

LC-MS/MSによる畜産食品中のネクイネートおよびバクイノレートの分析

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	中島,崇行 林,洋 笹本,剛生 神田,真軌 草野,友子 松島,陽子 金井,節子 竹葉,和江 永山,敏廣
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	52巻3号
掲載ページ	p. 178-182
発行年月	2011年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ノート

LC-MS/MSによる畜産食品中のネクイネート
およびバクイノレートの分析

(平成22年6月22日受理)

中島崇行* 林 洋 笹本剛生 神田真軌 草野友子
松島陽子 金井節子 竹葉和江 永山敏廣Determination of Nequinat and Buquinolate in Livestock Products Using Liquid
Chromatography-Tandem Mass SpectrometryTakayuki NAKAJIMA*, Hiroshi HAYASHI, Takeo SASAMOTO, Maki KANDA, Tomoko KUSANO,
Youko MATSUSHIMA, Setsuko KANAI, Kazue TAKEBA and Toshihiro NAGAYAMATokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-0073, Japan; * Corresponding author

We studied the simultaneous determination of nequinat and buquinolate, which are used as feed additives to prevent coccidiosis, by means of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample was extracted with acetonitrile, then loaded onto an HLB mini-column with 20% methanol. After clean-up with 20% methanol, the analytes were eluted with acetonitrile-methanol (1:1). The coccidiostats in the purified samples were determined using ESI-MRM mode LC-MS/MS with a sample matrix calibration curve. Mean recoveries of nequinat and buquinolate from 8 kinds of livestock samples (chicken muscle, chicken liver, chicken heart, swine muscle, swine heart, cattle muscle, sheep muscle, egg) were in the range of 89.5% to 108.6%, and the relative standard deviation values were <20% ($n=10$) at the levels of 0.01 $\mu\text{g/g}$ and 0.05 $\mu\text{g/g}$, respectively. The limits of quantification of these compounds were 0.001 $\mu\text{g/g}$ in each sample.

(Received June 22, 2010)

Key words: 抗コクシジウム剤 coccidiostats; ネクイネート nequinat; バクイノレート buquinolate; 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC-MS/MS

緒 言

コクシジウム症は主に *Eimeria* 属の原虫によって引き起こされる消化管障害であり、鶏をはじめ牛や豚などに発症する疾病である。その感染経路はホストとなっている家畜の糞便などから飼料や水、土などを介して、あるいは媒介生物によって間接的に伝播する例が知られている。そのため養鶏場などの集約的環境下では一度感染が始まると集団感染のリスクが高まり、それによって家畜を出荷できなくなるなど甚大な経済的被害が予想されることから、現在では多様な薬剤が上市され、予防および治療に使用されている^{1),2)}。一方、抗コクシジウム剤の中には、いまだに分析法が確立しておらず、厚生労働省より試験法が通知されていない薬剤もある。海外で飼料添加物として用いられるネクイネートやバクイノレートもその1つで、キノロン

骨格を有し、脂溶性が高く、他の抗コクシジウム剤と物理化学的性状が異なるため、これまで畜水産物を対象とした分析法は報告されていなかった (Fig. 1)。そこでネクイネートおよびバクイノレートの分析法について検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は東京都内で市販されていた鶏筋肉、鶏肝臓、鶏心臓、豚筋肉、豚心臓、牛筋肉、羊筋肉、鶏卵を使用した。

2. 試薬および標準品

試薬: メタノールは関東化学(株)製の HPLC 用, アセトニトリルおよび蒸留水は和光純薬工業(株)製の HPLC 用, ヘキサンおよび1-プロパノールは和光純薬工業(株)製の特級, ギ酸は和光純薬工業(株)製の LC/MS 用を使用した。

標準品: ネクイネートおよびバクイノレートの標準品は

* 連絡先 Takayuki_1_Nakajima@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

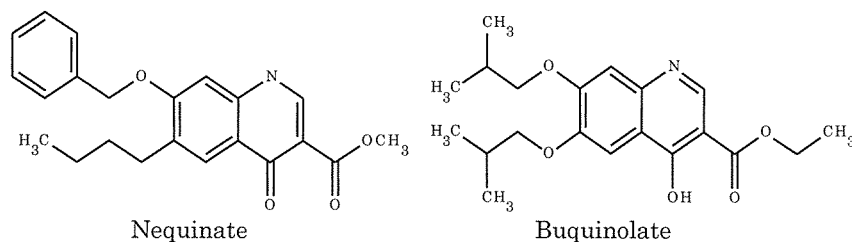


Fig. 1. Chemical structures of nequinolate and buquinolate

Table 1. LC-MS/MS conditions for nequinolate and buquinolate

LC-MS/MS conditions						
Column	L-column 2 ODS (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm)					
Column temperature	40°C					
Flow rate	0.2 mL/min					
Mobile phase	(A) 0.1% formic acid: (B) acetonitrile (A% : B%)=0 min (95 : 5)→3 min (95 : 5)→10 min (10 : 90)→15 min (10 : 90)→15.1 min (95 : 5)→20 min (95 : 5)					
Injection volume	5 μL					
Ionization	ESI positive					
Analysis mode	Multiple reaction monitoring (MRM)					
Ion-spray voltage	3,000 V					
Vaporizer temperature	450°C					
Capillary temperature	220°C					
	Precursor ions (<i>m/z</i>)	Quantitative product ions (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Qualitative product ions (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Tube lens (V)
Nequinolate	366	145	47	91	33	100
Buquinolate	362	204	35	260	29	95

林純薬(株)製の残留動物薬試験用試薬を使用した。

標準溶液: 各薬剤を 5 mg ずつ正確に秤量し, それをメタノールで溶解, 50 mL に定容し, 100 μg/mL 標準原液を作製した。これを用時メタノールで希釈し, 検量線作成および添加回収実験に使用した。

固相カートリッジ: Waters 社製 Oasis[®] HLB (200 mg) をメタノール 5 mL, 水 5 mL でコンディショニングした後に使用した。

メンブレンフィルター: Millipore 社製 Millex-LG 0.2 μm

3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 Prominence シリーズ

質量分析装置: Thermo Scientific 社製 TSQ Quantum Access MAX

装置条件および測定条件を Table 1 に示した。

4. 試験溶液の調製

試料 5.0 g を採取し, アセトニトリル 30 mL およびアセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL を加えて細砕した後, 毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離した。その上澄液を分液漏斗に採り, アセトニトリル層を分取, ヘキサン層を残留物に戻し, 新たにアセトニトリル 20 mL を加えよくかくはん後, 毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離した。得られた上澄液を分液漏斗に採った後, 分取したアセトニトリ

ル層を先のアセトニトリル層に合わせた。これに 1-プロパノール 10 mL を加え, 減圧下濃縮乾固した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶かした後, 水 8 mL を加え混和し, 全量を HLB カートリッジ (200 mg) に負荷した。カートリッジを 20%メタノールで洗浄後, アセトニトリル-メタノール (1 : 1) 混液で溶出し 10 mL に定容した後, その一部をメンブレンフィルターでろ過して試験溶液とした。

結果および考察

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

1.1 MS/MS 条件の検討

これまでの報告^{3), 4), 6)~8)}に従い, 各薬剤の標準溶液 (1 μg/mL) についてイオン化条件を検討した結果, 両薬剤ともプロトン付加分子を高感度に検出することができた。次にこれらのイオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行い, コリジョンエネルギーなどの MS/MS 条件を最適化後, 最も感度の良かったプロダクトイオンを定量用に, 2 番目に感度の良かったプロダクトイオンを定性用を使用することとした。

1.2 LC 条件の検討

これまでの報告^{3)~8)}を参考に, HPLC カラムについては ODS 系であるジューエルサイエンス社製 Inertsil[®] ODS-3 と化学物質評価研究機構製 L-column 2 ODS, 移動相の

Table 2. Recoveries of nequinatate and buquinololate from 8 kinds of livestock

Compound	Spiked level (µg/g)	Recovery (%) [*]															
		Chicken muscle		Chicken liver		Chicken heart		Swine muscle		Swine heart		Cattle muscle		Sheep muscle		Egg	
		Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Nequinatate	0.01	91.7	9.9	95.3	18.1	89.5	16.9	104.3	15.0	91.0	12.0	102.5	11.9	99.6	17.0	96.8	16.3
	0.05	101.0	9.1	90.1	14.0	93.6	11.7	91.5	13.6	93.2	13.6	102.7	10.5	99.3	8.6	98.7	8.6
Buquinololate	0.01	99.9	9.0	105.4	14.6	98.9	13.7	108.6	17.2	90.2	16.9	107.6	10.5	105.9	15.4	102.0	18.5
	0.05	103.8	8.5	93.3	13.8	97.4	8.8	97.6	9.5	97.6	16.7	102.0	6.7	102.8	5.9	101.4	6.7

**n* = 10

水系溶媒としてギ酸水溶液とギ酸含有酢酸アンモニウム水溶液、有機系溶媒としてアセトニトリルとメタノールを選択し、それぞれの組み合わせを検討した。その結果 Table 1 に示す条件において、ピーク形状および感度の点において良好な結果が得られた。

1.3 検量線

LC-MS/MS による測定では、試料マトリクスの影響を受け、試料間あるいは同じ種類の試料であっても個体間で薬剤のイオン化のパターンが異なることがある。ネクイネートおよびバクイノレートの 0.01 µg/mL 標準溶液ならびに、鶏筋肉、鶏肝臓、鶏心臓、豚筋肉、豚心臓、牛筋肉、羊筋肉、鶏卵の 8 種類のブランク試験溶液 900 µL に 0.1 µg/mL 標準溶液 100 µL を加えたマトリクス添加標準溶液のピーク形状および強度を比較した。その結果、ネクイネートは豚心臓および鶏卵でイオン化促進効果が認められ、バクイノレートはすべての試料で抑制効果が認められた。各試料間でマトリクス効果に違いが生じることが判明したことから、定量はそれぞれのマトリクス検量線を用いて行うこととした。各試料のブランク試験溶液 900 µL に、0.001, 0.005, 0.01, 0.05 µg/mL の濃度となるように各標準溶液 100 µL を添加して得られたクロマトグラムのピーク面積から各検量線を作成した。その結果、ネクイネートおよびバクイノレートともに、すべての試料について $R^2 > 0.998$ の直線性が得られた。

2. 前処理法の検討

はじめに、既存の分析法の適用について検討した。動物用医薬品の分析法のうち、最も多くの薬剤を同時に抽出することができることから厚生労働省一斉試験法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I」^{*1} に注目した。本法に準じて鶏筋肉からの添加回収実験を行ったところ、両薬剤とも回収率は 50% 以下と低いものであった。回収率の低い原因が抽出過程にあるのか、精製過程にあるのかを確かめるため、抽出液の濃縮乾固残留物をメタノール 2 mL に再溶解した後、孔径 0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過した抽出溶液について測定したところ、両薬剤とも 95% 以上の回収率を示した。このことから、回収率が低

下した原因は抽出過程ではなく、精製過程すなわち含水アセトニトリル-ヘキサンによる液液分配にあると考えられた。一方、抽出物には多くの夾雑成分が認められ、その溶解液をそのまま機器に注入すると、測定の妨害のみならず流路やイオン源の汚れなどの装置への負荷が懸念された。そこで本研究では既報^{6), 8), 9)}を参考に HLB カートリッジを用いた精製を濃縮操作後に追加することにした。

まず、カートリッジからの溶出溶媒について検討した。鶏筋肉を用い、抽出液の濃縮乾固残留物に 20% メタノールで希釈した 0.01 µg/mL 標準溶液を 10 mL 加えて溶解させた後、全量をカートリッジに負荷した。メタノール、アセトニトリル、アセトニトリル-メタノール (1:1) 混液、0.1% ギ酸含有アセトニトリルの 4 種類の溶媒 10 mL で溶出し、それぞれの溶出率を測定したところ、アセトニトリル-メタノール (1:1) 混液で 96% 以上の溶出が確認できた。次にカートリッジに負荷する際のメタノール濃度について検討した。上記と同様の方法で、抽出液の濃縮乾固残留物を 10%, 20%, 40%, 60% メタノールそれぞれで溶解したものを、アセトニトリル-メタノール (1:1) 混液で溶出した。その結果、負荷時のメタノール濃度が 40% 以上では、負荷時に薬剤の一部が流出し、回収率が理論値よりも低下した。また、10% メタノールで溶解した場合は、夾雑成分が析出し、カートリッジ内に目詰まりが生じた。以上の点を踏まえ、負荷する際のメタノール濃度を 20% と設定した。

3. 添加回収実験

あらかじめ両薬剤を含有していないことを確認した試料に、混合標準溶液を 0.01 µg/g および 0.05 µg/g となるように添加し、添加回収実験を行った。その結果、0.01 µg/g および 0.05 µg/g 添加時のいずれにおいても回収率は 89.5~108.6%、相対標準偏差は 20% 未満であった (Table 2)。鶏筋肉、鶏肝臓、鶏卵での添加回収実験で得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示した。なお、本法におけるネクイネートおよびバクイノレートの定量下限値 ($S/N \geq 10$) は、8 種類の試料いずれにおいても 0.001 µg/g であった。

4. 実態調査

本法を用いて市販の輸入鶏筋肉 3 検体、輸入豚筋肉 3 検体、輸入牛筋肉 4 検体、計 10 検体について残留実態調

*1 厚生労働省医薬食品局食品衛生部長通知別添：平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号 (2005)

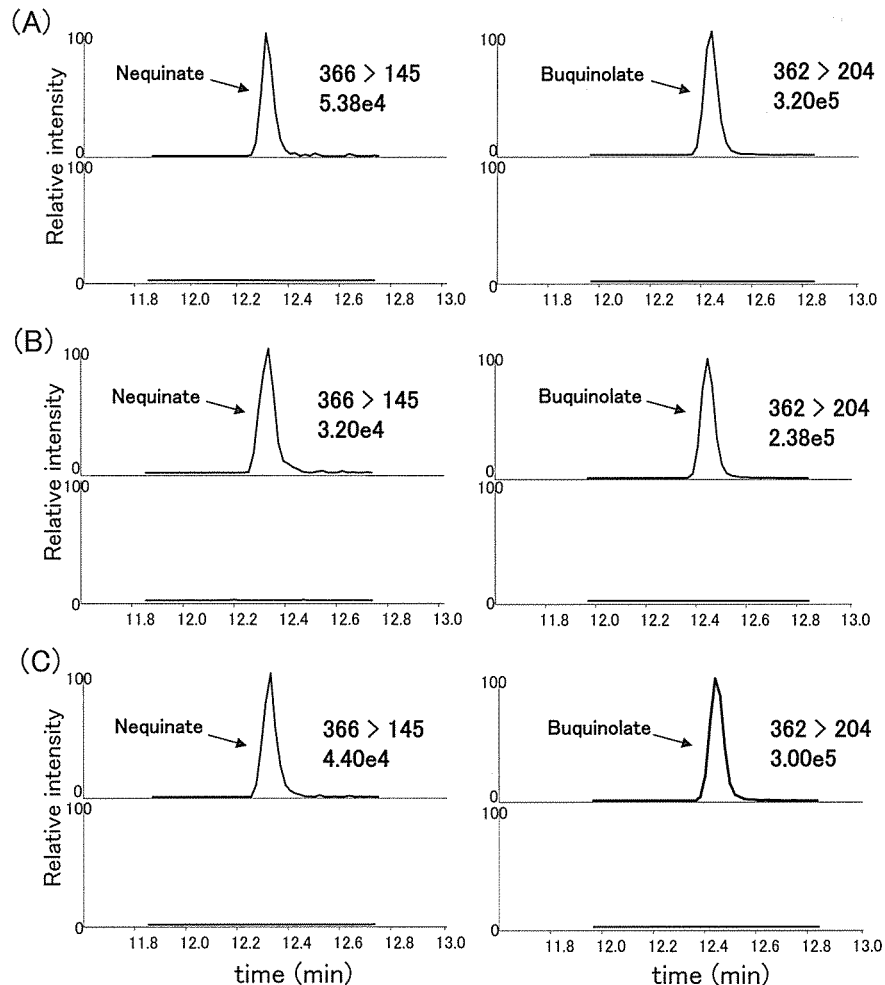


Fig. 2. Typical MRM chromatograms of nequinolate and buquinolate

- (A) Chicken muscle extract, upper: 0.01 $\mu\text{g/g}$ spiked, below: blank
 (B) Chicken liver extract, upper: 0.01 $\mu\text{g/g}$ spiked, below: blank
 (C) Egg extract, upper: 0.01 $\mu\text{g/g}$ spiked, below: blank

査を実施したところ、いずれの検体からもネクイネートおよびバクイノレートは検出されなかった。

本研究は、「平成 21 年度厚生労働省医薬食品局食品安全部残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る分析法開発事業」として実施した。また、成果の概要は、日本食品衛生学会第 99 回学術講演会（2010 年 5 月、東京）において発表した。

文 献

- Allen, P. C., Fetterer, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 58-65 (2002).
- Chapman, H. D. Evaluation of the efficacy of anti-coccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1141-1144 (1998).
- Dubois, M., Pierret, G., Delahaut, Ph. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **813**, 181-189 (2004).
- Nakao, A. Rapid simultaneous analysis of residual animal drugs and synthetic antibacterials in livestock products and seafoods using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Fukuokashi Hokenkanyokenkyusho Ho (Annual Report of Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment)*, **29**, 80-85 (2003).
- Kanda, M., Ushiyama, K., Igusa, K., Murayama, M., Horie, M., Hirokado, M., Miyazaki, T. Simple determination of residual anticoccidial drugs (diclazuril and nicarbazin) in chicken tissues by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 110-113 (2003).
- Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., Jedziniak, P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J.*

- Chromatogr. A, **1216**, 8141–8148 (2009).
- 7) Noguchi, S., Terada, H., Tamura, Y. Simultaneous determination of veterinary drugs in livestock foods and seafoods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **49**, 177–188 (2008).
- 8) Yoshida, E., Shibuya, T., Kurokawa, C., Inoue, Y., Yamamoto, Y., Miyazaki, M. Study of simultaneous determination of residual veterinary drugs including tetracyclines antibiotics in milk and dairy products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 216–222 (2009).
- 9) Tanizawa, H., Shima, M., Ikehara, C., Kobata, M., Sato, M. Multi-residue method for screening of pesticides in crops by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 185–197 (2005).

LC-MS/MSによる畜産食品中のネクイネートおよびバクイノレートの分析（ノート）

中島崇行* 林 洋 笹本剛生
神田真軌 草野友子 松島陽子
金井節子 竹葉和江 永山敏廣
食衛誌 52(3), 178~182 (2011)

公的な試験法の定められていないネクイネートおよびバクイノレートの分析法を確立した。試料から厚生労働省通知の一斉試験法Iに準じて抽出した後、20%メタノールでHLBカートリッジに負荷し、アセトニトリル-メタノール(1:1)混液で溶出、10 mLに定容しLC-MS/MSにより定量した。本法のネクイネートおよびバクイノレートの定量限界は0.001 $\mu\text{g/g}$ であった。8種類の試料（鶏筋肉、鶏肝臓、鶏心臓、豚筋肉、豚心臓、牛筋肉、羊筋肉、鶏卵）について2濃度における各々の添加回収率は、89.5~108.6%、相対標準偏差は20%未満($n=10$)であった。本法を用いて市販の食肉10検体について実態調査を行ったところ、いずれの検体からもネクイネートおよびバクイノレートは検出されなかった。

* 東京都健康安全研究センター