

() 除タンパクフィルターを利用した動物用医薬品の迅速分析法

郡山市食肉衛生検査所 ○青柳美奈子、伊名田健二、齊藤浩二
大越憲幸、宮崎雅人

はじめに

当所では全部廃棄とならなかった病畜（牛）に対し、残留抗菌剤スクリーニング検査としてプレミテスト（DSM Premi Test B.V. 製/アヅマックス（株）輸入・販売）を実施し、プレミテスト陽性時には当所で検出可能な薬剤（32 物質）について LC/MS/MS による定量試験を行っている。当所の LC/MS/MS 分析は令和 5 年度当初、合成抗菌剤（計 25 薬剤）と TC 系・PC 系等（計 7 薬剤）で抽出に係る前処理や機器分析用の移動相が異なっていた。そのため 1 日 1 系統の検査が限界で、仮に 2 系統の分析を行う場合最大 3 日程度を要し、保留期間が長期化する問題が生じる。さらに当所現行の試験項目にはモネンシン等の抗菌性飼料添加物が入っておらず、試験項目の拡充も課題となっていた。

今回、これまで検査対象にしてきた 32 物質に、動物医薬品検査所が公表している各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高および販売量を参考にアモキシシリン、タイロシン、チアムリン、チルミコシン、フェンベンダゾール、リンコマイシン、クエン酸モランテル、さらに抗菌性飼料添加物ラサロシド、モネンシンの 9 物質を加えた計 41 物質について、抽出前処理操作の検討と LC/MS/MS に係る分析条件の見直しを行ったところ良好な結果が得られたので報告する。

材料および方法

1. 試料 あらかじめ動物用医薬品が検出されないことを確認した牛の筋肉
2. 試薬等 超純水、アセトニトリル、メタノールおよびギ酸：LC/MS 用、n-ヘキサンおよびジメチルホルムアミド：HPLC 用、その他：Captiva ND Lipids（アジレント・テクノロジー（株）製）
3. 標準溶液 各標準品を力価 10.0mg になるよう正確に秤量しメタノールまたはジメチルホルムアミドに溶解、1,000ppm になるよう調製したものを標準原液とした。さらにこれらを混合し、アセトニトリル：水（8:2）で添加回収試験用標準溶液を作製した。
4. 装置および分析条件 表 1 のとおり。

表1.装置および分析条件

LC部	Waters社製 ACQUITY Premier		
MS部	Waters社製 Xevo TQ-S micro		
カラム	Waters社製 ACQUITY PREMIER HSS 1.8μ 2.1×100mm		
カラム温度	40℃		
サンプル温度	15℃		
注入量	5μL		
流速	0.4mL/min		
移動相	A液	0.1%ギ酸水	
	B液	0.1%ギ酸含有メタノール	
グラジエント条件	Time(min)	A液(%)	B液(%)
	1~3	99	1
	3~20	1	99
	30	1	99
	30.1	99	1
	35	99	1

5. 試験溶液の調製

図1に示す。筋肉を5gに秤量し、混合標準溶液を0.01ppmとなるよう添加した。抽出にはサンプル前処理用フィルターとして、タンパク質、リン脂質、脂肪除去効果がある Captiva ND Lipids を用い、精製した。

6. 抽出溶媒の検討

抽出溶媒はアセトニトリル
80mL：ギ酸 1mL を基本として、水を5、7、10、12mLそれぞれ加えたものについて動物用医薬品混合標準溶液を用い、0.01ppmとなるよう試料に加えて添加回収試験を行い、最適な水の添加量を検討した。

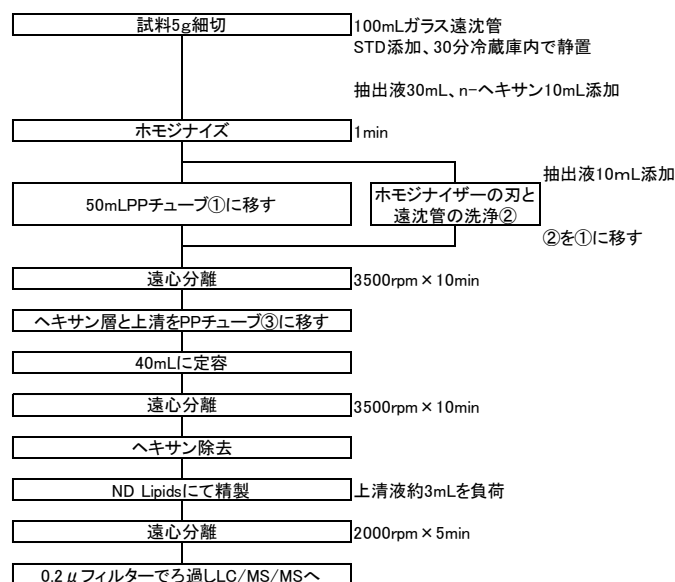


図1.試験溶液の調製

成績

分析条件について移動相 B に 0.1%ギ酸含有アセトニトリルを使用した場合、ラサロシドは測定不能であった。一方 0.1%ギ酸含有メタノールでは 41 成分すべて測定可能となった。

抽出溶媒を検討した結果、添加する水の量を 10mL とすることで全ての物質の真度が 70～120%を示し、最良の結果となった。平成 22 年度厚生労働省通知「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」に従い併行精度、室内精度を評価した結果、低濃度のみの評価とはなるが、マトリックス検量線を使用した場合、全ての物質で真度、精度ともに目標値を満たした（表 2）。

また、アモキシシリン、チルミコシン、クエン酸モランテルにおいては 2 峰性を示すなどピーク形状が不良であったが、定量性に問題はなく、今回検討したすべての物質について妨害ピーク等も認められなかった。

考察及びまとめ

本調査では、当所で以前から課題となっていた動物用医薬品検出に係る LC/MS/MS の移動相の統一が図れた。さらにこれまでの試験項目に販売量の多い物質や抗菌性飼料添加物を加えたことで、より当所の実情に即した検査が可能となった。検査対象とした TC 系、PC 系、セフェム系、合成抗菌剤、抗菌性飼料添加物等が前処理及び機器設定で約 3 時間、定量までも 6 時間程度で実施可能となったため、プレミテストの陽性判定後に必要な検査を迅速に行えるようになった。抽出工程に時間を要する減圧乾固操作を含む場合や、動物用医薬品の系統別に検出操作を行う機関も多いと思慮される中、上記の動物用医薬品が一

斉に分析可能であり、かつ妥当性を確認できた本検査法は、迅速検査法として有用である
と考える。

今回の検討では一律基準値での残留検出を念頭に置き、低濃度（0.01ppm）での添加回収
試験を行った。今後は高濃度での添加回収試験を実施するとともに、ピーク形状が不良で
あった一部の動物用医薬品について、カラムの変更等、分析条件の検討継続を予定してい
る。また検査項目についても農政サイドに確認するなどして可能な限り使用実態に近い検
査ができるよう努めていきたい。

表2.妥当性評価

	物質名	m/z			真度(%)		精度 (RSD%)	
		* (ESI-)			検量線		併行	室内
		親イオン	定量用	定性用	絶対	マトリックス		
1	2-Aminofulubendazole	255.9	94.9	122.9	95.5	93.4	9.65	5.84
2	Amoxicillin	365.9	113.8	349	67.3	72.9	3.35	3.08
3	Ampicillin	350.0	105.9	160	83.4	83.5	4.57	7.45
4	Azaperol	330.1	121	149	109.1	99.5	5.72	13.29
5	Azaperone	328.1	122.9	165.0	105.5	99.6	8.46	8.85
6	Benzylpenicillin	* 333.1	74	192	69.3	84.4	5.70	7.00
7	Cephazolin	455.0	156	323	75.9	75.1	12.14	13.58
8	Chlortetracycline	479.1	154	444.1	51.1	72.4	6.91	11.97
9	Ciprofloxacin	332.1	245.1	288.1	88.3	84.2	4.72	9.39
10	Danofloxacin	358.1	82	340.1	89.6	93.7	5.58	7.62
11	Doxycycline	445.1	97.9	154	54.1	81.8	10.45	12.33
12	Enrofloxacin	360.2	316.2	342.1	96.8	96.5	4.45	8.06
13	Fenbendazole	300.0	159	268	81.5	93.1	3.84	6.58
14	Florfenicol	* 355.96	185	336	85.1	99.1	11.09	15.70
15	Flubendazole	314.1	122.9	282	88.8	96.4	3.51	7.24
16	Lincomycin	407.0	126	359	103.4	92.3	6.60	9.36
17	Lasalocid	591.0	337	(親608) 237	99.3	94.9	7.30	11.38
18	Monencin	693.4	461	675	92.0	90.1	8.58	11.64
19	Morantel	221.1	111	123	101.0	96.3	3.59	7.88
20	Naldixic Acid	233.1	186.94	215	101.0	97.1	5.03	7.70
21	Norfloxacin	320.0	233	302	102.9	99.5	7.98	12.57
22	ThiabendazoleM	218.15	147	191	90.8	84.2	10.13	17.41
23	Ormethoprim	275.13	122.9	259.1	104.1	101.7	4.85	7.79
24	Oxolinica Acid	262.07	159.9	244.0	98.6	95.3	4.86	7.57
25	Oxytetracycline	461.14	426.1	443.3	78.9	77.2	6.47	6.78
26	Pyrimethamine	249.09	176.9	233.0	101.4	97.9	4.65	7.68
27	Sulfadimethoxine	311.1	92	156	101.2	99.4	4.59	8.23
28	Sulfadimidine	279.1	64.7	92	107.0	101.0	5.59	7.99
29	Sulfadoxine	311.2	92	156	101.0	96.5	4.44	7.38
30	Sulfamerazine	265.07	64.7	91.8	95.8	91.3	5.37	10.35
31	Sulfamethoxazole	254.03	91.8	155.9	77.8	94.2	5.12	8.14
32	Sulfamonomethoxine	281.06	91.8	155.9	102.5	100.5	5.29	8.86
33	Sulfaquinoxaline	301.05	91.8	155.9	99.8	96.1	3.78	7.02
34	Tetracycline	445.14	154.1	410.1	56.8	77.4	2.53	8.97
35	Thiabendazole	202.09	130.9	175	101.0	96.9	6.32	8.55
36	Thianphnicol	* 354	79	185	80.8	79.4	5.71	13.49
37	Tiamulin	494.2	119	192.1	106.9	101.6	5.02	7.58
38	Tilmicosin	435.5	88	(親869.5) 174	119.3	105.1	6.99	8.18
39	Trimethoprim	291.12	122.9	230	102.2	98.6	7.21	8.68
40	Tylosin	917	101	174	93.6	98.1	3.33	8.83
41	Xylazine	221.15	89.8	164	99.2	97.5	3.30	6.91

参考文献

- 〔１〕 “各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量”，令和４年動物
用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報，2022，動物
医薬品検査所