

【資 料】

## LC-MS/MSを用いた牛の肝臓中のアミノグリコシド系抗生物質に関する 一斉分析法の検討

Study on a Method for Simultaneous Determination of Aminoglycoside Antibiotics  
in Cow Liver 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

アミノグリコシド系抗生物質の迅速かつ高感度な分析方法の確立を目指し、9物質を同時分析するため、牛の肝臓を試料として、一斉分析法の検討を行った。試料を5%トリクロロ酢酸及び0.2 mol/Lヘプタフルオロ酪酸水溶液で抽出し、遠心分離後、固相カラム (PS-2, Plexa) による精製を行い、LC-MS/MSで測定を行う分析法を用い、基準値濃度の標準品を添加して妥当性評価を行ったところ、7物質で目標値を満たした。

[キーワード：アミノグリコシド系抗生物質, 牛の肝臓, 一斉分析法, 液体クロマトグラフトンデム質量分析計]

[Key words : Aminoglycoside Antibiotics, Cow Liver, Simultaneous Determination, LC-MS/MS]

### 1 はじめに

アミノグリコシド系抗生物質は、アミノ糖を含む配糖体抗生物質の総称であり、結核菌などに対して有効で抗菌力も優れているため、人に対する医療において外薬剤、経口剤及び注射剤として用いられるとともに、動物用医薬品や飼料添加物としても汎用されている<sup>1), 2)</sup>。家畜などの疾病治療や予防に有効であるが、その一方で、畜水産食品中への残留が食品衛生上懸念されている。

アミノグリコシド系抗生物質の分析法としては、微生物学的検査法と理化学的検査法が用いられている。微生物学的検査法は「平成6年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について」(平成6年7月1日付け衛乳発第107号。)により簡易検査法及び分別推定法を厚生労働省が定めている。しかし、これらの方法は検出限界濃度が高く、基準値での検出が困難な物質もある<sup>3)</sup>。一方、理化学的検査法は「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115001号。)により「ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン試験法」と「ゲンタマイシン試験法」を厚生労働省が定めている。しかし、これらの方法は十分な回収率が得られないこともあり、高感度かつ迅速に分析できるLC-MS/MSを用いた一斉分析法の開発が、各地方衛生研究所等において独自に行われている<sup>4)~7)</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、分析機関ごとに妥当性評価の実施が必要とされている。

本県では、アミノグリコシド系抗生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る。そこで、LC-MS/MSを用いた一斉分析法を牛の筋肉及び腎臓を用いて検討し、妥当性評価を行った結果を報告した<sup>8)</sup>。今回、牛の肝臓を用いて検討し、妥当性評価を行ったので報告する。

### 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、牛の肝臓を試料として使用した。添加回収試験に使用した試料は、分析対象とする抗生物質が検出されないことを確認後、使用した。

#### 2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品 : ストレプトマイシン (以下「SM」という。)はDr.Ehrenstorfer製, ジヒドロストレプトマイシン (以下「DHSM」という。)は林純薬製, スペクチノマイシン (以下「SPCM」という。), ネオマイシン (以下「NM」という。)及びカ

ナマイシン（以下「KM」という。）はLKT Labo製、ゲンタマイシン（以下「GEM」という。）はFluka製、アプラマイシン（以下「APM」という。）はLKT Labo製、トブラマイシン（以下「TOB」という。）はLKT Labo製、カスガマイシン（以下「KGM」という。）は富士フィルム和光純薬製の標準品を用いた。

標準原液：各標準品を、精製水に溶解し、標準原液（1000 µg/mL）を調製した。

#### 混合標準原液

：標準原液（1000 µg/mL）を混合し、表1に示す肝臓の基準値の10倍の混合標準原液を作成した。なお、TOB及びKGMは試料への添加濃度が1 ppmとなるようにした。

#### マトリックス添加混合標準溶液

：肝臓の分析対象物質を含まない試料（以下「ブランク試料」という。）を用いて作成した試験溶液に混合標準原液を添加し、試料濃度でそれぞれ基準値（TOB及びKGMは1 ppm）の1/10、1/5、1/2、1、2倍になるように作成した。

固相カラム：既報<sup>8)</sup>のとおり。

その他の試薬：残留農薬試験用、特級試薬を用いた。

### 2.3 LC-MS/MS装置及び測定条件

既報<sup>8)</sup>のとおり。

### 2.4 試験溶液調製方法

既報<sup>8)</sup>のとおり抽出を行った後、精製は固相カラムのPS-2とPlexaの連結カラムを用いた。このカラムからアセトニトリル：0.2 mol/L ヘプタフルオロ酪酸（以下

「HFBA」という。）水溶液（8：2）（以下「溶出液」という。）で既報の3 mLから変更して6 mLで溶出させた。溶出液を窒素ガスで0.5 mLまで濃縮し、濃縮液を20 mmol/L HFBA水溶液で1 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、ブランク試料にTOBとKGMを除く7物質を基準値濃度になるように添加して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。また、TOBとKGMは基準が「含有してはならない」であるが、検量線の直線性を考慮して、1 ppmになるように添加して添加回収試験を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 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り、目的成分のイオン化に影響があることが報告されている<sup>9)</sup>。実試料におけるこの影響を補正するために、既報<sup>8)</sup>と同様にマトリックス添加混合標準液を用いて定量することとした。基準値及び測定結果を表1に示した。SMは定量限界（S/N比が10以上）が、基準値の1/10より高く、基準値の1/5であったため、定量限界を検量線の最低濃度とした（表1 \*2）。DHSM、SPCM、NM、KM、GEM、APM、TOB、KGMの定量限界は、基準値の1/10以下の値であったため、検量線の最低濃度を基準値の1/10とした。全ての物質で良好な直線性（ $r^2 \geq 0.99$ ）が得られた。なお、既報の牛の筋肉と腎臓で、検量線で良好な直線性が得られなかった

表1 基準値及び測定結果

抗生物質名	基準値 (ppm)	測定溶液濃度 (ppm)	検量線範囲 (ppm)	定量限界 (ppm)	検量線 ( $\geq 0.99$ )
SM	0.6	0.3	0.06-0.6	0.06	○*2
DHSM		0.3	0.03-0.6	0.02	○
SPCM	2	2	0.2-4	0.01	○
NM	0.5	0.5	0.05-1	0.01	○
KM	1	1	0.1-2	0.05	○
GEM	2	2	0.2-4	0.02	○
APM	5	5	0.5-10	0.01	○
TOB	含有してはならない*1	1	0.1-2	0.01	○
KGM	含有してはならない*1	1	0.1-2	0.01	○

\*1：TOB及びKGMは試料濃度で1 ppmになるように添加

\*2：定量限界以上の濃度で検量線を調製した

TOBとKGMは、添加濃度を0.1 ppmから1 ppmに変更することにより、良好な直線性が得られた。

### 3.2 精製法の検討

牛の肝臓を試料として、既報<sup>8)</sup>と同様に試験溶液を調製したところ、NM及びGEMの回収率が50%未満となった(表2)。カラムからの溶出液量を3 mLから6 mLに変更したところ、回収率の改善が見られたので、カラムからの溶出液量を6 mLに変更した。

表2 添加回収試験結果\* (カラム溶出 3 mL)

抗生物質名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
SM	81	8.8	11
DHSM	77	9.0	9.0
SPCM	97	9.8	10
NM	47	9.1	13
KM	72	7.2	7.2
GEM	42	6.8	7.1
APM	87	8.3	10
TOB	76	9.7	11
KGM	0	-	-

\* : TOB及びKGMは試料濃度で1 ppm, 他は基準値量を添加

☐ : 目標値を満たさず

### 3.3 妥当性評価結果

#### 3.3.1 選択性

ブランク試料として使用する肝臓を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。

#### 3.3.2 真度及び精度

添加回収試験を行った真度及び精度の結果を表3に示す。肝臓にTOBとKGMを除く7物質の標準品を試料濃度で基準値になるように添加した添加回収試験では、真度及び精度の目標値を7物質全てが満たした。

TOBとKGMを試料濃度で1 ppmになるように添加した添加回収試験では、TOBが真度及び精度において目標値を満たしていた。検討した分析法が、TOBを1 ppm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。

今後は、既報<sup>8)</sup>で牛の腎臓におけるGEMの回収率は60%程度であったので、カラムからの溶出液量を3 mLから6 mLに変更して再検討を行う。また、KGMは、固

相カラムの溶出で良好な回収率が得られなかったので、引き続き検討を行う。

表3 添加回収試験結果\* (カラム溶出 6 mL)

抗生物質名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
SM	92	9.0	15
DHSM	91	8.8	11
SPCM	90	5.8	8.2
NM	73	7.3	14
KM	91	7.1	10
GEM	75	7.9	10
APM	93	9.3	9.3
TOB	95	5.2	10
KGM	0	-	-

\* : TOB及びKGMは試料濃度で1 ppm, 他は基準値量を添加

☐ : 目標値を満たさず

## 4 まとめ

LC-MS/MSを用いた牛の肝臓中のアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析法を検討した。肝臓を試料とし、試料を5%トリクロロ酢酸及び0.2 mol/L HFBA水溶液で抽出し、遠心分離後、固相カラム(PS-2, Plexa)による精製を行い、LC-MS/MSで測定を行う分析法を用い、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9物質のアミノグリコシド系抗生物質のMRMモードによる測定を行った。検量線は全ての物質で良好な直線性が得られた。
- (2) 精製は固相カラムのPS-2とPlexaの連結カラム用い、溶出液をアセトニトリル:0.2 mol/L HFBA水溶液(8:2)6 mLに変更して溶出させた結果、回収率が改善した。
- (3) TOBとKGMを除く7物質を試料濃度で基準値になるように添加して添加回収試験を行ったところ、選択性、真度及び精度の目標値を7物質全てが満たした。
- (4) TOBとKGMを試料濃度で1 ppmになるように添加して添加回収試験を行ったところ、TOBは選択性、真度及び精度において目標値を満たしていた。一方、KGMは真度及び精度の目標値を満たさなかった。

今後、牛乳等を用いて検討を行い、アミノグリコシド系抗生物質の一斉分析法で分析可能な畜水産物の種類の追加を目指すこととしている。

## 文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 490-499, 金原出版, 東京, 2015
- 2) 内山万利子：-動物用抗菌性物質を取り巻く現状(XIV)-動物用抗菌剤の各論(その3)アミノグリコシド系抗生物質, 日本獣医師会雑誌, 70, 626-629, 2017
- 3) 草野友子, 神田真軌, 八巻ゆみこ, 平井昭彦, 鎌田国広：食肉中に残留するアミノグリコシド系抗生物質の微生物学的検査法, 東京都健康安全研究センター年報, 54, 142-145, 2003
- 4) 梶田弘子, 阿久津千寿子, 畠山えり子, 小向隆志：LC/MS/MSによる乳中のアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 49, 3, 189-195, 2008
- 5) 雅楽川憲子, 蒲澤泰子, 丹治敏英：LC/MSを用いた食肉中のアミノグリコシド系抗生物質の検討, 新潟県保健環境化学研究所年報, 23, 70-74, 2008
- 6) 金井節子, 林 洋, 中島崇行, 神田真軌, 松島陽子ら：LC-MS/MSによるアミノグリコシド系抗生物質の分析, 第48回全国衛生化学技術協議会年会 講演集, 68-69, 2011
- 7) Agilent Bond Elut Plexa SPE, Agilent Poroshell 120 カラム, LC/タンデムMSを使用したウシ筋肉中のアミノグリコシドの分析, <https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5991-1321JAJP> (2021.4.5アクセス)
- 8) 難波順子, 浦山豊弘, 池田和美, 金子英史, 繁田典子：LC-MS/MSを用いた牛の筋肉及び腎臓中のアミノグリコシド系抗生物質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, 44, 71-77, 2020
- 9) 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