

Ultivo トリプル四重極 LC-MS を用いた 食肉中動物用医薬品類の分析



Authors

滝埜昌彦

澤田浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、試料精製に脂質除去用ミニカラムである Captiva EMR-Lipid を使用し、測定に Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた食肉中動物用医薬品類の一斉分析法を紹介します。動物用医薬品は家畜や養殖魚の疫病予防などの目的で使用されている医薬品です。これら動物用医薬品は休薬期間を遵守していれば、食肉や養殖魚に基準値以上残留することはありません。しかし、輸入食肉や輸入養殖魚では基準値を超える違反例がしばしば報告されています。従って、食肉や養殖魚中残留動物用医薬品分析は重要です。最近では対象動物用医薬品の増加により、従来の LC を用いた個別分析法から LC-MS を用いた一斉分析法に置き換わってきています。更には、より簡便なスクリーニング手法の研究も盛んに行われています。そこで脂質除去用ミニカラム及びトリプル四重極 LC-MS を用いた食肉中動物用医薬品の迅速な一斉分析法を検討しました。

Key words: 動物用医薬品, 牛肉, 豚肉, 鶏肉, Ultivo, Captiva EMR-Lipid

分析条件

システム

1260 Infinity II Prime pump (G7104C)
 1260 Infinity II Vial Sampler (G7129A)
 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS (G6465AA)
 MassHunter Data Acquisition C.01.00

LC-MS条件

今回の分析はトリプル四重極LC/MS法を使用しました。条件は表1及び2に示した通りです。

表1. 分析条件

LC		Agilent 1260 Infinity II Prime LC System	
移動相	A:0.1% 硝酸 B:メタノール		
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(1.8 µm, 2.1 mm × 100 mm) (P/N:959758-902)		
流速	0.2 mL/min	Time(min)	%B
カラム温度	40 °C	0	5
注入力	1.5 µL	30	100
グラジエント	右図	34	100
MS		Ultivo Triple Quadrupole LC/MS System	
イオン源	Agilent Jet Stream(AJS)		
測定モード	Dynamic MRM (dMRM)		
乾燥ガス	350 °C 10L/min		
シースガス	400 °C 12 L/min		
ネブライザ圧	50 psi		
キャピラリー電圧	4000 V		
ノズル電圧	0 V		

表2. 各動物用医薬品のMRM条件

動物用医薬品	プリカーサー		プロダクト		コリジョンエネルギー		極性	動物用医薬品	プリカーサー		プロダクト		コリジョンエネルギー		極性	動物用医薬品	プリカーサー		プロダクト		コリジョンエネルギー		極性
	定量	確認	定量	確認	定量	確認			定量	確認	定量	確認	定量	確認			定量	確認	定量	確認	定量	確認	
Amprolium	244	150	151	17	8	正	Sulfachlorpyridazine	285	156	92	17	33	正	Sulfantran	334	133	136	29	29	負			
Sulfaguanidine	215	92	108	29	25	正	Pyrimethamine	249	233	177	33	33	正	Sulfabromomethazine	357	92	108	49	41	正			
Dicyclanil	191	41	43	25	53	正	Dimetomid	224	42	181	16	8	負	Oxacillin	402	243	160	13	16	正			
Olaquinox	264	143	212	41	25	正	Sulfadoxine	311	156	92	17	33	正	Pheneticillin	403	160	114	13	49	正			
Sulfisomidine	279	124	186	25	20	正	Halofuginone	414	100	120	29	29	正	Nitroxymil	289	127	162	29	25	負			
Sulfacetamide	215	92	156	25	20	正	Carazolol	299	116	56	20	40	正	Trenbolone (a,b)	271	253	107	25	37	正			
5-Hydroxy-thiabendazole	218	191	147	29	41	正	Oxfendazole	316	159	191	45	25	正	Josamycin	829	174	109	38	60	正			
Clopidol	192	101	51	33	55	正	Oxybendazole	250	218	176	21	41	正	Brotizolam	393	314	279	29	41	正			
Lincomysin	407	126	359	33	21	正	Mafoprozine	402	193	180	32	40	正	Piromidic acid	289	271	243	20	35	正			
Levamisole	205	178	91	25	45	正	2-Acetamino-5-nitrothiazole	186	139	96	13	25	負	Fenbendazole	300	268	159	24	45	正			
Sulfadiazine	251	92	108	29	25	正	Sulfamethoxazole	254	92	108	29	25	正	Robenidine	334	111	155	53	25	正			
5-Phosphoryl-1H-benzimidazole-2-amine	240	133	198	35	25	正	Sulfaethoxyypyridazine	295	92	156	37	21	正	Menbutone	259	241	159	12	9	正			
Thiabendazole	202	175	131	29	41	正	Florphenicol	356	185	336	17	5	負	Zeranol	321	277	303	15	30	負			
Diaveridine	261	245	123	33	29	正	Sulfatrazazole	268	92	108	37	33	正	Nafacillin	415	199	171	25	49	正			
Ampicillin	350	106	160	20	10	正	Tilmicosin	436	174	697	29	25	正	Praziquantel	313	203	83	16	32	正			
Sulfathiazole	256	156	92	13	29	正	Miloxacin	264	246	215	12	28	正	Ketoprofen	255	209	105	12	25	正			
Sulfapyridine	250	92	108	33	29	正	Chloramphenicol	321	152	176	17	17	負	Flunixin	297	279	264	29	41	正			
Trimethoprim	291	230	123	25	29	正	Oxolinic acid	262	244	216	20	32	正	Meloxicam	352	115	141	25	25	正			
Marbofloxacin	363	72	345	27	25	正	Oleandomycin	688	158	544	33	17	正	Dicloxacillin	470	160	311	17	17	正			
Enoxacin	321	303	232	25	45	正	Ethopabate	238	206	136	9	29	正	Fenobucarb	208	95	152	13	5	正			
Sulfamerazine	265	92	108	33	29	正	Chlorhexidine	253	170	177	17	13	正	Triclabendazole metabolite	331	168	170	36	32	正			
Pyrantel	207	150	109	33	49	正	Sulfabenzamide	277	156	92	13	37	正	Warfarin	309	163	251	12	25	正			
Norfloracin	320	302	276	19	15	正	Erythromycin A	735	576	158	25	29	正	Altrenogest	311	227	269	24	12	正			
Ofloracin	362	318	261	20	30	正	Prednisolone	361	343	147	9	25	正	Famphur	326	217	93	21	37	正			
Carbadox	263	231	90	12	36	正	Clostron	378	342	142	10	35	負	Rifaximin	786	754	151	24	39	正			
Ormetoprim	275	259	123	29	29	正	Hydrocortisone	363	121	327	35	25	正	Clostebol	323	143	131	39	39	正			
Ciprofloxacin	332	314	231	24	44	正	Sulfadimethoxine	311	156	92	25	37	正	Carprofen	272	228	226	13	37	負			
Nitrofurazone	199	54	182	41	13	正	Sulquinolaxin	301	156	92	17	33	正	Nicarbazin	301	137	107	13	41	負			
Lomefloxacin	352	265	308	28	16	正	Bromacil	261	205	188	15	33	正	Emamectin B1a	887	158	82	41	45	正			
Thiamphenicol	354	185	290	21	9	負	Tylosin	917	174	43	45	55	正	Norgestomet	373	313	271	12	16	正			
Danofloxacin	358	340	82	25	45	正	Benzocaine	166	138	120	13	25	正	Diflubenzuron	311	158	141	13	41	正			
Sulfadimidine	279	186	92	17	37	正	Difurazone	361	222	58	21	41	正	Diclazuril	405	334	35	20	40	負			
Enrofloxacin	360	316	342	20	25	正	Oxfendazole sulfone	332	300	159	29	53	正	Febantel	447	383	415	21	12	正			
cefazolin	455	323	156	10	20	正	PenicillinG	335	160	176	13	13	正	Novobiocin	613	189	218	41	17	正			
Azapero	328	165	123	25	41	正	Mebendazole	296	264	77	25	55	正	Triclabendazole	359	274	344	45	37	正			
Orbifloxacin	396	267	378	41	25	正	Albendazole	266	234	191	25	37	正	Triclabendazole_負	357	197	342	30	25	負			
Xylazine	221	90	164	25	29	正	Methylprednisolone	375	357	161	9	21	正	Chlormadinone	405	309	345	16	12	正			
Sulfamonomethoxine	281	92	108	33	29	正	Nalixic acid	234	216	188	17	33	正	Melengestrol	397	337	279	13	25	正			
Neospiramycin	350	174	160	15	10	正	Tiamulin	494	192	119	25	45	正	Toifenamic acid	262	244		13		正			
Trichlorfon	257	109	221	21	9	正	Prifinium	306	86	91	29	45	正	Toifenamic acid	262	201		41		正			
Sarafloxacin	386	368	342	25	25	正	Dexamethasone	393	373	355	0	13	正	Bithionol	353	192	161	33	29	負			
Morantel	221	123	111	41	29	正	Flubendazole	314	282	123	25	45	正	Decoquinat	418	372	204	29	45	正			
Difloxacin	400	382	356	29	25	正	Phenoxyethylpenicillin metanol	383	160	114	16	45	正	Allethrin	303	135	123	9	13	正			
Spiramycin I	422	174	101	20	25	正	Phenoxyethylpenicillin	351	160	114	8	40	正	Temephos	467	125	419	41	21	正			
Tripeleennamine	256	211	91	16	45	正	Flumequin	262	244	202	21	41	正	Cloasatel	661	345	127	40	45	負			
Sulfamethoxyypyridazine	281	156	108	17	29	正	Valnemulin	565	263	164	16	39	正	Monensin	689	635	617	17	25	正			
Isometamidium	460	313	298	20	20	正	Sulfantran	334	133	136	29	29	負										

混合標準液

動物用医薬品混合標準液は富士フィルム和光純薬混合標準液(PL-1-3,PL-2-1)及び各動物用医薬品アセトニトリル溶液(1000 ppm)を混合した後、80%アセトニトリル水溶液を希釈液として各濃度に調製しました。

試料調製

試料はスーパーマーケットで購入した牛、豚、鶏の赤身肉及び豚レバーを使用しました。試料25gを正確に秤量後、1%ギ酸含有アセトニトリル溶液50mLを用いホモジナイザーで抽出(10000回転/5分)を行いました。抽出液は遠心分離(4000回転/5分)後、25mLを遠沈管(50mL)に移し、塩(4g硫酸マグネシウム、1g塩化ナトリウム、1gクエン酸ナトリウム及び0.5gクエン酸二ナトリウムセスキ水和物)を添加後、1分間激しく振とうしました。遠心分離(4000回転/5分)で得た上清4mLを超純水で5mLに定容し、Agilent Captiva EMR-Lipidに負荷し、固相抽出用マニホールドを用いて減圧下で1mL/min程度の速度で溶出しました。初めの1mLを捨てた後、1mLを捕集し、0.45μmのシリンジフィルターでろ過し試験溶液としました。

結果

標準液

今回、確立した分析法での感度、直線性を確認しました。図1に0.1ppb標準液における動物用医薬品のS/N分布を示しました。0.1ppb標準液でS/N<10の化合物は、不検出の7化合物を含めて図1に示した15化合物でした。これら化合物は1ppbでは十分測定可能でした。

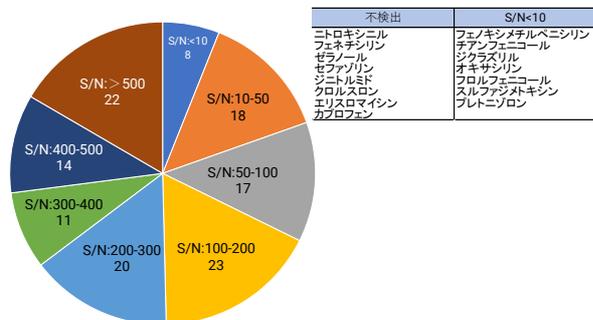


図1 各動物用医薬品のS/N分布 (濃度:0.1 ppb)

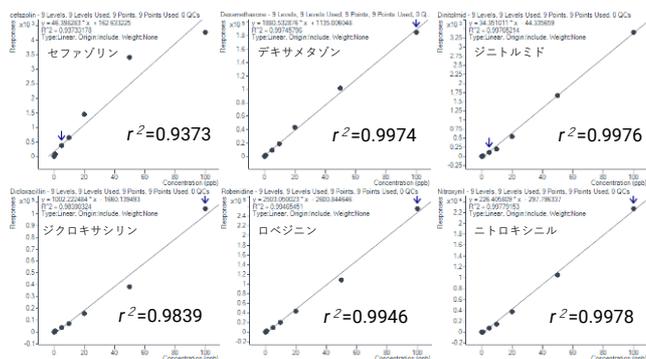


図2 直線性の劣った動物用医薬品の検量線 (濃度範囲:0.1~100 ppb)

直線性は0.1~100 ppbで検量線を作成して評価しました。図2に示した化合物は高濃度でのイオン化効率低下及び化合物の吸着や分解により決定係数が0.999以下でしたが、その他化合物は良好でした。

Captiva EMR-Lipidによる試料精製

Captiva EMR-Lipidは試料中の脂質除去に有効であり、食肉中マトリックス成分の除去が可能です。そこで標準品を添加した試料粗抽出液を用いて評価しました。各食肉抽出液中動物用医薬品の溶出プロフィールを図3に示しました。結果、初留(1 mL)で回収率の低い化合物が存在しましたが、2 mL以上では60%以上の回収率が得られました。従って、Captiva EMR-Lipidによる精製は初留を1 mL捨てた後、1 mLを捕集しました。

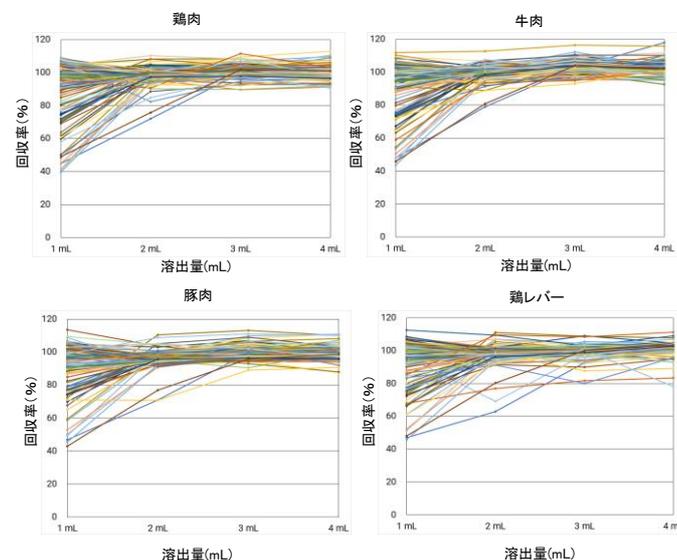


図3 標準液による動物用医薬品の溶出プロフィール

Captiva EMR-Lipidによるマトリックス除去効果はスクランモード測定で評価しました。結果のTIC及びイオン化阻害率を図4及び図5に示しました。

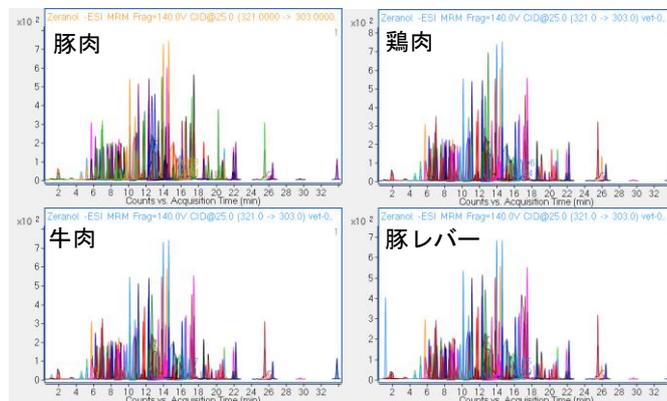


図4 各試料抽出液のTIC

