

1 分析試験法における実験計画法を用いた条件検討効率化の試み

○佐々木秀樹

はじめに

食肉に残留する動物用医薬品の分析試験は、その分析対象となる化合物が多様多様であり、化合物の系統毎に試験法を用意する必要がある。新たな試験法を導入する際には、多くの場合、様々な条件検討が必要となる。条件検討は、多くの労力と時間を要し、特に分析における各「操作」が分析結果に与える影響を解析し適切に評価することには苦慮することが多い。

今回、導入を予定する試験法の前処理方法を検討するに当たり、各「操作」の分析結果への影響について、実験計画法により条件検討をしたところ、実験回数を低減し、かつ一定の成果が得られたので、その概要について報告する。

材料及び方法

1. 検討対象とした前処理法：QuEChERS法を応用した Y. Jung らの方法[1]をもとに図1の通り設計した。
2. 検出対象とした化合物：サルファ剤6種(スルファメラジン(以下, SMR), スルファジミジン(以下, SDD), スルファメトキサゾール(以下, SMZ), スルファジメトキシシン(以下, SDM), スルファモノメトキシシン(以下, SMM), スルファキノキサリン(以下, SQX))を検出対象とした。添加回収試験は、残留基準値の100倍濃度の標準液200 μ Lを牛の筋肉2gに加え、抽出操作を行い、HPLC注入時に基準値相当となるよう設計した。
3. HPLC条件：当所におけるサルファ剤分析法を一部変更して設定した(図3右)。
4. 統計ソフトウェア：R ver. 4.2.0, package: conjoint ver. 1.41
5. 設定した実験パラメータ：図1に示した抽出法における※①～⑤の操作を因子とし、各因子について表1に示した2または3水準を設定した。

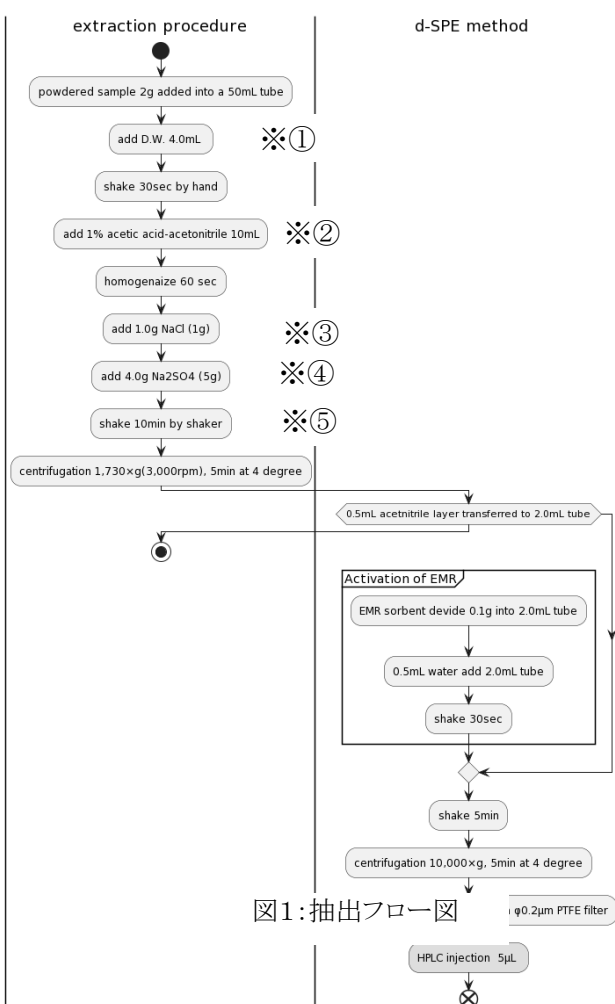


図1:抽出フロー図

6. 解析：回収率 = 測定された Area 値 ÷ 標準品 (基準値濃度) の Area 値 × 100 として算出し、解析に供した。得られた回収率について aov 関数により分散分析を実施した。なお、解析の R スクリプトを図 2 に示した。

```

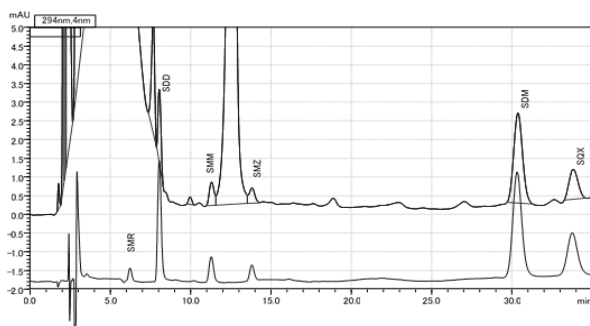
library(conjoint) #load conjoint package
#create list
Factors <- expand.grid(
  NaCl = c("0g", "1g"),
  Na2SO4 = c("2g", "5g"),
  H2O = c("0mL", "4mL"),
  Shake = c("hand", "10minByShaker"),
  ExtSolv = c("9mL", "10mL", "11mL")
)
#create orthogonal table
designort <- caFactorialDesign(data = Factors, type = "orthogonal")
designort #show orthogonal table
cor(caEncodedDesign(designort)) #check of orthogonal table
#create dataframe for anova
recoveryratio <- c(87.81, 100.28, 82.66, 97.22, 63.55, 89.37, 60.45, 45.53)
datFrame <- cbind(designort, recoveryratio)
result <- aov(recoveryratio ~ ., data=datFrame) #5way anova
summary(result) #show summary
#show graph
layout(matrix(1:5, ncol=5))
plot(datFrame$NaCl, datFrame$recoveryratio, ylab="recovery ratio", xlab="NaCl")
plot(datFrame$Na2SO4, datFrame$recoveryratio, ylab="", xlab="Na2SO4")
plot(datFrame$H2O, datFrame$recoveryratio, ylab="", xlab="H2O")
plot(datFrame$Shake, datFrame$recoveryratio, ylab="", xlab="Shake")
plot(datFrame$ExtSolv, datFrame$recoveryratio, ylab="", xlab="ExtSolv")

```

図 2：解析に用いた R スクリプト

成績

caFactorialDesign 関数により、8 パターンの試行が得られた(表 1)。試行パターンは本来すべての組み合わせを見るために $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3 = 48$ パターン必要なところ、6 分の 1 に削減された。割り付けられた 8 パターンの試行において、6 種類の化合物のうち、SDM が妨害を受けずに分析可能であった(図 3)。そこで、試行により得られた SDM の回収率を算出し、分散分析に供した結果、塩化ナトリウムの添加量(NaCl)及び抽出溶媒の量(ExtSolv)について有意差($p < 0.05$)が認められた(表 2)。



Column:
 CAPCELL PAK C18 MG II S3 3.0mm i.d. × 150mm
 Flow rate: 0.3mL/min
 Mobile phase:
 0.05M Formic Acid:ACN:MetOH=75:15:10
 Temperature: 40°C
 Detection: UV 294nm

図 3：試行 No. 1 で得られたクロマトグラム(左上)及び標準品 6 種のクロマトグラム(左下)並びに HPLC 条件(右)

表 1 : 試行した実験の条件と回収率

試行 No.	NaCl の 添加量	Na ₂ SO ₄ の 添加量	H ₂ O の 添加量	混和	抽出溶媒の量	回収率 (%)
1	0g	2g	0mL	hand	9mL	87.81
6	1g	2g	4mL	hand	9mL	100.28
11	0g	5g	0mL	shaker	9mL	82.66
16	1g	5g	4mL	shaker	9mL	97.22
23	0g	5g	4mL	hand	10mL	63.55
26	1g	2g	0mL	shaker	10mL	89.37
36	1g	5g	0mL	hand	11mL	60.45
45	0g	2g	4mL	shaker	11mL	45.53

表 2 : 分散分析の結果

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
NaCl	1	574.1	574.1	525.717	0.0277	*
Na ₂ SO ₄	1	45.6	45.6	41.802	0.0977	.
H ₂ O	1	23.5	23.5	21.516	0.1352	
Shake	1	0.9	0.9	0.828	0.5299	
ExtSolv	2	2037.9	1018.9	933.071	0.0231	*
Residuals	1	1.1	1.1			

Signif. '***' p<0.001, '**' p<0.01, '*' p<0.05, '.' p<0.1

考 察

当所では HPLC-UV による試験法により検査を行っている。しかしながら、近年の検査法は LC-MS/MS による試験が前提となってきたり、試験機器の更新が必要とされている。LC-MS/MS を導入する場合、改めて SOP の策定、妥当性評価、速やかな新試験法への移行が求められる。加えて、QuEChERS 法などこれまでに全く試行したことの無い試験法についても検討する必要性が生じる。QuEChERS 法は抽出の際に塩析や分散固相抽出 (d-SPE) など、当所ではあまり馴染みのない手法で、過去に実施した経験がない。そこで今回、試験法の各操作が結果に及ぼす影響を把握することを試みた。

今回の解析から、①塩化ナトリウムの添加及び抽出溶媒量は有意な影響を与える、②抽出溶媒を加える前に予め試料に添加する H₂O の量は有意な影響を与えない、③脱水のために添加する無水硫酸ナトリウム量は有意な影響を与えない、④手作業による混和とシェーカーによる混和で有意な差は無い等の試験法における各操作の影響を効率よく把握することができた。

まとめ

導入を検討する試験法の前処理方法について、操作条件の変動による結果への影響を観測した。実験計画法を用いることにより、実験回数を大幅に低減しながら、試験法の各操作の変動が結果に及ぼす影響について把握することが可能であった。

(1) Jung, Young Sung et al: "Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS." Food chemistry vol.382 132313 (2022).