

# 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及び妥当性評価

田頭宗幸<sup>1)</sup> 渡邊利奈<sup>2)</sup> 西村幸江 富山典孝<sup>3)</sup>

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

Toshiyuki TAGASHIRA, Rina WATANABE, Yukie NISHIMURA, Noritaka TOMIYAMA

### 要旨

蜂蜜及び牛乳試料中に残留する動物用医薬品の迅速かつ簡便な試験法の開発を目的として、平成 27 年度に試験法の検討<sup>1)</sup>を行った。

しかし、検討した試験法ではテトラサイクリン系抗生物質の一部の分析に適さないことが課題であったため、ミニカラムのコンディショニング条件、溶出に用いる液量及び分散型固相精製条件の検討を行い、試験法を改良した。改良した試験法について、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン<sup>2),3)</sup>に従い妥当性評価試験を行った。

その結果、蜂蜜及び牛乳試料いずれにおいても、テトラサイクリン系抗生物質に対する同試験法の妥当性が認められた。全体としては、動物用医薬品 96 成分中、蜂蜜試料では 73 成分、牛乳試料では 64 成分の適合が認められた。

キーワード：蜂蜜、牛乳、動物用医薬品、迅速分析試験法、妥当性評価

### はじめに

平成 27 年度に牛乳及び蜂蜜中に残留する動物用医薬品の迅速分析試験法の検討を行い、添加回収試験(5 併行)を実施し、動物用医薬品 95 成分のうち牛乳において 79 成分、蜂蜜において 75 成分が妥当性評価ガイドライン(以下、ガイドラインとする。)の真度及び併行精度の目標値を満たしたことを報告した<sup>1)</sup>。

しかし、検討した試験法ではテトラサイクリン系抗生物質(本研究においては、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン及びオキシテトラサイクリンを指す。以下、TCs とする。)のうちテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリンの分析に適さないことが課題となった。

TCs は、牛の乳房炎治療等に幅広く使用され、乳に移行することがあり、市販されている牛乳に残留することがある<sup>4)</sup>。また、国内では蜜蜂への使用が禁止されているが、海外では蜜蜂の主な病

気である腐蝕病の治療に使用されることがあり、輸入蜂蜜でしばしば検出されている<sup>5)</sup>。

そこで、今回、抽出方法のさらなる検討を行い、改良した試験法(以下、改良法とする。)について妥当性評価を実施したので報告する。

### 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 44 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

衛生化学部<sup>1)</sup> 現 工業技術センター<sup>2)</sup> 現 日向保健所<sup>3)</sup> 現 環境管理課

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。アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。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、 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 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。分散型固相は、アジレント・テクノロジー(株)社製の Bondsil-C18(粒径:40 $\mu\text{m}$ )及び Bondsil-PSA(粒径:40 $\mu\text{m}$ )を用いた。0.01M $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 含有クエン酸緩衝液(以下、緩衝液とする。)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」<sup>6)</sup>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 $\times$ 150mm, 5 $\mu\text{m}$ ),

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 $^{\circ}\text{C}$ , 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

均一試料 5.0g を 50mL 容ポリプロピレン製遠沈管に量り採り、緩衝液 5mL を加えた。アセトニトリル 6mL 及び塩化ナトリウム 1g を加え、高速振とう機で 5 分間振とうし、4 $^{\circ}\text{C}$ 、毎分 5,800 回転、5 分間遠心分離を行った。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 を加えて同様の操作を行った。有機層を同メスフラスコに分取後、水層に緩衝液 5mL を加え、ボルテックスミキサー(または高速振とう機)で攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、毎分 5,800 回転、5 分間遠心分離を行った。予め

メタノール 10mL, 水 10mL を通液したミニカラム(OasisHLB(1g/20cc))にろ紙(5A)をセットし、飽和  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶液 5mL を通液した後に水層を負荷させた。ろ紙を緩衝液 3mL で 3 回洗浄し、さらにろ紙を外してミニカラムを水 10mL で 3 回洗浄後、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 $\mu\text{m}$  メンブランフィルターろ過したものを試験溶液とした(図 1)

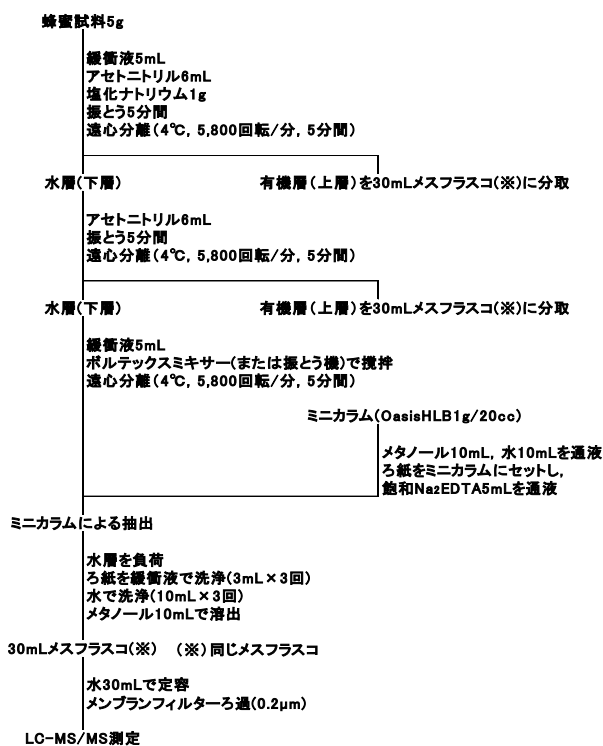


図 1 蜂蜜試料の調製フロー

#### 2) 牛乳試料

均一試料 5.0g を 50mL 容ポリプロピレン製遠沈管に量り採り、ギ酸 0.1mL, クエン酸三ナトリウム二水和物 1.5g 及び  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.5g を加えた。アセトニトリル 6mL 及び塩化ナトリウム 1g を加え、高速振とう機で 5 分間振とうし、4 $^{\circ}\text{C}$ 、毎分 5,800 回転、5 分間遠心分離を行った。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 を加えて同様の操作を行った。有機層を同メスフラスコに分取後、水層に緩衝液 10mL を加え、ボルテックスミキサー(または高速振とう機)で攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、毎分 5,800 回転、5 分間遠心分離を行った。予めメタノール 10mL, 水 10mL を通液したミニカラム(OasisHLB(1g/20cc))にろ紙(5A)をセット

し、飽和 Na<sub>2</sub>EDTA 溶液 5mL を通液した後に水層を負荷させた。ろ紙を緩衝液 3mL で 3 回洗浄し、さらにろ紙を外してミニカラムを水 10mL で 3 回洗浄後、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 に定容した。定容液から 15mL 容ポリプロピレン製遠沈管に 5mL を分取し、分散型固相 C18 及び PSA を 50mg ずつ加え 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌し、4℃、毎分 3,500 回転、5 分間遠心分離した後、上澄液を 0.2µm メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

(図 2)

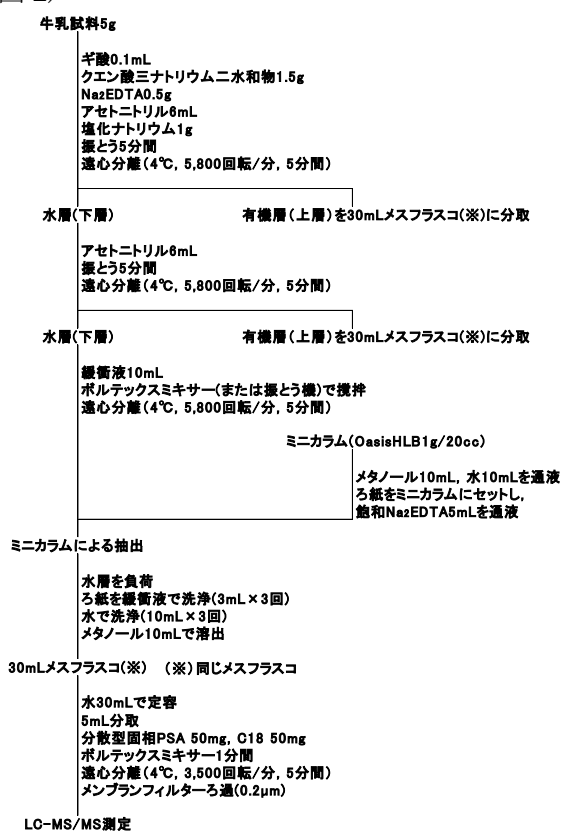


図 2 牛乳試料の調製フロー

## 結果及び考察

### 1 ミニカラムのコンディショニング条件の検討

TCs は、金属成分とキレートを形成する性質がある。そのため、固相抽出に用いるミニカラム中に金属不純物が存在する場合、金属不純物が TCs の抽出に悪影響を与えるので、Na<sub>2</sub>EDTA 溶液をマスキング剤としてミニカラムのコンディショニングに用いる方法が報告されている<sup>7)</sup>。

そこで、飽和 Na<sub>2</sub>EDTA 溶液をコンディショニング条件に加えて検討した。その結果、テトラサイクリン及びオキシテトラサイクリンの回収率が向上した。また、飽和 Na<sub>2</sub>EDTA 溶液をミニカラムから完全に除去するため、水による洗浄回数を増やすこととした。

### 2 溶出に用いる液量の検討

ミニカラムに保持された TCs を溶出させるためメタノールの量を変えて、溶出率を比較した。その結果、10mL を最適ととした。

### 3 分散型固相精製の条件の検討

牛乳試料において試験溶液が白濁していたことから、分析機器の負担軽減のため、分散型固相精製を用いることとした。使用する固相剤として、有機物や色素の除去を目的とした C18 及びリン脂質の除去を目的とした PSA の 2 種類を選択した。試験溶液に各固相剤を添加し、各固相量を検討した。その結果、試験溶液 5mL あたり C18 50mg, PSA 50mg が最適であった。

### 4 妥当性評価

動物用医薬品 96 成分の試料中濃度が 0.01µg/g 及び 0.04µg/g となるように添加した。添加した試料を改良法に基づき抽出し、妥当性評価を行った。それぞれの濃度について、分析者 3 人、1 日 2 併行、2 日間分析する枝分かれ実験により妥当性評価試験を行い、その結果を表 1 に示した。

なお、各試料において以下 1) から 3) の評価項目を全て満たす動物用医薬品を、その試料での妥当性評価に適合する動物用医薬品とした。

#### 1) 選択性

ブランク試料の測定結果から得られた妨害ピークが、定量限界濃度 (0.01µg/g) に相当するピークの 1/3 未満であるか確認した。

#### 2) 真度及び精度

各試料の添加回収試験結果から、平均値の添加濃度に対する比から真度、定量値の標準偏差及び相対標準偏差から併行精度及び室内精度を求め、ガイドラインに記載された目標値を満たすか確認した。

#### 3) 定量限界

定量限界濃度 (0.01µg/g) から得られるピークの S/N 比が 10 以上であることを確認した。

## まとめ

平成27年度に検討した試験法からミニカラムのコンディショニング溶液、溶出に用いるメタノール量及び分散型固相精製の条件を検討し、試験法を改良した。改良法をガイドラインに従って妥当性評価を実施したところ、動物用医薬品96成分のうち、蜂蜜試料においてTCsを含む73成分、牛乳試料においてTCsを含む64成分で妥当性が確認できた。現在、当研究所では、改良法に基づいて収去検査を行っている。

## 文献

- 1) 田頭宗幸, 渡邊利奈, 金丸和博: 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, 宮崎県衛生環境研究所報, 27, 81-85(2015)
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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)
- 5) Fujita K, Ito H, Ishihara M, *et al.*  
: Analysis of Trace Residues of Tetracyclines in Dark-Colored honeys by High-Performance Liquid Chromatography Using Polymeric Cartridge and Metal Chelate Affinity Chromatography, J.Food Hyg.Soc.Japan, 49(3), 196-203, (2008)
- 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, 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
- 7) 公益社団法人日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編, 82, (2003)

表1 妥当性評価の結果

番号	化合物名	MRMトランジション (m/z)	検査				牛乳						
			選択性	真度・精度 0.01µg/g 0.04µg/g	定量 限界	妥当性	備考	選択性	真度・精度 0.01µg/g 0.04µg/g	定量 限界	妥当性	備考	
1	アクリロミド	201.0 > 155.0	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
2	アルベンダゾール	240.0 > 133.0											
3	アレスリン	303.2 > 135.0			x								
4	アルトレノゲスト	311.0 > 227.4											
5	アンブロリウム	243.0 > 149.8		x	x		x	x			x		
6	ベンゾカイン	165.9 > 137.9											
7	プロチゾラム	395.5 > 314.4										x	
8	セフォペラゾン	646.0 > 142.9	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
9	ケルヘキシジン	505.1 > 352.7		x	x							x	
10	酢酸クロルマジノン	405.3 > 309.1										(注2)	
11	ケルテトラサイクリン	479.1 > 444.0										(注2)	
12	シプロフロキサシン	332.1 > 314.0											
13	クロビドール	192.0 > 101.0											
14	クrostepol	323.2 > 143.0									x	(注2)	
15	ダノフロキサシン	356.2 > 340.1										x	
16	デキサメタゾン	393.2 > 147.0	x										
17	ジシクラニル	190.9 > 149.9	x	x								x	
18	ジフロキサシン	400.0 > 356.0											
19	エマメクチン安息香酸	886.5 > 158.1										x	
20	エンロフロキサシン	360.2 > 342.0										(注3)	
21	エプリノメクチン	914.0 > 186.0											
22	エトパベート	238.1 > 206.0											
23	ファムフル	326.0 > 93.0											
24	フェノブカルブ	208.1 > 95.0											
25	フルベンダゾール	314.1 > 282.0											
26	フルメキン	262.0 > 244.0											
27	ヒドロコルテゾン	363.2 > 120.9											
28	ジョサマイシン	828.3 > 174.0										x	
29	ケトプロフェン	255.2 > 209.1											
30	ラサロシド	613.0 > 377.0	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
31	レバミゾール	205.1 > 178.0											
32	リンコマイシン	407.2 > 126.1		x	x							x	
33	マホブラジン	402.3 > 193.1											
34	マルボフロキサシン	363.0 > 72.0										x	
35	メベンダゾール	296.0 > 263.8											
36	メシリナム	326.2 > 167.1	x		x	x	x	x	x	x	x		
37	メロキシカム	352.0 > 114.5											
38	メンブトン	259.1 > 185.0											
39	ミロキサシン	264.0 > 246.0										x	
40	ミロサマイシン	728.2 > 158.0											
41	モネンシン	688.5 > 461.4			x							x	
42	モランテル	221.1 > 123.0			x							x	
43	ナフシリン	415.1 > 199.0										(注2)	
44	ナリジクス酸	233.1 > 215.1											
45	オフロキサシン	362.2 > 261.1											
46	オラキンドックス	263.9 > 142.9		x	x							x	
47	オルビフロキサシン	396.0 > 352.0											
48	オルメトプリム	275.2 > 123.0											
49	オキシリニック酸	262.0 > 244.0											
50	オキシベンダゾール	250.1 > 218.0											
51	オキシテトラサイクリン	461.2 > 426.1											
52	フェノキシメチルペニシリン	350.9 > 228.8											
53	ブレドニゾロン	361.2 > 343.0	x									x	
54	ブリフィニウム	307.3 > 86.1											
55	ピランテル	206.6 > 149.7		x	x							x	
56	ピリメタミン	249.1 > 233.1											
57	リファキシミン	786.4 > 754.3											
58	ロベニジン	334.1 > 111.0											
59	サラフロキサシン	388.0 > 368.0										x	
60	スルファベンズアミド	277.0 > 156.0											
61	スルファセタミド	215.0 > 92.1											
62	スルファクロルピリダジン	285.0 > 92.0											
63	スルファジアジン	251.1 > 92.0											
64	スルファジメトキシ	311.1 > 156.0											
65	スルファジミジン	279.1 > 92.0											
66	スルファドキシ	311.1 > 92.0											
67	スルファエトキシピリダジン	295.1 > 156.0											
68	スルファグアニジン	215.1 > 108.0										x	
69	スルファメラジン	265.1 > 92.0											
70	スルファメトキサゾール	254.1 > 91.8											
71	スルファメトキシピリダジン	281.1 > 108.0											
72	スルファモノメトキシ	281.1 > 92.0											
73	スルファピリジン	250.1 > 92.0											
74	スルファキノキサリン	301.0 > 92.0											
75	スルファチアゾール	258.0 > 156.0											
76	テメホス	467.0 > 418.3										x	
77	テトラサイクリン	445.2 > 410.0											
78	チアベンダゾール	202.0 > 175.0											
79	チアムリン	494.3 > 192.1											
80	チルミコシン	435.5 > 88.1											
81	トルフェナム酸	262.1 > 209.0											
82	酢酸トレンボロン	271.2 > 253.1											
83	トリクロルホン	257.0 > 109.0										x	
84	トリメトプリム	291.2 > 123.0											
85	トリベレナミン	256.3 > 211.1											
86	タイロシン	916.5 > 174.0										x	
87	バルネムリン	565.3 > 263.1											
88	ワルファリン	309.1 > 162.7		x								x	
89	キシラジン	221.1 > 90.0										(注2)	
90	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	185.9 > 138.7			x							x	
91	クルスロン	380.0 > 344.0											
92	ジクラズリル	405.0 > 333.8											
93	フルフェニコール	356.0 > 335.3	x		x	x	x				x	x	
94	ナイカルバジン	301.0 > 137.0											
95	スルファニトラン	334.0 > 136.0											
96	チアンフェニコール	353.7 > 184.7											
適合数			88	86	82	91	73		89	82	75	91	84

○:適合 x:不適合

(注1)LC-MS/MSの測定モードは1~89はポジティブモード、90~96はネガティブモードである。

(注2)妥当性評価の全ての項目を満たしているが、基準値(平成29年度時点)が定量限界未満であるので妥当性評価から除いた。

(注3)妥当性評価の全ての項目を満たしているが、基準値(平成29年度時点)がシプロフロキサシンとの総計であり、牛乳試料ではシプロフロキサシンが不適合であったので、妥当性評価から除いた。