広島市衛研年報 36, 29-33(2017)

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，動物用医薬品，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)]，その他の動物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雑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℃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℃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。

試験溶液はメンブ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で行った。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-トレンボロン，β-トレンボロンは，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℃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 0.01ppm で 8 化合物，添加濃度 0.1ppm で 2 化合物で真度が目標値の 70%を下回った。

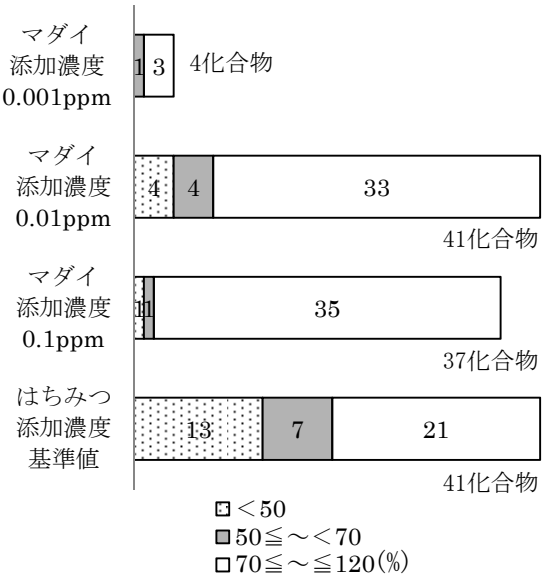

図 1　試料別回収率(真度)の分布

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

分析対象化合物	基準値 (ppm)	定量限界 (ppm)	添加濃度 0.001ppm 真度 (%)	添加濃度 0.001ppm 併行精度 (RSD%)	添加濃度 0.001ppm 室内精度 (RSD%)	添加濃度 0.01ppm 真度 (%)	添加濃度 0.01ppm 併行精度 (RSD%)	添加濃度 0.01ppm 室内精度 (RSD%)	判定
目標値			70～120	30＞	35＞	70～120	25＞	30＞	
酢酸メレンゲステロール		0.001	57.2	16.7	60.6	37.0	6.4	31.9	×
ゼラノール	0.002	0.0005	91.7	4.7	12.4	94.3	4.9	4.9	○
α-トレンボロン	N.D.	0.002	104.5	9.9	21.0	94.6	5.8	14.9	○
β-トレンボロン		0.002	102.9	8.5	15.1	93.8	7.5	15.6	○
適合化合物数									3

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)	定量限界 (ppm)	添加濃度 0.01ppm 真度 (%)	添加濃度 0.01ppm 併行精度 (RSD%)	添加濃度 0.01ppm 室内精度 (RSD%)	添加濃度 0.1ppm 真度 (%)	添加濃度 0.1ppm 併行精度 (RSD%)	添加濃度 0.1ppm 室内精度 (RSD%)	判定
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	○
クロピドール		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	○
スルファピリジン		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	○
適合化合物数									30

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 併行精度(RSD%)	目標値 室内精度(RSD%)	判定
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＞	○
エトパベート		0.01	0.01	87.2	1.9	9.8	25＞	30＞	○
オキソリニック酸		0.01	0.01	73.7	6.3	16.0	25＞	30＞	○
オルメトプリム		0.02	0.02	84.8	3.6	5.8	15＞	20＞	○
クロピドール		0.01	0.01	64.4	5.4	5.4	25＞	30＞	×
酢酸メレンゲステロール		0.001	0.001	97.5	21.1	25.2	30＞	35＞	○
スルファキノキサリン		0.01	0.01	35.6	11.6	54.3	25＞	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＞	×
スルファジアジン		0.01	0.01	14.6	16.8	97.8	25＞	30＞	×
スルファジミジン		0.01	0.01	23.6	22.5	41.2	25＞	30＞	×
スルファジメトキシン		0.01	0.01	44.2	9.9	34.3	25＞	30＞	×
スルファチアゾール		0.01	0.01	13.8	29.8	84.6	25＞	30＞	×
スルファドキシン		0.01	0.01	41.7	7.3	16.9	25＞	30＞	×
スルファニトラン		0.01	0.01	101.2	19.0	19.0	25＞	30＞	○
スルファピリジン		0.01	0.01	11.5	80.1	230.7	25＞	30＞	×
スルファメトキサゾール		0.01	0.01	46.9	9.4	40.8	25＞	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＞	×
スルファメラジン		0.01	0.01	26.6	12.2	42.4	25＞	30＞	×
スルファモノメトキシン		0.01	0.01	15.3	18.7	61.5	25＞	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	0.01	54.5	6.2	11.0	25＞	30＞	×
5-ヒドロキシチアベンダゾール		0.01	0.01	26.6	6.5	31.0	25＞	30＞	×
チアンフェニコール		0.01	0.01	101.0	4.5	8.5	25＞	30＞	○
トリメトプリム		0.02	0.02	81.5	2.0	5.4	15＞	20＞	○
α-トレンボロン	N.D.	0.002	0.002	79.0	8.4	16.4	25＞	30＞	○
β-トレンボロン		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＞	×
ナリジクス酸		0.01	0.01	90.8	7.4	8.9	25＞	30＞	○
ピリメタミン		0.02	0.02	89.6	1.9	4.3	15＞	20＞	○
ピロミド酸		0.01	0.01	94.8	2.5	5.6	25＞	30＞	○
フルベンダゾール		0.01	0.01	78.4	2.1	8.6	25＞	30＞	○
レバミゾール		0.01	0.01	77.9	4.4	6.0	25＞	30＞	○
エンロフロキサシン		0.01	0.01	71.1	5.1	-	25＞	30＞	○
シプロフロキサシン		0.01	0.01	78.0	11.9	-	25＞	30＞	○
オフロキサシン		0.01	0.01	59.0	6.5	-	25＞	30＞	×
オルビフロキサシン		0.01	0.01	61.1	9.1	-	25＞	30＞	×
サラフロキサシン		0.01	0.01	62.3	4.7	-	25＞	30＞	×
ジフロキサシン		0.01	0.01	72.6	8.0	-	25＞	30＞	○
ダノフロキサシン		0.01	0.01	74.0	20.1	-	25＞	30＞	○
ノルフロキサシン		0.01	0.01	61.0	7.7	-	25＞	30＞	×
フルメキン		0.01	0.01	77.2	4.8	-	25＞	30＞	○
適合化合物数									21

ンについては，添加濃度は0.001及び0.01ppmの2濃度，その他の化合物については0.01及び0.1ppm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0.01μg/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,試料中のきょう雑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-アミンエトパベート	90.3	85.9
オキソリニック酸	94.5	85.9
オルメトプリム	101.4	83.3
クロピドール	68.3	70.0
酢酸メレンゲステロール	50.0	63.1
スルファキノキサリン	41.0	101.5
スルファクロルピリダジン	88.9	76.9
スルファジアジン	81.1	50.7
スルファジミジン	35.0	29.1
スルファジメトキシン	66.6	53.1
スルファチアゾール	88.4	90.1
スルファドキシン	45.4	41.6
スルファニトラン	91.1	66.5
スルファピリジン	97.5	92.2
スルファメトキサゾール	45.7	42.7
スルファメトキシピリダジン	87.5	62.1
スルファメラジン	68.0	53.9
スルファモノメトキシン	51.9	51.5
ゼラノール	81.3	55.9
チアベンダゾール	98.3	100.8
5-ヒドロキシチアベンダゾール	71.1	67.9
チアンフェニコール	115.7	60.5
トリメトプリム	128.4	103.1
α-トレンボロン	64.7	72.2
β-トレンボロン	92.4	102.0
ナイカルバジン	88.0	102.0
ナリジクス酸	100.3	104.6
ピリメタミン	106.1	90.8
ピロミド酸	91.2	87.3
フルベンダゾール	111.1	106.1
レバミゾール	99.8	103.1
エンロフロキサシン	72.3	88.3
シプロフロキサシン	102.2	84.0
オフロキサシン	99.0	94.2
オルビフロキサシン	96.7	74.5
サラフロキサシン	95.9	88.6
ジフロキサシン	106.4	87.0
ダノフロキサシン	98.1	79.3
ノルフロキサシン	75.8	88.2
フルメキン	112.7	83.9
	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)

n=3