

HPLC/MS/MS による畜水産食品中の サルファ剤の迅速一斉分析

阿部 圭子¹

Rapid Simultaneous Determination of Sulfa Drugs in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Keiko ABE

Summary

A method for rapid simultaneous determination was developed for sulfa drugs in livestock products and seafoods by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Sulfa drugs were extracted with acetonitrile-water(85:15). The solution was cleaned up on a Sep-Pak Alumina N Cartridges. The LC separation was performed on a YMC Pack Pro C18 column(3 μ m, 50 $\times$ 2.0mm i.d.) using gradient elution with 2mmol/L ammonium acetate-acetonitrile. The recoveries of sulfa drugs from meat products, fish, egg and milk spiked at 1.0 μ g/g were 61 ~ 91%. The detection limits were 0.02 ~ 0.05 μ g/g.

Key Words : 一斉分析 simultaneous determination, サルファ剤 Sulfa drugs, 畜産食品 livestock products, 水産食品 seafoods, 液体クロマトグラフ質量分析計 Liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry(HPLC/MS/MS), グラジエント溶出 gradient elution

はじめに

近年、畜水産動物にはその生産効率を上げるため、伝染病の予防や治療等にさまざまな動物用医薬品や飼料添加物が使用されている。サルファ剤は $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{N=}$ という共通の構造を有する合成抗菌剤で、グラム陽性球菌、グラム陰性球菌、グラム陰性桿菌などに対して有効であることから汎用されている。また一般的に安定性が高く組織移行性に優れていることから、使用方法を誤れば畜水産物中に残留する可能性が高い。これらが残留する食品を摂取することにより人体への影響が危惧されるため、食品衛生法では食肉、食鳥、卵、魚介類及び乳等は抗生物質のほか、化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならないと厳しく規制がなされている。

本市においては、平成4年と8年にうなぎからスルファジミジンが検出され、平成7年と8年に鶏卵からスルファモノメトキシシンが検出されている。

1. 福岡市保健環境研究所 衛生化学部門

一方では国内外で化学的な評価が確立し、これらが残留する食品を摂取しても影響がないレベルとしての安全基準を設定することが可能となった。そこで安全性が確立されたものについて食品衛生法が改正され、新たに残留基準が設定されている。サルファ剤のスルファジミジンについては、平成9年3月、厚生省告示及び乳等省令により残留基準が設定された¹⁾。

当所においては、平成9年度から12年度にかけて厚生省通達の一斉分析法^{2)~4)}に改良を加えた分析法^{5)~6)}(以下、従来法)を開発し検査を実施しているところである。しかしこれらの検査方法は多大な労力と時間を要し、夾雑成分の影響が多い等の理由からより迅速で精度の高い検査法が必要となってきた。

今回高速液体クロマトグラム質量分析計(以下、HPLC/MS/MS)が導入されたため、11種類のサルファ剤を簡易な前処理操作によりHPLC/MS/MSを用いて感度良く、迅速かつ一斉に分析する方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は福岡市内で流通していた鶏肉，豚肉，牛肉，タイ，ブリ，鶏卵，牛乳を使用した．

2. 試薬・器具及び標準品

アセトニトリル，メタノール，蒸留水：和光純薬工業(株)社製，高速液体クロマトグラフ用．酢酸アンモニウム，ギ酸：和光純薬工業(株)社製，特級を使用した．

2mM 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 0.15g を量りとり，蒸留水を加えて 1000mL とした．

0.1%ギ酸：ギ酸 1mL を量りとり，蒸留水を加えて 1000mL とした．

精製カラム：Waters 社製 Sep-Pak Alumina N(original)

標準品：関東化学(株)社製，標準品は各々の標準原液をアセトニトリル - 水(9:1)に適宜溶解し 1ppb になるよう調整した．11 種類のサルファ剤の名称は表 1，構造式は図 1 のとおりである．

表 1 11 種類のサルファ剤標準物質

No	名 称	略 称
1	スルファジアジン	SDZ
2	スルファメトキサゾール	SMX
3	スルファチアゾール	STZ
4	スルファメラジン	SMR
5	スルフィソミジン	SID
6	スルファジミジン	SDD
7	スルファメトキシピリダジン	SMPD
8	スルファモノメトキシ	SMMX
9	スルファクロルピリダジン	SCPD
10	スルファキノキサリン	SQ
11	スルファジメトキシ	SDMX

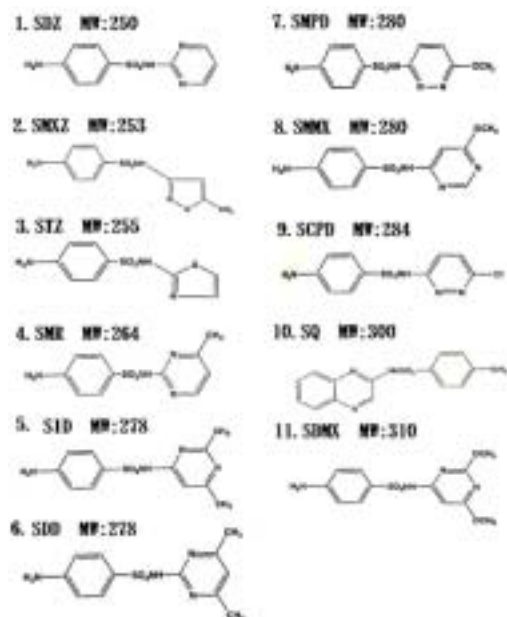


図 1 11 種類のサルファ剤の構造式

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ：ヒュレット・パッカード社製，HP-1100 シリ - ズシステム一式(以下)

・クォータリポンプ：G1311A

・デガッサ：G1322A

・オートサンブラ：G1313A

・カラム恒温槽：G1316A

質量分析計：PE SCIEX 社製，API2000

4. HPLC/MS/MS 測定条件

高速液体クロマトグラフ及び質量分析計の測定条件は表 2，3 のとおりである．

表 2 HPLC Condition

分離カラム	YMC社製 YMC-Pack Pro C18 (3 μ m, 2.0mm i.d. $\times$ 50mm)
カラム温度	室温
移動相	A 液：2mM 酢酸アンモニウム - メタノール (99:1) B 液：メタノール
グラジエント条件	時間 (min) 流速 (μ L/min) 移動相組成 (%)
	0 200 100 0
	0.5 200 100 0
	6 200 10 90
	15 200 10 90
	15.1 200 100 0
	30 200 100 0
試料注入量	50 μ L

表 3 Mass Spectrometry

Ionization	ESI
Ion Source	Turbo Ion Spray
Mode	Positive MRM
Nebulizer, Drying gas	N ₂
Turbo Gas Temp	500
IS Voltage	5500V

5. 試験溶液の調製方法

食肉及び魚介類は細切した後フドカッターで粉碎混和し，それぞれ5gを採り試料とした．鶏卵は割卵した後よく攪拌混和し5gを採り試料とした．牛乳はよく振とう混和した後5gを採り試料とした．各々の調製試料5gを50mL 遠沈管に量りとり，抽出溶媒としてアセトニトリル - 水(85:15)を加え50mLとし，10 分間振とうした後，遠心分離(3,000rpm, 10min)し，上澄液を No5Cろ紙でろ過した．

次にろ液 5mL を分取し，アルミナカラムに負荷した

後アセトニトリル - 水(85:15)溶液で溶出し 10mL とした。さらにこの精製した溶出液を 1mL 分取し、水を加え 10mL とした。これを 0.2 μ m ディスポ - ザブルディスクフィルタ - でろ過し HPLC/MS/MS 試験溶液とした。以上のフロ - シ - トを図 2 に示す。

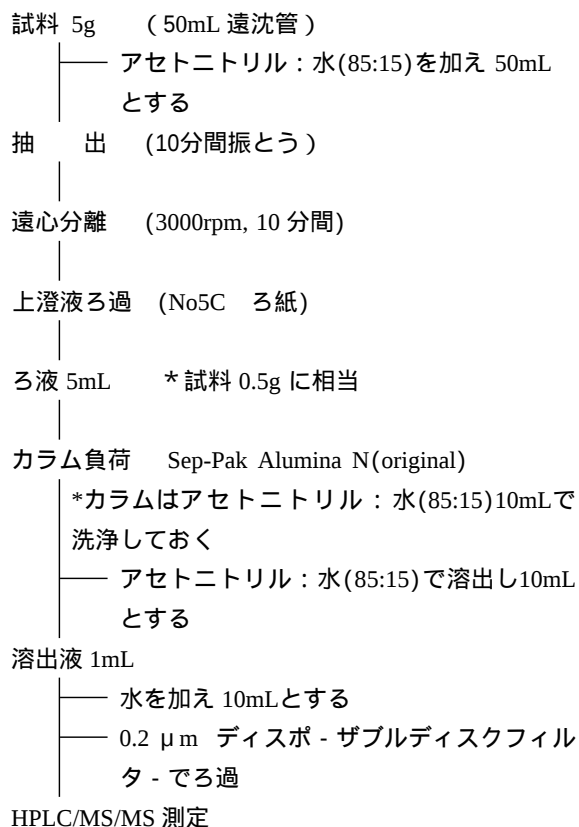


図 2 サルファ剤の分析フロ - シ - ト

結果と考察

1. HPLC/MS/MS 測定条件の検討

1) 質量分析計測定条件の最適化

質量分析器の測定条件を設定するために、11 種類のサルファ剤を各々アセトニトリル：水(1:1)溶液で 1 ~ 2ppm に調製した。まずインフュ - ジョンポンプを用いて四重極内部の各電圧の自動での最適化を行った。

次に FIA(Flow Injection analysis)を行いながらガス圧や温度などイオンソ - スの最適化を行った。最適化のパラメ - タは表 4 のとおりである。

表 4 質量分析器の最適化のパラメ - タ

略 称	内 容
CUR	カ - テンガスの圧
NEB	ネブライザ - ガスの圧
CAD	コリ - ジョンガスの圧
IS	イオンスプレ - の電圧
NC	ニ - ドルにかかる電流
DP	オリフィスプレ - トにかかる電圧
FP	フォ - カスリングにかかる電圧
EP	四重極 0 にかかる電圧
IE1	Q1 の分解能に影響を与える電圧
CEP	Q2 の入り口にかかる電圧
CE	コリ - ジョンエネルギー -
CXP	Q2 の出口にかかる電圧
IE3	Q3 の分解能に影響を与える電圧
DF	検出器の反射板にかかる電圧
CEM	検出器にかかる電圧
GS1	GS1 の圧
GS2	GS2 の圧

11 種類のサルファ剤はスルファアミド基(-SO₂ NH⁺-)という共通の構造を有しており、ベンゼン環や置換基にも NH⁺-基を持つため、インタ - フェ - スには極性化合物のイオン化に適したエレクトロスプレイイオン化(ESI)を選択した。Turbo Ion Spray にてイオン化し MRM モ - ドで最適化を行ったところ、Positive モ - ドで 11 種類すべてのプロトン付加イオン(Precursor ion)及びフラグメントイオン(Product ion)が感度良く測定できた。

最適化した条件の内、表 4 のパラメ - タの中で CUR, IS, GS1,GS2, CAD については、11 種類平均的に高感度となるような値に、またその他については各物質の最適条件に設定した。各条件は表 5,6 に示すとおりである。

表 5 共通パラメ - タ

略 称	設 定 値
CUR	40 psi
CAD	4 psi
IS	5500
TEM	500
GS1	45 psi
GS2	90 psi

表 6 11 種類のサルファ剤の MS 条件

No	略 称	Precursor ion(MW)	Product ion(MW)	DP (psi)	CE
1	SDZ	251	156	21	23
2	SMX	253	156	21	23
3	STZ	256	156	16	21
4	SMR	265	156	21	25
5	SID	279	124	26	33
6	SDD	279	186	21	25
7	SMPD	281	156	21	25
8	SMMX	281	156	21	25
9	SCPD	285	156	16	23
10	SQ	301	156	21	25
11	SDMX	311	156	26	29

2) 移動相の検討

従来法では移動相として A 液に 10mM リン酸緩衝液, B 液にアセトニトリルを用いてグラジエント測定していたが, 質量分析計に不揮発性のリン酸緩衝液を導入することはできない。そこで, イオン化を促進するために A 液に 1% 酢酸, B 液にアセトニトリルを用いた場合(条件 1)及び A 液に 2mM 酢酸アンモニウム, B 液にメタノールを用いた場合(条件 2)について, A 液から B 液へのグラジエント測定を行い比較検討した。その結果ピーク形状, 感度とも条件 2 のほうが優れていたため条件 2 で測定することとした。グラジエント条件を図 3 に示した。

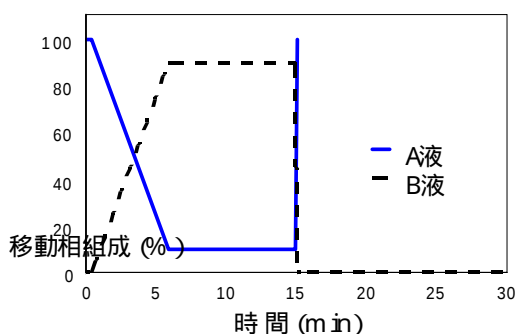


図 3 移動相のグラジエント条件

3) 移動時間及びイオン化の再現性の検討

移動相のグラジエント溶出を行うため, 移動時間に多少のずれが生じたり, 次の分析のイオン化に影響を及ぼすことが考えられる。そこで MS 測定後に移動相が安定するまでの時間について検討した。平衡化時間を 5, 10, 15 分に設定し, スルファジアジンを添加した試料を, 繰り返し 10 回分析した時の移動時間の再現性を調べた(表 7)。

表 7 移動時間及びピーク面積の再現性

平衡化時間 (min)	移動時間 変動係数 (%)	ピーク面積 変動係数 (%)
5	0.18	15
10	0.12	8
15	0.12	4

多数の検体を同時に分析するため, 一検体に要する時間をできるだけ短縮する必要がある。再現性の検討の結果からイオン化の安定性を考慮して平衡化時間は 15 分間が最適と判断した。

3. 標準物質の直線性と定量下限値の検討

混合標準物質の 0.1 ~ 100ppb における濃度とピーク面積との関係を図 4 に, 相関係数を表 8 に示す。

11 種類とも良好な結果が得られた。

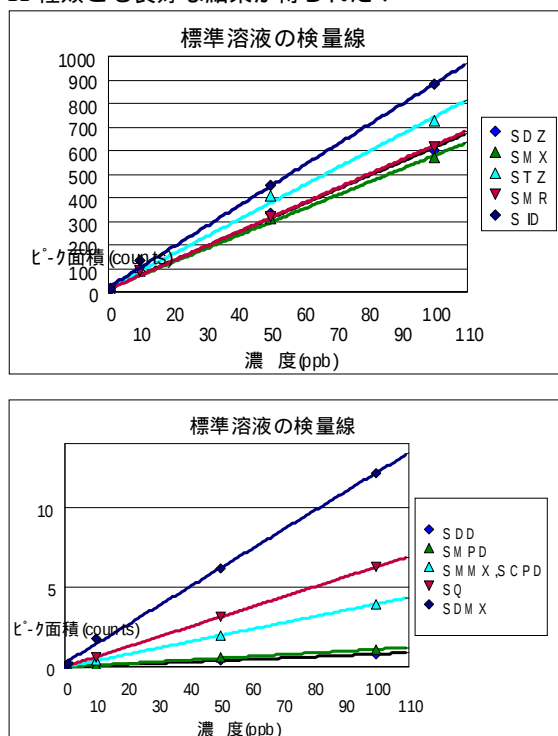


図 4 11 種類のサルファ剤の濃度と面積の関係

表 8 11 種類のサルファ剤の相関係数

種 類	相関係数	種 類	相関係数
1 SDZ	0.997	6 SDD	0.995
2 SMX	0.996	7 SMPD	0.997
3 STZ	0.995	8 SMMX, SCPD	1.000
4 SMR	0.998	9 SQ	1.000
5 SID	0.997	10 SDMX	0.999

4. 標準物質の試料への添加回収

7 種類の畜水産食品に, 試料 5g に対して 5.0 $\mu\text{g/g}$ の混合標準溶液を加えた場合の, 回収率及び相対標準偏差 (RSD) を調べた(表 9)。混合標準溶液のクロマトグラムを図 5 に, 鶏肉, タイ, 鶏卵, 牛乳の 4 種類の試料に混合標準溶液を添加したとき及び牛肉の抽出溶液のクロマトグラムを図 6 ~ 10 に示した。

表9 8種類の畜水産食品に混合標準溶液を添加した場合の回収率及び相対標準偏差(RSD) (単位: % n = 3)

No	サルファ剤	鶏 肉		豚 肉		牛 肉		タ イ		ブ リ		鶏 卵		牛 乳	
		回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
1	SDZ	63	12.8	61	8.3	64	8.8	72	7.3	66	8.2	70	13	62	9.1
2	SMX	73	5.6	68	6.2	62	5.5	69	5.7	71	5.6	69	5.1	83	6.3
3	STZ	68	8.2	73	5.9	63	5.1	82	5.8	73	6.1	78	4.9	70	5.3
4	SMR	88	5.3	82	6.5	80	4.3	88	6.3	78	6.3	76	8.1	73	6.4
5	SID	83	8.2	88	6.9	78	7.5	83	4.9	83	5.8	87	6.4	88	5.6
6	SDD	87	5.5	83	4.8	80	4.3	89	5.1	81	6.7	89	5.2	86	6.3
7	SMPD, SMMX	63	3.7	64	4.9	63	4.8	68	6.1	69	6.1	71	6.3	73	6.4
8	SCPD	78	4.2	82	6.9	85	5.6	88	5.4	78	7.1	81	4.9	83	5.8
9	SQ	68	5.1	72	7.1	76	6.9	78	6.7	81	5.8	78	5.5	81	6.4
10	SDMX	67	6.3	77	6.0	81	7.1	82	4.8	80	5.3	81	7.2	91	6.8

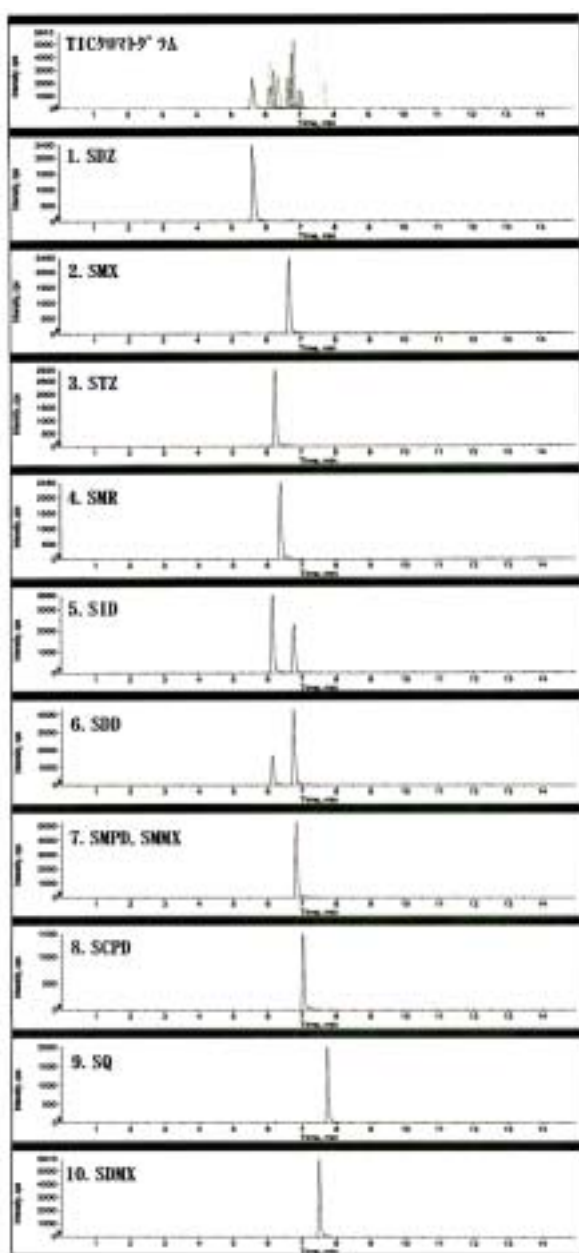


図5 混合標準溶液のTIC及びSRMクロマトグラム

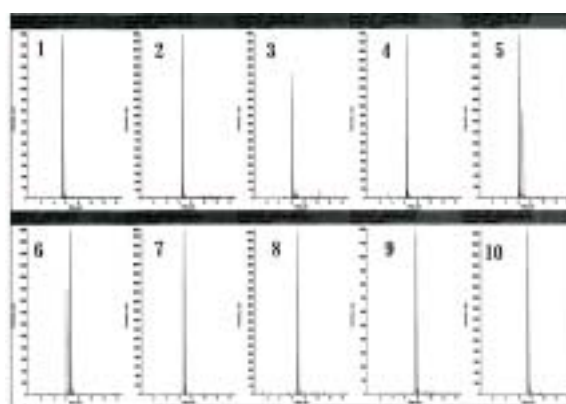


図6 鶏肉に混合標準溶液を添加した場合のクロマトグラム

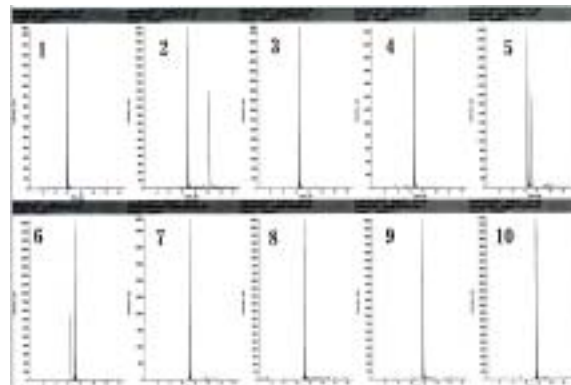


図7 タイに混合標準溶液を添加した場合のクロマトグラム

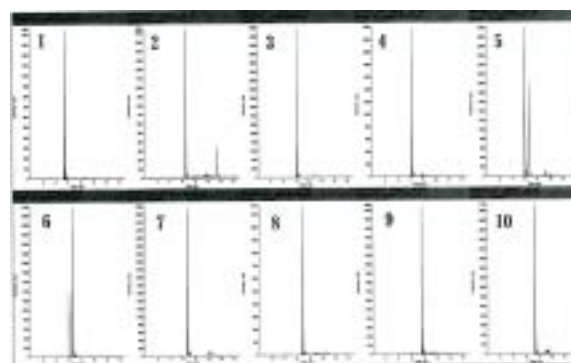


図8 鶏卵に混合標準溶液を添加した場合のクロマトグラム



図9 牛乳に混合標準溶液を添加した場合のクロマトグラム

SDZ, SMPD, SMMX の回収率は 60 ~ 70% と他物質と比較して多少低い値であった。相対標準偏差は HPLC で最初に分離される SDZ が 10 % を超えたが、他物質は約 5 ~ 10% と良好であった。試料抽出溶液のクロマトグラムでは鶏卵に SMXZ の SRM クロマトグラムに夾雑物のピークが認められた以外はまったく夾雑物の影響はなかった。なお本法による検出限界は S/N を 10 とした場合 0.02 ~ 0.05 μg であった。

ま と め

畜水産食品を対象として HPLC/MS/MS を用いた 11 種類のサルファ剤の迅速一斉分析法について検討した。

従来法では濃縮、精製操作がかなり煩雑であり、夾雑物の影響が大きく解析に時間を要した。本法では抽出液をアルミナカラムで精製し、さらに希釈することにより夾雑物の影響をほとんど受けず、非常に良好なクロマトグラムが得られた。回収率も約 60 ~ 90% と良好で、

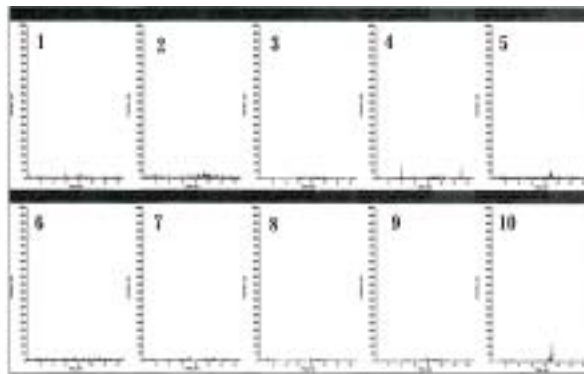


図10 牛肉抽出溶液のクロマトグラム

日常検査のスクリーニング法として、極めて有用と考えられる。

文 献

- 1) 厚生省令第 33 号：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，平成 9 年 3 月 28 日
厚生省告示第 72 号：食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件，平成 9 年 3 月 28 日
- 2) 食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について，衛乳第 79 号，平成 5 年 4 月 1 日
- 3) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長：衛乳第 276 号，畜水産食品の動物用医薬品のモニタリング検査に係る試験法について，平成 9 年 10 月 1 日
- 4) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 追補，313 ~ 329，1993.8.30
- 5) 福岡市保健環境研究所報，Vol.23, 111 ~ 119, 1998
- 6) 福岡市保健環境研究所報，Vol.26, 126 ~ 134, 2001