

LC-MS/MS による畜産物中の動物用医薬品検査の妥当性評価

【化学衛生室】

田中恵里

1 はじめに

当所では、畜産物中の残留動物用医薬品検査について、厚生労働省の通知試験法である「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」（以下、一斉 I 法）¹⁾ 及び個別試験法に準拠した方法で実施している。平成 22 年 12 月に「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について」²⁾ が改正され、食品衛生法の規格適合試験について適用されることとなった。そこで、当所において一斉 I 法で検査を実施していた化合物 11 物質及び個別に検査を実施していた 1 物質（イベルメクチン）について、まとめて検査可能な条件を検討したうえで、ガイドラインに沿って妥当性評価を実施したので報告する。

2 方法

2.1 試料

試料は、あらかじめ分析対象動物用医薬品（12 物質）が残留していないことを確認した牛の筋肉及び腎臓を用いた。筋肉には 12 物質、腎臓には 6 物質について、試料中濃度が各基準値（不検出基準の場合は、一斉 I 法の定量下限）となるよう混合標準溶液を添加し、30 分放置した後抽出操作を開始した。

なお、各基準値は評価を実施した平成 26 年 1 月時点のものである。

2.2 試薬等

各標準品原液は、単品をメタノールで溶解し、1000 μ g/mL とした。なお、フルベンダゾールについては、メタノールへの溶解度が低いため、少量の *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解後、メタノールで 100 μ g/mL とした。これらの標準品原液を適宜希釈し試験に用いた。

2.3 装置

○ ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 ポリトロ

ン PT10-35

○ 高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製
Agilent 1100 シリーズ

○ 質量分析装置：AB Sciex 社製 API3000

2.4 試験溶液の調製(図1参照)及び評価方法

試験溶液の調製は、一斉 I 法に従った。

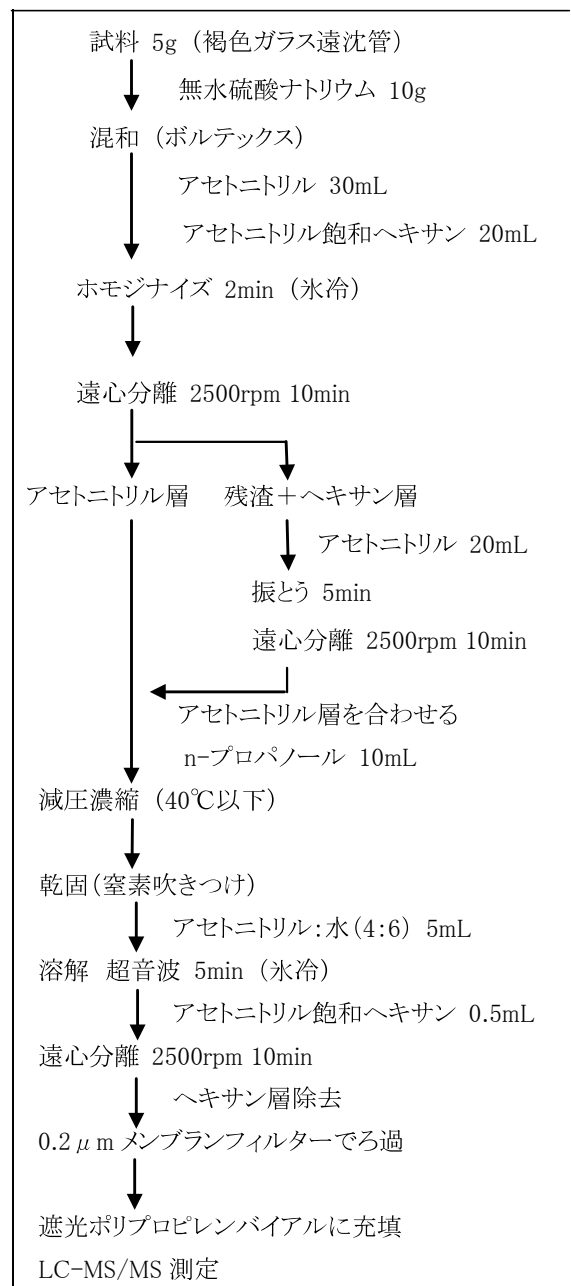


図 1 試験溶液調整フロー

イベルメクチンの抽出条件は、石井らの報告³⁾でアセトニトリルを採用しており、これを参考とした。試験は、光分解を起こしやすい物質があるため、遮光して行った。

評価は、実施者1名が1日1回(2併行)5日間実施する枝分かれ試験とした。

2.5 LC-MS/MS 測定条件

【HPLC条件】

分析カラム：Waters XTerra MS C18(2.1*150mm 3.5 μ m)、ガードカラム：Waters XTerra MS C18(2.1*10mm 3.5 μ m)、移動相：A液 0.1mM ギ酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸水溶液、B液 0.1mM ギ酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液、グラジエント条件:表1のとおり、カラム

時間 (min)	ESI(+)		時間 (min)	ESI(-)	
	A液(%)	B液(%)		A液(%)	B液(%)
0.0	95	5	0.0	95	5
3.0	95	5	3.0	95	5
15.0	5	95	15.0	5	95
25.0	5	95	20.0	5	95
25.1	2	98	20.1	95	5
30.0	2	98	35.0	95	5
30.1	95	5	—	—	—
45.0	95	5	—	—	—

温度：40℃、注入量：5 μ L、流速：0.2mL/min とした。

移動相は、井之上らの報告⁴⁾を参考にした。移動相中のアンモニウムイオン濃度を一定とするため、B液にもギ酸アンモニウムを添加した。

なお、移動相B液については、アセトニトリルへのギ酸アンモニウムの溶解度が乏しいことから、10mM ギ酸アンモニウム水溶液を調製し添加した。

【MS/MS条件】

各化合物の測定条件は、表3のとおりで、各標準溶液をインフュージョン注入し、最適な条件を選定した。イベルメクチンについては、MS測定において、 $[M+H]^+$ 及び $[M-H]^-$ が十分な強度で確認されないことから、 $[M+NH_4]^+$ をQ1とした。

イオンソース条件は、表2のとおりとした。

表2 イオンソース条件

イオンソース条件	ESI(+)	ESI(-)
NEB	12	14
CUR	8	13
IS(V)	5500	-3500
TEM(°C)	400	500
CAD	8	7
ターボガス(L/min)	6	6

表3 各化合物(12種)のMS/MS測定条件

化合物名	ESI	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V)	FP(V)	CE(V)	CXP(V)	EP(V)
デキサメタゾン	+	393.2	373.2	41	270	11	22	10
マルボフロキサシン	+	363.2	72.1	36	220	47	20	10
イベルメクチン B1a	+	892.5	569.2	31	180	21	34	10
タイロシン	+	916.5	174.3	26	150	57	14	10
フルベンダゾール	+	314.1	282.2	52	360	28	4	10
エンロフロキサシン	+	360.1	316.1	51	200	25	18	10
シプロフロキサシン	+	332.1	288.2	46	230	27	54	10
オフロキサシン	+	362.2	318.2	51	300	27	28	10
オルメトプリム	+	275.2	259.2	46	250	43	14	10
リンコマイシン	+	407.2	126	46	290	45	8	10
スルファモノメキシシ	+	281.1	92.2	36	200	43	16	10
チアンフェニコール	-	354.0	185.0	-36	-200	-28	-11	-10

3 結果

3.1 選択性

筋肉及び腎臓のブランク試料を測定したところ、すべての物質において、定量を妨害するピークは確認されず、選択性の目標値に適合していた。

3.2 真度及び精度

結果を表4に示した。真度の目標値 70%～120%に適合したものは、筋肉で12物質中9物質、腎臓で6物質中5物質となった。真度を満たさないもののうち回収率 50%未満のものは腎臓におけるタイロシンのみであった。

測定時における試料由来のマトリックス効果を測定するために、筋肉及び腎臓試料の抽出液を乾固させ各基準値の混合標準溶液で再溶解して測定した。筋肉で12物質中2物質が120%以上のマトリックス効果を示した。

チアンフェニコールについては、真度及びマトリックス効果の両方において、正の方向に働いているため、検量線にマトリックスを添加して補正することで、真度の目標値 70%～120%に適合する可能性が示唆された。

ガイドラインの精度の目標値は表5のとおりであり、併行精度は、全ての物質において、筋肉及び腎臓共に目標値に適合していた。室内精度は、筋肉で12物質中10物質、腎臓で6物質中4物質が適合していた。

表5 精度の目標値

濃度 (ppm)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤0.001	30>	35>
0.001<～≤0.01	25>	30>
0.01<～≤0.1	15>	20>
0.1<	10>	15>

3.3 定量下限

当所では、基準値の1/10を結果報告の下限としている。報告下限濃度の標準液を測定し、目標値(S/N比 ≥10)に適合していることを確認した。基準が不検出の場合は、一斉I法の定量下限値が目標値(S/N比 ≥10)に適合していること

を確認した。

4 まとめ

牛筋肉及び腎臓中の残留動物用医薬品について、一斉I法を用いて、筋肉では12物質、腎臓では6物質の化合物についてガイドラインに基づき、妥当性評価を行った。筋肉では7物質、腎臓では4物質においてガイドラインのすべての目標値に適合していた。ガイドラインを満たさない項目については、引き続き検討予定である。

また、従来、個別試験法で検査していたイベルメクチンについて、一斉I法で検査可能なことがわかり、業務の効率化につながった。

5 参考文献

- 1) 厚生労働省通知：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、平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)
- 2) 厚生労働省通知：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、平成22年12月24日、食安発1224第1号(2010)
- 3) 石井里枝, 堀江正一, 星野庸二, 中澤裕之：食衛誌, Vol. 39, 42-45(1998)
- 4) 井之上浩一, 吉見幸子, 日野知証, 岡尚男：食衛誌, Vol. 51, 1-9(2010)

表4 化合物別基準値、真度、精度等

No.	分析対象化合物	食品名	定量下限又は報告下限 (ppm)	基準値 (ppm)	真度 (%)	併行精度 RSD (%)	室内精度 RSD (%)	マトリックス 効果 (%)
1	デキサメタゾン	牛筋肉	0.004	0.04	94.4	2.9	2.6	105
2	マルボフロキサシン	牛筋肉	0.01	0.1	95.3	5.3	10.7	108
3	イバルメクチン	牛筋肉	0.001	0.01	96	7	6.5	112
4	タイロシン	牛筋肉	0.005	0.05	71	4.1	20.3	100
5	フルベンダゾール	牛筋肉	0.002	0.02	103.2	4.2	3.1	111
6	リンコマイシン	牛筋肉	0.02	0.2	65.2	3.1	7.3	96
7	エンロフロキサシン	牛筋肉	0.0025	0.025	107.6	3.9	12.5	111
8	シプロフロキサシン	牛筋肉	0.0025	0.025	79.9	2.9	27.2	148
9	オフロキサシン	牛筋肉	0.01	不検出	100.3	3.3	11	113
10	オルメトプリム	牛筋肉	0.002	0.02	67	5.4	12.8	82
11	スルファモノメキシシ	牛筋肉	0.001	0.01	98.3	3.4	5.6	104
12	チアンフェニコール	牛筋肉	0.002	0.02	142.5	3.6	11.6	136
13	デキサメタゾン	牛腎臓	0.004	0.04	100.5	6	9.5	102
14	マルボフロキサシン	牛腎臓	0.015	0.15	95.3	2.8	8.1	103
15	イバルメクチン	牛腎臓	0.001	0.01	100.9	5	5.7	109
16	タイロシン	牛腎臓	0.005	0.05	17.8	7.4	24.4	111
17	フルベンダゾール	牛腎臓	0.002	0.02	103	3.7	6.8	111
18	チアンフェニコール	牛腎臓	0.002	0.02	111.2	3.5	28.8	104

* 基準値は、評価を行った平成26年1月時点のもの。

* マトリックス効果 (%) は、「マトリックス添加標準/標準」のピーク面積比 (%) を表したもの。