

LC-MS/MSを用いた畜水産物中動物用医薬品の 迅速一斉分析法の検討

松尾広伸, 辻村和也

長崎県では県民の健康被害を未然に防ぐために、基準値を超過した動物用医薬品が残留する畜水産物が流通しないように、平成2年度より畜水産食品の残留有害物質モニタリングを実施している。検査対象および検査項目の見直しが適宜行われており、現在は県産のマダイ、ブリおよび乳を対象に、魚類12項目、乳8項目で検査を行っている。平成21年度よりQuEChERS法を適用して前処理を行ってきたが、今回前処理の見直しを行った。これまで粉体で用いていたエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを高濃度水溶液として用いることで、秤量操作の効率化を図った。さらに、魚類において遠心操作を-10℃で行うことで、テトラサイクリン系抗生物質の回収率を約10～20%改善することができた。本分析法の妥当性評価を行ったところ、全ての項目について、真度70-120%を含む妥当性ガイドラインが示す性能パラメータを満たすことができたため、動物用医薬品の検査法として利用可能と考えられた。

キーワード：動物用医薬品、テトラサイクリン系抗生物質、LC-MS/MS、EDTA-2Na

はじめに

本県では、平成2年度より畜水産物中動物用医薬品のモニタリングを開始し、食の安心・安全のために検査を行ってきた。当センターではLC-MS/MSを用いて対象成分の一斉分析を行っており、モニタリング開始当初は、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Ⅲ（畜水産物）¹⁾」（一斉試験法Ⅲ）に則って検査を行っていたが、減圧濃縮と固相抽出の工程があることにより、検体の前処理に長時間を要しており、加えて一部の対象成分では低回収率が課題であった。平成22年より、通知試験法を含めて動物用医薬品で用いる試験法は「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²⁾」（ガイドライン）に則って妥当性評価を実施し、基準を満たすことが求められることとなったが、一斉試験法Ⅲでは低回収率のため全ての対象成分について基準を満たすことが難しいと考えられた。そこで、前処理の簡略化とガイドラインで求められている基準を満たすことを目的として、平成24年よりQuEChERS法(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)の頭文字をとって名付けられた試料前処理法)を

利用した分析法を導入した。この分析法では、溶媒等による粉碎抽出後の上清に分散固相およびEDTA-2Naによるバッチ精製を行う分析法であり、前処理の簡略化と回収率の改善を達成することができた。一方で、分散固相のキットが市販されていないことから分散固相やEDTA等複数の粉体試薬を全て秤量する必要があるため、多検体の検査においては精製工程が煩雑であり、また検体によっては高価な内部標準試薬を用いる必要があった。

そこで今回は、近年検査対象の見直しがあったことから内部標準試薬を省き、さらに精製工程の簡便化を目的として、分析法の見直しを行い、新規分析法について妥当性評価を実施したので報告する。

方法

1 試薬等

(1) 標準品

富士フィルム和光純薬株式会社製の動物用医薬品混合標準液キノロン剤、マクロライドおよびPL2-1を用いた。これらに含まれていない分析対象については富士フィルム和光純薬株式会社性の単品を用いた。

(2) その他の試薬等

- ・アセトニトリル:富士フィルム和光純薬株式会社製、LC/MS用
- ・メタノール:富士フィルム和光純薬株式会社製、LC/MS用
- ・ギ酸:富士フィルム和光純薬株式会社製、LC/MS用
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)株式会社同仁化学研究所製
- ・クエン酸:富士フィルム和光純薬株式会社製、特級
- ・リン酸水素二ナトリウム:関東化学株式会社製、特級
- ・0.2M EDTA水溶液:EDTA-2Na 37.2 gを精密に量り、精製水に溶解して正確に500 mLとする
- ・0.2M EDTAクエン酸緩衝液:EDTA-2Na 37.2 g、クエン酸6.4 g及びリン酸水素二ナトリウム13.8 gを精密に量り、精製水に溶解して正確に500 mLとする
- ・50 mLチューブ用セラミックホモジナイザー:アジレント・テクノロジー株式会社製
- ・フィルターバイアル(0.2 µm PTFE):トムソン製

(3) 混合標準原液および検量線用標準液の調製

各標準品を秤量した後、メタノールに溶かし、それらと混合標準品を混合して1 µg/mLになるように調製して混合標準原液とした。混合標準原液は適宜メタノールで希釈して、5、10、25、50、100、200 ng/mLの混合標準液を調製した。

各試料の抽出用液1 mLに対して、各混合標準液100 µLを加え、0.5、1、2.5、5、10、20 ng/mL 検量線用標準液とした。

2 分析対象

スルファメラジン(SMR)、スルファジミジン(SDD)、スルファモノメトキシシン(SMMX)、スルファジメトキシシン(SDMX)、スルファキノキサリン(SQX)、オキシテトラサイクリン(OTC)、テトラサイクリン(TC)、クロルテトラサイクリン(CTC)、スピラマイシン I (SPM)、ネオスピラマイシン I (neo-SPM)、オキシソリン酸(OA)、チアンフェニコール(TP)、チアベンダゾール(TBZ)、5-ヒドロキシチアベンダゾール(5-OH-TBZ)の内、試料の検査対象である化合物を分析対象とした。

3 試料

予め動物用医薬品が含まれていないことを確認したマダイ、ブリ、乳を用いた。マダイとブリは包丁で細切し

て均質化した。-30°Cで保管し、検査の際に解凍して用いた。また試料ごとの検査対象物質を表1に示す。

4 装置

高速液体クロマトグラフ質量分析装置はアジレント・テクノロジー株式会社製Agilent 1290 Infinity LC + 6460を用いた。

5 LC-MS/MS測定条件

- ・注入量:5 µL
- ・カラム:アジレント・テクノロジー株式会社製ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径1.8 µm)
- ・カラム温度:40°C
- ・流量:0.3 mL/min
- ・移動相:A:アセトニトリル B:0.3%ギ酸
A:B=95:5(0 min)→20:80(5 min)
→20:80(6.7 min)
- ・イオン化モード:AJS (Agilent Jet Stream)-ESI
- ・測定モード:MRM

化合物ごとのプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、フラグメンター電圧および衝突エネルギー(CE)については表2に示した。

表1. 検査対象物質

化合物	マダイ	ブリ	乳
SMR	○	○	—
SDD	○	○	○
SMMX	○	○	—
SDMX	○	○	—
SQX	○	○	—
OTC	○	○	○
TC	○	○	○
CTC	○	○	○
SPM	○	○	○
neo-SPM	○	○	○
OA	○	○	—
TP	○	○	—
TBZ	—	—	○
5-OH-TBZ	—	—	○

表2. 対象化合物のMS/MSパラメータ

化合物	Q1>Q3(定量) (m/z)	Q1>Q3(確認) (m/z)	フラグメンター 電圧(V)	CE (eV)	極性
SMR	265>92	265>108	110	25	positive
SDD	279>186	279>92	110	13	positive
SMMX	281>92	281>108	110	25	positive
SDMX	311>156	311>92	140	17	positive
SQX	301>156	301>92	140	13	positive
OTC	461>426	461>443	110	17	positive
TC	445>410	445>154	110	17	positive
CTC	479>444	479>154	110	17	positive
SPM	422>174	422>101	120	16	positive
neo-SPM	350>160	350>174	120	8	positive
OA	262>244	262>160	110	13	positive
TP	354>290	354>185	140	4	negative
TBZ	202>175	202>131	160	24	positive
5-OH-TBZ	218>191	218>147	160	24	positive

6 前処理法

妥当性評価試験に用いた前処理法を図1に示した。

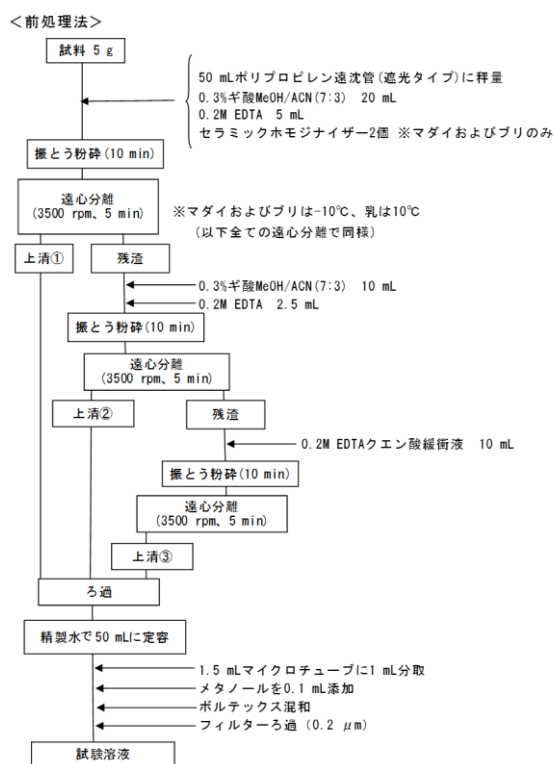


図1. 前処理法

7 妥当性評価試験

ガイドラインに則って実施した。ブリ、マダイおよび乳5 gに対して、低濃度側は混合標準原液を50 μL(試料中濃度:0.01 μg/g)、高濃度側は混合標準原液を250 μL(試料中濃度:0.05 μg/g)それぞれ添加し、30分間静置したものを妥当性評価試験用試料とした。

妥当性評価試験の性能パラメータは、選択性、定量限界、真度および精度(n=2, 2濃度、5日間)とした。

結果および考察

1 MS/MS条件の検討

MS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEはMasshunter Optimizer(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて最適化し、最も強度の高いMS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEの組み合わせを測定条件として選定した(表2)。

全ての対象化合物について、0.5~20 ng/mLの範囲内で、決定係数 $R^2 \geq 0.99$ の良好な直線性を確認した。

2 前処理方法の検討

(1) 粉砕方法の検討

試料から目的成分を抽出するために、シャフト式のホモジナイザーを用いることが一般的であるが、試料間で刃の洗浄を行う必要があるため、多検体における処理が煩雑となり、加えてコンタミネーションの恐れがある。これまで代替法としてガラスビーズでの粉砕抽出が報告されており³⁾、今回はセラミックホモジナイザーで粉砕抽出を行うことにした。

(2) 乳における抽出試薬の検討

前処理の簡便化のために、固相抽出法による精製を行わない前処理法が望ましい。既往として、3段階の振とう抽出を行う前処理法⁴⁾が報告されており、この方法を参考に、複数回数の振とう抽出を行う前処理法を検討することにした。

まず抽出溶媒の組成およびギ酸濃度の検討を行った。テトラサイクリン系抗生物質(TCs)と金属イオンのキレート形成による抽出阻害を防ぐために、EDTAの添加が有効であるとの報告⁵⁾がある。粉体を秤量して加えると、特に多検体を扱う場合、操作が煩雑になることから、2M EDTAを調製し、試液として取り扱うことで操作の簡便化を図った。抽出に用いる有機溶媒中のギ酸濃度については、0.25%が最も抽出効率が良かったという報告⁶⁾があるため、抽出溶媒全体としてほぼ同値になるように0.3%とした。抽出に用いる有機溶媒および0.2M EDTAの量については、割合を複数パターン試行し、最も全体的に回収率が良好であったことから、1回目の抽出を0.3%ギ酸メタノール/アセトニトリル(7/3)を20mL、0.2M EDTA 5 mLとし、さらに洗いを兼ねて2回目の抽出は1回目の半量として2回振とう抽出を行うことにした。

しかし5-OH-TBZについては、回収率が約40%と低回収率であった。そこで、TCsの抽出効率改善も意図して、3段階目の抽出では0.2M EDTAクエン酸緩衝液を用いたところ、回収率を改善することができた。

以上の予備検討で、乳においては、全ての対象化合物の回収率が、ガイドラインの目標値である70-

120%以内と、良好な結果が得られた。

(3) マダイおよびブリにおける抽出試薬の検討

乳の前処理方法をマダイおよびブリに適用したところ、TCsの回収率のばらつきが大きい傾向があり、さらにCTCの回収率は70%未満であった。

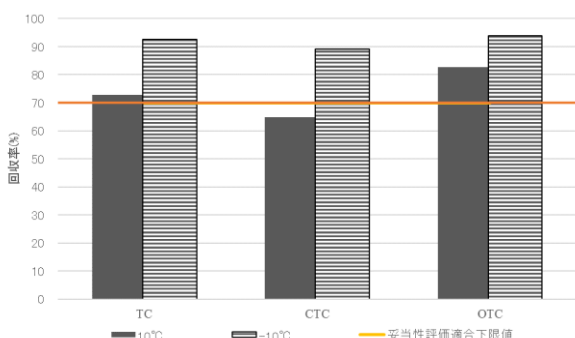


図2. 遠心時の温度の違いによるTCs回収率比較
(ブリを用いた試行回数n=2の平均値)

そこで、TCsは、温度が高いほど分解しやすいという報告⁷⁾⁸⁾があるため、低温での遠心分離を行うことで分解を抑制することを試みた。また魚中の脂質のためにイオン化が安定しないと考え、同時に低温によって脂質を固化して除去することで、ばらつきの低減を図った。乳における前処理法では、遠心分離時の温度は10°Cであったところを、-10°Cに変更して添加回収試験を行い、結果を図2に示した。両者を比較したところ、TCでは約20%、CTCでは約25%回収率が改善した。このため、乳については遠心分離の温度を10°C、マダイおよびブリについては-10°Cとして妥当性評価を行った。

3 妥当性評価

検査対象である乳8成分、マダイおよびブリ12成分について、5日間2併行で妥当性評価を行った。

(1) 選択性

ブランク試料について、定量を妨害するピークの有無を確認した。全ての試料で妨害ピークは存在しなかった。

(2) 検出限界

検体中濃度を一律基準の0.01 µg/gとなるように、ブランク試料に混合標準液を添加し、分析を行った。全ての対象化合物のピークは、ガイドラインの目標値であるSN>10を満たした。

(3) 真度および精度

結果を表3および表4に示す。全ての成分について、目標値(真度70~120%、低濃度側の併行精度<25%、高濃度側の併行精度<15%、低濃度側の室内精度<

30%、高濃度側の室内精度<20%)を満たした。

まとめ

乳、マダイおよびブリについてTCsを含む動物用医薬品の一斉分析法の見直しのため、主に抽出操作の検討を行った。

抽出操作については、操作の効率化も踏まえつつ、対象となる動物用医薬品の抽出効率改善を検討した。操作の効率化については2点改善した。1点目は抽出粉碎の際にセラミックホモジナイザーを用いることで、これにより多検体への対応性向上と、コンタミネーションのリスクの軽減が期待できる。2点目は、TCsの抽出効率向上のために用いられていたEDTAを検体ごとに秤量分取するのではなく、高濃度水溶液として分注することで、より迅速な前処理が可能となった。

また、抽出効率改善の面では、抽出溶媒の組成やギ酸濃度について検討を行い、最適と考えられる条件を選定した。さらに魚においては、TCsの分解を抑制し、併せて脂質の除去により分析のばらつきを軽減するために、遠心操作時の温度を-10°Cとすることで、TCsの添加回収率が約10~25%改善することができた。

本法の妥当性評価を行ったところ、乳8項目、マダイおよびブリ12項目の全ての対象動物用医薬品について、ガイドラインの目標値を満たした。

以上により、前処理に要する時間が軽減され、分析の簡便化・迅速化が実現できた。今年度から本法を当センターの検査法として適用しており、より効率的な検査を実施している。

参考文献

1. 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(2005年1月24日)
2. 食安発第1224号 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知:食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドラインの一部改正について(2010年12月24日)。
3. 藤田瑞香, 他:ガラスビーズ粉碎法を用いたLC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤の分析, 食品衛生学雑誌, 40, 411-415 (2008).
4. 松本理世, 他:LC/MS/MSを用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第3報), 熊本県保健環境科学研究所報, 44, 28-37 (2014).
5. 吉田絵美子, 他:乳および乳製品中のTCsを含めた動物用医薬品一斉分析の検討, 食品衛生

- 学雑誌, 50, 216-222 (2009).
6. 吉田絵美子, 他:加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法の検討, 食品衛生学雑誌, 52, 59-65 (2011).
7. 内藤宏孝:LC-MS/MSによる水環境試料中の

- TCs及びその代謝物の定量, 分析化学, 64, 25-34 (2015).
8. 河端俊治:食品衛生の立場から見た問題点, 日本水産学会誌, 28, 125-131 (1962)

表3. 妥当性評価結果(乳)

化合物	評価	乳					
		低濃度側(0.01 $\mu\text{g/g}$)			高濃度側(0.05 $\mu\text{g/g}$)		
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
SMR	—	—	—	—	—	—	—
SDD	○	96.7	3.4	7.2	98.7	1.3	13.5
SMMX	—	—	—	—	—	—	—
SDMX	—	—	—	—	—	—	—
SQX	—	—	—	—	—	—	—
OTC	○	94.8	7.5	9.0	95.2	9.2	10.6
TC	○	85.2	5.8	6.4	87.5	7.1	12.4
CTC	○	89.2	6.0	11.7	84.9	4.8	11.9
SPM	○	92.6	7.6	8.8	96.8	2.0	7.9
neo-SPM	○	94.9	4.2	6.2	100.8	3.2	8.1
OA	—	—	—	—	—	—	—
TP	—	—	—	—	—	—	—
TBZ	○	93.6	2.9	5.6	96.3	1.1	6.7
5-OH-TBZ	○	93.6	2.9	7.3	98.0	1.0	6.5

表4. 妥当性評価結果(マダイおよびブリ)

化合物	評価	マダイ						ブリ						
		低濃度側(0.01 $\mu\text{g/g}$)			高濃度側(0.05 $\mu\text{g/g}$)			低濃度側(0.01 $\mu\text{g/g}$)			高濃度側(0.05 $\mu\text{g/g}$)			
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
SMR	○	94.6	5.0	10.8	101.7	4.7	8.0	○	88.9	5.1	5.5	99.0	4.7	8.0
SDD	○	93.1	4.0	10.9	102.3	4.2	9.2	○	89.1	2.1	5.2	101.2	4.2	9.2
SMMX	○	99.6	4.2	13.3	103.8	4.6	11.7	○	81.5	5.6	7.8	98.5	4.6	11.7
SDMX	○	89.7	4.9	10.7	101.9	4.4	8.8	○	87.4	1.4	4.3	98.8	4.4	8.8
SQX	○	85.4	5.3	7.7	95.6	4.7	14.2	○	84.2	5.0	5.6	99.8	4.7	14.2
OTC	○	79.6	7.9	8.9	88.1	4.3	8.4	○	79.8	5.8	11.6	93.1	4.3	8.4
TC	○	80.5	8.7	9.1	87.4	3.1	5.1	○	75.7	2.1	6.5	87.3	3.1	5.1
CTC	○	81.5	10.2	11.0	84.2	2.3	8.0	○	75.5	3.7	7.2	80.6	2.3	8.0
SPM	○	89.7	4.7	12.0	99.5	4.4	8.0	○	91.5	2.2	5.1	96.9	4.4	8.0
neo-SPM	○	90.5	1.8	11.2	103.4	3.7	11.1	○	90.7	3.4	9.4	98.5	3.7	11.1
OA	○	89.5	3.0	6.1	98.1	4.7	6.3	○	86.6	2.6	4.9	98.8	4.7	6.3
TP	○	91.2	8.7	12.2	98.2	6.4	7.9	○	97.2	5.9	6.7	96.0	6.4	7.9
TBZ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5-OH-TBZ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Development and Validation of Rapid Analysis Method for Multi-Class Residual Veterinary Drugs in Livestock and Marine Foods by LC-MS/MS

Hironobu Matsuo, Kazunari Tsujimura

In Nagasaki Prefecture, monitoring surveys have been conducted since 1990 to monitor the distribution of foods that exceed the maximum residual standard value for the residue of veterinary drugs in livestock and

marine foods. Currently, eight milk drugs and 12 red seabream and yellowtail drugs are being monitored. Since 2009, such monitoring has been performed using the QuEChERS method as a pretreatment operation, and it has not been revised since then. Therefore, the pretreatment process in analytical methods was revised and revalidated in this study. To simplify weighing, a highly concentrated ethylenediaminetetraacetic acid solution was used instead of its powder, and centrifugation in fish was performed at -10°C , increasing the recovery rate of tetracyclines by approximately 10%–25%. Drug recovery rates ranged from 84.9% to 100.8% for milk, 79.6% to 103.8% for red seabream, and 75.5% to 101.2% for yellowtail. Relative standard deviations for repeatability were $<12.0\%$, whereas those within laboratory reproducibility were $<15.0\%$. Consequently, the revised rapid analysis method for multi-class residual veterinary drugs in milk and fish was validated following Japanese guidelines for the validation of analytical methods for residual agricultural chemicals in food, and it has been used to conduct monitoring surveys since this year.

Keywords: veterinary drugs, tetracyclines, LC-MS/MS, EDTA-2Na