

(5)豚の脂肪における動物用医薬品一斉分析法の検討

○推野千紘、佐々木秀樹

1. はじめに

当所では、牛、豚及び鶏の筋肉を対象とした残留動物用医薬品検査について、短時間で多数の化合物を検査可能な体制を整備してきた。検査には、Enhanced Matrix Removal-lipid (以下、EMR)と除タンパクフィルターを組み合わせた Captiva EMR-Lipid (以下、Captiva)による精製を行い、液体クロマトグラフ四重極質量分析計 (以下、LC-MS/MS)を用いた一斉分析法 (以下、従来法)を試験法として用いており、これまでに、牛筋肉で49化合物、豚筋肉で46化合物、鶏筋肉で47化合物について試験法の妥当性を確認している[1]。

一方、残留基準値は、食品分類(動物種、部位 等)ごとに設定されているものの、当所で確立している試験法は筋肉に限られ、脂肪における試験法は未整備である。また、検査対象化合物の中には、チルミコシンをはじめ、薬物動態等の理由から筋肉よりも脂肪に蓄積しやすいものが存在することからも[2]、脂肪における試験法の確立が、より正確な検査を行う上で重要である。そこでまず、当所所管のと畜場で処理頭数の多い豚について、脂肪を対象とした残留動物用医薬品検査体制を確立することを目的とし、試験法の構築と、その妥当性評価を実施した。

2. 材料および方法

(1)材料

検体には、分析対象化合物を含まないことを確認した豚の脂肪を用いた。標準品及び市販の標準混合液は全て富士フィルム和光純薬(株)製のHPLCグレードを使用した。各標準品はメタノールもしくはアセトニトリルに溶解させ、濃度が20 ppmもしくは100 ppmになるよう調整し、標準溶液とした。100 ppmに調整した標準溶液は、各化合物の最終濃度が20 ppmになるように同系統の化合物と混合した。使用した試薬等は表1に、LC-MS/MSの測定条件は表2に示した。分析対象化合物とLC-MS/MSによる分析条件を表3に示した。なお、分析条件は島津製作所LC/MS/MSメソッドパッケージ動物用医薬品Ver.2により設定した。ただし、一部化合物は当所で条件設定を行った。

(表1) 使用した試薬等

試薬名	グレード	使用目的
水	超純水	移動相等
アセトニトリル	試薬特級 LCMS用	標準溶液作製 移動相等
メタノール	試薬特級 LCMS用	標準溶液作製 抽出溶媒
ギ酸	LCMS用	移動相

(表2) LC-MS/MSの測定条件

項目	条件
LC-MS/MS	島津製作所社製 LCMS-8050
分離カラム	オクタデシルシリル化シリカゲル (内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3 μ m)
カラム温度	40度
移動相	A液: 0.1%ギ酸-水 B液: 0.1%ギ酸-アセトニトリル
注入量	試験溶液2 μ Lを超純水8 μ Lと共注入
グラジエント条件	A液: B液 = 99:1 (0min) \rightarrow 85:15 (1min) \rightarrow 60:40 (6min) \rightarrow 0:100 (10min) \rightarrow 0:100 (18min) \rightarrow 99:1 (18.01min) \rightarrow 99:1 (22min)
流速	0.2mL/min
イオン化モード	ESI (+)、ESI (-)、MRMモード

(表3) 分析対象化合物の分析条件

化合物 グループ	動物用医薬品	基準値 (ppm)		ESI	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)			
		豚の筋肉	豚の脂肪			定量イオン	確認イオン		
①	市販 (キノロン系)	サラフロキサシン	不検出	不検出	+	386.15	368.05	342.10	
		オキシロニック酸	0.02	0.02	+	262.05	244.05	216.05	
		オフロキサシン	不検出	不検出	+	362.15	318.10	261.05	
		オルピフロキサシン	0.02	0.02	+	396.15	352.20	295.10	
		エンロフロキサシン	(総和として)	(総和として)	+	360.15	316.20	245.15	
		シプロフロキサシン	0.05	0.05	+	332.15	314.10	231.05	
		ジフロキサシン	0.02	0.02	+	400.15	299.10	356.20	
		ダノフロキサシン	0.1	0.1	+	358.15	82.10	340.20	
		ナリジクス酸	不検出	不検出	+	233.10	187.10	215.05	
		ノルフロキサシン	0.02	0.02	+	320.30	302.30	231.25	
		ピロミド酸	不検出	不検出	+	289.15	243.10	200.90	
		フルメキン	0.5	1	+	262.10	202.00	244.10	
		マルボフロキサシン	0.05	0.05	+	363.15	72.15	320.10	
		調整 (テトラ サイクリン系)	オキシテトラサイクリン	(総和として)	(総和として)	+	461.25	426.25	443.25
	クロルテトラサイクリン		0.2	0.2	+	479.15	444.30	154.20	
テトラサイクリン	+				445.35	410.40	154.25		
ドキシサイクリン	0.05		0.05	+	445.35	428.40	98.20		
調整 (リンコマイシン)	リンコマイシン	0.2	0.3	+	407.25	126.20	359.30		
②	市販 (サルファ剤系)	オルメトプリム	0.05	0.05	+	275.15	123.15	259.10	
		ジアベリジン	不検出	不検出	+	261.15	245.10	123.05	
		スルファエトキシピリダジン	不検出	不検出	+	295.10	92.00	140.10	
		スルファキノキサリン	0.1	0.1	+	301.10	156.05	92.00	
		スルファクロルピリダジン	0.05	0.05	+	285.00	156.10	92.05	
		スルファジアジン	0.1	0.1	+	251.05	92.15	156.00	
		スルファジミジン	0.10	0.10	+	279.10	92.15	186.15	
		スルファジメトキシ	0.2	0.05	+	311.10	156.00	92.10	
		スルファセタミド	不検出	不検出	+	215.05	92.05	156.00	
		スルファチアゾール	不検出	不検出	+	256.00	156.05	92.05	
		スルファドキシ	0.1	0.1	+	311.10	156.05	92.05	
		スルファトロキサゾール	不検出	不検出	+	268.10	202.10	108.05	
		スルファニトラン	不検出	不検出	-	334.05	136.10	137.10	
		スルファベリジン	不検出	不検出	+	250.05	156.00	92.10	
		スルファプロモメタジン	不検出	不検出	+	358.95	92.15	266.00	
		スルファベンズアミド	不検出	不検出	+	277.05	156.15	92.15	
		スルファメトキサゾール	0.02	0.02	+	254.05	155.95	92.15	
		スルファメトキシジアジン	不検出	不検出	+	281.15	92.15	156.10	
		スルファメトキシピリダジン	不検出	不検出	+	281.05	156.05	92.05	
		スルファメラジン	不検出	不検出	+	265.10	156.05	92.05	
		スルファモノメトキシ	0.02	0.05	+	281.05	156.05	92.15	
		スルファイソキサゾール	不検出	不検出	+	268.10	113.10	156.00	
		スルファイソミジン	不検出	不検出	+	279.10	124.25	186.10	
		トリメトプリム	0.1	0.1	+	291.15	123.15	230.10	
		ピリメタミン	0.05	0.05	+	249.10	177.00	128.15	
		市販 (マクロライド系)	エリスロマイシンA	0.2	0.2	+	734.45	158.10	576.30
			チアムリン	0.1	0.1	+	494.35	192.05	119.00
	ロイコマイシンA5		不検出	不検出	+	773.50	109.15	174.30	
	スピラマイシンi		0.2*1	0.3*1	+	422.55	174.20	101.20	
	ネオスピラマイシンi				+	350.45	174.20	160.25	
	チルミコシン		0.1	0.1	+	870.60	174.15	697.45	
	タイロシン		0.1	0.1	+	916.55	174.15	101.05	
	調整 (ペニシリン系)	ベンジルペニシリン	0.05	0.05	+	335.15	176.20	114.10	
アンピシリン		0.06	0.06	+	350.20	192.20	114.05		
調整 (セフェム系)	セファゾリン	不検出	不検出	+	455.20	323.20	156.25		
③	市販 (ホルモン剤)	クロステボル	不検出	不検出	+	323.20	143.05	131.10	
		α-トレンボロン	不検出	不検出	+	271.15	199.05	115.10	
		β-トレンボロン	不検出	不検出	+	271.15	199.10	253.15	
		プレドニゾロン	0.001	0.001	-	405.25	329.20	295.25	
		メチルプレドニゾロン	0.01	0.01	+	375.40	161.25	357.40	
		ゼラノール	0.002	0.002	-	321.35	277.30		
	調整 (殺鼠剤)	ワルファリン	0.001	0.001	+	309.20	163.10	251.10	

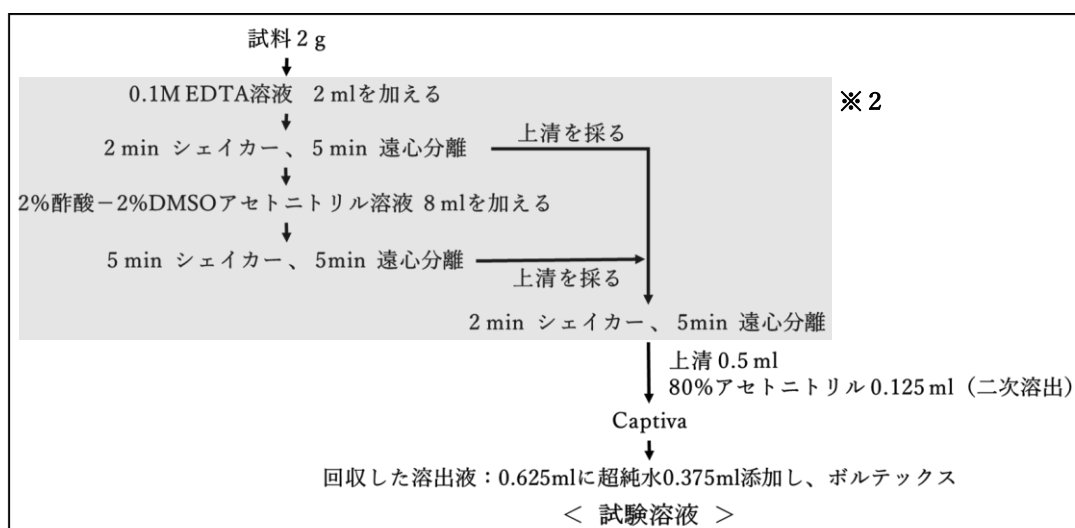
※1 スピラマイシン i 及びネオスピラマイシン i は、スピラマイシンとして基準値が設定されており、以下の式を用いてスピラマイシンとしての含量に換算する。

$$\text{スピラマイシンの含量 (ppm)} = \text{スピラマイシン i の含量 (ppm)} + \text{ネオスピラマイシン i の含量 (ppm)} \times 1.206$$

(2) 方法

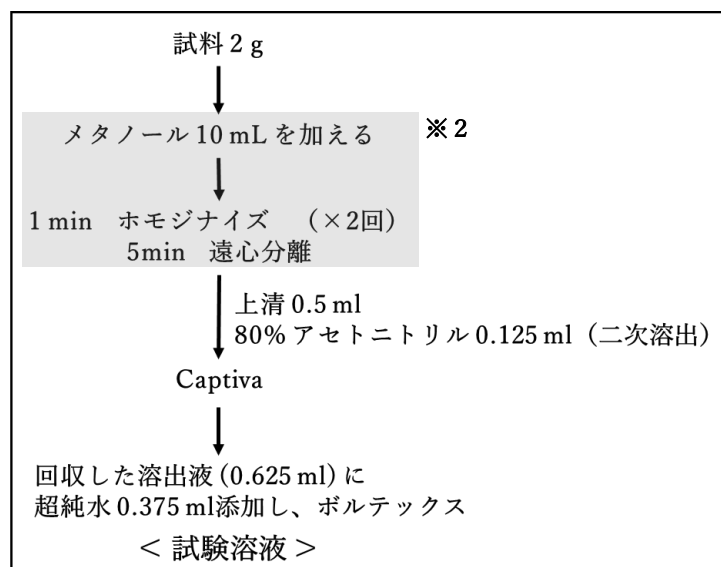
(i) 操作フロー

試料には、豚脂肪をドライアイス凍結粉碎法により均一化したものを用いた。はじめに、筋肉を対象とした従来法（図 1）を適用して検討したが、脂肪をほとんど乳化できなかつた。2%酢酸-2%DMSO アセトニトリル溶液を用い、振とう工程をホモジナイズに変更して検討したものの、乳化は改善せず、また、器具への脂肪の固着が認められた。研修会で、脂肪抽出においてメタノールでホモジナイズすると脂肪が微粒子として均一に分散するとの知見が得られたため[3]、抽出溶媒をメタノールに変更してホモジナイズを行った。その結果、完全ではなかつたものの、従来法と比較して乳化が改善したため、本検討ではこの方法（以下、本法）を採用した（図2）。



(図1) 従来法のフロー図

※2 網掛け部分については、従来法から本検討で変更した箇所



(図2) 本法のフロー図

※2 網掛け部分については、従来法から本検討で変更した箇所

(ii) 標準混合液の調整

市販もしくは調製した標準混合液および標準溶液について、使用溶媒ならびに検量線の検量点の違いをもとに、60 化合物を表 3 に示す 3 つのグループに分類した。各グループについて、各化合物の濃度が 2 ppm となるよう、標準溶液と市販もしくは調製した標準混合液を混合し、80%アセトニトリルで適宜希釈することにより、3 グループの標準混合液を調製した。

(iii) 検量線の作成

化合物グループ①②の検量点は 50 ppb、5 ppb、0.5 ppb の 3 点とし、グループ③の化合物は比較的基準値が低い化合物が多いことから 5 ppb、0.5 ppb、0.05 ppb の 3 点とした。

(iv) ポジティブコントロールの調整

当所 SOP の妥当性評価検査実施標準作業書に基づき、「一律基準濃度(0.01ppm)」と「基準値に近い一定の濃度」の 2 濃度を用いた。「基準値に近い一定の濃度」は、化合物グループ①②は 0.1ppm、化合物グループ③は 0.001ppm とした。

(v) 妥当性評価

前述のポジティブコントロール 2 濃度を用いた添加回収試験を、分析者 1 名が 1 日 1 回(2 併行)、5 日間実施した。得られた結果について、当所 SOP「妥当性評価検査実施標準作業書」に基づき、以下の項目について評価した。

- a. 保持時間の変動の確認(マトリックスの有無で保持時間に変動がないことの確認)
- b. 検量線の直線性
- c. 選択性の確認(定量を妨害するピークの確認)
- d. 真度(回収率が 70%~120%の範囲内であることを確認)
- e. 精度(併行精度及び室内精度が規定の範囲*未満であることを確認)
※ポジティブコントロールの濃度によって異なる
- f. 定量限界

(vi) マトリクス効果 (Matrix Effect 以下、ME) の確認

均質化した試料から図 2 の手順で調製した陰性対照試験溶液に標準混合液を添加し、(iii)の濃度になるよう調整して、マトリクス検量線を作成した。各化合物について、マトリクス検量線と絶対検量線の傾きを比較するために、式1 [4] により ME を算出した。

$$ME(\%) = \left(\frac{\text{Slope of Calibration Curve in the Sample}}{\text{Slope of Calibration Curve in Solvent}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{式 1})$$

3. 結果

妥当性評価を行った結果は表 4 のとおりである。60 化合物中 41 化合物で妥当性が確認できた。真度及び精度は、2 濃度用いたポジティブコントロールのうち、基準値よりも低い濃度について評価を行った。保持時間、検量線および定量限界の 3 項目は、すべての化合物で評価基準を満たしていた。また、ME は全化合物において -20%~20%の範囲内であることを確認した。

一方、併行精度や室内精度が評価基準を満たさなかった化合物が認められた。プレドニゾロン、メチルプレドニゾロンおよびゼラノールでは、検量線とポジティブコントロールのいずれにおいても、低濃度でピークの不安定化やノイズの増大が認められ、妥当性を確認できなかった。

分類別では、サルファ剤系はほぼ全ての化合物で妥当性が確認された。一方、テトラサイクリンおよびドキシサイクリンでは、0.1 ppm の添加回収試験でわずかにピークが認められたものの、0.01 ppm の添加

(表4) 分析対象化合物の妥当性評価の結果

化合物	豚脂肪 基準値 (ppm)	評価項目								ME	判定
		保持時間	検量線	選択性	真度	併行精度	室内精度	定量限界			
キノロン系	サラフロキサシン	不検出	OK	OK	OK	27%	27%	47%	OK	-2.18%	不適
	オキシロニック酸	0.02	OK	OK	OK	99%	9%	17%	OK	-8.43%	適
	オフロキサシン	不検出	OK	OK	OK	37%	11%	26%	OK	-3.61%	不適
	オルビフロキサシン	0.02	OK	OK	OK	60%	20%	18%	OK	-6.94%	不適
	エンロフロキサシン	(総和として)	OK	OK	OK	48%	8%	43%	OK	-3.30%	不適
	シプロフロキサシン	0.05	OK	OK	OK	7%	123%	140%	OK	-12.49%	不適
	ジフロキサシン	0.02	OK	OK	OK	84%	20%	26%	OK	-5.44%	適
	ダノフロキサシン	0.1	OK	OK	OK	20%	26%	47%	OK	-1.73%	不適
	ナリジクス酸	不検出	OK	OK	OK	95%	4%	18%	OK	-7.91%	適
	ノルフロキサシン	0.02	OK	OK	OK	1%	2679%	2301%	OK	-1.58%	不適
	ピロミド酸	不検出	OK	OK	OK	87%	9%	10%	OK	0.24%	適
	フルメキン	1	OK	OK	OK	97%	12%	12%	OK	2.36%	適
	マルボフロキサシン	0.05	OK	OK	OK	41%	10%	12%	OK	-9.10%	不適
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	(総和として)	OK	OK	OK	8%	14%	121%	OK	5.12%	不適
	クロルテトラサイクリン	0.2	OK	OK	OK	5%	201%	181%	OK	1.26%	不適
	テトラサイクリン	0.2	OK	OK	NG	2%	227%	214%	OK	-7.85%	不適
	ドキシサイクリン	0.05	OK	OK	NG	-18%	-149%	-173%	OK	-11.61%	不適
リンコマイシン系	リンコマイシン	0.3	OK	OK	OK	101%	5%	7%	OK	1.37%	適
サルファ剤系	オルメトプリム	0.05	OK	OK	OK	99%	10%	16%	OK	15.06%	適
	ジアベリジン	不検出	OK	OK	OK	93%	10%	12%	OK	16.82%	適
	スルファエトキシピリダジン	不検出	OK	OK	OK	106%	10%	14%	OK	9.92%	適
	スルファキノキサリン	0.1	OK	OK	OK	95%	10%	11%	OK	7.96%	適
	スルファクロルピリダジン	0.05	OK	OK	OK	93%	5%	6%	OK	13.48%	適
	スルファジアジン	0.1	OK	OK	OK	100%	11%	18%	OK	10.87%	適
	スルファジミジン	0.10	OK	OK	OK	105%	7%	15%	OK	6.77%	適
	スルファジメトキシ	0.05	OK	OK	OK	104%	5%	7%	OK	7.74%	適
	スルファセタミド	不検出	OK	OK	OK	87%	4%	10%	OK	14.38%	適
	スルファチアゾール	不検出	OK	OK	OK	99%	10%	10%	OK	9.37%	適
	スルファドキシ	0.1	OK	OK	OK	107%	6%	10%	OK	6.03%	適
	スルファトキサゾール	不検出	OK	OK	OK	103%	16%	29%	OK	3.74%	適
	スルファニトラン	不検出	OK	OK	OK	85%	14%	35%	OK	8.81%	不適
	スルファピリジン	不検出	OK	OK	OK	105%	10%	14%	OK	8.74%	適
	スルファプロモメタジン	不検出	OK	OK	OK	104%	13%	18%	OK	9.54%	適
	スルファベンズアミド	不検出	OK	OK	OK	87%	3%	14%	OK	6.48%	適
	スルファメトキサゾール	0.02	OK	OK	OK	97%	10%	15%	OK	9.93%	適
	スルファメトキシジアジン	不検出	OK	OK	OK	106%	3%	5%	OK	9.32%	適
	スルファメトキシピリダジン	不検出	OK	OK	OK	108%	10%	10%	OK	7.13%	適
	スルファメラジン	不検出	OK	OK	OK	104%	15%	19%	OK	11.98%	適
	スルファモノメトキシ	0.05	OK	OK	OK	105%	7%	16%	OK	6.58%	適
スルファイツキサゾール	不検出	OK	OK	OK	105%	5%	9%	OK	10.35%	適	
スルファイツミジン	不検出	OK	OK	OK	99%	4%	6%	OK	14.32%	適	
トリメトプリム	0.1	OK	OK	OK	96%	6%	9%	OK	17.79%	適	
ピリメタミン	0.05	OK	OK	OK	98%	8%	13%	OK	15.12%	適	
マクロライド系	エリスロマイシンA	0.2	OK	OK	OK	89%	6%	15%	OK	15.06%	適
	チアムリン	0.1	OK	OK	OK	93%	8%	14%	OK	11.90%	適
	ロイコマイシンA5	不検出	OK	OK	OK	114%	12%	35%	OK	13.39%	不適
	スピラマイシンi	0.3*1	OK	OK	OK	90%	10%	14%	OK	-0.68%	適
	ネオスピラマイシンi		OK	OK	OK	92%	23%	37%	OK	16.06%	不適
	チルミコシン	0.1	OK	OK	OK	83%	7%	13%	OK	7.63%	適
タイロシン	0.1	OK	OK	OK	86%	12%	27%	OK	5.95%	適	
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0.05	OK	OK	OK	95%	12%	28%	OK	4.63%	適
	アンピシリン	0.06	OK	OK	OK	83%	16%	25%	OK	-0.67%	適
セフェム系	セファゾリン	不検出	OK	OK	OK	71%	21%	38%	OK	-2.57%	不適
ホルモン剤	クロステボル	不検出	OK	OK	OK	98%	6%	13%	OK	4.52%	適
	α-トレンボロン	不検出	OK	OK	OK	102%	11%	10%	OK	10.95%	適
	β-トレンボロン	不検出	OK	OK	OK	107%	9%	18%	OK	9.62%	適
	プレドニゾロン	0.001	OK	OK	OK	34%	193%	327%	OK	-3.03%	不適
	メチルプレドニゾロン	0.01	OK	OK	OK	113%	30%	48%	OK	4.21%	不適
	ゼラノール	0.002	OK	OK	OK	83%	92%	103%	OK	4.30%	不適
殺鼠剤	ワルファリン	0.001	OK	OK	OK	105%	18%	28%	OK	9.23%	適

評価基準を満たさないものについて着色している

回収試験でピークを確認できないものが多く、テトラサイクリン系の全化合物で妥当性を確認できなかった。キノロン系では妥当性が確認できた化合物は半数以下であった。

4. 考察

本研究では、豚脂肪を対象とした動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価を行った。検量線におけるMEは全化合物で-20~20%の範囲内であり、マトリクス由来のイオン化抑制・促進の影響は限定的であるため、絶対検量線を用いた定量が適用可能であると考えられた。

妥当性が確認できなかった化合物の一部では、併行精度や室内精度が基準を満たさなかった。これらの化合物では、ホモジナイズ工程における抽出効率が十分ではないと考えられる。このため、試料中の成分の影響を受けやすく、測定値にばらつきが生じたものと考えられる。今後、脂肪をより均一に乳化・分散させる抽出溶媒の検討が必要である。

プレドニゾロン、メチルプレドニゾロンおよびゼラノールでは、低濃度においてピークの不安定化やノイズの増大が認められた。本試験法では、抽出及び精製の工程を経ることで試験溶液中の濃度が10分の1に希釈されるため、基準値付近の濃度を評価する場合には、基準値の10分の1濃度よりもさらに低い濃度の検量点が必要となる。化合物グループ③の中で最も低い基準値は0.001ppmであったことから、その10分の1濃度よりも低い0.05ppbを検量点として設定した。しかしながら、当該濃度域では十分なピークの再現性が得られなかったため、今後は検量点の設定について、さらなる検討が必要である。

本検討では、テトラサイクリン系の全ての化合物で妥当性を確認できなかった。テトラサイクリン系は金属イオンと強くキレート形成しやすく、抽出過程で沈殿や固相への吸着が生じることが知られている。今回の抽出溶媒にはEDTAなどのキレート剤を添加していなかったため、金属イオンとのキレート形成を抑制できず、その結果、回収率が低下した可能性が高いと考えられる。

キノロン系化合物は、抽出溶液の酸性度を高めることで回収率が向上する一方、マクロライド系化合物は抽出溶液の酸性度を上げることで回収率が低下することが知られている。今回対象とした60化合物のうち、動物用医薬品データベースに記載されているマクロライド系化合物の中には、チルミコシンのように筋肉より脂肪に移行しやすいものが含まれていた。脂肪中のマクロライド系化合物の回収率を確保する観点から、本検討では抽出溶媒に酸を添加しなかった。このことが、キノロン系化合物における回収率および精度の低下につながったと思われる。今後は、キノロン系およびマクロライド系の双方に適合する抽出条件を確立するため、酸性度の最適化を含めた検討が必要である。

以上の結果から、筋肉における従来法をもとに構築した本法では、60化合物中41化合物について妥当性を確認できた。一方で、抽出工程や検量点設定等に改善の余地が認められたことから、分析対象化合物の拡充に向けて抽出条件の再検討が必要である。より正確な検査体制を構築できるよう、脂肪における動物用医薬品一斉分析法の試験法の確立に努めたい。

5. 引用文献

- [1]山口麻綾、建入茂樹、推野千紘、佐々木秀樹:動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価、第43回国食肉衛生検査所協議会理化学部会総会及び研修会講演要旨(19-21)
- [2]農林水産省動物医薬品検査所:動物用抗生物質医薬品基準、チルミコシン類(案)(179-185)
https://www.maff.go.jp/nval/kentei_kensa/kousei/index.html
- [3]田口貴章:食品に残留する農薬等の規制とその試験法について、第43回理化学部会総会・研修会資料(特別講演資料)
- [4]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).