

(4) 動物用医薬品一斉分析法の改良の検討

○山口麻綾、佐々木秀樹

1. はじめに

当所における動物用医薬品一斉分析法(以下、従来法)は QuEChERS 法で抽出および精製を行い、液体クロマトグラフ四重極質量分析計(以下、LC-MS/MS)で測定を行うものである。昨年度、大幅な改良を行った結果[1]、豚の筋肉で 46 種類、牛の筋肉で 49 種類、鶏の筋肉で 47 種類の化合物で分析の妥当性が確認されている。一方、妥当性が確認できなかった化合物には、テトラサイクリン系やペニシリン系の生産現場でよく用いられている化合物が含まれており、当所におけるモニタリング検査では豚と肉用鶏の検体数が多いことからさらなる改善が必要である。、以前検討した 62 化合物について、それらを対象と販売されている割合が多い抗生物質及び合成抗菌剤[2]を分析可能とし、検査対象化合物を拡充することを目的として試験法の改良を行った。妥当性評価を行ない、一定程度の成果が得られたため報告する。

2. 材料及び方法

(1) 材料

検体は豚、牛、鶏の筋肉を用い、ドライアイス凍結粉碎方法で均一化を行った。標準品及び市販の標準混合液は全て富士フィルム和光純薬(株)製の HPLC グレードを使用した。各標準品はメタノールもしくはアセトニトリルに溶解させて濃度が 20ppm もしくは 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、各化合物の最終濃度が 20ppm になるように同系統の化合物と混合した。使用した試薬等は表 1 に、LC-MS/MS の測定条件は表 2 に示した。分析対象化合物と LC-MS/MS による分析条件を表 3 に示した。なお、分析条件は島津製作所 LC/MS/MS メソッドパッケージ動物用医薬品 Ver.2 により設定した。ただし、一部化合物は当所で条件設定を行った。その結果、検討した化合物数は 60 種類となった。

表1 試薬等

試薬名	グレード等
水	超純水
アセトニトリル	LCMS用(移動相用) 試薬特級(抽出溶液用)
ギ酸 メタノール	LCMS用
酢酸 ジメチルスルホキシド (以下、DMSO) EDTA	試薬特級

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	オクタデシルシリル化シリカゲル(内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3 μ m)
カラム温度	40度
移動相	A液:0.1%ギ酸-水 B液:0.1%ギ酸-アセトニトリル
注入量	試験溶液2 μ Lを超純水8 μ Lと共注入
グラジエント	A液:B液=99:1(0min) \rightarrow 85:15(1min) \rightarrow 60:40(6min) \rightarrow 0:100(10min) \rightarrow 0:100(18min) \rightarrow 99:1(18.01min) \rightarrow 99:1(22min)
流速	0.2mL/min
イオン化モード	ESI(+), ESI(-), MRMモード

(2) 方法

i) 操作フロー

今回の検討で用いた豚及び牛の筋肉の一斉分析法の操作フローは図1の通りであり、従来法を一部変更している。テトラサイクリン系の化合物等、0.1M EDTA に溶解しやすい化合物の回収率向上を目的として、0.1MEDTA の量を増やし、それに伴って2%酢酸-2%DMSO-アセトニトリルの量を増やしている。また、従来法では抽出及び精製の工程を経て試料内の化合物濃度が10分の1となったが、同様の希釈率となるように精製方法を一部変更した。

表3 分析対象化合物及びLC-MS/MSによる分析条件

化合物 グループ	動物用医薬品	保持時間 (min)	分析条件(m/z)			
			プリカーサーイオン	プロダクトイオン		
				定量イオン	確認イオン	
①	キノロン系	サラフロキサシン	6.95	386.15	368.05	342.10
		オキソリニック酸	8.94	262.05	244.05	216.05
		オフロキサシン	5.92	362.15	318.10	261.05
		オルビフロキサシン	6.62	396.15	352.20	295.10
		エンロフロキサシン	6.49	360.15	316.20	245.15
		シプロフロキサシン	6.00	332.15	314.10	231.05
		ジフロキサシン	7.17	400.15	299.10	356.20
		ダノフロキサシン	6.25	358.15	82.10	340.20
		ナリジクス酸	9.83	233.10	187.10	215.05
		ノルフロキサシン	5.90	320.30	302.30	231.25
		ピロミド酸	10.44	289.15	243.10	200.90
	フルメキン	9.91	262.10	202.00	244.10	
	マルボフロキサシン	5.87	363.15	72.15	320.10	
	テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	6.09	461.25	426.25	443.25
	クロルテトラサイクリン	7.53	479.15	444.30	154.20	
テトラサイクリン	6.40	445.30	410.25	415.20		
ドキシサイクリン	7.78	445.30	428.30	154.20		
リンコマイシン	5.20	407.25	126.20	359.30		
②	サルファ剤系	オルメプリム	6.29	275.15	123.15	259.10
		ジアベリジン	5.60	261.15	245.10	123.05
		スルファエトキシピリダジン	8.42	295.10	92.00	140.10
		スルファキノキサリン	9.25	301.10	156.05	92.00
		スルファクロルピリダジン	8.12	285.00	156.10	92.05
		スルファジアジン	6.15	251.05	92.15	156.00
		スルファジミジン	7.23	279.10	92.15	186.15
		スルファジメキシシ	9.18	311.10	156.00	92.10
		スルファセタミド	5.72	215.05	92.05	156.00
		スルファチアゾール	6.08	256.00	156.05	92.05
		スルファドキシシ	8.52	311.10	156.05	92.05
		スルファトロキサゾール	8.61	268.10	202.10	108.05
		スルファニトラン	9.78	334.05	136.10	137.10
		スルファベリジン	6.32	250.05	156.00	92.10
		スルファプロモメタジン	9.95	358.95	92.15	266.00
		スルファベンズアミド	9.11	277.05	156.15	92.15
		スルファメトキサゾール	8.59	254.05	155.95	92.15
		スルファメキシジアジン	7.50	281.15	92.15	156.10
		スルファメキシピリダジン	7.39	281.05	156.05	92.05
		スルファメラジン	6.73	265.10	156.05	92.05
		スルファモノメキシシ	7.73	281.05	156.05	92.15
	スルファイソキサゾール	8.76	268.10	113.10	156.00	
	スルファイソミジン	5.30	279.10	124.25	186.10	
	トリメプリム	5.87	291.15	123.15	230.10	
	ピリメタミン	7.87	249.10	177.00	128.15	
	マクロライド系	エリスロマイシンA	8.73	734.45	158.10	576.30
	チアムリン	9.27	494.35	192.05	119.00	
	ロイコマイシンA5	9.21	773.50	109.15	174.30	
	スピラマイシニ	6.82	422.55	174.20	101.20	
	ネオスピラマイシニ	6.32	350.45	174.20	160.25	
	チルミコシン	7.83	870.60	174.15	697.45	
	タイロシン	8.99	916.55	174.15	101.05	
	ペニシリン系	ベンジルペニシリン	9.24	335.15	176.20	114.10
アンピシリン	5.55	350.20	192.20	114.05		
セファゾリン	6.77	455.20	323.20	156.25		
③	ホルモン剤	クロステボル	11.30	323.20	143.05	131.10
		α -トレンボロン	10.36	271.15	199.05	115.10
		β -トレンボロン	10.23	271.15	199.10	253.15
		プレドニゾロン	9.05	405.25	329.20	295.25
		メチルプレドニゾロン	9.58	375.40	161.25	357.40
		ゼラノール	10.38	321.35	277.30	—
	ワルファリン	10.80	309.20	163.10	251.10	

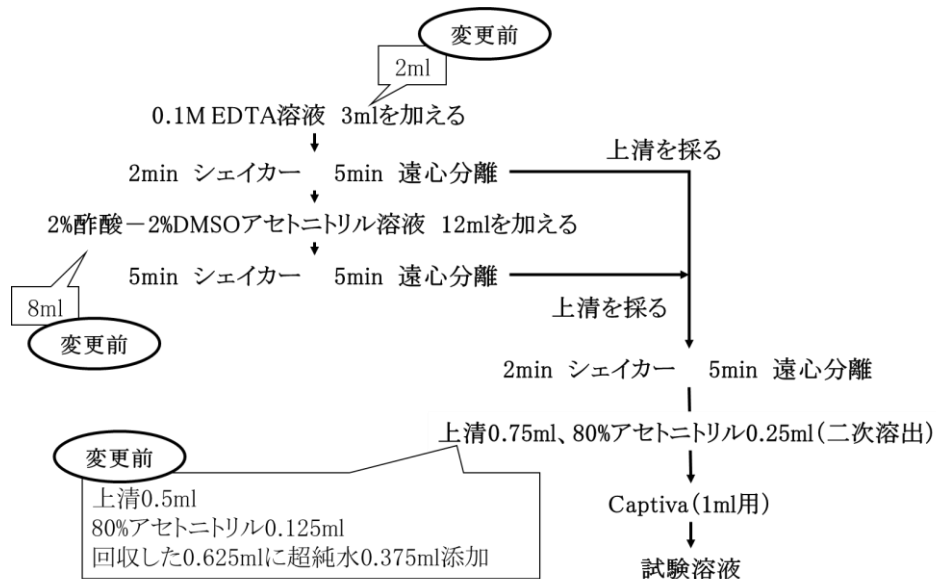


図1 豚及び牛の筋肉における一斉分析法

事前検討において、図1の方法では鶏の筋肉において一部化合物の回収率が向上しなかったため、精製力の向上を目的として、精製工程を変更した(図2)。精製に用いる Captiva を充填剤の量が多い製品に変更し、それに伴って通液する上清と二次溶出の量を増加している。さらに図1及び図2の操作フローでは豚、牛、鶏の筋肉いずれにおいてもテトラサイクリン系及びペニシリン系の化合物の回収率が向上しなかったことから、EDTAの濃度を半分にし、さらに抽出溶液中の有機溶媒濃度を下げするために、抽出溶媒を50mM EDTA-50%アセトニトリルに変更した個別試験法(図3)を用いて妥当性評価を行なった。抽出溶媒は100%アセトニトリルと0.1M EDTAを等量混合することで作製し、混合後数時間でEDTAが析出することから、用時調整とした。図2と図3のいずれにおいても、図1からの変更点を枠で囲っている。

図1～図3のいずれの方法においても、下記のii)からv)は同様に行った。ただし、個別試験法では表3における60化合物のうち、テトラサイクリン系の4種類、リンコマイシン、ペニシリン系の2種類、セファゾリンの計8化合物のみ妥当性評価を行なっている。

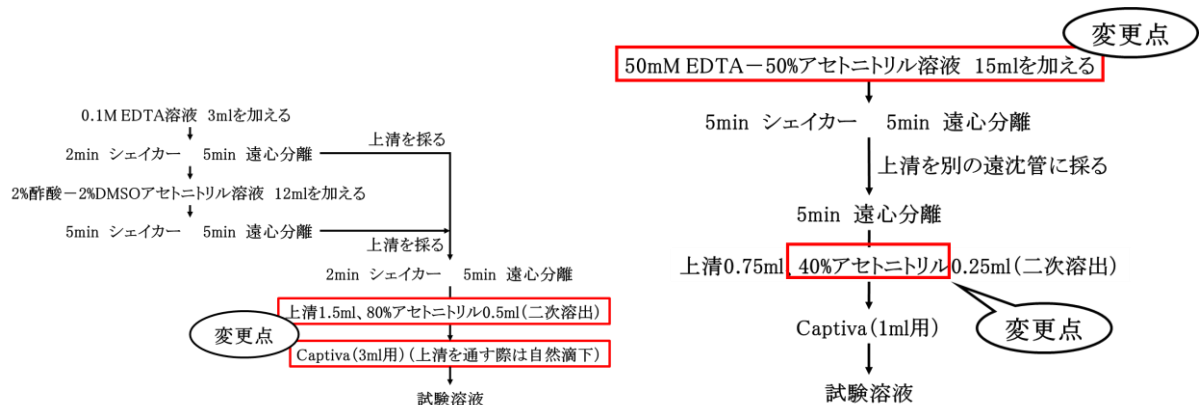


図2 鶏の筋肉における一斉分析法

図3 個別試験法

ii) 標準混合液の調製

市販もしくは調整した標準混合液と標準溶液に使用した溶媒及び検量線の検量点の違いから、60化合物を表3に示す3つのグループに分けた。各化合物が2ppmになるように標準溶液及び市販もしくは

調整した標準混合液を混合し、80%アセトニトリルで適宜希釈を行った。

iii) 検量線の作成

化合物グループ①②の検量点は 50ppb、5ppb、0.5ppb の 3 点とし、グループ③の化合物は比較的基準値が低い化合物が多いことから 5ppb、0.5ppb、0.05ppb の 3 点とした。

iv) ポジティブコントロールの調整

当所 SOP の妥当性評価検査実施標準作業書に基づき、「一律基準濃度 (0.01ppm)」と「基準値に近い一定の濃度」の 2 濃度を用いた。「基準値に近い一定の濃度」は、化合物グループ①②は 0.1ppm、化合物グループ③は 0.001ppm とした。

v) 妥当性評価項目

当所 SOP の妥当性評価検査実施標準作業書に基づき、以下の 6 項目について評価を行なった。

- 1, 保持時間の変動の確認 (マトリックスの有無で保持時間に変動がないことの確認)
- 2, 検量線の直線性
- 3, 選択性の確認 (定量を妨害するピークの確認)
- 4, 真度 (回収率が 70%~120%の範囲内であることを確認)
- 5, 精度 (併行精度及び室内精度が規定の範囲*未満であることを確認)
※ポジティブコントロールの濃度によって異なる
- 6, 定量限界

3. 結果

個別試験法の妥当性評価を行なった結果を表 4 に、一斉分析法の妥当性評価を行なった結果は表 5 に示す。表 5 には参考として従来法の結果を併記する。真度及び精度は、2 濃度用いたポジティブコントロールのうち、基準値よりも低い濃度について評価を行なった。個別試験法において、検討した 8 化合物全てにおいて保持時間、検量線、選択性、定量限界の 4 項目の評価基準を満たしていた。妥当性が確認された化合物数は 5~7 化合物と概ね良好な結果となった。

一斉分析法において、検討した 60 化合物全てにおいて保持時間、検量線及び定量限界の 3 項目の評価基準を満たしていた。選択性の項目で評価基準を満たしていなかったのは、豚、牛、鶏筋肉のプレドニゾロン、鶏筋肉のメチルプレドニゾロンとゼラノールである。また、上記 3 化合物においては真度及び精度の項目においても評価基準を満たしていなかった。妥当性が確認された化合物数は豚の筋肉は 46 種類から 52 種類と 6 種類増加したものの、牛の筋肉は 49 種類から 40 種類と 9 種類、鶏の筋肉は 47 種類から 44 種類と 3 種類減少した。

表 4 個別試験法における妥当性評価の結果

動物用医薬品		妥当性評価の結果		
		豚の筋肉	牛の筋肉	鶏の筋肉
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	○	○	○
	クロルテトラサイクリン	○	○	○
	テトラサイクリン	○	○	○
	ドキシサイクリン	○	×	○
リンコマイシン		○	○	○
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	○	×	×
	アンピシリン	○	○	○
セファゾリン		×	×	○

○: 妥当性評価の結果「適」と判定

×: 妥当性評価の結果「不適」と判定

表 5 一斉分析法における妥当性評価の結果

動物用医薬品		妥当性評価の結果			(参考)従来法の妥当性評価の結果		
		豚の筋肉	牛の筋肉	鶏の筋肉	豚の筋肉	牛の筋肉	鶏の筋肉
キノロン系	サラフロキサシン	○	×	○	×	○	○
	オキソリニック酸	○	○	○	○	○	○
	オブロキサシン	○	○	○	○	○	○
	オルビフロキサシン	○	○	○	○	○	○
	エンロフロキサシン	○	○	○	×	○	○
	シプロフロキサシン	○	×	○	×	○	○
	ジフロキサシン	○	×	×	○	×	○
	ダノフロキサシン	○	×	×	○	○	○
	ナリジクス酸	○	○	○	○	○	○
	ノルフロキサシン	○	×	○	○	○	○
	ピロミド酸	○	○	○	○	○	○
	フルメキン	○	○	○	○	○	○
	マルボフロキサシン	○	○	○	○	○	○
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	○	×	×	×	×	○
	クロルテトラサイクリン	×	×	×	×	×	×
	テトラサイクリン	×	×	×	○	○	×
	ドキシサイクリン	○	×	×	○	○	○
	リンコマイシン	○	×	×	○	○	○
サルファ剤系	オルメプリム	○	○	○	○	○	○
	ジアベリジン	○	×	○	○	○	○
	スルファエトキシピリダジン	○	○	○	○	○	○
	スルファキノキサリン	○	○	○	○	○	○
	スルファクロルピリダジン	○	○	○	○	○	○
	スルファジアジン	○	○	○	○	○	○
	スルファジミジン	○	○	○	○	○	○
	スルファジメキシシン	○	○	○	○	○	○
	スルファセタミド	○	○	○	×	×	×
	スルファチアゾール	○	○	○	○	○	○
	スルファドキシシン	○	○	○	○	○	○
	スルファトロキサゾール	○	×	○	○	○	○
	スルファニトラン	○	×	×	×	×	×
	スルファピリジン	○	○	○	○	○	○
	スルファプロモタジン	○	○	○	-		
	スルファベンズアミド	○	○	○	○	○	○
	スルファメキサゾール	○	○	○	○	○	○
	スルファメキシジアジン	○	○	○	×	○	○
	スルファメキシピリダジン	○	○	○	○	○	○
	スルファメラジン	○	○	○	○	○	○
	スルファモノメキシシン	○	○	○	○	○	○
スルファイソキサゾール	○	○	○	○	○	○	
スルフィンミジン	○	○	○	○	○	○	
トリメプリム	○	○	○	○	○	○	
ピリメタミン	○	○	○	○	○	○	
マクロライド系	エリスロマイシンA	○	○	○	○	○	○
	チアムリン	○	○	○	○	○	○
	ロイコマイシンA5	○	○	×	○	○	×
	スピラマイシンi	○	○	×	○	○	×
	ネオスピラマイシンi	×	×	×	○	○	×
	チルミコシン	○	○	○	○	○	○
タイロシン	○	○	○	○	○	×	
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	○	×	○	○	○	○
	アンピシリン	×	×	×	×	×	×
	セファゾリン	×	×	×	×	×	×
ホルモン剤	クロステボル	○	○	○	○	○	○
	α-トレンボロン	○	○	○	○	○	○
	β-トレンボロン	○	○	○	○	○	○
	プレドニゾロン	×	×	×	×	×	○
	メチルプレドニゾロン	×	×	×	×	×	×
	ゼラノール	×	×	×	×	×	×
	ワルファリン	○	○	○	○	○	○
妥当性が確認された化合物数		52	40	44	46	49	47

○:妥当性評価の結果「適」と判定

×:妥当性評価の結果「不適」と判定

-:ピークが検出出来ず、妥当性評価を行なうことが出来なかった

4. 考察

従来法で検討[1]を行った際に課題となっていた、豚の筋肉において妥当性が確認できなかった一部キノロン系化合物について、今回の検討で妥当性が確認された。抽出溶液の酸性度を変えることなく改良できたことから、今回の検討で抽出溶液を増量したことにより、抽出効率が向上し、妥当性が確認できたと考えられる。

牛の筋肉に改良した一斉分析法を適用し、妥当性評価を行なったものの、検査可能な化合物数が大幅に減少し、且つダノフロキサシンなど牛を対象に販売されている動物用医薬品に含まれる化合物の妥当性が確認できなかった。牛の筋肉においては従来法で検査を行うのが最適であると考えられる。

タイロシンは鶏のマイコプラズマ症の治療を目的として用いられる動物用医薬品である。従来法では鶏の筋肉におけるタイロシンの妥当性を確認できなかったことから、タイロシンの妥当性を確認することを目的として、鶏の筋肉の一斉分析法の操作フローを改良した。その結果、タイロシンの妥当性が確認できたものの、検査可能な化合物数は減少した。しかしながら、今回の検討によって鶏の筋肉における一斉分析法で検査不可となった6化合物のうち、個別試験法で妥当性が確認された3化合物を除いて、肉用鶏を対象とした動物用医薬品に含まれる化合物はなかったことから、今後、今回検討した方法を用いて収去検査を行うことを検討している。

プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン及びゼラノールは選択性の項目で不適と判定され、妨害ピークが多く低濃度での定量が難しいことを示しており、従来法の検討[1]と同様の結果となった。以前の検討後に分析条件の最適化を行い、3化合物全てプリカーサーイオン及びプロダクトイオンのいずれも変更を行っている。さらなる分析条件の変更は困難であることから、上記3化合物を対象とした新たな個別試験法を作成する必要があると考える。今回の検討で用いている一斉分析法では、前処理の工程を経ると試料内の化合物の濃度が10分の1に希釈される。試料内に基準値量の化合物が含まれていることを想定して検量線を作成した際、化合物グループ③において最も低い検量点は0.05ppbとなる。抽出溶液の量を減らす、前処理工程での希釈率を下げる、もしくは最も低い検量点の濃度を上げることによって、選択性を改善できると考える。

個別試験法において検査対象とした8化合物のうち、テトラサイクリン系などの一斉分析法で妥当性が確認できなかった化合物は、個別試験法で妥当性を確認することができた。従来法の検討[1]では0.1M EDTAの量が少ないことが原因で真度が低くなったと考えたが、今回の検討において抽出溶液の量を増やしても真度が低かったのに対して、個別試験法でEDTAの濃度を下げることによって真度の向上が認められた。そのことから、以前の検討ではEDTAの濃度が高すぎたことによって妥当性が確認できなかったと考える。個別試験法において妥当性が確認できなかった化合物のうち、ドキシサイクリンとベンジルペニシリンは一斉分析法において妥当性が確認されていることから、収去検査においては、個別試験法と一斉分析法を併行して実施することで、補うことが可能であると考えられる。セファゾリンは乳用牛を対象に販売されている動物用医薬品の一つであるが、他のセフェム系の動物用医薬品は豚や肉用鶏も対象として販売されている。そのため、今後検査可能な化合物を増やすためにも、今回の検討で一斉分析法に対して行ったのと同様に、セフェム系を対象とした個別試験法を検討する必要があると考える。

今回の検討で、一斉分析法の操作フローを一部変更し、且つ個別試験法を開発したことにより、分析対象化合物を増加することが可能となった。一斉分析法及び個別試験法はLC-MS/MSにおける測定条件や検量線が共通であり、前処理を併行して行えば同日中に分析を行うことが可能である。そのため、来年度以降の収去検査においても、検査にかかる時間は変えずに検査対象化合物を増加することが可能となる。いずれの操作フローも未だ改善点を認めることから、分析可能な化合物をさらに増やすために今後も検討を継続する必要がある。

5. 引用文献

[1]山口麻綾、建入茂樹、推野千紘、佐々木秀樹:動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価、第43回全国食肉衛生検査所協議会理化学部会研修会、19-21

[2]農林水産省 動物医薬品検査所:令和5年度動物用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報(別冊)各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量、(<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/index.html>)