

【調査研究】

# LC-MS/MSを用いた牛の筋肉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 Cow muscle by LC-MS/MS

難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義 (衛生化学科)

NAMBA Junko, TSUTSUI Michiyo, IKEDA Kazumi, KANEKO Hidefumi, HAYASHI Takayoshi  
(Food and Drug Chemical Research Section)

## 要 旨

動物用医薬品の迅速かつ高感度な分析方法の確立を目指し、岡山県では理化学的分析法の確立されていない抗生物質等について、LC-MS/MSを用いたサルファ剤等合成抗菌剤との同時分析法を検討した。牛の筋肉を試料とし、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含有トリス塩酸緩衝液で抽出、遠心分離後、固相カラム (HLB) 及びアセトニトリル/ヘキサン分配による精製を行い、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86物質のうち37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, 抗生物質, 牛の筋肉, 一斉分析法, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words : Veterinary drugs, Antibiotics, Cow muscle, 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、食品衛生法の改正により、農薬や飼料添加物と共に動物用医薬品が、一定の量を超えて残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度が平成18年5月29日に施行され、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、高感度かつ迅速に分析できる一斉分析法の開発が求められている。ただし、厚生労働省が定めた「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」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号)については、検体中に夾雑物が多く、その影響を排除するなどの作業が複雑であることが報告されているため、各地方衛生研究所等において独自にLC-MS/MSを用いた一斉試験法が開発が行われている<sup>2)~5)</sup>。なお、厚生労働省が定めた「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」(平成19年11月15日付け食安発第1115001号。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分析を実施する場合において、分析機関ごとに妥当性評価

の実施が必要とされている。

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についてはLC-MS/MSを用いた一斉分析法<sup>6)</sup>により実施しているが、抗生物質等については理化学的分析法が確立されておらず、微生物学的分析法で行っている状況であった。そこで、分析の効率性の向上等を目指し、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との同時前処理法も検討し、まず、はちみつを用いて妥当性評価を行った結果を報告した<sup>7)</sup>。今回、牛の筋肉を用いた同時前処理法を検討し、妥当性評価を行ったので報告する。

## 2 方法

### 2.1 試料

厚生労働省から代表的な畜水産物であると示されている、牛の筋肉(横隔膜等)を使用した。なお、当該試料は、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後、使用した。

### 2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品：既報<sup>7)</sup>のとおり調製した。

混合標準溶液1 (抗生物質等動物用医薬品)：既報<sup>7)</sup>のとおり調製した。

混合標準溶液1-1 (抗生物質等動物用医薬品)：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), ポリエーテル系抗生物質) を混合標準溶液1と同様に調製した。

混合標準溶液2 (サルファ剤等動物用医薬品) : 既報<sup>7)</sup> のとおり調製した。

マトリックス添加混合標準溶液 : 混合標準溶液を牛の筋肉を用いて作成したブランク試験溶液に混合標準溶液を段階的に添加し, 調製した。(0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 µg/mL)

固相カラム : アジレント製 Captiva EMR-Lipid, 1 mL  
その他の試薬等 : 既報<sup>7)</sup> のとおり。

## 2.3 装置及び測定条件

### 2.3.1 LC-MS/MS

既報<sup>7)</sup> のとおり。

### 2.3.2 ゲル浸透クロマトグラフ (以下「GPC」という。)

カラム : 条件① 昭和電工製 GLNpak PAE-2000 AC

20.0 mm × 300 mm, 5 µm

(プレカラム : PAE-G AC 20.0 mm × 100 mm, 9 µm)

条件② 昭和電工製 GLNpak EV-2000 AC 20.0 mm × 300 mm, 16 µm

(プレカラム : EV-G AC 8.0 mm × 50 mm, 16 µm)

移動相 : 条件① アセトン:シクロヘキサン (95 : 5)

条件② アセトン:シクロヘキサン (2 : 8)

カラム温度 : 40 °C

移動相流量 : 4 mL/min

試料注入量 : 2 mL

## 2.4 分析溶液調製方法

はちみつの分析フロー<sup>7)</sup> 及び牛の筋肉の分析フローを図1に示す。牛の筋肉では脂肪分等の夾雑物が多いため, はちみつの分析フローに脱脂操作を追加し, 検体採取量及び最終溶液量を変更した。牛の筋肉試料2 gを50 mLポリプロピレン製遠沈管に量り取り, 10 mmol/L 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 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 15 mLを加えてホモジナイズした後, 10分間振とうし, 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 Na<sub>2</sub>EDTA含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液5 mLで再抽出し, 遠心分離後, 上層を合わせ桐山ルートで吸引ろ過した。

HLB 1 gカラムをメタノール 10 mL, 精製水 10 mL, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 10 mLで順番にコンディショニングした。得られた上層全量をHLB 1 gカラムに負荷し, 精製水 10 mLで洗浄し, 遠心脱水後, アセトニトリル 20 mLで溶出させた。溶出液を分液ロートに移し, アセトニトリル飽和ヘキサン20 mLを加えて振とうし, アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層を1 mL以下になるまで減圧濃縮した後にアセトニトリルを約4 mL加えて, 0.5 mL程度まで再濃縮



図1 分析フロー

し、濃縮液をアセトニトリルで4 mLに定容後、0.20 μmメンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用分析溶液とした。

### 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実験計画に基づき、添加濃度0.1 μg/g及び0.01 μg/gの2濃度で試料に対する添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 定量限界値及び検量線

LC-MS/MSを用いた分析の問題点として、試料中のマトリックスにより、目的成分のイオン化に影響があることが報告されており<sup>9)</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。牛の筋肉試料2 gを前処理し4 mLのLC-MS/MS測定溶液とするので、添加濃度0.01 μg/gはLC-MS/MS測定溶液濃度では0.005 μg/mLとなることから、検量線は0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 μg/mLの6点調製し、各濃度でS/N比を求めた。0.002 μg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていない物質は、混合標準溶液1では、テトラサイクリン系の全4物質（オキシテトラサイクリン (Oxytetracycline)、テトラサイクリン (Tetracycline)、クロルテトラサイクリン (Chlortetracycline)、ドキシサイクリン (Doxycycline)、ペニシリン系の6物質（アスポキシシリン (Aspoxicillin)、アモキシシリン (Amoxicillin)、アンピシリン (Ampicillin)、オキサシリン (Oxacillin)、フェノキシメチルペニシリン (Phenoxymethylpenicillin)、ベンジルペニシリン (Benzylpenicillin)）及びマクロライド系の2物質（モキシデクチン (Moxidectin)、ネオスピラマイシンI (Neospiramycin I)）の12物質であった。テトラサイクリン系及びペニシリン系は定量限界値の高い物質が多いので、最適な測定条件等を今後検討することとし、今回の検討対象物質からは除外した。このことから、以下の検討は、混合標準溶液1-1として、テトラサイクリン系及びペニシリン系以外のキノロン系、リンコマイシン系、マクロライド系、ポリエーテル系の37物質を用いて行った。混合標準溶液2では、スルフィソキサゾール (Sulfisoxazole)、スルファチアゾール (Sulfathiazole)、スルファメラジン (Sulfamerazine)、スルファニトラン (Sulfanitran)、オルメトプリム (Ormetoprim)、スルファクロロピリダジン (Sulfachlorpyridazine)、トレンボロン (Trenbolone)、キシラジン (Xylazine)、アレスリン

(Allethrin) の9物質が0.002 μg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしておらず不合格となった。0.002 μg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていない11物質は0.005 μg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていた。そのため検量線は0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 μg/mLを5点調製し、添加濃度0.1 μg/gの添加回収試験のみを行うこととした。

また、検量線の相関係数が0.99未満の標準品は不合格とした。混合標準品1-1では全ての標準品で、混合標準品2では2物質（フロルフエニコール (Florfenicol)、ナイカルバジン (Nicarbazine)）を除く標準品で良好な直線性 ( $r^2 \geq 0.99$ ) が得られた。

### 3.2 精製法の検討

牛の筋肉は、はちみつに比べてタンパク質や脂質などの夾雑物を多く含むので、はちみつの分析法に脱脂を目

表1 アセトニトリル/ヘキサン分配検討結果

動物用医薬品	回収率 (%)
Enrofloxacin	79
Ciprofloxacin	86
Oxolinic acid	100
Ofloxacin	77
Orbifloxacin	95
Sarafloxacin	87
Difloxacin	100
Danofloxacin	120
Nalidixic acid	98
Norfloxacin	92
Flumequine	100
Piromidic acid	87
Marbofloxacin	97
Lincomycin	58
Clindamycin	100
Miloxacin	23
Pirlimycin	100
Erythromycin A	85
Erythromycin B	98
Oleandomycin	80
Josamycin	79
Spiramycin I	81
Tylosin	78
Tiamulin	84
Tilmicosin	74
Mirosamicin	85
Clarithromycin	85
Azithromycin	97
Roxithromycin	91
Leucomycin A5	71
Tacrolimus NH <sub>3</sub>	110
Dirithromycin	39
Moxidectin	40
Avermectin B1a NH <sub>3</sub>	100
Eprinomectin	103
Neospiramycin I	75

表2 GPCの分画毎の溶出率(%)

条件	①						②						
	PAE2000						EV2000						
	10-14	14-18	18-22	22-26	26-30	合計	10-14	14-18	18-22	22-26	26-30	30-34	合計
Enrofloxacin	0	0	8.9	11	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxolinic acid	0	0	20	52	4.1	76	4.5	3.5	0	0	0	0	8.0
Ofloxacin	0	0	0	6.4	0	6.4	0	0	0	0	0	0	0
Orbifloxacin	0	0	3.8	28	3.3	35	0	0	0	0	0	0	0
Sarafloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Difloxacin	0	0	16	21	2.8	40	0	0	0	0	0	0	0
Danofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	0	0	50	10	0	60	0	0	0	5.3	2.2	2.6	10
Norfloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flumequine	0	0	94	12	2.6	110	0	0	0	6.5	3.0	2.4	12
Piromidic acid	0	0	52	31	3.5	87	0	0	0	3.5	0	0	3.5
Marbofloxacin	0	0	0	13	7.8	21	0	0	0	0	0	0	0
Lincomycin	0	0	0	0	19	19	6.0	4.8	2.1	0	0	0	13
Clindamycin	0	0	8.0	76	6.9	91	9.0	27	34	0	0	0	70
Miloxacin	0	0	0	33	8.0	41	0	0	0	0	0	0	0
Pirlimycin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycin A	0	0	59	37	3.9	100	11	14	21	4.7	6.8	5.4	63
Erythromycin B	0	0	33	15	0	48	14	17	14	4.6	3.4	2.9	57
Oleandomycin	0	0	39	0	0	39	13	13	13	3.8	3.9	2.6	49
Josamycin	0	87	0	0	0	87	58	27	2.9	0	0	0	88
Spiramycin I	0	0	0	0	0	0	4.4	0	0	0	0	0	4.4
Tylosin	0	80	12	0.0	0	92	62	24	2.4	0	0	0	88
Tiamulin	0	68	31	3.1	0	100	0	0	38	14	13	4.2	70
Tilmicosin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirosamicin	0	0	71	5.7	0	77	27	30	15	0	0	0	72
Clarithromycin	0	0	120	4.9	0	120	8.1	19	36	10	11	5.1	89
Azithromycin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roxithromycin	0	6.0	86	2.9	0	95	15	23	21	7.2	4.0	0	70
Leucomycin A5	0	81	3	0	0	84	59	30	1.7	0	0	0	90
Tacrolimus NH <sub>3</sub>	0	100	0	0	0	100	63	36	2.6	0	0	0	100
Dirithromycin	0	0	44	6.3	0	51	10	8.1	9.1	0	0	0	27
Moxidectin	0	110	0	0	0	110	32	59	6.4	0	0	0	98
Avermectin B1a NH <sub>3</sub>	0	110	0	0	0	110	77	38	4.5	0	0	0	120
Eprinomectin	0	93	0	0	0	93	67	29	4.0	0	0	0	100
Neospiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 固相カラムからの溶出率(%)

条件	①				②			
	溶出液	負荷液	溶出液		合計	負荷液	溶出液	
動物用医薬品	1mL	0-1mL	1-2mL	1mL		0-1mL	1-2mL	
Enrofloxacin	9.4	24	10	44	7.7	14	7.6	29
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	5.0	7.6	13
Oxolinic acid	77	18	2.9	98	89	20	0	110
Ofloxacin	3.4	12	14	29	3.4	42	35	81
Orbifloxacin	8.4	33	16	57	7.6	36	11	55
Sarafloxacin	2.7	13	12	27	4.3	48	36	89
Difloxacin	40	33	5.6	79	26	20	4.8	51
Danofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	73	26	3.9	100	79	23	4.7	110
Norfloxacin	0	0	0	0	0	9.1	16	25
Flumequine	94	18	3.1	110	76	26	3.1	110
Piromidic acid	77	20	5.3	100	64	29	5.7	98
Marbofloxacin	3.0	8.4	8.2	19	2.2	38	21	62
Lincomycin	35	39	0	74	37	0	0	37
Clindamycin	93	22	0	120	35	11	0	46
Miloxacin	82	21	3.4	110	74	26	3.8	100
Pirlimycin	10	40	14	64	4.8	37	28	70
Erythromycin A	4.0	15	13	32	3.2	8.4	4.8	16
Erythromycin B	3.0	13	25	40	7.0	11	4.3	22
Oleandomycin	13	39	35	87	11	21	12	44
Josamycin	83	37	0	120	45	30	3.8	79
Spiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0
Tylosin	52	43	0	95	62	57	0	120
Tiamulin	3.3	15	22	40	4.9	7.9	5.0	18
Tilmicosin	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirosamicin	15	40	10	65	5.7	11	5.9	23
Clarithromycin	2.6	10	18	31	5.3	5.0	0	10
Azithromycin	0	0	0	0	0	0	0	0
Roxithromycin	5.4	14	15	34	4.7	3.3	0	8.0
Leucomycin A5	93	36	0	130	57	38	0	95
Tacrolimus NH <sub>3</sub>	104	15	0	120	90	20	0	110
Dirithromycin	2.6	3.0	3.9	10	3.7	2.1	0	5.8
Moxidectin	98	20	0	120	102	19	0	120
Avermectin B1a NH <sub>3</sub>	89	20	0	110	89	16	0	100
Eprinomectin	103	22	0	120	113	6.5	0	120
Neospiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0

的とした精製工程を追加する必要があると推測されたため、(1)アセトニトリル／ヘキサン分配、(2)GPC、(3)固相カラムによる精製法の検討を混合標準溶液1-1の37物質の内、モネンシンを除く、同一のLC条件で測定可能な36物質で行った。

(1) アセトニトリル／ヘキサン分配は、アセトニトリルに標準品を0.02  $\mu\text{g}$ 添加した後、同量のアセトニトリル飽和ヘキサンで液液分配を行い、アセトニトリル層を分取した後濃縮、測定した。結果を表1に示す。回収率が70%以上の物質は、32物質であった。

(2) GPCは2.3.2で示した条件①及び②で行い、移動相2 mLに標準品を0.2  $\mu\text{g}$ 添加した後、両カラムとも2分(8 mL)ごとに分取し、濃縮、測定した。結果を表2に示す。回収率が70%以上の物質は、GPCの条件①では16物質、②では12物質であった。GPCでは回収率が良好な物質数が少なかった。

(3) 固相カラムはCaptiva EMR-Lipidを用いた。このカラムは、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることにより、脂質炭化水素鎖を選択的に保持した上で、目的物質は通過する。また、負荷量の20～25%のアセトニトリル:水(8:2)で溶出させることが推奨されている<sup>8)</sup>。アセトニトリル:水(8:2) 1 mLに標準品を0.02  $\mu\text{g}$ 添加した後、カラムに負荷し、条件①アセトニトリル:水(8:2) 2 mL又は条件②アセトニトリル:水(1:1) 2 mLで溶出し

た後に濃縮、測定した。結果を表3に示す。回収率が70%以上の物質は、条件①で16物質、条件②では15物質であった。Captiva EMR-Lipidも回収率が良好な物質数が少なかった。

上記の結果から、追加の精製法はアセトニトリル／ヘキサン分配を採用することとした。

### 3.3 分析溶液中の含水率の検討

標準品の一部は測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化が見られた。図2にオフロキサシン標準品(0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )をアセトニトリルまたはアセトニトリル:水(1:1)で溶解した場合のMRMクロマトグラムを示す。上段のアセトニトリルに溶解した場合はピークトップが割れているが、下段のアセトニトリル:水(1:1)で溶解した場合は良好なピーク形状になった。ピーク面積は、アセトニトリルに溶解した方が2倍程度大きかった。このことから、標準溶液と試料のアセトニトリルと水の組成比を一定にすることが定量値のバラツキをなくすためには重要であると考えられた。しかし、減圧濃縮は液量が少なくなると沈殿の生成等による突沸が起こりやすくなり、乾固することは困難であったため、濃縮後の液量を一定にし、同様に操作したブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量することとした。

### 3.4 妥当性評価結果

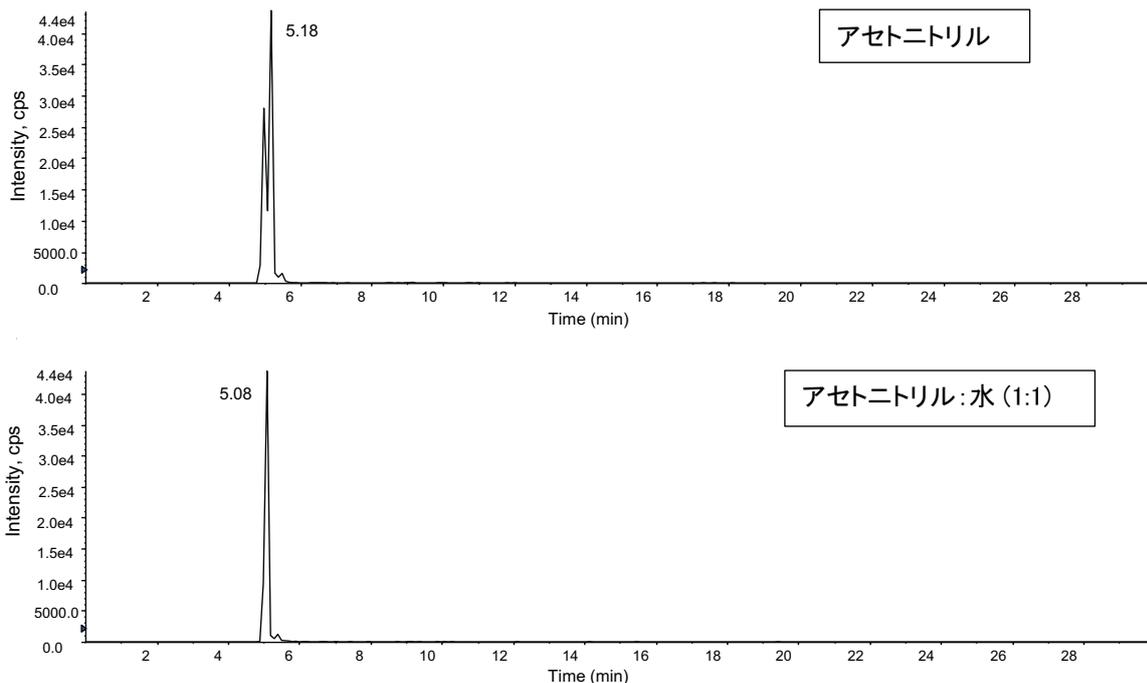


図2 オフロキサシン標準品(0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

### 3.4.1 選択性

ブランク試料として使用する牛の筋肉を2.4に従って前処理した後、LC-MS/MSで分析し、定量を妨害するピークの有無を確認したが、ガイドラインに示された選択性の目標値（ピークの面積が定量限界値（0.002 µg/mL）のピーク面積の1/10未満）を超えるような妨害成分は認められなかった。

### 3.4.2 真度及び精度

牛の筋肉2 gに各標準品を0.2 µg（添加濃度 0.1 µg/g）又は0.02 µg（添加濃度 0.01 µg/g）添加し、分析溶液調

製方法に従って前処理した後にLC-MS/MSで分析した時の真度及び精度の結果を、混合標準溶液1-1は表4、混合標準溶液2は表5に示す。なお、混合標準溶液2で定量限界値が0.005 µg/mLの9物質は、添加濃度 0.1 µg/gでの結果のみを示す。

真度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは15種類、0.01 µg/gでは20種類であり、両添加濃度で目標値を満たす物質は14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 µg/gでは27種類、0.01 µg/gでは27種類であり、両

表4 妥当性評価結果（混合標準溶液1-1）

動物用医薬品名	結果	定量限界 0.002 ug/mL	検量線 $r^2 \geq 0.99$	0.1 µg/g			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	○			78.2	6.28	14.8	72.5	12.9	16.9
Ciprofloxacin				53.0	12.6	27.7	95.9	25.3	25.3
Oxolinic acid	○			84.4	5.29	7.40	71.9	4.42	11.6
Ofloxacin	○			70.1	4.94	11.7	94.6	7.73	17.1
Orbifloxacin	○			70.3	10.4	10.9	71.0	11.2	11.6
Sarafloxacin				40.2	6.43	22.8	63.1	26.5	26.5
Difloxacin	○			72.0	3.68	19.1	117	12.7	19.0
Danofloxacin	○			75.4	9.42	13.4	96.0	7.48	17.7
Nalidixic acid	○			89.3	5.06	14.7	119	10.7	15.8
Norfloxacin				41.7	8.08	25.9	58.9	30.7	30.7
Flumequine	○			75.4	6.68	6.68	78.8	14.1	21.3
Piromidic acid	○			73.3	7.55	8.07	94.9	7.71	16.3
Marbofloxacin				61.4	8.75	14.8	86.4	26.1	34.8
Miloxacin				37.1	10.5	48.8	28.0	14.7	49.3
Lincomycin				46.1	14.2	21.3	69.3	29.2	29.2
Clindamycin				47.7	14.8	20.1	105	12.9	16.2
Pirlimycin				13.7	8.37	30.9	27.9	33.4	33.4
Erythromycin A	○			83.6	9.01	13.6	82.1	8.22	12.9
Erythromycin B				57.6	6.43	26.1	58.2	30.0	34.2
Oleandomycin				52.5	5.15	23.6	158	5.41	17.0
Josamycin	○			70.2	9.60	17.1	77.4	9.27	10.9
Spiramycin I				74.2	11.3	17.2	42.0	34.5	34.5
Tylosin	○			71.0	5.33	10.9	81.3	13.2	17.1
Tiamulin				60.8	6.86	46.0	21.3	20.8	34.5
Tilmicosin				61.1	7.96	22.9	58.6	26.4	26.4
Mirosamicin				53.3	7.73	34.1	93.3	10.8	19.5
Clarithromycin				72.4	8.98	30.5	73.0	14.7	29.0
Azithromycin				41.1	15.1	20.7	87.3	24.3	35.1
Roxithromycin				59.1	7.66	22.3	164	15.5	22.6
Leucomycin A5				64.1	6.83	13.8	81.9	13.3	19.7
Tacrolimus NH <sub>3</sub>	○			73.3	7.91	8.3	78.6	17.5	17.5
Dirithromycin				12.2	26.3	37.7	0	-	-
Moxidectin		×		11.1	67.3	88.0	-	-	-
Avermectin B1a NH <sub>3</sub>				9.94	23.5	85.9	0	-	-
Eprinomectin				23.8	41.3	74.9	0	-	-
Neospiramycin I		×		31.5	10.4	21.2	-	-	-
Monensin				37.4	14.8	17.6	42.8	10.5	20.2
目標値				70-120	<15	<20	70-120	<25	<30

表5 妥当性評価結果 (混合標準溶液2)

抗菌性物質名	結果	定量限界 0.002 ug/mL	検量線 $r^2 \geq 0.99$	0.1 $\mu\text{g/g}$			0.01 $\mu\text{g/g}$			合成抗 菌剤一 斉分析 法結果
				真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	
Diaveridine				55.4	7.21	9.66	62.5	16.1	21.5	
Sulfaethoxypyridazine	○			70.5	8.13	9.60	82.0	10.9	14.7	○
Sulfaguanidine				93.2	4.50	6.21	45.7	41.0	42.9	
Sulfabromomethazine				67.3	9.02	9.48	80.5	21.0	21.0	○
Sulfabenzamide				45.4	17.5	17.5	46.1	22.9	22.9	○
Sulfisoxazole		×		56.1	12.6	17.2	-	-	-	○
Sulfisozole	○			73.3	5.54	7.98	79.4	8.4	16.3	○
Sulfisomidine	○			77.8	9.42	9.42	75.8	11.2	18.5	○
Clopidol	○			81.2	6.27	8.52	98.8	11.4	12.4	○
Difurazone				0	-	-	0	-	-	
Sulfathiazole		×		42.1	11.8	15.9	-	-	-	○
Sulfapyridine	○			78.9	6.86	9.26	80.4	13.8	19.8	○
Sulfamerazine		×		73.9	9.52	9.52	-	-	-	○
Sulfadoxine	○			83.9	5.89	5.89	90.2	10.2	19.7	○
Sulfamethoxazole	○			79.9	7.81	8.10	91.3	12.7	16.3	
Sulfadimethoxine	○			75.1	6.22	9.44	81.5	11.6	18.2	○
Sulfaquinoxaline				49.2	11.7	17.4	50.8	11.9	15.2	○
Sulfantran		×		51.8	11.9	15.2	-	-	-	
Trimethoprim				67.4	7.98	8.27	73.7	23.8	24.0	○
Sulfadiazine	○			84.2	7.41	7.77	92.0	13.9	20.0	○
Ormetoprim		×		52.2	7.47	11.5	-	-	-	○
Sulfadimidine	○			78.6	6.22	6.93	77.8	14.8	21.3	○
Sulfamethoxyypyridazine	○			77.9	7.95	7.95	70.0	16.4	21.8	○
Sulfamonomethoxine	○			71.6	5.47	7.98	77.2	13.5	14.2	○
Sulfachlorpyridazine		×		38.3	11.1	11.8	-	-	-	○
Sulfatroxazole	○			80.5	9.60	9.6	85.2	7.9	14.4	○
Levamisole	○			78.8	4.50	10.2	91.7	7.7	19.7	
Thiabendazole	○			76.2	6.13	9.19	89.9	15.7	20.7	
Ethopabate	○			87.0	4.49	7.89	106	8.9	17.1	○
Trenbolone		×		57.2	8.46	9.28	-	-	-	
Melengestrol acetate				16.7	38.5	39.7	25.3	24.3	31.3	
Xylazine		×		0	-	-	-	-	-	
Pyrimethamine				23.5	13.2	33.6	30.4	12.0	61.0	
Allethrin		×		0	-	-	-	-	-	
Dexamethasone	○			73.0	9.92	10.7	106	14.0	15.2	
Hydrocortisone				46.6	21.4	26.6	0	-	-	○
Famphur				46.3	23.2	23.2	60.1	25.1	43.9	
Trichlorfon(DEP)	○			77.1	9.22	14.1	93.4	13.8	14.8	
Fenobucarb(BPMC)				55.4	11.1	11.1	92.2	17.6	22.6	○
Sulfacetamide	○			88.1	7.30	10.1	78.9	9.23	9.23	○
Prednisolone	○			88.8	8.26	8.26	112	6.93	6.93	
Glenbuterol				0	-	-	0	-	-	
Lincomycin	○			91.0	9.18	10.9	95.6	11.4	16.1	
Zeranol				4.00	48.1	48.1	0	-	-	
Thiamphenicol	○			72.4	5.21	6.43	73.5	12.7	21.9	○
2-Acetylamino-5-nitrothiazole	○			72.4	13.7	13.7	90.8	13.0	13.0	
Florfenicol			×	93.1	51.5	51.5	62.5	15.6	46.3	
Clorsulon				0	-	-	0	-	-	
Chloramphenicol	○			74.2	7.31	9.77	97.5	14.5	14.8	
Nicarbazin			×	0	-	-	0	-	-	
目標値				70-120	<15	<20	70-120	<25	<30	

添加濃度で目標値を満たす物質は24種類であった。よって、混合標準溶液1-1と2を合計すると38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19種類、混合標準溶液2で29種類となり、合計すると48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1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは32種類、0.01 µg/gでは23種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1 µg/gでは38種類、0.01 µg/gでは33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1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは17種類、0.01 µg/gでは24種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1 µg/gでは38種類、0.01 µg/gでは30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1-1で13種類、混合標準溶液2で24種類となり、合計すると37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、測定値が低く、ばらつきが大きくなる傾向があった。

既に鶏の筋肉で妥当性評価が終了し、分析を実施しているサルファ剤等合成抗菌剤の一斉分析法で混合標準溶液2は26種類が真度及び精度の基準を全て満たしていた(表5右端列)。今回検討した分析法で基準を満たしていた物質をサルファ剤等合成抗菌剤の一斉分析法で基準を満たしていた物質と比較すると、9種類は新たに基準を満たした物質であり、両分析法を採用することにより、35物質の分析が可能となった。

#### 4 まとめ

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中動物用医薬品の一斉分析法を検討した。牛の筋肉2 gを10 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA含有0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液でホモジナイズした後振とう抽出し、室温で遠心分離し、上層を分取した。HLB 1 gによる固相抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を追加した。アセトニトリル層を減圧濃縮し、アセトニトリル溶液で4 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86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、0.002 µg/mL又は0.005 µg/mLで十分な定量感度(S/N比 ≥ 10)が得られた。また、83種類の標準品で0.002～0.1 µg/mL又は0.005～0.1 µg/

mLの範囲のマトリックス添加検量線で良好な直線性( $r^2 \geq 0.99$ )が得られた。

(2) 検討した全ての動物用医薬品で、選択性は目標値を満たしていた。

(3) 真度の目標値を2種類の添加濃度で満たす物質は、混合標準溶液1-1では14種類、混合標準溶液2では24種類であり、合計38種類であった。真度の目標値を50～150%に広げた場合、合計48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1-1で13種類、混合標準溶液2で24種類となり、合計すると37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、測定値が低く、ばらつきが大きくなる傾向があった。

なお、分析法について次の留意点も明らかになった。

① 牛の筋肉の脂肪分等夾雑物を除去するために、はちみつつの分析法に追加する精製法はアセトニトリル/ヘキサン分配とする。

② 標準品の一部は溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化が見られた。標準溶液と試料のアセトニトリルと水の組成比を一定にすることが定量値のばらつきをなくすためには重要であるため、ブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量する。

今後は、鶏卵等を用いて検討を行い、現在の一斉分析法で分析可能な畜水産物の種類の追加を目指す。また、現在のLC-MS/MS測定条件では定量限界値の高い物質が多いテトラサイクリン系及びペニシリン系の抗生物質の最適な測定条件等の再検討を行うと共に、個別分析法の検討を行う。

#### 文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 490-499, 金原出版, 東京, 2015
- 2) 中郡昭人：豚筋肉及び腎臓における限外ろ過膜を用いた動物用医薬品一斉分析法, 日本獣医師会雑誌, 68, 311-315, 2015
- 3) 藤井良昭, 西村一彦, 橋本 諭, 加賀岳朗：高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法による畜肉中のテトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生

- 物質の一斉分析, 分析化学, 66, 5, 369-374, 2017
- 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行: 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, 岡山県環境保健センター年報, 42, 67-76, 2018
  - 8) アジレントテクノロジー: Agilent Captiva EMR-LipidカートリッジクリーンアップおよびLC/MS/MSを用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析, [https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low\\_5991-8598JAJP.pdf](https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5991-8598JAJP.pdf) (2019.11.7アクセス)