

原 著

豚筋肉及び腎臓における限外ろ過膜を用いた 動物用医薬品一斉分析法

中 郡 昭 人[†]

*秋田県食肉衛生検査所 (〒018-5141 鹿角市八幡平字川部内川原 62-1)

(2015年1月15日受付・2015年4月10日受理)

要 約

本研究では冷却抽出により脂肪分を取り除き、最適限外ろ過膜を適用して簡便で迅速な動物用医薬品の多成分分析法を開発することを目的とした。豚筋肉と豚腎臓へアセトニトリル 10ml を添加しホモジナイズ後遠心した。上清を水で 25ml に定容し、1ml を Amicon Ultra-2 に導入し分離後 LC/MS で測定した。添加回収試験 (0.01 µg/g) では、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン及びフェノブカルブでガイドラインの基準値に達しなかった。これら以外 42 種類の薬物では基準値以内であったことから、本分析法は動物用医薬品分析法として有用であると考えられた。

——キーワード：LC/MS, 豚筋肉・腎臓, 一斉試験法, 限外ろ過膜, 動物用医薬品。

-----日獣会誌 68, 311~315 (2015)

平成 18 年 5 月に食品中に残留する農薬、動物用医薬品及び飼料添加物についてポジティブリスト制度が施行され、残留基準値が設定されることになった。これに伴い、迅速で効率的な動物用医薬品の多成分分析法が求められている。厚生労働省では、公定試験法として畜水産物中残留農薬一斉試験法や個別試験法を通知している(厚生労働省医薬食品安全部長通知“食品に残留する農薬、飼料添加物または動物用医薬品の成分である物質の試験法について”平成 17 年 1 月 24 日、食安発第 0124001 号 (2005))。しかし、これらの試験法は作業が複雑で夾雑物が多く、測定結果のばらつきや機器への影響も大きいことが問題となっている [1-3]。本研究ではこれらの問題を解決すべく、簡便、迅速で夾雑物の少ない処理法を開発することを目的とした。

材 料 及 び 方 法

試料及び試薬：試料はあらかじめ残留動物用医薬品が陰性であることを確認した豚横隔膜筋及び腎臓を用いた。鋏で細切した試料 2.5g を、ポリプロピレン (PP) 製遠沈管 (50ml) に採取し、使用まで -30℃ で保存した。

標準品：2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール、

キシラジン、クレンプテロール、クロルスロン、チアムリン、トリクロロホン、ピリメタミン、ファミフル、フェノブカルブ、フロルフェニコール、リンコマイシンは動物用医薬品混合標準液 (PL-1-3, 和光純薬工業(株), 大阪) を使用した。オルメトプリム、トリメトプリム、ジアベリジン、スルフィソミジン、スルファジアジン、スルファピリジン、スルファメラジン、スルフィソゾール、スルファジミジン、スルファモノメトキシ、スルファメトキシピリダジン、スルファメトキサゾール、スルファドキシ、スルファトロキサゾール、スルファエトキシピリダジン、スルフィソキサゾール、スルファベンズアミド、スルファジメトキシ、スルファプロモメタジン、スルファニトランは PL 動物薬 (LC/MS Mix 1, 林純薬工業(株), 大阪) を使用した。エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、ダノフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、シプロフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、フルメキン、ピロミド酸、マルボフロキサシン、ミロキサシンは PL 動物薬 (LC/MS Mix 2, 林純薬工業(株), 大阪) を使用した。

その他の試薬：アセトニトリル、メタノール、水 (高速液体クロマトグラフィー用、関東化学(株), 東京)、ギ

[†] 連絡責任者：中郡昭人 (秋田県食肉衛生検査所)

〒018-5141 鹿角市八幡平字川部内川原 62-1

☎ 0186-32-2995 FAX 0186-32-2940

E-mail : Chuugun-Akihito@pref.akita.lg.jp

Sample 2.5 g (in 50 ml PP tube)
 | Add 10 ml of acetonitrile
 | homogenize
 | Centrifuge (10,000 xg, 20 min, -5 °C)
 Top
 | Adjust to 25 ml with water
 | Shake for 1 min
 1 ml
 |
 Ultrafiltration
 | Amicon Ultra-2
 | Centrifuge (5,000 xg, 20 min, 4 °C)
 Test solution for LC/MS

図1 Analytical procedure for veterinary drugs.

酸 (特級, 和光純薬工業(株), 大阪), 限外ろ過膜 (Amicon Ultra-2, Merck Millipore, U.S.A.) を使用した。

装置: 高速ホモジナイザー (ポリトロン PT10TSK, Kinematica, スイス), 遠心分離機 (ハイブリッド高速冷却遠心機 6200, 久保田商事(株), 東京), 高速液体クロマトグラフィー装置 (AQUITY e2960, Waters, U.S.A.), 質量分析装置 (3100, Waters, U.S.A.) を使用した。

LC 条件: カラムは XBridge C18 (2.1×150mm, i.d., 3.5 μm, Waters, U.S.A.) を使用し, カラム温度は 40°C, 注入量は 10 μl とした。移動相は A 液にアセトニトリル, B 液に水, C 液に 1% ギ酸を用いた。グラジェント条件は, A : B : C = 20 : 75 : 5 で溶出を開始し, 30 分間で A : B : C = 95 : 0 : 5 とし, 流速は 0.3 ml/min とした。

MS 条件: 測定モードは, 選択イオンレコーディング (SIR) モードとし, エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた。その他の条件は以下のとおりである。

- ・ネブライザーガス: 窒素ガス
- ・イオン源温度: 140°C
- ・デソルベーション温度: 350°C
- ・デソルベーションガス流量: 600 l/min
- ・コーンガス流量: 50 l/min
- ・スプレー電圧: ポジティブイオンモード 3.00 kV, ネガティブイオンモード -2.17 kV, (フロルフェニコール, クロルスロン, スルファプロモメタジン及び 2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾールはネガティブイオンモードで, その他の成分はポジティブイオンモードで測定した)

試験溶液の調整: -30°C で凍結保存しておいた試料 (50 ml/PP 遠心管入) へ, アセトニトリル 8 ml を添加し 1 分間ホモジナイズした。その後アセトニトリル 2 ml で

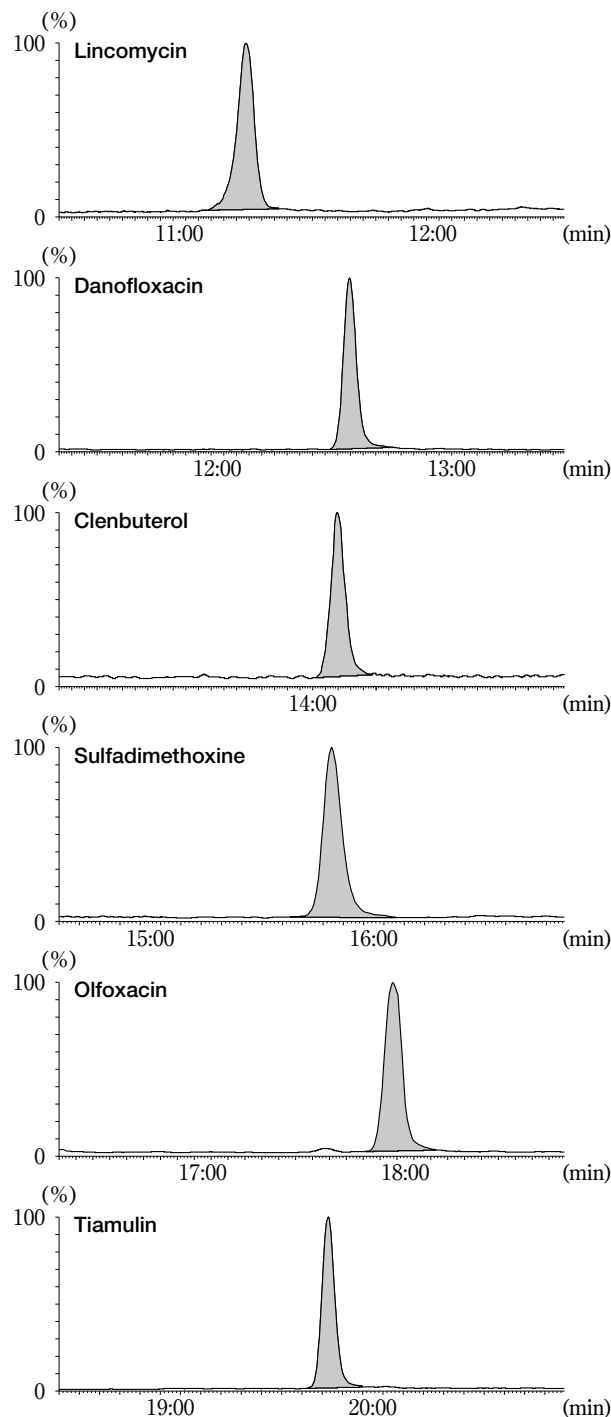


図2 Typical LC/MS chromatogram obtained from pig muscle spiked with veterinary drugs at 0.01 mg/g.

各グラフは豚筋肉標本における, リンコマイシン, ダノフロキサシン, クレムブテロール, サルファジメトキシシン, オルフォキサシン及びチアムリンの代表的な SIR クロマトグラムを示す。横軸は保持時間 (分), 縦軸は相対的存在量 (%) を示す。

ホモジナイザーの刃を共洗いし, 遠心管に加えた。10,000xg, 20 分間, -5°C で遠心分離後, 上清を水で 25 ml に定容した。十分に攪拌後, 1 ml を Amicon Ultra-2 に導入し, 5,000xg, 20 分間, 4°C で遠心分離

表 Recoveries of 45 veterinary drugs in pig muscle and kidney.

Veterinary drugs	Muscle			Kidney		
	Trueness* ¹ (%)	RSDr* ² (%)	RSDwr* ³ (%)	Trueness* ¹ (%)	RSDr* ² (%)	RSDwr* ³ (%)
2-Acetylamino-5-nitrothiazole	101.3	15.3	18.2	101.7	23.4	23.5
Ciprofloxacin	57.0* ⁴	15.3	21.9	58.3* ⁴	12.1	20.3
Clenbuterol	91.7	11.0	14.1	101.2	7.4	9.6
Clorsulon	91.9	13.1	19.1	91.8	7.4	11.2
Danofloxacin	73.2	13.2	19.6	80.0	9.6	15.8
Diaveridine	86.3	9.5	15.0	103.7	6.1	9.7
Difloxacin	89.1	11.5	11.8	107.3	10.6	11.2
Enrofloxacin	82.0	8.6	10.1	100.0	9.0	9.4
Famphur	100.5	9.4	10.3	108.7	21.5	25.6
Fenobucarb	98.2	9.7	11.0	65.8* ⁴	45.3* ⁴	55.2* ⁴
Florfenicol	93.1	17.7	28.6	104.3	14.4	14.5
Flumequine	99.7	7.4	8.2	106.0	13.3	15.7
Lincomycin	70.5	9.0	11.5	91.0	17.9	27.9
Marbofloxacin	70.4	10.7	15.1	85.8	7.3	12.5
Miloxacin	98.4	7.6	8.7	106.1	12.9	15.0
Nalidixic acid	87.2	6.9	8.4	99.7	9.0	9.7
Norfloxacin	56.5* ⁴	14.4	15.2	58.0* ⁴	9.6	16.7
Ofloxacin	96.0	10.9	11.1	106.3	14.0	16.4
Orbifloxacin	78.2	13.5	21.3	91.8	7.8	14.4
Ormetoprim	84.6	9.7	17.4	103.9	7.4	9.2
Oxolinic acid	83.7	12.6	17.3	109.2	5.9	12.0
Piromidic acid	94.0	7.7	8.2	102.0	13.6	16.1
Pyrimethamine	87.8	9.4	9.8	99.9	10.1	11.6
Sarafloxacin	70.6	14.8	22.4	83.2	10.2	16.0
Sulfabenzamide	89.1	8.2	13.2	106.1	8.3	8.8
Sulfabromomethazine	93.9	12.7	19.6	93.0	9.4	11.5
Sulfadiazine	87.7	8.4	9.7	102.3	9.5	10.2
Sulfadimethoxine	95.2	7.0	8.0	108.0	11.6	13.8
Sulfadimidine	94.7	8.9	8.9	102.7	12.5	14.7
Sulfadoxine	97.6	10.8	11.9	105.4	12.4	14.4
Sulfaethoxypyridazine	95.5	6.9	8.0	108.2	8.9	10.1
Sulfamerazine	96.0	11.9	12.4	100.8	12.1	13.7
Sulfamethoxazole	100.8	9.4	9.6	101.5	14.5	17.2
Sulfamethoxypyridiazine	94.7	8.3	8.6	111.1	13.8	16.4
Sulfamonomethoxine	97.5	10.5	11.5	106.6	10.4	12.0
Sulfanitran	109.4	12.8	14.8	104.6	20.8	24.2
Sulfapyridine	88.4	10.5	11.6	102.3	10.8	12.7
Sulfatroxazole	98.1	8.4	9.2	106.1	12.6	14.9
Sulfisomidine	93.9	9.3	12.7	100.1	6.6	9.9
Sulfisoxazole	99.2	8.0	9.1	105.2	12.0	14.2
Sulfisozole	103.3	7.0	7.2	107.5	12.9	15.3
Tiamulin	85.4	15.3	16.3	103.8	12.4	14.3
Trichlorfon	103.7	7.3	12.2	101.8	16.7	19.0
Trimethoprim	85.3	9.5	19.1	105.7	5.5	10.5
Xylazine	92.2	10.3	11.7	99.4	11.0	12.8

*1 : The mean recovery rates

*2 : RSD of repeatability

*3 : RSD of within-laboratory repeatability

*4 : Did not meet the criteria of the guideline

した上清 10 μ l を試験溶液とした (図 1).

値は 0.970 ~ 0.999 と高い直線性を示すことを確認した.

検量線 : 各標準品をメタノールで 20 倍希釈 (1 μ g/ml) したものを標準品原液とした. 検体の前処理を行った溶液を用いて 0.005, 0.01, 0.02, 0.025, 0.05 及び 0.1 μ g/ml の 6 濃度でマトリックス検量線を作成した. r^2

成 績

前処理法の検討 : 抽出には公定法の一斉試験法 I で使用されているアセトニトリルを用いた. ホモジナイズを

1 分間行い、質量の大きな物質を除去するため遠心分離した。その際、Kondo ら [2] の方法を取り入れ、10,000xg, -5°C, 20 分間の遠心分離を行った。精製は岡 [4] の報告をもとに、回収率が最も優れていた排除限界 10,000 の限外ろ過膜を使用した。これにより、各薬物とも特異的な単一性ピークを観察した (図 2)。

分析法妥当性評価：各標準品を、厚生労働省のガイドラインに基づき、一律基準値である 0.01 $\mu\text{g/g}$ を試料に添加し、回収試験を行った。同一の試料を 1 日 1 回 (2 併行)、5 日間実施する枝分かれ実験を行った。評価はガイドラインで規定されている、真度 70~120%、併行精度 25% 以下、室内精度 30% 以下で行った。真度では豚筋肉においてシプロフロキサシンとノルフロキサシンが、腎臓においてシプロフロキサシン、フェノブカルブ及びノルフロキサシンで基準値に達しなかった (表)。併行精度と室内精度では腎臓においてフェノブカルブの値が基準値よりも超過していた。それ以外の薬物では基準値以内であった (表)。

考 察

前処理法の検討：畜産物の試料中にはタンパク質や水分のほかに脂肪が多く含まれている。公定法では試料前処理における脂肪成分の除去にヘキサンを用いた液-液分配を用いているが、これらの操作のみでは脂肪分や夾雑物が十分に取り除けないことが報告されている [2, 5]。そこで本研究では抽出液の脂肪分を冷却により固形化し分離する方法を取り入れた [2]。これにより検体中の脂肪分はほぼ取り除かれ、夾雑ピークも少なくなった (未公開データ)。精製には操作法が簡便な限外ろ過膜を使用した。限外ろ過膜には排除限界によりさまざまな種類が存在する。また、メーカーによりろ過膜の形状が異なり、ろ過性能も異なっている。岡 [4] は、食肉中の抗生物質分析においてさまざまな排除限界の限外ろ過膜を比較し、排除限界 10,000 の製品が最も回収率が優れていたと報告している。また、Ultrafree (Merck Millipore, U.S.A.) と Microcon (Microcon Technologies Inc., カナダ) の比較では、Ultrafree で良好な回収率を観察した [4]。そこで本研究では Ultrafree 製品の後続品である Amicon Ultra (排除限界：10,000) を使用した。

添加回収試験：45 種類の動物用医薬品を豚試料に添加し、回収試験を行った結果、回収率がガイドラインの基準値に達しなかった薬物は筋肉、腎臓ともにシプロフロキサシンとノルフロキサシンであった。ESI 法を用いた MS 測定では、イオン化の過程で試験溶液中に含まれるマトリックスにより修飾を受け、測定値が影響を受けるといわれている [6-8]。本研究では各薬物の標準液を前処理液で希釈したマトリックス検量線を使用して

いるので、これら 2 薬品の回収率低下がマトリックス効果である可能性は低いと推察される。一方、梶田ら [9] は牛肉試料において、ニューキノロン系抗菌剤は精製過程でろ過膜へ吸着されてしまうため、回収率が低いと報告をしている。また農産物中の農薬分析において、Ultrafree 製品による前処理で 83 種類の農薬のうち 18 種類で回収率が低下したが、これは膜への吸着が原因であると報告されている [10]。これにより、本研究で観察されたニューキノロン系抗菌剤 2 薬物の回収率低下も、ろ過膜への吸着が原因であると考えられた。また、豚腎臓ではフェノブカルブの回収率、併行精度及び室内精度のすべてが基準値に達しなかった。この原因は、同様に膜への吸着によるものである可能性も推察される。しかし、併行精度と室内精度にも影響があったことから、個々の測定値に大きなばらつきが存在していたと考えられるので、他の要因が関与していると思われる。

本研究は 42 種類の動物用医薬品を、ホモジナイズと遠心分離という簡易かつ迅速な方法で一斉分析可能であることから、畜産物中の動物用医薬品分析法として有用であると考えられた。

引 用 文 献

- [1] Iijima Y, Saegusa K, Ito T, Anjo T, Matsuki Y, Nambara T : Simultaneous determination of anabolic compounds in beef by capillary GC/MS, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 33, 164-170 (1992)
- [2] Kondo T, Kaburagi Y, Shibata M, Kurokawa C, Inoue Y, Yamamoto Y, Miyazaki M : New Clean-up method with dispersive solid-phase extraction for simultaneous determination of pesticide residues in livestock products by GC-MS/MS, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 53, 75-84 (2012)
- [3] Oka H, Ito Y, Ikai Y : Use of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Food Analysis, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 42, 159-173 (2001)
- [4] 岡 尚男 : LC/MS/MS による食肉中のテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の同時分析, *SCAS NEWS*, 2007-1, 3-6 (2007)
- [5] Yamaguchi T, Kakimoto K, Nagayoshi M, Nagayoshi M, Yamaguchi M, Okihashi M, Kajimura K, Yamamoto Y : Simultaneous determination of veterinary drugs in livestock products using dispersive and cartridge column solid-phase extraction by LC-MS/MS, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 54, 290-297 (2013)
- [6] Côté C, Bergeron A, Mess JN, Furtado M, Garofolo F : Matrix effect elimination during LC-MS/MS bio-analytical method development, *Bioanalysis*, 1, 1243-1257 (2009)
- [7] Ghosh C, Shinde CP, Chakraborty BS : Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis, *J Chromatogr B*, 893-894, 193-200 (2012)
- [8] Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR :

- Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J Chromatogr B*, 852, 22-34 (2007)
- [9] Kajita H, Hatakeyama E : Simultaneous determination of residual veterinary drugs in livestock products and fish by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49, 381-389 (2008)
- [10] Hatakeyama E, Kajita H, Sugawara T, Sasaki A, Takahashi S, Komukai T : Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by LC/MS/MS using clean-up with ultrafiltration, *Syokuhin Eiseigaku Zasshi*, 47, 137-145 (2006)

Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Pig Muscle and Kidney Using
Liquid Chromatography/Mass Spectrometry with Ultrafiltration

Akihito CHUGUN[†]

*Akita Prefectural Meat Hygiene Inspection Office, 62-1 Kawabe Uchikawahara, Hachimantai,
Kazuno City, 018-5141, Japan

SUMMARY

A rapid, simple cleanup method using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) was developed for the determination of veterinary drugs in pig muscle and kidney using freeze extraction and ultrafiltration. The samples were extracted with acetonitrile and cleaned using ultrafiltration. The recovery rates for the 45 drugs from the pig preparation (0.01 $\mu\text{g/g}$) were examined. The 42 drugs met the required validation guidelines. These results indicate that this method may be useful for the simultaneous determination of veterinary drugs in livestock products.

— Key words : LC/MS, pig muscle and kidney, simultaneous determination, ultrafiltration, veterinary drugs.

[†] Correspondence to : Akihito CHUGUN (Akita Prefectural Meat Hygiene Inspection Office)

62-1 Kawabe Uchikawahara, Hachimantai, Kazuno City, 018-5141, Japan

TEL +81-186-32-2995 FAX +81-186-32-2940 E-mail : Chuugun-Akihito@pref.akita.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 311 ~ 315 (2015)