

固相抽出法とフォトダイオードアレイ検出HPLC

による鶏卵中の残留サルファ剤の分析法

木内 佳伸¹・藤本 和司²・藤本 喬³

Solid-Phase Extraction Method of Residual Sulfonamides in Chicken Eggs by HPLC with Photodiode Array Detection

Yoshinobu KIUCHI, Kazushi FUJIMOTO and Takasi FUJIMOTO

A solid-phase extraction method using cation-exchange cartridge was developed for the determination of 8 sulfonamides (sulfathiazole, sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamonomethoxine, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine) in chicken eggs by high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection.

The drugs were extracted from the homogenized sample with acetonitrile and washed with n-hexane (saturated with acetonitrile before use) to remove fat and then evaporated to dryness. The residue was cleaned up with Mega Bond-Elut SCX and Sep-pak Frorisil cartridges.

The HPLC separation of the drugs was carried out on an Inertsil ODS-3 column (250 × 4.6 mm i.d.) with 50 mM sodium dihydrogen phosphate-acetonitrile (2:1) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 ml/min. Photodiode array detection was monitored at the wavelength of 275 nm.

The recoveries of the drugs from chicken eggs spiked at the level of 0.1 μg/g were in the range of 86.9 ~ 94.3 %, with high precision. The limit of detection was 0.03 μg/g for each drug. Sulfamonomethoxine was found in 1 sample at level of 0.08 μg/g.

This proposed method was considered to be suitable for residue analysis.

Key Words : サルファ剤 sulfonamides, 固相抽出 solid-phase extraction, 鶏卵 chicken egg, 陽イオン交換カートリッジ cation-exchange cartridge, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, フォトダイオードアレイ検出器 photodiode array detector

I はじめに

サルファ剤は安定性及び組織移行性に優れ広範囲な抗菌スペクトルと原虫性疾患に有効なことから畜水産動物の感染症の予防と治療を目的に、わが国をはじめ諸外国で広く使用されている。しかし、一般に抗生物質に比較

して抗菌力が弱いことから通常の投与量が多く使用方法を誤れば畜水産物中に残留する可能性が高い。このような動物用医薬品の畜水産物への残留は、その毒性や耐性菌出現などの問題から食品衛生上重要な課題となっており食生活の安全性を確保するうえで抗菌性物質の残留検査は重要性を増している。

畜水産物中の残留サルファ剤の分析法は、比色法¹⁾や微生物学的法²⁾⁻⁴⁾、薄層クロマトグラフ法^{5), 6)}、ガスクロマトグラフ法⁷⁾⁻¹¹⁾、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法¹²⁾⁻²³⁾などが報告されている。その分析におけるクリーンアップにはアルミナ¹²⁾⁻¹⁴⁾、フロリジ

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
3. 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)

ル^{15), 16)}, C18^{17) - 20)}などが主に使用されており, イオン交換相²¹⁾を使用した報告は少ない。

著者らは, 前報²⁴⁾で陽イオン交換カートリッジを使用した固相抽出による HPLC 法を開発し蜂蜜中の残留サルファ剤について報告した。今回この分析法に改良を加え鶏卵に適應した。また, HPLC による測定を固定波長型の UV 検出器から UV スペクトルや 3 次元クロマトグラムなど, 定性的情報量の多いフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器に置き換え, 検出時における確認の確実性を高めたので報告する。

II 実験方法

1. 試料

平成 7 年 4 月から平成 8 年 3 月にかけて福岡市内で入手した鶏卵 (殻付き 47 件, 液卵 14 件) 61 件を用いた。

2. 試薬

- ・サルファ剤: スルファチアゾール (STZ), スルファメラジン (SMZ), スルファジミジン (SDD), スルファクロルピリダジン (SCPD), スルファメトキサゾール (SMXZ) は sigma 社, スルファモメトキシシ (SMM), スルファジメトキシシ (SDM) は第一製薬(株), スルファキノキサリン (SQX) は大日本製薬(株)製の計 8 種類を用いた。
- ・10%酢酸-メタノール: 酢酸 (特級) をメタノールで 10% に希釈して用いた。
- ・50%メタノール: メタノールと蒸留水を等量混合した。
- ・4%アンモニア-メタノール: 25%アンモニア水 (特級) をメタノールで 4% に希釈して用いた。
- ・50%メタノール-ジクロロメタン: メタノールとジクロロメタンを等量混合した。
- ・Mega Bond Elut SCX カートリッジ (1g, Varian 製): メタノール 6 ml, 蒸留水 6 ml 及び 10%酢酸-メタノール 6 ml でコンディショニングした後使用した。
- ・Sep-pak Florisil カートリッジ (900 mg, Waters 製): 50%メタノール-ジクロロメタン 15 ml でコンディショニングした後使用した。
- ・サルファ剤標準原液: 各サルファ剤 10 mg を精秤し各々メタノール 100 ml に溶解し, 標準原液 (100 μ g/ml) とした。
- ・HPLC 用サルファ剤標準溶液: 各標準原液を適宜 HPLC 移動相で希釈して用いた。
- ・その他の試薬は, 和光純薬工業(株)製の特級または HPLC 分析用を用いた。

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Column : Inertsil ODS-3 (GL Sciences Inc.) 250 mm \times 4.6 mm i. d.
Mobile phase : 50 mM NaH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN = 2 : 1
Flow rate : 0.5 ml/min
Column temp. : 35 $^{\circ}$ C
Photodiode array detector : Wavelength range = 210~350nm (monitor UV 275 nm)
Resolution = 2 nm
Interval = 1.49 sec.
Sample size : 10 μ l

3. 装置

ペリスタリックポンプ: アトー(株)製, SJ-1220 型
ロータリーエバポレーター: 東京理科器械(株)製, N-4 型
ホモジナイザー: Kinematica 製, ポリトロン PT 10-35
高速液体クロマトグラフ

ポンプ: Waters-600 E
インジェクター: Waters-717 (autosampler)
紫外検出器: Waters-486
フォトダイオードアレイ検出器: Waters-991 J
(データ処理: NEC PC-9801 FA)

4. HPLC 条件

測定条件は Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出及び脱脂操作

ホモジナイズした鶏卵 50 g にアセトニトリル 100 ml を加え振とう後, 一晚放置し, 上澄み液を No. 5 C 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 n-ヘキサン (アセトニトリル飽和) 30 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 30 ml を加え同様に操作した。下層のアセトニトリル層を分取し, 1-プロパノール 20 ml を加えロータリーエバポレーターにより減圧乾固 (水浴 40~45 $^{\circ}$ C) し, 窒素ガスにより完全に溶媒を除去した。残留物に 10%酢酸-メタノール 10 ml を加え溶解した。

2) クリーンアップ法

10%酢酸-メタノール 10 ml に溶解した試料液をペリスタリックポンプを用い流速 3 ml/min で Mega Bond Elut SCX カートリッジに負荷した。50%メタノール 10 ml でカートリッジを洗浄し, 4%アンモニア-メタノール 8 ml で溶出した。溶出液にエタノール 12 ml を加えロー

タリーエバポレーターで減圧乾固し、50%メタノール-ジクロロメタン10mlに溶解した。この溶解液をSep-pak Florisilカートリッジに通し、さらに50%メタノール-ジクロロメタン5mlを通した。その溶出液(計15ml)をロータリーエバポレーターにより減圧乾固し、残留物をHPLC移動相1mlに溶解してPDA-HPLC測定溶液とした。その10 μ lをPDA-HPLCに注入した。

6. 検量線の作成

各標準品の濃度が0.1, 0.3, 0.5, 0.8及び1 μ g/mlである混合標準溶液を調製し、その10 μ lをHPLCに注入した。検出波長UV-275nmで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。

III 結果及び考察

1. 前処理方法の検討

前報²⁾の蜂蜜の場合は10%酢酸水溶液で希釈した蜂蜜を直接、陽イオン交換カートリッジ(Bond Elut SCX)に負荷して抽出・精製する方法であったが、鶏卵においては同様の方法が不可能であることから厚生省のモニタリング検査法(改定法)²⁾に準じ試料からの抽出はアセトニトリルを使用し、n-ヘキサンとの液-液分配により脱脂を行った。脱脂後10%酢酸水溶液とした試料をSCXカートリッジに負荷しようとしたが目詰まりをおこし負荷できなかった。この目詰まりはメタノールを流すと解除された。そこで試料の負荷には10%酢酸-メタノールを用いることにした。これによりスムーズな負荷が可能となった。つぎに負荷する試料の量とSCXカートリッジの充填量の違いによる保持能力を比較した。充填量500mgのカートリッジでは試料5gの時の回収率は、70~94%であったが試料を10gとすると回収率は30~77%に低下しサンプルマトリックスの影響が明らかであった。一方、充填量1gのカートリッジでは、試料5g及び10gいずれの場合においても回収率は、85%以上の良好な結果が得られた。そこで濃縮倍率を上げ低濃度の測定を目的に充填量1gのMega Bond Elut SCXカートリッジに試料10gを負荷することにした。SCXカートリッジに試料を負荷した後、洗浄操作として50%メタノールを10ml流し、溶出は4%アンモニア-メタノールを用いた。サルファ剤は4%アンモニア-メタノール6mlで溶出終了となったが確実性を考慮して8mlとした。この時点ではクリーンアップが不十分でHPLCクロマトグラムにおいて保持時間の早いSTZの直前部分に夾雑ピークが観られた。そこで前報と同様に50%メタノール-ジクロロメタンとした試料液を

Sep-pak Florisilカートリッジに通し夾雑ピークを除去した。また、SCXカートリッジの使用前のコンディショニング操作において10%酢酸-メタノールで洗浄するとSTZとSCPDの回収率が5%程度向上したのでこの操作を追加した。

2. HPLC測定条件

1) 測定波長について

8種類のHPLC用サルファ剤標準溶液をPDA-HPLCに注入しUVスペクトルを測定したところ250nm~290nm付近に吸収極大が認められた。検量線及びHPLC測定時のモニター波長としては、すべてのサルファ剤を良好に検出できる275nmを用いることにした。

2) HPLC分離用カラム及び移動相について

前報²⁾ではHPLC分離用カラムにPuresil 5C18120Å(150 \times 4.6mm i.d.)、移動相に5mMシュウ酸-アセトニトリル(8:2)を用いて測定したが、この条件では8種類のサルファ剤の分離時間が長いことからサルファ剤相互のピークの間隔(保持時間)が広く固定波長型の検出器を使用していたこともあり検出下限に差を生じた。そこで再度HPLC分離条件を検討した。カラムにはODS系の250mmタイプを使用して分離能を上げ、移動相にはアセトニトリル/水系を用いてアセトニトリルの比率を上げサルファ剤を短い間隔で分離することにした。移動相に用いる塩にはシュウ酸、リン酸-カリウム、リン酸-ナトリウムの3種類について検討した。

近年、HPLC用のODS系カラムは、基材に高純度シリカゲルを用い、残存シラノール基をエンドキャップした高性能なタイプが多く市販されているが、そのなかから今回はInertsil ODS-3(250 \times 4.6mm i.d.)を用いた。

移動相の塩に10~50mMのシュウ酸やリン酸-カリウムを用いアセトニトリルの比率を20~35%と変更したがSQXとSDM(ピーク7, 8)の分離が不十分で1本に重なるかピークトップのみの分離で完全に分離することができなかった。塩をリン酸-ナトリウムとすると8種類のサルファ剤の分離が可能となった。塩濃度を10, 30, 50mMと比較したところ50mMリン酸-ナトリウムとアセトニトリルの混合比を(2:1)とした時、サルファ剤相互の分離が良好となった。各々のサルファ剤の保持時間の再現性の為にカラム温度を35 $^{\circ}$ C一定とした。

3. 各サルファ剤のUVスペクトルの比較

サルファ剤標準品(各10ng)のHPLCクロマトグラムをFig. 1(A)に、PDA検出器によるUVスペクトルをFig. 2に示した。

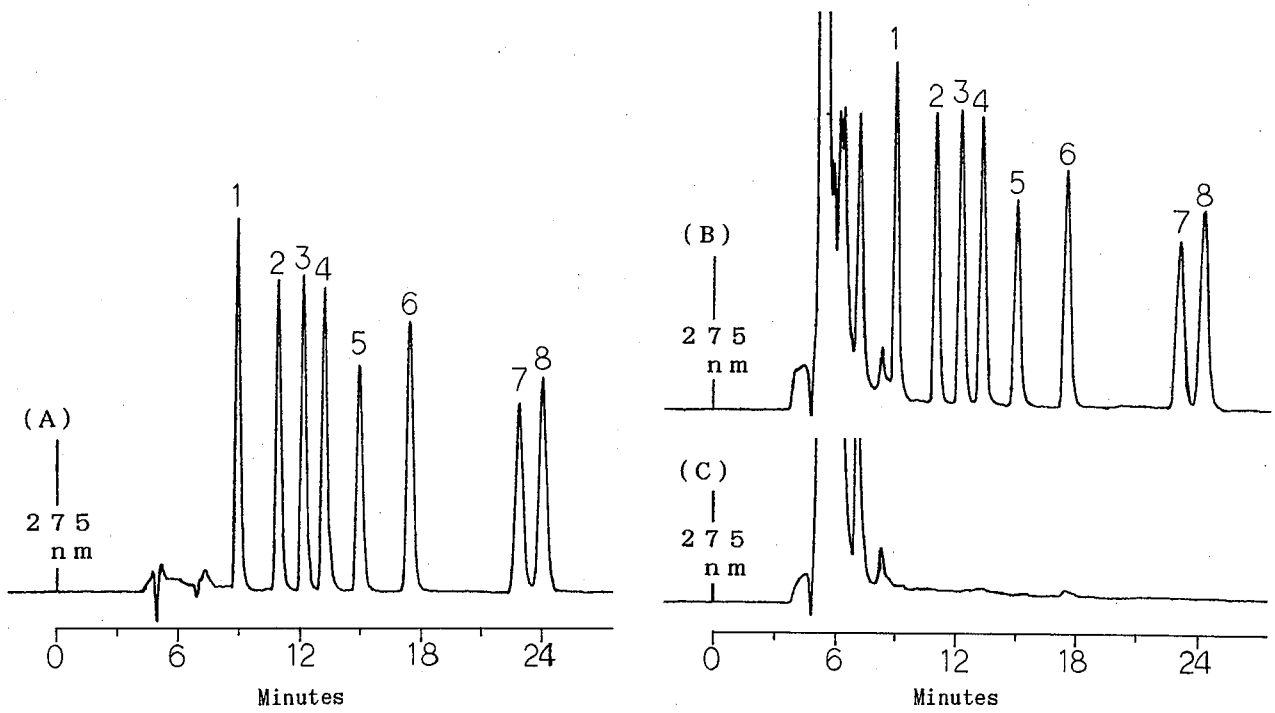


Fig. 1. Typical chromatograms of (A) standard mixture of 10 ng (equivalent to $0.1 \mu\text{g/g}$) of each sulfonamide, (B) chicken egg sample spiked with $0.1 \mu\text{g/g}$ of each sulfonamide and (C) blank chicken egg sample.

Peaks: 1 = sulfathiazole (STZ); 2 = sulfamerazine (SMZ); 3 = sulfadimidine (SDD);
 4 = sulfamonomethoxine (SMM); 5 = sulfachloropyridazine (SCPZ);
 6 = sulfamethoxazole (SMXZ); 7 = sulfaquinoxaline (SQX)
 8 = sulfadimethoxine (SDM)

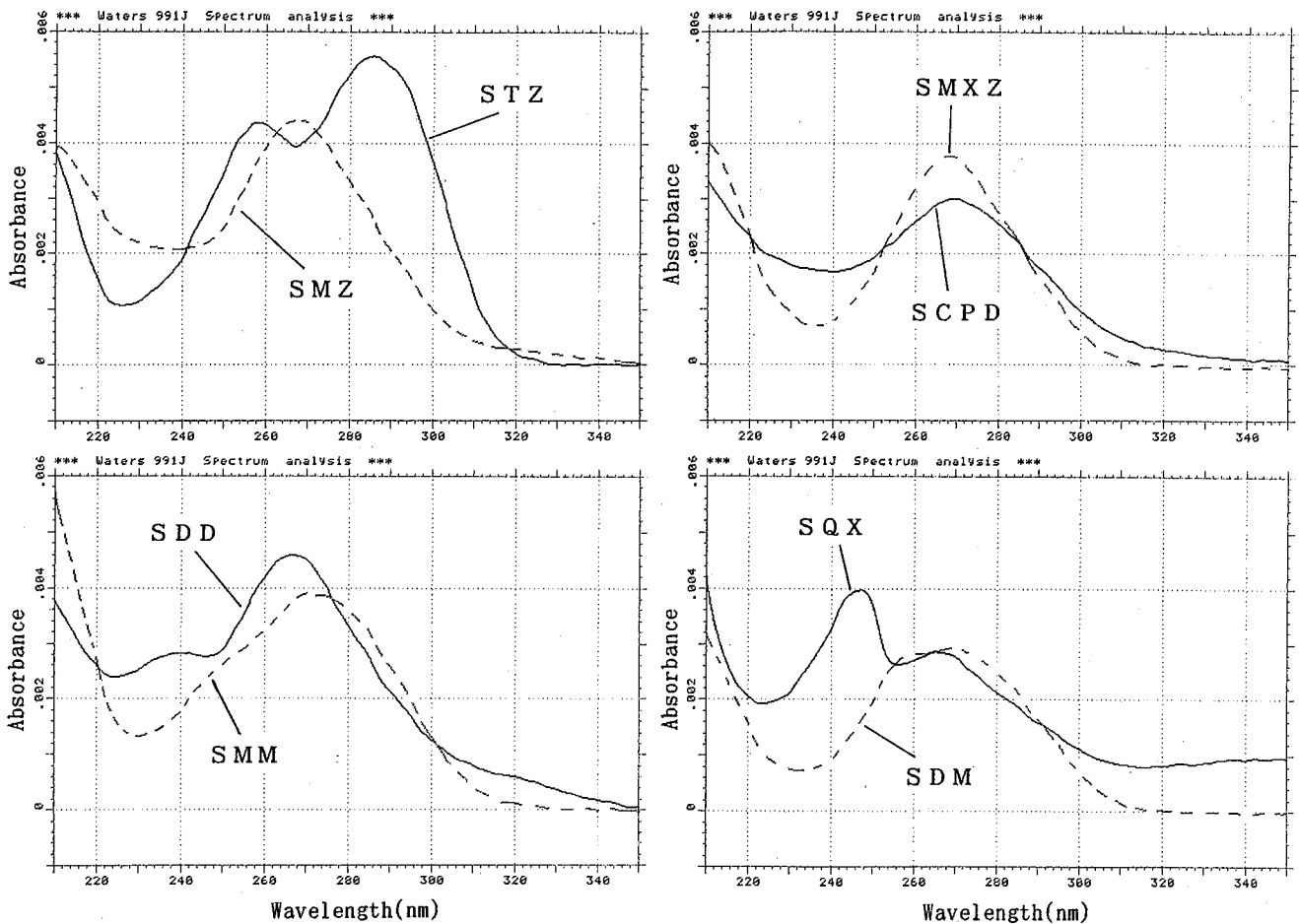


Fig. 2. UV spectra of 8 sulfonamides (each 10 ng) by HPLC with photodiode array detection.

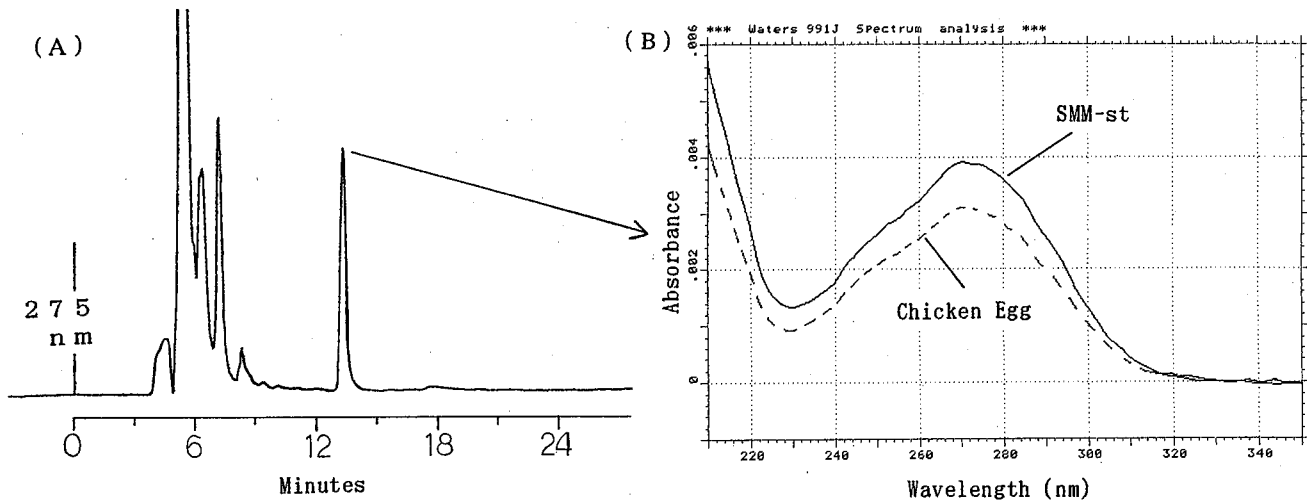


Fig. 3. (A) HPLC chromatogram of chicken egg sample in which sulfamonomethoxine (SMM) was detected 0.08 ppm, plotted at 275 nm. (B) UV spectra of the peak (at 13.4 min) obtained from chicken egg sample and standard SMM.

Table 2. Recovery rate of 8 Sulfonamides from Chicken eggs by the Proposed Method

Sulfonamides	Recovery ^{a)} (%)	
	0.1 ppm ^{b)}	1.0 ppm ^{c)}
S T Z	89.4 ± 2.0	86.3 ± 1.8
S M Z	93.6 ± 1.5	93.1 ± 2.0
S D D	91.8 ± 0.9	93.0 ± 2.1
S M M	93.4 ± 2.4	93.6 ± 2.1
S C P D	92.5 ± 3.5	91.7 ± 1.9
S M X Z	91.8 ± 2.0	92.8 ± 2.2
S Q X	86.9 ± 4.5	87.5 ± 2.8
S D M	94.3 ± 2.4	94.3 ± 1.5

a) mean ± S. D. for 5 samples

b) spiked with 0.1 μg/g of each sulfonamide

c) spiked with 1.0 μg/g of each sulfonamide

サルファ剤は、アミノベンゼンスルホン酸を基本構造とし、ベンゼン核に結合するN-4位に置換基のある誘導体は消化管吸収が悪くなることからN-1位に置換基のある誘導体が多く作られている。今回対象としたサルファ剤は全てN-1位に異なる置換基が結合した誘導体である。

サルファ剤のUVスペクトルは、この置換基の構造によりそれぞれ異なり各サルファ剤の識別は可能であった。サンプルマトリックスの多い鶏卵の残留分析においては、HPLCによる分離（保持時間）とPDA検出器によるUVスペクトル、さらには他のデータ解析ソフト（3次元クロマトグラフ、等高線など）により標準品と比較解析することで定性能力は高いものとなった。

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、いずれのサルファ剤も1~10 ngの範囲において原点を通る直線性を示した。

5. 添加回収及び検出限界

1) 添加回収

試料10g相当のアセトニトリル抽出液に各サルファ剤を1 μg（検体換算0.1 ppm）及び10 μg（検体換算1.0 ppm）添加した。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0.1 ppm添加のHPLCクロマトグラムをFig. 1 (B)に示した。サルファ剤の回収率は、86.3~94.3%、標準偏差は5以下であった。サルファ剤の種類や添加量の違いによる大きな差はなく回収率、再現性ともに良好な結果が得られた。

2) 検出限界

本法における検出限界は、Fig. 1 (C)に示したようにHPLCのクロマトグラムにおいて特に妨害となる夾雑ピーク（ベースラインノイズ）がないことからPDA検出器によるUVスペクトルなどのデータ解析において確認同定が確実にできるレベルとしては0.03 ppmであった。また、固定波長型のUV検出器（UV-275 nm）を使用した測定では0.01 ppmまで十分な検出が可能であった。

本法を用い実験方法1. 試料に示した鶏卵61検体についてサルファ剤の分析を行ったところ1検体からFig. 3 (A)に示したようにSMMと同一の保持時間にピークを検出した。このピークについて最大ピーク高さ（保

持時間)及び1/2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SMMのスペクトルと一致した。この結果は、3次元クロマトグラムや等高線などによる解析でも同様であった。保持時間におけるUVスペクトルをFig. 3(B)に示した。以上よりSMMの単一ピークであることを確認した。定量値は0.08 ppmであった。

IV ま と め

陽イオン交換カートリッジを用いた固相抽出法とフォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー(PDA-HPLC)による鶏卵中の8種類の残留サルファ剤について分析法を検討し、次の結果を得た。

1. 試料からアセトニトリルでサルファ剤を抽出し、*n*-ヘキサンによる脱脂を行った後、Mega Bond Elut SCX と Sep-pak Florisil によるクリーンアップを行った。

2. HPLCカラムは、Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm i.d.)、移動相は、50 mM NaH₂PO₄-アセトニトリル(2:1)を用いた。検出波長は、UV-275 nmで行った。

3. PDA-HPLCによりサルファ剤の保持時間とUVスペクトルの比較が可能となった。

4. 本法による添加回収率は、0.1及び1.0 µg/g 添加で86.3~94.3%、標準偏差は5以下であった。

検出限界は、0.03 µg/gであった。

5. 鶏卵61件について本法を適用した結果、1検体からスルファモノメトキシシンが0.08 ppm検出された。

本法は、試料の前処理におけるクリーンアップが良好でHPLCクロマトグラム上において特に妨害となるピークはなくPDA-HPLCにより保持時間以外の定性的情報を同時に得ることができる。このことから鶏卵中の残留サルファ剤の定性及び定量分析法として有効な方法の一つといえる。

文 献

- 1) Schwartz, D. P., & Sherma, J. : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69 (1), 72~74, 1986
- 2) 神崎政子, 竹葉和江, 村上文子, 丸山務, 松本昌雄 : 東京衛研年報, 34, 159~164, 1983
- 3) 神崎政子, 竹葉和江, 村上文子, 丸山務, 松本昌雄 : 同上, 35, 202~206, 1984
- 4) 神保勝彦, 門間千枝, 松本昌雄, 丸山務 : 食衛誌, 33 (3), 217~222, 1992
- 5) Neidert, E., Baraniak, Z., & Sauve, A. :

- J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69 (4), 641~643, 1986
- 6) Sherma, J., Bretschneider, W., Dittamo, M., Dibiasse, D., D. Huh, & Schwartz, D. P. : J. Chromatogr., 463 (1), 229~233, 1989
- 7) 井崎やえ子, 戸田和子, 藤原光雄 : 食衛誌, 16 (6), 391~396, 1975
- 8) Nose, N, Kobayashi, S, Hirose, A, & Watanabe, A : J. Chromatogr., 123, 167~173, 1976
- 9) 能勢憲英, 菊池好則, 山田文子, 渡辺昭宣 : 食衛誌, 20 (2), 115~119, 1979
- 10) Matusik, J. E., Sternal, R. S., Barnes, C. J., & Sphon, J. A. : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73 (4), 529~533, 1990
- 11) 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, 85~102, 中央法規出版(東京), 1990
- 12) 堀義宏 : 食衛誌, 24 (5), 447~453, 1983
- 13) 永田知子, 佐伯政信 : 同上, 29 (1), 13~20, 1988
- 14) 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, 103~107, 中央法規出版(東京), 1990
- 15) 中澤裕之, 高島英伍, 日野誠二, Mtema, C. A. : 分析化学, 32, 179~183, 1983
- 16) Horie, M., Saito, K., & Nose, N. : J. AOAC. Int., 75 (5), 786~789, 1992
- 17) 寺田久屋, 麻野間正晴, 坪内春夫, 石原利克, 坂部美雄 : 衛生化学, 29 (4), 226~231, 1983
- 18) 堀江正一, 星野庸二, 能勢憲英, 岩崎久夫, 中澤裕之 : 同上, 31 (6), 371~376, 1985
- 19) 堀江正一, 齊藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 浜田尚樹, 中澤裕之 : 食衛誌, 31 (2), 171~176, 1990
- 20) Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, S., Short, C. R., & Barker, S. A. : J. Agric. Food. Chem., 38 (2), 423~426, 1990
- 21) 田村博, 世取山守, 黒崎かな子, 篠原信勝 : 食衛誌, 35 (3), 271~275, 1994
- 22) Haagsma, N., & vanWater, C. : J. Chromatogr., 333, 256~261, 1985
- 23) 石井里枝, 堀江正一, 星野庸二, 徳丸雅一, 能勢憲英 : 食衛誌, 35 (2), 173~179, 1994
- 24) 木内佳伸, 藤本喬 : 福岡市衛生試験所報, 20, 113~119, 1995
- 25) 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