

【資 料】

LC-MS/MSを用いた牛乳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 Various Aminoglycoside Antibiotics
in Cow Milk 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的として、ストレプトマイシン（以下「SM」という。）、ジヒドロストレプトマイシン（以下「DHSM」という。）、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。）、カナマイシン（以下「KM」という。）、ゲンタマイシン（以下「GEM」という。）、アブラマイシン（以下「APM」という。）、トブラマイシン（以下「TOB」という。）及びカスガマイシン（以下「KGM」という。）について、牛乳を試料として一斉分析法の検討を行った。SM, DHSM, SPCM, NM, KM及びGEMについては、基準値となるよう標準品を牛乳試料に添加し、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、遠心分離し、固相カラム（PS-2, Plexa）を用いて精製した後、LC-MS/MSで測定して妥当性評価を行ったところ、目標値を満たした。APM及びTOBについては、以前実施した標準品による検証では、一般的に添加濃度とされる0.01 ppm付近の検量線の直線性が良好でなく、妥当性評価は不適であった。しかし今回、1 ppmとなるよう牛乳試料に添加して同様に添加回収試験を行ったところ、両抗生物質ともに目標値を満たした。このことから、本分析法は、APM及びTOBについても1 ppm以上含有する場合には参考値として活用できると考えられた。

[キーワード：アミノグリコシド系抗生物質, 牛乳, 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 : Aminoglycoside Antibiotics, Cow Milk, 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。そのため、人に対する医療における外用剤、経口剤及び注射剤はもとより、動物用医薬品や飼料添加物としても汎用されているが^{1), 2)}、一方で食品衛生の観点では、畜水産食品への残留が懸念されている。

アミノグリコシド系抗生物質の検査は、微生物学的検査法と理化学的検査法に分類される。このうち微生物学的検査法については、「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号厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知）により簡易検査法及び分別推定法が示されているが、これらは検出感度が低く、抗生物質が特定できないため、主にスクリーニング目的に用いられている³⁾。一方、理化学的検査法は抗生物質の特定に用いられており、「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124001号号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）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」及び「ゲンタマイシン試験法」が示されている。しかし、これらの方法は十分な回収率を得られないことがあるため、地方衛生研究所等において、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進められている⁴⁾⁻⁷⁾。なお、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に当たっては、「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号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知。以下「ガイドライン」という。）により、分析機関ごとに妥当性評価を実施して目標値を満たすことが必要とされている。

本県は平成30年度まで、アミノグリコシド系抗生物質についての理化学的検査法を確立していなかったため、微生物学的検査法のみを実施していた。そこで、令和元

年度からLC-MS/MSを用いた一斉分析法の検討を開始し、これまでに牛の筋肉、腎臓及び肝臓を分析対象とした妥当性評価を実施し、理化学的検査の体制構築に努めてきた^{8),9)}。今回、新たに牛乳を分析対象とした妥当性評価を実施したので報告する。

2 方法

2.1 試料

ガイドラインにより代表的な畜水産物とされている牛乳を試料とした。

2.2 標準品、固相カラム及び試薬

標準品：SMはDr.Ehrenstorfer製、DHSMは林純薬工業製、SPCM、NM及びKMはLKT Labo製、GEMはFluka製、APM及びTOBはLKT Labo製、KGMは富士フィルム和光純薬製の標準品を用いた。

標準原液：8種の抗生物質の標準品を、各々精製水に溶解し、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、表1に示す牛乳の基準値の10倍（ただし、APM及びTOBは10 ppm）となるよう混合し、精製水で定容して混合標準原液を調整した。

マトリックス添加混合標準溶液：牛乳試料（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、試料濃度がそれぞれ基準値（APM及びTOBは1 ppm）の1/10、1/5、1/2、1、1.5及び2倍になるように調整した。

固相カラム：既報⁹⁾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⁸⁾のとおり。

2.4 試験溶液調製方法

既報⁹⁾のとおり行った。すなわち、牛乳試料5 gを5%トリクロロ酢酸及び0.2 mol/Lヘプタフルオロ酪酸（以下「HFBA」という。）水溶液で抽出し、遠心分離後、上清を30 mLに定容し、6 mLを分取して固相カラムのPS-2とPlexaの連結カラムに負荷し、カラムからの溶出液は破棄した。続いて、このカラムに捕集された抗生物質をアセトニトリル：0.2 mol/L HFBA水溶液（8：2）（以下「溶出液」という。）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、SM、DHSM、SPCM、NM、KM及びGEMについては、ブランク試料に基準値濃度を添加して添加回収試験を実施し、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。APM及びTOBについては、以前実施した標準品による検証で、一般的に添加回収試験の添加濃度とされる0.01 ppm付近の検量線の直線性が良好でなかったことから⁸⁾、妥当性評価は不適となった。今回は検量線の直線性が良好な濃度域での分析法の検討を目的に、添加濃度を1 ppmとして同様に評価した。

表1 基準値及び検量線の範囲及び相関係数

抗生物質名	基準値 (ppm)	添加回収用牛乳試料中濃度 (ppm)	試験溶液濃度 (µg/mL)	検量線の範囲 (µg/mL)	定量限界 (µg/mL)	検量線の直線性相関係数 (r ≥ 0.99)
SM	0.2	0.1 ^{*1}	0.1 ^{*1}	0.02-0.2 ^{*3}	0.02 ^{*3}	○ ^{*3}
DHSM		0.1 ^{*1}	0.1 ^{*1}	0.01-0.2	0.01	○
SPCM	0.2	0.2	0.2	0.02-0.4	0.01	○
NM	2	2	2	0.2-4	0.01	○
KM	0.7	0.7	0.7	0.07-1.4	0.05	○
GEM	0.2	0.2	0.2	0.02-0.4	0.02	○
APM	含有してはならない	1 ^{*2}	1 ^{*2}	0.1-2	0.01	○
TOB	含有してはならない	1 ^{*2}	1 ^{*2}	0.1-2	0.01	○

*1：基準値はSM及びDHSMの和が0.2 ppmであるため牛乳試料中濃度で各0.1 ppmになるように添加

*2：APM及びTOBは十分な感度が得られないため牛乳試料中濃度で1 ppmになるように添加

*3：検量線の最低濃度が測定溶液濃度の1/10を満たさない

3 結果及び考察

3.1 定量限界及び検量線

LC-MS/MSを用いた分析は、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問題とされている¹⁰⁾。そのため、既報⁸⁾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。基準値及び検量線の範囲・直線性を表1に示す。抗生物質の定量限界は、測定溶液濃度の1/10以下になるのが望ましい。しかし、SMの定量限界(S/N比が10以上)は、基準値に従って調整した測定溶液濃度の1/5となる0.02 ppmであったため、検量線の最低濃度も0.02 ppmとした。一方、DHSM, SPCM, NM, KM及びGEMの定量限界は、それぞれの基準値に従って調整した測定溶液濃度の1/10以下の値であったため、検量線の最低濃度を測定溶液濃度の1/10とした。APM及びTOBの検量線の最低濃度は、添加回収試験の添加濃度1 ppmから調整した測定溶液濃度の1/10とした。検量線は、全ての抗生物質で相関係数(r) 0.99以上の直線性が認められた。なお、既報^{8), 9)}で検討していたKGMは固相カラムから溶出しないため、今回の検討物質から除いた。

3.2 妥当性評価結果

3.2.1 選択性

選択性の評価は、牛乳試料に基準値となるよう添加したSM, DHSM, SPCM, NM, KM及びGEMについてのみ実施した。ブランク試料として使用する牛乳を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。その結果、これらの抗

生物質のクロマトグラムには、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。

3.2.2 真度及び精度

添加回収試験における真度及び精度の結果を表2に示す。SM, DHSM, SPCM, NM, KM及びGEMの標準品を基準値となるよう牛乳試料に添加した添加回収試験では、いずれの抗生物質も感度、真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。

また、APM及びTOBを1 ppmとなるよう牛乳試料に添加した添加回収試験では、いずれの抗生物質も真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。このことから、検討した分析法は、APM及びTOBを1 ppm以上含有する場合には参考値として活用できると考えられた。

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：

表2 妥当性評価結果*1

抗生物質名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	評価結果
SM*2	85	13	13	○
DHSM*2	97	9.4	12	○
SPCM*3	92	5.8	12	○
NM*3	86	3.6	3.6	○
KM*3	93	6.1	7.8	○
GEM*3	85	7.1	12	○
目標値*2	70~120	< 15	< 20	
目標値*3	70~120	< 10	< 15	
APM	88	7.4	12	×
TOB	107	8.2	9.0	×

*1 : APM及びTOBは十分な感度が得られないため牛乳試料中濃度で1 ppmになるように、他は基準値の濃度になるように添加

*2 : 目標値*2を用いて評価

*3 : 目標値*3を用いて評価

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) アジレント・テクノロジー株式会社: 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) 難波順子, 浦山豊弘, 金子英史, 佐藤 淳, 繁田典子: 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, 岡山県環境保健センター年報, 45, 63-66, 2021
- 10) 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