

博士学位論文

畜産物中に残留するアプラマイシンの定量方法開発
に関する研究

**Study on development of quantitative measuring method for
residual apramycin in livestock products.**

2023年3月

三重大学大学院地域イノベーション学研究科
小笠原 英城

Abstract

The major goal of this thesis to develop a method for the determination of apramycin in livestock products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

An extraction study was conducted in first study to establish a method for preparing sample from livestock products for quantitative apramycin measurement by LC–MS/MS. Apramycin was extracted from samples via alkaline hydrolysis or with trichloroacetic acid (TCA) in the presence of *n*-hexane (hexane). Next, matrix components were removed from the extracted apramycin using two types of hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) solid-phase extraction (SPE) cartridges, and apramycin was retained with strong cation-exchange SPE cartridges. Apramycin recovery from the extract was evaluated using bovine muscle, liver, and fat samples with apramycin at the maximum residue limit-value (muscle and fat: 0.5 ppm, liver: 5 ppm). The recovery rate of alkaline hydrolysis extraction was 75.5-90.1% and hexane-TCA extraction was 77.3-92.6%, demonstrating that this method could sufficiently remove matrix components that would affect the measurement, as indicated by guidelines of the Ministry of Health, Labour and Welfare. The method examined in this study is effective for apramycin residue sample preparation in livestock products for quantitative LC-MS/MS measurements.

A validation study was conducted in next study to establish a method for determining apramycin by LC-MS/MS in bovine muscle, fat, and liver. Bovine tissue samples (e.g., muscle, fat, and liver) were extracted using the *n*-hexane–trichloroacetic acid (hexane–TCA) method, and cleanup was performed using two different hydrophilic–lipophilic balance (HLB) cartridge columns and a MCX cartridge column for these samples. The apramycin in the resulting samples was quantified by LC-MS/MS by utilizing an external calibration curve. The validation study was performed on bovine tissues spiked with apramycin at maximum residue limits (MRLs; muscle and fat: 0.5 ppm; liver: 5 ppm) and a value equivalent to 1/10 of MRLs (1/10 MRLs; muscle and fat: 0.05 ppm, liver: 0.5 ppm). The trueness ($n = 5$) values of apramycin based on the used three kinds of bovine tissue were 84.3%–92.7% at MRLs and 79.2%–97.8% at 1/10 MRLs, and the relative standard deviations (RSD) were 2.1%–5.9% at MRL and 2.8%–5.7% at 1/10 MRLs. The quantitation limits of the developed method were 0.05 mg/kg (0.05 ppm) for bovine muscle and fat and 0.5 mg/kg (0.5 ppm) for the bovine liver according to the results of the validation study.

These results suggest that the established method for the quantitation of apramycin by an external calibration method using LC-MS/MS well fits bovine tissues.

In the future, we plan to examine the applicability of the uniform limit (0.01 ppm) for suitability

with pig liver (MRL: 0.06) and examine whether the extraction method can be applied to other aminoglycoside antibiotics while assuming its application to the screening measurements of aminoglycoside antibiotics.

目 次

第1章	緒論	
1.1	研究背景	1
1.2	本論文の構成	3
	引用文献	5
	図表	8
第2章	事前検討	
2.1	緒言	10
2.2	方法	10
2.2.1	試薬	10
2.2.2	試料	11
2.2.3	機器および装置	11
2.2.4	LC-MS/MS 測定装置	11
2.2.5	アプラマイシンのアルカリ加水分解処理	13
2.2.6	微生物試験の試料調製	13
2.3	結果	14
2.3.1	プロトタイプ LC-MS/MS 測定法の構築	14
2.3.2	アルカリ加水分解処理のアプラマイシン構造への影響	15
2.3.3	微生物試験の試料調製液の LC-MSMS 測定	16
2.4	考察	17
	引用文献	19
	要旨	20
	図表	21

第3章	LC-MS/MS 測定用試料の調製方法の検討	
3.1	緒言	29
3.2	方法	30
3.2.1	試薬.....	30
3.2.2	試料.....	30
3.2.3	アプラマイシン標準溶液および添加試料の調製	30
3.2.4	機器および装置	31
3.2.5	LC-MS/MS 測定条件.....	31
3.2.6	LC-MS/MS 測定用試料の調製方法	31
3.2.6.1	アルカリ加水分解による抽出.....	31
3.2.6.2	ヘキサン-トリクロロ酢酸による抽出.....	32
3.2.6.3	LC-MS/MS 測定用試料の調製	32
3.3	結果	33
3.3.1	LC-MS/MS 測定条件の最適化	33
3.3.2	固相カートリッジの検討.....	35
3.3.3	測定用試料の調製方法の比較検討	36
3.4	考察	37
	引用文献	39
	要旨	40
	図表	41
第4章	畜産物中の残留アプラマイシン定量方法の妥当性評価	
4.1	緒言	49
4.2	方法	50
4.2.1	試薬	50
4.2.2	試料	50

4.2.3	機器および装置	50
4.2.4	LC-MS/MS 測定および測定用試料の調製方法	50
4.2.5	アプラマシン定量用の標準液	51
4.3	結果	51
4.3.1	検量線	51
4.3.2	妥当性評価	51
4.4	考察	54
	引用文献	55
	要旨	57
	図表	58
第5章	総括	
5.1	全体総括	63
	引用文献	68
	要約	69
	謝辞	72
	研究成果の発表状況	73

第1章 緒 論

1.1 研究背景

アプラマイシンは放線菌 *Streptomyces tenebrarius* が産生する一群のアミノグリコシド系抗生物質ネブラマイシンの Factor 2 で(1)、ペプチジル転位のレベルでタンパク質合成を阻害することにより作用を示す(2, 3)。また、広い抗菌スペクトルを持ち、従来のアミノグリコシド系抗生物質（カナマイシン、フラジオマイシン等）の耐性菌に対して強い抗菌力を示し、アミノグリコシド系抗生物質不活化酵素に対して安定であるという特徴を有することから動物用医薬品として開発され、牛、豚、家きん、ウサギ等の大腸菌 (*Escherichia coli*)、緑膿菌、気管支敗血症菌、サルモネラ菌 (*Salmonella*) などのグラム陰性菌、黄色ブドウ球菌、マイコプラズマなどの一部のグラム陽性菌への感染症治療に用いられる(4)。

日本では、硫酸アプラマイシンの飼料添加剤及び飲水添加剤が豚の細菌性下痢症を適応症として承認され、ポジティブリスト制度導入に伴い残留基準値（maximum residue limits: MRL）が設定されている(5)。アプラマイシンにおいては、平成 27 年に一部の畜産物および組織で MRL が改正され、現在は牛の筋肉や脂肪で 0.5 ppm、肝臓で 5 ppm、豚の筋肉、脂肪、肝臓で 0.06 ppm、鳥の筋肉、脂肪、肝臓で 0.5 ppm、その他家きんは含有不可など、畜産物の種類と部位ごとに MRL が定められている(6)。このため、畜産物中に残留するアプラマイシンの定量法が必要とされている。

農薬・飼料添加物・動物用医薬品の公示試験法の開発については、厚生労働省から公開されている、「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(以下、ガイドライン)」に従う必要があり、畜水産物の固体試料の場合、分析対象成分は脂肪とともに抽出する方法を検討することになっている(7, 8)。

一方で、アミノグリコシド系抗生物質であるアプラマシンは、①畜産物との親和性が高い ②高極性で有機溶媒に難溶、という特性のため、脂肪と共に抽出する測定方法がまだ確立されていない。アプラマシンの構造式を Fig. 1-1 に示す(9)。

アプラマイシンの定量法としては、*Bacillus subtilis* (ATCC 6633) を用いたバイオオートグラフィーによる微生物学的定量法が告示されている(10)。しかし、この方法は Fig. 1-2 に示すように、操作がきわめて煩雑で、特異性や検出感度等に課題がある。特に、分析対象試料の調製にはアルカリ加水分解処理後の抽出液を中和処理し、2回のイオン交換クロマトグラフィーを行うとされているが、水溶液である抽出液の中和処理は非常に煩雑で時

間を要する操作である。また、2回のカラムクロマトを行うことで、目的成分の回収率も損なうことになる。また、近年、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (Liquid Chromatograph – Tandem Mass Spectrometry: LC-MS/MS) の普及に伴い、食品中に残留する農薬等の高感度分析においても LC-MS/MS が利用されるようになってきた。アプラマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質は高極性という性質から、トリクロロ酢酸 (TCA) 抽出-ミニカラム精製後の試料を LC-MS/MS により定量測定する方法が報告されている(11-20)。しかし、LC-MS/MS 測定はイオンペア試薬を用いた分離 (以下、逆相イオンペアクロマトグラフィー) (11-17)、マトリックス添加標準液を用いた定量方法 (以下、マトリックス添加検量線法) (18-20)、内部標準法(17, 20)であり、絶対検量線法による定量方法は確立されていない。また、TCA 溶液は脂肪の溶解・分散が困難なため、脂肪組織を対象とした抽出方法が確立されていない。逆相イオンペアクロマトグラフィーで用いるイオンペア試薬は、アプラマイシンのような水溶性の高い成分をオクタデシルシリル (ODS) カラムのような逆相系充填剤を用いたカラムに保持させることを目的に溶離液に添加する試薬である。測定対象の成分が塩基性の性質をもつ場合、酸性のイオン化合物を、酸性の性質を持つ場合、塩基性のイオン化合物をイオンペア試薬として用いる。測定対象の成分と異符号のイオンペア試薬が結合することで、測定対象成分のイオン性を弱めることができる。さらに、イオンペア試薬はアルキル基を官能基として持つため、結合後に脂溶性が高まることで、ODS カラムに保持されやすくなる。アプラマイシンは塩基性の性質を持つため、ペントスルホン酸ナトリウムやヘキサスルホン酸ナトリウム等の酸性イオンペア試薬が用いられる。一方で、イオンペア試薬は吸着性の高い成分が多く、HPLC の配管やカラム、質量分析部などに吸着されやすい。これにより、カラムの劣化や配管への吸着、後続に行う分析時にイオン化阻害等を引き起こす要因となる。このため、逆相イオンペアクロマトグラフィーによる LC-MS/MS 分析を行った場合、分析終了後に分析装置内に残存したイオンペア試薬を完全に除去する必要があるなど、操作が極めて煩雑となる。マトリックス添加検量線法は、夾雑成分を多く含む試料を定量測定する場合に用いられることが多い。LC-MS/MS 測定では、夾雑成分が多い試料を測定する場合、質量分析部において、イオン化阻害やイオン化促進が発生しやすくなる。そこで、試料を前処理した検液に標準液を添加したマトリックス添加検量線を作成することで、夾雑成分の影響を相殺した定量結果を得ることができる。しかし、コントロール用マトリックスを調製するためには、測定対象成分が残留していない試料が必要となり、分析対象が多岐にわたる食品分析においては実

用的でない。例えば、今回対象とした畜産物の場合、対象とする畜肉の種類や部位など、対象試料の種類ごとに標準液を添加するための前処理を行う必要があるため、測定手順が増え非効率である。また、試料マトリックス中のイオン化阻害物質を十分に除去できていないため、高感度定量が困難となる。夾雑成分の影響を排除した方法としては内部標準法がある。内部標準法は測定対象成分と類似の性質を持つ物質を内部標準液とし、標準液と試料検液に添加し測定を行う方法である。測定対象物質と内部標準物質のピーク面積比を用いて定量を行う為、機器の感度変動や試料注入量誤差、溶媒の気散などには対応できる。しかし、内部標準物質と夾雑成分とのピークを分離カラム等により完全に分離するか、夾雑成分の影響を受けないような精製を行わなければならない。このような内部標準法における問題点の対策として、LC-MS/MS 測定においては、化学的・物理的性質が対象成分とほぼ同じ安定同位体標識化合物（サロゲート物質）を内部標準物質として用いる方法がある。しかし、サロゲート物質は通常に入手できる物質は限定的で、現状ではアプラマイシンのサロゲート物質は製造・販売がされていない。また、外部機関に委託し製造することは可能であるが、きわめて高額になることから、サロゲート物質を用いた内部標準法は汎用的な方法とはならない。

以上のような背景から、本研究では、操作性に優れたアプラマイシンの絶対検量線法による LC-MS/MS 測定法について検討を行った。さらに、試料調製方法の確立されていない脂肪組織についても牛の脂肪を用いて、試料調製方法の検討を行った。測定方法の妥当性評価は、牛の筋肉、脂肪、肝臓の MRL および MRL の 1/10 に相当する濃度になるようにアプラマイシンを添加した試料を定量測定し、その結果を用いて、ガイドラインに基づき評価を行った(7, 8)。

1.2 本論文の構成

本論文はポジティブリスト制度導入により、MRL が設定されたアプラマイシンを定量測定する方法を開発すること目的とした。定量測定の対象は畜産物であり、牛肉の筋肉や脂肪、肝臓からアプラマイシンを抽出し、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定に適応可能な試料調製方法を開発しその妥当性を評価した。

第 2 章では畜産物中のアプラマイシンを定量測定するための事前検討を行った。アプラマイシンを定量測定するための装置である LC-MS/MS の事前検討では、イオンペア試薬を用いずにアプラマイシンを保持できる分離カラムの選定と、そのカラムを用いて作成した

検量線の形状調査や、イオン化条件を検討した。牛肉組織からの試料調製方法の事前検討では、アルカリ加水分解抽出におけるアプラマイシンの構造への影響、畜産物中のアプラマイシン測定のアプラマイシンの告示法である微生物試験で定められている抽出方法と固相カートリッジでの精製方法を参考に試料調製を行い、その方法が LC-MS/MS 法に適応可能であるか調べた結果を報告する。

第3章では、牛の組織からアプラマイシンの試料調製方法の確立を行った。試料調製方法は MRL に相当するアプラマイシンを添加した牛の組織から、アプラマイシンの抽出方法と抽出液の精製方法の検討を行った。抽出方法はアルカリ加水分解抽出法とトリクロロ酢酸 (TCA) 抽出法を検討し、精製方法は抽出液から夾雑成分を除去する固相カートリッジ、アプラマイシンを回収する固相カートリッジについて検討し、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定に適応できる試料調製方法の検討を行った結果を報告する。また、LC-MS/MS 測定についてはイオン化条件の最適化を行い、その条件における検量線の直線性を調べた結果についても報告する。

第4章では、第3章で検討した牛組織中の残留アプラマイシン定量測定方法について、妥当性評価を行った。牛組織 (筋肉、脂肪、肝臓) にアプラマイシンの MRL 及び MRL の 1/10 (1/10 MRL) になるように標準添加し、試料のアプラマイシンを定量し、開発した定量測定方法の妥当性評価を行った。評価対象は、選択性、真度、精度、定量限界値、マトリックスの影響とし、ガイドラインに基づき評価した結果を報告する。

第5章では、第2章、第3章および第4章の研究成果を総括し、研究全体の考察とこれからの課題をまとめた。さらに、本研究で得た成果を地域に還元する方法の提案を行うと共に、地域イノベーションの可能性を考察する。

引用文献

- 1) Ryden, R., Moore, B. J.: The in vitro activity of apramycin, a new aminocyclitol I antibiotic. *J Antimicrob Chemother.*, **3**, 609-613 (1977).
- 2) Hermann, T., Tereshko, V., Skripkin, E., Patel, D. J.: Apramycin recognition by the human ribosomal decoding site. *Blood Cells Mol Dis.*, **38**, 193-198 (2007).
- 3) Perzynski, S., Cannon, M., Cundliffe, E., Chahwala, S. B., Davies, J.: Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis. *Eur. J. Biochem.*, **99**, 623-628 (1979).
- 4) JECFA, Apramycin: Evaluation of certain veterinary drug residues in food, <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v969je01.pdf>, (2012), Accessed data: 22 January 2022.
- 5) Notification No.497-499 (Nov. 29, 2005), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 6) Notification No.0519 (May. 19, 2015), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 7) Notification No. 1115001 (Nov. 15, 2007), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 8) Nemoto, S.: Advancement of Official Analytical Method for Residual Pesticides in Foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science.)*, **51**, 349-359 (2010).
- 9) Mandhapaty, A., Shcherbakov, D., Duscha, S., Vasella, A., Bottgger, E. C., Crich, D.: Importance of the 6'-Hydroxy Group and Its Configuration for Apramycin Activity. *Chem Med Chem*, **9**, 2074-2083 (2014).
- 10) Materials of the Subcommittee on Pesticides and Veterinary Drugs of the Food Sanitation Subcommittee of the Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council ,2015 20th January(<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanz-enbu/0000074613.pdf>).
- 11) Savoy, M., Woo, P. M., Ulrich, P., Tarres, A., Mottier, P., Desmarchelier, A.: **35**, 67 Determination of 14 aminoglycosides by LC-MS/MS using molecularly imprinted polymer solid phase extraction for clean-up. *Food Additives & Contaminants* 5-686, (2018).

- 12) United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Screening for Aminoglycosides by LC-MS-MS. CLG-AMG4. 02/ 2015
- 13) Namba, J., Urayama, T., Ikeda, K., Kaneko, H., Shigeta, N.: Study on a method for simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in cow muscle and kidney by LC-MS/MS. Okayamaken Kankyohokensenta Nenpo (Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health.), **44**, 71-77 (2020).
- 14) Utagawa, N., Gawasawa, Y., Tanji, T.: Analysis of aminoglycoside antibiotics in meat by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Niigataken Hokenkagakukenyusho Nenpo (Annual Report of Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences.), **23**, 70-74 (2008).
- 15) Dijkstra, J. A.: Quantification of amikacin and kanamycin in serum using a simple and validated LC-MS/MS method. University of Gronigen, 38-48, (2017).
- 16) PLozza, T., Trenerry, V. C., Zeglinski, P., Nguyen, H., Johnstone, P.: The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residue in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. International Food Research Journal, **3**, 1077-1084 (2011).
- 17) Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C. S.R., Fernandes, C., Silva, L. H.M., Gloria, M. B. A.: A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. Talanta, **163**, 85-93 (2017).
- 18) Kajita, H., Akutsu, C., Hatakeyama, E., Komukai, T.: Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in milk by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science.), **49**, 189-195 (2008).
- 19) Hamamoto, K., Mizuno, Y., Koike, R.: Sensitive method for the determination of Kanamycin residue in livestock products and marine products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Kachiku Eiseigaku Zasshi (The Japanese journal of animal hygiene.), **39**, 9-14 (2013).
- 20) Omiya, S., Kumazawa, T., Lee, X., Shoji, Y., Sato, J., Sawaguchi, T.,

Yoshimura, A., Sato K.: Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Tandem-Mass Spectrometry for Quantitative determination of Six Aminoglycoside Antimicrobials in Human Plasma. Showagakukai Zasshi (Journal of The Showa University Society), **76**, 285-298 (2016).

图 表

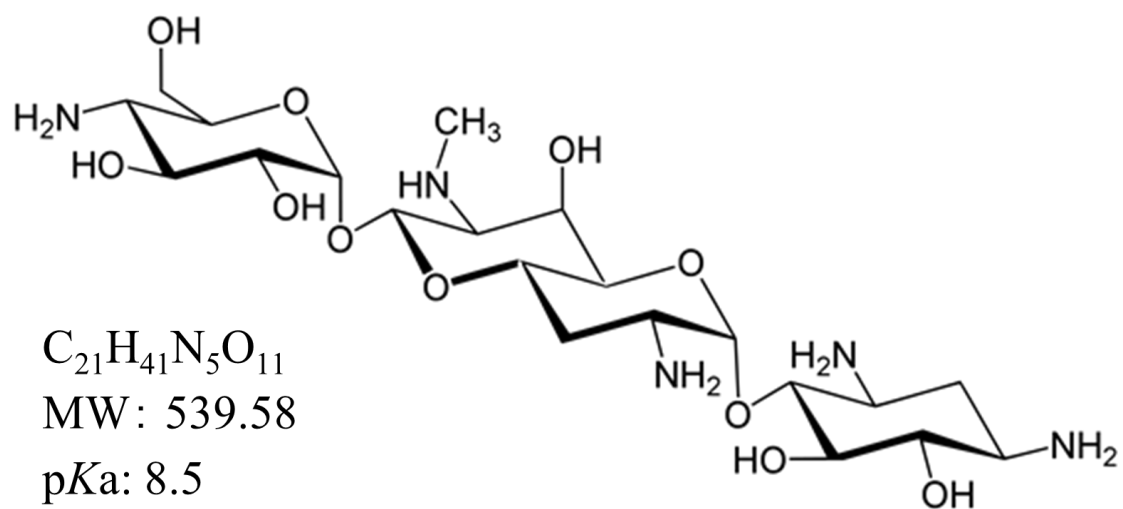
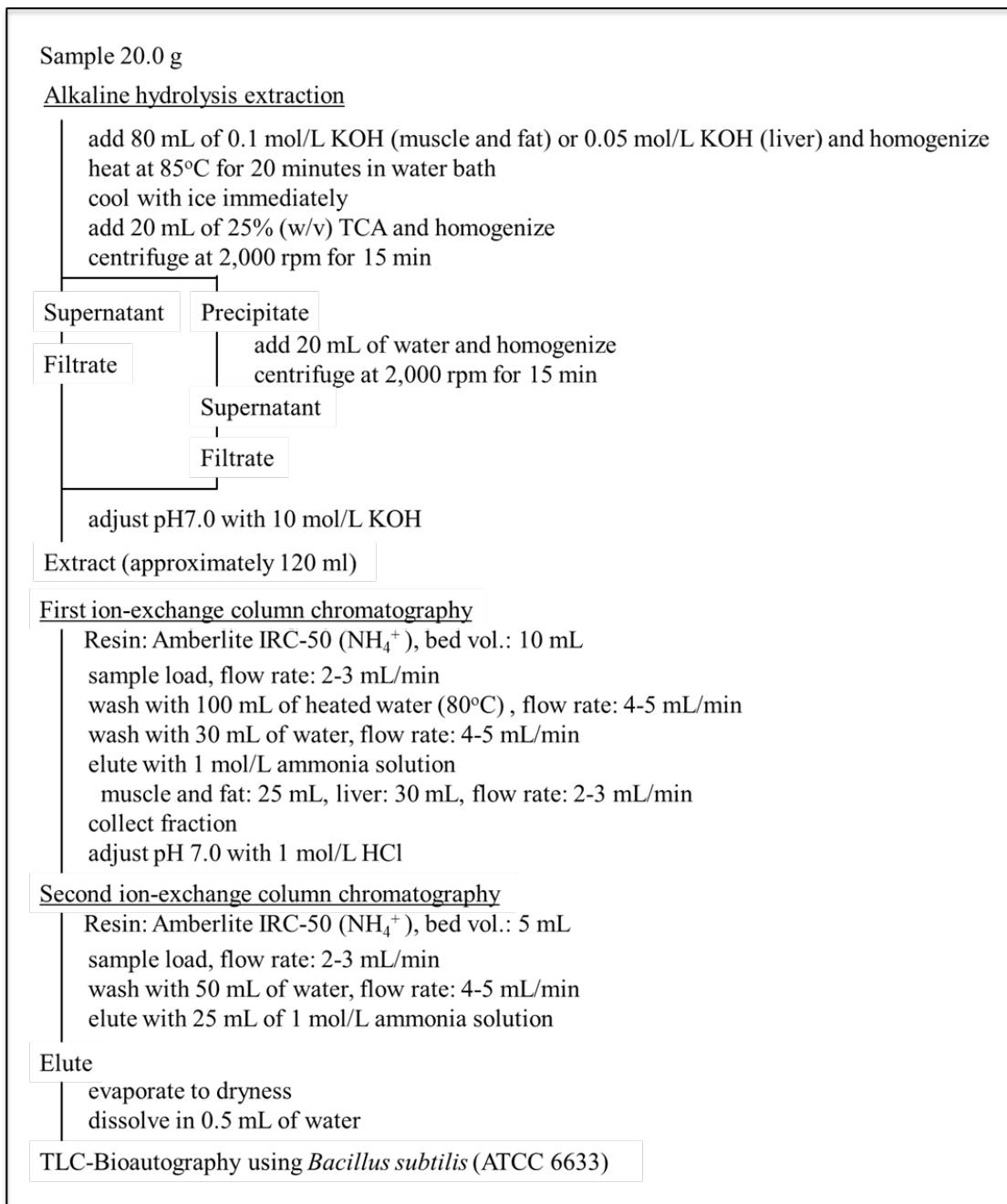


Fig. 1-1 Apramycin chemical structure



Source: Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

Fig.1-2 Schematic diagram for the literature-based microbiological quantification method

第2章 事前検討

2.1 緒言

畜産物中の残留アプラマイシンの定量測定方法は、第1章で述べたとおり、告示法である微生物試験方法（微生物試験）が明記されていることと(1)、TCA で抽出し LC-MS/MS で測定する方法が報告されている。LC-MS/MS 法では、逆相イオンペアクロマトグラフィーや(2, 3)、マトリックス添加検量線法による定量測定方法であり(4, 5)、汎用的な絶対検量線を用いた定量測定方法が確立されていない。

絶対検量線法が確立されていない理由として、抽出液中の夾雑成分が十分に除去されていないことが挙げられる。本章では、微生物試験やすでに報告されている方法を参考に、畜産物中に残留するアプラマイシンを定量測定するための事前検討を行った。

事前検討として、1) アプラマイシンの LC-MS/MS 測定条件、2) アルカリ加水分解処理のアプラマイシン構造への影響、3) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) を用いた微生物試験における試料調製方法が LC-MS/MS 法に適応可能であるかの確認、の3つについて試験を行った。

LC-MS/MS 測定条件は、逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いずにアプラマイシンを分離するクロマト条件の選定と、質量分析部におけるイオン化条件の検討を行った。アルカリ加水分解処理のアプラマイシン構造への影響は、微生物試験で用いられているアルカリ加水分解を LC-MS/MS 測定に適応できるか確認するために、アルカリ加水分解によりアプラマイシンが分解されないか調べた。アプラマイシン標準液をアルカリ加水分解処理し、高速液体クロマトグラフ-オービトラップ型イオントラップ質量分析計（Orbitrap LC-MS）による精密質量解析や核磁気共鳴（NMR）を用いた構造解析をすることにより、アプラマイシンの構造変化を確認した。微生物試験における試料調製方法が LC-MS/MS 法に適応可能であるか確認する為、微生物試験法を参考にアプラマイシンの抽出を牛の組織（筋肉、脂肪、肝臓）について行い、LC-MS/MS 測定にて回収率を求めた。さらに、前処理を行った検液を希釈し、希釈の有無による回収率の差から夾雑成分の影響を確認した。

2.2 方法

2.2.1 試薬

アプラマイシン硫酸塩標準品：純度 99.5% (富士フィルム和光純薬製)、アセトニトリル：

高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）、ギ酸：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）、*n*-ヘキサン：特級（富士フイルム和光純薬製）、メタノール：LC/MS用（富士フイルム和光純薬製）、2-プロパノール：高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）、100%（w/v）トリクロロ酢酸溶液：生化学用（富士フイルム和光純薬製）、アンモニア水（10%）：（富士フイルム和光純薬製）（cat. # 013-17505）、水：超高純度蒸留水精製装置で精製したものをを使用した。LC-MS/MS測定に用いる分離カラムとして、HILIC系カラムであるCAPCELL PAK ST（5 μm、2.0 mm x 100 mm）（大阪ソーダ製）、Atlantis HILIC Silica（5 μm、2.1 mm x 100 mm）（Waters製）、TSKgel Amide-80（2 μm、2.0 mm x 100 mm）（東ソー製）の3種類とマルチモード系ポリマーゲルカラムであるTSKgel VMPak-25（7 μm、2.0 mm x 100 mm）（東ソー製）を使用した。

2.2.2 試料

牛肉の筋肉、肝臓、脂肪と部位別に三重県津市内の食肉小売店で国内産牛から加工されたものを購入した。牛筋肉は、可能な限り脂肪を除いた後、細切均一化した。牛脂肪は、可能な限り筋肉部を除いた後、細切均一化した。牛肝臓は、全体を細切均一化した。

2.2.3 機器および装置

超高速ホモジナイザーはPolytron PT3100Dを、シャフトはPT-DA 20/2EC-B193（Kinematica社）を使用した。遠心分離器は多本架冷却遠心機AX-320、ローターTS-37（100mL用アダプター付き）（TOMY社）を使用した。遠心減圧濃縮器は遠心エバポレーターCVE-3100（東京理科機器株式会社）、減圧型多検体用マニホールド（Waters社）を使用した。NMRはJNM-ECX400P（日本電子株式会社）を使用した。

2.2.4 LC-MS/MS測定装置

アプラマイシンの定量分析には、Agilent Technologies製の液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置（LC：1260 infinity、MS/MS：6470 Triple Quadrupole）を使用した。また、精密質量を測定する装置として、Thermo Fisher Scientific製の高速液体クロマトグラフ-オービトラップ型イオントラップ質量分析装置（Orbitrap LC-MS, LC：Dionex UltiMate 3000, MS：LTQ Orbitrap Velos）を使用した。アプラマイシンは非常に親水性の高い成分であることから、アプラマイシンのLC-MS/MSによる定量測定では、オクタデシルシリル（ODS）

系カラムを用いた逆相イオンペアクロマトグラフィー、順相系カラムクロマトグラフィー、親水性相互作用 (HILIC) 系クロマトグラフィー、陽イオン交換作用を併せ持つポリマーゲル (マルチモード系ポリマーゲル) カラムクロマトグラフィーによる分離が考えられる (10-21)。逆相イオンペアクロマトグラフィーは第 1 章で述べた通り、測定後に LC-MS/MS 装置内からイオンペア試薬を除去するための洗浄が必要となる。また、順相系カラムクロマトグラフィーの場合は溶離液に無極性或いは低極性溶媒を使用することから、操作性が悪い。一方で HILIC 系カラムクロマトグラフィー及びマルチモード系ポリマーゲルカラムクロマトグラフィーは、イオンペア試薬を必要とせず、極性溶媒の溶離液で測定可能であることから、取扱いが容易である。そこで、Table 2-1 に示した条件で HILIC 系およびマルチモード系ポリマーゲルカラムクロマトグラフィーにて、アブラマイシンを測定し、アブラマイシンの保持やピーク形状から、測定に用いるカラムを選定した。測定用カラムは、HILIC 系カラムである大阪ソーダ社製 CAPCELL PAK ST (5 μm 、2.0 mm x 100 mm)、Waters 社製 Atlantis HILIC Silica (5 μm 、2.1 mm x 100 mm)、東ソー社製 TSKgel Amide-80 (2 μm 、2.0 mm x 100 mm) とマルチモード系ポリマーゲルカラムである東ソー社製 TSKgel VMpak-25 (7 μm 、2.0 mm x 100 mm) を検討した。Table 2-1 の条件で用いる LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific 製) は、 m/z 200 で最大 60,000 の分解能がある精密質量測定が可能な質量分析装置である。また、LC-MS/MS 測定の検出器の条件として、ESI ポジティブモードで測定し、プリカーサーイオンを m/z 540.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ を選択した方法と m/z 270.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ を選択した方法が報告されている。本研究で使用する予定の LC-MS/MS は Agilent Technologies 6470 である。アブラマイシンを含むアミノグリコシド系抗生物質の分析で Agilent Technologies 社の LC-MS/MS を用いた方法としては、Agilent Technologies 6490 を用いた藤井らの方法(6)および、Agilent Technologies 6460 を用いた Zhai の方法(7)が報告されていた。藤井らの方法は HILIC 系カラムクロマトグラフィー、Zhai らの方法は逆相イオンペアクロマトグラフィーであったことから、藤井らの方法を参考に LC の条件を設定した。その条件を Table 2-2 に示す。HILIC 系カラムクロマトグラフィーの特性として、逆相系カラムクロマトグラフィーと比較すると、検量線の直線性が劣ることが知られている。そこで、Table 2-2 に示した条件で、アブラマイシンの標準液を LC-MS/MS 測定し、検量線の形状を確認した。その際に、プリカーサーイオンとして、 m/z 540.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ を選択した条件と m/z 270.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ を選択した条件の 2 種類で検量線の形状などを比較検討した。検量線用の標準液濃度は 2.5、7.5、10、12.5、15 ng/mL とした。

2.2.5 アプラマイシンのアルカリ加水分解処理

試料から目的成分の抽出効率には、処理過程における目的成分の分解と夾雑成分との結合等による共沈などが影響する。告示法に定められているアプラマイシンの微生物試験ではアルカリ加水分解による抽出を行う。アルカリ加水分解は、試料のマトリックス成分を分解する効果が期待され、食品分析にも使用されている方法であるが、一方で、測定対象物質自体の分解が懸念される。告示法による微生物試験の場合、*Bacillus subtilis* (ATCC 663) の生育阻害を指標としてアプラマイシンの残留を間接的に確認する方法であるため、アプラマイシンの構造の一部が分解しても測定に大きな影響は受けないが、物質をイオン化しその質量を測定する LC-MS/MS の場合は測定が困難となる。そこで、アルカリ加水分解処理によりアプラマイシンが分解されないか確認した。確認方法としては、アルカリ加水分解処理を行ったアプラマイシン標準液を Orbitrap-LC/MS による精密質量解析や NMR による構造解析と二つの方法により行った。精密質量解析による確認方法は、アプラマイシン 200 µg/mL 標準溶液と 0.1 M KOH 溶液を等量混合後、85°C で 20 分間加熱処理したもの、加熱を行わなかったもの、コントロールとしてアプラマイシン 200 µg/mL 溶液と精製水を等量混合したものそれぞれを希釈液（アセトニトリル：水：ギ酸=3：7：0.1）で 10 倍に希釈したものを Table 2-1 に示す条件で Orbitrap-LC/MS 測定を行い、10 µg/mL のアプラマイシンを同じ条件で測定したものと比較した。また、構造解析による確認方法は、0.5 M、0.05 M KOH および重水にアプラマイシンを溶解後、85°C で 20 分間加熱処理を行ったものと、コントロールとして重水にアプラマイシンを溶解したものを NMR 測定し、それぞれのスペクトルの変化からアルカリ加水分解により、アプラマイシンの構造変化が生じるかを調べた。

2.2.6 微生物試験の試料調製

Bacillus subtilis (ATCC 6633) を用いた微生物試験では、Fig. 1-2 に示す通り、試料からアプラマイシンをアルカリ加水分解で抽出し、抽出液を中和処理後、イオン交換クロマトグラフィーで精製する方法で試料調製を行うことになっている。この微生物試験に用いられている試料調製方法が LC-MS/MS 法に適用可能か検討した。まず、牛の筋肉、脂肪、肝臓それぞれ 10 g を Fig.1-2 に基づき、アルカリ加水分解抽出を行った。それぞれの抽出液を中和し、10 mL および精製水で 1/10 希釈した肝臓抽出溶液 10 mL に、0.1 M ギ酸-アンモニウム溶液 (pH8.5)

2 mL を添加・混合し、全量を 2 種類の陰イオン交換固相カートリッジ、WAX Cartridge (3 cc/60 mg) -MAX Plus Short Cartridge (225 mg) に注入した。固相を 0.01 M ギ酸-アンモニウム溶液 (pH8.5) 1 mL で洗浄し、流出液を全量回収後、0.01 M ギ酸-アンモニウム溶液 (pH8.5) で 20 mL に定容した。1/10 希釈した肝臓および脂肪、筋肉抽出試料は 10 mL、肝臓抽出試料は、0.01 M ギ酸-アンモニウム溶液 (pH8.5) で 1/10 希釈したもの 10 mL を、陽イオン交換固相カートリッジ、WCX Cartridge (1 cc/30 mg) に全量注入し、アプラマイシンを回収した。固相カートリッジを精製水 3 mL、90%アセトニトリル 3 mL で洗浄後、アセトニトリル：水：ギ酸 (3 : 7 : 0.1) 1 mL で固相カートリッジからアプラマイシンを溶出し、ブランク試料 1 mL を調製した。マトリックスの影響を確認するため、アプラマイシンの最終濃度を 100 ng/mL とするよう、抽出液を 2 µg/mL アプラマイシンおよび 40%アセトニトリルを用いて、それぞれ無希釈、1/10 希釈、1/100 希釈液に調製した。無希釈のものと 1/10 希釈、1/100 希釈液を LC-MS/MS 測定し、希釈倍率と回収率の関係から夾雑成分の影響を確認した。

2.3 結果

2.3.1 プロトタイプ LC-MS/MS 測定法の構築

アプラマイシンの LC-MS/MS 測定における溶離液にイオンペア試薬を使用しない、分離カラムの検討を行った。Table 2-1 に示す測定条件で 1 µg/mL に調製したアプラマイシン標準溶液を Orbitrap LC-MS に注入し、アプラマイシンの保持やピーク形状から、分離カラムを選定した。分析結果のクロマトグラムを Fig. 2-1 に示す。

HILIC 系カラム CAPCELL PAK ST (A)、Atlantis HILIC Silica (B)、TSKgel Amide-80 (C) およびマルチモード系ポリマーゲルカラムである TSKgel VMPak-25 (D) の各クロマトグラムの上段がトータルイオンクロマトグラム (TIC ; m/z 100 - 1000)、中段が 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ 、下段が 2 価イオンの m/z 270.6 $[M+2H]^{2+}$ のクロマトグラムを示した。検討したいずれのカラムでもアプラマイシンの保持時間が 8.0-10.2 分であり、アプラマイシンを保持することは確認できたが、ピーク形状及び

ピーク強度が最も優れている CAPCELL PAK ST を本研究で用いる分離カラムとして選定した。

次に、CAPCELL PAK ST カラムを用いた場合の、アプラマイシンの検量線について、直線性の確認や LC-MS/MS 定量測定における MS/MS 条件について検討した。標準液はアプラマイシン標準原液をアセトニトリル及び水 (4 : 6) 混液で、2.5、7.5、10、12.5、15 ng/mL

に調製した標準液を測定した。Table 2-2 の条件で標準液を測定し、プリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ と 2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ で検量線を作成し、決定係数 (R^2) や検量線の形状を比較検討した。

プリカーサーイオン m/z 540.3 $[M+H]^+$ については、最も強度が強く得られたプロダクトイオン m/z 217.1 を定量用イオン、次いで強度が強く得られたプロダクトイオン m/z 378.2 を定性用イオン、プリカーサーイオン m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ については、最も強度が強く得られたプロダクトイオン m/z 162.1 を定量用イオン、次いで強度が強く得られたプロダクトイオン m/z 217.7 を定性用イオンとした。検量線の結果を Fig. 2-2 に示す。

検量線の決定係数 R^2 は m/z 540.3 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 217.1、 m/z 270.1 $[M+2H]^{2+} \rightarrow m/z$ 162.1 とも 0.999 以上と良好であったが、直線性が認められなかった。特に、プリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 217.1 の検量線において 7.5 ng/mL の測定値が検量線から大きく乖離する結果であった。この現象については、原因は不明であるが、同じ測定を 3 回繰り返し行ない、同じ結果となった。このことから、定量測定 of MS/MS 条件を、プリカーサーイオン m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ 、プロダクトイオン m/z 162.1 と設定した。

2.3.2 アルカリ加水分解処理のアプラマイシン構造への影響

アルカリ加水分解によるアプラマイシン分解の有無について確認した。アプラマイシン 200 $\mu\text{g/mL}$ 溶液と 0.1 M KOH 溶液を等量混合後、85°C で 20 分間、加熱処理および非加熱、コントロールとしてアプラマイシン 200 $\mu\text{g/mL}$ 溶液と精製水を等量混合した試料を Orbitrap LC-MS で解析を行った。LC-MS 測定には希釈液: (アセトニトリル: 水: ギ酸= 3 : 7 : 0.1) で 10 倍希釈したものを 5 μL 供した。LC-MS 測定条件を Table 2-1、分析結果を Fig. 2-3 に示す。

Fig. 2-3 は各条件におけるアプラマイシンのクロマトグラムであり、それぞれ上段が TIC (m/z : 100-1000)、中段が 1 価イオンの質量範囲 m/z 540.28213-540.29293、下段が 2 価イオンの質量範囲 m/z 270.64470-270.60512 である。

TIC によるピーク強度を標準液と比較した結果、アルカリ加熱処理、アルカリ非加熱処理がそれぞれ 94.0%、88.4%となった。また 1 価イオンと 2 価イオンにおける精密質量については、アルカリ加熱処理、アルカリ非加熱処理ともに標準液と同じ精密質量範囲でピークが検出した。以上の結果から、アプラマイシンは 0.05 M KOH 内において 85°C で 20 分間加熱処理を行っても顕著な分解を受けないことが確認された。

NMR 解析では、試薬はすべて重水 (D₂W、NMR 用、 cat # 047-34243、富士フイルム和光株) で調製した。試料の解析は 400 MHz 高分解能核磁気共鳴装置 (日本電子株式会社 JNM-ECX400P) で行った。500 mg/mL アプラマイシン 0.05 mL に 0.1 M KOH、0.01 M KOH または D₂W を 0.05 mL 加え、85°C で 30 分加熱処理を行った。熱処理後の試料は冷却後、1.4 mL の D₂W を加え、NMR 解析に供した。解析結果を Fig. 2-4 に示す。

NMR スペクトル中に示した青矢印付近に見えている左右 2 つのピークは、構造式上の青矢印で示した位置に存在する 2 つの CH₂ (H が 4 個分) のシグナルに対応していると考えられる。一方、NMR スペクトル中に示した赤矢印付近の 3 つのピークは、構造式上に赤矢印で示した位置に存在する O に挟まれました 3 つの CH のシグナルに対応していると考えられる。これらのピークが、0.5 M KOH で処理した時に、左側のスペクトル上で、位置がシフトしただけであったことから、骨格構造は維持され、構造式上に付した緑矢印の位置の水酸基の H が解離し、O になったと考えられる。

NMR 解析では、0.5 M KOH、85°C で 20 分加熱処理において、メチル基の水素分子が遊離することが、骨格構造は維持されていることが確認できた。0.05 M KOH および水 (重水) では、85°C で 20 分加熱処理を行っても水素イオンの遊離は認められず、また骨格構造にも影響は認められなかった。

今回の NMR 分析のスペクトルには水酸基あるいはアミン基の水素は観察されていなかった。しかし、0.5M KOH でアルカリ加熱処理した場合、橙矢印で示した箇所のスペクトルの変化が観察された。

2.3.3 微生物試験の試料調製液の LC-MS/MS 測定

牛の筋肉、脂肪、肝臓の各 10 g を Fig. 1-2 に示した方法でアルカリ加水分解抽出を行った。それぞれの抽出液 10 mL および精製水で 1/10 希釈した肝臓抽出溶液 (1/10 肝臓抽出液) の 10 mL に 0.1 M ギ酸-アンモニウム溶液 (pH8.5) 2 mL を添加・混合し、2.2.6 に示した方法で抽出液の精製を行い、ブランク試験溶液 1 mL を調製した。マトリックスの影響を確認するため、ブランク試験溶液にアプラマイシン標準液を添加し、最終濃度を 100 ng/mL となるように調製した。さらにブランク試験溶液を、1/10 倍、1/100 倍に希釈後 100 ng/mL となるように調製した試料の LC-MS/MS 測定結果を Table.2-3 に示した。

牛の筋肉、脂肪、1/10 肝臓抽出液、肝臓における回収率はそれぞれ、61.2%、63.7%、67.1%、59.9%であった。また、各ブランク試験溶液を 1/10 倍希釈したものに標準添加した試料の

回収率はそれぞれ 81.7%、84.2%、86.7%、83.8%、1/100 倍希釈した場合の回収率は 98.5%、98.3%、101.7%、97.5%と希釈倍率と共に回収率が向上した。各試料は、それぞれ 1/10 以上の希釈を行うことで、指定された条件である回収率 75%以上を上回るまでにはマトリックスの影響を低減できた。標準添加試料のマトリックスの影響調査結果から、本章で検討した微生物試験法を参考にした試料調製方法では、夾雑成分が十分に除去されていないため、MS/MS 測定においてイオン化阻害が起きていることが明らかとなった。

2.4 考察

本章では、畜産部中に残留するアブラマイシンの定量測定方法を開発するための事前検討を行った。まず、アブラマイシンを定量測定する LC-MS/MS について、分離カラムの選定を行った。分離カラムは、アブラマイシンは極性の高い成分であるため、イオンペア試薬を用いずに極性溶媒を溶離液として使用可能な HILIC 系カラムとマルチモード系ポリマーゲルカラムで検討を行った。カラムには、HILIC 系カラムである CAPCELL PAK ST、Atlantis HILIC Silica、TSKgel Amide-80 の 3 種類とマルチモード系ポリマーゲルカラムである TSKgel VMpak-25 について検討を行った。いずれのカラムもアブラマイシンを保持することが確認できたが、カラムの種類によっては、良好なピーク形状が得られないものも見られた。検討したカラムの中では、CAPCELL PAK ST が最もピーク形状に優れ、ピーク強度も高い結果となった。また、HILIC 系カラムは、逆相系カラムと比較して検量線の直線性が劣ると言われている。アブラマイシンのイオン化条件では、プリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ 、2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ を用いた方法が報告されており、それを参考に Table.2-2 で示す条件でアブラマイシンの検量線を作成し、直線性を確認した。プリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ の場合、検量線上から大きく外れる点が見られる傾向が見られた。一方で 2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ の方はそのような傾向は見られず、全ての点で安定的に検量線上にプロットされた。

アルカリ加水分解による、アブラマイシンの構造への影響については、アブラマイシンに対してアルカリ加水分解処理を行い、アブラマイシンが分解されていないか、Orbitrap LCMS による精密質量解析及び NMR 測定による構造解析により確認した。結果、アルカリ加水分解処理により、アブラマイシンは分解されないことが分かった。よって、畜産物からアブラマイシンを抽出する方法の一つとしてアルカリ加水分解を取り入れることは可能であることが明らかとなった。

そこで、アプラマイシンの微生物試験に用いられているアルカリ加水分解が試料調製法として LC-MS/MS 測定に適応できるか検討した。牛の筋肉、脂肪、肝臓をアルカリ加水分解し、抽出液を中和した後、陰イオン交換固相カートリッジおよび陽イオン交換固相カートリッジで精製し各組織のブランク調製溶液を調製した。ブランク調製溶液にアプラマイシンを添加し LC-MS/MS 測定を行い、夾雑成分の影響を調べた。結果、回収率が 70%未満であった。そのブランク調製液を 10 倍、100 倍と希釈したものに標準添加した試料を測定した結果、希釈倍率が上がるにつれ、回収率も上昇した。試料調製液を 10 倍に希釈したもので、回収率がいずれの部位においても 80%以上、100 倍希釈したもので、回収率がいずれの部位も 98%以上と非常に良好な回収率となった。この結果から、微生物試験に用いられている試料調製方法では、LC-MS/MS 測定を行うための夾雑成分が十分に除去されないことが明らかとなった。また、Fig.1-2 に示す試験方法では、アルカリ加水分解抽出後に抽出液の中和を行う必要があり、その操作は非常に煩雑である。本章で検討した固相カートリッジは、陰イオン交換系固相カートリッジは WAX Cartridge (3 cc/60 mg) -MAX Plus Short Cartridge (225 mg)、陽イオン交換系固相カートリッジは WCX Cartridge (1 cc/30 mg) を用いた。今後は、アプラマイシンの物性と抽出液の液性を参考に、pH 調整が不要な固相カートリッジを選定し、LC-MS/MS 測定に適応可能な精製方法を検討する。

引用文献

- 1) Materials of the Subcommittee on Pesticides and Veterinary Drugs of the Food Sanitation Subcommittee of the Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council. ,2015 20th January (<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000074613.pdf>)
- 2) Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C. S.R., Fernandes, C., Silva, L. H.M., Gloria, M. B. A.: A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, 163, 85-93 (2017).
- 3) Kajita, H., Akutsu, C., Hatakeyama, E., Komukai, T.: Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in fish. *Talanta*, 163, 85-93 (2017).
- 4) Hamamoto, K., Mizuno, Y., Koike, R.: Sensitive method for the determination of Kanamycin residue in livestock products and marine products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Kachiku Eiseigaku Zasshi (The Japanese journal of animal hygiene.)*, 39, 9-14 (2013).
- 5) Omiya, S., Kumazawa, T., Lee, X., Shoji, Y., Sato, J., Sawaguchi, T., Yoshimura, A., Sato, K.: Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Tandem-Mass Spectrometry for Quantitative determination of Six Aminoglycoside Antimicrobials in Human Plasma. *Showagakukai Zasshi (Journal of The Showa University Society)*, 76, 285-298 (2016).
- 6) Fujii, Y., Nishimura, K., Hashimoto, S., Kaga, T.: Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in Meat by HPLC/ Tandem MS. *The 65th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 65, 431 (2016).

要 旨

畜産物中の残留アプラマイシン定量測定方法を開発するための事前検討を行った。LC-MS/MS 測定の分析条件では、分離カラムの検討と質量分析装置のイオン化条件などを検討した。分離カラムの検討では、アプラマイシンは親水性が強いことから、HILIC 系のカラムとマルチモード系ポリマーゲルカラムを用いた。分離カラムはメーカーの異なる 3 種類の HILIC 系カラムとマルチモード系ポリマーゲルカラムを比較検討した。検討の結果、いずれのカラムでもアプラマイシンを保持することが可能であることが判明したが、ピーク形状が最も良好で、ピーク強度が高い CAPCELL PAK ST を分離カラムとして選定した。質量分析装置の条件設定では、イオン化のプリカーサーイオンについて、1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ と 2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ を比較検討し、検量線の直線性で評価したところ、1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ を用いるより 2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ を用いた方がよりよい相関が得られることが分かった。試料調製方法では、アルカリ加水分解によるアプラマイシンの分解が懸念されたが、アルカリ加水分解後のアプラマイシンを Orbitrap LC-MS 測定及び NMR による解析を行ったところ、アプラマイシンはアルカリ加水分解により、ほぼ分解されないことが分かった。さらに、アプラマイシンの微生物試験法を参考にアルカリ加水分解抽出後、抽出液の中和処理を行い、陰イオン交換固相カートリッジと陽イオン交換固相カートリッジで精製し、LC-MS/MS による測定を試みた。しかし、アプラマイシンのイオン化を阻害する夾雑成分を十分に除去できず、試みた方法は LC-MS/MS 法に適用できないことが分かった。また、アルカリ加水分解抽出後に行う、抽出液の pH 調整（抽出液の中和）操作は非常に煩雑であることから、第 3 章では、中和処理を省略した簡便な試料調製方法の検討を行う。

☒ 表

Table 2-1 Orbitrap LC-MS conditions (Thermo Fisher Scientific)

LC parameters			
Equipment	Dionex UltiMate 3000 (Themro Fisher Scientific)		
Column*	CAPCELL PAK ST (2.0 x 100 mm, 5 μm: OSAKA soda)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volme	5 μL		
Column temperature	40°C		
Mobile phase	A: 0.4%(v/v) formic acid in water, B: 0.4%(v/v) formic acid in acetnitrile		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	10	90
	5.0	10	90
	8.5	70	30
	17.0	70	30
	18.0	10	90
	27.0	10	90
MS conditions			
Equipment	LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)		
Analysis mode	Full Scan		
Ionization	ESI positive		
Chapillary voltage	3500 V		
Sheath gas	50 L/min		
Auxiliary gas	15 L/min		
Capillary temperature	40°C		
Heater temperature	70 V		
Mass range	<i>m/z</i> 100-1000		

***When evaluation of columns, four kinds of column were tested including CAPCELL PAK ST.**

Table 2-2 LC-MS/MS conditions (Agilent Technologies)

LC parameters				
Equipment	1260 Infinity LC (Agilent Technologies)			
Column	CAPCELL PAK ST (2.0 x 100 mm, 5 µm: OSAKA soda)			
Flow rate	0.3 mL/min			
Injection volume	10 µL			
Column temperature	40°C			
Mobile phase	A: 0.4%(v/v) formic acid in water, B: 0.4%(v/v) formic acid in acetonitrile			
Gradient	<u>Time (min) A (%) B (%)</u>			
	0	10	90	
	5	10	90	
	8.5	70	30	
	17	70	30	
	18	10	90	
	27	10	90	
	MS conditions			
Equipment	6470 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies)			
Analysis mode	Selective reaction monitoring (SRM)			
Ionization	ESI positive			
Chapillary voltage	3500 V			
Drying gas	N ₂ , 300°C, 5 L/min			
Sheath gas	N ₂ , 400°C, 11 L/min			
Nebulizer gas	N ₂ , 45 psi			
Fragmentor	140 V			
Collision gas	N ₂			
Transitions				
Compound	Molecular weight	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
Apramycin	539.58	540.3	217.1 ^{a)}	25
			378.2 ^{b)}	12
		270.7	162.1 ^{a)}	5
			217.1 ^{b)}	5
^{a)} Used for quantitation, ^{b)} Used for confirmation				

Table 2-3 Confirmation of matrix effect (Alkaline hydrolysis)

Sample ¹⁾	LC-MS/MS Results		Peak area ratio ³⁾ (%)	Recovery ⁴⁾ (%)	
	Retention time (min)	Peak area			
1/10 Bovine liver	x1 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.213	86684	67.6	67.1
	x1/10 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.220	111738	87.1	86.7
	x1/10 ² Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	130976	102.1	101.7
	x1 Matrix (Blank) (0 ng/mL)	11.227	617	0.5	-
Bovine liver	x1 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.213	77144	60.2	59.9
	x1/10 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	107765	84.0	83.8
	x1/10 ² Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	125330	97.7	97.5
	x1 Matrix (Blank) (0 ng/mL)	11.220	356	0.3	-
Bovine muscle	x1 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.220	78977	61.6	61.2
	x1/10 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	105338	82.1	81.7
	x1/10 ² Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	126820	98.9	98.5
	x1 Matrix (Blank) (0 ng/mL)	11.220	561	0.4	-
Bovine fat	x1 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.220	82126	64.0	63.7
	x1/10 Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	108218	84.4	84.2
	x1/10 ² Matrix (100 ng/mL apramycine)	11.227	126255	98.5	98.3
	x1 Matrix (Blank) (0 ng/mL)	11.213	231	0.2	-
Standard ²⁾	100 ng/mL apramycin	11.234	128232	100	-

1) Sample

Tissue: 10 g, Extraction: Liver 0.05 M KOH , Muscle, Fat 0.1 M KOH, Extract used for purification: 1/10 Liver 1 mL(1/10 dil, 10mL), Liver, Muscle, Fat 10 mL,

Preparation: Extract was neutralized, impurities were removed with WAX-MAX, and the apramycin was recovered with WCX.

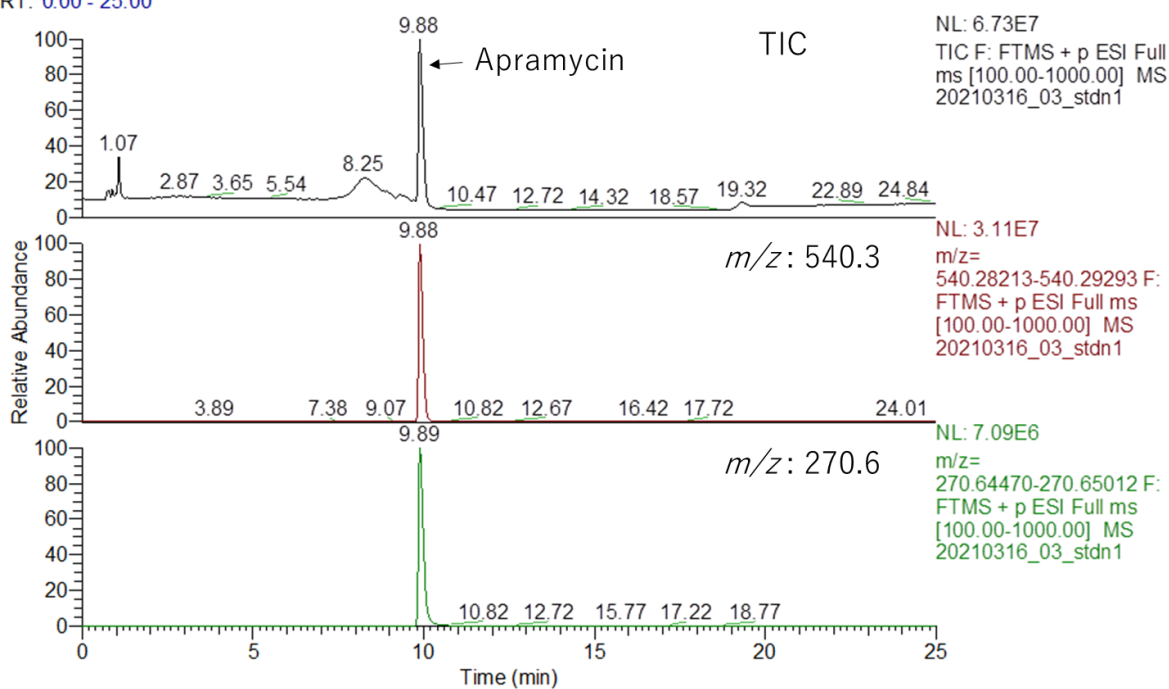
2) Standard in solvent

3) Peak area ratio (%) = Sample peak area/Standard peak area

4) Recovery (%) = (Peak area of sample fortified with standard - Peak area of matrix)/Peak area of standard

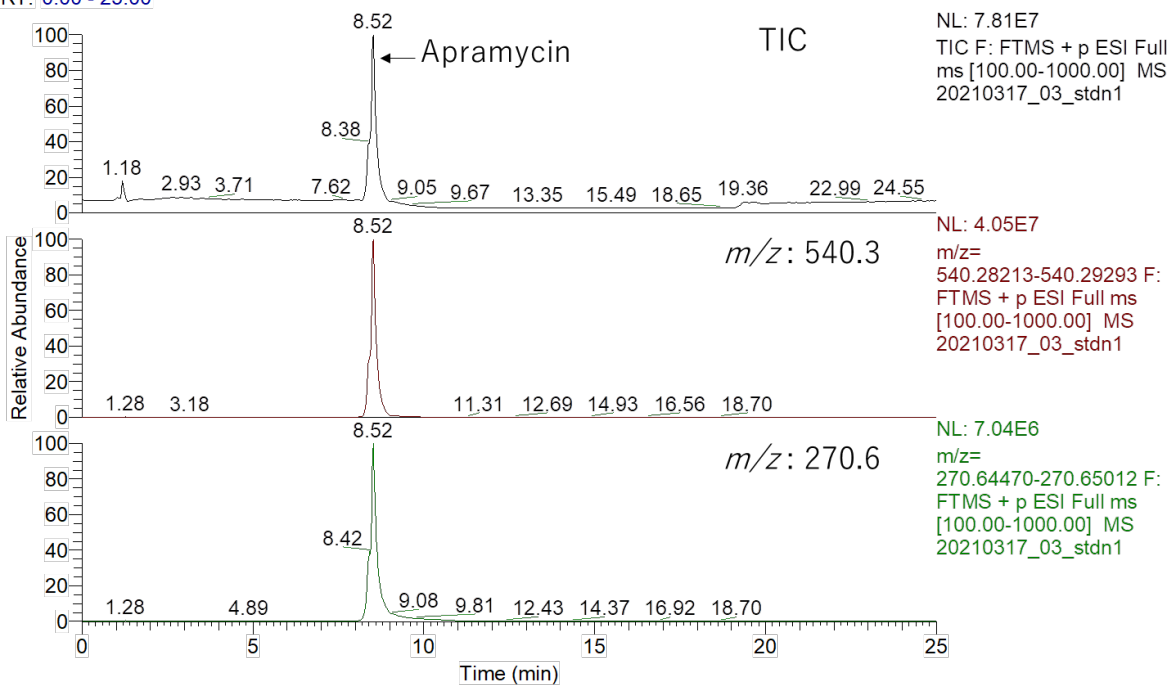
A

RT: 0.00 - 25.00

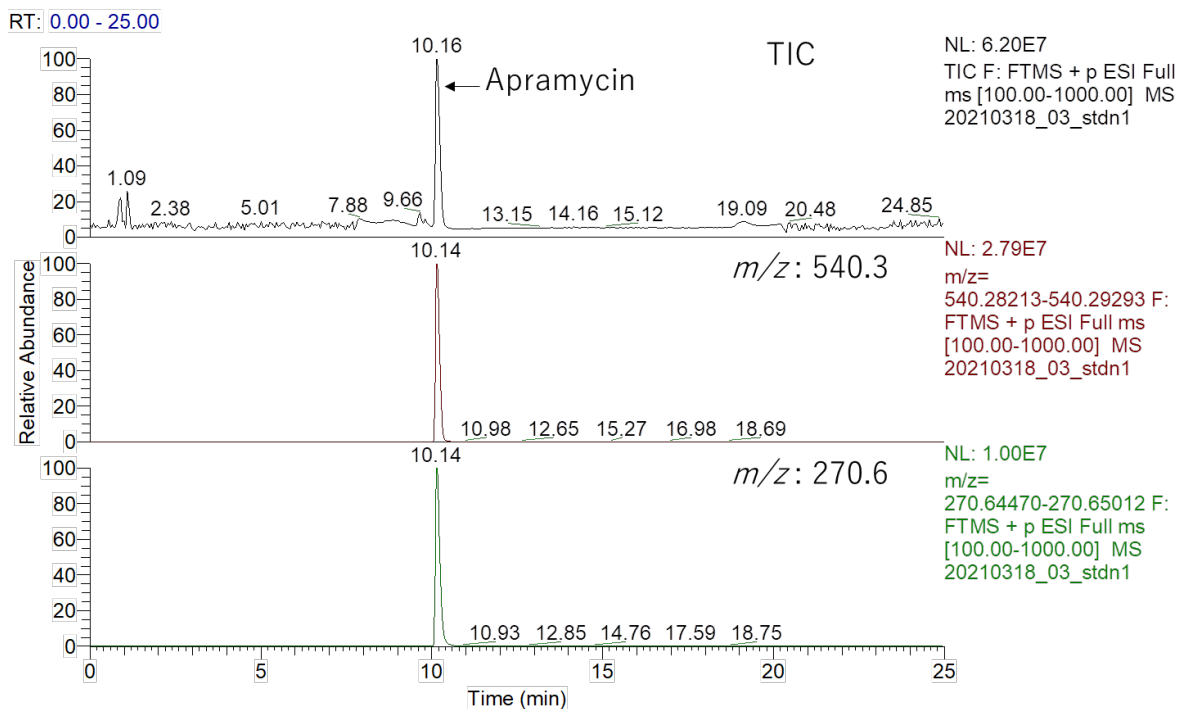


B

RT: 0.00 - 25.00



C



D

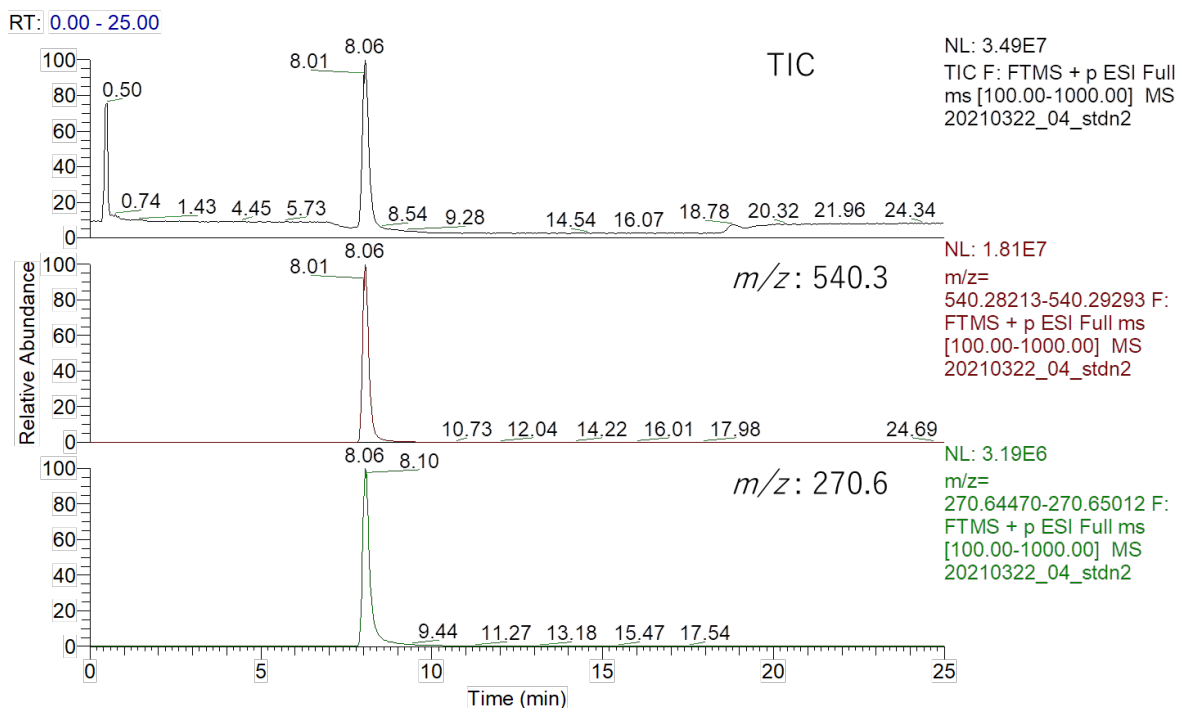


Fig. 2-1 Apramycin analysis chromatogram

A: CAPCELL PAK ST, B: Atlantis HILIC Silica, C: TSKgel Amide-80, D: TSKgel VMPak-25

Upper: TIC, Middle: m/z 540.3, Lower: m/z 270.6

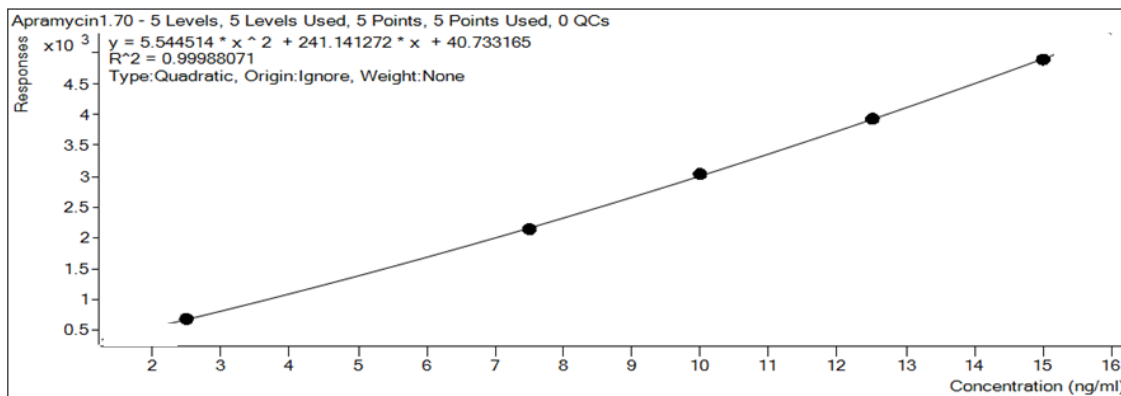
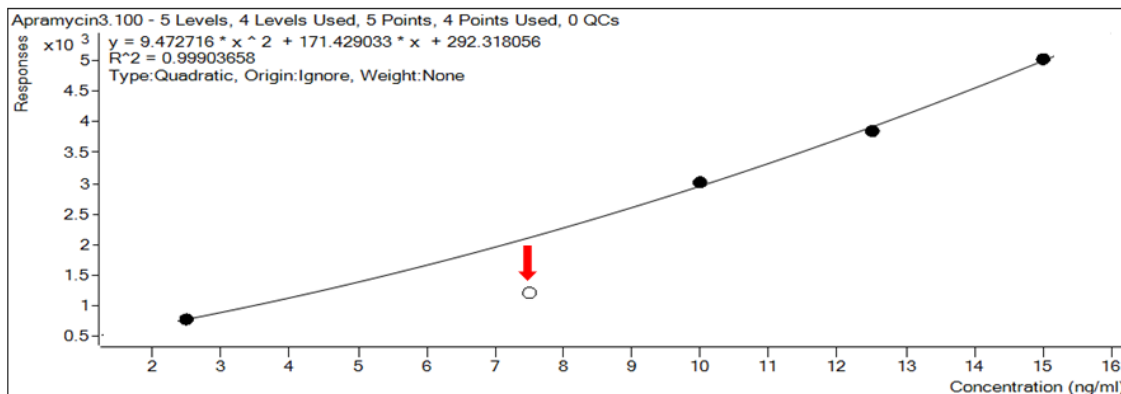
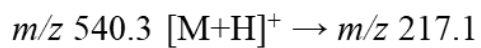


Fig. 2-2 External calibration curves of apramycin (2.5 - 15 ng/mL)

Upper : m/z 540.3 $[M+H]^+ \rightarrow 217.1$, Lower : m/z 270.1 $[M+2H]^{2+} \rightarrow 162.1$

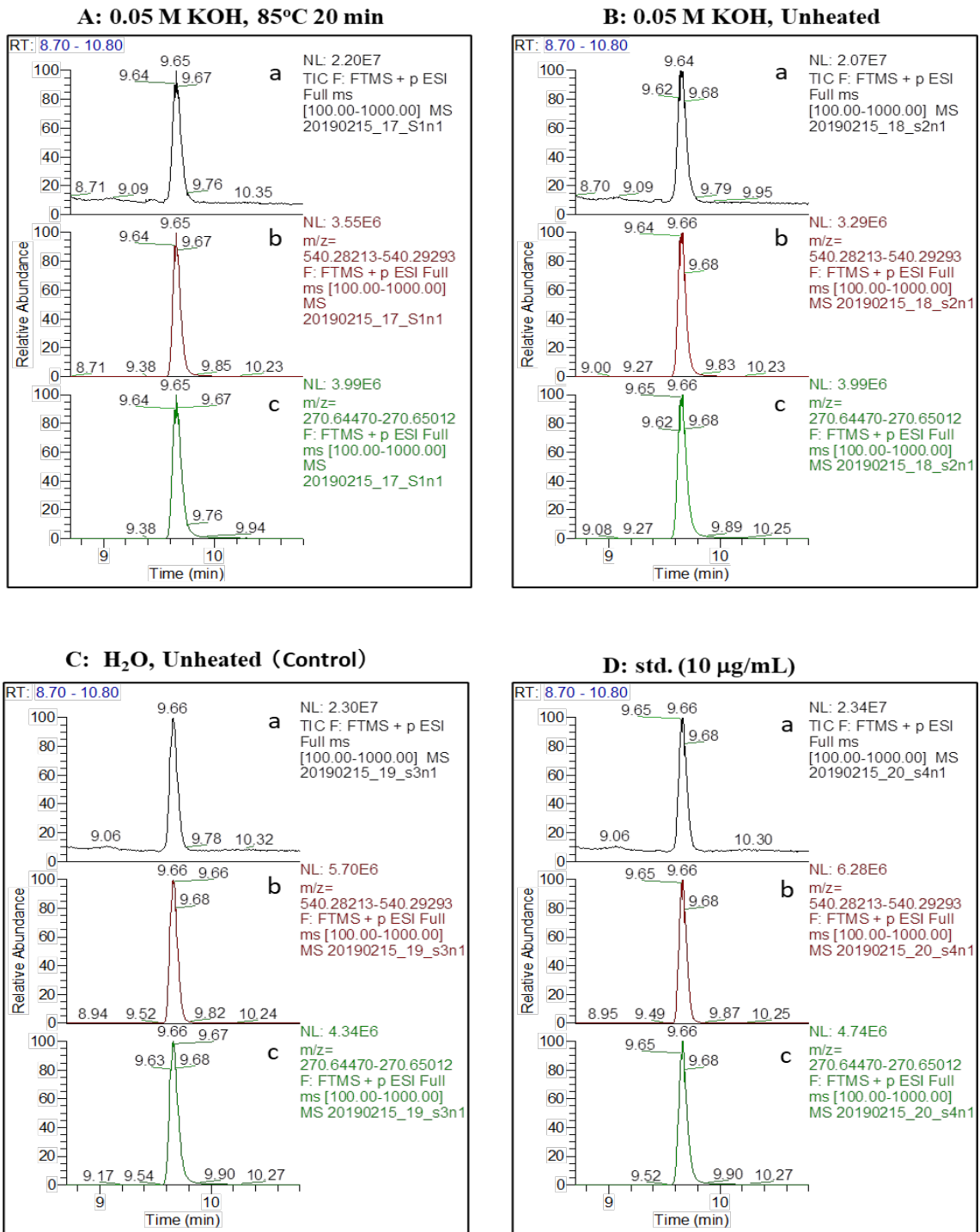
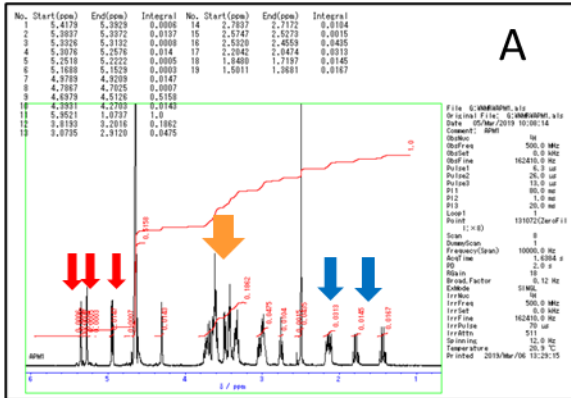


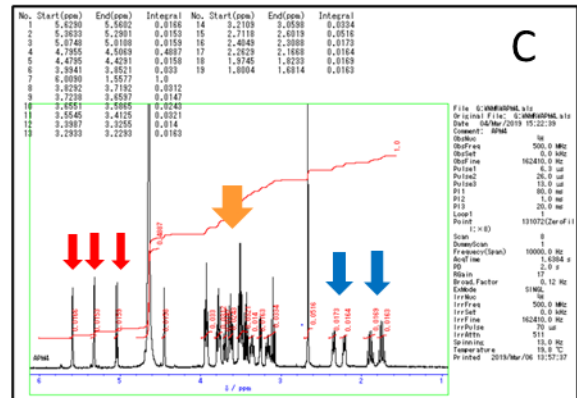
Fig. 2-3 Effect of heat-alkaline treatment (Orbitrap-LC/MS analysis)

A: Alkaline treatment (0.05M KOH, 85 °C, 20min), B: Alkaline treatment (0.05M KOH, Unheated), C: H₂O Unheated (Control), D: Apramycin standard (10 mg/mL)
a: TIC (mass range: 100-1000), b: *m/z* 540.28213-540.29293, c: *m/z* 270.64470-270.65012

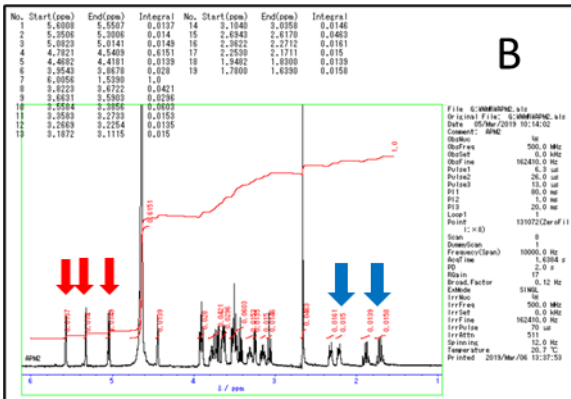
0.5 M KOH, 85°C 20 min



D₂O, unheated (control)



0.05 M KOH, 85°C 20 min



D₂O, 85°C 20 min

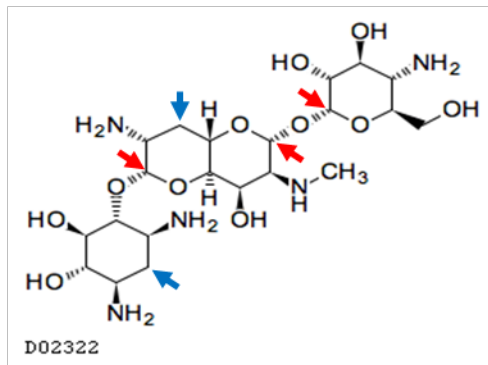
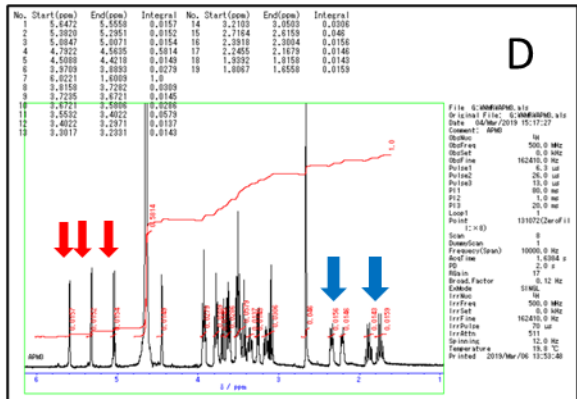


Fig. 2-4 Effect of heat-alkaline treatment (NMR analysis)

¹H NMR Data of AP treated with alkaline hydrolysis with 0.5M KOH (A), AP treated with alkaline hydrolysis with 0.05M KOH, 85 °C 20min (B), AP in D₂O (Control) (C), AP in D₂O, 85 °C 20min (D)

Red allow: Signal of CH in AP formula structure, Blue allow: Signal of CH₂ in AP formula structure

第3章 LC-MS/MS 測定用試料の調製方法の検討

3.1 緒言

第2章では畜産物中のアプラマイシン測定に関する事前検討を行った。LC-MS/MS 定量測定の事前検討については、分離カラムの選定や検量線の形状確認、イオン化条件の検討を行った。分離カラムとして、HILIC系カラムである CAPCELL PAK ST を選定した。また、質量分析部におけるイオン化では、1価イオンと2価イオンがプリカーサーイオンとして生じることから、それぞれのプリカーサーイオンについて、検量線を作成し濃度とピーク強度の相関を調べ、2価イオンを用いた方がより高い相関が得られることを明らかとし、LC-MS/MSによるアプラマイシンのプロトタイプ測定系を構築した。

本章では、第2章で構築した LC-MS/MSによるアプラマイシンのプロトタイプ測定系の最適化と絶対検量線法に適応させるための試料の調製方法を検討した。

絶対検量線法による定量方法が確立されていない理由としては、分析用試料中の夾雑成分が十分に除去されていないことが挙げられる。本章では、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定系を確立するため、分析用試料から夾雑成分を除去するための方法を中心に検討した。さらに、牛の筋肉、肝臓に加え、十分に検討されていない牛の脂肪についても試料の調製方法を検討した。

牛試料からのアプラマイシン抽出方法は、アルカリ加水分解抽出および n-ヘキサン存在下での TCA 抽出（ヘキサン-TCA 抽出）で検討した。抽出液からの分析試料の調製は固相カートリッジを用いて検討した。アルカリ加水分解抽出およびヘキサン-TCA 抽出の抽出液はともに強酸性で、アプラマイシンの pK_a は 8.5 であることから、アプラマイシンを吸着させる固相カートリッジとして、逆相系陽イオン交換共重合体固相カートリッジを検討した。また、アプラマイシンのイオン化に影響を及ぼす夾雑成分を吸着除去するために、2種類の HLB 共重合体固相カートリッジを連結する方法の検討を行った。確立した試料調製方法は、MRL に相当する濃度になるようにアプラマイシンを添加した牛組織（筋肉、脂肪：0.5 ppm、肝臓：5 ppm）の測定を行い、選択性と回収率について評価した。評価基準はガイドラインに基づき行った(1, 2)。

3.2 方法

3.2.1 試薬

アプラマイシン硫酸塩標準品：純度 99.5% (富士フイルム和光純薬製)、アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製)、ギ酸：高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製)、*n*-ヘキサン：特級 (富士フイルム和光純薬製)、メタノール：LC/MS 用 (富士フイルム和光純薬製)、2-プロパノール：高速液体クロマトグラフ用 (富士フイルム和光純薬製)、100% (w/v) トリクロロ酢酸溶液：生化学用 (富士フイルム和光純薬製)、アンモニア水 (10%)：(富士フイルム和光純薬製) (cat. # 013-17505)、水：超高純度蒸留水精製装置で精製したものを使用した。親水性-親油性バランス (hydrophilic-lipophilic balance: HLB) 型固相として、Supel-select HLB (200 mg/6 mL) (Merck 製)、Oasis HLB Plus Short Cartridge (225 mg) (Waters 製)、陽イオン交換型固相として、Oasis MCX Plus Short Cartridge (225 mg) (Waters 社製)、InertSep mini MC-1 (280 mg) (ジーエルサイエンス製) を使用した。LC-MS/MS 測定に用いる分離カラムとして、HILIC系カラムである CAPCELL PAK ST (5 μ m, 2.0 mm x 100 mm) (大阪ソーダ製) を用いた。

3.2.2 試料

牛肉の筋肉、肝臓、脂肪と部位別に三重県津市内の食肉小売店で国内産牛から加工されたものを購入し、2.2.2 と同様に処理を行った。

3.2.3 アプラマイシン標準溶液および添加試料の調製

アプラマイシン硫酸塩 118.2 mg (アプラマイシン 100 mg 相当量) を精秤し、水 10 mL で溶解して 10 mg/mL 溶液 (標準原液) を調製した。溶液は 0.2 mL に分注し、冷凍 (-30°C) 保存した。

検量線用標準溶液は標準原液をアセトニトリル/水/ギ酸 (30:70:1) 混液で適宜希釈し、0.5 - 3.0 ng/mL、25 - 150 ng/mL、および 250 - 1500 ng/mL の濃度の溶液を調製した。

試料添加用標準溶液は標準原液を水で希釈し、200 μ g/mL および 20 μ g/mL の溶液を調製した。続いて、それぞれの溶液を 50% メタノールで希釈し、100 μ g/mL および 10 μ g/mL の溶液を調製した。アプラマイシン添加組織試料の調製は 0.5 mL の試料添加用標準溶液 (5 ppm の場合は 100 μ g/mL 溶液、0.5 ppm の場合は 10 μ g/mL 溶液) を 10 g の牛組織サンプルに加えてよく混合したのち、25 °C で 30 分間静置した。このアプラマイシン添加組織試料

は、それぞれポジティブリスト制度における、残留基準値相当（牛の筋肉、脂肪：0.5 ppm、牛の肝臓：5 ppm）の濃度である。

3.2.4 機器および装置

超高速ホモジナイザーは Polytron PT3100D を、シャフトは PT-DA 20/2EC-B193（Kinematica 社）を使用した。遠心分離器は多本架冷却遠心機 AX-320 ローターTS-37（100mL 用アダプター付き）（TOMY 社）を使用した。遠心減圧濃縮器は遠心エバポレーター CVE-3100（東京理科機器株式会社）、減圧型多検体用マニホールド（Waters 社）を使用した。LC/MS/MS は Agilent Technologies 製の高速液体クロマトグラフ 1260 infinity LC および質量分析装置 6470 Triple Quadrupole を使用した。

3.2.5 LC-MS/MS 測定条件

第2章の LC-MS/MS 測定条件の検討結果から、分離カラムは CAPCELL PAK ST、プリカーサーイオンは 2 価イオンである m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ を選択した。本章では、アブラマシンの検出感度を上昇させるための LC-MS/MS 条件の最適化を行った。測定条件の最適化は 1 $\mu\text{g/mL}$ のアブラマジン標準溶液を用いて行った。まず、フラグメンター電圧を 70 V と 140 V に設定し、プリカーサーイオンのマススペクトルを調べ、最適なフラグメンター電圧を設定した。さらに、コリジョンセルにおけるコリジョンエネルギーを 5 eV に設定しプロダクトイオンのマススペクトルを調べ、LC-MS/MS 条件を最適化した。最適化した条件で検量線を作成し、直線性を調べた。また、1 価イオンについても同様の方法で最適化した結果を用いて検量線を作成し、直線性を調べた。

3.2.6 LC-MS/MS 測定用試料の調製方法

3.2.6.1 アルカリ加水分解による抽出

牛組織からのアブラマイシンのアルカリ加水分解抽出法の概要を Fig.3-1 に示す。牛脂肪と、牛筋肉および牛肝臓で異なる手順で抽出を行った。

a) 牛脂肪

牛脂肪 10 g に対し、0.4 M KOH-20%メタノール溶液 50 mL を加えて攪拌し、65 °C で 30 分間、180 rpm で振とうした。直ちに氷冷後、10% (w/v) トリクロロ酢酸溶液 15 mL 添加し、5 分間ホモジナイズした。さらに、n-ヘキサン 30 mL を添加し攪拌したのち、3000 rpm

で 10 分間遠心分離を行い、水相を採取した。抽出残留物に 10% (w/v) TCA 溶液 30 mL と n-ヘキサン 30 mL を添加し 5 分間ホモジナイズした後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。水相を採取し先に採取した水相に合わせ、10% (w/v) TCA 溶液で 100 mL に定容した。

b) 牛筋肉、牛肝臓

牛筋肉、牛肝臓 10 g に対し、0.4 M KOH-20%メタノール溶液（牛肝臓は 0.2M KOH）を 50 mL 加えて 5 分間ホモジナイズした後、65°C で 30 分間、180 rpm で振とうした。直ちに氷冷後、10% (w/v) TCA 溶液 10 mL 加え、5 分間ホモジナイズした。3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取した。抽出残留物に 10% (w/v) TCA 溶液 30 mL を加えホモジナイズし、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清み液を分取し、先の上清み液に合わせた後、10% (w/v) トリクロロ酢酸溶液で 100 mL に定容した。

3.2.6.2 ヘキサン-トリクロロ酢酸による抽出

牛組織からのアプラマイシンのヘキサン-トリクロロ酢酸（TCA）抽出方法の概要を Fig.3-2 に示す。牛脂肪と、牛筋肉および牛肝臓で異なる手順で抽出を行った。

a) 牛脂肪

試料 10 g に 10% (w/v) TCA 溶液 40 mL を加え、Vortex mixer で良く攪拌した後、n-ヘキサン 40 mL を添加し、5 分間ホモジナイズした。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、水相を採取した。抽出残留物に 10% (w/v) TCA 溶液 40 mL、n-ヘキサン 25 mL を加え、5 分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。水相を分取し、先に分取した水相に合わせ、10% (w/v) TCA 溶液で 100 mL に定容した。

b) 牛筋肉、牛肝臓

試料 10 g に 10% (w/v) TCA 溶液 50 mL を加え、vortex mixer で良く攪拌した後、n-ヘキサン 30 mL を添加し、ホモジナイズした。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、水相を採取した。抽出残留物に 10% (w/v) TCA 溶液 40 mL、n-ヘキサン 25 mL を加え、5 分間ホモジナイズした後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。水相を分取し、先に分取した水相に合わせ、10% (w/v) TCA 溶液で 100 mL に定容した。

3.2.6.3 LC-MS/MS 測定用試料の調製

抽出液からの LC-MS/MS 測定用試料の調製は固相カートリッジを用いて行った。

アプラマイシンは pK_a 8.5 と塩基性の性質を持つことに加え、本章で検討した抽出方法の抽出液は強酸性であることから、アプラマイシンを吸着する固相カートリッジとして、逆相系陽イオン交換固相カートリッジ [Oasis MCX Plus Short Cartridge (225 mg) 以下 MCX と InertSep mini MC-1 (280 mg) 以下 MC-1] を選択し比較検討した。また、抽出液中に含まれる夾雑成分の吸着除去を目的とし、2種類の親水性-親油性バランス (hydrophilic-lipophilic balance: HLB) 型固相カートリッジである、[Supel-select HLB (200 mg/6 mL) 以下 SupelHLB と Oasis HLB Plus Short Cartridge (225 mg) 以下 OasisHLB] を用いた。抽出液中に含まれる夾雑成分の吸着除去は、HLB 固相カートリッジ (SupelHLB 又は OasisHLB) か、2種類の連結された HLB 固相カートリッジ (SupelHLB と OasisHLB の2種類の固相カートリッジを連結させたもの (以下、SupelHLB-OasisHLB) で検討を行った。さらに、HLB 固相カートリッジの下部に逆相系陽イオン交換固相カートリッジ (MCX 又は MC1) を連結させることで、HLB 型固相カートリッジを通液した抽出液から直接アプラマイシンを回収する方法を検討した。夾雑成分を除去するための固相カートリッジとアプラマイシン回収するための固相カートリッジの組み合わせとして、OasisHLB 或いは SupelHLB と MC1 の2連結固相 (それぞれ、OasisHLB-MC1 および SupelHLB-MC1)、SupelHLB-OasisHLB と MC1 或いは MCX の3連結固相 (それぞれ、SupelHLB-OasisHLB-MC1 および SupelHLB-OasisHLB-MCX) の4種類について検討を行った。

固相カートリッジによる抽出液調製の手順を Fig. 3-3 に示す。メタノール、水各 10 mL を固相カートリッジに注入しコンディショニングを行った後、抽出液を 10 mL 注入し、0.1 mol/L HCl 10 mL (5 mL x 2) で洗浄した。SupelHLB と OasisHLB を取り外し、MCX または MC-1 に水、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル及び水 (7:3) 混液をそれぞれ各 10 mL (5 mL x 2) で洗浄した。アプラマイシンの溶出は、アンモニア水 (10%) 及びアセトニトリル (3:7) 混液 10 mL (5 mL x 2) を用いた。溶出液は遠心減圧濃縮器を用いて、40°C で溶媒を除去した。この残留物を 30% (v/v)アセトニトリルに溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

3.3 結果

3.3.1 LC-MS/MS 測定条件の最適化

Table 3-1 に示す条件で、1 µg/mL のアプラマイシンを測定し、LC-MS/MS 測定条件の最適化を行った。質量分析装置の条件として、フラグメンター電圧の検討を行った。フラグメンター電圧はイオン源で生成したイオンを質量分析部へ導入する際に印加する電圧であ

り、その電圧によって感度の変動する。第2章では140 Vで検討を行ったが、本章では70 Vと140 Vに設定し、スキャン範囲を m/z 50 - 1000 でアブラマイシンのマススペクトルの確認を行った。結果を Fig. 3-4 の上段に示す。

フラグメンター電圧70 Vではプロトン付加分子の $[M+3H]^{3+}$ と $[M+2H]^{2+}$ が強く観察され、フラグメンター電圧140 Vではプロトン付加分子の $[M+H]^+$ が強く観察された。フラグメンター電圧70 Vでは、ほぼ同程度のピーク強度で $[M+3H]^{3+}$ と $[M+2H]^{2+}$ で3価と2価のそれぞれのイオンが検出したが、2価に比べて3価のイオンは、質量数がアブラマイシンの質量数との差が大きくなり、特異性に欠けることが懸念される。また、プロダクトイオンとして検出するイオンの質量数も小さくなる可能性があり、夾雑成分の影響を受ける可能性が高くなる。そこで、70 Vにおけるプリカーサーイオンを m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ に設定した。また、140 Vにおけるプリカーサーイオンを m/z 540.2 $[M+H]^+$ に設定した。さらに、コリジョンエネルギーを5 eVに設定し、フラグメンター電圧70 Vにおけるプリカーサーイオン m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ 、およびフラグメンター電圧140 Vにおけるプリカーサーイオン m/z 540.2 $[M+H]^+$ のそれぞれのプロダクトイオンスペクトルを確認した。結果を Fig. 3-4 の下段に示す。

プリカーサーイオンが2価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ では、プロダクトイオンとして m/z 162.1 および m/z 217.2 が強く観測された。また、1価イオンの m/z 540.2 $[M+H]^+$ では、プロダクトイオンとして m/z 217.1 および m/z 378.2 が強く観測された。以上の結果から、アブラマイシンのイオン化条件は、ESIにおけるポジティブモードでイオン化し、質量数や安定性を考慮し、フラグメンター電圧70 Vではプリカーサーイオン m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ について定量用イオンを m/z 162.1、定性用イオンを m/z 217.1 に設定し、フラグメンター電圧140 Vではプリカーサーイオン m/z 540.2 $[M+H]^+$ について定量用イオンを m/z 217.1、定性用イオンを m/z 378.2 と設定した。

設定したイオン化条件で、3種類の濃度範囲（0.5 - 30 ng/mL、25 - 150 ng/mL、250 - 1500 ng/mL）でアブラマイシンの検量線を作成し、直線性を確認した。プリカーサーイオンとして2価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ を用いた検量線を Fig. 3-5 に、1価イオンの m/z 540.2 $[M+H]^+$ を用いた検量線を Fig. 3-6 に示す。

イオン化条件を最適化することにより、最適化前の Fig. 2-2 に示した検量線と比較し、1価イオンの場合も2価イオンの場合も直線性が向上した。プリカーサーイオンが2価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ の場合、検量線が0.5 - 30 ng/mL、25 - 150 ng/mL、250 - 1500 ng/mL

いずれの濃度範囲においても決定係数 (R^2) 0.999 以上と良好な直線性を示した。一方でプリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.3 $[M+H]^+$ の場合、0.5 - 30 ng/mL、25 - 150 ng/mL、250 - 1500 ng/mL の濃度範囲でそれぞれ $R^2=0.983$ 、0.991、0.996 となり、1 価イオンは 2 価イオンと比べて、検量線の直線性が劣ることが分かった。これは、第 2 章の事前検討で行った結果と同様の傾向が見られた。以上の結果から本研究におけるアプラマイシンの LC-MS/MS 測定条件は、フラグメンター電圧を 70 V、コリジョンエネルギーを 5 eV に設定し、プリカーサーイオンを 2 価イオンの m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ 、プロダクトイオンを定量イオンに m/z 162.1、定性イオンに m/z 217.1 と設定した。

3.3.2 固相カートリッジの検討

固相カートリッジを用いた抽出液中の夾雑成分除去方法を、牛筋肉からの抽出液を用いて検討した。HLB 固相カートリッジ (抽出液から夾雑成分除去) と逆相系陽イオン交換固相カートリッジ (抽出液からアプラマイシンを回収) の組み合わせとして、3.2.6.3 の通り、OasisHLB-MC1、SupelHLB-MC1、SupelHLB-OasisHLB-MC1、SupelHLB-OasisHLB-MCX の 4 種類で検討を行った。検討した方法は回収率と選択性について評価し、評価基準はガイドライン(1, 2)に基づいた。結果を Table 3-2 に示す。

検討は、MRL 相当になるようにアプラマイシンを添加した牛筋肉試料、および牛筋肉のブランク試料をヘキサン-TCA 抽出し、その抽出液を用いて実施した。アプラマイシン (0.5 ppm / 0.5 mg/kg) を添加した牛筋肉からの回収率は、OasisHLB-MC1、SupelHLB-MC1、SupelHLB-OasisHLB-MC1 および SupelHLB-OasisHLB-MCX でそれぞれ 86.1%、81.3%、85.9% および 82.5% となり、全ての条件で 70-120% の回収率を示し、ガイドラインの基準に適合することが確認された。また、牛筋肉のヘキサン-TCA 抽出液に添加したアプラマイシン標準溶液の回収率は、OasisHLB-MC1、SupelHLB-MC1、SupelHLB-OasisHLB-MC1 および SupelHLB-OasisHLB-MCX でそれぞれ 87.4%、91.3%、100.4% および 104.2% で、いずれの固相カートリッジの組み合わせにおいても、70-120% の回収率を示し、ガイドラインの基準に適合することが確認され、サンプルマトリックス中の夾雑成分が十分除去できた。また、ブランク試料では、アプラマイシンと同一の保持時間にピークが検出されたが、選択性 (0.011-0.065, 評価基準 ≤ 0.1) から、測定への影響は小さいと考えられる。本章で 4 種類の固相カートリッジの組み合わせで夾雑成分の除去方法を検討した結果、いずれの組み合わせにおいても、ガイドラインに適合する回収率や選択性であったが、最も良好な選

択性 (0.011) が得られた SupelHLB-OasisHLB-MCX を抽出液中の夾雑成分を除去する固相カートリッジとした。

3.3.3 測定用試料の調製方法の比較検討

牛の筋肉、脂肪、肝臓の各組織に MRL に相当する濃度 (牛の筋肉と脂肪は 0.5 ppm、牛の臓は 5 ppm) になるようにアプラマイシンを添加した。標準を添加した試料とブランク試料をアルカリ加水分解抽出またはヘキサン-TCA 抽出によりアプラマイシンを抽出した。抽出液を SupelHLB-OasisHLB-MCX (それぞれアルカリ加水分解抽出-SPE およびヘキサン-TCA 抽出-SPE) を用いて夾雑成分を除去し、選択性、回収率、選択反応モニタリング (Selected Reaction Monitoring, SRM) クロマトグラムのピーク形状を評価した。測定結果は、ガイドライン(1,2)に基づき評価した。これらの検討結果を Table 3-3 に示した。

選択性の評価基準は、ブランク牛組織のアプラマイシン測定を行い、アプラマイシンの保持時間付近に観測される妨害ピークの面積値を、マトリックスを含む残留基準相当の標準溶液の面積値で除して行い、10 分の 1 未満 (<10%) であることを妨害ピークの許容範囲とした。ヘキサン-TCA 抽出-SPE の選択性は、牛の肝臓、筋肉、脂肪でそれぞれ 0.0038、0.0055、0.0014 であった。アルカリ加水分解抽出-SPE では、牛の肝臓、筋肉、脂肪に対して選択性が、それぞれ 0.014、0.040、0.0026 となった。ヘキサン-TCA 抽出-SPE およびアルカリ加水分解抽出-SPE における選択性は、いずれの牛組織においてもガイドラインの許容範囲に適合した。回収率試験については、ヘキサン-TCA 抽出-SPE では、牛の肝臓、筋肉、脂肪でそれぞれ 77.3%、92.5%、92.6%であり、アルカリ加水分解抽出-SPE では、牛の肝臓、筋肉、脂肪でそれぞれ 75.5%、90.1%、86.6%であった。いずれの調製法においても、回収率は 70 - 120%でありガイドラインの目標値に適合することが確認された。

ヘキサン-TCA 抽出-SPE またはアルカリ加水分解抽出-SPE 抽出液に MRL 相当量になるようにアプラマイシンを添加し、マトリックスの影響を評価した。ヘキサン-TCA 抽出-SPE では、牛の肝臓、筋肉、脂肪で回収率がそれぞれ 83.5%、94.5%、97.6%、アルカリ加水分解抽出-SPE では、牛の肝臓、筋肉、脂肪で回収率がそれぞれ 86.2%、92.0%、99.9%と、試料による夾雑成分の影響をわずかに受けたが、ガイドラインの目標値である 70-120%の範囲に適合することが確認された。これらの結果から、開発した試料調製方法は、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定に適応可能であると考えられる。

アルカリ加水分解抽出-SPE による SRM のピーク形状と、ヘキサン-TCA 抽出-SPE によ

る SRM のピーク形状をそれぞれ Fig. 3-6A と Fig. 3-6B に示す。

アプラマイシンは保持時間 11.29-11.34 分にピークが検出され、アプラマイシン添加試料で検出されたアプラマイシンのピークはヘキサン-TCA 抽出-SPE およびアルカリ加水分解抽出-SPE の両方で、良好なピーク形状が得られることが確認された。ヘキサン-TCA 抽出-SPE とアルカリ加水分解抽出-SPE では、選択性、回収率、マトリックスの影響、ピーク形状に関して明確な差は確認されなかった。しかし、ブランク試料中の夾雑成分の影響に関しては、アプラマイシンの保持時間周辺に妨害ピークが検出された。特に、アルカリ加水分解抽出-SPE は、ヘキサン-TCA 抽出-SPE より妨害ピークが大きい傾向を示した。これは、アルカリ加水分解の過程で、ヘキサン-TCA 抽出では生じない、分解物の可能性があると考えられる。この妨害ピークの大きさは、MRL におけるピーク面積の 10 分の 1 未満（10%未満）であるため、MRL の測定では影響ない。しかし牛試料中に残留するアプラマイシンが MRL に適合するかを試験を行う場合、MRL だけでなく MRL より低い濃度で精度よく定量できることが望ましい。その場合、検出した妨害ピークが MRL より低濃度を対象として測定する場合、影響を受けるか調べる必要がある。

第 4 章では確立した試料調製法を LC-MS/MS の定量測定に適応するために、真度や精度 (RSD) を求め、その再現性を評価する。また、マトリックスの影響や S/N 比を評価し、定量限界値 (limit of quantification, LOQ) を求める。これらの試料調製法は、LC-MS/MS の定量測定において、アプラマイシンと同様の性質を持つアミノグリコシド系抗生物質の試料調製方法にも応用できる可能性がある。

3.4 考察

本章では、まず、アプラマイシンを定量測定するため LC-MS/MS 測定条件の最適化を行った。つぎに、牛組織を用いて絶対検量線法による LC-MS/MS 測定に適応できる試料調製方法を検討した。LC-MS/MS のイオン化条件を最適化するために、第 2 章で検討した条件からフラグメンター電圧やコリジョンエネルギーを変更し、プリカーサーイオンやプロダクトイオンのマススペクトル検出状況を調べた。アプラマイシンのイオン化では、プリカーサーイオンが 1 価イオンの m/z 540.2 $[M+H]^+$ と 2 価イオン m/z 270.7 $[M+2H]^{2+}$ が検出されるが、条件の最適化を行う事により、1 価イオン、2 価イオンともに最適化前に比べ直線性が改善された。0.5 - 30 ng/mL、25 - 150 ng/mL、250 - 1500 ng/mL と 3 つの濃度範囲で検量線の直線性を確認したところ、2 価イオンの方が 1 価イオンより良好な直線性が得られた。

第2章の結果も1価イオンの方が、一部の濃度で検量線上にプロットされない点が見られるなど、理由の判明には至らないが、イオン化の際に何らかのイオン化阻害などが生じていると考えられる。

次に、試料からアプラマイシンの調製方法について検討を行った。アプラマイシンの抽出方法の検討は、牛試料（牛の筋肉、脂肪、肝臓）にそれぞれの MRL 相当の濃度になるようにアプラマイシン標準溶液を添加したものをを用いて行った。標準添加牛試料を、アルカリ加水分解抽出とヘキサン-TCA 抽出の二種類の抽出方法で比較検討を行った。また、抽出液中の夾雑成分除去を目的として二種類の親水性-親油性バランス型である HLB 型固相カートリッジ（SupelHLB、OasisHLB）を用いた。さらに、夾雑成分を除去した抽出液からアプラマイシンを陽イオン交換固相カートリッジ（MCX、MC1）に回収した。畜産物からの抽出液は多くの脂肪酸や油脂等が夾雑成分として含まれることから、HLB 型固相カートリッジを1個のみ用いた場合と、2個の固相カートリッジを連結した夾雑成分の除去方法を検討した。固相カートリッジにおける精製は、SupelHLB-MC1、OasisHLB-MC1 の二連結固相と、SupelHLB-OasisHLB-MC1、SupelHLB-OasisHLB-MCX の三連結固相で検討を行った。アルカリ加水分解抽出、ヘキサン-TCA 抽出を行い、それぞれの抽出液に4つの固相の組み合わせにより精製したところ、いずれの固相抽出方法においても、選択性、回収率ともにガイドラインの評価基準に適合し、良好な結果が得られた。最終的にヘキサン-TCA 抽出- SupelHLB-OasisHLB-MCX の組み合わせが最も選択性が優れた結果であった。これは、アルカリ加水分解抽出により、新たな分解物が生成し、その結果夾雑成分の影響が顕著になったことが要因と考えられる。

本章で確立した、畜産物中の残留アプラマイシンの試料調製方法は、今まで確立されてこなかった、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定に適応可能とただけでなく、牛脂肪中のアプラマイシン定量にも有効であると初めて実証された。しかしアプラマイシンの違法使用を監視・規制するためには、開発した試験方法を MRL だけでなく、MRL 低濃度で精度よく定量できることが望ましい。第4章では、牛組織におけるそれぞれの MRL と MRL の 1/10 の濃度（1/10 MRL）で、開発した試験方法の妥当性評価を行った。

引用文献

- 1) Notification No. 1115001 (Nov. 15, 2007), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 2) Nemoto, S.: Advancement of Official Analytical Method for Residual Pesticides in Foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science.), 51, 349-359 (2010).

要 旨

第3章では、LS-MS/MSを用いたアブラマイシン測定のための試料調製法を確立することが出来た。牛の各組織（筋肉、肝臓、脂肪）からのアブラマイシンの抽出には、ヘキサン-TCA抽出またはアルカリ加水分解抽出を検討した。抽出液から夾雑成分を除去するために、2種類のHLB SPEカートリッジを連結して使用し、アブラマイシンの回収には陽イオン交換型SPEカートリッジを用いた。分析用試料液はLC-MS/MSで測定を行い、得られた測定結果をガイドラインに基づき評価した。ヘキサン-TCA抽出-SPE法、アルカリ加水分解抽出-SPE法ともに、選択性は基準濃度に相当するピーク面積の10%未満であり、ガイドラインの評価基準に適合した。また、回収率も70-120%の範囲でガイドラインの評価基準を満たした。さらに、牛脂肪中のアブラマイシンのヘキサン-TCA-SPEおよびアルカリ加水分解抽出-SPEによる定量がともに有効であると初めて実証された。本研究により、確立された試料調製法が、牛の筋肉、脂肪、肝臓を絶対検量線法によるLC-MS/MS測定に適用できることが実証された。なお、本章の検討結果はJpn J Food Chem Safety 29 124-133 (2022)に掲載された。

☒ 表

Table 3-1 LC-MS/MS conditions

LC parameters				
Equipment	1260 Infinity LC (Agilent Technologies)			
Column	CAPCELL PAK ST (2.0 x 100 mm, 5 μm: OSAKA soda)			
Flow rate	0.3 mL/min			
Injection volume	5 μL			
Column temperature	40°C			
Mobile phase	A: 0.4%(v/v) formic acid in water, B: 0.4%(v/v) formic acid in acetonitrile			
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)	
	0	10	90	
	5	10	90	
	8.5	70	30	
	17	70	30	
	18	10	90	
	27	10	90	
	MS conditions			
Equipment	6470 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies)			
Analysis mode	Selective reaction monitoring (SRM)			
Ionization	ESI positive			
Chapillary voltage	3500 V			
Drying gas	N ₂ , 200°C, 13 L/min			
Sheath gas	N ₂ , 400°C, 12 L/min			
Nebulizer gas	N ₂ , 50 psi			
Fragmentor	70 V			
Collision gas	N ₂			
Transitions				
Compound	Molecular weight	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
Apramycin	539.58	270.7	162.1 ^{a)}	5
		270.7	217.1 ^{b)}	5

^{a)} Used for quantitation, ^{b)} Used for confirmation

Table 3-2 Evaluation of solid phase cartridges

Sample	Solid phase extraction (SPE)	LC-MS/MS Results		Peak area ratio ²⁾ (%)	Recovery ³⁾ (%)	Selectivity ⁴⁾
		Retention time (min)	Peak area			
Standard in bovine muscle (0.5ppm apramycin)	Oasis HLB-MC1	11.249	43117	92.2	86.1	-
	Supel HLB-MC1	11.242	39646	84.7	81.3	-
	Supel HLB-Oasis HLB-MC1	11.249	41252	88.2	85.9	-
	Supel HLB-Oasis HLB-MCX	11.249	39142	83.7	82.5	-
Matrix (bovine muscle)	Oasis HLB-MC1	11.256	2828	6.0	-	0.065
	Supel HLB-MC1	11.249	1615	3.5	-	0.036
	Supel HLB-Oasis HLB-MC1	11.256	1047	2.2	-	0.022
	Supel HLB-Oasis HLB-MCX	11.263	526	1.1	-	0.011
Standard in matrix (0.5ppm apramycin)	Oasis HLB-MC1	11.242	43701	93.4	87.4	-
	Supel HLB-MC1	11.242	44307	94.7	91.3	-
	Supel HLB-Oasis HLB-MC1	11.242	48003	102.6	100.4	-
	Supel HLB-Oasis HLB-MCX	11.249	49291	105.4	104.2	-
Standard (0.5ppm apramycin) ¹⁾		11.242	46780	100	100	-

1) Standard in solvent

2) Peak area ratio (%) = Sample peak area/Standard peak area

3) Recovery (%) = (Peak area of sample fortified with standard - Peak area of matrix)/Peak area of standard

4) Selectivity = (Peak area of "Matrix (bovine muscle)"/Peak area of "Standard in matrix"

Table 3-3 Recovery and selectivity for apramycin spiked in livestock products

Sample	LC-MS/MS Results	Retention time (min)	Peak area	Peak area ratio ²⁾ (%)	Recovery ³⁾ (%)	Selectivity ⁴⁾	
							Retention time (min)
Standard in tissue	Hexane-TCA-SPE	Bovine liver (5ppm apramycin)	11.317	229704	77.6	77.3	-
	Hexane-TCA-SPE	Bovine muscle (0.5ppm apramycin)	11.297	18281	93.1	92.5	-
		Bovine fat (0.5ppm apramycin)	11.297	18228	92.8	92.6	-
		Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine liver (5ppm apramycin)	11.317	226982	76.7	75.5
	Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine muscle (0.5ppm apramycin)	11.290	18458	94.0	90.1	-
		Bovine fat (0.5ppm apramycin)	11.290	17074	86.9	86.6	-
Matrix (Blank)	Hexane-TCA-SPE	Bovine liver	11.338	944	0.32	-	0.0038
	Hexane-TCA-SPE	Bovine muscle	11.297	103	0.52	-	0.0055
		Bovine fat	11.324	26	0.13	-	0.0014
		Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine liver	11.331	3500	1.2	-
	Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine muscle	11.297	750	3.8	-	0.040
		Bovine fat	11.324	51	0.25	-	0.0026
Standard in matrix	Hexane-TCA-SPE	Bovine liver (5ppm apramycin)	11.317	247915	83.8	83.5	-
	Hexane-TCA-SPE	Bovine muscle (0.5ppm apramycin)	11.290	18677	95.1	94.5	-
		Bovine fat (0.5ppm apramycin)	11.290	19197	97.7	97.6	-
		Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine liver (5ppm apramycin)	11.310	258728	87.4	86.2
	Alkaline hydrolysis-SPE	Bovine muscle (0.5ppm apramycin)	11.290	18827	95.8	92.0	-
		Bovine fat (0.5ppm apramycin)	11.290	19684	100.2	99.9	-
Standard ¹⁾	0.5ppm apramycin		11.290	19646	100	100.0	-
	5ppm apramycin		11.317	295945	100	100.0	-

1) Standard in solvent

2) Peak area ratio (%) = Sample peak area/Standard peak area

3) Recovery (%) = (Peak area of sample fortified with standard - Peak area of matrix)/Peak area of standard

4) Selectivity = (Peak area of "Matrix (Blank)"/Peak area of "Standard in matrix"

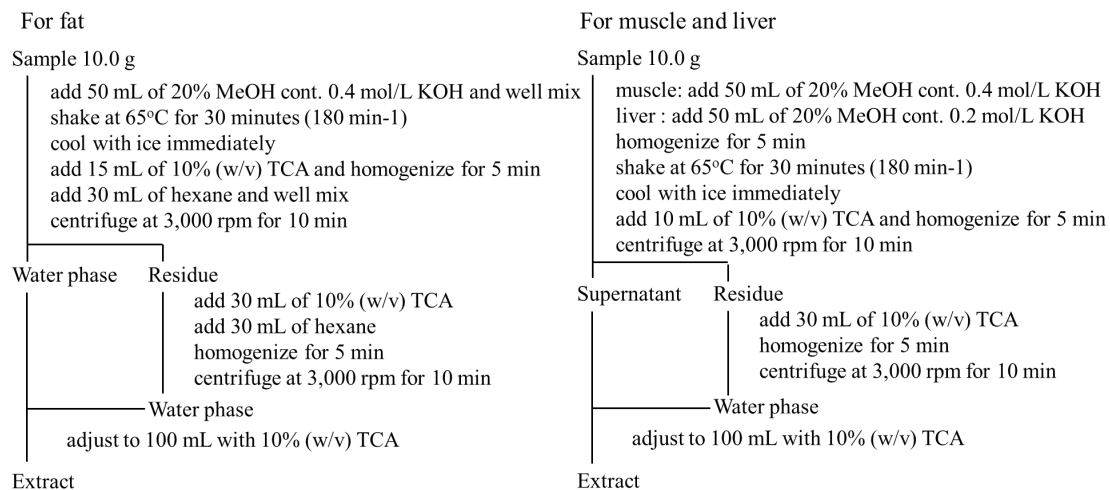


Fig. 3-1 Alkaline hydrolysis extraction

Left: Extraction for Fat, Right: Extraction for Muscle and Liver

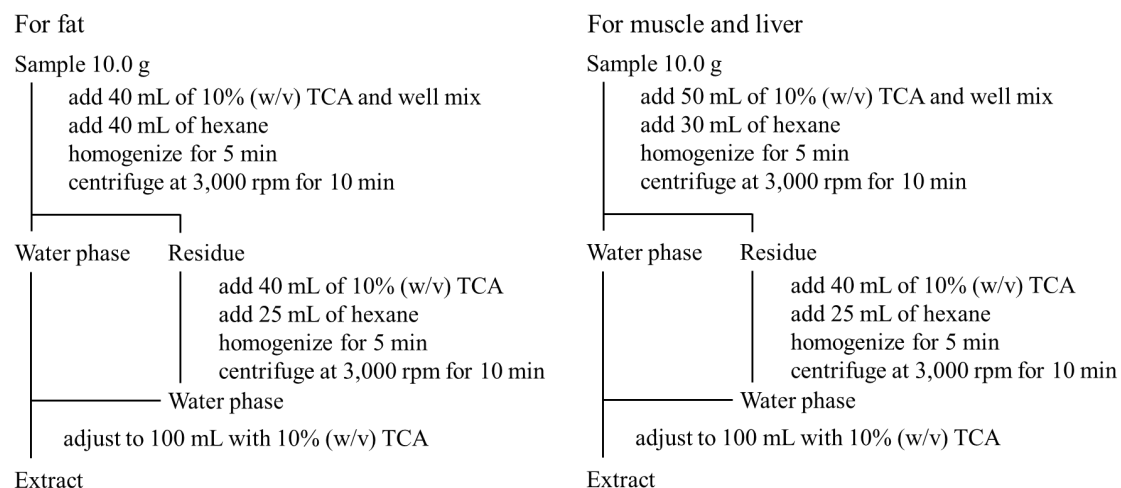


Fig. 3-2 Trichloroacetic acid (TCA) extraction

Left: Extraction for Fat, Right: Extraction for Muscle and Liver

Supel-select HLB-Oasis HLB Plus Short Cartridge-Oasis MCX Plus Short Cartridge

condition with 10 mL of methanol and 10 mL of water
load 10 mL of extracted solution
wash with 10 mL of 0.1 mol/L HCL
remove Supel-select HLB-Oasis HLB Plus Short Cartridge

Oasis MCX Plus Short Cartridge

wash with 10 mL of water
wash with 10 mL of methanol
wash with 10 mL of 2-propanol
wash with 10 mL of 70% (v/v) acetonitrile
elute with 10 mL of acetonitrile-10% ammonia solution (7:3)
collect fraction

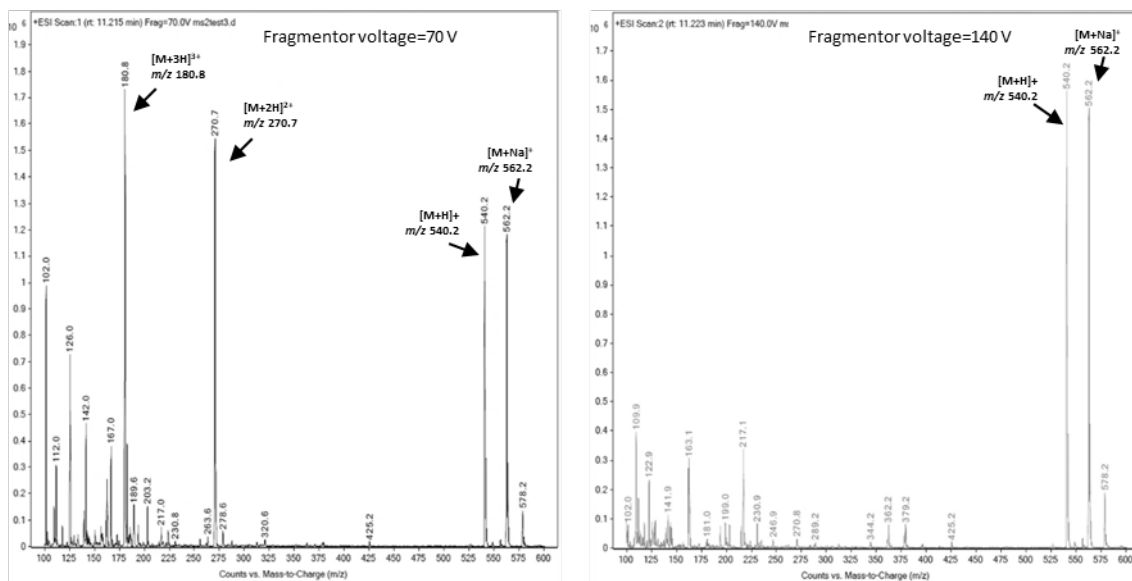
Eluate

evaporate to dryness at below 40°C
dissolve in 5 mL of 30% (v/v) acetonitrile

LC-MS/MS analysis

Fig. 3-3 Purification procedure by solid phase extraction

Mass Spectrum

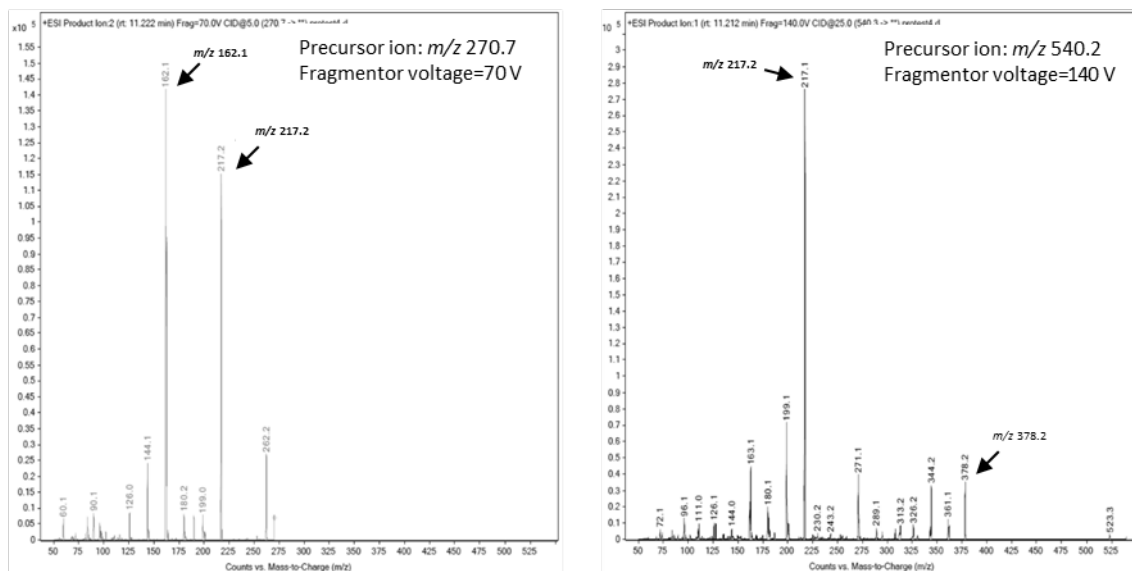


Ionization: ESI(+), Scan range: m/z 50~1000, Apramycin: 1 $\mu\text{g/mL}$

Left: Fragmentor voltage 70 V

Right: Fragmentor voltage 140 V

Product ion spectrum



Ionization: ESI(+), Scan range: m/z 50~1000, Apramycin: 1 $\mu\text{g/mL}$, Collision Energy=5 eV

Left: Fragmentor voltage 70 V, Precursor ion: m/z 270.7

Right: Fragmentor voltage 140 V, Precursor ion: m/z 540.2

Fig. 3-4 Apramycin mass spectrum

A

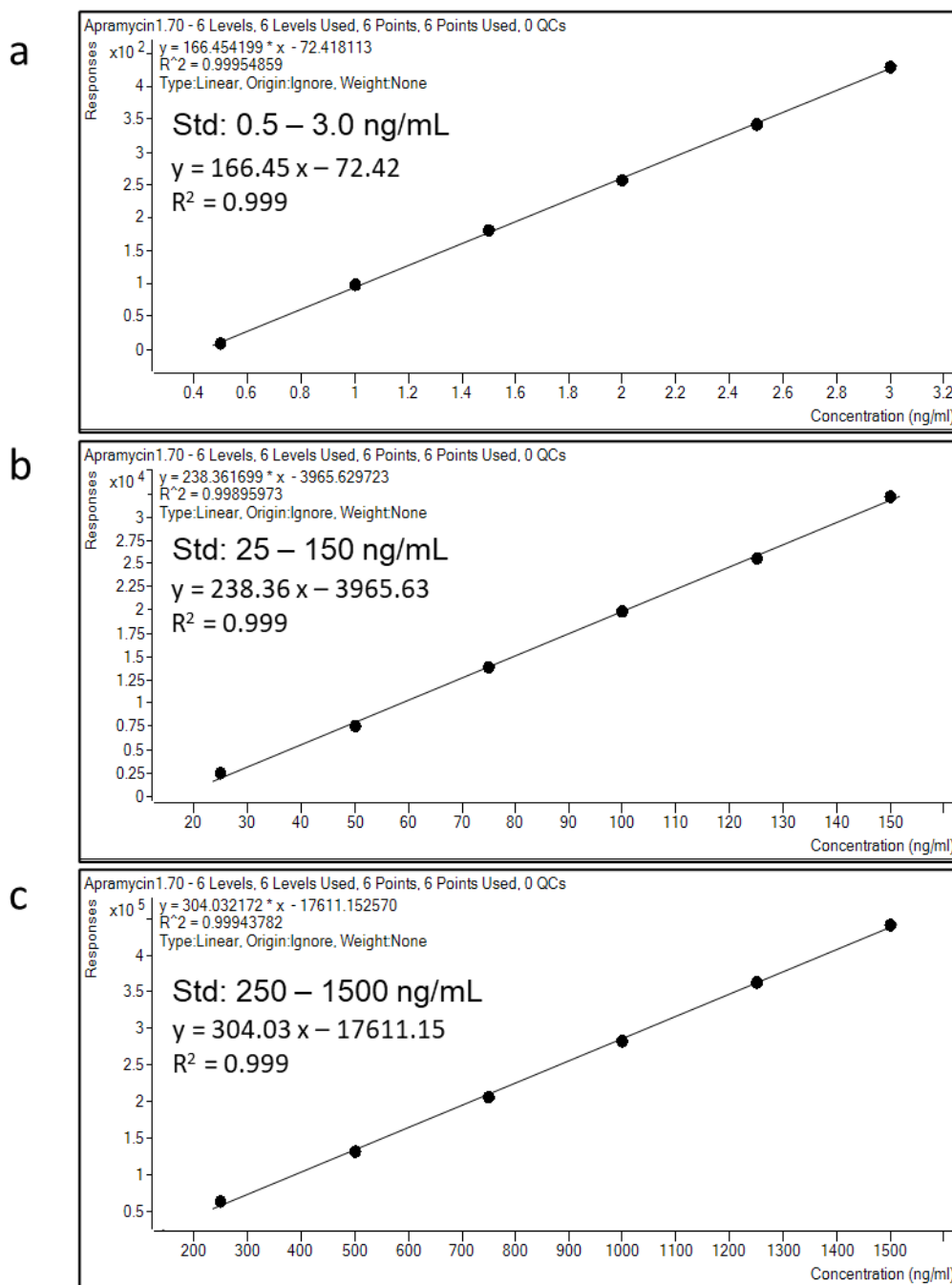


Fig. 3-5 A External calibration curves for LC-MS/MS analysis of apramycin

(SRM transition $m/z\ 270.7\ [M+2H]^{2+} \rightarrow m/z\ 162.1$)

Concentration range of 0.5-3 ng/mL (a), 25-150 ng/mL (b), 250-1500 n/mL (c)

B

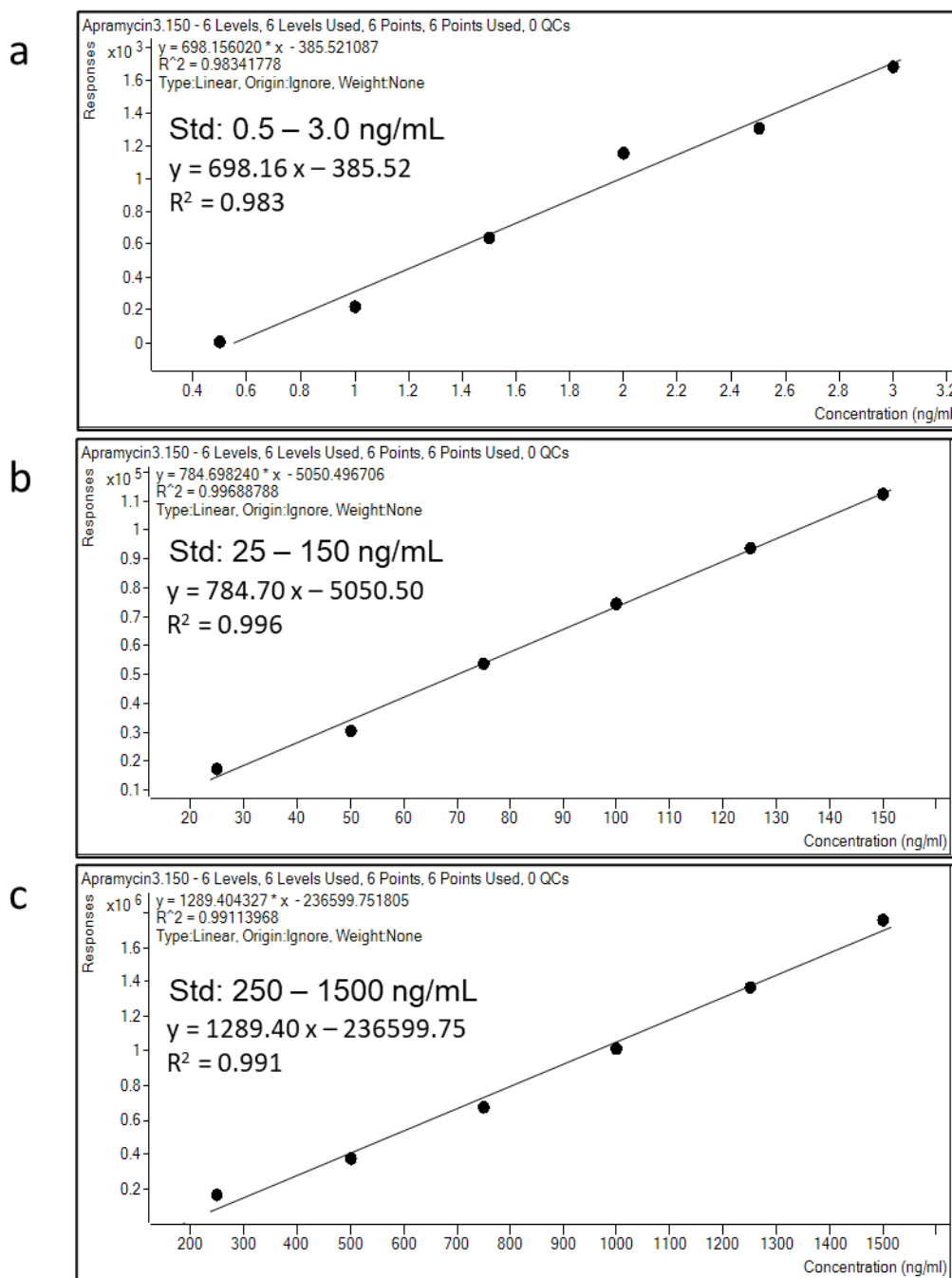
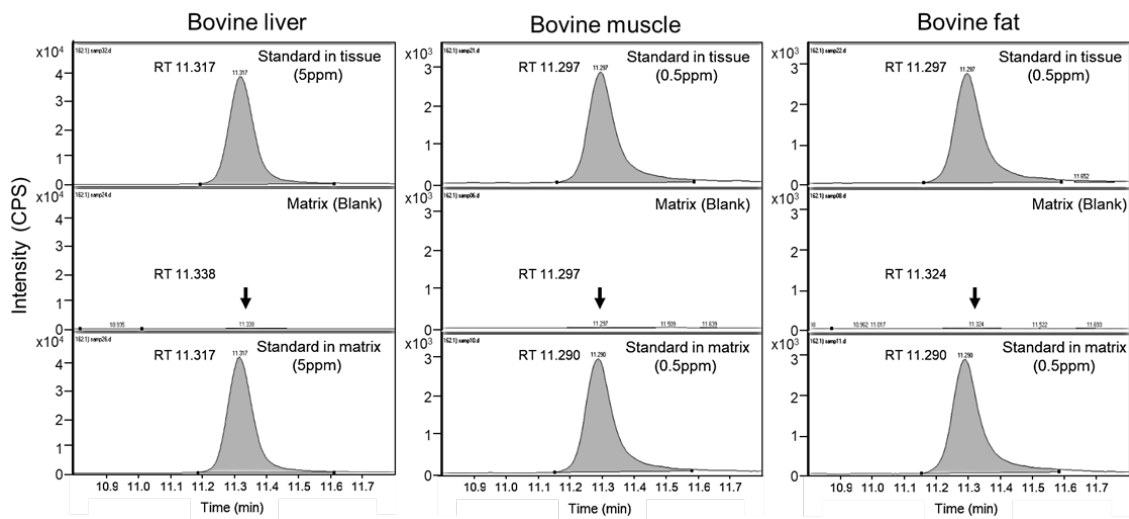


Fig. 3-5 B External calibration curves for LC-MS/MS analysis of apramycin

(SRM transition m/z 540.2 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 217.1)

Concentration range of 0.5-3 ng/mL (a), 25-150 ng/mL (b), 250-1500 n/mL (c)

A



B

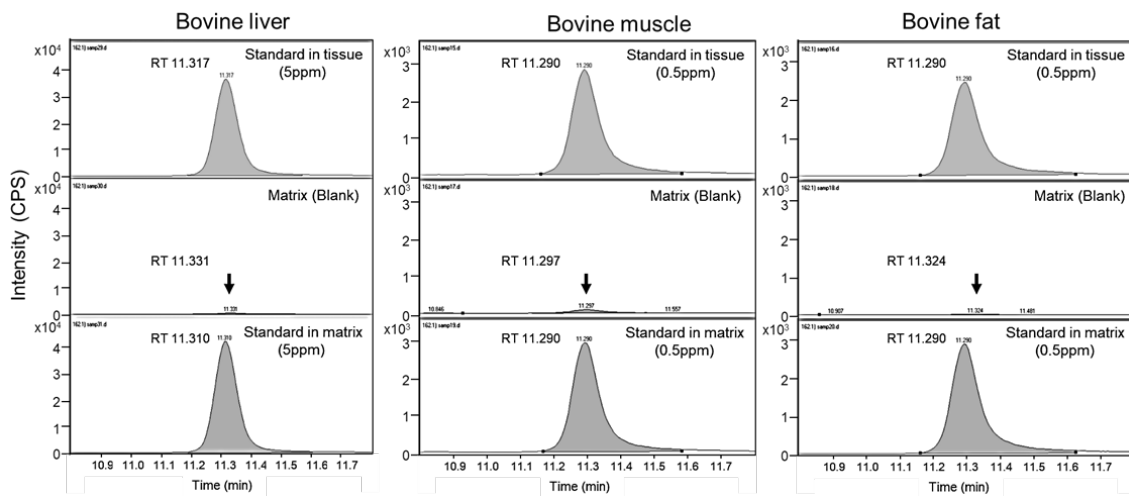


Fig. 3-6 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of the results presented in Table 3-3

A: Trichloroacetic acid-SPE, B: Alkaline hydrolysis-SPE

Upper: Standard in tissue, Middle: Matrix (Blank), Bottom: Standard in matrix

第4章 畜産物中の残留アプラマイシン定量方法の妥当性評価

4.1 緒言

畜産物中に残留するアプラマイシンの定量法としては、*Bacillus subtilis* (ATCC 6633) を用いたバイオオートグラフィーによる微生物学的定量法が告示されている(1)。しかし、その方法は測定試料の調製が極めて煩雑で、特異性や検出感度が十分でないなどの問題点もある。そのため、LC-MS/MS を用いた様々な定量方法が報告されている(2-11)。しかし、それらの方法は、逆相イオンペアクロマトグラフィー (2-8)、マトリックス添加検量線法(9-11)、内部標準法 (6, 11)であり、絶対検量線法を用いた汎用的な定量方法は確立されていない。また、LC-MS/MS を用いた方法では、脂肪組織を対象とした試料調製方法は報告されていない。第3章および Jpn J Food Chem Safety 29 124-133 (2022) (12)に報告したように、畜産物中に残留するアプラマイシンの濃度を、絶対検量線法による LC-MS/MS 測定するための簡便な試料調製法を確立した。この方法は、抽出液中の夾雑成分の除去とアプラマイシンの回収（クリーンナップ）を効率的に行うために、2種類の HLB 共重合体カートリッジと逆相系陽イオン交換共重合体カートリッジを3連結した固相カートリッジを用いた。その方法は分析対象成分であるアプラマイシンを脂肪とともに抽出するアルカリ加水分解抽出法およびアプラマイシンを脂肪と分けて抽出するヘキサン-TCA 抽出法の2つのタイプの抽出方法で調製された抽出液のいずれにも適応できることが特徴である。MRL のアプラマイシンを添加した試料をアルカリ加水分解抽出またはヘキサン-TCA 抽出したのち、固相カートリッジを用いて測定用試料を調製し LC-MS/MS 分析を行ったところ、選択性ならびに回収率ともに良好な結果が得られた。二つの抽出方法を比較すると、TCA 抽出の方がより夾雑成分の影響が低いことが確認された。

本章では、LC-MS/MS による、牛試料中のアプラマイシンの残留分析法について、MRL (牛筋肉および脂肪:0.5 ppm、肝臓:5 ppm)およびMRLの1/10に相当する濃度(1/10 MRL、牛の筋肉および脂肪:0.05ppm、牛の肝臓:0.5ppm)の2つの濃度の試料を分析することにより測定法のバリデーション(妥当性評価)を行った。

4.2 方法

4.2.1 試薬

アプラマイシン硫酸塩 (99.5%) や他の試薬として、特級 n-ヘキサン、LCMS 用メタノール、HPLC 用 2-プロパノール、100% (v/v)TCA (生化学用)、10%アンモニア溶液は富士フイルム和光純薬 (大阪) から購入した。HPLC 用アセトニトリル、ギ酸は関東化学から購入した。超純水は MilliQ を用いた。逆相系強陽イオン交換型固相カートリッジである、Oasis MCX Plus Short Cartridge (MCX) (225 mg) は、Waters 製 (Milford, MA, USA) を購入した。HLB 固相カートリッジである、Supel-select HLB (SupelHLB) (200 mg/6 mL) と Oasis HLB Plus Short Cartridge (OasisHLB) (225 mg) はそれぞれ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USAG) と Waters 製を購入した。

4.2.2 試料

牛の筋肉、肝臓、脂肪は三重県津市にある牛肉販売店で購入した。各組織は第 2 章の通り処理をした。

4.2.3 機器および装置

超高速ホモジナイザーは Polytron PT3100D を、シャフトは PT-DA 20/2EC-B193 (Kinematica 社) を使用した。遠心分離器は多本架冷却遠心機 AX-320 ローターTS-37 (100mL 用アダプター付き) (TOMY 社) を使用した。遠心減圧濃縮器は遠心エバポレーター CVE-3100 (東京理科機器株)、減圧型多検体用マニホールド (Waters 社) を使用した。LC-MS/MS は Agilent Technologies 製の高速液体クロマトグラフ 1260 infinity LC 及び質量分析装置 6470 Triple Quadrupole を使用した。

4.2.4 LC-MS/MS 測定および測定用試料の調製方法

LC-MS/MS 測定のためのサンプル調製は、Fig. 3-2 に示したヘキサン-TCA 法で試料からアプラマイシンを抽出し、Fig. 3-3 に示した固相カートリッジによる抽出液の精製を行った。要約すると、10 mg/mL のアプラマイシンを 3.2.3 と同様に調製し保管した。牛組織への添加用標準液は 3 種類の濃度 (200、20 および 2 $\mu\text{g/mL}$) を 10 mg/mL 標準液を水で希釈することにより調製した。最終的に 50% (v/v)メタノールで 100、10 および 1 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。アプラマイシン標準添加試料は添加用標準液を牛試料 10 g に対しそれぞれ 0.5

mL 添加し、(5 ppm には 100 µg/mL 溶液を、0.5 ppm には 10 µg/mL 溶液を、0.05 ppm には 1 µg/mL 溶液) よく混合し、25°C で 30 分静置させた。

アプラマイシンの LC-MS/MS 測定は Table 3-1 に示す条件で行った。要約すると、機器はアジレント社製の LC-MS/MS 装置 (LC: 1260 Infinity, MS/MS: 6470 Triple Quadrupole MS)、分析用試料はオートサンプラー (1260 Multisampler, Agilent Technologies) を用いて、一回の分析に 5 マイクロリトルを注入した。試料の分離は CAPCELL PAK ST column (100 × 2.0 mm i.d., particle size 5 mm; OSAKA SODA, Osaka, Japan) を用いた。アプラマイシンの測定に用いた SRM コンディションを Table 4-1 に示した。MS データの解析には、MassHunter Ver.B.09.00 (Agilent Technologies) および Excel 2021 (Microsoft) を用いた。

4.2.5 アプラマイシン定量用の標準液

アプラマイシン定量に用いる標準溶液として 2.5 - 15 ng/mL、25 - 150 ng/mL および 250 - 1500 ng/mL の濃度範囲で調整し、検量線を作成した。25 - 150 ng/mL および 250 - 1500 ng/mL の標準溶液調製は、3.2.3 に通り行った。2.5 - 15 ng/mL は、アプラマイシン標準原液 2 µg/mL の溶液を 50% メタノールで希釈し、1 µg/mL の溶液から適宜希釈し調製した。

4.3. 結果

4.3.1 検量線

本研究では、アプラマイシンの濃度として、5、0.5、0.05 ppm に設定し定量測定方法の検討を行った。まずは、それぞれの濃度を測定するための濃度範囲における検量線の直線性を確認した。Fig.4-1 に、250 - 1500 ng/mL の範囲、25 - 150 ng/mL の範囲、2.5 - 15 ng/mL の範囲における検量線を示す。250 - 1500 ng/mL の範囲の検量線は、回帰式 $y=539.50x-7460.65$ 、決定係数 (R^2) 0.999、25 - 150 ng/mL の範囲の検量線は、回帰式 $y=758.89x-4992.78$ 、決定係数 (R^2) 0.999、2.5 - 15 ng/mL の範囲の検量線は、回帰式 $y=226.33x-257.59$ 、決定係数 (R^2) 0.999 であった。いずれの検量線も決定係数 (R^2) が 0.999 で良好な直線性であることが確認できた。

4.3.2 妥当性評価

検量線の評価では、検討した全ての濃度範囲において直線性が得られたため、妥当性評価は、MRL (筋肉と脂肪: 0.5 ppm、肝臓: 5 ppm) および 1/10 MRL (筋肉と脂肪: 0.05 ppm、

肝臓 0.5 ppm) の濃度になるようにアプラマシンを添加した牛の筋肉、脂肪、肝臓を用いて実施した。測定結果は厚生労働省の定めるガイドライン (ガイドライン) (13, 14)を参考に、選択性、真度、精度、定量限界、マトリックス効果を評価した。Table 4-2 に選択性、Table 4-3 に真度、精度および定量限界の評価、Table 4-4 にマトリックスの影響、Fig. 4-1 に検量線、Fig. 4-2 に添加回収試験における代表的なクロマトグラム (MRL; Fig. 4-2 A、1/10 MRL; Fig. 4-2 B) を示した。また、Fig 4-2 C には Fig. 4-2 B における Matrix (Blank) を拡大したものを示した。

(1) 選択性

選択性は、ブランク試料中のアプラマイシンの保持時間付近に検出される妨害ピークの面積値を、マトリックス含有の標準溶液 (MRL、1/10 MRL) の面積値で除して評価し、MRL に対して 1/10 未満 (10%未満)、1/10 MRL に対して 1/3 未満 (30%未満) を合格基準とした。結果を Table 4-2 に示す。

MRL に対し、牛の筋肉、脂肪、肝臓でそれぞれ 0.007、0.001、0.005 となり、1/10 MRL に対し、牛の筋肉、脂肪、肝臓でそれぞれ 0.034、0.031、0.010 となった。選択性はすべての牛組織で MRL 及び 1/10 MRL で 0.1 未満となり、ガイドラインの基準に適合することが分かった。Fig. 4-2 に示した、ブランク試料の SRM クロマトグラム (Fig. 4-2 A、B 上段及び Fig.4-2 C) をみると、試料由来と思われるピークが出現した。ピークの形状から、複数の成分が混合したものと推察される。筋肉と肝臓でピーク面積値が 100 を超えたが、それぞれのピークにおける定量イオン (m/z 270.7 \rightarrow m/z 162.1) と確認イオン (m/z 270.7 \rightarrow m/z 217.1) のピーク面積比 (m/z 270.7 \rightarrow m/z 162.1 / m/z 270.7 \rightarrow m/z 217.1) が、アプラマイシンの標準液の場合、約 1.6 に対して、筋肉や肝臓のブランク試料から出現するピークの場合、1.3 となった。よって、ブランク試料から出現したピークは、アプラマイシンとは異なる成分であると考えられる。また、選択性の結果から分かる通り、MRL、1/10 MRL におけるピーク面積と比較すると、定量値への影響は小さいものであると考えられるが、厚生労働省が示す一律基準値 (0.01 ppm) に適用するには、マトリックス中に存在する夾雑成分の除去、カラムクロマトでのアプラマシンとの分離など、試験方法の改良が必要であると考えられる。参考として、各ブランク試料のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 4-3 に示す。

(2) 真度

真度の結果は、牛組織をそれぞれ5回測定した結果の平均値を算出した。結果を Table 4-3 に示す。

牛の筋肉、脂肪および肝臓で、それぞれ真度が MRL で 92.7%、85.1%、84.3%、1/10 MRL で 97.8%、93.6%、79.2% となり、ガイドラインの目標値（70 - 120%）に適合した。

(3) 精度

精度の結果は牛組織をそれぞれ5回測定した結果の相対標準偏差（RSD）から求めた。結果を Table 4-3 に示す。

牛の筋肉、脂肪、肝臓に対し、それぞれ精度（RSD）が MRL で、3.3%、2.1%、5.9%、1/10 MRL で、5.7%、2.8%、3.0% となり、ガイドラインの目標値（15%未満）に適合した。

(4) 定量限界値

定量限界値（LOQ）は S/N 比で判定した。1/10 MRL の添加試料を測定し、得られたピークの S/N 比は牛の筋肉、脂肪、肝臓でそれぞれ、676.3、3161.7、7190.3 であり S/N 比 ≥ 10 を十分に満たした。尚、S/N 比は MassHunter Ver. B.09.00（Agilent Technologies）を用いて、ガイドラインと同じ計算法である“peak to peak”により算出した。

(5) マトリックスの影響

マトリックスの影響は、牛組織を試料調製した溶液にアプラマイシンの標準を添加したものと、溶媒に添加したもののピーク面積を比較し、評価した。結果を Table 4-4 に示す。

結果は、筋肉、脂肪、肝臓が、それぞれ MRL で 0.88、0.97、0.79、1/10 MRL で 0.91、0.94、0.88 となり、いずれの試料とも回収率が 70-120%の範囲内で良好な結果であった。

(6) 評価

選択性、真度、精度および S/N 比の結果から、開発した試験方法は、牛の筋肉と脂肪で 0.05 ppm、牛の肝臓で 0.5 ppm を LOQ として適応可能であることが分かった。しかしながら、豚の様により小さい MRL（豚の筋肉、脂肪、肝臓で 0.06 ppm）の試料を測定する場合や、一律基準値（0.01 ppm）に適応するためには、マトリックス中に存在する夾雑成分の

除去、カラムクロマトでのアプラマイシンとの分離など、さらなる工夫が必要であることも明らかとなった。

4.4. 考察

絶対検量線法による LC-MS/MS を用いたアプラマイシンの定量測定方法について、MRL および 1/10 MRL に相当する量になるようにアプラマイシン標準液を添加した牛組織（筋肉・脂肪・肝臓）を分析することにより妥当性を評価した。その結果、真度（MRL: 84.3 - 92.7%、1/10 MRL: 79.2 - 97.8%）、精度（MRL: 2.1 - 5.9%、1/10 MRL: 2.8 - 5.7%）ともにガイドラインの目標値を満たした。また、各組織のブランク試料を用いて選択性を測定した結果、MRL（0.001 - 0.007）、1/10 MRL（0.010 - 0.034）ともにガイドラインの基準を満たした。さらに、1/10 MRL における SN 比は >10 であった。

これらの結果から、開発したアプラマイシンの絶対検量線法による LC-MS/MS を用いた定量測定法は、牛組織に適応できると考えられる。今後は、豚の肝臓（MRL: 0.06 ppm）などにも対応するため、一律基準値（0.01ppm）に適用可能な方法の検討や、アミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング測定へ応用するために、開発した試料調製方法が他のアミノグリコシド系抗生物質でも適用可能かを検討することを予定している。

引用文献

- 1) Materials of the Subcommittee on Pesticides and Veterinary Drugs of the Food Sanitation Subcommittee of the Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council ,2015 20th January(<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentu/0000074613.pdf>).
- 2) Savoy, M., Woo, P. M., Ulrich, P., Tarres, A., Mottier, P., Desmarchelier, A.: Determination of 14 aminoglycosides by LC-MS/MS using molecularly imprinted polymer solid phase extraction for clean-up. *Food Additives & Contaminants*, 35, 675-686, (2018).
- 3) United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Screening for Aminoglycosides by LC-MS-MS. CLG-AMG4. 02/ 2015
- 4) Namba, J., Urayama, T., Ikeda, K., Kaneko, H., Shigeta, N.: Study on a method for simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in cow muscle and kidney by LC-MS/MS. *Okayamaken Kankyohokensenta Nenpo (Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health.)*, 44, 71-77 (2020).
- 5) Utagawa, N., Gawasawa, Y., Tanji, T.: Analysis of aminoglycoside antibiotics in meat by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Niigataken Hokenkagakukenkyusho Nenpo (Annual Report of Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences.)*, 23, 70-74 (2008).
- 6) Dijkstra, J. A.: Quantification of amikacin and kanamycin in serum using a simple and validated LC-MS/MS method. *University of Gronigen*, 38-48, (2017).
- 7) PLozza, T., Trenerry, V. C., Zeglinski, P., Nguyen, H., Johnstone, P.: The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residue in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Food Research Journal*, 3, 1077-1084 (2011).
- 8) Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C. S.R., Fernandes, C., Silva, L. H.M., Gloria, M. B. A.: A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, 163, 85-93 (2017).

- 9) Kajita, H., Akutsu, C., Hatakeyama, E., Komukai, T.: Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in milk by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science.)*, 49, 189-195 (2008).
- 10) Hamamoto, K., Mizuno, Y., Koike, R.: Sensitive method for the determination of Kanamycin residue in livestock products and marine products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Kachiku Eiseigaku Zasshi (The Japanese journal of animal hygiene.)*, 39, 9-14 (2013).
- 11) Omiya, S., Kumazawa, T., Lee, X., Shoji, Y., Sato, J., Sawaguchi, T., Yoshimura, A., Sato K.: Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Tandem-Mass Spectrometry for Quantitative determination of Six Aminoglycoside Antimicrobials in Human Plasma. *Showagakukai Zasshi (Journal of The Showa University Society)*, 76, 285-298 (2016).
- 12) Ogasawara, H., Seko, M., Akiyama, H., Yano, T: A sample preparation method from livestock products for quantitative apramycin measurement by LC-MS/MS
- 13) Notification No. 1115001 (Nov. 15, 2007), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 14) Nemoto, S.: Advancement of Official Analytical Method for Residual Pesticides in Foods. *hokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science.)*, 51, 349-359 (2010).

要 旨

第3章や、Jpn J Food Chem Safety 29 124-133 (2022)に報告したように、畜産物に残留するアプラマイシンを、絶対検量線法を用いた LC-MS/MS で測定するための試料調製法を確立した。本章では、牛の筋肉・肝臓・脂肪を対象として LC-MS/MS を用いたアプラマイシンの定量測定法の開発のための妥当性評価を行った。牛の組織試料からの抽出はヘキサン存在下でのトリクロロ酢酸抽出 (hexane-TCA) 法で行った。抽出後の試料は2種類の HLB 固相カートリッジと MCX 固相カートリッジを用いて精製した。得られた試験試料中のアプラマイシンは絶対検量線を用いて LC-MS/MS で定量した。妥当性評価は、残留基準値 (MRL: 牛の筋肉および脂肪 : 0.5 ppm、牛の肝臓 : 5 ppm) および MRL の 1/10 に相当する値 (1/10 MRL: 牛の筋肉および脂肪 : 0.05 ppm、牛の肝臓 : 0.5 ppm) の濃度になるようにアプラマイシンを添加した牛の筋肉、脂肪、肝臓を用いて実施した。妥当性評価の結果は、真度が (MRL: 84.3-92.7%、1/10 MRL: 79.2-97.8%)、精度が (MRL: 5.9-2.1%、1/10 MRL: 5.7-2.8%) とともに良好な結果が得られた。定量限界は、1/10 MRL の添加試料から得られたピークの S/N 比で判定した。牛の筋肉、脂肪、肝臓、それぞれ、676.3、3161.7、7190.3 であり S/N ≥ 10 を十分に満たしており、牛の筋肉と脂肪で、0.05 ppm、牛の肝臓で 0.5 ppm の定量限界を保証できることが明らかとなった。

图 表

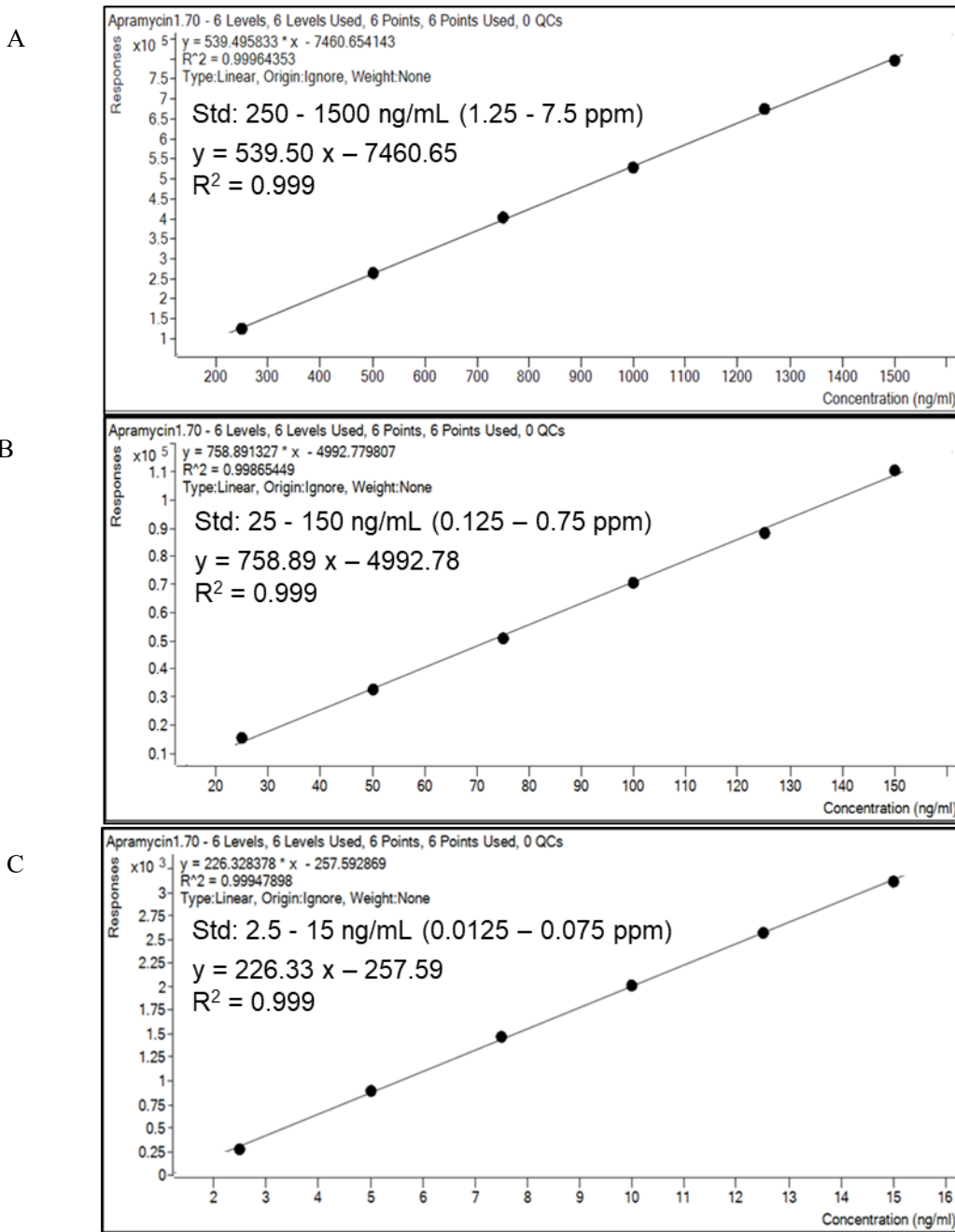
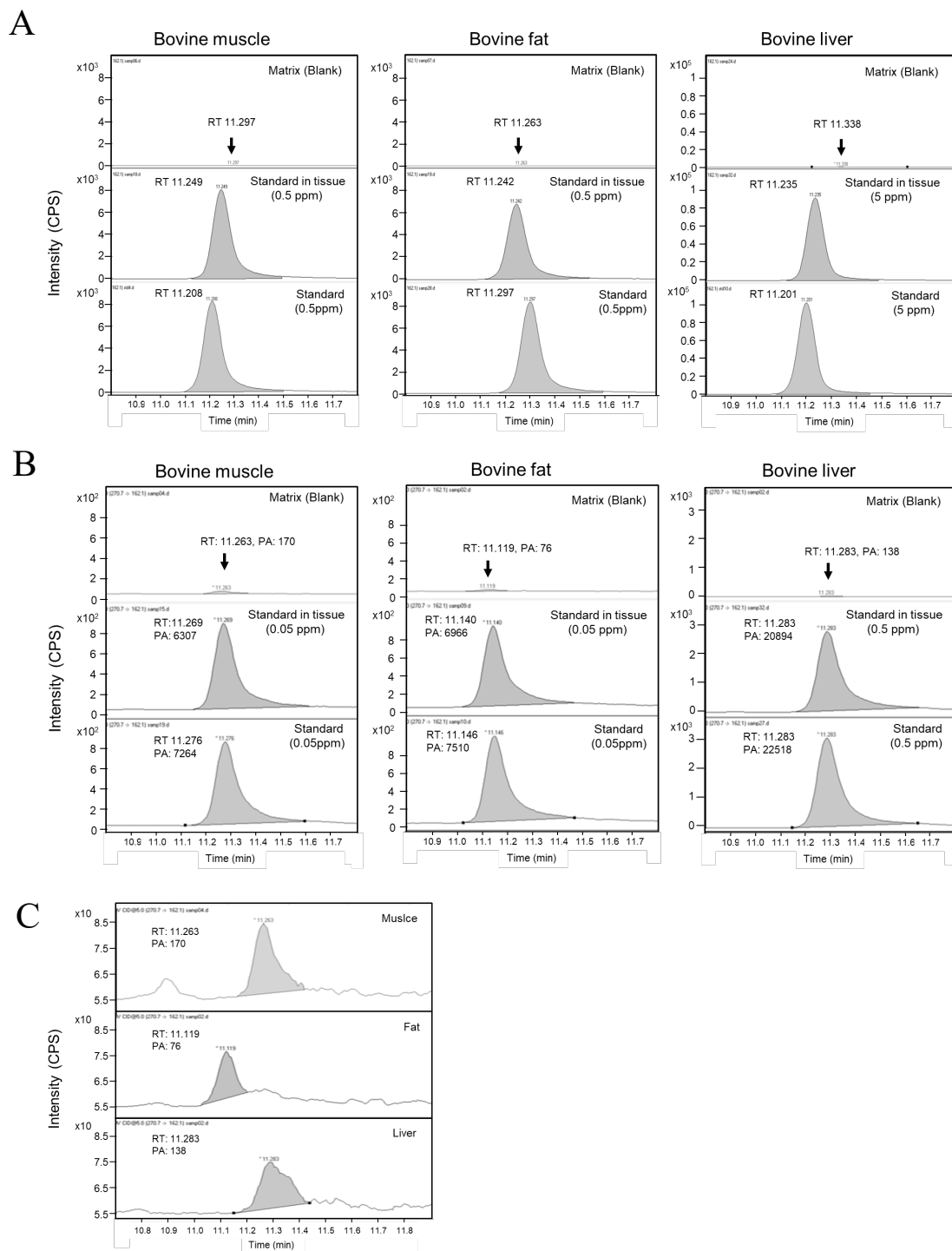


Fig.4-1 LC-MS/MS calibration curves of apramycin

A: range 250 - 1500 ng/mL (1.25 - 7.5 ppm), B: range 25 - 150 ng/mL (0.125 - 0.75 ppm)

C: range 2.5 - 15 ng/mL (0.0125 - 0.075 ppm)



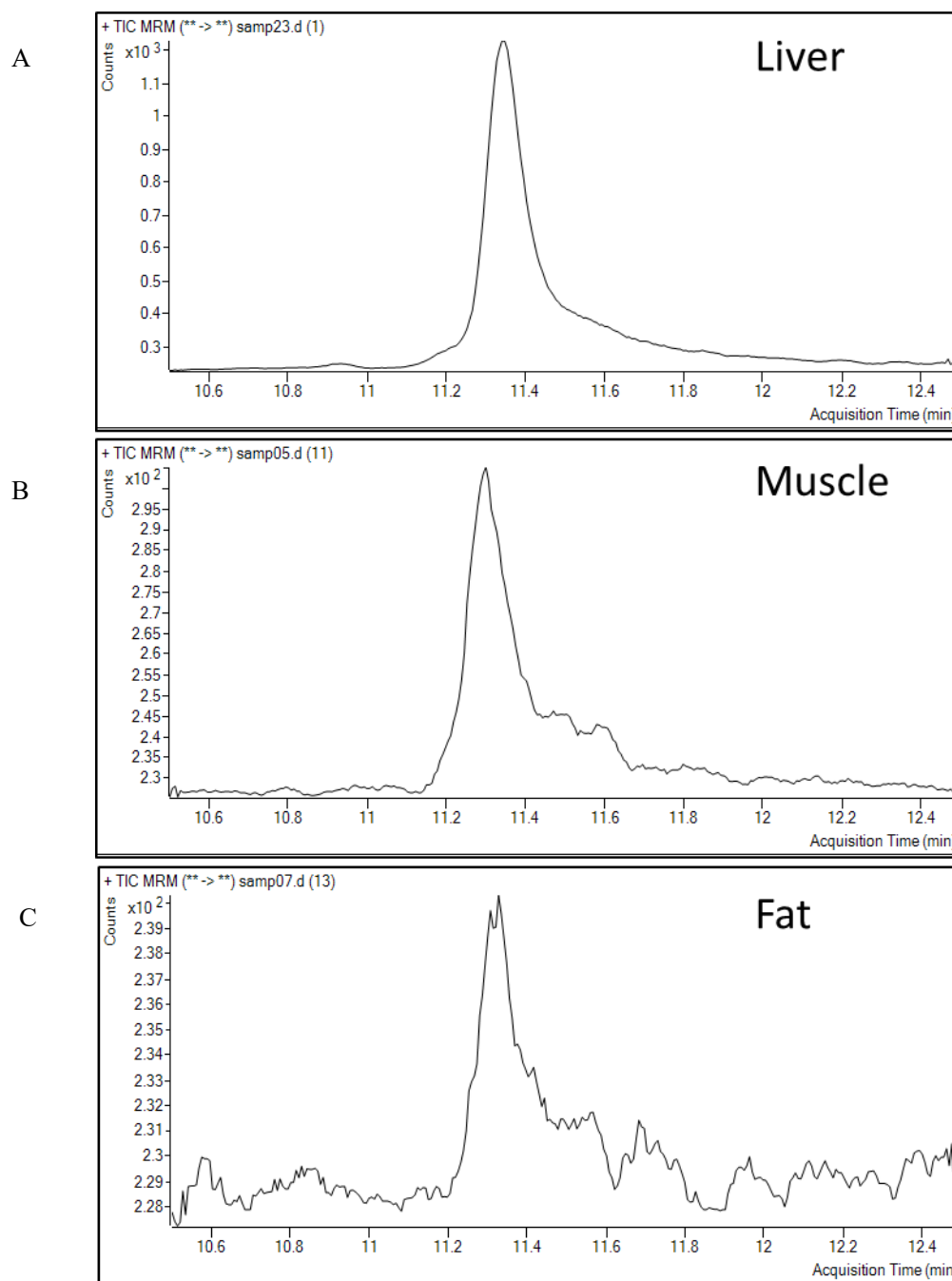


Fig.4-3 Total ion chromatogram of blank sample

Scan range: m/z 100 – 600

A: Liver, B: Muscle, C: Fat

Table 4-1 LC-MS/MS selective reaction monitoring (SRM) conditions for apramycin

Compound	Molecular formula	Molecular weight	Transitions (m/z)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
Apramycin	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁	539.6	270.7 → 162.1 ^{a)} 270.7 → 217.1 ^{b)}	70	5

a) Used for quantitation

b) Used for confirmatio

Table 4-2 Evaluation of selectivity

Bovine Tissue	MRL ¹⁾ (ppm)	1/10 MRL (ppm)	Additive concentration (ppm)	Permissible Range of Interfering Peak			Peak area ²⁾							Evaluation of selectivity ⁴⁾
				Evaluation concentration (ppm)	Evaluation criteria	Blank sample			Additive standard in matrix ³⁾			Area ratio (a)/(b)		
						n=1	n=2	Average (a)	n=1	n=2	Average (b)			
Muscle	0.5	0.05	0.5	MRL	0.5	< 0.100	163	103	133	17731	18677	18204	0.007	o
Fat	0.5	0.05	0.5	MRL	0.5	< 0.100	5	26	16	19197	20460	19829	0.001	o
Liver	5	0.5	5	MRL	5	< 0.100	1648	944	1296	231886	247915	239901	0.005	o
Muscle	0.5	0.05	0.05	1/10 MRL	0.05	< 0.333	250	170	210	6416	6307	6362	0.034	o
Fat	0.5	0.05	0.05	1/10 MRL	0.05	< 0.333	87	40	64	1952	2295	2124	0.031	o
Liver	5	0.5	0.5	1/10 MRL	0.5	< 0.333	256	138	197	19875	19514	19695	0.010	o

1) MRL: Maximum residue limit.

2) The results were evaluated by injecting blank samples and standard solutions sequentially.

3) Standard solutions at equivalent to evaluation concentration prepared with blank sample (matrix-matched standard solution) were used.

4) If the peak area ratio met the evaluation criteria for the permissible range of interfering peak, "o" was indicated; if not, "x" was indicated.

Table 4-3 Evaluation of trueness, accuracy (RSD) and limit of quantification (LOQ)

Bovine Tissue	MRL (ppm)	1/10 MRL (ppm)	Additive concentration (ppm)	Evaluation of LOQ ¹⁾	Recovery rate(%)					Trueness (%)	Precision (RSD %)	S/N ^{2),3)}		
					n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	Average
Muscle	0.5	0.05	0.5	—	87.9	92.2	92.7	95.4	95.5	95.5	3.3	—	—	—
Fat	0.5	0.05	0.5	—	85.6	82.1	86.6	86.1	85.0	85.6	2.1	—	—	—
Liver	5	0.5	5	—	75.5	85.4	86.5	87.0	87.0	87.0	5.9	—	—	—
Muscle	0.5	0.05	0.05	S/N	99.0	105.0	98.9	96.4	89.7	93.1	5.7	1065.5	287.0	676.3
Fat	0.5	0.05	0.05	S/N	95.4	92.2	95.2	89.6	95.6	92.6	2.8	4999.6	1323.8	3161.7
Liver	5	0.5	0.5	S/N	75.0	80.3	80.3	80.7	80.5	80.6	3.0	10822.0	3558.6	7190.3

1) When S/N ratio was calculated for evaluation limit of quantification (LOQ) described [S/N]

2) S/N was obtained from the peak at the maximum (Max) and the peak at the minimum (Min) in the five recovery tests.

3) S/N was calculated via the "peak to peak" method using Mass Hunter Ver. B.09.00 (Agilent Technologies)

Table 4-4 Result of matrix effect

Bovine Tissue	MRL ⁽¹⁾ (ppm)	1/10 MRL (ppm)	Additive concentration (ppm)	Standard concentration ⁽²⁾ (mg/L)	Peak Area ⁽³⁾							Peak area ratio ⁽⁶⁾
					Blank ⁽⁴⁾	Matrix-matched standard solution ⁽⁵⁾			Standard solution			
						n=1	n=2	Avarage	n=1	n=2	Avarage	
Muscle	0.5	0.05	0.5	0.1	133	17731	18677	18071	19646	21337	20492	0.88
Fat	0.5	0.05	0.5	0.1	16	19197	20460	19813	19646	21337	20492	0.97
Liver	5	0.5	5	1	1296	231886	247915	238605	295945	311233	303589	0.79
Muscle	0.5	0.05	0.05	0.01	210	6416	6307	6152	7264	6212	6738	0.91
Fat	0.5	0.05	0.05	0.01	64	1952	2295	2060	2202	2198	2200	0.94
Liver	5	0.5	0.5	0.1	197	19875	19514	19498	22518	21806	22162	0.88

- 1) MRL: Maximum residue limit
- 2) Standard solutions at equivalent to 100% or recovery rate were prepared with blank sample (matrix-matched standard solution) and with solvent (Standard solution).
- 3) The results were evaluated from two measurements taken alternately in the order of matrix-matched standard solution and solvent standard solution.
- 4) If a peak was detected in the blank, the peak area of the matrix-added standard solution was subtracted from the one of the blank.
- 5) Matrix-matched standard solutions were prepared with blank samples on the day of the examination.
- 6) The peak area ratio was calculated as the ratio of the peak area of the matrix-matched standard solution to that of the standard solution.

第5章 総括

5.1 全体総括

農薬、飼料添加物および動物用医薬品は食糧生産の効率化のためにはなくてはならない存在であるが、食品に残留するそれらの成分は、人体に摂取する可能性があることから、食の安全・安心を担保するため、国の主導の下、科学的根拠に基づいた残留基準が設定されている。

平成17年のポジティブリスト制度導入以前は、250農薬、33動物用医薬品のみが食品の成分に係る規格（残留基準）に定められており、これらの成分が残留基準を超えた場合、食品の販売が禁止になるという仕組みであった。一方で残留基準が定められていない成分については、食品にその成分が残留していても、基本的には販売禁止などの規制は設けられていなかった。2002年に冷凍ほうれん草中に基準値を大きく超えるクロルピリホスが検出された際にも、残留基準値が定められていない農薬が残留していたことも問題視された(1)。

ポジティブリスト制度の導入により、厚生労働省は、全ての農薬、飼料添加物、動物用医薬品について、残留基準を設定し、基準値を超えて残留する食品の販売、輸入などは、食品衛生法により、禁止されることとなった。ポジティブリスト制度導入後、新規に残留基準が設定された農薬等（100品目）も含めると、現在、残留基準が設定されている農薬等は合計で760品目になる。

ポジティブリスト制度導入時に暫定的に残留基準が設定された農薬等については、平成18年以降計画的に食品健康影響評価が行われ、順次、薬事・食品衛生審議会の審議を経て残留基準の見直しが進められており、令和2年12月現在、累計で699品目の農薬等に係る食品健康影響評価が進められた。その結果を踏まえて残留基準が改正された農薬等は491品目ある。

食品中の農薬の残留基準値は、食品安全委員会が定めた農薬ごとの許容一日摂取量（ADI：毎日一生涯にわたって摂取し続けても健康への悪影響がないと推定される一日当たりの摂取量）と急性参照容量（ARfD：24時間又はそれより短時間の間に摂取しても健康への悪影響がないと推定される量）と二つの指標をもとに、厚生労働省がこれらの指標を上回らないように残留基準値を設定することになっている。さらに、個々の残留基準値について、農薬を定められた使用方法を遵守して農薬を適正に使用した際の残留濃度等に

基づき設定する。これは国際的にも共通の考え方であるが、各国において、農薬の使用の可否や使用方法が、その国の気候、病虫害の発生状況や栽培実態を踏まえて、それぞれで定められていることから、それを基に定められる残留基準値も各国で異なる場合もある。また、同じ食品であっても、日本と海外で検査部位が異なる（例：玄米と精米）ことにより、残留基準値が異なる場合もある。そのため、輸出入の際には自国で残留濃度を確認するための方法が重要である。

日本では地域で伝統的に伝わる飼育方法で生産され、食経験が豊富な食品であっても、国際基準に照らし合わせた場合、違反品とされる場合がある。そのような中で、科学的根拠に基づく食品の有害性や安全性について根拠示し、国際規格に反映させることが必要である。その根拠となる食品中の含有成分量調査などのレギュラトリーサイエンス研究は、間接的に地域の地位の食産業を保護し、また活性化する上で重要な役割を担うものである。

本研究では畜産物中に残留するアプラマイシンの定量測定法の開発を行った。従来アプラマイシンの定量方法としては、微生物試験法が告示されているが、試料調製方法が煩雑であることや、特異性や定量感度に問題があった。また、LC-MS/MS法を用いた定量測定方法が報告されているが、イオンペア試薬の使用やマトリックス添加検量線による定量など必ずしも汎用性の高い方法では無かった。そこで、より簡便で高感度なアプラマイシンの定量測定を汎用的な分析条件で行う方法を開発することを試みた。

第1章では、本研究の背景や関連法令、LC-MS/MSなどの概説、本研究の目的を述べた。

第2章では、畜産物中のアプラマイシンを定量測定するための事前検討を行った。アプラマイシン測定の方法である微生物試験法やすでに報告されているアプラマイシンの測定方法を参考にLC-MS/MS測定の方法やアルカリ加水分解におけるアプラマイシンの構造変化、微生物試験における試料調製方法のLC-MS/MS法への適応等の検討を行った。

第3章では、LC-MS/MSを用いた絶対検量線法での定量に適応可能な、試料調製方法について検討した。牛肉試料からアプラマイシンの抽出は、アプラマイシンを脂肪とともに抽出するアルカリ加水分解抽出法およびアプラマイシンを脂肪と分けて抽出するヘキサソール-TCA抽出法について検討を行った。抽出液の精製方法は、2種類のHLB型固相カートリッジ（SupelHLB、OasisHLB）を用いて、夾雑成分を固相カートリッジに吸着除去し、逆相強陽イオン交換固相カートリッジ（MCX、MC1）にアプラマイシンを回収する方法を検討した。牛の組織（筋肉、脂肪、肝臓）にMRLに相当する濃度になるようにアプラマイ

シンを添加し、試料調製を行い、選択性、回収率をガイドライン(2, 3)に基づき評価したところ、それぞれの牛の組織に対し、検討したいずれの方法においてもガイドラインの基準に適合する結果となった。最終的に、選択性の結果が最も優れたヘキサン-TCA 抽出と SupelHLB と OasisHLB の二種類の固相カートリッジと、MCX を組み合わせた方法を採用することとした。これにより、牛肉中の残留アプラマイシンについて、LC-MS/MS を用いた絶対検量線法で測定が可能になった。さらにこの方法は牛脂肪中のアプラマイシンについても LC-MS/MS 法による定量が可能となった。また、中和処理することなく試料調製が可能となったことから、試料調製方法の簡便化にも成果が得られた。

第4章では、第3章で開発した試料調製方法について、妥当性評価試験を行った。牛の組織（筋肉、脂肪、肝臓）にそれぞれ MRL（筋肉、脂肪：0.5 ppm、肝臓:5 ppm）および 1/10 MRL（筋肉、脂肪：0.05 ppm、肝臓:0.5 ppm）になるようにアプラマイシン標準液を添加した試料を用いて妥当性評価を行った。選択性、真度、精度および S/N 比の結果から、開発した試験方法は、牛の筋肉と脂肪で 0.05 ppm、牛の肝臓で 0.5 ppm を LOQ として適応可能であることが明らかとなった。本研究で牛のブランク試料の測定を行った結果、アプラマイシンの保持時間付近にピークが検出されたが、MS/MS における定量イオンと確認イオンのピーク面積比から、アプラマイシンとは異なる成分であることが分かった。ブランク試料から検出されたピークについては、選択性の結果から、牛の筋肉、脂肪、肝臓中のアプラマイシンを測定するうえでは、影響は小さいものと考えられる。しかしながら、豚の様により小さい MRL（豚の筋肉、脂肪、肝臓で 0.06 ppm）の試料を測定する場合や、一律基準値（0.01 ppm）に適応するためには、より夾雑成分を除去する方法を検討する必要がある。あるいは、LC-MS/MS の測定条件を検討し、分離カラムを用いて、妨害ピークとアプラマイシンを完全に分離させるための工夫が必要であると考えられる。夾雑成分の影響を除去することは、分析精度の向上だけでなく、分析装置への負荷を低減させる意味でも非常に重要であると考えられる。

現在、農林水産省の主導の下、積極的に輸出を模索している農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略に取り組み様々な農林水産物に対し、輸出額の増額を目標に掲げている。牛肉を例に挙げると、牛肉の輸出額は 2019 年には 297 億円の実績があったが、2025 年の目標額は 1600 億円と約 6 倍に増加されている(1)。それに伴い肉用繁殖雌牛の増頭や食肉処理施設の再編など様々な取り組みを行っている。豚肉や鶏肉も同様で、2019 年の輸出額に対し、2025 年には 1.5-2 倍程度の増額を目標に掲げている。このようなことから、今後、日

本における農林水産物の輸出機会が大きく増加することが考えられる。そのような背景で、畜産物の安定的な生産を目的として抗生物質の使用機会も増加すると思われる。その際に、抗生物質の適正な使用がされなかった場合、先に述べたポジティブリスト制度のしくみから、畜産物中から抗生物質が残留基準値を超過して検出される可能性があり、その場合、食品の出荷停止や、廃棄、さらに市場に出回っている場合には、製品の全回収というリスクが伴う。また、畜産物を輸入する機会もあることから、従来日本では使用されていない抗生物質などが残留している可能性がある。その様な事から、国民の健康上の安全や、国内の畜産物生産者を守るためにも、本研究で開発したアプラマイシンの定量測定方法は非常に有用であると考えられる。特に、三重県は松阪牛として非常に有名な産地であることや、世界に目を向けると以前は発展途上国とされていた国でも豊かさが増すにつれて、動物性たんぱく質の摂取機会が増加すると思われる。地域や生産者にとって、安い外国産の牛肉の輸入は競争力という観点やからリスクがあり、生産した牛肉を輸出する場合には、日本とは異なる残留基準値に抵触するリスクがある。このように、残留基準値が設定されることは、リスクが増えると考えられるが、逆に他との差別化の機会ととらえることもできる。本研究で得られた畜産物中のアプラマイシンを測定する技術は、リスクの回避の観点からも、機会の創出という観点からも非常に有用であると考えられる。

次に分析技術に目を向けると、今後、今回使用した装置よりも高性能なものが製造される可能性がある。実際、20年ほど前までは、今回使用した LC-MS/MS は感度が不安定で定量分析には主に、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) や吸光度検出器を搭載した液体クロマトグラフが多く用いられていた。しかし、現在は、LC-MS/MS が分析装置の主流の1つと変化している。GC/MS 法と LC-MS/MS 法では分析に関する留意点が大きく異なり、それに伴い試料調製方法における留意点も異なる。よって、今後新たな装置が開発された場合、試験方法の開発にも大きく影響を及ぼすが、本研究で得られた試験方法を開発する上での手順や技術的な手法は、今後に生かすことが出来るようになる。特に、時代と共に変動するものは分析装置だけでなく、抗生物質などの医薬品も新たなものが開発されると思われる。近年の新型コロナウイルスの出現により新たな医薬品が製造されたように、今後も今までなかった物性を持った医薬品が開発されることが予想される。このような場合にも、本研究で検討した記述は試験方法開発に貢献できると考えられる。

現在実施している、研究活動と環境問題の関連は、河川を中心とした環境水中に存在する抗生物質の問題が挙げられる。抗生物質が環境に放出される経路として、人や畜産物が

摂取した抗生物質が体内で分解されることなく、尿や便として下水道を通して下水処理場へ流入し、処理場で十分に処理されないまま、放流水として河川に放出されることが一例として挙げられる。また、抗生物質を飲まずにそのまま下水へ流すなど、抗生物質の適切な服用がされていないケースもあり、そのことも一つの問題とされている。現在、日本のみならず、世界において抗生物質が原因となる、薬剤耐性菌の発現が問題として挙げられている。薬剤耐性菌の問題として、世界で 70 万人が薬剤耐性菌に感染している現状があり、WHO によると、薬剤耐性菌に対して対策しなかった場合、2050 年には 1,000 万人が感染による死亡することが想定されている（現在の癌による死亡者数を超える）。近年では、WHO が加盟国に、薬剤耐性菌に対する行動指針計画の策定・実行を要求されるようになった。

また、The New York Times でも薬剤耐性菌をコロナの次のパンデミックと位置づけ、2020 年にその危険性を報告している。その中で、環境中、排出水中、下水中に含まれる抗生物質濃度の実態調査や移動経路調査、抗生物質の除去技術の評価試験など、抗生物質を測定する機会が増加すると考えられる。

地球上には 14 億リットルの水が存在するが、そのうち人が利用できる水量は 0.01% 弱である。水は雨、河川・海・地下水、蒸発、雲、雨と循環しており、人間活動の中で使用できる水の量が減少している中、あらたな抗生物質による影響がより一層の懸念事項となる。

よって、本研究で開発した測定技術や開発に至るまでの検討手順は、抗生物質による薬剤耐性菌の現状把握や問題解決に大いに役立つと考えられる。

引用文献

- 1) Kurihara, S., Shimoura, S., Maruyama, A.: Impacts of positive list system on Japanese farmers: an approach using decision tree and cluster analysis strategies. *Nougyo Keiei Kenkyu* (Japanese journal of farm management), 48, 24-34 (2010)
- 2) Notification No. 1115001 (Nov. 15, 2007), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- 3) Nemoto, S.: Advancement of Official Analytical Method for Residual Pesticides in Foods. *hokuhin Eiseigaku Zasshi* (Food Hygiene and Safety Science.), 51, 349-359 (2010).
- 4) 農林水産省 農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/progress/attach/pdf/index-19.pdf>

要約

本論文は、畜産物中に残留するアプラマイシン (AP) の定量測定方法開発を目的とした。AP はアミノグリコシド系抗生物質の一つであり、動物用医薬品として使用され、ポジティブリスト制度の導入により、残留基準値 (MRL) が設定されている。畜産物中の AP 定量測定方法は、微生物試験方法が告示されているが、手順が非常に煩雑で、特異性や検出感度に課題がある。他にも液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法が報告されているが、マトリックス添加検量線法による定量測定やイオンペア試薬の使用等、汎用的な分析方法ではない。また、脂肪組織に対する試験方法も報告されていない。そこで、畜産物中の残留 AP の定量測定について、試料調製方法、機器分析方法を検討した。本論文は 5 章から成る。

第 1 章は、本研究の背景や関連法令、LC-MS/MS などの概説、本研究の目的を述べた。

第 2 章は、畜産物中の AP を定量測定するための事前検討を行った結果について報告した。AP の定量測定を行うには、試料調製方法と AP を検出させる方法について検討する必要がある。まず、AP を検出させる方法として、すでに報告されている LC-MS/MS 条件を参考に、AP が検出されるか検討した。AP の検出が確認された後、より定量精度が高まるよう、分離カラムの比較検討やイオン化等の条件を検討した。試料調製方法は、AP について、微生物試験方法が告示されており、その試料調製方法が LC-MS/MS 法に適応できるか検討を行った。微生物試験法では、アルカリ加水分解抽出-イオン交換クロマトグラフィー精製法が用いられている。微生物試験では AP による微生物活性を評価する試験であるため、官能基の一部が分解されても測定結果への影響は少ない。しかし、AP を LC-MS/MS 法で定量測定するには、AP がアルカリ加水分解抽出で分解されないことを確認する必要がある。そこで AP をアルカリ加水分解し、液体クロマトグラフィー-オービトラップ型イオントラップ質量分析計 (Orbitrap LC-MS) による精密質量測定と核磁気共鳴 (NMR) 分析装置による構造解析を行い、AP が分解されないことを確認した。また、微生物試験に準じた方法で牛試料 (筋肉、脂肪、肝臓) を試料調製した際の夾雑成分除去について調べるため、LC-MS/MS 法で定量測定を行ったところ、回収率が 59.9-63.7%であったが、試験液を 10 倍、100 倍と希釈するにつれ、回収率がそれぞれ、81.7-84.2%、97.5-98.5%に向上した。本章で検討した方法では、夾雑成分が十分に除去されないことが分かった。また、微生物試験の工程の一つにある抽出液の中和操作が極めて煩雑であるため、AP の特性と抽出液の液性から、中和操作を省略した試料調製方法を第 3 章で検討した。

3章では、牛試料を用いてAPをLC-MS/MSで定量測定する為の試料調製方法を検討した。牛試料に残留基準値(MRL)のAP(牛筋肉、牛試料:0.5 ppm、牛肝臓:5 ppm)を添加し、試料調製方法の検討を行った。抽出方法は、アルカリ加水分解抽出とn-ヘキサン(ヘキサン)存在下でトリクロロ酢酸抽出(ヘキサン-TCA抽出)の二種類を検討した。LC-MS/MS測定用試料の調製はAPが水溶性の性質があることから、親水性-親油性バランス型(HLB)固相に抽出液を通液することと、APは*pKa*(8.5)であることと、抽出液の液性が強酸性であることから、抽出液からAPを回収する固相として、逆相系強陽イオン交換固相を用いた。本論文では、2種類のHLB固相を選定し、1種類の固相で精製した場合と、2種類の2個の固相を連結した場合で不純物の除去効果を検証した。また、APを回収する固相は2種類(MCX、MC1)を選定し、HLB固相との組み合わせで抽出液の精製を評価した。評価は選択性と回収率とし、評価基準は厚生労働省による、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(ガイドライン)に基づいた。結果は、いずれの試料調製方法でもガイドラインの基準に適合したが、選択性の結果などから2種類のHLB固相とMCXの3つの固相を組み合わせた精製方法が最も良好な結果が得られることが分かった。また、APは高極性で有機溶媒に難溶という特性のため、脂肪と共に抽出することが困難で、脂肪中のAP測定方法が確立されていなかったが、アルカリ加水分解では脂肪を可溶化して抽出、ヘキサン-TCA抽出では、他の部位よりヘキサンの割合を増やし抽出を行った。これにより牛脂肪の分析にも適応可能であると初めて実証した。

第4章では、畜産物中のAP定量方法の妥当性評価を行った。本章では、MRL(牛筋肉、牛試料:0.5 ppm、牛肝臓:5 ppm)とMRLの1/10(1/10 MRL; 牛筋肉、牛試料:0.05 ppm、牛肝臓:0.5 ppm)になるようにアプラマイシンの標準液を添加した牛肉試料を用いて、第3章のヘキサン-TCA抽出法の妥当性評価を行った。妥当性は厚生労働省のガイドラインに基づき、選択性、真度、精度、定量限界値について評価した。選択性は、牛のブランク試料を前処理し、LC-MS/MS測定した結果、APの保持時間付近に検出される妨害ピークの面積値を、マトリックス中の標準溶液MRLの面積値で除して1/10未満(0.1未満)を許容範囲とした。選択性の結果は牛の筋肉、脂肪、肝臓で、0.010-0.034となり、すべての組織でガイドラインの許容範囲内となった。真度、併行精度は、標準添加した牛の各組織を5回測定した結果より算出した。結果は、真度がMRLで84.3-92.7%、1/10 MRLで79.2-97.8%となり、ガイドラインの目標値(70-120%)を満足した。併行精度はMRLで2.1-5.9%、1/10 MRLで2.8-5.7%となり、ガイドラインの目標値(15%未満)を満足した。定量限界値の評

価は、S/N 比が 10 以上を条件となる。牛の筋肉、脂肪、肝臓の 1/10 MRL における S/N 比は、676.3- 7190.3 となり、ガイドラインの目標値 (10 以上) を満足した。S/N 比及び真度、併行精度の結果から、開発した試験方法が、牛の筋肉と脂肪で 0.05 ppm、牛の肝臓で 0.5 ppm を LOQ として適応可能であることが分かった。これにより、LC-MS/MS 法を用いた絶対検量線法による畜産物中の AP の定量方法を確立し、今までに開発されてきた方法より簡便で高感度な定量方法が実現できた。しかしながら、豚の様により小さい MRL (豚の筋肉、脂肪、肝臓で 0.06 ppm) の試料を測定する場合や、一律基準値 (0.01 ppm) に適応するためには、より夾雑成分を除去する方法を検討する必要がある。

第 5 章では、本論文の成果の要約と、今後の課題、将来性及び地域への貢献の可能性について述べた。

謝辞

本研究の遂行、本論文をまとめるにあたり、終始適切なお助言と懇切丁寧なお指導ならびにご校閲を賜りました三重大学大学院 地域イノベーション学研究科 矢野 竹男 教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なお指導とご教示を賜りました、星薬科大学 薬学部 穂山 浩 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、NMR のデータ取得とご教示を賜りました、三重大学大学院工学研究科 鳥飼 直也 教授にお礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、貴重なお助言を頂きました、三重大学大学院地域イノベーション学研究科 末原 憲一郎 教授、加賀谷 安章 准教授、ならびに狩野 幹人 准教授に感謝申し上げます。

本研究の一部は株式会社東海テクノで行ったものであり、研究の機会を与えてくださいました市田 淳一 元社長 (2020 年 3 月逝去) に心より感謝申し上げます。また、市田 明 社長、田中 正廣 前社長をはじめとする株式会社東海テクノの役員の皆様、社員の皆様にはたくさんのご協力賜り心よりお礼申し上げます。特に、四日市分析センター応用ラボ Gr. 瀬古 万里 係長には、データ取得など多大なお協力を頂き、心よりお礼申し上げます。

研究成果の発表状況

本論文の成果は以下の報告にて公表した

- 1) Ogasawara, H., Seko, M., Akiyama, H., and Yano, T. A sample preparation method from livestock products for quantitative apramycin measurement by LC-MS/MS. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 29, 124-133, 2022
- 2) Ogasawara, H., Seko, M., Akiyama, H., and Yano, T. Development of a sample preparation method for apramycin residue analysis in livestock products by LC-MS/MS. *Proceeding of the 14th International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2022)* p21-24, October 13, 2022 Regional Innovation Hall, Mie University
- 3) 小笠原 英城, 瀬古 万里, 穂山 浩, 矢野 竹男 : アプラマイシンの LC-MS/MS 分析のための畜産物からの試料調製法. 日本食品化学会 第 28 回学術大会 (2022. 5 東京ビッグサイト)
- 4) 小笠原 英城, 坂宮 章世, 瀬古 万里, 坂井 隆敏, 根本 了, 穂山 浩, 奥村克 純, 矢野 竹男 : 畜産物中のアプラマイシンの分析法の開発. 日本食品化学会 第 26 回学術大会 (2020. 8 紙上開催)