

STQ 法と LC/MS/MS を組み合わせた食肉中の動物用医薬品高速一斉分析 (前処理編)

○島三記絵¹⁾、朝野夏世²⁾、宇野由紀²⁾、佐々野僚一¹⁾

1)株式会社アイスティサイエンス、2)株式会社島津製作所

【目的】食の安全性を確保する上で食品中に残留する動物用医薬品の分析は重要である。しかし動物用医薬品には物性の異なる様々な種類がありこれらを同時に分析するのは容易ではない。小西ら¹⁾はSTQ法を用いてサルファ剤の一斉分析を報告しており、本実験では分析項目の拡大を目的としてここにキノロン剤の追加を試みた。またSTQ法による前処理とUHPLCシステムとMS/MSを組み合わせた高速LC/MS/MSメソッドでの測定により前処理から測定までのトータルソリューションとしての「迅速・簡便・高精度」化を図った。

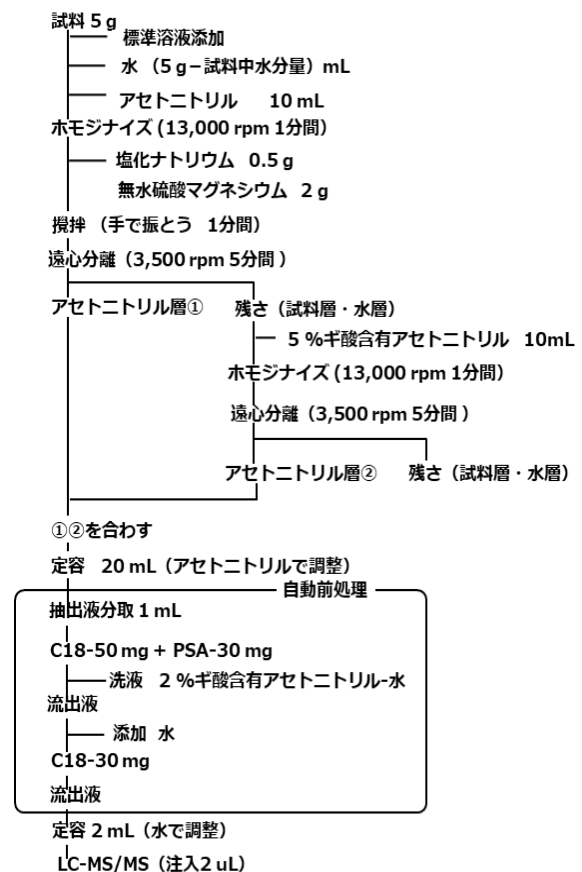
【方法】試料：鶏ささみ、豚ヒレ、牛ヒレ(市販品)、標準試薬：PL動物薬LC/MS Mix1及び2、固相カートリッジ：Smart-SPE(アイスティサイエンス)、自動前処理装置：全自動固相抽出装置ST-L400(アイスティサイエンス)、LC-MS/MS：Nexera X2及びLCMS-8045(島津製作所)

添加回収試験：予冷式ドライアイス凍結粉碎をした試料に試料中濃度0.01ppmとなるよう標準溶液を添加し添加回収試験を行った。

前処理：試料をアセトニトリル及びギ酸含有アセトニトリルで繰り返し抽出を行い、それらをあわせて定容した。抽出液はC18、PSAを用いて精製した。

【結果】サルファ剤(葉酸拮抗剤を含む)及びキノロン剤の計41成分の添加回収試験を行ったところ一部の成分を除いて回収率70-120%、RSD20%未満の良好な結果が得られた。

【考察】主にサルファ剤はアセトニトリルで、キノロン剤はギ酸含有アセトニトリルで溶媒(アセトニトリル)層に移行した。これらの抽出液をあわせることで物性の異なる両者を同じ前処理方法で分析することができた。また1分析時間が18分の高速LC/MS/MSメソッドを用いた測定とあわせて前処理から測定までの「迅速・簡便・高精度」化を図ることが可能となった。



図：前処理フロー

1)小西ら,第108回日本食品衛生学会学術講演会要旨集,p.116(2014)

STQ法とLC/MS/MSを組み合わせた食肉中の動物用医薬品高速一斉分析 (前処理編)



島三記絵¹⁾、朝野夏世²⁾、宇野由紀²⁾、佐々野僚¹⁾

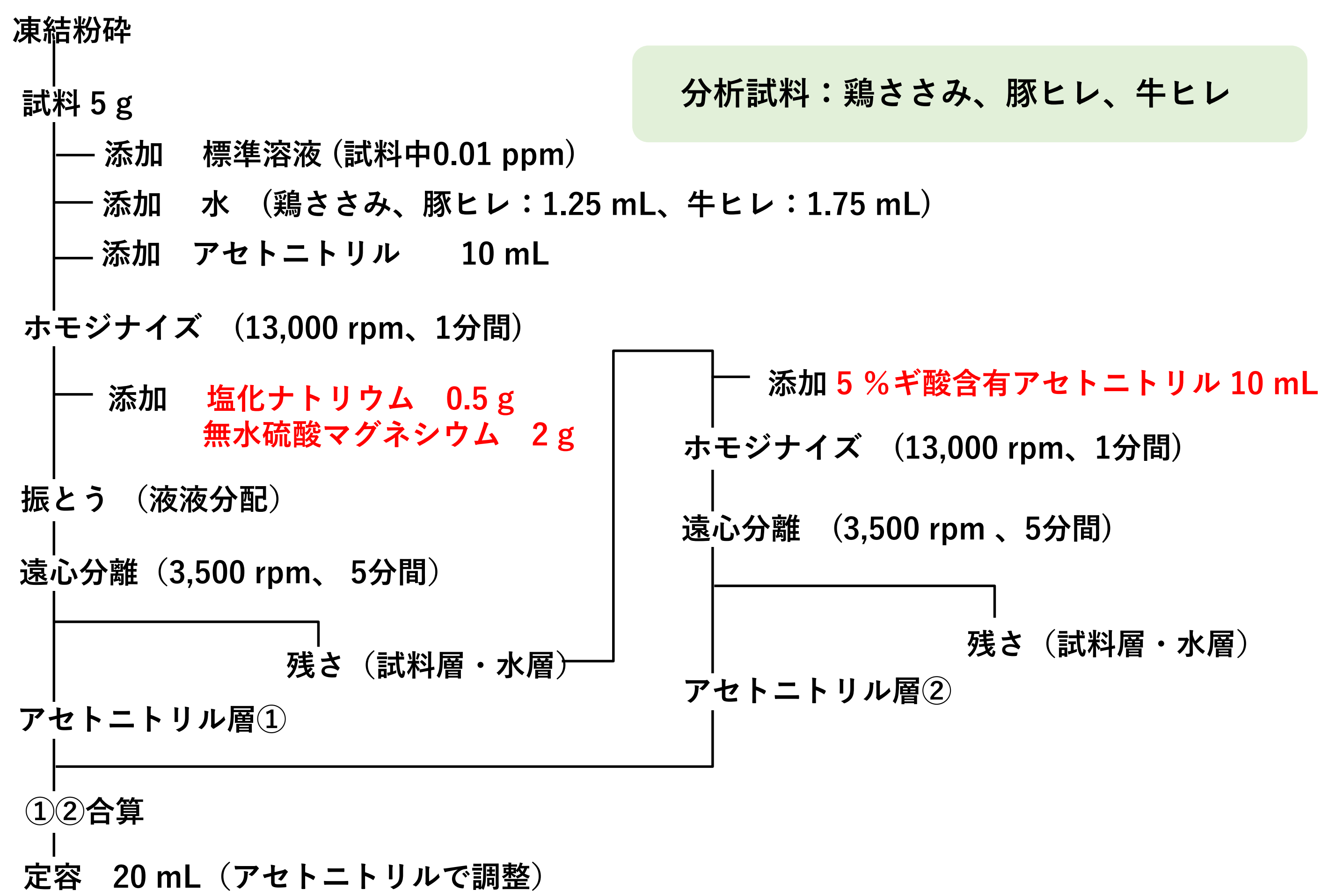
1) 株式会社アイスティサイエンス、2) 株式会社島津製作所

緒言

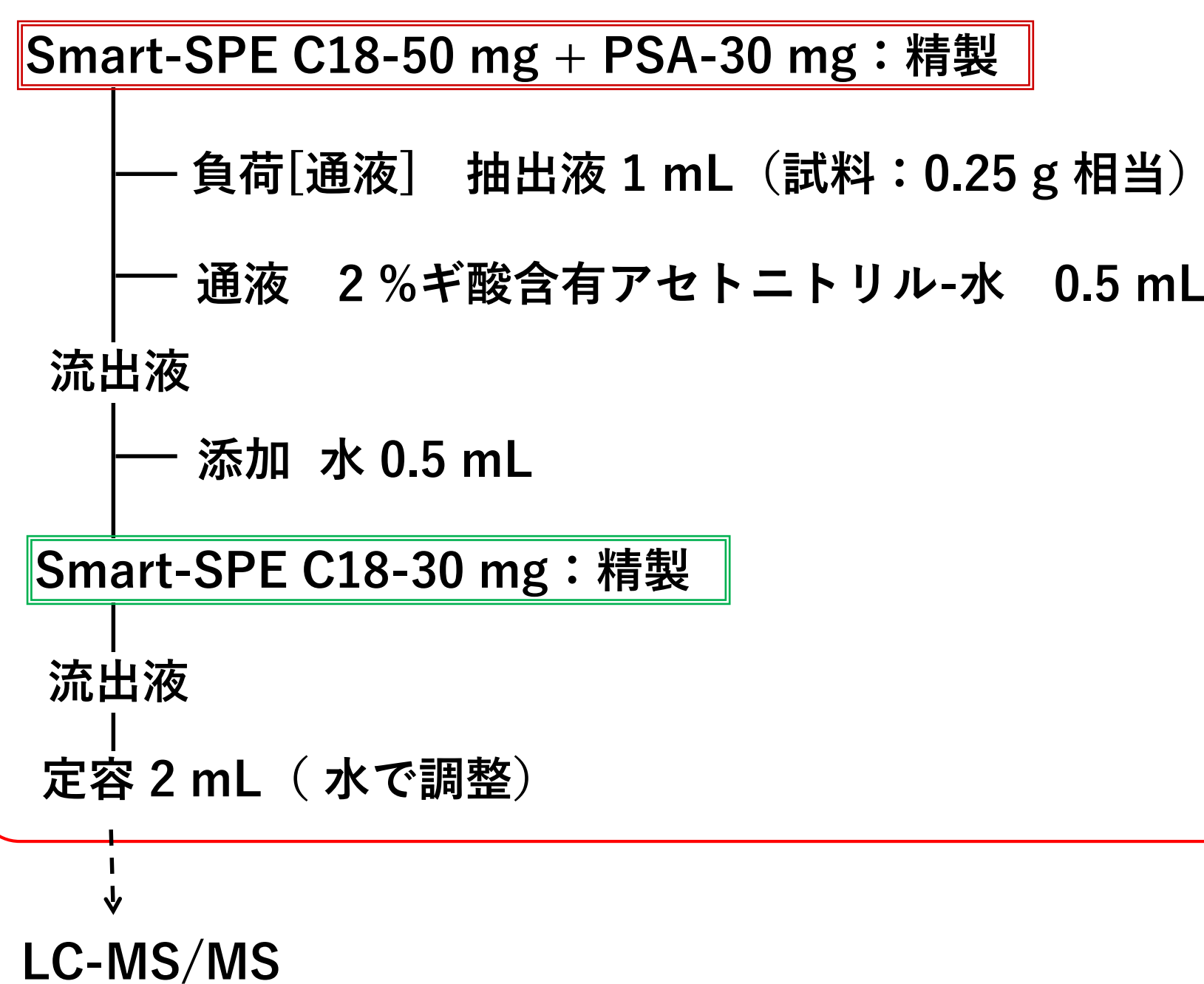
食品中に残留する動物用医薬品の分析は重要である。しかし動物用医薬品には物性の異なる様々な種類がありこれらを同時に分析するのは容易ではない。更に「迅速・簡便」も求められる中、QuEChERS法と固相カートリッジを用いた一斉分析法¹⁾が報告されており、本実験ではSTQ法における一斉分析の第一段階としてサルファ剤とキノロン剤の一斉分析の検討を行った。また全自動固相抽出装置を用いたSTQ法による前処理とUHPLCシステムとMS/MSを組み合わせた高速LC/MS/MSメソッドでの測定により前処理から測定までの「迅速・簡便・高精度」化を図った。本分析法は鶏ささみ、豚ヒレ、牛ヒレを用いて添加回収試験を行い評価した。

実験方法

1. 前処理フロー



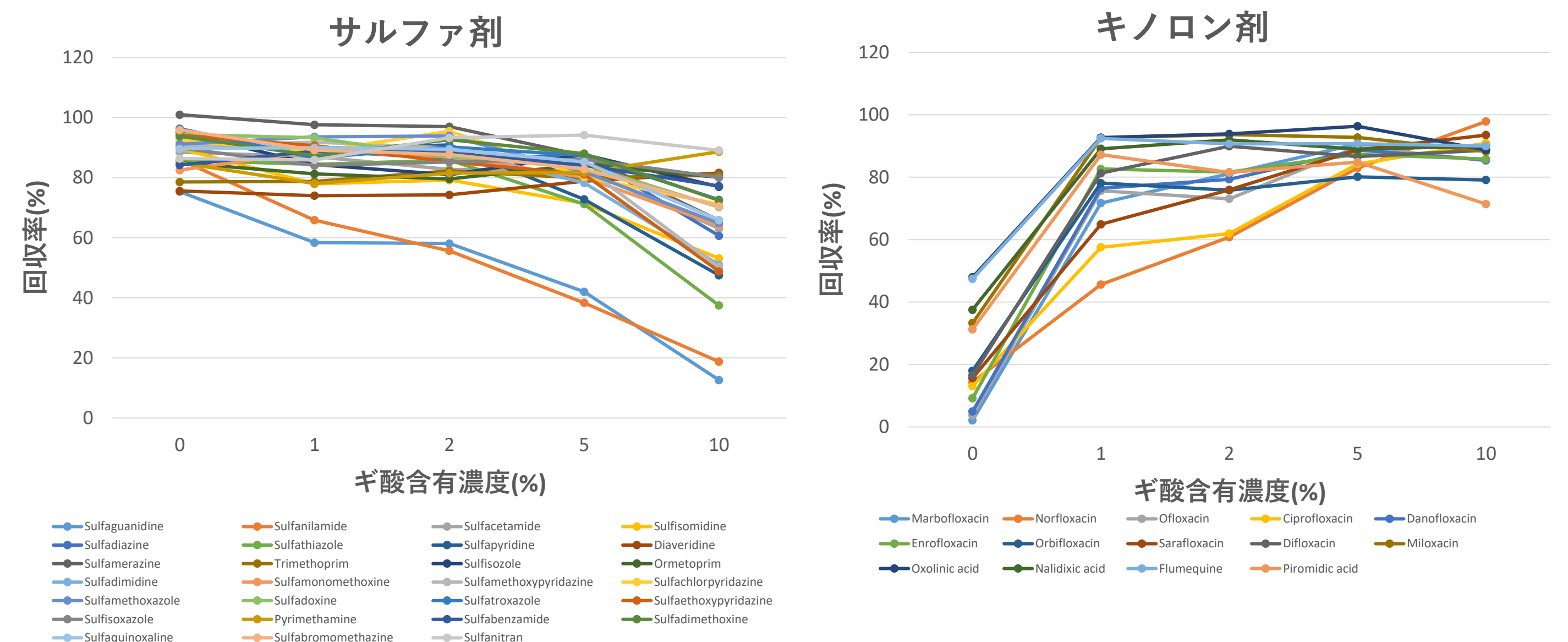
《全自動固相抽出装置による精製》 約10分/検体



結果

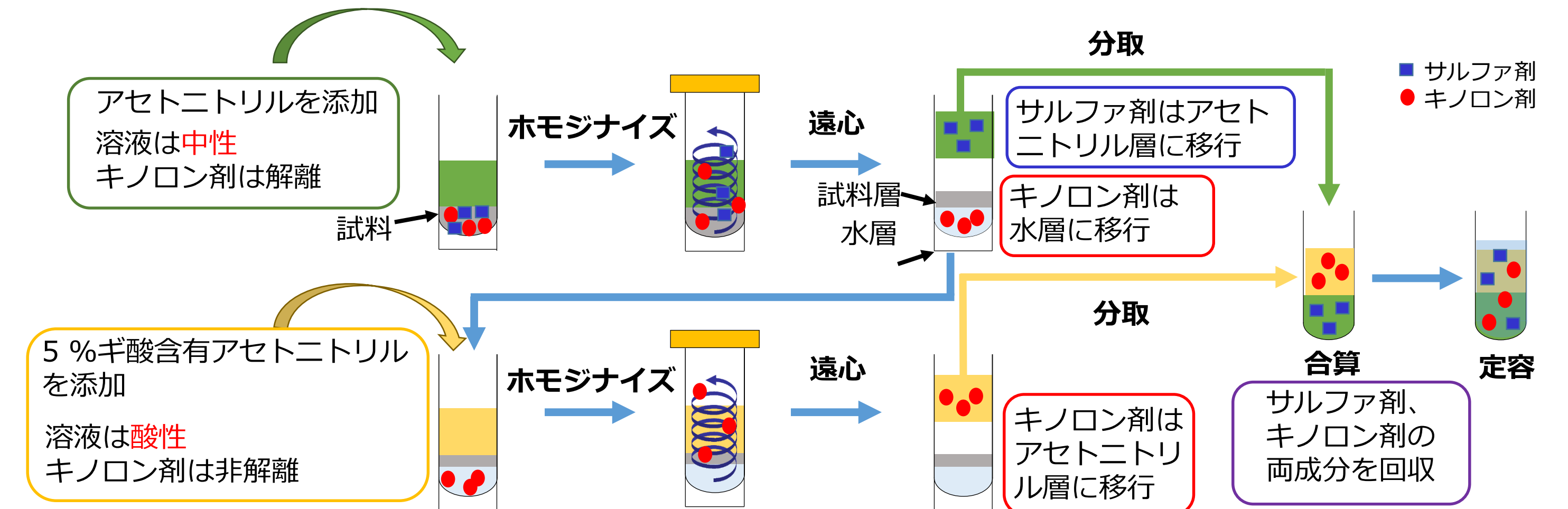
1. 抽出時のギ酸濃度の検討

抽出溶媒のアセトニトリルにギ酸を添加することでキノロン剤の回収率が向上するという報告²⁾によりアセトニトリルに添加するギ酸濃度の検討を行った。その際緩衝作用を避けるためクエン酸ナトリウム塩は添加せず塩化ナトリウムと無水硫酸マグネシウムのみ添加した。キノロン剤はギ酸添加により回収率の向上がみられた。これは酸性状態でキノロン剤が非解離になりアセトニトリル層に移行したためと考えられる。一方サルファ剤ではギ酸濃度が高くなるに従い回収率が低下する成分がみられたためアセトニトリルとギ酸含有アセトニトリルそれぞれの抽出液を合算することにした。



2. 繰り返し抽出定容法の採用

サルファ剤はアセトニトリル、キノロン剤は5%ギ酸含有アセトニトリルで抽出した結果が良好であったためこれらの抽出液を合算し両者の回収率向上を目指した。また、合算時には定容操作を行い定量精度を確保することにした。



3. 添加回収試験

本法における添加回収試験を行った。ギ酸含有アセトニトリル抽出液と合算することでサルファ剤2成分が低回収率となったがその他の成分は良好な結果が得られた。

2. 測定条件

【測定装置】
UHPLC(Nexera X2)及びLCMS-8045 (島津製作所製)

【LC条件】
分析カラム：ResteK Raptor™ Biphenyl(2.1 mml.D. × 100 mmL., 2.7 μm)
移動相 A液：0.1%ギ酸+0.5 mmol/Lギ酸アンモニウム-水
B液：0.1%ギ酸-メタノール
流速：0.4 mL/min
グラジエント：B.Conc 2%(0 min)→100%(12.5-14.5 min)→2%(14.6-17.5 min)
分析時間：18分
注入量：2 μL(+40 μL水)
カラム温度：40℃

【MS条件】
イオン化モード：ESI positive and negative
ネプライザーガス流量：3 L/min
ドライイングガス流量：10 L/min
ヒーティングガス流量：10 L/min
インターフェース温度：350℃
DL温度：150℃
ヒートブロック温度：300℃
測定モード：MRM



表1 添加回収試験結果

薬名	鶏ささみ		豚ヒレ		牛ヒレ	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
Sulfaguanidine	54	3.0	59	3.4	43	1.9
Sulfanilamide	36	5.9	46	4.7	25	5.1
Sulfacetamide	91	2.3	92	5.6	88	3.5
Sulfadiazine	84	3.7	86	2.5	81	3.7
Sulfisomidine	96	3.8	90	5.5	89	2.5
Sulfathiazole	95	2.8	86	2.7	88	5.5
Sulfapyridine	87	5.6	89	3.7	86	3.5
Diaveridine	87	4.1	90	3.9	85	2.0
Sulfamerazine	90	4.9	91	4.7	88	4.7
Trimethoprim	87	4.3	88	5.1	88	3.6
Sulfisoxazole	96	5.9	90	4.7	88	2.5
Ormetoprim	93	2.8	89	4.2	87	2.0
Sulfadimidine	95	5.0	89	7.1	94	6.4
Sulfamonomethoxine	92	5.0	96	4.1	81	1.5
Sulfamethoxyypyridazine	97	5.4	90	4.8	93	1.9
Sulfachloropyridazine	94	5.2	89	2.8	93	5.7
Sulfamethoxazole	98	6.4	90	2.2	86	1.6
Sulfadoxine	89	5.3	94	2.7	83	2.2
Sulfatroxazole	92	3.9	98	4.6	96	5.5
Sulfathoxyypyridazine	94	3.8	92	2.9	86	2.6
Sulfisoxazole	100	6.0	99	4.1	91	4.2
Pyrimethamine	88	3.1	84	4.9	85	6.3
Sulfabenzamide	93	2.8	86	3.0	86	2.7
Sulfadimethoxine	92	3.5	89	2.9	84	1.7
Sulfaquinolone	91	3.1	90	3.9	98	2.8
Sulfabromomethazine	97	7.5	86	5.1	85	2.1
Sulfantran	97	23.9	103	22.8	91	23.7
Marbofloxacin	83	4.4	84	3.9	84	5.3
Norfloxacin	74	5.9	80	3.1	85	6.9
Ofloxacin	83	3.2	79	4.4	92	2.3
Ciprofloxacin	79	4.9	88	9.2	83	6.1
Danofloxacin	87	4.4	86	4.1	95	3.3
Enrofloxacin	87	6.3	89	1.7	92	5.5
Orbifloxacin	73	8.0	73	4.5	78	3.6
Sarafloxacin	76	5.5	84	10.8	70	8.8
Diffloxacin	82	7.2	77	4.8	87	3.9
Miloxacin	97	2.9	91	3.4	96	2.7
Oxolinic acid	99	3.2	92	3.2	94	2.7
Nalidixic acid	95	4.9	87	3.2	88	4.4
Flumequine	102	5.4	95	0.8	94	5.3
Promidic acid	84	4.5	72	4.0	74	3.1

まとめ

サルファ剤及びキノロン剤の計41成分のうち38成分で回収率70-120%、RSD20%未満の良好な結果が得られた。サルファ剤2成分の回収率向上は今後の課題であるが本分析法ではアセトニトリルとギ酸含有アセトニトリルの抽出液を合算することでサルファ剤とキノロン剤を同じ前処理方法で分析することができた。加えて合算時に定容操作を加えることで定量的にも精度を確保することができた。

また全自動固相抽出装置を用いることで1検体の精製時間が約10分となり1分析時間が18分の高速LC/MS/MSメソッドの測定と合わせることで前処理から測定までの「迅速・簡便・高精度」化を図ることが可能となった。

参考文献

- 1)小西ら,第108回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集,p.47(2014)
- 2)小林ら,第112回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集,p.58(2016)
- 3)T.Nakajima et al., Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. Shokuhin eiseigaku Zasshi.2012;53(5):243-53.