

テトラサイクリン系及び β -ラクタム系抗生物質の LC-MS/MS 一斉分析法の改良

Improvement of LC-MS/MS Simultaneous Analysis Method for Tetracycline
and β -lactam Antibiotics

上田友紀子 藤井 良昭 加賀 岳朗 西村 一彦

Yukiko UEDA, Yoshiaki FUJII, Takero KAGA and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : veterinary drug (動物用医薬品) ; muscle (筋肉) ; kidney (腎臓) ; LC-MS/MS (液体クロマトグラフィー質量分析計)

緒 言

動物用医薬品(動物薬)は、家畜及び養殖魚の疾病予防や治療に用いられ、安定的な生産に貢献している。その一方で、動物薬が食品中に残留した場合には、食品を摂取した人への健康影響が危惧される。このため、動物薬には食品衛生法に基づく残留基準値が設定され¹⁾、安全性確保が図られている。この安全性確保にはより多くの動物薬に対する残留検査の実施が有効であることから、効率的な動物薬分析法として、多成分一斉分析法の開発が求められてきた。そのため当所では、LC-MS/MSによる畜肉中のテトラサイクリン系及び β -ラクタム系(ペニシリン系、セフェム系)抗生物質を対象とした一斉分析法を開発した²⁾。しかし、テトラサイクリン系抗生物質のクロルテトラサイクリンにおいて、多くの場合は75~80%程度の回収率が得られているが、試料によっては70%を数%下回る例が認められた。また、ペニシリン系抗生物質として汎用されているアンピシリン³⁾において、真度が妥当性評価ガイドライン⁴⁾の目標値である70%を下回っており、回収率の向上が課題であった。そこで本研究では、既報²⁾の分析法を基に、クロルテトラサイクリン及びアンピシリンの回収率向上を目的として精製法の検討を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

方 法

1. 試料

試料は、あらかじめ動物薬が残留していないことを確認した北海道産の牛筋肉及び牛腎臓を用いた。

2. 試薬及び試液

試薬は、富士フイルム和光純薬(株)製 LC/MS用のアセ

トニトリル、ギ酸、超純水、残留農薬・PCB試験用の *n*-ヘキサン(以下、ヘキサン)、特級のクエン酸一水和物、リン酸水素二ナトリウム・12水、試験研究用のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA・2Na)、定量分析用1 mol/L水酸化ナトリウム溶液、有害金属測定用塩酸を用いた。0.05 mol/L EDTA含有マキルベン緩衝液(pH 6.5)(以下、抽出溶媒)は、リン酸水素二ナトリウム・12水50.86 gとクエン酸一水和物6.09 gを精製水に溶解して1,000 mLに定容し、EDTA・2Na 18.61 gを加えた。マキルベン緩衝液(pH 7.4)(以下、希釈溶媒)は、リン酸水素二ナトリウム・12水26.03 gとクエン酸一水和物0.77 gを精製水に溶解し、400 mLに定容した。固相抽出ミニカラムには、N含有のビニルポリマーとスチレンジビニルベンゼンの複合ポリマー固相を採用したジーエルサイエンス(株)製のInertSep[®] HLB FF(200 mg/6 mL)(以下、HLBミニカラム)を用いた。ろ紙はGEヘルスケア製ワットマン定量ろ紙No. 41(直径125 mm)を用いた。標準品は表1に示す動物薬14物質を用いた。標準原液は以下のとおり調製した。テトラサイクリン系抗生物質は標準品5 mgを量りとり、各々メタノールに溶解し、50 mLに定容した。 β -ラクタム系抗生物質は標準品2 mgを量りとり、各々アセトニトリルに溶解して50 mLに定容した。1 μ g/mLの混合標準溶液は、まずテトラサイクリン系抗生物質を相当量採取し、窒素ガス気流下でメタノールを除去した後、そこへ β -ラクタム系抗生物質の標準原液を加え、超純水で希釈して調製した。

3. 装置及び分析条件

ボルテックスミキサーは、サイエンティフィックインダストリーズ製のVORTEX-GENIE 2を用いた。遠心分離機は(株)久保田製作所製ユニバーサル冷却遠心機5930、固

表1 分析対象物質と LC/MS/MS 条件

化合物名		入手源*	フラグメン ター電圧 (V)	Q 1 (<i>m/z</i>)	定量イオン		確認イオン	
					Q 3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)	Q 3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)
テトラ サイクリン系	オキシテトラサイクリン	和光	117	461	426	20	201	44
	クロルテトラサイクリン	和光	112	479	444	24	154	32
	テトラサイクリン	和光	122	445	410	20	154	28
	ドキシサイクリン	関東	122	445	428	20	267	44
ペニシリン系	アンピシリン	和光	113	350	114	36	106	20
	オキサシリン	和光	93	402	243	12	160	12
	クロキサシリン	和光	113	436	277	12	160	12
	ナフシリン	関東	93	415	199	12	171	44
	ベンジルペニシリン	和光	93	335	176	12	160	16
	フェノキシメチルペニシリン	和光	93	351	160	8	114	40
	メシリナム	和光	137	326	167	24	139	36
セフェム系	セフキノム	関東	108	529	167	28	134	20
	セファゾリン	和光	93	455	323	8	156	16
	セファロニウム	和光	93	459	152	20	123	8

Q 1：プリカーサイオン、Q 3：プロダクトイオン、CE：コリジョンエネルギー
測定条件はすべて ESI(+)

*和光：富士フイルム和光純薬(株)、関東：関東化学(株)

相抽出操作はジーエルサイエンス(株)製の GL-SPE 吸引マニホールドキットを用いた。

LC は Agilent Technologies 製 1260 Infinity II LC を用い、MS/MS は Agilent Technologies 製 6470 Triple Quad LC/MS を用いた。LC 分析カラムは Waters 製 Atlantis T 3 (3 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm) を用いた。カラム温度は 40℃、移動相は A 液 0.1% ギ酸、B 液 アセトニトリルのグラジエント溶出条件とし、その条件は 1% B 液 (0.2 min) - 30% B 液 (6 min) - 90% B 液 (9-14 min) - 1% B 液 (14.5-26 min) とした。流量は 0.3 mL/min、試料溶液の注入量は 5 μ L、イオン化モードは ESI (+)、測定モードは多重反応モニタリング (MRM) とした。表 1 に動物薬ごとの MRM 分析条件を示した。

4. 試験溶液の調製

均一化した試料 2.5 g を 50 mL 容 PP 製遠沈管に量りとり、筋肉の場合は精製水 0.5 mL を加えた。アセトニトリルを 2 mL 加えてボルテックスミキサーを用い、1 分間激しくかくはんした。その後、時々転倒混和しながら 5 分間置き、抽出溶媒 25 mL、ヘキサン 6 mL を加えて、1 分間振とう抽出した。遠心分離 (4℃、3,300 rpm、5 分間) 後、ヘキサン層を除去し、ろ紙を用いて上清をろ過した。残さに抽出溶媒 20 mL、ヘキサン 5 mL を加えて同様の操作を行い、ろ液を合わせた後、抽出溶媒を加えて 50 mL に定容した。この 10 mL を分取し、希釈溶媒 30 mL を加えて混合し、あらかじめアセトニトリル 10 mL、精製水 10 mL でコンディショニングした HLB ミニカラムに全量を負荷した。精製水 10 mL で洗浄、90% アセトニトリル 5 mL でミニカラムから溶出した後、遠心分離 (4℃、15,000 rpm、10 分間) し、その上清を試験溶液として LC-MS/MS に供した。

5. 検量線

あらかじめ動物薬が残留していないことを確認した試料から「4. 試験溶液の調製」に従って調製した試験溶液で 1 μ g/mL の混合標準溶液を希釈し、1~10 ng/mL の範囲で検量線用のマトリックス標準溶液を調製した。

6. 添加回収試験

牛筋肉、牛腎臓に混合標準溶液を 0.05 mg/kg となるよう添加し、30 分間静置した後、回収試験を行った。試行回数は 5 回とした。

結果及び考察

1. 抽出時における脱脂条件の検討

テトラサイクリン系抗生物質は光によって分解するため⁵⁾、当初はクロルテトラサイクリンの回収率が低くなる原因を光分解と推察した。しかし、遮光下で検査を行った場合でも回収率が 70% を下回ることがあり、他の要因を検討したところ、ヘキサンによる脱脂工程で回収率の低下が示唆された。そこで、脱脂に用いるヘキサン量を減少させることによる回収率の向上を検討した。すなわち、抽出溶媒量 1 回目 25 mL、2 回目 10 mL に対し、ヘキサン量を変えた 3 つの条件を設定して添加回収率を比較した。試料は牛腎臓を用い、各ヘキサン量は次のとおりとした。従来法：(1 回目 12.5 mL、2 回目 10 mL)、Test 1：(1 回目 6 mL、2 回目 5 mL)、Test 2：(1 回目 12.5 mL、2 回目ヘキサン無し)。抽出した後、「4. 試験溶液の調製」に従って HLB ミニカラムで精製を行った。それぞれの結果を図 1 に示した。従来法と比較してクロルテトラサイクリンについて、Test 1 では回収率が 5% 向上したが、Test 2 では差は認められなかった。また、クロルテトラサイクリン以外の動物薬についても Test 1 ではほとんどが従来法より高い値

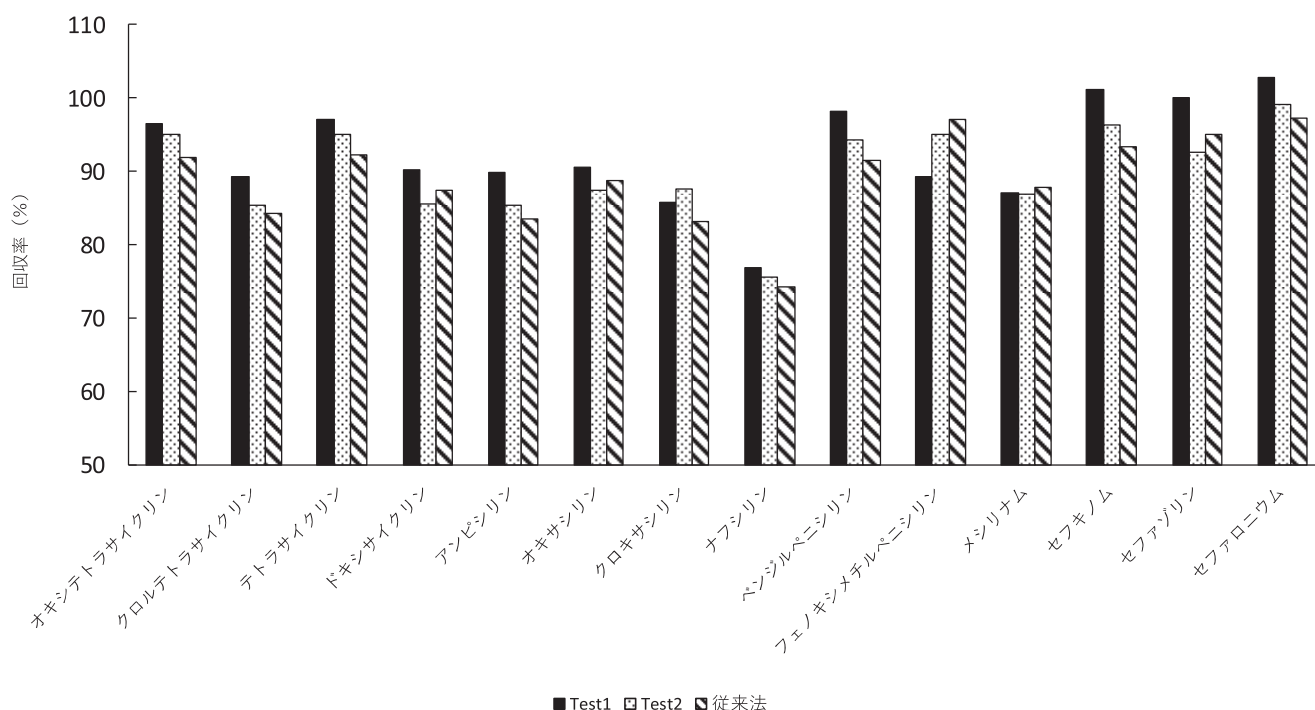


図1 ヘキサン量が抽出に与える影響

抽出溶媒量：1回目 25 mL、2回目 20 mL

Test 1（ヘキサン量：1回目 6 mL、2回目 5 mL）、Test 2（ヘキサン量：1回目 12.5 mL、2回目なし）、従来法（ヘキサン量：1回目 12.5 mL、2回目 10 mL）

を示し、Test 2では大きな差は認められなかった。一方、ヘキサン量の減少により脱脂効率の低下が懸念されたが、LC-MS/MS分析において定量を妨害するピークは認められず、ピーク形状も良好であったことから、いずれの条件でも精製効果に問題はないと考えられた。これらの結果より、Test 1の条件、すなわち、ヘキサン量1回目 6 mL、2回目 5 mLを加えて脱脂する方法を用いることにした。

2. ミニカラム精製法の検討

アンピシリンの回収率が妥当性評価ガイドラインの目標値を下回る原因を種々検討した結果、既報²⁾で用いているスチレンジビニルベンゼン共重合体 (SDB) ミニカラムに対する保持が低いためと考えられた。そこで、アンピシリンを含む極性物質の保持を高める目的で、SDBに親水性基を導入したHLB ミニカラムの使用を検討することにした。テトラサイクリン系抗生物質及びペニシリン系抗生物質は、アミノ基やカルボキシル基などの置換基を有しているため、溶液のpHによりイオン型、分子型に変化する。このことから、HLB ミニカラムへの保持はpHによる影響を受けると考え、負荷溶液のpHによる回収率への影響を検討した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液、1 mol/L 塩酸でpH5、6、7、8、9に調整した希釈溶媒20 mLに、1 µg/mL 混合標準溶液を500 µL添加し、1% (v/v) となるようにアセトニトリルを加え、負荷溶液とした。この負荷溶液全量をアセトニトリルと精製水各10 mLでコンディショニングしたHLB ミニカラムに負荷し、精製水10 mLで洗浄した後、90% アセトニトリル10 mLで溶出した。これ

を90% アセトニトリルで10倍希釈し、LC-MS/MSに供した。結果を図2に示した。テトラサイクリン系抗生物質、特にクロルテトラサイクリンはpH 8以上の負荷溶液で回収率が低下した。アンピシリンはpH 6以下の負荷溶液で回収率が低く、pH 7以上で安定した回収率を示した。また、セフェム系抗生物質は、テトラサイクリン系抗生物質やペニシリン系抗生物質とは異なり、負荷溶液のpHにより回収率が大きく変化する物質は認められなかった。以上の結果から、負荷溶液の最適pHをpH 7と考えた。抽出液にはpH 6.5のマキルベン緩衝液を用いていることから、pH 7.4の希釈溶媒と混和し、負荷溶液のpHを7.0に調整することにした。

3. 添加回収試験

牛筋肉、牛腎臓について添加回収試験を実施した結果を表2に示した。アンピシリン及びクロルテトラサイクリンにおいて、いずれの試料でも80%以上の良好な回収率が得られた。全体でも、真度は筋肉試料で86~97%、腎臓試料で77~102%、併行精度は、筋肉試料で1.2~2.8%、腎臓試料で2.3~5.8%と、良好な結果が得られた。また、一律基準値 (0.01 mg/kg) の半分の濃度でもS/N≥10を満たすことを確認しており、定量下限値を0.005 ppmに設定可能と考えられた。

以上の結果より、今回改良した分析法は、テトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生物質の一斉分析法として有用である。今後は、他の畜産物試料への適用性を確認するとともに、妥当性評価試験を行う予定である。

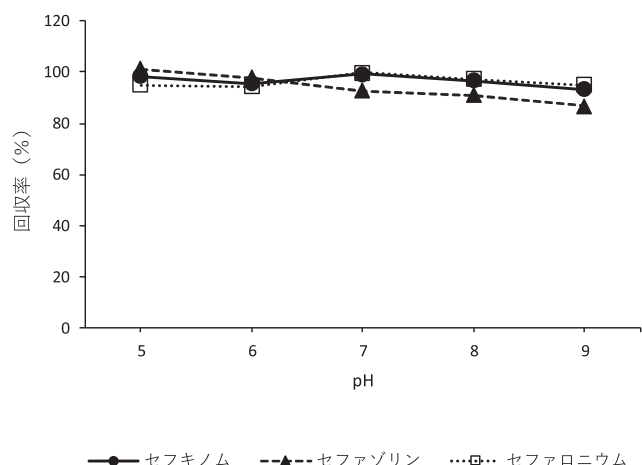
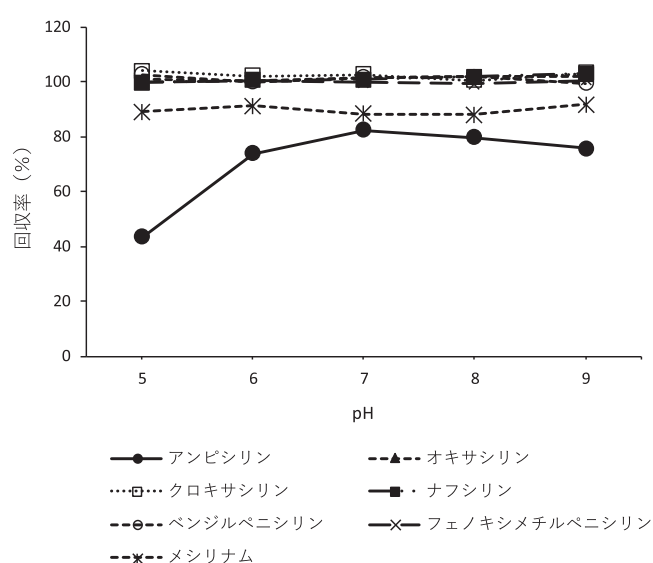
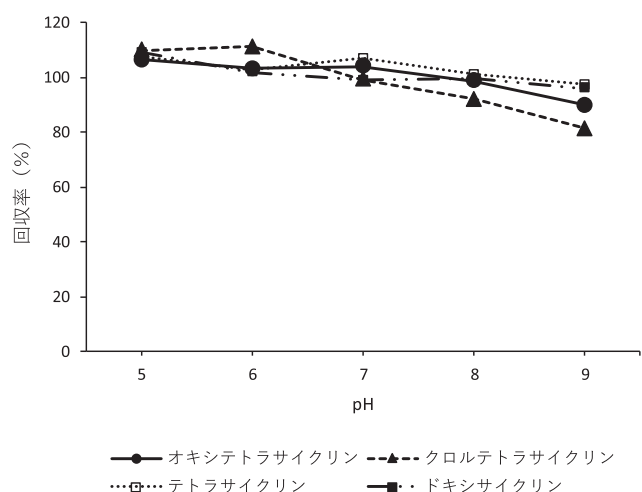


図2 負荷溶液のpHが回収率に与える影響

表2 添加回収試験結果

	筋肉		腎臓	
	真度	併行精度	真度	併行精度
	%	%	%	%
オキシテトラサイクリン	94	2.6	102	4.9
クロルテトラサイクリン	87	2.6	85	4.2
テトラサイクリン	94	2.0	97	3.6
ドキシサイクリン	91	1.6	81	2.5
アンピシリン	89	1.7	88	3.8
オキサシリン	94	2.8	89	5.3
クロキサシリン	90	2.2	83	5.0
ナフシリン	86	1.2	77	5.8
ベンジルペニシリン	98	1.5	93	2.4
フェノキシメチルペニシリン	97	1.9	90	4.1
メシリナム	95	1.2	89	2.3
セフキノム	96	2.7	99	3.6
セファゾリン	97	2.2	94	2.9
セファロニウム	96	1.5	101	3.3

n=5

添加濃度：0.05 mg/kg

文 献

- 1) 厚生省告示第340号「食品、添加物等の規格基準」，昭和34年12月28日
- 2) 藤井良昭，西村一彦，橋本 諭，加賀岳朗：液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法による畜肉中のテトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生物質の一斉分析，分析化学，66(5)，369-375 (2017)
- 3) 農林水産省 動物医薬品検査所：動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報（別冊），各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫薬・抗寄生虫剤の販売高と販売量，令和元年
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部食安発1224第1号「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の一部改正について」，平成22年12月24日
- 5) 六川 彰，筒井健機：ヒト歯肉由来培養繊維芽細胞におけるテトラサイクリン系抗生物質の染色体異常誘導能の検討，日歯周誌，39(3)，338-347 (1997)