報 文

LC/MS による食肉中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の定量

(平成 13 年 8 月 1 日受理)

堀江正一^{*1,†} 吉田栄充^{*1} 菊池好則^{*1} 中澤裕之^{*2}Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in
Meat by Liquid Chromatography/Mass SpectrometryMasakazu HORIE^{*1,†}, Terumitsu YOSHIDA^{*1}, Yoshinori KIKUCHI^{*1} and Hiroyuki NAKAZAWA^{*2}

(^{*1} Saitama Prefectural Institute of Public Health: 639-1, Kamiokubo, Saitama,
Saitama 338-0824, Japan; ^{*2} Hoshi University: 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku,
Tokyo 142-0063, Japan; [†] Corresponding author)

A sensitive and selective method using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (LC-ESI-MS) for the determination of aminoglycoside antibiotics, streptomycin and dihydrostreptomycin, in meat has been developed. The LC separation was performed on a TSK-gel Super ODS column (10 cm × 2 mm i.d.) using 5 mmol/L heptafluoro-*n*-butyric acid (HFBA)-acetonitrile (88:12) as the mobile phase at a flow rate of 0.18 mL/min. The positive ionization produced typical $[M+H]^+$ molecular ions of both drugs (streptomycin m/z 582; dihydrostreptomycin m/z 584). The calibration graphs for streptomycin and dihydrostreptomycin were rectilinear from 0.25 to 25 ng with selected ion monitoring (SIM). The drugs were extracted with 1% metaphosphoric acid, and the extracts were added to 2 mL of 0.1 mol/L heptanesulfonic acid. The solution was cleaned up on a Bond Elut C18 (500 mg) cartridge. The recoveries of streptomycin and dihydrostreptomycin from swine and bovine muscle fortified at 0.2 $\mu\text{g/g}$ were 73.2~82.6%, and the detection limits were 0.01 $\mu\text{g/g}$ for both drugs.

(Received August 1, 2001)

Key words: ストレプトマイシン streptomycin; ジヒドロストレプトマイシン dihydrostreptomycin; アミノグリコシド系抗生物質 aminoglycoside antibiotics; 食肉 meat; 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS

緒 言

ストレプトマイシン (SM) 及びジヒドロストレプトマイシン (DSM) (Fig. 1) は、アミノ糖を構成成分として含むアミノグリコシド系抗生物質 (AGs) で、グラム陽性菌、グラム陰性菌、抗酸菌などに対して有効であることから、畜産動物の感染症治療薬として汎用されている。しかし、一方ではこれら医薬品の畜産物への残留が食品衛生上懸念されており¹⁾、畜産食品の安全性を確保するため迅速で精度の高い残留分析法が必要とされている。

従来、SM 及び DSM を含め、抗生物質の残留分析は一般に微生物学的試験法が汎用されてきた。微生物学的試験法は抗菌性物質の残留の有無をチェックするスクリーニン

グ法としては優れた手法である。しかし、選択性に欠ける面があり、検出された抗菌性物質を特定することは困難である。これに代わる方法として、UV 検出器や蛍光検出器を用いた HPLC が抗生物質の微量分析に汎用されている。ところが、SM 及び DSM などの AGs は UV も蛍光吸収もないことから、*o*-phthalaldehyde (OPA) などを用いて蛍光誘導体とした後、蛍光検出 HPLC で測定^{2), 3)}されている。しかし、誘導体化法は、日常検査法として用いるには操作が煩雑である。

HPLC の検出器に質量分析計を直結した高速液体クロマトグラフ/質量分析計は、分離分析法として最も期待されている手法であり、最近畜産食品中に残留する動物用医薬品の分析にも採用されている^{4), 5)}。今までに、タンデムタイプの LC/MS/MS を用いた SM 及び DSM の残留分析法が報告^{6), 7)}されている。しかし本法は、インターフェイスにスプリット注入法を採用していることから検出

[†] 連絡先^{*1} 埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 埼玉県さいたま市上大久保 639-1^{*2} 星薬科大学: 〒142-0063 東京都品川区荏原 2-4-41

下限値が ppm レベルと十分ではなく、かつ分析操作が煩雑である。そこで、日常検査に用いる簡易かつ感度の高い SM 及び DSM の LC/MS による残留分析法を検討した。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は埼玉県内で市販されている牛、豚の筋肉部と肝臓を用いた。

標準品：ストレプトマイシン（硫酸塩、767 μg /力価）及びジヒドロストレプトマイシン（硫酸塩、768 μg /力価）はシグマ社製を使用した。

標準溶液：標準品 13 mg（塩基として 10 mg）を精ひょうし、精製水 10 mL に溶解して標準原液を調製し、適宜 HPLC 移動相で希釈して標準溶液とした。なお、標準原液は 5°C 以下で保存した。

除タンパク・抽出用溶液：1% メタリン酸を約 10°C に冷却して用いた（用時調製）。

ヘプタフルオロ-*n*-酪酸 (heptafluoro-*n*-butyric acid): 東京化成工業(株)製、イオンペアー試薬用

ヘプタンスルホン酸ナトリウム (heptanesulfonic acid, sodium salt): Aldrich 社製

Bond Elut C18 カートリッジ (500 mg): Varian 社製、カートリッジはあらかじめメタノール 5 mL 及び精製水 10 mL でコンディショニングした後、使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

2. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズ LC/MSD を使用し、Table 1 に示した条件で測定した。

Fig. 1. Chemical structures of streptomycin and dihydrostreptomycin

3. 検量線の作成

SM 及び DSM の 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 及び 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製し、その 5 μL を LC/MS 装置に注入した。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し、モニターイオン（プロトン付加イオン, SM: m/z 582; DSM: m/z 584）より得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

4. 試験溶液の調製

試料 5 g を採り、除タンパク・抽出用溶液 25 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした後、遠心分離 (3,000 rpm; 10 min) した。上清を綿栓ろ過した後、ろ液を Bond Elut C18 カートリッジに負荷し、精製水 5 mL で洗浄した。流出液及び洗浄液を合わせ、0.1 mol/L ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 2 mL を加えた後、再度コンディショニング（先に上清を負荷したカートリッジをメタノール 5 mL 及び精製水 10 mL で洗浄）した Bond Elut C18 カートリッジに負荷した。カートリッジを精製水 5 mL で洗浄後、メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を移動相 1 mL（肝臓は 2 mL）に溶解して試験溶液とし、この 5 μL を LC/MS 装置に供した。

結果及び考察

1. LC/MS 測定条件の検討

1.1 移動相の影響

SM 及び DSM は Fig. 1 に示すとおりアミノ糖を有する水溶性塩基性化合物である。そこで、インターフェースには極性化合物のイオン化に適したエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を選択し、イオン化モードはポジティブとした。本条件により SM 及び DSM のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ （それぞれ m/z 582 及び 584）及びフラグメントイオン (m/z 263) が良好に観測された。なお、フラグメントイオンは SM 及び DSM の構成成分である streptidine ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_4$; mol wt 262.3) であると推定された。

SM 及び DSM は、前述したように水溶性塩基性化合物であり、逆相モードではカラムに保持されない。このことからトリフルオロ酢酸 (TFA)、ペンタフルオロプロピオン酸 (pentafluoropropionic acid, PFPA) やヘプタフルオロ酪酸 (heptafluoro-*n*-butyric acid, HFBA) など^{2), 6~8)} のイオンペアー剤が用いられている。そこで、揮発性のイオンペアー剤、TFA 及び HFBA を用いて保持挙動を検討し

Table 1. Operating Conditions of LC/MS

Apparatus: Agilent 1100 Series LC/MSD (Agilent Technologies)			
MS conditions		HPLC conditions	
Ionization	ESI, Positive	Column	TSK-gel Super ODS (100×2 mm)
Fragmentor	180 V	Eluent	5 mmol/L HFBA-MeCN (88:12)
Nebulizer	N ₂ (40 psi)	Flow rate	0.18 mL/min
Drying gas	N ₂ (10 L/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4,500 V	Injection size	5 μL
SIM ion	m/z 584, 582, 263		

Fig. 2. Effect of concentration of heptafluoro-*n*-butyric acid (HFBA) in mobile phase on capacity factor (k') of streptomycin and dihydrostreptomycin

Fig. 3. Effect of concentration of heptafluoro-*n*-butyric acid (HFBA) in mobile phase on the intensity of $(M+H)^+$ ions of streptomycin (m/z 582) and dihydrostreptomycin (m/z 584)

た。その結果、TFA では保持が十分ではなく、かつ強固なイオンペアーを形成するためか感度も HFBA に比べて低いものであった。そこで、HFBA をイオンペアー剤として選択し、濃度を変えて保持、感度及びピーク形状に及ぼす影響を検討した。Fig. 2 に示すように HFBA 濃度が高くなるに従いカラムに強く保持された。一方、HFBA 濃度が高くなるに従いプロトン付加イオンの強度低下が観測された (Fig. 3)。保持、相互分離及び検出感度を総合的に評価して HFBA 濃度は 5 mmol/L とした。以上の結果から、移動相には 5 mmol/L HFBA-アセトニトリル (88:12) を用い、流速は毎分 0.18 mL とした。

1.2 フラグメンター電圧の影響

ESI はマイルドなイオン化法であり、化合物の分子量情報は得やすいが、構造情報には乏しい面がある。そこで、キャピラリー出口の電圧 (フラグメンター電圧) を変えることにより、イオン源内の窒素分子との衝突条件を変化させて構造情報 (フラグメントイオン) を得る方法が利用されている^{9), 10)}。SM 及び DSM 共に、フラグメンター電圧を変えることにより、Fig. 4 に示すとおりイオンの生成比を変えることが可能であった。そこで、フラグメンター電圧は、プロトン付加イオン及びフラグメントイオンを効率的に生成する 180 V に設定した。

更に、ネブライザー圧力、乾燥ガス圧力・温度、キャピラリー電圧などの最適測定条件を検討し、Table 1 に示す

Fig. 4. Effect of fragmentor voltages on the relative abundances of $(M+H)^+$ and product ions of streptomycin (m/z 582 $\rightarrow$ m/z 263) and dihydrostreptomycin (m/z 584 $\rightarrow$ m/z 263)

条件を設定した。なお、定量にはプロトン付加イオンを用い、結果をより確かなものとするために、フラグメントイオンも同時にモニター可能な条件とした。

1.3 SIM の分析精度

プロトン付加イオン $[M+H]^+$ を選んだ SIM により SM 及び DSM の検量線を作成した。両イオンの検量線とも 0.25~25 ng の範囲で良好な直線性 ($r=0.999$) を示した。また、各注入量 (0.5, 1 及び 5 ng) における測定を 5 回行い、ピーク面積の変動係数を求めたところ、いずれの注入量においても 5% 以内であり、ほぼ満足できる分析精度を得ることができた。なお、標準溶液を移動相ではなく、精製水で調製すると低濃度領域ほど検出感度の低下が見られるので、溶解液にはイオンペアー剤 HFBA を含む移動相を使用することが重要である。

2. 前処理法の検討

SM 及び DSM は水溶性塩基性化合物であることから、トリクロロ酢酸 (TCA) や過塩素酸 (PCA) などを用いて除タンパク・抽出後、陽イオン交換樹脂充てんカートリッジによる固相抽出法が汎用されている²⁾。そこで、まずはじめに除タンパク剤として TCA 及び PCA を用い、カートリッジとして強陽イオン交換樹脂充てんカートリッジ、Bond Elut SCX 及び弱陽イオン交換樹脂充てんカートリッジ、Bond Elut CBA を用いて検討した。強陽イオン交換樹脂充てんカートリッジでは保持が強すぎ、逆に弱陽イオン交換樹脂充てんカートリッジでは保持がやや不十分であった。

そこで、HPLC 分離モードと同様に、イオンペアー剤と逆相系カートリッジを組み合わせた前処理法を検討した。除タンパク剤として TCA, PCA 及びメタリン酸、イオンペアー剤として HFBA 及びヘプタンスルホン酸 (heptanesulfonic acid)、逆相系カートリッジとして、BAKER-BOND spe C18 (500 mg), Bond Elut C18 (500 mg), Sep-Pak tC18 (400 mg) 及び OASIS HLB (60 mg) を用いて検討した。その結果、除タンパク・抽出用溶液には 1% メタリン酸、イオンペアー剤には 0.1 mol/L ヘプタンスルホン酸、カートリッジには Bond Elut C18 (500 mg) を用いたとき、最も良好な結果を得ることができた。

Fig. 5. LC/MS-ESI chromatograms of (A) standard mixture (both drugs, 5 ng; equivalent to $0.2 \mu\text{g/g}$), (B) bovine muscle extract and (C) bovine liver extract

Fig. 6. LC/MS-ESI chromatograms of (A) standard mixture (both drugs, 5 ng; equivalent to $0.4 \mu\text{g/g}$ in bovine liver) and (B) extract of bovine liver fortified at $1 \mu\text{g/g}$

本法では試料由来成分をより多く除去するために、まずはじめにメタリン酸抽出液にイオンペアー剤を加えないでカートリッジに負荷した。本操作により疎水性の高い化合物はカートリッジに保持され、SM 及び DSM は保持され

ず流出した。流出液にイオンペアー剤を加え、再度コンディショニングした Bond Elut C18 に負荷することにより、より夾雑成分の少ない試験溶液を得ることができた。操作性を考慮すると、はじめからメタリン酸抽出液にイオ

Table 2. Recoveries of Streptomycin and Dihydrostreptomycin from Meat

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (mean $\pm$ S.D., $n=5$) (%)	
		Streptomycin	Dihydrostreptomycin
Swine muscle	0.2	79.5 $\pm$ 4.5	76.7 $\pm$ 6.9
Swine liver	1.0	76.9 $\pm$ 7.6	65.9 $\pm$ 9.3
Cattle muscle	0.2	82.6 $\pm$ 5.5	80.2 $\pm$ 7.1
Cattle liver	1.0	78.2 $\pm$ 6.5	73.2 $\pm$ 7.3

ンペアー剤を加えて試験溶液を調製することが好ましいが、この処理法ではSM, DSMのプロトン付加イオンの強度がマトリックスの影響により30~40%程度低下が見られた。なお、SMのプロトン付加イオンは、特にマトリックスの影響を受けやすく、マトリックスの影響を避ける目的で、本法においては試料が肝臓の場合、試験溶液量を2 mLとした。本法を用いることにより、Fig. 5に示すとおり夾雑物の影響を受けることなく食肉中のSM及びDSMを分析することが可能であった。

3. 添加回収実験

市販の牛、豚の筋肉部と肝臓にSM及びDSMを0.2あるいは1.0 $\mu\text{g/g}$ の濃度に添加し(Fig. 6)、回収率を求めた。Table 2に示すとおり各試料に対する回収率は平均でおおむね70%以上、標準偏差(S.D.)も10以内であり、残留分析法としてはほぼ満足できる値が得られた。なお、本法による検出限界は、SM及びDSMとも豚肉・牛肉にあっては0.01 $\mu\text{g/g}$ 、豚肝臓・牛肝臓にあっては0.02 $\mu\text{g/g}$ (S/N=3)まで十分検出することが可能であった。

ま と め

国際食品規格であるCodex基準ではSM, DSMの暫定最大残留基準値(MRL)を設定している¹¹⁾。暫定MRLはSM及びDSMの総残留量として設定されており、牛、豚の筋肉部及び肝臓とも0.6 $\mu\text{g/g}$ (腎臓は1 $\mu\text{g/g}$)である。本法は操作性に優れており、検出感度もCodexの暫定基準を十分満足するものである。更に、既に報告されているLC/MS/MSによる分析法^{6), 7)}に比べ検出感度に優れ、かつ分析操作も簡易であり、日常検査法として有用と思われる。なお、現在我が国ではSM, DSMについては残留基準値は設定されていないが、残留基準値設定プライオリティリスト^{*3}に収載されており、近い将来残留基準値が設定されるものと考えられる。今回確立したLC/MSは、SM, DSMのように発色団のないアミノグリコシド系抗生物質(AGs)の残留分析に極めて有効な手法であ

り、他のAGsも含め、食品中の有害化学物質の定性・定量法としての応用が期待される。

文 献

- 1) Horie, M., Nakazawa, H., Current legal regulation of veterinary drugs and their residual analysis. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **36**, 329-343 (1995).
- 2) Salisbury, C.D.C., "Chemical analysis for antibiotics used in agriculture", Oka, H., Nakazawa, H. *et al.* eds., Arlington, AOAC Int., 1995, p. 307-332. (ISBN 0-935584-57-9)
- 3) Tawa, R., Matsunaga, H., Fukimoto, T., High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. Chromatogr. A*, **812**, 141-150 (1998).
- 4) Niessen, W. M. A., Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **812**, 53-76 (1998).
- 5) Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Use of liquid chromatography/mass spectrometry in food analysis. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **42**, 159-173 (2001).
- 6) McLaughlin, L. G., Henion, J. D., Determination of aminoglycoside antibiotics by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometry and ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **591**, 195-206 (1992).
- 7) McLaughlin, L. G., Henion, J. D., Kijak, P. J., Multi-residue confirmation of aminoglycoside antibiotics in bovine kidney by ionspray high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 417-429 (1994).
- 8) Miguel, I. D., Puech-Costes, E., Samain, D., Use of mixed perfluorinated ion-pairing agents as solvents in ion-pair high-performance liquid chromatography for the preparative purification of aminoglycoside antibiotics. *J. Chromatogr.*, **407**, 109-119 (1987).
- 9) Horie, M., Ishii, R., Yoshida, T., Hoshino, Y., Nakazawa, H., Determination of erythromycin and oleandomycin in meat and fish by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, 309-313 (1999).
- 10) Horie, M., Nakazawa, H., Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **882**, 53-62 (2000).
- 11) "Evaluation of certain veterinary drug residues in food" Fifty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Tech. Rep. Ser., No. 893, 2000.

*3 「動物用医薬品の残留基準値設定プライオリティリスト」,
厚生省乳肉衛生課, 平成10年12月11日