

Ⅱ．分担研究報告

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

研究分担者 坂井隆敏

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速な分析法の開発を目的として、種々の畜産食品からの効率的な抽出法の検討を実施した。抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液を使用し、添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を添加することにより、種々の畜産食品から高極性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質を効率的に抽出可能であると推察された。

A. 研究目的

アミノグリコシド系抗生物質は、人や動物用の医薬品として広く使用されている。

農薬・動物用医薬品等の成分である物質については、使用された動物由来の食品の摂食により人の健康に害を及ぼすことのないよう、食品中の残留基準が設定されており、アミノグリコシド系抗生物質についても、動物用医薬品として使用される物質については食品中の残留基準が設定されている。したがって、各食品中のアミノグリコシド系抗生物質を検査する必要があるが、効率的な検査を実施するためには、食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法が必要不可欠である。

畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の試験法としては、「ゲンタマイシン試験法(畜水産物)」及び「ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン試験法(畜水産物)」が通知されているが、食品によっては効率的に精確な分析値が得られない場合があることが報告されている。また、当該試験法は、LC-MS(/MS)測定においてイオンペア

試薬(ヘプタフルオロ-*n*-酪酸)を含む移動相が使用されているが、LC-MS 用のイオンペア試薬の多くは腐食性が高く、分析機器への負担が大きい。

以上のような理由から、本研究においては、食品中のアミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法の開発を検討した。

平成 29 年度は、非常に極性が高い物質であるアミノグリコシド系抗生物質について、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。

B. 研究方法

①標準原液及び標準溶液の調製

検討対象化合物について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル(1:1)混液で希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

②LC 測定条件の再検討

昨年度の検討で設定した LC 条件について、

グラジエント条件や分析カラムの長さを再検討し、より高精度且つ効率的な測定条件の確立について検討した。

③効率的な抽出法の検討

種々の畜産物からの効率的な抽出法について検討した。

すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、種々の抽出溶媒を用いた際の操作性や回収率について検討した。また、試料中のタンパク質等を沈殿させるための添加剤として、塩及び酸の添加について検討した。

④装置及び測定条件等

以下に、本研究で使用した装置及び測定条件等を示した。

LC: Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム: ZIC-cHILIC PEEK HPLC Column (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm、MERCK MILLIPORE 社製)

カラム温度: 40°C

流速: 0.4 mL/分

注入量: 5 μL

移動相:

A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)

B 液 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件:

t_0 , B=50%; t_5 , B=35%; t_8 , B=5%; t_{18} , B=5%; $t_{18.1}$, B=50%; t_{30} , B=50%

MS/MS: Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度: 150°C

脱溶媒温度: 600°C

窒素ガス流量: 1000 L/hr

コーンガス流量: 150 L/hr

キャピラリー電圧: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

法・ポジティブイオンモード

C. 研究結果及び考察

①LC 測定条件の再検討

昨年度の検討において、各検討対象化合物について比較的良好なピーク形状が得られる LC 測定条件を確立したが、確立した条件を用いて標準溶液を繰り返し測定したところ、幾つかの化合物においては測定回数の増加に伴うピーク面積値の減少傾向が確認された。

以上の理由から、まず、LC 測定条件について再検討した。

ネオマイシン等の特に極性が高い化合物においてピーク面積値の減少傾向が確認されたことから、分析カラムの平衡化の際に水和層が十分に形成されていないことが原因であると推察されたことから、平衡化の時間を延長した。また、効率的な測定を考慮し、カラムの長さを 15 cm から 10 cm に変更した。

その結果、全ての検討対象化合物において、良好なピーク形状が得られ、また、各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液の繰り返し測定 (n=10) においてもピーク面積値の減少や増加傾向は確認されず、相対標準偏差 (RSD%) 7%未満の良好な精度が得られた (表 1)。

②効率的な抽出法の検討

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、検討対象化合物を効率的に抽出可能な抽出溶媒について検討した。

検討対象化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は非常に極性が高い化合物である一方、対象食品である畜産物は脂肪等の低極性夾雑物を含む食品も多いことから、まず、極性の高い含水溶媒と低極性の非水系溶媒を同時に用いる方法について検討した。

なお、抽出に含水溶媒を用いた場合には、食品に依っては遠心分離後に残留物が得られず、清澄な抽出液が得られないこともあるため、タンパク質を沈殿させることを目的として塩及び酸の添加を検討した。添加する塩としては、LC の移動相にも使用しているギ酸アンモニウムを選択し、酸としては比較的取扱いが容易なギ酸を選択した。

各検討食品に水及びメタノールもしくはアセトニトリル、*n*-ヘキサンもしくは酢酸エチル、ギ酸アンモニウム及びギ酸を加え、ホモジナイズ及び遠心分離を行った結果、下層の含水溶媒層(水及びメタノールもしくはアセトニトリル)は比較的清澄な溶液が得られたが、食品に依っては上層の非水系溶媒層がゲル状になる、上層と下層の間に浮遊物層が得られるなど、抽出液である含水溶媒層を採る操作が困難となる場合があることが確認された。

そこで、非水系溶媒を使用せず、含水溶媒である水及びメタノール混液のみでの抽出を検討した。

水及びメタノール混液のみで抽出する場合であっても、清澄な抽出液を得るためには塩及び酸の添加が必要であったことから、上述のギ酸アンモニウム及びギ酸を添加して検討した。

試料 10.0 g に対して、水及びメタノール混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を添加後、ホモジナイズ、遠心分離した結果、メタノール比率が 50% 以上の場合に各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、水及びメタノール(1:1)混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を加えて抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定したところ、ネオマイシン等の特に極性が高い化合物が抽出されていないこと

が確認された。

添加する酸について再検討したところ、ギ酸の代わりに塩酸を添加することで、各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。

そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、各比率の水及びメタノール混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定した。また、各ブランク試料を同様に抽出し、抽出液に各検討対象化合物を添加したものをマトリックス添加標準溶液とした。各検討対象化合物について「抽出液におけるピーク面積値」/「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値」×100 の値を算出し、これを回収率とした。結果を表 2 に示した。表 2 に示される通り、塩酸酸性条件下で抽出した場合には、水とメタノールの比率に関わらず、ネオマイシン等の非常に極性が高い物質であっても効率的に抽出可能であった。以上の結果から、高極性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質を効率的に抽出するためには、強酸性条件下で抽出する必要があると考えられた。

次いで、他の畜産物への適用性について検討した。すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵をそれぞれ 10.0 g 量り採り、各検討対象化合物 100 µg を添加した。室温で 30 分間放置後、水及びメタノール(1:1)混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出した。抽出液を合わせ、100 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。結果を表 3 に示した。表 3 に示される通り、検討対象化合物と検討食品に組み合わせによっては、回収率が 60% 程度となる場合もあることが確認された。本検討においては、抽出液をそのまま測定したため、測定の際の試料マトリク

スの影響により正確な測定値が得られていない可能性などを考慮すると、得られた回収率は比較的良好であったと考えられた。

以上の結果及び考察から、塩酸酸性下、水及びメタノール混液を用いてホモジナイズ抽出することで、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵から極性の高い各検討対象化合物を効率的に抽出可能であると推察された。

D. 結論

食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発を目的として、平成 29 年度は、LC 測定条件の改良、並びに、種々の畜産物からの効率的な抽出法について検討した。

まず、LC 測定条件の改良については、分析カラムの平衡化の際の水和層の形成が不十分であることが推察されたため、平衡化時間を延長したところ、良好な併行精度が得られた。また、分析カラムの長さを 15 cm から 10 cm に変更することで、より効率的な測定が可能となった。

抽出法については、抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液を使用し、タンパク質等を沈殿させるための添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を用いることで、検討した牛の筋肉、牛の肝

臓、牛乳及び鶏卵から、極性の高い検討対象化合物を効率的に抽出可能であることが推察された。

抽出液をそのまま測定した場合には、試料マトリックスの影響により、検討対象化合物のピークの保持時間の変動やピーク形状の不良、測定値の変動など、正確な定量に影響を及ぼし得る問題が確認されたことから、試料マトリックスを効果的に除去可能な精製法の確立が必須であると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 改良 LC 条件下における混合標準溶液の繰り返し測定結果

化合物名	相対標準偏差 (RSD%)
アブラマイシン	2.8
アミカシン	6.3
カスガマイシン	4.7
カナマイシン	6.2
ゲンタマイシンC1	6.4
ジヒドロストレプトマイシン	3.6
ストレプトマイシン	3.8
スペクチノマイシン	3.5
ネオマイシン	6.2
ネチルマイシン	3.8
ハイグロマイシンB	2.7

表 2 牛の筋肉抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	水及びメタノール混液			
	(1:4)	(2:3)	(3:2)	(4:1)
アブラマイシン	119	105	96	96
アミカシン	97	80	85	105
カスガマイシン	88	94	95	81
カナマイシン	92	99	103	96
ゲンタマイシンC1	81	90	95	70
ジヒドロストレプトマイシン	83	90	93	107
ストレプトマイシン	84	89	98	115
スペクチノマイシン	84	99	94	94
ネオマイシン	102	91	71	76
ハイグロマイシンB	98	93	93	94

表 3 各試料抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	牛の筋肉	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
アブラマイシン	72	80	139	67
アミカシン	71	82	149	72
カスガマイシン	100	88	90	79
カナマイシン	81	60	99	67
ゲンタマイシンC1	82	84	73	69
ジヒドロストレプトマイシン	94	70	107	72
ストレプトマイシン	84	64	96	69
スペクチノマイシン	88	72	103	81
ネオマイシン	91	81	114	75
ハイグロマイシンB	86	88	111	83

