

- ・高速液体クロマトグラフ alliance 2690 (Waters 製)
- ・検出器 996 Photodiode Array Detector (Waters 製)
- ・カラム Cadenza CD-C18 (3 μ m、3 mm \times 15 cm、Imtakt 製)
- ・カラム温度 40 $^{\circ}$ C
- ・移動相 0.05%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (8/2)
- ・流速 0.4 mL/min
- ・測定波長 UV 280 nm
FL ex 280 nm、em 455 nm

れた。

3) 定量方法

適宜希釈した各標準溶液を、注入量 10 μ l で高速液体クロマトグラフィーにより、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

I - C 研究結果

1) 試料溶液の調製

検査法①の操作条件は、モニタリング検査法 (合成抗菌剤の一斉分析法¹⁾)、検査法②の操作条件は、食品衛生法の食品、添加物等の規格基準中のサラフロキサシンおよびダノフロキサシン試験法に準じた。

2) 添加回収試験

ウナギ、ウナギ白焼き、ウナギ蒲焼きに対する添加回収試験の結果は、0.1 添加の時、回収率 90~98%、相対標準偏差は 2.0~2.8% (n=3) であった。本法による定量下限は 0.01 ppm であった。

検査法①、②いずれの方法でもウナギおよびウナギ加工食品への適用が可能であったが、ウナギ蒲焼きはタレの部分が混入すると夾雑物が多くなり、目的物ピークの測定を妨害し、測定値の再現性が低くなる傾向が見ら

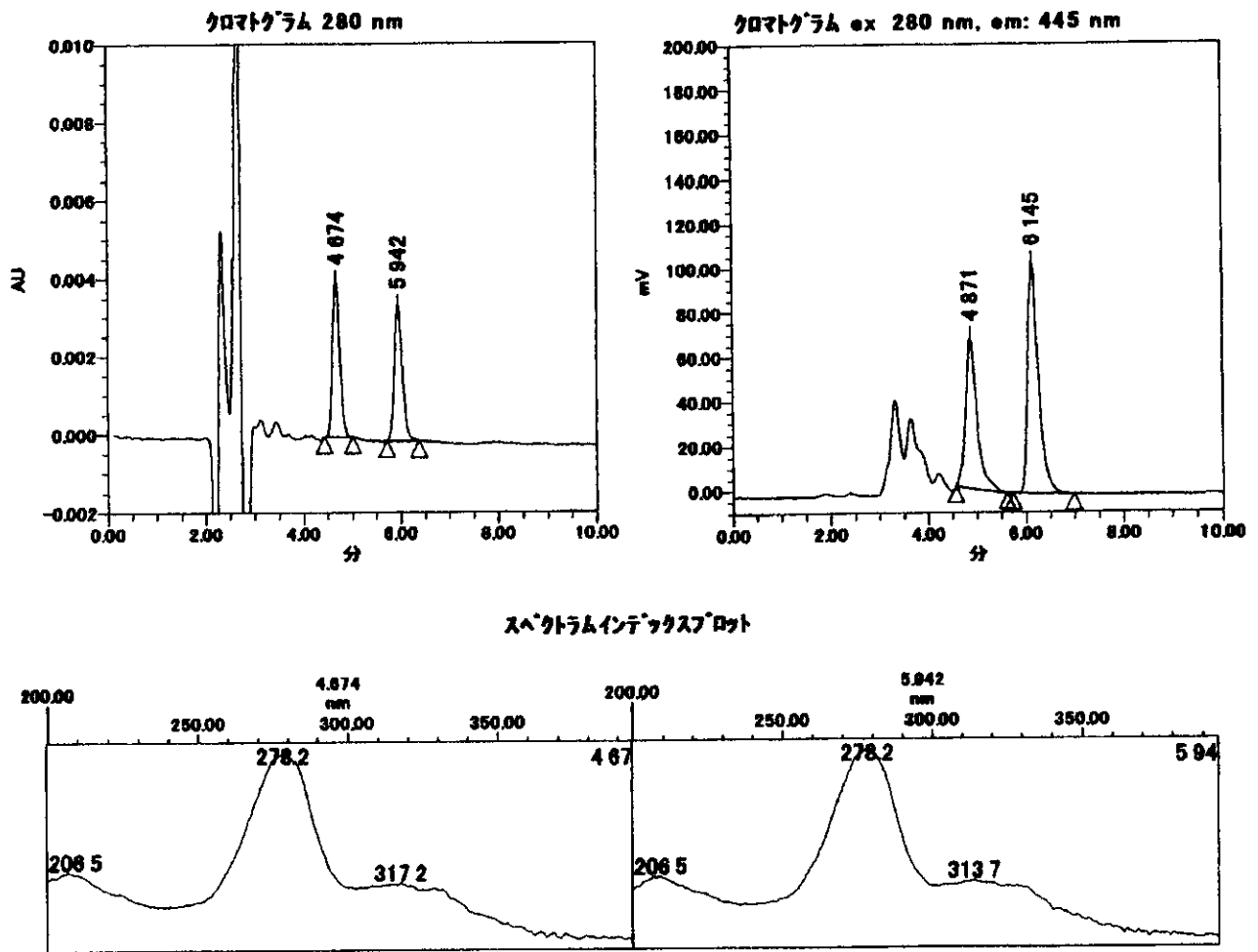


図 I-1 エンロフロキサシン、シプロフロキサシンのクロマトグラム
 それぞれ検体中濃度 0.1 ppm 相当
 左上 UV 280 nm、右上 FL ex 280 nm、em 445 nm にて測定
 左下 シプロフロキサシン、右下 エンロフロキサシンの UV スペクトル

II キノキサリン-2-カルボン酸の検査方法の検討

キノキサリン-2-カルボン酸は、畜産物に使用される合成抗菌剤カルバトックスの代謝物であり、食品、添加物等の規格基準において残留基準が設定されている。近年、畜産物中のカルバトックスの代謝について新たな知見が得られ、従来は存在しないと考えられていた代謝物が存在し、遺伝毒性発がん性を有することが明らかとなった。これを受けて、残留基準の再評価がなされ、基準値の引き下げ、試験法の定量下限の引き下げが要求されている。

本報告では、キノキサリン-2-カルボン酸試験法の定量下限を引き下げるべく再検討を行った。

II-B 研究方法

II-B-1 実験材料

1) 試料

市販されている豚の筋肉、肝臓を用いた。

II-B-2 試験方法

1) 試料溶液の調製

食品衛生法の食品、添加物等の規格基準中のキノキサリン-2-カルボン酸

試験法にしたがった。

2) HPLC 条件

HPLC 測定条件は、表 II-1 に示したとおり、LC/MS および LC/PDA を用い、それぞれの最適条件により測定した。

3) 定量方法

適宜希釈した各標準溶液を、注入量 10 μ L で高速液体クロマトグラフィーにより、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

II-C 研究結果

1) 試料溶液の調製

条件①～⑤で共通して用いた抽出、精製法は、夾雑物の除去効果が高く、いずれの条件においても測定を妨害するピークは認められなかった。

2) 添加回収試験

豚の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、筋肉に 0.005 ppm 添加の時、回収率 90～97%、肝臓に 0.01 ppm 添加の時、回収率 92～99%、相対標準偏差は 3.6～5.1% (n=3) であった。

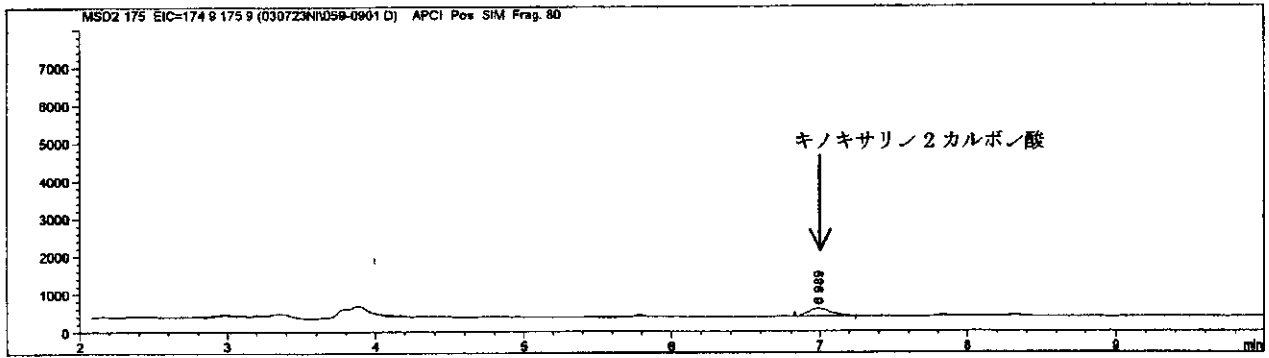
本法による定量下限は豚の筋肉で 0.001 ppm、肝臓で 0.005 ppm であった。

表 II-1 HPLC 条件

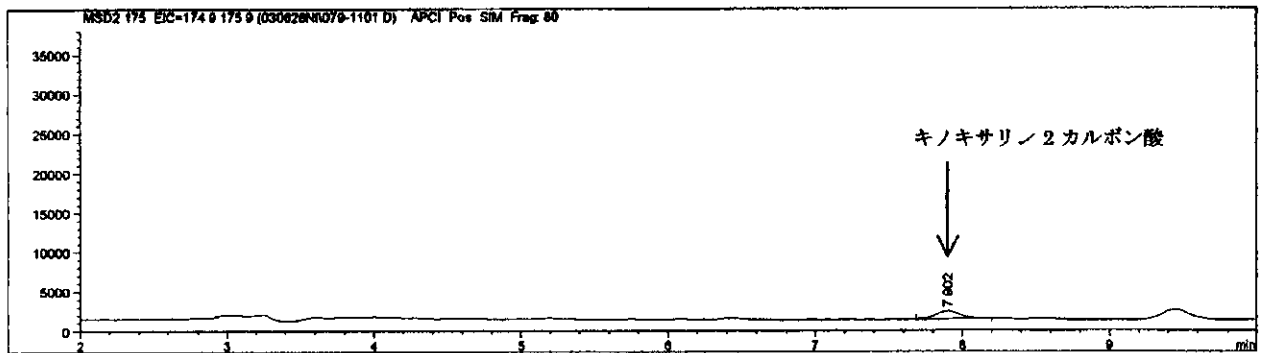
条件①	分離カラム	Mightysil RP-18 GP、4.6 mmφ×150 mm (関東化学)
	カラム温度	40°
	移動相	メタノール-2mM 酢酸アンモニウム (1:4)、0.4 mL/min
	検出器	G1946A (HEWLETT-PACKARD、LC/MS システム)
	イオン化法	APCI+
	測定質量	m/z=175
条件②	分離カラム	Cadenza CD-C18、3 mmφ×150 mm (Imtakt)
	カラム温度	40°
	移動相	アセトニトリル-0.01%酢酸 (1:4)、0.4 mL/min
	検出器	Agilent 1100 (Agilent、LC/MS システム)
	イオン化法	ESI-
	測定質量	m/z=173
条件③	分離カラム	Cadenza CD-C18、3 mmφ×150 mm (Imtakt)
	カラム温度	40°
	移動相	アセトニトリル-0.05%トリフルオロ酢酸 (1:4)、0.4 mL/min
	検出器	Waters-ZQ (Waters、LC/MS システム)
	イオン化法	ESI+
	測定質量	m/z=175
条件④	分離カラム	Cadenza CD-C18、3 mmφ×150 mm (Imtakt)
	カラム温度	40°
	移動相	アセトニトリル-0.05%トリフルオロ酢酸 (1:4)、0.4 mL/min
	検出器	Waters 996 PDA (Waters、LC/UV システム)
	測定波長	320 nm
条件⑤	分離カラム	Cadenza CD-C18、3 mmφ×150 mm (Imtakt)
	カラム温度	40°
	移動相	アセトニトリル-0.05%トリフルオロ酢酸 (1:4)、0.4 mL/min
	検出器	Waters 996 PDA (Waters、LC/UV システム)
	測定波長	245 nm

表 II-2 各条件における定量下限

条件	定量下限 (ppb)	
	豚筋肉	豚肝臓
①	1	5
②	1	5
③	5	10
④	5	30
⑤	1	5

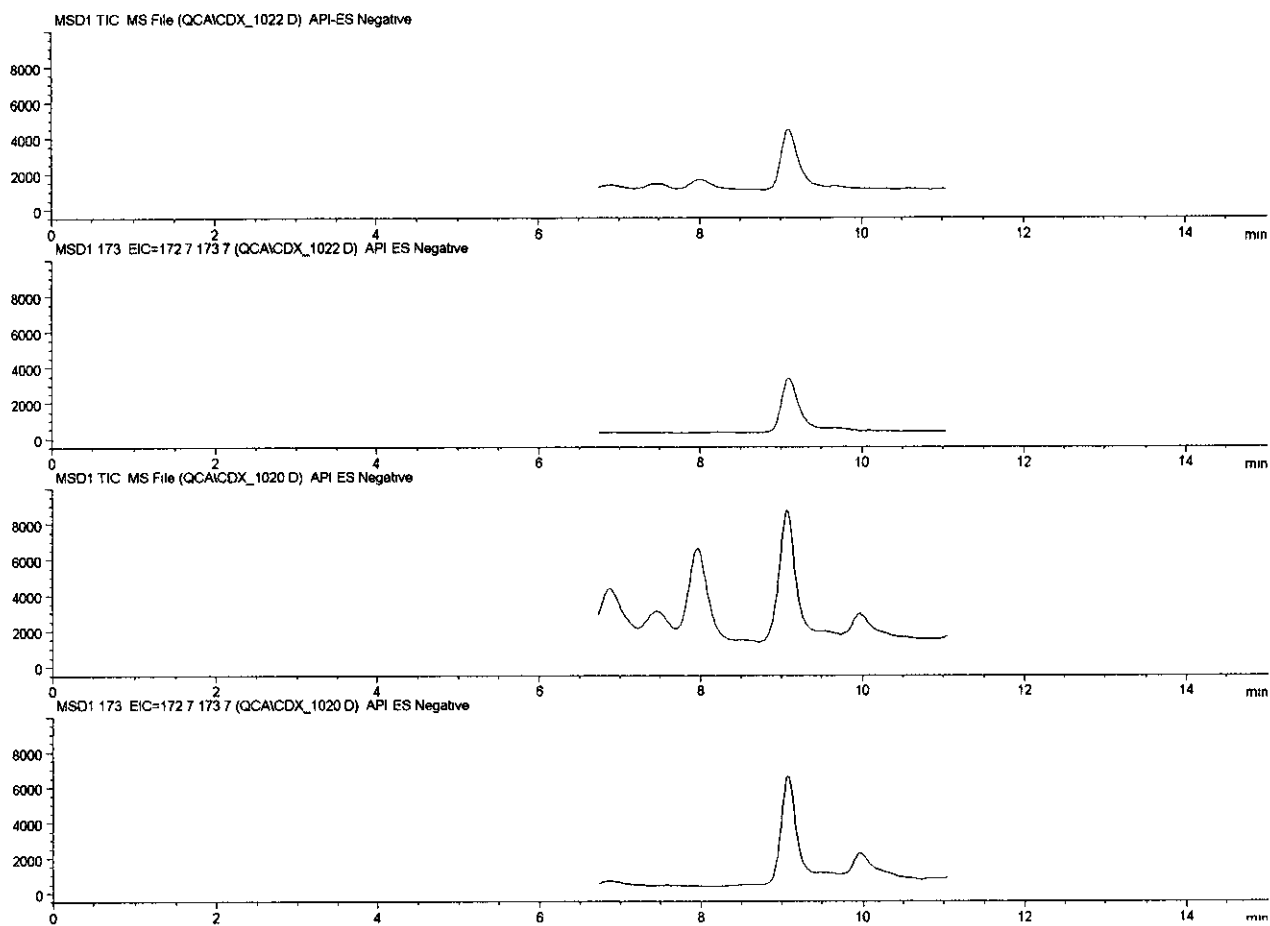


添加試料(豚筋肉) (0.001 ppm添加) のクロマトグラム



添加試料(豚肝臓) (0.001 ppm添加) のクロマトグラム

図 II-1 条件①によるクロマトグラム



図Ⅱ-2 条件②によるクロマトグラム

上から豚筋肉にキノキサリン-2-カルボン酸 2.5 ppb 添加、TIC

上に同じく、SIM

豚肝臓にキノキサリン-2-カルボン酸 5 ppb 添加、TIC

上に同じく、SIM

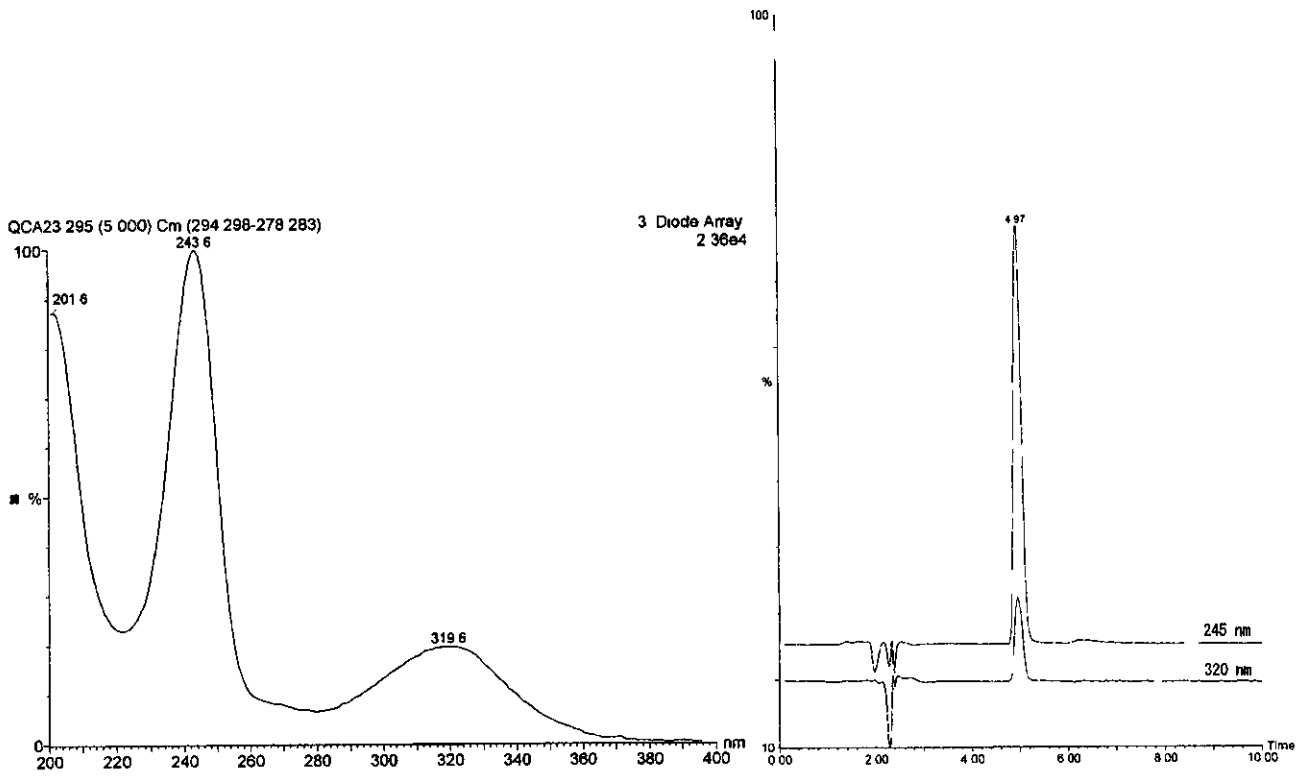


図 II - 3 キノキサリン-2-カルボン酸の吸収スペクトルおよびクロマトグラム
標準溶液 試料中 10 ppb 相当

D 考察

1) エンロフロキサシン、シプロフロキサシンの残留検査法を開発した。各化合物の定量下限は 0.01 ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 90% 以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3% 以内であった。

ウナギ蒲焼きはタレの部分が混入すると夾雑物が多くなり、目的物ピークの測定を妨害し、測定値の再現性が低くなる傾向が見られた。検査の際にはタレの影響のない部分のみを取り出して、試料とする必要がある。

2) キノキサリン-2-カルボン酸の残留検査法を開発した。定量下限は豚の筋肉で 0.001 ppm、肝臓で 0.005 ppm であった。添加回収試験の結果、各試料に対する回収率は平均で 90% 以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5% 以内であった。

現在、一般に入手可能な装置を用いたキノキサリン-2-カルボン酸の残留試験方法で、最も定量下限が低いのは LC/MS/MS による方法であるか、LC/MS/MS 装置は、日本の食品関係の公定残留試験法には採用されておらず、日本の食品関係検査機関において普及しているとは言い難い。

そこで今回は、すでに公定残留試験法に採用されている LC/MS、LC/UV による測定方法を比較検討した。

使用した検出器、条件は表 II-1 の通り、各条件における定量下限は表 II-2 の通りである。

条件①～③は LC/MS による方法であるが、装置により最適測定条件が異なり、定量下限も異なっている。一方、条件④、⑤は LC/UV による方法であり、条件⑤の

定量下限は LC/MS と同等である。

条件①～⑤で共通して用いた抽出、精製法は、夾雑物の除去効果が高く、いずれの条件においても測定を妨害するピークは認められなかった(図 II-1、2)。

キノキサリン-2-カルボン酸の吸収スペクトルは、図 II-3 に示した通り 245 および 320 nm に吸収極大があるが、吸収は 245 nm のほうが 320 nm より 5 倍強い。また、実際のクロマトグラム上でも 245 nm のほうが、ピーク高さが 5 倍高い。キノキサリン-2-カルボン酸の ADI は設定せずとされ、定量下限すなわち残留基準値とされていたため、従来法による 320 nm での測定でも、従来の残留基準値レベルの定量は可能であった。今回のように、定量下限を引き下げる必要がある場合には、より吸収の強い波長で測定することが有効である。

日本国内の食品関係検査機関の測定機器整備状況を考慮すると、LC/UV による試験法はほぼすべての機関において実施可能である。LC/MS は一部の抗生物質の公定残留試験法に採用されているものの、検査機関への普及率は未だに低いと思われる。

さらに、LC/MS は LC/UV と比べて定量の再現性、精度に劣る。

以上の点を考慮して、キノキサリン-2-カルボン酸の残留試験法としては、条件⑤の LC/UV による方法が最適である。

E 結論

合成抗菌剤のエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、カルハトックスの代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸の残留検査法を確立した。

今回確立した方法は、残留検査法とし

て有用であると考えられる。

キノキサリン-2-カルボン酸の残留検査法の定量下限をさらに引き下げるためには、日本国内の検査機関へ LC/MS/MS 装置の導入を推進した上で、LC/MS/MS による方法を採用する必要がある。

参考文献

- 1) 村山ら 食衛誌, 32(3), 155 (1991)

別添 7

研究成果の刊行に関する一覧

発表者 氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Moto et al	Absence of <i>m vivo</i> genotoxicity and liver initiation activity of dicyclanil	J Toxicol Sci	28	173-179	2003

20031207

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。