

研 究

LC-MS/MSを用いた動物用医薬品一斉分析法の改良の検討

山口麻綾, 佐々木秀樹

宮城県食肉衛生検査所

要 約

当所ではLC-MS/MSを用いた動物用医薬品の検査法に、一斉分析法を採用しているが、分析法の妥当性評価において当初目標としていた化合物の一部で妥当性を確認することができなかった。そこで、品質工学のパラメータ設計の手法を用いて操作フローの検討を行い、分析法の改良を試みた。すなわち因子と水準を設定して試行実験を行い、最適条件を決定した。次に、最適条件と現行の条件の改善効果度合いを推定し、確認実験により理論の再現性を判断した。その結果、複数の化合物において精度が上がる可能性が示唆されたものの、目標とした化合物での理論の再現性は認められなかった。このことから、操作フローの一部改良では大きな改善は望めないことが示唆され、分析対象化合物の種類を増加するには別の一斉分析法等を検討するなど、大幅な変更が必要と考えられた。

キーワード：一斉分析法, LC-MS/MS, 残留動物用医薬品検査, 品質工学

当所における動物用医薬品一斉分析法（以下、本法）は、QuEChERS法で抽出後にEnhanced Matrix Removal-Lipid（以下、EMR）を用いて分散固相抽出を行い、液体クロマトグラフタンデム四重極質量分析計（以下、LC-MS/MS）で測定する方法である。QuEChERS法とは迅速かつ簡便に試料の前処理を行うことができる手法として2003年にアメリカで最初に発表された方法¹⁾であるが、当所ではY.Jungら²⁾の報告を基に本法の検査系を構築した。運用にあたり、本法の妥当性評価を行ったところ、豚筋肉および牛筋肉で13種類、鶏の筋肉では10種類の化合物について妥当性が確認できた。今回、分析対象化合物の増加を目的として、品質工学におけるパラメータ設計の手法を用いて一連の操作フローの検討を行ったところ、一定の成果が得られたため、その概要を報告する。

材料および方法

検体は豚の筋肉を用いた。分析対象化合物は表1に示した20種類（以下、各化合物は表1の略称で示す）とした。使用した試薬等は表2に示した。

表1 分析対象化合物

化合物名称(略称)	
オキシテトラサイクリン(OTC)	スルファメラジン(SMR)
クロルテトラサイクリン(CTC)	スルファメトキサゾール(SMX)
テトラサイクリン(TC)	スルファモノメキシム(SMM)
シプロフロキサシン(CPFX)	スルファキノキサリン(SQX)
エンロフロキサシン(ERFX)	ベンジルペニシリン(PCG)
ダノフロキサシン(DNFX)	セファゾリン(CEZ)
マルボフロキサシン(MBFX)	エリスロマイシンA(EM)
オルビフロキサシン(OBFX)	リンコマイシン(LCM)
スルファジメトキシ(SDM)	タイロシン(TS)
スルファジミジン(SDD)	ワルファリン(WF)

本法において豚筋肉で妥当性が確認できた化合物については表1の背景を着色して示した

表 2 使用した試薬等

試薬名	グレード等	メーカー等
水	超純水	
アセトニトリル	LCMS用(移動相用)	富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)
	試薬特級(抽出溶液用)	
ギ酸	LCMS用	
塩化ナトリウム(以下,NaCl)	試薬特級	
無水硫酸ナトリウム(以下,Na ₂ SO ₄)		
酢酸		
ジメチルスルホキシド(以下,DMSO)		
飽和EDTA	超純水にEDTAを飽和量加えたもの	純正化学株式会社(東京都)
EMR	粉末状	アジレント・テクノロジー株式会社(東京都)

各化合物の標準品(富士フイルム和光純薬株式会社,大阪府)を10mg秤量し,50%アセトニトリルに溶解させて濃度が100ppmになるよう調整し標準溶液とした。標準溶液を用いて各化合物の濃度が,食品衛生法に基づく残留基準値の40倍になるように添加回収用標準溶液を100mL調整し,これを50%アセトニトリルで適宜希釈して試験に供した。LC-MS/MSの測定条件はLC/MS/MSメソッドパッケージ動物用医薬品Ver.2(株式会社島津製作所,京都市)により設定した(表3)。

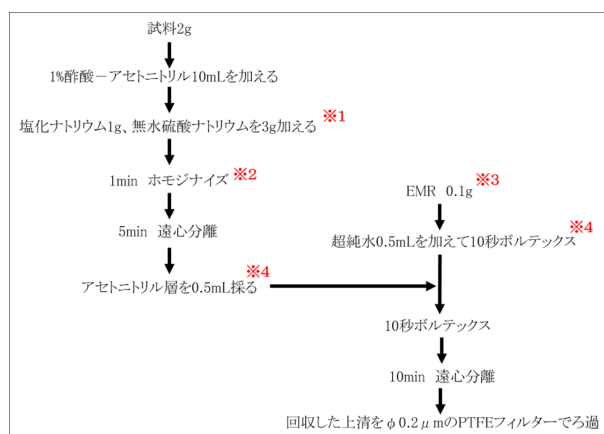


図 1 本法の操作フロー

表 3 LC-MS/MSの測定条件

LC-MS/MS	島津製作所社製 LCMS-8050
分離カラム	オクタデシルシリル化シリカゲル(内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3μm)
カラム温度	40度
移動相	A液:0.1%ギ酸-水 B液:0.1%ギ酸-アセトニトリル
注入量	試験溶液2μLを超純水8μLと共注入する
グラジエント	A液:B液=99:1(0min)→85:15(1min)→60:40(6min)→0:100(10min)→0:100(18min)→99:1(18.01min)→99:1(22min)
流速	0.2mL/min
イオン化モード	ESI(+)、MRMモード

本法の操作フローを図1に示した。今回検討するにあたって用いた品質工学のパラメータ設計の手法を以下に記載した。

① 因子と水準の決定

パラメータ設計では初めに実験結果に影響を与える要因(以下,因子)を決定する。本研究では操作フローは大きく変えず,添加する試薬の量など細かい部分について条件検討を行うこととし,図1の※1~※4の操作に加え,※1の操作に新たにDMSO,飽和EDTA,水を加える操作を追加した計8因子を決定した。

各因子の検討水準として,ホモジナイズ以外の7因子については3水準を設定した。ホモジナイズは有りと無しの2水準とし,ホモジナイズをしない場合は10分間のシェイカーによる振盪とした(表4)。なお,精製後の化合物濃度が添加した濃度の10分の1となるように,操作※4の水およびアセトニトリルを同量とした。

表 4 設定した因子と水準

操作	因子	水準		
		1	2	3
※1	NaCl添加量	1g	2g	3g
	Na ₂ SO ₄ 添加量	3g	5g	0g
	DMSO添加量	0.1mL	0.2mL	0.4mL
	飽和EDTA添加量	0mL	0.1mL	0.2mL
	水の添加量	0mL	2mL	4mL
※2	ホモジナイズ	有	無	
※3	EMR粉末の量	0.05g	0.1g	0.2g
※4	EMRに加える水の量	0.25mL	0.5mL	1mL
	採取するアセトニトリル量			

② 直交表の作成

決定した 8 因子とそれらに対応する水準の全ての組み合わせは4374通りであるため、実験回数を低減するために直交表を作成した。パラメータ設計ではそれぞれの因子の働きは独立したものとするため、相互作用の影響を低減できる L_{18} 直交表を用いた(表 5)。

③ 試行実験

直交表を基に全18パターンの実験を行った。各パターンで3種類のポジティブコントロール(基準値2倍, 基準値, 基準値0.5倍で各1検体)とネガティブコントロール1検体の計4検体で実験を行った。

④ SN比と感度の算出

LC-MS/MSで検出した化合物量を基にSN比と感度を各化合物および各因子の水準毎に算出した。パラメータ設計ではSN比と感度を基に評価を行う。

SN比はシグナル(有効成分)とノイズ(有害成分)の比であるため、値が大きいほどばらつきが少ないことを示し、併行精度が小さく安定した検査法であることを示す。一方、感度は $S=10\log \beta^2$ の式で求められ、 β は化合物の添加量と回収量の比で表される。本研究では添加した化合物量と回収量の比が「1」となるのが理想であり、そのため感度 $S(S=10\log \beta^2)$ は0に近いほど分析方法がその化合物に適していると言える。

表 5 試行パターン一覧

試行No.	ホモジナイズ	飽和EDTA	水	NaCl	Na ₂ SO ₄	DMSO	EMR粉末量	EMR添加水量
1	有	0mL	0mL	1g	3g	0.1mL	0.05g	0.25mL
2	有	0mL	2mL	2g	5g	0.2mL	0.1g	0.5mL
3	有	0mL	4mL	3g	0g	0.4mL	0.2g	1mL
4	有	0.1mL	0mL	1g	5g	0.2mL	0.2g	1mL
5	有	0.1mL	2mL	2g	0g	0.4mL	0.05g	0.25mL
6	有	0.1mL	4mL	3g	3g	0.1mL	0.1g	0.5mL
7	有	0.2mL	0mL	2g	3g	0.4mL	0.1g	1mL
8	有	0.2mL	2mL	3g	5g	0.1mL	0.2g	0.25mL
9	有	0.2mL	4mL	1g	0g	0.2mL	0.05g	0.5mL
10	無	0mL	0mL	3g	0g	0.2mL	0.1g	0.25mL
11	無	0mL	2mL	1g	3g	0.4mL	0.2g	0.5mL
12	無	0mL	4mL	2g	5g	0.1mL	0.05g	1mL
13	無	0.1mL	0mL	2g	0g	0.1mL	0.2g	0.5mL
14	無	0.1mL	2mL	3g	3g	0.2mL	0.05g	1mL
15	無	0.1mL	4mL	1g	5g	0.4mL	0.1g	0.25mL
16	無	0.2mL	0mL	3g	5g	0.4mL	0.05g	0.5mL
17	無	0.2mL	2mL	1g	0g	0.1mL	0.1g	1mL
18	無	0.2mL	4mL	2g	3g	0.2mL	0.2g	0.25mL

⑤ 最適条件の決定

各因子について、SN比が大きい水準を最適な水準とした。なお、各水準間のSN比の差が1未満であった場合は、感度が0に近い水準を最適な水準と判断した。この操作を化合物ごとに行った。各因子の最適な水準を決定した後、全化合物中で最も頻度の高かった水準を本法における最適条件とした。

⑥ 改善効果の推定

⑤で決定した最適条件と現行の条件を比較し、改善効果を推定した。DMSOの添加量については設定した各水準に現行の条件（0 mL添加）がないため、最も近い水準である水準1（0.1 mL）を現行の条件として、改善効果の推定をした。改善効果の推定はSN比と感度それぞれにおける最適条件と現行条件の差（以下、利得）を基に算出する。SN比と感度のいずれも改善効果が1以上であれば、その化合物により適した分析法であることが推定される。

⑦ 再現性の確認

⑥で推定した効果が得られるかを確認するために、

確認実験を行った。確認実験では最適条件と現行条件のそれぞれで実験を行い、ポジティブコントロールとネガティブコントロールは③と同様に設定した。実験後、④と同様にSN比と感度から利得を算出し、⑥で求めた推定値の利得と比較しておよそ±30%の範囲内であれば理論の再現性があると判断した。

成績と考察

③の試行実験で得られた各化合物の濃度を基に各水準におけるSN比と感度を算出した。各因子の最適な水準と、それを基に決定した最適条件を表6に示した。CEZにおいて、ピークを検出できない試行パターンがあり、SN比および感度を算出することができなかった。このため、CEZを除いた19化合物について検討を進めた。⑤により最適条件を決定したところ、現行条件よりも水、NaCl、Na₂SO₄およびEMR添加水量が増加する水準が最適条件となった。

表6 各化合物の最適な水準および本法における最適条件

化合物名	ホモジナイズ	飽和EDTA	水	NaCl	Na ₂ SO ₄	DMSO	EMR粉末量	EMR添加水量
OTC	1	1	3	3	3	3	2	1
CTC	1	1	2	3	2	1	2	2
TC	2	1	3	2	2	1	1	3
CPFX	1	2	2	1	2	3	2	1
ERFX	1	1	1	1	3	2	2	1
DNFX	1	1	1	1	2	3	1	3
MBFX	1	2	3	3	3	2	2	3
OBFX	1	2	2	3	3	2	1	1
SDM	1	2	3	3	3	1	2	3
SDD	2	2	1	3	3	1	1	1
SMR	1	1	2	3	2	1	2	2
SMX	1	1	3	3	3	1	3	2
SMM	2	2	2	3	3	2	2	1
SQX	1	2	1	1	2	2	1	3
PCG	2	1	3	3	2	2	2	2
EM	1	2	3	1	1	3	3	3
LCM	1	3	1	3	2	3	2	3
TS	1	1	1	3	2	3	2	3
WF	1	3	3	1	1	1	1	2
最適条件	1	1	3	3	2	1	2	3

表中に記載した数字は表4に記載した水準の番号を示す

⑥により最適条件と現行条件のSN比と感度から利得と改善効果を化合物ごとに算出したものを推定値として表7に示した。改善効果を推定したところ、CTC, TC, CPFX, MBFXおよびSDMにおいて精度が上がる可能性が示唆された。しかしながら、感度においては改善効果が1を下回る化合物が多く、むしろ回収率の低下が推定された。

確認実験の各化合物の回収率から算出したSN比、感度および利得は確認実験値として、推定値と同様に表7に示した。確認実験の結果、SQXおよびWFのSN比、OBFX, SMRおよびEMの感度において理論の再現性が認められた。しかしながら、本法で妥

当性が確認できていない7種類の化合物においては理論の再現性が認められなかった。

本法はQuEChERS法を応用したY.Jungら²⁾の報告を基に操作フローを組んでいるが、当初検査対象とした一部の化合物で妥当性を確認できなかった。そこで、分析法の改良を試みることにしたが、同時に複数の要因を検討する場合、実験回数は膨大となり、多くの労力と時間がかかる。そこで、本調査ではパラメータ設計の手法を使って実験回数の低減を図りつつ条件検討を行った。その結果、試行実験で複数の化合物において精度の向上が示唆されたものの、確認実験では本法で妥当性が確認されていない化合

表7 各化合物の改善効果の推定と確認実験の結果

	OTC				CTC				TC			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	74.730	-62.556	21.509	-22.299	95.477	-41.522	31.866	-13.753	156.770	-53.244	26.013	-15.693
現行条件(db)	71.603	-55.975	30.101	-20.795	83.738	-37.257	27.348	-12.577	82.531	-48.514	46.635	-15.334
利得(db)	3.127	-6.581	-8.592	-1.504	11.739	-4.265	4.519	-1.175	74.239	-4.731	-20.622	-0.359
改善効果	1.433	0.220	0.372	0.707	3.863	0.375	1.682	0.763	5151.907	0.336	0.093	0.921
	CPFX				ERFX				DNFX			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	94.897	-18.405	26.601	-5.480	91.908	-11.992	25.499	-1.788	103.780	-13.942	30.353	-3.188
現行条件(db)	88.369	-15.349	36.782	-5.632	98.331	-11.137	26.015	-2.178	103.780	-12.208	33.246	-3.500
利得(db)	6.528	-3.056	-10.181	0.153	-6.423	-0.854	-0.516	0.390	0.000	-1.734	-2.893	0.313
改善効果	2.120	0.495	0.310	1.036	0.477	0.821	0.942	1.094	1.000	0.671	0.717	1.075
	MBFX				OBFX				SDM			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	104.744	-11.610	36.114	-2.028	56.943	-7.950	19.862	-0.944	109.529	-4.821	31.411	-1.856
現行条件(db)	95.716	-9.381	50.187	-2.447	53.278	-9.303	24.556	-2.220	98.492	-2.570	28.799	-2.172
利得(db)	9.029	-2.230	-14.073	0.419	3.666	1.354	-4.694	1.276	11.038	-2.252	2.612	0.316
改善効果	2.828	0.598	0.198	1.101	1.525	1.366	0.583	1.341	3.564	0.595	1.351	1.076
	SDD				SMR				SMX			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	94.457	-9.879	32.975	-1.994	93.829	-8.658	24.907	-2.988	98.389	-6.105	26.304	-2.991
現行条件(db)	93.315	-10.765	38.059	-1.287	98.405	-8.658	39.836	-2.914	95.432	-7.546	30.556	-3.257
利得(db)	1.142	0.885	-5.084	-0.707	-4.575	0.000	-14.929	-0.074	2.956	1.441	-4.252	0.266
改善効果	1.141	1.226	0.557	0.850	0.591	1.000	0.179	0.983	1.405	1.394	0.613	1.063
	SMM				SQX				PCG			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	82.132	-12.711	30.975	-2.300	95.356	-4.840	31.736	-1.253	82.386	-11.167	38.156	-2.554
現行条件(db)	77.337	-11.559	33.040	-2.705	92.357	-4.002	27.952	-1.633	83.485	-12.281	33.182	-3.094
利得(db)	4.795	-1.153	-2.065	0.405	2.999	-0.838	3.784	0.380	-1.099	1.115	4.974	0.541
改善効果	1.737	0.767	0.788	1.098	1.412	0.825	1.546	1.091	0.881	1.293	1.773	1.133
	EM				LCM				TS			
	推定値		確認実験値		推定値		確認実験値		推定値		確認実験値	
	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度	SN比	感度
最適条件(db)	95.675	-12.612	30.845	-0.913	61.128	-74.937	15.858	-17.633	89.252	-15.340	35.044	-2.634
現行条件(db)	96.407	-13.189	39.476	-1.339	59.197	-61.258	19.048	-17.004	84.956	-15.343	40.748	-2.787
利得(db)	-0.731	0.577	-8.631	0.426	1.931	-13.679	-3.190	-0.629	4.296	0.003	-5.704	0.153
改善効果	0.919	1.142	0.370	1.103	1.249	0.043	0.693	0.865	1.640	1.001	0.519	1.036
	WF											
	推定値		確認実験値									
	SN比	感度	SN比	感度								
最適条件(db)	72.337	-7.387	22.194	-0.128								
現行条件(db)	75.678	-6.736	25.327	-1.193								
利得(db)	-3.341	-0.651	-3.133	1.064								
改善効果	0.681	0.861	0.697	1.278								

推定値と確認実験値のSN比および感度を比較し±30%の範囲に入る値について表の背景を着色して表示した

物は理論の再現性が認められなかった。これは、今回検討した条件の中にこれらの回収率をコントロールできる要因がないことを示唆しており、本法の一部改良程度では大きな改善が望めないと考えられる。

本法で妥当性が確認できていない化合物の中には養豚場で使用されることが多いテトラサイクリン系の化合物が含まれている。今後、これらの化合物の検査体制を整備するために、別の一斉分析法への変更や個別試験法の採用も検討し、当所における分析体制の拡充を図りたい。

引用文献

- 1) Michelangelo Anastassides, Steven J Lehotay, Darinka Stajnbaher, Frank J Schenck: J AOAC Int, 86, 412-431 (2003)
- 2) Young Sung Jung, Dan-Bi Kim, Tae Gyu Nam, Dongwon Seo, Miyoung Yoo : Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS, Food chemistry 382, 132313 (2022)