

# 鶏卵からの合成抗菌剤の検出事例について

木内 佳伸<sup>1</sup>・藤本 喬<sup>2</sup>

## Case of Residual Synthetic Antibacterials in Chicken Egg

Yoshinobu KIUCHI and Takashi FUJIMOTO

平成7年度に行った合成抗菌剤の残留検査において鶏卵からアンプロリウムが0.04 ppm, スルファモノメトキシシが0.08 ppm検出された。検査は以下に示す方法で行った。

1. 鶏卵からのアンプロリウム: 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による検査において, アンプロリウムの保持時間にピークがみとめられたのでフォトダイオードアレイ検出器によるUVスペクトルの測定, さらにアンプロリウムをフェリシアン化カリウム酸化により発蛍光物質として, 薄層クロマトグラフィーによる測定を行いアンプロリウムであることを確認した。

2. 鶏卵からのスルファモノメトキシシ: アンプロリウムの場合と同様にHPLCによる検査においてピークがみとめられたのでスルファモノメトキシシのメチル化体を調製し, ECD検出器付ガスクロマトグラフィーによる測定, さらにガスクロマトグラフ質量分析計によるSIM測定を行いスルファモノメトキシシであることを確認した。

今回検出されたアンプロリウムとスルファモノメトキシシは, 過去にも検出事例が報告されており今後とも衛生行政上注意を要する検査項目であると考えられた。

Key Words: 合成抗菌剤 synthetic antibacterials, 鶏卵 chicken egg,

アンプロリウム amprolium, スルファモノメトキシシ sulfamonomethoxine,

高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography,

薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography,

フォトダイオードアレイ検出器 photodiode array detector,

ECD検出器付ガスクロマトグラフ ECD gas chromatography,

ガスクロマトグラフ質量分析 gas chromatography mass spectrometry

### I はじめに

当試験所では, 従来から畜水産食品の衛生対策の一つとして食肉, 卵, 乳, 養殖魚等を対象に年間170検体程度の残留合成抗菌剤検査を行っている。その検査項目は, 当試験所における残留事例<sup>1), 2)</sup>や畜水産食品の残留有害モニタリング検査<sup>3), 4)</sup>の項目及び検疫所における輸入食品の違反事例<sup>5) - 8)</sup>として報告のあった項目等を考慮し実施している。

平成7年度に当試験所で行った卵の残留合成抗菌剤検査は, 鶏卵47件, 液卵14件, うずら卵4件の計65検体

でその対象測定項目は, Table 1に示したようにサルファ剤, フラン剤, 抗原虫剤等の25項目である。

そのなかで, 鶏卵からアンプロリウム(平成7年5月15日・行政収去)が0.04 ppm, スルファモノメトキシシ(平成7年9月5日・行政収去)が0.08 ppm検出されたのでその検査の概要について報告する。

### II 鶏卵からのアンプロリウムの検出について

#### 1. アンプロリウム (APL) の検査方法

##### 1) APLの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法

既報<sup>9)</sup>に示したように試料50gからアセトニトリルで抽出し, その抽出液10g相当をn-ヘキサンにより脱脂した。アルミナカラムによる精製を行った後, UV検出器付HPLCにより測定した。さらにフォトダイオードアレイ検出器によりUVスペクトルを測定した。

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

(現所属, 福岡市博多保健所 衛生課)

2. 福岡市衛生試験所 理化学課

(現所属, 福岡市教育委員会 学校給食センター)

## 2) APLの薄層クロマトグラフィー (TLC) 法

「畜水産食品中の残留物質検査法」(公定法)<sup>10)</sup>に準じ、試料20gから5%トリクロル酢酸により抽出し、その抽出液5g相当をビタミンB1定量用ビタチェンジカラムにより精製し、アルカリ性下で硝酸銀を加えフェリシアン化カリウム酸化により蛍光体を生成した。TLCにより分離し、検出は紫外線照射により行った。

APLの各検査法の測定条件をTable 2に示した。

Table 1. Inspection List of Residual Synthetic Antibacterials in Chicken Egg

(from April, 1995 to March, 1996)

Sulfamonomethoxine	Piromidic acid
Sulfadimethoxine	Amprolium
Sulfaquinoxaline	Clopidol
Sulfathiazole	Decoquinat
Sulfamerazine	Zoalene
Sulfadiazine	Ethopabate
Sulfadimidine	Nicarbazine
Sulfamethoxazole	Pyrimethamine
Furazolidone	Thiamphenicol
Difurazon	Ormetoprim
Nitrofurazone	Trimetoprim
Oxolinic acid	Halofuginone
Nalidixic acid	

Table 2. Analytical Conditions for Amprolium

[HPLC]	
Instrument	Jasco TRI ROTAR
Column	Wakosil-II 5C18AR 4.6 × 250 mm
Mobile phase	CH <sub>3</sub> CN : McIlvaine buffer (pH3.4) containing 10 mM SDS (40 : 60 V/V%)
Flow rate	0.8 ml/min
Column temp.	40°C
Detector (UV)	Shimadzu SPD-6A UV-270 nm (0.01)
(PDA)	Waters 991 J (photodiode array) wavelength 230 ~ 310 nm
Saple size	15 μl
[TLC]	
TLC plate	HPTLC Kieselgel 60 (10 × 10 cm) MERCK Art.5631
Developer (solvent)	Pyridine-Isobutyl Alcohol-water (66 : 17 : 17)
Detector	MANASLU-LIGHT Long Wave 3650 Å (365 nm) Short Wave 2536 Å (254 nm)

## 2. APLの結果

APLの公定検査法は、蛍光体としたAPLをTLCで確認と定量を行う方法であるが、当試験所においては通常既報<sup>9)</sup>に示したHPLC法による検査を行っている。今回このHPLC法において、Fig. 1に示したようにHPLCのクロマトグラム上、APLと同一の保持時間にピークを検出したため、検出器をフォトダイオードアレイ検出器に替え最大ピーク高さ(保持時間)及び半分のピーク高さ(保持時間の前後2点)におけるUVスペクトルを測定した。いずれのスペクトルもAPLのスペクトルと一致し、単一ピークであることを確認した。保持時間におけるUVスペクトルをFig. 2に示した。HPLC法による定量値は、0.04 ppmであった。

つぎにAPL不検出の鶏卵を対照としてAPL検出鶏卵の公定法による測定を行った。TLCクロマトグラムをFig. 3に示した。Rf値0.40と0.27にスポットを確認した。このRf値は山口ら<sup>11)</sup>が報告したAPLの酸化生成物(蛍光体)のAmprochrome-I & II (APC-I & II)のRf値(0.39, 0.26)と同様であった。蛍光強度は、APL 0.25 ppm (検体換算0.05 ppm)のスポットより若干低く対照とした鶏卵にはスポットは認められなかった。以上の結果よりAPL検出とした。

定量値はHPLC法での0.04 ppmとした。

## III 鶏卵からのスルファモノメトキシンの検出について

### 1. スルファモノメトキシンの検査法

#### 1) SMMXのHPLC法

厚生省通知の「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(改定法)」<sup>12)</sup>に準じ、試料10gからアセトニトリルで抽出後、n-ヘキサンによる脱脂、アルミナミカラム(Sep-Pak Alumina N)による精製を行った後、HPLCで測定した。

#### 2) SMMXのガスクロマトグラフィー(GC)法

上記一斉分析法(改定法)と同様の操作で精製し得られた試料をジアゾメタンでメチル化<sup>13)</sup>後、ECD検出器付ガスクロマトグラフィー(ECD-GC)により測定した。

#### 3) SMMXのガスクロマトグラフ質量分析

(GC-MS)

上記GC法で調製したSMMXのメチル化体をGC-MSにより分析した。

SMMXの各検査法の測定条件をTable 3に示した。

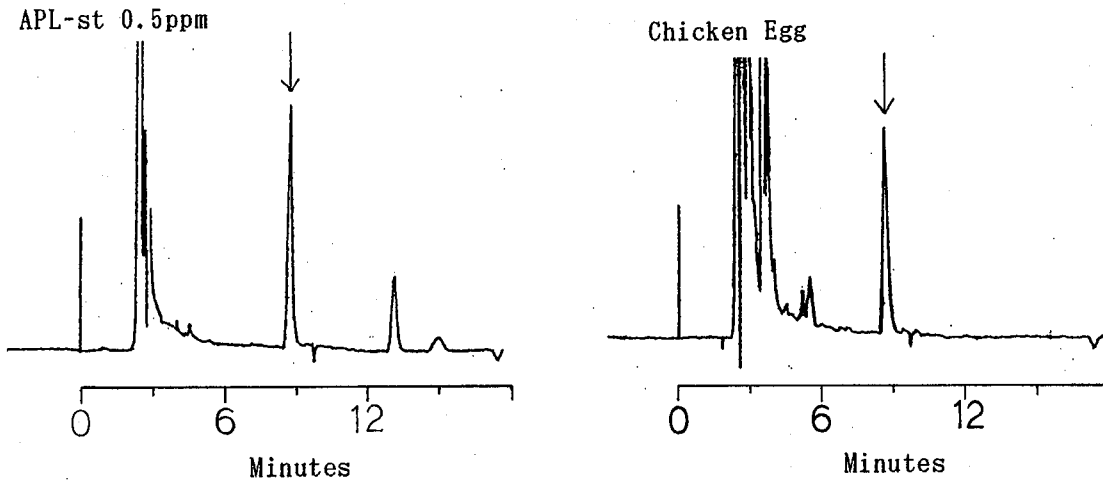


Fig. 1 HPLC chromatograms of Amprolium in Chicken Egg

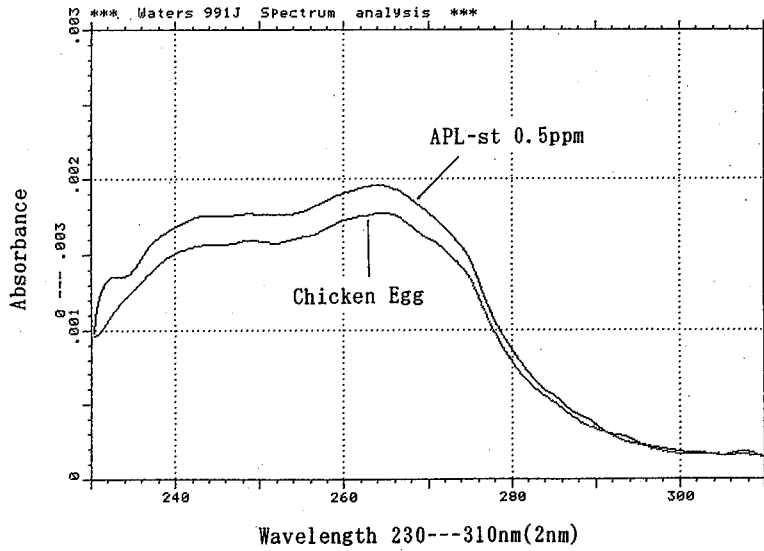


Fig. 2 UV spectra of the peak at 8.7 min (Fig. 1) obtained from Chicken Egg sample and standard Amprolium

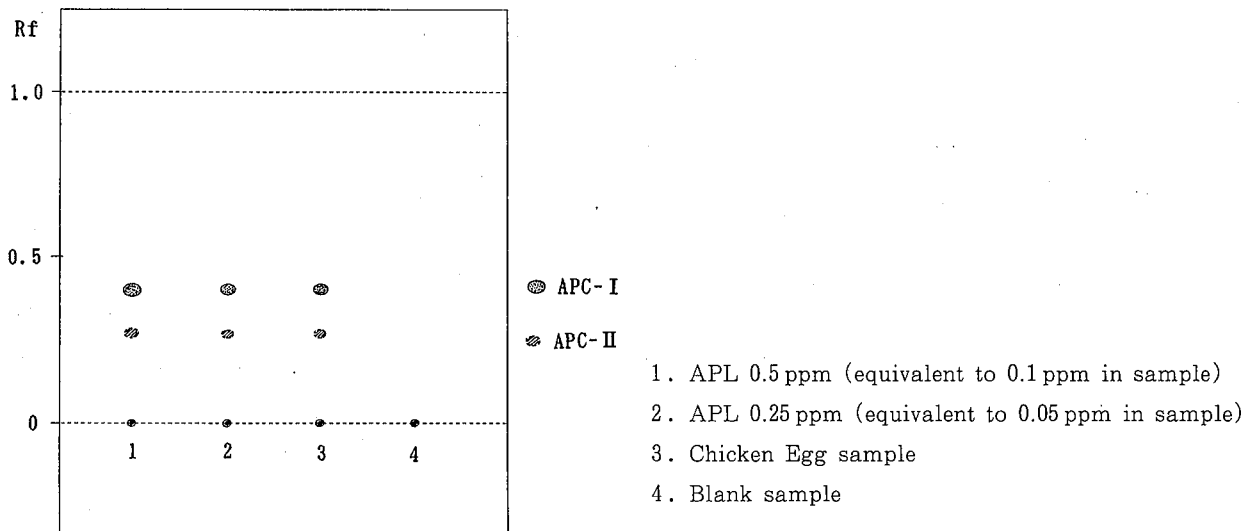


Fig. 3 TLC chromatogram of Amprolium in Chicken Egg

## 2. SMMXの結果

SMMXの公定法は、先に示した厚生省通知の一斉分析法(改定法)<sup>12)</sup>によるHPLC法及びEDC-GCを用いた個別分析法<sup>13)</sup>であるが、当試験所では広範囲の合成抗菌剤の残留の有無を目的にHPLCを用いた一斉分析法により行っている。Fig. 4に示したようにHPLCのクロマトグラム上SMMXと同一の保持時間にピークを検出したため、個別分析法に示されたジアゾメタンによるメチル化の後、ECD-GCによる測定を行った(Fig. 5)。

GCのクロマトグラム上、メチルスルファモノメトキシンのピークが認められたためGC-MSによる確認を行った。はじめに標準品より調製したメチルスルファモノメトキシンの質量スペクトルを測定(Fig. 6)し、質量数(m/z) 92, 110, 138, 230による検体のSIMクロマトグラムを測定した(Fig. 7)。これによりSMMXであることを確認した。

鶏卵からのSMMXの定量値は、HPLC法、GC法とも差はなく、値は、HPLC法の0.08 ppmとした。

Table 3. Analytical Conditions for Sulfamonomethoxine

[HPLC]	
Instrument	Waters 600 E
Column	Waters Puresil 5 C18 4.6 × 150 mm
Mobile phase	CH <sub>3</sub> CN : 5 mM Oxalic acid (20 : 80V/V%)
Flow rate	0.6 ml/min
Column temp.	33 °C
Detector (UV)	Waters 486 UV-275 nm (0.01)
Sample size	10 μl
[ECD-GC]	
Instrument	Yanaco G-2800 <sup>63</sup> Ni
Column	2% OV-17/Uniport HP 80/100 mesh ID 2.5 mm × 1.7 m
Injection temp.	280 °C
Column temp.	260 °C
Detector temp.	280 °C
Carrier gas	N <sub>2</sub> 1.8 Kg/cm <sup>2</sup>
Injection volume	1 μl
[GC-MS]	
Instrument	HP 5989 A
Column	HP-5 MS ID 0.25 mm × 30 m df= 0.25 μm (Crosslinked 5% Ph Me Silicone)
Ionization mode	EI 70 eV
Ion source temp.	250 °C
Column temp.	150 °C (3 min) → 10 °C/min → 290 °C
Carrier gas	He 1.0 ml/min (10.6 PSI)

## IV 考察及びまとめ

近年わが国の畜産は、大規模化、集約化によって著しい発展を遂げ食品の安定供給に寄与しているが、その背景には抗菌性物質の使用による疾病予防あるいは発育促進技術の導入が大きな役割を果たしている。しかし一方ではこのような抗菌性物質の多用に対し公衆衛生の面から厳しい批判も起きている。これらの抗菌性物質は、人畜共通のものも多く抗菌性物質が畜産物に残留することはその毒性及び耐性菌出現などの問題において好ましいものではない。これらの使用に当たっては薬事法や飼料安全法により用途、用法が細かく規制されており適正に使用されれば残留はないとされている。また、食品衛生法の規定により畜産物及び食品への残留は排除されている。

今回検出したAPLとSMMXは、抗原虫剤として鶏のkokシジウム症やロイコチゾーン症の予防や治療に使用されている薬剤である<sup>14)</sup>。APLは、予防を目的に飼料添加物として鶏の幼雛、中雛期(産卵前の鶏群)にエトパベート、スルファキノキサリンとの合剤として使用されている。能勢ら<sup>15)</sup>はこの3種類の薬剤の使用基準に基づく添加量での投与実験を行っており鶏卵におけるAPLの投与中止後の消失速度はエトパベート、スルファキノキサリンに比べ遅く、投与中止後7日目でも検出されることを報告している。今回APLを検出した鶏卵においては、エトパベート及びスルファキノキサリンは検出されていないことから休薬期間の日数が不足した為の残留ではないかと考えられた。一方、SMMXは、その使用にあたっては獣医師の指導を必要とする要指示薬で産卵鶏へは原則として使用できないことになっている。しかし、鶏卵におけるSMMXの残留事例は、いくつか報告されている<sup>16)-18)</sup>。SMMXの鶏組織及び鶏卵への残留性については寺田ら<sup>19)</sup>や永田ら<sup>18), 20)</sup>が報告しているが鶏卵においてはAPLと同様に消失速度が緩やかで投与量にもよるがその残留日数は5~7日間となっている。このことからAPLと同様に休薬期間の日数不足、もしくはその他の原因があったものと推測された。

当試験所における合成抗菌剤の検査は、広範囲の薬剤を対象に一斉分析法を主に行っているが、今回のAPLやデコキネートのように一斉分析法による分析が困難な項目もあり個別分析法も平行して行っている。前述したようにAPLは当試験所で検討した方法でAPLそのものを測定し、場合によってはフォトダイオードアレイ検出器による定性(UVスペクトル測定)が可能である。TLCによる公定法と比較すると抽出液や検出法が異なっているが今回の事例において公定法と同様の結果が得られたことからAPLの検査法の一つとして有効であると

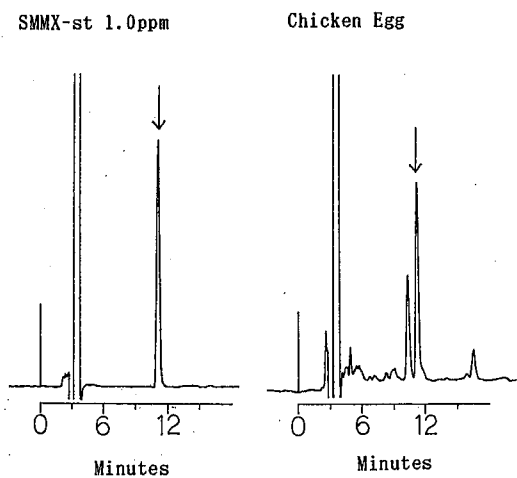


Fig. 4 HPLC chromatograms of Sulfamonomethoxine in chicken Egg

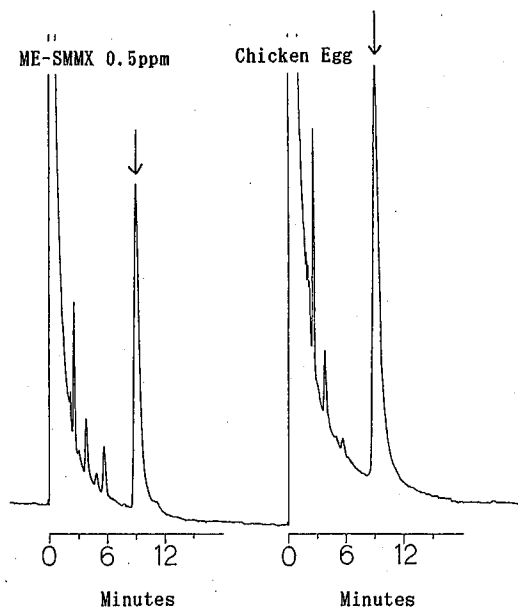


Fig. 5 ECD-GC chromatograms of methylated Sulfamonomethoxine in Chicken Egg

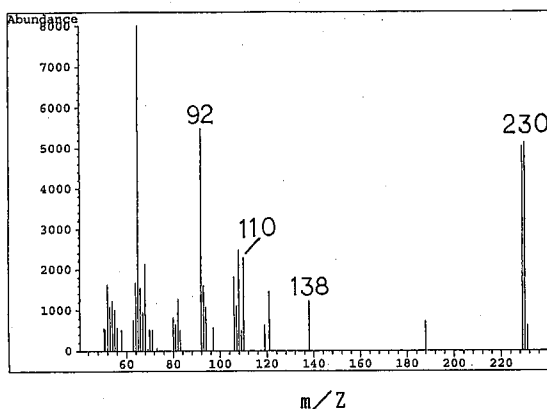
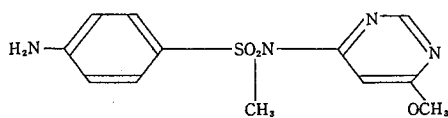


Fig. 6 Mass spectrum of methylated Sulfamonomethoxine

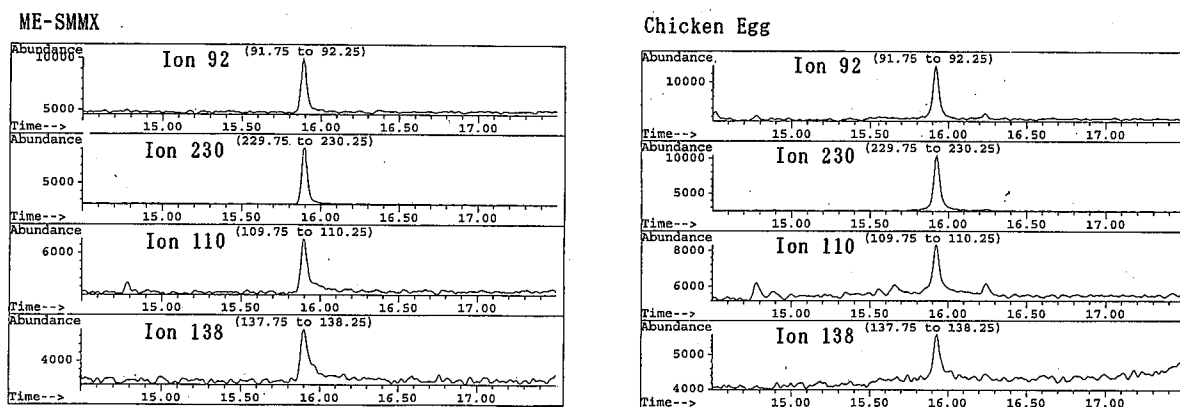


Fig. 7 GC/MS/SIM chromatograms of methylated Sulfamonomethoxine in Chicken Egg

いえる。

今回検出された APL や SMMX 以外にも Table 1 に示したサルファ剤、フラン剤、抗原虫剤等は鶏に使用されていることから、これらは今後とも留意すべき検査項目であり、また、生産者にあつては、使用する薬剤の用途ならびに用法を遵守することが要請される。

## 文 献

- 1) 森部昌江, 藤本喬: 福岡市衛生試験所報, 10, 30 ~ 36, 1985
- 2) 木内佳伸, 中村正規, 藤本喬: 同上, 17, 54 ~ 59, 1992
- 3) 長谷部和久: 食品衛生研究, 44 (9), 7 ~ 25, 1994
- 4) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課: 衛乳第 83 号, 平成 7 年 5 月 29 日付, 平成 7 年度畜水産食品の残留有害モニタリング検査の実施について
- 5) 厚生省編: 輸入食品 1991, 146 ~ 153, (社)日本食品衛生協会, 1992
- 6) 厚生省編: 輸入食品 1992, 150 ~ 166, (社)日本食品衛生協会, 1993
- 7) 厚生省編: 輸入食品 1993, 222 ~ 241, (社)日本食品衛生協会, 1995
- 8) 厚生省編: 同上, 293 ~ 306, (社)日本食品衛生協会, 1995
- 9) 木内佳伸, 藤本喬: 福岡市衛生試験所報, 19, 63 ~ 70, 1994
- 10) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編: 畜水産食品中の残留物質検査法, 136 ~ 139, 中央法規出版, 1990
- 11) 山口敏幸, 花井潤師, 平田睦子, 白石由美子, 青木襄, 高杉信男: 食衛誌, 25 (6), 499 ~ 504, 1984
- 12) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課: 衛乳第 79 号, 平成 5 年 4 月 1 日付, 平成 5 年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について, 別添 2
- 13) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編: 畜水産食品中の残留物質検査法, 85 ~ 89, 中央法規出版 (東京), 1990
- 14) 田先威和夫, 山田行雄, 森田琢磨, 田中克英 編著: 養鶏ハンドブック, 311 ~ 394, (株)養賢堂 (東京) 1985
- 15) 能勢憲英, 星野庸二, 菊池好則, 正木宏幸, 堀江正一, 河内佐十: 食衛誌, 23 (3), 246 ~ 252, 1972
- 16) 庄野節子, 光武隆久, 川原田優, 井元孝: 佐賀県衛生研究所報, 15, 97 ~ 100, 1989
- 17) 原崎孝子, 出美規子, 森屋一雄: 同上, 19, 101 ~ 102, 1993
- 18) 永田知子, 佐伯政信, 飯田哲也, 片岡実, 伊能林平: 食衛誌, 30 (5), 375 ~ 383, 1989
- 19) 寺田久屋, 麻野間正晴, 坪内春夫, 石原利克, 坂部美雄: 名古屋市衛生研究所報, 30, 42 ~ 46, 1984
- 20) 永田知子, 佐伯政信, 脇雅之, 片岡実, 鹿野茂: 食衛誌, 31 (2), 159 ~ 165, 1990