

## [ 資 料 ]

# 兵庫県における輸入畜水産食品中の残留動物用医薬品の試験結果 (2010 年度)

後藤 操\* 松岡 智郁 武田 信幸

## Investigation on the Veterinary Drug Residues of Imported Meat and Fish in Hyogo Prefecture (FY2010)

Misao GOTOU\* , Tomofumi MATSUOKA and Nobuyuki TAKEDA

*Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Imported meat and fish were analysed for the residual veterinary drugs in Hyogo Prefecture in fiscal year 2010. The antimicrobials of 4 tetracyclines(TCs), 8 fluoroquinolones(FQs), 3 acid quinolones(AQs), 16 sulfa drugs(SDs), and 2 hormones(HRs) were determined by LC-FL methods using immobilized metal chelate affinity chromatography(IMAC). Among 30 samples analysed, one sample of the shrimp was found positive for enrofloxacin .

### はじめに

食の安全,安心に消費者の関心が高まる中,2006年よりポジティブリスト制が施行され,規制対象となる動物用医薬品等は,従来の約30物質から約230物質に増加した.兵庫県は,食品衛生監視指導計画に基づき,県内で流通する輸入畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査を継続している.2010年度は,テトラサイクリン系抗生物質(TCs),フルオロキノロン系抗菌性薬(FQs),酸性キノロン系抗菌性薬(AQs),サルファ剤(SDs)およびホルモン剤(HRs)の計33物質の残留検査を実施したので,その結果を報告する.

### 方 法

#### 1. 試料および試薬

試料は,2010年度に健康福祉事務所が収去した輸入畜

健康科学部

\* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29  
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター  
健康科学部 後藤 操

水産食品4品目(牛肉,豚肉,鶏肉,エビ)30検体で,内訳をTable1に示した.

検査を行った医薬品は,TCs4物質,FQs8物質,AQs3物質,SDs16物質およびHRs2物質の計33物質であり,各グループの医薬品名とその定量限界値をTable2に示した.なお,HRsは牛肉についてのみを検査対象とし,豚肉など,その他の食品は対象外とした.

標準品は,和光純薬工業(株),関東化学(株)および林純薬工業(株)から購入した.それぞれ10~25mgを精密に量りとり,メタノール100mLに溶解した(標準原液).

メタノールおよびアセトニトリルは和光純薬工業(株)製のHPLC用を,アセトン,酢酸エチルおよびn-ヘキサンは和光純薬工業(株)製または関東化学(株)製の残留農薬試験用を用いた.その他の試薬は特級品を用いた.

IMAC(Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography)用樹脂はChelating Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア・ジャパン社製)を用いた.

固相抽出用カートリッジは,Oasis HLB(Waters社製,3cc,60mg)をあらかじめメタノール1mL,水1mLでコンディショニングして使用した.また,HRs分析用として,Sep-Pak Vac RC Silica(Waters社製,12cc,500mg)をあらかじめ5%アセトンのn-ヘキサン溶液

Table 1 Veterinary Drug Residues of Imported Meat and Fish

| Sample         | No. of Sample | Country (No. of Sample) | No. of positive | Veterinary Drug | Residue (ppm) |
|----------------|---------------|-------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| cattle muscle  | 5             | Australia (5)           | 0               |                 |               |
| swine muscle   | 5             | USA (5)                 | 0               |                 |               |
| chicken muscle | 5             | Brazil (4)              | 0               |                 |               |
|                |               | USA (1)                 | 0               |                 |               |
| shrimp         | 15            | Viet Nam (4)            | 1 <sup>a)</sup> | enrofloxacin    | 0.02          |
|                |               | India (3)               | 0               |                 |               |
|                |               | Thailand (2)            | 0               |                 |               |
|                |               | Malaysia (2)            | 0               |                 |               |
|                |               | Indonesia (2)           | 0               |                 |               |
|                |               | Papua Niugini (1)       | 0               |                 |               |
|                |               | Myanmar (1)             | 0               |                 |               |

a) Details of the production country and the cause are being confirmed.

Table 2 The List of Surveyed Veterinary Drugs

| Drug (LOQ <sup>a)</sup> )  |
|--|
| tetracyclines<br>oxytetracycline (0.02) , tetracycline (0.02) , chlortetracycline (0.03) , doxytetracycline(0.05)  |
| fluoroquinolones<br>enrofloxacin (0.01) , ciprofloxacin (0.01) , ofloxacin (0.01) , orbifloxacin (0.01) , sarafloxacin (0.01) , difloxacin (0.01) , danofloxacin (0.01) , norfloxacin (0.01)   |
| acidic quinolones<br>oxolinic acid (0.01) , nalidixic acid (0.01) , flumequine (0.01)  |
| sulfa drugs<br>sulfacetamide (0.01) , sulfaquinoxaline (0.01) , sulfaguanidine (0.01) , sulfachlorpyridazine(0.01) , sulfadiazine(0.01) , sulfadimidine(0.01) , sulfadimethoxine (0.01) , sulfamonomethoxine (0.01) , sulfadoxine (0.01) , sulfanilamide (0.01) , sulfapyridine (0.01) , sulfamethoxypyridazine (0.01) , sulfamethoxazole (0.01) , sulfamerazine (0.01) , sulfathiazole (0.01) , sulfabezamide(0.01) |
| hormones<br>zeranol(0.002) , $\beta$ -trenbolone(0.002)  |

a) limit of quantitation (ppm)

10mL でコンディショニングしたものを使用した。  
除蛋白・抽出溶媒は、0.25%メタリン酸、メタノールおよびアセトニトリルを(6:2:2)の割合で混合して用いた<sup>1)</sup>。

リン酸緩衝液は、リン酸一ナトリウム(二水和物)15.6g

を約800mLの水に溶解し、リン酸でpH3.5に調整した後、水で1Lとした。

0.1%フルオレスカミン試薬(蛍光誘導体化試薬)は、フルオレスカミン100mgをアセトン100mLに溶解した。MEN緩衝液、鉄イオン溶液およびIMAC樹脂の調製

は、既報に従った<sup>2,3)</sup>。

## 2. 装置

蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC-FL) は(株)島津製作所製 LC-20A を、飛行時間型質量分析計付液体クロマトグラフ (LC/TOF-MS) は Agilent 社製 1200 シリーズ液体クロマトグラフおよび 6210 Time-of-Flight 質量分析計を用いた。

## 3. 測定条件

### 3.1 スクリーニング

#### 3.1.1 TCs, AQs, FQs, SDs の測定条件

装置: HPLC-FL

分析カラム: Atlantis dC18 (Waters 社製, 3  $\mu$ m, 4.6 mm i.d.  $\times$  20 mm) を用いた。

カラム温度: 40

移動相: 50mM 酢酸マグネシウムおよび 1mM EDTA2Na を含む 100mM 酢酸ナトリウム水溶液とメタノールとの (85:15) 混液を酢酸で pH6.0 に調整 (TCs, FQs, AQs 用),

アセトニトリル/メタノール (2:1) と 0.1M クエン酸との (40:60) 混液 (SDs 用)

流速: 1.0mL/min. (TCs, AQs, SDs 用), 1.0mL/min. (0min.) (2.5min.) 1.5mL/min. (3min.) (9.5min.) (FQs 用)

測定波長 (励起波長/蛍光波長): 380nm/520nm (TCs 用), 295nm/455nm (FQs 用), 320nm/365nm (AQs 用), 400nm/495nm (SDs 用)

注入量: TCs と AQs は 20  $\mu$ L, FQs と SDs は 10  $\mu$ L

#### 3.1.2 HRs の測定条件

装置: LC/TOF-MS

分析カラム: Ascentis C18 (Sigma-Aldrich 社製, 3  $\mu$ m, 2.1mm i.d.  $\times$  150mm), カラム温度: 40

移動相: ①0.1%ギ酸, ②0.1%ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント: ③20% (0min.) (15min.) 30% (0min.) (8min.) 50% (0min.) (4min.) 85% (8min.)

ポストラン (再平衡化): 5min.

流速: 0.4mL/min., 注入量: 10  $\mu$ L

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI (Positive, 3500V/Negative, 3500V)

ネブライザ圧力: 40psi, 乾燥ガス: 13L/min (350 )。

フラグメンター電圧: 150V, スキャン範囲:  $m/z$  50-1050, モニターイオン:  $m/z$  271.1692 [M+H]<sup>+</sup> (

トレンボロン),  $m/z$  21.1707 [M+H]<sup>+</sup> (ゼラノール)  
リファレンスマス:  $m/z$  121.0509 および 922.0098 (Positive),  $m/z$  119.0363 および 1033.9881 (Negative)

### 3.2 エンロフロキサシンの確認試験 (厚生労働省通知試験法: 2 法による測定)

#### 3.2.1 LC/TOF-MS

カラムおよび移動相の条件は HRs の測定条件に従った。その他の条件は下記に示した。

グラジエント: ④1% (0min.) (25min.) 25% (0min.) (5min.) 95% (10min.) ポストラン (再平衡化): 12min.

流速: 0.4mL/min., 注入量: 5  $\mu$ L

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI (Positive, 3000V)

ネブライザ圧力: 60psi, 乾燥ガス: 13L/min. (350 )

フラグメンター電圧: 100V, 200V, スキャン範囲:  $m/z$  50-950, モニターイオン:  $m/z$  360.1718 [M+H]<sup>+</sup>  
リファレンスマス:  $m/z$  121.0509 および 922.0098

#### 3.2.2 HPLC-FL

分析カラム: Wakosil- 5C18RS (和光純薬工業株製, 5  $\mu$ m, 4.6mm i.d.  $\times$  150mm)

その他の条件は、通知法の個別試験法 (以下、通知法と略記) に従った<sup>4)</sup>。

## 4. 試験溶液の調製

### 4.1 スクリーニング

#### 4.1.1 TCs, AQs, FQs, SDs 測定用

細切した試料 5g をとり、除蛋白・抽出溶媒 50mL を加えて、室温でホモジナイズした後、5A ろ紙でろ過した。ろ液 2mL をとり、MEN 緩衝液 4mL と混和し、その 3mL を HLB カートリッジに負荷し、蒸留水 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。溶出液は直接 IMAC 樹脂に負荷し、その通過液は 40 の水浴中で蒸発乾固し、リン酸緩衝液 1mL を加え溶解後、フルオレスカミン試薬 150  $\mu$ L を混和し、SDs 測定用試験溶液とした。なお、IMAC 樹脂は、蒸留水 3mL で洗浄し、さらに MEN 緩衝液を通し、100  $\mu$ L で洗浄後、次の溶出液 400  $\mu$ L を TCs, FQs および AQs の測定用試験溶液とした。

#### 4.1.2 HRs 測定用

細切した試料 10g をとり、水 10mL および酢酸エチル 30mL を加えて、室温でホモジナイズした後、15

分間振とう抽出を行った。遠心分離後、酢酸エチル層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。この抽出液を 40 の水浴中で蒸発乾固後、5%アセトンの *n*-ヘキサン溶液 5mL に溶解した。これをシリカゲルカートリッジに負荷し、同溶液 10mL で洗浄後 20%アセトンの *n*-ヘキサン溶液 10mL で溶出した。溶出液を蒸発乾固後、40%アセトニトリル水溶液 1mL に溶解したものを HRs 測定用試験溶液とした。

4.2 エンロフロキサシン確認用（厚生労働省通知試験法）通知法に従った<sup>4)</sup>。

結果および考察

1. スクリーニング試験の結果

輸入畜水産食品 4 品目 30 検体を対象としてスクリー

ニング法で検査した結果、ベトナム産（産地等を再確認中）のエビ 1 検体からエンロフロキサシンと同じ保持時間にピークが検出された。その他の検体からはいずれの医薬品も検出されなかった。

2. 確認試験の結果

スクリーニングで検出されたピークが、エンロフロキサシンであるかどうかを通知法<sup>4)</sup>に従い、LC/TOF-MS および HPLC-FL による確認試験を行った。

まず、精密質量による信頼性の高い定性分析が可能である LC/TOF-MS による確認を行った。結果を Fig.1 に示した。試験溶液から検出されたピークは、保持時間およびマススペクトルがエンロフロキサシンの標準物質と一致し、エンロフロキサシンの残留が確認できた。測定値は 0.02ppm であった。

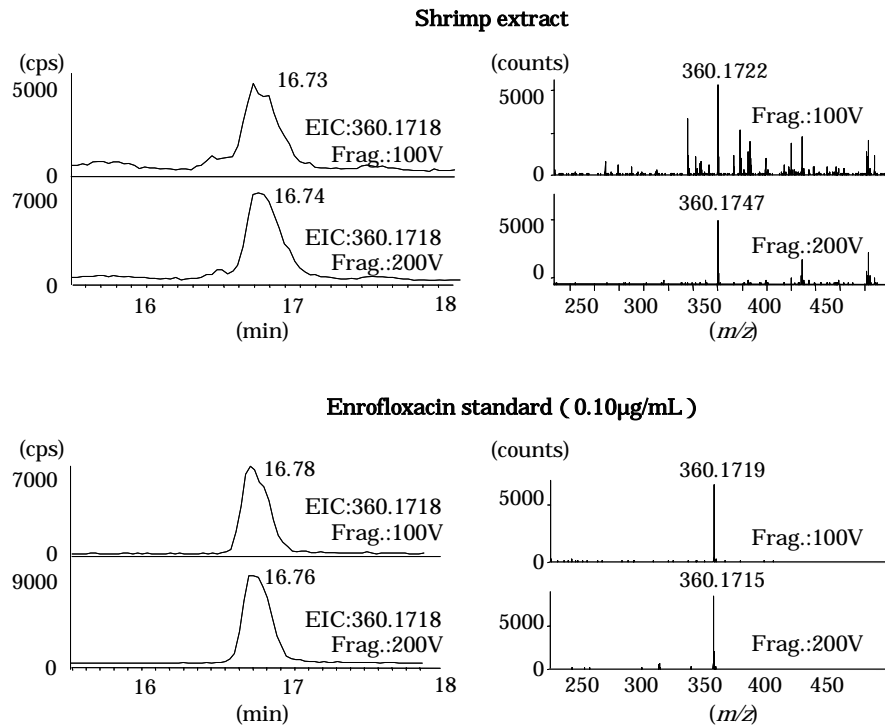


Fig.1 Extracted ion chromatograms and mass spectra of shrimp extract and enrofloxacin standard.

EIC: Extracted ion chromatogram. Frag.: Fragmentor voltage

続いて行った HPLC-FL 測定においても、試験溶液からエンロフロキサシンのピークを検出した。LC/TOF-MS 同様、その測定値は 0.02ppm であり、基準値（含有してはならない；定量限界値 0.01ppm）を超過した。なお、通知法による添加回収実験をエンロフロキサシンのみについて行い、0.02ppm での添加回収率は 103.1%（CV：13.0%，n = 5）であった。

3. スクリーニングおよび確認試験を含めた試験結果

今回の試験結果を Table 1 に示した。エンロフロキサシンがエビ 1 検体から基準値を超えて検出された。エンロフロキサシンは、牛、豚および鶏に対し感染症治療に用いられる抗菌性薬である。その ADI 値は、0.002mg/kg 体重/日と設定されていることから<sup>5)</sup>、ヒト体重 60kg で ADI 値相当のエビの量は 6.0kg/日と算出さ

## 文 献

れる。日常的に喫食する量とかけ離れているため、ただちに健康被害が発生するとは考えられない。一方、厚生労働省の2004～2009年度の輸入食品監視指導結果（厚生労働省食品安全部提供）によると、エンロフロキサシンは32件の違反事例が発生し、このうちエビからは1例の検出が認められ、中国産であった。なお、これまでベトナム産としては2005年度にナマズ（冷凍切り身）の1例のみである。

今後も県内を流通する食品の安全性確保に向けて、モニタリング調査を継続する必要があると考えられる。

## まとめ

2010年度に輸入畜水産食品における残留動物用医薬品の試験を実施した結果、ベトナム産（産地等を再確認中）のエビ1検体からエンロフロキサシンが基準値を超えて検出された。

## 謝 辞

本試験検査において、試料採取にご協力を頂きました健康福祉部生活消費局生活衛生課および健康福祉事務所の関係各位に深謝いたします。

- 1) 堀江正一, 吉田栄充, 斎藤貢一, 中澤裕之: HPLCによる食肉及び魚肉中の残留動物用医薬品のスクリーニング法. 食衛誌, **39**, 383-389 (1998)
- 2) 武田信幸: 金属キレート樹脂を用いた前処理法によるウナギ蒲焼き中エンロフロキサシンの分析法. 兵庫県立健康環境科学研究所紀要, **4**, 64-67 (2007)
- 3) Takeda, N., Matsuoka, T. and Gotou, M.: Potentiality of IMAC as Sample Pretreatment Tool in Food Analysis for Veterinary Drugs. *Chromatographia*, **72**, 127-131 (2010)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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, 別添(最終改正: 平成22年10月28日)
- 5) 内閣府食品安全委員会通知: 食品健康影響評価の結果の通知について, 平成18年5月18日, 府食第402号