

液体クロマトグラフ質量分析計による畜水産食品中の 動物用医薬品分析法の検討

【食品衛生室】

岩永千歳

1 はじめに

平成 18 年 5 月の残留農薬等ポジティブリスト制の施行にともない、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が定められた。

これにともない、県内で使用量の多い動物用医薬品およびマラカイトグリーンを試験対象物質とし、当所における試験法の測定精度を確認した。その結果、添加回収試験における回収率が低い物質が見受けられたため、回収率の向上を目的とし試験法の検討を行ったので報告する。

2 材料

1) 試料

牛肉(筋肉・腎臓)、豚肉(筋肉・腎臓)、鶏肉(筋肉)、鶏卵、養殖魚(フナ、フグ)を対象食品とした。

2) 試薬等

(1) 標準品

エリスロマイシン、アザペロン、エンロフロキサシン、オフロキサシン、オルメトプリム、マラカイトグリーンは、Dr.Ehrenstorfer GmbH 製のものを用いた。

タイロシンは日本イーライリリー、デキサメタゾン は Cal Bio Chem、リンコマイシンは MP Bio Chemicals の製造品を用いた。

チアンフェニコール、プレドニゾロン、シプロフロキサシン、スルファモノメトキシ、ロイコマラカイトグリーンは、和光純薬工業(株)製のものを用いた。

各標準品 0.05 g を量りとり、アセトニトリル/メタノール(1:1)溶液で 50 ml とした。

一斉分析の項目はアセトニトリル/水(4:6)、マラカイトグリーン分析の項目はメタノールで適宜希釈し、検量線溶液とした。

(2) 試薬

抽出に用いた試薬は、和光純薬製の特級、残留農薬試験用及び LC/MS 用を用いた。

(3) 機器

ホモジナイザー：ポリトロン PT10-35 ((株)セントラル科学貿易)

高速液体クロマトグラフ：Agilent 1100 series (Agilent Technology 社製)

質量分析計：API3000 (Applied Biosystems 社製)

3)試験項目

試験を行った項目は表 1 のとおりである。

表 1 検体名と試験項目

	鶏 筋 肉	鶏 卵	豚 肉	牛 肉	養 殖 魚
オフロキサシン					
エンロフロキサシン					
シプロフロキサシン					
オルメトプリム					
スルファモノメトキシ					
リンコマイシン					
チアンフェニコール					
タイロシン					
プレドニゾロン					
エリスロマイシン					
デキサメタゾン					
アザペロン					
マラカイトグリーン					

* 豚肉と牛肉は、それぞれ筋肉と腎臓

3 方法

1) 畜産物の動物用医薬品試験

厚生労働省通知「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法（畜水産物）」（以下、通知法）¹⁾に基づいて行った。ただし、測定はLC/MS/MSとした。

具体的には、均一化した試料5 gを遠沈管(100 ml)に量りとり、アセトニトリル 30 ml、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mlを加えた後、無水硫酸ナトリウム 10 gを加えた。

氷冷しながら、ホモジナイザーで3分間粉碎した。2000 rpmで5分間遠心分離した後、抽出液を分液ロートにうつし、下層をナスフラスコに移した。遠心後の残さにアセトニトリル 20 mlと残ったヘキサン層を加え、5分間振とうした。2000 rpmで5分間遠心分離した後、上記と同様の操作を行った。

分取したアセトニトリルに1-プロパノールを加え、濃縮し、アセトニトリル/水(4:6)に溶かした。10 mlの試験管に移しアセトニトリル飽和ヘキサン 0.5 mlを加え攪拌し、2000 rpmで5分間遠心分離した。

アセトニトリル層をとり、LC/MS/MS用試験溶液とした。

2) 水産物の動物用医薬品試験

昭和34年厚生省告示第370号「マラカイトグリーン試験法」（以下、告示法）²⁾に基づき添加回収試験を行った。結果は、添加回収率が10%以下と極端に低かった。

回収率が低かった原因は、精製の段階で消失していると予想し、精製を行っていない赤木らの方法³⁾を参考に行った。

具体的には、サンプルを2 g採取し、内部標準物質（マラカイトグリーン-d5、ロイコマラカイトグリーン-d6）を添加し、アセトニトリル 30 ml、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 ml及び無水硫酸ナトリウム 10 gを加え、ホモジナイザーで粉碎した。2000 rpmで5分間遠心分離し、有機層と残さにわけた。残さにアセトニトリル 20 mlと有機層のヘキサンを加え、5分間振とうし2000 rpmで5分間遠心分離した。

アセトニトリル層をあわせ、1-プロパノール 10 mlを加え濃縮乾固し、メタノール 1 mlに溶かした。この溶液をLC/MS/MSにて測定した。

2) LC/MS/MS分析

(1) LC条件

カラム：Xterra MSC18 2.1×150mm, 粒子径 3.5 μm
(waters社製)

移動相：A液) 0.1%ギ酸/水

B液) アセトニトリル

グラジエント条件：

0 3(分) A)95% B)5%

3 15(分) A)95% B)5% A)5% B)95%

(Liner gradient)

流速：0.2 ml/分

カラム温度：40

注入量：5 μl

(2) MS条件

イオン化モード：ESI(チアンフェニコールのみネガティブ測定、その他はすべてポジティブ測定)

測定モード：MRM

Infusion及びFlow Injection Analysisにより、個々の物質の最適な条件を設定した。(表2)

表2 LC/MS/MS測定条件

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
オフロキサシン	362.2	318.2	27
エンロフロキサシン	359.9	316.0	25
シプロフロキサシン	332.1	288.2	27
オルメトプリム	275.0	259.2	43
スルファモメトキシ	280.9	92.2	43
リンコマイシン	407.2	125.9	45
チアンフェニコール	353.8	185.0	-28
タイロシン	916.8	174.3	57
ブレドニゾロン	361.2	343.1	13
エリスロマイシン	734.6	158.1	43
デキサメタゾン	393.2	91.1	85
アザペロン	328.2	164.9	29
マラカイトグリーン	329.1	313.3	47
ロイコマラカイトグリーン	331.2	239.1	41
マラカイトグリーン-d5	334.2	318.2	49
ロイコマラカイトグリーン-d6	337.3	240.0	43

4 結果及び考察

1) 畜産物の添加回収試験

添加回収試験は、各 0.05 ppm の溶液（アセトニトリル溶液）を試料に 1 ml 添加して行った。

添加回収試験の結果は、厚生労働省通知食安発第 1115001号「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」（以下、ガイドライン）⁵⁾ をもとに評価した。

各試験の添加回収率と変動係数を表 3～8 に示す。検体 A と検体 B は、試験に用いた個体が異なり、試験日も異なる。

表 5、6 牛筋肉と牛腎臓の結果から、タイロシンとエリスロマイシンの添加回収率は極端に低くなっている。表 7、8 豚筋肉と豚腎臓の結果からも、タイロシンの添加回収率が低くなっている。

タイロシンとエリスロマイシンの試験については、牛肉及び豚肉の筋肉と腎臓で 1 回の試験（豚筋肉の検体 B）を除いて、添加回収率が 40% を下回った。これは、試料由来のマトリクスの影響というよりも前処理法そのものの改善が必要と考えられた。タイロシンとエリスロマイシンはともにマクロライド系抗生物質であり、酸性条件下において分解されるとの報告⁶⁾があり、今後、前処理中の pH 変化による影響を検討する必要があると考えられた。

ガイドラインによると、0.01ppm で添加した場合の併行精度は 25% 未満であるが、鶏卵（検体 A）のオルメトプリムで超えていた。

牛と豚についても、併行精度が 25% 以上であったものは、牛筋肉（検体 A）のチアンフェニコール、牛腎

臓（検体 A と B）のデキサメタゾンであった。

添加回収試験の結果から、一斉試験法において分析可能であると記載された物質でも回収率が低く、ばらつきの大きい場合があることが明らかとなった。

今回、添加回収率が悪かったタイロシンとエリスロマイシンは、現在のところ個別法も制定されておらず、一斉試験法で検出するしかないため試験法の検討が必要である。

2) 水産物の添加回収試験

添加回収試験は、各 0.05 ppm の溶液（メタノール溶液）を試料に 1 ml 添加して行った。

告示法²⁾ とその後に出された事務連絡の方法⁴⁾ のどちらも検討したが、添加回収率は 10% 以下であった。

前処理法の改善と LC/MS/MS の測定時のイオン化抑制について検討を行った。

まず、測定時のイオン化抑制の有無をみるために、マトリクス溶液を用いて調製した標準液と、メタノールで調製したものの両者により検量線を作成した。その結果、図のようにロイコマラカイトグリーンでイオン化抑制が認められた。

そのため、マラカイトグリーン-d5、ロイコマラカイトグリーン-d6 をサロゲート物質として添加し、内部標準として使うことにした。

マラカイトグリーンでは、イオン化抑制が見られなかったため、測定時だけの問題ではなく、前処理法にも改善が必要であることが示唆された。よって、精製過程を省き、抽出液をそのまま分析することとした。その結果、添加回収率を上げることができ、内部標準

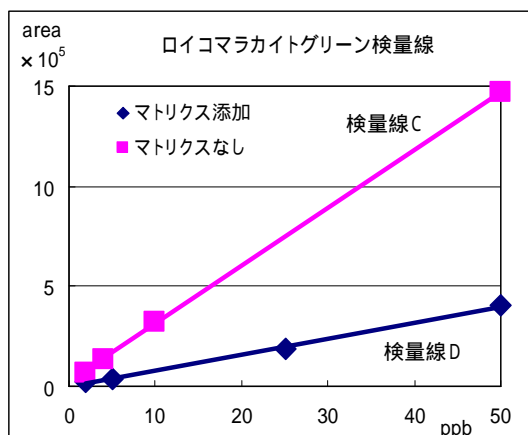
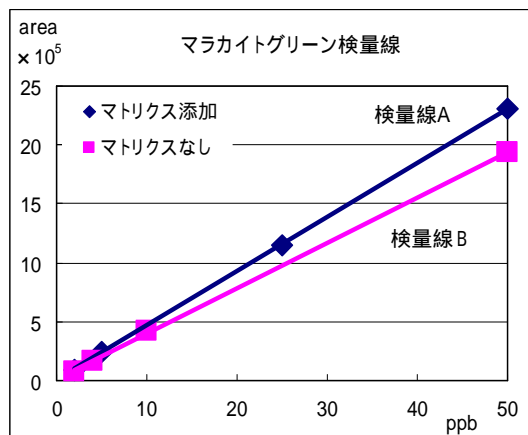


図) マトリクスを添加した標準液のマトリクス効果の比較

(マトリクス溶液の調製は、告示法で行った。ただし、ミニカラムによる精製は行っていない。)

A) $y=46047x+5237$ B) $y=38524x+16435$ C) $y=29008x+21401$ D) $y=7975x-1866$

の添加回収率も 40%以上であった。

以上のことより、マラカイトグリーンを試験は、精製過程を省き、内部標準を使うことで改善された。

動物用医薬品は、光、pHに対して不安定となる物性を示す物質が多くあり、これらの影響により前処理

工程中に分解してしまうことが考えられるため、分解要因を排除した試験法の検討が必要である。

表3 添加回収試験結果(鶏肉)

	検体 A(n=5)		検体 B(n=3)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
オフロキサシン	153	5.5	101	2
エンロフロキサシン	116	5.9	110	4.7
シプロフロキサシン	317	6.6	68	6
オルメトプリム	70	1.3	93	2.1
スルファモノメトキシ	88	16.1	103	1.1
リンコマイシン	69	6.2	83	2.2

表4 添加回収試験結果(鶏卵)

	検体 A(n=5)		検体 B(n=3)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
オフロキサシン	103	9.2	61	2.8
エンロフロキサシン	82	7.9	68	5.4
シプロフロキサシン	168	11.8	48	3.6
オルメトプリム	61	30.5	72	9.4
スルファモノメトキシ	79	11.2	68	7.4
リンコマイシン	64	10.4	80	13.5

表5 添加回収試験結果(牛筋肉)

	検体 A(n=5)		検体 B(n=5)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
チアンフェニコール	79	33.4	104	12.3
タイロシン	32	22.4	16	10.9
プレドニゾロン	91	17	88	6.7
エリスロマイシン	8	10.8	7	4.9
デキサメタゾン	100	17.3	90	8.9

表6 添加回収試験結果(牛腎臓)

	検体 A(n=5)		検体 B(n=5)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
チアンフェニコール	107	19.9	60	15.5
タイロシン	13	17.1	2	1
プレドニゾロン	84	21.7	75	8.8
エリスロマイシン	10	23.2	10	1.1
デキサメタゾン	89	33.1	90	30.1

表7 添加回収試験結果(豚筋肉)

	検体 A(n=3)		検体 B(n=3)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
チアンフェニコール	112	11.9	112	4.6
タイロシン	30	13.1	85	2.9
プレドニゾロン	83	11.2	103	1.7
アザペロン	71	18	90	3.8

表8 添加回収試験結果(豚腎臓)

	検体 A(n=3)		検体 B(n=3)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
チアンフェニコール	124	8.3	107	3.5
タイロシン	15	2.8	39	5.8
プレドニゾロン	91	12.7	83	6.5
アザペロン	40	4.8	89	8.5

表9 添加回収試験結果(養殖魚)

	検体フグ A(n=2)		検体フナ B(n=2)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
マラカイトグリーン	102	2.4	113	5.34
ロイコマラカイトグリーン	81	21.6	100	0.35

6 参考文献

- 1)平成 17 年 1 月 24 日付食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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」
- 2)昭和 34 年厚生省告示第 370 号「マラカイトグリーン試験法」
- 3)福岡市保健環境研究所報 No.31, 85-87(2006)
- 4)平成 18 年 7 月 3 日付厚生労働省事務連絡「食品中のマラカイトグリーンの試験法について」
- 5)平成 19 年 11 月 15 日付厚生労働省通知「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について」
- 6)D.A.Volmer, J.P.Hui:Rapid Commum Mass Spectrum, 12(3), 123-129(1998)