

# オートサンプラーの自動希釈機能を用いた テトラサイクリン類のスクリーニング分析

岩田 奈津紀

## ユーザーベネフィット

- ◆ オートサンプラーの自動希釈機能により、前処理の手間が省けます。
- ◆ 金属配位性物質のピークのテーリングを抑制できます。

## ■はじめに

動物用医薬品は、感染症の予防・治療薬として専ら動物に用いられる物質で、代表的なものに抗菌性物質（抗生物質、合成抗菌剤）などが挙げられます。しかし、これらは意図せず畜水産物に残留している場合があります。アレルギー、耐性菌出現の原因となることがあります。人が安心して食することができるように人の健康に害を与えない量を考慮して、各国で最大残留基準（Maximum Residue Limit; MRL）が設定されています<sup>1)</sup>。一方、各国で違反事例の報告があり、検査対象成分も多いため、多成分の迅速一斉分析や高感度分析を理由に、LC/MSで分析されることも増えています。しかし、LC/MS分析で使用される移動相の場合、金属配位性のテトラサイクリン類は、LCシステムやカラムに使用される金属材質、カラム充填剤表面の残存金属などに吸着します。したがって、現在でも金属吸着を抑制する移動相を用いて、HPLCで分析されることが多いです。

ここでは、食品衛生検査の前処理の効率化を見据えたオートサンプラーの自動希釈モードによるテトラサイクリン類の分析例をご紹介します。

## ■自動前処理機能

Nexera liteには、オートサンプラーの自動前処理機能が搭載されています。この自動前処理機能には、希釈、試薬添加、共注入などのモードがあります。本稿では、希釈モードを用いた例をご紹介します。希釈モードは、任意倍率の希釈試料を自動調製し、そのまま分析カラムへ導入することが可能です。希釈倍率や混合動作に関する条件はワークステーション LabSolutions™で設定します。図1に希釈モードの設定画面を示します。

モード 希釈

---

**バイアル設定**

	トレイ番号	バイアル番号	オフセット
原液バイアル:	自動設定	1	27
希釈液バイアル:	バイアル指定	3	1

**希釈設定**

希釈後の容量:	200 $\mu$ L
希釈倍率:	4 -> 希釈後濃度: 25 %

**ミキシング設定**

ミキシング回数:	5	ミキシング容量:	50 $\mu$ L
ミキシング上部空気:	<input checked="" type="radio"/> あり <input type="radio"/> なし	待ち時間:	0.1 min

図1 希釈モードの設定画面

## ■テトラサイクリン類混合標準溶液の分析

テトラサイクリン類は、各国で違反事例の多い抗生物質の一種です。厚生労働省監修の「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」<sup>2), 3)</sup>にも示されているように、テトラサイクリン類のHPLC分析では、移動相にイミダゾール緩衝液と有機溶媒の混合溶液を使用します。

ここでは、希釈モードを用いてテトラサイクリン類を分析しました。表1に分析条件を、表2に移動相および希釈液の調製方法を示します（次頁）。なお、表1、2は上記試験法に記載の条件を参考にしました。オートサンプラーの希釈モードの設定は図1の通りです。メタノールで調製したテトラサイクリン類混合標準溶液を希釈液で4倍に自動希釈しました。図2にテトラサイクリン類混合標準溶液（メタノールで調製、希釈前の濃度：各100  $\mu$ g/L）のクロマトグラムを示します。この濃度は、上記試験法で提示されている前処理工程の内、固相抽出までの操作を行った際の基準値濃度（0.2 mg/kg）に相当します。本稿の方法を用いると、ホモジナイズ、抽出、脱脂、固相抽出、濃縮乾固、再溶解の6工程の内、濃縮乾固および再溶解の2工程を省略できます。

一方で、イミダゾール緩衝液の移動相を用いたとしても使用するカラムによっては、カラムへの吸着が抑制できない場合があります。本稿では、Shim-pack™ FC-ODSを用いることで、テーリングせずシャープなピーク形状が得られました。この時、クロルテトラサイクリン（ピーク3）のS/Nは36でした（計算方法：ASTM、範囲：5～15分、区間：0.5分）。

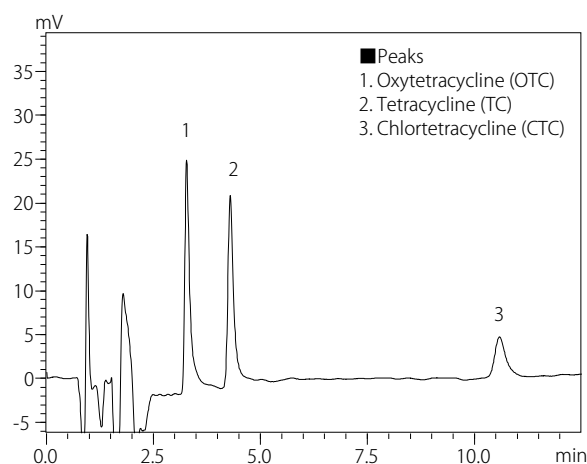


図2 テトラサイクリン類混合標準溶液（各100  $\mu$ g/L）のクロマトグラム（自動希釈後の濃度：各25  $\mu$ g/L）

表1 分析条件

System	: Nexera lite
Column	: Shim-pack FC-ODS <sup>†1</sup> (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: A) 1 mol/L magnesium imidazole buffer (pH 7.2) B) methanol A/ B = 78 : 22
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 100 μL
Vial for samples and mixing	: Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene <sup>†2</sup>
Vial for diluent	: Shimadzu Vial, LC, 4mL, Polypropylene <sup>†3</sup>
Detection	: Ex: 380 nm, Em: 520 nm (RF-20AXS)

\*1 P/N: 228-40511-93 \*2 P/N: 228-31600-91 \*3 P/N: 228-31537-91

表2 移動相および希釈液の調製方法

Mobile phase A	1 mol/L magnesium imidazole buffer (pH 7.2) Add 68.08 g of imidazole, 0.37 g of EDTA·2Na and 10.72 g of magnesium acetate into 800 mL of ultrapure water, and dissolve completely. Adjust the pH to 7.2 with acetic acid, and add ultrapure water to make 1000 mL using volumetric flask. Then, filter under reduced pressure with a 0.22 μm membrane filter.
Diluent	1.36% potassium phosphate solution Add 1.36 mg of potassium dihydrogen phosphate into 100 mL of ultrapure water, and dissolve completely.

## ■ 再現性

自動希釈機能を用いて、混合標準溶液（希釈前の濃度：各100 μg/L）の6回繰り返し分析を行いました。表3に保持時間と面積の再現性（%RSD）を示します。

表3 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Compound	Retention time	Peak area
OTC	0.06	5.69
TC	0.03	2.85
CTC	0.03	1.42

## ■ オートサンプラーのサンプルセット

図3にオートサンプラーへのセット例を示します。希釈液は消費量が多いため、4 mLのバイアルを使用しました。また、サンプルラック3には、4 mLバイアル用のサンプルプレートを使用しました。Nexera liteはプレートの自動認識機能があるため、このプレートをラックにセットするだけですぐに使用できます。つまり、ニードル位置のティーチング作業は不要です。このように、容量の異なるバイアルを同時にセット可能です。

分析開始前に、希釈液（水色）、試料（橙色）および混合用バイアル（緑色）をサンプルラックにセットしました。希釈液は4 mLのポリプロピレン（PP）製バイアルを使用しました。試料および混合用バイアルには、1 mLのPP製バイアルを使用しました。

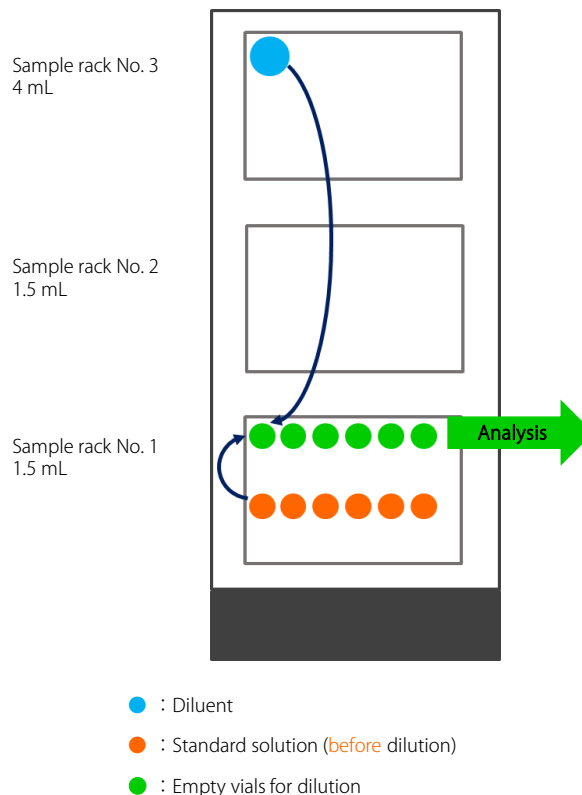


図3 オートサンプラーへのセット例

## ■ まとめ

オートサンプラーによる自動希釈を行うことで、手動による前処理の省力化が可能でした。この方法によって、実サンプルの前処理工程の内、濃縮乾固および再溶解の2工程が省略できます。したがって、スクリーニング用途でテトラサイクリン類を分析する際には、業務の効率化が図れます。

### [参考文献]

- 1) 食品に残留する農薬等に関する新しい制度（ポジティブリスト制度）について、厚生労働省
- 2) 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、食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（平成17年1月24日）
- 3) 厚生労働省監修「食品衛生検査指針（動物用医薬品・飼料添加物編）」、p. 68～79、（社）日本食品衛生協会（2003）

Nexera、LabSolutionsおよびShim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。