

HPLC-FLによるキノロン剤試験法の検討

精密検査班 ○佐藤政人, 上村健人

1 はじめに

キノロン剤は抗菌スペクトルが広域で、家畜において治療薬として広く使用されているが¹⁾²⁾、これまでも食肉中での残留事例が報告されている。キノロン剤の試験法について個別試験法³⁾(以下、通知法)が厚生労働省から示されている。以前当所で通知法に沿った抽出方法を検討したが、減圧濃縮工程で非常に時間がかかり現実的ではなかった⁴⁾。このため、当所の阿部らは抽出工程が簡便な合成抗菌剤の一斉分析法を参考にキノロン剤試験法を検討し、妥当性評価を実施したところ、キノロン剤5剤(ノルフロキサシン(NFLX), シプロフロキサシン(CPFX), ダノフロキサシン(DNFX), エンロフロキサシン(ERFX), オルビフロキサシン(OBFX))のうち、牛の筋肉で2剤(NFLX, ERFX), 豚の筋肉で3剤(NFLX, CPFX, ERFX), 鶏で1剤(ERFX)について妥当性を認めることができた⁵⁾。

今回更に妥当性が認められる薬剤を増やすため、通知法に沿った方法の減圧工程を再検討したところ短時間での濃縮が可能となったため、対象薬剤について豚の筋肉を用い妥当性評価を実施することとした。また、牛や豚での使用頻度が高いマルボフロキサシンについて、当所での新たな分析対象とする事についても併せて検討したので、その概要を報告する。

2 材料

【試料】

豚の筋肉

【試薬】

- ・抽出液としてアセトニトリル及び0.2%メタリン酸溶液(2:3)混液
- ・水は超純水, メタノール及びアセトニトリルはHPLC用を使用。

【固相抽出カラム】

- ・ジベンジルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体カラム(60mg)(Waters社 Oasis HLB 30µm)。

【標準溶液】

標準物質:エンロフロキサシン(ERFX), シプロフロキサシン(CPFX), ダノフロキサシン(DNFX), ノルフロキサシン(NFLX), オルビフロキサシン(OBFX), マルボフロキサシン(MBFX), いずれも富士フイルム和光純薬(株)を使用。各薬剤とも100ppmとなるようにメタノールで溶解したものを標準原液とし、希釈調整は30%メタノール(水:メタノール=7:3)を用いた。添加濃度は各薬剤について通知法に示されている定量限界値の0.01ppmとした。

3 方法

(1)前処理

試験溶液抽出手順を図1に示した。

(2)測定条件

測定条件を表1に示した。移動相についてはアセトニトリル:0.1%ギ酸溶液(14:86)のイソクラティック溶出とした。測定波長については励起波長290nm, 蛍光波長を450nmとし, MBFXの溶出されるリテンションタイム付近のみ, 蛍光波長を500nmとした。

(3) 妥当性評価

妥当性評価ガイドラインに従い、添加回収試験を1日2検体ずつ、5日間(計10検体)実施し、選択性及び真度、精度について評価を行った。選択性については抗生物質等を含まないブランク試料のクロマトグラムから妨害ピークの有無を確認した。真度は平均回収率が70~120%の範囲にあるか、精度はRSD(回収率の相対標準偏差)が添加濃度に対応する許容範囲内にあるか確認し、選択性、真度、精度の3項目を全て満たした薬剤について、妥当性が認められたと判定した。検量線は4点(0.025ppm, 0.05ppm, 0.1ppm, 0.2ppm)とし、絶対検量線法により定量を行った。

| 表1 HPLC 測定条件 | |
|----------------------|-----------------------------|
| 試料 5.0 g | 検出器: 蛍光検出器(RF-20AXS) |
| 抽出液 100mL | 測定波長: 励起波長 290 nm |
| ホモジナイズ 1min | 蛍光波長 450 nm |
| 吸引ろ過 | ※MBFX では蛍光波長 500nm |
| 抽出液 20mL | セル部温調温度: 30 °C |
| 吸引ろ過 | 流速: 0.5 mL/min |
| 濃縮 40°C以下(30mL まで濃縮) | 分析カラム: 大阪ソーダ(株) カプセルパック |
| 固相抽出カラム負荷 | C18 MG II S5 |
| メタノール 5mL(コンディショニング) | (3.0 mm i.d.×150 mm, 3 µm) |
| 水 5mL(コンディショニング) | カラム温度: 40 °C |
| 水 5mL(洗浄) | 測定時間: 15 min |
| メタノール 5mL(溶出) | 注入量: 10 µL |
| 濃縮乾固 40°C以下 | 移動相: アセトニトリル:0.1%ギ酸溶液=14:86 |
| 30%メタノール 1mL | (イソクラティック溶出) |
| 超音波抽出 1min | |
| 試験溶液 | |
| 図1 試験溶液抽出手順 | |

4 抽出方法の検討

従来は、減圧濃縮工程で使用するエバポレーターの回転数を70rpm程度で濃縮していたが、今回は250rpmに上げたところ、効率的に減圧濃縮ができるようになった。また、突沸を感知する機能を有するエバポレーターを導入することで、不意に突沸した際に、自動で抽出液が突沸しない圧力に調節されるようになり、より安定的に濃縮することができた。

5 MBFX の測定条件の検討

今回対象薬剤としたMBFXを通知法に示されている測定波長で分析したところ、MBFXのリテンションタイム付近にピークを認めることができなかった。そこで、MBFXを検出するための適切な励起波長及び蛍光波長について検討した。はじめに、蛍光波長の検討を行うため、励起波長を通知法に示されている290nmに固定し、蛍光波長を通知法に示されている450nmから徐々に上げ、MBFXのピークを確認したところ、500nmの時にピークが極大となり、500nm以降はピークが小さく

なった(図 2)。次に励起波長について検討するため, 蛍光波長を 500nm に固定し, 励起波長を 270nm から徐々に上げ, MBFX のピークを確認したところ, 通知法に示されている 290nm の時にピークが極大となった(図 3)。この結果から, MBFX の最適な測定波長は蛍光波長が 500nm, 励起波長が 290nm となった。

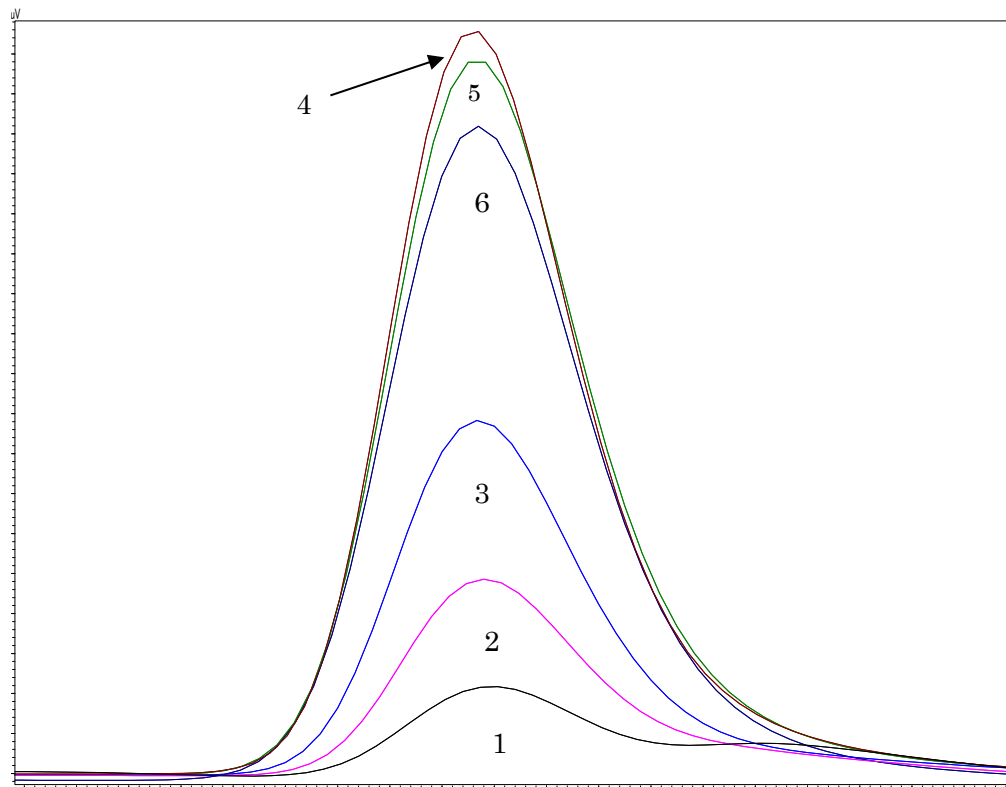


図 2 励起波長 290nm における MBFX の蛍光波長の違いにおけるクロマトグラム
(1:450nm, 2:470nm, 3:490nm, 4:500nm, 5:510nm, 6:520nm)

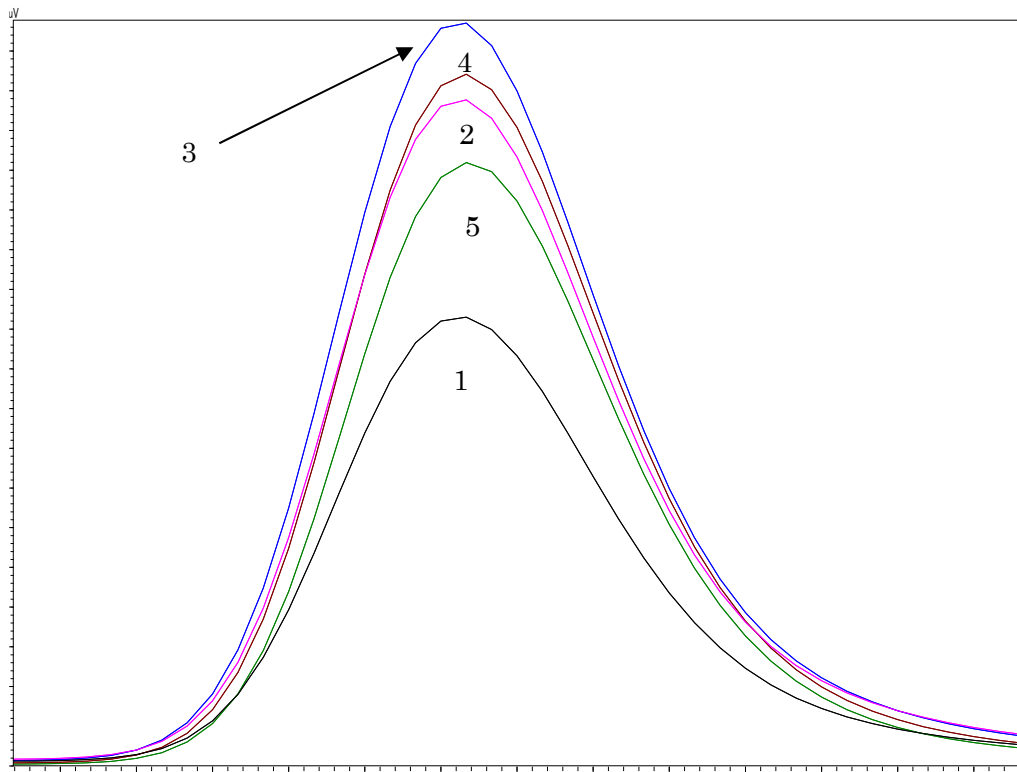


図3 蛍光波長 500nm における MBFX の励起波長の違いにおけるクロマトグラム
(1:270nm, 2:280nm, 3:290nm, 4:300nm, 5:310nm)

6 成績

通知法に沿った抽出を行った結果、6種の対象薬剤について回収率は良好であり、検討した測定条件において各薬剤のピーク形状及び分離も良好であった(図4)。また、ブランク試料に標準溶液を添加せず抽出を行った結果、6種の対象薬剤のリテンションタイム付近に妨害するピークが認められなかった(図5)。

妥当性評価の結果を表2に示した。6種の対象薬剤について妥当性評価ガイドラインに示す項目を全て満たしており、妥当性が認められる結果となった。

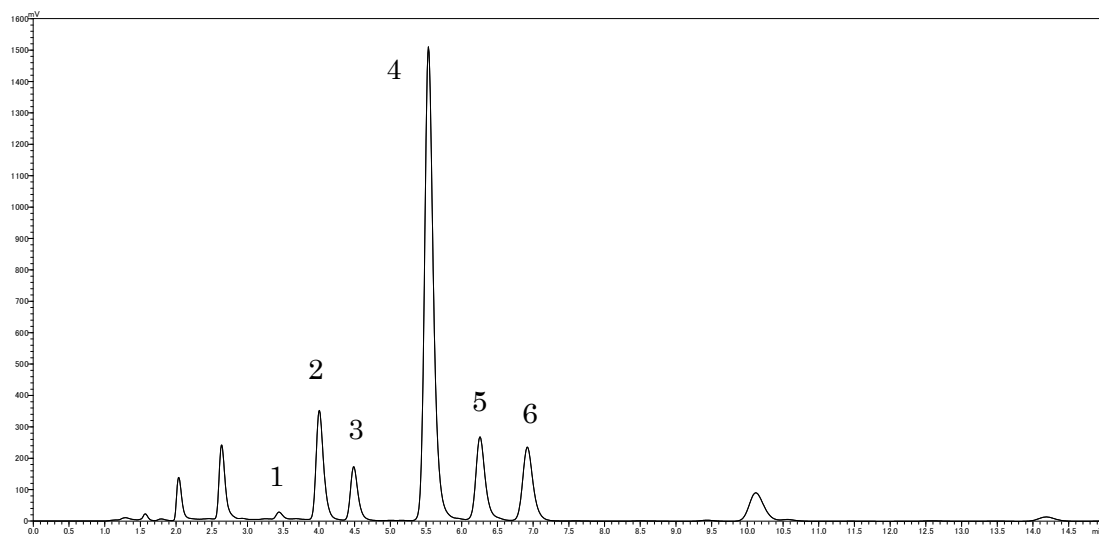


図4 キノロン剤のクロマトグラム
(1:MBFX, 2:NFLX, 3:CFPX, 4:DNFX, 5:ERFX, 6:OBFX)

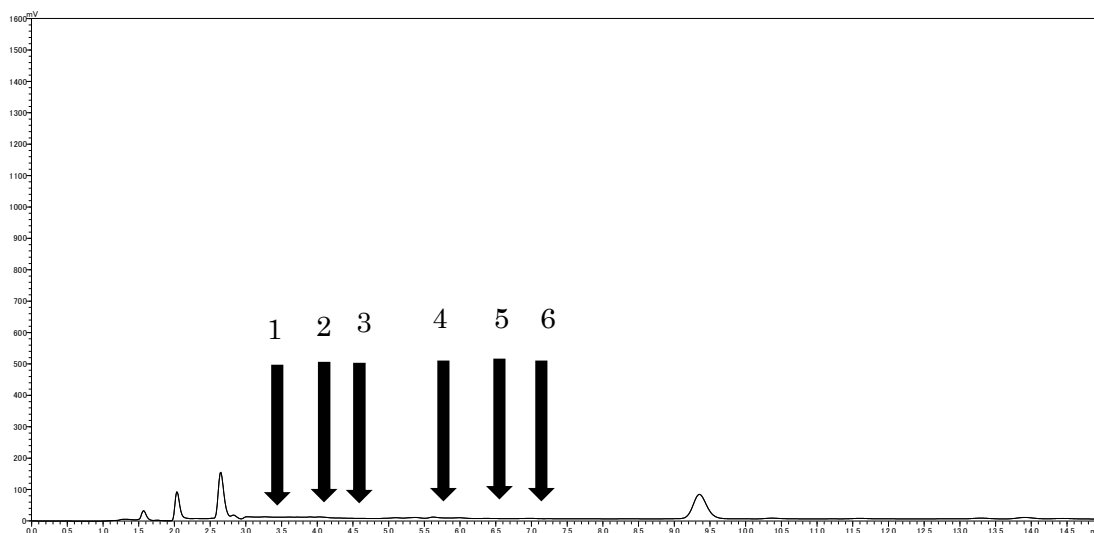


図5 陰性コントロールのクロマトグラム
(1:MBFX, 2:NFLX, 3:CPFX, 4:DNFX, 5:ERFX, 6:OBFX)

表2 妥当性評価結果

| 抗生物質 | 真度(%) | | 併行精度(RSD%) | | 室内精度(RSD%) | | 選択性 | 妥当性 |
|------|-------|--------|------------|------|------------|------|-----|-----|
| | 測定値 | 許容範囲 | 測定値 | 許容範囲 | 測定値 | 許容範囲 | | |
| MBFX | 87.00 | 70~120 | 3.81 | <25 | 5.85 | <30 | ○ | 有 |
| NFLX | 89.40 | | 4.85 | | 9.75 | | ○ | 有 |
| CPFX | 88.90 | | 2.82 | | 8.65 | | ○ | 有 |
| DNFX | 96.30 | | 2.73 | | 9.80 | | ○ | 有 |
| ERFX | 95.40 | | 2.10 | | 8.84 | | ○ | 有 |
| OBFX | 84.40 | | 2.95 | | 8.53 | | ○ | 有 |

※添加濃度は6種の薬剤とも0.01ppm

7 考察

通知法に示された方法では、吸引ろ過後に抽出液を減圧濃縮するが、抽出液にはアセトニトリル及び0.2%メタリン酸溶液(2:3)混液が使用されており、この混液は水を多量に含むため、減圧濃縮の際に揮発しにくい。しかし、回収率に影響する抽出時間を少しでも短縮するために、より減圧すると、それによって突沸が誘発されてしまう。当初通知法の減圧濃縮行程では、エバポレーターの回転数を70rpm程度に設定していたが、低粘稠の溶液の場合エバポレーターの回転数を上げることで液の表面積が大きくなり、揮発しやすくなる。そこで、過度な減圧をせずに、エバポレータ

一の回転数を 250rpm まで上げたところ、従来の回転数での濃縮時間から大幅に短縮することができた。

マルボフロキサシンの測定にあたっては、通知法に示されている励起波長 290nm、蛍光波長 450nm において、今回の標準品濃度 0.01ppm では検出することができなかった。そこで、適切なマルボフロキサシンの測定波長を探るため、様々な励起波長及び蛍光波長で検討した結果、励起波長 290nm、蛍光波長 500nm において最も大きなピークを検出することができた。今回対象薬剤としている他の 5 種のキノロン剤についても当該波長で検出できないか検討したが、標準品だけでの測定ではピークが検出されるものの、標準品を添加していない陰性コントロールにおいて、標準品と同じリテンションタイムに妨害ピークが検出されることが確認された。そこで、マルボフロキサシンが検出されるリテンションタイム付近のみ測定波長を変更するタイムプログラムを組んだところ、良好なクロマトグラムを得ることができた。

以上の検討結果を抽出行程及び測定条件に反映し、豚肉において妥当性評価を実施したところ、対象薬剤 6 種全てで良好な結果を得ることができた。今後は牛肉及び鶏肉においても妥当性評価を実施し、また、確認試験の実施体制についても関係機関と連携を密にし、当検査法を活用することで、安全安心な食肉の流通に貢献したいと考えている。

参考文献

- 1)木島まゆみ:動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (XXI) 動物用抗菌剤の各論 (その 10) キノロン系抗菌剤, 日獣会誌 71,227-232 (2018)
- 2)農林水産省動物医薬品検査所:平成 30 年動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報 (別冊) 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
- 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:平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 024001 号, 別添 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試験法, 第 3 章 個別試験法 (通知法)「エンロフロキサシン, オキシリニック酸, オフロキサシン, オルビフロキサシン, サラフロキサシン, ジフロキサシン, ダノフロキサシン, ナリジクス酸, ノルフロキサシン及びフルメキン試験法 (畜水産物)」
- 4)宮城県食肉衛生検査所:HPLC-FL によるキノロン剤試験法の検討, 平成 27 年度事業概要
- 5)宮城県食肉衛生検査所:ニューキノロン剤試験法の検討, 平成 28 年度事業概要
- 6)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について, 平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号