

Application
News

No. C175

LC/MS

食肉、卵、牛乳中のアミノグリコシド系抗生物質の高速定量分析と MRM スペクトルを用いた化合物同定

アミノグリコシド系抗生物質 (AGs) は、牛、羊、豚および家禽に対する細菌の感染防止のために広く使われています。AGs は、様々な菌に有効な広域抗生物質であり、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に有効です。

AGs は、聴器官毒性や腎毒性がありますが、その価格の安さから、獣医学分野で広く使用されています。AGs は、体組織への親和力も高く、万が一休薬期間を守られなかったり、不適切に使用されたりした場合には、我々が口にする食肉、牛乳、卵などの中に残存する可能性があります。AGs を含む食品を食べることは、人体にとって有害です。そこで、規制当局は、獣医学分野で使用されている AGs 系化合物に対して、食物中の残留基準 (MRL) を設定しています。

AGs 系化合物は極性が非常に高く、通常の逆相カラムには、ほとんど保持されないため、通常の逆相クロマトグラフィーの分離では、イオンペア試薬が使われます。イオンペア試薬は LC の流路やカラム、MS のインターフェイスなどに残留しやすく、他の分析で良好なデータが得られないことがあり、使用が好まれないことも少なくありません。

「LC/MS/MS メソッドパッケージ アミノグリコシド系抗生物質」では、イオンペア試薬を使用しない親水性相互作用液体クロマトグラフィ (HILIC) を用いた LC-MS/MS による分析メソッドを提供しています。高速定量分析メソッドと MRM スペクトルを用いた化合物同定メソッドの 2 つが収録されています。化合物同定メソッドを使った分析は、高速定量スクリーニング分析と同じ移動相、カラムを使用するため、高速定量スクリーニングと化合物同定を同じ分析システムで、メソッドを変えるだけで簡単に行うことが可能です。さらに、上記メソッドパッケージには、食肉、卵、牛乳に対応できる単一前処理プロトコルが前処理例として含まれています。

本報では、いくつかの食肉サンプルと牛乳の安全性評価のための「LC/MS/MS メソッドパッケージ アミノグリコシド系抗生物質」の活用方法をご紹介します。

M. Levi

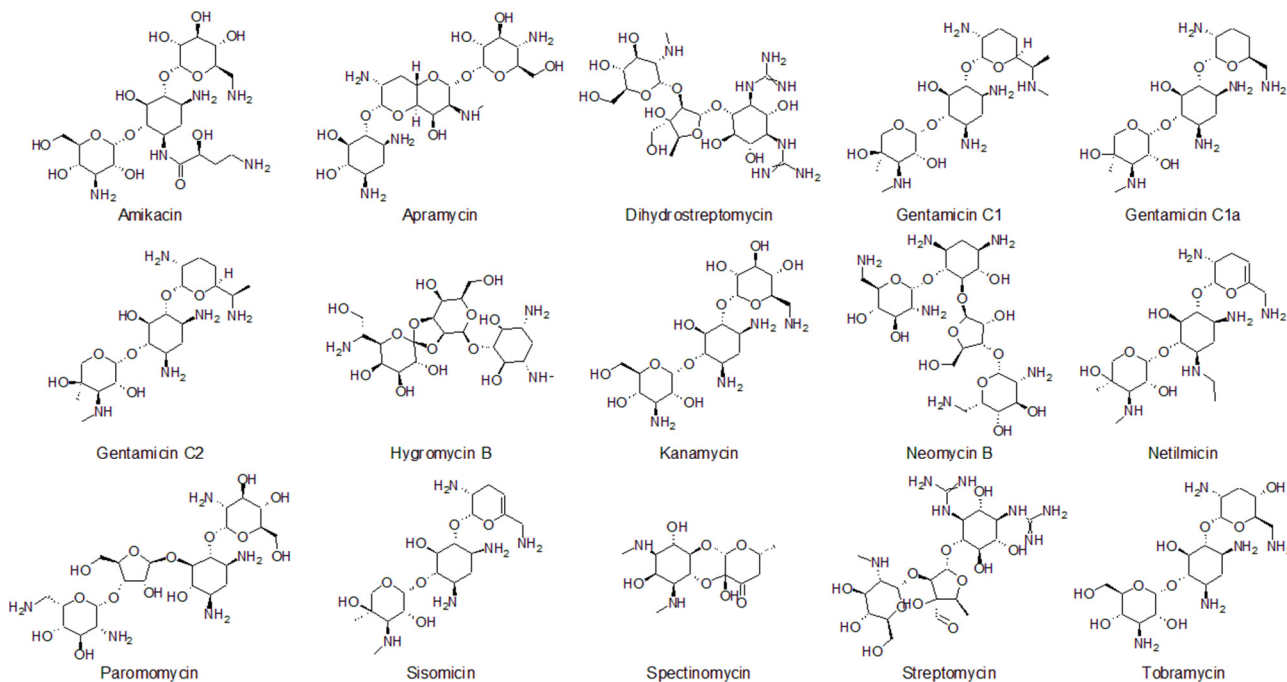


図1 メソッドパッケージに登録されているアミノグリコシド (AGs) 系化合物

■ 試料調製

食肉サンプル（神戸牛、鶏むね肉、鶏レバー、豚ロース）と牛乳は市販品を使用しました。各サンプル 5g（食肉は粉碎後）をメソッドパッケージに収録されている方法で前処理しました。前処理では、内部標準である Ribostamycin を添加後、酸性バッファーで 2 回抽出しました。抽出液をミックスモードの弱陽イオン交換充填剤を用いたポリマー系固相抽出カラム（Biotage 社製）で精製後、5 倍希釈したものを 5 μ L ずつ注入して測定を行いました。各 AGs 系化合物は、厚生労働省が設定している MRL の 0.5 倍と 1.5 倍の濃度になるように添加しました。

■ LC-MS/MS による分析

上記の精製・溶出した液を LC-MS/MS で、「LC/MS/MS メソッドパッケージアミノグリコシド系抗生物質」に収録されているメソッドを用いて分析しました。定量には、移動相で調製した標準試料で作成した検量線を使用しました。

測定は、最初に 1 つ目の高速定量分析メソッドを使用しています。高速定量分析メソッドは HILIC を用いた分離条件を採用しています。分析時間は 4.5 分で、1 化合物あたり 2 つの MRM が設定されています。移動相にはギ酸系水溶液とアセトニトリルを使用しました。

MRL に代表される基準値を超えて検出された化合物があった場合には、2 つ目の化合物同定メソッドを用いてピーク同定を行いました。化合物同定メソッドは、高速定量分析と同じ移動相、カラムを使用しますが、分析時間 13 分で、1 化合物あたり 15 個の MRM が設定されています。

分析システムは Nexera™ X2 と LCMS™-8060 を用いました。解析は LabSolutions Insight™ Library Screening (オプション) を用いて行いました。

■ 結果

MRL は家畜種や化合物によって異なります。日本では、個別に MRL が規定されていない動物用医薬品に対しては一律基準 10 μ g/kg が適用されます。そこで、MRL が規定されている Apramycin、Dihydrostreptomycin、Gentamicin、Kanamycin、Neomycin、Spectinomycin、Streptomycin については、検量線の範囲を最小 MRL の 10% から最大 MRL の 150% の範囲で設定しました。一方、MRL が規定されていない他の化合物については、検量線範囲を 10 μ g/kg の 20% (2 μ g/kg) から 150% (15 μ g/kg) に設定しました。表 1 に各化合物の検量範囲を示します。7 点検量で、各点の検量精度は 85~115% となりました。代表的な検量線を図 2 に示します。

AGs 系化合物を添加していないサンプルには、当然 AGs 系化合物は入っていません。そこで、濃度の計算値を用いて、各化合物の添加回率を計算しました。（表 2）全てのマトリクスに対して化合物の回収率が 70~120% におさまり、良好な結果が得られました。再現性は、牛肉サンプルを用いて、MRL の 1/2 の濃度 (0.5×MRL) で評価しました。再現性の評価結果を表 3 に示します。%RSD は全化合物 20% 未満であり、本分析で安定したデータが得られていることがわかります。

図 3 には各 AGs 系化合物の MRM クロマトグラムの例を示します。

表 1 対象アミノグリコシド (AGs) 系化合物の日本で規定されている残留基準 (MRL) と検量範囲

	Calibration Range					
	Low MRL (μ g/kg)	High MRL (μ g/kg)	LLOQ (μ g/kg)	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (μ g/kg)	ULOQ (ng/mL)
Amikacin	No value	Default (10)	2	0.1	15	0.75
Apramycin	60	500	6	0.3	750	37.5
Dihydrostreptomycin	200	600	20	1.0	900	45.0
Gentamicin (sum)	100	200	10	0.5	300	15.0
Hygromycin	No MRL	Default (10)	2	0.1	15	0.75
Kanamycin	40	500	4	0.2	750	37.5
Neomycin	500	500	50	2.5	750	37.5
Netilmicin	No MRL	Default (10)	2	0.1	15	0.75
Paromomycin	No MRL	Default (10)	2	0.1	15	0.75
Sisomicin	No MRL	Default (10)	2	0.1	15	0.75
Spectinomycin	200	2000	20	1.0	3000	150.0
Streptomycin	200	600	20	1.0	900	45.0
Tobramycin	No MRL	Default (10)	2	0.1	15	0.75

表2 各アミノグリコシド (AGs) 系化合物の添加回収率

		AMI	APRA	DHSTP	GENT C1a	GENT C1	GENTC2/C2a	HYGRO	KANA
Recovery at 0.5×MRL	Milk	91.90 %	88.7 %	108 %	76.6 %	89.4 %	83.3 %	94.3 %	100 %
	Beef	107 %	89.0 %	117 %	90.4 %	94.2 %	95.2 %	107 %	102 %
	Pork	88.3 %	98.9 %	114 %	80.4 %	86.3 %	87.6 %	96.5 %	88.7 %
	Chicken Breast	82.2 %	90.3 %	97.4 %	98.7 %	92.4 %	90.3 %	105 %	94.8 %
	Chicken Liver	70.9 %	91.5 %	103 %	91.3 %	80.8 %	86.1 %	99.4 %	101 %
Recovery at 1.5×MRL	Milk	83.0 %	99.0 %	106 %	85.8 %	91.0 %	101 %	91.8 %	98.1 %
	Beef	89.9 %	95.9 %	96.9 %	98.8 %	91.2 %	95.5 %	104 %	96.1 %
	Pork	86.3 %	89.5 %	98.5 %	95.1 %	102 %	96.9 %	112 %	97.2 %
	Chicken Breast	82.2 %	90.3 %	97.4 %	98.7 %	92.4 %	90.3 %	105 %	94.8 %
	Chicken Liver	87.8 %	90.7 %	90.7 %	99.5 %	85.5 %	88.8 %	91.6 %	83.8 %
		NEO	NETIL	PARO	SISO	SPC	STP	TOB	
Recovery at 0.5×MRL	Milk	81.2 %	101 %	73.3 %	75.3 %	94.0 %	111 %	91.0 %	
	Beef	91.4 %	101 %	88.1 %	88.4 %	110 %	114 %	91.5 %	
	Pork	85.7 %	91.0 %	90.7 %	76.4 %	101 %	111 %	85.8 %	
	Chicken Breast	94.1 %	90.5 %	78.4 %	84.9 %	92.7 %	102 %	107 %	
	Chicken Liver	78.6 %	90.8 %	76.5 %	78.8 %	101 %	108 %	92.5 %	
Recovery at 1.5×MRL	Milk	96.7 %	93.6 %	86.9 %	99.4 %	94.8 %	105 %	102 %	
	Beef	113 %	91.1 %	103 %	106 %	86.9 %	93.1 %	105 %	
	Pork	106 %	90.4 %	94.8 %	94.3 %	95.2 %	105 %	108 %	
	Chicken Breast	94.1 %	90.5 %	78.4 %	84.9 %	92.7 %	102 %	107 %	
	Chicken Liver	109 %	82.4 %	89.5 %	95.3 %	75.3 %	90.0 %	98.1 %	

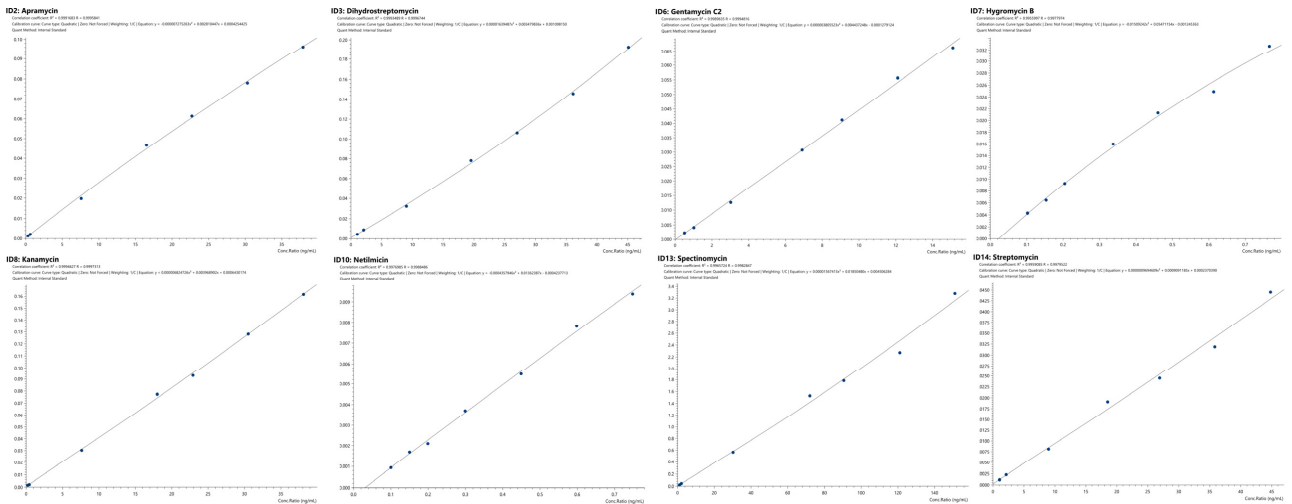


図2 Apramycin, Dihydrostreptomycin, Gentamycin C2, Hygromycin B, Kanamycin, Netilmicin, Spectinomycin, Streptomycin の検量線

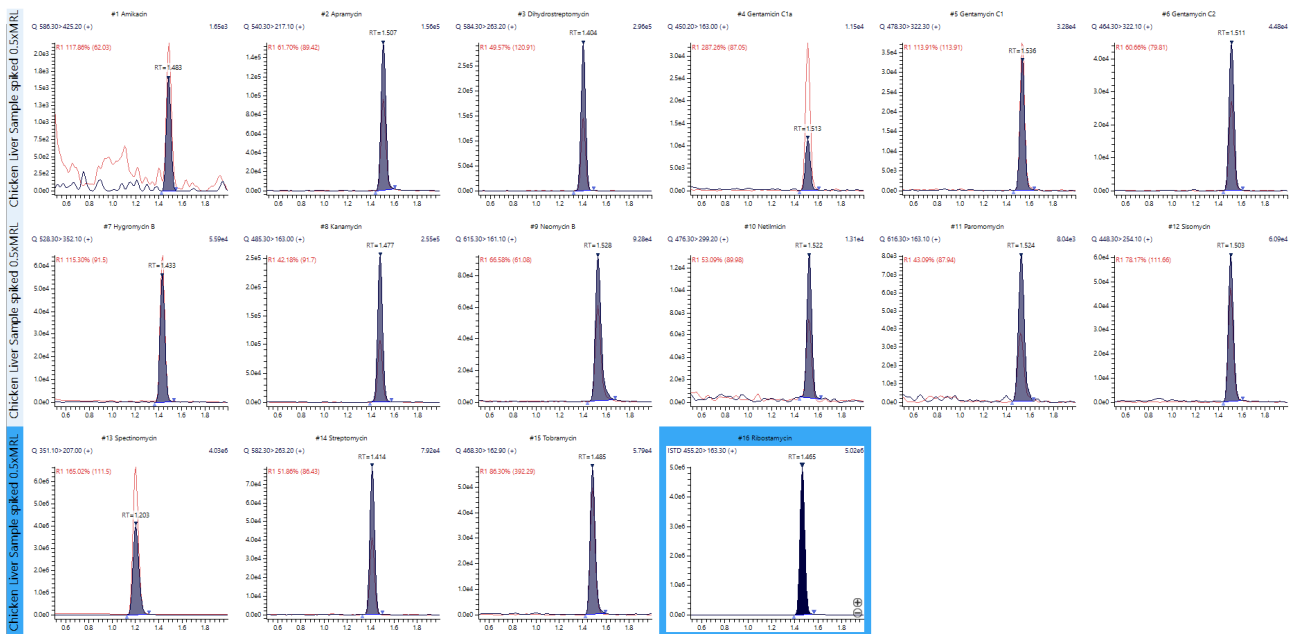


図3 鶏レバーサンプルのMRMクロマトグラム (濃度: 0.5×MRL)

表3 アミノグリコシド (AGs) 系化合物を牛肉サンプルに添加した場合の添加回収率と再現性 (濃度: 0.5×MRL)

	AMI	APRA	DHSTP	GENT C1a	GENT C1	GENT C2/C2a	HYGRO	KANA
Mean Conc. (μg/kg)	5.38	225	350	45.6	47.5	48.0	5.32	21.1
Recovery	107%	89.0%	117%	90.4%	94.2%	95.2%	107%	102%
%RSD	19.9%	7.7%	10.0%	10.8%	10.2%	6.9%	7.1%	12.0%
	NEO	NETIL	PARO	SISO	SPC	STP	TOB	
Mean Conc. (μg/kg)	228	5.03	4.39	4.47	275	348	4.66	
Recovery	91.4%	101%	88.1%	88.4%	110%	114%	91.5%	
%RSD	8.8%	10.0%	8.1%	4.4%	11.0%	11.9%	6.2%	

高速定量メソッドを使った分析で MRL を超えて検出された成分の同定精度を高めるために、分析時間を長くし、1化合物あたりの MRM 数を 15 個まで増やした化合物同定メソッドを用いて再測定を行います。測定で得られた各 MRM トランジションに対応するスペクトルをマージして、MRM スペクトルを作成します。

図4に、LabSolutions Insight Library Screening を用いたライブラリ検索の例を示します。実測した MRM スペクトルを読み込むと、自動でライブラリ検索を実行します。この MRM スペクトルを使った化合物同定では、類似度の高い結果を得ることができます。図4の例で示した Dihydrostreptomycin の類似度は 95 点と高く、一方、2番目にヒットしている非常に構造が似ている Streptomycin の類似度は 51 点でした。

結論

新規開発したメソッドパッケージを使って、食肉と牛乳に添加した AGs 系化合物の分析を行うことができました。高速定量メソッドを使った分析では、極低濃度でも良好な回収率と高精度の検量線が得られました。本報で採用したメソッドパッケージに収録されている前処理方法は、高回収率でかつマトリクス効果を最小限に抑えるものであることから、マトリクス成分によらず、標準試料で作成した検量線を定量分析に適用することができました。

また、MRM スペクトルを用いた化合物同定メソッドは、化合物同定の確度を向上することが示されました。

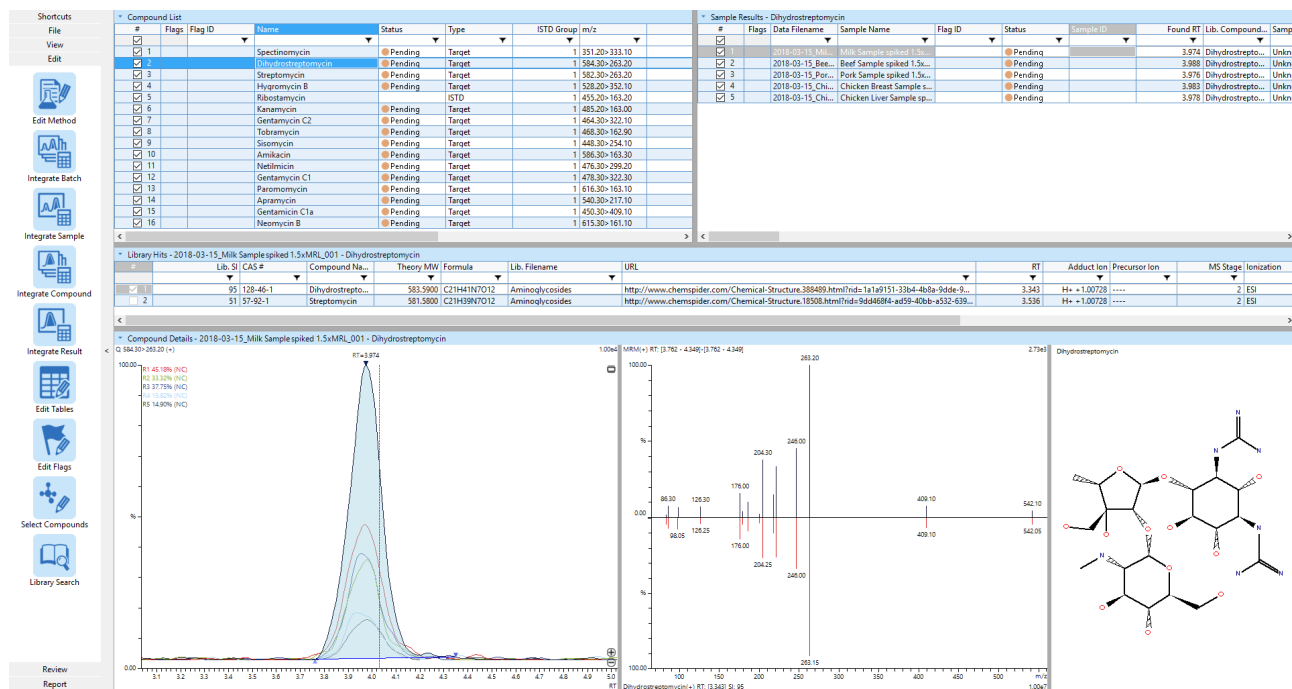


図4 牛乳中の Dihydrostreptomycin (濃度: 1.5×MRL) の MRM スペクトルを用いたライブラリ検索結果

Nexera、LCMS、および LabSolutions Insight は、株式会社島津製作所の商標です。本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行: 2018年5月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。