

液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法による水環境試料中の テトラサイクリン系抗生物質の定量

○内藤宏孝

1 はじめに

テトラサイクリン系抗生物質（TCs）は、人や動物に使用されているが、特に動物用としての使用が多く、医薬品だけでなく飼料添加物としても用いられており、最も多く使用されている抗生物質の1つである。TCsは、畜産施設周辺の土壌や水域で検出されており、また、その耐性菌が環境中に存在することが確認されている。このため、生態系への直接的な影響だけでなく、耐性菌の拡散による二次的なリスクも懸念されることから、TCsの詳細な残留状況の把握が求められている。

現在、TCsの分析は、主に液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法（LC/MS/MS）が適用されており、その前処理法は、固相抽出法が一般的に用いられている。しかし、固相抽出においてTCsは、その性質上、疎水性相互作用のほか、水素結合やキレート結合、イオン交換等の様々な作用が働くため、十分な回収が得られず、分析上の課題となっている。そこで、今回、試料へのEDTA-2Naの添加と固相カートリッジからの溶出方法を検討した結果、簡便な前処理方法で、TCsの効率的でしかも再現性のある回収が実現され、環境水中に存在する10 ng/LレベルのTCsを、精度よく定量することが可能となったので報告する。

2 分析方法

今回対象としたTCsは、クロルテトラサイクリン(CTC)、テトラサイクリン(TC)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ドキシサイクリン(DC)及びイソクロルテトラサイクリン(iso-CTC)の5物質である。

水質試料にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(EDTA-2Na)を添加し、固相カートリッジ(Oasis HLB)に通水した後、メタノール／0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v)で通水方向と逆向きから溶出し、LC/MS/MSにより表

表 1 測定条件

LC: SHIMADZU LC-20 Series					
カラム:Ascentis Express C18 (2.1mmφ×150mm, 2.7μm)					
移動相: A: 0.2%ギ酸/水, B: CH ₃ CN					
B: 10→60% (0→9 min, gradient) - 60→90%(9→10min, gradient) - 90%(10→14 min)					
流量: 0.2 mL/min		カラム温度: 40 °C		注入量: 10 μL	
MS: AB Sciex API3200					
イオン化法		: ESI-Positive			
ターボガス温度		: 700 °C			
イオンスプレー電圧		: 5.5 kV			
	CTC	TC	OTC	DC	iso-CTC
モニターイオン (m/z)	479>444	445>410	461>426	445>428	479>462
DP (V)	31	36	31	41	41
CE (V)	27	23	25	23	25

1に示す測定条件で定量した。

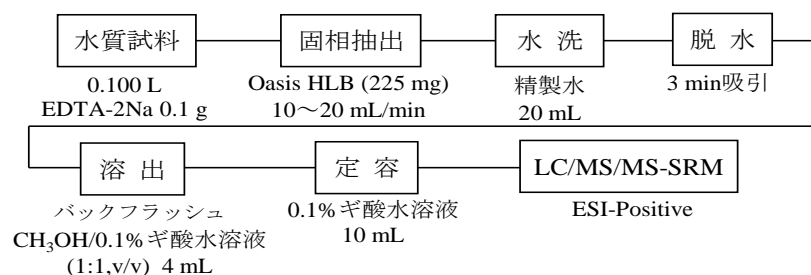


図 1 分析フロー

3 結果

3.1 検量線及び装置検出下限

CTC, DC については 0.20 ng/mL~100 ng/mL, TC, OTC 及び iso-CTC については 0.10 ng/mL~100 ng/mL の標準溶液の各 10 μ L を LC/MS/MS に注入し, 注入濃度と得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した. その結果, どの検量線もこの濃度範囲では良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) が確認された. また, 検量線の最低濃度の標準溶液 (CTC, DC 0.2 ng/mL, TC, OTC, iso-CTC 0.1 ng/mL) を繰り返し測定し ($n=7$), 得られた測定値の標準偏差を用いて装置検出下限値 (IDL) を算出したところ, 表 2 のとおりとなり, どの TCs も良好な再現性で高感度に定量することが可能であった.

表 2 装置検出下限 (IDL)

物質名	IDL (ng/mL)	最終液量 (mL)	試料量 (L)	IDL 試料換算値 (ng/L)
CTC	0.052	10	0.100	5.2
TC	0.023	10	0.100	2.3
OTC	0.020	10	0.100	2.0
DC	0.035	10	0.100	3.5
iso-CTC	0.026	10	0.100	2.6

3.2 添加回収試験結果及び検出下限値

河川水 (朝鮮川), 海水 (名古屋港) に TCs を添加し, 添加回収試験を行ったところ, 表 3 に示したとおり, 添加回収率は 85~105% で, 変動係数も 2.3~4.5% となり, 再現性は良好であり, 実試料に対して十分に適用可能であることが確認された.

また, 海水試料を用い, 「化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版)」に定められた方法に従って検出下限値を算出したところ, 表 3 に示したとおり, どの物質も 10 ng/L レベルの微量分析が可能であった.

表 3 添加回収試験結果及び検出下限値

物質名	試料量 (L)	MDL ¹⁾ (ng/L)	MQL ²⁾ (ng/L)	添加回収試験 (n=5)							
				海水				河川水			
				無添加 (ng/L)	添加量 (ng)	回収率 (%)	C.V. (%)	無添加 (ng/L)	添加量 (ng)	回収率 (%)	C.V. (%)
CTC	0.100	6.2	16	<6.2	20	99	4.5	<6.2	20	94	3.6
TC	0.100	3.0	7.7	<3.0	20	98	2.5	<3.0	20	95	4.2
OTC	0.100	2.9	7.4	<2.9	20	99	3.7	<2.9	20	97	2.7
DC	0.100	4.2	11	<4.2	20	87	2.3	<4.2	20	85	3.1
iso-CTC	0.100	2.8	7.1	<2.8	20	105	2.8	7.7	20	100	4.4

1) MDL: 測定方法の検出下限値

2) MQL: 測定方法の定量下限値

4 まとめ

LC/MS/MS による環境水中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法を開発した. 試料は, 固相抽出を前処理とし LC/MS/MS により定量した. 本法は簡便な前処理操作で環境水中に残留するテトラサイクリン系抗生物質を 10 ng/L レベルで定量することが可能であり, 環境モニタリング法として有用であると考えられた.