

四重極飛行時間型質量分析計を用いた 鶏ささみ中動物用医薬品の分析

伊藤 友紀、中園 純菜

ユーザーベネフィット

- ◆ 精密質量を取得可能なLCMS-9030によるフルスキャン分析により、動物用医薬品の網羅的測定が可能です。
- ◆ 狭い m/z ウィンドウの抽出イオンクロマトグラム (XIC) 描画により、ノイズや夾雑ピークの少ないクロマトグラムが得られます。
- ◆ ルーチン分析に求められる定量下限をカバーする高感度分析が可能です。

■はじめに

動物用医薬品は、家畜や養殖魚の病気の予防や治療、成長促進など様々な目的で使用されています。動物用医薬品により畜水産物の安定供給が可能な反面、残留した動物用医薬品による健康リスクが問題となっています。そのため、各地域、各国では食品中の動物用医薬品の最大残留基準値 (MRL) を定め厳格に規制しています。

現在、食品中の動物用医薬品の分析には選択性が高く高感度な定量結果が得られるトリプル四重極質量分析計が広く用いられています。しかし、この手法ではターゲットとして想定しない化合物を検知することができず、一度に測定できる成分数に限りがあるため、スクリーニング用途で使うには網羅性に限界があります。このような背景から、食品中の動物用医薬品分析において高分解能質量分析計を用いたフルスキャン分析による網羅的な測定法に注目が集まっています。

本稿では、四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を用いた網羅的測定の事例として、鶏ささみ中の動物用医薬品を分析した事例をご紹介します (図1)。



図1 Nexera™ X3とLCMS™-9030

■サンプルの前処理

本分析には市販の鶏ささみを使用しました。また、動物用医薬品としてサルファ剤およびキノロン剤の混合標準溶液 (林純薬工業株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社) を使用しました。動物用医薬品分析を行うべく、鶏ささみの抽出および精製は株式会社アイスティサイエンスが開発した繰り返し抽出定容法を伴ったSTQ-LC法¹⁾をもとに実施しました。詳細な前処理フローを図2に示します。なお、鶏ささみに動物用医薬品の標準試料を一定濃度添加し、前処理を行うことにより、前処理過程でのロスおよびマトリクスエフェクトの総合的な回収率評価も行いました。

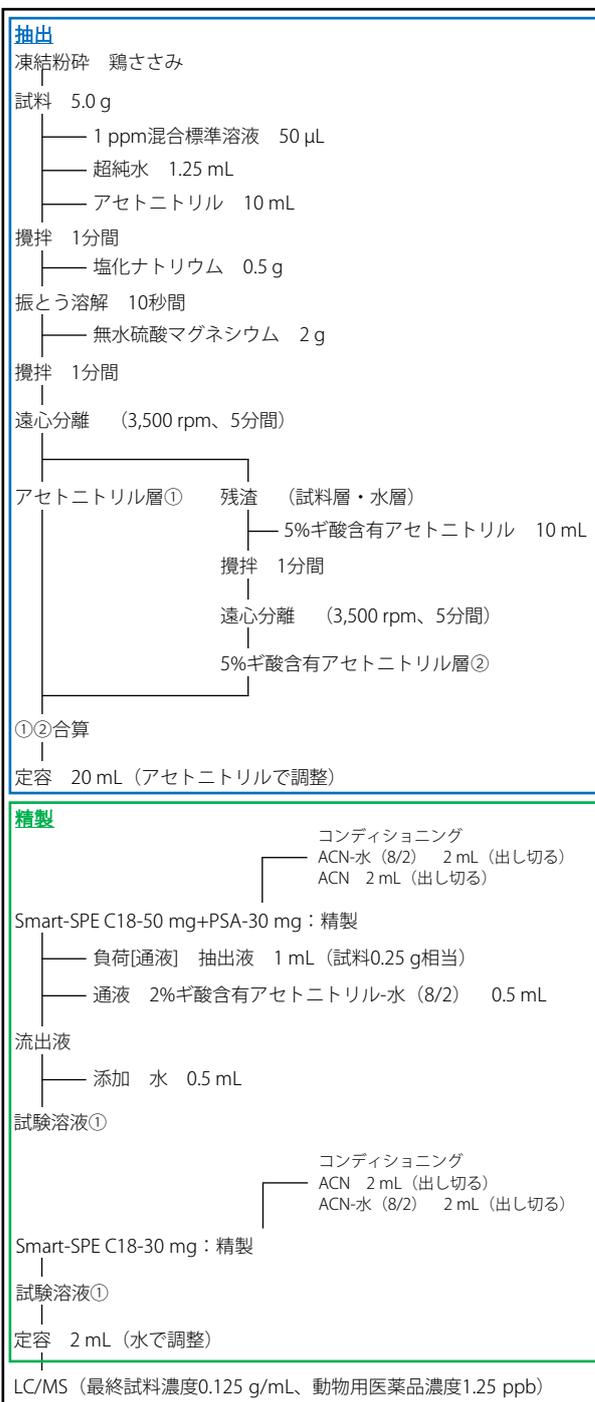


図2 前処理フロー

■ 分析条件

動物用医薬品の分析には、「LC/MS/MSメソッドパッケージ 動物用医薬品Ver.2」に収録されているメソッドをLCMS-9030に適用したメソッドを使用しました。HPLC条件とMS条件を表1に示します。

■ 動物用医薬品の化合物リスト

表2に本実験で使用した動物用医薬品の化合物リストを示します。動物用医薬品の精密質量はLabSolutions Insight Explore™を用いて計算しました。

表1 分析条件

UHPLC (Nexera™ X3 system)		MS (LCMS-9030)	
Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 [Metal free column] (150 mmL×2.1 mmI.D., 2.7 μm) P/N: 227-31073-03	Ionization	: ESI (Positive)
Mobile Phase A	: 0.1% Formic acid-Water	TOF-MS	: <i>m/z</i> 100-1000
Mobile Phase B	: 0.1% Formic acid-Acetonitrile	Nebulizing Gas Flow	: 3.0 L/min
Gradient Program	: B conc. 1% (0 min)-15% (1 min)-40% (6 min)-100% (10-15 min)-1% (15.01-18 min)	Drying gas Flow	: 10.0 L/min
Flowrate	: 0.2 mL/min	Heating gas Flow	: 10.0 L/min
Injection Volume	: 2 μL (Co-injection 10 μL Water)	DL Temp.	: 250 °C
		Block Heater Temp.	: 400 °C
		Interface Temp.	: 250 °C

表2 動物用医薬品の化合物リスト

化合物	分子式	選択したイオン	<i>m/z</i>	保持時間 (min)
Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	332.1405	5.700
Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	358.1562	5.852
Diaveridine	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	261.1346	5.302
Difloxacin	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	400.1467	6.766
Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	360.1718	6.088
Flumequine	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	[M+H] ⁺	262.0874	9.708
Marbofloxacin	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	[M+H] ⁺	363.1463	5.469
Miloxacin	C ₁₂ H ₉ NO ₆	[M+H] ⁺	264.0503	8.598
Nalidixic Acid	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	233.0921	9.633
Norfloxacin	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	320.1405	5.726
Ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	[M+H] ⁺	362.1511	5.620
Orbifloxacin	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	396.1530	6.318
Ormetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	275.1503	5.886
Oxolinic Acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	[M+H] ⁺	262.0710	8.638
Piromidic acid	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	289.1295	10.235
Pyrimethamine	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₄	[M+H] ⁺	249.0902	7.568
Sarafloxacin	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	386.1311	6.649
Sulfabenzamide	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	277.0641	8.914
Sulfabromomethazine Na	C ₁₂ H ₁₃ BrN ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	357.0015	9.730
Sulfacetamide	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	215.0485	5.424
Sulfachlorpyridazine	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	285.0208	7.817
Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	251.0597	5.751
Sulfadimethoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	[M+H] ⁺	311.0809	8.980
Sulfadimidine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	279.0910	6.929
Sulfadoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	[M+H] ⁺	311.0809	8.120
Sulfaethoxypyridazine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	295.0859	8.117
Sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	265.0754	6.425
Sulfamethoxazole	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	254.0594	8.187
Sulfamethoxypyridazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	281.0703	6.891
Sulfametoxydiazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	281.0703	7.328
Sulfamonomethoxine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	281.0703	7.432
Sulfapyridine	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	[M+H] ⁺	250.0645	6.018
Sulfaquinoxaline	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	301.0754	8.947
Sulfathiazole	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	[M+H] ⁺	256.0209	5.783
Sulfatroxazole	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	268.0750	8.311
Sulfisomidine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	279.0910	4.998
Sulfisoxazole	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	268.0750	8.461
Sulfisozole sodium	C ₉ H ₈ N ₃ NaO ₃ S	[M+H] ⁺	240.0437	7.572
Trimethoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	291.1452	5.567

■ LCMS-9030によるフルスキャン分析

1.25 ppbに希釈した39成分の動物用医薬品混合標準溶液、動物用医薬品混合標準溶液を添加し前処理した鶏ささみ抽出液（前処理後のサンプル溶液中動物用医薬品の濃度は1.25 ppb）、およびBlankとしてアセトニトリルと動物用医薬品を添加していない鶏ささみ抽出液をそれぞれフルスキャン分析しました。それぞれにおける動物用医薬品39成分の抽出イオンクロマトグラム（XIC）を図3に示します。なお、XICの描画条件は±20 ppmです。

動物用医薬品混合標準溶液を添加し前処理した鶏ささみ抽出液において、動物用医薬品混合標準溶液と同様に39成分の動物用医薬品すべてを1.25 ppbの濃度で検出することができました。また、A、Bのブランクサンプルにおいて夾雑シグナルがほとんど検出されていないことから、LCMS-9030は動物用医薬品のフルスキャン分析に十分な分解能を有していることが示されました。

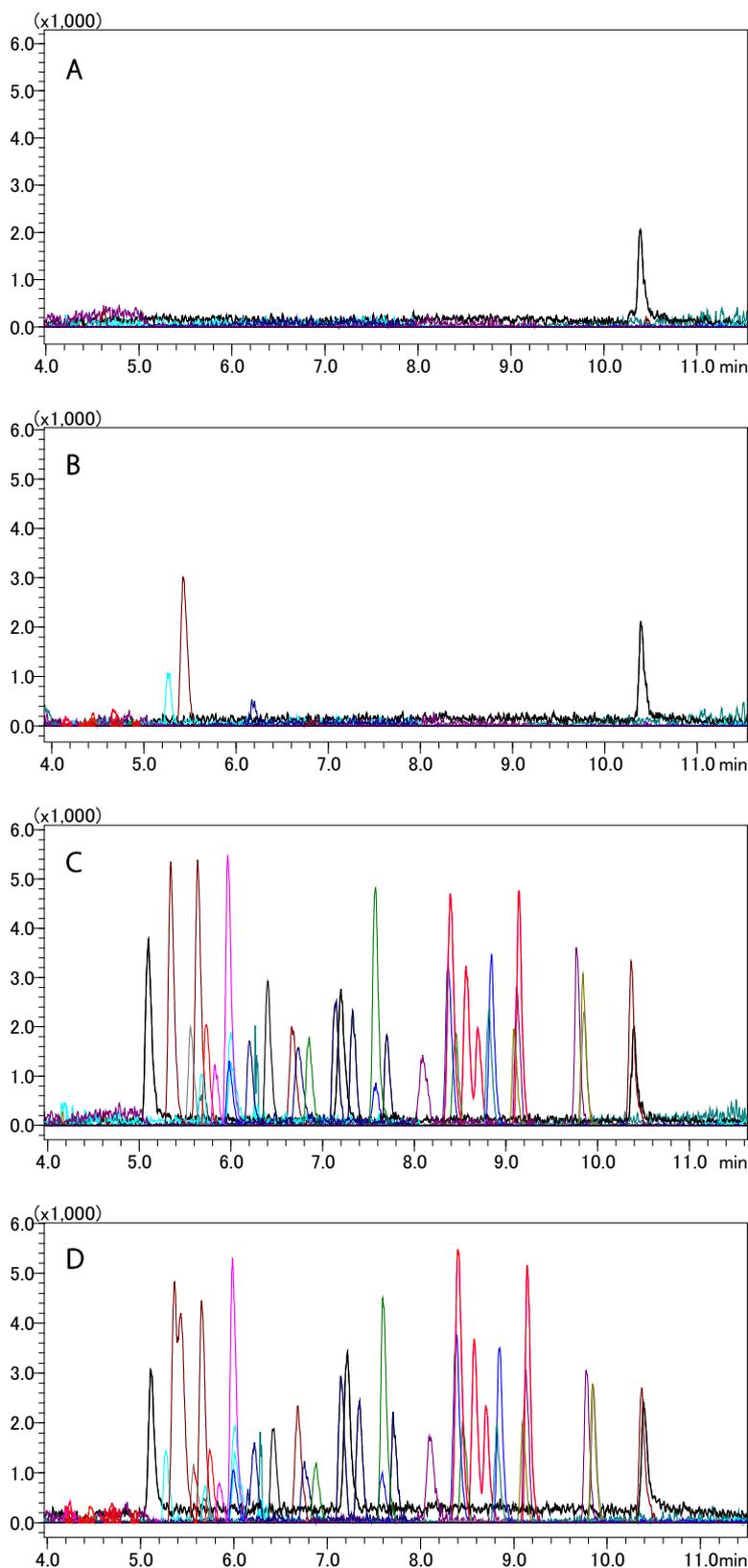


図3 動物用医薬品39成分の抽出イオンクロマトグラム
(A) アセトニトリル、(B) 動物用医薬品未添加鶏ささみ抽出液、(C) 動物用医薬品混合標準溶液、(D) 動物用医薬品添加鶏ささみ抽出液

■直線性

各動物用医薬品の直線性は0.25-50 ppbの範囲での6点検量線（溶媒中および鶏ささみ抽出液中）を作成して評価しました。溶媒中および鶏ささみ抽出液中のどちらにおいても、直線性は全成分で非常に良好な結果（決定係数 R^2 : 0.99以上）を示します。サルファ剤であるSulfamethoxazoleの

溶媒およびマトリクス検量線を図4に、キノロン剤であるEnrofloxacinの溶媒およびマトリクス検量線を図5に例として示します。動物用医薬品全39成分の直線範囲を表3に示します。

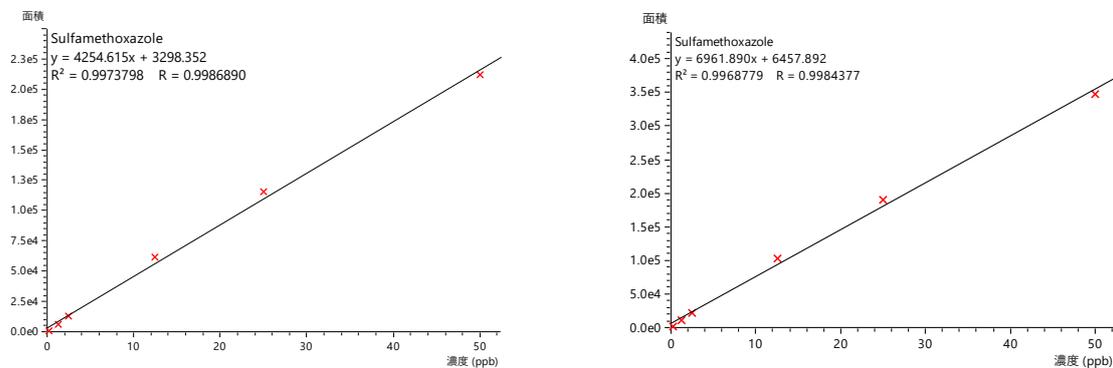


図4 Sulfamethoxazoleの溶媒中の検量線（左）および鶏ささみ抽出液中の検量線（右）

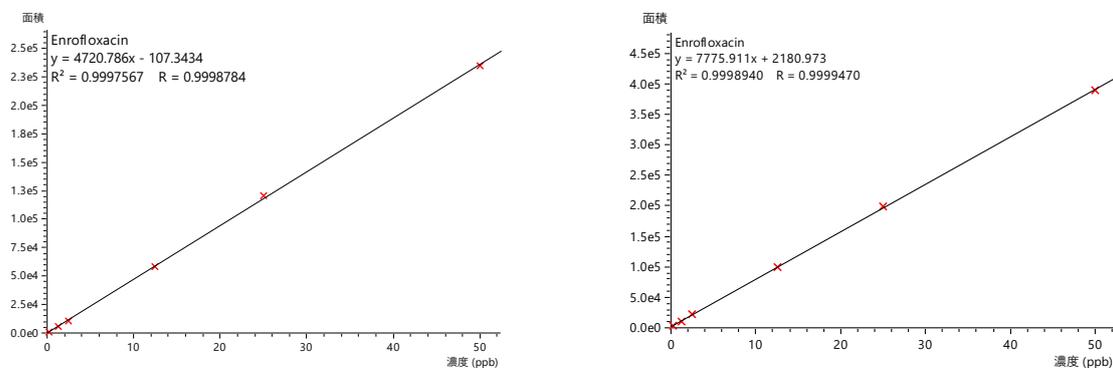


図5 Enrofloxacinの溶媒中の検量線（左）および鶏ささみ抽出液中の検量線（右）

表3 全動物用医薬品の直線範囲

化合物	直線範囲 (ppb)		化合物	直線範囲 (ppb)	
	溶媒中	鶏ささみ抽出液中		溶媒中	鶏ささみ抽出液中
Ciprofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfachlorpyridazine	0.25-50	0.25-50
Danofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadiazine	0.25-50	0.25-25
Diaveridine	0.25-50	0.25-50	Sulfadimethoxine	0.25-50	0.25-50
Difloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadimidine	0.25-50	0.25-50
Enrofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadoxine	0.25-50	0.25-50
Flumequine	0.25-50	0.25-50	Sulfaethoxypyridazine	0.25-50	0.25-50
Marbofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamerazine	0.25-50	0.25-50
Miloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamethoxazole	0.25-50	0.25-50
Nalidixic Acid	0.25-50	0.25-50	Sulfamethoxypyridazine	0.25-50	0.25-50
Norfloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfametoxydiazine	0.25-50	0.25-50
Ofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamonomethoxine	0.25-50	0.25-50
Orbifloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfapyridine	1.25-50	1.25-50
Ormetoprim	0.25-50	0.25-25	Sulfaquinoxaline	0.25-50	0.25-50
Oxolinic Acid	0.25-50	0.25-50	Sulfathiazole	0.25-50	0.25-50
Piromidic acid	0.25-50	0.25-50	Sulfatroxazole	0.25-50	0.25-50
Pyrimethamine	0.25-50	0.25-50	Sulfisomidine	0.25-50	0.25-50
Sarafloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfisoxazole	0.25-50	0.25-50
Sulfabenzamide	0.25-50	0.25-50	Sulfisozole sodium	0.25-50	0.25-50
Sulfabromomethazine Na	0.25-50	0.25-50	Trimethoprim	0.25-50	0.25-50
Sulfacetamide	0.25-50	0.25-50			

■ 添加回収率

混合標準農薬39成分を試料あたり0.01 mg/kg（前処理後のサンプル溶液中濃度は1.25 ppb）となるように添加した鶏ささみ抽出液を用いて、添加回収率および質量誤差（n=6）を確認しました。添加回収率、再現性、質量誤差の結果を表4に、回収率の内訳を図6に示します。

測定した39成分のうち32成分について、回収率が70-120%となりました。高濃度のサンプルを含む試験液においても、マトリクスによる阻害を大幅に受けることなく、良好な回収率および再現性を得ることができました。

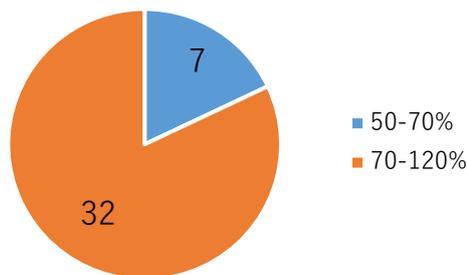


図6 添加回収率の内訳

表4 添加回収率と再現性および質量誤差 (n=6)

化合物	回収率 (%)	%RSD	質量誤差 (mDa)	化合物	回収率 (%)	%RSD	質量誤差 (mDa)
Ciprofloxacin	68.4	5.5	0.2	Sulfachlorpyridazine	125.8	8.0	0.6
Danofloxacin	90.4	5.6	1.0	Sulfadiazine	109.6	2.5	0.0
Diaveridine	92.8	3.0	0.7	Sulfadimethoxine	109.7	3.0	0.9
Difloxacin	70.1	3.7	1.4	Sulfadimidine	110.6	4.4	1.2
Enrofloxacin	116.1	12.1	1.3	Sulfadoxine	117.6	2.6	1.1
Flumequine	98.6	2.7	0.7	Sulfaethoxyipyridazine	120.2	3.5	0.9
Marbofloxacin	61.9	5.0	1.0	Sulfamerazine	114.5	2.6	0.8
Miloxacin	80.3	4.3	0.6	Sulfamethoxazole	115.5	3.2	1.0
Nalidixic Acid	91.8	4.0	0.7	Sulfamethoxyipyridazine	115.4	2.8	0.6
Norfloxacin	71.3	3.3	0.8	Sulfamethoxydiazine	114.7	2.6	0.4
Ofloxacin	74.3	4.3	1.0	Sulfamonomethoxine	114.2	3.5	0.7
Orbifloxacin	68.5	4.1	1.2	Sulfapyridine	65.9	24.4	-0.3
Ormetoprim	97.1	2.8	0.8	Sulfaquinoxaline	112.3	1.9	0.6
Oxolinic Acid	105.2	4.0	0.7	Sulfathiazole	109.4	4.0	0.9
Piromidic acid	86.8	3.7	0.8	Sulfatroxazole	111.3	1.8	0.7
Pyrimethamine	94.3	3.3	0.7	Sulfisomidine	78.0	7.6	1.1
Sarafloxacin	73.4	7.7	0.7	Sulfisoxazole	114.7	2.4	0.7
Sulfabenzamide	108.6	3.2	0.5	Sulfisozole sodium	120.8	4.3	0.8
Sulfabromomethazine Na	111.9	3.4	1.2	Trimethoprim	84.2	2.2	0.8
Sulfacetamide	89.7	4.9	0.6				

■ まとめ

繰り返し抽出定容法を伴うSTQ-LC法により、前処理の迅速、簡便化を図ることができました。前処理した鶏ささみ試料をLCMS-9030を用いてフルスキャン分析したところ、添加回収率、再現性、直線性、質量誤差のいずれも良好な結果が得られました。以上より、本稿で示した分析法は「迅速・簡便・高精度」な動物用医薬品分析が可能であり、食品中の動物用医薬品分析に有用であることが示されました。

<参考文献>

- 1) 島ら、第114回日本食品衛生学会学術講演会ポスター発表資料、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）

LCMS、Nexera、Shim-packおよびLabSolutions Insight Exploreは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

01-00461-JP 初版発行：2022年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ LCMS-9030

四重極飛行時間型質量分析計

関連分野

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ