

報 文

微生物学的試験法による畜産物中に残留する 抗菌性物質の高感度測定法

堀江 正一^{®1}, 小林 晴美¹, 石井 里枝¹, 中澤 裕之²

畜産食品中に残留するペニシリン系抗生物質 (PCs), セファロスポリン系抗生物質 (CEs), テトラサイクリン系抗生物質 (TCs), マクロライド系抗生物質 (MLs), アミノグリコシド系抗生物質 (AGs), キノロン系抗菌剤 (QNs) などを中心とした, より多くの抗菌性物質を一括して検出できる微生物学的試験法を検討した. 畜産食品から 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2) で除タンパクと同時に薬物を抽出し, ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した. 各グループから代表的薬剤を選び, 残留基準値レベルで添加回収実験を行った結果, 明瞭な阻止円が観測され, 回収率はおおむね 70% 以上であった. 本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高い PCs, CEs, MLs, TCs, AGs, QNs を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 抗菌性物質の残留の有無を簡便に判定できる有効な方法であると思われる.

1 緒 言

畜産動物の疾病予防及び治療を目的に数多くの抗菌性物質が使用され, 畜産物の生産性向上に大きく寄与している. しかし, 一方では, これら薬物の畜産物中への残留が食品衛生上強く懸念されていることから¹⁾, 残留の有無を確認する簡易かつ迅速な分析法の確立が必要とされている. 残留抗菌性物質の分析法は, 微生物学的試験法と理化学的試験法に大別される. 微生物学的試験法とは, 抗菌性物質が有する微生物の増殖を抑制する作用 (抗菌作用) を指標とした分析法であり, 形成された阻止円大きさを測定することにより, 試料中の抗菌性物質の量を求めることができる. 抗生物質をはじめとする抗菌性物質の残留分析には, 従来から微生物学的試験法が汎用されてきた²⁾. 現在, 日常検査には平成 6 年に厚生省から示された「畜産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」及び「畜産食品中の残留抗生物質の分別推定法 (改訂)」が公定法として用いられている. しかし, これらの検査法³⁾は, 試料前処理に有害な有機塩素系溶媒を使用しており, 操作も煩雑な面がある. 更に検出感度の点で改善すべき問題がある. そこで今回, 畜産食品中に残留する可能性が高いペニシリン系抗生物質, セファロスポリン系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノ

グリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤などを中心とした, より多くの抗菌性物質の残留の有無を一括して判定できる実用的な微生物学的試験法の構築を試みた.

2 実 験

2.1 試料及び試薬

試料には, 埼玉県内で市販されていた牛, 豚, 鶏の筋肉部及び豚肝臓を用いた.

標準抗菌性物質: 試験に供した抗生物質及び合成抗菌剤は動物用医薬品として汎用されている薬剤を中心に選択し, ペニシリン系抗生物質 (PCs) 7 種, セファロスポリン系抗生物質 (CEs) 7 種, マクロライド系抗生物質 (MLs) 8 種, アミノグリコシド系抗生物質 (AGs) 6 種, テトラサイクリン系抗生物質 (TCs) 4 種, クロラムフェニコール (CP), サルファ剤 (SAs) 10 種, キノロン剤 (QNs) 12 種の計 55 種類の抗菌性物質を用いた (Table 1).

標準溶液: 各標準品約 20 mg を精秤し, PCs, CEs, MLs, TCs, CP, SAs, QNs はメタノール 50 mL に, AGs は精製水 50 mL に溶解して標準原液を調製し, 適宜 10% メタノールで希釈して標準溶液とした.

除タンパク・抽出用溶液: 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリルを (6:2:2) の割合に混合し, 約 10°C に冷却をして用いた (用時調製).

Oasis HLB カートリッジ (200 mg): Waters 製, カートリッジはあらかじめメタノール 5 mL, 次いで精製水 5 mL でコンディショニングした後使用した.

その他の試薬は, いずれも特級品を使用した.

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

Table 1 Detection Limit of Antibacterials

Antibacterials			Detection limit/ $\mu\text{g mL}^{-1}$			
			<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 8)	<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 5)	<i>M.L.</i> ATCC 9341	
Antibiotics	Penicillins	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	
		Ampicillin	0.05	0.05	0.01	
		Benzylpenicillin	0.05	0.1	0.01	
		Cloxacillin	0.25	2.5	2.5	
		Dicloxacillin	0.25	1	1	
		Nafcillin	0.5	2.5	0.05	
		Oxacillin	0.1	2.5	0.25	
	Cephalosporins	Cefoperazone	2	>50	0.5	
		Cefuroxime	0.25	>50	0.5	
		Cephapirin	0.01	0.5	0.1	
		Cephalonium	0.25	5	1	
		Cephalexin	0.5	5	0.5	
		Cefquinome	1	2.5	0.25	
		Ceftiofur	0.05	2.5	0.1	
	Macrolides	Erythromycin	0.5	0.1	0.05	
		Oleandomycin	5	0.5	0.25	
		Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	
		Josamycin	2.5	1	0.25	
		Spiramycin	10	2.5	0.5	
		Tylosin	2.5	0.5	0.5	
		Tilmicosin	2.5	1	0.5	
		Mirosamicin	2.5	0.5	0.1	
	Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin	10	0.5	2.5	
		Neomycin	10	0.5	10	
		Gentamycin	1.0	0.25	5	
		Kanamycin	2.0	1	12.5	
		Spectinomycin	>10	>10	>10	
		Streptomycin	5.0	0.5	2.5	
	Tetracyclines	Oxytetracycline	0.25	1	>10	
		Chlortetracycline	0.05	0.5	10	
		Tetracycline	0.1	1	>10	
		Doxycycline	0.05	0.1	1	
	Others	Chloramphenicol	10	10	2.5	
	Synthetic antibacterials	Sulfa drugs	Sulfadiazine	>50	>50	>50
			Sulfadimethoxine	>50	>50	>50
			Sulfadimazine	>50	>50	>50
			Sulfadoxine	>50	>50	>50
			Sulfamethoxazole	>50	>50	>50
			Sulfamethoxypyridazine	>50	>50	>50
			Sulfamerazine	>50	>50	>50
			Sulfamonomethoxine	>50	>50	>50
			Sulfaquinoxaline	>50	>50	>50
			Sulfathiazole	>50	>50	>50
Quinolones			Danofloxacin	0.5	0.05	10
		Difloxacin	0.5	0.05	>50	
		Enrofloxacin	0.5	0.25	10	
		Flumequine	1.0	2.5	>50	
		Nalidixic acid	2.5	10	>50	
		Norfloxacin	1.0	0.5	>50	
		Ofloxacin	1.0	0.25	10	
		Orbifloxacin	0.5	0.25	25	
		Oxolinic acid	0.5	1.0	>50	
		Piromidic acid	1.0	5.0	>50	
		Vebufloxacin	1.0	0.5	25	
Sarafloxacin		0.5	0.25	50		

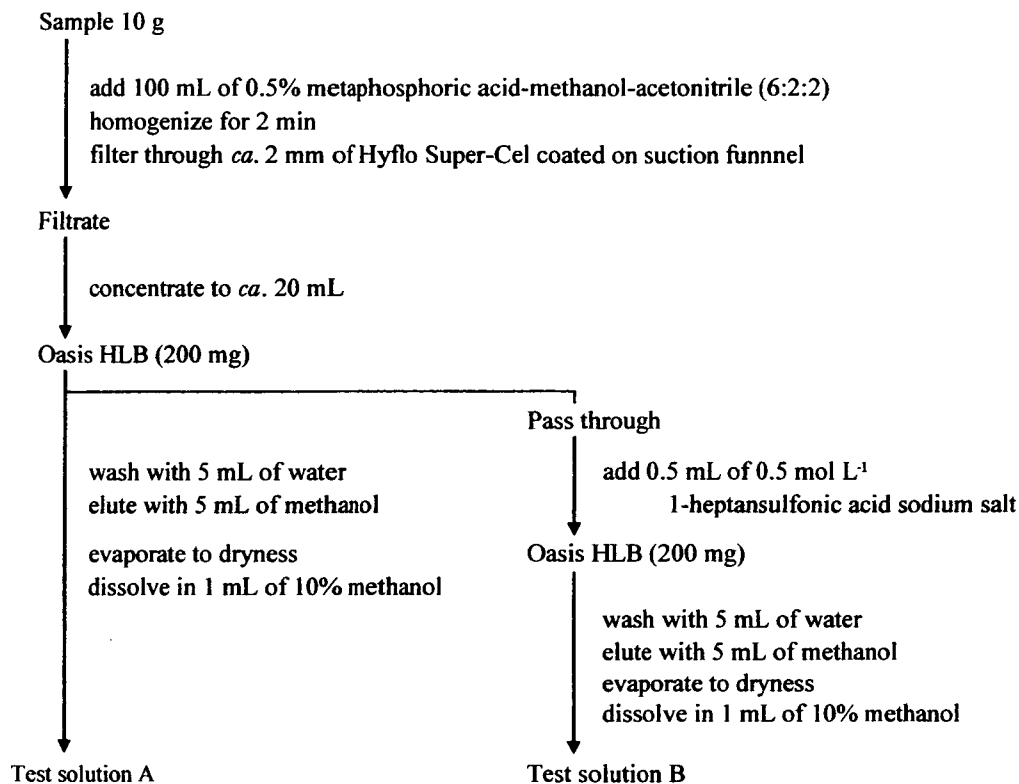


Fig. 1 Analytical procedure for antibacterials in livestock products

2.2 微生物学的試験法

試験菌としては, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B.s.* ATCC 6633) 及び *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M.l.* ATCC 9341) を用いた. 試験菌液の調製は「動物用抗生物質製剤検定一般基準」⁴⁾ に準拠した. 検査用平板培地は「畜産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾ におおむね準拠して調製した. すなわち, 検査用平板は, いずれも Difco 製の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地) 及び Antibiotic Medium 5 (AM5 培地) を使用した. これらの培地を 121°C, 15 分間高圧滅菌処理後, 55°C ± 1 に保持し, これに *B.s.* ATCC 6633 芽胞菌液 (使用培地; AM5 及び AM8 の 2 種類では, 培地の 1/100 量を), *M.l.* ATCC 9341 試験菌液 (使用培地; AM5 では培地の 1/5 量) を加え, 十分に混合した後, その 9 mL をベトリ皿に注入し, 水平に静置して凝固させ, 検査用平板培地を作製した. パルプディスクはアドバンテック東洋製の直径 10 mm, 厚さ 1.2 mm (吸水量 0.08 mL ± 0.01 mL) の厚手タイプを用いた. パルプディスクを試験溶液に浸漬し, 検査用平板培地上に置いた. それらの平板は, 約 5°C で 30 分間放置した後, 30°C で 18 時間培養した.

2.3 検量線の作成

各標準品の濃度が 0.01 ~ 10 ppm となるように標準溶液を調製し, 微生物学試験法に供した. 出現した阻止円の直径から片対数グラフを用いて検量線を作成した. すなわ

ち, 片対数グラフの縦軸に阻止円直径を, 横軸 (対数目盛) に薬剤濃度をプロットして検量線を作成した.

2.4 試験溶液の調製

試料 10 g を取り, 除タンパク・抽出用溶液 100 mL を加えてホモジナイズした後, 濾過補助剤ハイフロスーパーセルを厚さ約 2 mm に敷いた吸引濾過器 (桐山漏斗製) を用いて濾過した. なお, 試料が肝臓の場合はホモジナイズ抽出液にもハイフロスーパーセル約 3 g 加え, 吸引濾過した. 濾液を 40°C の水浴中で約 20 mL に減圧濃縮した後, Oasis HLB カートリッジに負荷した. カートリッジを精製水 5 mL で洗浄後, メタノール 5 mL で溶出した. 溶出液を減圧乾固した後, 残留物を 10% メタノール 1.0 mL で溶解し, PCs, CEs, MLs, TCs 及び QNs 検査用試験溶液 (試験溶液 A) とした. 一方, カートリッジ流出液及び洗浄液を合わせ, 0.5 M ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加えた後, 再度コンディショニング (先に使用したカートリッジをメタノール 5 mL 及び精製水 10 mL で洗浄) した Oasis HLB カートリッジに負荷した. カートリッジを精製水 5 mL で洗浄した後, メタノール 5 mL で溶出した. 溶出液を減圧乾固した後, 残留物を 10% メタノール 1.0 mL で溶解し, AGs 検査用試験溶液 (試験溶液 B) とした (Fig. 1).

Table 2 Comparison of test organisms on limit of detection of tetracyclines

Tetracyclines	Detection limit/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 8)	<i>B.m.</i> ATCC 11778 (AM 8)
Oxytetracycline	0.25	0.1
Chlortetracycline	0.05	0.05
Tetracycline	0.1	0.1
Doxycycline	0.05	0.05

3 結果及び考察

3.1 テトラサイクリン系抗生物質の検出

「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾では、試験菌として *B.s.* ATCC 6633, *M.L.* ATCC 9341 及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B.m.* ATCC 11778) の3試験菌を採用している。3試験菌の中で、特に *B.m.* ATCC 11778 は TCs を感度よく検出する目的で採用されている²⁾。しかし、試験菌 *B.m.* ATCC 11778 は、試験菌液の調製が煩雑な面がある。そこで、試験菌 *B.m.* ATCC 11778 の代わりに *B.s.* ATCC 6633 の使用を検討した。一般に試験菌 *B.s.* ATCC 6633 の培地には、pH が 7.9 である AM 5 が採用されている。しかし TCs は、弱酸性領域で安定であることから、抽出溶液及び培地の pH 共に弱酸性領域 (pH 4.5 及び 6.5) が用いられている。そこで、*B.s.* ATCC 6633 を試験菌に用い、培地の pH が弱酸性 (pH 5.9) に調整済みの AM 8 を採用したところ、*B.m.* ATCC 11778 に比べ、幾分劣るものの TCs を感度よく検出することが可能であった (Table 2)。

3.2 抗菌性物質の検出限界

畜水産食品中に残留する抗菌性物質の検査に数多くの試験菌及び培地が採用されている⁴⁾。しかし、個々の抗菌性物質に対して好ましい試験菌及び培地を採用することは、試験操作が非常に煩雑となり、結果を得るまでに長時間を必要とする。そこで、比較的多くの抗菌性物質に対して感受性を示す 2 試験菌、3 検査用平板培地を用いることとした {*B.s.* ATCC 6633 (使用培地: AM5 及び AM8 の 2 種類) 及び *M.L.* ATCC 9341 (使用培地: AM5)}。本検査用培地に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べた (Table 1)。Table 1 に示すとおり、2 菌種、3 種平板培地を用いることにより、今回分析に供した多くの抗菌性物質は 0.1~0.5 ppm レベルで検出することが可能であった。なお、SAs はいずれも 50 ppm レベルでも阻止円の形成が十分でなく、通常の残留レベルでは検出困難と思われた。したがって、以後の検討から SAs は除くこととした。

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度の

施行により、畜水産食品中に含まれる抗菌性物質の検出感度としては、残留基準 (暫定基準を含む) 及び一律基準 (0.01 ppm) を満足する検出感度が要求される。抗菌性物質の牛、豚、鶏等の筋肉可食部、肝臓及び魚介類に対する残留基準 (暫定基準を含む) は、PCs, CEs では 0.005~2.0 ppm, MLs は 0.05~2 ppm, AGs は 0.04~2.0 ppm, TCs は 0.05~0.6 ppm, QNs は、0.01~2 ppm の範囲である。抗菌性物質及び対象食品により、残留基準値は大きく異なるが、望まれる検出感度は一律基準を含めた残留基準を総合的に考慮すると、微生物学的試験法においては 0.01~0.1 ppm と思われる。

3.3 前処理法の検討

現在公定法として採用されている「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾における前処理法は、試料 5 g をクエン酸アセトン緩衝液 20 mL でホモジナイズ抽出するのみと簡易な操作である。しかし、この方法は畜産食品中に残留する薬物を 5 倍希釈するため、検出感度上問題がある。一方、「畜水産食品中の残留抗生物質分別推定法 (改訂)」³⁾では最終的に残留薬物は 10 倍に濃縮されるが、操作にクロロホルム等を使用し、かつ操作が極めて煩雑である。

畜水産食品中の残留抗菌剤の前処理法として種々の方法が用いられている。著者らはこれまでに、メタリン酸-メタノール系⁵⁾⁶⁾あるいはメタリン酸-アセトニトリル系溶液⁷⁾⁸⁾で除タンパクと同時に抽出し、多くの薬物が保持される逆相系カートリッジによる前処理法を採用してきた。MLs や TCs はメタリン酸-メタノール系を、一方 QNs はメタリン酸-アセトニトリル系を用いることにより高回収率を得た。なお、除タンパク・抽出溶媒中のメタリン酸については、その濃度が高くなるに従い、除タンパク効果は向上するが、回収率が低下する薬物も見られた。そこで、除タンパク・抽出溶媒には 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2)⁹⁾を用いることにした。

次に、カートリッジであるが、TCs や QNs はシリカベースのオクタデシルシラン (ODS) 系カートリッジでは、充填剤中の残存シラノール基や金属不純物の影響を強く受け、不可逆的に一部が吸着される⁷⁾。そこで、カートリッジには残存シラノール基や金属不純物の影響の少ないポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いることにした。

なお、本前処理法では AGs は、そのほとんどがカートリッジに保持されずに流出した。AGs は、アミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であるためと考えられる。そこで、カートリッジ流出液にイオンペアー剤を加え、アミノグリコシド系抗生物質を保持させる手法を採用した¹⁰⁾¹¹⁾。

Table 3 Recoveries of Antibacterials from Swine Muscle and Liver

Antibacterials			Added/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery, % (mean, $n = 3$)	MRL in sample/ $\mu\text{g g}^{-1}$
Penicillins	Penicillin G	Swine Muscle	0.05	77	0.05
		Swine Liver	0.05	72	0.05
	Ampicillin	Swine Muscle	0.05	77	0.06
		Swine Liver	0.05	72	0.06
Cephalosporins	Cefapilin	Swine Muscle	0.1	89	0.03
		Swine Liver	0.1	82	0.03
	Cefalexin	Swine Muscle	0.1	86	0.2 (cattle muscle)
		Swine Liver	0.1	81	0.2 (cattle liver)
Macrolides	Erythromycin	Swine Muscle	0.1	75	0.05
		Swine Liver	0.1	70	0.05
	Spiramycin	Swine Muscle	0.1	81	0.2
		Swine Liver	0.1	73	0.6
Tetracyclines	Oxytetracycline	Swine Muscle	0.2	82	0.2
		Swine Liver	0.2	75	0.6
	Chlortetracycline	Swine Muscle	0.2	70	0.2
		Swine Liver	0.2	65	0.6
Aminoglycosides	Streptomycin	Swine Muscle	0.5	83	0.6
		Swine Liver	0.5	72	0.6
	Dihydrostreptomycin	Swine Muscle	0.5	81	0.6
		Swine Liver	0.5	77	0.6
Quinolones	Enrofloxacin	Swine Muscle	0.1	85	0.05
		Swine Liver	0.1	82	0.1
	Oxolinic acid	Swine Muscle	0.1	88	1
		Swine Liver	0.1	84	1

3.4 添加回収実験

豚の筋肉及び肝臓に PCs からベンジルペニシリン, アンピシリン, CEs からセファピリン, セファレキシン, MLs からエリスロマイシン, スピラマイシン, TCs からオキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, AGs からストレプトマイシン, デヒドロストレプトマイシン, QNs からエンロフロキサシン, オキシリン酸を選び, 添加回収実験を行った. 添加レベルは, 残留基準を参考にして 0.05~0.5 ppm とした. 今回検討した各抗菌性物質の添加回収率を Table 3 に示す. 添加回収率は, おおむね 70% 以上であり, 残留分析法としてはほぼ満足すべき結果であると思われる.

本法により, 今回検討した 12 種類の牛, 豚, 鶏の筋肉部及び豚肝臓における検出感度は, 0.005~0.05 ppm レベルであった. 代表例として, 豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度を Table 4 に示す. 牛, 鶏の筋肉部及び豚肝臓における検出感度も豚筋肉部及び豚肝臓とほぼ同じであった. 今回検討した 12 種類の抗菌剤の本法における検出感度は, 基準以下の濃度の検出が可能であり, 満足できるものであった.

本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高い PCs, CEs, MLs, TCs, AGs, QNs を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 残留抗菌性物質の簡易かつ高感度な検出法として日常検査に用いら

れることが期待される.

4. 結 語

畜産食品中に残留する主な抗菌性物質として, ペニシリン系抗生物質, セファロsporin系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノグリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤などを中心とした, より多くの抗菌性物質を一括して検出できる高感度な微生物学的試験法を検討した.

畜産食品から 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2) で除タンパクと同時に薬物を抽出し, ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した. 各グループから代表的薬剤を選び, 残留基準値レベル (0.05~0.5 ppm) で添加回収実験を行った結果, その回収率はおおむね 70% 以上であった.

本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質, セファロsporin系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノグリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 残留抗菌性物質の簡易かつ高感度な検出法として日常検査に用いられる実用的な方法であると考えられる.

本研究は, 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安

Table 4 Limit of detection for swine muscle and liver

	Antibacterials		Detection limit/ $\mu\text{g g}^{-1}$			MRL in sample/ $\mu\text{g g}^{-1}$
			B.s. ATCC 6633 (AM 8)	B.s. ATCC 6633 (AM 5)	M.L. ATCC 9341	
Penicillins	Penicillin G	Swine Muscle	0.005	0.01	0.005	0.05
		Swine Liver	0.01	0.01	0.005	0.05
	Ampicillin	Swine Muscle	0.01	0.01	0.005	0.06
		Swine Liver	0.01	0.01	0.005	0.06
Cephalosporins	Cefapilin	Swine Muscle	0.005	0.01	0.01	0.03
		Swine Liver	0.005	0.01	0.02	0.03
	Cefalexin	Swine Muscle	0.05	0.5	0.1	0.2 (cattle muscle)
		Swine Liver	0.05	0.5	0.1	0.2 (cattle liver)
Macrolides	Erythromycin	Swine Muscle	0.05	0.01	0.005	0.05
		Swine Liver	0.2	0.02	0.005	0.05
	Spiramycin	Swine Muscle	2	1	0.05	0.2
		Swine Liver	2	1	0.05	0.6
Tetracyclines	Oxytetracycline	Swine Muscle	0.05	0.5	0.5	0.2
		Swine Liver	0.05	0.5	0.5	0.6
	Chlortetracycline	Swine Muscle	0.01	0.1	0.5	0.2
		Swine Liver	0.01	0.1	0.5	0.6
Aminoglycosides	Streptomycin	Swine Muscle	0.5	0.05	0.2	0.6
		Swine Liver	0.5	0.05	0.2	0.6
	Dihydrostreptomycin	Swine Muscle	0.5	0.05	0.2	0.6
		Swine Liver	0.5	0.05	0.2	0.6
Quinolones	Enrofloxacin	Swine Muscle	0.05	0.02	1	0.05
		Swine Liver	0.05	0.02	1	0.1
	Oxolinic acid	Swine Muscle	0.1	0.1	>10	1
		Swine Liver	0.1	0.1	>10	1

心・安全確保推進事業)により実施したものである。関係各位に深謝します。

文 献

- 堀江正一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **36**, 329 (1995).
- 神保勝彦: 食品衛生学雑誌, **40**, J195 (1999).
- 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法, 畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法: 厚生省乳肉衛生課長通知, 衛乳第107号, 平成6年7月1日.
- 動物用抗生物質製剤検定一般基準: 農林水産省告示第1437号, 昭和54年10月17日.
- M. Horie, K. Saito, R. Ishii, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. A*, **812**, 295 (1998).
- M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa: *Anal. Chim. Acta*, **492**, 187 (2003).
- 堀江正一, 齋藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **34**, 289 (1993).
- M. Horie, K. Saito, N. Nose, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **653**, 69 (1994).
- 堀江正一, 齋藤貢一, 吉田栄充, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **39**, 383 (1998).
- 堀江正一, 吉田栄充, 菊池好則, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **42**, 374 (2001).
- M. Horie, H. Saito, T. Natori, J. Nagata, H. Nakazawa: *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **27**, 863 (2004).

Sensitive Microbiological Assay of Residual Antibacterials in Meat by Microbiological Method

Masakazu HORIE¹, Harumi KOBAYASHI¹, Rie ISHII¹ and Hiroyuki NAKAZAWA²

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

² Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 20 July 2007, Accepted 2 November 2007)

A simple and sensitive screening method using bioassay for the simultaneous analysis of antibacterials (penicillins, cephalosporins, macrolides, tetracyclines, aminoglycoside, quinolones, etc.) in meat has been developed. The drugs were extracted with 0.5% metaphosphoric acid-methanol-acetonitrile (6 : 2 : 2), and the extracts were cleaned up on an OASIS HLB cartridge (200 mg). The pulp disk method with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (pH 6 and 8) and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (pH 8) as test organisms was employed for assaying the antibacterials. Many antibacterials, except for sulfa drugs, were detected with sufficient sensitivity (0.01 ~ 0.5 µg/mL). The recoveries of typical antibacterials (penicillin G, ampicillin, cefapirin, cefalexin, erythromycin, spiramycin, oxytetracycline, chlortetracycline, streptomycin, dihydrostreptomycin, enrofloxacin and oxolinic acid) from swine muscle and liver fortified at levels of 0.05 ~ 0.5 µg/g were 65 ~ 89%. Therefore, we recommend this proposed screening method for the routine analysis of residual antibacterials in livestock products.

Keywords : antibacterials ; bioassay ; residual analysis ; meat.

報 文

微生物学的スクリーニング, HPLC および LC/MS/MS による 食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質 4 薬剤の 迅速分析

(平成 19 年 9 月 10 日受理)

神田真軌* 草野友子 小山内たか 牛山慶子 竹葉和江
坂本美穂 林 洋 井草京子 井部明広 永山敏廣

Rapid Determination of Residues of 4 Tetracyclines in Meat by a Microbiological Screening, HPLC and LC/MS/MS

Maki KANDA*, Tomoko KUSANO, Taka OSANAI, Keiko USHIYAMA, Kazue TAKEBA,
Miho SAKAMOTO, Hiroshi HAYASHI, Kyoko IGUSA, Akihiro IBE
and Toshihiro NAGAYAMA

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;
* Corresponding author

A rapid and precise determination residues of 4 tetracyclines (TCs) (oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) and doxycycline (DOXY)) in meat was developed by employing three analyses; a microbiological screening, HPLC and LC/MS/MS. TCs were extracted with pH 4.0 McIlvaine buffer containing 0.01 mol/L EDTA from a meat sample, and then purified using a mixed mode, reversed-phase and cation-exchange cartridge. The mean recoveries ($n=5$) of 0.2 $\mu\text{g/g}$ OTC, TC and CTC, 0.05 $\mu\text{g/g}$ DOXY spiked in meat samples were 76.6–99.0% (C.V. 1.6–5.4%). In 13 meat samples in which the microbiological screening indicated the presence of TCs, CTC (9 samples) and DOXY (4 samples) were identified with HPLC and LC/MS/MS.

(Received September 10, 2007)

Key words: テトラサイクリン系抗生物質 tetracyclines; オキシテトラサイクリン oxytetracycline; テトラサイクリン tetracycline; クロルテトラサイクリン chlortetracycline; ドキシサイクリン doxycycline; 食肉 meat; 微生物学的スクリーニング microbiological screening; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析法 LC/MS/MS

緒 言

抗生物質は、畜水産動物の疾病の予防および治療に用いられ、畜水産食品の安定供給に貢献している。これらのうちテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、広範囲の微生物に抗菌スペクトルを有すること、また安価であることなどから、国内外で動物用医薬品および飼料添加物として汎用されている。そのため、食品中の残留事例も多く報告されている。

平成 18 年 5 月のポジティブリスト制度の施行に伴い、オキシテトラサイクリン (OTC)、テトラサイクリン (TC) およびクロルテトラサイクリン (CTC) の 3 薬剤は、HPLC による一斉試験法^{*1}および個別試験法^{*2}が示されて

いる。しかし、現在のところ、ドキシサイクリン (DOXY) の試験法は示されていない。

近年、食肉中の DOXY の残留事例が多く報告されている^{*3,1)}。その原因には DOXY が安価になり、従来の 3 薬剤に代わり使用が増加している背景がある^{*3}。このことから、DOXY を含めた TCs 4 薬剤の分析法の早急な確立が必要である。

畜水産食品中の TCs の分析法はこれまでに、微生物学的試験法^{2)~4)}、HPLC^{5)~8)} および LC/MS/MS^{9)~12)} など数多く報告されている。しかし近年、その多くは TCs 単独

*1 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/3-008.html>

*2 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-038.html>

*3 <http://www.pref.mie.jp/MSHOKU/hp/GAIYOU/H17doxy.html>

* 連絡先

東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

薬剤もしくは3薬剤の分析法であり、特に DOXY を含む4薬剤の同時分析の報告は少ない^{7), 12)}。

TCs は動物の体内ではエピマー化およびアイソマー化されないが¹³⁾、水溶液中ではこれらの変化が起きやすい^{12), 14)}。そのため、残留分析には迅速な方法が必要である。そこで、逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジカラムを用い、TCs 4薬剤の高回収率が得られ、簡便かつ高性能な試料の精製法を検討した。また測定には、3つの方法を組み合わせた精度の高いシステムの構築を試みた。食の安全を確認するための実際の検査では、多くの検体を一斉に処理する方法が必要とされる。そこで、第一段階として、簡易かつ低コストに TCs 4薬剤の有無を同時に判定できる、微生物学的スクリーニング(スクリーニング)を検討した。スクリーニングにより TCs の残留が推定された検体は、第二段階として選択性および汎用性の高い HPLC を用いて同定・定量し、さらに第三段階として高い選択性を持つ LC/MS/MS により確認する方法を検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

試料: あらかじめ TCs が残留していないことを確認した市販のブタ、ウシおよびニワトリの筋肉を使用した。

標準品: TCs として、オキシテトラサイクリン塩酸塩(和光純薬工業(株)製)、テトラサイクリン塩酸塩(関東化学(株)製)、クロルテトラサイクリン塩酸塩(和光純薬工業(株)製)およびドキシサイクリン塩酸塩(林純薬工業(株)製)を使用した。

標準原液: 各抗生物質の標準品をひょう量し、メタノールに溶解して、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を作製した。スクリーニングおよび HPLC においては pH 7.0 リン酸緩衝液を用いて、LC/MS/MS においてはメタノールを用いて希釈し、標準溶液を調製した。

0.01 mol/L EDTA 含有 pH 4.0 マキルベン緩衝液(マキルベン緩衝液): 0.1 mol/L クエン酸溶液に 0.2 mol/L リン酸二ナトリウム溶液を混合し、pH 4.0 に調整し、0.01 mol/L になるように EDTA を加えた。

pH 7.0 リン酸緩衝液: 0.1 mol/L のリン酸一カリウムと 0.1 mol/L のリン酸二カリウムを混合し、pH 7.0 に調整した。

イミダゾール緩衝液: イミダゾール 68.08 g, 酢酸マグネシウム 10.72 g および EDTA 0.37 g を水 800 mL に溶かした。これに酢酸を加えて pH 7.2 に調整し、水で 1,000 mL に定容した。

固相抽出カートリッジ: Oasis[®] MCX カートリッジ (6 mL, 150 mg, Waters 社製) (MCX カラム) を使用した。使用前には、メタノール 10 mL およびマキルベン緩衝液 10 mL を用いてコンディショニングを行った。

MCX カラムからの溶出溶液: アセトニトリル, 0.25 mol/L 塩化カリウムおよび TEA を 80:20:0.01 (v/v/v) に混合した。この混液は用時調製した。

メタノールおよびアセトニトリルは HPLC 用を、ギ酸は LC/MS 用を、その他の試薬は特級を使用した。

2. 試験溶液の調製

試料は細切均一化した後、その 5.0 g をひょう量した。これに、マキルベン緩衝液を 100 mL 加え、ホモジナイズした。3,000 回転/分で 15 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を MCX カラムに流速約 1~2 mL/min で負荷した。カラムを 0.1 mol/L リン酸一カリウム 10 mL で洗浄し、3 分間アスピレーターで通気を行い乾燥させた。次いで、カラムをアセトニトリル 5 mL および 0.1 mol/L リン酸一カリウム 10 mL で順次洗浄した後、再び 3 分間乾燥させた。アセトニトリル-0.25 mol/L 塩化カリウム-TEA (80:20:0.01, v/v/v) 混液 10 mL を用いて TCs を溶出した。この溶出液を 40°C で減圧乾固した。残留物を pH 7.0 リン酸緩衝液 0.50 mL に溶解し、これをスクリーニングおよび HPLC 用試験溶液とした。また、同様に試料の前処理を行い減圧乾固した残留物をメタノール 1.0 mL に溶解し、10,000 回転/分、5 分間遠心分離した後、上清を LC/MS/MS 用試験溶液とした。

3. TCs の測定

1) スクリーニング

試験菌には、*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*) および *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*K. rhizophila*) の 3 菌株を使用した。

試験菌液、検査平板の作製、培養条件および判定は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」^{*4}に準拠した。ただし、試験溶液 75 μL をペーパーディスクに負荷した。

検量線の作成: *B. mycoides* プレートに、OTC 0.5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TC 0.25~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CTC および DOXY 0.05~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液をおのおの 75 μL ずつ負荷したペーパーディスクを置き、前記のスクリーニングの方法に従って操作して、得られた阻止円の直径から片対数検量線を作成した。

2) HPLC

装置: 島津 LC-10Avp 装置

条件: Table 1a に示した。

検量線の作成: 0.05~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCs 標準溶液を用い、10 μL を HPLC に注入し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

3) LC/MS/MS

HPLC 装置: Agilent Technologies 社製 1100

質量分析装置: Thermo Electron 社製 Finnigan MAT TSQ 7000

条件: Table 1b に示した。

TCs の確認: LC/MS/MS 用試験溶液 1 μL を LC/MS/

*4 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知“平成6年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について”, 平成6年7月1日, 衛乳第107号(1994).

Table 1. Operating conditions of HPLC and LC/MS/MS for analysis of oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) and doxycycline (DOXY)

a) HPLC		
Column	Sunfire (150×3.0 mm i.d., 3.5 μm p.d.)	
Mobile phase	Imidazole buffer-methanol (4 : 1)	
Flow rate	0.2 mL/min	
Column temperature	40°C	
Injection volume	10 μL	
Detection	FL, Ex: 390 nm; Em: 512 nm	
b) LC/MS/MS		
HPLC conditions		
Column	Sunfire (150×2.1 mm i.d., 3.5 μm p.d.)	
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid; B: Methanol gradient (A : B = 100 : 0 → 0 : 100 in 10 min)	
Flow rate	0.2 mL/min	
Column temperature	40°C	
Injection volume	1 μL	
MS conditions		
Ionization	ESI, positive	
Spray voltage	4.5 kV	
Sheath gas	N ₂ , 80 psi	
Auxiliary gas	N ₂ , 40 arbitrary unit	
Collision gas	Ar, 2 mTorr	
Capillary temperature	350°C	
	Transition reaction	Collision energy
	Precursor ions → Product ions (<i>m/z</i>)	(eV)
OTC	461 → 443 [M+H-NH ₃] ⁺	18
TC	445 → 410 [M+H-NH ₃ -H ₂ O] ⁺	18
CTC	479 → 444 [M+H-NH ₃ -H ₂ O] ⁺	25
DOXY	445 → 428 [M+H-NH ₃] ⁺	25

MS に注入し、Multiple Reaction Monitoring (MRM) で測定した。各 TCs の保持時間と重なるピークが検出された場合、その MS/MS スペクトラムを得て、各 TCs のプロダクトイオン (Table 1b) と比較し、TCs であるかどうかの確認を行った。

検量線の作成：標準品無添加のブタ、ウシおよびニワトリの筋肉を、本分析法に従い抽出および精製し、MCX カラムからの溶出液を減圧乾固した。残留物を 0.025~2.5 μg/mL の TCs 標準溶液 1.0 mL で溶解し、この試験溶液 1 μL を LC/MS/MS に注入した。MRM で測定し、プロダクトイオン (Table 1b) 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を作成した。

結果および考察

1. 抽出および精製方法の検討

TCs の抽出には、残留抗生物質の検査に広く利用されるマキルベン緩衝液²⁾を用いた。また、精製には MCX カラムを用いた。なお回収率は、HPLC を用いて測定した。

1.1 MCX カラムからの溶出溶液の検討

マキルベン緩衝液 40 mL に、OTC、TC および CTC 10 μg/mL、DOXY 2.5 μg/mL の混合標準溶液 100 μL を添加し、MCX カラムに負荷後、以下の溶液で溶出し、

回収率を比較した。

既報³⁾の溶出溶液 28% アンモニア水 5% 含有アセトニトリル-0.1 mol/L リン酸-カリウム (9 : 1, v/v) 混液 5 mL では、TC、CTC および DOXY の 3 薬剤の回収率が 70% 以下と低かった。この溶出溶液を 2 倍の 10 mL にしても、CTC の回収率は 59% と改善が見られなかった。そこで、TCs 4 薬剤の同時分析に適した溶出溶液の組成について検討した。

CTC はアルカリ溶液中でエピマー化およびアイソマー化されやすいことが知られており^{12), 14)}、既報の溶出溶液に用いたアンモニア水の影響で一部変化したのではないかと推察された。そこで、この溶出溶液である 28% アンモニア水 5% 含有アセトニトリル-0.1 mol/L リン酸-カリウム (9 : 1, v/v) 混液 5 mL に CTC の標準溶液 10 μg/mL を 100 μL 加え、溶媒を留去した後、pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解し、CTC 量を測定した。その結果、CTC は 50% に減少することが判明し、低回収の原因と考えられた。

アンモニア水を TEA^{15), 16)} に替え、Table 2 に示す溶出溶液 A のアセトニトリル-水-TEA (80 : 20 : 0.01, v/v/v) 混液 10 mL で検討を行った。始めに、溶出溶液 A に

Table 2. Effects of the eluate from mixed-mode, reverse-phase and cation-exchange (MCX) cartridge on the recoveries of tetracyclines (TCs) spiked in the McIlvaine buffer

Eluate from MCX cartridge	Recovery (mean±CV)*2 (% , n=3)			
	OTC *3	TC *3	CTC*3	DOXY*3
A Acetonitrile-H ₂ O-TEA*1 (80:20:0.01, v/v/v)	76±4.5	66±6.1	66±7.6	67±7.2
B Acetonitrile-0.25 mol/L KCl-TEA (80:20:0.01, v/v/v)	98±3.5	89±2.4	102±4.5	95±0.8

*1 TEA: Triethylamine

*2 TCs were determined by HPLC.

*3 The levels of TCs spiked in the McIlvaine buffer are 100 µL of 10 µg/mL (OTC, TC, CTC) and 2.5 µg/mL (DOXY).

CTCの標準溶液 10 µg/mL を 100 µL 加え、溶媒を留去した後、pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解したところ、CTC はほとんど減少しないことを確認した。しかし、OTC 以外の TCs 3 薬剤の MCX カラムからの回収率が 70% 以下であった。そこでさらに回収率を上げるため、溶出力の強いカリウムイオン¹⁴⁾を加えた。カリウムイオンとして、アセトニトリルとの混液で溶解する塩化カリウムを用いた。塩化カリウムの濃度は、アセトニトリル-塩化カリウム-TEA (80:20:0.01, v/v/v) 混液を作製したとき 2 層に分離しない 0.25 mol/L とした (溶出溶液 B)。この溶出溶液 B 中では、CTC はほとんど減少しないことを確認した上で、この B 液 10 mL を用いて MCX カラムから溶出したとき、TCs 4 薬剤の回収率はいずれも 89% 以上、変動係数 (CV) は 5% 以内と良好な結果が得られたので、これを MCX カラムからの溶出溶液とし、以下の検討を行った。

1.2 抽出液量の検討

ブタの筋肉 5.0 g に各々残留基準値相当量の OTC, TC および CTC 0.2 µg/g, DOXY 0.05 µg/g を添加し、マキルベン緩衝液を用いて抽出した後、本前処理法に従い精製した。マキルベン緩衝液 40 mL では、OTC 以外の TCs 3 薬剤の回収率は 70% 以下、CV は 5% 以上であった。抽出液中のマトリックス濃度を下げ、MCX カラム上の精製効率を上げるため、マキルベン緩衝液の量を 100 mL に増加して検討した。TCs 4 薬剤の回収率はすべて 70% 以上、CV も 5% 以下と良好な結果が得られたので、抽出液量を 100 mL とした。

2. 添加回収実験

ブタ、ニワトリおよびウシの筋肉 5.0 g に、それぞれ残留基準値相当量もしくは残留基準値の 1/2 相当量の OTC, TC および CTC 0.2 µg/g, DOXY 0.05 µg/g を添加し、添加回収実験を行った。TCs の定量には HPLC を用いた。

回収率は、OTC が 85.6~90.1% (CV 1.6~4.5%)、TC が 76.6~76.8% (CV 3.0~4.5%)、CTC が 86.0~90.0% (CV 3.2~4.6%) および DOXY が 85.3~99.0% (CV 2.2~5.4%) と良好な結果が得られた (Table 3)。本分析法における回収率は、個別試験法^{*2}の回収率 (63.1~82.5%, CV 3.7~8.1%, n=5) と比較して、顕著な改善が

Table 3. Recoveries of TCs from meat samples

TCs	Meat sample	Amount spiked (µg/g)	Recovery* (%)	CV (%)
OTC	Pork	0.2	90.1	1.6
	Cattle	0.2	85.6	4.5
	Chicken	0.2	89.9	3.9
TC	Pork	0.2	76.7	4.5
	Cattle	0.2	76.6	3.2
	Chicken	0.2	76.8	3.0
CTC	Pork	0.2	86.1	4.6
	Cattle	0.2	86.0	3.3
	Chicken	0.2	90.0	3.2
DOXY	Pork	0.05	87.9	2.2
	Cattle	0.05	85.3	5.4
	Chicken	0.05	99.0	4.8

n=5

* TCs were determined by HPLC.

Table 4. The sensitivity patterns for TCs spiked in pork muscle at the maximum residue levels (MRLs) on the microbiological screening (screening)

TCs	Amount spiked (µg/g)	Strain		
		<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>
OTC	0.2	++*1	++*2	-*3
TC	0.2	++	+	-
CTC	0.2	++	+	-
DOXY	0.05	++	+	-

n=3

*1 ++: Diameter of inhibition zone was more than 17 mm.

*2 +: Diameter of inhibition zone was more than 12 mm and less than 17 mm.

*3 -: Diameter of inhibition zone was less than 12 mm.

認められた。また、コーデックス委員会が設定した動物用医薬品残留分析法の適格性許容基準¹⁷⁾を十分満たしていた。

3. TCs のスクリーニング

豚筋肉に残留基準値相当の TCs 4 薬剤をそれぞれ添加し、スクリーニングを行った。各試験菌の感受性パターンを Table 4 に示した。これらの結果から、MCX カラム用いて前処理を行った試験溶液が *B. mycoides* プレートに最も強い感受性を示した場合、本分析法において TCs の残

Table 5. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) of TCs

TCs	The LOD on screening ($\mu\text{g/g}$)	The LOQ on HPLC ($\mu\text{g/g}$)	The MRLs ($\mu\text{g/g}$)
OTC	0.03	0.003	} 0.2*
TC	0.02	0.003	
CTC	0.005	0.005	
DOXY	0.008	0.005	0.05** 0.1***

* The sum of OTC, TC and CTC for pork, cattle and chicken

** For pork and chicken muscle

*** For cattle muscle

留を推定できることが示唆された。

スクリーニングの検出限界値は、0.005~0.03 $\mu\text{g/g}$ であった (Table 5). これは、残留基準値より十分に低い値であった。また、「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法 (改訂)」*4の検出限界値 (0.01~0.05 $\mu\text{g/g}$) より低い値であり、ポジティブリスト制度施行後の残留検査に十分適用できることが示された。

4. HPLC による TCs の同定・定量

HPLC のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。TCs 4 薬剤のピークとウシ、ブタおよびニワトリ筋肉由来のきょう雑ピークとの分離は良好であった。定量限界値 (S/N=10) は、OTC および TC 0.003 $\mu\text{g/g}$, CTC および DOXY

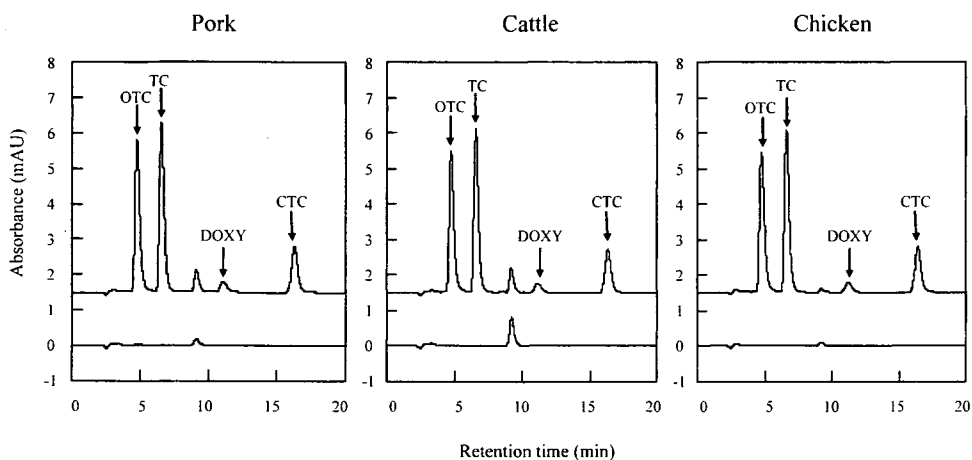


Fig. 1. HPLC chromatograms of 0.2 $\mu\text{g/g}$ OTC, TC, CTC and 0.05 $\mu\text{g/g}$ DOXY spiked in pork muscles, cattle muscles and chicken muscles

Upper profile: spiked, lower profile: unspiked, in each window

Table 6. Results of determination by screening, HPLC and LC/MS/MS of 13 TCs-positive meat samples

a) CTC detected from 9 meat samples

Meat sample	Origin	Screening		HPLC	LC/MS/MS	
		Diameter of inhibition zone (mm)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	MS/MS spectrum (m/z)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Pork	Canada	13.86	0.007	0.007	479→462, 444	0.006
Pork	Mexico	14.13	0.008	0.008	479→462, 444	0.006
Pork	America	14.58	0.009	0.009	479→462, 444	0.004
Pork	Mexico	15.12	0.009	0.009	479→462, 444	0.009
Pork	America	15.87	0.011	0.011	479→462, 444	0.009
Pork	Japan	19.20	0.028	0.029	479→462, 444	0.013
Pork	America	20.63	0.055	0.052	479→462, 444	0.047
Pork	America	21.00	0.072	0.071	479→462, 444	0.12
Turkey	America	22.52	0.088	0.090	479→462, 444	0.10

b) DOXY detected from 4 meat samples

Meat sample	Origin	Screening		HPLC	LC/MS/MS	
		Diameter of inhibition zone (mm)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	MS/MS spectrum (m/z)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Chicken	Malaysia	13.94	0.008	0.005	445→428	0.006
Chicken	Malaysia	15.83	0.013	0.011	445→428	0.010
Chicken	Brazil	15.89	0.014	0.013	445→428	0.014
Cattle	Canada	18.80	0.028	0.027	445→428	0.033

0.005 $\mu\text{g/g}$ であった (Table 5). これにより, スクリーニングにおいて TCs の残留が推定された場合, HPLC 測定により TCs 4 薬剤の同定・定量が可能であることが示された.

5. 本分析法における検出事例

これまで, 分別推定法を用いた著者らの残留抗生物質検査において, TCs の残留が推定された食肉 16 検体に本分析法を適用した. いずれも, スクリーニングで TCs の残留が推定され, HPLC 測定を行ったところ, 9 検体から CTC 0.007~0.090 $\mu\text{g/g}$ (Table 6a) を検出した. また,

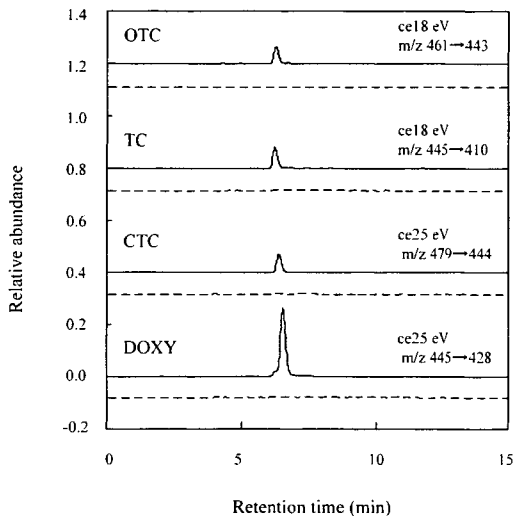


Fig. 2. MRM chromatograms of standard OTC, TC, CTC and DOXY (0.1 $\mu\text{g/mL}$) (—), and blank pork muscles (---)

ce: collision energy

残り 7 検体については, 4 検体から DOXY 0.005~0.027 $\mu\text{g/g}$ (Table 6b) を検出した. また, 3 検体からは定量限界値以下ではあったが, CTC および DOXY の両方が確認可能であった. この 7 検体は, これまで個別試験法^{*2}では薬剤を同定できなかったが, 本分析法で初めて同定することが可能となった. この 16 検体について, LC/MS/MS で測定し, MRM クロマトグラム (Fig. 2) および MS/MS スペクトラムで, CTC および DOXY であることを確認した.

6. スクリーニングと HPLC および LC/MS/MS の相関

CTC もしくは DOXY のみを検出した食肉 13 検体について, 測定値の相関性を調べた.

スクリーニングおよび HPLC による定量値の相関係数は, CTC 0.998 および DOXY 0.995 と良好な相関性を示した (Fig. 3a). 残留薬剤が単独の場合, スクリーニングによる定量値を求め, HPLC による定量値と比較することはより信頼性を高めるために有意義であると考えられる.

TCs 4 薬剤の標準溶液のピーク面積は, マトリックスがある場合には, マトリックスがない場合と比べ小さく, マトリックスによる抑制が見られた. そこで, LC/MS/MS による定量値は, 実験方法 3. TCs の測定 3) LC/MS/MS に示した方法に従い作成したマトリックス検量線 (相関係数 0.999) から求めた. HPLC および LC/MS/MS による定量値の相関係数は, CTC 0.886 および DOXY 0.983 であった (Fig. 3b). LC/MS/MS による定量には, マトリックス検量線が試料ごとに必要とされることなどから, LC/MS/MS は確認に用いることとし, HPLC で妨害

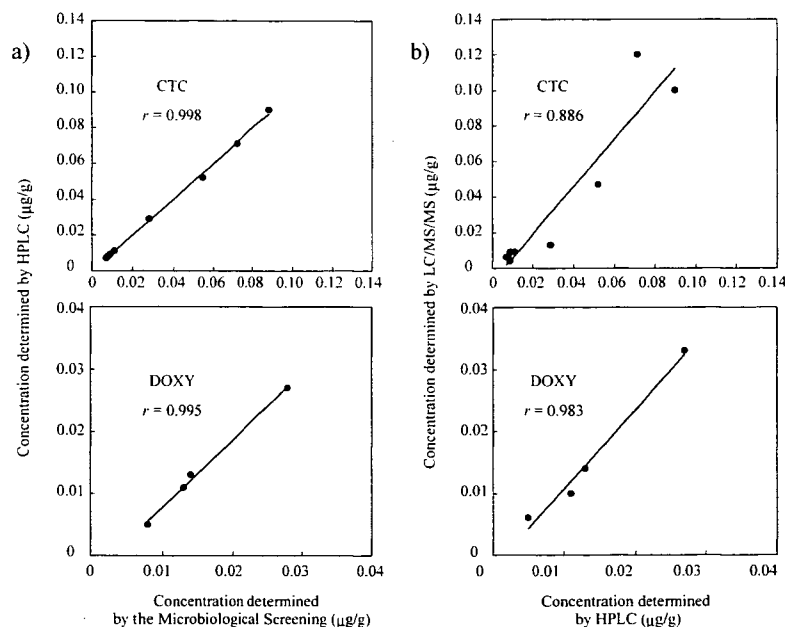


Fig. 3. a) Correlation between CTC and DOXY concentrations determined by the microbiological screening and CTC and DOXY concentrations determined by HPLC

b) Correlation between CTC and DOXY concentrations determined by HPLC and CTC and DOXY concentrations determined by LC/MS/MS

などが見られたときなど必要に応じて定量を行うことが望ましいと考える。

まとめ

微生物学的スクリーニング, HPLC および LC/MS/MS による食肉中の TCs 4 薬剤の迅速かつ精度の高い分析法を構築した。

1. MCX カラムからアセトニトリル-0.25 mol/L 塩化カリウム-TEA (80:20:0.01, v/v/v) 混液で溶出することで, TCs 4 薬剤を選択的に効率よく精製することが可能となった。

2. OTC, TC および CTC 0.2 $\mu\text{g/g}$, DOXY 0.05 $\mu\text{g/g}$ を添加したときの回収率は, 76.6~99.0% (CV 1.6~5.4%) と良好な結果が得られた。

3. 微生物学的スクリーニングの TCs 4 薬剤の検出限界値は 0.005~0.03 $\mu\text{g/g}$ で, 食肉中の残留基準値を十分に検出可能であった。

4. 微生物学的スクリーニングにより TCs の残留が推定された場合, HPLC を用いて, TCs 4 薬剤を同定・定量するシステムが構築できた。

5. LC/MS/MS により, TCs 4 薬剤の確認が可能であった。

6. 本分析法を用いて, 食肉の検査を実施したところ, 9 検体から CTC 0.007~0.090 $\mu\text{g/g}$, 4 検体から DOXY 0.005~0.027 $\mu\text{g/g}$ が検出された。

今回構築した TCs 4 薬剤の分析法は, 現行の個別試験法に比べ, 簡便な前処理のため, 水溶液中の TCs 4 薬剤の変化を抑制でき, 回収率を向上させることができた。実試料に応用する場合, 本分析法は検査の迅速化において, また結果の信頼性を高める上で極めて有用であることが示唆された。

なお, 本研究の一部は日本食品衛生学会第 92 会学術講演会 (2006 年 10 月, 愛知) において発表した。

文 献

- De, Wasch, K., Okerman, L., Croubels, S., De, Brabander, H., Van, Hoof, J., De, Backer, P. Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: Correlation between results of screening and confirmatory tests. *Analyst*, **123**, 2737-2741 (1998).
- Jinbo, K., Monma, T., Maruyama, T., Matsumoto, A. Simplified classification method for residual antibacterial agents in meat by microbiological assay. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **32**, 86-92 (1991).
- Kusano, T., Kanda, M., Kamata, K., Miyazaki, Y. Microbiological method for the detection of antibiotic residues in meat using mixed-mode, reverse-phase and cation-exchange cartridge. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 191-196 (2004).
- Ferrini, A. M., Mannoni, V., Aureli, P. Combined plate microbial assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food Addit. Contam.*, **23**, 16-24 (2006).
- Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S., Niedzielska, J., Ellis, R. Determination of tetracycline residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, **12**, 294-299 (1998).
- Cooper, A. D., Stubbings, G. W., Kelly, M., Tarbin, J. A., Farrington, W. H., Shearer, G. Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J. Chromatogr. A*, **812**, 321-326 (1998).
- Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A*, **987**, 227-233 (2003).
- Schneider, M. J., Braden, S. E., Reyes-Herrera, I., Donoghue, D. J. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **846**, 8-13 (2007).
- Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., Oka, H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in food by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **732**, 55-64 (1999).
- Ishii, R., Horie, M., Murayama, M., Maitani, T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 277-283 (2006).
- Pena, A., Lino, C. M., Alonso, R., Barceló, D. Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.*, **55**, 4973-4979 (2007).
- Bogialli, S., Curini, R., Di, Corcia, A., Laganà, A., Rizzuti, G. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1564-1570 (2006).
- Nielsen, P., Gyrd-Hansen, P. Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **19**, 305-311 (1996).
- Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Carey, M. P., Blachflower, W. J., Hewitt, S. A. Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. *J. Chromatogr. A*, **812**, 327-337 (1998).
- "Saishin Kosou Chushutsuho Gaidobukku" 1st Ed. GL Sciences Inc., Tokyo (1996), p. 148-154.
- Cerkvenik-Flajs, V. Determination of residues of aza-

perone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **586**, 374–382 (2007).

17) FAO/WHO ed. "Codex Alimentarius: Residues of veterinary drugs in foods, Vol. 3", 2nd Ed. (1995), p. 66–69. (ISBN 92-5-103822-8)