

31. 食肉中のβラクタム系抗生物質による健康被害防止を 目的とした迅速な一斉分析法の開発

○服部涼子¹、川元達彦¹、稲田忠明^{2,3}、玉木 洋^{4,5} (¹兵庫県立健康生活科学研究所、²旧所属：兵庫県立健康生活科学研究所、³現所属：兵庫県健康福祉部健康局薬務課、⁴旧所属：兵庫県健康福祉部健康局生活衛生課、⁵現所属：兵庫県洲本健康福祉事務所)

【目的】

βラクタム系抗生物質は、ヒト用医薬品として呼吸器感染症、外傷の二次感染等種々の細菌感染症の治療に古くから使用されてきた。畜産動物においてもβラクタム系抗生物質は、呼吸器感染症、乳房炎等の細菌感染症治療薬あるいは予防薬として広く用いられている。一方で、本薬剤により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、本薬剤が残留した食肉、牛乳の摂取による有症例も報告されている。全国食肉衛生検査所協議会の調査によると、平成19年～平成24年で市場に流通する前のと畜検査において毎年残留事例があり、最多のテトラサイクリン系に次いで多い結果となっている。これらのことから本薬剤が残留した食肉による健康被害の発生が危惧される。食肉への医薬品残留は、畜産動物への医薬品投与後の休薬期間を逸脱する等の不適正使用が主な原因であるが、薬剤耐性菌出現の要因にもなるため、現場での慎重な使用管理が重要である。また、早期流通阻止を行うために、探知の手段として医薬品残留検査の段階での一斉分析法の開発が必要である。

βラクタム系抗生物質は幅広い極性と異なるpKa(2～9)を示すことから多成分一斉分析が困難とされている。現状として、単一成分あるいは系統別に幾つかのβラクタム系抗生物質の分析法が公定法として通知されているのみである。本研究では、βラクタム系抗生物質のうち、公定法において異なる試験法で対象となっている4成分及び公定法が定められていないアンピシリン及びフェニチシリンを対象とした一斉分析法の開発を検討した。また、βラクタム系抗生物質が分解しやすい性質であることを考慮し、前処理法として試料から短時間で脱脂・抽出・精製・測定を行うためにQuEChERS法を実施するとともに、新型の脂質除去剤であるZ-sep及びC₁₈を組み合わせた分散型固相¹⁾による脱脂を行った。測定には、より特異的に精密質量を検出でき、選択性の優れた高速液体クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析装置(以下、LC/TOF-MSとする)を用いた。

【方法】

1. 標準品

ペニシリン系のうち、アンピシリン(ABPC)及びクロキサシリン(MCIPC)はFluka製、フェニチシリン(PEPC)はSIGMA製、セファロスポリン系のうち、セフチオフル(CTF)はファイザー(株)製、セファゾリン(CEZ)は林純薬工業(株)製、セフロキシム(CXM)は和光純薬工業(株)製を用いた。各標準品は10.0mgを精秤し、メタノール/水(1:1、v/v)100mLに溶解して100μg/mLの標準原液とした。

2. 安定同位元素標識標準品

アンピシリン-d₅ (ABPC-d₅) は林純薬工業(株)製、セフロキシム-d₃ (CXM-d₃) は TRC(株)製を用い、上記と同様に調製した。セフロキシム-d₃ はメタノール/水 (1:1, v/v) に溶かすと分解が進行したため 100%メタノールに溶解後、分析時まで-20℃で保存した。

3. 試薬等

試薬は全て和光純薬(株)製を用いた。固相充填剤に用いた Z-sep、Discovery-C18 (C₁₈ 充填剤、以下、DSC-C18 とする) 及び Z-sep+は全て SUPELCO 製を使用した。Z-sep 及び DSC-C18 は、15mL ポリプロピレン製遠心管に重量比で 1:1 となるように 500mg 分取したものをを用いた (以下、Z-sep/DSC-C18 とする)。Z-sep+も同様に 500mg 用いた。

4. 試料

試料として用いた鶏肉及び牛肉は市販品を用いた。

5. 試験溶液の調製

試料 1g に内部標準物質としてアンピシリン-d₅ 及びセフロキシム-d₃ (以下、各 d 体とする) を 0.1 μg/g となるように添加後、水を 2 mL 加えて手動により混和した。次にアセトニトリルを 8 mL 加えた後、5 分間振とうし、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。あらかじめ 1.0%ギ酸アセトニトリル溶液 1mL を浸潤させた Z-sep/DSC-C18 に試料抽出液の上清を全量デカンテーション後、20 秒間手動により混和し、3,000 rpm で 3 分間遠心分離後、上清を全量 50mL ナス型フラスコに分取した。分散型固相に、水 2mL、アセトニトリル 8 mL を加えて洗浄し、上記と同様に混和・遠心分離を行った。この操作を 2 回繰り返す、得られた上清液を全て 50mL ナス型フラスコに回収した。試料液の全量が 0.05mL 以下となるまで 40℃で減圧濃縮後、水 0.5mL に転溶した。0.45 μm フィルターにより濾過後、試験溶液とした。

6. 装置及び測定条件

装置 : Agilent 社製 1200LC+6210MSD-TOF

分析カラム : SHISEIDO 社製 CAPCELL PAK C₁₈ MGIII (2.0mm×150mm、5 μm)

ガードカラム : SHISEIDO 社製 MGIII カートリッジ (2.0mm×10mm、5 μm)

移動相 : A) 0.1%ギ酸、B) アセトニトリル A:B=99:1 (0 分) → 0:100 (15 分) → 0:100 (18 分)

流速 : 0.25mL/min カラム温度 : 40℃ 注入量 : 20 μL

イオン化法及びキャピラリー電圧 : ESI (Positive 及び Negative、4000V)

定量イオン及び確認イオン : 表 1 のとおり リファレンス *m/z* : 121.0508、922.0097

【結果及び考察】

1. HPLC 移動相条件の検討

有機溶媒には、測定時の βラクタム系抗生物質の安定性が高いとされる²⁾ アセトニトリルを用いた。水系溶離液には、報告例の多い 0.1%ギ酸水溶液、20 mM ギ酸アンモニウム水溶液、20 mM 酢酸アンモニウム水溶液を検討した。また本研究ではシリコン重合体でシリカゲル表面が被覆

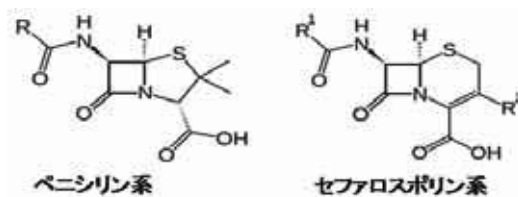


図 1 βラクタム系抗生物質の化学構造式

表 1 対象成分の分析パラメータ

対象成分	測定モード	保持時間(分)	定量イオン	フラグメンター電圧	確認イオン	フラグメンター電圧
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
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

されたポリマーコート型分析カラムを用いた。このため、アルカリ性移動相においてシリカゲルの溶解を防げることから、仙台市食肉衛生検査所の報告³⁾を参考にアルカリ条件である 20 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH8.0) も検討した。各水系溶離液における各成分 1.0 μ g/mL のクロマトグラフのピーク面積値 (n=2) を比較した結果、セフチオフルのみ 20 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH8.0) において最も高い感度を示したが、その他の 5 成分においては 0.1% ギ酸水溶液を用いた場合、他の溶離液と比較してピーク面積値が 2~10 倍高かった。このことから、水系溶離液には 0.1% ギ酸水溶液を採用し、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。以上の条件をもとに各標準溶液 (1.0 μ g/mL) を測定したところ、図 2 に示すとおり、検出ピークは良好に分離され、各試料のブランク試験溶液からは対象成分のピークの保持時間の前後 0.5 分間に妨害ピークは検出されないことが分かった。

2. 精製条件の検討

β ラクタム系抗生物質の残留分析における前処理には、限外ろ過膜、C₁₈ カラムあるいはヘキサン液抽出による脱脂後に HLB カラムによる精製、また近年では C₁₈ 樹脂を用いた分散型固相による QuEChERS 法²⁾等、多数の報告がある。本研究では、Katerina M. らの方法²⁾を参考に、C₁₈ 樹脂ではなく、Z-sep/DSC-C18 あるいは Z-sep+を用いた QuEChERS 法を試みた。Z-sep/DSC-C18 はシリカゲルにジルコニア (ZiO) が結合した Z-sep と C₁₈ 樹脂の混合物であり、Z-sep+はシリカゲルに ZiO 及び C₁₈ がともに化学結合した充填剤である。これらの充填剤は ZiO がルイス酸作用により親水性脂質夾雑物を、C₁₈ が疎水性結合により疎水性脂質夾雑物を保持するため、いずれの性質の脂質夾雑物に対しても高い除去効果を示すとされている。

試料からの目的成分の抽出にはアセトニトリルによる除タンパク質効果があり、 β ラクタム系抗生物質の抽出効率が良好²⁾とされる食肉試料 1g に対して水 2mL 及びアセトニトリル 8mL を用いる条件を適用した。この方法により抽出した牛肉の抽出液を用いて精製条件を検討したところ、分散型固相に直接抽出液の上清を添加すると全対象成分において十分な回収率が得られなかった。この原因の一つとして対象成分が有するカルボキシル基の Z-sep+及び Z-sep の ZiO への保持が考えられた。この現象を抑制するために ZiO をあらかじめ酸性溶液のカルボキシル基で被覆することが必要と考え、コンディショニングとして固相 500 mg に対して 1 mL の酸性溶液を浸潤させることとした。

酸性溶液には、ルイス塩基作用が異なる 1% ギ酸アセトニトリル溶液、0.5% クエン酸アセトニ

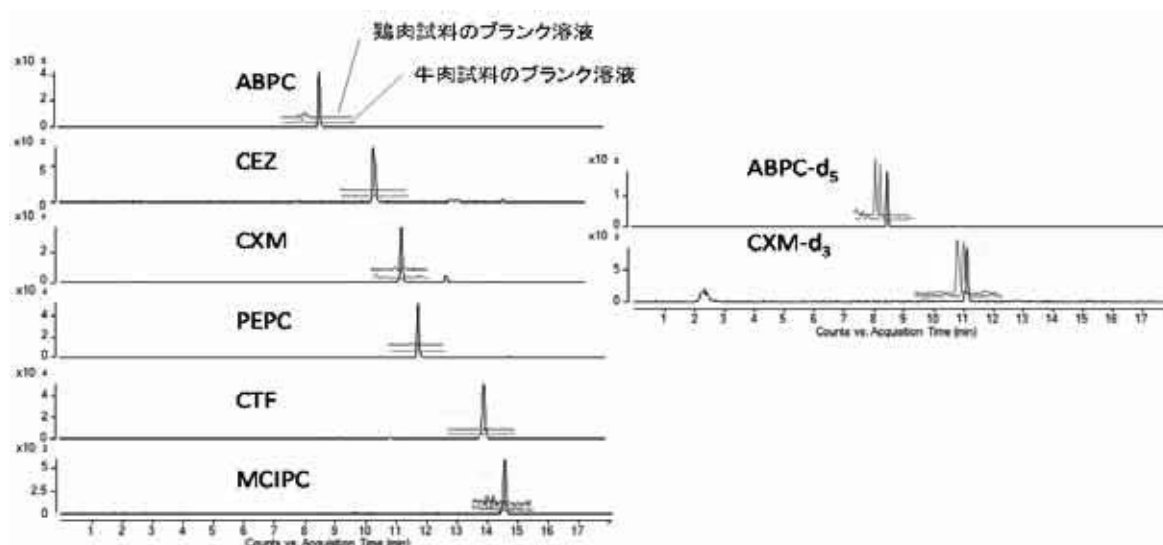


図2 標準溶液 (0.1 μg/mL) 及びブランク試料のマスクロマトグラフ

トリル溶液、1%ギ酸アンモニウムメタノール溶液を用いた。その結果、全対象成分において回収率が向上し、各 d 体はともに、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン⁴⁾に定める安定同位元素標識標準品の回収率の目標値である 40%以上を満たした。一方で、アンピシリン及びアンピシリン-d₅は他成分と挙動が異なったためアンピシリン-d₅はアンピシリンのみを、セフロキシム-d₃はそれ以外の成分を補正することとした。

各 d 体による内部標準法により求めた、コンディショニング溶液毎の各対象成分の平均回収率 (n=3) を図 3 に示した。Z-sep/DSC-C18 及び Z-sep+の固相とも 0.5%クエン酸アセトニトリル溶液によるコンディショニングでは、フェニチシリン、セファゾリン、セフチオフル及びクロキサシリンが、1%ギ酸アンモニウムメタノール溶液ではフェニチシリン及びセフチオフルが 120%を超える高い回収率となった。固相に Zsep/DSC-C18 とし、1%ギ酸アセトニトリル溶液によるコンディショニングでは、全成分で平均回収率は 70~120%の範囲内であり最も良好な結果となった。

4. 添加回収試験

鶏肉、牛肉を試料として添加回収試験を実施した。各 d 体を用いた内部標準法により求めた平均回収率 (n=3) は、鶏肉で 92.6%~108.5% (RSD: 2.8%~10.8%)、牛肉で 76.4%~96.9% (RSD: 3.0%~20.9%) となり、概ね良好な結果となった。検出下限値は基準値設定のある成分について

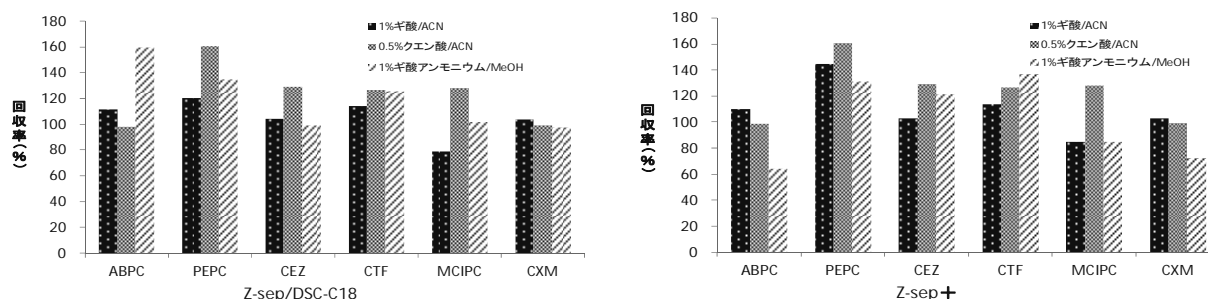


図3 コンディショニング溶液毎の Zsep/DSC-C18 及び Zsep+における対象成分の内部標準法により求めた平均回収率 (n=3)

表 2 平均添加回収率 (n=3) 及び定量下限値

対象成分	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	鶏肉			牛肉		
		回収率 \pm RSD (%)	検出* 下限値 ($\mu\text{g/g}$)	基準値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 \pm RSD (%)	検出* 下限値 ($\mu\text{g/g}$)	基準値 ($\mu\text{g/g}$)
ABPC	0.05	108.5 \pm 2.8	0.004	0.02	86.7 \pm 10.9	0.009	0.03
MCIPC		99.4 \pm 5.7	0.015	検出しては ならない	94.2 \pm 7.7	0.019	検出しては ならない
PEPC		92.6 \pm 9.1	0.008	検出しては ならない	76.4 \pm 20.9	0.009	検出しては ならない
CEZ		104.8 \pm 9.8	0.005	検出しては ならない	91.5 \pm 13.2	0.006	0.05
CTF		98.3 \pm 10.8	0.006	検出しては ならない	77.3 \pm 19.9	0.007	1.00
CXM		93.7 \pm 7.9	0.010	検出しては ならない	96.9 \pm 3.0	0.005	0.02

*n=3、S/N \geq 3

は、全て基準値よりも低い値となった。一方で、セフロキシム-d₃の回収率は、49.2%~69.7%であり妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしたが、アンピシリン-d₅は40%より低いことがあった。アンピシリン-d₅は固相への残留が他の成分と比較して多く、Z-sepへの強い保持が考えられた。今後、回収率の向上のためにはコンディショニング液の最適化について更なる検討が必要であると考えられた。

【まとめ】

β ラクタム系抗生物質6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pKaを有し、極性が広範囲であったが、本法ではZsep/DSC-C18固相を1%ギ酸アセトニトリル溶液によりコンディショニングすることで良好な回収率を示した。また1検体あたりの前処理所要時間は30分程度であり、公定法の1/6~1/2に短縮できた。本法は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る。

【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。

【参考文献】

- 1) 杉立ら、第40回日本農薬学会講演要旨集、P102 (2015)
- 2) Katerina M. et al. *Journal of Chromatography A*, **1202**, 118-123 (2008)
- 3) 仙台市食肉衛生検査所 平成17年度事業概要 調査研究 P6 (2005)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 平成22年12月24日 食安発1224第1号(2010)

【経費使用明細】

使用内容	標準品購入費	165,223円
	精製用固相購入費 (Zsep+, Zsep, DSC-C18等)	131,619円
	重炭酸アンモニウム購入費	2,095円
	分析用器具・消耗品購入費 (メディウム瓶, 遠沈管ラック等)	4,873円
	旅費 (助成金贈呈式出席)	1,240円
合計 (助成金300,000円, 交通費5,000円及び預金利息50円含む)		305,050円