

資料

HPLCを用いた水産物中の 残留テトラサイクリン系抗生物質試験法の妥当性評価

白井 力 清川 由樹 吉田 純一

1 はじめに

鹿児島県はブリ類、ヒラメ、ウナギなどを養殖しており、養殖水産物は本県の重要な水産資源となっている。

抗生物質は、動物用医薬品あるいは飼料添加物として水産動物の疾病の予防および治療に用いられ、そのうち水産動物用抗生物質の2013年の販売量は約122トン¹⁾であり、水産物の養殖には必要不可欠なものである。一方では、これらの養殖水産物への残留が懸念されている。そのため、薬事法で対象動物への使用禁止期間等²⁾が、食品衛生法で食品中の基準値³⁾が定められている。テトラサイクリン系抗生物質は水産動物に広く汎用されており(2013年販売量の約4割¹⁾)、当センターでの過去10年間の行政依頼検査でも、養殖水産物(506検体中34検体)からオキシテトラサイクリンが基準値(0.2ppm)以下で検出(0.02~0.154ppm)されている^{4)~13)}。

当センターでは、食品中に残留するテトラサイクリン系抗生物質の試験は、厚生労働省から示された「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試験法」¹⁴⁾(以下「公定法」という。)に準じて実施している。公定法に従って試験を実施する場合は、試験機関で当該試験法が適用可能か妥当性を評価することが求められている。また、2010年12月に「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」(以下「ガイドライン」という。)が改正¹⁵⁾されたこと、当センターの分析装置に更新があったことから、試験法の妥当性評価を実施する必要性が生じた。

そこで、2013年度から2か年にかけて、8種類の水産物(加工品を含む。)を対象としてHPLCを用いた試験法の妥当性評価を実施したので報告する。

2 調査方法

2.1 試料

県内養殖のカンパチ、ブリ、マダイ、ヒラメ、ニジマス、クルマエビ、ウナギ及びウナギ蒲焼き(輸入品)

2.2 対象化合物

オキシテトラサイクリン(以下「OTC」という。)、クロルテトラサイクリン(以下「CTC」という。)及びテトラサイクリン(以下「TC」という。)に、魚介類(すずき目魚類に限る。)で基準値が設定されているドキシサイクリン(以下「DOXY」という。)を追加し、合計4物質を対象化合物とした。

2.3 試薬及び試液

2.3.1 試薬

標準品：オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品(HPLC用)、クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品(HPLC用)、テトラサイクリン塩酸塩標準品(容量分析用)、ドキシサイクリンヒクレート標準品(食品分析用)は、和光純薬工業(株)製を用いた。

超純水：分析対象化合物を含まないものを用いた。

有機溶媒：*n*-ヘキサン(残留農薬・PCB試験用)、メタノール(HPLC用)は和光純薬工業(株)製を用いた。

その他の試薬：エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物(試験研究用)は(株)同仁化学研究所製、イミダゾール(特級)、硫酸ナトリウム(PCB・フタル酸エステル試験用)、リン酸一カリウム(特級)は和光純薬工業(株)製、酢酸マグネシウム四水和物、酢酸、クエン酸一水和物及びリン酸二ナトリウム十二水和物(全て特級)は関東化学(株)製を用いた。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：ジエールサイエンス(株)製 InertSep PLS-2 (265mg)を用いた。

2.3.2 試液

イミダゾール緩衝液：イミダゾール68.08g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物0.37g及び酢酸マグネシウム四水和物10.72gを超純水に溶かして800mLとした。これに酢酸を加えてpH7.2に調整し、超純水を加

えて1000mLとした。

EDTA含有クエン酸緩衝液：エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物1.86gに第1液307mLと第2液193mLを混和したものを加えて溶かした。第1液：クエン酸一水和物21.0gを超純水に溶かして1000mLとした。第2液：リン酸二ナトリウム十二水和物71.6gを超純水に溶かして1000mLとした。

飽和EDTA二ナトリウム溶液：超純水にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を飽和状態になるまで溶かして、静置し、上澄みを用いた。

1.36%リン酸一カリウム溶液：リン酸一カリウム13.6gを超純水に溶かして1000mLとした。

2. 3. 3 標準原液及び混合標準液の調製

各標準品50mgを量り取り、メタノールに溶かし、メスフラスコで50mLとしたものを各標準原液とした。各標準原液を1.36%リン酸一カリウム溶液により適宜希釈して混合標準液とした。

2. 4 装置

高速液体クロマトグラフは(株)島津製作所製Prominenceシリーズを使用した。送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

2. 5 HPLC測定条件

測定条件は、表1のとおり。

表1 HPLC測定条件

蛍光検出器	: 励起波長380nm, 蛍光波長520nm
分析カラム	: ジーエルサイエンス(株)製 InertSustainSwift C18 (内径4.6mm, 長さ150mm, 粒径5 μ m)
流速	: 1.2mL/min
注入量	: 20 μ L
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
移動相	: A液: イミダゾール緩衝液 : B液: メタノール

2. 6 試験溶液の調製

2. 6. 1 抽出法

公定法の一部を変更し、以下のとおり実施した。なお、試験フローを図1に示した。

可食部(骨, 内臓, 皮及び殻を除く)を細切均一化した後, その5.0gを50mL合成樹脂製遠心管に量り取った。これにEDTA含有クエン酸緩衝液25mLを加え, ホモジナイズ(7500rpm 1分間)し, 遠心分離(3000rpm 10分間

4 $^{\circ}$ C)を行い, 水層を100mL褐色ガラス製遠心管に移した。合成樹脂製遠心管の残留物にEDTA含有クエン酸緩衝液25mLを加え, 1分間激しく振り混ぜた後, 上記と同様の条件で遠心分離を行い, 水層を先の遠心管に合わせた。これに*n*-ヘキサン20mLを加え, 5分間激しく振とうした後, 再び, 上記と同様の条件で遠心分離を行い, 水層を分取した。

2. 6. 2 精製法

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムに, メタノール10mL, 超純水10mL, 飽和EDTA二ナトリウム溶液5mLを順次注入し, 流出液は捨てた。このカラムに2.6.1で得られた水層20mL(試料2.0g相当量)を流速2.0mL/min以下で負荷した後, 超純水30mLを数回に分けて注入し, 流出液は捨てた。このカラムにメタノール10mLを流速2.0mL/min以下で溶出させ, 溶出液を50mL褐色ガラス製遠心管に採り, 40 $^{\circ}$ C以下で溶出液を濃縮乾固させた。この残留物に, 1.36%リン酸一カリウム溶液0.4mLを加えて溶かし, 0.45 μ mフィルターでろ過し, 得られたろ液を試験溶液とした。

A (抽出法)

試料 5.0g

- (混合標準液添加: 30分程度放置)
- EDTA含有クエン酸緩衝液25mL
- ホモジナイズ 7500rpm 1分間
- 遠心分離 3000rpm 10分間 4 $^{\circ}$ C

水層

残留物

- EDTA含有クエン酸緩衝液25mL
- 激しく振とう 1分間
- 遠心分離 3000rpm 10分間 4 $^{\circ}$ C

水層

残留物

合わせた水層

- *n*-ヘキサン20mL
- 激しく振とう 5分間
- 遠心分離 3000rpm 10分間 4 $^{\circ}$ C

水層を分取

B (精製法)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム

- メタノール10mL, 超純水10mL
- 飽和EDTA二ナトリウム溶液5mL
- 抽出法で得られた水層 20mL負荷(流速2.0mL/min以下)
- 超純水30mL(数回に分けて注入)
- メタノール10mL(流速2.0mL/min以下)

溶出液

- 濃縮乾固40 $^{\circ}$ C以下

残留物

- 1.36%リン酸一カリウム溶液0.4mL
- 0.45 μ mフィルターろ過

試験溶液(ろ液)

HPLC測定

図1 試験フロー

2. 7 妥当性評価のための実験計画

ブランク試料への各化合物の添加濃度は、OTCの基準値0.2ppmとした。ブランク試料5.0gに対して、2mg/L混合標準液を0.5mL添加（試料中換算0.2μg/g）した。添加後は、30分程度放置した後に抽出操作を行った。分析者1名が2併行5日間、または分析者2名が2併行3日間実施する計画とした。妥当性評価の性能パラメータは、選択性、真度、精度及び定量限界とした。

3 結果及び考察

3. 1 移動相の検討

移動相は、イミダゾール緩衝液（A液）とメタノール（B液）の混液を用い、次の3つの条件で検討した。

（条件1）A液：B液=85：15

- ・公定法の条件であり、OTC及びTCの分析に使用

（条件2）A液：B液=75：25

- ・公定法の条件であり、CTCの分析に使用

（条件3）A液：B液=80：20

- ・新しく設定した条件であり、DOXYの分析に使用

図2はこれらの条件により分析した1mg/L混合標準液（試料中換算0.2μg/g）のクロマトグラムである。OTC及びTCは、条件1でピークが良好に分離した。CTCは条件2、DOXYは条件3でピークの保持時間（以下「RT」という。）が約7分となり、良好に分離した。

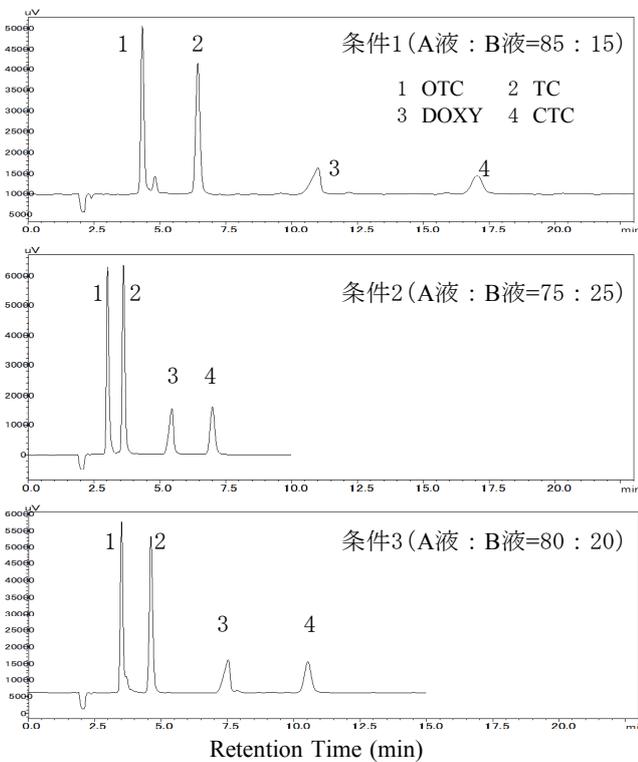


図2 1mg/L混合標準液のクロマトグラム

3. 2 検量線の直線性

各化合物の濃度は、各ピーク面積を用いて絶対検量線を作成し、定量した。0.1～2mg/Lの範囲で良好な直線性（決定係数0.994以上）が得られた（図3）。

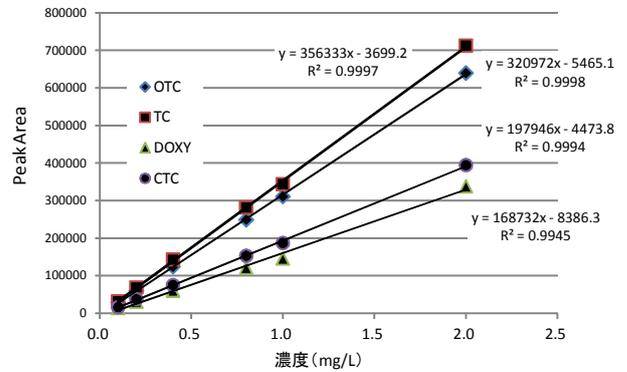


図3 検量線

3. 3 選択性

ブランク試料について、定量を妨害するピーク（以下「妨害ピーク」という。）の有無を確認した。妨害ピークを認めた化合物は、ガイドラインの妨害ピークの許容範囲に基づき評価した（表2）。

表2 妨害ピークの許容範囲

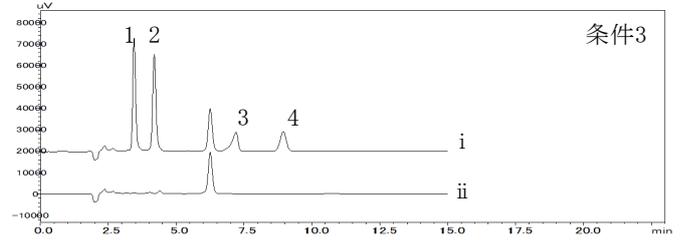
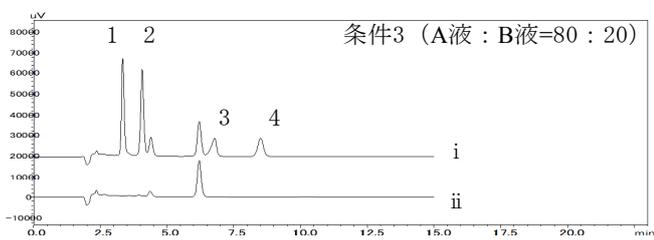
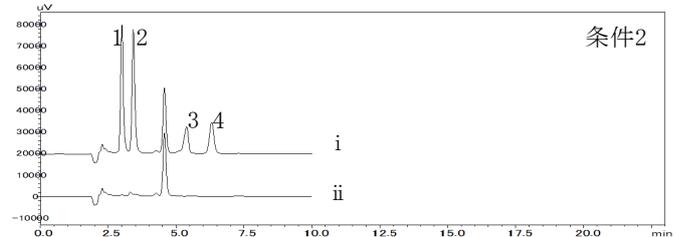
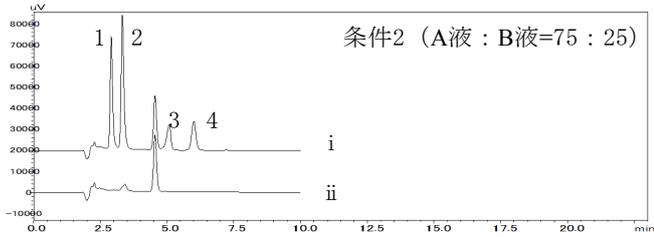
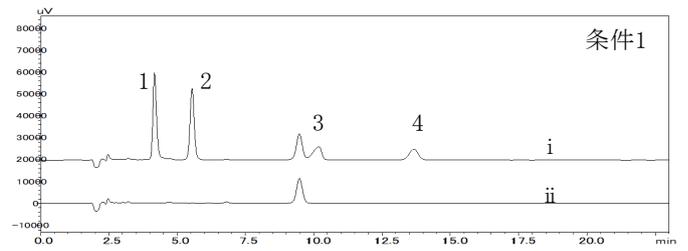
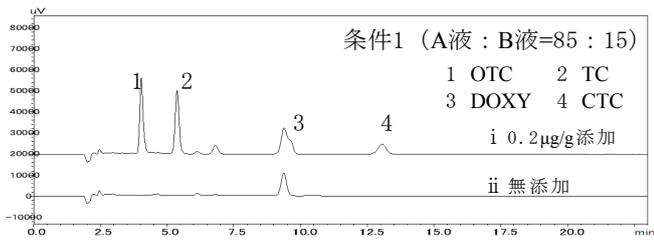
定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 ≤ 基準値1/3	< 基準値濃度相当ピークの1/10
定量限界 > 基準値1/3	< 定量限界濃度相当ピークの1/3
不検出	< 定量限界濃度相当ピークの1/3

各試料のクロマトグラムを図4～図11に示した。図中の i はブランク試料に0.2μg/gとなるように混合標準液を添加したもの、iiは無添加のものを示した。

カンパチ、ブリ、マダイ、ヒラメ、ニジマス及びウナギにおいて、ブランク試料を分析した際に、TCとDOXYの間に夾雑物ピークが検出されたが、各化合物と同じRTに妨害ピークは検出されなかった（図4～8、図10）。

クルマエビにおいて、OTCとTCの間に夾雑物ピークが検出されたが、各化合物と同じRTに妨害ピークは検出されなかった（図9）。

ウナギ蒲焼きにおいて、RTが2.5分前後に大きな夾雑物ピークが検出された（図11）。これは、蒲焼きの加工由来における糖類などの成分と考えられる。今後、試験溶液の調製時に精製法を検討する必要がある。

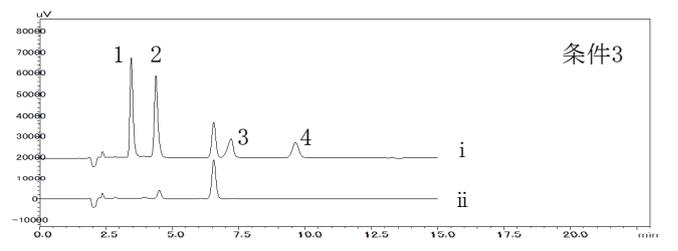
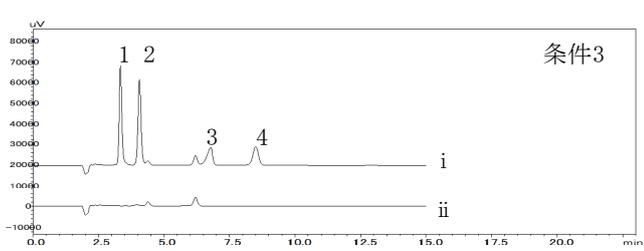
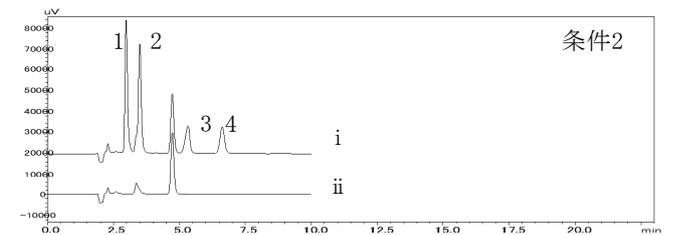
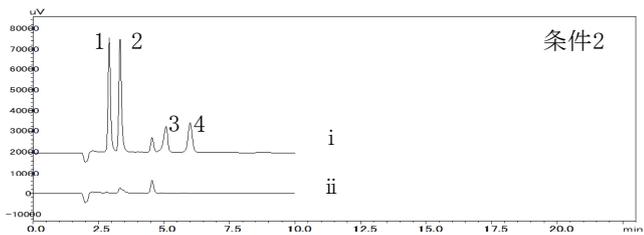
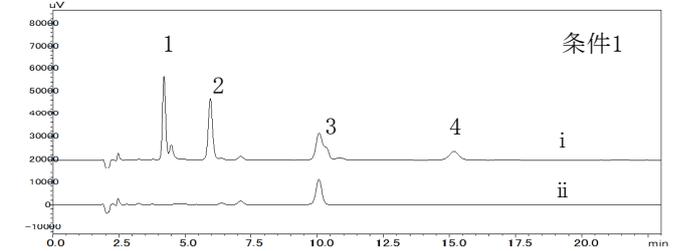
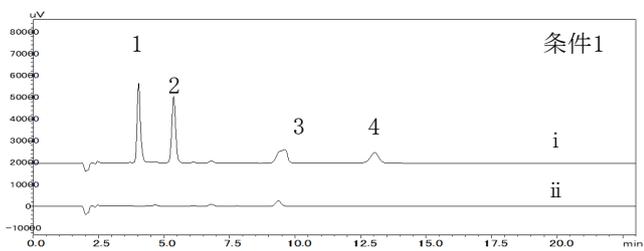


Retention Time (min)

図4 カンパチのクロマトグラム

Retention Time (min)

図5 ブリのクロマトグラム

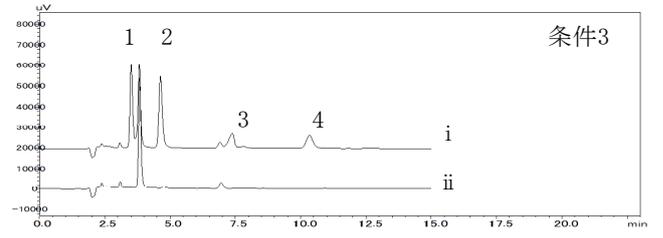
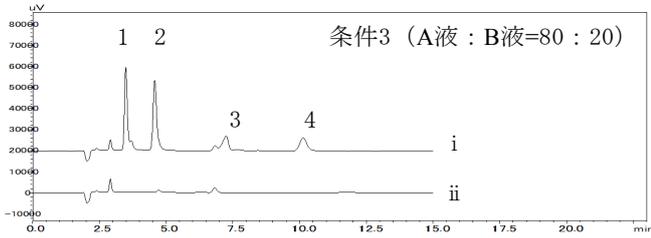
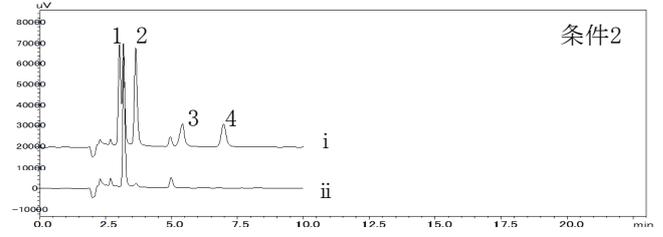
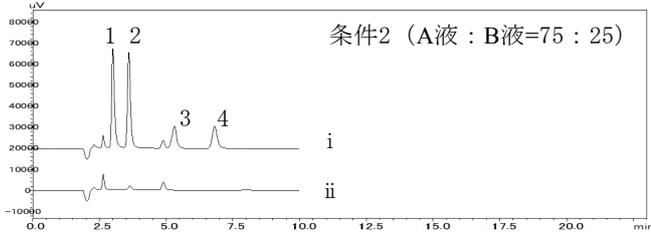
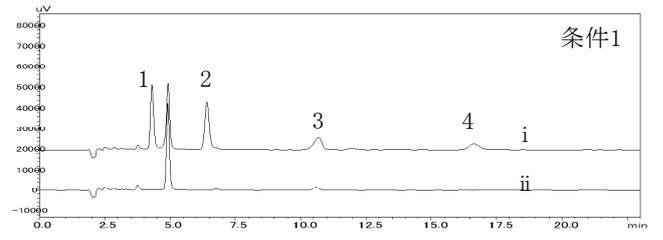
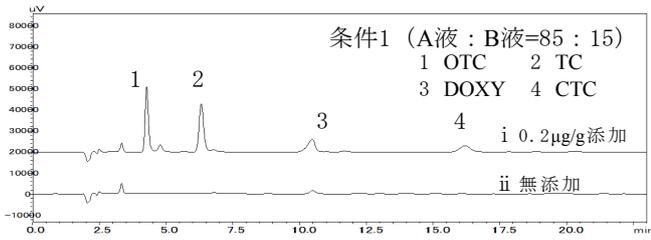


Retention Time (min)

図6 マダイのクロマトグラム

Retention Time (min)

図7 ヒラメのクロマトグラム

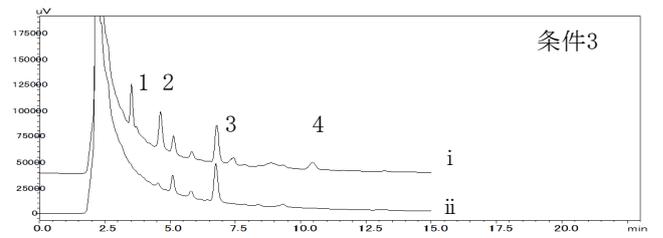
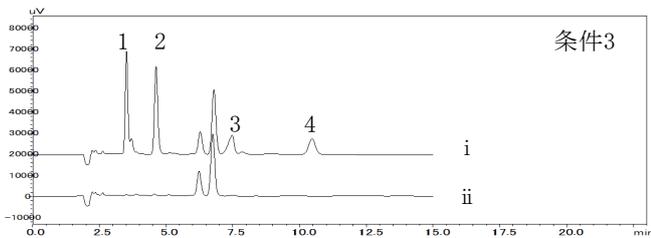
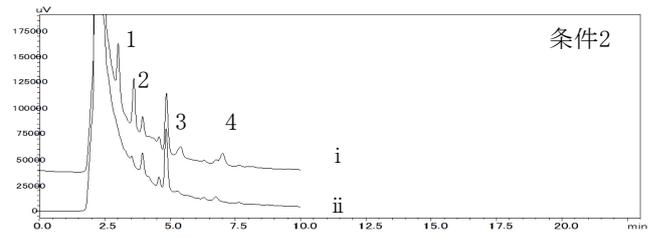
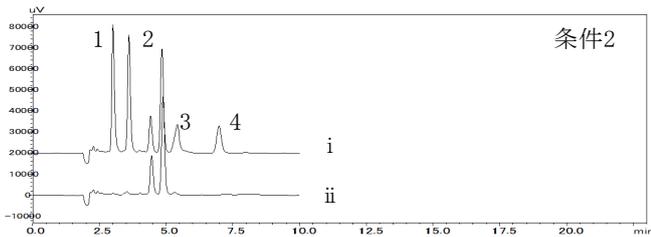
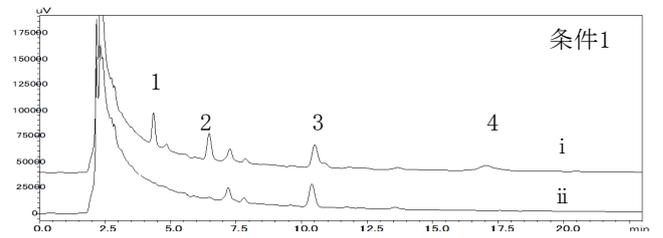
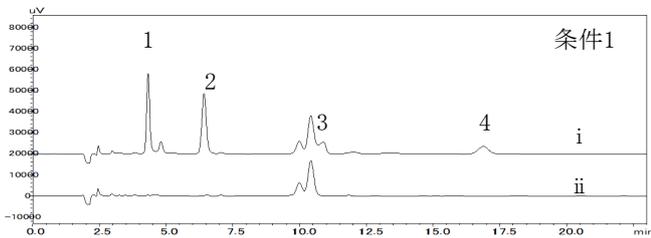


Retention Time (min)

図8 ニジマスのクロマトグラム

Retention Time (min)

図9 クルマエビのクロマトグラム



Retention Time (min)

図10 ウナギのクロマトグラム

Retention Time (min)

図11 ウナギ蒲焼きのクロマトグラム

表3-1 真度及び精度

No.	化合物名	カンパチ			ブリ			マダイ			ヒラメ		
		0.2 µg/g			0.2 µg/g			0.2 µg/g			0.2 µg/g		
		真度 (回収率) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)									
1	OTC	83.8	2.2	4.2	87.2	2.1	2.5	84.9	3.6	4.6	84.2	4.0	4.9
2	TC	81.0	2.5	6.9	82.6	2.6	4.5	82.9	4.0	6.2	82.2	3.7	4.7
3	DOXY	73.3	1.8	3.1	76.7	2.6	3.4	71.7	3.8	4.2	70.3	4.3	4.3
4	CTC	71.8	3.1	4.3	74.6	2.2	4.0	73.9	4.1	6.3	70.8	4.5	6.5
ガイドラインの目標値		70~120	10>	15>	70~120	10>	15>	70~120	10>	15>	70~120	10>	15>

表3-2 真度及び精度

No.	化合物名	ニジマス			クルマエビ			ウナギ			ウナギ蒲焼き		
		0.2 µg/g			0.2 µg/g			0.2 µg/g			0.2 µg/g		
		真度 (回収率) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)									
1	OTC	85.1	3.0	6.5	84.7	3.1	4.1	87.4	1.1	3.2	84.2	2.1	9.4
2	TC	82.1	4.7	7.6	83.0	4.1	5.3	83.8	1.3	5.9	85.4	1.5	7.3
3	DOXY	74.3	2.6	6.3	73.4	4.0	5.2	77.4	7.5	12.7	61.1	6.1	19.1
4	CTC	74.0	5.0	6.4	75.3	3.7	4.8	73.3	2.6	8.5	75.3	6.6	26.1
ガイドラインの目標値		70~120	10>	15>	70~120	10>	15>	70~120	10>	15>	70~120	10>	15>

3. 4 真度及び精度

真度及び精度の結果を表3-1, 表3-2に示す。

真度(回収率)について, カンパチ(71.8~83.8%), ブリ(74.6~87.2%), マダイ(71.7~84.9%), ヒラメ(70.3~84.2%), ニジマス(74.0~85.1%), クルマエビ(73.4~84.7%)及びウナギ(73.3~87.4%)で, 全ての化合物でガイドラインの目標値(70~120%)を満たした。しかし, ウナギ蒲焼きはDOXYが61.1%で目標値を満たさなかった。

精度について, カンパチ, ブリ, マダイ, ヒラメ, ニジマス, クルマエビ及びウナギは, 全ての化合物がガイドラインの目標値を満たした。しかし, ウナギ蒲焼きの室内精度で, DOXY(19.1%)及びCTC(26.1%)は目標値を満たさなかった。

真度および精度の両方で目標値を満たした試料は, カンパチ, ブリ, マダイ, ヒラメ, ニジマス, クルマエビ及びウナギであった。ウナギ蒲焼きで, 目標値を満たした化合物はOTC及びTCであった。

3. 5 定量限界

本試験法の定量限界は, OTC: 0.02 µg/g, TC: 0.02 µg/g, DOXY: 0.03 µg/g及びCTC: 0.03 µg/gとしている。これらの値と, 各試料の基準値からガイドラインに基づき定量限界を評価した。ただし, OTCは魚介類として0.2ppm, DOXYは魚介類(すずき目魚類に限る。)として0.05ppmの基準値が設定されているため, 全試料のOTC及び, カンパチ, ブリ, マダイのDOXYにおける定量限界の評価は行わなかった。また, 定量限界濃度に対

応する濃度から得られるピークのS/N比は, ブランク試料に0.2 µg/g濃度で添加して得られたピークのS/N比を基に算出した。

その結果, ウナギ蒲焼きを除いた各試料において, 定量限界濃度に対応する濃度から得られたピークは, S/N比 \geq 10を満たした。

ウナギ蒲焼きにおいて, 定量限界濃度に対応する濃度から得られたピーク(TC, DOXY及びCTC)は, 全てS/N比 \geq 10を満たさなかった。

4 まとめ

- 1) 公定法の一部を変更した試験法を実施したところ, テトラサイクリン系抗生物質4化合物は, OTC及びTCが条件1で, CTCが条件2で, DOXYが条件3の移動相条件下で分離・確認が可能であった。
- 2) 本試験法を用いてテトラサイクリン系抗生物質4化合物の妥当性評価を実施した結果, カンパチ, ブリ, マダイ, ヒラメ, ニジマス, クルマエビ及びウナギで全ての化合物の妥当性が確認できた。
- 3) ウナギ蒲焼きについて, 妥当性が確認できた化合物は, OTCのみであり, 精製法を検討する必要がある。
- 4) 今後, さらに対象試料を増やすとともに, 内部精度管理に基づくデータ収集を行っていく予定である。

参考文献

- 1) 農林水産省；各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量，動物用医薬品，医薬部外品及び医療機器製造販売高年報（別冊），平成25年
- 2) 動物用医薬品の使用の規制に関する省令（昭和55年9月30日農林水産省令第42号），最終改正平成25年2月6日
- 3) 食品，添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号），最終改正平成27年6月2日
- 4) 鹿児島県環境保健センター；本誌，6，27（2005）
- 5) 鹿児島県環境保健センター；本誌，7，26（2006）
- 6) 鹿児島県環境保健センター；本誌，8，24（2007）
- 7) 鹿児島県環境保健センター；本誌，9，24（2008）
- 8) 鹿児島県環境保健センター；本誌，10，22（2009）
- 9) 鹿児島県環境保健センター；本誌，11，49（2010）
- 10) 鹿児島県環境保健センター；本誌，12，23（2011）
- 11) 鹿児島県環境保健センター；本誌，13，20（2012）
- 12) 鹿児島県環境保健センター；本誌，14，20（2013）
- 13) 鹿児島県環境保健センター；本誌，15，21（2014）
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；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（食安発第1129002号），平成17年11月29日
- 15) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；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（食安発1224第1号），平成22年12月24日