

畜水産物中のゼラノールとチアンフェニコール試験の 妥当性評価について

食品薬品部

菅谷 京子 齋藤 仁美 大山 周子
駒場 直行¹ 徳田 侑子 黒崎 かな子
(¹現保健福祉部保健福祉課)

1 はじめに

当センターでは LC-MS/MS による畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析法として合成抗菌剤・内寄生虫用剤・ホルモン剤の検査を実施している。

その内、ホルモン剤には天然型と合成型があり、日本では天然型のみ繁殖用薬として使用が許可されている。しかし、海外では牛の肥育目的等で合成型が使用されることがあり、海外の食肉検査で合成型であるゼラノールが検出された事例がある。少量のホルモン剤の残留により人に健康被害が起きる可能性があるため、日本では低い残留基準が設定されている。

そこで、県生活衛生課の意向も踏まえ、ホルモン剤の検査項目追加を目指すこととした。他の都道府県等で検査が実施されているホルモン剤¹⁾²⁾のうち、現在使用している動物用医薬品混合標準液に含まれており、現有機器で測定可能と期待されるゼラノールを検討対象とすることとした。

なお、現在測定している項目は、検出器の分析モードをポジティブモードで行っている。しかし、ゼラノールの分析モードはネガティブモードである。そこで併せて、上記混合標準液に含まれており、同時にネガティブモードで分析可能と思われるチアンフェニコールについても今回の検討対象に加えた。

チアンフェニコールはクロラムフェニコールと類似した抗菌スペクトルを有する合成抗菌剤であり、多くの国で動物用医薬品として使用されている。HPLC で分析していた時には検査対象項目であったが、LC-MS/MS 移行時に、ポジティブモードで分析できないことから測定項目から削除されていた。

以上のことから、現在当センターで残留動物用医薬品の検査を実施している畜水産物について、ゼラノールとチアンフェニコールを検査するための妥当性評価を行い、若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

輸入豚肉、鶏卵、にじます：平成29年度の収去品
あゆ：平成28年度の収去品

輸入鶏肉：市販品

2.2 試薬等

・標準品

動物用医薬品混合標準液 PL-2-1 (各 20µg/mL メタノール溶液)：和光純薬工業(株)

本液をアセトニトリルで 2 ng/mL~150 ng/mL の間の数段階に適宜希釈し、窒素ガス気流下で溶媒を除去した後、図1の方法で得られたブランク試料溶液(マトリックス溶液)を用いて、マトリックス添加標準液を調製し検量線を作成した。

・その他の試薬

アセトニトリル、ヘキサン：HPLC 用

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

ギ酸：特級

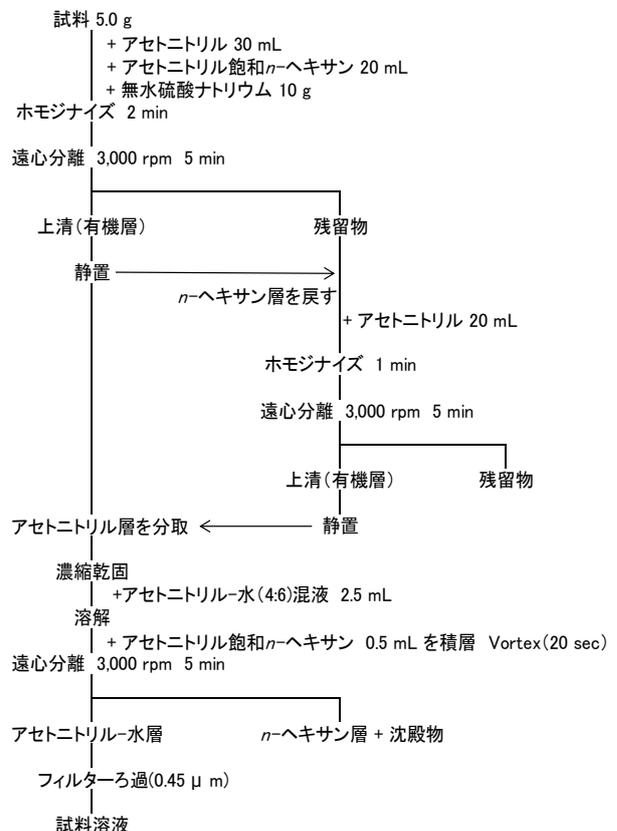


図1 試料溶液の調製方法

2.3 試料の調製

豚肉・鶏肉・あゆ・にじます：筋肉部を均一化

鶏卵：全卵を均一化

2.4 試料溶液の調製方法

現在の残留動物用医薬品の検査で用いている調製方法に準じた(図1)。

空試験として試料の代わりに超純水を用いたものと、マトリックス溶液として標準液を添加しない試料についても同様に行った。

2.5 装置及び測定条件(表1)

カラムは現在の残留動物用医薬品検査で使用しているものを用いることとした。

測定項目が少ないため、移動相の条件はより短時間でできるよう調整した。

測定モードはネガティブモードとした。

国からの通知³⁾等を参考に、機器の条件の最適化を行い、感度良く測定できる2種のモニターイオン(表2)、電圧等を設定した。

なお、ポジティブモードとネガティブモードの測定を同時に行くと感度が下がるため、ネガティブモードのみで測定することとした。

2.6 添加濃度(表3)

それぞれの化合物の基準値となるよう標準溶液を添加した。

2.7 妥当性評価方法

「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」⁴⁾(以下、ガイドライン)に従い、それぞれの試料について枝分かれ実験計画により、1日2併行、5日間の添加回収試験を実施した。

選択性、真度(回収率)、併行精度、室内精度、定量限界についてガイドラインの目標値を満たしているかどうか評価した。

表1 装置及び測定条件

●装置					
SCIEX 3200 Q TRAP [®] LC/MS/MSシステム					
●測定条件					
・カラム: Mightysil RP18 PA(φ 2.0mm x 150mm, 5μ m)					
・カラム温度: 40 °C					
・流速: 0.2 mL/min					
・注入量: 5 μ L					
・移動相: 下記のA液及びB液によるグラジエント					
A液: 0.1% ギ酸					
B液: 0.1% ギ酸-アセトニトリル溶液					
グラジエント条件:					
時間(分)	0	7	10	10.5	15
A液(%)	90	0	0	90	90
B液(%)	10	100	100	10	10
・イオン化モード: ESI(ElectroSpray Ionization)法					
・測定モード: MRM(Multiple Reaction Monitoring)法					

表2 モニターイオン

試験項目	測定条件 No.	モニターイオン	
		プリカーサー	プロダクト
		(m/z)	(m/z)
ゼラノール	1	321.0	277.4
	2	321.0	303.0
チアンフェニコール	1	353.9	184.9
	2	353.9	78.9

表3 添加濃度

試料	食品の分類	ゼラノール (ppm)	チアンフェニコール (ppm)
輸入豚肉	豚の筋肉	0.002	0.02
輸入鶏肉	鶏の筋肉	0.002	0.05
鶏卵	鶏の卵	0.002	0.01
あゆ	魚介類(さけ目)	0.002	0.01
にじます	魚介類(さけ目)	0.002	0.01

3 結果

3.1 ゼラノール(表4)

ゼラノールについては基準値が0.002 ppmと一律基準である0.01 ppmより低い、今回評価したすべての試料において、測定条件1のみ妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

選択性については、マトリックス溶液とマトリックス添加標準液から得られた代表的なクロマトグラムの比較により評価したが、いずれの試料についてもゼラノールのピークを妨害するピークは認められなかった。

真度については、すべての試料・条件で目標値を満たしていた。

併行精度、室内精度ともに、鶏肉の測定条件2を除いては目標値を満たす結果となった。

一斉分析法の定量下限値0.0025 ppmが基準値より高いため、定量限界を基準値と同じ0.002 ppmに設定できるかどうか評価した。S/N比を、マトリックス添加標準液から得られた代表的なクロマトグラムから算出した。いずれの試料でも測定条件1において目標値を満たした。測定条件2では鶏肉のみ目標値を満たしたが、併行精度、室内精度の結果により妥当性を満たせなかった。

どの試料についても測定条件2については定性試験の参考としたい。

3.2 チアンフェニコール(表5)

すべての試料について、それぞれの測定条件でガイドラインの目標値を満たしていた。

選択性については、ゼラノールと同様にマトリックス溶液とマトリックス添加標準液から得られたクロマトグラムの比較により評価したが、いずれの試料についてもチアンフェニコールのピークを妨害するピークは認められなかった。

真度については99.0%~107.9%であり、すべての試料・条件で目標値を満たしていた。

表4 ゼラノールの妥当性評価結果

測定条件	基準値 (ppm)	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	定量限界 (S/N比)	妥当性 の適否	
目標値			70~120	<25	<30	≥10		
豚肉	1	0.002	○	81.1	5.4	21.9	20.0	○
	2	0.002	○	82.6	8.5	15.8	7.5	×
鶏肉	1	0.002	○	89.6	9.1	18.1	46.8	○
	2	0.002	○	87.5	28.2	30.0	12.4	×
鶏卵	1	0.002	○	70.1	5.2	13.0	39.7	○
	2	0.002	○	74.7	14.3	17.8	5.4	×
あゆ	1	0.002	○	82.8	10.7	12.0	13.1	○
	2	0.002	○	74.4	20.2	23.3	2.4	×
にじます	1	0.002	○	75.4	7.1	11.2	55.6	○
	2	0.002	○	75.7	5.6	14.3	6.6	×

：目標値を満たさない

表5 チアンフェニコールの妥当性評価結果

測定条件	基準値 (ppm)	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	定量限界	妥当性 の適否	
目標値			70~120	※1	※2			
豚肉	1	0.02	○	99.0	2.8	3.2	○	○
	2	0.02	○	100.0	3.1	5.5	○	○
鶏肉	1	0.05	○	101.1	3.9	4.1	○	○
	2	0.05	○	101.9	4.7	6.6	○	○
鶏卵	1	0.01	○	107.9	6.6	10.0	○	○
	2	0.01	○	103.1	5.1	8.9	○	○
あゆ	1	0.01	○	101.8	3.9	8.6	○	○
	2	0.01	○	103.6	1.9	4.1	○	○
にじます	1	0.01	○	102.1	2.4	7.6	○	○
	2	0.01	○	105.2	4.1	8.8	○	○

※1: 併行精度の目標値は、豚肉、鶏肉は<15、鶏卵、あゆ、にじますは<25

※2: 室内精度の目標値は、豚肉、鶏肉は<20、鶏卵、あゆ、にじますは<30

併行精度と室内精度の目標値は添加濃度によって異なる。添加濃度とした基準値が一律基準より高い豚肉と鶏肉については目標値もより厳しく設定されているが、結果は併行精度で1.9 RSD%~6.6 RSD%、室内精度で3.2 RSD%~10.0 RSD%とすべての試料で良好であった。

検査を実施する際には、より結果の良かった測定条件で定量を行い、もう一方の測定条件による結果を定性試験の参考としたい。

現在の一斉分析の際の定量下限値は、すべての試料でチアンフェニコールの基準値より低いため定量限界には問題なかった。

4 まとめ

現在当センターで残留動物用医薬品の検査を実施している試料について、ゼラノールとチアンフェニコール試験の妥当性評価を実施した。

ゼラノールは、すべての試料について、測定条件1のみで目標値を満たす結果となった。目標値を満たした測定条件1で定量を行い、目標値を満たさなかった測定条件2を定性試験の際の参考にすることで、すべての試料について検査が可能である。

従来の一斉分析法の定量下限値はゼラノールの基準値より高かった。しかし今回の検討で、ゼラノールだけは基準値濃度までの検量線を引くことにより、基準値の確認が可能になったことがわかった。

汚染物質の検査において、ホルモン剤が基準値を超過しているか否かを試験することは有意義なことであるため、ゼラノールを検査項目に加えることは望ましいと考える。

チアンフェニコールについてはいずれの試料・条件でも目標値を満たしていたため、現在の一斉分析法と同様な試料溶液の調製方法及び検量線により、検査が可能になったことがわかった。チアンフェニコールは汎用性が高い薬剤なので、検査項目に加えることは有意義と思われる。

現在の一斉分析法に項目を追加した場合、ポジティブモードとネガティブモードの測定を別々に行うため分析

時間は増加するが、前処理の作業量はほぼ変わらないため、実務上支障はないと考えられる。ゼラノールとチアンフェニコールを検査項目に加えて検査実施標準作業書(SOP)を改訂し、来年度からの取去検査を実施したい。

5 参考文献等

- 1) 山口貴弘他、「LC/MS/MSによる畜産食品中のホルモン剤一斉分析法の検討」、大阪府立公衆衛生研究所所報、第49号、20-23、2011
- 2) 林由美他、「LC/MS/MSによる動物用医薬品の簡易一斉分析法検討」、大分県衛生環境研究センター年報、第40号、39-45、2012
- 3) 「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」別表「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ～Ⅲ(畜水産物)」、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日付食安発第0124001号
- 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について、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、平成19年11月15日付食安発第1115001号