

# LC/MS/MS を用いた動物用医薬品の一斉分析法の検討

西川 徹・馬場 強三・村上 正文

## Study of Simultaneous Analytical Method of Veterinary Drugs Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Toru NISHIKAWA, Tsuyomi BABA, Masafumi MURAKAMI

A simple method using liquid chromatography/tandem mass for simultaneous determination of veterinary drugs and their metabolites in livestock products and seafoods (bovine muscle, egg, milk and shrimp) was studied. Mass spectral acquisition was done by applying multiple reaction monitoring (MRM).

The veterinary drug was extracted by acetonitrile-methanol (70:30, v/v), and the extracts defatted by n-hexane with saturated acetonitrile. The extracts were evaporated, dissolved with acetonitrile-water (10:90) for analysis by liquid chromatography / tandem mass. The veterinary drugs were separated by reversed-phase LC using Mightsil RP-18GP column and determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry.

The detection limits were range from 0.02 ng/g to 5.25 ng /g .The recoveries of veterinary drugs and their metabolites were almost 60 ~ 120 % from livestock products and seafood respectively.

Key words: liquid chromatography/tandem mass, Simultaneous analytical method, Veterinary drugs, Livestock products, Seafoods

キーワード: 高速液体クロマトグラフータンデム質量分析、一斉分析法、動物用医薬品、畜産食品、水産物

### はじめに

抗生物質や合成抗菌剤、寄生虫駆除薬などの動物用医薬品は畜水産動物の疾病予防及び治療を目的として使用されており、畜水産物の生産性に大きく寄与している。しかし、一方ではこれらの動物用医薬品の食品中への残留が食品衛生法上強く危惧されており、現在までに31種の動物用医薬品に残留基準値が設けられ、そのほとんどに個別に分析法が示されている。また、2006年5月よりポジティブリスト制度が施行され、平成17年6月に示された暫定基準(最終案)において、244種類の動物用医薬品について暫定基準が提示されている。そのため、今後このポジティブリスト制度に対応するためには高感度な多成分同時分析法が不可欠である。

HPLC による分析法では感度が不十分なことが多く、一斉分析できる医薬品の数にも限度があるため、近年では LC/MS/MS を用いた動物用医薬品のスクリーニング法について報告がされている<sup>1)3)</sup>。

そこで今回、LC/MS/MSを用いて簡易で高感度なスクリーニング手法を動物用医薬品及びその代謝物 20 種類について検討したので報告する。

### 調査方法

#### 1 試料及び試薬

##### ① 試料

県内産の牛筋肉、乳、卵、エビを用いた。

##### ② 標準品及び標準原液

動物用医薬品については表1に示すとおりで、厚生労働省が実施している「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査」のなかで検査項目となっている動物用医薬品を中心に合成抗菌剤(ピリメタミン、ナイカルバジン、オルメトプリム、トリメトプリム、チアンフェニコール、オキシリン酸、スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシ、スルファジメトキシ、スルファキノキサリン)、テトラサイクリン系抗生物質(オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン)、マクロライド系抗生物質(スピラマイシン、ネオスピラマイシン)、ベンズイミダゾール系寄生虫駆除薬(チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール、フルベンダゾール)、抗生物質(クロラムフェニコール)を分析対象とした。

これらの各標準品 10mg をメタノール又はアセトニトリルに溶解して 100ml とし、標準原液とした。さらに各標準

原液をアセトニトリル-水(10:90)で希釈して、混合標準溶液を調整した。

### ③ 試薬

蒸留水、メタノール、アセトニトリルは関東化学社(株)製の高速液体クロマトグラフ用を、ヘキサンは関東化学(株)社製の残留農薬用(5000倍濃縮品)を用いた。

その他の試薬は特級品を用いた。

## 2 分析装置及び条件

### (1) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)

高速液体クロマトグラフには島津製作所製LC-VPシステムを使用し、分析カラムは関東化学(株)社製 Mightysil RP-18GP (2.0mm i.d.×150mm、粒子径3 $\mu$ m)を用いた。カラム温度は40 $^{\circ}$ Cとし、移動相はA液に0.1%ギ酸溶液、B液にアセトニトリルを用い、A液95%(0min)→A液5%(25min)→A液95%(25.1min~35min)でグラジエント分析を行なった。

また、流速は0.2 ml/min、試料注入量は5 $\mu$ lとした。

### (2) 質量分析装置

Applide Biosystems 社製 API2000 を用いた。イオン化

はエレクトロスプレー(ESI)によるポジティブ及びネガティブイオン化法により行った。ポジティブモードではイオンスプレー電圧は5.0kv、イオン源温度は500 $^{\circ}$ Cに設定し、ネガティブモードではイオンスプレー電圧は-3.5kv、イオン源温度は450 $^{\circ}$ Cに設定した。

化合物ごとの条件についてはTable1に示した。

## 3 分析方法

試料5gを50ml遠沈管に入れ、アセトニトリル-メタノール(70:30, v/v) 30ml 及び無水硫酸ナトリウム10gを加えてホモジナイズを行い、3,000rpm、5分間遠心分離した。上清を100ml分液ロートに移し、遠心分離した残留物にアセトニトリル-メタノール(70:30, v/v) 20mlを加え、5分間超音波抽出を行い、3,000rpm、5分間遠心分離した。この上清をさきほどの上清と合わせた後、アセトニトリル飽和ヘキサン30mlを加えて5分間振とうして、アセトニトリル-メタノール層を200mlナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮した(38 $^{\circ}$ C)。残留物にアセトニトリル-水(10:90)10mlを加えて溶解し、0.2 $\mu$ mフィルターでろ過し、試験液とした。

Table1. Retention time and compound-specific ESI-MS/MS parameters.

Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering Potential(V)	Collision Energy(V)
5-hydroxythiabendazole (5-OH TBZ)	5.6	218.2	191.2	31	33
tiabendazole (TBZ)	6.3	202.1	175.3	26	35
trimethoprim (TMP)	6.6	291.2	230.3	26	31
ormetoprim (OMP)	7.1	275.1	123.4	31	35
oxytetracycline (OTC)	7.2	461.1	426.1	16	25
tetracycline (TC)	7.6	445.1	410.1	11	25
sulfamerazine (SMR)	7.8	265.1	92.3	21	39
neospiramycin (nSPM)	8.2	699.3	174.4	21	47
thiamphenicol (TP)	8.4	355.9	78.8	-61	-52
sulfadimidine (SDD)	8.8	279.1	186.0	21	25
spiramycin (SPM)	8.8	843.4	174.4	66	45
chlortetracycline (CTC)	9.2	479.2	444.0	21	25
pyrimethamine (PYR)	9.4	248.9	178.2	31	39
sulfamonomethoxine (SMMX)	9.7	281.0	92.3	21	41
oxolinic acid (OXA)	11.4	262.1	216.3	16	41
chloramphenicol (CAP)	11.6	322.9	120.9	-60	-38
sulfadimethoxine (SDMX)	12.2	311.1	156.3	26	29
sulfaquinoxaline (SQX)	12.2	301.1	156.2	21	23
flubendazole (FBZ)	13.6	314.1	282.3	26	33
nicarbazin (NCZ)	18.1	300.9	136.9	-11	-40

上記方法によって調整された各ブランク溶液に、各試料 0.5g あたり 5ng、10ng、20ng、50ng に相当する量の検査対象物質を添加し、この標準液によって作成した検量線により定量を行った。

また、同様に各試料 0.5g あたり 50ng の検査対象物質を添加して標準液を作成し、標準溶液のみの場合のイオン化と比較することにより、上記の試験法によって得られた試験液中のマトリクス成分が ESI によるイオン化に及ぼす影響について調査した。

添加回収試験は各試料に最終試験溶液濃度が 20ppb(40ng/g)になるように添加して行なった(n=3)。

## 結果と考察

### 1 分析条件の検討

#### ① 液体クロマトグラフ条件の検討

動物用医薬品は種類によって極性が異なるため、幅広い極性に対応できる ODS 系のカラムについて検討を行なった。東ソー(株)社製 TSK-gel Super ODS (2.0mm i.d. × 100mm、粒子径 2 μm) と関東化学(株)社製 Mightysil RP-18GP (2.0mm i.d. × 150mm、粒子径 3 μm) で検討したところ、テトラサイクリン系抗生物質やオキシソリン酸は TSK-gel Super ODS カラムではピーク形状が悪く、分離も Mightysil RP-18 GP の方が良かったため、カラムは Mightysil RP-18 GP を選択した。

移動相を検討する際、イオン化の促進を促す目的で移動相に添加するギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの揮発性酸(塩)について検討した。その結果、0.1%ギ酸溶液とアセトニトリルを用いたグラジエント分析が、感度及び分離が一番良好であった。1 回の分析時間は 25 分としたが、機器を安定させる為に A 液の割合を 95%にして 10 分間安定化した。

#### ② 質量分析計の条件の検討

イオン化は ESI によるポジティブイオン化とネガティブイオン化によって行い、イオンスプレー電圧やイオン源温度等のイオンソースのパラメーターは、感度の低いテトラサイクリン系抗生物質やクロラムフェニコールやチアンフェニコールの感度が最大になるようフローインジェクションアナリシス(FIA)により最適な条件を決定した。また化合物ごとの最適条件については、インフュージョンポンプを用いた MRM 法により決定した(Table1)。

クロラムフェニコールやチアンフェニコール、ナイカルバジンはネガティブイオン化の方が高感度であったため、これら3種はネガティブイオン化によりイオン化を行うこととした。また、ナイカルバジンは N,N'-Bis(4-nitrophenyl)urea を分析対象化合物とした。

### 2 前処理法の検討

動物用医薬品の一斉分析において、通知法<sup>4)</sup>ではアセトニトリルで抽出となっているが、テトラサイクリン系抗生物質はアセトニトリルではほとんど抽出できないという報告がされている<sup>5)</sup>。そこでテトラサイクリン系抗生物質の抽出効率を上げる目的で、抽出溶媒はアセトニトリル-メタノール混液を用いた。メタノールの含量について検討したところ、メタノールの割合を 30%とすることで全体的に良好な回収率が得られた。

抽出後はアセトニトリル飽和ヘキサンによる脱脂を行い、濃縮した後、アセトニトリル-水(10:90)で 10ml にメスアップを行なった。本来ならば、更にここからカラム等で精製し、試料中の夾雑物を除く必要があるが、動物用医薬品はその種類によって物性が大きく異なり、20種類を同時に精製するのは困難であるため、LC/MS/MS が非常に選択性に優れているという点を考慮し、カラムによる精製は行わなかった。各動物用医薬品の検出感度次第では最終試験液量は考慮すべきであるが、サンプル中のマトリクス成分の割合を出来るだけ少なくするため、最後のメスアップ量は 10ml とした。

LC/MS/MS で分析を行なう際、試料由来のマトリクス成分がイオン化を促進または抑制し、定量を阻害することが知られている。そこで、本法により調製したブランク溶液に標準を添加した時のイオン強度と、標準溶液のみのイオン強度について比較したところ、マトリクス成分によるイオン化の促進が、スピラマイシン、ネオスピラマイシンを中心にサルファ剤を除いた動物用医薬品で多くみられ、またイオン化の抑制も一部のサンプルでみられた。

そこで、定量は試験液中のマトリクスの影響を避けるため、本法によって調整された各ブランク溶液に各サンプル 0.5g(/1ml)あたり 5ng、10ng、20ng、50ng に相当する量の動物用医薬品を添加して作成した検量線により定量を行った。すべての動物用医薬品で相関係数 0.990 以上と良好な検量線が得られた。

### 3 検出下限値

各サンプルのブランク溶液に動物用医薬品を添加して検出下限値(S/N=3)を求めたところ、各サンプルでの検出下限値は 0.02~5.3 ng/g であった(Table2)。サルファ剤やトリメトプリム、オルメトプリム、ベンズイミダゾール系寄生虫駆除薬などは高感度であったが、チアンフェニコールやクロラムフェニコール、テトラサイクリン系抗生物質については感度がやや低かった。しかし、ほとんどの動物用医薬品においてポジティブリスト制度の一律基準値である 0.01ppm 以下の濃度で検出することは可能であ

Table 2. The detection limits of veterinary drugs in each test solution.

Compound	detection limit ( ng / g )			
	bovine muscle	milk	egg	Shrimp
5-hydroxythiabenzazole (5-OH TBZ)	0.04	0.05	0.05	0.04
tiabendazole (TBZ)	0.06	0.05	0.05	0.05
trimethoprim (TMP)	0.04	0.02	0.04	0.04
ormetoprim (OMP)	0.06	0.07	0.07	0.08
oxytetracycline (OTC)	0.42	0.50	0.60	1.1
tetracycline (TC)	0.45	0.50	0.40	0.50
sulfamerazine (SMR)	0.15	0.10	0.08	0.10
neospiramycin (nSPM)	0.60	1.9	0.90	1.6
thiamphenicol (TP)	4.8	5.3	5.3	4.6
sulfadimidine (SDD)	0.15	0.20	0.15	0.20
spiramycin (SPM)	0.60	1.8	0.60	2.3
chlortetracycline (CTC)	1.1	0.90	1.8	3.7
pyrimethamine (PYR)	0.10	0.07	0.08	0.07
sulfamonomethoxine (SMMX)	0.70	0.60	0.60	0.60
oxolinic acid (OXA)	0.40	0.30	0.40	0.90
chloramphenicol (CAP)	1.9	2.0	1.6	2.1
sulfadimethoxine (SDMX)	0.02	0.10	0.02	0.03
sulfaquinoxaline (SQX)	0.12	0.08	0.06	0.05
flubendazole (FBZ)	0.06	0.07	0.04	0.09
nicarbazin (NCZ)	0.05	0.20	0.03	0.04

った。

#### 4 回収試験

回収試験の結果について Table3に示す。アセトニトリルとメタノール(70:30) 混合液を抽出溶媒とすることにより、ほとんどの動物用医薬品で回収率は60%以上と良好であった。また、変動係数(CV)もほとんどにおいて20%以下であり、再現性も確認された。アセトニトリルでは抽出されないテトラサイクリン系抗生物質も卵以外の検体では良好に回収された。一方、4 検体の回収率を中央値でみると、テトラサイクリン系3種類は約55%~67%、フルベンダゾールは155%であったが、これら以外の16種類については70%~120%であった。卵でのテトラサイクリン系抗生物質の回収については、抽出溶媒の検討、若しくはテトラサイクリン系抗生物質の個別分析法を考える必要があった。

本法は無水硫酸ナトリウムで水溶性夾雑物を除いた後、アセトニトリルとメタノール(70:30) 混合液で2回抽出しているが、精製はヘキサンによる脱脂を行なうのみという非常にシンプルな方法であるため、スルファモノメキシ

ンやチアンフェニコールで、クロマトグラム上に一部のサンプルからピークが確認されたが、定量を阻害するような妨害ピークはみられなかった。

#### まとめ

合成抗菌剤や抗生物質及び寄生虫駆除薬等の動物用医薬品20種類について、牛肉、乳、卵、エビを用いて簡易で迅速な一斉分析法を検討したところ、アセトニトリル-メタノール(70:30)混合液を抽出溶媒として使用することにより、一部のサンプルを除いて、回収率60%以上と良好な結果であった。また、テトラサイクリン系抗生物質やスピラマイシンなど、通知法で一斉分析の対象となっていない動物用医薬品についても一部のサンプルを除いて適応可能であった。本試験法による検出下限値は0.02~5.3 ng/gであり、平成18年5月に施行されるポジティブリスト制度の一律基準値である0.01ppm以下の濃度で検出することが可能であった。

以上により、今回検討した本試験法は畜水産食品中に含まれる動物用医薬品のスクリーニング法として有用であると考えられる。

Table 3. The recoveries of veterinary drugs from bovine muscle, egg, milk and shrimp.

Compound	Recovery (%)							
	bovine muscle	CV (%)	milk	CV (%)	egg	CV (%)	shrimp	CV (%)
5-hydroxythiabendazole (5-OH TBZ)	71.8	19.1	73.7	29.4	88.7	5.7	60.2	25.7
tiabendazole (TBZ)	89.7	6.7	84.0	3.1	85.7	10.0	90.7	4.1
trimethoprim (TMP)	86.8	4.6	88.5	3.7	86.2	3.9	89.5	4.8
ormetoprim (OMP)	85.7	8.3	89.7	1.8	93.0	1.9	87.2	9.0
oxytetracycline (OTC)	69.2	10.9	70.2	12.6	27.4	3.2	58.4	14.4
tetracycline (TC)	81.2	2.3	85.3	6.5	21.1	4.7	78.5	5.1
sulfamerazine (SMR)	88.2	2.7	86.2	1.2	96.0	3.4	88.8	2.3
teospiramycin (nSPM)	96.2	5.2	109.7	16.4	117.8	5.5	65.0	6.7
thiamphenicol (TP)	97.8	4.9	92.5	10.8	99.3	4.5	91.3	14.9
sulfadimidine (SDD)	87.8	3.3	91.2	5.8	96.2	4.7	89.7	1.7
spiramycin (SPM)	104.5	4.3	104.5	23.2	118.8	6.0	63.2	6.0
chlortetracycline (CTC)	56.5	24.7	78.0	1.1	14.2	9.3	70.2	5.3
pyrimethamine (PYR)	84.8	7.1	89.0	2.0	87.0	5.7	89.2	3.7
sulfamonomethoxine (SMMX)	88.5	4.3	86.8	6.3	94.3	0.8	89.7	0.6
oxolinic acid (OXA)	82.8	4.0	89.2	10.0	54.2	4.4	129.0	5.2
chloramphenicol (CAP)	97.3	6.5	96.7	7.3	92.7	9.4	104.2	7.0
sulfadimethoxine (SDMX)	85.3	3.0	85.0	4.6	96.2	1.8	91.0	0.5
sulfaquinoxaline (SQX)	86.5	1.2	86.3	4.3	94.3	2.7	89.5	2.0
flubendazole (FBZ)	152.5	1.5	139.2	12.5	174.0	0.3	155.7	5.5
nicarbazin (NCZ)	86.2	3.5	94.2	2.0	84.5	6.6	101.2	10.6

### 参 考 文 献

- 1) 中尾朱美:LC/MS/MSによる畜水産食品中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) 山田良司, 他 :LC/MS/MSを用いた筋肉中の残留動物医薬品の多成分同時分析, 生活衛生, **49(3)**, 152~160, (2005)
- 3) Khong SP, Hammel YA, Guy PA : Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, Rapid Commum Mass Spectrom, **19(4)**, 493~502, (2005)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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)
- 5) 中尾朱美、畑野和宏:LC/MS/MSによる畜水産食品中の残留動物用医薬品及び合成抗菌剤の迅速一斉分析(Ⅱ), 福岡市保健環境研究所報, **30**, 167~169, (2005)