

LC-MS/MS を用いた畜産物中駆虫薬の分析

柿本健作* 山口貴弘* 永吉晴奈* 山口瑞香* 尾花裕孝*

豚、牛、鶏の筋肉、牛乳および鶏卵中から 17 種の駆虫薬を分析する簡便で迅速な方法を確立した。試料からの抽出にはアセトニトリルを用い、精製には粉末状の ODS および PSA による分散固相抽出を行った。測定には高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を使用した。0.005 および 0.01 $\mu\text{g/g}$ 添加試料からの平均回収率は 70-113%、併行精度は 1-22%であった。

キーワード：畜産物、駆虫剤、分散固相抽出、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

Key words: animal livestock product, anthelmintic, dispersive solid phase extraction, LC-MS/MS

駆虫薬はその構造からベンズイミダゾール系、イミダゾール系、マクロライド系などが存在する。そのなかでベンズイミダゾール系駆虫薬は幅広い寄生虫感染に有効で、また穀物貯蔵や輸送中の防腐剤としても用いられる。我が国では食用の鳥、豚、牛に用いられ、筋肉や鶏卵、乳などにそれぞれ残留基準値が設定されている¹⁾。当所では以前より駆虫剤の 1 つであるフルベンダゾールの分析を行っているが、煩雑な液-液分配操作を行う必要がある、また回収率が良好でないことがあった。そこで今回、一律基準である 0.01 $\mu\text{g/g}$ を対象濃度に設定し、多数の駆虫剤を食品中から迅速に真度・精度良く分析することを目的とし前処理方法および液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた測定条件の検討を行った。

実験方法

1 試料および試薬

試料：大阪府内で市販されている豚肉、牛肉、鶏肉、鶏卵および牛乳を用いた。

標準品：チアベンダゾール(TBZ)、パルベンダゾール(PBZ)、プラジクアンテル(PZQ)および 5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン(NH2ABZ-SO2)は和光純薬工業(株)製、アルベンダゾ

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Determination of Anthelmintic Drugs in Livestock Products by LC-MS/MS by Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Haruna NAGAYOSHI, Mizuka YAMAGUCHI and Hirota OBANA

ール(ABZ)、オクスフェンダゾール(OFZ)、フェンベンダゾール(FBZ)、フルベンダゾール(FLU)およびレバミゾール(LVS)は関東化学(株)製、ジメトリダゾール(DMTZ)、メトロニダゾール(MNZ)およびロニダゾール(RNZ)は Dr.Ehrenstorfer 社製、フェバンテル(FEB)およびメベンダゾール(MBZ)は Riedel-de-haën 社製、オクスフェンダゾールスルフォン(OFZ-SO2)は林純薬工業(株)製、オキシベンダゾール(OXI)はシグマ社製、5-ヒドロキシチアベンダゾール(TBZ-OH)は畜水産品残留安全協議会から入手したものを使用した。各化合物の構造式を図 1 に示した。

前処理用固相：ODS は和光純薬工業(株)製ワコーシール(R)40C18 を、PSA、NH2、SCX および SAX は Varian 社製 Bondesil 粒子径 40 μm を使用した。

アセトニトリル、メタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用をそれぞれ用いた。その他の試薬は和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を用いた。

2 装置および測定条件

装置：高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100(KINEMATICA 社製)、遠心分離器は himac CR5B2(日立工機(株)製)、遠心エバポレーターは CVE-3100(東京理化学器械(株)製)、LC-MS/MS は ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE(Waters 社製)を用いた。

LC-MS/MS 測定条件

分析カラム：ACQUITY UPLC BEH C18(100 \times 2.1 mm i.d., 1.7 μm)(Waters 社製)

移動相：(A)0.1%ギ酸含有 10mM ギ酸アンモニウム
水溶液および(B)アセトニトリル

min	A%	B%
0	95	5
5	80	20
12	15	85
16	10	90

流量：0.2 mL/min

カラムオーブン：40°C

注入量：5 μ L

イオン化モード：ESI(+)

測定モード：選択反応モニタリング (SRM)

イオン源温度：120°C

キャピラリー電圧：3 kV

コーンガス流量：窒素 50 L/hr

脱溶媒ガス温度及び流量：窒素 350°C、900 L/hr

モニターイオン：化合物ごとの条件は表 1 に示した。

各化合物について SRM 測定条件最適化の際に得られたプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせの中で、最も感度の良いものを定量に、次に良かったものを定性に設定した。

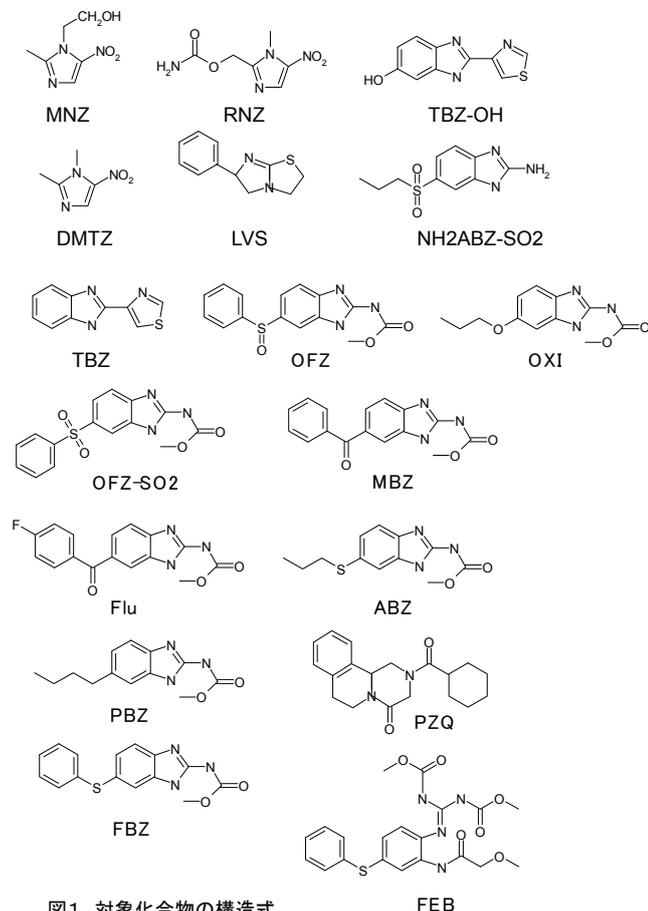


図1 対象化合物の構造式

3 試験溶液の調製

フードプロセッサーにより均一化した試料 3 g を 50 mL 容ポリプロピレン製遠沈管にひょう量し、塩化ナトリウム 3 g およびアセトニトリル 10 mL を加えホモジナイザーを用いて均質化後、3,500 rpm で 5 分間遠心分離した。上層のアセトニトリル 6 mL をあらかじめ PSA0.2 g および ODS0.5 g を入れた 15 mL 容ポリプロピレン製遠沈管に採り、30 秒間振とうし、毎分 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液を 2 mL ガラス製遠沈管に採りそこへ DMSO 60 μ L を加え遠心エバポレーターにより DMSO のみとなるまで濃縮した。そこへ 10%アセトニトリル溶液を 540 μ L 加え、0.2 μ m メンブランフィルターでろ過し試験溶液とした。このうち 5 μ L を LC-MS/MS に注入した。

4 検量線の作成

マトリックス入り標準溶液は、抽出および精製を行った各種ブランク試料溶液に対し標準溶液を濃縮前に添加し、その後通常の試験試料と同様に操作したものを 4 濃度 (0.0025, 0.005, 0.01, 0.02 μ g/mL) 調製した。各種マトリックス入り標準溶液から得た検量線の相関係数の範囲は 0.976~1.000 であった。

表1 Retention time and SRM conditions

Compound	Retention time (min)	Cone voltage (V)	Transition quantitation(m/z)	Collision energy (eV)
MNZ	3.8	20	172→128	20
RNZ	4.1	20	201→140	10
TBZ-OH	4.2	40	218→191	30
DMTZ	4.7	30	142→95	20
LVS	4.9	30	205→178	20
NH2ABZ-SO2	5.1	30	240→133	30
TBZ	5.6	40	202→175	30
OFZ	8.2	30	316→159	40
OXI	8.8	30	250→176	30
OFZ-SO2	9.0	30	332→300	20
MBZ	9.3	30	296→264	20
FLU	9.6	50	282→123	30
ABZ	9.9	30	266→234	20
PBZ	10.1	30	248→216	20
PZQ	10.5	30	313→203	20
FBZ	10.6	50	268→159	30
FEB	11.6	20	447→383	20

結果および考察

1 抽出および精製条件の検討

抽出の検討：ベンズイミダゾール系駆虫薬の抽出には特に TBZ-OH において酢酸エチルに比べてアセトニトリルが有効であるとの報告²⁾があることから今回アセトニトリルで抽出を行った。抽出時の検討には豚肉を使用した。当初抽出時に脱水目的で硫酸マグネシウムを添加したが、TBZ-OH、NH₂ABZ-SO₂ および OFZ-SO₂ で 25~40% の回収率の低下が認められたため、塩化ナトリウムの添加のみとした。

精製の検討：畜産物のほとんどは脂質を含んでおり、例えば牛かたロースは筋肉部分に脂質を 20% ほど含み、それが分析に支障をきたすことがある。そのため前処理で脂質を取り除く操作が必要となる。脱脂効果を比較検討するため、ヘキサンまたは ODS を試料抽出液に PSA とともに添加し検討を行った。ヘキサン分配による脱脂を行った場合、FBZ で試料由来成分による分析時のイオン化促進によると考えられる回収率の増大が認められた。また鶏卵試料を処理した際、ヘキサン分配したもの比べて ODS 処理を行ったものでは黄色の色素成分がより除去されていた。ヘキサン分配時に FBZ の回収率が増大したこと、鶏卵試料における色素の除去が ODS で良好であった結果を踏まえ、脱脂過程には ODS を用いることにした。

精製に ODS のみを使用した場合最終溶液に懸濁成分が生じたため、更なる精製を検討した。ODS に加えて精製に用いる固相には PSA の他に、NH₂、SAX および SCX を検討した。SAX、PSA、NH₂ は陰イオン交換能を有し、それぞれイオン保持能、交換容量に差がある。弱酸や強酸の官能基を有する夾雑物質、特に脂肪酸などの除去に有用であると考えられた。SCX は陽イオン交換能を有するので塩基性の夾雑物質の除去に効果があると考えられるがベンズイミダゾール系駆虫薬などの塩基性を有する対象物質をも保持してしまう可能性がある。それら 4 種の固相における駆虫薬の挙動を確認するため、0.005 μg/g となるように添加した豚肉試料で今回検討した。

陰イオン交換能を有する 3 種の固相では PSA と SAX の間においては顕著な差は見られなかったが、NH₂ で特に TBZ-OH の回収率(33%)が低かった。この原因と

して NH₂ と水酸基の水素結合が働いたためと考えられた。SCX については半分近くの物質で回収率 50% を下回った。これは対象物質が SCX に吸着してしまっているためと考えられた。PSA と SAX で良好な結果を示したが、PSA を使用した場合 SAX に比べて、濃縮後溶液中の食品由来残渣が少なかったため日常の検査業務において測定機器への負荷軽減を考え PSA を使用することとした。完成した前処理方法のフローチャートを図 2 に示した。

混合標準溶液を試料中濃度 0.005 μg/g となるように添加した豚肉試料から得られたクロマトグラムから Waters 社の解析ソフト Masslynx4.1 を用いて、定量限界として S/N=10 を与える各物質の試料中濃度を求めたところ、LVS で 0.00003 μg/g、TBZ-OH、OXI、PBZ および PZQ で 0.00005 μg/g、TBZ、OFZ、MBZ、ABZ、FEB で 0.0001 μg/g、MNZ、RNDZ、NH₂ABZ-SO₂、OFZ-SO₂ および FLU で 0.0005 μg/g、FBZ および PRT で 0.001 μg/g、DMTZ で 0.005 μg/g であった。

2 添加回収試験

抽出溶媒、精製方法の検討の結果、完成した分析方法を用い、妥当性評価試験（分析者 3 名、2 併行×2 日間）を行った（表 2）。対象試料は豚肉、牛乳および鶏卵試料とした。なお、牛肉および鶏肉試料については併行精度評価（6 併行）のみを行った。均一化試料に対して、0.1 μg/mL の混合標準溶液を試料中濃度 0.01 μg/g および 0.005 μg/g となるように添加した。

マトリックス入り標準溶液の検量線から得られた結果を表 2 に示した。いずれの試料においても回収率(真度)が 70%~120%（目標値）以内であった。併行再現性の相対標準偏差（併行精度）および室内再現性の相対標準偏差（室内精度）はいずれにおいても目標値（併行精度<25%、室内精度<30%）を満たしていた。

3 まとめ

LC-MS/MS を使用し、畜産物中から駆虫薬 17 種類を簡便、迅速に分析する方法を確立した。均一化した試料を 20 検体前処理するのに要する時間は約 2 時間である。抽出にはアセトニトリル、精製には ODS および PSA による分散固相抽出を用いた。試料抽出液に直接樹脂を添加することで、精製操作を迅速簡便化しカラム充填固相で起こりうるリスクの 1 つである目詰まり

表 2 Recoveries of anthelmintics from fortified livestock products using matrix matched calibration curve

Compound	Recovery, % (2 replicates, 2 days) ^{a),b)}											
	swine muscle (N=12)		hen egg (N=12)		bovine milk (N=12)		bovine muscle ^{c)} (N=6)		Chicken muscle ^{c)} (N=6)			
	added (µg/g)	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01
MNZ		104 (8,10)	95 (7,5)	96 (6,7)	87 (5,6)	95 (11,10)	93 (8,8)	90 (6)	85 (4)	77 (8)	82 (4)	
RNZ		94 (5,5)	90 (5,5)	99 (6,7)	92 (7,6)	98 (5,5)	89 (2,2)	91 (8)	81 (6)	95 (6)	87 (3)	
TBZ-OH		78 (2,3)	79 (2,3)	92 (3,3)	86 (5,5)	89 (4,4)	90 (2,3)	73 (4)	71 (2)	77 (3)	77 (2)	
DMTZ		99 (15,18)	97 (9,7)	89 (14,16)	88 (15,10)	91 (10,11)	89 (9,9)	102 (22)	97 (11)	102 (13)	98 (11)	
LVS		93 (4,5)	89 (2,4)	100 (3,4)	93 (4,4)	95 (3,3)	88 (3,4)	81 (4)	82 (2)	88 (3)	84 (2)	
NH2ABZ-SO2		84 (4,4)	78 (5,7)	91 (6,7)	87 (4,4)	94 (6,6)	84 (5,7)	73 (4)	70 (4)	88 (4)	80 (5)	
TBZ		95 (3,4)	92 (2,4)	98 (2,2)	90 (4,4)	105 (3,4)	96 (1,3)	91 (2)	89 (2)	94 (3)	92 (2)	
OFZ		93 (6,5)	84 (4,6)	94 (6,6)	88 (4,5)	93 (3,5)	91 (3,6)	89 (8)	87 (4)	89 (5)	84 (5)	
OXI		97 (3,5)	93 (4,5)	98 (3,5)	91 (5,5)	102 (4,5)	104 (3,5)	89 (3)	89 (5)	92 (6)	92 (4)	
OFZ-SO2		117 (4,10)	112 (13,17)	96 (5,6)	92 (5,8)	99 (6,5)	97 (6,5)	91 (6)	104 (11)	94 (6)	96 (9)	
MBZ		104 (6,12)	98 (6,12)	104 (7,7)	102 (5,6)	105 (5,4)	106 (5,6)	94 (8)	92 (7)	87 (9)	89 (8)	
FLU		89 (4,6)	87 (5,6)	104 (7,7)	92 (7,7)	109 (7,6)	107 (4,4)	89 (9)	91 (5)	92 (9)	85 (8)	
ABZ		91 (7,6)	90 (3,6)	98 (4,6)	89 (3,5)	111 (5,10)	113 (5,10)	82 (6)	81 (3)	88 (9)	86 (5)	
PBZ		91 (4,5)	90 (4,6)	103 (6,9)	94 (10,9)	109 (8,12)	111 (2,12)	79 (5)	76 (4)	91 (8)	92 (5)	
PZQ		90 (4,5)	89 (4,5)	101 (3,5)	93 (5,5)	103 (5,5)	96 (3,7)	85 (4)	80 (3)	88 (3)	85 (5)	
FBZ		99 (7,7)	101 (6,6)	112 (11,19)	104 (11,10)	105 (18,24)	98 (6,16)	91 (6)	88 (4)	86 (6)	89 (8)	
FEB		92 (2,3)	91 (3,4)	87 8,14)	77 (7,10)	103 (9,10)	101 (3,4)	86 (3)	78 (5)	83 (6)	80 (4)	

a) The intermediate precision study was run by three persons

b) Recovery: Mean (Repeatability relative standard deviation, intermediate reproducibility relative standard deviation) (%)

c) Only repeatability study was evaluated in bovine muscle and chicken muscle

を回避することができると考えられる。添加回収試験の結果は、妥当性評価ガイドライン³⁾を満たすものであり日常のスクリーニング検査に利用できると考えられた。

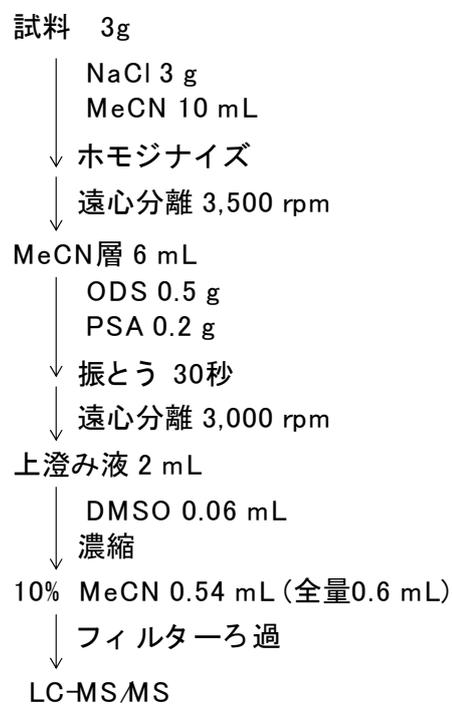


図 2 分析フロー

参考文献

- 1) 昭和 34 年厚生省告示第 370 号
- 2) Takeba, K., Fujinuma, K., Sakamoto, M., Jimbo, K., Oka, H., Ito, Y. and Nakazawa, H. : Determination of Benzimidazole Anthelmintics in Livestock Foods by HPLC, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **44**, 246-252 (2003)
- 3) 厚生労働省医薬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, 食安発第 1115001 号 (2007)