

(8) 動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価

○山口 麻綾、推野 千紘、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、本法)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り、現在、豚筋肉及び牛筋肉で 13 種類、鶏の筋肉で 10 種類の化合物で分析の妥当性を確認している。昨年度、分析可能な化合物を増やすために検討を行ったが、大きく改善することは出来なかった。そこで、別の手法を検討したところ、本法の精製の工程で用いている Enhanced Matrix Removal-Lipid(以下、EMR)と除タンパクフィルターを組み合わせた Captiva EMR-Lipid(以下、Captiva)を用いた動物用医薬品一斉分析法で良好な結果が得られたとの報告があった[1]。Captiva はカートリッジタイプであるが事前に有機溶媒を通す等のカラムコンディショニングが不要な製品であるため、利便性に長けていると考えられ、且つ上記報告の操作フローは本法よりも簡便かつ短時間で作業を行うことができる。このことから、操作をより簡便に行うことを目的として、上記報告を基に検討を行うこととした。

一方、現在使用している標準混合液は当所で調整しており、多系統の化合物を混合している。標準溶液や標準混合液の調整作業は精密かつ煩雑であり、作業者の負担が大きい。そこで、作業者の負担を減らし、且つ検討する化合物の数を増やすことを目的として、市販の標準混合液を使用することを併せて検討した。

新規の一斉分析法及び市販の標準混合液使用の 2 点について検討し、構築した試験法の妥当性評価を行なったところ良好な結果が得られたので報告する。

2. 材料及び方法

(1) 材料

検体は豚の筋肉を用いた。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。

表1 試薬等

表2 LC-MS/MS の測定条件

試薬名	グレード等	LC-MS/MS	島津製作所社製 LCMS-8050
水	超純水	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)
アセトニトリル	LCMS用(移動相用) 試薬特級(抽出溶液用)	カラム温度	40度
ギ酸 メタノール	LCMS用	移動相	A液:0.1%ギ酸-水 B液:0.1%ギ酸-アセトニトリル
酢酸 ジメチルスルホキシド (以下、DMSO) EDTA	試薬特級	注入量	試験溶液2 μ Lを超純水8 μ Lと共注入する
Captiva	カートリッジタイプ	グラジエント	A液:B液=99:1(0min)→85:15(1min)→60:40(6min)→0:100(10min)→0:100(18min)→99:1(18.01min)→99:1(22min)
		流速	0.2mL/min
		イオン化モード	ESI(+)、ESI(-)、MRMモード

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	基準値	定量イオン(m/z)	確認イオン(m/z)
①	市販 (キノロン系)	サラフロキサシン	不検出	386.15>368.05
		オキシリニック酸	0.02	262.05>244.05
		オフロキサシン	不検出	362.15>318.10
		オルビフロキサシン	0.02	396.15>352.20
		エンロフロキサシン	0.05	360.15>316.20
		シプロフロキサシン	0.05	332.15>314.10
		ジフロキサシン	0.02	400.15>356.20
		ダノフロキサシン	0.1	358.15>340.20
		ナリジクス酸	不検出	233.10>215.05
		ノルフロキサシン	0.02	320.15>302.15
		ピロミド酸	不検出	289.15>243.10
		フルメキン	0.5	262.10>202.00
		マルボフロキサシン	0.05	363.15>72.15
	調整 (テトラサイク リン系)	オキシテトラサイクリン	0.2	461.20>426.20
		クロルテトラサイクリン	0.2	479.60>445.15
		テトラサイクリン	0.2	445.20>410.25
		ドキシサイクリン	0.05	445.20>428.20
	調整(リンコマ イシン系)	リンコマイシン	0.2	407.25>126.20
②	市販 (サルファ剤 系)	オルメトプリム	0.05	275.15>123.15
		ジアベリジン	不検出	261.15>245.10
		スルファエトキシピリダジン	不検出	295.10>92.00
		スルファキノキサリン	0.1	301.10>156.05
		スルファクロルピリダジン	0.05	285.00>156.10
		スルファジアジン	0.1	251.05>92.15
		スルファジミジン	0.1	279.10>92.15
		スルファジメトキシ	0.2	311.10>156.00
		スルファセタミド	不検出	215.05>156.00
		スルファチアゾール	不検出	256.00>156.05
		スルファドキシ	0.1	311.10>156.05
		スルファトロキサゾール	不検出	268.10>92.05
		スルファニトラン	不検出	334.05>136.10
		スルファニルアミド	不検出	173.10>132.15
		スルファピリジン	不検出	250.05>156.00
		スルファブロモメタジン	不検出	358.20>317.15
		スルファベンズアミド	不検出	277.05>156.15
		スルファメトキサゾール	0.02	254.05>155.95
		スルファメキシジアジン	不検出	281.15>92.15
		スルファメキシピリダジン	不検出	281.05>156.05
		スルファメラジン	不検出	265.10>156.05
		スルファモノメトキシ	0.02	281.05>156.05
		スルフィソキサゾール	不検出	268.10>113.10
		スルフィソゾール	不検出	239.20>163.15
		スルフィソミジン	不検出	279.10>124.25
		トリメトプリム	0.1	291.15>123.15
		ピリメタミン	0.05	249.10>177.00
	市販 (マクロライド 系)	エリスロマイシンA	0.2	734.45>158.10
		チアムリン	0.1	494.35>119.00
		ロイコマイシンA5	不検出	773.50>109.15
		スピラマイシンi	0.2	422.40>174.20
		ネオスピラマイシンi	0.2	699.45>174.10
		チルミコシン	0.1	869.60>174.10
		タイロシン	0.1	916.70>174.25
	調整 (ペニシリン系)	ベンジルペニシリン	0.05	335.15>160.15
	調整 (セフェム系)	アンピシリン	0.06	350.20>106.15
		セファゾリン	不検出	455.10>156.15
③	市販 (ホルモン剤 系)	クロステボル	不検出	323.20>143.05
		α0.01トレンボロン	不検出	271.15>199.05
		β0.01トレンボロン	不検出	271.15>199.10
		プレドニゾロン	0.001	361.20>343.25
		メチルプレドニゾロン	0.01	375.20>357.25
		ゼラノール	0.002	323.20>305.15
	調整 (殺鼠剤)	ワルファリン	0.001	309.20>163.10

(2) 方法

i) 操作フロー

今回の実験の操作フローは図 1 の通りであり、既報[1]から変更した点は抽出溶液のみである。本法と比較した場合、ホモジナイズの工程がないため検体数の増加によって作業時間が増えることがなく、より簡便な操作となっている。既報[1]で用いられた 2%ギ酸-2%DMSO アセトニトリル溶液は、酸性度が高くマクロライド系の化合物の結果に影響を与えたことから、抽出溶媒の酸性度を下げて事前に検討を行ったところ、最も成績が良かった 2%酢酸-2%DMSO アセトニトリル溶液を使用することとした。

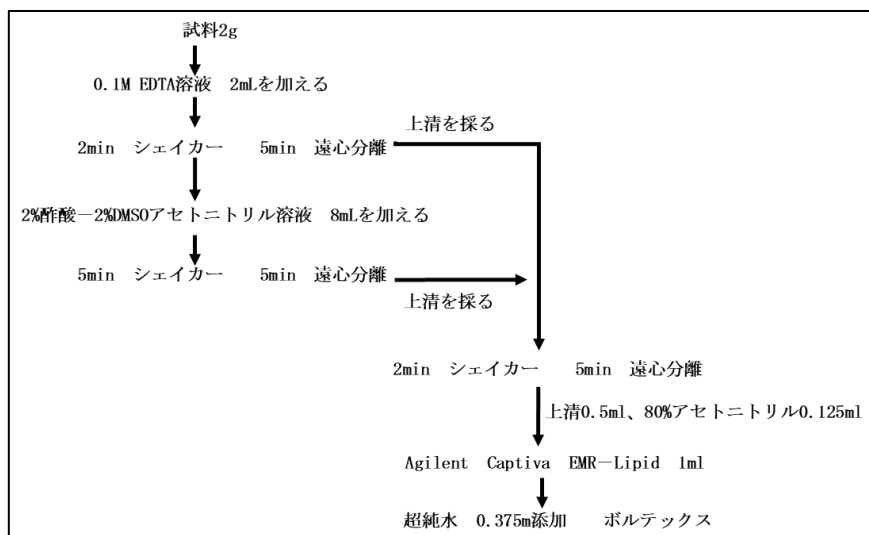


図1 操作フロー

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、62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 0.05ppm、0.005ppm、0.0005ppm 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 0.005ppm、0.0005ppm、0.00005ppm 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

妥当性評価を行なった結果は表 4 の通り。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。検討した 62 化合物のうち、44 化合物において妥当性が確認できた。スルファニルアミド、スルファブプロモメタジン、スルファメトキシジアジン、スルフィソゾールの 4 化合物は分析条件が合わず目的のピークが検出出来なかったことから、上記 6 項目の評価を行なうことが出来なかった。検量線の直線性及び定量限界の 2 項目は 58 化合物全てにおいて評価基準を満たしていた。

今回使用した市販の標準混合液において、混合液中に含まれる化合物のうち半数以上で妥当性を確認することができた。また、操作フローを変えたことにより作業時間が 30 分～1 時間短縮された。

4. 考察

妥当性が確認できなかった化合物のうち、サラフロキサシン及びシプロフロキサシンはいずれもキノロン系化合物であり、抽出溶液の酸性度が上がると回収率が高くなる。しかし、抽出溶液の酸性度が上がるとマクロライド系化合物の回収率が低下することから、両者の回収率を下げない抽出条件を検討する必要があると考えられる。また、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、アンピシリン及びセファゾリンはいずれも水に非常によく溶けることから、操作フローの最初に添加する 0.1M EDTA 溶液の量を増やすことによって溶出しやすくなると考えられる。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ており、これは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いる。抽出及び精製の工程を経ると濃度が 10 分の 1 に希釈されることから、基準値付近の濃度であった場合に基準値の 10 分の 1 濃度よりもさらに低い濃度での検量点が必要となる。そのため、化合物グループ③の中で最も低い基準値は 0.001ppm であったことから、その 10 分の 1 濃度である 0.0001ppm より低い濃度での検量点として 0.00005ppm を設定したが、検量点を少し変える等さらなる検討が必要である。

妥当性評価の結果、4 化合物において分析条件が合わずに目的のピークを得ることが出来なかった。この 4 化合物はいずれも島津製作所 LC/MS/MS メソッドパッケージ動物用医薬品 Ver.2 に含まれていない化合物であったことから独自に分析条件を設定した化合物であり、サルファ剤系の市販の標準混合液に含まれている化合物である。そのため、分析条件の設定は市販の標準混合液を用いて行ったが、1 化合物のピークが複数認められる等の不具合が発生した。これは、条件設定を行う前の準備段階及び条件の設定に誤りが生じたことにより発生したと考えられ、それによって保持時間や m/z の設定がずれたことなどが考えられることから、改めて分析条件の見直し等を行う必要があると考える。

市販の標準混合液に含まれる多くの化合物で妥当性を確認できたことから、市販の標準混合液を導入することは分析対象化合物を大幅に増やすことに大きく寄与した。また、市販の標準混合液に含まれない化合物については独自に調整を行い、調整した標準混合液も併用して運用したが、従来よりも調整する標準溶液及び標準混合液の本数を減らすことができ、作業時間を大幅に短縮できたことから、作業者の負担軽減にも大きく貢献すると考える。

今回の検討で、操作フローを大幅に変更したことにより分析対象化合物が約 3 倍に増加し、且つ作業時間を短縮することが可能となった。また、市販の標準混合液を用いることにより、以前よりも煩雑な作業が低減された。操作フローについてはいくつかの改善点を認めたことから、分析可能な化合物をさらに増やすために今後再度検討を行う必要がある。

表 4 妥当性評価の結果

化合物	評価項目							判定
	保持時間	検量線	選択性	真度	併行精度	室内精度	定量限界	
サラフロキサシン	OK	OK	OK	74%	18%	47%	OK	不適
オキシリニック酸	OK	OK	OK	104%	13%	17%	OK	適
オブロキサシン	OK	OK	OK	97%	10%	29%	OK	適
オルビフロキサシン	OK	OK	OK	105%	11%	25%	OK	適
エンフロキサシン	OK	OK	OK	106%	7%	17%	OK	適
シプロフロキサシン	OK	OK	OK	81%	22%	42%	OK	不適
ジフロキサシン	OK	OK	OK	109%	10%	29%	OK	適
ダノフロキサシン	OK	OK	OK	89%	13%	25%	OK	適
ナリジクス酸	OK	OK	OK	110%	4%	11%	OK	適
ノルフロキサシン	OK	OK	OK	87%	19%	15%	OK	適
ピロミド酸	NG	OK	OK	97%	6%	7%	OK	不適
フルメキン	OK	OK	OK	101%	8%	13%	OK	適
マルボフロキサシン	OK	OK	OK	91%	11%	21%	OK	適
オキシテトラサイクリン	OK	OK	OK	66%	13%	12%	OK	不適
クロルテトラサイクリン	OK	OK	OK	59%	29%	51%	OK	不適
テトラサイクリン	OK	OK	OK	72%	13%	17%	OK	適
ドキシサイクリン	OK	OK	OK	87%	5%	11%	OK	適
リンコマイシン	OK	OK	OK	73%	5%	8%	OK	適
オルメトプリム	OK	OK	OK	95%	6%	8%	OK	適
ジアベリジン	OK	OK	OK	85%	6%	9%	OK	適
スルファエトキシピリダジン	OK	OK	OK	103%	4%	9%	OK	適
スルファキノキサリン	OK	OK	OK	99%	6%	9%	OK	適
スルファクロルピリダジン	NG	OK	OK	101%	4%	10%	OK	不適
スルファジアジン	OK	OK	OK	113%	5%	17%	OK	適
スルファジミジン	OK	OK	OK	106%	8%	9%	OK	適
スルファジメトキシ	OK	OK	OK	106%	4%	6%	OK	適
スルファセタミド	OK	OK	OK	119%	20%	42%	OK	不適
スルファチアゾール	OK	OK	OK	105%	13%	17%	OK	適
スルファドキシ	OK	OK	OK	109%	5%	13%	OK	適
スルファトロキサゾール	OK	OK	OK	106%	6%	12%	OK	適
スルファニトラン	OK	OK	OK	166%	9%	14%	OK	不適
スルファニルアミド								不適
スルファピリジン	OK	OK	OK	111%	11%	17%	OK	適
スルファプロモメタジン								不適
スルファベンズアミド	OK	OK	OK	105%	5%	10%	OK	適
スルファメトキサゾール	NG	OK	OK	105%	7%	7%	OK	不適
スルファメキシジアジン								不適
スルファメキシピリダジン	OK	OK	OK	105%	13%	13%	OK	適
スルファメラジン	OK	OK	OK	108%	11%	10%	OK	適
スルファモノメトキシ	OK	OK	OK	112%	4%	14%	OK	適
スルフィソキサゾール	OK	OK	OK	96%	12%	27%	OK	適
スルフィソゾール								不適
スルフィソミジン	OK	OK	OK	102%	12%	13%	OK	適
トリメトプリム	OK	OK	OK	97%	9%	15%	OK	適
ピリメタミン	OK	OK	OK	83%	14%	10%	OK	適
エリスロマイシンA	OK	OK	OK	90%	7%	10%	OK	適
チアムリン	OK	OK	OK	84%	7%	14%	OK	適
ロイコマイシンA5	OK	OK	OK	91%	11%	19%	OK	適
スピラマイシンi	OK	OK	OK	80%	13%	13%	OK	適
ネオスピラマイシンi	OK	OK	OK	87%	9%	12%	OK	適
チルミコシン	OK	OK	OK	101%	7%	20%	OK	適
タイロシン	OK	OK	OK	95%	7%	20%	OK	適
ベンジルペニシリン	OK	OK	OK	90%	6%	16%	OK	適
アンピシリン	OK	OK	OK	55%	17%	21%	OK	不適
セファゾリン	OK	OK	OK	94%	19%	31%	OK	不適
クロステボル	OK	OK	OK	102.7%	4%	3%	OK	適
α 0.01トレンボロン	OK	OK	OK	94%	15%	18%	OK	適
β 0.01トレンボロン	OK	OK	OK	95%	20%	19%	OK	適
プレドニゾロン	OK	OK	NG	201%	493%	446%	OK	不適
メチルプレドニゾロン	OK	OK	NG	96.0%	22%	26%	OK	不適
ゼラノール	OK	OK	NG	122%	104%	84%	OK	不適
ワルファリン	OK	OK	OK	103%	8%	10%	OK	適

評価の基準を満たしている項目を着色している

5. 引用文献

[1]Limian Zhao, Derick Lucas:Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジクリーンアップおよび LC/MS/MS を用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析、食品分析アプリケーション集、第 3 巻、64-75 (2018)