

畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質検査における 前処理法の検討

常松順子・久保田晶子・河野嘉了・田中志歩・松永美樹・佐藤秀樹

福岡市保健環境研究所保健科学課

Study of Pretreatment Method for Simultaneous Determination of Tetracycline Antibiotic in Livestock Products and Seafoods

Junko TSUNEMATSU, Akiko KUBOTA, Yoshinori KAWANO, Shiho TANAKA
Miki MATSUNAGA and Hideki SATO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市保健環境研究所ではドキシサイクリンを除くテトラサイクリン系抗生物質の検査で高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計による一斉分析を行っているが、鶏卵の泡立ち等操作性に課題があったため、その改善と前処理時間の短縮を目指し検討を行った。

まず、最も時間を要している精製時の固相カラムの目詰まり解消のため、精製工程での固相カラムの粒子径、充填量、カラムサイズを大きいものに変更し、さらに、鶏卵や牛肉に対しては、抽出工程での遠心分離条件及びデカンテーションへの変更について検討した。

試験法の検証として、乳とうなぎでは 1,930×g で遠心分離後綿栓ろ過、鶏卵と牛肉では 10,000×g で遠心分離後上清をデカンテーションしたものを、変更した固相カラムに負荷する条件で妥当性評価試験を実施した。その結果、すべての評価パラメーターにおいて目標値等を満たすと同時に、対象の全ての食品について前処理時間が短縮されたのに加え、現行法で問題となっている鶏卵の泡立ちも解消されるなど操作性も改善した。

Key Words : テトラサイクリン系抗生物質 tetracycline antibiotic, 一斉分析 simultaneous determination, 高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

1 はじめに

テトラサイクリン系（以下、「TC系」とする。）抗生物質は、牛、豚、鶏、魚類等を対象に動物用医薬品として使用されており、食品衛生法に基づき、ポジティブリスト制度の下、食品によっては含有してはならない又は残留基準が設定されているものがあり、厳しく規制されている。また、食品衛生法に定める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はガイドライン¹⁾に基づく妥当性評価を実施しなければならない。

これまでに福岡市保健環境研究所では、畜水産物中のTC系抗生物質の試験法として、厚生労働省通知²⁾に規定する個別試験法を参考に、オキシテトラサイクリン（以下、「OTC」とする。）、クロルテトラサイクリン

（以下、「CTC」とする。）、テトラサイクリン（以下、「TC」とする。）の一斉分析法³⁾（以下、「現行法」とする。）を確立し適用している。

しかし、食品によって抽出操作における吸引ろ過時や固相カラムによる精製時の目詰まり、鶏卵では吸引ろ過時の著しい泡立ちなど、操作性に課題があり前処理に時間を要していた。TC系抗生物質が紫外線で分解されやすいことを考慮すると、前処理時間の短縮は必要であり、そのためには操作が速やかにできるよう改良しなければならない。

そこで、前処理における操作性の改善と時間短縮を目的に、最も時間を要している精製操作時において通液性の高い精製固相カラムへの変更の検討から開始し、抽出操作時の遠心分離条件及びろ過方法の変更を検討後、

OTC, CTC, TC の 3 化合物に対し, 牛乳, うなぎ, 鶏卵, 牛肉の 4 つの食品において妥当性評価を実施したので報告する。また, ドキシサイクリン (以下, 「DOXY」とする。) については, 現行法の試験法では抽出用溶液は水溶液を使用しているため, DOXY の個別試験法とは抽出用溶液 (個別試験法ではアセトン) の極性が異なっている。そこで, 本検討では参考として, 上記 3 化合物と同時に一斉分析に含め, 前処理法検討での回収率や変動を確認し, 若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で市販されている牛乳, うなぎ, 鶏卵, 牛肉を用いた。

各試料の採取方法は以下のとおり行った。

牛乳: 同一ロットを, フードプロセッサを用いてよく混合均一化し試料とした。

うなぎ: 同一個体の可食部を細切した後, フードプロセッサを用いてよく混合均一化し試料とした。

鶏卵: 同一生産ロットの殻付卵の殻を除去し卵白と卵黄を合わせて, フードプロセッサを用いてよく混合均一化し試料とした。

牛肉: 可能な限り脂肪層を取り除き細切した後, フードプロセッサを用いてよく混合均一化し試料とした。

2.2 試薬等

標準品: オキシテトラサイクリン塩酸塩, クロルテトラサイクリン塩酸塩, テトラサイクリン塩酸塩, ドキシサイクリンヒクラーのいずれも富士フィルム和光純薬社製を用いた。

標準原液: 標準品を OTC, CTC, TC 及び DOXY の力価で換算して 100 mg/L になるように蒸留水で調製した。

混合標準溶液: 各標準原液を蒸留水で, 10 mg/L になるように混合し混合標準液を調製した。

添加回収用混合標準溶液: 混合標準液をメタノール: 蒸留水=1:1 で希釈し, 0.2 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L を調製した。

検量線用混合標準溶液: 混合標準液をメタノール: 蒸留水=1:1 で希釈し, 0.0005 mg/L~0.050 mg/L の範囲内で段階的に調製した。

検量線用マトリックス添加混合標準液: ブランク試料の試料溶液と混合標準液を 9:1 で混合し, 0.0005 mg/L~0.050 mg/L の範囲内で段階的に調製した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム:

InertSep HLB FF (200 mg/20 mL) (ジーエルサイエンス社製)

メタノール: LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬社製)

アセトニトリル: LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬社製)

ギ酸: LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬社製)

メタリン酸: 特級 (シグマアルドリッチ社製)

2.3 装置・器具等

LC-MS/MS

LC部: Agilent 社製 1260 シリーズ

MS部: Agilent 社製 Agilent 6470

振とう機: タイテック社製 RECIPRO SHAKER SR-2w

遠心機: 久保田製作所製 フロア型冷却遠心機 KUBO TAS700FR, ハイブリッド型高速冷却遠心機 KUBOTA 6200

フィルター: 孔径 0.2 μm メンブレンフィルター

バイアル: 1.5 mL スクリューバイアル ポリプロピレン製 (以下, 「PP 製」とする。), 褐色

PP製遠心管: 50 mL 容, 15 mL 容, 褐色

2.4 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に, 対象化合物の測定イオン等を表 2 に示す。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

分析カラム	GLサイエンス 社製 InertSustain C18 HP (2 mm id×100mm, 3 μm)
カラム温度	40℃
注入量	5 μL
移動相	A液: 0.1%ギ酸 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液: 5% (3 min)-100% (23 min)-100% (28 min)-5% (28.1 min)-5% (30 min)
流速	0.2 mL/min (0-28 min), 0.4 mL/min (28.1-30 min)
イオン化	ESI (ポジティブモード)
イオンスプレー電圧	4000 V
イオンソース温度	300℃

2.5 前処理法の検討

2.5.1 精製工程での固相カラムの変更

1) 溶出溶媒量の検討

(1) 混合標準溶液による溶出状況の確認

0.2%メタリン酸溶液: 蒸留水=2:3 に試料換算濃度 0.2 mg/kg になるよう添加回収用混合標準液を添加したものを, 現行法に従いメタノール 10 mL と水 30 mL でコンディショニングした InertSep HLB FF に 10 mL 負荷後, 蒸留水 5 mL で洗浄し, 加圧して蒸留水を除去

表2 対象化合物の測定イオン等

No.	化合物名	相対保持時間※	Q1(m/z)	Frag(V)	定量イオン		確認イオン	
					Q3(m/z)	CE(V)	Q3(m/z)	CE(V)
1	OTC	1.00	461.2	132	426.1	20	443.1	12
2	CTC	1.18	479.1	132	444.0	24	462.1	16
3	TC	1.05	445.2	132	410.1	20	154.0	32
4	DOXY	1.22	445.2	132	428.1	20	154.0	36

※相対保持時間はOTCの保持時間（10.0分）に対する相対値であり，妥当性評価結果の平均値で示した。

後，メタノール 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 mL で溶出した。各溶出液を蒸留水で2倍になるように希釈混合後，0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し褐色 PP 製バイアルに入れ，試験溶液とした。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線を用いて行い，回収率を求めた。

(2) 試料における回収率の確認

試料は，牛乳，うなぎ，鶏卵，牛肉を用いた。

試験法は現行法³⁾に準じ，試料に試料換算濃度 0.02 mg/kg になるよう添加回収用混合標準溶液を添加し，0.2 % メタリン酸を加え 10 分間振とう後，1,930×g で 10 分間遠心分離した後，綿栓ろ過操作を 2 回繰り返し調製したものを抽出液とした。抽出液の 10 mL を InertSep HLB FF に負荷後，蒸留水 5 mL で洗浄し，加圧して蒸留水を除去後，メタノール 10 mL で溶出した溶出液に蒸留水 10 mL を混合し，0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し褐色 PP 製バイアルに入れ，試験溶液とした。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線を用いて行い，回収率を求めた。

2) 添加回収試験

2.5.1 1) (2) の試験法について，試料として牛乳，うなぎ，鶏卵，牛肉を用い，定量限界濃度 0.02 mg/kg（うなぎの OTC は基準値 0.2 mg/kg）の添加回収試験を 5 名 2 併行で実施した。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線を用いて行い，ガイドラインに従い真度（回収率）と精度（併行精度）を評価した。

3) 食品由来成分が固相カラムによる精製へ及ぼす影響

鶏卵，牛肉について，食品由来成分の影響を少なくするため，2.5.1 1) (2) の試験法の遠心分離条件を 10,000×g に変更した各抽出液 100 mL に，試料換算濃度が 0.02 mg/kg になるように添加回収用混合標準液 0.2 mg/L を 1 mL 添加後，精製を行う添加回収試験（n=3）を行った。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線と検量線用マトリックス添加混合標準液（0.001 mg/L）による 1 点検量線を用いて行い，それぞれ回収率を求めた。

2.5.2 抽出工程についての検討

1) 遠心分離条件の変更

鶏卵と牛肉について，2.5.1 1) (2) の試験法の遠心分離条件を 10,000×g に変更し，定量限界濃度（0.02 mg/kg）での添加回収試験（n=3）を行った。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線を用いて行い，回収率を求めた。

2) 綿栓ろ過からデカンテーションへの変更

牛肉について，2.5.2 1) の試験法の綿栓ろ過をデカンテーションへ変更し定量限界濃度（0.02 mg/kg）での添加回収試験（n=3）を行った。定量は検量線用混合標準溶液による絶対検量線を用いて行い，回収率を求めた。

2.6 妥当性評価試験

2.6.1 試験溶液の調製

牛乳，うなぎの試験溶液の調製法を図 1 に，鶏卵，牛肉の試験溶液の調製法を図 2 に示す。

2.6.2 実施方法

実施者 5 名で 2 併行試験を 1 日間行い，試料は牛乳，うなぎ，鶏卵，牛肉を用いた。OTC，CTC，TC の添加濃度は，牛乳，鶏卵，牛肉については，通知法の定量限界濃度の最低値である 0.02 mg/kg と各食品の基準値濃度の 2 濃度，うなぎについては，OTC は基準値濃度（0.2 mg/kg），CTC，TC は 0.02 mg/kg とし，DOXY の添加濃度は，上記 CTC，TC と同じ濃度とした。2.5 試験溶液の調製に従い試験溶液を調製後，結果は，ガイドラインに従って選択性・真度（回収率）・精度（併行精度・室内精度）を評価した。

3 結果及び考察

3.1 前処理方法の検討

3.1.1 精製工程での固相カラムの変更

1) 溶出溶媒量の検討

(1) 混合標準溶液による溶出状況の確認

InertSep HLB FF（粒子径 60 μm，充填量 200 mg，カラムサイズ 20 mL）は，現行法の Oasis HLB（粒子径 30 μm，充填量 60 mg，カラムサイズ 6 mL）よりも粒子径

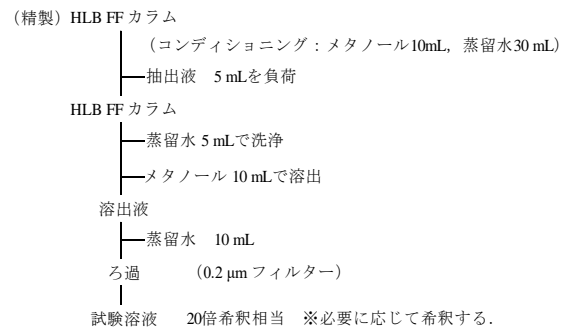
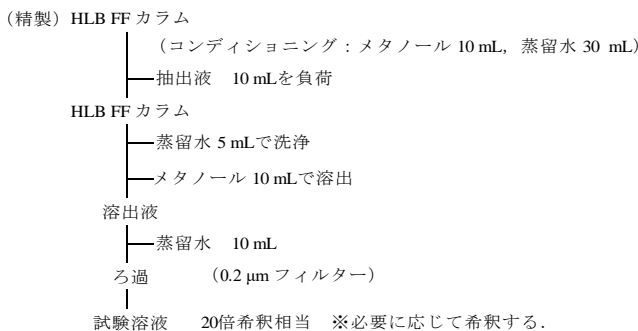
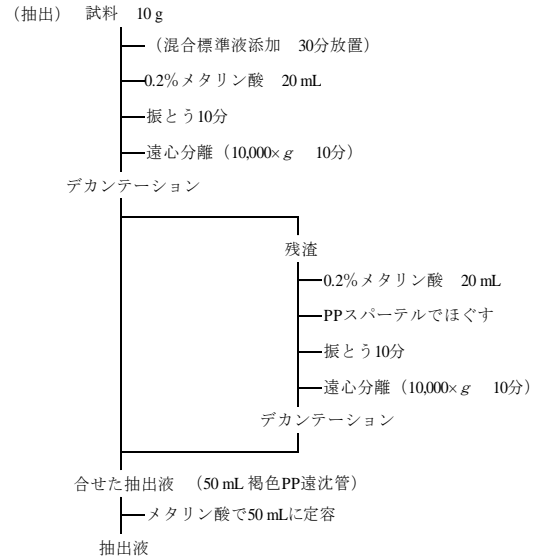
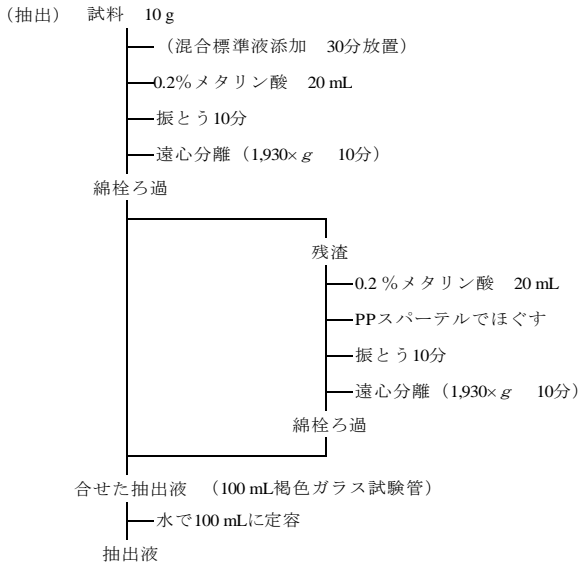


図1 牛乳, うなぎの試験溶液の調製法

図2 鶏卵, 牛肉の試験溶液の調製法

や接液面積が大きいため通液性の改善が期待される。そこで、InertSep HLB FFにおける溶出溶媒量を決定するため、混合標準溶液による溶出状況を確認した。溶出溶媒量を変化させた時の溶出状況を図3に示す。

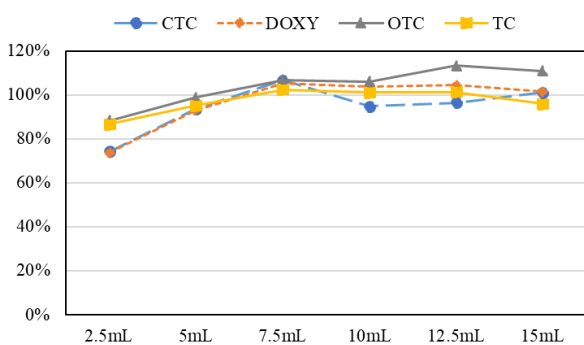


図3 溶出溶媒量を変化させた時の TC 系抗生物質の溶出状況

その結果、溶出溶媒(メタノール)量 7.5 mL 以上で TC 系抗生物質の回収率は 95%以上となった。実際の検査では、精製において食品由来成分による TC 系抗生物質回収率低下も考えられることから、現行法の倍量の 10 mL を溶出溶媒量とすることとした。

(2) 試料における回収率の確認

3.1.1 1) (1)で決定した溶出溶媒量条件で、試料における回収率を確認した。各試料における回収率を表3に示す。

表3 各試料における TC 系抗生物質の回収率

No.	化合物名	回収率 (%)			
		牛乳	うなぎ	鶏卵	牛肉
1	OTC	110	98	112	91
2	CTC	100	87	103	77
3	TC	105	93	109	81
4	DOXY	99	76	88	64

添加濃度: 0.02 mg/kg (n=1)

牛乳, うなぎ, 鶏卵については, OTC, CTC, TC では回収率は 87~112%で, DOXY では回収率は 76~99%であった。牛肉については, OTC, CTC, TC では回収率が 77~91%であり, DOXY では回収率は 64%であった。以上のことから, 固相カラムの InertSep HLB FF の溶出溶媒量は 10 mL で, OTC, CTC, TC では概ね 80%以上の回収率が得られ, 参考として分析した DOXY でも, 牛乳, うなぎ, 鶏卵で 75%以上の回収率が得られた。

2) 添加回収試験

2.5.1 1) (2) の試験法における精度を確認するため行った添加回収試験結果を表4に示す。

牛乳では、OTC, CTC, TC の回収率は 93~108%, 併行精度は 3.1~5.4%と目標値を満たしており, DOXY も回収率は 96%, 併行精度は 4.2%であり, 回収率は良好であった。うなぎでは、OTC, CTC, TC の回収率は 83~89%, 併行精度は 2.7~3.2%と目標値を満たしており, DOXY の回収率は 70%, 併行精度は 1.8%であり, 回収率が目標値の範囲内であった。これらの結果から、牛乳, うなぎの試験法については、2.6.1 の牛乳, うなぎの試験溶液の調製法を採用することとした。

一方、牛肉では、回収率は OTC, CTC, TC が 72~101%と良好であったが、DOXY が 59%と低く、併行精度は OTC, CTC, DOXY が 7.6~14.5%であったが、TC が 16.8%と目標値を超過した。鶏卵は、全ての化合物で、併行精度が 16.9~18.6%と目標値を超過した。

また、この変更により、鶏卵以外の食品については固

相カラムでの通液性が改善したが、鶏卵については固相カラムからの溶出に時間がかかり通液性は改善しなかった。

3) 食品由来成分が固相カラムによる精製へ及ぼす影響

TC 系抗生物質はタンパク質と結合あるいは金属とキレートを作りやすく抽出されにくい化合物であると報告³⁾されている。そのため、牛肉の CTC, TC の回収率の変動や DOXY の回収率の低さについては、食品由来成分中のタンパク質や金属等の影響も考慮し検討する必要があると考えられた。

そこで、3.1.1 2) の添加回収試験結果で併行精度が目標値前後で変動が比較的大きい鶏卵と牛肉について、各抽出液の食品由来成分が固相カラムの精製に及ぼす影響を確認することとし、食品由来成分の影響を少なくするため、遠心分離条件を 10,000×g に変更した抽出液に対し添加回収試験を行い、InertSep HLB FF での精製における TC 系抗生物質の損失（以下、「精製ロス」とする。）を確認した。

表4 精製工程での固相カラムを InertSep HLB FF に変更した試験法での添加回収試験結果

No.	化合物名	牛乳		うなぎ		鶏卵		牛肉	
		0.02 mg/kg ^{※1}		0.02 mg/kg ^{※1}		0.02 mg/kg ^{※1}		0.02 mg/kg ^{※1}	
		回収率 (%)	併行精度 (%)	回収率 (%)	併行精度 (%)	回収率 (%)	併行精度 (%)	回収率 (%)	併行精度 (%)
1	OTC	106	3.1	83	3.2	85	18.3	101	8.1
2	CTC	108	4.3	84	2.7	74	18.6	72	14.5
3	TC	93	5.4	89	3.0	81	18.5	80	16.8
4	DOXY	96	4.2	70	1.8	72	16.9	59	7.6
	目標値	70~120	<15	70~120	<15 ^{※2}	70~120	<15	70~120	<15

※1 添加濃度

※2 OTCは<10

検量線用混合標準溶液による絶対検量線での結果では、鶏卵は OTC, TC の回収率で、牛肉は OTC, CTC, TC の回収率で 110%を超え、イオン化促進が認められたため、検量線用マトリックス添加混合標準液による 1 点検量線で再度回収率を求めた。その結果を表5に示す。

表5 食品由来成分が固相カラムによる精製へ及ぼす影響

No.	化合物名	鶏卵		牛肉	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
1	OTC	104	0.9	108	0.2
2	CTC	104	1.7	106	4.8
3	TC	103	2.2	106	2.8
4	DOXY	106	2.4	104	1.9

添加濃度：試料中濃度として0.02 mg/kg (n=3)

鶏卵の及び牛肉の回収率は 105%前後で再現性も良好

であったことから、固相カラム InertSep HLB FF での精製ロスはほとんどないと考えられた。従って、遠心分離条件を 10,000×g に変更した抽出液では、食品由来成分が固相カラムによる精製に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。

また、遠心分離条件の変更により、鶏卵抽出液の固相カラムからの溶出時の通液性は良好になった。

以上のことから、鶏卵と牛肉の試験法として真度（回収率）及び精度を向上させるためには、抽出工程に関する検討が必要と考えられた。

3.1.2 抽出工程についての検討

1) 遠心分離条件の変更

3.1.1 2) の検討結果から精度が不十分な鶏卵と牛肉について、3.1.1 3) の遠心分離条件を 10,000×g に変更した抽出液への添加回収試験結果では、精製ロスはほとんど

なく、再現性も良好であった。そこで、試験法の精度確認のため、添加回収試験 (n=3) を行った。結果を表 6 に示す。

表 6 遠心分離条件 10,000×g に変更した試験法での添加回収試験結果

No.	化合物名	牛肉		鶏卵	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
1	OTC	98	3.5	104	0.4
2	CTC	82	15.2	86	2.6
3	TC	80	12.3	100	7.6
4	DOXY	60	3.5	54	1.8

添加濃度：0.02 mg/kg (n=3)

遠心分離条件が 1,930×g である 3.1.1 2) の検討結果と比較すると、牛肉の CTC を除く 3 化合物と鶏卵の 4 化合物は精度が改善していた。一方、精製ロスの有無を確認した 3.1.1 3) の検討結果と比較すると、牛肉の CTC と TC は RSD が 12.3~15.2% と大きく、鶏卵でも TC は RSD が 7.6% とやや大きかった。以上のことから、遠心力を増やすことにより、鶏卵については精度の改善が確認できたが、牛肉の CTC と TC は精度の改善が十分ではなかった。

2) 綿栓ろ過からデカンテーションへの変更

現行法³⁾では遠心分離後のろ過は吸引ろ過であり、食品によっては目詰まりや泡立ちなどによりろ過に時間を要していた。一方、中島ら⁵⁾は、豚の頸部筋肉における TC 系抗生物質の添加回収試験で綿栓ろ過を使用しており、内山ら⁶⁾は、豚腎臓の DOXY 分析法の検討でろ過をろ紙から綿栓に変更している。いずれも EDTA 含有クエン酸緩衝液で抽出しヘキサン脱脂した抽出液を遠心分離後綿栓ろ過しており、現行法と同様、抽出に有機溶媒は使用されていない。そこで、前処理法の検討を効率よく行うため、目詰まりの多い吸引ろ過から綿栓ろ過に変更し検討を開始した。

しかし、牛肉については、遠心分離条件を 10,000×g に変更したにもかかわらず、3.1.2 1) の検討結果では回収率の変動が大きかった。

TC 系抗生物質はタンパク質と結合あるいは金属とキレートを作りやすく抽出されにくい化合物であると報告³⁾されており、星野ら⁷⁾は、良好な再現性を得るためにはクリーンアップ過程に除タンパク操作が必要で、除タンパク剤としてメタリン酸を検討している。

当所では 0.2%メタリン酸溶液による抽出のため、メタリン酸の除タンパク効果により、抽出でのタンパク質残留による TC 系抗生物質の損失は少ないと考えられる。しかし、遠心分離後油脂類を含むと考えられる浮遊物があり綿栓に付着していた。上記中島ら⁵⁾や内山ら⁶⁾の報告では、前述の抽出液に対しヘキサン脱脂処理後遠心分

離し綿栓ろ過を行っており、いずれの報告も検体の油脂類は脱脂用のヘキサンに溶解した状態で綿栓ろ過を行っていると考えられた。従って、本検討での牛肉の試験法では、綿栓に抽出液中の油脂類を含むと考えられる浮遊物が付着することにより回収率が変動している可能性があった。

そこで、牛肉について、綿栓ろ過からデカンテーション (浮遊物は PP スパテルで入らないように行う) へ変更し添加回収試験 (n=3) を行った。結果を表 7 に示す。

表 7 デカンテーションへ変更した試験法での添加回収試験結果

No.	化合物名	牛肉	
		回収率 (%)	RSD (%)
1	OTC	96	2.1
2	CTC	79	3.1
3	TC	93	1.6
4	DOXY	64	2.2

添加濃度：0.02 mg/kg (n=3)

CTC, TC は RSD が 1.6~3.1% となり、再現性が良好になった。以上のことから、牛肉と 3.1.2 1) の検討結果で TC の RSD がやや大きかった鶏卵についても、綿栓ろ過をデカンテーションに変更することとした。

3) TC 系抗生物質の吸着への対応

現行法³⁾は、OTC, CTC, TC の 3 化合物は、ガラス製バイアル内で分解もしくはガラス表面に吸着しやすいため PP 製バイアルを使用しており、ドキシサイクリン試験法 (畜水産物) の試験法開発事業報告書 (<https://www.mhlw.go.jp/content/000473288.pdf>) でも、DOXY は金属と容易に錯体を形成しガラス壁に吸着されやすいため、PP 製の器具を使用している。

2) のデカンテーションへの変更により再現性は良好になったが、妥当性評価試験では、堅牢性の高いデータが求められる。そこで、精度が十分でなかった肉類と鶏卵の試験法については、抽出工程で使用するガラス製器具を PP 製器具へ変更した。さらに、メタリン酸による除タンパク効果を高めるため、定容を水から 0.2%メタリン酸での定容に変更し、操作の迅速化のため定容をスケールダウンした 2.6.1 の牛肉、鶏卵の試験溶液の調製法で行うこととした。

3.2 妥当性評価結果

各試料の妥当性評価結果を表 8 に示す。なお、定量限界濃度での妥当性評価は、3.1.1 2) 添加回収試験結果を用いた。DOXY については、参考であるため、評価は行わなかった。

試料中の各化合物濃度は、牛乳とうなぎについては

0.0005~0.010 mg/L の濃度範囲で、鶏卵と牛肉については、定量限界濃度 (0.02 mg/kg) 測定時は 0.0005~0.005 mg/L の濃度範囲で、基準値濃度 (0.2~0.4 mg/kg) 測定時は 0.005~0.050 mg/L の濃度範囲で作成した検量線で定量した。

また、試料マトリックスのイオン化への影響を確認するため、マトリックス添加標準液の溶媒標準液に対するピーク面積の比を確認した。結果を表9に示す。

表9 試料マトリックスのイオン化への影響

No.	化合物名	ピーク面積比 [※] (a/b)			
		牛乳	うなぎ	鶏卵	牛肉
1	OTC	1.02	1.00	1.26	1.16
2	CTC	1.01	0.99	1.13	1.13
3	TC	1.06	0.99	1.17	1.13
4	DOXY	1.00	1.00	0.99	1.12

※ マトリックス添加混合標準溶液(a)の混合標準溶液(b)に対するピーク面積の比

牛乳、うなぎについては、0.99~1.06 でありイオン化の影響はほとんどないと考えられた。一方、鶏卵と牛肉については、鶏卵の DOXY を除く化合物で、1.12~1.26 でありイオン化促進が確認された。

そこで、牛乳とうなぎについては溶媒標準溶液を用い、鶏卵と牛肉については、マトリックス添加標準溶液を用いて定量した。各化合物において、検量線の決定係数は 0.997 以上と良好な直線性を示した。

選択性については、対象の全ての食品で、妨害ピークが定量限界濃度に相当するピーク面積の 1/3 未満で許容範囲内であることを確認した。

OTC, CTC, TC は、真度・精度においても、対象の全ての食品でガイドラインの目標値を満たした。

一方、参考として分析した DOXY では、回収率は牛乳で 90%以上と高くうなぎや牛肉で 70%前後、鶏卵では 60%未満と低かったが、精度は対象の全ての食品で目標値の範囲内であった。DOXY は、地方公共団体及び検疫所における平成 30 年度食品中の残留農薬等検査結果 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000660662.pdf>) で豚の筋肉において違反事例が多く、収去検査において監視が必要な化合物である。本検討での参考結果では回収率が不十分であったことから、今後は DOXY を含めた TC 系抗生物質の一斉試験法ができるよう抽出用溶液の変更まで含めた検討が必要と考えられた。

本検討で、前処理法の変更により通液性が改善されたことで、1 件当たりの前処理時間は鶏卵以外で 20 分以上、鶏卵では 40 分以上の短縮となった。さらに、現行法で問題となっていた鶏卵の泡立ちも解消され操作性も改善したことから、前処理時間の短縮とともに、前処理の操作性が向上し、検査に関して労力の削減が可能になった。

表8 妥当性評価結果

No.	化合物名	牛乳								うなぎ							
		0.02 mg/kg [*]				0.1 mg/kg [*]				0.02 mg/kg [*]				0.2 mg/kg [*]			
		真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定
1	OTC	106	3.1	3.1	○	102	5.3	5.5	○	-	-	-	-	83	3.2	6.0	○
2	CTC	108	4.3	4.0	○	92	5.6	5.4	○	84	2.7	5.1	○	-	-	-	-
3	TC	93	5.4	5.0	○	99	5.5	5.0	○	89	3.0	5.7	○	-	-	-	-
4	DOXY	96	4.2	3.6	-	91	6.2	5.3	-	70	1.8	4.4	-	-	-	-	-
	目標値	70~120	<15	<20		70~120	<15	<20		70~120	<15	<20		70~120	<10	<15	

No.	化合物名	鶏卵								牛肉							
		0.02 mg/kg [*]				0.4 mg/kg [*]				0.02 mg/kg [*]				0.2 mg/kg [*]			
		真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	判定
1	OTC	91	8.6	6.7	○	89	5.0	5.4	○	102	2.4	2.3	○	99	5.3	5.1	○
2	CTC	75	4.3	7.3	○	71	5.0	6.2	○	79	2.3	3.8	○	78	6.1	7.8	○
3	TC	88	8.6	6.7	○	86	9.0	6.5	○	93	4.4	5.2	○	88	9.2	7.9	○
4	DOXY	55	5.2	11.1	-	59	7.1	6.2	-	72	2.8	5.2	-	67	7.2	6.6	-
	目標値	70~120	<15	<20		70~120	<10	<15		70~120	<15	<20		70~120	<10	<15	

※ 添加濃度 判定○:ガイドラインの目標値を満たす

4 まとめ

当所での畜水産物中の TC 系抗生物質 (OTC, CTC, TC) の検査法について、前処理時間の短縮を目指し前処理法の検討を行った。なお、DOXY については、通

知法と抽出溶媒の極性が異なっているため、本検討では参考として、前処理法検討での回収率や変動を確認した。

まず、最も時間を要している精製時の固相カラムの目詰まり解消のため、粒子径、充填量、カラムサイズを大きい固相カラムのへの変更について、現行法³⁾に準じ

混合標準液にて溶出溶媒量を検討した結果, 10 mL と決定した. 次に, 牛乳, うなぎ, 鶏卵, 牛肉について, 現行法³⁾ に準じろ過を綿栓ろ過に変更した抽出液を, 固相カラムに負荷後溶出調製したものを試験溶液として回収率を確認した結果, OTC, CTC, TC について概ね 80%以上が得られた. さらに, 精度の確認として, 添加回収試験を行った結果, 牛乳とうなぎは良好であったが, 鶏卵と牛肉は精度が不十分であった.

そこで, 抽出工程を検討した結果, 鶏卵は遠心力を 10,000×g に変更することで通液性及び精度が改善し, 牛肉は遠心力を 10,000×g に変更後上清をデカンテーションすることで精度が改善した.

試験法の検証として, 牛乳とうなぎでは 1,930×g で遠心分離後綿栓ろ過, 鶏卵と牛肉では 10,000×g で遠心分離後上清をデカンテーションしたものを, InertSep HLB FF に負荷する条件で妥当性評価試験を実施した結果, OTC, CTC, TC については, すべての評価パラメーターにおいて目標値を満たした. 一方, 参考として分析した DOXY では, 回収率は牛乳で 90%以上と高く, うなぎや牛肉で 70%前後, 鶏卵では 60%未満と低かったが, 精度は対象の全ての食品で目標値の範囲内であった.

前処理法の変更により通液性が改善されたことで, 対象の全ての食品について前処理時間が短縮されたのに加え, 現行法で問題となっている鶏卵の泡立ちの解消など操作性も向上した.

文献

- 1) 厚生労働省通知食安発 1224 第 1 号: 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
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第 0124001 号: 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 (別添), 平成 17 年 1 月 24 日
- 3) 内山賢二, 他: 畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析, 福岡市保健環境研究所報, 36, 115~117, 2010
- 4) 岡尚男, 他: 抗生物質の化学的分析法の検討 (第 2 報) プレパック C18 カートリッジのテトラサイクリン系抗生物質への適用について, 薬学雑誌, 103 (5), 531~537, 1983
- 5) 中島仁志, 他: 高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いたテトラサイクリン系抗生物質一斉分析法の検討, 長崎県川棚食肉衛生検査所, 2018
- 6) 内山陽介, 他: 高速液体クロマトグラフィーによる豚腎臓のドキシサイクリン分析法の検討, 神奈川県食品衛生検査所, 2017
- 7) 星野庸二, 他: 高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質及びマクロライド系抗生物質の定量, 食品衛生学会誌, 25 (5), 430~435, 1984