

## LC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤一斉分析法の検討

藤田瑞香\* 柿本健作\* 山口貴弘\* 尾花裕孝\*

畜水産食品中の残留サルファ剤 10 種類の一斉分析法を高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて検討した。2 種類の固相カラムを使用することにより、多種類の試料の精製が可能となった。さけへの添加回収試験の結果、回収率は74~89%、相対標準偏差は7%以下と良好であり、日常の検査業務に適用できる試験法を確立することができた。

**キーワード:** サルファ剤、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計、畜水産食品

**Key words:** Sulfonamides, LC/MS/MS, livestock products and seafood

サルファ剤は広い抗菌スペクトルを有する合成抗菌剤の一種で動物用医薬品として広く使用されており、食品衛生法により残留基準が設定されている。当所では、以前よりサルファ剤の分析を行っているが、試料によっては試料由来の成分により分析が妨害されることがあった。そこで今回、試料の前処理方法を改善し、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた分析法の検討を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1 試料

大阪府内で市販されていたさけ、たら、鶏肉、牛乳を用いた。

#### 2 試薬および器具等

##### 2-1 標準品

スルファチアゾール(STZ)、スルファメラジン(SMR)、スル

ファジミジン(SDD)、スルファモノメトキシ(SMMX)、スルファクロルピリダジン(SCPD)、スルファドキシ(SDOX)、スルファメトキサゾール(SMXZ)、スルファジメトキシ(SDMX)、スルファキノキサリン(SQ)は関東化学(株)製、スルフィソゾールナトリウム(SIZ)は畜水産品残留安全協議会製を用いた。

##### 2-2 試薬および器具

アセトニトリル、メタノール: 関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬

その他の試薬: 和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬水: ミリポア社製MILLI-Q SP. TOC. により精製して用いた。

固相抽出カラム: Varian 社製 Bond Elut Jr-C18 (500mg) (以下 ODS)、Waters 社製 Sep-Pak Plus Alumina B (以下 Alumina B)

メンブランフィルター: アドバンテック東洋(株)製 DISMIC (親水性 PTFE, 13mm $\phi$ , 0.2 $\mu$ m)

#### 3 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT10 (KINEMATICA 社製)、遠心分離機は himac CR5B2 (日立工機(株)製)を用いた。LC/MS/MS は AQUITY UPLC—Quattro Premier XE (Waters 社製)を用いた。

#### 4 LC/MS/MS 測定条件

分析カラム: Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (150 $\times$ 2.1 mm 1.7 $\mu$ m)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、流速: 0.2mL/min、注入量: 10 $\mu$ L

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課  
Multiresidue Method for the Determination of Sulfonamides in Livestock products and Seafood Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry  
by Mizuka FUJITA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Hirotaka OBANA

移動相：A液；0.1%ギ酸5%メタノール水溶液 B液；  
5%メタノールアセトニトリル溶液

グラジエント条件：B液5-15% (10min)、15-75 (7min)

イオン化モード：ESI(+)、イオン源温度：120°C

脱溶媒ガス温度および流量：窒素 350°C、900L/hr

コーンガス流量：窒素 50L/hr

化合物ごとの条件は表1に示した。

表1 LC/MS/MS parameters for the determination of

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
STZ	256	156	34	16
		92		28
SMR	265	92	28	25
		108		25
SDD	279	186	34	17
		92		31
SIZ	240	92	22	25
		156		11
SMMX	281	156	22	26
		126		31
SCPD	285	156	34	16
		92		34
SDOX	311	156	25	16
		92		28
SMXZ	254	92	25	30
		156		15
SDMX	311	156	28	22
		92		28
SQ	301	92	30	34
		108		22

## 4 抽出および精製方法

### 4-1 抽出法

試料5gを50mL遠心チューブに量り、無水硫酸ナトリウム10gおよびアセトニトリル25mLを加えホモジナイズ後、毎分3000回転で5分間遠心分離した。上清を100mLの分液ロートにろ紙でろ過して移し、残渣にアセトニトリル25mLを加えて攪拌後毎分3000回転で5分間遠心分離した。上清を同様にろ過して先のろ液と合わせ、*n*-ヘキサン40mLを加えて、振とう機を用いて5分間振とう後、静置し、下層をナスフラスコに集めた。*n*-プロパノールを約10mL加え約40°

Cで減圧乾固した。残留物に*n*-プロパノール3mLを加えて溶かした。

### 4-2 精製法

アセトニトリル5mLを通液して前処理したAlumina Bに抽出法で得られた溶液を注入し、ナスフラスコを*n*-プロパノール2mLで洗い込み、続けてカラムに注入した。カラムをアセトニトリル5mLで洗浄し、あらかじめアセトニトリル5mL、水5mLを通液して前処理したODSカラムを下に接続し、85%アセトニトリル水溶液10mLで溶出した。溶出液に*n*-プロパノールを約3mL加え約40°Cで減圧乾固し、アセトニトリル-水の混液(1:9)を1mL加えて溶かし、メンブランフィルターでろ過し、これを試験用液とした。

## 結果および考察

### 1 LC/MS/MS 条件の検討

#### 1-1 MS/MS 条件の検討

イオン化にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を選択し、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)法で測定を行った。イオン化モードは感度が良好であったポジティブモードを採用した。

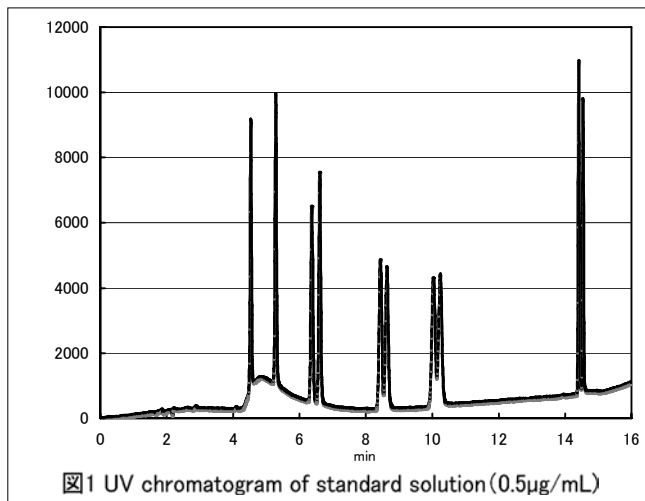
#### 1-2 LC 条件の検討

イオン化モードがESI(+)であったため移動相にプロトンを供与するため0.1%ギ酸を用いた。また、UV265nmでの同時測定を行うため各ピークの完全分離を検討した。移動相に5%となるようメタノールを加え、グラジエント条件を検討したところ、10種類のサルファ剤のピークを分離することができた(図1)。

#### 1-3 検量線および定量下限

0.05~0.5mg/Lの標準溶液を調製し、絶対検量線を作成したところ、すべてのサルファ剤で決定係数 $r^2=0.99$ 以上の良好な直線性が認められた。

定量下限は0.01mg/kgとした。



## 2 前処理方法の検討

本法は厚生労働省通知の個別試験法であるスルファジミジン試験法（以下、通知法）を基にしている<sup>1)</sup>。通知法では中性アルミナ固相カラムに試料を95%アセトニトリル溶液で負荷することとなっているが、サルファ剤の保持が十分ではない。そこで、酸性物質であるサルファ剤を保持させるため塩基性アルミナを使用することとした。また、95%アセトニトリル溶液で負荷を行うと、十分に保持されないサルファ剤があった。そのためn-プロパノールに溶解し、Alumina Bに注入し、アセトニトリルで洗浄を行うこととしたところすべてのサルファ剤が保持された。さらに試料によっては低極性物質が十分に除去できなかったので溶出時にODSを連結し精製を行った<sup>2)</sup>。これにより、Alumina Bのみの精製では除去できなかった色素性分も除去できた。その結果、様々な種類の試料に対応できる前処理方法を確立できた。また、マトリックス添加標準溶液を用いることなく定量を行うことが可能となった。

## 3 添加回収試験

あらかじめ対象のサルファ剤が含有していないことを確認した後にサルファ剤0.03mg/kgを添加し、回収率を求めた(n=6)。平均回収率は74~89%で、相対標準偏差は7%以下と良好な結果が得られた。また、同時に測定したUVでの定量でもほぼ同様の結果であった。その他の試料での添加回収試験結果を表2に示した。たらおよび鶏肉の一部のサルファ剤を除いては良好な結果であった。この理由としては妨害成分の除去が不十分であったためと思われる。

## 4 まとめ

以上より、本法は簡易で十分な定量精度が得られることから、日常分析法として利用できると思われる。

### 2 Recoveries of sulfonamides from livestock products and seafood

	Average recoveries% (RSD%)			
	Salmon (n=6)	Pacific cod (n=3)	milk (n=2)	chicken (n=6)
STZ	85 (6)	67 (9)	70	60 (9)
SMR	80 (6)	68 (5)	92	73 (11)
SDD	89 (4)	74 (15)	89	71(13)
SIZ	84 (2)	85 (7)	116	66 (15)
SMMX	81 (3)	80 (3)	85	66 (13)
SCPD	74 (7)	63 (10)	79	74 (11)
SDOX	82 (4)	82 (6)	86	71 (11)
SMXZ	80 (5)	75 (15)	84	70 (12)
SDMX	87 (3)	85 (20)	99	70 (12)
SQ	74 (7)	57 (4)	70	71 (9)

## 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長「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(通知)」平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)
- 2) 藤田瑞香, 田口修三, 尾花裕孝: ガラスビーズ粉砕法を用いたLC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤の分析, 食品衛生学雑誌, 49, 411-415 (2008)