. Recoveries of Veterinary Drugs Added to Meat, Liver, Kidney and Milk

	Recovery* (%)					
	ABZ-M	TBZ	TBZ-M	PNZ	PYR	TMP
Beef	91.7±4.2	99.1±0.4	89.3±2.1	74.7±4.6	83.0±3.9	80.9±3.2
Pork	97.2±2.4	100.0±0.7	96.7±4.6	73.1±8.9	80.6±2.2	86.4±3.7
Chicken	86.7±6.1	85.1±6.3	78.2±9.7	70.0±8.7	79.4±8.8	83.3±5.8
Cattle liver	78.0±3.7	82.7±4.0	84.1±3.4	77.9±4.7	82.0±4.4	66.7±5.8
Swine liver	72.0±8.6	87.4±3.4	79.8±3.4	71.7±2.9	63.0±3.7	68.4±5.3
Cattle kidney	73.6±7.1	81.5±3.0	76.2±4.6	86.7±5.8	79.8±5.4	68.5±5.4
Swine kidney	82.1±3.0	78.8±2.2	75.4±1.3	66.6±7.2	62.8±5.9	62.3±1.5
Cows' milk	79.8±4.3	92.4±2.8	81.0±4.4	76.8±3.8	88.1±5.5	77.6±6.4

* Values are mean±S.D. (n=3).

* Samples were spiked with 0.1 µg/g of veterinary drugs.

結 語

畜産食品中の5種の医薬品(6化合物)の一斉分析法を検討した。試料をアセトニトリルで抽出し、脱脂後、肉の場合は、抽出液をアルミナカラムで精製する方法で、肝臓・腎臓・牛乳の場合は、必要に応じてpH7の緩衝液を加えて硫酸アンモニウム飽和として酢酸エチル-*n*-ヘキサン(8:2)で抽出後、アルミナカラムで精製する方法で試験溶液を調製した。試験溶液を紫外及び蛍光検出器付きHPLCで分析した。

試験溶液のクロマトグラム上には、試料由来のピークが若干認められたが定量には影響がなかった。添加回収率は60%以上であった。

本法は肉・肝臓・腎臓・牛乳に適用でき、簡便かつ迅速で基準値に対応できることから、これら医薬品の実用的なスクリーニング法と考えられた。

文 献

- 1) 厚生省令第62号, 厚生省告示第218号(1995)“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成7年

12月26日。

- 2) 厚生省令第33号, 厚生省告示第73号(1997)“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成9年3月28日。
- 3) 厚生省令第93号, 厚生省告示第239号(1999)“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成11年11月26日。
- 4) 厚生省生活衛生局長通知“畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(改訂法)”平成5年4月1日衛乳第79号(1993)。
- 5) Horie, M., Yoshida, T., Saito, K., Nakazawa, H., Rapid screening method of residual veterinary drugs in meat and fish by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **39**, 383-389 (1998)。
- 6) Nishimura, K., Chonan, T., Hiramata, Y., Simultaneous determination of 10 kinds of veterinary drugs by HPLC. *Hokkaidoritsu Eiseikenkyusho Ho* (Report of the Hokkaido Institute of Public Health), **48**, 81-84 (1998)。
- 7) 畜産生物科学安全研究所編“畜水産食品の薬物残留とその分析法”東京, 近代出版社, 1994, p. 152-175。