

鶏肉・鶏卵中の残留動物用医薬品検査に係る

新規検査項目の試験法検討

【化学衛生室】

米澤友紀子、坪内一晃、福田武史

1 はじめに

当所では、鶏肉及び鶏卵中の残留動物用医薬品を、厚生労働省通知「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」(以下、「通知法」という。)¹⁾「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ(畜水産物)」¹⁾(以下、「Ⅰ法」という。)に従い、県内において使用履歴のある動物用医薬品成分を対象に検査を実施している。この度、鶏肉及び鶏卵に主に使用されている動物用医薬品の再確認を行ったところ、検査項目の見直しと新規検査項目の追加検討が必要となった。

そこで、検査項目の追加検討にあわせ、当所で開発し、牛及び豚の筋肉と腎臓の検査に使用している試験法(「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ(畜水産物)」を改良した方法²⁾、以下、「Ⅲ法改」という。)が、鶏肉及び鶏卵の検査に適用可能か検討を行い、「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」³⁾(以下、「ガイドライン」という。)に従い妥当性評価を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

2 方法

2.1 試料

試料は、対象成分が残留していないことを確認した鶏の筋肉及び鶏卵を使用した。鶏卵については、検査対象項目がすべて不検出基準であったため、通知法に示された定量限界濃度となるよう、また鶏肉については、試料中濃度が各基準値となるよう混合標準溶液を添加し、いずれも、標準液添加後 30 分間放置した後、抽出操作を開始した。

■抽出溶媒 (10mM EDTA含有[アセトニトリル:メタノール:0.1%メタリン酸=1:1:2])*抽出溶媒はあらかじめ冷却しておく
【抽出】 試料 5.0g(褐色PP遠沈管) 抽出溶媒 50mL ホモジナイズ(2min)(氷冷) ハイフロースーパーセル薬さじ1杯を遠沈管に入れて混ぜる 吸引ろ過(ハイフロースーパーセル積層) 遠沈管に抽出溶媒 20mLを入れて洗いこみ 吸引ろ過 ろ液をあわせて100mLにメスアップ 5mL分取し、100mLナスフラスコへ 濃縮(有機溶媒が除去され、2mL程度になるまで) +水 2.5mL 濃縮液
【精製】 OasisHLBカラム(60mg) 【流出液は捨てる】 メタノール 5mL、水 5mLで吸引洗浄(コンディショニング) 濃縮液を負荷 水 2.5mL×2で100mLナスフラスコを洗いこみ 【流出液は受ける】 50mLナスフラスコ メタノール 2.5mL×2で100mLナスフラスコを洗いこみ メタノール 1mLで溶出 濃縮、窒素乾固 +アセトニトリル:水(4:6)(鶏肉:2.5mL、鶏卵1mL) 超音波で溶解 0.2µmPTFEフィルターろ過 250µLPPバイアルに充填 LC/MS/MS測定

図1 試液調製フロー

2.2 標準品

標準品は、和光純薬工業製及びシグマアルドリッチ社製を用いた。

2.3 試薬等

メタリン酸(特級)は和光純薬工業製を、2NA(EDTA・2Na)(試験研究用)は同仁化学研究所製を、その他の試薬についてはLC/MS用を用いた。固相カラムは、Waters社製 Oasis HLB(60mg)を用いた。

2.3 装置

- ホモジナイザー:
KINEMATICA ポリトン PT10-35
- 高速液体クロマトグラフ:
島津製作所 Nexera X2
- 質量分析装置: AB SCIEX QTRAP5500

2.4 試験溶液の調製及び検討項目

試験溶液の調製方法は図1のとおりである。試験は、光分解を起こしやすい化合物があるため、遮光して行った⁴⁾。当初、褐色処理をしたガラス器具(試験管及びナスフラスコ)を使用した。牛筋肉等の行政検査時に試験精度が低下した際、原因として、褐色ガラスに含まれる金属成分が流出したことが影響したと推測されたため⁵⁾、透明のガラス器具に変更し、試験室内の照明を落とし、さらにアルミホイルによりガラス器具を遮光することにより対応した。

検討項目は、I法によりこれまで検査を実施しているエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、オルメプリム及びスルファモノメキシミンに加え、新たにオキソリニック酸、チアンフェニコール、ノルフロキサシン、アモキシシリン、フロルフエニコール(代謝物フロルフエニコールアミンを含む。)とした。その結果、アモキシシリン及びフロルフエニコールアミンについて

は、回収を得ることができなかつたため、これらを除いた8物質について妥当性評価を行うこととした。回収が得られなかつた原因として、この2化合物は極性が高いため、使用した固相抽出カラムに保持されなかつたものと推測された。

2.5 LC/MS/MS 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は、表1のとおりとした。また、鶏肉における各化合物のイオン化条件等は表2-1のとおりとした。鶏卵については、同条件検討したが、低濃度における機器感度が一部化合物について不良であったため、イオン化条件等の再検討を行い、表2-2のとおりとした。

表1 LC/MS/MS 測定条件

分析カラム	化学物質評価研究機構 L-column2 ODS(2.1*150mm 3μm)	
ガードカラム	化学物質評価研究機構 L-column2 ODS (2.1*10mm 5μm)	
移動相	A液	0.1mMギ酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸水溶液
	B液	0.1mMギ酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
流速	0.2mL/min	
グラジエント条件	B: 0min(10%)→1min(10%)→10min(40%) →13min(40%)→18min(98%)→30min(98%)	
カラム温度	40°C	
注入量	3μL	

表2-1 化合物の測定条件(鶏肉)

【イオン化条件 ESI(+): CUR(40),CAD(7),IS(+4500V),TEM(700°C),GAS1(40),GAS2(30)】

【イオン化条件 ESI(-): CUR(40),CAD(7),IS(-4000V),TEM(700°C),GAS1(40),GAS2(80)】

化合物名	ESI	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
エンロフロキサシン	+	360.1	316.1	51	10	25	18
シプロフロキサシン	+	332.1	288.2	46	10	27	54
オキソリニック酸	+	262.0	216.0	56	10	39	20
オフロキサシン	+	362.2	318.2	51	10	27	28
オルメプリム	+	275.2	123.1	46	10	33	4
スルファモノメキシミン	+	281.1	156.1	36	10	23	4
チアンフェニコール	-	354.0	185.0	-72	-10	-26	-11
ノルフロキサシン	+	320.0	276.2	46	10	23	24

表2-2 化合物の測定条件(鶏卵)

【イオン化条件 CUR(40),CAD(9),IS(+4500V,-4500),TEM(700°C),GAS1(50),GAS2(80)】

化合物名	ESI	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
エンロフロキサシン	+	360.1	316.1	84	10	27	30
シプロフロキサシン	+	332.0	314.2	86	10	33	26
オキシリニック酸	+	262.0	216.0	56	10	39	20
オフロキサシン	+	362.1	318.1	76	10	27	32
オルメトプリム	+	275.1	123.0	101	10	37	8
スルファモノトキシシン	+	281.1	92.3	86	10	41	8
チアンフェニコール	-	354.0	185.0	-72	-10	-26	-11
ノルフロキサシン	+	320.1	276.2	46	10	23	24

3 結果

3.1 妥当性評価の結果

妥当性評価は、ガイドラインに従い、実施者1名が1日1回(2併行)5日間実施する枝分かれ試験とした。

(1) 選択性

鶏肉及び鶏卵のブランク試料を測定したところ、全ての化合物において、定量を妨害するピークは確認されず、選択性の目標値に適合した。

(2) 真度及び精度

予備試験時に、鶏肉及び鶏卵ともにチアンフェニコールについてイオン化促進が確認されたため、マトリックス溶液を添加した混合標準液により検量線を作成し評価した。

表3のとおり、鶏肉については、全ての成分で真度の目標値(70%~120%)に適合した。また、併行精度及び室内精度もガイドラインの目標値(併行精度<15%、室内精度<20%)に適合した。

鶏卵については、エンロフロキサシンを除いた7成分が、真度の目標値に適合した。併行精度及び室内精度は、すべての化合物がガイドラインの目標値(オルメトプリム:併行精度<15%、室内精度<20%、その他の化合物:併行精度<25%、室内精度<30%)に適合した。しかし、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン及びノルフロキサシンといったニューキノロン系合成抗菌剤を中心に、併行精度及び室内精度がガイドラインの範囲内ではあるも

の、精度が不安定な結果となった。今回検討したニューキノロン系合成抗菌剤は、ガラスに吸着するという報告がある³⁾ため、使用したガラス器具のロット差や試料とガラス器具の付着時間の差等により影響が生じたと考えられる。試験溶液の調製を迅速に行うとともに、長時間試料が付着したガラス器具については超音波処理を行うなど、ガラス器具への吸着を低減させる対応が必要である。

(3) マトリックス効果

ブランク試料を、基準値相当濃度の混合標準液(鶏卵については、通知法に示された定量限界相当濃度の混合標準液)により溶解したマトリックス混合標準溶液と、アセトニトリル:水(4:6)混液により溶解した混合標準溶液を調製し、マトリックスによる影響を確認した。

鶏肉については、ニューキノロン系合成抗菌剤でイオン化抑制の傾向が確認された。また、スルファモノトキシシンについては、鶏卵においてイオン化促進の傾向が、チアンフェニコールについては、鶏肉、鶏卵ともに顕著なイオン化促進が確認された。

3.2 一斉試験に備えた鶏肉の試験結果

鶏肉及び鶏卵の一斉試験に対応するため、鶏卵を対象として設定した表2-2の測定条件が、鶏肉に適用可能か確認することとし、5併行の添加回収試験を実施した。標準溶液添加濃度及び試験操作は、妥当性評価と同様とした。

真度及び併行精度を妥当性評価ガイドラインに準

拠して評価したところ、表4のとおり、すべての項目が、ガイドラインの目標値に適合した。また、定量を妨害するピークも確認されなかった。

4 まとめ

鶏肉及び鶏卵中の残留動物用医薬品検査について検査項目の追加検討にあわせ、Ⅲ法改が適用可能か検討し妥当性評価を行った結果、鶏肉については8成分、鶏卵については7成分がガイドラ

インの目標値に適合した。鶏卵において妥当性評価が不適合であったエンロフロキサシンについても真度は60%以上あるため、スクリーニング検査には十分使用できる結果であった。

試験精度が不安定であったニューキノロン系合成抗菌剤等については、今後、化合物のガラス吸着影響等を調べ、試験精度がより安定するよう検討していく予定である。

表3 鶏肉及び鶏卵の妥当性評価の結果(*はニューキノロン系合成抗菌剤)

成分名	鶏肉					鶏卵				
	基準値 (ppm)	真度 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)	マトリック ス効果 (%)	通知法定 量限界 (ppm)	真度 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)	マトリック ス効果 (%)
エンロフロキサシン*	0.05	97	4.5	11	78	0.01	62	23	23	93
シプロフロキサシン*		99	8.1	15	82	0.01	87	18	16	114
オキシリニック酸	0.03	97	2.7	12	96	0.01	97	2.3	5.8	98
オフロキサシン*	0.05	99	6.1	16	77	0.01	75	21	21	98
オルメトプリム	0.1	99	5.4	9.5	84	0.02	101	2.3	3.6	93
スルファモノメキシシ	0.1	99	8.8	12	118	0.01	96	3.4	13	146
チアンフェニコール	0.05	108	4.3	18	156	0.01	72	12	23	191
ノルフロキサシン*	0.02	96	8.0	15	79	0.01	91	15	18	100

表4 鶏肉の添加回収試験の結果(n=5)

成分名	真度(%)	併行精度 (%)
エンロフロキサシン	92	4.1
シプロフロキサシン	99	3.2
オキシリニック酸	94	1.3
オフロキサシン	97	3.3
オルメトプリム	101	1.4
スルファモノメキシシ	92	2.2
チアンフェニコール	103	6.5
ノルフロキサシン	106	4.6

5 参考文献

- 1) 厚生労働省通知：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、食安発第0124001号(2005)
- 2) 田中恵理, 福田武史：鳥取県衛生環境研究所報第56号, 43-45(2015)
- 3) 厚生労働省通知：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、食安発1224第1号(2010)
- 4) 内田耕太郎, 柿本健作, 山口貴弘, 永吉晴奈, 起橋雅浩, 小西良昌, 梶村計志：大阪府立公衆衛生研究所報52号, 21-26(2014)
- 5) 大野ちづ子, 藤井伸基, 織田まゆみ：徳島県保健環境センター報27号, 45-48(2009)