

鶏の筋肉のエンロフロキサシン試験法の妥当性評価について

中西 理恵 濱田 幸子 大藤 升美 棟久 美佐子 藤永 祐介 茶谷 祐行

Validation on Analytical Method for Enrofloxacin in Chicken meat

Rie NAKANISHI Sachiko HAMADA Masumi OHFUJI Misako MUNEHISA
Yusuke FUJINAGA Yoshiyuki CHATANI

鶏の筋肉のエンロフロキサシン検査の試験法について、「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」に基づき妥当性評価を実施したところ、真度はエンロフロキサシンが103%、シプロフロキサシンが95%、併行精度はエンロフロキサシンが1.7%、シプロフロキサシンが5.3%、室内精度はエンロフロキサシンが3.1%、シプロフロキサシンが8.7%であり、いずれも目標値を満了し、本試験法の妥当性が確認できた。

キーワード：妥当性評価、動物用医薬品、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、鶏肉

key words : Validation, Veterinary Drugs, Enrofloxacin, Cyprofloxacin, Chicken meat

はじめに

京都府では、毎年、食品衛生監視計画に基づき府内で収去した食品中の残留農薬及び動物用医薬品の検査を実施しているところであるが、食品衛生法に定める規格基準への適合性を判断するためには、その試験法について厚生労働省通知^{*1}の「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」(以下、「ガイドライン」という。)に基づく妥当性評価の実施が求められている。

本研究では、残留農薬検査については農産物及び加工食品の一斉分析検査を厚生労働省通知^{*2}(以下、「試験法通知」という。)に規定する一斉試験法に準じた方法で、動物用医薬品検査については鶏の筋肉のエンロフロキサシン、エビ等のテトラサイクリンの個別分析検査を試験法通知に規定する個別試験法(以下、「個別通知法」という。)に準じた方法で実施しており、これらの試験法についてガイドラインに従った妥当性評価を順次行っているところである。今回、鶏の筋肉を対象としたエンロフロキサシン検査の妥当性評価を行ったので、その結果を報告する。

なお、エンロフロキサシンの残留基準はエンロフロキサシン及びその代謝物であるシプロフロキサシンの和として設定されていることから両物質について、また、個別通知法と同様に、定量用の測定に蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC)を、確認用の測定に液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いて妥当性評価を行った。

材料と方法

1. 試料

市販品の鶏の筋肉をミキサーで均一化し、凍結及び融解を

(平成26年6月10日受理)

繰り返さないために一回当たりの使用量ずつ分取し冷凍保存しておいたものを試料とした。

2. 対象化合物

エンロフロキサシン及びその代謝物であるシプロフロキサシン

3. 試験法

3-1. 試薬

標準品は和光純薬工業(株)製、高速液体クロマトグラフ用のエンロフロキサシン標準品及びシプロフロキサシン塩酸塩一水和物標準品を用いた。それぞれ100 µg/mLになるようメタノールで溶解したものを標準原液とし、各標準原液をアセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸溶液(15:85)混液で段階的に濃度を調製したものを混合標準溶液とした。

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムはWaters社製Oasis HLB固相抽出カートリッジ(60 mg)をメタノール5 mL及び水10 mLでコンディショニングしたものを用いた。

アセトニトリル、メタノール及びギ酸は和光純薬工業(株)製のLC/MS用を、メタリン酸は和光純薬工業(株)製の試薬特級を、トリフルオロ酢酸は和光純薬工業(株)製の和光特級を用いた。

3-2. 試験溶液の調製方法

調製方法の操作フローを図1に示した。

試料5.0 gにアセトニトリル及び0.2%メタリン酸(2:3)混液100 mLを加え5分間ホモジナイズした後吸引ろ過した。ろ

*1 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、平成22年12月24日、食安発1224第1号(2010)。

*2 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)。

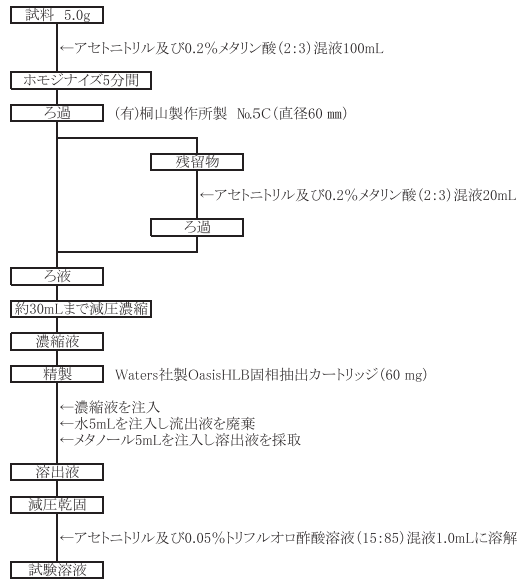


図1. 試験溶液調製方法

紙上の残留物にさらにアセトニトリル及び0.2%メタリン酸(2:3)混液20 mLを加え、かき混ぜた後吸引ろ過した。これらのろ液を併せて40°C以下で約30 mLまで減圧濃縮し、得られた濃縮液をOasis HLB固相抽出カートリッジ(60 mg)に注入した後水5mLを注入して流出液を捨て、メタノール5mLで溶出した。溶出液を40°C以下で減圧乾固し、残留物にアセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸溶液(15:85)混液1.0 mLを加え、超音波洗浄機に5分間漬けて溶解し試験溶液とした。

3-3. 測定装置及び測定条件

HPLC ((株)島津製作所製、LC部:CBM-20A(コントローラ)、LC-10AD及びLC-10AD_{VP}(送液ポンプ)、DGU-20A₃(デガッサー)、CTO-10AC_{VP}(カラムオープン)、検出部:RF-10A_{XL}(蛍光検出器)

LC-MS/MS(LC部:Agilent Technologies社製1100series、MS/MS部:Applied Biosystems社製API3000)

測定条件を表1に示した。

LC-MS/MS測定イオンについては、エンロフロキサシンの定量用イオンを360.1/316.3、確認用イオンを360.1/244.9及び360.1/203.4、シプロフロキサシンの定量用イオンを332.2/288.3、確認用イオンを332.2/245.1とした。

4. 妥当性評価方法

4-1. 選択性

無添加試料を用いて本試験法に従って試験を行い、定量を妨害するピークの有無を確認し、選択性の評価を行った。

4-2. 真度、併行精度、室内精度及び定量限界

試料5.0gに残留基準値である0.05 ppm(w/w)の濃度となるように混合標準溶液を添加し30分間放置したものを添加試料とし、実施者2名がそれぞれ添加試料を1日1回(2併行)で3日間、本試験法に従い実施した。

HPLCによる測定結果から、真度、併行精度及び室内精度を

表1. 測定装置及び測定条件

HPLC	(株)島津製作所製
装置	(LC部) コントローラ CBM-20A 送液ポンプ LC-10AD、LC-10AD _{VP} デガッサー DGU-20A ₃ カラムオープン CTO-10AC _{VP} (検出部) 蛍光検出器 RF-10A _{XL}
分離カラム	関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP 長さ150 mm、内径4.6 mm(粒径5 μm)
移動相	アセトニトリル及び0.1%ギ酸溶液(1:99)～(1:0)までの濃度勾配を35分でを行い、(1:0)で5分間保持する。
流量	1.0 mL/分
注入量	10 μL
カラム温度	40°C
検出器	蛍光検出器
測定波長	450 nm(励起波長 290 nm)
LC-MS/MS	
装置	(LC部)Agilent Technologies社製1100series (MS/MS部)Applied Biosystems社製API3000
分離カラム	関東化学(株)製 Mightysil RP-18 MS 長さ150 mm、内径2.0 mm(粒径5 μm)
移動相	アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸溶液(18:82)
流量	0.2 mL/分
注入量	5 μL
カラム温度	40°C
イオン化法	ESI
極性	ポジティブモード
ネブライザーガス流量(NEB)	14 mL/分
カーテンガス流量(CUR)	10 mL/分
イオンスプレー電圧(IS)	5000 V
イオン源温度(TEM)	500°C
ターボスプレー流量	6000 mL/分
フォーカシング電圧(FP)	370 V
エントランス電圧(EP)	10 V
コリジョン反応ガス流量(CAD)	4.0 mL/分
測定モード	Multiple Reaction Monitoring(MRM)
測定イオン(Q1/Q3)	エンロフロキサシン 360.1/316.3, 360.1/244.9, 360.1/203.4 シプロフロキサシン 332.2/288.3, 332.2/245.1

求め、ガイドラインに定められた目標値と比較して評価した。また、添加試料のピークのS/Nを求め、定量限界の確認を行った。

LC-MS/MSについては添加試料及び標準品の定量用イオンと確認用イオンのピーク面積比を求め、ピークが当該物質であるかどうかを確認し、真度、併行精度及び室内精度による評価と定量限界の確認も行った。

結果及び考察

選択性、真度、併行精度及び室内精度の結果を表2に示した。

表2. 妥当性評価結果

HPLC	添加試料濃度 (ppm(w/w))	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
エンロフロキサシン	0.05	○	103	1.7	3.1
シプロフロキサシン	0.05	○	95	5.3	8.7
LC-MS/MS	添加試料濃度 (ppm(w/w))	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
エンロフロキサシン	0.05	○	114	5.4	5.4
シプロフロキサシン	0.05	○	104	4.5	6.5

注)実施者2名が1日1回2併行で3日間実施した結果である。
選択性の○は妨害ピークが無かったことを示す。

無添加試料にはHPLC、LC-MS/MSともに妨害ピークは認められず、選択性に問題は無かった。

HPLCにおいては、真度はエンロフロキサシンが103%、シプロフロキサシンが95%、併行精度はエンロフロキサシンが1.7%、シプロフロキサシンが5.3%、室内精度はエンロフロキサシンが3.1%、シプロフロキサシンが8.7%であった。

LC-MS/MSにおいては、添加試料及び標準品について、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン各々の定量用イオンと確認用イオンのピーク面積比を求め、標準品のピーク面積に対する添加試料のピーク面積比を算出したところ、0.85～1.09であり差異が無かったことから各ピークが当該物質であることを確認した。また、定量用イオンの測定結果から求めた真度はエンロフロキサシンが114%、シプロフロキサシンが104%、併行精度はエンロフロキサシンが5.4%、シプロフロキサシンが4.5%、室内精度はエンロフロキサシンが5.4%、シプロフロキサシンが6.5%であった。

ガイドラインにおける目標値は真度が70～120%、併行精度が15%未満、室内精度が20%未満であり、HPLC、LC-MS/MSともに目標値に適合していた。

真度、併行精度及び室内精度が目標値に適合していたことに加えて、全添加試料のピークのS/NがHPLC、LC-MS/MSともに10以上であることを確認できたので、定量限界は添加濃度である0.05 ppm (w/w) とした。

以上により、本研究所における鶏の筋肉のエンロフロキサシン検査における本試験法が食品規格への適合判定のための試験法として妥当であることが確認できた。

本試験法ではHPLCによる測定を定量用、LC-MS/MSによる測定を確認用と位置付けて妥当性評価を行ったところ、両者とも試験法として妥当性が確認できた。今年度はLC-MS/MSの更新を予定しており、新装置導入後に再度妥当性評価を行うので、LC-MS/MSのみを用いた試験法の確立を検討したいと考えている。