

## と畜場搬入病畜におけるサルファ剤の残留状況 —HPLCによる血中定量を中心として—

豊橋市食肉衛生検査所 ○合川敏彦 山内俊平 三浦義明  
内藤 昇 斎藤富士雄 井野 仁

### はじめに

一般に微生物学的検出感度の低いサルファ剤の検査は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた一斉分析法による。同分析法は多種の薬剤を同時に分析できる利点を有する反面、臓器を用いた場合、妨害ピーク等の影響でしばしば各薬剤の確認同定が困難となる場合がみられ、また、検体の前処理あるいはグレジエント送液に伴う分析に比較的時間を要する。

多数の検査対象獣畜が搬入される生産地型のと畜場を所轄する食肉衛生検査所においては、多検体処理が可能な迅速スクリーニング検査法の導入が望まれる。

そこで今回、管内での使用頻度の高いスルファモノメキシン（SMMX）、スルファジミシン（SDD）、スルファメトキソゾール（SMXZ）、スルファジメキシン（SDMX）のサルファ剤4剤について、マトリックスが比較的単純かつ抽出操作が不要な血清を用いたHPLCによる迅速分析法を検討したところ比較的良好な成績が得られた。本分析法を中心に1999年7月～2000年11月に実施したと畜場搬入病畜のサルファ剤残留検査状況と合わせて報告する。

### 材料及び方法

#### 1 血清中のサルファ剤分析法の検討

##### (1) 試料及び試薬

試料は、豚及び牛の放血時の血液から得られた血清を用いた。標準品は、関東化学（株）製を使用し、通知（衛乳第79号.H5.4.1）の方法に従い溶解希釀して標準溶液とした。

##### (2) 方法

###### ① 試料及び試験溶液の調製法

1頭につき血清0.4ml、2～3検体を集合（集合検体）し、約5倍量の蒸留水で希釀したものを、あらかじめメタノール5ml、蒸留水10mlの順でコンディショニングしたSep-pak Plus PS-2（Waters社製）に負荷し、蒸留水20mlで洗浄後、メタノール10mlで溶出し、水浴中（40℃以下）で減圧乾固した。残留物に移動相1mlを加えて溶解し、その50μlをHPLCに注入した。陽性の集合検体については、個体毎に血清1mlを再採取し、上記処理を行い残留個体を特定後、絶対検量線法により定量した。

###### ② HPLC装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ：（株）島津製作所製 LC-10A システム、UV 検出器：（株）島津製作所製

SPD-M10Avp、分析カラム：Wakosil-II 5C18 RS (150cm×4.6mm, 和光純薬工業(株)製)、移動相：アセトニトリル-25mM リン酸二水素ナトリウム (30:70)、流速：1.0ml/min、カラム温度：40°C、検出波長：274nm (SMMX, SMXZ, SDMX)、268nm (SDD)、注入量：50μl

## 2 と畜場搬入病畜におけるサルファ剤残留検査

本分析法を用いて、と畜場搬入病畜（豚 1843 頭、牛 420 頭）について血清中のサルファ剤残留検査を行う一方、残留が認められたものについては、告示試験法または通知試験法（衛乳第 79 号.H5.4.1）に基づき食肉中の残留を検査した。

## 成 績

### 1 サルファ剤 4 剤 (SMMX, SDD, SMXZ 及び SDMX) の検量線及び添加回収実験

検量線は  $0.01\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.0\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で作成したところ、原点を通る良好な直線性 ( $r > 0.99$ ) を示した。添加回収実験は、豚及び牛血清 1ml に各薬剤を 0.1 及び  $1.0\mu\text{g}$  添加して行ったところ、いずれの薬剤も回収率 66~100% で変動係数 1.2~12.5% ( $n=5$ ) の比較的良好な成績が得られた。なお、本分析法における定量下限は、標準品と比較した吸収スペクトル (200~400nm) による確認同定 (一致度 0.98 以上) が可能な濃度とし、SMMX 及び SDD が  $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 、SMXZ が  $0.03\mu\text{g}/\text{ml}$ 、SDMX が  $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

## 2 と畜場搬入病畜におけるサルファ剤残留状況

豚では 1843 頭中 10 頭 (0.5%) の血清からサルファ剤 (SMMX: 9 頭、SDD: 1 頭) が検出され、このうち 7 頭の筋肉に残留 (SMMX: 6 頭、SDD: 1 頭) が認められた。牛では 420 頭中 4 頭 (0.9%) の血清からサルファ剤 (SDD: 2 頭、SMMX: 1 頭、SDMX: 1 頭) が検出され、このうち 3 頭の筋肉に残留 (SDD : 2 頭、SMMX: 1 頭) が認められた。また、上記サルファ剤以外に本分析法で分析可能なオキソリン酸 (OXA) が牛 1 頭の血清及び筋肉から検出された。これら HPLC における各種薬剤の検出状況と併せて実施した微生物学的検査（腎臓の直接法）の成績を表に、残留事例の代表的なクロマトグラムを図 1~図 6 に示した。

なお、聞き取り調査により、残留畜 15 頭中 14 頭で検出薬剤の投与歴が認められ、それら大半が出荷制限期間内に搬入されたものであった。

表 と畜場搬入病畜におけるサルファ剤並びにオキソリン酸検出事例					
検出薬剤	獣畜	検出濃度 (ppm)		直接法	
		血清	筋肉	腎臓	投与方法
SMMX	豚 (繁殖用)	0.12	—	—	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	0.13	—	—	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	0.15	—	—	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	0.51	0.29	+	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	0.56	0.20	—	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	1.03	0.44	+	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	1.35	0.18	+	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	1.55	0.55	+	飼料添加
SMMX	豚 (繁殖用)	2.65	2.10	+	飼料添加
SDD	豚 (肉用)	0.20	0.10	—	飼料添加
SDD	牛 (2 週齢)	0.96	0.82	—	ミルク添加
SDD	牛 (9 月齢)	4.35	2.12	—	ミルク添加
SMMX	牛 (6 歳)	0.03	0.04	—	手術部滴下
SDMX	牛 (5 ヶ月齢)	1.13	—	+	不明
OXA	牛 (1 ヶ月齢)	2.60	0.82	+	ミルク添加

+ : 1mm 以上の阻止帯形成、- : 阻止帯形成せず

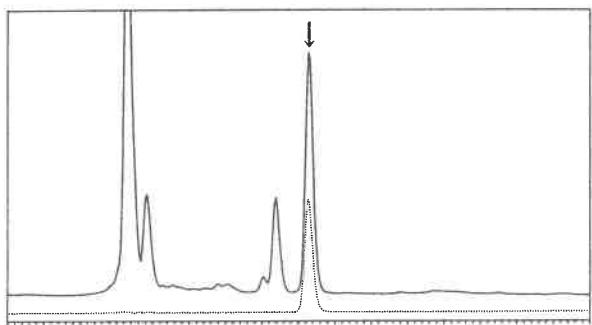


図1 SMMX(矢印)が検出された豚血清（実線）とSMMX 標準溶液（破線）のクロマトグラム

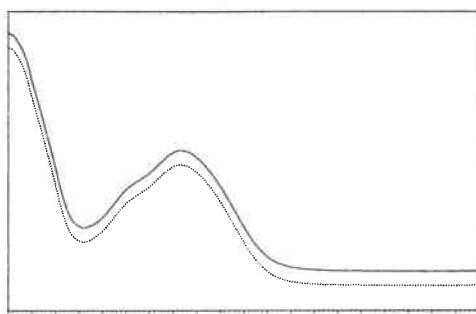


図2 4.16分(図1)におけるUV吸収スペクトル(200~400nm)

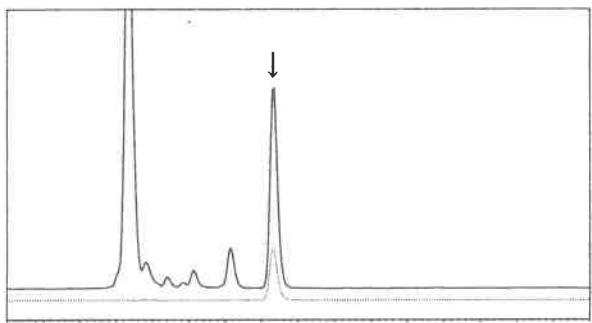


図3 SDD(矢印)が検出された牛血清(実線)とSDD 標準溶液（破線）のクロマトグラム

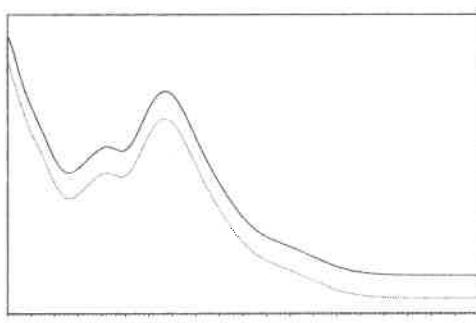


図4 3.68分(図3)におけるUV吸収スペクトル(200~400nm)

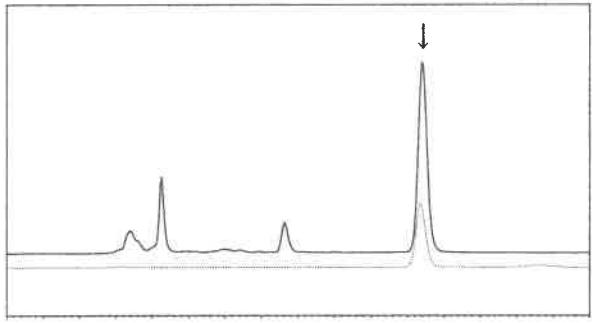


図5 OXA(矢印)が検出された牛血清(実線)とOXA 標準溶液（破線）のクロマトグラム

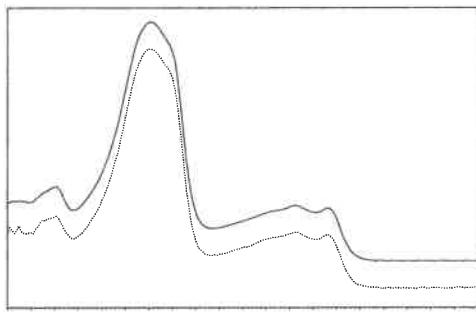


図6 5.68分(図5)におけるUV吸収スペクトル(200~400nm)

## 考 察

血清を用いた本分析法は、従来法に比べて短時間で行えることから年間数千頭に及ぶ検査も可能であり、食肉への残留事例の摘発に至ったことからも十分有効な方法と思われる。しかし、血中残留が確認されたものの大半が薬剤投与後およそ48時間以内のものであり、サルファ剤の血中濃度は比較的早期に低下し、投与後2~3日以上経過したものではHPLCの定量下限を下回る可能性も示唆された。食肉に残留するサルファ剤の血中モニターは、その迅速性において有効な方法と考えられる一方で、モニター効果の厳密な評価には、血中濃度と食肉残留量との経時的相関性についてさらに検討を加える必要があろう。