

LC-MS/MSを用いた畜水産物中ドキシサイクリン分析法検討

小林 麻紀^a, 酒井 奈穂子^a, 神田 真軌^a, 林 洋^a, 大町 勇貴^a, 森田 有香^a, 根本 了^b, 橋本 常生^a

畜水産物中のドキシサイクリン分析法について検討を行った。ドキシサイクリンは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 (PSA) 及びスチレンジビニルベンゼン共重合体 (PLS-2) ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで測定を行い、絶対検量線法で定量した。5品目の畜水産物 (豚の筋肉, 豚の脂肪, 豚の肝臓, 鶏の筋肉, ぶり) を対象に残留基準値濃度または一律基準値濃度 (0.01 ppm) における添加回収試験を行った結果, 真度 ($n=5$) は91.2~103.3%, 併行精度は3.1~10.2%, 定量限界は0.01 mg/kgであった。

キーワード: ドキシサイクリン, 畜産物, 水産物, 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

はじめに

ドキシサイクリン (Fig.1) 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テトラサイクリン系の抗生物質である。我が国では, 動物用医薬品として, 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が, また, 鶏を対象とした飲水添加剤が承認されている。テトラサイクリン系抗生物質は, 安価で広範な抗菌スペクトラムを有していることから, 広く使用され, ドキシサイクリンの流通量は年々増加傾向にある¹⁻³⁾。ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い, 基準値が豚, 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。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⁴⁾。

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分析法の報告⁵⁻¹³⁾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。そこで, 畜水産物を対象として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, 高感度で選択性の高いLC-MS/MSによる一律基準値 (0.01 mg/kg) に適用できる試験法を開発し, 畜水産物への適用性について検討したので報告する。

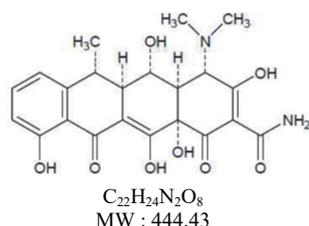


Fig.1. Structure of doxycycline

実験方法

1. 試料

市販の豚の筋肉, 豚の脂肪, 豚の肝臓, 鶏の筋肉及びぶり (皮を含む筋肉部) を用いた。

2. 試薬

1) 標準溶液

ドキシサイクリン標準品は富士フィルム和光純薬 (株) 製のドキシサイクリンヒクラート高速液体クロマトグラフ用標準品を用いた。この23.1 mg (ドキシサイクリンとして20.0mg) をメタノールに溶解して1,000 µg/mlの標準原液を調製した。この標準原液をアセトンで希釈したものを添加回収用標準溶液とし, 0.1%(v/v) 硝酸・メタノールで適宜希釈したものを検量線用標準溶液とした。

2) ミニカラム

InertSep PSA 500 mg/3 mL (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InertSep PLS-2 265 mg/6 mL (スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム) はジーエルサイエンス社製を用いた。

3) その他の試薬

有機溶媒は残留農薬試験用及びLC/MS用を用いた。クエン酸及びリン酸二ナトリウムは特級を, 塩酸は容量分析用を, 硝酸はLC-MS用を用いた。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムは生化学用を用いた。

エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 (EDTA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。

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 国立医薬品食品衛生研究所

210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26

3. 装置

1) 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

Waters社製Quattro Premier XE System.

4 測定条件

1) LC条件

分析カラム：化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS 粒子径 5 μm , 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 移動相：A液 0.1% (v/v)ギ酸溶液, B液 0.1% (v/v)ギ酸含有メタノール, グラジエント条件：0分 A:B=95:5 \rightarrow 0.5分 A:B=60:40 \rightarrow 1.5分 A:B=50:50 \rightarrow 2.5分 A:B=30:70 \rightarrow 3.5分 A:B=2:98 \rightarrow 5分. 流量：0.2 mL/min, カラム温度：40°C

2) LC-MS/MS条件

イオン化法：ESI(+), キャピラリー電圧：3.0 kV, ソース温度：110°C, デソルベーション温度：350°C, コーンガス流量：N₂, 50 L/hr, デソルベーションガス流量：N₂, 850 L/h. 定量イオン (m/z)：445.4 \rightarrow 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)：445.4 \rightarrow 154.1 [コーン電圧 28 V, コリジョンエネルギー 30 eV] クロマトグラムを Fig.2に示した.

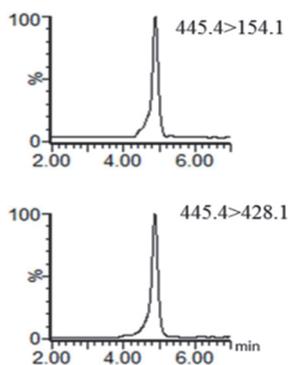


Fig.2. LC-MS/MS Chromatograms Obtained MRM Mode for doxycycline 2.5 ng/mL

5. 分析方法

1) 抽出法

試料10 gにEDTA緩衝液10 mL及びアセトン50 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、その上澄液を分取した。残さにアセトン25 mLを加え、1回目と同様に細砕した後、遠心分離した。上澄液を合わせ、アセトンを加えて100 mLに定容し、試料抽出溶液とした。試料抽出溶液5 mLを分取し、窒素吹付濃縮装置を用いて40°C以下で濃縮した。

2) 脱脂法

残留物に*n*-ヘキサン5 mL及び*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、窒素吹付濃縮装置を用いて40°C以下で濃縮した。

3) 精製法

残留物に0.1% (v/v)ギ酸・メタノール1 mLを加えて溶かした。この溶液をあらかじめ0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1% (v/v)ギ酸・メタノール20 mLで、それぞれコンディショニングし、PSAの下にPLS-2を接続したミニカラムに注入した。容器を0.1% (v/v)ギ酸・メタノール各1 mLずつで2回洗い、洗液をカラムに注入し、さらに0.1% (v/v)ギ酸・メタノール7 mL注入し、全溶出液を採り、0.1% (v/v)ギ酸・メタノールを用いて正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

結果及び考察

1. LC及びMS条件の検討

分析カラムは、CapcelpakC18 MG II (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径5 μm : (株)大阪ソーダ製), Mightysil RP-C18GP (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径5 μm : 関東化学(株)製)及びL-column2 ODS (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径5 μm : 化学物質評価研究機構製)を用いて検討を行ったところ、ドキシサイクリンのピーク強度及び再現性について良好な結果が得られたので、L-column2 ODSを使用することとした。検討したいずれのカラムにおいても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カラム温度を低く設定し、改善されたとの報告がある^{5,12)}。カラム温度を40°C, 30°C及び25°Cに設定して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。ピークにリーディングが見られるものの、定量性に問題がなかったため、通常のカラムを用いて検討を行った。

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% (v/v)ギ酸溶液が最もピーク強度が高く、また、アセトニトリルとの混液よりもメタノールとの混液のほうがピーク形状が良好であったため、0.1% (v/v)ギ酸溶液及びメタノールとの混液について検討した。0.1% (v/v)ギ酸・メタノール及び0.1% (v/v)ギ酸溶液 (5:95) から、0.1% (v/v)ギ酸・メタノール及び0.1% (v/v)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。

2. 抽出法の検討

1) 抽出溶媒

抽出溶媒としてアセトニトリル, アセトン, アセトン・*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 にドキシサイクリン標準溶液5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、各溶媒50 mL, 25 mL でホモジナイズ後、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%(v/v)ギ酸・メタノールに置換後、LC-MS/MS で測定した。その結果、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、PLS-2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く、濃縮時間も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。

2) 抽出時分解の有無の確認

豚の肝臓を試料として、添加後の放置時間による経時変化について添加回収試験を行った。

ドキシサイクリン標準溶液5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mLを添加し、0分、10分、20分及び30分放置後、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、PLS-2で精製を行った後、試験溶液とした。いずれも70%程度と十分な回収が得られなかった。

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。酸は0.1 mol/L塩酸、0.1%(v/v)ギ酸及び0.1%(v/v)リン酸を用いた。緩衝液はオキシテトラサイクリン試験法(農産物)及びオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法(畜水産物)¹³⁾で使用されているEDTA緩衝液を用いた。豚の肝臓に、ドキシサイクリン標準溶液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、PLS-2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Table 1 に示した。その結果、EDTA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、EDTA緩衝液を用いることとした。

Table 1. Comparison of the recovery of doxycycline from swine liver by using the acid solution or EDTA buffer solution

Added solution(10 mL)	Recovery(%) ^a
0.1 mol/L Hydrochloric acid	59.4
0.1 vol% Formic acid	81.8
0.1 vol% Phosphoric acid	78.3
EDTA buffer	99.4

^a Fortified level : 0.05 mg/kg

3. 脱脂法の検討

脱脂法としてアセトニトリル-ヘキサン分配を検討した。

ドキシサイクリンはガラス壁に吸着しやすく、ガラス製の分液ロートを用いた場合の回収率は1%未満であった。そこで、ポリプロピレン製の遠心管を用いた。15 mLポリプロピレン製遠心管にドキシサイクリン標準溶液0.05

mg/L (アセトン溶液) 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回振とう抽出を行った。その結果、2回の抽出で100%の回収が得られた。

次に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、溶媒を除去した。残留物重量を測定後、*n*-ヘキサン5 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え同様に操作し、2回抽出後にアセトニトリルを合わせ濃縮乾固した。残留物重量を測定したところ、脂肪等を含む残留物重量は89.7~93.1% (3回試行) 減量し、目視においても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。

4. 精製法の検討

1) PLS-2及びHLBでの検討

テトラサイクリン系抗生物質の試験法では精製にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (PLS-2)^{8,10,13)}またはジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (Oasis HLB)^{5,7,9,12,14)}が汎用されている。PLS-2 265mg/6 mL及びHLB200 mg/6 mL ミニカラムを用い、メタノール20 mLでコンディショニングした後、ドキシサイクリン標準溶液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。ドキシサイクリンはPLS-2ミニカラムでは25 mLで91.4%、HLB ミニカラムでは30 mLで68.9%溶出された。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。そこで、酸性条件での溶出を検討した。

各カラムを0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液20 mLでコンディショニングした後、ドキシサイクリン標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液で溶出した。PLS-2ミニカラムでは10 mLで99%、HLB ミニカラムでは10 mLで94.4%溶出された。

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、PLS-2または HLB ミニカラムに負荷し、それぞれ0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液10 mLで溶出して精製した。各ミニカラムについて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ところ、面積比は PLS-2ミニカラムでは0.93~1.06、HLB ミニカラムで0.90~1.08と PLS-2ミニカラムのほうが、より1に近い結果であった。また、PLS-2ミニカラムのほうが通液性が高く、操作の迅速性からも PLS-2を用いることとした。しかし、PLS-2及び HLB ミニカラムの両方で豚の肝臓及びぶりで色素の除去が不十分であり、また、ぶりでは夾雑ピークがドキシサイクリンに近接して検出されたことから、他のミニカラムを組み合わせて精製効果を高めることを検討することとした。

2) C18及びPSAでの検討

脂質、脂肪酸及び低極性化合物を除去する目的でC18及

びPSA ミニカラムを用いて検討を行った。

InertSep C18 500 mg/6 mL 及び InertSep PSA 500 mg/6 mL ミニカラムを0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液20 mL でコンディショニングした後、ドキシサイクリン標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液で溶出した。C18ミニカラムでは10 mL で92.4%、PSA ミニカラムでは30 mL で13%溶出され、PSA ミニカラムからの溶出は不十分であった。

ドキシサイクリンが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精製に用いる報告¹⁴⁾があることから、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。

PSA ミニカラムに各濃度 (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 mol/L) の塩酸溶液10 mL 及び0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液20 mL でコンディショニングした後、ドキシサイクリン標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液で溶出した。塩酸濃度0.1 mol/L 以上で洗浄した場合、0.1%(v/v)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。

3) ミニカラムの組合せ検討

C18, PLS-2及びPSA ミニカラムを0.1 mol/L 塩酸10 mL 及び0.1%(v/v)ギ酸・メタノール20 mL でコンディショニングした後、C18及びPLS-2カラムを、または、PSA 及びPLS-2ミニカラムを連結し、ドキシサイクリン標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1%ギ酸・メタノールで溶出したところ、いずれの組合せにおいても10 mL の溶出で98%以上の回収が得られた。

次に、豚の肝臓及びぶりを各組合せで精製したところ、C18及びPLS-2ミニカラムの組み合わせでは、妨害ピーク及び色素を完全に除去することはできなかった。PSA 及びPLS-2ミニカラムを組合せた場合、妨害ピークの影響を受けずに測定することができ、色素も除去できた。そこで、精製にはPSA 及びPLS-2ミニカラムの組合せを用いることとした。

5. 試験溶液調製溶媒についての検討

1) 溶解溶媒の検討及び安定性の確認

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。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、精製時の溶出溶液である0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液を用いることとした。

次に0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液中でのドキシサイクリンの安定性を確認した。

0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液を用いてドキシサイクリン標準溶液0.0005 mg/L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。面積値の経日変化をFig.3 に示した。ドキシサイクリンは-20°C保管以外では2日以降、-20°Cも4日以降面積値が低下したことから、試験溶液は調製後、速やかに測定を行い、測定時にはオートサンプラー内を8°Cに設定した。また、検量線用標準溶液は用時調製することとした。

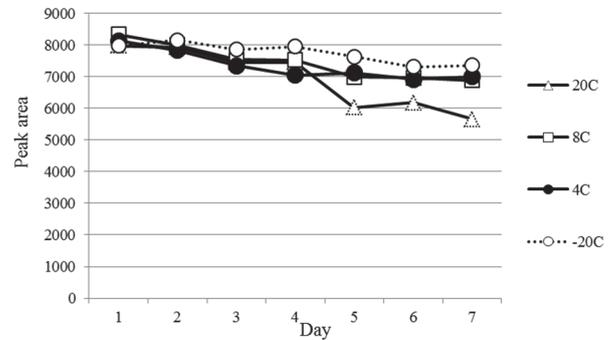


Fig.3. Change in peak area of doxycycline standard solution during storage in 0.1%(v/v) formic acid - methanol at different temperatures

2) 標準原液の安定性の確認

ドキシサイクリン標準原液 (1,000 mg/L) は-20°Cで保存すれば、1ヵ月程度は安定との報告がある¹²⁾。作成時、1ヵ月、2ヵ月、5ヵ月及び12ヵ月経過したドキシサイクリン標準原液を0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液で希釈して0.0005 mg/L 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値変化をFig.4 に示した。

ドキシサイクリンの面積値は1ヵ月以降減少したため、標準原液の保管は-20°Cで1ヵ月とした。

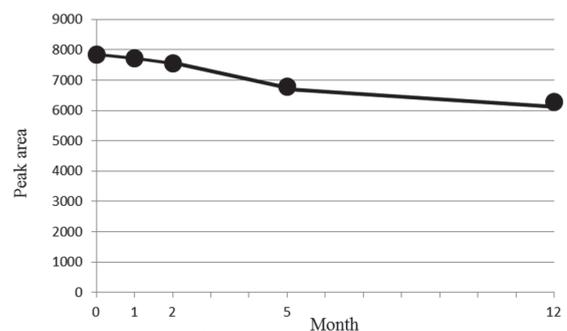


Fig.4. Change in peak area of doxycycline standard solution during storage in methanol

6. 検量線

標準品の0.125~0.75 ng/mL及び0.625~3.75 ng/mL 0.1%(v/v)ギ酸・メタノール溶液を各濃度範囲で6点調製し、5 µLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積で検量線を作成した。相関係数 (r) は0.999以上で良好な直線性が得られた。

7. 添加回収試験

各標準溶液を豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶりに試料中濃度が0.01及び0.05 mg/kgとなるよう添加し、30分放置後、本法を用いて添加回収試験を行った。

5回試行時における回収率の平均は0.01 mg/kgで91.2~103.3%, 0.05 mg/kgで93.5~97.0%, 併行精度は0.01 mg/kgで5.2~10.2%, 0.05 mg/kgで3.1~6.3%であった。(Table 2). いずれも真度70~120%, 併行精度15%未満の目標値¹⁾を満たした。

試料マトリックスの測定への影響について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、マトリックスによる測定への顕著な影響は認められなかった。0.01 mg/kg添加相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液でのS/N比を求めたところ、22~31と全ての食品でS/N \geq 10を満たしており、本法による定量限界を0.01 mg/kgに設定した。

Table 2. Recovery of doxycycline from livestock products and Seafood

Sample	MRL (mg/kg)	Fortified level (mg/kg)	Recovery ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)	Peak area ratio ³⁾
Chicken muscle	0.05	0.05	96.4	4.6	1.01
		0.01	99.4	5.5	0.96
Swine, muscle	0.05	0.05	97.0	3.3	1.02
		0.01	99.7	5.2	1.01
Swine fat	0.05	0.05	96.2	3.1	1.00
		0.01	103.3	10.2	1.01
Swine liver	0.05	0.05	93.5	6.3	1.03
		0.01	91.2	8.2	1.05
Yellowtail	0.05	0.05	96.7	5.9	0.99
		0.01	99.0	6.4	0.97

1) n=5, 2) Relative standard deviation,

3) Matrix standard / standard in solvent, n=2

8. 実態調査

本法を用い、平成29年4月から平成30年3月にかけて東京都内で市販されていた、牛の筋肉、さけ等の畜水産物23品目104試料について調査したところ、豚の筋肉(検出値: 0.01 ppm未満)、豚の肝臓(0.01, 0.02及び0.04 ppm)及び鶏の筋肉(0.01 ppm)の計5試料からドキシサイクリンが0.01未満~0.04 ppm検出された。残留基準値を超えて検出されたものはなく、食品衛生法に違反するものはなかった。なお、いずれの試料においてもクロマトグラム上に特に定量を妨害するピークは認められなかった。

ま と め

LC-MS/MSを用いた畜水産物中のドキシサイクリン試験法を検討した。試料からはEDTA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、PSA及びPLS-2ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで測定した。5品目の畜水産物(豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶり)を対象に添加回収試験を行った。残留基準値濃度または一律基準値濃度となるように添加したときの本法の真度は91.2~103.3%, 併行精度は3.1~10.2%であり、良好な

結果が得られた。定量限界は、検討したいずれの畜水産物においても0.01 mg/kgであり、ドキシサイクリンの分析法として有用と思われる。

謝 辞 本研究は、厚生労働省医薬・生活衛生局「平成29年度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」により実施したものである。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産省動物用医薬品検査所：平成27年動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報(別冊)各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗寄生虫剤の販売高と販売量, 3, 2015.
- 2) 農林水産省動物用医薬品検査所：平成28年動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報(別冊)各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗寄生虫剤の販売高と販売量, 3, 2016.
- 3) 農林水産省動物用医薬品検査所：平成29年動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報(別冊)各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗寄生虫剤の販売高と販売量, 3, 2017.
- 4) 食品安全委員会農薬専門調査会：動物用医薬品評価書ドキシサイクリン, 2012年11月.
- 5) 藤田瑞香, 柿本健作, 田口修三, 他：大阪府立公衛研所報, **45**, 77-81, 2007.
- 6) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 他：食衛誌, **49**, 37-44, 2008.
- 7) 河原さおり, 内尾雅子, 田島幸治：熊本市環総研所報, **16**, 43-48, 2009.
- 8) 白田忠雄, 萩原彩子, 山本浩嗣, 他：茨城県衛研所報, **48**, 25-28, 2010.
- 9) 影山温子, 徳橋慎介, 平松佐穂, 他：高知県衛研所報, **60**, 29-34, 2014.
- 10) 白井力, 清川由樹, 吉田純一：鹿児島県環保センター報, **16**, 63-69, 2015.
- 11) DE Almeida Marcos Pego, *et al.* : *Talanta*, **144**, 922-932, 2015.
- 12) 清川由樹, 吉田純一：鹿児島県環保センター報,**18**, 55-61, 2017.
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発第0124001号, 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法(通知), 2005.
- 14) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：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.
- 15) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課：残留農薬等試験法評価基準, 9-11, 平成29年7月11日.

Determination of Doxycycline in Livestock Products and Seafood by LC-MS/MS

Maki KOBAYASHI^a, Naoko SAKAI^a, Maki KANDA^a, Hiroshi HAYASHI^a, Yuki OMACHI^a,
Yuka MORITA^a, Satoru NEMOTO^b and Tsuneco HASHIMOTO^a

An analytical method based on LC-MS/MS was developed for the determination of doxycycline in livestock products and seafood.

Doxycycline was extracted using acetone after acidification with EDTA buffer. Crude extracts were defatted by liquid-liquid partition using acetonitrile and *n*-hexane. Cleanup was carried out using a combination of ethylenediamine-*N*-propyl silylated silica gel (PSA) and styrene divinylbenzene-based copolymer gel (PLS-2) mini columns. Sample solutions were subjected to LC-MS/MS using an external solvent calibration curve.

The average recovery ($n=5$) of doxycycline from five samples of livestock products and seafood (chicken muscle, swine muscle, swine fat, swine liver and yellowtail) after spiking with doxycycline at the maximum residue limit (MRL) or uniform limit of 0.01 mg/kg was 91.2 – 103.3%, with a relative standard deviation of 3.1 – 10.2%. The limit of quantitation of the developed method was calculated to be 0.01 mg/kg.

Keywords: doxycycline, livestock products, seafood, LC-/MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b National Institute of Health Sciences
3-25-26, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa, 210-9501, Japan