

LC/MS/MS による残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について (第4報)

金成 徹 竹村悦子 大野金男
理化学課

要 旨

2006年度より当所では、厚生労働省の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」により、豚肉、養殖魚、生乳及び鶏卵の行政検査を行ってきた。

平成19年に試験法の妥当性評価ガイドラインが厚生労働省より示され、その後、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC/MS/MS）を導入したので、測定機器の分析条件及び添加回収試験を行い検討した。その結果、LC/MSを使用していた従前からの分析法よりS/N比が改善され、定量下限値も下げることができた。

キーワード：LC/MS/MS、動物用医薬品、畜水産物、妥当性評価ガイドライン

はじめに

2006年5月29日のポジティブリスト制導入以来、畜水産物における動物用医薬品等の規制対象数が大幅に増加し、畜水産物中の動物用医薬品等を効率的かつ迅速に分析する手法が必要とされている。

当所では、平成17年11月29日付け食安発第1129002号で厚生労働省から通知された「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（一部改正）」中の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」¹⁾（以下“通知法”とする）により、豚肉、養殖魚、生乳及び鶏卵の行政検査を行ってきた。その後、通知の一部改正等があり、第1報²⁾、第2報³⁾及び第3報⁴⁾に報告のとおり、測定可能な動物用医薬品の種類を増やしてきた。

今回LC/MSに替わり、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC/MS/MS）が導入されたことに伴い、測定条件等を検討した。また、平成19年11月15日付け食安発第1115001号で厚生労働省から通知された「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」⁵⁾（以下“ガイドライン”とする）に沿った検討も行ったので、その結果を報告する。

材 料

1 試料

豚肉、養殖魚（イワナ）、生乳、鶏卵

2 標準品

（いずれも和光純薬又は関東化学製の市販品）

1) 抗生物質

オレアンドマイシン、クロキサシリン、ジョサマイシン、セフォペラゾン、タイロシン、チアムリン、チルミコシン、リンコマイシン

2) 合成抗菌剤

エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オルメトプリム、クロピドール、シプロフロキサシン、スルファキノキサリン、スルファクロルピリダジン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシシリン、スルファチアゾール、スルファドキシニル、スルファニトラン、スルファピリジン、スルファベンズアミド、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシシリン、ダノフロキサシン、トリメトプリム、ピリメタミン

3) 寄生虫駆除剤等

5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン（以下“アルベンダゾール”）

代謝物”とする), オキシベンダゾール, チアベンダゾール, 5-ヒドロキシチアベンダゾール (以下“チアベンダゾール代謝物”とする), ファムフル, フルベンダゾール, メベンダゾール, レバミゾール

3 試薬

アセトニトリル : HPLC 用
 蒸留水 : ミリ Q 水
l-プロパノール : 試薬特級
n-ヘキサン : 試薬特級
 無水硫酸ナトリウム : 試薬特級
 トリフルオロ酢酸 : 試薬特級
 メタノール : HPLC 用
N,N-ジメチルホルムアミド : HPLC 用

方法

前処理方法等については, 通知法に準拠して行った.

1 標準原液及び溶液の調製

1) 各標準品ごとの標準原液の調製

標準品の 20mg 相当量を量り採り, メタノールで溶解し, 20mL にメスアップしたものを標準原液とした.

メタノールに溶解しにくいもの (オキシベンダゾール等) については, *N,N*-ジメチルホルムアミドで同様の操作を行った.

2) 10ppm 混合標準溶液の調製

各標準原液をアセトニトリル : 水 (4 : 6) 混液で 100 倍希釈して調製した.

3) 検量線用標準溶液の調製

上記をアセトニトリル : 水 (4 : 6) 混液で希釈して 0.005 ~ 0.02ppm の検量線用標準溶液を調製した.

2 装置

高速液体クロマトグラフ : Waters ACQUITY UPLC

タンデム型質量分析計 : Waters TQD
 解析ソフト : Masslynx

3 測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ条件

カラム : Waters ACQUITY BEH C18 1.7 μ m

2.1mm \times 100mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 5 μ L

流量 : 0.3mL/分

移動相 : A : 0.05 % トリフルオロ酢酸

B : アセトニトリル

なお, グラジエント条件については, 表 1 に示す.

表 1 グラジエント条件

分析時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	備考
0	99	1	リニアグラジエント
10	0	100	
10 ~ 12.5	0	100	ホールド
12.5 ~ 15	100	1	ホールド

2) タンデム型質量分析計条件

イオン化 : ESI+

ソース温度 : 130 $^{\circ}$ C

脱溶媒温度 : 350 $^{\circ}$ C

コーンガス流量 : 60L/時

脱溶媒ガス流量 : 360L/時

4 試料溶液の調製

通知法に基づき, 試料をアセトニトリルで抽出し, 脂質及び夾雑物は *n*-ヘキサンで抽出除去し, 水及び水溶性夾雑物は無水硫酸ナトリウムで除いた後, 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) で測定した. ただし, 最後のメスアップ量については 2mL とした. (前処理法のフローシートについては, 図 1 を参照)

添加回収試験は, 定量限界値 (0.004ppm) になるよう試料に標準溶液を添加し, 同様の前処理を行った.

結果及び考察

1 タンデム型質量分析計の測定イオン等の検討

1ppm に希釈した各動物用医薬品標準液をスキャン測定し, プレカーサーイオンの設定

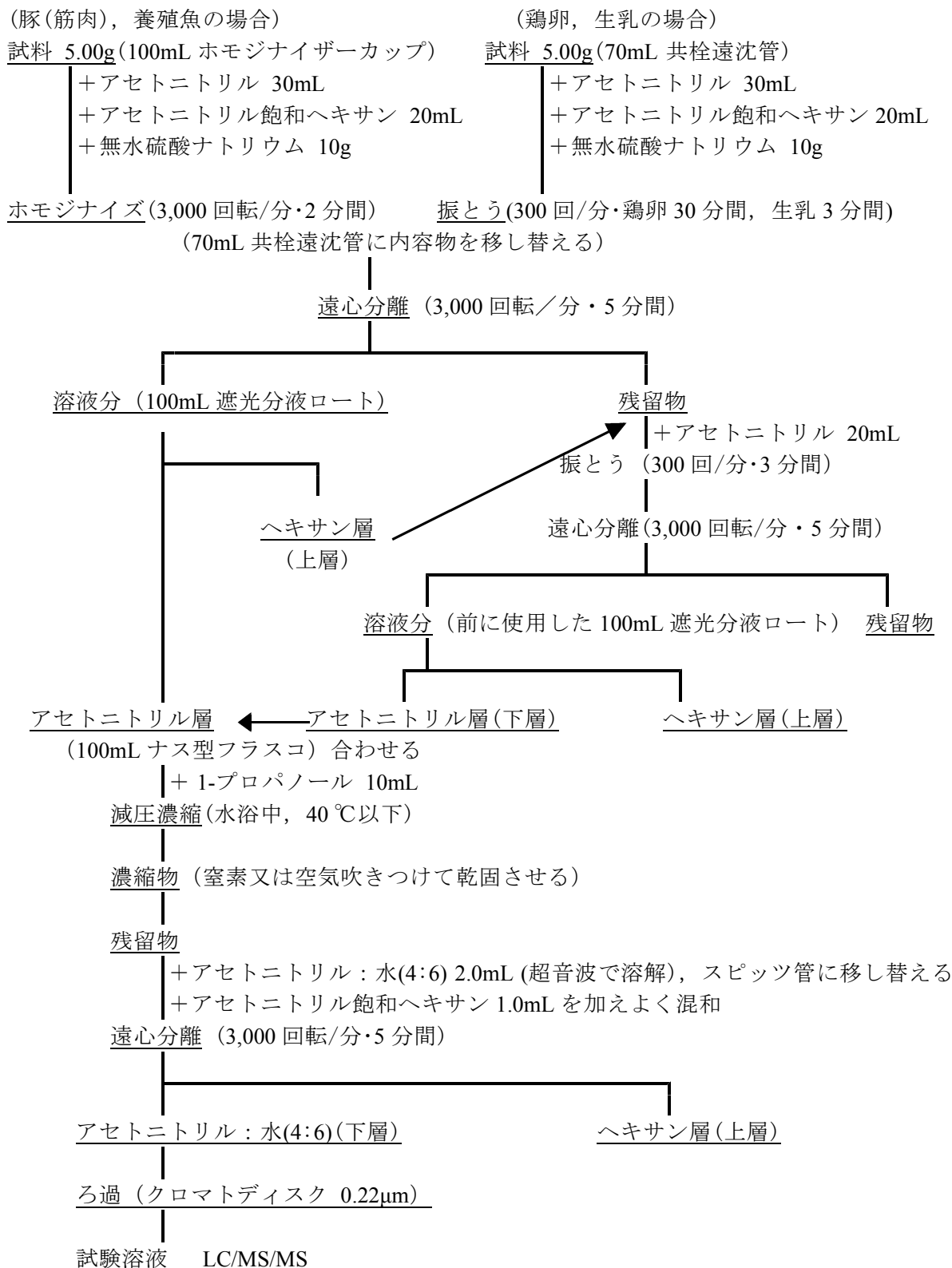


図1 前処理法のフローシート

を行った。またそのプレカーサーイオンで強度が最適となるコーン電圧を求めた。

次に設定したプレカーサーイオン及び最適コーン電圧によるプロダクトイオンスキャン測定を行い、強度の大きいプロダクトイオン及びコリジョン電圧を求めた。

これらの検討により、各標準溶液のモニターイオン等を表2のとおりを設定した。

表2 各標準溶液の検討結果

名 称	モニターイオン	コーン電圧(V)	コリジョン電圧(V)
アルベンダゾール代謝物	240 → 133	40	30
エンロフロキサシン	360 → 245	30	30
オキシベンダゾール	250 → 176	30	30
オキソリニック酸	262 → 244	40	20
オルメプリム	275 → 123	40	20
オレアンドマイシン	688 → 158	40	15
クロキサシリン	436 → 160	20	25
クロピドール	192 → 101	40	30
シプロフロキサシン	332 → 245	30	25
ジョサマイシン	829 → 174	40	30
スルファキノキサリン	301 → 156	30	20
スルファクロルピリダジン	285 → 156	30	15
スルファジアジン	251 → 92	30	30
スルファジミジン	279 → 186	40	15
スルファジメトキシ	311 → 156	40	25
スルファチアゾール	256 → 156	30	15
スルファドキシ	311 → 156	30	25
スルファニトラン	336 → 156	40	20
スルファピリジン	250 → 156	30	20
スルファベンズアミド	277 → 156	30	20
スルファメキサゾール	254 → 92	30	20
スルファメキシピリダジン	281 → 92	30	30
スルファメラジン	265 → 156	40	15
スルファモノメトキシ	281 → 92	30	25
セフォペラゾン	646 → 143	30	20
タイロシン	916.4 → 174	50	50
ダノフロキサシン	358 → 96	40	20
チアベンダゾール	202 → 175	40	20
チアベンダゾール代謝物	218 → 191	40	25
チアムリン	494 → 192	40	15
チルミコシン	869.5 → 174	50	50
トリメプリム	291 → 230	40	30
ピリメタミン	249 → 177	40	25
ファミフル	327 → 93	30	30
フルベンダゾール	314 → 282	40	20
メベンダゾール	296 → 264	40	20
リンコマイシン	407 → 126	40	30
レバミゾール	205 → 178	40	20

2 選択性及び定量限界について

ガイドラインによれば、選択性の基準とし

て妨害ピークの許容範囲が定量限界ピークの1/3未満とされている。

また、定量限界(0.004ppm 相当)において S/N ≥ 10 であることも判断基準として示されている。

今回の検討では、スルファニトラン及びチルミコシンについて定量限界付近で S/N=10 程度ともともと感度が悪く、検体によっては妨害ピークの方が大きいものもあり、基準を満たせなかった。それ以外の標準品は全て適合した。

なお、定量限界値は 0.01 ~ 6.8ppb (S/N=10) と標準品の種類により大きく異なった。

従前の LC/MS との感度比較では、測定項目により 5 ~ 785 倍感度が良くなった。

3 回収率及び室内精度等について

豚肉、養殖魚(イワナ)、生乳、鶏卵での回収率・室内精度について表3に示す。

回収率については、ジョサマイシン、チルミコシン及びチアベンダゾール代謝産物以外は、いずれかの畜水産物の試料において 70 ~ 120%の範囲内に入った。

また、今回の添加回収の濃度(0.004ppm 相当)では、ガイドラインにおいて“併行精度 25%未満かつ室内精度 30%未満”が目標値とされているが、スルファニトラン及びチルミコシンについては室内精度で 50%を超える大きなばらつきが見られた。

これは、もともと他の項目と比較して感度が悪いため、検量線作成時の標準溶液や検体のピーク面積の少しの差が定量に大きく影響し、かつ、選択性が良くないため、検体由来のピークにも左右されることなどによるものと思われる。

4 妥当性の評価について

ガイドラインを満たす項目については、本測定系での測定に支障が無いと判断される。

一方、畜水産物中の残留動物用医薬品については含有されないことが前提であり、それを確認するためのスクリーニング検査であると考えた場合、ガイドラインの数値を概ね満たすものは、定量性についてやや疑わしいものの、その測定物質の有無を判定することは

表3 回収率(n=10)及び室内精度(n=5)の結果

(単位：%)

	豚 肉		養 殖 魚		生 乳		鶏 卵		評 価
	回収率	室内精度	回収率	室内精度	回収率	室内精度	回収率	室内精度	
アルベンダゾール代謝物	93.2	11.8	83.5	14.0	290	11.6	82.4	7.6	b
エンロフロキサシン	134	27.5	113	24.7	116	15.3	129	36.8	b
オキシベンダゾール	75.1	4.1	31.7	20.6	76.8	9.1	64.5	14.3	b
オキシリニック酸	125	8.8	108	12.4	95.0	12.1	71.2	13.7	a
オルメトプリム	137	5.8	105	9.8	115	7.0	93.2	8.7	a
オレアンドマイシン	153	30.5	227	23.7	120	40.5	108	18.9	c
クロキサシリン	85.2	28.0	77.8	45.2	90.2	12.8	75.8	17.4	b
クロピドール	73.8	16.6	57.5	23.1	56.4	10.7	68.2	23.3	b
シプロフロキサシン	129	45.7	104	49.9	112	37.9	68.4	39.8	c
ジョサマイシン	177	15.2	188	11.7	144	11.5	129	5.8	b
スルファキノキサリン	88.8	10.0	51.1	24.1	70.1	12.7	52.7	19.6	a
スルファクロルピリダジン	93.2	6.7	65.9	15.6	78.4	19.5	58.6	12.9	b
スルファジアジン	94.8	21.4	75.8	25.7	59.8	12.5	75.3	14.6	a
スルファジミジン	121	21.5	100	17.4	78.9	12.6	76.8	15.3	a
スルファジメトキシシン	101	11.0	72.4	20.4	90.1	11.5	67.8	10.9	a
スルファチアゾール	61.1	19.4	48.0	12.1	75.9	19.2	61.4	19.6	c
スルファドキシシン	108	8.3	79.3	19.1	77.5	11.5	68.1	14.4	a
スルファニトラン	119	94.5	79.5	70.9	105	53.3	97.9	66.8	d
スルファピリジン	81.4	5.9	67.5	12.1	81.7	17.6	71.3	13.1	a
スルファベンズアミド	76.3	11.0	40.6	34.4	85.9	10.5	59.5	26.5	b
スルファメトキサゾール	86.8	11.0	57.5	21.7	66.7	7.9	60.6	18.9	b
スルファメトキシピリダジン	118	12.1	92.4	18.4	93.6	12.4	76.9	14.9	a
スルファメラジン	86.2	12.0	78.0	19.9	93.1	15.6	64.9	11.6	a
スルファモノメトキシシン	106	26.6	93.2	28.3	116	19.1	70.0	22.2	a
セフォペラゾン	62.0	27.1	71.8	18.3	81.9	46.2	50.0	51.5	c
タイロシン	191	27.1	274	28.7	114	11.6	91.8	11.3	b
ダノフロキサシン	140	18.9	120	32.3	181	16.5	114	30.2	b
チアベンダゾール	55.8	14.5	31.3	16.3	14.5	29.5	67.9	26.1	c
チアベンダゾール代謝物	77.8	9.9	42.8	18.8	44.1	11.6	51.5	12.9	c
チアムリン	140	6.4	106	9.7	117	6.8	46.0	13.9	b
チルミコシン	4731	107	2148	56.2	1061	82.9	2597	89.3	d
トリメトプリム	129	11.6	90.2	20.5	94.5	13.5	98.1	11.4	a
ピリメタミン	91.1	5.8	48.7	15.3	86.2	8.4	71.1	10.6	a
ファミフル	—	—	—	—	94.3	22.1	89.5	21.4	a
フルベンダゾール	107	15.7	67.8	11.4	86.2	31.3	77.4	23.3	b
メベンダゾール	—	—	—	—	93.0	6.9	84.7	6.5	a
リンコマイシン	62.5	13.2	45.5	17.6	53.6	16.5	74.3	11.3	c
レバミゾール	86.9	12.5	70.4	7.2	58.9	15.3	89.0	5.9	a

評価欄： a：概ね満たす

b：一部の検体種別で困難

なお、表中の—は欠測を示す。

c：スクリーニング検査として可能

d：検査法について再度検討必要

可能と思われる。

ただし、ガイドラインの数値よりあまりにも解離した項目については、やはり測定項目に含めることは適当でないと考えられるので、各項目と測定対象の組み合わせについて、以下の判断基準により検討した。

- 1) ガイドラインの数値を満たしている (評価 A)
- 2) 回収率が 50 ~ 200 % のもの (評価 B : 概ね満たしている)
- 3) 精度がガイドラインの数値+10 % 以内のもの (評価 C : スクリーニング検査としては可能)
- 4) 検査法について再度検討の必要なもの (評価 D)

これにより、検体種別ごとにとりまとめたものを表 4 として示す。

表 4 検体種別ごとの妥当性総合評価一覧

	豚 肉	養殖魚	生 乳	鶏 卵
アルベンダゾール代謝物	A	A	D	A
エンロフロキサシン	B	A	A	C
オキシベンダゾール	A	D	A	B
オキシリニック酸	A	A	A	A
オルメトプリム	B	A	A	A
オレアンドマイシン	C	C	D	A
クロキサシリン	A	D	A	A
クロビドール	A	B	B	B
シプロフロキサシン	D	D	C	C
ジョサマイシン	B	B	B	B
スルファキノキサリン	A	B	A	B
スルファクロルピリダジン	A	B	A	B
スルファジアジン	A	A	B	A
スルファジミジン	A	A	A	A
スルファジメトキシ	A	A	A	B
スルファチアゾール	B	C	A	B
スルファドキシ	A	A	A	B
スルファニトラン	D	D	D	D
スルファピリジ	A	B	A	A
スルファベンズアミド	A	C	A	B
スルファメキサゾール	A	B	B	B
スルファメキシピリダジ	A	A	A	A
スルファメラジ	A	A	A	B
スルファモノメトキシ	A	A	A	A
セフォペラゾン	C	A	D	D
タイロシン	B	C	A	A
ダノフロキサシン	B	C	B	C
チアベンダゾール	A	C	C	B
チアベンダゾール代謝物	B	D	D	B
チアムリン	B	A	A	C
チルミコシン	D	D	D	D
トリメトプリム	B	A	A	A
ピリメタミン	A	C	A	A

ファミフル	-	-	C	A
フルベンダゾール	A	B	C	A
メベンダゾール	-	-	C	A
リンコマイシン	B	C	B	A
レバミゾール	A	A	B	A

なお、表中の-は欠測を示す

まとめ

今回の検討により、従前から実施していた LC/MS による畜水産物中の残留動物用医薬品検査から、LC/MS/MS による測定に切り替えるにあたって、ガイドラインに基づき項目の精査を行うことが出来た。

また、LC/MS/MS に移行したことにより、定量下限値が下がり、ピーク形状も改善した。その結果、検体由来の妨害ピークも出にくくなり、解析時間の短縮及び解析者の負担軽減につながると思われる。

引用文献

- 1) 食安発第 1129002 号. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 2005/11/29.
- 2) 石川雅人. LC/MS による残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について (短報). 福島県衛生研究所年報 2004 ; 22 : 47-53.
- 3) 赤城理恵. LC/MS による残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について (第 2 報). 福島県衛生研究所年報 2005 ; 23 : 47-53.
- 4) 金成 徹. LC/MS による残留動物用医薬品等の一斉分析法に関する検討について (第 3 報). 福島県衛生研究所年報 2008 ; 26 : 85 - 89.
- 5) 食安発第 1115001 号. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 2007/11/15.