

HPLC を用いた食肉中のアンピシリン試験法の検討

神奈川県食肉衛生検査所 ○高砂安奈、八巻幸子、宮地義則

はじめに

ペニシリン系抗生物質であるアンピシリン（ABPC）は、グラム陽性菌からグラム陰性菌まで広範にわたり優れた作用域と抗菌力を有する抗生物質であり、豚及び牛の肺炎、細菌性下痢、豚丹毒等の治療薬として使用されている。特に豚においては注射薬として販売量が多く[1]、豚の腎臓で検出事例も報告されている[2]。

しかし、ABPC は厚生労働省から試験法を示されておらず、当所でも試験法を確立していなかったため、今回、持田らの報告 [3]（以下「既報」という。）を基に、HPLC による ABPC 定量試験を検討した。また、確認試験については、神奈川県衛生研究所（以下「衛研」という。）の LC/MS/MS での分析方法を検討したので、これらの概要を報告する。

材料及び方法

1 材料、装置及び測定条件

(1) 検体

当所所管と畜場に搬入され、動物用医薬品等の残留のないことを確認した豚筋肉。

(2) 標準品及び標準溶液

標準品はアンピシリン標準品（富士フィルム和光純薬（株）製の HPLC 用）、標準溶液は標準品を精密に量り、水に溶解して標準原液（ $100 \mu\text{g/mL}$ ）とし、抽出溶媒で適宜希釈したもの。

(3) 試薬

水は超純水、アセトニトリルは HPLC 用、その他の試薬は特級を用いた。

(4) HPLC の装置及び測定条件

HPLC は Waters(株) 製 WATERS ACQUITY Arc Systems を、検出器は Waters(株) 製 蛍光検出器（2475）を用い、測定条件を表 1 に示した。

表 1 測定条件

項目	条件
測定波長	励起波長 : 346nm、測定波長 : 422nm
分析カラム	CORTECS T3 (2.7 μm, 3mm × 150mm) Column (Waters (株) 製)
カラム温度	35°C
移動相	0.02mol/L リン酸一カリウム溶液 : アセトニトリル = 80 : 20
流速	0.3mL/min
注入量	5 μL

2 方法

(1) 試験溶液調製方法の検討

豚筋肉に「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）に定める残留基準濃度（0.06ppm）の ABPC を添加し、既報に基づき添加回収試験を実施したところ、66.1% であった（n=3）。回収率向上のため、①抽出回数の増加（1 回 → 2 回）、

②抽出溶媒を水に変更 (pH4.5 リン酸緩衝液→水)、③ろ紙ろ過を綿栓ろ過に変更、④トリクロロ酢酸 (TCA) 濃度の変更 (75%→100%、50%、25%、0%) を検討した (n=1)。

(2) 5回繰り返し試験

(1)の結果から、最も回収率が良好であった方法を用いた試験法（改良法）(図1)により、豚筋肉を検体として5回繰り返し試験を実施し、得られた結果の選択性、真度及び併行精度について妥当性評価ガイドライン[4]に従い評価した（添加濃度：0.06ppm）。

(3) LC/MS/MS での試験

(2)で調製した蛍光誘導体化前のろ液（図1中＊部、添加検体、ブランク検体）及び標準溶液を使用し、衛研のLC/MS/MSでABPCを検出できるか試験を実施した。

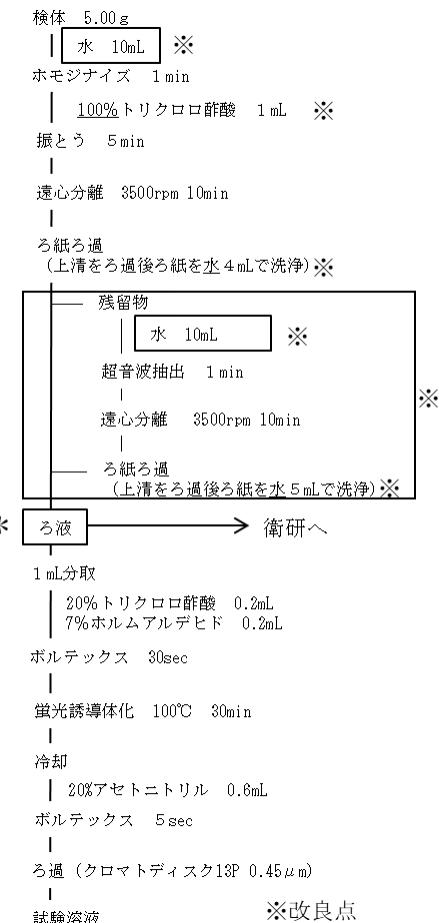


図1 試験溶液調製手順（改良法）

成績及び考察

1 試験溶液調製方法の検討

表2及び表3に各方法の結果を示した。①抽出回数の増加では、回収率76.0%、②抽出溶媒を水に変更した場合は、回収率は80.4%と既報よりも回収率は向上した。しかし、③綿栓ろ過については、回収率は70%未満であった。また、④TCA濃度の比較では、100%TCA添加で最も回収率が高かった。

よって、改良法では、抽出回数を2回

に増やし、抽出溶媒を水に変更し、添加するTCA濃度を100%とすることとした。調製方法を改良することによって回収率の向上を図り、また抽出溶媒をリン酸緩衝液から水に変更することによって、LC/MS/MSへの負荷を減じた方法に改良することができた。

表2 試験溶液調製方法検討結果

改良点	回収率 (%)
①抽出回数增加	76.0
②水 (抽出2回、100%TCA)	80.4
③綿栓ろ過	62.9
④TCA濃度 (水抽出2回)	表3のとおり
【参考】既報	66.1

表3 TCA濃度検討結果

TCA濃度 (%)	100	75	50	25	0
回収率 (%)	76.7	76.1	66.4	59.8	45.7

2 5回繰り返し試験

図2に改良法で行った豚筋肉検体のクロマトグラムを示した。プランク検体のクロマトグラムは、ABPCの定量を妨害するピークを認めず、選択性は良好であった。平均回収率74.5%、相対標準偏差(RSD)は1.2%で、妥当性評価ガイドラインにおける真度及び併行精度の目標値を満たした。

3 LC/MS/MSでの試験

MRMでは、添加検体からABPCの検出を確認することは可能だった。しかし、回収率が10%程度と非常に低かったため、プロダクトイオンスキャンでは標準溶液と類似したスペクトルを確認することができなかった。これは、試験溶液調製後、LC/MS/MSでの分析まで数日経過していたことや、ABPCはpH2では24時間で60%分解するとの報告[5]もあり、強酸であるトリクロロ酢酸が試験溶液に含まれていることから、ABPCが分解されている可能性が示唆された。

まとめ

豚筋肉のABPC試験法について、既報を改良することで、回収率の向上及びLC/MS/MSの負荷を減じた方法にすることができた。また、選択性、真度及び併行精度について良好な結果を得ることができた。しかし、蛍光誘導体化前のろ液を保管しておくとABPCが分解されてしまうという新たな問題点を認めた。今後は試験溶液保管方法等の検討を行い、また、室内精度を含め試験法の妥当性を評価したい。ABPC試験法確立を目指し、日常の検査に取り入れることにより、より安全な食の提供に寄与していきたい。

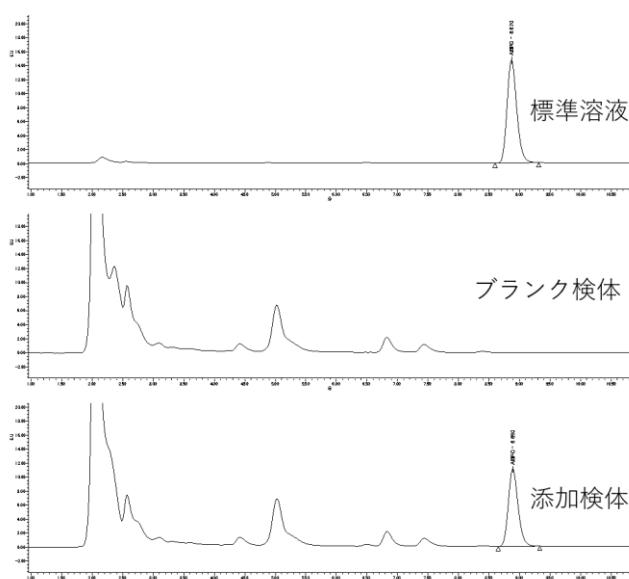


図2 標準溶液及び検体のクロマトグラム

[1]農林水産省動物医薬品検査所：令和4年動物用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報（別冊）各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量

[2]厚生労働省：平成30年度食品中の残留農薬等検査結果

[3]持田雅、木村陽平、熊野英子、梶義則：金沢市令和2年度事業概要、31-33

[4]「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の一部改正について（平成22年12月24日付食安発第1224号厚生労働省医薬食品安全部長通知）

[5]医療用医薬品品質情報集（オレンジブック）（平成20年3月版、厚生労働省医薬食品局審査管理課）