

うなぎ蒲焼からのレバミゾール検出事例

—個別試験法の妥当性評価—

保健科学課 微量分析担当

1 はじめに

動物用医薬品や飼料添加物（以下、動医薬等）は、病気の予防や治療、飼料の品質保持等の目的で畜水産物に使用され、安定した食料の供給に寄与している。

一方、平成18年5月に食品中に残留する農薬等にポジティブリスト制度が導入され、多くの動医薬等について暫定基準（以下、一律基準）が設定された。さらに、平成22年12月に「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）が改正されたため^{1) 2)}、食品衛生法に定められた規格基準への適合性について判断を行う試験に適用されることとなった。

当所では、「高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）による畜水産物中の動物用医薬品等の一斉試験法」について、同改正通知に従い妥当性評価を実施後、収去検査で使用している³⁾。

平成27年6月、うなぎ加工品の収去検査で、中国産のうなぎ加工品から、レバミゾールが一律基準を超過して検出された。レバミゾールは寄生虫駆除剤であり、魚介に対する個別規準はないため、一律基準を超えると規格基準違反となる。そこで、この検出事例に伴い、検査方法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

違反検体：平成27年6月に収去検査で持ち込まれた、中国産のうなぎ加工品のうなぎ蒲焼を用いた。

妥当性評価試験用試料：平成27年6月に収去検査で持ち込まれた検体のうち、レバミゾールが検出されなかった国産のうなぎ加工品のうなぎ蒲焼を用いた。

2.2 試薬等

標準品：食品分析用、残留物質試験用または生化学用を使用した。レバミゾールは、和光純薬工業株式会社製のレバミゾール塩酸塩標準品（99.0%）を使用した。

0.2 μm フィルター：アドバンテック東洋（株）製 DISMIC-25HP を使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋（株）製 ろ紙5Aを使用した。ポジティブモード測定用褐色ポリプロピレン製バイアル：GLサイエンス社製 1.5mL スクリューバイアル PP褐色を使用した。

その他の試薬：HPLC用または残留農薬試験用を使用した。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 LC-MS/MS

液体クロマトグラフ：Agilent社製 1260シリーズ
質量分析装置（MS/MS）：AB SCIEX社製 TQ5500

1) 一斉試験法での条件

収去検査時に実施した一斉試験法は、前報³⁾に示した方法に準じて行った。

分析カラム：Waters 社製 Xterra MS C18
2.1mm i.d. × 50mm, 3.5 μm

移動相：A液：0.1%ギ酸，B液：アセトニトリル
グラジエント条件：表1に示した。

カラム温度：40℃

注入量：5 μL

イオン化：ESI(+)

イオンスプレー電圧：5, 500V

イオンソース温度：700℃

化合物条件：表2に示した。レバミゾール以外については前報³⁾のとおりとした。

表1 LC-MS/MSによる一斉試験法での
グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0.0	95	5	0.2
3.0	95	5	0.2
15.0	5	95	0.2
20.0	5	95	0.2
20.1	95	5	0.5
27.0	95	5	0.5
27.1	95	5	0.2
30.0	95	5	0.2

表2 LC-MS/MSによる一斉試験法での化合物条件

化合物名	モナークイオン (m/z)	**DP (V)	**CE (V)
レバミゾール	定量 204.9 > 178.1	29	28
M.W. 204.1	定性 204.9 > 91.0	79	12

**DP：Declustering Potential

**CE：Collision Energy

2) レバミゾールの妥当性評価試験での条件

分析カラム：Waters 社製 Atrantis T3
 2.1mm i.d.×50mm, 3.0μm
 移動相：A 液：0.1%ギ酸, B 液：アセトニトリル
 グラジエント条件：表 3 に示した。
 カラム温度：40℃
 注入量：5μL
 イオン化：ESI(+)
 イオンスプレー電圧：5, 500V
 イオンソース温度：600℃
 化合物条件：表 4 に示した。

表 3 LC-MS/MS によるレバミゾールの妥当性評価試験での溶離液条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0.0	90	10	0.2
15.0	90	10	0.2

表 4 LC-MS/MS によるレバミゾールの妥当性評価試験での化合物条件

化合物名	モーターイオン (m/z)	*DP (V)	*CE (V)
レバミゾール	定量 205.0>178.1	29	8
M.W. 204.1	定性 205.0>123.0	37	16

*DP : Declustering Potential

*CE : Collision Energy

2.3.2 LC/Q-TOF-MS

液体クロマトグラフ：Agilent 社製
 Agilent 1260Infinity
 質量分析装置 (Q-TOF)：Agilent 社
 6530Accurate-Mass Q-TOF

1) 確認試験での条件

分析カラム：Waters 社製 Atrantis T3
 2.1mm i.d.×100mm, 3.0μm
 移動相：A 液：0.1%ギ酸, B 液：アセトニトリル
 グラジエント条件：表 5 に示した。
 カラム温度：40℃
 注入量：5μL
 イオン化法およびキャピラリー電圧：ESI
 (Positive, 4000V)
 ネブライザ圧力：50 psi, 乾燥ガス：10L/min (280℃)
 フラグメンター電圧：180 V
 スキャン範囲：m/z 100-1000
 リファレンスマス：121.0509 および 922.0098

表 5 LC/Q-TOF-MS によるレバミゾール確認試験のグラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0.0	90	10	0.2
10.0	90	10	0.2
20.0	10	90	0.2
22.0	10	90	0.4
22.1	90	10	0.2
25.0	90	10	0.2

2.4 試験溶液の調製

試験溶液調製のフローチャートを図 1 に示す。

試料3g(50mL褐色遠沈管)

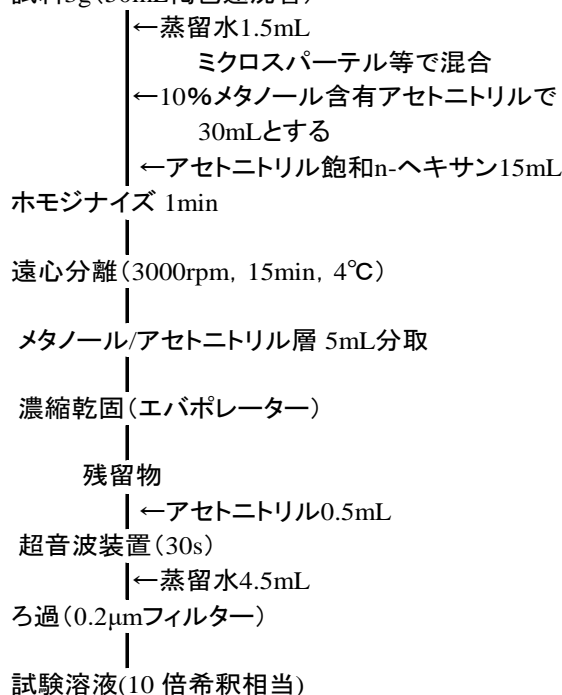


図 1 試験溶液調製のフローチャート

2.5 妥当性評価試験

うなぎ蒲焼において、一律基準濃度 0.01ppm での添加回収試験を実施者 3 名で 2 併行 2 日間行い、ガイドラインに従い選択性・真度・精度 (併行精度・室内精度) を評価した。

2.6 違反検体の検査

レバミゾールが検出された中国産のうなぎ蒲焼に対し、妥当性評価済みの試験法を用いて 5 回繰返し試験を実施すると同時に、0.01ppm での添加回収試験 (n=3) を実施した。

3 結果および考察

3.1 一斉試験法による検査結果

平成 27 年 6 月, うなぎ加工品の取査検査において, LC-MS/MS による畜水産物中の動物用医薬品等の一斉試験法で検査を実施した. その結果, 中国産のうなぎ加工品 1 検体から, レバミゾールが一律基準を超過して検出された. なお, 検出検体から, 他の化合物は検出されなかった.

化合物を確定するためには, 表 4 に示すとおり, 定量イオンに加え定性イオン確認が必要である. 図 2 に示すとおり, 検出検体の定量イオンでは, 妨害ピークは認められなかったが, 定性イオン (204.9>91.0) のピークの後ろに大きな妨害ピークが認められたため, LC 条件の及び定性イオンの検討をおこなった.

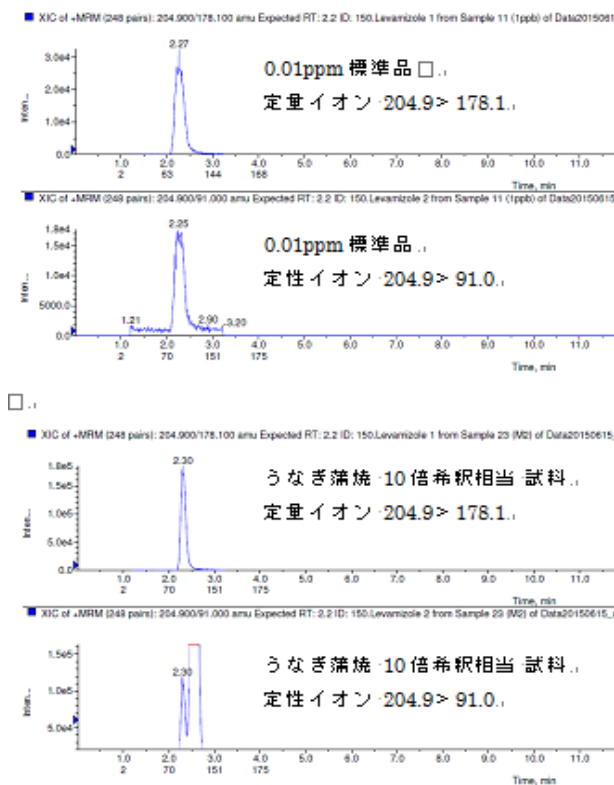


図 2 取査検査時の定量・定性イオンでの確認クロマトグラム

3.2 LC 条件及び定性イオンの検討

定性イオンと妨害ピークとの分離を検討するため, 分析カラムを酸性化合物の保持に優れた Waters 社製 Atrantis T3 に変更した. さらに, 表 4 に示すとおり, 分析開始時のアセトニトリル溶媒比率を 10% と高くすると同時に, アイソクラティック条件とし, 分析時間は試験法の妥当性評価を迅速に実施できるよう約 20 分に短縮した. その結果を図 3 に示す. 定量イオンは, 妨害ピ

ークが認められずピーク形状も良好であったが, 定性イオン (204.9>91.0) は, 妨害ピークが定性イオンピークの前に認められ, 分離も十分ではなかった.

そこで, MS/MS 条件の再検討を行った. その結果, 図 4 に示すとおり, 205.0>178.1, 205.1>123.0 のイオンはいずれも, 妨害ピークはなくピーク形状も良好であった. 従って, 205.0>178.1 を定量イオンとし, 205.1>123.0 を定性イオンとした.

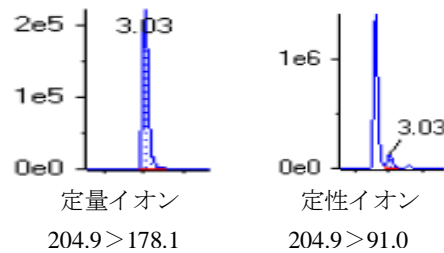


図 3 うなぎ蒲焼試料の LC 条件変更後のクロマトグラム

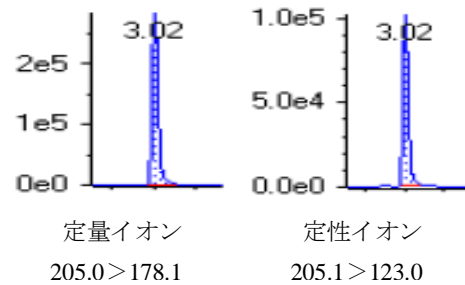


図 4 うなぎ蒲焼試料の MS/MS 条件変更後のクロマトグラム

3.3 LC-Q-TOF/MS による確認試験

レバミゾールの確認試験として, LC-Q-TOF で測定を行った.

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C11 H12 N2 S	205.0788	4.9	Find By Formula	204.072

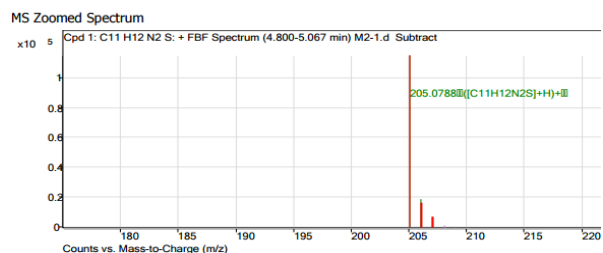
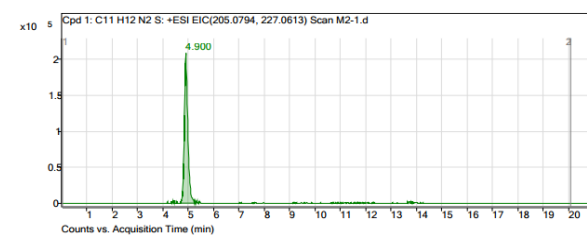


図 5 うなぎ蒲焼試料のレバミゾール分子式での抽出イオンクロマトグラムとマススペクトル

LCの溶離液は、LC-MS/MSでの測定条件と同じとしたが、グラジエント条件はLC-MS/MSでの測定条件よりも短くした。カラムについては、LC-MS/MSと同じWaters社製Atrantis T3を使用し、50mmではピーク形状が悪かったため、100mmに変更した。

違反検体の測定の結果、得られたTICから、Agilent社製の解析ソフトMass Hunterを用いて分子式(C₁₁H₁₂N₂S)を使った化合物の検出(モノアイソトピック質量: 204.072, 質量誤差: ±100ppm)を行った。その結果、図5に示すとおり、約4.9分の保持時間にレバミゾール抽出イオンを確認することができ、形状も良好であった。また、抽出イオンはレバミゾールのプロトン付加分子[M+H]⁺(m/z 205.088)であることを確認することができた。

3.4 レバミゾールの妥当性評価試験結果

LC条件を変更したことから、規格基準違反と判断するためには、変更後の試験法に対し妥当性評価が必要となった。評価を行う試験法は、違反検体からレバミゾール以外の化合物は検出されなかったことから、一斉試験法ではなくレバミゾール個別試験法とし、評価濃度は一律基準である0.01ppmとした。

レバミゾール試験法の妥当性評価試験結果を表6に示す。すべての性能パラメータは目標値に適合した。

表6 レバミゾール個別試験法の妥当性評価試験結果

評価パラメータ	検査結果	目標値等
(1) 選択性	妨害ピークなし	妨害ピークがないこと
(2) 真度(%)	89.1	70~120
(3) 併行精度(RSD%)	1.9	<25
(4) 室内精度(RSD%)	2.6	<30
(5) 定量限界	0.01ppm S/N比=117	S/N比≥10

3.5 違反検体検査結果

レバミゾールが検出された中国産のうなぎ蒲焼に対し、レバミゾール個別試験法で5回繰り返し試験を実施した。絶対検量線により定量した結果、濃度平均値は0.04ppm(RSD%=6.7)であった。さらに、一律基準0.01ppmでの添加回収試験(n=3)を実施した結果、回収率は102.5%(RSD%=5.7)と良好であった。

これらの結果から、レバミゾールが検出された中国産のうなぎ蒲焼は、一律基準を超過した規格基準違反検体であると判断した。

4 まとめ

平成27年6月、うなぎ加工品の収去検査において、LC-MS/MSによる畜水産物中の動物用医薬品等の一斉試験法で検査を実施した結果、中国産のうなぎ加工品1検体から、レバミゾールが一律基準を超過して検出された。

ところが、妨害ピークが認められたため、LC条件の検討及びMS/MS条件の再検討を行った。

また、確認試験としてLC-Q-TOF/MSにより分子式を使った化合物の検出を行ったところ、レバミゾールのプロトン付加分子を確認することができた。

LC条件を変更したことから、変更後のレバミゾール個別試験法に対し妥当性評価試験を行った結果、性能パラメータは目標値に適合した。

定量試験では、回収率(一律基準濃度0.01ppmを添加)は良好で、濃度平均値は0.04ppmであった。

これらの結果から、レバミゾールが検出された中国産のうなぎ蒲焼は、一律基準を超過した規格基準違反検体であると判断した。

文献

- 1) 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、平成19年11月15日
- 2) 厚生労働省通知食安発第1224第1号: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、平成22年12月24日
- 3) 内山賢二, 中村正規: LC-MS/MSによる畜水産物中の動物用医薬品等の一斉試験法(V), 福岡市保健環境研究所報, 37, 95-100, 2011