

LC/MSによる残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について（第2報）

赤城理恵 神尾典子 味戸一宏 金成徹 川田好徳 安部幸雄
理化学グループ

要 旨

ポジティブリスト制度導入を目前に控え、畜水産食品中の動物用医薬品等を効率的、かつ迅速に分析する手法が必要とされている。

このような中、厚生労働省から「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」が通知され、LC/MSの測定イオン等も示された。

そのため、通知法に準拠した方法で、40品目の動物用医薬品等についてLC/MS（SIM）の測定条件を検討し、当所で行政検査を実施している生乳、鶏卵、養殖魚、豚肉を対象として添加回収試験を実施した。

また、鶏卵の抽出法も合わせて検討したのでその結果を報告する。

キーワード：動物用医薬品等、ポジティブリスト制度、一斉分析法、LC/MS

はじめに

平成18年5月のポジティブリスト制導入により、動物用医薬品等の残留基準が大幅に増加するため、多くの動物用医薬品等を効率的かつ迅速に分析する手法が必要とされている。

当所では、19品目を対象とした「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法（改定法）（平成5年4月1日付け衛乳第79号）」を基本にLC/MS（SIM）による分析条件を確立し（以下従来法という.）、平成16年4月から行政検査に対応してきた。

しかしトリメトプリム、オルメトプリム及びピリメタミン等一部品目については、前処理で除去できなかった食品中の妨害物質（マトリックス）の影響によるイオン増強が見られ、回収率が120%を大きく超えるものがあり定量再現性に問題があった¹⁾。

このような中、厚生労働省から84品目を対象とした「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」が通知され、LC/MSの測定イオン等の条件も示された。

従来法と比較すると、抽出・精製等の前処理方法はほぼ同一である。

しかし、LC/MSの測定条件は、従来法では、0.3%酢酸とアセトニトリルのグラジェ

ントで実施していたが、通知法では0.05%トリフルオロ酢酸（TFA）（または0.1%ギ酸）とアセトニトリルのグラジェントを使用しており移動相条件が異なる。

移動相を従来法から0.05%TFAとアセトニトリルのグラジェントに変えて行ってみたところ、前記問題点に改善が見られた。

そのため、当所で行政検査を実施している生乳、鶏卵、養殖魚、豚肉を対象として、通知法で添加回収試験を実施し、測定可能な動物用医薬品等を検討した。

また、鶏卵の抽出法についても合わせて検討したのでその結果を報告する。

材 料

1 試料

生乳、鶏卵、養殖魚（コイ）、豚肉

2 標準品

1) 合成抗菌剤（28品目）

スルファキノキサリン、スルファグアニジン、スルファクロルピリダジン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシシン、スルファセタミド、スルファチアゾール、スルファドキシシン、スルファニトラン、スルファピリジン、スルファベンズアミド、

スルファメトキサゾール, スルファメトキシ
ピリダジン, スルファメラジン, スルファモ
ノメトキシ, オラキンドックス, クロピド
ール, ナイカルバジン, ピリメタミン, エン
ロフロキサシン, オキシソリニック酸, オフロ
キサシン, サラフロキサシン, ダノフロキサ
シン, ナリジクス酸, オルメトプリム, トリ
メトプリム

2) 抗生物質 (3 品目)

エリスロマイシン, オレアンドマイシン,
タイロシン

3) 寄生虫駆除剤 (7 品目)

チアベンダゾール, チアベンダゾール代謝
産物, アルベンダゾール代謝産物, フルベン
ダゾール, ピランテル, モランテル, レバミ
ゾール

4) ホルモン剤 (2 品目)

デキサメタゾン, プレドニゾロン

3 試薬

アセトニトリル: HPLC 用, 残留農薬試験
用

蒸留水: HPLC 用

1-プロパノール: 試薬特級

n-ヘキサン: 試薬特級

無水硫酸ナトリウム: 試薬特級

トリフルオロ酢酸: 試薬特級

ぎ酸: HPLC 用

メタノール: HPLC 用

N,N-ジメチルホルムアミド: HPLC 用

方 法

平成 17 年 11 月 29 日付け厚生労働省医薬
食品局食品安全部長通知, 食安発第 1129002
号「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」中の「HPLC による動物用医薬品等の一
斉試験法 I (畜水産物)」に準拠して行った。

1 標準原液及び溶液の調製

1) 標準原液の調製

各標準品 20.0mg を量り採り, メタノール
(スルファジアジン, オキシソリニック酸, ナ
リジクス酸, フルベンダゾール, ナイカルバ
ジンは N,N-ジメチルホルムアミド) に溶か

し, メスフラスコにて全量 20.0mL にする
(1000ppm 濃度)。

ただし, クロピドールは 10.0mg を正確に
量り N,N-ジメチルホルムアミドに溶解して
全量 20.0mL とする (500ppm 濃度)。

2) 10ppm 混合標準溶液の調製

1) のうち, クロピドール標準原液は 400 μ L
を, その他の標準原液は 200 μ L をメスフラ
スコに採り, アセトニトリル: 水 (4:6) 混
液を加えて 20.0mL とする。

3) 検量線用標準液

1) の 10ppm 混合標準液をアセトニトリ
ル: 水 (4:6) 混液で希釈して 0.05 ~ 1.0ppm
程度の検量線用混合標準液を作る。

2 装置

高速液体クロマトグラフ: Waters2695

フォトダイオードアレイ: Waters2996

質量分析計: WatersZQ4000 (ESI)

解析ソフトウェア: Empower

3 測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ条件

カラム: Waters XTerra RP18 5 μ m
2.1 \times 150mm

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

注入量: 10 μ L

流速: 0.20mL/分

移動相:

(1) A: 0.05% TFA

B: アセトニトリル

(2) A: 0.1%ぎ酸

B: アセトニトリル

表 1 グラジエント条件

| 分析時間 | A(%) | B(%) | 備考 |
|-----------|------|------|--------|
| 0 | 99 | 1 | リニア |
| 35 | 0 | 100 | グラジエント |
| 35.1 ~ 45 | 99 | 1 | ホールド |

2) 質量分析計条件

イオン化: ESI +

ソース温度: 130 $^{\circ}$ C

脱溶媒温度: 350 $^{\circ}$ C

コーンガス流量: 60L/時

脱溶媒ガス流量：360L/時

4 試料溶液の調製

各動物用医薬品等を試料からアセトニトリルで抽出し、脂質及び夾雑物は n-ヘキサンで除き、水及び水溶性夾雑物は無水硫酸ナトリウムで除いた後、LC/MS で測定した (図 1 参照)。

添加回収試験は、試料 5.0g に各標準品を 0.5 μ g 添加して、試料同様に前処理を行い試験液とした。

また、これまで生乳については、抽出時のホモジナイズ操作を振とう機による振とう操作で代用してきたが、鶏卵についても同様の操作で実施できるかどうかを検討した。

結果及び考察

1 各動物用医薬品標準品の測定条件

最初に 5ppm 程度に希釈した各動物用医薬品標準溶液を ESI プローブに直接注入し通知で示されたモニターイオンの強度が顕著となる最適コーン電圧を選択した。

次に A 液 0.05 % TFA の移動相条件で、1 ppm に希釈した各動物用医薬品標準溶液を LC/MS による TIC フルスキャン分析を実施し、目的とする分離ピークの保持時間、モニターする主イオン及びその構成イオンを確認した。なお、その際に、フォトダイオードアレイ (UV 波長) により、保持時間及び吸収波長を確認し、各動物用医薬品標準品の分離ピークであることを併せて検証した。

その結果、オラキンドックス及びスルファグアニジン、スルファセタミドについて、本条件では分離・確認できなかった。また、モランテルとエリスロマイシンは保持時間の異なる 2 本のピークに分かれた。

各標準品のモニターイオン、コーン電圧等測定条件、A 液 0.05%TFA、A 液 0.1%ギ酸のそれぞれの移動相条件における保持時間を表 2 に示す。移動相条件を変えて保持時間を比較したところ、標準物質の溶出する順番が変化したことから、A 液 0.05%TFA の移動相条件で標準品と保持時間が一致するピークが出現し、動物用医薬品等の検出が疑われた場合は、A 液を 0.1%ギ酸に変えて、2 種類の移

動相条件で保持時間が一致することを確認することとした。

2 鶏卵抽出法の検討

鶏卵について、ホモジナイズ操作を振とう機による振とう操作で代用してみたところ、回収率が低下した。そのため、振とう時間を 2 分から 30 分に延長したところ、ホモジナイズ操作とほぼ同様の結果が得られた (表 3 参照)。振とう操作で実施すると、検体をホモジナイズカップから遠心管に移し替える操作の省略等、操作を簡略化できることから、鶏卵については振とう 30 分で実施することとした。

3 添加回収試験

絶対検量線法により定量した結果を表 4 に示す。標準液で分離・確認が可能であった 37 品目中、生乳で 33 品目、鶏卵で 28 品目、養殖魚で 28 品目、豚肉で 31 品目で回収率が 70 ~ 120 % となり、概ね良好な結果が得られた。

ナイカルバジンは、鶏卵、養殖魚、豚肉で回収率が低かった。検体間で回収率に大きな差が見られた品目もあった。

4 LC/MSにおけるマトリックス効果

検体と品目の組み合わせによって、イオン化が促進または抑制され、ピーク形状や大きさが変化するものがあることから、これら品目については、マトリックスを加えた標準液で定量するなど今後検討していく必要がある。

5 各動物用医薬品の定量下限値

各動物用医薬品の標準溶液のクロマトグラフから、S/N ([S : 分析対象物のピークの高さ] と [N : ベースラインノイズ] の比) = 10 となる分析対象物の濃度を、定量下限値として求めた。

プレドニゾロンの定量下限値は、0.012ppm で、生乳、鶏卵、養殖魚、豚肉の残留基準値 0.0007ppm より大きく、本法では測定が不可能であった。それ以外の品目の定量下限値は、0.001 ~ 0.010ppm で、すべて基準値未満の定量下限値が得られた。デキサメタゾン

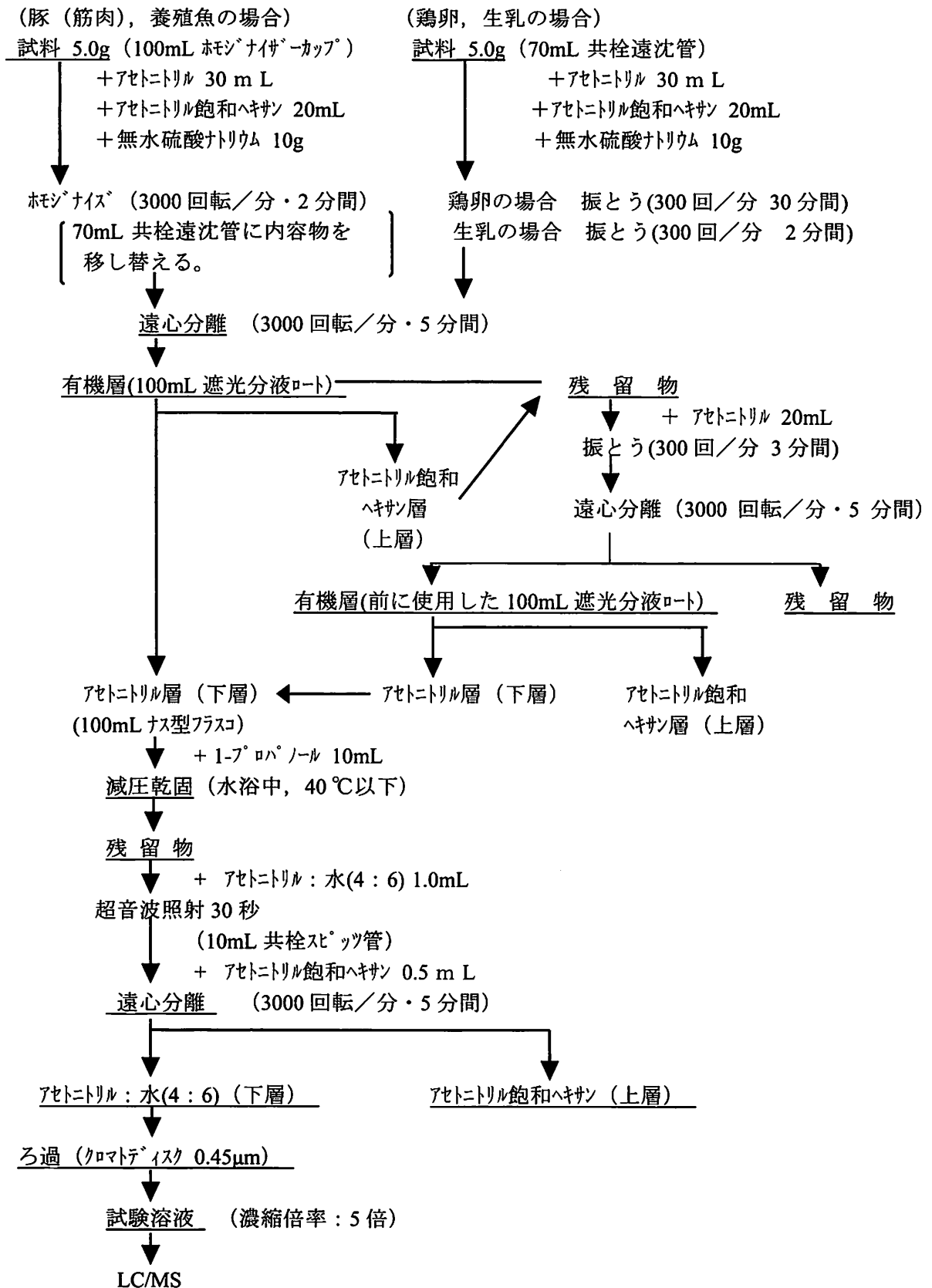


図1 試験方法のフロー

表2 検査品目と測定条件

| | 検査品目 | 分子量 | 測定条件 | | | |
|----|--------------|-------|--------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| | | | モニターイオン(m/z) | イオン電圧 (v) | 保持時間 (分) A 液 0.05 % TFA | 保持時間 (分) A 液 0.1 % ぎ酸 |
| 1 | スルファクアニジン | 214.2 | 215 | 25 | 2.7 | — |
| 2 | オラキントックス | 263.3 | 264 | 25 | 5.8 | — |
| 3 | スルファセタミド | 214.2 | 215 | 25 | 7.2 | — |
| 4 | スルファジニジン | 250.3 | 251 | 30 | 7.5 | 8.4 |
| 5 | スルファピリジン | 249.3 | 250 | 25 | 8.5 | 9.2 |
| 6 | レハミゾール | 204.3 | 205 | 40 | 9.1 | 5.5 |
| 7 | クロピドール | 192.1 | 192 | 45 | 9.2 | 9.1 |
| 8 | スルファメラジン | 264.3 | 265 | 30 | 9.2 | 10.1 |
| 9 | スルファチアゾール | 255.3 | 256 | 25 | 9.3 | 9.8 |
| 10 | スルファジミジン | 278.3 | 278 | 30 | 10.5 | 11.4 |
| 11 | アルベクタゾール代謝産物 | 239.4 | 240 | 35 | 10.9 | 8.6 |
| 12 | チアベクタゾール代謝産物 | 217.3 | 218 | 45 | 11.2 | 9.6 |
| 13 | チアベクタゾール | 201.3 | 202 | 40 | 11.6 | 9.9 |
| 14 | ピラントール | 206.3 | 207 | 35 | 11.7 | 9.0 |
| 15 | スルファトキシピリタジン | 280.3 | 281 | 30 | 11.8 | 12.2 |
| 16 | トリメプリーム | 290.3 | 291 | 40 | 11.9 | 9.9 |
| 17 | モランテル | 220.3 | 221 | 30 | 12.7, 14.2 | 10.2, 11.6 |
| 18 | オフロキサシン | 361.4 | 362 | 35 | 12.8 | 11.2 |
| 19 | オルメプリーム | 274.3 | 275 | 40 | 12.9 | 10.8 |
| 20 | ダノフラキサシン | 357.4 | 358 | 35 | 13.4 | 11.8 |
| 21 | スルファモメトキシ | 280.3 | 281 | 30 | 13.4 | 13.8 |
| 22 | ブレトニゾロン | 360.5 | 361 | 25 | 13.7 | 17.6 |
| 23 | エフロキサシン | 359.4 | 360 | 30 | 13.8 | 12.1 |
| 24 | スルファクロルピリタジン | 284.7 | 285 | 30 | 13.8 | 14.0 |
| 25 | スルファメトキサゾール | 253.3 | 254 | 25 | 14.4 | 14.5 |
| 26 | スルファトキシ | 310.3 | 311 | 30 | 14.4 | 14.6 |
| 27 | サラフロキサシン | 385.4 | 386 | 35 | 14.8 | 12.9 |
| 28 | ピリメタミン | 248.7 | 249 | 25 | 16.0 | 13.7 |
| 29 | オキシリニック酸 | 261.2 | 262 | 25 | 16.2 | 16.2 |
| 30 | スルファヘンズアミド | 276.3 | 277 | 25 | 17.0 | 17.0 |
| 31 | スルファジメトキシ | 310.3 | 311 | 35 | 17.3 | 17.5 |
| 32 | オレアントマイシン | 687.8 | 688 | 25 | 17.5 | 15.6 |
| 33 | スルファキノキサリン | 300.3 | 301 | 30 | 17.9 | 18.0 |
| 34 | ナリシクス酸 | 232.2 | 233 | 25 | 18.1 | 18.0 |
| 35 | フルベクタゾール | 313.3 | 314 | 35 | 18.2 | 19.6 |
| 36 | タイロシン | 916.1 | 916 | 50 | 19.1 | 17.2 |
| 37 | デキサメタゾン | 392.5 | 393 | 25 | 19.3 | 19.3 |
| 38 | エリスロマイシン | 733.9 | 716 | 25 | 19.7, 21.1 | 16.6 |
| 39 | スルファニトラン | 335.3 | 336 | 25 | 20.8 | 20.8 |
| 40 | ナイカルギジン | 426.4 | 303 | 25 | 25.7 | 25.7 |

表3 鶏卵抽出法の検討

回収率(%)

| 品目名 | ホモジナイズ 2分 | 振とう | |
|----------------------------|--------------|------|-------|
| | | 2分 | 30分 |
| スルファジ [®] アジン | 78.0 | 51.6 | 75.6 |
| スルファビ [®] リジン | 110.5 | 61.7 | 111.7 |
| レハ [®] ミゾール | 102.6 | 61.6 | 95.0 |
| クロビ [®] ドール | 82.8 | 49.5 | 79.3 |
| スルファメラジン | 88.9 | 61.2 | 93.1 |
| スルファチアゾール | 56.3 | 31.7 | 61.4 |
| スルファジ [®] ミジン | 77.8 | 49.2 | 85.6 |
| アルベンダゾール代謝物 | 77.4 | 43.9 | 83.3 |
| チアベンダゾール代謝物 | 118.3 | 58.9 | 91.4 |
| チアベンダゾール | 85.2 | 44.2 | 88.8 |
| ビ [®] ランテル | 62.9 | 37.7 | 92.0 |
| スルファメキシビ [®] リダジン | 83.8 | 55.5 | 100.9 |
| トリメプ [®] リム | 111.0 | 70.4 | 110.3 |
| モランテル 1 | 138.6 | 89.7 | 173.0 |
| モランテル 2 | 59.7 | 32.1 | 64.8 |
| オフロキサシン | 61.0 | 40.9 | 65.3 |
| オルメプ [®] リム | 84.9 | 53.2 | 93.4 |
| ダ [®] ノフラキサシン | 65.0 | 40.4 | 69.3 |
| スルファモノメキシシン | 66.7 | 42.9 | 74.6 |
| ブレド [®] ニゾロン | 76.5 | 34.0 | 104.1 |
| エンフロキサシン | 67.6 | 40.5 | 75.0 |
| スルファクロルビ [®] リダジン | 91.6 | 61.3 | 107.4 |
| スルファメキサゾール | 76.8 | 43.2 | 80.3 |
| スルファト [®] キシシン | 83.7 | 55.7 | 92.8 |
| サラフロキサシン | 52.5 | 32.7 | 54.0 |
| ビ [®] リメタミン | 68.1 | 35.2 | 82.7 |
| オキソリニック酸 | 79.7 | 44.0 | 82.5 |
| スルファベンズ [®] アミド | 68.7 | 42.7 | 80.0 |
| スルファジ [®] メキシシン | 72.8 | 39.4 | 78.9 |
| オレアント [®] マイシン | 86.7 | 39.4 | 98.2 |
| スルファキキサリン | 67.7 | 36.3 | 78.9 |
| ナリジ [®] クサ酸 | 59.9 | 34.5 | 64.2 |
| フルベンダゾール | 83.1 | 36.1 | 90.3 |
| タイロシン | 107.0 | 36.4 | 153.9 |
| デ [®] キサメタゾン | 88.8 | 43.4 | 98.7 |
| エリスロマイシン 1 | 95.8 | 43.8 | 113.5 |
| エリスロマイシン 2 | 132.8 | 65.6 | 278.0 |
| スルファニトラン | 80.8 | 41.7 | 95.8 |
| ナイカルバ [®] ジン | 25.0 | 12.0 | 52.6 |

表4 添加回収試験結果

(n=3)

| 品目名 | 回収率(%) | | | |
|----------------------------|--------|-------|-------|-------|
| | 生乳 | 鶏卵 | 養殖魚 | 豚肉 |
| スルファジ [®] アジン | 74.4 | 75.6 | 84.6 | 97.7 |
| スルファビ [®] リジン | 96.2 | 111.7 | 88.7 | 111.2 |
| レハ [®] ミゾール | 88.4 | 95.0 | 59.4 | 102.6 |
| クロビ [®] ドール | 76.7 | 79.3 | 63.7 | 85.8 |
| スルファメラジン | 71.4 | 93.1 | 78.4 | 99.0 |
| スルファチアゾール | 71.7 | 61.4 | 67.4 | 72.5 |
| スルファジ [®] ミジン | 84.6 | 85.6 | 72.7 | 84.0 |
| アルベンダゾール代謝物 | 96.3 | 83.3 | 80.4 | 94.4 |
| チアベンダゾール代謝物 | 101.4 | 91.4 | 36.4 | 98.2 |
| チアベンダゾール | 93.2 | 88.8 | 51.7 | 68.7 |
| ビ [®] ランテル | 47.3 | 92.0 | 112.0 | 66.8 |
| スルファメキシビ [®] リダジン | 80.5 | 100.9 | 99.8 | 110.8 |
| トリメプ [®] リム | 116.3 | 110.3 | 64.6 | 109.4 |
| モランテル 1 | 171.2 | 173.0 | 79.4 | 153.2 |
| モランテル 2 | 53.3 | 64.8 | 91.4 | 75.3 |
| オフロキサシン | 101.9 | 65.3 | 88.3 | 99.3 |
| オルメプ [®] リム | 86.2 | 93.4 | 52.1 | 93.1 |
| ダ [®] ノフラキサシン | 84.5 | 69.3 | 91.1 | 87.0 |
| スルファモノメキシシン | 80.6 | 74.6 | 86.2 | 83.3 |
| ブレド [®] ニゾロン | 67.3 | 104.1 | 79.0 | 81.5 |
| エンフロキサシン | 100.2 | 75.0 | 96.3 | 105.4 |
| スルファクロルビ [®] リダジン | 108.8 | 107.4 | 85.5 | 116.7 |
| スルファメキサゾール | 85.9 | 80.3 | 74.8 | 102.1 |
| スルファト [®] キシシン | 90.3 | 92.8 | 105.4 | 117.6 |
| サラフロキサシン | 89.1 | 54.0 | 75.2 | 90.2 |
| ビ [®] リメタミン | 94.3 | 82.7 | 91.0 | 102.6 |
| オキソリニック酸 | 100.5 | 82.5 | 107.4 | 116.6 |
| スルファベンズ [®] アミド | 84.0 | 80.0 | 73.5 | 91.5 |
| スルファジ [®] メキシシン | 75.3 | 78.9 | 90.9 | 89.4 |
| オレアント [®] マイシン | 103.7 | 98.2 | 90.0 | 106.6 |
| スルファキキサリン | 88.6 | 78.9 | 83.4 | 98.8 |
| ナリジ [®] クサ酸 | 90.2 | 64.2 | 113.5 | 107.1 |
| フルベンダゾール | 91.4 | 90.3 | 88.8 | 93.4 |
| タイロシン | 105.8 | 153.9 | 108.9 | 106.1 |
| デ [®] キサメタゾン | 119.3 | 98.7 | 87.4 | 121.4 |
| エリスロマイシン 1 | 119.0 | 113.5 | 100.9 | 124.4 |
| エリスロマイシン 2 | 175.0 | 278.0 | 496.9 | 251.4 |
| スルファニトラン | 113.5 | 95.8 | 87.7 | 106.7 |
| ナイカルバ [®] ジン | 79.9 | 52.6 | 62.3 | 48.7 |

卵と養殖魚で不検出基準のため、これら検体においては、デキサメタゾン是对象品目から除外することとした。

まとめ

厚生労働省通知「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ(畜水産物)」に基づき、40品目の動物用医薬品等について、LC/MS(SIM)で測定条件を検討したところ、37品目について本条件で分離・確認が可能であった。その37品目について、生乳、鶏卵、養殖魚、豚肉を対象として添加回収試験を実施した。その結果、生乳で33品目、鶏卵で28品目、養殖魚で28品目、豚肉で31品目で回収率が70～120%となり、概ね良好な結果となった。

残留基準値が最も低いプレドニゾロンでは基準値未満の定量下限値が得られなかったため、本法で測定は不可能であったが、それ以外の品目については、基準値未満の定量下限値が得られた。

今後、さらに測定可能な品目を増やすとともに、マトリックスの影響を受けやすい品目について、マトリックスで希釈した標準液での定量や標準添加法、マトリックスをさらに除去する精製法等、検討していきたいと考えている。

引用文献

1)石川雅人, 赤城理恵, 神尾典子, 他. LC/MSによる残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について. 福島県衛生研究所年報, 2004; 22: 47-53.