

食肉中に残留するβ-ラクタム系抗生物質の試験法検討

【化学衛生室】

古都一美、永瀬知美*

1 はじめに

動物用医薬品は、家禽などの畜水産物を疾病や寄生虫から守るために用いられ、その食品への残留については、食品衛生法で基準が定められている。

当所では、厚生労働省の通知試験法である「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」で行政検査を実施しているが、この方法では抽出中に物質が不安定となり分解される¹⁾、厚生労働省が示す妥当性評価ガイドラインに規定される回収率70%から120%が得られない²⁾等、検査が困難な動物用医薬品が存在する。

本調査では、抽出中に物質が不安定となり分解される等、検査が困難である抗菌性物質のうち、県内で飼育される家畜において使用頻度の特に高いβ-ラクタム系抗生物質を対象物質として、QuEChERS法³⁾と東京都健康安全研究センターの動物用医薬品抽出法を参考にした試験溶液調製フローを用いて4種類の抽出溶媒^{4) 5) 6)}により添加回収試験を実施したので報告する。

2 調査方法

(1) 試料

あらかじめ標的β-ラクタム系抗生物質(15種)が残留していないことを確認した鶏肉を用いた。試料の鶏肉に、試料中濃度0.1 μg/gとなるよう混合標準液を添加し、添加回収試験を行った。

(2) 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製
Agilent1100 シリーズ

質量分析装置：ABSciex 社製 API3000

(3) 方法

試験溶液の調製は、図1に示した方法により行った。

抽出溶媒は、0.5%ギ酸/アセトニトリル：メタノール(8:2)⁴⁾、1%ギ酸アセトニトリル⁵⁾、アセトニトリル⁵⁾、マキルベン(pH7)+0.1%ギ酸アセトニトリル⁶⁾の4種類を使用して実施した。

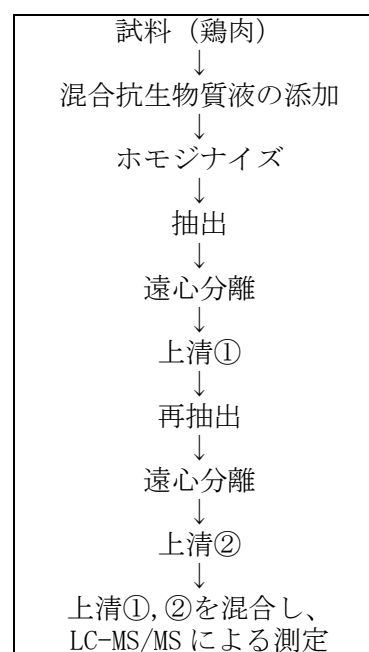


図1 試験溶液調整フロー

(4) LC-MS/MS 測定条件

液体クロマトグラフ質量分析装置による測定条件は、表1及び2により実施した。

表1 β-ラクタム系抗生物質のLC/MS/MS条件

HPLC 条件	Column	L-column 2 ODS (Chemicals Evaluation Research Institute)	
	Dimension	2.1 mm i.d. ×150 mm, 5 μm	
	Temperature	40°C	
	Flow Rate	0.2 mL/min	
	Mobile Phase	A: 0.05% Formic acid in Water	
		B: Acetonitrile	
	Gradient	0 min(A:B 95:5)→4 min(A:B 95:5)→15 min(A:B 10:90)→ 20 min(A:B 10:90)→25 min(A:B 95:5)→45 min(A:B 95:5)	
注入量	5 μL		
MS/MS 条件	イオン化方式	ESI	
	測定方法	MRM	
	Ion Spray voltage	(+)3500、(-)4000	
	Ion Source temp	(+)350、(-)350	

表2 β-ラクタム系抗生物質 (15種) のMRM測定条件

名称	測定 モード	モニターイオン		MS条件			
		プレカーサ イオン	プロダクト イオン	DP	FP	CE	CXP
アンピシリン	-	348	207	-26	-140	-18	-9
クロキサシリン	-	433	292	-21	-110	-16	-13
ジクロキサシリン	-	467	327	-21	-110	-18	-7
ナフシリン	-	413	271	-21	-120	-16	-13
フェノキシメチルペニシリン	-	349	208	-16	-120	-14	-1
ベンジルペニシリン	-	333	191	-21	-80	-14	-15
メシリナム	-	324	182	-26	-150	-18	-9
アスポキシシリン	+	494	250	76	130	27	10
セフォペラゾン	-	644	114	-21	-120	-28	-7
セフチオフル	-	522	126	-16	-110	-28	-9
セファレキシム	+	348	157	26	120	13	8
セファゾリン	+	455	323	46	240	15	14
セファピリン	+	424	292	31	170	21	16
セファロニウム	+	459	337	36	200	15	20
セフロキシム	+	447	386	36	200	17	22

3 結果

4 種類の抽出溶媒 0.5%ギ酸/アセトニトリル:メタノール(8:2)、1%ギ酸アセトニトリル、アセトニトリル、マキルベン(pH7)+0.1%ギ酸アセトニトリルの添加回収結果を表4に示す。

0.5%ギ酸/アセトニトリル:メタノール(8:2)で抽出した場合、4種類の抽出溶媒の中で回収率のばらつきがもっとも少なかった。1%ギ酸アセトニトリル、アセトニトリルでは回収率100%を超えるものが多く、また、マキルベン(pH7)+0.1%ギ酸アセトニトリルでは、全く回収できないものがあった。

β -ラクタム系抗生物質は構造内にアミド構造とカルボキシル基をもつ弱酸性高極性薬物⁶⁾であり、酸性条件下では分子型として存在する。この性質とpKaを考慮し、この4種類を選択した。

抗生物質によって回収されやすい溶媒とされにくい溶媒とが存在した。これは化学構造からの分類で同類とされる抗生物質の中でも、各物質の付属官能基によってpKaが異なり、分子型とイオン型の存在比が異なるため、添加回収率に差が生じたと考えられる。

また、アンピシリンの様にプロトン性極性溶媒(0.5%ギ酸/アセトニトリル:メタノール(8:2)、マキルベン)ではイオンが安定化し、抽出も安定するが、非プロトン性極性溶媒(アセトニトリル)では抽出が安定しないという物質特性も抽出に影響していると考ええる。

4 まとめ

鶏肉中の残留動物用医薬品試験法において、15種 β -ラクタム系抗生物質を対象にして抽出溶媒を検討した。抽出溶媒を0.5%ギ酸/アセトニトリル:メタノール(8:2)とした場合、15種の β -ラクタム系抗生物質のうち、8種類の物質で回収率40%から150%の回収率を得ることができた。

5 参考文献

- 1)岡尚男:LC/MS/MSによる食肉中のテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の同時分析,SCAS NEWS,3-6,2007-I
- 2)上村聖子、角谷直哉ら:LC/MS/MSによる魚介類・食肉・鶏卵中残留動物用医薬品スクリーニング分析法の検討,大阪市立環境科学研究所報告,第73集,39-44(2011)
- 3)Anastassiades, M., Lehotray., et al. AOAC Int., 86, 412_431(2003)
- 4)Takayuki, N., Takeo, S., et al. Food Hyg. Sci. 94 Vol. 53, No. 2(2012)
- 5)第48回全国衛生化学技術協議会年回(長野県)での東京都健康安全研究センターポスター発表
- 6)神田真軌、中島崇行ら:LC-MS/MSによる高極性動物用医薬品の一斉分析法と妥当性評価,第104回食品衛生学会での東京都健康安全研究センターポスター発表
- 7)河原さおり、内尾雅子ら:LC/MS/MSを用いた豚の組織中の β -ラクタム及びテトラサイクリン系抗生物質の同時分析,熊本市環境総合センター所報,43-48,平成20年度

表4 抽出溶媒種による添加回収試験結果の違い(n=2)

	溶媒の種類							
	0.5%ギ酸/アセトニトリル:メ タノール(8:2)		1%ギ酸アセトニトリル		アセトニトリル		マキルベン(pH7)+0.1%ギ 酸アセトニトリル	
	添加試料 No.1	添加試料 No.2	添加試料 No.1	添加試料 No.2	添加試料 No.1	添加試料 No.2	添加試料 No.1	添加試料 No.2
セフォペラゾン	126.0%	88.0%	641.0%	600.0%	450.0%	613.0%	109.0%	146.0%
セフチオフル	46.4%	82.7%	197.0%	221.0%	150.0%	172.0%	113.0%	125.0%
アンピシリン	105.7%	112.8%	102.0%	110.0%	76.6%	78.2%	97.1%	92.1%
クロキサシリン	51.4%	76.7%	188.0%	209.0%	147.0%	130.0%	73.3%	102.0%
ジクロキサシリン	67.5%	56.1%	201.0%	200.0%	138.0%	132.0%	103.0%	106.0%
ナフシリン	28.6%	71.0%	167.0%	172.0%	140.0%	131.0%	67.7%	82.9%
フェノキシメチルペニシリン	88.2%	84.3%	118.0%	118.0%	100.0%	95.5%	0.0%	0.0%
ベンジルペニシリン	60.9%	71.5%	96.8%	100.0%	91.8%	84.8%	0.0%	0.0%
メシリナム	105.8%	137.7%	262.0%	251.0%	92.7%	93.2%	125.0%	136.0%
セファゾリン	47.1%	53.4%	181.0%	204.0%	78.4%	120.0%	7.3%	0.0%
セファピリン	51.2%	54.6%	112.0%	103.0%	107.0%	97.6%	40.0%	21.2%
セファロニウム	9.5%	18.3%	177.0%	277.0%	75.2%	178.0%	58.0%	0.0%
セフロキシム	58.8%	52.0%	169.0%	180.0%	99.7%	101.0%	32.9%	15.7%
アスポキシシリン	21.4%	19.9%	90.2%	98.8%	88.5%	90.2%	0.0%	0.0%
セファレキシシ	60.2%	60.3%	102.0%	102.0%	66.3%	66.9%	91.9%	80.3%