

テトラサイクリン系抗生物質分析法の整備

仲真弘樹・佐久川さつき・古謝あゆ子

Validation study on Analytical Methods for Tetracycline Antibiotics

Hiroki NAKAMA, Satsuki SAKUGAWA, and Ayuko KOJA

要旨：LC-MS/MS を用いたテトラサイクリン系抗生物質の分析法を整備した。検体は豚の筋肉、測定対象成分はオキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリンとした。各種文献を参考に、将来的にドキシサイクリン及びペニシリン系抗生物質も測定対象に含められるような分析法を選択した。選択した分析法の一部を変更し、厚生労働省通知「妥当性評価ガイドライン」に従い妥当性評価試験を行った。その結果、すべての評価項目でガイドラインの目標値を満たした。

Abstract： The analytical method for tetracycline antibiotics in pork muscle using LC-MS/MS was validated. The target analytes were oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline. With reference to various literature, we selected the method that will be able to include doxycycline and penicillin antibiotics as the target analyte in the future. This method was modified and validated in accordance with the method validation guideline of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. As a result, all analytes satisfied the guideline criteria.

Key words: テトラサイクリン, Tetracycline, 豚の筋肉, Pork muscle, 食品衛生法, Japanese food sanitation law, 妥当性評価, Validation study, タンデム四重極型質量分析計付き高速液体クロマトグラフ, LC-MS/MS

I はじめに

動物用医薬品は畜水産動物の疾病の予防及び治療を目的として用いられるが、一方で畜水産物中への残留により、ヒトの健康への危害や薬剤耐性菌の出現が懸念される。そのため、食品衛生法に基づく残留規制によって安全性確保が図られている¹⁾。テトラサイクリン系抗生物質 (Tcs) は動物用抗生剤の中で最も使用量が多く、牛や豚等を対象に飼料添加剤や注射剤等が承認されている²⁾。

Tcs のうち、オキシテトラサイクリン (OTC)、テトラサイクリン (TC)、クロルテトラサイクリン (CTC) は、蛍光検出器付きの高速液体クロマトグラフを用いた試験法が示されている³⁾。ただし、当該試験法で上記薬剤が検出された際は、より選択性の高い質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC/MS 等) を用いて、検出されたものが薬剤かどうか確認する確認試験を行う必要がある。一方で、LC/MS 等を用いた試験法も開発されており、LC-MS 等を用いることで確認試験を省けるだけでなく、その他複数の薬剤成分を含めた一斉分析にも発展可能である。

本報では、タンデム四重極型質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC-MS/MS) を用いて、上記 3 薬剤 (OTC,TC,CTC) について、食品衛生法に定められている規格基準への適合性判断が可能な試験法を整備したので、その内容を報告する。

II 方法

1. 試験法整備の方針

試験法の測定対象成分は Tcs3 薬剤 (OTC,TC,CTC) としたが、将来的にドキシサイクリンやペニシリン系抗生物質等を含めた一斉分析にも対応できるよう、これらを含めた一斉分析法⁴⁾を参考とし、検討を行った。

検討した試験法の性能評価として、「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」⁵⁾ (以下、「ガイドライン」という。) に基づき妥当性評価試験を実施した。

2. 試料

試験法の検討及び性能評価に用いる試料として、あらかじめ測定対象成分が残留していないことを確認した豚の筋肉を用いた。

3. 試薬

標準品：オキシテトラサイクリン塩酸塩及びテトラサイクリン塩酸塩は富士フィルム和光純薬 (株) 製を、クロルテトラサイクリン塩酸塩は関東化学 (株) 製を用いた。

試薬等：アセトニトリル、メタノール、超純水、ギ酸は富士フィルム和光純薬 (株) 製 LC/MS 用を、ヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を、クエン酸、リン酸二ナトリウムは特級を、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

(EDTA2Na) は試験研究用を用いた。固相精製カラムは Waters 製の Sep-Pak PS-2 (500 mg) を用いた。

4. LC-MS/MS 分析条件

①装置

LC : Agilent 1290 システム (Agilent Technologies 社製)

MS : Agilent 6495 Triple Quad

②LC 条件

カラム : ZORBAX Extend - C18 Rapid Resolution HT

(内径 2.1 mm × 長さ 100 mm, 粒子径 1.8 μm)

ガードカラム : ZORBAX Eclipse Plus C18

(内径 2.1 mm × 長さ 5 mm, 粒子径 1.8 μm)

カラム温度 : 30 °C

移動相 : A 液と B 液について表 1 の濃度勾配で送液した。

A 液 : 0.1%ギ酸 B 液 : アセトニトリル

流速 : 0.3 mL/min 注入量 : 1 μL

③MS 条件

Ionization : JET Stream (ESI, Positive ion mode)

Gas Temp (°C) : 200 Gas Flow (L/min) : 20

Nebulizer (psi) : 50 Sheath Gas Temp (°C) : 400

Capillary (V) : 3500 Nozzle Voltage (V) : 0

Mode : MRM Fragmentor (V) : 166

測定対象成分の MRM 条件は, 表 2 に示した。

表 1. グラジエント条件.

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	95	5
3	95	5
11	80	20
14	50	50
19	50	50
20	95	5
35	95	5

表 2. 測定対象成分の MRM 条件.

成分名称	プレカーサーイオン (m/z)	定量イオン		定性イオン	
		プロダクトイオン (m/z)	CE (eV)	プロダクトイオン (m/z)	CE (eV)
Oxytetracycline	461	426	21	443 / 201	13 / 45
Tetracycline	445	410	21	5	29
Chlortetracycline	479	444	25	20	17

CE(eV) : コリジョンエネルギー

5. 試験溶液の調製

図 1 に分析方法のフローチャートを示した。ミルサーで細切・均一化した試料 2.5 g をポリプロピレン製 50 mL 遠心チューブに採取し, 蒸留水 0.5 mL を加えて試料とよくなじませた後, アセトニトリル 2.0 mL を加え, Vortex ミキサーで 1 分間激しく攪拌した。時々攪拌しながら 5 分間放置したのち, 50 mM EDTA 含有クエン酸緩衝液 (抽出溶媒) 15 mL を加え, ドリル型ホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズを行った。ヘキサン 10 mL を加えて 2 分間振とうしたのち, 遠心分離 (4 °C, 3,000 rpm, 10 分間) を行い, ヘキサン層を除去し, ガラス繊維ろ紙を用いて上清を減圧ろ過した。残渣に抽出溶媒 10 mL 及びヘキサン 10 mL を加えて同様の操作を行い, ろ液を合わせたのち, 抽出溶媒で 50 mL に定容した。

あらかじめアセトニトリル 10 mL, 蒸留水 10 mL でコンディショニングした固相精製カラムに上記抽出液 20 mL を負荷した。蒸留水 10 mL で洗浄, 50%アセトニトリル 4.8 mL で溶出し, 5.0 mL に定容したのち, フィルターろ過 (PTFE, 0.2 μm) したものを試験溶液とした。

6. 標準溶液の調製

測定対象成分の濃度が 1,000 ppm となるよう各標準品をメタノールに溶解して標準原液とした。各標準原液を混合し, 40%アセトニトリルで希釈して検量線用混合標準溶液 (0.002 - 0.08 ppm) を調製した。

7. 妥当性評価試験

分析者 1 名が 1 日 1 回 (2 併行), 5 日間添加回収試験を行う枝分かれ実験を実施した。試料に豚の筋肉を用い, 添加濃度は 0.02 ppm 及び 0.2 ppm とした。混合標準溶液を添加し, 30 分以上室温で静置したのち, 「5. 試験溶液の調製」 のとおり試験溶液を調製した。分析結果を解析し, ガイドラインに基づき選択性, 真度, 併行精度及び室内精度を求め, 目標値を満たしているか確認した。

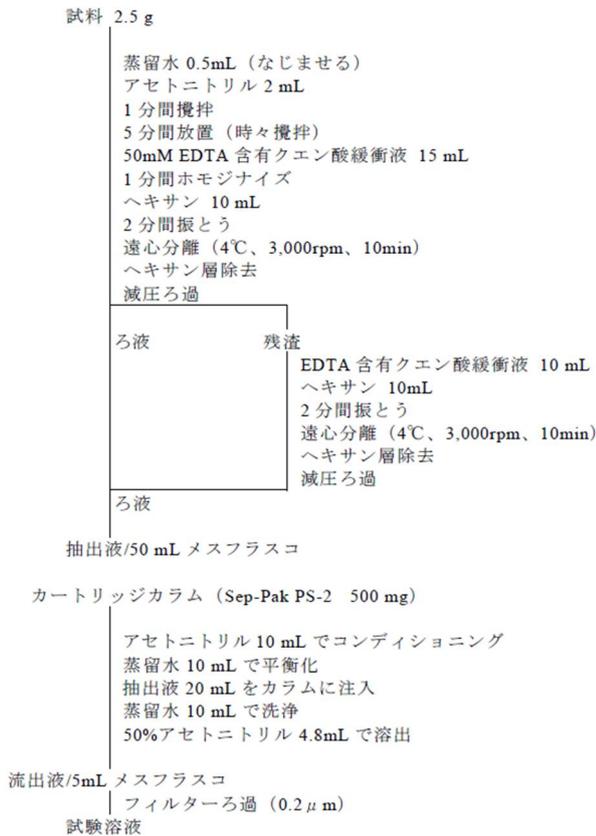


図 1. 分析方法のフローチャート.

Ⅲ 結果と考察

1. 分析カラムの検討

Tcs は金属配位性を持つため、分析時に分析カラムの金属材料や充填剤表面の残存金属への吸着により、ピーク形状の悪化やキャリーオーバーが生じることがある。そのため、Tcs の分析では接液部に金属を含まないメタルフリーカラムの使用が有効であり、このカラムの使用によりピークの形状及び強度の改善が報告されている⁶⁾。しかし、当所でメタルフリーカラムを用いた検討を行ったところ、ステンレスカラムと比較して Tcs のピーク形状及び強度に変化は見られなかった。要因としては、使用したステンレスカラム中の残存金属が比較的少なく、測定に影響を与えなかったことが考えられる。

また、メタルフリーカラムの検討の際、カラムの劣化によるピーク形状の悪化が複数回確認された。これがカラムの材質によるものとは判断できないが、当該カラムにはガードカラムの販売が無く、使用を続けるのは困難であった。上記のことから、分析カラムとしてステンレスカラムを選択した。

2. グラジエント条件及び試料注入量

マトリクス効果の対策として、移動相のグラジエント条件と試料注入量を検討した。グラジエント条件は濃度勾配を緩やかにするほど各成分のピーク分離が良くなり、マトリクス効果が小さくなるが、ピーク自体がブロードとなり、SN 比が低下してしまう。また、注入量は少ないほどマトリクス効果は小さくなる。したがって、注入量を比較的少量の 1 μL と設定し、定量限界濃度付近の Tcs を測定した際に十分な SN 比が確保できるようなグラジエント条件を設定した。標準液中の Tcs と試験溶液中の Tcs を測定し、強度を比較したところ、強度比は 106~108% となり、顕著なマトリクス効果は見られなかったため、定量法は絶対検量線法を選択した。

3. MRM トランジション

測定対象成分のモニターイオン及び CE の条件は装置の自動プログラムにより決定した。OTC の定性イオンについて、自動プログラムでは 443 が選択されたが、強度が弱くなることがあったため、第 2 候補の 201 も定性イオンとして設定した。

4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、参考文献⁴⁾と同様とし、所有している器具や測定対象成分にあわせて一部変更した。

5. 妥当性評価

検討した試験法を用いた妥当性評価試験の結果を表 3 に示す。ガイドラインの目標値は、真度が 70~120%、併行精度が 15%以下 (添加濃度 0.02 μg/g) または 10%以下

表 3. 妥当性評価試験結果 (豚の筋肉) .

成分名称	添加濃度 : 0.02 μg/g			添加濃度 : 0.2 μg/g		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Oxytetracycline	98	2.5	2.8	96	2.2	3.8
Tetracycline	94	3.0	6.2	93	1.5	4.1
Chlortetracycline	90	4.7	9.2	87	2.7	5.5

(添加濃度 0.2 µg/g) , 室内精度が 20%以下または 15%以下であり, いずれも目標値を満たす良好な結果が得られた。また, 選択性についてもガイドラインの目標値を満たすことを確認した。以上のことから, 本分析法は食品衛生法に基づく規格基準検査で使用可能な分析法であることが確認できた。

IV 参考文献

- 1) 村山三徳 (2010) 食品中の残留動物用医薬品の規制. 食品衛生学雑誌, 51, 360-362.
- 2) 内山万利子 (2018) テトラサイクリン系抗生物質. 日本獣医師会雑誌, 70, 10-14.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部 (2005) 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について. 平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号.
- 4) 藤井良昭・西村一彦・橋本諭・加賀岳郎 (2017) 高速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, 369-374.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部 (2010) 食品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 日食安発 1224 第 1 号.
- 6) 清川由樹・吉田純一 (2017) LC/MS/MS を用いたテトラサイクリン系抗生物質を含む動物用医薬品の迅速一斉法の検討. 鹿児島県環境保健センター所報, 18, 55-61.