

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

1. 目的

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、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[1]方法であり、様々な研究機関で改良が行われているが当所では Y.Jung ら[2]の報告を基に本法の検査系を構築した。本法を構築するにあたって 20 種類の化合物を対象とし、妥当性評価を行い、豚筋肉及び牛筋肉で 13 種類、鶏の筋肉で 10 種類の化合物について妥当性が確認された。今回、更なる分析対象化合物の拡大を目的として、抽出及び精製の工程における最適な条件設定について、品質工学におけるパラメータ設計の手法を用いて検討したところ、一定の成果が得られたため、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

(1)材料

検体は豚の筋肉を用いた。標準品は 20 種類の化合物全てにおいて富士フィルム和光純薬(株)製の HPLC グレードを使用した。各標準品を 10mg 秤量し、50%アセトニトリルに溶解させて濃度が 100ppm になるように調整し標準溶液とした。各化合物の濃度が残留基準値の 40 倍になるように各標準溶液量を調整した標準混合液を 100mL 作成して添加回収用標準溶液とし、50%アセトニトリルで適宜希釈して試験に供した。使用した試薬等は表 1 に、LC-MS/MS の測定条件は表 2 に示した。分析対象化合物と LC-MS/MS による分析条件を表 3 に示した。なお、分析条件は島津製作所 LC/MS/MS メソッドパッケージ動物用医薬品 Ver.2 により設定した。

表1 試薬等

試薬名	グレード等
水	超純水
アセトニトリル	LCMS 用(移動相用) 試薬特級(抽出溶液用)
ギ酸	LCMS 用
酢酸 無水硫酸ナトリウム(以下、Na ₂ SO ₄) 塩化ナトリウム(以下、NaCl) ジメチルスルホキシド(以下、DMSO)	試薬特級
飽和 EDTA	超純水に EDTA を飽和量加えたもの
EMR	粉末状 アジレント・テクノロジー(株)製

表2 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 3 μm)
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 2 μL を超純水 8 μL 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

表3 分析対象化合物及び LC-MS/MS による分析条件

化合物名称(略称※)	本法における豚の筋肉での妥当性の有無	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
オキシテトラサイクリン(OTC)	無	461.15	426.10
クロルテトラサイクリン(CTC)	無	479.10	444.10
テトラサイクリン(TC)	無	445.15	410.20
シプロフロキサシン(CPFX)	無	332.15	314.10
エンロフロキサシン(ERFX)	無	360.15	316.20
ダノフロキサシン(DNFX)	有	358.15	340.20
マルボフロキサシン(MBFX)	有	363.15	72.15
オルビフロキサシン(OBFX)	有	396.15	352.20
スルファジメトキシシン(SDM)	有	311.10	156.00
スルファジミジン(SDD)	有	279.10	92.15
スルファメラジン(SMR)	有	265.10	156.05
スルファメトキサゾール(SMX)	有	254.05	155.95
スルファモノメトキシシン(SMM)	有	281.05	156.05
スルファキノキサリン(SQX)	有	301.10	156.05
ベンジルペニシリン(PCG)	有	335.10	160.10
セファゾリン(CEZ)	無	455.05	323.05
エリスロマイシンA(EM)	有	734.45	158.10
リンコマイシン(LCM)	無	407.20	126.10
タイロシン(TS)	有	916.55	174.10
ワルファリン(WF)	有	309.10	163.05

妥当性が確認できている化合物の背景を着色して示す

※以降は各化合物について略称で示す

(2) 方法

本法の操作フローを図1に示した。

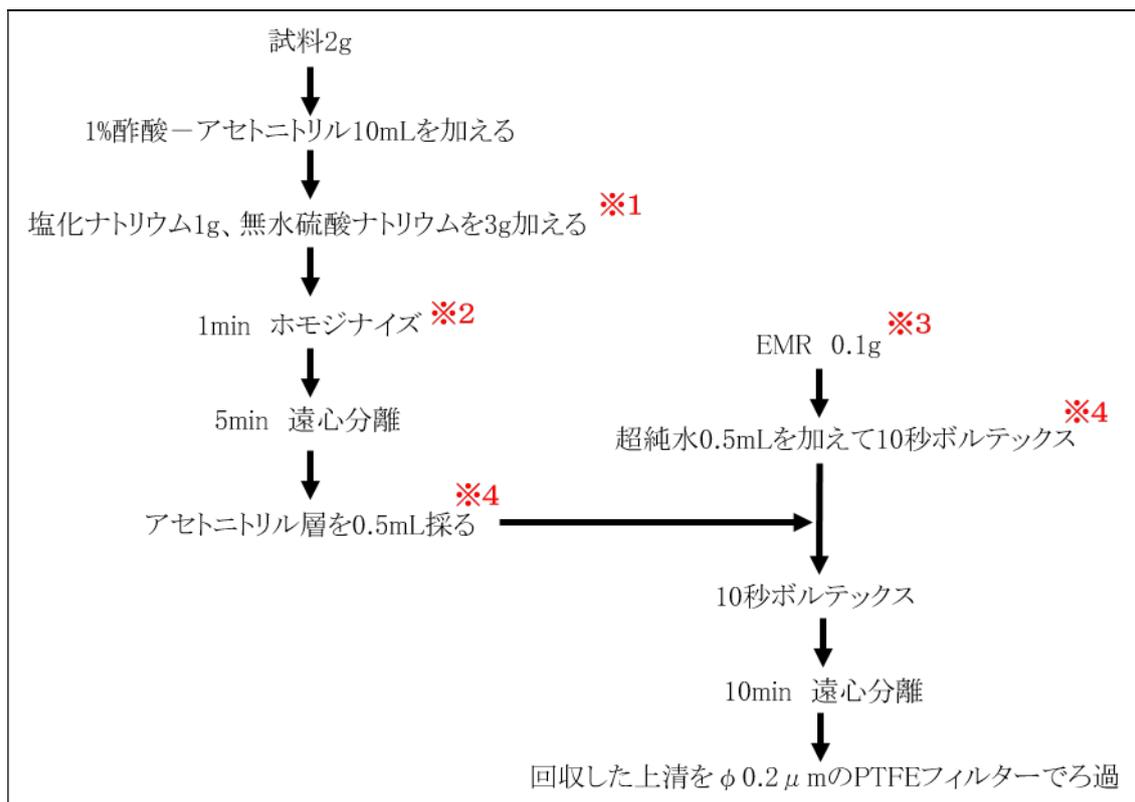


図1 本法の操作フロー

また、パラメータ設計の流れを図2に示す。以下、①～⑦の方法について記載する。

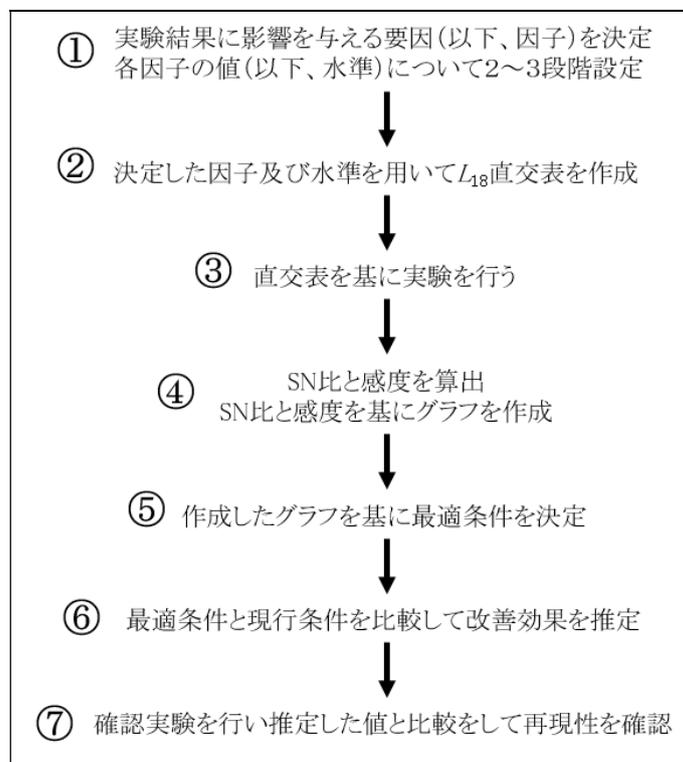


図2 パラメータ設計の大まかな流れ

①因子と水準の決定

本実験では図 1 の※1～※4 の操作を因子として決定した。※1の操作に新たに DMSO、飽和 EDTA、水を加える操作を追加し、因子は計 8 つとした。ホモジナイズ以外の 7 つの因子については 3 水準を設定した。ホモジナイズは有り無しとの 2 水準とし、ホモジナイズをしない場合は代わりに 10 分間シェイカーにかけた(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 で水の量及びアセトニトリル量を同量としている。

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 採取するアセトニトリル量	0.25mL	0.5mL	1mL

②直交表の作成

決定した8つの因子とそれらに対応する水準の全ての組み合わせは 4374 通りとなり、実験する場合には膨大な時間と労力がかかる。そこで、直交表を作成し実験回数を低減することとした。

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考え、相互作用についてはその影響をできるだけ抑えるために L_{18} 直交表を用いた。直交表を用いると、1 因子の各水準の平均値を算出する際に、各水準に対して他の因子の水準が同じ数だけ含まれることから、着目する因子以外の条件は全て揃っており、各水準の平均値を比較することが可能となる。

決定した因子及び水準を基に作成した直交表を表 5 に示す。

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。

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

④SN 比と感度の算出とグラフ化

パラメータ設計では SN 比と感度を基に評価を行った。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ている。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。今回の実験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 に近い方が望ましいこととなる。

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及び各因子の水準毎に算出し、結果をグラフ化して作成し視覚的に示した。

⑤最適条件の決定

次に、グラフから最適な水準を選択した。第一に SN 比が大きくばらつきが少ない水準を選択し、各水準間で SN 比の差が少ない場合は、感度を確認して最適な水準を選択することとした。今回は、各水準間の SN 比の差が 1 未満であった場合に感度が 0 に近い水準を最適と判断した。この操作を化合物ごとに行った。

各化合物の最適な水準を決定した後、全化合物について比較し、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、改善効果の見込みを推定した。DMSO の添加量については設定した各水準に現行の条件(0mL 添加)を設定していないため、最も近い水準である水準 1 (0.1mL)を現行の条件として、改善効果の推定をした。

改善効果の算出値は 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)から求められる。SN 比と感度のいずれも改善度合いが 1 以上であれば、その化合物に対する分析法としての性能が上がる事が推定される。

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%の範囲内であれば再現性があると判断した。

3. 結果

検出された化合物量を基に各化合物の SN 比と感度を算出しグラフを作成した。例として図 3 に SMR における SN 比と感度のグラフを示す。一方、CEZ においては検出時のピークが認められないパターンがあり、SN 比及び感度を算出することができなかつたため、CEZ を除いた19種類の化合物について検討を進めた。

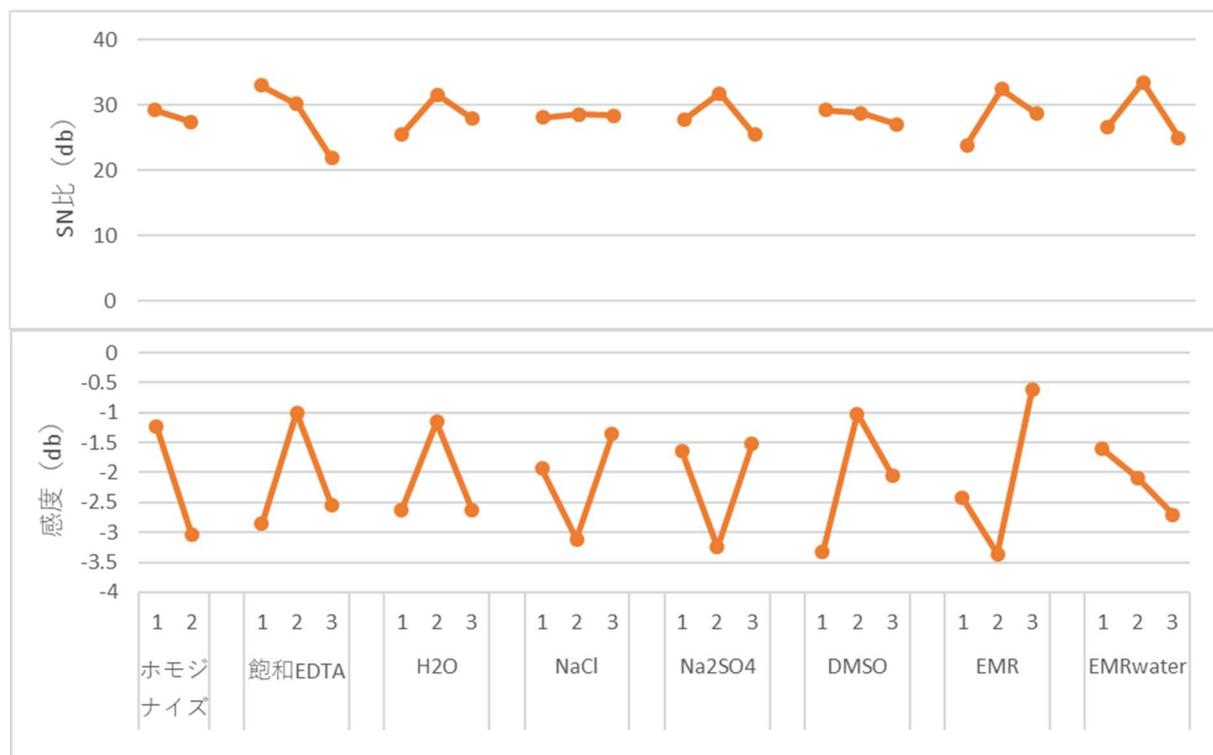


図 3 SMR における SN 比と感度のグラフ

化合物ごとの最適な水準とそれを基に決定した最適条件を表 6 に示す。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。

表 6 化合物ごとの最適な水準及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

最適条件と現行条件の SN 比と感度から利得と改善度合いを化合物ごとに算出したものを推定値として表 7 に示す。確認実験の結果として各化合物の回収率を表 8 に、回収率から算出した SN 比、感度及び利得は確認実験値として表 7 に示す。表 7 では推定値と確認実験値の SN 比及び感度を比較し、±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。表 8 では本法の添加回収試験の目標値である回収率 70%~120%を満たす化合物とその添加濃度について、背景を着色して示した。

表7 化合物ごとの利得及び改善度合いと確認実験の結果

	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
改善度合い	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
改善度合い	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
改善度合い	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
改善度合い	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
改善度合い	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
改善度合い	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								
改善度合い	0.681	0.861	0.697	1.278								

表 8 確認実験での各化合物の回収率 (%)

	基準値 (ppm)	現行条件			最適条件		
		基準値0.5倍	基準値	基準値2倍	基準値0.5倍	基準値	基準値2倍
OTC	0.2	9.46	8.54	9.25	4.98	7.33	7.93
CTC	0.2	27.21	24.50	23.02	19.75	21.58	20.31
TC	0.2	17.22	17.26	17.07	14.52	15.07	16.87
CPFX	0.05	54.48	50.99	52.47	45.46	49.94	54.52
ERFX	0.05	80.08	69.80	79.69	75.78	73.20	83.80
DNFX	0.1	68.64	69.60	66.03	65.43	65.54	70.46
MBFX	0.05	75.10	75.01	75.58	79.65	76.62	79.78
OBFX	0.02	75.21	86.90	75.23	102.17	106.86	84.63
SDM	0.2	68.05	74.71	79.27	73.59	78.12	81.87
SDD	0.10	89.96	87.44	85.69	82.67	82.68	78.49
SMR	0.01	72.70	70.05	71.79	73.42	78.94	68.72
SMX	0.02	62.00	66.25	69.77	68.38	64.06	72.73
SMM	0.02	80.54	72.89	72.87	70.90	73.48	77.92
SQX	0.1	72.01	78.77	84.57	79.71	83.56	87.75
PCG	0.05	70.37	73.15	69.23	73.22	76.38	74.14
EM	0.2	85.15	83.89	86.20	84.49	85.65	91.46
LCM	0.2	8.95	12.18	14.93	4.79	11.50	14.06
TS	0.1	74.23	71.34	72.75	77.69	75.66	73.15
WF	0.001	97.80	95.00	84.55	66.80	106.00	98.65

4. 考察

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おり、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ことから改善を試みた。同時に複数の要因を検討する場合、実験回数が膨大となり、多くの労力と時間がかかる。そのため、本調査ではパラメータ設計の手法を使って実験回数を低減しつつ条件検討を行った。

本法における最適条件を検討した結果、現行条件よりも水、NaCl、Na₂SO₄及び EMR 添加水量が増加する水準が最適条件とされた。この条件で利得を算出したところ、CTC、TC、CPFX、MBFX 及び 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度合いが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。

確認実験の結果、SQX 及び WF の SN 比、OBFX、SMR 及び EM の感度において推定値との結果が一致していると考えられた。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、本法で妥当性を確認するためには別の因子の選定や個別試験法への変更を検討する必要があると考える。

5. 引用文献

[1]Michelangelo Anastassides et al., J. AOAC Int., 86, 412-431 (2003)

[2]Jung, Young Sung et al : “Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS.” Food chemistry vol.382 132313 (2022).