

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：83907

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590128

研究課題名（和文）日本人の食卓を考慮した加工食品中の効率的かつ実用的な動物用医薬品分析法の構築

研究課題名（英文）Development of practical and efficient determination methods for residual veterinary drugs in Japanese cuisine

研究代表者

伊藤 裕子（ITO YUKO）

愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：80470178

研究成果の概要（和文）：食品中に残留する動物用医薬品の分析法は、もっぱら未加工非加熱の食品を対象としており、変性した脂質やタンパク質、調味料などから構成された加工食品を分析する方法はほとんどない。そこで、日本食を中心とした加工食品中の残留動物用医薬品について、向流クロマトグラフィーや固相抽出を前処理に LC-MS/MS を分離検出に用いた分析法を検討し、トリフェニルメタン系合成殺菌剤とその代謝物、ベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤とその代謝物、サルファ剤、キノロン剤について、効率的かつ実用的な分析法を確立した。

研究成果の概要（英文）：In many cases, it is difficult to determine the residual veterinary drugs in processed food owing to their degenerated fat and proteins, and some seasonings. Simple and practical determination methods of triphenylmethane-dyes and their major metabolites, benzimidazole anthelmintics and their major metabolites, sulfonamides and quinolone antibacterial residues in Japanese cuisine by LC/MS/MS have been successfully developed. The sample preparation system involves the use of organic solvent for extraction and dual-counter-current chromatography or solid phase extraction for clean-up.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：食品衛生、加工食品、動物用医薬品、残留分析

## 1. 研究開始当初の背景

いわゆる輸入冷凍ギョウザ事件以降、かつては、ほとんど手つかずの状態であった加工

食品中の残留薬物分析について、農薬一斉分析法の学会発表や技術セミナーなど盛んであり、数は少ないが学術論文として報告もあ

る。しかし、動物用医薬品分析法、特に多成分分析法については、未だほとんど報告がない状態が続いている。多種多様で複雑なマトリックスを含む加工食品を分析する際、未加工或いは加工度の低い食材を対象とした分析法をそのまま用いることができるとは限らず、多くの場合その効率的な除去が重要となる。マトリックス除去法は、これまで分析者或いは分析機関の経験や知識の蓄積に委ねられており、それが学術論文や学会などで公表されることは希であった。また、世界的にも各国による食文化の違いから加工食品を対象とした分析法はほとんどなく、加工度の低い乾燥果実、食用油、果汁などを対象とした農薬分析法についての報告が中心である。一方、変異原性を有するマラカイトグリーンやニトロフランなど動物用医薬品が、魚肉中から検出される報告事例はあとを絶たず、加工食品を対象とした分析法の開発が急がれている。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、食の安全、安心を確保することを目的に、多くの簡便迅速かつ実践的な食品理化学分析法を構築してきた。これらの分析法の開発には、その目的に応じて液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC/MS/MS) や液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC) を、それぞれ検出手法として選択し、また、前処理法として、固相抽出法 (SPE)、限外ろ過膜法、双方向向流クロマトグラフィー法 (dual CCC) を対象食品、目的化合物に合わせて、単独、或いは組み合わせて用いてきた。構築した分析法のほとんどは、精度や感度を重視しつつも、効率性をも追求しているため、多成分を同時にかつ迅速に分析できるものとなっている。また、これまで混合物の単離精製に用いられてきた dual CCC を食品分析に応用し、分析時間を従来法の約 1/4 に短縮した迅速分析の例や抽出液を直接分析してサンプル秤量から 1 時間以内で結果を得る超高速分析の例は、研究代表者らが最初である。しかし、これら分析法のうち一部を除いては、加工食品を対象とした場合、その精度や感度は保証されていない。研究代表者らは、日常業務として残留動物用医薬品と食品添加物の分析に一貫して取り組んでおり、高感度微量分析と夾雑物の多い加工食品分析の両方に長けている。本研究では、分析法開発の経験、ノウハウを活かしながら、加工度の高い食品、特に日本の食文化を考慮した加工食品を対象に、開発が遅れている残留動物用医薬品の分析法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究を効率的に進めるためには、加工食

品に特徴的に含まれる分析妨害物質の効果的な除去方法を構築し、それを多くのすでに確立されている検出法に組み込む、といった手法が有効であると考えた。研究代表者らのこれまでの経験において、加工食品分析の障害となるマトリックスの多くは、その加工工程において変質した脂質やタンパク質、調味料や増粘剤などである。一方、これらの効果的な除去方法として、一部の加工食品を対象としたものではあるが、dual CCC を用いる方法を残留農薬分析において確立している。また、活性アルミナ樹脂など古典的な手法が、代表的な日本食の一つである蒲焼きを分析する際の前処理法として有効であることを明らかにしている。本研究では、これらの方法について、適用食品或いは適用動物用医薬品を広げ、既存の検出法とのマッチングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) dual CCC を前処理に用いた加工食品分析法の構築

研究代表者らは、dual CCC を加工食品中の残留農薬分析に応用した際、2 種類のカラムについて検討し、それぞれ良好な結果を得ている。はじめに、用いるカラムの種類を選択した。すなわち、中空のプラスチックチューブをコイル状に巻き T アダプターにより接続したチューブカラムと、円盤型のプラスチックディスクに螺旋状に溝を掘った円盤型カラム (図 1) について、動物用医薬品分析に適したカラムを選択した。2 種類のカラムの容量と試料採取量、検出限界など考慮した結果、円盤型カラムを選択することとした。

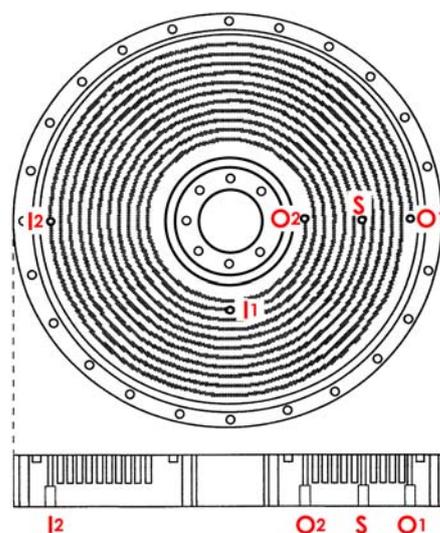


図 1. Dual CCC の円盤型カラムデザイン  
 $I_1$  ; 下相液入り口、 $I_2$  ; 上相液入り口  
 $O_1$  ; 下相液出口、 $O_2$  ; 上相液出口、  
 $S$  ; 試料注入口

#### ①加工食品中のサルファ剤分析法の検討

合成抗菌剤として多用されるサルファ剤について、多成分同時分析法を検討した。検討したサルファ剤は、スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシ、スルファジメトキシシ、スルファキノキサリン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルフィソキサゾール、スルファチアゾール、スルフィソミジン、スルフィソゾール、スルファジアジン、スルファクロピリダジン、スルファベンズアミド、スルファピリジン、スルファセタミド、スルファドキシンの17種類である。細切、秤量した試料に6種のサルファ剤安定同位元素標識体を内標準物質として加えた後、硫酸マグネシウムとアセトニトリルとともにホモジナイズ抽出した。遠心分離により得られた抽出液を約50倍に濃縮後、dual CCCにより精製し、LC/MS/MS分析した。dual CCCを残留動物用医薬品分析に応用する例は、世界的にも初めてのことであるため、まず、豚、牛、鶏の筋肉、生ウナギ、鶏卵を用いて0.01 mg/kg濃度での添加回収試験を行った。その結果、回収率は、73~117%であり、変動係数は、1.6~7.4%であった。また、鶏卵を対象として分析法の再現性を検証し、厚生労働省が提唱するガイドラインを満たす結果を得た。この方法を、肉や魚の塩焼き、照り焼き、竜田揚げやフライ、更に茶碗蒸しなど素材や加工度の異なる10種類の加工食品に適用したところ、いずれの検体からも測定を妨害する物質は検出されず、添加回収実験において満足できる結果を得た。本法は、試料を秤量し、試験溶液を得るまでに要する時間が約120分/5検体であり、迅速スクリーニング法として有用であると考えられる。

#### ②加工食品中のキノロン剤分析法の検討

畜水産現場において多用され、検疫所などで検出事例のあるキノロン剤について多成分同時分析法を検討した。検討したキノロン剤は、ノフロキサシン、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、オルビフロキサシン、ジフロキサシン、オキシロニック酸の7種である。サルファ剤の検討により得られた分析法を基に検討を行った。内標準物質には、2種のキノロン剤安定同位元素標識体を用いた。サルファ剤との物性の違いから、抽出回数や脱水剤の添加量など微細な変更を要したが、dual CCCによる前処理システムは、変更を必要としなかった。この方法を用いて、未加工、非加熱の食肉、素材や加工度の異なる加工食品8種類を対象に添加回収試験を行ったところ、良好な回収率(69~118%)を得た。

dual CCCを前処理に用いた加工食品分析法を構築することができた。この方法は、加工食品に含まれる砂糖、醤油などの水溶性夾雑

物を有機溶媒により抽出することにより、その影響を除き、抽出液に含まれる加熱変性した脂肪や油脂をdual CCCにより効率的に精製するものである。dual CCCを用いる前処理システムは、操作が簡便であるばかりでなく、多数の検体を連続して処理でき、かつ前試料の残りといったコンタミネーションが全く無いなど、残留動物用医薬品分析において優れる点が多いことが示された。これらの研究は、国内外において初めての試みであり、dual CCCの利便性が証明されたことは、インパクトが高い。今後、この前処理法を更に多くの動物用医薬品分析に適用し、迅速分析法を開発することにより、食の安全を確保する一助となると考える。

#### (2) 活性アルミナ樹脂とSPE法を前処理に用いた加工食品分析法の構築

##### ①加工食品中のトリフェニルメタン系合成殺菌剤分析法の検討

トリフェニルメタン系合成殺菌剤は、かつて水産養殖現場において多用されたが、変異原性を有する恐れのあることが判明したため、食用に供する動物への使用が禁止された。しかしながら、殺菌効果が高く、安価であり、観賞魚などへ使用されていることから、誤って食用養殖魚に使用される恐れがある。実際、外国からの輸入水産品について、検疫所での検出事例が少なくない。そこで、代表的なトリフェニルメタン系合成殺菌剤として、マラカイトグリーン、クリスタルバイオレット、ブリリアントグリーンの3種と代謝体であるロイコマラカイトグリーン、ロイコクリスタルバイオレットの2種について、加工食品を対象とした同時分析法を検討した。研究代表者らは、ウナギ蒲焼き中のマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンを分析する際、活性アルミナ樹脂とSPE法を用いた前処理が有効であることを見出しているため、これを基に検討を行った。内標準物質として、マラカイトグリーン、クリスタルバイオレット、ロイコマラカイトグリーンおよびロイコクリスタルバイオレットの安定同位元素標識体を用いた。細切、秤量した試料に内標準物質を加えた後、活性アルミナと過塩素酸-アセトニトリル、ジクロロメタンとともにホモジナイズ抽出した。遠心分離により得られた抽出液のC18カートリッジ通過液を濃縮後、移動相で溶解したものをLC/MS/MS分析した。ウナギの他、エビ、サケなどを原料とする水産加工品や調理品15種類を対象に添加回収試験を行ったところ、良好な回収率(68~122%)を得た。本法は、試料を秤量し、試験溶液を得るまでに要する時間が約80分/5検体であり、迅速スクリーニング法として有用であると考えられる。

##### ②加工食品中のベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤分析法の検討

ベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤は、抗虫スペクトルが広いことから、畜産業において汎用され、その残留が懸念されるため、多成分同時分析法を検討した。分析対象として、代表的なベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤であるチアベンダゾール、フルベンダゾール、メベンダゾール、オキシベンダゾール、トリクラベンダゾールの5種に代謝物である5-ヒドロキシチアベンダゾール、5-プロピルスルフォニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン、5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)ベンズイミダゾール-2-オンの3種を加えた8種を選択した。トリフェニルメタン系合成殺菌剤の検討により得られた分析法を基に検討を行った。内標準物質には、4種のベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤安定同位元素標識体を用いた。トリフェニルメタン系合成殺菌剤との物性の違いから、抽出液を塩基性とし、ジクロロメタンの添加を省いた。また、活性アルミナの添加は、ホモジナイズ抽出時ではなく、遠心分離後の抽出液に脱水剤とともに添加することとした。豚、牛、鶏の筋肉を用いて0.01 mg/kg濃度での添加回収試験を行った。その結果、回収率は、87~108%であり、変動係数は、0.5~3.7%であった。また、豚筋肉を対象として分析法の再現性を検証し、厚生労働省が提唱するガイドラインを満たす結果を得た。この方法を未加熱の鶏味噌漬けと生豚カツ、加熱調理済みの鶏竜田揚げと鶏照り焼き、およびソース豚カツに適用したところ、いずれの検体からも測定を妨害する物質は検出されず、添加回収実験において満足できる結果を得た。

活性アルミナ樹脂とSPE法を前処理に用いた加工食品分析法を構築することができた。この方法は、dual CCCを用いる前処理システムと異なり、検体を連続処理することはできないが、一般的な実験室にある実験器具を用いて簡易に操作できること、多種多様な加工食品に対して、個別に樹脂量を変更できるなど、実用性に富んでいる。また、汎用される方法と比較して迅速である。この前処理法についても、今後、更に多くの動物用医薬品分析に適用し、迅速分析法を開発することが可能であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① 渡邊美奈恵、上野英二、井上知美、大野春香、猪飼誉友、森下智雄、大島晴美、林留美子、LC-MS/MSによる農産物中残留農薬の一斉分析、食品衛生学雑誌、査読有、54巻、2013、14—24

- ② 大野春香、上野英二、渡邊美奈恵、大島晴美、三上栄一、GC-マイクロECDによる魚介類中のPCB、有機塩素系農薬およびクロルデン類の一斉分析、食品衛生学雑誌、査読有、52巻、2011、251—257
- ③ 上野英二、大野春香、渡邊美奈恵、大島晴美、三上栄一、根本了、松田りえ子、LC-MSによる畜水産物中のスピノサドの分析、食品衛生学雑誌、査読有、52巻、2011、330—335
- ④ 山本新也、墨岡成治、藤岡正信、三上栄一、宮本謙一、GC-MS/MSによるダイエット健康食品中の医薬品成分分析法の検討、食品衛生学雑誌、査読有、52巻、2011、363—369
- ⑤ 後藤智美、食品中の残留化学物質の理化学的分析法に関する研究—カーバメート系農薬の迅速分析法について—、薬学雑誌、査読有、130巻、2010、999—1010

[学会発表] (計8件)

- ① 後藤智美、伊藤裕子、猪飼誉友、森下智雄、ハチミツ中の植物性自然毒による食中毒原因物質の分析法、第49回全国衛生化学技術協議会年会、2012年11月22日、高松市
- ② 伊藤裕子、後藤智美、猪飼誉友、森下智雄、畜産食品中のベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤の分析、日本食品化学学会第18回総会・学術大会、2012年6月22日、函館市
- ③ 伊藤裕子、後藤智美、猪飼誉友、林留美子、岡尚男、伊東洋一郎、双方向向流クロマトグラフィーの残留動物用医薬品分析への応用(2)鶏卵及び加工食品中のサルファ剤分析、日本薬学会第132年会、2012年3月31日、札幌市
- ④ 後藤智美、伊藤裕子、猪飼誉友、林留美子、植物性自然毒による食中毒の原因物質(リコリン及びコンバラトキシン)の同時分析法、第120回日本食品衛生学会学術講演会、2011年9月30日、秋田市
- ⑤ 後藤智美、伊藤裕子、棚橋高志、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一、植物性自然毒(リコリン及びコンバラトキシン)の同時分析法の検討、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡市
- ⑥ 伊藤裕子、後藤智美、棚橋高志、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一、岡尚男、伊東洋一郎、双方向向流クロマトグラフィーの残留動物用医薬品分析への応用(1)—畜産食品中のサルファ剤分析—、日本食品衛生学会第100回学術講演会、2010年9月16日、熊本市

- ⑦ 伊藤裕子、後藤智美、渡邊美奈恵、棚橋高志、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一、安定同位元素標識体を用いたLC-MS/MSによる食品中のヒスタミン分析について、第35回日本医用マスペクトル学会年会、2010年9月9日、名古屋市
- ⑧ 伊藤裕子、後藤智美、棚橋高志、猪飼誉友、大島晴美、三上栄一、岡尚男、伊東洋一郎、Preliminary studies on the use of dual countercurrent chromatography for the rapid determination of five sulphonamide drugs in pork muscle、With International Symposium on CounterCurrent Chromatography、2010年7月28日~30日、リヨン市、フランス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 裕子 (YUKO ITO)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：80470178

### (2) 研究分担者

後藤 智美 (TOMOMI GOTO)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：10450868

(2010~2012年度)

三上 栄一 (EIICHI MIKAMI)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：80450865

(2010~2012年度)

猪飼 誉友 (YOSHITOMO IKAI)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・室長

研究者番号：70450872

(2011~2012年度)

林 留美子 (RUMIKO HAYASHI)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・部長

研究者番号：30450860

(2011年度)

棚橋 高志 (TAKASHI TANAHASHI)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：70525766

(2010年度)

大島 晴美 (HARUMI OSHIMA)

愛知県衛生研究所・衛生化学部・室長

研究者番号：60450863

(2010年度)