

資 料

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

南谷臣昭, 坂本友佳, 永井宏幸, 後藤黄太郎

要 旨

牛乳中に残留するテトラサイクリン系抗生物質を, 高分解能 Orbitrap 質量分析計を用いて定量する分析法を検討し, その妥当性評価を行った. 食品中の残留物質の分析には, トリプル四重極質量分析計が最も汎用されているが, 今回, 厚生労働省通知の試験法により試験溶液を調製して, 高分解能 Orbitrap 質量分析法により定量分析を行った. 厚生労働省通知のガイドラインに従い, 1日2併行, 5日間の添加回収試験により, 試験法の妥当性を評価したところ, 分析対象の3化合物で, 真度が78~80%, 併行精度が5%以下, 室内精度が10%以下となり, 良好な結果が得られた. また, ブランク試料のクロマトグラムにはノイズがほとんど見られず, 極めて高い選択性を示した. 定量限界は0.01 mg/kgを設定することが可能であった.

キーワード: 牛乳, テトラサイクリン系抗生物質, 高分解能 Orbitrap 質量分析法, 妥当性評価

1 はじめに

オキシテトラサイクリン (OTC), クロルテトラサイクリン (CTC) 及びテトラサイクリン (TC) は, 多くのグラム陽性菌及び陰性菌をはじめ, マイコプラズマ, クラミジア及びリケッチアなどに対して有効な, 広域スペクトル抗生物質である. 日本では, 動物用医薬品として, 牛, 豚, 鶏, 魚類等を対象に, OTC と CTC の塩酸塩が飼料添加剤や注射剤等で承認されている.

日本を初め, JECFA や EMEA の ADI は, テトラサイクリン類の微生物学的影響を考慮して設定されており, 過去に調査されたヒト腸内細菌叢に耐性菌を生じさせない量をもとに, OTC, CTC 及び TC の単独又は和として, 0.03 mg/kg 体重/日と設定されている¹⁾. 牛乳中の基準値は, これに残留試験の結果を加味して, OTC, CTC 及び TC の総和で, 0.1 mg/kg が設定されている.

畜水産物に残留するテトラサイクリン類の分析法としては, 厚生労働省から個別試験法が通知されている²⁾. この試験法は, マグネシウムイオンを含むイミダゾール緩衝液を移動相とする液体クロマトグラフィーにより, 蛍光検出法で定量する方法である. しかし, 近年, 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS あるいは LC-MS/MS) の普及により, 質量分析計を用いて定

量する分析法が多く開発されている³⁾⁻⁵⁾. 特に, トリプル四重極 (QqQ) によるタンデム質量分析法は, 検出感度と特異性に優れた方法であり, 多成分同時分析法としても広く用いられている.

今回我々は, 高分解能 Orbitrap 質量分析計による精密質量分析により定量する方法を検討した. テトラサイクリン系抗生物質3化合物を対象に, 個別試験法の前処理により試験溶液を調製した. 個別試験法の定量限界 (OTC, TC : 0.02 mg/kg, CTC : 0.03 mg/kg) 濃度における添加回収試験を実施し, 厚生労働省通知のガイドライン⁶⁾に基づく妥当性評価を行い, 選択性, 真度, 併行精度, 室内精度, 定量限界のパラメータを求め, ガイドラインの目標値に適合していることを確認した.

2 実験方法

2.1 試料

添加回収用試料として, 岐阜県内の小売店で販売されていた牛乳 (無脂乳固形分 8.3%以上, 乳脂肪分 3.6%以上) を用いた. 事前に試験対象であるテトラサイクリン類が含まれていないことを確認して用いた.

2.2 試薬・試液

標準品は, 和光純薬工業 (株) 製の高速液体クロマトグラフィー用のオキシテトラサイクリン塩酸塩標準

品(純度 98.0%以上), クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品(純度 98.0%以上), テトラサイクリン塩酸塩標準品(純度 99.0%以上)を用いた。各標準品を 1,000 $\mu\text{g/mL}$ となるようにメタノールに溶解して標準原液を調製した。3 種の標準原液を混合して, メタノールで希釈し, 1 $\mu\text{g/mL}$ としたものを混合標準溶液とした。

試験溶液の調製に用いた, エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(EDTA), クエン酸及びリン酸二ナトリウムは和光純薬工業(株)製の特級を, *n*-ヘキサンは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を, メタノールは和光純薬工業(株)製の LC-MS 用を用いた。液体クロマトグラフィーの移動相に用いたアセトニトリル及びギ酸は, 和光純薬工業(株)製の LC-MS 用を用いた。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムは Waters 社製の Sep-Pak Plus PS-2 (265 mg) を用いた。試験溶液を入れるバイアルは, Agilent 社製のポリプロピレン(PP)製バイアル(1 mL)を用いた。

2.3 装置および測定条件

2.3.1 装置

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所(株)製 LC-30 シリーズ(Nexera X2)

質量分析装置: Thermo Fisher Scientific 社製 Q-Exactive Plus

2.3.2 LC 条件

カラム: (財)化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (2.1 $\times$ 150 mm, 3 μm), カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$, 注入量: 5 μL , 移動相: A 液 0.1%ギ酸, B 液アセトニトリル, 移動相流速: 0.2 mL/分, グラジエント条件: 0 分(A:B=95:5) $\rightarrow$ 10 分(A:B=50:50) $\rightarrow$ 15 分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 20 分(A:B=5:95) $\rightarrow$ 20.1 分(A:B=95:5) $\rightarrow$ 30 分(A:B=95:5), 保持時間: 7.4 分(OTC), 7.7 分(TC), 8.6 分(CTC)

2.3.3 MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード(ESI(+)), スプレー電圧: 4.4 kV, シースガス圧: 30 arb, Aux ガス圧: 5 arb, キャピラリー温度: 250 $^{\circ}\text{C}$, ベーポライザー温度: 300 $^{\circ}\text{C}$, RF-レンズレベル: 50

測定モード: t-SIM (四重極による質量範囲の絞り込みと Orbitrap によるスキャン), アイソレーションウィンドウ(四重極): 4.0 m/z , 分解能: 140,000 (FWHM) @ m/z 200, AGC ターゲット: $5e^5$, Maximum IT: 100 ms

2.4 試験溶液の調製

厚生労働省通知の個別試験法に従って行った²⁾。

2.4.1 抽出

牛乳 5 g を量り採り, EDTA 含クエン酸緩衝液 30 mL

及び *n*-ヘキサン 20 mL を加え, 振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離して水層を分取した。

2.4.2 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム(Sep-Pak Plus PS-2)にメタノール 10 mL, 水 10 mL, 飽和 EDTA 溶液 5 mL を順次注入し, 流出液は捨てた。このカラムに, 2.4.1 抽出で得られた水層を注入した後, 水 10 mL を注入し流出液は捨てた。このカラムにメタノール 10 mL を注入し全溶出液を採り, 減圧下で溶媒を除去した後, 残留物をアセトニトリル・水(1:9)混液に溶解してメスフラスコで 10 mL に定容したものを, PP 製バイアルに移し替えて試験溶液とした。(0.5 g sample/mL)

2.5 定量

1 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液を 1 mL 採取し, 水で希釈して 10 mL に定容して, 100 ng/mL の標準溶液を調製した。さらにこれを, アセトニトリル・水(1:9)混液で希釈して, 検量線用の標準溶液を調製した(1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 ng/mL の 6 濃度)。標準溶液も, 試験溶液と同様に PP 製バイアルに移し替えた。これを 5 μL 注入してピーク面積法により検量線を作成し, 絶対検量線法により濃度を求めた。

解析対象としたクロマトグラムは, 各化合物のプロトン付加分子の精密質量(OTC: m/z 461.1554, m/z CTC: 479.1215, m/z TC: 445.1605)の $\pm 10\text{ppm}$ をマストランクス(質量抽出幅)とする, 抽出イオンクロマトグラム(EIC)を用いた。

2.6 添加回収試験及び妥当性評価

牛乳 5 g に, OTC 及び TC 0.2 $\mu\text{g/mL}$, CTC 0.3 $\mu\text{g/mL}$ を含む混合標準溶液を 0.5 mL 添加して添加試料とした(試料中濃度 OTC 及び TC: 0.02 mg/kg, CTC: 0.03 mg/kg)。

本試験法の妥当性を評価するため, 1 日 2 併行の添加回収試験を 5 日間実施し, 全体の平均値から真度(%)を, 一元配置の分散分析により併行精度(RSD%)と室内精度(RSD%)を求めた。また, ブランク試料を, 2.4 試験溶液の調製に従って調製した試験溶液のクロマトグラム上の妨害ピークをもとに, 選択性を評価した。これらの結果を, 厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン⁹⁾に示された目標値と比較した。

2.7 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試料を, 2.4 試験溶液の調製に従い調製し, 添加回収試験における回収率 100%相当濃度の標準液 10 mL に溶解して, マトリックス標準溶液とした。同濃度の溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス

ス標準溶液のピーク面積の比を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。

3 結果および考察

3.1 TC 及び CTC の異性化

今回の検討では当初、試験溶液を入れるバイアルにガラス製バイアルを使用していた。しかし、TC 及び CTC の保持時間の前に、TC 及び CTC のプロトン付加分子と同一の精密質量を持つ、異性体と見られるピークが観察された (図1, 保持時間: 7.2 分 (TC の異性体), 7.9 分 (CTC の異性体))。特に CTC の標準溶液では異性体のピークが大きかった。

CTC は、微酸性 (pH 2-6) 溶液中でエピマー化して、4-epi-CTC を形成することが知られている⁷⁾。今回は、不活性処理済みのガラス製バイアルを用いたが、試験溶液の溶媒に水を多く含んでいたため、ガラス表面に残存するシラノール基の影響により、エピマー化が進行したと推察された。

そこで、バイアルを PP 製のものに変更したところ、異性化の進行を抑えることができ、良好なクロマトグラムが得られた (図3, (C))。

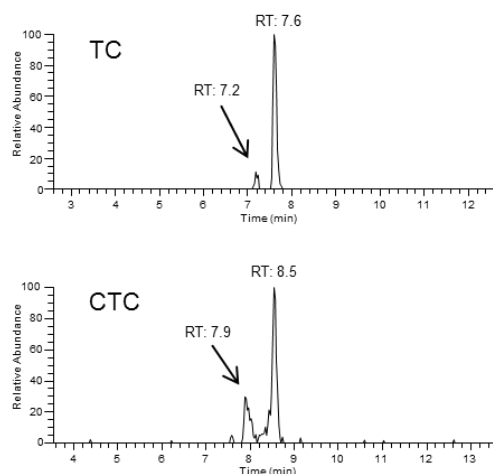


図1. TC 及び CTC の抽出イオンクロマトグラフ
上段: TC (m/z 445.1560-445.1650), 下段: CTC (m/z 479.1167-479.1263), 牛乳添加試料の抽出溶液, ガラス製バイアル使用

3.2 LC の測定条件

石井らは、リーディングする傾向にある CTC のピーク形状を改善するのに、L-column ODS が有効であるこ

とを報告している³⁾。今回使用した L-column2 ODS は、L-column ODS に比べ、残存シラノールをより高度にエンドキャッピングした担体を使用しており、CTC のピーク形状は良好であった。

3.3 選択性、検量線及び定量限界

Orbitrap 質量分析計による定量分析においては、QQQ 型質量分析計で必要となる SRM 条件の最適化を行う必要がなく、Orbitrap のフルスキャンモードによる測定結果から、プロトン付加分子などの精密質量の抽出イオンクロマトグラムを得ることにより、QQQ 型検出器と同様な選択性の高い結果を得ることが可能となる⁸⁾。

ブランク試料のクロマトグラムを図3に示す。各化合物の精密質量の ± 10 ppm の抽出イオンクロマトグラムにおいては、妨害ピークはおろか、ノイズがほとんど見られず、OTC と CTC でわずかにスパイクノイズが見られるのみであり、極めて良好な選択性を示した。

検量線を図2に示す。検量線に用いた、1~50 ng/mL の範囲において、決定係数 (r^2) はいずれの化合物においても 0.995 以上となり、良好な直線性を示した。

定量限界の目標値は、基準値の 1/10 である 0.01 mg/kg とした。定量限界相当濃度の標準溶液 (5 ng/mL) のクロマトグラムは、十分な感度を有していたことから、定量限界として 0.01 mg/kg が設定可能であった。

3.4 真度及び精度

個別試験法の定量限界 (OTC, TC : 0.02 mg/kg, CTC : 0.03 mg/kg) に相当する濃度における添加回収試験から求められた、真度、併行精度及び室内精度の結果を表1に示す。

真度は、妥当性評価ガイドラインの目標値である 70 ~ 120% の範囲内となり、良好な結果が得られた。マトリックス標準溶液とその濃度に相当する溶媒標準溶液の比 (百分率) は、OTC が 94%, TC が 98%, CTC が 97% となり、試料マトリックスの測定への影響はほとんど見られなかった。

併行精度は、いずれの化合物も 5% 以内、室内精度はいずれの化合物も 10% 以内となり、妥当性評価ガイドラインの目標値である 15% 以内、20% 以内を十分に満たしていた。

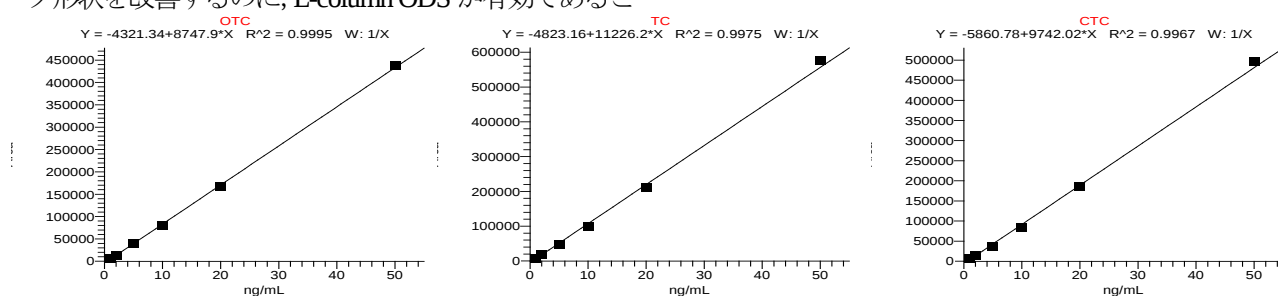


図2. 検量線 (左: OTC ($r^2=0.9995$), 中央: TC ($r^2=0.9975$), 右: CTC ($r^2=0.9967$))

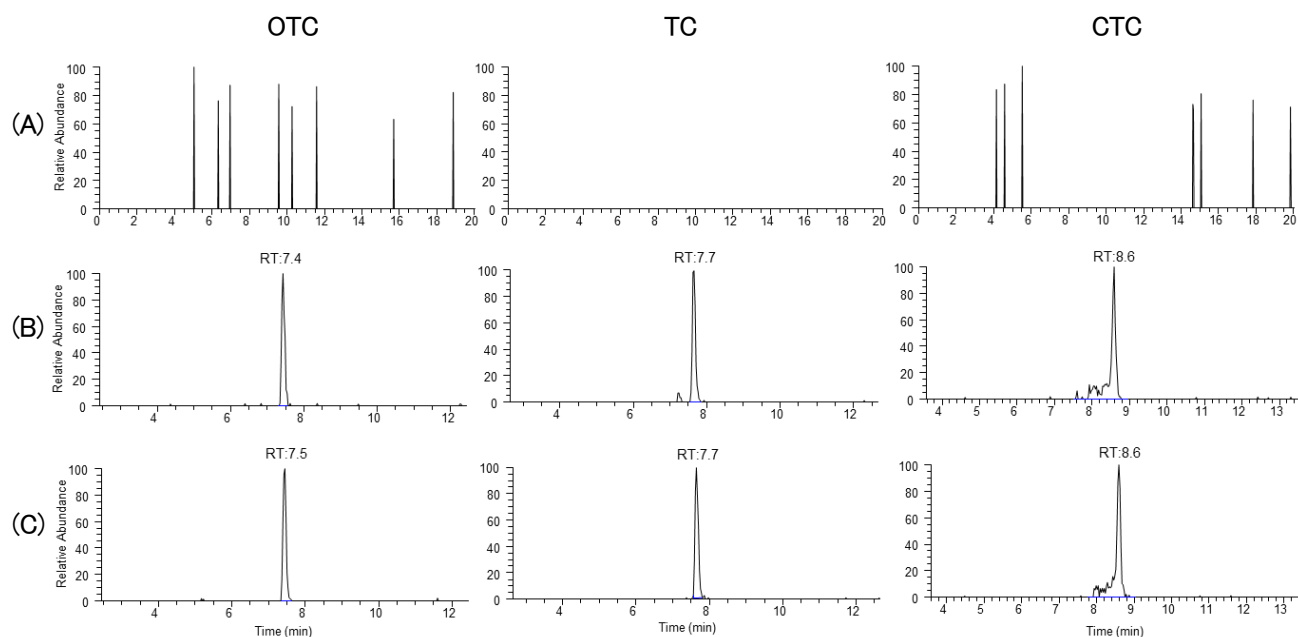


図 3. 抽出イオンクロマトグラム (左列: OTC (m/z 461.1508-461.1600), 中央列: TC (m/z 445.1560-445.1650), 右列: CTC (m/z 479.1167-479.1263))

(A) 牛乳ブランク試料の抽出溶液, (B) 牛乳添加試料の抽出溶液 (添加濃度 OTC, TC : 0.02 mg/kg, CTC : 0.03 mg/kg), (C) 標準溶液 (OTC, TC : 10 ng/mL, CTC : 15 ng/mL)

表 1. 真度, 併行精度及び室内精度の結果

	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OTC	80.2	3.2	7.3
TC	79.4	4.7	6.3
CTC	78.0	4.3	6.6

4 まとめ

牛乳中のテトラサイクリン系抗生物質を, 高分解能 Orbitrap 質量分析計による精密質量分析により実施する方法を検討した。

Orbitrap 質量分析計のフルスキャンモードによる測定結果から, テトラサイクリンのプロトン付加分子の精密質量 ± 10 ppm の抽出イオンクロマトグラムを得ることにより, 極めて高い選択性が得られた。標準溶液の測定結果から, 定量限界は, 基準値の 1/10 である 0.01 mg/kg を設定することが可能であった。

添加回収試験の結果, 真度及び精度は妥当性評価ガイドラインの目標値に適合していた。また, 試料マトリックスの測定における影響は見られなかった。

Orbitrap 質量分析計による定量分析は, 現在汎用されている QqQ 質量分析計と同様に, 行政検査に用いることが十分に可能であることが示された。今回は, テトラサイクリン類のプロトン付加分子のモノアイソトピック質量を対象とした定量分析を実施したが,

Orbitrap 質量分析計の強みは, 精密質量による成分の同定能力にある。今後は, 同位体ピークの理論比との比較も加味して, 成分の同定能力をさらに強化した分析系の構築を行う必要がある。

文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会委員長通知: 食品健康影響評価の結果の通知について, 平成 24 年 11 月 5 日, 府食第 969 号, 2012.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号, 2005.
- 3) Ishii R., Horie M., Murayama M., Maitani T.: Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC-MS/MS, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 47, 277-283, 2006.
- 4) Kanda M., Kusano T., Osanai T., Ushiyama K., Takeba K., Sakamoto M., Hayashi H., Igusa K., Ibe A., Nagayama T.: Rapid Determination of Residues of 4 tetracyclines in Meat by a microbiological screening, HPLC and LC/MS/MS, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 49, 37-44, 2008.
- 5) Bogialli, S., Curini, R., Di, Corcia, A., Lagana, A., Rizuti, G.: A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues, J. Agric. Food Chem., 54, 1564-1570, 2006.

- 6) 厚生労働省医薬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について, 平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1224001 号, 2010.
- 7) Kennedy, D. G, McCracken, R. J., Carey, M. P, Blachflower, W. J., Hewitt, S. A.: Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. J. Chromatogr. A, 812, 327-337, 1998.
- 8) Gomez-Perez M. L., Plaza-Bolanos P., Romero-Gonzalez R. Martinez-Vidal J. L.: Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1248, 130-138, 2012.

Quantitative determination of tetracycline antibiotics in milk using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry

Tomiaki MINATANI, Yuka Sakamoto, Hiroyuki NAGAI, Kotarou GOTO

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan.*