

LC/MS/MS による畜水産物中のキノロン剤の一斉分析法の検討

生 活 科 学 部

は じ め に

多くの合成抗菌剤が、動物用医薬品あるいは飼料添加物として使用されている。なかでも、製剤の種類および使用量が多いものとしてサルファ剤とキノロン剤が挙げられる¹⁾。これら薬物の畜水産物中への残留の有無を確認し、畜水産物の安全性の確保に資することが必要とされている。

キノロン剤の畜水産物中の分析法としては、エンロフロキサシン(ERFX)、オキシリニック酸(OXA)、オフロキサシン(OFLX)、オルビフロキサシン(OBFX)、サラフロキサシン(SRFX)、ジフロキサシン(DFLX)、ダノフロキサシン(DNFX)、ナリジクス酸(NA)、ノルフロキサシン(NFLX)およびフルメキン(FQ)試験法(畜水産物)として通知されている²⁾。また、ERFXの残留基準は、その代謝物のシプロフロキサシン(CPFX)との和として設定されている。そこで、上記11種のキノロン剤について一斉分析法を検討したので報告する。

方 法

1 試料

鶏肉(もも)および養殖魚(ひらめおよび鰻)を試料とした。

2 試薬

ERFX, OXA, OFLX, DNFX, NA, NFLX および FQ : 関東化学(株)製,

OBFX : 林純薬工業(株)製

DFLX : Dr.Ehrenstorfer 社製

CPFX および SRFX : Riedel-de Haën 社製

標準原液 : 各標準品 5mg をメタノールに溶かし 50ml とした(100 µg/ml)。

混合標準液 : 各標準原液 5ml を取り、減圧濃縮し、水およびメタノール(7:3)を加えて 100ml とした(5 µg/ml)。

抽出溶媒:0.2%メタリン酸およびアセトニトリル(6:4)を使用した。

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis HLB カラム(200mg, 6cc, Waters 社製) : あらかじめメタノール 5ml および蒸留水 10ml でコンディショニング後、使用した。

その他の試薬 : 高速液体クロマトグラフ用、残留農薬試験用または特級品を用いた。

3 装置

(1) 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS)

高速液体クロマトグラフ(HPLC) :

島津製 Prominence

質量分析装置:Applied Biosystems 社製 API4000

(2) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)

高速液体クロマトグラフ(HPLC) : 島津製 LC-10A
フォトダイオードアレイ検出器(PDA) :

島津製 SPD-M10AV_p

蛍光検出器(FL) : 島津製 RF-10AX_L

4 測定条件

(1) LC/MS/MS

a HPLC 条件

カラム : Xterra MS C18(2.1 φ × 150mm, 3.5 µm)(Waters 製)

移動相 : A 液 ; 0.05%トリフルオロ酢酸, B 液 ;
アセトニトリル

グラジエント条件 : B 液を 25 分間で 1%から
70%まで変化させた。

流速 : 0.2 ml/min

カラム温度 : 40

注入量 : 5 µl

b MS/MS 条件

Polarity : Positive

Curtain Gas : 50

Ion Source Gas1 : 50

Ion Source Gas2 : 50

IonSpray Voltage : 5500

Temperature : 500

Collision Gas : 5

Entrance Potential : 10

Resolution Q1 : Unit

Resolution Q3 : Unit

Dwell Time (msec) : 50

化合物ごとの測定条件は、表 1 に示した。

(2) HPLC

カラム : Mightysil RP-18(H) (4.6 φ × 150mm, 5 µm)(関東化学製)

移動相 : A 液 ; 0.1%ギ酸, B 液 ; アセトニトリル
グラジエント条件 : B 液を 10 分間で 10%から

表1 モニターイオンおよびMS/MS条件

モノ剤	保持時間 (分)	Q1 イオン (m/z)	定量条件				定性条件			
			Q3 イオン (m/z)	DP	CE	CXP	Q3 イオン (m/z)	DP	CE	CXP
ERFX	12.1	360.1	316.1	76	29	22	245.0	76	39	18
CPFX	11.5	332.3	288.3	91	27	20	245.2	91	35	18
OXA	15.1	262.0	244.1	51	29	16	216.0	51	43	14
OFLX	11.3	362.2	261.0	71	39	18	318.0	71	27	24
OBFX	12.3	396.1	351.9	81	25	24	295.0	81	35	28
SRFX	12.9	386.3	342.2	101	27	8	299.1	101	37	20
DFLX	13.1	400.1	356.0	76	29	24	299.0	76	43	22
DNFX	11.8	358.1	314.2	71	27	8	340.2	71	31	38
NA	17.4	233.1	214.9	46	23	14	186.9	46	35	14
NFLX	11.3	320.2	276.0	71	25	22	302.2	71	29	24
FQ	18.1	262.1	244.0	51	27	20	202.0	51	45	12

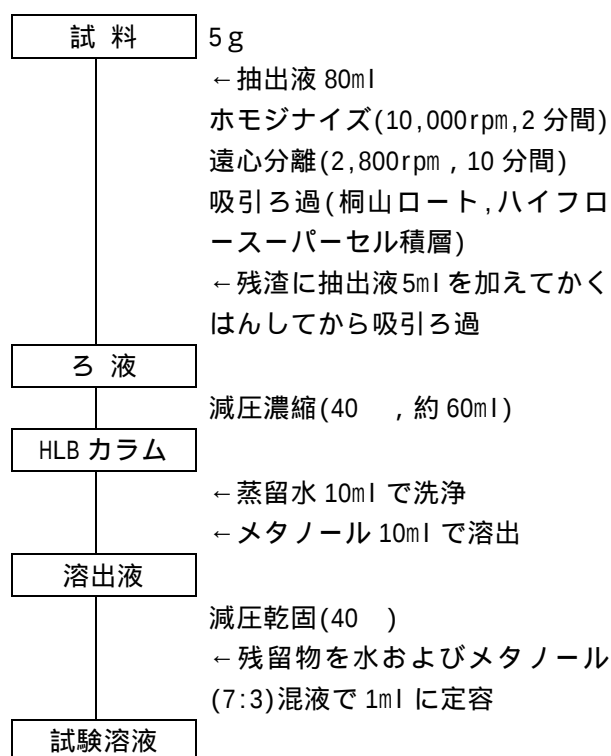


図1 分析方法のフローチャート

15%まで変化させた後、10分間で80%まで変化させ、そのまま2分間保持した。

流速：1.0 ml/min

カラム温度：40℃，注入量：10μl

測定波長：UV；260nm および 280nm，FL；波長タイムプログラム(0分 Ex290nm，Em450nm，17分後 Ex325nm，Em365nm)で測定した。

5 試験溶液の調製

通知法²⁾に準拠し、次のとおり調製した。

(1) 抽出操作

試料 5g に抽出液 80ml を加え、2 分間ホモジナイズした。テフロン製の遠沈管に移し替え、2800rpm で 10 分間遠心分離した後、ろ過補助剤ハイフローズーパーセルを積層した吸引ろ過器(桐山口)を用いてろ過した。残渣に抽出液 5ml を加えてかくはん後、ろ過した。ろ液を 40℃で約 60ml に減圧濃縮した。

(2) 精製操作

Oasis HLB カラム(200mg, 6cc)にろ液を負荷し、蒸留水 10ml で洗浄後、メタノール 10ml で溶出した。溶出液を 40℃で減圧乾固した後、残留物を水およびメタノール(7:3)混液で 1ml に定容し、試験溶液とした。

分析方法のフローチャートを図1に示した。

6 検量線の作成

混合標準液を水およびメタノール(7:3)で希釈して 0.05～1μg/ml の検量線用標準液を調製した。それぞれ HPLC に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。

結果と考察

1 HPLC 分析条件の検討

(1) LC 条件

カラムは Mightysil RP-18(H)を用いて、移動相は 0.1%ギ酸-アセトニトリル系でグラジエント条件を検討したところ、ピーク形状は良好なクロ

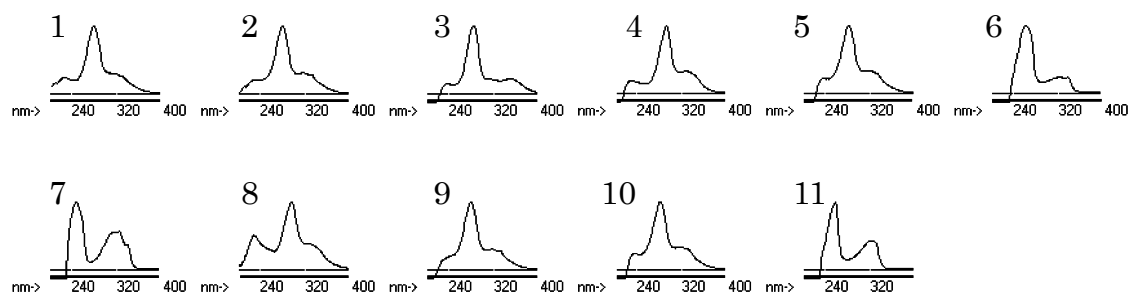


図2 各キノロン剤のUVスペクトル

[1.NFLX, 2.CPFX, 3.DNFX, 4.OBFX, 5.SRFX, 6.OXA
7.FQ, 8.OFLX, 9.ERFX, 10.DFLX, 11.NA (5 μ g/ml)]

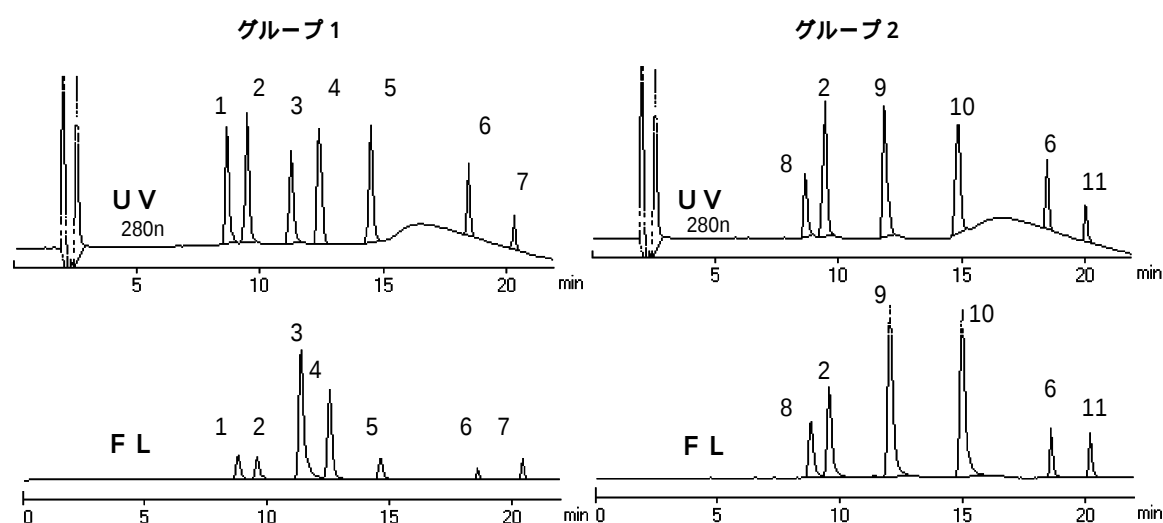


図3 各キノロン剤のHPLCクロマトグラム

[1.NFLX, 2.CPFX, 3.DNFX, 4.OBFX, 5.SRFX, 6.OXA
7.FQ, 8.OFLX, 9.ERFX, 10.DFLX, 11. NA (5 μ g/ml)]

マトグラムが得られたが, NFLX と OFLX のピークを分離することができなかった。そこで, 保持時間が重ならないように分析対象キノロン剤 11 種を 2 グループに分けることとした。

(2) UV 条件

通知法は HPLC-FL で測定し, LC/MS で確認する方法であるが, UV 検出器も併用した。各キノロン剤の紫外外部吸収スペクトルを図2に示した。OXA, NA および FQ は 260nm, その他のキノロン剤は 280nm で測定することとした。

混合標準液のクロマトグラムを図3に示した。

(3) FL 条件

FL の測定波長は, SRFX および DFLX が溶出するまでは Ex290nm・Em450nm とし, それ以降 (17 分以降) は Ex325nm・Em365nm で測定することとした。

混合標準液のクロマトグラムを図3に示した。

2 LC/MS/MS 分析条件の検討

(1) LC 条件

カラムは Xterra MS C18 を用いて, 移動相は 0.05%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル系でグラジエント条件を検討したところ, ピーク形状が良好な MRM クロマトグラムが得られた。

(2) MS/MS 条件

イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブモードで行い, 得られた MRM クロマトグラムを用いて定量した。

アナライザー部の各種パラメータの最適化はインフュージョンポンプを用いて, 成分毎に行った。

イオンソースの各種パラメータの最適化は DNFX を用いて FIA (Flow Injection Analysis) によ

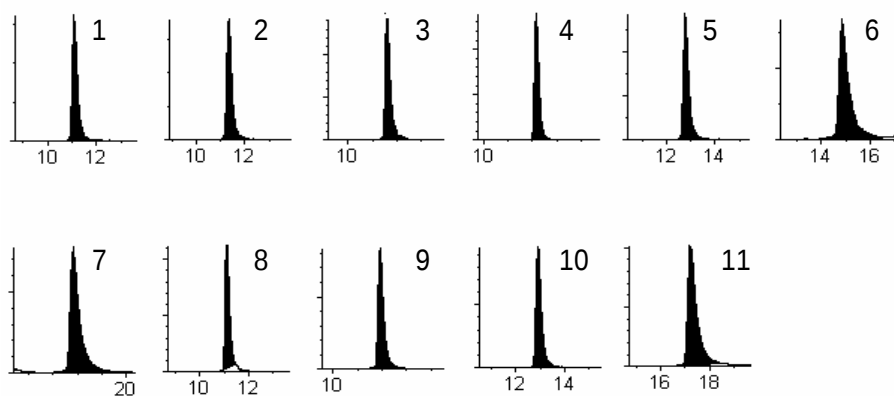


図4 各キノロン剤の LC/MS/MS(MRM)クロマトグラム
 [1.NFLX, 2.CPFX, 3.DNFX, 4.OBFX, 5.SRFX, 6.OXA
 7.FQ, 8.OFLX, 9.ERFX, 10.DFLX, 11. NA (1 μ g/ml)]

表2 試料中のマトリックス成分の影響

キノロン剤	マトリックス標準液/溶媒標準液(%) [*]		
	鶏肉(もも)	ひらめ	鰻
ERFX	108	88	101
CPFX	115	82	91
OXA	137	78	88
OFLX	112	90	97
OBFX	101	96	98
SRFX	98	89	85
DFLX	97	85	92
DNFX	127	95	97
NA	104	88	95
NFLX	104	81	90
FQ	103	88	115

* : 数値は n=2 の平均値, マトリックス標準液および溶媒標準液の濃度は 0.5 μ g/ml

って行った。

各キノロン剤の MS/MS のモニターイオンおよび各パラメータを表1に示した。

混合標準液のクロマトグラムを図4に示した。

3 抽出操作

鶏肉ではろ過の際に目詰まりし時間を要したが, ろ過する前に遠心分離の操作を加えることにより改善した。

4 精製操作

Oasis HLB カラムを 60mg から 200mg に変更したところ, 添加回収率が向上した。

5 定量下限および検量線の直線性

(1) HPLC-UV

定量限界(S/N 10)は DFLX が 0.03ppm, NFLX, CPFX, OBFX および SRFX が 0.02ppm, その他のキノロン剤は 0.01ppm 以下であった。

検量線は, 0.05 ~ 1 μ g/ml の範囲で直線性が得られた。相関係数は 0.980 以上であった。

(2) HPLC-FL

定量限界(S/N 10)はすべて 0.01ppm 以下であった。

検量線は, 0.05 ~ 1 μ g/ml の範囲で直線性が得られた。相関係数は, 0.981 以上であった。

(3) LC/MS/MS

定量限界(S/N 10)は 11 キノロン剤すべて 0.01ppm 以下であった。

各キノロン剤の定量用モニターイオンを用いた検量線は, 0.05 ~ 1 μ g/ml の範囲で良好な直線性が得られた。相関係数は, 0.997 以上であった。

6 LC/MS/MSにおけるマトリックス成分の影響

試料中のマトリックス成分の影響を検証するため, マトリックス標準液(0.5 μ g/ml)と溶媒標準液(0.5 μ g/ml)の面積値(n=2)を比較した。その結果を表2に示した。試料中のマトリックスによりイオン化が抑制または促進されている可能性が推察された。

7 添加回収試験

近年, ブラジル産鶏肉(もも), 韓国産養殖ひらめおよび台湾産鰻等から ERFX が検出されている。当所においても平成 10 年度に県外産の養殖ひらめから OXA を検出している。これらのことから, 鶏肉(もも), ひらめおよび鰻に各キノロン剤を 0.2 μ g/g 添加して回収試験を行った。添加回収試験結果を表3および表4に示した。

表 3 添加回収試験結果(LC/MS/MS)

キノロン剤	回収率(%) [*]					
	鶏肉(もも)		ひらめ		鰻	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV
ERFX	70.3	6.2	56.3	1.8	30.7	4.3
CPFX	70.3	13.7	59.8	5.4	40.4	3.8
OXA	64.5	8.6	94.9	4.7	65.5	2.6
OFLX	77.9	7.3	75.5	1.6	39.9	1.4
OBFX	80.6	4.5	84.9	1.3	72.5	3.7
SRFX	60.9	9.5	58.0	3.1	42.7	3.4
DFLX	67.7	4.8	66.2	3.7	39.0	5.2
DNFX	83.5	4.9	95.3	8.3	47.3	6.1
NA	72.5	5.6	100.6	0.8	72.7	3.1
NFLX	70.1	10.1	69.6	0.3	42.9	5.7
FQ	71.9	9.1	91.4	0.8	82.3	7.3

* : 鶏肉(もも)および鰻は n=3, ひらめは n=2, 添加濃度は 0.2 µg/g

表 4 添加回収試験結果(HPLC-FL)

キノロン剤	回収率(%) [*]			
	グループ 1		グループ 2	
	平均	CV	平均	CV
ERFX	-	-	76.6	2.4
CPFX	69.2	3.3	72.9	2.7
OXA	83.5	1.3	83.3	2.4
OFLX	-	-	79.6	2.8
OBFX	80.7	1.4	-	-
SRFX	72.2	2.2	-	-
DFLX	-	-	77.0	3.2
DNFX	80.6	5.0	-	-
NA	-	-	83.5	2.1
NFLX	74.8	3.1	-	-
FQ	83.9	1.1	-	-

* : n=3, 鶏肉(もも)に 0.2 µg/g 添加

鶏肉(もも)については LC/MS/MS および HPLC-FL で回収試験を実施したところ, どちらの回収率も 60%以上 (LC/MS/MS 60.9~83.5%, HPLC-FL 69.2~83.9%) で, 変動係数も 20%以内であり, 残留分析法として有用であると考えられた。また, LC/MS/MS, HPLC-FL とともに定量を妨害するような

ピークはなく, 選択的に定量をすることができた。HPLC-UV では試料由来のきょう雑物ピークがあり, 定量が困難なキノロン剤があった。

ひらめの回収率は 50%以上 (56.3~100.6%) で, 変動係数は 10%以内であった。

鰻の回収率は OXA, OBFX, NA および FQ については 60%以上で, 変動係数は 10%以内であった。

8 残留調査

ブラジル産鶏肉 2 検体について検査を実施したところ, いずれのキノロン剤も検出しなかった。

ま と め

キノロン剤 11 種の LC/MS/MS および HPLC-FL による一斉分析法について検討したところ, 鶏肉(もも)については良好な結果が得られ, 本法は残留分析法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省監修食品衛生検査指針(動物用医薬品・飼料添加物編), 56, 日本食品衛生協会(2003)
- 2) 厚生労働省通知食安発第 1130004 号, 平成 18 年 11 月 30 日