

## 2) LC-MS/MS による食肉中抗菌性物質の同定

山口奈穂 小林将英 西名武士\* 福島宏暢

### 要旨

食肉衛生検査所で実施した分別推定法等の微生物学的検査の結果、抗菌性物質の残留が認められた食肉の検体について、当所において LC-MS/MS による動物用医薬品の一斉分析法で分析し、残留する抗菌性物質の同定及び定量を行った。その結果、一斉分析法でセファゾリンやマルボフロキサシン等の抗菌性物質を検出し、同定した。また、医薬品の残留が疑われた検体に対し、新たに個別の分析法を構築し、ミノサイクリン又はロキシスロマイシンを検出した。

**キーワード：LC-MS/MS, 抗菌性物質, 分別推定法, 一斉分析法**

### はじめに

食肉に抗菌性物質の残留が疑われる場合、熊本県では食肉衛生検査所にて、残留抗菌性物質モニタリング検査が実施されている。すなわち、微生物学的手法で腎臓や筋肉抽出液の抗菌活性を検査し、陽性の場合、「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法（改定）」（以下、「分別推定法」という。）<sup>1,2)</sup>にて残留する抗菌性物質の系統推定を行う<sup>3)</sup>。分別推定法で食肉が抗菌活性を有することは判明するが、残留する抗菌性物質の系統推定ができないなど、さらなる調査が必要な際に、食肉衛生検査所からの依頼で、当所の LC-MS/MS による動物用医薬品の一斉分析法<sup>4)</sup>（以下「一斉分析法」という。）を用いて抗菌性物質の同定検査を実施している。

LC-MS/MS は、多種類の抗菌性物質を高感度に検出し、その高い選択性から、標準品のクロマトグラムと比較することで定性が可能である。当所では、独自に開発した一斉分析法により畜水産物の収去検査等を実施している。しかし、日常の検査において、動物用医薬品が残留した試料は得難く、これまで一斉分析法の評価は妥当性評価ガイドラインに準拠した添加回収試験<sup>5)</sup>でのみ行ってきた。一方で、分別推定法で抗菌活性が認められた検体は、抗菌性物質の残留が明らかかな陽性試料であり、かつ、獣医師や畜主への聞き取り調査から、使用された薬剤が判明するケースも多い。

このため、一斉分析法での検出結果と聞き取り調査結果を照合し、一斉分析法の有用性の評価を行った。

2017年度から2019年度に行った10件の同定検査のうち、一斉分析法で同定に成功した事例及び医薬品を検出した事例について報告する。

### 実験方法

#### 1 検体

分別推定法において何らかの抗菌活性が認められた検体。聞き取り調査や薬剤の使用履歴（以下、「使用履歴等」という。）から、使用された抗菌性物質が予め分かったものもあった。分別推定法の結果と併せて表3に示す。

#### 2 一斉分析項目

- ・抗菌性物質（69項目） 表1のとおり
- ・その他動物用医薬品（81項目）

#### 3 試薬

##### 3-1 標準品

関東化学製、林純薬工業製、肥飼料検査所製、富士フィルム和光純薬製、Dr.Ehrenstorfer GmbH 製及び Riedel-de Haen 製を用いた。

表 1 一斉分析において測定する抗菌性物質

系統：測定項目
<b>サルファ剤</b> ：スルファエトキシピリダジン，スルファキノキサリン，スルファクロルピリダジン，スルファジアジン，スルファジミジン，スルファジメトキシ，スルファセタミド，スルファチアゾール，スルファドキシ，スルファトロキサゾール，スルファピリジン，スルファプロモメタジンナトリウム，スルファベンズアミド，スルファメトキサゾール，スルファメトキシピリダジン，スルファメラジン，スルファモノメトキシ，スルフィソゾール，スルファニトラン
<b>抗原虫剤</b> ：アンプロリウム，エトパペート，クロピドール，ジアベリジン，ジニトルミド，デコキネート，ナイカルバジン，ピリメタミン，ロベニジン
<b>β-ラクタム系</b> ：アンピシリン，オキサシリン，クロキサシリン，セファゾリン，セフロキシム，ナフシリン，フェノキシメチルペニシリン，ベンジルペニシリン
<b>ニューキノロン系</b> ：エンロフロキサシン，オフロキサシン，オルビフロキサシン，サラフロキサイン，ジフロキサシン，ダノフロキサシン，ノルフロキサシン，マルボフロキサシン
<b>マクロライド系</b> ：エリスロマイシン，オレアンドマイシン，ジョサマイシン，スピラマイシン，タイロシン，チアムリン，チルミコシン
<b>オールドキノロン系</b> ：オキシソリニック酸，ナリジクス酸，フルメキン，ミロキサシン
<b>テトラサイクリン系</b> ：オキシテトラサイクリン，クロルテトラサイクリン，テトラサイクリン
<b>ポリエーテル系</b> ：サリノマイシン，モネンシン，ラサロシド
<b>フェニコール系</b> ：チアンフェニコール，フロルフエニコール
<b>リンコマイシン系</b> ：ピルリマイシン，リンコマイシン
<b>葉酸拮抗剤</b> ：オルメトプリム，トリメトプリム
<b>アンサマイシン系</b> ：リファキシミン
<b>ペプチド系</b> ：ノボビオシン

### 3-2 その他試薬

アセトニトリル (以下, 「ACN」という, HPLC用), イソプロパノール (HPLC用), ギ酸 (LC/MS用), 酢酸アンモニウム, メタノール (以下, 「MeOH」という, HPLC用), リン酸二ナトリウム, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (以下, 「EDTA」という。), クエン酸：富士フィルム和光純薬製

アセトン (残留農薬試験・PCB試験用)：関東化学製ろ過フィルター (0.2μm・25N), ポリプロピレン製バイアル：GL Sciences 社製

EDTA 含有クエン酸緩衝液：クエン酸 21.0g を水に溶かして 1,000mL とした (第 1 液)。リン酸二ナトリウム

71.6g を水に溶かして 1,000mL とした (第 2 液)。EDTA1.86g に第 1 液 307mL と第 2 液 193mL を混和したものに加え, 溶かした。

0.2%ギ酸含有 ACN：ACN1,000mL にギ酸 2mL を加えた。

### 4 一斉分析法の試験溶液調製方法<sup>4)</sup>

検体をフードプロセッサーで細切均一化した後, その 5.00g を量り採り, 0.2%ギ酸含有 ACN15mL を加え, ホモジナイズ (2,000rpm, 1 分) した後, 遠心分離した (3,000rpm, 5 分)。上清をガラスロート (11G2) でろ過し, 50mL メスフラスコに移した。残渣に 0.2%ギ酸含有 ACN10mL を加え, 振とう (10 分) し, 遠心分離 (3,000rpm, 5 分) した。上清をガラスロート (11G2) でろ過し, 上記の 50mL メスフラスコに移した。残渣に EDTA 含有クエン酸緩衝液 15mL を加え, 振とう (10 分) し, 遠心分離 (3,000rpm, 5 分) した。上清をガラスロート (11G2) でろ過し, 上記の 50mL メスフラスコに移し, 水で正確に 50mL としたものを抽出液とした。抽出液 2.5mL を採り, 水及び MeOH (1:9) 混液 0.25mL を加え, 混和した後, フィルターろ過したものを試験溶液とした。

### 5 検量線の作成

抗菌性物質が残留していないことを確認した試料から調製した試験溶液に, 各標準溶液を添加したマトリクス添加標準液で検量線を作成した。

### 6 測定条件

#### 6-1 装置

MS/MS 部	Triple Quad 5500 (AB SCIEX 製)
LC 部	Nexera X2 (島津製作所製)
分析カラム	メタルフリー-PEEK カラム InertSustain® C18 (2.1×150mm, 3μm) (GL Sciences 社製)

#### 6-2 測定条件

イオン化法	ESI
分析モード	sMRM (ポジティブネガティブ同時取り込み) 1 項目につき定量イオンと定性イオンを測定
カラムオープン移動相	40°C A 液 (0.1%ギ酸, 0.25mM 酢酸アンモニウム含有水), B 液 (0.1%ギ酸, 0.25mM 酢酸アンモニウム含有 MeOH)

グラジエント条件 表2のとおり  
 流量 0.4mL/min  
 注入量 5μL

表2 グラジエント条件

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	100	0
0.5	80	20
19.9	10	90
20	2	98
25	2	98
25.1	100	0
30	100	0

### 結果及び考察

#### 1 一斉分析法による同定

すべての検体についてははじめに一斉分析法で検査した。その結果を表3に示す。ピークを検出した場合、標準品とピーク形状、保持時間及び定量イオンと定性イオンのピーク強度比を比較した。検体A及びBからはセファゾリンを、検体Cからはオルビフロキサシンを検出した。これらの抗菌性物質は使用が確認されたものであった。標準品のクロマトグラムと比較し、ピーク形状、保持時間及びピーク強度比が類似していたため、それぞれの抗菌性物質が残留していると判断した。検体Aのクロマトグラムを図1に、検体Cのクロ

マトグラムを図2に示す。

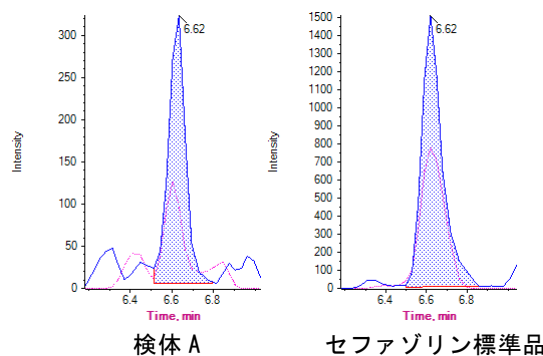


図1 検体A及びセファゾリン標準品のクロマトグラム

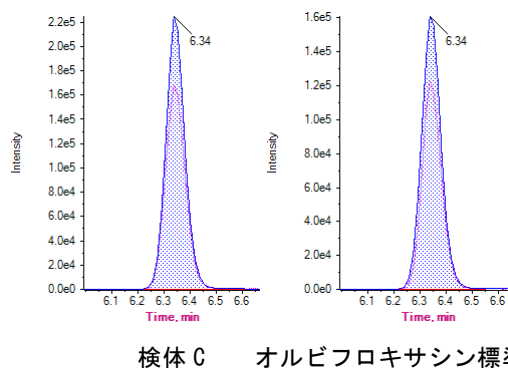


図2 検体C及びオルビフロキサシン標準品のクロマトグラム

表3 検体情報と一斉分析法結果

検体	検体情報			一斉分析法結果	
	部位	使用履歴等	分別推定法結果	検出項目	検出値 (μg/g)
A	牛筋肉	セファゾリン フロルフェニコール	推定不能	セファゾリン	0.0010
B	牛筋肉	セファゾリン	推定不能	セファゾリン	0.69
C	牛筋肉	オルビフロキサシン	推定不能	オルビフロキサシン	7.3
D	牛筋肉	セファゾリン アンピシリン	推定不能	マルボフロキサシン	0.51
E	牛筋肉	なし	推定不能	マルボフロキサシン	0.18
F	牛筋肉	なし	テトラサイクリン系	マルボフロキサシン	1.8
G	豚筋肉	エンラマイシン	推定不能	エンロフロキサシン	0.78
H	牛筋肉	ミノサイクリン	テトラサイクリン系	ND	
I	牛筋肉	ロキシスロマイシン	推定不能	ND	
J	牛筋肉	ミノサイクリン	テトラサイクリン系	ND	

検体 D, E, F 及び G は、使用が確認されていない抗菌性物質を検出した。検体 E は、使用履歴等で事前に分かっている項目はなかったが、一斉分析法でマルボフロキサシンを検出した。マトリクス由来の妨害ピークではないか確認するため、モニターするイオンの数を2つから6つに増やし、アイソクラティック条件で、マトリクス添加標準液、試料溶液及びこの2液を等量混合した溶液のクロマトグラムを比較した(図3)。保持時間とピーク強度比はほぼ等しく(表4)、混合液のピーク形状は良好であったので、マルボフロキサシンのピークであると判断した。検体 D, F 及び G についても同様に一斉分析法から LC 条件等を一部変更した方法で確認試験を実施し、検体 D 及び F はマルボフロキサシン、検体 G はエンロフロキサシンが残留していると判断した。検体 D, E, F 及び G は、当所から結果を発出後に、家畜保健衛生所の調査で、検出した抗菌性物質の使用が判明し、同定結果は正しかったことが証明されている。

一斉分析法はこれまで、妥当性評価試験で行う添加回収試験で、試験法の評価を行ったのみであった。しかし、一連の陽性試料の検査により、試料中から抽出し、LC-MS/MS で測定できていたことが立証された。特に、ニューキノロン系抗菌性物質(以下、「ニューキノロン剤」という。)を検出した事例が多くあった。一般的に畜産物からのニューキノロン剤の抽出には、ACN や ACN 及び 0.2% メタリン酸溶液 (2:3) 混液が用いられ<sup>6,7)</sup>、抽出溶媒の ACN へのギ酸添加や、抽出回数の増加で抽出効率が向上することが知られている<sup>8,9)</sup>。一斉分析法は 0.2% ギ酸含有 ACN で 2 回ホモジナイズ抽出を行うため、この操作でニューキノロン剤を効率よく抽出できたことが推測された。

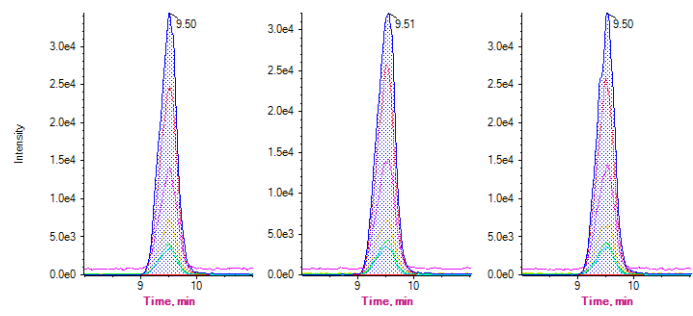
分別推定法の結果に注目すると、同じニューキノロン剤が残留していても推定結果が、推定不能やテトラサイクリン系を示すなど、結果にばらつきがあったことが分かった。分別推定法で推定できるものは、マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系及びアミノグリコシド系の4系統<sup>2)</sup>であり、ニューキノロン剤やサルファ剤など、推定できない抗菌性物質が残留している場合、高濃度に残留していたとしても、推定できなかったり、誤った結果につながったりしていたことが考えられた。

## 2 ミノサイクリン及びロキシスロマイシン分析法の検討

検体 H, I 及び J は、一斉分析法で検査において何も検出しなかった。使用履歴等から、検体 H 及び J はミノサイクリン、検体 I はロキシスロマイシンの使用が予め分かっており、分別推定法では、検体 H 及び J がテトラサイクリン系と推定され、検体 I は推定不能という結果であった(表3)。

ミノサイクリン及びロキシスロマイシンの公定法はないため、分析法を作成した。各標準品の MeOH 溶液をインフュージョンで MS 部へ導入し、イオン化条件を設定した。どちらもポジティブモードでプリカーサーイオンを検出し、プロダクトイオンのうち、感度及び選択性が高いイオンを5つずつ選定した。条件を表5に示す。

抽出法は、テトラサイクリン系及びマクロライド系で実績のある一斉分析法で行い、同時に添加回収試験(n=1)を実施した。検体 H 及び J はミノサイクリン、検体 I はロキシスロマイシンを検出した(表6)。検体 H のクロマトグラムを図4に、検体 I のクロマトグラムを図5に示す。妨害ピークは認められず、良好なピーク形状であった。また、検体のクロマトグラムと標



マルボフロキサシン 検体 E 混合液  
標準品

図3 検体 E の確認試験

表4 マルボフロキサシンピーク強度比

モニターイオン (m/z)	ピーク強度比 (%)		
	標準液	検体 E	混合液
363.2 > 72.1	100	100	100
> 345.3	38.9	42.0	40.2
> 320.1	71.5	80.3	75.0
> 70.1	20.9	20.3	18.8
> 205.0	11.7	12.9	12.1
> 122.1	9.9	10.7	10.7

準品のクロマトグラムと比較して、ピーク形状、保持時間及びピーク強度比はほぼ等しかった。検量線は、マトリクス添加検量線を採用し、ミノサイクリンが 0.5～10ng/mL の範囲で、ロキシスロマイシンが 0.01～10ng/mL の範囲で直線性を示し、いずれも相関係数は 0.99 以上であった（図 6 及び図 7）。添加回収試験は検体中濃度が 10ng/g となるように添加し、分析した結果、回収率は 91.8～102.1%と良好であった。

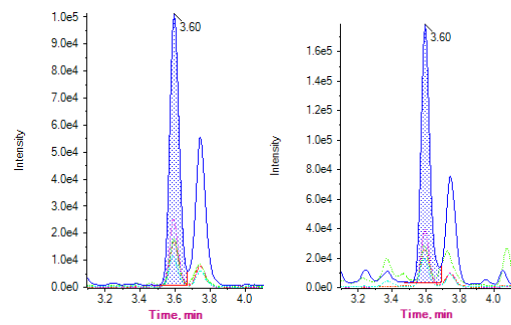
ミノサイクリン及びロキシスロマイシンは一般的に人体用の医薬品として使われる薬剤であり、食品中への残留は認められていないが、検出値は一律基準以上の比較的高値を示した。この検出結果を受けて、抗菌性物質の適正使用の指導が強化されており、当所の分析が食の安全を守る一助となった。

表 5 ミノサイクリン及びロキシスロマイシンの MS/MS 最適化条件

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
ミノサイクリン $C_{23}H_{27}N_3O_7$	458.1	441.2	96	27
		283.1		61
		187.0		79
		130.2		115
ロキシスロマイシン $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	837.4	158.1	16	45
		441.2		33
		83.0		115
		72.0		123
		116.0		89

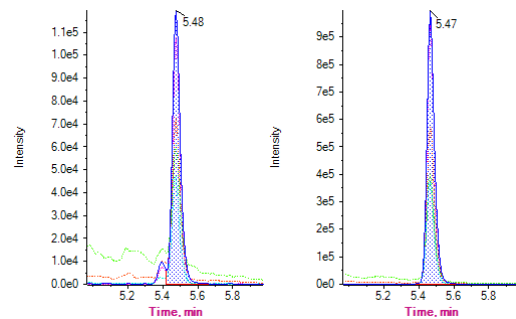
表 6 検体 H, I, J の検出結果

検体	検出項目	検出値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)
H	ミノサイクリン	0.058	96.0
I	ロキシスロマイシン	0.013	91.8
J	ミノサイクリン	1.4	102.1



検体 H ミノサイクリン標準品

図 4 検体 H 及びミノサイクリン標準品のクロマトグラム



検体 I ロキシスロマイシン標準品

図 5 検体 I のクロマトグラム

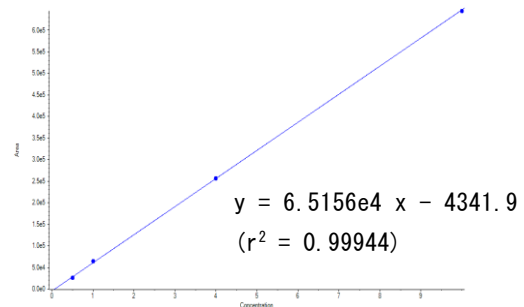


図 6 ミノサイクリンの検量線

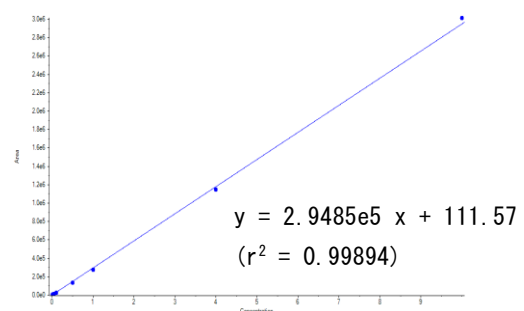


図 7 ロキシスロマイシンの検量線

## まとめ

分別推定法で抗菌活性が認められた検体を LC-MS/MS による動物用医薬品の一斉分析法で分析し、残留する抗菌性物質の同定を行った。その結果、一斉分析法の結果が正しかったことが使用履歴等から判明し、一斉分析法の有用性の確認ができた。

また、ミノサイクリン及びロキシスロマイシンについて MS/MS 測定条件及び抽出法の検討を行い、分析法を新たに構築した。

分別推定法だけでは推定不能や、推定を誤る事例があることから、LC-MS/MS 等を用いた高感度かつ網羅的な理化学的試験による分析と組み合わせた確認が重要と考えられた。

## 文献

- 1) 「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」厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：平成 6 年 7 月 1 日付け衛乳第 107 号。
- 2) 食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編 2003, 厚生労働省監修
- 3) 平成 30 年度版 熊本県食肉衛生検査所事業概要（平成 29 年度実績）
- 4) 松本理世, 飛野敏明, 西名武士：熊本県保健環境科学研究所報, **44**, 28-37 (2014)。
- 5) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドラインの一部改正について」厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号。
- 6) HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）
- 7) エンロフロキサシン, オキシリニック酸, オフロキサシン, オルビフロキサシン, サラフロキサシン, ジフロキサシン, ダノフロキサシン, ナリジクス酸, ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）
- 8) 西村一彦, 山口博美, 橋本論：北海道立衛生研究所報, **63**, 57-63 (2013)
- 9) 畑野和広：食品衛生学雑誌, **45**(5), 239-244 (2004)