

Table 3 Comparison of media using streptomycin

Medium	pH	Concentration of streptomycin	
		($\mu\text{g/mL}$)	
		0.04	0.1
AM5*	7.6	—	11.2
	8.0	ND	13.3
LLA**	7.0	—	ND
	8.0	ND	15.1
LLA*** (Composite)	8.0	15.3	—

Diameter of inhibition zone : mm, ND : Not detected, — : Not tested

* : Antibiotic medium 5 (Becton Dickinson), ** : Lab-lemco Agar (Oxoid)

*** : LLA using Purified Agar (Oxoid)

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業) 研究報告書
食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

分担研究報告書

「アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析」

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

複雑なマトリックスから構成されている食肉中に残留する抗生物質を分析するため、夾雑成分を効果的に除去できる前処理法を検討した。本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有するアフィニティーカラムによる試料精製法を構築した。アフィニティーカラムの有用性を検討するため、キノロン系抗菌剤のノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、エンロフロキサシンの4種類およびアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを測定対象物質とした。それぞれの標準品を食肉抽出液に添加して回収率を求めた結果、いずれの抗菌性物質においても良好な回収率が得られたことから、本研究で構築したアフィニティーカラムの有用性が示唆された。

A 研究目的

近年、粉卵やハチミツなどの輸入食品を中心に抗生物質の残留が数多く検出されている。これらの薬剤は、主に動物用医薬品や飼料添加物として使用されており、法的に規制された用法用量、休薬期間等が遵守されずに使用された場合、畜水産食品中に残留するといわれている。そのため、食品衛生の観点から食品中に残留する抗生物質の測定法が必要とされているが、食品は複雑なマトリックスから構成されていることから、微量に残留

している抗菌性物質を測定する際に、マトリックスに含まれる多くの夾雑成分の影響を受けて分析が困難となる。そのため、効果的に夾雑成分を除去できる前処理法が必要とされている。そこで本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有するアフィニティーカラムによる試料精製の有用性を検討し、畜水産食品中に残留する抗生物質の実用可能な分析法を構築した。

B 研究方法

B.1 試料

鳥のむね肉・肝臓(市販品)

B.2 測定対象物質

キノロン系抗菌剤である、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、エンロフロキサシンの4種およびアミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンを測定対象物質とした。

B.3 機器分析の測定条件

キノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンの測定は、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法(HPLC/FL)を使用した。分析用ポンプとして島津製作所社製 LC-10AS および蛍光検出器には RF-10A_{XL} を用いた。

B.3.1 キノロン系抗菌剤

移動相には 30 mM リン酸緩衝液(pH = 3.0): アセトニトリル = 90 : 10 (v:v), 分析カラムには Waters 社製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長を励起波長 280 nm, 蛍光波長を 448 nm とし測定した。

B.3.2 ゲンタマイシン

移動相には 10 mM ギ酸緩衝液(pH = 3.0): アセトニトリル = 13 : 87(v/v), 分析カラムには Waters 社製 Atlantis C18(2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長を励起波長 265 nm, 蛍光波長を 313 nm とし測定した。

B.4 アフィニティーカラムの作製方法

B.4.1 キノロン系抗菌剤

抗キノロン抗体 1 mg とカラムに充填したレジン 1 mL 相当を、0.5 M NaCl 含有

0.1 M 炭酸緩衝液(pH = 8.0)にてカップリング反応を室温で 2 時間行った。反応後、0.5 M NaCl にてカラムの洗浄を行い、次に未反応基のブロッキングのため、0.5 M NaCl 含有 0.1 M トリス緩衝液(pH = 8.0)にて反応を行った。最後にカラムの平衡化として、PBS を流し、アフィニティーカラムの作製を完了とした。

B.4.2 ゲンタマイシン

抗ゲンタマイシン抗体 1 mg を 0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)で希釈し、HiTrap NHS-activated HP Columns(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)に流し、室温で 2 時間反応を行った。反応後、0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)を流した。次に未反応基のブロッキング及び洗浄のため、0.5 M NaCl 含有 0.5 M モノエタノールアミン(pH = 8.3)と 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 酢酸緩衝液(pH = 4.0)を交互に 3 回流した。最後にカラムの平衡化として PBS を流し、アフィニティーカラムの作製を完了とした。

B.5 アフィニティーカラムによる精製法

B.5.1 キノロン系抗菌剤

アフィニティーカラムのコンディショニングとして、PBS 5 mL を流した。次に試料溶液 5 mL を負荷し、洗浄溶媒である精製水 5 mL を流した。最後に溶出液である 100 mM クエン酸 5 mL により脱離を行った。

B.5.2 ゲンタマイシン

アフィニティーカラムのコンディショ

ニングとして、PBS 5 mL を流した。次に試料溶液 1 mL を負荷し、洗浄溶媒である精製水 5 mL を流した。最後に溶出液である 1%酢酸 5 mL により脱離を行った。

B.6 前処理方法

B.6.1 キノロン系抗菌剤

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、アセトニトリル 15 mL 加え、ホモジナイズにより均質化した。その後、遠心分離操作(3000 rpm, 10 min)により得られた上清を回収し、残渣にアセトニトリル 15 mL を加え、再度、遠心分離(3000 rpm, 10 min)を行った。回収した上清にアセトニトリル飽和ヘキサン 15 mL を加え、よく混和した後、下層のアセトニトリル相を回収した。回収したアセトニトリル相に、再度アセトニトリル飽和ヘキサンを 15 mL 加え、同様な操作を行った。アセトニトリル相を合わせ、40°C、減圧下で濃縮乾固させ、得られた残渣に PBS を加えて再溶解させた。その後、アフィニティーカラムによる精製を行い HPLC/FL の測定試料とした。

B.6.2 ゲンタマイシン

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、1.2%メタリン酸 15 mL 加え、ホモジナイズにより均質化した。その後、遠心分離操作(3000 rpm, 10 min)により得られた上清を回収し、残渣に 1.2%メタリン酸 10 mL を加え、再度、遠心分離(3000 rpm, 10 min)を行った。回収した上清にヘキサン 12.5 mL を加え、よく混和した後、下層の水相を回収した。水相に、再度ヘキサンを 12.5 mL 加え同様な操作を行った。水相を

合わせ、40°C、減圧下で濃縮乾固させ、得られた残渣に PBS を加えて再溶解させた。その後、アフィニティーカラムによる精製を行った。

次に、溶出液 500 μ L に 1 M NaOH 70 μ L, 200 mM ホウ酸緩衝液 430 μ L を加えて pH を調整し、蛍光誘導体化用の試料溶液とした。

B.7 ゲンタマイシンの誘導体化法

試料溶液 200 μ L に 200 mM ホウ酸緩衝液 100 μ L および 1 mM 9-fluorenylmethyl chloroformate(FMOC-Cl) 50 μ L を加え、37°C, 15 min でインキュベートした。インキュベート後、100 mM グリシン 50 μ L を加え、攪拌した後、5 min 放置した。次にペンタン 1 mL 加え、攪拌後、下層 300 μ L を回収し、これを HPLC 試料溶液とした。

C. 研究結果

C.1 アフィニティーカラムの保持能の検討

C.1.1 キノロン系抗菌剤

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ダノフロキサシンの標準品 25 ng/mL を 5 mL アフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、95.3~98.4%の回収率であった。また、食肉に対して 50 ng/g となるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は 96.5~100.8%であった。どちらの場合でも良好な回収率が得られた。

C.1.2 ゲンタマイシン

ゲンタマイシンの標準品 500 ng/mL を

1mL アフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、103.1~111.3%の回収率であった。また、食肉に対して 500 ng/g となるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は 89.3~96.8%であった。どちらの場合でも良好な回収率が得られた。

ニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンの回収率を Table 1 に示す。

C.2 試料前処理法の回収率

C.2.1 キノロン系抗菌剤

食肉 5g をホモジナイズする段階で、100ng/g となるようにエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ダノフロキサシンの標準品を添加した。その後、B.4.1 で示した前処理を行って回収率を求めたところ、54.2~69.4%となった。

C.2.2 ゲンタマイシン

食肉 5g をホモジナイズする段階で、500ng/g となるようにゲンタマイシンの標準品を添加した。その後、B.4.2 で示した前処理を行って回収率を求めた。結果として、78.2~87.8%となった。

ニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンにおける、食肉の前処理操作過程を含んだ回収率を Table 2 に示す。

C.3 実試料のクロマトグラム及び従来法との比較

C.3.1 キノロン系抗菌剤

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ダノフロキサシンの標準品を添加した食肉抽出液を用い、

アフィニティーカラムおよび従来から用いられている固相抽出法の Oasis MCX により精製を行い、両者とも HPLC/FL により測定して、精製効果を比較検討した。その結果、アフィニティーカラムにより精製した場合、Oasis MCX により精製した場合と同等な良好なクロマトグラムが得られた(Fig. 1)。

C.3.2 ゲンタマイシン

ゲンタマイシンの標準品を添加した食肉抽出液を用い、アフィニティーカラムおよび従来から用いられている固相抽出法の Bond-Elut C18 により精製を行い、HPLC/FL により測定して、精製効果を比較検討した。その結果、アフィニティーカラムにより精製した場合、Bond-Elut C18 による精製に比べて夾雑成分が少ない良好なクロマトグラムが得られた(Fig. 2)。

D. 考察

ニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムは、それぞれの標準品および食肉抽出液に添加した標準品を保持することが可能であったことから、夾雑成分の多い食肉抽出液を用いた場合でも十分な実用性があるものと考えられる。

また、HPLC クロマトグラムにおいて本法と従来法の固相抽出法による精製を比較したところ、アフィニティーカラムにより従来法と同等かそれ以上に夾雑成分の影響の少ないクロマトグラムが得られたことから、食肉中に残留するニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシン分析

において、アフィニティーカラムを用いた前処理法が有用であると思われる。

E. 結論

食肉中の残留抗菌性物質の分析は、様々な夾雑成分により困難とされる。そこで、食肉中の夾雑成分の除去のため、優れた選択性と高い精製能力を有するアフィニティーカラムによるクリーンアップ法の検討を行った。キノロン系抗菌剤とアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを測定対象物質としてそれぞれ検討した結果、夾雑成分を十分除去できたクロマトグラムが得られ、また添加回収率も良好であった。これらの結果から、食肉中に残留する動物用医薬品分析におけるアフィニティーカラムを用いた前処理法の有用性が示唆され、残留分析に応用できることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

1. 論文発表

1) 岩崎雄介, 伊藤 岳, 北村 涉, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之: 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキノロン系抗菌剤の分析: 分析化学, 55(12), 943-948 (2006)

2. 学会発表

1) 北村 涉, 椛沢 圭介, 伊東 岳, 岡山 明子, 加藤 美穂子, 小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 斉藤 貢一, 中澤

裕之。アフィニティーカラムを用いた前処理及びHPLC/FLによる食肉中残留抗菌剤の分析。日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月・富山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 アフィニティーカラムを用いた各抗菌剤の回収率

ニューキノロン系抗菌剤

試料	添加量	回収率 (% ; mean ± S.D.)			
		ルフロキサシン	シプロフロキサシン	ダノフロキサシン	エンロフロキサシン
標準品	25 ng/mL	95.3 ± 4.5	96.7 ± 5.4	98.4 ± 5.2	95.6 ± 6.7
鳥肉*	50 ng/g	100.5 ± 4.0	100.5 ± 3.5	100.8 ± 3.6	96.5 ± 3.5

ゲンタマイシン

試料	添加量	回収率 (% ; mean ± S.D.)		
		C1a	C2	C1
標準品	500 ng/mL	111.3 ± 13.1	103.1 ± 7.4	104.6 ± 7.2
鳥肉*	500 ng/g	96.8 ± 18.4	89.3 ± 17.6	89.5 ± 17.5

* 鳥むね肉(皮なし) n = 5

Table 2 試料前処理法の回収率

ニューキノロン系抗菌剤

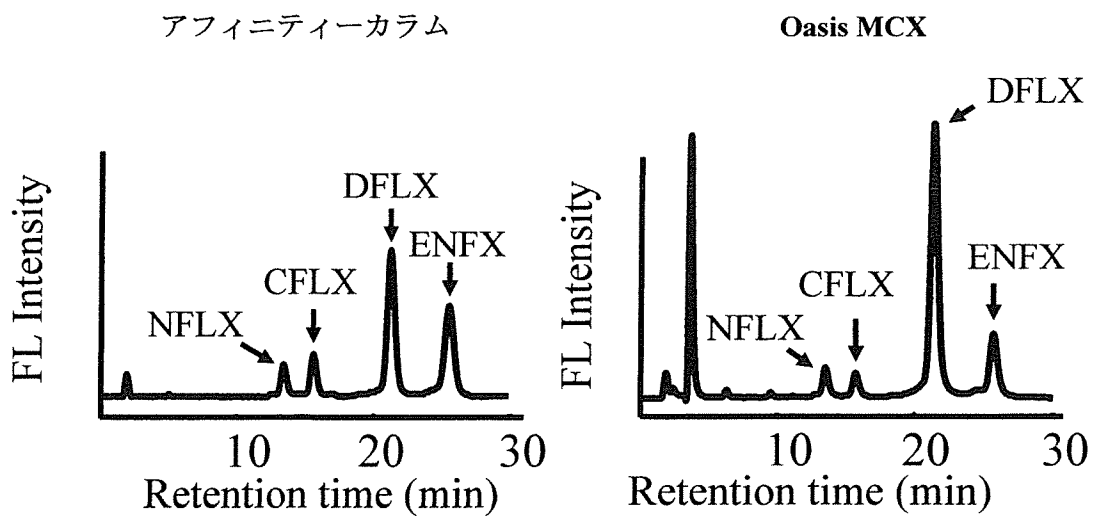
試料	添加量 (ng/g)	回収率 (% ; mean ± S.D.)			
		ルフロキサシン	シプロフロキサシン	ダノフロキサシン	エンロフロキサシン
鳥肉*	100	61.1 ± 5.2	63.9 ± 8.3	54.2 ± 8.6	69.4 ± 12.5

* 鳥レバー n = 3

ゲンタマイシン

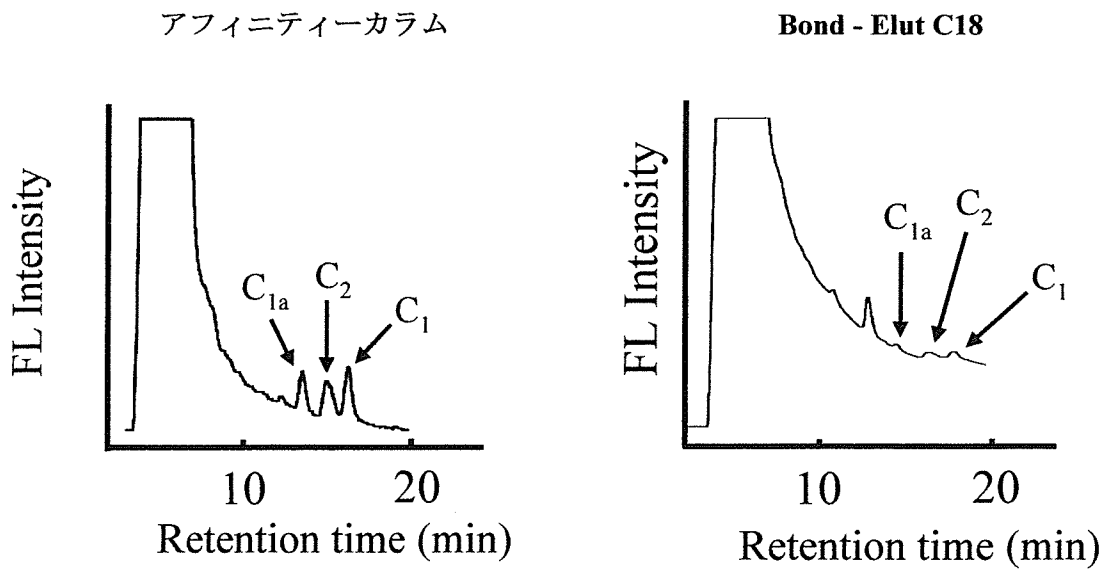
試料	添加量 (ng/g)	回収率 (% ; mean ± S.D.)		
		C1a	C2	C1
鳥肉**	500	78.2 ± 16.5	80.0 ± 19.7	87.8 ± 19.7

** 鳥むね肉 n = 3



試料：鳥レバー

Fig. 1 実サンプルのクロマトグラム及び従来法との比較(ニューキノロン系抗菌剤)
NFLX: ノルフロキサシン, CFLX: シプロフロキサシン, DFLX: ダノフロキサシン, ENFX: エンロフロキサシン



試料：鳥むね肉

Fig. 2 実サンプルのクロマトグラム及び従来法との比較(ゲンタマイシン)

研究成果

1. 論文発表

- 1) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による乳中のマクロライド系抗生物質の定量. 分析化学, 55, 651-660 (2006)
- 2) 岩崎雄介, 伊藤 岳, 北村 渉, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之: 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキノロン系抗菌剤の分析: 分析化学, 55, 943-948 (2006)
- 3) 堀江正一, 石井里枝, 竹上晴美, 井部明広, 丹野憲二, 中澤裕之: 微生物学的試験法による残留抗菌性物質のスクリーニング (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 竹上晴美, 堀江正一「残留抗菌性物質の微生物学的簡易検査法の検討」第 91 回日本食品衛生学会(東京)
- 2) 竹上晴美, 石井里枝, 堀江正一「微生物学的簡易検査法による残留抗菌性物質分析の基礎的検討 (第 2 法)」第 43 回全国衛生化学技術協議会 (鳥取)
- 3) 堀江正一, 竹上晴美, 村山三徳「LC/MS/MS による畜産物中のマクロライド系抗生物質セテカマイシン及びテルテカマイシンの定量」第 93 回日本食品衛生学会(東京)
- 4) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 井部明広ら「逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジを用いた食肉中残留抗生物質の微生物学的系統推定スクリーニング試験法(第 4 報)」第 92 回日本食品衛生学会 (名古屋)
- 5) 藤田和弘, 加藤仁美, 尾崎由佳, 丹野憲二, 堀江正一「バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の検討」第 91 回日本食品衛生学会(東京)
- 6) 伊藤裕信, 高田由美子, 藤田和弘, 丹野憲二, 堀江正一「バイオアッセイによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討」第 91 回日本食品衛生学会(東京)
- 7) 北村渉, 栴沢圭介, 伊東岳, 岡山明子, 加藤 美穂子, 小平司, 堀江正一, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之「アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析」日本薬学会第 127 年会(富山)

報 文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による 乳中のマクロライド系抗生物質の定量

竹上 晴美^①, 堀江 正一^①, 中澤 裕之^②

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いた簡易かつ感度の高い乳中のマクロライド系抗生物質, 具体的にはエリスロマイシン, オレアンドマイシン, キタサマイシン, ジョサマイシン, ミロサマイシン, ネオスピラマイシン, スピラマイシン, チルミコシン及びタイロシンの同時分析法を検討した. 試料の前処理には抽出にアセトニトリルを採用し, ヘキサンによる液液抽出によりクリーンアップを行った. 高速液体クロマトグラフ測定条件は, TSK-gel Super ODS カラム (10 mm × 2 mm i.d.), 移動相には 0.2% 酢酸-アセトニトリル系グラジェント溶出法を用いた. 質量分析測定条件のイオン化モードは positive モードが適しており, 測定イオンは $(M + 2H)^{2+}$ 又は MH^+ を用いた. 本法における添加回収率は 0.1 µg/g の添加で 63.8~95.9%, 検出限界は 0.01 µg/g であった.

1 緒 言

14 及び 16 員環のラクトン環を基本骨格とするマクロライド系抗生物質 (MLs) は, グラム陽性菌, マイコプラズマ, 連鎖球菌などに対して有効であることから, 畜産動物や養殖魚の感染症治療薬としては用いられている¹⁾.

しかし, 一方ではこれら医薬品の畜水産物への移行及び残留が食品衛生上懸念されており²⁾, 畜水産食品の安全性を確保するために残留規制が行われている.

従来, マクロライド系を含む抗生物質の残留分析には一般に微生物学的試験法が用いられてきた. 微生物学的試験法は抗菌性物質の残留の有無をチェックするスクリーニング法としては優れた手法であるが, 選択性に欠ける面があり, 検出された抗菌性物質を特定することは困難である. これに代わる方法として, 紫外吸収 (UV) 検出器を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) が抗生物質の微量分析には用いられている³⁾⁴⁾. 先に著者らはクリーンアップに陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた MLs の分析法を報告した⁵⁾⁶⁾. 陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた試料前処理方法は, 夾雑成分の除去に優れた手法であるが, 操作がやや煩雑な面がある.

最近, 選択性に優れた高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) が残留 MLs の分析に用いられており^{7)~11)}, 著者らも LC/MS による食肉中の MLs の同時分析法を報告した¹²⁾. しかし, 先に報告した分析法¹²⁾を乳試料に適用

した場合, 前処理中にエリスロマイシン (EM), スピラマイシン (SPM) の分解が見られ, 特に EM はそのほとんどが分解された. EM は MLs の中で最も抗菌活性が強いことから, 最も用いられている薬剤であり, 特に乳房炎治療薬としていちばん多く使用されている. また, SPM も使用量の多い MLs である¹³⁾. したがって, 乳中の EM, SPM を感度よく検出・定量することは, 乳の安全性を確保する上で有用と考えられる. そこで, 今回, LC/MS を用いた簡易かつ感度の高い乳中の MLs の同時分析法を検討した.

2 実験方法

2.1 試料及び試薬

試料は埼玉県内で生産された生乳及び牛乳を用いた.

標準品: ネオスピラマイシン (NSPM) 及びスピラマイシン (SPM) は林純薬工業製, チルミコシン (TLM) は日本イーライリリー製, オレアンドマイシン (OM) は, 日本ファイザー製, ミロサマイシン (MRM) 及びキタサマイシン (KT) は朝日化学工業製, エリスロマイシン (EM) は大日本製薬 (現大日本住友製薬) 製, タイロシン (TS) は武田薬品工業製, ジョサマイシン (JM) は山之内製薬 (現アステラス製薬) 製を使用した.

標準溶液: 標準品 10 mg を精ひょうし, メタノール 10 ml に溶解して標準原液を調製し, 適宜 40% アセトニトリルで希釈して標準溶液とした. なお, 標準原液は 5℃ 以下で保存した.

^① 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

^② 星薬科大学: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Operating conditions of LC-MS for analysis of macrolide antibiotics

MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization	ESI, Positive	Column	TSK-gel Super ODS (100 × 2 mm)
Fragmentor	Time program	Eluent	Gradient
Nebulizer	N ₂ (40 psi)	Flow rate	0.2 ml/min
Drying gas	N ₂ (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500 V	Injection size	5 µl
SIM ion	m/z (M + H) ⁺ , (M + 2H) ²⁺		

Time/min	Fragmentor voltage/V
5.0	60
11.5	100
15.5	150

Time/min	A, %	B, %
0	85	15
20	50	50
25	50	50

A = 0.2% Acetic acid, B = Acetonitrile (containing 0.2% Acetic acid)

Table 2 Typical ions detected for macrolide antibiotics using LC/ESI-MS

Compound	Mw	Base peak ions	Main other ions
Neospiramycin (NSPM)	698.8	350.2 (M + 2H) ²⁺	721.5, 699.5, 540.3
Spiramycin (SPM)	843.1	422.3 (M + 2H) ²⁺	843.5, 699.5, 540.3
Tilmicosin (TLM)	869.2	435.3 (M + 2H) ²⁺	869.5, 695.5
Oleandomycin (OM)	688.9	688.4 (M + H) ⁺	670.4, 544.3
Mirosamicin (MRM)	727.9	728.4 (M + H) ⁺	554.3
Erythromycin (EM)	733.9	734.5 (M + H) ⁺	716.4, 576.3
Tylosin (TS)	916.1	916.5 (M + H) ⁺	742.3, 582.3
Kitasamycin (KT)	771.9	772.5 (M + H) ⁺	702.5, 558.3
Josamycin (JM)	828.0	828.5 (M + H) ⁺	860.4, 786.4

2・2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Agilent 製 1100 シリーズ LC/MSD を使用し, Table 1 に示した条件で測定した。

2・3 検量線の作成

0.025, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0 µg/ml の混合標準添加溶液を調製し, その 5 µl を LC/MS 装置に注入した。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) を採用し, Table 2 に示すモニターイオンより得られたクロマトグラムからピーク面積を求め, マトリックス検量線 (標準添加法) により検量線を作成した。

2・4 試験溶液の調製

試料 5 g を採取し, アセトニトリル 30 ml 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて 1 分間ホモジナイズした後, 3500 rpm で 10 分間遠心分離した。次に上澄みを綿栓漏斗後, 減圧乾固し, 40% アセトニトリル 2 ml と *n*-ヘキサン 1 ml を加えて混合した後, 再度 3500 rpm で 10 分間遠心

分離した。*n*-ヘキサン相を除去した 40% アセトニトリル相を試験溶液とし, この 5 µl を LC/MS 装置に供した。

2・5 微生物学的試験法

日常検査において公定法としては用いられている「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」¹⁴⁾ に準拠し, 試験菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis* ATCC 6633), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus* ATCC 9341) 及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides* ATCC 11778) を用いた。試験菌液及び検査用平板培地の調製及び抗菌活性の測定も前記検査法に準拠し, 簡便なペーパーディスク法を用いた。

3 結果及び考察

3・1 前処理法の検討

著者らは前報¹²⁾において除タンパク・抽出溶液として 0.2% メタリン酸とメタノール (6:4) 混液を用いた。しかし, 食肉と異なり試料が乳の場合では, 濃縮前の抽出溶液の pH が 3.8, 約 30 ml に濃縮時では 2.9 となった。

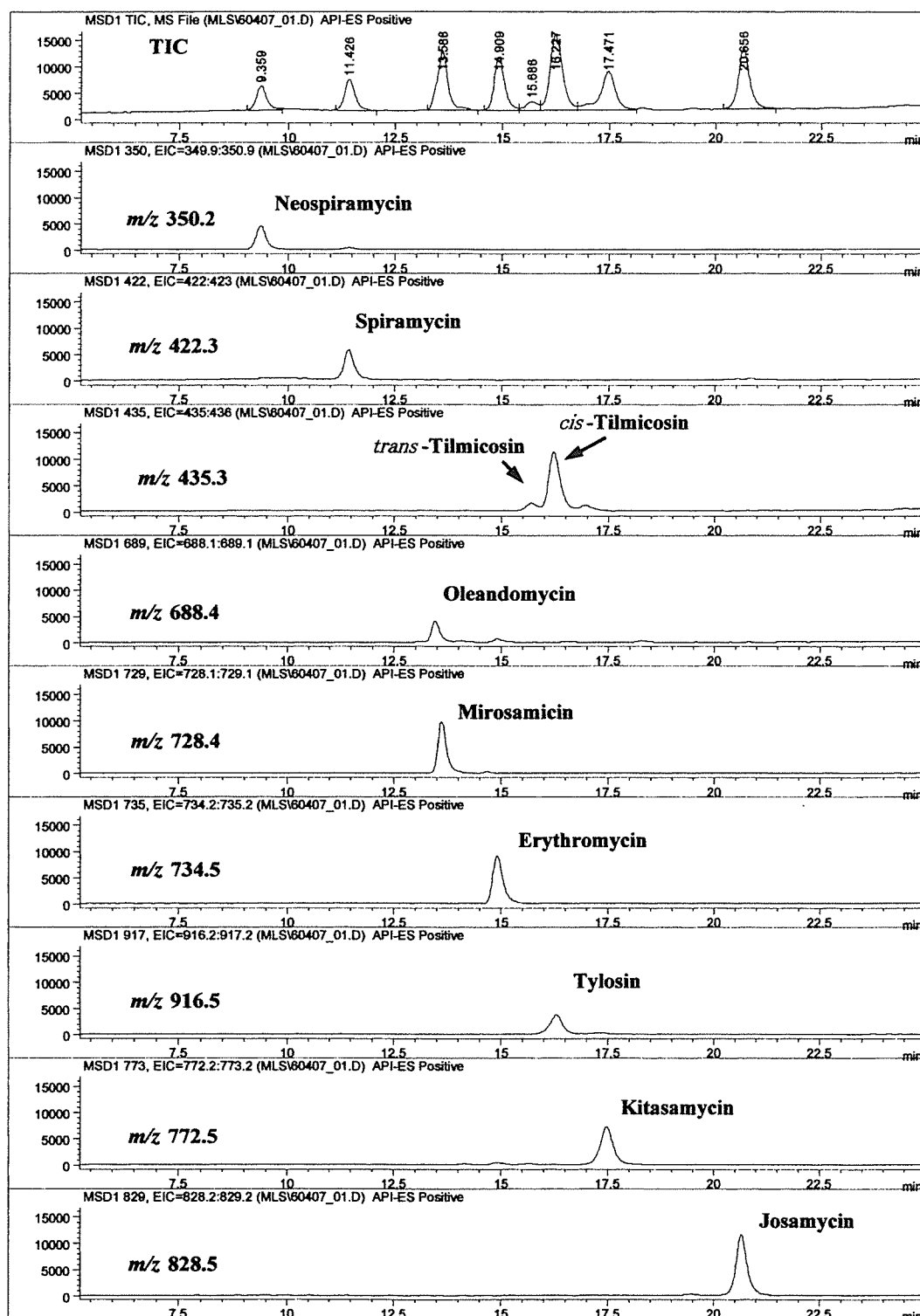


Fig. 1 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of standard mixture ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$)

MLsは一般的に酸に対して不安定とされており,特にEMはpHが4以下であると分解が早いと報告されている¹⁵⁾.乳試料に $0.1 \mu\text{g/g}$ の濃度で9種のMLsを添加した場合,EMは約95%とそのほとんどが,SPMにあっても約50%

に分解が見られた.そこで,除タンパク剤としてメタリン酸を用いない前処理法の検討を試みた.

残留薬物の分析において,メタノール,アセトニトリル及びエタノール等は,除タンパク効果が優れていることが

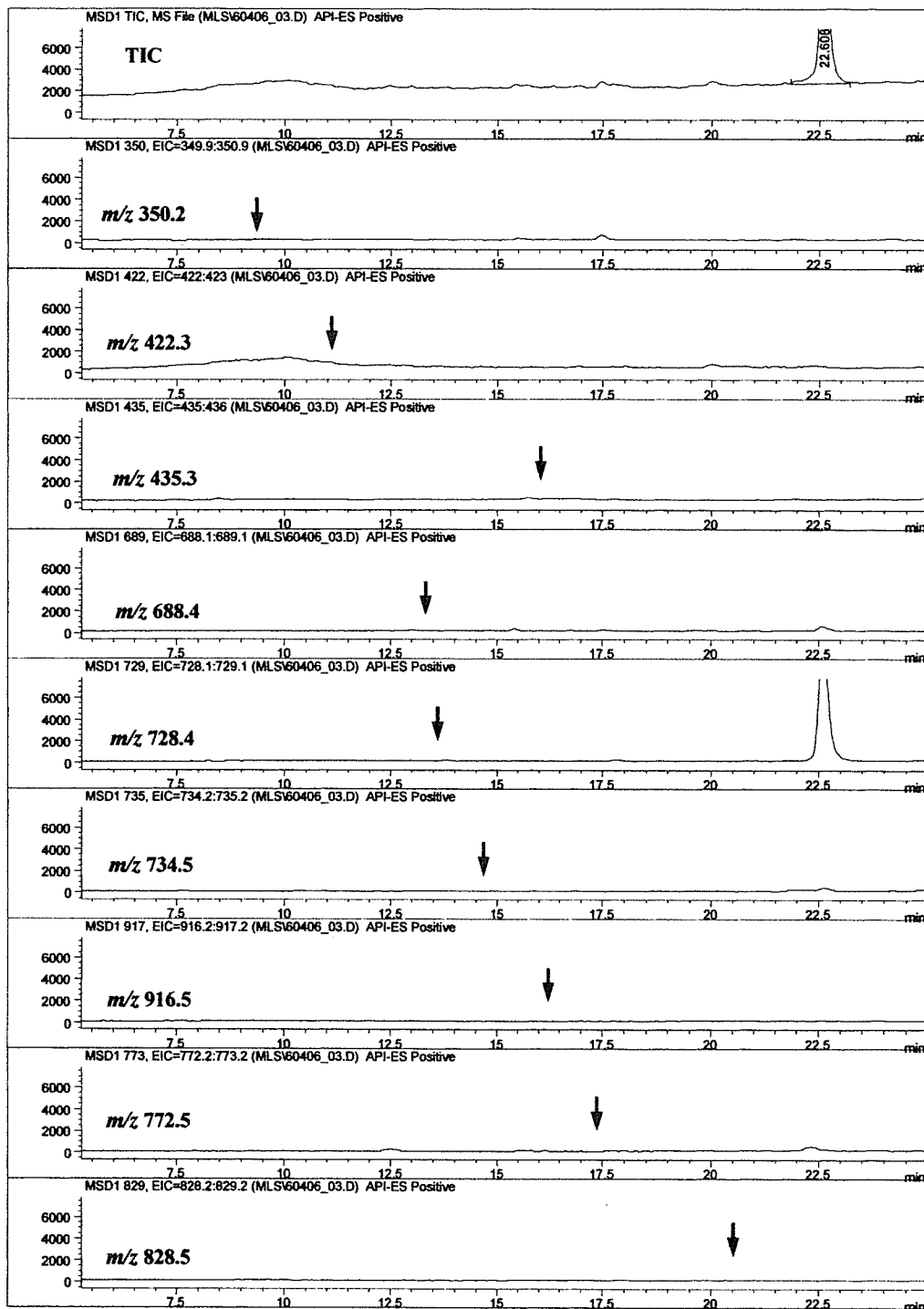


Fig. 2 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract

ら、血液など生体試料の除タンパク剤としては用いられている。しかし、メタノール、アセトニトリル等の有機溶媒で抽出した場合、乳は脂肪も多く含んでいることから、脂質の除去も必要となる。アセトニトリルはヘキサンとの組み合わせにより脱脂操作が容易であり、脂質の除去には用いられている。このような理由からアセトニトリルによる

抽出法を検討した。乳をアセトニトリル 30 ml で抽出した溶液の pH は 6.5 であり、酸性下で最も不安定であると思われる EM の抽出にも本法は適用可能であった。アセトニトリル抽出液を減圧乾固し、40% アセトニトリル 2 ml / ヘキサン 1 ml に溶解させて十分混合することにより、脂溶性の高い脂質や色素成分はヘキサン相に分配される。本

Table 3 Recoveries of macrolide antibiotics from milk

Sample	Added/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery (mean \pm RSD, $n = 5$), %								
		NSPM	SPM	TLM	OM	MRM	EM	TS	KT	JM
Raw milk	0.02	70.9 \pm 5.9	90.6 \pm 5.2	97.9 \pm 8.2	76.9 \pm 5.4	74.5 \pm 5.0	76.3 \pm 2.1	84.7 \pm 6.7	78.4 \pm 10.8	99.9 \pm 4.1
	0.1	63.9 \pm 6.9	94.5 \pm 1.6	71.9 \pm 3.2	93.4 \pm 3.6	95.9 \pm 3.4	94.1 \pm 7.8	75.0 \pm 4.3	72.5 \pm 4.9	81.9 \pm 2.1
Pasteurised milk	0.02	79.6 \pm 7.7	94.8 \pm 7.0	105.2 \pm 7.8	99.4 \pm 10.4	89.7 \pm 5.1	86.5 \pm 2.7	73.4 \pm 5.7	89.1 \pm 4.8	87.8 \pm 4.2
	0.1	63.8 \pm 9.3	95.2 \pm 7.7	69.1 \pm 7.5	89.8 \pm 7.0	92.4 \pm 3.6	86.5 \pm 2.5	74.4 \pm 3.5	74.1 \pm 9.2	80.0 \pm 2.8

法により得られた試験溶液及び混合標準溶液の代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。Fig. 2 に示すように、夾雑物の影響を受けることなく、9 種の MLs を分析することが可能であった。

3・2 添加回収実験

検量線は 0.025 から 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (絶対量として 0.05 ~ 2 ng) の範囲で良好な直線性 ($r^2 = 0.995$) を示した。生乳及び牛乳 (130°C で 2 秒殺菌) に 9 種の MLs を 0.02 及び 0.1 $\mu\text{g/g}$ の濃度に添加し、回収率を求めた。その結果を Table 3 に示す。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分離分析法であるが、イオン化がマトリックスの影響を受けやすいことが短所とされている。そこで、マトリックスの影響の少ない試験溶液の調製が望まれている。

生乳に 0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加したとき、OM, MRM, EM, TS, KT 及び JM のイオン化は、マトリックスの影響が少なく、絶対検量線による回収率は平均 75% 以上、相対標準偏差 (RSD) も 10% 以内と良好な値であった。しかし、NSPM, SPM 及び TLM はイオン化促進が見られ、見掛け上の回収率は 150% 前後であった。前述したように、LC/MS の分析では、しばしば試料成分の影響で目的成分のイオン化抑制やイオン化促進が見られる場合がある。そこで、マトリックスの影響を補正する目的で、安定同位体標識内標準物質やマトリックス検量線 (標準添加法) が用いられている。本法においても、比較的早く溶出する NSPM, SPM 及び TLM のイオン化がマトリックスの影響を受けることから、マトリックス検量線を用いて回収率を算出することにした。本法による各薬物の回収率は 0.02 及び 0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加時共に、おおむね 70% 以上、RSD も 15% 以内であり、残留分析法として満足できる値が得られた¹⁶⁾。なお、本法による検出限界は、いずれの薬物も 0.01 $\mu\text{g/g}$ ($S/N = 3$) であった。ポジティブリスト制における乳の MLs 基準値は一律基準も含めると 0.01 ~ 2 $\mu\text{g/g}$ ¹⁷⁾ であり、残留分析法として満足すべき感度を得られた。生乳に MLs を 0.1 $\mu\text{g/g}$ 及び 0.01 $\mu\text{g/g}$ 添加して得られた代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。

本法を用いて、埼玉県内で生産された生乳 3 検体、県内流通品である牛乳 7 検体 (65°C 低温殺菌 3 検体, 130°C

高温殺菌 4 検体)、計 10 検体について残留調査を実施した結果、すべての試料から 9 種の MLs は検出されなかった。なお、10 検体すべてについて、本法の検出限界とした 0.01 $\mu\text{g/g}$ 濃度で 9 種の MLs を添加し、9 種の MLs が良好に回収されているか並行検査を実施した。いずれの検体においても 9 種の MLs は、おおむね 60% 以上が回収され、抗生物質ごとの回収率はほぼ同程度であり、異なる乳試料間での相違はほとんど見られなかった。

3・3 微生物学的試験法による MLs の検出限界

従来、MLs の残留分析には一般に微生物学的試験法がはん用されてきた。そこで、試験菌 *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 及び *B. mycoides* ATCC 11778 に対する抗菌活性を調べた。MLs の検出限界を Table 4 に示す。MLs は *M. luteus* ATCC 9341 に最も強い抗菌活性を示した。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分析手法であるが、LC/MS により MLs が検出された場合、抗生物質が本来持っている抗菌活性を用いた微生物学的試験法とクロスチェックすることにより、より信頼性の高い結果を得ることが可能である。MLs の抗菌活性は比較的強いことから、微生物学的試験法を用いたクロスチェックは有用と考えられる。

3・4 LC/MS 法と微生物学的試験法との相関

9 種の MLs を個別に添加した試料について、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性を調べた。再現性を考慮し、微生物学的試験法では各試料につき 3 回測定を行い、その平均値を用いた。いずれの抗生物質についても、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性は、 $r^2 > 0.9$ と良好であった。代表例としてジョサマイシン及びエリスロマイシンの結果を Fig. 5 に示す。

現在、動物用医薬品の残留分析に HPLC-UV 法がはん用されているが、短波長領域にしか UV 吸収のない MLs の分析には微生物学的試験法が適用されている。しかし、微生物学的試験法は前述のように選択性に欠ける面があり、検出された抗菌性物質を特定することは困難である。LC/MS は比較的簡易な前処理で同時に多くの薬物を定量

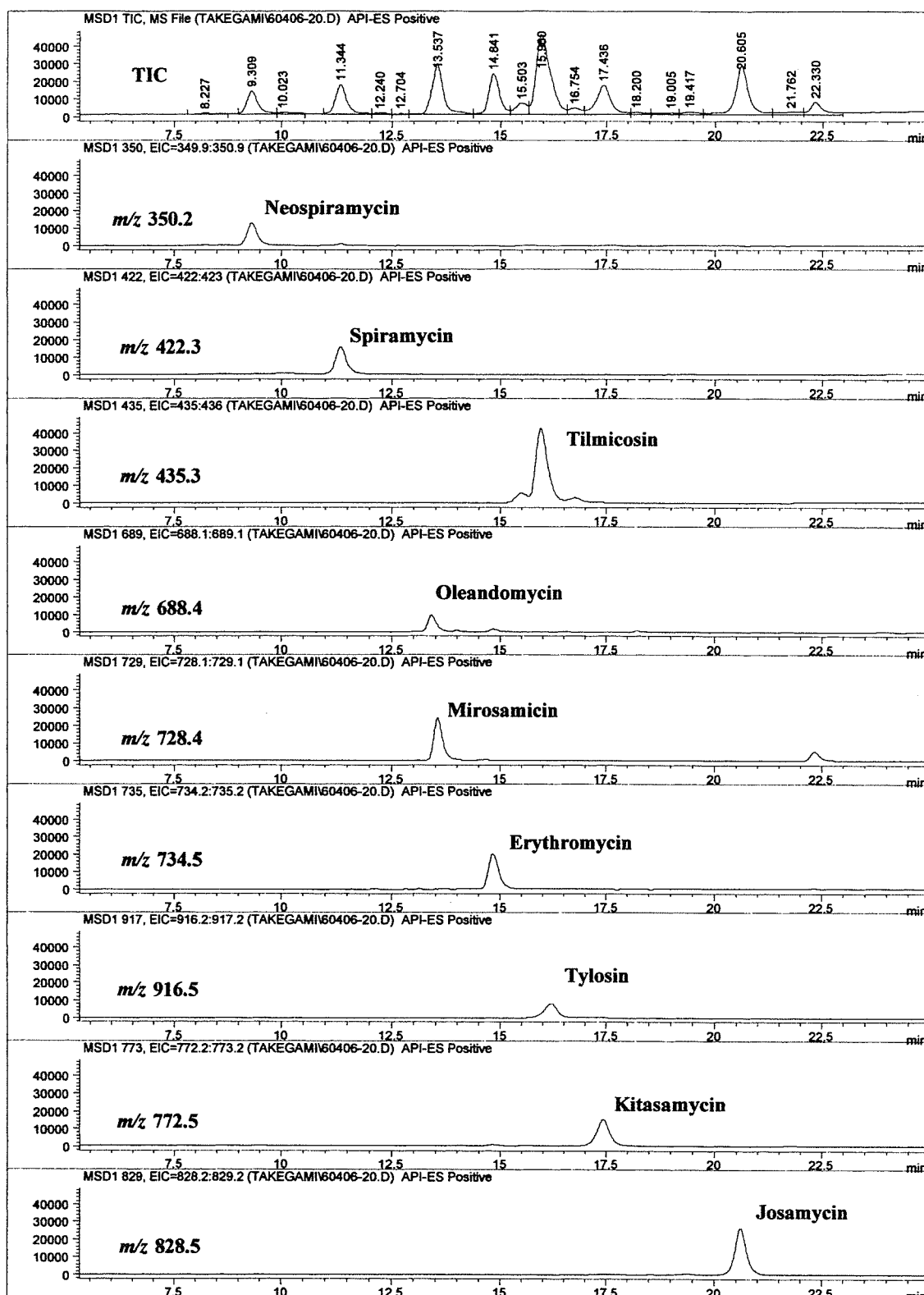


Fig. 3 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ of each drug

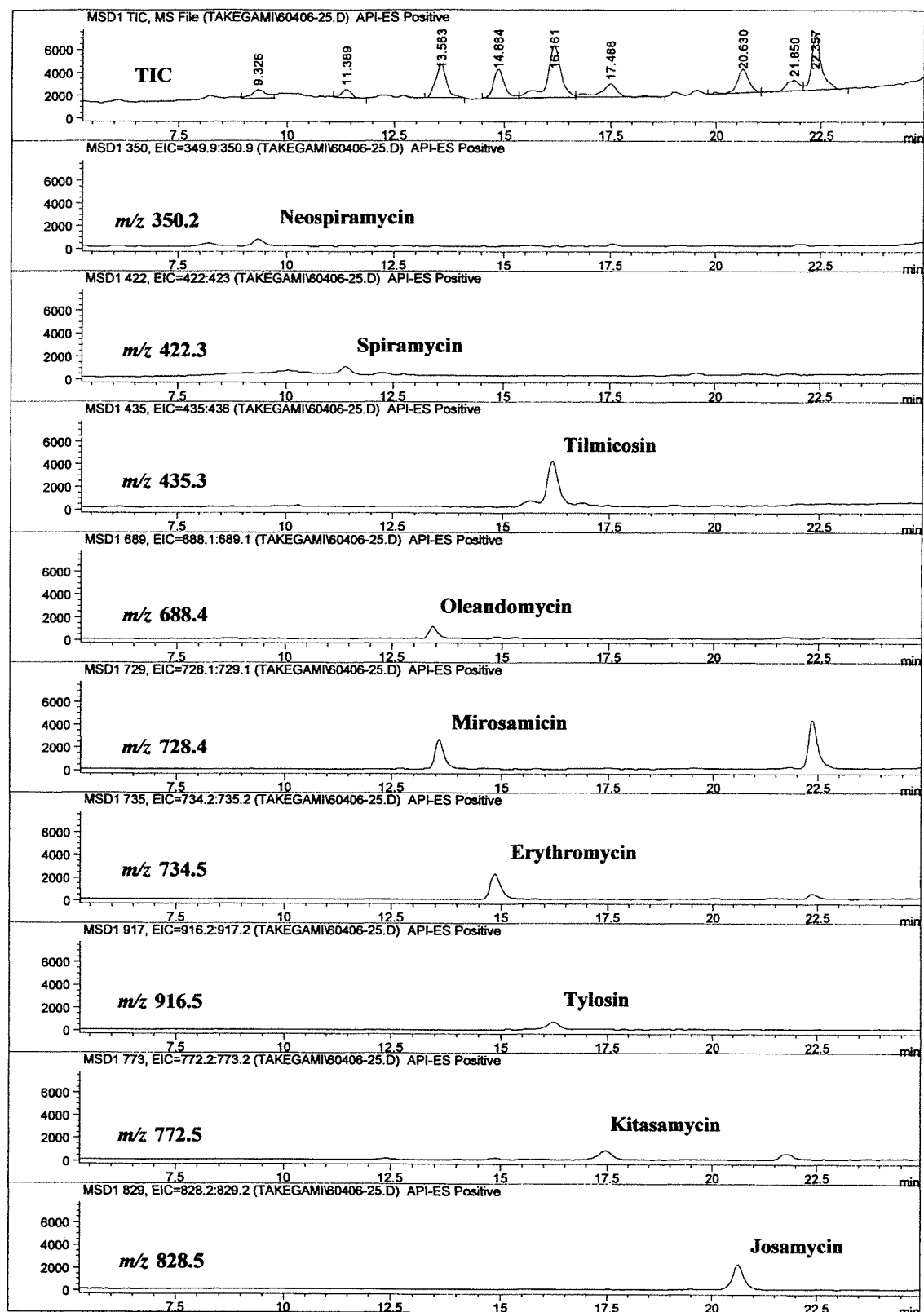


Fig. 4 Typical LC-ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ of each drug

Table 4 Antibacterial activities of macrolide antibiotics

Compound	Detection limit/ppm		
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>B. mycoides</i> ATCC 11778
NSPM	2.5	1.0	10.0
SPM	1.0	0.5	10.0
TLM	0.5	0.5	2.5
OM	0.5	0.25	5.0
MRM	2.5	0.5	2.5
EM	0.1	0.1	0.5
TS	0.5	0.5	2.5
KT	0.5	0.25	2.5
JM	1.0	0.25	2.5

Each drug was dissolved in 40% acetonitrile.

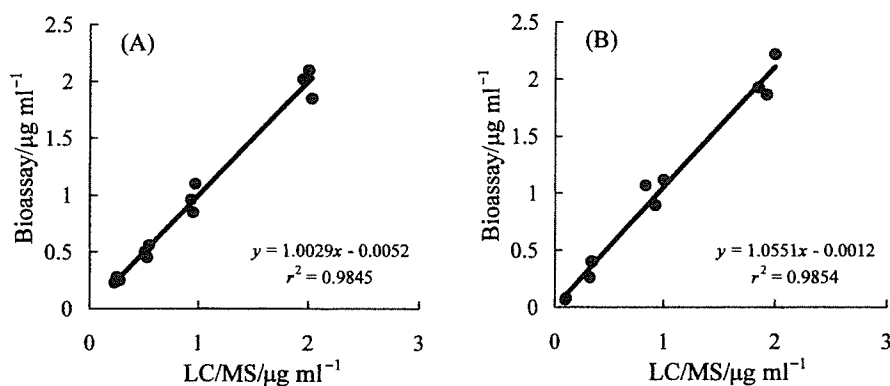


Fig. 5 Correlation between LC/MS and bioassay methods for (A) josamycin ($y = 1.00x - 0.005$; $r^2 = 0.985$; $n = 12$) and (B) erythromycin ($y = 1.05x - 0.001$; $r^2 = 0.985$; $n = 12$) in milk

することが可能であることから、今後ますます有効な分析手法になるものと考えられる。

文 献

- 1) 二ノ宮幾代治: “動物の抗生物質”, p. 307 (1987), (養賢堂).
- 2) 堀江正一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **36**, 329 (1995).
- 3) Kanfer, I, Skinner, M, F. Walker, R. B.: *J. Chromatogr. A*, **812**, 255 (1998).
- 4) J. M. Gaugain, B. Anger, M. Laurentie: *J. AOAC Int.*, **82**, 1046 (1999).
- 5) M. Horie, K. Saito, T. Yoshida, R. Ishii, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. A*, **812**, 295 (1998).
- 6) 堀江正一, 城戸靖雅, 村山三徳, 豊田正武, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **40**, 401 (1999).
- 7) B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders: *J. AOAC Int.*, **79**, 397 (1996).
- 8) W. M. A. Niessen: *J. Chromatogr. A*, **812**, 53 (1998).
- 9) 岡 尚男, 伊藤裕子, 猪飼蒼友: 食品衛生学雑誌, **42**, 159 (2001).
- 10) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Achene, A. Cacilia: *J. Chromatogr. A*, **926**, 97 (2001).
- 11) M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Dlahaut: *J. Chromatogr. B*, **753**, 189 (2001).
- 12) M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa: *Analytica Chimica Acta*, **492**, 187 (2003).
- 13) 農林水産省動物医薬品検査所年報, No. 30 (1993).
- 14) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: 衛乳第 107 号 (1994).
- 15) D. A. Volmer, J. P. M. Hui: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 123 (1998).
- 16) Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION: “CODEX ALIMENTARIUS VOLUME THREE Residues of veterinary drugs in foods”, p. 67 (1996), (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, Rome).
- 17) 厚生労働省告示: 第 497 号, 498 号 (2005).

Determination of Macrolide Antibiotics in Milk by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Harumi TAKEGAMI¹, Masakazu HORIE¹ and Hiroyuki NAKAZAWA²

¹ Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

² Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 25 April 2006, Accepted 30 June 2006)

A simple and reliable method using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS) has been developed as an analytical method of macrolide antibiotics, such as erythromycin, oleandomycin, kitasamycin, josamycin, mirosamicin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin and tylosin in milk. The drugs were extracted with acetonitrile, and the extracts were cleaned up by partition with hexane. The extracts were analyzed using LC/MS. The LC separation was performed on a TSK-gel Super ODS column (100 mm × 2 mm i.d.) with a gradient system of 0.2% acetic acid-acetonitrile as the mobile phase. MS acquisitions parameters were established in the positive ESI mode, and the related molecular ions were $(M + 2H)^{2+}$ or $(M + H)^+$. The recoveries of the drugs from milk fortified at a level 0.1 µg/g were 63.8 ~ 95.9% with high precision. The limits of detection of the drugs in milk were 0.01 µg/g.

Keywords : macrolide antibiotics ; erythromycin ; oleandomycin ; kitasamycin ; josamycin ; mirosamicin ; neospiramycin ; spiramycin ; tilmicosin ; tylosin ; milk ; LC/MS.

報 文

酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる 食肉中のキノロン系抗菌剤の分析

岩崎 雄介¹, 伊東 岳¹, 北村 渉¹, 加藤美穂子², 小平 司²,
堀江 正一³, 伊藤 里恵¹, 斉藤 貢一¹, 中澤 裕之^{®1}

キノロン系抗菌剤は人や動物に対して治療を目的に幅広く使用されている。しかし、畜水産食品においてキノロン系抗菌剤の残留が数多く検出されていることから、薬物残留を評価するのに簡便且つ迅速に分析可能な市販 ELISA キットによるスクリーニングが期待される。酵素免疫測定法 (ELISA) 法は多数の検体を一度に処理できるが、交差反応性に起因する同定能力等に課題を有する。そこで、ELISA 法として開発された New Quinolone Kit の有用性を検証するために、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) を用いた高精度な機器分析法を構築し、比較検討した。HPLC/FL による検出限界及び定量限界はエンロフロキサシンにおいて 2 ng/g 及び 10 ng/g であった。エンロフロキサシン 50 ng/g を添加したところ、回収率は 107.8% と良好な結果を得ることができた。ELISA 法との相関性を検討するため、同一食肉を試料として HPLC/FL 及び ELISA 法をそれぞれ適用したところ、両者の値に相関性が認められた。HPLC/FL では煩雑な前処理及び約 120 分の分析所要時間を必要とするため、ELISA 法は 1 次スクリーニング法として有用であると考えられる。

1 緒 言

近年、粉卵やハチミツなどの輸入食品を中心に抗菌性物質の残留が数多く検出されている¹⁾²⁾。これらの薬剤は、主に疾病の治療を目的とした動物用医薬品を目的として使用されており、法的に規制された用法用量、休薬期間等が遵守されずに使用された場合、畜水産食品中に残留するといわれている。更に、キノロン系に代表される抗菌剤の一部は生体内においても代謝されにくく、未変化体として土壌や環境水に流出されている³⁾⁴⁾。そして、環境中に残留した抗菌剤による、生態系への影響や、抗生物質が効かない薬剤耐性菌を引き起こすことが懸念されている。

抗菌性物質の定量には液体クロマトグラフィー等の機器分析が主に使用されており、キノロン系抗菌剤の分析法も数多く報告されている^{5)~7)}。しかし、測定対象薬剤や試料によって前処理方法を変えなければならず、更に測定時間が長いことを考慮すると、多数の検体を簡便に測定するためには適当でないと考えられる。

一方、多数の検体を対象に医薬品の残留を評価するには簡便且つ迅速に分析可能な Enzyme-linked immunosor-

bent assay (ELISA) 法が有用であると考えられる。ELISA 法は抗原抗体反応を利用した免疫化学的な測定法の一つで、特定の物質に対して特異的に検出することが可能なため、比較的簡単な前処理操作で、短時間に多数の検体を分析することができる。しかし、ELISA 法は十分な免疫原性と酵素活性を保持した標識抗原の作製が難しいことや、固相化の作業などが煩雑であるため、残留分析の領域では普及が進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、市販 ELISA キットの 1 次スクリーニング法としての有用性を検証することを目的として、畜産食品に残留するキノロン系抗菌性物質を対象とした高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) と ELISA 法による分析を実施し、その値の相関性を評価した。

2 実 験

市販 ELISA キットの有用性を検証するため、畜産食肉中キノロン系抗菌剤に関して HPLC/FL による残留分析法を構築して検証を行った。

2.1 試 薬

キノロン系抗菌剤である、ノフロキサシンは和光純薬製を用い、エノキサシン、オフロキサシン及びロメフロキサシンは Sigma 製を使用した。シプロフロキサシンは MP Biomedicals 製を使用し、ダノフロキサシン及びエンロフ

¹ 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

² 株式会社フロンティア研究所: 061-3241 北海道石狩市新港西 1-777-12

³ 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

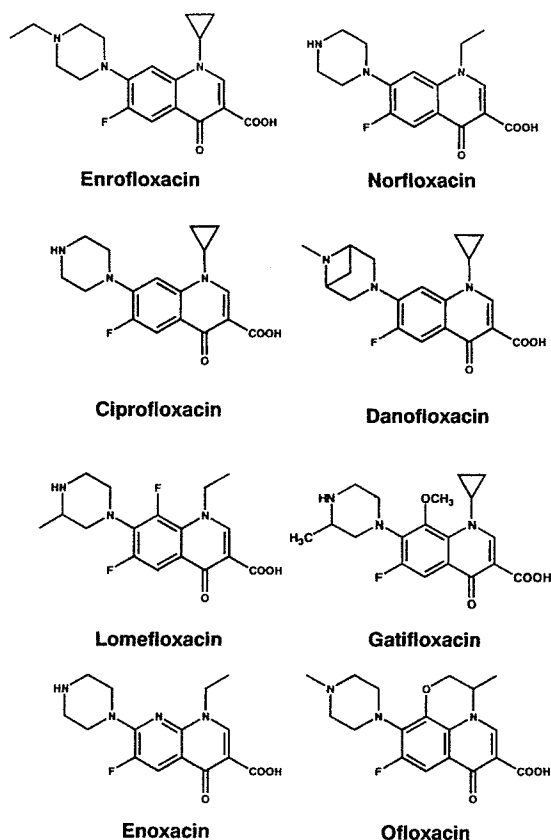


Fig. 1 Structures of fluoroquinolone

ロキサシンは関東化学製を用いた。ガチフロキサシンはLKT Laboratories製を使用した。アセトニトリルは和光純薬製（HPLC用）を用いた。超純水は日本ミリポア製Milli-Qの超純水装置で調製したものをを用いた。

2・2 ELISA キット

フロンティア研究所製 New Quinolone Kit を用い、キノロン系抗菌剤の測定を行った。定量値は反応率が100%であるエンロフロキサシン量に換算することで求めた。

2・3 HPLC 条件

機器分析によるキノロン系抗菌剤の測定には、HPLC/FLを使用した。分析用ポンプとして島津製作所製 LC-10AS 及び蛍光検出器には RF-10A_{XL} を用いた。移動相は 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH = 3.0) : アセトニトリル = 83 : 17 (v : v) を調製し、イオンペアー試薬として Nonaflo-ropentanoic acid (NPPA) を 0.2% になるように加え、流量 0.2 ml/min で送液した。分析カラムには Waters 製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長は励起波長 270 nm, 蛍光波長 447 nm に設定して測定を行った。

Table 1 Cross-reactivity of fluoroquinolones by ELISA

	Cross-reactivity, %
Enoxacin	20
Norfloxacin	100
Ofloxacin	1.4
Ciprofloxacin	100
Danofloxacin	80
Lomefloxacin	30
Enrofloxacin	100
Gatifloxacin	0.9

2・4 前処理方法

細切した食肉約 5 g を精密に量り取り、アセトニトリル 15 ml を加えた後に、ホモジナイズした。その後、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) により得られた上清を回収し、残渣にアセトニトリル 15 ml を加え、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) を再度行った。アセトニトリル層を 40℃, 減圧下で乾固させ、得られた残渣に 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) を加えて再溶解させた。その後、Oasis MCX[®] (30 mg) を用いた固相抽出法を適用した。固相抽出条件は、洗浄溶媒にメタノール (1 ml) と 50 mM 炭酸アンモニウム (2 ml) を使用し、5% アンモニア含有メタノール (3 ml) で固相カートリッジからキノロン系抗菌剤の溶出を行った。溶出液を 40℃, 減圧下で乾固し、得られた残渣に 50 mM PBS (phosphate buffered saline) を加えて再溶解させ、HPLC/FL 及び ELISA の測定に供した。

3 結果及び考察

3・1 ELISA における交差反応性の評価

キノロン系抗菌剤の構造式を Fig. 1 に示す。New Quinolone Kit における交差反応性について、キノロン系抗菌剤標準品を用いて求めたところ、エンロフロキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンは抗体と 100% 反応する結果を得ることができた。また、ダノフロキサシンは 80%、ロメフロキサシンは 30% 前後で交差反応性を示した (Table 1)。また、ELISA キットによるエンロフロキサシンの定量限界値は 8 ng/g であった。

3・2 蛍光波長の最適化

測定対象キノロン系抗菌剤の移動相中における励起及び蛍光スペクトルを測定したところ、Fig. 2 に示すように発蛍光性が確認された。そこで、本分析法においては動物用医薬品として主に使用されているエンロフロキサシンに着目し、キノロン系抗菌剤が検出できる波長 270 nm 及び 447 nm に設定し、以後の実験を行った。キノロン系抗菌剤の蛍光強度は移動相の pH 及び塩濃度に依存して変化することから、それぞれの最適条件を検討した。その結果、