

6 高速液体クロマトグラフィーによる畜水産物中合成抗菌剤の系統的一斉分析法

【食品化学科】 林 田 博 通

はじめに

畜水産物の生産性向上のため、飼料添加物及び動物用医薬品として多くの合成抗菌剤が用いられている。一方、食品衛生法で「食肉、食鳥卵及び魚介類は化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならない」と規制されており、行政の立場からその残留について監視指導が必要であり、そのためには残留の有無の迅速なチェックが必要である。現在、合成抗菌剤の分析法として厚生省編「畜水産食品中の残留物質検査法」があるが、これらは個々の薬剤についての検査法であり、多種類の薬剤を検査するには多大の時間と労力を必要とする。又、数種類の薬剤を一斉に分析する方法については、数件^{(1)~(3)}報告されている。しかし、それらは前処理がかなり複雑で問題点も多い。著者はより簡便な方法でクロピドール(CL)、ピリメタンミン(PM)、ジニトルミド(DNT)、エトパベート(ETP)、ナイカルバジン(NCZ)、サルファ剤3種類(SMM, SDM, SQX)の計8種類について、高速液体クロマトグラフィーによる系統的一斉分析法について検討し、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1 試 薬

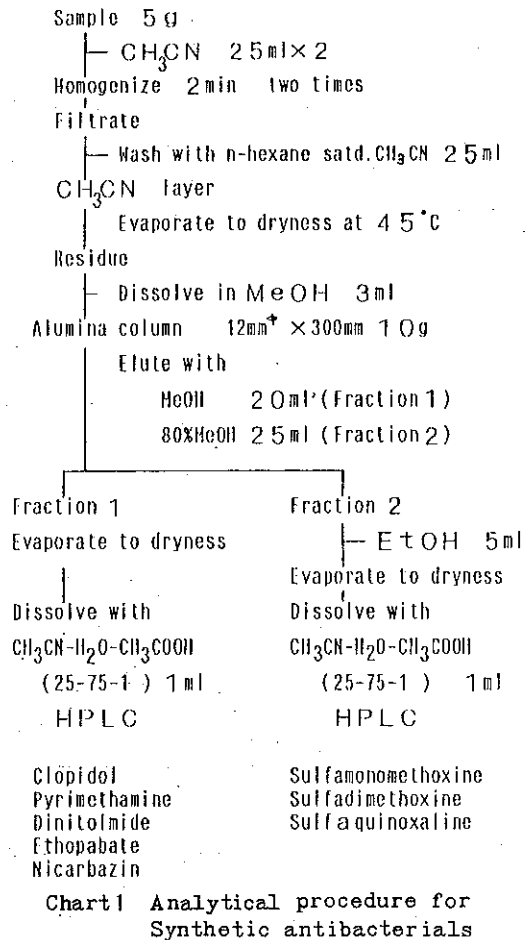
有機溶媒：残留農薬分析用及びHPLC用試薬。
 合成抗菌剤標準品：食品衛生指定検査機関協議会より購入したもの。
 標準溶液：各標準品をアセトニトリルに溶解し、5 µg/mlの濃度に調整した。
 アルミナカラム：メルク製、塩基性活性度1のカラムクロマトグラフ用アルミナ10gを内径12mm、長さ300mmのクロマト管にメタノールを用いて充てんし、メタノール50mlで洗浄した。
 HPLC用フィルター：クラボウ製クロマトディスク0.45µm。

2 器具及び装置

ホモジナイザー：ポリトンホモジナイザー
 ロータリーエバポレーター：柴田科学器械製
 高速液体クロマトグラフィー：柳本製L-5000
 HPLC用検出器：柳本製分光光度計M-315
 分光光度計：日立製ダブルビーム分光光度計220A

3 試験溶液の調整

試料5gを遠沈管にとりアセトニトリル25mlを加え2分間ホモジナイズした後遠心分離し、アセトニトリル層を分液ロートにとる。同様な操作を行い先の分液ロートに合



せる。アセトニトリル飽和n-ヘキサン25mlで洗浄し、アセトニトリル層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。残留物をメタノール3mlに溶解する。この溶液を定量的にアルミナカラムに負荷し、メタノール20mlで溶出する(フラクション1)。さらに80%メタノール25mlで溶出する(フラクション2)。それぞれのフラクションを濃縮乾固し、25%アセトニトリル1%酢酸混液1mlに溶解した後0.45 μ mフィルターでろ過し、HPLC用試験溶液とした。試験のフローシートをChart 1に示す。

4 HPLCの分析条件

測定条件をTable 1に示す。

Table 1 HPLC Conditions for Determination of Synthetic Antibacterials

Synthetic Antibacterials	CP	PM	DNT	ETP
	SMM	SDM	SQX	NCZ
Column	YANAPAK ODS-A(4.6mm I, D \times 250mm)			
Mobile phase	CH ₃ CN-H ₂ O-CH ₃ COOH (25-75-1)		CH ₃ CN-H ₂ O (60-40)	
Flow rate	1ml/min			
Detector	UV 270nm		UV 340nm	
Sensitivity	0.02 AUFS		0.04 AUFS	
Column Temp	40 $^{\circ}$ C			
Chart speed	5mm/min			
Sample size	10 μ l			

結果及び考察

1. 前処理法の検討

1.1 試料からの抽出

抽出溶媒としてメタノール、アセトニトリル等が用いられているが、今回アセトニトリルで行った。また抽出液をアセトニトリル飽和n-ヘキサンで洗浄したが薬剤の損失はみられなかった。

1.2 アルミナカラムからの溶出

サルファ剤と他の抗菌剤の分離にアルミナカラムが有効であり、今回アルミナカラムを用いてメタノール水系による溶出を検討した。まず、アルミナ(塩基性活性度I)をメルク社製、ウエルム社製について検討したがウエルム社製は吸着力が強く、サルファ剤との分離ではメルク製が適当であった。つぎに溶出液について検討したが、フラクション2でメタノールのみではサルファ剤が溶出しにくく水の添加を検討し、80%メタノール25mlが適当であった。以上の結果、アルミナ10g、メタノール20mlでクロピドール、ピリメタミン、ジニトルミド、エトパバート、ナイカルバジンが溶出し、次いで80%メタノール25mlでサルファ剤が溶出した。各抗菌剤の溶出パターンを図1に示す。なお、フラクション2の濃縮操作において泡立ちが激し

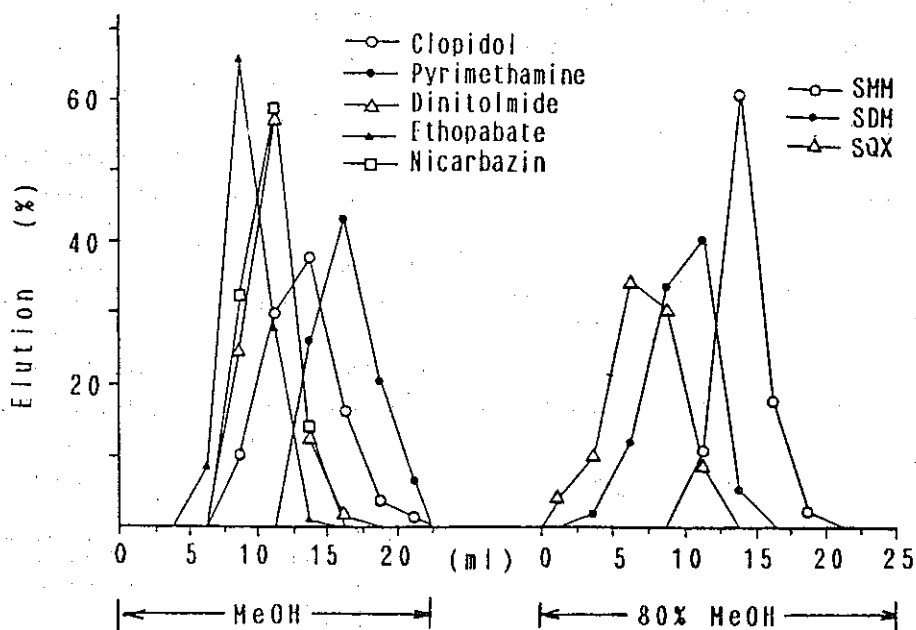


Fig1 Elution pattern of synthetic antibacterials from alumina column

く操作が難しいのでエタノール5 mlを添加したところ、泡立ちもなく濃縮乾固が容易にできた。

2 HPLC測定条件の検討

合成抗菌剤8種について紫外吸収スペクトルを測定すると(図2) 270 nm付近に吸収極大を有するものが多く7種については270 nmで、またナイカルバジンについては340 nmに設定した。また、分離カラムはYanapak ODS-A 250 mmを用い、移動層としてアセトニトリル-水-酢酸の組み合わせを検討した結果、ナイカルバジン以外はアセトニトリル-水-酢酸(25-75-1)で良好な分離を示し、ナイカルバジンについてはアセトニトリル-水(60-40)が適当であった。図3、図4にフラクション1、図5にフラクション2のクロマトグラムを示す。ここで(A)は標準液、(B)は試料のみ、(C)(D)は標準を添加した時のクロマトグラムである。

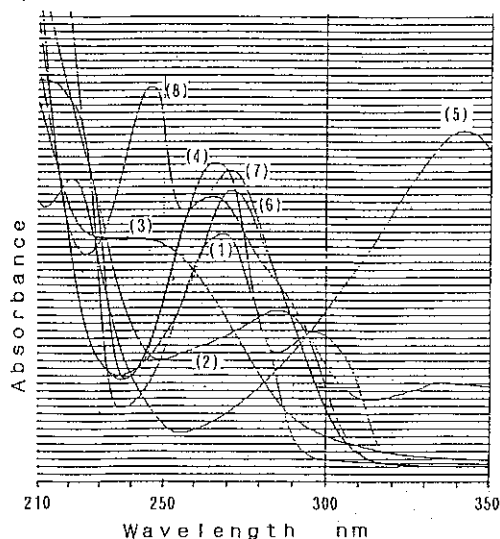


Fig 2 Absorption spectra of synthetic antibacterials in acetonitrile

- (1) Clopidol
- (2) Pyrimethamine
- (3) Dinitolmide
- (4) Ethopabate
- (5) Nicarbazine
- (6) Sulfamonomethoxine
- (7) Sulfadimethoxine
- (8) Sulfaquinoxaline

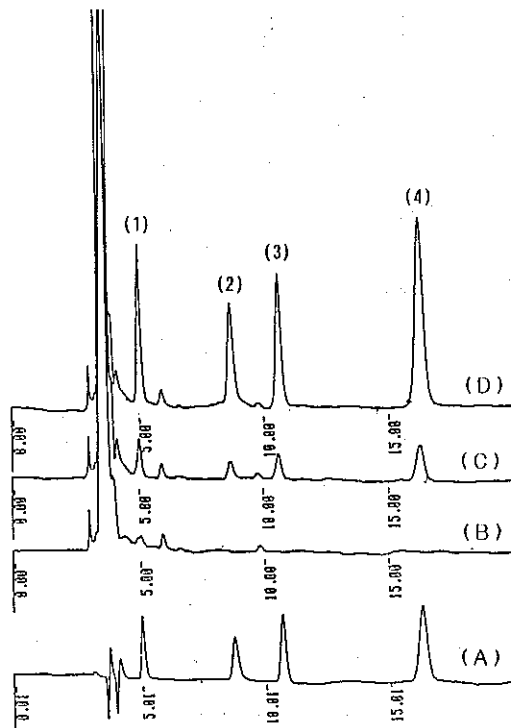


Fig 3 Liquid chromatograms of fraction 1

(A) mixed standards

- (1) Clopidol (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- (2) Pyrimethamine (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- (3) Dinitolmide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- (4) Ethopabate (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

(B) Chicken extract

(C) addition of synthetic antibacterials (0.5 $\mu\text{g}/5\text{g}$)

(D) addition of synthetic antibacterials (2.5 $\mu\text{g}/5\text{g}$)

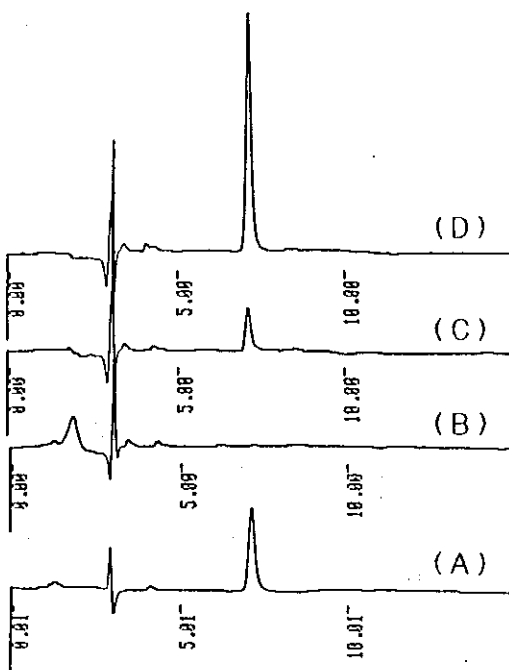


Fig4 Liquid chromatograms of Nicarbazine

- (A) standard (1 µg/ml)
 (B) Chicken extract
 (C) addition of Nicarbazine (0.5 µg/5g)
 (D) " (2.5 µg/5g)

3 添加回収及び検出限界

試料に各薬剤を添加して回収実験を行ったが大部分は80%以上の回収率が得られた。各薬剤それぞれの回収率をTable 2に示す。

また、検出限界は試料5gで行った場合いずれも0.05 ppmであった。

Table 2 Recovery of Synthetic Antibacterials from Chicken Tissues

	Added(µg/5g)	Recovery(%)
Clopidol	0.25	88
	1.25	94
Pyrimethamine	0.5	84
	2.5	92
Dinitolmide	0.5	82
	2.5	73
Ethopabate	0.5	94
	2.5	93
Nicarbazine	0.5	88
	2.5	96
Sulfamonomethoxine	0.5	76
	2.5	88
Sulfadimethoxine	0.5	86
	2.5	84
Sulfaquinoxaline	0.5	80
	2.5	82

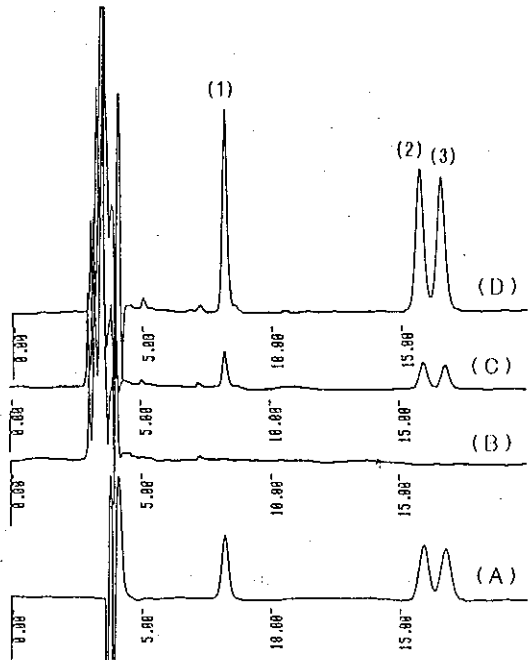


Fig5 Liquid chromatograms of fraction 2

- (A) mixed standards
 (1) Sulfamonomethoxine (1 µg/ml)
 (2) Sulfadimethoxine (1 µg/ml)
 (3) Sulfaquinoxaline (1 µg/ml)
 (B) Chicken extract
 (C) addition of synthetic antibacterials (0.5 µg/5g)
 (D) " (2.5 µg/5g)

まとめ

HPLCによる畜水産物中合成抗菌剤の定量法を検討し次の結果を得た。

1. 合成抗菌剤8種類をアセトニトリル抽出、アルミナカラムにより分画し、HPLCで測定できた。
2. 添加回収率も80%以上であり満足いく方法が得られた。本法の検出限界は0.05 ppmであった。

なお、本研究の要旨は第30回鳥取県公衆衛生学会(1987年7月、鳥取市)及び第24回全国衛生化学技術協議会年会(1987年9月、東京都)において発表した。

文献

- (1) 能勢憲英、星野庸二、菊池好則、河内佐十：食衛誌23 176 (1982)
- (2) 堀 義宏：同上24 447 (1983)
- (3) 中澤裕之、高島英伍、日野誠二：分析化学 32 179 (1983)