

資料

広島県における動物用医薬品試験法の妥当性評価

井原 紗弥香, 中島 安基江, 新井 清

Validation of Multi-residue Method for Veterinary Drugs by LC-QTOF/MS in Hiroshima Prefecture

SAYAKA IHARA, AKIE NAKASHIMA, and KIYOSHI ARAI

(Received October 1, 2015)

当センターは食品衛生事業の中で、魚類及び食肉類の残留動物用医薬品の検査を実施している。今回、分析機器の変更に伴い、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）」[1]（以下、通知法）の一部を改良し、妥当性評価を実施した。ウナギ及び牛の筋肉を用い、現在本県が対象としている動物用医薬品17物質について検証した。その結果、それぞれ13物質について目標値を満たす良好な結果が得られた。

キーワード：動物用医薬品, 妥当性評価, LC-QTOF/MS

緒言

本県では、県民生活の安全・安心を確保するため、魚類及び食肉類の残留動物用医薬品の検査を実施している。これまで、LC-MS/MSを用いて検査を行ってきたが、機器の新規導入により、平成27年度からLC-QTOF/MSを使用した検査に移行することになった。食品衛生法に基づく収去検査を実施する際には、平成19年に通知され、平成22年に一部改正された「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」（以下、ガイドライン）[2]により、試験法の妥当性の確認が義務付けられている。

そこで、LC-QTOF/MSを用いた残留動物用医薬品分析について、通知法を改良（以下、改良法）し、妥当性評価を実施したので、その結果を報告する。

材料と方法

1 試料

平成27年度収去検査の検体として搬入されたウナギ及び牛肉を用いた。これらはフードプロセッサ等を用いて均一化した。

これらの検体には、あらかじめ動物用医薬品が残留していないことを確認のうえ妥当性評価に使用した。

2 対象動物用医薬品

対象となる動物用医薬品を表1に示した。標準品はチ

アベンダゾールはシグマアルドリッチ社製を、クロピドール、トリメトプリム、オルメトプリム、ピリメタミン、オキシリン酸及びフルベンダゾールは関東化学(株)製を、5-ヒドロキシチアベンダゾール（チアベンダゾール代謝物）、5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン（アルベンダゾール代謝物）及び α -トレンボロンは林純薬工業(株)製を、スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシン、スルファジメトキシシン、 β -トレンボロン、チアンフェニコール及びナイカルバジンは和光純薬工業(株)製を用いた。

3 分析方法

分析方法を図1に示した。

通知法の一部を改良した。すなわち、抽出液をアセトニトリルで100mLに定容し、ウナギの場合は20mL、牛の筋肉の場合は40mL分取して使用することとした。また、精製操作にC18ミニカートリッジを用いることとした。

4 装置

LC：Agilent1200（Agilent社製）

QTOF/MS：Agilent6540（Agilent社製）

5 測定条件

各物質の精密質量及び測定イオンは表1に示した。また、LC-QTOF/MSの測定条件を表2に示した。

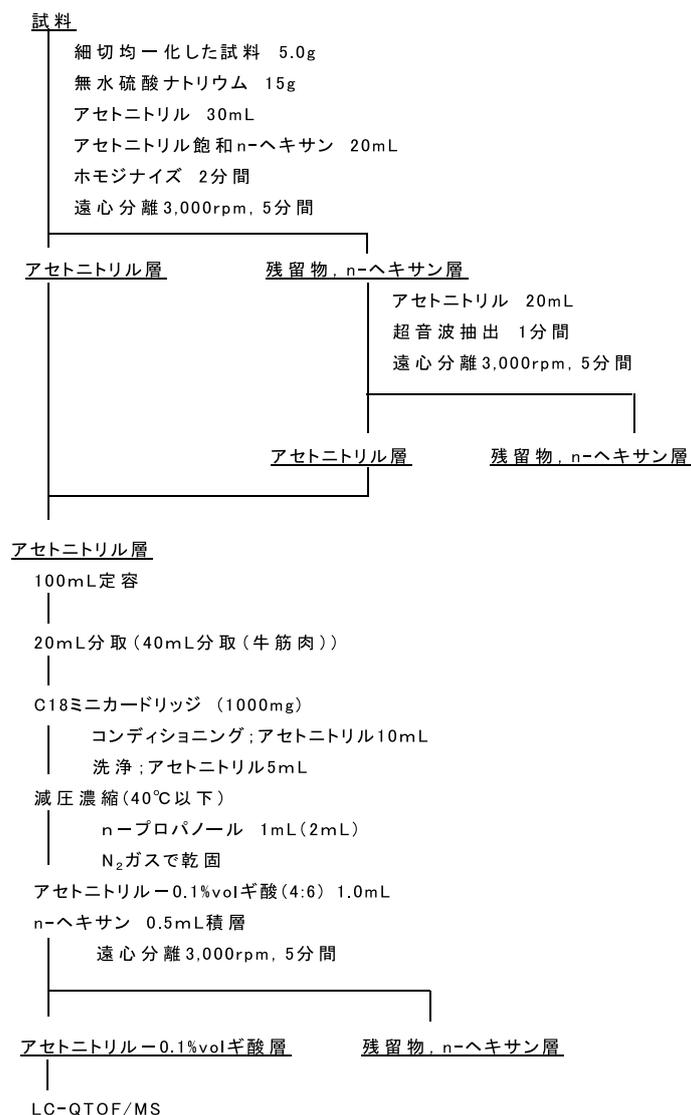


図1 分析フロー

表1 各物質の精密質量及び測定イオン

No	項目	分析対象化合物名	精密質量	イオン化 ^(注)	定量イオン
1	チアベンダゾール	チアベンダゾール	201.04	pos	202.04
		5-ヒドロキシチアベンダゾール [チアベンダゾール代謝物]	217.03	pos	218.03
2	クロピドール	クロピドール	190.99	pos	191.99 215.97
3	5-プロピルスルホニル-1H- ベンズイミダゾール-2-アミン	5-プロピルスルホニル-1H- ベンズイミダゾール-2-アミン [アルベンダゾール代謝物]	239.07	pos	240.08
4	トリメトプリム	トリメトプリム	290.14	pos	291.14
5	オルメトプリム	オルメトプリム	274.14	pos	275.15
6	スルファメラジン	スルファメラジン	264.07	pos	265.07
7	スルファジミジン	スルファジミジン	278.08	pos	279.09
8	スルファモノメトキシシ	スルファモノメトキシシ	280.06	pos	281.07
9	ピリメタミン	ピリメタミン	248.08	pos	249.09
10	オキサリニック酸	オキサリニック酸	261.06	pos	262.07
11	スルファジメトキシシ	スルファジメトキシシ	310.07	pos	311.08
12	フルベンダゾール	フルベンダゾール	313.09	pos	314.09
13	α-トレンボロン	α-トレンボロン	270.16	pos	271.16
14	β-トレンボロン	β-トレンボロン	270.16	pos	271.16
15	チアンフェニコール	チアンフェニコール	355.00	neg	353.99
16	ナイカルバジン	ナイカルバジン	426.13	neg	137.03

(注) pos:ポジティブモード
neg:ネガティブモード

表2 LC-QTOF/MSの測定条件

LC条件	
カラム	Inertsil® ODS-4 (3.0mm*150mm, 3µm, GL Sciences社製)
カラム温度	40度
流量	0.4mL/分
移動相	A液: 0.1vol% ギ酸溶液 B液: 0.1vol% ギ酸含有アセトニトリル溶液
注入量	5 µL
グラジエント条件	pos: (% B) (1) →20分 (64) →30分 (100) →35分 (100) neg: (% B) (1) →10分 (64) →15分 (100) →20分 (100)
MS条件	
イオン化モード	ESI/Agilent JetStream
キャピラリー電圧	3500V (Pos), -3500V (neg)
ドライガス温度, 流量	350°C, 10L/分 (N ₂)
フラグメンタ	100V (pos), 150V (neg)

表3 妥当性評価の性能パラメーター

妨害ピークの許容範囲			
定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲		
定量限界 ≤ 基準値 1 / 3	< 基準値濃度に相当するピークの 1 / 10		
定量限界 > 基準値 1 / 3	< 定量限界濃度に相当するピークの 1 / 3		
不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの 1 / 3		
真度及び精度の目標値			
濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.001 < ~ ≤ 0.01	70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <	70 ~ 120	10 >	15 >

6 検量線

基準値濃度を100%とし、系列を6点作成した。定量は絶対検量線法にて行った。

7 妥当性評価

妥当性評価の性能パラメーターを表3に示した。各項目について以下のようにそれぞれの目標値等に適合しているか確認した。

- (1) 選択性: ブランク試料を用い、定量を妨害するピークを確認した。
- (2) 真度 (回収率): 添加濃度は基準値とし、回収率を確認した。基準値の設定がないものは、一律基準値 (0.01µg/g) を添加した。
- (3) 精度: 分析者2名が添加試料1日1回 (2併行)、3日間分析を実施した。併行精度及び室内精度は一元配置の分散分析を用いて算出した。
- (4) 定量限界: ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピークがS/N比 ≥ 10であることを確認した。

結果及び考察

新しく導入したLC-QTOF/MSによる残留動物用医薬品の一斉分析法について、ガイドラインに従い妥当性評

価を行った。

その結果、今回の検討した17物質のうち、ガイドラインの目標値等すべて適合した物質数は、ウナギでは13物質、牛の筋肉では13物質であった (表4)。共通して目標値等に適合しなかった物質は、ピリメタミン及びナイカルバジンであった。

ウナギで目標値等に適合しなかった物質は、クロピドール、ピリメタミン、チアンフェニコール及びナイカルバジンであり、いずれも真度において70%未満もしくは120%を超え、目標値から外れていた。一方、牛の筋肉において目標値等に適合しなかった物質は、オルメトプリム、ピリメタミン、オキシリン酸及びナイカルバジンであった。オルメトプリムは真度及び室内精度の目標値を満たさず、ピリメタミン、オキシリン酸及びナイカルバジンは真度において目標値から外れていた。

以上のことから一部の物質以外において、本改良法は妥当であると評価できた。しかし、このように13物質の内訳は2検体で異なっており、他の畜水産物においても随時妥当性評価が必要であると考えられる。

つぎに、今回真度の目標値を満たさなかった物質を対象に、マトリクス効果の有無を確認するため、基準値の標準溶液とブランク試料に同濃度の標準溶液を最終段階で添加した試料の面積値を比較した。その結果、真度が70%未満であったクロピドール、オルメトプリム及びピ

表4 LC-QTOF/MSによる妥当性評価結果

No	項目	分析対象化合物名	イオン化 ^①	ウナギ						牛の筋肉							
				基準値 (mg/Kg) の評価	選択性 真度(%) の評価	併行精度 (RSD%) の評価	室内精度 (RSD%) の評価	定量限界 S/N \geq 10 の評価	妥当性評 価結果	基準値 (mg/Kg) の評価	選択性 真度(%) の評価	併行精度 (RSD%) の評価	室内精度 (RSD%) の評価	定量限界 S/N \geq 10 の評価	妥当性評 価結果		
1	チアベンダゾール	チアベンダゾール	pos	0.02	○	91.6	2.8	6.0	S/N \geq 10	○	0.1	○	101.0	4.5	5.3	S/N \geq 10	○
		5-ヒドロキシチアベンダゾール [チアベンダゾール代謝物]	pos		○	96.7	1.5	8.9	S/N \geq 10	○	0.1	○	93.4	1.6	6.3	S/N \geq 10	○
2	クロピドール	クロピドール	pos		○	54.9	2.7	9.2	S/N \geq 10	×	0.2	○	87.5	2.1	9.7	S/N \geq 10	○
3	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン [アルベンダゾール代謝物]	pos		○	97.6	3.0	9.0	S/N \geq 10	○	0.1	○	84.7	0.7	4.4	S/N \geq 10	○
4	トリメトプリム	トリメトプリム	pos	0.05	○	71.3	2.3	3.8	S/N \geq 10	○	0.05	○	94.7	1.4	2.7	S/N \geq 10	○
5	オルメトプリム	オルメトプリム	pos	0.1	○	89.1	1.1	7.6	S/N \geq 10	○	0.02	○	63.6	2.8	38.8	S/N \geq 10	×
6	スルファメラジン	スルファメラジン	pos		○	80.2	6.8	18.4	S/N \geq 10	○	0.1	○	84.9	10.1	13.4	S/N \geq 10	○
7	スルファジミジン	スルファジミジン	pos		○	79.5	7.7	10.1	S/N \geq 10	○	0.1	○	81.6	10.0	12.4	S/N \geq 10	○
8	スルファモノメトキシ	スルファモノメトキシ	pos	0.1	○	79.1	4.9	11.2	S/N \geq 10	○	0.01	○	80.4	17.4	15.9	S/N \geq 10	○
9	ピリメタミン	ピリメタミン	pos		○	60.8	2.6	12.5	S/N \geq 10	×		○	49.8	3.7	17.3	S/N \geq 10	×
10	オキシロニック酸	オキシロニック酸	pos	0.1	○	106.6	8.8	16.1	S/N \geq 10	○	0.1	○	123.5	3.2	6.9	S/N \geq 10	×
11	スルファジメトキシ	スルファジメトキシ	pos		○	77.8	7.9	17.1	S/N \geq 10	○	0.05	○	83.7	9.5	12.6	S/N \geq 10	○
12	フルベンダゾール	フルベンダゾール	pos		○	99.6	2.6	10.2	S/N \geq 10	○	0.02	○	111.0	1.6	5.1	S/N \geq 10	○
13	α -ートレンボロン	α -ートレンボロン	pos		○	97.6	8.9	7.1	S/N \geq 10	○		○	92.2	7.1	5.9	S/N \geq 10	○
14	β -ートレンボロン	β -ートレンボロン	pos		○	92.1	6.7	9.9	S/N \geq 10	○	0.002	○	96.6	12.2	18.5	S/N \geq 10	○
15	チアンフェニコール	チアンフェニコール	neg		○	181.1	7.8	11.0	S/N \geq 10	×	0.02	○	115.5	3.7	5.0	S/N \geq 10	○
16	ナイカルバジン	ナイカルバジン	neg		○	203.4	3.0	13.0	S/N \geq 10	×		○	134.7	3.3	6.8	S/N \geq 10	×

(注) pos:ポジティブモード
neg:ネガティブモード

リメタミンにおいては、マトリクスによるイオン化抑制効果が確認できた。また、真度が120%を超えたオキシロニック酸、チアンフェニコール及びナイカルバジンにおいては、マトリクスによるイオン化促進効果が確認できた。よって、これらの物質が真度の目標値を満たさなかった原因は、マトリクス効果が一要因であると推測された。

今回我々が実施した改良法は、通知法の最終溶液中の試料量を1/5もしくは2/5にすることで、マトリクス効果の低減を狙ったものである。小林らは最終定容量を20倍にした結果、マトリクス効果が低減したことを報告している[3]。しかし、改良法では真度が70~120%を外れる物質が認められることから、単に試料量を希釈するだけではマトリクス効果の十分な低減には至らなかった。また、今回評価を行ったLC-QTOF/MSでは、改良法からさらに試料溶液の希釈を行うと、定量限界の評価において不適合となる可能性もある。そのため、真度の改善には精製操作等の前処理法の改善やマトリク

ス検量線法による定量法について、さらに検討を加える必要がある。今後も分析法の検討を進め、県民の食の安全・安心の確保に寄与していきたい。

文 献

- [1] 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 (一部改正). 平成18年5月26日安発第0526001号
- [2] 厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知. 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
- [3] 小林華奈子, 八木昌子, 佐藤智. 新潟市衛生環境研究所年報. 2011, 63-65