

# 高速液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法による テトラサイクリン類試験法の妥当性評価

吉井 要 小石 智和 濱尾 誠 土田 貴正  
小島 大輝 近藤 綾 北野 隆一 浅井 紀夫

## Validation of a High Performance Liquid Chromatography –Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitative Determination of Tetracyclines

Kaname YOSHII Tomokazu KOISHI Makoto HAMAOKA Takamasa TSUCHIDA  
Daiki KOBATA Aya KONDO Ryuichi KITANO Norio ASAI

高速液体クロマトグラフィー – 質量分析法によるオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの簡便な試験法を確立した。この試験法について「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(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. 食安発1224第1号)に基づき、エビ及びカンパチについて妥当性評価を実施したところ、標準品添加回収率79.8~101.5%、併行精度4.1~6.2%、室内精度6.2~13.7%と良好な結果であり、全ての項目で同ガイドラインの目標値を満たしたことから、本試験法が行政検査に適用できることが確認できた。

キーワード：抗生物質、テトラサイクリン、妥当性評価、高速液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析  
Keywords：Antibiotics, Tetracyclines, Validation, Liquid chromatography –tandem mass spectrometry

### はじめに

食品中に残留する動物用医薬品は、食品衛生法においてポジティブリスト制度による成分規格で規制されている。食品衛生法に定める規格基準への適合性を判断するためには、その試験法について「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(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. 食安発1224第1号、以下、ガイドライン)に基づく妥当性評価の実施が求められている。

当所では、食品中に残留する動物用医薬品の検査として、オキシテトラサイクリン(以下、OTC)、クロルテトラサイクリン(以下、CTC)及びテトラサイクリン(以下、TC)の3種のテトラサイクリン系抗生物質について厚生労働省通知(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 平成17年1月24日. 食安発第0124001号、以下、試験法通知)に規定する個別試験法に準じた方法で検査を実施している。平成26年度の当所年報にて蛍光検出による高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)を用いたエビのテトラサイクリン系抗生物質検査の妥当性評価について報告し<sup>1)</sup>、このHPLCによる試験法をカンパチ(スズキ目魚類)にも適用した。

このHPLC試験法の課題として、対象化合物ごとに移動相を異なる組成で使用し、さらにエビにおいては妨害ピークの重なりを避けるため検体ごとにも移動相を異なる組成で使用する必要があった。また、カンパチにおいてはCTCの標準品添加回収率が妥当性評価の目標値を下回り、CTCを報告対象

外としていた。今回、分析の作業量、時間、妥当性に関わるこれらの課題を解決するため、分析方法についてHPLCから高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(以下、LC-MS/MS)に変更するとともに前処理方法を検討して、簡便かつ短時間で実施できる試験法を確立し、エビ及びカンパチにおいて妥当性評価を実施したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 試料

市販のエビ及びカンパチの切り身をミキサーで均一化し、凍結と融解を繰り返さないよう約10gずつ分取し冷凍保存しておいたものを試料とした。

#### 2. 対象化合物

対象化合物は、OTC、CTC、TCの3物質とした。

#### 3. 試験法

##### 3-1. 試薬及び機器

標準品はオキシテトラサイクリン塩酸塩標準品、クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品及びテトラサイクリン塩酸塩標準品(いずれも高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業(株)製)を使用した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(以下、EDTA)は(株)同仁化学研究所製を使用し、アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用を、その他試薬は全て特級を使用し、いずれも和光純薬工業(株)製を使用した。セラミックホモジナイザーは、Agilent Technologies社製を使用した。ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重

(令和3年1月26日受理)

合体ミニカラムはOasis PRiME HLB (6cc, 200mg, Waters社製)を使用した。高速液体クロマトグラフシステムは、Nexera X2 ((株) 島津製作所製)を、タンデム型質量分析計はQTRAP4500 (AB Sciex社製)を使用した。分析カラムはInertSustainShift C18 (内径2.1mm、長さ150mm、粒径5 $\mu$ m、ジーエルサイエンス(株)製)を使用し、ガードカラムにCartridge Guard Column Ei (内径2.1 mm、長さ10mm、粒径5 $\mu$ m、ジーエルサイエンス(株)製)を使用した。

### 3-2. 試験溶液の調製方法

本検討開始時の試験溶液の調製フローを図1に、妥当性確認時の試験溶液の調製フローを図2に示す。

検量線の作成に使用する混合標準溶液は、標準品をそれぞれメタノールで溶解し1000 $\mu$ g/mLの標準原液を作製し、それらを混合して0.1% (w/v) ギ酸水溶液で段階的に希釈して調製した。

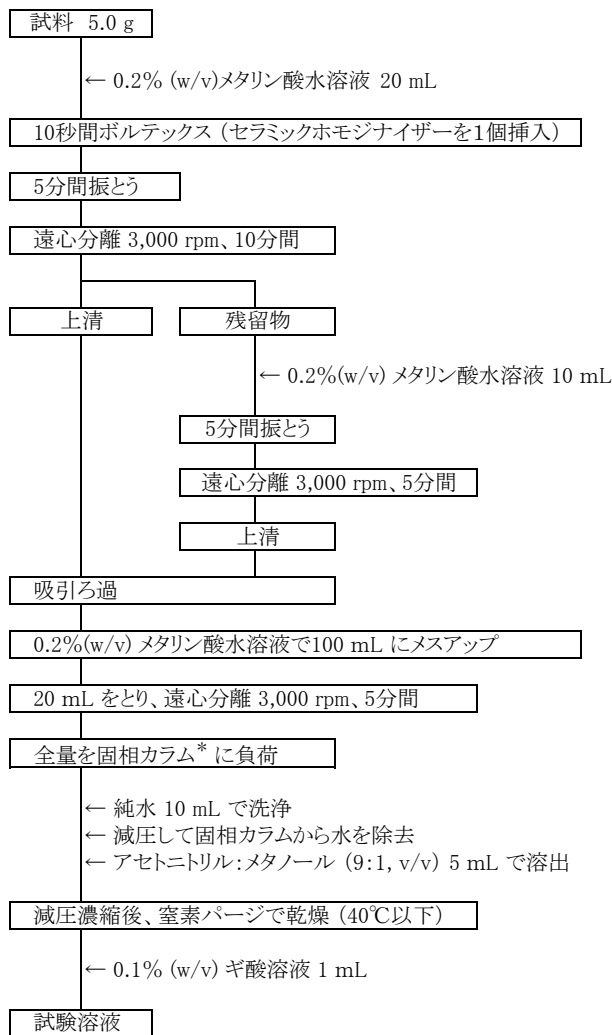


図1. 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による試料 (エビ、カンパチ) 中のテトラサイクリン類定量のための前処理フロー図 (検討開始時)。\*Oasis PRiME HLB

### 3-3. 測定条件

LC-MS/MSによる試料の測定条件を表1に、移動相のグラジエント条件を表2に、質量分析法において定量に使用したイオン等を表3に示す。

検量線は2.5ng/mL~200ng/mLの範囲で作成し、絶対検量線法により定量した。

### 3-4. 妥当性評価

妥当性評価はガイドラインに従って実施した。標準品添加量は、無検出試料に対してOTCは基準値相当の0.2 $\mu$ g/gの濃度になるように添加し、基準が不検出のCTC及びTCは、試験法通知の定量限界が個別試験法 (HPLC) 及び一斉試験法のHPLC、LC-MSのいずれもそれぞれ0.03 $\mu$ g/g、0.02 $\mu$ g/gと記載されているが、より低い濃度の0.01 $\mu$ g/gとした。試料に混合標準溶液を添加してから30分間以上静置したものを添加試料とし、測定回数は1日2回、5日間の枝分かかれ実験で実施した。

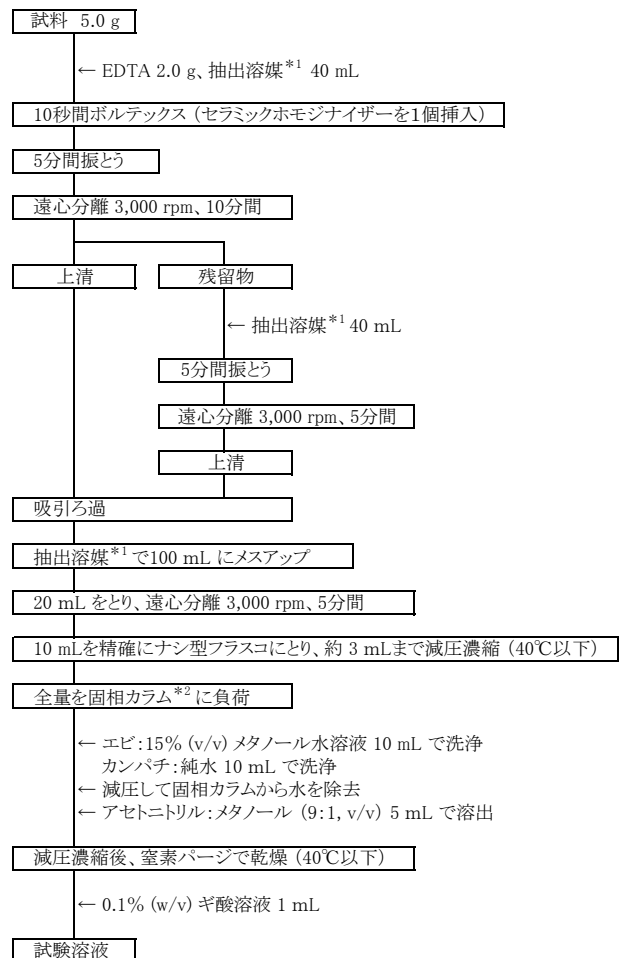


図2. LC-MS/MS による試料 (エビ、カンパチ) 中のテトラサイクリン類定量のための前処理フロー図 (妥当性確認時)。\*1メタノール-0.2% (w/v) メタリン酸水溶液混液 (2:3, v/v)、\*2Oasis PRiME HLB

表1. 高速液体クロマトグラフィー - タンデム型質量分析計の測定条件

装置パラメーター	条件	
分離部	流量	0.2 mL/分
	注入量	5 $\mu$ L
	カラム温度	40°C
	移動相	A液: 0.1%ギ酸水溶液 B液: アセトニトリル
検出部	イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI positive)
	測定モード	多重反応モニタリング (MRM)
	ターボガス温度	350°C
	ターボスプレー圧力	40 psi
	ネブライザーガス圧力	70 psi
	カーテンガス流量	25 mL/分
	コリジョン反応ガス流量	9 mL/分
	イオンスプレー電圧	5500 V
	エントランス電圧	10 V

表2. 高速液体クロマトグラフィーのグラジエント条件

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
	0.1%ギ酸水溶液	アセトニトリル
0.01	95	5
15	20	80
20	20	80
20.1	95	5
30	95	5

表3. 質量分析計の化合物ごとのパラメーター

化合物名	分子量		測定条件			
			プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	デクラスタリング電位 (V)	コリジョンエネルギー (V)
オキシテトラサイクリン (OTC)	460.148	定量イオン	461.075	425.800	76	27
		確認イオン	461.075	443.000	76	19
クロルテトラサイクリン (CTC)	478.114	定量イオン	479.055	443.900	96	31
		確認イオン	479.055	461.800	96	25
テトラサイクリン (TC)	444.153	定量イオン	445.115	410.000	66	27
		確認イオン	445.115	153.900	66	35

## 結果及び考察

### 1. 前処理条件の検討 (エビ)

内山・中村<sup>2)</sup>は、抽出溶媒として0.2% (w/v) メタリン酸水溶液を畜産物のテトラサイクリン類一斉試験法に使用した。そこで、筆者らはエビを試料として0.2% (w/v) メタリン酸水溶液のみでEDTA及びメタノールは添加せずに抽出を試みたところ、OTC、CTC及びTCの標準品添加回収率は、それぞれ70.9、73.0、72.5%でいずれも低い値であった。また、吸引る過後の抽出液は白濁していた。これらの原因としてテトラサイクリン類が金属2価イオンとキレートを形成し、凝集した可能性が考えられたこと<sup>3)</sup>から、キレート形成を防止する目的で抽出溶媒にEDTAを添加し同様の試験を行った。この結果、白濁は解消し、標準品添加回収率はOTCが93.3%、TCが105.9%で、エビを試料とした場合にはEDTAの添加が標準品添加回収率の改善に有効と考えられた。一方、CTCは143.9%であり、ガイドラインに示された基準 (70~120%)

を逸脱した。この原因として精製工程で夾雑物の除去が不十分なことによるマトリクス効果の可能性が考えられたことから、検体を負荷した固相カラムの洗浄液について、メタノールの濃度の影響を0%~20% (v/v) の範囲で検討した。結果を表4に示す。メタノール濃度の増加に伴いCTCの標準品添加回収率は減少の傾向にあったが、メタノール濃度が20%の場合は15%の場合と比較してOTC及びTCの標準品添加回収率が100%以下で低かったことから、固相カラムの洗浄液をこれ以降15% (v/v) メタノール水溶液とした。この洗浄条件においてもCTCの標準品添加回収率は120%を超過しており良好な結果は得られなかった。そこで、試験法通知の「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法III (畜水産物)」を参考に抽出溶媒を有機溶媒と水系溶媒との混合系であるメタノール-0.2% (w/v) メタリン酸水溶液混液 (2:3, v/v) に変更し、標準品添加回収試験を実施して変更前の0.2% (w/v) メタリン酸水溶液のみの場合と比較した。なお、変更後の検体溶液を固相カラムに負荷するにあたり、メタノール濃度を低下させる必要があったため、メタノールの留去を目的としてロータ

表4. 固相抽出カラム洗浄液のメタノール濃度による標準品添加回収率 (%) への影響

化合物	メタノール濃度 (% v/v)				
	0	5	10	15	20
OTC	93.3	87.3	89.8	91.3	84.6
CTC	143.9	130.1	136.1	125.8	126.5
TC	105.9	93.8	99.3	100.2	91.9

リーエバポレーターにより減圧濃縮する工程を追加した。抽出溶媒変更前後を比較した結果を表5に示す。抽出溶媒をメタノール-0.2%(w/v) メタリン酸水溶液混液(2:3, v/v)とした場合にCTCの回収率は101.3%でガイドラインの基準の範囲内となり、OTC及びTCについても基準の範囲内であった。回収率が改善したのは、抽出溶媒にメタノールを添加することにより極性が下がり、極性の高いマトリクスの混入を低減できたためと考えられた。

なお、各検討段階において、検査の支障となる妨害ピークは認められなかった。

## 2. 前処理条件の検討 (カンパチ)

カンパチを試料として前項のエビで構築した試験法で標準品添加回収試験を実施したところ、OTC、CTC及びTCの回収率はいずれも70%未満であった。そこで、固相カラムの洗浄液を15%(v/v)メタノール水溶液から純水へ変更し、標準品添加回収試験を実施した。この結果を表6に示す。洗浄液を純水とした場合にOTC、CTC及びTCの回収率はそれぞれ80.0%、97.7%、83.5%で、洗浄液を15%(v/v)メタノール水溶液とした場合と比較して良好な結果となり、いずれもガイドラインの基準の範囲内となった。回収率が改善したのは、洗浄液の極性が上がり、テトラサイクリン類が固相カラムに保持されやすくなり流出しにくくなったためと考えられるが、15%(v/v)メタノール水溶液を洗浄液とした場合に、試料がエビとカンパチで標準品添加回収率が異なる理由の解明にはさらに検討が必要である。

## 3. 妥当性評価試験

以上の検討結果により当所で構築したテトラサイクリン類の試験法(図2)について、エビ及びカンパチを試料として標準品添加回収試験による妥当性評価を実施した結果を表7に示す。ガイドラインの妥当性評価の基準は、選択性では、

定量限界が基準値の1/3以下の場合(OTCが該当)において、妨害ピーク面積が基準値に相当するピーク面積の1/10を超えないこと、基準が不検出の場合(CTC及びTCが該当)において、妨害ピーク面積が定量限界値に相当するピーク面積の1/3を超えないこととされている。また、真度は70~120%の範囲内であること、併行精度は、添加濃度が0.2µg/gの場合は10%以下、添加濃度が0.01µg/gの場合は25%以下であること、室内精度は、添加濃度が0.2µg/gの場合は15%以下、添加濃度が0.01µg/gの場合は30%以下であることとされている。今回の試験では、すべての試料で妨害ピークは認められなかった。エビ及びカンパチをそれぞれ試料としたテトラサイクリン類の3つの化合物の標準品添加回収試験で、選択性、真度、併行精度、および室内精度のすべての項目でガイドラインに示された条件を満たした。また、全ての標準品添加試料の測定結果において、S/N≥10であった。

今回、これらの事前検討を経て構築したテトラサイクリン類のLC-MS/MS試験法が、前段のとおりガイドラインに示された全ての妥当性評価の基準を満たし、行政検査に適用できることを確認した。

## 引用文献

- 濱田幸子, 樋口泰則, 茶谷祐行. 2015. エビのテトラサイクリン等試験法の妥当性評価について. 京都府保健環境研究所年報, 60, 24-27.
- 内山賢二, 中村正規. 2010. 畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析. 福岡市保健環境研究所年報, 36, 115-117.
- 吉田絵美子, 渋谷孝博, 黒川千恵子, 井上豊, 山本善彦, 宮崎元伸. 2009. 乳および乳製品中のテトラサイクリン系抗生物質を含めた動物用医薬品一斉分析の検討. 食品衛生学雑誌, 50(5), 216-222.

表5. 抽出溶媒による標準品添加回収率(%)への影響

化合物	抽出溶媒	
	0.2%(w/v)メタリン酸水溶液	メタノール-0.2%(w/v)メタリン酸水溶液混液(2:3, v/v)
OTC	91.3	101.7
CTC	125.8	101.3
TC	100.2	90.6

表6. 固相抽出カラム洗浄液による標準品添加回収率(%)への影響(カンパチ)

化合物	固相抽出カラム洗浄液	
	15%(v/v)メタノール水溶液	純水
OTC	53.9	80.0
CTC	64.5	97.7
TC	67.2	83.5

表7. OTC、CTC及びTC試験法の妥当性評価の結果

化合物	エビ				カンパチ			
	選択性	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	選択性	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)
OTC	○	85.7	4.8	8.1	○	79.8	4.1	10.0
CTC	○	101.5	6.2	8.2	○	88.1	5.1	13.7
TC	○	94.1	4.5	6.2	○	86.4	5.0	7.2

注) 選択性の○はガイドラインの基準を満足したことを示す。