

LC-MS/MS を用いたハチミツ中の動物用医薬品一斉分析法の検討

松渕亜希子 松田恵理子

ハチミツ中の動物用医薬品 80 成分について、LC-MS/MS による一斉分析法を検討した。ハチミツを 100 倍に希釈し、精密ろ過膜を用いてろ過する方法（以下、希釈法）と、ポリマー系カラム（Oasis HLB）を用いて固相抽出する方法（以下、固相抽出法）の 2 法について比較検討した。

希釈法により添加回収試験（添加濃度：0.02 及び 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、各 $n=3$ ）を実施したところ、低濃度では 53 成分、高濃度では 66 成分で良好な結果（回収率 50～120%、相対標準偏差（以下、RSD）15%以下）が得られた。低濃度では、夾雑物の影響を受けやすく、成分によっては良好な結果が得られないものもあった。

固相抽出法により、添加回収試験（添加濃度：0.001 $\mu\text{g/g}$ 、 $n=3$ ）を行ったところ、73 成分で良好な結果であった。固相抽出法を用いることで、一律基準及び不検出レベルに耐えうる十分な感度と精度を満たすことができ、スクリーニング法としての有用性が得られた。

1. はじめに

ハチミツは、ミツバチが植物の花蜜等からつくります天然の甘味物質であり、腐そ病やバロア病等のミツバチの疾病に使われる動物用医薬品の残留が懸念されている。ハチミツの国内自給率は 10%未満であり、流通品の大部分は中国、カナダ、アルゼンチン等からの輸入品である。検疫所のモニタリング検査では、ハチミツやその加工品から、動物用医薬品の検出事例が報告されている¹⁾。

ハチミツの場合、基準値が設定されている動物用医薬品の数が少なく、それらの基準値が極めて低い。また、これまで検出事例のあったものが数種であることから、ハチミツの分析法は測定対象物質を限定的に絞り込んだものが多く²⁻⁴⁾、多種類を対象とした低濃度レベルにおける一斉分析法の検討は非常に少ない。そこで今回、LC-MS/MS を用い、簡便かつ迅速で低濃度レベルに対応できる動物用医薬品一斉分析法を検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

秋田県内で販売されているハチミツを用いた。

2.2 対象動物用医薬品

表 1 に示した、動物用医薬品 80 成分（抗生物質 14、合成抗菌剤 32、寄生虫駆除剤 13、抗炎症薬 6、ホルモン剤 5、その他医薬品等 10）を対象とした。

症薬 6、ホルモン剤 5、その他医薬品等 10）を対象とした。

2.3 試薬等

標準品は以下のメーカーの製品を用いた。

関東化学、林純薬工業、和光純薬工業、Dr.Ehrenstorfer、LKT Laboratories、MP Biochemicals、Riedel-de Haen、Sigma Aldrich、AcuuStandard、ALEXIS、川崎三鷹製薬、テバ製薬、武田シエリング・プラウ・アニマルヘルス、インターベット、コーキン化学。

溶媒は、関東化学製のアセトニトリル、メタノール、水（いずれも LC-MS 用）、和光純薬工業製のジメチルホルムアミド（特級）、ギ酸（LC-MS 用）を用いた。

標準原液及び混合標準溶液は次の方法で調製した。各標準品の溶解性に応じ、メタノール、アセトニトリル、水、ジメチルホルムアミドを用いて溶解し 500 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した。これらの各標準原液を混合し 1 $\mu\text{g/mL}$ となるようにアセトニトリルで調製し、混合標準液とした。

精製カラムは、精密ろ過膜は Whatman 社製 Anotop10（孔径 0.02 μm ）、ポリマー系（ジニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体）カラムは Waters 社製の Oasis HLB（60 mg/3cc）を用いた。

表1 対象動物用医薬品およびイオン化最適条件

成 分	RT ^{*1} (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	DP ^{*2} (V)	CE ^{*3} (V)	CXP ^{*4} (V)
Benzylpenicillin	21.6	335.2	217.0	111	21	14
Oxacillin	23.1	402.2	160.1	61	19	10
Nafcillin	24.0	415.3	199.2	81	19	12
Cloxacillin	23.0	435.9	178.0	126	35	12
Dicloxacillin	23.5	470.2	212.1	61	45	14
Cephalexin	15.3	348.1	158.1	61	15	10
Ceftiofur	20.4	524.2	241.1	76	25	16
Nalidixic acid	21.6	233.2	215.2	46	23	14
Piromidic acid	23.2	289.2	243.2	61	43	16
Oxolinic acid	20.0	262.2	216.1	61	41	14
Flumequine	21.8	262.2	202.2	61	45	12
Sarafloxacin	16.3	386.1	342.2	86	27	10
Orbifloxacin	15.9	396.1	352.2	91	27	10
Trimethoprim	14.0	291.1	230.1	86	33	16
Ormetoprim	15.0	275.1	259.1	86	37	18
Pyrimethamine	17.8	249.1	233.0	111	39	16
Kitasamycin	20.2	772.4	109.3	111	61	6
Oleandomycin	19.3	688.4	544.4	76	23	18
Mirosamicin	19.0	728.4	116.1	101	67	10
Josamycin	21.0	828.6	174.0	131	47	12
Erythromycin	20.2	734.5	158.2	96	43	10
Sulfadoxine	17.6	311.2	155.9	71	27	10
Sulfadimethoxine	19.3	311.2	156.1	76	31	10
Sulfabenzamide	18.2	277.1	156.0	71	19	10
Sulfadiazine	12.4	251.1	155.9	66	23	10
Sulfamonomethoxine	17.4	281.2	156.0	66	25	10
Sulfamethoxypyridazine	16.3	281.2	155.9	61	25	10
Sulfacetamide	9.7	215.0	156.0	61	15	10
Sulfisozole	14.8	240.0	156.0	66	21	10
Sulfathiazole	13.4	256.1	155.9	56	23	10
Sulfisoxazole	17.5	268.1	113.1	61	23	8
Sulfatroxazole	17.1	268.1	108.2	76	37	6
Sulfaquinoxaline	19.7	301.2	156.0	71	25	10
Sulfamerazine	14.6	265.1	155.9	66	25	10
Sulfadimidine	16.1	279.1	186.0	71	25	14
Sulfisomidine	12.2	279.1	124.0	56	31	8
Sulfapyridine	13.8	250.1	156.1	56	23	10
Sulfamethoxazole	17.0	254.1	156.0	61	23	10
Sulfamethizole	15.8	271.1	156.0	51	21	10
Sulfanitran	21.3	336.2	156.1	76	19	10

*1 Retention time *2 Declustering potential *3 Collision Energy *4 Collision cell exit potential

表1 対象動物用医薬品およびイオン化最適条件, 続き

成 分	RT ^{*1} (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP ^{*2} (V)	CE ^{*3} (V)	CXP ^{*4} (V)
Sulfachloropyridazine	16.9	285.1	155.9	61	23	10
Suifabromomethazine	21.4	359.0	92.1	76	49	6
Fenbendazole	24.0	300.1	268.1	81	31	18
Oxfendazole	20.6	316.1	159.0	86	47	10
Oxfendazole sulfone	20.9	332.1	300.1	91	31	20
Praziquantel	23.7	313.2	203.1	91	25	14
Morantel	15.8	221.1	123.0	66	47	8
Flubendazole	22.7	314.1	282.1	86	31	20
Oxibendazole	19.7	250.1	218.1	86	27	16
Triclabendazole	26.1	358.9	344.0	101	37	10
Triclabendazole Oxon	25.0	329.0	167.9	101	43	12
Mebendazole	22.3	296.1	264.1	81	31	18
Metronidazole	11.2	172.1	128.0	61	21	10
Dimetridazole	12.8	142.0	96.1	61	23	6
Ronidazole	11.7	201.1	140.0	51	17	10
Clopidol	14.9	192.0	101.0	86	39	6
Benzocaine	20.3	166.0	138.0	61	21	10
Azaperone	16.0	328.1	165.0	81	31	10
Brotizolam	22.9	392.9	314.0	101	33	8
Mafoprazine	17.6	402.2	193.1	86	41	14
Xylazine	15.7	221.1	90.1	66	33	6
Tolfenamic Acid	26.7	262.1	209.1	46	39	14
Meloxicam	23.7	352.0	115.0	71	27	8
Ketoprofen	23.3	255.2	209.1	76	19	14
Carprofen	24.9	274.1	228.0	61	21	16
Flunixin	25.3	297.1	264.0	86	47	18
Dexamethasone	22.7	393.2	373.2	71	13	10
Altrenogest	24.9	311.2	227.2	96	35	16
Norgestomet	24.5	373.2	313.2	86	19	8
Chlormadinone	25.1	405.2	345.1	81	19	10
Clostebol	24.8	323.2	143.0	81	35	10
Melengestrol acetate	25.3	397.2	337.3	76	21	10
Virginiamycin	22.8	526.3	337.1	101	31	10
Tiamulin Fumarate	19.8	494.4	192.1	81	29	14
Clenbuterol	15.9	277.1	203.0	61	25	14
Menbutone	23.1	259.1	159.0	51	15	10
Tripelennamine	17.1	256.2	211.2	46	21	14
Famphur	22.4	326.0	93.0	76	43	6
Prifinium	19.3	306.2	86.1	56	37	4
Ethopabate	20.8	238.1	206.0	46	17	14

*1 Retention time *2 Declustering potential *3 Collision Energy *4 Collision cell exit potential

2.4 装置

高速液体クロマトグラフは Agilent Technologies 社製 Agilent1100, 質量分析装置は AB Sciex 社製 API4000, 遠心分離機は久保田製作所製 KUBOTA 8850 を用いた。

2.5 LC および MS 条件

分析カラムは, Atlantis T3 (2.1 mm i.d × 150 mm, 粒子径 3 μm, Waters 社製) を使用した。移動相は A 液 0.05% 乙酸水溶液, B 液 0.05% 乙酸/アセトニトリルを用い, グラジエント条件を 0 min (B : 5%) → 2 min (B : 20%) → 6 min (B : 20%) → 22 min (B : 95%) → 30 min (B : 95%) → 30.1 min (B : 5%) → 40 min (B : 5%) とした。カラム温度は 40℃, 流速は 0.2 mL/min, 注入量は 10 μL とした。

イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 ポジティブモード (ESI Positive), 分析モードは Multiple Reaction Monitoring (MRM) とした。イオンスプレー電圧は 5.5 kV, イオン源温度は 500℃ とした。

MRM 条件は, 50~100 ng/mL の範囲で調製した各動物用医薬品の標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し, 自動最適化より決定した。自動最適化の結果, 感度が最も良好であったイオンを選択し, 定量用イオンに用いた (表 1)。

2.6 検量線の作成

検量線は, 絶対検量線とし, 0, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 20 ng/mL の濃度で作成し, 全ての成分について 0.01, 0.05, 0.1~20 ng/mL の範囲で良好な直線性 ($r = 0.999$ 以上) が得られた。

2.7 検出限界および定量限界

検出限界及び定量限界は, 標準液 (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ng/mL) を測定し, ピークの S/N 比 3 以上の濃度を検出限界, 10 以上の濃度を定量限界とした。表 2 に各試験法の希釈倍率に換算した試料あたりの検出限界 (ng/g), 定量限界 (ng/g) を示す。

2.8 試料液の調製

2.8.1 希釈法

試料 2.0 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に

量り採り, メタノール 18 mL を加え, 30 分間振とうした。振とう後, 遠心分離 (3000 rpm, 5min) を行い, 上清を 20 mL メスフラスコに移し, 水で定容した。定容した液 1.0 mL を 10 mL メスフラスコに分取し, 50% メタノール溶液で定容した。これを Anotop 10 でろ過し, 試験液とした。

2.8.2 固相抽出法

試料 2.0 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に量り採り, 水 20 mL を加えて, 超音波抽出を 10 分間行った。

Oasis HLB にメタノール 5 mL, 水 5 mL を順次注入しコンディショニングを行った後, 先の抽出液を全量負荷し, 流出液を捨てた。次に水 20 mL を注入してカラムを洗浄後, カラムを遠心分離 (3000 rpm, 10 min) し, 水を完全に除去した。このカラムにメタノール 5 mL を注入し, 溶出液をガラス試験管に採取した。次に窒素気流下でメタノールを除去し, 20% メタノール溶液 2 mL を正確に加えて溶解し, これを試験液とした。

3 結果および考察

3.1 希釈法

ハチミツが LC-MS/MS 測定の妨害となる脂肪を含まず⁵⁾, またタンパク質の含有量も少ないこと, さらに操作の簡便・迅速性を考慮し, 試料をメタノールで抽出後, 50% メタノール溶液で希釈した液を精密ろ過膜でろ過する方法⁶⁾を検討することにした。ろ過膜の目詰まりや夾雑物の影響を防ぐため, 希釈倍率を 100 倍とした。

ハチミツに, 試料あたり 0.02 (低濃度) および 0.1 (高濃度) μg/g となるように混合標準液を添加し, 2.8.1 により試験液を調製し, 添加回収試験を実施した。結果を表 2, 3 に示す。回収率 50~120%, RSD15% 以下を満たした成分が, 低濃度で 53 成分, 高濃度で 66 成分であり, 高濃度では概ね良好な結果が得られた。低濃度では, 高濃度に比べ RSD15% を超えてバラツキが大きい成分が多く, またキタサマイシン, ジョサマイシン等の検出できない成分もあった。

3.2 固相抽出法

先の精密ろ過膜を使用した方法では概ね良好な結果が得られたが, 希釈倍率が高く, 試料量

表2 希釈法および固相抽出法の添加回収試験結果

成 分	希 釈 法						固 相 抽 出 法			
	添 加 濃 度 (μg/g)				LOD ^{*3} (μg/g)	LOQ ^{*4} (μg/g)	添 加 濃 度 (μg/g)		LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
	0.02		0.1				0.001			
	平均 ^{*1}	RSD ^{*2}	平均	RSD			平均	RSD		
Benzylpenicillin	57.6	13.5	86.6	27.6	0.01	0.1	75.8	5.4	0.0001	0.001
Oxacillin	98.5	13.0	93.3	9.2	0.001	0.005	100.8	3.9	0.00001	0.00005
Nafcillin	95.2	5.3	96.0	4.5	0.001	0.005	99.5	2.5	0.00001	0.00005
Cloxacillin	74.2	36.9	107.2	25.2	0.001	0.005	99.1	7.7	0.00001	0.00005
Dicloxacillin	99.7	8.5	88.8	6.5	0.01	0.1	90.7	7.5	0.0001	0.001
Cephalexin	120.3	29.6	120.7	3.7	0.001	0.005	57.9	7.2	0.00001	0.00005
Ceftiofur	110.3	37.8	122.4	44.2	0.001	0.005	101.6	6.5	0.00001	0.00005
Nalidixic acid	94.5	8.3	95.5	1.8	0.01	0.1	92.8	8.3	0.0001	0.001
Piromidic acid	94.0	3.3	84.9	4.0	0.001	0.005	95.9	4.0	0.00001	0.00005
Oxolinic acid	89.0	4.5	78.7	5.0	0.01	0.1	64.6	5.9	0.0001	0.001
Flumequine	66.2	11.7	76.4	0.3	0.001	0.001	71.0	6.2	0.00001	0.00001
Sarafloxacin	119.7	6.0	91.0	16.6	0.01	0.1	99.4	11.9	0.0001	0.001
Orbifloxacin	78.2	22.3	106.0	7.5	0.005	0.01	80.4	4.6	0.00005	0.0001
Trimethoprim	140.5	9.6	136.3	6.3	0.001	0.005	101.3	2.1	0.00001	0.00005
Ormetoprim	118.7	8.2	127.7	0.9	0.001	0.001	88.2	3.9	0.00001	0.00001
Pyrimethamine	119.2	7.1	105.5	10.7	0.001	0.005	89.7	0.9	0.00001	0.00005
Kitasamycin	- ^{*5}	-	72.4	12.5	0.001	0.001	110.3	2.3	0.00001	0.00001
Oleandomycin	104.0	22.5	110.4	8.8	0.001	0.001	119.0	2.2	0.00001	0.00001
Mirosamicin	115.8	5.0	99.8	4.5	0.001	0.005	118.7	3.4	0.00001	0.00005
Josamycin	-	-	130.5	35.2	0.001	0.001	100.2	7.0	0.00001	0.00001
Erythromycin	90.8	16.3	94.4	4.5	0.001	0.001	57.4	3.7	0.00001	0.00001
Sulfadoxine	94.7	3.1	97.5	3.3	0.001	0.001	86.2	3.5	0.00001	0.00001
Sulfadimethoxine	97.7	10.9	100.4	3.7	0.001	0.001	94.6	4.0	0.00001	0.00001
Sulfabenzamide	107.3	6.9	105.6	5.9	0.001	0.001	74.4	5.4	0.00001	0.00001
Sulfadiazine	109.2	4.4	98.4	1.9	0.001	0.005	83.4	2.7	0.00001	0.00005
Sulfamonomethoxine	95.2	6.8	92.9	5.0	0.001	0.001	88.1	4.3	0.00001	0.00001
Sulfamethoxy pyridazi	114.8	8.2	98.0	3.3	0.001	0.001	87.9	4.0	0.00001	0.00001
Sulfacetamide	103.0	15.3	102.4	15.6	0.001	0.005	68.1	2.2	0.00001	0.00005
Sulfisozole	81.8	34.6	96.1	5.5	0.005	0.01	67.4	5.4	0.00005	0.0001
Sulfathiazole	88.8	20.4	104.4	7.7	0.005	0.01	76.8	1.5	0.00005	0.0001
Sulfisoxazole	111.0	21.7	100.2	3.5	0.001	0.005	87.0	5.9	0.00001	0.00005
Sulfatroxazole	102.0	2.1	100.4	2.3	0.001	0.005	88.7	1.8	0.00001	0.00005
Sulfaquinoxaline	127.3	8.7	100.2	15.3	0.001	0.001	87.0	3.3	0.00001	0.00001
Sulfamerazine	97.7	9.8	91.5	4.2	0.001	0.001	86.6	3.2	0.00001	0.00001
Sulfadimidine	105.7	7.2	81.0	3.1	0.001	0.005	94.6	4.3	0.00001	0.00005
Sulfisomidine	108.0	11.6	104.1	7.2	0.001	0.001	80.9	3.4	0.00001	0.00001
Sulfapyridine	76.3	26.2	101.1	13.8	0.001	0.001	80.4	0.3	0.00001	0.00001
Sulfamethoxazole	100.2	4.2	104.2	5.6	0.001	0.005	91.3	3.8	0.00001	0.00005
Sulfamethizole	84.0	14.3	82.1	4.5	0.001	0.001	87.9	0.4	0.00001	0.00001
Sulfantran	145.0	8.8	109.7	14.5	0.001	0.005	35.6	7.5	0.00001	0.00005

*1 n=3の平均値 (%) *2 Relative standard deviation (%) : 相対標準偏差 (%) *3 Limit of Detection (S/N≥3) : 検出限界 (各法の希釈倍率に

換算した値を掲載) *4 Limit of quantification (S/N≥10) : 定量限界 (各法の希釈倍率に換算した値を掲載) *5 - : 不検出

表2 希釈法および固相抽出法の添加回収試験結果、続き

成 分	希 釈 法						固 相 抽 出 法			
	添加濃度 (μg/g)				LOD ^{*3} (μg/g)	LOQ ^{*4} (μg/g)	添加濃度 (μg/g)		LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
	0.02		0.1				0.001			
	平均 ^{*1}	RSD ^{*2}	平均	RSD			平均	RSD		
Sulfachloropyridazine	96.0	9.4	101.6	5.7	0.001	0.005	83.3	2.6	0.00001	0.00005
Sulfabromomethazine	93.0	16.0	92.5	10.6	0.001	0.005	97.0	2.3	0.00001	0.00005
Fenbendazole	99.8	8.0	104.7	1.1	0.005	0.01	84.6	2.9	0.00005	0.0001
Oxfendazole	100.5	14.3	89.2	11.7	0.001	0.001	106.0	1.6	0.00001	0.0000
Oxfendazole sulfone	108.5	2.9	96.1	0.5	0.001	0.005	96.6	0.6	0.00001	0.00005
Praziquantel	103.2	7.6	101.8	5.3	0.001	0.005	106.3	1.1	0.00001	0.00005
Morantel	115.7	3.9	130.0	6.0	0.01	0.1	124.3	1.9	0.0001	0.001
Flubendazole	86.5	2.5	92.6	6.8	0.001	0.005	102.0	1.7	0.00001	0.00005
Oxibendazole	98.3	15.0	109.7	3.2	0.005	0.01	91.7	1.9	0.00005	0.0001
Triclabendazole	78.7	16.5	88.5	4.4	0.001	0.005	27.9	8.5	0.00001	0.00005
Triclabendazole Oxon	87.3	8.7	103.3	7.4	0.001	0.005	65.0	5.1	0.00001	0.00005
Mebendazole	102.8	6.6	95.2	5.4	0.005	0.01	101.3	2.3	0.00005	0.0001
Metronidazole	104.3	15.6	116.0	7.4	0.005	0.01	86.6	1.3	0.00005	0.0001
Dimetridazole	98.5	1.8	100.9	11.0	0.01	0.05	79.6	5.1	0.0001	0.0005
Ronidazole	109.0	14.8	103.3	3.0	0.001	0.001	83.2	4.2	0.00001	0.00001
Clopidol	43.3	40.4	95.7	9.5	0.005	0.01	74.1	4.1	0.00005	0.0001
Benzocaine	87.0	1.1	95.4	3.9	0.005	0.01	85.0	3.4	0.00005	0.0001
Azaperone	104.0	8.8	105.5	8.3	0.001	0.005	96.8	8.5	0.00001	0.00005
Brotizolam	96.8	10.1	92.2	2.5	0.001	0.001	111.3	6.4	0.00001	0.00001
Mafoprazine	121.8	6.2	126.7	4.6	0.001	0.001	90.6	2.0	0.00001	0.00001
Xylazine	112.8	10.7	116.0	6.0	0.001	0.005	133.0	3.4	0.00001	0.00005
Tolfenamic Acid	78.3	15.8	106.3	10.6	0.001	0.005	43.9	12.4	0.00001	0.00005
Meloxicam	102.8	3.6	92.9	1.8	0.001	0.001	100.4	3.5	0.00001	0.00001
Ketoprofen	68.2	23.2	96.0	3.6	0.001	0.005	102.3	2.5	0.00001	0.00005
Carprofen	^{*5}	-	64.4	28.4	0.01	0.05	72.2	4.6	0.0001	0.0005
Flunixin	93.7	6.1	92.9	4.6	0.001	0.005	103.4	4.4	0.00001	0.00005
Dexamethasone	93.8	10.8	98.1	6.3	0.001	0.005	102.0	3.6	0.00001	0.00005
Altrenogest	75.8	17.6	59.6	8.8	0.01	0.05	46.8	15.0	0.0001	0.0005
Norgestomet	95.8	9.8	93.5	21.0	0.001	0.005	92.8	1.4	0.00001	0.00005
Chlormadinone	104.3	14.0	105.0	3.8	0.005	0.01	89.6	4.2	0.00005	0.0001
Clostebol	91.8	12.5	89.1	5.5	0.005	0.01	90.8	4.2	0.00005	0.0001
Melengestrol acetate	87.8	17.2	87.6	4.1	0.005	0.01	91.4	6.2	0.00005	0.0001
Virginiamycin	173.8	22.6	105.3	7.2	0.005	0.01	114.0	3.8	0.00005	0.0001
Tiamulin Fumarate	107.5	7.9	117.3	3.2	0.001	0.001	139.7	1.1	0.00001	0.00001
Clenbuterol	101.8	6.3	117.0	7.5	0.001	0.005	109.0	1.8	0.00001	0.00005
Menbutone	90.8	16.1	92.4	8.4	0.001	0.005	91.8	5.1	0.00001	0.00005
Tripelennamine	124.0	7.3	138.3	7.2	0.001	0.005	84.1	7.6	0.00001	0.00005
Famphur	78.0	11.3	97.2	6.2	0.001	0.005	97.3	4.2	0.00001	0.00005
Prifinium	102.8	1.4	112.0	5.4	0.001	0.001	111.3	2.7	0.00001	0.00001
Ethopabate	95.3	7.9	96.4	1.9	0.001	0.005	90.7	0.8	0.00001	0.00005

*1 n=3の平均値 (%) *2 Relative standard deviation (%) : 相対標準偏差 (%) *3 Limit of Detection (S/N≥3) : 検出限界 (各法の希釈倍率に

換算した値を掲載) *4 Limit of quantification (S/N≥10) : 定量限界 (各法の希釈倍率に換算した値を掲載) *5 - : 不検出

表3 希釈法および固相抽出法の回収率評価結果

評価条件 回収率(%)	希釈法		固相抽出法
	添加濃度(μg/g)		
	0.02	0.1	0.001
No data	3	0	0
< 50	1	0	4
50 - 120 (RSD < 15%)	53	66	73
50 - 120 (RSD ≥ 15%)	16	6	0
120 <	7	8	3

表4 一律基準以下の成分とその基準値

成 分	基準値 (μg/g)	LOQ ^{*1} (μg/g) (固相抽出法)
Benzyloxyphenylpenicillin	0.004	0.001
Nafcillin	0.005	0.00005
Brotizolam	0.001	0.00001
Altrenogest	0.003	0.0005
Norgestomet	0.0001	0.00005
Chlormadinone	0.002	0.0001
Clostebol	0.0005	0.0001

*1 表2の固相抽出法のLOQを再掲

表5 不検出基準の成分と通知法の検出限界(LOD)

成 分	LOD(μg/g)	
	通知法 ^{*1}	固相抽出法 ^{*2}
Dimetridazole	0.0002	0.0001
Ronidazole	0.0002	0.00001
Dexamethasone	0.00005	0.00005
Clenbuterol	0.00005	0.00005

*1 厚生労働省通知，食安発第1129001号，別添3より

*2 表2の固相抽出法のLODを再掲

に換算した場合，低濃度レベルのピークの確認が困難な場合があるため，他の方法も検討した。ハチミツを対象とした分析法はこれまでに数多く報告されており^{2,3,7-9)}，その中からハチミツを水で希釈後，ポリマー系カラム Oasis HLB で精製する方法を採用し，一斉分析に適用できるか試みた。

ハチミツに，試料あたり 0.001 μg/g となるように混合標準液を添加し，2.8.2 より試験液を調製し，添加回収試験を行った。結果を表 2，3 に示す。測定成分の 9 割以上の 73 成分において回収率 50～120%，RSD15%以下を満たした。

測定した 80 成分のうち，一律基準以下が 7 成

分(表 4) あるが，添加回収試験結果や定量限界値を総合すると，本法は十分な定量精度を満たすと考えられる。不検出基準についても 4 成分(表 5) あるが，本法の検出限界は通知法の検出限界¹⁰⁾を下回り，定性には支障ない感度が得られた。また不含有基準の成分においても，適用可能な感度を有していると考えられる。

まとめ

ハチミツの一斉分析法として，希釈法と固相抽出法の 2 法について比較検討した。希釈法では高濃度 (0.1 μg/g) の添加濃度において，回収率 50～120%，RSD15%以下を満たした成分が 66 成分であり，概ね良好な結果が得られた。

固相抽出法では，添加濃度が 0.001 μg/g の低濃度であっても，9 割以上の成分において回収率 50～120%，RSD15%以下を満たし，一律基準および不検出レベルに耐えうる十分な感度と精度が得られた。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp>, ホーム>政策について>分野別の政策一覧>健康・医療>食品>輸入食品監視業務>違反事例
- 2) 石井里枝他：LC-MS/MS によるハチミツおよびローヤルゼリー中のクロラムフェニコールの分析，食品衛生学雑誌，**47**, 2, 2006, 58-65.
- 3) 石井里枝他：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，食品衛生学雑誌，**47**, 6, 2006, 277-283.
- 4) 井之上浩一他：LC/ESI-MS/MS による畜水産物中の大環状ラクトン寄生虫駆除剤の一斉分析法，食品衛生学雑誌，**51**, 1, 2010, 1-9.
- 5) 五訂増補日本食品標準成分表
- 6) 梶田弘子他：LC-MS/MS による畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析，食品衛生学雑誌，**49**, 6, 2008, 381-389.
- 7) 西村修一他：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**, 2007, 125-130.
- 8) 野口昭一郎他：LC-MS/MS を用いた畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析法，食品

衛生学雑誌, **49**, 3, 2008, 177-188.

- 9) 遠藤美砂子他：畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析, 宮城県保健環境センター年報, **26**, 2008.
- 10) 厚生労働省通知, 食安発第 1129001 号, 平成 17 年 11 月 29 日: 食品衛生法等の一部を改

正する法律による改正後の食品衛生法第 11 条第 3 項の施行に伴う関係法令の整備について, 別添 3, 改正後の一般規則 5, 6 及び 7 に規定する各試験法の検出限界.