

(6)LC-MS/MS におけるアミノグリコシド系抗生物質の分析法の検討

○山口麻綾、佐々木秀樹

1. はじめに

畜水産物の残留動物用医薬品検査において、当所では液体クロマトグラフ四重極質量分析計(以下、LC-MS/MS)を用いた一斉分析法を用いている。しかし、動物用医薬品の化学的な性質によっては、他の系統と同時に一斉分析法で検査を行うことが困難な化合物群があり、その一つとしてアミノグリコシド系があげられる。アミノグリコシド系の動物用医薬品にはカナマイシンやストレプトマイシン等が含まれ、畜産現場では細菌性感染症の治療薬として使用されることが多い。しかしながら、消費者庁が定める通知試験法のうち、畜水産物におけるアミノグリコシド系の個別試験法において LC-MS/MS を用いた試験法は定められていない。また、アミノグリコシド系の動物用医薬品は極性が高いこと等、LC における分析条件の設定等に苦慮することが多い上、食肉を検体としたアミノグリコシド系動物用医薬品の検査方法に関する文献も少ない。そのため、当所における LC-MS/MS を用いた定性もしくは定量試験方法を確立するに当たり、いくつかの検討を行ったため報告するもの。

2. 材料及び方法

(1)材料

検体は豚の筋肉を用いた。検体はドライアイス凍結粉碎方法でパウダー状に均一化した。使用した試薬を表1に示した。標準品はカナマイシン硫酸塩(富士フィルム和光純薬株式会社)、ストレプトマイシン硫酸塩及びジヒドロストレプトマイシンセスキ硫酸塩(いずれも関東化学株式会社)の3種類を用いた。各標準品は水に溶解させて濃度が100ppmになるよう調整し標準溶液とした。100ppmに調製した標準溶液は、80%アセトニトリルで適宜希釈し試験に供した。LC-MS/MSの測定条件は表2に示した。分離カラムは高極性化合物の分析に用いられる親水性相互作用クロマトグラフィー(Hydrophilic interaction liquid chromatography 以下、HILIC)のカラムを用いた(ジーエルサイエンス株式会社)。なお、カラムは、アミノグリコシド系の化合物が金属へ吸着しやすいことから、カラムの接合部に金属を使用しないメタルフリーのものとした。各化合物の豚の筋肉における基準値とLC-MS/MSによる分析条件を表3に示した。なお、分析条件は当所で設定を行った。

表1 試薬等

試薬名	グレード等	使用目的
水	超純水	標準溶液作成等
アセトニトリル	試薬特級	標準溶液作成
ギ酸	LCMS用	移動相
ギ酸アンモニウム溶液	LCMS用	
酢酸ナトリウム EDTA トリクロロ酢酸 塩化ナトリウム	試薬特級	抽出用緩衝液
ギ酸 イソプロパノール(以下、IPA) メタノール アンモニア水		溶出液

表2 LC-MS/MSの測定条件

LC-MS/MS	島津製作所社製 LCMS-8050
分離カラム	Inertsil Amide メタルフリーPEEKカラム (内径2.1mm、長さ100mm、粒子径3 μ m)
カラム温度	40度
注入量	7.5 μ l
流速	0.5ml/min
イオン化モード	ESI(+) MRMモード

表3 各化合物の豚の筋肉における基準値とLC-MS/MSによる分析条件

	基準値(ppm)	定量イオン(m/z)	確認イオン(m/z)
カナマイシン	0.04	485.35>163.15	485.35>324.30
ストレプトマイシン	0.6	582.50>263.20	582.50>204.15
ジヒドロストレプトマイシン		584.45>246.10	584.45>263.30

(2)方法

i) LC 部の分析条件の設定

使用した分離カラムの仕様上、カラム圧が 20MPa を超えてはならないこと、グラジエント条件を設定する際に水が主成分である移動相 A の濃度が 50%を超えないことの 2 点を遵守する必要がある。この条件を満たした上で、以下①及び②の 2 点について検討を行った。

①グラジエント条件

HILIC カラムは通常使用される逆相モードカラムとは異なり高極性化合物の保持が強く、移動相の有機溶媒濃度を下げることによって化合物がカラムから溶出される。そのため、グラジエント条件を設定する際、分析開始時は有機溶媒の濃度を高くし、徐々にその濃度を下げていくこととなる。表 4 に示した条件は大宮ら[1]が報告した条件であり、当初、この条件で分析を行ったところ、ピークのテーリングが起こった。そのため、表 4 の条件を元にピーク形状の改善を目的として調整を行うこととした。表 4 の工程 1 から 2 にかかると時間を 30 秒ずつ段階的に減らし、最も短い時間を 1 分として設定し、ピーク形状の比較を行った。工程 1 から 2 にかかると時間を 4 分に設定した際の当所で設定したグラジエント条件をグラフ化したものを図 1 に示す。ピークのテーリングが認められたことから、工程 2 から 3 にかかると時間を 11 分として設定を行った。

表 4 グラジエント条件

工程No.	時間(分)	移動相A(%)	移動相B(%)
1	0.00	30	70
2	4.00	50	50
3	4.01	30	70
4	7.00	30	70

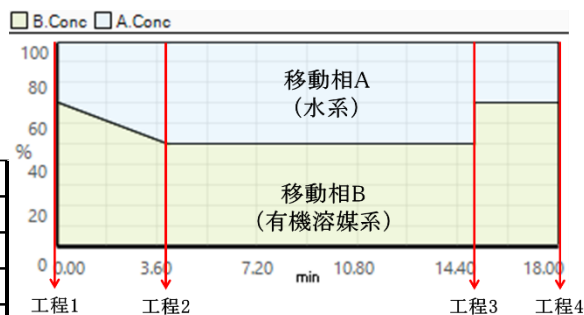


図 1 当所で設定したグラジエント条件

②移動相

大宮ら[1]によると、移動相 A を 0.1%ギ酸-水、移動相 B を 0.1%ギ酸-アセトニトリルに設定した際、0.98ppm の濃度においてカナマイシン等のピーク強度が良好であったとの報告があった。豚におけるカナマイシンの基準値を考慮し、より低濃度での分離及びピーク形状の改善を目的として、既報[2]を基にギ酸及びギ酸アンモニウムを移動相 A 及び移動相 B それぞれに添加した。ギ酸及びギ酸アンモニウムの濃度が高くなるにつれて LC-MS/MS の感度が低下する恐れがあり、且つカラム圧力が上昇することから、ギ酸アンモニウムは移動相 A において 10mM と 20mM の 2 濃度で比較を行うこととし、移動相 B においては添加なしと 20mM で比較を行い、さらに濃度を上げての検討は行わないこととした。また、既報[2]でギ酸を添加する場合は移動相を pH3.8±1 の範囲に収めることが推奨されていることから、予めギ酸の濃度を調整した結果、1%が適当であったことから、ギ酸は 0.1%と 1%の 2 濃度で検討を行った。さらに、アセトニトリル中のギ酸及びギ酸アンモニウムの溶解度を上げるために、移動相 B の主成分を 90%アセトニトリルとした条件も加えて、検討を行った。検討を行った移動相 A 及び B の組成とその組み合わせを表 5 に示す。検討した組み合わせは 7 種類となった。さらに、検討した結果を基に、検量線の検量点を決定した。検量線は絶対検量線法とした。

表 5 検討した移動相及びその組み合わせ

	移動相A			移動相B		
	主成分	添加した試薬と濃度		主成分	添加した試薬と濃度	
		ギ酸アンモニウム	ギ酸		ギ酸アンモニウム	ギ酸
①	水	—	0.1%	アセトニトリル	—	0.1%
②		10mM				—
③		20mM				1.0%
④			0.1%			
⑤			90%アセトニトリル	20mM	0.1%	
⑥					1.0%	
⑦						

ii) 前処理方法の検討

①精製カラム及び精製方法

精製用のカラムは、Yang ら[3]の報告でアミノグリコシド系化合物の分析において良好な結果が得られたとの報告があった Waters 社製 Oasis HLB (60mg, 3cc) (以下、HLB)と、梶田ら[4]の報告で用いられた Waters 社製 Oasis PRIME MCX (60mg, 3cc) (以下、MCX)の 2 種類を使用し比較検討を行った。HLB 及び MCX の精製フローを図 2 に示す。なお、溶出後は希釈等をせずそのまま分析を行った。

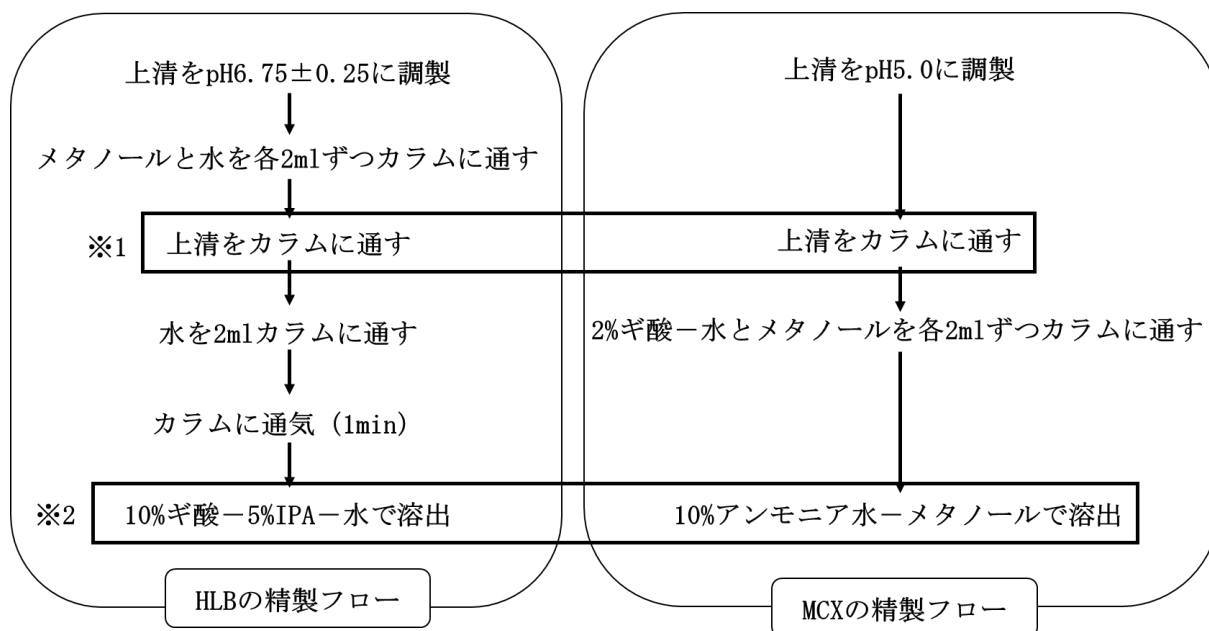
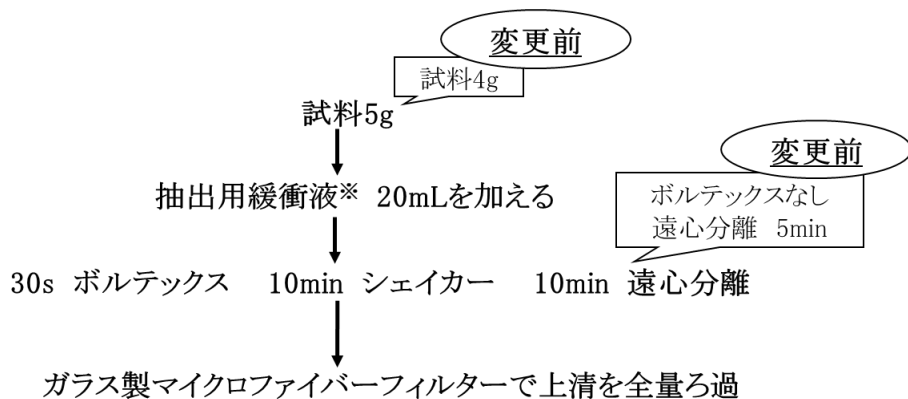


図 2 HLB 及び MCX の精製フロー

図 2 に示した※1及び※2の 2 か所についても検討を行った。大宮ら[1]の報告では、LC-MS/MS の検出限界はカナマイシンで 0.98ppm、ストレプトマイシンで 0.12ppm である。今回検討に用いた 3 種類の化合物のうち、豚の筋肉で最も基準値が低いカナマイシンでは 0.04ppm であり、i)②で移動相の検討を行った場合でも、前処理工程を経て濃縮する必要がある。Yang ら[3]は、精製の際に上清を全量カラムに通し、溶出液を 3ml に設定した際、回収率が良好であったと報告している。そこで今回の検討では、図 2 の※1 で上清を全量カラムに通し、図 2 の※2 で溶出液を 5ml もしくは 2.5ml に設定して検討を行った。つまり、試料内に基準値量のカナマイシンが含まれていると仮定した場合で、溶出液が 5ml の際は溶出液の濃度が 0.04ppm と基準値と同等、溶出液が 2.5ml の際は溶出液の濃度が 0.08ppm となり、2 倍に濃縮されることとなる。カラムの比較検討を行うにあたり、精製の工程のみを行うため、抽出用緩衝液に直接カナマイシンを添加して実験を行った。

②抽出工程

抽出の工程は United States Department of Agriculture (以下、USDA) が 2020 年に公開した方法 [5]を元に、そこから当所で調整を行った。今回用いた操作フローに変更前の部分を追記したものを図 3 に示す。抽出用緩衝液は酢酸ナトリウムに水を 900ml 加え、pH4.0 に調製した後、EDTA、トリクロロ酢酸及び塩化ナトリウムを加え 1L まで定容して作成した。各試薬の濃度は図 3 の下部に記載の通りであり、参考とした方法[5]と同様である。試料に含まれる化合物は前処理の工程を経て希釈されるが、希釈率を下げるために試料の量を 5g へ増加した。それに伴い、試料と抽出用緩衝液を混和しやすくするためにボルテックスの工程を追加した。また、遠心分離後のろ過を容易にするために、遠心分離の時間を 10 分間へ延長した。図 3 に示した操作フローを元に実験を行い、必要に応じて適宜調整することとした。



※10mM酢酸ナトリウム－0.4mM EDTA－2%トリクロロ酢酸－0.5%塩化ナトリウム－水

図3 抽出工程の操作フロー

3. 結果及び考察

i) LC 部の分析条件の設定

0.1ppm のカナマイシンを、グラジエント条件を変えて分析した結果を図4に示す。工程1から2にかかる時間が短くなるにつれて、保持時間が早くなったが、ピーク形状に大きな変化は認められなかった。1ppm のストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンを、工程1から2にかける時間を1分間にして分析を行った結果を図5に示す。図5のピーク形状等に問題がないことから、分析にかける時間を短くするために、工程1から2にかける時間を1分間として分析を行うこととした。

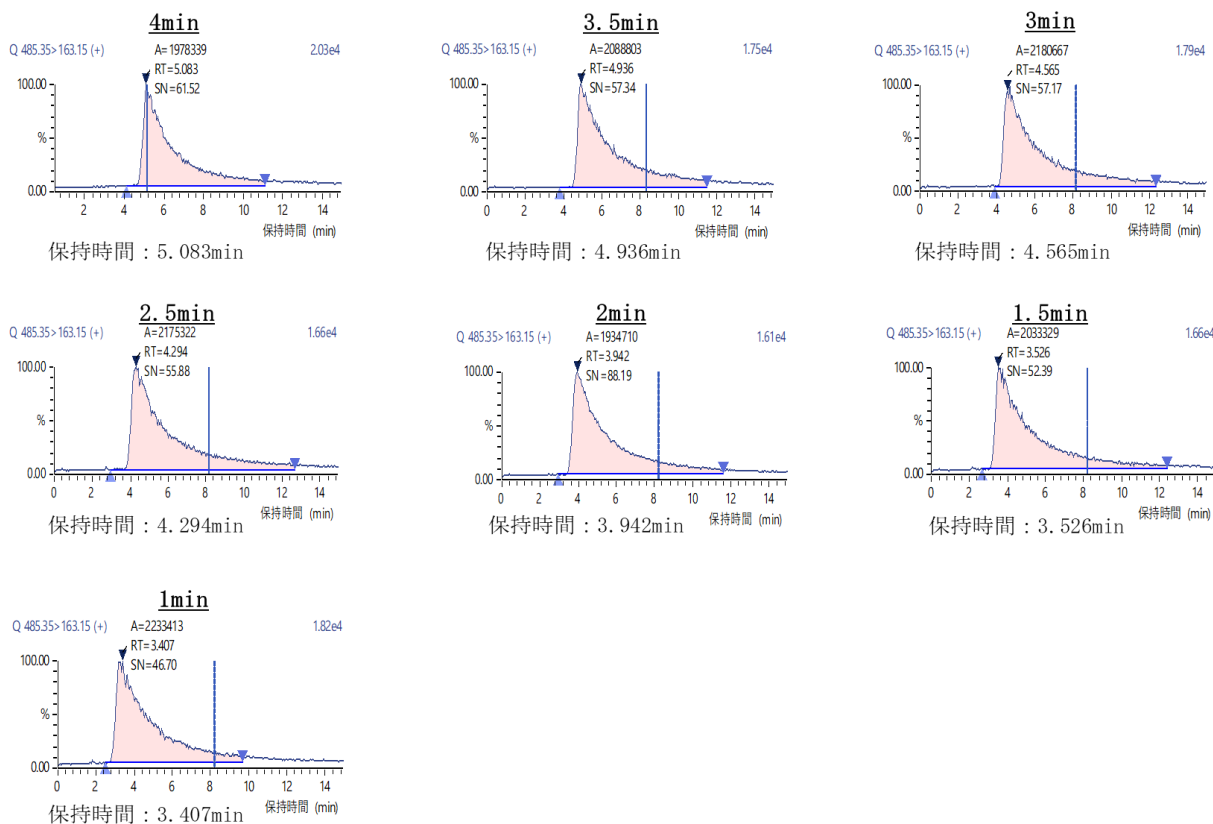


図4 グラジエント条件を段階的に変更して分析を行ったカナマイシンのクロマトグラム
各クロマトグラム上部の時間は工程1から2にかかる時間、下部に保持時間を記載

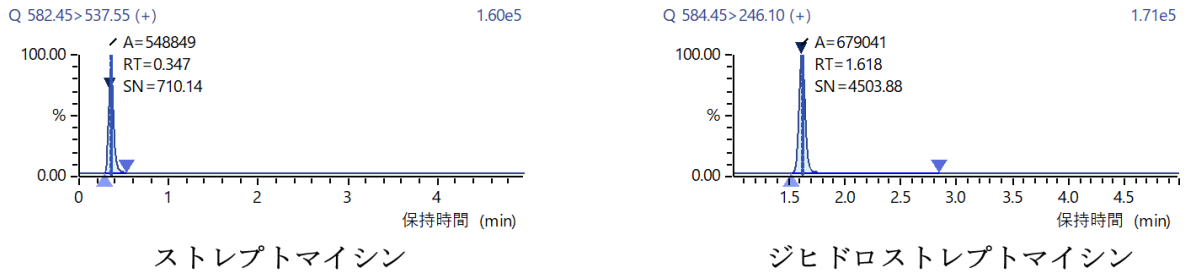


図5 ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンのクロマトグラム

カナマイシンを0.01ppm、0.1ppm、1ppmの3濃度で、且つ7種類の移動相の組み合わせで比較検討を行った結果を図6に示す。0.01ppmにおいて最もピーク形状が良好であったのは⑦の移動相の組み合わせとなった。いずれの移動相もギ酸アンモニウム濃度が20mMが最適であったことから、移動相に添加する試薬をこれよりさらに増加して、低濃度でのピーク形状の改善を試みることは困難と考えた。⑦の移動相の組み合わせで0.04ppmのカナマイシンを分析した結果を図7に示す。ピーク形状に問題が無かったことから、カナマイシンの検量点の最低濃度を0.04ppmとし、0.08ppm、0.16ppmの3点、すなわち、基準値濃度、基準値濃度の2倍、基準値濃度の4倍の3点で検量線を作成(図8)することとした。ジヒドロストレプトマイシンも同様に検量点を取り、検量線を作成した結果を図8に示す。R²=0.95以上であることから作成した検量線に問題はなく、今後の前処理方法の検討に用いることとした。

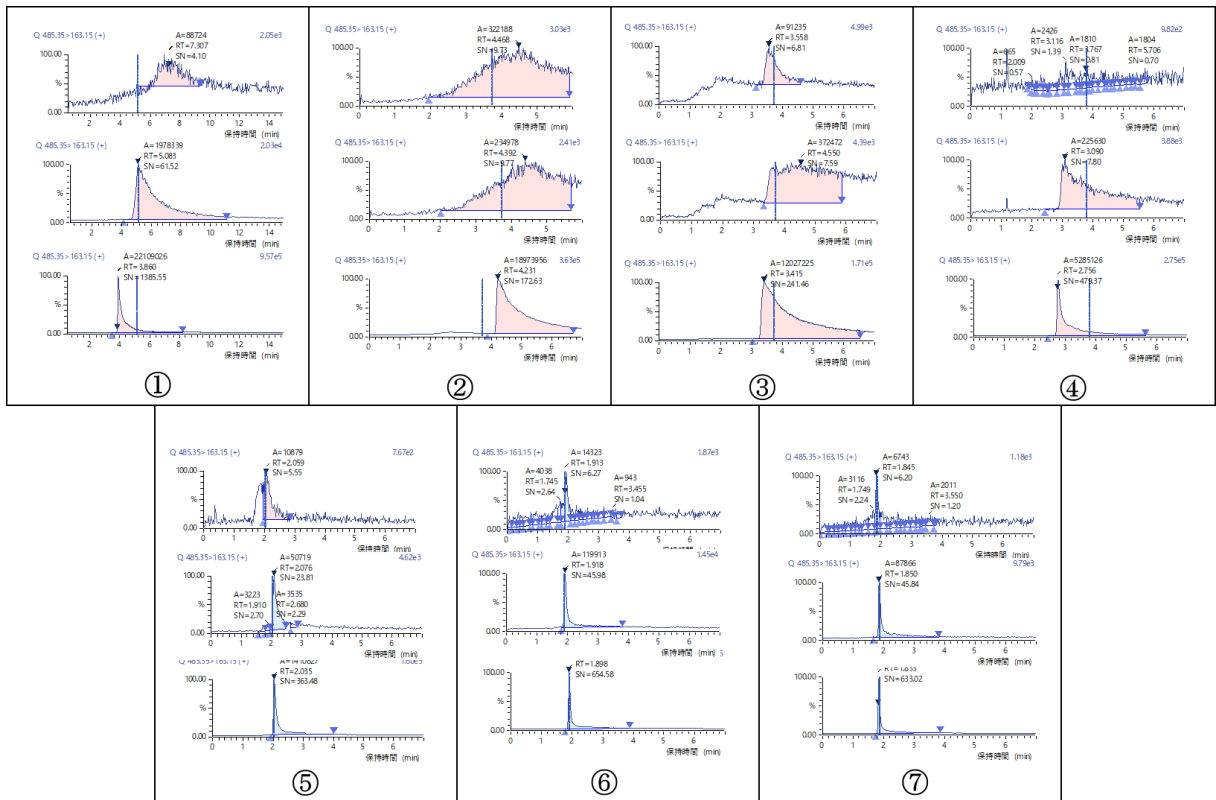


図6 移動相の比較検討

図中の①から⑦は表5の①から⑦に対応

3つのクロマトグラムは上から順に0.01ppm、0.1ppm、1ppm

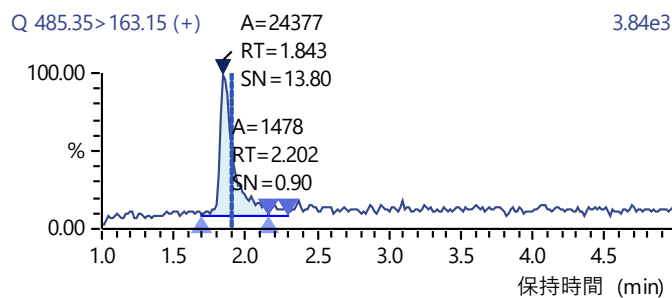


図 7 カナマイシン 0.04ppm のクロマトグラム

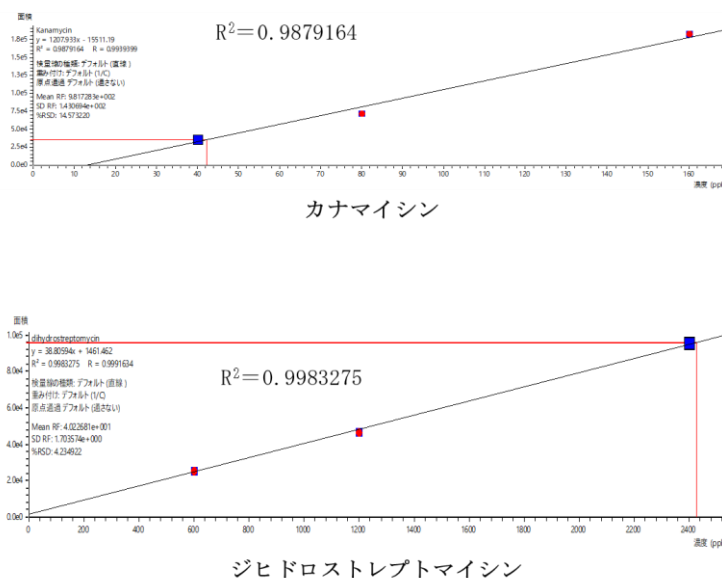


図 8 カナマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの検量線

ii) 前処理方法の検討

初めに、20mlの上清を全量カラムに通液し、5mlで溶出した際のHLBとMCXの性能の比較を行った。溶出する際の濃度が低い可能性を考慮し、検体中に1ppmのカナマイシンが含まれていると想定して比較検討を行った結果を図9に示す。ピーク形状およびピークの面積から、MCXよりもHLBの方がより上清をカラムに通液したときの保持力もしくは溶出時の溶出力が強かったと考えられる。次に、検体中に基準値量、すなわち0.04ppmのカナマイシンが含まれていると想定し、20mlの上清を全量HLBカラムに通液し、2.5mlで溶出した際の結果を図10に示す。ピーク形状およびピーク面積の比較のために、0.1ppmのカナマイシンの分析結果と比較した。カラムに上清20mlを通液した際に、100%カラムに保持され、且つ2.5mlで溶出した際にその全量が溶出された場合、溶出液の濃度は0.08ppmとなる。実験結果と0.1ppmのピーク面積を比較したところ、0.096ppmと算出されたことから、実験の結果、負荷した0.08ppmのカナマイシンがほぼ溶出されたと考えられる。

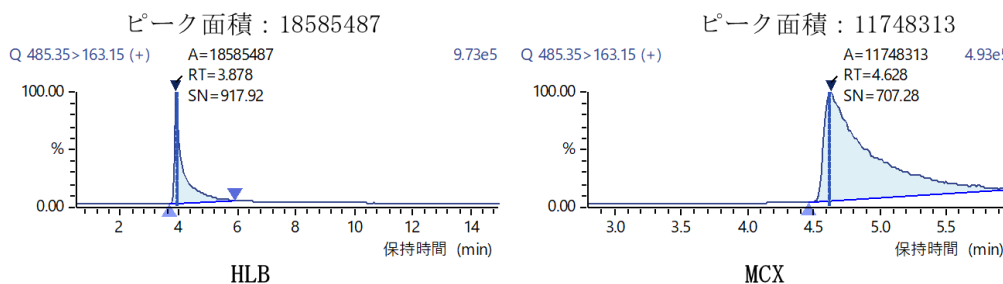


図 9 HLBとMCXの比較

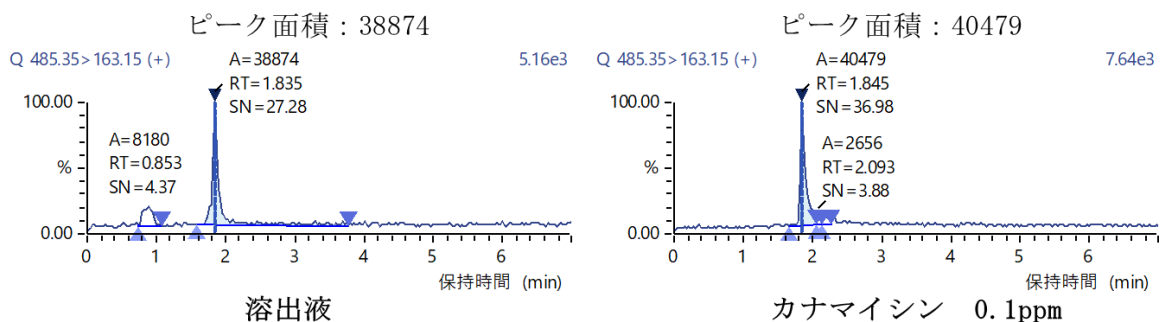


図 10 2.5ml で溶出した場合のクロマトグラム

豚の筋肉を用いてカナマイシンを基準値濃度添加し、抽出及び精製まで行った結果を表 6 の (a) に示す。回収率は 4 割程度にとどまった。そこで、抽出用緩衝液を 2 倍の 40ml に増加する方法とろ過の工程を省く方法の 2 種類の方法を追加で行った結果を表 6 の (b) 及び (c) に示す。ろ過の工程を省いた際はジヒドロストレプトマイシンもカナマイシンと同様に基準値濃度添加して実験を行った。抽出用緩衝液を増加する方法では回収率がさらに低下した。Yang ら [3] の報告では充填剤が 500mg 含まれている HLB を用い、上清は 20ml 通液していたが、本検討で用いた HLB の充填剤の量は 60mg であったことから、カラムに通液する上清の量に対して HLB の充填剤の量が足りなかったと考えられる。また、ろ過を行わない方法ではカナマイシンの回収率が向上したが 20ml 全量を通液するのにかなりの時間を要した。さらに、その後何度か同様にろ過せずに実験を行ったが、上清中に浮遊物が多く、HLB に詰まりが生じて 20ml 全量を通液することが出来なかった。USDA の報告 [5] でも、ドライアイス凍結粉碎方法で肉を均一化した際はろ過が必要であると記載されていたことから、ろ過工程は外すことが出来ないと考える。当初、ろ過を行う際にガラス製のロートを用いていたが、アミノグリコシド系の化合物はガラスに吸着することが報告 [6] されていることから、プラスチック製のロートを用いるか、もしくはロート無しでろ過を行う必要があったと考える。

表 6 添加回収試験の結果

		測定値 (ppb)	回収率 (%)
(a)		32.4565	40.57
(b)		23.8795	29.85
(c)	カナマイシン	51.8477	64.81
	ジヒドロストレプトマイシン	410.7556	34.23

(a) 図 3 の操作フローで実験を行った結果

(b) 抽出用緩衝液を 40ml へ増加した結果

(c) ろ過工程を省いた結果

4. まとめ

今回の検討で、カナマイシンを中心としたアミノグリコシド系抗生物質の分析条件について決定することができた。また、前処理工程についてはいくつかの検討事項があることから、それらを再検討し、当所における定量試験法の確立を目指したい。

5. 引用文献

- [1]大宮 信哉、熊澤 武志、李 曉隴、庄司 幸子、佐藤 淳一、澤口 聡子、吉村吾志夫、佐藤 啓造:HILIC-MS-MSによる血漿中アミノグリコシド系抗菌薬の簡易迅速分析法、昭和学会誌 第76巻 第3号、285-298(2016)
- [2]アジレントテクノロジー株式会社:親水性相互作用クロマトグラフィーのメソッド開発およびトラブルシューティング、5991-9271JAJP(2018)
- [3]Jinchuan Yang, Paul D,Rainville:Analysis of Aminoglycosides in Foods Using a Zwitterionic Stationary Phase and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry、Waters Application Note 720007442(2022)
- [4]梶田 弘子、阿久津千寿子、畠山えり子、小向隆志:LC/MS/MSによる乳中のアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析、食衛誌、Vol.49,No.3、189-195(2008)
- [5]CLG-AMG4.03、Screening for Aminoglycosides by LC/MS-MS、USDA Food Safety and Inspection Service,Office of Public Health Science、effective:11/02/20
- [6]Marc Cherlet、Siegrid De Baere、Patrick De Backer: Quantitative determination of dihydrostreptomycin in bovine tissues and milk by liquid chromatography- electrospray ionization- tandem mass spectrometry、Journal of Mass Spectrom、42、647-656(2007)