

蜂蜜及び牛乳中の残留動物用医薬品の迅速分析試験法の検討

田頭宗幸 渡邊利奈 金丸和博¹⁾

Study of Quick Determination of Residual Veterinary Drugs in Honey and Milk

Toshiyuki TAGASHIRA, Rina WATANABE, Kazuhiro KANEMARU

要旨

蜂蜜及び牛乳試料に残留する動物用医薬品の迅速分析試験法の検討を行った。

蜂蜜試料において、試料を Na₂EDTA 含有クエン酸緩衝液に溶解し、アセトニトリル及び塩化ナトリウムを用いて振とう抽出後、有機層を分取した。残った水層に Na₂EDTA 含有クエン酸緩衝液を加え冷却遠心分離後、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(OasisHLB)による固相抽出を行った。メタノールで溶出後、分取した有機層及び水を加えて 30mL に定容し LC-MS/MS により分析を行った。

牛乳試料において、試料にギ酸、クエン酸三ナトリウム二水和物及び Na₂EDTA を添加し、アセトニトリル及び塩化ナトリウムを用いて振とう抽出後、有機層を分取した。残った水層に Na₂EDTA 含有クエン酸緩衝液を加え冷却遠心分離後に吸引ろ過し、OasisHLB による固相抽出を行った。メタノールで溶出後、分取した有機層及び水を加えて 30mL に定容し LC-MS/MS により分析を行った。

動物用医薬品が検出しないと予め確認した各試料に対し、試料中濃度が 0.01µg/g となるように動物用医薬品 95 成分を添加し、添加回収試験(n=5, 分析者 1 名)を行ったところ、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン^{1),2)}の目標値(真度 70%~120%, 併行精度 25%未満)を満たした動物用医薬品は、蜂蜜試料において 75 成分、牛乳試料において 79 成分であった。

キーワード：蜂蜜、牛乳、動物用医薬品、迅速分析試験法

はじめに

動物用医薬品は、家畜等の疾病の予防及び治療に用いられており生産向上に大きく寄与している。一方で、様々な食品において動物用医薬品の検出事例が報告されており、消費者の健康被害または食への不信感による加工食品等の流通の妨げにつながるおそれがある。そこで、これらの問題を未然に防ぐため食品中に残留する動物用医薬品検査の迅速化が強く望まれている。

近年、残留農薬検査の迅速分析試験法として QuEChERS 法が普及しており、残留動物用医薬品検査への応用も報告されている³⁾。当研究所においても、平成 25 年度に QuEChERS 法を応用した迅速かつ簡便な試験法を確立し、鶏肉、鶏卵、

鶏肝及びうなぎを試料として動物用医薬品 95 成分について妥当性評価ガイドラインに従い添加回収試験を行ったところ、全ての試料で約 70 成分が目標値を満たした。しかし、この方法は、蛋白質及び脂肪を多く含む検体を対象とした試験法であり、糖類を多く含む蜂蜜及び牛乳には適さなかった。そこで、振とう抽出法及び固相抽出法の組み合わせによる蜂蜜及び牛乳試料中に残留する動物用医薬品を迅速かつ簡便に定量できる試験法を検討したので報告する。

衛生化学部¹⁾ 現 都城家畜保健衛生所

方法

1 試料

分析対象とする動物用医薬品が検出されないと予め確認した宮崎県産の蜂蜜及び牛乳を添加回収用試料として用いた。

2 標準品及び試薬等

1) 標準品

和光純薬工業(株)製動物用医薬品混合標準液 PL-1-3 及び PL-2-1, 林純薬工業(株)製 PL 動物薬 LC/MS Mix2, その他個別標準品 43 成分を用いた。

2) 試薬等

クエン酸, クエン酸三ナトリウム二水和物, 塩化ナトリウム及びギ酸は和光純薬工業(株)製の試薬特級を用いた。リン酸水素二ナトリウムは関東化学(株)製の試薬特級を用いた。エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(以下, Na_2EDTA とする。)は(株)同仁化学研究所製の試験研究用を用いた。ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムは Waters 社製の OasisHLB(1g/20cc)を用いた。 Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液は厚生労働省通知「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」⁴⁾(以下, TCs 個別法とする。)に記載されている方法に従って調製した。

3 装置及び測定条件

1) 装置

高速液体クロマトグラフ: アジレント・テクノロジー(株)社製 1200Series

質量分析計: 同社 6460 Triple Quad

2) 測定条件

カラム: (一財)化学物質評価研究機構製 L-column ODS(2.1×150mm, 5 μm), 移動相: A0.1%ギ酸, B アセトニトリル
流速: 0.25mL/min, グラジエント条件: ポジティブ B%(min): 5(0)–55(13)–95(22)–95(28)–5(28.1)–5(40), ネガティブ B%(min): 5(0)–100(8)–100(12)–5(12.1)–5(17), カラム温度: 40°C, 測定モード: ダイナミック MRM

4 試験溶液の調製

1) 蜂蜜試料

試料 5.00g を 50mL 容ポリプロピレン製遠沈管に採り, Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液 5mL を加え十分に試料を溶解させた。

2) 牛乳試料

試料 5.00g を 50mL 容ポリプロピレン製遠沈管に採り, ギ酸 0.1mL, クエン酸三ナトリウム二水和物 1.5g 及び Na_2EDTA 0.5g を加えた。

3) 蜂蜜試料及び牛乳試料共通

アセトニトリル 6mL 及び塩化ナトリウム 1g を加え 5 分間振とうし, 常温, 3,500rpm, 5 分間の遠心分離をした後, 有機層をパスツールピペットで 30mL メスフラスコに全量分取した。残った水層にアセトニトリル 6mL を加え同様の操作を行った。有機層を分取後, 水層が全量 15mL になるまで Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液を加え, ボルテックスで 1 分間攪拌し, 4°C, 3,500rpm, 10 分間の遠心分離を行った。牛乳試料はさらに吸引ろ過を行った。予めメタノール 10mL 及び水 10mL でコンディショニングした OasisHLB(1g/20cc) に水層を負荷し, 水 10mL で洗浄した後, メタノール 10mL で溶出させた。溶出液を 30mL メスフラスコ内の有機層と合わせ水で 30mL に定容し, 0.2 μm フィルターろ過したものを試験溶液とした。(図 1)

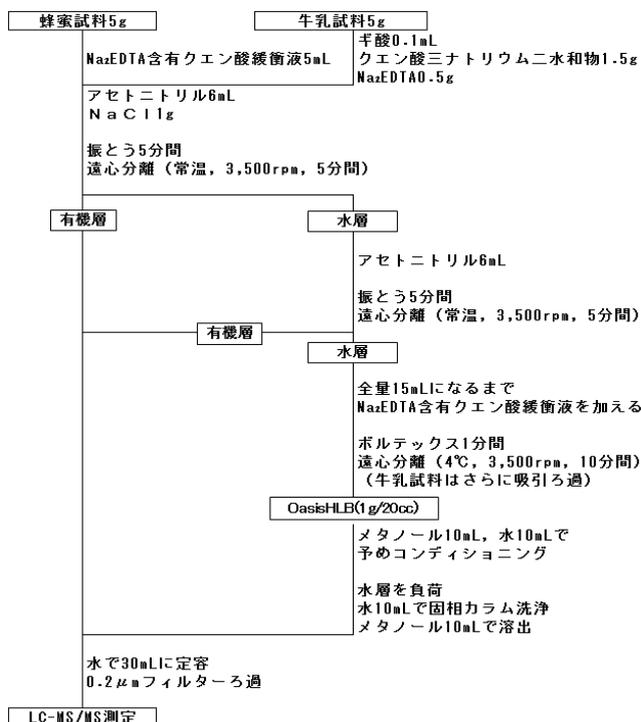


図 1 試験溶液調製の方法

結果及び考察

1 抽出溶媒の検討

有機層には、厚生労働省通知「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I(畜水産物)」⁴⁾で蜂蜜及び牛乳試料を対象とした農薬等の抽出において使用されるアセトニトリルを用いることとした。水層に用いる溶媒を選択するにあたり、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(以下、TCsとする。)の抽出について着目した。TCsは、牛の乳房炎治療や子宮内膜炎治療として使用され⁵⁾、また、蜜蜂の幼虫を侵す腐蛆病の予防や治療として使用される可能性が高い⁶⁾ことから蜂蜜及び牛乳において残留が懸念される動物用医薬品である。TCsの分配係数は $\text{LogPow} = -0.68 \sim -1.22$ ⁷⁾と低いことから水層に抽出されると推測した。そこで、TCs個別法に使用される Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液を抽出溶媒として用いることとした。牛乳試料を Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液及びアセトニトリルを用いて振とう抽出したところ、有機層に牛乳由来の成分が抽出されエマルジョン化した。そこで、 Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液を用いず、試料中のpHを調節するためギ酸0.1mL及びクエン酸三ナトリウム二水和物1.5gを加え、 Na_2EDTA 0.5gを添加して振とう抽出することとした。

2 塩析効果の検討

振とう抽出における塩析効果を検討するため、抽出溶媒に加える塩化ナトリウムを0g、0.5g、1g、1.5g及び2gで比較した。その結果、塩化ナトリウム1gにおいて63成分が真度70%~120%を満たしたので最適条件とした。

3 固相カラム検討

固相抽出について、TCsの抽出に使用されるInertSepPLS-2(500mg/20cc)⁸⁾、OasisHLB(500mg/12cc)⁹⁾及びOasisHLB(1g/20cc)の3種類を検討した。各固相カラムをメタノール10mL、水10mLでコンディショニングした後、動物用医薬品95成分を添加した Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液10mL

を負荷し、水10mLで洗浄後にメタノール10mLで溶出した。その結果、2)で抽出できた63成分を除いた動物用医薬品で、OasisHLB(1g/20cc)において16成分が真度70%~120%を満たし、最も多かった。

4 負荷液の検討

振とう抽出後の水層をそのまま固相カラムに負荷すると目詰まりを起こした。そこで、水層が全量15mLになるまで Na_2EDTA 含有クエン酸緩衝液を加えた後、4℃、3,500rpm、10分間の遠心分離を行った結果、目詰まりは改善された。牛乳試料の場合は遠心分離後さらに吸引ろ過を行うと目詰まりは改善された。

5 添加回収試験

本試験法を用い、蜂蜜及び牛乳の各試料に対し、試料中濃度が0.01 $\mu\text{g/g}$ となるように混合標準液を添加し、動物用医薬品95成分について添加回収試験(n=5,分析者1名)を行った。その結果、妥当性評価ガイドラインの目標値(真度70%~120%、併行精度25%未満)を満たした成分数は、蜂蜜試料において75成分、牛乳試料において79成分であった。(表1)

しかし、TCsのうち蜂蜜試料ではオキシテトラサイクリン及びテトラサイクリン、牛乳試料ではオキシテトラサイクリンが目標値を満たさなかった。

まとめ

蜂蜜及び牛乳試料を対象とした振とう抽出法及び固相抽出法を組み合わせた迅速分析試験法を検討した。本試験法を用いて添加回収試験(n=5,分析者1名)を行ったところ、蜂蜜試料について75成分、牛乳試料について79成分の残留動物用医薬品の迅速かつ簡便な試験に有用であることが分かった。しかし、蜂蜜及び牛乳において残留が懸念されるTCsが十分に回収できなかった。さらに検討を重ねていきたい。

表1 添加回収試験結果
(試料中濃度0.01ppm, n=5, 分析者1名)

化合物	NRMトラン ジション(m/z)	蜂蜜		牛乳	
		真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)
アクロミド	Aklomide	201.0 > 155.0	-	-	×
アルベンダゾール	Albendazole metabolite	240.0 > 133.0	97.1	17.6	175.2 15.5
アレスリン	Allethrin	303.2 > 135.0	100.0	5.0	90.9 4.4
アルトレンゲスト	Altrenogest	311.0 > 227.4	95.4	2.1	90.9 2.2
アンプロリウム	Amprolium	243.0 > 149.8	45.2	11.0	86.2 21.4
ベンゾカイン	Benzocaine	165.9 > 137.9	110.8	2.2	101.3 6.7
ブロチゾラム	Brotizolam	395.5 > 314.4	54.8	6.1	88.1 14.0
セフォペラゾン	Cefoperazone	466.0 > 142.9	-	×	-
クロルヘキシジン	Chlorhexidine	505.1 > 352.7	48.0	14.5	-
酢酸クロルマジノン	Chlormadinone	405.3 > 309.1	129.8	1.7	91.9 8.7
クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	479.1 > 444.0	79.8	10.0	86.3 14.7
シプロフロキサシン	Ciprofloxacin	332.1 > 314.0	57.3	10.8	109.3 6.3
クロピドール	Clopidol	192.0 > 101.0	101.2	2.1	90.6 4.6
クロステボル	Clostebol	323.2 > 143.0	110.7	2.7	95.2 3.5
ダノフロキサシン	Danofloxacin	358.2 > 340.1	83.8	9.0	104.5 5.2
デキサメタゾン	Dexamethasone	393.2 > 147.0	90.2	3.3	91.0 14.3
ジシクラニル	Dicyclanil	190.9 > 149.9	90.3	9.9	89.3 14.3
ジフロキサシン	Difloxacin	400.0 > 356.0	105.2	2.4	112.6 4.0
エマメクチン安息香酸	Emanectin Bla	886.5 > 158.1	113.4	1.3	96.2 2.0
エンロフロキサシン	Enrofloxacin	360.2 > 342.0	101.4	3.8	114.0 3.9
エプリノメクチン	Eprinomectin Bla	914.0 > 186.0	77.4	3.8	98.7 5.1
エトバベート	Ethopabate	238.1 > 206.0	94.4	1.8	92.7 5.5
ファムフル	Famphur	326.0 > 93.0	75.3	5.0	90.8 8.6
フェノブカルブ	Fenobucarb	209.1 > 95.0	118.1	0.9	97.9 6.6
フルベンダゾール	Flubendazole	314.1 > 282.0	79.1	2.8	102.8 2.0
フルメキン	Flumequin	262.0 > 244.0	86.1	0.9	103.3 1.5
ヒドロコルチゾン	Hydrocortisone	363.2 > 120.9	103.7	5.0	104.5 5.2
ジョサマイシン	Josamycin	828.3 > 174.0	113.0	1.1	103.2 2.2
ケトプロフェン	Ketoprofen	255.2 > 209.1	75.5	2.6	105.0 1.5
ラサロシド	Lasalocid	613.0 > 377.0	326.0	58.4	×
レバミゾール	Levamisole	205.1 > 178.0	-	×	-
リンコマイシン	Lincomycin	407.2 > 126.1	85.2	9.9	139.7 26.1
マホプラジン	Mafoprozine	402.3 > 193.1	105.4	1.3	104.7 1.3
マルボフロキサシン	Marbofloxacin	363.0 > 72.0	87.6	7.1	108.2 3.4
メベンダゾール	Mebendazole	296.0 > 263.8	97.5	1.2	114.1 13.9
メシリナム	Mecillinum	326.2 > 167.1	68.4	14.1	89.3 10.1
メロキシカム	Meloxicam	352.0 > 114.5	-	×	96.0 15.4
メンブトン	Menbutone	259.1 > 185.0	77.2	6.3	99.3 1.9
ミロキサシン	Miloxacin	264.0 > 246.0	71.1	8.5	79.8 11.2
モネンシン	Monensin	688.5 > 461.4	85.1	2.0	83.8 11.0
モランテル	Morantel	221.1 > 123.0	38.7	11.3	103.1 11.5
ナフシリン	Naficillin	415.1 > 199.0	-	×	-
ナリジクス酸	Nalidixic acid	233.1 > 215.1	94.9	2.1	103.0 2.7
オフロキサシン	Ofloxacin	362.2 > 261.1	88.5	8.9	113.5 4.2
オラキンドックス	Olaquinox	263.9 > 142.9	19.8	7.4	374.2 24.9
オルビフロキサシン	Orbifloxacin	396.0 > 352.0	101.9	3.8	114.9 3.7
オルメトプリム	Ormethoprim	275.2 > 123.0	97.2	3.3	94.9 2.9
オキソリニック酸	Oxolinic acid	262.0 > 244.0	86.1	0.9	103.3 1.5
オキシベンダゾール	Oxibendazole	250.1 > 218.0	102.1	1.2	103.5 2.5
オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	461.2 > 426.1	53.2	17.2	47.4 153.9
フェニキシメチルペニシリン	Phenoxymethylpenicillin	350.9 > 228.8	38.2	63.3	106.7 20.7
プレドニゾン	Prednisolone	361.2 > 343.0	105.3	7.0	106.7 7.5
プリフィニウム	Prifinium	307.3 > 86.1	111.1	1.0	101.9 2.4
ピランテル	Pyrantel	206.6 > 149.7	59.3	14.6	82.9 10.8
ピリメタミン	Pyrimethamine	249.1 > 233.1	100.8	0.8	102.0 2.2
リファキシミン	Rifaximin	786.4 > 754.3	3.8	223.6	-
ロベニジン	Robenidine	334.1 > 111.0	107.9	3.6	114.9 2.3
サラフロキサシン	Sarafloxacin	386.0 > 368.0	88.1	8.3	112.6 4.7
スルファベンズアミド	Sulfabenzamide	277.0 > 156.0	77.5	2.2	89.8 4.7
スルファセタミド	Sulfacetamide	215.0 > 92.1	85.8	9.4	97.6 1.7
スルファクロロピリダジン	Sulfachloropyridazine	285.0 > 92.0	81.9	4.0	80.9 4.4
スルファジアジン	Sulfadiazine	251.1 > 92.0	88.3	4.7	96.0 2.7
スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	311.1 > 156.0	75.3	1.8	90.0 5.0
スルファジミジン	Sulfadimidine	279.1 > 92.0	87.7	4.7	90.6 2.7
スルファドキシ	Sulfadoxine	311.1 > 92.0	84.1	3.4	103.8 2.2
スルファエトキシピリダジン	Sulfaethoxyypyridazine	295.1 > 156.0	82.1	2.1	94.0 1.8
スルファグアニジン	Sulfaguanidine	215.1 > 108.0	98.4	12.3	82.9 11.4
スルファメラジン	Sulfamerazine	265.1 > 92.0	89.8	3.2	88.2 1.3
スルファメトキサゾール	Sulfamethoxazole	254.1 > 91.8	78.3	3.4	109.9 5.8
スルファメトキシピリダジン	Sulfamethoxyypyridazine	281.1 > 108.0	88.5	5.6	86.2 1.7
スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	281.1 > 92.0	87.5	4.1	81.7 4.3
スルファピリジン	Sulfapyridine	250.1 > 92.0	85.2	2.9	84.7 3.1
スルファキノキサリン	Sulfaquinolaxin	301.0 > 92.0	83.0	4.4	81.2 4.2
スルファチアゾール	Sulfathiazole	256.0 > 156.0	96.0	5.7	93.3 2.5
テメホス	Temephos	467.0 > 419.3	72.6	3.4	88.9 5.8
テトラサイクリン	Tetracycline	445.2 > 410.0	54.8	22.7	93.5 14.8
チアベンダゾール	Thiabendazole	202.0 > 175.0	98.7	0.8	92.6 3.2
チアムリン	Tiamulin	494.3 > 192.1	109.2	0.8	102.3 2.5
チルミコシン	Tilmicosin	435.5 > 88.1	76.5	5.3	124.7 12.1
トルフェナム酸	Tolfenamic acid	262.1 > 209.0	-	×	-
酢酸トレンボロン	Trenbolone (α,β)	271.2 > 253.1	102.2	1.5	107.4 2.5
トリクロルホン	Trichlorfon	257.0 > 109.0	94.5	2.9	105.7 4.7
トリメトプリム	Trimethoprim	291.2 > 123.0	95.9	5.9	42.0 18.1
トリペレナミン	Tripeleminamine	256.3 > 211.1	103.4	1.3	99.6 2.1
タイロシン	Tylosin	916.5 > 174.0	108.7	2.0	104.1 3.4
バルネムリン	Valnemulin	565.3 > 263.1	99.3	1.9	101.6 1.8
ワルファリン	Warfarin	309.1 > 162.7	84.5	3.1	115.1 30.6
キシラジン	Xylazine	221.1 > 90.0	97.2	2.0	101.8 2.7

Negative

化合物	MRMトラン ジション(m/z)	蜂蜜			牛乳		
		真度 (%)	併行精度 (%)	検量線	真度 (%)	併行精度 (%)	検量線
2-アセチルアミノ-5- ニトロチアゾール	2-Acetylamino-5- nitrothiazole	185.9 > 138.7	93.2	2.3	94.1	6.1	
クロルスロン	Clorsulon	380.0 > 344.0	104.5	10.7	105.0	8.1	
ジクラズリル	Diclazuril	405.0 > 333.8	95.3	3.1	92.2	3.3	
フロルフェニコール	Florfenicol	356.0 > 335.3	92.4	11.9	-	-	X
ナイカルバジン	Nicarbazin	301.0 > 137.0	98.1	1.7	93.3	3.1	
スルファニトラン	Sulfanitran	334.0 > 136.0	95.2	2.8	103.8	1.6	
チアンフェニコール	Thiamphenicol	353.7 > 184.7	105.5	5.7	96.1	19.4	

※ 検量線はマトリックスを添加しており、検量点が5未満または相関係数が0.99未満の場合は、不採用(X)とした。

文献

- 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日食安発第1115001号
- 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」, 平成22年12月24日食安発1224第1号
- 吉田絵美子, 渋谷孝博, 黒川千恵子, 井上豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法の検討, 食品衛生学雑誌, 52(1), 59-65, (2011)
- 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、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日食安発第0124001号
- 吉田絵美子, 渋谷孝博, 黒川千恵子, 井上豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 乳および乳製品中のテトラサイクリン系抗生物質を含めた動物用医薬品一斉分析の検討, 食品衛生学雑誌, 50(5), 216-222, (2009)
- 石井里枝, 堀江正一, 村山三徳, 米谷民雄: LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のテトラサイクリン系抗生物質の分析, 食品衛生学雑誌, 47(6), 277-283, (2006)
- 環境省: 平成 25 年度化学物質分析法開発調査報告書, 724, (2014)
- 臼井力, 清川由樹, 吉田純一: 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, 鹿児島県環境保健センター所報, 16, 63-69, (2015)
- 南谷臣昭, 中村昌司, 永井宏幸, 大塚公人, 後藤黄太郎: LC-MS/MS による蜂蜜中の動物用医薬品の一斉分析, 岐阜県保健環境研究所報, 21, 13-18, (2013)