

# 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(2)

岩田 奈津紀、加藤 理英

## 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。
- ◆ 畜水産物試料にも適用でき、迅速なスクリーニング分析が可能です。

## ■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。中でも、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。

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>。

アプリケーションニュースNo. 01-00224A-JPでは、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混合標準溶液の分析についてご紹介しました。ここでは、既報分析条件を畜水産物試料に適用したスクリーニング分析例についてご紹介します。

## ■前処理

試料は鶏の胸肉、豚のヒレ肉およびエビを用いました。前処理方法は、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>を参考にしました。この試験法では、ホモジナイズ、抽出、脱脂、固相抽出、濃縮乾固、再溶解の6工程が示されています。しかし、本稿では、濃縮乾固および再溶解の2工程を省略し、前処理の効率化を図りました。図1に前処理プロトコルを、表1に抽出液であるEDTA含有クエン酸緩衝液の調製方法を示します。固相抽出カートリッジには、ジューエルサイエンス製 InertSep HLB FFを用いました。

表 1 抽出液の調製方法

Extracting solution	Citrate buffer containing EDTA 1 <sup>st</sup> solution: Add 21.0 g of citrate acid into 1,000 mL of ultrapure water, and dissolve completely.
	2 <sup>nd</sup> solution: Add 71.6 g of disodium hydrogen phosphate into 1,000 mL of ultrapure water, and dissolve completely. Dissolve 1.86 g of EDTA·2Na in a mixed solution of 307 mL of the 1 <sup>st</sup> solution and 193 mL of the 2 <sup>nd</sup> solution.

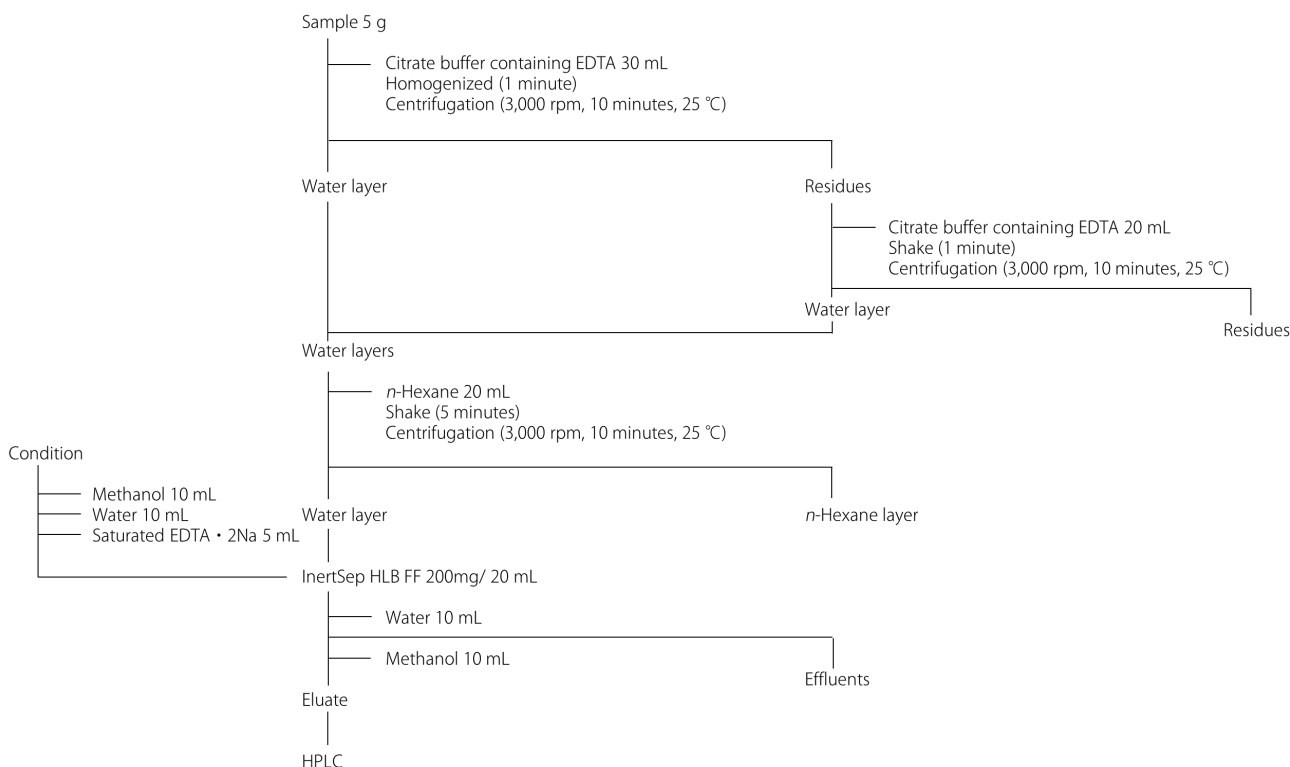


図 1 前処理プロトコル

## ■ オートサンプラーのサンプルセット

図2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シリーズのオートサンプラーはプレートの自動認識機能を有しているため、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。

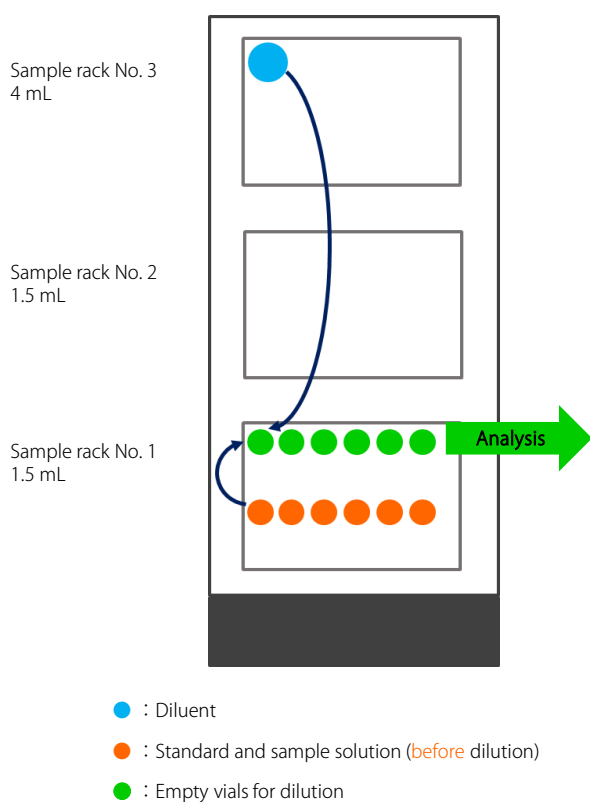


図2 オートサンプラーへのセット例

## ■ 分析条件

オートサンプラーの自動希釈機能を用いて試料中のテトラサイクリン類を分析しました。表2に分析条件を、表3に移動相および希釈液の調製方法を示します。

また、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3にオートサンプラーの希釈モードの設定画面を示します。本稿では、図1の前処理から得られた試料溶液を希釈液で4倍に自動希釈しました。

なお、混合標準溶液（自動希釈前の濃度：各100 µg/L）の6回繰り返し分析による再現性の結果については、アプリケーションニュースNo. 01-00224A-JPをご参照ください。

表2 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, 1 mL, Polypropylene*2
Vial for diluent	: Shimadzu Vial, LC, 4 mL, Polypropylene*3
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3 移動相および希釈液の調製方法

Mobile phase A	<u>1 mol/L (Magnesium) imidazole buffer (pH 7.2)</u> 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	<u>1.36% Potassium phosphate solution</u> Add 1.36 mg of potassium dihydrogen phosphate into 100 mL of ultrapure water, and dissolve completely.

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 µL		
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 µL
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3 希釈モードの設定画面

## ■鶏肉、豚肉、エビのスクリーニング分析

図4～図6にそれぞれ鶏の胸肉、豚のヒレ肉およびエビのクロマトグラムを示します。比較のため、混合標準溶液（自動希釈前の濃度：各100 µg/L、メタノールで調製）のクロマトグラムを重ね書きしました。この濃度は、図1の前処理を行った際の基準値濃度（0.2 mg/kg）に相当します。いずれの試料からもテトラサイクリン類は検出されませんでした。

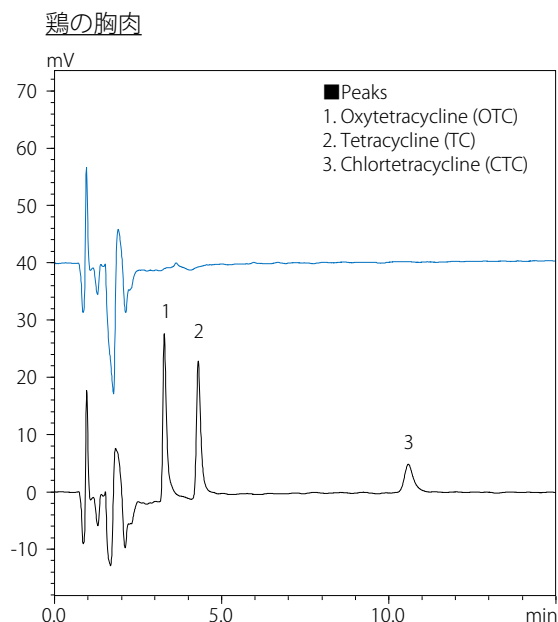


図4 鶏の胸肉のクロマトグラム  
(青線：鶏の胸肉、黒線：標準溶液)

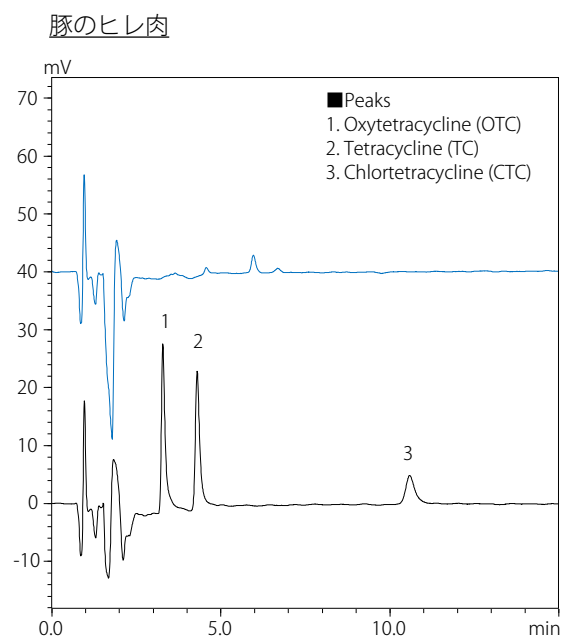


図5 豚のヒレ肉のクロマトグラム  
(青線：豚のヒレ肉、黒線：標準溶液)

## エビ

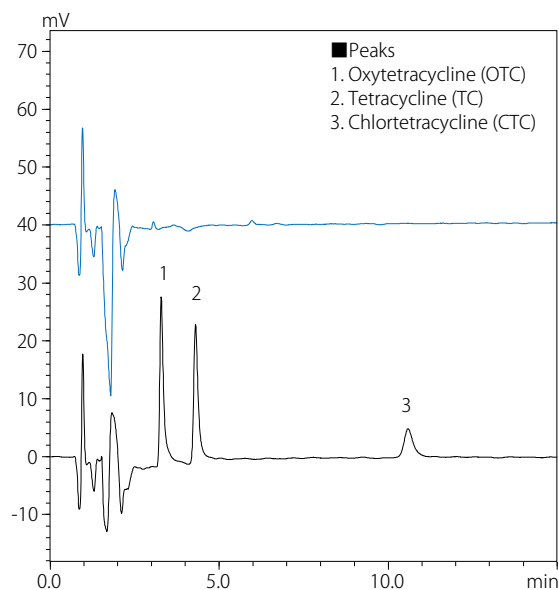


図6 エビのクロマトグラム  
(青線：エビ、黒線：標準溶液)

## ■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工程（約1時間相当）が省略できました。以上より、テトラサイクリン類のスクリーニング検査において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、Shim-packおよびLabSolutions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。