

牛乳中合成抗菌剤の同時分析法の開発と妥当性評価

内田耕太郎* 柿本健作* 山口貴弘* 永吉晴奈* 起橋雅浩* 小西良昌* 梶村計志*

牛乳中の合成抗菌剤 37 種類の同時分析法を開発し妥当性評価を行った。アセトニトリルで抽出し、ヘキサノン分配、遠心式フィルターろ過で精製を行い、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で測定する簡便な分析法を構築した。この分析法の選択性、真度、精度、定量限界について評価したところ、国の示すガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られた。

キーワード: 合成抗菌剤、牛乳、遠心式フィルター、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計、妥当性評価
Key words: Antibiotics, Milk, Centrifugal filter, LC-MS/MS, Validation

家畜に投与された動物用医薬品が代謝、排泄されずに食品に残留すると、人の健康を害する恐れがある。そのため、薬事法で使用基準や休薬期間、食品衛生法で食品中の残留基準が定められている。全国の検疫所や地方衛生研究所では、食品中の動物用医薬品の検査を行っており、当所でも抗菌剤、駆虫剤、ホルモン剤など多系統の動物用医薬品を検査している¹⁾。

同一の系統に属する動物用医薬品は、化学的性質が似ているため、同時に分析されることが多い。当所でもこれまで、サルファ剤²⁾、テトラサイクリン系抗生物質³⁾、駆虫剤⁴⁾、ホルモン剤⁵⁾など系統ごとに分析法を開発し検査を行ってきた。

一方、近年、高性能の測定機器を利用し、簡単な抽出、精製操作で多系統の医薬品を同時に分析する方法が多数報告されている^{6) 7) 8)}。このような分析法を活用することで、より多くの医薬品の検査が可能となり、分析にかかる費用や時間も削減できる。

そこで、今回新たに牛乳中のサルファ剤、キノロン剤、代謝拮抗剤の同時分析法を開発し、ガイドライン⁹⁾に基づく妥当性評価を行ったので報告する。

方法

1. 試料

大阪府内で販売されていた牛乳を用いた。

2. 試薬、器具

2-1. 標準品: キノロン剤 13 種類、サルファ剤 20 種類、代謝拮抗剤 4 種類を対象とした (表 1)。市販の標準品および混合標準溶液を使用した。標準品は林純薬工業 (株)、関東化学 (株)、和光純薬工業 (株)、Dr Ehrenstorfer 社、Sigma-Aldrich 社、U.S. Pharmacopeial Convention 製の残留動物薬分析用またはその同等品を用いた。混合標準液は林純薬工業 (株) 製 PL 動物薬 LC/MS Mix1 (27 種類混合) および PL 動物薬 LC/MS Mix2 (14 種類混合) を用いた。

2-2. 標準溶液: 標準品をアセトニトリル、メタノール、アセトニトリル/メタノール (1:1) またはメタノール/ジメチルスルホキシド (1:1) に溶解し、標準溶液 (100 ~1000 µg/mL) を調製した。MS/MS 測定条件の検討にはこの標準溶液を用いた。添加回収試験は市販の混合標準溶液で行った。PL 動物薬 LC/MS Mix1 と Mix2 を混合希釈し、添加用混合溶液 (0.2、2 µg/mL、アセトニトリル溶液)、検量線用混合溶液 (5、10、20、50、100、200 µg/L、10%メタノール溶液) を調製した。混合溶液に含まれる 41 化合物のうち、37 化合物を対象とした。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Validation of Multi-residue Method for the Determination of Antibiotics in Milk by LC-MS/MS
by Kotaro UCHIDA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Haruna NAGAYOSHI, Masahiro OKIHASHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

2-3. その他の試薬、器具：アセトニトリル、メタノール、ヘキサンは和光純薬工業（株）製の残留農薬 PCB 試験用を用いた。ギ酸は、抽出には和光純薬工業（株）製の試薬特級を、移動相には和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。ジメチルスルホキシドは和光純薬工業（株）製ダイオキシン類分析用を使用した。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q 純水製造装置（Elix Advantage、MilliQ Advantage A10）で精製した水（比抵抗値 18.2 MΩ・cm）を用いた。遠心式フィルターは Millipore 社製 AMICON ULTRA Centrifuge Filter Unit 0.5 mL 3K を用いた。ポリプロピ

レン（PP）製 50 mL 遠沈管は AGC テクノグラス（株）製を用いた。PP 製 1.5 mL 遠沈管は Eppendorf AG 社製を用いた。

3. 装置

遠心機：日立工業（株）製 Centrifuge CF7D2 または、久保田商事（株）製ユニバーサル冷却遠心機 5922 型、振盪機：東京理科機械（株）製 EYELA CUTE MIXER CM-1000、遠心エバポレーター：東京理化学器械（株）製 CYE-3100 型、LC：Waters 社製 ACQUITY UPLC I-Class System、MS/MS：Waters 社製 Xevo TQ-S Mass

表 1. MS/MS 測定条件

Compound	Transition	Cone (V)	Collision (eV)	Compound	Transition	Cone (V)	Collision (eV)
<i>Quinolones</i>				Sulfadimidine	279 → 186	44	16
Ciprofloxacin	332 → 231	6	20	Sulfadoxine	279 → 92	44	28
	332 → 288	6	16		311 → 156	40	16
Danofloxacin	358 → 82	6	40	Sulfaethoxypyridazine	311 → 92	40	28
	358 → 340	6	20		295 → 156	29	16
Difloxacin	400 → 356	6	18	Sulfaguanidine	295 → 92	30	35
	400 → 299	6	26		215 → 156	14	12
Enrofloxacin	360 → 316	4	18	Sulfamerazine	215 → 92	14	22
	360 → 245	4	24		265 → 108	4	16
Flumequine	262 → 244	34	16	Sulfamethoxazole	265 → 92	4	26
	262 → 202	34	30		254 → 156	24	14
Marbofloxacin	363 → 72	14	16	Sulfamethoxypyridazine	254 → 92	24	26
	363 → 320	14	14		281 → 92	4	26
Miloxacin	264 → 215	24	24	Sulfamonomethoxine	281 → 126	4	14
	264 → 246	24	12		281 → 92	4	28
Nalidixic acid	233 → 187	22	24	Sulfapyridine	281 → 126	4	16
	233 → 215	22	12		250 → 156	40	14
Norfloxacin	320 → 276	4	14	Sulfaquinoxaline	250 → 92	40	24
	320 → 233	4	18		301 → 156	6	14
Ofloxacin	362 → 318	4	16	Sulfathiazole	301 → 92	6	28
	362 → 261	4	24		256 → 156	32	14
Orbifloxacin	396 → 295	2	22	Sulfatroxazole	256 → 92	32	24
	396 → 352	2	16		268 → 92	12	24
Oxolinic acid	262 → 244	36	16	Sulfisomidine	268 → 113	20	15
	262 → 216	36	26		279 → 124	4	30
Sarafloxacin	386 → 342	6	16	Sulfisoxazole	279 → 186	4	14
	386 → 299	6	26		268 → 113	18	14
<i>Sulfonamides</i>				Sulfisozole	268 → 156	18	12
Sulfabenzamide	277 → 92	10	24		240 → 156	16	12
	277 → 156	10	10	240 → 92	16	22	
Sulfabromomethazine	357 → 92	4	30	<i>Antimetabolites</i>			
	357 → 108	4	18	Diaveridine	261 → 245	26	26
Sulfachlorpyridazine	285 → 156	6	12	Ormetoprim	261 → 123	26	20
	285 → 92	6	26		275 → 259	26	26
Sulfadiazine	251 → 92	28	24	Pyrimethamine	275 → 123	26	22
	251 → 156	28	12		249 → 177	62	26
Sulfadimethoxine	311 → 156	38	18	Trimethoprim	249 → 233	62	26
	311 → 92	38	28		291 → 123	42	22
					291 → 261	42	22

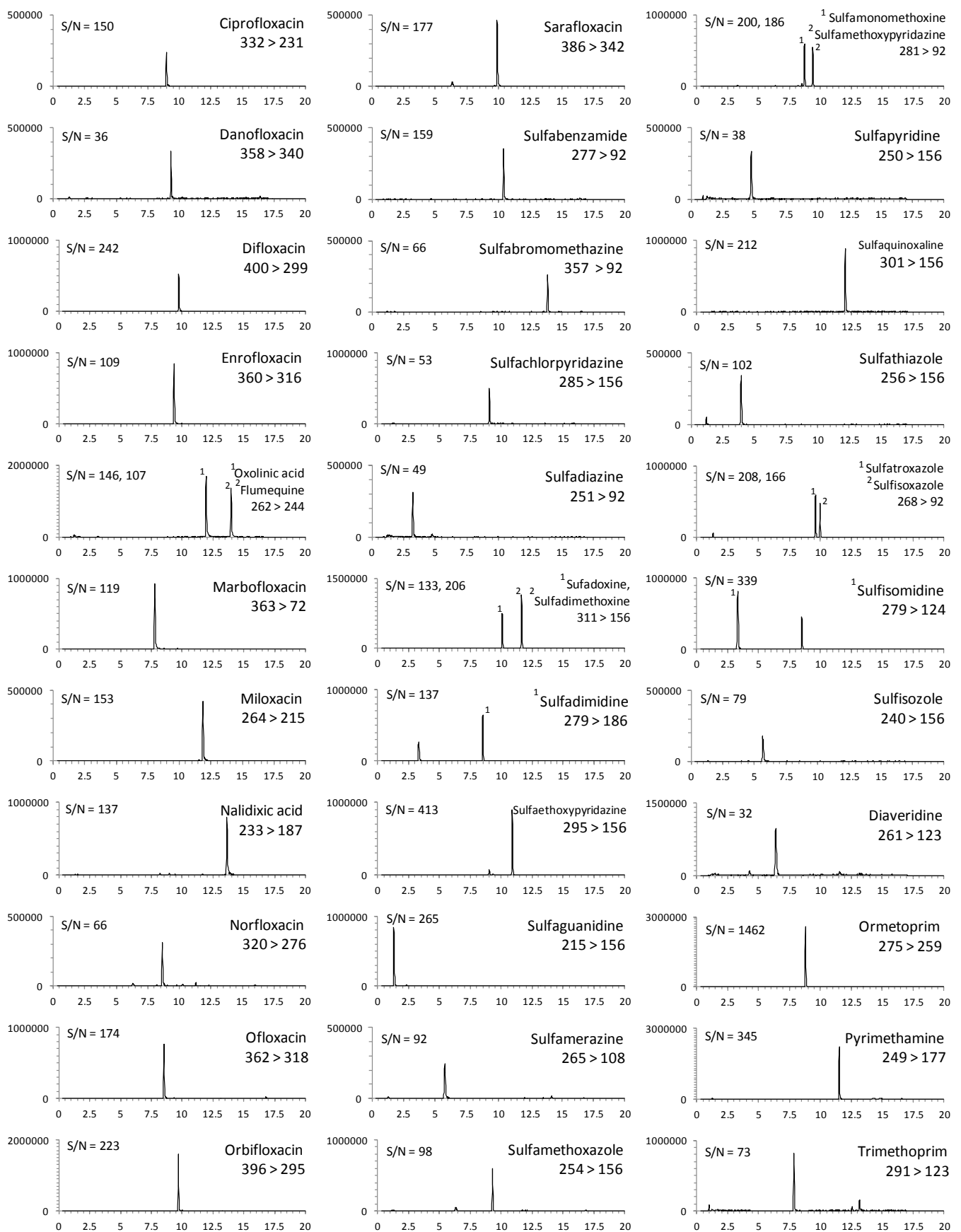


図 1. クロマトグラム (10 µg/kg 添加回収試験)

Spectrometer、分析カラム : Waters 社製 CORTECS UPLC
C18 (1.6 μ m、 2.1 \times 100 mm)

4. 測定条件

4-1. 移動相 : A 液 : 0.1%ギ酸水溶液、 B 液 : 0.1%
ギ酸メタノール、グラジエント条件 : (%B) Initial (10)
→ 5 min (10) → 20 min (90)、流速 : 0.2 mL/min、

表 2. 妥当性評価結果 (真度、精度)

Compound	Spiked level: 10 μ g/kg			Spiked level: 100 μ g/kg		
	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)		Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	
		Intra day	Inter day		Intra day	Inter day
<i>Quinolones</i>						
Ciprofloxacin	86.8	4.2	6.0	84.6	3.7	4.4
Danofloxacin	88.9	5.5	6.0	89.5	2.6	3.8
Difloxacin	97.7	3.3	4.8	98.2	4.1	4.2
Enrofloxacin	94.3	1.6	4.4	97.4	3.7	3.6
Flumequine	101.6	6.0	8.2	99.8	5.0	5.1
Marbofloxacin	87.7	1.7	4.0	87.9	2.6	3.2
Miloxacin	99.9	6.1	7.0	95.4	4.6	5.8
Nalidixic acid	99.3	4.9	6.5	96.8	4.6	4.5
Norfloxacin	83.7	3.1	6.6	82.7	2.6	3.9
Ofloxacin	93.4	2.7	4.0	92.4	2.8	3.2
Orbifloxacin	95.9	2.5	6.2	94.2	2.0	2.9
Oxolinic acid	103.2	7.2	7.5	100.3	5.5	4.9
Sarafloxacin	90.3	4.0	6.1	90.4	3.1	3.4
<i>Sulfonamides</i>						
Sulfabenzamide	90.7	3.7	8.1	93.7	4.5	4.6
Sulfabromomethazine	93.2	5.8	9.2	96.0	5.2	5.6
Sulfachlorpyridazine	89.9	3.9	8.0	92.7	5.5	4.9
Sulfadiazine	92.5	2.8	7.6	92.8	5.6	5.4
Sulfadimethoxine	92.3	3.9	9.1	94.3	3.9	5.2
Sulfadimidine	90.3	2.3	8.0	90.8	4.9	6.8
Sulfadoxine	91.8	4.4	8.1	93.8	4.7	4.6
Sulfaethoxyypyridazine	90.4	3.0	9.1	91.6	5.4	6.0
Sulfaguandine	83.4	4.1	8.3	89.2	4.6	10.0
Sulfamerazine	91.4	4.0	8.4	92.4	5.2	5.5
Sulfamethoxazole	91.6	2.8	7.8	95.3	4.9	5.4
Sulfamethoxyypyridazine	89.5	3.2	9.2	93.9	5.3	5.8
Sulfamonomethoxine	89.1	2.3	11.1	91.6	5.0	7.0
Sulfapyridine	88.3	4.5	8.6	92.9	5.0	5.6
Sulfaquinoxaline	92.3	3.8	7.8	94.3	4.7	5.3
Sulfathiazole	86.0	3.8	9.5	91.6	5.4	5.9
Sulfatroxazole	91.1	3.7	8.4	93.8	4.6	4.2
Sulfisomidine	90.3	2.2	10.5	92.2	4.9	6.8
Sulfisoxazole	91.8	4.1	10.0	93.7	4.4	5.1
Sulfisozole	87.3	3.7	10.1	93.5	5.1	6.3
<i>Antimetabolites</i>						
Diaveridine	87.3	3.7	10.1	93.5	5.1	6.3
Ormetoprim	100.0	1.9	5.2	98.3	2.7	3.3
Pyrimethamine	101.1	3.3	5.3	100.5	1.7	4.8
Trimethoprim	102.1	3.5	5.5	97.8	2.0	3.9

表 3. 真度および精度の目標値

結果および考察

Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	
		Intra day	Inter day
≤ 1	70 ~ 120	30 >	35 >
$1 < \sim \leq 10$	70 ~ 120	25 >	30 >
$10 < \sim \leq 100$	70 ~ 120	15 >	20 >
$100 <$	70 ~ 120	10 >	15 >

カラム温度：50°C、注入量：5 μL

4-2. MS/MS 測定条件：対象とした 37 化合物の定量用および確認用 MRM を同時に測定するメソッドを作成した。化合物ごとのパラメーターを表 1 に示した。

Ion mode：positive、Capillary：3.00 kV、Source temperature：150°C、Desolvation temperature：400°C、Cone gas flow：150 L/h、Desolvation gas flow：1000 L/h、Collision gas flow：1.15 mL/min

5. 抽出、精製

試料 2 g を PP 製 50 mL 遠沈管に採取した。これにヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL を加え、激しく振り混ぜた。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を別の 50 mL 遠沈管に分取した。残渣に 2% ギ酸ヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL を加え、激しく振り混ぜた。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を先程の 50 mL 遠沈管に合わせた。その後、ヘキサン飽和アセトニトリルを加え、正確に 20 mL とした。これにアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加え 10 分間振盪機で攪拌した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層 0.5 mL を 1.5 mL 遠沈管に分取した。これにジメチルスルホキシド 25 μL を加え、遠心エバポレーターで 1 時間濃縮した。残渣に 10% アセトニトリルを加え、0.5 mL とした。12000 rpm で 10 分間遠心し、遠心式フィルターを通過した溶液を試験液とした。

6. マトリックス標準溶液

試料 2 g を 50 mL 遠沈管に採取し、添加試料と同様の抽出、精製操作を行った。遠心エバポレーターで濃縮後、残渣に検量線用混合溶液 (5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{L}$) 50 μL と 10% メタノールを加え、0.5 mL とした。遠心式フィルターを通過させたものをマトリックス標準溶液とした。

1. 選択性

医薬品の残留が認められない牛乳から調製したブランク試料と、標準溶液を添加した同牛乳から調製した添加試料のクロマトグラフを比較したところ、定量を妨害する夾雑ピークは無かった。図 1 に 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加試料のクロマトグラムを示した。

2. 真度、精度

試料中濃度が 10 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるように標準溶液を添加し、30 分程度放置後、抽出、精製を行い濃度を測定した。それぞれ 2 併行の添加回収試験を 5 日間行い、真度、併行精度、室内精度を求めた。表 2 に示すように真度は 82.7~103.2% であった。試料中濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の場合、併行精度は 1.6~7.2%、室内精度は 4.0~11.1% であった。一方、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の場合、併行精度は 1.7~5.6%、室内精度は 2.9~10.0% であった。残留検査に用いる試験法の性能は告示¹⁰および通知¹¹で規定されており、その妥当性を評価するためのガイドラインが策定されている。真度、精度ともに全ての化合物でこのガイドラインの目標値 (表 3) を満たす結果が得られた。

3. 定量限界

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加試料の S/N 比を計算した。Waters 社の MS 用定量解析ソフトウェア MassLynx を用い、ピークの前または後、約 2 分間をノイズ範囲とし、ピークおよびノイズの振れ幅の最大値の比を算出した。図 1 のクロマトグラム中に S/N 比を示した。10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加試料においてはいずれの化合物も S/N 比は 10 以上であり、この濃度での定量性が確認できた。

結論

牛乳中の合成抗菌剤の分析法を新たに開発し妥当性評価を行った。試料中濃度が 10 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるよう標準溶液を添加し、選択性、真度、精度、定量限界を評価した。いずれもガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

文献

- 1) 大阪府立公衆衛生研究所年報-平成 24 年度版, 50-57 (2013)
- 2) 藤田瑞香, 柿本健作, 山口貴弘, 尾花裕孝 : LC/MS/MS による畜水産物中のサルファ剤一斉分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **47**, 13-15 (2009)
- 3) 藤田瑞香, 柿本健作, 田口修三, 田中之雄 : LC-MS/MS による食品中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **45**, 77-81 (2007)
- 4) 柿本健作, 山口貴弘, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝 : LC-MS/MS を用いた畜水産物中駆虫剤の分析, 大阪府立公衆衛生研究所報, **49**, 15-19 (2011)
- 5) 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝 : LC/MS/MS による畜産食品中のホルモン剤一斉分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **49**, 20-23 (2011)
- 6) Sara Bogialli : Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**, 947-966 (2009)
- 7) Xi Xia, Yuanyuan Wang, Xia Wang, Yun Li, Feng Zhong, Xiaowei Li, Yaoling Huang, Shuangyang Ding, Jianzhong Shen : Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Jornal of Chromatography A*, **1292**, 96-103 (2013)
- 8) M. Gbylik, A. Posymiak, K. Mitrowska, T. Bladek and J. Zmudzki : Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **30**, 940-948 (2013)
- 9) 「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について」平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号 (2007)
- 10) 「食品、添加物等の規格基準」昭和 34 年 12 月 28 日 厚生省告示第 370 号 (1962)
- 11) 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号 (2005)