ノート

畜産食品中の残留ベンジルペニシリンの微生物学的試験法

(平成 11 年 9 月 7 日受理)

藤田 和弘^{*1} 山口嘉奈子^{*1} 松岡 慎^{*1} 高山正彦^{*1}
 渡井正俊^{*2} 丹野憲二^{*3} 丸山賀子^{*4}
 村山三徳^{*5} 豊田正武^{*5}

Biological Method for Determination of Residual Benzylpenicillin in Livestock Products

Kazuhiro FUJITA^{*1}, Kanako YAMAGUCHI^{*1}, Shin MATSUOKA^{*1}, Masahiko TAKAYAMA^{*1}, Masatoshi WATAI^{*2},
 Kenji TANNO^{*3}, Noriko MARUYAMA^{*4}, Mitsunori MURAYAMA^{*5} and Masatake TOYODA^{*5}

(^{*1}Japan Food Research Laboratories Nagoya Branch: 4-5-13, Osu, Naka-ku, Nagoya 460-0011, Japan; ^{*2}Japan Food Research Laboratories Tama Laboratory: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan; ^{*3}Japan Food Research Laboratories Head Office and Laboratory: 52-1, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151-0062, Japan; ^{*4}Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology: 3-7-11, Hashimoto-dai, Sagamihara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan; ^{*5}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

A biological method for determination of residual benzylpenicillin (PCG) in livestock products was evaluated. PCG was extracted from a sample with distilled water. The extract was deproteinized by adding tungstic acid, followed by a Bond Elut C18 cartridge clean-up procedure. The cylinder method was employed for quantitative determination, and microbioautography for identification of PCG. The average recovery at the maximum residue limits recommended by the Codex committee was 80.7% and the determination limits were 5 ppb (muscle, liver, kidney) and 1 ppb (milk).

(Received September 7, 1999)

Key words: ベンジルペニシリン benzylpenicillin; ボンドエルト C18 カートリッジ Bond Elut C18 cartridge; 微生物学的試験法 microbioassay; 円筒平板法 cylinder method; マイクロバイオオートグラフィー microbioautography

緒言

平成 7 年 12 月及び平成 9 年 3 月に食品衛生法が改正され、11 品目の動物用医薬品の食品への残留基準値が設定された。更に平成 9 年 10 月にベンジルペニシリン (PCG) を含む 4 物質について残留基準値を設定することが食品衛生調査会に諮問され、これらの残留分析法の確立が急務となった。

PCG の分析法については、微生物学的方法^{1)~3)} や HPLC による方法^{4)~8)} が報告されている。従来の微生物学

的方法である、国際酪農連盟 (IDF) の方法¹⁾ や「畜水産食品中の残留物質検査法」²⁾ (以下「検査法」) は定性的な試験法であり、また、Haginaka ら⁶⁾ や Boisson ら^{7), 8)} の HPLC による方法は有用な方法ではあるが、我が国では毒物に指定されている塩化水銀(II) を反応試薬として用いているため、近年の環境問題を考慮した場合、使用しがたいと考えた。

著者らは、PCG の迅速、簡便でなおかつ Codex 規格の残留基準値 (Table 1)⁹⁾ を満足する分析法の確立を目的として検討を行った。その結果、微生物学的方法である円筒

^{*1} (財)日本食品分析センター名古屋支所: 〒460-0011 名古屋市中区大須 4-5-13

^{*2} (財)日本食品分析センター多摩研究所: 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

^{*3} (財)日本食品分析センター東京本部: 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町 52-1

^{*4} (財)畜産生物科学安全研究所: 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

^{*5} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1. Recommended Maximum Residue Limits for PCG by the Codex Committee

Species	Muscle ($\mu\text{g/kg}$)	Liver ($\mu\text{g/kg}$)	Kidney ($\mu\text{g/kg}$)	Milk ($\mu\text{g/kg}$)
Cattle	50	50	50	4
Pigs	50	50	50	—

平板法で定量し、マイクロバイオオートグラフィーで確認する方法により、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

牛・豚肉、肝臓、牛腎臓及び牛乳の市販品を用いた。

2. 試験菌株

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis* C-953 (以下 *B. calidolactis* と略称) を使用した。

3. 試薬など

PCG 標準品: 和光純薬工業 (株) 製のベンジルペニシリンカリウムを使用した。

標準溶液: 標準溶液を 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) の濃度になるようにリン酸緩衝液で調製し、使用に際しては円筒平板法ではリン酸緩衝液で、マイクロバイオオートグラフィーでは 50% アセトンで適宜希釈した。

その他の試薬: 和光純薬工業 (株) 製試薬特級を用いた。

試験菌液調製用培地: 「検査法」の M-18 培地を用いた。試験菌液: 継代培養して保存した試験菌を M-18 培地に接種し、55°C で 6 時間振とう培養したもの、又は 17 時間静置培養したもの。

定量用平板培地: Heart Infusion Agar (Difco 社製) 又は「検査法」の M-19 培地を用い、試験菌液を培地量の 0.5% 加えて混合し、8 mL の単層平板培地とした。なお、円筒平板法に用いる場合は、ステンレススチール製円筒 (外型 8 mm, 内径 6 mm, 高さ 10 mm) を置いた。

マイクロバイオオートグラフィー用培地: Heart Infusion Agar (Difco 社製) に、試験菌液を培地量の 0.5% 加えて混合して調製した。

リン酸緩衝液: 「検査法」の B-11 緩衝液を用いた。

吸着カラム: Varian 社製 Bond Elut C18 (500 mg/3 cc), Waters 社製 Sep-Pak Plus C18, Sep-Pak Plus PS2, (株) ワイエムシー社製 YMC spe ODS は、いずれもアセトニトリル 10 mL, 水 10 mL 及び 2% NaCl 溶液 5 mL の順に流して調製した。

TLC プレート: E. Merck 社製セルロースプレート (Art. 5716) を使用した。

展開溶媒: 1-ペンタノール-アセトン-水=4:1:3 (上層) を使用した。

ペーパーディスク: Advantec 社製枝肉の抗菌性物質検査用を使用した。

4. 試験溶液の調製

4.1 牛・豚肉、肝臓、牛腎臓

試料 5 g を 250 mL の遠心管にはかりとり、水 30 mL を加えてホモジナイズした後、0.17 mol/L 硫酸 5 mL 及び 5% タングステン酸ナトリウム溶液 5 mL を加えて 5 分間振とうした。遠心分離 (3,500 rpm 5 分室温、以下同様) した後、上澄み液を分取し、残留物に再度水 20 mL を加えて 5 分間振とうした。遠心分離した後、上澄み液

Fig. 1. Correlation of preincubation between standing for 17 hr and shaking for 6 hr

を分取し、先のものと合わせてガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。ろ液に 25% NaCl 溶液 8 mL を加えた後、Bond Elut C18 に負荷した。2% NaCl 溶液 10 mL, 水 10 mL でカートリッジを洗浄した後、80% アセトニトリル 5 mL で PCG を溶出し、溶出液を 80% アセトニトリルで 10 mL に定容してその 5 mL を減圧下 40°C で濃縮乾固した。残留物をリン酸緩衝液 5 mL に溶解し、円筒平板法用試験溶液とした。一方、残りの 5 mL は同様に濃縮乾固した後、残留物を 50% アセトン 1 mL に溶解し、マイクロバイオオートグラフィー用試験溶液とした。

4.2 牛乳

試料 25 g を 250 mL の遠心管にはかりとり、水 25 mL 及び飽和 EDTA-2Na 5 mL を加えて 5 分間振とうした。遠心分離後、上澄み液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。ろ液に 25% NaCl 溶液 6 mL を加えた後、Bond Elut C18 に負荷した。以下 4.1 と同様に行い、試験溶液を調製した。

5. 検量線の作成

0.0025, 0.005, 0.01, 0.02 及び 0.04 ppm の濃度に調製した標準溶液を、円筒平板法の場合はステンレススチール製円筒に各々 250 μL 注入後、ペーパーディスク法の場合はペーパーディスクに各々 75 μL 浸み込ませて 30 分間風乾した後定量用平板培地に置き、55°C で 16~18 時間培養して円筒周辺に生じた阻止円直径から検量線を作成した。

結果及び考察

1. 試験菌液調製法及び定量用平板培地の検討

B. calidolactis による試験菌液の調製は、「検査法」などでは、55°C で 17 時間静置培養する方法が採用されており、試験時間が長くなる要因の 1 つとなっている。そこで試験の迅速性を考慮し、6 時間の振とう培養による方法との比較検討を行った。

17 時間静置培養した菌液と 6 時間振とう培養した菌液

Table 2. Comparison of Pre-treatment Columns on the Recovery of PCG

Column	Recovery* ¹ (%)	
	Eluent A* ²	Eluent B* ³
Bond Elut C18	93.9	91.8
Sep-Pak Plus C18	34.4	37.3
Sep-Pak Plus PS2	93.1	93.7
YMC spe ODS	92.7	92.1

*¹ Standard solution of PCG containing 10 µg was applied to the column duplicatedly.

*² PCG was eluted with 5 mL of 80% MeCN.

*³ PCG was eluted with 5 mL of 60% MeCN.

Table 3. Comparison of Extraction Solvents for PCG from Cattle Kidney

Extraction solvents	Spiked (ppb)	Recovery (%)
0.05 mol/L Phosphate buffer (pH 6.0)	0	Detect* ¹
	50	93.3
D. W.* ² -Acetone (1 : 1)	0	Detect
	50	87.8
D. W. +5% Sodium tungstate +0.17 mol/L sulfuric acid	0	ND* ³
	50	84.1

*¹ Inhibition zone was formed.

*² Distilled water

*³ Inhibition zone was not formed.

では、菌の増殖期が異なるため、薬剤に対する感受性が異なる可能性も示唆された。しかし、Fig. 1 に示したように、0.0025~0.04 ppm の濃度範囲において、ほぼ同様の阻止円形成が得られ、PCG の定量において問題ないと判断された。

また、定量用平板培地として「検査法」で使用されている M-19 培地の場合、阻止円の形状が若干不明瞭になるケースが見受けられた。そこで丹野ら³⁾ がマイクロバイオオートグラフィーで使用している Heart Infusion Agar との比較を行ったところ、非常に明確な阻止円が得られ、検出感度も同等であった。

Heart Infusion Agar は、菌に対する発育促進物質を豊富に含む¹⁰⁾ ため、菌の生育が良くなり阻止円の形状がクリアになったものと考ええる。

そこで、試験菌液の調製は迅速性を考慮し、6 時間の振とう培養を、定量用平板培地は Heart Infusion Agar を用いることとした。

2. 吸着カラムの検討

PCG の前処理法としては、イオン交換樹脂カラムによる前処理法³⁾ や、食塩水を利用した Terada らの C18 カートリッジによる前処理法⁴⁾ が報告されている。著者らは、分析の簡便性を考慮して、Terada らの方法⁴⁾ に準じて、標準溶液を用いて 3 種の C18 カートリッジと 1 種のスチレンジビニルベンゼン共重合体のカートリッジによる前処理法について検討した。

その結果を Table 2 に示した。溶出液として 60% ア

Table 4. Recoveries of PCG from Livestock Products

Sample	Spiked (ppb)	Recovery* (%)	RSD (%)
Cattle muscle	50	76.7	2.8
	5	82.1	10.4
Cattle liver	50	85.8	1.7
	5	82.0	2.8
Cattle kidney	50	84.1	2.9
	5	89.8	6.2
Swine muscle	25	80.0	2.2
Swine liver	25	80.0	0.0
Milk	25	74.0	1.4
	4	76.3	0.7
	1	74.7	5.2

* The average of 3 replication

セトニトリル又は 80% アセトニトリルを用いたいずれの場合においても、Sep-Pak Plus C18 を除く 3 種のカートリッジで、PCG 添加濃度 10 µg において 90% 以上の良好な結果が得られた。

そこで、Boison ら^{7), 8)} が使用した Bond Elut C18 を採用し、溶出液は濃縮操作を考慮して 80% アセトニトリルを使用することとした。

3. 抽出法の検討

3.1 牛腎臓による検討

畜産食品中からの PCG の抽出には、リン酸緩衝液²⁾、アセトン-水混液³⁾、タングステン酸による除タンパクを行う方法^{4), 7), 8)} の報告がある。著者らは、これらのいずれの抽出法が最も簡便かつ効果的であるかを試料として牛腎臓を用いて比較検討し、その結果を Table 3 に示した。

リン酸緩衝液やアセトン-水混液による抽出法では、良好な回収率が得られるものの、無添加区において試料成分由来の阻止円が認められ、更に精製が必要であった。一方、Terada ら⁴⁾ や Boison^{7), 8)} らが用いているタングステン酸による抽出法では、無添加区においても阻止円の形成が認められず、操作性も簡便であり、回収率も良好であったため、本抽出法を用いることとした。

3.2 牛乳による検討

タングステン酸の除タンパク効果は、硫酸酸性下において陽電荷を帯びたタンパク質が WO₄²⁻ と結合し沈殿することに起因する¹¹⁾。しかし、牛乳ではその主なタンパク質であるカゼインが陽電荷を帯びていないため、十分な効果が得られなかった。

そこで、タングステン酸の代わりにキレート作用のある EDTA を加えたところ、良好な除タンパク効果が得られ、70% 以上の回収率を得ることができた。

カゼインは Ca²⁺ と複合体を形成し、ミセルとして牛乳中に存在するが、EDTA を加えることにより、そのバランスが崩れたものと考えられる。

4. 添加回収試験

Table 4 に示すように、いずれの添加濃度においても 70% 以上の良好な結果が得られた。また、調製した試験

Fig. 2. Microbioautogram of PCs

a: benzylpenicillin (1 ng),

b: ampicillin (1 ng),

c: cloxacillin (5 ng),

d: dicloxacillin (5 ng),

e: nafcillin (5 ng)

Solvent system: 1-pentanol-acetone-D.W. (4:1:3, upper layer)

溶液は冷凍(-25℃)において3日間安定であった。

なお、本法による定量下限は、畜肉で5 ppb、牛乳で1 ppbであった。

5. マイクロバイオオートグラフィー

検出される抗菌性成分の確認のために Kline らの方法¹²⁾に準じてマイクロバイオオートグラフィーを実施した。

ペニシリン系抗生物質(PCs)のTLC条件は、シリカゲルプレートによる米田らの報告¹³⁾やセルロースプレートによる丹野らの報告³⁾がある。しかし、いずれの条件においても、PCGと他のPCsを十分に分離することは困難であった。

そこで、丹野らの条件を改良し、展開溶媒に1-ペンタノール-アセトン-水=4:1:3(上層)を用いてRf値の比較を行った。

その結果、Fig. 2に示したように標準溶液を用いた場合、PCG(Rf値0.79)は、アンピシリン(Rf値0.11)、クロキサシリン(Rf値0.86)、ジクロキサシリン(Rf値0.91)、ナフシリン(Rf値0.91)と分別することができた。

しかし、PCGとクロキサシリンのRf値がやや接近していることから、試料由来の夾雑物の影響により、Rf値が変動する場合が考えられる。そこで、ペニシリナーゼ(PCase)による失活試験¹⁾を実施したところ、PCGが失活し、クロキサシリンとの分別が可能であった。

なお、試験溶液についてマイクロバイオオートグラフィーを実施したところ、いずれの試料からも、試料成分由来の抗菌スポットは残留基準値レベルにおいて検出されなかった。

6. ペーパーディスク法の応用

微生物学的方法による抗生物質の定量法としては、円筒平板法や穿孔平板法が用いられている¹⁴⁾。しかし、カップドロッパーや穿孔装置を必要とする。そこで、定性法に使

Fig. 3. Correlation of calibration curve between paper-disc and cylinder method

用されている簡便なペーパーディスク法^{1), 2)}について、その定量性を検討した。Fig. 3に円筒平板法及びペーパーディスク法により作成した検量線を示したが、ペーパーディスク法の場合、円筒平板法よりも若干検出感度が劣るものの、十分な阻止円形成を得ることができ、簡便な方法として応用可能であった。

7. 市販食品の分析

本法により、市販品の牛・豚肉、肝臓及び牛乳の計30試料について分析を行ったが、いずれの試料からもPCGは検出されなかった。

結 論

PCGの迅速、簡便な残留分析法の確立を目的として検討し、以下の結論を得た。

1. 試験菌として *B. calidolactis* を用いた場合、菌液の調製は、6時間の振とう培養が、定量用平板培地は、Heart Infusion Agar が有効であった。
2. 抽出法として、畜肉では水で抽出後、タングステン酸による除タンパク操作を、牛乳ではEDTA溶液による抽出を用い、精製カラムとしてBond Elut C18を用いたところ、残留基準値レベルの添加回収試験の平均回収率は、80.7%であった。また、定量下限は畜肉で5 ppb、牛乳で1 ppbであった。
3. マイクロバイオオートグラフィーにより、PCGの分別が可能であったが、試料由来の夾雑物を考慮した場合、PCaseによる失活試験を実施することが更に有効であった。
4. 簡便法としてペーパーディスク法が応用可能であった。
5. 市販試料(牛・豚肉、肝臓及び牛乳)計30試料について分析を行ったが、いずれからPCGは検出されなかった。

なお、本研究は、平成9年度厚生科学研究費(食品衛生調査研究事業)補助金で行ったものである。

文 献

- 1) IDF standard 57: Detection of penicillin in milk by a disk assay technique (1970).
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課 “畜産食品中の残留物質検査法” (1990).
- 3) Tanno, K., Sekiguchi, M., Igarashi, T., Saito, B., Uchibe, H., Determination of penicillin residues in live-stock products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **23**, 149-153 (1982).
- 4) Terada, H., Asanoma, M., Sakabe, Y., Studies on residual antibacterials in foods III. High-performance liquid chromatographic determination of penicillin G in animal tissues using an on-line pre-column concentration and purification system. *J. Chromatogr.*, **318**, 299-306 (1985).
- 5) Terada, H., Sakabe, Y., Studies on residual antibacterials in foods IV. Simultaneous determination of penicillin G, penicillin V and ampicillin in milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **348**, 379-387 (1985).
- 6) Haginaka, J., Wakai, J., Liquid chromatographic determination of penicillins by postcolumn alkaline degradation using a hollow-fiber membrane reactor. *Analytical Biochemistry*, **168**, 132-140 (1988).
- 7) Boison, J. O., Salisbury, C. D. C., Chan, W., MacNeil, J. D., Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 497-501 (1991).
- 8) Boison, J. O., Korsrud, G. O., MacNeil, J. D., Keng, L., Determination of penicillin G in bovine plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, **576**, 315-320 (1992).
- 9) Codex Alimentarius Volume 3 (1994).
- 10) Sakazaki, T. “Shin Saikinbaichigakukoza Jo”, Tokyo, Kindai Shuppan, 1978, p. 150-151.
- 11) 日本分析化学会編 “分析化学実験ハンドブック” 東京, 丸善, 1987, p. 298-300.
- 12) Kline, R. M., Golab, T., A simple technique in developing thin-layer bioautographs. *J. Chromatogr.*, **18**, 409-411 (1965).
- 13) Yoneda, Y., Ozaki, H., Kominato, A., Iyama, I., Chemical classification of antibiotics in meat by the disc method and by TLC-bioautography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **22**, 299-306 (1981).
- 14) “Nihon-Kouseibussitu-Iyakuhinkijun (The minimum requirements for antibiotic products of Japan)”, Yakuji-jihosha, 1998. (ISBN4-8407-2280-3)