

# LC-MS/MS による動物用医薬品等一斉試験法

## －その 1－精製方法の比較検討について－

山本 直美、田畑 佳世、田野 貴仁、池田 耕介、神藤 正則

### 要旨

動物用医薬品の一斉試験法は、通知試験法として「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ～Ⅲ（畜水産物）<sup>1)</sup>」が示されている。当所では、Ⅲ法を小スケール化し、抽出溶媒等を変更した方法<sup>2)</sup>を用いて検査を行ってきたが、濃縮等に時間がかかるという問題点があった。本研究では、精製工程における時間短縮を目的とし、3 種類の精製方法の比較・検討を行った。脂質除去機能付き除タンパクフィルタ（Captiva ND Lipids）を用いた精製方法において添加回収試験を行ったところ、測定した 66 成分中回収率が 70～120%となったものが 60 成分となり良好な結果が得られた。また濃縮操作等も簡略化できたことで、時間短縮にもつながった。

キーワード：動物用医薬品、脂質除去機能付き除タンパクフィルタ、LC-MS/MS

### 1 はじめに

動物用医薬品の一斉試験法は、通知試験法として「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ～Ⅲ（畜水産物）<sup>1)</sup>（以下、Ⅰ～Ⅲ法）」が示されている。この中で、Ⅲ法は、サルファ剤、キノロン剤およびテトラサイクリン系抗生物質を分析対象とし、固相抽出により精製を行うのが特徴である。当所では、Ⅲ法を小スケール化し、抽出溶媒等を変更した方法<sup>2)</sup>（以下、Ⅲ法改変法①）を用いて検査を行ってきた。本法の課題として、精製の工程で濃縮等の操作に時間がかかることが挙げられる。

そこで本研究では、主に精製の工程を見直すこととした。3 種類の精製方法を比較して、回収率が良好であり時間短縮を図れる方法の検討を行った。また、今回の

研究により改変した方法（以下、Ⅲ法改変法②）を用いて妥当性評価を行った<sup>3)</sup>。本稿では、精製方法の比較・検討した結果について報告する。

### 2 材料および方法

#### 1) 測定項目

66 成分（サルファ剤、キノロン剤、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質等）

#### 2) 装置および測定条件

LC-MS/MS 装置および測定条件を表 1 に示した。

#### 3) 精製方法の検討

Ⅲ法改変法①で使用するジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB, Waters 製）と、タン

パク質、リン脂質および脂質を除去する効果のあるフィルタ（脂質除去機能付き除タンパクフィルタ Captiva ND Lipids, Agilent 製）、脂質除去ミニカラム（Captiva EMR-Lipid, Agilent 製）の3種類を比較・検討した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

機器	LC		Exion LC AC (SCIEX)				
	MS/MS		QTRAP 5500 (SCIEX)				
カラム	XBridge BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 2.5 μm、Waters)						
移動相	A 液	0.1%ギ酸					
	B 液	アセトニトリル					
時間(分)	0	1	10	12	16	16.01	20
A 液(%)	95	95	40	2	2	95	95
B 液(%)	5	5	60	98	98	5	5
移動相流量			0.3 mL/min				
カラム温度			40℃				
注入量			2 μL				
イオンソース温度			500℃				
イオン化法			ESI (+)、ESI (-)				
イオンスプレー電圧			4500 V (+) 、 -4500 V (-)				
測定モード			MRM				

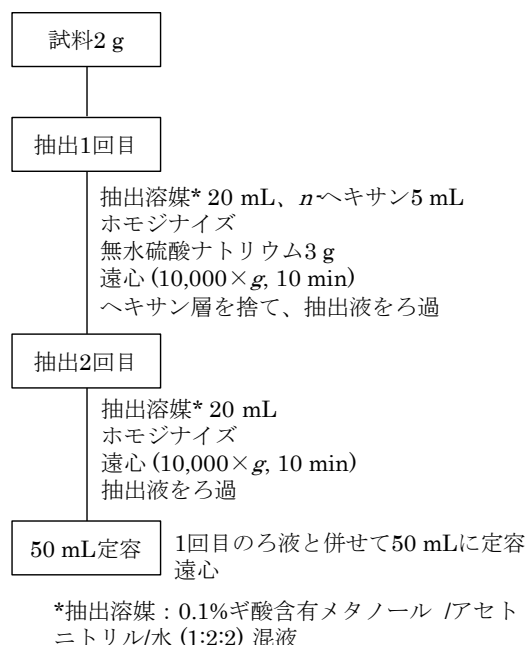


図 1 抽出操作フロー

測定対象とする試料（牛筋肉、豚筋肉および鶏筋肉）は脂質を多く含むことが予想されたため、脂質除去機能のある精製方法を比較対象として選択した。抽出操作のフローを図 1 に、精製操作のフローを図 2 に示す。検討試料には、牛筋肉を用いた。

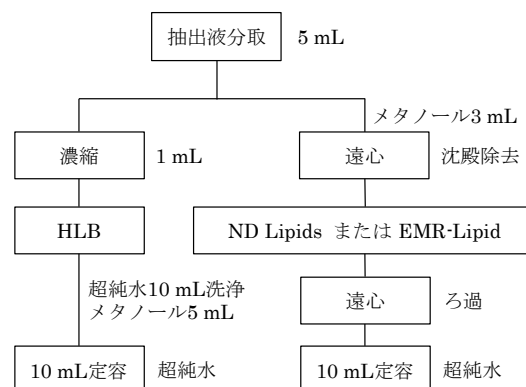


図 2 精製操作フロー

### 3 結果および考察

#### 1) 精製方法の比較

Oasis HLB、Captiva ND Lipids および Captiva EMR-Lipid に等量の抽出液を負荷し、回収率を算出して比較した。結果を表 2 に示す。回収率が 70～120%の範囲となった成分数は、全 66 成分中 Oasis HLB で 58 成分、Captiva ND Lipids で 60 成分、Captiva EMR-Lipid で 51 成分となった。Captiva EMR-Lipid ではテトラサイクリン系抗生物質において回収率の低下が見られた。Oasis HLB と Captiva ND Lipids では良好な結果が得られた。

図 2 に示すように、Oasis HLB は濃縮操作が必要であり、また通液には吸引マ

表 2 3 種類の精製方法の比較

No.	化合物名	分類	添加回収率 (%)		
			HLB	ND Lipids	EMR-Lipid
1	2-Acetyl amino-5-nitrothiazole	寄生虫駆除剤	86.4	82.5	80.7
2	5-Propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine	ベンズイミダゾール系	84.2	82.9	77.6
3	alfa-Trenbolone	ホルモン剤	87.2	86.6	81.7
4	Allethrin	殺虫剤 (農薬)	20.0	21.7	22.5
5	beta-Trenbolone	ホルモン剤	76.7	77.1	72.0
6	Chlortetracycline	テトラサイクリン系	69.0	71.3	50.3
7	Ciprofloxacin	キノロン剤	83.9	105	102
8	Clenbuterol	β-作動薬	86.5	82.9	80.7
9	Clorsulon	寄生虫駆除剤	89.1	83.2	78.0
10	Danofloxacin	キノロン剤	128	135	127
11	Dexamethason	合成副腎皮質ホルモン	87.9	83.9	80.8
12	Difloxacin	キノロン剤	82.5	81.0	73.0
13	Doxycycline	テトラサイクリン系	71.8	76.5	52.1
14	Emamectin_B1a	マクロライド系	51.5	77.0	57.5
15	Enrofloxacin	キノロン剤	81.6	82.5	71.1
16	Erythromycin	マクロライド系	55.2	223	217
17	Ethopabate	抗原虫剤	90.8	87.3	82.6
18	Famphur	殺虫剤 (農薬)	86.2	82.7	78.7
19	Fenobucarb(BPMC)	殺虫剤 (農薬)	74.5	77.9	71.4
20	Florfenicol	フェニコール系	88.0	84.5	82.5
21	Flumequine	キノロン剤	88.9	88.8	83.4
22	Hydrocortison	天然副腎皮質ホルモン	101	92.9	90.6
23	Kitasamycin	マクロライド系	77.0	73.2	67.3
24	Levamisole	寄生虫駆除剤	86.7	82.1	76.5
25	Lincomycin	リンコマイシン系	99.2	100	95.1
26	Marbofloxacin	キノロン剤	84.7	84.4	78.0
27	Melengestrol acetate	ホルモン剤	76.5	74.7	64.4
28	Monensin	ポリエーテル系	54.6	53.4	45.8
29	Nalidixic acid	キノロン剤	91.1	89.4	83.2
30	Neospiramycin	マクロライド系	73.4	68.8	62.4
31	Norfloxacin	キノロン剤	66.5	77.0	72.3
32	Ofloxacin	キノロン剤	80.6	78.1	68.2
33	Orbifloxacin	キノロン剤	81.2	75.3	71.2
34	Ormetoprim	葉酸拮抗剤	86.4	83.1	75.3
35	Oxolinic Acid	キノロン剤	87.1	87.9	83.2
36	Oxytetracycline	テトラサイクリン系	81.8	83.2	61.4
37	Piromidic Acid	キノロン剤	86.1	85.7	77.6
38	Prednisolone	合成副腎皮質ホルモン	87.0	85.9	83.9
39	Pyrimethamine	抗原虫剤	83.2	79.0	75.2
40	Sarafloxacin	キノロン剤	85.1	108	100
41	Spiramycin	マクロライド系	77.0	74.1	68.3
42	Sulfacetamide	サルファ剤	81.0	82.4	77.3
43	Sulfachlorpyridazine	サルファ剤	90.1	92.9	89.3
44	Sulfadiazine	サルファ剤	91.6	93.1	90.8
45	Sulfadimethoxine	サルファ剤	95.8	101	96.4
46	Sulfadimidine	サルファ剤	98.0	101	98.6
47	Sulfadoxine	サルファ剤	97.2	98.1	98.0
48	Sulfamerazine	サルファ剤	94.2	94.3	93.3
49	Sulfamethoxyypyridazine	サルファ剤	97.3	99.9	101
50	Sulfametoxazole	サルファ剤	93.6	90.4	90.1
51	Sulfamonomethoxine	サルファ剤	102	106	105
52	Sulfanitran	サルファ剤	83.4	78.0	75.2
53	Sulfapyridine	サルファ剤	95.2	98.7	96.6
54	Sulfaquinoxaline	サルファ剤	97.7	96.6	95.7
55	Sulfathiazole	サルファ剤	90.6	94.6	92.3
56	Temephos(Abate)	殺虫剤 (農薬)	21.6	45.3	40.4
57	Tetracycline	テトラサイクリン系	75.9	79.4	55.8
58	Thiabendazole	ベンズイミダゾール系	85.7	83.3	78.2
59	Thiamphenicol	フェニコール系	86.0	87.0	83.0
60	Tiamulin	マクロライド系	87.5	82.4	77.3
61	Tilmicosin	マクロライド系	88.9	85.9	82.1
62	Trichlorfon(DEP)	殺虫剤 (農薬)	81.0	77.3	73.6
63	Trimethoprim	葉酸拮抗剤	80.3	75.5	73.3
64	Tylosin	マクロライド系	74.9	73.8	70.0
65	Xylazine	鎮静剤	83.3	78.7	74.4
66	Zeranol	ホルモン剤	83.3	85.6	77.5

ニフォールドを用いる必要がある。一方で、Captiva ND Lipids は濃縮操作が不要で、遠心操作により通液を行うため、一度に多くのサンプルを処理でき、時間の短縮が図れた。そこで、Ⅲ法改変法②では、Captiva ND Lipids を採用することとした。

## 2) テトラサイクリン系抗生物質の回収率低下の原因検証

3 種類の精製方法の中で Captiva EMR-Lipid を用いた場合、特にテトラサイクリン系抗生物質の回収率の低下がみられた。そこで、回収率低下の原因が LC-MS/MS 測定におけるマトリックスによる影響なのか、精製におけるカラムへの吸着なのかを検証した。

LC-MS/MS 測定での影響かどうかを調べるため、図 2 フロー最後の試験溶液を 10 mL に定容する際に既知濃度（試料 1 g 当たり 0.2  $\mu$ g）の標準溶液を添加した（これをスパイク試料とする）。精製での影響かどうかを調べるため、図 2 フローの Captiva ND Lipids または Captiva EMR-Lipid へ抽出液を負荷する直前に、既知濃度（試料 1 g 当たり 0.2  $\mu$ g）の標準溶液を添加した（これをカラム前添加試料とする）。それぞれの回収率を算出し、比較した。検討試料には、牛筋肉を用いた。

スパイク試料およびカラム前添加試料の各回収率を表 3 に示した。スパイク試料では、Captiva ND Lipids、Captiva EMR-Lipid 共に 95%以上の回収率が得られたが、カラム前添加試料では Captiva ND Lipids で 90%以上の回収率が得られ

た一方、Captiva EMR-Lipid では 46.4～62.6%と回収率の低下が見られた。これらより、Captiva EMR-Lipid でテトラサイクリン系抗生物質の回収率が低下した原因は、カラムへの吸着が原因と推察された。

## 4 まとめ

精製工程において 3 種類の精製方法の比較・検討を行った。Captiva ND Lipids、Captiva EMR-Lipid を用いた方法は、Oasis HLB を用いた方法と異なり、濃縮操作が不要で多検体を同時に処理できるため、時間短縮が図れた。測定成分に関して、サルファ剤、キノロン剤、テトラサイクリン系抗生物質およびマクロライド系抗生物質等の回収率を比較すると、Captiva EMR-Lipid では、テトラサイクリン系抗生物質の回収率の低下が見られた。検証の結果、カラムへの吸着が原因と考えられた。一方で、Captiva ND Lipids は、テトラサイクリン系抗生物質の回収率の低下は見られず、測定成分の 66 成分中 60 成分で回収率 70～120%を満たした。

よって、脂質除去機能付き除タンパクフィルタ Captiva ND Lipids を用いた方法は、精製工程が簡便かつ測定可能な成分も多い、有用な方法であると考えられた。

## 5 参考文献

1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知,食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について. 平成 17 年 1 月 24 日付け食

安発第 0124001 号.

2) 佐藤伸哉,他：LC-MS/MS を用いた動物用医薬品一斉分析法の検討. 平成 25 年度堺市衛生研究所年報, p.98-104.

3) 池田 耕介,他：LC-MS/MS による動

物用医薬品等一斉試験法ーその 2ー妥当性評価についてー.令和元年度堺市衛生研究所年報,p.70-77.

表 3 スパイク試料およびカラム前添加試料の回収率

化合物名	分類	添加回収率 (%)			
		スパイク試料		カラム前添加試料	
		ND Lipids	EMR-Lipid	ND Lipids	EMR-Lipid
Chlortetracycline	テトラサイクリン系	108	106	94.6	54.8
Doxycycline	テトラサイクリン系	101	95.4	92.1	46.4
Oxytetracycline	テトラサイクリン系	106	103	95.6	62.6
Tetracycline	テトラサイクリン系	99.0	99.5	90.3	53.6