

畜水産物中の動物用医薬品試験法の妥当性評価(第2報)

佐々木 珠生 小中 ゆかり 福田 裕

動物用医薬品 41 化合物について、LC-MS/MS を用いた一斉分析法を検討し、マダイ、はちみつを対象として妥当性評価を実施した。その結果、マダイは 41 化合物中 33 化合物、はちみつは 21 化合物が「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」¹⁾(以下「ガイドライン」という。)の評価基準を満たした。

キーワード： LC-MS/MS, 勘定用医薬品, 妥当性評価

はじめに

当所では、テトラサイクリン系抗生物質については蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフを用いた分析法^{2),3)}、その他の勘定用医薬品については主に多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-DAD)を用いた一斉試験法を実施してきたが、HPLC-DAD では試料中のきょう雜成分の妨害ピークが多く、HPLC 用カラムを変更して再測定を行うなど苦慮してきた。

一方、食品衛生法に定められている規格基準への適合性の判断を行う試験については、ガイドラインの定める目標値等に適合していることが求められている。

そこで、当所の HPLC-DAD 分析対象化合物について、高感度で選択性の高い LC-MS/MS を用いた一斉試験法について検討し、ガイドラインに基づき、妥当性評価を行っている⁴⁾。このたび、マダイ、はちみつについて妥当性評価を行ったので、その結果について報告する。

方 法

1 試料

マダイ(養殖)、はちみつ

2 試薬

固相抽出カラム：Waters 社製 Oasis HLB(200mg)を、あらかじめメタノール 5mL、蒸留水 5mL でコンディショニングして使用した。

その他の試薬は既報⁴⁾のとおり。

3 装置

既報⁴⁾のとおり。

4 分析条件

既報⁴⁾のとおり。

5 試験溶液の調製

マダイについては、通知法「HPLC による動物用

医薬品等の一斉試験法 I(畜水産物)⁵⁾(以下「通知法 I」という。)に準じて調製した。ただし、最終試験溶液量を 1mL から 5mL に変更した。

はちみつについては、通知法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III(畜水産物)⁵⁾(以下「通知法 III」という。)に準じて調製した。必要に応じて加温(40°C以下)溶解し、均一化した試料 5g を 50mL 遮光比色管に採取し、蒸留水 20mL を加えて溶解した。3,000rpm で 5 分間遠心分離後、上澄み液を固相抽出カラム(Oasis HLB)に全量負荷し、蒸留水 10mL で洗浄後、メタノール 10mL で 100mL 遮光なすフラスコに溶出した。溶出液を 40°C以下で減圧乾固し、残留物にアセトニトリル及び水(4:6)混液 5mL を加えて溶かし、これを試験溶液とした。

試験溶液はメンプランフィルターでろ過して使用した。

6 検量線

アセトニトリル及び水(4:6)混液で希釈した標準溶液を用いて絶対検量線法を行った。マトリックス添加標準溶液は用いなかった。

7 妥当性評価

ガイドラインに従い、枝分かれ実験計画により、1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を実施した。ただし、はちみつのニューキノロン剤 9 化合物については、5 併行の添加回収試験のみ実施した。添加濃度は、マダイは 0.001, 0.01 及び 0.1ppm の 3 濃度、はちみつは基準値濃度とした。ただし、はちみつに基準のない化合物の添加濃度は通知法 I 及び通知法 III に示されている定量限界濃度とした。また、 α -トレノボロン、 β -トレノボロンは、農薬等の残留基準告示において「不検出」とされているので、添加濃度は、施行通知⁶⁾に示されている検出限界濃度 0.002ppm とした。

8 マトリックス添加標準溶液の調製

あらかじめ分析対象化合物を含まないことを確認した試料を用いて「5 試験溶液の調製」に従い抽出操作を行い、40°C以下で減圧乾固した。マダイでは、残留物にアセトニトリル及び水(4:6)混液 2.5mL を加えて溶かし、アセトニトリル飽和ヘキサン 0.5mL を積層して毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル-水層をマトリックス溶液とした。はちみつでは、残留物にアセトニトリル及び水(4:6)混液 2.5mL を加えて溶かし、これをマトリックス溶液とした。

20ng/mL 混合標準溶液とマトリックス溶液を当量混合し、マトリックス添加標準溶液(10ng/mL)とした。

結果と考察

1 定量限界

酢酸メレンゲステロール, ゼラノール, α -トレンボロン及び β -トレンボロンについては, 添加濃度 0.001ppm での添加回収試験における添加試料中のピークが S/N 比 ≥ 10 であることを確認した。その他の化合物については, 添加濃度 0.01ppm での添加回収試験における添加試料中のピークが S/N 比 ≥ 10 であることを確認した。

2 選択性

ブランク試料を本法に従って試験し、定量を妨害するピークの有無を確認した。全ての化合物でガイドラインに規定された許容範囲内であった。

3 真度(回収率)及び精度

真度及び精度の結果を表1～3に示した。なお、表中の網掛けは、ガイドラインの目標値を満足できなかったものを示す。

試料別の真度の分布を図1に示した。マダイでは添加濃度0.001ppmで1化合物、添加濃度

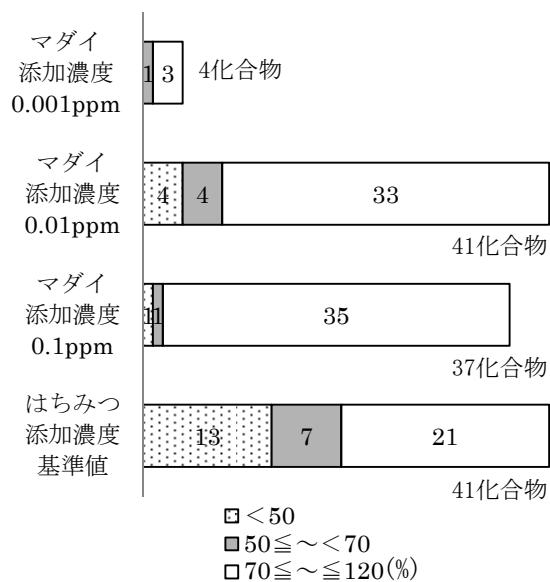


図 1 試料別回収率(真度)の分布

0.01 ppm で 8 化合物、添加濃度 0.1 ppm で 2 化合物で直度が目標値の 70% を下回った。

はちみつでは 20 化合物で真度が目標値を下回り、このうちサルファ剤については 13 化合物中 12 化合物で目標値を下回った。

クロピドール、スルファジアジン、スルファチアゾール、スルファピリジン及びノルフロキサシンについては、マダイ、はちみつとともに真度が目標値を下回った。

4 評価結果

全ての性能パラメーター(定量限界, 選択性, 真度及び精度)が, ガイドラインの目標値等に適合している場合は○, 適合していない場合は×を表1～3の判定の欄に示した。

マダイについては、酢酸メレンゲステロール、ゼラノール、 α -トレンボロン及び β -トレンボロ

表1 マダイの妥当性評価結果 1

表2 マダイの妥当性評価結果2

分析対象化合物	基準値 (ppm)	定量	添加濃度 0.01ppm			添加濃度 0.1ppm			判定
		限界 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
目標値		70~120	25>	30>	70~120	15>	20>		
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	0.01	90.3	3.9	16.6	87.9	5.2	5.8	○	
エトパベート	0.01	97.3	5.9	14.1	94.2	6.4	8.6	○	
オキソリニック酸	0.06	0.01	100.1	4.1	12.2	98.1	6.8	10.6	○
オルメトプリム	0.02	72.5	7.0	29.0	83.5	10.2	14.6	○	
クロビドール	0.01	55.9	4.8	29.3	79.3	6.2	15.5	×	
スルファキノキサリン	0.01	84.4	9.5	13.8	90.2	7.1	10.6	○	
スルファクロルピリダジン	0.01	81.2	6.7	10.8	90.6	8.8	9.6	○	
スルファジアジン	0.01	39.3	5.3	21.1	70.3	6.3	13.6	×	
スルファジミジン	0.01	75.0	7.1	20.6	93.3	7.8	12.3	○	
スルファジメトキシン	0.01	91.1	5.4	22.3	92.9	4.1	8.8	○	
スルファチアゾール	0.01	60.0	2.0	21.7	81.3	7.0	12.4	×	
スルファドキシン	0.01	93.9	8.9	11.0	94.7	5.3	10.6	○	
スルファニトラン	0.01	99.8	7.4	11.6	96.8	8.7	8.7	○	
スルファビリジン	0.01	60.7	7.0	19.8	83.7	7.5	10.9	×	
スルファメトキサゾール	0.01	91.1	6.5	9.9	94.1	5.7	7.5	○	
スルファメトキシピリダジン	0.01	80.6	6.2	20.1	92.5	3.7	8.6	○	
スルファメラジン	0.01	70.4	3.9	24.7	86.7	6.7	12.1	○	
スルファモノメトキシン	0.1	0.01	87.4	5.0	14.3	90.1	8.6	8.6	○
チアベンダゾール	0.02	0.01	77.2	5.6	20.1	87.6	6.2	8.9	○
5-ヒドロキシチアベンダゾール	0.01	109.0	5.3	9.0	95.2	7.7	10.6	○	
チアンフェニコール	0.02	0.01	116.5	3.7	9.1	99.4	3.6	6.1	○
トリメトプリム	0.05	0.02	68.2	4.8	32.1	82.8	7.9	15.2	×
ナイカルバジン	0.02	84.3	5.2	6.3	83.3	3.3	4.0	○	
ナリジクス酸	0.01	96.4	4.6	12.7	95.4	4.1	6.7	○	
ピリメタミン	0.02	83.0	8.2	19.5	86.5	7.4	11.2	○	
ピロミド酸	0.01	99.2	4.9	14.4	91.9	6.7	9.2	○	
フルベンダゾール	0.01	97.7	4.4	12.8	94.9	5.0	8.0	○	
レバミゾール	0.01	79.5	8.1	26.5	93.4	8.2	14.1	○	
エンロフロキサシン	0.01	91.9	3.7	16.8	93.5	4.0	8.8	○	
シプロフロキサシン	0.01	48.4	8.0	19.7	55.6	10.6	14.8	×	
オフロキサシン	0.01	80.0	3.9	14.2	83.2	9.2	11.1	○	
オルビフロキサシン	0.01	84.4	4.8	21.9	82.8	12.3	14.4	○	
サラフロキサシン	0.01	71.1	14.8	20.2	71.7	8.1	12.3	○	
ジフロキサシン	0.01	90.7	4.4	17.4	91.4	8.0	9.9	○	
ダノフロキサシン	0.01	70.8	5.7	18.9	79.4	11.2	13.1	○	
ノルフロキサシン	0.01	46.9	9.4	15.6	49.9	9.6	12.1	×	
フルメキン	0.04	0.01	100.6	7.0	13.7	97.3	6.0	9.9	○

表3 はちみつの妥当性評価結果

分析対象化合物	基準値 (ppm)	定量限 界(ppm)	添加濃 度(ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	目標値		判 定
							併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	0.01	0.01	83.0	3.2	7.9	25>	30>	30>	○
エトバベート	0.01	0.01	87.2	1.9	9.8	25>	30>	30>	○
オキソリニック酸	0.01	0.01	73.7	6.3	16.0	25>	30>	30>	○
オルメトブリム	0.02	0.02	84.8	3.6	5.8	15>	20>	20>	○
クロビドール	0.01	0.01	64.4	5.4	5.4	25>	30>	30>	×
酢酸メレンゲステロール	0.001	0.001	97.5	21.1	25.2	30>	35>	35>	○
スルファキノキサリン	0.01	0.01	35.6	11.6	54.3	25>	30>	30>	×
スルファクロルピリダジン	0.01	0.01	38.7	6.4	43.6	25>	30>	30>	×
スルファジアジン	0.01	0.01	14.6	16.8	97.8	25>	30>	30>	×
スルファジミジン	0.01	0.01	23.6	22.5	41.2	25>	30>	30>	×
スルファジメトキシン	0.01	0.01	44.2	9.9	34.3	25>	30>	30>	×
スルファチアゾール	0.01	0.01	13.8	29.8	84.6	25>	30>	30>	×
スルファドキシン	0.01	0.01	41.7	7.3	16.9	25>	30>	30>	×
スルファニトラン	0.01	0.01	101.2	19.0	19.0	25>	30>	30>	○
スルファピリジン	0.01	0.01	11.5	80.1	230.7	25>	30>	30>	×
スルファメトキサゾール	0.01	0.01	46.9	9.4	40.8	25>	30>	30>	×
スルファメトキシピリダジン	0.01	0.01	19.2	22.3	69.0	25>	30>	30>	×
スルファメラジン	0.01	0.01	26.6	12.2	42.4	25>	30>	30>	×
スルファモノメトキシン	0.01	0.01	15.3	18.7	61.5	25>	30>	30>	×
ゼラノール	0.002	0.0005	0.002	91.3	5.9	11.6	25>	30>	○
チアベンダゾール	0.02	0.01	54.5	6.2	11.0	25>	30>	30>	×
5-ヒドロキシチアベンダゾール		0.01	26.6	6.5	31.0	25>	30>	30>	×
チアンフェニコール	0.01	0.01	101.0	4.5	8.5	25>	30>	30>	○
トリメトブリム	0.02	0.02	81.5	2.0	5.4	15>	20>	20>	○
α-トレノボロン	N. D.	0.002	0.002	79.0	8.4	16.4	25>	30>	○
β-トレノボロン		0.002	0.002	85.9	6.0	19.7	25>	30>	○
ナイカルバジン	0.02	0.02	64.3	7.2	8.7	15>	20>	20>	×
ナリジクス酸	0.01	0.01	90.8	7.4	8.9	25>	30>	30>	○
ピリメタミン	0.02	0.02	89.6	1.9	4.3	15>	20>	20>	○
ピロミド酸	0.01	0.01	94.8	2.5	5.6	25>	30>	30>	○
フルベンダゾール	0.01	0.01	78.4	2.1	8.6	25>	30>	30>	○
レバミゾール	0.01	0.01	77.9	4.4	6.0	25>	30>	30>	○
エンロフロキサシン	0.01	0.01	71.1	5.1	-	25>	30>	30>	○
シプロフロキサシン	0.01	0.01	78.0	11.9	-	25>	30>	30>	○
オフロキサシン	0.01	0.01	59.0	6.5	-	25>	30>	30>	×
オルビフロキサシン	0.01	0.01	61.1	9.1	-	25>	30>	30>	×
サラフロキサシン	0.01	0.01	62.3	4.7	-	25>	30>	30>	×
ジフロキサシン	0.01	0.01	72.6	8.0	-	25>	30>	30>	○
ダノフロキサシン	0.01	0.01	74.0	20.1	-	25>	30>	30>	○
ノルフロキサシン	0.01	0.01	61.0	7.7	-	25>	30>	30>	×
フルメキン	0.01	0.01	77.2	4.8	-	25>	30>	30>	○

ンについては、添加濃度は 0.001 及び 0.01 ppm の 2 濃度、その他の化合物については 0.01 及び 0.1 ppm の 2 濃度で真度、精度の評価を行った。適合化合物数は 33 化合物であった。

はちみつについては、ニューキノロン剤は併行精度のみで精度の評価を行った。適合化合物数は 21 化合物であった。

5 マトリックス効果

多くの化合物で真度が 70% を下回ったことから、試料中のマトリックス成分が LC-MS/MS 分析においてイオン化を抑制していると考えられ、その影響について検証した。試料中濃度 0.01 μg/g に相当するマトリックス添加標準溶液(10ng/mL)を調製し、マトリックスを含まない標準溶液に対するピーク面積比を求め、マトリックス効果の有無を確認した。多くの化合物においてマトリックスによるイオン化抑制効果が確認された(表 4)。今後、マトリックス添加標準溶液やサロゲートの使用を検討する必要があると思われる。

ま　と　め

LC-MS/MS 一斉試験法においては、試料中のきょう雜成分の妨害ピークはなく、解析にかかる時間が短縮された。マダイ、はちみつについて妥当性評価を行ったところ、検討対象 41 化合物に対してマダイでは 33 化合物、はちみつでは 21 化合物がガイドラインの評価基準を満たした。

文　　献

- 1) 厚生労働省通知、食安発 1124 第 1 号、平成 22 年 12 月 24 日
- 2) 畜水産食品中のオキシテトラサイクリン分析法の改良、広島市衛生研究所年報、18, 79 ~80(1999)
- 3) 佐々木珠生 他:畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質試験法の妥当性評価、広島市衛生研究所年報、34, 57~58(2015)
- 4) 佐々木珠生 他:畜産物中の動物用医薬品試験法の妥当性評価、広島市衛生研究所年報、35, 31~38(2016)
- 5) 厚生労働省通知、食安発 0124001 号、平成 17 年 1 月 24 日
- 6) 厚生労働省通知、食安発 1129001 号、平成 17 年 11 月 29 日

表 4 マトリックスの影響

分析対象化合物	マトリックス効果*(%)	
	マダイ	はちみつ
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	90.3	85.9
エトペベート	94.5	85.9
オキソリニック酸	101.4	83.3
オルメトプリム	68.3	70.0
クロピドール	50.0	63.1
酢酸メレンゲステロール	41.0	101.5
スルファキノキサリン	88.9	76.9
スルファクロルピリダジン	81.1	50.7
スルファジアジン	35.0	29.1
スルファジミジン	66.6	53.1
スルファジメトキシン	88.4	90.1
スルファチアゾール	45.4	41.6
スルファドキシン	91.1	66.5
スルファニトラン	97.5	92.2
スルファピリジン	45.7	42.7
スルファメトキサゾール	87.5	62.1
スルファメトキシビリダジン	68.0	53.9
スルファメラジン	51.9	51.5
スルファモノメトキシン	81.3	55.9
ゼラノール	98.3	100.8
チアベンダゾール	71.1	67.9
5-ヒドロキシチアベンダゾール	115.7	60.5
チアンフェニコール	128.4	103.1
トリメトプリム	64.7	72.2
α-トレンボロン	92.4	102.0
β-トレンボロン	88.0	102.0
ナイカルバジン	100.3	104.6
ナリジクス酸	106.1	90.8
ピリメタミン	91.2	87.3
ピロミド酸	111.1	106.1
フルベンダゾール	99.8	103.1
レバミゾール	72.3	88.3
エンロフロキサシン	102.2	84.0
シプロフロキサシン	99.0	94.2
オフロキサシン	96.7	74.5
オルビフロキサシン	95.9	88.6
サラフロキサシン	106.4	87.0
ジフロキサシン	98.1	79.3
ダノフロキサシン	75.8	88.2
ノルフロキサシン	112.7	83.9
フルメキン	107.5	83.1

*マトリックス添加標準液/溶媒標準液(ピーク面積比)