

## 報 文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による  
乳中のマクロライド系抗生物質の定量竹上 晴美<sup>®1</sup>, 堀江 正一<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>2</sup>

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いた簡易かつ感度の高い乳中のマクロライド系抗生物質, 具体的にはエリスロマイシン, オレアンドマイシン, キタサマイシン, ジョサマイシン, ミロサマイシン, ネオスピラマイシン, スピラマイシン, チルミコシン及びタイロシンの同時分析法を検討した. 試料の前処理には抽出にアセトニトリルを採用し, ヘキサンによる液液抽出によりクリーンアップを行った. 高速液体クロマトグラフ測定条件は, TSK-gel Super ODS カラム (10 mm × 2 mm i.d.), 移動相には 0.2% 酢酸-アセトニトリル系グラジェント溶出法を用いた. 質量分析測定条件のイオン化モードは positive モードが適しており, 測定イオンは  $(M + 2H)^{2+}$  又は  $MH^+$  を用いた. 本法における添加回収率は 0.1 µg/g の添加で 63.8~95.9%, 検出限界は 0.01 µg/g であった.

## 1 緒 言

14 及び 16 員環のラク톤環を基本骨格とするマクロライド系抗生物質 (MLs) は, グラム陽性菌, マイコプラズマ, 連鎖球菌などに対して有効であることから, 畜産動物や養殖魚の感染症治療薬としては用いられている<sup>1)</sup>.

しかし, 一方ではこれら医薬品の畜水産物への移行及び残留が食品衛生上懸念されており<sup>2)</sup>, 畜水産食品の安全性を確保するために残留規制が行われている.

従来, マクロライド系を含む抗生物質の残留分析には一般に微生物学的試験法が用いられてきた. 微生物学的試験法は抗菌性物質の残留の有無をチェックするスクリーニング法としては優れた手法であるが, 選択性に欠ける面があり, 検出された抗菌性物質を特定することは困難である. これに代わる方法として, 紫外部吸収 (UV) 検出器を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) が抗生物質の微量分析には用いられている<sup>3)4)</sup>. 先に著者らはクリーンアップに陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた MLs の分析法を報告した<sup>5)6)</sup>. 陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた試料前処理方法は, 夾雑成分の除去に優れた手法であるが, 操作がやや煩雑な面がある.

最近, 選択性に優れた高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) が残留 MLs の分析に用いられており<sup>7)~11)</sup>, 著者らも LC/MS による食肉中の MLs の同時分析法を報告した<sup>12)</sup>. しかし, 先に報告した分析法<sup>12)</sup>を乳試料に適用

した場合, 前処理中にエリスロマイシン (EM), スピラマイシン (SPM) の分解が見られ, 特に EM はそのほとんどが分解された. EM は MLs の中で最も抗菌活性が強いことから, 最もは用いられている薬剤であり, 特に乳房炎治療薬としていちばん多く使用されている. また, SPM も使用量の多い MLs である<sup>13)</sup>. したがって, 乳中の EM, SPM を感度よく検出・定量することは, 乳の安全性を確保する上で有用と考えられる. そこで, 今回, LC/MS を用いた簡易かつ感度の高い乳中の MLs の同時分析法を検討した.

## 2 実験方法

## 2.1 試料及び試薬

試料は埼玉県内で生産された生乳及び牛乳を用いた.

標準品: ネオスピラマイシン (NSPM) 及びスピラマイシン (SPM) は林純薬工業製, チルミコシン (TLM) は日本イーライリリー製, オレアンドマイシン (OM) は, 日本ファイザー製, ミロサマイシン (MRM) 及びキタサマイシン (KT) は朝日化学工業製, エリスロマイシン (EM) は大日本製薬 (現大日本住友製薬) 製, タイロシン (TS) は武田薬品工業製, ジョサマイシン (JM) は山之内製薬 (現アステラス製薬) 製を使用した.

標準溶液: 標準品 10 mg を精ひょうし, メタノール 10 ml に溶解して標準原液を調製し, 適宜 40% アセトニトリルで希釈して標準溶液とした. なお, 標準原液は 5°C 以下で保存した.

<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

<sup>2</sup> 星薬科大学: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Operating conditions of LC-MS for analysis of macrolide antibiotics

MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization	ESI, Positive	Column	TSK-gel Super ODS (100 × 2 mm)
Fragmentor	Time program	Eluent	Gradient
Nebulizer	N <sub>2</sub> (40 psi)	Flow rate	0.2 ml/min
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500 V	Injection size	5 µl
SIM ion	$m/z$ (M + H) <sup>+</sup> , (M + 2H) <sup>2+</sup>		

Time/min	Fragmentor voltage/V
5.0	60
11.5	100
15.5	150

Time/min	A, %	B, %
0	85	15
20	50	50
25	50	50

A = 0.2% Acetic acid, B = Acetonitrile (containing 0.2% Acetic acid)

Table 2 Typical ions detected for macrolide antibiotics using LC/ESI-MS

Compound	Mw	Base peak ions	Main other ions
Neospiramycin (NSPM)	698.8	350.2 (M + 2H) <sup>2+</sup>	721.5, 699.5, 540.3
Spiramycin (SPM)	843.1	422.3 (M + 2H) <sup>2+</sup>	843.5, 699.5, 540.3
Tilmicosin (TLM)	869.2	435.3 (M + 2H) <sup>2+</sup>	869.5, 695.5
Oleandomycin (OM)	688.9	688.4 (M + H) <sup>+</sup>	670.4, 544.3
Mirosamicin (MRM)	727.9	728.4 (M + H) <sup>+</sup>	554.3
Erythromycin (EM)	733.9	734.5 (M + H) <sup>+</sup>	716.4, 576.3
Tylosin (TS)	916.1	916.5 (M + H) <sup>+</sup>	742.3, 582.3
Kitasamycin (KT)	771.9	772.5 (M + H) <sup>+</sup>	702.5, 558.3
Josamycin (JM)	828.0	828.5 (M + H) <sup>+</sup>	860.4, 786.4

## 2・2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Agilent 製 1100 シリーズ LC/MSD を使用し, Table 1 に示した条件で測定した.

## 2・3 検量線の作成

0.025, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0 µg/ml の混合標準添加溶液を調製し, その 5 µl を LC/MS 装置に注入した. 検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) を採用し, Table 2 に示すモニターイオンより得られたクロマトグラムからピーク面積を求め, マトリックス検量線 (標準添加法) により検量線を作成した.

## 2・4 試験溶液の調製

試料 5 g を採取し, アセトニトリル 30 ml 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて 1 分間ホモジナイズした後, 3500 rpm で 10 分間遠心分離した. 次に上澄みを綿栓濾過後, 減圧乾固し, 40% アセトニトリル 2 ml と *n*-ヘキサン 1 ml を加えて混合した後, 再度 3500 rpm で 10 分間遠心

分離した. *n*-ヘキサン相を除去した 40% アセトニトリル相を試験溶液とし, この 5 µl を LC/MS 装置に供した.

## 2・5 微生物学的試験法

日常検査において公定法としては用いられている「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」<sup>14)</sup> に準拠し, 試験菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis* ATCC 6633), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus* ATCC 9341) 及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides* ATCC 11778) を用いた. 試験菌液及び検査用平板培地の調製及び抗菌活性の測定も前記検査法に準拠し, 簡便なペーパーディスク法を用いた.

## 3 結果及び考察

### 3・1 前処理法の検討

著者らは前報<sup>12)</sup>において除タンパク・抽出溶液として 0.2% メタリン酸とメタノール (6:4) 混液を用いた. しかし, 食肉と異なり試料が乳の場合では, 濃縮前の抽出溶液の pH が 3.8, 約 30 ml に濃縮時では 2.9 となった.

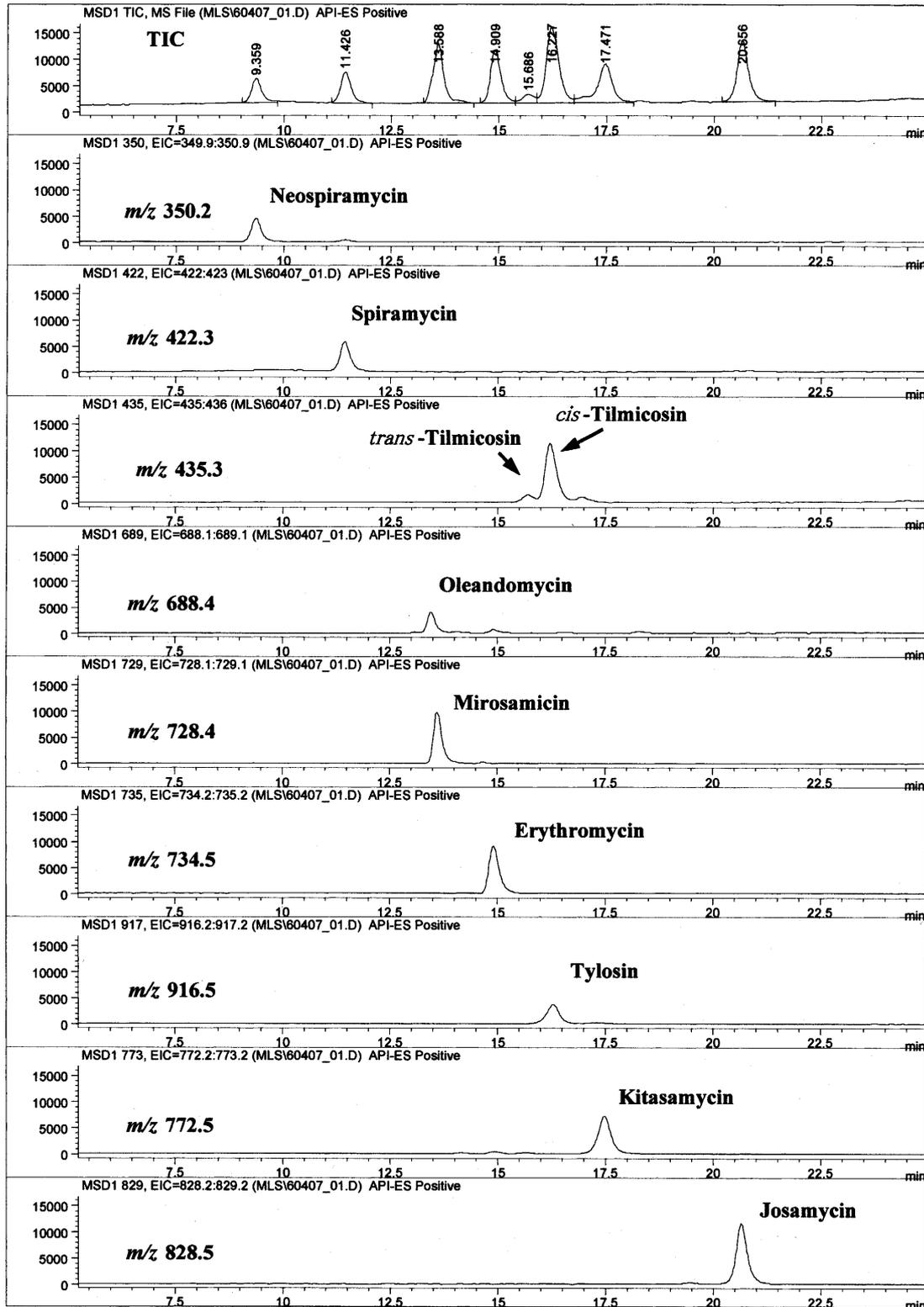


Fig. 1 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of standard mixture ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ )

MLs は一般的に酸に対して不安定とされており, 特に EM は pH が 4 以下であると分解が早いと報告されている<sup>15)</sup>. 乳試料に  $0.1 \mu\text{g/g}$  の濃度で 9 種の MLs を添加した場合, EM は約 95% とそのほとんどが, SPM にあっても約 50%

に分解が見られた. そこで, 除タンパク剤としてメタリン酸を用いない前処理法の検討を試みた.

残留薬物の分析において, メタノール, アセトニトリル及びエタノール等は, 除タンパク効果が優れていることが

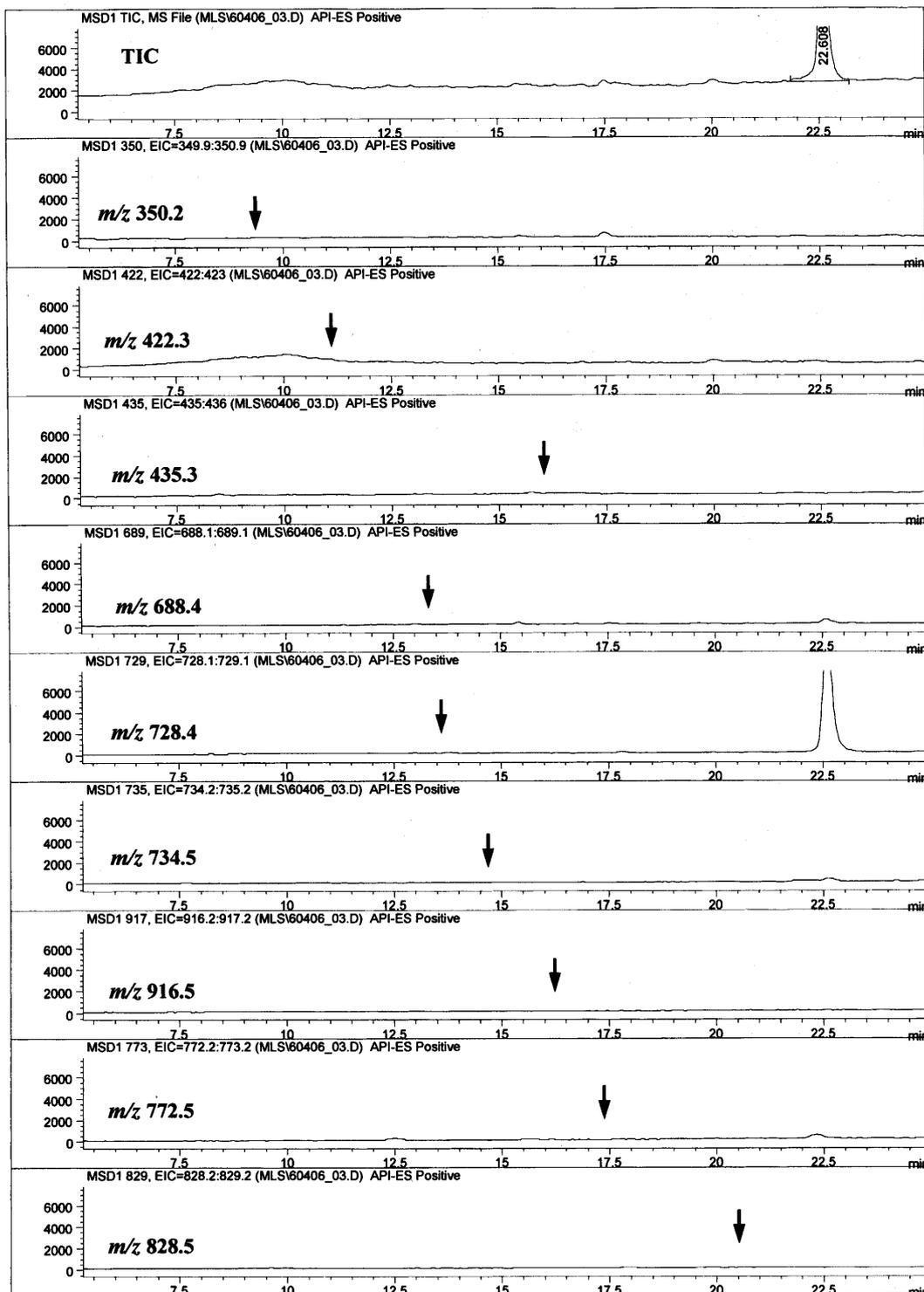


Fig. 2 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract

ら、血液など生体試料の除タンパク剤としては用いられている。しかし、メタノール、アセトニトリル等の有機溶媒で抽出した場合、乳は脂肪も多く含んでいることから、脂質の除去も必要となる。アセトニトリルはヘキサンとの組み合わせにより脱脂操作が容易であり、脂質の除去には用いられている。このような理由からアセトニトリルによる

抽出法を検討した。乳をアセトニトリル 30 ml で抽出した溶液の pH は 6.5 であり、酸性下で最も不安定であると思われる EM の抽出にも本法は適用可能であった。アセトニトリル抽出液を減圧乾固し、40% アセトニトリル 2 ml / ヘキサン 1 ml に溶解させて十分混合することにより、脂溶性の高い脂質や色素成分はヘキサン相に分配される。本

Table 3 Recoveries of macrolide antibiotics from milk

Sample	Added/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery (mean $\pm$ RSD, $n = 5$ ), %								
		NSPM	SPM	TLM	OM	MRM	EM	TS	KT	JM
Raw milk	0.02	70.9 $\pm$ 5.9	90.6 $\pm$ 5.2	97.9 $\pm$ 8.2	76.9 $\pm$ 5.4	74.5 $\pm$ 5.0	76.3 $\pm$ 2.1	84.7 $\pm$ 6.7	78.4 $\pm$ 10.8	99.9 $\pm$ 4.1
	0.1	63.9 $\pm$ 6.9	94.5 $\pm$ 1.6	71.9 $\pm$ 3.2	93.4 $\pm$ 3.6	95.9 $\pm$ 3.4	94.1 $\pm$ 7.8	75.0 $\pm$ 4.3	72.5 $\pm$ 4.9	81.9 $\pm$ 2.1
Pasteurised milk	0.02	79.6 $\pm$ 7.7	94.8 $\pm$ 7.0	105.2 $\pm$ 7.8	99.4 $\pm$ 10.4	89.7 $\pm$ 5.1	86.5 $\pm$ 2.7	73.4 $\pm$ 5.7	89.1 $\pm$ 4.8	87.8 $\pm$ 4.2
	0.1	63.8 $\pm$ 9.3	95.2 $\pm$ 7.7	69.1 $\pm$ 7.5	89.8 $\pm$ 7.0	92.4 $\pm$ 3.6	86.5 $\pm$ 2.5	74.4 $\pm$ 3.5	74.1 $\pm$ 9.2	80.0 $\pm$ 2.8

法により得られた試験溶液及び混合標準溶液の代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。Fig. 2 に示すように、夾雑物の影響を受けることなく、9 種の MLs を分析することが可能であった。

### 3.2 添加回収実験

検量線は 0.025 から 1.0  $\mu\text{g/ml}$  (絶対量として 0.05 ~ 2 ng) の範囲で良好な直線性 ( $r^2 = 0.995$ ) を示した。生乳及び牛乳 (130°C で 2 秒殺菌) に 9 種の MLs を 0.02 及び 0.1  $\mu\text{g/g}$  の濃度に添加し、回収率を求めた。その結果を Table 3 に示す。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分離分析法であるが、イオン化がマトリックスの影響を受けやすいことが短所とされている。そこで、マトリックスの影響の少ない試験溶液の調製が望まれている。

生乳に 0.1  $\mu\text{g/g}$  添加したとき、OM, MRM, EM, TS, KT 及び JM のイオン化は、マトリックスの影響が少なく、絶対検量線による回収率は平均 75% 以上、相対標準偏差 (RSD) も 10% 以内と良好な値であった。しかし、NSPM, SPM 及び TLM はイオン化促進が見られ、見掛け上の回収率は 150% 前後であった。前述したように、LC/MS の分析では、しばしば試料成分の影響で目的成分のイオン化抑制やイオン化促進が見られる場合がある。そこで、マトリックスの影響を補正する目的で、安定同位体標識内標準物質やマトリックス検量線 (標準添加法) が用いられている。本法においても、比較的早く溶出する NSPM, SPM 及び TLM のイオン化がマトリックスの影響を受けることから、マトリックス検量線を用いて回収率を算出することにした。本法による各薬物の回収率は 0.02 及び 0.1  $\mu\text{g/g}$  添加時共に、おおむね 70% 以上、RSD も 15% 以内であり、残留分析法として満足できる値が得られた<sup>16)</sup>。なお、本法による検出限界は、いずれの薬物も 0.01  $\mu\text{g/g}$  ( $S/N = 3$ ) であった。ポジティブリスト制における乳の MLs 基準値は一律基準も含めると 0.01 ~ 2  $\mu\text{g/g}$ <sup>17)</sup> であり、残留分析法として満足すべき感度が得られた。生乳に MLs を 0.1  $\mu\text{g/g}$  及び 0.01  $\mu\text{g/g}$  添加して得られた代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。

本法を用いて、埼玉県内で生産された生乳 3 検体、県内流通品である牛乳 7 検体 (65°C 低温殺菌 3 検体, 130°C

高温殺菌 4 検体)、計 10 検体について残留調査を実施した結果、すべての試料から 9 種の MLs は検出されなかった。なお、10 検体すべてについて、本法の検出限界とした 0.01  $\mu\text{g/g}$  濃度で 9 種の MLs を添加し、9 種の MLs が良好に回収されているか並行検査を実施した。いずれの検体においても 9 種の MLs は、おおむね 60% 以上が回収され、抗生物質ごとの回収率はほぼ同程度であり、異なる乳試料間での相違はほとんど見られなかった。

### 3.3 微生物学的試験法による MLs の検出限界

従来、MLs の残留分析には一般に微生物学的試験法がはん用されてきた。そこで、試験菌 *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 及び *B. mycoides* ATCC 11778 に対する抗菌活性を調べた。MLs の検出限界を Table 4 に示す。MLs は *M. luteus* ATCC 9341 に最も強い抗菌活性を示した。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分析手法であるが、LC/MS により MLs が検出された場合、抗生物質が本来持っている抗菌活性を用いた微生物学的試験法とクロスチェックすることにより、より信頼性の高い結果を得ることが可能である。MLs の抗菌活性は比較的強いことから、微生物学的試験法を用いたクロスチェックは有用と考える。

### 3.4 LC/MS 法と微生物学的試験法との相関

9 種の MLs を個別に添加した試料について、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性を調べた。再現性を考慮し、微生物学的試験法では各試料につき 3 回測定を行い、その平均値を用いた。いずれの抗生物質についても、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性は、 $r^2 > 0.9$  と良好であった。代表例としてジョサマイシン及びエリスロマイシンの結果を Fig. 5 に示す。

現在、動物用医薬品の残留分析に HPLC-UV 法がはん用されているが、短波長領域にしか UV 吸収のない MLs の分析には微生物学的試験法が適用されている。しかし、微生物学的試験法は前述のように選択性に欠ける面があり、検出された抗菌性物質を特定することは困難である。LC/MS は比較的簡易な前処理で同時に多くの薬物を定量

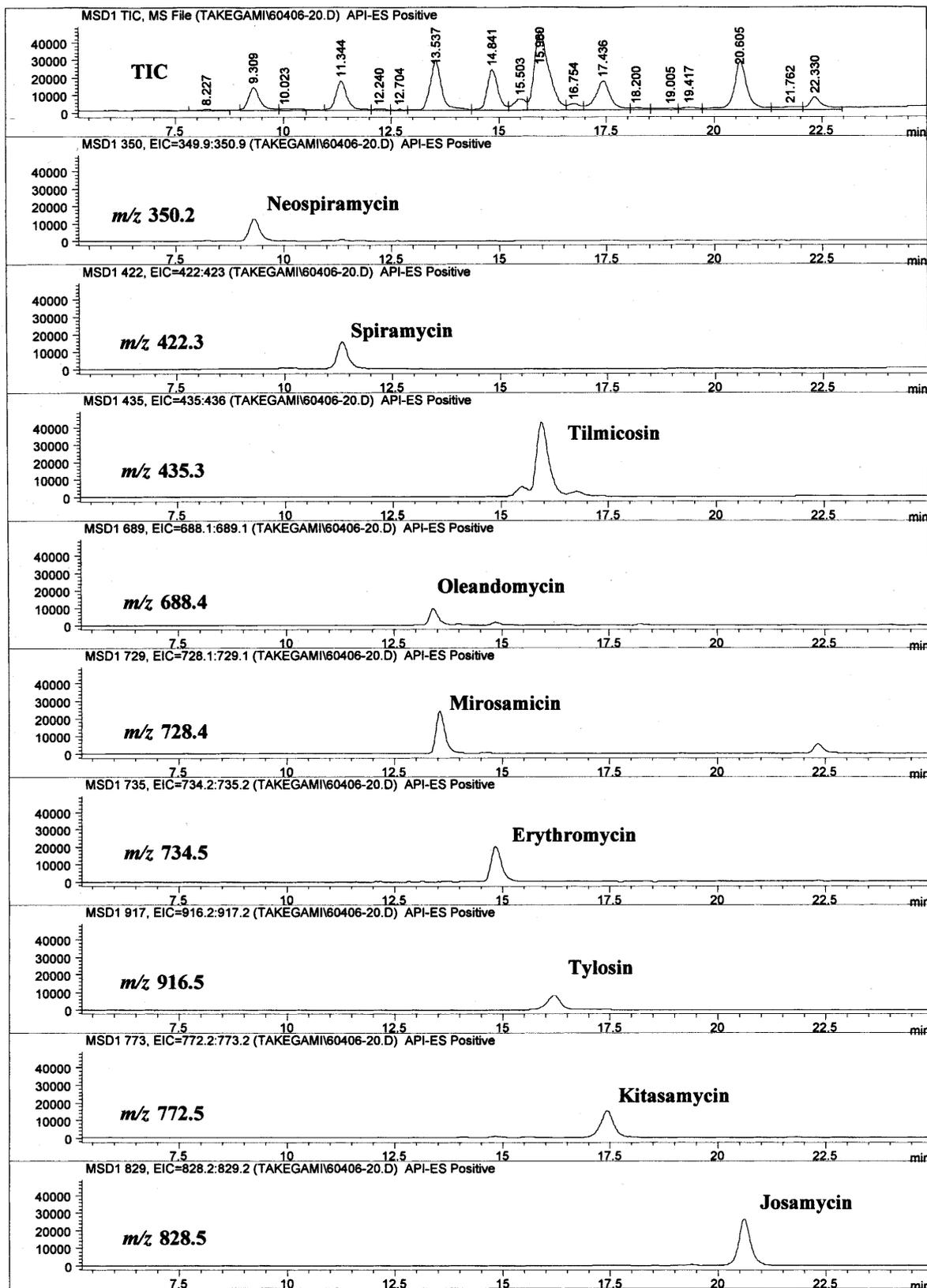


Fig. 3 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at  $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  of each drug

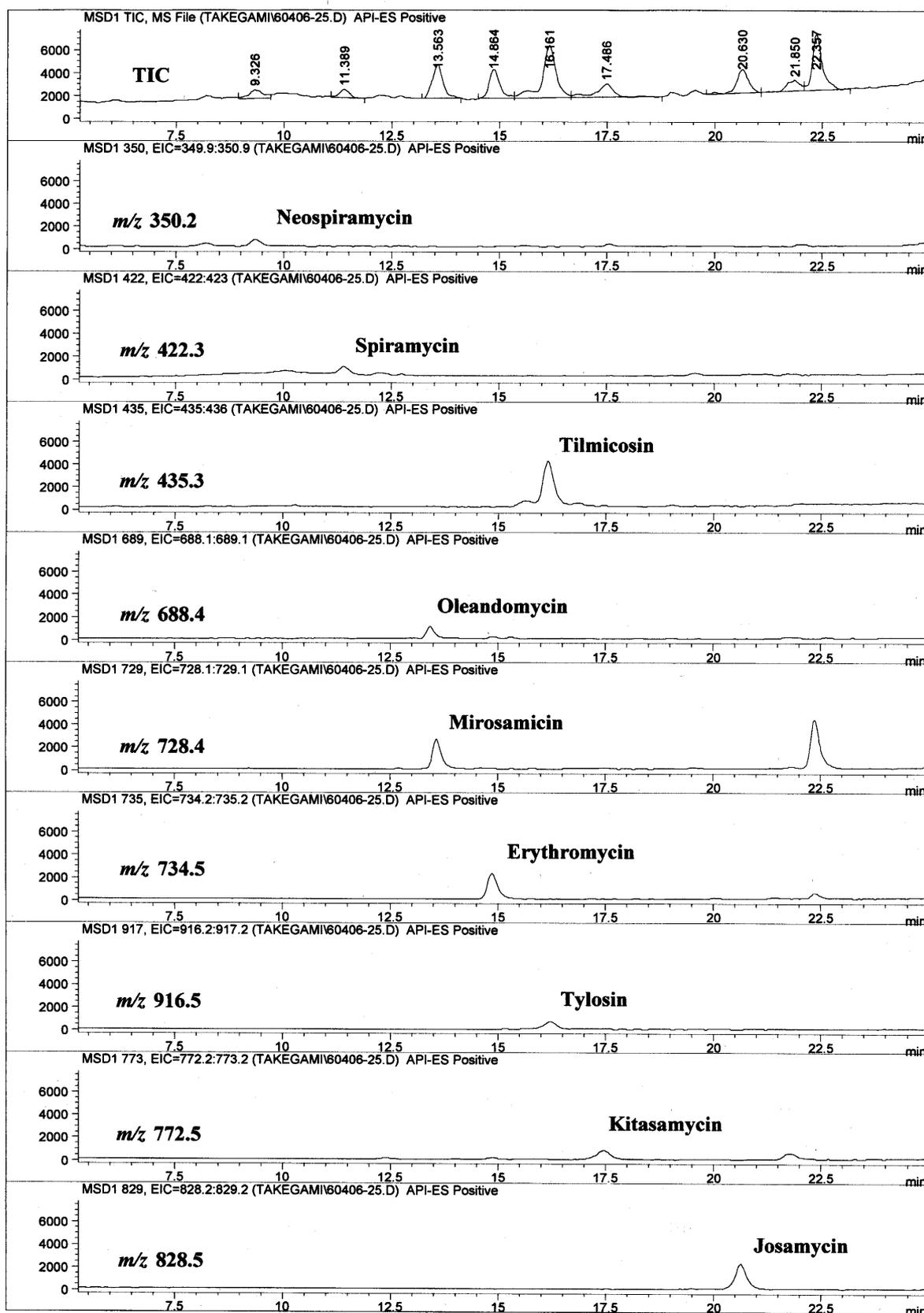


Fig. 4 Typical LC-ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at  $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  of each drug

Table 4 Antibacterial activities of macrolide antibiotics

Compound	Detection limit/ppm		
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>B. mycoides</i> ATCC 11778
NSPM	2.5	1.0	10.0
SPM	1.0	0.5	10.0
TLM	0.5	0.5	2.5
OM	0.5	0.25	5.0
MRM	2.5	0.5	2.5
EM	0.1	0.1	0.5
TS	0.5	0.5	2.5
KT	0.5	0.25	2.5
JM	1.0	0.25	2.5

Each drug was dissolved in 40% acetonitrile.

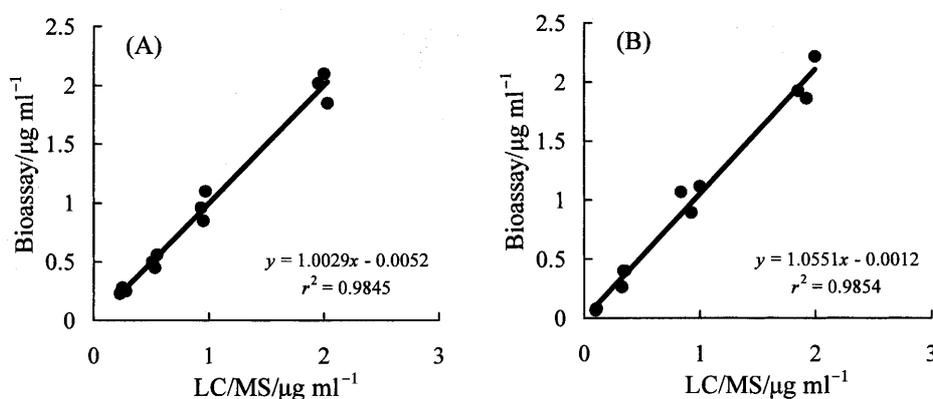


Fig. 5 Correlation between LC/MS and bioassay methods for (A) josamycin ( $y = 1.00x - 0.005$ ;  $r^2 = 0.985$ ;  $n = 12$ ) and (B) erythromycin ( $y = 1.05x - 0.001$ ;  $r^2 = 0.985$ ;  $n = 12$ ) in milk

することが可能であることから、今後ますます有効な分析手法になるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 二ノ宮幾代治: “動物の抗生物質”, p. 307 (1987), (養賢堂).
- 2) 堀江正一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **36**, 329 (1995).
- 3) Kanfer, I, Skinner, M, F. Walker, R. B.: *J. Chromatogr. A*, **812**, 255 (1998).
- 4) J. M. Gaugain, B. Anger, M. Laurentie: *J. AOAC Int.*, **82**, 1046 (1999).
- 5) M. Horie, K. Saito, T. Yoshida, R. Ishii, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. A*, **812**, 295 (1998).
- 6) 堀江正一, 城戸靖雅, 村山三徳, 豊田正武, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **40**, 401 (1999).
- 7) B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders: *J. AOAC Int.*, **79**, 397 (1996).
- 8) W. M. A. Niessen: *J. Chromatogr. A*, **812**, 53 (1998).
- 9) 岡 尚男, 伊藤裕子, 猪飼誉友: 食品衛生学雑誌, **42**, 159 (2001).
- 10) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Achene, A. Caccia: *J. Chromatogr. A*, **926**, 97 (2001).
- 11) M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Dlahaut: *J. Chromatogr. B*, **753**, 189 (2001).
- 12) M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa: *Analytica Chimica Acta*, **492**, 187 (2003).
- 13) 農林水産省動物医薬品検査所年報, No. 30 (1993).
- 14) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: 衛乳第 107 号 (1994).
- 15) D. A. Volmer, J. P. M. Hui: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 123 (1998).
- 16) Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION: “CODEX ALIMENTARIUS VOLUME THREE Residues of veterinary drugs in foods”, p. 67 (1996), (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, Rome).
- 17) 厚生労働省告示: 第 497 号, 498 号 (2005).

## Determination of Macrolide Antibiotics in Milk by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Harumi TAKEGAMI<sup>1</sup>, Masakazu HORIE<sup>1</sup> and Hiroyuki NAKAZAWA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

<sup>2</sup> Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 25 April 2006, Accepted 30 June 2006)

A simple and reliable method using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS) has been developed as an analytical method of macrolide antibiotics, such as erythromycin, oleandomycin, kitasamycin, josamycin, mirosamicin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin and tylosin in milk. The drugs were extracted with acetonitrile, and the extracts were cleaned up by partition with hexane. The extracts were analyzed using LC/MS. The LC separation was performed on a TSK-gel Super ODS column (100 mm × 2 mm i.d.) with a gradient system of 0.2% acetic acid-acetonitrile as the mobile phase. MS acquisitions parameters were established in the positive ESI mode, and the related molecular ions were  $(M + 2H)^{2+}$  or  $(M + H)^+$ . The recoveries of the drugs from milk fortified at a level 0.1 µg/g were 63.8~95.9% with high precision. The limits of detection of the drugs in milk were 0.01 µg/g.

**Keywords** : macrolide antibiotics ; erythromycin ; oleandomycin ; kitasamycin ; josamycin ; mirosamicin ; neospiramycin ; spiramycin ; tilmicosin ; tylosin ; milk ; LC/MS.