

## LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の妥当性評価

山口県環境保健センター

仙代 真知子・光川 恵里・林 宏美・辻本 智美・塩田 真友

### Validation of Simultaneous Test Method I (Livestock and Fishery Products) for Veterinary Drugs, etc. by LC/MS

SENDAI Machiko, MITSUKAWA Eri, HAYASHI Hiromi, TSUJIMOTO Satomi, SHIOTA Mayu  
*Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment*

#### はじめに

山口県では、県内で生産又は流通する畜水産物について、動物用医薬品を対象に収去検査を行っている。当センターでは、厚生労働省通知の「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」（以下「HPLC I 試験法」という。）に従い、食肉等について毎年 45 検体、LC-MS/MS を用いて検査を実施してきた。

試験法について、2021 年 9 月に通知の改正があり、HPLC I 試験法が廃止され、「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」<sup>1)</sup>（以下「LC/MS I 試験法」という。）が新設された。この LC/MS I 試験法で検査を実施するにあたり、妥当性評価を行ったので報告する。

#### 方法

##### 1 試料

筋肉（鶏）、肝臓（鶏）、腎臓（牛）、鶏卵、魚介類（トラフグ）、はちみつ

##### 2 標準品

富士フィルム和光純薬(株)製の動物用医薬品混合標準液（キノロン剤、サルファ剤+葉酸代謝拮抗剤、マクロライド）（各 20 µg/mL）、フルベンダゾール標準品、フルベンダゾール代謝産物 R35475 標準品

##### 3 測定条件の検討

LC/MS I 試験法による移動相及びグラジエント条件において、C18 分析カラムの検討を行った。

##### 4 試験溶液調製及び検量線の検討

試験溶液の調製について、当センターにおける最適な条件を検討した。

検量線について、マトリックス効果（試料中の夾雑成分の影響）の確認を行った。マトリックス検量線は、各検量線濃度の 2 倍濃度の混合標準溶液に、検量線用ブランク試験溶液を等量加え調製した。検量線用ブランク試験溶液は、対象化合物が検出されない試料を用い、最終定容量を 1/2 とし、標準溶液と混合することとした。

##### 5 妥当性評価試験

試験は、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン<sup>2)</sup>に従い実施した。添加濃度は、0.01ppm（以下「低濃度」という。）及び 0.1ppm（以下「高濃度」という。）とし、2 人 2 併行 3 日間の

添加回収試験を実施した。試験結果から選択性、真度（回収率）、精度（併行精度と室内精度）及び定量限界について評価した。

## 結果及び考察

### 1 測定条件の検討

C18 分析カラム 4 種について比較し、良好なピーク形状及び感度であったものを選択した。装置及び測定条件を表 1 に示す。

表 1 装置及び測定条件

装置	Sciex 社製 HPLC : Exion LC、MS/MS : Qtrap4500
カラム	L-column3 C18 (2.1 mm×150 mm, 3 μm) 又は Inertsil ODS-4HP(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
カラム温度	40°C
移動相	A 液 : 0.1 vol%ギ酸 B 液 : 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液
グラジエント(B 液)	0-5 min (1%) → 35-40 min (100%)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 μL
イオン化法	ESI (+)
イオンソース温度	550°C又は 650°C
イオンスプレー電圧	4500 V 又は 5500 V
測定モード	MRM (個別の条件については、省略)

### 2 試験溶液調製及び検量線の検討

試験溶液の調製は、LC/MS I 試験法に従って行った（図 1）。高濃度試料は、試験溶液を 5 倍希釈した。

なお、鶏卵については、1 回目の遠心分離時に分離が不十分であったため、温度を下げ遠心力を上げたが効果が小さかったため、上層を除去後、径の細い遠沈管に移し再度遠心分離することとした。

試験開始当初、結果にばらつきが認められた。一部の試薬について、前回調整した余りを使用していたが、すべての試薬を当日調製にしたところ、改善が見られた。

器具については、化合物のガラス吸着を防ぐため、可能な範囲でガラス器具の使用を避け、試験溶液は、PP 製バイアルに充填した。

LC-MS/MS による測定では、マトリックス効果の確認をした。溶媒検量線とマトリックス検量線（濃度 2~20 ng/mL）を比較したところ、一部の化合物においてイオン化抑制が認められた（図 2）。そのため、検量線は、正確に定量できるようにマトリッ

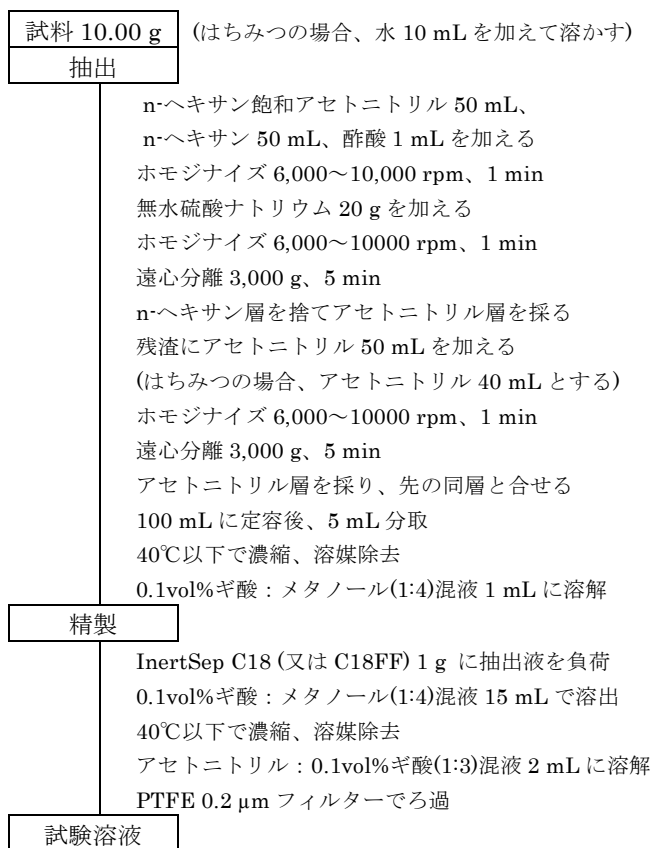


図 1 試験溶液調製法の概要

クス検量線とした。マトリックス検量線は、低濃度用と高濃度用の 2 種類調製し、濃度は、直線性が確認できた範囲（1 又は 2.5～10 ng/mL）とした。

なお、高濃度試料については、試験溶液を 5 倍希釈しているため、マトリックスの影響が低減され、イオン化抑制はほとんど見られなかった。

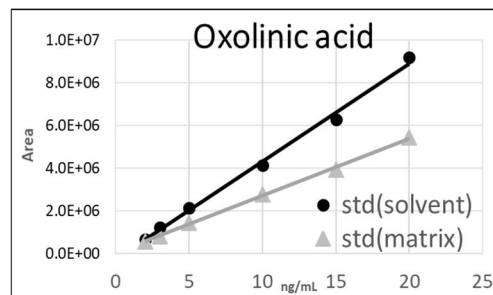


図 2 検量線の比較

### 3 妥当性評価試験

検討した 42 化合物のうち 5 化合物については、定量限界濃度における標準溶液のピークの S/N 比が 10 未満又は検量線の直線性が 0.99 未満であった。これらを除く 37 化合物について、ガイドラインに基づき評価を行った。全対象において、選択性は目標値を満たし、定量限界濃度（低濃度の添加試料）のピークは、S/N 比が 10 以上であることを確認した。各食品の評価適合化合物数は、筋肉（鶏）：27、肝臓（鶏）：7、腎臓（牛）30、鶏卵：30、魚介類（トラフグ）：33、はちみつ：10 であった。この結果は、厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課が公表している評価結果<sup>3)</sup>と比較し大差なかった。個別の真度、併行精度及び室内精度の結果は、表 2 に示す（表中の「-」は、ピーク形状、検量線の直線性及び感度等が不良で対象外としたもの）。

### まとめ

畜水産物 6 種類、各 37 化合物について、LC/MS I 試験法の妥当性評価を行ったところ、平均 21 化合物が適合となり、おおむね良好な結果であった。また、従来の HPLC I 試験法の平均 13 化合物（対象化合物は一部異なる）と比較し、検査化合物数が増加した。

### 参考文献

- 1) 厚生労働省「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」第 2 章一斉試験法 LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）（令和 3 年 9 月 6 日付け生食発 0906 第 1 号）
- 2) 厚生労働省「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」（平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号）
- 3) 医薬・生活衛生局 食品基準審査課「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の妥当性評価試験結果（平成 26～28 年度）」（令和 3 年 9 月）

表 2 結果詳細 添加濃度:上段 0.01ppm、下段 0.1ppm、真度(%）、併行精度(RSD%)、室内精度(RSD%)

化合物名	筋肉(鶏)			肝臓(鶏)			腎臓(牛)			鶏卵			魚介類(トラフグ)			はちみつ		
	真度	併行	室内	真度	併行	室内	真度	併行	室内	真度	併行	室内	真度	併行	室内	真度	併行	室内
オキソリニック酸	87	14	15	79	16	19	100	5	7	105	11	26	99	7	10	94	18	19
	79	6	7	78	7	8	95	2	5	87	11	14	100	6	7	99	5	8
オフロキサシン	62	12	17	69	10	15	82	4	5	88	7	27	79	6	15	23	15	48
	72	9	10	76	5	7	93	4	6	74	6	12	90	5	7	35	17	19
オルピフロキサシン	67	5	9	71	12	13	89	4	5	83	6	8	85	6	9	81	7	12
	77	6	6	83	5	8	95	2	3	88	6	7	93	4	5	92	5	7
オルメトプリム	74	5	9	61	7	21	96	2	5	94	10	14	95	5	9	70	7	12
	74	7	8	70	4	18	97	3	6	92	6	7	96	4	5	79	6	7
サラフロキサシン	56	14	19	54	12	14	80	15	15	77	7	18	72	7	12	53	9	29
	72	6	9	75	7	8	94	5	12	81	7	10	91	5	6	63	11	13
ジアベリジン	77	9	11	66	7	20	149	4	12	110	8	13	-	-	-	61	3	16
	84	6	9	82	12	14	167	8	14	106	8	9	-	-	-	70	4	10
ジフロキサシン	69	4	8	66	14	15	90	1	5	89	14	15	88	5	9	54	8	22
	76	4	9	77	6	9	95	2	5	82	8	9	98	6	7	62	12	15
スピラマイシン I	63	7	12	30	9	75	-	-	-	96	7	14	-	-	-	75	9	14
	60	8	12	40	10	52	-	-	-	100	6	6	-	-	-	74	7	12
(ネオスピラマイシン I)	46	11	11	16	30	52	-	-	-	93	5	13	-	-	-	19	7	29
	50	9	15	21	7	44	-	-	-	95	9	9	-	-	-	27	6	24
スルファエトキシピリダジン	77	8	12	53	13	30	92	3	6	75	9	16	90	7	11	53	14	27
	73	6	14	71	10	11	92	4	9	74	9	14	94	5	7	61	17	20
スルファキノキサリン	74	4	6	53	10	22	92	4	4	78	7	8	92	5	7	51	12	17
	70	7	14	89	8	10	90	5	6	80	7	11	94	2	6	56	16	19
スルファジアジン	84	7	12	60	14	14	94	5	6	86	3	21	91	8	9	54	13	29
	91	9	11	105	14	15	97	5	8	86	6	12	105	5	6	61	20	21
スルファジミジン	74	2	9	54	15	33	96	5	8	73	9	11	90	7	13	57	10	35
	70	8	11	66	9	15	94	2	8	77	6	12	96	5	7	67	9	11
スルファジメトキシン	73	7	8	57	11	24	95	2	4	84	6	6	91	6	6	57	14	19
	75	5	9	75	9	10	94	3	4	83	6	9	97	3	5	62	17	18
スルファチアゾール	73	5	7	46	15	35	94	7	8	64	10	19	97	7	10	55	35	41
	74	5	12	76	15	34	103	5	8	69	8	19	109	4	6	58	21	24
スルファドキシ	80	5	6	52	12	35	93	3	4	80	10	15	88	7	10	56	14	19
	76	5	9	72	8	12	96	2	7	79	4	8	95	4	7	61	19	23
スルファトロキサゾール	76	6	11	58	12	25	95	2	5	76	8	13	91	4	7	54	38	55
	77	5	11	78	6	9	96	3	9	81	5	11	100	4	5	54	14	14
スルファピリジン	77	7	7	52	9	32	94	6	6	72	11	20	88	8	11	56	24	25
	75	10	14	63	10	14	97	2	7	71	7	17	96	5	7	61	8	10
スルファプロモメタジンナトリウム	76	3	7	60	7	18	87	6	7	106	5	10	90	10	10	53	16	20
	90	6	16	71	10	17	90	6	7	99	10	13	97	3	4	57	35	40
スルファベンズアミド	72	4	5	56	10	20	87	2	2	70	1	10	84	9	10	54	23	28
	71	4	8	68	9	10	89	1	4	74	6	11	92	4	5	62	13	14
スルファメトキサゾール	74	5	6	58	12	27	92	2	6	78	9	12	92	4	8	55	23	29
	76	7	11	70	3	11	94	3	7	82	7	9	95	8	10	64	17	21
スルファメトキシジアジン	-	-	-	51	13	38	98	7	7	-	-	-	93	7	7	47	16	25
	-	-	-	72	10	17	96	4	9	-	-	-	97	5	8	60	19	20
スルファメトキシピリダジン	-	-	-	49	10	35	98	6	7	-	-	-	91	8	10	58	13	23
	-	-	-	70	9	12	96	4	7	-	-	-	95	4	7	64	15	17
スルファメラジン	77	9	11	57	16	31	91	3	4	71	8	12	95	5	7	53	12	28
	75	9	12	64	31	18	97	4	7	76	7	10	98	6	6	64	15	16
スルファモノメトキシン	70	3	5	54	11	25	94	2	3	79	7	11	84	5	7	52	21	23
	73	8	10	68	10	12	97	2	5	77	5	10	99	6	7	64	15	15
スルフィソキサゾール	76	6	6	54	11	24	77	4	27	76	7	9	89	8	12	56	16	22
	75	6	12	73	16	20	84	4	24	79	6	11	94	4	5	59	18	21
スルフィソミジン	84	5	14	67	10	13	90	2	3	82	3	20	90	8	9	50	19	26
	98	8	12	78	9	10	93	3	4	89	8	13	99	3	4	61	14	15
タイロシン	-	-	-	44	21	78	-	-	-	-	-	-	90	9	5	98	3	8
	-	-	-	49	9	47	-	-	-	-	-	-	96	12	12	101	4	6
チアムリン	76	4	7	70	6	10	97	2	3	93	5	6	97	3	4	91	6	6
	78	3	10	82	1	6	101	1	7	95	6	7	102	4	4	98	3	7
チルミコシン	-	-	-	61	20	36	93	2	3	-	-	-	85	6	17	82	6	11
	-	-	-	77	13	16	99	2	15	-	-	-	93	13	16	88	5	11
トリメトプリム	79	11	15	63	9	17	93	3	6	100	7	15	79	8	15	67	7	12
	81	5	5	81	7	8	92	7	8	102	7	7	90	9	14	75	3	8
ナリジクス酸	80	8	9	79	12	15	90	2	4	93	13	20	93	2	3	93	5	5
	77	5	5	81	5	7	91	3	6	82	7	9	99	2	3	95	2	2
ピリメタミン	72	4	12	64	8	18	89	2	7	86	6	9	89	4	9	91	4	11
	72	6	9	75	7	9	93	2	5	90	3	5	95	5	5	93	3	5
ピロミド酸	74	3	5	74	6	8	90	2	6	78	6	7	93	5	8	89	4	4
	76	3	5	82	8	12	94	3	3	77	5	8	101	3	3	90	4	20
フルベンダゾール	75	3	5	71	6	7	98	4	4	100	5	5	100	5	5	98	3	4
	78	3	6	84	3	5	95	2	4	96	3	4	102	2	5	99	3	5
(フルベンダゾール代謝物)	68	5	6	62	13	17	91	8	14	85	7	9	85	4	6	70	6	8
	70	4	4	76	9	11	85	4	7	87	3	6	92	6	6	75	5	8
フルメキン	81	9	12	83	13	17	97	2	3	133	24	30	95	3	4	92	6	7
	83	5	8	84	6	8	97	2	4	98	9	9	101	3	3	98	2	5
マルボフロキサシン	70	8	17	-	-	-	-	-	-	97	20	37	-	-	-	-	-	-
	78	9	10	-	-	-	-	-	-	83	13	15	-	-	-	-	-	-
ロイコマイシンA5	-	-	-	43	11	54	167	9	79	-	-	-	96	5	18	97	3	5
	-	-	-	49	54	61	220	43	97	-	-	-	108	5	20	100	2	5