

Application News

No. C99

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた 動物用医薬品のスクリーニング分析

Quantitative Analysis of Veterinary Drugs Using Triple Quadrupole LC/MS/MS [LCMS-8050]

平成 18 年 5 月、一定の量を超えて農薬、飼料添加物および動物用医薬品が残留する食品の販売などを禁止するポジティブリスト制度が施行されました。それに伴い、現在多くの動物用医薬品について厳しい残留基準が定められています。残留基準が設定されている化合物は多岐に渡り、また今

後も数が増えていくと予想されることから、できるだけ多くの化合物を高感度かつ迅速に分析する技術が必要とされています。本アプリケーションでは、畜水産物粗抽出物における 89 成分の動物用医薬品について、高感度一斉分析を行った例をご紹介します。

Y. Fujito

■ サンプルの前処理

Sample Preparation

動物用医薬品の分析では、肉や魚など脂質等を多量に含むサンプルを測定することが多く、感度や再現性の良いデータを得るためには前処理が非常に重要となります。一般的には固相抽出法が用いられますが、時間と手間がかかることから、今回は前処理の簡易化を目的に、野菜中の残留農薬分析等に使用される QuEChERS 法を用いて前処理を行いました。QuEChERS 法にはアセトニトリル抽出とクリーンアップの 2 つの工程がありますが、今回はアセトニトリル抽出のみを行いました。

*QuEChERS 塩キット：Restek Q-sep™ AOAC2007.01

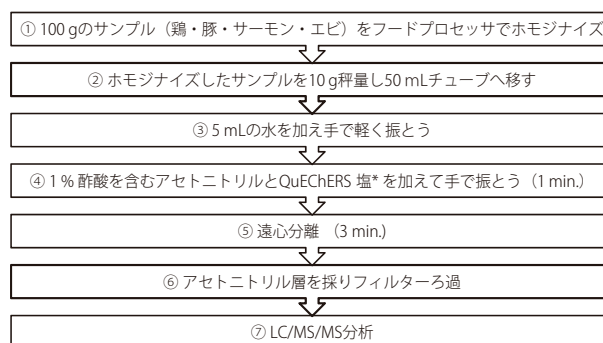


Fig. 1 前処理プロトコル
Procedure of Sample Preparation

■ サンプルと水の共注入によるピーク形状の改善

Improvement of Peak Shape by Water Co-Injection

逆相モードでは、サンプル溶媒と移動相の溶出力の関係性により、極性化合物のピークが崩れたり割れたりする現象が起こることがあります。このため、サンプル溶媒が有機溶媒リッチの場合は、（置換または希釈により）水を加えて溶出力を下げる必要があります。本分析では、前処理終了時のサンプル溶媒はアセトニトリル 100% であるため、そのまま LC/MS に注入すると、いくつかの成分でピーク割れを起こします (Fig. 2 左)。

今回、前処理の手間をできる限り省くため、オートサンプルラ (SIL-30A) の前処理機能を用いてサンプルと水の共注入を行うことで、ピーク形状の改善を行いました。

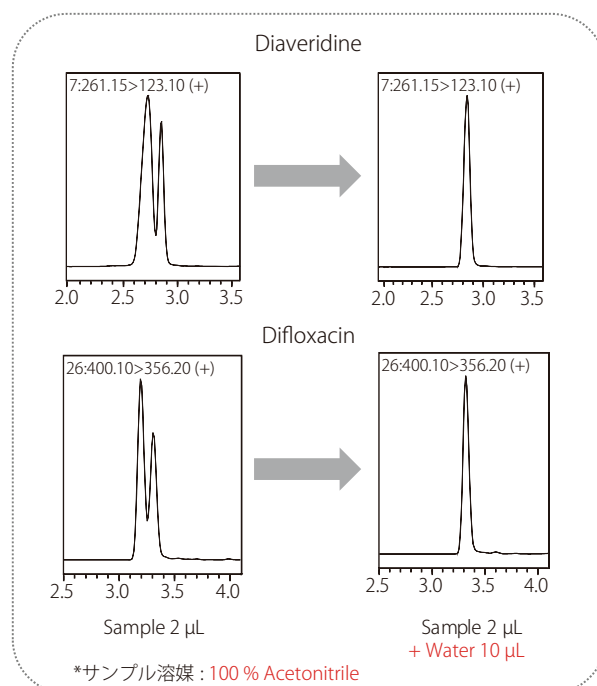
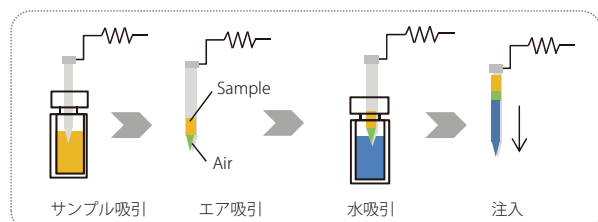


Fig. 2 水の共注入あり/なしのピーク形状の比較
Comparison of Peak Shape

■マトリクス標準溶液のMRM測定

MRM Analysis of Matrix Standards

サンプル溶液に標準溶液を添加したマトリクス標準溶液のMRMクロマトグラムをFig. 3に示します（下記データは豚肉抽出溶液を使用）。Table 1に、マトリクスを含まない標準溶液とマトリクス添加標準溶液における定量下限値を示しました。アセトニトリル抽出を行っただけの粗抽出物においても、多くの化合物で標準溶液のみの場合と同等の感度が得

られています。標準溶液とマトリクス添加溶液で定量下限値が異なる化合物もいくつか確認されましたが、これらはマトリクスエフェクトによるものではなく、夾雑成分由来のイオンによりバックグラウンドが上昇することが原因であると考えられます（Fig. 5参照）。

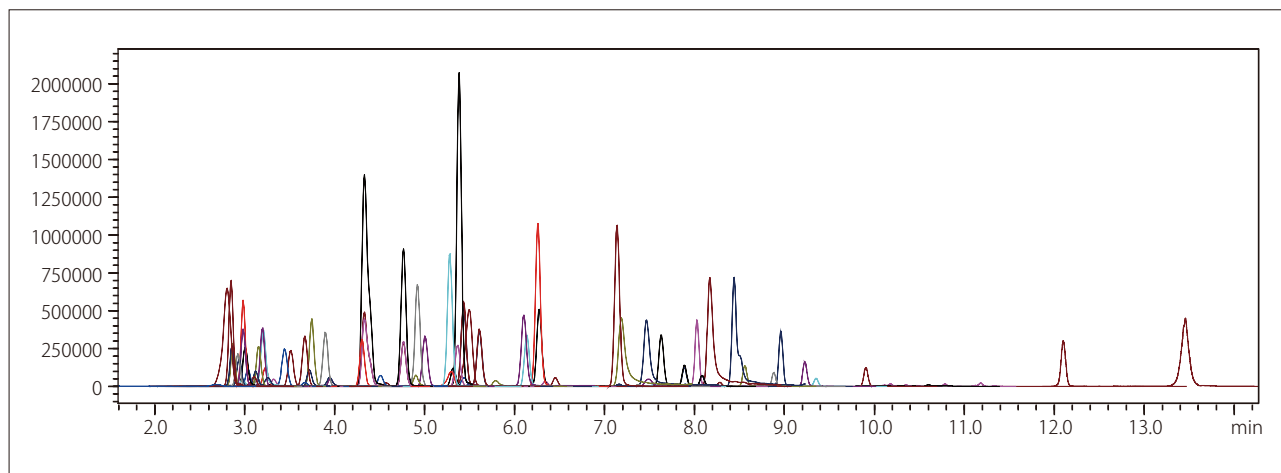


Fig. 3 動物用医薬品 89 成分のピーク検出例 (10 µg/L 標準溶液添加豚肉抽出液)
MRM Chromatograms of 89 Veterinary Drugs

Table 1 標準溶液およびマトリクス標準溶液における定量下限値とマトリクス検量線直線性範囲
LOQs of Veterinary Drugs in Neat Standards and Matrix Standards/Calibration Range of Veterinary Drugs in Matrix Standards

	標準溶液		マトリクス添加標準溶液			標準溶液		マトリクス添加標準溶液	
	Min. Conc.	Max. Conc.	Min. Conc.	Max. Conc.		Min. Conc.	Max. Conc.	Min. Conc.	Max. Conc.
Gentamicin	0.5	50	1	50	Sulfachloropyridazine	0.02	20	0.02	20
Sulfanilamide	1	50	1	50	Sulfadimethoxine	0.02	10	0.02	10
Levamisole	0.05	50	0.05	50	Tylosin	0.05	50	0.05	50
Lincomycin	0.01	10	0.01	10	Sulfamethoxazole	0.02	10	0.1	10
5-Propylsulfonyl-1-benzimidazole-2-amine	0.05	10	0.05	10	Sulfaethoxyypyridazine	0.02	10	0.02	10
Diaveridine	0.01	10	0.01	10	Tiamulin	0.01	50	0.01	50
Trimethoprim	0.02	20	0.02	20	Florfenicol	0.5	50	10	50
Marbofloxacin	0.01	50	0.01	50	2-Acetyl-amino-5-nitrothiazole	0.05	50	0.05	50
Sulfisomidine	0.02	20	0.02	20	Sulfatroxazole	0.01	5	0.01	5
Norfloxacin	0.5	50	0.5	50	Leucomycin	0.01	50	0.01	50
Ormetoprim	0.02	10	0.02	10	Sulfisoxazole	0.01	50	0.05	50
Thiabendazole	0.01	10	0.01	10	Oxolinic acid	0.01	50	0.1	50
Ciprofloxacin	0.05	10	0.5	10	Chloramphenicol	0.5	50	1	50
Neospiramycin I	0.01	10	0.05	10	Clorsulon	0.5	50	1	50
Danofloxacin	0.1	10	0.1	10	Sulfabenzamide	0.01	10	0.01	10
Enrofloxacin	0.05	50	0.1	50	Ethopabate	0.01	10	0.01	10
Oxytetracycline	0.01	50	0.1	50	Sulfadoxine	0.02	20	0.02	20
Xylazine	0.01	10	0.01	10	Sulfaquinoxaline	0.02	10	0.02	10
Orbifloxacin	0.05	50	0.05	50	Prednisolone	0.1	20	0.05	20
Sulfacetamide	1	50	1	50	Ofloxacin	0.5	50	0.5	50
Clenbuterol	0.01	10	0.01	10	Flubendazole	0.01	50	0.01	50
Tetracycline	0.05	50	0.01	50	Methylprednisolone	0.5	50	0.5	50
Spiramycin I	0.01	50	0.01	50	Nalidixic acid	0.01	50	0.01	50
Sarafloxacin	0.5	50	0.5	50	Dexamethasone	0.5	50	0.5	50
Difloxacin	0.05	50	0.1	50	Flumequine	0.01	50	0.01	50
Sulfadiazine	0.02	20	0.1	20	Benzylpenicillin	0.5	50	0.5	50
Sulfathiazole	0.02	20	0.1	20	Sulfantran	0.2	50	0.2	50
Sulfapyridine	0.02	20	0.1	20	Sulfabromomethazine	0.01	50	0.01	50
Carbadox	0.05	10	0.05	10	betaTrenbolone	0.02	50	0.1	50
Pyrimethamine	0.02	20	0.02	20	Emamectin B1a	0.01	50	0.01	50
Sulfamerazine	0.02	20	0.02	20	alphaTrenbolone	0.02	50	0.1	50
Chlortetracycline	0.1	50	0.1	50	Piromidic acid	0.01	50	0.05	50
Tilmicosin	0.1	50	0.1	50	Zeranol	1	50	0.1	50
Thiamphenicol	1	50	1	50	Ketoprofen	0.01	50	0.05	50
Sulfadimidine	0.02	20	0.02	20	Testosterone	0.01	10	0.05	10
Sulfametoxydiazine	0.01	10	0.02	10	Famphur	0.05	50	0.05	50
Sulfamethoxyypyridazine	0.02	20	0.02	20	Fenobucarb (BPMC)	0.01	50	0.01	50
Sulfisozole	0.01	50	0.01	50	Clostebol	0.05	50	0.05	50
Trichlorfon (DEP)	0.05	50	0.05	50	Dichlofenac	0.01	50	0.01	50
Sulfamonomethoxine	0.02	20	0.02	20	Melengestrol Acetate	0.05	50	0.05	50
Furazolidone	1	50	1	50	Temephos (Abate)	0.01	50	0.5	50
Difurazone	0.05	50	0.05	50	Allethrin	0.1	50	1	50
Erythromycin A	0.01	50	0.01	50	Closantel	0.01	10	0.01	10
Cefazolin	0.5	50	0.5	50	Monensin	0.01	10	0.01	10

(単位: µg/L)

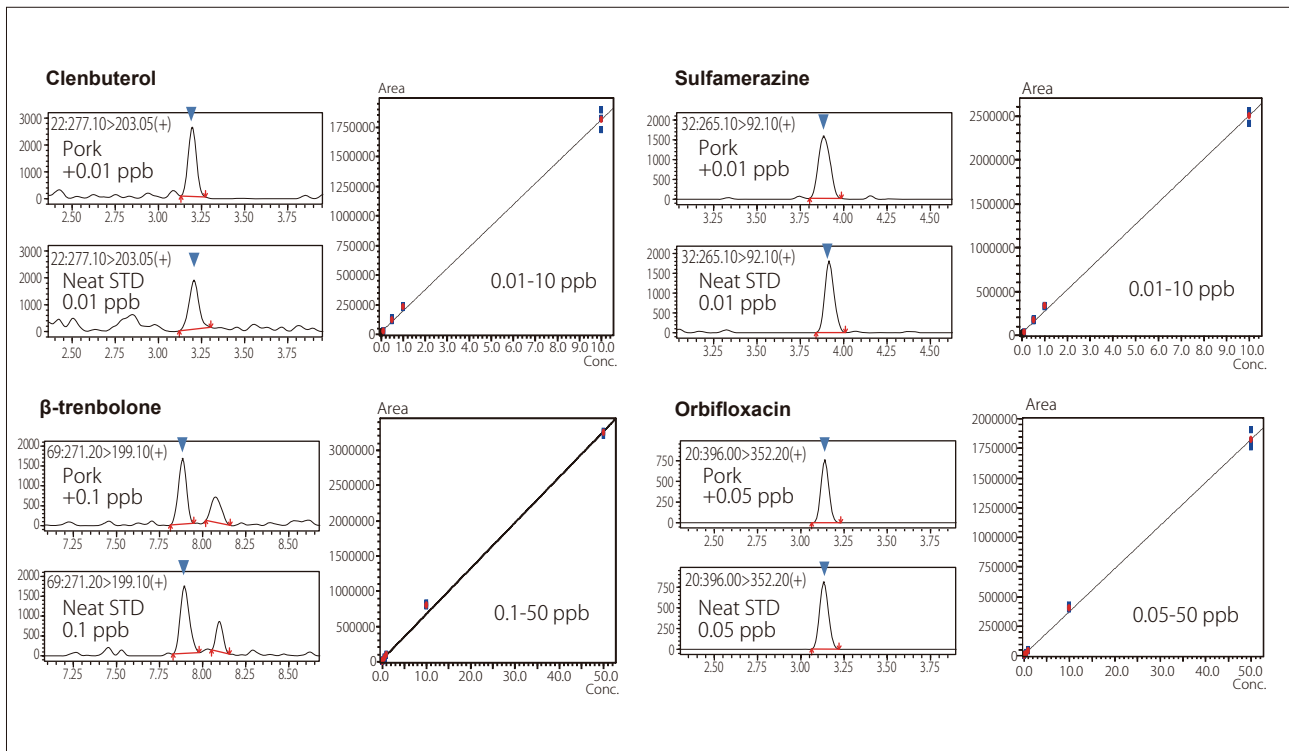


Fig. 4 代表的な化合物の LOQ 付近の MRM クロマトグラムと検量線
MRM Chromatograms Around LOQ and Calibration Curves of Typical Compounds

■ 畜水産物粗抽出物中の回収率 (マトリクスエフェクトの確認)

Recoveries of Veterinary Drugs in the Crude Extracts from Livestock Products and Seafood

マトリクスを多く含む実サンプルを測定した際のマトリクスエフェクトの有無を確認しました。今回、サンプルにはエビ、鶏肉、豚肉、サーモンの4種類を用い、各サンプルのアセトニトリル抽出溶液に標準溶液を 10 $\mu\text{g/L}$ の濃度になるように添加し、回収率を求めました。結果、9 割以上の化合物

で 70-120 % の良好な回収率が得られ、QuEChERS 法のアセトニトリル抽出のみの粗抽出溶液においても、マトリクスエフェクトの影響を受けることなく測定できることが確認されました。

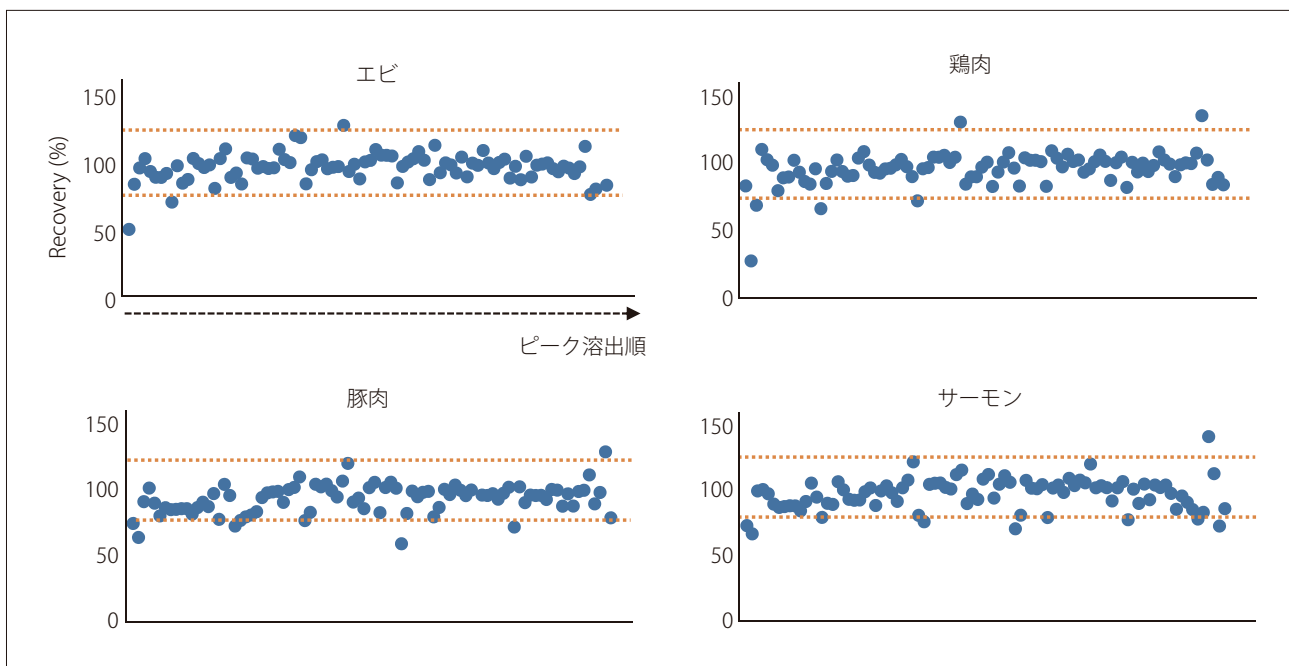


Fig. 5 各サンプル溶液における動物用医薬品の回収率
Recoveries of Veterinary Drugs in Each Matrices

■ QuEChERS 法によるアセトニトリル抽出の抽出効率

Extraction Efficiency of Acetonitrile Extraction Using QuEChERS Method

QuEChERS 法によるアセトニトリル抽出の抽出効率を確認するため、Fig. 1 の②の段階で標準溶液を 10 µg/L の濃度になるように添加し、回収率を求めました。結果、マトリクスあり/なしの場合ともに、約 8 割の化合物について良好な回

収率が得られました。ただし、極性の高いテトラサイクリンやキノロン系の化合物は回収率が悪い傾向が見られました。これらの化合物については、別途抽出溶媒、抽出試薬の検討を行う必要があります。

Table 2 添加回収率 (標準溶液前添加)
Recoveries (pre-spike)

回収率	マトリクスなし	マトリクスあり (豚肉)	回収率が悪かった化合物
< 50 %	17 (19 %)	13 (15 %)	Tetracyclines Quinolones
50 % - 70 %	1 (1 %)	8 (9 %)	
> 70 %	71 (80 %)	68 (76 %)	

■ 堅牢性

Durability

豚肉粗抽出溶液 (標準溶液 10 µg/L 添加) を用いて、装置の長期安定性を確認しました。非常に複雑なマトリクスの連

続測定においても、3 日間にわたって安定したデータを取得することが可能でした。

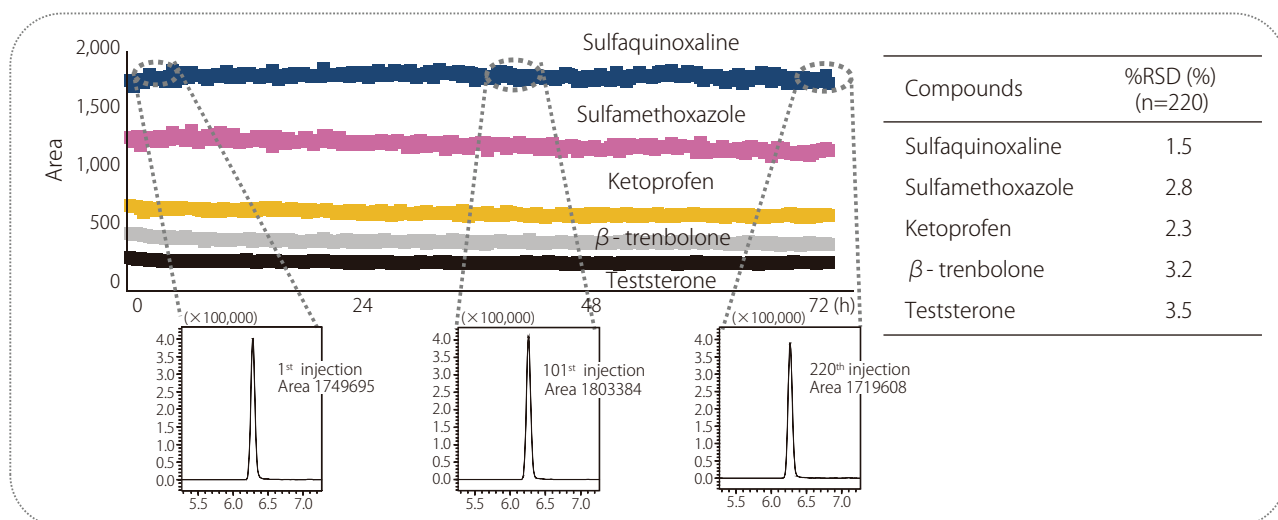


Fig. 6 連続測定における代表的な化合物の面積値プロットおよび再現性
Area Plotting and %RSD of Typical Compounds in Continuous Analysis

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mobile Phase A	: 0.1 % Formic Acid - Water
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Time Program	: 1 %B (0 min) → 15 %B (1 min) → 40 %B (6 min) → 100 %B (10-13 min) → 1 %B (13.01-16 min)
Flow Rate	: 0.2 mL/min.
Injection Volume	: 2 µL (2 µL sample solution + 10 µL water)
Oven Temperature	: 40 °C
Ionization Mode	: ESI (Positive / Negative)
Probe Voltage	: +2.0 kV / -1.0 kV
Neburizing Gas Flow	: 3.0 L/min.
Drying Gas Flow	: 10.0 L/min.
Heating Gas Flow	: 10.0 L/min.
Interface Temperature	: 400 °C
DL Temperature	: 200 °C
Block Heater Temperature	: 400 °C

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2014年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。