

LC/MS/MSによる畜産食品中のホルモン剤一斉分析法の検討

山口貴弘* 柿本健作* 永吉晴奈* 山口瑞香* 尾花裕孝*

畜産食品中の残留ホルモン剤の一斉分析法を高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて検討した。食肉(牛肉・豚肉・鶏肉)および牛肝臓に関して7種類のホルモン剤について一斉分析が可能になった。

キーワード: ホルモン剤、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計、畜産食品

Key words: hormones, LC/MS/MS, livestock products

ホルモン剤には天然型(エストラジオール、ヒドロコルチゾン等)と合成型(ゼラノール、トレンボロン等)があり、日本では天然型のみ繁殖用薬として使用が許可されている。しかし、海外では牛の肥育目的で合成型が使用されることがあり、海外の食肉モニタリング検査ではゼラノールが検出された。ホルモン剤は少量であっても健康被害が起こる可能性があるため、EUをはじめ日本でも低い残留基準が設定されている。

当所では、以前よりホルモン剤(α , β -トレンボロン、ゼラノール)の分析を行っているが、試料由来成分により分析が妨害されることがあった。

そこで今回、試料前処理方法の改良および検査項目の増加を目的として検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

大阪府内で市販されていた牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓を用いた。

2 試薬および器具等

2-1 標準品

メチルプレドニゾロン(MPD)はLKT Laboratories, Inc製、デキサメタゾン(DMX)、酢酸メレンゲステロール(MGS)、ベタメタゾン(BMZ)は和光純薬工業(株)製、 α , β -トレンボロン(α , β -TB)は林純薬工業(株)製、ゼラノール(ZER)は関東化学(株)製を用いた。

2-2 試薬および器具

アセトニトリル、メタノール: 関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬

n-プロパノール: 和光純薬工業(株)製試薬特級

n-ヘキサン: 和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬

水: ミリポア社製 Elix Advantage/Milli-Q Advantage A10により精製して用いた。

固相抽出カラム: アジレント社製サンプリーク OPT (60 mg)

メンブランフィルター: アドバンテック東洋(株)製

DISMIC(親水性 PTFE, 13 mm ϕ , 0.2 μ m)

ろ紙: アドバンテック東洋(株)製定量ろ紙 (5A 125mm)

3 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100(KINEMATICA 社製)、遠心分離機は himac CR5B2(日立工機(株)製)を用いた。LC/MS/MS は ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE (Waters 社製)を用いた。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Multiresidue Method for the Determination of Hormones in Livestock

Products Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

by Takahiro YAMAGUCHI, Kensaku KAKIMOTO, Haruna

NAGAYOSHI, Mizuka YAMAGUCHI and Hirota OBANA

4 LC/MS/MS 測定条件

分析カラム：Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100×2.1 mm, 1.7 μm)

カラム温度：40 °C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 μL

移動相：A 液；0.1% ぎ酸 10 mmol/L ぎ酸アンモニウム水溶液 B 液；アセトニトリル

グラジエント条件：B 20-30%(0-14 min), 30-60%(14-23 min), 60-80%(23-26 min)

イオン化モード：ESI(+/-)、イオン源温度：120 °C
脱溶媒ガス温度および流量：窒素 350 °C、900 L/hr

コーンガス流量：窒素 50 L/hr

化合物ごとの条件は表 1 に示した。

表 1 LC/MS/MS parameters for the determination of hormones

	ESI +/-	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone voltage(V)	Collision energy(eV)
MPD	+	375	161	20	25
			357		15
DMX, BMZ	+	393	355	20	15
			337		15
MGS	+	397	337	20	15
			279		25
α,β- TB	+	271	253	35	25
			199		25
ZER	-	321	277	20	25
			303		25

5 抽出および精製方法

5-1 抽出法

試料 5 g を 50 mL 遠心チューブに量り、85%アセトニトリル 25 mL を加えホモジナイズ後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清をろ紙でろ過して 100 mL 容の分液ロートに移し、残渣に 85%アセトニトリル 15 mL を加えて攪拌後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を同様にろ過して先のろ液と合わせ、n-ヘキサン 40 mL を加えて、振とう機を用いて 5 分間振とう後、静置し、下層を 100 mL ナスフラスコに採取した。n-ブロパノールを約 10 mL 加え約 40 °C で減圧濃縮した。残

留物にメタノール 0.5 mL、水 9.5 mL を順に加えて溶解した。

5-2 精製法

メタノール 3 mL、水 3 mL を通液して前処理したサンプルリク OPT(60 mg) に抽出法で得られた溶液を負荷した。カラムを 30%メタノール 5 mL で洗浄し、吸引乾燥した後、メタノール 6 mL で溶出した。溶出液は窒素気流下で濃縮乾固し、アセトニトリル - 水(1:9)混液を 1 mL 加え溶解し、メンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とした。

結果および考察

1 LC/MS/MS 条件の検討

1-1 MS/MS 条件の検討

イオン化には高感度な測定が可能であったエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を選択し、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 法で測定を行った。

1-2 LC 条件の検討

対象物質のピークが完全に分離できるようグラジエント条件の検討を行った。特にデキサメタゾンとベタメタゾン、α-トレンボロンと β-トレンボロンは異性体であり同じ分子量なのでクロマトグラフィーで分離できる条件を検討し、上記移動相条件により分離が可能となった。(図 1)

1-3 検量線および定量下限

検量線はあらかじめ対象のホルモン剤が含有していないことを確認した試料の抽出溶液を用いたマトリックス検量線を 0.005~0.1 mg/L の範囲で作成したところ、概ね決定係数 $r^2=0.98$ 以上の直線性が認められ、分析に支障がないと判断できた。定量下限値は 0.005 mg/kg とした。

2 前処理方法の検討

本研究は、当所で実施されていた牛肉中のホルモン剤検査について、項目数の増加や前処理法の改良を目的として検討を行った。従来¹⁾の方法は、逆相カラムである ODS (オクタデシルシリル基修飾シリカゲル) カートリッジカラムと弱陰イオン交換カラムである NH₂

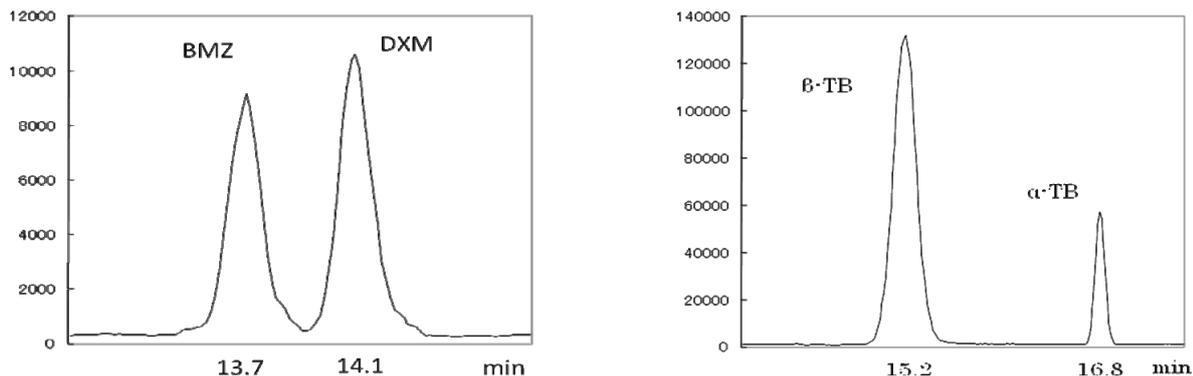


図 1 MRM chromatogram of bethamethasone, dexamethasone, α -trenbolone and β -trenbolone in standard solution containing 0.01 mg/

(アミノプロピル基修飾シリカゲル) カートリッジカラムを組み合わせた精製を行っていた。しかし、カートリッジカラムを2種類使用しコストがかかることや、LC/MS/MSで測定を行う際に、妨害となる食品由来成分の除去が不十分であった。本法では、食品由来成分の除去を目的としてポリマー系逆相カラムを検討した。数種類のポリマー系逆相カラムを検討した結果、サンプリーク OPT がもっとも回収率が良好であった。サンプリーク OPT を用いることで食品由来成分の除去が可能であることが確認できた。カラムの洗浄は、メタノール濃度を変更し検討を行った。30%メタノールではすべてのホルモン剤が流出せず、食品由来成分の除去も可能であった。メタノールで溶出した時にすべての対象物質を溶出することができた。本検討により、コスト面、迅速性および妨害成分の除去向上がサンプリーク OPT を使用することで達成することができた。

3 添加回収試験

あらかじめ対象のホルモン剤が含有していないことを確認した豚肉、鶏肉にホルモン剤 0.01 mg/kg、牛肉、牛肝臓に 0.005、0.01 mg/kg を添加し、回収率を求めた。なお α 、 β -TB については、牛肝臓では α -TB の値、牛肉では β -TB の値により残留基準値が設定されており、豚肉、鶏肉については α 、 β -TB の合算により基準値が設定されている。本研究では牛肝臓は α -TB、牛肉、豚肉、鶏肉は β -TB のみで添加回収試験を行った。各 6 検体の平均回収率は 70.4%~90.0%で、相対標準偏差(RSD)は

16.2%以下であり、厚生労働省が通知した妥当性評価ガイドライン²⁾の目標値を満たすことが確認できた。(表 2)

表 2 Recoveries of hormones from livestock products

Average recoveries% (RSD%) n=6						
	beef		beef liver		pork	chicken
conc. (mg/kg)	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01
MPD	85.6 (6.3)	75.9 (14.7)	86.3 (4.3)	90.0 (7.7)	78.8 (6.1)	80.6 (10.6)
DMX	89.1 (7.4)	88.9 (12.4)	86.9 (4.3)	84.3 (10.3)	75.7 (9.4)	85.8 (7.6)
MGS	83.6 (12.1)	78.6 (11.2)	68.0 (8.7)	74.7 (14.0)	78.1 (13.6)	75.0 (16.2)
BMZ	80.2 (8.6)	81.4 (13.5)	85.7 (6.0)	85.2 (6.7)	82.6 (13.5)	79.6 (10.5)
α -TB	—	—	81.5 (3.0)	81.5 (4.2)	—	—
β -TB	75.6 (5.6)	70.4 (6.8)	—	—	79.4 (4.3)	72.0 (13.4)
ZER	78.8 (10.1)	75.3 (13.3)	78.1 (7.5)	81.7 (7.5)	82.9 (9.6)	78.8 (12.7)

4 まとめ

以上より、本法は簡易で十分な定量精度を得られることから、日常分析法として有用であると考えられる。

しかし、ベタメタゾンについては残留基準値が低く、本分析法の定量下限値を下回っているため、行政検査として行うには今後さらに検討が必要である。

参考文献

- 1) 田口修三, 吉田精作, 田中之雄, 堀伸二郎: 二段カートリッジ固相抽出及びオンライン精製 HPLC を用いた牛肉及び牛肝臓中のトレンボロン, ゼラノールの迅速分析, 食品衛生学雑誌, **42**, 226-230 (2001)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長「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 (通知)」平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号 (2007)