

[技術資料]

畜産物中の動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価について

理化学課 食品担当 宮崎則文 福田勝一朗 緒方研太 山田和明 大窪かおり

キーワード 動物用医薬品一斉試験法 妥当性評価 LC-MS/MS

1 はじめに

佐賀県では、畜水産物の残留有害物質等モニタリング検査を、これまでは養殖魚と乳の理化学検査を当センターで、それ以外は佐賀県食肉衛生検査所で実施していたが、令和6年度から食肉の理化学検査を順次当センターに移管する計画があり、これまで適用していた試験法では対応できない項目があったことから、令和5年度に、まず鶏の筋肉の試験法の検討及び妥当性評価を実施したので報告する。

2 検査方法

2-1 試料

市販の鶏肉を試料とした。

2-2 検査項目

LC-MS/MS 一斉分析でオキシソリニック酸などの合成抗菌剤等 15 物質 13 項目について実施した。

2-3 標準品、試薬等及び標準液、試薬の調製

(1)検査に使用した標準品、試薬等

標準品は、富士フィルム和光純薬(株)社製の単品標準品を使用した。

試薬は、LC/MS 用、HPLC 用、試験研究用又は試薬特級を使用した。

精製用カラムは、Waters 社製 Oasis HLB 60mg/3mL を使用した。

その他、50mL 遮光ポリプロピレン遠沈管、Agilent 社製セラミックホモジナイザー等を使用した。

(2)標準液の調製

標準原液の調製方法は、オキシソリニック酸等の合成抗菌剤 11 物質と内寄生虫用剤のフルベンダゾールについては、10 mgをアセトニトリル又はメタノールにそれぞれ溶かし、50mL とした。(200 μ g/mL)テトラサイクリン系 3 物質は、50 mgをメタノールにそれぞれ溶かし、50mL とした。(1,000 μ g/mL)

各標準原液を混合して適宜アセトニトリル:水(1:9)で希釈して、0.25、0.5、0.75、1、2.5、5、10、50、250ng/mLの混合標準液を調製した。このうち、検量線用は、0.25から10ng/mLの混合標準液を使用した。なお、標準液の調製は、遮光下で行い、メスフラスコはポリプロピレン製を使用した。

(3)試薬の調製

抽出及び精製に使用する試薬の調製は、次のとおり行った。

・0.3%ギ酸 in メタノール:アセトニトリル(7:3):ギ酸 3mL をメタノールで 1,000mL としたものを 700mL 取り、アセトニトリル 300mL と合わせ混合した。

・0.2mol/L EDTA:EDTA-2Na37.2g を精密に量り、超純水に溶かして正確に 500mL とした。

・0.2mol/L EDTA クエン酸緩衝液:EDTA-2Na37.2g、クエン酸 6.4g 及びリン酸水素二ナトリウム 13.8g を精密に量り、超純水に溶かして正確に 500mL とした。

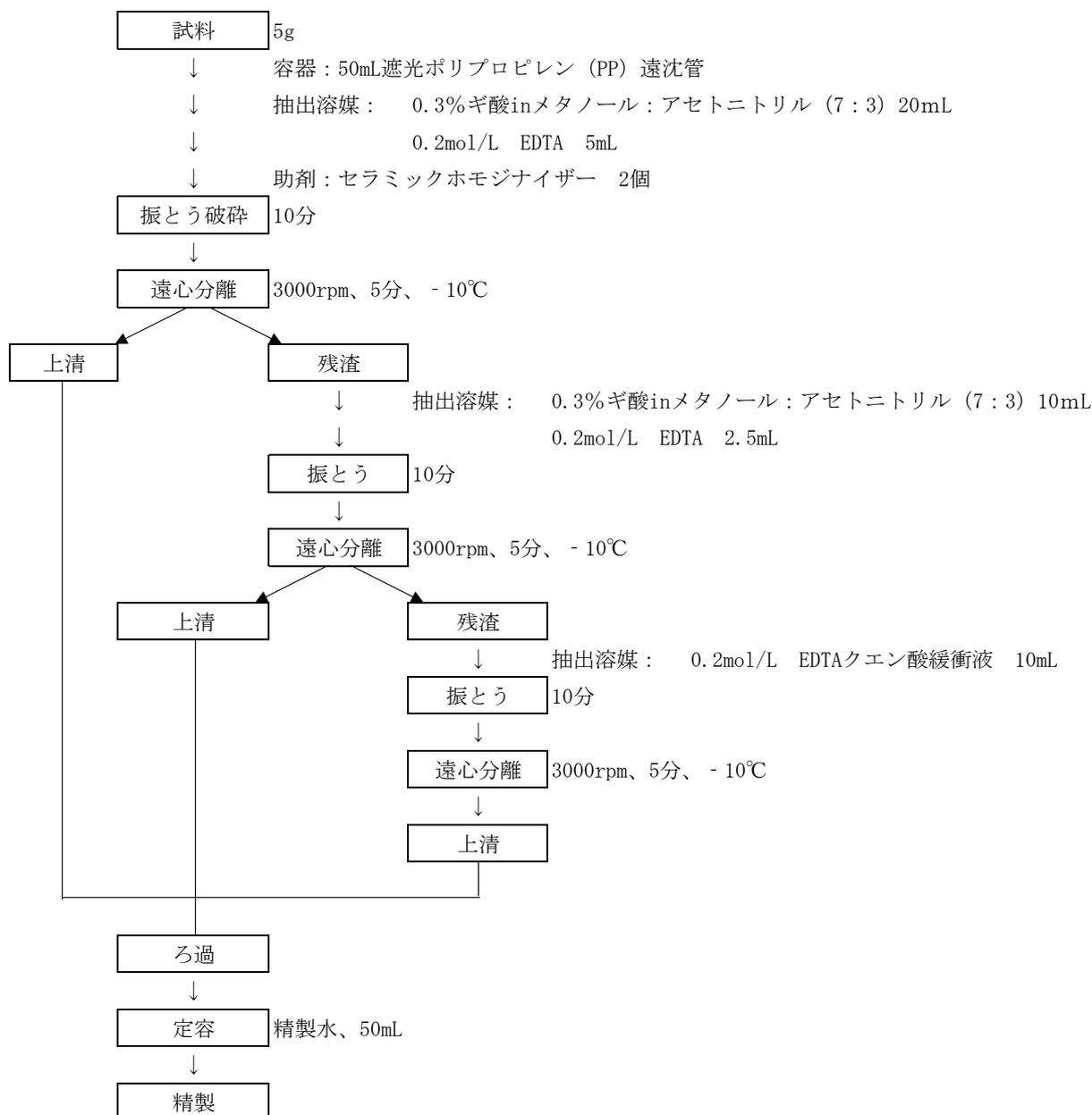
・0.1%ギ酸 in メタノール:ギ酸 0.5mL をメタノールで 500mL とした。

[技術資料]

2-4 試験溶液の調製

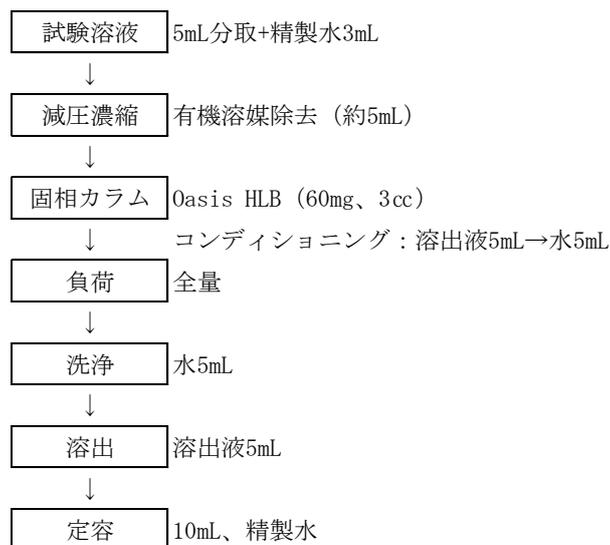
養殖魚等に適用していた当センター試験法は通知法を適用したものであるが、使用量が多く検出される頻度の多いテトラサイクリン系3物質(TCs)のうちクロルテトラサイクリン以外を他の合成抗菌剤と同時に測定できないことが判明していたため、既報の文献¹⁾をもとに試験法の再構築を行った。TCsはガラスや金属に吸着しやすいことから、キレート抑制にEDTAを添加し、容器への吸着と光分解対策に遮光ポリプロピレン遠沈管を使用、さらにホモジナイズの簡便化と金属への吸着対策としてセラミックホモジナイザーを採用した。また、最終試験溶液にできるだけ夾雑物を残さずLC-MS/MSを長期安定的に使用するために固相カートリッジによる精製を追加した。(図1)²⁾

【抽出】



[技術資料]

【精製】



※溶出液：0.1%ギ酸inメタノール

図1 試験溶液の調製フロー

2-5 装置及び分析条件

(1) LC-MS/MS

① 装置

LC:Agilent 1260、1290

MS:Agilent 6470 Triple Quad

② LC 条件

カラム:L-column3 C18,3 μ m

2.0mm×100mm METAL FREE(P)

カラム温度:40°C

移動相:A:0.1%ギ酸、B:アセトニトリル

グラジエント条件 A:B(min) 95:5(0)→0:100(15)→0:100(20)

流速:0.2mL/min

注入量:2 μ L

③ MS 条件

イオン化法:AJS ESI(+)(-)

ネブライザー:N₂、50psi乾燥ガス:N₂、350°C、10L/minシースガス:N₂、400°C、12L/min

キャピラリー電圧:3,500V

分析モード:MRM

検出条件:次に示すとおり

[技術資料]

測定項目	プリカーサー イオン	プロダクト イオン	フラグメン ター電圧(V)	コリジョン エネルギー (V)	Polarity
オキシリニック酸	262.1	244.1	100	20	Positive
	262.1	216	100	32	Positive
オルメトプリム	275.2	259.1	180	24	Positive
	275.2	123	180	24	Positive
スルファキノキサリン	301.1	155.9	120	12	Positive
	301.1	92	120	28	Positive
スルファジミジン	279.1	186	140	12	Positive
	279.1	92	140	32	Positive
スルファジメトキシシ	311.1	156	140	20	Positive
	311.1	92	140	32	Positive
スルファメラジン	265.1	108	120	24	Positive
	265.1	92	120	28	Positive
スルファモノメトキシシ	281.1	108	120	24	Positive
	281.1	92	120	28	Positive
チアンフェニコール	354	290.1	120	4	Negative
	354	185	120	16	Negative
トリメトプリム	291.2	230.1	180	20	Positive
	291.2	123	180	24	Positive
ナイカルバジン	301	136.8	120	12	Negative
	301	106.9	120	32	Negative
ピリメタミン	249.1	233.1	160	40	Positive
	249.1	177	160	28	Positive
フルベンダゾール	314.1	282	120	21	Positive
	314.1	123	120	25	Positive
オキシテトラサイクリン	461.2	426.1	140	16	Positive
	461.2	201	140	40	Positive
クロルテトラサイクリン	479.1	444.1	140	20	Positive
	479.1	154	140	28	Positive
テトラサイクリン	445.2	410.1	140	16	Positive
	445.2	154	140	28	Positive

3 試験法の検討および妥当性評価の方法

試験法の検討は、鶏肉 5g に 0.02ppm の濃度で添加回収試験を実施して行った。

妥当性評価は、実施者 1 名が 1 日 1 回(2 併行)5 日間実施する実験計画に基づき、0.01ppm 及び 0.05ppm の 2 濃度で添加回収試験を実施した。ガイドラインに従い、結果について選択性、真度・精度、定量限界の 4 項目を評価した。

[技術資料]

4 結果

(1) 試験法の検討

結果は、表1のとおりで、チアンフェニコール及びナイカルバジン以外は平均回収率70~120%、相対標準偏差15%未満を満足しており、良好な結果であった。

表1 試験法の検討における添加回収試験の結果一覧

測定項目	試験溶液中濃度 (ng/mL)			回収量 (ng)			回収率 (%)			平均回収率 (%)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
オキソリニック酸	0.80	0.80	0.86	80	80	86	80	80	86	82	3.6	4.4
オルメトプリム	0.81	0.82	0.86	81	82	86	81	82	86	83	2.7	3.2
スルファキノキサリン	0.84	0.82	0.81	84	82	81	84	82	81	82	1.7	2.1
スルファジミジン	0.84	0.82	0.83	84	82	83	84	82	83	83	0.7	0.8
スルファジメトキシシ	0.85	0.84	0.83	85	84	83	85	84	83	84	0.9	1.1
スルファメラジン	0.84	0.84	0.80	84	84	80	84	84	80	83	2.2	2.6
スルファモノメトキシシ	0.81	0.78	0.79	81	78	79	81	78	79	80	1.1	1.4
チアンフェニコール	0.88	1.40	1.30	88	140	130	88	140	130	119	28	23
トリメトプリム	0.79	0.75	0.78	79	75	78	79	75	78	77	1.9	2.4
ナイカルバジン	0.82	1.29	0.84	82	129	84	82	129	84	98	26	27
ピリメタミン	0.85	0.85	0.87	85	85	87	85	85	87	86	1.1	1.3
フルベンダゾール	0.76	0.78	0.79	76	78	79	76	78	79	78	1.6	2.1
オキシテトラサイクリン	0.86	1.00	1.06	86	100	106	86	100	106	97	10	10
クロルテトラサイクリン	1.12	0.97	1.02	112	97	102	112	97	102	103	7.7	7.4
テトラサイクリン	0.81	0.87	0.79	81	87	79	81	87	79	82	4.5	5.5

(2) 妥当性評価

① 選択性

ブランク試料を検討した試験法に従って試験し、定量を妨害するピークの有無を確認したところ、チアンフェニコールとナイカルバジンの2項目が不適合であった。

② 真度・精度

添加濃度0.01ppm及び0.05ppmの結果をそれぞれガイドラインの目標値(表2)と比較したところ、11項目が目標値に適合した。

なお、真度及び精度の何れかで不適合となった項目は表3のとおりであった。

表2 真度及び精度の目標値

添加濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01	70~120	25 >	30 >
0.05		15 >	20 >

[技術資料]

表 3 真度・精度が不適合となった項目の結果

	0.01ppm			0.05ppm		
	真度 (%)	併行 精度 RSD(%)	室内 精度 RSD(%)	真度 (%)	併行 精度 RSD(%)	室内 精度 RSD(%)
チアンフェニコール	104	49	71	91	9	11
ナイカルバジン	NA	NA	NA	275	193	193

■ : 不適合

NA : NDの結果があり、計算不可

③定量限界

定量限界に対応する濃度(0.5ppb)について、標準溶液から得られるピークの S/N 比を確認したところ、目標値である $S/N \geq 10$ を満たさなかったものは、チアンフェニコールとナイカルバジンの 2 項目があった。

④総合評価

評価項目の目標値を全て満たしたものは 11 項目あり、表 4 のとおりであった。

表 4 総合評価

	測定項目	選択性	真度		精度		定量 限界	評価
			0.05ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.01ppm		
1	オキシリニック酸	○	○	○	○	○	○	○
2	オルメトプリム	○	○	○	○	○	○	○
3	スルファキノキサリン	○	○	○	○	○	○	○
4	スルファジミジン	○	○	○	○	○	○	○
5	スルファジメトキシシ	○	○	○	○	○	○	○
6	スルファメラジン	○	○	○	○	○	○	○
7	スルファモノメトキシシ	○	○	○	○	○	○	○
8	チアンフェニコール	×	○	○	○	×	×	×
9	トリメトプリム	○	○	○	○	○	○	○
10	ナイカルバジン	×	×	×	×	×	×	×
11	ピリメタミン	○	○	○	○	○	○	○
12	フルベンダゾール	○	○	○	○	○	○	○
13	オキシテトラサイクリン	○	○	○	○	○	○	
	クロルテトラサイクリン	○	○	○	○	○		
	テトラサイクリン	○	○	○	○	○		

○:適合 ×:不適

5 まとめ

チアンフェニコール及びナイカルバジン以外の 13 物質 11 項目について、妥当性評価で、選択性、真度・精度、定量限界の全てが判定基準を満たしていたことから、TCs を含む動物用医薬品の一斉分析法を確立することができた。

今後は、牛の筋肉及び豚の筋肉について妥当性評価を実施し、当センターで全ての畜産物中の有害物質等モニタリング検査が可能な体制を整備する予定である。

[技術資料]

【文献】

- 1) 松尾広伸、辻村和也:LC-MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品の迅速一斉分析法の検討, 長崎県環境保健研究センター所報 66, 60-65 (2020)
- 2) 清川由樹、吉田純一:LC/MS/MS を用いたテトラサイクリン系抗生物質を含む動物用医薬品の迅速一斉分析法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報 18, 55-59 (2017)