

カラムスイッチング LC/MS/MS による残留動物用医薬品の一斉分析

Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs by Column-switching Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry

遠藤 美砂子 柳田 則明*¹

Misako TAGIRI-ENDO, Noriaki YANAGITA

畜産物中に含まれる残留動物用医薬品 89 物質をカラムスイッチング-高速液体クロマトグラフィー (LC) / タンデム質量分析計 (MS/MS) により一斉分析する方法を検討した。試料はアセトニトリル/メタノール (4:1, v/v) で抽出した後、0.1%ギ酸移動相によりオンライン固相抽出カラムに注入し、目的とする医薬品を保持するとともに極性夾雑物を取り除いた。次にカラムスイッチングにより溶出液を分析カラムに通し、0.1%ギ酸/アセトニトリルのグラジェントにより目的物質を溶出させ、MS/MS で検出した。一斉分析の評価基準として回収率が 60 ~ 140%, 相対標準偏差が 20%以内であることを条件とした場合、本法により鶏卵中 62, 豚肉中 67, 牛肉中 67 物質の残留動物用医薬品の分析が可能となった。

キーワード：動物用医薬品；残留分析；オンライン固相抽出；カラムスイッチング；高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析

Key words：veterinary drugs；residual analysis；on-line solid phase extraction；column-switching；LC/MS/MS

1 はじめに

国民の健康の保護を図ることを目的とした「食品衛生法等の一部を改正する法律」(平成 15 年 5 月 30 日公布)により、食品中に残留する農薬等に関し、いわゆるポジティブリスト制が施行された。このうち、動物用医薬品については約 240 物質に暫定基準等が設定された。これにより各都道府県では、迅速に多くの物質を検査することが必要になるとともに、多くの物質について定量値を求めることが要求されるようになった。

当部ではこれまでポジティブリスト制に対応すべく、行政モニタリング検査において、平成 16 および 17 年度は HPLC 分析^{1) 2)}による約 18 物質の残留動物用医薬品検査を行い、平成 18 年度に LC/MS 分析に移行することで 33 ~ 36 物質の検査を実施してきた³⁾。また、平成 19 年度からは LC/MS/MS 分析を導入し、さらに検査物質数を増加させるとともに、オンライン固相抽出を採用することで前処理の簡素化を図ることができた⁴⁾。

今回、さらなる検査物質数の増加を図るため、カラムスイッチング LC/MS/MS による同一分析条件で 26 物質を追加できるか検討したので報告する。

2 方法

2.1 試料および試薬

試料は宮城県内で市販されている鶏卵、豚肉および牛肉を用いた。動物用医薬品は、合成抗菌剤 41, 抗生物質 19, 寄生虫駆除剤 15, 寄生虫駆除剤の代謝物 2, 殺虫剤 5, 消炎剤 4, 抗ヒスタミン剤 1, 鎮静剤 2 の計 89 物質を対象とした。厚生労働省通知「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 I」⁵⁾を参考としてアセトニトリル抽出可能な

物質を選定した。動物用医薬品標準品およびその他の試薬類は、関東化学、林純薬工業、和光純薬工業、Sigma-Aldrich Lab. GmbH, Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers から購入して使用した。各標準品は、その 10mg をメタノールに溶解して正確に 100ml とし、標準原液 (100 μ g/ml) とした。各標準原液を混合してメタノールで希釈し、1000 ng/ml の混合標準溶液を調製した。

2.2 装置および測定条件

LC は Agilent 社製 Agilent1100 シリーズを用い、オンライン固相抽出カラムには Waters 社製 Oasis HLB (2.1 \times 20mm, 25 μ m) を、また分析カラムには Agilent 社製 ZORBAX SB-Aq (2.1 \times 50mm, 3.5 μ m) を用いた。試料注入量は 10 μ l, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C, 移動相は 0.1 %ギ酸とアセトニトリルのグラジェント溶出とした。カラムスイッチング LC の構成を図 1 に、グラジェント条件を表 1 に示した。移動相 (A, B) はポンプ (C) により送液し、精製濃縮過程では、インジェクター (D) により注入した試験溶液が、オンライン固相抽出カラム (E) に流れて、目的物質は E に吸着され、夾雑物は六方バルブ (F) から廃液される。次の分離検出過程では、F を切替え、分析カラム (G) に目的物質を流して分離させ、MS/MS で検出する。

MS/MS は Applied Biosystems 社製 API3000 を用いた。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブモード (POS) ならびにネガティブモード (NEG) で行い、multiple reaction monitoring (MRM) 測定により定量した。化合物毎の MRM 測定条件は Table2 に示した。イオンスプレー電圧は 5500V (POS) ; -3500V (NEG), イオン源温度は 450 $^{\circ}$ C (POS) ; 500 $^{\circ}$ C (NEG), ネプライザーガスは 13, カーテンガスは 11 (POS) ; 9 (NEG), コリジョンガスは 5 に設定した。なお, dwell time の制限から, LC/MS/MS 分析は 3 系列 (POS2 系列,

* 1 現 石巻保健福祉事務所

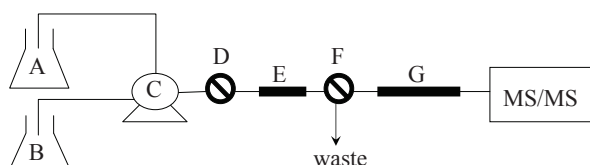
NEG1 系列) で行った。

2.3 試験溶液の調製

前報⁴⁾の方法により試験溶液を調製した(図2)。すなわち、細切試料5gを採り、アセトニトリル/メタノール(4:1, v/v) 20ml および無水硫酸ナトリウム 20gを加えて1分ホモジナイズし、2,500rpmで10分遠心分離した後、上清を50mlのメスフラスコに移した。残留物にアセトニトリル/メタノール(4:1, v/v) 20mlを加え、10分振とう抽出した後遠心分離し、上清を先程の50mlメスフラスコに加え、アセトニトリル/メタノール(4:1, v/v)で正確に50mlとした。その5mlを採り、突沸防止のためにn-プロパノール1mlを加えてから、濃縮乾固した。残渣にアセトニトリル/水(1:1, v/v) 1mlを加えて超音波洗浄器を用いて溶解し、4℃、15,000rpmで10分遠心分離した上清10μlをカラムスイッチング LC/MS/MSに供した。

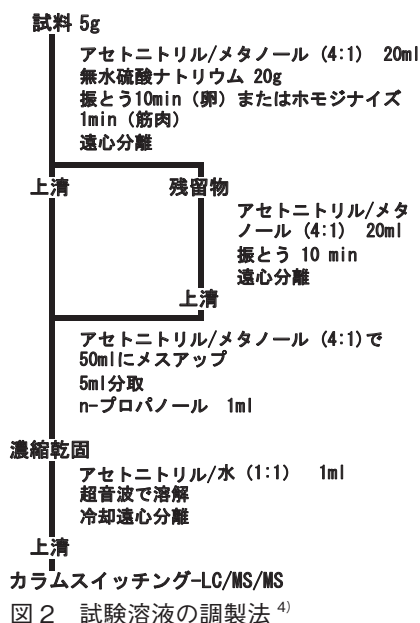
2.4 検量線の作成

鶏卵、豚肉、牛肉それぞれについて、上述した試験溶液の調製法に従い抽出液を得た。この抽出液を50mlに希釈した後、その5mlを5個のメスフラスコにそれぞれ採り、n-プロパノール1mlを加えた後、濃縮乾固した。残渣にアセトニトリル/水(1:1, v/v)で希釈した混合標準溶液0, 2.5, 5.0, 10, 15ng/mlをそれぞれ1ml加えて溶解した後、4℃、15,000rpmで10分遠心分離し



A: 0.1% ギ酸 B: アセトニトリル C: LCポンプ D: インジェクター
E: Oasis HLB カートリッジカラム F: カラムスイッチ G: 分析カラム

図1 カラムスイッチング HPLC システム



た上清を検量線用の標準溶液とした。検量線用標準溶液の濃度に対してピーク面積をプロットして検量線を作成し、検量線の傾きを用いて測定濃度を求めた。

3 結果

3.1 MS/MS 条件の検討

前報⁴⁾から追加した物質の最適条件については、インフュージョンポンプを用いて最大感度が得られる条件を求めた(表2)。イオンスプレー電圧やイオン源温度などの測定中固定した条件については、感度の小さい物質を用いてフローインジェクションにより最適条件を設定した。

3.2 検量線および検出下限値

絶対検量線法により定量値を求めた場合、満足する真度と精度を得ることができなかった。しかし、標準添加法は前処理検体数が多くなり、スクリーニング検査にしては操作に手間がかかる。そこで、試料マトリックス由来のイオン化促進/抑制の影響を排除するため、混合標準溶液に試料抽出残渣を加えて検量線を作成したところ、真度および精度が改善された。本法では、抽出液の10分の1量をLC/MS/MS分析に供するため、上述した検量線の作成方法を用いても特に操作量が増えることはない。検量線はほとんどの化合物で、2.5~15ng/mlの範囲で直線性を示し、相関係数は0.99以上であった。

基準値が10ng/g未満の化合物は基準値の1/2を、基準値が10ng/g以上の場合や不検出基準の場合は5ng/g(測定濃度として2.5ng/ml)を検出目標値として設定した。検出目標値に対応する検量線用混合標準溶液のピークと、ブランク溶液のピークを比較し、定量を妨害するピークがないか、もしくは(検出目標値に対応する検量線用混合標準溶液のピーク高さ)/(ブランク溶液のピーク高さ) ≥ 3の場合にその物質の検出目標値を検出下限値とした。追加した26物質のうち、メチルプレドニゾンとオラキンドックスはすべての試料で、5ng/gの検出下限値を満たすことができなかった。また、ハロフジノン・イソメタジウムおよびテトラサイクリンは豚肉と牛肉で、ニフルスチレン酸は鶏卵で、ノルフロキサシンは牛肉で検出下限値は5ng/gを超えていた。

3.3 添加回収試験

追加した26物質のうち、前報⁴⁾で抽出溶媒をアセトニトリルのみからアセトニトリル/メタノール(4:1)に変更したことで回収率が改善されたサルファ剤(スルファメチゾール・スルファトラン)は、回収率が70.0~83.2%と良好であった。一方、厚生労働省通知「HPLCによる動物用医薬品等の一斉分析法I」により定量できる物質とされているクロキサシリン・ハロフジノン・リファキシミン・タイロシンの回収率が低かった。また、テトラサイクリン系は、すべての品目で回収率が悪かった。

コーデックス委員会における分析法としての必要条件⁶⁾に、許容添加回収率70~110%並びに%RSD20%以内でなければならないとある。しかし、本法がスクリーニング

分析である点を考慮し、真度と精度の許容範囲を回収率 60 ~ 140%, % RSD を 20%以内としたとき、本カラムスイッチング-固相抽出/LC/MS/MS 分析により残留動物用医薬品の一斉分析が可能な医薬品は、鶏卵中 62, 豚肉中 67, 牛肉中 67 物質であった。

4 おわりに

開発したカラムスイッチング-固相抽出/LC/MS/MS 分析にて、前報⁴⁾と同じアセトニトリル/メタノール (4:1, v/v) 抽出による方法で、26 物質を追加したところ、テトラサイクリン系を中心とした抗生物質で回収率が低い物質があった。カラムスイッチング-固相抽出/LC/MS/MS は効率的に極性夾雑物を取り除くことができることから、今後は、水を含む抽出溶媒を用いて極性の高い抗生物質の回収率

を良くする必要があると思われる。

参考文献

- 1) 石川潔, 高橋紀世子, 赤間仁, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 19, 171 (2001).
- 2) 赤間仁, 高橋紀世子, 石川潔, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 20, 84 (2002).
- 3) 遠藤美砂子, 山内一成, 氏家愛子, 柳田則明: 宮城県保健環境センター年報, 24, 63 (2006).
- 4) 遠藤美砂子, 柳田則明: 分析化学, 56, 317-326 (2007).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知別添: 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号 (2005).
- 6) Official Standards of Codex Alimentarius Commission: CAC/GL 19-1993 (1993).

表 1 グラジエント条件

(I) ポジティブモードの1系列

時間 (min)	0	0.90	0.95	1.50	2.00	2.50	3.00
移動相 (%)	A:	100	100	100	5	5	100
	B:	0	0	0	95	95	0
流速 (ml/min)	1.0	1.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
バルブポジション	Waste	Waste	Waste	Waste	Waste	Waste	MS/MS

時間 (min)	6.00	11.00	12.00	15.00	19.00	19.50	20.00
移動相 (%)	A:	5	5	100	100	100	100
	B:	95	95	0	0	0	0
流速 (ml/min)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0
バルブポジション	MS/MS	MS/MS	MS/MS	MS/MS	MS/MS	Waste	Waste

(II) ポジティブモードの1系列と、ネガティブモードの1系列

時間 (min)	0	0.90	0.95	1.50	6.00	11.00	12.00
移動相 (%)	A:	100	100	100	5	5	100
	B:	0	0	0	95	95	0
流速 (ml/min)	1.0	1.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
バルブポジション	Waste	Waste	Waste	Waste	Waste	Waste	MS/MS

時間 (min)	15.00	19.00	19.50	20.00
移動相 (%)	A:	100	100	100
	B:	0	0	0
流速 (ml/min)	0.2	0.2	1.0	1.0
バルブポジション	MS/MS	MS/MS	Waste	Waste

A: 0.1% Formic acid

B: Acetonitrile

表2 物質毎のMS/MS条件(追加分26物質)

医薬品名	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering potential	Focusing potential	Collision energy	Collision cell exit potential
Ampicillin	350	106	36	170	29	18
Azaperone	328	165	46	90	33	10
Clorsulon	380	344	-51	-200	-16	-11
Chlortetracycline	479	444	41	180	29	14
Cloxacillin	434	293	-31	-110	-18	-9
Diclazuril	405	334	-46	-190	-26	-11
Halofuginone	416	138	41	180	27	10
Isometamidium	460	298	41	170	33	16
Marbofloxacin	363	320	46	180	23	20
Monensin	669	87	-61	-270	-78	-7
Methylprednisolone	375	91	31	140	91	16
Nifurstyrenate	258	184	-41	-160	-18	-13
Norfloxacin	320	276	56	240	27	18
Neospiramycin	699	174	51	240	41	12
Oxybendazole	250	218	46	200	27	14
Oleandomycin	688	158	46	180	39	10
Olaquinox	264	143	46	170	45	10
Oxytetracycline	461	426	41	180	27	14
Phenoxymethyl penicillin	349	208	-36	-170	-14	-11
Rifaximin	786	754	51	240	33	26
Sulfamethizole	271	156	36	160	23	26
Sulfanitran	334	136	-61	-250	-40	-7
Spiramycin	843	174	61	300	51	12
Tetracycline	445	410	41	140	27	12
Tilmicosin	869	174	61	320	59	12
Tylosin	917	174	51	230	55	12

表3 添加回収試験結果(追加分26物質)

医薬品名	鶏卵		豚肉		牛肉	
	回収率(%)	%RSD	回収率(%)	%RSD	回収率(%)	%RSD
Ampicillin	11.2	23.1	56.8	8.6	70.8	6.9
Azaperone	84.0	11.9	93.4	6.8	96.4	7.4
Clorsulon	81.6	5.4	99.0	5.8	88.6	6.6
Chlortetracycline	<25	—	22.0	12.0	34.4	18.1
Cloxacillin	<25	—	90.6	17.8	88.2	7.1
Diclazuril	74.2	10.2	108.2	9.5	98.4	12.4
Halofuginone	95.2	4.5	—	—	—	—
Isometamidium	53.8	8.9	—	—	—	—
Marbofloxacin	72.2	16.0	66.4	19.1	74.8	11.2
Monensin	89.8	4.8	94.8	10.0	98.6	11.3
Methylprednisolone	—	—	—	—	—	—
Nifurstyrenate	—	—	45.8	28.8	30.4	33.9
Norfloxacin	46.4	14.7	89.0	6.4	—	—
Neospiramycin	117.4	10.4	66.6	11.2	80.4	11.2
Oxybendazole	79.4	4.0	95.8	4.5	87.2	11.5
Oleandomycin	81.8	1.6	87.4	5.5	91.8	8.7
Olaquinox	—	—	—	—	—	—
Oxytetracycline	<25	—	33.8	13.3	42.8	6.7
Phenoxymethyl penicillin	12.4	33.5	90.0	10.9	76.4	24.0
Rifaximin	168.2	8.2	110.4	3.7	89.0	7.0
Sulfamethizole	70.4	5.1	74.8	7.7	71.4	19.3
Sulfanitran	70.0	15.6	76.6	6.6	89.2	7.1
Spiramycin	95.8	9.0	62.4	9.1	68.2	13.0
Tetracycline	2.6	21.1	—	—	—	—
Tilmicosin	106.4	1.8	102.2	5.8	93.2	4.5
Tylosin	68.8	3.6	59.8	11.9	73.6	10.2

n = 5; 20 ng/gを添加して実施