

# 食肉中のテトラサイクリン系及び ペニシリン系抗生物質の同時分析

## LC/MS/MSによる

金城学院大学薬学部 教授

岡 尚男



### 1 はじめに

輸入野菜や輸入畜水産物中の農薬，抗生物質の残留基準違反や牛海綿状脳症等

をはじめとする食品の安全性に関わる問題が相次いで発生し，国民の食品に対する不安が大きく広がった．このことを受けて，平成15年5月，食品衛生法が55年ぶりに抜本的に改正され，その大きな柱の一つがポジティブリスト制と言われるものである．ポジティブリスト制への移行に伴い，食品の厳格な検査と，より一層の安全性を確保するため，基準が設定される農薬及び動物用医薬品等の簡便・迅速な残留分析法の開発が急がれている．著者らはポジティブリスト制への移行を踏まえ，テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の同時分析法の開発を行った．本稿ではポジティブリスト制について概説するとともに，これについて紹介する．

### 2 ポジティブリスト制の概要

ポジティブリスト制とは，農薬，飼料添加物及び動物用医薬品が，人の健康を害する恐れのない量として，厚生労働大臣が定める量（0.01 ppm）以上に残留する食品の製造，流通が禁止されるものである．ただし，ポジティブリスト制の対象外が二つあり，一つは残留基準値が設定されている場合であり，もう一つは厚生労働大臣が指定するアミノ酸等の人の健康を損なう恐れがないことが明らかなものである．平成18年5月28日までは250農薬，33動物用医薬品に残留基準値が設定されていたが，翌5月29日から農薬，

動物用医薬品等合わせて799品目の残留基準値及び暫定残留基準値が設定された（平成18年8月現在では800品目）．基準値の設定にあたって，厚生労働省は，1）国際基準であるCODEX基準，2）国内の農薬取締法に基づく登録保留基準（動物用医薬品にあっては，薬事法に基づく承認時の定量限界，3）JMPR（FAO/WHO合同残留農薬専門家会議）及びJECFA（FAO/WHO食品添加物専門家会議）で科学的な評価に必要とされている毒性試験結果などのデータに基づき残留基準を設定している米国，カナダ，EU，オーストラリア及びニュージーランドの基準を参考にしている．すなわち，CODEX基準がある物質についてはCODEX基準を，CODEX基準はないが国内で承認されている物質については登録保留基準あるいは承認時の定量限界を，また，国内で登録あるいは承認されていないが，上述の5ヶ国で残留基準が設定されている物質はそれらの国の残留基準を参考としている．

### 3 食肉中のテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の同時分析<sup>1)</sup>

#### 1) 目的

テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質は，動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されている．中でも図1に示すオキシテトラサイクリン（OTC），テトラサイクリン（TC），クロルテトラサイクリン（CTC），ペニシリンG（PCG），ナフシリン（NFPC），アンピシリン（ABPC）の使用頻度は高く，それらの食品への残留がしばしば認められるので，食品中のこれらの抗生物質の簡便・迅速な同時分析法が必要とされている．しかし，

#### 著者略歴

1970年 名城大学薬学部卒業  
愛知県豊橋保険所  
1972～2005年 愛知県衛生研究所  
1986年 薬学博士  
1987年 日本薬学会東海支部学術奨励賞 受賞  
（テトラサイクリン系抗生物質の化学的分析法に関する研究）  
1988～1989年 米国立衛生研究所留学（1年間）  
1997年 日本食品衛生学会奨励賞 受賞  
（逆相クロマトグラフィー及び質量分析法の食品分析への応用）  
現 在 金城学院大学薬学部 教授

#### 主な研究領域

汎用抗生物質の化学的分析法の研究  
向流クロマトグラフィーに関する研究  
衛生化学分野におけるLC-MSの応用研究

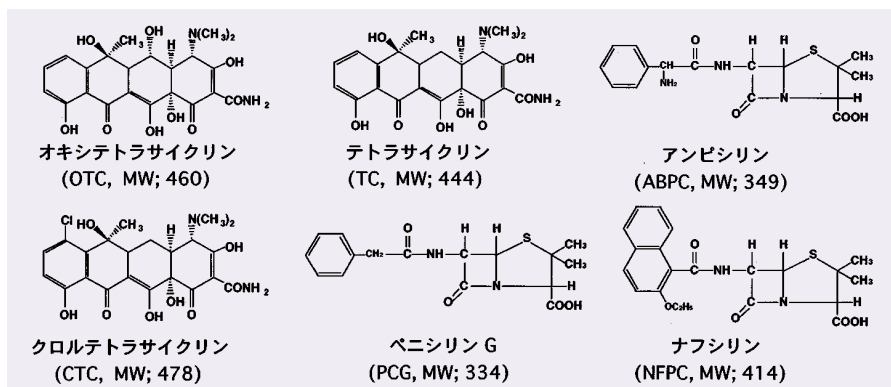


図1 テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の構造

テトラサイクリン系抗生物質は2価の金属イオンとキレートを生じやすく、これを回避するために酸性の移動相あるいは酸性条件下での精製が行われ、特に、シュウ酸を添加した系がもっぱら用いられている<sup>2, 3)</sup>。一方、ペニシリン系抗生物質は、酸性あるいは塩基性条件下では速やかに分解するので、中性の移動相あるいは中性条件下での精製が行われている<sup>4, 5-8)</sup>。このように、これらの抗生物質は相反する物理化学的性質を有しているため、同時分析法はこれまで報告されていなかった。そこで、これらの抗生物質の物理化学的性質を熟慮し、検討を加えることにより、簡便・迅速な同時分析の開発を試みた。

## 2) 戦略

テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の同時分析法の開発に当たり、著者らは次のような戦略を立てた。

分析操作開始前に内標準物質を試料に直接添加し、分析操作時の損失を補正する。

抽出に用いる溶媒は前述のテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の化学的性質の両方を満足させるものとする。

試料抽出液の精製には限外濾過膜を使用する。試料の精製には、通常、ク

ロマトグラフィーが用いられるが、両抗生物質の化学的性質を満足させるクロマトグラフィー条件を確立するには相当な困難が予想されるためである。

両抗生物質の検出には、試料濃縮法を用いたショートカラムカラム-エレクトロスプレータンデム質量分析計 (ESI LC/MS/MS) を用いる。これも通常のカラムを用いたESI LC/MS/MS条件を確立するには相当な困難が予想されるためである。

## 3) 内標準物質

テトラサイクリン系にはデメクロサイクリン (DMCTC) を、ペニシリン系には、それぞれの重水素標識体を使用した (PCG-d5, NFPC-d6, ABPC-d5) とし、0.001 ~ 0.2 ppmの範囲で良好な直線性が得られた ( $r > 0.999$ )。さらに、牛、豚の組織を用いて絶対検量線法との比較を行ったが、相対標準偏差値で5倍以上の差を生じたので、これらの内標準物質の使用はテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の分析精度の向上には極めて有効であると考えられる。

## 4) 抽出溶媒

両抗生物質の化学的性質を考慮し、種々の溶媒を用いて検討した結果、抽出溶媒には蒸留水を用いることとした。ペニシリン系抗生物質の動物組織中からの抽出には蒸留水が最も適していることが知られており、事実、著者らの前報においてもこのことを報告している<sup>4, 5-8)</sup>。一方、テトラサイクリン系抗生物質は酸性条件下の方が良い抽出効率を示すことが知られており<sup>9)</sup>、蒸留水での抽出率は50%以下と見積もられる。しかし、今回は内標準物質としてDMCTCを分析操作開始前に添加し、分析操作時の損失の補正を行うので、蒸留水を用いても問題は生じないと考え、抽出溶媒として蒸留水を選択した。

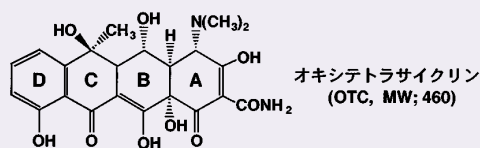
## 5) 試料抽出液の限外濾過膜による精製

種々の限外濾過膜を比較検討したところ、表1に示すように濾過膜の種類によっては50%の回収率しか与えないものも存在した。ウルトラフリーMC/PLは良好な回収率を示したが、MC/PBとYMにおいてはTC, DMCTC, NFPCの回収率が低下した。これは限外濾過膜の材質によっては不可逆的な吸着が起こるものと考えられる。そこで、排除限界が5,000と10,000のMC/PLの操作性を検討したところ、排除限界10,000の方が濾

表1 限外濾過膜の比較

限外濾過膜	NMWL*	回収率(%)**						
		OTC	TC	CTC	DMCTC	PCG	ABPC	NFPC
Ultrafree-MC/PB	5,000	84	50	89	69	100	100	61
Ultrafree-MC/PB	10,000	98	59	102	58	98	99	70
Ultrafree-MC/PL	5,000	100	89	102	95	99	99	89
Ultrafree-MC/PL	10,000	100	92	99	98	98	100	92
Microcon YM-3	3,000	90	58	82	63	90	97	75
Microcon YM-10	10,000	107	68	101	67	85	98	71

\* NMWL: 排除限界  
\*\* n=3, 1 ppm溶液 0.5 mL を負荷し、13,000 rpm で5分間遠心分離

1)  $[M+H-NH_3]^+$ 

A環上のカルボキシアミド基よりアンモニアが脱離

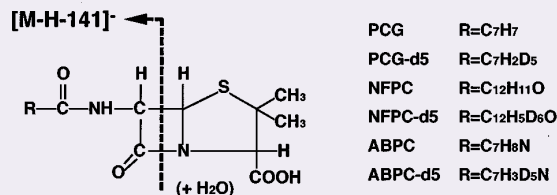
2)  $[M+H-NH_3-H_2O]^+$ 

C環上での脱水

テトラサイクリン	プレカーサーイオン		プロダクトイオン	
	$[M+H]^+$	$[M+H-NH_3]^+$	$[M+H-NH_3]^+$	$[M+H-NH_3-H_2O]^+$
OTC	461	444	444	426
TC	445	428	428	410
CTC	479	462	462	444
DMCTC	465	448	448	430

(m/z)

図2 テトラサイクリン系抗生物質のプレカーサーイオンとプロダクトイオン



ペニシリン	プレカーサーイオン		プロダクトイオン	
	$[M-H]^-$	$[M-H-CO_2]^-$	$[M-H-CO_2]^-$	$[M-H-141]^-$
PGC	333	289	289	192
PCG-d5	338	294	294	197
NFPC	413	369	369	272
NFPC-d6	419	375	375	278
ABPC	348	304	304	207
ABPC-d5	353	309	309	212

(m/z)

図3 ペニシリン系抗生物質のプレカーサーイオンとプロダクトイオン

過に要する時間が短いことが判明したので、これを用いることとした。

## 6) 試料濃縮法を用いたショートカラムカラムESI LC/MS/MS

当初、著者らは分析時間を短縮するために、フローインジェクションESI LC/MS/MSによる検出を考えた。しかし、目的とする検出感度に到達できなかったために、ショートカラムを用いて試料溶液を濃縮し、ESI LC/MS/MSに導入することとした。テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質は、上述のような相反する化学的性質を有しているために、クロマトグラフの手法による同時分析は不可能である。これが現在まで、同時分析法の開発を拒んできた主な理由である。そこで、著者らは両抗生物質の化学的性質を再度詳細に検討したところ、テトラサイクリン系抗生物質は、pH 3.0以下でクロマトグラム上、左右対称なピークを示し<sup>9,10)</sup>、ペニシリン系抗生物質はpH 3.0で5分間は安定であることが判明した<sup>4)</sup>。すなわち、同時分析を可能とする条件は、pH 3.0の移動相を用いて保持時間5分以

内に両抗生物質をカラムから溶出することである。もちろん、このような条件下ですべての抗生物質をベースライン分離することは無理である。しかし、著者らは検出にMS/MSを用いているので、クロマトグラフ的な分離が不十分でもMS/MSによる分離定量が可能である。そこで、著者らはどのようにしてショートカラムで両抗生物質を濃縮し、保持時間5分以内にMS/MSに導入するかを検討した。その結果、テトラサイクリン系抗生物質のテーリングもなく、ペニシリン系抗生物質の分解も起こさない以下のESI LC/MS/MS条件を見出した。

## LC条件

カラム：TOSOH TSK-Guardgel ODC-80Ts (15 x 3.2 mm, I.D.)

移動相：0.05 % ギ酸 (pH 3.0) 及び0.05 % ギ酸-メタノール (pH 3.0) を用いたステップワイズグラジエント溶離 (試料注入後30秒間は0.05 % ギ酸で溶離し、その後、0.05 % ギ酸-メタノールで溶離)

流速：0.2 mL/min 注入量：100  $\mu$ L

## ESI MS/MS条件

MS/MS装置：Waters Quattro Micro

イオン化モード：ESI+ (テトラサイクリン系), ESI- (ペニシリン系)

モニターイオン：図2及び3に帰属とともに示した。

これらのESI LC/MS/MS条件を用いることにより、テトラサイクリン系抗生物質は保持時間3.5分に、ペニシリン系抗生物質は4.5分に溶出する。

## 7) 試料からの添加回収率

最終的にスキーム1に示す分析方法を確立することができた。テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質が残留していないことを確認した牛、豚

試料(5 g)
内標準物質の添加 (0.1 mL) (0.1 ppm溶液：PCG-d5, ABPC-d5, NFPC-d6, DMCTC)
ホモゲナイズ (蒸留水5 mL)
遠心分離 (15,000 rpm, 20分)
抽出液
ウルトラフリー MC/PL (NMWL: 10,000, 1% Tween 20処理)
濾液
試料濃縮法を用いたショートカラム ESI LC/MS/MS

スキーム1 同時分析法

の筋肉，肝臓，腎臓にそれぞれの抗生物質が0.05及び0.1 ppmになるように添加し，添加回収実験を行ったところ，表2及び3に示すように回収率67.9～115.9%，相対標準偏差9.8%以下，検出限界0.005 ppmであった．また，図4にウシ筋肉の代表的なプロファイルを示したが，分析を妨害する物質は検出されず，本法の有用性が示されていると思われる．

#### 4 おわりに

従来，著者らは食品衛生上の重要な項目の分析法の開発を基礎的な研究から始め，応用研究へと移行してきた．しかし，食品中に残留する農薬・動物用医薬品の規制がポジティブリスト制に移行し，多数の項目を短期間で分析

することが要求されるようになってきたために，キーワードが簡便・迅速・確実な同時分析法の開発へと変化しつつある．本稿で紹介したテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の分析法は典型的な例であり，読者が分析法を検討する際の参考に供する事ができれば幸いである．最後に，本稿を執筆するに当り，ご協力頂いた愛知県衛生研究所の伊藤裕子博士，後藤智美博士，吉見幸子氏に深謝いたします．

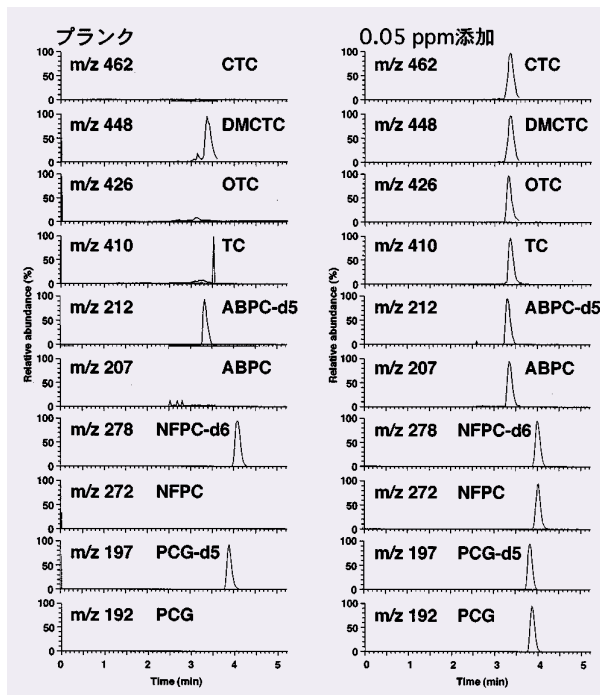


図4 牛筋肉の代表的なMRMプロファイル

表2 牛組織からのテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の回収率

抗生物質	添加濃度 (ppm)	筋肉		腎臓		肝臓	
		回収率 (%)	C.V.(%)	回収率 (%)	C.V.(%)	回収率 (%)	C.V.(%)
OTC	0.05	102.9	2.3	70.4	2.0	78.0	2.6
	0.1	99.6	2.3	79.8	3.0	85.3	2.2
TC	0.05	102.1	2.3	67.9	1.6	80.5	2.8
	0.1	97.0	2.4	82.9	4.3	83.7	4.0
CTC	0.05	88.2	2.7	88.4	2.9	105.6	3.8
	0.1	88.3	2.9	97.3	2.8	101.5	4.3
ABPC	0.05	103.1	5.2	96.1	2.4	102.3	9.8
	0.1	104.4	3.8	103.8	4.5	106.6	5.7
NFPC	0.05	96.2	3.4	96.1	3.0	100.1	2.9
	0.1	99.4	1.5	98.7	2.2	98.2	2.2
PCG	0.05	95.9	5.1	97.2	1.9	96.4	2.9
	0.1	99.6	1.7	98.7	2.6	97.9	4.5

(n=5)

表3 豚組織からのテトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質の回収率

抗生物質	添加濃度 (ppm)	筋肉		腎臓		肝臓	
		回収率 (%)	C.V.(%)	回収率 (%)	C.V.(%)	回収率 (%)	C.V.(%)
OTC	0.05	73.6	2.8	72.3	2.3	75.8	2.2
	0.1	79.2	1.9	83.6	2.5	79.0	4.1
TC	0.05	67.1	3.6	69.3	1.3	72.7	2.7
	0.1	73.3	2.4	85.4	4.0	72.6	3.2
CTC	0.05	99.6	1.5	91.6	3.7	115.9	9.8
	0.1	101.7	0.7	85.1	3.9	110.7	0.9
ABPC	0.05	99.2	2.1	100.4	5.3	96.5	7.9
	0.1	99.2	3.3	103.6	5.9	100.9	3.2
NFPC	0.05	97.5	1.6	98.8	2.2	102.6	4.2
	0.1	97.4	0.8	99.7	2.8	101.2	1.7
PCG	0.05	100.4	2.2	94.4	0.3	97.5	4.6
	0.1	97.7	1.4	97.2	0.9	98.6	1.2

(n=5)

#### 文献

- 1) Tomomi Goto, Yuko Ito, Sadaji Yamada, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka, J. Chromatogr. A, 1100, 193-199, 2005.
- 2) H. Oka, K. Uno, K. -I. Harada, K. Yasaka, M. Suzuki, J. Chromatogr., 298 (1984) 435.
- 3) H. Oka, H. Matsumoto, K. Uno, K. -I. Harada, S. Kadowaki, M. Suzuki, J. Chromatogr. 325 (1985) 265.
- 4) J. O. Boison, in: H. Oka, H. Nakazawa, K. -I. Harada, J. D. MacNeil (Eds.), Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture, AOAC International, Arlington, VA, 1995, Ch. 8, pp. 235-306.
- 5) Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, J. Hayakawa, T. Kagami, J. Chromatogr. A 810 (1998) 81-87.
- 6) Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, J. Hayakawa, T. Kagami, K. Takeba, J. Chromatogr. A 855 (1999) 247.
- 7) Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, J. Hayakawa, T. Kagami, K. Takeba, J. Chromatogr. A 880 (2000) 85.
- 8) Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, J. Hayakawa, T. Kagami, K. Takeba, J. Chromatogr. A 911 (2001) 217.
- 9) H. Oka, J. Patterson, in: H. Oka, H. Nakazawa, K. -I. Harada, J. D. MacNeil (Eds.) a, Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture, AOAC International, Arlington, VA, 1995, Ch. 10, pp. 333-406.
- 10) H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, K. -I. Harada, M. Uchiyama, H. Asukabe, M. Suzuki, J. Chromatogr. 393 (1987) 285.