

## HPLC による畜産食品中のシロマジン分析法

林 洋\*, 竹 葉 和 江\*, 草 野 友 子\*, 牛 山 慶 子\*, 坂 本 美 穂\*,  
神 田 真 軌\*, 井 草 京 子\*, 小 山 内 た か\*, 井 部 明 広\*

### Determination of Cyromazine in Animal-derived Foods by HPLC

Hiroshi HAYASHI\*, Kazue TAKEBA\*, Tomoko KUSANO\*, Keiko USHIYAMA\*, Miho SAKAMOTO\*,  
Maki KANDA\*, Kyoko IGUSA\*, Taka OSANAI and Akihiro IBE\*

An analytical method of insecticide cyromazine in milk, chicken muscle and egg by high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection was developed. Chromatographic separation of cyromazine was performed on a C18 column (3  $\mu$ m, 4.6 mm i.d.  $\times$  75 mm) using a mixture of 50 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile as the mobile phase, at 40°C and at a flow rate of 1.0 mL/min. Cyromazine in food samples was extracted with 0.4% metaphosphoric acid-methanol (1:1). The extracts were cleaned up with a cation-exchange cartridge, Oasis MCX. Average recoveries ( $n=5$ ) of cyromazine from spiked food samples were 73-84%, the coefficients of variation (C.V.) were 1-14%, the limits of detection ( $S/N=3$ ) were 5 ng/g. Identification of cyromazine was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS)

**Keywords** : シロマジン cyromazine, 殺虫剤 insecticide, 残留分析 residual analysis, 畜産食品 animal-derived foods, 生乳 raw milk, 鶏肉 chicken, 鶏卵 egg, 高速液体クロマトグラフ HPLC, 液体クロマトグラフ/質量分析装置 LC/MS

### はじめに

シロマジンは、トリアジン構造を有する昆虫成長抑制剤で、畜舎、鶏舎内およびその周辺のハエ等の衛生害虫の駆除に用いられている防虫および殺虫剤である。ハエ等の幼虫に殺虫効果を発揮してその生活環を断ち切り、効率良く衛生害虫を駆除する。作用機序が幼虫のクチクラ硬化による殺虫作用であるため、外骨格を持たない哺乳類や鳥類に対して、高い安全性を有している。

動物用医薬品としてのシロマジンは、国内では平成 14 年 12 月 20 日に、乳、鶏肉、羊肉、鶏卵に残留基準値が設定され、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた残留試験法が告示された<sup>1)</sup>。しかし、この省令および告示試験法では、精製に使用する固相抽出カートリッジの製造ロットによっては、十分な回収率が得られない場合があるとの指摘があり、平成 15 年 1 月 15 日付でカートリッジのロット差等の影響を受けにくい試験法が示された (通知法)<sup>2, 3)</sup>。

シロマジンの残留基準値が設定されたことに伴い、東京都内の乳処理工場に搬入される生乳中のシロマジン进行分析する必要が生じたことから、通知法に基づいて添加回収実験を行ったところ回収率は 50% 以下であり、満足のできる結果でなかった。そこで、通知法の除タンパク・抽出用溶

液、固相抽出カートリッジ、溶出液および HPLC 条件等について検討を加えて改良したところ、良好な結果が得られたので報告する。また、シロマジンは鶏肉および鶏卵にも残留基準値が設定されていることから、これらについての本分析法の適用の可能性についても検討した。さらに、検体からシロマジンが検出された際には、高速液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS) による確認作業が必須であることから、LC/MS による乳中のシロマジンの測定条件についても検討したのであわせて報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

東京都内で市販の牛乳、鶏肉、鶏卵および東京都内の乳処理工場で採取した生乳を用いた。

#### 2. 試薬

標準品：和光純薬工業製のシロマジン (純度 99.0%) を使用した。

標準溶液：シロマジン 10 mg をメタノールで溶解し 100 mL としたものを標準原液 (100  $\mu$ g/g) とし、これを適宜移動相で希釈して標準溶液とした。

除タンパク・抽出用溶液：0.4% メタリン酸溶液-メタノ

\* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

ール (1:1) を用時調製し、メタリン酸の除タンパク効果を高めるため、あらかじめ冷蔵庫で 10°C に冷却したものを使用した。

50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0) : 7.80 g のリン酸一ナトリウムを蒸留水 900 mL に溶解し、50% リン酸を用いて pH 3.0 に調整した後、蒸留水を加えて 1,000 mL とした。

50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 : 77.08 g の酢酸アンモニウムを蒸留水で溶解して 1,000 mL とし、セルロース混合エステルメンブレンフィルター (0.45  $\mu$ m, 東洋濾紙製) でろ過したものを原液 (1 mol/L) とした。これを適宜蒸留水で希釈して 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液とし、移動相に使用した。

固相抽出カートリッジ : 強酸性陽イオン交換体カートリッジ Waters 製 Oasis MCX (充填剤量 150 mg) を使用した。メタノール 3 mL および蒸留水 3 mL で前処理後使用した。

アセトニトリル, メタノールおよび蒸留水は HPLC グレードのものを, その他の試薬は特級品を用いた。

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ : 島津製作所製 LC-10Avp システムを使用した。

高速液体クロマトグラフ/質量分析装置 : 高速液体クロマトグラフとして Agilent Technologies 製 1100 シリーズを, 質量分析装置として Thermo Electron 製 Finnigan MAT TSQ 7000 を使用した。

振とう機 : 杉山元理器製 ELVIS EL を用いた。

ホモジナイザー : IKA Works 製 ULTRA-TURRAX T 25 basic を用いた。

冷却遠心機 : トミー精工製 LX-130 を用いた。

メンブレンフィルター : Whatman 製 AUTOVIAL 5 ナイロンメンブレンフィルター (0.45  $\mu$ m) を用いた。

### 4. HPLC 測定条件

分析カラム : 資生堂製 Capcell Pak C18 MG (3  $\mu$ m, 4.6 mm i.d.  $\times$  75 mm), 移動相 : 牛乳, 生乳および鶏肉の場合は 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (49:1) を, 鶏卵の場合は 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (97:3) を使用した, 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40°C, 試料注入量 : 50  $\mu$ L, 検出はフォトダイオードアレイ検出器を使用し, 検出波長は 240 nm を使用した。

### 5. LC/MS 測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ 分析カラム : 資生堂製 Capcell Pak C18 MG (3  $\mu$ m, 2.0 mm i.d.  $\times$  75 mm), 移動相 : 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (49:1), 流速 : 300  $\mu$ L/min, カラム温度 : 40°C, 試料注入量 : 10  $\mu$ L.

2) 質量分析装置 イオン化 : ESI, positive, イオンスプレー電圧 : 4.5 kV, 脱溶媒化温度 : 350°C, モニターイオン :  $m/z$  167.

### 6. 試験溶液の調製

乳の場合は試料 5.0 g, 鶏肉の場合は検体を細切均一化した後, その 5.0 g, 鶏卵の場合は卵の殻を除き均質化した後, その 1.0 g を 100 mL 遠沈管に秤量し, 0.4% メタリン酸溶液-メタノール (1:1) 35 mL を加え, 振とう機 (牛乳, 生乳の場合) またはホモジナイザー (鶏肉, 鶏卵の場合) を用いて均質化した後, 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過し, Oasis MCX カートリッジに負荷した。このカートリッジを 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0) -メタノール (1:1) 10 mL および蒸留水 5 mL で順次洗浄した後, 28% アンモニア水-メタノール (1:99) 5 mL で溶出した。この溶出液を 50 mL 遠沈管に採り, ロータリーエバポレーターで 40°C 以下で減圧乾固し, これに 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (49:1) 1 mL を加えて 3 分間超音波処理した後, メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

### 7. 検量線の作成

シロマジン標準溶液を 50 ng/mL ~ 10  $\mu$ g/mL の範囲で調製し, 50  $\mu$ L を HPLC に注入して各クロマトグラムピーク面積から絶対検量線法により検量線を作成した。

## 結果および考察

### 1. HPLC 測定条件の検討

通知法の操作条件では, カラム充填剤として C18 (3.0 ~ 6.0 mm i.d.  $\times$  150 mm), 移動相として 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) -アセトニトリル (49:1) を用いて操作することが示されている。分析カラムに Capcell Pak C18 UG120 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 資生堂) を用いてシロマジン標準溶液の測定を行ったところ, ピーク形状が悪くシャープなピークのクロマトグラムが得られなかった。また, シロマジン標準溶液を添加した牛乳抽出試料では, 移動相の混合比を変化させた場合でも牛乳試料のマトリックスピークとの分離が不十分であった。さらに, シロマジンが検出された場合の LC/MS による測定の際の利便性を考慮し, 共通して利用可能な移動相を採用することとした。以上のような理由から移動相は 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル混液を使用することにした。

この移動相を用いて, 繁用されている市販分析カラム (L-column ODS (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 化学物質評価研究機構), Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, ジーエルサイエンス), Chromolith Performance RP-18e (4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm, Merck), Capcell Pak C18 UG120 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm), Capcell Pak C18 MG (4.6 mm i.d.  $\times$  75 mm) 等) を用いて, シロマジンのピーク形状および牛乳マトリックスとの相互分離等について検討した。その結果, 分析カラムでは, Capcell Pak C18 MG を用いた場合がもっともピーク形状が良好なクロマトグラムが得られた。また, 移動相のアセトニトリル濃度については, 1 ~ 10% の範囲で変化させて最適な分離条件を検討したところ, アセトニトリル濃度 2

%の場合が牛乳試料のマトリックスピークとの分離が良好であった。なお、鶏卵においては、この条件ではマトリックスピークとの分離が不十分であったため、移動相の混合比を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (97:3) とした。

試料の注入量は、シロマジンの感度およびピーク形状を考慮して 50  $\mu$ L とした。

## 2. 試験溶液の調製法の検討

1) 固相抽出カートリッジの変更 通知法では精製用の強酸性陽イオン交換体カートリッジには Bond Elut SCX が使用されており<sup>3)</sup>、このカートリッジでは製造ロット差によるバラツキが大きいことが指摘されていた。著者らもこのカートリッジを用いて予備実験を行ったところ十分な回収率が得られなかった。また、しばしば試料抽出溶液の負荷の際に目詰りをおこすことがあった。そこで、同じ強酸性陽イオンタイプの交換体を使用した Oasis MCX カートリッジを用いて回収率について比較検討した。その結果、回収率は Bond Elut SCX の場合は 25% であったが Oasis MCX の場合は 64% と改善された。また、Oasis MCX の場合は製造ロット差が少なく安定した回収率が得られ、目詰りも生じないことがわかったため、精製用の固相抽出カートリッジには Oasis MCX を用いて検討することにした。

2) 溶出液の検討 Oasis MCX カートリッジに変更したことに伴い、溶出液についても検討した。通知法で使用されている 100 mmol/L リン酸二カリウム溶液-メタノール (1:9) と強酸性陽イオン交換体を使用する際に通常用いられる 28% アンモニア水-メタノール (1:99) について比較検討した。その結果、シロマジンの回収率は、100 mmol/L リン酸二カリウム溶液-メタノール (1:9) の場合は 67% であり、28% アンモニア水-メタノール (1:99) では 77% へと改善されたため、溶出液は 28% アンモニア水-メタノール (1:99) を使用することにした。

3) 除タンパク・抽出用溶液の検討 ここまでに検討した条件に従い、抽出に 1.2% メタリン酸溶液-メタノールを用いて牛乳でのシロマジンの添加回収実験を行ったところ、乳の種類によってはブランク試料にシロマジンと溶出時間が重なるマトリックスピークが出現する例が認められた。メタリン酸溶液-メタノールは動物用医薬品の残留試験法における試料調製の中で多く使用されており、メタリン酸の濃度を下げると試験溶液中の夾雑物が減少することが知られている。スピラマイシン試験法<sup>4)</sup>、チルミコシン試験法<sup>4)</sup>においても同様の抽出液が使用されており、試料の種類により 0.4% あるいは 1.2% のメタリン酸の濃度の抽出溶液が使用されている。そこで、牛乳試料についても 0.4% および 1.2% メタリン酸の溶液について検討した。その結果、1.2% メタリン酸溶液を使用した場合に出現した牛乳のマトリックスピークは、0.4% メタリン酸溶液を使用した場合には認められず、また、この場合の回収率は 82~86% と良好な値であった。以上のことから、除タンパク・抽出用

溶液は 0.4% メタリン酸溶液-メタノール (1:1) を用いることとした。

## 3. 添加回収実験

あらかじめシロマジンが含有していないことを確認した牛乳、生乳、鶏肉および鶏卵に、牛乳は 10 ng/g および 50 ng/g、生乳、鶏肉は 50 ng/g、鶏卵は 100 ng/g の濃度でシロマジンを添加し回収率を求めた。その結果、Table 1 に示したよう

Table 1. Recoveries of Cyromazine from Animal-derived Foods

Sample	Spiked level (ng/g)	Recovery (%) *
Milk	10	75.6 $\pm$ 13.3
	50	73.4 $\pm$ 1.1
Raw milk	50	79.4 $\pm$ 0.8
Chicken muscle	50	75.0 $\pm$ 2.3
Egg	100	84.0 $\pm$ 4.8

\*Values indicate the mean  $\pm$  C.V. (n=5).

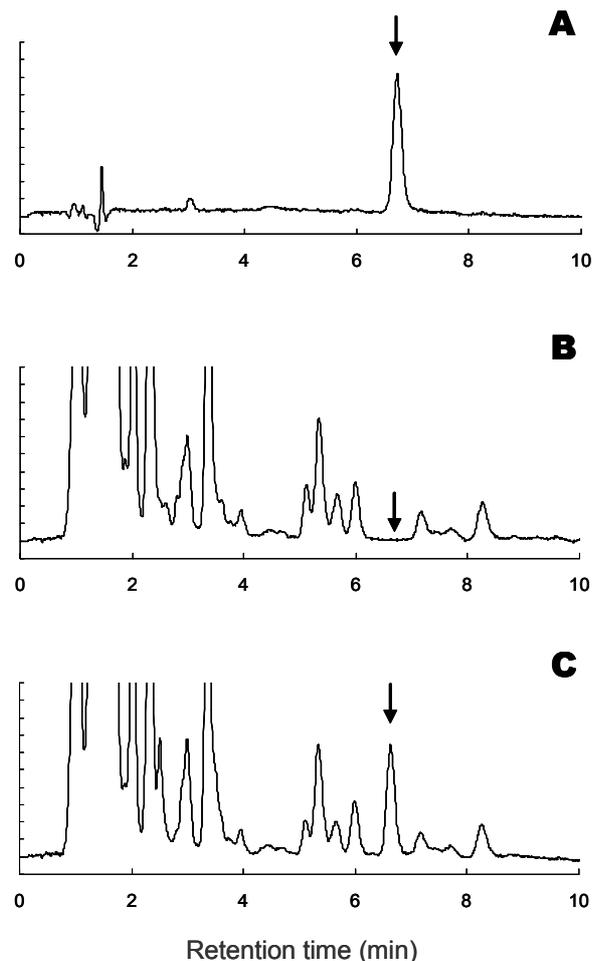


Fig. 1. Typical Liquid Chromatograms of (A) Standard Cyromazine (250 ng/mL), (B) Blank Milk Extract and (C) an Extract of Milk spiked with 50 ng/g of Cyromazine.

Arrows indicate the retention time of cyromazine.

にシロマジンの平均添加回収率 ( $n=5$ ) は 73.4~84.0%, 変動係数は 0.8~13.3% の範囲にあった。また, 試料中のシロマジンの検出限界は, 乳および鶏肉で 5 ng/g, 鶏卵で 25 ng/g であり, これはシロマジンのそれぞれの残留基準値, 乳 10 ng/g, 鶏肉 50 ng/g および鶏卵 200 ng/g を十分検出可能であった。Codex 規格<sup>5)</sup> および厚生労働省の「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法迅速作成ガイドライン」<sup>6)</sup> によると, これらの添加濃度における回収率は 70~110%, 変動係数は 20% 以下であることから, 残留分析法として満足できる結果であった。シロマジンを添加した牛乳, 鶏肉および鶏卵の試料の HPLC クロマトグラムを Fig. 1~3 に示した。

#### 4. 生乳の残留調査

東京都内の乳処理工場で採取した生乳 20 検体について, 本分析法を適用してシロマジンの残留調査を行った。その結果, いずれの検体からもシロマジンは検出されなかった。

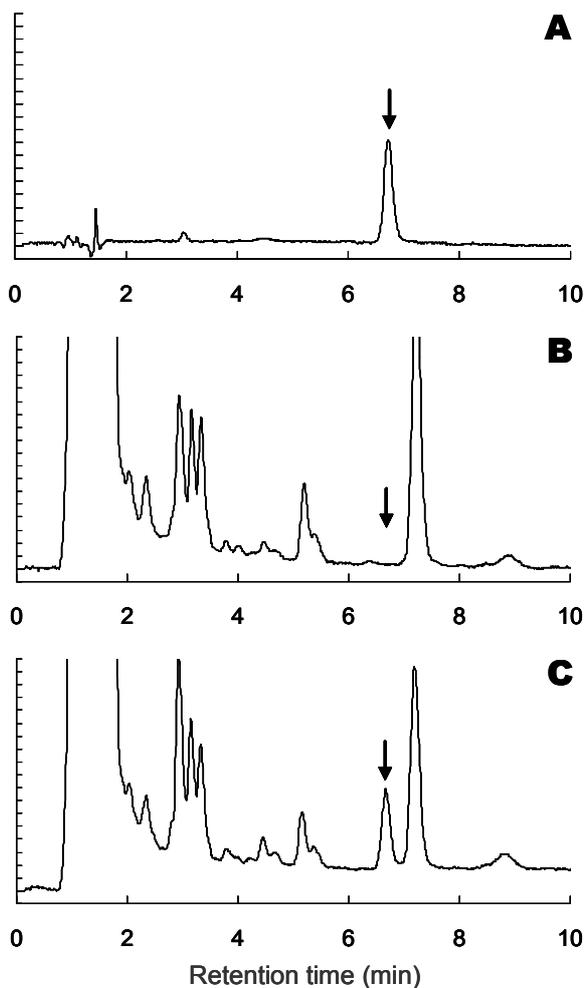


Fig. 2. Typical Liquid Chromatograms of (A) Standard Cyromazine (250 ng/mL), (B) Blank Chicken Muscle Extract and (C) an Extract of Chicken Muscle spiked with 50 ng/g of Cyromazine.

Arrows indicate the retention time of cyromazine.

これらの生乳を採取した畜舎では衛生害虫の駆除のため不定期にシロマジンを使用しているとのことであったが, これらの生乳には残留していないことが明らかとなった。

#### 5. LC/MS での確認

LC/MS の測定に用いた分析カラムおよび移動相は, おおむね HPLC 条件に従い, 試料注入量は, 十分な検出感度を得るため 10  $\mu$ L とした。LC/MS による分析のインターフェイスには, 極性化合物のイオン化に適した方法であるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を使用し, 検出には選択イオンモニター (selected ion monitor, SIM) 法を採用した。またイオン化モードはポジティブモードを使用した。シロマジンのモニターには, プロトン化分子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  167) を選択した。本分析法を用いて, シロマジン 50 ng/g を添加した牛乳試料溶液を調製して LC/MS で測定した。その SIM クロマトグラムとマススペクトルを Fig. 4 に示した。LC/MS による測定ではシロマジン 1 ng/g レベルの測定が可

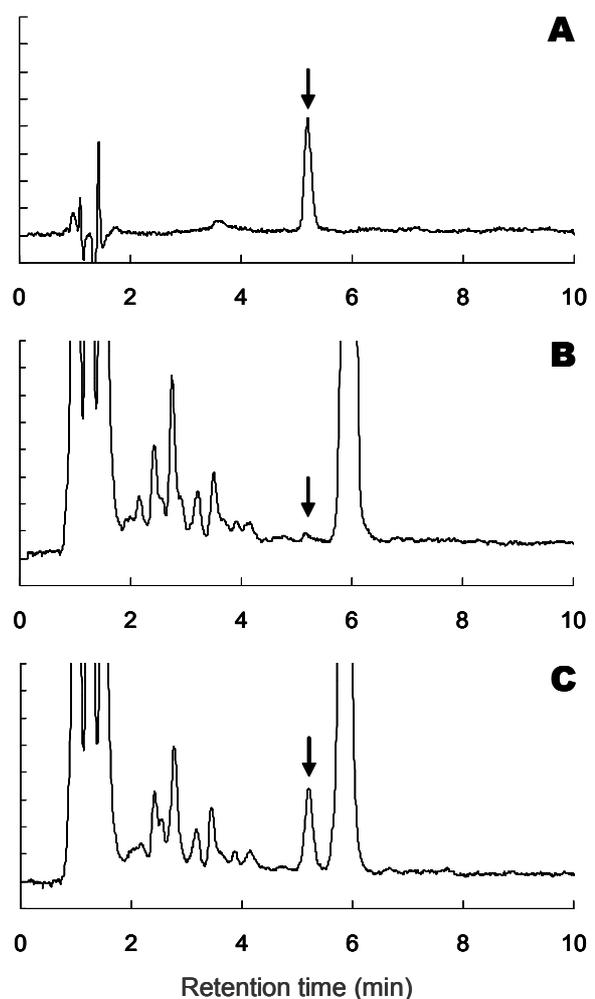


Fig. 3. Typical Liquid Chromatograms of (A) Standard Cyromazine (100 ng/mL), (B) Blank Egg Extract and (C) an Extract of Egg spiked with 100 ng/g of Cyromazine.

Arrows indicate the retention time of cyromazine.

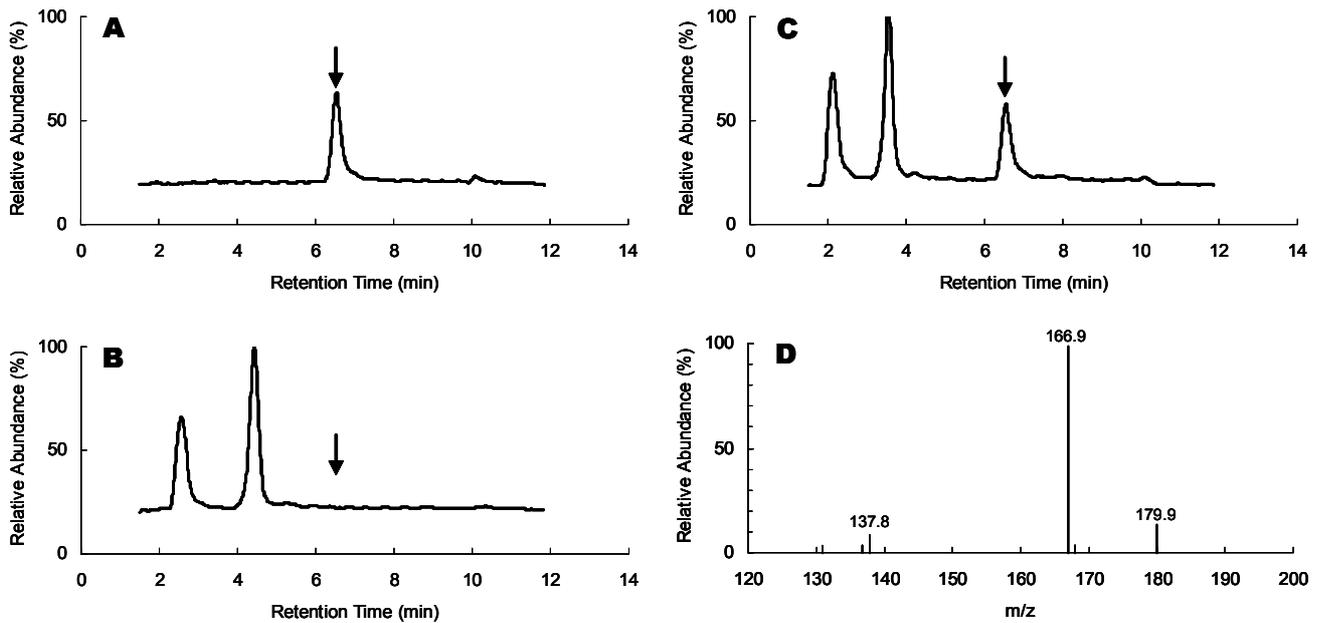


Fig. 4. Typical LC/MS SIM ( $m/z$  167) Chromatograms of (A) Standard Cyromazine (10 ng/mL), (B) Blank Milk Extract and (C) an Extract of Milk spiked with 2 ng/g of Cyromazine. (D) Full Scan Mass Spectrum of Cyromazine.

Arrows indicate the retention time of cyromazine.

能であった。

#### まとめ

HPLC による畜産食品中のシロマジンの残留分析法を検討した。試料を 0.4% メタリン酸溶液-メタノール (1:1) で抽出後, Oasis MCX を使用し, 溶出液に 28% アンモニア水-メタノール (1:99) を使用して精製を行った。

分析用のカラムは Capcell Pak C18 MG (4.6mm i.d.×75 mm) を用い, 移動相は 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリルを使用し, 良好なクロマトグラムが得られた。

本分析法の乳, 鶏肉および鶏卵における添加回収率は 73% 以上, 変動係数は 14% 以下であった。また, 本分析法の検出限界は, 乳および鶏肉で 5 ng/g, 鶏卵で 25 ng/g であった。

東京都内の乳処理工場に搬入された生乳 20 検体についてシロマジンの残留調査を行ったが, シロマジンは検出されなかった。

(本研究の概要は, 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会,

2004 年 11 月, 広島で発表した。)

#### 文献

- 1) 平成 14 年 12 月 20 日付厚生労働省令第 164 号および厚生労働省告示第 387 号 (2002).
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知 “畜水産食品中に残留する動物用医薬品等の試験方法について” 平成 15 年 1 月 15 日食基発第 0115001 号 (2003).
- 3) 残留動物用医薬品試験法検討委員会: 食品衛生研究, **53** (5), 39-45, 2003.
- 4) 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” 平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号 (2005).
- 5) FAO/WHO ed.: Codex Alimentarius: Residues of veterinary drugs in foods, Volume 3, 2nd ed., 66-69, 1995.
- 6) 米谷民雄: 食品衛生研究, **56** (4), 7-12, 2006.