報 文

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

(平成 21 年 3 月 9 日受理)

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Study of Simultaneous Determination of Residual Veterinary
Drugs Including Tetracyclines Antibiotics in
Milk and Dairy ProductsEmiko YOSHIDA*, Takahiro SHIBUYA, Chieko KUROKAWA, Yutaka INOUE,
Yoshihiko YAMAMOTO and Motonobu MIYAZAKISaitama City Institute of Health Science and Research, Division of Life Science:
7-5-12 Suzuya, Chuo-ku, Saitama-shi 338-0013, Japan; *Corresponding author

It is considered to be difficult to detect tetracycline antibiotics in all-at-once simultaneous analysis with other drugs by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, because tetracycline antibiotics chelate with bivalent metal ions such as calcium in samples. Therefore, we studied simultaneous determination of tetracycline antibiotics after removal of calcium with disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-2Na).

Tetracycline antibiotics could be assayed in all-at-once analysis by adding EDTA-2Na during the extraction procedure. It was possible to determine 65 veterinary drugs in milk, 70 in yogurt, 59 in whipped cream, 67 in cheese and 60 in ice cream. Recovery ranged from 70 to 120%, with a coefficient of variation of less than 25% and with a quantification limit of $0.01 \mu\text{g/g}$ ($S/N \geq 10$).

(Received March 9, 2009)

Key words: 乳 milk; 乳製品 dairy product; テトラサイクリン系抗生物質 tetracyclines; エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム EDTA-2Na; カルシウム calcium; 液体クロマトグラフィー / タンデム型質量分析法 LS/MS/MS

緒 言

畜水産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が用いられ、生産性向上に大きく寄与している。動物用医薬品は「動物用医薬品の使用の規制に関する省令^{*1}」により、使用できる動物の種類、用法・用量、休薬期間が規定され、食品中での残留防止が図られている。

それでもなお、近年、輸入食品や加工食品などさまざま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、残留薬剤の検出技術の向上が強く望まれている^{*2,1),2)}。

畜水産物に用いられる医薬品の 1 つに、テトラサイクリン系抗生物質が挙げられる。テトラサイクリン系抗生物質であるテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン(以下、本報においてこの 3 種類

を TCs とする)は、広抗菌域抗生物質であり、グラム陰性菌・陽性菌、マイコプラズマに有効である。そのため、牛・豚などの各種家畜および魚介類に広く用いられており、とりわけ牛の乳房炎治療や子宮内膜炎治療に幅広く使用されている^{3),4)}。一方で、治療に使用された TCs は乳中へ移行する⁵⁾ことから、市販される乳および乳製品(乳加工品)に TCs が残留することが懸念される。

TCs はカルシウムなどの 2 価の金属イオンとキレートを形成するために、カルシウムを多く含有する骨や歯牙において、骨形成や歯牙形成に有害作用(色素沈着)が認められる^{4),6)}ことから、乳製品を介して TCs を摂取した場合の影響が懸念され、乳および乳製品中の TCs を検出・定量することは重要である。

畜産食品に残留する TCs の分析は、厚生労働省より通知された「一斉試験法 I から III」^{*3}の対象成分には含まれ

* 連絡先

さいたま市健康科学研究センター 生活科学課: 〒338-0013 さいたま市中央区鈴谷 7-5-12

*¹ 昭和 55 年 9 月 30 日農林水産省令第 42 号*² 厚生労働省食安監発第 0214001 号「畜水産食品の残留物質対策について」平成 19 年 2 月 14 日*³ 厚生労働省医薬品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(2005)

ておらず、これとは別に個別試験法が定められている。近年、質量分析計付き高速液体クロマトグラフ(LC/MS)や、タンデム型質量分析計付き高速液体クロマトグラフ(LS/MS/MS)によるTCs分析法⁷⁾が検討されているが、試験法の妥当性評価ガイドライン^{*4)}に示された真度(回収率)を満たしておらず、乳および乳製品に対し、個別に分析する必要がある。その理由として、乳および乳製品中のカルシウムとTCsが形成するキレートが分析に影響を与えるため、TCsを一斉分析によって検出することが困難となることが挙げられる。

そこで、本研究では、試料の抽出方法を検討し、一斉試験法III(以下、III法とする)を基にしたLS/MS/MSによる一斉試験法にTCsを含めた分析法の検討を行った。

実験方法

1. 試料および試薬

試料には市販されている牛乳および乳製品(ヨーグルト、生クリーム、チーズ、アイスクリーム)を用いた。

標準品: 関東化学(株)製、林純薬工業(株)製、和光純薬工業(株)製、(独)肥飼料検査所製、Dr. Ehrenstorfer社製、Sigma Aldrich社製の標準品を用いた。

標準原液: 標準品88成分(β -ラクタム系・マクロライド系・その他を含む抗生物質16成分、サルファ剤・キノロン剤・その他を含む抗菌剤30成分、抗原虫剤・駆虫剤・殺虫剤を含む28成分および抗炎症剤・抗ヒスタミン剤・鎮静剤・ホルモン剤を含む14成分)をそれぞれの溶解性に応じて0.1N水酸化ナトリウム溶液、ジメチルスルホキシド溶液を用いてメタノールで適宜溶解し、50~1,000 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した。

混合標準液: 各標準原液をメタノールで1 $\mu\text{g/L}$ に調製し、検量線作成および添加回収試験に用いた。

除タンパク・抽出用溶液: 0.2%メタリン酸、アセトニトリルおよびメタノール(3:1:1, v/v)混液を用時調製し、冷却して用いた。

固相抽出用カートリッジ: Oasis HLB カートリッジ(60 mg, Waters社製)をメタノール5 mLおよび精製水5 mLでコンディショニングした後に用いた。

その他の試薬: すべて特級、HPLC用あるいはLC/MS用を用いた。

2. LC/MS/MS装置および測定条件

測定機器はApplied Biosystems社製API 4000 QTRAPおよびAgilent Technologies社製1200 seriesを用いた。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法(ESI)、分析モードはMultiple Reaction Monitoring(MRM)で測定した。測定モードは、ネガティブモードでのみ測定可能な7成分(Clorsulon, Closantel, Diclazuril, Nitroxylin, 1, 3-Bis(4-nitrophenyl)urea, 2-Acetylamin-

5-nitrothiazole, Sulfanitran)以外は、ポジティブモードを選択した。各対象成分の測定イオンはIII法^{*3)}および文献8に基づいて最適化を行い選択した(Table 1)。分析カラムはAtlantisTM d-C18 (3 μm , 2.1 $\times$ 150 mm: Waters社製)を用い、カラム温度40 $^{\circ}\text{C}$ 、試験溶液注入量は5 μL とした。移動相はA液に0.1%ギ酸水溶液、B液に0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を用いた。グラジエント条件は0分(A=95%) $\rightarrow$ 5分(A=95%) $\rightarrow$ 10分(A=40%) $\rightarrow$ 12分(A=5%) $\rightarrow$ 25分(A=5%) $\rightarrow$ 25.01分(A=95%) $\rightarrow$ 28分(A=95%)とし、流速は0.2 mL/minとした。

3. 検量線の作成

対象動物用医薬品88成分を含有していない各試料の抽出溶液(以下、マトリックス溶液とする)に混合標準液を最終濃度0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 ng/mLとなるように添加した試験溶液を調製した。この試験溶液から得られたMRMクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

4. 試験溶液の調製

試料5.0 gに、0.2%メタリン酸、アセトニトリルおよびメタノール(3:1:1, v/v)混液60 mL、ハイフロスーパーセルおよびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)2 gを加えて粉碎した後、吸引ろ過した。ろ液を抽出溶液で100 mLまで定容希釈し、そのうち10 mLを分取し、45 $^{\circ}\text{C}$ 以下で約3 mLに濃縮した。次にコンディショニングしたOasis HLB カートリッジに、濃縮した試料溶液および精製水5 mLを負荷した後、メタノール5 mLにて溶出した。溶出液を45 $^{\circ}\text{C}$ 以下で減圧乾固したのち、アセトニトリルおよび水(4:6, v/v)混液5.0 mLにて溶解し、試験溶液とした。

以上の本方法の各操作をFig. 1に示した。

結果および考察

1. 前処理法の検討

1.1 試料溶液のスケールダウン

III法では全量(100 mL)の試料溶液を20 mLに減圧濃縮し、精製カートリッジに負荷することが指示されているが、この際に夾雑成分の影響により突沸したり、精製カートリッジが目詰まりすることが、回収率低下の原因として考えられた。そこで本方法(Fig. 1)では、試料溶液100 mLのうち10 mLを分取しスケールダウンを行ったところ、濃縮時の突沸と精製カートリッジの目詰まりが解消した。その結果、濃縮(前処理)時間は一試料当たり40分から10分に短縮した。

1.2 EDTA-2Naの添加

TCsはカルシウムとキレートを形成することから、乳および乳製品を対象食品とした場合、一斉試験法IからIIIによる定量は困難である。この原因として、カルシウムとキレートを形成したTCsは1.分子量が変化する⁹⁾、2.ろ過操作時にろ紙上に残留する、3.カートリッジでの精製時に保持されずに通過する、または4.カートリッジ

^{*4)} 厚生労働省医薬品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(2007)

Table 1. Compound-specific MS/MS parameters

No.	Veterinary drug	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)
Positive mode						
1	Sulfaguanidine	3.8	215.1	156.0	50	25
2	Olaquinox	6.0	264.1	142.9	40	50
3	5-Hydroxythiabendazole	6.4	218.0	191.1	80	40
4	Lincomycin	6.6	407.2	126.2	70	45
5	Sulfacetamid	6.8	215.0	156.0	40	15
6	Albendazole metabolite	6.8	240.1	133.1	60	45
7	Levamisole	6.9	205.1	178.0	40	35
8	Diaveridine	6.9	261.1	123.0	60	35
9	Clopidol	7.0	192.0	101.0	70	40
10	Thiabendazole	7.0	202.0	175.0	70	40
11	Trimethoprim	7.2	291.1	123.0	80	35
12	Sulfadiazine	7.2	251.1	156.0	40	25
13	Ofloxacin	7.4	362.1	318.2	70	30
14	Oxytetracycline	7.4	461.1	426.2	50	30
15	Sulfathiazole	7.4	256.0	156.0	40	25
16	Ciprofloxacin	7.5	332.1	314.1	70	30
17	Ormetoprim	7.5	275.1	123.2	80	35
18	Sulfapyridine	7.6	250.1	156.0	50	25
19	Pyrantel	7.7	207.1	150.2	70	45
20	Danofloxacin	7.7	358.1	340.1	70	30
21	Tetracycline	7.8	445.2	410.4	50	30
22	Neospiramycin	7.8	350.2	174.1	50	25
23	Enrofloxacin	7.9	360.2	316.2	70	30
24	Azaperone	7.9	328.2	165.1	60	35
25	Sulfamerazine	8.0	265.1	156.0	50	25
26	Orbifloxacin	8.0	396.1	352.2	70	30
27	Thiamphenicol	8.2	356.0	307.9	40	25
28	Spiramycin	8.2	422.3	101.2	50	30
29	Xylazine	8.3	221.1	90.2	70	35
30	Clenbuterol	8.3	277.1	203.0	40	25
31	Sulfadimidine	8.6	279.1	186.0	50	25
32	Morantel	8.6	221.1	123.0	80	50
33	Sulfamethoxypyridazine	8.6	281.1	156.0	60	25
34	Tripelennamine	8.7	256.2	211.1	40	25
35	Chlortetracycline	8.9	479.1	444.1	60	30
36	Pyrimethamine	9.1	249.1	177.1	80	45
37	Halofuginone	9.2	416.0	138.3	50	30
38	Sulfamonomethoxine	9.2	281.1	156.0	60	25
39	Oxibendazole	9.3	250.1	218.1	50	30
40	Sulfachloropyridazine	9.6	285.0	156.0	40	25
41	Olleandomycin	9.7	688.4	544.3	60	25
42	Sulfadoxine	9.9	311.1	156.0	60	30
43	Sulfamethoxazole	10.0	254.1	92.2	50	40
44	Erythromycin	10.0	734.4	576.5	65	30
45	Tylosin	10.3	916.5	174.1	90	55
46	Miloxacin	10.5	264.0	246.0	45	25
47	Oxolinic acid	10.5	262.1	244.1	50	25
48	Prednisolone	10.7	361.2	343.2	45	15
49	Ethopabate	10.8	238.1	206.1	35	20
50	Sulfabenzamide	10.8	277.1	156.0	40	20
51	Sulfaquinoxaline	10.9	301.1	156.0	50	25
52	Sulfadimethoxine	10.9	311.1	156.0	60	30
53	Mebendazole	11.2	296.1	264.3	50	35
54	Benzylpenicillin	11.2	367.1	160.0	50	25
55	Methylprednisolone	11.5	375.2	357.3	45	15
56	Flubendazole	11.6	314.1	282.1	70	35
57	Dexamethasone	11.8	393.2	373.2	40	15
58	Robenidine	11.9	334.1	155.1	65	30
59	Phenoxymethyl penicillin	11.9	383.1	160.0	55	25
60	Nalidixic acid	11.9	233.1	187.2	50	40

Table 1. continued

No.	Veterinary drug	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)
Positive mode						
61	Flumequin	12.2	262.1	244.1	50	30
62	β -Trenbolone	12.7	271.2	253.0	55	30
63	α -Trenbolone	12.8	271.2	253.0	55	30
64	Brotizolam	12.9	394.9	314.0	70	35
65	Cloxacilin	13.0	468.1	160.2	60	25
66	Nafcillin	13.0	447.1	199.3	55	25
67	Piromidic acid	13.0	289.1	243.2	60	45
68	Zeranol	13.1	323.2	305.2	30	15
69	Emamectin B1a benzoate	13.4	886.4	158.2	90	50
70	Flunixin	13.7	297.1	279.2	60	35
71	Triclabendazole metabolite	13.8	329.0	167.9	90	45
72	Famphur	13.9	326.0	281.0	55	25
73	Fenobucarb	13.9	208.1	95.1	35	20
74	Rifaximin	14.0	786.4	754.4	60	35
75	Diffubenzuron	14.5	311.0	158.1	40	25
76	Triclabendazole	14.9	360.9	274.0	90	55
77	Tolfenamic acid	15.1	262.0	244.1	40	20
78	Melengestrol acetate	15.2	397.2	337.4	50	25
79	Temephos	15.7	467.0	419.1	80	30
80	Allethrin	16.0	303.2	135.2	35	20
81	Monensin	20.4	693.4	675.4	100	55
Negative mode						
82	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	10.1	186.0	139.0	-45	-20
83	Clorsulon	10.6	379.9	343.9	-45	-15
84	Sulfanitrane	12.1	334.1	135.8	-50	-40
85	Nitroxynil	13.1	288.9	126.7	-45	-30
86	1,3-Bis(4-nitrophenyl)urea	14.1	301.1	137.1	-35	-15
87	Diclazuril	14.5	405.0	334.0	-60	-25
88	Closantel	17.1	660.8	126.8	-80	-75

Fig. 1. Analytical procedure for veterinary drugs

Improved steps of method III in this report are shown in boxes. Briefly, 5 g of sample was homogenized with 2 g EDTA, Hyflo super-cel and 60 mL of acetonitrile-methanol-0.2% sodium metaphosphate solution. After dilution to 100 mL, 10 mL was taken for the following steps. For HPLC, 5 mL of acetonitrile solution was used.

に保持されたままメタノールでは溶出されないこと、の4点が考えられる。そこで、文献10に基づき溶出液にメタノールおよび70%アセトニトリルを用いて、TCsの定量が困難である原因が、溶出に用いた溶媒によるものではないことを確認した。そのうえで、カルシウム除去に重点を置いた前処理法の検討を行うこととした。まず、すでに報告されている塩析による抽出法¹¹⁾を試みたが、TCsの回収率は低く安定した結果が得られなかった。個別試験法で用いられている EDTA-2Na 含有クエン酸緩衝液を使用し、吸引ろ過後のろ紙上残さの抽出を行った。その結果、EDTA-2 Naにより OTCは28.4%から98.8%、TCは77.3%から95.0%、CTCは74.2%から98.9%と回収率の改善が見られたが、操作が煩雑になるため、EDTA-2Naをろ過前の抽出段階で添加することとした。一般的に乳中のカルシウム含有量は100 mL当たり100 mgとされており¹²⁾、EDTA-2Naと2価の金属イオンの反応モル比が1:1であることから、乳5 gに対するEDTA-2Naの添加量は1 gで十分なカルシウム除去効果があると考えられた。しかし夾雑成分の影響を考慮し、添加量1 g, 2 g, 3 gの3点で検討を行ったところ、88成分のうちサルファ剤3成分(Sulfapyridine, Sulfamethoxypyridazine, Sulfachloropyridazine)は、1 gおよび3 gでは十分な回収率が得られなかった。そこで、最終的にEDTA-2Na添加量

Table 2. Improvement of TCs recovery (%) by EDTA-2Na addition

(A)				(B)			
Sample	Recovery (%)			Sample	Recovery (%)		
Milk	Veterinary drug	EDTA		Yogurt	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	28.4	103.0		OTC	7.4	84.4
	TC	77.3	102.1		TC	14.6	98.1
(C)	Veterinary drug	EDTA		(D)	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	66.4	92.1		OTC	45.9	94.3
	TC	90.1	99.4		TC	69.5	104.6
(E)	Veterinary drug	EDTA		Cheese	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	49.2	90.4		CTC	49.7	79.7
	TC	78.1	92.6				
(E)	Veterinary drug	EDTA		Ice cream	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	49.2	90.4		OTC	49.2	90.4
	TC	78.1	92.6		TC	78.1	92.6
(E)	Veterinary drug	EDTA		Ice cream	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	49.2	90.4		CTC	69.6	81.5
	TC	78.1	92.6				
(E)	Veterinary drug	EDTA		Ice cream	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	49.2	90.4		OTC	49.2	90.4
	TC	78.1	92.6		TC	78.1	92.6
(E)	Veterinary drug	EDTA		Ice cream	Veterinary drug	EDTA	
		Not added	Added			Not added	Added
	OTC	49.2	90.4		CTC	69.6	81.5
	TC	78.1	92.6				

(A): Milk, (B): Yogurt, (C): Cream, (D): Cheese, (E): Ice cream. TCs recovery of all samples was improved by EDTA-2Na addition.

を2 gとした。

以上、EDTA-2Na添加によるTCsを除くその他の85成分に対する影響を確認したが、ピーク形状への影響はなく、回収率低下も認められなかった。

そこで、EDTA-2Na添加によるカルシウム除去に伴ったTCsの回収率の変化を調べた。牛乳をはじめとする乳製品にTCs標準液を添加し（添加量0.01 µg/g）、Fig. 1に則して抽出を行ったところ、牛乳では回収率が、OTCは28.4%から103.0%、TCは77.3%から102.1%、CTCは74.2%から89.1%へと大幅に改善した（Table 2(A)）。同様に、100 g中にカルシウムを110 mg含むとされるヨーグルト¹²⁾においても回収率は、OTCが7.4%から84.4%、TCは14.6%から98.1%、CTCは11.8%から86.4%に改善した（Table 2(B)）。また、100 g中にカルシウムを80 mg含むとされるクリームやチーズ¹²⁾においても、TCsの回収率の改善が見られた（Table 2(C), (D)）。チーズにはさまざまな種類の製品が存在し、種類によりカルシウム含有量は異なるが、いずれも同様にEDTA-2Na添加による回収率の改善が認められた（Table 3）。また、全粉乳に分類され、100 g中にカルシウムを890 mg含むとされるアイスクリーム¹²⁾においても、TCsの回収率が改善した（Table 2(E)）。

2. 検量線

LC/MS/MSによる測定は試料中の夾雑成分の影響を受け、イオン抑制や促進効果などのマトリックス効果を受け

ることが知られている^{13), 14)}。この影響を補正する方法として安定同位体を使用した内部標準添加法が利用されるが、多成分一斉分析においては定量対象物質に適した内部標準品を選定することは困難である。そこで、マトリックス効果を補正することを目的とし、各試料のマトリックス溶液を用いて、試料ごとの検量線を作成した。検量線は、0~10 ng/mLの範囲で良好な直線性 ($R^2=0.980\sim0.999$) を示した。

3. 添加回収試験

本方法（Fig. 1）を用い、対象動物用医薬品88成分を含有していないことをあらかじめ確認した乳および乳製品の各試料に対し、試料中の動物用医薬品濃度が0.01 µg/gとなるように混合標準液を添加し、対象88成分について添加回収試験を行った。その結果、回収率70%以上120%未満、変動係数(CV)25%未満が得られたのは、乳では65成分であった。また、各種乳製品において、ヨーグルトでは70成分、生クリームでは59成分、チーズでは67成分、アイスクリームでは60成分であった（Table 3）。

まとめ

前処理の際にEDTA-2Naを添加することにより、従来、乳および乳製品中では測定することが困難であったTCsが、LS/MS/MSによる多成分一斉分析法において定量可能であることが確認できた。5 gの乳および乳製品に対し、EDTA-2Na 2 gを前処理段階で添加した結果、

Table 3. Recoveries of veterinary drugs

Veterinary drug	Recovery (%)											
	Milk		Yogurt		Cream		Cheese (Hard type)		Process chese		Ice cream	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
2-Acetylamino-5-nitrothiazole	89.1	8.2	95.6	11.0	83.0	1.8	78.6	4.0	123.3	11.4	82.7	2.1
Albendazole metabolite	98.5	9.5	100.0	3.5	93.3	2.7	101.3	5.8	108.5	12.3	90.2	6.5
α -Trenbolone	88.8	0.8	92.4	6.1	87.1	8.6	88.0	8.1	99.6	5.0	81.3	4.3
Benzylpenicillin	80.2	2.6	90.9	4.1	83.0	3.7	86.5	3.9	98.7	3.3	82.4	4.7
β -Trenbolone	82.1	15.2	81.7	12.6	79.5	6.3	78.6	18.2	99.3	16.4	79.5	11.8
Chlortetracycline	89.1	6.3	86.4	7.3	92.8	7.9	79.7	6.6	91.0	2.4	81.5	4.5
Ciprofloxacin	95.5	1.5	108.5	7.1	136.6	6.8	98.1	9.9	111.3	2.3	96.2	8.0
Clenbuterol	88.9	3.5	96.7	3.1	91.5	2.9	94.3	4.7	106.7	6.0	89.2	2.9
Clopidol	97.7	5.9	94.9	4.1	82.2	4.3	96.9	6.7	107.6	6.7	92.3	4.9
Clorsulon	88.9	4.6	95.5	5.4	85.4	5.6	87.1	2.3	102.2	6.8	83.2	4.6
Cloxacilin	71.6	3.6	73.6	4.4	80.1	7.9	78.8	3.4	85.5	3.1	64.0	4.1
Danofloxacin	102.0	13.6	110.4	9.5	166.4	8.4	131.2	6.5	138.0	19.5	102.4	15.3
Dexamethasone	93.1	3.1	94.9	4.8	91.2	5.8	96.4	5.5	101.3	3.2	84.9	6.0
Diaveridine	96.4	7.3	96.6	4.8	83.5	4.2	92.5	2.9	111.7	8.5	92.7	4.5
Diclazuril	62.2	13.6	80.7	5.9	14.1	30.7	50.0	12.9	40.3	20.5	56.0	7.5
Diflubenzuron	65.8	6.5	87.2	2.1	4.8	92.6	39.2	9.1	37.1	6.1	38.0	9.7
Enrofloxacin	96.1	5.0	95.0	6.3	107.0	6.6	94.1	8.2	104.9	7.3	85.5	5.8
Erythromycin	17.0	6.4	18.6	26.6	3.7	87.0	39.2	10.6	92.3	10.5	2.6	78.2
Ethopabate	92.8	8.5	96.2	9.0	86.4	5.1	93.9	3.0	101.9	4.1	84.5	9.6
Famphur	85.8	6.2	91.9	4.3	50.3	15.9	82.4	4.4	87.0	5.0	75.3	4.0
Flubendazole	101.1	11.3	107.6	5.3	71.6	12.6	81.2	11.6	88.8	7.5	96.8	3.8
Flumequin	98.1	1.4	89.8	1.5	83.4	6.3	91.1	9.6	101.0	4.9	86.6	4.8
Flunixin	80.2	5.8	97.3	3.7	59.6	20.4	77.0	5.4	85.4	9.2	72.3	3.6
Halofuginone	93.9	9.2	96.8	4.8	90.6	6.0	98.2	5.5	100.0	7.0	86.9	5.4
Levamisole	94.3	5.3	94.3	5.2	77.6	4.1	94.1	3.9	113.7	10.2	85.9	3.5
Lincomycin	102.0	11.2	96.1	3.2	85.2	4.9	98.4	6.8	97.3	6.0	87.0	4.1
Mebendazole	88.3	3.9	92.9	2.9	66.9	10.3	80.1	7.8	86.7	5.2	80.8	2.3
Melengestrol acetate	84.3	6.7	95.1	5.8	25.9	24.6	62.0	11.0	63.8	9.8	67.1	6.8
Methylprednisolone	97.5	2.1	92.6	9.4	91.0	5.3	94.9	9.4	70.9	27.8	96.8	6.7
Miloxacin	87.9	7.3	87.3	8.9	75.4	15.1	76.6	6.3	97.0	10.8	91.9	7.7
Monensin	55.2	5.9	53.6	7.8	7.5	30.9	36.2	9.5	50.3	10.3	18.7	9.4
Morantel	99.7	6.5	109.4	16.5	101.1	6.7	102.2	12.2	113.0	5.8	95.2	12.4
Nafcillin	67.4	0.5	70.6	4.8	74.8	6.6	73.4	5.9	88.1	7.1	63.2	3.1
Nalidixic acid	95.8	4.2	98.2	2.5	87.3	10.5	95.1	6.8	100.7	2.2	87.4	2.5
Neospiramycin	85.0	0.5	88.7	2.4	98.1	6.2	91.6	3.1	91.8	4.8	79.6	3.8
Nitroxynil	—	—	—	—	64.3	13.7	—	—	—	—	72.1	12.1
Ofloxacin	93.8	7.9	98.7	8.6	114.0	3.3	85.8	7.4	88.7	42.0	111.0	9.0
Olleandomycin	102.0	2.0	100.4	4.6	93.5	7.2	97.2	6.2	120.0	6.6	85.3	7.1
Orbifloxacin	87.8	5.3	93.6	4.3	82.7	5.8	92.3	8.9	105.7	7.6	88.2	4.3
Ormetoprim	98.8	4.8	102.0	4.6	96.4	8.9	93.5	8.0	109.7	2.6	84.5	6.0
Oxibendazole	96.4	2.9	105.8	3.9	87.2	8.0	82.9	3.3	100.2	5.0	91.7	2.7
Oxolinic acid	92.0	9.5	98.9	4.0	74.0	7.9	90.7	5.4	97.0	9.2	77.9	5.5
Oxytetracycline	103.0	8.0	84.4	3.5	92.1	5.2	94.3	3.3	102.0	2.6	90.4	8.8
Phenoxymethyl penicillin	84.3	12.7	82.0	5.2	81.6	3.8	82.6	6.9	89.3	4.5	74.3	5.8
Piromidic acid	88.8	9.9	87.6	6.4	74.0	17.0	87.1	9.7	90.4	7.8	71.9	4.1
Prednisolone	91.0	1.4	103.2	2.9	85.3	6.8	91.7	3.6	105.0	4.4	77.6	7.9
Pyrantel	99.6	5.7	91.6	6.4	86.3	7.4	97.5	5.9	111.3	7.0	93.2	4.5
Pyrimethamine	97.2	1.2	105.9	4.3	82.0	4.0	95.2	8.1	117.0	6.2	92.3	2.6
Rifaximin	59.3	0.2	19.5	18.4	55.4	18.7	38.9	26.8	6.9	11.8	23.2	77.7
Robenidine	54.9	11.8	28.4	20.5	24.2	28.0	16.0	18.9	107.0	6.1	43.9	15.6
Spiramycin	74.3	4.7	90.9	4.0	89.2	6.5	89.0	6.6	97.9	1.4	78.2	2.9
Sulfabenzamide	72.7	4.3	94.3	6.5	80.1	6.4	81.0	4.1	96.4	9.8	48.6	5.0
Sulfacetamid	80.5	7.5	81.6	7.6	75.0	2.6	92.9	6.5	102.1	10.2	76.0	9.0
Sulfachloropyridazine	76.0	5.7	82.4	6.6	79.7	12.5	92.0	7.0	114.0	10.0	75.6	11.3
Sulfadiazine	81.6	9.4	79.8	13.6	73.7	4.9	90.0	6.5	107.0	5.2	77.6	11.2
Sulfadimethoxine	81.5	6.0	93.8	8.7	74.1	8.2	89.5	3.7	98.6	5.1	53.1	11.9
Sulfadimidine	74.6	2.2	77.1	11.5	80.4	8.3	94.5	2.6	98.0	3.6	68.3	9.3
Sulfadoxine	61.3	8.65	92.3	2.4	67.8	9.5	91.5	3.1	103.7	2.0	72.4	8.6

Table 3. continued

Veterinary drug	Recovery (%)											
	Milk		Yogurt		Cream		Cheese (Hard type)		Process chese		Ice cream	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Sulfamerazine	78.0	6.8	83.0	5.0	72.7	5.4	94.1	7.7	101.5	5.6	72.6	8.0
Sulfamethoxazole	79.6	0.3	110.0	6.4	74.3	6.9	92.0	11.0	107.9	11.4	80.1	4.1
Sulfamethoxypyridazine	72.9	19.6	92.2	10.3	68.6	12.5	88.7	4.4	96.8	7.2	72.1	12.8
Sulfamonomethoxine	79.9	17.1	91.6	8.4	82.6	11.7	88.7	8.2	90.2	11.2	81.4	11.0
Sulfanitran	89.8	5.0	97.5	4.0	82.6	6.6	85.6	4.9	93.4	8.3	82.9	3.2
Sulfapyridine	78.8	9.7	70.1	15.7	79.7	9.6	95.1	6.1	91.2	11.2	65.4	6.8
Sulfaquinoxaline	58.2	6.2	85.2	4.4	71.8	9.4	79.4	4.6	100.2	5.7	61.9	6.7
Sulfathiazole	74.2	6.8	71.2	11.9	76.7	7.3	90.8	8.2	97.8	6.5	66.0	9.3
Tetracycline	102.1	3.3	96.1	1.5	99.4	6.7	104.6	5.3	100.2	7.6	92.6	4.3
Thiabendazole	93.5	1.9	91.7	6.3	80.3	5.3	91.6	5.1	109.1	14.8	90.7	3.3
Thiabendazole metabolite	96.1	12.8	97.5	4.8	86.1	5.5	86.9	2.8	69.8	10.0	90.5	3.6
Thiamphenicol	94.0	3.3	102.5	6.1	90.8	6.2	95.5	3.0	135.0	14.2	88.6	3.0
Tolfenamic acid	32.8	8.2	31.7	17.4	7.8	30.1	13.9	22.1	15.4	13.8	21.0	11.8
Trimethoprim	96.1	4.8	93.4	5.9	89.5	2.6	94.4	2.8	108.0	5.8	92.9	1.9
Tripelennamine	81.9	2.8	75.9	18.5	75.0	6.3	89.9	5.6	97.5	5.3	74.4	14.4
Tylosin	75.3	0.8	90.8	4.2	67.3	9.5	82.6	1.8	97.7	6.5	73.1	3.7
Xylazine	87.1	8.2	91.8	4.5	63.6	12.4	96.2	2.9	105.0	3.3	84.6	4.7
Zeranol	89.7	7.1	93.6	6.3	67.1	24.3	82.1	4.5	79.0	3.1	74.2	7.1

Samples were spiked at 0.01 $\mu\text{g/g}$ ($n=5$).

TCs の回収率が顕著に改善した。さらに試料調製段階で、試料溶液の一部を分取しスケールダウンすることにより、減圧濃縮時の突沸およびカートリッジの目詰まりを回避し、かつ、前処理時間を短縮することもできた。その結果、動物用医薬品 88 成分の添加回収試験において、乳で 65 成分、ヨーグルトで 70 成分、アイスクリームで 60 成分、生クリームで 59 成分、チーズで 67 成分が回収率 70～120%、CV 25%未満であり、以前の報告で 50%程度⁶⁾とされていた TCs の回収率が著しく改善した。また、本方法による定量下限値は 0.01 $\mu\text{g/g}$ ($S/N \geq 10$) であった。

一方、Erythromycin, Monensin, Rifaximin, Tolfenamic Acid, Robenidine, Diclazuril, Nitroxynil, Diflubenzuron および 1,3-Bis(4-nitrophenyl)urea は、すべての乳および乳製品で十分な回収率が得られなかった。

文 献

- Miyata, M. The current situation residue of veterinary drugs in imported foods after enforcement of positive list system. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **48**, J303-J307 (2007).
- 日本食品衛生学会編集. “食品安全の事典” 東京, 朝倉書店, 2009, p. 318-343. (ISBN 978-4-254-43096-7 C 3561)
- 細貝祐太郎, 松本昌雄監修. “食品安全性セミナー 4 動物用医薬品・試料添加物” 東京, 中央法規出版株式会社, 2001, p. 34-35 (ISBN 4-8058-2124-8 C3047)
- 二宮幾代治. “動物の抗生物質” 東京, 養賢堂, 1987, p. 1-27, p. 202-217. (ISBN 4-8425-8712-1).
- Hajurka, J., Nagy, J., Popelka, P., Rozanska, H., Sokol, J., Cabadaj, R., Hura, V. Tetracycline concentrations in blood and milk of cows following intrauterine treatment of acute or subacute/chronic endometritis. *Bull.*

Vet. Inst. Pulaway, **47**, 435-447 (2003).

- 高久史磨, 矢崎義雄監修. “治療薬マニュアル 2005” 東京, 医学書院, 2008, p. 1141, p. 1240-1245. (ISBN 978-4-260-00586-9)
- 中尾朱美, 畑野和弘. LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品および合成抗菌剤の迅速一斉分析 (II). 福岡市保健環境研究所報, **30**, 167-69 (2005).
- 中尾朱美. LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品及び合成抗菌剤の迅速一斉分析. 福岡市保健環境研究所報, **29**, 80-85 (2004)
- Vartanian, V., Goolsby, B., Brodbelt, J. Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 1089-1098 (1998).
- Kai, S., Akaboshi, T., Fujimaki, T., Ito, S. A study on data analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of veterinary drugs in livestock foods. *Chromatography*, **28**, 29-35 (2007).
- Martins-Junior, H., Kussumi, T., Wang, A., Lebre, D. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**, 397-405 (2007).
- 黒川雄一. “食材図典 II” 東京, 小学館, 2001, p. 112-140. (ISBN 4-09-526083-1)
- (社)日本分析化学液体クロマトグラフィー研究懇談会編集. “液クロの巻” 茨城, 筑波出版会, 2003, p. 136-137. (ISBN 4-924753-50-5 C3043)
- Ishi, R., Horie, M., Murayama, M., Maitani, T. Analysis of tetracycline in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **47**, 277-283 (2006).