

【調査研究】

# LC-MS/MSを用いたはちみつ中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討

## Study on a Method for Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Honey by LC-MS/MS

難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行\* (衛生化学科)

\*水質科

Junko Namba, Kanae Koeduka, Hidefumi Kaneko, Masaaki Akaki, Toshiyuki Yoshioka\*  
(Food and Drug Chemical Research Section)

\*Water Section

### 要 旨

動物用医薬品の迅速かつ高感度の分析方法の確立を目指し, 理化学的分析法の確立されていない抗生物質等のLC-MS/MSを用いた一斉分析法及び, 既に導入しているサルファ剤等合成抗菌剤との同時分析法を検討した。はちみつを試料とし, 各種標準品を添加し, 前処理方法の検討を行った。試料をエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(以下「Na<sub>2</sub>EDTA」という。)含有 Tris-HCl緩衝液で抽出, 遠心分離後, 固相カラム(HLB)による精製を行い, LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。当方法について, 妥当性評価を行ったところ, 検討を行った抗生物質及び合成抗菌剤100物質のうち60物質で目標値を満たし, 実用の可能性が示唆された。

[キーワード: 動物用医薬品, はちみつ, 一斉分析法, 液体クロマトグラフトンデム質量分析計]

[Key Words: Veterinary drugs, Honey, Simultaneous determination, LC-MS/MS]

## 1 はじめに

動物用医薬品は, 安定した高い生産性を得るために畜水産物に用いられる医薬品であり, その畜水産物への移行・残留が懸念されている<sup>1)</sup>。このため, 動物用医薬品が畜水産物に残留し人の健康を損なうことのないよう, 平成18年5月29日に施行された食品衛生法に基づくポジティブリスト制度により, 農薬や飼料添加物と共に食品中の残留基準が見直され, 安全性の確保が図られている。このポジティブリスト制度導入に伴い, 規制の対象となる農薬, 飼料添加物及び動物用医薬品が大幅に増加したため, 一斉分析法を用いた迅速かつ高感度な分析が求められようになった。また, 平成19年11月15日付け食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」<sup>2)</sup> (以下「ガイドライン」という。)により, 食品に残留する農薬, 飼料添加物及び動物用医薬品の検査を実施する場合において, 食品の多様性等にも配慮の上, 検査機関ごとに妥当性評価を実施する必要が生じた。

岡山県では, 畜水産物中のサルファ剤等合成抗菌剤を主とする動物用医薬品の検査をLC-MS/MSを用いた一斉分析法<sup>3)</sup>により実施しているが, 抗生物質等は理化学的検査法が確立されておらず, 微生物学的検査で行っている状況である。そこで, 検査の効率性の向上を目指し, 抗

生物質等の一斉分析法を検討すると共に, サルファ剤等合成抗菌剤を主とする動物用医薬品との同時前処理法も検討し, 妥当性評価を行ったので報告する。

## 2 方法

### 2.1 試料

厚生労働省より代表的な畜水産物であると示されている, はちみつを用いて前処理方法を検討した。事前に分析対象とする動物用医薬品が検出されないことを確認した。

### 2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品: 抗生物質等動物用医薬品 (キノロン系・ニューキノロン系合成抗菌剤, マクロライド系抗生物質 (マクロライド系駆虫薬を含む), テトラサイクリン系抗生物質, ペニシリン系抗生物質, ポリエーテル系抗生物質) は表1に, サルファ剤等動物用医薬品は表2に示した標準品を用いた。

混合標準溶液1 (抗生物質等動物用医薬品)

: 各標準品を精秤し, アセトニトリル又はメタノールに溶解し標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。これらを混合し, アセトニトリル溶液で希釈した。  
(0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 µg/mL)

混合標準溶液2 (サルファ剤等動物用医薬品)

: 既報<sup>3)</sup> のとおり調製した。

表1 混合標準溶液1の測定条件

動物用医薬品名	系統	LC条件	イオン化モード/イオン化電圧 (V)	イオン源温度 (°C)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	検量線				
Enrofloxacin	キノロン系・ニューキノロン系合成抗菌剤	1	pos/ 5500	400	360.389	316.3 245.0					
Ciprofloxacin					332.273	231.2 314.3					
OxolinicAcid					262.114	244.2 216.1					
Ofloxacin					362.349	318.1 261.2					
Orbifloxacin					396.286	352.3 295.4					
Sarafloxacin					386.273	368.2 299.3					
Difloxacin					400.256	356.2 382.1					
Danofloxacin					358.343	340.3 255.0					
NalidixicAcid					233.173	215.3 187.1					
Norfloxacin					320.251	302.4 276.2					
Flumequine					262.16	244.2 202.1					
Piromidic Acid					289.165	271.2 243.2					
Marbofloxacin					363.148	345.1 72.0					
Miloxacin					264.126	215.1 246.2					
Lincomycin					リンコ系抗生物質	1	pos/ 5500	400	407.221	126.2 82.2	
Clindamycin									425.271	126.1 82.2	
Pirlimycin									411.212	112.2 363.3	
Erythromycin A					マクロライド系抗生物質	1	pos/ 5500	400	734.524	158.3 83.1	
Erythromycin B									718.486	158.4 83.0	
Oleandomycin									688.439	158.2 544.5	
Josamycin	828.517	109.3 174.3									
SpiramycinI	843.497	174.2 101.2									
Tylosin	916.5	174.2 101.2									
Tiamulin	494.343	192.2 119.1									
Tilmicosin	869.578	174.3 88.2									
Mirosamicin	728.453	158.3 116.1									
Clarithromycin	748.489	158.2 83.2									
Azithromycin	749.544	83.1 591.5									
Roxithromycin	837.546	158.3 83.1									
LeucomycinA5	772.453	109.1 174.3									
Tacrolimus	821.518	768.4 109.2									
Dirithromycin	835.52	677.4 158.3									
Moxidectin	640.426	199.3 98.2									
AvermectinB1a	890.485	305.4 145.3									
Eprinomectin	914.454	186.2 112.3									
NeospiramycinI	699.505	174.1 88.0									
Oxytetracycline	テトラサイクリン系抗生物質	1	pos/ 5500	400					461.149	426.0 201.2 410.3	
Tetracycline					445.277	154.1 444.2					
Chlortetracycline					479.203	462.3 462.3					
Doxycycline					445.185	428.2 154.2					
Aspoxicillin	ペニシリン系抗生物質	2	pos/ 5500	500	494.178	250.2 101.0					
Amoxicillin					366.132	114.0 349.1					
Ampicillin					350.118	106.2 192.3					
Oxacillin					402.141	160.2 243.2					
Cloxacillin					436.078	160.2 277.2					
Dicloxacillin					470.059	311.1 160.2					
Nafcillin					415.151	199.1 171.1					
Phenoxymethylpenicillin					351.115	160.3 114.0					
Benzylpenicillin					335.116	160.2 176.1					
Mecilinum					326.179	167.1 139.2					
Monensin					生エリホリ 物系抗テ	2	pos/ 5500	500	688.485	461.4 125.2	

表2 混合標準溶液2の測定条件

動物用医薬品名	LC条件	イオン化モード/イオン化電圧 (V)	イオン源温度 (°C)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	検量線
Diaveridine	3	pos/ 5500	600	261.197	245.3 123.2	
Sulfaethoxypyridazine				295.094	156.1 92.1	
Sulfaguanidine				215.107	92.0 156.3	
Sulfabromomethazine				357.172	92.2 108.1	
Sulfabenzamide				277.125	156.2 92.3	
Sulfisoxazole				268.153	92.1 156.2	
Sulfisozole				240.112	156.3 92.1	
Sulfisomidine				279.269	124.1 92.2	×
Clopidol				192.193	101.1 87.0	
Difurazone				361.259	58.2 222.3	
Sulfathiazole				255.957	155.9 92.2	×
Sulfapyridine				250.016	92.1 156.0	×
Sulfamerazine				265.078	92.0 156.0	
Sulfadoxine				311.008	156.2 92.0	
Sulfamethoxazole				253.987	156.0 92.0	
Sulfadimethoxine				311.050	156.0 92.0	
Sulfaquinoxaline				301.028	155.9 92.1	
Sulfantran				336.097	134.1 65.0	
Trimethoprim				291.118	230.3 123.0	
Sulfadiazine				251.043	156.1 91.9	
Ormetoprim				275.089	123.1 259.3	
Sulfadimidine				279.074	92.1 186.3	
Sulfamethoxypyridazine				281.058	156.2 91.9	×
Sulfamonomethoxine				281.049	91.9 156.1	
Sulfachlorpyridazine				284.970	156.2 92.1	
Sulfatroxazole				268.153	92.1 156.2	
Levamisole				205.108	178.2 91.1	
Thiabendazole				202.082	175.1 131.0	
Ethopabate				237.994	136.0 206.1	
Trenbolone				271.157	115.0 128.3	
MelengestrolAcetate				397.277	279.3 337.2	
Xylazine				221.100	90.1 164.1	
Pyrimethamine				249.100	177.2 198.2	
Allethrin	303.320	135.2 91.0				
Dexamethasone	393.363	147.0 91.1				
Hydrocortisone	363.358	121.2 91.2				
Famphur	326.151	93.1 217.2				
Trichlorfon (DEP)	257.013	109.1 127.1				
Fenobucarb (BPMC)	208.231	95.1 152.1				
Sulfacetamide	215.129	156.2 92.0				
Prednisolone	361.288	343.2 147.4				
Clenbuterol	277.197	203.2 132.1				
Zeranol	neg/ -4500	500	321.120	277.2 62.8		
Thiamphenicol			353.912	185.2 79.0		
2-acetylamino-5-nitrothiazole			185.876	138.9 95.9	×	
Florfenicol			355.979	185.0 336.0		
Clorsulon			379.819	343.9 342.0		
Chloramphenicol			320.999	152.1 257.1		
Nicarbazin			301.030	136.9 107.0		

イオン化モード pos:positive  
neg:negative

マトリックス添加混合標準溶液：はちみつのブランク試料を用いて作成した試験溶液に混合標準溶液1又は2を添加し、試料濃度でそれぞれ0.1  $\mu\text{g/g}$ 及び0.01  $\mu\text{g/g}$ になるように作成した。

固相カラム：ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム

Waters製 Oasis HLB 20 cc, 1 g (以下「HLB 1g」という。)

Waters製 Oasis HLB Plus 225 mg (以下「HLB Plus」という。)

Waters製 Sep-Pak Plus PS2 265 mg (以下「PS2」という。)

シリンジフィルター Milex-LCR：Millipore製0.45  $\mu\text{m}$   
その他の試薬：残留農薬試験用、特級試薬を用いた。

### 2.3 装置及び測定条件

LC-MS/MS

#### 1) LC条件

LC機種：島津製作所製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

カラム：Waters製XterraMS C18 2.1 mm x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$   
カラム温度：40℃

移動相流量：0.2 mL/min

試料注入量：5  $\mu\text{L}$

LC条件1 (抗生物質等動物用医薬品分析条件1)

移動相A：0.1 %ギ酸含有 1 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液

B：アセトニトリル

グラジエント条件：A/B=95/5(0 min)→80/20 (0.5 min)  
→5/95 (1.5 min)→2/98 (22-30 min)  
→95/5 (35-40 min)

LC条件2 (抗生物質等動物用医薬品分析条件2)

移動相 A：5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液

B：5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液

グラジエント条件：A/B=95/5 (0 min) →80/20 (0.5 min)  
→5/95 (1.5 min) →2/98 (22-30 min) →95/5 (35-40 min)

LC条件3 (サルファ剤等動物用医薬品分析条件)

既報<sup>3)</sup> のとおり行った。

#### 2) MS条件

MS機種：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MRMモード

MRM測定条件：表1 (混合標準溶液1), 表2 (混合標準

溶液2) に示した。

### 2.4 試験溶液調製方法

分析フローを図1に示す。はちみつ試料4 gを50 mLポリプロピレン製遠沈管に量り取った。次に、10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有 0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液 15 mLを加えて10分間振とう後、6900 gで20分間、室温で遠心分離した。上層を分取し、沈殿を10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有 0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液5 mLで再抽出し、遠心分離後、上層を合わせた。

固相カラムHLB 1 gをメタノール 10 mL, 精製水 10 mL, 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有 0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液 10 mLで順番にコンディショニングした。カラムに得られた上層全量を負荷し、精製水 10 mLで洗浄し、アセトニトリル 15 mLで溶出させた。溶出液を1 mL以下になるまで減圧濃縮しアセトニトリルを約4 mL加えて、0.5 mL程度まで再濃縮し、濃縮液をアセトニトリルで2 mLに定容後、シリンジフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

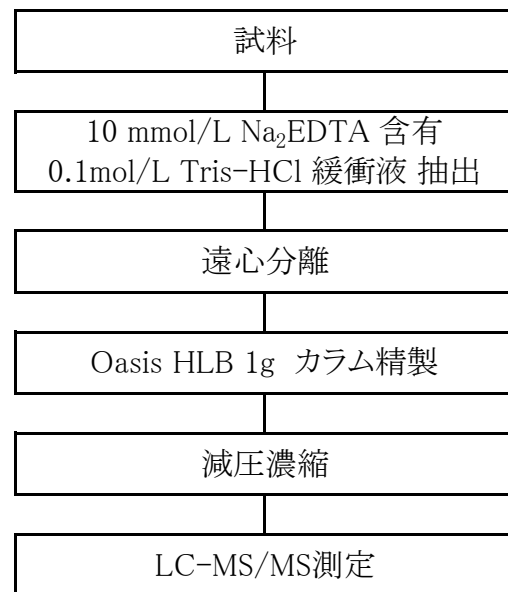


図1 分析フロー

### 2.5 妥当性評価の方法

ガイドラインに示された分析者1名が2併行5日間実施する枝分かれ試験計画に基づき、添加濃度0.1  $\mu\text{g/g}$ 及び0.01  $\mu\text{g/g}$ の2濃度ではちみつ試料に対する添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度、精度を評価した。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 LC-MS/MS測定条件

##### 3.1.1 MS条件

イオン化法はESI positive 又はnegativeモードを選択して条件の検討を行い、混合標準溶液1は表1、混合標準溶液2は表2に示した。MSスペクトルで測定された各測定物質の最も強度が強いイオンをプリカーサーイオンとした場合に得られるプロダクトイオンの中で、一番強度が強いイオンを定量イオン（上段）、次に強いイオンを定性イオン（下段）とした。

##### 3.1.2 LC条件

分析カラムは既報<sup>3)</sup>と同様にC18を使用することとし、移動相Bをアセトニトリルで同一とし、移動相Aを0.1%ギ酸含有1mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液、0.1%ギ酸水溶液、20mmol/L HFBA水溶液及び20mmol/L HFBA含有1mmol/L酢酸アンモニウム水溶液とした場合の組み合わせを検討した。0.1%ギ酸含有1mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液での標準品(1µg/mL)のピーク面積と、検討したそれぞれの移動相Aでの標準品(1µg/mL)のピーク面積の比(%)を図2に示す。その結果、0.1%ギ酸含有1mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルのグラジエント分析条件(LC条件1)でのピーク面積が一番

大きい標準品が多いので、この条件を採用することとした。この条件で混合標準溶液1(0.005µg/mL)のモネンシンを除いた物質は、図3に示す良好な形状のピークを得ることが出来た。一方で、モネンシンは図4①に示すように、この測定条件では1µg/mLでも十分な感度を得ることが出来なかったため、5mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液と5mmol/Lギ酸アンモニウムメタノール溶液のグラジエント分析(LC条件2)を用いたところ、図4②に示すように、0.005µg/mLで十分な感度及び良好なピーク形状を得ることが出来た。混合標準溶液2は既報<sup>3)</sup>の分析条件(LC条件3)を用いた。

##### 3.1.3 定量限界値及び検量線

混合標準溶液1(0.005µg/mL)はクロルテトラサイクリン及びドキシサイクリンを除いた物質、混合標準溶液2(0.005µg/mL)はジフラゾンを除いた物質がS/N比 $\geq 10$ を満たしており、前処理で2倍濃縮するので試料濃度では0.0025µg/gとなり、十分な定量性を確保できた。クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン及びジフラゾンは0.01µg/mLでS/N比 $\geq 10$ を満たしていたが、ピーク面積は他の物質に比べて小さかった。

また、各標準品の0.005～0.3µg/mLアセトニトリル溶液を7点(クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン

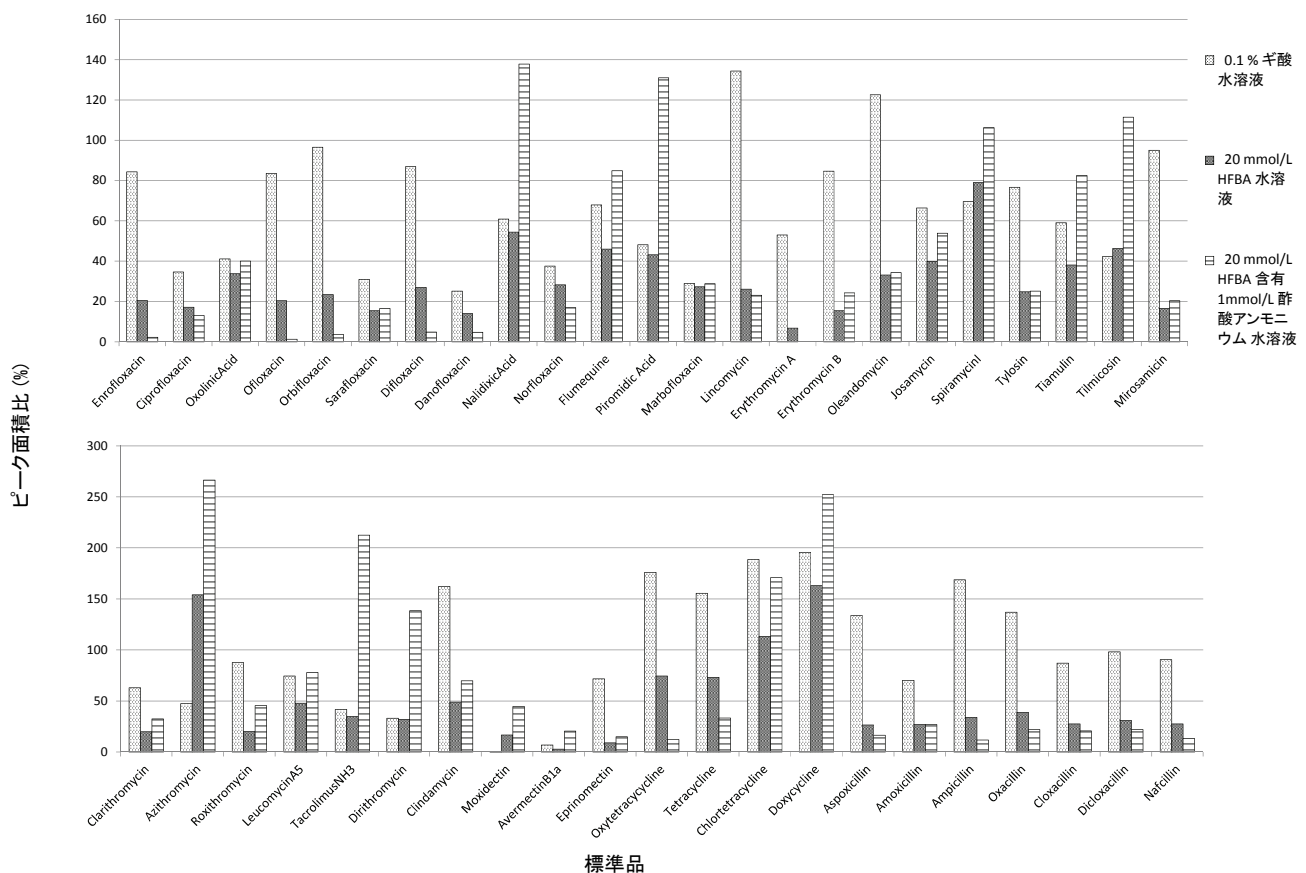


図2 標準品の移動相Aの違いによるピーク面積比の比較  
(0.1%ギ酸含有1mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルの組み合わせを100とした)

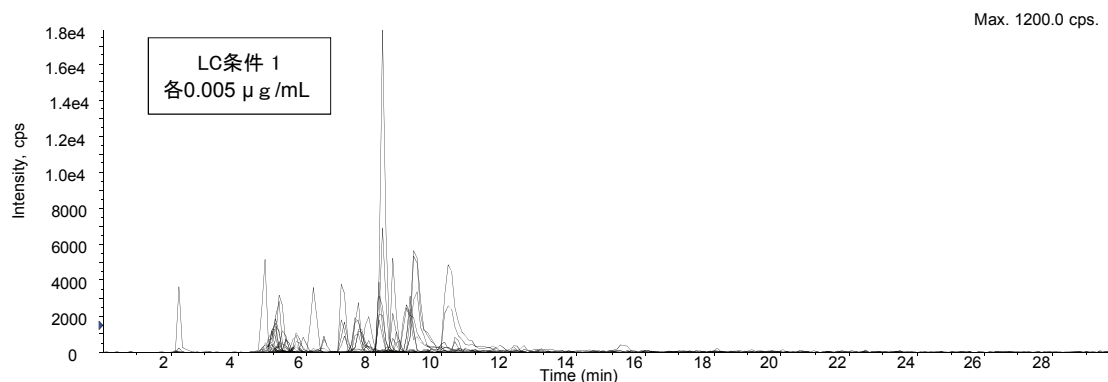


図3 混合標準溶液1のMRMクロマトグラム

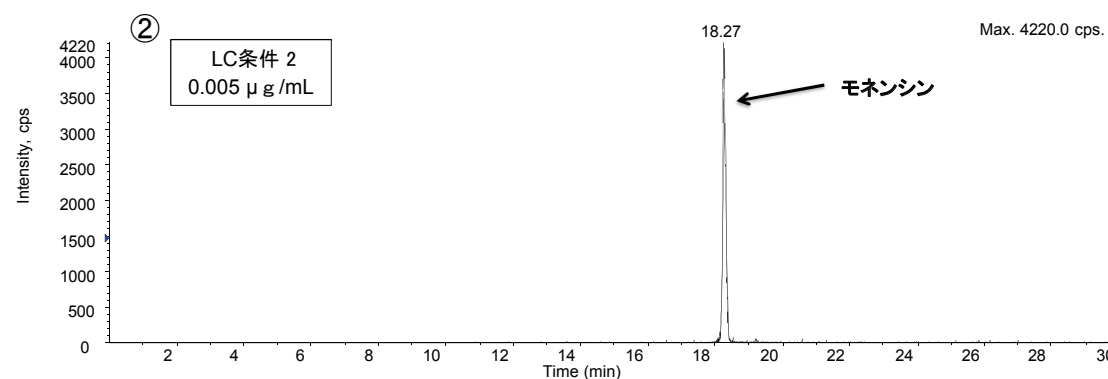
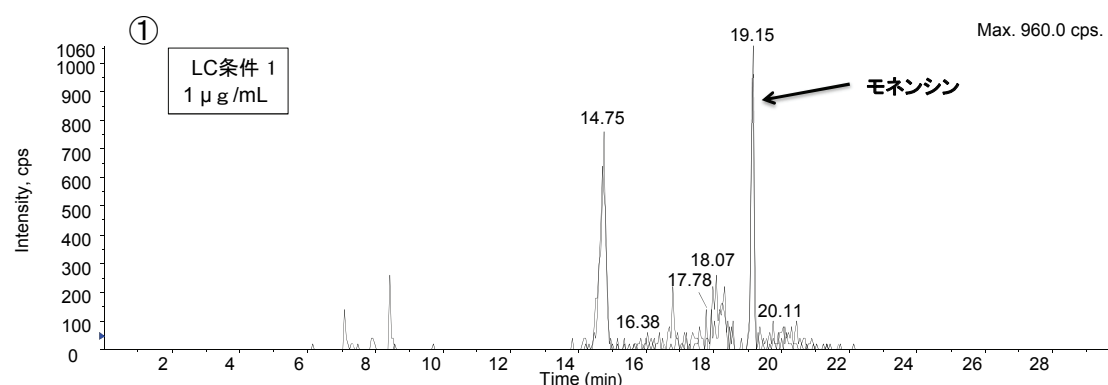


図4 モネンシンのMRMクロマトグラム

及びジフラズンは0.01 ~ 0.3  $\mu\text{g/mL}$ アセトニトリル溶液を6点) 調製し、LC-MS/MS測定を行った。検量線の相関係数が0.99未満の標準品は不合格(×)とし、結果を表1及び表2に示した。混合標準品1では全ての標準品で、混合標準品2では5物質(スルフィソミジン、スルファチアゾール、スルファピリジン、スルファメトキシピリダジン、2-アセチル-5-ニトロチアゾール)を除く標準品で良好な直線性(相関係数0.99以上)が得られた。

混合標準溶液1の標準品(0.1  $\mu\text{g/mL}$ 及び0.01  $\mu\text{g/mL}$ )のピーク面積とマトリックス添加混合標準溶液中の標準品のピーク面積の比(%)を表3に示す。マトリックスを添加することにより、面積の減少が見られる標準品があった。また、高濃度より低濃度の方がマトリックス

の影響を受けやすいことが推測された。マトリックスによるイオン化抑制も報告されており<sup>4)</sup>、実試料におけるこの影響を補正するために、マトリックス添加混合標準液を用いて定量することとした。

### 3.1.4 バイアル瓶の検討

LC条件1の標準品(0.1  $\mu\text{g/mL}$ )を、ポリプロピレン製バイアル瓶に入れて測定したピーク面積と、不活性処理済みガラス製バイアル瓶に入れて4時間後に測定したピーク面積の比(%)を表4に示す。テトラサイクリン系とペニシリン系の一部の物質はガラス製バイアル瓶で低い値となった。ガラス容器への吸着や分解は他の物質でも多数報告されており<sup>5)~7)</sup>、ポリプロピレン製バイアル瓶を使用することで、より正確な測定ができると考えら

表3 マトリックス添加標準品のピーク面積比 (%)

動物用医薬品名	マトリックス添加標準品濃度	
	0.1 $\mu$ g/mL	0.01 $\mu$ g/mL
Enrofloxacin	79	68
Ciprofloxacin	79	49
OxolinicAcid	96	96
Ofloxacin	81	61
Orbifloxacin	84	81
Sarafloxacin	74	55
Difloxacin	91	77
Danofloxacin	71	58
NalidixicAcid	97	89
Norfloxacin	84	68
Flumequine	94	92
Piromidic Acid	93	89
Marbofloxacin	94	88
Miloxacin	73	49
Lincomycin	113	97
Clindamycin	95	91
Pirlimycin	124	131
Erythromycin A	97	91
Erythromycin B	99	93
Oleandomycin	95	100
Josamycin	88	83
SpiramycinI	133	212
Tylosin	89	73
Tiamulin	105	105
Tilmicosin	110	136
Mirosamicin	98	100
Clarithromycin	96	91
Azithromycin	99	97
Roxithromycin	102	108
LeucomycinA5	93	98
Tacrolimus	111	109
Dirithromycin	95	97
Moxidectin	97	80
AvermectinB1a	99	117
Eprinomectin	96	92
NeospiramycinI	106	120
Oxytetracycline	106	103
Tetracycline	97	91
Chlortetracycline	112	132
Doxycycline	110	103
Aspoxicillin	82	0
Amoxicillin	70	21
Ampicillin	93	91
Oxacillin	93	107
Cloxacillin	99	123
Dicloxacillin	86	105
Nafcillin	98	102
Phenoxymethylpenicillin	99	130
Benzylpenicillin	93	132
Mecilinum	97	70
Monensin	107	90

表4 バイアル瓶の検討

動物用医薬品名	ガラス製バイアル瓶 ピーク面積比 (%)
Enrofloxacin	71
Ciprofloxacin	68
OxolinicAcid	75
Ofloxacin	79
Orbifloxacin	80
Sarafloxacin	87
Difloxacin	97
Danofloxacin	75
NalidixicAcid	86
Norfloxacin	91
Flumequine	77
Piromidic Acid	79
Marbofloxacin	94
Miloxacin	94
Lincomycin	114
Clindamycin	76
Pirlimycin	86
Erythromycin A	93
Erythromycin B	88
Oleandomycin	85
Josamycin	75
SpiramycinI	110
Tylosin	82
Tiamulin	88
Tilmicosin	74
Mirosamicin	81
Clarithromycin	99
Azithromycin	85
Roxithromycin	79
LeucomycinA5	71
Tacrolimus	95
Dirithromycin	103
Moxidectin	72
AvermectinB1a	108
Eprinomectin	83
NeospiramycinI	102
Oxytetracycline	68
Tetracycline	66
Chlortetracycline	19
Doxycycline	71
Aspoxicillin	116
Amoxicillin	71
Ampicillin	84
Oxacillin	56
Cloxacillin	107
Dicloxacillin	117
Nafcillin	84
Phenoxymethylpenicillin	98
Benzylpenicillin	50
Mecilinum	81
Monensin	101





表6 妥当性評価結果(混合標準溶液1)

動物用医薬品名	結果	高濃度(0.1 μg/g)			低濃度(0.01 μg/g)		
		真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
Enrofloxacin	○	78	1	2	76	13	13
Ciprofloxacin		52	3	7	30	46	46
OxolinicAcid	○	81	5	9	71	11	17
Ofloxacin	○	76	4	9	70	17	22
Orbifloxacin	○	76	5	10	70	8	10
Sarafloxacin		61	5	5	66	14	21
Difloxacin	○	80	3	3	88	14	14
Danofloxacin	○	72	7	8	70	13	14
NalidixicAcid	○	87	5	6	93	5	5
Norfloxacin		54	7	12	44	39	52
Flumequine	○	98	2	2	96	4	4
Piromidic Acid	○	87	1	4	89	4	5
Marbofloxacin	○	77	5	9	90	12	20
Miloxacin		42	20	46	42	20	36
Lincomycin		76	2	92	66	12	92
Clindamycin	○	99	5	8	110	8	11
Pirlimycin	○	95	4	9	98	5	15
Erythromycin A	○	84	2	2	85	2	2
Erythromycin B	○	79	6	9	89	18	18
Oleandomycin	○	88	5	5	79	4	4
Josamycin	○	89	3	7	100	7	11
SpiramycinI		135	5	18	118	14	25
Tylosin	○	83	4	4	96	6	10
Tiamulin	○	79	4	7	81	7	8
Tilmicosin		85	16	16	86	17	19
Mirosamicin	○	85	3	7	90	6	6
Clarithromycin	○	79	6	7	93	23	23
Azithromycin	○	77	6	6	83	21	21
Roxithromycin		91	8	9	96	36	39
LeucomycinA5	○	90	5	5	81	4	7
Tacrolimus		83	11	11	94	31	34
Dirithromycin		26	35	35	27	53	53
Moxidectin		33	8	17	40	43	43
AvermectinB1a		50	13	16	50	43	50
Eprinomectin		59	16	16	74	61	66
NeospiramycinI	○	91	5	6	87	13	13
Oxytetracycline		92	11	39	106	9	37
Tetracycline		113	7	30	122	27	38
Chlortetracycline		102	4	25	100	17	30
Doxycycline		101	5	22	120	10	24
Aspoxicillin		11	78	109	0	-	-
Amoxicillin		21	31	66	0	-	-
Ampicillin		59	14	51	80	11	36
Oxacillin	○	84	3	7	70	14	17
Cloxacillin	○	96	7	13	70	11	18
Dicloxacillin	○	91	6	11	75	16	22
Nafcillin	○	93	5	10	78	5	14
Phenoxyethylpenicillin	○	88	7	18	75	11	24
Benzylpenicillin	○	82	10	18	71	14	23
Mecilinum		45	10	81	52	19	96
Monensin	○	94	3	5	82	8	9
目標値		70-120	<15	<20	70-120	<25	<30

表7 妥当性評価結果(混合標準溶液2)

動物用医薬品名	結果	高濃度(0.1 μg/g)			低濃度(0.01 μg/g)		
		真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
Diaveridine	○	96	11	20	97	13	17
Sulfaethoxypyridazine	○	80	3	5	73	11	11
Sulfaguanidine		88	17	17	44	42	89
Sulfabromomethazine	○	91	4	4	91	16	16
Sulfabenzamide	○	82	5	6	86	9	10
Sulfisoxazole	○	77	4	9	80	4	5
Sulfisozole	○	83	4	4	71	13	14
Sulfisomidine		81	4	4	66	10	11
Clopidol	○	93	4	4	87	10	10
Difurazone		18	55	55	0	-	-
Sulfathiazole		73	5	5	46	18	20
Sulfapyridine		75	4	6	65	11	19
Sulfamerazine	○	76	5	7	71	9	12
Sulfadoxine	○	81	3	3	80	6	7
Sulfamethoxazole	○	83	3	5	84	8	11
Sulfadimethoxine	○	84	3	4	90	9	9
Sulfaquinoxaline		72	10	10	60	12	13
Sulfantran	○	90	9	10	71	17	17
Trimethoprim		95	49	49	105	14	15
Sulfadiazine		69	3	8	64	13	19
Ormetoprim	○	106	4	10	87	14	22
Sulfadimidine	○	78	3	4	71	4	7
Sulfamethoxyypyridazine		81	4	4	63	14	14
Sulfamonomethoxine	○	82	4	4	84	9	14
Sulfachlorpyridazine	○	79	1	4	74	9	9
Sulfatroxazole	○	83	3	3	73	9	12
Levamisole	○	100	8	15	96	5	18
Thiabendazole	○	93	8	15	88	9	18
Ethopabate	○	81	10	19	85	17	17
Trenbolone	○	82	2	3	85	10	19
MelengestrolAcetate	○	81	5	5	79	18	18
Xylazine		0	-	-	0	-	-
Pyrimethamine	○	77	7	7	75	12	12
Allethrin		21	26	34	19	72	84
Dexamethasone	○	95	6	6	78	23	23
Hydrocortisone	○	81	4	5	100	10	12
Famphur	○	86	6	6	96	12	12
Trichlorfon(DEP)		50	17	19	62	16	16
Fenobucarb(BPMC)	○	70	6	16	79	12	12
Sulfacetamide		87	10	13	52	23	36
Prednisolone	○	91	6	6	111	4	5
Glenbuterol		0	-	-	0	-	-
Zeranol		0	-	-	0	-	-
Thiamphenicol	○	73	4	13	71	9	20
2-acetylamino-5-nitrothiazole		86	22	22	73	13	18
Florfenicol	○	130	18	18	86	27	27
Clorsulon		11	41	47	7	91	91
Chloramphenicol	○	89	14	15	95	14	14
Nicarbazin		0	-	-	0	-	-
目標値		70-120	<15	<20	70-120	<25	<30



結果を混合標準溶液1は表6、混合標準溶液2は表7に示す。

真度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1で添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では38種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では39種類であり、両添加濃度で目標値を満たす物質は36種類であった。混合標準溶液2では真度の目標値を満たす物質は、添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では39種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では32種類であり、両添加濃度で目標値を満たす物質は32種類であった。よって、混合標準溶液1と2を合計すると68種類であった。また、スクリーニングとして真度の範囲を50～150%に広げた場合、両添加濃度で目標値を満たす物質は混合標準溶液1で42種類、混合標準溶液2で37種類となり、合計すると79種類で、スクリーニングとしての有用性が示された。目標値から外れる物質は真度が70%未満の物質がほとんどであった。

併行精度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1で添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では45種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では40種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では38種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では41種類であった。室内精度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1で添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では40種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では34種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1  $\mu\text{g/g}$ では40種類、0.01  $\mu\text{g/g}$ では40種類であった。

真度及び精度の基準を全て満たした物質は、混合標準溶液1で30種類、混合標準溶液2で30種類となり、合計すると60種類であった。基準を満たさない物質は、定量限界値でのピーク面積が小さく、真度の値が低く、精度の値が高くなる傾向があった。LC-MS/MS測定のプロトコル等の測定条件を再検討する必要も考えられた。

#### 4 まとめ

LC-MS/MSを用いたはちみつ中動物用医薬品の一斉分析法を検討した。はちみつを10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液で振とう抽出後、室温で遠心分離し、上層を分取した。HLB 1gによる固相抽出後、減圧濃縮し、アセトニトリルで2 mLに定容し、LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。妥当性評価を行ったところ、以下の結果を得た。

(1) LC-MS/MS測定で100種類の動物用医薬品のMRMモードによる測定を行った結果、0.005  $\mu\text{g/mL}$ 又は0.01  $\mu\text{g/mL}$ で十分な定量感度 (S/N比 $\geq 10$ ) が得られた。また、95種類の標準品で0.005～0.3  $\mu\text{g/mL}$ 又は0.01～0.3  $\mu\text{g/mL}$ の範囲の検量線で良好な直線性 (相関係数0.99以上) が得られた。なお、マトリックスを添加することにより、面積の減少が見られる標準品があり、

マトリックス添加混合標準液を用いて定量した。

(2) 妥当性評価を行ったところ、選択性は目標値を満たしていた。

(3) 真度の目標値を高低2種類の添加濃度で満たす物質は、混合標準溶液1では36種類、混合標準溶液2では32種類であり、合計68種類であった。真度の目標値を50～150%に広げた場合、合計79種類で合格となり、スクリーニングとしての有用性が示された。目標値から外れる動物用医薬品は、真度が70%未満の動物用医薬品がほとんどであった。

(4) 妥当性評価で適合と判定される両添加濃度で真度及び精度の基準を全て満たした動物用医薬品は、混合標準溶液1で30種類、混合標準溶液2で30種類となり、合計すると60種類であり、実用の可能性が示唆された。

(5) 今回基準を満たさなかった物質は、定量限界値でのピーク面積が小さく、真度の値が低く、精度の値が高くなる傾向があった。

なお、分析法について①②③などの留意点も明らかになった。

① バイアル瓶はガラス容器への吸着や分解を防ぐため、ポリプロピレン製バイアル瓶を使用する。

② 精製のために用いる固相カラムはOasis HLB 20cc 1gを採用し、10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液で負荷し、精製水で洗浄後アセトニトリル15 mLで溶出する。

③ 試料からの抽出は、固相カラムの負荷液で振とう抽出を行い、室温で遠心分離した後、上層を分取する。

今後LC-MS/MS測定のプロトコル等の測定条件の再検討を引き続き行い、一斉分析法で分析可能な動物用医薬品の追加又は個別分析法の構築の検討を進めることとしている。

#### 文 献

- 1) 衛生試験法・注解2015 2.4食品汚染物試験法 2有機化合物 3動物用医薬品 (2015年3月20日発行), 490-499, 2015
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて、食安発第1115001号、平成19年11月15日、2007
- 3) 浦山豊弘、肥塚加奈江、赤木正章、山本淳：厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価 (第3報)、岡山県環境保健センター年報37, 137-144, 2013

- 4) 甲斐茂美, 小管教仁, 脇ますみ, 岸弘子: LC-MS/MSを用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価, 神奈川県衛生研究所研究報告, 44, 9-14, 2014
- 5) 内田耕太郎, 柿本健作, 山口貴弘, 永吉晴奈, 起橋雅浩ら: 溶液中における合成抗菌剤の安定性, 大阪府立公衆衛生研究所報, 52, 21-26, 2014
- 6) 清川由樹, 吉田純一: LC-MS/MSを用いたテトラサイクリン系抗生物質を含む動物用医薬品の迅速一斉法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報, 18, 55-61, 2017
- 7) 松本理世, 飛野敏明, 西名武士, 宇梶徳史, 濱本愛ら: LC/MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第3報), 熊本県保健環境科学研究所報, 44, 2014
- 8) 南谷臣昭, 中村昌司, 永井宏幸, 大塚公人, 後藤黄太郎: LC-MS/MSによる蜂蜜中の動物用医薬品の一斉分析, 岐阜県保健環境研究所報, 21, 13-18, 2013
- 9) 田頭宗幸, 渡邊利奈, 金丸和博: 蜂蜜及び牛乳中の残留動物用医薬品の迅速分析試験法の検討, 宮崎県衛生環境研究所年報, 27, 81-85, 2015
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法, 衛乳第117号, 平成9年4月1日, 1997