

STQ 法を用いた動物用医薬品一斉分析への応用の検討

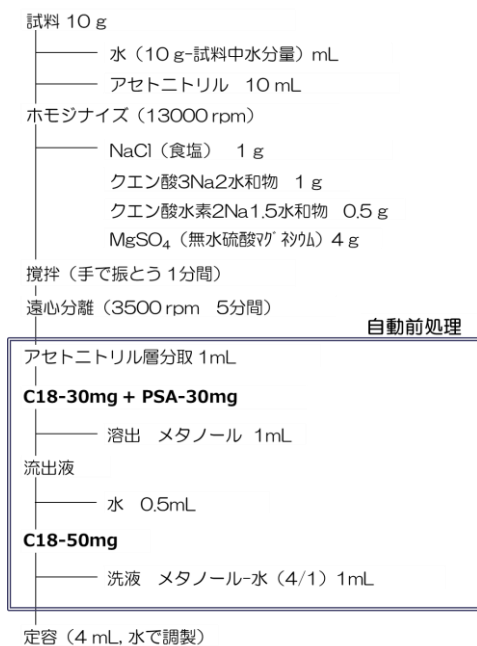
○小西賢治、松尾俊介、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

【目的】食品中残留動物用医薬品分析において厚生労働省より一斉試験法¹⁾が通知されている。抽出、精製そして濃縮乾固など操作が煩雑で熟練度を要する場合がある。そこで今回、簡便さと精製を両立した残留農薬迅速一斉分析法として挙げられるSTQ法による動物用医薬品分析への応用を検討した。

【方法】 試料：豚赤身、鶏ささみ（市販）、標準試薬：PL動物薬LC/MS Mix1（林純薬工業）、固相カートリッジ：Smart-SPE（アイスティサイエンス）、自動前処理装置：全自動固相抽出装置ST-L300（アイスティサイエンス）

添加回収試験：試料中濃度0.05ppmとなるように動物用医薬品標準品を添加し、添加回収試験を行った。

前処理フロー



装置及び測定条件

装置	LC:Prominence(島津製作所) MS/MS: API3200 system(エービー・サイエックス)
分析カラム	YMC-Triart C18
移動相	A: 0.05%ギ酸 B: アセトニトリル
流速	0.2mL/min
注入量	5 µL
イオン化モード	ESI Positive
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring)

【結果】

サルファ剤および葉酸拮抗剤27成分中豚赤身で24成分、鶏ささみにおいて23成分で70-120%の回収率が得られた。

【考察】

アセトニトリルによる抽出：

サルファ剤および葉酸拮抗剤は比較的高極性 (LogPow<1) の成分が多く、水層への分配が懸念される。添加回収試験の結果より、アセトニトリルへの分配が可能であった。

固相ミニカートリッジによる精製効果：

食肉中には、多量の脂質および脂肪酸が含まれており、無極性固相C18で脂質を、陰イオン交換系固相PSAで脂肪酸の除去が可能であったと思われる。流出液に水を添加して溶媒の極性を調整しC18に通液することで、HPLC分析カラムへの夾雑物負荷を軽減できた。十分な精製を行うことで、イオン化抑制を軽減し絶対検量線による定量が可能になったのではないかと推測される。

1)厚生労働省 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

(A-11)

STQ法を用いた動物用医薬品 一斉分析への応用の検討

- 小西賢治、松尾俊介、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

検討内容

残留農薬一斉分析法としてこれまで報告してきたSTQ法をもとに、動物用医薬品分析法の検討を行った。

① LC-MS/MSによる標準溶液の測定

LC-MS/MSによる標準溶液の測定を実施した。

② QuEChERS法による抽出工程の評価

水に標準溶液を添加して液液分配を実施した。

③ 固相ミニカラムによる精製の検討

実サンプルによる添加回収試験を実施した。

・ 鶏ささみ ・ 豚赤身 ・ 牛赤身

多段階添加回収試験により各工程における性能評価を実施した。

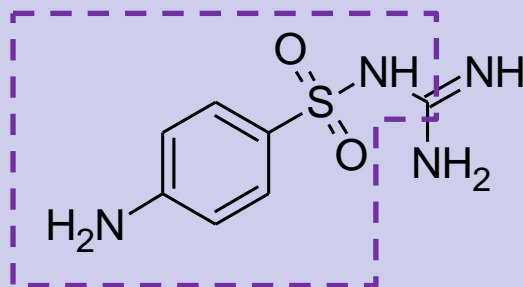
対象成分

安定性、組織移行性が高く畜水産物に残留する可能性が高いサルファ剤及び葉酸拮抗剤を分析対象とした。

⇒PL動物薬 LC/MS Mix1（林 純薬工業）を使用した。

サルファ剤（23成分）

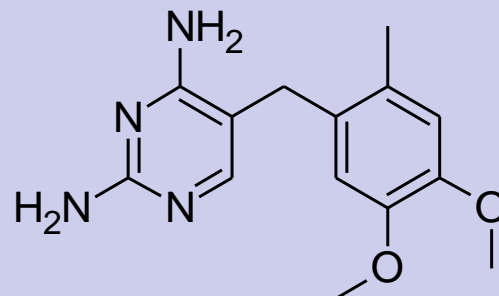
基本骨格



例：) スルファグアニジン

ベンゼンスルホンアミド基を基本骨格に持つ化合物
LogPow < 2の成分が多数

葉酸拮抗剤（4成分）



例：) オルメトプリム

サルファ剤と配合して合剤として使用される。

検討① LC-MS/MSによる標準溶液の測定

目的

LC-MS/MSによる測定条件の確立

LC	: Prominence (島津製作所)
MS/MS	: API3200 (エービー・サイエックス)
カラム	: YMC-Triart C18 (ワイエムシィ)
移動相	: A…0.05%ギ酸 B…アセトニトリル
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5uL
イオン化モード	: ESI Positive
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

東京都安研 神田氏の資料*を参考に測定条件を検討した。

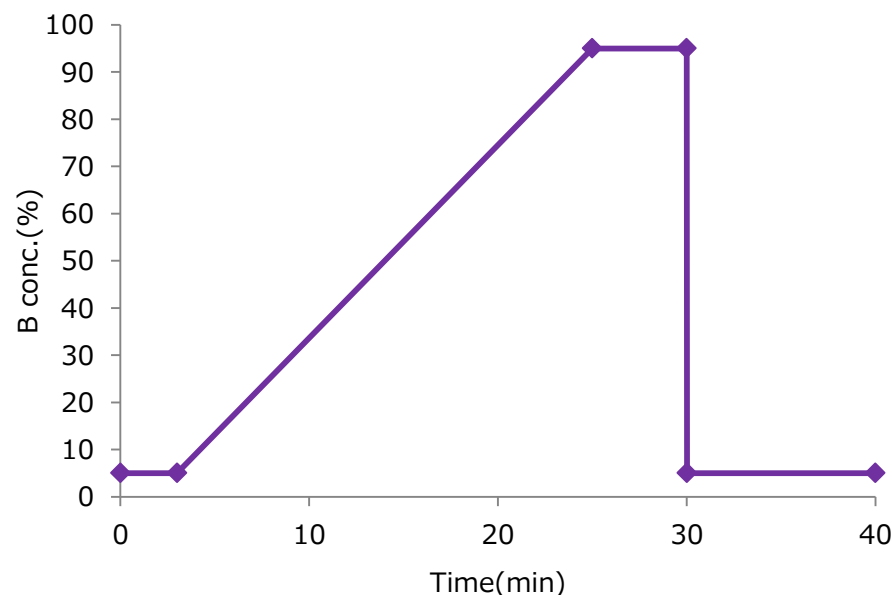
*神田真軌,第104回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集,2012年,P.102

検討① LC-MS/MSによる標準溶液の測定

測定条件

Name	RT	定量		定性	
		Q1	Q3	Q1	Q3
Sulfaguanidine	3.65	215	156	215	92
Sulfacetamide	9.08	215.1	156.1	215.1	92.1
Sulfisomidin	9.69	279.1	124.1	279.1	186.1
Diaveridine	10.6	261.2	245.1	261.2	123.2
Sulfathiazole	10.7	256	156	256	92.2
Trimethoprim	11	291.1	230.3	291.1	261.3
Sulfapyridine	11	250	156.2	250	92.2
Sulfadiazine	11.1	251.1	156.2	251.1	92.2
Ormetoprim	11.5	275.2	123.1	275.2	81.1
Sulfamerazine	11.5	265.1	108	265.1	92.2
Sulfadimidine	12.5	279.1	92.1	279.1	65.1
Sulfamonomethoxine	12.5	281.1	92.1	281.1	156.1
Sulfisozole	12.6	240.1	156.2	240.1	92.1
Sulfachlorpyridazine	13.6	285.1	156	285.1	92.2
Pyrimethamine	13.8	249.1	177.2	249.1	198.2
Sulfamethoxypyridazine	14.1	281.1	156.1	281.1	92.1
Sulfamethoxazole	14.1	254	156	254	92.1
Sulfadoxine	14.2	311.1	156.1	311.1	92.1
Sulfaethoxypyridazine	14.3	295.1	156.2	295.1	92.2
Sulfatroxazole	14.3	268.1	156.2	268.1	92.1
Sulfisoxazole	14.6	268.1	156.2	268.1	92.1
Sulfabenzamide	15.4	277	156	277	92
Sulfadimethoxine	15.6	311.1	156.2	311.1	92.1
Sulfaquinoxaline	15.6	301	156.2	301	92.3
Sulfantran	17.3	336.1	134.1	336.1	65
Sulfabromomethazine	17.49	357	156.2	357	92
Sulfanilamide	-	173.1	93.2	173.1	76.1

time(min)	0	3	25	30	30.01	40
A conc.(%)	95	95	5	5	95	95
B conc.(%)	5	5	95	95	5	5



結果

スルファニルアミドを除く26成分のピーク測定が可能であった。

検討② QuEChERS法による抽出工程の評価

目的

水-アセトニトリル系における高極性成分の挙動調査（標準のみ）

超純水 10g

— アセトニトリル 10mL

— NaCl 1g

クエン酸3Na 1g

クエン酸水素2Na 0.5g

硫酸Mg(無水) 4g

遠心分離(3500rpm 5min)

アセトニトリル層

水で10倍希釈

LC-MS/MS測定 ※10倍希釈

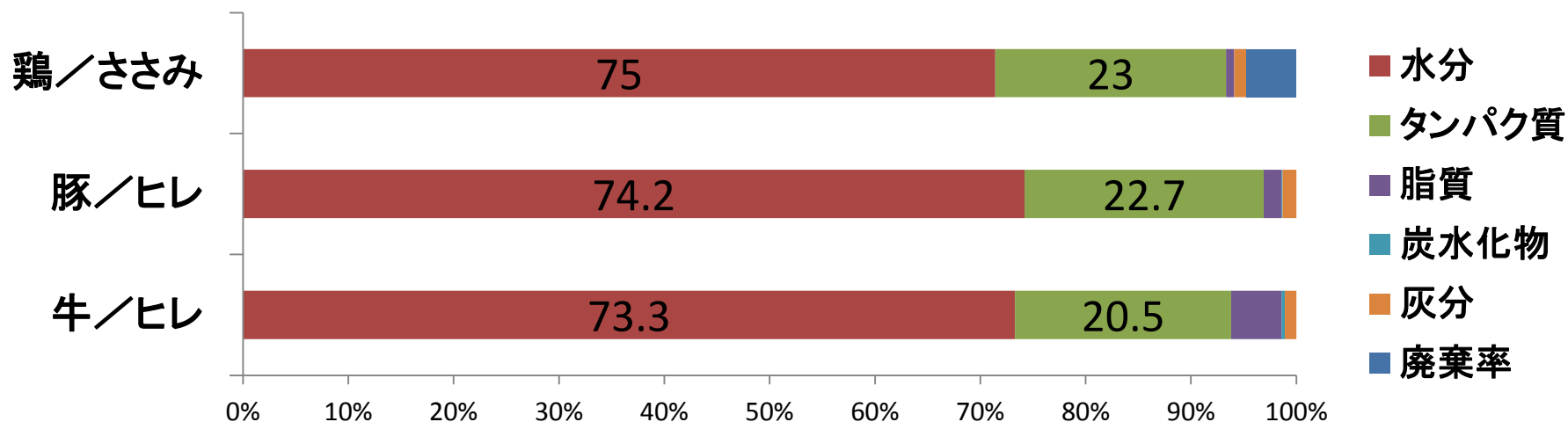
Sample Name	回収率 (%)
Diaveridine	99.4
Ormetoprim	117.6
Pyrimethamine	104.0
Sulfabenzamide	90.0
Sulfabromomethazine	97.4
Sulfacetamide	69.7
Sulfachlorpyridazine	94.3
Sulfadiazine	84.6
Sulfadimethoxine	86.4
Sulfadimidine	94.8
Sulfadoxine	85.8
Sulfaethoxypyridazine	92.1
Sulfaguanidine	97.4
Sulfamerazine	99.3
Sulfamethoxazole	80.1
Sulfamethoxypyridazine	105.2
Sulfamonomethoxine	90.4
Sulfanilamide	-
Sulfanitran	90.9
Sulfapyridine	109.8
Sulfaquinoxaline	85.0
Sulfathiazole	94.7
Sulfatroxazole	93.8
Sulfisomidin	94.0
Sulfisoxazole	89.9
Sulfisozole	91.9
Trimethoprim	119.3

検討② QuEChERS法による抽出工程の評価

QuEChERS法による抽出のメリット

- ① 遠心分離による迅速な液液分配
- ② 有機溶媒（アセトニトリル）による除タンパク効果
- ③ 緩衝液による幅広い成分への抽出

食品中成分表



検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

目的

実サンプルを用いた前処理の性能評価

- Point2** 試料 10g ← **Point1** 標準液添加① (抽出前添加)
- Point3** 水 2mL
- アセトニトリル 10mL
- ホモジナイズ (13000 rpm)
- 30分/4検体
- NaCl 1g
- クエン酸3Na 1g
- クエン酸水素2Na 0.5g
- 硫酸Mg(無水) 4g
- 攪拌 (手で振とう 1min)
- 遠心分離(3500rpm 5min)
- アセトニトリル層 ← **Point3** 標準液添加② (抽出後添加)

Point1

多段階添加回収試験による
各工程の性能評価

Point2

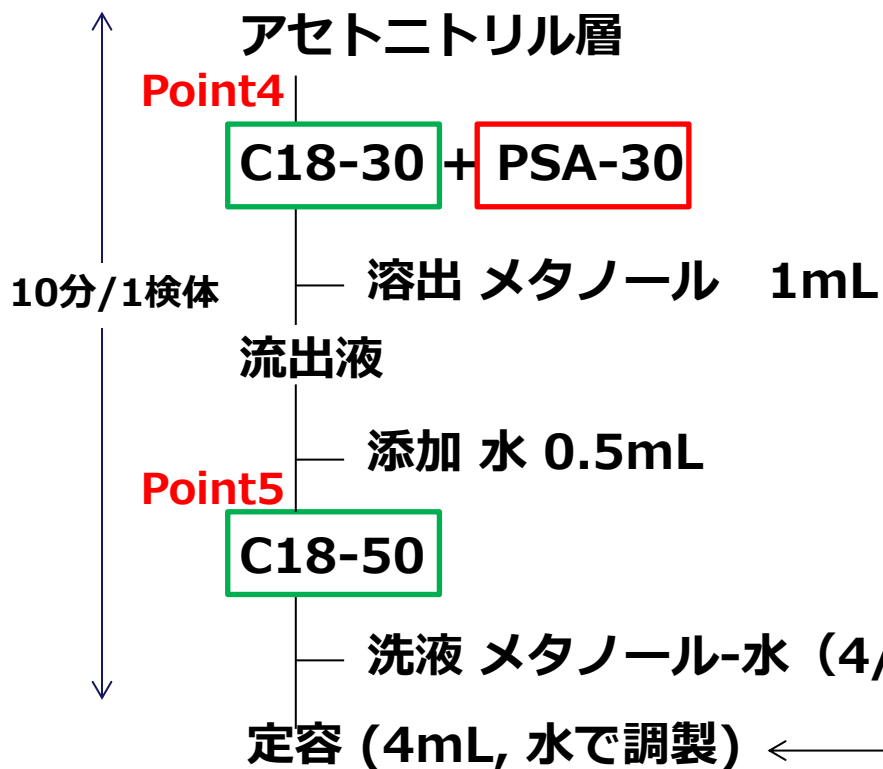
凍結粉碎でパウダー状に粉碎



Point3

水分量≒抽出溶媒

検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討



※アセトニトリル : メタノール : 水
= 1 : 0.8 : 1.2

Point1

多段階添加回収試験による
各工程の性能評価

Point4

C18…脂質、低極性成分
PSA…脂肪酸

Point5

極性を調整してC18に通液

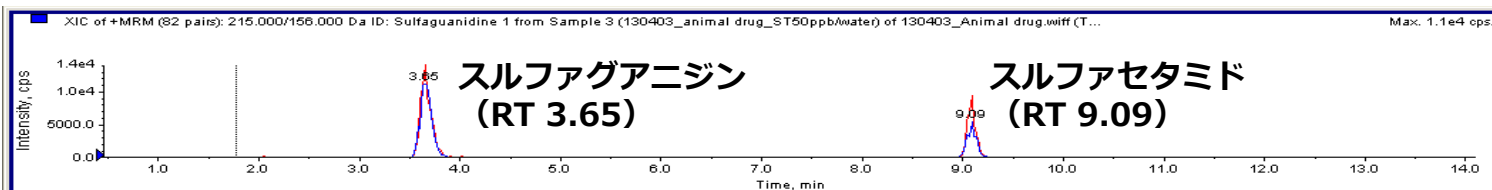


※自動前処理装置により
固相抽出操作を実施。

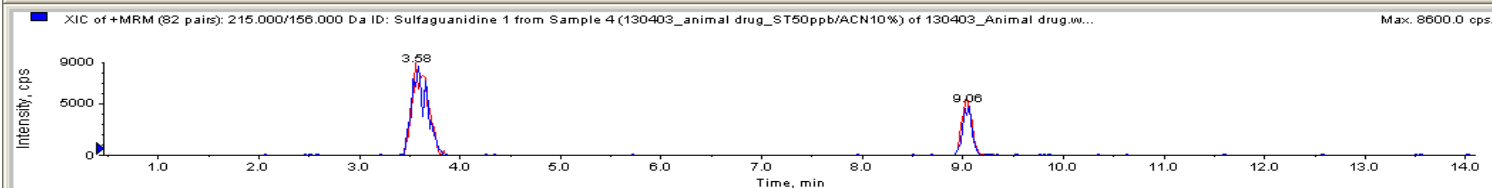
検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

【参考】 アセトニトリル-水比率によるピーク形状の変化

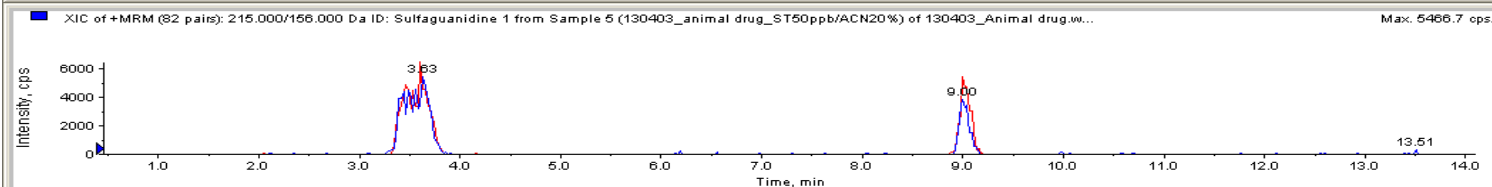
ACN10%



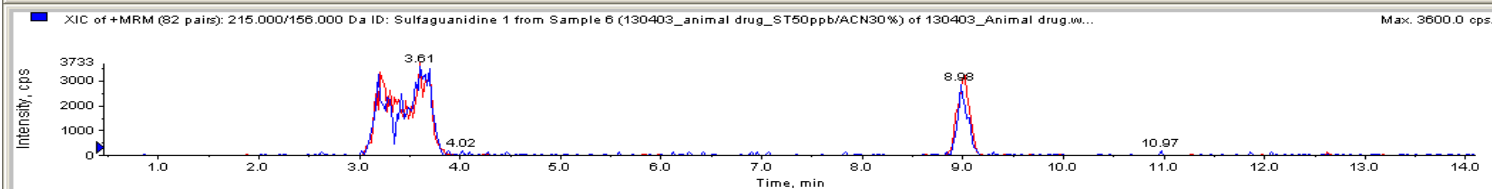
ACN20%



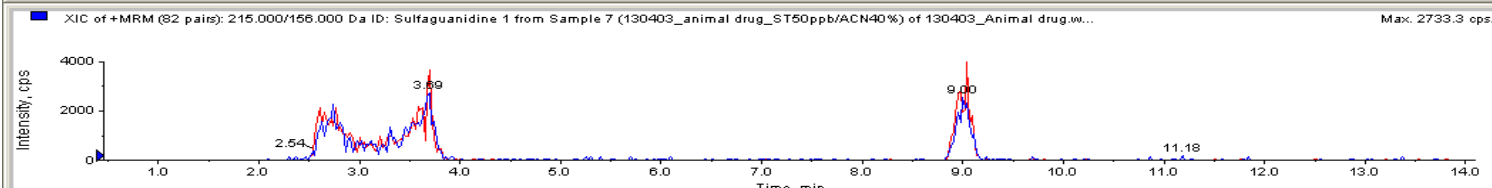
ACN30%



ACN40%



ACN50%



検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

Point1

多段階添加回収試験による各工程の性能評価について

添加①（抽出前）、添加②（抽出後）、添加③（精製後）の3点で添加回収試験を行うことで各工程における性能評価が可能であると考えた。

パターンA

~~添加①~~ < 添加②



抽出工程に原因。

- ・ 抽出溶媒が不適切
- ・ pHによるイオン化

パターンB

~~添加②~~ < 添加③



精製工程に原因。

- ・ 固相への吸着
- ・ 溶出力不足

パターンC

~~添加③~~



測定時に原因。

- ・ イオン化阻害
- ・ 精製不足

検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

Sample Name	抽出前添加		抽出後添加		精製後添加		パターン
	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	
Diaveridine	44.7	×	65.8	△	65.6	△	A, C
Ormetoprim	75.0	○	98.7	○	99.5	○	
Pyrimethamine	87.9	○	99.1	○	115.1	○	
Sulfabenzamide	81.7	○	70.8	○	102.8	○	
Sulfabromomethazine	92.3	○	112.4	○	94.2	○	
Sulfacetamide	82.4	○	96.1	○	114.4	○	
Sulfachlorpyridazine	77.6	○	66.6	△	105.7	○	
Sulfadiazine	81.1	○	82.8	○	104.2	○	
Sulfadimethoxine	90.5	○	91.8	○	94.4	○	
Sulfadimidine	92.8	○	103.3	○	95.0	○	
Sulfadoxine	90.0	○	78.5	○	107.9	○	
Sulfaethoxypyridazine	97.7	○	104.0	○	93.4	○	
Sulfaguanidine	79.2	○	64.6	△	87.5	○	
Sulfamerazine	109.1	○	103.0	○	115.3	○	
Sulfamethoxazole	86.1	○	88.9	○	92.7	○	
Sulfamethoxypyridazine	94.7	○	90.6	○	100.8	○	
Sulfamonomethoxine	83.7	○	88.7	○	103.8	○	
Sulfanilamide	-	-	-	-	-	-	
Sulfanitran	137.1	-	122.8	-	77.1	○	
Sulfapyridine	92.7	○	88.0	○	95.1	○	
Sulfaquinoxaline	83.1	○	91.8	○	111.9	○	
Sulfathiazole	68.2	△	80.7	○	101.1	○	A
Sulfatroxazole	76.5	○	89.9	○	93.4	○	
Sulfisomidin	75.4	○	95.9	○	106.9	○	
Sulfisoxazole	76.5	○	89.9	○	93.4	○	
Sulfisozole	86.9	○	91.1	○	102.4	○	
Trimethoprim	82.7	○	95.2	○	114.1	○	

添加回収試験 (鶏肉)

回収率 (%)	成分数
120-	1
70-120	23
50-70	1
-50	1

パターンA

- ・ 抽出溶媒が不適切
- ・ pHによるイオン化

パターンB

- ・ 固相への吸着
- ・ 溶出力不足

パターンC

- ・ イオン化阻害
- ・ 精製不足

検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

Sample Name	抽出前添加		抽出後添加		精製後添加		パターン
	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	
Diaveridine	72.7	○	91.0	○	103.0	○	
Ormetoprim	76.2	○	105.4	○	101.1	○	
Pyrimethamine	86.1	○	98.5	○	110.0	○	
Sulfabenzamide	83.3	○	95.3	○	106.1	○	
Sulfabromomethazine	81.5	○	74.7	○	103.7	○	
Sulfacetamide	103.6	○	93.9	○	114.3	○	
Sulfachlorpyridazine	76.3	○	86.5	○	115.3	○	
Sulfadiazine	93.9	○	103.4	○	122.5	-	
Sulfadimethoxine	104.7	○	106.6	○	121.1	-	
Sulfadimidine	99.9	○	110.5	○	122.1	-	
Sulfadoxine	97.1	○	99.0	○	109.4	○	
Sulfaethoxypridazine	114.5	○	111.7	○	108.4	○	
Sulfaguanidine	140.9	-	124.8	-	201.3	-	B
Sulfamerazine	108.5	○	120.6	-	115.0	○	
Sulfamethoxazole	93.4	○	88.3	○	116.5	○	
Sulfamethoxypridazine	99.5	○	98.0	○	108.7	○	
Sulfamonomethoxine	88.1	○	99.0	○	106.9	○	
Sulfanilamide	-	-	-	-	-	-	
Sulfantran	80.4	○	73.2	○	125.0	-	
Sulfapyridine	109.0	○	109.0	○	114.6	○	
Sulfaquinoxaline	91.9	○	84.3	○	120.3	-	
Sulfathiazole	67.9	△	72.2	○	104.6	○	A
Sulfatroxazole	108.5	○	108.3	○	126.5	-	
Sulfisomidin	83.7	○	93.9	○	113.6	○	
Sulfisoxazole	89.1	○	92.9	○	108.4	○	
Sulfisozole	80.6	○	66.5	△	108.8	○	B
Trimethoprim	93.0	○	113.4	○	132.1	-	

添加回収試験 (豚肉)

回収率 (%)	成分数
120-	1
70-120	24
50-70	1
-50	0

パターンA

- 抽出溶媒が不適切
- pHによるイオン化

パターンB

- 固相への吸着
- 溶出力不足

パターンC

- イオン化阻害
- 精製不足

検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

Sample Name	抽出前添加		抽出後添加		精製後添加		パターン
	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	回収率 (%)	判定	
Diaveridine	52.2	△	80.0	○	91.5	○	A
Ormetoprim	76.2	○	102.2	○	99.3	○	
Pyrimethamine	63.1	△	93.4	○	102.0	○	A
Sulfabenzamide	57.4	△	70.6	○	91.4	○	A
Sulfabromomethazine	98.5	○	111.8	○	111.8	○	
Sulfacetamide	97.0	○	100.0	○	117.0	○	
Sulfachlorpyridazine	67.6	△	57.4	△	88.0	○	B
Sulfadiazine	61.1	△	81.9	○	91.7	○	A
Sulfadimethoxine	79.1	○	88.6	○	103.7	○	
Sulfadimidine	80.4	○	97.5	○	104.5	○	
Sulfadoxine	93.0	○	94.5	○	108.6	○	
Sulfaethoxypyridazine	82.0	○	94.4	○	104.2	○	
Sulfaguanidine	111.0	○	131.5	-	154.8	-	
Sulfamerazine	84.7	○	105.4	○	108.4	○	
Sulfamethoxazole	71.4	○	76.8	○	102.1	○	
Sulfamethoxypyridazine	78.1	○	83.7	○	101.1	○	
Sulfamonomethoxine	90.0	○	89.8	○	112.7	○	
Sulfanilamide	-	-	-	-	-	-	
Sulfanitran	80.2	○	91.7	○	87.5	○	
Sulfapyridine	72.7	○	80.9	○	91.7	○	
Sulfaquinoxaline	76.1	○	77.5	○	91.7	○	
Sulfathiazole	68.2	△	83.8	○	123.4	-	A
Sulfatroxazole	70.3	○	73.8	○	94.6	○	
Sulfisomidin	68.3	△	88.4	○	101.6	○	A
Sulfisoxazole	85.1	○	79.7	○	95.0	○	
Sulfisozole	72.6	○	73.0	○	113.8	○	
Trimethoprim	69.2	△	88.1	○	104.4	○	A

添加回収試験 (牛肉)

回収率(%)	成分数
120-	0
70-120	18
50-70	8
-50	0

パターンA

- 抽出溶媒が不適切
- pHによるイオン化

パターンB

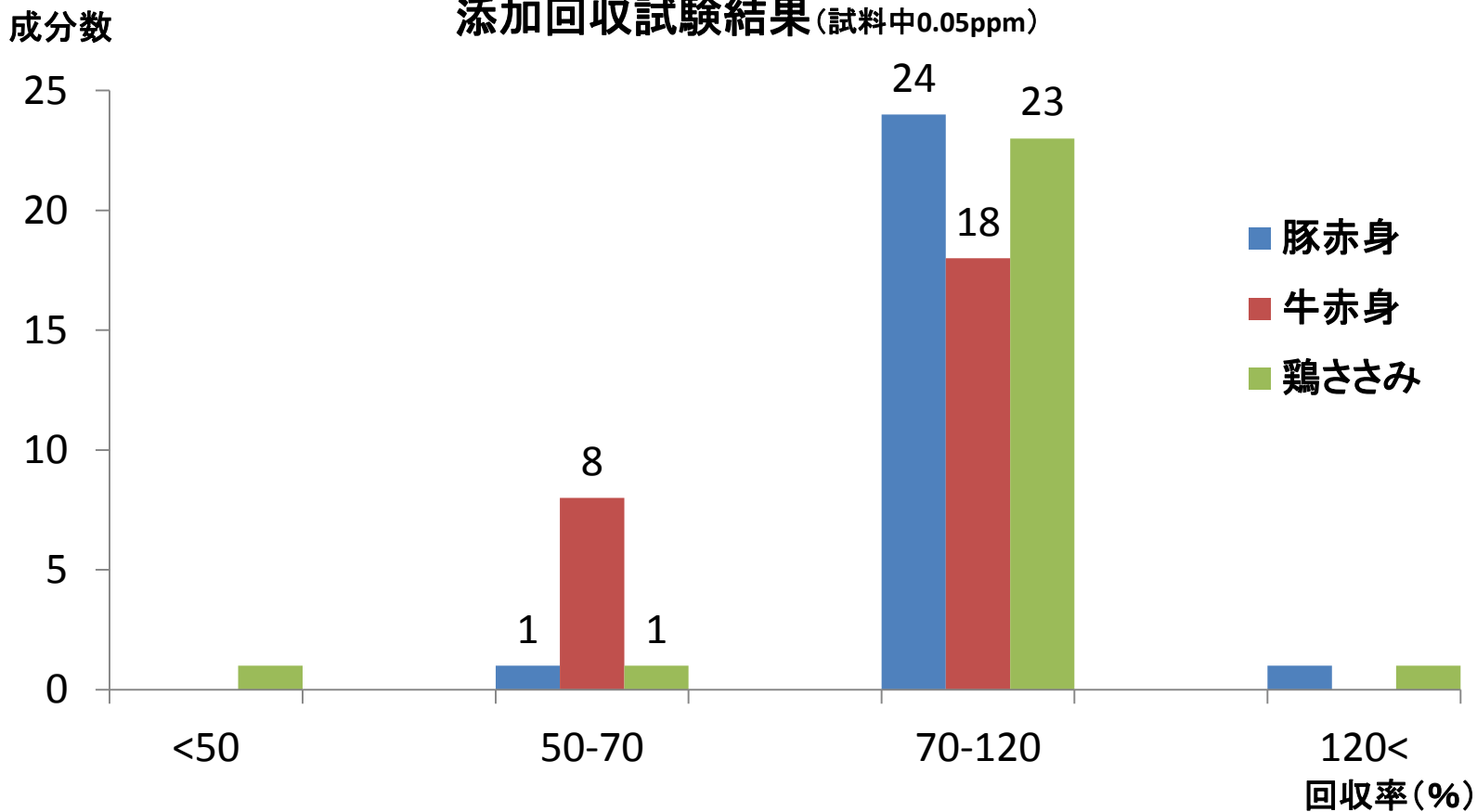
- 固相への吸着
- 溶出力不足

パターンC

- イオン化阻害
- 精製不足

検討③ 固相ミニカラムによる精製の検討

添加回収試験結果 (試料中0.05ppm)



まとめ

残留農薬一斉分析法としてこれまで報告してきたSTQ法をもとに、動物用医薬品分析法の検討を行った。

➤ **標準溶液用いてLC-MS/MS測定条件を検討した。**

全27成分中スルファニルアミドを除く26成分の測定が可能であった。

➤ **水に標準溶液を添加して液液分配を行った。**

高極性($\text{LogP} \leq 0$)成分もアセトニトリルで分配可能であった。

➤ **実サンプルによる多段階添加回収試験を行った。**

豚赤身、鶏ささみで良好な結果が得られた。牛赤身では、26成分が50-120%の回収率で、迅速前処理法としては十分な性能であった。

➤ **今回の結果からサルファ剤についてSTQ法での応用が可能であったと言える。**