

LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品 及び合成抗菌剤の迅速一斉分析

中尾朱美

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Rapid Simultaneous Analysis of Residual Animal Drugs and Synthetic Antibacterials in Livestock Products and Seafoods Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry.

Akemi NAKAO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

A rapid and simultaneous method was developed for the analysis of 61 kinds of residual animal drugs and synthetic antibacterials in livestock products and seafoods using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Mass spectral acquisition was done by applying selected reaction monitoring (SRM). The animal drugs and synthetic antibacterials were extracted with acetonitrile. The LC separation was performed on a YMC-Pack Pro C18 column (2mm i.d. × 50mm) with a gradient system of 0.02% formic acid-acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.2mL/min. The recoveries of the 61 kinds of drugs were almost 40 ~ 120 % from livestock products and seafoods fortified at 100 ng/g. The detection limits of those were 1 ~ 15ng/g (S/N=3). Ten milk, twenty-two meat and six seafood samples were analysed by this method. No drugs were detected in any sample.

Key Words : 高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析 LC/MS/MS, 一斉分析
Simultaneous analysis, 動物用医薬品 Animal drugs, 合成抗菌剤 Synthetic antibacterials, 畜産食
品 Livestock product, 水産物 seafoods

はじめに

畜水産食品の需要の高まりとともに生産効率を高めるため、病気の予防や治療の目的で様々な動物用医薬品や合成抗菌剤が使用されている。食品中に残留するこれら薬剤の人体への影響が危惧される中で、平成7年以降、食品・添加物等の規格基準が改正され、現在までに29品目について残留基準が設定された。

これらの試験法は個別に示されているものがほとんどであり、多大な労力と時間を要することが難点である。また、ポジティブリスト制の導入に伴い、食品の動物用医薬品等の残留基準が大幅に増加するため、迅速かつ簡易なこれらの分析法が求められている。

当所では現在、「食品衛生検査指針¹⁾」に示された一斉分析法を一部改良した検査法²⁾とペニシリン系抗生物質分析法^{3),4)}及び厚生省通知のキノロン系合成抗菌剤分析法^{5),6)}など複数の分析法を用いて検査を行っている。このため、現状のままではポジティブリスト制の導入に柔軟に対応することは困難であると考えられる。

近年、LC/MS の普及に伴い畜水産物中の動物用医薬品や合成抗菌剤の分析法として同機器を用いた報告が見られるようになった⁷⁻⁹⁾。

そこで、畜水産食品中の動物用医薬品及び合成抗菌剤について LC/MS/MS を用いた迅速一斉スクリーニング法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

福岡市内で市販されていた畜水産物を用いた。

2. 試薬等

標準品：検査対象薬剤は Table 1 に示すとおりで食品分析用，残留物質試験用または生化学用を用いた。

標準原液：アセトニトリル，水またはアセトニトリル水溶液で濃度50～500mg/Lを調製した。ただしFBZ及びDE Cはジクロロメタン，アセトニトリル，メタノールの混合溶媒で調製した。

混合標準溶液：標準原液をアセトニトリル-水(10:90)で適宜希釈し調製した。

0.2 μm フィルター：関東化学(株)製 DISMIK 25HP を使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 ろ紙 5A を使用した。

その他の試薬：HPLC 用または残留農薬試験用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent1100 シリーズを使用した。

質量分析装置 (MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。

ホモジナイザー：Kinematica 社製 PT10-35 を使用した。

超音波装置：NEY 社製 208H を使用した。

遠心機：(株)コクサン製 H103-NR を使用した。

4. 測定条件

1)高速液体クロマトグラフ

分析カラム：

(株)YMC 製 YMC-Pack Pro C18 2mm i.d. × 50mm, 5μm

移動相：A液：0.02%ギ酸，B液：アセトニトリル

グラジエント条件：

条件1 (ポジティブイオン化)

時間(min)	A液(%)	B液(%)	流速(mL/min)
0	95	5	0.02
3	95	5	0.02
15	5	95	0.02
20	5	95	0.02

条件2 (ネガティブイオン化)

時間(min)	A液(%)	B液(%)	流速(mL/min)
0	95	5	0.02
3	95	5	0.02
15	10	90	0.02
40	10	90	0.02

カラム温度：30

注入量：5 μL

2)質量分析計

条件1 (ポジティブイオン化)

イオン化：ESI(+)

イオンスプレー電圧：5.5kV

イオンソース温度：700

化合物ごとの条件：Table 1 に示した。

条件2 (ネガティブイオン化)

イオン化：ESI(-)

イオンスプレー電圧：-4.5kV

イオンソース温度：600

化合物ごとの条件：Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調製

1)牛乳

試料 5g にアセトニトリル 30mL を加え、5 分間振とうし、上澄み液をろ紙でろ過した。ろ液にアセトニトリル飽和 n-ヘキサン 15mL を加え振とう後、アセトニトリル層を 50mL に定容した。うち 4mL を濃縮乾固後、残留物にアセトニトリル 0.2mL を加え超音波に 30sec かけた後、水 1.8mL を加え 0.2 μm フィルターでろ過し試験溶液とした。

2)その他の食品

試料 5g にアセトニトリル 30mL を加え、ホモジナイズした後、上澄み液をろ紙でろ過した。以下牛乳と同様の操作を行い試験溶液とした。

結果及び考察

1.LC/MS/MS条件の検討

動物用医薬品及び合成抗菌剤の分析は一般的に ODS 系カラムが用いられていること、また、分析時間の短縮及び溶媒の使用削減のため、カラムには YMC-Pack Pro C18 (2mm i.d. × 50mm, 5μm) を使用した。ギ酸及び酢酸アンモニウムを用いアセトニトリル-水系でグラジエ

Table 1. Retention time and compound-specific MS/MS parameters of animal drugs and synthetic antibacterials

Compound	R.T. (min.)	SRM		Declustering Potential(V)	Collision Energy(V)
		Trace(m/z)			
(positive ionization)					
1. 5-propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine (ABZ-Met)	2.0	240.1	133.3	71	41
2. 5-hydroxythiabendazole (SHTBZ)	2.9	217.9	191.3	91	34
3. olaquinox (ODX)	3.5	263.9	143.3	56	45
4. trimethoprim (TMP)	3.5	291.1	230.1	76	31
5. sulfisomidine (SID)	4.0	278.6	124.2	61	31
6. sulfadiazine (SDZ)	5.0	250.9	156.2	51	21
7. tiabendazole (TBZ)	5.3	201.8	175.1	91	35
8. ormetoprim (OMP)	5.5	274.9	259.4	86	35
9. clopidol (CLP)	6.0	191.9	101.2	81	37
10. sulfathiazole (STZ)	8.4	255.6	92.3	46	45
11. morantel citrate (MOR)	9.1	221.0	111.2	81	35
12. sulfamerazine (SMR)	9.2	264.9	108.3	66	35
13. enoxacin (EX)	9.3	321.2	206.4	66	39
14. ofloxacin (OFX)	9.5	362.0	318.3	71	29
15. nitrofurazone(NFX)	9.6	320.1	276.3	66	25
16. lomefloxacin (LFX)	9.8	352.1	265.4	71	33
17. ciprofloxacin (CPF)	9.8	332.0	288.3	76	25
18. danofloxacin (DFX)	10.0	358.0	340.1	56	31
19. enrofloxacin (EFX)	10.0	360.1	245.4	71	37
20. neospiramycin (NSPM)	10.0	350.2	174.3	51	23
21. sarafloxacin (SFX)	10.3	386.0	299.3	81	37
22. spiramycin (SPM)	10.3	422.3	174.3	56	29
23. norfloxacin (NFZ)	10.5	198.9	54.2	61	45
24. isometamizium (IMD)	10.6	460.3	298.3	66	31
25. pyrimethamine (PYR)	10.6	248.9	233.3	96	39
26. sulfadimidin (SDD)	10.6	279.0	124.3	56	33
27. carbadox (CDX)	10.8	262.9	231.1	61	19
28. sulfamethoxyipyridazine (SMPD)	11.1	280.8	156.3	56	25
29. furazolidone (FZD)	11.2	225.9	122.1	71	29
30. sulfamonomethoxine (SMMX)	11.7	280.4	108.3	56	39
31. difurazon (DFZ)	11.8	360.3	222.3	81	27
32. sulfachloropyridazine (SCPD)	11.8	284.6	156.3	51	23
33. sulfamethoxazole (SMX)	12.2	253.8	156.2	66	23
34. oxolinic acid (OXA)	12.7	261.8	244.3	56	25
35. ethopabate (ETB)	12.8	238.0	136.3	41	39
36. sulfadimethoxine (SDMX)	13.0	310.9	156.3	71	29
37. sulfaquinoxaline (SQ)	13.1	300.8	156.2	51	23
38. albendazole (ABZ)	13.4	266.0	234.1	71	29
39. nalidixic acid (NA)	13.6	233.0	187.4	46	35
40. flubendazole (FBZ)	13.9	314.1	282.0	81	31
41. β -trenbolone (-TBL)	14.0	271.0	199.3	86	33
42. α -trenbolone (-TBL)	14.2	271.1	253.1	86	31
43. piromidic acid (PMA)	14.4	289.0	243.4	51	41
44. nicarbazin (NCZ)	16.0	302.8	139.3	71	25
45. decoquinate (DEC)	18.3	418.2	372.4	96	31
(negative ionization)					
1. aminobenzylpenicillin (AMPI)	6.6	348.0	207.1	- 50	- 16
2. thiamphenicol (TP)	10.7	355.7	119.2	- 65	- 44
3. 2-quinoxalinecarboxylic acid (Q2CA)	11.8	172.8	102.1	- 40	- 26
4. zoalene (ZOR)	11.9	223.8	181.1	- 50	- 16
5. chloramphenicol (CP)	12.8	322.8	151.9	- 60	- 24
6. cefazolin (SEZ)	13.3	320.6	167.0	- 40	- 14
7. zeranol (ZER)	14.9	321.0	277.0	- 85	- 30
8. benzylpenicillin (PEN G)	15.5	332.8	191.9	- 45	- 14
9. 6-chloro-(2,3-dichlorophenoxy)-benzimidazole-2-one (TCBZ-Met)	15.8	328.7	182.1	- 90	- 34
10. phenoxymethylpenicillin (PEN V)	16.3	348.8	208.2	- 45	- 14
11. oxacillin (OX)	16.5	400.0	258.8	- 55	- 16
12. phenethicillin (PHEN)	16.5	362.7	222.0	- 55	- 14
13. diclazuril (DCZ)	16.8	406.7	335.6	- 60	- 26
14. triclabendazole (TCBZ)	17.2	358.9	343.5	- 80	- 32
15. cloxacillin (CLOX)	17.3	433.9	292.9	- 45	- 16
16. nafcillin (NAF)	18.2	413.0	272.0	- 55	- 14
17. dicloxacillin (DICLOX)	18.5	467.5	327.0	- 50	- 16
18. closantel (CST)	35.0	660.7	126.9	- 110	- 76

1) R.T. is retention time.

Table 2. Recoveries of animal drugs and synthetic antibacterials from milk, chicken , egg and prawn

Compound	Recovery(%)				D.L. (ng/g)
	Milk	Chicken	Egg	Prawn	
(positive ionization)					
1. ABZ-Met	73.2(6.5)	75.0(5.8)	69.8(3.7)	62.0(2.1)	1
2. SHTBZ	91.8(4.4)	67.0(7.9)	75.0(7.0)	47.0(6.6)	3
3. ODX	7.5(66.7)	2.3(31.0)	3.7(33.9)	1.0(106.8)	15
4. TMP	96.7(3.9)	94.2(4.8)	99.7(9.4)	51.7(4.6)	2
5. SID	58.3(6.1)	80.5(5.0)	91.3(8.8)	67.0(2.6)	1
6. SDZ	60.7(6.9)	93.0(5.1)	85.2(8.9)	77.5(3.4)	1
7. TBZ	86.8(2.4)	79.7(1.9)	84.8(4.2)	66.3(1.6)	5
8. OMP	82.7(3.9)	77.5(3.9)	83.0(5.5)	57.7(3.5)	5
9. CLP	97.7(2.9)	88.3(2.9)	91.5(4.9)	70.3(7.3)	2
10. STZ	48.8(10.0)	78.8(4.5)	77.5(7.8)	74.3(2.5)	3
11. MOR	20.9(7.3)	20.8(8.3)	17.7(13.7)	19.6(11.6)	9
12. SMR	50.8(10.2)	75.0(4.8)	83.3(7.0)	71.8(4.0)	3
13. EX	119(5.7)	101(5.0)	59.7(10.9)	103(10.2)	3
14. OFX	91.8(4.1)	84.8(6.0)	79.8(6.6)	83.7(8.0)	2
15. NFX	122(6.0)	93.8(2.9)	61.5(0.8)	101(8.4)	6
16. LFX	78.2(9.1)	77.3(4.9)	37.6(5.8)	65.7(6.4)	5
17. CPFX	117.8(13.7)	83.5(5.7)	54.0(10.4)	90.5(12.1)	5
18. DFX	143(2.3)	142(9.3)	127(1.4)	99.7(7.8)	5
19. EFX	100(5.8)	101(8.9)	97.2(4.4)	94.7(10.3)	2
20. NSPM	67.5(5.2)	57.0(6.1)	79.7(10.8)	48.1(3.2)	6
21. SFX	89.3(5.9)	87.5(2.0)	58.0(8.3)	72.7(6.0)	2
22. SPM	68.7(2.8)	65.3(1.1)	75.0(8.0)	57.3(1.3)	2
23. NFZ	48.9(13.8)	52.5(1.6)	70.8(9.6)	39.8(4.5)	9
24. IMD	61.0(13.8)	113(19.2)	291(16.1)	54.9(19.4)	15
25. PYR	81.8(4.2)	75.3(5.0)	80.0(13.0)	58.2(2.5)	1
26. SDD	52.4(5.2)	84.5(4.3)	82.0(4.8)	80.3(2.4)	1
27. CDX	55.4(13.0)	43.8(15.1)	58.3(7.8)	48.1(6.1)	9
28. SMPD	52.1(4.7)	80.5(8.1)	82.5(7.3)	83.0(5.7)	2
29. FZD	70.0(4.3)	68.2(2.2)	35.4(4.3)	58.3(6.5)	6
30. SMMX	59.5(3.7)	83.8(5.6)	81.0(3.2)	93.5(3.9)	3
31. DFZ	46.5(6.2)	46.7(4.7)	66.0(5.3)	23.4(4.3)	5
32. SCPD	61.0(5.0)	80.2(5.4)	78.2(3.5)	87.7(3.4)	1
33. SMX	64.0(6.2)	77.8(5.2)	80.2(7.7)	82.0(4.6)	2
34. OXA	83.8(5.4)	68.5(8.9)	69.7(5.8)	79.0(1.1)	2
35. ETB	89.0(1.9)	87.2(4.6)	87.7(3.7)	85.3(6.0)	1
36. SDMX	71.8(1.6)	87.3(6.3)	86.0(6.5)	87.0(4.1)	1
37. SQ	72.7(12.5)	79.3(3.8)	79.5(9.7)	82.5(1.2)	1
38. ABZ	87.5(1.5)	80.3(2.0)	90.7(8.4)	65.8(0.9)	1
39. NA	83.8(3.9)	78.8(5.9)	53.1(8.3)	79.2(0.4)	2
40. FBZ	90.8(1.8)	82.5(1.6)	84.5(5.1)	78.0(2.3)	1
41. -TBL	80.7(3.8)	82.0(1.6)	81.2(2.6)	70.3(3.4)	2
42. -TBL	85.2(6.4)	82.2(3.5)	79.7(4.6)	70.3(4.7)	2
43. PMA	73.8(9.9)	74.7(5.7)	47.1(7.5)	72.5(4.5)	5
44. NCZ	73.5(1.4)	51.8(7.9)	75.2(10.5)	50.2(5.5)	1
45. DEC	13.1(23.3)	31.2(38.5)	86.8(7.8)	51.9(16.8)	6
(negative ionization)					
1. AMPI	51.7(5.4)	19.3(4.3)	42.3(20.0)	43.2(6.4)	6
2. TP	89.3(9.1)	85.7(6.8)	85.0(14.8)	81.3(2.5)	3
3. Q2CA	65.5(2.0)	36.3(2.9)	53.1(5.7)	41.1(9.7)	2
4. ZOR	88.5(2.0)	87.5(1.1)	82.5(13.7)	49.8(6.8)	3
5. CP	96.7(0.8)	98.5(7.0)	96.5(1.8)	95.3(5.0)	1
6. SEZ	78.5(7.3)	60.3(1.9)	52.9(13.4)	60.7(2.4)	3
7. ZER	83.2(0.9)	77.0(2.8)	78.7(10.1)	69.5(5.0)	1
8. PEN G	73.2(3.9)	14.9(6.5)	50.3(19.6)	56.8(4.3)	3
9. TCBZ-Met	46.3(5.3)	30.6(19.5)	64.2(6.5)	36.4(16.0)	1
10. PEN V	84.2(1.8)	42.3(4.0)	58.1(21.0)	64.0(2.3)	2
11. OX	85.0(2.4)	63.7(5.7)	52.1(20.0)	67.7(4.8)	1
12. PHEN	85.5(1.5)	53.6(6.2)	52.8(19.0)	65.8(1.9)	1
13. DCZ	61.0(4.1)	34.8(17.8)	80.7(7.8)	39.0(12.0)	1
14. TCBZ	28.0(5.5)	26.7(18.4)	68.0(7.2)	26.3(15.9)	1
15. CLOX	76.0(7.3)	63.3(4.1)	36.1(19.3)	63.5(1.4)	3
16. NAF	78.3(5.2)	39.6(7.6)	52.9(9.4)	61.8(1.2)	1
17. DICLOX	74.0(4.4)	62.3(0.9)	35.9(16.6)	64.5(2.8)	3
18. CST	6.2(13.4)	40.7(0.8)	118(8.2)	46.5(2.8)	2

1) Values are mean(RSD). (n=3)

2) D.L. is detection limits.

ント分析した結果、酢酸アンモニウムではキノロン剤がカラム中の不純金属とキレートを形成しピーク形状がかなり悪かったが、ギ酸ではピーク形状が良好となったため移動相にはギ酸を使用することとした。また、ピーク形状を検討した結果、ギ酸濃度は0.02%が良好であった。各薬剤の保持時間はTable 1に示すとおりである。なお、測定終了後はLCの移動相をA液95%、B液5%で10分間保持し機器を安定させた。

イオン化はエレクトロスプレー(ESI)により、化合物によってポジティブモード、ネガティブモードで行い、SRMを用いて分析を行った。各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て最大感度が得られる条件をTable 1のとおり求めた。各プレカカーサーイオンに対して、相対的に最も感度が強く得られたプロダクトイオンをモニターイオンとした。

イオンスプレー電圧及びイオンソース温度などの測定中固定した条件については、それぞれのモードで感度の影響を受けやすかったIMD、DEC及びCSTの感度が高く得られた条件を設定した。

また、各薬剤の検量線は1～100ng/Lの範囲でピーク面積との相関係数は0.999以上と良好な直線関係が得られた。

2. 試験溶液調製法の検討

動物用医薬品及び合成抗菌剤の分析に一般的に用いられているアセトニトリルを抽出溶媒として用いた。

また、使用したLC/MS/MS装置が選択性に優れクロマトグラム上に妨害ピークが少ないこと、物性の異なる多くの薬剤を同時に精製することは困難であること、また、スクリーニングを目的とすることからカラムによる精製操作は省略した。

最終検液のアセトニトリル含量は前述のLC条件でのピーク形状を考慮して10%とした。

3. 添加回収試験

本法を用い牛乳、鶏肉、鶏卵及びエビに各薬剤を100ng/g添加して回収試験を行った。Table 2に示すとおり、ODXおよびMORを除いては回収率はおおむね40～120%、相対標準偏差(RSD)は1.0～21.0%であった。

DFXやIMDの回収率が高くなったり、FZDやDFZなどで一部の試料で回収率が低くなったのは、試料由来のマトリックス成分によりイオン化が促進または抑制された結果であった。

また、いずれの薬剤についても定量に支障をきたすような試料由来の夾雑ピークは見られなかった。

なお、添加回収試験から得られたクロマトグラムから

検出限界(S/N=3)を算出した結果はTable 2に示すとおり1～15ng/gであった。

以上の結果から、ODX及びMOR以外の61薬剤について、本法は日常のスクリーニング試験として適用できるものと思われた。

4. 残留実態調査

本法により牛乳10件、食肉22件、鮮魚貝類6件について残留実態調査を行ったが、いずれの薬剤も検出されなかった。

ま と め

畜水産食品中の残留動物用医薬品及び合成抗菌剤について、LC/MS/MSによる迅速一斉分析法を検討した。

ODX及びMORを除いた61種類の薬剤の添加回収試験による回収率はおおむね40～120%で、試料由来の夾雑ピークも見られなかった。

本法は試料を抽出しその一部を濃縮乾固後アセトニトリル-水溶液に溶解するだけであり、定性に優れ迅速かつ簡便に61種類の薬剤を一斉分析できることから、スクリーニング法として非常に有用な手法と思われる。

文 献

- 1)厚生労働省監修：食品衛生検査指針2003 動物用医薬品・飼料添加物編, 26～43, 2003
- 2)福岡市保健環境研究所報, Vol23, 111～119, 1998
- 3)Kazuhiro, H.: Simultaneous determination of five penicillins in muscle, liver and kidney from slaughtered animals using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan), 44, 1-6, 2003
- 4)福岡市保健環境研究所報, Vol28, 79～83, 2003
- 5)厚生労働省通知食監発第0605002号：うなぎにおけるエンロフロキサシン分析法について, 平成15年6月5日
- 6)厚生労働省通知食安監発第0703005号：うなぎにおけるエンロフロキサシン分析法について, 平成15年7月3日
- 7)Masakazu, H., Terumitsu, Y., Yoshinori, K., Hiroyuki, N.: Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in meat by liquid chromatography / mass spectrometry, Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan), 42, 374-378, 2001

8) Masakazu, H., Harumi, T., Kazuo, T., Yoshimori, K.,
Hiroyuki, N.: Determination of spiramycin and tilmicosin
in meat and fish by LC/MS.
Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 44,
150-154, 2003

9) Naoyuki, S., Keiko, I., Akio, S., Toshio, H., Noboru, N.:
Analysis of moxidectin by LC/MS and Determination of
residues in adipose and muscle tissues in commercial
beef.
Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 44,
198-202, 2003