

## LC/MS による残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について（短報）

石川雅人 赤城理恵 神尾典子 松山勝江 金成徹 安部幸雄 片平大造  
理化学グループ

### 要 旨

動物用医薬品等の残留基準値は、平成 16 年 11 月 26 日現在で、16 品目の抗生物質・合成抗菌剤、12 品目の寄生虫駆除剤、2 品目のホルモン剤及び 1 品目の飼料添加物の計 31 品目について設定されており、試験法については、告示等で約 20 種類の個別試験法が示されている。

一方、平成 15 年 5 月 30 日に食品衛生法等の一部を改正する法律が公布され、3 年以内に、残留基準値が設定されていない約 200 種類の動物用医薬品等に残留基準値及び試験法が示されるなど、いわゆるポジティブリスト制度への移行が目前に控えている。

このような中、数多い個別試験法を実施する前に、より多くの動物用医薬品を効率的、かつ迅速にスクリーニングする分析法を採用することが、人件費や消耗品等のコスト低減にもつながり、必要かつ現実的であるため、既設の高速液体クロマトグラフ・質量分析計（以下 LC/MS という。）を用いて検討を行った。

キーワード：動物用医薬品等、ポジティブリスト制度、一斉分析法、LC/MS

#### はじめに

動物用医薬品は畜産物等を安定的に生産するために必要不可欠であるが、人間への影響や安全性の観点からその使用にあたっては使用基準等を遵守することが義務付けられている<sup>1)</sup>。

このため、食品衛生法では残留した薬剤による人体へのリスク評価を基に、畜水産食品中への残留基準値を設けられている。これを受けて、保健所、地方衛生研究所及び食肉衛生検査所などにおいて、流通している食品に基準を超過したものがないかモニタリング検査を実施している。このような中、昨今の食の安全・安心に対する消費者の関心の高まりとともに、平成 18 年 5 月までに約 200 種類の動物用医薬品（平成 7 年以降現在までに、31 品目）の残留基準が設けられるなど、今後はより多くの動物用医薬品の残留について、安全確認を求められるものと思われる。

これまで、残留動物用医薬品のスクリーニング検査法として、バイオアッセイを用いてマクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系及びアミノグリコシド系抗生物質 4 系統を対象とした「畜水産食品中の残留抗生

物質の分別推定法（改定法）（平成 6 年 7 月 1 日付け衛乳第 107 号）<sup>2)</sup>及び高速液体クロマトグラフ・多波長検出器（以下フォトダイオードアレイという。）を用いてサルファ剤系、ニューキノロン系など 19 品目を対象とした「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法（改定法）（平成 5 年 4 月 1 日付け衛乳第 79 号）（以下一斉分析法という。）」<sup>3)</sup>が示されている。

この一斉分析法を基本に合成抗菌剤 19 品目を対象に LC/MS の分析条件を確立し、平成 16 年 4 月から行政検査に適應してきたが同一分析条件で 21 品目についても、追加できるか検討を行ったので、現在までの状況を報告する。なお、本研究は平成 16 年度から 2 ヶ年計画の「LC/MS による食品中の残留動物用医薬品の調査研究」事業として実施している。

#### 材料及び方法

##### 1 試料

生乳、鶏卵、豚肉、養殖魚類（コイ、イワナ、ニジマス、ヒラメ）

##### 2 標準品及び試薬等

表 1 参照

表1 標準品及び試薬

1 標準品					
試薬名	品質	製造メーカー	試薬名	品質	製造メーカー
カバドックス	HPLC用	和光純薬工業	スルファトキザール	HPLC用	和光純薬工業
カバドックス	HPLC用	和光純薬工業	スルファチザール	HPLC用	和光純薬工業
カバドックス代謝物	残留動物薬試験用	林純薬工業	スルファトキビリダジン	食品分析用	関東化学
チアフェニコール	HPLC用	和光純薬工業	スルフィロジン	HPLC用	和光純薬工業
フラリドン	HPLC用	和光純薬工業	スルファドキン	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
スルファメジン	HPLC用	和光純薬工業	スルファセトアミド	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
スルファジミジン	HPLC用	和光純薬工業	スルファベンザミド	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
スルファモノキシン水和物	HPLC用	和光純薬工業	スルファニトラ	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
スルファジトキシ	HPLC用	和光純薬工業	スルファゲンジン	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
スルファキナリンナトリウム	HPLC用	和光純薬工業	スルファピリジン	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
*オキノリン酸	HPLC用	和光純薬工業	スルファクロピリダジン	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
*ナジク酸	HPLC用	和光純薬工業	スルファルアミド	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
*ピロミド酸	HPLC用	和光純薬工業	*エノロキサ	残留動物薬試験用	林純薬工業
ナイカルバジン	HPLC用	和光純薬工業	*塩酸サラロキサ	残留動物薬試験用	SIGMA-ALDRICH
クロピドール	食品分析用	関東化学	*メシル酸ゲノロキサ	残留動物薬試験用	林純薬工業
トリメプリム	HPLC用	和光純薬工業	*オロキサ	残留動物薬試験用	林純薬工業
オルメプリム	食品分析用	関東化学	クロラフェニコール	残留動物薬試験用	林純薬工業
クエン酸モナテル	HPLC用	和光純薬工業	ジクラリル	残留動物薬試験用	林純薬工業
ピリメタミ	HPLC用	和光純薬工業	チアベンダゾール	食品添加物試験用	和光純薬工業
ジフラゾン	HPLC用	和光純薬工業	フルベンダゾール	HPLC用	和光純薬工業
スルファジジン	HPLC用	和光純薬工業			
2 標準品・移動相調製試薬					
試薬名	品質	製造メーカー	試薬名	品質	製造メーカー
ジメチルホルムアミド	HPLC用	和光純薬工業	アセトニトリル	LC/MS用	和光純薬工業
テトラヒドロフラン	HPLC用	和光純薬工業	蒸留水	HPLC用	和光純薬工業
メタノール	HPLC用	和光純薬工業	酢酸	精密分析用	和光純薬工業
3 試料溶液調製試薬					
試薬名	品質	製造メーカー	試薬名	品質	製造メーカー
アセトニトリル	試薬特級	和光純薬工業	硫酸ナトリウム(無水)	試薬特級	和光純薬工業
ヘキサ	試薬特級	和光純薬工業	1-ブタノール	試薬特級	和光純薬工業
リン酸二水素Na・2水	試薬特級	和光純薬工業	メタノール	試薬特級	和光純薬工業
Bond Elut JR	C18 500mg	パリアン	クロマトディスク	0.45 μ	GLサイエンス

### 3 標準原液及び溶液の調製

各標準品 10.0mg を量り採り，ナイカルバジンはジメチルホルムアミドに，フルベンダゾールはテトラヒドロフランに，チアベンダゾール及びキノロン剤はメタノールに，その他はアセトニトリルに溶かし，メスフラスコで100mL としたものを標準原液とした。

各標準原液をアセトニトリル - 水(4:6)混液により希釈し，定量限界を求める場合は，5.0 ~

100ppb の範囲で，添加回収試験及び未知試料の検査には，2ppm の混合標準溶液を作成した上で，0.1 ~ 1.0ppm に適宜希釈し標準溶液とした。

なお，フラン剤など光に対して不安定な薬剤<sup>4)</sup>は，遮光性のあるガラス製器具を使用した。

### 4 装置

高速液体クロマトグラフ Waters2695，

フォトダイオードアレイ Waters2996 ,  
質量分析計 ; WatersZQ4000 (ESI)  
解析ソフトウェア ; Empower

5 測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ条件

流速 ; 0.2mL/分

試験液注入量 ; 5  $\mu$  L

カラム温度 ; 40

分析カラム ; Waters XTerra RP<sub>18</sub> 5  $\mu$  m 2.1  
× 150mm 及び資生堂 Capcell  
PAK<sub>C18</sub> 3  $\mu$  m MG 2.0 ×  
150mm

移動相及び溶出条件 ; A 及び B による 35  
分間のグラジエント溶出

A ; 水-酢酸 (100:0.3)

B ; アセトニトリル-水-酢(80:20:0.3)

表2 グラジエント溶出条件<sup>5)</sup>

分析時間	A (%)	B (%)	備考
0分	100	0	
15分	40	60	
15.1 ~ 25分	0	100	
25.1 ~ 35分	100	0	

この間はリニアグラジエント

2) 質量分析計条件

イオン化 ; ESI + 及び ESI -

モニターイオン ; 表3 (SIR 1つ)参照

コーン電圧 ; 表3参照

ソース温度 ; 130

脱溶媒温度 ; 350

コーンガス流量 ; 60L/時

脱溶媒ガス流量 ; 360L/時

シリンジポンプ ; Hamilton250  $\mu$  L

6 試料溶液の調製

生乳, 鶏卵, 豚肉, 養殖魚類 (コイ, イワナ, ニジマス, ヒラメ) について, 0.5 ~ 1.0kg の試料を細切混和 (豚肉及び養殖魚類は筋肉部位) したのから 5.0g 量り採り, アセトニトリルで抽出した後, アセトニトリル-ヘキサン分配により精製したアセトニトリル層を減圧乾固 (40 以下) して得た残留物 (鶏卵については, 妨害する物質を取り除くために, 残留物を ODS カラム処理したもの) をアセトニトリル-水 (4:6) に溶解し, アセトニトリル-

水-ヘキサン分配によりさらに精製し試験液とした.

また, 添加回収試験は, 採取した試料 5.0g に各標準品を 1  $\mu$  g 添加して, 試料同様に前処理を行い, 試験液とした. なお, 前処理は一斉分析法に準じた. (図1参照)

結果及び考察

1 各動物用医薬品標準品の測定条件

最初に 5ppm 濃度程度に希釈した各動物用医薬品標準溶液を Hamilton250  $\mu$  L のシリンジポンプを用いて, 10  $\mu$  L/分の流量で, 質量分析計の ESI プローブに直接注入し, コーン電圧, イオン化モード及びモニターするイオン等の最適条件を検討した.

次に, 2ppm 濃度に希釈した各動物用医薬品標準溶液を LC/MS による TIC フルスキャン分析を実施し, 目的とする分離ピーク, モニターする主イオン及びその構成イオンを確認した. なお, その際に, フォトダイオードアレイ (UV 波長) により, 分離時間及び吸収波長を確認し, 各動物用医薬品標準品の分離ピークであることを併せて検証した.

各標準品のイオン等の測定条件は表3のとおりである. フラグメンター電圧 (コーン電圧) 条件は, 25 ~ 45V の範囲となった. SIR イオンは, クロラムフェニコール及びジクラズリルは ESI ネガティブモードの (M-H)<sup>-</sup> イオンを, 他はすべて ESI ポジティブモードで, 標準物質のプロトン付加イオン (M+H)<sup>+</sup> を選んだ. なお, ナイカルバジンについては, 物質の構成成分である *N,N'*-bis-(4-nitrophenyl) urea : 分子量 = 302.25 のプロトン付加イオン<sup>6)</sup> を選択した. また, スルファグアニジン及びスルファニルアミドについて, 本移動相条件では分離・確認できなかった.

質量分析計 (以下 MS という.) で分離確認のできた 38 品目については, 保持時間が 11 分台と 12 分台にそれぞれ 7 物質と集中しているため, 従来のフォトダイオードアレイ (UV 波長) による分離測定はきわめて困難である. なお, SIR イオンのうち, 279m/z (スルファジミジン, スルフィソミジン), 281m/z (スルファモノメトキシ, スルファメトキシピリダジン) 及び 311m/z (スルファジメト

表 3 測定条件検討結果

項目(略名)	分子量	UV波長(nm)	保持時間(分)	SIRイオン(m/z)	イオン電圧(V)
1 オキドックス(OQD)	263.25	260	9.4	264	30
2 カバドックス(CDX)	262.23	306	<u>12.4</u>	263	35
カバドックス代謝物	174.16	323	<u>12.1</u>	175	35
3 チアンフェニール(TPC)	356.22	226	<u>12.7</u>	356	35
4 フラゾリドン(FZ)	225.16	360	14.1	226	35
5 スルファメゾン(SMR)	264.30	268	<u>12.3</u>	265	35
6 スルファジミゾン(SDD)	278.32	268	13.5	<u>279</u>	30
7 スルファモメキシ水合物(SMMX)	298.32	274	14.3	<u>281</u>	30
8 スルファジメキシ(SDMX)	310.33	258	17.3	<u>311</u>	35
9 スルファキノリナトリウム(SQX)	322.32	270	17.3	301	30
10 オキサリン酸(OXA)	261.24	262	16.4	262	30
11 ナリックス酸(NA)	232.24	258	19.1	233	35
12 ピロミド酸(PMA)	288.31	282	20.4	289	30
13 ナイカルジン(NCZ)	426.39	350	21.5	303	35
14 クロピドール(CLP)	192.05	267	10.8	192	35
15 トリメプリーム(TMP)	290.32	271	<u>11.1</u>	291	35
16 オルメプリーム(OMP)	274.32	265	<u>11.5</u>	275	35
17 クエン酸モランテル(MRT)	412.45	320	<u>12.8</u>	221	35
18 ピリメタミン(PYR)	248.72	272	13.9	249	45
19 ジフラゾン塩酸塩(DFZ)	396.75	382	16.0	361	35
20 スルファジアゾン(SDZ)	250.28	268	10.9	251	30
21 スルファメキサール(SMXZ)	253.28	268	15.4	254	25
22 スルファチアール(STZ)	255.32	285	<u>11.4</u>	256	30
23 スルファメキシリダジン(SMPD)	280.32	265	13.4	<u>281</u>	30
24 スルファイミジン(SID)	278.33	260, 282	10.1	<u>279</u>	30
25 スルファドキシ(SDOX)	310.33	272	15.4	<u>311</u>	35
26 スルファセアミド(SCA)	214.24	272	9.6	215	25
27 スルファベンザミド(SBZ)	276.31	272	17.5	277	25
28 スルファニトラン(SNT)	335.34	264	19.6	336	30
29 スルファグアニジン(SGD)	232.26				
30 スルファピリジン(SPZ)	249.29	263	<u>11.9</u>	250	25
31 スルファクロピリダジン(SCPD)	284.73	272	14.9	285	30
32 スルファニルアミド(SNA)	171.21				
33 エンフロキサシン(ERFX)	359.40	282	<u>12.1</u>	360	35
34 塩酸サラフロキサシン(SRFX)	421.83	280	<u>12.8</u>	386	30
35 メシル酸ダフロキサシン(DNFX)	453.50	284	<u>11.9</u>	358	35
36 オフロキサシン(OFLX)	361.40	294	<u>11.5</u>	362	35
37 クロラムフェニール(CP)	323.13	277	16.4	323	30
38 ジクラスリル(DLZ)	407.60	277	22.0	407	30
39 チアベンダゾール(TBZ)	201.25	242, 302	<u>11.4</u>	202	30
40 フルベンダゾール(FBZ)	313.29	246, 308	19.9	314	35

キシ ン，スルファドキシ ン）に，それぞれ 2 物質が重なったため，分析カラムを通常分析に使用している Waters XTerra RP<sub>18</sub> 5 μ m 2.1 × 150mm (840psi) からより背圧の高い資生堂 Capcell PAK C<sub>18</sub> 3 μ m MG 2.0 × 150mm (1400psi) に変更したところピークの分離が良好となった．表 3 の各物質の保持時間はこのカラムでのデータを参考までに記載した．

2 添加回収試験

絶対検量線法により定量した結果は表 4 のとおりである．フラゾリドン，サルファ剤 5 種，ナイカルバジン及びフルベンダゾールについては，ODS カラム処理した鶏卵の回収率がやや低い傾向にあるものの，50 ~ 120 % の範囲にあり，ある程度の定量再現性は認められた．しかし，トリメトプリム，オルメトプリム及びピリメタミンについては，前処理で除去できなかった食品中の妨害物資の影響によるイオン増強がみられ，回収率が 120% を大きく超えるものがあり定量再現性は認められなかった．

3 各動物用医薬品の定量限界

定量限界は表 5 のとおりである．なお，「定量限界」については，厚生労働省の食品中の残留農薬等試験法を参考として，S/N (分析対象物のピークの高さ；S とベースラインノイズ；N の比) = 10 となる分析対象物の量 (又は濃度) を試料に含まれる分析対象物の定量が可能な最低の量 (又は濃度) として，各動物用医薬品の標準溶液のクロマトグラフから手計算で求めた．MS による定量限界は従来のフォトダイオードアレイ (UV 波長) による定量限界と比較しても，全体的に感度が向上した．

4 市販品の検査

生乳；12 検体，鶏卵；12 検体，豚肉；11 検体，養殖魚類；19 検体 (コイ，イワナ，ニジマス，ヒラメ) 合計 54 検体について表 6 の検査対象動物用医薬品を質量分析計により検査したが，いずれも検出されなかった．

まとめ

本試験法の同一種類の食品群についての添加回収率が Codex の規格<sup>7)</sup>である 80 ~ 110% ，

相対標準偏差 (%) が 15% 未満の条件を満たしていないため，現段階では定量試験に適しているとはいいがたいが，従来のフォトダイオードアレイ (UV 波長) による一斉分析法に比べて，検出感度が高いことから，平成 16 年度は，14 品目の残留動物用医薬品のスクリーニング試験として採用し，定量については個別法又は告示法で実施することとした．

表 4 添加回収試験；n=5 (単位；%)

検査項目	鶏卵	豚肉	養殖魚
ファンエニコール	101 ~ 188	72 ~ 98	
フラゾリドン	54 ~ 110	100 ~ 118	
スルファミジン	56 ~ 97	86 ~ 96	83 ~ 116
スルファミジン	69 ~ 95	92 ~ 121	77 ~ 118
スルファミキシン	64 ~ 94	97 ~ 103	75 ~ 114
スルファミキシン	66 ~ 89	97 ~ 106	80 ~ 107
スルファミキサリ	58 ~ 84	90 ~ 105	77 ~ 100
サリリ酸	45 ~ 83	108 ~ 136	86 ~ 112
ナイカルバジン	60 ~ 98		
トリメトプリム	99 ~ 346	75 ~ 339	
オルメトプリム	191 ~ 350	79 ~ 308	
ピリメタミン	105 ~ 215	82 ~ 191	
ジフラゾン	92 ~ 140	64 ~ 102	
フルベンダゾール	76 ~ 85	90 ~ 110	

表 5 定量限界の比較 (単位；mg/kg)

検査項目	質量分析計	フォトダイオードアレイ
	定量限界 (濃縮率；5)	定量限界 (濃縮率；5)
ファンエニコール	0.03	0.05
フラゾリドン	0.006	0.03
スルファミジン	0.002	0.02
スルファミジン	0.002	0.02
スルファミキシン	0.002	0.03
スルファミキシン	0.002	0.03
スルファミキサリ	0.003	0.03
サリリ酸	0.004	0.02
ナイカルバジン	0.006	0.03
トリメトプリム	0.005	0.05
オルメトプリム	0.003	0.05
ピリメタミン	0.002	0.05
ジフラゾン	0.005	0.10
フルベンダゾール	0.002	0.02

表 6 検査項目等

検査項目	生乳	鶏卵	豚肉	養殖魚
チンフェニコール				
フラゾリドン				
スルファミジン				
スルファジミジン				
スルファモトキシ				
スルファジモトキシ				
スルファキキサリ				
オキリン酸				
ナイバジン				
トリメプ リム				
ホメプ リム				
ピリタミン				
ジフラゾン				
カルベソタゾール				

今回の 38 品目の動物用医薬品については、平成 16 年 8 月 6 日付けで「食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制に係る分析法(案)」中の別添 5 試験法<sup>8)</sup>(従来の一斉分析法と同様の前処理法)が適用されるものが大部分であったので、定量限界の確認、標準添加法による定量、添加回収試験等を実施し、定量再現性を考慮した LC/MS による多成分の一斉分析法を確立していきたい。

また、平成 18 年 5 月までにポジティブリスト制度が施行されるが、LC/MS(MS)を用いた新たな残留農薬一斉分析法(メタノール系移動相)が厚生労働省において検討されているところである。当所に現有する LC/MS 1 台を農薬と動物用医薬品で共用して検査項目数を増やすためには、移動相条件をメタノール系に切り換える必要があるため、情報収集しながら併せて検討していきたいと考えている。

引用文献

- 1) 細貝祐太郎，松本昌雄監修．食品安全セミナー動物用医薬品・飼料添加物．中央法規．
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長．平成 6 年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について(別添 3)畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改定)．平成 6 年 7 月

1 日．衛乳第 107 号．

3) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長．平成 5 年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について(別添 2)畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(改定法)．平成 5 年 4 月 1 日，衛乳第 79 号．

4) 中澤裕之監修．動物用医薬品データブック．林純薬工業(株)．

5) Waters .LC/MS Application Notes .AMDJ010 .

6) 残留動物用医薬品試験法検討委員会．畜水産食品中に残留する動物用医薬品の試験法(その 7)．食品衛生研究 .2000 ; 50(10) ; 7-18 .  
7) 村山三徳，齋藤行生．畜水産食品中に残留する動物用医薬品の試験法(その 1)．食品衛生研究．1996 ; 46(3) : 7-15 .

8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課．食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制に係る分析法(案)の検討について．平成 16 年 8 月 6 日．

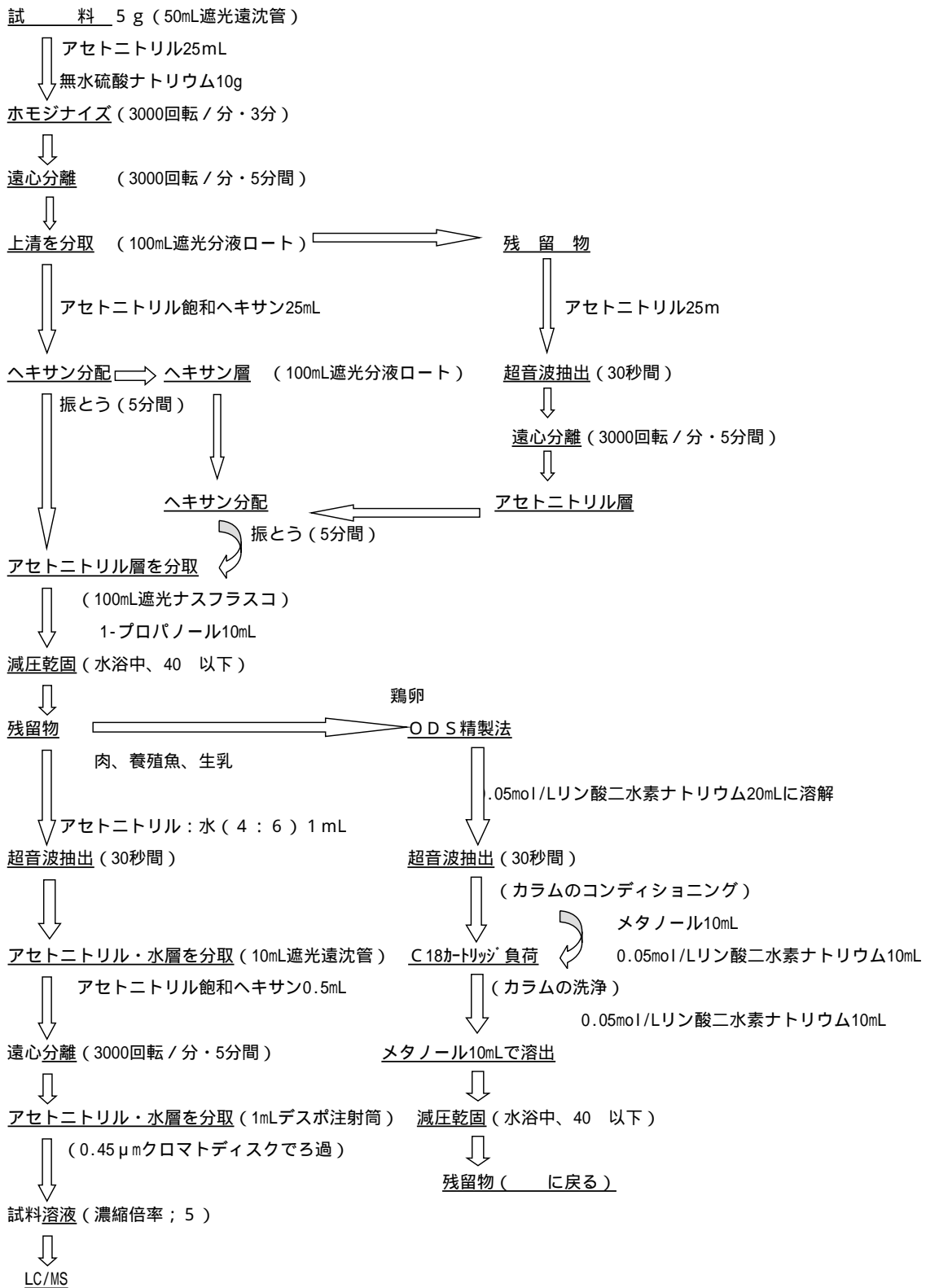


図 1 操作フローチャート