

畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析

内山賢二・中村正規

福岡市保健環境研究所保健科学課

Simultaneous Determination of Tetracyclines in Livestock Products and Seafoods Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Kenji UCHIYAMA and Masanori NAKAMURA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

畜水産物中に残留するオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンおよびテトラサイクリンの LC-MS/MS による一斉分析法を検討した。試験溶液は、0.2%メタリン酸溶液で抽出後、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で精製し、溶媒留去に褐色試験管を用い調製した。試料バイアルは褐色ポリプロピレン製を使用した。鶏肉、鶏卵、牛乳、鮭および牡蠣で添加回収試験(添加濃度 0.1 μ g/mL)を実施したところ、回収率が 73~111%、相対標準偏差 1.5~5.3%と良好な結果を得た。試料マトリックスによるイオン化への影響は見られなかった。

Key Words : 液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析装置 LC-MS/MS , 一斉分析 simultaneous determination , テトラサイクリン系抗生物質 tetracyclines

1 はじめに

テトラサイクリン系抗生物質は、動物用医薬品や飼料添加物として使用されており、畜水産物の安定的な生産や供給に寄与している。しかし、厚生労働省発表の「平成 18 年度国産畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査結果」では、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)およびテトラサイクリン(TC)の和として違反が 2 件となっており、食品中に残留するこれらの化合物を監視することは、食の安全安心を守る上で重要である。

これまでに当所では、分析法として液体クロマトグラフによる食品中のテトラサイクリン系抗生物質の迅速分析¹⁾を報告している。しかし、移動相として使用する高濃度の緩衝液により、分析カラムが早く劣化するなどの問題があった。そこで今回は、選択性が高く高感度に検出可能な LC-MS/MS を用いて、OTC、CTC、TC の一斉分析法の検討を行った。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で市販されていた鶏肉、鶏卵、牛乳、鮭および牡蠣を用いた。

2.2 試薬等

標準品: 塩酸オキシテトラサイクリン、塩酸クロルテトラサイクリン、塩酸テトラサイクリンのいずれも Riedel-de Haën 社製を用いた。

標準原液: 標準品を OTC、CTC および TC の力価で換算して 100mg/L になるように蒸留水で調製した。

混合標準溶液: 標準原液を蒸留水で適宜希釈し調製した。

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: Waters 社製 Oasis-HLB(60mg)をメタノール 5mL、蒸留水 5mL でコンディショニングしたあと使用した。

ガラス製 15mL 褐色試験管: 日本理化学器械(株)製 TYPE-20P を使用した。

ガラス繊維ろ紙: アドバンテック東洋(株)製 GA-200 (I.D.5cm) を使用した。

0.2 μ m フィルター: アドバンテック東洋(株)製 DISMIC25HP を使用した。

褐色ポリプロピレン製バイアル: GL サイエンス社製

1.5mL スクリューバイアル PP 褐色を使用した。
 その他の試薬：HPLC 用または特級を使用した。

2.3 装置

液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent1100 シリーズ (G1312A Bin Pump) を使用した。

質量分析計：AB SCIEX 社製 API4000 を使用した。

超音波装置：アイワ医科工業 (株) 製 AU-308CB を使用した。

遠心機：(株) 久保田製作所ユニバーサル冷却遠心機 KUBOTA5930 を使用した。

振とう機：タイテック (株) 製 RECIPRO SHAKER SR-2W を使用した。

2.4 測定条件

2.4.1 液体クロマトグラフ (HPLC)

分析カラム：(株) YMC 社製 YMC-Pack Pro C18

2mm i.d. × 50mm, 3µm

移動相：A 液：0.02% ギ酸，B 液：アセトニトリル

グラジエント条件：表 1 のとおり

表 1 グラジエント条件

時間(min)	A液 (%)	B液 (%)	流速 (mL/min)
0	95	5	0.20
15	20	80	0.20
20	20	80	0.20
20.1	95	5	0.20
30	95	5	0.20

2.4.2 質量分析計

イオン化：ESI (+)，イオンスプレー電圧：5000V

イオンソース温度：700

各化合物の条件 (定量イオン，確認イオン等)：表 2 のとおり

2.5 試験溶液の調製

試料 10g に 0.2% メタリン酸溶液を 20mL 加え，振とう機で 10 分間振とうし，遠心分離 (3000rpm, 10min) した後，上澄みを吸引る過した。残渣に 0.2% メタリン酸溶液 20mL を加え，再度振とう，遠心分離を行い，上澄みを吸引る過した後，ろ液を合わせ水で 100mL に定容した。そのうち 10mL をジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (60mg) に負荷し，蒸留水 5mL で洗浄し，加圧して蒸留水を除去後，メタノール 5mL で溶出した。溶出液を 35 以下で減圧濃縮，窒素パージで乾固させ，蒸留水 1mL で溶解した後，0.2µm フィルター

でろ過し褐色ポリプロピレン製バイアルに入れ，試験溶液とした。

表 2 各化合物の測定条件

化合物名	MW ¹	測定条件			
		Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V) ²	CE(V) ³
OTC(定量)	460.1	461.2	426.1	71	27
(確認)		461.2	443.0	71	19
CTC(定量)	478.1	479.2	444.0	76	31
(確認)		479.2	462.1	76	25
TC(定量)	444.2	445.2	410.1	76	29
(確認)		445.2	154.1	76	39

1 単一同位体における分子量

2 DP:Declustering potential

3 CE:Collision energy

3 結果および考察

3.1 HPLC 条件およびバイアルの検討

HPLC の移動相はこれまでに当所で検討した条件²⁾を用いた。グラジエント条件は各化合物のピークがシャープになるよう，表 1 のとおりとした。

また，当所では動物用医薬品等の測定において，不活性処理済みガラス製バイアルよりもポリプロピレン製バイアルを使用した方が多くの化合物において長時間にわたり測定値が安定すると報告³⁾している。そこで混合標準溶液を用いて 3 化合物のバイアル中での安定性を検討した結果，不活性処理済みガラス製バイアルでは 3 化合物とも時間の経過とともにピーク強度が低下したが，褐色ポリプロピレン製バイアルではピーク強度が長時間安定していた。3 化合物は，ガラス製の容器内で分解もしくはガラス表面に吸着しやすい性質であることが考えられ，褐色ポリプロピレン製バイアルを使用することとした。

3.2 LC MS/MS 条件の検討

イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用い，ポジティブモードで MRM 分析を行った。各化合物の条件はインフュージョンポンプを用いて最大感度が得られる条件を表 2 のとおり求めた。各化合物の検量線は 20 ~ 500ng/mL の範囲において相関係数は 0.998 以上と良好な直線性が得られた。標準溶液 20ng/mL のクロマトグラムから S/N=10 となる濃度を求めたところ，3 化合物とも 10ng/mL であった。

3.3 添加回収試験

鶏肉, 鶏卵, 牛乳, 鮭および牡蠣に各化合物を 0.1µg/mL 添加して回収試験を行った。濃縮操作において, ガラス製褐色ナシ型フラスコを使用して検討した場合, 回収率がいずれも 70%を下回ったが, ガラス製 15mL 褐色試験管で検討したところ, 良好な回収率を得た(表 3)。いずれの試料においても 73~111%と良好に回収され, また相対標準偏差も 1.5~5.3%であり, 定性・定量に支障をきたすようなピークは見られなかった。

3 化合物はガラス製容器内で分解もしくはガラス表面に吸着しやすいため, 内表面積が大きなガラス製褐色ナシ型フラスコを使用した場合, 回収率が低下したと考えられた。

表 3 添加回収試験結果

試料名	回収率(%)		
	OTC	CTC	TC
鶏肉	76.8(1.8)	84.5(2.0)	73.6(2.7)
鶏卵	91.9(2.7)	97.8(1.2)	96.9(5.3)
牛乳	99.7(4.5)	95.9(2.1)	111(1.5)
鮭	85.2(2.0)	94.0(0.7)	85.1(3.2)
牡蠣	72.5(3.2)	87.6(0.8)	73.2(3.2)

()内の数値は相対標準偏差(n=3)

また, 同濃度の標準溶液とブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス標準溶液)の測定値を

比較した結果を表 4 に示したが, 試料マトリックスによるイオン化への影響は見られなかった。

以上の結果から, 本法は畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質の分析において有用であると考えられた。

表 4 標準溶液に対するマトリックス標準溶液のイオン化への影響

試料名	イオン化への影響(%)		
	OTC	CTC	TC
鶏肉	91.9	105	91.1
鶏卵	97.0	94.2	99.1
牛乳	99.4	105	99.3
鮭	108	105	104
牡蠣	102	122	113

文献

- 1) 久保記久子, 赤木浩一, 畑野和広: 高速液体クロマトグラフによる食品中のテトラサイクリン系物質の迅速分析, 福岡市保健環境研究所報, 30, 170~172, 2005
- 2) 中尾朱美, 畑野和広: LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品および合成抗菌剤の迅速一斉分析(), 福岡市保健環境研究所報, 30, 167~169, 2005
- 3) 久保記久子, 中村正規: LC-MS/MS による畜水産物中の動物用医薬品等の一斉分析(), 福岡市保健環境研究所報, 35, 110~115, 2010