

LC-MS/MS による残留動物用医薬品分析におけるマトリックス効果の影響

— 食品衛生外部精度管理調査結果から —

小山和志¹・山本明彦¹・山下晃子¹

令和4年度一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所（以下、秦野研究所）が実施した残留動物用医薬品検査に係る食品衛生外部精度管理調査（以下、外部精度管理）に参加した。調査では鶏肉（むね）ペースト中のスルファジミジンを分析して結果を報告したところ、報告値は添加濃度の73.6%と低値であり、その原因は分析 LC-MS/MS 法によるマトリックス効果の影響が懸念された。希釈法によりマトリックス効果軽減の検討を行った結果、本調査試料に対し、当研究所の分析条件における適正な希釈倍率は50倍であった。

キーワード：残留動物用医薬品、スルファジミジン、LC-MS/MS 法、マトリックス効果、外部精度管理調査

1 はじめに

都道府県等は食品の安全性の確保のため、取去した食品及び器具又は容器包装等の検査をするための施設、食品衛生検査施設を設置しなければならないとされ¹⁾当研究所はそれに該当する。また、検査施設における検査結果の信頼性確保を図るため、食品衛生検査施設における検査等の業務管理方法が食品衛生法施行令²⁾・施行規則³⁾及び関係通知⁴⁾で示され、外部精度管理調査への参加も義務付けられている。その実施機関としては秦野研究所が国から認定されている⁵⁾。

当研究所では従来から取去食品等の残留動物用医薬品検査を実施している⁶⁾ことから、当該精度管理に毎年参加しており、令和4年度も参加した。

外部精度管理調査に係る分析法は、実施要領において参加機関の検査実施標準作業書（以下、SOP）によることと決められている。当研究所の SOP は平成18年5月のポジティブリスト制度（農薬等が一定の量を超えて残留する食品の販売等を原則禁止する制度）の施行に合わせて厚生労働省が平成17年1月に通知した試験法⁷⁾に平成17年11月に追加された「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」⁸⁾（以下、通知法）に準じた分析法の妥当性を評価⁹⁾、¹⁰⁾して作成したものである。通知法は平成18年10月には LC-MS/MS を分析装置として使用が可能になり¹¹⁾、平成19年2月

には対象項目が追加¹²⁾される等順次改定された。

秦野研究所から配布された検体について SOP によりスルファジミジンを分析しその結果を報告したところ、報告値の統計解析の結果は Z-スコア -1.531（従来方式）でその評価は $|Z| \leq 2$ の満足であったが、報告値は低値（添加濃度73.6%）であった。分析は LC-MS/MS 法であったことから、夾雑物によるマトリックス効果¹³⁾、¹⁴⁾、¹⁵⁾の影響が懸念されるためその検討を行ったところ、良好な結果と若干の知見が得られたので報告する。

2 分析方法

2.1 試料

試料は令和4年9月秦野研究所から送付された「2022年度食品衛生外部精度管理調査残留動物用医薬品検査調査試料鶏肉（むね）ペースト中のスルファジミジン（調査番号22VD）」で、分析を開始するまで -30°C で保存した（表1）¹⁶⁾。

なお、ブランク試料には予めスルファジミジンが検出されないことを確認した冷凍保存の鶏肉（もも）を用いた。

2.2 試薬及び標準品

2.2.1 試薬

アセトニトリル：LC/MS 用（関東化学）、残留農

1 長野県環境保全研究所 食品・生活衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

- 薬試験用（関東化学又は富士フィルム和光純薬）
- 蒸留水：LC/MS 用（関東化学）
- n-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学又は富士フィルム和光純薬）
- n-プロパノール：試薬特級（関東化学）
- 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用（関東化学又は富士フィルム和光純薬）
- トリフルオロ酢酸：HPLC 用（関東化学）

表 1 調査試料の概要

調査対象物質：スルファジミジン 調査試料の形態：鶏肉（むね）ペースト 添加物質：スルファジミジン（食品分析用，関東化学） 添加濃度：0.080 μg/g 保管条件：冷凍（-20℃以下） 均質性 ^{※1} 平均値：0.0737 μg/g 標準偏差：0.000958 相対標準偏差：0.013(無名数)
安定性 ^{※2} 安定性確認時の濃度/均質性確認時の濃度(%)：93.2 標準偏差(%)：1.25

注：※1) 全調査試料から系統的に10個の容器を抽出し各容器から無作為に2部位を採取してそれぞれについて測定
 ※2) 報告期限日以降に10個の容器で測定

2.2.2 標準品

スルファジミジン：HPLC 用（富士フィルム和光純薬）
 その他一斉分析対象項目：HPLC 用，食品分析用等（富士フィルム和光純薬又は関東化学）

2.3 試験溶液の調製

試料を冷蔵 5℃で一昼夜解凍後，配布容器中でスパーテルを用いてよくかき混ぜて検体とした。その検体について図 1 に示した当研究所 SOP のフローにより脱水，脱脂等による夾雑物の除去を同時に行いながらスルファジミジンをアセトニトリルへホモジナイズ抽出した。ホモジナイズは細心の注意を払ったが，通常の検体とは異なり遠心沈殿管の壁にわずかに検体が残った。抽出液はロータリーエバポレーターで可能な限り濃縮し，最後は窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固させた。溶媒除去に必要な時間は約 20 分/検体であった。なす形フラスコの残留物は水・アセトニトリル (6:4) 混液(以下，希釈液)1mL を加えて溶解させたが，通常の検体とは異なりべっ

たりと底に付着し容易には溶解しなかったため超音波洗浄機を用いた。その液をアセトニトリル飽和 n-ヘキサンで再度脱脂を行って得られた水・アセトニトリル層（以下，粗試験溶液）は約 0.6~0.9mL であった。この 0.3mL の差はアセトニトリル飽和 n-ヘキサン層と水・アセトニトリル層間のエマルジョン量の差であり，遠心分離を繰り返しても解消しなかった。

粗試験溶液を検量線の直線性，希釈誤差等を勘案し，希釈液で希釈して試験溶液とした。

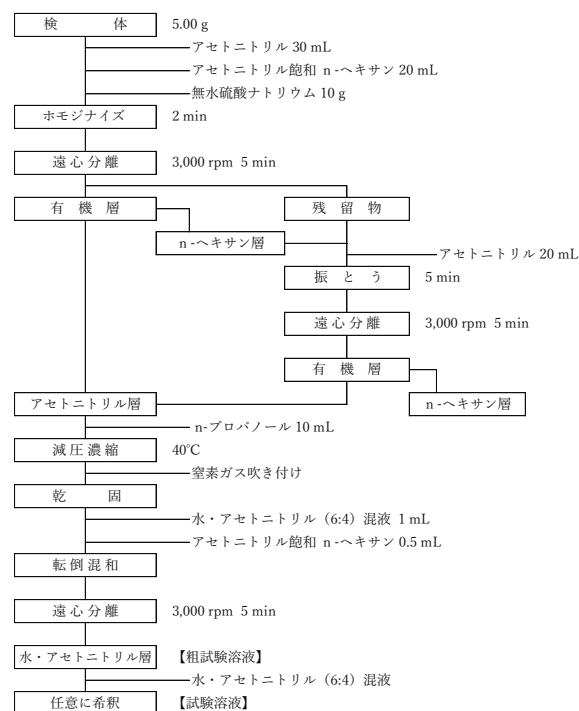


図 1 試験溶液調製フロー

2.4 分析装置及び操作条件

2.4.1 分析装置

LC-MS/MS

LC 部：Nexera XR（島津製作所）

MS/MS 部：LCMS-8050（島津製作所）

2.4.2 操作条件等

LC-MS/MS 操作条件を表 2 及び表 3 に示した。なお，本報告に係る分析項目はスルファジミジンのみであるが，当該項目は一斉分析法で分析を実施しているため，参考としてその他の項目についても示した。

表2 LC-MS/MS 操作条件①

LC部操作条件		
カラム	: Inertsil Sulfa C18 (3.0mmI.D.×150mm, 3μm, ジーエルサイエンス)	
カラム温度	: 40°C	
移動相	A: アセトニトリル B: 0.05%トリフルオロ酢酸	
グラジエント条件	時間(min)	A液(%) B液(%)
	0.0	1 99
	35.0	100 0
	40.0	100 0
	40.1	1 99
	45.0	1 99
流量	: 0.400mL/min	
保持時間(目安)	: 表3参照	
試料温度	: 4°C	
注入量	: 5μL	
MS/MS部操作条件		
イオン化モード	: ESI (+)	
ネブライザーガス流量	: 3.00L/min	
ドライイングガス流量	: 3.00L/min	
ヒーティングガス流量	: 17.00L/min	
ヒートブロック温度	: 400°C	
DL温度	: 200°C	
インターフェース温度	: 300°C	
CIDガス	: アルゴン, 270kPa	
MRM条件	: 表3参照	

表3 LC-MS/MS 操作条件②

NO.	動物用医薬品名等	保持時間の目安 (min)	Q1 ^{※1} (m/z)	定量用			確認用	
				Q3 ^{※2} (m/z)	CE (V)	Q3 ^{※2} (m/z)	CE (V)	
1	スルファセタミド	7.7	215	156	10	92	29	
2	スルファチアゾール	8.7	256	156	14	92	26	
3	スルファピリジン	8.9	250	156	16	92	27	
4	リンコマイシン	9.3	407	126	26	359	19	
5	スルファメラジン	9.5	265	156	16	92	29	
6	アルベンダゾール ^{※3}	9.8	240	133	26	198	19	
7	レバミゾール	10.0	205	178	19	91	39	
8	スルファジミジン	10.4	279	186	17	92	30	
9	トリメトプリム	10.5	291	230	23	123	25	
10	スルファメトキシピリダジン	10.8	281	156	17	92	31	
11	オルメトプリム	11.1	275	123	24	259	26	
12	スルファモノメトキシ	11.9	281	156	18	92	33	
13	スルファクロルピリダジン	12.5	285	156	15	92	27	
14	スルファドキシ	13.2	311	156	20	92	34	
15	スルファメトキサゾール	13.3	254	156	14	92	26	
16	オキシベンダゾール	14.2	250	218	17	176	26	
17	ピリメタミン	14.3	249	177	29	128	45	
18	オキシロニック酸	14.6	262	160	38	216	29	
19	スルファベンズアミド	15.0	277	156	12	92	26	
20	エトパベート	15.1	238	136	27	164	21	
21	メベンダゾール	15.2	296	264	21	105	31	
22	スルファジメトキシ	15.3	311	156	20	92	32	
23	スルファキノキサリン	15.4	301	156	17	92	29	
24	フルベンダゾール	16.0	314	282	23	123	34	
25	ナリジクサ酸	17.3	233	215	14	187	27	
26	フルメキン	17.8	262	244	20	202	30	
27	チアムリン	18.5	494	192	22	119	39	
28	ファムフル	22.2	326	217	18	93	30	
29	ジフルベンズロン	24.4	311	158	17	141	31	

注 ※1): プリカーサーイオン
 ※2): プロダクトイオン
 ※3): 代謝物 (5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン)

2.5 検量線の作成

スルファジミジン等の標準原液を希釈液で段階的に希釈し、各 0.5~100ng/mL の混合標準溶液列を調製した。その溶液列を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積から絶対検量線を作成した。スルファジミジンの検量線は図 2 に示したように 0.5~20ng/mL 濃度範囲で R 及び R²>0.999 の良好な直線性が確認できた。装置コンディション等により、その濃度範囲がわずかに変動することがあった。

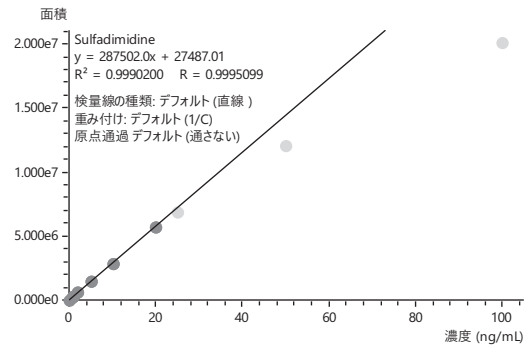


図2 スルファジミジンの検量線

2.6 定量下限値

スルファジミジン等の定量(報告)下限値は、0.01mg/kg (ppm) である。

3 結果及び考察

3.1 分析結果

スルファジミジンの外部精度管理調査試料の分析結果を表4, また、その代表的な LC-MS/MS (MRM) クロマトグラムを図3に示した。秦野研究所への報告は粗試験溶液を 25 倍希釈した試験溶液の結果について行った。秦野研究所による当該外部精度管理調査に係る全体の解析結果(従来方式)の抜粋を表5¹⁶⁾に示した。なお、解析はロバスト方式でも行われているがその解析結果等は省略した。

報告値の平均値は 0.0589 μg/g (CV 3.7%) であり、解析の結果は Z-スコア-1.531 でその評価は満足であった。しかし、それは添加濃度(0.080 μg/g)の 73.6%に相当し低値であったことから、その原因の確認が必要と考えられた。

クロマトグラム, CV 及び検量線等に問題は認められないため、この低値は分析に用いた LC-MS/MS 法由来の試験溶液に含まれる夾雑物によるマトリックス効果が原因と考えられた。

表 4 分析値と希釈倍率

希釈倍率	25倍		50倍		100倍	
	測定値 (ng/mL)	分析値 ($\mu\text{g/g}$)	測定値 (ng/mL)	分析値 ($\mu\text{g/g}$)	測定値 (ng/mL)	分析値 ($\mu\text{g/g}$)
1	11.099	0.0565	6.345	0.0646	3.364	0.0682
2	11.707	0.0596	6.222	0.0633	3.202	0.0649
3	11.856	0.0603	6.234	0.0635	3.127	0.0634
4	11.163	0.0568	6.524	0.0664	3.336	0.0676
5	12.054	0.0614	6.547	0.0666	3.140	0.0636
平均	-	0.0589	-	0.0649	-	0.0655
CV(%)	-	3.7	-	2.4	-	3.4

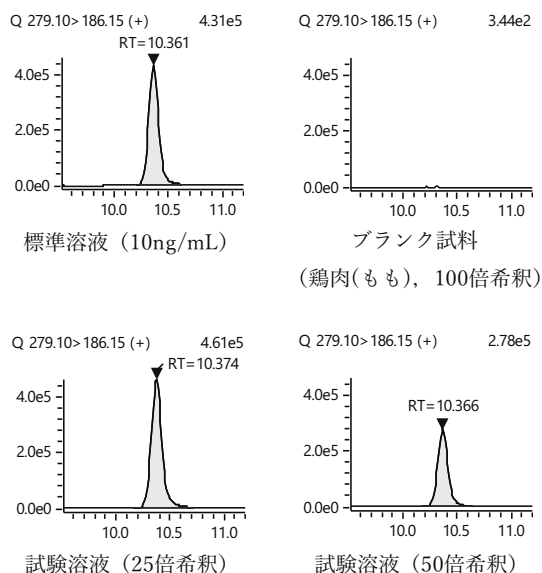


図 3 LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

表 5 調査試料の解析結果の概要

回収機関数 : 160
データクリーニングによる除外 : 1機関
2シグマ処理による除外 : なし
データ数 (有効機関数) : 159機関
付与値 (平均値) : 0.076398 ($\mu\text{g/g}$)
標準偏差 : 0.011414 ($\mu\text{g/g}$)

注) 解析 : 従来方式

3. 2 マトリックス効果軽減の検討

LC-MS/MS 法でのマトリックス効果とは、試験溶液中の夾雑物の影響で目的成分のイオン化効率が変わり分析値が上下することである。この度は分析

値が低値であったことから、マトリックス効果の内イオン化抑制 (以下、イオンサプレッション) に該当すると考えられた。

イオンサプレッションを抑制させる方法^{13),14),15)}としては、①固相カラム等による夾雑成分の除去、②LCでの夾雑成分との分離の向上、③サロゲート物質を用いた内部標準法及び④標準添加法等が知られている。①、②についてはスルファジミジンのピークの保持時間付近に溶出している夾雑成分が不明であり、③については費用面、④については試験溶液量が少ない等により現実的ではないため、試験溶液の希釈によるイオンサプレッションの抑制を試みた。

粗試験溶液を 50 倍希釈した試験溶液の分析結果の平均は $0.0649 \mu\text{g/g}$ (CV 2.4%)、対添加濃度 81.1%、100 倍希釈については $0.0655 \mu\text{g/g}$ (CV 3.4%)、対添加濃度 81.9%と高くなったことから、イオンサプレッションの発生が裏付けられ、希釈によりその影響が抑制されたと考えられる。また、50 倍希釈と 100 倍希釈の間で分析値の大きな変化がなく希釈誤差を勘案すると、この度の検体の適正な希釈倍率は 50 倍付近であったと考えられた。

なお、LC-MS 法に係る文献ではあるが LC-MS は機種によってイオン化に差があり、ある機種ではイオン化阻害がなくても、他の機種ではイオン化阻害が大きい旨の報告¹⁷⁾があることから、この 50 倍希釈については、あくまでも当研究所における適正倍率と考えられる。

4 まとめ

令和 4 年度、秦野研究所が実施した残留動物用医薬品検査に係る外部精度管理調査 (鶏肉 (むね) ペースト中のスルファジミジン) に参加した。その報告は通知法に準じて作成し、妥当性の評価を行った分析法により得られた結果で行った。報告値の統計解析の結果は Z-スコア -1.531 でその評価は満足であったが、添加濃度の 73.6%に相当し低値であったことから、その原因を探ったところ以下の知見が得られた。

(1) 粗試験溶液を 25 倍希釈して分析し、報告した結果の平均は $0.589 \mu\text{g/g}$ (CV 3.7%) であったのに対し、50 倍希釈した分析結果の平均は $0.0649 \mu\text{g/g}$ (CV 2.4%)、対添加濃度 81.1%、100 倍希釈は $0.0655 \mu\text{g/g}$ (CV 3.4%)、対添加濃度 81.9%であっ

たことから、報告値はイオンサプレッションの影響を受けていたと考えられた。また、その対処には希釈法が有効であることが分かった。

(2) この度の検体について、当研究所で分析を行う場合には、マトリックス効果等を勘案すると 50 倍程度の希釈が適切と考えられた。

(3) LC-MS/MS 法でスルファジミジン等の分析対象成分が検出された場合には、試験溶液の段階的な希釈等何らかの方法で分析結果がマトリックス効果を受けていないことの検証が必要と考えられた。

(4) 今後、検体の種類や分析項目ごとに適切な希釈倍率の組み合わせの取りまとめが必要と考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省，食品衛生法（昭和二十二年法律第二百三十三号）
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=78330000&dataType=0&pageNo=1
（令和 5 年 11 月 15 日確認）
- 2) 厚生労働省，食品衛生法施行令（昭和二十八年政令第二百二十九号）
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=78331000&dataType=0&pageNo=1
（令和 5 年 11 月 15 日確認）
- 3) 厚生労働省，食品衛生法施行規則（昭和二十三年厚生省令第二十三号）
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=78332000&dataType=0&pageNo=1
（令和 5 年 11 月 15 日確認）
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知（平成 16 年 3 月 23 日付け食安監発第 0323007 号）「食品衛生検査施設における検査等の業務管理について」。
- 5) 厚生省生活衛生局長通知（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 118 号）「食品衛生検査施設等の外部精度管理調査の実施機関について」。
- 6) 長野県環境保全研究所，業務年報第 19 号令和 4 年（2022 年）度。
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号）「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について」。
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 17 年 11 月 29 日付け食安発第 0129002 号）「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について（一部改正）」。
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号）「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」。
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号）「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」。
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 18 年 10 月 3 日付け食安発第 1003001 号）「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について（一部改正）」。
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成 19 年 12 月 28 日付け食安発第 1228004 号）「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の一部改正について」。
- 13) 望月直樹（2011）食品の安全における LC-MS/MS 分析の問題点，The Pharmaceutical Society of Japan, 131(7)：1019-1025.
- 14) 中村洋企画・監修，LC/MS，LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決第 1 版（公益社団法人日本分析化学会）。
- 15) 中村洋企画・監修，LC/MS，LC/MS/MS Q&A100 虎の巻第 1 版（公益社団法人日本分析化学会）。
- 16) （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所，2022年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書。
- 17) 大野ちづ子ら（2009）LC/MS による化学物質の分析法開発に携わっての一考察，徳島県保健環境センター年報，No.27：45-48.

Influence of matrix effects on residual veterinary drug analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).
-From the results of external quality assessment programs for food hygiene-

Kazushi KOYAMA¹, Akihiko YAMAMOTO¹ and Akiko YAMASHITA¹

1 Food and Pharmaceutical Sciences Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan