

## 資料

# LC/MS/MSによる動物用医薬品の一斉分析（平成22-24年）

中川礼子・堀 就英・高橋浩司・芦塚由紀\*・梶原淳睦

LC/MS/MSを用いた動物用医薬品の迅速簡便な一斉分析を厚生労働省通知の一斉分析法IIを基に改良開発し、平成22-24年の畜水産食品75検体に適用した。結果は、スルファ剤等の15品目はすべての検体において不検出（検出限界0.01 µg/g）であった。なお、本分析法の添加回収率は、60.9-144.8%とおおむね良好であった。

[キーワード：LC/MS/MS、迅速一斉分析、動物用医薬品]

## 1 はじめに

食の安全安心を確保するため、平成18年からポジティブリスト制が施行された。畜水産物の生産・飼育過程で使用される合成抗菌剤、合成ホルモン、合成抗生物質等さまざまな動物用医薬品にも、個々の食品において、特別に設定される基準の他に、一律基準や不検出を含む規制の網が掛けられ、同時にこれらの動物用医薬品の検査法も通知された。一度に多成分を検査する一斉分析法には、I、II、IIIと3種類通知された。著者らは多成分分析を目的とするため、アセトニトリル・アセトニトリル飽和ヘキササン・無水硫酸ナトリウムでホモジナイズ抽出するI法、アセトニトリル/水(95:5,v/v)を用いるII法、アセトニトリル/メタノール/メタリン酸混合溶液を用いるIII法のうち、特に測定項目数が多いI及びII法に注目した。I法は著者らも導入を検討したが、手間や濃縮時間が長く掛かることから、すでに他機関で検証済みのアセトニトリル<sup>1)</sup>やメタノール<sup>2)</sup>のみでのホモジナイズ抽出する、より簡易な方法を試行しつつ、併行して、II法についても検討した。その結果、II法のアセトニトリル/水(95:5,v/v)抽出が広範囲の抗菌剤の品目の溶解性に適しており、ルーチン化しやすいことが予想されたため、II法における抽出操作に、簡単な精製工程を追加して、当所におけるSOPとして採用した。ここでは、当所のSOPによる平成22-24年度の試験結果を、改良した分析法の説明及びその添加回収試験の結果と併せて報告する。

## 2 実験方法

### 2・1 試料

試料は鶏肉、豚肉、牛肉、魚肉で平成22-24年に福岡県内で収去されたものである。

### 2・2 試薬および標準品

溶媒：アセトニトリル及び蒸留水はLC/MS用、n-ヘキササンは残留農薬試験用、無水硫酸マグネシウムは特級品でいずれも関東化学（株）製を用いた。

標準品：関東化学（株）製、林純薬工業（株）製及び和光純薬工業（株）製の標準品（混合標準品を含む）を用いた。

標準原液及び混合標準溶液：単一標準品については5%アセトニトリルを溶解液とした。溶解が不十分なものについては、メタノールを追加し、100 µg/mL標準原液を作製した。これらの標準原液を用い、10 µg/mL、1 µg/mL濃度の混合標準液を5%アセトニトリルで希釈して作製し、検量線作成用標準液及び添加回収用標準液として用いた。

フィルター：Whatman社製 Mini-Uniprep<sup>TM</sup> (0.45 µm)

### 2・3 装置

高速液体クロマトグラフ：Waters社製 Acquity<sup>TM</sup>

質量分析装置：Waters社製 Xevo<sup>TM</sup>

### 2・4 HPLC条件

分析カラム：InertsilSustain (GL Science社)、2.1×150mm、粒径5µm)、移動相：A液0.1%酢酸、B液：アセトニトリル、グラジエント条件：A:B(85:15) (2分間保持) → (13分間でグラジエント) → A:B(30:70) → (0.1分間保持) → A:B(85:15)

カラム温度40°C、流速0.2 mL/分、注入量10µL

### 2・5 MS条件

イオン化：ESIポジティブモード、キャピラリー電圧0.60 kV、イオン源温度130°C、各測定項目のMRM測定条件を表1に示した。

### 2・6 検量線の作成

測定項目の動物用医薬品を含有していないことが確認された鶏肉、豚肉、魚肉の各試験溶液と、検量線作成用標

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野39）

\*福岡県保健医療介護部保健医療介護総務課

（〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7）

準液 (1 µg/mL) を用いて、0.01~0.1 µg/mL の間で3点以上のマトリックス添加標準液を調製した。この標準液のMRM クロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、量-反応において、直線性を示すことを確認した。

## 2. 7 試料溶液の調製

均一化した畜水産食品 5 g を 50 mL の褐色遠心管に秤取りし、5%アセトニトリル 30 mL を加え、2 分間ホモジナイズ抽出した。これを 3000 rpm で遠心分離し、上清を 100 mL の比色管に移した。残渣に 5%アセトニトリル 30 mL を加えて 30 分間振とう抽出し、遠心分離後の上清を先の比色管に移し合し、5%アセトニトリルで正確に 60mL とした。その 6mL を正確にとり 10 mL 容スピッチ管に移し、無水硫酸マグネシウム 0.1-0.2 g 加え激しく混和した。これを 3000 rpm で遠心分離し、アセトニトリル層を別の 10 mL 容スピッチ管に移し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 4mL を加えて激しく混和した。これを 3000 rpm で遠心分離し、n-ヘキサン層をパスツールピペットで取り、除いた。残ったアセトニトリル層を 100 mL 容ナス型フラスコに移し、40°C 以下で減圧濃縮乾固した。残渣にアセトニトリル/水 (1 : 4, v/v) 2 mL を正確に加え、超音波で溶解した。この液を 0.45 µ のフィルターでろ過した後、LC/MS/MS で測定した。

## 3 結果と考察

平成22-24年県内で収去された鶏肉20件、豚肉18件、牛肉16件、魚21件計75件について、サルファ剤9品目を始めとする合成抗菌剤15品目について検査した。結果はすべて不検出であった。なお、表1に、本SOPでの内部精度管理での添加回収結果を示した。添加濃度は試料当たり0.02 µg/g 相当であった回収率は60.9%から144.8%で、マトリックス添加検量線を用いてもイオン化促進効果が完全に補正しきれない、ピリメタミン、クロピドール及びスルファキノキサリンなどの品目もあったが、0.01 µg/gを検出下限値とする迅速簡便なスクリーニング法として適用できることが示された。本法は厚生労働省通知の一斉分析法Ⅱと同じ抽出溶媒であるため、適用できる動物用医薬品も共通である。さらに極めて簡易であるため、今後、迅速な対応が求められる検査機関での有益性が期待できるものと思われる。

## 4 まとめ

LC/MS/MSを用いた動物用医薬品の迅速簡便な一斉分析を、通知法を基に改良し、平成22-24年の収去食品75検体(鶏肉20件、豚肉18件、牛肉16件、魚21件)に適用した。結果は、サルファ剤等の15品目は、すべての検体において不検出であった。

## 文献

- 1) 中尾朱美 : LC/MS/MSによる畜水産食品の残留動物用医薬品及び合成抗菌剤の迅速一斉分析, 福岡市保健環境研究所報, 29, 80-85, 2004.
- 2) 梶田弘子, 畠山えり子 : LC/MS/MSによる畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析, 食衛誌, 49, 381-389, 2008.

表1 LC/MS/MS分析における測定項目の諸パラメーター及び添加回収結果

日本語名	保持時間 (min)	親イオン 電圧(V)	コーン	子イオン (定量)		子イオン (確認)		添加回収率(%)		
				イオン	コリジョン (eV)	イオン	コリジョン (eV)	豚肉 (n=5)	鶏肉 (n=5)	魚 (n=5)
1 トリメトプリム	5.25	291	38	123	36	261	28	107.8	87.9	117.2
2 スルファジアジン	5.75	251	24	156	16	92	28	74.7	74.6	78.1
3 オルメトプリム	5.67	275	20	123	25	259	25	105.6	87.2	126.0
4 スルファメラジン	6.80	265	30	92	25	108	25	80.5	89.0	73.5
5 チアンフェニコール	6.97	356	20	308	15	229	20	87.6	88.8	100.6
6 スルファメトキシピリダジン	7.60	281	26	156	30	126	15	97.8	76.6	81.1
7 スルファジミジン	7.60	279	30	186	15	124	20	108.0	82.3	76.4
8 ピリメタミン	7.60	249	30	233	25	177	25	144.8	80.2	78.2
9 スルファモノメトキシシ	8.52	281	35	156	15	126	15	99.2	81.4	71.8
10 クロビドール	5.12	192	35	101	15	-	-	124.9	110.4	128.7
11 スルファメトキサゾール	9.54	254	24	156	16	92	26	101.4	60.9	87.3
12 スルフィソキサゾール	9.96	268	20	92	30	156	14	100.8	69.6	97.3
13 オキソリン酸	10.17	262	35	244	15	216	25	105.5	111.7	72.8
14 スルファキノキサリン	10.89	301	35	156	15	108	25	132.0	83.1	122.9
15 スルファジメトキシシ	10.93	311	35	156	20	108	25	117.8	83.9	108.6