

分担研究報告書（平成 11 年度）

動物用医薬品の残留防止対策に関する研究

動物用医薬品の検査方法の確立

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

動物用医薬品のうち、抗生物質のオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン、抗コクシジウム剤のジクラズリル及びナイカルバジンについて、畜水産食品中の残留検査法を検討した。定量下限は FAO/WHO 合同食品規格委員会（コーデックス委員会）が設定したコーデックス規格の 1/2 ないし 1/10 を目標として検討した。また検査法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準を参考に、コーデックス規格レベル濃度（規格レベル）での添加回収試験における回収率と相対標準偏差から評価した。

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの検査法は、オキシテトラサイクリン試験法（平成 7 年 12 月厚生省告示第 218 号）を基に、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの定量下限は、筋肉、脂肪、肝臓、鶏卵、魚介類及び牛乳においてそれぞれオキシテトラサイクリン及びテトラサイクリンが 0.02 ppm、クロルテトラサイクリンが 0.03 ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均でオキシテトラサイクリン及びテトラサイクリンが 90% 以上、クロルテトラサイクリンが 75% 以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3% 以内であった。

ジクラズリル及びナイカルバジンの検査法は、イベルメクチン試験法を基に、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。

ジクラズリル及びナイカルバジンの定量下限は、筋肉、脂肪及び肝臓においてそれぞれジクラズリルが 0.1 ppm、ナイカルバジンが 0.02 ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率はジクラズリル及びナイカルバジン共に平均で 80% 以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5% 以内であった。

本研究で確立した残留検査法は、5 試験研究機関による標準化の結果、畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査法として実用に適すると評価された。

研究協力者：

青木 葉一（財団法人・畜産生物科学安全研究所・分析部）

堀江 正一（埼玉県衛生研究所・衛生科学・水・食品担当）

宮崎 奉之（東京都立衛生研究所・生活科学部）

村山 三徳（国立医薬品食品衛生研究所・食品部）

渡井 正俊（財団法人・日本食品分析センター・多摩研究所・試験研究部）

A. 研究目的

平成7年12月、平成9年3月、平成11年11月に食品衛生法が改正され、計15品目の動物用医薬品の食品への残留基準が食品・添加物等の規格基準において新たに設定され、さらに5品目の動物用医薬品の食品への残留規格基準について諮問された。本年度は、新たに諮問された5品目の動物用医薬品、抗生物質のオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン、抗コクシジウム剤のジクラズリル及びナイカルバジンについて残留検査法を検討した。

検査法の定量下限は、FAO/WHO 合同食品規格委員会(コーデックス委員会)が設定したコーデックス規格の1/10を目標とした。

I. オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの検査方法の検討

I-B. 研究方法

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンは、テトラサイクリン系抗生物質である。既にオキシテトラサイクリンに対する残留基準値が設けられ、試験法が規定されているが、コーデックス委員会においてオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンに対するグループADIが設定されたのを受けて、これら3種類の分別定量法を検討した。

既に規定されているオキシテトラサイクリン試験法では、クロルテトラサイクリンの定量下限が不十分であるため、改良を試みた。

I-B-1. 試料及び試薬

1) 試料

市販の鶏の筋肉、肝臓、鶏卵、エビ、牛乳を用いた。

2) 試薬

・オキシテトラサイクリン (塩酸オキシテトラサイクリン、99.3%、Sigma 社製)

・クロルテトラサイクリン (塩酸クロルテトラサイクリン、82%、Sigma 社製)

・テトラサイクリン (塩酸テトラサイクリン、98.7%、Sigma 社製)

・イミダゾール、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA-2Na)、クエン酸・一水和物、酢酸、酢酸マグネシウム・四水和物、メタノール、n-ヘキサン、リン酸一カリウム、リン酸二ナトリウム・十二水和物 (以上試薬特級)

・Sep-Pak Plus PS2 (265 mg、Waters 社製)、メタノール 10 ml、水 10 ml、飽和 EDTA-2Na 5 ml の順で洗浄して使用した。

・イミダゾール緩衝液：イミダゾール 68.08 g、酢酸マグネシウム 10.72 g、EDTA-2Na 0.37 g を約 800 ml の水に溶解し、酢酸を加えて pH を 7.2 に調整後、さらに水を加えて 1,000 ml とした。

・EDTA 含有クエン酸緩衝液：クエン酸 12.9 g、リン酸二ナトリウム・十二水和物 27.6 g、EDTA-2Na 3.72 g を水に溶かして 1,000 ml とした。

・リン酸緩衝液：リン酸一カリウム 13.6 g を水に溶かして 1,000 ml とした (pH4.5)。

3) 器具及び装置

- ・遠沈管 (100、50 ml)
- ・ナス形フラスコ (50 ml)
- ・超高速ホモジナイザー
- ・振とう装置
- ・遠心分離装置
- ・ロータリーエバポレーター
- ・高速液体クロマトグラフ (蛍光検出器付)

I-B-2. 操作

1) 試料溶液の調製

筋肉、肝臓、腎臓、鶏卵および魚介類の場合：細切均一化した検体 5 g を 50 ml 遠沈管にとり、EDTA 含有クエン酸緩衝液 30 ml を加えてホモジナイズした後、3,000 rpm、10 分間遠心分離し、水層を 100 ml 遠沈管に移した。50 ml 遠沈管の残留物に、EDTA 含有クエン酸緩衝液 20 ml を加えて激しく振り

混ぜた後、3,000 rpm、10分間遠心分離し、水層を先の100 ml遠沈管に合わせた。これにn-ヘキサン20 mlを加えて5分間振とう後、3,000 rpm、10分間遠心分離した。n-ヘキサン層を捨て、水層をSep-Pak Plus PS2に負荷した後、カラムを水10 mlで洗浄した。メタノール10 mlで溶出し、溶出液をロータリーエバポレーター、40°以下で濃縮乾固した。残留物にリン酸緩衝液1.0 mlを加えて溶解して試験溶液とした。

乳の場合：検体5 gを100 ml遠沈管にとり、EDTA含有クエン酸緩衝液30 mlおよびn-ヘキサン20 mlを加えて5分間振とう後、3,000 rpm、10分間遠心分離した。n-ヘキサン層を捨て、水層をSep-Pak Plus PS2に負荷した後、カラムを水10 mlで洗浄した。メタノール10 mlで溶出し、溶出液をロータリーエバポレーター、40°以下で濃縮乾固した。残留物にリン酸緩衝液1.0 mlを加えて溶解して試験溶液とした。

2) HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ：8010 シリーズ、東ソー社製
- ・蛍光検出器：FS-8010、東ソー社製
- ・カラム：Wakosil-II 5C18 HG、4.6 mm ID × 150 mm (和光純薬工業社製)
- ・移動相：オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン測定用；イミダゾール緩衝液-メタノール (85:15)、クロルテトラサイクリン測定用；イミダゾール緩衝液-メタノール (75:25)
- ・流速：1.0 ml/min
- ・測定波長：励起波長；380 nm、蛍光波長；520 nm

3) 定量方法

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの標準品をそれぞれリン酸緩衝液に溶解し、さらにリン酸緩衝液で適宜希釈して、検量線作成用標準溶液とした。検量線作成用標準溶液及び試験溶液のそれ

ぞれ20 µlをHPLCにより測定し、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

I-C. 研究結果

1) 試料溶液の調製

既に規定されているオキシテトラサイクリン試験法では、検体 10 g を抽出用緩衝液 100 ml でホモジナイズし、その 50 ml を精製、濃縮して最終的な試験溶液 2.5 ml を得ているが、定量下限を引き下げるために、濃縮率を 2.5 倍に上げた。すなわち、検体 5 g を抽出用緩衝液計 50 ml で 2 回抽出し、その全量を精製、濃縮して最終的な試験溶液 1 ml を得た。

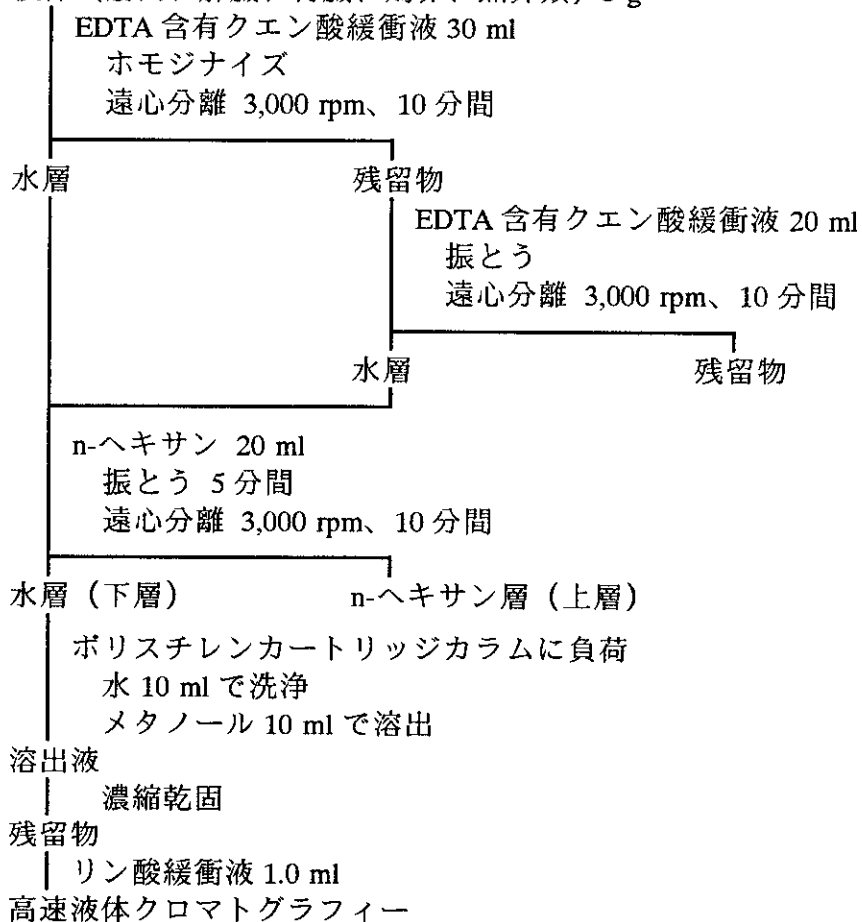
本調製法により、既法の精製効率を損なうことなく定量下限を改良することができた。

2) 添加回収試験

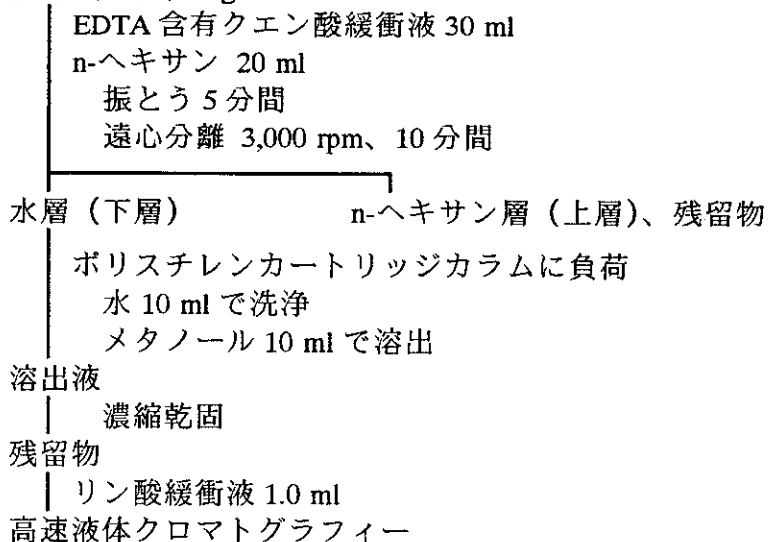
鶏の筋肉、肝臓、鶏卵、エビ、牛乳に対する添加回収試験の結果は、鶏の筋肉に 0.2 ppm 添加の時、回収率がオキシテトラサイクリン 94 ~ 98%、クロルテトラサイクリン 75 ~ 80%、テトラサイクリン 88 ~ 90%、肝臓に 0.6 ppm 添加の時、オキシテトラサイクリン 100 ~ 105%、クロルテトラサイクリン 85 ~ 88%、テトラサイクリン 87 ~ 90%であり、相対標準偏差は 1 ~ 5% (n=3) であった。

本法による定量下限はオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンが 0.02 ppm、クロルテトラサイクリンが 0.03 ppm であり、残留基準値の 1/60 ~ 1/3 であった。

検体（筋肉、肝臓、腎臓、鶏卵、魚介類）5 g



検体（牛乳）5 g



フローシート オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及び
テトラサイクリン検査法

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの性状

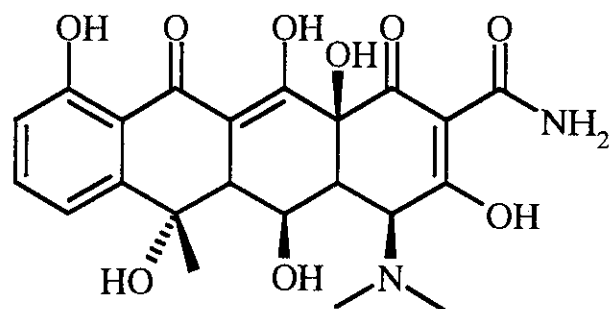
オキシテトラサイクリン (OTC)

oxytetracycline : $C_{22}H_{24}N_2O_9$; 460.44

oxytetracycline hydrochloride :

$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$; 496.91 dec.: 190-194 °

塩酸オキシテトラサイクリンは淡黄色粉末で、水に溶けやすく、アセトン、エーテル、クロロホルムに溶けにくい。アルカリに不安定である。



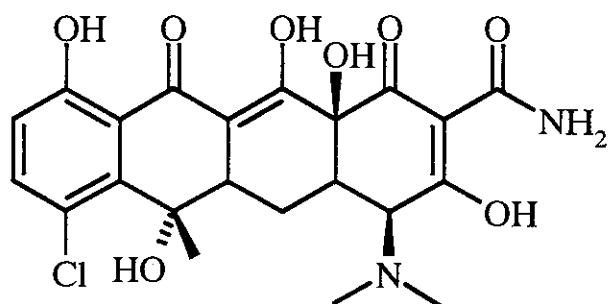
クロルテトラサイクリン (CTC)

chlortetracycline : $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$; 478.88

chlortetracycline hydrochloride :

$C_{22}H_{23}ClN_2O_8 \cdot HCl$; 515.35 dec.: 210 ° <

塩酸クロルテトラサイクリンは黄色粉末で、水に溶けやすく、アセトン、エーテル、クロロホルムに溶けにくい。アルカリ、熱、光に不安定である。



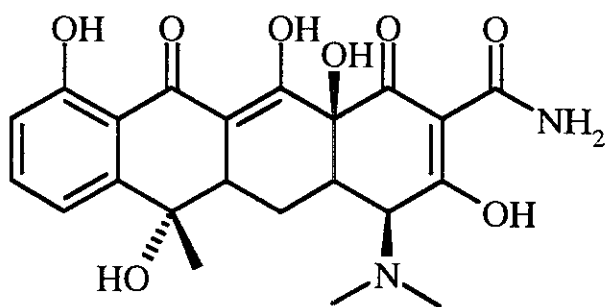
テトラサイクリン (TC)

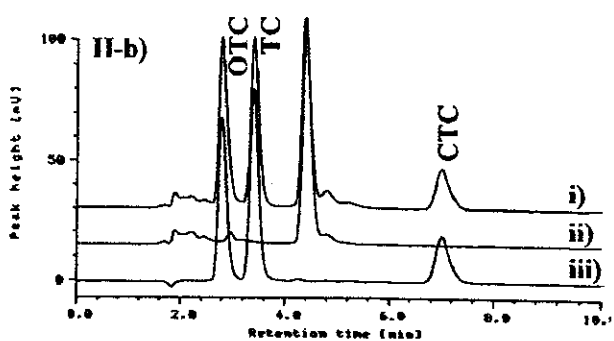
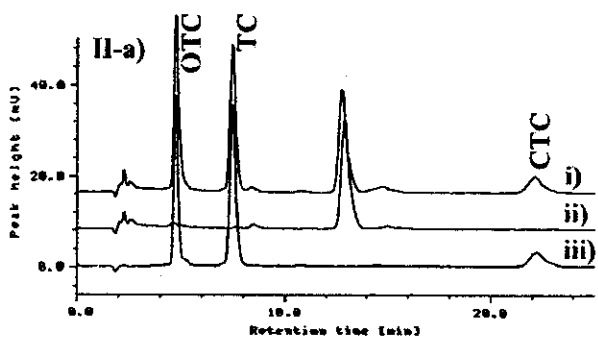
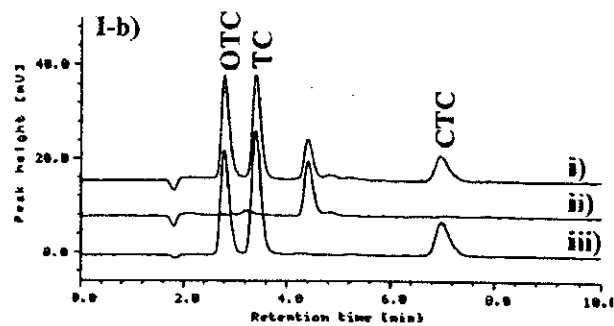
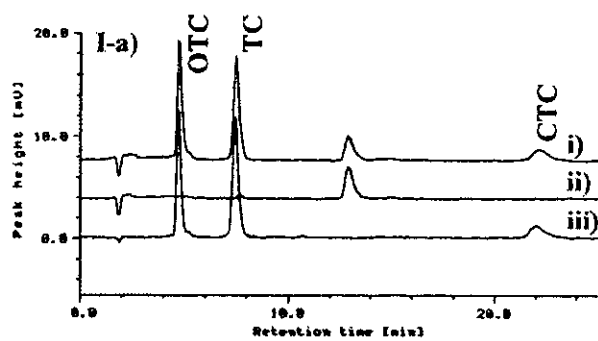
tetracycline : $C_{22}H_{24}N_2O_8$; 444.43

tetracycline hydrochloride :

$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$; 480.90 dec.: 214 °

塩酸テトラサイクリンは淡黄色粉末で、水に溶けやすく、アセトン、エーテル、クロロホルムに溶けにくい。アルカリ、熱、光に不安定である。





- ・クロマトグラム I 鶏筋肉、i) CTC, OTC, TC 各 0.2 ppm 添加、ii) 無添加、iii) 標準品 CTC, OTC, TC 各 20 ng/20 μ l
- II 鶏肝臓、i) CTC, OTC, TC 各 0.6 ppm 添加、ii) 無添加、iii) 標準品 CTC, OTC, TC 各 60 ng/20 μ l
- a) 移動相：イミダゾール緩衝液 - メタノール (85:15)、1.0 ml/min
- b) 移動相：イミダゾール緩衝液 - メタノール (75:25)、1.0 ml/min
- CTC: クロルテトラサイクリン、OTC: オキシテトラサイクリン、TC: テトラサイクリン

II. ジクラズリル及びナイカルバジンの検査 方法の検討

II-B. 研究方法

ジクラズリル及びナイカルバジンは共に食鳥類に用いられる抗コクシジウム剤である。ナイカルバジンの検査法としては、既に合成抗菌剤の一斉分析法(厚生省生活衛生局監修:「食品衛生検査指針追補 I」、(社)日本食品衛生協会、pp.314~329、(1993))があるので、これを基にしてジクラズリル及びナイカルバジンの検査法としての最適化を試みた。

ナイカルバジンは、*N,N'*-bis-(4-nitrophenyl)urea 及び 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine の等モル化合物であるが、残留基準値は、*N,N'*-bis-(4-nitrophenyl)urea を指標として設定されている。従って HPLC による分別定量が適している。

II-B-1. 実験材料

1) 試料

市販の鶏の筋肉、肝臓を用いた。

2) 試薬

- ・ジクラズリル (99.83%、JANSSEN 社製)
- ・ナイカルバジン (*N,N'*-bis-(4-nitrophenyl)urea として 70.6%、KOFFOLK, MERIAL 社製)
- ・アセトニトリル、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*n*-プロパノール、*n*-ヘキサン、メタノール、硫酸ナトリウム・無水、リン酸一ナトリウム・二水和物 (以上試薬特級)

・Bond Elut C18 (500 mg、Varian 社製)、メタノール 10 ml、50 mM リン酸一ナトリウム 10 ml の順に洗浄してから使用した。

3) 器具及び装置

- ・遠沈管 (100ml)
- ・ナス形フラスコ (100、50ml)
- ・分液ロート (100ml)
- ・超高速ホモジナイザー
- ・振とう機
- ・遠心分離機

- ・ロータリーエバポレーター
- ・高速液体クロマトグラフ(多波長検出器付)

II-B-2. 試験方法

1) 試料溶液の調製

細切均一化した検体 5 g を 100 ml 遠沈管にとり、アセトニトリル 30 ml、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 20 ml および無水硫酸ナトリウム 10 g を加えてホモジナイズした後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。アセトニトリル層および *n*-ヘキサン層を 100 ml 分液ロートに移し、アセトニトリル層を 100 ml ナス形フラスコに移した。*n*-ヘキサン層を、先の 100 ml 遠沈管の残留物に加え、さらにアセトニトリル 20 ml を加えて激しく振り混ぜた後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を先の 100 ml ナス形フラスコに合わせ、*n*-プロパノール 10 ml を加えて、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。

残留物に 50 mM リン酸一ナトリウム-メタノール(4:1) 10 ml を加えて溶かして、C18 カートリッジカラムに負荷した後、50 mM リン酸一ナトリウム 10 ml で洗浄し、負荷液、洗浄液は捨てた。次いで水-メタノール(1:4) 10 ml で溶出し、溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。残留物にメタノール 1 ml を加えて溶解し試験溶液とした。

2) HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ: 8010 シリーズ、東ソー社製
- ・多波長検出器: Waters 996 PDA、Waters 社製
- determination; DCZ 275 nm, NCZ 350 nm
- ・カラム: Wakosil-II 5C18 HG、4.6 mm ID × 150 mm (和光純薬工業社製)
- ・移動相: アセトニトリル-25 mM リン酸一ナトリウム (5:5)
- ・流速: 1.0 ml/min

・測定波長：ジクラズリル；275 nm、ナイカルバジン；350 nm

3) 定量方法

ジクラズリル標準品は、*N,N*-ジメチルホルムアミド及びメタノールに、ナイカルバジンは、*N,N*-ジメチルホルムアミド及びアセトニトリルに溶解した後、それぞれメタノールで適宜希釈して、検量線作成用標準溶液とした。検量線作成用標準溶液及び試験溶液のそれぞれ10 µlをHPLCにより測定し、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

II-C. 研究結果

1) 試料溶液の調製

合成抗菌剤の一斉分析法では、アセトニトリル抽出後、ヘキサン分配による脱脂を行っているが、ナイカルバジンは酸、熱、光に不安定な化合物であるため、抽出精製操作は可能な限り迅速に行う必要がある。そこでアセトニトリル抽出の際にヘキサンを加えてホモジナイズすることにより、抽出、脱脂の2段階の操作を1段階に減らし、操作の迅速化を図ることができた。また、筋肉等の脂肪の少ない検体では、脱脂操作を省略しても測定に支障はなかった。

合成抗菌剤の一斉分析法では、C18カートリッジカラムによる精製の際、試料を50 mMリン酸一ナトリウム溶液として負荷し、メタノールで溶出しているが、ジクラズリル、ナイカルバジン共に回収率が低く、精製効果も十分ではなかった。ジクラズリル、ナイカルバジン共に水にほとんど溶けない化合物であるため、負荷時の溶液を50 mMリン酸一ナトリウム-メタノール(4:1)とする事により回収率を上げることができた。また、負荷後の溶出液にメタノールを用いると脂質等が同時に溶出されてしまい十分に精製されないことが分かったので、溶出液には水-メタノール(1:4)を用い、脂質等の溶出を防いだ。これによりジクラズリル及びナイカルバジンの回収率を上げ

ると共に、十分な精製効果を得ることができた。

2) 添加回収試験

鶏の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、ジクラズリルが筋肉に0.5 ppm添加のとき回収率76-83%、肝臓に3 ppm添加のとき86-92%、ナイカルバジンが筋肉に0.2 ppm添加のとき回収率81-85%、肝臓に0.2 ppm添加のとき81-96%であり、相対標準偏差は1~3% (n=3)であった。

本法による定量下限はジクラズリル0.1 ppm、ナイカルバジン0.02 ppmであり、残留基準値の1/30~1/5であった。

検体 5 g

アセトニトリル 30 ml
アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 20 ml
硫酸ナトリウム 10 g
ホモジナイズ
遠心分離 3,000 rpm、5 分間

アセトニトリル層 (下層)

n-ヘキサン層 (上層)、残留物

アセトニトリル 20 ml
振とう 1 分間
遠心分離 3,000 rpm、5 分間

アセトニトリル層 (下層)

n-ヘキサン層 (上層)、
残留物

n-プロパノール 10 ml
濃縮乾固

残留物

50 mM リン酸一ナトリウム-メタノール (4:1) 10 ml
超音波抽出

水-メタノール層

C18 カートリッジカラムに負荷
50 mM リン酸一ナトリウム 10 ml で洗浄
水-メタノール (1:4) 10 ml で溶出

溶出液

濃縮乾固

残留物

メタノール 1 ml

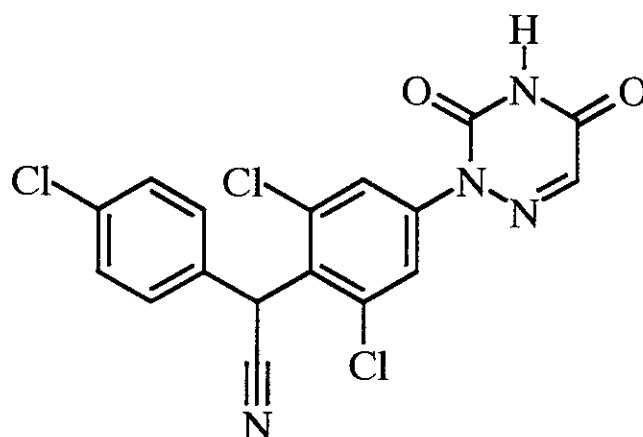
高速液体クロマトグラフィー

フローシート ジクラズリルおよびナイカルバジン検査法

ジクラズリル及びナイカルバジンの性状

ジクラズリル (DCZ)

diclazuril : C₁₇H₉Cl₃N₄O₂; 407.64



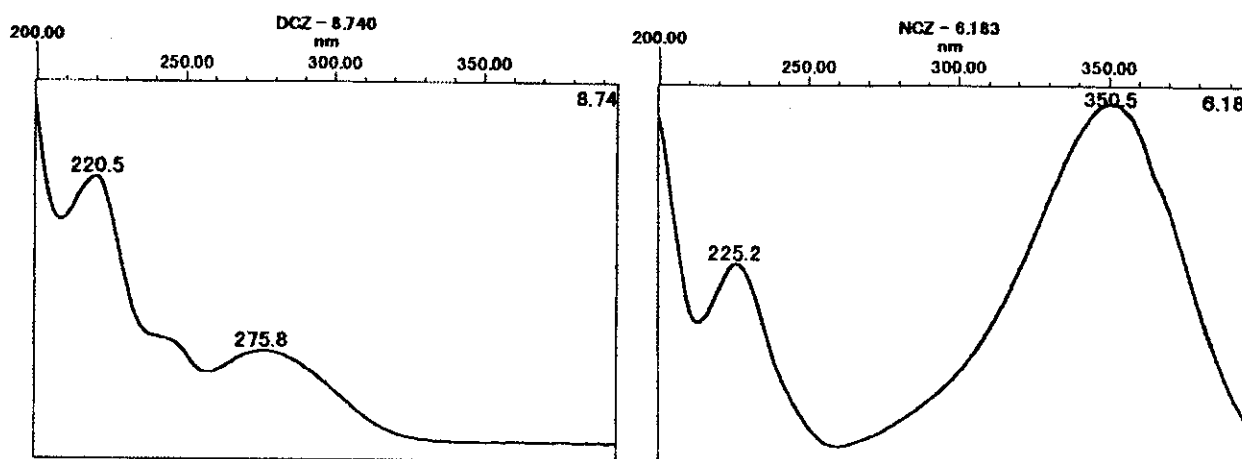
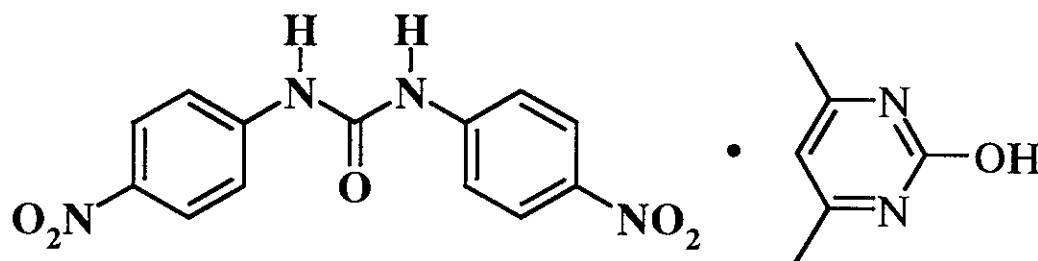
ナイカルバジン (NCZ)

nicarbazin : C₁₉H₁₈N₆O₆; 426.38 dec.: 265-275 °

N,N'-bis-(4-nitrophenyl)urea : C₁₃H₁₀N₄O₅; 302.25

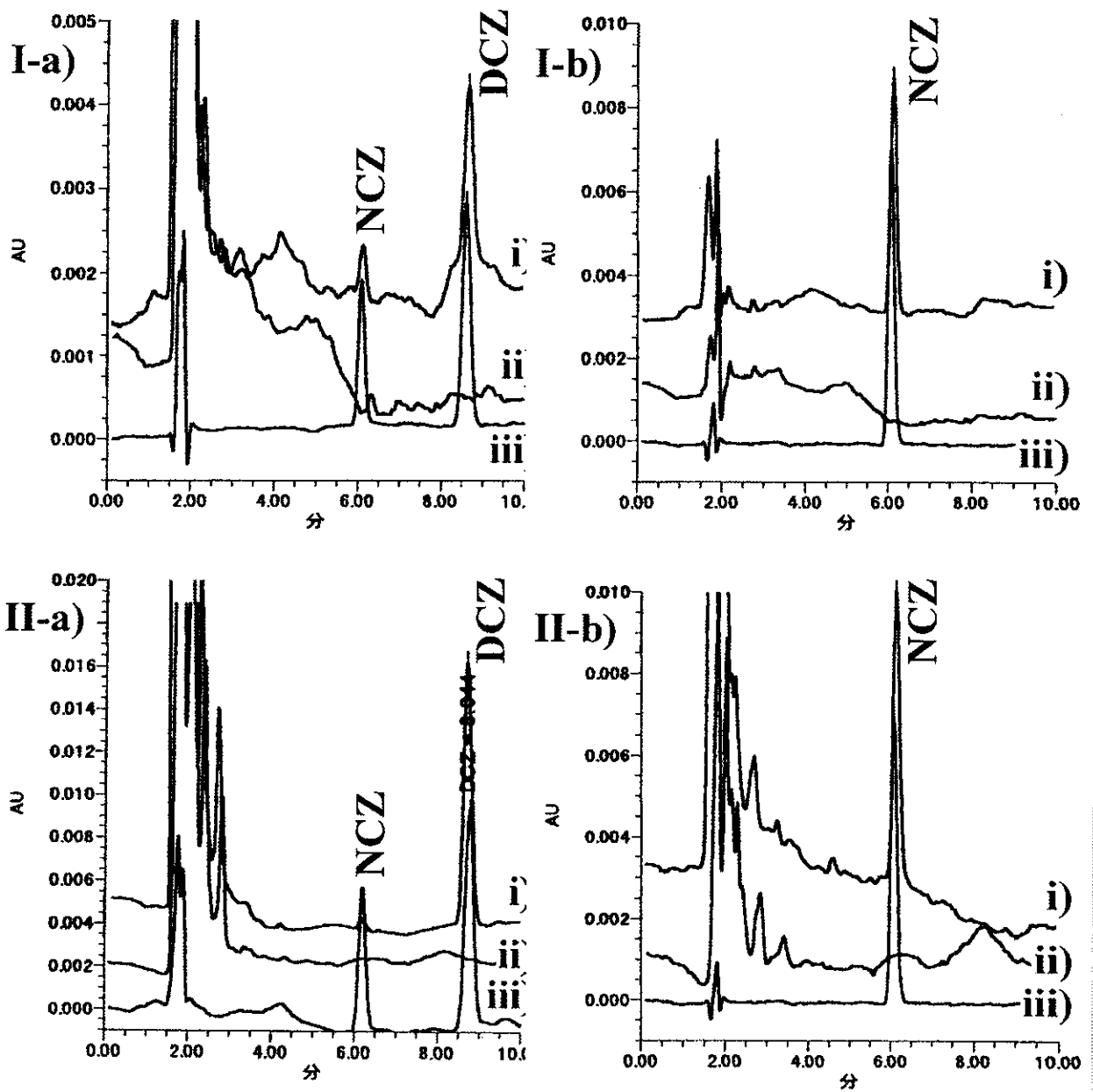
2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine : C₆H₈N₂O; 124.14

ナイカルバジンは、酸、熱、光に不安定である。



標準品の吸収スペクトル

(左) DCZ : ジクラズリル、(右) NCZ : ナイカルバジン



クロマトグラム I 鶏筋肉、i) DCZ 0.5 ppm, NCZ 0.2 ppm 添加、ii) 無添加、
 II 鶏肝臓、i) DCZ 3 ppm, NCZ 0.2 ppm 添加、ii) 無添加、
 I-a)- iii) 標準品 DCZ, NCZ 各 25 ng/10 μ l
 I,II-b)- iii) 標準品 DCZ, NCZ 各 10 ng/10 μ l
 II-a)- iii) 標準品 DCZ, NCZ 各 100 ng/10 μ l
 a) 測定波長 : 275 nm、b) 測定波長 : 350 nm

D. 考察

1) オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの残留検査法を開発した。本法による定量下限はオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンが 0.02 ppm、クロルテトラサイクリンが 0.03 ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 75～100%であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

2) ジクラズリル及びナイカルバジンの残留検査法を開発した。本法による定量下限はジクラズリル 0.1 ppm、ナイカルバジン 0.02 ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 80%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3%以内であった。

E. 結論

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン、ジクラズリル及びナイカルバジンの残留検査法を確立した。今回確立した各方法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準に適合している。また、操作、設備等の面でも、現在の各種検査機関において容易に実施、導入が可能であり、残留検査法として有用であると考えられる。