シリカゲルを用いたマトリックス固相分散法と高速液体クロマトグラフィーによる畜産食品中のサルファ剤の定量

(平成 5 年 12 月 10 日受理)

田村 博* 世取山 守*
黒崎かな子* 篠原 信勝*

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Sulfonamides in Livestock Products Using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Method with Silica Gel

Hiroshi TAMURA, Mamoru YOTORIYAMA, Kanako KUROSAKI
and Nobukatu SHINOHARA

(Food Division, Tochigi Prefectural Institute of Public Health:
4-9-7, Yonan, Utsunomiya-shi, Tochigi 320, Japan)

The MSPD method with silica gel (Silica Gel-MSPD) was developed for the extraction of sulfonamides in livestock products. Residual sulfonamides such as sulfamerazine (SMR), sulfadiazine (SDD), sulfamonomethoxine (SMM), sulfadimethoxine (SDM) and sulfaquinoxaline (SQO) were extracted from chicken muscle tissue, yolk and pork muscle tissue. A sample (0.5 g) was mixed with 0.7 g of silica gel and 1.5 ml of acetonitrile, and the mixture was dried, washed with hexane and eluted with methanol or tetrahydrofuran (THF). An aliquot of the methanol or THF solution was subjected to HPLC for the determination of each sulfonamide. The recoveries of sulfonamides added to the chicken, yolk and pork were 78.1 to 93.1%, 74.6 to 86.2% and 69.6 to 87.1%, respectively. The limits of detection for the proposed method were 0.01 ppm for SMR and SDD, 0.02 ppm for SMM and 0.04 ppm for SDM and SQO.

In order to confirm the utility of the proposed method, analyses of commercial products were performed, and the result was compared with that obtained by MSPD with ODS. Consequently, 0.94 ppm of SMM and 0.99 ppm of SDM were detected in two samples of pork muscle by the proposed method, whereas the values detected by using ODS were 0.81 and 0.56 ppm, respectively.

(Received December 10, 1993)

Key words: シリカゲル silica gel; マトリックス固相分散 matrix solid-phase dispersion (MSPD); サルファ剤 sulfonamides; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC)

1. はじめに

食肉、魚肉中のサルファ剤を含む合成抗菌剤の多成分同時分析法には、ガスクロマトグラフィー (GC)¹⁾、GC-質量分析計 (GC/MS)²⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{3)~6)}、HPLC/MS⁷⁾、超臨界抽出法⁸⁾などが用いられている。

これらの分析法の前処理操作には、液-液分配法によ

るクリーンアップ、ミニカートリッジなどを用いた固相抽出法がある。いずれの方法も多数の機器、多量の有機溶媒を用いて抽出、クリーンアップを行い、機器分析に供するのが一般的である。一方、Long らは、新しい前処理法として C₁₈ を用いた matrix solid phase dispersion method^{9), 10)} (以下 ODS-MSPD 法) により、牛乳¹¹⁾や豚肉中¹²⁾の 8 種類のサルファ剤を定量した。また、Reimer らは、魚肉中の 7 種類の合成抗菌剤の抽出にこの方法を応用した¹³⁾。これらの方法は、用いる機器、溶媒ともに

* 栃木県衛生研究所: 〒320 栃木県宇都宮市陽南 4-9-7

Scheme 1. Analytical procedure by MSPD method with silica gel for the determination of sulfonamides in chicken muscle tissue, pork muscle tissue and york of an egg

少なく、簡便かつ迅速に検査を行える方法である。そこで、これらの ODS-MSPD 法を追試するとともに、著者らは固相に少量のアセトニトリルを添加したシリカゲルを用いることにより、鶏肉、鶏卵黄及び豚肉中のサルファ剤を更に高い効率で精度良く抽出できる前処理方法（以下シリカゲル-MSPD 法）を見いだしたので、報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

標準添加用試料として、鶏肉及び豚肉は市販品の筋肉をペースト状にし、小分けし、冷凍保存（ -20° 以下）したものを分析時に解凍して用いた。市販鶏卵は卵黄部分を分取して用いた。

市場調査用の試料として、鶏肉、鶏卵黄及び豚肉は市販品を標準添加用試料と同様に処理し、直ちに分析に供した。また、埼玉県衛生研究所より既知濃度の豚肉を譲り受けた。

2.2 試薬

アセトニトリル及びメタノールは Merck 社製 HPLC 用を、テトラヒドロフラン (THF) は和光純薬工業(株)製 HPLC 用を、ヘキサンは和光純薬工業(株)特級をそれぞれ用いた。シリカゲルは Varian 社製 SI 40UM Part No. 1221~3001 を用いた。

2.3 器具

リザーバー（プラスチック製注射筒）は Varian 社製 Bond Elut Reservoir（フリット付き、8 ml）、ガラス乳鉢は外径 90 mm のものを用いた。

2.4 標準試薬

スルファメラジン (SMR)、スルファジミジン (SDD) はシグマ社製、スルファモノメトキシシン (SMM)、スルファジメトキシシン (SDM)、スルファキノキサリン (SQO) は、食品衛生検査機関協議会より購入した。5 種類のサルファ剤を 10 mg 精ひょうし、メタノールでそれぞれ正確に 100 ml に調製し、標準原液として冷蔵庫に保管した。これらを適宜混合、メタノールで希釈し、標準液として実験に供した。

2.5 抽出操作

抽出操作を Scheme 1 に示した。ガラス乳鉢に試料 0.5 g を量りとり、シリカゲルを 0.7 g 加えた。添加回収実験を行うときは、10 μl の標準溶液を試料の上に添加し、1~2 分放置した。更にアセトニトリル 1.5 ml、無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加え、均一になるまで乳棒ですりつぶした。乾燥して乳鉢の内壁が白くなるまですりつぶし続けた。得られた混合物を、あらかじめ約 0.5 g の無水硫酸ナトリウムを入れたリザーバーに移した。混合物の上に更に約 1 g の無水硫酸ナトリウムを加え、アダ

Fig. 1. Influence of methanol content in matrix solid-phase mixture for recovery
A: SMR; B: SDD; C: SMM; D: SDM; E: SQO

□: sulfonamides detected from eluent, ▨: sulfonamides detected from wash

プターを介してプランジャー付きのガラス注射器に取り付けた。n-ヘキサン 8 ml を 10 ml/min 程度で通し、洗浄した。シリカゲルに保持されたサルファ剤は、鶏肉にあってはメタノール 6 ml、鶏卵黄にあっては THF 3 ml、豚肉にあってはメタノール 10 ml を 30 ml/min 程度で通し、溶出した。4,000 rpm で 2 分間遠心分離した。上澄みを 40°, N₂ 気流中で乾固した。残留物をメタノール 200 μ l で再溶解し、0.5 μ m メンブランフィルターでろ過し、ろ液の 10 μ l を HPLC へ注入した。

2.6 HPLC 条件

分析カラムには化学品検査協会製 L-カラム ODS (4.6 $\times$ 15 cm) を使用し、溶離液にアセトニトリル-1% 酢酸 (18:82) を用い、カラム温度 40°, 流速 1 ml/min で送液し、日本分光(株)製 875 UV を用いて 272 nm で測定した。

3. 結果及び考察

3.1 残留溶媒と回収率

抽出溶媒が固相-試料混合物中に残留した場合の、回収率に与える影響について検討した結果を Fig. 1 に示した。抽出溶媒としてメタノールを用い、ガラス乳鉢で約 1 分間混合した後、そのまま乾燥せずにリザーバーに移し、洗浄、溶出した時の回収結果である。メタノール量を増加させると、洗浄液中に見いだされるサルファ剤の量も増加した。これによって各サルファ剤の回収率は著しく減少した。すなわち、固相-試料混合物中に残留するメタノールは、洗浄時にサルファ剤を一部溶出し、その量はメタノール量の増加に伴い増加した。このことは、試料と固相を混合するときは、抽出溶媒を完全に除去する必要があることを示唆している。

Fig. 2. Effect of acetonitrile volume on recovery

○: SMR; ●: SDD; △: SMM; ▲: SDM; □: SQO

3.2 抽出溶媒の検討

試料をシリカゲルと混合するときに用いる抽出溶媒を選択するために、それぞれ 1.5 ml のメタノールとアセトニトリルを用いて添加回収実験を行った。抽出溶媒は、先の結果から、試料、シリカゲル、抽出溶媒の混合物を乾燥するまですりつぶすことによって除去し、抽出操作に供した。本項以降の検討についても同様である。メタノールを用いた場合の回収率は 61.7% (SDM) ~ 68.5% (SMR) であったのに対し、アセトニトリルを用いた結果は、67.1% (SMM) ~ 74.6% (SMR, SDD) と、メタノールを用いた結果を 6~9% 程度上回ったため、アセトニトリルを抽出溶媒として用いた。

抽出溶媒の最適な量を求めるために、それぞれの溶媒量において添加回収実験を行った結果を Fig. 2 に示した。アセトニトリルを使用せず抽出した場合の回収率は 60% 前後であったが、再現性が悪かった。抽出溶媒を用いないためサルファ剤が局所的に保持され、すりつぶしの程度によって洗浄時の消失を高め、再現性を悪化させたものと考えられる。アセトニトリル量 0.5 ml において SMR と SDD の回収率は 80%、SQO は 70% を示した。アセトニトリル量の増加に伴い若干の増加傾向を示し、SMM の回収率はアセトニトリル量 0.5 ml ~ 1.5 ml の範囲において 80% 前後、SDM は 85% 前後の高い回収率が得られた。この結果から抽出に用いるアセトニトリル量を 1.5 ml とした。

3.3 溶出溶媒と溶出挙動の検討

固相に保持されたサルファ剤の溶出に用いる溶媒の種類について、メタノール、THF、エチルエーテルなどの溶媒もしくはその混合系を用いて検討した。その結果、鶏肉及び豚肉では、メタノールを使用したとき最も良い回収率を示し、夾雑物も少なかった。鶏卵黄では THF を用いたとき最も良い結果が得られ、他の溶媒では夾雑

Fig. 3. Elution profile of sulfonamides

A: chicken muscle tissue; B: york of egg; C: pork muscle tissue

Eluents: A, C: methanol; B: tetrahydrofuran

▨: 0~2 ml; ▤: 2~4 ml; ▩: 4~6 ml; ▦: 6~8 ml of eluent

Fig. 4. Chromatograms of sulfonamides extracted from livestock products (upper row) and of controls (lower row)

A, D: chicken muscle tissue; B, E: york of an egg; C, F: pork muscle tissue

物が多く抽出された。これらの結果から、鶏肉及び豚肉では溶出にメタノールを使用し、鶏卵黄では THF を使用することとした。

次に、至適な溶出溶媒量を求めるため、固相に保持された各サルファ剤の溶出挙動を検討した結果を Fig. 3 に示した。鶏肉中のサルファ剤は、メタノールの最初の 2 ml によって溶出された全サルファ剤の約 80% が溶出し、次の 2 ml ですべて溶出した。4~6 ml 以降にはサルファ剤は見出されなかった。この結果から、溶出に使用するメタノールの量を 6 ml とした。豚肉中のサルファ剤は、全量が溶出されるまでにメタノール 8 ml を要した。8~10 ml 以降にはサルファ剤は見いだされなかったことから、溶出に使用するメタノール量を 10 ml とした。鶏卵黄中のサルファ剤は、THF の最初の 2 ml によって全サルファ剤が溶出された。2~4 ml 目以降にはサルファ剤は見出されなかった。この結果から、溶出に使用する THF 量を 3 ml とした。

3.4 食品への添加回収

2.5 の方法により、5 回の添加回収実験を行った結果

Table 1. Recoveries of Sulfonamides by MSPD Method

		Recovery (%)	
		(Mean $\pm$ S.D. ($n-1$), $n=5$)	
		Silica gel* ¹	ODS* ²
Chicken muscle	SMR	85.7 $\pm$ 2.8	61.4 $\pm$ 14.2
	SDD	93.1 $\pm$ 4.7	59.2 $\pm$ 15.1
	SMM	81.7 $\pm$ 4.2	53.2 $\pm$ 13.7
	SDM	84.4 $\pm$ 5.0	61.4 $\pm$ 11.0
	SQO	78.1 $\pm$ 5.4	56.2 $\pm$ 18.6
York of egg	SMR	86.2 $\pm$ 2.8	52.2 $\pm$ 12.1
	SDD	74.6 $\pm$ 4.2	46.8 $\pm$ 11.7
	SMM	83.0 $\pm$ 2.7	39.3 $\pm$ 7.2
	SDM	85.0 $\pm$ 4.3	38.3 $\pm$ 8.6
	SQO	84.8 $\pm$ 4.3	31.5 $\pm$ 6.1
Pork muscle	SMR	72.4 $\pm$ 6.9	39.3 $\pm$ 24.0
	SDD	76.1 $\pm$ 10.3	37.7 $\pm$ 13.4
	SMM	69.6 $\pm$ 6.0	38.5 $\pm$ 13.6
	SDM	87.1 $\pm$ 14.3	39.2 $\pm$ 14.3
	SQO	73.1 $\pm$ 6.9	30.1 $\pm$ 11.1

*¹: MSPD with silica gel; *²: MSPD with C₁₈

を Table 1 の左側に示し、代表的なクロマトグラムを Fig. 4 に示した。添加されたサルファ剤は、共存物質にほとんど妨害されずに分離された。

鶏肉からの回収率は、SQO で 78.1 $\pm$ 5.4%~SDD で 93.1 $\pm$ 4.7%、鶏卵黄では SDD で 74.6 $\pm$ 4.2%~SMR で 86.2 $\pm$ 2.8% と高い値を示した。豚肉からの回収率は、SMM で 69.6 $\pm$ 6.0%~SDM で 87.1 $\pm$ 14.3% であり、SDD と SDM の再現性が悪かった。この方法における検出限界は、S/N=3 として算出すると、それぞれ SMR: 0.01, SDD: 0.01, SMM: 0.02, SDM: 0.04, SQO: 0.04 ppm であった。

3.5 ODS-MSPD 法との比較

抽出溶媒を用いない Long らの ODS-MSPD 法¹²⁾でも添加回収実験を行った。その結果を Table 1 の右側に併

せて示した。回収率 70% 程度を示す結果も得られたが、一方では 20% 程度に留まることもあり、平均すると、 $30.1 \pm 11.1\%$ (pork-SQO) $\sim 61.4 \pm 14.2\%$ (chicken-SMR, SDM) と低く、再現性も全体に悪かった。原因としては、先に述べたとおり、抽出溶媒を用いないためにサルファ剤が局所的に保持され、すりつぶしの程度によって洗浄時の消失を高め、再現性を悪化させたものと考えられる。

3.6 市場調査の結果

シリカゲル-MSPD, ODS-MSPD 両法で市場調査を行った。鶏肉、鶏卵黄及び豚肉合わせて 18 検体中、豚肉 2 検体からサルファ剤が検出された。シリカゲル-MSPD 法による検出値は SDM が 0.99 ppm, SMM が 0.94 ppm であったのに対し、ODS-MSPD 法による検出値は、それぞれ 0.56, 0.81 ppm といずれも下回った。この市場調査結果によって、シリカゲル-MSPD 法による添加回収実験結果の信頼性が実証された。固相と試料だけを混合する ODS-MSPD 法では、サルファ剤は固相と試料の直接接触によってのみ抽出されるのに対して、シリカゲル-MSPD 法では、アセトニトリルが存在することによって有機溶媒抽出の効果が付加される。サルファ剤はアセトニトリルに抽出され、均一に分散し、シリカゲルに均等に保持されると推測される。固相と試料を直接混合して抽出しようとするときは、有機溶媒を併用することが重要であることが明らかとなった。

4. ま と め

鶏肉、鶏卵黄及び豚肉中の 5 種類のサルファ剤 (SMR, SDD, SMM, SDM, SQO) は、アセトニトリルとともにシリカゲルと直接混合するシリカゲル-MSPD 法によって、効率よく抽出されることが認められた。固相と試料を直接混合してサルファ剤を抽出しようとするときは、有機溶媒を併用しなければ、高い抽出効率には期待できないことが明らかとなった。

このシリカゲル-MSPD 法は、使用する溶媒量が少ない方法である。また、試料全量をリザーバー内に充てん

する上に、アセトニトリルによる溶媒効果も付加することによって極めて高い抽出効果が得られた。更にシリカゲルを用いることで、ODS を用いる従来の MSPD 法に比較してランニングコストも低く抑えられた。これらの利点を生かして、現在、他の合成抗菌剤、抗生物質、食品添加物などへの応用についても検討中である。

謝 辞

試料を提供して下さった埼玉県衛生研究所堀江正一博士に深謝致します。

文 献

- 1) Manuel, A. J., Steller, W. A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64**, 794~799 (1981).
- 2) Mooser, A. E., Koch, H.: *ibid.* **76**, 976~982 (1993).
- 3) 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).
- 4) Horie, M., Saito, K., Nose, N., Nakazawa, H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75**, 786~789 (1992).
- 5) Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T., Matsumoto, M.: *ibid.* **73**, 990~992 (1990).
- 6) 姫井るり子, 小出圭子, 辻 功, 山本誠司, 堀江正一, 鈴木澄子, 中澤裕之: 食衛誌. **34**, 392~397 (1993).
- 7) 堀江正一, 斉藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 寺 正成, 橋和丘陽, 中澤裕之, 山根靖弘: 衛生化学 **36**, 283~289 (1990).
- 8) Ezzell, J. L., Richter, B. E.: J. Chromatogr. Sci. **31**, 162~169 (1993).
- 9) Barker, S. A., Long, A. R.: J. Liquid Chromatogr. **15**, 2,071~2,089 (1992).
- 10) Walker, C. C., Lott, H. M., Barker, S. A.: J. Chromatogr. **642**, 225~242 (1993).
- 11) Long, A. R., Short, C. R., Barker, S. A.: *ibid.* **502**, 87~94 (1990).
- 12) Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, S., Short, C. R., Barker, S. A.: J. Agric. Food Chem. **38**, 423~426 (1990).
- 13) Reimer, G. J., Suarez, A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75**, 979~981 (1992).