

資料

エピマーを含むテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討

Examination of Analysis Method of Tetracycline Antibiotics Containing Epimers

前原香純 二石大介¹ 下島浩幸

1 はじめに

テトラサイクリン系抗生物質（以下「TCs」という。）は動物用医薬品や飼料添加物として畜水産物に広く使用されている抗生物質である。当センターでの行政試験では、水産物からオキシテトラサイクリン（以下「OTC」という。）が、過去10年間で33件検出（全て基準値以下）されており、そのうち30件が鹿児島県内産であったことから、県内の水産業においてもTCsは使用されていることが推測された。

TCsは、国内では食品衛生法により食品への残留基準値が定められているが、海外では基準値及び規制対象物質が異なる場合があり、例えば、EUではTCsの立体異性体の一種であるエピマーを含めた残留基準値が定められている。なお、エピマーは微酸性環境中や生物体内での代謝等の様々な要因により形成されることが報告されている^{1),2)}。

本県は、近年、県内産畜水産物の輸出に力を入れている。輸出品については、輸出先の規制を遵守しなければならず、輸出先の規制にも対応しうる検査法の確立が求められる。現在、当センターのTCs検査は、厚生労働省から示された「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試験法」に準じた試験法³⁾（以下「公定法」という。）で実施しており、エピマーの分析には対応していない。

そこで、畜水産物を対象としたエピマーを含むTCsのLC-MS/MSによる一斉分析法の検討を行った。また、公定法で得られた結果との比較及びTCsが検出された県内産水産物中のエピマー含有量の実態調査を実施したので報告する。

2 方法

2. 1 試料

カンパチ、ブリ、ヒラメ、鶏肉及び豚肉を試料とした。魚介類は骨や皮、血合い肉を除去したものを細切均一化し、肉類は骨や軟骨、皮、脂肪部位を除去したものを細切均一化した。

2. 2 対象化合物

OTC、テトラサイクリン（以下「TC」という。）、クロルテトラサイクリン（以下「CTC」という。）及びドキシサイクリン（以下「DC」という。）と、エピマーである4-エピマー-オキシテトラサイクリン（以下「4epiOTC」という。）、4-エピマー-テトラサイクリン（以下「4epiTC」という。）、4-エピマー-クロルテトラサイクリン（以下「4epiCTC」という。）の7物質を対象とした。

2. 3 試薬及び試液

2. 3. 1 試薬

(1) 標準品

オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品（高速液体クロマトグラフ用）、テトラサイクリン塩酸塩標準品（高速液体クロマトグラフ用）、クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品（高速液体クロマトグラフ用）、ドキシサイクリンヒクラー特標準品（高速液体クロマトグラフ用）は、富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。

4-エピマー-オキシテトラサイクリン標準品（試験研究用）、4-エピマー-テトラサイクリン標準品（試験研究用）、4-エピマー-クロルテトラサイクリン標準品（試験研究用）はToronto Research Chemicals Inc製を用

1 退職（2020年3月）

いた。

(2) 有機溶媒

メタノール(LC/MS用)は富士フイルム和光純薬(株)製, メタノール(高速液体クロマトグラフィー用)は関東化学(株)製を用いた。

(3) その他の試薬

1mol/Lギ酸アンモニウム溶液(高速液体クロマトグラフ用), クエン酸一水和物(特級), リン酸二ナトリウム十二水和物(特級), ギ酸(高速液体クロマトグラフ用)は, 富士フイルム和光純薬(株)製, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物(試験研究用, 以下「EDTA・2Na」という。)は, (株)同仁化学研究所製を用いた。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムは, ジーエルサイエンス(株)製 InertSep PLS-2 (265mg)を用いた。

2. 3. 2 試液

(1) EDTA含有クエン酸緩衝液

EDTA・2Na1.86gに第1液307mLと第2液193mLを混和したものを加え溶解した。

第1液: クエン酸一水和物21.0gを超純水に溶解して1000mLとした。

第2液: リン酸二ナトリウム十二水和物71.6gを超純水に溶解して1000mLとした。

(2) 飽和EDTA二ナトリウム溶液

超純水にEDTA・2Naを飽和状態になるまで溶解した後, 静置し上澄みを用いた。

(3) 20mmol/Lギ酸アンモニウム含有水: メタノール(1:4)混液

1mol/Lギ酸アンモニウム溶液4mLに超純水を加えて200mLとし, メタノール800mLと混和して1000mLとした。

(4) 0.1%ギ酸溶液

ギ酸1mLに超純水を加えて1000mLとした。

2. 4 混合標準溶液の調製及び検量線の作成

エピマーの標準品はそれぞれ1.0mgを正確に量り取り, メタノールで10mLに定容し100 μ g/mLとした。

エピマー以外の標準品はそれぞれ50mgを正確に量り取り, メタノールで50mLに定容した後, 2.5mLずつ量り取り, メタノールで25mLに定容し100 μ g/mLとした。

これら標準原液を20mmol/Lギ酸アンモニウム溶液: メタノール(1:4)混液で混合希釈し, 0.45 μ mメンブレンフィルターで濾過したものを混合標準溶液とした。検量線は, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 μ g/mLの

6点とした。

2. 5 装置

分析には高速液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS/MS)を使用した。LC部は(株)島津製作所製のProminenceシリーズを使用し, 送液ポンプはLC-20AD, オートサンプラーはSIL-20ACHT, カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

MS部はAB Sciex社製の4000QTRAPを使用し, イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

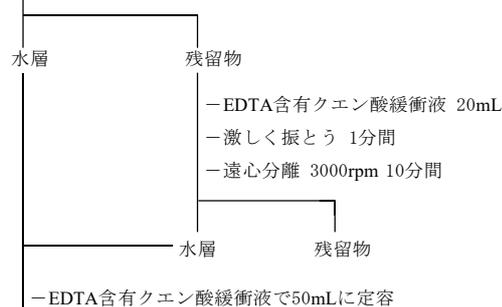
2. 6 試験溶液の調製

(一財)日本食品分析センターが実施している検査方法⁴⁾を参考に試験溶液を調製した。試験フローを図1に示す。

【抽出法】

試料 5.0g

- (添加回収試験では混合標準溶液添加: 30分程度放置)
- EDTA含有クエン酸緩衝液 25mL
- ホモジナイズ 7500rpm 1分間
- 遠心分離 3000rpm 10分間



試料抽出液

【精製法】

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム

- メタノール 10mL, 超純水 10mL
- 飽和EDTA二ナトリウム溶液 5mLでコンディショニング
- 試料抽出液 10mL負荷
- 超純水 20mLで洗浄
- 20mmol/Lギ酸アンモニウム含有水: メタノール(1:4)混液 8mLで溶出

溶出液

- 20mmol/Lギ酸アンモニウム含有水: メタノール(1:4)混液で10mLに定容
- 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過

試験溶液

LC-MS/MS測定

図1 試験フロー

2. 7 妥当性評価の実験計画

ブランク試料5.0gに対し、0.2 μ g/mL混合標準溶液を0.5 mL添加（試料中換算0.02 μ g/g）及び2.0 μ g/mL混合標準溶液を0.5mL添加（試料中換算0.2 μ g/g）し、30分間静置したものを妥当性評価試験用試料とした。

検査員1名が2併行5日間で実施し、選択性、真度、精度及び定量下限について評価を行った。

2. 8 OTCが検出された実試料の検査

2017年度から2019年度に実施した公定法による検査においてOTCを検出したカンパチ1検体、ブリ3検体、ヒラメ6検体について、OTC及び4epiOTCの含有量を本研究で検討した分析法を用いて検査を行った。

3 結果及び考察

3. 1 LCカラムの検討結果

エピマーを含むTCsを最適に測定するために、InertSustainC18カラム（内径2.1mm、長さ150mm、粒径3 μ m、炭素量11%、ジーエルサイエンス（株）製）及びInertsil ODS-SP PEEKカラム（内径2.1mm、長さ100mm、粒径3 μ m、炭素量9%、ジーエルサイエンス（株）製）について比較検討をした結果を図2に示す。

両カラムとも7物質全ての分離が可能であり、ピーク強度も十分であったが、InertSustainC18カラムの方がOTCと4epiOTCのピーク分離が良く、またエピマーの感度も良好であった。これはカラムの長さが長かったこと、充填剤の炭素量が多かったことがピークの分離により適していたためと考えられた。

DCはInertsil ODS-SP PEEKカラムの方がより高感度であった。これは、Inertsil ODS-SP PEEKカラムが接液部に金属を使用していないメタルフリーカラムであったためと考えられた。TCsは金属とキレートを形成しやすいため、カラムの金属材質や充填剤表面の残存金属への吸着が起りやすく、ピーク形状の悪化やキャリアオーバーなどの原因となることが報告されている⁵⁾。

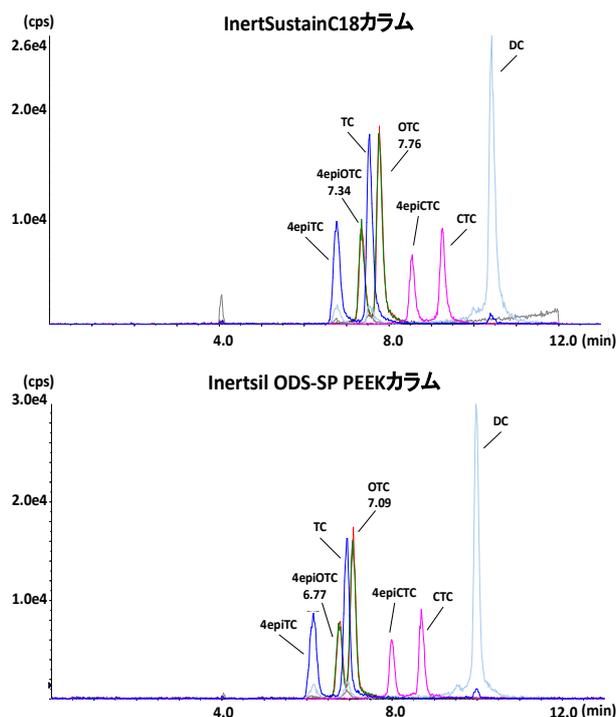


図2 カラムの違いによるTCsのクロマトグラムの比較

3. 2 カラム温度の検討結果

TCsにはケト・エノール互変異体が存在するため、ピーククリーニングを起こしやすく、ピーク形状がブロードになることがある。このケト・エノール互変異体への変化はカラム温度条件を低くすることで抑えることができ、ピーク形状の改善に有効であると報告⁵⁾されている。そこで、オープン温度の条件を40 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ Cとして比較検討した。カラムはInertSustainC18を使用した。

結果は図3のとおり25 $^{\circ}$ C及び20 $^{\circ}$ Cのピーク形状がシャープとなり感度が良かった。なお、25 $^{\circ}$ Cの方がリテンションタイムが早く分析時間の短縮が可能であり、より適切であった。

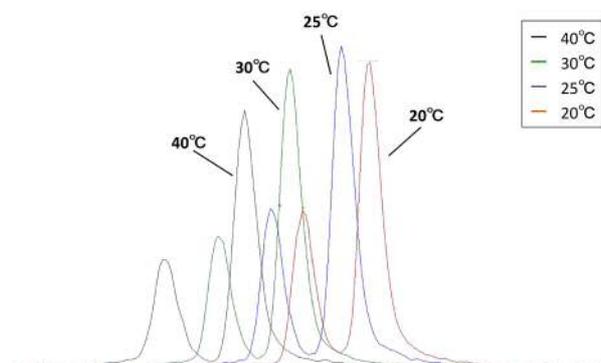


図3 温度条件によるOTC及び4epiOTCのクロマトグラムの比較

3. 3 移動相の検討結果

移動相のB液（有機相）はメタノールとし、A液（水相）については0.1%ギ酸、0.2%ギ酸、0.1%ギ酸と5mmol/Lギ酸アンモニウムの3種類を比較検討した。カラムはInertSustainC18を使用した。

結果は図4のとおり0.1%ギ酸のピーク形状が最もシャープであり感度が良好であった。

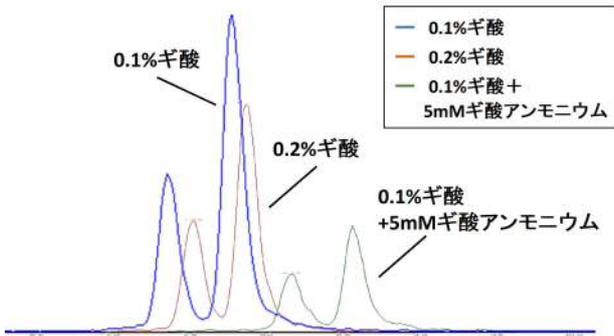


図4 移動相条件によるOTC及び4epiOTCのクロマトグラムの比較

3. 4 試験溶液調製方法の検討結果

有機溶媒使用量の低減及び検査の迅速化を目的として、公定法のヘキサンによる脱脂工程の省略を検討した。

その結果、回収率及びピーク形状に特に差が見られず問題がなかったことから、ヘキサンによる脱脂行程は省略とした。しかし、脂質の多いブリや豚肉は固相カラムでの精製途中において目詰まりすることが多いため、マニホールドを用いて減圧環境で精製を行い対応した。

3. 5 LC/MS/MS測定条件の決定

各種パラメーターは表1、LC-MS/MSの測定条件は表2のとおりとした。検量線は、0.001~0.2µg/mLの範囲において、全ての対象化合物で相関係数0.995以上の良好な直線性が得られた。

表1 化合物ごとのMS/MSパラメーター及び保持時間

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)
OTC	461.1	426.2	61	27	7.7
TC	445.1	410.1	66	27	7.5
CTC	479.1	444.1	71	31	9.3
DC	445.1	428.1	71	27	10.4
4epiOTC	461.1	426.2	61	27	7.3
4epiTC	445.1	410.1	66	27	6.8
4epiCTC	479.1	444.1	71	31	8.5

表2 LC-MS/MS測定条件

①LC条件 (株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	: ジーエルサイエンス(株)製 InertSustain C18 (内径2.1mm, 長さ150mm, 粒径3µm)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5µL
カラム温度	: 25°C
移動相	: A液) 0.1%ギ酸 B液) メタノール
グラジエント条件	: 0min (A:B=80:20) →11min (10:90) →12min (10:90) →12.1min (80:20) →18min (80:20)
②MS条件 AB Sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン法 (ESI・Positive)
イオンソース温度	: 500°C
イオンスプレー電圧	: 5.5kV
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

3. 6 妥当性評価結果

妥当性の評価は、「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⁶⁾」(以下「妥当性評価ガイドライン」という)に従い実施した。

3. 6. 1 選択性

全てのブランク試料において、定量を妨害するピークは認められなかった。

3. 6. 2 真度及び精度

真度及び精度の結果は表3のとおりであった。

真度については、試料中換算0.2µg/g添加では、ブリ88.2~110.5%、ヒラメ78.2~105.2%、鶏肉84.2~113.9%、豚肉90.1~113.4%であり、試料中換算0.02µg/g添加では、ブリ94.2~117.3%、ヒラメ90.1~111.0%、鶏肉91.3~119.3%、豚肉94.8~117.0%であった。全て妥当性評価ガイドラインの目標値である70~120%の範囲を満たした。

精度については併行精度、室内精度ともに、ブリ、ヒラメ、鶏肉、豚肉において、全ての化合物で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

3. 6. 3 定量下限

検量線の最低濃度である0.001µg/mLにおいて、S/N比≥10を満たしたため、試料中濃度0.01µg/gを定量下限値とした。

公定法ではOTC及びTCの定量下限値は0.02µg/g、CTC及びDCの定量下限値は0.03µg/gであることから、定量下限を1/2~1/3に引き下げることができ、より低濃度の検査が可能となった。

表3 真度及び精度

化合物名	ブリ						ヒラメ					
	0.2 µg/g			0.02 µg/g			0.2 µg/g			0.02 µg/g		
	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度
	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)
OTC	107.8	1.7	6.5	114.6	5.9	9.7	101.7	9.7	10.1	111.0	4.5	6.9
TC	110.1	3.3	8.3	117.3	3.5	7.9	105.2	9.7	12.6	110.0	5.3	9.4
DC	88.2	3.8	8.0	94.2	6.6	7.3	78.2	9.1	9.4	90.1	14.1	15.6
CTC	105.0	3.4	9.4	112.7	2.4	7.9	91.6	8.7	10.6	97.6	4.7	13.0
4epiOTC	110.5	2.2	8.5	116.3	6.3	6.5	103.5	9.6	14.0	106.4	5.4	11.4
4epiTC	104.2	4.4	6.6	108.4	3.6	5.8	99.2	8.5	9.4	104.5	6.5	7.4
4epiCTC	96.0	1.8	7.1	100.9	6.2	7.9	84.7	7.6	7.9	92.5	4.1	10.3
ガイドラインの目標値	70~120	10>	15>	70~120	15>	20>	70~120	10>	15>	70~120	15>	20>

化合物名	鶏肉						豚肉					
	0.2 µg/g			0.02 µg/g			0.2 µg/g			0.02 µg/g		
	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度
	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(RSD%)
OTC	106.5	3.1	5.4	110.7	5.2	7.3	113.4	1.9	7.4	114.8	0.9	6.2
TC	106.3	3.4	9.0	115.5	5.4	8.3	109.3	2.0	8.4	116.1	2.8	6.8
DC	96.2	2.9	10.5	100.3	2.2	10.7	92.0	2.4	9.1	95.6	2.8	8.9
CTC	104.0	4.2	11.8	110.2	6.0	8.6	105.3	3.3	10.0	110.5	3.9	10.6
4epiOTC	113.9	3.7	9.0	119.3	8.0	8.7	109.5	3.1	9.0	117.0	5.8	5.8
4epiTC	94.4	3.7	8.7	102.1	5.0	5.0	97.8	1.6	6.1	103.8	2.4	5.0
4epiCTC	84.2	5.4	14.3	91.3	8.3	10.3	90.1	2.9	7.7	94.8	3.6	10.9
ガイドラインの目標値	70~120	10>	15>	70~120	15>	20>	70~120	10>	15>	70~120	15>	20>

3. 7 OTCが検出された実試料の定量値の比較及び4epiOTC含有量結果

2017年度から2019年度に実施した公定法による検査において、OTCを検出したカンパチ1検体、ブリ3検体、ヒラメ6検体について、本研究の分析法を用いてOTC及び4epiOTCの定量を行った。結果は表4のとおりであった。

公定法の結果を100%としたとき、本研究の分析法による検査結果の一致率は73.7~144.1%であり、公定法と本研究の分析法ではおおむね近い結果であったが、含有量が多くなると乖離が大きくなる傾向がみられた。

図5に示すとおり、4epiOTCの含有量はOTCの含有量と相関が見られた。また、スズキ目であるカンパチとブリについては4epiOTCは定量下限値未満であった。

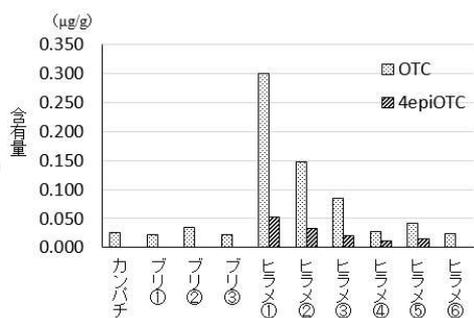


図5 OTCと4epiOTCの含有量の比較

表4 検査結果及び公定法との比較結果

試料	物質名	検査結果(A) (µg/g)	公定法結果(B) (µg/g)	A/B (%)
カンパチ	OTC	0.025	0.023	108.7
	4epiOTC	定量下限値未満	—	—
ブリ①	OTC	0.023	0.022	104.5
	4epiOTC	定量下限値未満	—	—
ブリ②	OTC	0.034	0.030	113.3
	4epiOTC	定量下限値未満	—	—
ブリ③	OTC	0.023	0.022	104.5
	4epiOTC	定量下限値未満	—	—
ヒラメ①	OTC	0.300	0.220	136.4
	4epiOTC	0.052	—	—
ヒラメ②	OTC	0.147	0.102	144.1
	4epiOTC	0.033	—	—
ヒラメ③	OTC	0.085	0.072	118.1
	4epiOTC	0.020	—	—
ヒラメ④	OTC	0.027	0.032	84.4
	4epiOTC	0.011	—	—
ヒラメ⑤	OTC	0.042	0.057	73.7
	4epiOTC	0.015	—	—
ヒラメ⑥	OTC	0.024	0.020	120.0
	4epiOTC	定量下限値未満	—	—

4 まとめ

- 1) TCsのエピマーも含めた検査法について、ブリ、ヒラメ、鶏肉、豚肉において妥当性評価を実施したところ、良好な結果を得ることができ、TCsのエピマーを規制対象としている輸出先に対応した検査が可能であることが示唆された。
- 2) ヘキサンを用いた脱脂工程を省略することにより、抽出・精製に要する時間を短縮することができた。
- 3) 定量下限が公定法の1/2～1/3となったことから、より微量での検査が可能になった。
- 4) 本研究の検査法を用いて実試料中のOTC及び4epiOTCを定量した結果、公定法との一致率は73.7%～144.1%であった。本研究の検査法は、OTCが0.147 μ g/gのとき一致率が144.1%となり、より高値を示す傾向があるものの、スクリーニング検査としては十分に有用であった。
- 5) 今回試験で用いたヒラメのOTCと4epiOTC含有量は相関がみられた。
また、スズキ目であるカンパチとブリは、OTCは検出したが4epiOTCは定量下限値未満であった。

参考文献

- 1) 南谷臣昭, 坂本友佳, 他; 液体クロマトグラフィー・高分解能Orbitrap質量分析法による牛乳中のテトラサイクリン系抗生物質の定量分析, 岐阜県保健環境研究所報, **23**, 18～22 (2015)
- 2) 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会第52回会合議事録, 平成23年1月24日
- 3) 臼井力, 清川由樹, 他; HPLCを用いた水産物中の残留テトラサイクリン系抗生物質試験法の妥当性評価, 本誌, **16**, 63～69 (2015)
- 4) 小椋和彦, 澁谷直美, 他; LC-MS/MSによる畜産物中のテトラサイクリン系抗生物質分析法の検討, 日本食品衛生学会第114回学術講演会要旨集, 140 (2018)
- 5) 清川由樹, 吉田純一; 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, 本誌, **18**, 55～59 (2017)
- 6) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知; 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 (食安発1224第1号), 平成22年12月24日