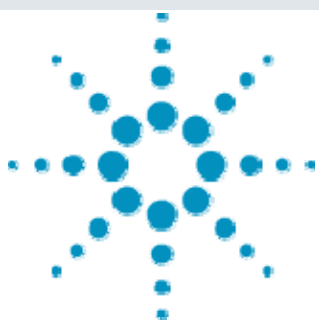




Agilent 6410 によるテトラサイクリン系 抗生物質の高感度一斉分析



＜要旨＞ テトラサイクリン系抗生物質(TCs)であるオキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)及びテトラサイクリン(TC)の LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。その結果、イオン源に ESI 法、移動相にギ酸を使用することで全ての TCs で良好なピーク形状が得られ、1ng/g 以下の測定が可能でした。また、うなぎ蒲焼および牛肉抽出液中で妨害ピークの影響はなく、顕著なイオン化抑制のない良好な結果が得られました。

Key Words: オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)、テトラサイクリン(TC)、LC-MS/MS、MRM

1. はじめに

蓄水産物に使用される抗生物質は生産性の向上や病気の予防および治療に動物用医薬品として直接家畜および飼料添加物として飼料に使用されており、今日の食料生産を支える上で重要な役割を担っています。しかし、一方でこれら薬剤が蓄水産物への残留が懸念されています。オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(TCT)、テトラサイクリン(TC)などのテトラサイクリン系抗生物質(TCs)は抗菌スペクトルが広く、安価であることから動物用医薬品及び飼料添加物として最も多く使用されており、違反例も多く報告されています。これら TCs の分析法として平成 17 年度に厚生労働省から出された通知試験法では蛍光検出器を用いた HPLC 法が指定されています。蛍光検出器を使用した HPLC 法は選択性の高い高感度分析法ですが、違反例が出た場合の確認法としては不十分です。そこで三連四重極型質量分析計である Agilent6410 LC-MS を用いた分析法について紹介します。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りですが、移動相にはメタノール及び 0.03%ギ酸を用い、グラジエント溶出で分離の最適化を行いました。また MS 条件はイオン源に ESI を用いた正イオンモードで測定し MRM 条件はプリカーサーイオンにはプロトン付加イオン、プロダクトイオンには脱塩酸イオンを使用しました。試料にはうなぎ蒲焼及び牛肉を使用しましたが、前処理は通知法に準じて行いました。この試料抽出液に 1ng/g 相等の OTC, CTC および TC 混合溶液を添加し試料マトリックス効果確認試料としました。

表.1 LC-MS/MS 条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Extend C18(100mm,2.1mm,1.8 μ m)
Mobile phase	: A: 0.03% HCOOH /MeOH, B: MeOH
	0.1% HCOOH +10mM HCOONH_4
	15%A/1min---(4min)---50%A---(15min)---70%A
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 2 μ L
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6410 LC-MS
Ionization	: ESI(Positive)
Collision energy	: 8V
MRM transition	: TC(445>410), OTC(461>426), CTC(479>444)
Collision energy	: TC(15eV), OTC(20V), CTC(20V)
Drying gas	: 10L/min at 350C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

3. 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS を用いた検出限界及び直線性

TCs は金属イオンと安易に配位する特性を持っていることから、通知法では移動相にキレート剤として EDTA-Na を使用しています。しかし LC-MS の場合揮発性の塩しか使用できないことからギ酸を使用して検討を行いました。その結果ギ酸濃度を 0.03%にすることで感度の低下もなくピーク形状も良好でした。図.1 には OTC, CTC, TC の MRM クロマトグラムを示します。

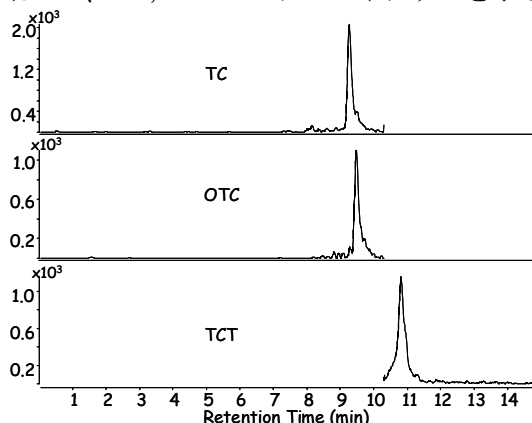


図.1 各 TCs の MRM クロマトグラム (5ng/mL)



Agilent Technologies

これらクロマトグラムのS/N比は全て10以上でした。直線性に関しては 50-5ppb での検量線を図. 2 に示しましたが、相関係数は全て 0.999 以上と良好でした。

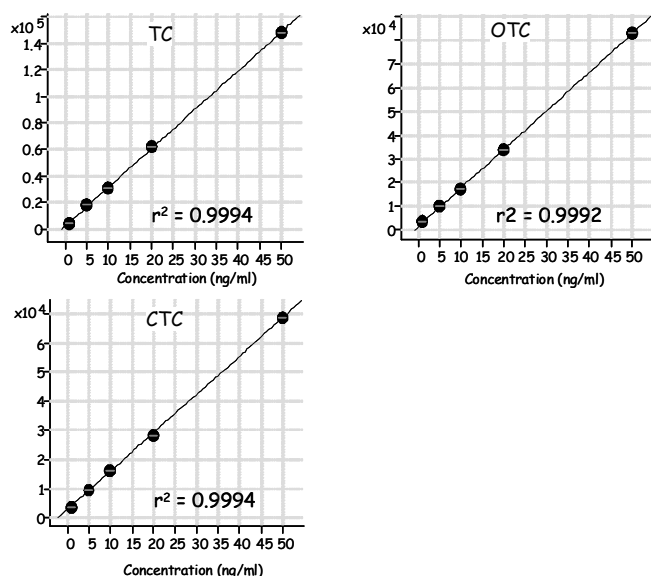


図. 2 各 TC の検量線

3.2 実試料への適応

対象試料にはうなぎ蒲焼及び牛肉を使用し、試料前処理は通知法に準じて実施しました。各試料は今回の3種類のTCは検出されませんでした。そこで抽出液中に試料中濃度として 1ng/g 相当の標準品を添加した試料のMRMクロマトグラムを図. 3 に示します。うなぎ蒲焼では標準品でのクロマトグラムと比較してうなぎ蒲焼由来のピークは全く観察されず、標準品での強度に対する相対強度も 104~112%と顕著なマトリックス効果もありませんでした。一方、牛肉に関しては、TC と OTC のクロマトグラムにおいて試料由来の妨害ピークが観察されました。特に OTC に関しては妨害ピークとの分離は不十分でしたが、妨害ピークの強度が低いことから定量値には大きく影響しませんでした。従って、牛肉中での各 TC の相対強度は 113~116%と若干高い値でしたが顕著な試料マトリックスによるイオン化抑制は認められませんでした。

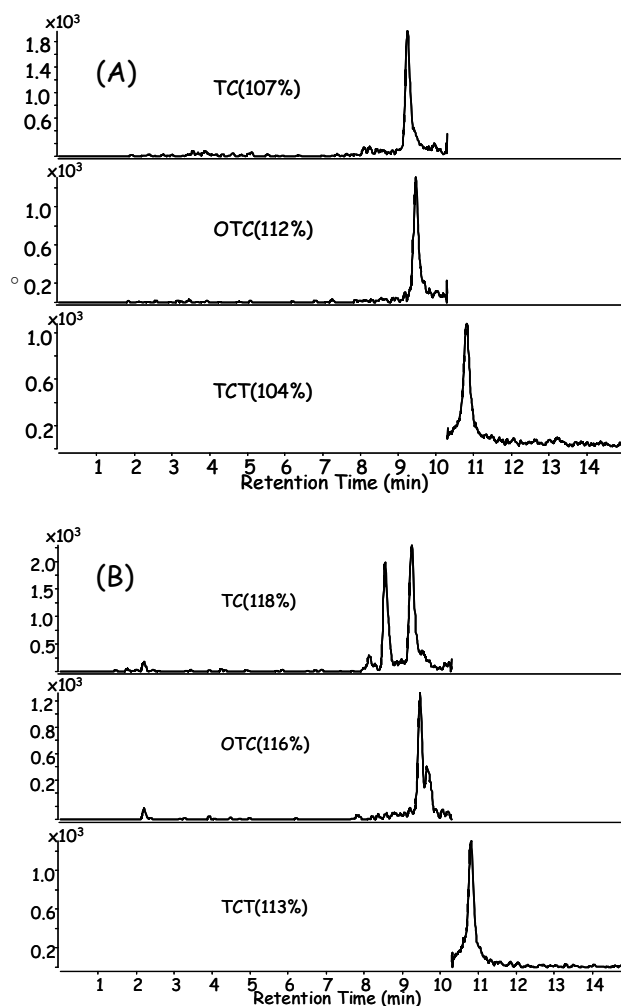


図. 3 うなぎ蒲焼抽出液 (A) 及び牛肉抽出液 (B) 中各 TC のMRM クロマトグラム

*添加濃度: 試料中換算 1ng/g

4. まとめ

今回、LC-MS/MS を用いた 3 種類のテトラサイクリン系抗生物質の分析法を紹介しましたが、MRM 法を使用することで 1ng/mL 以下の高感度分析が可能であり、また実試料中においても妨害成分の影響なく測定が可能であり MRM 法の高い選択性が実証できました。

【LCMS-200802TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp