

【調査研究】

## LC-MS/MSを用いたはちみつ中のテトラサイクリン系抗生物質に関する 一斉分析法の検討

Study on a Method for Simultaneous Determination of Tetracycline Antibiotics in Honey by LC-MS/MS

浦山豊弘, 難波順子, 金子英史, 佐藤 淳, 繁田典子

URAYAMA Toyohiro, NAMBA Junko, KANEKO Hidefumi, SATO Atsushi, SHIGETA Noriko

### 要 旨

テトラサイクリン系抗生物質について、はちみつを試料としてLC-MS/MSを用いた一斉分析法を検討した。試料を水で希釈・均一化し、固相カラム（Oasis HLB 60 mg）による精製を行う方法で良好な回収率が得られた。分析法の妥当性評価を厚生労働省が示すガイドラインに基づき実施したところ、食品衛生法に基づく規格基準のある4物質を含む5物質で評価に係る目標値を満たした。

[キーワード：テトラサイクリン系抗生物質、はちみつ、一斉分析法、液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words : Tetracycline antibiotics, Honey, Simultaneous determination, LC-MS/MS]

## 1 はじめに

動物用医薬品は、安定した高い生産性を得るため、ペットや家畜等の疫病予防又は成長促進を目的に家畜や養殖魚等に用いられる医薬品である。

食品への残留は、食品衛生法に基づく規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）（以下「残留基準」という。）が定められており、平成18年のポジティブリスト制度施行により、個別の基準がある場合を除き、抗菌性物質を含有してはならないとされた。

このような経緯や食の安全・安心に対する県民意識の高まりを踏まえ、当センターでは残留動物用医薬品の検査を継続して実施している。

動物用医薬品の分析法としては、厚生労働省から「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日付け食安発第0124001号）（以下「通知試験法」という。）により、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）」等が示されている。しかしながら、煩雑で時間も要する難点があったため、これまでに畜水産物中のサルファ剤等合成抗菌剤を主とする動物用医薬品について、有機溶媒と2種類の固相カラムを用いて簡単かつ確実にクリーンアップを行いLC-MS/MSで測定する一斉分析法を開発し、厚生労働省が示す「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19年11月15日付け、食安発第1115001号）（以下「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価を実

施し報告した<sup>1)</sup>。更に第2報<sup>2)</sup>及び第3報<sup>3)</sup>（以下「既報1」という。）において、同じ分析法で分析可能な物質を追加した。

また、抗生物質等についても、理化学的分析法を確立しておらず微生物学的分析法により分析を実施していたため、分析の効率性の向上等を目指し、はちみつを用いたマクロライド系抗生物質等の一斉分析法を検討し、妥当性評価を行った<sup>4)</sup>。（以下「既報2」という。）

今回、分析可能な抗生物質等の種類を増やすため、マクロライド系抗生物質等との同時分析では妥当性評価の目標値を満たさなかったテトラサイクリン系抗生物質の前処理法について、はちみつを用いて検討し、妥当性評価を行ったので報告する。

## 2 方法

### 2.1 試料

今回の試料として、ガイドラインで代表的な食品として挙げられる畜水産物の1つであるはちみつのうち、国産の純粋はちみつで、一般に流通しており入手が容易な、れんげはちみつ、あかしあはちみつ及びみかんはちみつの3種類を選択した。あかしあはちみつとれんげはちみつで基礎的な検討及び妥当性評価を行い、3種類のはちみつで、はちみつの種類による回収率の違いを確認した。

### 2.2 検討物質

いずれかの食品で残留基準が設定されているテトラサ

イクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ドキシサイクリンの4物質のほか、残留基準が設定されていないテトラサイクリン系抗生物質のうち標準物質が入手できたデメクロサイクリン、ミノサイクリン及びチゲサイクリンの3物質を加えた7物質について検討した。

### 2.3 標準品、固相カラム及び試薬

標準品：テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン及びチゲサイクリン：富士フィルム和光純薬製

オキシテトラサイクリン：関東化学製

標準原液：各標準品10.0 mgを精秤後、メタノールに溶解し、10.0 mLに定容して標準原液（1000 µg/mL）を調製した。（溶解しにくい物質は少量のギ酸を添加してメタノールに溶解させた）  
混合標準原液：各標準原液（1000 µg/mL）を各1 mLずつ分取して混合し、メタノールで10 mLに定容して100 µg/mLの混合標準原液を調製した。

固相カラム：Waters製 Oasis HLB 1 cc Vac RC Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm（以下「HLB 60 mgカラム」という。）

シリンジフィルター：Millipore製 Millex-LCR 0.45 µm

その他の試薬：LC/MS用、特級試薬を用いた。

### 2.4 装置及び測定条件

#### 1) LC条件

HPLC：島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

カラム：Waters製 XTerra MS C18 2.1 mm × 150 mm, 3.5 µm

カラム温度：40 °C

移動相：A液：0.1%ギ酸水溶液、B液：アセトニトリル  
グラジエント条件：A/B = 97/3 (0-3 min) → 57/43 (19 min) → 2/98 (24-33 min) → 97/3 (38-48 min)

移動相流量：0.2 mL/min

試料注入量：5 µL

#### 2) MS条件

MS機種：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MRMモード

測定イオン：表1に示した。

イオン化モード：ESI positive モード

ターボガス温度：600 °C

イオン化電圧：5500 V

表1 測定イオン

抗生物質名	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	
		定量	確認
Tetracycline	445.126	409.9	154.1
Chlortetracycline	479.005	444.0	154.3
Oxytetracycline	461.071	426.2	201.3
Doxycycline	445.185	428.2	154.2
Demeclocycline	465.016	447.9	153.9
Minocycline	458.079	441.2	283.1
Tigecycline	586.174	513.2	569.1

### 2.5 前処理操作

分析フローを図1に示す。はちみつ5 gを50 mLポリプロピレン（以下「PP」という。）製遠沈管に量り取り、精製水20 mLを加えて超音波で溶解し抽出溶液とした。

HLB 60 mgカラムをメタノール10 mL、精製水10 mLで順にコンディショニングした後、抽出溶液を負荷し、精製水10 mLで洗浄後、メタノール5 mLで15 mL LPP製遠沈管に溶出させた。溶出液を窒素ガスで0.5 mLまで濃縮し、濃縮液を10%メタノールで5 mLに定容後、0.45 µmメンブレンフィルターでろ過したものをPP製バイアルに入れLC-MS/MS測定用分析溶液とした。

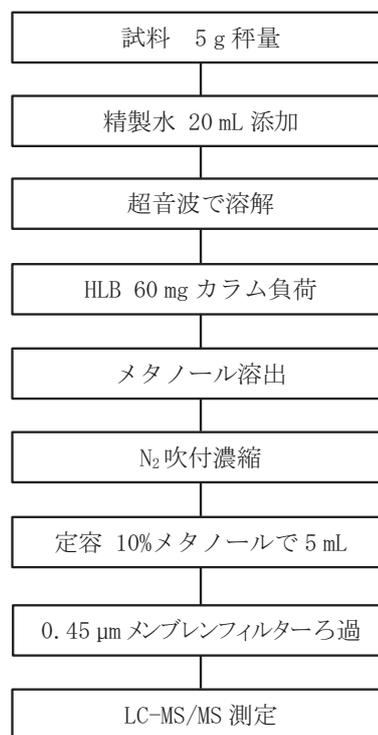


図1 分析フロー

## 2.6 妥当性評価の方法

ガイドラインに示された実施者1名が2併行を5日間実施する枝分かれ試験計画に基づき、はちみつ試料に対して添加濃度0.1 µg/g及び0.01 µg/gの2濃度で添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。なお、いずれの食品にも残留基準が設定されていない3物質は定量限界濃度を添加する必要があることから、デメクロサイクリン及びミノサイクリンは0.01 µg/g、チゲサイクリンは0.05 µg/g（定量限界が農業等での一律基準濃度である0.01 µg/gを満たさないため参考）で行った。また、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びドキシサイクリンもはちみつの残留基準が設定されていないため、定量限界濃度の0.01 µg/gで行った。

また、別の種類のはちみつ2種類を用い、ガイドライン中の「妥当性評価された試験法を評価対象とした食品と異なる食品に適用する場合」に準じ、添加濃度0.1 µg/g及び0.01 µg/g（チゲサイクリンは0.05 µg/g）の2濃度で5併行の添加回収試験を行い、選択性及び真度を評価した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 LC条件

LCの分析カラムは、各地方衛生研究所等での報告<sup>5), 6)</sup>や通知試験法のうち「ドキシサイクリン試験法（畜水産物）」（以下「ドキシサイクリン通知法」という。）でC18系が使用されており、既報1及び既報2でも使用したことから、XTerra MS C18を採用した。

移動相は、既報2でA液はギ酸水溶液が望ましいと報告したが、B液については検討していないため、既報1で

採用している0.1%ギ酸アセトニトリル、既報2で採用しているアセトニトリル、ドキシサイクリン通知法で採用しているメタノールについて感度（ピーク面積、ピーク高）及びピーク形状（ピークの半値幅）を比較した。表2のとおり0.1%ギ酸アセトニトリルよりアセトニトリルのピーク高が高く、ピーク面積が大きかったためアセトニトリルを採用した。なお、メタノールを用いた場合、ピーク面積は大きかったがピーク幅（半値幅）が広いため採用しなかった。

### 3.2 MS条件

ターボガス温度について、既報1で採用されている600℃と既報2で採用されている400℃を比較した。表2のとおり600℃のピーク面積が大きかったので600℃を採用した。

### 3.3 検量線

検量線は、チゲサイクリン以外の6物質では5~1000 ng/mLの範囲で相関係数0.99以上の直線性があった。

チゲサイクリンで直線性が確認されたのは20~200 ng/mLの狭い範囲であったが、二次近似では20~1000 ng/mLの広い範囲で相関があり、下に凸の曲線となることから、カラム等への吸着による影響と考えられた。

以下の検討では定量性を考慮し、チゲサイクリンを除き5~500 ng/mLの範囲の検量線で定量した。チゲサイクリンの定量には、直線性がある20~200 ng/mLの範囲の検量線を用いたが、みかんはちみつへの添加回収試験では検出濃度が200 ng/mLを超過するため、20~500 ng/mLの二次近似の検量線を用いた。

### 3.4 精製法の検討

精製には固相カラムOasis HLBが使用されていること

表2 B液の種類、ターボガス温度とピーク面積、ピーク高、半値幅

B液	ターボガス温度	Tetracycline			Chlortetracycline			Oxytetracycline			Chlortetracycline		
		ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)	ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)	ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)	ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)
メタノール	600℃	220,500	21,650	0.13	118,500	4,725	0.23	140,500	13,400	0.13	623,000	15,300	0.33
0.1%ギ酸アセトニトリル		96,500	12,000	0.10	49,000	3,580	0.11	59,700	7,715	0.10	230,500	11,200	0.14
アセトニトリル		125,000	15,500	0.10	63,350	4,765	0.11	73,750	9,655	0.10	324,500	16,150	0.14
	400℃	88,450	11,300	0.10	45,400	3,290	0.11	51,600	6,805	0.10	234,000	12,000	0.14

B液	ターボガス温度	Demeclocycline			Minocycline			Tigecycline		
		ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)	ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)	ピーク面積 (counts)	ピーク高 (cps)	ピーク半値幅 (min)
メタノール	600℃	72,550	6,740	0.14	147,500	13,700	0.15	44,650	4,190	0.09
0.1%ギ酸アセトニトリル		30,600	3,720	0.10	43,000	5,340	0.10	26,250	4,030	0.07
アセトニトリル		39,800	4,790	0.10	60,350	7,670	0.10	31,200	5,045	0.07
	400℃	29,250	3,550	0.10	39,750	5,075	0.10	17,050	2,770	0.07

が多いが、充填量はさまざまである。既報2では充填量1gとplus(充填量225mg)を比較したが、テトラサイクリン系では、充填量による差は見られなかった。今回、テトラサイクリン系の分析法として、HLB 60mgを用いてメタノールで溶出する方法<sup>5)</sup>と、HLB plusを用い逆方向からメタノール/0.1%ギ酸水溶液(1:1)で溶出する方法<sup>6)</sup>について、対象の7物質の分画状況を確認した。

結果を表3に示す。チゲサイクリンを除く6物質では、いずれの方法でも70~120%の良好な回収率であり、溶出溶媒を更に2mL加えた画分への溶出は1%以下であった。

### 3.5 抽出法の検討

畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質の抽出液としては、EDTA含有Tris-HCl緩衝液(既報2)、EDTA含有クエン酸緩衝液(ドキシサイクリン通知法)などが

使用されているが、はちみつにおいては水で希釈するだけで抽出可能であるとの報告<sup>5)</sup>があり、同報告での回収率も良好であったので、この方法を検討することとした。

はちみつ(あかしあはちみつを使用)5gに各0.1μg/gとなるよう標準物質を添加し、2.5に従い希釈・均一化し、メタノール10mL、精製水10mLで順番にコンデショニングした固相カラムに、抽出溶液を負荷し、精製水10mLで洗浄後、3.4と同様に溶出させた(2mLでの追加溶出はなし)。

結果を表4に示す。HLB plusではミノサイクリンとチゲサイクリンで回収率が120%を大幅に超過したので、HLB 60mgを採用することとした。

### 3.6 妥当性評価結果

#### 3.6.1 選択性

ブランク試料を2.5に従って前処理した後、LC-MS/

表3 カラムからの溶出率(%)

カラム	HLB 60mg		HLB plus	
	メタノール		メタノール/ 0.1%ギ酸水溶液(1:1)	
溶出溶媒	メタノール		メタノール/ 0.1%ギ酸水溶液(1:1)	
溶出液量	0~5 mL	5~7 mL	0~4 mL	4~6 mL
Tetracycline	83	1	93	0
Chlortetracycline	85	0	87	0
Oxytetracycline	89	0	96	0
Doxycycline	90	0	92	0
Demeclocycline	88	0	91	0
Minocycline	88	0	95	0
Tigecycline	35	0	62	0

※網掛けは5~7mL又は4~6mLの溶出液を加えても、ガイドラインの真度の目標値を満たさない項目

表4 はちみつ(あかしあはちみつ)を用いた回収率の比較(%)

カラム	HLB 60mg	HLB plus
溶出溶媒	メタノール	メタノール/ 0.1%ギ酸水溶液(1:1)
溶出液量	5 mL	4 mL
Tetracycline	98	104
Chlortetracycline	97	98
Oxytetracycline	95	111
Doxycycline	102	103
Demeclocycline	92	93
Minocycline	120	131
Tigecycline	166	267

※網掛けはガイドラインの真度の目標値を満たさない項目

表5 妥当性評価結果(れんげはちみつを使用)

動物性医薬品名	結果	選択性	高濃度(0.1μg/g)			低濃度(0.01μg/g) <sup>*1</sup>		
			真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
Tetracycline	○	○	(81)	(5)	(3)	83	4	11
Chlortetracycline	○	○	(85)	(5)	(4)	114	2	4
Oxytetracycline	○	○	85	8	3	108	13	12
Doxycycline	○	○	(88)	(3)	(5)	118	3	6
Demeclocycline	○	○	(83)	(4)	(4)	107	6	9
Minocycline		○	(92)	(2)	(9)	145	4	11
Tigecycline	○	○	(106)	(5)	(16)	114	9	15
目標値			70-120	<15	<20	70-120	<25 <sup>*2</sup>	<30 <sup>*3</sup>

※Oxytetracycline以外は、はちみつの残留基準が設定されていないため、評価対象としない高濃度の結果は括弧書きとした。

※網掛けはガイドラインの目標値を満たさない項目

\*1: Tigecyclineは0.05μg/g, \*2: Tigecyclineは<15, \*3: Tigecyclineは<20

MS で分析し、妨害ピークの有無を確認した。ガイドラインに示された許容範囲を超える妨害ピークは認められず、表5のとおり7物質全てで選択性に問題はなかった。

### 3.6.2 真度及び精度

真度及び精度の結果を表5に示す。2濃度で添加した添加回収試験で、併行精度及び室内精度の目標値を全ての物質で満たしたが、ミノサイクリン (0.01 µg/g添加) は真度が120 %を超過し、目標値を満たさなかった。

真度及び精度の目標値を全て満たした物質は、6物質であった。

### 3.6.3 はちみつの種類による真度への影響

3.6.2の妥当性評価で用いたはちみつ(れんげはちみつ)とは別のはちみつ2種類(あかしあはちみつ、みかんはちみつ)を用いて選択性及び真度を評価した結果を表6に示す。

いずれのはちみつでも、ブランク試料から許容範囲を超える妨害ピークを認めず、選択性に問題はなかった。

真度の評価では、3.6.2で目標値を満たした6物質のうちチゲサイクリンは、あかしあはちみつ、みかんはちみつのいずれも120 %を超過し、はちみつの種類によって真度の目標値を満たさないことが分かった。このことか

ら、チゲサイクリンは目標値を満たした物質から除外した。

以上から、検討した分析法がはちみつ中のテトラサイクリン系抗生物質5物質の一斉分析法として適用できると判断された。

なお、ミノサイクリンとチゲサイクリンで真度が120 %を超え分析法の確立に至らなかったのは、マトリックス効果が原因と考えられる。

## 4 まとめ

LC-MS/MSを用いたはちみつ中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析法を検討した。試料に精製水を加えて超音波で均一化し、HLB 60 mgカラムで精製し、LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。妥当性評価を行ったところ、以下の結果を得た。

- (1) 検量線は、7物質のうち6物質で、5~1000 ng/mLの範囲で相関係数0.99以上の直線性があった。
- (2) 選択性は7物質の全てで目標値を満たしていたが、真度及び精度の目標値を全て満たした物質は5物質であった。
- (3) チゲサイクリンは、はちみつの種類によって真度の目標値を満たさない場合があった。

表6 別の種類のはちみつでの評価結果

はちみつの種類	動物性医薬品名	結果	選択性	高濃度 (0.1 µg/g)	低濃度 (0.01 µg/g*)
				真度 (%)	真度 (%)
あかしあ はちみつ	Tetracycline	○	○	(95)	84
	Chlortetracycline	○	○	(103)	92
	Oxytetracycline	○	○	106	95
	Doxycycline	○	○	(99)	83
	Demeclocycline	○	○	(101)	103
	Minocycline		○	(140)	143
	Tigecycline		○	(183)	190
みかん はちみつ	Tetracycline	○	○	(82)	78
	Chlortetracycline	○	○	(94)	94
	Oxytetracycline	○	○	88	94
	Doxycycline	○	○	(96)	93
	Demeclocycline	○	○	(84)	90
	Minocycline		○	(166)	187
	Tigecycline		○	(329)	389
	目標値			70-120	70-120

※Oxytetracycline以外は、はちみつの残留基準が設定されていないため、評価対象としない高濃度の結果は括弧書きとした。

※網掛けはガイドラインの目標値を満たさない項目

\* : Tigecyclineは0.05 µg/g

(4) いずれかの食品で残留基準が設定されている4物質を含む5物質で、選択性、真度及び精度の目標値を全て満たしたことから、本分析法がはちみつ中のテトラサイクリン系抗生物質5物質の一斉分析法として適用できると判断された。

今後は、牛の筋肉等、はちみつ以外の食品を用いて、夾雑物質を多く含む食品中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析法を検討する予定である。

## 文 献

- 1) 大月史彦, 肥塚加奈江, 前田大輔, 山本 淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価, 岡山県環境保健センター年報, 35, 109-113, 2011
- 2) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価 (第2報), 岡山県環境保健センター年報, 36, 109-114, 2012
- 3) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価 (第3報), 岡山県環境保健センター年報37, 137-144, 2013
- 4) 難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行: LC-MS/MSを用いたはちみつ中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 42, 67-76, 2018
- 5) 石井里枝, 堀江正一, 村山三徳, 米谷民雄: LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のテトラサイクリン系抗生物質の分析, 食品衛生学雑誌, 47, 277-283, 2006
- 6) 内藤宏孝: LC-MS/MSによる水環境試料中のテトラサイクリン系抗生物質及びその代謝物の定量, 分析化学, 64, 25-34, 2015