

LC/MS/MS を用いた畜水産物の残留動物用医薬品の一斉分析法適用の検討

Study on Simultaneous Analysis of Residual Veterinary Drugs for Livestock and Marine Products by LC/MS/MS

紙本 佳奈 藤田 直希 安永 恵
Kana KAMIMOTO Naoki FUJITA Megumi YASUNAGA

要 旨

畜水産物を試料として、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC/MS/MS）を用いた残留動物用医薬品等の一斉分析法について検討し、「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」に従って、妥当性評価を実施した。その結果、動物用医薬品等 63 化合物中、約 9 割の化合物について、ガイドラインの目標値を満たしていた。

キーワード：残留動物用医薬品 畜水産物 LC/MS/MS 一斉分析法

I はじめに

飼料添加物及び動物用医薬品（以下、「動物用医薬品等」という。）は、動物の健康並びに動物性食品の安定生産を確保する上で欠かせない。しかし、食品中に含まれる可能性のある残留物の毒性や、残留物を原因とする薬剤耐性菌の出現、過敏症誘発などの影響も懸念されている。

現在、当センターでは、畜水産物に残留する動物用医薬品等については、厚生労働省通知¹⁾の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」（以下、「通知法」という。）及び個別試験法に準じて検査を実施している。また、平成 22 年 12 月 24 日付けで「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」（以下、「ガイドライン」という。）²⁾が厚生労働省により通知されたことから各試験検査機関は、このガイドラインに従い試験法の妥当性を確認することとなっている。

さらに、平成 18 年にポジティブリスト制度が施行され、規制対象となる動物用医薬品等が大幅に増加した。これらは種類により大きく物性が異なっており、同時に分析することは難しく、現在、当センターにおいても複数の試験法で対応している。

そこで、LC/MS/MS を用いた多成分一斉分析法について検討し、妥当性評価を実施した結果を報告する。

II 方法

1 試料

あらかじめ分析対象の動物用医薬品等の残留がないことを確認した豚肉をフードプロセッサを用いて均一化したものを試料とした。

2 試薬等

(1) 対象動物用医薬品

対象となる動物用医薬品を表 1 に示す。抗生物質 14 化合物（ β -ラクタム系抗生物質 4 化合物、テトラサイクリン系抗生物質 4 化合物、マクロライド系抗生物質 3 化合物、ポリエーテル系抗生物質 2 化合物、リンコマイシン系抗生物質 1 化合物）、合成抗菌剤 30 化合物、寄生虫駆除剤 7 化合物、ホルモン剤 6 化合物、殺虫剤 4 化合物、成長促進剤 1 化合物、鎮静剤 1 化合物、総計 63 化合物について実施した。

(2) 試薬

① 標準原液

富士フィルム和光純薬（株）製：動物用医薬品混合標準液 PL-1-3、動物用医薬品混合標準液 PL-2-1、動物用医薬品混合標準液（キノロン剤）（各 20 $\mu\text{g/mL}$ ）

5-ヒドロキシチアベンダゾール、アンピシリン、エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、クロピドール、クロルテトラサイクリン、サリノマイシン、ジクロキサシリン、ジフラゾン、セファゾリン、タイロシン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ナイカルバジン、フル

ベンダゾール、ベンジルペニシリン、モランテルの標準品を各々秤量し、メタノールに溶解した。(各 100 µg/mL)

標準品がメタノールに溶けにくい場合は、少量の *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解後、メタノールで希釈した。

② 混合標準溶液

富士フィルム和光純薬(株) 製動物用医薬品混合標準液 PL-1-3、PL-2-1、キノロン剤、その他 17 種類の標準原液を混合し対象の 63 化合物を含む混合標準溶液を調製した。本液 1 mL は各々 1 µg を含有する。

混合標準溶液をアセトニトリル：水(4：6)混液で適宜希釈したものにブランク試料から調製した試験溶液を加え、マトリックス検量線を作成した。

③ その他の試薬

n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用、メタノール、アセトニトリルは HPLC 用、*N,N*-ジメチルホルムアミドは特級、ギ酸、移動相に使用したアセトニトリルは LC/MS 用を用いた。

EDTA 含有クエン酸緩衝液：(第 1 液) クエン酸(特級) 21.0 g を水に溶かして 1000 mL とする。(第 2 液) リン酸二ナトリウム(特級) 71.6 g を水に溶かして 1000 mL とする。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物(特級) 1.86 g に第 1 液 307 mL と第 2 液 193 mL を混和したものを加えて溶かす。

(3) 精製用ミニカラム

Oasis PRiME HLB 6 cc (200 mg) (Waters 社製)

3 装置および測定条件

(1) 装置：液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 ACQUITY Xevo TQD/ACQUITY UPLC H-Class (Waters 社製)

(2) 測定条件

分析カラム：Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×100 mm、粒子径 1.7 µm) (Waters 社製)

移動相：A 液-0.05%ギ酸、B 液-0.05%ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント条件：B 液濃度 5% (0 分) → 98% (10 分) → 5% (12.5 分) → 5% (17 分)

カラム温度：40°C、流速：0.3 mL/min

試料注入量：5 µL

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法、ポジティブモード、ネガティブモード

デソルベーション温度：400°C

既報³⁾ の分析条件を参考にして設定した MRM 条件を表

1 に示す。

4 試験溶液の調製

試験溶液調製のフローチャートを図 1 に示す。

(1) 抽出法

試料 5.00 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に秤量し、EDTA 含有クエン酸緩衝液 5 mL を加え攪拌する。アセトニトリル 15 mL、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 10 mL、無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、ホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取する。残渣に 5%ギ酸含有アセトニトリル 10 mL を加えて激しく振り混ぜた後、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルで正確に 30 mL としたものを抽出液とする。

(2) 精製法

抽出液 6 mL をミニカラムに負荷し、アセトニトリル 4 mL で溶出した液を 38°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去する。アセトニトリル：水(4：6)混液 2 mL に溶解後、ろ過したものを試験溶液とする。

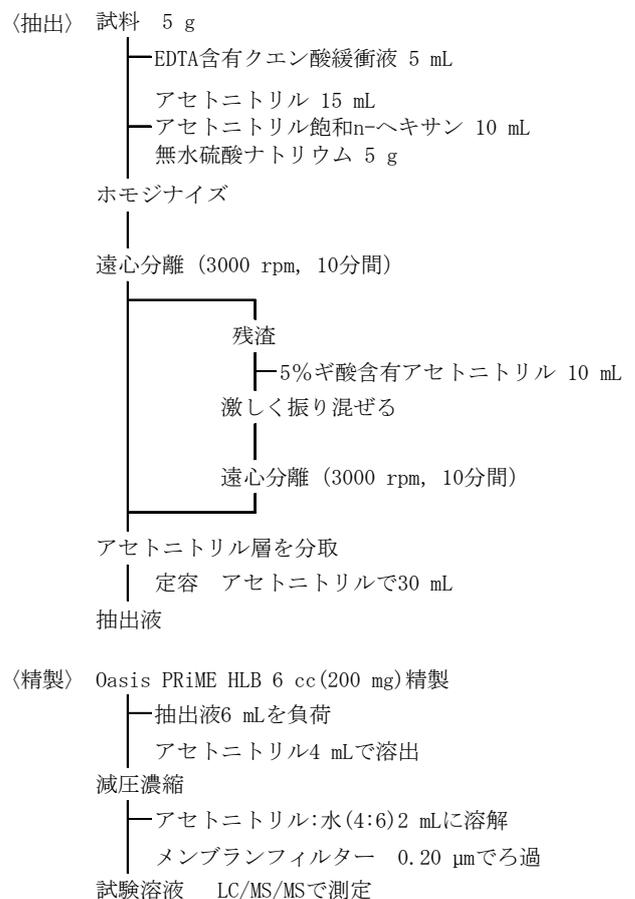


図 1 試験溶液調製フローチャート

表1 測定条件

No. 分類	分析対象化合物名	一斉分析法 I 対象化合物	イオン化法	保持 時間(分)	プリカーサー (m/z)	プロダクト (定量) (m/z)	CV(V)	CE(eV)	プリカーサー (m/z)	プロダクト (確認) (m/z)	CV(V)	CE(eV)
1	抗生物質		ESI(+)	3.47	350.2	106.0	30	18	350.2	160.0	30	12
2	エリスロマイシン	○	ESI(+)	5.55	734.5	158.1	30	30	734.5	576.5	30	20
3	オキシテトラサイクリン		ESI(+)	3.73	461.1	426.0	34	18	461.1	201.1	34	18
4	クロルテトラサイクリン		ESI(+)	4.62	479.1	444.1	35	22	479.1	154.2	35	22
5	サリマイシン		ESI(+)	12.15	773.6	431.3	65	51	773.6	531.4	65	42
6	ジクロキシサリリン		ESI(+)	7.31	470.0	211.9	40	40	470.0	254.0	40	25
7	セファゾリン		ESI(+)	3.98	455.1	323.0	22	10	455.1	156.0	22	16
8	タイロシン	○	ESI(+)	5.75	916.5	174.1	60	40	916.5	101.1	60	45
9	チアムリン	○	ESI(+)	6.07	494.0	192.0	30	15	494.0	119.0	30	30
10	テトラサイクリン		ESI(+)	3.93	445.2	410.2	30	14	445.2	154.2	30	14
11	ドキシサイクリン		ESI(+)	4.80	445.2	428.2	30	20	445.2	154.0	30	28
12	ベンジルペニシリン		ESI(+)	5.78	335.2	176.2	25	20	335.2	160.0	25	25
13	モネシリン	○	ESI(+)	12.21	693.7	461.3	64	54	693.7	479.3	64	50
14	リンコマイシン	○	ESI(+)	3.32	407.2	126.1	40	25	407.2	359.3	40	20
15	合成抗菌剤		ESI(+)	5.39	301.1	156.1	32	16	301.1	92.2	32	30
16	サルファ剤		ESI(+)	4.51	285.0	156.0	35	16	285.0	92.0	35	35
17	スルファジアジン	○	ESI(+)	3.09	251.0	92.0	30	27	251.0	156.0	30	15
18	スルファジミン	○	ESI(+)	4.01	279.1	92.0	35	30	279.1	124.1	35	20
19	スルファジメキシ	○	ESI(+)	5.36	311.1	156.0	36	20	311.1	92.0	36	32
20	スルファセキド	○	ESI(+)	2.75	215.0	156.0	25	12	215.0	108.0	25	18
21	スルファチアゾール	○	ESI(+)	3.37	256.0	156.0	31	15	256.0	92.0	31	25
22	スルファドキシ	○	ESI(+)	4.73	311.0	156.0	35	15	311.0	92.0	35	32
23	スルファコトラン	○	ESI(+)	6.14	336.0	156.0	30	15	336.0	92.0	30	30
24	スルファピリジン	○	ESI(+)	3.48	250.0	156.0	33	16	250.0	108.0	33	25
25	スルファメキサゾール	○	ESI(+)	4.74	254.1	92.0	30	25	254.1	156.0	30	15
26	スルファメキシピリダジン	○	ESI(+)	4.07	281.1	91.8	34	28	281.1	155.7	34	16
27	スルファメゾリン	○	ESI(+)	3.63	265.1	92.0	35	25	265.1	156.0	35	15
28	スルファモノメキシ	○	ESI(+)	4.38	281.0	92.0	35	35	281.0	156.0	35	22
29	合成抗菌剤		ESI(+)	5.29	238.1	206.2	25	10	238.1	135.9	25	12
30	その他		ESI(+)	3.90	360.3	316.3	25	20	360.3	342.3	25	20
31	エンロロキサシン	○	ESI(+)	3.76	362.3	318.3	25	20	362.3	261.3	25	30
32	オルビフロキサシン	○	ESI(+)	4.00	396.1	352.2	40	16	396.1	295.1	40	22
33	オルメフロキシム	○	ESI(+)	3.78	275.1	123.0	40	25	275.1	259.0	40	25
34	クロビドール	○	ESI(+)	3.07	192.1	100.9	40	26	192.1	86.9	40	30
35	ジフラゾン(バナゾン)		ESI(+)	5.60	360.7	222.0	35	20	360.7	302.0	35	20
36	ダノフロキサシン	○	ESI(+)	3.79	358.2	96.0	38	25	358.2	314.1	38	20
37	チアフェニコール	○	ESI(+)	3.87	373.0	307.8	15	20	373.0	337.8	15	15
38	トリメフロキシム	○	ESI(+)	3.59	291.3	123.0	40	30	291.3	230.2	40	30
39	ナイカルバジン		ESI(-)	7.67	301.0	136.8	16	12	301.0	106.9	16	32
40	ナジジクス酸	○	ESI(+)	5.93	233.1	215.0	30	15	233.1	187.0	30	25
41	ルフロキサシン		ESI(+)	3.61	320.1	233.0	40	25	320.1	276.1	40	20
42	ピリメタシン	○	ESI(+)	4.82	249.2	177.1	40	30	249.2	233.1	40	30
43	フロロフェニコール	○	ESI(-)	4.80	356.0	336.0	35	10	356.0	184.9	35	20
44	マルボフロキサシン	○	ESI(+)	3.52	363.1	72.0	35	20	363.1	320.0	35	15
45	寄生虫駆除剤		ESI(-)	4.77	186.0	139.0	35	16	186.0	95.8	35	20
46	5-プロピルスルホニル -1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンダゾールの分析対象物)	○	ESI(+)	3.31	240.0	132.9	40	25	240.0	197.9	40	20
47	チアベンダゾール	○	ESI(+)	3.35	202.0	175.0	51	25	202.0	131.0	51	30
48	5-ヒドロキシチアベンダゾール	○	ESI(+)	3.07	218.0	191.1	33	26	218.0	147.0	33	32
49	フルベンダゾール	○	ESI(+)	6.01	314.1	282.0	45	25	314.1	123.0	45	35
50	モランテル	○	ESI(+)	4.35	221.1	111.0	40	25	221.1	73.0	40	22
51	レバミゾール	○	ESI(+)	3.25	205.0	90.9	40	34	205.0	123.0	40	27
52	ホルモン剤		ESI(+)	6.58	271.2	253.2	40	22	271.2	199.0	40	22
53	α-トレンボロン	○	ESI(+)	6.35	271.2	199.0	40	22	271.2	253.2	40	22
54	ゼラノール		ESI(+)	6.79	323.1	122.8	15	25	323.1	188.9	15	25
55	デキサメタゾン	○	ESI(+)	6.08	393.3	373.2	20	10	393.3	355.2	20	10
56	ヒドロコチゾン	○	ESI(+)	5.52	363.4	121.1	35	25	363.4	327.3	35	15
57	プレドニゾロン	○	ESI(+)	5.45	361.2	343.2	25	10	361.2	170.7	25	20
58	殺虫剤		ESI(+)	8.55	886.6	158.0	45	37	886.6	81.9	45	40
59	トリクロルホン	○	ESI(+)	4.25	257.0	109.0	28	18	257.0	79.0	28	30
60	ファミフル	○	ESI(+)	7.52	326.0	93.0	32	31	326.0	217.0	32	20
61	フェブカルブ	○	ESI(+)	7.58	208.0	94.9	22	14	208.0	152.0	22	8
62	成長促進剤		ESI(+)	4.25	277.1	203.0	25	15	277.1	132.0	25	28
63	鎮静剤	○	ESI(+)	4.21	221.1	90.0	40	20	221.1	164.0	40	25

CV(V) : コーン電圧, CE(eV) : コリジョンエネルギー

5 妥当性評価方法

ガイドラインに従い、分析者1名が、添加試料を1日1回(2併行)、5日間実施する枝分かれ実験計画に基づき、一律基準である0.01 µg/gとなるように添加した試料を用いて試験を実施し、真度(回収率)及び精度を評価した。

表2 妥当性評価結果

化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
2-アセチルアミノ-5-ニコチンアザール	118.7	5.2	4.3
5-ヒドロキシベンゾアザール	88.2	6.9	6.2
5-βピロリホルン -1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンゾアザールの分析対象物)	88.7	1.3	2.0
α-トルネホルン	99.4	2.1	1.6
β-トルネホルン	97.2	4.7	5.0
アンピシリン	34.7	16.2	17.1
エトパベート	96.7	1.3	1.8
エマクチンB1a	95.0	2.7	2.5
エリスロマイシン	29.1	16.1	12.0
エンロキサシン	93.8	6.0	4.6
オキシテトラサイクリン	72.0	6.5	5.4
オフロキサシン	97.1	5.0	6.3
オルビフロキサシン	92.3	1.3	2.9
オルメプリム	79.8	2.7	4.0
キシラジン	89.9	3.0	3.1
クレンブテロール	95.7	1.6	2.6
クロビドール	96.4	2.5	2.2
クロルテトラサイクリン	66.5	4.4	7.0
サリノマイシン	62.5	15.7	18.0
ジクロキサシン	83.6	11.3	11.1
ジフラゾン(パナゾン)	77.2	21.9	27.8
スルファキノキサリン	93.3	4.4	6.3
スルファクロヒリダジン	88.0	7.5	9.9
スルファジアジン	94.3	5.7	6.9
スルファジミジン	87.0	4.9	5.8
スルファジメキシジン	91.2	3.6	4.8
スルファセキド	96.1	4.7	6.0
スルファチアゾール	76.6	4.5	5.4
スルファトキシジン	91.4	4.7	6.0
スルファニトラン	97.8	23.1	16.7
スルファヒリジン	83.8	5.1	5.4
スルファメキサゾール	95.6	5.7	5.4
スルファメキシピリダジン	88.5	5.0	5.5
スルファメラジン	86.6	7.5	9.9
スルファモノメキシジン	106.9	2.9	4.0
セファゾリン	84.1	17.2	20.6
ゼラノール	96.4	8.4	8.7
タイロシン	73.8	19.6	22.4
ダフロキサシン	78.6	3.7	4.2
チアベンゾアザール	95.7	1.8	2.7
チアムリン	95.8	1.5	2.8
チアンフェニコール	93.3	23.7	16.9
デキサメタゾン	99.8	5.0	4.1
テトラサイクリン	58.3	13.8	11.8
ドキシサイクリン	78.3	5.2	8.3
トリクロホン	99.3	4.4	7.0
トリメプリム	83.5	4.8	7.4
ナイカルバジン	95.8	6.7	4.8
ナリジクス酸	98.1	2.5	2.1
ルフロキサシン	74.8	12.8	11.3
ヒドロロチゾン	98.9	10.5	12.2
ピリメタジン	84.0	3.3	3.6
ファミール	97.7	2.8	2.8
フェノカルブ	98.3	2.3	3.1
フルベンゾアザール	98.7	1.7	1.8
フレドニゾロン	96.7	2.5	4.5
フロロフェニコール	87.6	15.5	11.7
ベンジルペニシリン	55.6	13.3	22.0
マルボフロキサシン	91.3	4.3	3.9
モネンジン	91.3	6.9	8.5
モランテル	79.7	2.9	3.9
リコマイシン	64.8	2.3	5.0
レバミゾール	91.4	1.7	4.9

真度(回収率)70~120%、併行精度RSD%<25、室内精度RSD%<30

Ⅲ 結果及び考察

1 抽出法および精製法の検討

通知法における分析対象化合物以外の化合物の抽出効率向上のため、個別試験法、島ら⁴⁾の報告を参考に、抽出時にEDTA含有クエン酸緩衝液を加え、抽出溶媒として5%ギ酸含有アセトニトリルを用いることとした。これによりテトラサイクリン類をはじめとする数種類の化合物で改善がみられた。

夾雑物の除去、分析カラムへの脂質等の蓄積の低減の効果もあることから、精製にはミニカラムを使用することとし、通知法等を参考に、Oasis PRiME HLB 6cc (200 mg)とSep-Pak Plus CN (Waters社製)を比較検討した。その結果、今回の対象である化合物については回収率に明確な差がみられなかったため、操作性に優れているOasis PRiME HLB 6cc (200 mg)を精製に用いることとした。

2 妥当性評価

妥当性評価の結果を表2に示す。定量限界は、S/N=10相当の濃度とした。ブランク試料を分析し、ガイドラインの許容範囲に基づき妨害ピークの有無を確認したところ、定量を妨害するピークは見られなかった。

ガイドラインの真度及び精度の目標値とともに満たしているのは、63化合物中56化合物であった。

目標値を満たさなかったアンピシリン、エリスロマイシン、クロルテトラサイクリン、サリノマイシン、テトラサイクリン、ベンジルペニシリン、リンコマイシンの7化合物について、試験工程を段階的に検討したところ、抽出操作以降の工程に問題があると考えられた。精製操作を行わずに、夾雑物の影響を低減する手法として、抽出液を希釈する方法が報告されている⁵⁾。これを参考に、抽出液を水で希釈し、ろ過したものを同条件のLC/MS/MSで測定したところ、上記化合物全てにおいて良好な結果が得られた。その結果を表3に示す。

動物用医薬品等は種類により極性や物性の違いが大きいため、今回の対象63化合物をすべて同一条件で精製することは難しかったが、約9割の化合物については、一斉分析法として適用可能となった。

表3 抽出希釈液測定結果

化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アンピシリン	93.8	4.4	5.3
エリスロマイシン	93.3	7.2	8.5
クロルテラサイクリン	84.7	17.7	17.8
サリマイシン	78.9	10.9	11.9
テトラサイクリン	94.9	17.7	16.8
ベンジルペニシリン	102.1	13.7	12.6
リンコマイシン	85.8	4.4	4.1

IV まとめ

LC/MS/MS を用いた動物用医薬品等の一斉分析法について、63 化合物を対象に、ガイドラインに従って妥当性評価を実施した結果、56 化合物がガイドラインの目標値を満たしており、一部を除いて一斉分析法として適用可能であった。

目標値を満たさなかった 7 化合物については、抽出液を希釈したものを測定に用いることで、検査に適用可能となった。ただし、機器の定量限界を考えると、現在の装置では一律基準以下の濃度に対応するのは難しい。

今後も高感度でより迅速な方法を検討し、県内での使用量が多い動物用医薬品等を中心に分析可能な対象化合物及び対象となる食品の種類を拡大し、県民の食の安全・安心に寄与していきたいと考えている。

文献

- 1) 「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,厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 2) 「食品中に残留する農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,厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 3) 紙本佳奈, 安永恵, 氏家あけみ: LC/MS/MS を用いた畜水産物の残留動物用医薬品の一斉分析法適用の検討, 香川県環境保健研究センター所報 14, 89-93 (2015)
- 4) 島三記絵, 井本英志, 佐々野僚一, 斎藤勲: STQ 法と LC/MS/MS を組み合わせた動物用医薬品高速一斉分析(第2報), 第 115 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 p.110
- 5) 松本理世, 飛野敏明, 西名武士, 宇梶徳史, 濱本愛, 村上弘: LC/MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第3報), 熊本県保健環境科学研究所報 44, 28-37(2014)