

高速液体クロマトグラフィーによる調理加工ウナギ中の 合成抗菌剤の分析法

木内 佳伸¹・藤本 喬¹

Analytical Method of Synthetic Antibacterials in Cooked Eel by High Performance Liquid Chromatography

Yoshinobu KIUCHI and Takashi FUJIMOTO

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた調理加工ウナギ (白焼き、蒲焼) 中のスルファメトキシシン (SMMX)、スルファジメトキシシン (SDMX)、フラゾリドン (FZD)、オキシリン酸 (OXA)、ピロミド酸 (PMA) の分析法を検討した。

試料からアセトニトリルで抽出し、n-ヘキサンによる脱脂を行い、クロロホルムに転溶した。濃縮後、0.2%メタリン酸で溶解し、Bond Elut C18カートリッジで精製、HPLCを行った。この時点で白焼きの測定は可能となったが、蒲焼は、妨害物のためOXAとPMA以外の測定ができなかった。そこで、先のHPLC検液をSep-pak Aluminaカートリッジで精製しFZD、SMMX、SDMXを測定した。検出には、蛍光 (Ex325nm、Em365nm) とUV (270nm及び360nm) を併用した。0.1 $\mu\text{g/g}$ レベルでの回収率は、62.6~91.7%であった。

検出下限は、OXA、PMAが0.03 ppm、FZD、SMMX、SDMXが0.05 ppmであった。

Key words: 合成抗菌剤 synthetic antibacterials、ウナギ eel、
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography、
スルファメトキシシン sulfamonomethoxine、スルファジメトキシシン sulfadimethoxine、
フラゾリドン furazolidone、オキシリン酸 oxolinic acid、ピロミド酸 piromidic acid

I はじめに

近年、わが国の畜水産物は高密度飼育による疾病の予防や治療、成長促進などの目的で抗菌性物質 (抗生物質及び合成抗菌剤) が用いられている。一方、これらの抗菌性物質の残留が問題となり食卓の安全性確保のため残留抗菌性物質の検査の重要性が増している。

水産物のウナギは、市場に流通するそのほとんどが養殖魚で占められている。また、調理加工され白焼きの状態では輸入されたり、蒲焼の形態で市販されるケースが多い。そこで、これら調理加工ウナギにおける抗菌性物質の分析法の確立が必要と考えられた。

今回、著者らは、ウナギの飼料添加剤として使用される合成抗菌剤のなかからスルファメトキシシン (SMMX)、スルファジメトキシシン (SDMX)、フラゾリドン

(FZD)、オキシリン酸 (OXA)、ピロミド酸 (PMA) の5種類の薬剤について調理加工ウナギ (白焼き、蒲焼) における分析法を検討したので以下報告する。

II 実験方法

1. 試料

福岡市内流通の生のウナギ7件、ウナギの白焼き5件、ウナギの蒲焼5件を用いた。

2. 試薬

- ・スルファメトキシシン (SMMX) : 第一製薬(株)製
- ・スルファジメトキシシン (SDMX) : 第一製薬(株)製
- ・フラゾリドン (FZD) : 上野製薬(株)製
- ・オキシリン酸 (OXA) : Sigma製
- ・ピロミド酸 (PMA) : Sigma製
- ・標準原液 : 各標準品 10 mgを精秤し、SMMX、SDMX、FZDはメタノール 100 mlに、OXA、PMAはアセト

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

Table 1. Operating Condition of HPLC

	①	②	③
Column		TSK-GEL ODS-80TM ϕ 4.6×150mm	
Mobile phase		Acetonitrile-5mM Oxalic acid	
	35 : 65	30 : 70	25 : 75
Flow rate		0.6ml/min	
Column temp.		Ambient	
Detector (UV)	270nm	360nm	270nm
sensitivity		2×10^{-2} AUFS	
Detector (FL)	Ex325nm, Em365nm		
sensitivity	GAIN×100, ATT. 16		
Sample size		10 μ l	

① : Sulfamonomethoxine, Furazolidone, Oxolinic acid, Sulfadimethoxine, Piromidic acid

② : Fulazolidone

③ : Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine

ン 100 ml に溶解し標準原液 (100 μ g/ml) とした。

・標準溶液 : 各標準原液を適宜 95 % アセトニトリルで希釈して用いた。

・95 % アセトニトリル : アセトニトリル-水 (95 : 5)

・85 % アセトニトリル : アセトニトリル-水 (85 : 15)

・ODS-ミニカラム : Bond Elut C18 (500 mg, Varian 製) をメタノール 10 ml、蒸留水 40 ml、0.2 % メタリン酸 3 ml で順次洗浄後使用した。

・アルミナーミニカラム : Sep-pak Alumina N (オリジナル、Waters 製) を 95 % アセトニトリル 10 ml で洗浄後使用した。

・シュウ酸及びメタリン酸は、片山化学工業(株)製の特級を用いた。

・その他の試薬は、和光純薬工業(株)製の HPLC 用または残留農薬分析用を用いた。

3. 装置

調理用電動カッター : 松下電器産業(株)製、MK-K3型

振とう機 : イワキ産業(株)製、V-DX型

ロータリーエバポレーター : 東京理科器械(株)製、N-4型

高速液体クロマトグラフ

ポンプ : Waters 製品、600 E

紫外検出器 : 東ソー(株)製、UV-8010

蛍光検出器 : Waters 製、470

インジェクター : Waters 製、U6K

4. HPLC 条件

測定条件は Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調整

調理用電動カッターで細切した試料 50 g にアセトニトリル 100 ml を加え振とう後、一晩放置し、上澄み液を No.5C の口紙を用いて口過した。さらにアセトニトリ

ル 40 ml で 2 回抽出し、先の口液と合わせ 200 ml とし抽出液とした。

抽出液 40 ml (試料 10 g 相当) に 0.2 % メタリン酸を含む 1 % 塩化ナトリウム水溶液 20 ml と n-ヘキサン 25 ml を加え振とうした。静置後、上層の n-ヘキサンを除去し、再度 n-ヘキサン 25 ml を加え同様に操作した。次にクロロホルム 20 ml を加え振とう後、下層のクロロホルム-アセトニトリル層を分取し、再度クロロホルム 15 ml で同様に操作した。

この下層を合わせロータリーエバポレーターで約 1 ml になるまで濃縮を行い 0.2 % メタリン酸 10 ml を加え ODS-ミニカラムに負荷した。水 7 ml で洗浄後メタノール 6 ml で溶出した。溶出液を減圧下乾固し、残留物を 95 % アセトニトリル 1 ml に溶解し HPLC 用試験溶液とした。HPLC 条件① (Table 1) で測定した。

この段階で蒲焼は、FZD、SMMX、SDMX の測定が困難であったため、さらに以下の精製を行った。

先の HPLC 用試験溶液に 95 % アセトニトリル 3 ml を加えアルミナーミニカラムに負荷し、95 % アセトニトリル 4 ml (計 8 ml) で溶出した。(アルミナ溶出 1)

さらに 85 % アセトニトリル 13 ml で溶出した。(アルミナ溶出 2)

両溶出液は、それぞれ減圧下乾固し 95 % アセトニトリル 1 ml に溶解した。アルミナ溶出 1 は HPLC 条件②、アルミナ溶出 2 は HPLC 条件③で測定した。

6. 検量線の作成

各標準品の濃度が 0.3、0.5、0.8 及び 1 μ g/ml である混合標準溶液を調整し、その 10 μ l を HPLC に注入した。

得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

Table 2. Recovery Rate of Synthetic Antibacterials from Eel and Cooked Eel¹⁾

Samples were spiked with 0.1 μg/g of each drug by Bond Elut C18 clean-up procedure.

Drug	Recovery ²⁾ (%)		
	Eel	Shirayaki	Kabayaki
Sulfamonomethoxine	90.6±1.3	87.3±7.9	62.6±4.3 ³⁾
Fulazolidone	88.6±3.6	84.6±4.7	76.1±7.8 ³⁾
Oxolinic acid	90.5±0.7	90.9±1.8	91.7±1.4
Sulfadimethoxine	86.6±2.0	78.9±4.5	72.4±4.2 ³⁾
Piromidic acid	90.4±1.6	90.7±2.0	89.3±3.5

1) Cooked Eel: Shirayaki=broiled eel, Kabayaki=broiled and seasoned eel

2) mean±S.D. for 3 samples

3) by Bond Elut C18 and Sep-pak Alumina clean-up procedure

III 結果及び考察

1. 前処理方法の検討

1) 抽出及び液-液分配について

試料からの抽出は、厚生省の一斉分析法¹⁾と同様のアセトニトリルを用いた。その抽出液に除タンパク及び水溶性夾雑物除去の目的で0.2%メタリン酸を含む1%塩化ナトリウム水溶液を加え、n-ヘキサンによる脂肪の除去を行った。さらにクロロホルムで再抽出を行った。

この時点で生のウナギは、測定可能であったが白焼き、蒲焼は調理加工によると思われる夾雑ピークが多く出現し測定は困難であった。そこで前処理カラムによる精製法を検討した。

2) 前処理カラムの検討

今回、測定対象とした合成抗菌剤の前処理カラムとして、OXAやPMAのキノロン系抗菌剤はODS-ミニカラム^{2, 3)}が、また、サルファ剤やフラン剤についてはアルミナカラム^{4, 5)}が用いられている。そこでODS-ミニカラムとしてBond Elut C18、アルミナ-ミニカラムとしてSep-pak Alumina Nを用い精製法を検討した。

ODS-ミニカラムは、5種類の合成抗菌剤について0.2%メタリン酸による保持、メタノールによる溶出が可能であったがアルミナ-ミニカラムではOXAとPMAが強く保持されたままであった。ODS-ミニカラム処理の時点で白焼きの測定は可能となったが蒲焼は、『調味たれ』によると思われる夾雑物の除去が不十分で蛍光によるOXAとクロマト上保持時間の遅いPMAの測定しかなかった。そこで夾雑物除去が不十分で測定困難であったFZD、SMMX、SDMXの測定のためODS-ミニカラム精製後のHPLC用試験溶液をさらにアルミナ-ミニカラムで精製することにした。アルミナ-ミニカラムにおいてFZDは、95%アセトニトリル8 mlに溶出され、SMMX、SDMXは、85%アセトニトリル13 mlに溶出され夾雑物が除去できた。

2. 測定波長について

各合成抗菌剤のHPLC移動相中での紫外外部吸収スペクトルは、FZDを除き260~290 nm付近に吸収極大を示した。

FZDは、360 nm付近に吸収極大を示したが270 nmでも感度的に測定可能であった。そこでTable 1に示したHPLC条件①では270 nmで5種類の合成抗菌剤を、HPLC条件②では360 nmでFZDを測定した。

また、蒲焼においては、OXAが夾雑ピークの影響で紫外部での測定が困難であったため蛍光による測定(励起波長325 nm、蛍光波長365 nm)を行った。

3. 分離用カラム及び移動相について

分離用カラムは、厚生省の一斉分析法¹⁾に示された東ソー社(株)製TSK-GEL ODS-80TMを用い、移動相は、キノロン系抗菌剤(OXA、PMA)を逆相クロマトグラフィでのテーリングを抑制するためシュウ酸を加える⁶⁾こととし、アセトニトリル-5 mMシュウ酸の組合せで検討した。

今回、測定対象とした5種類の合成抗菌剤の相互分離は、アセトニトリル-5 mMシュウ酸(35:65)で可能であった。しかし、蒲焼においては夾雑ピークとの分離が不十分のため、FZDは、アセトニトリル-5 mMシュウ酸の比率を(30:70)、サルファ剤は、(25:75)とし測定した。

4. 検量線

実験方法6. に述べた方法に従って検量線を作成した結果、いずれの合成抗菌剤も3~10 ngの範囲で原点を通る直線性を示した。

5. 添加回収及び検出限界

試料10 g相当のアセトニトリル抽出液に各合成抗菌剤を1 μg添加し、本法に従って操作し回収率を求めた。その結果をTable 2に示した。また、その時得られた標準品及び各検体のクロマトグラムをFig. 1~6に示した。

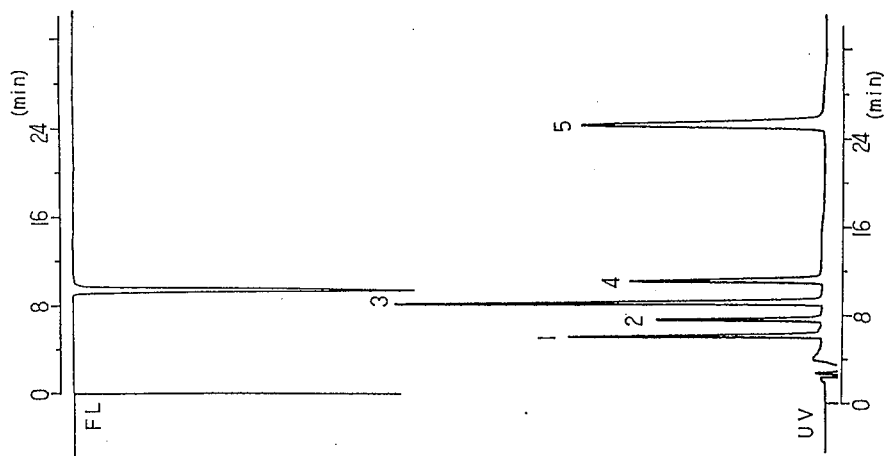


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard mixture of 10ng each drug

Peaks : 1=sulfamonomethoxine (SMMX) ; 2=furazolidone (FZD) ;
 3=oxolinic acid (OXA) ; 4=sulfadimethoxine (SDMX) ;
 5=piromidic acid (PMA)

HPLC operating conditions of ① in Table 1.

Column : TSK-GEL ODS-80TM ϕ 4.6 \times 150mm

Mobile phase : CH₃CN : 5mM Oxalic acid (35 : 65)

Flow rate : 0.6ml/min Column temp. : Ambient

Detector : UV-270nm (0.02)

FL-Ex325nm, Em365nm (GAIN \times 100, ATT. 16)

Sample size : 10 μ l

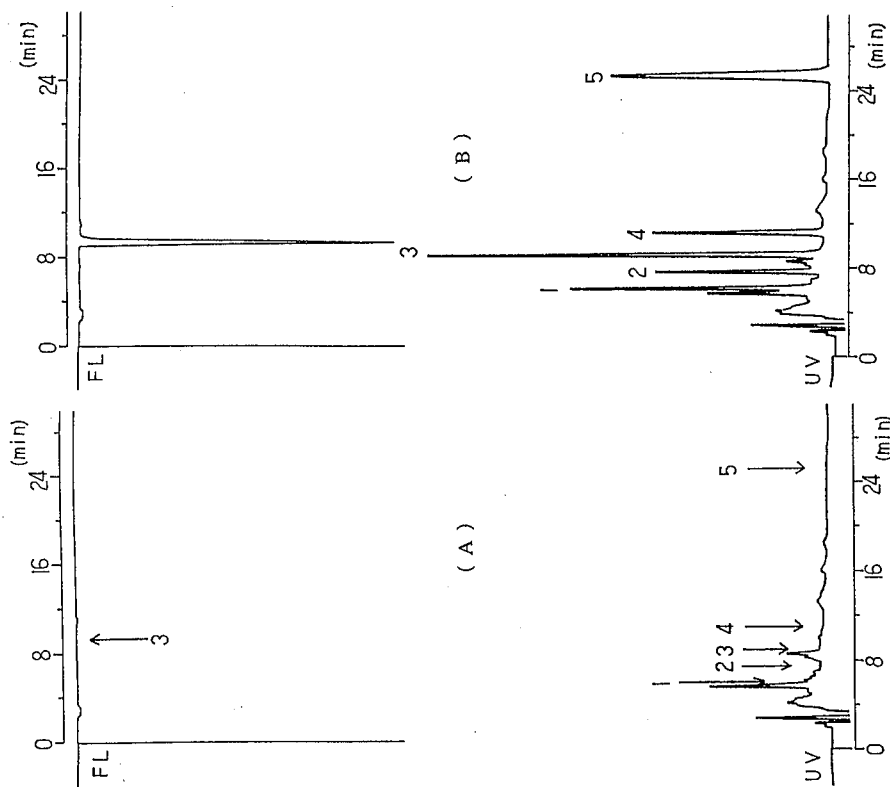


Fig. 2. HPLC chromatograms of (A) blank eel sample and

(B) eel sample spiked with 1 μ g/10g of each drug
 (clean-up: Bond Elut C18)

Peaks : 1=SMMX ; 2=FZD ; 3=OXA ; 4=SDMX ; 5=PMA

HPLC operating conditions are same as Fig. 1.

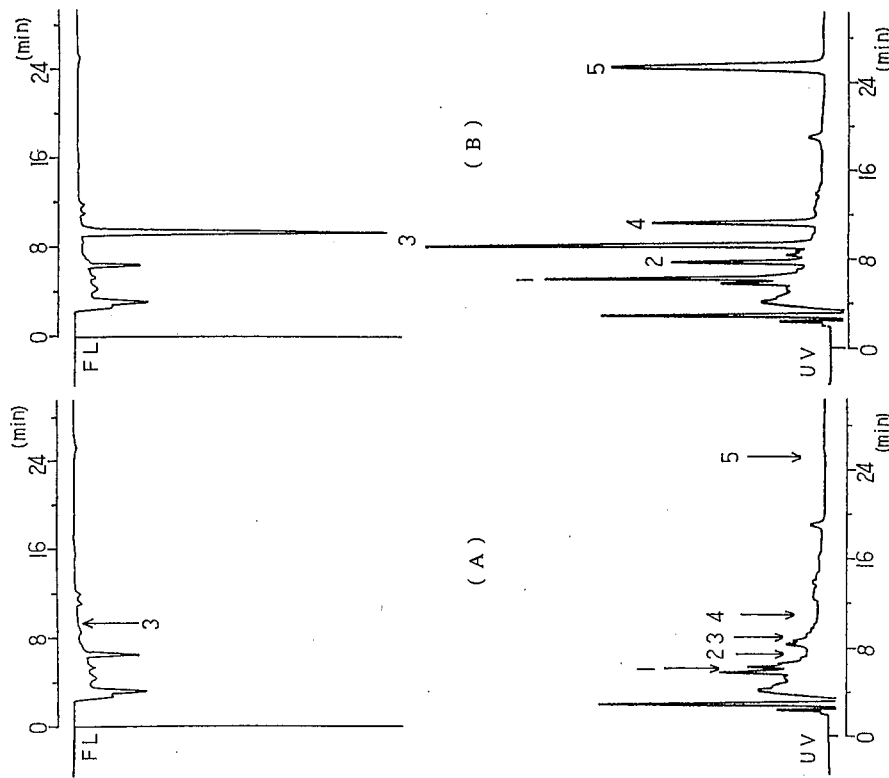


Fig. 3. HPLC chromatograms of (A) blank Shirayaki* sample and
 (B) Shirayaki sample spiked with 1 $\mu\text{g}/10\text{g}$ of each drug
 (clean-up: Bond Elut C18)
 Peaks : 1 = SMMX ; 2 = FZD ; 3 = OXA ; 4 = SDMX ; 5 = PMA
 HPLC operating conditions are same as Fig. 1.
 * Shirayaki = broiled eel

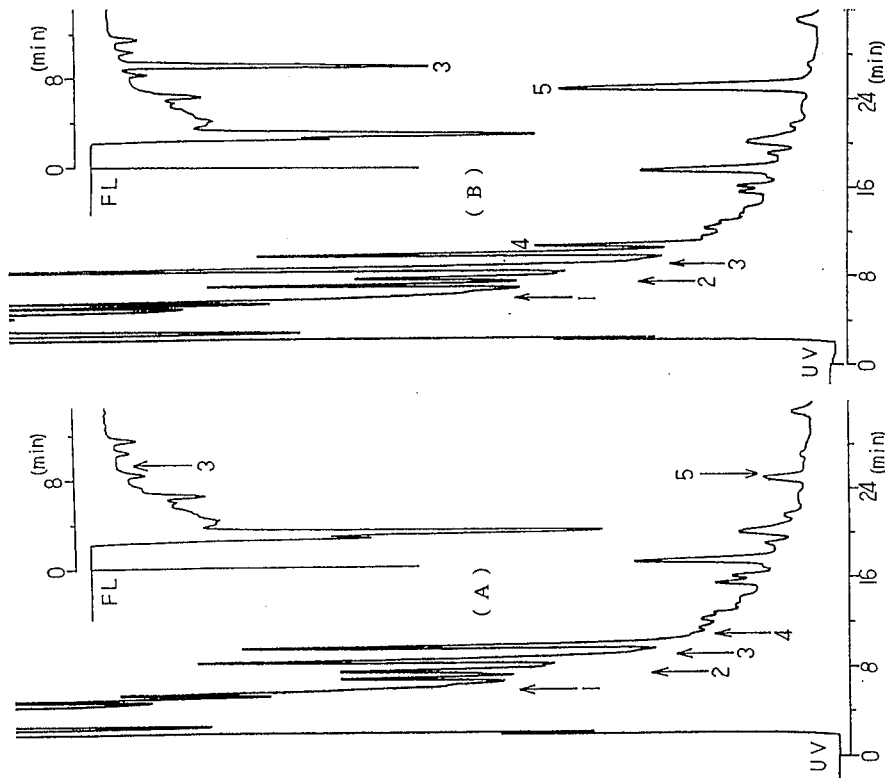


Fig. 4. HPLC chromatograms of (A) blank Kabayaki* sample and
 (B) Kabayaki sample spiked with 1 $\mu\text{g}/10\text{g}$ of each drug
 (clean-up: Bond Elut C18)
 Peaks : 1 = SMMX ; 2 = FZD ; 3 = OXA ; 4 = SDMX ; 5 = PMA
 HPLC operating conditions are same as Fig. 1.
 * Kabayaki = broiled and seasoned eel

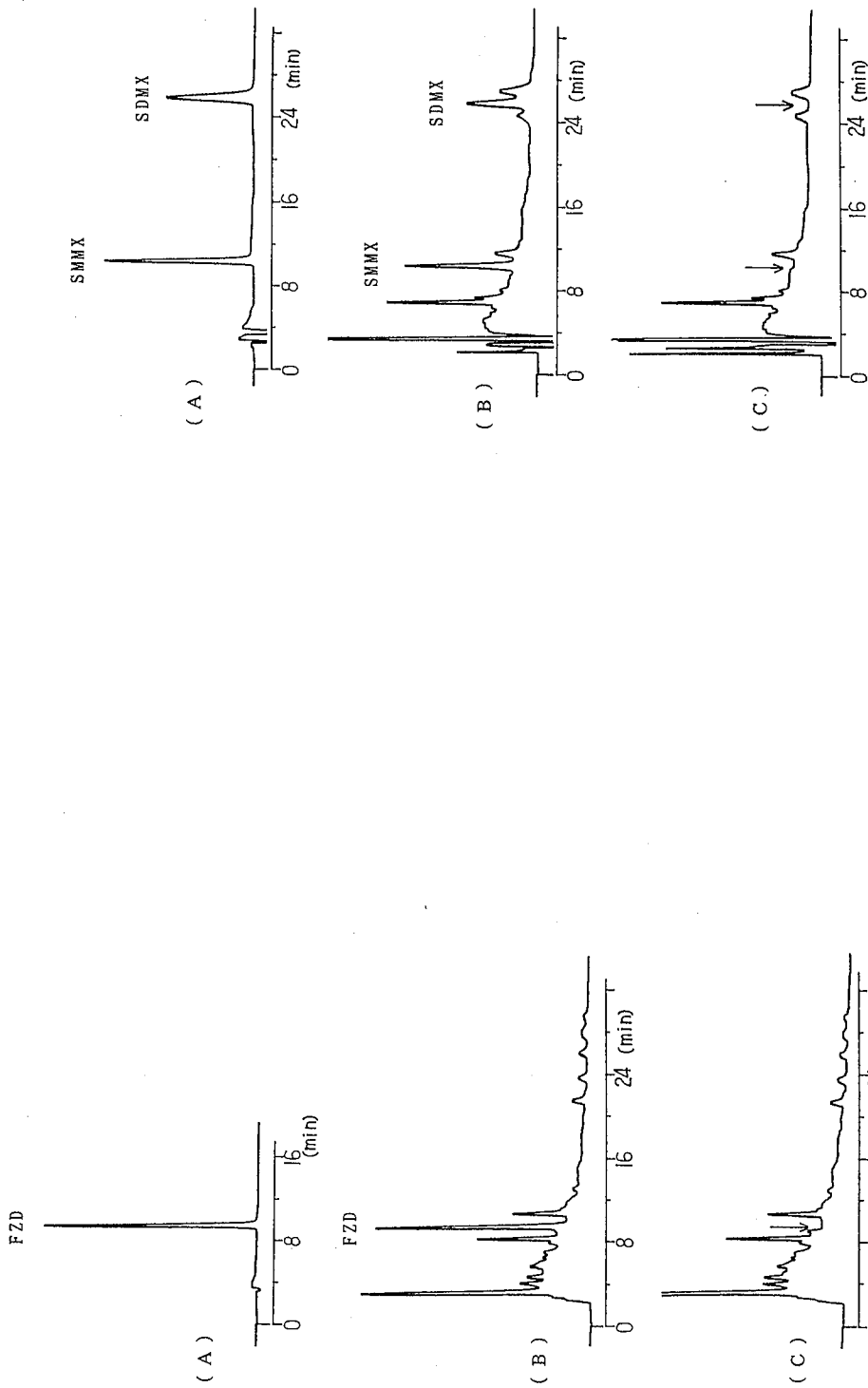


Fig. 5. HPLC chromatograms of furazolidone (FZD) in Kabayaki*
(clean-up: Bond Elut C18 and Sep-pak Alumina 95%CH₃CN)

- (A) standard : 10ng of FZD
(B) Kabayaki sample spiked with 1 μ g/10g of FZD
(C) blank Kabayaki sample

*Kabayaki=broiled and seasoned eel

HPLC operating conditions of ② in Table I.

Column : TSK-GEL ODS-80TM ϕ 4.6 \times 150mm
Mobile phase : CH₃CN : 5mM Oxalic acid (30 : 70)
Flow rate : 0.6ml/min Column temp : Ambient
Detector : UV-360nm (0.02) Sample size : 10 μ l

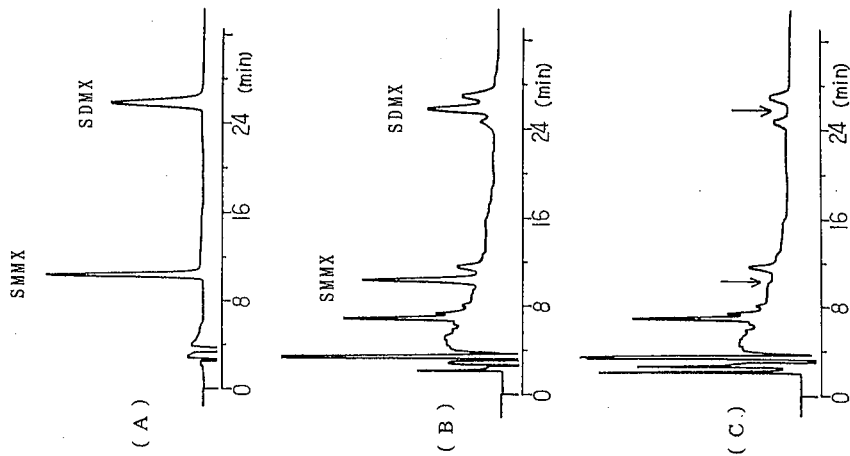


Fig. 6. HPLC chromatograms of sulfamonomethoxion (SMMX)
and sulfadimethoxion (SDMX) in Kabayaki*
(clean-up : Bond Elut C18 and Sep-pak Alumina 85%CH₃CN)

- (A) standard : 10ng each of SMMX and SDMX
(B) Kabayaki sample spiked with 1 μ g/10g each of SMMX and SDMX
(C) blank Kabayaki sample

*Kabayaki=broiled and seasoned eel

HPLC operating conditions of ③ in Table I.

Column : TSK-GEL ODS-80TM ϕ 4.6 \times 150mm
Mobile phase : CH₃CN : 5mM Oxalic acid (25 : 75)
Flow rate : 0.6ml/min Column temp : Ambient
Detector : UV-270nm (0.02) Sample size : 10 μ l

ODS-ミニカラム処理で測定可能な生のウナギと白焼きの平均回収率は、78.9～90.7%と満足すべき結果が得られた。蒲焼においては、ODS-ミニカラム処理で測定可能なOXAとPMAが、約90%と満足のいく回収率を示したが、ODSからアルミナーミニカラム処理を行ったFZD、SMMX、SDMXは、62.6～76.1%とカラム精製による損失がみられた。

本法における検出限界は、ODSからアルミナーミニカラムの一連の操作を行った場合、OXAとPMAが0.03 ppm、FZD、SMMX、SDMXが0.05 ppmであった。

本法を用い福岡市内流通のウナギ7件、白焼き及び蒲焼各5件について測定を行ったが、5種類の合成抗菌剤は、いずれも検出されなかった。

6. まとめ

HPLCによる調理加工ウナギ（白焼き、蒲焼）中の5種類の合成抗菌剤の分析法を検討し、次の結果を得た。

1) 白焼きは、Bond Elut C18による精製で測定可能であったが、蒲焼は、精製が不十分でOXA、PMAしか測定できなかった。蒲焼については、さらにSep-pak Aluminaによる精製を行いFZD、SMMX、SDMXを測定を行った。

2) HPLCのカラムは、TSK-GEL ODS-80TM、移動相は、比率の異なるアセトニトリル-5 mM シュウ酸の混液3種類を用い、測定対象に合わせ適宜使用した。

3) 検出は、蛍光とUVを併用した。

4) 蒲焼における回収率は、0.1 ppm添加で62.6～91.7%、定量限界値は、OXA、PMAが0.03 ppm、FZD、SMMX、SDMXが0.05 ppmであった。

本法は、2種類の前処理カラム、3種類のHPLC移動相、蛍光とUVの併用による測定と、操作性及び測定機器の面で難易な部分があるが、爽雑物の多い蒲焼における分析法としては有効な方法であるといえる。

今回、検討を行った測定項目は、国内における対象薬剤の一部あること、また、海外からの輸入量が増加⁷⁾していることなどから、今後、他の合成抗菌剤についても検討して行きたいと考える。

この報告は、第29回全国衛生化学技術協議会（1992年金沢市）において発表した。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：衛乳第105号、平成2年12月21日付、畜水産食品中の有害残留物質モニタリング検査について、別紙検査実施要領
- 2) 堀井昭三、他：高速液体クロマトグラフィーによるウナギ中のオキシリン酸、ナリジクス酸、ピロミド酸の同時定量法、東京衛研年報：38：182～184：1987
- 3) M. HORIE, et al : Simultaneous Determination of Nalidixic acid, Oxolinic acid and Piromidic acid in Fish by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence and UV detection, J. Chromatogr., 402, 301～308, 1987
- 4) 堀 義宏：高速液体クロマトグラフィーによる養殖魚中合成抗菌剤の定量法、食衛誌、25(2)、158～162、1984
- 5) 永田知子、佐伯政信：高速液体クロマトグラフィーによる鶏組織中に残留する17種の合成抗菌剤の同時分析法、食衛誌、29(1)、13～20、1988
- 6) M. HORIE, et al : Simultaneous Determination of Residual Synthetic Antibacterials in Fish by High-performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 538, 484～491, 1991
- 7) 増井好男：ウナギの生産・流通・消費、食の科学(光琳)、173、36～43、1992