

[ノート]

抗菌性抗生物質であるモネンシナトリウムの

牛の筋肉及び腎臓からの分析法の検討

服部 涼子* 後藤 操 川元 達彦 吉田 昌史

Studies on a Determination for Antibacterial Substance

Monensin Sodium in Bovine Muscles and Kidneys

Ryoko HATTORI*, Misao GOTOU, Tatsuhiko KAWAMOTO and Masashi YOSHIDA

Health Science Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We developed a simple determination for Monensin sodium (MNS) in bovine muscles and kidneys using LC-TOF/MS. The 3 g samples were cleaned up by dispersive column solid-phase extraction(d-SPE) using ODS and PSA each 300 mg and 500 mg Silica cartridges. The extracts were cleaned up more effectively by this method than the official method, and the matrix effect value was less than 1/10 of the official method. Validation carried out on the samples spiked at 0.01µg/g generally conformed to the guideline of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. We applied this analysis method to the request insectation and confirmed the safety of the meats and kidneys of the 2 bovines.

I はじめに

モネンシナトリウム (以下, MNS) は, 主に家畜の抗コクシジウム剤として使用されている. 非極性を示すポリエーテル系イオノフォア抗生物質であり, 細胞膜内外の金属イオンの濃度勾配を崩すことで抗菌性を発現する. 食品衛生法では全ての食品に抗生物質を使用, または含有してはならないと定められている一方で, MNSは飼料安全法において指定されており, 家畜の飼料の栄養効率促進を目的として飼料添加物として用いられている. 人への健康影響としては, 職業暴露によるアレルギー症状等が報告¹⁾されており, ADIは0.003 mg/kg 体重/日と設定されている.

平成28年2月に岡山県の飼料製造会社において基準値超過のMNSが添加された飼料が製造され, 農場で当該飼料を給餌された肉用牛の一部が出荷された. しかし, 出荷先となった香川県において流通前の枝肉など全製品についてMNS不検出の確認が終了し, 3月には全頭出荷再開となった. その後, 4月に同一ロットの肉用牛2頭が兵庫県へ搬入され, 県生活衛生課より安全性確認のため当所へ残留検査の依頼があった. そこで, 厚労省通知法である「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」(以下, I法)²⁾をもとにLC/TOF-MSによるMNS分析法の検討を行った. また, 本法について厚労省のガイドライン³⁾に基づき妥当性を検証するとともに搬入検体の検査に用いたの

健康科学部

*別掲請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター

健康科学部 服部 涼子

II 材料と方法

1. 試料

1.1 試験法の検討用食品

牛筋肉及び牛腎臓

1.2 依頼検査の検体

牛筋肉 2 検体, 牛腎臓 2 検体

2. 標準品

MNS は Dr. Ehrenstorfer 社製を用いた。MNS の化学構造式を Fig.1 に示した。

MNS は、10 mg をメタノール 100 mL に溶解して 100 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液とし、さらに希釈して 10 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液として 4°C で保存した。添加用標準溶液には、標準原液をメタノールで用時希釈して用いた。溶媒標準溶液には、基準値濃度に調製した標準溶液を 40% アセトニトリル水溶液に転溶して用いた。

マトリックス標準溶液はブランク試料から得た抽出液を乾固後、調製済みの溶媒標準溶液に溶かして使用した。

3. 試薬等

アセトニトリル及びメタノールはそれぞれ和光純薬工業 (株) 製及び関東化学 (株) 製の HPLC 用を用いた。その他の試薬は全て和光純薬工業 (株) 製の特級を用いた。固相ミニカラムは ISOLUTE C₁₈ (EC) 及び ISOLUTE PSA (ともにバイオタージ・ジャパン (株) 製)、あらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした SeP-Pak vac RC silica 500 mg (日本ウォーターズ (株) 製) を用いた。

4. 試験溶液の調製

試験溶液の最適な調製手順を Fig.2 に示す。本法による添加回収試験では、試料 3 g に 0.15 $\mu\text{g/mL}$ の添加用標準溶液 200 μL を添加して試料中濃度が 0.01 $\mu\text{g/g}$ となるようにした。

5. 装置

LC/TOF-MS 装置: アジレントテクノロジー (株) 製 Agilent 1200LC+6210 MSD-TOF

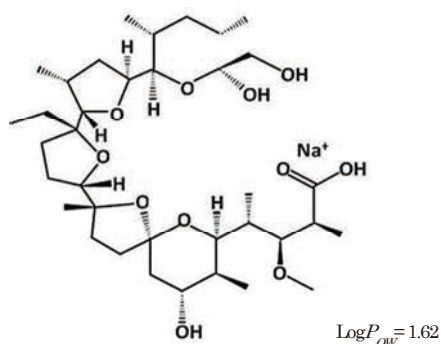


Fig.1 Chemical structure of MNS

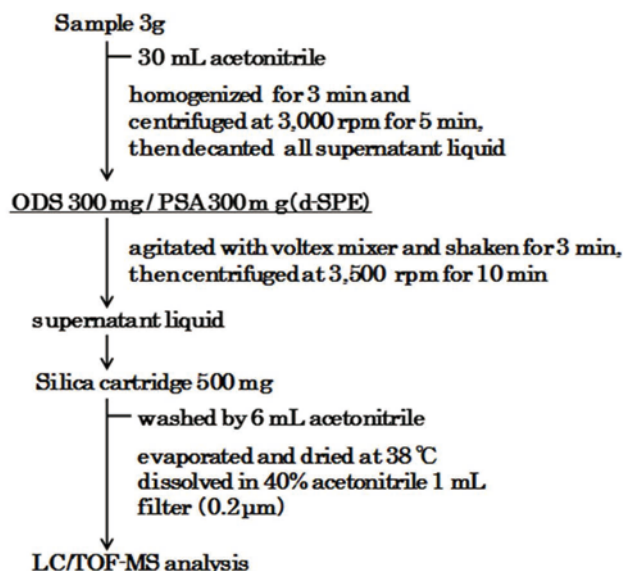


Fig.2 Sample preparation flow

遠心分離器: 久保田商事(株)製 KUBOTA8700

フードプロセッサー: 松下電器産業 (株) 製 National MK-K58

6. 分析条件

6.1 LC 条件

分析カラム: Inertsil ODS-SP (3.0 mm × 100 mm, 3 μm)
ジーエルサイエンス (株) 製, ガードカラム: Inertsil ODS-3
(3.0 mm × 10 mm, 3 μm) ジーエルサイエンス (株) 製
移動相: A) 0.1%ギ酸, B) 0.1%ギ酸アセトニトリル, グ
ラジエント条件: A:B = 60:40 (0分) → 0:100 (11分)
→ 0:100 (20分), 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C,
注入量: 5 μL , カラム温度: 40°C, サンプルクーラー温度:
15°C

6.2 MS 条件

ネブライザーガス: 15 psi, 乾燥ガス: 2.9 L/min (300°C),
イオン化法及びキャピラリー電圧: ESI (Positive, 4000 V),
リファレンスマス: m/z 121.0508, 922.0097

定量イオン及び確認イオンのモニターイオンは m/z
693.4190 のイオンを用い、定量イオンのフラグメンター電
圧は 200 V, 確認イオンは 100 V とした。

III 結果及び考察

1. 分析条件の検討

分析カラムへの MNS の吸着が推察されたため、分析カ
ラムには炭素量が少なく保持能の低い Inertsil ODS-SP を
使用した。

移動相は、I 法²⁾ では 0.1%ギ酸溶液-アセトニトリルが

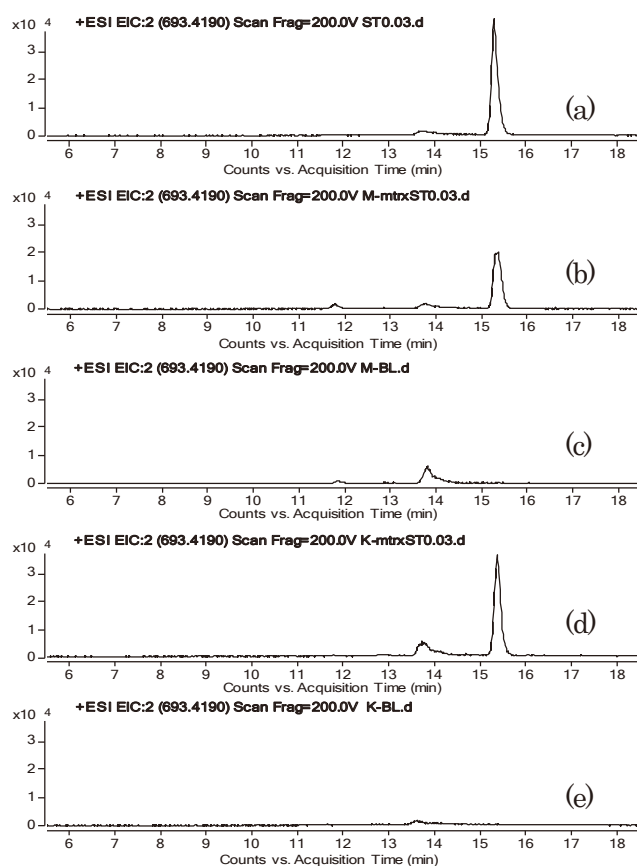


Fig 3 Chromatograms of MNS standard solution (0.03 µg/mL) (a), MNS matrix standard solution of bovine muscle (0.03 µg/mL) (b), blank solution of bovine muscle (c), MNS matrix standard solution of bovine kidney (0.03 µg/mL) (d), blank solution of bovine kidney (e)

用いられているが、0.1%ギ酸溶液-0.1%ギ酸/アセトニトリルを用いた報告⁴⁶⁾を参考に測定したところ、後者で感度が10倍以上上昇したため、0.1%ギ酸溶液-0.1%ギ酸/アセトニトリルを用いることとした。

グラジエント条件は、有機溶媒比率を40%から開始し、11分で100%として、15.3分付近において良好なピークを得ることができた (Fig. 3)。

モニターイオンは、フラグメンター電圧200Vにおいてナトリウム付加体である $C_{36}H_{62}O_{11}+Na^+$ (m/z 693.4190) が最も高感度であったため定量イオンとした。フラグメンター電圧100Vにおいても同一イオンの感度が高かったため確認イオンとして用いた。

2. 前処理法の検討

2.1 I法からの変更

牛筋肉を用いたI法²⁾による添加回収試験では、低回収率となったため原因を調査したところ、添加したMNSは最終試験溶液に積層するヘキサンから約25%が検出され、

MNSのヘキサンへの移行が確認された。また、マトリックス標準溶液のピーク高が溶媒標準溶液の約10%となり、イオン化抑制が確認された。さらにヘキサン液液分配時の煩雑な操作によりロスが生じたと考えられた。これらのことから、脱脂操作にはヘキサンではなくODS及びPSAを用いた固相抽出法とした。固相抽出にはミニカラム固相抽出及び分散固相抽出を検討した。

2.2 固相抽出法の検討

2.2.1 ミニカラム固相抽出

固相抽出はChéneauらの方法⁵⁾を参考にODSを用いる方法を試みたが、回収率が20%未満であり、MNSの吸着が推察された。PSAでは、75%以上であり良好な回収率であったが、分析を継続するにつれて妨害ピークが増加するとともにベースラインが上昇し、感度の低下が認められた。

2.2.2 分散固相抽出

山口らの方法⁷⁾を参考に行った検討では、試料3g相当の牛筋肉の抽出液に等量のODS及びPSAを100mg, 200mg, 300mg, 500mg添加して平均添加回収率 ($n=2$) を比較した。100~300mgでは87.1~117.4%となり、良好な値となった。500mgでは52.5%となったことから、MNSのODSへの吸着の影響が推察された。以上の結果から、最も回収率が安定していた各300mgを用いることとした。また、この抽出法の採用によりヘキサン液液分配と比較して操作がより簡便になった。

2.3 シリカゲルカラムによる精製

シリカゲルカラムに極性夾雑物を保持させて除去する方法^{6,7)}でさらに精製を行った。この精製を行わない場合と比較して、ベースラインの上昇などによる感度の低下は認められず、より精製できることが明らかとなった。

3. 妥当性評価

ガイドライン²⁾に基づく妥当性評価の結果をTable 1に示す。

選択性については、ピーク近傍にMNSのピーク高の1/3を超える妨害は認められず良好であった。本法の定量下限値は0.01 µg/gであり、ガイドラインの目標値である $S/N \geq 10$ を十分に満たした。牛の筋肉及び腎臓の残留基準値(0.01 µg/g)付近における定量が可能であることが明らかとなった。

真度、併行精度、室内精度についても目標値を満たしたことから、本法は妥当性があり行政検査として適用可能であった。

4. マトリックス効果

マトリックス効果は、LC/MS装置のイオン源における目的成分のイオン化が試料中のマトリックス成分と競合し、

Table 1 Validation results of this study for bovine muscles and kidneys

Fortified concentration (µg/g)	Sample	Recovery (%) ^{a)}	Repeatability (RSD%) ^{b)}	Intermediate precision (RSD%) ^{b)}
0.01	bovine muscles	82.2 (7.4)	7.5	10.3
	bovine kidneys	94.2 (11.4)	16.2	12.3
Criteria		70~120	< 25	< 30

a) n=5, ():CV%

b) n=10 (2×5)

Table 2 Comparison between the official method and this study

Analysis method	Bovine muscles			Bovine kidneys		
	Recoveries calculated with matrix standard (%)	Recoveries calculated with solvent standard (%)	Matrix effect value ^{c)}	Recoveries calculated with matrix standard (%)	Recoveries calculated with solvent standard (%)	Matrix effect value ^{c)}
The official ^{a)}	77.2 (13.3)	3.3 (13.3)	20.8	-	-	-
This study ^{b)}	82.2 (7.4) *	40.2 (7.3)	2.0	94.2 (11.4) *	85.6 (11.4)	1.1

a) n=3

b) n=5, ():CV%

c) Recoveries calculated with matrix standard /those with solvent standard

*see above

目的成分の感度が標準溶液と比較して、低下（イオン化抑制）あるいは上昇（イオン化促進）する現象である⁸⁾。

本法及びI法¹⁾の添加回収試験におけるマトリックスの影響を比較するため、マトリックス効果を次式⁹⁾により求め、結果をTable 2に示した。

$$\text{マトリックス効果} = \frac{\text{マトリックス添加標準溶液により算出した回収率}}{\text{溶媒標準溶液により算出した回収率}}$$

マトリックス効果の値>1の場合はイオン化抑制を示し、値<1の場合はイオン化促進を示す。牛筋肉を用いたI法の添加回収試験（n=3）では、20.8となり、イオン化抑制が確認された。本法（n=5）では、牛の筋肉及び腎臓で2.0及び1.1であった。牛の筋肉においてはI法¹⁾と比較してイオン化抑制が小さく、より効果的にマトリックスを排除できていることが確認できた。

5. 本法によるMNS残留検査

依頼された牛筋肉及び牛腎臓各2検体について分析したところ、MNSは検出されなかった。

IV 結論

本法では、通知法において煩雑な操作を伴うヘキサン液液分配をODS及びPSAによる分散固相抽出に変更し、さらにシリカゲルカラムによる精製を行った。この方法は、操作が簡便であるとともに効果的にマトリックスを除去でき、LC/TOF-MSでより信頼性の高い定量が可能となった。また、本法はガイドラインに基づく妥当性評価を満たしたため、行政検査として適用でき、今回、本法を用いた依頼検体の筋肉及び腎臓を検査した結果、MNSは検出されず、これらの安全性を示すことができた。

文献

- 1) 内閣府食品安全委員会通知：食品健康影響評価の結果の通知について。平成25年2月18日、府食第128号別添（2013）
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について。平成17年1月24日、食安発第0124001号別添（2005）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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。平成22年12月24日、食安発1224

- 第1号 (2010)
- 4) Lombardi, K. R. Burnett, T. J. Brunelle, S. L. Ulrey, W. D. Coleman, M. R. : Determination and Confirmation of Narasin and Monensin in Chicken, Swine, Bovine Tissues by LC-MS/MS : Final Action 2011.24 J. AOAC Int., **96**, 902-909 (2013)
- 5) Chéneau, E. Henri, J. Pirotais, Y. Abjean, J. Roudaut, B. Sanders, P. Laurentie, M. : Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies : Applying a total error approach. J. Chromatogr. B, **850**, 15-23 (2007)
- 6) 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)
- 7) 山口瑞香, 柿本健作, 山口貴弘, 尾花裕孝 : LC-MS/MS による畜産物中のポリエーテル系抗生物質及びマクロライド系駆虫薬の一斉分析. 食品衛生学雑誌, **52**, 281-286 (2011)
- 8) 望月直樹 : 食品の安全における LC-MS/MS 分析の問題点. 薬学雑誌, **131**, 1019-1025 (2011)
- 9) 松岡智郁, 秋山由美, 三橋隆夫 : 食肉中のオキサベトリニル, トリチコナゾール, フルセナセットおよびプロメトリンにおける残留農薬一斉分析法の適用性. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 第2号, 26-31 (2011)
- (平成 29 年 3 月 15 日受理)