

UPLC-MS/MSを用いた一斉分析法の妥当性評価結果報告

秋田県食肉衛生検査所

○児玉光司

はじめに

- ・ 当所では、通知試験法※1および簡便化した試験法（QuEChERS法※2）の併用で前処理を行ってきた

※1 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）

※2 QuEChERS法：Quick（迅速）Easy（簡単）Cheap（安価）
Effective（効果的）Rugged（堅牢性）Safe（安全）

- ・ 超高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（UPLC-MS/MS）を導入
- ・ ガイドラインを参考に妥当性評価を実施

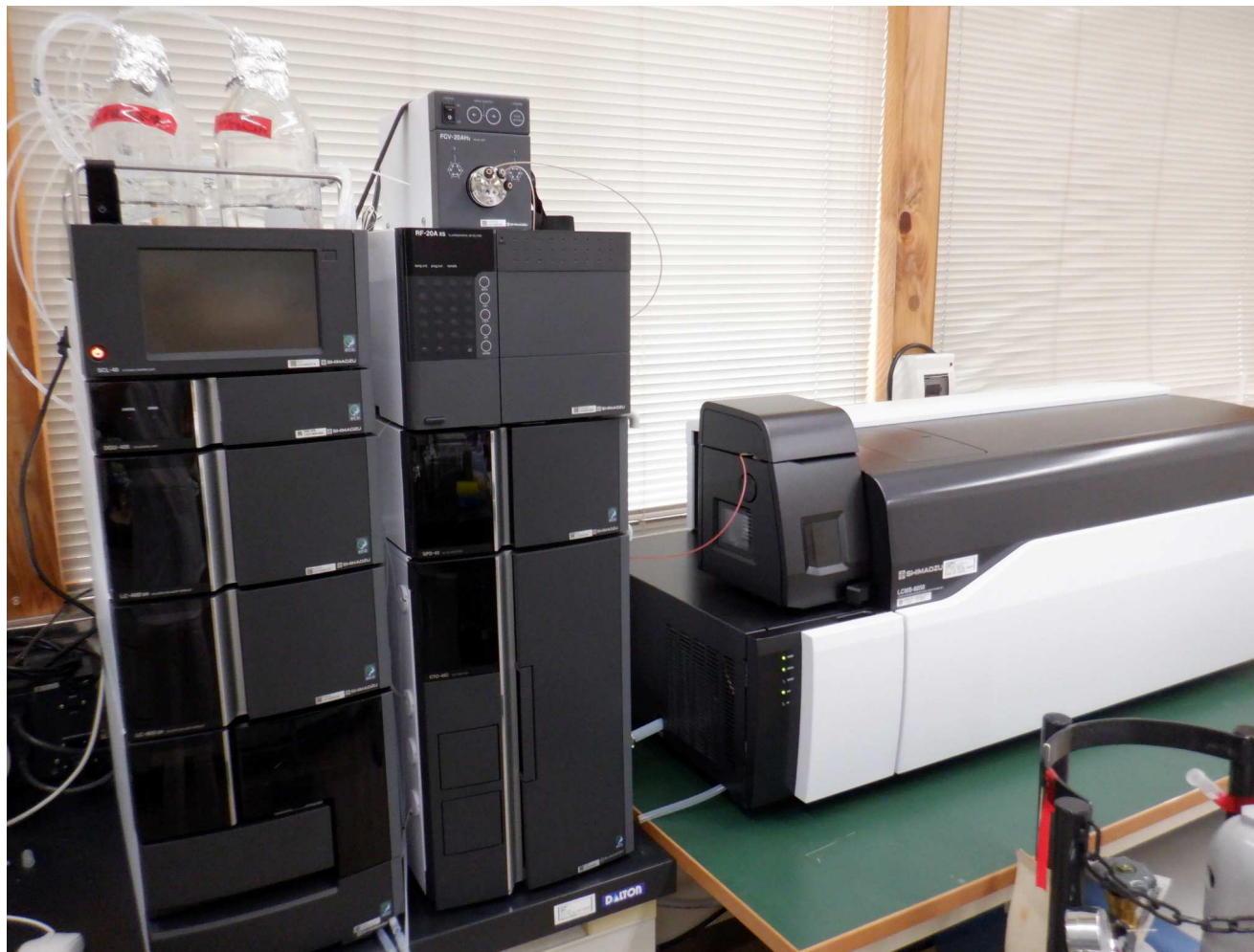
はじめに

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

評価方法

- ①選択性
- ②真度（回収率）
- ③精度
- ④定量限界

材料



UPLC部 : Nexeraシリーズ (島津製作所製)

MS/MS部 : LCMS-8050 (島津製作所製)

注入量 : 10 μ L

流速 : 0.2 mL/min

1検体の分析時間 : 約20分

材料

カラム



カラム温度: 40°C

標準品



①



②



③

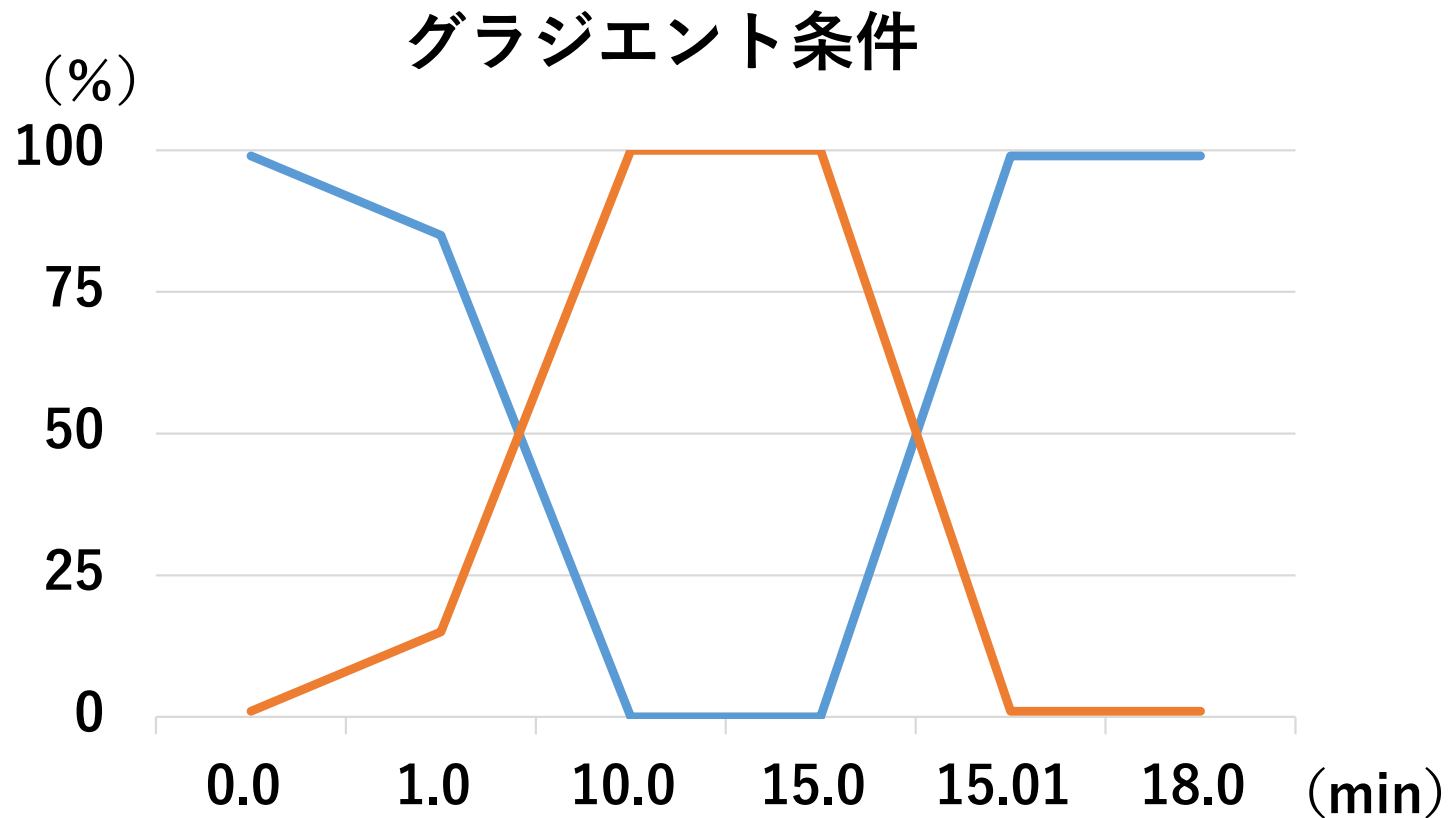
- ①PL-1-3
- ②サルファ剤 + 葉酸代謝拮抗剤
- ③キノロン剤

材料

移動相A: 0.1% Formic acid - Water

移動相B: 0.1% Formic acid - Acetonitrile

時間 (min)	0.0	1.0	10.0	15.0	15.01	18.0
移動相A (%)	99	85	0	0	99	99
移動相B (%)	1	15	100	100	1	1



方法

ブランク試験（選択性）

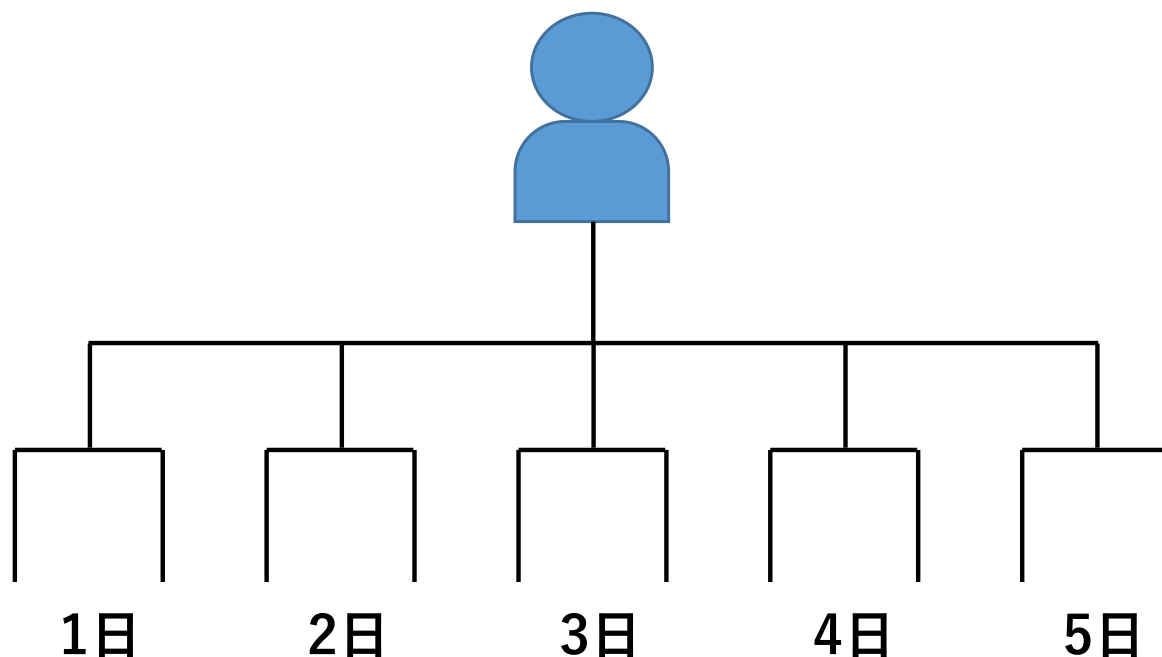
試料：豚、鶏の筋肉および腎臓 各2検体（合計8検体）

添加：無し

添加回収試験（真度・精度）

試料：豚、鶏の筋肉および腎臓 各2検体 5日間（合計40検体）

添加濃度：0.01 $\mu\text{g/g}$ （機械測定時濃度0.001 $\mu\text{g/mL}$ ）



方法(評価)

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70~120	30>	35>
0.001< ~ ≤ 0.01	5	70~120	25>	30>
0.01< ~ ≤ 0.1	5	70~120	15>	20>
0.1<	5	70~120	10>	15>

※「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」

前処理過程で0.001 ppmとなるため、 ≤ 0.001 の行で評価

方法 (前処理)

検体：2.50 g

(50 mL ポリプロピレン管 (PP))

30 μ L ギ酸

アセトニトリル 7mL

ホモジナイズ後、共洗い (アセトニトリル 3 mL (15 mL PP))

無水硫酸ナトリウム 2 g

ボルテックスで攪拌後、遠心分離 3,500 rpm (1,643 $\times$ g) 、 -5°C、 20 min

上清を50 mL PPに移し替える

水で25 mLに定容

アセトニトリル飽和n-ヘキサン 5mL (豚筋肉のみ10 mL)

ボルテックスで攪拌

遠心分離 3,500 rpm (1,643 $\times$ g) 、 -5°C、 10 min

下層 アセトニトリル水層

上層 ヘキサン層 吸引除去

1 mLをろ過 (Minisart RC 4、 0.2 μ m)

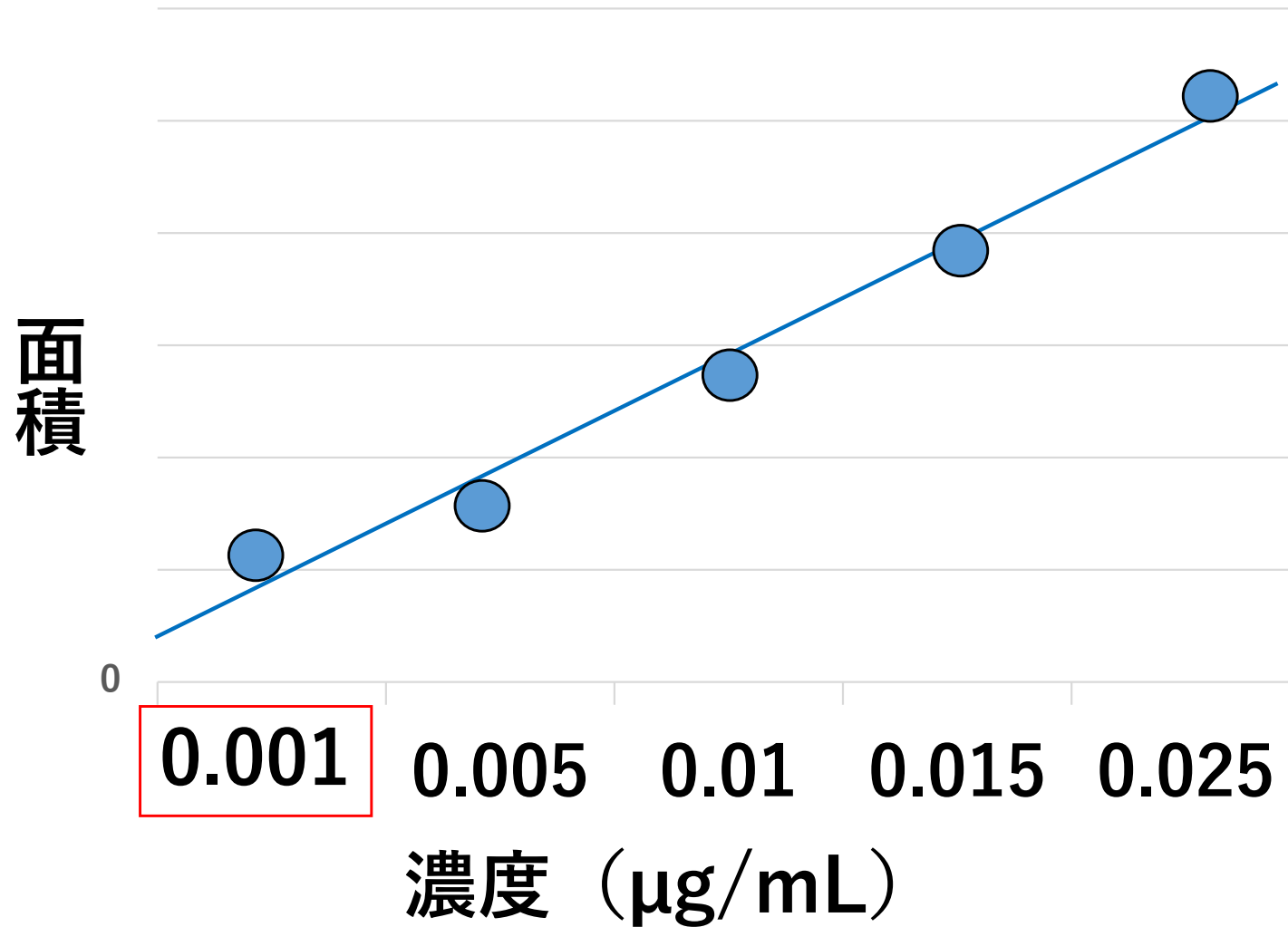
UPLC-MS/MS (試験溶液10 μ L)

方法 (前処理)

- ・ 化合物の吸着が少ないPPを使用
- ・ アセトニトリル飽和n-ヘキサン量が豚筋肉だけ違う
- ・ 10倍希釈されている
- ・ 濃縮乾固およびその後の溶出作業が無い
- ・ 通知法よりも有機溶媒の使用量が少ない

方法(添加回收試験)

絶対検量線法



方法（定量限界）

10検体の定量値が正規分布していると考え、以下のとおり推定値を算出した

検出限界	定量限界
3σ	10σ

※ σ （標準偏差）

結果

ブランク試験（選択性）

分析対象である農薬等を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認した。

添加回収試験（真度・精度）

化合物52種中

豚		鶏		計
筋肉	腎臓	筋肉	腎臓	
24	30	28	34	116

結果

添加回收試験（定量限界）

定量限界	豚筋肉	豚腎臓	鶏筋肉	鶏腎臓
平均	0.01	0.01	0.01	0.01
最大	0.023	0.021	0.032	0.032
最小	0.0044	0.0048	0.006	0.007

検出限界	豚筋肉	豚腎臓	鶏筋肉	鶏腎臓
平均	0.0025	0.0025	0.003	0.003
最大	0.0070	0.0062	0.0096	0.0096
最小	0.0013	0.0014	0.002	0.002

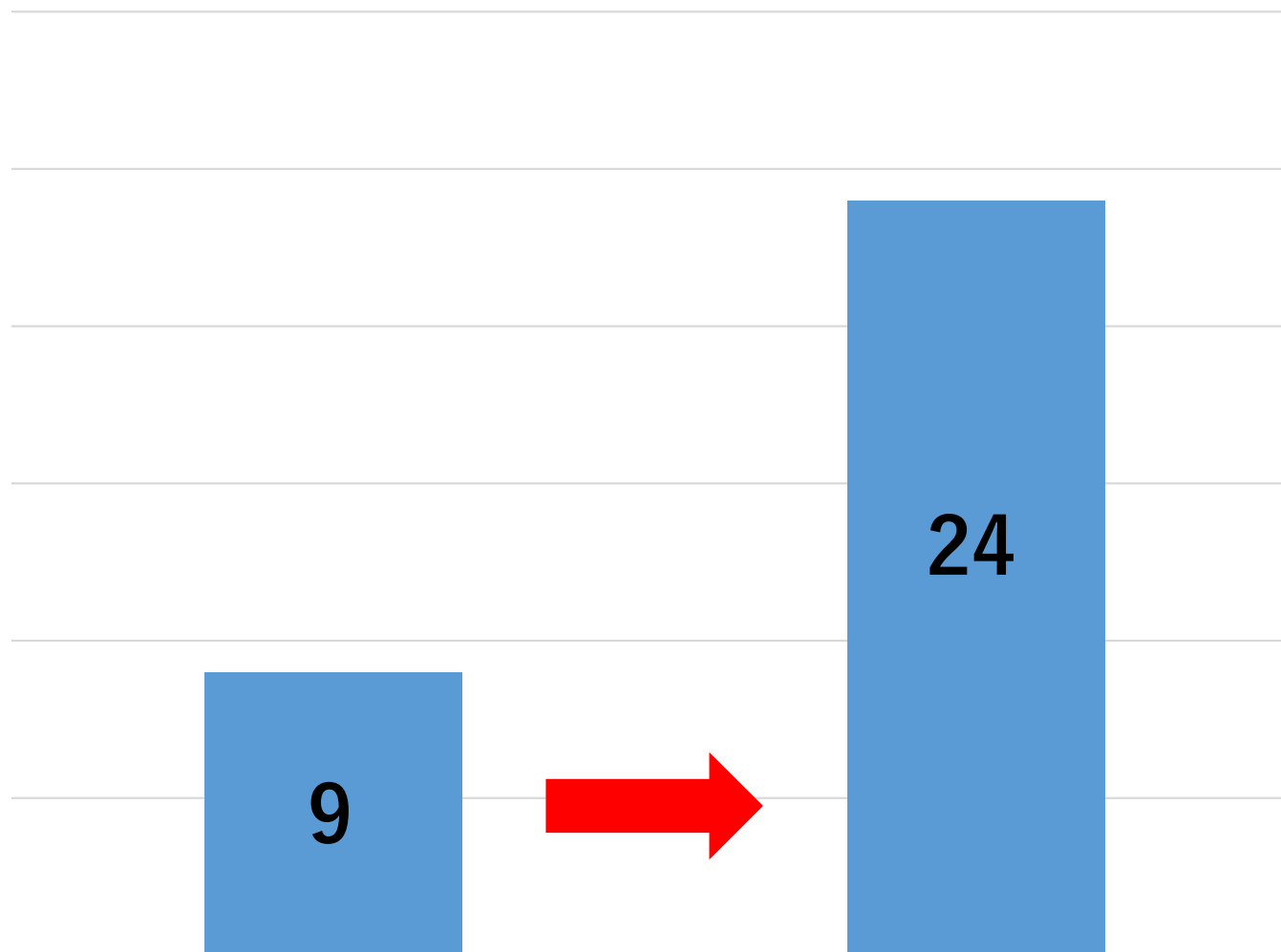
妥当性評価結果（豚筋肉）

アセトニトリル飽和n-ヘキサン

5 mL添加の場合

10 mL添加の場合

化合物数



考察

従来の検量線は0.005、0.01、0.015、0.025、0.05、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の6点で作成。

今回は、0.001 $\mu\text{g/mL}$ を新たに加え、0.05、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の2点を除いた5点で検量線を作成。結果、真度が安定した。

真度について基準を満たした数

	豚		鶏	
	筋肉	腎臓	筋肉	腎臓
6点	4	5	6	6
5点	27	25	24	27

考察

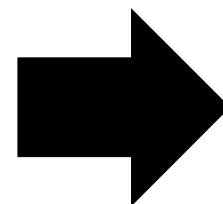
	通知法 + LC-MS	QuEChERS法 + UPLC- MS/MS
分析化合物数(※1)	85	116
分析時間 (※2)	15 h	7.5 h
有機溶媒の使用量	70 mL	15~20 mL

※1 豚および鶏の筋肉・腎臓の合計数

※2 前処理～測定終了までの時間（8検体分） 17

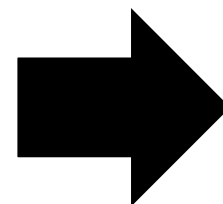
結論

分析化合物数**増加**
分析時間**短縮**



効率的な
分析

有機溶媒の
廃液**少量**



環境負荷
軽減