

食品中に残留する動物用医薬品分析法の進歩

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	堀江, 正一
巻/号	51巻6号
掲載ページ	p. 363-372
発行年月	2010年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



総説

食品中に残留する動物用医薬品分析法の進歩

堀江正一*

Development of Analytical Methods for Residual Veterinary Drugs in Food

Masakazu HORIE

Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University:
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357, Japan

Key words: 動物用医薬品 veterinary drug; 飼料添加物 feed additive; 残留分析 residual analysis; 微生物学的試験法 bioassay; 理化学的試験法 chemical analysis; 畜水産食品 animal and fishery product

1. はじめに

畜水産動物の疾病の予防および治療を目的に多くの動物用医薬品や飼料添加物等の薬物が使用され、畜水産物の安定供給に大きく貢献している。しかし、一方では使用した薬物の畜水産物への残留が食品衛生上問題となっており、動物用医薬品等の適切な使用が求められている。そこでわが国では、生産段階において「薬事法」および「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（飼料安全法）」により動物用医薬品や飼料添加物の適正使用を義務づけ、畜水産物中に薬物が残留することがないように規制している。さらに、と畜処理あるいは水揚げされて畜水産物となった段階では「食品衛生法」により残留規制が行われ、畜水産物の安全性確保が図られている。

平成18年5月、残留基準値が設定されていない農薬・動物用医薬品等を含む食品の流通を禁止する「ポジティブリスト制度」が施行された。ポジティブリスト制度施行前までは基準が設定されている農薬は250品目、動物用医薬品は33品目であった。しかし、ポジティブリスト制度の施行により、国内外で使用されている農薬、動物用医薬品等799品目（平成22年1月現在では821項目）に残留基準が設定された。これに伴い、農産物、畜水産物の安全性を担保するため、迅速で精度の高い農薬、動物用医薬品等の薬物の残留分析法が必要とされている。そこで本稿では、畜水産食品中に残留する動物用医薬品、飼料添加物の分析法について、公定試験法を中心に、分析法が精力的に開発された1970年代（昭和50年代）から今日までの変遷を概説したい。なお、すでに食肉中に残留する動物用医薬品等の分析法については、いくつかの総説や解説^{1)~5)}、成書^{6)~10)}があるので参照されたい。

2. 公定試験法について

2.1 通知試験法・告示試験法

国が示す公定試験法の中には官報に「告示」として掲載される「告示試験法」と、厚生労働省主管課長等から「通知」として示される「通知試験法」がある。動物用医薬品に関する公定試験法は当初通知試験法として示され、ガットウルグアイ・ラウンドの合意を受けた平成7年からは告示試験法として示されることとなった。すなわち、平成7年12月以降、ポジティブリスト制度が導入される平成18年5月まで合計33品目については「告示」の中で残留試験法が示された。

2.2 告示試験法から通知試験法へ

平成15年5月に食品衛生法が昭和22年制定以来、実に五十数年ぶりに抜本的に改正された。本改正の大きな柱の1つとして、ポジティブリスト制度があり、施行までの猶予期間が3年とされた。平成15年5月以降、ポジティブリスト制度への移行作業が順次進められた。まず最初に行われた見直しは、平成7年以降「告示」の中で示されてきた試験法を「通知」に移す作業である。なお、通知で定められた試験法については、当該試験法と同等以上の性能を有すると認められる試験法によっても試験することが可能であるが、残留基準において「不検出」と規定する品目の試験法については、従来どおり告示により定めることとし、当該試験法のみに基づき判断することとされた。すなわち、「不検出」項目は告示試験法で示し、告示試験法に関しては、当該試験法と同等以上の性能を有すると認められる試験法の適用は認めないとされた。なお、「同等以上の性能」を判断するガイドラインが「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」として示されている。

2.3 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

乳等省令及び食品、添加物等規格基準で食品ごとに規定されていた農薬、動物用医薬品の残留基準が食品、添加物

* 大妻女子大学家政学部：〒102-8357 東京都千代田区三番町
12

等規格基準に一本化され、品目（成分）ごとの規制に見直しされた。これに伴い、試験法も「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」として一括りされた。本通知法の中に収載されている多くの試験法は、今まで告示で示されていた試験法を通知試験法としたものであり、現在（平成22年8月）まで十数回の一部改正を経て、8通りの一斉試験法、228通りの個別試験法が収載されている。なお、228通りの個別試験法の中で、約30試験法が動物用医薬品を分析対象としたものである。

3. 微生物学的試験法

わが国では抗生物質及び合成抗菌剤については長い間「無残留」規制がとられてきた。このような残留規制の経緯から、抗生物質及び合成抗菌剤を中心とした残留分析法が国から示されてきた。と同時に、多くの検査研究機関でこれら抗菌性物質の残留試験法が精力的に開発され、報告されてきた。

畜水産食品中に残留する抗菌性物質の検査法については、多くの方法が報告されてきた。最初に厚生省（現厚生労働省）が公定法として昭和52年に通知した方法が「畜水産食品中の残留物質検査法」である。第1集は、抗生物質を対象とした微生物学的試験法が、第2集には理化学的試験法を用いた合成抗菌剤の分析法が収載された。本通知法はその後、追加および改定が行われ、昭和63年までに第1集は「第1集の6」まで、第2集は「第2集の8」まで編集された。このように、残留抗菌性物質の分析法は、微生物学的試験法と理化学的試験法に大別できる。

微生物学的試験法とは、抗菌性物質が本来有する微生物の増殖を抑制する作用（抗菌作用）を利用した分析法である。「畜水産食品中の残留物質検査法第1集」では、各抗

生物質に適した試験菌を用いた個別検査法を多く採用しているが（Table 1）、1集の3では分別同定法を、1集の5では簡易検査法を採用している。なお、合成抗菌剤の多くは、残留試験法に採用されている試験菌に対して抗菌作用が弱いため、化学的試験法により分析されている。

3.1 簡易検査法

畜水産食品中に残留する抗生物質の検査に数多くの試験菌および培地が採用されている（Table 1）。しかし、個々の抗生物質に対して好ましい試験菌および培地を採用することは、数多くの抗生物質を分析するうえで試験操作が非常に煩雑となる。日常分析法として求められることは、操作が簡単で検出感度が高いことである。そこで、比較的多くの抗菌性物質に対して感受性を示す試験菌を用いた簡易検査法（第1集の5）が示された。本法は、広範囲な抗生物質に感受性を示す2菌株、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、と *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*Kocuria rhizophila* ATCC 9341) を採用している。しかし、この2菌種に対して抗菌活性の弱い抗生物質は、残留していたとしても高濃度に残留していない限り検出されないケースが少なくないことが欠点である。本検査法の概略は、試料5gをクエン酸・アセトン緩衝液20mLでホモジナイズ抽出し、その上清を試験溶液としている。平成6年には、本検査法の一部が改良され、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法及び分別推定法」として示された。本改良法は試験菌にこれまで採用されてきた上記2菌株にテトラサイクリン系抗生物質を感度良くかつ選択的に検出可能な *Bacillus mycoides* 11778 を加えた3菌株を採用している^{11)~13)}。

一方、米国やEUにおいても、食品中に残留する抗生物質の分析には微生物学的試験法が用いられている。米国では、STOP (Swab test on premises) 法、CAST (Calf Anti-

Table 1. Various methods for microbiological assay of residual antibiotics in livestock products in Japan

Test organisms	Antibiotics
○Individual methods	
<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C-953	Ampicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Lasalosid, Salinomycin
<i>Bacillus cereus mycoides</i> ATCC 11778	Oxytetracycline, Chlortetracycline
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Bacitracin
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Tylosin, Spiramycin, Kitasamycin, Oleandomycin, Erythromycin, Penicillin G
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Kanamycin, Streptomycin, Enramycin, Monensin, Quebemycin
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 19637	Flavophospholipol
<i>Pseudomonas syringae</i> X 205	Hygromycin B
<i>Corynebacterium xerosis</i> NCTC 9755	Thiopeptin, Virginiamycin
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	Colistin
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	Macarbomycin, Destomycin A
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Fradiomycin, Novobiocin
<i>Escherichia coli</i> NIHG	Chloramphenicol
<i>Piricularia oryzae</i>	Kasugamycin
○Systematic methods	
<i>Bacillus cereus mycoides</i> ATCC 11778	Tetracycline antibiotics
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Macrolide and Penicillin antibiotics
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Aminoglycoside antibiotics

Table 2. Comparison of bioassay screening test in USA, EU and Japan

No.	USA		EU		Japan	
	7-Plate bioassay		4-Plate test		3-Plate test	
	Organism	Medium	Organism	Medium	Organism	Medium
1	<i>B. c.</i> ¹⁾ ATCC 11778	Difco AM 8	<i>B. s.</i> ²⁾ BGA	pH 6.0	<i>B. s.</i> ATCC 6633	Difco AM 5
2	<i>M. l.</i> ³⁾ ATCC 9341	Difco AM 2 ⁵⁾	<i>B. s.</i> BGA	pH 8.0	<i>M. l.</i> ATCC 9341	Difco AM 5
3	<i>M. l.</i> ATCC 9341	Difco AM 26 ⁶⁾	<i>B. s.</i> BGA	pH 7.2 ⁷⁾	<i>B. c.</i> ATCC 11778	Difco AM 8
4	<i>B. s.</i> ATCC 6633	Difco AM 5	<i>M. l.</i> ATCC 9341			
5	<i>M. l.</i> ATCC 9341	Difco AM 11				
6	<i>M. l.</i> ATCC 15957	Difco AM 11				
7	<i>S. e.</i> ⁴⁾ ATCC 12228	Difco AM 11				

¹⁾ *Bacillus cereus*, ²⁾ *Bacillus subtilis*, ³⁾ *Micrococcus luteus*, ⁴⁾ *Staphylococcus epidermidis*, ⁵⁾ without penicillinase, ⁶⁾ with penicillinase, ⁷⁾ Trimethoprim

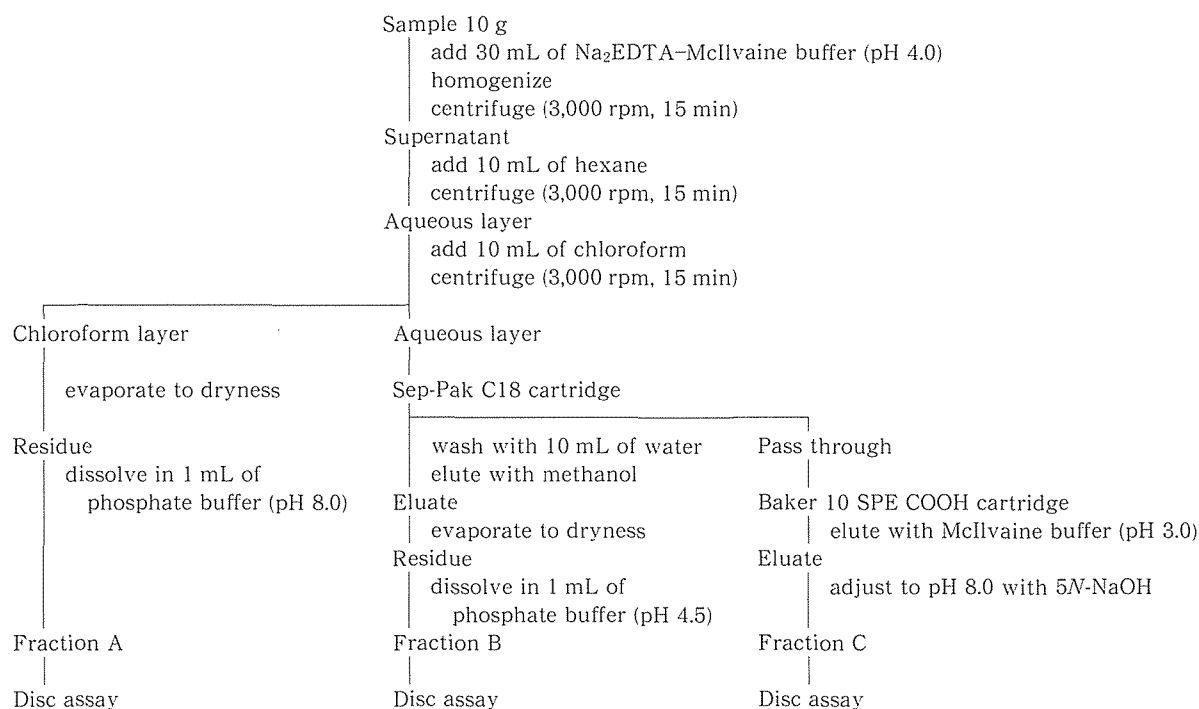


Fig. 1. Microbiological assay for antibacterials in livestock products

biotic and Sulfa Test) 法および FAST (Fast Antimicrobial Screen Test) 法と呼ばれるスクリーニング法が用いられている。STOP 法は、牛や豚の腎臓組織中に直接綿棒を一定時間挿入して組織液を綿棒に浸潤させた後にその綿棒を測定用培地上に置き、29°C、18 時間前後培養して阻止円の有無を確認する方法である。CAST 法および FAST 法は、STOP 法を改良したものであり、試験菌には STOP 法と異なり *Bacillus megaterium* ATCC 9885 が用いられている¹⁴⁾。なお現在では、7 種類の検査用平板を用いた方法により残留抗菌性物質の検査が実施されている。一方、EU では、ドイツで開発された 4-Plate 法が残留抗菌性物質のスクリーニング法として多用されている。試験菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 の代わりに *Bacillus subtilis* BGA と *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を採用している^{15), 16)}。また、サルファ剤を検出するためにトリメトプリムを添加した培地も採用されている (Table 2)。

3.2 分別同定法

簡易検査法により陽性を示した検体については、検体中の抗菌性物質の種類を確認することが重要となる。そこで、簡易検査法で陽性を示した検体については、Fig. 1 に示すような、液-液分配法と固相抽出法により、抗生物質を分別し、試験菌に対する抗菌パターン (Table 3) から、抗生物質を推定しようとする分別同定法が採用されている¹²⁾。

微生物学的試験法は、操作が簡便で一度に多くの抗菌性物質の残留の有無をチェックできるという長所を有している。しかし、検出感度の面で残留基準値レベルで検出することができない抗菌性物質も多く、かつ残留する抗菌性物質を特定できないという欠点がある。各国の食品規格を国際基準である Codex 基準に整合性を図る国際的な流れの中で、平成 7 (1995) 年に抗生物質オキシテトラサイクリンなど 6 品目 (イベルメクチン、オキシテトラサイクリン

Table 3. Classification of antibacterials in fractions by inhibition patterns of test organism

Fraction	Test organism			Determination of antibacterials
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
A	+	++	-	Macrolides
B	+	-	++	Tetracyclines
B	+	++	-	Penicillines
C	++	-	+	Aminoglycosides

ン、クロサンテル、ゼラノール、トレンボロン、フルベンダゾール) について残留基準値が設定された。このときに抗生物質オキシテトラサイクリンの試験法として、公定法として初めて HPLC を用いた理化学的検査法が示された。なお、同時に多数の検体の試験を行うなどスクリーニング試験法を併用したほうが効率的と判断された場合には、従来から抗生物質の残留分析に用いられてきた微生物学的試験法を実施することが許された。ただし、このスクリーニング試験法で陽性と判断された場合、HPLC による理化学的試験法による確認が必要とされた。

なお、ポジティブリスト制度導入により示された「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」の中には微生物学的試験法は全く採用されていない。前記したとおり、微生物学的試験法は残留する抗菌性物質を特定できないという欠点があり、このことが通知試験法として採用されなかった理由と考えられる。しかし、微生物学的試験法は試料の前処理が簡易であり、かつ多数の検体を一度に検査できる長所を有している。今後、簡易かつ効果的な前処理法等の開発や、試験菌の採用により、LC-MS 等の高価な機器設備のないところでも抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングする手法としての利用が望まれる^{17)~19)}。

4. 理化学的試験法

一般に微生物学的試験法は、試料の前処理が簡易であり、多数の検体を一度に処理できるなどの利点がある。しかし、選択性に欠け、数種類の抗菌性物質が同時に残留している場合、個々の成分を識別後、各成分を定量することは困難である。一方、分析機器を用いる理化学的分析法は、試料の前処理が煩雑であるが、残留薬物成分を特定できることから残留分析には必須な手法である。分析機器の中では、HPLC に関する技術の進歩が目ざましく、UV 検出器や蛍光検出器を用いた HPLC 法が多用されているが、最近では質量分析計 (MS) を検出器に用いた高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS(/MS)) が最も有用とされている。残留農薬の検査では、農薬が揮発性に富む化学物質であるものが多いことから、ガスクロマトグラフ法 (GC)、ガスクロマトグラフ/質量分析法 (GC-MS) が汎用されている。しかし、動物用医薬品の多くは揮発性に乏しいものが多いことから、GC、GC-MS 法はほとんど用いられていない。動物用医薬品の分析には専ら HPLC および

LC-MS(/MS) が汎用されている。

4.1 GC 法から HPLC 法へ

食品中に残留する薬剤の分析に用いられている手法は、微生物学的試験法を除き、分析機器の進歩とともに大きく変化してきたと言える。今から 30~35 年ほど前に GC が微量分析の中核を占め、現在でも揮発性の高い残留農薬の分析法として汎用されている。しかし、GC は難揮発性や熱的に不安定な化合物の分析には不向きな例が多い。1969 年 Du Pont 社の Kirkland により粒子径 30 μm のガラス粒子の表面にシリカゲルをコーティングしたペリキュラタイプ充填剤が開発され、また高圧送液ポンプの開発と相まって HPLC 法が確立された。HPLC 法が世に登場してから約 40 年が経過し、今日ではあらゆる分野で最も多用されている分析手法である。

上述したとおり今日、HPLC に関する技術の進歩が目ざましく、検出器に UV 検出器、MS を用いた HPLC 法が動物用医薬品の残留分析に多用されている。しかし、昭和 52~63 年にかけて厚生省から示され合成抗菌剤等の試験法、畜水産食品中の残留物質検査法第 2 集) の中には GC 法による試験法が多用されていた (Table 4)。当時は、パックドカラムを用いた GC 法が分離分析法の主流であった。しかし、合成抗菌剤の多くは揮発性に乏しいことから、揮発性の誘導体にしてから GC に供された。例えば、合成抗菌剤の代表であるサルファ剤であるが、ジアゾメタンを用いてメチル化して揮発性の誘導体とした後、今ではほとんど姿を消したと思われるパックドカラムを用いた GC 法により測定された²⁰⁾。しかし、誘導体化は操作が煩雑であることから、徐々に GC 法に代わり HPLC を用いた分析法が多用されるようになっていった。

その後、平成 5 (1993) 年に HPLC を用いた 19 種類の合成抗菌剤を同時に分析する試験法が通知されている。本試験法は、ポジティブリスト制度施行に伴い示された「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」の中の一斉試験法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I」の原型と言える。試験法の概略は、アセトニトリルで抽出後、アセトニトリル-ヘキサン分配により精製し、それぞれの合成抗菌剤の適正波長を (230~360 nm) 用いて測定されている²¹⁾。本法における各薬剤の定量下限は、0.02~0.1 ppm である。なお、19 種類の合成抗菌剤の疎水性が大きく異なることから、移動相の溶出条件としてグラジエント溶出法を採用している。

現在、分析法の妥当性を評価するガイドライン「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」が示されているが、当時においても残留分析法の開発に当たっては「動物用医薬品の GLP 基準及び毒性試験法等ガイドライン」が示されていた。ガイドラインの概要は、「この試験のためには相当の感度、精度および再現性を有する分析法を確立しておく。この場合における相当の感度、精度及び再現性とは、検出限界 0.05 ppm 以

Table 4. Chemical assay for residual synthetic antibacterials in livestock products in Japan

Antibacterials	Extraction and/or deproteinization	Measurement	Detection limit (ppm)
Sulfonamides	Acetonitrile	ECD-GC (5% OV-17)	0.01-0.05
Furazolidone	Ethyl acetate	ECD-GC (5% EGSS-X)	0.03
Difurazon	Ethyl acetate	TLC-densitometry (420 nm)	0.1
Niflupirinol	Acetone	HPLC-UV (360 nm)	0.2-0.4
Nifurstyrenic acid	Methanol	TLC-densitometry (400/520 nm)	0.05
Pyrimethamine	Isobutanol-benzene	ECD-GC (1.5% OV-17)	0.05
Robenidine	Ethyl acetate	ECD-GC (3% OV-17)	0.05
Dinitolumid	Acetonitrile	ECD-GC (1.5% OV-17)	0.01
Amprolium	Trichloroacetic acid	TLC-densitometry (400/460 nm)	0.02
Decoquinatone	Methanol-chloroform	Fluorometry (270/380 nm)	0.1
Clopidol	Methanol	ECD-GC (10% DC200)	0.05-0.1
Nicarbazine	Acetonitrile	HPLC-UV (340 nm)	0.03
Ethopabate	Acetonitrile	HPLC-UV (270 nm)	0.02
Carbadox	Acetonitrile	HPLC-UV (380 nm)	0.05
Olaquinox	Acetonitrile	HPLC-UV (380 nm)	0.05
Thiamphenicol	Acetone	FPD-GC (2% OV-17)	0.5
Ormetoprim	Ethyl acetate	HPLC-UV (230 nm)	0.05
Trimethoprim	Ethyl acetate	HPLC-UV (230 nm)	0.05
Morantel citrate	Dichloromethane	HPLC-UV (320 nm)	0.05
Oxolinic acid	Dichloromethane	HPLC-UV (254 nm)	0.05
Nalidixic acid	Dichloromethane	HPLC-UV (254 nm)	0.05
Piromidic acid	Methanol-chloroform	HPLC-UV (280 nm)	0.05

下, 1~2 ppm の添加回収試験における回収率 70%以上, 変動係数 (標準偏差/平均値) 10%以下のものをいう」のような内容であった。

4.2 HPLC-UV 法から LC-MS (/MS) 法へ

HPLC の発展に伴い, さまざまな原理の検出器が開発されてきた。しかし, 実用性の高いものとしては, UV, 蛍光および電気化学検出器 (ECD) などに限定されてくる。蛍光検出器や ECD は選択性が高く検出感度も優れているが, 分析対象化合物が発蛍光性あるいはフェノール性水酸基などを有する電気化学的に活性な物質に限定される。キノロン系抗菌剤は発蛍光性の物質が多いことから, 蛍光検出器を用いた分析法が有効である。しかし, 動物用医薬品の多くは発蛍光性でなく, 電気化学的にも不活性であることから, 汎用性の高い UV 検出器が残留分析に多用されている。ところが, UV 検出器は選択性および定性能力に欠ける面があり, 分析試料が夾雑成分の多い肝臓では分析困難となる場合が多い。そこで, 定性的情報として保持時間と吸収スペクトルが同時に得られるフォトダイオードアレイ検出器が UV 検出器の代わりに汎用されている²²⁾ (Fig. 2), 夾雑成分の多い試料には適用できない。また, アミドグリコシド系抗生物質のように UV 吸収や蛍光吸収のない成分をどのようにして分析可能にするかも重要な課題となる。このような場合, 検出感度および選択性の向上を目的に蛍光ラベル化等²³⁾の誘導体化法が有効である。しかし, 誘導体化は操作が煩雑であり, 日常検査法としては好ましい方法とは言えない。そこで今日では, UV 吸収や蛍光吸収のない化合物に対しては誘導体化することなく, 高感度かつ選択的に検出可能であり, さらに一度に多くの成分が検出可能である LC-MS (/MS) による分析法が

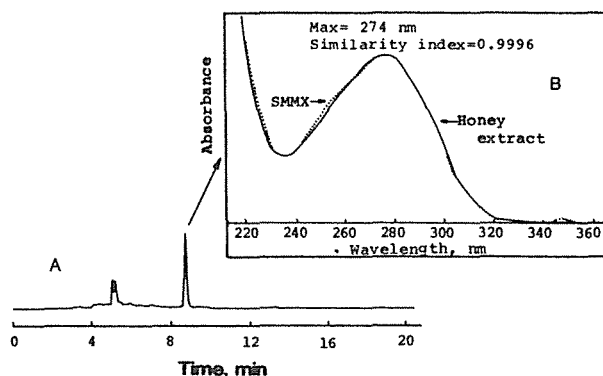


Fig. 2. (A) Chromatogram of honey in which 0.23 $\mu\text{g/g}$ sulfamonomethoxine was detected at 275 nm. (B) Normalized spectra of peak (at 8.7 min) obtained from honey extract (—) and standard sulfamonomethoxine (.....).

最も有用な方法として評価されており, 米国等でも公定法として多用されている²⁴⁾。

5. ポジティブリスト制度施行後の通知試験法

「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」の中には, 動物用医薬品, 飼料添加物を分析対象とした一斉試験法として, 「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I」, 「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 II」および「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III」と, 約 30 通りの個別試験法が記載されている。一斉試験法は, いずれも HPLC によるとしているが, 分析手法としては LC-MS (/MS) を想定したものと言える。それぞれの分析対象化合物数は, 一斉試験法 I = 104 項目 (107 成分), II = 66 項目 (68 成

分), III=29項目(33成分)となっている。

5.1 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I

前記したように, 本試験法の原型は平成5年に通知された「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法」である。試験法の概要は, 動物用医薬品を試料からアセトニトリルで抽出し, 脂質および脂溶性夾雑物は *n*-ヘキサンで除き, 水および水溶性夾雑物は無水硫酸ナトリウムで除いた後, LC-MS等で測定する方法である。

試験溶液調製法は, 試料5gを量り採り, アセトニトリル30mL, アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン20mL及び無水硫酸ナトリウム10gを加え, ホモジナイズした後, 毎分3,000回転で5分間遠心分離し, 有機層を採る。得られた有機層からアセトニトリル層を分取し, 残った *n*-ヘキサン層を遠心分離した残留物に加え, さらにアセトニトリル20mLを加えて激しく振り混ぜた後, 毎分3,000回転で5分間遠心分離する。 *n*-ヘキサン層を捨て, 得られたアセトニトリル層を合わせ, *n*-プロパノール10mLを加えて, 40℃以下で濃縮し, 溶媒を除去する。残留物にアセトニトリルおよび水(4:6)混液1.0mLを加えて溶かし, アセトニトリル飽和ヘキサン0.5mLを積層して, 毎分3,000回転で5分間遠心分離し, アセトニトリル-水層を試験溶液としている。

移動相は, グラジエント溶出法を採用しており, アセトニトリルおよび0.05%トリフルオロ酢酸溶液(1:99)から(100:0)までの濃度勾配を35分間で行っている。0.05%トリフルオロ酢酸溶液の代わりに0.1%ギ酸溶液の使用も有効である。

5.2 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 II

本試験法は, 一斉試験法の中でHPLC-UV法による測定も可能としたものである。試験法の概略は, 合成ケイ酸マグネシウム(フロリジル)カラムクロマトグラフィーおよびオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)カラムクロマトグラフィーを用いた精製により, 夾雑成分の影響を少なくしていることからUV検出器の利用を可能としている²⁵⁾。なお, 精製にフロリジルカラムクロマトグラフィーを用いていることから, 金属との相互作用の強いテトラサイクリン系抗生物質²⁶⁾やキノロン剤²⁷⁾は分析対象となっていない。

試験溶液調製法は, 試料5gを量り採り, 95%アセトニトリル水溶液30mLを加え, ホモジナイズした後, 毎分2,500回転で5分間遠心分離し, アセトニトリル層を採る。残留物に95%アセトニトリル水溶液30mLを加えて激しく振り混ぜた後, 上記と同様に遠心分離し, 得られたアセトニトリル層を合わせる。この抽出液を, フロリジルカラム, つづいてODSカートリッジで精製し, 試験溶液を得る方法である。精製効果においては優れているが, 操作が煩雑な点が難点と言える。

5.3 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 III

本試験法は, アセトニトリル-メタノール-0.2%メタリン酸(2:2:6)混液で試料から薬剤を除タンパク質と同時

に抽出し, ポリマー系逆相カートリッジOasis HLBでクリーンアップして試験溶液を調製し, LC-MS(/MS)で測定する方法である²⁸⁾。一斉試験法I, IIでは, 分析対象となっていないテトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリンおよびドキシサイクリン)が分析対象として含まれている。一斉試験法の中で分析対象化合物数は29項目(33成分)と少ないが, 分析対象となっていない成分でも分析可能なものも多いと思われる。

5.4 HPLCによる個別試験法

「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」の中は約30通りの動物用医薬品, 飼料添加物を分析対象とした個別試験法が収載されている。その多くは, UV検出器, 蛍光検出器等を用いたHPLCによる分析法を採用しているが, 確認試験として「LC-MS(/MS)により確認すること」としている試験法も多い。ここでは, 動物用医薬品として多用されているキノロン剤とLC-MSを採用しているジヒドロストレプトマイシン, ストレプトマイシン等の試験法を簡単に紹介したい。

(1) エンロフロキサシン, オキシリン酸, 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, ノルフロキサシンおよびフルメキン試験法

試験法の概略は, キノロン剤を試料からアセトニトリル-0.2%メタリン酸溶液(4:6)混液で抽出し, 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(Oasis HLB)で精製した後, 蛍光検出-HPLCで測定し, LC-MSで確認する方法である。分析対象化合物に挙げた以外のキノロン剤(エノキサシン, マルボフロキサシン, ミロキサシン, ベブフロキサシン, シプロフロキサシン等)も分析可能である。キノロン剤は, 3位のカルボキシル基と4位のカルボニル基からなるβ-ジケトン部位で金属イオンに配位することから, クリーンアップに用いるカートリッジや分離カラム充填剤中の金属不純物の影響を強く受ける²⁷⁾。本法では, 金属不純物の含有量の少ないポリマー系カートリッジを採用している。また, 分離用カラムには金属不純物の含有量の少ない高純度シリカゲルを基材とした充填剤が有効である。キノロン剤の多くは発蛍光性の強い物質である。蛍光検出はUV検出に比べ, 選択性に優れかつ高感度検出が可能であることから, 発蛍光性物質の検出には極めて有効である。一般に, オールドキノロン剤の励起極大波長は325nm付近, 蛍光極大波長は365nm付近にあるのに対し, ニューキノロン剤の励起極大波長は290nm付近, 蛍光極大波長は450~500nmの範囲である。なお, LC-MS法による確認であるが, 多くのキノロン剤は, プロトン化分子[M+H]⁺, 脱炭酸イオン[M+H-CO₂]⁺等が主な生成イオンとして観測される。

(2) アミノグリコシド系抗生物質

ストレプトマイシン(SM), ジヒドロストレプトマイシン

ン(DSM), スペクチノマイシン(SPCM)およびネオマイシン(NM)等のアミノグリコシド系抗生物質(AGs)は、UVも蛍光吸収もないことから、*o*-phthalaldehyde(OPA)等を用いて蛍光誘導体とした後、蛍光検出HPLCで測定されている。しかし、誘導体化法は、日常検査法として用いるには操作が煩雑である。そこで、上述したとおりLC-MSによる畜産食品中に残留するSM, DSM等のAGsの残留分析法が採用されている^{29)~31)}。LC-MS測定条件は、AGsはアミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であることから、イオン化モードはポジティブモードが採用されている。また、これらの化合物は、水溶性塩基性化合物であり、逆相モードではカラムに保持されない。このことからヘプタフルオロ酪酸(heptafluoro-*n*-butyric acid; HFBA)がイオンペア剤として用いられている。試料調製法は、HPLC分離モードと同様に、イオンペア剤と逆相系カートリッジを組み合わせた前処理法が採用されている。1%メタリン酸により、除タンパク質と同時に抽出し、イオンペア剤としてHFBAを加えて、ポリマー系逆相系カートリッジ Oasis HLBに保持・精製している。

5.5 告示試験法

「不検出」項目については、通知ではなく告示の中で試験法が示されており、現在(平成22年8月)21試験法が告示されている。その中で、動物用医薬品を分析対象とした試験法は下記の11試験法である。

- ①カルバドックス試験法
- ②クレンブテロール試験法
- ③クロラムフェニコール試験法
- ④クロルプロマジン試験法
- ⑤ジエチルスチルベストロール試験法
- ⑥ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾール試験法
- ⑦デキサメタゾン試験法
- ⑧ α -トレンボロン及び β -トレンボロン試験法
- ⑨ニトロフラゾン試験法
- ⑩ニトロフラントイン、フラゾリドン及びフラルタドン試験法
- ⑪マラカイトグリーン試験法

「不検出」項目の検出限界は0.05~2 ppbと極めて低く設定されており、高感度かつ選択的な試験法が要求されることから、これら11の試験法はすべてLC-MS(/MS)を採用したものである。ここでは、カルバドックス試験法、クロラムフェニコール試験法及びニトロフラゾン試験法について簡単に紹介する。

(1) カルバドックス試験法

カルバドックス(CDX)は、経口投与後比較的速やかに代謝(Fig. 3)され³²⁾、親化合物として残留するよりも代謝体キノキサリンカルボン酸(QCA)として残留することから、CDXの残留マーカーとしてQCAが用いられている。なお、CDXおよびその中間代謝物Desoxy-CDXには発がん性や変異原性があることが知られている³³⁾。試験法の

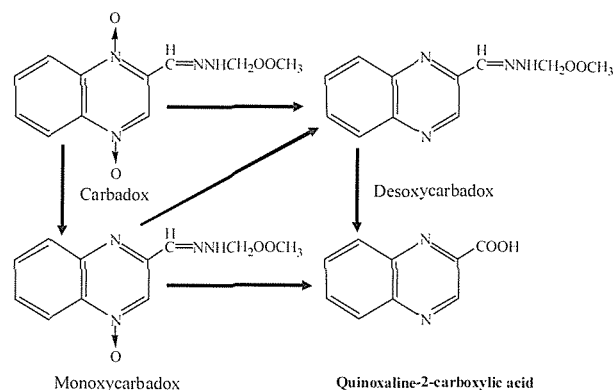


Fig. 3. Chemical structures of carbadox, monoxycarbadox, desoxycarbadox and quinoxaline-2-carbadox (QCA)

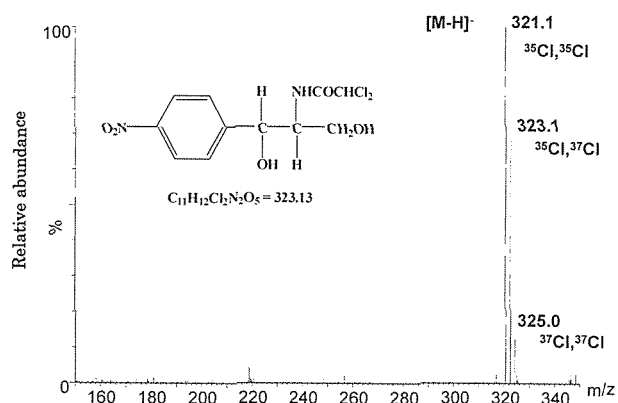


Fig. 4. Electrospray mass spectrum of chloramphenicol

概要は、試料5gをメタノール-0.3%メタリン酸溶液(3:7)混液でホモジナイズ抽出し、減圧濃縮後、ODSカートリッジで精製する。次いで、強塩基性陰イオン交換体ミニカラムで精製した後、酢酸エチルを用いた液-液分配法でさらに精製して試験溶液を調製している³⁴⁾。

(2) クロラムフェニコール試験法

ポジティブリスト制度施行後、検疫所で食品衛生法違反として最も多く検出されているのがクロラムフェニコール(CP)である。試験法の概略は、試料5gをメタノール-1%メタリン酸溶液の混液(6:4)を用いて抽出後、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLBでクリーンアップした後、LC-MS/MSにより測定する。Fig. 4にLC-MSにより得られたCPのMSスペクトルを示す。CPは分子内に2個の塩素原子があることから、塩素原子に起因する同位体イオンピーク(³⁵Cl=75.78%, ³⁷Cl=24.22%)が明瞭に観測されている³⁵⁾。

(3) ニトロフラゾン試験法

ニトロフラゾン(NFZ)は、合成抗菌剤であるニトロフラン剤に属し、畜水産動物の感染症治療および成長促進効果を目的に汎用されてきた。しかし、NFZは発がん作用の疑いがあることから畜水産動物への使用は、日本をはじめ多くの国で禁止されている。畜水産動物に投与されたニトロフラン剤は前述したカルバドックス同様に速やかに代

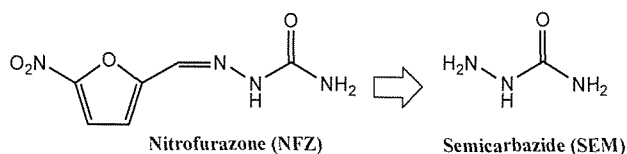
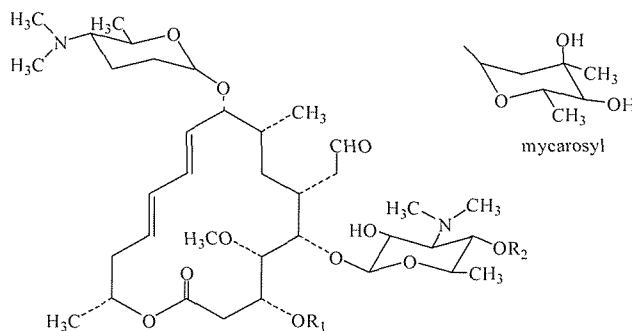


Fig. 5. Chemical structures of nitrofurazone and semicarbazide

謝されることが知られている。NFZ も速やかに代謝され、セミカルバジド (SEM, Fig. 5) になることから、NFZ の残留マーカーとして SEM が用いられてきた。しかし、SEM については、瓶詰食品から微量検出されることが報告され、その原因が金属蓋のパッキンに使用されている発泡剤アゾジカルボンアミド由来であることが明らかにされた³⁶⁾。また、一部食品については次亜塩素酸処理時に SEM が生じることも明らかにされ、SEM の検出をもって NFZ の不適正使用と断定するには問題があるとされた。このことから、わが国では平成 19 年 5 月、SEM を NFZ の残留マーカーとせず、NFZ そのものを残留マーカーとすることにした。これに伴い、親化合物 NFZ の高感度かつ選択性に優れた残留分析法が告示された。試験法の概略は、動物用医薬品を分析対象とした一斉試験法 I が原型であり、試料をアセトニトリルで抽出後、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンで脱脂する。アセトニトリル層を減圧乾固した後、この残留物に 0.1% ギ酸含有メタノール溶液 1 mL を加えて溶かし、これを試験溶液としている。

6. 多成分から構成されている薬剤の残留性評価について

マクロライド系抗生物質やアミノグリコシド系抗生物質の中には、化学構造が類似した複数の成分からできているものが多い。例えば、マクロライド系抗生物質、スピラマイシン (SPM) は Fig. 6 に示すとおり、化学構造が類似した 6 成分から構成されている。現在、SPM 標準品は、スピラマイシン I (SPM-I) と規定されているが、市販されている製剤には SPM-I 以外の成分も含まれている³⁷⁾。微生物学的試験法では、製剤中の成分組成および各成分の抗菌活性が異なっても各成分が有する抗菌力をトータルで評価できる。しかし、HPLC を用いた理化学的分析法では、各構成成分の標準品が入手できなければ各成分を正確に評価することが困難である。実際に市場に流通するスピラマイシン製剤を分析すると、主成分は SPM-I が約 70% であったと報告されている。同様に、キタサマイシンも構造の類似した複数の成分、ロイコマイシン A1, A3~A9, A13 等から構成されており、各成分の抗菌活性も大きく異なることが報告されている³⁸⁾。このような場合、各成分をどのように評価して残留量とするかが問題となるが、SPM のように主成分 SPM-I が 70% 近く占めている場合は SPM-I の検出・定量をもって残留量とすることが現実的な対応策と考えられる。なお、SPM は経口投与された場合、その一部が速やかに代謝され、ネオスピラマイシン (NSPM) になることから、残留基準値は SPM-I および



	R ₁	R ₂
Spiramycin I	-H	-mycarosyl
Spiramycin II	-COCH ₃	-mycarosyl
Spiramycin III	-COCH ₂ CH ₃	-mycarosyl
Neospiramycin I	-H	-H
Neospiramycin II	-COCH ₃	-H
Neospiramycin III	-COCH ₂ CH ₃	-H

Fig. 6. Chemical structures of spiramycins

NSPM-I の和として設定されており、残留分析においても両物質が分析対象となっている。

7. おわりに

畜水産食品の安全性を担保するため、畜水産食品中に残留する動物用医薬品の迅速で精度の高い残留分析法の開発が必要とされてきた。現在まで、UV 検出器等を用いた HPLC 法が動物用医薬品の残留分析法として汎用され、今日では HPLC の検出器にタンデム質量分析計が直結した高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) が大きな力を発揮している。一方、抗生物質等の抗菌力を有する物質の分析に汎用された微生物学的試験法は、残留する成分を特定できないという欠点から、ここ数十年間、公定試験法として採用されていない。しかし、一定レベル以上残留しているか否かのスクリーニング法として有効に活用していくことが望まれる。また、生産段階での薬剤の使用履歴の把握に努め、より効果的かつ経済的な残留分析を行うことも必要と考える。

文 献

- 1) Blasco, C., Torres, C.M., Pico, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends Anal. Chem.*, **26**, 895-913 (2007).
- 2) Bogialli, S., Corcia, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.*, **95**, 947-966 (2009).
- 3) Marazuela, M. D., Bogialli, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Anal. Chim. Acta*, **645**, 5-17 (2009).
- 4) Horie, M., Nakazawa, H. Current legal regulation of veterinary drugs and their residual analysis. *J. Food*

- Hyg. Soc. Japan, **36**, 329-343 (1995).
- 5) Hamamoto, Y., Analysis of residual veterinary drugs in food. *Bunseki*, No. 9, 539-550 (2004).
 - 6) 城戸靖雅, 中澤裕之, 堀江正一編. 動物用医薬品・飼料添加物, 中央法規, 2001. (ISBN 4-8058-2124-8)
 - 7) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編, (社)日本食品衛生協会, 2003. (ISBN 978-4-88925-006-0)
 - 8) Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., MaCheil, J.D., ed. Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. AOAC International, 1995. (ISBN 0-935584-57-9)
 - 9) Horwitz, W., ed. 18th Official Methods of Analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists, 2005. (ISBN 0-935584-80-3)
 - 10) Kobayashi, H., Nakamura, K., ed. Analytical methods for pesticides and other organic chemicals by GC/MS and LC/MS. Soft Science, 2008, p. 201-220. (ISBN 978-4-88171-119-4-C3043)
 - 11) Jinbo, K. Method of inspection for residual antibacterial agents in livestock farm products and marine products by microbiological assay. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **40**, J-195-J-202 (1999).
 - 12) Jinbo, K., Monma, C., Maruyama, T., Matsumoto, M. Simplified classification for residual antibacterials agents in meat by microbiological assay. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **32**, 86-92 (1992).
 - 13) Jinbo, K., Kataoka, J., Kokubo, Y., Konuma, H., Kondo, F. Sensitivity of microbiological simplified method to residual antibiotics in meat and marine products. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **36**, 525-531 (1995).
 - 14) USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Edition. Chapter 33. Detection of antibacterial residues in meat and poultry tissue by screen tests.
 - 15) Bogaerts, R., Wolf, F. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*, **60**, 672-673 (1980).
 - 16) Currie, D., Lynas, L., Kennedy, D. G., McCaughey, J. Evaluation of modified EC four-plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Addit. Contam.*, **15**, 651-660 (1998).
 - 17) Kusano, T., Kanda, M., Kamata, K., Miyazaki, T. Microbiological method for detection of antibiotics residues in meat using mixed-mode, reverse-phase and cation-exchange cartridge. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 191-196 (2004).
 - 18) Horie, M., Kobayashi, H., Ishii, R., Nakazawa, H. Sensitive microbiological assay of residual antibacterials in meat by microbiological method. *Bunseki Kagaku*, **56**, 1097-1103 (2007).
 - 19) Horie, M., Kobayashi, H., Ishii, R., Ibe, A., Fujita, K., Tanno, K., Nakazawa, H. Simple and rapid microbiological method for determination of residual antibacterials in meat. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **49**, 168-176 (2008)
 - 20) Nose, N., Kikuchi, Y., Yamada, F., Watanabe, A. Analytical method of sulfanilamides residues in livestock products by gas chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **20**, 115-119 (1979).
 - 21) Murayama, M., Uchiyama, S., Saito, Y. Rapid determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat by high performance liquid chromatography with stepwise gradient elution. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **32**, 165-160 (1991).
 - 22) Horie, M., Saito, K., Nose, N., Nakazawa, H. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **75**, 786-789 (1992).
 - 23) Tawa, R., Matsunaga, H., Fukimoto, T. High performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. Chromatogr. A*, **812**, 141-150 (1998).
 - 24) USDA/FSIS Analytical Chemistry Laboratory Guidebook.
 - 25) Terada, H., Nagai, Y., Yamamoto, K., Akabe, Y. Simultaneous determination on residual antibacterials in swine tissues. *Nagoyashi Eiseikenkyusho Ho*, **35**, 101-105 (1989).
 - 26) Oka, H., Uno, K., Harada, K., Suzuki, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. II. Evaluation of prepacked C18 cartridge for extraction of tetracycline. *Yakugaku Zasshi*, **103**, 531-537 (1983).
 - 27) Horie, M., Saito, K., Nose, Norihide., Nakazawa, H. Simultaneous determination of benfloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **653**, 69-76 (1994).
 - 28) Horie, M., Yoshida, T., Saito, K., Nakazawa, H. Rapid screening method for residual veterinary drugs in meat and fish by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **39**, 383-389 (1998).
 - 29) Horie, M., Yoshida, T., Kikuchi Y., Nakazawa, H. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **42**, 374-378 (2001).
 - 30) Kajita, H., Akutsu, C., Hatakeyama, E., Komukai, T. Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in milk by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **49**, 189-195 (2008).
 - 31) Ishii, R., Horie, M., Chan, W., MacNeil, J. Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, **25**, 1509-1519 (2008).
 - 32) WHO Food Additives Series No. 31. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, Nitrofurans (Nitrofurazone), 1993, p. 125-145, World Health Organization, Geneva.
 - 33) Shinozawa, M., Koeda, T., Fujisawa, H. Liver carcinogenesis by carbadox in Wistar rats. *Med. Biol.*, **127**, 283-288 (1993).
 - 34) Horie, M., Murayama, M. Determination of carbadox metabolites, quinoxaline-2-carboxylic acid and desoxycarbadox, in swine muscle and liver by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 135-140 (2004).
 - 35) Ishii, R., Horie, M., Murayama, M., Maitani, T., Analysis of chloramphenicol in honey and royal jelly by

- LC/MS/MS. J. Food Hyg. Soc. Japan, **47**, 58-63 (2006).
- 36) Pereira, A. S., Donato, J. L., De Nucci, G. Implication of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. Food Addit. Contam., **21**, 63-69 (2004).
- 37) Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Iwasaki, H., Shida, Y., Nakazawa, H., Fujita, M. Determination of spiramycin in swine, cattle and chicken muscles by high performance liquid chromatography. Bunseki Kagaku, **35**, 219-224 (1986).
- 38) Vezina, C., Bolduc, C., Kudelski, A., Audet, P. Biosynthesis of kitasamycin by leucine analog-resistant mutants of *Streptomyces kitasatoensis*. Antimicrob. Agent Chemother., **15**, 738-746 (1979).