

はちみつ中に残留する抗生物質の一斉分析法に関する検討

食品薬品部

小篠 智江 渡辺 真美子¹ 徳田 侑子²

齋藤 仁美 菅谷 京子 市本 範子

(¹現県東健康福祉センター) (²前県南健康福祉センター)

要旨

はちみつ中に残留する抗生物質として、養蜂場で腐蝕病の予防を目的として投与される抗生物質が挙げられる。

国内において、みつばちに投与することを許可されている抗生物質に、マクロライド系抗生物質のタイロシン及びミロサマイシンの2種類があるが、当センターでは従来、この2つの抗生物質を同定・定量できる体制は構築されていなかった。

一方、テトラサイクリン系抗生物質については、過去に検出事例に遭遇した際に、標準作業手順書を作成していたが、当時、行政検査として早急な結果報告を最優先とし、既に運用されていた、鮎・にじます・鶏肉を対象とした検査方法を一部改変し適用したため、試験溶液の調製に時間を要していた。

そこで、今回、LC-MS/MSを用いて、この2系統の抗生物質を同時に、しかも精度よく定性・定量することが可能で、なおかつ、総所要時間を短縮できる検査方法を確立し、妥当性評価を行った後に行政検査に導入した。

キーワード：はちみつ、抗生物質、マクロライド、テトラサイクリン、LC-MS/MS

1 はじめに

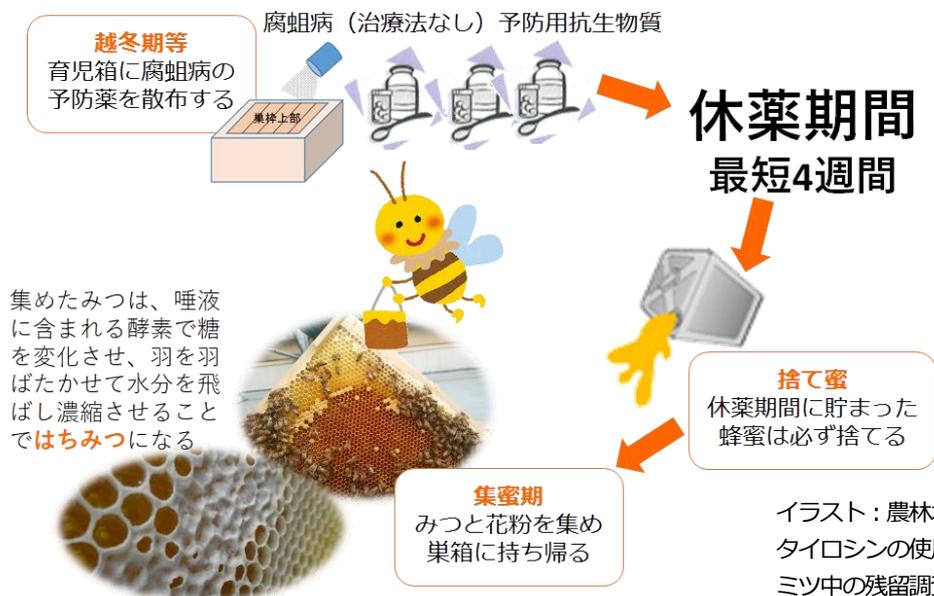
家畜伝染病予防法上に定義されている疾病は28あり、うち、蜜蜂の疾病では腐蝕病がある。腐蝕病の原因は細菌感染であり、蜜蜂の感染症では最も重く、治療法がない。採蜜シーズン前の薬剤投与が有効な手段とされている(図1)。

使用することを許可されている薬剤には、マクロライド系抗生物質(MLs)のタイロシン及びミロサマイシンの2種類がある。ミロサマイシン製剤は、原薬の供給停止により製造中止となっており、タイロシン製剤が、現在製造・販売されている腐蝕病用の唯一の予防薬である。

タイロシン製剤の製品であるタイラン水溶散は、平成30(2018)年1月にみつばち用医薬品として販売開始となった。その後、最初の集蜜期である平成30(2018)年5月に、当県とは別の県において残留基準値(当時0.2ppm)より高い濃度のタイロシンが検出された事例が報告された。

一方、ミロサマイシン製剤は製造が中止されているが、使用は禁止されていない。

現在、当センターにおけるはちみつの抗生物質の検査は、まず、微生物学的検査(バイオアッセイ)による簡易法を実施し、陽性になった場合は、同じく微生物学的検査である分別推定法を行い、抗生物質の系統を推定している。分別推定法で陽性になった系統の抗生物質については、同定・定量を行うための理化学的検査としてLC-MS/MSによる定性・定量試験を行っている(図2)。



イラスト：農林水産省「蜜蜂用タイロシンの使用状況及びハチミツ中の残留調査について」他

図1 抗生物質の投与とはちみつ

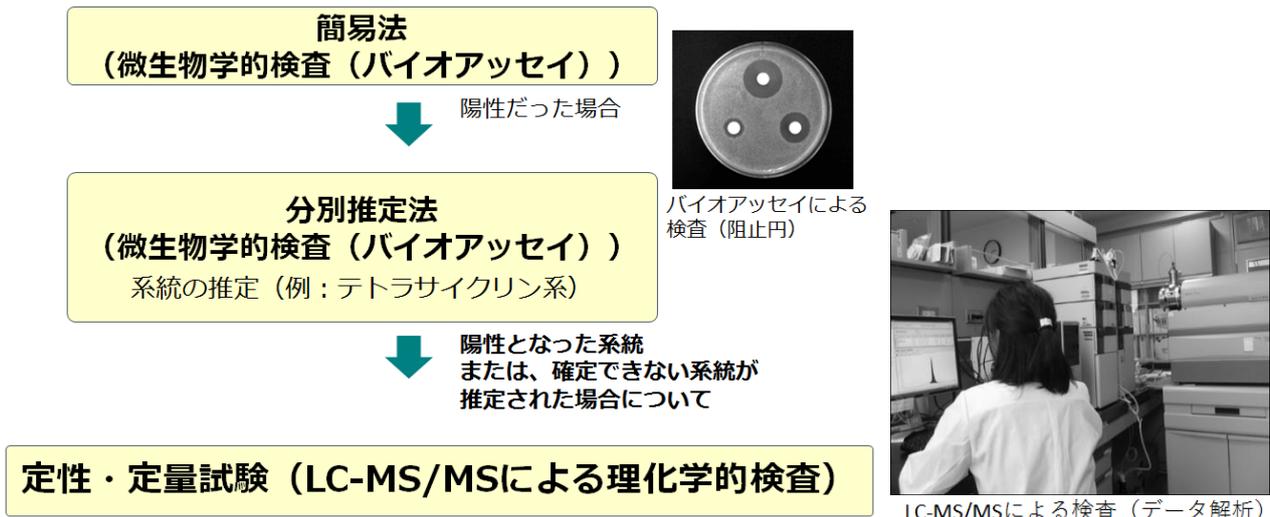


図2 はちみつ中の抗生物質の検査法

理化学的検査の標準作業手順書 (SOP) は、過去の検出状況から、テトラサイクリン系抗生物質 (TCs) についてのみ作成してあったが、MLs については未作成であり、当センターでは、はちみつに残留しているタイロシン及びミロサマイシンの定性・定量試験が実施できる体制とはなっていなかった。

そこで、みつばちに使用が許可されている、タイロシン及びミロサマイシンについて、既存の TCs 検査法と同時に前処理、測定ができる条件を設定し、併せて、前処理方法についても所要時間を短縮する改良法を考案し、平成 30 年度に報告した¹⁾。その後、試験溶液の調製に使用する固相抽出カラムを変更すると共に、その妥当性について、ガイドライン²⁾ に基づく評価を行い、SOP を作成し、行政検査に適用させた。

2 研究方法

2.1 試料

分析対象とする抗生物質が検出されないことを予め確認した栃木県産のはちみつを試料とした。

2.2 分析対象とする抗生物質

タイロシンA、タイロシンB、ミロサマイシン (以上 MLs3 物質)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロルテトラサイクリン (CTC)、テトラサイクリン (TC) (以上 TCs3 物質)。

なお、はちみつ中にあるのは、タイロシンAの一部が分解されてタイロシンBとなる。

2.3 試薬及び器具等

2.3.1 標準品

タイロシン標準品 (タイロシンA)、TC 塩酸塩標準品: 富士フィルム和光純薬(株)製、デスマイコシン (タイロシンB): Toronto Research Chemicals Inc. 製、ミロサマイシン: 林純薬工業(株)製、OTC 塩酸塩標準品、CTC 塩酸塩標準品: 関東化学(株)製。

2.3.2 その他の試薬

アセトニトリル、メタノール: 関東化学(株)製 (高速液体クロマトグラフィー用)、ギ酸: 関東化学(株)製 (特級)。

表1 測定条件

カラム温度: 40°C					
流速: 0.2mL/分					
移動相: 下記のA液及びB液によるグラジエント					
A液: 0.1%ギ酸 B液: アセトニトリル					
グラジエント条件:					
時間 (分)	0	15.0	20.0	20.1	25.0
A液 (%)	95	20	20	95	95
B液 (%)	5	80	80	5	5

イオン化モード: ESI 法 測定モード: MRM 法

表2 MS/MS パラメータ

抗生物質	MW	Q 1 (m/z)	Q 3 (m/z)	D P (V)	C E (V)
タイロシンA	916.10	916.5	174.1	46	51
タイロシンB	771.93	772.4	174.2	76	39
ミロサマイシン	727.88	728.4	158.2	41	37
OTC	460.43	461.2	426.1	30	30
CTC	478.88	479.2	444.2	30	30
TC	444.43	445.3	410.2	30	30

2.3.3 固相抽出カラム

検討の過程で、Waters社製 Oasis HLB 3cc (60mg) から、Oasis PRiME HLB 6cc (200mg) に変更した。

2.3.4 フィルター及びミニバイアル

フィルター—体型で、材質にガラスや金属を使っていない、ミニバイアル (Whatman Mini-Uni Prep スリット入りセプタム付き、フィルター径 0.45 μm (PVDF 製)) を採用した。

2.3.5 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 (株) 製 Prominence (構成：LC-20AD (送液ユニット) ×2、SIL-20AC (オートサンプラ)、CTO-20AC (カラムオープン)、CBM-20A (システムコントローラ))、質量分析計：AB SCIEX 社製 LC/MS/MS System Q TRAP 3200、分析カラム：関東化学 (株) 製 Mightysil RP18 PA (2.0mm×150mm、5μm)、測定条件、測定イオンは表1及び表2のとおり。

2.4 検量線の作成

2.3.1の各標準品を適宜アセトニトリル：水 (1:9) 混液で希釈、混合した 0.01~0.5 μg/mL の検量線用標準液 (6濃度) を調製後、マトリックス添加標準液としたものを各 5 μL 注入し、得られたピーク面積を用いてマトリックス検量線を作成した。

2.5 試験溶液の調製

試料 5.0g を 50mL の PP 製遠沈管に精秤し、超純水 20mL を加え、手で 30 秒間振とうした後、コンディショニング不要の固相抽出カラムに混和しながら注入、超純水 5mL で洗浄し、流出液は捨てた。このカラムにメタノール 5mL を注入し、溶出液を 50mL ナス型フラスコに採り、エバポレーターを用いて 40℃以下で減圧濃縮、窒素乾固後、アセトニトリル：水 (1:9) 混液 2mL を加え、超音波で溶解したものを試験溶液とした。試験溶液は、フィルター付き PP 製バイアルを用いてろ過し LC-MS/MS に注入した (図3)。

なお、ガラス器具は必要に応じてメタノールによる予備洗浄を行い、乾燥させた後使用した。

2.6 妥当性確認試験

添加回収試験による 2 濃度 2 併行の枝分かれ実験を 1 日 1 回×5 日間実施した。基準値の異なる 6 項目を一斉に分析するため、添加回収試験溶液に添加する各抗生物質の濃度は、一律基準の 0.01 μg/g を低濃度、各項目の基準値に近い 0.1 μg/g を高濃度として設定し、試料中濃度に換算した濃度を含むよう、混合標準液を添加し、使用した。

3 結果及び考察

3.1 結果

妥当性確認試験に用いた、2 濃度の添加回収用試料は、いずれも、対象の抗生物質すべてにおいて、選択性、真度、精度 (併行精度、室内精度)、定量限界の基準を満たしていた (表3)。

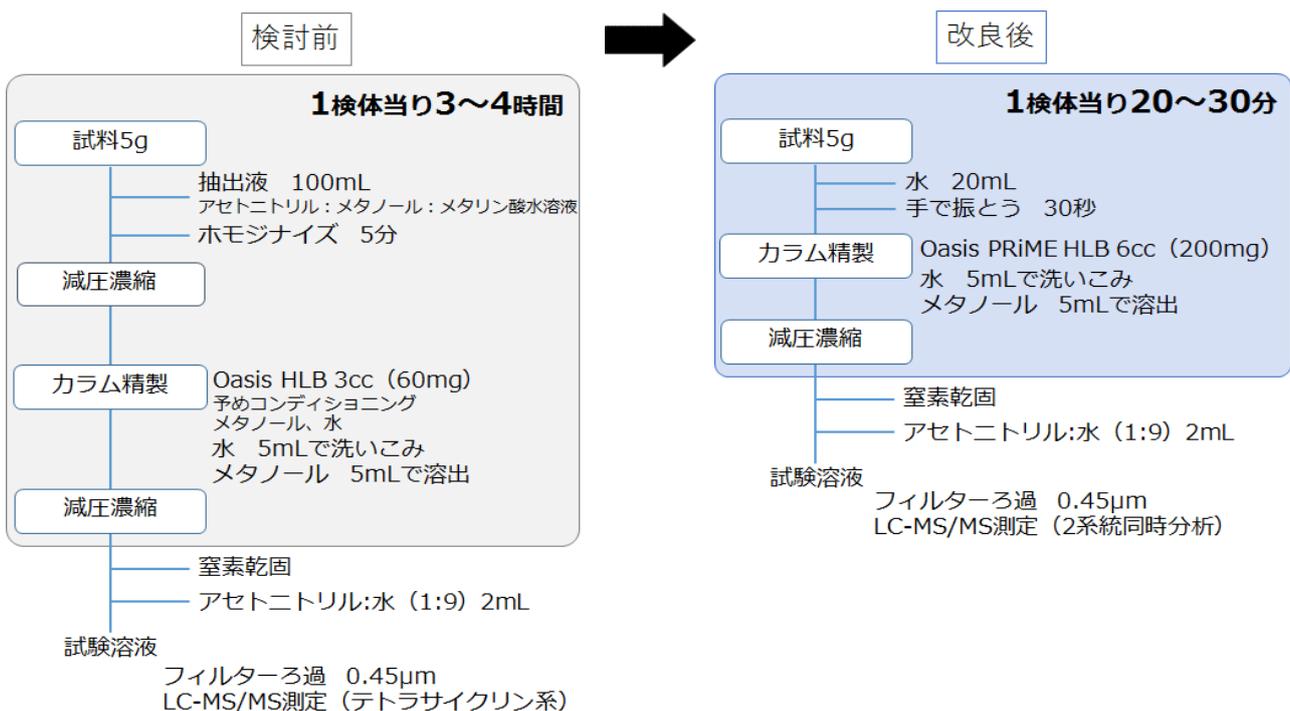


図3 試験溶液の調製フロー

表3 妥当性確認試験の結果

分析対象項目 カッコ内は基準値 (ppm)	マクロライド系			テトラサイクリン系		
	タイロシンA (タイロシンとして0.7***)	タイロシンB	ミロサマイシン (0.05)	OTC (0.3)	CTC (-)	TC (-)
妥当性評価の目標値						
選択性	S/N \geq 1/3 ~1/10**	○	○	○	○	○
真度 (%) *	70~120 70~120	119.8 109.3	116.4 107.9	115.9 110.7	109.7 105.1	99.2 95.2
併行精度 (RSD%) *	25> 15>	5.4 6.3	1.9 2.3	1.8 3.1	5.7 5.2	9.8 8.3
室内精度 (RSD%) *	30> 20>	11.9 6.2	5.9 2.3	5.9 2.7	9.7 8.3	16.7 16.3
						104.6 103.4
						7.7 6.8
						12.5 11.5

* 真度、併行精度、室内精度の上段は低濃度 (0.01ppm)、下段は高濃度 (0.1ppm) の結果を示す。

** 項目により異なる²⁾。

*** 令和元 (2019) 年9月20日改正。改正前の基準値は0.2ppm。

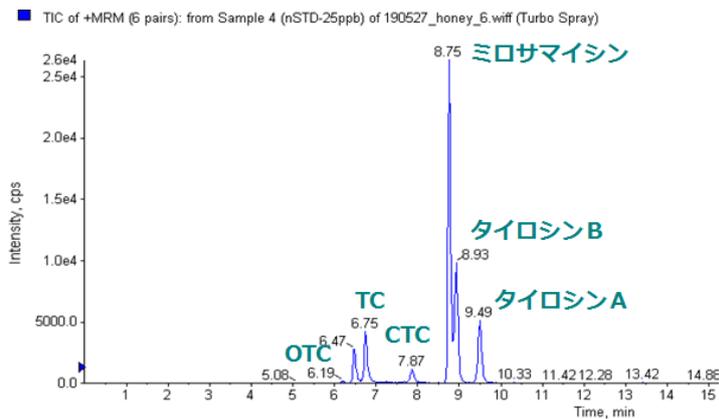


図4 トータルイオンクロマトグラム (検体中濃度0.01ppm相当)

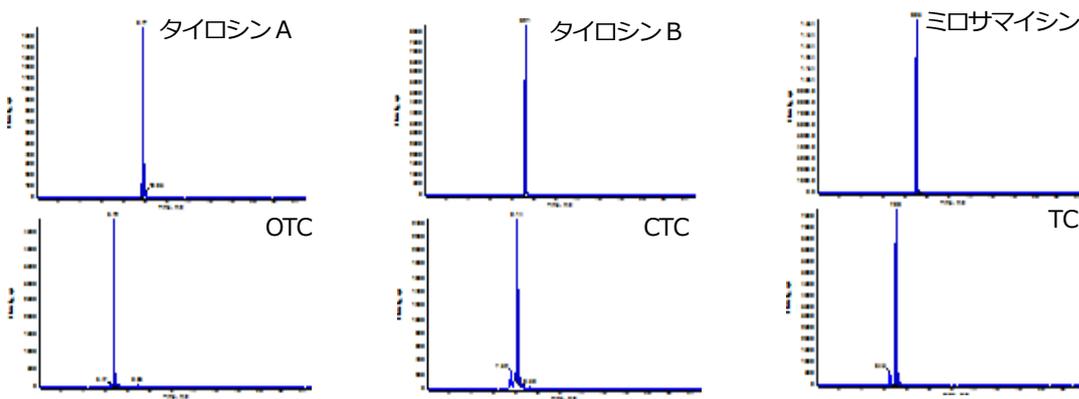


図5 マトリックス標準液のクロマトグラム (検体中濃度0.01ppm相当)

3.1.1 選択性 (試料中に存在する他の物質があっても、正しく検査できるか)

ブランク試料として使用するはちみつを上記の方法に従って測定した結果、定量を妨害するピークは検出されなかった。6項目を同時分析できる条件下でも、ガイドラインに示された選択性の目標値 (妨害ピークと基準値濃度に相当するピークとの面積の比であり、許容範囲は試験法の定量限界と各基準値の関係により異なる) を超える妨害成分は認められなかった (図4)。

3.1.2 真度（添加した濃度と検査結果が一致するか（回収率））

各抗生物質の2併行5日間における回収率の平均値は、95.2～119.8%であり、低濃度、高濃度共に、目標値である70～120%の範囲内だった。

3.1.3 精度（繰り返し行っても結果が一致するか）

次に示す①及び②のいずれにおいても、標準偏差は目標値を満たしていた。

- ① 併行精度（同一と見なされる試料に対する、同一の試験法・試験室・実施者・装置での繰り返し）
- ② 室内精度（複数の実施者または実施日での繰り返し）

3.1.4 定量限界（適切な精確さをもって定量できる最低量又は濃度）

基準値が「不検出」となっている抗生物質については、定量限界を評価することとされており、今回の場合、CTCとTCの2項目が該当する。これらについて0.01ppmの抗生物質を含むはちみつについて、LC-MS/MSで得られたピークにおけるS/N比は、CTCで21.5、TCで42.4と目標値（3以上）を大幅に上回った。

なお、その他の4項目を含む6項目全濃度において、S/N比は10を大きく上回っていた。0.01ppmの抗生物質を含むはちみつで得られたクロマトグラムを示す（図5）。

3.2 考察

抗生物質2系統の同時測定・解析が可能となり、検査の所要時間は半減し、検体や有機溶媒等の使用量を増やすことなく、結果報告までの日数を短縮することができた。全処理工程の短縮によって誤差が生じる要素を減少させたことは、精度の向上に少なからず寄与したと考えられる。

はちみつは、他の畜水産物と異なり、測定に影響する共存物質が少なく、水によく溶けるため、試料5.0gを水20mLで溶解できることを確認し、抽出操作の低容量化、抽出試薬の削減を実現させた。従来、抽出には、金属製の300mL用遠沈管やガラス製フラスコを洗浄し再使用していたが、水20mLとの混和へとスケールダウンさせたことにより、ポリプロピレン製の50mL遠沈管を、用時新たに開封し用いる方式に変更することができた。さらに、固相抽出では、コンディショニングが不要で、通液性が良く、サイズの大きいカラムに希釈試料を直接負荷することで、1回負荷量の増加と、操作ステップ数の削減が可能となり、所要時間の大幅な短縮が達成された。固相抽出カラムに試料を負荷する際は、すべての目的物質の抽出を意図して、内容物が一樣になるよう、駒込ピペットでおだやかに吸引・吐出を繰り返しながら行うが、固相抽出の処理時間を短縮させたことで、ピペッティング動作の負担が軽減され、抽出中の試料の偏りや過度の泡立ちを防ぐと同時に、目的物質の経時変化を最小限度に抑えられるようになったと考えられる。固相に保持させた抗生物質は、メタノール5mLで充分溶出・回収できた。試験溶液をろ過する際に、フィルター一体型のポリプロピレン製ミニバイアルを採用することで、それまで使用していたガラス製シリンジと金属製の針及びディスク型のフィルターを組み合わせる必要がなくなったため、作業効率と操作の安全性を大幅に高めることができた。

抗生物質のガラス容器への吸着や分解及び金属イオンとのキレート形成は測定の誤差要因としてしばしば問題となるが、今回確立した前処理方法を採用することによって、検出目的とする抗生物質の損失を防止することができた。

作業工程の改良と抗生物質2系統の同時分析により、使用する電力及び固相抽出中の吸引に使用する水道水の量も大幅に削減できた。

表4 課題と改善結果のまとめ

課題	検討内容	改善結果
抽出に時間がかかる	抽出液の種類、量	水系抽出液 100mL で抽出し減圧濃縮後固相抽出 →水 20mL で希釈し直接固相抽出カラムに負荷
カラムが詰まりやすい	カラムの種類	カラムサイズの変更 (3cc/60mg→6cc/200mg)
	コンディショニング方法	複数条件でテストし、最終的にコンディショニング不要の製品を採用
回収率が低い	器具の材質による影響	金属やガラス製の容器をポリプロピレン製（シングルユース）に変更
	操作中の経時変化	前処理方法改良による総処理時間短縮及び操作ステップ数削減
2系統を同時に測定できない	グラジエント条件	条件設定及び測定メソッドの最適化を実行
	モニタイオンの種類	感度よく検出できるモニタイオンの選択

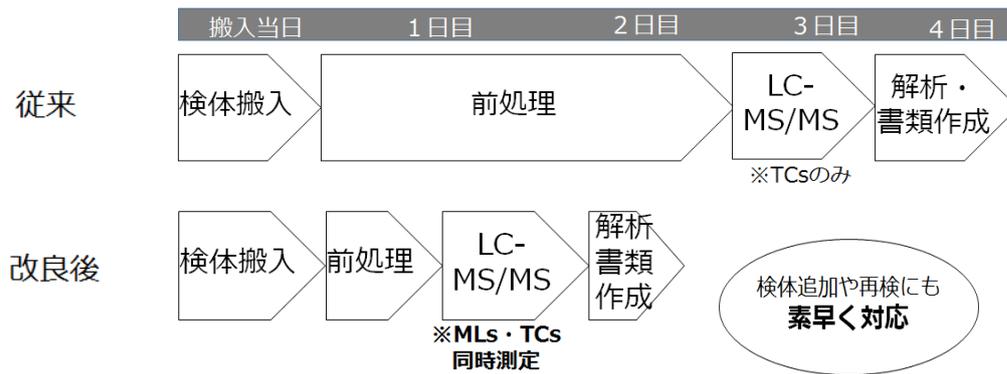


図6 結果報告までのタイムライン

また、検査法の原理として、微生物学的検査法は、陰性の判定には有効であるが、前処理に用いる試薬や有機溶媒、さらには食品由来の抗菌性物質を原因とする偽陽性反応が起こることも知られている。当センターでも、分別推定法で陽性となったものについて、理化学的検査で陰性となった事例が複数あり、今回確立した、抗生物質2系統を短時間で、安定して精度よく測定できる本法の意義は大きい。

4 まとめ

はちみつ中の抗生物質に対する、LC-MS/MSによる理化学的検査において、使用が許可されているマクロライド系抗生物質であるタイロシン（タイロシンA、タイロシンAの産物であるタイロシンB）、ミロサマイシンと、使用不許可であるテトラサイクリン系抗生物質のOTC、CTC及びTCの6項目を同時分析できる、迅速で簡便な試験法を検討し、ガイドラインに基づく妥当性評価を行った。

2濃度2併行5日間の枝分かれ実験を用いた妥当性評価において、抗生物質6項目のすべてにつき、選択性、真度、精度（並行精度、室内精度）、定量限界の基準を満たし、本試験法は妥当であると判断できたため、新たにSOPを作成し、行政検査に適用することとした。

検討前の課題と主な検討内容、改善した結果を表4に示す。

抗生物質2系統で共通かつ所要時間の短い前処理方法と、LC-MS/MSにおける2系統同時分析の採用により、所要日数が4日から2日に短縮し、使用する有機溶媒や水道水及び電力量も削減できたほか、作業の分担・引継もしやすくなった（図6）。本法の有用性は、多数検体測定時や追加検討が必要な場合等には、より一層高まる。

実際にこの方法を運用してみて、分析の進捗が大変スムーズなことや、検体の追加などへの素早い対応力を実感している。また、成績を出すにあたって、より慎重な検討を加える必要が生じた際にも、日数を遅らせることなく、報告することも可能となった。

行政検査において精度を高めつつ結果判明までの時間を短縮することは、とりもなおさず、行政判断やその後の措置の早期化に直結することから、今回確立した試験法を確実に運用し、迅速で正確な検査を行っていくことで、科学的根拠の面から県民の食の安全確保の一助としていきたい。

5 参考文献

- 1) 徳田侑子他、はちみつ中の抗生物質の検査法の検討について、平成30（2018）年度栃木県生活衛生関係業績発表会抄録集、2018。
- 2) 「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日付け食安発第1115001号）