

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究  
—動物用医薬品（サルファ剤）の水質分析法の検討—

浦山豊弘, 新 和大, 中野拓也, 山本 淳

【調査研究】

## 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究

- 動物用医薬品(サルファ剤)の水質分析法の検討 -

Study on the development of analysis method of chemical substances at the time of  
water quality accidents

- Study of water quality analysis method of Veterinary Drugs -

浦山豊弘, 新 和大, 中野拓也, 山本 淳(水質科)

Toyohiro Urayama, Kazuhiro Atarashi, Takuya Nakano, Jun Yamamoto  
(Water Section)

### 要 旨

動物用医薬品である合成抗菌剤のサルファ剤 27 物質について、水質試料の高感度同時分析法を検討した。ポリマー系逆相固相抽出した後メタノールで溶出し、対象物質のピーク形状ができるだけシャープとなる分析カラムを検討し、液体クロマトグラフタンデム質量分析計で分析することで、26 物質について検出下限値が 3.6 ~ 27 ng/L の高感度な分析法が開発できた。河川水及び海水を用いた添加回収試験の回収率は、それぞれ 73 ~ 107%, 58 ~ 103% であった。

[キーワード：動物用医薬品, サルファ剤, 水質, LC/MS]

[Key words : Veterinary Drugs, Sulfonamides, Water quality, LC/MS]

### 1 はじめに

動物用医薬品は、家きん等を病気や寄生虫から守るために用いられている医薬品であり、また、一部は人用に用いられている成分もあり、これらは排水路や下水道を通じて環境中に排出されていることが考えられる。

筆者らは既報<sup>1)~3)</sup>において畜水産物中の動物用医薬品の分析法を検討したが、それを応用して環境水中の動物用医薬品であるサルファ剤の 27 物質について分析法を検討し、26 物質の高感度同時分析法開発したので、報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 検討物質

検討物質を表 1 に示す。林純薬工業製、動物薬混合標準溶液 LC/MS Mix 1 に含まれる 27 物質について検討を行った。

#### 2.2 試薬

動物薬混合標準溶液 LC/MS Mix 1 :

林純薬工業製(各 20  $\mu$ g/mL)

スルファメトキサゾール-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> :

SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製(純度 99%)

スルファメトキサゾール-*d*<sub>4</sub> :

林純薬工業製(純度 97.4%)

スルファクロロピリダジン-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> :

SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製(純度 99%)

スルファジアジン-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> :

SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製(純度 99%)

スルファメサジン(スルファジミジン)-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> :

CIL 社製(10  $\mu$ g/mL, 純度 90%)

スルファドキシシン-*d*<sub>3</sub> : 林純薬工業製(純度 99.9%)

トリメトプリム-*d*<sub>9</sub> :

SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製(純度 98%)

スルファジメトキシシン-*d*<sub>6</sub> :

和光純薬工業製(環境分析用)(純度 98%)

アセトニトリル, メタノール :

LC/MS 用 和光純薬工業製

精製水 : ミリポア製 Milli-Q Gradient により調製

固相カートリッジ :

Waters 製 Oasis HLB Plus LP (225 mg)

表1 検討物質一覧表

物質名	英名	分子式	CAS 番号	分子量	モアイト ピーク質量
スルファニルアミド	Sulfanilamide	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	63-74-1	172.20	172.0307
スルファグアニジン	Sulfaguanidine	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	57-67-0	214.24	214.0524
スルファセトアミド	Sulfacetamide	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	144-80-9	214.24	214.0412
スルフィソゾール	Sulfisozole	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	73247-57-1	239.25	239.0365
ピリメタミン	Pyrimethamine	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	58-14-0	248.71	248.0829
スルファピリジン	Sulfapyridine	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	144-83-2	249.29	249.0572
スルファジアジン	Sulfadiazine	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	68-35-9	250.28	250.0524
スルファメトキサゾール	Sulfamethoxazole	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	723-46-6	253.28	253.0521
スルファチアゾール	Sulfathiazole	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	72-14-0	255.32	255.0136
ジアベリジン	Diaveridine	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	5355-16-8	260.29	260.1273
スルファメラジン	Sulfamerazin	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	127-79-7	264.30	264.0681
スルファトロキサゾール	Sulfatroxazole	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	23256-23-7	267.30	267.0678
スルフィソキサゾール	Sulfisoxazole	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	127-69-5	267.30	267.0678
オルメトプリム	Ormetoprim	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	6981-18-6	274.32	274.1430
スルファベンザミド	Sulfabenzamide	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	127-71-9	276.31	276.0569
スルフィソミジン	Sulfisomidine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	515-64-0	278.33	278.0837
スルファジミジン	Sulfadimidine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	57-68-1	278.33	278.0837
スルファメキシピリダジン	Sulfamethoxypyridazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	80-35-3	280.30	280.0630
スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	1220-83-3	280.30	280.0630
スルファクロピリダジン	Sulfachloropyridazine	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> SCl	80-32-0	284.72	284.0135
トリメトプリム	Trimethoprim	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	738-70-5	290.32	290.1379
スルファエトキシピリダジン	Sulfaethoxypyridazine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	963-14-4	294.33	294.0787
スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	59-40-5	300.34	300.0681
スルファドキシ	Sulfadoxin	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	2447-57-6	310.33	310.0736
スルファジメトキシ	Sulfadimethoxin	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	122-11-2	310.33	310.0736
スルファニトラン	Sulfanitran	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	122-16-7	335.34	335.0576
スルファブロメタジン	Sulfabromomethazine	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	116-45-0	357.23	355.9943

## 2.3 LC/MS の測定条件

35.1 ~ 48 min A : B = 97 : 3

LC/MS 機器 : Waters Alliance 2695/ Quattro micro API

カラム流量 : 0.2 mL/min

LC

カラム温度 : 40 °C

LC 機種 : Waters Alliance 2695

試料注入量 : 5 µL

カラム : Waters 製 Atlantis T3 2.1 mm × 150 mm, 3 µm

MS

移動相 : A : 0.1% ギ酸 / 10 mmol/L ギ酸アンモニウム  
水溶液 (99 : 1)

MS 機種 : Waters Quattro micro API

B : 0.1% ギ酸 - アセトニトリル 溶液 / 10  
mmol/L ギ酸アンモニウム - アセトニトリル  
溶液 (99 : 1)

キャピラリー電圧 : 2.5 kV

ソース温度 : 100 °C

デゾルベーション温度 : 450 °C

コーンガス量 : 60 L/Hr

デゾルベーション流量 : 500 L/Hr

0 ~ 1 min A : 97 → 85 B : 3 → 15 linear gradient

イオン化法 : ESI-Positive (スルファニトラ  
ンは ESI-Negative)

1 ~ 10 min A : 85 → 77 B : 15 → 23 linear gradient

10 ~ 21 min A : 77 → 25 B : 23 → 75 linear gradient

測定モード : SRM

21 ~ 22 min A : 25 → 0 B : 75 → 100 linear gradient

22 ~ 35 min A : B = 0 : 100

モニターイオン, コーン電圧及びコリジョン電圧 :

35 ~ 35.1 min A : 0 → 97 B : 100 → 3 linear gradient

表 2 及び表 3 参照

表2 対象物質のモニターイオン, コーン電圧及びコリジョン電圧

物質名	保持時間	モニターイオン	コーン電圧	コリジョン電圧
Sulfanilamide	4.81	173.1 > 156.0	18	6
Sulfaguanidine	3.91	215.0 > 156.0	24	13
Sulfacetamide	8.66			
Sulfisozole	13.75	240.1 > 156.1	20	11
Pyrimethamine	17.00	249.0 > 177.0	43	27
Sulfapyridine	10.65	250.0 > 92.0	27	23
Sulfadiazine	9.65	251.0 > 156.0	22	13
Sulfamethoxazole	17.53	254.06 > 156.0	26	13
Sulfathiazole	10.25	256.0 > 156.0	23	12
Diaveridine	9.51	261.2 > 245.1	37	23
Sulfamerazin	11.42	265.1 > 92.0	27	24
Sulfatroxazole	17.88			
Sulfisoxazole	18.50	268.2 > 156.1	22	12
Ormetoprim	11.16	275.0 > 123.0	38	23
Sulfabenzamide	19.57	277.0 > 156.1	20	10
Sulfisomidine	8.69			
Sulfadimidine	13.08	279.0 > 92.0	32	29
Sulfamethoxypyridazine	13.48			
Sulfamonomethoxine	15.31	281.0 > 156.0	27	15
Sulfachloropyridazine	16.21	285.0 > 156.0	21	13
Trimethoprim	10.26	291.1 > 230.1	36	21
Sulfaethoxy-pyridazine	17.90	295.0 > 156.0	28	17
Sulfaquinoxaline	20.03	301.0 > 156.0	27	15
Sulfadoxin	17.45			
Sulfadimethoxin	20.00	311.0 > 156.0	28	17
Sulfanitran (Negative)	22.03	334.0 > 136.0	22	25
Sulfabromomethazine	22.19	357.0 > 92.0	35	32

表3 サロゲート内標準のモニターイオン, コーン電圧及びコリジョン電圧

物質名	モニターイオン	コーン電圧	コリジョン電圧
Sulfamethoxazole- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	260.08 > 162.0	24	14
Sulfadiazine- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	257.08 > 162.0	24	14
Sulfadimidine- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	285.0 > 98.0	28	29
Sulfachloropyridazine- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	291.04 > 162.0	23	14
Trimethoprim- <i>d</i> <sub>9</sub>	300.2 > 234.0	38	21
Sulfadoxin- <i>d</i> <sub>3</sub>	314.1 > 159.0	28	19
Sulfadimethoxin- <i>d</i> <sub>6</sub>	317.12 > 162.0	32	21

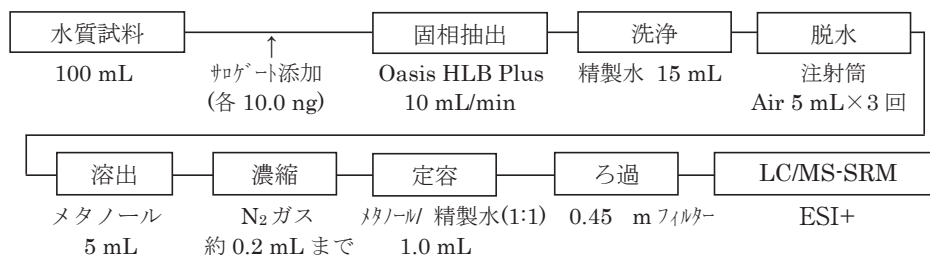


図1 分析法のフローチャート

## 2.4 前処理方法

水質試料 100 mL に 2.00 ng/μL のサロゲート内標準液を 5 μL 添加し、混合した。これをメタノール 10 mL, 精製水 20 mL でコンディショニングした固相カートリッジ (Oasis HLB plus) に 10 mL/min の速さで通水した。固相カートリッジを精製水 15 mL で洗浄後、注

射筒で空気を 5 mL × 3 回通気して固相中の水分を除去した。これをメタノール 5 mL で溶出し、40 °C 以下の窒素気流下で約 0.2 mL まで濃縮し、メタノール / 精製水 (1:1) で 1.0 mL に定容し、0.45 μm フィルターでろ過を行い、試験液とした。分析法のフローチャートを図1に示す。

## 2.5 装置検出下限値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下限値 (IDL) 及び分析方法の検出下限値 (MDL) と定量下限値 (MQL) の測定及び算出は、「化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版)」<sup>4)</sup> に従った。IDL は、検量線に用いる最低濃度付近の標準液を 7 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL 及び MQL は、海水に IDL 試料換算値の 5 倍程度の標準物質を添加した試料を 7 個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、LC/MS で測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1,I} \times 2$$

$t(n-1, 0.05)$ : 危険率 5%, 自由度  $n-1$  の  $t$  値 (片側)

$\sigma_{n-1,I}$ : IDL 算出のための測定値の標本標準偏差

$$MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1,M} \times 2$$

$$MQL = 10 \times \sigma_{n-1,M}$$

$t(n-1, 0.05)$ : 危険率 5%, 自由度  $n-1$  の  $t$  値 (片側)

$\sigma_{n-1,M}$ : MDL 算出のための測定値の標本標準偏差

## 3 検討結果及び考察

### 3.1 抽出用固相カートリッジの検討結果

過去の分析法開発<sup>5)~7)</sup>において高回収率であった Oasis HLB, Sep-Pak C18, InertSep PLS-3 の 3 種類の固相を検討した。

精製水 100 mL にスルファメトキサゾール標準物質 1.0  $\mu$ g を添加し、各固相に 10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出した後、アセトニトリル 5 mL で溶出した。

結果を図 2 に示す。シリカ系固相の Sep-Pak C18 は、酸性下での通水で極性物質でも高回収率が得られた事例<sup>5)</sup>もあったが、今回の検討では回収率が低かった。ポリマー系固相の Oasis HLB, InertSep PLS-3 では、いずれも高回収率であったが、Oasis HLB がメタノール 5 mL 溶出での回収率が高く、アセトニトリル画分への残留もなかったため、Oasis HLB を採用することとした。

### 3.2 溶出溶媒の検討結果

3.1 の検討から Oasis HLB を採用することとしたが、InertSep PLS-3 ではアセトニトリル画分への残留が確認されたためアセトニトリルでの溶出も検討することとし、サルファ剤 27 物質に対し、溶出溶媒の種類 (メタノールまたはアセトニトリル) と量 (5mL または 10mL) を検討した。

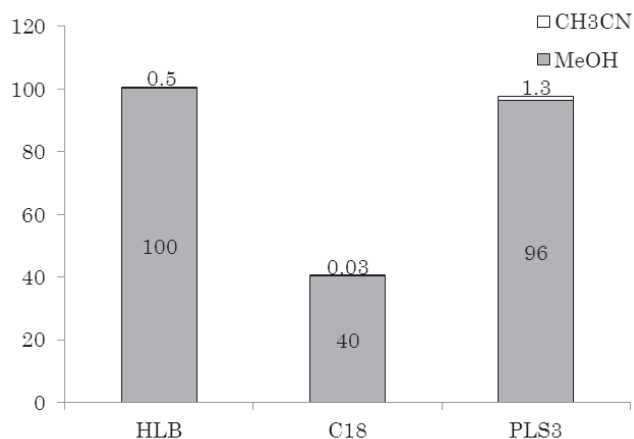


図 2 抽出用固相カートリッジの検討結果 (スルファメトキサゾール)

精製水 100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出後、更にメタノール 5 mL で溶出したもの及びアセトニトリル 5 mL で溶出後、更にアセトニトリル 5 mL で溶出したものを比較した。

結果を表 4 に示す。ピリメタミン、ジアベリジン、オルメトプリム、トリメトプリムの 4 物質はアセトニトリルでは回収率が低く、10mL でも溶出しきってないと考えられたため、メタノールを採用することとした。一般にメタノールよりアセトニトリルの方が溶出力が強いが、4 物質はスルホニル基を持たずアミノ基を 2 つ持つため、メタノールの持つプロトン親和性が溶出に寄与していると考えられた。

また、溶媒量については、メタノール 5mL で目的物質の 50% 以上が溶出し、メタノール 5 ~ 10 mL への残留が 2% 以下であったので、メタノール 5 mL での溶出とした。

### 3.3 試料通水時の pH の検討

試料通水時の pH 調整の必要の有無を確認するための検討を行った。海水 (水島沖) 100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、pH をそれぞれ 3, 4, 5, 7, 9 に調整した後、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出した。(測定溶媒はメタノール、pH8 は pH 未調整)。結果を表 5 に示す。多くの物質では pH9 で回収率が低くなることが確認されたが、通常の公共用水域の pH7 ~ 8 では pH 調整不要であると判断した。また、スルファセタミドは pH5 以下にしなければ回収できなかったが、多成分を簡易かつ一斉に分析することが目的であるため、スルファセタミドを除く 26 物質の同時分析法の確立を目標とした。

表4 溶出溶媒の検討試験結果(Oasis HLB)

対象物質	回収率 (%)					
	メタノール			アセトニトリル		
	0-5 mL	5-10 mL	計	0-5 mL	5-10 mL	計
Sulfanilamide	62	0.4	62	59	0.1	59
Sulfaguanidine	51	0.2	51	48	0.2	49
Sulfacetamide	94	0.5	94	93	0.2	93
Sulfisozole	93	0.6	93	96	0.8	97
Pyrimethamine	100	0.7	101	3	25.9	29
Sulfapyridine	94	0.5	94	104	0.9	105
Sulfadiazine	96	0.7	97	105	0.9	106
Sulfamethoxazole	101	0.8	101	99	1.4	101
Sulfathiazole	91	1.1	92	85	15.7	101
Diaveridine	99	1.2	101	5	7.8	13
Sulfamerazin	92	0.4	93	110	0.9	111
Sulfatroxazole	102	0.7	103	105	0.9	106
Sulfisoxazole	97	0.7	98	102	0.8	102
Ormetoprim	101	0.9	102	5	7.1	12
Sulfabenzamide	100	0.6	101	85	11.9	97
Sulfisomidine	101	0.1	101	101	2.0	103
Sulfadimidine	98	0.4	99	103	0.6	103
Sulfamethoxypyridazine	96	0.7	97	97	1.4	99
Sulfamonomethoxine	91	0.8	92	95	3.0	98
Sulfachloropyridazine	90	1.2	91	95	4.0	99
Trimethoprim	100	0.6	101	10	20.8	31
Sulfaethoxypyridazine	102	0.9	102	103	1.4	104
Sulfaquinoxaline	103	2.0	105	91	21.0	112
Sulfadoxin	102	0.5	102	102	0.5	103
Sulfadimethoxin	103	0.6	103	103	1.5	105
Sulfanitran	85	0.0	85	84	0.0	84
Sulfabromomethazine	117	1.0	118	117	1.8	119

表5 通水時の pH の検討試験結果(Oasis HLB)

対象物質	回収率 (%)					
	pH3	pH4	pH5	pH7	pH8	pH9
Sulfanilamide	40	57	60	57	71	52
Sulfaguanidine	53	67	67	65	70	54
Sulfacetamide	89	87	91	7	0.9	0.5
Sulfisozole	88	88	92	83	61	10
Pyrimethamine	101	94	98	97	101	86
Sulfapyridine	86	87	90	91	91	82
Sulfadiazine	85	85	91	90	78	17
Sulfamethoxazole	99	98	101	98	100	73
Sulfathiazole	70	83	89	85	86	77
Diaveridine	96	93	94	94	99	86
Sulfamerazin	91	95	94	91	95	81
Sulfatroxazole	94	95	99	95	103	70
Sulfisoxazole	99	97	103	101	104	77
Ormetoprim	100	95	98	97	100	89
Sulfabenzamide	99	104	106	103	101	90
Sulfisomidine	83	86	94	91	95	82
Sulfadimidine	93	98	102	99	103	92
Sulfamethoxypyridazi	97	100	104	100	102	94
Sulfamonomethoxine	88	93	96	92	97	83
Sulfachloropyridazine	78	85	86	86	97	78
Trimethoprim	99	94	96	95	97	87
Sulfaethoxypyridazin	104	104	110	107	110	98
Sulfaquinoxaline	102	103	104	105	107	97
Sulfadoxin	104	102	106	104	101	94
Sulfadimethoxin	97	98	104	101	105	93
Sulfanitran	125	109	114	117	125	105
Sulfabromomethazine	101	106	111	114	128	103

### 3.4 逆相 - イオン交換ミックスモード固相の検討

3.2 及び 3.3 の検討で、保持時間が短く水溶性が高い物質の回収率が低い傾向であったため、イオン交換系固相を検討することとし、陰イオン交換系の Waters 製 Oasis MAX Plus 及び陽イオン交換系の Oasis MCX Plus の 2 種類の逆相 - イオン交換ミックスモード固相を検討した。河川水(旭川・乙井手堰)、海水(水島沖)100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、MAX は濃アンモニア水 / 精製水 (5:95)、精製水で洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、更にギ酸 / メタノール (2:98) 5

mL で溶出、MCX は、2% ギ酸水溶液、精製水で洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、更に濃アンモニア水 / メタノール (5:95) で溶出した(測定溶媒はメタノール)。

結果は表6のとおりで、対象物質は3種類の溶出パターンに分かれた。溶出パターンを表7に示す。パターン①は、陽イオン性を示し、陰イオン性を示さない物質で、該当の6物質はアミノ基を2つ持つ物質であった。パターン②は、陰イオン性を示し、陽イオン性を示さない物質で、該当のスルファニトランは、ニトロ基の電子供与作用により2級アミンが陽イオンになりにくいと判断され

表6 逆相 - イオン交換ミックスモード固相の検討試験結果

対象物質	回収率 (%)											
	海水						河川水					
	MAX			MCX			MAX			MCX		
MeOH	ギ酸/ MeOH	計	MeOH	NH3/ MeOH	計	MeOH	ギ酸/ MeOH	計	MeOH	NH3/ MeOH	計	
Sulfanilamide	27	2	29	5	52	57	27	3	29	0	45	46
Sulfaguanidine	29	0	29	0	61	61	27	1	27	0	55	55
Sulfacetamide	1	6	7	0	1	1	0	67	67	3	53	56
Sulfisozole	0	59	59	7	22	29	0	66	66	1	58	58
Pyrimethamine	101	0	101	0	90	90	99	0	99	0	82	82
Sulfapyridine	0	62	62	0	71	72	0	67	67	0	66	66
Sulfadiazine	0	45	45	8	39	48	0	56	56	0	61	61
Sulfamethoxazole	0	74	74	15	59	74	0	78	78	1	71	72
Sulfathiazole	0	47	47	0	48	49	0	52	52	0	49	49
Diaveridine	90	0	90	0	89	89	93	0	93	0	81	81
Sulfamerazin	1	69	70	4	69	73	1	72	74	0	71	72
Sulfatroxazole	1	71	72	10	59	70	0	76	76	2	69	70
Sulfisoxazole	1	71	72	12	27	39	0	66	66	2	63	65
Ormetoprim	91	0	91	0	88	88	93	0	94	0	83	83
Sulfabenzamide	1	70	70	11	45	56	0	58	59	1	62	63
Sulfisomidine	0	71	72	0	67	67	0	67	67	0	64	64
Sulfadimidine	0	66	66	0	71	72	0	77	78	0	70	70
Sulfamethoxy pyridazine	0	54	55	1	69	69	0	64	64	0	69	69
Sulfamonomethoxine	0	59	59	3	50	53	0	62	63	0	62	62
Sulfachloropyridazine	0	55	56	6	47	53	0	58	58	0	48	49
Trimethoprim	91	0	92	0	88	88	90	0	90	0	78	78
Sulfaethoxy pyridazine	1	61	62	0	77	77	0	71	71	0	72	72
Sulfaquinoxaline	1	73	74	1	75	76	0	81	81	0	73	74
Sulfadoxin	0	71	72	8	67	74	0	81	81	1	73	73
Sulfadimethoxin	1	77	78	3	73	76	0	79	79	0	68	69
Sulfanitran	6	58	64	65	6	71	5	65	70	35	5	40
Sulfabromomethazine	1	77	78	1	62	63	0	91	91	1	64	64

表7 逆相 - イオン交換ミックスモード固相での溶出パターン

パターン 番号	溶出パターン				該当物質
	MAX		MCX		
	MeOH	ギ酸/ MeOH	MeOH	NH3/ MeOH	
①	○		○		Sulfanilamide, Sulfaguanidine, Pyrimethamine, Diaveridine, Ormetoprim, Trimethoprim
②		○	○		Sulfanitran
③		○	○		Others

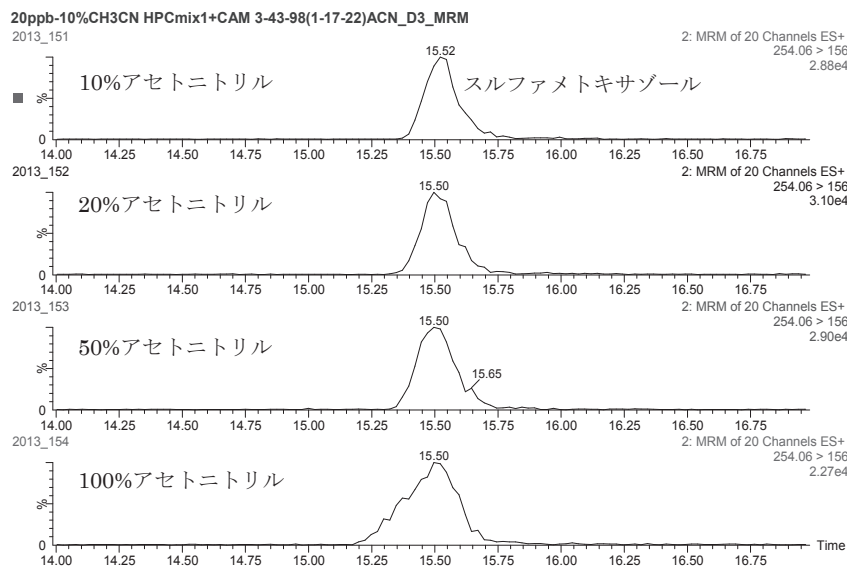


図3 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-1(スルファメトキサゾール)

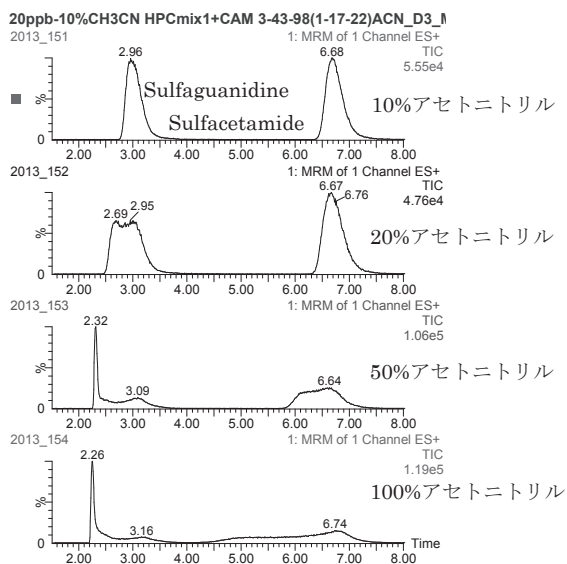


図4 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-2(保持時間8分以下の物質)

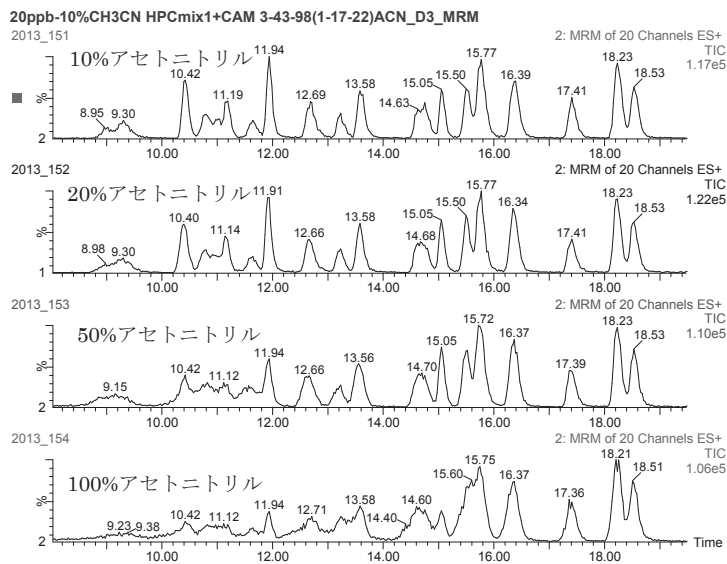


図5 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-3(保持時間8~19分)

た。パターン③は、陽イオン性、陰イオン性共に示す物質であり、対象物質の多くが該当した。

Oasis MCX を用いれば、②に該当するスルファニトラン以外の物質はアンモニア/メタノール画分に溶出するが、スルファメトキサゾール、スルファトロキサゾール、スルフィソキサゾール、スルファベンズアミドでは10%以上がメタノール画分に溶出し、また、回収率も80%未満の物質が多かったため、採用しないこととした。

### 3.5 試験液の溶媒組成の検討結果

測定条件のうち、試験液の溶媒組成を検討することとした。測定カラムとして当初検討した XTerra カラムで

は、試験液をアセトニトリル 100% で調製すると、図3～5に示すとおりピークがリーディングすることが分かった。(使用カラム：Waters 製 XTerra MS C18 2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm, 注入量：10 μL)

### 3.6 注入量の検討結果

注入量を5 μLにしたところ、図6に示すとおり20%アセトニトリルでも問題なくなり、50%アセトニトリルでも保持時間が最も短いスルファグアニジンを除き問題なくなった。100%アセトニトリルでは、保持時間15分以下のものはピーク形状が崩れた(測定カラムはAtlantisT3を使用)。



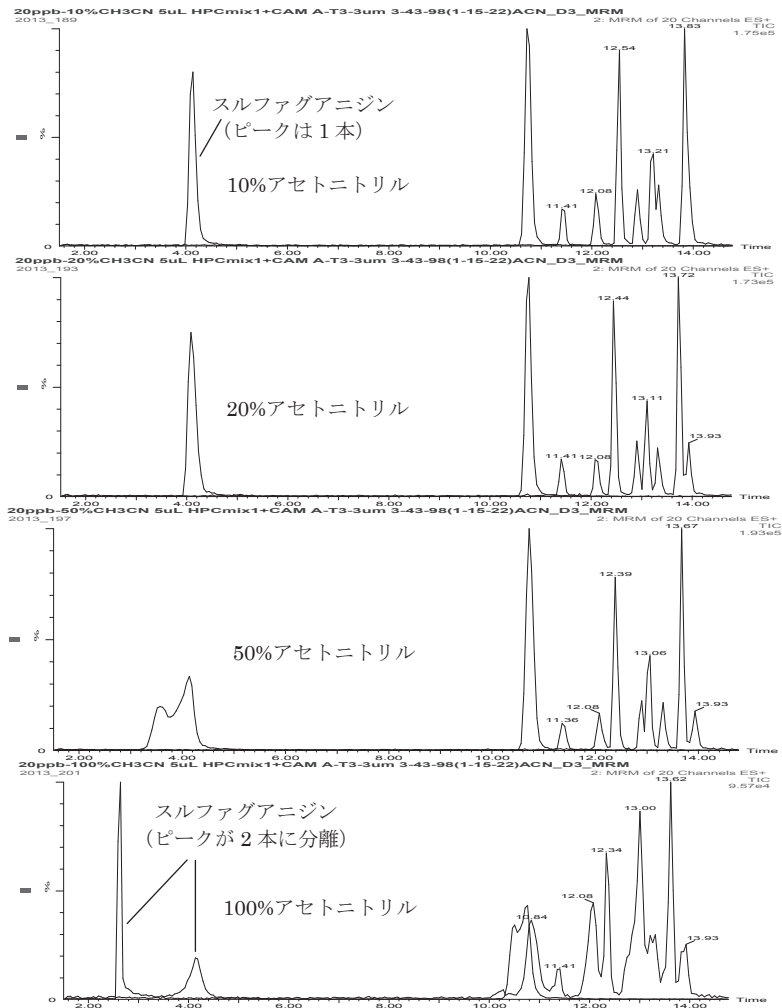


図6 注入量 5 µL で測定したクロマトグラム

### 3.7 試験液の溶媒組成の検討結果

3.5 及び 3.6 の検討結果から、有機溶媒の割合を低くするか、注入量を少なくすれば保持時間が短い物質でもピーク形状が崩れないことがわかったので、注入量は感度とピーク形状を考慮して 5 µL とし、有機溶媒の割合を減らしても測定物質が溶解しなくなる現象が現れないかを確認した。

河川水(旭川・乙井手堰)、海水(水島沖) 100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出したものを用い、試験液の溶媒をメタノール/精製水(1:4)、メタノール/精製水(1:1)、メタノールと変更し、同じ溶媒組成の標準品との面積値の比較を行った。

結果を表 8 に示す。有機溶媒の割合を変更しても明確な違いは現れず、有機溶媒の割合を下げても、測定物質が溶解しなくなる現象は確認されなかったため、試験液の溶媒をメタノールからメタノール/精製水(1:1)に変

更した。

### 3.8 移動相及びカラムの検討結果

移動相をギ酸/アセトニトリル系(図 7) からギ酸/メタノール系(図 8) に変更したところ、むしろテーリングしてピーク幅が広がり気味となった。

測定カラムを XBridge C18(図 9) 及び Atlantis T3(図 10) に変更したところ、いずれもピークがシャープとなり良好であったが、Atlantis T3の方がよりシャープであったため、Atlantis T3を採用することとした。

### 3.9 移動相条件の検討

カラムを XTerra から Atlantis T3 に変更することで個々のピーク形状はシャープになったが、目的物質同士の分離では 5 ~ 10 分に何も溶出せず、10 ~ 14 分に何物質か重なったピークがあった。(図 11)

そこで、10 ~ 14 分に溶出していた物質のピーク間隔が広がるよう 1 ~ 10 分で B: 15 → 23% となるよう緩やかにグラジエントさせるよう変更した。

表 8 試験液の溶媒組成の検討試験結果

対象物質	河川水			海水		
	メタノール/ 精製水 (1:4)	メタノール/ 精製水 (1:1)	メタノール	メタノール/ 精製水 (1:4)	メタノール/ 精製水 (1:1)	メタノール
Sulfanilamide	62	66	70	65	68	66
Sulfaguanidine	71	71	60	71	66	56
Sulfacetamide	8	11	10	1	1	0
Sulfisozole	73	79	78	53	51	51
Pyrimethamine	88	100	96	99	101	99
Sulfapyridine	87	93	83	93	89	83
Sulfadiazine	86	90	84	83	79	73
Sulfamethoxazole	91	96	92	95	95	91
Sulfathiazole	72	87	84	92	87	82
Diaveridine	86	94	89	97	98	91
Sulfamerazin	87	90	84	94	91	86
Sulfatroxazole	90	101	99	105	99	101
Sulfisoxazole	87	84	82	93	84	81
Ormetoprim	88	95	93	98	99	93
Sulfabenzamide	88	91	93	102	93	92
Sulfisomidine	89	93	89	96	95	84
Sulfadimidine	90	97	94	105	100	91
Sulfamethoxy-pyridazine	89	98	95	101	101	94
Sulfamonomethoxine	79	84	78	87	85	74
Sulfachloropyridazine	67	75	74	86	79	77
Trimethoprim	89	92	93	100	97	93
Sulfaethoxy-pyridazine	103	104	103	109	106	102
Sulfaquinoxaline	88	96	97	104	98	93
Sulfadoxin	97	101	99	105	106	98
Sulfadimethoxin	97	102	101	108	103	100
Sulfanitran	79	61	75	96	64	86
Sulfabromomethazine	95	103	99	109	102	103
平均	82	87	85	91	86	83

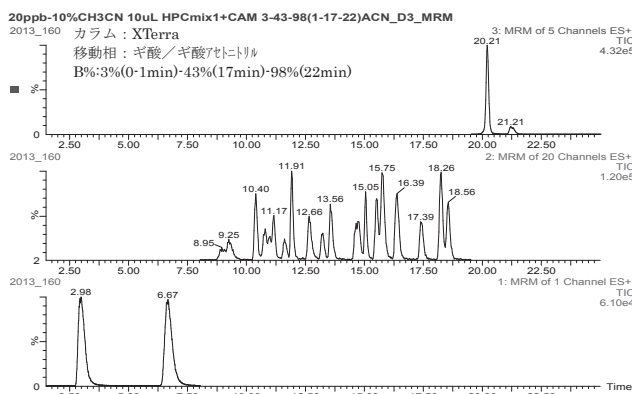


図 7 当初検討した条件で測定したクロマトグラム (基準とする)

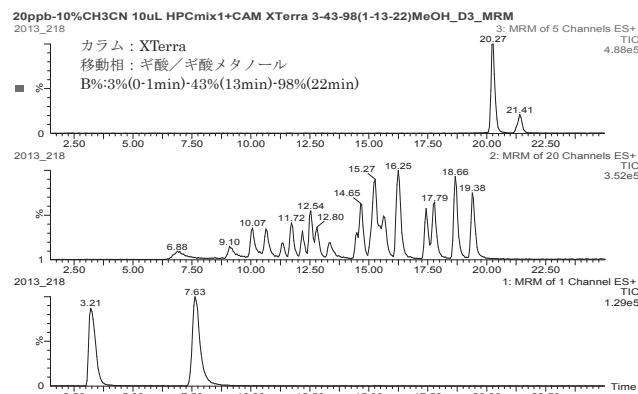


図 8 移動相をメタノール系に変更して測定したクロマトグラム

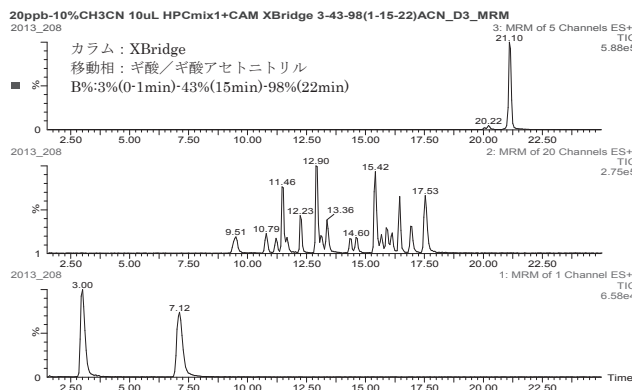


図 9 カラムを XBridge に変更して測定したクロマトグラム

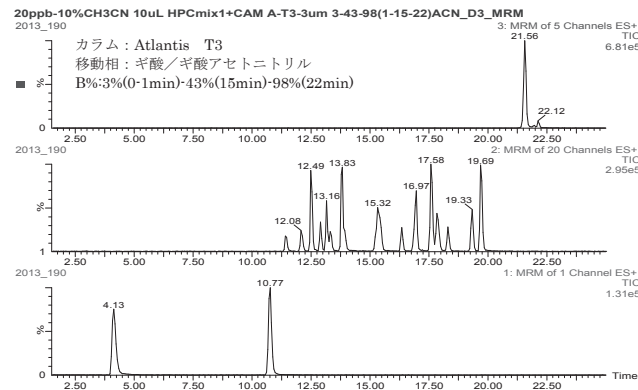


図 10 カラムを Atlantis T3 に変更して測定したクロマトグラム

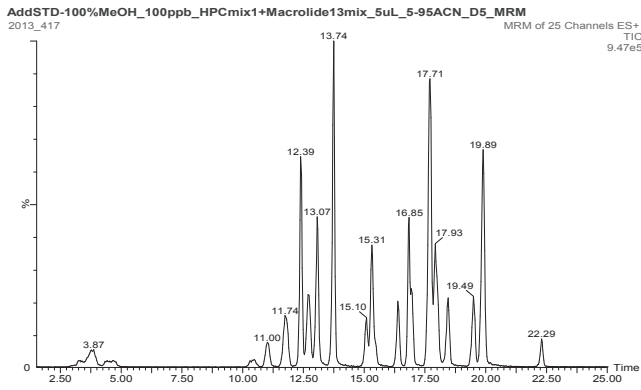


図 11 当初検討した移動相条件で測定したクロマトグラム

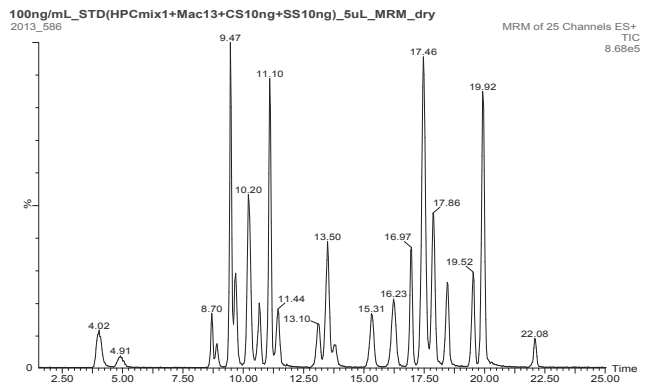


図 12 最終的な移動相条件で測定したクロマトグラム

表 9 装置検出下限(IDL)の算出結果

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	注入液濃度 (ng/mL)	注入量 (L)	平均値 (ng/mL)	標準偏差 (ng/mL)	IDL* (ng/mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)	S/N	CV (%)
Sulfanilamide	100	1	1.00	5.0	0.98	0.069	0.27	2.7	9.6	7.1
Sulfaguanidine	100	1	0.50	5.0	0.490	0.0259	0.10	1.0	10	5.3
Sulfacetamide	100	1	1.00	5.0	1.01	0.0611	0.24	2.4	9.5	6.1
Sulfisozole	100	1	0.50	5.0	0.506	0.0259	0.10	1.0	12	5.1
Pyrimethamine	100	1	1.00	5.0	1.06	0.084	0.33	3.3	8.0	7.9
Sulfapyridine	100	1	1.00	5.0	1.05	0.109	0.42	4.2	11	10
Sulfadiazine	100	1	1.00	5.0	1.17	0.112	0.44	4.4	9.4	9.6
Sulfamethoxazole	100	1	1.00	5.0	1.06	0.0959	0.37	3.7	9.9	9.1
Sulfathiazole	100	1	1.00	5.0	1.09	0.108	0.42	4.2	9.3	9.9
Diaveridine	100	1	1.00	5.0	1.12	0.0605	0.24	2.4	11	5.4
Sulfamerazin	100	1	1.00	5.0	1.05	0.103	0.40	4.0	11	9.8
Sulfatroxazole	100	1	1.00	5.0	1.06	0.0853	0.33	3.3	12	8.1
Sulfisoxazole	100	1	1.00	5.0	0.989	0.0982	0.38	3.8	13	9.9
Ormetoprim	100	1	1.00	5.0	1.03	0.0971	0.38	3.8	14	9.5
Sulfabenzamide	100	1	1.00	5.0	1.10	0.106	0.41	4.1	10	9.6
Sulfisomidine	100	1	1.00	5.0	1.04	0.103	0.40	4.0	13	9.8
Sulfadimidine	100	1	1.00	5.0	1.02	0.0526	0.20	2.0	9.0	5.1
Sulfamethoxyppyridazine	100	1	1.00	5.0	1.02	0.0996	0.39	3.9	10	9.8
Sulfamonomethoxine	100	1	1.00	5.0	1.04	0.103	0.40	4.0	11	9.9
Sulfachloropyridazine	100	1	1.00	5.0	1.07	0.0967	0.38	3.8	10	9.1
Trimethoprim	100	1	1.00	5.0	1.04	0.0607	0.24	2.4	11	5.8
Sulfaethoxyppyridazine	100	1	1.00	5.0	1.04	0.108	0.42	4.2	11	10
Sulfaquinoxaline	100	1	1.00	5.0	0.961	0.108	0.42	4.2	12	11
Sulfadoxin	100	1	1.00	5.0	1.05	0.104	0.40	4.0	9.5	9.9
Sulfadimethoxin	100	1	1.00	5.0	1.01	0.0921	0.36	3.6	14	9.1
Sulfanitran	100	1	5.00	5.0	4.97	0.480	1.9	19	9.7	9.7
Sulfabromomethazine	100	1	1.00	5.0	0.978	0.150	0.58	5.8	6.6	15

\*: IDL = t (n-1,0.05) ×  $\sigma_{n-1}$  × 2

最終条件における分離状況を図 12 に示す。

### 3.10 装置検出下限 (IDL) 及び検出下限 (MDL), 定量下限 (MQL)

IDL を表 9, MDL, MQL を表 10 に示す。

IDL は 0.10 (スルファグアニジン及びスルフィソゾール) ~ 1.9 ng/mL (スルファニトラン), MDL は 3.6 (スルファニルアミド) ~ 27 ng/L (スルファニトラン) であった。スルファニトランのみ感度が低く, これは食品分析に用いている装置でも同様の傾向であった。

### 3.11 添加回収試験結果

河川水への添加では, スルファセタミドとスルファニトランを除き, 70 ~ 120% の良好な回収率であった。(表 11)

海水への添加では, 酸性下で通水する必要があるスルファセタミドのほか, スルファグアニジンとスルフィソゾールで 70% 未満の回収率となった。(表 12)

表 10 検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出結果

対象物質	試料	標準添加量 (ng)	試料換算濃度 (ng/L)	操作ブランク平均 (ng/L)	無添加平均 (ng/L)	標準偏差 (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	CV (%)	ターゲット回収率 (%)	
Sulfanilamide	海水	2.00	20.0	ND	ND	13.8	0.92	3.6	9.2	6.6	-
Sulfaguanidine	海水	2.00	20.0	ND	ND	13.7	1.60	6.2	16	12	-
Sulfacetamide	海水	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfisozole	海水	2.00	20.0	ND	ND	12.9	1.32	5.1	13	10	-
Pyrimethamine	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.2	0.98	3.8	9.8	5.7	-
Sulfapyridine	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.2	1.80	7.0	18	9.9	-
Sulfadiazine	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.6	1.25	4.9	13	7.1	85
Sulfamethoxazole	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.8	1.79	7.0	18	11	93
Sulfathiazole	海水	2.00	20.0	ND	ND	15.9	1.64	6.4	16	10	-
Diaveridine	海水	2.00	20.0	ND	ND	20.0	3.24	13	32	16	-
Sulfamerazin	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.5	1.89	7.3	19	11	-
Sulfatroxazole	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.7	2.50	9.7	25	14	-
Sulfisoxazole	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.4	1.85	7.2	19	9.5	-
Ormetoprim	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.6	1.61	6.3	16	8.2	-
Sulfabenzamide	海水	2.00	20.0	ND	ND	16.5	2.63	10	26	16	-
Sulfisomidine	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.8	1.59	6.2	16	8.9	-
Sulfadimidine	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.0	1.34	5.2	13	7.0	98
Sulfamethoxyypyridazine	海水	2.00	20.0	ND	ND	17.6	1.98	7.7	20	11	-
Sulfamonomethoxine	海水	2.00	20.0	ND	ND	16.0	1.85	7.2	19	12	-
Sulfachloropyridazine	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.7	1.65	6.4	17	8.8	93
Trimethoprim	海水	2.00	20.0	ND	ND	20.3	3.14	12	31	16	99
Sulfaethoxyypyridazine	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.6	2.87	11	29	15	-
Sulfaquinoxaline	海水	2.00	20.0	ND	ND	14.6	2.16	8.4	22	15	-
Sulfadoxin	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.2	1.88	7.3	19	10	102
Sulfadimethoxin	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.7	2.13	8.3	21	11	99
Sulfanitrans	海水	10.0	100	ND	ND	116	7.00	27	70	6.1	-
Sulfabromomethazine	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.3	2.15	8.3	22	11	-

(注) スルファセタミドは、酸性下で抽出する必要があり、pHを調整しない他成分との同時分析ではMDLを求めることができなかった。

表 11 添加回収試験結果(河川水)

対象物質	試料名	試料量 (mL)	試験数	無添加			10 ng 添加			
				検出濃度 (ng/L)	ターゲット回収率 (%)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	ターゲット回収率 (%)
Sulfanilamide	河川水	100	2	ND	-	5	90	90	3.4	-
Sulfaguanidine	河川水	100	2	ND	-	5	79	79	3.1	-
Sulfacetamide	河川水	100	2	ND	-	5	6.3	20	-	-
Sulfisozole	河川水	100	2	ND	-	5	73	73	4.5	-
Pyrimethamine	河川水	100	2	ND	-	5	100	100	7.1	-
Sulfapyridine	河川水	100	2	11	-	5	100	89	3.2	-
Sulfadiazine	河川水	100	2	ND	81	5	103	103	2.7	78
Sulfathiazole	河川水	100	2	ND	-	5	80	80	4.7	-
Diaveridine	河川水	100	2	ND	-	5	99	97	4.5	-
Sulfamerazin	河川水	100	2	ND	-	5	94	94	1.1	-
Sulfatroxazole	河川水	100	2	ND	-	5	101	101	3.8	-
Sulfisoxazole	河川水	100	2	ND	-	5	73	73	3.3	-
Ormetoprim	河川水	100	2	ND	-	5	96	96	2.3	-
Sulfabenzamide	河川水	100	2	ND	-	5	79	79	9.3	-
Sulfisomidine	河川水	100	2	ND	-	5	83	83	4.6	-
Sulfadimidine	河川水	100	2	ND	95	5	97	97	2.3	98
Sulfamethoxyypyridazine	河川水	100	2	ND	-	5	90	90	2.2	-
Sulfamonomethoxine	河川水	100	2	ND	-	5	79	79	4.1	-
Sulfachloropyridazine	河川水	100	2	ND	79	5	100	100	3.5	78
Trimethoprim	河川水	100	2	ND	91	5	101	99	6.3	98
Sulfaethoxyypyridazine	河川水	100	2	ND	-	5	107	107	3.5	-
Sulfaquinoxaline	河川水	100	2	ND	-	5	77	77	4.0	-
Sulfadoxin	河川水	100	2	ND	89	5	93	93	9.4	115
Sulfadimethoxin	河川水	100	2	ND	97	5	102	102	3.4	100
Sulfanitrans	河川水	100	2	ND	-	5	133	133	1.8	-
Sulfabromomethazine	河川水	100	2	ND	-	5	95	95	5.4	-

(注) スルファセタミドは、酸性下で通水する必要があるため、pH未調整で通水した同時分析では回収率が低くなっている。スルファニトランは、ESI-Negative では高めに定量される傾向にあり、ESI-Positive では低め(回収率 44%)に定量される傾向にある。

表 12 添加回収試験結果(海水)

対象物質	試料名	試料量 (mL)	試験数	無添加			10 ng 添加			
				検出濃度 (ng/L)	ターゲット回収率 (%)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	ターゲット回収率 (%)
Sulfanilamide	海水	100	2	ND	-	7	78	78	6.9	-
Sulfaguanidine	海水	100	2	ND	-	7	58	58	7.5	-
Sulfacetamide	海水	100	2	-	-	7	-	-	-	-
Sulfisozole	海水	100	2	ND	-	7	65	65	4.7	-
Pyrimethamine	海水	100	2	ND	-	7	97	97	3.7	-
Sulfapyridine	海水	100	2	ND	-	7	87	87	1.5	-
Sulfadiazine	海水	100	2	ND	84	7	101	101	5.7	76
Sulfathiazole	海水	100	2	ND	-	7	81	81	3.9	-
Diaveridine	海水	100	2	ND	-	7	94	94	4.4	-
Sulfamerazin	海水	100	2	ND	-	7	88	88	3.2	-
Sulfatroxazole	海水	100	2	ND	-	7	98	98	4.1	-
Sulfisoxazole	海水	100	2	ND	-	7	81	81	3.4	-
Ormetoprim	海水	100	2	ND	-	7	94	94	3.2	-
Sulfabenzamide	海水	100	2	ND	-	7	95	95	2.6	-
Sulfisomidine	海水	100	2	ND	-	7	85	85	3.6	-
Sulfadimidine	海水	100	2	ND	98	7	103	103	5.8	96
Sulfamethoxyypyridazine	海水	100	2	ND	-	7	95	95	2.9	-
Sulfamonomethoxine	海水	100	2	ND	-	7	93	93	4.7	-
Sulfachloropyridazine	海水	100	2	ND	91	7	102	102	2.4	87
Trimethoprim	海水	100	2	ND	98	7	103	103	6.1	91
Sulfaethoxyypyridazine	海水	100	2	ND	-	7	102	102	1.7	-
Sulfaquinoxaline	海水	100	2	ND	-	7	90	90	3.2	-
Sulfadoxin	海水	100	2	ND	108	7	95	95	5.5	102
Sulfadimethoxin	海水	100	2	ND	103	7	96	96	5.9	112
Sulfanitrans	海水	100	2	ND	-	7	116	116	6.1	-
Sulfabromomethazine	海水	100	2	ND	-	7	100	100	2.4	-

(注) スルファセタミドは、酸性下で通水する必要があるため、pH未調整で通水した同時分析では、ほとんど回収できなかった。

#### 4 まとめ

合成抗菌剤であるサルファ剤等 27 物質の多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- ①対象物質は、逆相系固相カートリッジの Oasis HLB に通水し、メタノール 5mL で溶出する方法で抽出できることがわかった。
- ②スルファセタミドは酸性で通水する必要があったが、その他の物質は pH 調整不要であり、多成分を簡易かつ一斉に分析することが目的であるため、同物質を除く 26 物質の分析法とした。
- ③逆相 - イオン交換ミックスモード固相を検討したが、対象物質により挙動が異なり、回収率も低かったため採用しないこととした。
- ④保持時間が短い物質では、注入量を増加させるか、試験液の有機溶媒の割合を増加させると、ピークがリーディングして形状が崩れる傾向にあった。
- ⑤測定カラムは、Atlantis T3 がピーク幅が狭く、保持時間が短い物質でもリーディングが少なかった。
- ⑥開発した分析法は、水質試料中のサルファ剤等 26 物質の分析に適用でき、検出下限は、3.6 ~ 27 ng/L であった。
- ⑦河川水及び海水を用いた添加回収試験（河川水は 0.10  $\mu\text{g/L}$ 、海水は 0.02  $\mu\text{g/L}$  添加）の回収率は、それぞれ 73 ~ 107%、58 ~ 103% であった。

なお、本研究は環境省委託の平成 25 年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

#### 文 献

- 1) 大月史彦, 肥塚加奈江, 前田大輔, 山本淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価, 岡山県環境保健センター年報, 35, 109-113, 2011
- 2) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価(第 2 報), 岡山県環境保健センター年報, 36, 109-114, 2012
- 3) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価(第 3 報), 岡山県環境保健センター年報, 37, 137-144, 2013
- 4) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き(平成 20 年度版), 平成 21 年 3 月, 2009
- 5) 浦山豊弘, 杉山広和, 剣持堅志, 藤原博一, 鷹野洋ら: LC/MS による農薬の多成分同時分析のための基礎的検討, 岡山県環境保健センター年報, 30, 57-62, 2006
- 6) 浦山豊弘, 剣持堅志, 吉岡敏行, 藤原博一, 中桐基晴: LC/MS による農薬の多成分同時分析のための基礎的検討(II), 岡山県環境保健センター年報, 31, 69-75, 2007
- 7) 浦山豊弘, 剣持堅志, 吉岡敏行, 藤原博一, 中桐基晴: LC/MS を用いた水質中モノハロゲン化フェノール類の分析法, 岡山県環境保健センター年報, 32, 59-65, 2008