

食肉残留性のアンピシリンを含むペニシリン系抗生物質の高速液体クロマトグラフィーによる同時分析改良法

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	松本, 浩明 牛水, 徹 赤坂, 和昭 ほか1名,
巻/号	59巻10号
掲載ページ	p. 696-702
発行年月	2006年10月

食肉残留性のアンピシリンを含むペニシリン系抗生物質の 高速液体クロマトグラフィーによる同時分析改良法

松本浩明¹⁾ 牛水 徹²⁾ 赤坂和昭³⁾ 齋藤忠夫^{4)†}

- 1) 仙台市健康福祉局食肉衛生検査所 (〒983-0034 仙台市宮城野区扇町6-3-6)
- 2) 仙台市健康福祉局保健医療課 (〒980-0803 仙台市青葉区国分町3-7-1)
- 3) 東北大学大学院生命科学研究所 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)
- 4) 東北大学大学院農学研究科 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

(2005年11月14日受付・2006年5月8日受理)

要 約

牛および豚の筋肉および腎臓に残留する可能性のあるペニシリン G (PCG), オキサシリン (MPIPC), クロキサシリン (MCIPC), ジクロキサシリン (MDIPC), ナフシリン (NFPC) およびアンピシリン (ABPC) の計6種類のペニシリン系抗生物質 (PCs) の蛍光HPLCを用いた同時分析法を開発した。ABPCのカラム保持時間は移動相のpHと組成を検討して延長させ、試料抽出段階ではtC18カートリッジを新たに採用した。各PCsを0.05 μg/gおよび0.20 μg/gを添加した食肉試料での回収率は、ABPCで80~98%の高い数値が得られ、PCG, MPIPC, MCIPC, MDIPCおよびNFPCにおいて、それぞれ71~75%, 65~71%, 63~69%, 60~63%および61~66%であった。本法による試料中での検出限界は、PCGで5ng/g, その他PCsで10ng/gであり、食肉衛生検査所での分析方法として十分に実用的であると考えられた。——キーワード: アンピシリン, ペニシリン G, 食肉試料, 蛍光誘導体化, HPLC。

日獣会誌 59, 696~702 (2006)

ペニシリン系抗生物質 (PCs) は、β-ラクタム環に5員環が存在する基本構造を有しており、その官能基側鎖 (R-) の違いにより多種類のPCsが合成・市販されている。図1には、7種類の代表的なPCsの化学構造を示した。PCsは細菌細胞壁に作用して抗菌作用を示すことから、細胞壁の存在しない動物細胞には作用点がない。そのため、PCsは副作用の少ない選択毒性等の長所を有し、人のみならず畜産分野においても医療用抗生物質として汎用されている。また動物用医薬品としても、PCsは牛の肺炎や乳房炎などの局所感染症から敗血症などの全身感染症まで、幅広く治療に用いられている。

いっぽう、これら動物用医薬品の畜産物中への移行や残留が食品衛生上の問題となっており、人への健康被害が懸念されている。諸外国や国連食糧農業機関 (FAO) および世界保健機関 (WHO) の合同食品規格 (Codex) 委員会では、食品中に残留する動物用医薬品の規制や規格基準が策定されている [4]。わが国では1999年よりペニシリン G (PCG) に食品残留基準が設定され、その定量には微生物学的試験法が採用された。しかし、本法は選択性や感度が低く、また結果を得るまでに長時間を

必要とするなど数々の問題点を抱えている。

いっぽう、これに代替する試験法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたPCsの残留分析法が提案されている [5, 12, 13]。紫外部 (UV) 検出器によるHPLC分析では、PCGの極大吸収波長 (220nm付近) で試料由来の夾雑物による吸収妨害を受けやすく、多くのピークが重なってしまい正確な分析は困難である。塩化水銀試薬を用いたプレカラム誘導体化法も報告されているが [1, 8, 15]、近年の環境汚染や水銀毒性などの面で推奨されない。高感度でかつ選択性の高い蛍光検出器でのHPLC分析では、乳 [10] や血清 [9] の分析事例は散見されるが、食肉中のPCsの残留分析例は極めて少ないのが現状である [7]。最近では、HPLCと質量分析装置 (MS) を組み合わせたLC/MS法による畜産物中のPCs分析例の報告もあるが [11]、分析装置やメンテナンス費用が高額でありすべての検査施設等での配備は難しい。

近年、牛水ら [14] はカルボキシル基 (-COOH) 標識用蛍光誘導体化試薬である1-プロモアセチルピレン (BAP) を用いて、食肉中に残留するPCG, オキサシリン

† 連絡責任者: 齋藤忠夫 (東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻食品機能健康科学講座動物資源化学研究室)

〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 ☎022-717-8711 FAX 022-717-8715

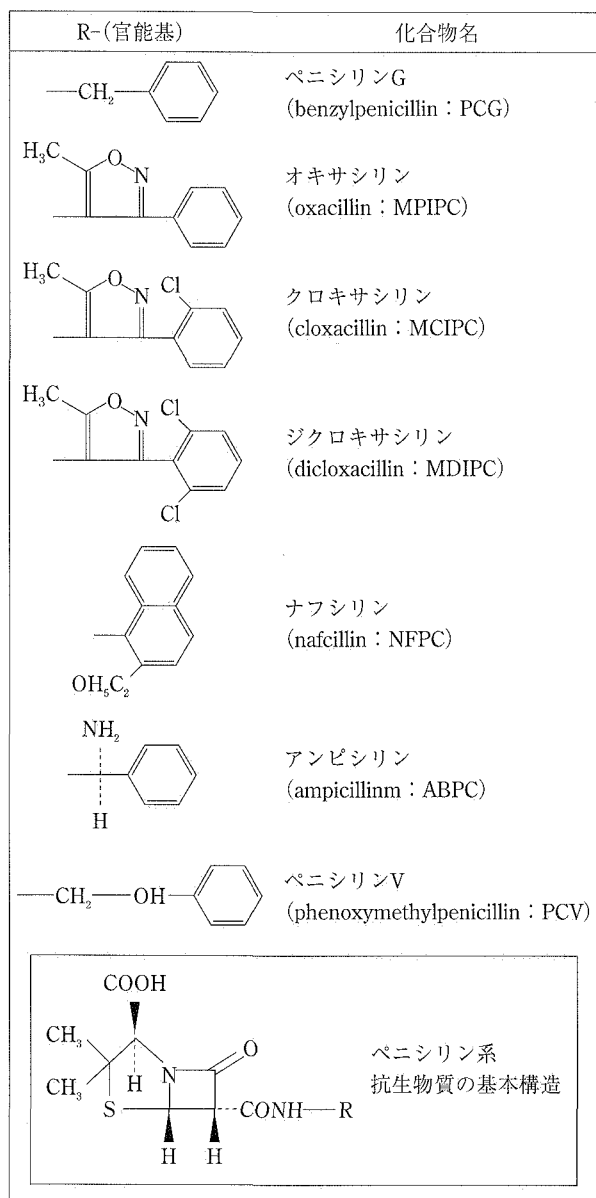


図1 7種類の代表的ペニシリン系抗生物質 (PCs) の名称と化学構造

ン (MPIPC), クロキサシリン (MCIPC), ジクロキサシリン (MDIPC) およびナフシリン (NFPC) の計5種類のPCsに対する蛍光HPLC分析法を報告した。本法は、蛍光検出器により高感度に定性・定量が可能な分析法であり、食肉衛生検査所等の検査施設においても広く実施可能である。

いっぽう、仙台市食肉衛生検査所に病畜として搬入される獣畜には、上記5種のPCsに加えて、アンピシリン (ABPC) の投与が疑われる事例が多い。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薬剤であり、大腸菌などのグラム陰性菌が原因とされる感染症に幅広く用いられている。しかしながら、前述の牛水の方法では、ABPCを含むPCsの分析には対応していない。今後はさらに検査施設に搬

入される獣畜の検査対象頭数は増加することが予想され、ABPCを含むPCsの分析法の検査施設における確立は急務と考えられる。

本論文では、牛水らの方法を元に、すでに測定可能な5種のPCsに、さらなる分析対象薬剤としてABPCを加え、これら6種のPCsの蛍光HPLCを用いた同時 (一斉) 分析法の確立とその現場への応用可能性を検討した。

材料および方法

試料: 仙台市ミートプラント (仙台市) に搬入され、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」(簡易検査法) により薬剤の残留のないことが確認された牛および豚の筋肉および腎臓を、添加回収試験に用いた。また、同プラントに搬入・処理され、簡易検査法と「畜水産食品中の残留抗生物質分別推定法」(分別推定法) によりPCs残留が疑われ、かつ出荷者からの聞き取り調査によりABPCの投与が確認された牛および豚の筋肉および腎臓を、残留陽性検体として用いた。

試薬: PCs標準品として、ペニシリンG^{a)} (PCG), オキサシリン^{b)} (MPIPC), クロキサシリン^{c)} (MCIPC), ジクロキサシリン^{d)} (MDIPC), ナフシリン^{e)} (NFPC) およびアンピシリン^{f)} (ABPC) を使用し、さらにHPLC分析時の内標準物質としてペニシリンV^{g)} (PCV) を用いた。各PCs標準品は、100 μg/ml濃度にミリQ水で溶解し、内標準物質 (PCV) は20 μg/ml濃度にアセトニトリル^{h)} で溶解し、それぞれ標準原液とした。これら原液は、ミリQ水またはアセトニトリルで適宜希釈して標準溶液を作成した。

カルボキシル基 (-COOH) 標識用の蛍光誘導体化試薬として1-ブromoアセチルピレンⁱ⁾ (BAP) を、蛍光誘導体化触媒として18-クラウン-6^{j)} 使用し、試料の濃縮過程で用いる抽出カートリッジカラムはtC18 (400mg)^{k)} を用いた。

アンピシリン (ABPC) の誘導体化反応条件とHPLC移動相の検討: 牛水ら [14] のPCs誘導体化条件 (2 μg/ml ABPC 500 μl, 10mM BAP溶液 50 μl, 5mg/ml 18-クラウン-6 50 μl, 反応温度 40 °C, 反応時間 30min) を参考にして、より高い反応率を得るために、蛍光誘導

a) Benzylpenicillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

b) Oxacillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

c) Cloxacillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

d) Dicloxacillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

e) Nafcillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

f) Ampicillin sodium salt, Sigma, U.S.A.

g) Phenoxymethylpenicillin potassium salt, Sigma, U.S.A.

h) HPLC用アセトニトリル, 和光純薬工業(株), 大阪.

i) 1-Bromoacetylpyrene, 和光純薬工業(株), 大阪.

j) 18-Crown-6, 和光純薬工業(株), 大阪.

k) Sep-Pak Plus tC18, Waters, U.S.A.

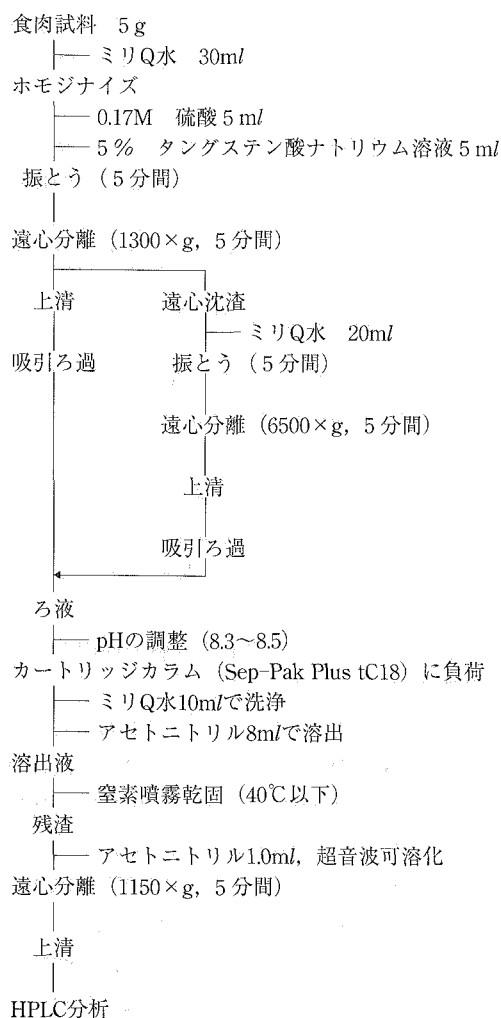


図2 食肉試料からのPCs抗生物質の抽出および精製方法

体化試薬のBAPおよび蛍光誘導体化触媒の18-クラウン-6の最適濃度条件を検討した。また、その決定した試薬濃度の条件において、反応温度および反応時間の検討を行った。すなわち、BAPは、1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15および20mMで、18-クラウン-6は、1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5および15mg/mlのそれぞれ7種の濃度条件を設定した。反応温度は、40, 60および80℃の3条件を設定し、それぞれの温度における反応時間は、30, 45, 60, 75および90分の5条件について検討した。

また、牛水法におけるHPLC移動相の組成（アセトニトリル-メタノール^{l)}-10mMリン酸1ナトリウム溶液^{m)}, 45:25:30; v/v/v)を参考にし、ABPCを加えたPCs標準品が試薬由来ピークに妨害されずに、連続して明瞭に分離する移動相の検討も行った。

食肉試料からのPCsの抽出と精製方法：食肉試料（筋肉、腎臓）からのPCs抗生物質の抽出および精製方法のフローを図2に示した。

試料5.0gを細切して、キャップ付ポリアロマー製遠心管（80ml容）に量り採り、ミリQ水30.0mlを加え、

ホモジナイザーⁿ⁾を用いて1分間24,000rpmの条件下にて均質化した。これに0.17M硫酸^{o)}および5% (w/v) タングステン酸ナトリウム溶液^{p)}のおおの5.0mlを加えて5分間振とうし、遠心分離（1,300×g, 5分, 室温）した。上清をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過して、遠心沈渣には再度ミリQ水20.0ml加えて5分間振とうした。遠心分離（6,500×g, 5分, 室温）した後、その上清を吸引ろ過し、先のろ液と合わせた。tC18カートリッジカラムは、事前にアセトニトリルおよびミリQ水のおおの20.0ml、ついで0.2%塩化ナトリウム溶液^{q)}および1N水酸化ナトリウム溶液^{r)}によりpH8.5に調製した2.5mMリン酸1ナトリウム溶液の各10.0mlで前処理（洗浄）した。

1N水酸化ナトリウム溶液によりpHを8.3~8.5に調整した抽出液を前処理済みのカートリッジカラムに負荷し、ミリQ水10.0mlで洗浄した。カートリッジに吸着したPCsをアセトニトリル8.0mlで溶出し、溶出液をガラス製試験管に採り、40℃下の窒素噴霧法で乾固した。残渣にアセトニトリル1.0mlを加え、攪拌（30秒）および超音波洗浄装置^{v)}を用いて2分間可溶化した後、遠心分離（1,150×g, 5分, 室温）し、上清部をHPLC分析に供した。

なお、添加回収試験では、試料5.0gにPCs混合標準溶液1.0および4.0μg/mlをおおの250μl添加し、食肉試料中のPCs最終濃度を0.05μg/gおよび0.20μg/gに調整したものを本試験に供し、上記の抽出処理を行った。

PCsのプレカラム蛍光誘導体化：PCs標準溶液および試料溶液（500μl）を反応バイアルに採り、これに内標準物質のPCV溶液（10μg/mlアセトニトリル）100μl、誘導体化触媒試薬の18-クラウン-6溶液（10mg/mlアセトニトリル）50μlおよび蛍光誘導体化試薬の10mM BAPアセトニトリル溶液50μlを加えて、密栓した後に混合・攪拌した。蛍光誘導体化反応は、40℃で45分間加温して行い、この反応液20μlをHPLC分析に供した。

蛍光HPLC分析：高速液体クロマトグラフは、送液ポンプ^{l)}、蛍光検出器^{m)}、カラムオープンⁿ⁾および脱気装置^{w)}から構成され、分析用カラムには、アルカリ領域で

l) HPLC用メタノール, 和光純薬工業(株), 大阪.
 m) リン酸1ナトリウム, 和光純薬工業(株), 大阪.
 n) T-25, IKA, ドイツ.
 o) 2N硫酸, 和光純薬工業(株), 大阪.
 p) タングステン酸ナトリウム二水和物, 和光純薬工業(株), 大阪.
 q) 塩化ナトリウム, 和光純薬工業(株), 大阪.
 r) 1N水酸化ナトリウム溶液, 和光純薬工業(株), 大阪.
 s) MU-604, シャープ, 大阪.
 t) L-6200, 日立製作所(株), 東京.
 u) F-1080, 日立製作所(株), 東京.
 v) L-7300, 日立製作所(株), 東京.
 w) S-3540, 相馬光学(株), 東京.

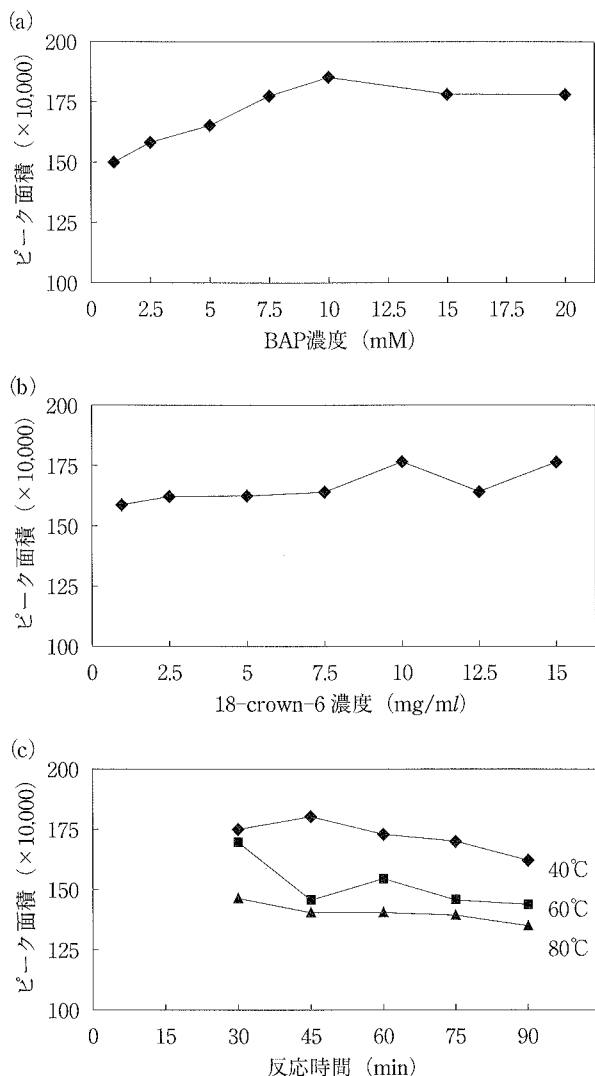


図3 ABPCの誘導体化反応条件の検討

- (a) BAP濃度の検討 (b) 18-クラウン-6濃度の検討
(c) 反応温度と反応時間の検討

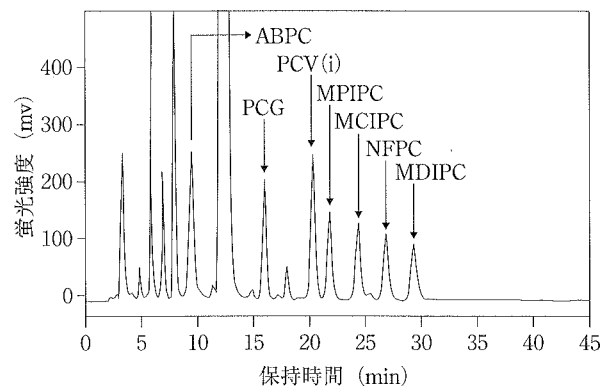
の逆相分析の可能なC18^{x)}カラムを使用した。最終的なデータ処理は、ワークステーション内蔵のデータ処理ソフト^{y)}を用いた。

移動相には、アセトニトリル-メタノール-10mMリン酸1ナトリウム溶液(7:7:6, v/v/v)を1N水酸化ナトリウム溶液によりpH9.0に調整したものをを用いた。溶出は、流速1ml/min, カラム温度40℃で行い、励起波長370nmおよび蛍光波長440nmで蛍光検出を行った。PCs標準溶液は、原液をミリQ水またはアセトニトリルを用いて、0.005, 0.01, 0.05, 0.25, 1.00, 5.00または10.00 μg/mlとなるように希釈調製した。それぞれの標準溶液を誘導体化し、HPLC測定に供し、得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、内部標準法を用いて検量線を作成した。

x) CAPCELL PAK C18MG, 資生堂(株), 東京。

y) D-7000, 日立製作所(株), 東京。

(a) 牛水らの原法



(b) 改良法

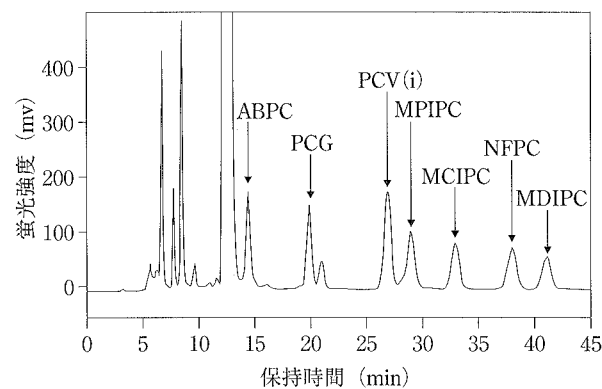


図4 7種類のペニシリン系抗生物質(PCs)のHPLCクロマトグラム

- (a) 牛水らの原法 [14] (b) 改良法

成 績

アンピシリン (ABPC) の誘導体化反応条件とHPLC移動相の検討: 蛍光誘導体化試薬のBAPの最適濃度の検討では、1, 2.5, 5, 7.5および10mMへと濃度を上昇させると、ABPCのピーク面積は増加した。しかしながら、より高濃度の15および20mMでは、ABPCの保持時間10分付近の反応試薬由来の夾雑ピークの影響により、ABPCのピーク面積は減少した(図3 (a))。

いっぽう、誘導体化反応触媒(18-クラウン-6)の最適濃度の検討では、1, 2.5, 5, 7.5および10mg/mlへ濃度を上昇させると、ABPCのピーク面積は濃度依存的に微増傾向を示した。しかしながら、12.5mg/ml以上の濃度では、夾雑ピークの影響もあり減少に転じた。(図3 (b))。以上の検討により、BAP濃度10mM, 18-クラウン-6濃度10mg/mlで以降の条件検討を行うことにした。

反応温度および反応時間の条件検討では、反応温度を40℃からさらに60および80℃へと上昇させると、ピーク面積は減少する結果となった(図3 (c))。また、40℃における各反応時間のピーク面積の比較では、45

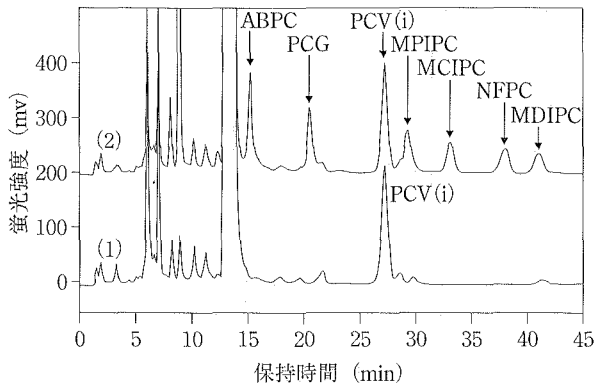


図5 豚筋肉におけるHPLCクロマトグラム
(1) 陰性対照 (2) PCs標準溶液0.20 µg/g添加

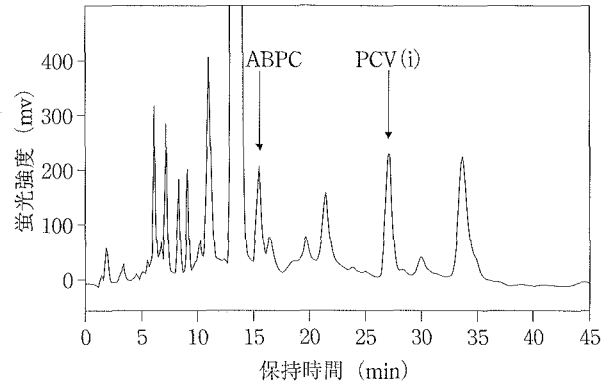


図6 ABPC残留陽性検体(牛頸部筋肉)のHPLCクロマトグラム

表1 食肉試料からのPCs添加回収試験

試料	添加濃度 (µg/g)	回収率 ¹⁾ (%)					
		ABPC	PCG	MIPIC	MCIPC	NFPC	MDIPC
牛筋肉	0.2	85.2±2.4	73.4±5.1	65.9±3.8	63.3±4.5	61.0±0.5	60.3±6.1
	0.05	83.3±4.4	72.5±4.8	67.5±3.0	65.3±4.3	63.3±2.0	63.0±5.1
豚筋肉	0.2	96.1±4.9	75.8±0.4	69.8±0.8	69.2±4.6	61.2±2.6	63.5±3.1
	0.05	96.9±1.9	74.7±2.4	71.3±5.6	67.9±5.1	65.1±8.0	62.1±2.7
牛腎臓	0.2	89.4±6.4	71.4±1.3	71.6±1.9	69.8±2.8	66.1±2.4	62.6±4.26
	0.05	98.5±5.2	71.6±5.0	67.6±3.0	68.5±3.7	67.0±1.3	2.8±4.0
豚腎臓	0.2	80.1±6.6	72.1±3.5	69.7±3.2	66.7±6.5	61.8±6.7	62.2±7.0
	0.05	86.0±4.6	72.2±6.2	68.2±7.0	67.7±5.6	65.6±4.7	63.3±7.8

1) 平均値±標準偏差 (n=5)

分で最大値を与えたことより、40℃で45分保持する加熱処理条件が最適と考えられた。

以上の条件にて、ABPCのピーク面積が最大となり、その他5種類のPCsについても、牛水法での誘導体化反応条件よりも良好な成績を示したので、以降の分析実験ではこの反応条件を用いることとした。

ABPCを加えたPCsのHPLC移動相の検討では、まず牛水法における移動相条件 [アセトニトリル-メタノール=10mMリン酸1ナトリウム溶液 (45:25:30, v/v/v, pH調整なし)] での予備実験で、ABPCが試薬由来の夾雑ピークの狭間に出現し、定量性を阻害する可能性が認められた。(図4 (a))。いっぽう、改良した移動相条件 [アセトニトリル-メタノール=10mMリン酸1ナトリウム溶液 (7:7:6, v/v/v) pH9.0] では、保持時間14分までに試薬由来の主要ピークが溶出し、ABPCを主要なピークよりも遅れて溶出させることに成功した。ABPCの後にはPCs成分が連続して溶出し、各ピークがベースラインセパレーションする理想的なクロマトグラム (図4 (b)) が得られた。しかし、全分析時間は牛水法の約30分から45分に15分間延長された。

添加回収試験：各食肉試料に各PCs最終濃度が0.05 µg/gおよび0.20 µg/gとなるように添加した回収試験

の結果を表1に示した。回収率は、ABPCで80%以上、PCGで70%以上、そしてその他PCsで60%以上と高値であった。標準偏差はいずれにおいても10%以内であり、良好な成績が得られた。図5には、添加回収試験における豚筋肉のHPLCクロマトグラムを示した。いずれの食肉試料においてもPCs分析を大きく妨げる試料由来ピークは認められなかった。なお本法による試料中の検出限界 (S/N比≥3) は、PCGで5ng/g、その他PCsで10ng/gであった。また、各PCs標準溶液の検量線を0.05 µg/ml～10.0 µg/mlの範囲で作成したところ、いずれのPCsにおいても良好な直線性 (r>0.999) を示した。

ABPCの残留陽性検体の分析：簡易検査法と分別推定法および聞き取り調査により、ABPCの投与が判明した牛および豚の筋肉および腎臓を本改良法により分析した結果、牛の筋肉、注射痕部位および腎臓で、それぞれ0.18 µg/g、5.41 µg/gおよび0.68 µg/gのABPCを、豚の筋肉および腎臓で、それぞれ0.01 µg/gおよび0.15 µg/gのABPCを検出することができた。図6には、牛頸部筋肉試料におけるHPLCクロマトグラムを示した。保持時間15.1分に明確なABPCのピークが検出できた (0.18 µg/g)。

考 察

本研究は、ペニシリン系抗生物質 (PCs) の基本構造であるカルボキシル基を特異的に標識する蛍光誘導体化試薬 BAP を用いて行った。共同研究者である牛水らにより、5 種 PCs の HPLC 分析はすでに実施されていたが [14]、今回、ABPC を含めた 6 種 PCs の蛍光 HPLC による同時分析の検討を行ったものである。ABPC は上記 5 種の PCs と同様、その基本構造にカルボキシル基を有することより (図 1 参照)、BAP に対して反応性を有することが確認された。しかしながら、ABPC はその官能基側鎖中にアミノ基 ($-NH_2$) も有し、他の 5 種の PCs とは異なりイオン化し易く極性および水溶性が高い。そのため、ABPC は C18 カラムには結合性が弱く、逆相 HPLC での同時分析は難しかった。牛水らの原法で ABPC の測定を行った場合も、約 9 分前後の蛍光誘導体化試薬由来の夾雑ピーク中に重なって溶出するため、本成分を正確に定量することは難しかった (図 4 (a) 参照)。したがって、ABPC の定量分析を行うためには、その保持時間を試薬由来の夾雑成分ピーク群よりも遅延させる必要があった。これらの問題を解決するために、移動相の pH や組成について検討を行った。

われわれは ABPC が塩基性物質でもあることに注目し、移動相の pH を 9.0 に上昇させ、アミノ基を非イオン化状態にさせることで、保持時間を延長させることを試みた。通常のシリカゲルベースのカラムでは、アルカリ性領域での逆相分析は難しいが、本研究では耐アルカリ性カラムを使用することで分析を可能とした。さらに移動相の組成については、アセトニトリルとメタノールの比率に注目し、後者の存在比率を高めることで ABPC の保持時間の延長を試みた。これらの一連の分析条件の改良により、ABPC の保持時間を試料と試薬由来ピークより後に移動させることに成功した (図 4 (b) 参照)。

いっぽう、ABPC を含めた PCs の食肉中からの抽出・精製方法は、公定法を基とした牛水の原法に準拠して検討を行った。牛水法では、硫酸とタングステン酸ナトリウムで除タンパク処理を行い、PCs は C18²⁾ カートリッジカラムにより精製した。しかし、ABPC は逆相担体への親和性が低く、高い吸着性が望めないため、ABPC の定性・定量分析を可能にするためには、カラムへの吸着性向上の必要性があった。

本研究では、トリファンクショナル結合充填材である tC18 カートリッジカラムを採用し、抽出液の pH をアルカリ領域に調整して、ABPC のイオン化を抑制した条件下で試料負荷することにより、高い回収率を得ることに成功した。すべての食肉試料からの ABPC 回収率は

80%以上であり、その他の PCs においても 60%以上の回収率が得られた。ABPC を含む PCs の同時分析に際しては、この tC18 カートリッジカラムの採用は極めて有効であると思われる。ただし本法は、塩基性物質である ABPC を第一の分析対象薬剤として精製・抽出方法を採用しているため、酸性物質であるその他 5 種 PCs については、従来の牛水法に比べ回収率は低いものとなった。

現在、食肉衛生検査所での残留抗菌性物質の検査は、簡易法と分別推定法の 2 種類の微生物学的方法により実施されている。簡易法は検出感度 (ABPC : 200ng/g, PCG : 390ng/g) が悪く [6]、分別推定法は本法より検出感度 (ABPC・PCG : 2.5ng/g) はよいが [6]、操作が煩雑で結果を得るまでに時間を要し、薬剤の種類までは同定ができないなどの短所もある。以上 2 つの微生物学的手法と比較すると、本法は PCG と並んで臨床用汎用される ABPC を含む 6 種 PCs を高感度にかつ迅速に分析できる点で優位性が高いと認められる。

現在わが国の食品衛生法では、畜産物中における ABPC の残留基準値は設定されておらず、PCs の中では PCG のみに設定されている。EU においては、本法で分析可能な 6 種の PCs すべてに残留基準値 (ABPC・PCG : 0.05 μ g/g, その他 PCs : 0.30 μ g/g) が規定されている [2, 3]。PCG と ABPC の回収率は、いずれの食肉試料においても 70%以上であり、食品衛生検査施設等における精度管理の一般ガイドラインに示された基準を満たしており、また 6 種 PCs すべて EU 残留基準値を検出可能な分析法として十分に満足すべき感度を有している。

2006 年 5 月に、動物用医薬品のポジティブリスト制度が導入され、ABPC や PCG 以外の PCs に対する残留基準値が設定された。しかし、それらの定量分析には LC/MS 法が採用され、全国の食肉衛生検査所で実施可能な分析法とは考えにくい。本改良法により ABPC を含む 6 種 PCs の迅速な同時分析が可能となり、また普及度の高い蛍光検出器付きの HPLC を測定機器に用いるために、将来的に検査現場での高い導入性および利用性が期待される。

引用文献

- [1] Boison JO, Keng LJY : J AOAC Int, 81, 1113-1120 (1999)
- [2] EU Commission Regulation 1850/97, Official Journal of the European Communities, L264, 12-14 (1997)
- [3] EU Commission Regulation 2701/94, Official Journal of the European Communities, L287, 7-17 (1994)
- [4] 堀江正一, 村山三徳 : 食衛誌, 45, J211-J215 (2004)
- [5] Ito Y, Ikai Y, Oka H, Kagami T, Takaba K : J Chromatogr, 855, 247-253 (1999)

z) Bond elute C18, Varian, U.S.A.

- [6] 神保勝彦：食衛誌，40，J195-J202 (1999) (2001)
- [7] Luo W, Hansen EB, Ang CYW, Thompson HC : J Chromatogr B, 694, 401-407 (1997) [12] Sørensen LK, Rasmussen BM, Boison JO, Keng L : J Chromatogr B, 694, 383-391 (1997)
- [8] Marchetti M, Schwaiger I, Schmid ER : Fresenius J Anal Chem, 371, 64-67 (2001) [13] Terada H, Asanoma M, Sakabe Y : J Chromatogr, 318, 299-306 (1985)
- [9] Mascher HJ, Kikuta C : J Chromatogr A, 812 221-226 (1998) [14] 牛水 徹, 佐藤寿男, 齋藤忠夫, 伊藤敏敏：日本畜産学会報, 72, 570-578 (2001)
- [10] Munns RK, Shimoda W, Roybal JE, Vieira C : J Assoc Off Anal Chem, 68, 968-971 (1985) [15] Verden E, Couëdor P : J AOAC Int, 82, 1083-109 (1999)
- [11] Riediker S, Stadler RH : Anal Chem, 73, 1614-1621

Modified Simultaneous Determination of Six Residual Penicillins Including Ampicillin in Edible Animal Tissue Using Fluorescence HPLC

Hiroaki MATSUMOTO*, Toru USHIMIZU, Kazuaki AKASAKA, Tadao SAITO[†]

* *Sendai Municipal Meat Inspection Center, 6-3-6 Ougimati, Miyagino-ku, Sendai-shi, 983-0034, Japan*

SUMMARY

A new pre-column labeled fluorescence HPLC was developed for simultaneous determination of six residual penicillins (PCs : benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin and ampicillin) in muscle and kidney tissue in cattle and pigs. The modifications include pH and composition of the mobile phase for extending the retention time of ampicillin on HPLC, and the introduction of tC18 solid-phase extraction cartridges. The recovery of ampicillin, benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin and nafcillin from edible animal tissue spiked at a level of 0.05 $\mu\text{g/g}$ and at 0.20 $\mu\text{g/g}$ and was in the ranges (%) of 80-98, 71-75, 65-71, 63-69, 60-63 and 61-66, respectively. The detection limits for benzylpenicillin and other penicillins were 5ng/g and 10ng/g, respectively in tissues. The method is considered to have application for every meat inspection office.

—Key words : Ampicillin, Benzylpenicillin, Edible animal tissue, Fluorescence derivatization, HPLC.

† *Correspondence to : Tadao SAITO (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)*

1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai-shi, 981-8555, Japan

TEL 022-717-8711 FAX 022-717-8715

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 696 ~ 702 (2006)

日本獣医公衆衛生学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎山本 茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)

○高島 郁夫 (北海道大学大学院獣医学研究科)

金内 長司 (元・麻布大学獣医学部)

高島 浩介 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)

津田 修治 (岩手大学農学部)

明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

今井 壯一 (日本獣医生命科学大学獣医学部)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)

月瀬 東 (日本大学生物資源科学部)

中市 統三 (山口大学農学部)

中澤 宗生 (動物衛生研究所疫学研究チーム)

(◎委員長, ○副委員長)

編集発行人	日本獣医公衆衛生学会
	会長 熊谷 進

『*投稿を希望される方は、学会誌投稿規程 (第58巻第12号853頁) 及び学会だより・投稿規程の一部改正記事 (第59巻第5号349頁) 並びに三学会誌投稿の手引き (第59巻第9号632頁) をご参照ください』