

エビのテトラサイクリン等試験法の妥当性評価について

濱田 幸子 樋口 泰則 茶谷 祐行

Validation on Analytical Method for Tetracyclines Residues in Shrimp

Sachiko HAMADA Yasunori HIGUCHI Yoshiyuki CHATANI

動物用医薬品検査について、「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」に基づきエビのテトラサイクリン等検査の試験法の妥当性評価を実施した。オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンで目標値を満たした。

キーワード：妥当性評価、動物用医薬品、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、エビ
key words : Validation, Veterinary Drugs, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Tetracycline, Shrimp

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取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「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」(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)(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。

本研究所では、動物用医薬品検査については厚生労働省通知(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)で規定する個別試験法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おり、平成25年度には鶏のエンロフロキサシンで実施した¹⁾。今回、エビのテトラサイクリン等検査の妥当性評価を行ったので、その結果を報告する。

材料と方法

1. 試料

市販品のエビをミキサーで均一化し、凍結及び融解を繰り返さないよう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

対象化合物は、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンの3物質とした。

3. 試験法

3-1. 試薬

(平成27年7月31日受理)

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オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品、クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品及びテトラサイクリン塩酸塩標準品を用いた。それぞれ1000 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た。混合標準溶液は小菅ら²⁾に従い回収率が良いとされている0.1%ギ酸水溶液及びアセトニトリル(9:1)溶液で、各標準原液を段階的に希釈して調製した。

抽出溶液は、クエン酸一水和物100 mmol溶液614 mLとリン酸水素二ナトリウム200 mmol溶液386 mLを混合したものにエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム3.72 gを溶解して調製した。イミダゾール緩衝液はイミダゾール68.08 g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム0.37 g、酢酸マグネシウム10.72 gを約800 mLの超純水に溶解し、酢酸でpH7.2に調整後、超純水を加えて1,000 mLとしたものを孔径0.2 µmのメンブレンフィルターでろ過して使用した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムはGLサイエンス社製InertSep PLS-2 (270 mg/20 mL)を用い、メタノール10 mL、水10 mL及び飽和エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液10 mLでコンディショニングを行った。

孔径0.2 µmPTFEフィルターは、緩衝液のろ過にはアドバンテック東洋(株)製H020A047Aを、試験溶液のろ過には同社のDISMIC13HP020ANを用いた。

エチレンジアミン四酢酸ナトリウムは(株)同仁化学研究所製、イミダゾール、リン酸水素二ナトリウムはナカライテスク(株)製特級を使用した。アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用を、その他試薬は特級を使用し、いずれも和光純薬工業(株)製とした。水はヤマト科学(株)製オートスチル WA570で作製したイオン交換水を用い、超純水はメルク(株)製 Milli-Q Direct 16を用いて調製した。

3-2. 試験溶液の調製方法

試験溶液の調製操作フローを図1に示した。

試料5.0 gに抽出溶液30 mLを加え2分間ホモジナイズした後、毎分3000回転で10分間遠心分離し、水層を採った。残留

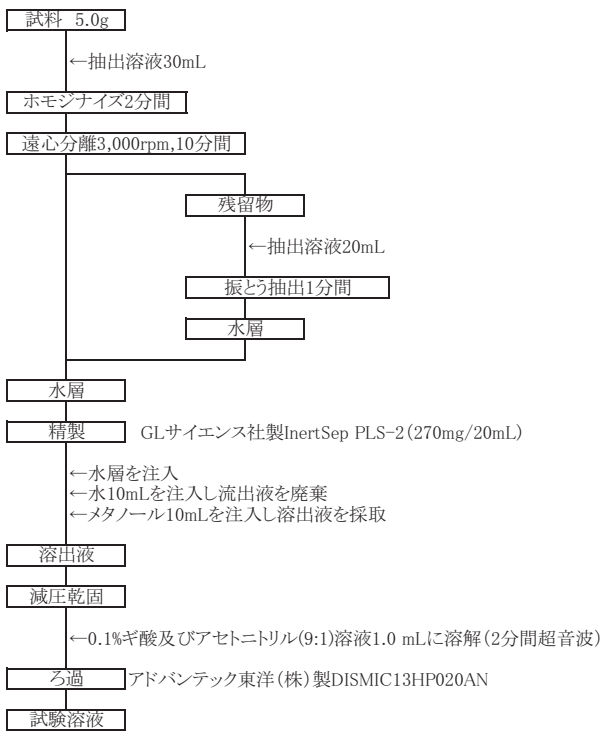


図1. 試験溶液調製方法

物にさらに抽出溶液20 mLを加え、1分間振とう抽出し、同様に遠心分離して水層を合わせた。この溶液をInertSep PLS-2 (270 mg/20 mL) に注入した後、水10 mLで洗浄し、メタノール10 mLで溶出した。溶出液を40℃以下で減圧乾固し、残留物に0.1%ギ酸及びアセトニトリル (9:1) 溶液1.0 mLを加え、超音波洗浄機で2分間処理して溶解し試験溶液とした。

3-3. 測定装置及び測定条件

測定装置と測定条件の一覧を表1に示した。

測定は、オキシテトラサイクリンとテトラサイクリンでは移動相①を用い、クロルテトラサイクリンでは移動相②を用いた。しかし、これまでに行った除去試験結果によると、移動相①で測定した場合、エビには検体によってオキシテトラサイクリンの保持時間近くに妨害ピークが現れるものがあり、その場合には移動相③を用いて測定を行い良好な結果を得ている。そこで妨害物質のあるエビの測定のため、エビのオキシテトラサイクリンについては2種類の移動相で評価した。

表1. 測定装置及び測定条件

HPLC装置	(株)島津製作所製 (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	ナカライテスク製 コスモシル5C18 長さ150 mm、内径4.6 mm(粒径5μm)
移動相	A液：イミダゾール緩衝液 B液：メタノール ① オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン A液:B液 (17:3) ② クロルテトラサイクリン A液:B液 (3:1) ③ オキシテトラサイクリン A液:B液 (193:7) (①で妨害ピークが見られる場合に使用する)
流量	1.0 mL/分
注入量	10 μL
カラム温度	40℃
検出器	蛍光検出器
測定波長	520 nm(励起波長 380 nm)

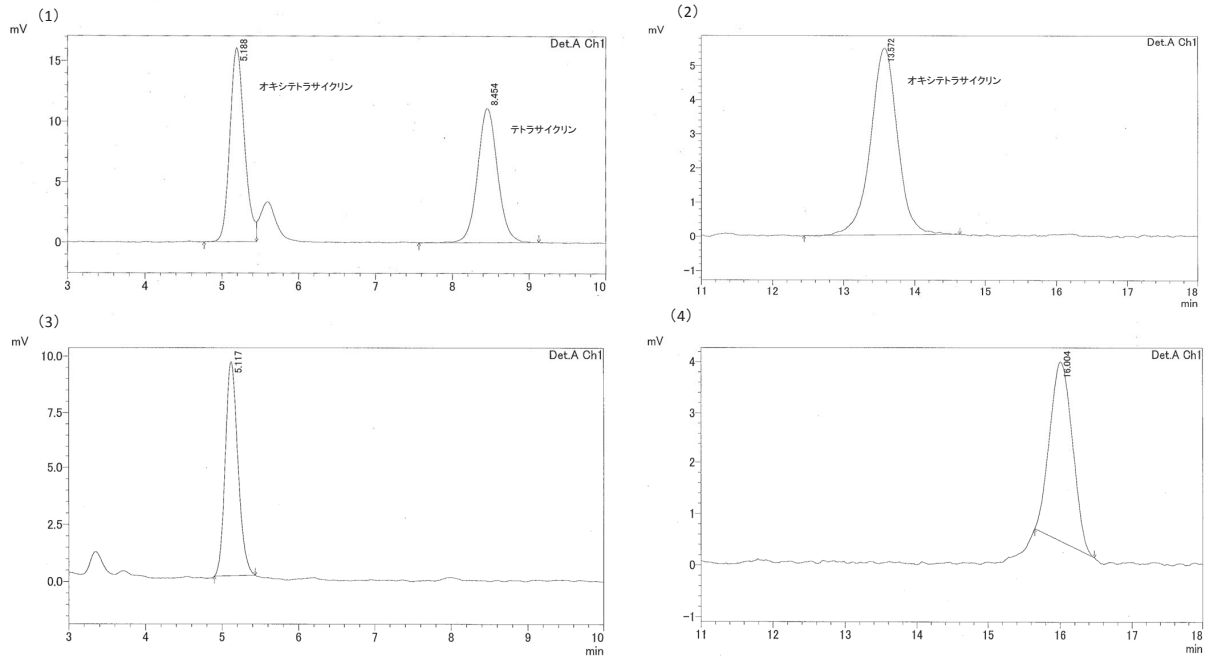


図2. エビの妨害ピーク

- (1) 標準物質 (移動相①)
- (2) 標準物質 (移動相③)
- (3) エビの妨害ピーク (移動相①)
- (4) エビの妨害ピーク (移動相③)

4. 妥当性評価方法

4-1. 選択性

無添加試料を用いてガイドラインに従い、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にオキシテトラサイクリンは残留基準値である0.2 µg/g、クロルテトラサイクリンは0.03 µg/g、テトラサイクリンは0.02 µg/g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1名が5日間、添加試料を1日1回 (2併行) で実施した。

高速液体クロマトグラフによる測定結果から、真度、併行精度及び室内精度を求め、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、添加試料の各対象物質のピークのS/Nを求め、定量限界の確認を行った。

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。

選択性について、移動相①ではオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンで妨害ピークが見られたが、それぞれ基準値濃度の1/10未満、定量限界濃度の1/3未満の面積値であったことから選択性を満足した。移動相③のオキシテトラサイクリン、移動相②のクロルテトラサイクリンでは妨害ピークはみられず選択性を満足すると判断した。

真度はオキシテトラサイクリンが移動相①で90%、移動相③で75%、クロルテトラサイクリンが72%、テトラサイクリンが84%、併行精度はオキシテトラサイクリンが移動相①で2.8%、移動相③で4.7%、クロルテトラサイクリンが8.3%、

表2. 妥当性評価結果

	添加試料濃度 (µg/g)	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	定量下限値 (µg/g)
オキシテトラサイクリン (移動相①)	0.2	○	90	2.8	12	0.02
オキシテトラサイクリン (移動相③)	0.2	○	75	4.7	5.7	0.02
クロルテトラサイクリン	0.03	○	72	8.3	12	0.03
テトラサイクリン	0.02	○	84	3.3	5.7	0.02

注) 実施者1名が2併行で5日間実施
 選択性の○はガイドラインの基準を満足したことを示す。

テトラサイクリンが3.3%、室内精度はオキシテトラサイクリンが移動相①で12%、移動相③で5.7%、クロルテトラサイクリンが12%、テトラサイクリンが5.7%であった。

ガイドラインにおける目標値は真度が70~120%、併行精度はオキシテトラサイクリンが10%未満、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンが15%未満、室内精度はオキシテトラサイクリンが15%未満、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンが20%未満であり、移動相①、③のオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンのすべてが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10以上であると確認できたので、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンの定量限界はそれぞれ添加濃度である0.03 µg/g、0.02 µg/gとした。また、オキシテトラサイクリンは添加濃度が0.2µg/gと他の2物質の10倍程度と高いので、添加試料のS/Nが100以上であったこと、添加濃度0.02 µg/g相当である0.1 µg/mLの標準溶液のS/Nが10以上であったことを確認し、定量限界は添加濃度の10分の1である0.02 µg/gとした。

以上により、本研究所のエビのオキシテトラサイクリン、

クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン検査において、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。

しかし、本試験法では前処理で精製しきれない妨害ピークを避けるため一つの試料について複数回の測定を行う必要があり測定の効率が悪く、今後は一回の測定で3つのテトラサイクリン類が測定できる試験法の確立を検討したいと考えている。

引用文献

- 1) 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. 鶏の筋肉中のエンロフロキサシン試験法の妥当性評価について. 京都府保健環境研究所年報, 59, 42-44.
- 2) 小菅教仁, 脇ますみ, 甲斐茂美, 岸弘子. 2012. 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水産物中の抗生物質の分析. 神奈川県衛生研究所報告, 42, 22-26.