

## LC-MS/MS 法による蜂蜜中の動物用医薬品一斉試験法の検討

大木翔平<sup>1</sup> 小林浩

Study on Simultaneous Analysis of Veterinary Drugs in Honey with LC-MS/MS

Shohei OGI and Hiroshi KOBAYASHI

キーワード：蜂蜜、動物用医薬品、LC-MS/MS、一斉試験法、妥当性評価

安定的な採蜜には、ミツバチの健康及び生息数の維持管理が必要不可欠である。特にミツバチ特有の疾患である腐蝕病やバロア病といった感染症に「動物用医薬品」が使用されているが、病気の治療に効果的な一方で、蜂蜜への残留が問題となる。近年、輸入蜂蜜からの検出事例が複数報告されている。現在、我が国で流通している蜂蜜の93%が輸入品<sup>1)</sup>であり、感度の高い分析方法による薬剤の残留実態把握は必要である。

蜂蜜中に残留する動物用医薬品の分析には、蜂蜜試料を水や緩衝液に溶解し、固相カラムで精製操作をする方法が報告<sup>2-4)</sup>されている。本研究では、より迅速かつ簡易な分析方法を検討するに当たり、有機溶媒による抽出を試みることにした。

今回我々は、動物用医薬品 55 物質を分析対象とし、高感度かつ簡易で低コストな分析方法を検討した。また、山梨県内に流通している輸入蜂蜜 6 検体の実態調査を実施したので報告する。

## 方法

### 1 試料

山梨県産のレンゲ蜂蜜、アカシア蜂蜜、アルゼンチン産のクローバー蜂蜜の3試料(以下3蜜源)を用い、一斉試験法の検討(妥当性評価)を実施した。

輸入蜂蜜の市販品実態調査には、山梨県内に流通する輸入蜂蜜6検体を用いた。

### 2 標準品および試薬等

測定対象物質は、当所の畜水産物検査項目に加え、H27年度輸入食品等モニタリング計画(食安発0330第3号)の「蜂に由来するもの」を参考にし、55物質とした。和光純薬工業(株)製、関東化学(株)製及び林純薬(株)製の標準品を用い、合成抗菌剤・寄生虫駆除剤46物質と抗生物質9物質の2系統の混合標準液を作製した。

アセトニトリル、無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験

用の関東化学(株)製を使用した。メタノール及び蒸留水はLC/MS用、ギ酸は高速液体クロマトグラフ用の関東化学(株)製を使用した。1-プロパノールは高速液体クロマトグラフ用の和光純薬工業(株)製を使用した。

ディスクフィルターは、クロマトディスクフィルタ13N非水系未滅菌0.45 $\mu$ mのクラボウ社製を使用した。

### 3 装置及び測定条件

表1に示した条件にて分析を実施した。各物質の定量イオンを表2に示した。

表1 LC-MS/MS 装置条件

LC	Waters 2695
カラム	Inert Sustain C18 (2.1mm.i.d×150mm 5 $\mu$ m)
移動相	A液：精製水 B液：アセトニトリル C液：0.1mol/Lギ酸溶液
グラジエント条件	A:B:C(min)=95:0:5(0)→ 65:30:5(8-15.9)→0:95:5(25)→ 95:0:5(25.1-30)
流速	0.2mL/min
注入量	10 $\mu$ L
MS/MS	Waters QuatroMicroAPI
イオン化モード	ESI(+), ESI(-)
キャピラリー電圧	0.7kV
イオンソース温度	110°C
デソルベーションソース温度	350°C
コーンガス流量	50L/hr
デソルベーションガス流量	350L/hr

### 4 試験溶液の調整方法

試験溶液の調整フローを図1に示した。試料5.0gを50mLキャップ付きポリ遠沈管に量り採り、85%アセトニトリル30mLを加え、手で1分間振とうして溶解した。3,000rpmで5分間遠心分離後、上層(アセトニトリル層)を無水硫酸ナトリウムが入った三角フラスコに分取した。残った下層に85%アセトニトリル20mLを加え、手で1分間振とうし、再び3,000rpmで5分間遠心分離し、上

1 現 地方独立行政法人山梨県立病院機構 中央病院

層(アセトニトリル層)を先の三角フラスコに合わせた。三角フラスコ内のアセトニトリルと無水硫酸ナトリウムを良く混和し、ろ紙(5A)を用いる過した。残った無水硫酸ナトリウムに85%メタノール2mLを用いて、3回洗い込みを行い、先のろ液と合わせた。1-プロパノール10mLを加えてロータリーエバポレーターにより約1mLまで減圧濃縮した(水浴約40°C)。この液を10mL遠心管に移し、メタノール:アセトニトリル:精製水=2:3:5を用いて5mLに定容し3,000rpm、5分間遠心分離し、0.45 $\mu$ mのディスクフィルターによりろ過し、LC用遮光ポリバイアルに入れ試験液とした。

## 5 検量線の作成

合成抗菌剤、寄生虫駆除剤:遮光ガラスメスフラスコを用い、混合標準液をメタノール:アセトニトリル:精製水=2:3:5液で希釈し、0.005~0.2 $\mu$ g/mLの検量線用標準液を作成した。得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法にて定量した。

抗生物質:ポリメスフラスコを用い、混合標準液をメタノール:アセトニトリル:精製水=2:3:5液で希釈し、0.005~0.2 $\mu$ g/mLの検量線用標準液を作成した。得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法にて定

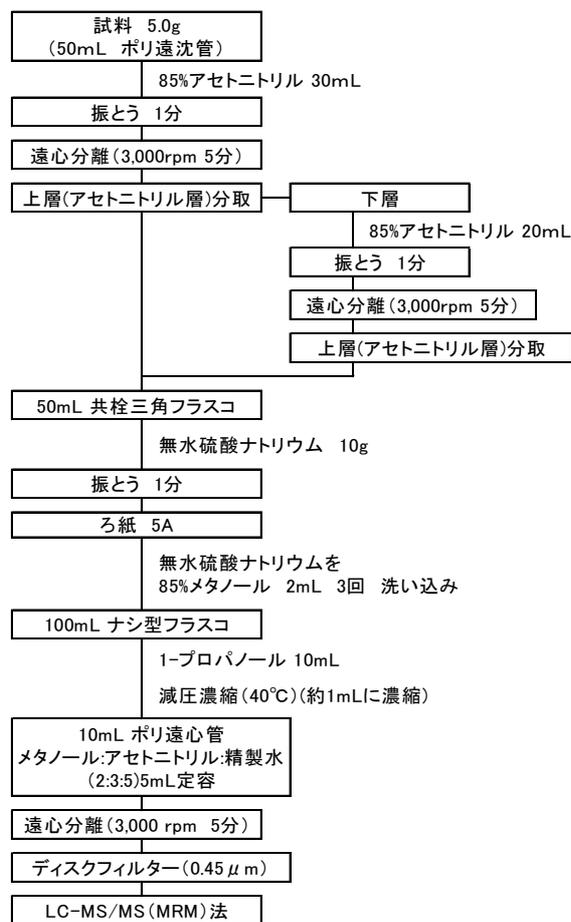


図1 試験溶液調整フロー

量した。

## 6 一斉試験法の妥当性評価

添加濃度は試料中濃度 0.01 $\mu$ g/g の1濃度とし、各試料に添加し評価試験を実施した。試験及び評価方法は妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup>に従い、分析者1名が2併行5日間繰り返し、真度(%)と併行及び室内精度(RSD%)を算出した。

## 結果と考察

### 1 分析法及び前処理方法の検討

#### (1) 標準溶液の調整方法の検討

全55物質の混合標準液を、遮光ガラスメスフラスコを用いて調整したが、テトラサイクリン系3物質(以下、TCs)の検量線の直線性が得られなかった。理由として、定容に用いたガラスメスフラスコへの吸着が考えられた。そこでTCsを含む抗生物質標準液のみポリメスフラスコを用い定容し、他の合成抗菌剤とは別系統の混合標準液として調整したところ良好な直線性が得られた。これにことない試験液容器をガラスバイアルからポリバイアルに変更した。

#### (2) 抽出溶媒の検討

動物用医薬品分析に広く用いられているメタノールとアセトニトリルを抽出溶媒検討に用いたところ、極性の高いメタノールでは蜂蜜が完全に溶解せず、アセトニトリルでは溶解困難であり、ゲル化してしまった。そこで、両溶媒を精製水で希釈し、50%メタノール、85%メタノール、50%アセトニトリル、85%アセトニトリルにて実施した。その結果、85%アセトニトリルが最も容易に溶解し、上層(アセトニトリル層)と下層(蜂蜜層)に分離したため、上層を試験溶液に用いた。よって、85%アセトニトリルを抽出溶媒に採用した。

#### (3) 水溶性夾雑物の除去と洗いこみの検討

回収率の概要を図2に示した。「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I」<sup>6)</sup>による水分除去は抽出溶媒と無水硫酸ナトリウムを同時に加えホモジナイズを実施す

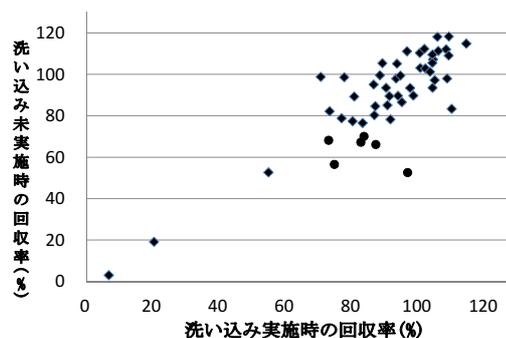


図2 メタノール洗い込みによる回収率比較

るが、本報では抽出後の上層に無水硫酸ナトリウムを加え、水分及び水溶性夾雑物の除去を行った。

ろ過後の無水硫酸ナトリウムに 85%メタノールによる洗い込みを実施した。洗いこみなしの妥当性評価ガイドラインによる適合数は 47 物質であったが、洗いこみを行なうことにより適合数は 53 物質となり、6 物質の回収率が改善した（黒丸）。

## 2 一斉試験法の妥当性評価

妥当性評価の結果を表 2 に示した。数値は真度を表す。併行及び室内精度は全て目標値に適合した。

55 物質中、レンゲ蜂蜜では 51 物質が目標値に適合し、アカシア蜂蜜では 46 物質、クローバー蜂蜜では 48 物質であった。このことから試験に用いた蜜源の違いにより適合物質に差が生じた。含有する夾雑物の違いによるものと考えられる。

## 3 輸入蜂蜜の市販品実態調査

結果を表 3 に示した。中国産の蜂蜜 1 検体よりトリメトプリムが検出された。トリメトプリムは通常、鶏や豚へ用いられる薬剤であり、蜂蜜からの検出は本来では考えにくい。しかし、中国産蜂蜜のトリメトプリム検出事例が報告されている<sup>4,5)</sup>。こうした検出事例などを鑑み、基準値が設定されている薬剤だけでなく、より多くの薬剤を分析する必要があると考えられた。

表 3 輸入蜂蜜の市販品実態調査結果

	蜜源	原産国	検出物質名
1	アカシア	ハンガリー	n. d.
2	クローバー	アメリカ	n. d.
3	混合	中国	<b>TMP</b> : 0.001 $\mu$ g/g
4	クローバー	ニュージーランド	n. d.
5	混合	中国	n. d.
6	クローバー	アルゼンチン	n. d.

定量下限値以上を検出物質とした。

## まとめ

本法は 55 物質を分析対象とし、3 蜜源全てで 8 割以上の物質が妥当性評価に適合した。よって、迅速かつ高感度な一斉試験法として有用であると考えられる。一方で、蜜源により妥当性評価適合物質が異なる結果となった。このことから同じ蜂蜜という分類とはいえ、妥当性評価は蜜源別に実施する必要があると考えられた。

輸入蜂蜜の市販品実態調査 6 検体からは基準値を超えた物質は検出されなかったが、中国産蜂蜜 1 検体から本来蜂蜜に残留するとは考えにくいトリメトプリムが検出された。今後は検体数をさらに増やし、調査を継続したいと考えている。

## 参考文献

- 1) 農林水産省生産局畜産部: 養蜂をめぐる情勢, 平成 27 年 10 月 (2015)
- 2) 石井里枝ら: 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, 食衛誌, **47**, 277~283 (2006)
- 3) 西村修一ら: LC/MS/MS によるハチミツ中の残留動物用医薬品等の一斉分析, 鹿児島県環境保健センター所報, **8**, 125~130 (2007)
- 4) 南谷臣昭ら: 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所報, **21**, 13~18 (2013)
- 5) 「食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドラインの一部改正について」厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 平成 22 年 12 月 24 日付け 食安発 1224 第 1 号
- 6) 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, 食安発第 0124001 号(2005)

表 2 各物質の条件と妥当性評価結果

種類	略語	物質名	イオンモード	RT(min)	MS/MS条件				レンジ		アカシア		クローバー		定量下限値 (ppm)	
					プリカーサーイオン Q1(m/z)	プロダクトイオン Q3(m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	真度 (%)	適否	真度 (%)	適否	真度 (%)	適否		
1	サ	SCA	スルファセタミド	+	10.7	215	156	20	10	87	○	75	○	57	×	0.001
2	サ	SID	スルフィソミジン	+	11.1	279	124	30	25	104	○	92	○	91	○	0.001
3	他	CLP	クロピドール	+	11.6	192	101	38	30	90	○	82	○	80	○	0.002
4	寄	LVS	レバミゾール	+	11.6	205	178	30	30	88	○	87	○	85	○	0.005
5	サ	SDZ	スルファジアジン	+	11.9	251	156	25	15	97	○	94	○	85	○	0.001
6	寄	ABZ-M	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	+	11.9	240	133	30	25	83	○	82	○	82	○	0.001
7	他	DVD	ジアベリジン	+	11.9	261	245	30	25	81	○	79	○	79	○	0.001
8	サ	STZ	スルファチアゾール	+	12.5	256	156	25	15	104	○	100	○	90	○	0.002
9	他	TMP	トリメプリーム	+	12.5	291	230	33	25	93	○	94	○	96	○	0.001
10	サ	SPD	スルファピリジン	+	12.8	250	156	25	15	93	○	103	○	107	○	0.001
11	寄	TBZ	チアベンダゾール	+	12.8	202	175	20	25	77	○	75	○	78	○	0.001
12	キ	MBFX	マルボフロキサシン	+	12.8	363	72	30	25	83	○	97	○	92	○	0.001
13	キ	OFLX	オフロキサシン	+	12.8	362	318	20	20	82	○	92	○	88	○	0.001
14	サ	SMR	スルファメラジン	+	13.4	265	156	28	15	100	○	104	○	92	○	0.001
15	他	OMP	オルトプリーム	+	13.4	275	259	25	25	96	○	96	○	82	○	0.001
16	キ	CPFX	シプロフロキサシン	+	13.4	332	314	40	20	70	○	104	○	130	×	0.005
17	キ	DNFX	ダノフロキサシン	+	13.6	358	314	30	16	97	○	124	×	111	○	0.005
18	キ	ERFX	エンロフロキサシン	+	13.6	360	316	30	22	87	○	89	○	101	○	0.001
19	キ	OBFX	オルビフロキサシン	+	13.7	396	295	30	22	77	○	74	○	97	○	0.002
20	サ	SIZ	スルフィソゾール	+	14.1	240	156	20	15	75	○	50	×	48	×	0.001
21	サ	SDD	スルファジミジン	+	14.2	279	186	32	18	108	○	99	○	90	○	0.001
22	サ	SMDZ	スルファメトキシジアジン	+	14.3	281	92	30	30	106	○	108	○	105	○	0.002
23	サ	SMPD	スルファメトキシピリダジン	+	14.4	281	156	25	20	106	○	103	○	101	○	0.001
24	サ	SRFX	サラフロキサシン	+	14.4	386	299	40	28	89	○	112	○	113	○	0.005
25	寄	MOR	モランテル	+	14.4	221	123	38	35	86	○	105	○	102	○	0.001
26	キ	DFLX	ジフロキサシン	+	14.5	400	299	40	28	111	○	97	○	104	○	0.001
27	サ	SMM	スルファモノキシン	+	15.3	281	156	23	18	105	○	98	○	100	○	0.001
28	サ	SCPD	スルファクロピリダジン	+	15.5	285	156	20	15	94	○	84	○	78	○	0.002
29	他	PYR	ピリメタミン	+	15.9	249	177	31	30	109	○	65	×	105	○	0.001
30	サ	SMX	スルファメトキサゾール	+	16.6	254	156	25	15	102	○	103	○	97	○	0.002
31	サ	SDOX	スルファドキシシン	+	16.6	311	156	25	20	100	○	106	○	111	○	0.001
32	サ	STXZ	スルファトロキサゾール	+	16.8	268	92	30	30	102	○	118	○	111	○	0.002
33	サ	SEPD	スルファエトキシピリダジン	+	16.8	295	156	20	20	114	○	117	○	115	○	0.001
34	サ	SIXZ	スルフィソキサゾール	+	17.3	268	92	30	30	94	○	102	○	87	○	0.005
35	キ	OXA	オキシソリン酸	+	18.3	262	244	25	20	95	○	95	○	95	○	0.001
36	サ	SBZ	スルファベンズアミド	+	19.1	277	156	20	12	109	○	104	○	104	○	0.001
37	他	ETB	エトパベイト	+	19.5	238	136	10	30	73	○	80	○	83	○	0.002
38	サ	SDM	スルファジメトキシシン	+	20.0	311	156	32	20	104	○	109	○	116	○	0.001
39	サ	SQM	スルファキノキサリン	+	20.1	301	156	20	18	104	○	110	○	108	○	0.002
40	キ	NA	ナリジクス酸	+	23.4	233	187	20	25	98	○	94	○	104	○	0.001
41	他	FMQ	フルメキン	+	24.4	262	244	20	20	87	○	79	○	87	○	0.002
42	寄	FBZ	フルベンダゾール	+	24.8	314	282	30	20	110	○	108	○	99	○	0.002
43	サ	SBM	スルファプロモメタジン	+	25.0	359	92	30	30	91	○	76	○	76	○	0.005
44	サ	SNT	スルファエトラン	-	25.0	334	136	35	30	197	×	124	×	139	×	0.01
45	キ	PA	ピロミド酸	+	26.0	289	243	40	30	73	○	73	○	79	○	0.005
46	他	NCZ	ナイカルバジン	-	28.0	301	137	20	11	103	○	87	○	85	○	0.001
47	T	TC	テトラサイクリン	+	13.6	445	410	26	20	108	○	100	○	103	○	0.001
48	T	CTC	クロルテトラサイクリン	+	15.3	479	444	28	21	108	○	161	×	109	○	0.005
49	T	OTC	オキシテトラサイクリン	+	11.3	461	426	24	18	75	○	82	○	80	○	0.002
50	M	EM	エリスロマイシン	+	20.5	734	158	32	30	84	○	44	×	46	×	0.001
51	M	SPM	スピラマイシン	+	14.3	422	101	20	16	79	○	79	○	82	○	0.003
52	M	N-SPM	ネオスピラマイシン	+	13.6	350	174	20	17	48	×	55	×	71	○	0.005
53	P	AMPC	アモキシシリン	+	3.6	366	349	15	10	8	×	7	×	6	×	0.001
54	P	ABPC	アンピシリン	+	12.0	350	106	18	14	22	×	30	×	26	×	0.002
55	P	PCG	ペンジルペニシリン	+	22.8	335	160	15	9	102	○	94	○	92	○	0.003
妥当性評価目標値 適合物質数										51		46		48		

サ:サルファ剤、キ:キノロン剤、寄:寄生虫駆除剤、他:その他合成抗菌剤  
T:テトラサイクリン系抗生物質、M:マクロライド系抗生物質、P:ペニシリン系抗生物質  
イオンモード +:ポジティブモード、-:ネガティブモード