環境水中に存在する合成抗菌剤（サルファ剤）の HPLC 及び LC/MS/MS 分析法検討

西下 司, 漆畑 正人, 五十嵐圭介

株式会社静環検査センター 本社環境研究所 (〒426-0041 静岡県藤枝市高柳2310)

[平成16年12月27日受理]

Determination of Sulphonamide Antibiotics in Environmental Water with HPLC and LC/MS/MS

Tsukasa NISHISHITA, Masato URUSHIBATA and Keisuke IGARASHI

Seikan Environmental Institute Co., Ltd.
(2310 Takayanagi, Fujieda, Shizuoka 426-0041)

[Received December 27, 2004]

Summary

A method for determination of thirteen sulphonamide antibiotics in environmental water was described using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Sulphonamide antibiotics were extracted from aqueous samples by polystyrene-divinylbenzene copolymer solid phase. This solid phase extraction (SPE) was affected with pH of samples and could recover 12 sulphonamide antibiotics with pH 4~5. The limit of detection and reproducibility for the method ranged from 0.20 to 1.6 ng/ℓ and ranged from 1.3 to 13.1 % c.v.

Key words: sulphonamide antibiotics, environmental water, solid phase extraction, LC/MS/MS

1. はじめに

国内の畜水産業は、そのほとんどが生産性の高い多頭羽集団飼育によって行われているため、生理に反した過密飼育による各種の疾病が発生し易くなっている。そのため、これらの予防、治療のために抗菌性物質が多量に使用される傾向にあるが、同時に使用薬剤の畜水産物から環境中への移行、残留が懸念されている^{1,2)}。抗菌性物質とは、細菌による感染症の治療薬として使用され、動物用医薬品としては重要かつ最も製造承認数が多い医薬品であり、微生物の産生する抗生物質と化学合成品である合成抗菌剤に大別できる。抗菌性物質の摂取によるヒトへの影響としては、直接毒性や腸内細菌叢への影響、

アレルギー発現、薬剤耐性菌の出現などが指摘されている³⁾。使用薬剤の食肉、乳、卵および魚介類などへの残留は食品衛生法の「食品、添加物等の規格基準」により規制されているが、今後食品以外の環境中からの摂取も考慮していく必要があると考えられる。ヒト用も含め、医薬品の環境中への排出量を調査した報告例は欧米諸国を中心に比較的多く存在する³⁻⁵⁾のに対し、国内における報告例はあまり見られない。今後は、特に医薬品の継続的に排出されている可能性が高いと思われる農業排水、畜産排水、下水処理放流水から河川水への流入、代謝までの軌跡について把握していくことが望まれる。

そこで本研究では、抗菌性物質の環境水中残留濃度の分析データを短期間で多量に蓄積するために必要となる

であろう簡便で信頼性の高い分析方法を確立することを目標とした。つまり、固相抽出を使用することにより前処理工程を簡略化し、選択性の高い検出器を使用することにより低濃度までモニタリングを可能とする分析法について検討を行った。今回の分析対象となる抗菌性物質としては、国内において製剤の種類および使用量が比較的多い合成抗菌剤の一種であるサルファ剤13種を選択した。

2. 実験

2. 1 試薬

Sulfadoxine は関東化学(株)製、Sulfisomidine は和光純薬工業(株)製、その他サルファ剤11種は Sigma 社製を用いた。各サルファ剤をメタノールで溶解し、適時10%メタ

ノールで希釈して使用した。アセトニトリルは関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフ用、メタノールはキシダ化学(株)製の残留農薬試験用(5000倍濃縮検定品)を用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。

固相抽出カートリッジは、共に逆相系であるスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填した Sep-Pak PS-2 (Waters 社製) およびオクタデシルシリルシリカを充填した Bond Elut C18 (Varian 社製)を用いた。使用直前にメタノール10mℓ、蒸留水10mℓでコンディショニングして使用した。測定対象物質の化学構造を Fig. 1 に示した。

2. 2 試料前処理

試料500mℓを0.1M塩酸でpH4.0に調整し、コンディショニングした固相抽出カートリッジ (Sep-Pak PS-2)

Fig. 1 Structures of sulphonamides

に10mℓ/min で加圧通水した。蒸留水10mℓ で洗浄後、30分間吸引乾燥して固相内の水分を除去した。メタノール10mℓ で溶出し、窒素吹き付けにより溶媒を除去後、10%メタノール水溶液で1 mℓ に定容して試験溶液とした。

2. 3 装置, 測定条件

高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器 (HPLC/PDA) は、Waters 社製 AllianceHT 2795および 2996 PADを使用し、カラムは関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP aqua (250mm, 4.6mm i.d.) を使用した。高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) は、Agilent Technologies 社製1100 series および Applied Biosystems 社製 API2000を使用し、カラムは関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP (100mm, 2.0mm i.d.) を使用した。測定条件を Table 1 および 2 に示した。

2. 4 試料

静岡県内の一級河川下流域 (試料 A) および二級河川支流 (試料 B)、養鶏場地下水 (試料 C)、下水処理場放流水 (試料 D) の4 試料を採取した。試料 A は県内有数の清流地点であり、飲料水原水の取水場がある。試料 B は農業地帯にあり、上流域に畜産場および肥料製造工場がある。試料 C は養鶏場付近の井戸水であるが、飲用にも使用されている。試料 D は浄化センター放流水であり、主に農業排水、生活排水が流入している。いずれも平成16年7月に採取した。

3. 結果

3. 1 測定条件

食品分野における残留合成抗菌剤の分析に使用される検出器としては紫外分光光度検出器 (UV) や PDA が最

Table 1 Conditions of HPLC/PDA

HPLC Waters Alliance HT 2795	
Column	Mightysil RP-18 GP aqua (250mm, 4.6mm i.d.)
Mobile Phase	A: 0.1% Phosphoric acid B: MeOH 95% A (5min.) – liner gradient 45min. – 65% B
Flow Rate	1.0 mℓ/min.
Oven Temp.	40 °C
Injection Volume	10 μℓ
Detector	PDA (UV 270nm)

Table 2 Conditions of LC/MS/MS

HPLC Agilent 1100	
Column	Mightysil RP-18 GP (100mm, 2.0mm i.d.)
Mobile Phase	A: Water B: MeOH 90% A – liner gradient 20min. – 50% B
Flow Rate	0.2 mℓ/min.
Oven Temp.	25 °C
Injection Volume	10 μℓ
MS Applied Biosystems API2000	
Ionization Mode	ESI
Polarity	Positive
Mode	MRM
Ionspray Voltage	4200 V
Collision Energy	23 eV
Probe Temp.	500 °C

も普及しており，操作も簡便である。特にサルファ剤の多くは270nm 付近の紫外部に吸収を持つことから，一斉分析が可能であると考えられる⁵⁻⁸⁾。したがって，まず最初に HPLC/PDA による検出を試みた。混合標準液のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。各サルファ剤の吸収極大波長は Sulfamethazine (SDD) の241.5nm から Sulfathiazole (STZ) の283.0nm の範囲に確認できたが，平均して吸収強度が得られた270nm をモニターすることとした。全体的に良好なピーク形状と分離が得られたが，Sulfadiazine (SDZ) と Sulfisomidine (SID)，Sulfamonomethoxine (SMMX) と Sulfadoxine (SDX) は完全分離が困難であった。Table 3 は5回繰り返し測定によ

る標準偏差 S 及び変動係数 (C.V.)，標準偏差から得られる装置の検出限界 (IDL) である。SMMX と SDX は他のサルファ剤と比較して C.V. 値が高めであるが，クロマトグラフ上の分離が不十分であるためであると考えられる。IDL は0.13~0.41ng であった。

次に，HPLC/PDA では分離困難であったピークを質量により識別し，かつ検出限界を下げる事が期待できる LC/MS/MS による検出を試みた。LC/MS/MS による混合標準液の MRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。各サルファ剤のベースピークはいずれも $[M + H]^+$ であったため， $[M + H]^+$ をプリカーサーイオンとした。プリカーサーイオンの衝突誘起解離により生成したプロダク

Fig. 2 HPLC/PDA chromatogram of sulphonamides

Table 3 Repeatability and limit of detection for Installation of HPLC/PDA

Component	S (n=5)	C.V.(%)	IDL (ng)
SG	5.7	5.5	0.17
SDZ & SID	11.4	5.5	0.34
SMR	5.5	5.1	0.16
SDD	7.2	7.2	0.22
SMMX	13.5	13.8	0.41
SDMX	9.4	9.0	0.28
SDX	10.2	18.7	0.30
SMP	5.5	5.5	0.16
SCP	4.4	4.4	0.13
SQX	6.4	6.4	0.19
STZ	7.1	6.5	0.21
SMXZ	7.1	7.4	0.21

トイオンのベースピークは、ほとんどのサルファ剤が $[M-NH-R]^+$ (m/z 156) であったが、SDDとSIDのみ $[NH-R]^+$ (m/z 124) であった。HPLC/PDAでは分離が困難であったSDZとSIDはベースライン分離が可能となった。これは使用カラムの官能基と移動相の差によるものと考えられる。一般的にサルファ剤のような塩基性化合物は、移動相のpHを下げることによってカラム充填剤表面のシラノール基のイオン化を抑えてピーク形状を改善するが、逆にピークの分離度が悪化する傾向がある。今回はピークの分離度を上げることを優先して移動相を中性付近に設定した。SMMXとSDXは、HPLC/PDAとはほぼ同様に分離が不十分ではあったが、プリカーサーイ

オンの違い (SMMX m/z 281→156, SDX m/z 311→156) による識別、同定が可能となった。Table 4はLC/MS/MS測定における標準偏差 (S) 及び変動係数 (C.V.), 標準偏差から得られる装置の検出限界 (IDL) である。SMMXとSDXの同定が可能となったことにより、C.V.値が大きく改善されている。逆に、SDDとSulfamethoxazole (SMXZ)はC.V.値が若干高くなったが、これはプロダクトイオンの強度が他のサルファ剤と比較して低いことと、移動相のpHが中性であることによりピークの半値幅が広がったためであると考えられる。IDLは1.0~7.8pgであり、HPLC/PDAによる検出と比較して1/100程度にすることができた。

Fig. 3 LC/MS/MS chromatogram of sulphonamides

Table 4 Repeatability and limit of detection for Installation of LC/MS/MS

Component	Monitoring Ion	S (n=5)	C.V. (%)	IDL (pg)
SG	215 / 156	0.045	9.8	4.5
SDZ	251 / 156	0.027	6.5	2.7
SMR	265 / 156	0.026	6.4	2.6
SDD	279 / 124	0.078	18.5	7.8
SMMX	281 / 156	0.043	11.5	4.3
SDMX	311 / 156	0.015	4.6	1.5
SDX	311 / 156	0.015	4.0	1.5
SID	279 / 124	0.024	5.9	2.4
SMP	281 / 156	0.035	9.8	3.5
SCP	285 / 156	0.016	4.7	1.6
SQX	301 / 156	0.010	3.5	1.0
STZ	256 / 156	0.014	4.0	1.4
SMXZ	254 / 156	0.065	17.2	6.5

3. 2 前処理条件

固相抽出は、食品中の残留抗生物質や抗菌剤の分析において脂質等の夾雑物の除去に使用されている^{1,6,8)}。また、水道水や環境水中の微量有機成分（農薬等）の効率的な捕集方法として従来の液/液抽出法に替わり多用されるようになった⁹⁾。今回はこれらの方法を参考にする事とした。

蒸留水500mlに測定対象物質を各100ng添加し、0.1M塩酸でpHを調整して固相カートリッジに通水後、吸引乾燥して固相内の水分を除去した。メタノール10mlで目的成分を溶出し、窒素吹き付けにより溶媒を除去後、10%メタノール水溶液で1mlに定容したものを試験に供した。固相カートリッジとしてSep-Pak PS-2およびBond Elut C18を比較し、試料pHを4～9に変化させて回収率をみた。試料のpH変化による回収率の変動をFig. 4に示した。Bond Elut C18では対象物質すべての回収率が50%以下であり、この前処理条件は適用できなかった。オクタデシルシリルシリカ（ODS）系のBond Elut C18は、対象物質に含まれるNH₂基などの塩基性基との二次相互作用（水素結合）により、対象物質を強く保持する傾向がある。したがって、溶出液を酸性にすることにより回収できると思われるが、今回の中性移動相を使用するHPLC条件では試験液を酸性にすることによるピーク分離度の低下がみられた。一方、Sep-Pak PS-2ではSulfaguanidine (SG)を除きpH6以下で安定して対象物質が回収できた。SGは他のサルファ剤と比較してオクタノール-水分分配係数（LogPow）が低く、極性が高いことからポリマー系のPS-2では保持することが困難であったと考えられる。

以上の結果より、今後の操作では試料をpH4～5に調整しPS-2を使用して環境水分析を行うこととした。

3. 3 環境水分析

2.2の操作に従って2.4に挙げた環境水への適用を試みた。添加回収試験は、各環境水500mlに測定対象物質を各100ng添加し、5回の繰り返し試験を行って平均回収率と変動係数（C.V.）を算出した。さらに、標準偏差より得られる分析条件の検出限界（LOD）も算出した。定量結果及び添加回収試験結果をTable 5に示した。LODは0.20～1.6ng/lとなりpptオーダーで分析可能となった。C.V.値においても1.3～13.1%と良好な結果が得られた。回収率は、試料A, B, Cの3つにおいてSGを除き88.6～128.7%となり概ね良好な結果が得られたが、試料Dは22.2～71.7%と低い値を示した。試料Dのような下水処理場放流水は、有機物や固形分（ss 6.2mg/l）等の夾雑物が多く含まれ、対象物質の固相への保持を阻害、あるいはMS/MS測定において対象物質のイオン化効率を低下させたと考えられるが、今後の検討課題となった。河川水及び地下水からは、試料BのSulfaquinoxaline (SQX)が検出限界付近で検出されたのみだったが、試料Dの下水処理場放流水からはSDZ, SIDおよびSulfachloropyridazine (SCP)が検出された。特にSDZは29ng/lと比較的高濃度で検出された。Fig. 5にSDZおよびSCPの標準物質（a）、試料Dに添加した標準物質（b）、および試料D（c）のクロマトグラムを示した。SDZおよびSCPのいずれにおいてもクロマトグラム上では妨害なく定量が可能であることが確認できた。

4. 考察

今回の検討で採用した前処理条件では、13種類のサルファ剤のうちSGを除く12物質で良好な結果が得られた。スチレンジビニルベンゼン共重合体系の固相の保持

Fig. 4 Variation of recovery of sulphonamides with pH value by (a) Sep-Pak PS-2 and (b) Bond Elut C18

能力は一般的に LogPow に依存しており、SG のような LogPow が低い物質は保持され難い。このような高極性物質の捕集には充填剤として活性炭を使用した固相が使用される例があり、逆相系固相と活性炭固相を直列に繋いで使用するタンデム型固相抽出法を検討している⁹⁾。この手法により、疎水性物質の捕集と同時操作で SG も回収されることが期待される。また、今回の前処理方法は比較的きれいな環境水において有用であることが示された一方、下水処理場放流水のような有機物等の夾雑成分の多い試料ではクリーンアップ操作が必要であることも示唆された。しかし、適当なサロゲート物質の入手が

困難な対象物質の分析において、前処理工程をできる限り簡略化して回収率の低下を抑えることも本検討の目的の一つであることから、抽出後の固相を有機溶剤で洗浄する操作を検討した。その結果、試料を固相に通水後、20%メタノール水溶液 5 ml で洗浄することによって対象物質の回収率の低下を抑えながら夾雑成分をある程度除去できることが分かってきた。以上の結果を踏まえ、本検討で確立された分析法は地下水から下水道放流水までの広範囲の試料をカバーできるであろうことが示唆された。

今回の検討では、4 種類のサルファ剤が検出された。

Table 5 Quantitative analysis of environmental water samples, recovery, repeatability and limit of detection for method (n =5)

Component	LOD (ng/ℓ)	Sample A		Sample B		Sample C		Sample D	
		Conc.	Recovery (%)	Conc.	Recovery (%)	Conc.	Recovery (%)	Conc.	Recovery (%)
		(ng/ℓ)	C.V. (%)	(ng/ℓ)	C.V. (%)	(ng/ℓ)	C.V. (%)	(ng/ℓ)	C.V. (%)
SG	0.91	N.D.	5.5	N.D.	2.2	N.D.	4.0	N.D.	2.6
			9.7		2.8		7.0		8.3
SDZ	0.54	N.D.	117.7	N.D.	111.5	N.D.	118.8	29	22.2
			5.3		7.3		4.0		2.8
SMR	0.52	N.D.	111.8	N.D.	111.8	N.D.	114.0	N.D.	71.7
			4.9		3.5		2.1		3.0
SDD	1.6	N.D.	89.5	N.D.	89.6	N.D.	94.6	N.D.	59.3
			3.1		4.0		5.6		5.5
SMMX	0.87	N.D.	96.5	N.D.	104.5	N.D.	103.3	N.D.	67.7
			4.1		2.8		6.1		13.1
SDMX	0.30	N.D.	94.6	N.D.	103.0	N.D.	99.2	N.D.	49.3
			5.3		5.1		4.3		4.8
SDX	0.30	N.D.	106.4	N.D.	109.8	N.D.	111.4	N.D.	65.8
			3.3		2.0		4.3		11.0
SID	0.47	N.D.	99.0	N.D.	97.5	N.D.	110.7	0.7	65.8
			5.8		7.0		9.9		5.8
SMP	0.70	N.D.	98.3	N.D.	100.5	N.D.	103.7	N.D.	63.5
			3.2		2.0		6.2		10.8
SCP	0.33	N.D.	123.3	N.D.	123.0	N.D.	128.7	1.5	63.3
			2.0		4.6		6.4		10.1
SOX	0.20	N.D.	107.8	0.5	111.0	N.D.	113.9	N.D.	48.3
			5.3		7.7		2.4		7.2
STZ	0.29	N.D.	101.0	N.D.	99.7	N.D.	104.6	N.D.	67.2
			4.1		2.6		6.8		4.3
SMXZ	1.3	N.D.	88.6	N.D.	90.4	N.D.	94.3	N.D.	38.1
			1.3		3.0		6.7		10.7

N.D. : not detected

Fig. 5 LC/MS/MS chromatogram of SDZ and SCP: (a) standard, (b) “sample D” spiked with standard, (c) unspiked “sample D”.

試料Bから検出されたSQXは、養鶏場において飲水添加投与されることが多い動物用医薬品であることから、河川に排水流入する可能性は高いと考えられる。同様に、試料Dから検出されたSCPは豚に対して飼料添加、飲水添加投与に使用され、SDZは牛に対して乳房注射投与に使用されることが多い。特にSDZについてはスルファジアジン銀としてヒト用医薬品にも使用され、化膿性疾患用塗布剤として市販されている。実際、欧州の都市下水の一次、二次処理水からSDZが26~100ng/ℓ検出されたとの報告例もある⁹⁾。今回検出された原因がヒト用医薬品由来なのか、動物用由来なのかは判断することが難しい。しかし、これらの医薬品は排出規制も無く、継続的に環境中に排出されている可能性が高いことからヒトに限らず、生態系に対する影響は無視できないのではないかとと思われる。今後は、さらに調査対象とする動物用医薬品を拡大し、医薬品の使用暦から排出量の季節変動までを系統的に調査していきたいと考えている。

要 約

合成抗菌剤の一種であるサルファ剤13種についてHPLC/PDAおよびLC/MS/MS分析を行った。HPLC/PDA

では分離不十分であったピークがLC/MS/MS分析によって識別定量可能となった。河川水、放流水等の環境水分析では、試料のpHを4~5に調整し、スチレンジニルベンゼン共重合体系の固相を使用することにより12物質において再現性良く回収できた。各対象物質の検出限界は0.20~1.6ng/ℓ、変動係数は1.3~13.1%であった。

文 献

- 1) 中澤裕之, 堀江正一:「食品に残留する動物用医薬品の新知識」, 食品化学新聞社, 東京 (1998)
- 2) 山本誠二: 家畜より排泄された動物用医薬品などの堆肥中での消長と植物体への移行残留, 畜産技術, **578**, 5-8 (2003)
- 3) Yang, S., Cha, J. and Carlson, K.: Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2131-2145 (2004)
- 4) Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P.: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**,

- 1319-1330 (2003)
- 5) Hartig, C., Storm, T. and Jekel, M.: Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **854**, 163-173 (1999)
 - 6) Reimer, G.J. and Suarez, A.: Liquid chromatographic confirmatory method for five sulfonamides in salmon muscle tissue by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.*, **75**, 979-981 (1992)
 - 7) 石井里枝, 堀江正一, 星野庸二, 徳丸雅一, 能勢憲英: フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いた畜水産物中の残留抗菌性物質の一斉分析法, 食品衛生学雑誌, **35**, 173-179 (1994)
 - 8) Ito, Y., Oka, H., Ikai, Y., Matsumoto, H., Miyazaki, Y. and Nagase, H.: Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis. V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **898**, 95-102 (2000)
 - 9) 松山勝江, 竹村悦子, 千葉寿茂, 羽隅邦彦: 固相抽出 GC/MS 法によるゴルフ場農薬の一斉分析について, 福島県衛生公害研究所年報, **15**, 122-124 (1997)