

—総説—

畜産食品中の残留抗菌性物質の理化学的分析法に関する研究

伊藤裕子

要約：人の健康を守るため、安全性の高い食品を確保することは、食品衛生上の最重要目標の一つであり、その一環として食品中に残留する抗菌性物質の検査は不可欠である。本研究では、衛生行政検査システムの構築を考慮し、抗菌性物質のうち使用量の多いテトラサイクリン系抗生物質 (TCs)、ペニシリン系抗生物質 (PCs)、サルファ剤 (SAs) の理化学的分析法を確立した。すなわち、定量法については、保健所などでも容易に実施可能なUV-HPLC法を用い、また、同定法については、より高感度で精密な分析が可能なLC/MS/MS法を用いた。まず、オキシテトラサイクリンをはじめとする4種のTCsについて、これまで困難であった牛組織中のTCsの精密同定法を開発した。また、弱酸性PCsのうちベンジルペニシリンをはじめとする6種のPCsについて、牛組織中のPCsの定量法及び高感度かつ信頼性の高い精密同定法を確立した。更に、SAsのうち使用頻度の高い10種類について、牛、豚等の肝臓、腎臓中の定量法及び精密同定法を確立した。本研究により、畜産食品に残留する抗菌性物質を簡易に定量し、更に高感度精密同定する検査システムが確立されたことから、食品検査の量と質の向上が期待される。

索引用語：畜産食品、残留抗菌性物質、テトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤、UV-HPLC、LC/MS/MS

Chemical analysis of residual antibiotics and antibacterials in livestock products

Yuko ITO

Abstract: One of the major roles of public health agencies is to ensure safe products for consumers through analysis of residual antibiotics and antibacterials in livestock products. In this study, the chemical analytical methods were established for tetracyclines (TCs), penicillins (PCs) and sulphonamides (SAs), which have been widely used for livestock as veterinary drugs. Taking into consideration their application in the inspection systems by the prefectural government, UV-HPLC, which is commonly used in health centers, was selected as the determination method, and LC/MS/MS, which was used for the highly sensitive analyse, was employed as a confirmation method. We established a simultaneous confirmation method for four kinds of TCs in bovine tissues. Both the simultaneous determination method and a highly sensitive identification method of six kinds of weak acid PCs in bovine tissues were developed. Multiresidue analytical methods were also developed for the simultaneous determination and confirmation of SAs in animal liver and kidney. In the present study, the combined use of a simple and reproducible determination and the highly sensitive and precise confirmation of residual antibiotics and antibacterials in livestock products was successfully established for the inspection system. This should provide high quality analysis for ensuring safe product improvements.

Keyphrases: livestock products, residual antibiotics and antibacterials, tetracyclines, penicillins, sulphonamides, UV-HPLC, LC/MS/MS

1. 緒言

近年、畜産業を取り巻く環境は大きく様変わりし、効

率的な生産がうたわれることにより、限られた場所で多くの畜産動物を飼育する多頭集団飼育が一般化した。このような過密飼育においては疾病防止対策が極めて重要

であるため、疾病の予防や治療に使用される抗菌性物質が、不可欠の生産用資材となっている。しかしながら、一方では使用された抗菌性物質の畜産物への移行及び残留などによる人体への悪影響が懸念され、消費者の健康を守るために残留抗菌性物質を分析することが不可欠となっている。とちく場などで実施される微生物学的分析法は、操作が簡便で高感度に検出できるため、スクリーニング法として優れているが、検出された抗菌性物質の特定や定量性に問題がある。一方、理化学的分析法は、残留物質を個別に検出でき、その同定が容易で定量性に優れているが、分析法の確立されているものは少ない。家畜に用いられる抗菌性物質は100種類を越えており、そのほとんどは理化学的個別分析法がないために、残留や使用の実態について詳細な調査のできない状態にある。このことから、すべての抗菌性物質に対して理化学的な残留分析法を確立することが緊急課題とされている。

一方、家畜に用いられる抗菌性物質のうちテトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤は使用量の多い薬物であり、これらの理化学的分析法、特に多成分同時分析法を確立することが畜産食品中に残留する抗菌性物質をモニターする上で効果的であると推測された。また、その分析法は、抗菌性物質の残留モニタリングにおいて重要な標的組織である、肝臓や腎臓についても適用できることが必要である。更に、とちく場などでの現場検査により検出された物質を保健所や食肉検査所などで定量し、衛生研究所などでその物質の同定をより高感度かつ精密に行う、といった衛生行政システムの構築を考慮すると、定量法には一般的な検査室に広く設置されているUV-HPLCを用い、精密同定法には化合物の構造情報が得られる質量分析計を2台直列に配置し超高感度分析が可能であるLC/MS/MSを用いることが有効であると考えられる。

以上のことから著者は、テトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤を目的抗菌性物質とし、食肉、肝臓、腎臓についてUV-HPLCとLC/MS/MSを用いた理化学的分析法を確立した。本総説では、この研究について述べる¹⁻⁵⁾。

2. テトラサイクリン系抗生物質の高感度精密分析法の開発

動物用医薬品あるいは飼料添加物として用いられるテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、オキシテトラサイクリン (OTC)、テトラサイクリン (TC)、クロルテトラサイクリン (CTC)、ドキシサイクリン (DC) の4種

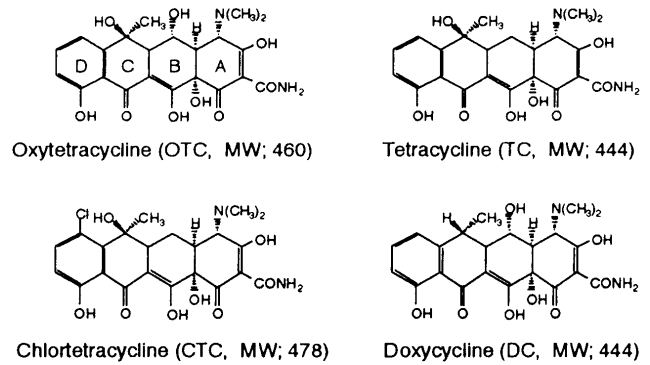


Figure 1. Structures of tetracyclines.

に代表される (Figure 1)。これらの定量法については、種々の食品中についてUV-HPLCを用いた比較的簡易な方法がすでに確立されており、その方法を基に、食品中のOTCの公定分析法が示されている⁶⁾。しかしながら、精密同定法については、前述したようにLC/MS/MSを用いる方法が有用であるが、食品中の夾雑物との分離とMSのイオン化に合致したHPLC条件が確立されておらず、満足できる方法は少ない⁷⁻⁹⁾。そこで、これらを検討し、LC/MS/MSを用いた精密分析法の確立に着手した。

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MS/MSによる牛組織中のテトラサイクリン系抗生物質の精密同定：TCsは、金属イオンとキレートを形成し、逆相系LCカラムの残存シラノール基に強く吸着してしまうため、これを阻止する目的で移動相にシュウ酸を添加したUV-HPLCによる定量法が確立されている¹⁰⁾。しかし、シュウ酸は不揮発性であるため、これをそのままエレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MSへ応用するとスプレー先端やインターフェイス内でシュウ酸が析出し、MS装置に重大な損傷を与えかねない。シュウ酸を加えない移動相とするためには、TCsのカラムへの吸着を別の方法で妨げる必要がある。そこで、基材に高純度シリカゲルを使用したC8カラムと代表的な揮発性の酸であるトリフルオロ酢酸を添加した移動相を用いたところ、4種のTCsは良好に分離した¹¹⁾。しかし、このHPLC条件によりESI LC/MS分析しても、標準溶液では高感度に分析できるが、牛組織中のTCsは試料中の夾雑物の影響によりその同定は困難であった。一方、ESI LC/MS/MSのプロダクトイオンスキャンモードは、はじめの質量分析計により目的化合物由来のイオンを選択し、そのイオンを開裂させて得られるすべてのプロダクトイオンを2番目の質量分析計で測定するものである。この測定方法によれば、試料からの夾雑イオンの影響をほとんど受けない同定法の確立が可能であると考え、これをTCsに応用した。

TCsをESI LC/MS分析すると、すべてのTCsから

[M+H]⁺ と[M+H-NH₃]⁺が観察され、これらのイオンはTCsの確認に有用と思われる、さらにDC以外の3種からは、[M+H-NH₃-H₂O]⁺も観察された¹²⁾。このイオンはTCsのA環のカルボキシアミド部分とC環の水酸基に由来するため、これを検出するか、しないかによって、分子量の等しいDCとTCの違いを判断することが可能である。以上のことから、MS/MS分析のプリカーサーイオンには、それぞれのプロトン化分子を用い、検出される3つのプロダクトイオンによりTCsを同定することとした。

ESI LC/MS/MSは高感度で選択性に優れた分析法であるが、再現性の良いスペクトルを得るためには、試料溶液の精製は欠くことのできない操作である。そこで、C18カートリッジによる試料精製法を応用することとした¹³⁾。はじめに、牛肝臓に0.1 mg/kgのTCsを添加しC18カートリッジにより精製した後、ESI LC/MS/MSによるTCsの同定を試みた。結果をFigure 2及び3に示したが、プロダクトイオンのベースピークをモニターして得られるクロマトグラムや、プロダクトイオンのトータルイオンクロマトグラム上に検出されるピーク、及び、そのピークトップから得られるタンデムマススペクトルは標準品のそれらと良く一致した。また、検出されたTCsの[M+H]⁺と[M+H-NH₃]⁺や[M+H-NH₃-H₂O]⁺は、牛肝臓のブランク試料からこれらに対応するイオンは検

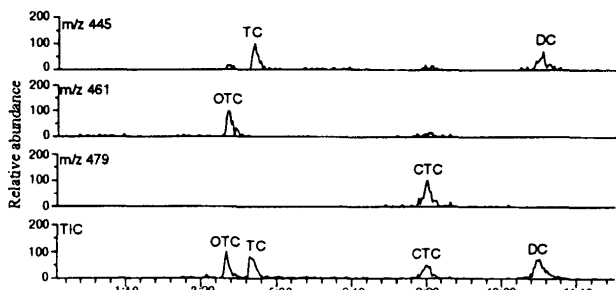


Figure 2. Total ion and mass spectra of tetracyclines fortified at a concentration of 0.1 mg/kg in bovine liver under MS/MS conditions.

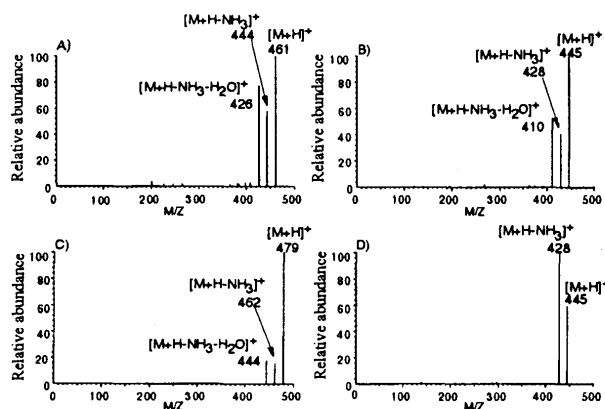


Figure 3. ESI tandem mass spectra of tetracyclines fortified at a concentration of 0.1 mg/kg in bovine liver. A) Oxytetracycline, B) tetracycline, C) chlortetracycline, D) doxycycline.

出されなかった。同様の試験を牛腎臓及び牛筋肉にも実施し、本法によりそれぞれのTCsが0.1 mg/kgでも同定されることを確認した。

次に、実際にとちく場においてHPLC分析によりOTCを0.58 mg/kg検出した牛肝臓とCTCを0.38 mg/kg検出した牛筋肉について、それぞれの薬物を本法により同定した (Figure 4及び5)。[M+H]⁺と[M+H-NH₃]⁺、[M+H-NH₃-H₂O]⁺の3種のプロダクトイオンはそれぞれ明確に検出され、牛組織中のTCs同定として本法が適用できることを証明した。

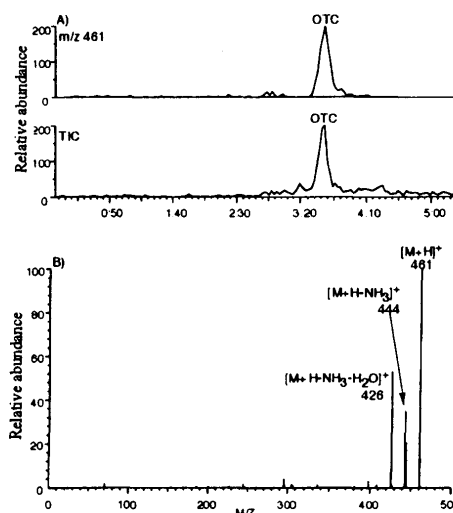


Figure 4. Total ion and mass chromatograms of residual oxytetracycline at concentration of 0.58 mg/kg in bovine liver under MS/MS conditions, and its ESI tandem mass spectrum. A) Total ion and mass chromatograms, B) ESI tandem mass spectrum.

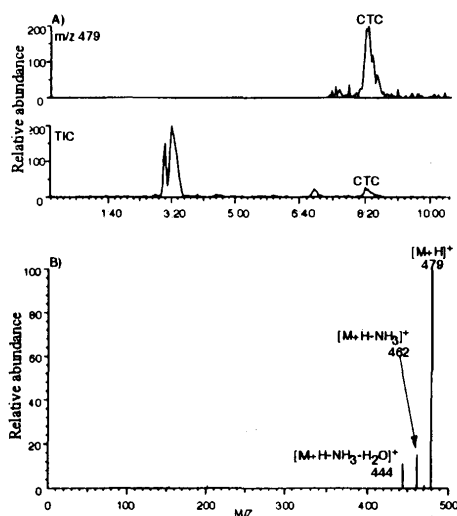


Figure 5. Total ion and mass chromatograms of residual chlortetracycline at concentration of 0.38 mg/kg in bovine muscle under MS/MS conditions, and its ESI tandem mass spectrum. A) Total ion and mass chromatograms, B) ESI tandem mass spectrum.

3. ペニシリン系抗生物質の定量法及び 精密同定法の開発

ペニシリン系抗生物質 (PCs) は、比較的安価であることもあって畜産用医薬品として多用される。このうち弱酸性を示す代表的な6種、すなわちベンジルペニシリン (PCG)、フェノキシメチルペニシリン (PCV)、オキサシリン (MPIPC)、クロキサシリン (MCIPC)、ナフシリン (NFPC)、ジクロキサシリン (MDIPC) についてその構造をFigure 6に示した。これらの食品中の残留理化学分析法は、特殊な装置を用いる方法や、有害試薬を用いて誘導体化する方法がほとんどであり、簡易にUV検出する方法は、牛乳中のPCsを対象とするのみであった¹⁴⁻¹⁸⁾。また、精密同定法については、ESI LC/MSが有用であるが、動物組織中の弱酸性PCsの分析法は、ほとんど報告されていない¹⁹⁻²¹⁾。更に、それらの検出感度は低く、残留基準値 (MRL=0.05 mg/kg (PCG))²²⁾に相当するPCsの確認は困難である。これらは、PCsに選択的な試料前処理法や、適切なLC条件が確立されていないことに起因すると推測できる。そこで、これらについて詳細に検討した結果、以下の成果を得た。

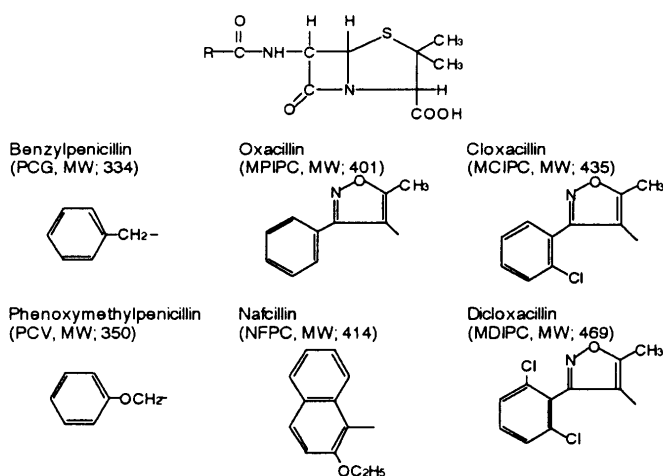


Figure 6. Structures of penicillins.

UV-HPLCによる豚肉、牛肉、牛肝臓及び腎臓中のペニシリン系抗生物質の定量：長波長側に顕著なUV吸収を持たないPCsを高感度にUV-HPLC分析するためには、試料中のPCsの効率的な抽出法と試料由来の夾雑物をできる限り取り除く精製法を組み合わせた試料精製法の確立が必要であると同時に、6種のPCsとそれらの付近に溶出する夾雑物が完全に分離するLC条件の確立が必要である。これらのことを念頭に研究に着手した。

極性の異なる6種の弱酸性PCsを一斉に分析するためには、移動相にイオンペア試薬を添加したイオンペアHPLCが有効であった。カラムには一般的なODSカラム

であるTSKgel ODS-80Tsを用い、移動相は、アセトニトリルと0.02 Mのリン酸緩衝液の混液に酸性化合物に対して有効であるセチルトリメチルアンモニウムクロライドを加えたものを用いた。検出はUV220 nmで検出した。

試料精製法のうち、抽出については、豚肉の場合、水を用いて3回抽出するのみで6種すべてのPCsをほぼ完全に抽出することができた。しかし、牛肉の場合にはPCG及びPCVの抽出が不十分であったため、抽出液に2%食塩水を用い、その容量を豚肉の場合の2倍量にして抽出した。更に、牛肝臓及び腎臓については、抽出時の発泡や抽出液の粘度上昇を防ぐため、タングステン酸ナトリウムと硫酸を除タンパク剤として抽出液 (2%食塩水) に加えた。

精製については、PCsがイオン性化合物であることから、イオン交換カートリッジが有効であると考えられた²³⁻²⁵⁾。しかし、抽出液は多量の夾雑物を含んでいるため、これをそのままカートリッジ処理するとイオン交換容量を超えてしまうことは、容易に予想される。一方、食肉中のPCG分析法にC18カートリッジと食塩を含んだ薄めたメタノールで洗浄する試料精製法があるが²⁶⁾、この方法によれば多量の夾雑物の除去が期待できる。これらのことから、PCsの粗抽出用カートリッジとして逆相系のBond Elut C18カートリッジを選択し、精製用イオン交換カートリッジとして、陰イオン交換系カートリッジであるSep Pak Accell Plus QMAを用いたとき、多くの夾雑物が除去され、かつ6種のPCsの回収率は良好であった。精密な分析のためには、更に詳細な精製条件の検討が必要であるため、各カートリッジの洗浄や溶出について検討した。最終的に得られた精製法のうち、牛肝臓についての方法をScheme 1に示した。このうち、Sep Pak Accell Plus QMAカートリッジの溶出液にHPLCの移動相を用いることは、再現性のよいクロマトグラムを得るのに有効であった。

以上の様に検討した分析法について実際の食品への応用を確認するため、試料に市販の豚肉、牛肉、牛肝臓及び腎臓を用いて添加回収実験を実施し、その結果を

Extract
Bond Elut C18 6cc (500 mg)
 wash with H₂O 10 ml, 15 % MeOH containing 2 % NaCl 5 ml and H₂O 5 ml
 aspirate over 10 min.
 elute with 55 % MeOH 5 ml

Euate
Sep-Pak Accell Plus QMA 3cc (500 mg)
 wash with 55 % MeOH 3 ml, 10 mM acetic acid MeOH soln. 3 ml and H₂O 3 ml
 aspirate over 10 min.
 elute with mobile phase of HPLC 2 ml

HPLC

Scheme 1. Clean-up procedure for analysis of penicillins in bovine liver

Table 1 Recoveries of penicillins from swine muscle and bovine tissues

Penicillins	Swine muscle			Bovine muscle			Bovine liver			Bovine kidney		
	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)	Fortified (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	C.V. (%)
Benzylpenicillin	0.5	85	1.4	0.5	92	2.9	0.5	82	4.2	0.5	83	4.7
	0.1	80	4.4	0.1	83	7.0	0.1	86	7.4	0.1	82	5.8
	0.05	84	6.6	0.05	77	6.4						
Phenoxymethylpenicillin	0.5	90	0.5	0.5	90	2.4	0.5	88	1.4	0.5	82	1.8
	0.1	89	2.3	0.1	82	4.8	0.1	83	4.1	0.1	86	7.8
	0.05	89	3.3	0.05	84	5.4						
Oxacillin	0.5	89	0.5	0.5	86	1.9	0.5	91	1.4	0.5	92	3.2
	0.1	95	2.6	0.1	74	3.5	0.1	96	3.4	0.1	92	4.2
	0.05	82	3.2	0.05	80	3.9						
Cloxacillin	0.5	85	0.5	0.5	85	1.8	0.5	91	2.9	0.5	89	2.9
	0.1	85	2.6	0.1	86	3.1	0.1	92	8.7	0.1	90	2.7
	0.05	93	3.7	0.05	82	4.0						
Nafcillin	0.5	86	1.5	0.5	89	1.7	0.5	84	1.7	0.5	80	3.5
	0.1	86	3.3	0.1	85	2.6	0.1	84	3.8	0.1	89	3.8
	0.05	93	4.2	0.05	90	5.2						
Dicloxacillin	0.5	77	1.7	0.5	83	4.4	0.5	73	3.1	0.5	79	5.9
	0.1	73	1.6	0.1	71	2.6	0.1	89	6.4	0.1	89	4.3
	0.05	80	5.7	0.05	79	6.4						

a) average of 5 trials.
C.V.: coefficient of variation.

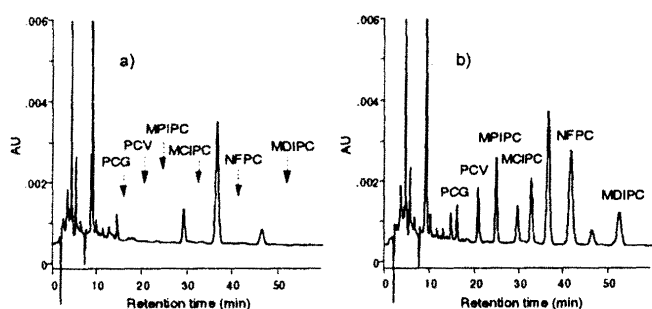


Figure 7. Typical HPLC chromatograms of bovine liver samples. a), bovine liver (control); b), fortified at a level of 0.5 mg/kg each of penicillins. Operating conditions, column: TSKgel ODS-80Ts (150 x 4.6 mm, I.D.); mobile phase: acetonitrile-0.02 M phosphate buffer, pH 6.2 (4.3:5.7, v/v) containing 12 mM cetyltrimethylammonium chloride; flow-rate: 0.8 ml/min; detector: UV220 nm; column temp.: 30°C.

Table 1に示した。このとき得られたクロマトグラムのうち、これまで特に分析が困難であった牛肝臓についてのクロマトグラムをブランク試料のそれと併せてFigure 7に示した。いずれの試料でも添加した6種の弱酸性PCsは、再現良く定量でき、かつ、定量を妨害する物質も検出されなかった。また、本法における検出限界は、豚肉及び牛肉については、6種のPCsともに試料中の濃度として0.02 mg/kgであった (S/N=3)。また、牛肝臓及び腎臓については、それぞれPCGが0.04 mg/kg、PCVが0.03 mg/kg、MPIPcとMCIPc及びNFPCが0.02 mg/kg、MDIPcが0.05 mg/kgであった (S/N=3)。

ESI LC/MS/MSによる牛組織中のペニシリン系抗生物質の精密同定：緒言で述べたように、LC/MS/MSは、高感度精密同定法に有用な手法であるので、これを

用いた牛組織中のPCs同定法を検討した。

LC/MSにおいては、目的物質と同じ保持時間に夾雑する物質が溶出すると、目的物質のイオン化の抑制が起こり、目的物質の検出感度が低下することがある。このため、高感度なLC/MS分析のためには、十分な試料の精製とクロマトグラム上での夾雑物との完全な分離が必要である。前述のように確立した定量法で得られるクロマトグラムは、UV220 nmで検出しているにもかかわらず、検出される夾雑物は非常に少ないことから、これを基に、ESI LC/MS/MS法を用いた牛組織中のPCs同定法を検討した。

UV-HPLCによる定量法で用いた移動相には不揮発性のイオンペア試薬や緩衝液が添加されており、ESI LC/MS/MSへ直接応用することは、非常に困難であった。そこで、弱酸性化合物に有効な揮発性イオンペア試薬であるジブチルアミンアセテートを用いることとした。高感度なMS分析のためには、移動相の組成は単純にアセトニトリルと水の混液であることが最適であることから、ジブチルアミンアセテートの添加量は可能な限り低いことが望ましい。そこで、その添加量と6種のPCsのキャパシティーファクター、MS感度及び溶出位置の安定性について調査したところ、添加量が2 mMのとき満足できる結果を得た。また、グラジエント分析により、極性が低く、保持時間の長いMDIPcの感度をアイソクラティック分析と比較して、約5倍上昇させることに成功した。

各PCsの標準溶液をESI LC/MS分析すると、6種のPCsすべてから、脱プロトン化分子、脱炭酸イオン、そしてペーラクタム環が開裂し水が付加したイオン([M-H-141])の3種が確認された。そこで、プリカー

Table 2 Diagnostic ions and ESI MS-MS conditions for penicillins analysis

Penicillins	Product ions ^{a)}			Precursor ion ^{a)}	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Ret. time window (min)
	[M-H] ⁻	[M-H-CO ₂] ⁻	[M-H-141] ⁻	[M-H] ⁻			
Benzylpenicillin	333	289	192	333	23	8	2.50-3.40
Phenoxymethylpenicillin	349	305	208	349	23	8	3.41-4.00
Oxacillin	400	356	259	400	20	10	4.01-5.00
Cloxacillin	434	390	293	434	20	9	5.20-6.25
Nafcillin	413	369	272	413	23	9	6.26-7.00
Dicloxacinil	468	424	327	468	23	9	7.01-8.00

a) (m/z)

サーイオンには脱プロトン化分子を選択し、プロダクトイオンとして検出が予期される[M-H]⁻、[M-H-CO₂]⁻及び[M-H-141]⁻に注目してMS条件の検討を行った。

実験で用いた装置ではイオンの取り込み口に掛ける電圧のことをコーン電圧と呼び、この電圧の強弱により1番目のMSで検出される各イオンの強度比をコントロールすることが可能である。コーン電圧の最適値は化合物ごとに異なるため、6種のPCsそれぞれについて脱プロトン化分子が最も高いイオン強度を示した電圧を選択した。また、用いた装置ではコリジョンエネルギーを変化させることにより、得られる3つのプロダクトイオンの強度比を調整することが可能である。3つのプロダクトイオンのうち[M-H-141]⁻が6種すべてのPCsからベースピークとして検出され、他の2つのイオン、すなわち脱プロトン化分子と脱炭酸イオンがともに10%以上の強度比を示すエネルギーをそれぞれ選択した。以上の検討により決定したESI LC/MS/MS条件をTable 2に示した。

UV-HPLCによる定量法で用いた試料精製法では、クロマトグラムの再現性を確保するために、Sep Pak Accell Plus QMAカートリッジからの溶出液にHPLCの移動相を用いて試験溶液としている。しかし、LC/MS/MSに用いる移動相を溶出液としてPCsの回収率を求めたところ、2 mlの溶出液量では最も高い回収率のものでも2%程度であった。そこで、ジブチルアミンアセテートの濃度のみを変化させ、クロマトグラムの再現性を確保しつつ、そのイオン強度によりPCsを溶出することを検討した。ジブチルアミンアセテート濃度が50 mM以上で6種のPCsは、95%以上溶出されたため、溶出液には、50 mMのジブチルアミンアセテートを含んだ30%アセトニトリル2 mlを用いることとした。

以上の様に検討した分析法について、市販の牛筋肉、肝臓及び腎臓を試料に添加実験を実施し、その適用性を確認した。PCGの残留基準値である0.05 mg/kgとなるよう6種のPCsをそれぞれの試料に添加しESI

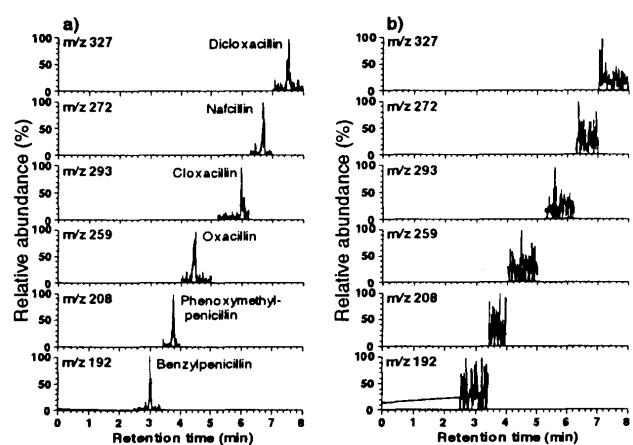


Figure 8. Typical mass chromatograms of the fortified liver sample monitored at [M-H-141]⁻ under ESI LC/MS/MS conditions. a), fortified with the 6 penicillins at the concentration of 0.05 mg/kg; b), bovine liver (control).

LC/MS/MS分析した。各PCsのプロダクトイオンのうち[M-H-141]⁻をモニターして得られた牛肝臓のマスプロトグラムをブランク試料と併せてFigure 8に示し、タンデムマススペクトルをFigure 9に示した。これらはPCs標準品のそれと良く一致し、また、ブランク試料からも分析の障害となるイオンは検出されなかった。本法の検出限界は、試料中の濃度として牛筋肉では0.02 mg/kg、牛肝臓と牛腎臓では0.02-0.03 mg/kgであった。このことから、WHOやFDA、EUそして日本において定められているPCsの残留基準値を越えるか、または、その付近のPCsが検出された食品について、本法を用いることにより精密に特定できることが証明された。

4. サルファ剤の定量法及び精密同定法の開発

サルファ剤 (SAs) は、抗菌スペクトルが広く、安定で効力損失が少ない上、比較的安価であるため繁用され

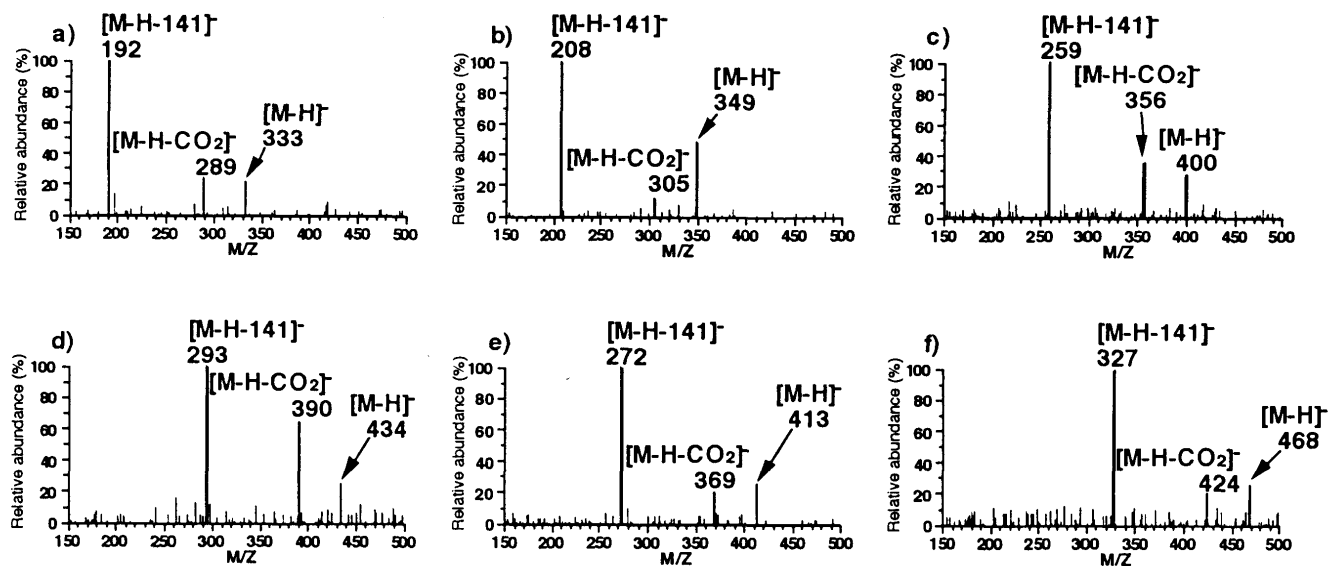


Figure 9. ESI tandem mass spectra of penicillins fortified at a concentration of 0.05 mg/kg in bovine liver. a), benzylpenicillin; b), phenoxymethylpenicillin; c), oxacillin; d), cloxacillin; e), nafcillin; f), dicloxacillin.

る合成抗菌剤である。スルファニル置換基の構造によって多くのSAsが存在するが、日本ではスルファジメトキシシン (SDMX)、スルファモノメトキシシン (SMMX)、スルファメラジン (SMR)、スルファメトキシピリダジン (SMPD)、スルファメトキサゾール (SMX)、スルフィソキサゾール (SIX)、スルファキノキサリン (SQ)、スルファジミジン (SDD)、スルフィソゾール (SIZ)、スルファジアジン (SDZ) の10種が用いられることが多い (Figure 10)。これらについて、UV-HPLCによる汎用性の高い分析法は、筋肉や鶏卵を対象とした報告に多く、肝臓や腎臓を対象とした報告では、特殊な装置や、複雑な操作を必要としている²⁷⁻³⁵⁾。これは、肝臓と腎臓中の夾雑物の影響と推測される。10種ものSAsをそれぞれ個別に分析することは実用的でなく、同時一斉分析が必然であることを踏まえても、やはりUV-HPLCによる分析

法の開発には試料溶液の精製がポイントとなる。SAsは両性イオンであることから、これまでの知見より明らかなように、イオン交換カートリッジを用いた精製法を精密に検討することによって肝、腎臓中のSAs分析が可能となると考えられる。一方、目的薬物がイオン化すること、試験溶液が十分に精製されていること、更にHPLCの移動相が揮発性であることの3つの条件を満足していれば、確立したHPLCによる定量法をそのままLC/MS/MSによる同定法へ応用できると推測できる。このことから、定量法で用いるHPLCの移動相は揮発性とし、同一試料精製法による定量法と精密同定法の確立を目指すこととした。

UV-HPLCによる肝臓、腎臓中のサルファ剤の定量：揮発性の移動相により10種のSAsを分離するLC条件を検討した結果、カラムにはLカラムの長さ25 cmのものを用い、移動相には、メタノール-アセトニトリル-0.05 M 干酸水溶液 (10 : 15 : 75) 混液を用いたとき10種のSAsは良好に分離された。なお、検出波長はSAsの極大吸収波長である272 nmを選択し、カラム温度は30度とした。

食品中のSAs分析法として、前処理にアミノカートリッジを用いたUV-HPLCによる定量法があるが²⁵⁾、肝臓と腎臓中のSAs分析に応用すると回収率が極端に低下するなど満足できる結果は得られない。この回収率低下の原因は、試料からの抽出、あるいは、カートリッジへの保持に問題があると推測された。そこで、SAsを添加した肝臓について、その試料採取量とそれに対応する抽出溶液を減少させて分析し回収率を比較したところ、肝臓

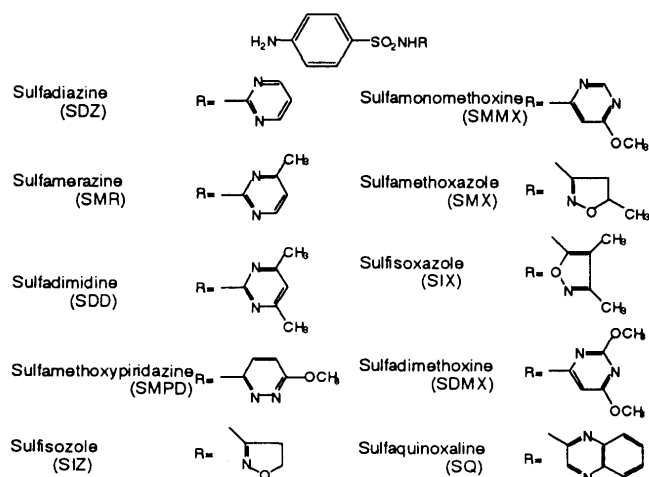


Figure 10. Structures of sulphonamides.

Table 3 Recoveries of sulphonamides from animal kidneys and livers

	Recovery, % (C. V., %) ^a									
	Fortified at 0.5 mg/kg					Fortified at 0.1 mg/kg				
	Swine		Bovine		Chicken	Swine		Bovine		Chicken
	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Liver
SDZ ^b	93.6 (3.5)	94.2 (2.5)	97.2 (1.3)	94.2 (3.2)	89.6 (4.4)	74.8 (4.6)	75.4 (5.1)	84.0 (5.1)	85.8 (4.2)	75.8 (6.1)
SMR ^b	94.0 (3.4)	91.0 (4.6)	97.8 (1.1)	92.4 (2.8)	90.8 (3.3)	73.0 (4.8)	74.0 (4.6)	83.6 (4.0)	86.2 (5.1)	78.8 (2.8)
SDD ^b	95.0 (4.0)	93.0 (3.0)	98.2 (1.3)	93.6 (2.3)	89.2 (4.8)	86.6 (5.5)	82.6 (4.9)	83.8 (3.9)	84.8 (4.7)	78.4 (4.7)
SMPD ^b	93.4 (3.6)	92.4 (3.7)	96.4 (1.2)	88.4 (3.4)	81.8 (4.5)	87.2 (5.2)	80.0 (6.8)	87.6 (5.9)	86.8 (5.7)	74.4 (5.7)
SIZ ^b	92.4 (3.3)	91.0 (3.2)	95.2 (1.2)	90.8 (2.4)	81.8 (4.0)	84.8 (5.2)	75.6 (4.8)	90.2 (3.1)	86.6 (3.1)	74.8 (5.5)
SMMX ^b	96.2 (3.2)	93.2 (3.0)	97.8 (1.1)	93.2 (3.0)	92.8 (4.2)	79.4 (6.3)	72.0 (6.5)	90.2 (3.8)	87.6 (5.1)	79.0 (4.7)
SMX ^b	94.2 (3.4)	91.4 (4.7)	96.4 (0.9)	93.8 (2.4)	90.6 (3.4)	75.0 (4.9)	80.6 (6.0)	86.8 (3.1)	84.2 (5.1)	81.4 (6.4)
SIX ^b	88.4 (3.6)	87.2 (4.4)	91.8 (1.9)	87.7 (1.7)	81.0 (4.8)	86.4 (4.4)	79.8 (5.6)	79.8 (3.7)	82.2 (5.6)	70.8 (6.9)
SDMX ^b	91.4 (3.3)	89.4 (3.8)	90.6 (2.2)	92.6 (3.5)	89.4 (2.2)	80.8 (4.7)	78.0 (6.6)	86.6 (4.9)	84.6 (5.8)	81.6 (5.1)
SQ ^b	87.8 (4.1)	89.0 (4.8)	90.8 (2.7)	95.8 (2.3)	86.8 (2.8)	81.2 (5.7)	78.8 (7.0)	79.2 (3.7)	79.2 (5.5)	85.2 (6.2)

^a Average of 5 trials.

^b SDZ: sulfadiazine, SMR: sulfamerazine, SDD: sulfadimidine, SMPD: sulfamethoxypyridazine, SIZ: sulfisozole, SMMX: sulfamonomethoxine, SMX: sulfamethoxazole, SIX: sulfisoxazole, SDMX: sulfadimethoxine, and SQ: sulfaquinoxaline

の採取量の減少に伴い、回収率が上昇した。このことから、アミノカートリッジへのSAsの保持に問題があることが判明し、前処理カートリッジには、アミノカートリッジよりも強い保持力を持った陰イオン交換カートリッジが必要であることが示唆された。各種市販カートリッジを検討した結果、Bond Elut PSAは、SAsを完全に保持し、かつ、溶出液としたアセトニトリル-0.05 M 酢酸アンモニウム (20 : 80) 混液10 mlでSAs10種すべてを98 %以上溶出した。このことから、前処理カートリッジには、Bond Elut PSAを用いることとした。これまでの知見より、クロマトグラムの再現性を確保するために、前処理カートリッジからの溶出液はHPLCの移動相を用いることが望ましい。しかしながら、確立したHPLC移動相は強酸性溶液であり、Bond Elut PSAカートリッジに保持されたSAsは移動相によっては、ほとんど溶出しなかった。そこで、弱酸性を示し、移動相に用いた0.05 Mの酢酸溶液と緩衝作用の期待できる0.05 Mの酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルの混液を用い、その混合比率はクロマトグラムの再現性を考慮して、アセトニトリル濃度を20 %とした。次いで、溶出液量を検討した結果、3 mlまででSAsは70-80 %程度溶出されるが、完全に溶出されるまでには、5 mlを要することが判明した。

これらの結果から、Bond Elut PSAからの溶出には、アセトニトリル・0.05 M 酢酸アンモニウム溶液 (20 : 80) 混液を5 ml用いた。

これまでの検討で得られたBond Elut PSAカートリッジによる試料精製法を用いて添加回収実験をしたところ、標準溶液では、ほぼ100 %の回収率が得られていたのに対して、豚肝臓抽出液では50 %以下の回収率しか得られなかった。このことから、試料由来の夾雑物がSAsのカートリッジへの保持を妨害し、十分な回収率を得るためには多量の抽出液の負荷は困難であると判断された。アミノカートリッジを用いたピリドンカルボン酸系抗菌剤の分析において、カートリッジへ負荷する溶媒は酢酸エチルのみよりも*n*-ヘキサンと酢酸エチルの混液を用いた方がカートリッジの保持力は増すことが知られている²⁴⁾。そこでこれを応用し、カートリッジへの負荷溶媒を検討したところ、試料の酢酸エチル抽出液の溶媒を留去後、5 mlの*n*-ヘキサン・酢酸エチル (1 : 1) 混液で残渣を溶解し、これをカートリッジ処理した時、良好な結果を得た。

以上の様に検討した分析法について、実試料への応用を確認するため、市販の豚、牛それぞれの肝臓と腎臓及び鶏の肝臓を用いて回収実験を実施し、満足できる結果を得た (Table 3)。また、検出限界は10種のSAsすべて

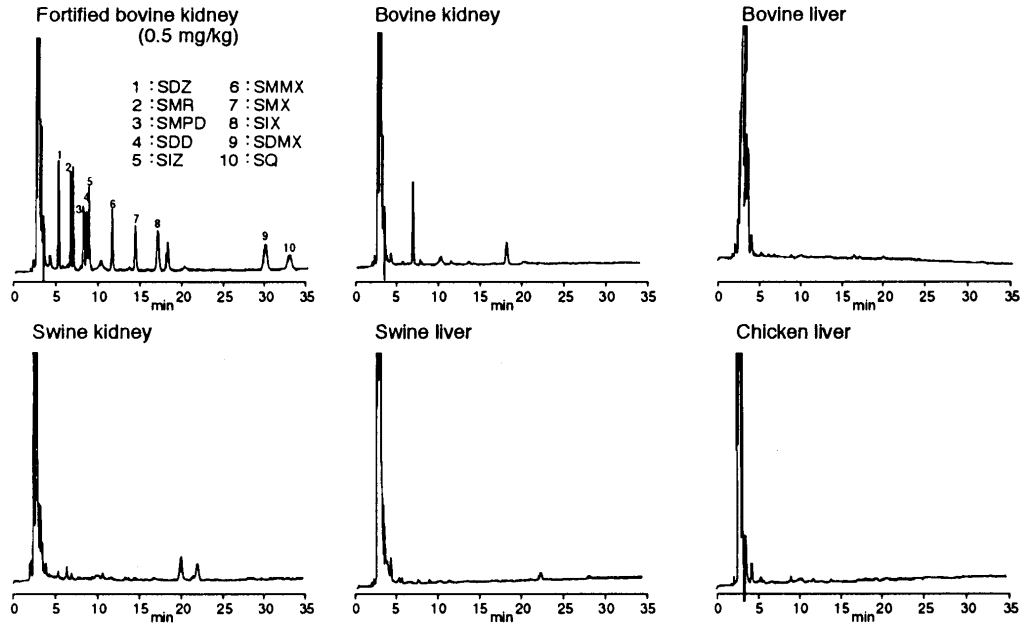


Figure 11. Typical HPLC chromatograms of various animal kidneys and livers. Operating conditions, column: L-column ODS (250 x 4.6 mm, I.D.); mobile phase: methanol-acetonitrile-0.05 M formic acid (10:15:75, v/v); flow-rate: 1.0 ml/min; detector: UV272 nm; column temp.: 30°C.

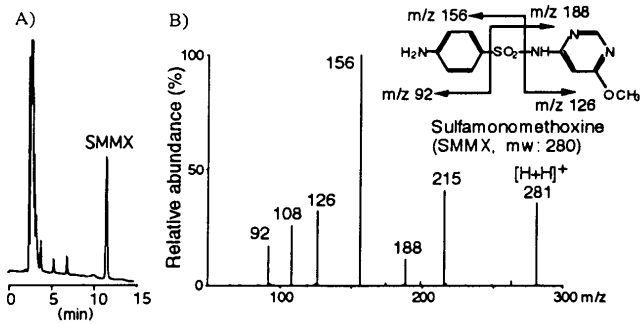


Figure 12. ESI LC/MS/MS analysis of residual SMMX at concentration of 1.07 mg/kg in bovine kidney. A) Monitored at UV 272 nm, B) ESI MS/MS spectrum of the residual SMMX.

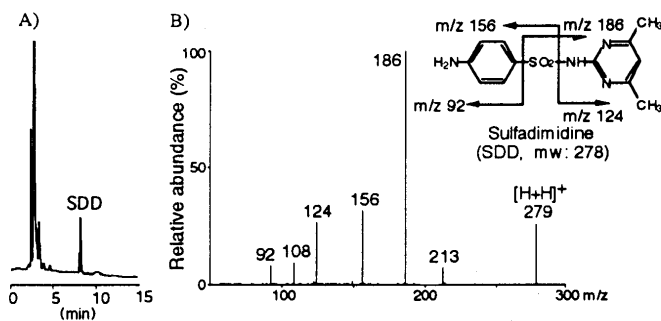


Figure 13. ESI LC/MS/MS analysis of residual SDD at concentration of 0.48 mg/kg in swine kidney. A) Monitored at UV 272 nm, B) ESI MS/MS spectrum of the residual SDD.

について0.03 mg/kg (S/N=3) であった。市販の豚、牛それぞれの肝臓と腎臓及び鶏の肝臓を分析したときに得られるクロマトグラムをFigure 11に示したが、これ

らのクロマトグラムからは定量を妨害する物質は検出されず、本法による十分な精製効果が確認された。

ESI LC/MS/MSによる精密同定： 確立したSAsの定量法はESI LC/MS/MSへの適用を念頭に構築したものであるため、実際の食品を用いてSAsの同定を試みた。すなわち、と畜場において微生物学的方法によりSAs陽性と判定された牛腎臓と豚腎臓、それぞれ1検体ずつを本法により精製し、これをESI LC/MS/MSにより同定した。UV-HPLCによる定量では、牛腎臓から1.07 mg/kgのSMMXが、また豚腎臓からは0.48 mg/kgのSDDがそれぞれ検出された (Figure 12 (A) 及び13 (A))。これらSDD及びSMMXをポジティブモードにより各SAsのプロトン化分子をプリカーサーイオンとしてESI LC/MS/MS分析したところ、クロマトグラム上の対応するピークトップにおけるタンデムマススペクトルは標準品から得られるそれと良好に一致した。すなわち、SMMXのプロダクトイオンとして、m/z 281、188、156、92が、またSDDのプロダクトイオンとして、m/z 279、186、156、92がそれぞれの構造に由来するイオンとして検出され、これらのイオンは文献値のそれと同一であった (Figure 12 (B) 及び13 (B))^{36, 37)}。このことから、本法は、動物肝臓及び腎臓中のSAsについて、UV-HPLCによる定量とESI LC/MS/MSによる精密同定を同時に実施できる方法として実用的で有用な方法と判断できた。

5. 総括

従来確立されていなかった食品中のテトラサイクリン系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、サルファ剤の分析法について、それぞれその原因を探り、試料精製法に固相抽出カートリッジを応用し、分析条件を詳細に検討した。その結果、それらのすべてを開発することに成功した。定量分析は、UV-HPLCにより薬物ごとに個別に実施され、その分析結果に疑義が生じた場合には、LC/MS/MSを用いて構造情報に基づいて精密に同定されることが可能となった。このシステムは、保健所や衛生研究所などの既存の機器の利用が可能であることから、食品検査の量と質を向上できることが期待される。本研究は、試料食品として分析が困難とされていた肝臓や腎臓についても網羅しているため、動物薬の残留実態調査などへの応用も期待される。また、本研究によって明らかにされた前処理カートリッジの重要性やMSのイオン化に合わせたHPLC移動相選択の重要性は、今後のこの他の残留動物薬分析法開発の一助となる知見であると確信する。

6. 文献

- 1) Oka, H.; Ikai, Y.; Ito, Y.; Hayakawa, J.; Harada, K.-I.; Suzuki, M.; Odani, H.; Maeda, K. *J. Chromatogr. B*, **1997**, *693*, 337.
- 2) Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Kagami, T.; Takeba, K. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *855*, 247.
- 3) Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Matsumoto, H.; Kagami, T.; Takeba, K. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *880*, 85.
- 4) Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Matsumoto, H.; Miyazaki, Y.; Takeba, K.; Nagase, H. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *911*, 217.
- 5) Ito, Y.; Oka, H.; Ikai, Y.; Matsumoto, H.; Miyazaki, Y.; Nagase, H. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *898*, 95.
- 6) Food Sanitation Law, Article No. 7, Law No.233, December 24 (1947), Standards or Requirements of Foods or Additives, Ministry of Health and Welfare Notification, 28th December 1959, revised on 218th December 1995.
- 7) Oka, H.; Uno, K.; Yasaka, K.; Suzuki, M. *J. Chromatogr.*, **1984**, *298*, 435.
- 8) Mulders, E. J.; Lagemaat, D. V. D. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1989**, *7*, 1829.
- 9) Walsh, J. R.; Walker, L. V.; Webber, J. J. *J. Chromatogr.*, **1992**, *596*, 211.
- 10) Oka, H.; Matsumoto, H.; Uno, K.; Harada, K.; Kadowaki, S.; Suzuki, M. *J. Chromatogr.*, **1985**, *325*, 265.
- 11) Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Harada, K.-I.; Asukabe, H.; Suzuki, M.; Himeji, R.; Horie, M.; Nakazawa, H.; MacNeil, J. D. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 2215.
- 12) Harada, K.-I.; Masuda, K.; Suzuki, M.; Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, *18*, 1512.
- 13) Ikai, Y.; Oka, H.; Kawamura, N.; Yamada, M.; Harada, K.-I.; Suzuki, M. *J. Chromatogr.*, **1987**, *411*, 313.
- 14) Perez, B.; Prats, C.; Castells, E.; Arboix, M. *J. Chromatogr. B*, **1997**, *698*, 155.
- 15) Luo, W.; Hansen, Jr., E. B.; Ang, C. Y. W.; Deck, J.; Freeman, J. P.; Thompson, Jr., H. C. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 1264.
- 16) Ang, C. Y. W.; Luo, W. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1997**, *80*, 25.
- 17) Takeba, K.; Fujinuma, K.; Miyazaki, T.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *812*, 205.
- 18) McGrane, M.; O'Keefe, M.; Smyth, M. R. *Analyst*, **1998**, *123*, 2779.
- 19) Hormazabal, V.; Yndestad, M. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1998**, *21*, 3099.
- 20) Blanchflower, W. J.; Hewitt, S. A.; Kennedy, D. G. *Analyst*, **1994**, *119*, 2595.
- 21) Hurtaud, D.; Delepine, B.; Sanders, P. *Analyst*, **1994**, *119*, 2731.
- 22) Food Sanitation Law, Article No. 7, Law No.233, December 24 (1947), Standards or Requirements of Foods or Additives, Ministry of Health and Welfare Notification, 28th December 1959, revised on 26th November 1999.
- 23) Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Hayakawa, J.; Kagami, T. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *810*, 81.
- 24) Ikai, Y.; Oka, H.; Kawamura, N.; Yamada, M. *J. Chromatogr.*, **1989**, *477*, 397.
- 25) Ikai, Y.; Oka, H.; Kawamura, N.; Hayakawa, J.; Yamada, M. *J. Chromatogr.*, **1991**, *541*, 393.
- 26) Terada, H.; Asanoma, M.; Sakabe, Y. *J. Chromatogr.*, **1985**, *318*, 299.
- 27) Simeonidou, E. J.; Botsoglou, N. A.; Paomas I. E.; Fletouris, D. J. *J. Liq. Chromatogr.*, **1996**, *19*, 2349.
- 28) Edler, P.; Cominoli, A.; Corvi, C. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **1997**, *88*, 554.
- 29) Stoev, G.; Michailova, A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *87*, 137.
- 30) Sista, H. S.; Dye, D. M.; Leonardo, L. *J. Chromatogr.*, **1983**, *273*, 464.
- 31) Gehring, T. A.; Rushing, L. G.; Thompson, H. C. *J. AOAC Int.*, **1995**, *78*, 1161.
- 32) Vinas, P.; Lopez-Erroz, C.; Campillo, N.; Hernandez-Cordoba, M. *J. Chromatogr. A*, **1996**, *726*, 125.
- 33) Gehring, T. A.; Rushing, L. G.; Thompson, H. C. *J. AOAC Int.*, **1997**, *80*, 751.
- 34) Long, A. R.; Short, C. R.; Baker, S. A. *J. Chromatogr.*, **1990**, *50*, 287.
- 35) McGrane, M.; O'Keefe, M.; Smith, M. R. *Anal. Lett.*, **1999**, *32*, 481.
- 36) Kristlansen, G. K.; Brock, R.; Bojensen, G. *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 3253.
- 37) Porter, S. *Analyst*, **1994**, *119*, 2753.

*本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第258号）の内容を中心にまとめたものである。