

# 食肉中の残留動物用医薬品のLC/MSによる一斉分析

## Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs in Meat by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry

遠藤美砂子 山内 一成\*<sup>1</sup> 氏家 愛子  
柳田 則明

Misako TAGIRI-ENDO, Kazushige YAMANOUCHI, Aiko UJIIE  
Noriaki YANAGITA

平成18年度のポジティブリスト制導入に向けて、平成16年度までの検査対象動物用医薬品数18物質（HPLC分析）を41物質に増やし、LC/MSによる分析法の検討を行なった。前処理法にはアセトニトリル抽出法を採用し、カラムはODSおよびAmideカラムを用いた。一斉分析の評価基準として回収率が60～140%、相対標準偏差が20%以内であることを条件とした場合、本法により鶏肉中33、豚肉中36、牛肉中33物質の動物用医薬品の分析が可能となった。本分析法を利用して鶏肉・豚肉・牛肉合計16検体を検査した結果、いずれの検体からも動物用医薬品は検出されなかった。

キーワード：動物用医薬品;残留分析;高速液体クロマトグラフィー/質量分析;食肉

**Keywords** : veterinary drugs; residual analysis ; LC/MS ; meat

### 1 はじめに

国民の健康の保護を図ることを目的とした「食品衛生法等の一部を改正する法律」（平成15年5月30日公布）により、食品中に残留する農薬等に関し、いわゆるポジティブリスト制が平成18年5月29日から施行されるが、残留動物用医薬品については、新たに約200物質について残留基準が設定される（現行の残留基準は33物質）。これにより各都道府県では、迅速に多くの物質を検査することが必要になるとともに、多くの物質について定量値を求めることが要求される。

当部では、高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析による残留動物用医薬品検査を担当しており、平成12年度からは前処理法にメタリン酸・有機溶媒混液による方法<sup>1)</sup>を採用<sup>2)3)</sup>し、平成16年度には食肉を対象とした行政検査（モニタリング）において18物質の検査が可能となった。しかし、HPLC分析はマトリックスの影響を受けやすく、測定精度に問題があるため、HPLC分析で検出された場合は、高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）またはLC/MS/MSによる確認検査を行なうことが要求されている。当部においても、LC/MSによる分析に移行することにより、上記問題点を解決し、検査物質数の増加を図る必要がある。

一方、四重極LC/MSの選択イオンモニタリング（SIM）

モード分析は高感度かつ定量性に優れた分析法として、動物用医薬品の分析にも利用されている<sup>4)</sup>。しかし、SIM測定は極性が類似の物質を一斉分析する場合、感度が低下することがある。そこで、一般的に用いられているオクタデシルシリカゲル（ODS）カラムに加えて、カルバモイル基化学結合型シリカゲル（Amide）カラムを用いた一斉分析法の有効性を検討したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 試料および試薬

試料は宮城県内で市販されている鶏肉・豚肉・牛肉を用いた。

標準品は合成抗菌剤27種、抗生物質2種、寄生虫駆除剤9種、ホルモン剤3種を使用した。

#### 2.2 装置および測定条件

LC/MSは、Agilent製1100シリーズLC/MSDを使用し、LC/MS測定条件は表1、グラジエント条件は表2、物質毎のMS条件およびグループ化条件は表3に示した。

#### 2.3 検量線の作成

各標準品の2、10、20、100、200および1000ng/ml混合溶液を調製し、さらに測定対象マトリックスで2倍希釈した標準混合溶液を用いて検量線を作成した。定量下限値は低濃度標準溶液（1～50ng/ml）による5回繰返し測定時の標準偏差の10倍から求めた。

\* 1 現 仙南保健福祉事務所

表1 LC/MS測定条件

装置 : Agilent1100シリーズLC/MSD		LC条件	
MS条件		カラム	(1)東ソー TSKgel ODS-80Ts (150×2.0mm, 5μm) (2)東ソー TSKgel Amide-80 (150×2.0mm, 5μm)
イオン化モード	ESI (positive or negative)	移動相	A: 0.1%ギ酸 / B: アセトニトリルのグラジエント
Nebulizer gas	N2(50psi)	流速	0.2ml/min
Drying gas	N2(10L/min, 300℃)	温度	40℃
Capillary Voltage	±4000V	注入量	5μL
SIMイオン	[M+H] <sup>+</sup> [M+2H] <sup>2+</sup> (tilmicosin) [M-H] <sup>-</sup>		

表2 グラジエント条件

(1)ODSカラム使用時			
時間(min)	0.1%ギ酸 (%)	アセトニトリル (%)	
0	95	5	
20	40	60	
35	40	60	
40	0	100	
55	0	100	
(2)Amideカラム使用時			
時間(min)	0.1%ギ酸 (%)	アセトニトリル (%)	
0	5	95	
20	55	45	
40	55	45	

表3 物質毎のMS条件およびグループ化条件

医薬品	カラム	SIMイオン (m/z)	モード	Fragmentor 電圧(V)	モニター時間 (min)
thiabendazole metabolite	ODS-80Ts	218.0	Pos	160	3.0-16.0
albendazole metabolite	ODS-80Ts	240.0	Pos	160	
thiabendazole	ODS-80Ts	202.0	Pos	160	
sulfamerazine	ODS-80Ts	265.0	Pos	140	
ofloxacin	ODS-80Ts	362.1	Pos	140	
ciprofloxacin	ODS-80Ts	332.1	Pos	140	
danofloxacin	ODS-80Ts	358.1	Pos	160	
sulfadimidine	ODS-80Ts	279.0	Pos	140	
enrofloxacin	ODS-80Ts	360.1	Pos	160	
sulfamethoxypridazine	ODS-80Ts	281.1	Pos	140	
furazolidone	ODS-80Ts	226.0	Pos	120	
sulfamonomethoxine	ODS-80Ts	281.1	Pos	140	
sulfamethoxazole	ODS-80Ts	254.0	Pos	120	
tilmicosin	ODS-80Ts	435.4	Pos	160	
oxolinic acid	ODS-80Ts	262.1	Pos	140	16.0-20.0
ceftiofur	ODS-80Ts	524.0	Pos	160	
difurazon	ODS-80Ts	361.1	Pos	140	
sulfadimethoxine	ODS-80Ts	311.1	Pos	140	
sulfaquinolaxaline	ODS-80Ts	301.0	Pos	120	
albendazole	ODS-80Ts	266.1	Pos	160	
nalidixic acid	ODS-80Ts	233.1	Pos	120	20.0-27.0
flubendazole	ODS-80Ts	314.0	Pos	160	
flumequine	ODS-80Ts	262.1	Pos	140	
β-trenbolone	ODS-80Ts	271.1	Pos	160	
α-trenbolone	ODS-80Ts	271.1	Pos	160	
piromidic acid	ODS-80Ts	289.1	Pos	140	
triclabendazole	ODS-80Ts	358.9	Pos	160	27.0-35.0
decoquinat	ODS-80Ts	418.2	Pos	160	35.0-43.0
thiamphenicol	ODS-80Ts	354.0	Neg	120	10.0-15.0
2-quinoloxalinecarboxylic acid	ODS-80Ts	173.0	Neg	100	
ethopasate	ODS-80Ts	236.1	Neg	160	15.0-40.0
zeranol	ODS-80Ts	321.1	Neg	160	
nicarbazin	ODS-80Ts	301.0	Neg	100	
closantel	ODS-80Ts	660.8	Neg	160	40.0-50.0
sulfadiazine	Amide-80	251.1	Pos	120	1.0-8.0
pyrantel	Amide-80	249.1	Pos	160	8.0-21.0
levamisole	Amide-80	205.0	Pos	140	
pyrimethamine	Amide-80	207.1	Pos	160	
ormethoprim	Amide-80	275.1	Pos	100	
trimethoprim	Amide-80	291.1	Pos	120	
clopidol	Amide-80	190.0	Neg	140	1.0-8.0

2.4 試験溶液の調製および標準添加

メタリン酸・有機溶媒混液法<sup>1)</sup>は操作が複雑であることから、操作が簡便で除蛋白効果の高いアセトニトリル抽出法<sup>5)</sup>を採用した(図1)。標準添加試料は、試料換算で0.1ppm、溶液濃度として100ng/mlとなるように調製した。

2.5 平成17年度残留動物用医薬品検査

平成17年度に保健所で買上した食肉3種16検体について、本一斉分析法による残留実態調査を行った。

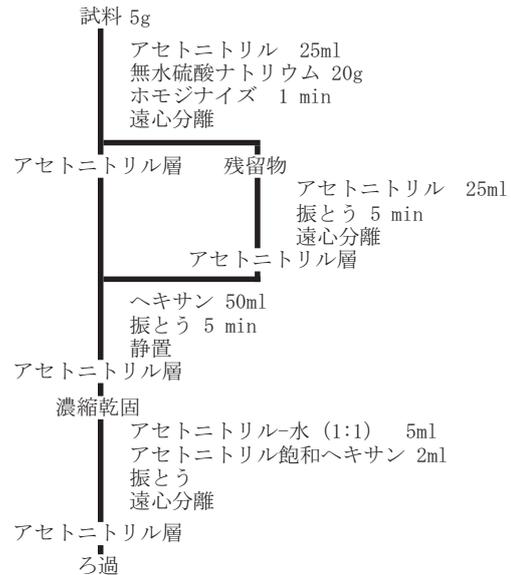


図1 試験溶液の調製方法

3 結果および考察

3.1 MS条件の検討

動物用医薬品41物質それぞれについて、フローイジェクション分析(FIA)によるスキャン測定により、SIMイオンの決定およびネブライザー圧力、乾燥ガス圧力・温度、キャピラリー電圧、フラグメンター電圧の検討を行った。移動相は水系溶媒としてギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムを、有機溶媒としてアセトニトリル、メタノールを用いて検討し、流速は0.2ml、水系溶媒：有機溶媒=1：1とした。移動相として、0.02~0.2%ギ酸とアセトニトリルを用いると多くの物質で最も強いイオン強度が得られた。定量用SIMイオンは、[M+H]<sup>+</sup>でのモニタリングが33物質、[M+2H]<sup>2+</sup>が1物質、[M-H]<sup>-</sup>が7物質となった。このうち、LCの条件として最適であった0.1%ギ酸を用いた場合のMS条件を表1および表3に示した。

3.2 ODSカラムを用いたLC条件の検討

41物質をODSカラムにより分離検出する条件を検討した。移動相は0.02~0.2%ギ酸とアセトニトリルのグラジエントを用いて検討した。表1および表2の条件で、最も良好な分離が認められた。しかし、20物質が保持時間3~16分にまとまって溶出するため(表4)、定量下限値が大きくなる傾向が認められた。

表4 SIMのグループ化 (ODS)

モード	モニター 時間(min)	モニター イオン数
POS	3-16	20
	16-20	6
	20-27	6
	27-35	1
	35-43	1
NEG	5-10	1
	10-15	2
	15-40	3
	40-50	1

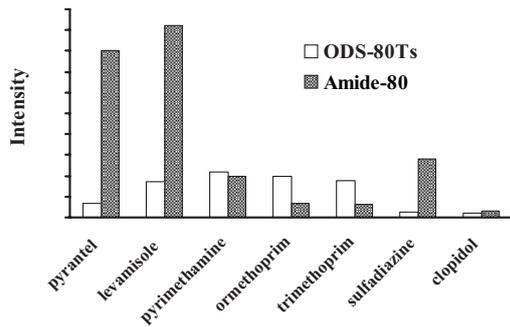


図2 ODSカラムおよびAmideカラム使用時の感度比較 (豚肉をマトリックスとした50ng/ml標準溶液)

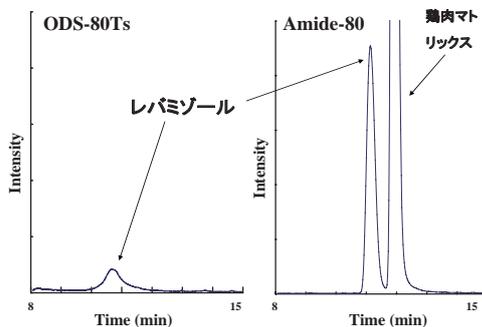


図3 鶏肉マトリックスを含む50ng/ml標準溶液のSIM (MW=205) クロマトグラム

3.3 Amideカラムを用いたLC条件の検討

次にODSカラムと同様に、ギ酸/アセトニトル系を用いて分析することが可能な順相分配系Amideカラムを使用した場合の分析条件を検討した。ODSカラムで保持時間3~16分に溶出する7物質をAmideカラムで分析したところ、4物質で感度の向上が認められた(図2)。特に現行の残留基準値が0.01ppm(牛, 豚, 鶏の筋肉等)であるレバミゾールで、試料換算0.005ppm(基準値の1/2)の定量下限値が得られるようになった。両カラムで分析したレバミゾールのSIMクロマトグラムを図3に示した。ピーク形状が改善されたため、マトリックスとの分離が可能となり、感度が大幅に増加した。定量下限値などを考慮し、7物質についてAmideカラムで分析することとした。測定条件は表1~3に示した。

表5 添加回収試験結果

医薬品	カラム	鶏肉		豚肉		牛肉	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
thiabendazole metabolite	ODS	107	7.7	127	5.3	140	3.8
albendazole metabolite	ODS	84.8	3.0	99.1	3.7	115	2.9
thiabendazole	ODS	74.1	3.4	91.3	3.1	102	1.0
sulfamerazine	ODS	67.2	3.0	106	3.7	52.0	1.8
ofloxacin	ODS	89.0	1.4	93.3	3.4	105	3.5
ciprofloxacin	ODS	77.2	6.4	68.0	6.4	82.6	3.6
danofloxacin	ODS	76.1	4.7	73.6	6.6	107	5.3
sulfadimidine	ODS	136	13	97.5	3.9	63.8	3.5
enrofloxacin	ODS	86.6	1.8	89.0	5.2	110	3.5
sulfamethoxyypyridazine	ODS	98.9	7.9	106	5.3	69.5	12
furazolidone	ODS	31.7	15	82.6	8.4	56.8	1.7
sulfanomothoxine	ODS	69.4	5.2	99.2	4.2	60.8	1.9
sulfamethoxazole	ODS	71.1	11	90.3	1.5	62.5	2.3
tilmicosin	ODS	90.5	3.8	90.9	2.5	113	3.6
oxolinic acid	ODS	82.4	5.6	97.6	6.5	127	1.9
ceftiofur	ODS	33.1	2.1	49.5	1.5	59.5	5.5
difurazone	ODS	39.6	13	63.5	3.2	64.3	5.1
sulfadimethoxine	ODS	67.1	8.6	93.6	0.4	64.8	3.6
sulfaquinoxaline	ODS	66.3	8.5	90.6	0.7	64.1	2.8
albendazole	ODS	65.4	8.3	92.5	5.4	93.8	2.1
nalidixic acid	ODS	73.7	7.1	89.5	4.5	117	1.5
flubendazole	ODS	69.9	9.9	102	2.3	132	2.5
flumequine	ODS	70.8	7.2	89.4	4.5	117	1.6
β-trenbolone	ODS	69.5	5.0	84.3	2.5	99.1	2.2
α-trenbolone	ODS	70.9	5.4	85.9	2.2	102	2.5
piromidic acid	ODS	76.6	7.5	87.4	5.0	116	2.1
triclabendazole	ODS	51.5	22	81.5	4.9	94.7	3.0
decoquinat	ODS	24.1	27	38.5	6.9	49.7	2.9
thiamphenicol	ODS	87.2	4.3	92.8	5.6	130	4.6
2-quinoxalinecarboxylic acid	ODS	44.5	4.3	46.3	3.9	54.6	13
ethopabate	ODS	89.0	4.3	87.8	3.9	110	1.2
zeranol	ODS	70.4	8.7	89.5	5.8	112	1.9
nicarbazin	ODS	55.3	27	92.9	6.1	81.4	2.7
closantel	ODS	21.8	65	43.8	6.4	81.3	1.4
sulfadiazine	Amide	71.1	3.3	93.4	9.8	35.3	15
pyrantel	Amide	83.7	4.8	72.5	6.4	70.7	4.8
levamisole	Amide	79.1	8.8	84.1	4.4	78.6	1.2
pyrimethamine	Amide	70.6	3.2	87.0	2.8	94.5	2.4
ormethoprim	Amide	91.9	3.4	97.8	1.3	99.0	0.4
trimethoprim	Amide	74.3	4.4	101	1.1	100	2.3
clopidol	Amide	65.4	11	56.9	13	40.6	1.4

注1) 回収率が60%未満か140%を超える、または相対標準偏差が20%を超えるもの

3.4 添加回収試験

鶏肉・豚肉・牛肉を試料とした場合の添加回収試験の結果を表5に示した。測定にあたり、絶対検量線法では一定の真度が得られなかったため、測定対象マトリックスで2倍希釈した標準溶液を用いて検量線を作成し、回収率を求めた。セフチオフル、デコキネート、2-キノキサリンカルボン酸の3物質については、いずれの品目でも回収率が60%未満であった。

3.5 試料マトリックスの影響

生産地・部位等の異なる鶏肉・豚肉・牛肉について、それぞれ5~6検体を本一斉分析法により分析した。本分析条件のみで判定不能な疑似ピークが表6に示す頻度で出現したため、1~2種の確認用SIMイオンを追加して再測定し、同定を試みた。その結果、全ての試料において定量限界値を超える動物用医薬品は検出されなかった。鶏肉ではスルファジアジンが、豚肉ではダノフロキサシンおよびオルメトプリムがすべての検体で疑似ピークを出現させた。動物試料はマトリックスの影響が大きく、LC/MS分析であってもその影響を完全に排除することはできなかったが、確認用SIMイオンで再分析して、SIMイオンの強度比を標準品と比較することで同定が可能であった。

表6 試料測定時における疑似ピークの出現頻度

医薬品	鶏肉(6)	豚肉(5)	牛肉(5)
ofloxacin	0	0	2
ciprofloxacin	1	0	0
danofloxacin	0	5	0
sulfadimidine	0	0	3
furazolidone	—	3	—
sulfadimethoxine	1	0	0
nalidixic acid	1	0	0
flubendazole	0	1	1
piromidic acid	1	0	0
thiamphenicol	0	4	1
sulfadiazine	6	0	—
levamisole	1	2	1
ormethoprim	0	5	2
trimethoprim	0	0	1

#### 4 まとめ

- (1) ポジティブリスト制度導入に向け、平成16年度までの検査対象動物用医薬品数18物質を41物質に増やし、LC/MSによる分析法の検討を行なった。前処理法にはアセトニトリル抽出法を採用した。
- (2) 一般的に使用される逆相系ODSカラムの他に、順相系のカラムを併用して分析することで、感度が大幅に改善される物質があった。
- (3) MS分析では試料マトリックスの影響によりイオ

ン化が促進／妨害され、絶対検量線法では一定の真度が得られないため、標準添加法が有効であった。

- (4) スクリーニング分析の評価基準として回収率が60～140%、相対標準偏差が20%以内であることを条件とした場合、本法により鶏肉中33、豚肉中36、牛肉中33物質の動物用医薬品の一斉分析が可能となった。
- (5) 検出された場合の確認方法として1～2種の確認用SIMイオンを分析することで、同定が可能であった。

#### 参考文献

- 1) 堀江正一, 吉田栄充, 斉藤貢一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **39**, 383 (1998).
- 2) 石川潔, 高橋紀世子, 赤間仁, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, **19**, 171 (2001).
- 3) 赤間仁, 高橋紀世子, 石川潔, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, **20**, 84 (2002).
- 4) S.Bogialli, R.Curini, A.D.Corcoa, M.Nazzari, M.L.Polci: J.Agric. Food Chem., **51**, 4225 (2003).
- 5) 村山三徳, 内山貞夫, 斎藤行生: 食品衛生学雑誌, **32**, 155 (1991).