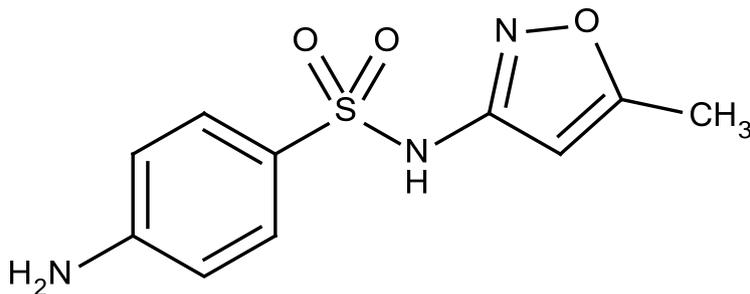


スルファメトキサゾール

Sulfamethoxazole

IUPAC 名：4-amino-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)-benzenesulfonamide

【対象物質の構造】



CAS 番号：723-46-6
分子式：C₁₀H₁₁N₃O₃S

同時分析：スルファニルアミド、スルファグアニジン、スルファセトアミド、スルフィソゾール、ピリメタミン、スルファピリジン、スルファジアジン、スルファチアゾール、ジアベリジン、スルファメラジン、スルファトロキサゾール、スルフィソキサゾール、オルメトプリム、スルファベンザミド、スルフィソミジン、スルファジミジン、スルファメトキシピリダジン、スルファモノメトキシ、スルファクロロピリダジン、トリメトプリム、スルファエトキシピリダジン、スルファキノキサリン、スルファドキシ、スルファジメトキシ、スルファニトラン、スルファプロモメタジン

Sulfanilamide, Sulfaguanidine, Sulfacetamide, Sulfisozole, Pyrimethamine, Sulfapyridine, Sulfadiazine, Sulfathiazole, Diaveridine, Sulfamerazine, Sulfatroxazole, Sulfisoxazole, Ormetoprim, Sulfabenzamide, Sulfisomidine, Sulfadimidine, Sulfamethoxy pyridiazine, Sulfamonomethoxine, Sulfachlorpyridazine, Trimethoprim, Sulfaethoxy pyridazine, Sulfaquinoxaline, Sulfadoxine, Sulfadimethoxine, Sulfanitran, Sulfabromomethazine,

【物理化学的性状】(スルファメトキサゾール)

[分子量(平均分子量)]	253.28 ¹⁾
[分子量(モライトビ ^o ック質量)]	253.0521
[融点]	166-172°C ¹⁾
[溶解性]	水：0.34 g/L (20°C) ²⁾
[log P _{ow}]	0.89 ³⁾
[pKa]	5.94 ²⁾

【毒性、用途】(スルファメトキサゾール)

【実験動物に対する急性毒性情報】

ラット(経口) 60週	TDL ₀ ：21 g/kg ³⁾
ラット(腹腔内注射)	LD ₅₀ ：2690 mg/kg ³⁾
マウス(経口)	LD ₅₀ ：2650 mg/kg ³⁾
マウス(静脈内注射)	LD ₅₀ ：1460 mg/kg ³⁾
マウス(腹腔内注射)	LD ₅₀ ：2300 mg/kg ³⁾
ラット(経口)	LD ₅₀ ：6200 mg/kg ³⁾

【用途】(スルファメトキサゾール)

医薬(抗生物質)、動物薬(抗菌剤)⁴⁾、殺菌剤、防かび剤、防汚剤、
医薬中間体³⁾

出典：

- 1) 和光純薬工業 製品安全データシート (MSDS)
- 2) 医薬品インタビューフォーム バクタ®配合錠、バクタ®配合顆粒
- 3) 神奈川県化学物質安全情報提供システム (kis-net)
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

【同時分析物質の物理化学的性状】

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

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準を添加した後、固相カートリッジに通水し捕集する。メタノールで溶出し、窒素気流下で濃縮後、定容して試験液とする。試験液を LC/MS/MS-SRM にて分析する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

スルファメトキサゾール	: 和光純薬工業製 (HPLC 用) (純度 99.0%)
動物薬混合標準溶液 LC/MS Mix 1 (スルファメトキサゾール及び同時分析物質が混合された製品)	: 林純薬工業製 (各 20 µg/mL)
スルファメトキサゾール- ¹³ C ₆	: SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製 (純度 99%)
スルファメトキサゾール-d ₄ (注 1)	: 林純薬工業製 (純度 97.4%)
スルファクロロピリダジン- ¹³ C ₆	: SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製 (純度 99%)
スルファジアジン- ¹³ C ₆	: SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製 (純度 99%)
スルファメサジン(スルファジミジン)- ¹³ C ₆	: CIL 製 (10µg/mL、純度 90%)
スルファドキシム-d ₃	: 林純薬工業製 (純度 99.9%)
トリメトプリム-d ₉	: SIGMA-ALDRICH (Fluka) 製 (純度 98%)
スルファジメトキシム-d ₆	: 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)

【標準液の調製】

〔標準原液〕

市販の混合標準液を用いない場合は、スルファメトキサゾール標準品10.0 mgを正確に量り取り、メタノール10 mLに溶解し、1000 mg/Lの標準原液を作成する。

〔サロゲート内標準液〕

スルファメトキサゾール-¹³C₆ 10.0 mgを正確に量り取り、メタノール10 mLに溶解し、1000 mg/Lのサロゲート内標準原液を作成する。(注2)

1000 mg/Lのサロゲート内標準原液を正確に1.00 mL分取し、メタノールを加え

て正確に10.0 mLとして、100 mg/Lのサロゲート内標準液を作成する。

100 mg/Lのサロゲート内標準原液を正確に200 µL分取し、メタノールを加えて正確に10.0 mLとし、2.00 ng/µLのサロゲート内標準液を作成する。

〔検量線用標準液〕

動物薬混合標準溶液(各20 µg/mL)(またはスルファメトキサゾール1000 mg/Lの標準原液)をメタノール/精製水(1:1)で順次希釈し、0.500~200 ng/mLの検量線用混合標準液を作成する。各濃度の標準液にはサロゲート内標準として、スルファメトキサゾール-¹³C₆標準液を10 ng/mL(注3)の濃度になるように添加し、検量線用標準液とする。

【器具】

試料採取瓶(1 L・細口瓶)、スピッツ型共栓付試験管(10 mL)、メスシリンダー、三角フラスコ、パストゥールピペット、マイクロシリンジ(注4)、コンセントレーター、ガラス注射筒、0.45 µm フィルター(親水性、PTFE、13 mm)(Millipore製)

使用するガラス器具はアセトンで洗浄し、乾燥して用いる。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)に従う。

【試料の前処理及び試料液の調製】

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(注3)し、混合する。これを固相カートリッジ(Oasis HLB plus)(注5)に10 mL/minの速さで通水(注6)する。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する。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 mLに定容し、0.45 µmフィルターでろ過を行い、試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従った操作をして得た試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS 測定条件〕(注7)

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

LC

LC 機種 : Waters Alliance 2695

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

移動相 : A:0.1%ギ酸/10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 (99:1)
B:0.1%ギ酸-アセトリル溶液 / 10 mmol/L ギ酸アンモニウム-アセトリル溶液 (99:1)

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

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

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

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

22 ~ 35 min A:B = 0:100

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

35.1 ~ 48 min A:B=97:3

カラム流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

試料注入量 : 5 μL

MS

MS 機種 : Waters Quattro micro API

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

イオン化法 : ESI(+) (スルファニトランは ESI(-))

測定モード : SRM

モニターイオン、コーン電圧及びコリジョン電圧 : 次表及び次々表参照

〔モニターイオン、コーン電圧及びコリジョン電圧〕(注8)

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
Sulfamethoxazole	17.53	254.06>156.0 (定量)	26	13
		254.06>92.0 (確認)	26	26
		254.06>108.0 (確認)	26	22
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
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	268.2 > 156.1	22	12
Sulfisoxazole	18.50			
Ormetoprim	11.16	275.0 > 123.0	38	23
Sulfabenzamide	19.57	277.0 > 156.1	20	10
Sulfisomidine	8.69	279.0 > 92.0	32	29
Sulfadimidine	13.08			
Sulfamethoxypyridazine	13.48	281.0 > 156.0	27	15
Sulfamonomethoxine	15.31			
Sulfachloropyridazine	16.21	285.0 > 156.0	21	13
Trimethoprim	10.26	291.1 > 230.1	36	21
Sulfaethoxypyridazine	17.90	295.0 > 156.0	28	17
Sulfaquinoxaline	20.03	301.0 > 156.0	27	15
Sulfadoxin	17.45	311.0 > 156.0	28	17
Sulfadimethoxin	20.00			
Sulfanitran (Negative)	22.03	334.0 > 136.0	22	25
Sulfabromomethazine	22.19	357.0 > 92.0	35	32

〔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- ¹³ C ₆	260.08 > 162.00	24	14
Sulfadiazine- ¹³ C ₆	257.08 > 162.00	24	14
Sulfadimidine- ¹³ C ₆	285.00 > 98.00	28	29
Sulfachloropyridazine- ¹³ C ₆	291.04 > 162.00	23	14
Trimethoprim- <i>d</i> ₉	300.20 > 234.00	38	21
Sulfadoxin- <i>d</i> ₃	314.10 > 159.00	28	19
Sulfadimethoxin- <i>d</i> ₆	317.12 > 162.00	32	21

〔検量線〕(注9)

検量線用標準液5.0 μLをLC/MSに注入し、得られた標準物質のピーク面積とサロゲート内標準の濃度比及びピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕(注10)

試験液5.0 μLをLC/MSに注入し、対象物質とサロゲート内標準のピーク面積比から検量線を用いて検出量を求める。

〔濃度の算出〕(注10)

試料水中濃度 C (μg/L) は次式により算出する。

$$C = R \times Q / V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準物質濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (ng)

(= 添加するサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (μL))

V : 試料水量 (mL)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 10.0 \text{ (ng)}$$

(= 添加サロゲート内標準液の濃度 (2.00 ng/μL) × サロゲート内標準添加液の容量 (5.00 μL))

$$V = 100 \text{ (mL)}$$

即ち、

$$C = 0.100 R \text{ (μg/L)}$$

である。

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いたLC/MSのIDLを下表に示す(注11)。

表1 IDL算出の結果

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
スルファメトキサゾール	0.37	100	1.00	0.0037

〔測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) 〕

本測定方法におけるMDL及びMQLを下表に示す (注12)。

表2 MDL及びMQLの算出結果

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
スルファメトキサゾール	100	1.00	0.0070	0.018

注解

- (注1) 通常はサロゲート内標準として ^{13}C 体を使用するため d 体は用いないが、 ^{13}C 体を手に入れない場合は d 体を用いることも可能と考えられる。本物質のサロゲート内標準は、対象物質の濃度が増加するにつれて面積値が低下する性質を有する。このような性質を持つ物質やマトリックス効果の影響が著しい物質では、真のサロゲート内標準回収率を求めることができないが、 d 体をシリンジスパイク内標準として使用することで正しい回収率を求めることができる。
- (注2) 同時分析物質のサロゲート内標準も同様の操作で1000 mg/Lの原液を作成するが、スルファジアジン- $^{13}\text{C}_6$ は溶解度が低いいため10.0 mgをメタノール100 mLに溶解して、100 mg/Lの原液を作成する。
- (注3) 本検討においては10 ng/mLとなるよう添加したが、ピーク面積を安定化させるには20~50 ng/mL程度となるよう添加することが望ましいと考えられる。また、装置の感度等に応じて添加量は変更して良い。
- (注4) 吐出誤差2%以下であることをあらかじめ確認しておくことが望ましい。精度を保証するため、校正されたデジタルマイクロシリンジや検量証明書付きマイクロシリンジの使用が有効である。例としてSGE製があるが推奨するものではない。
- (注5) 固相カートリッジは、メタノール10 mL、精製水20 mLでコンディショニングしたものを使用する。
- (注6) スルファセタミドを同時分析する場合は、酸性 (pH5以下) にした後、通水する。スルファメトキサゾールを含むそれ以外の物質ではpH調整は不要である。
- (注7) LC/MSの条件は、本測定に使用した機種 (Waters Alliance2695 + Quattro micro API) 固有のものである。
- (注8) 多成分を同時分析する時は、定量イオンのみの測定でも良い。その場合、

検出された際には、確認イオンも測定する。

- (注9) スルファメトキサゾールは高濃度域で絶対検量線の傾きが小さくなる傾向にあるが、サロゲート内標準を用いることで検量線が直線となる。なお、*d*体をシリンジスパイク内標準として誤って¹³C体の面積値のみを補正すると検量線の傾きを補正できないので、検量線や定量計算ではシリンジスパイク(*d*体)内標準を使用しないことに留意する。
- (注10) 同時分析物質のうち、サロゲート内標準があるスルファクロロピリダジン、スルファジアジン、スルファメサジン(=スルファジミジン)、スルファドキシシ及びトリメトプリムは、スルファメトキサゾールと同様に対象物質とサロゲート内標準のピーク面積比を用いて定量し、それ以外の物質は絶対検量線で定量する。
- (注11) IDLは、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)に従って算出した。結果を以下に示す。

表3 IDLの算出結果

物質名	スルファメトキサゾール
試料量 (mL)	100
最終液量 (mL)	1
注入液濃度 (ng/mL)	1.00
注入量 (μL)	5.0
結果 1 (ng/mL)	0.976
結果 2 (ng/mL)	0.927
結果 3 (ng/mL)	0.976
結果 4 (ng/mL)	1.17
結果 5 (ng/mL)	1.10
結果 6 (ng/mL)	1.15
結果 7 (ng/mL)	1.10
平均値 (ng/mL)	1.057
標準偏差 (ng/mL)	0.0959
IDL (ng/mL)*	0.37
IDL 試料換算値 (μg/L)	0.0037
S/N	9.9
CV (%)	9.1

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

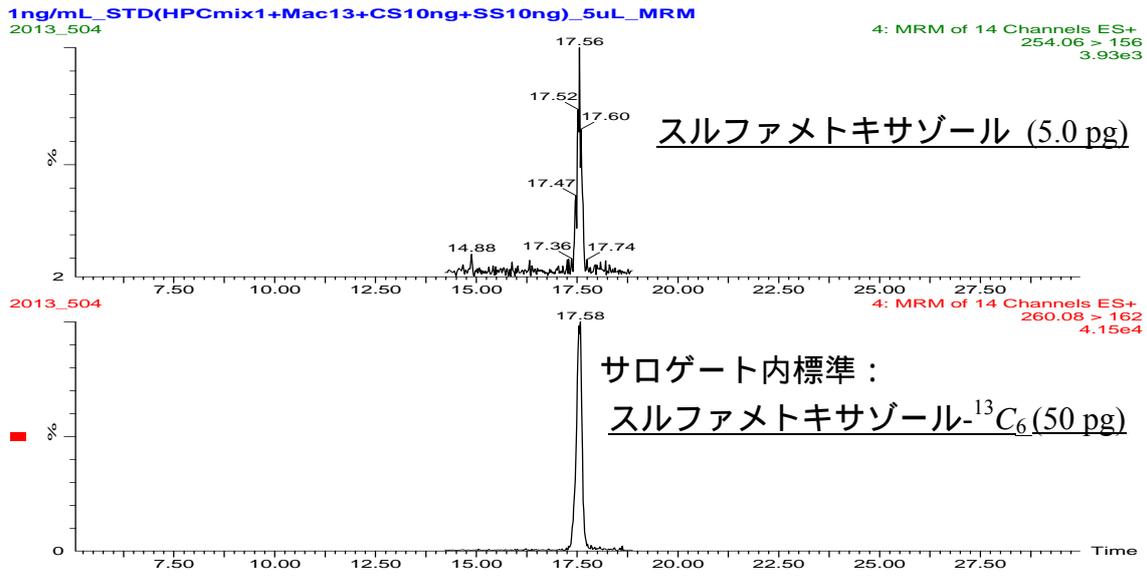


図1 IDL 測定時のクロマトグラム

〔同時分析物質のIDLの算出結果〕

同時分析物質のIDLの算出結果を以下に示す。

表4 同時分析物質の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 (μL)	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
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
Sulfamethoxy pyridazine	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
Sulfaethoxy pyridazine	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

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

(注12) MDL及びMQLは、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)により、表のとおり算出した。測定時の代表的なクロマトグラムを図に示す。

表5 MDL及びMQLの算出結果

物質名	スルファ メトキサゾール	サロゲート 回収率(%)
試料	海水	-
試料量 (mL)	100	-
標準添加量 (ng)	2.00	-
試料換算濃度 (µg/L)	0.0200	-
最終液量 (mL)	1.00	-
注入量濃度 (ng/mL)	2.00	-
装置注入量 (µL)	5.0	-
操作ブランク(µg/L) ^{*1}	ND	96
無添加平均 (µg/L) ^{*2}	ND	96
結果 1 (µg/L)	0.0219	88
結果 2 (µg/L)	0.0173	95
結果 3 (µg/L)	0.0172	95
結果 4 (µg/L)	0.0169	96
結果 5 (µg/L)	0.0193	91
結果 6 (µg/L)	0.0198	93
結果 7 (µg/L)	0.0189	95
平均値 (µg/L)	0.01876	93.3
標準偏差 (µg/L)	0.00179	2.79
MDL (µg/L) ^{*3}	0.0070	-
MQL (µg/L) ^{*4}	0.018	-
S/N 比	11	-
CV(%)	9.6	3.0

*1 試料マトリクスのみがない状態で水質試料と同様の操作を行い測定した値 (n = 1)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準物質を添加しない状態で含まれる濃度の平均値(n = 2)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

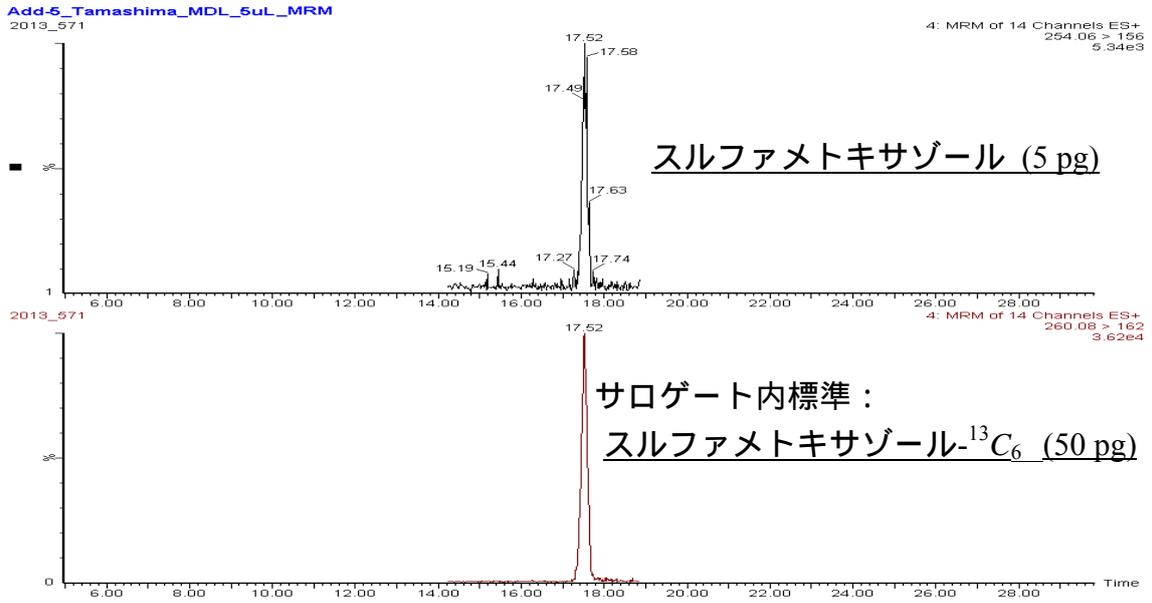


図2 MDL 測定時の代表的なクロマトグラム

H26年度調査において、混合標準試料中の各物質の検出感度差からクロマトグラムでは十分なS/Nが得られているにも関わらず分析法開発手順によるMDLではNDとなったり、MDLが検量線最低濃度より大きい事例が見られた。このため、検量線最低濃度(S/N>10を確認)の試料換算値を検出下限値として取りまとめた物質もあった。なお、検量線最低濃度においても十分なS/Nのある物質も存在し、S/N10程度まで濃度を下げた標準物質測定が望まれる。(2015年度精査等検討会コメント)

〔同時分析物質のMDL及びMQL〕

同時分析物質のMDL及びMQLの算出結果を以下に示す。

表6 同時分析物質のMDL及び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)	平均値 (ng/L)	標準偏差 (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	CV (%)	リカバリ率 (%)
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
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
Sulfamethoxy pyridazine	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
Sulfaethoxy pyridazine	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
Sulfantran	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。

§2 解説

【分析法】 【フローチャート】

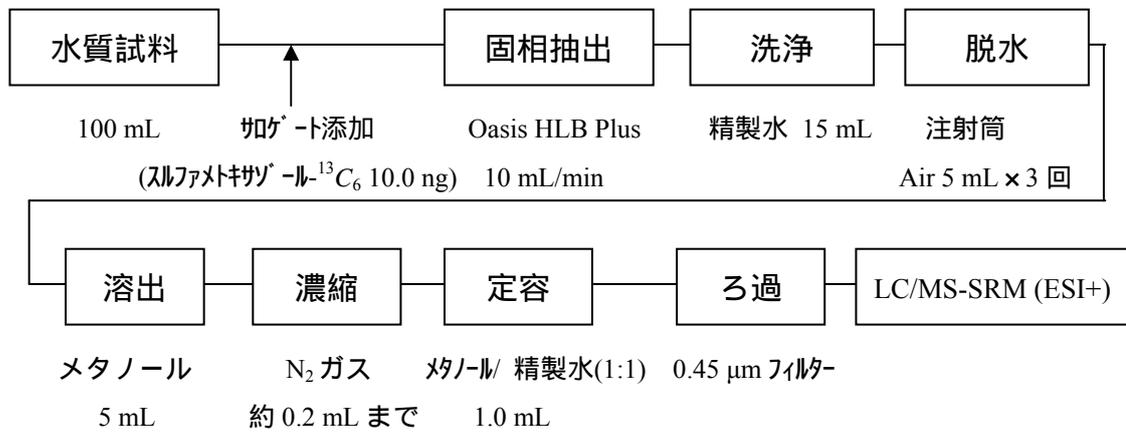


図3 分析法のフローチャート

【検量線】

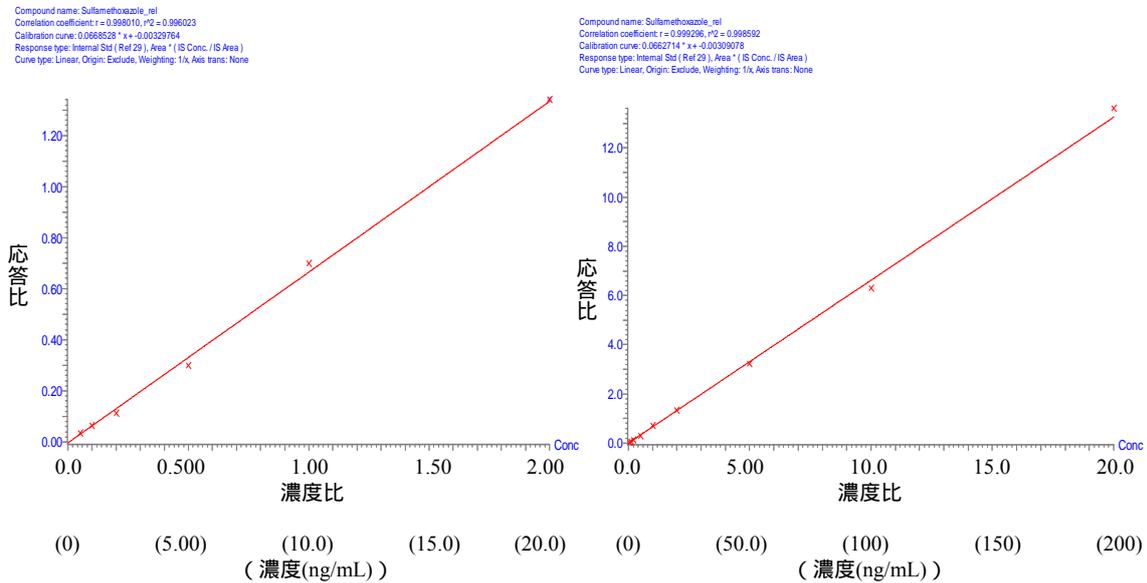


図4 検量線

(対象物質濃度範囲 0.500 ~ 20.0 ng/mL (左図) 0.500 ~ 200 ng/mL (右図))

表 7 検量線作成用データ

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値		応答比 (As/Ais)
		スルファメトキサ ゾール (As) (m/z 254>156)	スルファメトキサゾ ール- $^{13}\text{C}_6$ (Ais)* (m/z 260>162)	
20	200	38848	2854	13.613
10	100	23973	3800	6.308
5	50	15172	4678	3.243
2	20	7548	5628	1.341
1	10	4234	6044	0.701
0.5	5	1939	6500	0.298
0.2	2	767	6731	0.114
0.1	1	447	6815	0.066
0.05	0.5	235	6796	0.035

*:サロゲート内標準：10.0 ng/mL

〔クロマトグラム〕

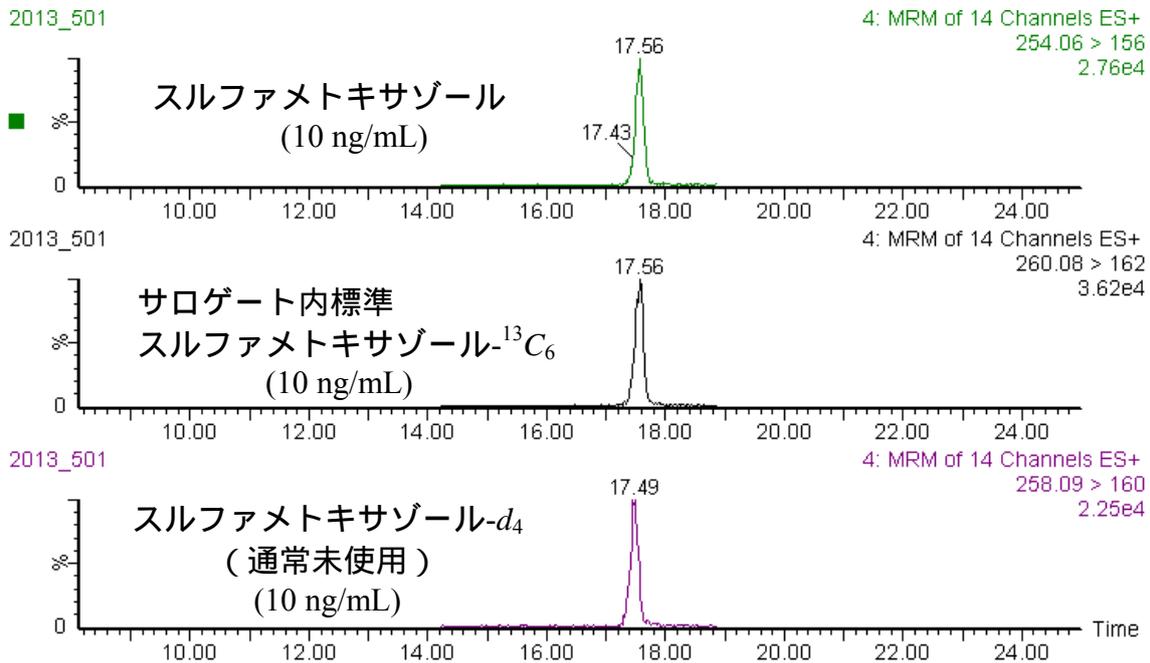


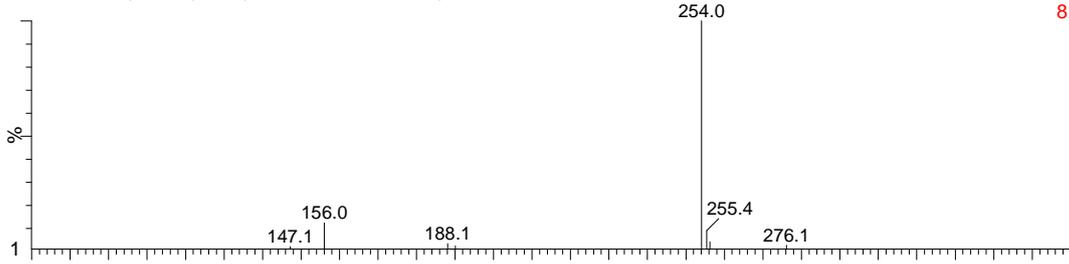
図 5 スルファメトキサゾール(10 ng/mL)のクロマトグラム

〔マススペクトル〕

スルファメトキサゾールのマススペクトル及びプレカーサーイオン m/z 254 に対するプロダクトイオンをそれぞれ下図に示す。

1ppm SMZ+CAM 100uL HPCmix1+CAM 3-43-98(1-17-22)ACN_D3_MRM
 2013_173 1264 (15.624) Cm (1258:1279-1383:1407)

1: Scan ES+
 8.44e5



2013_174 1262 (15.611) Cm (1252:1273)

1: Daughters of 254ES+
 2.65e6

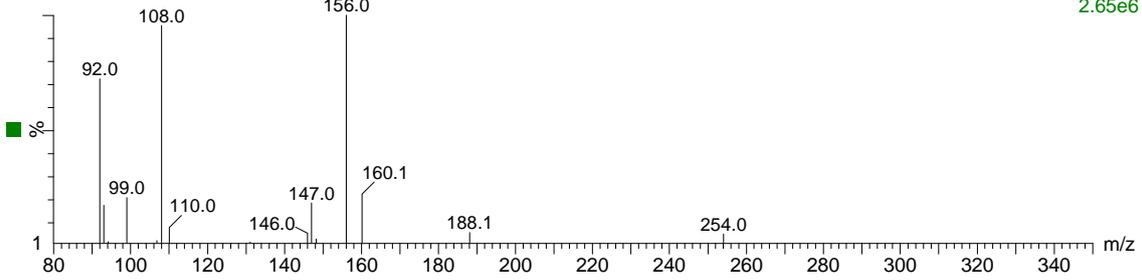
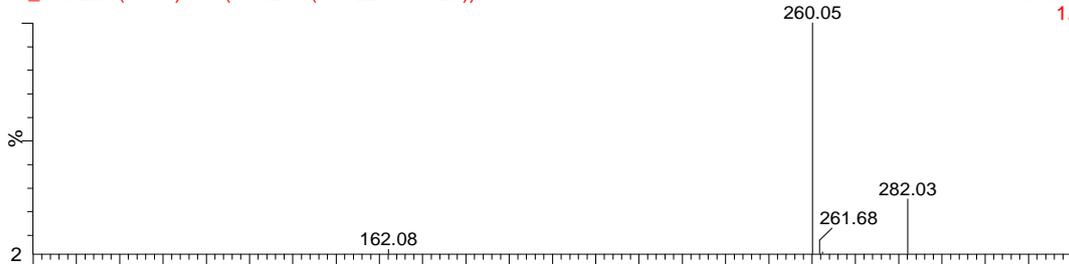


図 6-1 スルファメトキサゾールのマススペクトル (上図) 及び
 プレカーサーイオン m/z 254 に対するプロダクトイオン (下図)

スルファメトキサゾール- $^{13}C_6$ のマススペクトル及びプレカーサーイオン m/z 260 に対するプロダクトイオンをそれぞれ下図に示す。

SMZ- $^{13}C_6$ 10ppm 100uL 5-95ACN_D5_D-scan
 2013_848 220 (6.849) Cm (191:257-(56:122+343:426))

Scan ES+
 1.05e6



2013_849 243 (7.043) Cm (229:273-(98:129+332:375))

Daughters of 260ES+
 7.20e6

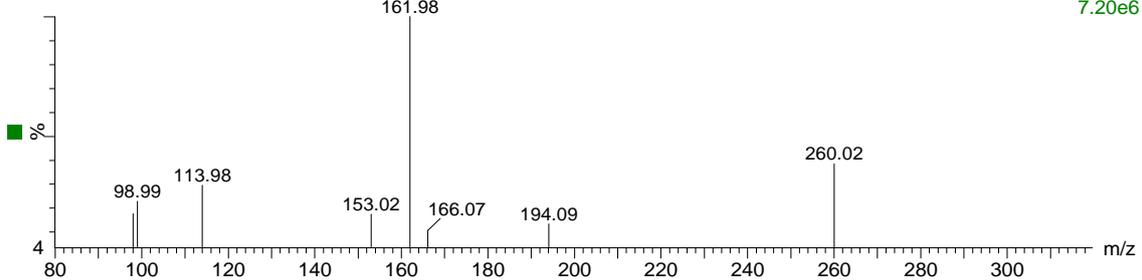


図 6-2 スルファメトキサゾール- $^{13}C_6$ のマススペクトル (上図) 及び
 プレカーサーイオン m/z 260 に対するプロダクトイオン (下図)

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクのクロマトグラムを図7に示す。操作ブランクからピークは検出されなかった。

BL-1_Milli-Q_CS10ng,SS10ng_5uL_3-100ACN_MRM

2013_637

4: MRM of 14 Channels ES+
254.06 > 156
426

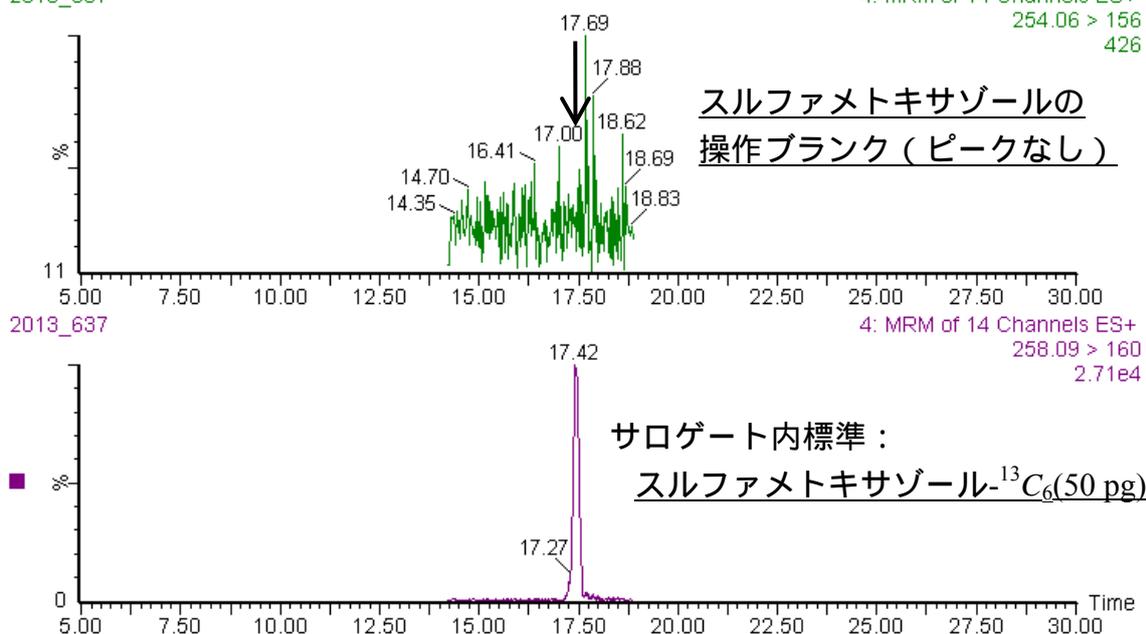


図7 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

添加回収試験結果を表8に示す。添加回収試験に用いた試料は、河川水は笹ヶ瀬川笹ヶ瀬橋、海水は岡山県倉敷市水島沖で採取した。

表8 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率 (%)
スルファメトキサゾール	河川水	100	無添加	2	11.4	-	2.0	87.3
		100	10.00	5	109	97.8	2.2	88.7
	海水	100	無添加	2	ND	-	-	95.8
		100	2.00	7	18.8	93.8	9.6	93.3
		100	10.00	7	106	106	2.2	88.9

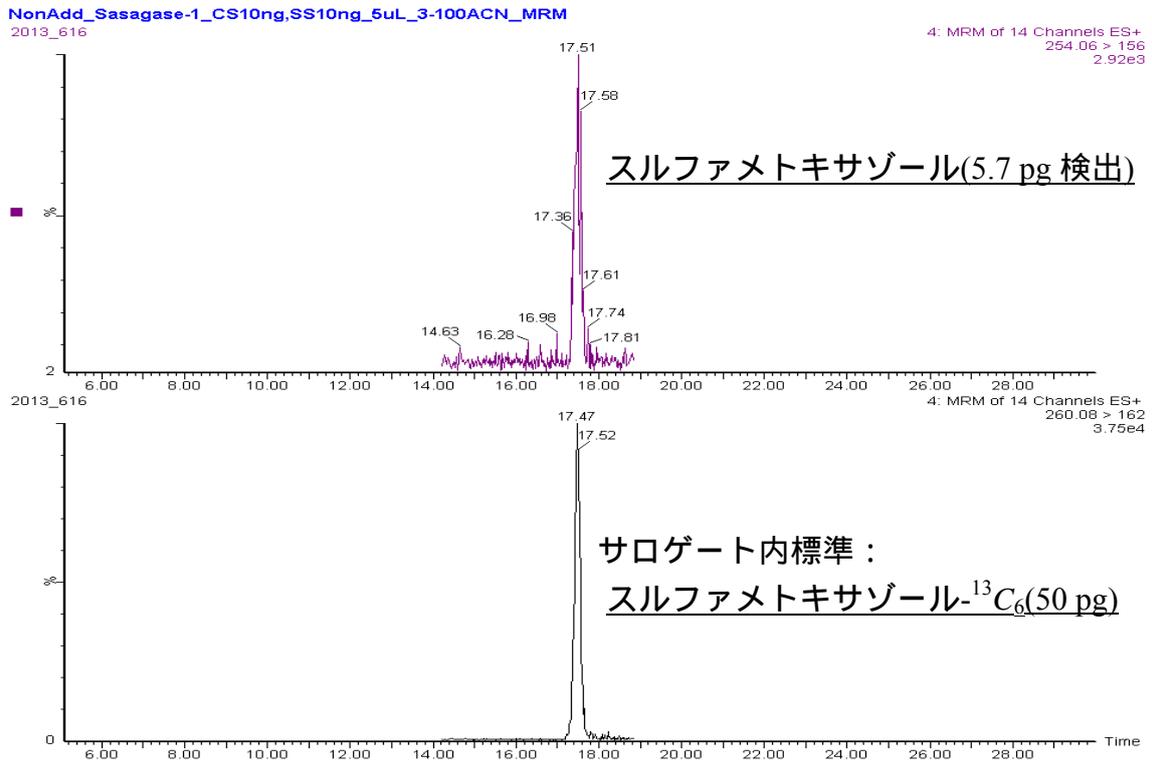


図8 無添加試料(河川水)のクロマトグラム

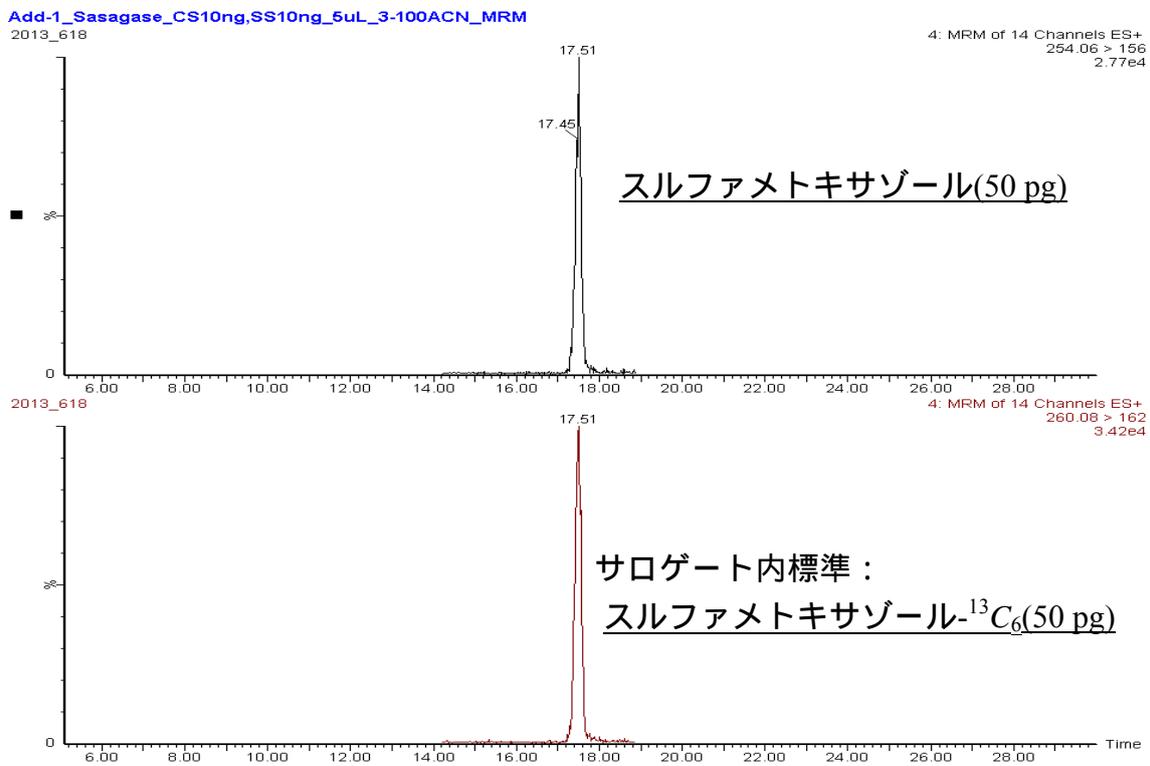


図9 添加試料(河川水)のクロマトグラム

〔同時分析物質の添加回収試験結果〕

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 9 同時分析物質の添加回収試験結果（河川水）

対象物質	試料名	試料		無添加		10 ng 添加				
		量 (mL)	試験数	検出濃度 (ng/L)	リカバリ率 (%)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	リカバリ率 (%)
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	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
Sulfamethoxypyridazine	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
Sulfaethoxypyridazine	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
Sulfanitran	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。

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 10 同時分析物質の添加回収試験結果（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)	リカバリ率 (%)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	リカバリ率 (%)
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
Sulfamethoxypyridazine	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
Sulfaethoxypyridazine	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
Sulfanitran	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。

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 11 に示す。分解性は確認されなかった。

表 11 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)	7 日後の残存率(%)*	
					暗所	明所
スルファメトキサゾール	5	2	500	88	100	-
	7	2	500	92	105	100
	9	2	500	90	105	-

*：7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

同時分析物質の分解性スクリーニング試験結果を表 12 に示す。明所で分解性が確認されたのは、スルファニルアミド、スルファグアニジン、スルファセタミド、スルファメトキシピリダジン、スルファエトキシピリダジンであり、pH に依存した分解性が確認された物質はなかった。

表 12 同時分析物質の分解性スクリーニング試験結果

対象物質	試験数	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)			7 日後の残存率(%)*			
			pH 5	pH 7	pH 9	暗所			明所
			pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 7
Sulfanilamide	2	500	61	74	71	95	96	101	47
Sulfaguanidine	2	500	61	75	72	98	98	104	78
Sulfacetamide	2	500	84	66	86	108	101	106	78
Sulfisozole	2	500	87	88	85	107	108	111	93
Pyrimethamine	2	500	89	87	81	96	103	109	101
Sulfapyridine	2	500	83	93	86	97	99	110	89
Sulfadiazine	2	500	83	90	89	91	103	101	94
Sulfathiazole	2	500	86	93	87	102	103	111	86
Diaveridine	2	500	89	89	80	96	100	118	102
Sulfamerazin	2	500	91	93	88	104	105	110	89
Sulfatroxazole	2	500	85	95	87	91	92	106	94
Sulfisoxazole	2	500	100	105	107	101	106	105	103
Ormetoprim	2	500	80	86	84	97	103	105	104
Sulfabenzamide	2	500	86	93	88	99	104	110	105
Sulfisomidine	2	500	85	93	87	100	106	111	104
Sulfadimidine	2	500	90	93	88	100	105	108	95
Sulfamethoxypyridazine	2	500	86	91	85	97	99	111	81
Sulfamonomethoxine	2	500	89	91	85	102	111	115	108
Sulfachloropyridazine	2	500	89	93	88	98	104	112	92
Trimethoprim	2	500	89	89	80	96	100	118	102
Sulfaethoxypyridazine	2	500	88	97	91	96	96	104	74
Sulfaquinoxaline	2	500	89	101	90	95	95	105	94
Sulfadoxin	2	500	87	96	88	96	100	112	94
Sulfadimethoxin	2	500	89	99	89	101	102	113	101
Sulfanitran	2	500	79	80	79	109	119	135	145
Sulfabromomethazine	2	500	94	97	91	102	112	117	92

*：7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

H26年度調査において、試料を通水した固相カートリッジ (HLB)を冷凍して96~131日間保存した後、溶出・測定した事例があった。使用した7種のサロゲートの添加回収率に問題はなく(スルファクロロピリダジンの4検体(68-79%/全12検体)を除き80%以上)、保存性に支障なしと判断された。(2015年度精査等検討会コメント)

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表13に示す。保存性は良好であった。

表13 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	試験数 (n)	初期濃度 (ng/L)又は (ng/mL)	残存率(%)		
					7日後	14日後	1月後
スルファ	試料	河川水	2	61.4 ^{*1}	104	-	-
メトキサ	粗抽出液	河川水	2	6.14	-	100	-
ゾール	標準液	標準液	2	5.00	-	-	103

*1：環境試料中に 11.4 ng/L + 標準品を 50 ng/L 添加

同時分析物質の保存性試験結果を表14に示す。保存性は良好であった。

表 14 同時分析物質の保存性試験結果

対象物質	試料名	試験 数 (n)	試験 対象	初期 濃度 (ng/L)	残存率 (%) 7日後	試験 対象	初期 濃度 (ng/mL)	残存率 (%) 14日後
Sulfaguanidine	河川水	2	試料	50	119	粗抽出液	5.0	102
Sulfacetamide	河川水	2	試料	50	- ^{*1}	粗抽出液	5.0	- ^{*1}
Sulfisozole	河川水	2	試料	50	125	粗抽出液	5.0	105
Pyrimethamine	河川水	2	試料	50	94	粗抽出液	5.0	99
Sulfapyridine	河川水	2	試料	61 ^{*2}	106	粗抽出液	6.1	107
Sulfadiazine	河川水	2	試料	50	112	粗抽出液	5.0	90
Sulfathiazole	河川水	2	試料	50	102	粗抽出液	5.0	103
Diaveridine	河川水	2	試料	52 ^{*3}	114	粗抽出液	5.2	100
Sulfamerazin	河川水	2	試料	50	105	粗抽出液	5.0	100
Sulfatroxazole	河川水	2	試料	50	98	粗抽出液	5.0	94
Sulfisoxazole	河川水	2	試料	50	127	粗抽出液	5.0	99
Ormetoprim	河川水	2	試料	50	109	粗抽出液	5.0	103
Sulfabenzamide	河川水	2	試料	50	121	粗抽出液	5.0	105
Sulfisomidine	河川水	2	試料	50	108	粗抽出液	5.0	108
Sulfadimidine	河川水	2	試料	50	100	粗抽出液	5.0	100
Sulfamethoxy pyridazine	河川水	2	試料	50	102	粗抽出液	5.0	102
Sulfamonomethoxine	河川水	2	試料	50	104	粗抽出液	5.0	98
Sulfachloropyridazine	河川水	2	試料	50	101	粗抽出液	5.0	104
Trimethoprim	河川水	2	試料	53 ^{*4}	100	粗抽出液	5.3	103
Sulfaethoxy pyridazine	河川水	2	試料	50	105	粗抽出液	5.0	98
Sulfaquinoxaline	河川水	2	試料	50	118	粗抽出液	5.0	107
Sulfadoxin	河川水	2	試料	50	96	粗抽出液	5.0	102
Sulfadimethoxin	河川水	2	試料	50	95	粗抽出液	5.0	100
Sulfanitran	河川水	2	試料	50	92	粗抽出液	5.0	95
Sulfabromomethazine	河川水	2	試料	50	102	粗抽出液	5.0	103

*1：スルファセタミドは、酸性下で抽出する必要があり、同時分析では0日後の回収

率が低かったので欠測とした。

*2：環境試料中に 11 ng/L + 標準品を 50 ng/L 添加

*3：環境試料中に 2 ng/L + 標準品を 50 ng/L 添加

*4：環境試料中に 3 ng/L + 標準品を 50 ng/L 添加

〔抽出用固相カートリッジの検討〕

精製水 100 mL に標準物質 1.0 μg を添加し、3 種類の固相に 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。

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少なかったため、Oasis HLB を採用することとした。

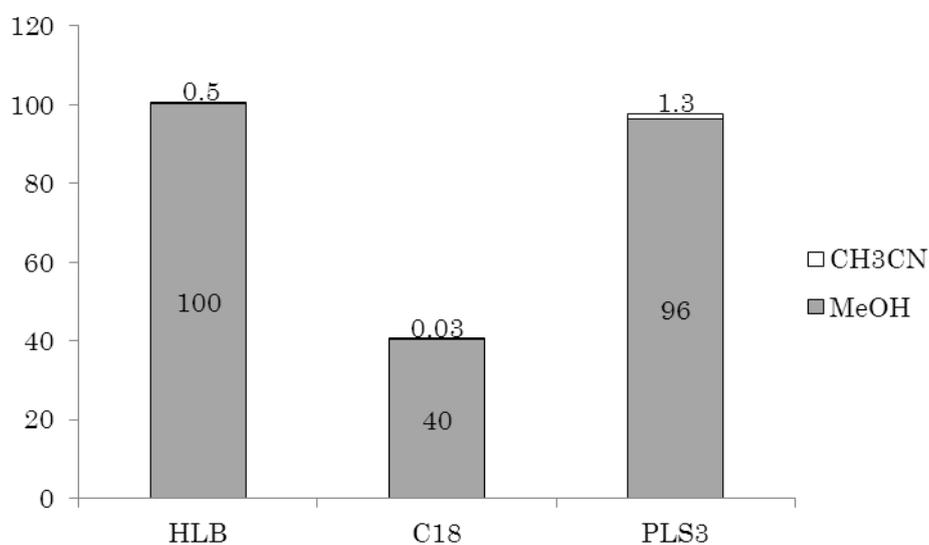


図 10 抽出用固相カートリッジの検討結果（スルファメトキサゾール）

〔溶出溶媒の検討〕

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。

アセトニトリルでは、回収率が低くなる同時分析物質がいくつもあったため、メタノールでの溶出とした。

溶媒量については、スルファメトキサゾールはメタノール 5~10 mL への残留が 1%未満、同時分析物質の最大でも 2%のみの残留であったので、メタノール 5 mL での溶出とした。

表 15 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
Sulfamethoxazole	101	0.8	101	99	1.4	101
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
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

〔環境試料の添加回収試験（予備試験）〕

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 で通水し、メタノール 5 mL で溶出した（測定溶媒はメタノール）。

スルファメトキサゾールは、回収率 100% の良好な結果であったが、スルファセタミドは河川水で 10%、海水で 1% であった。

表 16 環境試料の添加回収試験結果 (Oasis HLB)

対象物質	回収率 (%)			
	河川水		海水	
	無添加	添加	無添加	添加
Sulfamethoxazole	<1	100	<1	100
Sulfanilamide	<1	67	<1	71
Sulfaguanidine	<1	62	<1	70
Sulfacetamide	<1	10	<1	1
Sulfisozole	<1	88	<1	61
Pyrimethamine	<1	100	<1	101
Sulfapyridine	<1	88	<1	91
Sulfadiazine	<1	87	<1	78
Sulfathiazole	<1	77	<1	86
Diaveridine	<1	95	<1	99
Sulfamerazin	<1	94	<1	95
Sulfatroxazole	<1	96	<1	103
Sulfisoxazole	<1	101	<1	104
Ormetoprim	<1	95	<1	100
Sulfabenzamide	<1	97	<1	101
Sulfisomidine	<1	94	<1	95
Sulfadimidine	<1	101	<1	103
Sulfamethoxypyridazine	<1	100	<1	102
Sulfamonomethoxine	<1	96	<1	97
Sulfachloropyridazine	<1	89	<1	97
Trimethoprim	<1	94	<1	97
Sulfaethoxypyridazine	<1	109	<1	110
Sulfaquinoxaline	<1	105	<1	107
Sulfadoxin	<1	99	<1	101
Sulfadimethoxin	<1	103	<1	105
Sulfanitran	<1	68	<1	125
Sulfabromomethazine	<1	125	<1	128

〔通水時の pH の検討〕

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 未調整で、環境試料の添加回収試験での検討結果を再掲した）。スルファメトキサゾールを含む多くの物質では、pH9 では回収率が低くなることが確認されたが、pH3～8 では差が見られない物質が多かったので、pH は調整しないこととした。

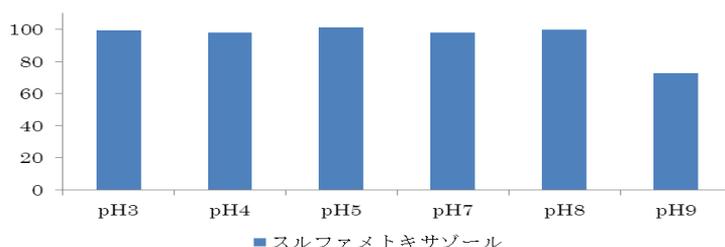


図11 通水時のpHの検討試験結果 (Oasis HLB)

表17 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
Sulfamethoxazole	99	98	101	98	100	73
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
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
Sulfamethoxy pyridazine	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
Sulfaethoxypyridazine	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

〔逆相-イオン交換ミックスマード固相の検討〕

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 で溶出した。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）。

スルファメトキサゾールは、陽イオンでも陰イオンでも保持する傾向にあったが回収率が低く、海水では MCX で 15%程度メタノール画分に溶出した。

同時分析物質では、メタノール画分に溶出するもの、ギ酸/メタノール又はアンモニア/メタノール画分に溶出するもの様々であり、回収率も低い傾向であったため、採用しないこととした。

表 18 逆相-イオン交換ミックスマ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	
Sulfamethoxazole	0	74	74	15	59	74	0	78	78	1	71	72
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
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
Sulfamethoxypyridazine	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
Sulfaethoxypyridazine	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
Sulfanitrans	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

〔試験液の溶媒組成の検討〕

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、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 2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm、注入量 : 10 μL)

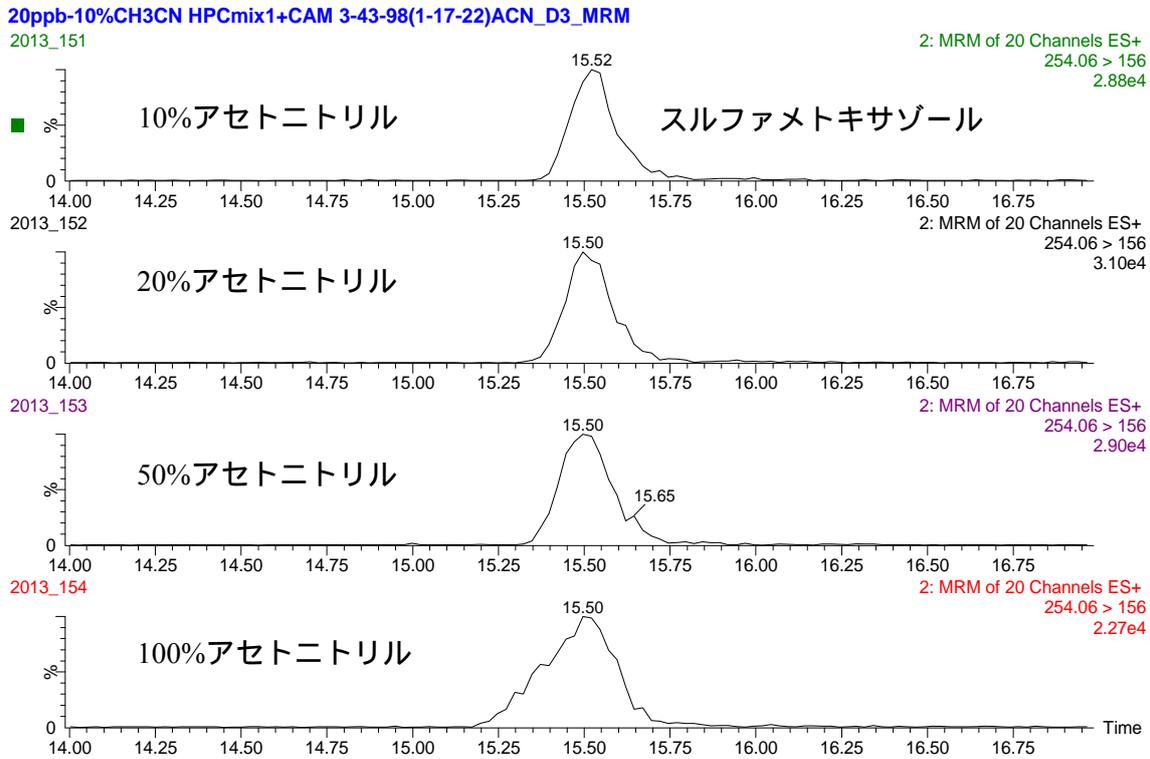


図 12-1 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-1

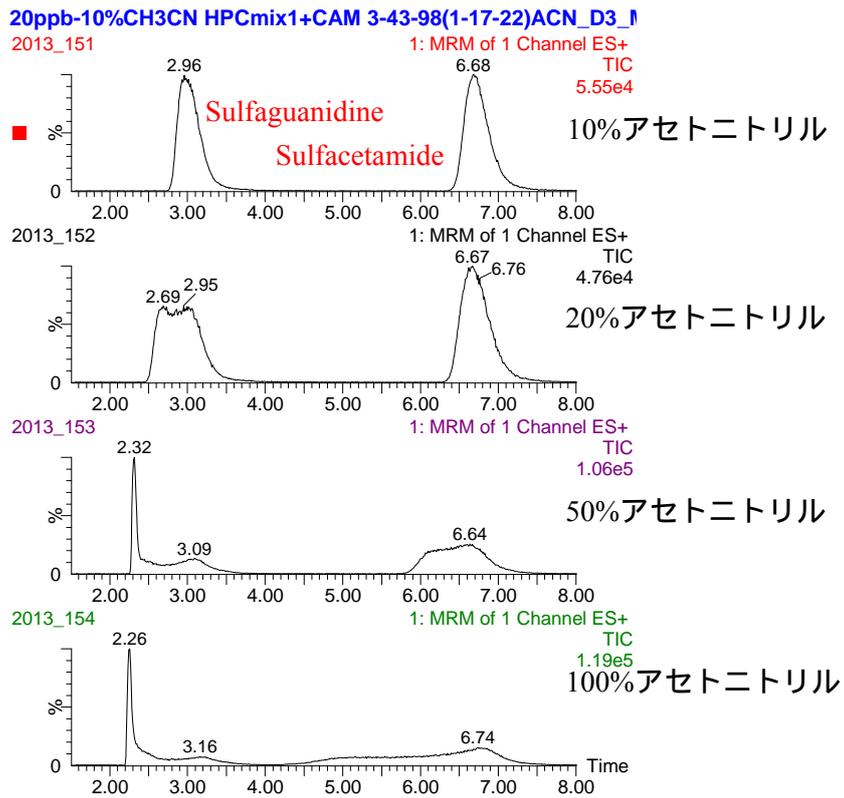


図 12-2 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-2

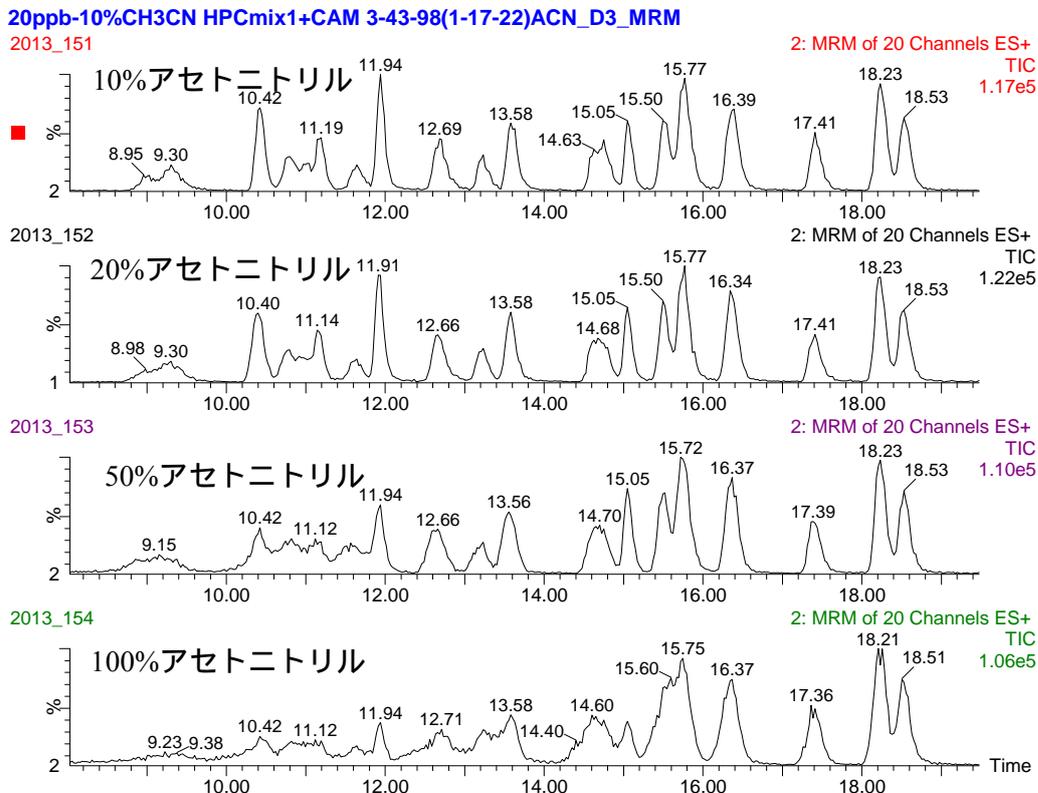


図 12-3 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム-3

〔注入量の検討〕

注入量を 5 μ L にしたところ、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（カラムは AtlantisT3 を使用）。

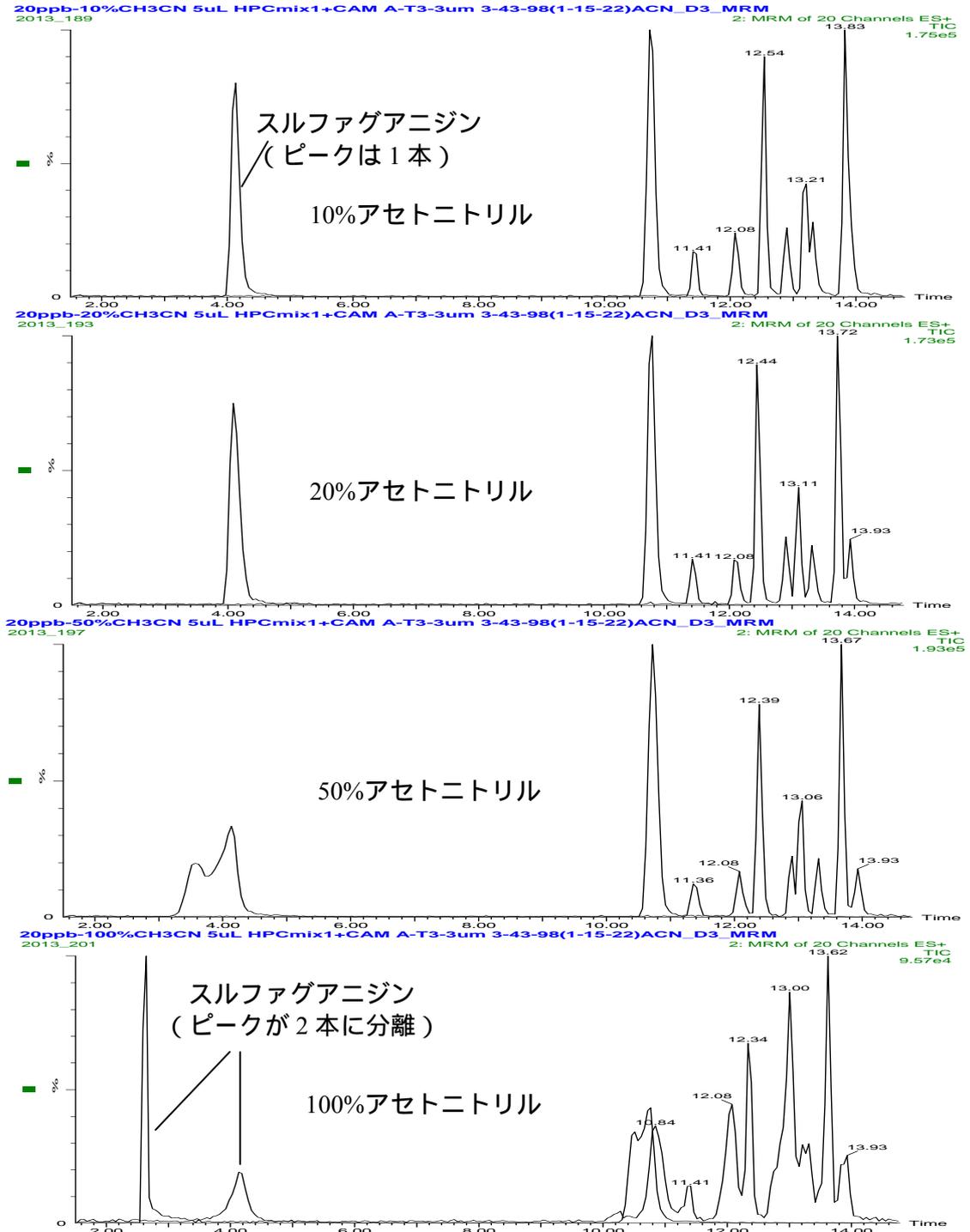


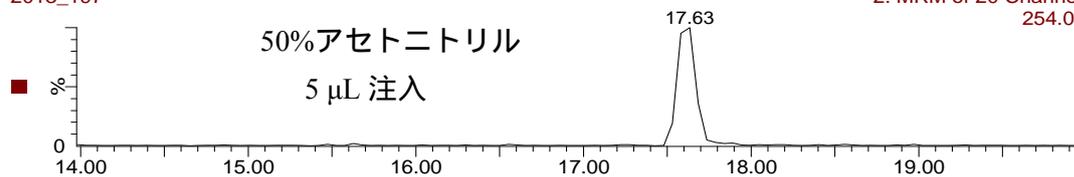
図13-1 注入量5 μ Lで測定したクロマトグラム-1

対象物質のスルファメトキサゾール (R.T : 17.6 min) は、5 μ L 注入であれば、100%アセトニトリルで調製しても支障なかった。

20ppb-50%CH3CN 5 μ L HPCmix1+CAM A-T3-3um 3-43-98(1-15-22)ACN_D3_MRM

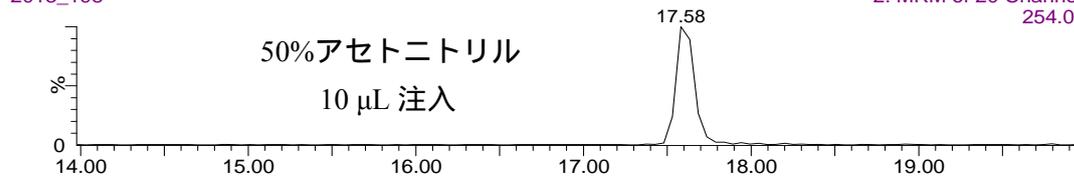
2013_197

2: MRM of 20 Channels ES+
254.06 > 156
2.67e4



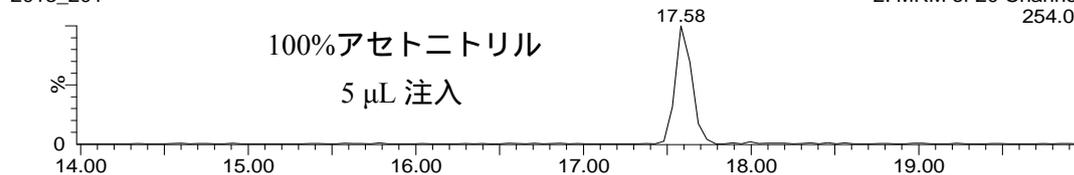
2013_198

2: MRM of 20 Channels ES+
254.06 > 156
5.12e4



2013_201

2: MRM of 20 Channels ES+
254.06 > 156
3.10e4



2013_202

2: MRM of 20 Channels ES+
254.06 > 156
3.50e4

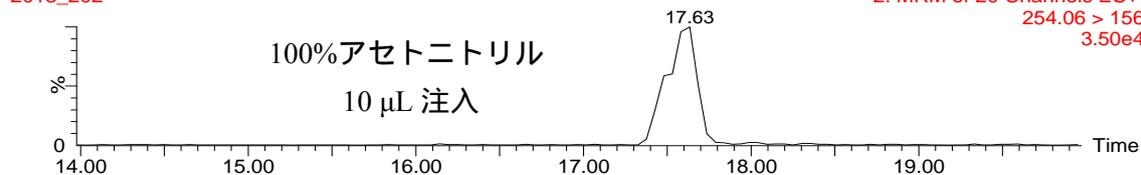


図13-2 注入量5 μ Lで測定したクロマトグラム-2

更に、注入量を 2 μ L にしたところ、保持時間が最も短いスルファグアニジンも 50%アセトニトリルで問題なくなり、100%アセトニトリルでもスルファグアニジンのピーク幅が広がる程度で、他の物質でピーク形状が崩れるものは無くなった (AtlantisT3)。

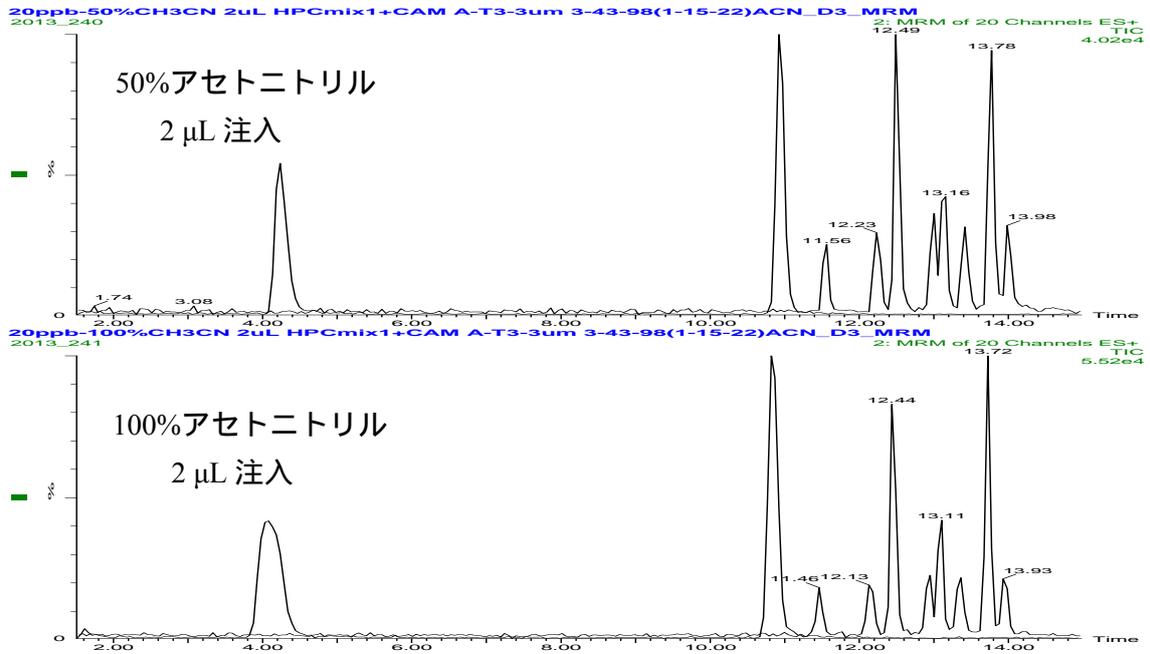


図13-3 注入量2 μ Lで測定したクロマトグラム

〔試験液の溶媒組成の検討〕

図 12-1 ~ 図 13-3 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 μ L 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。

明確な違いはなく、有機溶媒の割合を下げることによって、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。

表19 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
Sulfamethoxazole	91	96	92	95	95	91
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
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
Sulfamethoxypyridazine	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
Sulfaethoxypyridazine	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
Sulfantran	79	61	75	96	64	86
Sulfabromomethazine	95	103	99	109	102	103
平均	82	87	85	91	86	83

〔移動相及びカラムの検討〕

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

20ppb-10%CH3CN 10uL HPCmix1+CAM 3-43-98(1-17-22)ACN_D3_MRM

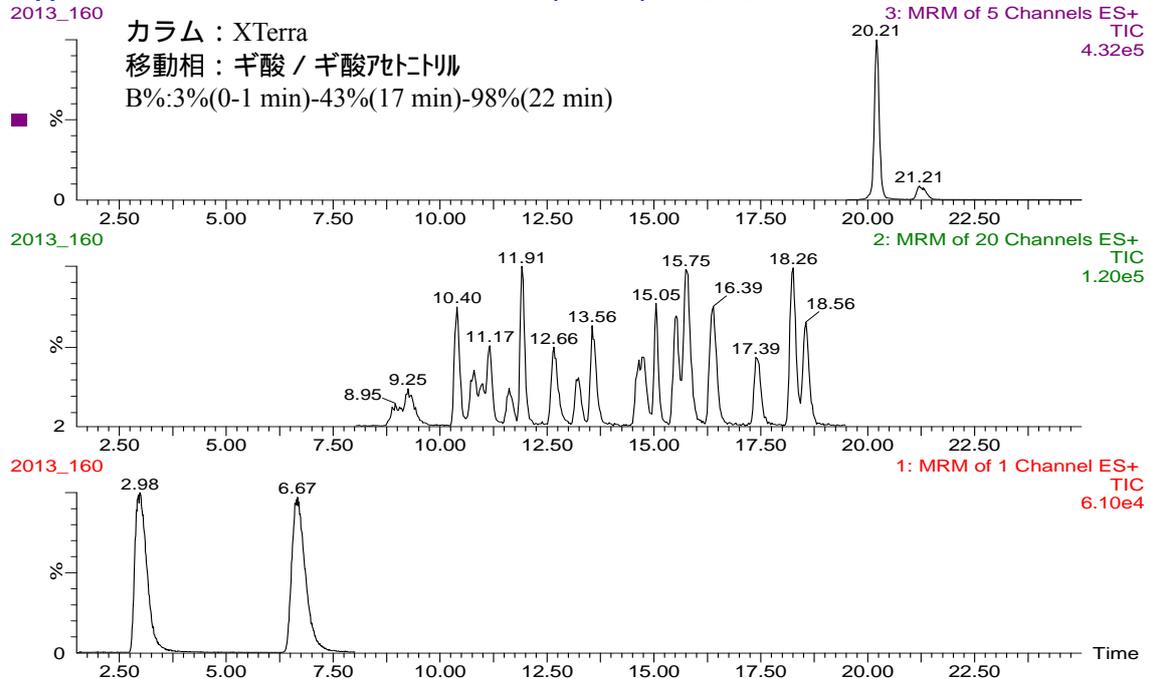


図14-1 当初検討した条件で測定したクロマトグラム (基準とする)

20ppb-10%CH3CN 10uL HPCmix1+CAM XTerra 3-43-98(1-13-22)MeOH_D3_MRM

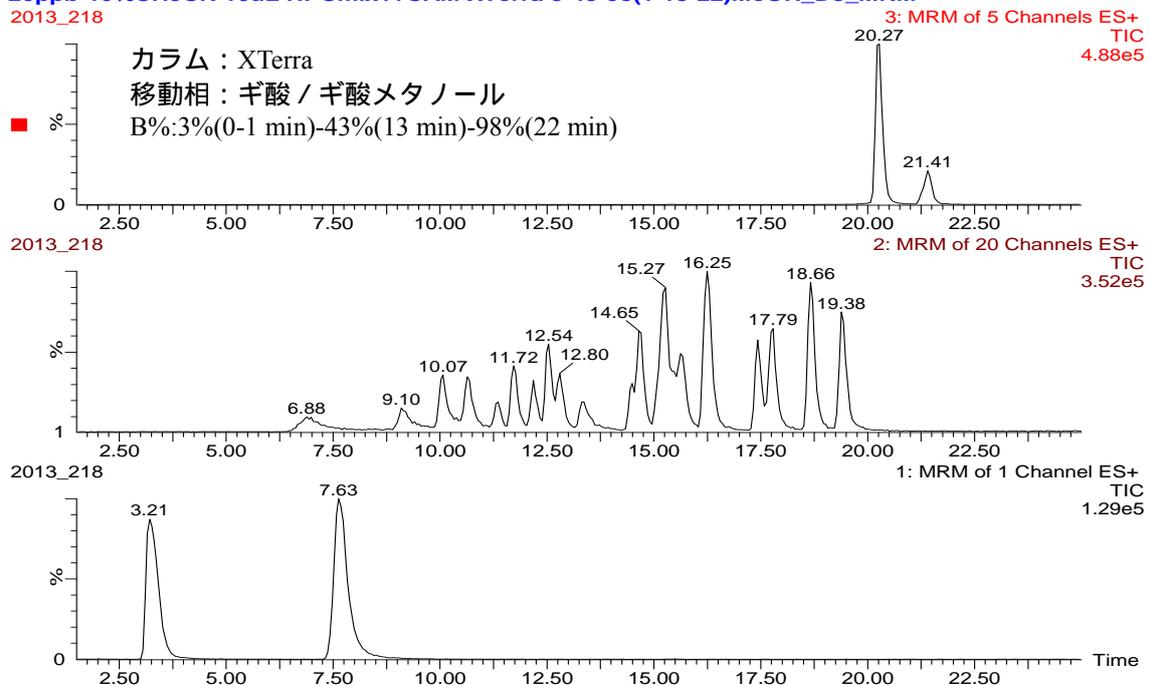


図14-2 移動相をメタノール系に変更して測定したクロマトグラム

カラムを Xbridge 及び Atlantis T3 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ので、Atlantis T3を採用することとした。

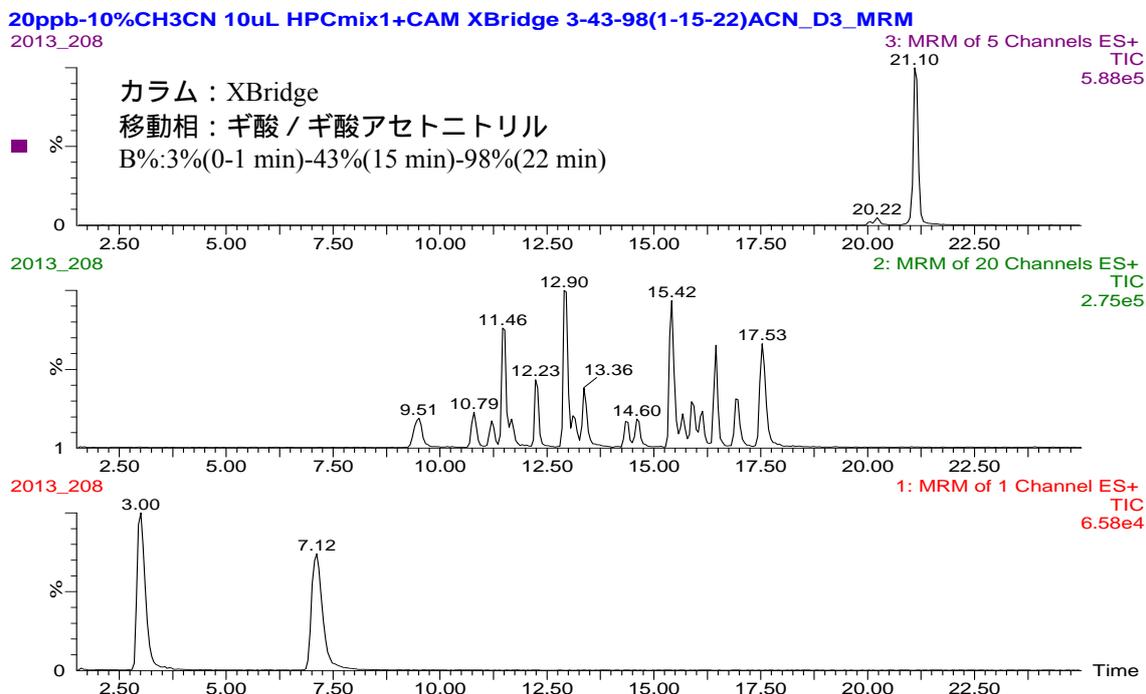


図14-3 カラムをXBridgeに変更して測定したクロマトグラム

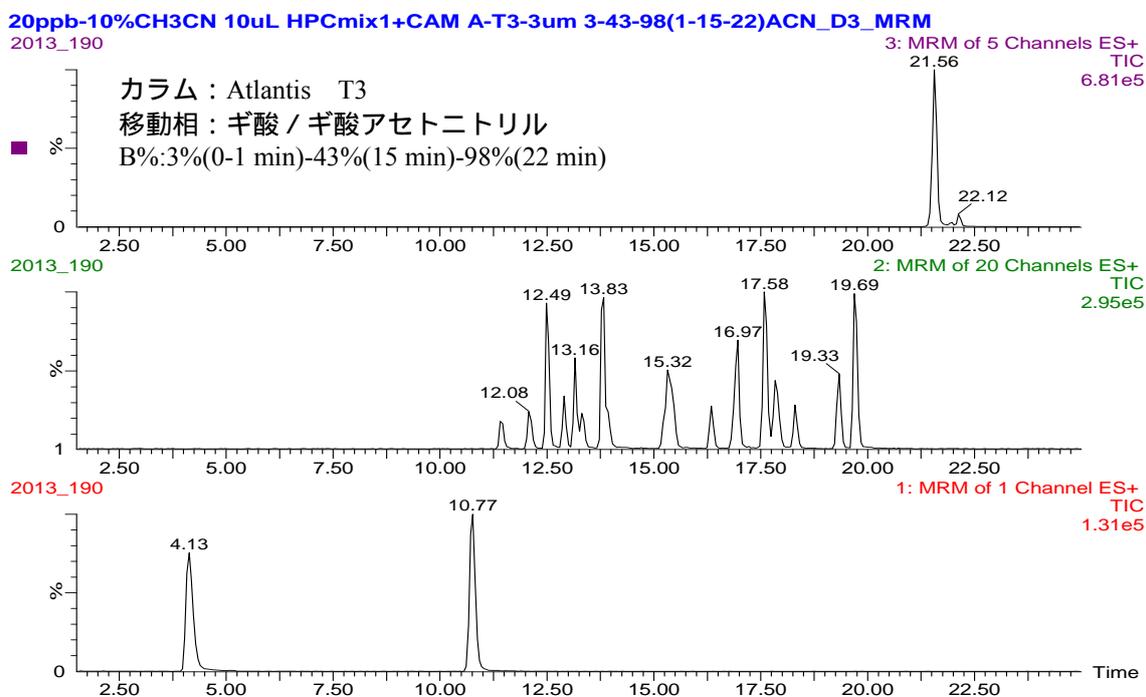


図14-4 カラムをAtlantisT3に変更して測定したクロマトグラム

〔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、分離状況は 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。

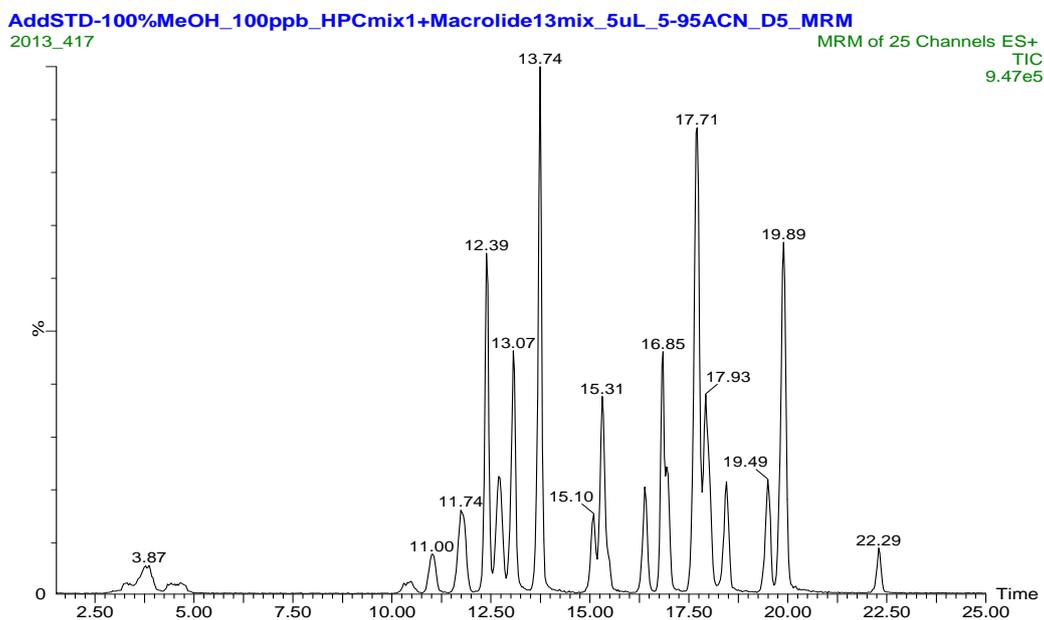


図15-1 当初検討した移動相条件で測定したクロマトグラム

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。

最終条件における分離状況を以下に示す。

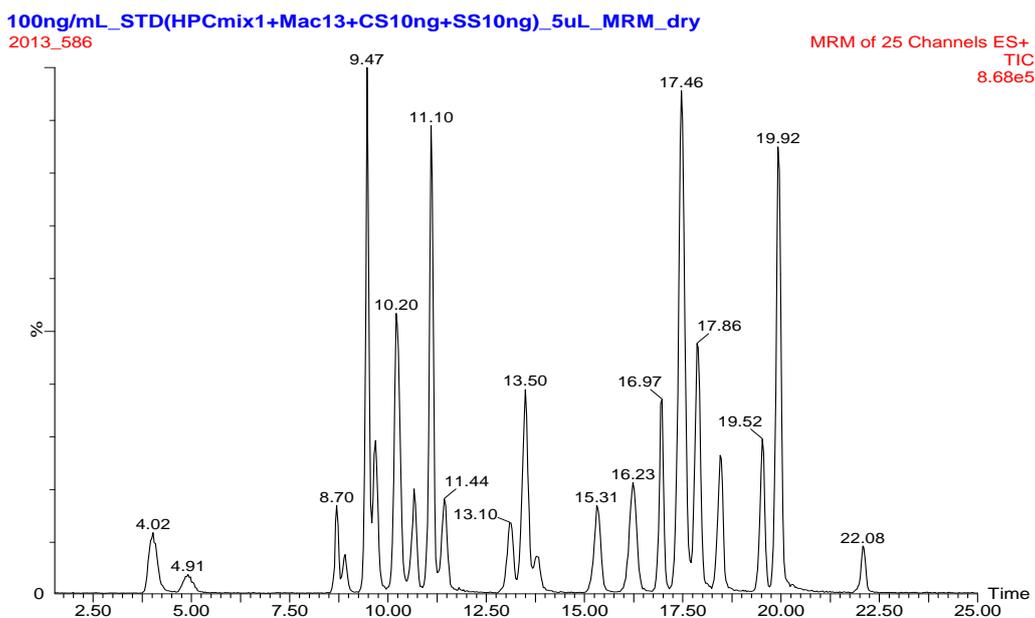


図15-2 最終的な移動相条件で測定したクロマトグラム

(参考) 保持時間一覧

物質名	保持時間 (min)	物質名	保持時間 (min)
Sulfaguanidine	3.91	Sulfamonomethoxine	15.31
Sulfanilamide	4.81	Sulfachloropyridazine	16.21
Sulfacetamide	8.66	Pyrimethamine	17.00
Sulfisomidine	8.69	Sulfadoxin	17.45
Diaveridine	9.51	Sulfamethoxazole	17.53
Sulfadiazine	9.65	Sulfatroxazole	17.88
Sulfathiazole	10.25	Sulfaethoxypyridazine	17.90
Trimethoprim	10.26	Sulfisoxazole	18.50
Sulfapyridine	10.65	Sulfabenzamide	19.57
Ormetoprim	11.16	Sulfadimethoxin	20.00
Sulfamerazin	11.42	Sulfaquinoxaline	20.03
Sulfadimidine	13.08	Sulfanitran	22.03
Sulfamethoxypyridazine	13.48	Sulfabromomethazine	22.19
Sulfisozole	13.75		

【評価】

本法は、水質試料中のスルファメトキサゾールの分析に適用でき、MDLは0.0070 µg/L、MQLは0.018 µg/Lであった。

なお、操作ブランクは不検出であり、海水の環境試料から対象物質は検出されなかったが、河川水の環境試料から検出下限以上 (0.011 µg/L) 検出された。

また、河川水及び海水を用いた添加回収試験 (河川水は0.10 µg/L, 海水は0.02 µg/L 添加) の回収率は、それぞれ98% (サロゲート回収率89%、変動係数2.2%)、94% (サロゲート回収率93%、変動係数9.6%) であった。

また、この分析法は対象物質を含む 26 種類の合成抗菌剤を同時分析することが可能である。

【担当者連絡先】

所属先名称：岡山県環境保健センター

所属先住所：〒701-0298 岡山市南区内尾739-1

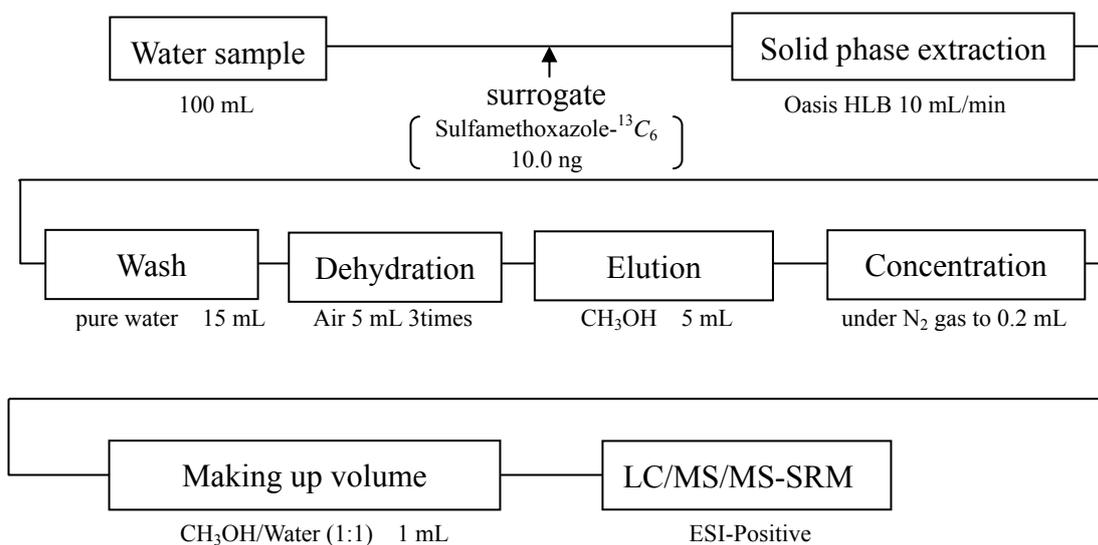
TEL：086-298-2684 FAX：086-298-2088

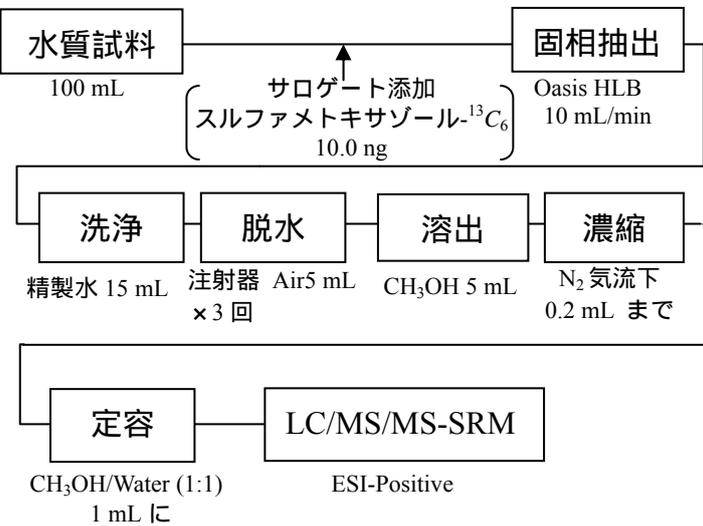
担当者名：浦山豊弘、新 和大

E-mail：kanpo@pref.okayama.lg.jp

Sulfamethoxazole

This method is suitable for the determination of Sulfamethoxazole in water sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). After 5 μL of Sulfamethoxazole- $^{13}\text{C}_6$ (surrogate, 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$) is added to 100 mL of water sample, the sample is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB plus) at a flow rate of 10 mL/min. The cartridge is washed with 15 mL of pure water, and then the extract is eluted with 5 mL of methanol. The eluate is concentrated under gentle stream of ultra-pure grade nitrogen gas to about 0.2 mL and made up to 1 mL with methanol/water (1:1), and analyzed by LC/MS/MS. The method detection limit (MDL) of Sulfamethoxazole is 0.0070 $\mu\text{g}/\text{L}$. The recovery of Sulfamethoxazole in river surface water was 98%. That in sea surface water was 94%. Using this method, Sulfamethoxazole was detected in river surface water.



物質名	分析法フローチャート	備考
スルファメトキサゾール	<p>【水質】</p>  <pre> graph TD A["水質試料 100 mL"] --> B["固相抽出 Oasis HLB 10 mL/min"] C["サロゲート添加 スルファメトキサゾール-13C6 10.0 ng"] --> B B --> D["洗浄 精製水 15 mL"] D --> E["脱水 注射器 Air 5 mL × 3 回"] E --> F["溶出 CH3OH 5 mL"] F --> G["濃縮 N2 気流下 0.2 mL まで"] G --> H["定容 CH3OH/Water (1:1) 1 mL に"] H --> I["LC/MS/MS-SRM ESI-Positive"] </pre>	<p>分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI Positive</p> <p>カラム： Atlantis T3 150 mm×2.1 mm, 3 μm</p> <p>検出下限値： 【水質】 (μg/L) スルファメトキサゾール： 0.0070</p>