

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)

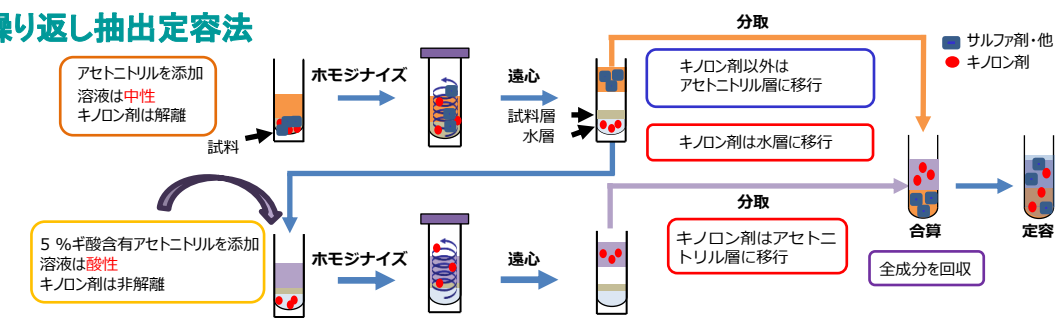


全自動固相抽出装置
ST-L400
 For STQ Method

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。

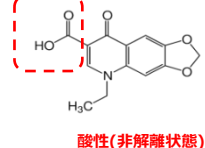
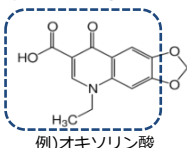
繰り返し抽出定容法



※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碎(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
 凍結粉碎キット

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