報 文

LC/MS/MS による畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析

(平成 20 年 5 月 13 日受理)

梶田 弘子* 畠山えり子

Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs in Livestock Products and Fish by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Hiroko KAJITA* and Eriko HATAKEYAMA

Research Institute for Environmental Sciences and Public Health of Iwate Prefecture:
1-36-1 Iiokashinden, Morioka-shi, Iwate 020-0852, Japan; * Corresponding author

A rapid multiresidue method was developed for determination of 98 veterinary drugs in livestock products and fish by LC/MS/MS. The drugs were extracted with methanol, and the extracted solution was diluted with water. The methanol concentration was adjusted to 50%, and finally the diluted solution was filtered through a microfiltration membrane (0.02 μm diameter pore size) prior to LC/MS/MS. Recoveries of 87 drugs from 4 foods (milk, egg, rainbow trout and cattle muscle) fortified at 0.2 $\mu\text{g/g}$ were in the range of 50–150% with a coefficient of variation (%) of less than 20%. The values obtained by this method from livestock products containing antibiotics were similar to those obtained by the official methods. This proposed method is expected to be useful as a multiresidue analysis method for screening of veterinary drugs in livestock products and fish.

(Received May 5, 2008)

Key words: 動物用医薬品 veterinary drug; 畜産食品 livestock product; 魚 fish; 一斉分析 simultaneous determination; 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS; 精密ろ過膜 microfiltration

緒 言

食品中に残留する動物用医薬品は、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」(昭和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号)によって規制されている。平成 18 年 5 月 29 日にポジティブリスト制度が施行されたことに伴い、基準(暫定を含む)が設定された動物用医薬品は 230 項目以上に大幅に増加し、抗生物質や抗菌性物質以外の動物用医薬品のうち基準が設定されていないものについては一律基準(0.01 ppm)が適用される。この制度改正に対応するため、迅速かつ効率的な動物用医薬品の多成分分析法を開発し、食の安全性を確保するため多くの動物用医薬品についてモニタリングできる検査体制の強化が求められている。厚生労働省は、新たに動物用医薬品の試験法として HPLC による一斉試験法 I, II, III および個別試験法*1などを示したが、検出された場合は LC/MS または LC/MS/

MS による確認試験が必要となる。LC/MS/MS は高感度・高選択性の機能を有するため食品中の夾雑成分の中から目的物質を検出する手法として有効であり、近年、同機器による畜水産物中の残留動物用医薬品一斉分析法が多数報告されている^{1)~9)}。

著者らは、限外ろ過法を用いた LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析について報告¹⁰⁾したが、この方法は、試料のメタノール抽出液に水を加えて希釈した際に生成する直径 100~200 nm のコロイド状粒子を限外ろ過膜により除去し¹¹⁾、得られた清澄なる液を LC/MS/MS で測定するという濃縮操作を省略した迅速分析法である。本法を畜産物に適用した場合、試料の種類によっては限外ろ過膜が目詰まりし、希釈抽出液を全量ろ過できない事例が見受けられた。そこで、本報では希釈抽出液中のコロイド状粒子を除去する目的で、孔径サイズ 0.02 μm (20 nm) の精密ろ過膜を用いた LC/MS/MS による動物用医薬品 98 成分を対象とした一斉分析法を検討した。

* 連絡先

岩手県環境保健研究センター: 〒020-0852 岩手県盛岡市飯岡新田 1-36-1

*1 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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について」平成 17 年 1 月 24 日、食安発第 0124001 号 (2005)。

実験方法

1. 試料

試料は岩手県内で市販されている牛乳、鶏卵、養殖魚（ニジマス）および牛肉を用いた。また、抗生物質のベンジルペニシリン、セファゾリンがそれぞれ検出されたウシ、ブタの筋肉および腎臓試料を用いた。

2. 試薬および標準品

溶媒：アセトニトリルおよび蒸留水はLC/MS用、メタノールは残留農薬試験用、その他の試薬は特級品で、いずれも関東化学(株)製を用いた。

標準品：関東化学(株)製、林純薬工業(株)製、和光純薬工業(株)製、肥飼料検査所製、Dr. Ehrenstorfer 社製、LKT Laboratories 社製、MP Biomedicals 社製、Riedel-de Haën 社製、Sigma Aldrich 社製、および Toronto Research 社製の標準品を用いた。

標準原液および混合標準溶液：それぞれの溶解性に依りてアセトニトリル、アセトニトリル-水(1:1)、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、メタノールを用いて溶解し100~200 µg/mL 標準原液を作製した。なお、キノロン系合成抗菌剤は少量の10 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて溶解し、蒸留水で定容した。混合標準溶液は水酸化ナトリウム水溶液に溶解したキノロン系合成抗菌剤標準品とその他の標準品グループに分けて50%メタノール溶液で希釈し、2種類の混合標準溶液を作製した(各1.0 µg/mLの動物用医薬品を含む)。なお、検量線作成および添加回収試験は2種類の混合標準溶液についてそれぞれ個別に行った。

ろ過膜：精密ろ過膜Whatman社製Anotop™ 10 (0.02 µm) (以下Anotopとする)

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製1100シリーズ
質量分析装置：Applied Biosystems社製API4000

4. HPLC条件

分析カラム：Waters社製Atlantis™ d-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径3 µm), 移動相：A液0.05%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液, B液アセトニトリル, グラジェント条件：ポジティブモード0~2分(A:B=80:20)→9~18分(A:B=10:90)→18.1~25分(A:B=80:20), ネガティブモード0~2分(A:B=80:20)→7~12分(A:B=10:90)→12.1~20分(A:B=80:20), カラム温度：40℃, 流速：0.2 mL/min, 注入量：10 µL

5. MS条件

イオン化：エレクトロスプレー(ESI)によるポジティブならびにネガティブモード, 分析モード：Multiple Reaction Monitoring (MRM) モード, イオンスプレー電圧：5.5 kV ならびに-4.5 kV, イオンソース温度：500℃

6. 検量線の作成

キノロン系合成抗菌剤標準品とその他の標準品についてそれぞれ個別に適宜希釈した混合標準溶液と動物用医薬品を含有していないことを確認した牛乳、鶏卵、ニジマスお

よび牛肉をおのおの試料調製した試験溶液を1:9で混合し、0.01, 0.1, 1 および10 ng/mL 濃度のマトリックス添加標準溶液を調製した。この標準溶液で検量線を作成し、MRMクロマトグラムのピーク面積から濃度を算出した(以下、マトリックス標準添加法)。

7. 試験溶液の調製

魚、牛肉試料はフードプロセッサーを用いペースト状になるまで磨砕均一化した。その試料5.0 gを50 mLポリエチレン遠沈管に採取し、鶏卵、ニジマスおよび牛肉試料については、水2.5 mLを加え十分に混和し、メタノール20 mL加え、30分間振とう抽出した後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。上清を25 mLメスフラスコに移し、水を加えて25 mLに定容した液1 mLを10 mLメスフラスコに分取した。その後、溶液のメタノール濃度を50%に調整し、試料の50倍希釈液を作製した。得られた希釈液をAnotopでろ過したろ液をLC/MS/MS試験溶液とした。

結果および考察

1. LC条件

今回対象とした動物用医薬品は多岐にわたり、さまざまな物理化学的性質を有することから、HPLCカラムは4種類のオクタデシルシリル化シリカゲルカラム(Atlantis™ d-C18, Cadenza CD-C18, Mightsil RP-18 GP および ZORBAX Eclipse XDB-C18) についてピーク形状、カラム保持、ピーク強度を中心に比較検討した。その結果、ペニシリン系抗生物質の保持が優れ、キノロン系のピークのテーリングがほとんどなかったAtlantis™ d-C18を用いた。

移動相に添加する揮発性の添加剤について、ギ酸(0.05%), 酢酸アンモニウム(10 mmol/L)およびギ酸(0.05%)+酢酸アンモニウム(10 mmol/L)を検討したところ、ギ酸+酢酸アンモニウムにおいて保持時間が早い動物用医薬品のピーク形状が良好であったことから0.05%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を採用した。

有機溶媒はアセトニトリルとメタノールを検討したが、アセトニトリルにおいてマクロライド系抗生物質の繰返し再現性が良好であったため、アセトニトリルを採用した。

2. MS条件

各標準原液をアセトニトリル-水(1:1)で希釈し、Q1スキャンを行い観測される[M+H]⁺, [M+2H]²⁺, [M-H]⁻などをプリカーサーイオンとしてFIA (Flow Injection Analysis) によって、MS/MSのパラメーターを最適化した。物質の選択性を上げるため、最も感度が強く得られたプロダクトイオンを定量用イオンとし、次いで感度が良かったプロダクトイオンを確認用イオンとする2つのMRMトランジションの測定条件をメベンダゾールおよびトリフェナム酸以外の96成分について設定した。なお、ペニシリン系やセファロsporin系抗生物質は両

Table 1. Compound-specific MS/MS parameters

No.	Veterinary drugs	R. T. (min) ^(a)	Quantitation				Confirmation				LOQ ($\mu\text{g/g}$) ^(b)
			MRM transition (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision exit potential (V)	MRM transition (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision exit potential (V)	
Positive mode											
1	Amprolium	3.3	243→150	26	13	20	243→94	26	15	12	0.001
2	Cefalexin	3.3	348→158	46	13	10	348→174	46	21	10	0.01
3	Cefapirin	3.3	424→292	46	21	16	424→152	46	33	10	0.01
4	Ampicillin	3.4	350→106	56	27	8	350→160	56	17	10	0.001
5	Lincomycin	4.2	407→126	61	39	10	407→359	61	25	10	0.001
6	Clopidol	4.4	192→101	76	39	6	192→87	76	43	6	0.01
7	Cefazolin	4.5	455→323	46	15	20	455→156	46	23	8	0.01
8	Procaine	4.7	237→100	46	23	6	237→120	46	29	20	0.001
9	Sulfacetamide	5.2	215→156	51	15	10	215→92	51	31	6	0.01
10	5-Hydroxythiabendazole	5.8	218→191	71	35	14	218→147	71	47	10	0.001
11	5-Propylsulfonyl-1 <i>H</i> - benzimidazole-2-amine	5.9	240→133	61	39	8	240→198	61	27	4	0.001
12	Sulfadiazine	6.0	251→156	46	23	10	251→92	46	39	16	0.001
13	Levamisole	6.2	205→178	66	31	32	205→91	66	63	14	0.01
14	Sulfathiazole	6.4	256→156	46	21	12	256→92	46	35	16	0.001
15	Sulfapyridine	7.2	250→156	46	25	26	250→92	46	35	22	0.001
16	Trimethoprim	7.5	291→230	61	33	12	291→261	61	35	20	0.001
17	Sulfamerazine	8.1	265→156	46	25	8	265→92	46	39	6	0.001
18	Ormethoprim	9.5	275→123	71	33	8	275→259	71	35	18	0.001
19	Pyrantel	9.6	207→150	71	39	10	207→136	71	43	8	0.01
20	Cefoperazone	10.3	646→530	71	15	14	646→143	71	47	10	0.01
21	Sulfadimidine	10.3	279→186	46	25	10	279→92	46	45	6	0.001
22	Sulfamethoxypyridazine	10.5	281→156	51	25	12	281→92	51	43	14	0.001
23	Morantel	10.6	221→123	51	47	8	221→111	51	35	8	0.01
24	Neospiramycin	10.6	699→174	81	39	10	699→540	81	27	14	0.01
25	Ceftiofur	10.7	524→241	51	25	14	524→125	51	79	8	0.01
26	Spiramycin	10.7	422→174	60	25	12	422→101	60	69	16	0.01
27	Xylazine	10.7	221→90	66	31	6	221→164	66	35	10	0.001
28	Benzylpenicillin	10.8	335→160	61	15	10	335→176	61	17	10	0.001
29	Sulfamonomethoxine	10.8	281→156	61	25	12	281→92	61	43	6	0.001
30	Thiabendazole	10.9	202→175	76	35	10	202→131	76	47	8	0.001
31	Phenoxymethylpenicillin	11.0	351→160	66	17	28	351→114	66	47	20	0.01
32	Pyrimethamine	11.0	249→177	81	41	14	249→233	81	39	12	0.001
33	Sulfachlorpyridazine	11.0	285→156	56	21	12	285→92	56	39	6	0.001
34	Oleandomycin	11.1	688→545	41	23	14	688→158	41	37	26	0.001
35	Oxacillin	11.1	424→265	51	21	14	424→182	51	23	12	0.01
36	Oxfendazole	11.1	316→159	66	43	8	316→191	66	29	12	0.001
37	Sulfadoxine	11.1	311→156	66	25	12	311→92	66	43	6	0.001
38	Sulfamethoxazole	11.1	254→156	61	21	14	254→92	61	35	6	0.001
39	Cloxacillin	11.2	436→277	66	19	8	436→160	66	19	10	0.01
40	Erythromycin	11.2	735→158	96	41	10	735→577	96	25	16	0.001
41	Prednisolone	11.3	361→343	36	15	10	361→147	36	33	10	0.001
42	Sulfabenzamide	11.3	277→156	51	19	12	277→92	51	41	4	0.001
43	Sulfisoxazole	11.3	268→156	61	19	8	268→92	61	21	8	0.001
44	Tripelennamine	11.3	256→211	36	19	4	256→91	36	47	6	0.001
45	Tylosin	11.3	917→174	116	53	10	917→83	116	111	14	0.01
46	Ethopabate	11.4	238→206	46	15	12	238→136	46	31	8	0.001
47	Hydrocortisone	11.4	363→121	66	33	8	363→327	66	23	8	0.001
48	Nafcillin	11.4	415→199	61	19	12	415→171	61	51	10	0.001
49	Norfloxacin	11.4	320→276	51	25	16	320→233	51	33	18	0.01
50	Ofloxacin	11.4	362→318	76	27	8	362→261	76	37	14	0.01
51	Danofloxacin	11.5	358→340	61	15	10	358→257	61	19	14	0.01
52	Dicloxacillin	11.5	470→160	66	21	10	470→311	66	19	8	0.01
53	Enrofloxacin	11.5	360→316	71	27	8	360→245	71	37	14	0.01
54	Sulfadimethoxine	11.5	311→156	66	31	10	311→92	66	45	6	0.001
55	Sulfaquinoxaline	11.5	301→156	71	23	12	301→92	71	39	6	0.001
56	Orbifloxacin	11.6	396→352	61	25	10	396→295	61	33	8	0.01
57	Oxfendazole sulfone	11.6	332→300	71	33	18	322→159	71	51	10	0.001
58	Dexamethasone	11.7	393→373	41	13	10	393→355	41	17	10	0.001
59	Kitasamycin	11.7	773→109	61	67	6	773→174	61	45	12	0.01
60	Promazine	11.7	285→86	41	25	6	285→58	41	57	2	0.001

Table 1. Continued

No.	Veterinary drugs	R. T. (min) ^{a)}	Quantitation				Confirmation				LOQ ($\mu\text{g/g}$) ^{b)}
			MRM transition (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision exit potential (V)	MRM transition (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision exit potential (V)	
61	Sarafloxacin	11.7	386→368	66	29	10	386→342	66	27	10	0.01
62	Thiamulin	11.7	494→192	61	29	4	494→119	61	55	8	0.001
63	Mebendazole	11.8	296→264	59	29	16					0.001
64	Oxibendazole	11.8	250→218	56	27	12	250→176	56	39	12	0.001
65	Flubendazole	11.9	314→282	86	31	6	314→123	86	49	20	0.001
66	Corticosterone	12.0	347→91	71	85	6	347→77	71	97	4	0.001
67	Flumequine	12.0	262→244	46	25	14	262→202	46	45	10	0.001
68	Nalidixic acid	12.0	233→215	46	21	12	233→287	46	35	12	0.001
69	Tolfenamic acid	12.0	262→209	41	39	4					0.001
70	Virginiamycin	12.0	526→508	71	19	14	526→355	71	25	10	0.001
71	Josamycin	12.1	828→109	86	65	8	828→174	86	47	14	0.01
72	β -Trenbolone	12.2	271→253	71	29	14	271→199	71	31	10	0.001
73	Flunixin	12.3	297→279	61	31	6	297→264	61	47	18	0.001
74	Ketoprofen	12.3	255→209	51	19	4	255→105	51	31	7	0.001
75	Oxolinic acid	12.3	262→216	46	41	18	262→244	46	25	6	0.001
76	Sedecamycin	12.3	301→156	46	17	10	301→92	46	77	14	0.01
77	Triflupromazine	12.3	353→58	56	69	10	353→86	56	37	14	0.001
78	5-Chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)- benzimidazole-2-one	12.7	329→168	86	41	8	329→105	86	65	6	0.01
79	Fenbendazole	12.6	300→268	46	29	14	300→159	46	45	26	0.001
80	Famphur	12.8	326→281	56	21	16	326→217	56	27	12	0.01
81	Rifaximin	12.8	786→754	71	31	22	786→95	71	89	6	0.001
82	Novobiocin	13.2	613→189	56	41	10	613→218	56	19	12	0.001
83	Febantel	13.4	447→383	66	27	10	447→415	66	19	12	0.001
84	Triclabendazole	14.1	359→344	71	39	10	359→274	71	52	8	0.001
85	Chlormadinone acetate	14.3	405→345	51	19	10	405→309	51	23	8	0.001
86	Melengestrol acetate	14.5	397→337	76	19	10	397→279	76	27	8	0.001
87	Temephos	15.7	467→405	76	21	12	467→419	76	27	12	0.01
88	Allethrin	16.1	303→135	36	15	8	303→93	36	19	6	0.01
89	Lasalocid	17.7	613→377	91	49	10	613→578	91	45	16	0.001
Negative mode											
1	Cefuroxime	8.7	423→207	-35	-18	-3	423→318	-35	-12	-7	0.01
2	Thiamphenicol	8.8	354→185	-65	-28	-11	354→290	-65	-16	-7	0.01
3	Florfenicol	9.0	356→336	-60	-12	-9	356→185	-60	-26	-11	0.001
4	Clorsulon	9.2	378→342	-60	-16	-9	378→142	-60	-40	-1	0.01
5	Zeranol	9.7	321→277	-75	-30	-7	321→303	-75	-30	-7	0.001
6	Nicarbazine	10.2	301→137	-55	-16	-1	301→107	-55	-48	-5	0.001
7	Diclazuril	10.4	405→334	-60	-26	-7	405→42	-60	-24	-7	0.001
8	Bithionol	11.1	355→163	-60	-34	-11	355→194	-60	-34	-1	0.001
9	Closantel	11.7	661→127	-70	-70	-7	661→345	-70	-50	-5	0.01

^{a)} Retention time^{b)} Limit of quantification ($S/N \geq 10$)

Fig. 1. Distribution of particle size according to methanol concentration in 50-fold dilution of the extracted samples

モードでイオンが確認され、セフロキシム以外はポジティブモードの感度が良好であった。この結果、ポジティブモードで 89 成分、ネガティブモードで 9 成分の一斉分析が可能であった。各物質の MS/MS パラメーターと定量下限値 ($S/N \geq 10$) を Table 1 に示した。定量下限値は $0.001 \sim 0.01 \mu\text{g/g}$ の範囲で、プレドニゾロンとデキサメタゾンを除く 96 成分については、検討した全試料において基準値レベルの分析に対し十分な感度を有していた。試料別に見ると、プレドニゾロンは牛肉については適用可能であった。デキサメタゾンの場合、鶏卵およびニジマスでは不検出とされており、検出限界値として示されている値 ($0.00005 \mu\text{g/g}$) を確保できなかったため本法を適用できなかったが、牛乳および牛肉については適用可能であった。

Fig. 2. LC/MS chromatograms of the extracted solution of milk filtered by Anotop (TIC, $m/z=300\sim400$) (A) 0.2 μm diameter pores, (B) 0.02 μm diameter pores

MS conditions:

Ionization mode: positive ion electron spray, source block temp.: 100°C, desolvation temp.: 350°C, Gas: nitrogen, flow rate: 350 L/hr, capillary voltage: 3.5 eV, cone voltage: 30 V

3. 精密ろ過膜の検討

牛乳、鶏卵試料の50倍希釈液について粒度分布測定器(Malvern社製, Zetasizer Nano-ZS)を用いて粒子径を測定した結果をFig. 1に示した。粒子径はメタノール濃度によって変化し、メタノール濃度を50%に調整した場合、100~200 nmの粒子径に正規分布し、農作物においても同じ挙動が観察されている¹¹⁾。粒子径はメタノール濃度や希釈倍率による影響を受け、溶液中の粒子径が大きくなると目詰まりを生じやすくなる。また、試料が畜水産物の場合、農産物に比べ限外ろ過膜では目詰まりを起こし全量ろ過できない事例が見受けられた。

精密ろ過膜は分析サンプルの前処理に用いられることが多く、孔径0.1~0.45 μm のシリンジフィルタータイプが汎用される。Anotopは0.02, 0.1および0.2 μm のサイズがあり、蜂の巣状の微細孔を持つ対称構造の膜である。今回検討した0.02 μm のAnotopは、孔径を考慮すると、希釈液中に生成したコロイド状粒子は排除されていると推測される。

牛乳試料に0.2 $\mu\text{g/g}$ 相当の混合標準液を添加した50倍希釈液を限外ろ過膜ULTRAFREE-MC 30000(Millipore社製)とAnotopでそれぞれ処理し、ろ過膜の比較を行ったところ、回収率70~120%かつCV20%以下の薬剤は限外ろ過膜で88成分、Anotopで94成分とAnotopのほうが多くの薬剤に適用できた。この原因として、検討した二つのろ過膜は膜の素材、構造などが異なることから動物用医薬品の膜への吸着性の違いが考えられた。

精製効果を確認するため、牛乳試料を用いて0.2および0.02 μm サイズのAnotopでろ過した試験溶液をLC/MS

でトータルイオンクロマトグラム(TIC)を測定した。装置は日本ウォーターズ(株)製Alliance LC/MSシステム(HPLC: Alliance2690, MS: ZMD4000)を用い、HPLC条件は実験方法4の条件で行なった。 m/z 100から m/z 600の範囲で100ずつ区切ってTICを測定したところ、 $m/z=300\sim400$, $m/z=400\sim500$, $m/z=500\sim600$ のクロマトグラムにおいて0.02 μm サイズのAnotopの精製効果が確認された。Fig. 2に $m/z=300\sim400$ のクロマトグラムを示したが、妨害ピークが除去され、良好なクロマトグラムが得られた。

4. マトリックスによるイオン化への影響

LC/MS/MSによる測定は試料中の夾雑成分の影響を受け、イオン化抑制や促進効果いわゆるマトリックス効果を受けることが知られている^{1)~5)}。このマトリックス効果を補正する方法として安定同位体等による内部標準添加法が推奨されるが^{1), 2), 12)}、多成分分析の場合、定量対象物質に対応した内部標準品を選定することは困難である。今回、対象とした4試料についてポジティブモードで測定する84化合物について試験溶液に10 ng/mL濃度になるように標準溶液を添加してシリンジスパイクを行い、マトリックス効果を確認した。牛乳試料の場合、65成分が100±20%のスパイク回収率が得られ、50%以下は2成分であった。なお、同じ成分でも試料の種類によってマトリックス効果の程度は異なっていた。そこで、本試験法では定量の精度を高めるため、マトリックス標準添加法を用いた。

5. 添加回収試験

あらかじめ動物用医薬品が含有していないことを確認した4種類の試料に混合標準溶液を0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように

Table 2. Recoveries of veterinary drugs added to livestock products and fish

No. Veterinary drugs		Recovery (%) ^{a)}							
		Milk		Egg		Rainbow trout		Cattle muscle	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Positive mode									
1	Amprolium	97.5	9.4	97.8	8.8	103.8	6.5	100.0	5.1
2	Cefalexin	93.3	13.3	84.9	10.2	61.3	11.7	74.4	11.9
3	Cefapirin	115.6	4.9	89.6	1.1	89.2	15.4	76.1	7.3
4	Ampicillin	81.8	16.5	78.0	0.3	70.3	6.3	75.6	3.9
5	Lincomycin	96.3	4.2	84.8	6.4	77.0	4.9	78.7	6.2
6	Clopidol	95.0	8.2	83.1	7.8	93.3	6.2	81.3	12.1
7	Cefazolin	110.0	1.2	99.2	8.1	79.4	5.8	64.6	4.7
8	Procaine	88.7	4.8	76.9	4.1	73.9	4.3	85.1	6.8
9	Sufacetamide	101.6	6.9	88.9	9.6	73.8	8.1	82.7	11.8
10	5-Hydroxythiabendazole	94.9	5.6	80.6	6.0	72.7	5.1	82.5	7.1
11	5-Propylsulfonyl-1 <i>H</i> -benzimidazole-2-amine	94.6	3.4	84.1	4.7	75.6	5.1	77.0	7.1
12	Sulfadiazine	94.0	4.9	82.9	4.4	75.3	6.3	83.9	6.4
13	Levamisole	95.4	8.1	81.4	3.2	74.9	9.9	77.9	6.2
14	Sulfathiazole	92.8	5.0	83.8	4.8	75.5	5.2	80.7	7.5
15	Sulfapyridine	94.5	3.1	79.8	2.7	76.4	3.9	80.0	5.7
16	Trimethoprim	94.0	4.9	83.0	3.2	72.3	3.3	78.7	3.7
17	Sulfamerazine	94.1	5.3	81.2	4.1	74.8	1.5	78.6	7.4
18	Ormethoprim	81.8	2.9	90.7	9.3	71.3	3.2	74.3	13.1
19	Pyrantel	91.8	9.6	73.0	15.1	67.0	13.1	82.0	23.4
20	Cefoperazone	107.3	6.9	87.3	5.9	88.6	5.2	75.8	6.9
21	Sulfadimidine	90.8	9.1	89.9	7.0	76.8	5.9	84.4	8.6
22	Sulfamethoxypyridazine	93.8	7.3	88.0	6.9	76.9	5.3	86.1	7.7
23	Morantel	83.3	8.3	82.8	8.6	83.3	3.1	85.9	5.5
24	Neospiramycin	69.8	11.7	65.6	5.0	70.2	3.8	80.3	5.0
25	Ceftiofur	101.8	3.9	81.5	6.4	76.3	5.5	75.7	5.0
26	Spiramycin	91.2	3.9	81.1	0.6	83.6	6.7	75.8	11.0
27	Xylazine	86.1	7.1	77.5	6.2	72.9	4.6	80.0	8.5
28	Benzylpenicillin	100.7	3.4	86.4	4.6	83.9	1.8	79.6	4.9
29	Sulfamonomethoxine	93.8	16.3	97.0	12.0	77.8	19.2	92.4	13.3
30	Thiabendazole	86.3	5.7	85.3	8.6	76.7	7.6	78.8	10.3
31	Phenoxymethylpenicillin	103.8	1.7	87.4	5.6	75.8	4.1	77.9	12.2
32	Pyrimethamine	90.2	6.5	84.3	8.2	66.0	7.6	74.6	7.0
33	Sulfachlorpyridazine	109.1	12.1	96.3	12.5	69.3	20.6	81.2	10.7
34	Oleandomycin	85.8	2.4	78.2	1.0	76.0	3.8	74.9	5.7
35	Oxacillin	103.7	10.7	116.3	11.2	104.5	8.5	83.6	7.2
36	Oxfendazole	103.6	9.7	103.6	11.4	84.2	9.8	99.0	8.0
37	Sulfadoxine	103.4	7.1	92.7	5.9	78.8	11.6	92.2	7.9
38	Sulfamethoxazole	109.6	12.8	101.9	7.5	86.8	15.1	97.8	9.6
39	Cloxacillin	99.0	7.2	104.8	6.2	82.5	3.1	71.4	6.9
40	Erythromycin	85.8	6.3	79.8	2.1	75.7	1.5	77.7	2.6
41	Prednisolone	106.3	5.2	90.4	7.2	81.3	6.2	93.9	9.3
42	Sulfabenzamide	106.4	6.3	92.7	9.2	74.5	6.3	83.8	7.3
43	Sulfisoxazole	110.4	14.9	97.9	9.4	71.7	19.2	90.6	9.2
44	Tripelennamine	89.7	3.7	79.2	4.2	77.8	6.3	82.8	9.7
45	Tylosin	72.9	20.9	71.3	4.2	74.0	10.0	72.8	3.2
46	Ethopabate	95.0	4.3	89.1	6.6	80.4	4.7	82.5	8.7
47	Hydrocortisone	97.0	4.5	86.8	10.9	79.2	11.7	77.1	3.8
48	Nafcillin	84.9	3.2	89.3	7.3	65.4	8.0	67.2	6.6
49	Norfloxacin	54.7	14.4	32.9	10.7	146.3	1.6	36.3	28.7
50	Ofloxacin	82.0	12.2	71.7	7.7	141.6	2.9	32.8	19.7
51	Danofloxacin	70.2	15.0	48.3	15.8	158.5	6.6	35.7	36.6
52	Dicloxacillin	90.8	5.6	88.1	3.9	75.8	3.1	83.9	9.0
53	Enrofloxacin	93.3	9.9	74.9	7.9	136.5	3.3	34.2	16.8
54	Sulfadimethoxine	101.4	10.7	98.6	9.9	79.0	16.5	91.0	11.7
55	Sulfaquinoxaline	108.2	15.6	109.9	17.4	80.7	22.3	95.2	12.9
56	Orbifloxacin	116.6	1.0	101.3	4.3	119.3	1.4	98.8	0.8
57	Oxfendazole sulfone	105.4	7.8	98.3	9.3	74.1	14.8	94.3	7.4
58	Dexamethasone	105.1	9.7	100.8	12.8	77.7	9.4	89.1	10.4
59	Kitasamycin	99.0	5.5	74.3	7.7	77.0	17.6	60.8	5.4
60	Promazine	86.0	6.0	69.3	4.7	58.0	4.0	66.8	9.1

Table 2. Continued

No.	Veterinary drugs	Recovery (%) ^{a)}							
		Milk		Egg		Rainbow trout		Cattle muscle	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
61	Sarafloxacin	74.5	2.1	51.1	3.6	105.3	4.4	41.0	12.8
62	Thiamulin	87.2	2.6	78.9	1.3	72.8	2.3	76.0	5.4
63	Mebendazole	107.0	13.2	98.3	13.9	81.6	6.6	90.4	11.8
64	Oxibendazole	98.1	7.9	93.9	6.5	73.1	8.0	87.9	5.9
65	Flubendazole	104.9	5.2	101.7	10.1	73.3	17.4	90.3	8.4
66	Corticosterone	105.3	17.5	92.1	6.8	75.3	15.0	79.0	6.8
67	Flumequine	80.8	11.0	26.6	40.2	64.3	14.3	74.7	7.0
68	Nalidixic acid	82.1	15.7	11.5	26.1	65.7	13.2	72.6	8.6
69	Tolfenamic acid	81.6	12.9	24.7	41.3	66.0	13.5	76.6	6.9
70	Virginiamycin	89.6	4.3	82.2	1.0	75.4	1.1	77.8	4.0
71	Josamycin	90.9	9.2	78.9	3.3	82.2	8.9	67.0	14.2
72	β -Trenbolone	93.7	11.5	90.7	9.8	72.7	15.0	82.1	6.4
73	Flunixin	99.0	10.0	92.5	11.6	72.3	17.1	77.5	8.6
74	Ketoprofen	95.8	2.6	85.2	1.4	75.6	2.3	78.0	8.6
75	Oxolinic acid	125.0	0.8	62.8	7.6	139.8	1.9	71.0	8.6
76	Sedecamycin	103.0	6.3	98.3	6.4	82.2	10.6	78.8	7.8
77	Triflupromazine	85.8	6.1	69.5	5.6	62.9	5.4	70.6	6.4
78	5-Chloro-6-(2, 3-dichlorophenoxy)- benzimidazole-2-one	87.4	13.1	77.5	18.3	77.3	4.0	66.2	26.9
79	Fenbendazole	103.1	9.1	90.1	9.9	70.3	10.2	84.8	9.4
80	Famphur	90.3	3.6	88.7	6.5	75.4	1.7	87.2	15.5
81	Rifaximin	112.6	10.9	67.9	8.4	83.5	16.3	95.5	10.5
82	Novobiocin	87.2	8.9	74.7	4.1	68.2	3.3	68.0	1.3
83	Febantel	92.8	6.3	81.3	6.2	75.3	3.3	83.3	7.9
84	Triclabendazole	114.1	14.7	68.6	5.7	65.1	4.7	76.6	8.9
85	Chlormadinone acetate	102.6	18.2	75.8	15.2	69.8	13.1	83.3	11.5
86	Melengestrol acetate	99.3	13.2	79.7	5.2	72.9	10.7	80.3	7.7
87	Temephos	84.0	9.9	73.9	13.1	64.2	6.4	77.9	10.5
88	Allethrin	83.4	7.7	75.3	5.6	67.7	10.7	77.2	16.5
89	Lasalocid	152.0	11.4	111.8	16.6	85.8	13.9	96.6	7.5
Negative mode									
1	Cefuroxime	75.9	8.3	84.0	11.3	91.6	7.4	61.1	7.4
2	Thiamphenicol	89.8	3.9	81.3	2.4	92.2	1.8	76.3	3.5
3	Florfenicol	90.3	0.8	86.0	2.3	100.8	4.9	75.5	1.3
4	Clorsulon	84.7	2.5	74.2	0.2	93.0	5.2	69.0	0.7
5	Zeranol	84.0	1.3	81.3	1.2	90.8	2.4	77.0	3.1
6	Nicarbazine	79.8	1.4	68.0	1.3	70.5	2.5	68.8	2.4
7	Diclazuril	91.9	2.0	81.0	2.5	92.6	1.6	70.9	1.9
8	Bithionol	73.0	4.6	59.8	4.2	70.3	1.6	64.4	3.5
9	Closantel	85.4	0.9	82.1	1.2	69.7	1.5	65.8	2.0

^{a)} Sample was spiked with 0.2 $\mu\text{g/g}$ of each veterinary drugs
 $n=3$

Table 3. Comparison between the results of the proposed method and official methods in livestock products contaminated with veterinary drugs

Vetrinary drugs	Sample	Proposed method residue ($\mu\text{g/g}$)	Official method residue ($\mu\text{g/g}$)
Benzylpenicillin	Cattle muscle	0.003	0.002
Benzylpenicillin	Cattle kidney	0.19	0.18
Benzylpenicillin	Pig muscle	0.06	0.05
Benzylpenicillin	Pig kidney	0.15	0.12
Cefazolin	Cattle muscle	3.9	4.2
Cefazolin	Cattle kidney	17.8	23.0

添加したときの回収率を求めた。Table 2 に示したように、検討したすべての試料において回収率 70~120% かつ CV20% 以下であった薬剤は 66 成分で、試料別では牛乳 94, 鶏卵 84, ニジマス 77, 牛肉 81 成分と違いが認められた。全試料において回収率 50~150%, CV 20% 以下であった薬剤を本法によるスクリーニング検査が適用可能と考えた場合、98 成分中 87 成分が分析可能であった。また、鶏卵および牛肉試料ではフルオロキノロン剤の回収率が 50% 未満の低回収率を示すものがあった。この原因としてろ過膜への吸着¹³⁾や抽出が不十分なことが考えられた。キノロン剤の抽出溶媒としてギ酸⁶⁾やメタリン酸¹⁴⁾をアセトニトリルに添加し酸性下で抽出する方法が報告されており、今回用いたメタノールでは試料の種類によっては十分抽出されないことが考えられ、本法を適用することは困難と考えられた。

6. 公定検査法との比較

ベンジルペニシリン、セファゾリンが残留するウシ、ブタの筋肉および腎臓試料を用いて本法と公定検査法^{*1}による分析値を比較し、Table 3 に示した。公定検査法^{*1}のベンジルペニシリン試験法によって得られた試験溶液を LC/MS/MS にて測定した分析値と、本法の分析値とはほぼ一致した。セファゾリンの場合、本法では筋肉 3.9 $\mu\text{g/g}$ 、腎臓 17.8 $\mu\text{g/g}$ に対し、公定検査法^{*1}ではそれぞれ 4.2 $\mu\text{g/g}$ 、23 $\mu\text{g/g}$ と高めの値であった。この原因として、公定検査法^{*1}で得られた試験溶液については 80 倍に希釈し測定したため、希釈倍率の違いが影響したものと考えられた。

ベンジルペニシリンについて定量用イオンに対する確認用イオンの比を標準品、マトリックス添加標準品および実試料ごとに比較した。標準品の 0.94 に対し、マトリックス標準品とウシ、ブタの筋肉および腎臓試料では 0.91~0.96 の範囲でイオン比はほぼ一致していた。

8. 実態調査

本法を用いて市販の鶏卵 20 検体について、試験法としての妥当性を確認した 84 成分を対象に残留実態調査を実施したところ、いずれの検体からも動物用医薬品は検出されなかった。

ま と め

畜水産物中の残留動物用医薬品 98 成分について LC/MS/MS による一斉分析法を検討した。

1. 前処理法はメタノールで抽出後、水を加え、メタノール濃度 50% に調整した試料の 50 倍希釈液を孔径 0.02 μm の精密ろ過膜 Anotop で精製した。
2. 定量下限値は 0.001~0.01 $\mu\text{g/g}$ の範囲で、プレドニゾロンとデキサメタゾンを除く 96 成分について基準値レベルの分析が可能であった。
3. 0.2 $\mu\text{g/g}$ 濃度の添加回収試験で回収率 70~120% の回収率が得られたのは 66 成分、50~150% の回収率が得られたのは 87 成分であった。

4. 抗生物質が検出された試料を用いて、本法と公定検査法を比較したところ、値はほぼ一致し、十分な真度で分析可能であった。
5. 本法を適用して、市販の鶏卵 20 検体について残留実態調査を行ったところ、いずれの検体からも動物用医薬品は検出されなかった。
6. 本法は固相抽出処理、濃縮操作を省略でき、迅速かつ簡易に物性の異なる多くの薬剤について一斉分析可能なことから、畜水産物中の残留動物用医薬品スクリーニング法として有用であると考えられる。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、試料を提供していただいた岩手県食肉衛生検査所関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Riediker, S., Stadler, R. H. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **73**, 1614-1621 (2001).
- 2) Hatano, K. 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).
- 3) Yamada, R., Kozono, M., Ohmori, T., Kato, M., Morimatsu, F., Kitayama, M. Multi-residue analysis of residual veterinary drugs in muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Seikatsu Eisei (Journal of Urban Living and Health Association)*, **49**, 152-160 (2005).
- 4) Hashimoto, T., Kaji, M., Namikawa, M., Komeda, M., Niimi, T., Yoshii, K., Morita, K., Kawakami, M., Tsuji, Y., Kawakatsu, T. Simultaneous determination of residual animal drugs in livestock products and seafoods by LC/MS/MS. *Kyotoshi Eiseikougai Kenkyusho Nenpo (Annual Report of Kyoto City Institute of Health and Environmental Sciences)*, **76**, 122-130, (2006).
- 5) Ishii, R., Horie, M., Murayama, M., Maitani, T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 277-283 (2006).
- 6) Hatano, K. Simultaneous determination of quinolones in foods by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 239-244 (2004).
- 7) Kai, S., Akaboshi, T., Kishi, M., Kanazawa, H., Kobayashi, S. Analysis of benzimidazole anthelmintics in livestock foods by HPLC/MS/MS. *BUNSEKI KAGAKU*, **54**, 775-782 (2005).
- 8) Yamada, R., Kozono, M., Ohmori, T., Morimatsu, F., Kitayama, M. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken

- muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 54–65 (2006).
- 9) Tagiri-Endo, M., Yanagita, N. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in muscle by on-line solid phase extraction/high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *BUNSEKI KAGAKU*, **56**, 317–326 (2007).
- 10) Hatakeyama, E., Kajita, H., Sugawara, T., Sasaki, A., Takahashi, S., Komukai, T. Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by LC/MS/MS using clean-up with ultrafiltration. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 137–145 (2006).
- 11) Kajita, H. Practical use and technical notice of ultrafiltration membrane for analysis of pesticide residues and veterinary drugs in foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, J5–6 (2007).
- 12) (社)日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会編集. “液クロの巻”, 茨城, 筑波出版会, 2003, p. 136–137.
- 13) 長浜邦雄監修. 普及版高純度化技術大系 “第2巻分離技術”, 東京, フジテクノシステム, 2001, p. 605–656.
- 14) Horie, M., Saito, K., Hoshino, Y., Terada, H., Nakazawa, H. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in meat and fish by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 329–334 (1997).