

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3報)

金成 徹 伊藤純子 竹村悦子 斎藤和男
理化学課

要 旨

2006年度より当所では、厚生労働省の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」により、豚肉、養殖魚、鶏卵及び生乳の行政検査を行ってきた。

その後、厚生労働省の一部改正通知等があり、対象動物用医薬品の数も拡充されてきたため、従前測定していなかった動物用医薬品6種類について添加回収試験等を行い検討した。その結果、新たにオキシベンダゾール、ジョサマイシン及びセフォペラゾンの測定が可能となった。

キーワード：LC/MS、動物用医薬品、畜水産物

はじめに

2006年5月のポジティブリスト制導入以来、畜水産物における動物用医薬品等の規制対象数が大幅に増加し、畜水産物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。

当所では、2006年度より厚生労働省から通知された「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”とする）により、豚肉、養殖魚、鶏卵及び生乳の行政検査を行ってきた。その後、通知の一部改正等があり、さらに測定可能な動物用医薬品の種類を増やした。

今回、当所で検査対象として追加可能な動物用医薬品項目について、第1報¹⁾及び第2報²⁾に引き続き、検討した結果を報告する。

材 料

1 試料

豚肉、養殖魚（イワナ）、生乳、鶏卵

2 標準品

（いずれも和光純薬又は関東化学製の市販品）

1) 今回検討に加えたもの

(1) 合成抗菌剤

チアンフェニコール

(2) 抗生物質

セフォペラゾン

セフロキシム

ジョサマイシン

(3) 寄生虫駆除剤

オキシベンダゾール

(4) その他

ブチルヒドロキシアニソール

2) 過去に分析可能と判断した標準品^{1), 2)}

アルベンダゾール代謝産物

エンロフロキサシン

オキシリニック酸

オルメトプリム

オレアンドマイシン

クロキサシリン

クロピドール

サラフロキサシン

シプロフロキサシン
 スルファキノキサリン
 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シン
 タイロシン
 ダノフロキサシン
 チアベンダゾール
 チアベンダゾール代謝産物
 チアムリン
 チルミコシン
 トリメトプリム
 ピリメタミン
 フルベンダゾール
 リンコマイシン
 レバミゾール

3 試薬

アセトニトリル：HPLC 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
 ギ酸：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

前処理方法等については，平成 17 年 11 月 29 日付け厚生労働省医薬食品

安全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）」（通知法）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，メタノールに溶解し，メスフラスコにて全量 20.0mL にした。

メタノールに溶解しにくいもの（オキシベンダゾール等）については，*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解してから，同様に操作を行った。

2) 10ppm 混合標準溶液の調製

標準原液 200 μ L をメスフラスコによりアセトニトリル：水（4：6）混液を加えて 20mL とした。（ただしフルベンダゾール及びスルファジミジンについては 5ppm で調製を行った。）

3) 検量線用標準液

上記をアセトニトリル：水（4：6）混液で希釈して 0.025 ～ 0.2ppm の検量線用混合標準液を調製した。

2 装置

高速液体クロマトグラフ：Waters 2695
 質量分析計：Waters ZQ4000（ESI）
 解析ソフト：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 × 150mm

カラム温度：40℃

注入量：10 μ L

流速：0.2mL/分

移動相：

(1) A : 0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA)

B : アセトニトリル

(2) A : 0.1 %ギ酸

B : アセトニトリル

表 1 グラジエント条件

| 分析時間 (分) | 移動相 | | 備考 |
|-------------|-----|-----|--------|
| | A% | B% | |
| 0 | 99 | 1 | リニア |
| 35 | 0 | 100 | グラジエント |
| 35 ~ 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 °C

脱溶媒温度 : 350 °C

コーンガス流量 : 60L/時

脱溶媒ガス流量 : 360L/時

4 新たに追加検討する動物用医薬品等の測定条件等の検討

1) A液 : 0.05 %トリフルオロ酢酸 (TFA), B液 : アセトニトリルの移動相条件で数 ppm 程度に希釈した各動物用医薬品標準液をスキャン測定し, モニターイオンの設定を行った. またそのモニターイオンで強度が最適となるコーン電圧を設定した.

2) A液 : 0.05 %トリフルオロ酢酸 (TFA), B液 : アセトニトリルの移動相条件で, 先に求めたモニターイオン及び最適コーン電圧による LC/MS のモニターイオンの測定条件 (SIR 条件) を設定し, 各動物用医薬品標準溶液の保持時間及び S/N 比による定量下限値を検討した.

3) 従前から測定を行っている動物用医薬品のモニターイオンと合わせて LC/MS の SIR モードによる SIR 測定条件を調整した.

4) 本法で動物用医薬品を検出した場合を想定し, 確認試験として, A液を 0.1 %ギ酸に置き換えて, ピークが検出できるかどうかを検討した.

5 試料溶液の調製

通知法に基づき, 試料をアセトニトリルで抽出し, 脂質及び夾雑物は *n*-ヘキサンで抽出し, 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. (ただし, 最後のメスアップ量については 2mL とした.)

添加回収試験は, 試料 5.0g に対し 1ppm 混合標準溶液 (フルベントゾール及びスルファジミジンについては 0.5ppm) を 0.2mL 添加して, 試料と同様に前処理を行い試験液とした.

結果及び考察

1 各動物用医薬品標準品の測定条件の検討

1) 新たに追加した各動物用医薬品

(1) 今回新たに検討した各標準溶液のモニターイオン・保持時間・最小検出量を表 2 に示す.

(2) S/N=10 を定量下限値とした場合, 2.4 ~ 82.3ppb と標準品の種類により大きく異なった.

(3) チアンフェニコールについては, 移動相に A液 0.05 %トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いた場合, 10ppm の高濃度溶液でも LC/MS でモニターイオンを測定できなかった. ただし, 通知法のとおり移動相 A液に 0.1 %ギ酸を用いた場合は, LC/MS でモニターイオンを測定することができた. 本分析法の検討方針として, A液に 0.05 % TFA を使用することが前提であったため, 毎回移動相を変更する必要があるチアンフェニコールについては, 検討対象から外した.

表 2 各標準溶液の検討結果

| 名 称 | モニター イオン | コーン 電圧 (V) | 保持 時間 (分) | 最小 検出量 (ng) |
|-------------------|-------------|------------------|-----------------|-------------------|
| オキシベンダ ゾール | 250 | 40 | 16.2 | 0.0074 |
| ジョサマイシン | 829 | 45 | 21.3 | 0.0409 |
| セフォペラゾン | 646 | 25 | 15.8 | 0.1658 |
| セフロキシム | 364 | 20 | 14.3 | 0.2471 |
| ブチルヒドロ キシアニソール | 195 | 30 | 24.3 | 0.1429 |
| チアンフェニ コール | -354 | 40 | 11.4 | 0.1227 |

注：チアンフェニコールについては A 液 0.1%ギ酸を用いた

2) オレアンドマイシンにおける標準品の塩形態の差異によるモニターイオンの変動

オレアンドマイシンの標準品については、従前よりリン酸塩を使用していた。リン酸による LC/MS のイオン化部のキャピラリー詰まりを懸念して、代替品の三酢酸塩を用いた。その結果、10ppm の標準溶液でも LC/MS においてモニターイオンを測定することができなかった。従前どおりリン酸塩では、モニターイオンの測定が可能であった。

通常使用している標準品を変更する場合は、予め測定可能かどうか検討しておく必要があると思われる。

2 各畜水産物による添加回収試験

豚肉、養殖魚（イワナ）、生乳、鶏卵での回収率について表 3 に示す。

1) オキシベンダゾール及びジョサマイシンについては回収率が全て 70%以上かつ変動係数が 20%以下であったため、測定可能と判断した。

表 3 添加回収試験の結果 (n=3)

| 名 称 | 平均回収率 (%) | | | |
|-------------------|-----------|-------------|-------------|-------|
| | 豚 肉 | 養殖魚 | 生 乳 | 鶏 卵 |
| オキシベンダゾール | 81.4 | 71.8 | 94.0 | 112.9 |
| ジョサマイシン | 116.2 | 167.2 | 131.7 | 198.6 |
| セフロキシム | 46.5 | 12.2 | 68.0 | 87.7 |
| セフォペラゾン | 55.6 | 58.6 | 90.3 | 88.0 |
| ブチルヒドロキシ アニソール | - | - | 84.5 | 69.7 |

注：斜字体は変動係数20%を超えたもの。

2) セフロキシムについては、これらの畜水産物の中で生乳にのみ数値基準（0.02ppm）があり、これについて回収率が 70%未満でかつ変動係数が 20%を超えたため、測定不可と判断した。

3) セフォペラゾンについては、豚肉及び養殖魚の回収率が 70%未満であったものの、生乳及び鶏卵の回収率は 70%以上であり、変動係数も 20%以下と良好であったため、生乳及び鶏卵での測定が可能と判断した。

4) ブチルヒドロキシアニソールについては、豚肉及び養殖魚では回収されず、生乳及び鶏卵については、変動係数が 20%を超えるものであったため、測定不可と判断した。

3 LC/MSのメソッドの修正によるピーク形状の改善

LC/MS での測定に際し、従前より 1 回の測定で全ての測定対象物のデータを取り込む設定としていたが、測定対象物が 40 を超え、SIR 測定条件でのグループ分けが難しくなってきた。そのため、1 バイアルに対し 2 回の測定を行い、測定項目を保持時間順に交互に

分割する方法と 1 分単位で分割する方法でピーク形状が改善するかどうか検討した。

1 分単位で分割する方法では，従前の方法でピーク形状の良くなかったスルファベンズアミド等（他の測定対象と比較してピークが小さいもの）が SIR 時間の増加に伴い，データポイント数が増加し，ピーク形状の良化が見られた。

なお，ピーク面積や高さについては方法の修正による変化はあまり見られなかった。

ま と め

1 今回追加検討を行った動物用医薬品と畜水産物の添加回収試験の結果から，本試験系においては，オキシベンダゾール，ジョサマイシン及びセフォペラゾンを追加することが可能であることが判明した。

2 従前の LC/MS の SIR 測定条件（1 回の測定で全て測定する方法）ではピーク形状の悪かったスルファベンズアミドが，測定を 2 回に分割することによりピーク形状が改善された。これにより，今後測定項目が増加した際にもモニターイオンを増やすことが容易になった。

引用文献

1) 石川雅人．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（短報）．福島県衛生研究所年報 2004；22：47-53．

2) 赤城理恵．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）．福島県衛生研究所年報 2005；23：47-53．

3) 厚生労働省．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．食安発第 1129002 号．平成 17 年 11 月 29 日．

畜水産物中の動物用医薬品等LC/MS一斉分析法フローチャート

