

【調査研究】

# LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中のキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質に関する一斉分析法の検討

Study on a Method for Simultaneous Determination of Quinolone and New Quinolone Antibacterial Substances in Cow Muscle by LC-MS/MS

難波順子, 浦山豊弘, 金子英史, 佐藤 淳, 繁田典子

NAMBA Junko, URAYAMA Toyohiro, KANEKO Hidefumi, SATO Atsushi, SHIGETA Noriko

## 要 旨

キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の迅速かつ高感度な分析方法の確立を目指し、牛の筋肉において既報の分析法で困難であった5物質を追加対象として検討した。既報の分析法からアセトニトリル/ヘキサン分配の回数及びLC-MS/MS測定用試験溶液の組成を変更した方法で妥当性評価を行ったところ、新たに2物質が目標値を満たした。

[キーワード：キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質，牛の筋肉，一斉分析法，  
液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words：Quinolone and new quinolone antibacterial substances, Cow muscle,  
Simultaneous determination, LC-MS/MS]

## 1 はじめに

動物用医薬品は、安定した高い生産性を得るために畜水産物に用いられる医薬品であるが、その畜水産物への移行・残留が懸念されている<sup>1)</sup>。このため、動物用医薬品が畜水産物に残留し人の健康を損なうことのないよう、農薬や飼料添加物と共に動物用医薬品が一定の量を超過して残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度により、安全性の確保が図られている。これに伴い、規制の対象となる農薬、飼料添加物及び動物用医薬品が多種類にわたることとなったため、高感度かつ迅速に分析できる一斉分析法の開発が求められている。ただし、厚生労働省が定めた「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」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号)については、検体中に夾雑物が多く、その影響を排除するなどの作業が繁雑であることが報告されているため、各地方衛生研究所等において独自にLC-MS/MSを用いた一斉試験法の開発が行われている<sup>2)~5)</sup>。なお、厚生労働省が定めた「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。以下「ガイドライン」という。)により、食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品の分析を実施する場合において、分析機関ごとの妥当性評価が必要とされている。

本県では、畜水産物中のサルファ剤等合成抗菌剤を主とする抗菌性物質についてはLC-MS/MSを用いた一斉分析法<sup>6)</sup>により実施しているが、その他の抗菌性物質については理化学的分析法が確立されておらず、微生物学的分析法で行っている状況であった。このため、マクロライド系等の複数の系統の抗生物質の分析法を、合成抗菌剤との同時分析も含めて検討し、これまでにはちみつ及び牛の筋肉を用いて妥当性評価を行った結果を報告した<sup>7), 8)</sup>。今回、既報<sup>8)</sup>の一斉分析法では妥当性評価の目標値を満たさなかった抗菌性物質のうち、キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の分析法について再検討を行うこととした。キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマなどに対して有効で抗菌力も優れているため動物用医薬品として汎用されている。また、人の医療上も重要な薬剤であることから、薬剤耐性菌出現を抑制するため、他の抗菌性物質が無効の場合のみ使用することなどのリスク管理処置が取られており<sup>9), 10)</sup>、検査の必要性が高い物質である。このことから、この度牛の筋肉を用いた分析法の更なる検討及び妥当性評価を行った。

## 2 方法

### 2.1 試料

厚生労働省から代表的な畜水産物であると示されてい

る牛の筋肉（横隔膜等）を使用した。なお、当該試料は、分析対象とする抗菌性物質が検出されないことを微生物学的分析法で確認後使用した。

## 2.2 標準品、固相カラム及び試薬

分析対象とする抗菌性物質

：既報<sup>8)</sup>のうち、キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質。

混合標準溶液

：林純薬工業株式会社製 PL動物薬 LC/MS Mix 2を用い、アセトニトリル：水（1:1）溶液で希釈した。（0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mL）

マトリックス添加混合標準溶液

：牛の筋肉を用いて作成したブランク試験溶液に混合標準溶液を段階的に添加し、調製した。（0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mL）

その他の試薬等：既報<sup>7)</sup>のとおり。

## 2.3 LC-MS/MS装置及び測定条件

MRM測定イオン：表1のとおり。

その他の条件等：既報<sup>7)</sup>のとおり。

表1 MRM測定イオン

抗生物質名	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
Enrofloxacin	360.389	316.3
		245.0
Ciprofloxacin	332.273	231.2
		314.3
Oxolinic Acid	262.114	244.2
		216.1
Ofloxacin	362.349	318.1
		261.2
Orbifloxacin	396.286	352.3
		295.4
Sarafloxacin	386.273	368.2
		299.3
Difloxacin	400.256	356.2
		382.1
Danofloxacin	358.343	340.3
		255.0
Nalidixic Acid	233.173	215.3
		187.1
Norfloxacin	320.251	302.4
		276.2
Flumequine	262.160	244.2
		202.1
Piromidic Acid	289.165	271.2
		243.2
Marbofloxacin	363.148	72.0*
		345.1*
Miloxacin	264.126	246.2*
		215.1*

：分析法1で目標値を満たさず

## 2.4 試験溶液調製方法

既報<sup>8)</sup>の分析法（以下「分析法1」という。）にアセトニトリル／ヘキサン分配の回数追加及びLC-MS/MS測定用試験溶液の組成変更を行った分析法（以下「分析法2」という。）で調製を行った。牛の筋肉試料2 gを50 mLポリプロピレン製遠心管に量り取り、10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（以下「Na<sub>2</sub>EDTA」という。）含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）（以下「抽出液」という。）15 mLを加えてホモジナイズした後、10分間振とうし、6900 × gで20分間、室温で遠心分離した。上層を分取し、沈殿を抽出液 5 mLで再抽出し、遠心分離後、上層を合わせ桐山ルートで吸引ろ過した。

HLB 1 gカラムをメタノール 10 mL、精製水 10 mL、抽出液 10 mLで順番にコンディショニングした。得られた上層全量をHLB 1 gカラムに負荷し、精製水 10 mLで洗浄し、遠心脱水後、アセトニトリル 20 mLで溶出させた。溶出液を分液ルートに移し、アセトニトリル飽和ヘキサン20 mLを加えて振とうし、アセトニトリル層を分取した後、再度アセトニトリル飽和ヘキサン20 mLを加えて振とうし、アセトニトリル層を分取した。アセトニトリルを0.5 mL以下になるまで減圧濃縮し、濃縮液をアセトニトリル：水（1:1）溶液で10 mLに定容後、0.45 µmメンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

## 2.5 妥当性評価の方法

ガイドラインに示された、分析者1名が2併行5日間実施する枝分かれ実験計画に基づき、添加濃度0.1 µg/g及び0.01 µg/gの2濃度で試料に対する添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。

## 2.6 微生物学的検査法で陽性であった検体の分析

微生物学的検査法の簡易検査法で陽性となり、分別推定法でキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の残留が疑われる牛の筋肉検体を検討した分析法に従って5併行で前処理を行い、定量を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 LC-MS/MS測定条件

MS条件は、マルボフロキサシンとミロキサシンの定量イオン（上段）と定性イオン（下段）を既報の条件より変更し、定量性及び感度良く測定できる条件とした。既報から変更した条件を表1に\*印で示す。

### 3.2 分析溶液中の含水率の検討

一部の標準品において、測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化

が見られたため、分析法1では、濃縮後の液量を一定にした後アセトニトリルで定容し、同様に操作したブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量した。分析法1で妥当性評価の目標値を満たさなかった5物質（シプロフロキサシン、サラフロキサシン、ノルフロキサシン、マルボフロキサシン及びミロキサシン）のうち、ミロキサシンは測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によるピーク形状の変化はなかった。

ミロキサシン以外の4物質は、測定溶媒のアセトニトリルの割合が高い場合はピーク形状が悪いが、水の割合をアセトニトリルと同量以上にするとピーク形状は良好であった。測定溶媒のアセトニトリルと水の割合の変化によるマルボフロキサシン標準品のピーク形状の比較を図1に示す。また、測定溶媒がアセトニトリルの場合の面積を100%として、アセトニトリルと水の割合の変化による5物質のピーク面積の比較を図2に示す。面積はマ

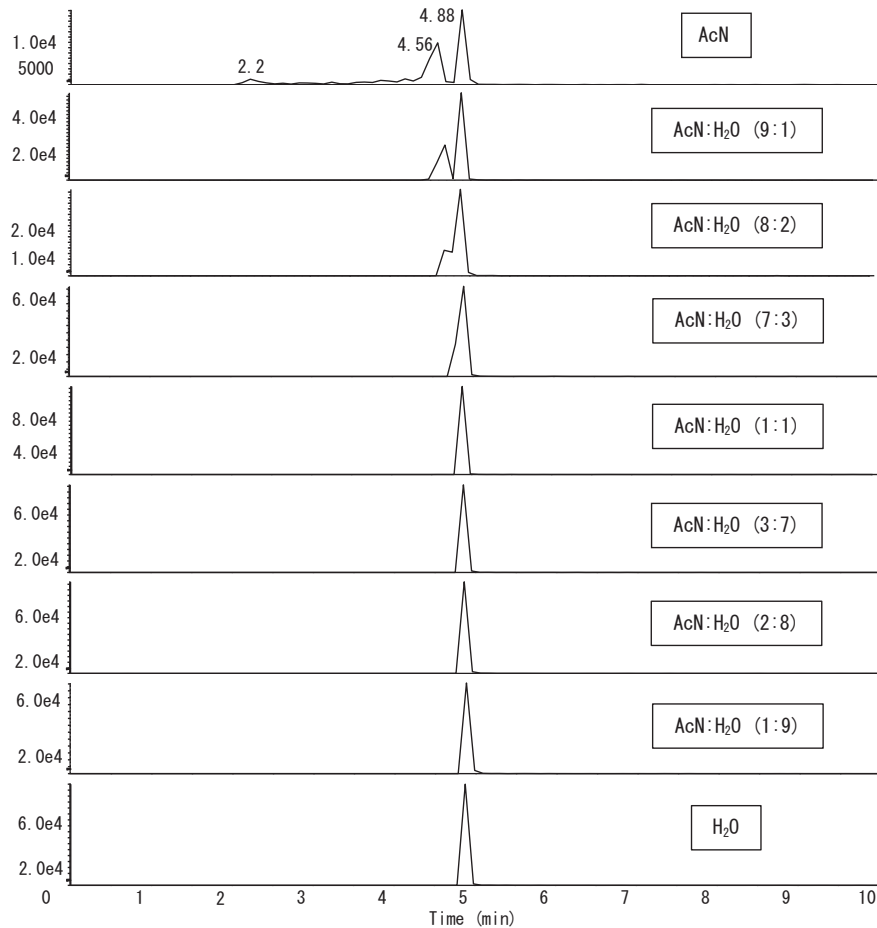


図1 測定溶媒の組成によるマルボフロキサシンのピーク形状の変化 (MRMクロマトグラム)

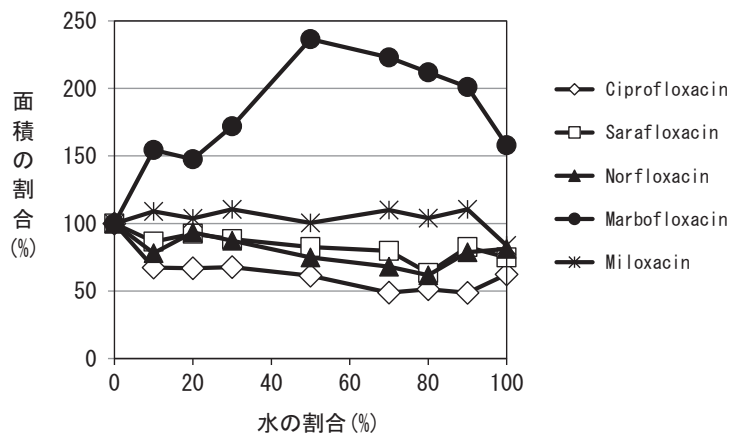


図2 測定溶媒のアセトニトリルと水の割合を検討

ルボフロキサシンではアセトニトリル：水（1:1）溶液に溶解した場合が最大となり、アセトニトリルに溶解した場合の2倍以上大きくなった。一方で、ミロキサシンはほぼ変化が無く、他の3物質は50～70%程度であった。ピーク形状等を考慮して、測定溶媒をアセトニトリルからアセトニトリル：水（1:1）溶液に変更した。

### 3.3 定量限界及び検量線

LC-MS/MSを用いた分析の問題点として、試料中のマトリックスによる目的成分のイオン化への影響がある。そのため、既報<sup>8)</sup>では実試料におけるこの影響を補正するためにマトリックス添加混合標準液を用いて定量している。牛の筋肉試料2gを前処理し10mLのLC-MS/MS測定溶液とするため、添加濃度0.01 µg/g及び0.1 µg/gはLC-MS/MS測定溶液濃度では0.002 µg/mL及び0.02 µg/mLに相当することから、検量線は0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mLの6点調製し、各濃度でS/N比を求めた。全ての物質が0.001 µg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていた。

また、検量線は相関係数を考慮して、添加濃度0.01 µg/gの場合は0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 µg/mLの6点、添加濃度0.1 µg/gの場合は0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mLの6点とした。全ての標準品で良好な直線性 ( $r^2 \geq 0.99$ ) が得られた。

### 3.4 精製法の検討

牛の筋肉は、タンパク質や脂質などの夾雑物を多く含むため、固相ミニカラム及びアセトニトリル／ヘキサン分配で精製している<sup>8)</sup>。アセトニトリル／ヘキサン分配時のヘキサン層に不溶性白濁物質が多く見られるため、アセトニトリル／ヘキサン分配を追加して合計2回行うことで、マトリックス効果の低減による真度の改善が得られた。

### 3.5 妥当性評価結果

#### 3.5.1 選択性

ブランク試料として使用する牛の筋肉を2.4に従って前処理した後、LC-MS/MSで分析し、定量を妨害するピークの有無を確認したが、ガイドラインに示された選択性の目標値（ピークの面積が基準値のピーク面積の1/10未満）を超えるような妨害成分は認められなかった。

#### 3.5.2 真度及び精度

牛の筋肉2gに各標準品を0.2 µg（添加濃度0.1 µg/g）又は0.02 µg（添加濃度0.01 µg/g）添加し、試験溶液調製方法に従って前処理した後にLC-MS/MSで分析した時の真度及び精度の結果を、表2に示す。

分析法1で妥当性評価の目標値を満たさなかった5物質（シプロフロキサシン、サラフロキサシン、ノルフロキサシン、マルボフロキサシン及びミロキサシン）のう

表2 添加回収試験結果

抗生物質名	分析法1		分析法2						
	結果 まとめ	結果 まとめ	検量線 ( $>0.99$ )	添加濃度 0.1 µg/g			添加濃度 0.01 µg/g		
				真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Enrofloxacin	○	×	○	85	5.7	25	-	-	-
Ciprofloxacin	×	×	○	70	7.7	20	-	-	-
Oxolinic Acid	○	○	○	101	6.9	6.9	90	16	21
Ofloxacin	○	×	○	78	11	16	-	-	-
Orbifloxacin	○	×	○	105	9.4	22	84	16	33
Sarafloxacin	×	×	○	70	7.4	31	-	-	-
Difloxacin	○	○	○	107	4.8	19	78	14	28
Danofloxacin	○	○	○	102	9.2	9.2	95	15	26
Nalidixic Acid	○	○	○	94	4.9	13	96	8.0	8.0
Norfloxacin	×	×	○	66	7.2	21	-	-	-
Flumequine	○	○	○	108	5.8	13	99	11	11
Piromidic Acid	○	○	○	102	2.8	5.9	92	13	13
Marbofloxacin	×	○	○	72	6.3	15	77	25	28
Miloxacin	×	○	○	84	8.9	16	98	13	13

○ : 目標値を満たさず

ち、真度の目標値を両添加濃度で満たす物質はマルボフロキサシンとミロキサシンの2物質であった。真度の目標値を満たしたこれら2物質は精度の目標値も満たしていた。目標値を満たさない3物質は、真度が添加濃度0.1 µg/gでは70%又はそれに近い値であり、添加濃度0.01 µg/gではピークを確認できたものの、定量値は定量限界以下であった。

分析法1で牛の筋肉で妥当性評価の目標値を全て満たしていた9物質のうち、分析法2で真度及び精度の目標値を両添加濃度で満たす物質はオキシリン酸、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、フルメキン及びピロミド酸の6物質であった。分析法2で目標値を満たさない3物質（エンロフロキサシン、オフロキサシン及びオルビフロキサシン）のうち、エンロフロキサシン及びオフロキサシンは添加濃度0.01 µg/gではピークを確認することはできたが、定量値は定量限界以下であった。これは分析法1ではLC-MS/MS測定用試験溶液を4 mLに定容したのに対して、分析法2では10 mLに定容したためと推測される。

分析法2の添加濃度0.1 µg/gでエンロフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン及びノルフロキサシンの4物質で室内精度がばらついた。また、これら4物質のうち、オルビフロキサシン以外の3物質は添加濃度0.01 µg/gでは感度が不足している物質であった。このため、添加濃度0.1 µg/gでの室内精度のばらつきが認められたことも分析法における感度の不足が原因と考えられた。

以上の結果より、分析法2では検討した14物質のうち、8物質が真度及び精度の目標値を満たしていたので、分析法1で妥当性評価の目標値を全て満たしていた9物質に分析法2で新たに目標値を満たした2物質を追加することにより、キノロン及びニューキノロン系抗菌性物質は11物質の分析が可能となった。両分析法を用いても目標値を満たさない3物質（シプロフロキサシン、サラフロキサシン及びノルフロキサシン）は添加濃度0.1 µg/gでは真度が70%又はそれに近い値であり、検討した分析法が0.1 µg/g程度含有する検体での確認検査としては有用であることが示された。

### 3.6 微生物学的検査法で陽性であった検体の分析結果

令和2年度は微生物学的検査法により牛の筋肉にキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の残留が疑われる事例が1件あったことから、分析法2により分析した。結果を表3に示す。マルボフロキサシンが平均0.43 ppmと基準値(0.1 ppm)を超えて検出された。また、相対

標準偏差も5%程度と良好な結果であり、検討した分析法が実試料にも十分に対応できることが示された。

表3 微生物学的検査で陽性となった筋肉検体からのマルボフロキサシン検出値

検体番号	検出値 (ppm)	平均値 (ppm)	相対標準偏差 (%)
1	0.39	0.43	5.3
2	0.44		
3	0.45		
4	0.44		
5	0.44		

## 4 まとめ

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中のキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の一斉分析法(分析法1)の改良を検討した。牛の筋肉2gを10 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA含有0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でホモジナイズした後振とう抽出し、室温で遠心分離し上層を分取した。HLB 1gによる固相抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を2回行った。アセトニトリル層を減圧濃縮し、アセトニトリル:水(1:1)溶液で10 mLに定容後、LC-MS/MSで測定を行う分析法2を構築した。妥当性評価を行ったところ、以下の結果を得た。

- (1) LC-MS/MS測定で14種類のキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質のMRMモードによる測定を行った結果、0.001 µg/mLで十分な定量感度(S/N比 ≥ 10)が得られた。また、全ての標準品で0.001~0.05 µg/mL又は0.002~0.1 µg/mLの範囲のマトリックス添加検量線で良好な直線性( $r^2 \geq 0.99$ )が得られた。
- (2) マトリックス効果の低減を目指して、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作の回数を2回に増やし、LC-MS/MS測定用試験溶液をアセトニトリル:水(1:1)溶液10 mLに変更することで良好な結果が得られた。
- (3) 検討した全てのキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質で、選択性は目標値を満たしていた。
- (4) 検討した14物質のうち、8物質が真度及び精度の目標値を満たしていた。分析法1で妥当性評価の目標値を満たさなかった5物質のうち、分析法2で真度及び精度の目標値を満たす物質は、マルボフロキサシンとミロキサシンの2物質であった。目標値を満たさなかった3物質も、添加濃度0.1 µg/gでは真度

が65%程度であり、確認検査としての有用性が示された。

- (5) 微生物学的検査法でキノロン及びニューキノロン系抗菌性物質の残留が疑われる牛の筋肉検体について、検討した分析法2に従って5併行で分析したところ、マルボフロキサシンが平均0.43 ppmと基準値(0.1 ppm)を超えて検出された。相対標準偏差も5%程度と良好な結果であり、検討した分析法が実試料にも十分に対応できることが示された。

## 謝 辞

本件の調査に際して、試料を提供して頂いた岡山県食肉衛生検査所の皆様に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 490-499, 金原出版, 2015
- 2) 中郡昭人：豚筋肉及び腎臓における限外ろ過膜を用いた動物用医薬品一斉分析法, 日本獣医師会雑誌, 68, 311-315, 2015
- 3) 藤井良昭, 西村一彦, 橋本 諭, 加賀岳朗：高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析法による畜肉中のテトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生物質の一斉分析, 分析化学, 66, 5, 369-374, 2017
- 4) 甲斐茂美, 小管教仁, 脇ますみ, 岸 弘子：LC-MS/MSを用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価, 神奈川県衛生研究所研究報告, 44, 9-14, 2014
- 5) アジレントテクノロジー：Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジクリーンアップおよびLC/MS/MSを用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析,  
[https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low\\_5991-8598JAJP.pdf](https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5991-8598JAJP.pdf) (2021.4.7アクセス)
- 6) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美：厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価(第3報), 岡山県環境保健センター年報37, 137-144, 2013
- 7) 難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行：LC-MS/MSを用いたはちみつ中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 42, 67-76, 2018
- 8) 難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林隆義：LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中の動物用医薬

品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 43, 115-124, 2019

- 9) 木島まゆみ：—動物用抗菌性物質を取り巻く現状(X X I)—動物用抗菌剤の各論(その10)キノロン系抗菌剤, 日本獣医師会雑誌, 71, 227-232, 2018
- 10) 堀江正一：食品中に残留する動物用医薬品の規制と分析法,  
[https://www.kanto.co.jp/dcms\\_media/other/CT\\_257\\_02.pdf](https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/CT_257_02.pdf) (2021.4.7アクセス)