

LC/MS/MS による乳及び乳製品中のペニシリン系 抗生物質の迅速同時定量

畑野 和広¹

Rapid Simultaneous Determination of Five Penicillins in Bovine Milk and Milk Products Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Kazuhiro Hatano

Summary

A simple and rapid method using high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of five penicillins (ampicillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin and cloxacillin) in bovine milk and milk products. Mass spectral acquisition was done in the negative ion mode by applying selected reaction monitoring (SRM). The five penicillins were extracted with water or n-hexane, and the extract was cleaned up on a C18 cartridge. Ampicillin-d5, penicillin G-d5 and phenethicillin were added to the extract as internal standards, and the extract was diluted with water for injection into the LC-ESI-MS/MS. The recoveries of the five penicillins were in the range of 70.6 ~ 97.4% from bovine milk fortified at 4ng/g and 82.8 ~ 103% from butter, cream and yogurt fortified at 20ng/g. The detection limits in bovine milk were 2ng/g for ampicillin, 0.5ng/g for penicillin G and penicillin V, and 1ng/g for oxacillin and cloxacillin. And those in butter, cream and yogurt were 6ng/g for ampicillin, 2ng/g for penicillin G and penicillin V, and 4ng/g for oxacillin and cloxacillin.

Key Words : ペニシリン penicillins, 残留分析 residual analysis, 高速液体クロマトグラフィー
- タンデム質量分析 LC/MS/MS, 牛乳 bovine milk, 乳製品 milk product, C18 カートリッジ
C18 cartridge

は じ め に

ベンジルペニシリンをはじめとしたペニシリン系抗生物質は、肺炎及び乳房炎などの治療薬並びに術後感染症の予防薬などとして幅広く使用されている¹⁾。一方、アレルギー性副作用や薬剤耐性などを引き起こすこれらの医薬品の畜産物への残留が公衆衛生上の問題となっており、畜産食品の安全性を確保するため迅速かつ精度よい分析法が求められている^{1, 2)}。

従来、ペニシリン系抗生物質の残留試験は微生物学的試験法が汎用されており²⁾、我が国においても残留基準値が設定されているベンジルペニシリンの試験法として

省令及び告示に採用されている^{3, 4)}。微生物学的試験は簡易検査としてスクリーニング的に用いるには有用であるが、選択性が低いためときには偽陽性を示すことがある。また、陽性を示した検体から抗菌性物質を特定し成分毎に定量することも困難である。このようなことから、UV検出器や蛍光検出器を用いた HPLC によるペニシリン系抗生物質の残留分析について数多く報告されているが^{5, 6)}、操作が煩雑であるばかりでなく分析対象物質に対する情報がクロマトグラム上のピークの保持時間のみであるので、十分な同定能力を有しているとはいえない。

近年、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) の普及に伴い畜産物中のペニシリン系抗生物質の分析法として同機器を用いた報告が見られるようになった⁷⁻

¹⁰⁾。

1.福岡市保健環境研究所 衛生化学部門 (現:保健科学部門)

当所においても、既に高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析(LC/MS/MS)による食肉中のペニシリン系抗生物質の迅速同時定量法について報告しているが¹¹⁾、今回、乳及び乳製品についても迅速同時定量法を検討した。

実験方法

1. 試料

市販の牛乳、生クリーム、ヨーグルト及びバターを用いた。

2. 試薬等

標準品：アンピシリン 3 水塩 (AMPI)、アンピシリン-d5 (AMPI-d5)、ベンジルペニシリンナトリウム塩 (PEN G)、ベンジルペニシリン-d5 (PEN G-d5) 及びフェノキシメチルペニシリンカリウム塩 (PEN V) は林純薬工業 (株) 製、オキサシリンナトリウム 1 水塩 (OXA)、クロキサシリンナトリウム 1 水塩 (CLOX) 及びフェネチシリンカリウム塩 (PHEN) はシグマ社製を使用した。

標準液：AMPI、PEN G、PEN V、OXA 及び CLOX の各 20 ~ 30mg (酸として) を精秤し、1000mg/L となるようアセトニトリル - 蒸留水 (1:2) で溶解し標準原液を調製した。蒸留水で 10mg/L の混合標準液を調製後、適宜アセトニトリル - 蒸留水 (6:94) で希釈して使用した。なお、いずれも内部標準を 10ng/mL となるよう添加した。また、標準原液は 5 以下で保存した。

内部標準液：AMPI-d5、PEN G-d5 及び PHEN の各 5 ~ 10mg を精秤し、標準液と同様に内部標準原液を調製し、それぞれを混合後蒸留水で希釈し 100ng/mL 混合内部標準液を調製した。

C18 カートリッジ：Varian 社製 Bond Elut C18 (500mg) をあらかじめアセトニトリル 5mL 及び蒸留水 10mL でコンディショニングして使用した。

0.2µm フィルター：関東化学 (株) 製 HLC-DISK 13 を使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋 (株) 製 ろ紙 5A を使用した。

その他の試薬：いずれも特級品または HPLC 用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

質量分析装置 (MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API2000 を使用した。

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 PT10-35 を使用

した。

超音波装置：NEY 社製 208H を使用した。

遠心機：(株) コクサン製 H103-NR を使用した。

4. 測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ

分析カラム：(株) YMC 製 YMC-Pack Pro C18 2mmi.d. × 50mm, 3µm

移動相：A 液；2mM 酢酸アンモニウム含有 1% アセトニトリル、B 液；2mM 酢酸アンモニウム含有 80% アセトニトリル、グラジエント条件；A 液 100% から 10 分間のリニアグラジエントで B 液 100%、2 分間保持

流速：0.2mL/min

カラム温度：30

注入量：100 µL

2) 質量分析計

イオン化：ESI、(-)

イオンスプレー電圧：-4.5kV

イオンソース温度：500

化合物ごとの条件：Table 1. に示した。

Table 1. Compound-specific ESI-MS/MS Parameters for Five Penicillins and Internal Standards (Ampicillin-d5, Penicillin G-d5 and Phenethicillin)

Compound	SRM		Declustering	Collision
	Trace (m/z)		Potential (V)	Energy (V)
AMPI	348	207	-6	-14
PEN G	333	192	-11	-12
PEN V	349	208	-6	-12
OXA	400	259	-6	-16
CLOX	434	293	-6	-16
AMPI-d5	353	212	-6	-14
PEN G-d5	338	197	-11	-12
PHEN	363	222	-6	-14

5. 試験溶液の調製

1) 抽出液の調整

(1) 牛乳、生クリーム及びヨーグルト

試料 25g (生クリーム及びヨーグルトは試料 5g を蒸留水で 25mL に希釈したもの) を 50mL 遠沈管にとり、飽和 EDTA 溶液 5mL 及び蒸留水を加えて 50mL とし、振とう後冷却遠心分離 (4℃, 3500rpm, 10min) した。上澄み液をろ紙でろ過後蒸留水で 50mL とし抽出液とした。

(2) バター

試料5gを200mL分液ロートにとり、n-ヘキサン50mLに溶解し、蒸留水50mLを加えて振とうした。水層を蒸留水で50mLとし、そのうち20mLを濃縮乾固後、蒸留水20mLに溶解し抽出液とした。

2) 精製

抽出液10mLをC18カートリッジに負荷し、蒸留水3mLで洗浄後20%アセトニトリル6mLで溶出した。溶出液に混合内部標準液2mLを加え蒸留水で20mLとし、0.2 μ mフィルターでろ過し試験溶液とした。

6. 定量

試験溶液 100 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から内部標準法により作成した検量線を用いて (AMPI は AMPI-d5 で, PEN G は PEN G-d5 で, PEN V, OXA 及び CLOX は PHEN で補正した), ペニシリン系抗生物質の濃度を求め試料中の含量を算出した。

結果及び考察

1. LC/MS/MSの測定条件

LC/MS/MS の測定は既報¹¹⁾のとおり前述の条件で行った。ただし, AMPI は AMPI-d5 で, PEN G は PEN G-d5 で補正することにし, それぞれの条件はインフュージョンポンプを用いて既報¹¹⁾と同様の方法で求めた。

2. 検量線

検量線は AMPI が 0.75 ~ 50ng/mL の範囲で, PEN G 及び PEN V が 0.25 ~ 50ng/mL の範囲で, OXA 及び CLOX については 0.5 ~ 50ng/mL の範囲で $r=0.9999$ 以上であった。

3. 前処理方法

1) 抽出方法

牛乳, 生クリーム及びヨーグルトの抽出は, 省令³⁾に準じて EDTA で除蛋白後, 水抽出することにした。バターについては水に溶解しないため, 一旦 n-ヘキサンに溶解後, 水に転溶することにした。

2) 精製方法

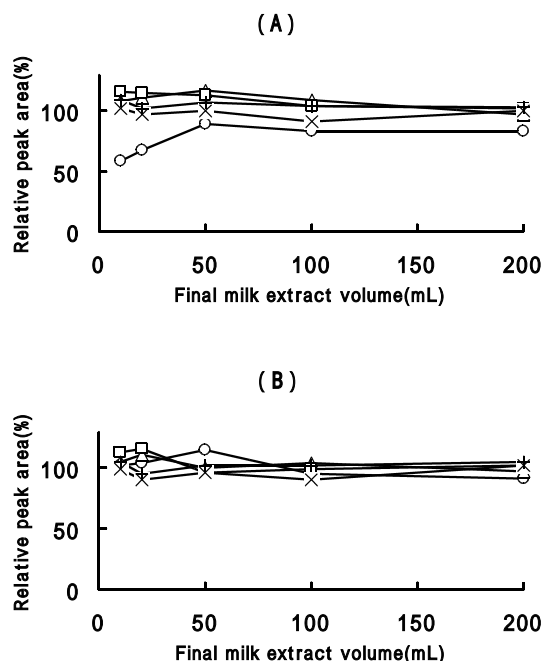
ペニシリン系抗生物質の中には酸及びアルカリ条件下で分解しやすい薬剤があること¹⁾, また, 分析の簡便性及び迅速性を考慮し, 既報¹¹⁾のとおり試料を pH 調製せずに C18 カートリッジで精製することにした。

3) 試料マトリックスがイオン化に与える影響

LC/MS 分析を行う場合, イオン源や機器のチューンの状態はいうまでもなく, 試料由来のマトリックス成分によりイオン化が抑制または促進され検出感度が変化することが報告されている^{9, 10)}。

マトリックス成分の除去にあたってはイオン交換樹脂を用いるクリーンアップ法等を組み合わせさらに高度な精製を行うことも考えられるが, 分析対象のすべての薬剤についてマトリックス成分だけを選択的に除去することは困難であり, 分析を複雑化することで回収率の低下や分析の迅速性の面において問題を残す。

このようなことから Hormazábal ら⁸⁾は定量の際の検量線を試料成分に添加して作成しているが, 試料の種類ごとに作成する必要があるため操作がかなり煩雑である。



- - - AMPI, - - - PEN G, - - - PEN V, - x - OXA, - + - CLOX

Fig. 1. Influence of milk coextractives on ionization efficiency of five penicillins.

The relative peak area(%)={peak area of penicillins (10ng/mL of each) in test solution prepared from milk / peak area of penicillins(10ng/mL of each) in standard solution} \times 100.

(A); not corrected. (B); Ampicillin was corrected with ampicillin-d5, PEN G was corrected with PEN G-d5, and PEN V, oxacillin and cloxacillin were corrected with phenethicillin.

そこで, 試験溶液を単に希釈することにより, マトリックス成分がペニシリン系抗生物質のイオン化に与える

影響をどの程度緩和することができるかについて検討した。

牛乳 25g を C18 カートリッジでクリーンアップした溶出液 6mL (5g 相当) を濃縮乾固後、各薬剤及び内部標準を 0.01µg/mL 含む水溶液で 10 ~ 200mL に溶解した試験溶液と標準液とのピーク面積を比較した。

Fig.1.に示したとおり、内部標準で補正しない場合、標準液に対する牛乳試験溶液中での各薬剤の相対強度は、特に AMPI が 10mL で 58.7%、20mL で 67.8%、50mL で 89.7%、200mL でも 83.2%とイオン化が抑制された。

一方、内部標準で補正した場合、10mL に溶解したときでも各薬剤の相対強度はいずれも 100 ± 10%以内であり、定量に支障がないレベルまで補正することができたが、エバポレーターによる濃縮操作の省略及びアセトニトリル含量によるピーク形状を考慮して、最終検液の量は 20mL にすることにした。

また、生クリーム、ヨーグルト及びバターについても同様の結果から最終検液の量は 20mL にすることにした。

4. 添加回収試験

本法によりこれらの薬剤を含まないことを確認した牛乳に各薬剤を 4ng/g、生クリーム、ヨーグルト及びバターに 20ng/g 添加して回収試験を行った。Table 2.に示したとおり回収率は 70.6 ~ 103%、標準偏差は 2.3 ~ 11%と良好な結果が得られた。

Table 2. Recoveries of Five Penicillins from Bovine Milk and Milk Products

compound	recovery(%) ^{a)}			
	bovine milk	cream	yogurt	butter
	4ng/g	20ng/g	20ng/g	20ng/g
AMPI	97.4±7.9	102±5.7	89.6±5.2	93.6±9.1
PEN G	91.6±2.4	101±2.3	95.6±4.3	82.8±5.3
PEN V	89.0±6.9	103±7.8	101±5.4	91.4±6.8
OXA	78.9±5.6	102±8.4	102±4.4	87.3±8.8
CLOX	70.6±11	99.3±3.3	97.2±10	91.9±9.7

a) Values are mean±S.D.(n=5).

一例として牛乳から得られた SRM によるクロマトグラムを Fig.2.に示したが、定量に支障のある試料由来の妨害ピークは見られず、選択性が非常に高いことがわかる。生クリーム、バター及びヨーグルトについても同様に妨害ピークは見られなかった。

なお、牛乳中では AMPI が 2ng/g、PEN G 及び PEN V が 0.5ng/g、OXA 及び CLOX が 1ng/g まで、生クリーム、

バター及びヨーグルトでそれぞれ 6、2 及び 4ng/g まで十分検出可能であった。

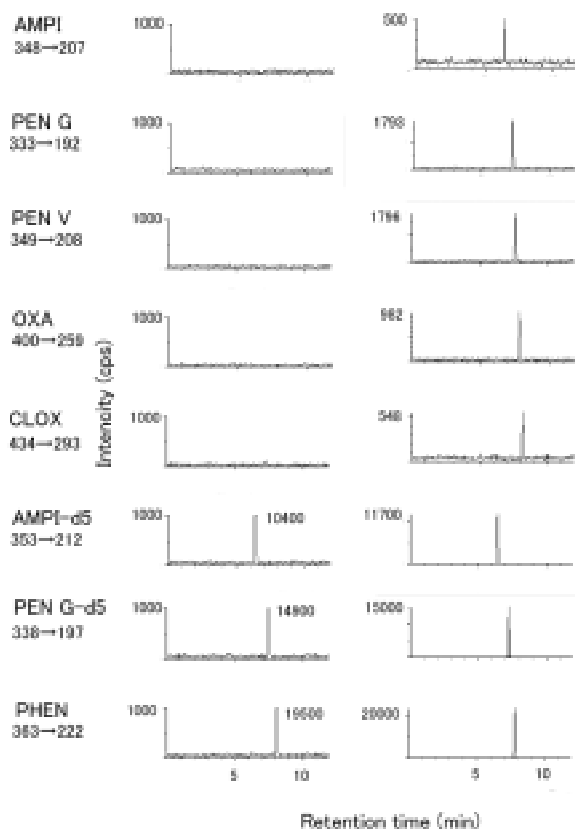


Fig. 2. SRM chromatograms of five penicillins and internal standards (ampicillin-d5, PEN G-d5, phenethicillin; 10ng/mL of each) in blank bovine milk(A) and bovine milk fortified with 4ng/g of each (B).

5. 残留実態調査

本法により市販の牛乳 30 検体、生クリーム 5 検体、ヨーグルト 5 検体及びバター 5 検体について残留実態調査を行ったが、いずれの検体についてもいずれの薬剤も検出されなかった。

ま と め

ペニシリン系抗生物質のうち AMPI、PEN G、PEN V、OXA 及び CLOX について、LC/MS/MS による乳及び乳製品中の迅速同時定量法を検討した。

C18 カートリッジによるクリーンアップ後内部標準を添加するだけであるので、エバポレーターによる濃縮操作などに伴う薬剤の損失をなくし分析時間も短縮することができた。いずれの試料及び薬剤についても再現性及び定量性とも良好な結果が得られ試料由来の夾雑ピークも見られなかった。

本法は従来の微生物学的試験法及び HPLC による分析法に比べ感度及び定性において優れ、また、試料の調製から LC/MS/MS 測定までを約 1 時間という短時間で分析できるので、日常の残留分析法として非常に有用な手法と考えられた。

文 献

- 1) Ninomiya, K. "Dobutsu No Koseibussitsu", Yokendo, 1987, p.1-99. (ISBN 4-8425-8712-1)
- 2) Horie, M., Nakazawa, H., Current legal regulations of veterinary drugs and their residual analysis. Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J.Food Hyg. Soc. Japan), 36, 329-343, 1995.
- 3) 厚生省令第 93 号(1999) “ 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令 ” 平成 11 年 11 月 26 日.
- 4) 厚生省告示第 239 号(1999) “ 食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件 ” 平成 11 年 11 月 26 日.
- 5) Sørensen, L. K., Snor, L. K., Elkær, T., Hansen, H., Simultaneous determination of seven penicillins in muscle, liver and kidney tissues from cattle and pigs by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. J. Chromatogr. B, 734, 307-318, 1999.
- 6) Himeji, R., Koide, K., Tsuji, I., Yamamoto, S., Horie, M., Suzuki, S., Nakazawa, H., Simultaneous determination of penicillins and sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan), 34, 392-397, 1982.
- 7) Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takabe, K., Nagase, H., Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis . Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 911, 217-223, 2001.
- 8) Hormazábal, V., Yndestad, M., Determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in plasma and tissues using liquid chromatography-mass spectrometry for residual and pharmacokinetic studies. J. Liq. Chromatogr., 21, 3,099-3,110, 1998.
- 9) Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A., Kennedy, D. G., Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Analyst, 119, 2,595-2,601, 1994.
- 10) Riediker, S., Stadler, R. H., Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal. Chem., 73, 1614-1621 2001.
- 11) Kazuhiro, H., Simultaneous determination of five penicillins in muscle, liver and kidney from slaughtered animals using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan), 44, 1-6, 2003.