報 文

高速液体クロマトグラフィーによる食肉中の 残留合成抗菌剤の分析

(平成5年11月15日受理)

堀井 昭三* 宮川 弘之*
井草 京子* 伊藤 武*

Analysis of Residual Synthetic Antibacterials in Meat and Poultry Meat by High Performance Liquid Chromatography

Shozo HORII, Hiroyuki MIYAKAWA, Kyoko IGUSA and Takeshi ITOH

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1,
Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

A simple and sensitive HPLC method is described for quantitative determination of some synthetic antibacterials in animal tissues. The compounds are divided into two groups, A and B. Tissue samples are extracted with acetonitrile and then group A is purified on a silicagel cartridge and group B by hexane partition; no other clean-up procedure is needed. Recoveries of the antibacterials spiked in animal tissue were 64~99%. The detection limits of quantitative determination by the proposed method were 0.01 ppm for each antibacterial. The calibration curves for these compounds showed good linearity in the ranges of 0.5~50 ng for carbadox, 1~100 ng for thiamphenicol and furazolidone and 2~200 ng for other drugs. Many chicken samples (total 121) which were purchased from a poultry processing plant in Tokyo were analyzed by the proposed method. Decoquinatone was detected in two samples of chicken muscle at levels of 0.02 and 0.03 ppm.

(Received November 15, 1993)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 食肉 meat; 食鳥肉 poultry meat; 合成抗菌剤 synthetic antibacterials; 残留分析 residual analysis

食生活の向上と共に動物性食品への嗜好が高まり、畜産物の供給量も年々増加しているが、生産者数は減少し、一生産者当たりの飼育頭羽数の増加は著しい¹⁾。このため、家畜の疾病予防や治療及び生産効率確保を目的として各種薬剤の使用は避けられない。使用したこれらの薬剤が畜産物中に残留する可能性も否定できず、厚生省は畜水産食品中の合成抗菌剤の分析法を通知している^{2)~5)}。平成3年10月の通知⁵⁾によれば、ニワトリの場合、アンプロリウム (APL) は蛍光デンシトメーターを、

デコキネート (DEQ) は蛍光分光光度計を、チアンフェニコール (TP)、オキシリン酸 (OXA) 及びサルファ剤は高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて分析することになっている。平成4年4月からは食鳥検査制度も実施され、食鳥肉の安全性確保のために、微生物学的検査と併せて化学的方法に基づく残留抗菌性物質検査も重要視されてきた。このため検査の迅速性は多数の検体を検査する場合に欠かせない。著者らはこれまでも簡易、迅速でかつ高感度な分析法の検討^{6), 7)}を進めているが、今回は平成3年10月厚生省が通知⁵⁾したサルファ剤以外の検査対象合成抗菌剤にピリメタミン (PYR)、ナイカル

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町3-24-1

Scheme 1. Flow Diagram of Analytical Procedure

バジン (NCZ) を加え HPLC のみで分析する方法を鶏肉の他、豚肉と牛肉についても検討した。

実験方法

1. 試料

薬剤不含飼料で飼育したニワトリ、ブタ、ウシで、薬剤を含まないことが判明している鶏肉、豚肉、牛肉を添加回収実験に、食鳥処理場より収去した鶏肉及び市販の豚肉、牛肉を実態調査に供した。

2. 試薬

抗菌剤標準品は食品指定検査機関協議会より購入した。APL, OXA, TP, フラゾリドン (FRZ) は水-アセトニトリル (1:1) 溶液で 100 μ g/g, NCZ, カルバドックス (CDX) はアセトニトリルで 50 μ g/g, PYR, クエン酸モランテル (MRT), ジフラゾン (DFZ) はメタノールで 100 μ g/g, DEQ はクロロホルムで 100 μ g/g 標準溶液を作製し、適宜メタノールで希釈した。アセトニトリルは HPLC 用、その他の溶媒と試薬は市販特級品を使用した。シリカゲルカートリッジは Sep-Pak シリカ (Millipore), 液クロ用前処理フィルターはクロマトディスク 13N C-133 (クラボウ) を使用した。

3. 装置

HPLC システム、ポンプ: LC-6AD (2 台); UV 検出器: SPD-6AV; 蛍光検出器: RF-550A; 制御部: SCL6B; 試料注入部: SIL6B; カラム恒温槽: CTO-6A; データ処理装置: クロマトパック C-R4AX (以上(株)島津製作所); 脱気装置: Shodex Degas KT-35 (昭和電工(株))

Table 1. Group of Synthetic Antibacterials

Tissue	Group	Compounds
Chicken	A	Thiamphenicol, pyrimethamine nicarbazin, decoquinat
	B	Amprolium, oxolinic acid
Swine	A	Thiamphenicol
	B	Carbadox, morantel citrate furazolidone, difurazon oxolinic acid
Bovine	A	Thiamphenicol
	B	Oxolinic acid

4. 試験溶液の調製

アセトニトリルとヘキサンによる分配やシリカゲルカートリッジへの保持等を考慮し、Table 1 に示したとおり抗菌剤を A, B 2 群に分け、Scheme 1 に示した方法で試験溶液の調製を行った。

結果及び考察

1. 検査対象抗菌剤の選択

検査対象抗菌剤は平成 3 年 10 月の厚生省通知⁵⁾及び汎用性などを考慮して選択したが、当所ではサルファ剤については日常検査において微生物学的検査を主に実施しており、化学的検査を補完的にやり支障が無いため、今回は検討しなかった。各抗菌剤は操作性や化学的性質により Table 1 に示したグループに分けた。これらの抗菌剤の分析方法については、厚生省通知以外にも多くの

Fig. 1. Liquid chromatograms of chicken (I) and swine (II)

A (UV) and C (FL): drug free sample
B (UV) and D (FL): synthetic antibacterials

方法^{8)~16)}が報告されているが、各抗菌剤を個別に測定する方法^{8), 9)}が多い。複数の抗菌剤の同時分析についての報告も標準品¹⁰⁾のみか、試料に添加した場合は、HPLCの分析条件は別^{11)~13)}になっているもの、あるいは、サルファ剤のみ¹⁴⁾、キノロン剤のみ¹⁵⁾、フラン剤のみ¹⁶⁾などのように同種類のものを対象にしたものが多い。試料中の各薬剤を含む同時分析法も何報^{17)~19)}か報告されているが、これらの報告は今回の著者らの方法より低い検出限界であり、更に、試料の前処理が一段階のものは見当らない。

日常分析法として全薬剤を同一のクリーンアップ法、及び HPLC 分析条件で操作できれば良いが、今回のように分析対象薬剤の化学的性質が異なる場合は、困難である。そのため、各抗菌剤を Table 1 に示したとおり、A, B 両グループに分けて分析することとした。これらの抗菌剤は汎用性や平成 3 年 10 月の厚生省通知等を考慮したものである。

クリーンアップ操作を可能な限り少なくすることを心掛け、まず、Sep-pak シリカに保持され、メタノール-クロロホルム (1:9 v/v) 混液 10 ml で溶出される抗菌剤

Fig. 2. Liquid chromatograms of chicken (III), bovine (IV), swine (V, I) and bovine (V, J)

A, E, I and J (UV) & C and G (FL): drug free sample, B, F and K (UV) & D and F (FL): synthetic antibacterials

を A グループとした。残りの抗菌剤は、厚生省通知に準拠し、ヘキサンによる脱脂 (1 回) のみを行い、B グループとした。両グループともクリーンアップ操作は一段階のみである (Scheme 1)。ブタに使用される CDX は A, B どちらのグループに入れても分析できるが、よりクリーンアップ操作が簡単な B グループとした。

2. HPLC 測定条件

OXA と DEQ は UV 検出のほか蛍光検出も可能なので、UV 検出器と蛍光検出器を直列に接続した。Fig. 1 の I に鶏肉 A 群、Fig. 2 の III に鶏肉 B 群を、Fig. 1 の II に豚肉 B 群、Fig. 2 の V に豚肉 A 群、Fig. 2 の IV, V に牛肉 B, A 群の HPLC クロマトグラムを示した。な

Table 2. HPLC Operating Conditions

Application	Mode	Mobile phase	Detection
Swine A & bovine A	Isocratic	I-II=85:15	UV: 230 nm
Chicken A	Gradient	II (%) 0~7 min, 15 (%) 7~12 min, 30 (%) 12~22 min, 70 (%) 22~55 min, 15 (%)	UV: 0~15.5 min, 230 nm 15.5~18.5 min, 340 nm 18.5~54 min, 254 nm 54~55 min, 230 nm FL: Ex. 326 nm, Em. 384 nm
Swine B	Gradient	II (%) 0~9 min, 12 (%) 9~15 min, 25 (%) 15~22 min, 45 (%) 22~55 min, 12 (%)	UV: 0~10 min, 306 nm 10~13.7 min, 350 nm 13.7~15.8 min, 320 nm 15.8~19 min, 254 nm 19~54 min, 350 nm 54~55 min, 306 nm FL: Ex. 320 nm, Em. 360 nm
Chicken B	Isocratic	(I+10mM sodium heptanesulfonate)-II=80:20	UV: 254 nm FL: Ex. 320 nm, Em. 360 nm
Bovine B	Isocratic	I-II=80:20	UV: 254 nm FL: Ex. 320 nm, Em. 360 nm

Column: L-column ODS, 4.6 ϕ $\times$ 150 mm (Chemicals Inspection & Testing Institute); Column oven: 40°C; Flow rate: 1ml/min; Sensitivity: 0.01 aufs

I: 0.025% Phosphoric acid; II: Acetonitrile

お, HPLC 分析条件を Table 2 に示した。

APL は移動相にイオンペアー試薬を加えなければ、ODS カラムに保持されないため、鶏肉の B グループの移動相にはイオンペアー試薬として、ヘプタンスルホン酸ナトリウムを 10 mM 加えたが、鶏肉の B グループ以外の移動相には、すべて 0.025% リン酸とアセトニトリルからなる混合液のみを使用した。移動相としてのリン酸は酢酸に比べ、UV 低波長領域に吸収を持たないため UV 検出器の感度を上げて良好な HPLC クロマトグラムが得られ、より高感度な分析が可能となった。

鶏肉 A と豚肉 B グループは数種類の抗菌剤を同時に分離することから、グラジェント (Table 2) を行った。Scheme 1 に示したような簡易なクリーンアップにもかかわらず、鶏肉、豚肉、牛肉の各グループとも、マトリックスの影響を受けずに定量可能であった。Table 2 で示した条件で、グラジェントを 1 昼夜連続しても、保持時間に変動は認められなかった (誤差 $\pm 2\%$ 以内)。各薬剤ともそれぞれの吸収極大が異なるので、波長プログラミングにより最適波長で測定した。

3. 添加回収実験

抗菌剤が含まれていない細切した肉 10 g に各抗菌剤 2 μ g 及び 10 μ g (OAX は半量) を添加し、本法に従って操作して回収率を求め Table 3 に示した。

鶏肉では、NCZ の回収率が最も低く 0.2 μ g/g 添加で 65.6%、1 μ g/g 添加で 74.5% であった。他の薬剤はい

ずれも 0.2 μ g/g 添加で 75% 以上の回収率を示した。特に TP は 90%、OXA は 95% 以上と良好であった。豚肉では、CDX の回収率が最も低く、TP と OXA が高い回収率を示した。牛肉では、TP と OXA を対象としたが、鶏肉、豚肉同様良好な結果が得られた。

4. 検量線の作成と検出限界

各抗菌剤とも UV 検出器で測定した場合、原点を通る直線性の高い検量線が得られた ($r=0.999$)。CDX は 0.5~50 ng, FRZ と TP は 2~200 ng, その他の抗菌剤はいずれも 1~100 ng の間に、直線性が見られた。(すべての抗菌剤に 100 倍にわたる直線性が見られたことから、定量範囲の広いことが示唆された) なお、検出限界はいずれの抗菌剤も 0.01 μ g/g であった。

5. 試料への適用

本法を食鳥処理場より収去した鶏肉 121 検体に適用したところ、2 検体より DEQ を検出 (0.02 と 0.03 μ g/g) した。市販の豚肉、牛肉各 20 検体からはいずれの薬剤も検出されなかった。DEQ を検出した検体については、更に、厚生省通知法³⁾により追試験を行った結果、ほぼ同様の値が出た。今回の方法で分析した後の試料を、移動相にカルシウムを加え、DEQ が蛍光強度を増す木下¹⁸⁾の方法に基づいて測定したところ、DEQ と同一保持時間を有するピークは標準品と同様に蛍光強度を増すこと (約 3 倍) が確認された。

分析対象に加えなかったが、スルファメラジン、スル

Table 3. Recovery of Synthetic Antibacterials from Animal Tissues

Tissue	Compound	Added ($\mu\text{g/g}$)	Rec. $\pm$ S.D. (%)
Chicken	Thiamphenicol	0.2	90.5 $\pm$ 5.4
		1.0	91.0 $\pm$ 1.8
	Pyrimethamine	0.2	75.3 $\pm$ 4.1
		1.0	90.3 $\pm$ 4.0
	Nicarbazin	0.2	65.6 $\pm$ 5.1
		1.0	74.5 $\pm$ 2.1
	Decoquinate	0.2	85.7 $\pm$ 4.2
		1.0	84.5 $\pm$ 2.7
	Amprolium	0.2	75.6 $\pm$ 3.1
		1.0	95.3 $\pm$ 7.3
Swine	Oxolinic acid	0.1	96.3 $\pm$ 2.3
		0.5	98.2 $\pm$ 2.6
	Thiamphenicol	0.2	94.5 $\pm$ 5.6
		1.0	94.0 $\pm$ 3.5
	Carbadox	0.2	63.6 $\pm$ 4.8
		1.0	82.8 $\pm$ 3.2
	Furazolidone	0.2	84.0 $\pm$ 3.1
		1.0	89.4 $\pm$ 1.0
	Difurazon	0.2	86.9 $\pm$ 4.7
		1.0	84.6 $\pm$ 2.7
Bovine	Morantel citrate	0.2	88.9 $\pm$ 3.6
		1.0	94.8 $\pm$ 3.8
	Oxolinic acid	0.1	92.5 $\pm$ 4.0
		0.5	95.8 $\pm$ 4.1
	Thiamphenicol	0.2	91.1 $\pm$ 4.7
		1.0	92.3 $\pm$ 3.8
	Oxolinic acid	0.1	87.2 $\pm$ 2.6
		0.5	98.9 $\pm$ 0.7

Based on 5 determinations at each concentration.

ファジミジン, スルファモノメトキシ, スルファジメトキシ, スルファキノキサリンは食肉中に残留すれば A, B グループともに検出される可能性はある。しかし, HPLC クロマトグラム上前述 5 種類のサルファ剤と同一保持時間を有する物質は存在しなかった。

今回検討したのは筋肉であるが, 厚生省通知⁵⁾のモニタリング対象組織である腎臓や肝臓についても今後検討する予定である。

謝 辞

試料の収集にあたられた東京都食品環境指導センターの皆様へ深謝いたします。

文 献

- 1) 畜産統計 1992 年版, 農林水産省経済局統計情報部
- 2) 厚生省通知 環乳第 40 号 (1977).
- 3) 同上 環乳第 34 号 (1979).
- 4) 同上 衛乳第 105 号 (1990).
- 5) 同上 衛乳第 94 号 (1991).
- 6) Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T., Matsumoto, M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 990~992 (1990).
- 7) Horii, S.: J. Liquid Chromatogr. **17**, 213~221 (1994).
- 8) 山本雄三, 橋口玲子, 荒木桂子, 串間奉文: 食衛誌: **32**, 444~447 (1991).
- 9) Coleman, M. D., Edwards, G., Mihaly, G. W.: J. Chromatogr. **308**, 363~369 (1984).
- 10) Ahuja, S. ed.: "Chromatography of Pharmaceuticals, ACS Symposium Series 512" p. 54~66 (1992), American Chemical Society, Washington, DC.
- 11) 堀 義宏: 食衛誌. **24**, 447~453 (1983).
- 12) 永田知子, 佐伯政信: 同上 **29**, 13~20 (1988).
- 13) 村山三徳, 内山貞夫, 斎藤行生: 同上 **32**, 155~160 (1991).
- 14) Bui, L. V.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. **76**, 966~975 (1993).
- 15) Horie, M., Saito, K., Hoshino, Y., Nose, N., Mochizuki, E., Nakazawa, H.: J. Chromatogr. **402**, 301~308 (1987).
- 16) Rupp, H. S., Munns, R. K., Long, A. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. **76**, 1,235~1,239 (1993).
- 17) 堀江正一, 星野庸二, 能勢憲英, 岩崎久夫, 中澤裕之: 衛生化学 **31**, 371~376 (1985).
- 18) 山本 優, 大内格之, 富沢 政, 菊地由生子, 高杉信男: 札幌市衛研年報. **16**, 80~87 (1988).
- 19) Nagata, T., Saeki, M.: J. Liquid Chromatogr. **14**, 2,551~2,561 (1991).
- 20) 木下光明: 飼料研究報告, **16**, 112~123 (1991).