

## OASISカートリッジを精製法に使用したフォトダイオードアレイ検出器付き HPLCによる食肉中残留動物用医薬品の同時分析法の検討（第2報）

A Study of Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs in Meats after Cleanup  
with OASIS Cartridge by HPLC with Photo Diode Array Detector ( No. 2 )

赤間 仁 高橋 紀世子 石川 潔  
大江 浩

Hitoshi AKAMA , Kiseko TAKAHASHI , Kiyoshi ISHIKAWA  
Hiroshi OOE

キーワード：HPLC，残留動物用医薬品，同時分析，OASISカートリッジカラム，  
フォトダイオードアレイ検出器

Key words：HPLC，Residual Veterinary Drugs，Simultaneous Determination，  
OASIS Cartridge Column，Photo Diode Array Detector

昨年度に引続き，OASISカートリッジカラムを精製法に使用して，フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いた多種動物用医薬品の同時分析法の検討を行ったところ，抽出方法等に今後の課題は残ったものの，豚，牛，鶏肉について16種類の分析が可能となった。

### 1 はじめに

平成14年3月現在，食品衛生法により基準値の定められた動物用医薬品は22種であり，答申中のもの4品目を含めると26種類に上っている。これらの医薬品については個別法が示されているが年々増加する基準物質を個別に分析することは多くの労力と時間を要し，多くの医薬品を速やかに分析することはますます困難になってきている。

当部では，平成12年度から堀江らの方法<sup>1)~4)</sup>に基づき，メタリン酸：アセトニトリル：メタノール混合液の除蛋白抽出液を用い，OASIS HLBカートリッジカラムでの妨害物除去をおこない，フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーによる簡便で効率的な一斉分析法の検討を行ってきたところである。

平成13年度は，昨年度の対象とした動物用医薬品にサルファ剤等10品目を加えた21品目の一斉分析法の検討を行ったので報告する。

### 2 分析対象物質等

#### 2.1 分析対象食品及び動物用医薬品

検討食品は，牛肉（筋肉），豚肉（筋肉），鶏肉（筋肉）とした。

対象動物用医薬品は，第1報で分析可能となったキノキサリン-2-カルボン酸（QCA），5-ヒドロキシ-チアベンダゾール（TBZm），5-プロピルスルフォニル-1H-ベ

ンズイミダゾール-2-アミン（ABZm），チアベンダゾール（TBZ），スルファジミジン（SDD），フルベンダゾール（FBZ），ゼラノール（ZNL），-トレンボロン（-TB），-トレンボロン（-TB），スルファモノメトキシシン（SMM），オキシリン酸（OXA）11種類に加え，クロルテトラサイクリン（CTC），オキシテトラサイクリン（OTC），スルファメラジン（SMR），スルファジメトキシシン（SDMX），スルファキノキサリン（SQX），ピリメタミン（PYR）フラドリゾン（FZ），オルメトプリム（OMP），トリメトプリム（TMP）及びチアンフェニコール（TPC）の21種類とした。

#### 2.2 装置

HPLC：ヒューレットパッカード社（現：Agilent）HP 1100

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

蛍光検出器

カラム：TSK-GEL ODS 80Ts（4.6mm i.d.×150mm）

Wakosil-II 5C18RS（4.6mm i.d.×150mm）

#### 2.3 分析条件

流速：0.7ml/min

カラム温度：40

測定波長：DAD 220nm，241nm，265nm，305nm，350nm

（5チャンネル）

FLD Ex 280nm Em 320nm

移動相：A：0.025M - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)

B：アセトニトリル/A：(80/20)

グラジエント条件：

	A	B
0min	95%	5%
10min	95%	5%
24min	70%	30%
33min	70%	30%
40min	30%	70%
45min	0%	100%
55min	0%	100%

2.4 試薬等

カートリッジカラム：

Waters OASIS HLB 3cc 60mg Extraction Cartridges

Waters OASIS HLB 6cc 500mg LP Extraction Cartridges

標準試薬：QCA, TBZm, ABZm, FBZ, ZNL, -TB, -TB：林純薬工業(株) TBZ：和光純薬工業(株) SDD, OXA, OTC, CTC, SMR, TMP：SIGMA SMM：第一農薬(株) SDMx, OMP：第一製薬(株)

SQX：大日本製薬(株) TPC：エーザイ(株) PYR：福寿製薬(株) FZ：上野製薬(株)

標準原液：各動物用医薬品100 $\mu$ g/mlメタノール溶液(ただし、FZについては、DMSO約10mlにあらかじめ溶解後100mlとした。)

標準添加回収用標準液：CTC, OTCについては、それぞれ5 $\mu$ g, 2 $\mu$ g/ml, 他の医薬品については1 $\mu$ g/mlアセトニトリル溶液とした。

標準添加回収用標準液：CTC, OTC

については、それぞれ5 $\mu$ g, 2 $\mu$ g/ml, 他の医薬品については1 $\mu$ g/mlアセトニトリル溶液とした。

2.5 分析方法

検量線：20ppb, 50ppb, 100ppb, 250ppb, 1000ppb

(ただし、SDMX, CTC, SQX, OTC, SMM, QCAについては最低濃度50ppbで検量線を作成)

分析フロー：(図1)

検体	凍結保存品約100gを細切にする。
試料	10g 0.25%メタリン酸：CH <sub>3</sub> CN：MeOH(6：2：2)を100ml加える (除タンパク、抽出液はあらかじめ4℃に氷冷)
抽出	バイオトロン(1min) (氷冷下；約4℃)
静置	氷冷下(4℃)15分
ろ過	桐山No.5C+ハイフロースーパーセル 2~3mm厚 ろ紙を除タンパク抽出液で湿润しハイフロースーパーセルを敷く
濃縮	45℃ 20~25mlまで ロータリーエバポレータ
抽出	OASIS HLB500 活性化：MeOH 5ml, H <sub>2</sub> O 5ml
負荷	
洗浄	H <sub>2</sub> O 20ml
溶出	100% MeOH 15ml
濃縮	45℃ 乾固直前まで
N <sub>2</sub> バージ	
溶解	アセトニトリル/0.025MKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH3.0)(25/75) 1mlで溶解
HPLC	HP-1100

図1 分析フロー

3 検討内容

3.1 グラジエント条件の検討

STD21物質の混合標準液について前報のグラジエント条件で分離を試みたが、ピークが混み合い分離がうまくいかなかった。

各食肉のブランクの妨害ピークがチャートの前半(0~20分)部分と後半(45分以後)部分に集中してみられることから、STDのピーク位置を妨害ピークからはずすために、ホールド時間を2回組み込み分析時間45分の条件を55分に延長し、グラジエントの傾斜を調整することで、チャート前半でのSTDピークの分離の改善を試みたところ、TPC, OMP, TMPを除く18種類について良好な分離が可能となった(図2)

ただし、CTCについては移動相の性質上リーディングは改善されなかった。

(採用したグラジエント条件の詳細：2.3 参照)

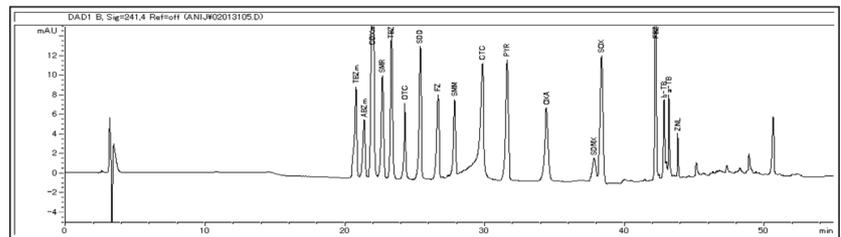


図2 標準18物質の分離状況(241nm) 濃度1ppm

図2は241nmでのSTDピークの分離状況であるが、感度及び妨害ピークの状況等を勘案し各医薬品の選択波長は表1のとおりとした。

表1 選択波長

チャンネル	波長(nm)	医薬品名
DAD A	280	SMR
DAD B	241	SMM
DAD C	265	SQX
DAD D	305	PYR
DAD E	350	SDMX
		SDD
		ZNL
		TBZm
		CDXm
		OTC
		FZ
		SQX
		FBZ
		-TB
		-TB
FLD 1	Ex280	ABZm
	Em 320	TBZ
		OXA

3.2 カラムによる分離の試行

今回のグラジエント条件では分析1検体あたり10分間の測定時間延長となるため、前報のグラジエント条件(45分)でWakosil-II 5 C18RSによるSTD分離の検討も行ったが、STDピークの分離状況はTSK-GEL ODS 80Tsと変わらず十分な分離は得られなかった。

このことから、カラムをTSK-GEL ODS80Tsに絞って検討をおこなった。

3.3 定量下限値向上のための検討

牛肉の筋肉中の残留基準値であるZNL (0.002ppm) 及び -TB (0.002ppm) の定量下限値を確保するために、試料重量を 5 g から 10 g に増やし濃縮率を 5 倍から 10 倍に上げて検討を行った。

まず、20ppbの低濃度の標準溶液で 5 回の繰り返し試験を行い、定量下限値を機器の性能上確保可能かどうかの確認を行った (表 2)。

QCA, SDMX, CTC, SQX, OTC, SMMの 6 医薬品については、STD20ppbでは感度が得られなかったが、これらQCA等の基準値である50ppb (0.005ppm) の濃度では18種類すべての医薬品について感度がとれている。

なお、-TBについては、基準値の約10分の1の感度が得られた。

表 2 STD20ppb繰り返し試験 n = 5

物質名	AV	CV%	検出限界3	10	定量下限値	基準値	判定
TBZm	17.80	3.055	0.0016	0.005	0.0005	0.10 ppm	
ABZm	16.80	1.757	0.0009	0.003	0.0003	0.10 ppm	
QCA	0.00	-	-	-	-	0.005 ppm	
TBZ	18.75	1.129	0.0006	0.002	0.0002	0.10 ppm	
SDD	23.15	2.574	0.0018	0.006	0.0006	0.10 ppm	
FBZ	22.68	1.384	0.0009	0.003	0.0003	0.01 ppm	
-TB	20.04	1.399	0.0008	0.003	0.0003	0.002 ppm	
-TB	20.24	1.182	0.0007	0.002	0.0002	0.01 ppm	
ZNL	25.84	10.490	0.0081	0.027	0.0027	0.002 ppm	x
OXA	18.90	1.742	0.0010	0.003	0.0003	- ppm	
SMR	18.86	2.107	0.0012	0.004	0.0004	- ppm	
PYR	23.99	3.290	0.0024	0.008	0.0008	- ppm	
SDMX	0.00	-	-	-	-	- ppm	
FZ	18.69	2.935	0.0016	0.005	0.0005	- ppm	
CTC	0.00	-	-	-	-	和 0.2 ppm	x
SQX	0.00	-	-	-	-	- ppm	
OTC	0.00	-	-	-	-	和 0.2 ppm	x
SMM	0.00	-	-	-	-	- ppm	

注：基準値の項の「和」の表記は、TC, CTC, OTCの値の和を示す。

しかしZNLについては、定量下限値が10で0.027となり、濃縮換算値 (低量下限値) も基準値を確保できないという結果になった。

一方で、コーデックス委員会が設定した「食品中の動物用医薬品残留分析法に関する適格性許容基準」によると、「濃度10ppbから100ppbの試験にかかる変動係数は20%以内、回収率は70~110%の範囲である試験法を採用する。」と述べられており、この基準を満たす試験法としては採用し得るといえる。

(ZNLの回収率については、後述の表3参照)

3.4 抽出方法の検討 (図3)

試料重量を 5 g から 10 g に増加したことにより、OASIS HLB 3 cc 60mg では負荷の際に目詰まりを起こし、うまくいかないことからOASIS HLB 6 cc 500mg を用い検討を行った。

また、溶出が十分行えるかどうかを確認するために、メタノールを10mlずつ2回に分けて溶出しSTDの溶出状況を見たところ図3のとおり結果となった。

SQX, FBZ, QCA, -TB, -TB等にやや溶出残がみられたが、その他の医薬品については10mlで十分溶出が行える状況であった。

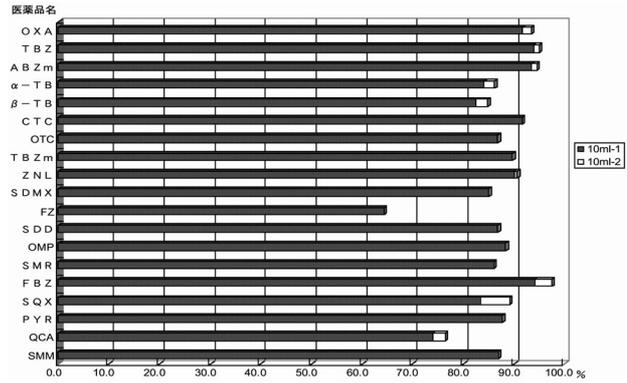


図 3 HLB500抽出試験

したがって、活性化及び洗浄については60mgと同様に、活性化はメタノール 5 ml, 水 5 ml で操作し、付加後の洗浄は水20mlで行い、溶出については妨害物質の溶出を考慮してメタノールを10mlから15mlに増やし行うこととした。(FZについては、試料に添加したときに回収率が改善されている。(後述表3参照))

3.5 クリーンナップ

グラジエント条件を確定し、牛肉でのHLB60mgとHLB500mgでのクリーンナップの状況を従来法と比較したところ、以下のようなチャートが得られ、どちらも同様の状況であった。(試料 5 g, 牛肉 (凍結試料), 保存期間約 6 ヶ月を使用した。)

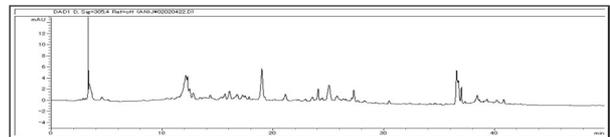


図 4 - 1 HLB60mgでの牛肉(筋肉)のクリーンナップ(305nm)

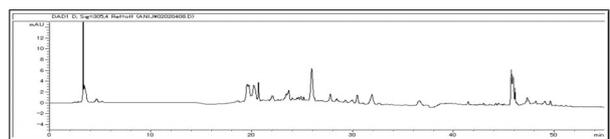


図 4 - 2 HLB500mgでの牛肉(筋肉)のクリーンナップ(305nm)

3.6 肉種によるクリーンナップの比較

次に試料重量10gとし、牛肉(筋肉), 豚肉(筋肉), 鶏肉(筋肉)のそれぞれのクリーンナップの状況を比較して見たところ、牛肉, 豚肉, 鶏肉ともに同様の夾雑物のピーク形状を示しているが、図4に示した牛肉の夾雑物ピークとは14分から17分及び43分以降のピーク形状が大きく異なる。

この違いについては、14分から17分にかけてのピークは図5 - 1 から 3 で、肉の種類による違いがみられないことから、操作の条件 (温度, 静置時間, ろ過等) による違いが原因である可能性が高いと思われる。(牛肉については新鮮肉を、豚肉, 鶏肉については (凍結試料) 保存期間約 6 ヶ月を各 10 g 使用した。)

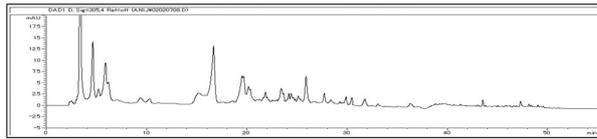


図5-1 牛肉(筋肉)(305nm)

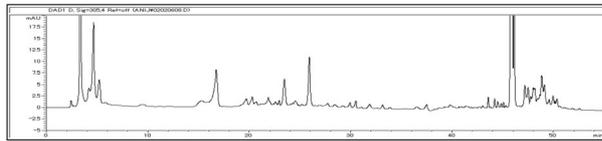


図5-2 豚肉(筋肉)(305nm)

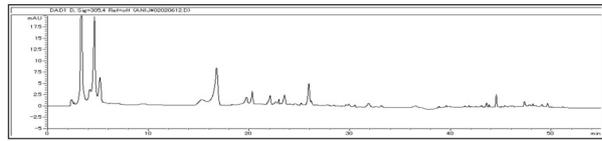


図5-3 鶏肉(筋肉)(305nm)

カートリッジカラムの充填剤のポリウムは約8倍であるので試料重量を2倍にしたことによる保持不足はないと考えられたが、医薬品を保持するのと同様に妨害物質もまた保持してしまうことから、60mgと比べるとやはり妨害ピークの面積も増加した。

3.7 牛(筋肉), 豚(筋肉), 鶏肉(筋肉)への添加回収率

添加回収のチャートについては、図6のとおりであるが、夾雑物の溶出は60mg(図3)とは異なりチャート前半に目立った。

添加回収に使用した牛肉, 豚肉, 鶏肉の夾雑物ピークの残留パターンは、肉種が異なるにもかかわらず類似していた。(図6-1, 2, 3)

しかし、精製の状況やカートリッジのロットなどの影響が原因かは不明であるが、検討の都度パターンが異なっていた。(図5と図6は、同一肉, 同一日の分析チャートである。)

添加回収率の状況については、表3に示したとおりの結果となった。

TBZm以下SQXまでの16種類の医薬品については各肉種ともに60%以上の回収率を得ることができたが、前報で良好であったSMMに関しては、妨害ピークとリテンションタイムが一致し定量できなかった。

OTCについては、前報同様に回

表3 標準添加回収率(%)

(n=3)

	添加量 (µg/10g)	牛肉平均	豚肉平均	鶏肉平均
TBZm	1	66.2	83.1	86.2
ABZm	1	81.3	80.4	83.3
QCA	1	76.4	80.5	79.7
TBZ	1	80.5	81.6	86.3
SDD	1	98.1	95.9	80.1
FBZ	1	86.7	94.9	91.0
-TB	1	59.7	62.5	70.1
-TB	1	74.7	78.4	81.1
ZNL	1	79.4	81.6	85.2
OXA	1	88.3	90.6	89.8
SMR	1	75.8	81.9	87.6
PYR	1	85.2	80.7	77.8
SDMX	1	60.1	68.4	68.6
FZ	1	76.3	76.0	84.0
CTC	5	67.9	66.6	80.8
SQX	1	80.1	86.5	88.3
OTC	2	52.1	59.7	24.6
SMM	1	206.1	150.6	267.9

回収率が低いため、モニタリングとしては活用できるが、テトラサイクリン系3物質の定量は公定法によらなければならない。

また、定量が可能な医薬品であっても、低波長側に妨害物質のスペクトルが検出され、220nmから350nmまでの全ての領域で標準と同じスペクトルが得られないものもあり、定性には、たとえばリファレンススペクトルの波長領域を250nmから350nm(高波長側)に限定して同定するなどの注意が必要であった。

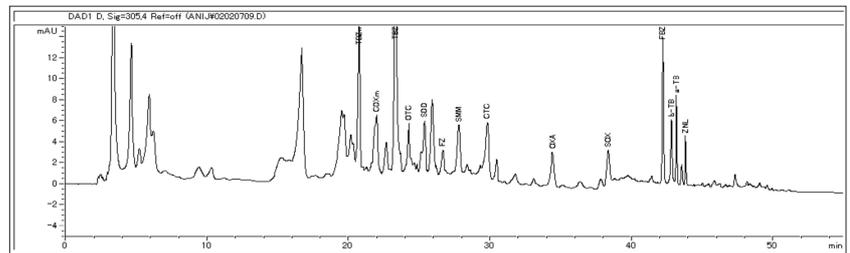


図6-1 牛肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

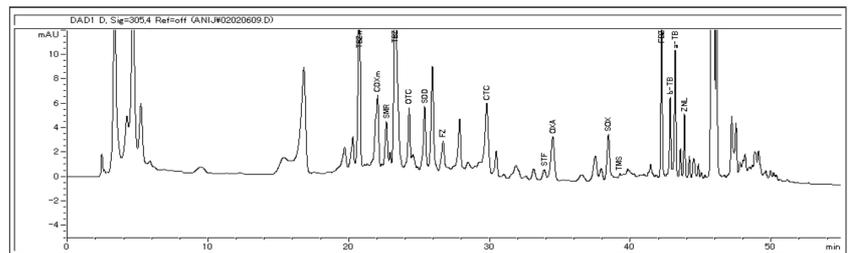


図6-2 豚肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

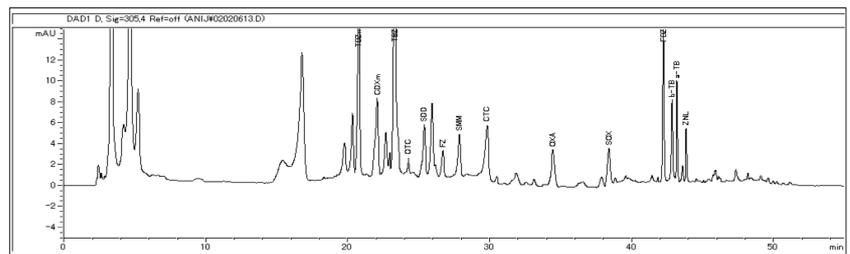


図6-3 鶏肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

#### 4 結果と考察

今回の検討の結果最終的に16種の医薬品について抽出操作が簡便な一斉分析が可能となったが、除蛋白抽出液の温度の保持や、15分の放置時間への注意及びハイフロースーパーセルを用いた桐山ルートによるろ過行程でかなりの時間（1検体あたり約10分）を要するなどの問題が残った。

また、ろ過には試料重量を10gに増やしたことで目詰まりがみられ、ろ過能力が限界であることから、定量下限値を上げるためにこれ以上試料重量を多くするには、別のろ過方法を検討しなければならない。

今回検討した医薬品のうち16種類について良好な回収率が得られたが、除タンパク抽出液の妨害の除去効果が肉種・部位により異なることから現時点では試料によって全ての医薬品をいつも正確に定量できると言い難く、妨害除去をコンスタントに行うためのさらなる検討を要する。

また、基準値が設定されていない動物薬は、リテンションタイムとスペクトルからその残留を判定することは可能であるが、低濃度の基準値が定められているZNLなどを、妨害に左右されることなく正確に定性、定量するためには、今後、質量分析器付き高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析法の検討が必須となるものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) 石井理枝他：食品衛生学誌No.35, 173～179 (1994)
- 2) 堀江正一他：食品衛生学誌No.39, 383～343 (1998)
- 3) 氏家愛子他：宮城県保健環境センター年報No.17, 74～78 (1999)
- 4) 石川潔他：宮城県保健環境センター年報No.19, 171～172 (2001)