

LC/MS/MSを用いた豚の組織中の β -ラクタム及び テトラサイクリン系抗生物質の同時分析

河原 さおり、内尾 雅子、田島 幸治（平成21年3月 退職）

1 はじめに

我が国の農薬や動物用医薬品等の規制は、2006年5月の食品衛生法の改正・施行によりポジティブリスト制へと大きく転換した。それに伴い分析法も多成分同時分析法の必要性が高まっている。

動物用医薬品は、その用途により抗生物質、合成抗菌剤、ホルモン剤、駆虫剤等に分類される。最近、Stolkerらは、動物用医薬品を系統ごとに分け、その分析法について総説にまとめている。その中で彼らは、1998～2003年までの5カ年間に約350報の動物用医薬品残留分析法に関する科学的論文が発表されたと述べている¹⁾。

今回我々は、抗生物質の中で14種類の β -ラクタム系（ペニシリン系8物質、セファロsporin系6物質）と4種類のテトラサイクリン系の合わせて18物質の抗生物質（図1）の同時分析法について豚の筋肉、腎臓、肝臓を試料として検討した。なお、これら2系列の選定は、 β -ラクタム系が動物の細菌感染症に最も広く使用されていること、またテトラサイクリン系は販売量が抗生物質の中で最も多く、その78%が牛や豚に使用されていることを考慮した²⁾。

2 実験

(1) 試料

豚の筋肉、腎臓及び肝臓

(2) 試薬

標準品は、和光純薬、関東化学、Dr. Ehrenstorfer GmbH、Riedel-deHaën、MD Biomedicals、Inc及びACROS社製のものを使用した。試薬は全て和光純薬製のものを用いた。

マキルベン緩衝液(pH7.0)は、0.2Mリン酸二ナトリウムに0.1Mクエン酸を加えてpH7.0としたものである。

(3) 装置及び測定条件

[LC部]

装置：島津社製 LD-20ADシリーズ

測定条件

カラム：YMC社製YMC-Pack Pro C18(内径2.0mm、長さ50mm、粒子系5 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A：0.05%ギ酸、B：アセトニトリル

グラジエント条件：B:0min(1%)-1min(1%)-4.5min(25%)-10.5min(50%)-17.5 min (99%)
-22.5 min (99%)

流速：0.2mL/分

注入量：5 μ L

[MS部]

装置：アプライド社製 3200 Q TRAP(triple-stage quadrupole(QqQ-MS))

測定条件 イオン化：ESI ポジティブ MRMモード

MSの測定条件とリテンションタイムを表1に、クロマトを図2に示した。

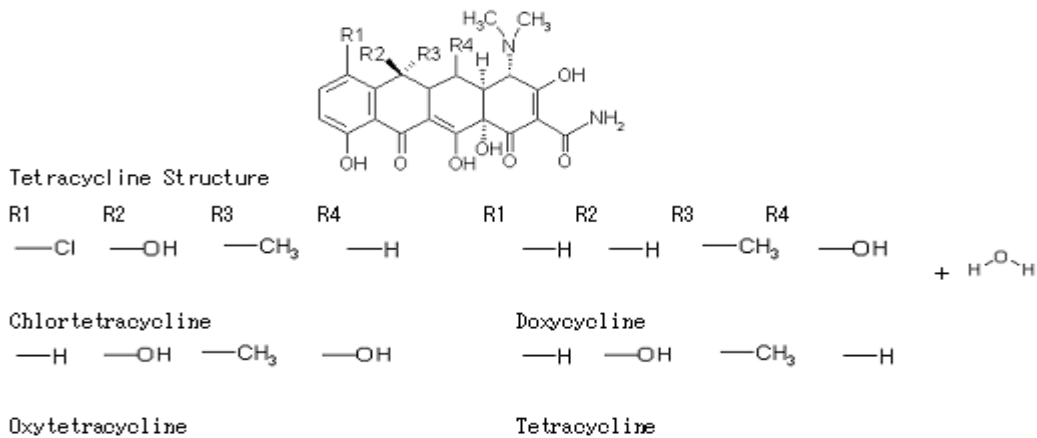
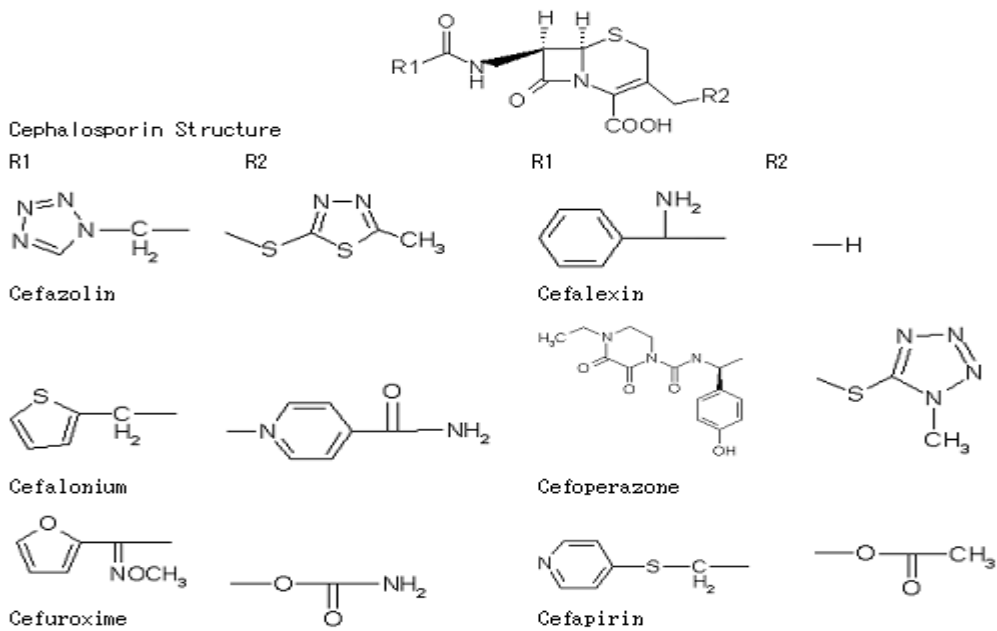
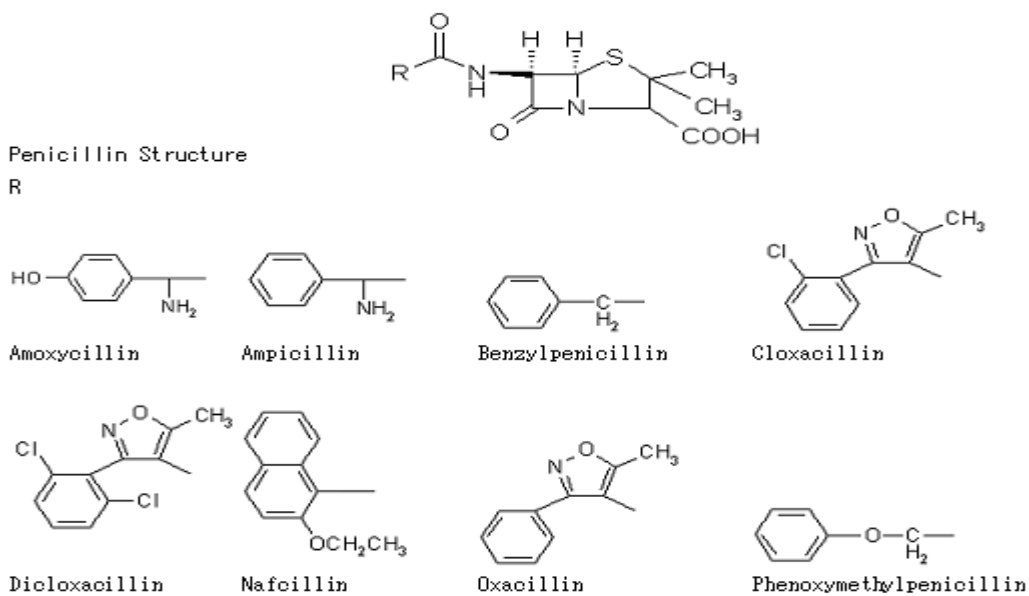


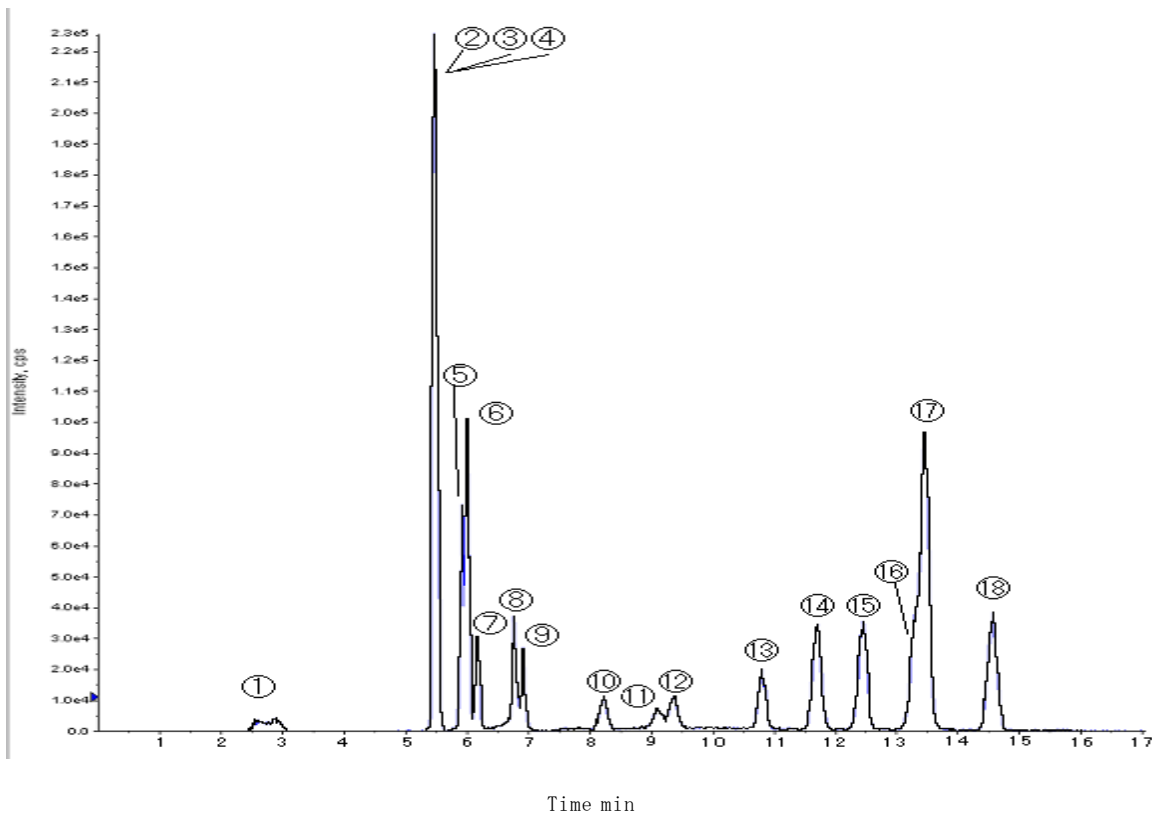
図1 14種類のβ-ラクタム系と4種類のテトラサイクリン系の抗生物質の構造式

表1 β-ラクタム系とテトラサイクリン系抗生物質を分析するためのMS/MS条件とHPLCのリテンションタイム

Positive	mol wt	Out ion		Ind ion		RT (min)
		Precursor ion	Product ion	Precursor ion	Product ion	
Penicillins						
Amoxicillin	365.4	366.1	> 114.1	366.1	> 134.2	2.65
Ampicillin	349.4	350.1	> 106.1	350.1	> 114.2	5.44
Benzylpenicillin	334.4	335.0	> 114.2	160.0	> 87.2	10.90
Cloxacillin	435.8	436.1	> 277.1	436.1	> 160.1	13.50
Dicloxacillin	470.3	470.0	> 160.2	470.0	> 114.2	14.80
Nafcillin	414.4	415.2	> 199.2	415.2	> 171.2	13.60
Oxacillin	401.4	402.2	> 160.1	402.2	> 114.2	12.60
Phenoxymethylpenicillin	350.4	351.1	> 160.2	351.1	> 114.1	11.80
Cephalosporins						
Cefazolin	454.5	455.0	> 322.9	455.0	> 156.1	8.33
Cefalexin	347.4	348.1	> 158.1	348.1	> 106.1	5.46
Cefalonium	458.5	459.1	> 152.2	459.1	> 158.0	6.16
Cefoperazone	645.6	646.1	> 143.2	646.1	> 290.3	9.48
Cefuroxime※	424.3	364.0	> 336.2	364.0	> 93.0	9.20
Cefapirin	423.4	424.0	> 292.1	424.0	> 152.1	5.53
Tetracyclines						
Chlortetracycline	478.8	479.1	> 444.2	479.1	> 154.2	6.75
Doxycycline	462.4 (444.4)	445.2	> 267.2	445.2	> 98.1	6.90
Oxytetracycline	460.4	461.1	> 426.0	461.1	> 201.1	5.90
Tetracycline	444.4	445.2	> 410.2	445.2	> 154.2	5.99
Negative						
Cefroxime	423.4	423.0	> 207.1	423.0	> 317.9	9.20

※ セフロキシムをポジティブで測定する時は、フラグメントイオンをプレカーサーイオンとする。

確認が必要な時は、当該物質をネガティブで[M-1]⁻をプレカーサーイオンとして測定する。



- | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------|--------------|------------------|---------------|
| ①Amoxicillin | ②Ampicillin | ③Cefapirin | ④Cefalexin | ⑤Oxytetracycline | ⑥Tetracycline |
| ⑦Cefalonium | ⑧Chlortetracycline | ⑨Doxycycline | ⑩Cefazolin | ⑪Cefuroxime | ⑫Cefoperazone |
| ⑬Benzylpenicillin | ⑭Phenoxymethylpenicillin | ⑮Oxacillin | ⑯Cloxacillin | ⑰Nafcillin | |
| ⑱Dicloxacillin | | | | | |

図2 標準溶液のクロマトグラム

3 結果と考察

(1) 抽出溶媒

今回対象とした物質の多くは、その溶解度⁴⁵から水あるいはメタノールに可溶である。このことから試料からの抽出溶媒として、水、メタノール及びその混合溶媒が考えられる。しかし、抽出時のpHを一定に保つために緩衝作用のある塩の添加が必要となること、テトラサイクリン系抗生物質のキレート作用を抑え添加回収率を向上させるためにEDTAの添加が必要なことを考慮するとメタノールでの抽出は困難である。また、混合溶媒は、固相カラムに負荷する前にメタノールの除去が必要となる。以上のことから、抽出溶媒を水系のEDTA含有マキルベン緩衝液とした。

(2) 精製用固相カラムの選定

Oasis HLBは親水性及び疎水性の物質を広く吸着させる性質を持っていることから、これまで動物用医薬品の分析に広く用いられてきた。本研究で対象とした動物用医薬品の極性の範囲を考慮すると、Oasis HLBが最も適しているとして選定した。

(3) 固相カラムにおける目的物質の保持と溶出

水と0.1M-EDTA含有マキルベン緩衝液(pH7.0)に目的物質を溶解させ、固相カラムにおける保持と溶出を検討した。保持については、両者の比較から水ではカラムからの流出液及びカラムの洗浄液に目的物質の含有が確認されたが、緩衝溶液では目的物質の流出が抑えられたことから、塩の添加により固相カラムへの保持能力を高めることが可能であった。固相カラムからの溶出は、メタノールとアセトニトリルで比較検討した。試料を含まないものでは両者に差はないものの、試料に添加した場合にメタノールでの回収率が高いという結果を得たことから、溶出溶媒はメタノールとすることとした。検討した内容から図3に示す分析フローを作成した。

<抽出>

試料5g (ブランクは水5mL)

標準溶液500ng/mL 1mL
0.1M-EDTA含有マキルベン緩衝液(pH7) 30mL
ホモジナイズ1分
遠心分離12000回転20分4°C

上清

残留物

0.1M-EDTA含有マキルベン緩衝液(pH7) 15mL
振とう5分
遠心分離12000回転20分4°C

上清

上清を合わせて50mLにメスアップ

<精製 (Oasis HLB 6mg 3cc) >

コンディショニング：メタノール5mL、水5mL、

0.1M-EDTA含有マキルベン緩衝液(pH7) 5mL

負荷量：20mL

洗浄：0.1M-EDTA含有マキルベン緩衝液(pH7) 5mL、水5mL

溶出：メタノール10mL

<濃縮>

乾固：窒素パージ40°C

溶解：10%アセトニトリル 1mL

図3 分析フロー図

(4) 回収率

ブランク(水)、豚の筋肉、腎臓及び肝臓の添加回収試験の結果を表2に示した。

今回、分析の対象とした物質の中で、アモキシシリン⁴⁶とセファピリンは、十分な回収率が得られないことが推定された。それは、アモキシシリンは非常に極性が大きくOasis HLBへの保持が困難であろうと考えられたこと、セファピリンは酵素反応により脱アセチルセファピリンに変化し、セファピリンとして定量できないことによる³⁾。

それ以外の物質についてはおおむね良好な結果が得られたが、ペニシリン系のアンピシリン、セファロスポリン系のセファレキシシンとセファロニウムは、表1のHPLCのリテンションタイムでも分かるように比較的極性が大きく固相カラムからの流出液及び洗浄液に流出することにより回収率が減少していた。

以上のことから、本法により、β-ラクタム系抗生物質は、ベンジルペニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、オキサシリン、フェノキシメチルペニシリン、セファゾリン、セフォペラゾン及びセフロキシムの9物質、テトラサイクリン系抗生物質は、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリン及びテトラサイクリンの4物質、計13物質の同時分析が可能であると結論した。

表2 β -ラクタムとテトラサイクリン系抗生物質の豚組織からの添加回収率(%)

	Blank	Muscle	Kidney	Liver
Penicillins				
Amoxicillin	26.4	16.9	1.7	9.3
Ampicillin	85.7	68.6	54.0	41.4
Benzylpenicillin	95.0	97.2	87.3	67.1
Cloxacillin	105.8	86.2	68.0	69.7
Dicloxacillin	102.8	74.2	61.3	59.4
Nafcillin	109.3	79.5	83.3	74.1
Oxacillin	101.7	89.0	78.7	75.4
Phenoxymethylpenicillin	101.9	98.3	84.6	66.6
Cephalosporins				
Cefazolin	94.3	78.6	77.9	65.9
Cefalexin	68.2	54.5	44.1	32.2
Cefalonium	67.1	54.1	58.3	43.0
Cefoperazone	88.1	73.3	76.5	64.4
Cefuroxime	100.7	81.3	82.8	64.9
Cefapirin	87.8	43.6	18.4	2.1
Tetracyclines				
Chlortetracycline	79.7	77.1	59.4	62.1
Doxycycline	91.7	78.2	76.4	61.6
Oxytetracycline	91.4	78.9	70.9	72.8
Tetracycline	91.9	78.2	66.0	67.7

(5) 考察

セファピリンが脱アセチルセファピリンに変化することは前に述べた。この変化は酵素反応によるもので生体内でも起こっている。脱アセチルセファピリンの状態でも抗菌効果があることから脱アセチルセファピリンを含めてセファピリンを測定することが望ましいが、標準品を手に入れることが困難なため、今回は測定できなかった。

試料の添加回収率は、ブランクに添加したものと比較して低くなっている。それは抽出カラムにかけた際に、試料成分の影響を受けて流出液及び洗浄液に流出することと溶出液がメタノールでは保持されたままとなって溶出しきれていないことが原因であると思われる。

近年、ペニシリン系抗生物質であるアモキシシリンはメタノール中でメタノール付加物を作ると報告されている⁴⁾。この付加物は $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ の部分との反応と考えられている。ペニシリン系の抗生物質は全て四員環を持っているため、他のペニシリン系抗生物質についても付加物を作る可能性がある。今回メタノールを固相カラムからの溶出に使用しているため、メタノール付加物生成の割合等が、回収率に影響する可能性もあると考えている。

4 参考文献

- 1) A. A. M. Stolker, U. A. Th. Brinkman: Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review, *Journal of Chromatography A*, 1067, 15–53, 2005
- 2) 動物用抗菌性物質の純末換算量(2003年), *動薬情報*, 23, 62–63, 2008
- 3) Clifton K. Fagerquist and Alan R. Lightfield: Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 17, 660–671, 2003
- 4) Svetlana Grujic, 他: Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using

electrospray ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 67-74, 2008