

【調査研究】

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中のペニシリン系抗菌性物質に関する 一斉分析法の検討

Study on a Method for Simultaneous Determination of Penicillin Antibacterial Substances
in Cattle Muscle by LC-MS/MS

難波順子, 浦山豊弘, 金子英史, 佐藤 淳, 繁田典子

NAMBA Junko, URAYAMA Toyohiro, KANEKO Hidefumi, SATO Atsushi, SHIGETA Noriko

要 旨

ペニシリン系抗菌性物質9物質（アモキシシリン, アンピシリン, オキサシリン, クロキサシリン, ジクロキサシリン, ナフシリン, フェノキシメチルペニシリン, ベンジルペニシリン及びメシリナム）の迅速かつ高感度な分析方法の確立を目的として, 既報の一斉分析法で妥当性評価の目標を満たすことが困難であった牛の筋肉を用いて検討した。既報の分析法から固相カラムへの負荷量と溶出液量の変更及びLC-MS/MS測定用試験溶液の組成を変更し, サロゲートが入手可能な4物質（アモキシシリン, オキサシリン, フェノキシメチルペニシリン及びベンジルペニシリン）はサロゲート法での定量を採用した方法を用いて妥当性評価を行ったところ, 7物質（アモキシシリン, オキサシリン, クロキサシリン, ジクロキサシリン, ナフシリン, フェノキシメチルペニシリン及びベンジルペニシリン）が目標値を満たした。目標値を満たさない2物質（アンピシリン及びメシリナム）は真度が70%に近い値であると共に精度は目標値を満たしており, 確認検査としては有用であることが示された。

[キーワード: ペニシリン系抗菌性物質, 牛の筋肉, 一斉分析法, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words: Penicillin antibacterial substances, Cattle muscle, Simultaneous determination, LC-MS/MS]

1 はじめに

動物用医薬品は, 安定した高い生産性を得るために畜水産物に用いられる医薬品であるが, その畜水産物への移行・残留が懸念されている¹⁾。このため, 動物用医薬品が畜水産物に残留し人の健康を損なうことのないよう, 農薬や飼料添加物と共に動物用医薬品が一定の量を超えて残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度により, 安全性の確保が図られている。

本県では, 畜水産物中のサルファ剤等合成抗菌剤を主とする抗菌性物質についてはLC-MS/MSを用いた一斉分析法²⁾により実施しているが, その他の抗菌性物質については理化学的分析法が確立されておらず, 微生物学的分析法で行っている状況であった。このため, マクロライド系等の複数の系統の抗生物質の分析法を, 合成抗菌剤との同時分析も含めて検討し, これまでにはちみつ及び牛の筋肉を用いて妥当性評価を行った結果を報告した^{3), 4)}。

一方でペニシリン系抗菌性物質は, 既報⁴⁾のLC-MS/MS測定条件では定量限界が高く, 牛の筋肉を用いた一斉分析法の検討対象から除外していた。ペニシリン系抗

菌性物質は, 細胞壁の合成阻害により殺菌的に作用し, その抗菌スペクトルは, グラム陽性菌, グラム陰性球菌, インフルエンザ菌や大腸菌など一部のグラム陰性桿菌にまで及ぶ⁵⁾。また, 人の医療上も経口剤及び注射剤として投与される重要な薬剤であることから, 薬剤耐性菌出現を抑制するため慎重な使用が求められており⁶⁾, 検査の必要性が高い物質である。

そこで, ペニシリン系抗菌性物質の分析法を牛の筋肉を用いて検討し, 厚生労働省が定めた「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成19年11月15日付け食安発第1115001号。以下「ガイドライン」という。)に従って妥当性評価を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試料

厚生労働省から代表的な畜水産物であると示されている牛の筋肉(横隔膜等)を使用した。なお, 当該試料は, 分析対象とする抗菌性物質が検出されないことを微生物学的分析法で確認後使用した。

2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品：表1に示すペニシリン系抗菌性物質9物質（アモキシシリン (Amoxicillin), アンピシリン (Ampicillin), オキサシリン (Oxacillin), クロキサシリン (Cloxacillin), ジクロキサシリン (Dicloxacillin), ナフシリン (Nafcillin), フェノキシメチルペニシリン (Phenoxymethylpenicillin), ベンジルペニシリン (Benzylpenicillin), メシリナム (Mecillinam)) 及びサロゲート物質4物質（アモキシシリン-d4 (Amoxicillin-d4), オキサシリン-d5 (Oxacillin-d5), フェノキシメチルペニシリン-d5 (Phenoxymethylpenicillin-d5), ベンジルペニシリン-d5 (Benzylpenicillin-d5))

標準原液：各標準品を精秤し, アセトニトリル：水 (1:1) に溶解し, 標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。

混合標準原液：標準原液 (1000 µg/mL) を混合し, 表2に示す食品衛生法に基づく筋肉の残留基準の10倍濃度の混合標準原液を作成した。なお, 基準が「含有してはならない」であるオキサシリン及びフェノキシメチルペニシリンは0.1 ppm (試料への添加濃度が0.01 ppm) となるように作成した。

マトリックス添加混合標準溶液：牛の筋肉の分析対象物質を含まない試料 (以下「ブランク試料」という。) を用いて作成した試験溶液に混合標準原液を添加し, 試料濃度でそれぞれ基準値 (オキサシリン及びフェノキシメチルペニシリンは0.01 ppm) の1/10, 1/5, 1/2, 1, 1.5, 2倍になるように作成した。

固相カラム：Waters製 Oasis HLB 20 cc 1 g

その他の試薬等：既報³⁾のとおり。

2.3 LC-MS/MS装置及び測定条件

1) LC条件

LC機種：島津製作所製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

カラム：Waters製 XterraMS C18 2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm

カラム温度：40 °C

移動相流量：0.2 mL/min

試料注入量：5 µL

移動相A：0.1 %ギ酸水溶液

B：0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：A/B=95/5 (0-3 min) →2/98 (15-30 min) →95/5 (35-40 min)

2) MS条件

MS機種：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MRMモード

MRM測定イオン：表1のとおり。

ターボヒーター温度：600 °C

その他の条件等：既報³⁾のとおり。

2.4 試験溶液調製方法

既報⁴⁾の分析法より固相カラムへの負荷量と溶出液量の変更及びLC-MS/MS測定用試験溶液の組成変更を行った分析法で調製を行った。牛の筋肉試料2 gを50 mLポリプロピレン製遠沈管に量り取り, 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (以下「Na₂EDTA」という。) 含有0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下「抽出液」という。) 15 mLを加えてホモジナイズした後, 10分間振とうし, 6900 × gで20分間, 室温で遠心分離した。上層を分取し, 沈殿を抽出液5 mLで再抽出し, 遠心分離後, 上層を合わせ20 mLに定容した。

固相カラムをアセトニトリル10 mL, 精製水10 mLで順番にコンディショニングした。得られた上層10 mLを固相カラムに負荷し, 精製水10 mLで洗浄し, アセトニトリル10 mLで溶出させた。溶出液を分液ロートに移し, アセトニトリル飽和ヘキサン10 mLを加えて振とうし, アセトニトリル層を分取した。この液を1 mL以下になるまで窒素ガスを吹き付けて濃縮し, 濃縮液を水で1 mL

表1 MRM測定イオン

抗生物質名	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
Amoxicillin	366.1	114.0
		349.1
Ampicillin	350.1	106.2
		192.3
Oxacillin	402.1	160.2
		243.2
Cloxacillin	436.1	160.2
		277.2
Dicloxacillin	470.1	160.2
		311.1
Nafcillin	415.2	199.1
		171.1
Phenoxymethylpenicillin	351.1	160.3
		114.0
Benzylpenicillin	335.1	160.2
		176.1
Mecillinam	326.2	167.1
		139.2
Amoxicillin-d4	370.2	114.0
		353.1
Oxacillin-d5	407.3	160.1
		248.2
Phenoxymethylpenicillin-d5	356.2	160.1
		114.0
Benzylpenicillin-d5	340.3	160.1
		181.1

に定容後、0.45 μmメンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用試験溶液とした。なお、抗菌性物質のガラス容器への吸着や分解を防ぐため、器具やバイアル瓶は可能な限りポリプロピレン製を用いた。

2.5 妥当性評価の方法

ガイドラインに示された、分析者1名が2併行5日間実施する枝分かれ実験計画に基づき、試料濃度で基準値となるように添加して添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。なお、アモキシシリン、オキサシリン、フェノキシメチルペニシリン及びベンジルペニシリンはサロゲート法で、その他の物質は絶対検量線法でそれぞれ定量した。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS測定条件

MS条件は、ジクロキサシリンの定量イオン（上段）と定性イオン（下段）を既報⁴⁾の条件より変更し、サロゲート物質は定量性及び感度良く測定できる条件を設定した。条件を表1に示す。

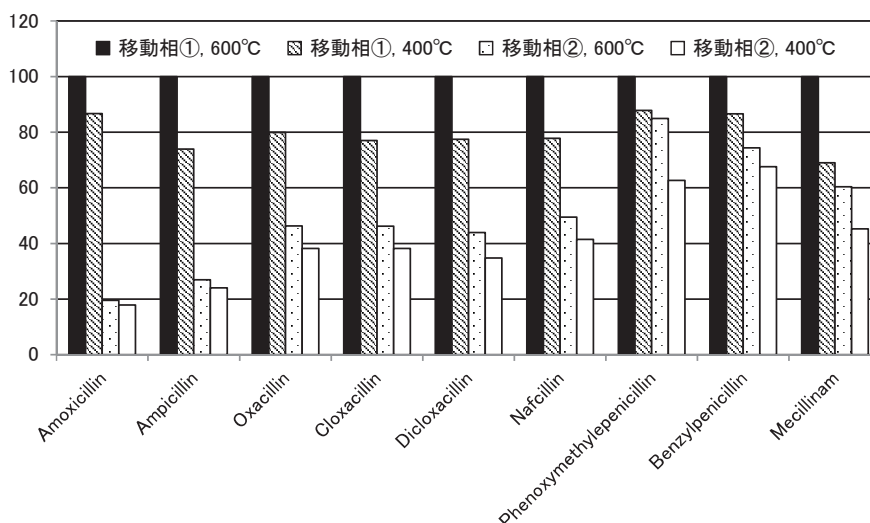
LC条件は、移動相とターボヒーター温度の検討を行った。移動相を移動相①A：0.1%ギ酸水溶液、B：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液又は移動相②A：0.1%ギ酸含有1 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液、B：アセトニトリル溶液、ターボヒーター温度を600℃又は400℃とし、移動相①でターボヒーター温度を600℃にした場合のピーク面積を100%として比較した結果を図1に示す。移動

表2 基準値、検量線の範囲及び相関係数

抗生物質名	基準値 (ppm)	添加回収用牛の筋肉試料濃度 (ppm)	検量線の範囲 (ppm)	検量線の直線性相関係数 ($r \geq 0.99$)
Amoxicillin	0.05	0.05	0.005-0.1	○
Ampicillin	0.03	0.03	0.003-0.06	○
Oxacillin	含有してはならない*1	0.01	0.001-0.02	○
Cloxacillin	0.04	0.04	0.004-0.08	○
Dicloxacin	0.03	0.03	0.003-0.06	○
Nafcillin	0.005	0.005	0.001-0.02	○*2
Phenoxymethylpenicillin	含有してはならない*1	0.01	0.001-0.02	○
Benzylpenicillin	0.05	0.05	0.01-0.1	○*2
Mecillinam	0.05	0.05	0.005-0.1	○

*1：試料濃度で0.01 ppmになるように添加

*2：検量線の最低濃度が基準値の1/10を満たさない



移動相①：0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

移動相②：0.1%ギ酸 1 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 / アセトニトリル

図1 移動相とターボヒーター温度の比較検討

相①でターボヒーター温度を600℃にした場合が全ての物質で面積が最大となるため、当該条件を採用した。

3.2 分析溶液中の含水率の検討

測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化が見られる物質があるため、既報⁴⁾では、濃縮後の液量を一定にした後、アセトニトリルで定容し、同様に操作したブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量した。測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によるピーク形状の変化を検討したところ、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、フェノキシメチルペニシリン、ベンジルペニシリンはピーク形状に大きな変化はなかった。一方、アモキシシリン、アンピシリン及びメシリナムはピークが2本に分かれる等、ピーク形状に変化があった。測定溶媒のアセトニトリルと水の割合の変化によるアモキシシリンのピーク形状の比較を図2に示す。ピーク形状及び試験溶液調製時の操作性等を考慮して、測定溶媒をアセトニトリルから水に変更した。

3.3 定量限界及び検量線

試料中のマトリックスによる目的成分のイオン化への影響を補正するためにマトリックス添加混合標準液を用いて定量した。基準値、検量線の範囲及び相関係数を表2に示す。ナフシリンとベンジルペニシリンは定量限界(S/N比が10以上)が、基準値の1/10より高く、基準値の1/5であったため、検量線の最低濃度を定量限界濃度とした(表2 *2)。ナフシリンとベンジルペニシリン以外の7物質の定量限界は、基準値の1/10以下の値であったため、検量線の最低濃度を基準値の1/10とした。よって、検量線は基準値の1/10から2倍の6点(ナフシリンとベンジルペニシリンは基準値の1/5から2倍の5点)で作成したところ、全ての標準品で相関係数(r)が0.99以上の直線性が認められた。

3.4 精製法の検討

牛の筋肉は、タンパク質や脂質などのマトリックスを多く含むため、既報⁴⁾では固相カラム及びアセトニトリル/ヘキサン分配で精製している。そこで、今回も固相カラム及びアセトニトリル/ヘキサン分配の検討を行った。

3.4.1 固相カラムの検討

固相カラムからの溶出液量の検討を行った。結果を表3に示す。溶出液10 mLで全ての物質が溶出したので、溶出液量を既報⁴⁾の20 mLより10 mLに変更した。

3.4.2 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

2.4 試験溶液調製方法に従い抽出し、固相カラムから

アセトニトリル10 mLで溶出させた溶出液中には約1 mLの水が含まれていた。そこで、基準値濃度の標準品を加えたアセトニトリル9 mLに水1 mLを加えた液と同量のアセトニトリル飽和ヘキサンを振とう後アセトニトリル層を分取し、アセトニトリル層への分配率を求めた結果を表4に示す。ナフシリンが80%であり、その他の物質は90%以上の回収率であった。操作性等を考慮して、アセトニトリル/ヘキサン分配は1回のみとした。

3.5 妥当性評価結果

3.5.1 選択性

ブランク試料として使用する牛の筋肉を2.4 試験溶液調製方法に従って前処理した後、LC-MS/MSで分析し、定量を妨害するピークの有無を確認したが、ガイドラインに示された選択性の目標値(ピーク面積が基準値のピーク面積の1/10未満)を超えるような妨害成分は認められなかった。

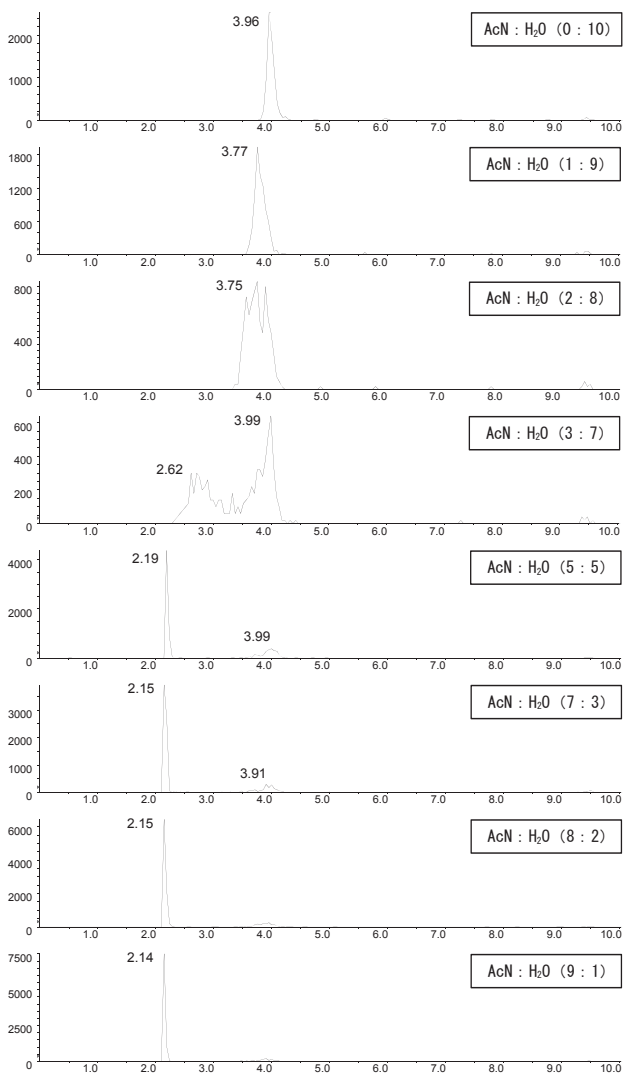


図2 測定溶媒の組成によるアモキシシリン標準品(0.05 µg/mL)のピーク形状の変化(MRMクロマトグラム)

表3 固相カラムからの溶出率 (%)

抗生物質名	溶出液量 (mL)	
	0-10	10-20
Amoxicillin	81	0
Ampicillin	94	0
Oxacillin	80	0
Cloxacillin	86	0
Dicloxacillin	75	0
Nafcillin	77	0
Phenoxymethylpenicillin	72	0
Benzylpenicillin	76	0
Mecillinam	82	0

表4 90%アセトニトリル/ヘキサン分配の分配率 (%)

抗生物質名	分配率 (%)
Amoxicillin	92
Ampicillin	91
Oxacillin	112
Cloxacillin	95
Dicloxacillin	100
Nafcillin	80
Phenoxymethylpenicillin	104
Benzylpenicillin	99
Mecillinam	91

表5 添加回収試験結果*1

抗生物質名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	評価結果
Amoxicillin*2	101	15	15	○
Ampicillin*2	65	8.4	18	×
Oxacillin*3	115	13	13	○
Cloxacillin*2	75	12	16	○
Dicloxacillin*2	72	11	15	○
Nafcillin*3	78	12	15	○
Phenoxymethylpenicillin*3	101	9.7	13	○
Benzylpenicillin*2	108	3.9	10	○
Mecillinam*2	69	6.5	13	×
目標値*2	70~120	< 15	< 20	
目標値*3	70~120	< 25	< 30	

*1: Oxacillin及びPhenoxymethylpenicillinは試料濃度で0.01 ppmになるように、
他は基準値の濃度になるように添加

*2: 目標値*2を用いて評価

*3: 目標値*3を用いて評価

3.5.2 真度及び精度

添加回収試験を行った真度及び精度の結果を表5に示す。真度の目標値(70~120%)を満たす物質はアモキシシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、フェノキシメチルペニシリン、ベンジルペニシリンの7物質であった。真度の目標値を満たしたこれら7物質は精度の目標値(アモキシシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン及びベンジルペニシリンの4物質は併行精度15%未満、室内精度20%未満並びにオキサシリン、ナフシリン及びフェノキシメチルペニシリンの3物質は併行精度25%未満、室内精度30%未満)も満たしていた。真度が目標値(70~120%)を

満たさない2物質(アンピシリン及びメシリナム)は70%に近い値であると共に精度は目標値(併行精度15%未満、室内精度20%未満)を満たしており、確認検査としては有用であることが示された。

また、サロゲート物質の回収率は54~69%であり、ガイドラインに示される目標値(40%以上)を満たしていた。

4 まとめ

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中のペニシリン系抗菌性物質の一斉分析法を検討した。牛の筋肉2gを10mmol/L Na₂EDTA含有0.1mol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)

でホモジナイズした後振とう抽出し、室温で遠心分離し上層を分取した。半量を固相カラムによる精製後、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を行った。アセトニトリル層に窒素ガスを吹き付けて濃縮し、水で1 mLに定容後、LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。妥当性評価を行ったところ、以下の結果を得た。

- (1) LC-MS/MS測定で9種類のペニシリン系抗菌性物質のMRMモードによる測定を行った。LC移動相を変更し、感度良く測定できる条件とした。全ての物質で基準値の1/10 (1/5) ~ 2 倍の濃度範囲で相関係数 (r) が0.99以上の直線性が認められた。
- (2) ペニシリン系抗菌性物質の効率的分析のため、以前検討した牛の筋肉中の抗生物質等の一斉分析法の検討を行い、固相カラムへの負荷量及び溶出液量並びにLC-MS/MS測定用試験溶液の組成を水に変更する変更を実施した。
- (3) 検討した全てのペニシリン系抗菌性物質で、選択性は目標値を満たしていた。
- (4) 検討した9物質のうち、7物質が真度及び精度の目標値を満たしていた。目標値を満たさなかった2物質も、真度が70 %に近い値であると共に精度は目標値を満たしており、確認検査としての有用性が示された。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 490-499, 金原出版, 2015
- 2) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美：厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価 (第3報), 岡山県環境保健センター年報37, 137-144, 2013
- 3) 難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行：LC-MS/MSを用いたはちみつ中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 42, 67-76, 2018
- 4) 難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義：LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 43, 115-124, 2019
- 5) 小澤真名緒：— 動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (X II) — 動物用抗菌剤の各論 (その1) ペニシリン系抗生物質, 日本獣医師会雑誌, 70, 488-491, 2017
- 6) 食品安全委員会：食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付

けについて,

http://www.fsc.go.jp/senmon/doubutu/index.data/taiseikin_rank_20140331.pdf (2022.6.8 アクセス)