

動物用医薬品等 LC/MS/MS 一斉分析法の検討

佐久間好恵 河野裕子 高野美紀子 遠藤俊彦 神尾典子 大越憲幸 笹原賢司
衛生研究所

要 旨

当所では畜水産物中の動物用医薬品等検査を LC/MS/MS 一斉分析法により実施しているが、十分な感度が得られない検査項目があった。移動相に用いるトリフルオロ酢酸をギ酸に換えることにより、感度の改善が期待されたので、両試薬による分析結果を比較した。

その結果、0.1%ギ酸溶液による測定の方が0.05%トリフルオロ酢酸溶液による測定に比べ、定量限界濃度でのシグナルとノイズの比 (S/N 比)、真度及び精度が良好であった。

キーワード：LC/MS/MS、動物用医薬品、畜水産物、トリフルオロ酢酸、ギ酸

はじめに

食品中の残留動物用医薬品の規制対象品目は、平成 18 年のポジティブリスト制の施行により大幅に増加した。

これを受け当所では平成 22 年度より、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知¹⁾による「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」(以下：試験法通知)に準拠し、畜水産物に残留する動物用医薬品の検査を実施してきた。

検査では、測定感度が低い、あるいは添加回収試験による回収率が悪い動物用医薬品があり、これらを改善するため測定条件の検討を行った。

試験法通知では、移動相にアセトニトリルおよび0.05%トリフルオロ酢酸(以下：TFA)を用いるグラジェント条件が示されており、ESI⁻で測定する場合には、0.05%TFAを0.1%ギ酸溶液(以下：FA)に置き換えるとしている。当所の測定はESI⁺で行っているが、FAを用いると感度等の改善が期待されるため、0.05%TFAと0.1%FAの両試薬でそれぞれ分析を行い分析結果を比較した。

その結果、0.1%FAにおいてより良好な結果が得られたので報告する。

材料及び方法

1 試料

生乳を用いた。

2 検査項目

抗生物質 6 物質、合成抗菌剤 16 物質、及び寄生虫駆除剤等 7 物質(代謝産物 2 物質を含む)計 29 物質(表 1)を測定対象とした。

3 試薬等

1) 標準品

各動物用医薬品の標準品は、関東化学(株)製、林純薬(株)製、または和光純薬工業(株)製のものをを用いた。

2) 標準原液

各標準品をメタノール(オキシベンダゾール、オキシリニック酸、スルファジアジン及びフルベンダゾールは、N,N-ジメチルホルムアミド)で溶解して1,000 μ g/mLの濃度に調製した。ただし、クロピドールは難溶性のため、N,N-ジメチルホルムアミドに溶解して500 μ g/mLの濃度に調製した。

3) 検量線用標準液

標準原液をアセトニトリル：水(4:6)混合液で希釈して、0.01ppm～0.2ppmの検量線用混合標準液を調製した。

4) 試薬

アセトニトリル：HPLC 用

蒸留水：ミリ Q 水

1-プロパノール：HPLC 用

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：試薬特級
メタノール：HPLC 用
N,N-ジメチルホルムアミド：HPLC 用

表 1 検査項目及び分析条件

検査項目	分類*	基準値**4		測定条件	
		(ppm)	モニターイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)
1 スルファジアジン	合	0.07	251→92	30	30
2 クロピドール	合	0.02	192→101	40	30
3 チアベンダゾール代謝物	※1	0.10	218→191	40	25
4 スルファチアゾール	合	0.09	256→156	30	15
5 スルファピリジン	合	0.01	250→156	30	20
6 チアベンダゾール	寄	0.10	202→175	40	20
7 リンコマイシン	抗	0.15	407→126	40	30
8 アルベンダゾール代謝物	※2	0.10	240→133	40	30
9 レバミゾール	寄	0.30	205→178	40	20
10 スルファジミジン	合	0.025	279→186	35	15
11 トリメトプリム	合	0.05	291→230	40	30
12 シプロフロキサシン	合	0.05	332→245	30	25
13 ダノフロキサシン	合	0.05	358→96	40	20
14 オルメトプリム	合	※3	275→123	40	20
15 エンロフロキサシン	合	0.05	360→245	30	30
16 スルファモノメトキシ	合	※3	281→92	30	30
17 セフオペラゾン	抗	0.05	646→143	30	20
18 スルファドキシ	合	0.06	311→156	30	25
19 オキシリニック酸	合	※3	262→244	25	20
20 オキシベンダゾール	寄	0.01	250→176	30	30
21 スルファベンズアミド	合	0.01	277→156	30	20
22 スルファジメトキシ	合	0.02	311→156	40	25
23 スルファキノキサリン	合	0.01	301→156	30	20
24 オレアンドマイシン	抗	0.05	689→158	30	25
25 フルベンダゾール	寄	0.01	314→282	35	20
26 タイロシ	抗	0.05	916.4→174	55	35
27 チアムリン	抗	※3	494→192	40	15
28 クロキサリン	抗	0.02	436→160	20	15
29 ファムフル	寄	0.02	327→93	30	30

※： 抗は抗生物質， 合は合成抗菌剤， 寄は寄生虫駆除剤等の略
 ※1： 5-ヒドロキシチアベンダゾール， チアベンダゾールは寄生虫駆除剤
 ※2： 5-プロピルスルホニル-III-ペンズイミダゾール-2-アミン， アルベンダゾールは寄生虫駆除剤
 ※3： 「食品、添加物等の規格基準」により，含有してはならないとされている。
 ※4： 基準値は平成25年9月現在のもの

4 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS)：Waters ACQUITY UPLC 及び Waters TQD を用いた。

5 試験溶液の調製

試験溶液は，添加試料 (2 併行) 及びブランク試料を用いて試験法通知に準拠し調製した。抽出のフローチャートを図 1 に示す。

添加試料の添加濃度は基準値とした。ただし，基準値が 0.2ppm より高濃度であるレバミゾールは，添加量を 0.2ppm とした。また，食品，添加物等の規格基準²⁾で「含有してはならない」とされている抗生物質等であるオルメトプリム，スルファモノメトキシ，オキシリニック酸及びチアムリンは，定量限界濃度である 0.004ppm を添加した。

さらに，定量限界濃度での S/N 比を確認す

るため，試料中の濃度が定量限界相当濃度になるような，マトリックス添加標準溶液をブランク試料を用いて調製した。

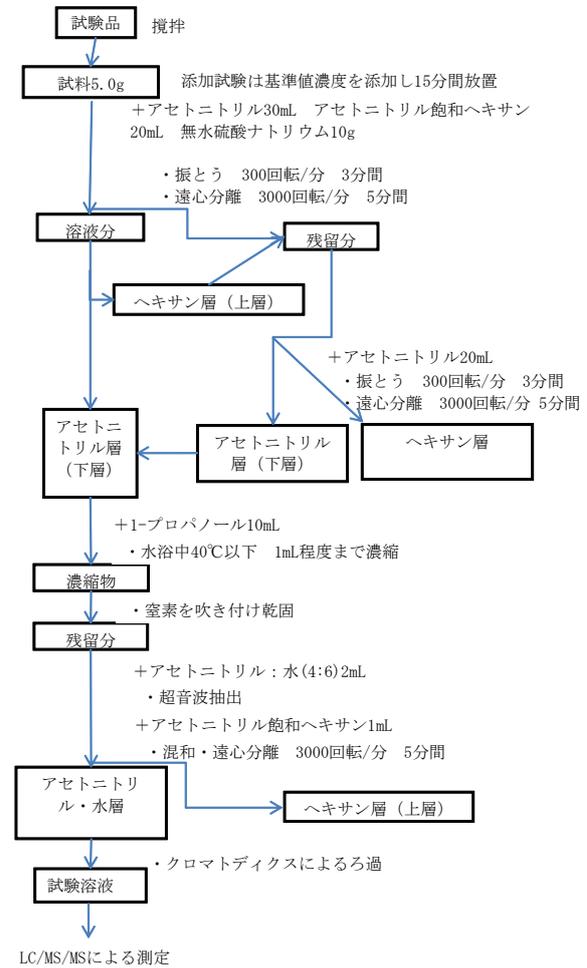


図 1 抽出フローチャート

6 分析条件

1) 液体クロマトグラフ

カラム：Waters ACQUITY BEH C18 1.7 μm 2.1mm × 100mm
 カラム温度：40 °C
 注入量：5μL

流量：0.3mL/分
 移動相：A 液；アセトニトリル B 液；0.05 %TFA もしくは 0.1%FA
 グラジエント条件：0 分 (A:B=1:99) → 10 分 (A:B=100:0) → 10 ~ 13.5 分 (A:B=100:0) → 13.6 ~ 16 分 (A:B=1:99)

2) タンデム型質量分析計

イオン化：ESI+

モニターイオン・コーン電圧及びコリジョン電圧：表 1 に示すとおり
 ソース温度：130℃
 脱溶媒温度：350℃
 コーンガス流量：60L/時
 脱溶媒ガス流量：360L/時

7 測定及び比較の方法

添加試料（2 併行）、ブランク試料、及びマトリックス添加標準溶液を、担当者 3 名がそれぞれ調製し、移動相 B 液に 0.05 % TFA 及び、0.1 % FA を用いてそれぞれ測定した。これを 2 日間実施した。

評価は、「妥当性評価ガイドライン」³⁾ の目標値等を参考に、以下のパラメータにより行った。

1) 選択性

ブランク試料に、妨害ピークがないか、ある場合は許容範囲内であるかを確認する。

2) 定量限界濃度における S/N 比

添加濃度と定量限界濃度が等しい検査項目（オルメトプリム、スルファモノメトキシ、オキシソニック酸及びチアムリン）については、添加試料から得られるピークの S/N 比を求め、また、添加濃度が定量限界濃度と異なる検査項目については、マトリックス添加標準溶液から得られるピークの S/N 比を求め、実施日ごとに平均値を算出した。その値が 10 以上であることを確認した。

3) 真度

添加回収試験における回収率の平均値が、70 %～120 % の範囲にあるかを確認した。

4) 精度

添加回収試料の試験を 2 併行、担当者 3 名で 2 日間実施し、得られた結果から併行精度と室内精度を求め、目標値を満たすかを確認した。

結 果

1) 選択性について

選択性は、0.05 % TFA 及び 0.1 % FA 両者において許容範囲を満たしていた。

2) 定量限界濃度での S/N 比について

今回の定量限界濃度におけるピークの S/N 比を表 2 に示す。

0.05 % TFA では、2 日目のセフォペラゾンの定量限界濃度におけるピークがとれなかった。また、1 日目も S/N 比が 10 未満であった。

他の検査項目については、0.05 % TFA 及び 0.1 % FA ともに S/N 比 ≥ 10 となり、パラメータの目標値を満たした。クロピドール、チアベンダゾール、リンコマイシン、レバミゾール、オキシベンダゾール及びスルファジメトキシンの 6 項目は、0.05 % TFA の方が S/N 比が大きかった。それ以外は 0.1 % FA の方が S/N 比が大きく、0.1 % FA の方が感度良く測定できた。

3) 真度について

今回の添加回収試験における回収率を表 2 に示す。

0.05 % TFA では、29 項目中 18 項目の添加回収率の平均が 70 %～120 % となり、真度の目標値を満たした。

一方、0.1 % FA では、0.05 % TFA より 6 項目多い 24 項目で真度の目標値を満たした。

4) 精度について

併行精度及び室内精度を表 2 に示す。

0.05 % TFA では、両方の目標値を満たすものは 29 項目中 16 項目であった。一方、0.1 % FA では、29 項目中 25 項目となり、0.05 % TFA に比べバラツキが少ない検査項目が多くなった。

考 察

移動相に用いられる TFA は、検査対象化合物のイオン化を抑制することがあると知られている。0.05 % TFA を用いた場合、添加回収率が 120 % を超えて目標値を満たさなかったものが 6 項目あった。これはイオン化の抑制ではなく、促進を受けているように受け止められるが、試料マトリックスの影響等も考えられる。また、0.05 % TFA で測定の際の併行精度や室内精度の値を見ると、バラツキが大きかったことから、0.05 % TFA を用いた測定では安定したイオン化が起こらなかったものと推測した。

一方 FA は、TFA ほど酸性ではなく、また、分子量が小さいため、質量分析部でのイオン化の妨害は少ないものと思われる、これを使用

した測定では、比較的安定したイオン化が起きたのではないかと考えられた。

まとめ

今回確認した全パラメータの目標値等を満たすものは、0.05%TFAによる測定では、29項目中12項目にとどまったが、0.1%FAによる測定では、それより11項目多い23項目となった。

今後、移動相に0.1%FAを用いて、鶏卵・養殖魚についても同様に妥当性評価を実施し、検査に反映させたい。

また、目標値等を満たすことができなかった検査項目については、測定条件等さらに改良を加えていくこととしたい。

引用文献

- 1) 食安発第 0124001 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：2005/1/24
- 2) 食品、添加物等の規格基準 厚生省告示第 370 号：1959/12/28
- 3) 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：2010/12/24

表2 S/N比・回収率・併行精度及び室内精度

No.	分析対象化合物	S/N比						FA/TFA	真度・精度								
		0.05%トリフロロ酢酸(TFA)			0.1%ギ酸(FA)				0.05%トリフロロ酢酸			0.1%ギ酸			目標値		
		1日目	2日目	平均	1日目	2日目	平均		真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度
1	スルファジアジン	22	40	31	184	487	335	10.7	92.1	92.8	93.1	80.3	10.2	10.9	70~120	15	20
2	クロピドール	298	129	213	25	19	22	0.1	78.7	5.3	6.5	93.6	2.1	5.0	70~120	15	20
3	チアベンダゾール代謝物	52	95	74	470	670	570	7.7	74.9	5.7	10.4	94.2	5.4	8.3	70~120	15	20
4	スルファチアゾール	113	57	85	280	158	219	2.6	79.7	16.4	20.8	75.2	9.8	12.7	70~120	15	20
5	スルファピリジン	62	98	80	435	548	491	6.1	83.7	24.6	25.0	82.2	13.4	13.9	70~120	25	30
6	チアベンダゾール	1278	571	924	234	366	300	0.3	89.6	8.1	12.6	89.8	4.9	6.7	70~120	15	20
7	リンコマイシン	612	208	410	299	186	242	0.6	102.3	8.5	20.2	76.4	14.3	16.1	70~120	10	15
8	アルベンダゾール代謝物	494	269	381	656	2480	1568	4.1	109.8	4.1	8.2	93.5	5.6	6.2	70~120	15	20
9	レバミノール	437	3465	1951	458	443	450	0.2	103.5	9.4	10.4	91.2	5.0	5.1	70~120	10	15
10	スルファジミジン	36	92	64	1523	1076	1300	20.3	84.8	16.1	19.2	78.4	4.9	12.5	70~120	15	20
11	トリメトプリム	156	85	121	404	346	375	3.1	118.1	8.2	17.7	84.1	11.2	12.4	70~120	15	20
12	シプロフロキサシン	34	25	30	138	249	194	6.5	56.8	10.8	12.2	111.9	5.0	5.1	70~120	15	20
13	ダノフロキサシン	40	34	37	21	157	89	2.4	134.3	12.0	17.2	94.5	7.4	12.6	70~120	15	20
14	オルメトプリム	497	624	561	994	346	670	1.2	176.3	7.4	8.0	85.9	6.6	10.1	70~120	25	30
15	エンロフロキサシン	69	32	50	147	300	223	4.4	129.2	23.1	23.9	112.1	6.5	7.0	70~120	15	20
16	スルファモノトキシム	74	108	91	172	167	169	1.9	106.8	22.6	25.8	87.3	10.7	20.0	70~120	25	30
17	セフォペラゾン	7	-	-	9	11	10	1.5	111.5	25.2	20.4	111.9	29.0	20.5	70~120	15	20
18	スルファドキシム	485	106	296	572	408	490	1.7	79.5	8.9	15.2	81.5	3.7	8.7	70~120	15	20
19	オキシリニック酸	136	127	132	291	129	210	1.6	128.4	7.1	7.8	85.7	6.3	14.6	70~120	25	30
20	オキシベンダゾール	1299	340	820	584	1037	811	1.0	76.3	3.1	8.3	70.1	6.7	8.9	70~120	25	30
21	スルファベンズアミド	147	79	113	149	328	239	2.1	89.6	8.6	13.2	82.2	10.6	12.0	70~120	25	30
22	スルファジメトキシム	449	259	354	467	226	346	1.0	82.0	8.5	10.4	82.1	6.2	6.6	70~120	15	20
23	スルファキノキサリン	25	124	74	544	772	658	8.9	73.2	8.1	10.2	73.9	7.8	8.7	70~120	25	30
24	オレアンドマイシン	8	13	11	35	21	28	2.6	80.1	11.1	11.1	115.1	10.8	12.2	70~120	15	20
25	フルベンダゾール	233	469	351	1322	1159	1240	3.5	90.8	6.3	8.5	92.5	4.6	6.6	70~120	25	30
26	タイロシム	21	4	12	117	36	76	6.2	54.5	16.5	18.8	48.3	28.4	16.3	70~120	15	20
27	チアムリン	32	45	39	199	228	214	5.5	121.5	20.6	22.4	121.0	27.1	20.0	70~120	25	30
28	クロキサシリン	70	42	56	295	203	249	4.4	81.6	5.7	5.8	83.8	5.2	5.8	70~120	15	20
29	ファムフル	2	22	12	29	7	18	1.5	81.5	4.5	10.2	91.5	6.8	7.8	70~120	15	20