

クロルテトラサイクリン

Chlortetracycline

IUPAC 名：[4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$)]-7-chloro-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenicarboxamide

テトラサイクリン

Tetracycline

IUPAC 名：[4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$)]-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenicarboxamide

オキシテトラサイクリン

Oxytetracycline

IUPAC 名：[4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 α ,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$)]-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenicarboxamide

イソクロルテトラサイクリン

Isochlortetracycline

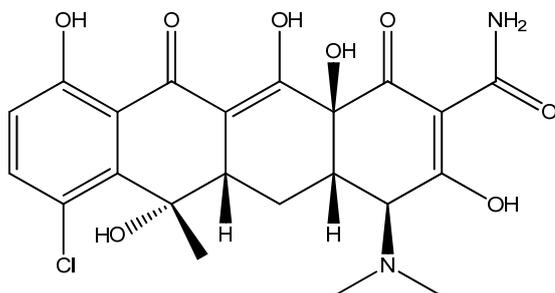
IUPAC 名：(4S,4aS,6S,8aS)-6-[(1S)-7-chloro-1,3-dihydro-4-hydroxy-1-methyl-3-oxo-1-isobenzofuranyl]-4-dimethylamino-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-3,8a-dihydroxy-1,8-dioxo-2-naphthalenicarboxamide

ドキシサイクリン

Doxycycline

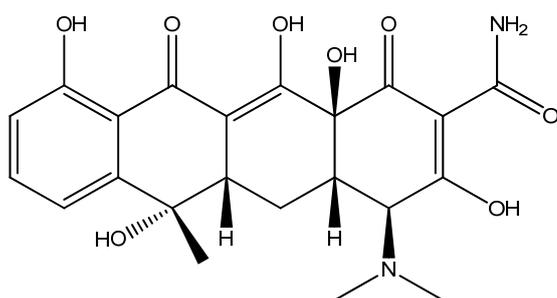
IUPAC 名：[4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 α ,5 $\alpha\alpha$,6 α ,12 $\alpha\alpha$)]-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenicarboxamide

【対象物質の構造】



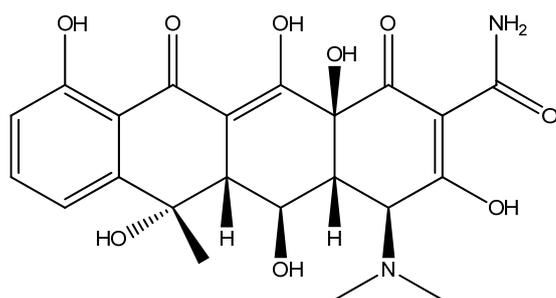
Chlortetracycline (CTC)

CAS 番号 : 57-62-5
分子式 : $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$



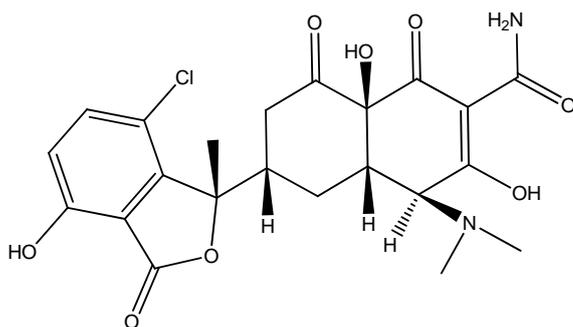
Tetracycline (TC)

CAS 番号 : 60-54-8
分子式 : $C_{22}H_{24}N_2O_8$



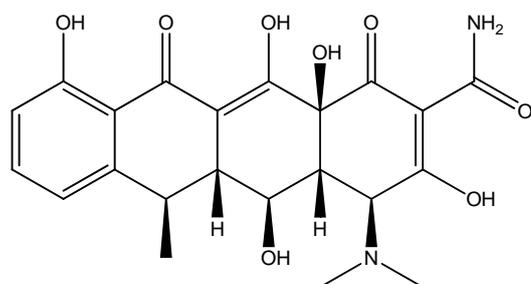
Oxytetracycline (OTC)

CAS 番号 : 79-57-2
分子式 : $C_{22}H_{24}N_2O_9$



Isochlortetracycline (ICTC)

CAS 番号 : 514-53-4
分子式 : $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$



Doxycycline (DC)

CAS 番号 : 564-25-0
分子式 : $C_{22}H_{24}N_2O_8$

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モル比質量)	融点 (°C)	沸点 (°C)	蒸気圧 (mm Hg)	水溶解度 (g/L)	log P _{ow}
クロルテトラサイ クリン (CTC)	478.885 (478.114)					-0.68 ¹⁾
テトラサイクリン (TC)	444.435 (444.153)				1.7 ²⁾	-1.19 ²⁾
オキシテトラサイ クリン (OTC)	460.434 (460.148)	184.5-185.5 ³⁾			1 ²⁾	-1.22 ²⁾
イソクロルテトラ サイクリン(ICTC)	478.885 (478.114)	202-205 ⁴⁾				
ドキシサイクリン (DC)	444.435 (444.153)					-1.36 ¹⁾

【毒性、用途】

物質名	毒性	用途
CTC	-	動物薬（抗生物質） ⁵⁾
TC	-	医薬（眼科用剤）、動物薬 ⁶⁾
OTC	急性経口毒性(LD ₅₀): 9000 mg/kg (ラット) ³⁾ EC ₅₀ : 73 mg/L(48時間) (オミシンコ) ³⁾	農薬(殺菌剤) ^{3,6)} 、医薬(歯 科用剤) ⁷⁾
ICTC	-	-
DC	-	動物薬（抗生物質） ⁵⁾ 、医 薬 ⁷⁾

出典：

- 1) Syracuse Research Corporation(SRC), KOWWIN (計算値)
- 2) Tolls, J., *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 3397-3406
- 3) 農薬ハンドブック 2011 年版, 日本植物防疫協会
- 4) Tronto Research Chemicals 試薬カタログ
- 5) 独立行政法人製品評価技術基盤機構ホームページ「化学物質総合情報提供システム(CHRIP)」(<http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>)
- 6) 15107 の化学商品, 化学工業日報社 (2007)
- 7) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構ホームページ(<http://www.pmda.go.jp/>)

§ 1 分 析 法

(1) 分析法の概要

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、固相カートリッジに通水した後、メタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v)で溶出し、LC/MS/MS-SRM 法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品	: 和光純薬工業製 高速液体クロマトグラフ用 (含量 98.8%)
テトラサイクリン塩酸塩標準品	: 和光純薬工業製 高速液体クロマトグラフ用 (含量 99.3%)
オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品	: 和光純薬工業製 高速液体クロマトグラフ用 (含量 98.2%)
イソクロルテトラサイクリン	: Tronto Research Chemicals (含量 95%)
ドキシサイクリン塩酸塩	: MP Biomedicals 製
アセトニトリル	: 和光純薬工業製 LC/MS 用
メタノール	: 和光純薬工業製 LC/MS 用
ギ酸	: 和光純薬工業製 LC/MS 用
塩酸	: 和光純薬工業製 有害金属測定用
EDTA-2Na	: 同仁化学研究所製 試験研究用
精製水	: 超純水製造装置 MilliQ Integral (MERCCK MILLIPORE 製) により精製
固相カートリッジ	: Oasis HLB Plus type 225 mg Waters 製

【標準液の調製】

〔標準原液〕

CTC、TC、OTC、DC は標準試薬が塩酸塩のため、塩酸の重量を加味してそれぞれ 10.8 mg を正確に量り取り、メタノール 100 mL に溶解し、各 100 µg/mL の標準原液を調製する。ICTC は、10.0 mg を正確に量り取り、メタノール 100 mL に溶解し 100 µg/mL の標準原液を調製する (注 1)。

〔検量線用標準液〕

標準原液をメタノール / 0.1%ギ酸水溶液(2:8, v/v)で適宜希釈し、0.100 ng/mL ~ 100 ng/mL の検量線用標準液を作成する (注 1)。

【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、ホールピペット、メスピペット、駒込ピペット、パストゥールピペット、PP 製目盛付受器(10-15 mL) (注2)

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)における「試料の採取方法および検体の調製等」に従う。

なお、試料は採取後直ちに EDTA-2Na を試料 100 mL あたり 0.1 g 添加し、よく振り混ぜ EDTA-2Na を溶解させた後、10°C 以下の冷暗所に保管する(注3)。

【試料の前処理及び試験液の調製】

試料採取時に EDTA-2Na が添加された水質試料 100 mL を、メタノール 10 mL、0.1 mol/L 塩酸 10 mL (注4)、精製水 10 mL で順次コンディショニングした固相カートリッジ(Oasis HLB)に 10~20 mL/min で通水する。通水終了後、固相カートリッジを 20 mL 程度の精製水で洗浄し(注5)、そのままアスピレーターで 3 分間吸引し、間隙水を除去する。固相カートリッジを逆向きにして、逆方向からメタノール/0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v) 4 mL で溶出する。この溶出液を 0.1%ギ酸水溶液で 10 mL に定容し、試験液とする(注6)。

【空試験液の調製】

試料と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS/MS 測定条件〕(注7)

〔LC 条件〕(注8)

使用機種	: SHIMADZU 製 LC-20 Series
カラム	: SUPELCO 製 Ascentis Express C18 (2.1 mm×150 mm, 2.7 μm)
移動相	: A: 0.2%ギ酸水溶液、B: アセトニトリル
	0→9 min A: 90→40、B: 10→60 linear gradient
	9→10 min A: 40→10、B: 60→90 linear gradient
	10→14 min A: B=10:90
	14→15 min A: 10→90、B: 90→10 linear gradient
	15→25 min A: B=90:10

カラム流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

試料注入量 : 10 µL

[MS 条件]

使用機種 : AB Sciex 製 API3200
イオン化法 : ESI (+)
ターボガス温度 (TEM) : 700°C
カーテンガス (CUR) : 25 psi
イオンスプレー電圧 (IS) : 5500 V
ネブライザーガス (GS1) : 70 psi
ターボガス (GS2) : 80 psi
コリジョンガス (CAD) : 5

物質名	モニターイオン (<i>m/z</i>)	ドリフト電圧 (DP)	コリジョン電圧 (CE)
CTC	479.3>444.1	31 V	27 V
TC	445.3>410.0	36 V	23 V
OTC	461.3>426.0	31 V	25 V
ICTC (注 9)	479.3>462.1 (479.3>197.2)	41 V (41 V)	25 V (57 V)
DC	445.3>428.1	41 V	23 V

[検量線]

検量線用標準液 10.0 µL を LC/MS/MS に注入し、ピーク面積と標準液濃度を用いて検量線を作成する。

[定量]

試験液 10.0 µL を LC/MS/MS に注入し、ピーク面積より試験液中の濃度を求める (注 10)。

[濃度の算出]

試料水中濃度 C (ng/L) は次式により算出する。

$$C \text{ (ng/L)} = \text{検出濃度 (ng/mL)} \times \text{最終液量 (mL)} / \text{試料量 (L)}$$

[装置検出下限 (IDL)]

本分析に用いた LC/MS/MS (AB Sciex API3200) の IDL を表 1 に示す(注 11)。

表 1 IDL の算出結果

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
CTC	0.052	0.100	10	5.2
TC	0.023	0.100	10	2.3
OTC	0.020	0.100	10	2.0
ICTC	0.026 (0.058)*	0.100	10	2.6 (5.8)*
DC	0.035	0.100	10	3.5

* : () は、モニターイオン m/z 479.3>197.2 のときの値。

〔測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL)〕

本測定方法における MDL 及び MQL を表 2 に示す (注 12)。

表 2 MDL 及び MQL 算出の結果

物質名	媒体名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
CTC	水質	0.100	10	6.2	16
TC	水質	0.100	10	3.0	7.7
OTC	水質	0.100	10	2.9	7.4
ICTC	水質	0.100	10	2.8 (7.8)*	7.1 (20)*
DC	水質	0.100	10	4.2	11

* : () は、モニターイオン m/z 479.3>197.2 のときの値。

注解

(注 1) 対象物質は不安定で、特に CTC、TC 及び ICTC は、特定の立体異性体 (エピマー) へ徐々に変換されるため、標準原液は -20°C で保存する。-20°C で保存すれば、1 ヶ月程度は安定である。また、検量線用標準液は、調製後、1 週間以上経過したものは使用せず、その間の保存は 4°C 以下とする。なお、容器は、標準原液についてはガラス製のスタンダードカプセルでも保存可能であるが、対象物質はガラス壁に吸着しやすいため、より低濃度の検量線用標準液の調製はポリプロピレン製の容器を使用する。

(注 2) 対象物質は、金属と反応し容易に錯体を形成するため、使用する器具類

は、あらかじめ洗剤による洗浄のほか、酸洗浄（一夜硝酸槽浸(0.1 mol/L HNO₃)）が必要である。

- (注3) 対象物質は、ガラス壁に吸着しやすいため、採取容器はポリプロピレン製の容器を使用する。また、金属との反応等を抑制するため、EDTA-2Naを添加するとともに、エピマーへの変換を抑制するため、EDTA-2Na添加後、直ちに10°C以下の冷暗所に保管する。
- (注4) 対象物質は、金属と反応し容易に錯体を形成するため、あらかじめ固相カートリッジに残留している金属を0.1 mol/L 塩酸で除去する。
- (注5) 試料を通水した後、固相カートリッジに残留しているEDTA-2Naを取り除くため、多めの精製水で洗浄する。
- (注6) 対象物質は、中性からアルカリ下で不安定で、特にCTCは、この領域で一部がICTCへ変換されるため、試験液の溶媒は、メタノールと0.1%ギ酸水溶液の混合液とする。
- (注7) LC/MS/MSの条件は、本測定に使用した機種特有のものである。また、測定用バイアルは、ポリプロピレン製のバイアルか不活性処理済みのガラス製バイアルを使用する。
- (注8) 試験液は、酸性の溶媒となるため、オートサンブラの洗浄液は、10~20%含水させたアセトニトリルを使用するとよい。
- (注9) ICTCのモニターイオンについては、基本的には、 m/z 479>462を用いるが、図1に示したとおり、 m/z 479>462はCTCも検出されるため、定量に支障を及ぼす場合は、 m/z 479>197を用いる。

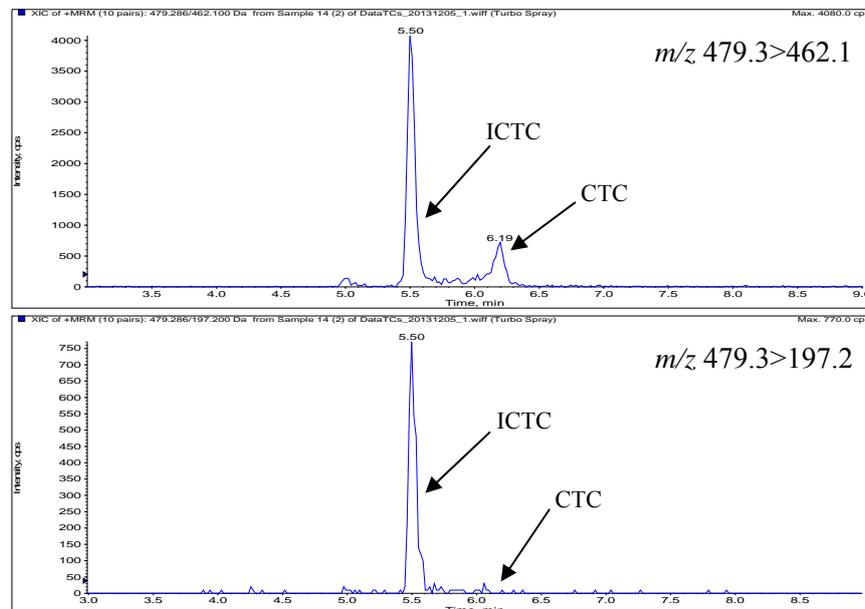


図1 ICTCのSRMクロマトグラム(TCs各2.0 ng/mL混合液)

(注 10) 実際の試料で、対象物質のエピマーも検出された場合は、エピマーのピーク面積を対象物質のピーク面積に足し合わせ、合計したピーク面積から試験液中の濃度を求める。エピマーの確認は、検量線用標準液を常温で 1 週間程度放置すると、一部がエピマーに変換されるため、この標準液を測定することにより確認できる。

(注 11) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って、表 3 のとおり算出した。また、IDL 測定時の SRM クロマトグラムを図 2 に示した。

表 3 IDL の算出結果

物質名	CTC	TC	OTC	ICTC	DC
試料量(水質) (L)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
最終液量 (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.20	0.10	0.10	0.10	0.20
装置注入量 (μL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
結果 1 (ng/mL)	0.204	0.109	0.0896	0.105	0.203
結果 2 (ng/mL)	0.190	0.0992	0.104	0.0916	0.196
結果 3 (ng/mL)	0.195	0.106	0.0903	0.107	0.220
結果 4 (ng/mL)	0.200	0.0992	0.0934	0.103	0.206
結果 5 (ng/mL)	0.217	0.112	0.0915	0.0914	0.210
結果 6 (ng/mL)	0.204	0.0976	0.0894	0.0963	0.193
結果 7 (ng/mL)	0.174	0.110	0.0934	0.0934	0.208
平均値(ng/mL)	0.1977	0.1047	0.09309	0.09824	0.2051
標準偏差(ng/mL)	0.0135	0.00595	0.00509	0.00662	0.00903
IDL(ng/mL)	0.052	0.023	0.020	0.026	0.035
IDL 試料換算値(ng/L)*	5.2	2.3	2.0	2.6	3.5
S/N	14	18	9.5	11	8.5
CV(%)	6.8	5.7	5.5	6.7	4.4

* : IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

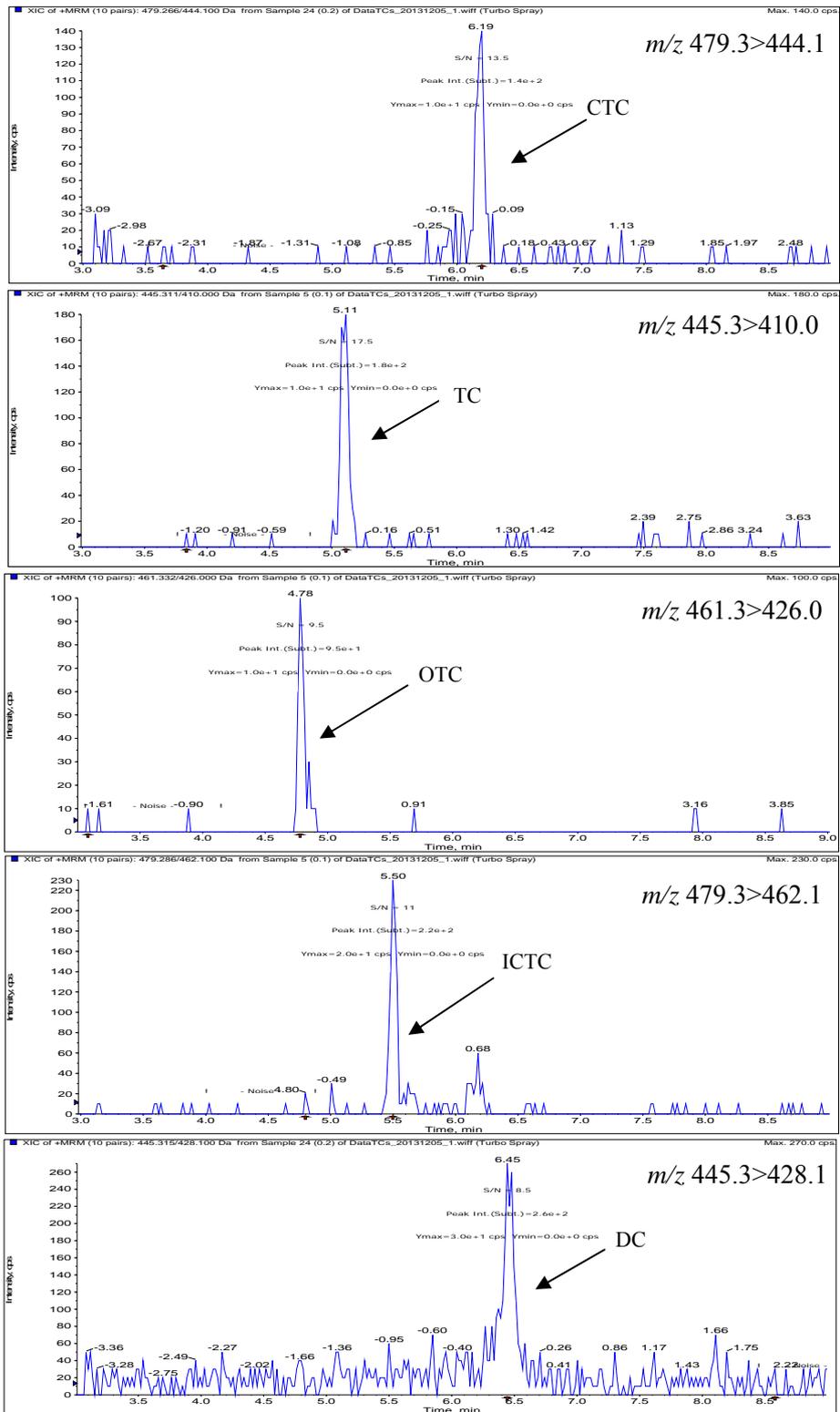


図2 IDL 測定時の SRM クロマトグラム
 (CTC, DC : 0.20 ng/mL , TC, OTC, ICTC : 0.10 ng/mL)

(注 12) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 21 年 3 月)に従って、表 4 のとおり算出した。また、図 3 に MDL 測定時の SRM クロマトグラムを示した。

表 4 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	CTC	TC	OTC	ICTC	DC
試料	海水	海水	海水	海水	海水
試料量 (L)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
標準添加量 (ng)	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00
試料換算濃度 (ng/L)	20.0	10.0	10.0	10.0	20.0
最終液量 (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
注入液濃度(ng/mL)	0.200	0.100	0.100	0.100	0.200
装置注入量 (μL)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1}	< 6.2	< 3.0	< 2.9	< 2.8	< 4.2
無添加平均(ng/L) ^{*2}	< 6.2	< 3.0	< 2.9	< 2.8	< 4.2
結果 1 (ng/L)	17.5	9.17	10.5	9.62	16.4
結果 2 (ng/L)	17.0	10.90	10.0	9.93	17.2
結果 3 (ng/L)	18.7	8.84	9.36	9.15	17.1
結果 4 (ng/L)	16.3	10.60	10.4	8.75	14.9
結果 5 (ng/L)	17.9	10.20	11.2	8.55	16.5
結果 6 (ng/L)	20.9	9.35	11.5	9.23	14.3
結果 7 (ng/L)	16.4	9.87	11.0	10.6	16.1
平均値 (ng/L)	17.81	9.847	10.57	9.404	16.07
標準偏差 (ng/L)	1.60	0.766	0.738	0.708	1.09
MDL (ng/L) ^{*3}	6.2	3.0	2.9	2.8	4.2
MQL (ng/L) ^{*4}	16	7.7	7.4	7.1	11
S/N	12	13	15	12	7.4
CV(%)	9.0	7.8	7.0	7.5	6.8

*1：試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値(n=3)

*2：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=2)

*3：MDL = $t(n-1,0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4：MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

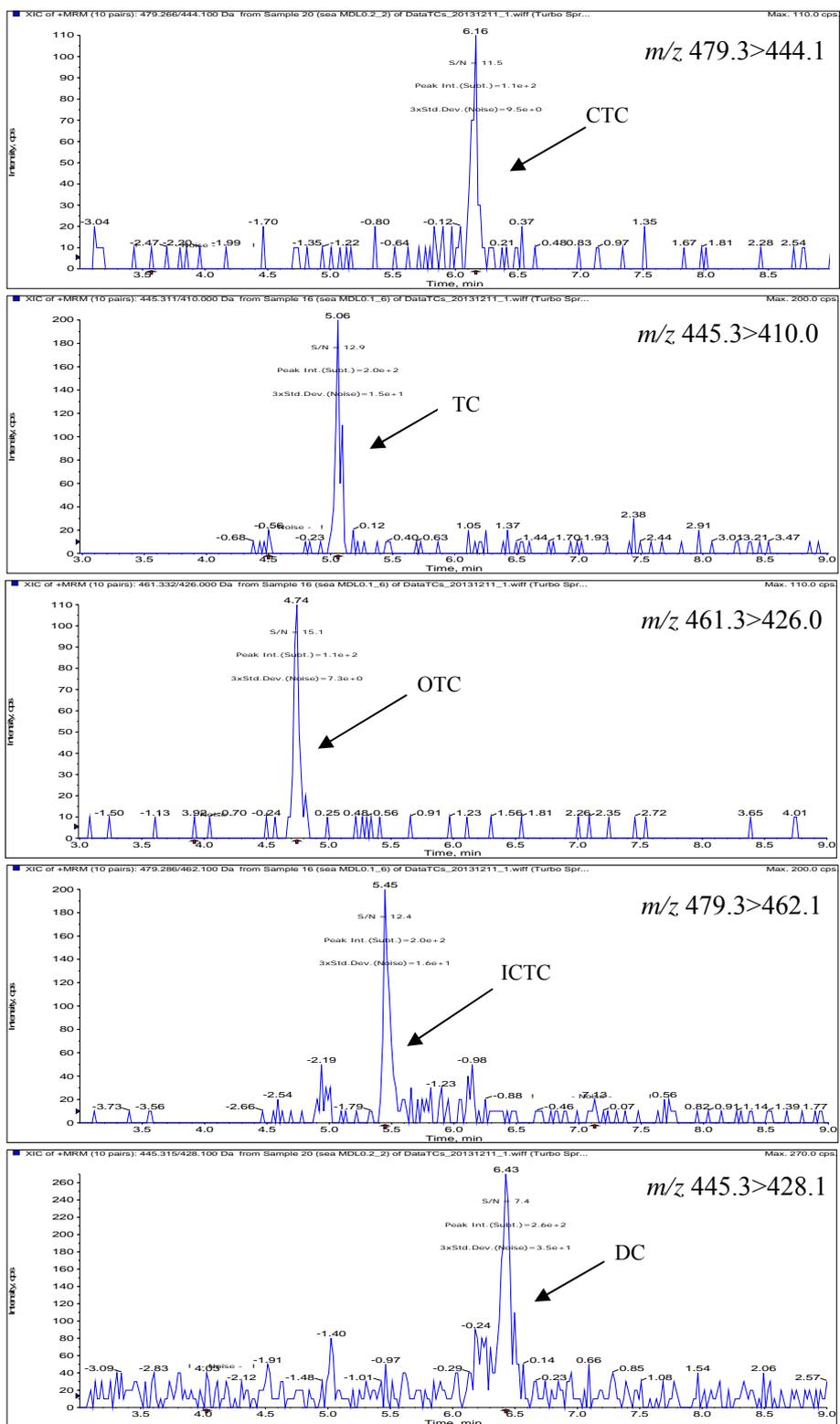


図3 MDL算出時のSRMクロマトグラム

§2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図4に示す。

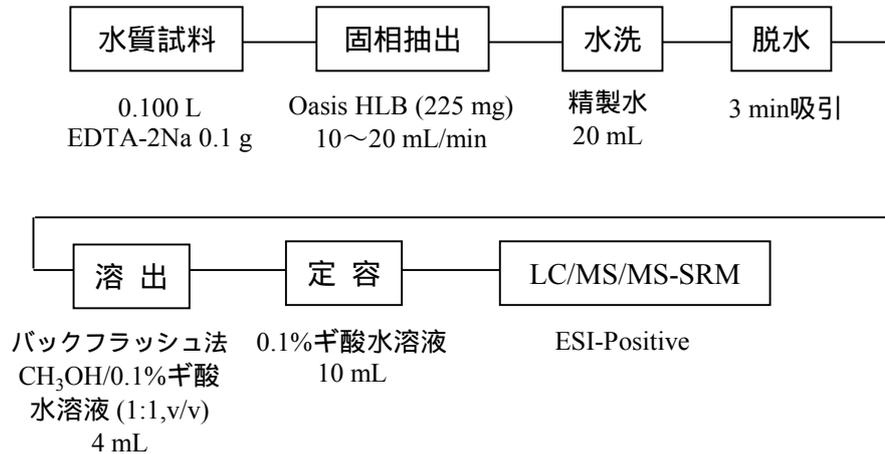


図4 分析法のフローチャート

〔検量線〕

検量線を図5～図9に、検量線作成用データを表5に示す。

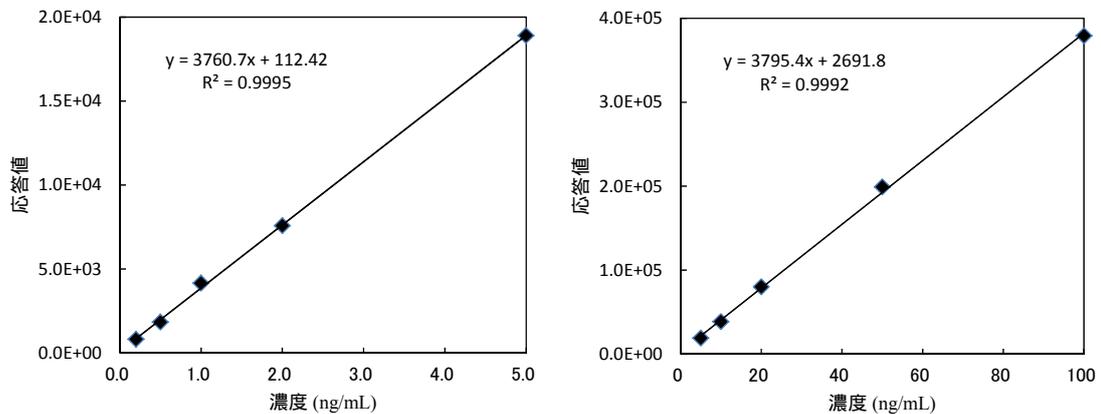


図5 低濃度及び高濃度領域の CTC の検量線
(対象物質濃度範囲 0.20-5.0 ng/mL (図左); 5.0-100 ng/mL (図右))

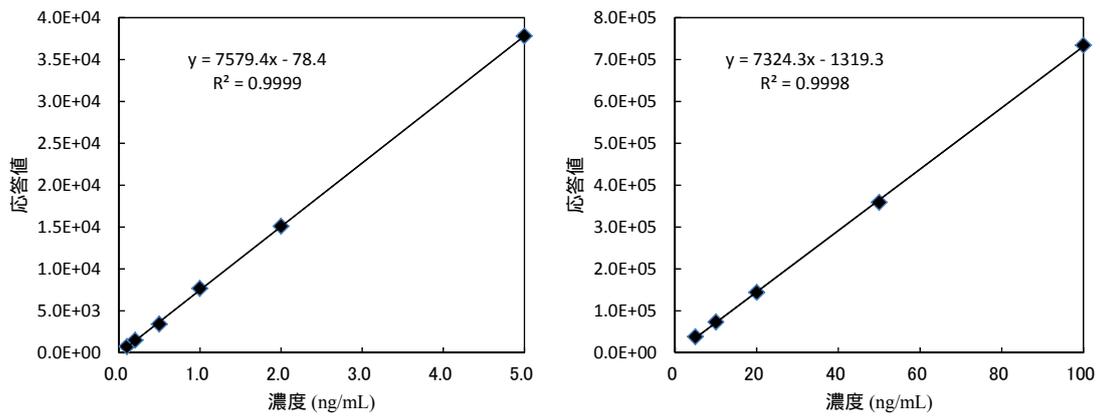


図6 低濃度及び高濃度領域のTCの検量線
(対象物質濃度範囲 0.10-5.0 ng/mL (図左); 5.0-100 ng/mL (図右))

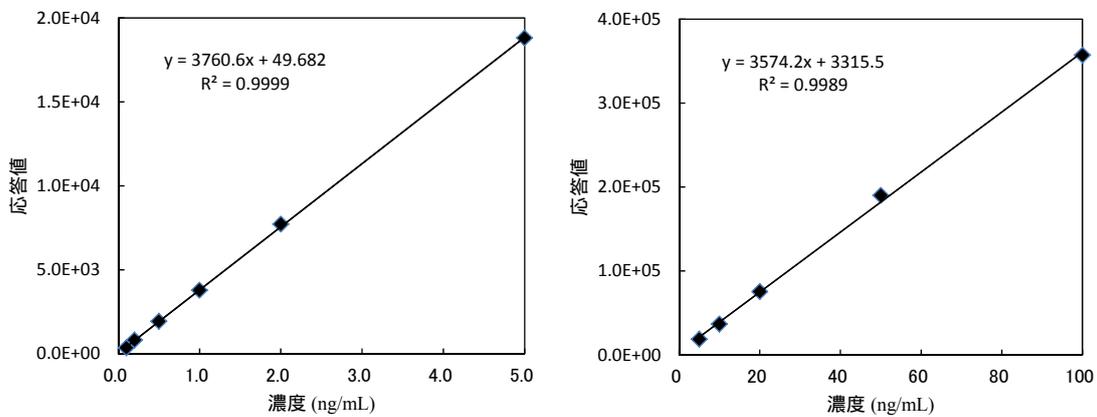


図7 低濃度及び高濃度領域のOTCの検量線
(対象物質濃度範囲 0.10-5.0 ng/mL (図左); 5.0-100 ng/mL (図右))

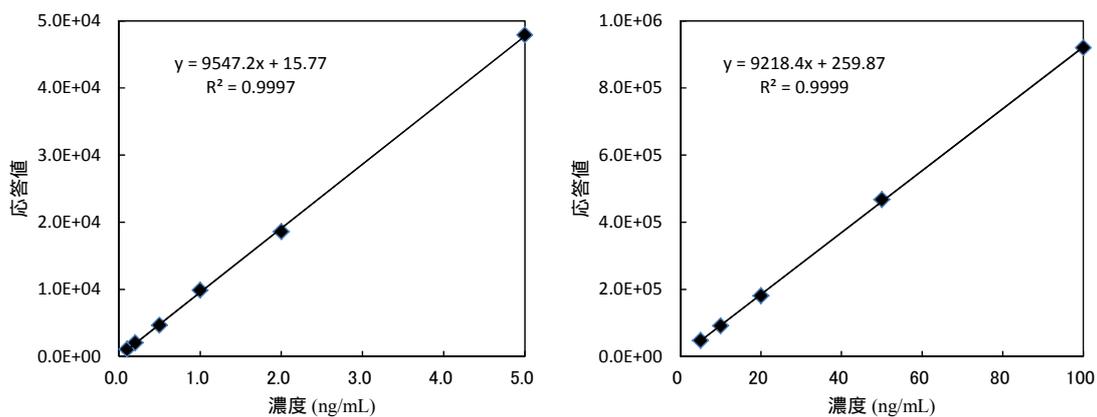


図8 低濃度及び高濃度領域のICTCの検量線
(対象物質濃度範囲 0.10-5.0 ng/mL (図左); 5.0-100 ng/mL (図右))

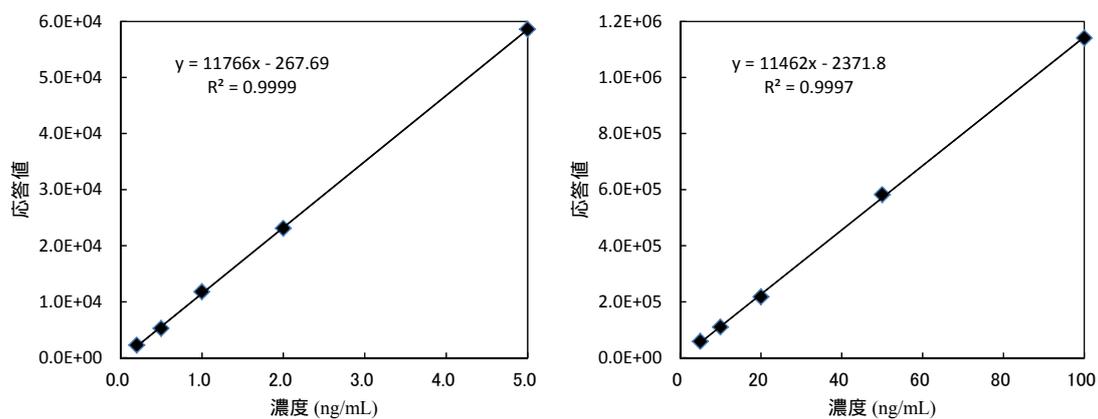


図9 低濃度及び高濃度領域のDCの検量線
 (対象物質濃度範囲 0.20-5.0 ng/mL (図左); 5.0-100 ng/mL (図右))

表5 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値				
	対象物質(As)	対象物質(As)	対象物質(As)	対象物質(As)	対象物質(As)
	[CTC]	[TC]	[OTC]	[ICTC]	[DC]
	(m/z 479>444)	(m/z 445>410)	(m/z 461>426)	(m/z 479>462)	(m/z 445>428)
0.10	-	738	351	1050	-
0.20	820	1480	810	2020	2290
0.50	1830	3430	1930	4660	5240
1.0	4150	7680	3780	9880	11800
2.0	7580	15100	7720	18600	23100
5.0	18900	37800	18800	47900	58600
10	38600	73600	36700	90800	110000
20	80100	144000	75300	181000	218000
50	199000	359000	190000	467000	582000
100	379000	734000	357000	920000	1140000

〔標準液のクロマトグラム〕

標準液の SRM クロマトグラムを図 10 に示す。

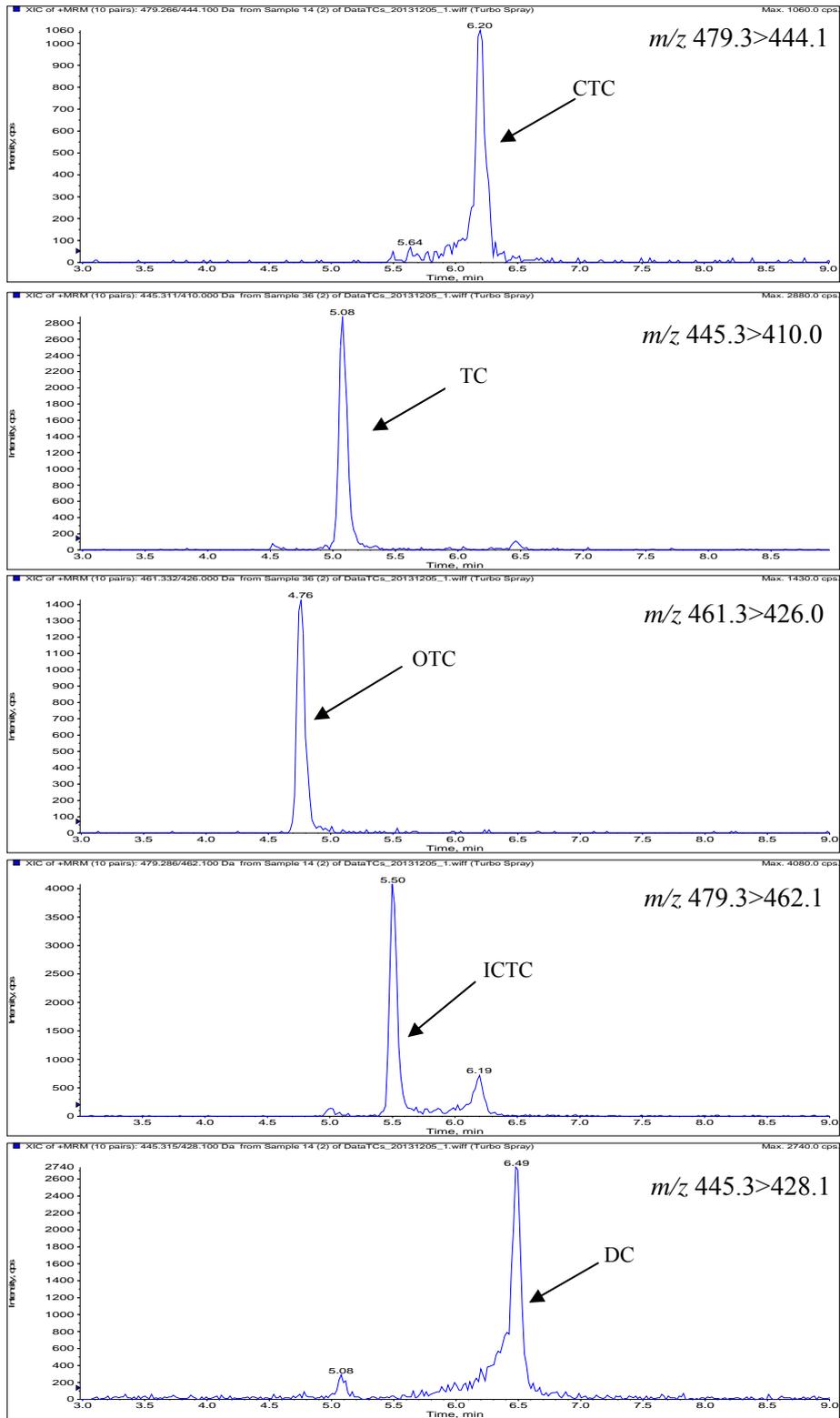


図 10 標準液の SRM クロマトグラム (濃度: 各 2.0 ng/mL)

〔マススペクトル〕

CTC、TC、OTC、ICTC 及び DC のマススペクトルを図 11～図 15 に示す。

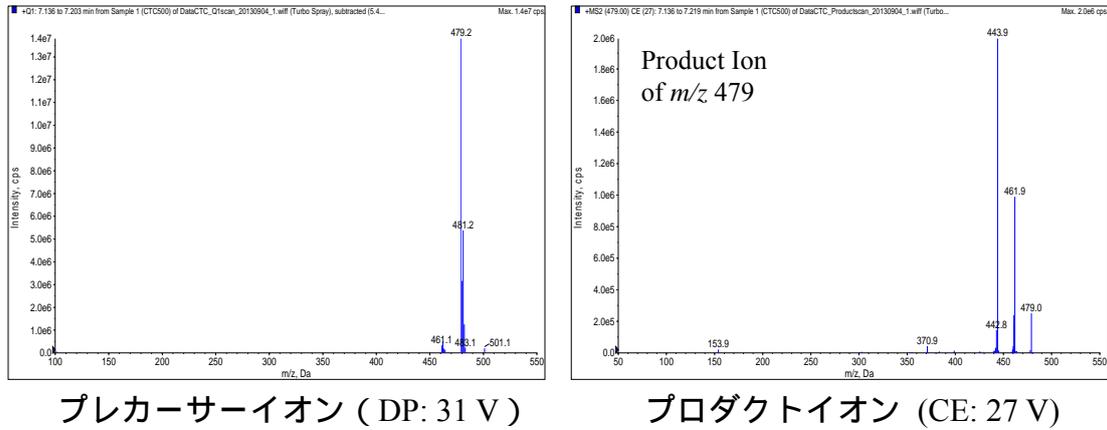


図 11 CTC のマススペクトル

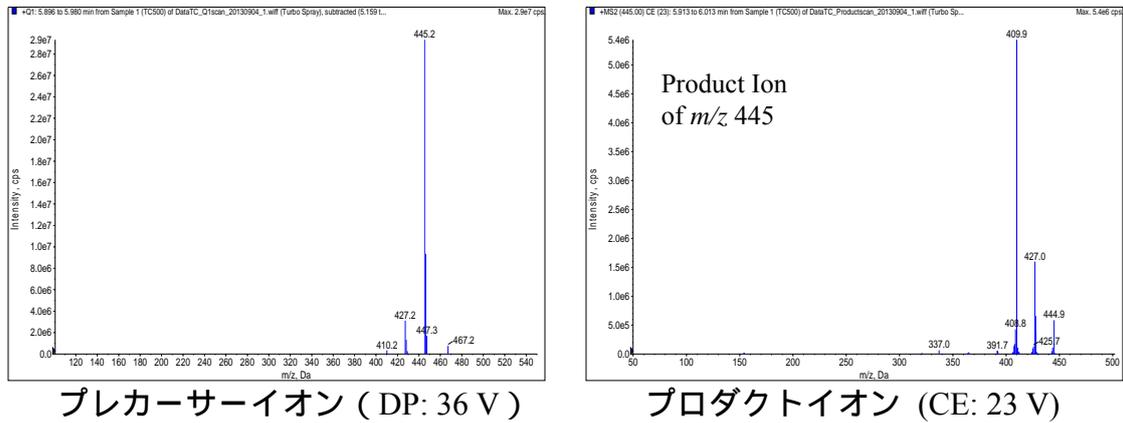


図 12 TC のマススペクトル

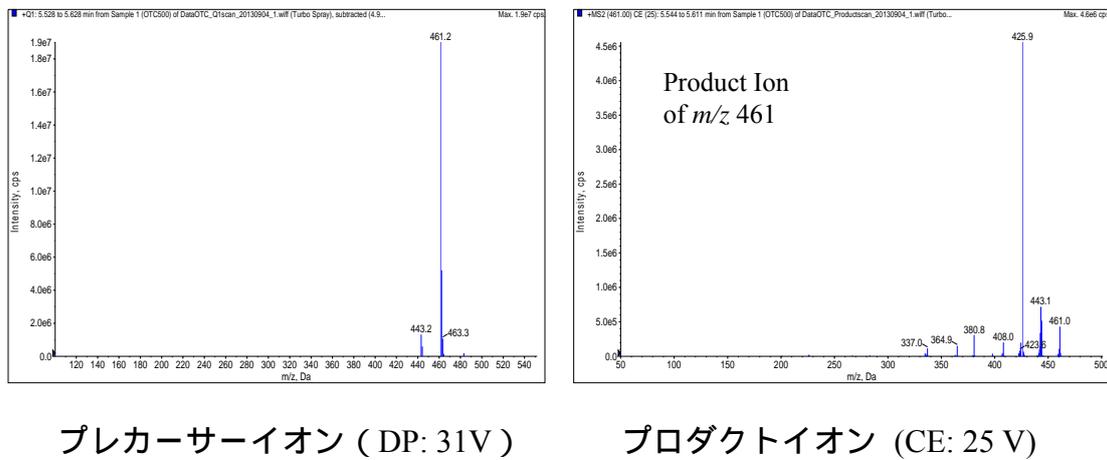
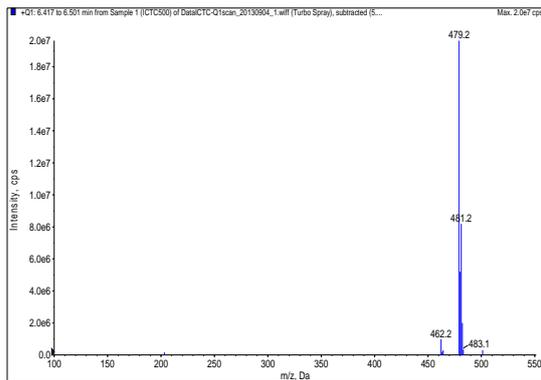
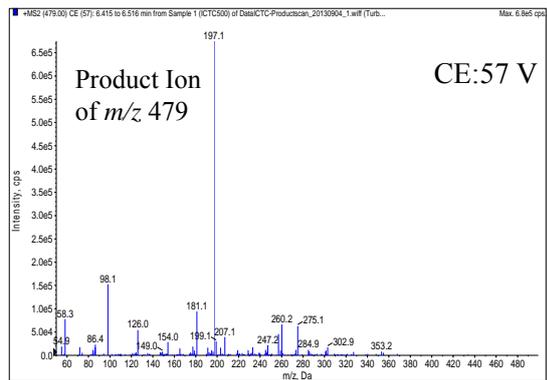
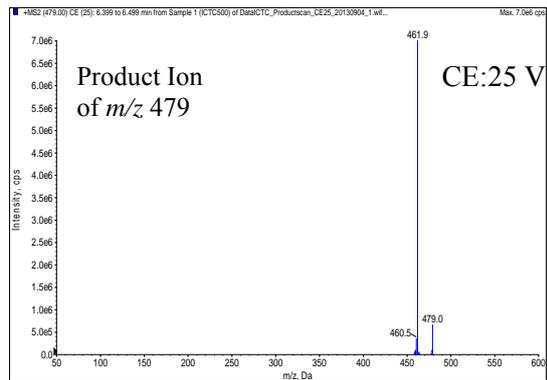


図 13 OTC のマススペクトル

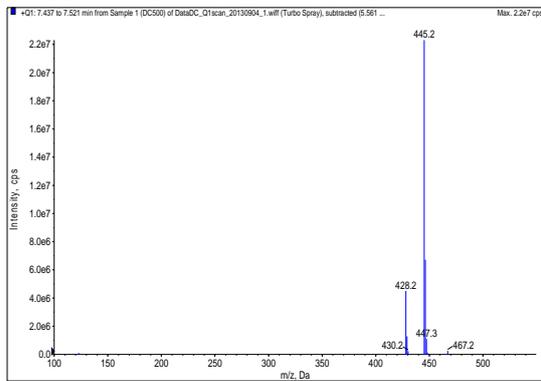


プレカーサーイオン (DP: 41 V)

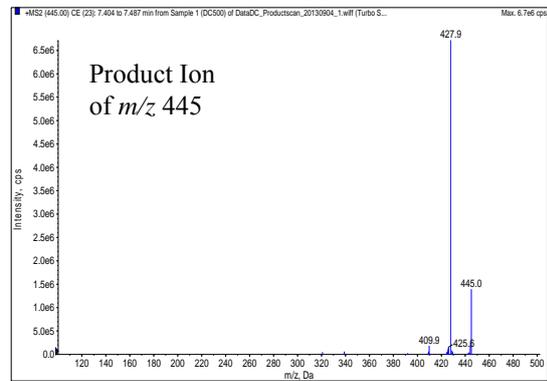


プロダクトイオン

図 14 ICTC のマススペクトル



プレカーサーイオン (DP: 41 V)



プロダクトイオン (CE: 23 V)

図 15 DC のマススペクトル

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクの SRM クロマトグラムを図 16 に示したが、CTC、TC、OTC、ICTC 及び DC は検出されなかった。

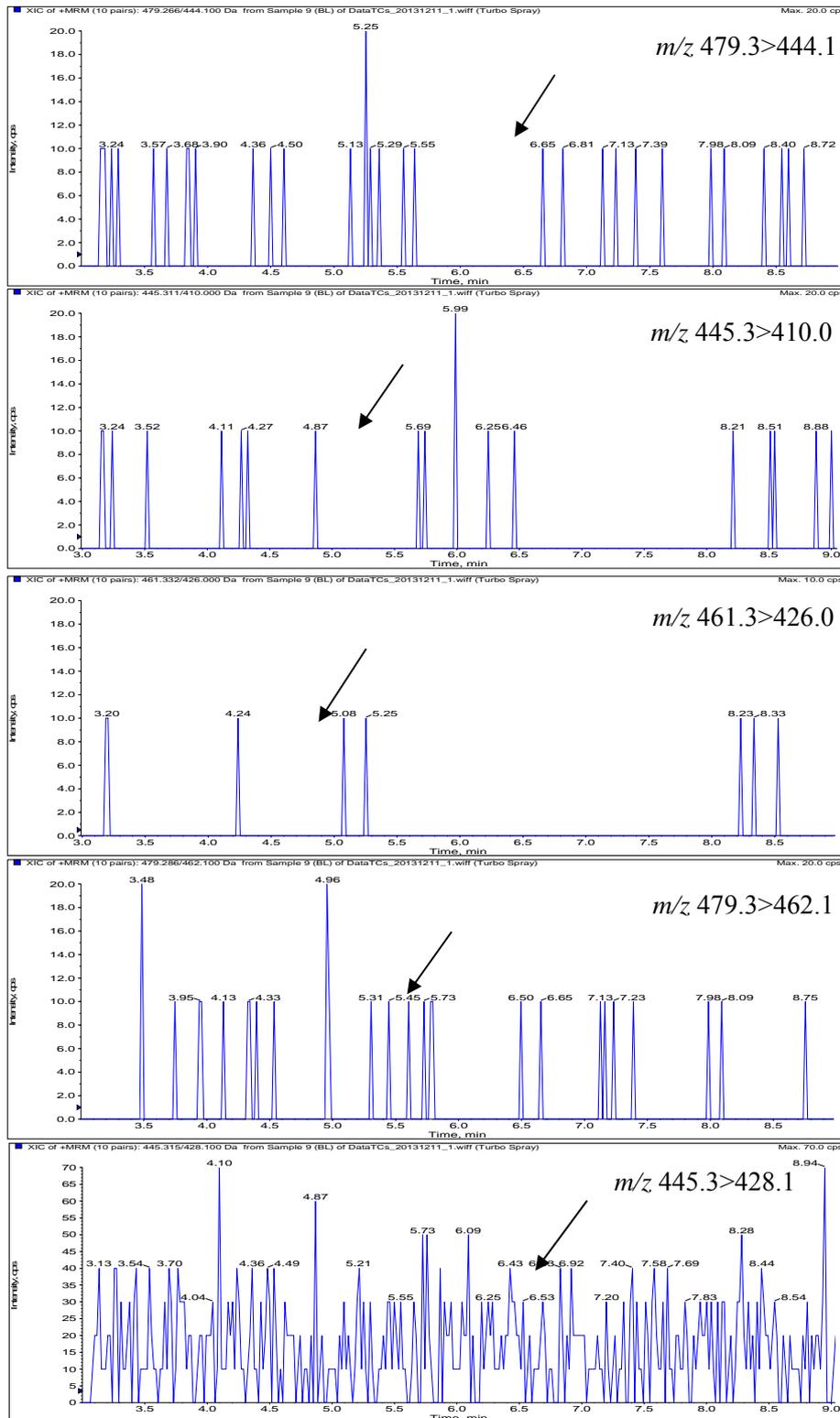


図 16 操作ブランクの SRM クロマトグラム

〔添加回収試験結果〕

精製水、河川水（朝鮮川）及び海水（名古屋港）への標準物質添加回収試験結果を表6に示す。

表6 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (L)	測定 回数	添加量 (ng)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	
精製水	CTC	0.100	3	無添加	< 6.2	-	-	
		0.100	5	20	190	96	4.9	
	TC	0.100	3	無添加	< 3.0	-	-	
		0.100	5	20	200	100	3.5	
	OTC	0.100	3	無添加	< 2.9	-	-	
		0.100	5	20	190	96	1.9	
	ICTC	0.100	3	無添加	< 2.8	-	-	
		0.100	5	20	190	96	3.9	
	DC	0.100	3	無添加	< 4.2	-	-	
		0.100	5	20	170	84	2.9	
	河川水	CTC	0.100	3	無添加	< 6.2	-	-
			0.100	5	20	190	94	3.6
TC		0.100	3	無添加	< 3.0	-	-	
		0.100	5	20	190	95	4.2	
OTC		0.100	3	無添加	< 2.9	-	-	
		0.100	5	20	190	97	2.7	
ICTC		0.100	3	無添加	7.7	-	-	
		0.100	5	20	210	100	4.4	
DC		0.100	3	無添加	< 4.2	-	-	
		0.100	5	20	170	85	3.1	
海水		CTC	0.100	3	無添加	< 6.2	-	-
			0.100	7	2.0	18	89	9.0
	0.100		5	20	200	99	4.5	
	TC	0.100	3	無添加	< 3.0	-	-	
		0.100	7	1.0	9.8	98	7.8	
		0.100	5	20	200	98	2.5	
	OTC	0.100	3	無添加	< 2.9	-	-	
		0.100	7	1.0	11	106	7.0	
		0.100	5	20	200	99	3.7	
	ICTC	0.100	3	無添加	< 2.8	-	-	
		0.100	7	1.0	9.4	94	7.5	
	DC	0.100	5	20	210	105	2.8	
0.100		3	無添加	< 4.2	-	-		
0.100		7	2.0	16	80	6.8		
		0.100	5	20	170	87	2.3	

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 7 に示す。どの物質も、pH5 程度の酸性下では安定であったが、アルカリ下では不安定であった。また、CTC については、アルカリ下で ICTC に変換することが確認された。

表 7 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)	7 日後の残存率(%)	
				暗所	明所
CTC	5	200	107	90	—
	7	200	97	79	60
	9	200	96	0	—
TC	5	200	94	97	—
	7	200	103	94	100
	9	200	103	74	—
OTC	5	200	105	85	—
	7	200	96	71	57
	9	200	98	63	—
ICTC	5	200	98	100	—
	7	200	95	90	57
	9	200	99	93	—
DC	5	200	100	108	—
	7	200	96	98	88
	9	200	99	32	—

〔保存性試験〕

保存性試験結果（保存温度：10°C、保存容器：PP 製容器）を表 8 に示す。河川水、海水ともに、ICTC を除いて 14 日後の残存率が 30%以下となった。ICTC については、100%を超える残存率となったが、これは、CTC が ICTC に変換したことに起因している。EDTA-2Na を添加することにより、14 日後においても、どの物質もほぼ 100%残存していることが確認されたことから、試料採取後、試料 100 mL に対し EDTA-2Na を 0.1 g 添加することとした。

表 8 保存性試験結果

試料名	物質名	添加剤	初期濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)					
				1 時間後	1 日後	3 日後	7 日後	14 日後	
海水	CTC	無添加	0.20	105	94	86	38	< 1	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	106	99	103	99	93	
	TC	無添加	0.20	100	102	99	87	30	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	101	112	107	114	106	
	OTC	無添加	0.20	93	94	90	74	< 1	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	104	99	100	99	97	
	ICTC	無添加	0.20	107	106	106	130	138	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	110	104	111	108	103	
	DC	無添加	0.20	99	101	96	40	< 1	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	106	103	104	98	94	
	河川水	CTC	無添加	0.20	105	71	55	40	10
			EDTA-2Na ^{a)}	0.20	101	104	104	98	95
TC		無添加	0.20	99	89	87	88	34	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	101	107	103	106	113	
OTC		無添加	0.20	103	78	64	46	14	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	99	96	101	105	105	
ICTC		無添加	0.20	101	117	120	134	138	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	104	108	103	108	112	
DC		無添加	0.20	99	82	77	71	20	
		EDTA-2Na ^{a)}	0.20	96	102	101	110	104	

a) EDTA-2Na は、試料 100 mL に対し 0.1 g 添加した。

〔検量線用標準液の保存性〕

標準液の保存性を確認するため、検量線用標準液(2.0 ng/mL) について保存性試験を行った。保存容器は、PP 製の試験管で、4°C、10°C、20°C の暗所で保存した。その結果を表 9 に、また、20°C で保存された標準液の SRM クロマトグラムを図 17 に示したが、CTC、TC 及び ICTC については、徐々にエピマーへ変換され、その程度は、保存温度に影響していることが認められた。このため、検量線用標準液は、調製後、1 週間以上経過したものは使用せず、その間は 4°C 以下で保存する必要がある。

なお、ガラス製の試験管に保存した標準液については、14 日後で 60~80%の残存率となり、若干の吸着が認められたことから、検量線用標準液の調製は PP 製容器の使用が望ましい。

表 9 検量線用標準液の保存性試験結果

物質名	保存温度 (°C)	濃度 (ng/mL)	残存率(%)				
			1 時間後	1 日後	3 日後	7 日後	14 日後
CTC	4	2.0	99	100	96	97	90
	10	2.0	93	96	96	82 (93)	75 (88)
	20	2.0	97	93	87 (99)	66 (90)	58 (84)
TC	4	2.0	102	100	102	100	99
	10	2.0	95	95	97	96	82 (95)
	20	2.0	101	89	82 (89)	84 (97)	66 (96)
OTC	4	2.0	93	102	94	100	95
	10	2.0	92	92	89	106	99
	20	2.0	94	87	84	98	85
ICTC	4	2.0	94	99	97	94 (98)	81 (96)
	10	2.0	94	99	88 (99)	92 (112)	70 (102)
	20	2.0	92	93	75 (97)	65 (101)	43 (102)
DC	4	2.0	97	99	104	97	92
	10	2.0	94	97	109	99	92
	20	2.0	93	100	96	105	91

注：()は、エピマーも含めた値

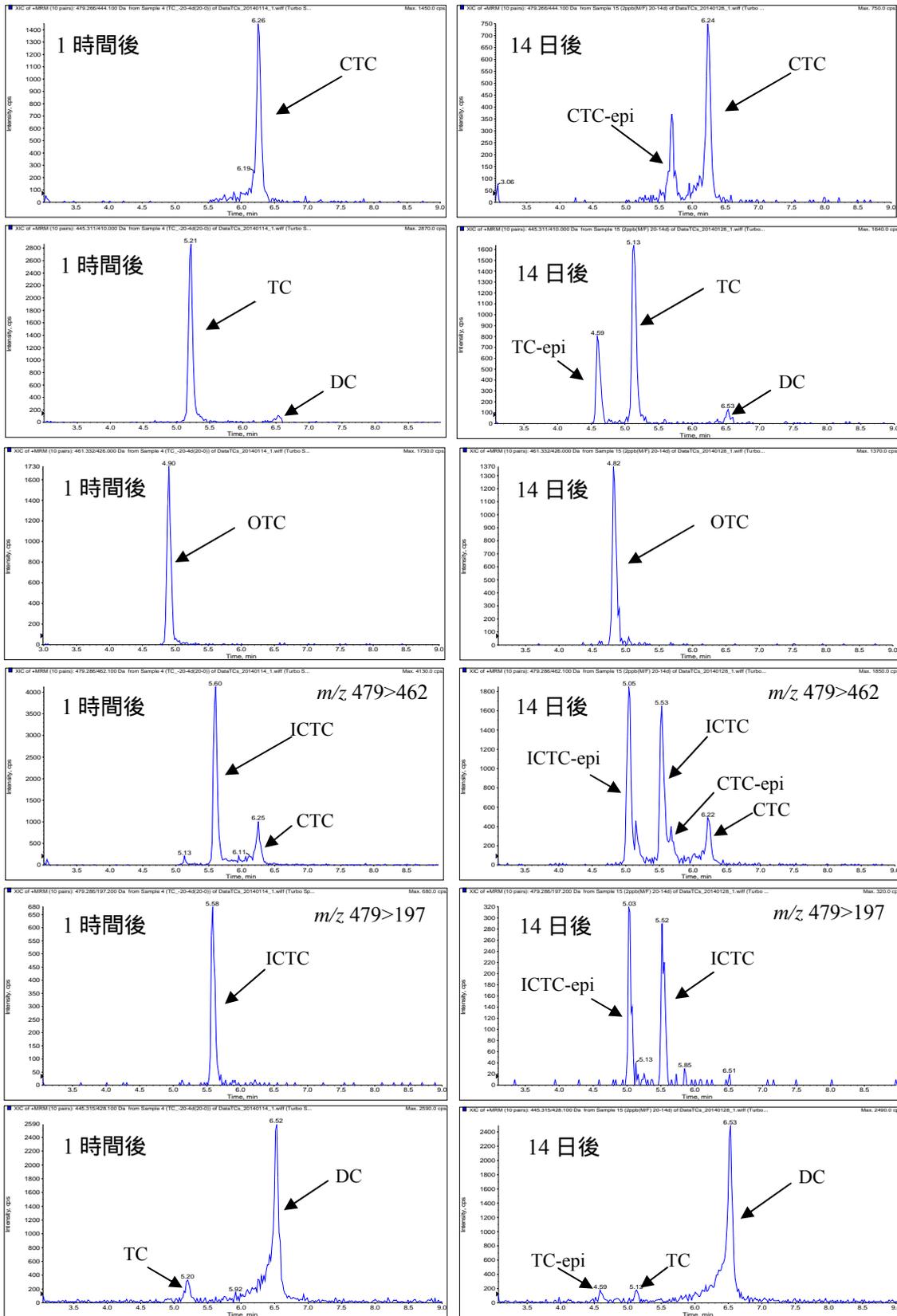


図 17 20°C で保存された混合標準液(2.0 ng/mL)の SRM クロマトグラム

〔添加回収試験の検討結果〕

精製水、河川水及び海水を用い、添加回収試験を行った。試料 100 mL に対象物質を各 20 ng 添加し、固相カートリッジ(Oasis HLB Plus) に通水し、メタノール 5 mL で、通水方向とは逆向きから溶出させた。その結果を表 10 に示した。精製水では、EDTA-2Na を試料に添加しなくても、良好な回収率が得られたが、海水、河川水については、そのまま固相抽出すると回収率が低く、良好な結果が得られなかった。EDTA-2Na を添加することにより、回収率の改善が認められたため、試料に EDTA-2Na を添加することにした。

表 10 添加回収試験検討結果

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	添加剤	回収率(%)				
				CTC	TC	OTC	ICTC	DC
精製水	100	20	無添加	92	99	91	90	84
	100	20	EDTA-2Na ^{a)}	96	100	96	96	84
海水	100	20	無添加	17	12	4	76	20
	100	20	EDTA-2Na ^{a)}	99	98	99	105	87
河川水	100	20	無添加	29	30	18	49	25
	100	20	EDTA-2Na ^{a)}	56	53	57	70	52

a) EDTA-2Na は、試料 100 mL に対し 0.1 g 添加した。

〔固相抽出の抽出溶媒の検討〕

比較的 SS 分の多い河川水(SS:12 mg/L) を用い、今回使用した固相カートリッジ(Oasis HLB Plus) の抽出溶媒を検討した。抽出溶媒として、メタノールとメタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v) を用い、通水方向とは逆向きから溶出させた。また、メタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v) については、通水方向と同じ向きからの溶出も行った。その結果を図 18 に示した。メタノールでは、どの物質も 50 ~ 60%の回収率であったが、メタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v)では、DC で若干回収率が悪いものの、どの物質も 4 mL でほぼ 80%以上の回収率が得られた。通水方向と同じ向きから溶出させた場合、CTC、DC の回収率が悪く、特に DC は 12 mL 流しても、50%程度の回収率となった。このことから、固相カートリッジからの溶出は、メタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v) 4 mL を用い、通水

方向とは逆向きから溶出させることとした。

なお、通水方向とは逆向きから溶出させた場合、夾雑物も同時に溶出されやすく、定量値に影響を及ぼす可能性が考えられたが、最終試験液に対象物質を添加し定量したところ、良好な定量結果が得られた。また、今回、メタノールと精製水の混合溶媒ではなく、メタノールと0.1%ギ酸水溶液の混合溶媒としたのは、対象物質が、中性からアルカリ下で不安定で、特にCTCは、この領域で一部がICTCへ変換されるためである。

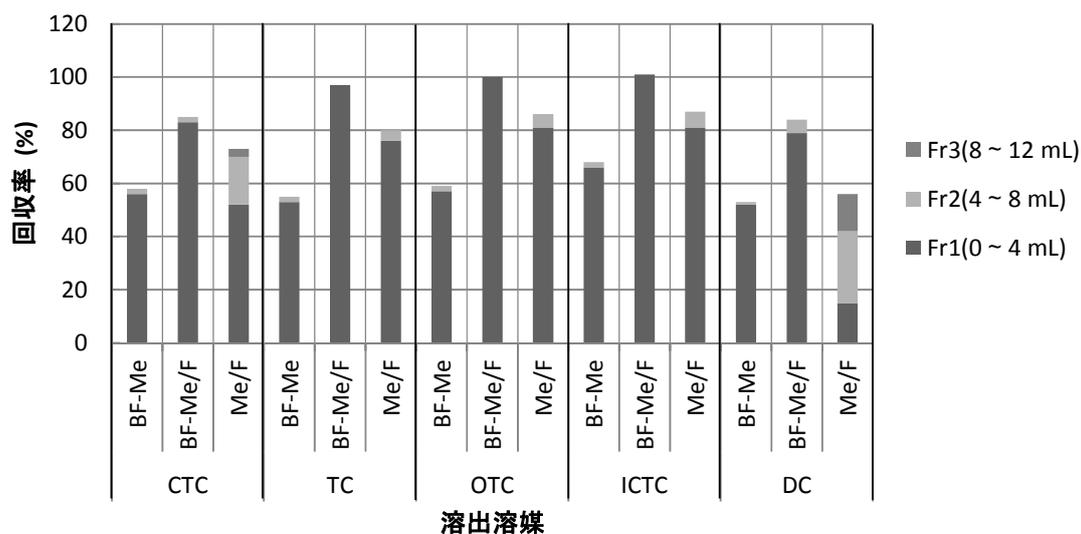


図 18 固相カートリッジ(Oasis HLB plus) の溶出パターン

- BF-Me : 通水方向と逆向きからメタノールで溶出
- BF-Me/F : 通水方向と逆向きからメタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v)で溶出
- Me/F : 通水方向からメタノール / 0.1%ギ酸水溶液(1:1, v/v)で溶出

〔環境試料の分析〕

海水（名古屋港）河川水（朝鮮川）のSRMクロマトグラムを図19及び図20に示す。海水（名古屋港）からはどの物質も検出されなかったが、河川水（朝鮮川）からはICTCが7.7 ng/L 検出された。その他の物質は検出されなかった。

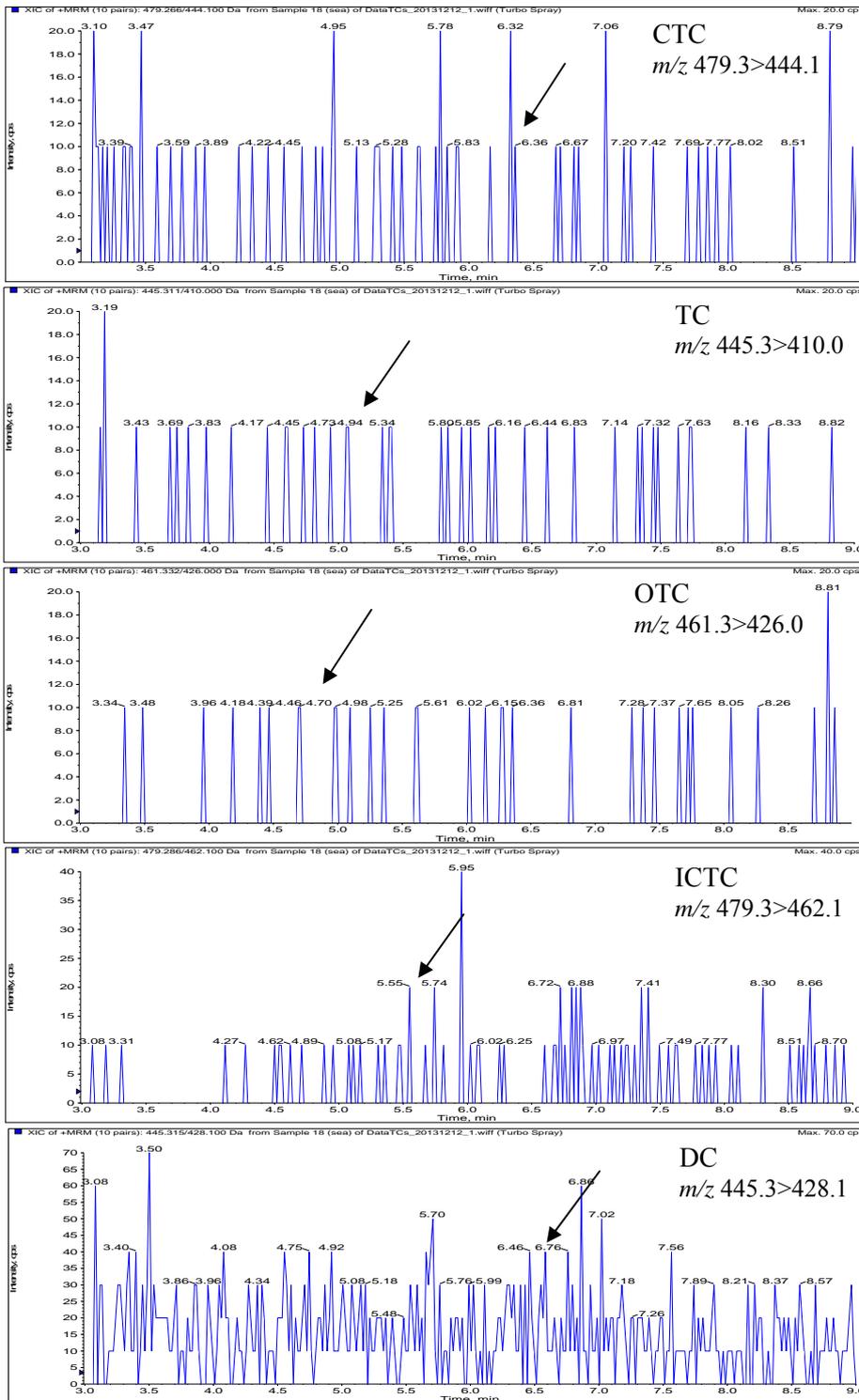


図19-1 海水（名古屋港）のSRMクロマトグラム（無添加）

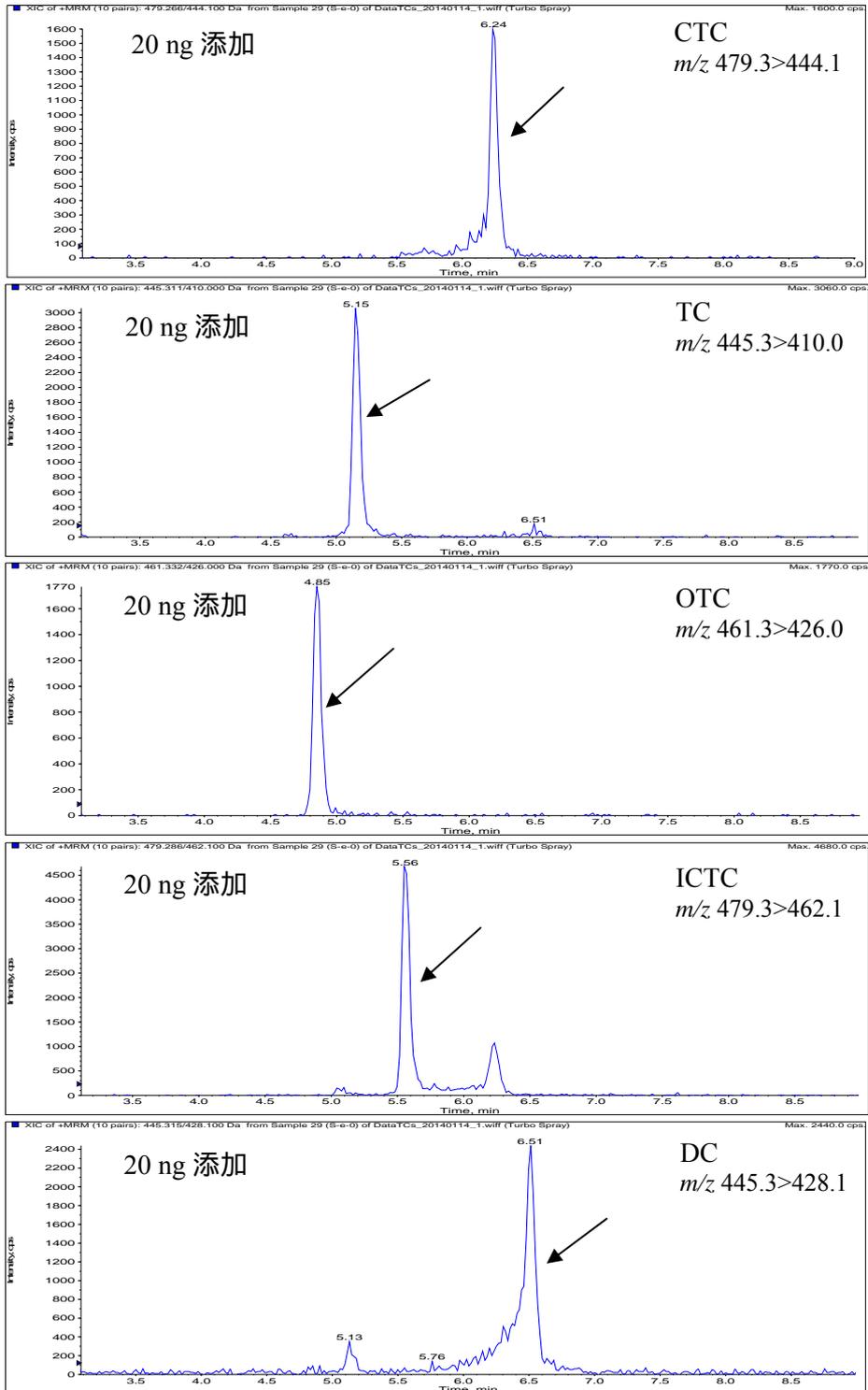


図 19-2 海水 (名古屋港) の SRM クロマトグラム (添加)

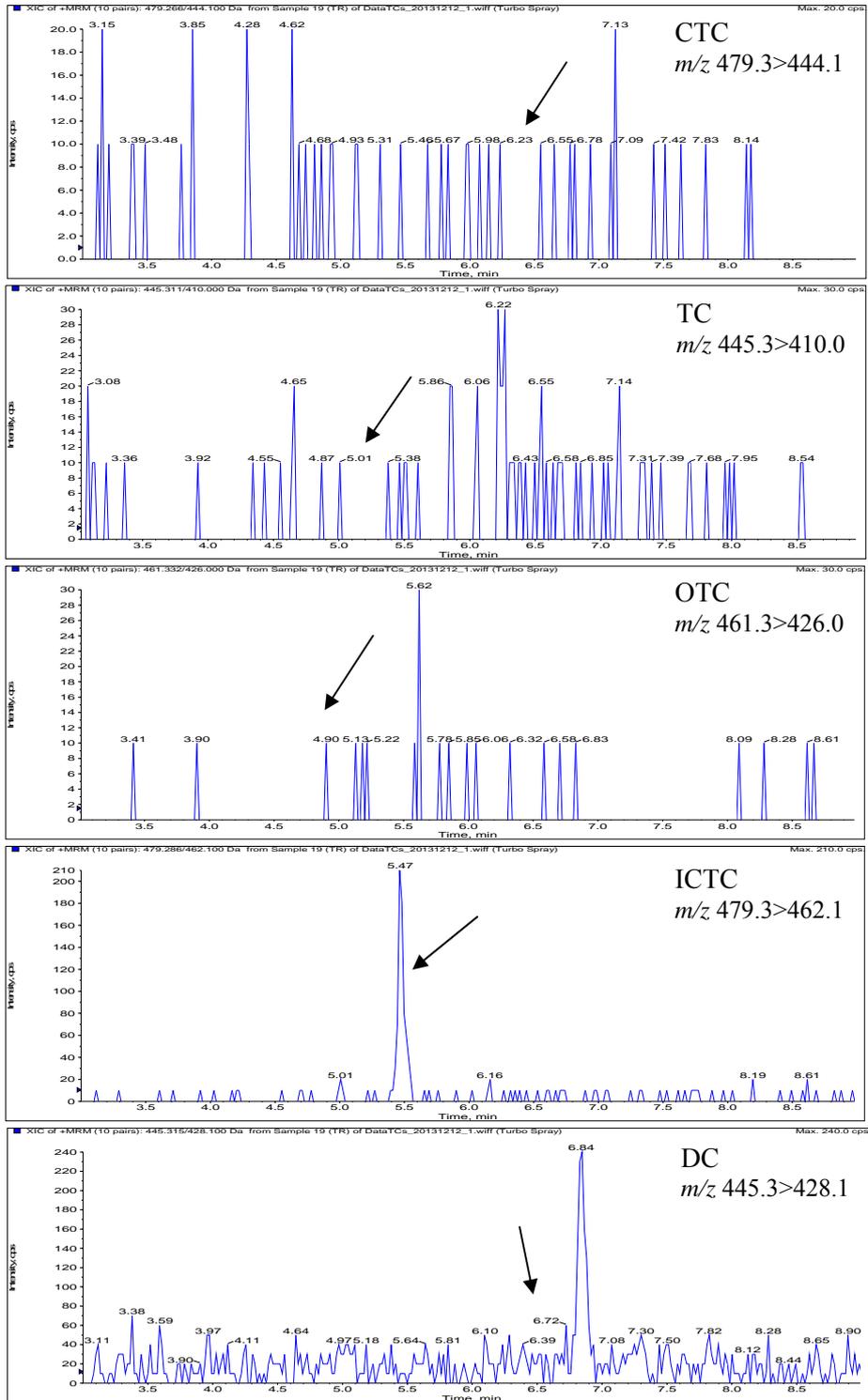


図 20-1 河川水 (朝鮮川) の SRM クロマトグラム (無添加)

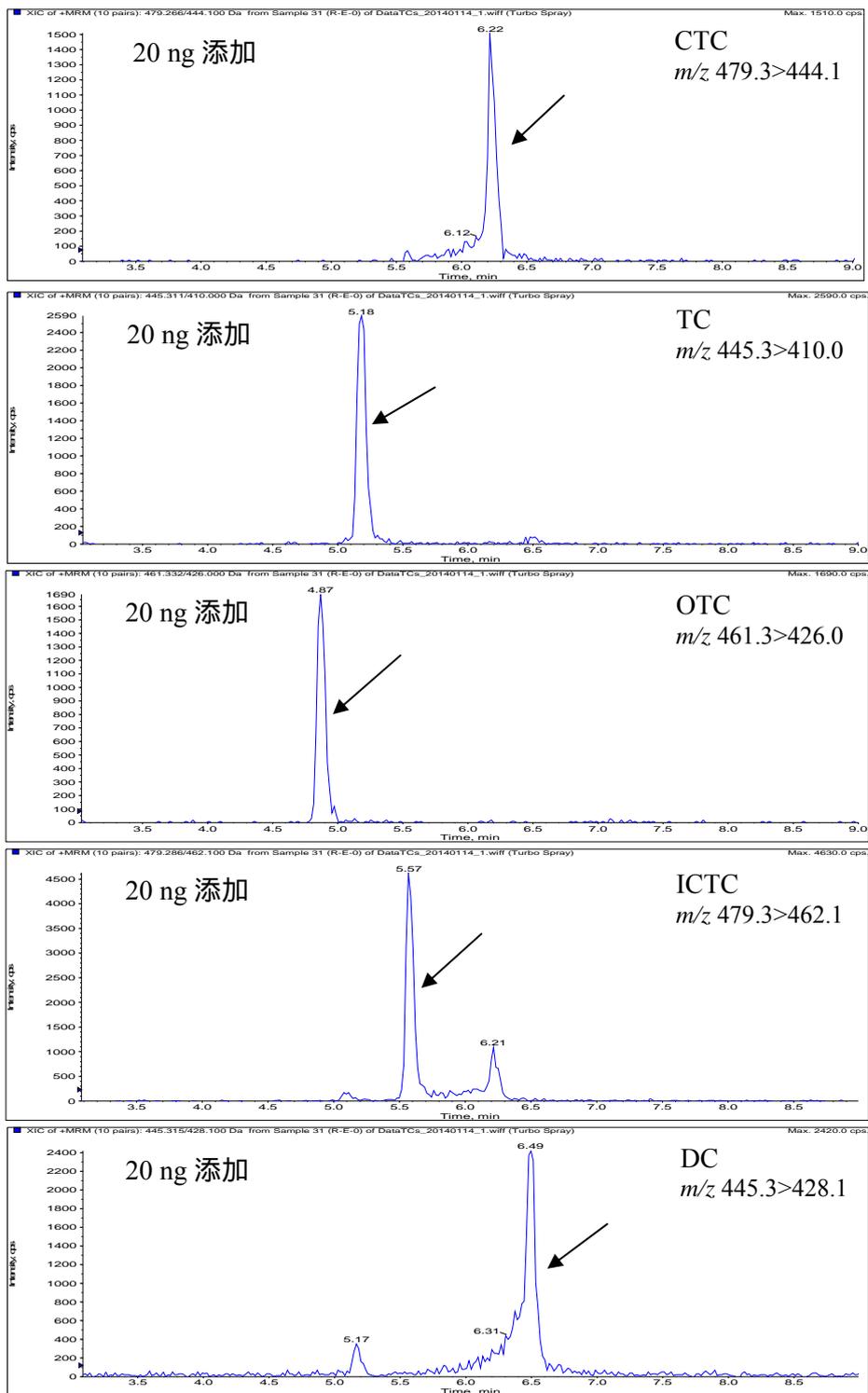


図 20-2 河川水 (朝鮮川) の SRM クロマトグラム (添加)

【評価】

本法で用いた LC/MS/MS のIDL は、CTC 0.052 ng/mL(試料換算濃度 5.2 ng/L)、TC 0.023 ng/mL(試料換算濃度 2.3 ng/L)、OTC 0.020 ng/mL(試料換算濃度 2.0 ng/L)、ICTC 0.026 ng/mL (試料換算濃度 2.6 ng/L)、DC 0.035 ng/mL (試料換算濃度 3.5 ng/L)であり、CTC、DC 0.20 ~ 100 ng/mL、TC、OTC、ICTC 0.10 ~ 100 ng/mL の濃度範囲で検量線の直線性($r^2 > 0.999$) が確認された。また、本法の MDL は、CTC 6.2 ng/L、TC 3.0 ng/L、OTC 2.9 ng/L、ICTC 2.8 ng/L、DC 4.2 ng/L で、MQL は、CTC 16 ng/L、TC 7.7 ng/L、OTC 7.4 ng/L、ICTC 7.1 ng/L、DC 11 ng/L であった。水質試料(精製水、河川水、海水(各 $n = 5$)) 100 mL に対象物質を各々 20 ng 添加した際の回収率は、CTC で 94 ~ 99% (変動係数 3.6 ~ 4.9%)、TC で 95 ~ 100% (変動係数 2.5 ~ 4.2%)、OTC で 96 ~ 99%(変動係数 1.9 ~ 3.7%)、ICTC で 96~105% (変動係数 2.8 ~ 4.4%)、DC で 84~87%(変動係数 2.3 ~ 3.1%)であった。以上の結果より、本法は環境水中に含まれる CTC を 15 ng/L レベル、TC、OTC、ICTC を 8 ng/L レベル、DC を 10 ng/L レベルで定量が可能であると判断される。

【参考文献】

- 1) Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4640-4646
- 2) Kennedy, D. G.; McCracken, R.J.; Carey, M.P.; Blanchflower, W.J.; Hewitt, S.A., *J. Chromatogr. A*, 1998, 812, 327-337

【担当者連絡先】

所属先名称：愛知県環境調査センター

所属先住所：〒462-0032 名古屋市北区辻町字流 7 番 6 号

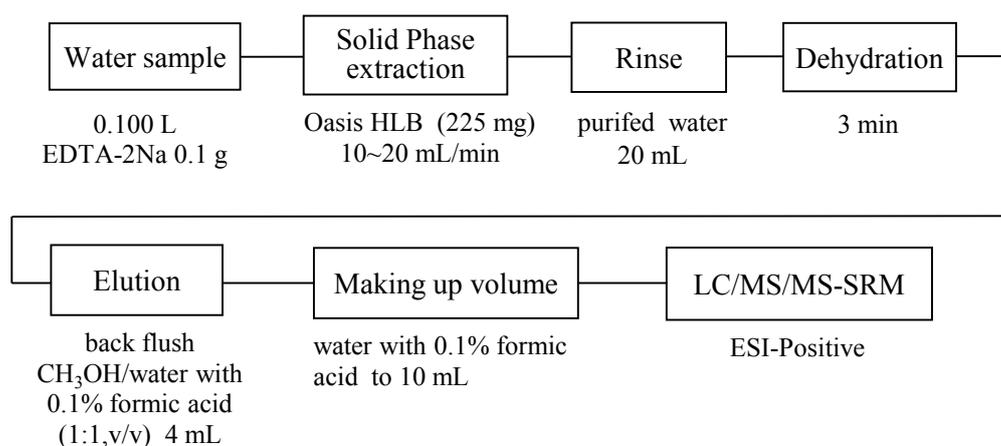
TEL：052-910-5494 FAX：052-991-6241

担当者名：内藤 宏孝

E-mail：hirotaka_naitou@pref.aichi.lg.jp

Chlortetracycline, Tetracycline, Oxytetracycline, Isochlortetracycline and Doxycycline

This method provides a procedure for the determination of chlortetracycline (CTC), tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), isochlortetracycline (ICTC) and doxycycline (DC) in water samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A water sample is stabilized with disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-2Na) to prevent the loss of the target analytes. The analytes are extracted from the water sample by passing the sample through a hydrophilic-lipophilic balance cartridge (Oasis HLB plus) at the flow rate of 10 - 20 mL/min. After extraction, the cartridges are rinsed with 20 mL of purified water to remove excess EDTA-2Na. The analytes are back-eluted from the cartridge with 4 mL of methanol/water with 0.1% formic acid (1:1, v/v) solution. The final volume is made up to 10 mL with water with 0.1% formic acid, and the analytes are determined by LC/MS/MS. The method detection limits are 6.2 ng/L for CTC, 3.0 ng/L for TC, 2.9 ng/L for OTC, 2.8 ng/L for ICTC and 4.2 ng/L for DC, respectively. The mean recoveries in water samples ranged from 89 to 99% (relative standard deviation : 3.6 - 9.0%) for CTC, from 95 to 100% (relative standard deviation : 2.5 - 7.8%) for TC, from 96 to 106% (relative standard deviation : 1.9 - 7.0%) for OTC, from 94 to 105% (relative standard deviation : 2.8 - 7.5%) for ICTC and from 80 to 87% (relative standard deviation : 2.3 - 6.8%) for DC, respectively. The analytes in the river water and the sea water sampled at each one site in Aichi prefecture were determined using this method. ICTC was detected at 7.7 ng/L in the river water sample, and CTC, TC, OTC and DC were not detected.



物質名	分析法フローチャート	備考
クロルテトラサイクリン、 テトラサイクリン、 オキシテトラサイクリン、 イソクロルテトラサイクリン、 ドキシサイクリン	<p>【水質】</p> <pre> graph LR A["水質試料 0.100 L EDTA-2Na 0.1 g"] --> B["固相抽出 Oasis HLB (225 mg) 10~20 mL/min"] B --> C["水洗 精製水 20 mL"] C --> D["脱水 3 min吸引"] D --> E["溶出 バックフラッシュ法 CH3OH/0.1%ギ酸 水溶液 (1:1,v/v) 4 mL"] E --> F["定容 0.1%ギ酸水溶液 10 mL"] F --> G["LC/MS/MS-SRM ESI-Positive"] </pre>	<p>分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI positive</p> <p>検出下限値： 【水質】 (ng/L) クロルテトラサイクリン 6.2 テトラサイクリン 3.0 オキシテトラサイクリン 2.9 イソクロルテトラサイクリン 2.8 ドキシサイクリン 4.2</p> <p>分析条件：</p> <p>機器 LC：SHIMADZU LC-20Series MS：API-3200</p> <p>カラム Ascentis Express C18 150 mm×2.1 mm, 2.7 μm</p>