

動物用医薬品の多成分同時分析の検討 —キノロン4種、サルファ剤4種、マクロライド2種、ステロイド1種—

内尾雅子 河原さおり 中熊秀光 田島幸治

1. 緒言

平成18年5月29日にポジティブリスト制が施行され、動物用医薬品等の規制対象が33物質から242物質に拡大された。

それに伴って、平成17年11月29日に試験法が一部改正され、畜水産物については現在まで3つの一斉試験法が定められた。

本市において動物用医薬品の一斉試験を行うにあたって、まず、対象物質の抽出を行った。厚生労働省のモニタリング調査や本市の食肉衛生検査所の病畜に添付された診断書をもとに、20程度の動物用医薬品が、主に使用されていると考えた。そのうち11物質が「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」（以下公定法Ⅰ）に含まれていた。この一斉試験法では、90物質が分析対象になっているが、これらの全ての化合物の同時分析を保証したのではなく、また測定部位、回収率等については言及していない。

そこで、ブタの筋肉（くび肉、横隔膜）、腎臓、肝臓について、選定した11物質を測定対象にして詳細な検討を行った。

2. 実験方法

(1) 試料及び試薬

検討に用いた試料は豚の4部位（くび肉、横隔膜、腎臓、肝臓）である。

標準品：ダノフロキサシン（DNFX）、サラフロキサシン（SRFX）、シプロフロキサシン（CPFX）、チルミコシン（TMS）、デキサメタゾン（DX）はSIGMA-ALDRICH製、スルファジミジン（SDD）、スルファモメトキシシン（SMMX）、スルファジメトキシシン（SDMX）は関東化学製、エンロフロキサシン（ERFX）、エプリノメクチン（EPR）は林純薬工業製、スルファキノキサリン（SQX）はRiedel-de Haën PESTANAL製を使用した。

標準原液：標準品を精ひょうし、各溶解液（下表参照）に溶解して標準原液（1000ppm）を調製した（SQXのみ500ppm）。

キノロン	シプロフロキサシン、ダノフロキサシン エンロフロキサシン、サラフロキサシン	20%0.1N NaOH /80%メタノール
サルファ剤	スルファジミジン、スルファモメトキシシン スルファジメトキシシン、スルファキノキサリン	アセトニトリル
マクロライド	チルミコシン、エプリノメクチン	アセトニトリル
ステロイド	デキサメタゾン	メタノール

(2) 装置及び機器

ホモジナイザー / キネマチカ製

振とう機 / yamato MODEL SA-31

ハイキャパシティ冷却遠心機 / Kubota 8800型

ロータリーエバポレーター / 柴田科学製 R-124型

冷却微量高速遠心機 / 日立製 himac CR15D

HPLC/Waters社製600S型ポンプ、717型オートサンプラー、996型フォトダイオードアレイ検出器
MS/Perkin-Elmer Sciex Instruments社製API100

(3) 測定条件

HPLCの測定条件はTable 1～Table 2に示した。MSの測定条件はTable 3に、また、MSで定量に用いたイオンをTable 4に示した。カラムは夾雑物と対象物質を分離させるために、極性物質の保持が強いAtlantis（Waters社製）を用いた。MSで検出されるイオンは[M+H]がほとんどだが、エプリノメクチンのみ[M+Na]を用いた。

また、対象物質の構造式を図1に、スタンダードのTICを図2に示した。

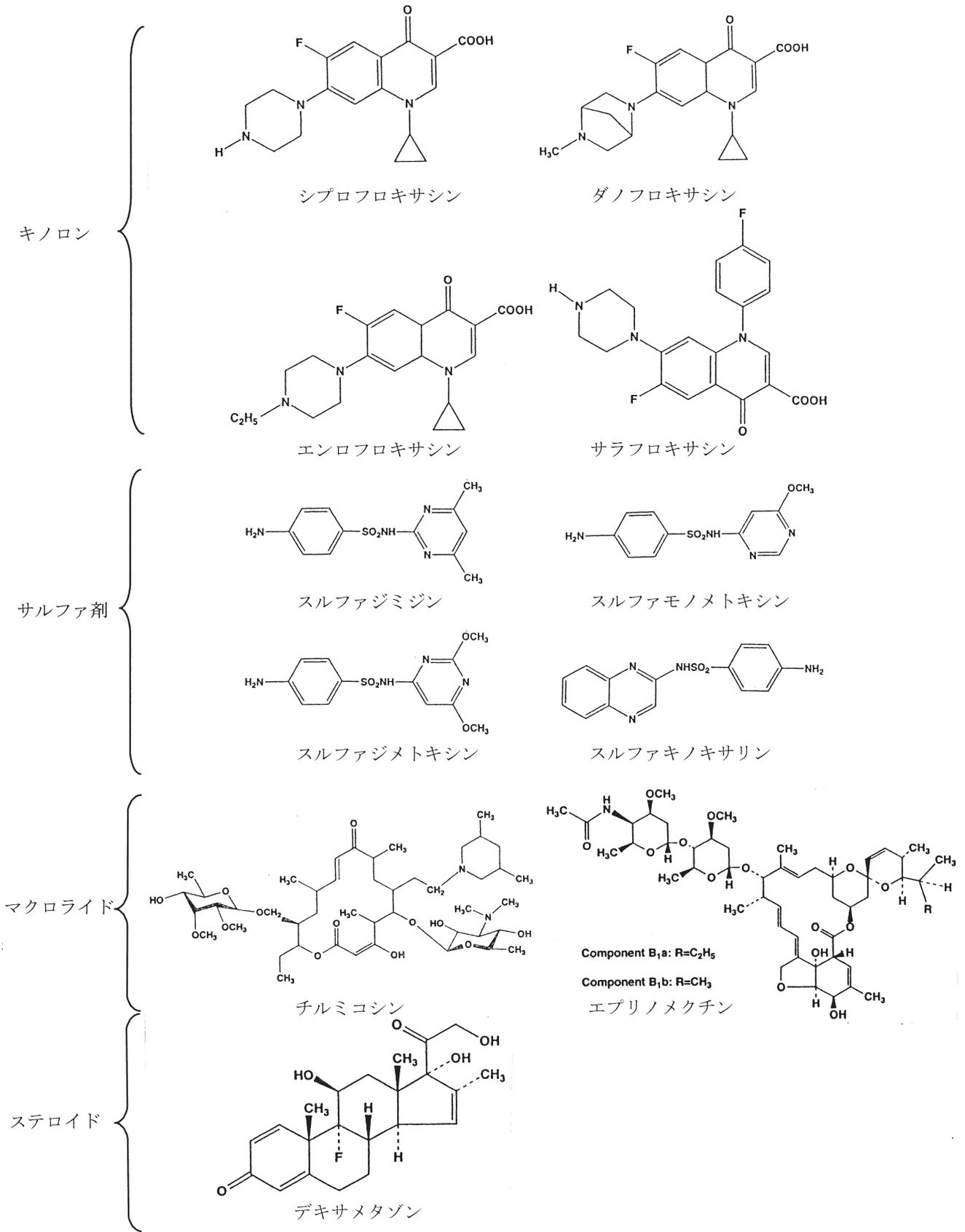


図1 各物質の構造式

Table 1 HPLC 条件

HPLC条件	
カラム	Atlantis(2.1mm×150mm×3μm)
スタンダード希釈液	CH ₃ CN : 水 = 10 : 90
溶離条件	Step gradient
流速	0.2mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μL

Table 2 ステップグラジエントの条件

Time/min	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)	D液 (%)
10	100	0	0	0
40	0	100	0	0
60	0	0	100	0
135	0	0	0	100
136	100	0	0	0
155	100	0	0	0

A液 CH₃CN : 水 : ギ酸 = 10 : 90 : 0.05
 B液 CH₃CN : 水 : ギ酸 = 20 : 80 : 0.05
 C液 CH₃CN : 水 : ギ酸 = 30 : 70 : 0.05
 D液 CH₃CN : 水 : ギ酸 = 70 : 30 : 0.05

Table 3 MS 条件

MS条件		
Split		1/2
Ionization	ESI, positive	
Gases	Nebulizer (N2)	8
	Current (N2)	10
Controls	IS	5500.0
	Temperature	400.0
	OR	30.0
	RING	260.0
	Q0	-10.0
	IQ1	-11.0
	ST	-18.0
	RO1	-10.9
	DF	-400.0
	CEM	2200.0

Table 4 LC/MS で検出される主なイオン

化合物	分子量	検出イオン
シプロフロキサシン	331	332.0
ダノフロキサシン	357	358.0
エンロフロキサシン	359	360.0
サラフロキサシン	385	386.0
スルファジミジン	278	279.0
スルファモノメトキシシン	280	281.0
スルファジメトキシシン	310	311.0
スルファキノキサリン	300	301.0
チルミコシン	869	869.6
エプリノメクチン	914	936.6
デキサメタゾン	392	393.2

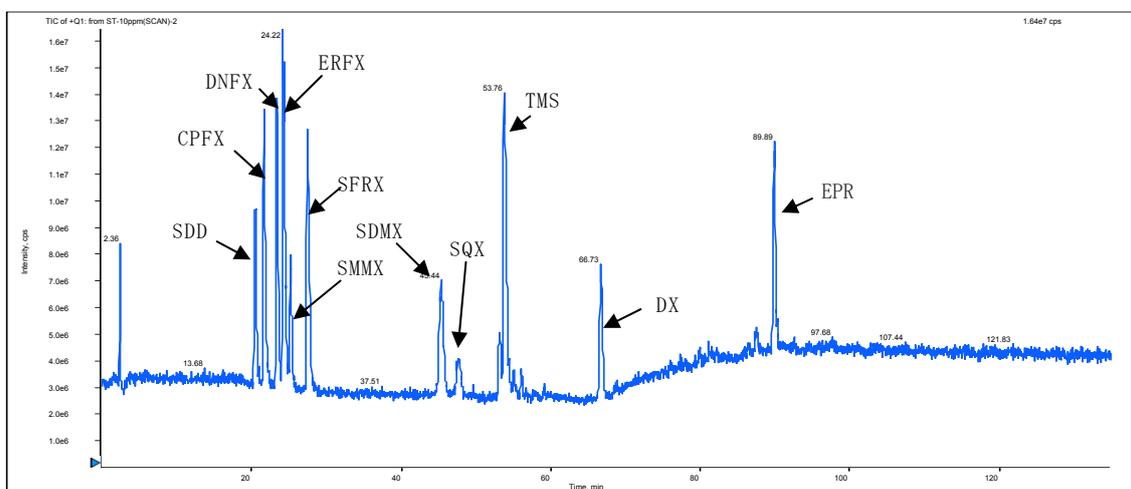


図2 スタンダード 10ppm の MS の TIC

(4) 試験溶液の調製法

試験溶液の調製については、公定法 I に準じたが、キノロン、サルファ剤はどちらも両極性物質でイオン化しやすく、ブランク（水）の添加回収で、回収率が著しく低下し、ばらつきがみられた。これらのイオン化を防ぐためには、塩の存在が不可欠ということがわかったので、すべての試料について 10 倍濃度の PBS0.3 mL を添加することにした。

また、2 回目の遠心分離は毎分 3000 回転では分離が完全ではなかったので、毎分 10000 回転で遠心することにした。

抽出操作の最後の溶解液を公定法 I のアセトニトリル：水 = 40 : 60 からアセトニトリル：水 = 10 : 90 に変更した。これは、スタンダードの希釈にアセトニトリル：水 = 40 : 60 を使用すると、キノロンのピークが 2 つに分かれたためである。

(5) 検量線

検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring/SIM) を採用し、Table 4 に示したモニターイオンより得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、検量線を作成した。

a) 絶対検量線の作成

標準原液をアセトニトリル：水 = 10 : 90 で希釈し、0.5、0.25、0.10、0.05ppm の標準溶液を作成する。0ppm はアセトニトリル：水 = 10 : 90 とする。

b) マトリックス検量線の作成

標準原液をアセトニトリル：水 = 10 : 90 で希釈し、10、5、2、1ppm のスタンダードを作成する。マトリックスの量を確保するために、試験溶液 190 μ L に各スタンダード 10 μ L を添加し、0.5、0.25、0.1、0.05、0ppm のマトリックス検量線用標準溶液を調製する。サンプルについても、試験溶液 190 μ L、アセトニトリル：水 = 10 : 90 を 10 μ L とした。

3 結果と考察

(1) 各物質の溶離挙動

各物質の溶離挙動について、PDA で測定した結果を図 3 にまとめた。

本研究で取り扱った複数の物質を含む 3 つの系列の動物用医薬品の溶離挙動を見ると、一部に逆転は見られるものの、疎水性の大きさは、キノロン、サルファ剤、マクロライドの順であり、またそれぞれの系統の中での疎水性は、おおよそ分子量に比例していた。

マクロライド、ステロイドは図 1 の構造式からも疎水性が高いことが予測されたが、特にエプリノメクチンは最も疎水性が高いことがわかった。

また、サルファ剤のスルファジメトキシシンとスルファキノキサリンの溶離挙動は極めて類似しており、アセトニトリル含有率が 20% では分離するが、25% 以上になると、分離が困難であることがわかった。

キノロンについては、スタンダードを希釈する液によって、イオン性のピークが現れ、本来のピークが低くなる現象が見られた。そこで、最適な希釈液を検討したところ、カラムに Inertsil ODS-3 (GL サイエンス社製) を使用した場合、アセトニトリル：水：ギ酸 = 10:90:0.05 が最適であった (図 4)。

しかし、同じくキノロンのスタンダードを測定するのに、Atlantis (Waters 社製) を使用した場合、希釈液にアセトニトリル：水：ギ酸 = 10:90:0.05 を使用したところ、イオン性のピークが現れた。そこで、あらためてスタンダードの希釈液を検討したところ、アセトニトリル：水 = 10 : 90 が最適であった (図 4)。

キノロンについては、このようにカラムによっても最適なスタンダードの希釈液が変化したので、注意を要する。

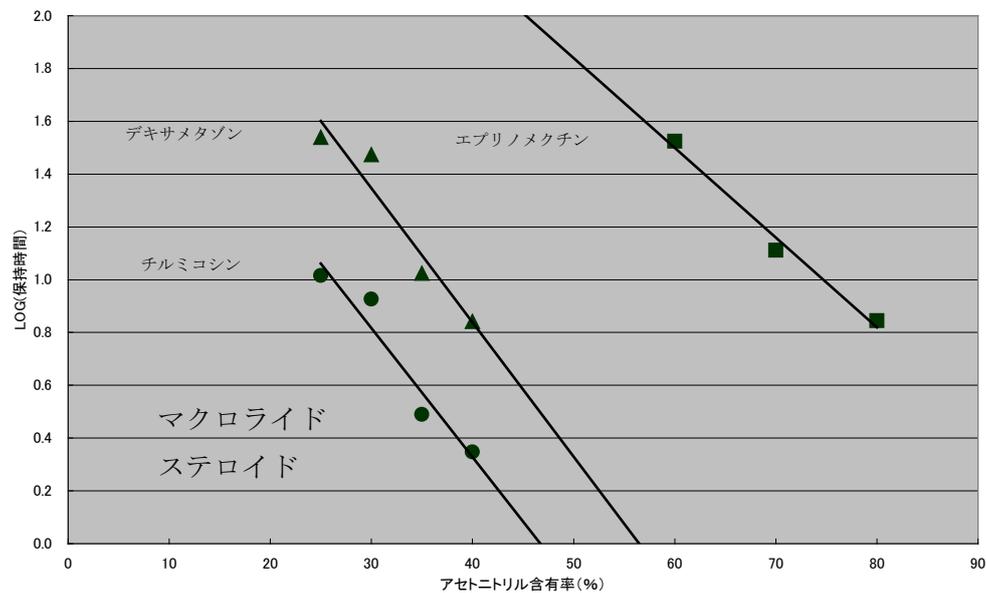
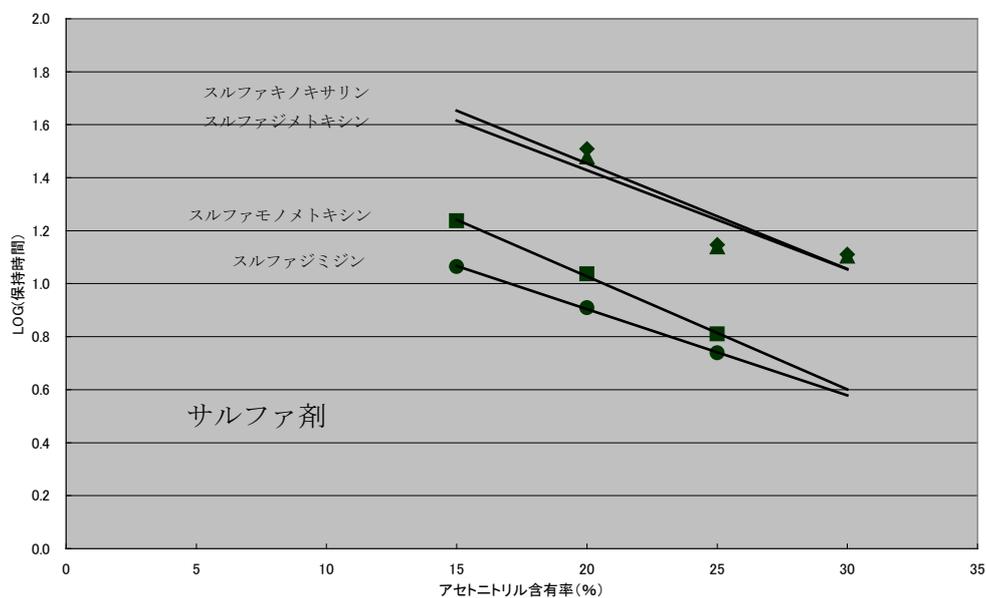
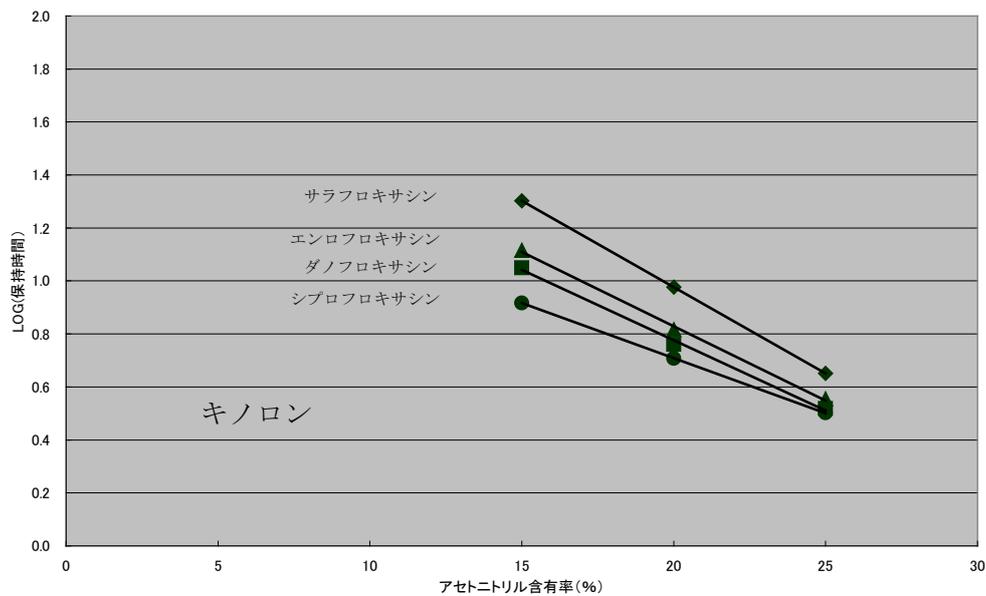


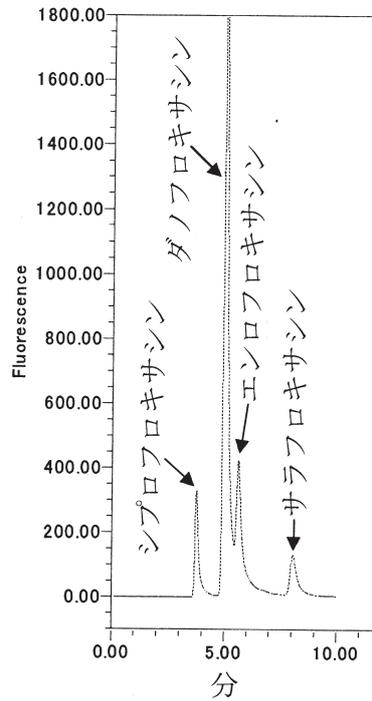
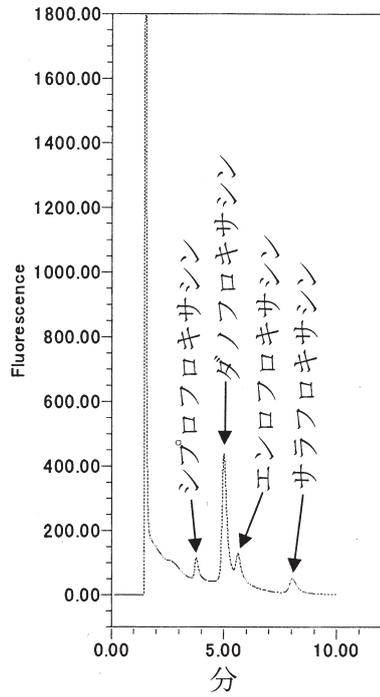
図3 各系統ごとのアセトニトリル含有率と LOG(保持時間) の関係

①Inertsil ODS-3 (GLサイエンス社製) を使用

検出器：蛍光検出器

アセトニトリル：水：ギ酸 = 50:50:0.05

アセトニトリル：水：ギ酸 = 10:90:0.05



②Atlantis (Waters社製) を使用

検出器：PDA

アセトニトリル：水：ギ酸 = 10:90:0.05

アセトニトリル：水 = 10:90

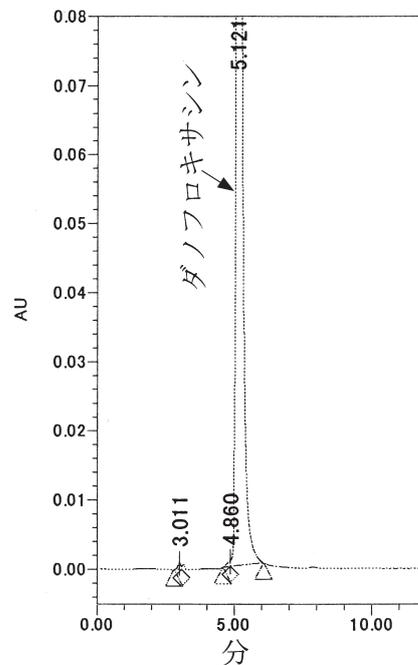
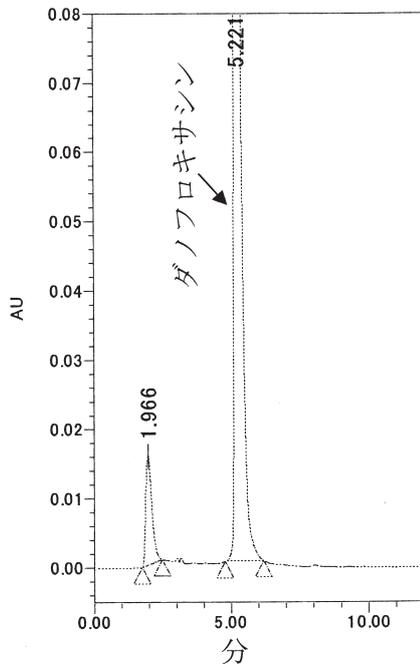


図4 キノロンスタンダードの希釈液の違いによるクロマトの変化

(2) キノロン、サルファ剤の回収率に及ぼす塩と pH の影響

塩と pH の影響については、PDA と蛍光検出器を用いて検討を行った。

キノロン、サルファ剤は、試料添加では安定した回収率が得られるが、ブランク（水）添加の回収率が不安定であった。その理由として、キノロン、サルファ剤ともに両極性物質であるので、pH に影響されているか、あるいは試料添加では回収率が高いことから、塩の存在が不可欠ではないか、という 2 点が考えられた。

そこで、水のかわりにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を使用して回収率を求めたところ、安定した回収率を得ることができた。pH の影響も調べるために、PBS の pH を調製し、回収率を求めたところ、pH には影響されないことがわかった。つまり、キノロン、サルファ剤は、塩の存在下では pH の影響は受けないと判断した。

そのため、ブランク（水）に PBS を加えることにしたが、条件をそろえるため、試料にも PBS を加えることにした。

(3) 実試料（ブタ）での検討

実試料を用いた検討は、夾雑物の影響を考慮して、LC/MS の SIM と定量ソフトである Mac Quan を用いて行った。

検量線は、絶対検量線とマトリックス検量線の傾きがほぼ等しいもの、異なるものがあり、絶対検量線を使用することは難しいことがわかった。また、各部位ごとのマトリックス検量線についても傾きが異なり、どの部位かのマトリックス検量線に代表させて定量するということができないことがわかった。したがって、定量の際は、測定する部位ごとにマトリックス検量線を作成し、それによって定量することにした。

夾雑物の影響は、SIM のそれぞれの物質の保持時間に妨害物質のピークがあるか否かを確認することで行ったが、ブタの 4 部位で妨害を受けていた物質は、シプロフロキサシン、スルファジミジン、チルミコシン、エプリノメクチン、デキサメタゾンの 5 物質であった。しかし、定量にあたっては、マトリックス検量線で補正することにより可能であると判断した。

ブタの各部位を測定するときの定量限界について調べた。

S/N 比が 3 以上としたとき、結果は Table 5 のとおり、定量限界が一部 0.01ppm に届かないところもみられたが、基準値までは定量可能であった。

Table 5 基準値とブタ各部位の定量限界（MS）の比較

(単位:ppm)

分類	物質名	ブタ腎臓		ブタくび肉		ブタ横隔膜		ブタ肝臓	
		定量限界	基準	定量限界	基準	定量限界	基準	定量限界	基準
キノロン	シプロフロキサシン	0.01	エンロフロキサシンとの和	0.01	エンロフロキサシンとの和	0.01	エンロフロキサシンとの和	0.01	エンロフロキサシンとの和
	ダノフロキサシン	0.01	0.20	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.05
	エンロフロキサシン	0.01	0.1	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01	0.1
	サラフロキサシン	0.01	-	0.01	-	0.01	-	0.01	-
サルファ	スルファジミジン	0.02	0.10	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.10
	スルファモノメトキシ	0.01	0.05	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.05
	スルファジメトキシ	0.01	0.1	0.01	0.2	0.01	0.2	0.01	0.2
	スルファキノキサリン	0.02	(0.1)※	0.02	(0.1)※	0.05	(0.1)※	0.01	(0.1)※
チロイド	チルミコシン	0.01	1.0	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	1.5
	エプリノメクチン	0.01	(2) ※	0.01	(0.1) ※	0.01	(0.1) ※	0.01	(2) ※
チロイド	デキサメタゾン	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.04	0.01	0.04

「-」は基準の設定なし

※ その他の陸棲哺乳類に属する動物を適用

マトリックス検量線でブタ各部位の添加回収率を求めた (Table 6)。

添加はスタンダード 0.5ppm を 1 mL 添加した (サンプル中濃度 0.1ppm)。

ブタ腎臓、ブタくび肉は回収率がほとんど 50%以上であったが、ブタ横隔膜、ブタ肝臓では 50%以下がいくつか見られた。エプリノメクチンについては、極性が低いため、抽出操作の最後の溶解液を公定法 I のアセトニトリル：水 = 40 : 60 からアセトニトリル：水 = 10 : 90 に変更したことによって、回収率が著しく低くなったと考えられる。

Table 6 ブタ各部位の回収率 (%)

分類	物質名	ブタ腎臓	ブタくび肉	ブタ横隔膜	ブタ肝臓
キノロン	シプロフロキサシン	55.0	51.5	38.9	33.1
	ダノフロキサシン	56.4	54.8	45.4	44.3
	エンロフロキサシン	77.6	79.9	57.3	57.5
	サラフロキサシン	71.9	65.3	50.5	46.4
サルファ剤	スルファジミジン	89.1	91.9	80.6	78.2
	スルファモノメトキシシン	90.0	84.4	79.2	71.3
	スルファジメトキシシン	86.1	73.6	88.1	54.2
	スルファキノキサリン	76.4	63.3	145.6	30.6
マクロライド	チルミコシン	58.1	90.7	55.8	57.1
	エプリノメクチン	23.8	0.5	4.7	0.0
ステロイド	デキサメタゾン	79.7	43.3	48.2	34.4

※ブタ横隔膜のスルファキノキサリンはマトリックス検量線が不良

実試料について LC/MS で検討を行った結果、定量下限、夾雑物の影響、回収率等で、必ずしも満足する結果ではない。

そこで、感度、選択性が LC/MS よりさらに優れた LC/MS/MS で回収率、夾雑物の影響を検討した。この際、HPLC の分離カラムは YMC-Pack Pro C18 を使用したが、スタンダードの希釈液にアセトニトリル：水 = 40 : 60 を使用しても、キノロンのピーク形状に問題がなかったため、最終溶解液をアセトニトリル：水 = 40 : 60 に変更した。

LC/MS/MS で測定した回収率を Table 7 に示した。ブタ肝臓の回収率で一部 60%台の物質が見られるものの、ブタの腎臓、くび肉、横隔膜では 77.7 ~ 114%と良好な結果が得られた。

夾雑物については、代表例としてブタ腎臓の MRM (multiple reaction monitoring) のチャートを図 5 に示したが、夾雑物の影響は見られなかった。その他の 3 部位についても夾雑物の影響は見られなかった。

Table 7 ブタ各部位の回収率 (%) と定量限界 (LC/MS/MS)

分類	物質名	定量下限※ (ppm)	mass range	ブタ腎臓	ブタくび肉	ブタ横隔膜	ブタ肝臓
キノロン	シプロフロキサシン	0.01	332.2/288.3	80.2	77.7	82.6	61.8
	ダノフロキサシン	0.01	358.2/82.2	102	104	114	92.4
	エンロフロキサシン	0.01	360.2/316.3	98.7	90.9	99.7	88.5
	サラフロキサシン	0.01	386.2/342.3	84.9	82.3	86.5	69.0
サルファ剤	スルファジミジン	0.01	279.1/92.2	86.7	99.1	108	79.9
	スルファモノメトキシ	0.01	281.1/156.2	84.9	89.4	100	80.1
	スルファジメトキシ	0.01	311.1/156.2	98.6	98.0	101	90.3
	スルファキノキサリン	0.01	301.1/156.2	96.1	81.2	93.8	73.1
テトラサイクリン	チルミコシン	0.01	869.6/174.3	91.9	110	96.4	102
	エプリノメクチン	0.01	936.5/490.4	81.0	94.3	113	79.3
ステロイド	デキサメタゾン	0.01	373.2/147.0	91.0	98.5	86.7	62.6

※定量限界はブタ4部位共通

使用カラム YMC-Pack Pro C18 (内径2mm、長さ50mm、粒子径5 μ m)
 溶離液 溶離液A 0.05%ギ酸
 溶離液B CH₃CN
 グラジエント条件 B液1%(1min)-15min-99%(5min)-1%(10min)

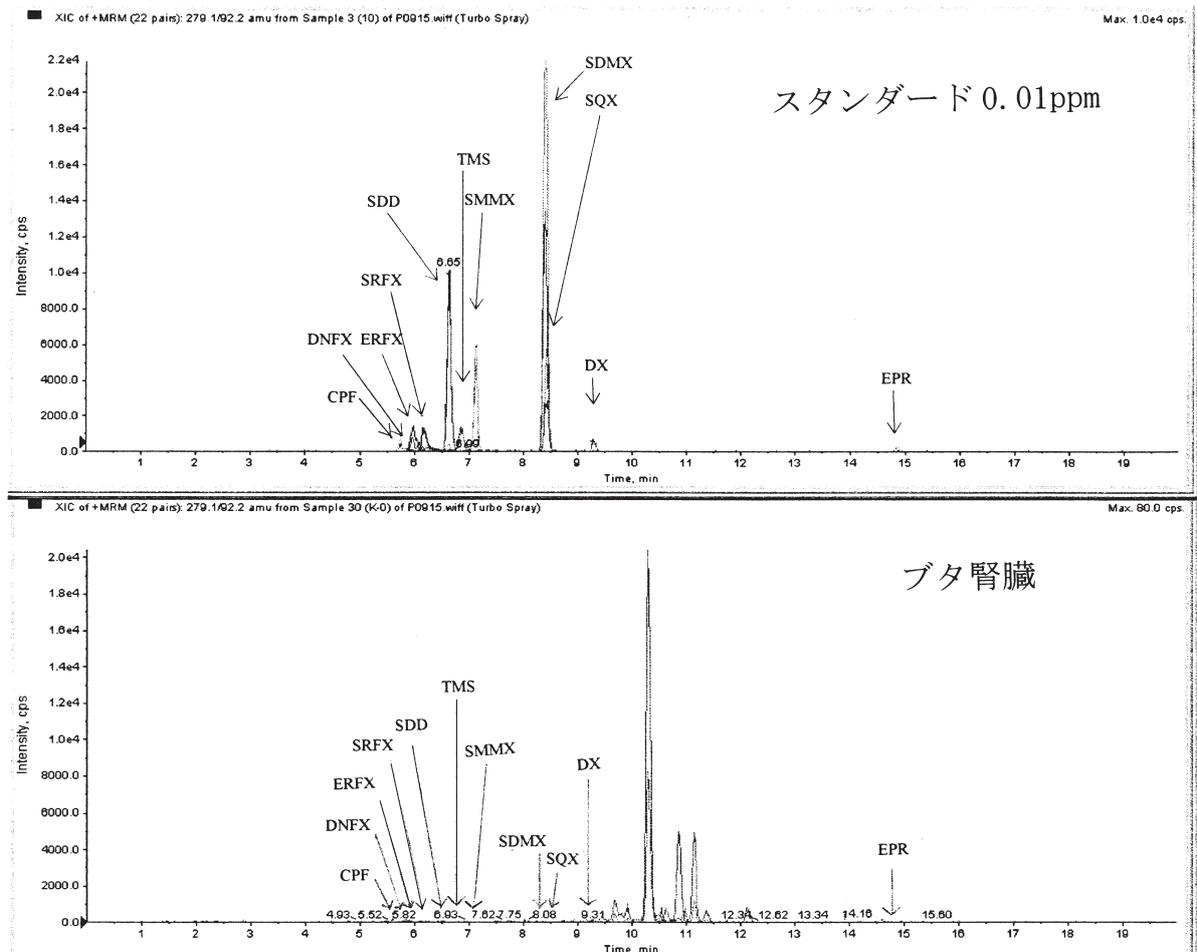


図5 スタンダード0.01ppmとブタ腎臓のMS/MS (MRM) の比較