

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

鶏肉及びその関連製品中の抗ウイルス剤の一斉分析法の開発に関する研究

平成26年度～27年年度 総合研究報告書

研究代表者 朝倉 敬行

平成28(2016)年 5月

目 次

I . 総合研究報告

鶏肉及びその関連製品中の抗ウイルス剤の一斉分析法の開発に関する研究
(資料) 図 1 ~ 6
表 1 ~ 12

----- 1

II . 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 別紙

A. 研究目的（緒言）

1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザ（H5N1型）が流行した際、はじめてヒトへの感染が確認されたが、その後もヒトへの感染のほか、東南アジアや東アジアの養鶏場を中心に散発的な流行が報告されている。鳥インフルエンザはニワトリ、ウズラ、アヒルなどの家禽やカモやガンなどの渡り鳥がもっているA型インフルエンザウイルスによる感染症であり、鳥インフルエンザウイルスの宿主である鳥は繁殖やエサを求めて長距離を移動するため、養鶏場などへの感染が広域化する可能性がある。ヒトへ感染する可能性は極めて低いとされており、ヒトからヒトへの感染例は確認されていない。しかし、感染した場合、豚などの家畜やヒトの体内で突然変異を起こし、鳥インフルエンザが新型ヒトインフルエンザとして流行することが危惧されており、免疫を獲得していないヒトに対しての危険性が指摘されている。

鳥インフルエンザは日本においても、過去、京都府京丹波町、宮崎県新富町や日向市、岡山県高梁市、佐賀県有田町などの養鶏場で発生し、周辺養鶏場への伝播が懸念されたが迅速な殺処分により被害の拡大が防止された。このように鳥インフルエンザが発生した場合、通常は殺処分によって感染を局限し、よって周囲への伝播を阻止するという対応が最も一般的に行われる。また、治療や感染防止対策の1つとしてワクチンを投与して免疫を獲得させ、これによって感染の予防に役立てようという対応策もある。実際に2005～6年に中国で大々的に鶏などにワクチンを投与して大きな効果を上げたといわれている¹⁾。さらに抗ウイルス剤を用いて治療を行う方法も実施されている。事実、中国ではワクチン投与とほぼ同じ頃、H5N1ウイルスに効くとされた抗ウイルス剤のアマンタジンを餌に混ぜ込み広く使用された²⁾。2012年には実際に中国産鶏肉から抗ウイルス剤であるアマンタジンとリバビリンが検出され、わが国でも社会的な問題となった。しかし、これらの薬剤はわが国において動物用医薬品として指定されておらず、その残留の有無は食品衛生上大きな問題である。

抗ウイルス剤はインフルエンザウイルス

の細胞内での複製の過程を阻害することにより効果を発揮する。すなわち、ウイルスが細胞に侵入後、細胞内へのRNAの放出を行う脱殻過程を阻害する、いわゆる、M2プロトンチャンネル阻害剤としてのアマンタジン、複製されたウイルスの細胞外への遊離を促進する酵素であるノイラミニダーゼを阻害するオセルタミビルやラニナミビルなどがある。また、細胞内でのウイルスの核酸複製を妨害するRNAポリメラーゼ阻害剤としてリバビリンがあるが、インフルエンザ薬としては実用化されず、C型肝炎用として実用化された³⁾。中国産鶏肉から2種の抗ウイルス剤が検出された事例は、作用機序の異なる薬剤を組み合わせることで効果の拡大を狙ったものと考えられる。このように複数の抗ウイルス剤が用いられた事例もあり、また、アマンタジンやリバビリン以外の抗ウイルス剤が使用される可能性も否定できない。そのため、これらの抗ウイルス剤を網羅的に分析できる方法の開発が望まれている。

抗ウイルス剤の分析は、これまでは生体内の薬物の挙動に関する研究が中心であり、ヒトや動物の血清^{4),5)}、血漿^{6)~10)}、尿^{6),8),9)}、唾液⁹⁾、肝臓¹²⁾などからの分析がほとんどであり、また、単品もしくは2,3剤の投与による実験が主体である。食品からの分析法としては、Chanら¹⁴⁾によるLC-MS/MSによる分析法やBerendsenら¹⁵⁾によるLC-MS/MSによる複数の抗ウイルス剤を対象にした分析法が報告されているが、いずれも鶏筋肉のみを対象としており、加工品の唐揚げやわが国で好まれる焼き鳥などで使用される鶏の内臓部や鶏卵などは対象にしていない。国内の報告例では、著者ら¹⁶⁾が2013年11月に第106回日本食品衛生学会(沖縄)において鶏肉中のアマンタジンとリバビリンの分析法について報告したのが最初であり、その後、鶴岡ら¹⁷⁾、前田ら¹⁸⁾により、鶏肉中のアマンタジンの分析法が報告されているのみである。

そこで、本研究では、まず鶏肉及びその加工品中の抗ウイルス剤の多剤分析法について検討することとし、次いで完成した分析法の実用性についての評価を行うこととした。

第一部 多剤分析法の開発(2015 年度実施)

抗ウイルス剤の多剤分析法を開発するにあたり、すでに報告¹⁶⁾したアマンタジンとリバビリンに加え、抗インフルエンザ薬として汎用されるオセルタミビル、ザナミビル、近年、開発されたペラミビル、ラニナミビル、諸外国で使用実績のあるリマンタジンとアルビドール、さらに、その他の抗ウイルス剤として、ヘルペスウイルスに対するアシクロビル、尖圭コンジローマに対するイミキモドを加え、計 10 種の抗ウイルス剤について鶏肉及びその加工品からの分析法を検討することにした。今回取り上げた抗ウイルス剤の構造式を図 1 示した。

研究方法

1. 試料

東京都内のスーパーマーケットで購入した鶏筋肉、肝臓、鶏卵、唐揚げ、焼き鳥を試料とした。

2. 器具・試薬

標準品：

リバビリン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業(株)製)

アシクロビル標準品：純度 99% (和光純薬工業(株)製)

アルビドール標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

オセルタミビルリン酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

イミキモド標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

1-(1-アダマンチル)エチルアミン塩酸塩(リマンタジン塩酸塩)標準品：純度 99.9% (Sigma Aldrich 社製)

1-アダマンタナミン(アマンタジン)標準品：純度 99.7% (和光純薬工業(株)製)

1-ペラミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

ラニナミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

ザナミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

リバビリン-¹³C₅ 標準品：純度 98%

(Tronto Research Chemicals 社製)

アシクロビル-*d*₄ 標準品：純度 97% (Tronto Research Chemicals 社製)

オセルタミビル-*d*₃ リン酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

リマンタジン-*d*₄ 塩酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

1-アミノアダマンタン-2, 2, 2', 2', 2'', 2''-*d*₆ (アマンタジン *d*₆)

(C/D/N Isotopes 社製)

ザナミビル-¹³C, ¹⁵N₂ 標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

標準原液：リバビリン、アルビドール、オセルタミビル、リマンタジンおよびアマンタジンについては、それぞれ 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

アシクロビルおよびイミキモドは、それぞれ 10 mg 精秤し、DMSO に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ペラミビルおよびラニナミビルは、それぞれ 10 mg 精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ザナミビルは、10 mg 精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

リバビリン-¹³C₅ は、その 1 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

アシクロビル-*d*₄ は、その 1 mg 精秤し、DMSO に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

オセルタミビル-*d*₃、リマンタジン-*d*₄ およびアマンタジン-*d*₆ については、それぞれ 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ザナミビル-¹³C, ¹⁵N₂ は、その 1 mg を精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

標準溶液：標準原液を適時希釈して使用した。

その他の試薬：

メタノール：LC-MS 用 (関東化学(株)製)、高速液体クロマトグラフィー用 (和

光純薬工業(株)製)
アセトニトリル：LC-MS 用(関東化学(株)製)
ギ酸アンモニウム：高速液体クロマトグラフィー用(和光純薬工業(株)製)
ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用(和光純薬工業(株)製)
塩酸：特級(和光純薬工業(株)製)
固相カラム(ODS ミニカラム)：Inert Sep C18 (1 g/6 mL)(GLサイエンス(株)製)
固相カラム(MCX ミニカラム)：OASIS MCX (150 mg/6 mL)(Waters 社製)
固相カラム(PBA ミニカラム)：Bond Elut PBA (500 mg/6 mL)(Agilent Technologies 社製)

3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)の、LC部は、島津製作所製 LC20A、MS部は、ABサイエックス社製 5500Q を使用した。

測定条件

<LC部>

カラム：Triart Diol-HILIC plus (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μ m, YMC 社製),
カラム温度：40 , 注入量：10 μ L, 移動相 A：0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル, 移動相 B：0.1vol%ギ酸溶液, グラジエント条件：0~5分(A:B=90:10) 5~25分(A:B=10:90) 25~30分(A:B=10:90), 流速：0.2 mL/min.

<MS部>

イオン化法：ESI-positive, イオン化温度：350 , 測定モード：SRM, 各抗ウイルス剤の SRM の条件は表 1 に示した。

4. 試験方法

1) 試料溶液の調製

試料をフードプロセッサーを用いて粉碎して均一化したのち、その 5.00 g を 100 mL の遠心管に採取し、これに 0.1vol%塩酸・メタノールを 50 mL 加え、ホモジナイザーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。得られた上清を 100 mL メスフラスコに

採取したのち、さらに残渣に 0.1vol%塩酸・メタノールを 25 mL 加えてホモジナイザーで攪拌後、同様に遠心分離を行った。得られた上清をメスフラスコに合わせ、0.1vol%塩酸・メタノールを用いて正確に 100 mL に定容したものを試料溶液とした。

2) 試験溶液の調製

試料溶液の 5 mL をあらかじめメタノール-水(9:1) 10 mL でコンディショニングした ODS ミニカラムに負荷し、その溶出液を 50 mL ナスフラスコに集めた。さらにメタノール-水(9:1) 混液 10 mL、メタノール 10 mL を流し、溶出液を先の 50 mL ナスフラスコに集め、減圧濃縮した。得られた残留物を 0.5vol%ギ酸・メタノール 5 mL で溶解し、予め 0.5vol%ギ酸・メタノール 10 mL でコンディショニングした MCX ミニカラムに全量負荷した。0.5vol%ギ酸・メタノール 10 mL で洗浄後、25%アンモニア水-メタノール(1:19) 混液 20 mL で溶出したものを溶出液 A とした。また、先の 0.5vol%ギ酸・メタノールでの負荷液と洗浄液を集め、これに 25%アンモニア水 500 μ L を加えよく混和したのち、予め 25%アンモニア水-メタノール(1:19) 混液 10 mL でコンディショニングした PBA ミニカラムに負荷した。25%アンモニア水-メタノール(1:19) 混液 10 mL で洗浄後、0.5vol%ギ酸・メタノール 10 mL で溶出したものを溶出液 B とした。溶出液 A と B を合わせ、減圧で溶媒を留去したのち、残渣をアセトニトリル-メタノール-ギ酸(8:1:1) 混液 2 mL で溶解したものを LC-MS/MS 用の試験溶液とした。

3) 検量線の作成

抗ウイルス剤標準原液の一定量を取り、アセトニトリル-メタノール-水(8:1:1) 混液で希釈し、0.05~10 μ g/mL の範囲で検量線用標準溶液を調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により検量線を作成した。さらに抗ウイルス剤を含まないことを確認した試料を用い、本分析法に従って調製した試験溶液で希釈した標準溶液を用いてマトリックス検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.01

μg/g に相当する試験溶液中の濃度は 0.00125 μg/mL である。

結果及び考察

1. 抽出条件の検討

鶏肉からの抗ウイルス剤の抽出には一般的にメタノールやアセトニトリルなどの極性溶媒が用いられる。今回対象とした抗ウイルス剤の大部分は塩基性物質であるが、ペラミビルやアシクロビルのような分子構造中にカルボキシル基のあるものやリバビリンのような配糖体もあり、化学的性質が大きく異なるため、これらを効率よく抽出できる溶媒系について検討することにした。鶏肉の筋肉試料 5g にそれぞれの抗ウイルス剤 0.1 μg を添加し、抽出溶媒として水、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、アセトン、メタノール-アセトニトリル混液を用いてそれぞれの抽出率について比較検討した。その結果、いずれの溶媒を用いてもすべての薬剤を良好に抽出することはできなかった。しかし、それらの中でもメタノール及びメタノール・アセトニトリル混液ではザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの回収率が 30% 以下と低かったものの他の抗ウイルス剤では 50% 以上の比較的良好な回収率が得られた。これらの結果から比較的高極性の高い溶媒が抽出に適しているものと思われた。

次に抗ウイルス剤はその置換基の違いにより抽出における pH の影響が大きいと考えられたため、抽出溶媒の pH の影響について検討を行った。溶媒系については pH 調整に緩衝液や塩酸溶液を用いることとし、これらとの混合に適したメタノールとの混合液を用いることとした。メタノールとリン酸緩衝液 (pH2.6)、酢酸緩衝液 (pH6.5) およびホウ酸緩衝液 (pH9.5) の比率が 4:1 になるように調製した混液とメタノールに塩酸を添加して pH を 1.0 以下に調整した溶媒を用いて回収率を調べた。結果は表 2 に示した通り、塩酸を添加して pH を強酸性にした抽出溶媒が最も良好な回収率が得られた。

抽出溶媒を強酸性にすることで回収率が改善したため、添加する塩酸の濃度の検討を行った。0.1vol% ~ 0.4vol% になるように塩

酸を加えたメタノールを用いて添加回収試験を行った。結果は表 3 に示した通り、いずれの濃度においても比較的良好な回収が得られたが、塩酸濃度が高くなるほど夾雑物が増加する傾向が見られたため、抽出溶媒には 0.1 vol% 塩酸・メタノールを用いることとした。

2. 精製条件の検討

今回分析対象とした抗ウイルス剤はほとんどが塩基性物質であるため、精製用ミニカラムとして一般的に汎用される逆相系ミニカラムよりも陽イオン交換体を用いる方が精製効果が大きいと考えられた。そこで、強陽イオン交換体の OASIS MCX を用いて精製効果について検討した。まず、抗ウイルス剤を含有した 0.5vol% ギ酸・メタノール 5 mL を OASIS MCX に負荷したところ、リバビリン以外の抗ウイルス剤は良好に保持されたが、リバビリンは保持されなかった。Berendsen ら¹⁵⁾も、リバビリンは強陽イオン交換体の SCX カラムに保持されなかったと述べており、配糖体であることが保持を困難にしているものと思われる。そこで、カチオン化が促進されるのを期待して負荷溶媒の pH を 1 付近に調整して負荷を試みたが全く保持されなかった。そこで、リバビリンについては別に追加精製を行うこととし、他の 9 種類の抗ウイルス剤の溶出条件について検討した。

OASIS MCX カラムに、0.5vol% ギ酸・メタノールで調製した抗ウイルス剤の標準溶液 5 mL を負荷し、洗浄溶媒には精製効果が大きいことから 0.5vol% ギ酸・メタノールを用いて洗浄後、カチオン型になっている抗ウイルス剤のイオン化を抑制してカラムからの脱離を促進するために 25% アンモニア水-メタノール混液を用いて溶出することとし、その溶出条件について検討した。その結果、各抗ウイルス剤の溶出挙動に幅があり、溶出溶媒量が増加する傾向があったため、できる限り溶出溶媒の量を少なくし、かつ精製効果を維持するために、混合比の異なる溶媒を段階的に用いることとした。すなわち、25% アンモニア水-メタノール (1:19) 混液 10 mL で溶出した後、25% アンモニア水-メタノール (1:9) 混液 10 mL を用いて溶出すること

とした。この画分を溶出液 A とした。各抗ウイルス剤の各段階での溶出挙動を表 4 に示した。

リバビリンについては MCX ミニカラムに試料溶液を負荷したのち、その負荷溶媒と洗浄液である 0.5vol% ギ酸・メタノール画分を別に捕集し、分画分については PBA ミニカラムを用いて精製を行うこととした。すなわち、リバビリンは構造内に cis-ジオール基を持つため、cis-ジオール基との親和性の強い PBA ミニカラムを用い、これに保持させることによって精製を行うこととした。リバビリンの PBA ミニカラムからの溶出挙動について検討したところ、図 2 に示した通り、25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液 10mL で洗浄後、0.5vol% ギ酸・メタノール 10mL での溶出が可能であった。この溶出画分を溶出液 B とした。

以上の操作で得られた溶出液 A および B を合わせ、減圧濃縮したものを LC-MS/MS 用の試験溶液とすることとした。

以上の精製条件を鶏筋肉に適用した場合、概ね良好な結果を得ることができたが、唐揚げなどの加工品では、試料溶液に移行してくる夾雑物が多く、特に脂質の多いものでは抽出溶液が濁るようなものもあり、イオン交換カラムに負荷する前に、これらを除去する必要があった。

そこで、脂質などの低極性の物質をあらかじめ ODS ミニカラムで除去する操作を追加することにした。すなわち、1. 抽出条件の検討で調整した試料溶液 5 mL を Inert Sep C18 ミニカラムに負荷し、さらにカラムに残留している抗ウイルス剤を洗い出すためにメタノール-水(9:1)混液 10 mL を流したところ、アマンタジンの約 15~20%、オセルタミビルの約 5% がカラムに残留していることが分かった。そこで、さらにメタノールを 10 mL を流したところこれらも完全に回収することができた。一方、脂質などの低極性物質はそのまま保持され、本操作で除去することができた。以上の結果から、カラムに残留している抗ウイルス剤はメタノール-水(9:1)混液 10 mL、メタノール 10 mL を用いて洗い出し、これらの溶出液を合わせて捕集することとした。得られた溶出液を減圧濃縮後、

残留物を 0.5vol% ギ酸・メタノール 5 mL に溶解し、強陽イオン交換ミニカラムに負荷する操作をすべての試料で追加することとした。

3 .安定同位体を用いた内部標準添加法の検討

対象とする薬剤の化学的性質が異なり、薬剤によって回収率に差が認められたため、安定同位体を用いた内部標準添加法について検討した。安定同位体が入手できたリバビリン、オセルタミビル、アマンタジン、リマンダジン、ザナミビルおよびアシクロビルについて検討した。その結果、マトリックス標準による回収率と有意差は認められず、どちらの手法を用いても定量には問題がないことが分かった。しかし、安定同位体を用いた補正は、正確な定量値を得ることができるが、安定同位体はすべての薬剤について入手できるわけではなく、また非常に高額であるため、今後の検討においては参考値として取り扱うこととした。

4. LC-MS/MS の測定条件の検討

1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI(+)モードでプロトン化分子 $[M+H]^+$ が感度よく検出されたことから、測定には ESI(+)モードを用いることとした。0.1vol% アセトニトリルおよび 0.1vol% ギ酸(1:1)混液を移動相としてフローインジェクションで各抗ウイルス剤の測定イオンおよびそれぞれの電圧等の MS 条件を検討した。各抗ウイルス剤のプロトン付加分子 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 3 に示した。

2) LC 条件の検討

まず、汎用される ODS 系カラムを用いて 10 種の抗ウイルス剤の分析条件を検討した。その結果、9 種の抗ウイルス剤については良好な LC-MS/MS クロマトグラムを得ることができたが、リバビリンはカラムに保持されず同一条件での測定が困難であることが分かった。そこで、これらの抗ウイルス剤はいず

れも極性化合物であるため、親水性相互作用を有する HILIC(Hydrophilic Interaction Chromatography)カラムを用いて検討することにした。移動相に HILIC 分析で広く使われるアセトニトリル/水系を用い、有機酸で pH を調整することで、すべての抗ウイルス剤で夾雑物の影響を受けることなく良好なクロマトグラムが得られることが分かった。

そこで、アセトニトリルと LC-MS/MS の移動相の添加剤として広く使用されているギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウムを用いて種々検討した結果、0.1vol%ギ酸含有アセトニトリルと 0.1vol%ギ酸を移動相とするグラジェント溶離を行った場合に最も良好なピーク形状、感度が得られた、そこで、0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を移動相として用いることとした。

5 . 添加回収試験

鶏の筋肉および内臓に各抗ウイルス剤を 0.1 mg/kg となるように添加して回収試験を実施した。その結果、絶対検量線を用いた場合、マトリックスの影響が大きく、十分な回収率を得るのは困難であった。そこで、マトリックスの影響を相殺すべくマトリックス検量線を用いて測定したところ、表 5 に示した通り、鶏の筋肉では、すべての抗ウイルス剤について、96.2~111.3%の回収率が得られ、標準偏差も 11.3%以内であった。また、肝臓では 100.1~109.2%の回収率、標準偏差も 7.9%以内と良好な結果が得られた。図 4 にその際の SRM クロマトグラムを示した。さらに、安定同位体のある 6 種類の抗ウイルス剤について、内部標準法を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率は 80.3~116.6%以内とマトリックス標準で補正した結果と同程度であった。

結論

鶏肉中から抗ウイルス剤を定量する一斉分析法の開発をした。

1 .対象としたのは、検出事例のあるアマンタジンとリバビリンに加え、抗インフルエンザ薬として汎用されるオセルタミビル、ザ

ナミビル、近年、開発されたペラミビル、ラニナミビル、諸外国で使用実績のあるリマンダジンとアルビドール、さらに、その他の抗ウイルス剤として、ヘルペスウイルスに対するアシクロビル、尖圭コンジローマに対するイミキモドを加え、計 10 種の抗ウイルス剤を分析対象とした。

2 . 鶏肉および肝臓中からの抗ウイルス剤の抽出には 0.1vol%塩酸・メタノール混液を用い、ODS ミニカラムおよび強陽イオン交換体ミニカラムを用いて精製後、LC-MS/MS を用いて定量する方法を作成した。

3 . LC-MS/MS での定量は、ESI ポジティブモードにより行った。LC カラムには親水性相互作用を有する HILIC カラムを用いることにより 10 種類の抗ウイルス剤を分離測定することができた。

4 . 筋肉および肝臓に 0.1 mg/kg 相当の 10 種の抗ウイルス剤を添加し、添加回収試験を実施した結果、筋肉では回収率 96.2~111.3%、標準偏差 11.3%以下、肝臓では回収率 100.1~109.2%、標準偏差 7.9%以下と良好な結果が得られた。なお、本法の定量下限値は 0.01 mg/kg であった。

第二部 妥当性確認(2016 年度実施)

第二部では前年度作成した抗ウイルス剤の一斉分析法の妥当性を確認するため、他機関の協力を得て、外部機関評価を行い、分析精度の検証を行った。これに先立ち、本試験法ではマトリックス効果が顕著に現れる場合があり、用いる LC-MS/MS の機器の感度や特性によって妨害や回収率に影響を及ぼす可能性も考えられたため、代表的な機器メーカーに標準溶液と抽出試料を提供し測定をお願いし、機器の違いによる測定値の変動について検証した。

研究方法

1. 機器の機種の違いによる評価

LC-MS/MS を販売してる 5 社に分析を依頼して機種による感度の差や特異性を検証した。

本検討に使用した機種とメーカーは以下のとおりである。

- QTrap® 4500 システム (AB サイエックス社)
- Xevo TQ-S micro (waters 社)
- Agilent 6460 (Agilent 社)
- TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific 社)
- LCMS-8050 システム (島津製作所株)

2. 外部機関評価

地方衛生試験所及び登録検査機関に対して抗ウイルス剤の評価試験を依頼した。試料は、各機関で購入した鶏筋肉を用い、提示した試験方法にのっとり添加回収試験を行う。得られた添加回収試験結果を用い、作成した試験方法の妥当性を確認した。参加機関と各機関が使用した機器は以下のとおりである。

- 一般財団法人石川県予防医学協会 API-3200(AB SCIEX 社製)
- 一般財団法人食品分析開発センター SUNATEC API-4000 QTRP(AB SCIEX 社製)
- 埼玉県衛生研究所 QTRAP 4500(AB SCIEX 社製)
- さいたま市衛生研究所 QTRAP 5500(AB SCIEX 社製)
- 奈良県衛生研究所 6430 Triple

Quad(Agilent 社製)

一般財団法人東京顕微鏡院 QTRAP 5500(AB SCIEX 社製)及び 8060(島津製作所製)

(五十音順)

3. 試験法プロトコル

前年度作製した分析法により試験を実施するよう依頼した。外部機関評価で提示した分析法は以下のとおりである。なお、メーカー評価にあたってはあらかじめ鶏筋肉と鶏卵を用い、鶏筋肉については 0.01 及び 0.1 mg/kg、鶏卵については 0.1 mg/kg となるように混合標準溶液を添加し、本分析法に従って調製した試験溶液を提供し、LC-MS/MS による測定のみ依頼した。

1) 試料溶液の調製

試料をフードプロセッサーを用いて粉碎して均一化したのち、その 5.00 g を 100 mL の遠心管に採取し、これに 0.1vol% 塩酸・メタノールを 50 mL 加え、ホモジナイザーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。得られた上清を 100 mL メスフラスコに採取したのち、さらに残渣に 0.1vol% 塩酸・メタノールを 25 mL 加えてホモジナイザーで攪拌後、同様に遠心分離を行った。得られた上清をメスフラスコに合わせ、0.1vol% 塩酸・メタノールを用いて正確に 100 mL に定容したものを試料溶液とした。

2) 試験溶液の調製

試料溶液の 10 mL をあらかじめメタノール-水 (9:1) 10 mL でコンディショニングした ODS ミニカラムに負荷し、その溶出液を 50 mL ナスフラスコに集めた。さらにメタノール-水 (9:1) 混液 10 mL、メタノール 10 mL を流し、溶出液を先の 50 mL ナスフラスコに集め、減圧濃縮した。得られた残留物を 0.5vol% ギ酸・メタノール 5 mL で溶解し、予め 0.5vol% ギ酸・メタノール 10 mL でコンディショニングした MCX ミニカラムに全量負荷した。0.5vol% ギ酸・メタノール 10 mL で洗浄後、25% アンモニア水-メタノール (1:19) 混液 20 mL で溶出したものを溶出液 A とした。また、先の 0.5vol% ギ酸・メタノールでの負荷液と洗浄液を集め、これに 25% アンモニア水 500 μ L を加えよく混和し

たのち、予め 25%アンモニア水-メタノール (1:19)混液 10 mL でコンディショニングした PBA ミニカラムに負荷した。25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液 10 mL で洗浄後、0.5vol%ギ酸・メタノール 10 mL で溶出したものを溶出液 B とした。溶出液 A と B を合わせ、減圧で溶媒を留去したのち、残渣をアセトニトリル-メタノール-ギ酸(8:1:1)混液 1 mL で溶解したものを LC-MS/MS 用の試験溶液とした。

3) 標準溶液

標準品等は第一部に示したものを使用し、標準溶液についても第一部に従って調製したものを各機関に提供した。メーカー評価にあたっては、10 µg/mL の混合標準溶液を提供し、これを用いて添加用の標準溶液とすると共に適宜希釈して検量線用標準溶液とした。外部機関評価にあたっては、2.5 ng/mL ~ 100 ng/mL の混合標準溶液 7 点を検量線用標準溶液として提供した。また、マトリックス検量線は各機関で調製を行った。

4. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件は本分析法の条件を参考に提示したが、条件は各メーカー及び各試験検査機関所有の機器で最適化して測定してもらうこととした。LCMS-8050 システム (島津製作所株)でのクロマトグラムを図 5 に示す。

測定条件 (参考)

<LC 部>

カラム : Triart Diol-HILIC plus (内径 2.1 mm ,長さ 150 mm ,粒子径 3µm ,YMC 社製),
カラム温度 : 40 , 注入量 : 10 µL , 移動相 A : 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル, 移動相 B : 0.1vol%ギ酸溶液, グラジエント条件 : 0~5 分(A : B = 90 : 10) 5~25 分(A : B = 10 : 90) 25~30 分(A : B = 10 : 90) , 流速 : 0.2 mL/min.

<MS 部>

イオン化法 : ESI-positive , イオン化温度 : 350 , 測定モード : SRM , 各抗ウイルス剤の SRM の条件は表 1 のとおり。

5. 妥当性を評価するための試験プラン

外部機関評価については鶏筋肉を用いて分析法の妥当性を評価することとした。評価するための各抗ウイルス剤の添加濃度は、0.01 mg/kg (定量限界濃度) および 0.1 mg/kg (定量限界濃度の 10 倍) とした。定量限界濃度は、各抗ウイルス剤とも一律基準である 0.01 mg/kg とした。試験は 3 箇所の地方衛生研究所、2 箇所の登録検査機関及び当院の 2 名の試験者(別々の実験室において異なるロットの試料を用いる)によって当院が示した試験法に従って操作を行うこととした。すなわち、各試験所及び試験者が 1 日に試料 1 種類につき 2 濃度の添加量の添加試料を 2 併行、合計 4 回の分析を実施した。なお、各試験所及び試験者が分析を実施する際に、無添加の該当試料を 1 回分析した。精製に用いたミニカラム及び測定に用いた LC カラムは、試験法に提示したものを各機関に提供した。

6. 分析法の妥当性評価

本法の妥当性を評価するための試験プランに従って添加回収試験が各機関で実施され、その結果が当院に送付された。各機関からの測定値を解析し、推定された真度 (回収率) , 併行精度 , 室間精度を算出し、目標値を満たすか評価した。定量に用いた検量線は、絶対検量線法、内部標準法、マトリックス検量線法の 3 種類の検量線で定量を行うこととした。

妥当性評価については、厚生労働省通知¹⁹⁾を参考にした。真度は、定量限界濃度で添加回収試験を行い、回収率が 70 ~ 120% であること。併行精度は、室内精度として 20% 未満あること。室間精度について明記されていないので、AOAC のガイドラインに記載されている²⁰⁾⁻²³⁾、Thompson の式 (修正 Horwitz の式) より、定量限界 0.01 mg/kg の場合である標準偏差 22% 未満とした。

7. 加工品への適用

1) 試料

東京都内及び神奈川県内のスーパーで購入した鶏卵、唐揚げ、焼き鳥 (タレ付き胸肉、レバー及びハツ) を試料とした。

2) 試験溶液の調製

3. 試験法プロトコルに準拠して行った。

結果および考察

1.各メーカーに分析を依頼した測定値の評価

各メーカーにおける分析結果を表 6 に示した。安定同位体があるアマンタジン、リマンタジン、オセルタミビル、ザナミビル、アシクロビル及びリバビリンの回収率は一部で不十分なメーカーがあったがほとんどは 70~120%と良好な結果を得ることができた。安定同位体がなく絶対検量線で定量を行なったペラミビル及びラニナミビルでは、特にラニナミビルの回収率が4%前後と極めて低い結果がある一方、140%を示すような機種もあり、満足な結果を得ることが出来なかった。この部分に限ってみると比較的良かったメーカーが1社あったが、おしなべてよくない結果であった。いずれにしても同一の試料から得られた試験溶液による分析を依頼しており、マトリックスは共通のため、機器の特性によるものかもしれない。アルビドール及びイミキモドは一部のメーカーで回収率が悪かったが、その他のメーカーでは良好な回収率を得ることができた。絶対検量線での定量分析については各メーカーで試験溶液を希釈したり、注入量を減らすなどマトリックスの影響を少なくすることで十分な回収を得ることができたと考えられた。

2.試験検査機関に分析を依頼した測定値の評価

外部機関5機関及び当院で実施した2試行を加えた7試行について室間再現性を確認した。AOAC INTERNATIONAL においては、有効試験所数は10ヶ所以上、試料は1マトリックスあたり2濃度、1濃度あたり6試料など細かい規定がある。本検討では参加機関の所有する機器の感度の差や外部機関評価を実施する機関への負担を軽減することを考慮して試料を鶏筋肉の1試料として0.01 mg/kg及び0.1 mg/kgの2濃度について添加回収試験を行い、室間精度等の妥当性を確認することとした。

実施された添加回収実験の中で無添加試料でリバビリンの保持時間付近に大きな妨害

害ピークが出現し、リバビリンの測定が出来ない機関があった。リバビリンについては、無添加試料でリバビリンの保持時間付近に妨害ピークが認められるケースがしばしばある。機器によって分離できないことも考えられたが、当院で使用したLCMS-8050システムでは分離することができた。そのクロマトグラムを図6に示す。選択性については、ブランク試料に妨害ピークを認める場合、定量限界濃度に相当する披検査物質のピークの面積(又は高さ)の1/3未満であることとされている。今回のリバビリンの測定において定量限界濃度相当の1/3以上の高さの妨害ピークが無添加試料に観察された機関があった。提示した分析法はリバビリンと妨害ピークの分離も考慮して作成したつもりであったが、たまたま購入した鶏肉の特性なのか、LC条件の僅かな違いによって分離できなかったのか確認が必要と思われた。実施機関によってはその妨害ピークとリバビリンとの分離が不十分で測定不能と判断せざるを得ない場合があった。これらのものは評価の対象から除いた。

各抗ウイルス剤の定量は、絶対検量線法、内部標準添加法、マトリックス検量線法を併用あるいは選択して行うこととしたが、絶対検量線法では、マトリックスの影響が大きく定量することが困難であった。マトリックスの影響は、ウイルス剤の種類や測定を行った試験室に依存するものではなく、試料に由来するものであった。内部標準添加法では、安定同位体を用いた内部標準による補正であり、正確な定量値を得ることができ、安定同位体はすべての薬剤について入手できず、これを用いて定量が行える薬剤に限られていた。マトリックス検量線は、決定係数が0.90~1.00と対象とした薬剤において良好な直線性を得ることができた。そこで、今回の妥当性評価には、マトリックス検量線を用いて測定した結果を用いた。

1) 真度(回収率)

表7に示す通り、定量限界付近での添加回収率は、8.3~175%であった。また、定量限界の10倍量添加(高濃度)した添加回収率は、表8に示す通り、0.9~127.8%であった。どちらの回収試験においてもザナミビル、アル

ビドール及びリバビリンは、良好な結果を得ることのできた機関と得ることのできなかつた機関に分かれた。これは、夾雑物の影響を受けたことにより定量値が低くなることによると考えられた。特に、リバビリンはリバビリンの保持時間に近接したところに大きな夾雑ピークが検出され、このピークとリバビリンを分離できた機関では回収率が良好であったと考えられる。しかし、すべての機関において全く回収できなかつた抗ウイルス剤はなく、最低でも 2 試験室において 70%以上の回収率を得ることができた。

2) 室間精度

回収率 50%以上得ることができた測定結果を用いて、併行精度及び室間精度について評価を行った。表 9 に示す通り、定量限界付近では、アマンタジンにおいて併行精度が 21.3%とバラツキの大きな結果となったが、他の抗ウイルス剤については 10%以下とそれぞれの試験室におけるデータのバラツキは小さく良好な結果を得ることができた。室間再現性については、リマンタジンで 36.4%と 30%を超える結果となった。高濃度における併行精度は表 10 に示す通り、ザナミビルを除く、すべての抗ウイルス剤において 10%以下と良好な結果を得ることができた。また、室間再現性においてはラニナミビルが 41.9%、リバビリンが 33.6%とばらつきのある大きな結果となった。コーデックス委員会における再現性は、30%以内とされており他の抗ウイルス剤については良好な結果であった。また、コーデックスが提示する化学物質の分析法の性能指標の一つである HorRat 値は、定量限界付近で 0.5~1.7、高濃度で 0.6~1.9 と CODEX の評価基準である 0.5~2.0 に適合した。今回の妥当性評価は、回収率が 50%以上得られた結果を使用し、回収が得られなかつたデータについては棄却を行ったためガイドラインの求める数字に適合したと考えられた。しかし、本法はスクリーニング手法として一定の評価が可能であると考えられた。

3) 室内精度

厚生労働省の示すガイドラインに従い、本試験法の妥当性確認を行った。ブランク試料について操作を行ったところ、リバビリンの

保持時間の付近に夾雑ピークが認められた。共同試験においてもこのピークが定量を困難にさせる場合があった。当院においては島津社製の LC-MS/MS を用いて測定したところ分離することができ定量に問題は生じなかつた。表 11 に示す通り、真度(回収率)は、81.30~107.34%で良好な結果を得ることができた。併行精度は、0.7~3.5%、室内精度が 2.8~8.2%であり、ガイドラインの示す目標値に適合する結果となった。

3. 加工品への適用

本試験法を鶏卵、唐揚げ、チキンナゲット及び焼き鳥への適用を行った。鶏卵、唐揚げ、チキンナゲット及び焼き鳥(胸肉)は概ね良好な回収率を得ることができた。焼き鳥(レバー)及び焼き鳥(ハツ)は、アルビドール、リバビリン、イミキモド及びアシクロビルでの回収率が良好であったが、他の抗ウイルス剤での回収率が低かつた。たれ付きの焼き鳥であったため、夾雑物が多く測定の妨害になったと考えられた。しかし、安定同位体を内部標準として定量を行うことでリマンタジン、オセルタミビル、ザナミビル及びアマンタジンは良好な回収率を得ることができた。

また、本検討に用いた加工品からは、10種の抗ウイルス剤は検出しなかつた。

結論

1. 外部機関を含む 7 試験所による妥当性評価において、スクリーニング手法としての一定の評価を得られるものであつた。
2. 厚生労働省の妥当性ガイドラインに従つた妥当性評価では真度、精度共にガイドラインの評価基準に適合した。

総括

鶏肉中から抗ウイルス剤を定量する一斉分析法の開発を行った。

1. 対象としたのは、検出事例のあるアマンタジンとリバビリンに加え、抗インフルエンザ薬として汎用されるオセルタミビル、ザ

ナミビル、近年、開発されたペラミビル、ラニナミビル、諸外国で使用実績のあるリマンタジンとアルビドール、さらに、その他の抗ウイルス剤として、ヘルペスウイルスに対するアシクロビル、尖圭コンジローマに対するイミキモドを加え、計 10 種の抗ウイルス剤を分析対象とした。

2. 鶏肉および肝臓中からの抗ウイルス剤の抽出には 0.1vol%塩酸・メタノール混液を用い、ODS ミニカラムおよび強陽イオン交換体ミニカラムを用いて精製後、LC-MS/MS を用いて定量する方法を作成した。

3. LC-MS/MS での定量は、ESI ポジティブモードにより行った。LC カラムには親水性相互作用を有する HILIC カラムを用いることにより 10 種類の抗ウイルス剤を分離測定することことができた。

4. 筋肉および肝臓に 0.1 mg/kg 相当の 10 種の抗ウイルス剤を添加し、添加回収試を実施した結果、マトリックス検量線を用いた、筋肉では回収率 96.2~111.3%、標準偏差 11.3%以下、肝臓では回収率 100.1~109.2%、標準偏差 7.9%以下と良好な結果がえられた。

なお、本法の定量下限値は 0.01 mg/kg であった。

5. 外部機関を含む 7 試験所による妥当性評価において、スクリーニング手法としての一定の評価を得られるものであった。

6. 厚生労働省の妥当性ガイドラインに従った妥当性評価では真度、精度共にガイドラインの評価基準に適合した。

7. 一斉分析法としては、アマンタジン、リマンタジン、オセルタミビル、イミキモド、ペラミビル及びラニナミビルの 6 剤の同時分析法として、他のザナミビル、アシクロビル、アルビドール及びリバビリンを含む 10 種のスクリーニング試験法として、採用できると考えられた。

8. 今後、抗ウイルス剤の分析の必要性等について再検討し、最終的には 6~8 剤の同時分析法としたい。

謝辞

1. 本研究に際し、外部機関評価試験に協力していただいた埼玉県衛生研究所、さいたま市衛生研究所、奈良県衛生研究所、一般財団法人石川県予防医学協会及び一般財団法人食品分析開発センターSUNATECの試験担当各位に深謝いたします。

2. 本研究に際し、依頼分析を実施していただいた AB サイエックス社、waters 社、Agilent technologies 社、Thermo Fisher Scientific 社および島津製作所(株)の担当各位、HILIC カラムの作成に協力していただきました GL サイエンス社の担当各位に深謝いたします。

文献

1) 食品安全情報 国立医薬品食品衛生研究所 No. 24 / 2005 (2005. 11.22)

2) 中国、鳥インフルエンザ抑制のために抗ウイルス剤を大量利用、人間治療用薬剤が無効に (農業情報研究所, 05.6.21)

<http://www.juno.dti.ne.jp/tkitaba/earth/epidemic/05062101.htm>

3) Ribavirin History, <http://www.news-medical.net/health/Ribavirin-History.aspx>

4) Alken, G.D., Brookes, S.T., Barrow, A., Dunn, J.A., Grosse, C.M.

Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of the neuraminidase inhibitor zanamivir (GG167) in human serum. J chromatogr B, 732, 383-393(1999).

5) Bahrami, G., Mohammadi, B., Kiani, A. Determination of oseltamivir carboxylic acid in human serum by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection. J chromatogr B, 864, 38-42(2008).

6) Lindegardh, N., Hanpithakpoong, W., Wattangoon, Y., Singhasivanon, P., White, J.N., Day N.P.J. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of Oseltamivir and its

- metabolite oseltamivir carboxylate in plasma, saliva and urine. *J chromatogr B*, **859**, 74-83(2007).
- 7) Liu, Y., Xu, C., Yan, R., Lim, C., Yeh, L.T., Lin, C.C. Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of varamidine and ribavirin in human plasma. *J chromatogr B*, **832**, 17-23(2006)
- 8) Heining, K. Bucheli, F. Sensitive determination of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in plasma, urine, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J chromatogr B*, **876**, 129-136(2008).
- 9) Sioufi, A., Pommier, F. Gas chromatographic determination of amantadine hydrochloride in human plasma and urine. *J chromatogr B*, **183**, 33-39 (1980).
- 10) Baughman, T.M., Wright, A.L., Hutton, K.A. Determination of zanamivir in rat and monkey plasma by positive ion Hydrophilic interaction chromatography(HILIC) / tandem mass spectrometry. *J chromatogr B*, **852**, 505-511(2007).
- 11) David, J.S., Geoffrey, L., Alison, M.B., Willard, L., Ke-Yu, W., Kenneth, C.C. Metabolism of the Influenza Neuraminidase Inhibitor Prodrug Oseltamivir in the Rat. *DRUG METABOLISM & DISPOSITION*, **28**, 737-741(2000).
- 12) Ohura, K., Tasaka, K., Hashimoto, M., Imai, T. Distinct Patterns of Aging Effects on the Expression and Activity of Carboxylesterases in Rat Liver and Intestine. *Drug Metab Dispos*, **42**, 264-273(2014).
- 13) Liu, Z., Yang, F., Yu, K., Lin, Y., Liu, S., Zhang, Q., Su, Z. Multi-residue determination of five antiviral drugs in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chinese J Chromatogr*, **30**, 1253-1259(2012).
- 14) Chan, D., Tarbin, J., Sharman, M., Carson, M., Smith, M., Smith, S. Screening method for the analysis of antiviral drugs in poultry tissues using zwitterionic hydrophilic liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, **700**, 194-200 (2011).
- 15) Berendsen, B. J. A., Wegh, R. S., Essers, M. L., Stolker, A. A. M., Weigel, S. Quantitative trace analysis of a broad range antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal chem*, **402**, 1611-1623(2012).
- 16) 萩原 踏, 朝倉敬行, 寶龍久枝, 村上麻里子, 中里光男, 安田和男. LC-MS/MS を用いた抗ウイルス剤の分析法, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 講演要旨集, p121 (平成25年11月21~22日、沖縄)
- 17) 鶴岡由美, 中島崇行, 橋本常生, 神田真軌, 林 洋, 松島陽子, 吉川聡一, 永野智恵子, 高野伊知郎. LC-MS/MS による鶏組織および鶏卵中アマンタジンの分析法の開発, 第107回日本食品衛生学会学術講演会, 講演要旨集, p47 (平成27年5月4~5日、東京)
- 18) 前田尚之, 田中絵美, 榎 加奈恵, 吉田由香, 佐々木道夫, 吉田 博. LC-MS/MS による鶏肉およびその加工品中のアマンタジン 分析法の開発, *食品衛生研究*, **64**, 35-45(2014).
- 19) 厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知. 平成22年12月24日食安発1224第1号「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の一部改正について」
- 20) 安井明美. 食品分析における信頼性確保. *The Chemical Times*, 191, 13-18(2004)
- 21) INTERLABORATORY COLLABORATIVE STUDY AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2002) Appendix D, p. 1-12
- 22) Codex Alimentarius Commission, Procedural Manual, 21th Edition, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2013.
- 23) MICHAEL, T., STEPHEN, L. R. E., ROGER W., Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods

of analysis, International Union of Pure and Applied Chemistry, Pure Appl. Chem., 74(5):835-855 (2002).

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

本研究の一部は日本食品衛生学会 第108回学術講演会（平成26年12月4～5日、金沢）において発表した。

H. 知的財産権

無し

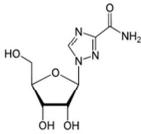
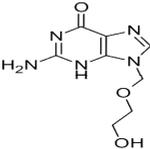
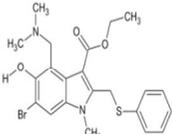
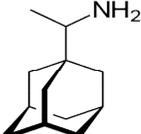
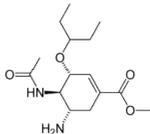
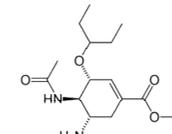
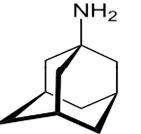
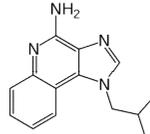
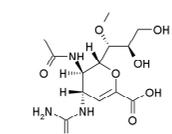
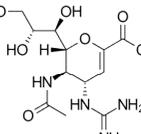
化合物名 () : 分子量	構造式	化合物名 () : 分子量	構造式	化合物名 () : 分子量	構造式
リバビリン (244.21)		アシクロビル (225.21)		アルビドール (531.89)	
リマントジン (179.30)		オセルタミビル (312.41)		イミキモド (240.30)	
アマンタジン (151.25)		ペラミビル (328.41)		ラニナミビル (346.34)	
ザナミビル (332.31)					

図1 抗ウイルス剤の構造式

表2 抽出溶媒の pH が抗ウイルス剤の回収率に与える影響

抽出溶媒	pH	回収率(%)									
		リバビリン	アシクロビル	アルビドール	リマンタジン	オセルタミビル	イミキモド	アマンタジン	ペラミビル	ラニナミビル	ザナミビル
ホウ酸緩衝液-メタノール(1:4)	9.5	47.0	72.5	83.6	59.9	62.2	63.5	34.9	55.9	53.9	35.1
酢酸緩衝液-メタノール(1:4)	6.5	37.0	30.1	21.3	96.4	67.7	78.2	81.4	23.3	3.3	-
りん酸緩衝液-メタノール(1:4)	2.6	39.5	35.9	54.1	52.2	44.5	35.3	44.9	43.7	38.0	45.7
メタノール(塩酸添加)	0.0	105.0	88.4	121.5	90.0	103.4	93.6	98.4	94.2	105.7	133.6

夾雑物の影響により測定不能

表 3 塩酸濃度が抗ウイルス剤の回収率に与える影響

抽出溶媒	pH	回収率(%)									
		リバビリン	アシクロビル	アルビドール	リマンタジン	オセルタミビル	イミキモド	アマンタジン	ペラミビル	ラニナミビル	ザナミビル
0.1vol%塩酸・メタノール	0.58	107.7	84.6	96.1	89.2	94.5	92.4	88.5	80.2	78.1	85.2
0.2vol%塩酸・メタノール	0.33	86.2	71.2	91.9	78.2	82.2	78.3	78.4	72.9	85.8	84.2
0.3vol%塩酸・メタノール	0.17	76.8	94.7	86.5	79.8	83.8	77.1	80.4	102.5	72.8	82.7
0.4vol%塩酸・メタノール	0.07	105.0	88.4	121.5	90.0	103.4	93.6	98.4	94.2	105.7	133.6

添加量：1 mg/kg 相当

表4 MCX ミニカラムからの抗ウイルス剤の溶出挙動

抽出溶媒	溶出溶媒量 (mL)	回収率(%)									
		リバビリン	アシクロビル	アルビドール	リマンタジン	オセルタミビル	イミキモド	アマンタジン	ペラミビル	ラニナミビル	ザナミビル
0.5vol%ギ酸・メタノール	5(負荷)	88.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	27.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25%アンモニア水-メタノール(1:19)	5	ND	97.2	98.96	97.4	114.0	96.1	103.3	95.1	23.7	25.2
	10	ND	0.5	ND	6.7	0.5	1.3	4.9	1.7	63.0	62.6
25%アンモニア水-メタノール(1:9)	5	ND	0.3	ND	0.4	ND	0.8	0.6	0.9	12.7	11.2
	10	ND	ND	ND	ND	ND	0.2	0.4	ND	ND	3.2
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	計	117.4	98.0	98.96	104.5	114.5	98.4	109.2	97.7	99.4	102.2

ND：検出下限値以下

負荷量：1 µg

表5 試料からの抗ウイルス剤の添加回収試験結果

試料	回収率(%)									
	リバピリン	アシクロビル	アルビドール	リマンタジン	オセルタミビル	イミキモド	アマンタジン	ペラミビル	ラニナミビル	ザナミビル
鶏筋肉	111.4	99.6	102.3	105.6	105.3	95.3	113.7	112.1	102.0	100.4
	97.7	103.0	98.7	103.9	101.2	92.8	112.9	110.1	105.8	103.8
	89.0	95.8	97.6	100.9	101.6	100.6	107.3	103.3	100.8	100.1
平均 ¹	99.4	99.5	99.5	103.5	102.7	96.2	111.3	108.5	102.9	101.4
標準偏差 (RSD, %)	11.3	3.6	2.5	2.4	2.3	4.0	3.5	4.6	2.6	2.1
参考値 ²	107.3		87.5	95.0	80.3	98.0	115.8			
鶏肝臓	110.2	115.6	98.8	103.0	99.6	111.1	110.8	108.3	114.3	108.6
	104.1	104.1	106.1	102.8	100.7	107.6	108.1	98.3	107.4	112.6
	100.7	100.4	100.8	98.8	99.9	106.9	106.7	97.7	105.6	106.5
平均 ¹	105.0	106.7	101.9	101.5	100.1	108.5	108.5	101.4	109.1	109.2
標準偏差 (RSD, %)	4.8	7.9	3.8	2.4	0.6	2.3	2.1	6.0	4.6	3.1
参考値 ²	107.6		97.9	115.4	103.4	94.2	116.6			

添加量 : 0.1 mg/kg 相当

1 n=3 の平均値、 2 内部標準により補正した値

表1 抗ウイルス剤のLC-MS/MS測定条件

化合物	測定モード	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	DP	CE	CXP
リバピリン	ESI(+)	245.1	113.0	96.0	15.0	25.0
			96.0	96.0	57.0	8.0
アシクロビル	ESI(+)	226.1	152.1	86.0	17.0	12.0
			135.1	86.0	39.0	12.0
アルビドール	ESI(+)	479.1	434.0	66.0	23.0	20.0
			280.9	66.0	45.0	14.0
リマンタジン	ESI(+)	180.1	163.1	96.0	15.0	14.0
			153.1	96.0	20.0	14.0
オセルタミビル	ESI(+)	313.2	166.1	96.0	37.0	12.0
			120.1	96.0	18.0	10.0
イミキモド	ESI(+)	241.2	185.0	156.0	31.0	10.0
			114.0	156.0	67.0	12.0
アマンタジン	ESI(+)	152.5	134.9	96.0	18.0	6.0
			79.0	96.0	39.0	12.0
ペラミビル	ESI(+)	329.2	270.1	81.0	25.0	14.0
			59.1	81.0	40.0	14.0
ラニナミビル	ESI(+)	347.2	60.1	136.0	21.0	8.0
			121.0	136.0	35.0	28.0
ザナミビル	ESI(+)	333.1	60.0	126.0	21.0	8.0
			121.0	126.0	37.0	16.0

DP:Declustering Potential(V), CE:collision Energy(eV), CXP:Cell Exit Potential(V)

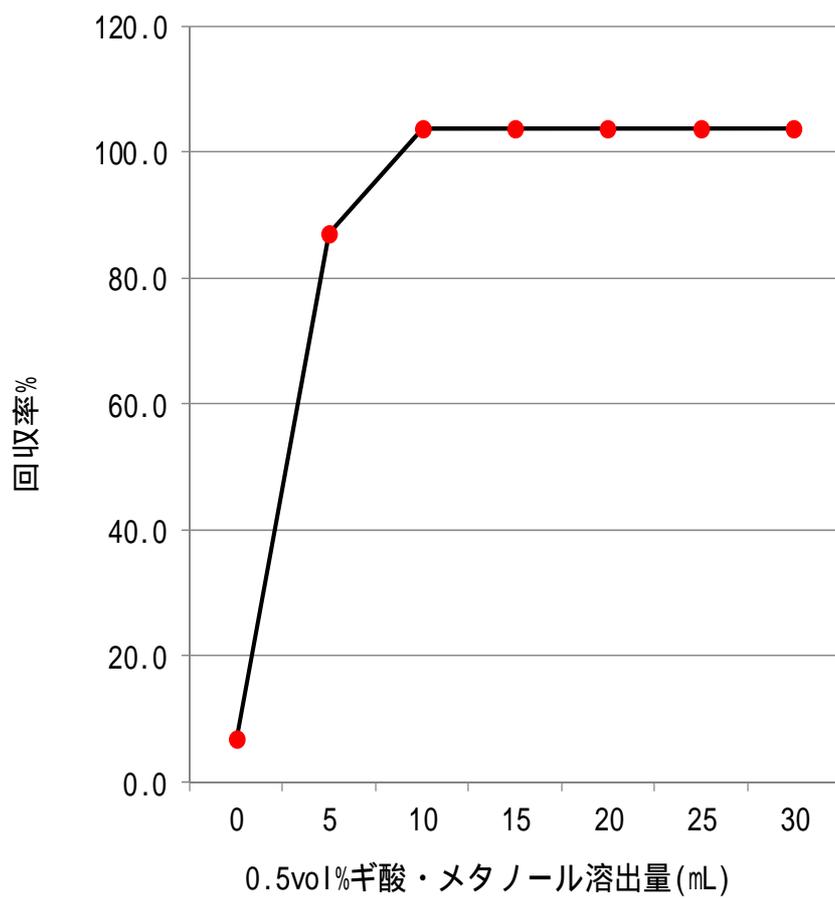
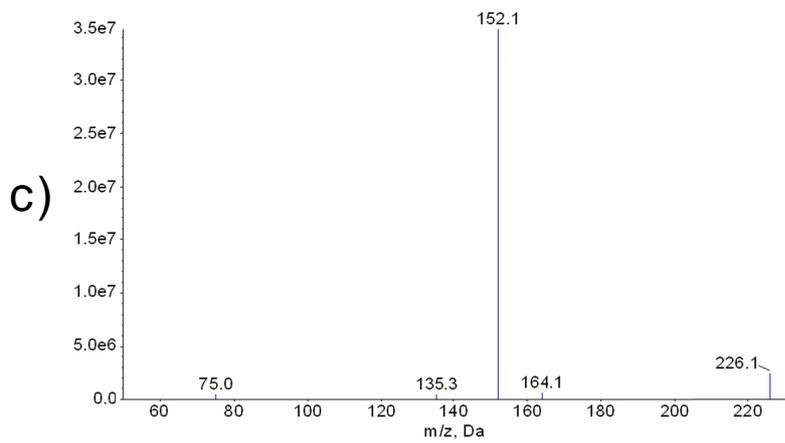
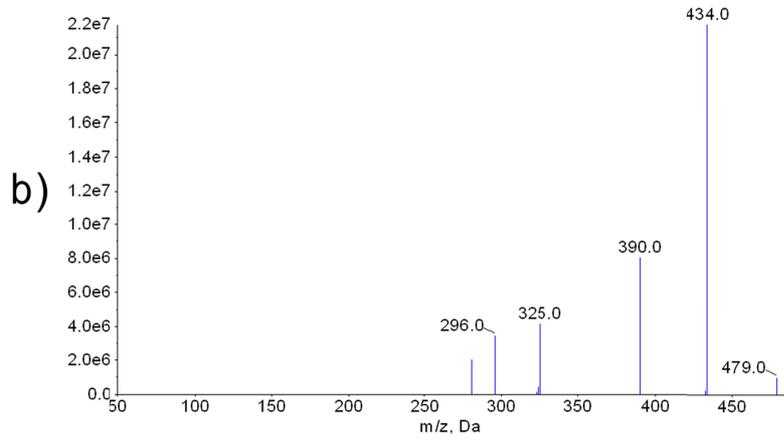
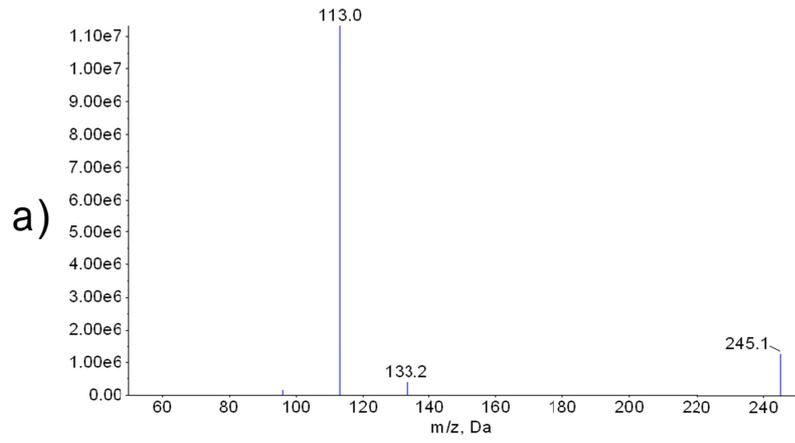
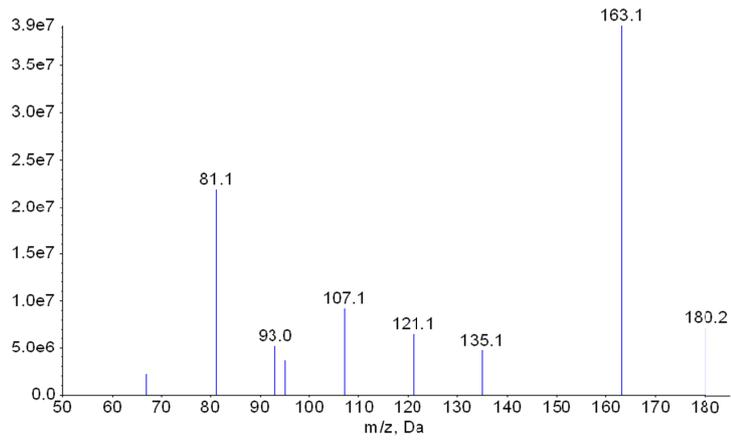


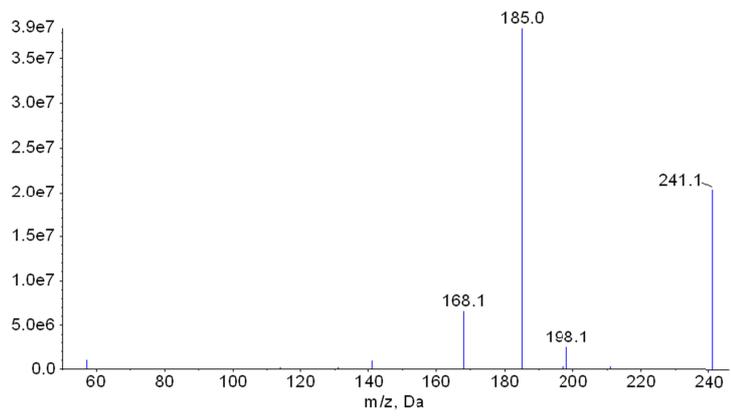
図2 PBA ミニカラムからのリバビリンの溶出挙動



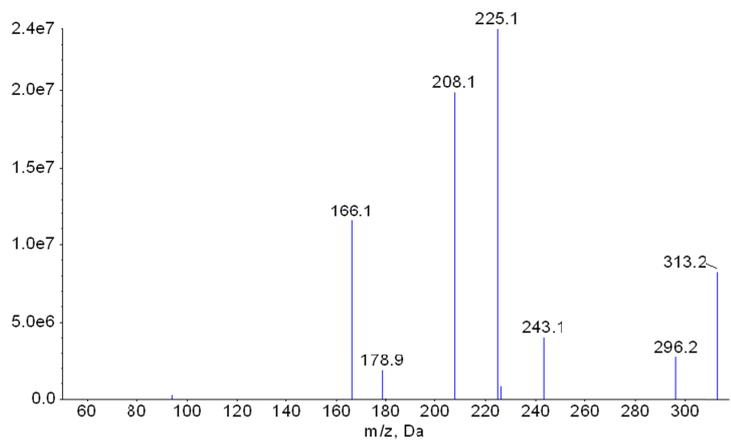
d)



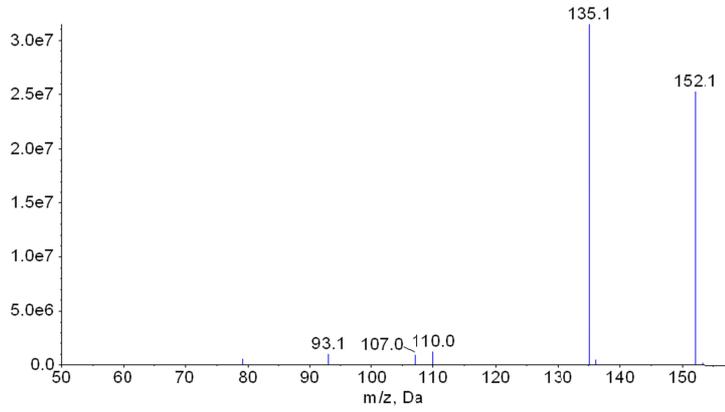
e)



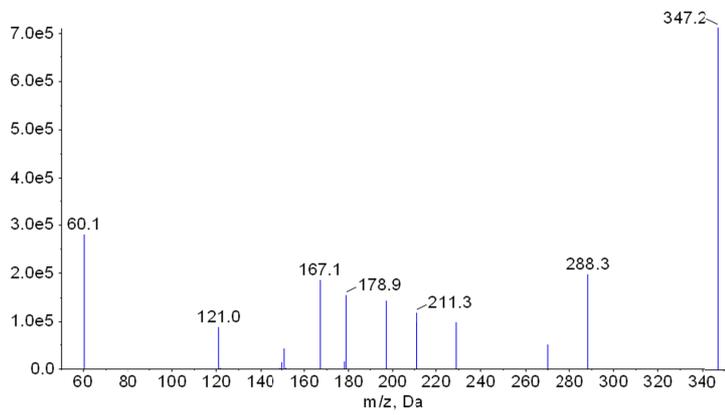
f)



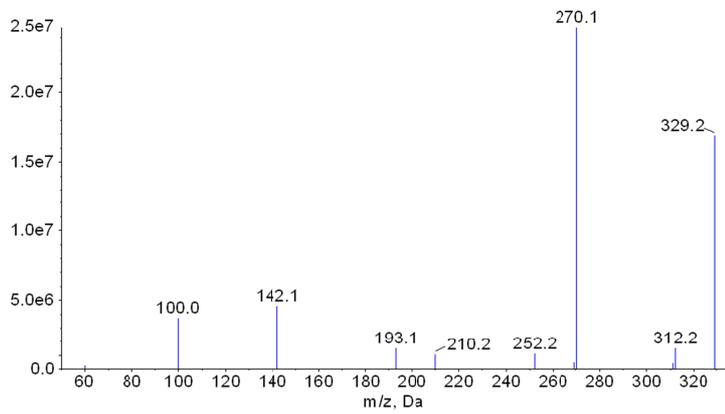
g)



h)



i)



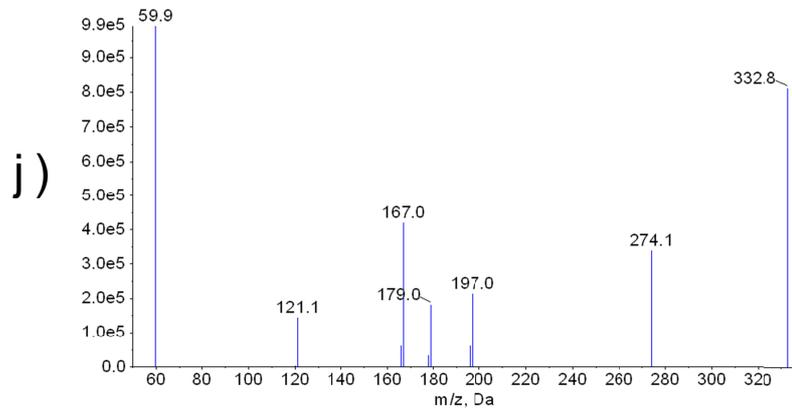
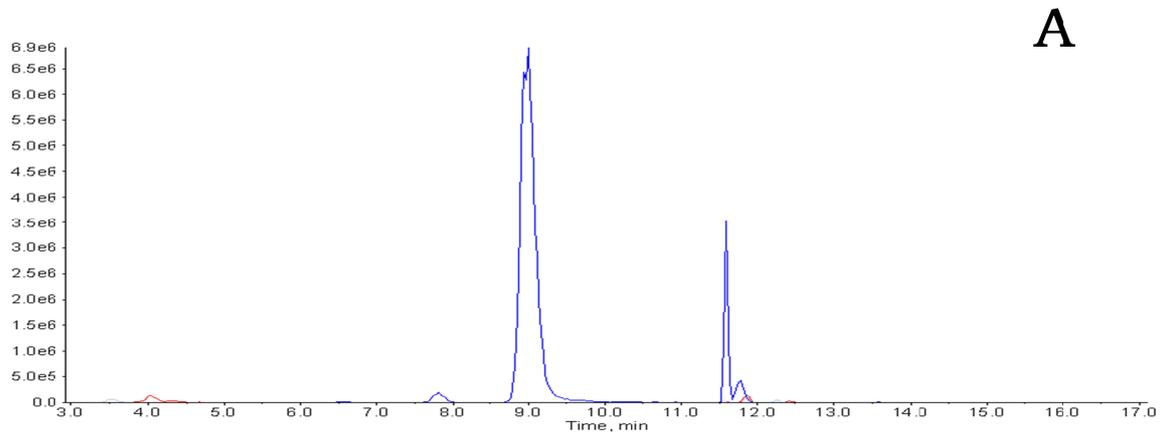
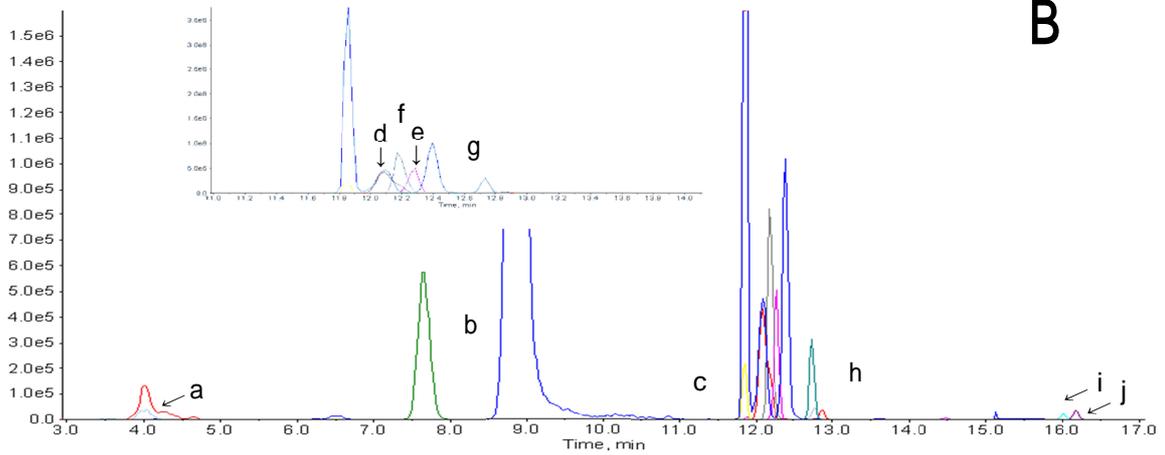


図3 抗ウイルス剤のMSスペクトル

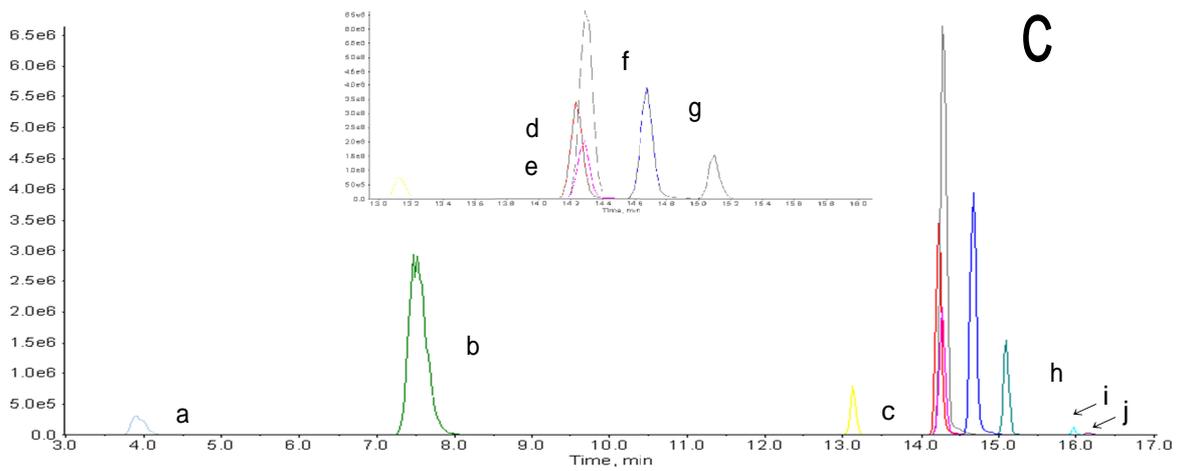
- (a) リバビリン、(b) アシクロビル、(c) アルビドール、(d) リマンタジン、
(e) オセルタミビル、(f) イミキモド、(g)アマンタジン、(h)ペラミビル、
(i) ラニナミビル、(j) ザナミビル



A



B



C

図4 鶏筋肉のSRMクロマトグラム

(A) ブランク試料、(B) 添加試料 (添加量: 0.1 $\mu\text{g/g}$ 相当)、(C) 標準溶液 (0.01 $\mu\text{g/mL}$)

(a) リバビリン、(b) アシクロビル、(c) アルビドール、(d) リマンタジン、(e) オセルタミビル、(f) イミキモド、(g) アマンタジン、(h) ペラミビル、(i) ラニナミビル、(j) ザナミビル

表9 外部機関評価試験結果(低濃度)

単位 $\mu\text{g/g}$																				
Lab	抗ウイルス剤																			
	アマンタジン		リマンタジン		オセルタミビル		ザナミビル		アシクロビル		アルビドール		イミキモド		ペラミビル		ラニナミビル		リバビリン	
1	3.57	1.47	2.55	1.40	4.32	3.63	0.87	0.99	2.55	1.22	0.78	0.85	4.80	4.36	3.36	3.77	3.78	3.66	3.04	1.26
2	3.43	3.16	3.33	3.52	3.01	3.01	2.23	2.23	2.93	3.76	2.42	2.66	4.06	3.91	2.19	2.19	3.12	3.18	1.63	1.72
3	5.49	4.01	3.51	3.12	2.72	2.73	2.16	2.25	2.46	1.90	2.16	1.99	3.40	3.28	3.78	2.91	1.60	1.87	8.35	1.72
4	5.00	3.43	8.76	8.26	3.76	2.85	0.42	0.42	3.76	3.90	2.28	1.54	4.63	3.60	5.51	4.91	0.70	0.61	5.54	5.79
5	1.45	1.45	4.01	3.50	4.25	4.57	3.75	4.00	4.00	4.01	3.96	3.84	5.10	4.42	2.93	2.78	3.61	2.40	0.82	0.54
6	4.24	4.23	2.55	1.72	3.75	4.48	4.44	4.68	4.68	4.46	4.71	4.73	4.51	4.49	4.61	4.62	4.52	4.44	4.73	5.49
7	4.86	4.94	6.12	6.32	4.60	4.64	5.41	5.42	3.86	4.01	4.47	4.41	4.08	4.16	4.84	4.82	5.83	5.87	4.72	4.68
Ave	4.38		3.85		3.73		4.62		3.83		3.90		4.20		4.07		4.04		5.16	
Recovery(%)	87.60		77.00		74.60		92.40		76.60		78.00		84.00		81.40		80.80		103.20	
RSD _r (%)	21.3		5.7		10.0		3.1		8.7		2.5		8.4		8.1		9.6		6.3	
RSD _R (%)	22.8		36.4		21		16.9		10.8		24.9		12.7		23.9		29.6		10.4	
PRSD _R (%)	22		22		22		22		22		22		22		22		22		22	
HoRat	1.0		1.7		1.0		0.8		0.5		1.1		0.6		1.1		1.3		0.5	

添加量 : 0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当

表7 外部機関評価試験 回収率の結果(低濃度)

																				単位 %
Lab	抗ウイルス剤																			
	アマンタジン		リマンタジン		オセルタミビル		ザナミビル		アシクロビル		アルピドール		イミキモド		ペラミビル		ラニナミビル		リバビリン	
1	71.3	29.4	51.0	27.9	86.3	72.5	17.3	19.7	51.0	24.3	15.6	16.9	95.9	87.2	67.1	75.4	75.6	73.2	60.8	25.2
2	68.6	63.2	66.6	70.4	60.2	60.2	44.6	44.6	58.6	75.2	48.4	53.2	81.2	78.2	43.8	43.8	62.4	63.6	32.6	34.4
3	109.8	80.2	70.2	62.4	54.3	54.6	43.2	45.0	49.2	38.0	43.2	39.8	68.0	65.6	75.6	58.2	32.0	37.4	167.0	34.4
4	100.0	68.6	175.2	165.2	75.2	57.0	8.3	8.3	75.2	78.0	45.6	30.8	92.6	72.0	110.2	98.2	14.0	12.2	110.8	115.8
5	29.0	29.0	80.2	70.0	85.0	91.4	75.0	80.0	80.0	80.2	79.2	76.8	102.0	88.4	58.6	55.6	72.2	48.0	16.4	10.8
6	84.8	84.6	51.0	34.4	75.0	89.6	88.8	93.6	93.6	89.2	94.2	94.6	90.2	89.8	92.2	92.4	90.4	88.8	94.6	109.8
7	97.2	98.8	122.4	126.4	92.0	92.8	108.2	108.4	77.2	80.2	89.4	88.2	81.6	83.2	96.8	96.4	116.6	117.4	94.4	93.6
Ave	72.46		83.81		74.72		56.07		67.85		58.28		83.99		76.02		64.56		41.19	

赤字：回収率 70 ~ 120%

黄色：回収率 50 ~ 120%

添加量：0.01 mg/kg 相当

表 10 外部機関評価試験結果(高濃度)

																				単位 µg/g
Lab	抗ウイルス剤																			
	アマンタジン		リマンタジン		オセルタミビル		ザナミビル		アシクロビル		アルピドール		イミキモド		ベラミビル		ラニナミビル		リバビリン	
1	6.24	11.50	5.95	12.48	46.83	51.64	1.63	3.63	11.91	16.79	0.47	2.68	57.35	58.59	30.29	28.94	5.75	6.76	24.64	26.07
2	34.82	32.33	34.95	35.16	31.54	31.62	14.30	12.12	15.30	9.50	39.11	41.05	43.55	43.69	20.50	20.66	21.26	20.25	15.53	9.97
3	38.50	45.21	24.34	20.27	30.52	31.28	4.01	1.96	21.88	27.62	10.67	8.72	31.24	29.08	37.42	31.85	5.52	5.19	22.92	11.78
4	42.01	39.88	47.73	44.95	36.79	33.10	1.15	11.83	37.17	35.81	22.47	17.96	42.92	40.70	40.03	41.22	9.91	10.30	62.32	57.14
5	33.30	36.40	32.50	38.41	39.91	43.53	2.00	1.42	30.38	37.50	54.26	44.36	45.45	46.04	35.13	33.92	3.61	2.40	12.59	10.76
6	47.68	45.17	41.35	44.48	47.64	48.65	45.89	48.10	47.64	48.08	51.92	52.93	47.04	48.03	47.65	47.05	44.88	46.85	52.20	50.70
7	52.67	52.47	61.46	63.88	53.12	53.34	56.55	56.94	49.83	50.00	51.08	52.68	48.66	48.51	52.54	51.80	52.22	51.65	38.22	44.49
Ave	41.70		44.49		41.39		51.87		38.59		48.42		45.06		39.82		39.52		44.47	
Recovery(%)	83.40		88.98		82.78		103.74		77.18		96.84		90.12		79.64		79.04		88.94	
RSD _r (%)	8.4		5.4		4.6		-		7.6		7.5		2.1		4.4		2.4		6.7	
RSD _R (%)	12.7		17.6		22.2		-		17.6		13.0		18.6		21.8		41.9		33.6	
PRSD _R (%)	22.0		22.0		22.0		22.0		22.0		22.0		22.0		22.0		22.0		22.0	
HoRat	0.6		0.8		1.0		-		0.8		0.6		0.8		1.0		1.9		1.5	

添加量 : 0.1 mg/kg 相当

表 8 外部機関評価試験 回収率の結果(高濃度)

Lab	抗ウイルス剤																				単位 %
	アマンタジン		リマンタジン		オセルタミビル		ザナミビル		アシクロビル		アルピドール		イミキモド		ペラミビル		ラニナミビル		リバビリン		
1	71.3	29.4	51.0	27.9	86.3	72.5	17.3	19.7	51.0	24.3	15.6	16.9	95.9	87.2	67.1	75.4	75.6	73.2	60.8	25.2	
2	68.6	63.2	66.6	70.4	60.2	60.2	44.6	44.6	58.6	75.2	48.4	53.2	81.2	78.2	43.8	43.8	62.4	63.6	32.6	34.4	
3	109.8	80.2	70.2	62.4	54.3	54.6	43.2	45.0	49.2	38.0	43.2	39.8	68.0	65.6	75.6	58.2	32.0	37.4	167.0	34.4	
4	100.0	68.6	175.2	165.2	75.2	57.0	8.3	8.3	75.2	78.0	45.6	30.8	92.6	72.0	110.2	98.2	14.0	12.2	110.8	115.8	
5	29.0	29.0	80.2	70.0	85.0	91.4	75.0	80.0	80.0	80.2	79.2	76.8	102.0	88.4	58.6	55.6	72.2	48.0	16.4	10.8	
6	84.8	84.6	51.0	34.4	75.0	89.6	88.8	93.6	93.6	89.2	94.2	94.6	90.2	89.8	92.2	92.4	90.4	88.8	94.6	109.8	
7	97.2	98.8	122.4	126.4	92.0	92.8	108.2	108.4	77.2	80.2	89.4	88.2	81.6	83.2	96.8	96.4	116.6	117.4	94.4	93.6	
Ave	72.46		83.81		74.72		56.07		67.85		58.28		83.99		76.02		64.56		41.19		

赤字：回収率 70～120%

黄色：回収率 50～120%

添加量：0.01 mg/kg 相当

表 11 妥当性評価ガイドラインによる室内精度結果

																												単位 ug/g		
Lab	抗ウイルス剤																													
	アマンタジン			リマンタジン			オセルタミビル			ザナミビル			アシクロビル			アルビドール			イミキモド			ベラミビル			ラニナミビル			リバビリン		
A-1	4.834	4.779	4.876	5.145	5.136	5.202	4.312	4.435	4.269	4.808	4.980	5.184	4.477	4.514	4.336	4.480	4.414	4.418	4.385	4.383	4.364	4.735	4.728	4.714	4.574	4.511	4.362	4.213	4.282	4.287
A-2	4.114	4.418	4.403	4.751	4.575	4.627	4.864	4.833	4.917	5.356	5.349	5.456	4.403	4.442	4.649	4.692	4.717	4.641	4.435	4.289	4.311	4.570	4.391	4.480	4.353	3.827	3.910	4.432	4.374	4.302
A-3	4.373	4.293	3.954	4.834	4.318	4.488	4.503	4.462	4.479	5.317	5.340	5.705	4.254	4.270	4.456	4.600	4.535	4.512	4.264	4.073	4.172	4.325	4.253	4.394	4.342	4.374	4.475	4.496	4.404	4.296
B-1	4.780	4.762	4.839	5.228	4.952	5.868	4.481	4.467	4.463	5.372	5.436	5.245	4.574	4.639	4.595	4.426	4.434	4.436	4.322	4.156	4.131	4.713	4.597	4.614	0.700	4.278	4.091	4.226	4.401	4.254
B-2	4.299	4.132	4.236	5.313	4.893	4.641	4.971	4.903	4.975	5.357	5.412	5.559	4.768	4.706	4.750	4.685	4.673	4.688	4.278	4.138	4.221	4.524	4.505	4.388	3.610	4.018	4.250	4.259	4.138	4.651
B-3	4.368	4.153	4.399	4.931	4.684	4.936	4.655	4.516	4.506	5.499	5.879	5.357	4.402	4.458	4.269	4.617	4.638	4.593	4.215	4.141	4.257	4.406	4.467	4.368	4.520	4.374	4.604	4.279	4.313	4.568
Ave	4.445			4.918			4.612			5.367			4.498			4.567			4.252			4.510			4.065			4.343		
Recovery(%)	88.90			98.36			92.23			107.34			89.95			91.33			85.04			90.19			81.30			86.86		
RSDr(%)	3.0			5.5			1.2			3.2			2.0			0.7			1.8			1.4			4.1			3.3		
RSD _r (%)	8.2			8.5			6.5			5.1			4.4			3.1			2.8			4.2			6.7			3.6		

添加量 : 0.01 mg/kg 相当

表 12 加工品での添加回収試験の結果

加工食品	抗ウイルス剤									
	アマンタジン	リマンタジン	オセルタミビル	ザナミビル	アシクロビル	アルビドール	イミキモド	ペラミビル	ラニナミビル	リバビリン
鶏卵	97.5(79.4)	98.4(91.5)	89.9(102.8)	98.7(92.7)	92.8	100.9	69.6	82.9	79.2	83.9(91.9)
焼き鳥(ムネ)	96.1(86.5)	106.8(117.0)	89.3(95.6)	102.8(103.8)	89.7	88.9	85.6	93.0	85.4	86.0(96.0)
焼き鳥(ハツ)	43.4 (108.4)	62.0(91.00)	63.8(107.6)	69.6(88.2)	75.8	97.1	84.0	66.3	68.7	104.0(100.8)
焼き鳥(レバー)	35.1(95.6)	47.3(81.9)	44.7(101.1)	57.2(88.7)	43.8	92.3	74.5	65.1	60.0	99.3(99.9)
唐揚げ	78.2(95.3)	73.2(111.4)	96.5(101.1)	97.6(88.2)	85.2	80.1	85.6	92.2	81.6	96.9(93.1)
チキンナゲット	107.2(90.3)	48.2(104.8)	82.4(100.0)	96.9	95.3	95.0	104.1	111.1	102.8	89.0(110.0)

単位 %

()内：安定同位体を用いて補正した結果 添加量：0.01 mg/kg 相当

表6 機種の違いによる抗ウイルス剤の回収率

単位 %

農薬名	試験部位	メーカー名				
		Thermo	waters	Agilent	AB	島津
アマンタジン	A	12.0	194.8	96.0	104.0	94.4
	D	26.0	104.8	84.0	96.0	114.6
	E	294.0	99.6	78.0	72.0	130.0
リマンタジン	A	48.8	220.0	71.2	100.5	47.2
	D	32.5	105.6	72.8	37.4	80.4
	E	25.7	110.3	75.4	51.6	94.9
オセルタミビル	A	200.0	221.6	76.0	184.0	200.0
	D	98.0	106.0	76.0	74.0	100.0
	E	100.0	105.6	84.0	88.0	42.0
ザナミビル	A	117.8	212.4	85.0	87.6	83.8
	D	104.4	107.5	90.6	87.4	63.5
	E	105.5	107.4	75.1	82.1	57.0
アシクロビル	A	182.4	237.0	69.6	94.4	104.0
	D	99.2	105.2	79.6	104.0	96.8
	E	99.2	106.7	70.8	100.0	96.0
アルビドール	A	86.6	80.9	69.6	104.0	49.7
	D	105.0	79.8	73.4	70.6	76.3
	E	111.8	75.1	77.7	76.6	76.3
イミキモド	A	-	95.6	112.0	32.0	44.0
	D	114.0	88.0	142.0	20.0	78.0
	E	118.0	66.4	142.0	16.0	104.0
ベラミビル	A	32.0	53.2	76.0	104.0	48.0
	D	32.0	62.4	52.0	46.0	92.0
	E	18.0	50.0	46.0	52.0	122.0
ラニナミビル	A	-	-	13.9	31.7	56.4
	D	-	105.5	4.4	3.1	95.9
	E	-	144.8	5.5	3.2	95.6
リバビリン	A	176.0	205.6	112.0	-	100.0
	D	99.0	102.4	122.0	-	132.0
	E	104.0	83.8	128.0	-	180.0

添加量： A:鶏筋肉(0.01 mg/kg) B:鶏筋肉(0.1 mg/kg) C:鶏卵(0.1 mg/kg)

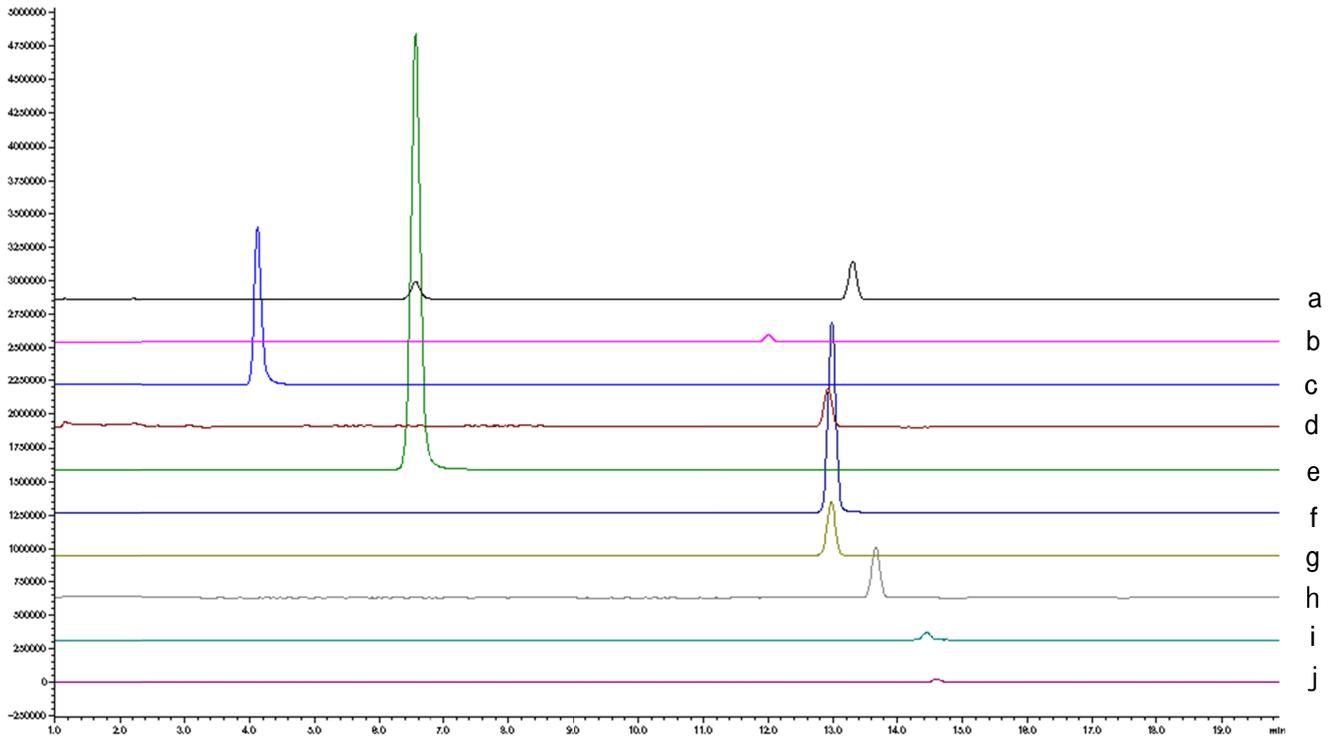


図5 標準溶液(0.01 µg/mL)のSRM クロマトグラム

使用機器：LCMS-8050 システム (島津製作所株)

- (a) アマンタジン、(b) アルビドール、(c) リバビリン、(d) リマンタジン、
 (e) アシクロビル、(f) イミキモド、(g) オセルタミビル、(h) ペラミビル、
 (i) ラニナミビル、(j) ザナミビル

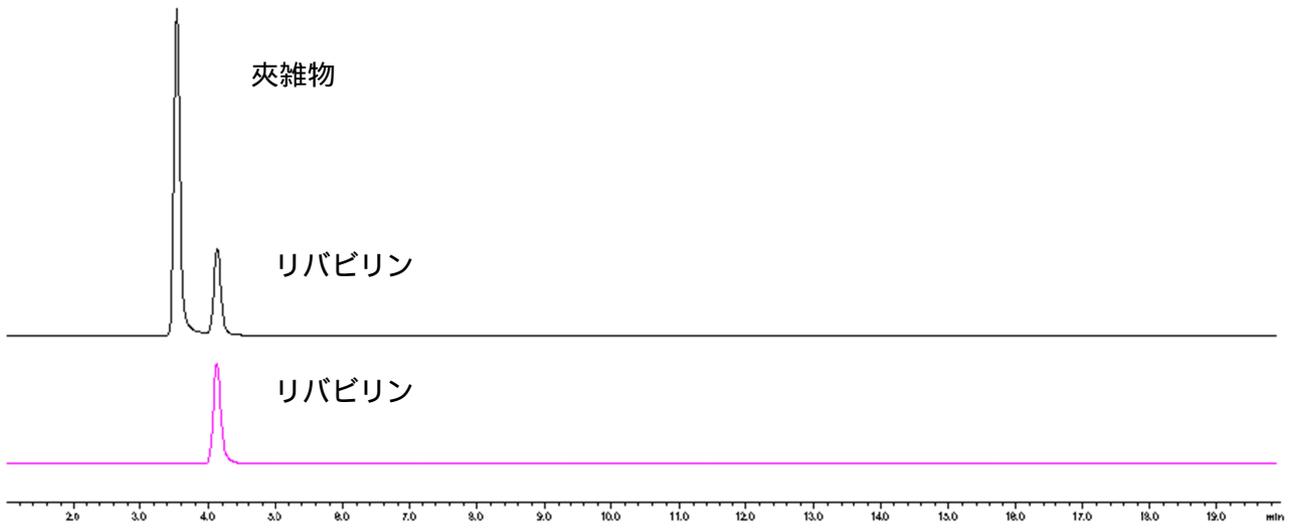


図6 リバビリンのSRMクロマトグラム
使用機器：LCMS-8050 システム（島津製作所株）

別紙

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

無し

雑誌

無し