

原 著

豚筋肉及び腎臓におけるガラスビーズを用いた
動物用医薬品迅速一斉分析法中 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4月21日受付・2015年7月27日受理)

要 約

本研究はガラスビーズで一斉抽出を行い、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。フードプロセッサーで粉碎した豚筋肉と豚腎臓にアセトニトリルとガラスビーズを添加し、高速振とう後遠心した。上清を水で定容し、ヘキサソール層後分離、ろ過したものをLC/MSで測定した。添加回収試験 (0.01 µg/g) では、豚腎臓でノルフロキサシン、シプロ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：ガラスビーズ, LC/MS, 豚筋肉・腎臓, 一斉試験法, 動物用医薬品.

-----日獣会誌 68, 587~591 (2015)

動物用医薬品は、ポジティブリスト制度が施行され (平成18年5月)、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 (公定法) を通知している (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 (2005))。さらに、平成22年12月には食品中の残留農薬等の検査法について、妥当性のガイドラインに基づき評価を行うことが求められている (食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について 平成22年12月24日 (2010))。しかし、この試験法は作業が複雑で作業時間も長く、妨害成分の影響も残されており回収率も低いことが問題となっている [1-6]。本研究ではガラスビーズを用いて一斉ホモジナイズ抽出を行い、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。フードプロセッサーにより粉碎し均一化した試料

2.5 g をポリプロピレン (PP) 製遠沈管 (50 ml) 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、フロルフエニコール、リンコマイシン

Sample 2.5 g (in 50 ml PP tube)

Add glass beads 2.5 g with 10 ml of acetonitrile
Shake for 20 min
Centrifuge (3,000 x g, 20 min, -5℃)

Top

Adjust to 25 ml with water
Add 5 ml of hexane
Centrifuge (5,000 x g, 20 min, -5℃)

Acetonitrile and water layer

Filtration (0.2 µm)

Test solution for LC/MS

図 Analytical procedure for veterinary drugs

[†] 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

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, オキサリニック酸, オフロキサシ, オルビフロキサシ, ダノフロキサシ, サラフロキサシ, ジフロキサシ, シプロフロキサシ, ナリジクス酸, ノルフロキサシ, フルメキン, ピロミド酸, マルボフロキサシ, ミロキサシは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, ヘキサン (高速液体クロマトグラフィー用, 関東化学(株), 東京), ギ酸 (特級, 和光純薬工業(株), 大阪), ガラスビーズ (BZ-1, アズワン(株), 大阪), フィルター (Minstart RC 4, sartorius, Germany) を使用した.

装置: 高速振とう機 (SA31, ヤマト科学(株), 東京), フードプロセッサー (KC-D609, ツインバード工業(株), 新潟), 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: 分析カラム (XBridge C18; 2.1×150 mm, i.d., 3.5 μm, Waters, U.S.A.) を使用し, カラム温度は40℃, 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=0:95:5で溶出を開始し, 27分間でA:B:C=73.3:21.7:5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. 測定は市販ソフト (MassLynx software Ver. 4.1, Waters, U.S.A.) を用い, 各標準品で最適な条件により解析した (表に解析した各標準品の分子量を示す). 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℃
- ・デソルベーション温度: 350℃
- ・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: 試料を入れた遠心管に, アセトニトリル 10 mlとガラスビーズ 2.5 gを添加し1分間ホモジナイズした. 高速振とう機を用い, 最大速度で20分間振とう後 3,000 x g, 20分間, -5℃で遠心した. 上清に水を加えて 25 mlに定容し, アセトニトリル飽和ヘキサン 5 mlを上層して 5,000 x g, 20分間, -5℃で遠心した. 上層のヘキサンを吸引除去後, 1 mlをフィルター (0.2 μm) でろ過し, 試験溶液とした (図).

検量線: 各標準品をアセトニトリルで20倍希釈 (1 μg/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 μg/ml の6濃度でマトリックス検量線を作成した. r^2 値は 0.965~0.999 と高い直線性を示すことを確認した.

分析法妥当性評価: 各薬物を, 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 μg/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.

成 績

前処理法の検討: 検体をフードプロセッサーで粉碎して均一化した後, ガラスビーズで振とう・抽出した. 試料中の脂肪分除去の目的で-5℃, 20分間の冷却遠心分離を行った. 試料の精製はヘキサンを用いて行った. 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 (表に保持時間を示す).

分析法妥当性評価: 真度では豚筋肉においてシプロフロキサシ, 腎臓においてシプロフロキサシ, ノルフロキサシ及びフェノブカルブで基準値に達しなかった (表). 併行精度と室内精度ではすべての薬物で基準値以内であった (表).

考 察

前処理法の検討: 厚生労働省で通知されている公定法では, 1検体ずつホモジナイズを行っている. この際, 高速ホモジナイザーのシャフトは検体ごとの洗浄が必須になり, 検体数が多くなると煩雑な作業になる. そこで本研究ではガラスビーズを使用し, 多検体を一斉にホモジナイズする方法を検討した. 初めに, 細切した筋肉へアセトニトリルとガラスビーズを加えて高速振とうを行ったが, 肉片の粉碎はできず抽出は不可能であった.

表 Recoveries of 45 veterinary drugs to pig muscle and kidney

Compound	Retention time (min)	Calculate exact mass	Muscle			Kidney		
			Trueness ^{*1} (%)	RSDr ^{*2} (%)	RSDwr ^{*3} (%)	Trueness ^{*1} (%)	RSDr ^{*2} (%)	RSDwr ^{*3} (%)
2-Acetylamino-5-nitrothiazole	15.9	185.85	79.6	4.8	7.7	71.3	3.3	12.9
Ciprofloxacin	12.3	331.97	60.3	8.6	14.1	61.6	3.3	11.0
Clenbuterol	14.0	276.98	78.2	7.3	7.9	80.0	2.8	10.8
Clorsulon	17.6	377.74	79.2	9.8	10.5	81.8	4.5	7.9
Danofloxacin	12.6	357.99	70.7	6.8	7.4	71.2	2.2	8.1
Diaveridine	11.3	260.97	73.2	6.6	7.5	75.3	3.3	11.4
Difloxacin	14.0	399.98	83.3	5.8	9.1	88.1	1.5	13.4
Enrofloxacin	13.0	360.00	78.7	6.1	6.9	82.5	1.2	7.7
Famphur	25.1	325.93	77.5	8.4	9.6	76.5	2.5	8.8
Fenobucarb	25.3	208.30	70.3	10.9	12.1	50.1	8.6	12.1
Florfenicol	16.2	355.78	80.7	5.4	7.3	81.9	1.3	10.0
Flumequine	16.8	261.92	90.5	4.7	5.6	93.2	3.6	6.6
Lincomycin	11.2	407.05	72.5	9.9	10.9	83.4	1.2	12.6
Marbofloxacin	11.7	362.98	73.0	9.0	9.5	76.0	1.6	10.3
Miloxacin	16.6	263.88	80.8	5.2	6.4	76.4	7.1	14.7
Nalidixic acid	15.9	232.93	76.5	5.1	6.3	80.0	2.4	4.3
Norfloxacin	12.0	319.97	72.7	8.2	13.7	63.6	5.3	9.2
Ofloxacin	18.0	310.95	84.1	6.2	10.0	89.9	5.2	10.7
Orbifloxacin	13.3	395.99	79.3	7.3	10.1	78.6	1.8	13.3
Ormetoprim	12.5	274.98	75.0	6.9	9.5	76.9	3.6	14.2
Oxolinic acid	11.3	201.90	73.2	8.1	15.1	74.6	4.9	8.7
Piromidic acid	22.0	288.96	77.4	6.7	8.3	74.2	4.2	8.1
Pyrimethamine	15.9	248.92	70.5	2.3	2.7	71.3	3.8	4.5
Sarafloxacin	13.9	385.90	72.2	6.4	12.5	73.5	4.2	12.2
Sulfabenzamide	14.0	276.90	79.8	7.7	8.5	79.8	4.3	8.7
Sulfabromomethazine	17.6	379.86	80.5	5.4	8.9	81.8	2.3	9.7
Sulfadiazine	15.9	250.89	70.7	3.7	4.0	70.8	4.1	6.3
Sulfadimethoxine	15.8	310.91	86.2	5.4	6.5	88.4	3.8	7.8
Sulfadimidine	13.5	278.98	86.3	7.5	9.2	84.6	3.5	12.3
Sulfadoxine	14.7	280.90	88.5	5.7	13.5	89.4	4.3	6.0
Sulfaethoxypyridazine	16.2	294.92	85.2	6.0	10.4	90.9	4.5	9.6
Sulfamerazine	12.3	264.97	85.4	8.4	14.6	90.7	3.1	14.3
Sulfamethoxazole	15.9	254.02	89.8	5.3	7.1	89.8	2.9	11.2
Sulfamethoxypyridiazine	18.0	310.91	84.4	5.3	6.0	87.1	4.5	7.7
Sulfamonomethoxine	14.8	280.90	86.6	7.0	10.1	85.0	5.1	10.8
Sulfanitran	20.6	335.96	88.8	5.3	5.8	84.1	3.6	4.7
Sulfapyridine	15.9	250.92	70.3	2.3	3.3	72.0	4.9	5.0
Sulfatroxazole	16.2	267.97	84.6	6.4	6.5	89.9	3.7	8.7
Sulfisomidine	10.2	278.92	88.1	6.9	14.4	83.2	2.1	17.7
Sulfisoxazole	16.2	267.97	81.2	7.2	8.4	84.7	2.4	9.3
Sulfisozole	13.7	239.88	88.5	5.0	11.6	86.3	1.7	10.7
Tiamulin	19.7	494.16	77.2	9.9	11.2	80.4	4.9	12.9
Trichlorfon	14.4	256.83	80.7	10.1	13.6	81.7	4.3	8.8
Trimethoprim	11.9	290.98	75.9	5.8	7.9	82.1	3.0	8.9
Xylazine	13.9	221.01	75.1	4.2	4.3	71.9	4.5	8.8

*1 : The mean recovery rates

*2 : RSD of repeatability

*3 : RSD of within-laboratory repeatability

■ : Did not meet the criteria of the guideline

そこでフードプロセッサーを用いて試料を事前に粉砕したものにガラスビーズを加えて振とうすることにより抽出が可能になったのでこれを使用した。ガラスビーズの量は多すぎても少なすぎても適正なホモジナイズが行えなかった。試料と同量のガラスビーズを加えると確実な

ホモジナイズが行われたためこれを採用した(未公開データ)。(一財)食品薬品安全センターの外部精度管理用検体を用い、通常のホモジナイザーによる方法とガラスビーズによる方法でスルファジミジン量を比較した。それぞれ $0.11 \pm 0.007 \mu\text{g/ml}$ ($n=4$) と $0.12 \pm 0.006 \mu\text{g/}$

ml (n=4) でほぼ変わらない値であり、ガラスビーズを用いた抽出方法でも測定可能であると推察された。さらに前処理の処理時間も大幅に短縮することができた(公定法 I : 約 3 時間, 本研究 : 約 1.5 時間)。また、動物試料を扱う際に問題になる脂肪成分の除去には、公定法で行われているヘキサンを用いず、冷却遠心分離法 (-5°C, 20 分間) を用いた。これは冷却遠心分離により脂肪を固化し分離する方法で、既報においてヘキサンを使用した方法よりも回収率が優れていたため採用した [4, 6]。検体の精製方法には固相抽出法 [7-10] や分散固相抽出 [4, 5, 11] などさまざまな方法があるが、本研究ではアセトニトリル-ヘキサンによる液-液分配法 [12] の回収率が最も優れていたためこれを採用した(未公開データ)。

添加回収試験：動物用医薬品 45 種類を試料に添加し、回収試験を行った。回収率がガイドラインの基準値に達しなかった薬物は豚筋肉でシプロフロキサシン、腎臓でシプロフロキサシンとノルフロキサシン及びフェノブカルブであった。キノロン系の薬物は逆相クロマトグラフィー用カラムで測定すると、充填剤中の金属イオンとキレートを形成しピークがテーリングすることが知られている [8, 13]。また、フルオロキノロン剤やスピラマイシン剤は数%から数十%の範囲でガラスに吸着することが報告されている。これらのことが原因でシプロフロキサシンとノルフロキサシンの回収率が低くなったと考えられる。さらに筆者 [6] の既報では、今回と同様に豚腎臓でシプロキサシン、ノルフロキサシン及びフェノブカルブの回収率が基準値に達していなかった。これは使用カラムが同一であることから、カラムの特性でこれらの薬物の回収率が低くなっている可能性も推察された。また、田沢らは牛、豚及び鶏筋肉を使用した添加回収試験で、ノルフロキサシンとシプロフロキサシンの回収率が 50% 台であることを報告している。さらに、畑野 [8] は、ウナギ蒲焼においてキノロン剤の回収率が 60% 台であると述べている。本研究でもこれら 2 つの薬剤の回収率は 60% 台であり、併行精度と室内精度は基準値内であることから、残留分析法として評価できると推察された。

本研究は豚筋肉では 44 種類、腎臓では 42 種類の動物用医薬品を、簡易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] 飯嶋美子, 三枝克彦, 伊東富晴, 安生孝子, 松木容彦, 南原利夫: キャピラリー GC/MS による牛肉中のタンパク同化剤の一斉分析, 食衛誌, 33, 164-170 (1992)
- [2] 藤田瑞香, 田口 修, 尾花裕孝: ガラスビーズ粉砕法を用いた LC/MS/MS による畜水産食品中のサルファ剤の分析, 食衛誌, 49, 411-415 (2008)
- [3] 吉田絵美子, 渋谷孝博, 黒川千恵子, 井上 豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法の検討, 食衛誌, 52, 59-65 (2011)
- [4] 近藤貴英, 蕪木康郎, 柴田雅久, 黒川千恵子, 井上 豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 分散固相抽出および多機能カラムを用いた GC-MS/MS による畜産物中の残留農薬一斉分析法, 食衛誌, 53, 75-84 (2012)
- [5] 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 起橋雅浩, 梶村計志, 山本容正: 分散固相および固相カートリッジカラムを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法, 食衛誌, 54, 290-297 (2013)
- [6] 中郡昭人: 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, 日獣会誌, 68, 311-315 (2015)
- [7] 畑野和広: LC/MS/MS による動物組織中のペニシリン系抗生物質の同時定量, 食衛誌, 44, 1-6 (2003)
- [8] 畑野和広: LC/MS/MS による食品中のキノロン剤の同時定量, 食衛誌, 45, 239-244 (2004)
- [9] 吉田絵美子, 渋谷孝博, 黒川千恵子, 井上 豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 乳および乳製品中のテトラサイクリン系抗生物質を含めた動物用医薬品一斉分析の検討, 食衛誌, 50, 216-222 (2009)
- [10] 岩越景子, 田村康宏, 大塚健治, 富澤早苗, 八巻ゆみこ, 増淵珠子, 中川由紀子, 増田諒子, 佐藤千鶴子, 笹本剛生, 高野伊知郎: LC-MS/MS を用いた農産物中残留農薬の迅速試験法に関する検討, 食衛誌, 55, 254-260 (2014)
- [11] 山口瑞香, 柿本健作, 山口貴弘, 尾花裕孝: LC-MS/MS による畜産物中のポリエーテル系抗生物質およびマクロライド系駆虫薬の一斉分析, 食衛誌, 52, 281-281 (2011)
- [12] 井之浩一, 吉見幸子, 日野知証, 岡 尚男: LC/ESI-MS/MS による畜水産物中の大環状ラクトン寄生虫駆除剤の一斉分析法, 食衛誌, 51, 1-9 (2010)
- [13] Samuelsen OB: Simple and rapid method for the determination of flumequinone and oxolinic acid in salmon (*Salmo salar*) plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, J Chromatogr, 530, 452-457 (1990)

Quick Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Pig Muscle
and Kidney Using Glass Bead Homogenization

Akihito CHUGUN[†]

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

SUMMARY

A quick and simple method involving glass beads for the simultaneous determination of veterinary drugs in pig muscle and kidney using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) was developed. Samples were extracted with acetonitrile, homogenized using glass beads, and cleaned with hexane. The recovery rates for 45 drugs from the pig preparation were examined. Forty-two drugs met the required validation guideline in pig kidney preparation. These results indicated that the present analysis was useful for rapid screening of veterinary drugs in livestock products.

— Key words : glass beads, LC/MS, pig muscle and kidney, simultaneous determination, 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, 587 ~ 591 (2015)
