

ノート

LC-MS/MS による残留動物用医薬品一斉試験法の検討と 妥当性評価

村田 将, 豊田真由美, 竹内 浩, 原 有紀, 林 克弘, 志村恭子

Experimentation and Validation of Simultaneous Analysis of Residual Veterinary Drugs using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Sho MURATA, Mayumi TOYODA, Hiroshi TAKEUCHI, Yuki HARA, Katsuhiko HAYASHI and
Kyoko SHIMURA

畜水産物中の残留動物用医薬品の試験法について, 液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) の導入を検討し, 牛・豚・鶏それぞれの筋肉, 鶏卵および養殖魚を対象として, 合成抗菌剤 11 種と内寄生虫用剤フルベンダゾールを測定する試験法を確立した. 厚生労働省が示す妥当性評価ガイドラインに基づいてこの試験法の性能評価を行った結果, 対象としたすべての食品およびすべての動物用医薬品において真度, 併行精度および室内精度の目標値を満たし, 良好な結果が得られた.

キーワード: 液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS), 残留動物用医薬品, 一斉試験法

はじめに

動物用医薬品は, 畜水産食品の安定的な生産に寄与しているが, その一方で, 食品への残留による人への健康影響が懸念されている. そのため, ささまざまな規制による管理がなされ, 食品衛生法では畜水産物における規格基準が定められている¹⁾.

平成 18 年の食品衛生法改正によりポジティブリスト制が施行されたことで規制対象品目が大幅に増加し, 検査機関においてはそれに対応するため, 分析法の開発や改訂が必要になった.

液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) は, これまで用いられてきた紫外可視分光光度計を検出器とする液体クロマトグラフ (UV/VIS-HPLC) に比べて, 選択性および

感度が非常に高い. そのため, 多成分の同時分析に適した手法として, 残留動物用医薬品の分析にも全国的に適用が進められている²⁻⁴⁾. そこで本研究では, LC-MS/MS を用いた一斉試験法を導入することを目的として, 残留動物用医薬品のなかでも, 本研究所における畜水産物の収去検査対象項目である合成抗菌剤 11 種および内寄生虫用剤フルベンダゾールについて検討を行ったので, その詳細を報告する.

実験方法

1. 試料

牛・豚・鶏それぞれの筋肉, 鶏卵および養殖魚 (マダイ) は, 平成 24 年度の収去検査の残品, もしくはスーパーマーケットで購入したものを, 検査項目の動物用医薬品が残留していないこと

を確認して用いた。

食肉筋肉および養殖魚はフードプロセッサを用いて、鶏卵はスパーテルにより均一化して試料とした。

2. 試薬

1) 標準品

合成抗菌剤のスルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシン、スルファジメトキシシン、スルファキノキサリン、ピリメタミン、ナイカルバジン、チアンフェニコール、オキシリン酸、ナリジクス酸、ピロミド酸および内寄生虫用剤のフルベンダゾールは関東化学(株)製標準試薬を用いた。

2) 試薬

アセトニトリルは、試験溶液調製には和光純薬工業(株)製 HPLC 用を、検量線の作成に用いる標準溶液の希釈および LC-MS/MS の移動相には関東化学(株)製 LC/MS 用を用いた。水は、試験溶液調製にはメルクミリポア(株)製の超純水装置から得られた超純水を、検量線の作成に用いる標準溶液の希釈および LC-MS/MS の移動相には関東化学(株)製 LC/MS 用を用いた。ギ酸は、鶏卵試料の前処理には和光純薬工業(株)製試薬特級を、LC-MS/MS の移動相には関東化学(株)製 HPLC 用を用いた。無水硫酸ナトリウムは関東化学(株)製残留農薬・PCB 試験用を、n-ヘキサンは和光純薬

工業(株)製残留農薬・PCB 試験用を用いた。

ろ紙は東洋濾紙(株)製定量濾紙 No.5A を用いた。

3. 装置および測定条件

ホモジナイザー

(株)日本精機製作所製エクセルオートホモジナイザーED-7

LC/MS/MS

装置 (HPLC) : (株)島津製作所製 Prominence20A
(MS) : AB SCIEX 製 API4000QTRAP

カラム : (財)化学物質評価研究機構製 L-column2
ODS (2.1mm i.d.×150mm, 3μm)

ガードカラム : (財)化学物質評価研究機構製
L-column2 ODS (2.0mm i.d.×50mm, 5μm)

カラム槽温度 : 40°C

移動相 : A 液 0.1%ギ酸水溶液

B 液 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件 : 0分 (A:B=85:15) →1-3.5分
(A:B=60:40) →6分 (A:B=50:50) →8分
(A:B=45:55) →17.5-30分 (A:B=5:95) →33-40分
(A:B=85:15)

流速 : 0.2mL/min

注入量 : 5μL

イオン化法 : ESI (+), ESI (-)

なお、質量分析計の詳細なパラメータは、表 1 および表 2 に示した。

表1 各化合物のLC/MS/MSパラメーターおよび保持時間

イオンモード	No.	化合物	保持時間(min)	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)	CXP(V)
ポジティブ	1	スルファメラジン	4.94	265.1	92.1	62	44	14
	2	スルファジミジン	5.18	279.0	186.0	67	26	9
	3	スルファモノメトキシシン	5.41	281.1	156.0	66	28	7
	4	オキシリン酸	6.14	262.0	244.0	59	24	12
	5	ピリメタミン	5.15	249.0	177.0	94	42	8
	6	スルファジメトキシシン	6.69	311.0	156.0	76	30	7
	7	スルファキノキサリン	6.62	300.9	156.0	63	25	7
	8	ナリジクス酸	8.14	233.1	215.0	51	22	11
	9	ピロミド酸	9.19	289.1	271.0	63	28	14
	10	フルベンダゾール	7.64	314.1	282.0	83	31	15
ネガティブ	11	チアンフェニコール	4.94	353.8	184.9	-77	-24	-8
	12	ナイカルバジン	12.75	300.8	137.0	-62	-14	-5

表2 イオン化条件

	ポジティブモード	ネガティブモード
カーテンガス(psi)	40	20
イオンプレー電圧(V)	5000	-4500
イオンソース温度(°C)	700	400
ネブライザーガス(psi)	60	50
ターボガス(psi)	80	80
コリジョンガス	5	4
インターフェースヒーター	ON	ON

4. 試験溶液の調製

試験溶液調製には、田沢らの方法²⁾を参考にした。

試料 5.00g をホモジナイズカップに採り、アセトニトリル(鶏卵試料では 0.5%ギ酸アセトニトリル溶液)20mL と無水硫酸ナトリウム 10g を加え、5,000rpm で 5 分間ホモジナイズした後、50mL 共栓遠沈管に移し、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。上清をろ紙によりろ過し、50mL メスフラスコに回収した。残留物にアセトニトリル(鶏卵試料では 0.5%ギ酸アセトニトリル溶液) 20mL を加え、20 分間振とう抽出後、同様に遠心分離とろ過を行い、得られたろ液を合わせてアセトニトリル(鶏卵試料では 0.5%ギ酸アセトニトリル溶液)で 50mL に定容した。ここから 4mL を 10mL 共栓試験管に採り、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 2mL を加え、5 分間振とう後、5 分間静置し、n-ヘキサン層を除去して脱脂した。残ったアセトニトリル層に超純水 6mL を加え、3,000rpm で 20 分間遠心分離した後、さらに分離してきた n-ヘキサンを除去し、超純水で 10mL に定容した。さらに、その 1.6mL を 2mL PP 製マイクロチューブに採り、15,000rpm で 10 分間遠心分離した。この上清から 130 μ L を採り、HPLC 用バイアル内で、0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(60/40, v/v) 130 μ L と混和して LC-MS/MS 測定溶液とした。

検量線の作成においては、標準溶液を水/アセトニトリル(60/40, v/v) で希釈して目的濃度とした後、ここから 800 μ L 採り、HPLC 用バイアル内で 0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(60/40, v/v) 800 μ L と混和して測定に供した。

5. 添加回収試験

添加回収試験における添加濃度は、対象食品において基準値が設定されている場合には「一律基準値(0.01ppm)」と「基準値」の 2 濃度とした。一方、対象食品に基準値が設定されていない、もしくは基準値が「一律基準値」と等しい場合には、「一律基準値」と「(一律)基準値の 10 倍の濃度(0.1ppm)」の 2 濃度とし、いずれの食品についても 2 濃度の評価を行った。

試料 5g を採取し、目的の濃度となるように調製した混合標準溶液 100 μ L をマイクロピペットにより添加し、30 分静置した。この標準添加試料において、上述の 4. 試験溶液の調製に従って操作し、それぞれの動物用医薬品の回収率を求めた。試行回数は、厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに基づき、各濃度について 2 併行を 5 日間行った⁵⁾。

実験結果および考察

1. 保持時間、検出限界および検量線の確認

LC/MS/MS 条件における各化合物の保持時間は表 1 に示す通りであった。

本試験法では、抽出液を希釈することで、マトリックスによるイオン化抑制等の妨害を回避している。従って、検体において一律基準(0.01ppm)に相当する濃度は、試験溶液の調製操作を経た LC-MS/MS 測定溶液(バイアル内で 2 倍希釈する前の段階)において 0.4ng/mL となる。しかし、その半分の 0.2ng/mL でもすべての化合物でクロマトグラムの S/N 比が 3 を超えたことから、検出限

表3 畜水産物からの動物用医薬品の添加回収率 (n=5)

化合物	牛筋肉					豚筋肉						
	添加濃度 (µg/g)	検量線*	相関係数	添加回収 率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	添加濃度 (µg/g)	検量線*	相関係数	添加回収 率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
スルファメラジン	0.01	a	1.0000	97.2	5.3	6.2	0.01	a	0.9999	104.7	4.8	6.1
	0.1	b	0.9998	92.0	2.8	4.2	0.1	b	1.0000	104.4	2.1	6.6
スルファジミジン	0.01	a	1.0000	104.8	2.5	6.1	0.01	a	0.9999	106.0	3.2	8.3
	0.1	b	1.0000	100.1	2.4	4.7	0.1	b	1.0000	104.6	3.0	6.8
スルファモノメトキシシ	0.01	a	0.9999	101.8	6.8	8.5	0.01	a	0.9999	101.3	1.8	5.8
	0.1	b	1.0000	96.2	3.4	3.5	0.02	a	0.9999	101.7	4.2	5.1
オキソリン酸	0.01	a	0.9999	93.5	4.7	5.0	0.01	a	1.0000	96.6	4.1	8.4
	0.1	b	1.0000	94.9	1.6	3.9	0.02	a	1.0000	97.5	2.3	7.5
ピリメタミン	0.01	a	0.9999	83.7	3.4	3.9	0.01	a	0.9999	87.0	2.2	5.6
	0.1	b	0.9999	82.1	2.7	5.3	0.05	b	0.9999	84.4	1.9	5.8
スルファジメトキシシ	0.01	a	1.0000	99.7	3.2	3.8	0.01	a	0.9999	102.0	1.8	6.4
	0.05	b	1.0000	94.1	4.0	<4.0	0.2	b	1.0000	100.2	1.1	7.0
スルファキノキサリン	0.01	a	1.0000	100.7	3.7	12.4	0.01	a	0.9998	102.6	5.8	7.2
	0.1	b	1.0000	95.7	3.4	6.6	0.1	b	0.9999	101.5	2.5	5.3
ナリクジス酸	0.01	a	1.0000	95.2	5.4	<5.4	0.01	a	1.0000	100.0	1.9	9.0
	0.03	a	1.0000	98.7	1.3	4.7	0.1	b	1.0000	103.0	1.9	6.5
ピロミド酸	0.01	a	0.9999	90.4	3.8	7.1	0.01	a	0.9999	99.4	4.3	10.1
	0.1	b	1.0000	98.2	1.6	3.6	0.1	b	1.0000	103.3	2.3	7.2
フルベンダゾール	0.01	a	1.0000	98.1	3.6	<3.6	0.01	a	0.9997	97.4	2.5	3.4
	0.02	a	1.0000	95.4	3.4	<3.4	0.1	b	1.0000	98.7	5.3	5.9
チアンフェニコール	0.01	a	0.9999	114.8	5.0	8.7	0.01	a	0.9999	115.2	5.6	<5.6
	0.02	a	0.9999	112.5	3.6	5.8	0.02	a	0.9999	115.4	5.2	6.2
ナイカルバジン	0.01	a	1.0000	97.7	6.1	<6.1	0.01	a	0.9993	96.5	4.6	<4.6
	0.1	b	1.0000	95.3	2.7	3.3	0.1	b	1.0000	95.1	3.4	4.7

* (a) 0.005ppm～0.05ppmの範囲で作成したもの、(b) 0.025～0.25ppmの範囲で作成したもの。

表3 (続き)

化合物	鶏筋肉				養殖魚							
	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	検量線*	相関係数	添加回収 率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	検量線*	相関係数	添加回収 率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
スルファメタジン	0.01	a	1.0000	97.6	2.3	6.5	0.01	a	1.0000	82.7	3.1	3.7
	0.1	b	0.9999	103.2	1.8	8.4	0.1	b	1.0000	91.1	3.2	7.3
スルフアジミジン	0.01	a	1.0000	102.6	2.5	8.4	0.01	a	0.9998	93.5	3.0	5.6
	0.1	b	1.0000	101.4	2.0	5.3	0.1	b	1.0000	93.7	4.6	9.6
スルフアモノメキシシ	0.01	a	1.0000	99.4	2.4	5.5	0.01	a	0.9995	86.6	5.2	5.3
	0.1	b	1.0000	98.0	1.5	7.4	0.1	b	1.0000	91.5	3.8	4.1
オキシリン酸	0.01	a	1.0000	92.5	1.7	2.0	0.01	a	0.9999	93.2	3.4	4.3
	0.03	a	1.0000	92.0	1.6	3.6	0.06	b	1.0000	92.7	5.2	<5.2
ピリメタミン	0.01	a	0.9998	87.6	2.3	4.8	0.01	a	1.0000	73.7	4.8	10.0
	0.05	b	0.9999	84.3	1.9	3.1	0.1	b	0.9996	74.6	3.0	5.6
スルフアジメトキシシ	0.01	a	1.0000	97.5	2.2	5.6	0.01	a	0.9999	92.9	4.2	4.7
	0.05	b	0.9999	96.7	2.0	5.7	0.1	b	1.0000	92.9	4.3	<4.3
スルフアキノキサリン	0.01	a	1.0000	97.1	2.8	5.3	0.01	a	1.0000	82.2	7.0	<7.0
	0.05	b	1.0000	93.9	2.5	8.5	0.1	b	1.0000	92.4	4.8	<4.8
ナリクジズ酸	0.01	a	0.9999	92.7	2.4	<2.4	0.01	a	0.9998	97.3	3.6	4.9
	0.1	b	0.9999	93.0	1.4	2.6	0.1	b	1.0000	96.1	4.8	5.6
ピロミド酸	0.01	a	0.9998	91.2	4.2	4.3	0.01	a	0.9998	96.1	2.8	7.6
	0.1	b	0.9997	92.3	1.8	3.2	0.1	b	1.0000	92.7	5.3	6.1
フルベンダゾール	0.01	a	0.9999	93.9	2.7	3.5	0.01	a	0.9998	94.5	4.4	4.7
	0.2	b	1.0000	93.8	1.1	2.9	0.1	b	1.0000	95.4	2.7	3.2
チアンフェニコール	0.01	a	1.0000	108.7	6.3	6.5	0.01	a	0.9997	116.8	2.9	7.7
	0.02	a	1.0000	105.3	2.6	3.9	0.02	a	0.9997	117.6	4.1	12.5
ナイカルバジン	0.01	a	0.9996	92.1	2.5	3.5	0.01	a	1.0000	93.1	15.9	<15.9
	0.2	b	1.0000	91.9	1.4	2.5	0.1	b	0.9999	91.7	5.9	<5.9

* (a) 0.005ppm~0.05ppmの範囲で作成したもの、(b) 0.025~0.25ppmの範囲で作成したもの。

表3 (続き)

化合物	鶏卵					
	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	検量線*	相関係数	添加回収 率(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
スルファメラジン	0.01	a	0.9989	99.9	9.4	<9.4
	0.1	b	0.9997	107.8	5.1	5.4
スルファジミジン	0.01	a	1.0000	98.0	5.1	6.0
	0.1	b	0.9997	102.7	4.2	<4.2
スルファモノメキシシ	0.01	a	0.9999	96.6	6.7	7.6
	0.1	b	1.0000	103.4	1.8	2.1
オキシリン酸	0.01	a	0.9999	110.3	3.3	9.3
	0.1	b	0.9999	110.9	3.7	5.7
ピリメタミン	0.01	a	1.0000	96.7	3.5	4.2
	0.1	b	0.9995	95.6	4.4	4.7
スルファジメキシシ	0.01	a	1.0000	100.9	6.4	<6.4
	1	c	0.9999	102.1	1.8	3.1
スルファキノキサリン	0.01	a	0.9992	97.2	3.2	4.6
	0.1	b	1.0000	116.6	2.8	3.6
ナリジクス酸	0.01	a	0.9996	109.1	5.6	9.3
	0.1	b	1.0000	109.5	2.5	2.9
ピロミド酸	0.01	a	0.9999	109.8	6.0	8.7
	0.1	b	0.9999	112.1	2.8	4.2
フルベンダゾール	0.01	a	1.0000	101.5	3.9	5.2
	0.4	c	1.0000	99.7	1.3	1.9
チアンフェニコール	0.01	a	0.9998	100.2	7.3	<7.3
	0.1	b	0.9998	98.0	4.2	5.5
ナイカルバジン	0.01	a	0.9999	91.8	14.0	14.2
	0.1	b	0.9999	94.9	6.0	<6.0

* (a) 0.005ppm~0.05ppmの範囲で作成したもの, (b) 0.025~0.25ppmの範囲で作成したもの, (c) 0.125~1.25ppmの範囲で作成したもの.

界は検体中濃度として 0.005ppm を下回ることが確認できた.

「一律基準値」と「基準値」の濃度差が大きいため、検量線は、鶏卵を除く食品においては a) 0.005ppm~0.05ppm および b) 0.025~0.25ppm の範囲、鶏卵においては a) 0.005ppm~0.05ppm, b) 0.025~0.25ppm および c) 0.125~1.25ppm の3範囲について作成した。これらの検量線は、各対象食品の測定時において、ほぼすべての化合物および濃度範囲で相関係数が 0.999 以上となり、良好な直線性を示した (表 3)。

2. 添加回収試験

添加回収試験の結果を表 3 に示した。

牛・豚・鶏それぞれの筋肉および養殖魚では、

対象とした 12 化合物のすべてで、回収率が厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに目標値として定められている 70-120%の範囲内に入り、併行精度および室内精度も同ガイドラインに定められている目標値を満たし、良好な結果が得られた。

一方、鶏卵を対象として、牛・豚・鶏それぞれの筋肉および養殖魚と同様の前処理を行ったところ、ピロミド酸およびナリジクス酸の回収率が 70%を下回り、またオキシリン酸では、回収率が 70%は上回るものの低くなる傾向が認められた。これらの化合物はすべて、化学構造にカルボキシル基を持つ酸性医薬品である。鶏卵の卵白には、卵アルブミン (ovalbumin) と呼ばれるタンパク質が豊富に含まれるが、これと類似した生化学的特性を持つ血清アルブミンは、酸性医薬品と結合す

ることで、それらの血中の薬物動態に影響を与えることが知られている^{6,7)}。そのため、卵アルブミンも同様に酸性医薬品と結合する可能性があると考え、抽出溶媒中に酸を添加することで、その結合を乖離させることを試みた。Nakajima らの方法⁸⁾を参考にして、抽出に用いるアセトニトリルに 0.5%ギ酸を添加し、回収率の変動を検討した。その結果、ピロミド酸、ナリジクス酸およびオキシソリン酸のすべての医薬品で、回収率が顕著に改善され、70-120%を満たした。これと同時に、併行精度および室内精度も目標値を満たし、良好な結果が得られた。

以上の結果から、牛・豚・鶏それぞれの筋肉、養殖魚および鶏卵において、対象とした 12 化合物すべてで良好な結果が得られた。本試験法は、厚生労働省の通知試験法である 3 種の「動物用医薬品等の一斉試験法」⁹⁾と異なり、減圧濃縮やカラムクロマトグラフィーによる精製の工程がないため、操作が簡便であり、突沸による試験溶液のロスや、カラムへの吸着による回収率の低下が起こらない。従って、食品の検査に熟練していない者でも短時間で安定した結果が出せる手法として優れていると考えられる。今回報告した動物用医薬品は 12 化合物に限られるため、今後は、畜産事業者と連携して情報を収集し、畜産現場で実際に使用されている薬物をより多く測定できるよう、分析対象とする化合物を拡充していく必要があると思われる。

まとめ

畜水産物中の残留動物用医薬品の試験法について検討した。牛・豚・鶏それぞれの筋肉、鶏卵および養殖魚を対象として、合成抗菌剤 11 種と内寄生虫用剤フルベンダゾールを測定する試験法を確立し、厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに基づいてこの試験法の性能評価を行った。その結果、対象としたすべての食品およびすべての医薬品で真度、併行精度および室内精度の目標値

を満たし、良好な結果が得られた。このことから、本法が残留動物用医薬品の行政検査に適することが示された。

文 献

- 1) 食品、添加物等の規格基準，厚生労働省告示 1370 号，昭和 34 年 12 月 28 日。
- 2) 田沢悌二郎，藤本 啓，地主 勝，井上真紀，長南隆夫：LC/MS/MS による畜産食品中残留動物用医薬品等の一斉試験法，北海道立衛生研究所報，No.62，1-10 (2010)。
- 3) 村川 弘，福島孝兵，飛野敏明：LC/MS/MS を用いた畜水産食品中の動物用医薬品迅速分析法の検討（第 2 報），熊本県保健環境研究所報，No.39，21-25 (2009)。
- 4) 遠藤美砂子，清野陽子，濱名 徹：宮城県における残留動物用医薬品一斉試験法の厚生労働省ガイドラインによる妥当性評価，宮城県保健環境センター年報，No.27，56-59 (2009)。
- 5) 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，食安発 1224 第 1 号，平成 22 年 12 月 24 日付け，厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知。
- 6) Huntington JA, Stein PE : Structure and properties of ovalbumin, J Chromatogr., **756**, 189-198 (2001)。
- 7) 岩川清吾，掛見正郎，河島進，玉井郁巳，辻彰，寺崎哲也，宮本悦子，森本一洋：わかりやすい生物薬剤学第 2 版，廣川書店 (1992)。
- 8) Takayuki Nakajima, Takeo Sasamoto, Hiroshi Hayashi, Maki Kanda, Kazue Takeba, Setsuko Kanai, Tomoko Kusano, Yoko Matsushima and Ichiro Takano : Screening Assay of Residual Antibiotics in Livestock Samples by LC-MS/MS, Food Hyg. Saf. Sci., **53**, 91-97 (2012)。
- 9) 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，食安発第 0124001 号，平成 17 年 1 月 24 日付け，厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知。