

畜産食品中の残留抗菌性物質の理化学的分析法に関する研究
——牛組織中のペニシリン系抗生物質の分析法について——

伊藤 裕子

**Development of Analytical Methods for Residual Antibiotics
and Antibacterials in Livestock Products**

Yuko ITO

*Department of Chemistry, Aichi Prefectural Institute of Public Health,
7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan*

(Received October 24, 2002)

One of the major roles of public health agencies is to ensure safe products for consumers through analysis of residual antibiotics and antibacterials in livestock products. In this study, the analytical methods were established for tetracyclines (TCs), penicillins (PCs), and sulphonamides (SAs), which are widely used as veterinary drugs in livestock. Taking into consideration the inspection systems used by prefectural governments, UV-HPLC, which is commonly used in health centers, was selected as the determination method, and LC/MS/MS, which is used for highly sensitive analyses, was employed as a confirmation method. Based on the physicochemical features of TCs, PCs, and SAs, detailed examinations of the solid-phase extraction cartridge clean-up and analytical conditions were carried out. A simultaneous confirmation method for four types of TCs in bovine tissues, both the simultaneous determination method and the highly sensitive identification method of six types of weakly acidic PCs in bovine tissues, and the simultaneous determination method of SAs in animal liver and kidney were established. The development of the analytical method for PCs is described in detail in this paper. The combined use of a simple and reproducible determination method and the highly sensitive and precise confirmation of residual antibiotics and antibacterials in livestock products was successfully established for the inspection system. This should provide high-quality analysis and ensure safe product improvements.

Key words—livestock products; residual antibiotics and antibacterials; analytical methods; tetracyclines; penicillins; sulphonamides

1. はじめに

人の健康を守るため、安全性の高い食品を確保することは、食品衛生上の最重要目標の1つであり、その一環として食品中に残留する抗菌性物質の検査は不可欠である。近年の食品衛生行政においては、畜水産食品中の抗菌性物質を従来のように抗菌力によって規制するのではなく、科学的な毒性データに基づいて化合物ごとに規制していく方向にあり、これらを個別に分析する理化学的分析法確立のニーズが高まっている。

一方、家畜に用いられる抗菌性物質のうち使用量

の多いテトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤の理化学的分析法、特にこれらの多成分同時分析法を確立することは畜産食品中に残留する抗菌性物質をモニターする上で効果的であると推測できる。さらに、と畜場などでの現場検査により検出された物質を保健所や食肉検査所などで定量し、衛生研究所などでその物質の同定をより高感度かつ精密に行う、といった衛生行政システムの構築を考慮すると、定量法には一般的な検査室に広く設置されているUV-HPLCを用い、精密同定法には化合物の構造情報が得られる質量分析計を2台直列に配置し、超高感度分析が可能であるLC/MS/MSを用いることが有効であると考えられる。

以上のことから、著者はテトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤を目的抗菌性物質とし、食肉、肝臓、腎臓についてUV-

愛知県衛生研究所化学部 (〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6)

e-mail: yuuko_1_itou@mail.aichi.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

HPLC と LC/MS/MS を用いた理化学的分析法を確立した。¹⁻⁶⁾ 本稿では、このうち牛組織中のペニシリン系抗生物質の分析法について述べる。

2. ペニシリン系抗生物質の定量法及び精密同定法の開発

ペニシリン系抗生物質 (PCs) は、敗血症、肺炎をはじめとする呼吸器感染症、牛の乳房炎などによく使用される薬物である。PCs のうち弱酸性を示す代表的な 6 種、すなわちベンジルペニシリン (PCG)、フェノキシメチルペニシリン (PCV)、オキサシリン (MPIPC)、クロキサシリン (MCIPC)、ナフシリン (NFPC)、ジクロキサシリン (MDIPC) についてその構造を Fig. 1 に示した。研究を開始した当初、これらの食肉中の残留理化学分析法は、特殊な装置を用いる方法や有害試薬を用いて誘導体化する方法が多く、簡易に UV 検出する方法はほとんど報告されていなかった。⁷⁻¹⁰⁾ また、精密同定法についても報告は少なく、それらの検出感度から残留基準値 [MRL=0.05 mg/kg (PCG)]¹¹⁾ に相当する PCs の確認は困難であった。¹²⁻¹⁴⁾ このことは、PCs に選択的な試料前処理法や、適切な測定条件が確立されていないことに起因すると推測できる。そこで、これらについて詳細に検討した結果、以下の成果を得た。

2-1. UV-HPLC による牛組織中のペニシリン系抗生物質の定量 極性の異なる 6 種の弱酸性

PCs を一斉に分析するためには、移動相に酸性化合物に対して有効であるセチルトリメチルアンモニウムクロライドをイオンペア試薬としてアセトニトリルとリン酸緩衝液の混液に加えたものを用いるイオンペア HPLC が有効であった。カラムには、一般的な ODS カラムを用い、長波長側に特異な UV 吸収を持たない PCs の検出は UV220 nm で行った。

試料精製法のうち、抽出については牛肉の場合は抽出液に 2% 食塩水のみを用い、肝臓及び腎臓の場合はこれにタンゲステン酸ナトリウムと硫酸を除タンパク剤として加えることで、満足できる結果を得た。

抽出液の精製には PCs がイオン性化合物であることから、イオン交換カートリッジが有効であると考えられた。¹⁵⁻¹⁷⁾ 詳細な検討の結果得られた精製法のうち、腎臓についての方法を Scheme 1 に示した。このうち、C18 カートリッジ (Bond Elut C18) 部分は、抽出液中に存在するイオン交換カートリッジ (Sep-Pak Accell Plus QMA カートリッジ) のイオン交換容量を超える夾雑物の除去に、また QMA カートリッジの溶出液に HPLC の移動相を用いることは、再現性のよいクロマトグラムを得るのにそれぞれ有効であった。

本法について実際の食品への応用を確認するため、試料に市販の牛肉、肝臓及び腎臓を用いて添加回収実験を実施し、その結果を Table 1 に示した。

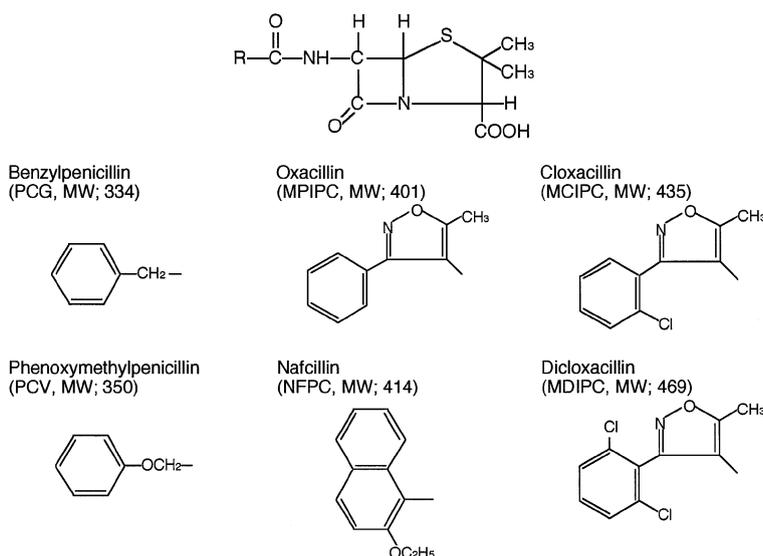


Fig. 1. Chemical Structures of Penicillins

Table 1. Recoveries of Penicillins from Bovine Tissues

Penicillins	Muscle			Liver			Kidney		
	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)
Benzylpenicillin	0.1	83	7.0	0.5	82	4.2	0.5	83	4.7
	0.05	77	6.4	0.1	86	7.4	0.1	82	5.8
Phenoxymethylpenicillin	0.1	82	4.8	0.5	88	1.4	0.5	82	1.8
	0.05	84	5.4	0.1	83	4.1	0.1	86	7.8
Oxacillin	0.1	74	3.5	0.5	91	1.4	0.5	92	3.2
	0.05	80	3.9	0.1	96	3.4	0.1	92	4.2
Cloxacillin	0.1	86	3.1	0.5	91	2.9	0.5	89	2.9
	0.05	82	4.0	0.1	92	8.7	0.1	90	2.7
Nafcillin	0.1	85	2.6	0.5	84	1.7	0.5	80	3.5
	0.05	90	5.2	0.1	84	3.8	0.1	89	3.8
Dicloxacillin	0.1	71	2.6	0.5	73	3.1	0.5	79	5.9
	0.05	79	6.4	0.1	89	6.4	0.1	89	4.3

a) Average of 5 trials. C.V.: coefficient of variation.

Bond Elut C18 6cc (500 mg)

wash with H₂O 10 ml, 15 % MeOH containing 2 % NaCl 5 ml and H₂O 5 ml aspirate over 10 min.
elute with 55 % MeOH 5 ml

Eluate

Sep-Pak Accell Plus QMA 3cc (500 mg)

wash with 55 % MeOH 3 ml, 10 mM acetic acid MeOH soln. 3 ml and H₂O 3 ml aspirate over 10 min.
elute with mobile phase of HPLC 2 ml

HPLC

Scheme 1. Clean-Up Procedure for Analysis of Penicillins in Bovine Liver and Kidney

このとき得られたクロマトグラムのうち、PCsをそれぞれ0.1 mg/kg添加した牛肉とそのブランク試料、さらに肝臓と腎臓のブランク試料について Fig. 2に示した。いずれの試料でも添加した6種の弱酸性PCsは、再現性よく定量でき、かつ定量を妨害する物質も検出されなかった。また本法における検出限界は、牛肉については6種のPCsともに試料中の濃度として0.02 mg/kgであった (S/N=3)。また、肝臓及び腎臓については、それぞれPCGが0.04 mg/kg, PCVが0.03 mg/kg, MPIPCとMCIPC及びNFPCが0.02 mg/kg, MDIPCが0.05 mg/kgであった (S/N=3)。

2-2. ESI LC/MS/MSによる牛組織中のペニシ

リン系抗生物質の精密同定 先に述べたように、LC/MS/MSは高感度精密同定法に有用な手法であるので、これを用いた牛組織中のPCs同定法を検討した。

LC/MSにおいては、夾雑物に起因するイオン化の抑制により、目的物質の検出感度が低下することがある。このため高感度なLC/MS分析のためには、十分な試料の精製とクロマトグラム上での夾雑物との完全な分離が必要である。著者らが確立した定量法で得られるクロマトグラムは、Fig. 2に示したとおりUV220 nmで検出しているにもかかわらず、検出される夾雑物は非常に少ないことから、これを基にエレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MS/MS法を用いた牛組織中のPCs同定法を検討した。

先の定量法で用いた移動相には不揮発性のイオンペア試薬や緩衝液が添加されており、ESI LC/MS/MSへ直接応用することは非常に困難であった。そこで弱酸性化合物に有効な揮発性イオンペア試薬であるジブチルアミンアセテートを用いて、その添加量と6種のPCsのキャパシティーファクター、MS感度及び溶出位置の安定性について検討したところ、添加量が2 mMのとき満足できる結果を得た。

各PCsの標準溶液をESI LC/MS分析すると、6種のPCsすべてから脱プロトン化分子、脱炭酸イオン、そしてβラクタム環が開裂して水が付加したイオン [M-H-141]⁻の3種が確認された。そこ

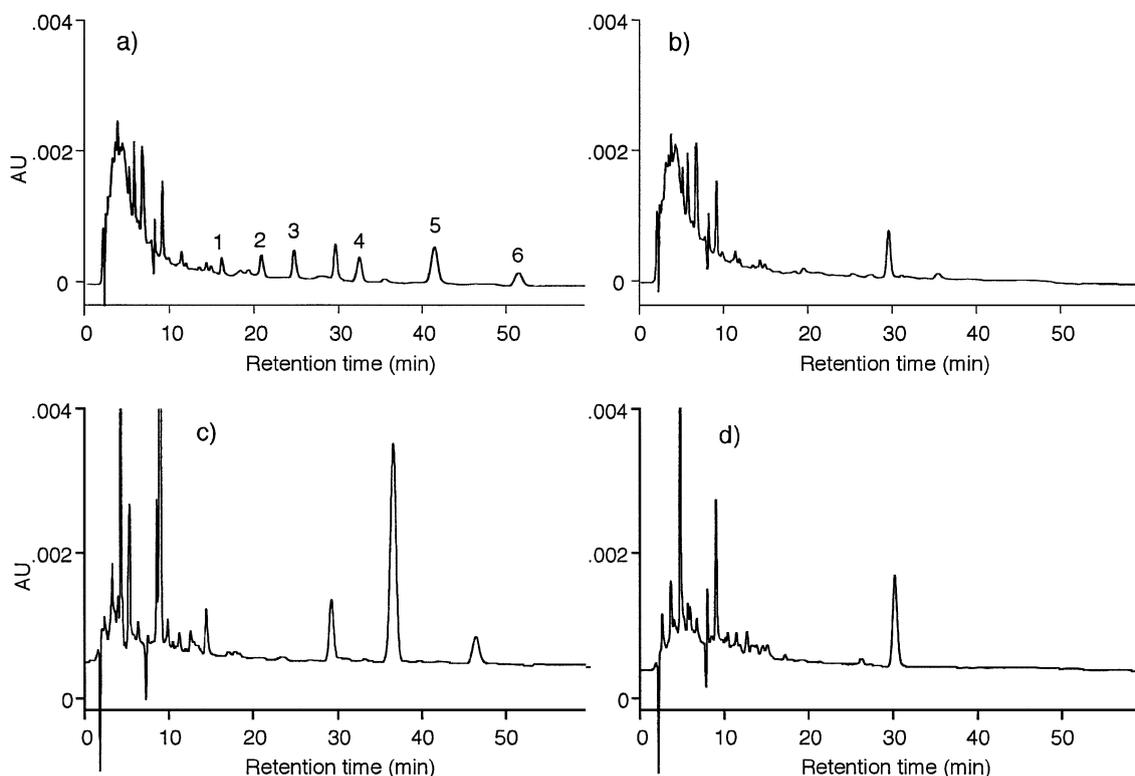


Fig. 2. Typical HPLC Chromatograms of Bovine Tissue Samples

a) muscle sample fortified at a concentration of 0.1 mg/kg each of penicillins, b) muscle sample, c) liver sample, d) kidney sample. 1, benzylpenicillin; 2, phenoxymethylpenicillin; 3, oxacillin; 4, cloxacillin; 5, nafcillin; 6, dicloxacillin. Operating conditions, column: TSKgel ODS-80Ts (150×4.6 mm I.D.); mobile phase: acetonitrile-0.02 M phosphate buffer, pH 6.2 (4.3: 5.7, v/v) containing 12 mM cetyltrimethylammonium chloride; flow-rate: 0.8 ml/min; detector: UV 220 nm; column temp.: 30°C.

Table 2. Diagnostic Ions and ESI MS/MS Conditions for Penicillins Analysis

Penicillins	Product ions ^{a)}			Precursor ion ^{a)}	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
	[M-H] ⁻	[M-H-CO ₂] ⁻	[M-H-141] ⁻	[M-H] ⁻		
Benzylpenicillin	333	289	192	333	23	8
Phenoxymethylpenicillin	349	305	208	349	23	8
Oxacillin	400	356	259	400	20	10
Cloxacillin	434	390	293	434	20	9
Nafcillin	413	369	272	413	23	9
Dicloxacillin	468	424	327	468	23	9

a) (m/z)

で、プリカーサーイオンには脱プロトン化分子を選択し、プロダクトイオンとして検出が予想される脱プロトン化分子、脱炭酸イオン及び [M-H-141]⁻ に注目して MS 条件の検討を行った。

実験で用いた装置ではプリカーサーイオンの強度比はコーン電圧で、プロダクトイオンの強度比はコリジョンエネルギーでそれぞれコントロールすることが可能である。そこで、各 PCs について脱プロトン化分子が最も高いイオン強度を示すコーン電圧

と、3つのプロダクトイオンのうち [M-H-141]⁻ が6種すべての PCs からベースピークとして検出され、脱プロトン化分子と脱炭酸イオンがともに10%以上の強度比を示すコリジョンエネルギーをそれぞれ選択した (Table 2)。

UV-HPLC による定量法で用いた試料精製法では、クロマトグラムの再現性を確保するために、QMA カートリッジからの溶出液に HPLC の移動相を用いて試験溶液としている。しかし、LC/MS/

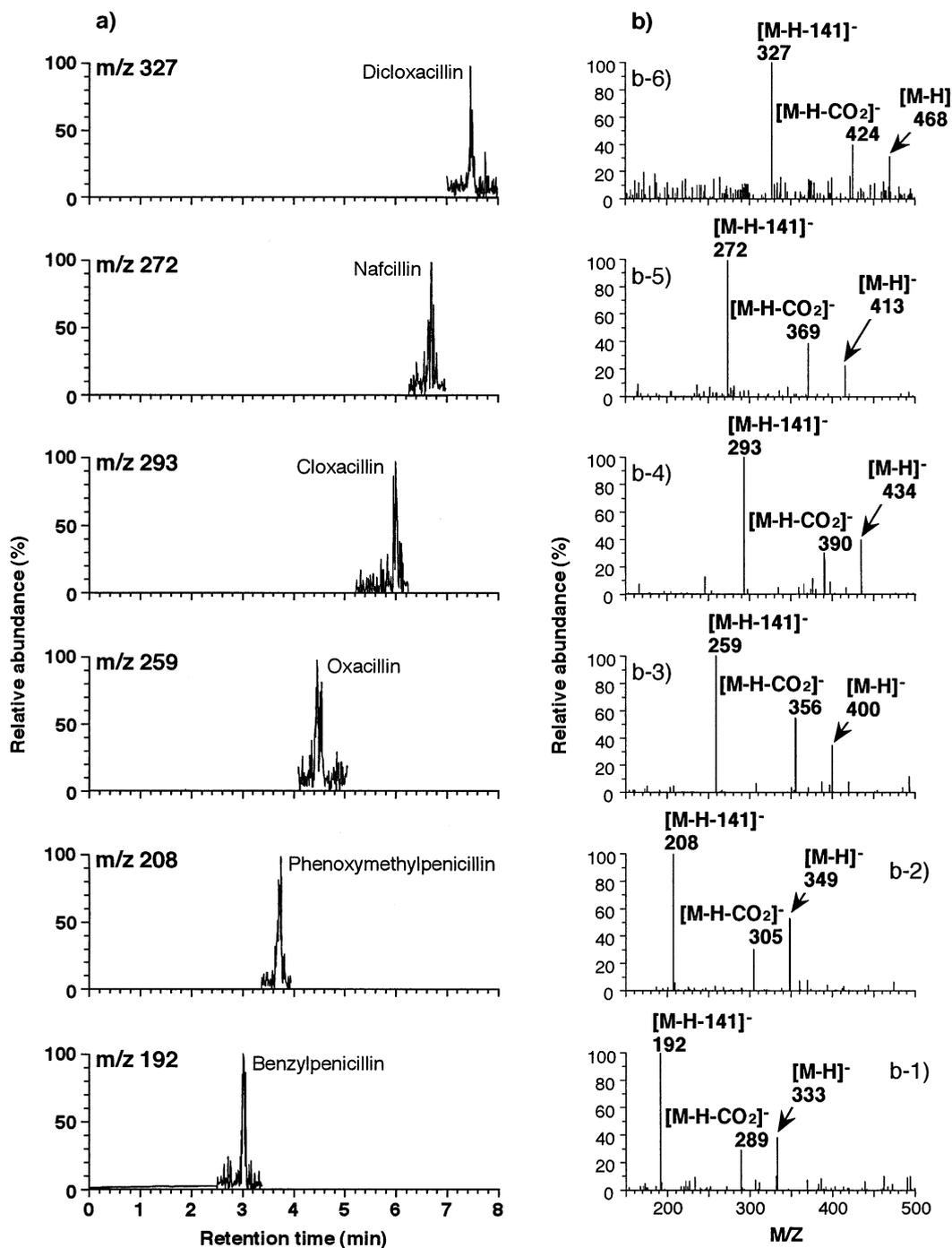


Fig. 3. ESI LC/MS/MS Analysis of Penicillins Fortified at a Concentration of 0.05 mg/kg in Bovine Kidney

(a) mass chromatograms monitored at $[M-H-141]^-$, (b) tandem mass spectra of penicillins recorded at the top of each peak on the mass chromatograms (a). (b-1) benzylpenicillin, (b-2) phenoxymethylpenicillin, (b-3) oxacillin, (b-4) cloxacillin, (b-5) nafcillin, (b-6) dicloxacillin.

MSに用いる移動相では、イオン強度が不足しPCsを溶出することができない。そこで、ジブチルアミンアセテートの濃度のみを変化させたところ、50 mM以上で6種のPCsは、95%以上溶出されたため、溶出液には50 mMのジブチルアミンアセテートを含んだ30%アセトニトリルを用いることとし

た。

以上のように検討した分析法について、市販の牛肉、肝臓及び腎臓を試料にPCGの残留基準値である0.05 mg/kgとなるよう6種のPCsをそれぞれ添加し、その適用性を確認した。各PCsのプロダクトイオンのうち $[M-H-141]^-$ をモニターして得ら

れた腎臓のマスキロマトグラムと各ピークトップから得られたタンデムマススペクトルを Fig. 3 に示した。これらは PCs 標準品のそれとよく一致し、またブランク試料からも分析の障害となるイオンは検出されなかった。本法の検出限界は、試料中の濃度として牛肉では 0.02 mg/kg、肝臓と腎臓では 0.02–0.03 mg/kg であった。このことから、WHO や FDA, EU そして日本において定められている PCs の残留基準値を越えるか、又はその付近の PCs が検出された食品について、本法を用いることにより精密に同定できることが証明された。

3. 総括

PCs の分析法と同様に、著者は化合物の化学的特性に基づいた試料精製法や LC 条件の詳細な検討により、食品中の TCs 及び SAs の分析法の確立にもそれぞれ成功している。したがって、上述の 3 種の抗菌性物質の定量分析は、UV-HPLC により薬物ごとに個別に実施され、その分析結果に疑義が生じた場合には、LC/MS/MS を用いて構造情報に基づいて精密に同定されることが可能となった。このシステムは保健所や衛生研究所などの既存の機器の利用が可能であることから、食品検査の量と質を向上できることが期待される。また今後他の様々な薬剤についての残留分析法が必要となるが、今回の一連の研究成果はその分析法開発の一助となる知見であると確信している。

謝辞 本研究を推進するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました岐阜薬科大学衛生学教室 永瀬久光教授に深く感謝申し上げます。さらに、本研究に際し、数々の助言と協力をいただきました愛知県衛生研究所 岡 尚男博士、同 猪飼誉友博士、同 近藤文雄博士、星薬科大学薬品分析化学教室 中澤裕之教授、東京都立衛生研究所 竹葉和江博士に厚くお礼申し上げます。

REFERENCES

1) Oka H., Ikai Y., Ito Y., Hayakawa J., Harada K.-I., Suzuki M., Odani H., Maeda K., *J.*

Chromatogr. B, **693**, 337–344 (1997).
 2) Nakazawa H., Ino S., Kato K., Waranabe T., Ito Y., Oka H., *J. Chromatogr. B*, **732**, 55–64 (1999).
 3) Ito Y., Ikai Y., Oka H., Kagami T., Takeba K., *J. Chromatogr. A*, **855**, 247–253 (1999).
 4) Ito Y., Ikai Y., Oka H., Matsumoto H., Kagami T., Takeba K., *J. Chromatogr. A*, **880**, 85–91 (2000).
 5) Ito Y., Ikai Y., Oka H., Matsumoto H., Miyazaki Y., Takeba K., Nagase H., *J. Chromatogr. A*, **911**, 217–223 (2001).
 6) Ito Y., Oka H., Ikai Y., Matsumoto H., Miyazaki Y., Nagase H., *J. Chromatogr. A*, **898**, 95–102 (2000).
 7) Gee H. E., Ho K. B., Toothill J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **79**, 640–644 (1996).
 8) Lihl S., Rehorek A., Petz M., *J. Chromatogr. A*, **729**, 229–235 (1996).
 9) Snippe N., van de Merbel N. C., Ruiter F. P. M., Steijger O. M., Lingeman H., Th. Brinkman U. A., *J. Chromatogr. B*, **662**, 61–70 (1994).
 10) Moats W. A., *J. Chromatogr.*, **593**, 15–20 (1992).
 11) Food Sanitation Law, Article No. 7, Law No. 233, December 24 (1947), Standards or Requirements of Foods or Additives, Ministry of Health and Welfare Notification, 28th December 1959, revised on 26th November 1999.
 12) Hormazabal V., Yndestad M., *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21**, 3099–3110 (1998).
 13) Blanchflower W. J., Hewitt S. A., Kennedy D. G., *Analyst*, **119**, 2595–2601 (1994).
 14) Hurtaud D., Delepine B., Sanders P., *Analyst*, **119**, 2731–2736 (1994).
 15) Ito Y., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Kagami T., *J. Chromatogr. A*, **810**, 81–87 (1998).
 16) Ikai Y., Oka H., Kawamura N., Yamada M., *J. Chromatogr.*, **477**, 397–406 (1989).
 17) Ikai Y., Oka H., Kawamura N., Hayakawa J., Yamada M., *J. Chromatogr.*, **541**, 393–400 (1991).