

LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品 および合成抗菌剤の迅速一斉分析 ()

中尾朱美・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Rapid Simultaneous Analysis of Residual Animal Drugs
and Synthetic Antibacterials in Livestock Products and Seafoods
Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry ().

Akemi NAKAO and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

畜水産食品中の残留動物用医薬品および合成抗菌剤のうち 11 薬剤 (エブリノメクチン, オキシテトラサイクリン, オクスフェンダゾール, オクスフェンダゾールスルホン, クロルテトラサイクリン, チルミコシン, テトラサイクリン, トリクロルホン, フェバンテル, フェンベンダゾールおよびフロルフェニコール) について, 当研究所で開発した LC/MS/MS による一斉分析法への適応性を検討した. 牛乳, 鶏肉, 卵, エビおよび鰻に各薬剤を 100ng/g 添加して回収試験を行った結果, エブリノメクチン, オクスフェンダゾール, オクスフェンダゾールスルホン, チルミコシン, フェバンテル, フェンベンダゾールおよびフロルフェニコールの 7 薬剤については, いずれの食品においても回収率は概ね 50% 以上で相対標準偏差は 10% 未満であり, スクリーニング試験として適応可能であった. また, トリクロルホンについては, 牛乳, 鶏肉および鰻において, オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリンおよびテトラサイクリンについては, 牛乳など一部の食品においてのみ回収率が 50% 以上となり, 食品の種類によって適応可能であった.

Key Words : 高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析 LC/MS/MS, 一斉分析 simultaneous analysis, 動物用医薬品 animal drug, 合成抗菌剤 synthetic antibacterial, 畜産食品 livestock product, 水産物 seafood

はじめに

畜水産物に使用される動物用医薬品や合成抗菌剤は生産性向上や病気の予防, 治療の目的で使用量が増加している. これら薬剤の食品中への残留が危惧される中で, 平成 7 年以降, 食品・添加物等の規格基準が改正され, 現在までに 31 品目について残留基準が設定された.

今後, ポジティブリスト制の導入に伴い, さらに食品の動物用医薬品等の残留基準が大幅に増加するため, 迅速かつ簡易なこれらの分析法が求められている.

当所では, 前報¹⁾で報告した LC/MS/MS による迅速一斉分析法を用いて, 61 薬剤についてスクリーニング検査を行っている. 今回, 残留基準が設定されている薬剤や水産物などで使用が認められている薬剤のうち検討していなかった 11 薬剤について新たに本法への適応性を検討した. なお, オクスフェンダゾール, フェバンテルおよびフェンベンダゾールについては通知法²⁾ではスルホン化してオクスフェンダゾールスルホンとして測定するが, 本法は多薬剤を一斉にスクリーニングすることを目的としているため, それぞれについてスルホン化せず

に適応性を検討した。

実験方法

1. 試料

福岡市内で市販されていた畜水産物を用いた。

2. 試薬等

標準品：検査対象薬剤は Table 1 に示すとおりで、食品分析用、残留物質試験用または生化学用を使用した。

標準原液：アセトニトリル、メタノール、水またはアセトニトリル-水で濃度50~500mg/Lを調製した。

混合標準溶液：標準原液をアセトニトリル-水(10:90)で適宜希釈し調製した。

0.2 μm フィルター：関東化学(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。

その他の試薬：HPLC 用または残留農薬試験用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent1100 シリーズを使用した。

質量分析装置 (MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。

ホモジナイザー：Kinematica 社製 PT10-35 を使用した。

超音波装置：NEY 社製 208H を使用した。

遠心機：(株)コクサン製 H103-NR を使用した。

4. 測定条件

前報¹⁾に示した方法により次のとおり行った。

1) 高速液体クロマトグラフ

分析カラム：(株)YMC 製 YMC-Pack Pro C18, 2mm i.d. × 50mm, 5μm

カラム温度：30

注入量：5 μL

移動相：A液：0.02%ギ酸, B液：アセトニトリル

グラジエント条件：

条件1 (ポジティブイオン化)

時間(min)	A液(%)	B液(%)	流速(mL/min)
0	95	5	0.2
3	95	5	0.2
15	5	95	0.2
20	5	95	0.2

条件2 (ネガティブイオン化)

時間(min)	A液(%)	B液(%)	流速(mL/min)
0	95	5	0.2
3	95	5	0.2
15	5	95	0.2
40	5	95	0.2

2) 質量分析計

条件1 (ポジティブイオン化)

イオン化：ESI, (+)

イオンスプレー電圧：5.5kV

イオンソース温度：700

化合物ごとの条件：Table 1 に示した。

条件2 (ネガティブイオン化)

イオン化：ESI, (-)

イオンスプレー電圧：-4.5kV

イオンソース温度：600

化合物ごとの条件：Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調製

前報¹⁾に示した方法により次のとおり行った。

試料 5g にアセトニトリル 30mL を加え、ホモジナイザー(牛乳の場合は5分間振とう)し、上澄み液をろ紙でろ過した。ろ液にアセトニトリル飽和 n-ヘキサン 15mL を加え振とう後、アセトニトリル層を 50mL に定容した。うち 4mL を濃縮乾固後、残留物にアセトニトリル 0.2mL を加え超音波装置に 30 秒かけた後、水 1.8mL を加え 0.2 μm フィルターでろ過し試験溶液とした。

結果および考察

1. LC/MS/MS条件の検討

イオン化はエレクトロスプレー(ESI)により、化合物によってポジティブモードまたはネガティブモードで行い、SRM を用いて分析を行った。各化合物ごとの最適条件についてはインフュージョンポンプを用いて最大感度が得られる条件を Table 1 のとおり求めた。各プレカ-サーイオンに対して、相対的に最も感度が強く得られたプロダクトイオンをモニターイオンとした。イオンスプレー電圧およびイオンソース温度などの測定中固定した条件については、前報¹⁾のとおりとした。各薬剤の検量線は 1 ~ 100ng/mL の範囲でピーク面積との相関係数 0.997 以上と良好な直線関係が得られた。

2. 添加回収試験

本法を用いて牛乳、鶏肉、卵、エビおよび鰻に各薬剤を 100ng/g 添加して回収試験を行った。Table 2 に示す

Table 1 Retention time and compound-specific MS/MS parameters of animal drugs and synthetic antibacterials

Compound	Retention Time		SRM		Declustering	Collision
	(min)		Trace(m/z)		Potential(V)	Energy(V)
(positive ionization)						
1. chlortetracycline (CTC)	10.9		479.3	443.9	46	31
2. eprinomectin (EPL)	18.9		914.4	186.3	58	27
3. febantel (FBN)	16.6		447.3	415.1	56	19
4. fenbendazole (FNB)	15.0		301.2	269.2	76	29
5. oxytetracycline (OTC)	10.8		461.2	426.2	66	29
6. oxfendazole (OXFN)	12.7		316.1	159.5	66	47
7. oxfendazole sulfone(OXFN-S)	13.7		332.2	300.1	81	31
8. tetracycline (TC)	10.9		445.2	410.2	61	29
9. trichlorfon (TCP)	11.7		257.0	127.1	46	25
10. tilmicosin(TIL)	11.4		869.8	88.3	116	107
(negative ionization)						
11.florfenicol (FLP)	12.9		356.1	335.8	- 65	- 14

Table 2 Recoveries of animal drugs and synthetic antibacterials from milk, chicken, egg, prawn and eel.

Compound	Recovery(%)					Detection Limits (ng/g)
	Milk	Chicken	Egg	Prawn	Eel	
(positive ionization)						
1. chlortetracycline (CTC)	55.7(1.2)	22.6(3.3)	1.1(47)	8.8(16)	12.9(0.8)	5(milk)
2. eprinomectin (EPL)	42.7(6.7)	96.6(8.0)	48.6(8.1)	124(11)	93.5(1.3)	25
3. febantel (FBN)	97.7(3.4)	88.0(2.2)	81.5(1.3)	80.3(0.8)	86.0(1.0)	0.1
4. fenbendazole (FNB)	57.3(2.5)	51.8(3.3)	69.3(1.0)	71.2(3.4)	59.2(5.0)	0.4
5. oxytetracycline (OTC)	53.8(1.5)	24.4(2.0)	0.5(25)	58.7(13)	19.3(0.2)	1(milk)
6. oxfendazole (OXFN)	85.7(5.2)	86.0(4.8)	86.7(1.3)	94.8(4.0)	89.5(1.8)	0.1
7. oxfendazole sulfone(OXFN-S)	111(6.8)	117(4.4)	110(2.7)	119(2.6)	122(4.3)	0.5
8. tetracycline (TC)	53.8(1.5)	33.4(3.0)	0.4(16)	69.6(7.0)	26.3(1.8)	2(milk)
9. trichlorfon (TCP)	74.2(1.8)	77.2(1.3)	7.7(132)	38.4(0.9)	81.5(4.1)	2
10. tilmicosin(TIL)	63.0(3.3)	114(9.6)	49.5(2.6)	63.7(7.8)	103(9.5)	3
(negative ionization)						
11.florfenicol (FLP)	141(5.5)	90.7(2.1)	84.4(8.7)	89.8(2.5)	91(9.1)	0.5

1) Values are mean(RSD). (n=3)

とあり、エプリノメクチン、オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン、チルミコシン、フェバンテル、フェンベンダゾールおよびフロルフェニコールの7薬剤については、いずれの食品においても回収率は概ね50%以上で相対標準偏差は10%未満であり、スクリーニング試験として適応可能であった。トリクロルホンについては、卵において7.7%、エビにおいて38.4%と回収率が悪かったが、牛乳、鶏肉および鰻においては回収率が70%以上と良好であった。オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンおよびテトラサイクリンの3薬剤については、牛乳においてのみ回収率が50%程度であり、その他の食品においては10%未満のものが多く、抽出方法の検討が必要であった。なお、いずれ

の薬剤についても定量に支障をきたすような試料由来の夾雑ピークは見られず、添加回収試験から算出した検出限界(S/N=3)はTable 2に示すとおり0.1~25ng/gであった。

文 献

- 1)中尾朱美：LC/MS/MSによる畜水産食品の残留動物用医薬品及び合成抗菌剤の迅速一斉分析，福岡市保健環境研究所報，29，80～85，2004
- 2)厚生労働省通知食安発第0722001号：食品，添加物等の規格基準の一部改正に係る食品中の残留農薬等試験法について，平成16年7月22日