

Ⅱ．分担研究報告

1. 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、種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。種々の固相抽出カートリッジカラムを用い、精製効果及び適用性について検討した。検討した抽出法及び精製法を組み合わせ分析法を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験を実施することで、構築した分析法の適用性を評価した。

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 30 年度は、畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製方法の確立について検討した。また、前年度に検討した抽出法と組み合わせ分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の分析法としての適用性について検討した。

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。

②抽出法の改良

昨年度の検討で設定した抽出溶媒において、試料によっては上澄液の採取が困難な場合があること、検討した精製法と組み合わせた場合に回収率が低下する場合があることが確認されたため、抽出法の改良について検討した。すなわち、抽出溶媒における塩酸濃度及び添加するギ酸アンモニウム量を再検討した。

③効率的且つ効果的な精製法の検討

種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。

すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

④添加回収試験

検討対象食品として、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。各食品に、検討対象化合物を基準値濃度(基準値が設定されていない場合は0.1 ppm)添加し、各食品の添加試料5個を以下に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液をLC-MS/MSで測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。

試料10.0 gを量り採り、2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液50 mL、ギ酸アンモニウム2 gを加えてホモジナイズした。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン50 mLを加えてホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離後、水/メタノール混液層を採った。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン層を除去し、水/メタノール混液層を採った。残留物に2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液30 mL、ギ酸アンモニウム2 gを加えてホモジナイズした。上記と同様の条件で遠心分離後、水/メタノール混液層を採り、先の水/メタノール混液層と合わせ、水を加えて100 mLに定容した。定

容後の抽出液10 mLを採り、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン(1:1)混液10 mLを加えて振とう後、上記と同様の条件で遠心分離した。上層(酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液層)を捨て、下層(水/メタノール混液層)を採った。この1 mLに水4 mLを加えた後、アンモニア水を用いてpHを7.0~7.5に調整した。

Oasis WCX(500 mg)にメタノール5 mL及び水5 mLを順次注入してコンディショニングした後、上記で得られた溶液を注入した。次いで、アセトニトリル及び水(1:4)混液5 mL、100 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 7.0)5 mL、水5 mLで順次洗浄した後、アセトニトリル、ギ酸及び水(2:1:7)混液10 mLで溶出した。溶出液に2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液0.1 mLを加えた後、エタノールを加えながら40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)(1:1)混液1 mLに溶解したものを試験溶液とした。

また、検討対象化合物を添加していない試料(ブランク試料)からマトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MSで測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出し、測定の際の試料マトリックスの影響を確認した。

図1に、試験溶液調製操作のフローを示した。

⑤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 μ L

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=60%; t_6 , B=5%; t_{14} , B=5%; $t_{14.1}$, B=60%; t_{24} , B=60%

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

①抽出溶媒の再検討

昨年度の検討において、抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液(終濃度 0.2 mol/L の塩酸を含む)を用い、抽出の際にギ酸アンモニウム 5 g を添加することにより、極性の高い検討対象化合物を畜産物から効率的に抽出可能であると推察された。

本年度は、検討した精製法における操作性や精製効果、回収率などを考慮し、抽出溶媒における塩酸濃度及びギ酸アンモニウムの添加量を再検討した。

抽出溶媒中の塩酸濃度については、濃度の増加に伴い遠心分離後の抽出液が清澄になることが確認された。2 mol/L(終濃度 1 mol/L)以上の塩酸濃度では抽出液の状態に違いは観察されなかったことから、抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸

及びメタノール(1:1)混液を選択した。

次いで、抽出時に添加するギ酸アンモニウム量について検討した。抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を用いた場合には、ギ酸アンモニウムを添加しない場合であっても比較的清澄な抽出液を得ることが可能であった。しかしながら、ギ酸アンモニウム無添加の場合の抽出液を Oasis WCX 精製に供した結果、ピークの保持時間が大きく異なり、良好な回収率が得られない化合物があることが確認された。昨年度と同様に、抽出時にギ酸アンモニウム 5 g を添加した場合の抽出液を Oasis WCX 精製に供したところ、保持時間のずれは改善されたものの、回収率は改善されなかった。原因を調査したところ、Oasis WCX に負荷する溶液中のギ酸アンモニウム量が多い場合に低回収率となることが確認されたことから、抽出時のギ酸アンモニウム添加量について再検討した。その結果、抽出時にギ酸アンモニウム 2 g を添加することにより、各畜産食品で比較的清澄な抽出液が得られ、また、Oasis WCX 精製においても良好な回収率が得られることが確認された。

以上の結果から、抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を用い、抽出時にギ酸アンモニウム 2 g を添加することとした。

②効率的且つ効果的な精製法の検討

畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

先ず、強酸性陽イオン交換基を有する InertSep MC-1 (500 mg) について検討した。カラム負荷においては、強酸性の抽出液をそのまま注入可能であった。また、抽出液 10 mL(試料 1

g 相当量)を負荷した場合であっても、各検討対象化合物の保持は良好であった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、アセトニトリル、アンモニア水及び水(5:1:4)混液などを用いることで比較的良好な回収率が得られたが、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンは全く溶出しないことが確認された。表 1 に、牛の肝臓及び鶏卵の添加試料(添加濃度 0.1 ppm、n=1)における各検討対象化合物の回収率を示した。

次いで、分子鑄型ポリマーを充填した SupelMIP(アミノグリコシド系抗生物質用、50 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、充填剤量が 50 mg と少量であるため、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合には、良好な保持は得られなかった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、2 vol%ギ酸(アセトニトリル及び水(1:4)混液)などを用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、鶏卵試料におけるストレプトマイシンなど、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいて良好な回収率が得られなかった。

続いて、弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCX(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合でも比較的良好な保持が得られたが、食品や抽出

液中の塩濃度等の影響により回収率が低下する可能性があることが確認された。洗浄においては、アセトニトリルやメタノールなど、種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、高濃度(10 vol%程度)のギ酸を含む溶液を用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいてはイオン化抑制傾向が確認されたが、比較的良好な回収率が得られた。

以上の結果から、本研究においては弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCX を用いた精製法を採用した。

なお、精製用固相カートリッジカラムからの溶出液を測定用試験溶液に置換する際など、検討対象化合物を含む溶液を効率的に濃縮するためには、エタノールなどを加えながらロータリーエバポレーター等で減圧濃縮を行う必要があるが、一部の検討対象化合物については濃縮工程において回収率が低下することが確認された。ギ酸アンモニウム等の塩を添加して濃縮することで、回収率低下を抑制することが可能であったことから、本研究においては、2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 0.1 mL 添加して濃縮操作を実施した。

③ 添加回収試験

本研究で構築した分析法を用いて添加回収試験を実施した。検討対象食品には、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。添加濃度は各食品における各検討対象化合物の基準値とし、基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm を添加濃度とした。本研究で用いた検討食品と検討対象化合物の添加濃度の組み合わせを表 2 に示した。作成した添加試料を「B. 研究方法

④添加回収試験」に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。また、マトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出した。

本検討で得られた結果を表 3 及び表 4 に示した。また、牛の筋肉における各検討対象化合物のクロマトグラムを図 2～11 に示した。

牛の筋肉では、スペクチノマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、カナマイシン及びネオマイシンにおいては若干低い真度が得られたが、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試験溶液調製工程における損失が原因であることが推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の脂肪においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン B 及びアミカシンにおいては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の肝臓においては、ストレプトマイシンで真度 10%程度、その他の化合物で真度 50%～60%程度と低値であった。マトリックス添加標準溶液の測定結果から、ストレプトマイシンを除い

て測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試料マトリックスの影響により精製用固相カートリッジカラムである Oasis WCX への保持が弱まったことなどが原因と推察された。

牛乳においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン及びハイグロマイシン B においては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

鶏卵においては、ジヒドロストレプトマイシンで高い真度が得られ、スペクチノマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン B、アブラマイシン及びネオマイシンで若干低い真度となった。

なお、カスガマイシンについては、使用した Oasis WCX に保持されなかったため、全ての検討食品において回収が得られなかった。

以上のように、本研究で構築した分析法を用いて畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質を分析した場合には、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。このことから、構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。実際の検査においては、本法を実施し、残留が疑われる場合には、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンについては弱酸性陽イオン交換カートリッジカラムへの負荷量を減らして実施し、その他の化合物については強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製の実施により、効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の

分析が可能と考えられた。

D. 結論

食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析法開発を目的として、平成 30 年度は畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法の確立について検討した。次いで、前年度に検討した抽出法と組み合わせて分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質分析法としての適用性を検討した。

固相カートリッジカラムを用いた精製において、強酸性陽イオン交換基を有するカラムを用いた場合には、カスガマイシン、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンには適用できないものの、その他の検討対象化合物については比較的良好的な回収率が得られた。弱酸性陽イオン交換基を有するカラムを用いた場合には、カスガマイシンを除く化合物に適用可能であったが、食品と化合物の組み合わせによっては良好的な真度が得られない場合もあることが確認された。

精製カラムとして弱酸性陽イオン交換基を有する固相カートリッジカラムを採用した分析法を用い、添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好的な真度が得られ

ない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。

以上の結果から、本検討で構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。本法を用いた分析の実施により残留が疑われる場合には、精製用固相カートリッジカラムへの負荷液量の調整や異なる固相カートリッジカラムを用いた精製の実施などにより効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

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

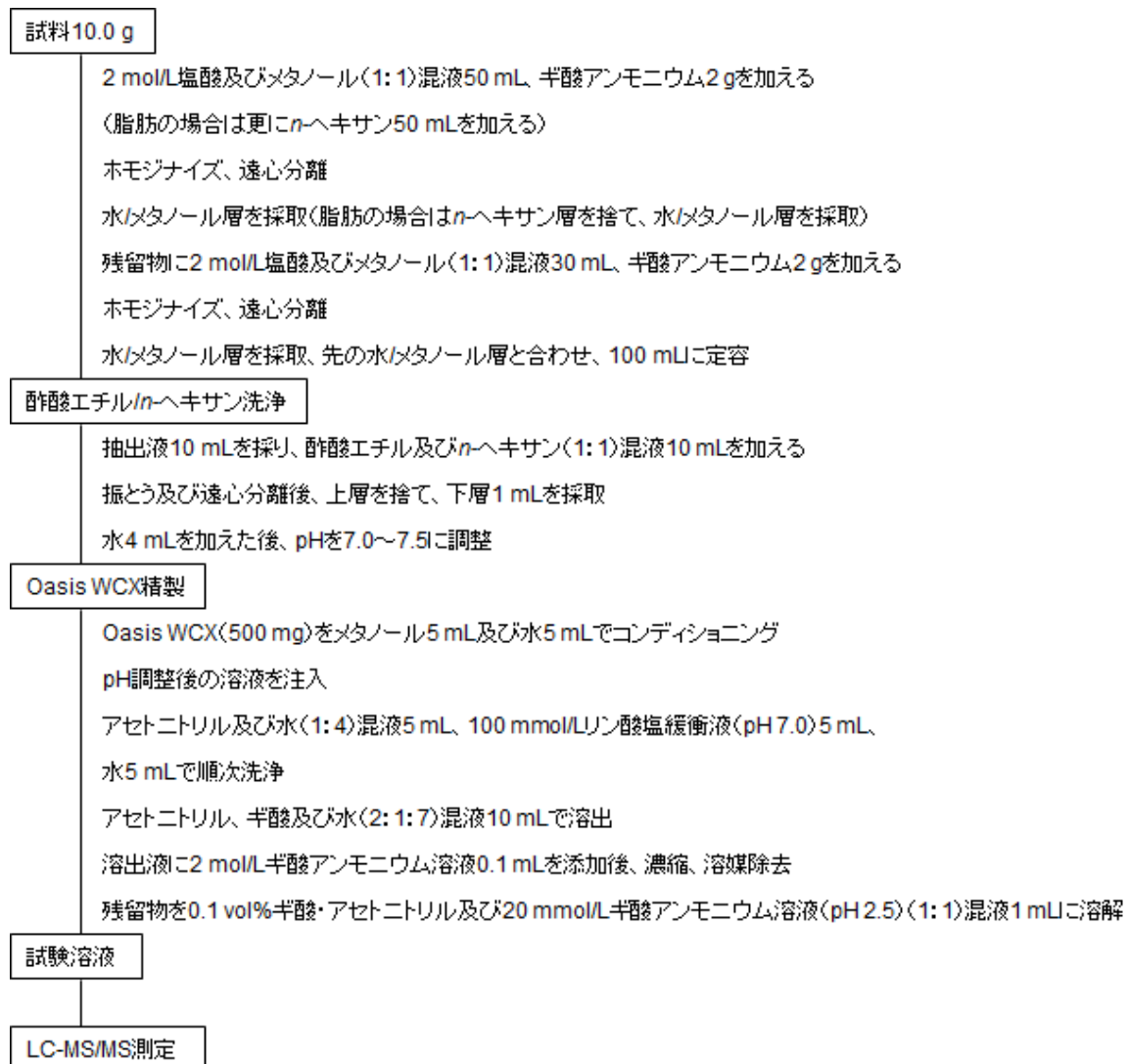


図 1 試験溶液調製法のフローチャート

表 1 強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製における検討対象化合物の回収率

	回収率(%、n=1、添加濃度0.1 ppm)	
	牛の肝臓	鶏卵
スペクチノマイシン	37	72
カスガマイシン	-	-
ネチルマイシン	110	184
ゲンタマイシンC1	80	104
カナマイシン	103	108
ハイグロマイシンB	42	133
アブラマイシン	99	99
ストレプトマイシン	-	-
ジヒドロストレプトマイシン	-	-
アミカシン	62	155
ネオマイシン	105	104

表 2 添加回収試験における検討対象化合物の添加濃度

	添加濃度(ppm)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	0.5	2	2	0.2	2
カスガマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネチルマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ゲンタマイシンC1	0.1	0.1	2	0.2	0.1
カナマイシン	0.04	0.04	1	0.7	0.2
ハイグロマイシンB	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
アブラマイシン	0.5	0.5	5	0.1	0.1
ストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
ジヒドロストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
アミカシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネオマイシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

*: 基準値が未設定の食品と検討対象化合物の組み合わせ

表 3 添加回収試験結果

	牛の筋肉		牛の脂肪		牛の肝臓		牛乳		鶏卵	
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
スペクチノマイシン	233	13.0	44	5.0	63	4.2	59	5.3	48	10.2
カスガマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	95	2.6	85	5.5	62	5.8	87	5.0	75	6.0
ゲンタマイシンC1	76	2.9	88	6.2	58	4.2	94	4.4	78	4.7
カナマイシン	61	10.2	78	4.9	55	7.5	71	6.4	62	6.7
ハイゲロマイシンB	78	5.0	47	11.9	60	2.4	61	12.6	54	5.5
アブラマイシン	74	3.4	76	3.9	58	3.6	80	9.0	69	7.1
ストレプトマイシン	80	1.1	103	5.9	13	4.8	110	11.0	105	12.0
ジヒドロストレプトマイシン	133	2.1	171	9.7	53	5.5	172	11.0	154	5.3
アミカシン	83	7.2	63	9.3	54	14.4	78	7.0	76	11.0
ネオマイシン	59	9.5	72	3.2	51	8.7	84	4.8	68	4.9

表 4 測定の際の試料マトリックスの影響

	測定の際の試料マトリックスの影響 [*]				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	3.80	0.51	0.91	0.69	0.76
カスガマイシン	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	1.20	1.02	1.01	0.99	0.84
ゲンタマイシンC1	1.14	1.05	0.92	1.00	1.33
カナマイシン	1.01	1.02	1.01	0.80	0.94
ハイゲロマイシンB	1.03	0.71	0.91	0.73	0.81
アブラマイシン	0.99	0.94	0.93	0.94	1.16
ストレプトマイシン	1.02	0.85	0.31	1.33	1.74
ジヒドロストレプトマイシン	1.37	2.24	0.75	2.06	2.27
アミカシン	1.19	0.77	0.90	0.87	1.13
ネオマイシン	1.07	0.92	1.05	1.01	0.87

*:マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

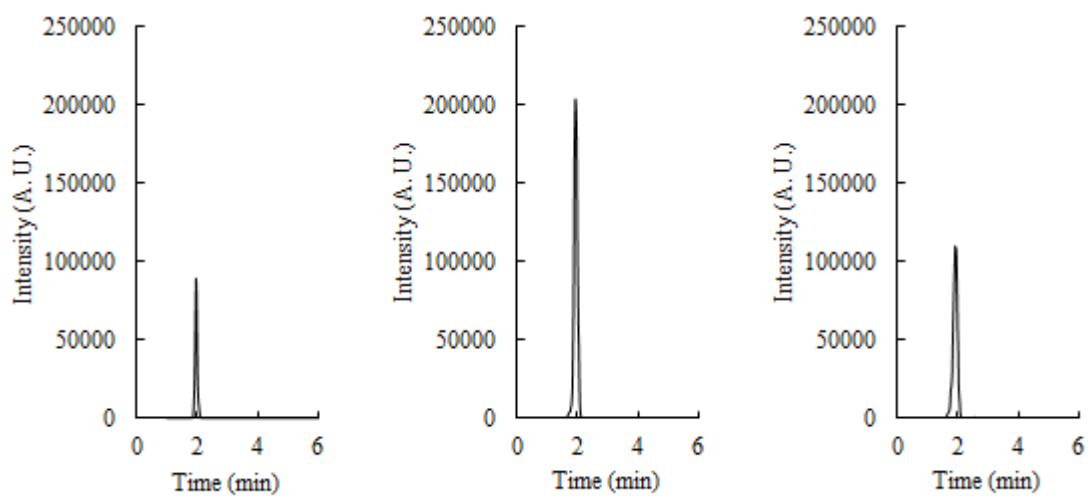


図 2 筋肉における SRM クロマトグラム(スペクチノマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

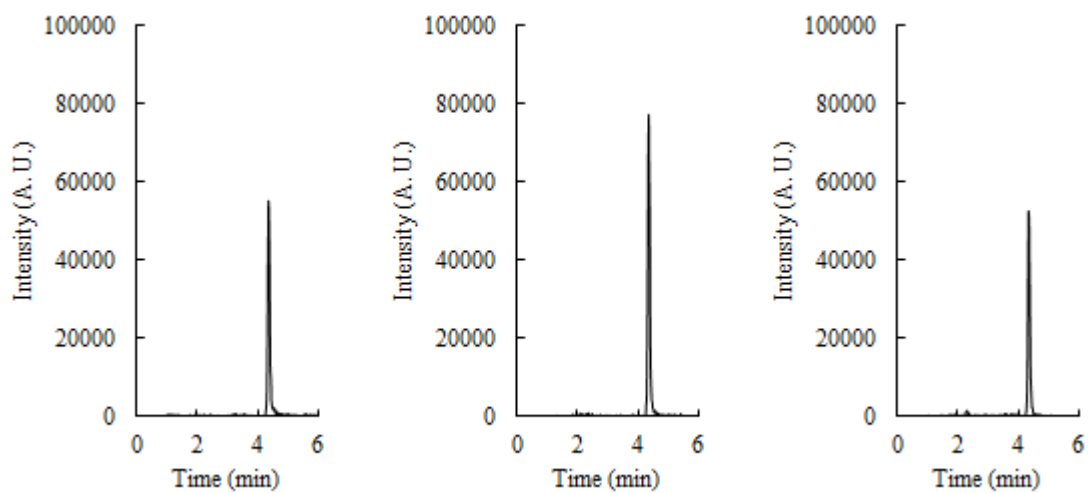


図 3 筋肉における SRM クロマトグラム(ネチルマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

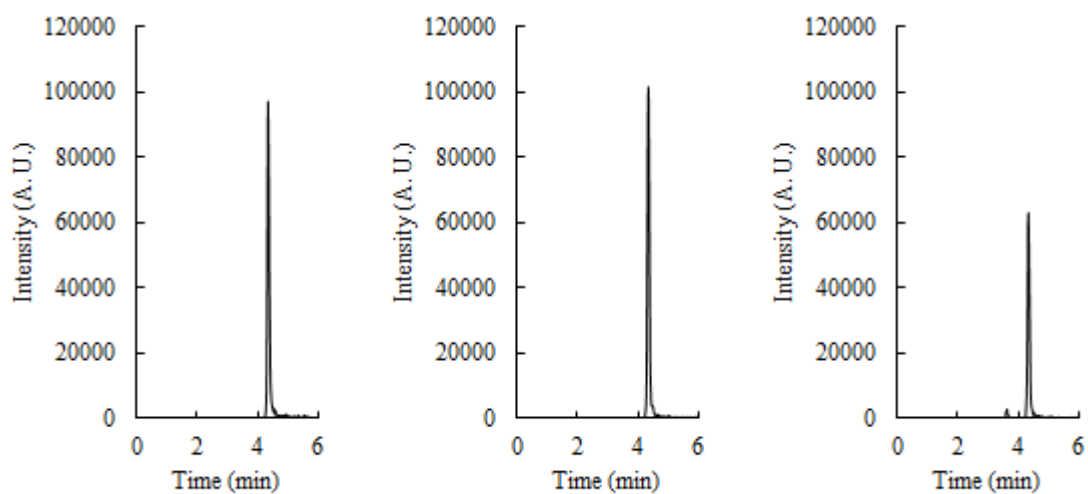


図 4 筋肉における SRM クロマトグラム(ゲンタマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

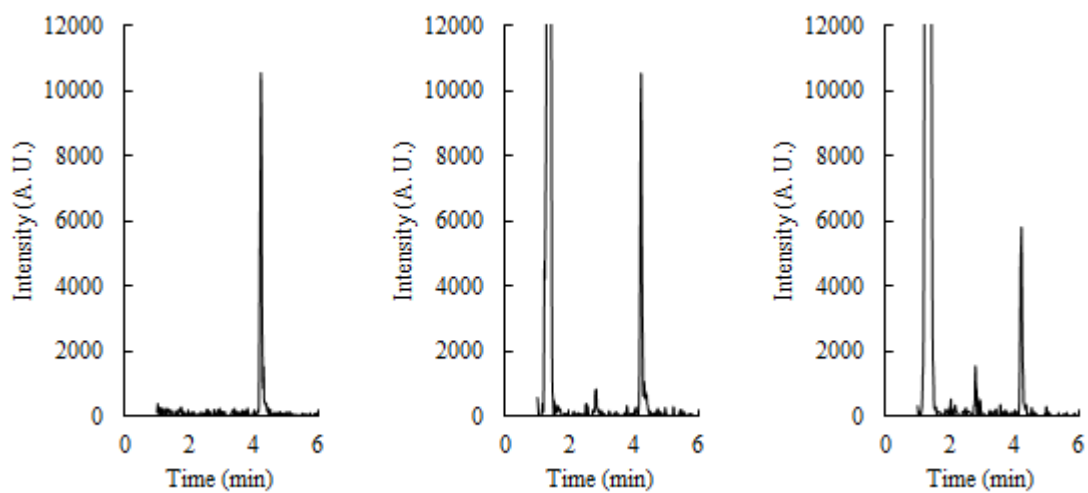


図 5 筋肉における SRM クロマトグラム(カナマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

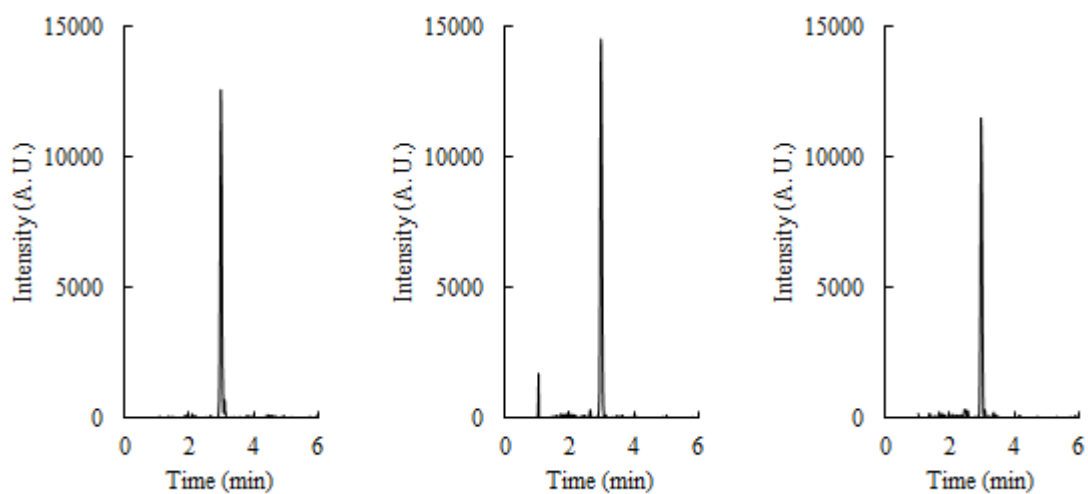


図 6 筋肉における SRM クロマトグラム(ハイグロマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

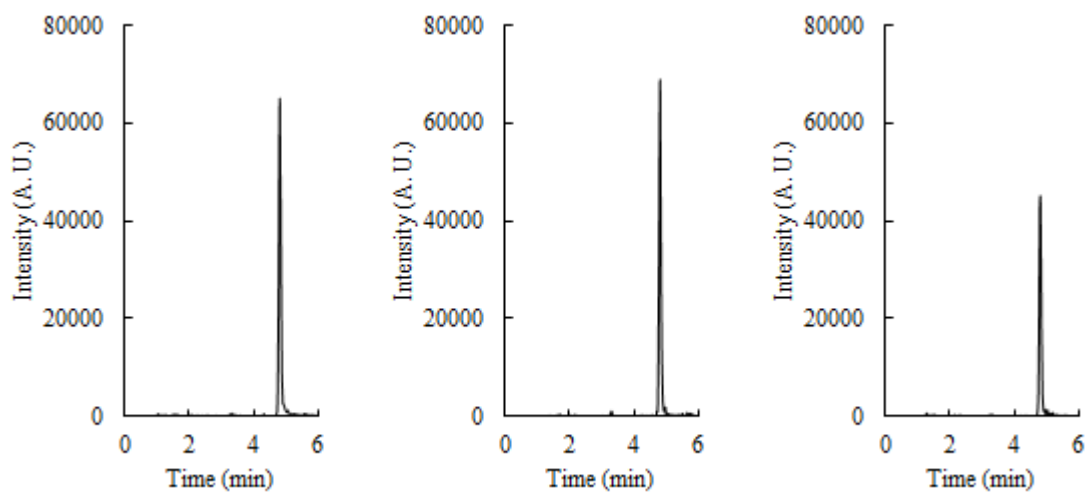


図 7 筋肉における SRM クロマトグラム(アプラマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

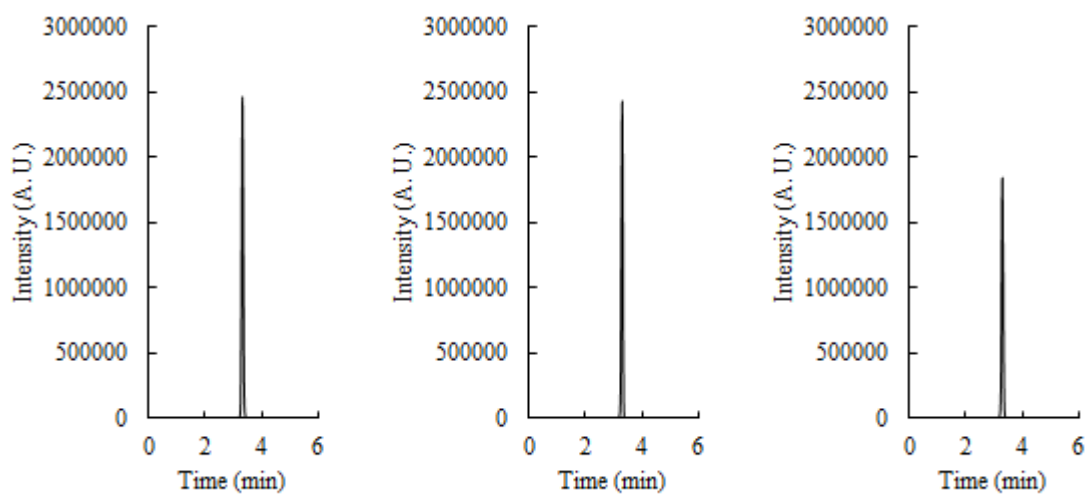


図 8 筋肉における SRM クロマトグラム(ストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

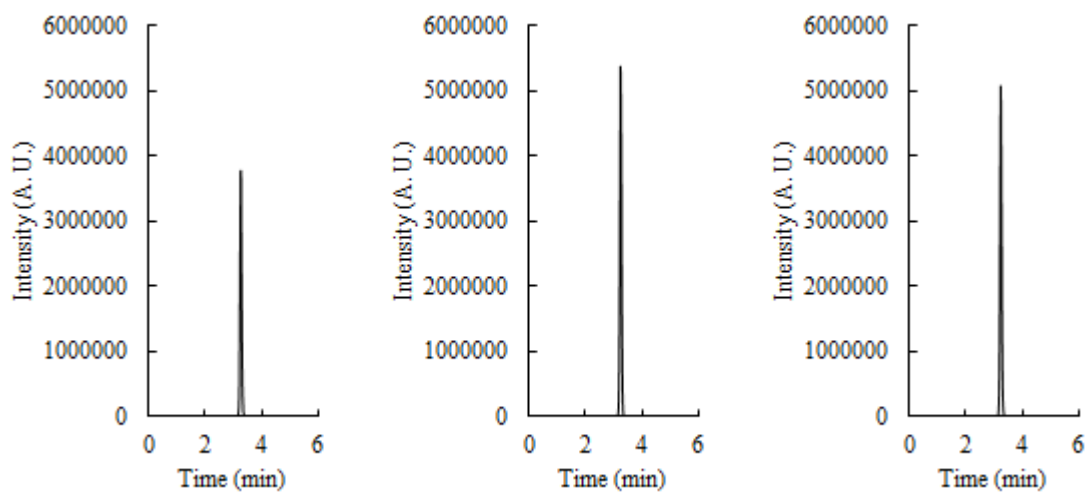


図 9 筋肉における SRM クロマトグラム(ジヒドロストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

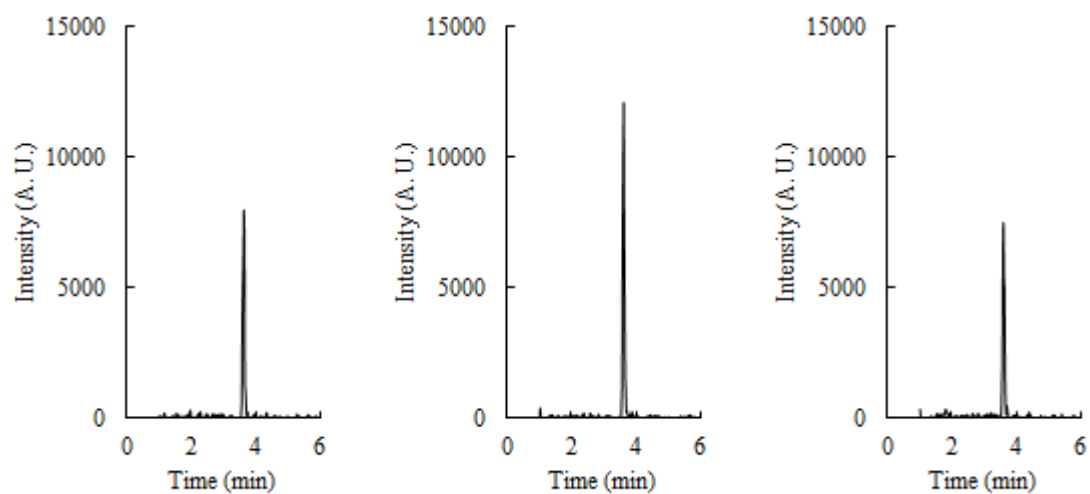


図 10 筋肉における SRM クロマトグラム(アミカシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

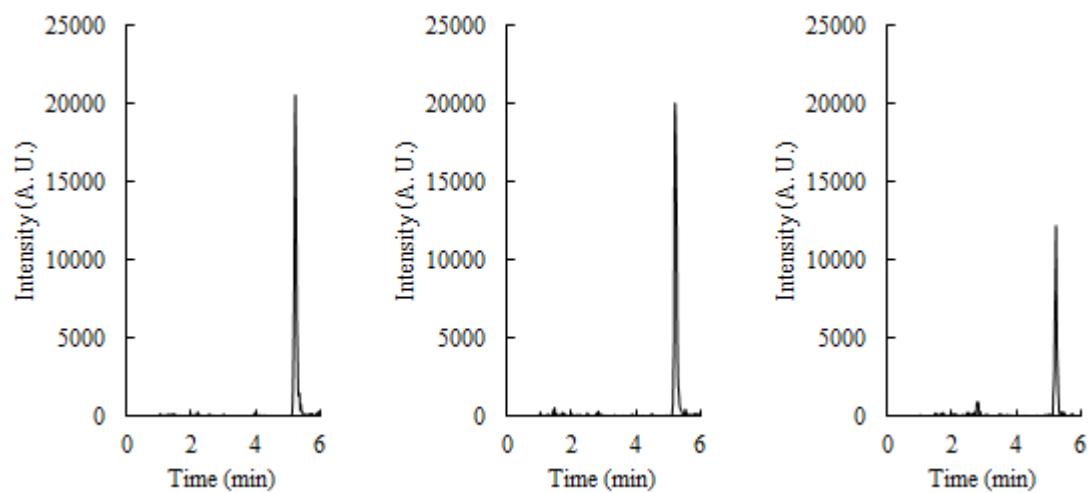


図 11 筋肉における SRM クロマトグラム(ネオマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料