

LC/MS/MSによる魚介類・食肉・鶏卵中残留動物用医薬品スクリーニング分析法の検討

上村聖子、角谷直哉、山口之彦、清水 充

Screening Method for Veterinary Drugs in Seafoods, Livestock Foods, and Eggs by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Masako UEMURA, Naoya KAKUTANI, Yukihiko YAMAGUCHI, and Mitsuru SHIMIZU

Abstract

A screening method for veterinary drugs in seafoods, livestock foods, and eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was examined. Validation of a multi-residue screening method for the determination of 49 veterinary drugs in 3 types of seafoods (sea bream, horse mackerel, and salmon), chicken, and egg was conducted by LC/MS/MS.

In 49 kinds of veterinary drugs, 43 drugs were obtained with recoveries in the range of 50 - 120% at a spiked level of 0.1 µg/g in these foods.

Key words: veterinary drugs, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, multi-residue screening methods

I 緒言

食の安心・安全についての関心が高まる中、平成18年5月29日に農薬、動物用医薬品および飼料添加物についてポジティブリスト制度が施行された[1]。それ以前は、動物用医薬品および飼料添加物33項目に対して基準値が設定されていたが、ポジティブリスト制施行を機に対象が約250項目へと広がった[2]。これら多数の項目を効率良く分析するために、厚生労働省より「HPLCによる動物用医薬品等の一斉分析法Ⅰ、ⅡおよびⅢ」が通知された[3]。一斉分析法Ⅰは、試料をアセトニトリルで抽出し、脂質などの脂溶性夾雑物は *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、HPLC-DAD、HPLC-FL又はLC/MSで測定する方法である。分析対象項目は分析法Ⅰ、ⅡおよびⅢの中でもっとも多い104項目であるが、精製度が低いため分析装置への負荷が懸念される。一斉分析法Ⅱは、試料を95%アセトニトリル水溶液で抽出し、合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー、アセトニトリル/ヘキサン分配、さらにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム

クロマトグラフィーにより精製した後、HPLC-DAD又はHPLC-ECDで測定する方法である。精製度が高く夾雑物が少ないためHPLC-UVでも測定可能な方法であるが、操作が煩雑であることが難点である。一斉分析法Ⅲは試料をアセトニトリル、メタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液で抽出し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC/MS又はLC/MS/MSで測定、確認する方法である。対象化合物は29項目と少ないが、分析対象に挙げられていない動物用医薬品でも分析可能なものも多いと思われる[2]。

今回、著者らは「HPLCによる動物用医薬品等の一斉分析法Ⅲ」の適用範囲を広げることを目的とし、通知法では対象となっていない化合物も含めた49種の動物用医薬品について、LC/MS/MSを用いたスクリーニング分析法の検討を行った。それらの結果について報告する。

II 実験方法

1) 試料

大阪市内に流通するタイ、小アジ、サーモン、鶏肉、

鶏卵の5畜水産物を添加回収試験用の試料とした。

2) 試薬等

(1) 標準品

スクリーニング分析の対象とした49種の動物用医薬品を表1に示す。49種の内訳は、 β -ラクタム系抗生物質7種、マクロライド系抗生物質8種、サルファ剤14種、キノロン剤11種(オールドキノロン剤3種およびニューキノロン剤8種)、その他合成抗菌剤5種およびベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤4種である。また、これらのうち21種は一斉分析法Ⅲの対象化合物であり、28種は対象とされていない化合物である。これらの動物用医薬品は和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)、関東化学(株)、シグマアルドリッチジャパン(株)、Dr. Ehrenstorfer GmbH、Riedel-de Haën, MP Biomedicalsおよび日本科学飼料協会配布品の標準品を用いた。

(2) 動物用医薬品標準原液

各動物用医薬品標準品10mg相当をメタノールまたはアセトニトリル/水(1:1)に溶解し100mLとした(100 μ g/mL)。

(3) 動物用医薬品標準混合溶液

LC/MS/MS分析においてESIポジティブモードで測定するマクロライド系抗生物質、サルファ剤、キノロン剤、チアンフェニコールを除くその他合成抗菌剤およびベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤について、各標準原液1mLを採り、アセトニトリル/水(1:4)で50mLに希釈し、ポジティブ用標準混合溶液とした(2 μ g/mL)。

また、ESIネガティブモードで測定する β -ラクタム系抗生物質およびチアンフェニコールについて、各標準原液1mLを採り、アセトニトリル/水(1:4)で50mLに希釈し、ネガティブ用標準混合溶液とした(2 μ g/mL)。

添加回収試験用標準混合溶液は、ポジティブ用標準混合溶液およびネガティブ用標準混合溶液を1:1で混合して用いた(1 μ g/mL)。検量線作成用標準混合溶液は、添加回収試験用標準混合溶液を適宜希釈し、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1および0.25 μ g/mL溶液を調製した。

(4) ポリマー系ミニカラム

Waters社製Oasis HLBミニカラム(充填剤60mg, 容量3mL)をメタノール10mL、蒸留水10mLでコンディショニングした。

(5) メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水

高速液体クロマトグラフ用を用いた。

(6) メタリン酸およびギ酸

試薬特級を用いた。

(7) 抽出溶媒

0.2%メタリン酸溶液、メタノール、アセトニトリルを3:2:1の割合で混合した。

(8) ろ過助剤

シグマアルドリッチ社製ハイフロスーパーセルを用いた。

(9) 2mmol/L ギ酸および2mmol/L ギ酸含有アセトニトリル

蒸留水およびアセトニトリルにそれぞれ2mmol/Lになるようギ酸を添加し、調製した。

3) 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent社製LC1100

タンデム型質量分析計: Applied Biosystems社製API2000

4) 測定条件

カラム: 東ソー製TSK-GEL ODS-100V 2.0 \times 150mm 粒径5 μ m

移動相: A液 2mmol/L ギ酸、B液 2mmol/L ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント条件: A/B:90/10 \rightarrow (8min) \rightarrow 40/60(5min) \rightarrow 90/10(5min)

サンプル注入量: 5 μ L

流速: 0.2mL/min.

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

イオン源温度: 550 $^{\circ}$ C

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

イオン化電圧: ポジティブモード 4800V、ネガティブモード -3800V

MRM測定条件: 表1

5) 試験溶液の調製

均一化した試料5gを250mL容ステンレス製遠沈管にはかり取り、抽出溶媒120mLを加えて2分間ホモジナイズした後、ろ過助剤0.5gを混合し、8,000rpmで10分間遠心分離を行った。上清はろ過助剤0.5gを積層した吸引ろ過器を用いてろ過した。ろ液は40 $^{\circ}$ C水浴中減圧下で約25mLまで濃縮した。コンディショニングしたOasis HLB カートリッジに抽出濃縮液全量を負荷し、蒸留水10mLで2回洗浄した後、メタノール10mLで動物用医薬品を溶出した。溶出液を40 $^{\circ}$ C水浴中減圧下で濃縮し、窒素気流下にて完全に乾固した。残留物にアセトニトリル/水(1:4)2mLを加え、超音波洗浄機中で再溶解し、試験溶液とした。フローを図1に示す。

表1 検討対象化合物名およびそれらのイオン化最適条件

No.	分類	動物用医薬品名	一斉分析法Ⅲ 対象化合物	保持 時間 (min.)	分子量	イオン化 モード	プレカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
1		アンピシリン	—	6.14	349.4	nega	348	207	-51	-14
2		ベンジルペニシリン	—	10.4	334.4	nega	333	192	-1	-18
3	β-ラクタム系 抗生物質	フェノキシメチルペニシリン	—	11.0	350.4	nega	349	208	-56	-12
4		オキサシリン	—	11.5	401.5	nega	400	259	-1	-18
5		クロキサシリン	—	12.1	435.9	nega	434	293	-1	-20
6		ナフシリン	—	12.3	414.5	nega	413	272	-6	-14
7		ジクロキサシリン	—	12.9	470.3	nega	468	327	-51	-10
8		ネオスピラマイシン-I	○	7.40	698.9	posi	350*	174	41	23
9		スピラマイシン-I	○	7.83	843.1	posi	422*	174	81	29
10		チルミコシン	—	8.54	869.2	posi	435*	174	46	35
11	マクロライド系 抗生物質	オレアンドマイシン	—	9.19	687.9	posi	689	158	61	37
12		ミロサマイシン	—	9.21	727.9	posi	729	158	81	39
13		タイロシン	—	9.82	916.1	posi	916	174	101	69
14		キタサマイシン	—	10.4	771.9	posi	772	109	71	59
15		ジョサマイシン	—	11.1	828.0	posi	829	109	71	65
16		スルファセタミド	—	6.48	214.2	posi	215	156	61	15
17		スルファジアジン	○	7.08	250.3	posi	251	156	46	21
18		スルファチアゾール	○	7.32	255.3	posi	256	156	51	21
19		スルファピリジン	○	7.54	249.3	posi	250	156	36	23
20		スルファメラジン	○	7.93	264.3	posi	265	156	141	23
21		スルファメトキシピリダジン	○	8.48	280.3	posi	281	156	51	25
22	合成抗菌剤	スルファジミジン	○	8.51	278.3	posi	279	186	26	25
23	サルファ剤	スルファモノトキシン	○	9.02	280.3	posi	281	156	26	29
24		スルファクロルピリダジン	○	9.37	284.7	posi	285	156	71	21
25		スルファドキシン	○	9.65	310.3	posi	311	156	51	25
26		スルファメトキサゾール	○	9.75	253.3	posi	254	156	56	23
27		スルファベンズアミド	○	10.5	276.3	posi	277	156	51	17
28		スルファキノキサリン	○	10.6	300.3	posi	301	156	91	23
29		スルファジメトキシン	○	10.6	310.3	posi	311	156	31	33
30	合成抗菌剤	オキシリニック酸	—	10.2	261.2	posi	262	244	26	27
31	オールド	ナリジクス酸	—	11.6	232.2	posi	233	215	36	25
32	キノロン剤	フルメキン	—	11.8	261.3	posi	262	244	61	23
33		ノルフロキサシン	—	7.17	319.3	posi	320	301	56	25
34		オフロキサシン	—	7.21	361.4	posi	362	318	46	25
35		シプロフロキサシン	—	7.29	385.8	posi	332	314	6	27
36	合成抗菌剤 ニュー	ダノフロキサシン	—	7.46	357.4	posi	358	340	61	33
37	キノロン剤	エンロフロキサシン	—	7.67	359.4	posi	360	342	151	27
38		オルビフロキサシン	—	7.80	395.4	posi	396	378	151	27
39		サラフロキサシン	—	8.13	385.4	posi	386	368	61	29
40		ジフロキサシン	—	8.22	399.4	posi	400	382	56	31
41			クロピドール	○	6.57	192.1	posi	194	101	151
42	その他 合成抗菌剤	ピリメタミン	—	8.72	248.7	posi	249	177	56	41
43		トリメプリーム	○	6.96	290.3	posi	291	261	36	39
44		オルメプリーム	○	7.30	274.3	posi	275	259	61	39
45		チアンフェニコール	○	7.90	356.2	nega	356	185	-131	-26
46			5-ヒドロキシチアベンダゾール	—	6.36	217.3	posi	218	191	61
47	ベンズ イミダゾール系	5-プロピルスルホニル-1H- ベンズイミダゾール-2-アミン	○	6.50	239.3	posi	240	133	66	39
48	寄生虫駆除剤	チアベンダゾール	—	7.59	201.3	posi	202	175	61	35
49		フルベンダゾール	○	11.6	313.3	posi	314	282	71	37

DP:デクラスタリングポテンシャル、CE:コリジョンエネルギー

※ 2価イオン

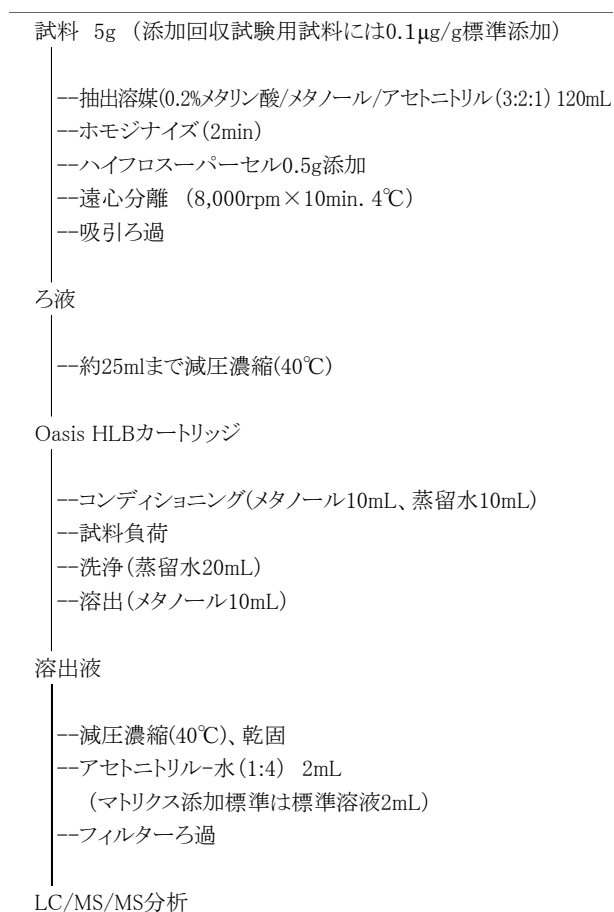


図1 動物用医薬品一斉分析法フローシート

6) 添加回収試験

均一化した試料 5g に、添加回収試験用標準混合溶液を試料中濃度として 0.1µg/g になるよう添加し、よく混合して30分間放置後、5)と同様にして試験溶液を調製した。マトリクスによる影響を補正するため、それぞれの畜水産物を5)と同様に処理して得られた抽出残留物を、検量線作成用標準混合溶液 0.1µg/mL および 0.25µg/mL で溶解したマトリクス添加標準溶液を調製し、二点検量線から回収率を算出した。

III 結果及び考察

1) 抽出条件の検討

抽出条件は厚生労働省通知「HPLCによる動物用医薬品等の一斉分析法Ⅲ」[3]をもとに検討した。通知法では0.2%メタリン酸、メタノールおよびアセトニトリルの混合比が3:1:1とされているが、この条件で抽出を行なったところ、抽出遠心後ろ過を行なう際、試料によってはマトリクス成分が目詰まりを起し、ろ過が困難な場合があった。そこで、抽出溶媒の比重を軽くするため、メタノールの配合比を増加させ、0.2%メタリン酸/メタノール/アセトニトリル(3:2:1)とした。また共沈作用を持つハイフろスーパーセルを抽出溶液に0.5g添加してから遠心分離を行なったところ、目詰まりせずろ過するこ

とが可能となった。

2) MS条件の検討

測定はESIポジティブモードおよびネガティブモードで行った。49種の動物用医薬品についてインフュージョン分析を行ない、ポジティブモードにおいてはプロトン化分子を、ネガティブモードにおいては脱プロトン化分子をプレカーサーイオンとして設定した。プロダクトイオンは、感度が高く、マトリクスによる妨害の少ないイオンを選択し、最適なデクラスティングポテンシャル(DP)およびコリジョンエネルギー(CE)の値を設定した。それぞれのMRM条件を表1に示す。

3) HPLC条件の検討

HPLCの移動相はアセトニトリル/水系で検討した。オールドキノロン剤であるオキシソリニック酸、ナリジクス酸およびフルメキンについては、ピークがテーリングしやすかったが、酸を加えることでピーク形状が改善された。揮発性の酸である酢酸とギ酸をそれぞれ移動相に加えて比較したところ、2mmol/Lギ酸を加えた時のピーク形状が最も良かったため、ギ酸添加濃度を2mmol/Lとした。

多数の項目を迅速に分析するためグラジェント分析とした。グラジェント勾配はMRM条件のプレカーサーイオンとプロダクトイオンが同じである、スルファメキシピリダジンとスルファモノメキシシ、スルファドキシシとスルファジメキシシおよびオキシソリニック酸とフルメキンのピークがそれぞれ分離するよう考慮して決定した。

サンプル注入量は5µLおよび10µLで比較した。その結果、10µL注入では検量線の高濃度側でイオンが飽和し、検量線がフラットになった。5µL注入では10µL注入に比べピーク形状が良く、検量線の直線範囲も広がったため、サンプル注入量を5µLとした。

4) 添加回収試験

試料に対し49種の動物用医薬品がそれぞれ0.1µg/gとなるよう添加して回収試験を行なった。

一般的にLC/MSやLC/MS/MS分析においては、マトリクス存在下でイオン化抑制が起こるため、検量線作成用標準溶液をもとにして作成した検量線を用いて回収率計算を行うと、見かけ上値が低くなってしまふ。これに対して、ニューキノロン剤では、マトリクスによりイオン化促進を受けるため、通常の検量線で計算すると、回収率が120%を大幅に超えるものが多くみられた。このようなマトリクスによるイオン化促進およびイオン化抑制作用の影響を補正するために、試料を抽出精製した後標準溶液で定容したマトリクス添加標準溶液の分析結果を用いて回収率を算出することとした。全化合物の添加回収率を図2に示す。

通知法では対象とされていないβ-ラクタム系抗生

物質7種について検討した結果、いずれの試料においてもアンピシリンの回収率が30%以下と低かった。他の6種については50~120%の回収率が得られた。アンピシリンは水溶性が高く、精製において充填剤に保持されにくいいため、回収率が低くなると考えられた。

マクロライド系抗生物質は、スピラマイシンおよびネオスピラマイシン以外は通知法の対象項目ではないが、検討した8種すべてについて回収率が50~110%と良好な結果が得られた。

サルファ剤においてはタイ、小アジおよびサーモンのマトリクスでスルファセタミドの回収率が50%以下であった。他の13種のサルファ剤については5種の畜水産物すべてで回収率が50~100%と良好な結果が得られた。

キノロン剤では、ノフロキサシンおよびシプロフロキサシンでサーモンにおける回収率が50%以下であった。他の9種のキノロン剤については5種の畜水産物すべてで50~110%の回収率が得られた。

その他合成抗菌剤では、クロピドールの回収率が50%以下になる場合があった。他の4種については5種の畜水産物すべてで50~100%の回収率が得られた。

ベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤については、サーモンにおけるフルベンダゾール回収率が若干低かったが、他についてはおおむね良好であった。

これらの結果から、今回検討した49種の動物用医薬品のうち、43種の動物用医薬品の一斉分析が、本法によって可能であると考えられた。

5) 動物用医薬品の種類およびマトリクスの種類が回収率に及ぼす影響

図2に示すとおり、動物用医薬品の種類およびマトリクスの種類により、回収率に一定の規則性があることがわかった。サルファ剤ではマトリクス別にみると、どの化合物でも鶏卵における回収率が高く、鶏肉と小アジでは回収率が低かった。一方、マクロライド系抗生物質やキノロン剤ではタイにおける回収率が全体的に高く、同じ魚類でもサーモンにおける回収率は低い傾向があった。サーモンにおける回収率は他のどの種類の動物用医薬品についても低いわけではなく、β-ラクタム系抗生物質ではサーモンにおける回収率が全体的に高かった。

回収率に影響を与える要素として、抽出過程および精製過程でのロスが挙げられる。アンピシリンのように5種のマトリクスのいずれにおいても回収率が低いものもあるが、スルファセタミドのように魚

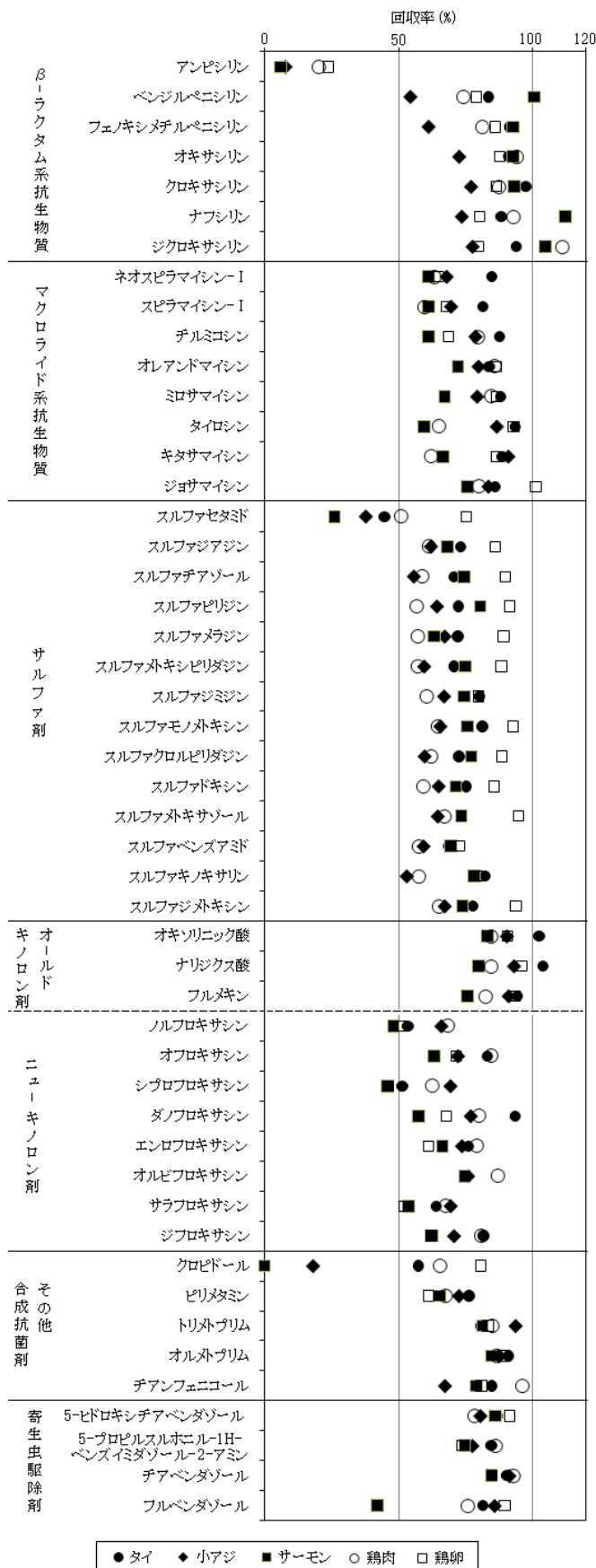


図2 動物用医薬品の添加回収率

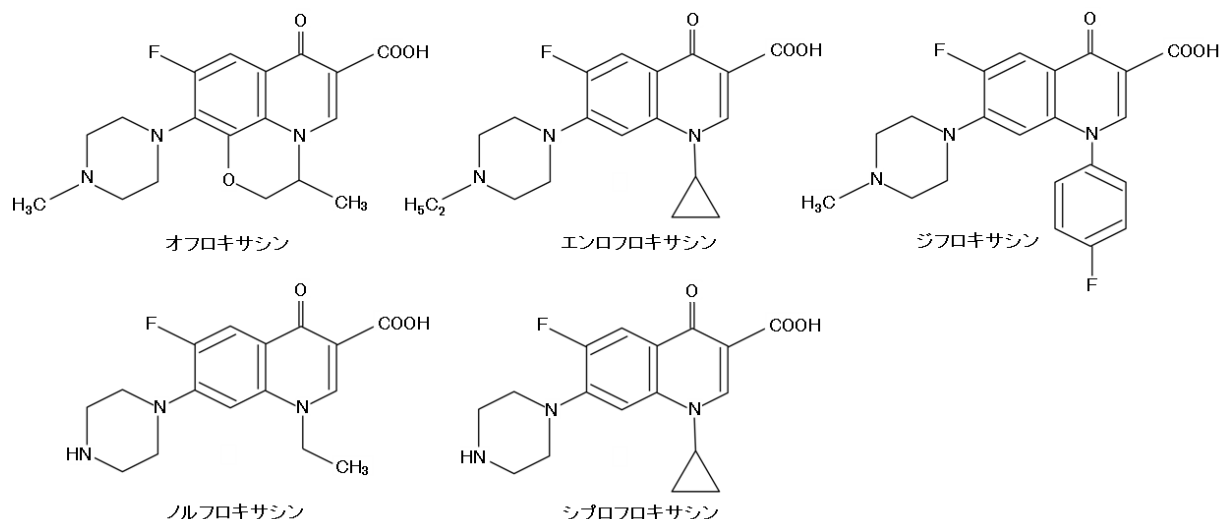


図3 ニューキノロン剤の構造式

類では回収率が50%を下回るものの鶏肉や鶏卵では50%以上の回収率が得られるものもある。このように、マトリクスが異なると、抽出効率や精製における充填剤への化合物の吸着および溶出の挙動が変化し、それが回収率に影響を及ぼしているということが推察された。

また、同じ種類の動物用医薬品は類似した構造をしているが、その構造によっても抽出効率や充填剤への吸着および溶出の挙動は変化するため、化合物を中心にして考えた場合、高い回収率が得られる化合物ではマトリクスの種類にかかわらず相対的に高い回収率となり、低めの回収率である化合物はどのマトリクスにおいても回収率が低めとなった。キノロン剤と言えば、オールドキノロン剤であるオキシリニック酸、ナリジクス酸およびフルメキンは、相対的に8種のニューキノロン剤より回収率が高かった。また、ニューキノロン剤の中での回収率は、どの魚類でも(オフロキサシン≒エンロフロキサシン≒ジフロキサシン) > (ノルフロキサシン≒シプロフロキサシン)という傾向がみられた。これら5種のニューキノロン剤の構造を図3に示す。ニューキノロン剤は構造にCOOH基を有しており、回収率が低かったノルフロキサシンおよびシプロフロキサシンはそれに加えてNH基を有している。一方、回収率が高めだったオフロキサシン、エンロフロキサシンおよびジフロキサシンではNH基の水素原子がメチル基やエチル基に置

換している。こうした化合物の構造の違いが、回収率に影響を及ぼすことが推察された。

IV まとめ

49種の動物用医薬品について、スクリーニング分析法を検討した。50～120%の回収率が得られた動物用医薬品をこのスクリーニング分析法で分析可能な項目とした場合、今回の添加回収試験結果から、43種の動物用医薬品の一斉分析が可能であると考えられた。通知法では対象となっていないβ-ラクタム系抗生物質、マクロライド系抗生物質およびキノロン剤など28種の動物用医薬品のうち、24種が分析対象となることが確認された。

参考文献

- 1) 平成17年厚生労働省告示第497号、498号、499号。2005.
- 2) 堀江正一. 食品中に残留する動物用医薬品分析法の進歩. 食衛誌 2010; 51: 363-372.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品衛生部長通知別添. 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). 2005.