

動物用医薬品一斉分析

(キノロン剤・サルファ剤・マクロライド・ホルモン剤)
(全自動固相抽出装置ST-L400)

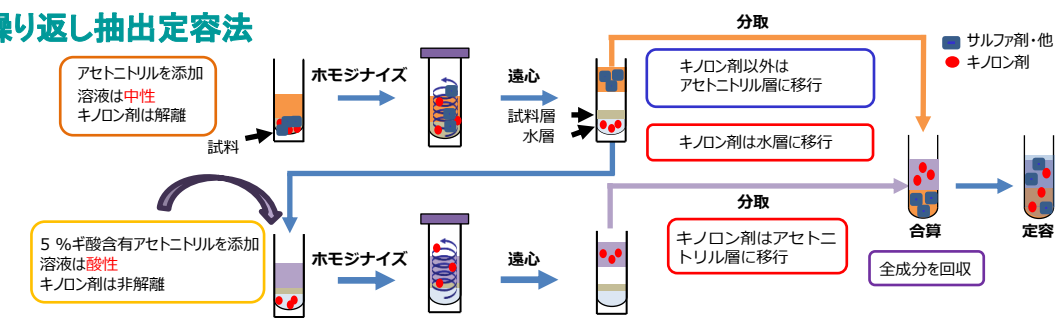


全自動固相抽出装置
ST-L400
 For STQ Method

はじめに

アプリケーションノートAS190602に引き続き動物用医薬品分析の対象試料を拡大しました。物性の異なる成分を分析するため下記の「繰り返し抽出定容法」がポイントとなります。本アプリケーションではサルファ剤、キノロン剤、ホルモン剤、マクロライドの計46成分について鶏ささみ、豚ヒレ肉、牛ヒレ肉、牛乳、鶏卵、加工品（鶏唐揚）を用いた添加回収試験の結果を示します。

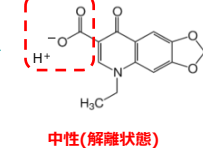
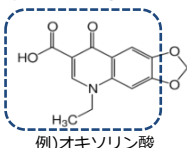
繰り返し抽出定容法



※キノロン剤について

4-キノロンを基本骨格にもつ化合物で、その骨格の中に-COOH基をもつため中性では解離し、酸性では非解離となります。

キノロン剤基本骨格



前処理フロー

予冷式ドライアイス凍結粉砕(牛乳、鶏卵を除く)

試料 5g 採取

- 2ppm混合標準溶液 25 μ L
- 水 (鶏: 1.25mL, 豚: 1.25mL, 牛: 1.75mL, 鶏卵: 1.25mL, 鶏唐揚: 3.00mL)
- アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ(13,000rpm 1分間)

- 塩化ナトリウム 0.5g
- 無水硫酸マグネシウム 2g

攪拌(手で振とう 1分間)

遠心分離 (3,500rpm 5分間)

アセトニトリル層① 残さ(試料層・水層)

①②合算

定容 20mL (アセトニトリルで調整)

【抽出のポイント】

アセトニトリル(中性)でキノロン剤以外の成分を、5%ギ酸含有アセトニトリル(酸性)でキノロン剤を溶媒層に移行します。これらの2種類の抽出液を合算し定容することで定量的にも精度を確保することができました(繰り返し抽出定容法)。

ST-L400

約10分/検体

負荷 [通液] 抽出液 1mL

Smart-SPE C18-50mg / PSA-30mg : 精製

通液 2%ギ酸含有アセトニトリル-水 (8/2) 0.5mL

流出液

添加 水 0.5mL

Smart-SPE C18-30mg : 精製

流出液

定容 2mL (水で調整)

LC-MS/MS(注入量5 μ L 試料0.625mg相当)



全自動固相抽出装置 ST-L400
 (アイスティサイエンス)

Sample



Information

水分量
 鶏ささみ: 73.2%
 豚ヒレ肉: 73.4%
 牛ヒレ肉: 64.6%
 牛乳: 87.4%
 鶏卵: 76.1%
 鶏唐揚: 41.2%
 水分量が80%未満の試料は抽出時に水を添加

出典
 食品成分データベース
<http://fooddb.mext.go.jp/>

Key word

動物用医薬品
 STQ法
 自動前処理
 固相抽出

AiSTI SCIENCE

Product

ST-L400
 Smart-SPE C18-50
 Smart-SPE C18-30
 Smart-SPE PSA-30

予冷式ドライアイス
 凍結粉砕キット

株式会社アイスティサイエンス
www.aisti.co.jp
 お問い合わせ先
 TEL. 073-475-0033
 E-Mail: as@aisti.co.jp

実験方法

- 粉碎方法 予冷式ドライアイス凍結粉砕法 (牛乳・鶏卵を除く)
- 添加濃度 (試料中) : 0.01 ppm
- 最終バイアル中濃度 : 1.25 ppb
- 標準溶液 : 動物用医薬品混合標準液 (富士フィルム和光純薬) キノン剤, サルファ剤, マクロライド, ホルモン剤

Code No.	製品名	容量	成分数
227-02051	動物用医薬品混合標準液(キノロン剤)(各20 µg/mL)	1mL	13
228-02081	動物用医薬品混合標準液(サルファ剤+薬酸代謝拮抗剤)(各20 µg/mL)	1mL	27
225-02091	動物用医薬品混合標準液(マクロライド)(各20 µg/mLアセトニトリル溶液)	1mL	7
220-02203	動物用医薬品混合標準液(ホルモン剤)(各20 µg/mLアセトニトリル溶液)	1mL	6

- 検量線 : 1点 : 1.25ppb (絶対検量線)
- 検量線希釈溶媒
下記① : ② : ③ : ④の混合液 (1 : 1 : 1 : 1)
①アセトニトリル ②5%ギ酸アセトニトリル
③2%ギ酸アセトニトリル-水 (8/2) ④水

測定条件

【測定装置】

Nexera X2及びLCMS-8045 (島津製作所製)

【LC条件】

- 分析カラム : YMC-Triart C18(150 × 2.1 mmI.D. ,S-3 µm,12 nm)
- 移動相 A液 : 0.1 %ギ酸水
B液 : 0.1 %ギ酸アセトニトリル
- 流速 : 0.2 mL/min
- グラジエント : B.Conc1 %(0 min)→15 %(1 min)→40 %(6 min)→100 %(10-15 min)→1 %(15.01-18 min)
- 注入量 : 5 µL (+10 µL水)
- カラム温度 : 40 °C

【MS条件】

- イオン化モード : ESI positive and negative
- 測定モード : MRM



Nexera X2及びLCMS-8045 (島津製作所)

結果と考察

鶏唐揚では他の試料にくらべイオン化阻害の傾向がみられました。また一部のキノロン剤では5%ギ酸アセトニトリル抽出の際、溶媒層への移行が若干足りず、回収率が70%未満になるものがありました。しかし加工品を含む6種類の試料においてほとんどの成分で概ね70%以上の良好な回収率が得られました。

表 1 添加回収試験結果

No.	化合物名	イオン化モード ¹⁾	保持時間 ²⁾ (分)	添加濃度: 試料中0.01ppm(n=3)											
				鶏ささみ		豚ヒレ肉		牛ヒレ肉		牛乳		鶏卵		唐揚	
				溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾	溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾	溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾	溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾	溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾	溶媒stdを用いた場合 ³⁾	マトリクスstdを用いた場合 ⁴⁾
1	alpha-Trenbolone	P	10.108	95	92	119	100	83	83	96	89	85	87	82	111
2	beta-Trenbolone	P	10.110	106	92	88	95	94	86	100	111	101	100	77	85
3	Ciprofloxacin	P	5.912	72	63	70	72	65	70	74	77	73	70	68	94
4	Clostebol	P	11.337	86	94	87	95	84	90	87	86	74	85	87	96
5	Danofloxacin	P	6.064	76	72	75	82	74	68	71	82	67	80	57	83
6	Diaveridine	P	5.486	69	94	69	96	59	91	70	87	84	85	61	104
7	Difloxacin	P	6.969	88	80	85	81	77	73	86	90	67	80	85	85
8	Enrofloxacin	P	6.308	81	83	78	85	79	75	103	87	82	69	75	92
9	Flumequine	P	9.880	88	84	85	93	87	84	91	85	77	74	90	88
10	Marbofloxacin	P	5.661	89	85	80	78	78	74	81	83	77	79	100	86
11	Methylprednisolone	P	9.435	107	102	88	109	88	78	97	87	112	83	91	82
12	Nalidixic Acid	P	9.809	87	85	84	91	87	82	89	87	74	77	105	91
13	Norfloxacin	P	5.762	74	65	69	70	59	48	84	75	75	76	72	93
14	Ofloxacin	P	5.820	73	74	85	74	75	74	83	79	82	72	81	88
15	Orbifloxacin	P	6.524	79	79	80	71	75	73	85	83	73	67	78	82
16	Ormetoprim	P	6.081	88	96	83	96	79	86	79	91	88	87	76	95
17	Oxolinic Acid	P	8.866	86	93	82	98	88	82	88	96	77	82	63	93
18	Piromidic acid	P	10.405	84	84	89	79	82	76	86	84	74	68	88	87
19	Prednisolone	P	8.941	92	107	92	92	93	89	99	97	89	95	69	95
20	Pyrimethamine	P	7.715	87	94	83	99	84	89	90	87	98	91	109	99
21	Sarafloxacin	P	6.846	92	75	74	74	65	62	91	81	77	62	85	77
22	Sulfabenzamide	P	9.120	101	97	98	99	85	82	87	89	78	89	91	95
23	Sulfabromomethazine Na	P	9.898	99	98	108	111	87	91	91	97	87	98	84	87
24	Sulfacetamide	P	5.747	98	105	87	95	92	102	96	89	88	89	76	103
25	Sulfachlorpyridazine	P	8.119	96	94	99	94	92	88	93	96	80	95	98	98
26	Sulfadiazine	P	6.056	92	94	86	93	78	90	81	91	88	88	57	96
27	Sulfadimethoxine	P	9.171	105	105	89	100	91	93	92	92	91	86	94	96
28	Sulfadimidine	P	7.234	98	99	93	100	88	85	89	86	98	91	92	98
29	Sulfadoxine	P	8.429	98	98	90	105	93	92	91	89	91	89	91	96
30	Sulfathoxypyridazine	P	8.398	94	99	84	99	88	82	90	94	89	91	100	99
31	Sulfamerazine	P	6.718	97	95	81	98	88	98	109	94	91	88	77	96
32	Sulfamethoxazole	P	8.472	99	103	88	99	93	105	85	84	96	90	91	93
33	Sulfamethoxypridazine	P	7.165	98	102	90	99	87	86	88	92	89	104	92	100
34	Sulfamonomethoxine	P	7.726	96	92	93	100	90	88	96	98	89	90	99	95
35	Sulfantran	N	9.736	108	104	108	93	103	91	98	96	101	86	110	92
36	Sulfapyridine	P	6.326	92	92	90	96	83	85	69	91	82	96	69	99
37	Sulfaquinoxaline	P	9.154	97	98	88	98	88	88	90	86	97	90	98	97
38	Sulfathiazole	P	6.047	88	94	85	99	72	76	84	91	76	90	61	94
39	Sulfatroxazole	P	8.597	93	87	100	105	99	95	89	87	92	90	79	95
40	Sulfisomidine	P	5.250	79	91	85	96	80	84	79	88	81	92	65	96
41	Sulfisoxazole	P	8.724	99	101	88	98	78	79	87	89	88	85	93	100
42	Sulfisozole	P	7.600	96	101	88	93	91	89	86	90	86	98	78	96
43	Tiamulin	P	9.210	99	98	95	99	86	89	89	89	96	95	79	97
44	Tilmicosin (isomers)	P	7.629	98	100	92	99	86	88	82	86	91	96	105	96
45	Trimethoprim	P	5.751	79	98	87	96	91	93	80	93	78	91	114	105
46	Zeranol	P	10.340	80	105	119	98	119	106	96	89	95	94	107	119

1)イオン化モード P:Positive N:Negative 2)弊社での実測値 3)添加回収サンプル÷溶媒std×100 4)添加回収サンプル÷マトリクスstd×100 50%未満 50%以上70%未満

参考文献

1) 島ら、第114回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集p.124、 2) 島ら、第115回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集p.110