

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

ドキシサイクリン試験法（畜水産物）

ドキシサイクリン試験法（畜水産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

ドキシサイクリンはテトラサイクリン系の抗生物質である。テトラサイクリン系の抗生物質は、土壌試料の系統的な探索によって発見された。クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリンはそれぞれ *Streptomyces aureofaciens* 及び *Streptomyces rimosus* によって産生される。ドキシサイクリンは、ファイザー社によりオキシテトラサイクリンから化学的に合成されたものである。ドキシサイクリンは、国内外でヒト用及び動物用医薬品として使用されている。日本では、動物用医薬品として、塩酸ドキシサイクリンを有効成分とする豚、鶏（産卵鶏を除く。）及び魚類を対象にした飼料添加剤並びに鶏を対象とした飲水添加剤が承認されている。

動物用医薬品評価書ではドキシサイクリンの一日摂取許容量を 0.0053 mg/kg 体重/日と設定している。

ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、豚、鶏及び魚介類（すずき目魚類に限る）にそれぞれ 0.05 ppm の基準値が設定された。

ドキシサイクリンの分析法については、酸や緩衝液及びアセトニトリル等の溶媒との混液で抽出する方法の報告はあるが、脂肪を溶解する溶媒を用いての報告はほとんどない²⁻⁸⁾。そこで、脂肪とともにドキシサイクリンを抽出する方法を検討するとともに一律基準 0.01 ppm に適用できるか検討を行った。

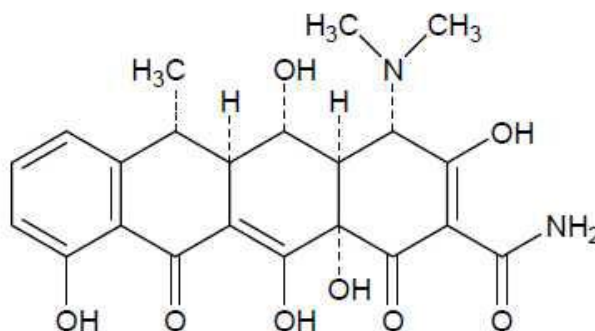
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物

和名 : ドキシサイクリン

英名 : Doxycycline

構造式



分子式 : C₂₂H₂₄N₂O₈

分子量 : 444.43

CAS NO. : 564-25-0

化学名

CAS 名 : [4S-(4 α ,4 α ,5 α ,5 α ,6 α ,12 α)]-4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacene-carboxamide

IUPAC 名 : (4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-dimethylamino-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-tetracycline-2-carboxamide

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

$$\log \text{Pow} \leq -1.36$$

[出典]

- ① 動物用医薬品評価書 ドキシサイクリン、2012年11月食品安全委員会農薬専門調査会.
- ② 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告、動物用医薬品ドキシサイクリン、2014年2月3日
- ② 中村吉成、ドキシサイクリンのすべて、魚病研究、17、67-76(1982).
- ③ 化学物質と環境 平成25年度化学物質分析法開発調査報告書、2014年10月環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
豚の筋肉	0.05
豚の脂肪	0.05
豚の肝臓	0.05
豚の腎臓	0.05
豚の食用部分	0.05
鶏の筋肉	0.05
鶏の脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.05
鶏の食用部分	0.05
魚介類 (すずき目魚類に限る。)	0.05

[実験方法]

1. 試料

検討には、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりを試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地を以下に記載した。

試料名	産地
豚の筋肉	国産
豚の脂肪	国産
豚の肝臓	国産
鶏の筋肉	国産
ぶり	国産

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 豚の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) 豚の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 豚の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 鶏の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(5) ぶり

皮を含む筋肉部を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ドキシサイクリン塩酸塩水和物標準品（ドキシサイクリンヒクラー標準品（別名：ドキシサイクリン塩酸塩ヘミエタノラート 0.5 水和物） $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0.5C_2H_5OH \cdot 0.5H_2O$ 、分子量：512.94）：純度 98.0%（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

アセトン：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）及び LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

塩酸：容量分析用（富士フィルム和光純薬製）

ギ酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物：生化学用（同仁化学研究所製）

クエン酸：特級（富士フィルム和光純薬製）

リン酸二ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）：InertSep PSA（ジーエルサイエンス製）

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：（265 mg）：InertSep PLS-2（ジーエルサイエンス製）

標準原液：標準品 23.1 mg（ドキシサイクリンとして 20.0mg）を精秤し、メタノールで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を 0.1 vol%ギ酸含有メタノールで適宜希釈し、0.000125～0.00375 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①：標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②：標準原液をアセトンで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液：第 1 液：クエン酸 21.0 g を水に溶かして 1,000 mL と

した。第2液：リン酸二ナトリウム 71.6 g を水に溶かして 1,000 mL とした。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 1.86 g に第1液 307 mL と第2液 193 mL を混和したものを加えて調製した。
ポリプロピレン製遠心管：100 mL (AGC テクノグラス製)、15 mL (コーニング製)

3. 装置

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52 (マイクロテック・ニチオン製)

フードプロセッサー：MK-K81 (パナソニック製)

濃縮装置：TurboVap® LV (バイオタージ製)

振とう機：TAIYO RECIPRO SHAKER SR-II W (大洋化学工業製)

遠心分離器：AX-321 (トミー精工製)

アスピレーター：MDA-015 (アルバック機工製)

吸引マニホールド：GL-SPE吸引マニホールド (ジーエルサイエンス製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Quattro Premier XE	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN805	Waters

4. 測定条件

LC-MS

LC 条件			
カラム	L-column2 ODS (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5µm : 化学物質評価研究機構製)		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 (µL)	5		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸溶液 B 液 : 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	95	5
	8	5	95
	11	5	95
	11.1	95	5
15	95	5	
MS 条件			
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)		
イオン化モード	ESI (+)		
キャピラリ電圧 (kV)	3.00		
ソース温度 (°C)	110		
脱溶媒温度 (°C)	350		
コーンガス	窒素、50 L/hr		
脱溶媒ガス	窒素、850 L/hr		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン (m/z)	ドキシサイクリン : MS/MS: +445.4→428.1 [コーン電圧 28 (V)、コリジョンエネルギー18 (eV)]		
定性イオン (m/z)	ドキシサイクリン : MS/MS: +445.4→154.1 [コーン電圧 28 (V)、コリジョンエネルギー30 (eV)]		
保持時間 (min)	ドキシサイクリン : 5.1		

5. 定量

ドキシサイクリン塩酸塩水和物標準品 23 mg (ドキシサイクリン 20 mg 相当) を精秤し、メタノールに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。この溶液を 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で希釈して、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.00125、0.001875、0.0025、0.00315 及び 0.00375 mg/mL の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

6. 添加試料の調製

(1) 豚の筋肉 (添加濃度：0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

豚の筋肉 (添加濃度：0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 豚の脂肪 (添加濃度：0.05 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

豚の脂肪 (添加濃度：0.01 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(3) 豚の肝臓 (添加濃度：0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

豚の肝臓 (添加濃度：0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) 鶏の筋肉 (添加濃度：0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

鶏の筋肉 (添加濃度：0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) ぶり (添加濃度：0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ぶりの筋肉 (添加濃度：0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ドキシサイクリンを試料からエチレンジアミン四酢酸存在下アセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g を 100 mL ポリプロピレン製遠心管に採り、エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 10 mL を加えた。これにアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液をポリプロピレン製 100 mL 容メスフラスコに採取した。残留物にアセトン 25 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 5 mL を 15 mL ポリプロピレン製遠心管に採り、40 °C 以下で窒素吹き付け濃縮装置で溶媒を除去した。残留物に *n*-ヘキサン 5 mL および *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え、5 分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返し、アセトニトリル層を合わせ、40 °C 以下で窒素吹き付け濃縮装置で濃縮

し、残留物に0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液1 mL を加えて溶かした。

(2) 精製

①エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムおよびスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep PSA (500 mg/3 mL)] に、0.1 mol/L の塩酸 10 mL を注入し、流出液は捨てた。0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 20 mL を注入し、流出液は捨てた。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL)] に、0.1 mol/L 塩酸 10 mL を注入し、流出液は捨てた。0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 20 mL を注入し、流出液は捨てた。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを接続し、このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、容器を 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 1 mL ずつで 2 回洗い、洗液をカラムに注入し、さらに 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 7 mL を注入し、全溶出液を採り、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液を用いて正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g

抽出

↓ エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 10 mL

↓ アセトン 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離

↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離

↓ 上澄液を合わせる

↓ アセトン 100 mL 定溶

濃縮 (溶媒除去)

↓ 抽出液 5 mL を分取し、濃縮乾固

アセトニトリル/ヘキサン分配 (脱脂)

↓ *n*-ヘキサン 5 mL および *n* ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう

↓ アセトニトリルを分取

↓ *n* ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう

↓ アセトニトリルを分取し、先のアセトニトリルと合わせ、濃縮乾固

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を 0.1 vol%ギ酸含有メタノール溶液 1 mL に溶解

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep PSA (500 mg/3 mL)]

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL)]

↓ 0.1 mol/L の塩酸 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸含有メタノール溶液 20 mL でコンディショニング

↓ 残留物を 0.1 vol%ギ酸含有メタノール溶液に溶解した溶液 1 mL を注入

↓ 容器を 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 1 mL で 2 回洗いこみ、注入

↓ 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 7 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で正確に 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定においては、ESI (-) モードではドキシサイクリンは検出されなかった。このため、測定モードは十分な感度の得られた ESI (+) モードとした。ドキシサイクリンの ESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。ESI (+) モードではドキシサイクリンのプロトン付加分子 (m/z 445.4 $[M+H]^+$) のスペクトルが得られた。

ドキシサイクリンのプロトン付加分子 (m/z 445.4 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2及び図3に示した。 m/z 445.4をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 428.1を定量用イオンに、次にイオン強度の強い m/z 154.1を定性用イオンとした。

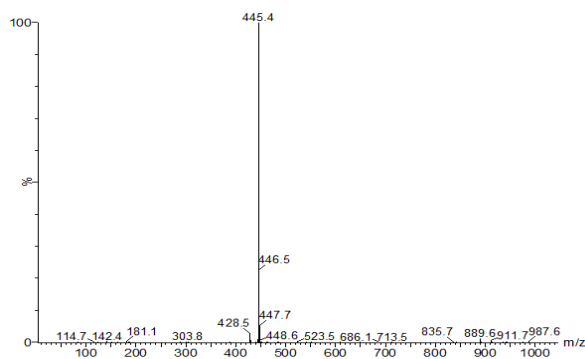


図1 ドキシサイクリンのマススペクトル
スキャン範囲：50～1,000 m/z
測定条件：ESI (+)
CV=28 V (CV : corn voltage)
ドキシサイクリン：1 mg/L

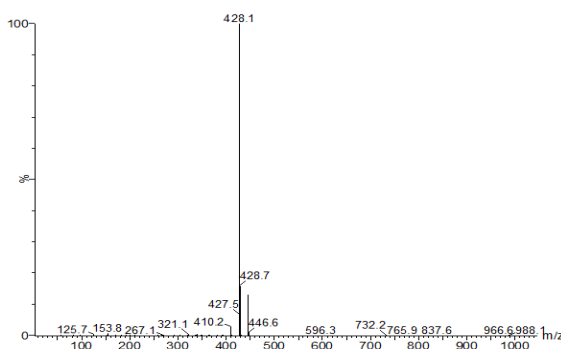


図2 ドキシサイクリンのプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 445.4
測定条件：ESI (+)
CV=28 V, CE=18 eV (定量用)
(CV : corn voltage, CE : collision energy)
ドキシサイクリン：0.1 mg/L

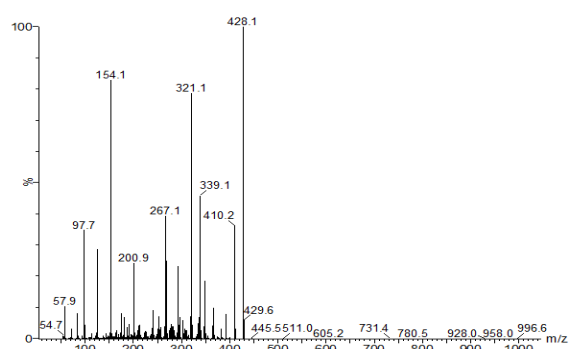


図3 ドキシサイクリンのプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 445.4
測定条件：ESI (+)
CV=28 V, CE=30 eV (定性用)
(CV : corn voltage, CE : collision energy)
ドキシサイクリン：0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）充填カラムを比較検討した結果、L-column2 ODS（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μ m：化学物質評価研究機構製）を使用することで、ドキシサイクリンの分離及び再現性について良好な結果が得られたが、ピークにリーディングが見られた。リーディングにはドキシサイクリンのケト・エノール互変異体の存在が影響しており、この相互変化を抑えるためにカラム温度を低くするとよいとの報告がある⁹⁾。カラム温度を 40 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 及び 25 $^{\circ}$ C で測定を行ったが顕著な改善は見られなかった。測定に用いる ODS カラムに金属不純物や残存シラノール基の少ないカラムを用いると良い場合がある。L-column2 ODS については、メタルフリーカラムもあるため比較したところ、差異が認められなかった。そのため、通常のカラムを用いて検討を実施した。

移動相条件については、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液について検討したところ、0.1 vol%ギ酸溶液が最もピーク強度が高く、また、アセトニトリル混液よりもメタノール混液のほうがピーク形状が良好であったため、0.1 vol%ギ酸溶液及びメタノールとの混液について検討した。

LC-MS/MS 測定では、分析対象化合物溶出後に移動相を十分に流し、分析カラム内に残存する夾雑物を溶出させる必要がある。アイソクラティックの条件では、メタノール及びギ酸溶液 3 : 7 混液ではドキシサイクリンのピーク強度が低く、1 : 1 混液では保持時間が 1.9 分と早かったため、グラジエント測定条件を検討した。

0.1 vol%ギ酸・メタノール及び 0.1 vol%ギ酸溶液 (5 : 95) から、0.1 vol%ギ酸・メタノール及び 0.1 vol%ギ酸溶液 (95 : 5) までの 8 分間のグラジエント条件で (95 : 5) で 3 分間保持した場合、ドキシサイクリンの保持時間は 5.1 分であった。

(3) 検量線

図 4 に 0.000625~0.00375 mg/L の濃度範囲で作成したドキシサイクリン検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

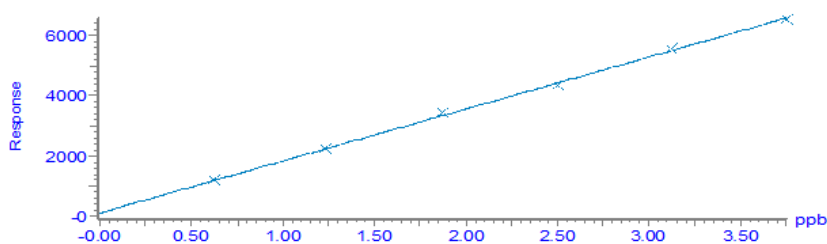


図4 ドキシサイクリン検量線の例

$$y = 1723.65x + 113.123$$

$$r^2 = 0.999143$$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$\text{ドキシサイクリン} : \left[\frac{10(\text{mL})}{0.5(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.0025(\text{ng})}{5(\mu\text{L})} \right] = 0.01 \text{ mg/kg}$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1)、酢酸エチル及びメタノールについて検討した。水 10 mL に 5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、各溶媒 50 mL、25 mL で 1 分間ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上層を 100 mL に

定容後、5 mL 分取し、0.1 vol% 酢酸・メタノール溶液に置換後、LC-MS/MS で測定した。表 1 に添加したドキシサイクリンの回収結果を示した。

アセトン及びメタノールで 98% の回収が得られた。アセトニトリル及び酢酸エチルも 90% 以上の回収ではあったが、脂肪を十分に分散可能なアセトン及びメタノールを用いて検討を行うこととした。

次に、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりを試料として、アセトン及びメタノールを用いて抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定した。その結果、メタノール抽出液よりもアセトン抽出液のほうが試料由来の夾雑成分の影響が少なかった (図 5)。また、メタノールよりも濃縮時間が短時間であることから、アセトンを抽出溶媒に用いることとした。

表 1 各溶媒からのドキシサイクリンの回収結果

化合物	回収率(%)		
	50 mL (1回目)	25 mL (2回目)	合計
アセトニトリル	94	1	95
アセトン	97	1	98
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	14	2	16
酢酸エチル	80	12	92
メタノール	95	3	98

添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1)

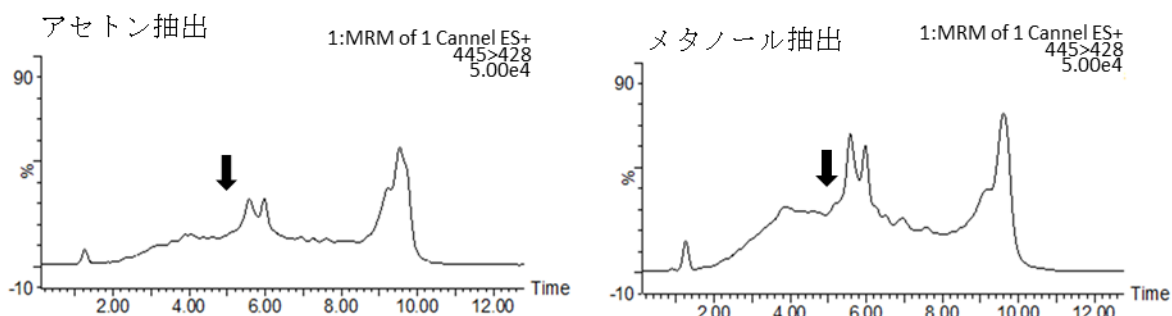


図 5 ぶりのブランク試験溶液における夾雑成分の比較

(2) 抽出時分解の有無の確認

豚の肝臓に標準品を添加後、放置中に分解が起きるか確認した。

豚の肝臓に 5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、各時間放置後、水 10 mL を加え、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。表 2 に添加したドキシサイクリンの回収結果を示した。

いずれも 70% 程度と十分な回収が得られなかった。

表 2 抽出時放置時間による分解の確認

放置時間 (分)	回収率(%)
0	79
10	71
20	70
30	71

添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1)

次に、酸溶液及び緩衝液添加による回収率の向上を検討した。

豚の肝臓に、5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、各溶液 10 mL を加え、30 分放置し、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製を行った後、LC-MS/MS で測定した。各溶液を加えた場合の回収結果を表 3 に示した。

その結果、オキシテトラサイクリン試験法 (農産物) で用いられているエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を加えた場合に顕著な回収率の向上がみられたことから、エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を採用することとした。

表 3 酸溶液及び緩衝液添加によるドキシサイクリンの回収結果

溶液	回収率(%)
0.1 mol/L 塩酸	59
0.1 vol% ギ酸	82
0.1 vol% リン酸	78
エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液	99

添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1)

(3) 脱脂操作の検討

① アセトニトリル/ヘキサン分配

ドキシサイクリンの 0.05 mg/L 溶液 0.5 mL を *n*-ヘキサン 30 mL に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL 又は 1%エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液・*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出を行ったときの結果を表 4 に示した。

エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を加えない場合は、分液ロートのガラス壁に吸着し、ほとんど回収が得られなかった。エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を含有する *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルでは、十分な回収は得られたものの、緩衝液がアセトニトリルに溶解しきれず、析出し、沈殿を生じた。

表 4 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

溶媒	転溶回数			合計
	1回	2回	3回	
<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル	tr	tr	tr	tr
1%エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液・ <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル	99	1	tr	100

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1) , tr : 1%未満

次にガラス器具を用いない手法を検討した。15 mL ポリプロピレン製遠心管にドキシサイクリンの 0.05 mg/L 溶液 0.5 mL を加え、溶媒を除去後、*n*-ヘキサン 5 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL で 3 回抽出を行ったときの結果を表 5 に示した。2 回の抽出で 100%の回収が得られた。

豚の脂肪をアセトンで抽出し、100 mL に定容後、その 5 mL を分取し、溶媒を除去後、同様に操作し、溶媒を除去したところ、顕著な脂肪の残留は見られず、脱脂効果が十分であることを確認した。

表5 ポリプロピレン製容器を用いたアセトニトリル/ヘキサン分配の検討

溶媒	転溶回数			合計
	1回	2回	3回	
<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル	98	2	0	100

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (*n*=1)

(4) 精製法検討

① スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL) 及び(500 mg/6 mL)] カラムをメタノール20 mLで予備洗浄した後、ドキシサイクリン0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、メタノールで溶出したときの溶出状況を表6に示した。ドキシサイクリンは265 mgでは25 mLで92%、500 mgでは25 mLで58%溶出された。

表6 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムのメタノールによる溶出状況

ミニカラム		溶出液量(mL)						合計
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PLS-2	265 mg	81	5	3	2	1	0	92
	500 mg	49	6	2	1	tr	0	58

回収率(%), 添加濃度 : 0.05mg/L (*n*=1), tr : 1%未満

次に、カラムを0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 20 mLで予備洗浄した後、ドキシサイクリン 0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表7に示した。

ドキシサイクリンはスチレンジビニルベンゼン共重合体265 mgでは10 mLで99%の回収であったが、500 mgでは15 mLで77%であった。十分な回収の得られた InertSep PLS-2 265 mg を用いて検討することとした。

次に、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりを試料として、アセトン抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、InertSep PLS-2 (265 mg /6 mL) を用い0.1 vol%ギ酸・メタノール 10 mLで溶出したところ、豚の肝臓及びぶりで色素の除去が不十分であり、また、ぶりでは妨害ピークがドキシサイクリンに近接して検出された (図6)。

表7 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液による溶出状況

ミニカラム		溶出液量(mL)						合計
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PLS-2	265 mg	98	1	0	0	0	0	99
	500 mg	67	9	1	0	0	0	77

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (*n*=1)

② エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep PSA (500 mg/3 mL)] 色素及び脂肪酸の除去のためにエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムを 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 20 mL で予備洗浄した後、ドキシサイクリン 0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 8 に示した。ドキシサイクリンは 13% と回収は不十分であった。

表8 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの
0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液による溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PSA (500 mg/3 mL)	tr	tr	1	1	4	7	13

回収率(%), 添加濃度 : 0.05mg/L ($n=1$), tr : 1%未満

テトラサイクリン系抗生物質は、金属と容易に錯体を形成するため、ミニカラムに残留している金属により、溶出が妨げられていると考えられた。塩酸でミニカラムを洗浄してから用いている報告があることから¹⁰⁾、塩酸でミニカラムを洗浄して金属を除去する操作を検討した。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムに各濃度の塩酸溶液 10 mL 及び 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 20 mL で予備洗浄した後、ドキシサイクリン 0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 9 に示した。

塩酸濃度 0.1 mol/L 以上で洗浄した場合、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 10 mL までで 100% 溶出した。そこで、最も濃度の薄い 0.1 mol/L 塩酸溶液 10 mL でカラムを洗浄することとした。

表9 塩酸洗浄を行った場合のエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化
シリカゲルミニカラムからの溶出状況

塩酸濃度(mol/L)	0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
0.01	0	tr	tr	1	3	5	9
0.05	3	4	5	7	15	44	78
0.1	97	3	0	0	0	0	100
0.2	98	2	0	0	0	0	100
0.5	99	1	0	0	0	0	100
1	99	1	0	0	0	0	100

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L ($n=1$), tr : 1%未満

③ カラムの組合せの検討

次にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合わせて溶出の確認を行った。

各カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及び 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 20 mL で予備洗浄した後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合せ、ドキシサイクリン 0.05 mg/mL (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 10 に示した。

ドキシサイクリンは、8 mL で溶出された。

表 10 0.1 mol/L 塩酸洗浄を行った場合の 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液によるミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	
InertSep PSA + PLS 2	97	2	1	tr	0	0	100

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1)

次に妨害ピークがドキシサイクリンに近接して検出されたぶりについて、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合せて精製を行ったところ、妨害ピークの影響を受けずに測定することができ (図 6)、色素も除去できた。

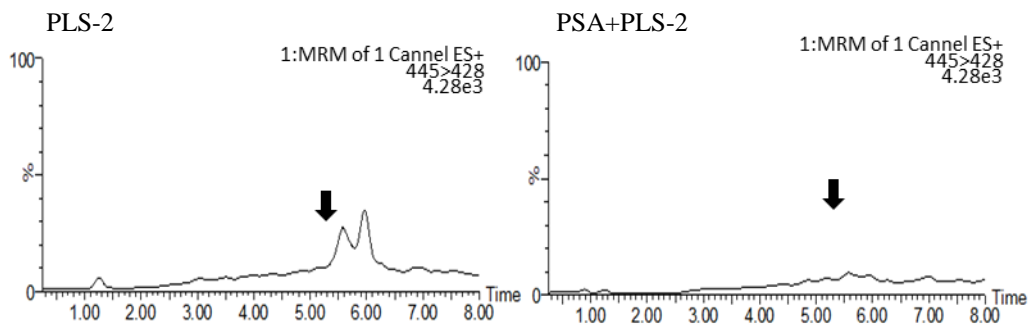


図 6 ぶり無添加溶液における精製効果

(5) 試験溶液調製溶媒についての検討

ドキシサイクリンは、溶解する溶媒により、ピーク強度に違いがみられた。アセトニトリル及び水ではピーク強度は低く、メタノールでピーク強度及びピーク形状が良好であった (クロマトグラムを図 7 に示す)。そこで、ドキシサイクリンとともに食品成分も十分に溶解できるメタノールを用い、精製時の溶出溶液である 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液を用いることとした。

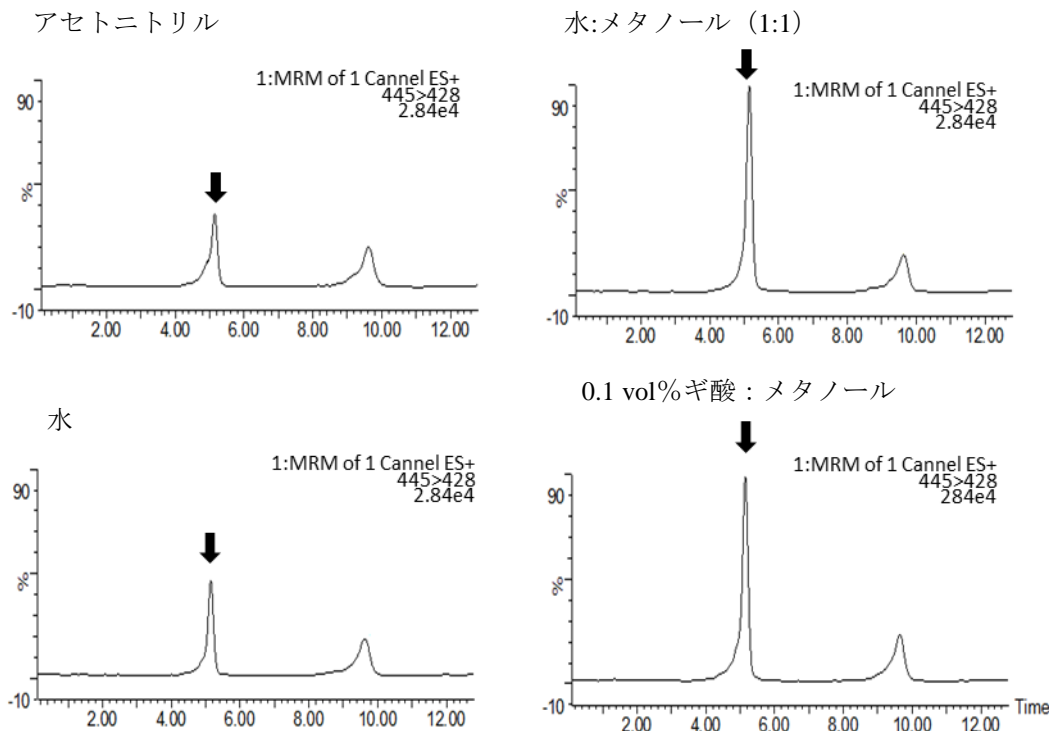


図 7 標準溶液のピーク形状 (0.005 mg/L)

次に 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液でのドキシサイクリンの安定性を確認した。

0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液を用いて 0.0005 mg/L 標準溶液を作成し、-20、4、8 及び 20°C で保管し、LC-MS/MS で測定してドキシサイクリンの経日変化を確認した。面積の経日変化を図 8 に示した。

-20°C 保管以外は 2 日以降、-20°C も 4 日以降面積値が低下したことから、検量線用標準液は、用時調製する必要があることを確認した。試験溶液は調製後、測定を速やかに行い、また、測定時にはオートサンプラー内を 8°C に設定した。

標準原液は -20°C で保存すれば、1 ヶ月程度は安定との報告がある⁹⁾。作成時期から 0 ヶ月、1 ヶ月、2 ヶ月、5 ヶ月及び 12 ヶ月経過した標準原液を 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で希釈して 0.0005 mg/L 標準溶液を作成し、LC-MS/MS で測定してドキシサイクリンの面積変化を図 9 に示した。

面積値は 1 ヶ月以降減少したため、標準原液の保管は -20°C で 1 ヶ月とした。

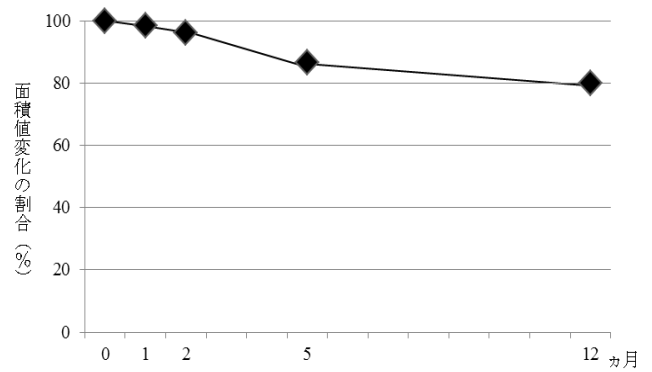
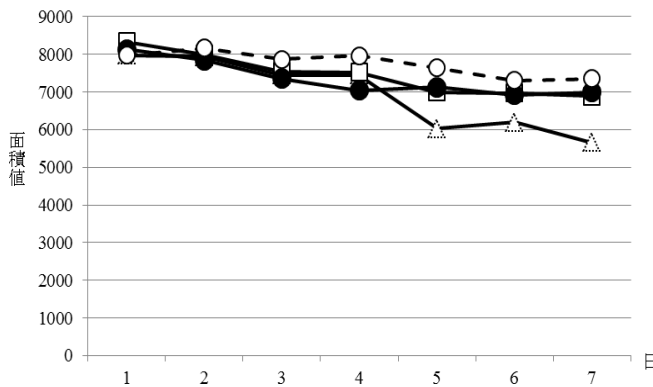


図 8 ドキシサイクリン標準溶液
保存温度による面積値の経日変化

△ 20°C □ 8°C ● 4°C ○ -20°C

図 9 ドキシサイクリン標準原液
面積値の経月変化

3. 添加回収試験

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりの5食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料のクロマトグラムを図 11~20 に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 21 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表11に示した。検討したいずれの試料においても、ドキシサイクリンの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表11 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ¹⁾							選択性 の評価 ³⁾	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリクス添加標準溶液 ²⁾			面積(高さ) 比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	ドキシサイクリン	豚筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	8	8	8	4715	4649	4682	0.002	○
		豚脂肪	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	17	11	14	4614	5231	4922	0.003	○
		豚肝臓	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	97	93	95	4925	5019	4972	0.020	○
		鶏筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	14	9	12	4579	4591	4585	0.003	○
		ぶり	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	31	33	32	5860	4746	5303	0.006	○

¹⁾ ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

²⁾ 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリクス添加標準溶液)を用いる。
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

³⁾ 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。0.01 mg/kgでは真度91~103%、併行精度は5~10%、0.05 mg/kgでは真度94~97%、併行精度は3~6%（目標値：真度70~120%及び併行精度15>）といずれも目標値に適合する結果であった。

基準値及び定量限界相当濃度（0.01 mg/kg）での添加回収試験を行った。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのS/N比の平均値は11~14であり、全ての食品でS/N \geq 10を満たした。

表12 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値
1	ドキシサイクリン	豚筋肉	0.01	0.05	0.05	—	1503	-82	0.9997	101.0	99.8	94.6	94.4	94.9	97.0	3.3			
		豚筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	1582	-8	0.9939	98.5	99.0	97.2	95.3	108.7	99.7	5.2	13.4	12.6	13.0
		豚脂肪	0.01	0.05	0.05	—	1848	-104	0.9965	94.8	101.2	97.0	94.0	94.2	96.2	3.1			
		豚脂肪	0.01	0.05	0.01	S/N	1719	-17	0.9906	94.1	118.3	92.8	108.4	102.8	103.3	10.2	17.2	12.7	14.9
		豚肝臓	0.01	0.05	0.05	—	1694	109	0.9994	86.3	97.6	93.2	100.7	89.4	93.5	6.3			
		豚肝臓	0.01	0.05	0.01	S/N	1647	18	0.9948	78.2	93.7	92.9	97.6	93.6	91.2	8.2	11.6	11.5	11.5
		鶏筋肉	0.01	0.05	0.05	—	1723	72	0.9993	95.4	99.1	102.5	92.3	92.5	96.4	4.6			
		鶏筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	1708	-13	0.9916	96.8	101.4	102.8	104.8	91.2	99.4	5.5	12.6	12.3	12.4
		ぶり	0.01	0.05	0.05	—	1808	-134	0.9990	98.4	105.3	96.2	90.1	93.6	96.7	5.9			
		ぶり	0.01	0.05	0.01	S/N	1615	-62	0.9958	95.4	105.4	106.0	96.5	91.7	99.0	6.4	11.4	11.3	11.3

*1 S/Nを求める必要がある場合には[S/N]と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表13に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は0.96~1.05であり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表13で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表14に示した。補正真度は95~103%であり、目標値（真度70~120%）に適合する結果であった。

表13 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²⁾								
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	ドキシサイクリン	豚筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	8	4549	4569	4551	4607	4343	4475	1.02
		豚筋肉	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	8	899	816	849	876	798	837	1.01
		豚脂肪	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	11	4614	5231	4911	5461	4399	4930	1.00
		豚脂肪	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	17	893	907	884	875	872	873	1.01
		豚肝臓	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	93	4798	4725	4668	4599	4440	4519	1.03
		豚肝臓	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	97	1025	1033	932	872	907	889	1.05
		鶏筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	9	4579	4591	4576	4530	4573	4552	1.01
		鶏筋肉	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	20	832	949	871	885	926	906	0.96
		ぶり	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	31	5007	4746	4846	4800	4959	4880	0.99
		ぶり	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	33	923	967	912	975	896	936	0.97

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 14 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
ドキシサイクリン	豚の筋肉	0.05	97	1.02	99
		0.01	100	1.01	101
	豚の脂肪	0.05	96	1.00	96
		0.01	103	1.00	103
	豚の肝臓	0.05	93	1.03	96
		0.01	91	1.05	96
	鶏の筋肉	0.05	96	1.01	97
		0.01	99	0.96	95
ぶり	0.05	97	0.99	96	
	0.01	99	0.97	96	

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(3) 脱脂方法の検討

① ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (10 mL 保持用)]

操作の簡便性向上及びエマルジョンによる回収率低下を考慮し、ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂を検討した。

10 mL 保持用カラムに、0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 1 mL 及びアセトン 9 mL を負荷し、室温条件下-0.02 Mpa で 5 分間吸引乾燥後、各溶出液 30 mL 1 分画及び 10 mL 9 分画で溶出し、濃縮後、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液を加え 10 mL に定容後 LC-MS/MS で測定したときの結果を表 15 に示した。いずれの溶媒でも十分な回収が得られなかった。

表 15 多孔性ケイソウ土カラムの検討

溶出液量 (mL)	回収率(%)		
	アセトニトリル	0.1 vol% ギ酸・ アセトニトリル	1 vol% エチレンジアミン 四酢酸含有クエン酸緩衝 液・アセトニトリル
0- 30	3	tr	1
30- 40	2	tr	2
40- 50	1	tr	2
50- 60	tr	tr	4
60- 70	tr	tr	3
70- 80	tr	tr	2
80- 90	tr	tr	3
90-100	tr	tr	3
100-110	tr	tr	2
110-120	tr	tr	1
合計	6	tr	23

添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1) , tr : 1%未満

(4) 精製法の検討

① 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 [Oasis HLB (200 mg/6 mL)]

カラムを0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLで予備洗浄した後、ドキシサイクリン0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、メタノールで溶出したときの溶出状況を表16に示した。ドキシサイクリンは10 mLで95%溶出された。

表 16 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からの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
Oasis HLB (200 mg/6 mL)	67	28	0	0	0	0	94

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L

次に、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりを試料として、アセトン抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、Oasis HLB (200 mg/6 mL)又はInertSep PLS-2 (265 mg/6 mL) に負荷し、それぞれ0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mLで溶出して精製した。マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求め、表 17 に示した。

面積比は Oasis HLB (200 mg/6 mL)では 0.90~1.08、InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL)では 0.93~1.06 と PLS-2のほうが、より1に近い結果であった。また、PLS-2のほうが通液性が高く、操作の迅速性からも HLBは採用しなかった。

表 17 試料マトリックスの影響

食品名	ピーク面積比*1			
	Oasis HLB (200 mg/6 mL)		InertSep PLS-2(265 mg/6 mL)	
	0.01 mg/kg	基準値	0.01 mg/kg	基準値
豚の筋肉	0.90	1.02	0.93	1.03
豚の脂肪	1.06	0.99	0.99	1.00
豚の肝臓	0.90	0.90	1.01	0.94
鶏の筋肉	1.08	1.03	1.06	0.99
ぶり	1.00	1.06	0.99	1.04

*1 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C₁₈ (500 mg/6 mL)]

カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLで予備洗浄した後、ドキシサイクリン0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表18に示した。

ドキシサイクリンは10 mLで100%溶出された。

次にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合わせて溶出の確認を行った。

各カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLで予備洗浄した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合せ、ドキシサイクリン0.05 mg/kg (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 19 に示した。

ドキシサイクリンは、8 mLで溶出された。

次に妨害ピークがドキシサイクリンに近接して検出されたぶりについて、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合わせて精製を行ったところ、妨害ピーク (図 10) 及び色素を完全に除去することはできなかった。

表 18 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep C ₁₈ (500 mg/6 mL)	98	2	0	0	0	0	100

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1)

表 19 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び
スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを組み合せからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	
InertSep C ₁₈ + PLS 2	98	1	tr	tr	0	0	99

回収率(%), 添加濃度 : 0.05 mg/L (n=1), tr : 1%未満

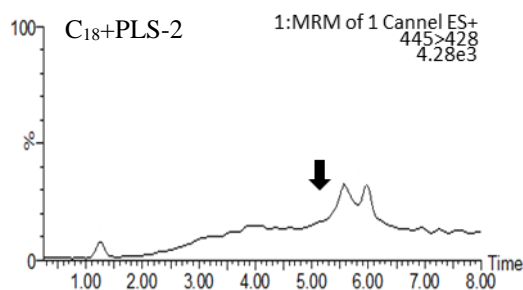


図 10 ぶり無添加溶液における精製効果

④ グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC (250 mg/3 mL)]

カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLで予備洗浄した後、ドキシサイクリン0.05 mg/kg (アセトン溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表20に示した。ドキシサイクリンはほとんど溶出されなかった。

表20 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep GC (250 mg/3 mL)	2	0	0	0	0	0	2

回収率(%), 添加濃度 : 0.05mg/L (n=1)

5. 考察

ドキシサイクリンは、金属と容易に錯体を形成し、ガラス壁に吸着されやすいため、ポリプロピレン製の器具を使用する必要があった。

ドキシサイクリンを脂肪とともに抽出するため、アセトン抽出溶媒に用いた。

豚の肝臓での検討結果により、抽出の際にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を加えて抽出することとした。

カラムによる精製では、ミニカラム内での金属との結合を防ぐために0.1 mol/L塩酸で洗浄処理を行った。また、一種類のカラムのみでは精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを接続して用いた。

検討した試験法を用いて、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりの5食品を試料に用いて、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.01 mg/kgでは真度91~103%、併行精度は5~10%、0.05 mg/kgでは真度94~97%、併行精度は3~6%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、畜水産物に適用可能であると判断された。

[結論]

畜水産物中のドキシサイクリン試験法を検討した。ドキシサイクリンを試料からエチレンジアミン四酢酸存在下アセトンで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配で脱脂後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりの5食品に適用した結果、0.01 mg/kgでは真度91~103%、併行精度は5~10%、0.05 mg/kgでは真度94~97%、併行精度は3~6%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) 動物用医薬品評価書 ドキシサイクリン、2012年11月食品安全委員会農薬専門調査会。
- 2) 藤田瑞香ら、LC/MS/MSによる食品中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討、大阪府立公衆衛生研究所研究報告、45、77-81(2007)。
- 3) 神田真軌ら、微生物学的スクリーニング、HPLCおよびLC/MS/MSによる食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質4薬剤の迅速分析、食品衛生雑誌、49、37-44(2008)。
- 4) 河原さおりら、LC/MS/MSを用いた豚の組織中の β -ラクタム及びテトラサイクリン系抗生物質の同時分析、熊本市環境総合研究所報、16、43-48(2009)。
- 5) 白田忠雄ら、鶏卵、豚肉中テトラサイクリン系抗生物質分析の検討、茨城衛生研究所年報、48、25-28(2010)。
- 6) 影山温子ら、畜産物(牛肉)中の動物用医薬品一斉分析法の検討、高知衛生研報、60、29-34(2014)。
- 7) 臼井力ら、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、鹿児島県環境保健センター所報、16、63-69(2015)。
- 8) DE Almeida Marcos Pego, et al, Optimization and validation method to evaluate the residues of β -lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC-MS/MS, Talanta, 144, 922-932 (2015)。
- 9) 清川由樹ら、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(2017)。
- 10) 化学物質と環境 平成25年度化学物質分析法開発調査報告書、722-754、2014年10月環境省総合環境政策局 環境保健部環境安全課

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

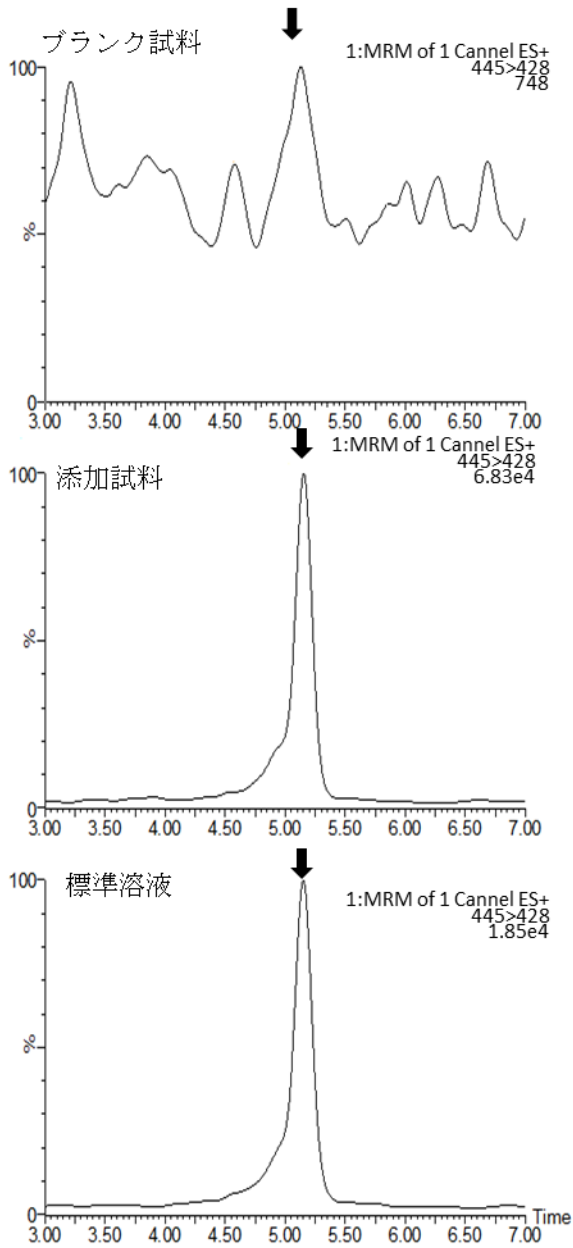


図 11 豚筋肉の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

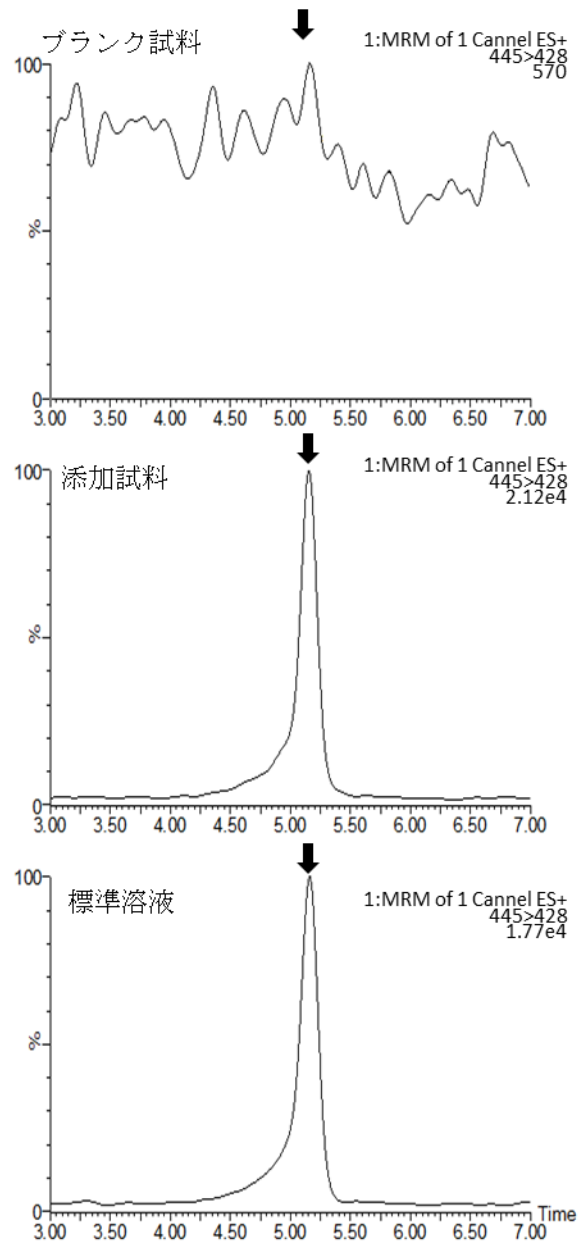


図 12 豚脂肪の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445 →428)
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

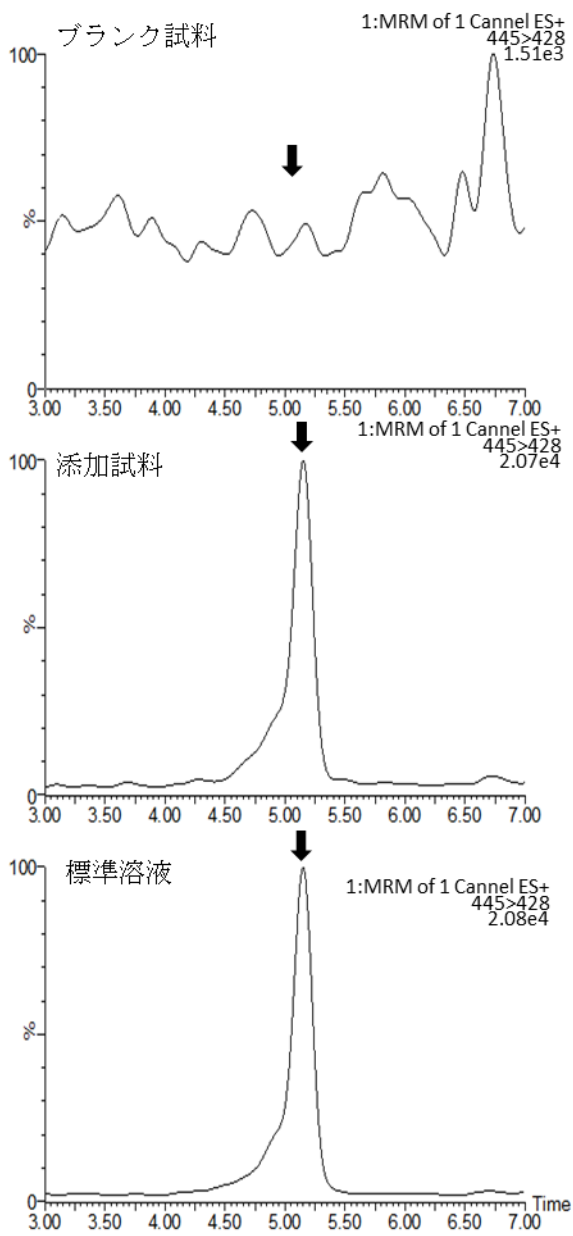


図 13 豚肝臓の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

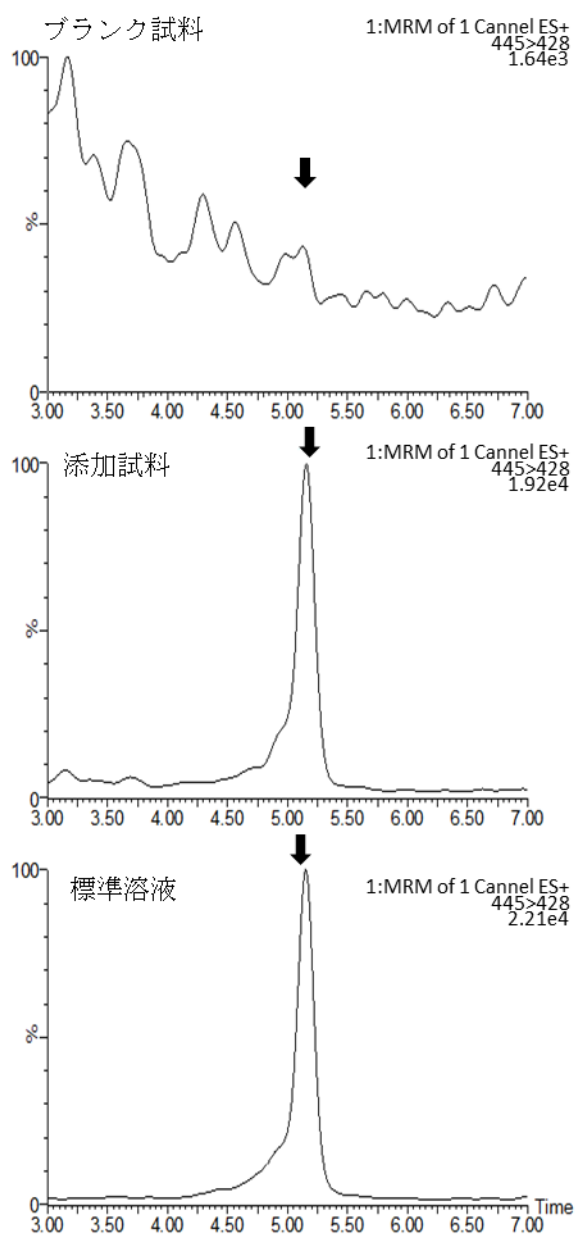


図 14 鶏筋肉の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

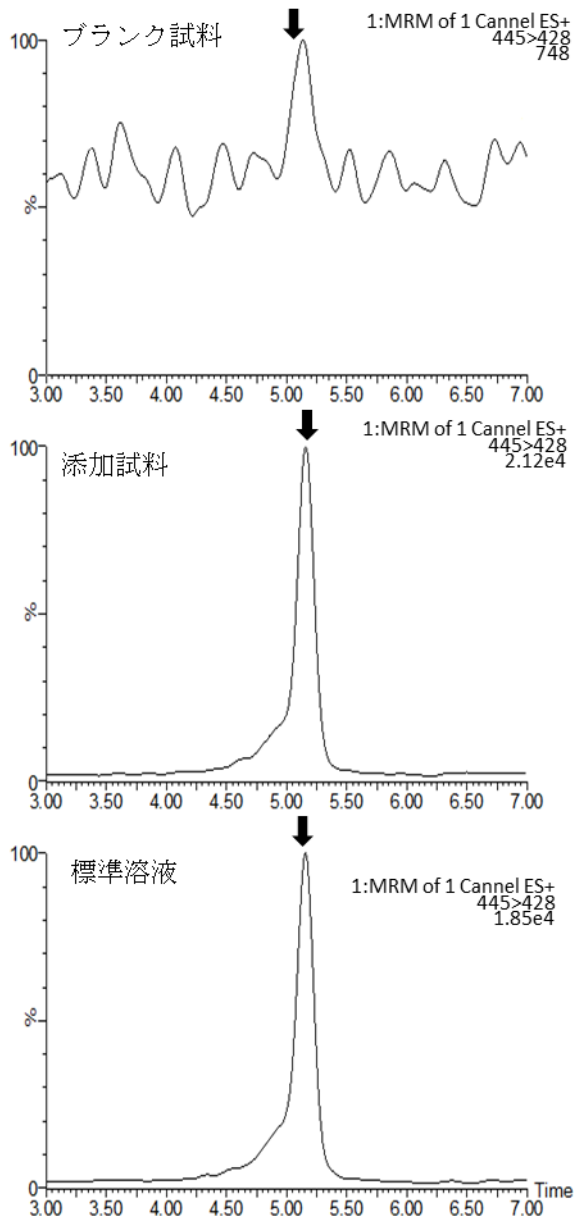


図 15 ぶりの SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

②定量限界における代表的なクロマトグラム (定量限界濃度)

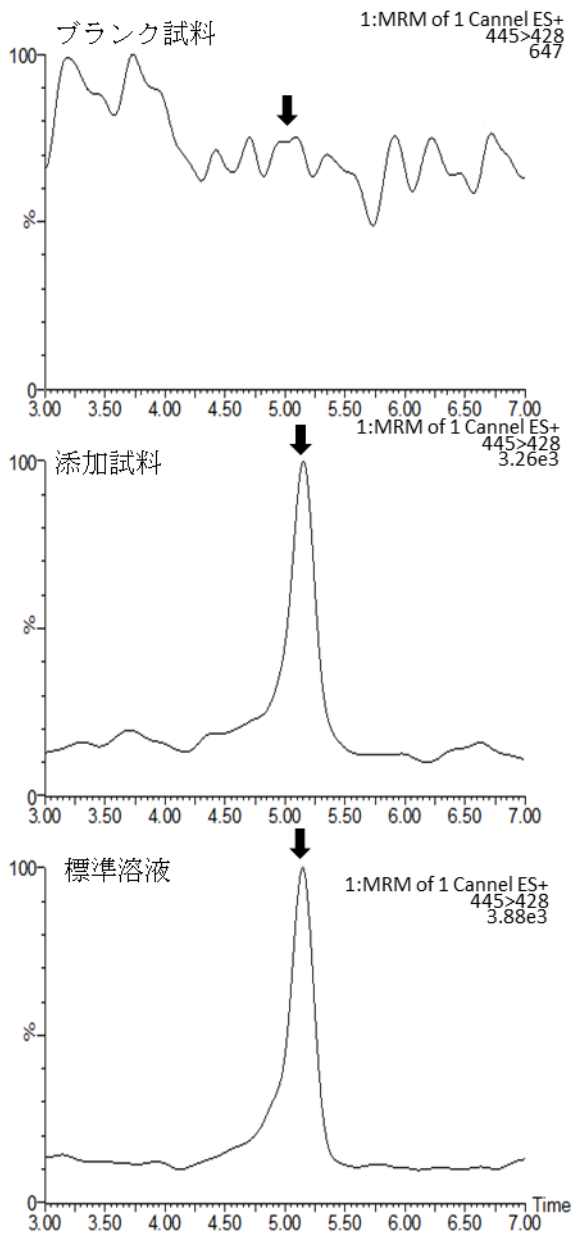


図 16 豚筋肉の SRM クロマトグラム
(ドキシサイクリン : m/z +445→428)
添加濃度 : 0.01 mg/kg

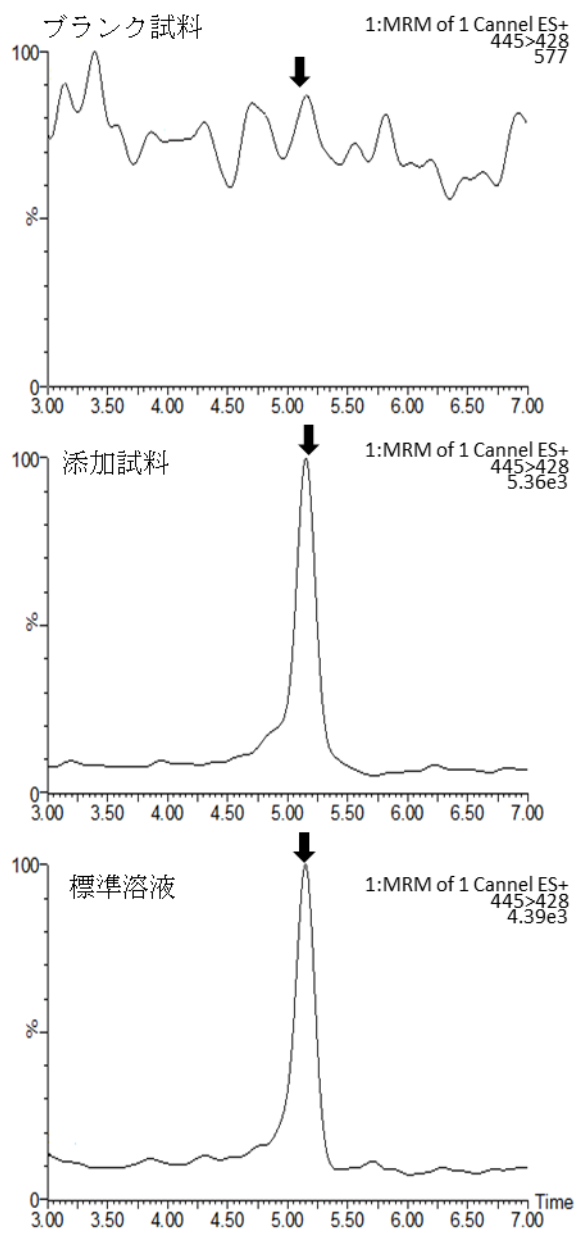


図 17 豚脂肪の SRM クロマトグラム
(ドキシサイクリン : m/z +445→428)
添加濃度 : 0.01 mg/kg

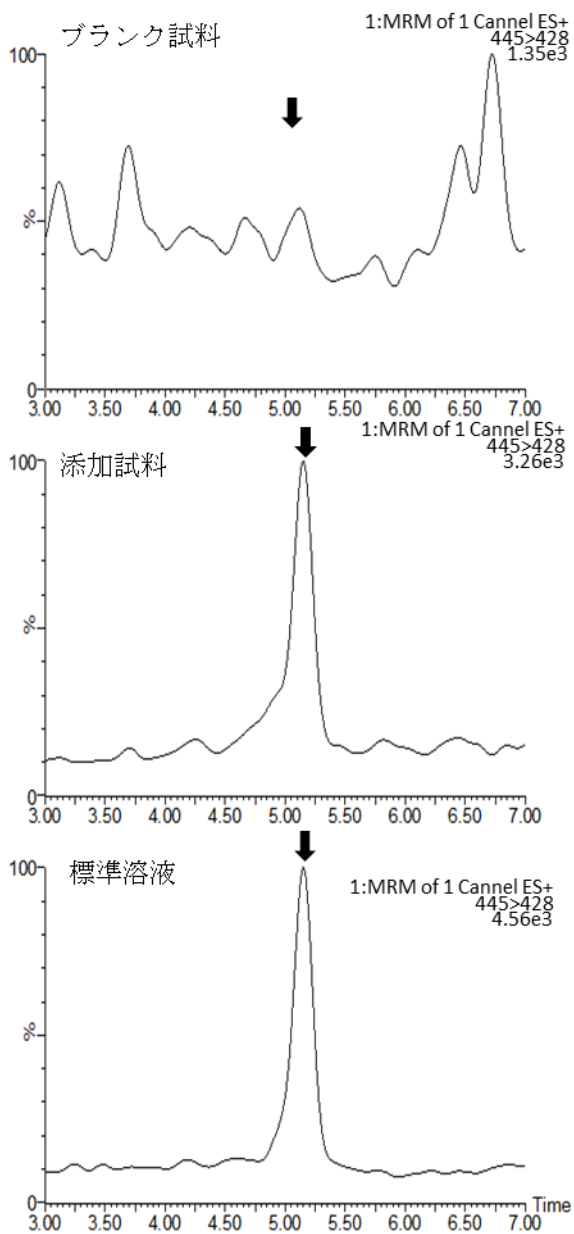


図 18 豚肝臓の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 加濃度 : 0.01 mg/kg

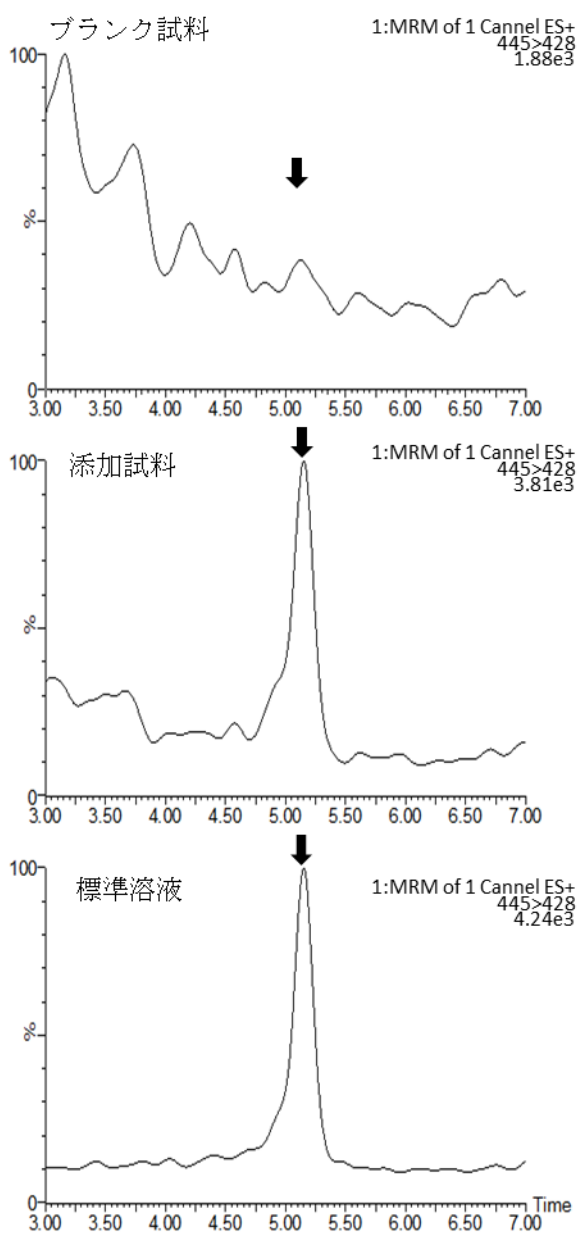


図 19 鶏筋肉の SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

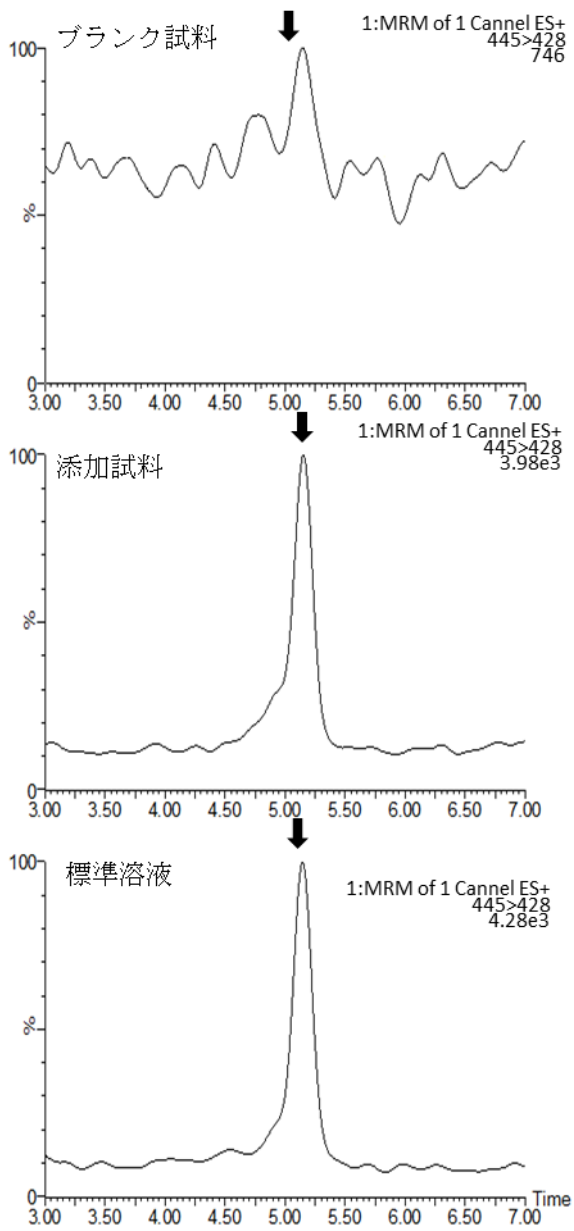


図 20 ぶり SRM クロマトグラム
 (ドキシサイクリン : m/z +445→428)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

② ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

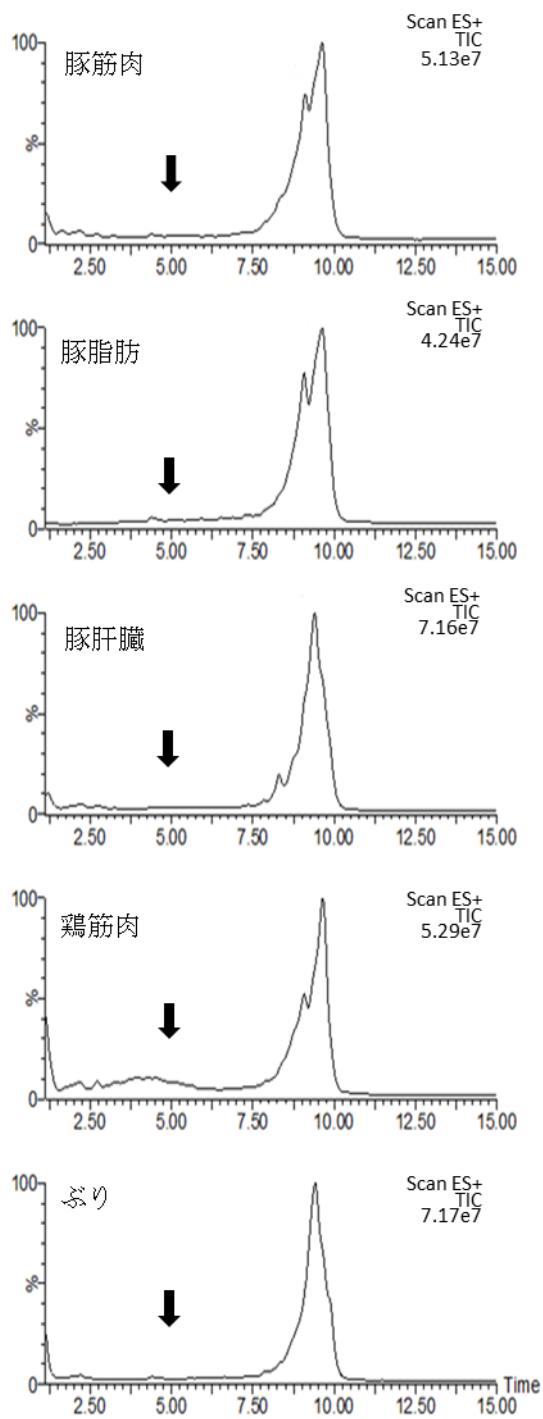


図 21 ブランク試料のトータルイオンクロマトム
測定条件： CV=28 V (CV : corn voltage)
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)