

鶏肉及び牛肉中のβラクタム系抗生物質の 簡便な一斉分析法の検討

服部 涼子* 後藤 操 川元 達彦 吉田 昌史

Studies on a Simple Simultaneous Determination for β Lactams in Chicken and Bovine Muscles

Ryoko HATTORI*, Misao GOTO, Tatsuhiko KAWAMOTO and Masashi YOSHIDA

Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple simultaneous determination applied QuEChERS methods using LC·TOF/MS was developed for β Lactams in chicken and bovine muscles. The 1 g sample was extracted with 2 mL water and 8 mL acetonitrile and cleaned up by dispersive column solid-phase extraction using the lipid removal agent, Zsep/C₁₈ (1 : 1, w/w) 500 mg. Conditioning dispersive columns by acidic acetonitrile, the antibiotics were prevented from absorbing to the bulking agents and the recovery rate increased by 22~69%.

Recoveries (n=5) fortified in samples at the levels of 0.05 µg/g was 84.9%~119.8%. The limits of quantification were less than the residue standard. The sample preparation time required of this method was about 30 minutes, and it was less than 1/2 of the official methods. This result showed that the method is suitable for rapid screening of 7 β Lactams in chicken and bovine muscles.

I はじめに

βラクタム系抗生物質は、畜産動物の疾病治療薬あるいは予防薬として多用されている。全国食肉衛生検査所協議会の調査によると2007年~2012年の、と畜検査において筋肉及び内臓部位での残留事例があり、最多のテトラサイクリン系抗生物質に次いで多い¹⁾。βラクタム系抗生物質は副作用としてアナフィラキシーショックを起こすことがあり²⁾、摂取による人への健康被害が危惧されるため、流通食品中の残留を迅速に探知できる分析法の開発が求められている。一方、βラクタム系抗生物質は幅広い極性と異なる酸解離定数(pKa)を示し、易分解

性であるなど不安定な性質を有することから多成分一斉分析が困難とされている。現在、一部の成分は通知試験法³⁾のうち、HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法や個別試験法の対象となっているが、多くの成分では公定法が定められていない。

本研究では、βラクタム系抗生物質の一斉分析法の開発を目的として、簡便で工程数の少ないQuEChERS法を用い、分散固相抽出において精製効率を上げるために、脂質除去剤であるC₁₈樹脂に加えて新たにZ-sepを充填した固相⁴⁾について検討した。また、測定はLC/TOF·MSにより行った。さらにβラクタム系抗生物質が不安定であることから対象成分と化学的性状が同一である安定同位元素標識標準品(以下、サロゲートとする)を用いた内部標準法により添加回収試験を行った。その結果、極性の異なるβラクタム系抗生物質7成分について良好な結果を得ることができたので報告する。

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 服部 涼子

II 材料と方法

1. 試料

試料には、市販品の鶏肉及び牛肉を用いた。

2. 標準品

アンピシリン（以下、ABPCとする）は関東化学工業（株）製のアンピシリン三水和物、クロキサシリン（以下、MCIPCとする）はRedel-de Haën社製のクロキサシリンナトリウム一水和物、フェニチシリン（以下、PEPCとする）はSIGMA製のフェネチシリンカリウム塩、セフトオフル（以下、CTFとする）はファイザー（株）製のセフトオフル、セファゾリン（以下、CEZとする）は林純薬工業（株）製のセファゾリンナトリウム塩、セフロキシム（以下、CXMとする）は和光純薬工業（株）製のセフロキシムナトリウム塩、セフォペラゾン（以下、CFPZとする）は和光純薬工業（株）製のセフォペラゾンナトリウム塩を用いた。各抗生物質の化学構造式、極性の指標となるオクタノール/水分配係数（ $\text{Log}P_{ow}$ ）及びpKaをFig. 1に示した。

サロゲートのうち、アンピシリン-d₅（以下、ABPC-d₅とする）は林純薬工業（株）製、セフロキシム-d₃（以下、CXM-d₃とする）はTRC（株）製を用いた。各サロゲートの化学構造式をFig. 2に示した。

3. 標準溶液の調製

各標準品及びABPC-d₅は、メタノール/水（1:1, v/v）に溶解してそれぞれ100 µg/mLの標準原液とした。さらに希釈して5 µg/mLの混合標準溶液及びABPC-d₅標準溶液として4°Cで保存した。CXM-d₃はメタノールに溶解して100 µg/mLのCXM-d₃標準原液とし、さらに希釈して5 µg/mLのCXM-d₃標準溶液として-20°Cで保存した。分析時に各標準溶液を精製水により用時希釈して分析用標準溶液及び添加用標準溶液として用いた。

4. 試薬等

アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業（株）製のHPLC用を用いた。その他の試薬は全て和光純薬工業（株）製の特級を用いた。脂質除去剤にはZ-sep、Z-sep+及びDiscovery-C18を用いた（全てSUPELCO製）。分散固相として15 mLポリプロピレン製遠心管に、Z-sep+を500 mg、Z-sep+及びDiscovery-C18を500 mg（1:1, w/w）

（以下、Z-sep/DSC-C18とする）を充填した。固相のコンディショニングとして0.5%クエン酸/アセトニトリル 1 mLあるいは1.0%ギ酸/アセトニトリル 1 mLを分注後、十分に混和し、浸潤させることとした。

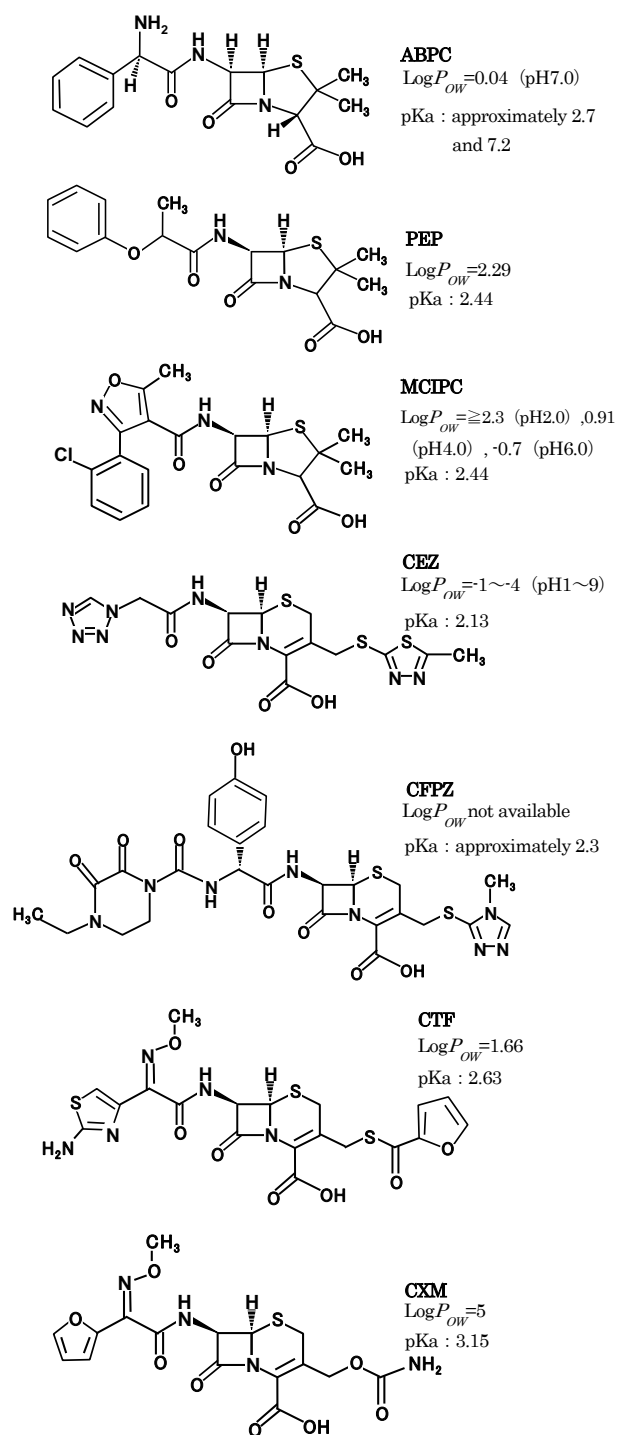


Fig. 1 Chemical structures, $\text{Log}P_{ow}$ and pKa of 7 β Lactams

5. 試験溶液の調製

Fig. 3に示す手順で行った。なお添加回収試験では、添加用混合標準溶液は、試料中濃度が0.05 µg/gとなるように調製した。

6. 装置

LC/TOF-MS装置：アジレントテクノロジー（株）製

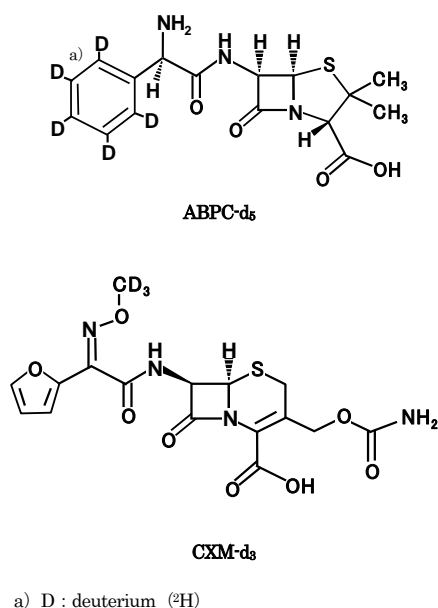


Fig. 2 Chemical structures of ABPC-d₅ and CXM-d₃

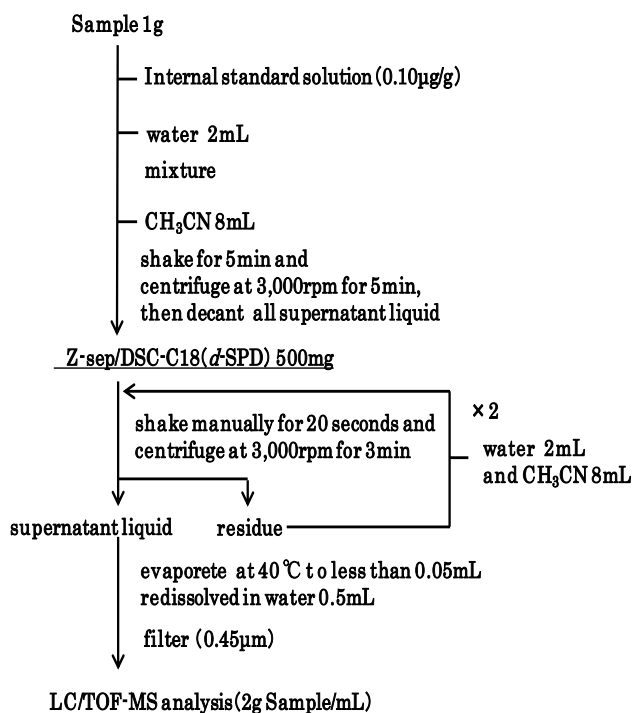


Fig. 3 Sample preparation flow

Agilent 1200LC+6210 MSD-TOF

遠心分離器：久保田商事(株)製KUBOTA8700

フードプロセッサ：松下電器産業(株)製National MK-K58

7. 分析条件

7.1 LC条件

分析カラム：(株)資生堂製CAPCELL PAK C18 MG III (2.0 mm × 150 mm, 5 µm), ガードカラム：(株)

資生堂製 MGIIIカートリッジ (2.0 mm × 10 mm, 5 µm), 移動相：A) 0.1%ギ酸, B) アセトニトリル, グラジエント条件：A:B = 99:1 (0分) → 0:100 (15分) → 0:100 (18分), 流速：0.25 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：20 µL, カラム温度：40°C, サンプルクーラー温度：15°C

7.2 MS条件

ネブライザーガス：35 psi, 乾燥ガス：11 L/min (350°C), イオン化法及びキャピラリー電圧：ESI (Positive及びNegative, 4000 V), リファレンスマス： m/z 121.0508, 922.0097

定量イオン及び確認イオンはTable 1に示す精密質量とした。

III 結果及び考察

1. HPLC移動相条件の検討

移動相に用いる有機溶媒は、測定時にβラクタム系抗生物質の安定性が高い⁵⁾アセトニトリルとした。水系溶液には報告例のある0.1%ギ酸水溶液⁵⁻⁹⁾, 20 mMギ酸アンモニウム水溶液¹⁰⁾, 20 mM酢酸アンモニウム水溶液¹¹⁾を比較した。今回、ポリマーコート型分析カラムを用い、塩基性移動相の使用が可能であったため、アミノ基を有する極性の高いABPCに対して塩基性移動相条件下でイオン化抑制することで感度が向上した報告¹²⁾をもとに20 mM重炭酸アンモニウム水溶液(pH8.0)も加えて検討した。標準溶液1.0 µg/mLの各成分のクロマトグラフのピーク面積値 (n=2) を比較した結果、0.1%ギ酸水溶液ではABPC, PEPC, MCIPC, CEZ及びCXM, 20 mM重炭酸アンモニウム水溶液(pH 8.0)ではCTF, 20 mMギ酸アンモニウム水溶液ではCFPZが最も高くなった。0.1%ギ酸水溶液はCTF及びCFPZにおいても比較的高かったことから本法において0.1%ギ酸水溶液を用いることとした。

MSはESI法において感度が高く、定量性を有し、妨害ピークが出現しない測定モードとした。各分析パラメータをTable 1に示す。以上の条件をもとに測定した結果、各成分の精密質量が整数値で明確に異なっていたため、各標準溶液において良好なクロマトグラムが検出された (Fig. 4)。

2. 前処理法の検討

2.1 前処理条件の選択

βラクタム系抗生物質の残留分析においてC₁₈ミニカラム固相^{6,7)}による脱脂後にポリマー系ミニカラム固相抽出を組み合わせた方法、近年ではQuEChERS法^{5,8)},

Table 1 LC-TOF/MS parameters

Analyte	mode	R.T. ^{a)} (min.)	Target ion (<i>m/z</i>)	Frag. ^{b)}	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Frag. ^{b)}
ABPC	posi	8.96	350.1169	100V	350.1169	250V
PEPC	posi	14.28	365.1166	100V	365.1166	250V
CEZ	posi	10.66	455.0373	100V	323.0563	100V
CFPZ	posi	11.54	646.1497	100V	646.1497	250V
CTF	posi	12.13	524.0363	100V	256.9942	100V
CXM	nega	11.16	423.0605	100V	362.0441	100V
MCIPC	nega	14.49	390.0674	100V	434.0583	100V
ABPC-d ₅	posi	8.95	355.1489	100V	355.1489	250V
CXM-d ₃	nega	11.14	426.0804	100V	426.0804	250V

a) R.T.: Retention Time

b) Frag.: Fragmenter voltage

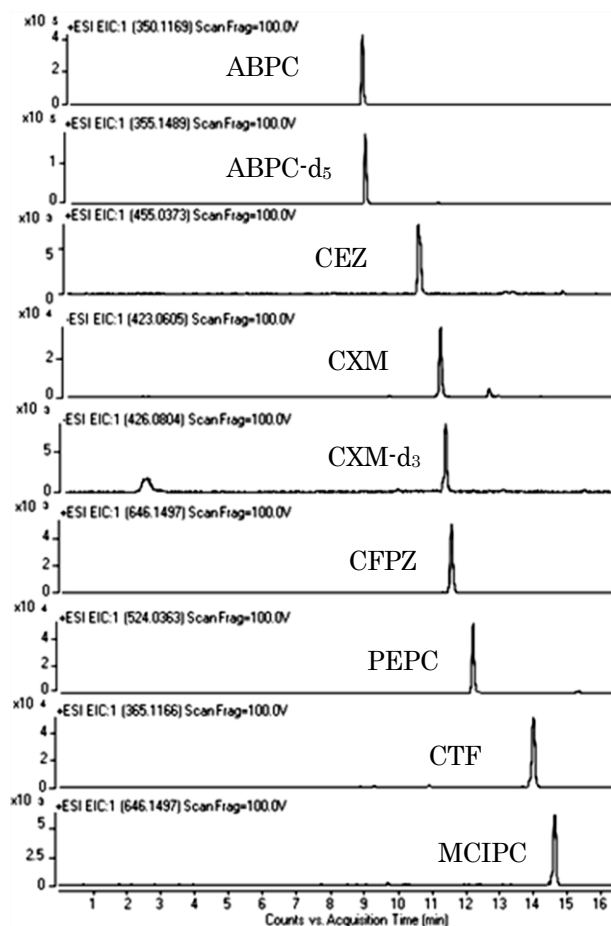


Fig. 4 Chromatograms of β Lactams standard solution (0.1 $\mu\text{g/mL}$)

QuEChERS法に液液抽出¹³⁾ あるいはミニカラム固相抽出⁹⁾ を組み合わせた方法等が報告されている。ポリマー系ミニカラム固相は今回対象とした成分の公定法³⁾ であ

る、一斉試験法Ⅱ及び個別試験法においても採用されており、高い精製効果がある。しかし、高極性の β ラクタム系抗生物質を分析する際は、カラムへの成分保持向上のためにpH調整が必要となり、抽出液の緩衝液への転溶、塩の除去操作があるため工程が多くなる。また、固相の平衡化・洗浄・溶出に時間を要する。本研究では β ラクタム系抗生物質の性質を考慮し、Katerina M.らの方法⁵⁾ を参考に工程数が少なく、簡便であるQuEChERS法を採用した。また、QuEChERS法の場合、精製が平易となることから、今回精製に用いる分散固相には新型の脂質除去剤である、Z-sep/DSC-C18あるいはZ-sep+を検討した。Z-sep/DSC-C18は、ジルコニア (ZrO_2) が化学結合したシリカゲルであるZ-sep及びC18樹脂の混合物であり、Z-sep+は ZrO_2 及びC18が化学結合したシリカゲルである。Z-sep/DSC-C18及びZ-sep+はともに、物質の非共有電子対に結合する ZrO_2 のルイス酸作用により親水性脂質夾雑物を、さらにC18の疎水性結合により疎水性脂質夾雑物を除去するため、高い脂質除去効果を有するとされている。

2.2 試料からの抽出条件の検討

β ラクタム系抗生物質の抽出効率が良好とされる条件⁵⁾ である、食肉試料1 gに対して水2 mLを加え、混和後アセトニトリル8 mLを加え、振とうする方法を用いた。

2.3 分散固相抽出の条件検討

条件検討には、混合標準溶液0.1 $\mu\text{g/mL}$ を添加した牛肉の抽出液(以下、標準添加牛肉抽出液とする)を用い、Z-sep/DSC-C18あるいはZ-sep+により精製後、測定した。

2.3.1 固相コンディショニングの有効性

分散固相がコンディショニング未処理の場合、全対象

Table 2 β Lactams recoveries obtained in bovine extracted solution samples fortified at 0.10 $\mu\text{g/g}$ ^{a)}

Analyte	Recovery (%) ^{b)}					
	1.0 % formic acid /acetonitrile		0.5 % citric acid /acetonitrile		1.0 % ammonium formate/methanol	
ABPC	111.5	(2.9)	98.5	(4.9)	158.6	(21.2)
PEPC	119.4	(8.1)	160.5	(2.0)	134.8	(17.7)
CEZ	98.2	(10.3)	133.9	(7.6)	99.1	(15.2)
CTF	114.5	(8.6)	135.4	(2.6)	134.4	(5.4)
CFPZ	96.8	(6.0)	143.2	(13.8)	148.0	(1.7)
MCIPC	79.3	(9.2)	133.9	(10.2)	100.9	(10.2)
CXM	98.8	(3.4)	103.8	(4.3)	100.3	(6.7)

a) 200 μL of standard solution (0.5 $\mu\text{g/mL}$) was added to 10 mL bovine extracted solution sample

b) correction value by surrogate, (): CV%, n=3

Table 3 β Lactams recoveries obtained in chicken muscle and bovine muscle fortified at 0.05 $\mu\text{g/g}$ ^{a)}

Analyte	Recovery (%) ^{b)}			
	chicken muscle		bovine muscle	
ABPC	98.7	(3.0)	103.9	(9.2)
PEPC	93.8	(7.1)	84.9	(10.9)
CEZ	116.4	(14.4)	102.1	(7.3)
CFPZ	107.2	(8.5)	119.8	(11.3)
CTF	111.5	(16.3)	95.3	(15.5)
CXM	98.3	(8.7)	99.2	(5.6)
MCIPC	112.9	(15.2)	96.4	(9.8)

a) 200 μL of standard solution (0.25 $\mu\text{g/mL}$) was added to 1.0 g samples

b) correction value by surrogate, (): CV%, n=5

Table 4 LOQ and residue standard of chicken muscle and bovine muscle for 7 β Lactams

Analyte	chicken muscle		bovine muscle	
	LOQ ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}	residue standard ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}	residue standard ($\mu\text{g/g}$)
ABPC	0.02	0.02	0.03	0.03
PEPC	0.02	— ^{b)}	0.02	— ^{b)}
CEZ	0.02	— ^{b)}	0.03	0.05
CFPZ	0.03	0.3	0.03	0.04
CTF	0.02	— ^{b)}	0.02	1.00
CXM	0.04	— ^{b)}	0.02	0.02
MCIPC	0.05	— ^{b)}	0.02	0.02

a) LOQ: Limits of Quantification defined by $S/N \geq 10$

b) —: not detected

成分で十分な回収率が得ることができなかった。原因の一つに対象成分中のカルボキシル基に対するZrO₂のルイス酸作用による対象成分の充填剤への吸着が推察された。この吸着を防ぐために酸性溶液中のカルボキシル基によるZrO₂の被覆が必要と考えられたため、コンディショニングとして固相に酸性溶液を浸潤させることとした。酸性溶液には、1.0%ギ酸/アセトニトリル、0.5%クエン酸/アセトニトリル、1.0%ギ酸アンモニウム/メタノールを用いた。その結果、Z-sep/DSC-C18及びZ-sep+により精製を行った、全対象成分において絶対検量線で求めた回収率がコンディショニング未処理の場合と比較して22~69%増加した。

2.3.2 固相充填剤の選定

2.3.1の検討試験において3つの酸性溶液でコンディショニング済みのZsep/DSC-C18及びZsep+により精製した全対象成分の絶対検量線で求めた回収率を比較したところ、Zsep/DSC-C18では一部を除き、Zsep+と比較して1.07~2.5倍高かった。このため固相充填剤はZsep/DSC-C18とした。

2.3.3 固相コンディショニング溶液の選定

固相コンディショニング溶液を選定するにあたり、サロゲートによる内部標準法によりコンディショニング溶液ごとの回収率を求めた。

・内部標準物質の検討

今回用いたサロゲートのうちABPC-d₅は2.3.1の検討試験において、絶対検量線で求めた回収率 (n=3) が低い傾向であった。ABPC-d₅の3つのコンディショニング溶液ごとの絶対検量線で求めた回収率は、0.5%クエン酸/アセトニトリルでは、44.7%、52.3%、56.6%、1.0%ギ酸/アセトニトリルでは、34.3%、41.3%、42.9%、1.0%ギ酸アンモニウム/メタノールでは7.4%、34.6%、36.2%であり、0.5%クエン酸/アセトニトリルの場合のみ厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン¹⁴⁾に定めるサロゲートの回収率の目標値40%を満たした。ABPC-d₅の同位体であるABPCについても同様な挙動を示したため、ABPC-d₅はABPCのみを補正することとした。一方でCXM-d₃は全てのコンディショニング溶液においてガイドラインの目標値を満たしていた。CXM-d₃はABPC以外の成分を補正することとした。ABPCの分析には固相のコンディショニングに0.5%クエン酸/アセトニトリルを用いることとした。

・固相コンディショニング溶液ごとの回収率

サロゲートによる内部標準法で求めたコンディショニング溶液ごとの回収率を求めた (Table 2)。

ABPCについては前項で選定した0.5%クエン酸/アセトニトリルでは、平均回収率は98.5±4.9% (n=3) と良

好な値であった。

ABPC以外の成分については、1.0%ギ酸/アセトニトリルでは79.3%~119.4%であり、良好な値となったが、0.5%クエン酸/アセトニトリル及び1.0%ギ酸アンモニウム/メタノールでは、120%を超える成分があり、安定しなかった。この原因として0.5%クエン酸/アセトニトリル及び1.0%ギ酸アンモニウム/メタノールによるコンディショニングの場合、内部標準であるCXM-d₃の有するカルボキシル基にZsepのルイス酸作用がコンディショニング溶液と比較してより強く働いたためCXM-d₃がより多く吸着するとともに回収率が低下し、対象成分の回収率が相対的に高くなったことが示唆された。これらのことから固相のコンディショニングにはABPC以外の成分については、1.0%ギ酸/アセトニトリルをABPCには、0.5%クエン酸/アセトニトリルを用いることとした。

3. 添加回収試験

サロゲートを用いた内部標準法により求めた平均回収率 (n=5) は、0.05 µg/g添加時において、鶏肉で93.8%~116.4% (RSD : 3.0%~16.3%)、牛肉で84.9%~119.8% (RSD : 5.6%~15.5%) と良好な結果であった (Table 3)。本法の定量下限値は、鶏肉で0.02~0.05µg/g、牛肉で0.02~0.03µg/gであり、残留基準値設定のある成分については、全て基準値よりも低い値となった (Table 4)。

4. Zsep/DSC-C18固相の精製効果

分散固相にZsep/DSC-C18を用いた場合、標準添加試料から抽出した試験溶液中のCEZ、CFPZ、CTFのクロマトグラム上において、C₁₈樹脂では検出された夾雑ピークが消失した。このことからZsep/DSC-C18はC₁₈樹脂と比較して夾雑物の除去効果があり、より高い精製効果があることが明らかとなった。

5. 公定法と所要時間の比較

本法は、公定法³⁾である一斉試験法Ⅱ及び個別試験法と比較して前処理操作が簡便で、所要時間は1検体あたり約30分であり、各公定法の1/2以下程度とすることができた。

IV 結 論

βラクタム系抗生物質7成分についてLC/TOF-MSを用いたQuEChERS法による簡便な一斉分析法を開発した。対象成分は異なる極性を有していたが、1.0%ギ酸/アセトニトリルあるいは0.5%クエン酸/アセトニトリルによ

りコンディショニングしたZsep/DSC-C18を用いることで、回収率が最も安定することが明らかとなった。また、本法は前処理操作を迅速に行うことが可能で、鶏肉及び牛肉を試料とした添加回収試験において良好な回収率を示し、各成分の定量下限値は残留基準値が設定されている成分については、基準値を下回った。これらのことから迅速なスクリーニング法として、早期の違反食肉の探知に役立てることが可能と考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団並びに情報提供にご協力頂きました兵庫県健康福祉部健康局生活衛生課、兵庫県食肉衛生検査センターの関係者の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) 全国食肉衛生検査所協議会理化学部会：平成 25 年度理化学部会調査研究事業報告，p. 2，全国食肉衛生検査所協議会事務局（2014）
- 2) 動物用医薬品専門調査会通知：動物用医薬品に係る食品健康影響評価について。平成 19 年 5 月 29 日，府食第 511 号（2007）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について。平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号別添（2005）
- 4) 杉立ら，第 40 回日本農薬学会講演要旨集，p. 102（2015）東京
- 5) Katerina, M. and Alan, R. : Streamlining methodology for the multiresidue analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry . *Journal of Chromatography A*, **1202**, 118-123 (2008)
- 6) 藤田ら，全国衛生化学技術協議会年会講演集，p. 42（2009）岩手
- 7) 仙台市食肉衛生検査所：平成 23 年度調査研究，p. 5-8，仙台市食肉衛生検査所（2011）：
http://www.city.sendai.jp/shoku/_icsFiles/afieldfile/2015/10/05/chousa_23.pdf
- 8) C.P. Rezenda, M. P. Almeida, R. B. Brito, C.K. Nonaka and M.O. Leite : Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of β -lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle. *Food Additives and Contaminants*, **29**, 541-549 (2012)
- 9) C. A. Macarov, L. Tong, M. Martínez-Huélamo, M. P. Hermo, E. Chirila, Y. X.Wang, D.Barrón, J. Barbosa : Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, bovine, porcine and chicken muscle, by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, **135**, 2612-2621 (2012)
- 10) Chayada, C. Urairat, K. Soparat, Y. Natchanun, L. : Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Analytica Chimica Acta*, **682**, 117-129 (2010)
- 11) 梶田ら，日本獣医師会学会年次大会講演要旨集，p. 315（2008）岩手
- 12) 仙台市食肉衛生検査所：平成 17 年度調査研究，p. 6-8，仙台市食肉衛生検査所（2005）：
http://www.city.sendai.jp/shoku/_icsFiles/afieldfile/2015/10/05/chousa_17.pdf
- 13) Bjorn, J. A. B., Henk, W.G., Robin, S. W., Steven L., Ralph, V. S., Alida, A.M.S., Michel, W. F. N. : Comprehensive analysis of β -lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins, and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **405**, 7859-7874 (2013)
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について。平成 22 年 12 月 24 日，食安発 1224 第 1 号（2010）
(平成28年3月24日受理)