

食肉中のエンロフロキサシン及びシプロフロキサシン試験法における
確認（定性）試験方法の検討

食肉衛生検査所 ○岸野巧、長坂真理子、小菅教仁

はじめに

フルオロキノロン系合成抗菌剤であるエンロフロキサシン(ERFX)は、牛及び豚の肺炎、大腸菌性下痢症等の治療薬として用いられ、畜産物中の ERFX 及びその代謝物であるシプロフロキサシン(CPFX)の試験法が厚生労働省から示されている(以下、「通知法」という。)[1]。

当所ではこれまでに、定量試験については通知法を改良した高速液体クロマトグラフ(HPLC)による試験法を確立したが(以下、「従来法」という。)[2]、確認(定性)試験(以下、「定性試験」という。)については、当所で質量分析計を保有していないことに加え、従来法の試験溶液がリン酸塩を含んでおり、質量分析計での分析ができない[3]という課題があった。

そこで今回、当所で従来法を改良した前処理方法を検討後(以下、「改良法」という。)、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による分析を神奈川県衛生研究所(以下、「衛研」という。)に依頼し、ERFX及びCPFXを定性する仕組みを構築すると共に、当所のHPLCにより改良法の妥当性評価を実施したので報告する。

材料及び方法

1 材料、装置、HPLC及びLC/MS/MS測定条件

使用した検体、標準品、試薬等は表1、HPLCの装置及び測定条件は表2、LC/MS/MSの装置及び測定条件は表3、4に示した。

表1 検体、標準品、試薬等

検体	豚筋肉及び牛筋肉
標準品	ERFX標準品(関東化学㈱製の食品分析用)、CPFX塩酸塩一水和物標準品(富士フィルム和光純薬㈱製のHPLC用)
標準溶液	各標準品を精密に量り、メタノールに溶解して標準原液(1000µg/mL)とし、これらを混合して0.1mol/Lリン酸二カリウム溶液:メタノール(7:3)で適宜希釈したものを混合標準溶液(STD)とした。
試薬	メタノール、アセトニトリル及び蒸留水はHPLC用、ギ酸はLC/MS用、その他の試薬は特級を用いた。
ミカラム	Inert-Sep SCX[500mg/6mL](ジ-エルサイエンス㈱製)[メタノール及び蒸留水でコンディショング後に使用]

表2 HPLCの装置及び測定条件(当所)

装置	WATERS ACQUITY Arc Systems (Waters㈱製)
検出器	蛍光検出器(Waters㈱製)
測定波長	励起波長:290nm 測定波長:450nm
分析カラム	CORTECS T3 (2.7µm, 3mm×150mm) Column (Waters㈱製)
カラム温度	40°C
移動相	0.1%ギ酸溶液:アセトニトリル=88:12
流速	0.4mL/min
注入量	5µL

表 3 LC/MS/MS の装置 (衛研)

LC測定条件		MS測定条件	
装置	ACQUITY UPLC I class(Waters(株)製)	装置	Xevo TQ-XS(Waters(株)製)
分析カラム	InertSustain C18 UHPLC-PEEK (2 μ m, 2.1mm \times 100mm) (ジールサイエンス(株)製)	イオン化方式	ESI(+)
移動相	A:0.1%ギ酸水溶液、B:0.1%ギ酸アセトニトリル	測定モード	マルチプルリアクションモニタリング及びプロダクトイオンスキャン
グラジエント条件	B:15%(0分) \rightarrow 15%(3分) \rightarrow 25%(5分) \rightarrow 35%(9分) \rightarrow 100%(12分) \rightarrow 100%(15分) \rightarrow 15%(15.5分)	キャピラリー電圧	1.0kV
カラム温度	30 $^{\circ}$ C	ソース温度	150 $^{\circ}$ C
流速	0.3mL/min	脱溶媒温度	500 $^{\circ}$ C
注入量	3 μ L	コンガス	窒素、150L/hr
		脱溶媒ガス	窒素、800L/hr
		コリジョンガス	アルゴン

表 4 LC/MS/MS の測定条件(衛研)

対象物質ごとの測定条件				
	プリカー Сайオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	イオン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
ERFX	360	316	30	18
	360	203	30	40
CPFX	332	288	32	18
	332	203	32	34
対象物質	上段：マルチプルリアクションモニタリングの定量イオン及びプロダクトイオンスキャンの測定条件			
	下段：マルチプルリアクションモニタリングの確認イオンの測定条件			

2 方法

(1) 試験溶液調製方法の検討

衛研のERFX等一斉試験法標準作業書を参考に、塩を含まない溶媒(0.1%ギ酸含有15%アセトニトリル)で希釈した混合標準溶液をHPLCで測定し、検量線を作成したが、良好な直線性が得られなかった。一方、従来法の希釈溶媒(0.1mol/Lリン酸二カリウム溶液:メタノール(7:3))では正確な定量ができることがわかっている。そこで、HPLC 定量用

及びLC/MS/MS 定性用に最終試験溶液を分ける方法を検討した(図)。

豚筋肉に残留基準値濃度(0.05ppm)の混合標準溶液を添加し、図中「追加点」内濃縮乾固後、メタノール又はアセトニトリルで定容した。これを「HPLC による定量」の手順に従って調製し、試験溶液をHPLCで測定して回収率を比較検討し(各n=3)、定容溶媒を選択した。

(2) LC/MS/MS による定性試験

(1)の結果から選択した定容溶媒を用いて、図中「LC/MS/MS による定性」の手順に従い試験溶液を調製後、ERFX及びCPFXの検出確認を衛研に依頼した(n=5)。

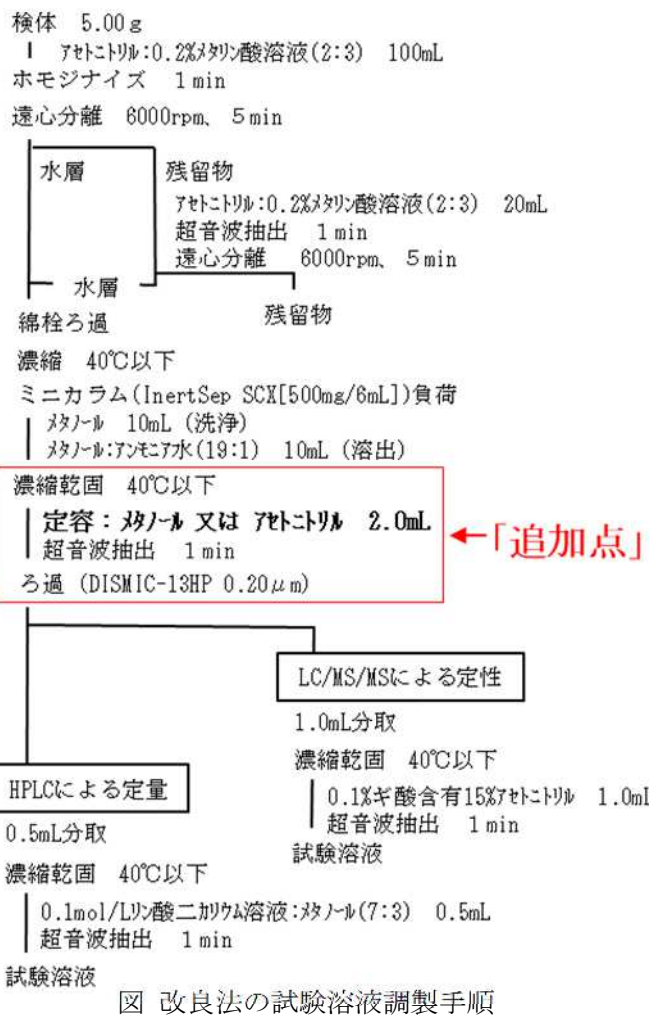


図 改良法の試験溶液調製手順

(3) 妥当性評価

(1)の結果から選択した定容溶媒を用いた改良法(図中「HPLCによる定量」)について、妥当性評価ガイドライン(以下、「ガイドライン」という。)[4]に従い妥当性評価を実施した。添加濃度は残留基準値濃度(0.05ppm)とし、得られた結果から選択性、真度(平均回収率)、併行精度及び室内精度の各性能パラメータを求め、それぞれガイドラインの目標値等に適合しているかを確認した。検量線は50%~150%に調製した混合標準溶液を用いて作成した。

成 績

1 試験溶液調製方法の検討

定容溶媒にメタノールを用いた場合の回収率はERFX96.5%、CPFX88.8%で、アセトニトリルと比較して明確な差が認められたため(表5)、方法(2)及び(3)ではメタノールを選択した。

表5 定容溶媒の比較検討

化合物	回収率(%)	
	メタノール	アセトニトリル
ERFX	96.5	2.9
CPFX	88.8	0.8

2 LC/MS/MSによる定性試験

混合標準溶液添加検体全てでERFX及びCPFXの検出が確認された。

3 妥当性評価

検量線はERFX及びCPFX共に良好な直線性を示し(相関係数 $r > 0.999$)、全ての性能パラメータはガイドラインの目標値等を満たした(表6)。

表6 妥当性評価結果

化合物	牛				豚			
	選択性	真度*1(%)	併行精度*2(%)	室内精度*3(%)	選択性	真度*1(%)	併行精度*2(%)	室内精度*3(%)
ERFX	○	99.6	1.6	4.3	○	97.1	1.1	2.9
CPFX	○	95.5	1.6	3.2	○	92.2	1.9	4.0
目標値	○	70~120	15未満	20未満	○	70~120	15未満	20未満

*1 真度=平均回収率

*2 併行精度=併行条件下の精度(相対標準偏差)

*3 室内精度=室内条件下の精度(相対標準偏差)

考 察

ERFX及びCPFXはガラスに吸着することが知られており[5]、HPLC定量用試験溶液として検討した0.1%ギ酸含有15%アセトニトリルでは、標準溶液の調製及び保管に使用しているガラス製のメスフラスコへの吸着を抑えることができず、標準溶液の濃度が変化したため、検量線の直線性が得られなかったと考えられた。このため、従来法の前処理工程に溶媒による定容工程を追加し、「HPLCによる定量」及び「LC/MS/MSによる定性」に分ける改良法を考案した。また、定容に用いる溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを比較検討したところ、回収率に大きな差が認められた。これは、アセトニトリルと比較してERFX及びCPFXがメタノールに対して高い溶解性を有しているものと推察された。

一方、定容溶媒にメタノールを選択して調製したLC/MS/MS定性用試験溶液の測定を衛研に依頼した結果、ERFX及びCPFXが添加検体全てで確認され、改良法の定性試験方法を確立することができた。併

せて、当所 HPLC を用いて実施した妥当性評価の結果、全ての性能パラメータがガイドラインの目標値等を満たしたことから、改良法が通知法と同等又はそれ以上の性能を有する試験法であることが示された。

まとめ

これまで検討してきた従来法にメタノールによる定容工程を加え、HPLC 定量用及び LC/MS/MS 定性試験用に分ける改良法を考案した。LC/MS/MS による定性試験を衛研に依頼したところ、添加検体全てで検出が確認され、併せて当所 HPLC による改良法の妥当性評価を実施した結果、全ての性能パラメータがガイドラインの目標値等を満たし、改良法の信頼性を確保することができた。今後は標準作業書の作成及び検査体制の整備を行い、収去検査等の日常検査に取り入れたい。

引用文献

- [1] 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）
- [2] 長坂真理子他：高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた畜産物中のエンロフロキサシ及びシプロフロキサシ試験法の妥当性評価, 令和元年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会資料, 365-367 (2019)
- [3] 小菅教仁他：金属キレートカラム精製法を用いた高速液体クロマトグラフィーによる畜産物中の抗生物質の分析, 神奈川県衛生検査所研究報告第 42 号, 22-26 (2012)
- [4] 「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」（平成 22 年 12 月 24 日付け食安発第 1224 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）
- [5] 内田耕太郎他：溶液中における合成抗菌剤の安定性, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告第 52 号, 21-26 (2014)