

## 動物用医薬品標準原液の保存安定性について

小山和志<sup>1</sup>・山本明彦<sup>1</sup>・本間 健<sup>1</sup>・中野文夫<sup>1</sup>

ポジティブリスト制度施行にともない残留動物用医薬品検査に必要な標準溶液の管理業務が増加したが、それらの保存安定性に係るデータは少ない。そこで当所で調製後、遮光下5℃で1年及び2年間保存した標準溶液を分析し若干の知見を得たので報告する。

キーワード：動物用医薬品，標準原液，保存安定性

### 1. はじめに

平成15年食品衛生法改正，平成18年5月29日施行の食品中の残留農薬や残留動物用医薬品等に係るポジティブリスト制度に対応するため，当所では検査項目の拡充を図ってきた。それに伴い保存しなければならない標準品，標準品を溶かした溶液（以下標準原液）及びその希釈液の数が増え，その管理業務も煩雑になっている。

標準品は光等に不安定な物質が多く，その溶液も同様に不安定なものが多いと考えられるが，保存や管理方法についての情報は多くない。本来，標準原液やそれを希釈した溶液は用時調製が原則と考えられるが，調製に要する時間等を考慮すると全てを用時調製にするのは現実的ではない。

当所では一部を除き，標準原液については，有効期間を設定し期間中は保存温度等を管理しながら使用している。有効期間は標準原液を定期的に測定し延長してきた。当初は3ヶ月設定であったが，6ヶ月に延長し，現在は1年としている。

そこで，ルーチン業務で一斉分析等を実施しているスルファジミジン等動物用医薬品35項目について，標準溶液の有効期間である1年間の保存安定性を再確認し，また，その妥当性を確認するため，1年間保存した標準原液及び2年間保存した標準原液を公定法<sup>1-3)</sup>により定量したので結果を報告する。なお，違反等の疑いのある検体の分析に当たっては，標準原液の有効期間内であっても，全て用時調製で再分析を実施している。

### 2. 実験方法

#### 2.1 対象項目

- ・スルファセタミド
- ・スルファジアジン
- ・スルファチアゾール
- ・スルファメラジン
- ・スルファジミジン
- ・トリメトプリム
- ・オルメトプリム
- ・スルファモノメトキシシン
- ・スルファクロルピリダジン
- ・スルファドキシシン
- ・オキシソリニック酸
- ・スルファベンズアミド
- ・スルファジメトキシシン
- ・スルファキノキサリン
- ・ナリジクス酸
- ・スルファピリジン
- ・5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン
- ・レバミゾール
- ・スルファメトキシピリダジン
- ・スルファメトキサゾール
- ・ピリメタミン
- ・エトパベート
- ・メベンダゾール
- ・フルベンダゾール
- ・エリスロマイシンA
- ・フルメキン

- ・ファミフル
- ・ジフルベンズロン
- ・リンコマイシン
- ・オキシベンダゾール
- ・チアムリン
- ・クロステボル
- ・クロルマジノン
- ・マラカイトグリーン
- ・ロイコマラカイトグリーン

アセトニトリル：関東化学（株），LC/MS 用  
 蒸留水：関東化学（株），LC/MS 用  
 トリフルオロ酢酸：関東化学（株），HPLC 用  
 その他：残留農薬試験用又は試薬特級

### 2.2.2 標準品

ポジティブリスト制度に係る試験法の標準品として，関東化学（株），和光純薬工業（株）及び林純薬工業（株）から市販されているものを用いた。

## 2.2 試薬及び標準品

### 2.2.1 試薬

メタノール：関東化学（株），残留農薬試験用  
 N,N-ジメチルホルムアミド：関東化学（株），試薬特級

### 2.3 標準原液の調製

標準原液の調製濃度は，HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）<sup>1)</sup>（以下通知試験法）には示されていない，そこで「食品中のマラカイトグリーン試験法等について」等<sup>4,5)</sup>により 100

表1 標準原液の調製溶媒

No.	定量項目	溶媒名	備考
1	スルファセタミド	メタノール	
2	スルファジアジン	メタノール	
3	スルファチアゾール	メタノール	
4	スルファメラジン	メタノール	
5	スルファジミジン	メタノール	
6	トリメトプリム	メタノール	
7	オルメトプリム	メタノール	
8	スルファモノメトキシ	メタノール	
9	スルファクロルピリダジン	メタノール	
10	スルファドキシ	メタノール	
11	オキサリニック酸	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	保存中に結晶析出
12	スルファベンズアミド	メタノール	
13	スルファジメトキシ	メタノール	
14	スルファキノキサリン	メタノール	
15	ナリジクス酸	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
16	スルファピリジン	メタノール	
17	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
18	レバミゾール	メタノール	
19	スルファメトキシピリダジン	メタノール	
20	スルファメトキサゾール	メタノール	
21	ピリメタミン	メタノール	
22	エトバペート	メタノール	
23	メベンダゾール	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
24	フルベンダゾール	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
25	エリスロマイシン A	メタノール	
26	フルメキン	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
27	ファミフル	メタノール	
28	ジフルベンズロン	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
29	リンコマイシン	メタノール	
30	オキシベンダゾール	N,N-ジメチルホルムアミド，メタノール	
31	チアムリン	メタノール	
32	クロステボル	メタノール	
33	クロルマジノン	メタノール	
34	マラカイトグリーン	メタノール	
35	ロイコマラカイトグリーン	メタノール	

$\mu\text{g/mL}$ とした。調製は、標準品 10mg を精密に量り、メタノールを加え、時々振り混ぜながら超音波処理し溶解した。その液にメタノールを加え、正確に 100mL とし標準原液とした。また、標準品がメタノールに溶けにくかった場合は、少量の N,N-ジメチルホルムアミドに溶解後、メタノールで正確に 100mL にした。成分ごとの詳細は表 1 に示した。

## 2.4 標準原液の保存

標準原液の保存は、褐色試験管に入れ、5℃の冷蔵庫で行った。温度の変動範囲は設定温度の $\pm 5^\circ\text{C}$ と当所の食品 GLP で規定している。また、保存容器が試験管のため、溶媒の蒸発を防ぐため、パラフィルム又はフッ素シールテープで試験管とキャップをシールした。

## 2.5 装置及び測定条件

### 2.5.1 高速液体クロマトグラフ(LC)操作条件 1

定量項目：表 1 に示した No.1 スルファセタミド～No.33 クロルマジノン

装置：島津製作所(株), Prominence

カラム：Inertsil Sulfa C18 (3.0mmI.D.  $\times$  150mm 3 $\mu\text{m}$ )

移動相：A 液；アセトニトリル，B 液；0.05% トリフルオロ酢酸，グラジエント条件は表 2 に示した。

流量：0.4mL/min

カラム温度：40℃

試料温度：5℃

注入量：5 $\mu\text{L}$

表 2 グラジエント条件 1

時間 (min)	A (%)	B (%)
0	1	99
35.0	100	0
40.0	100	0
40.1	1	99
45.0	1	99

A：アセトニトリル，B：0.05%トリフルオロ酢酸

### 2.5.2 高速液体クロマトグラフ(LC)操作条件 2

定量項目：表 1 に示した No.34 マラカイトグリーン及び No.35 ロイコマラカイトグリーン

装置：島津製作所(株), Prominence

カラム：Inertsil ODS-3 (2.1mmI.D.  $\times$  100mm 3 $\mu\text{m}$ )

移動相：A 液；アセトニトリル，B 液；0.01mol/L ige酸アンモニウム，グラジエント条件は表 3 に示した。

流量：0.3mL/min

カラム温度：40℃

試料温度：5℃

注入量：5 $\mu\text{L}$

表 3 グラジエント条件 2

時間 (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
20.0	100	0
30.0	100	0
30.1	10	90
35.0	10	90

A：アセトニトリル，B：0.01mol/L ige酸アンモニウム

### 2.5.3 トリプル四重極型質量分析(MS/MS)操作条件

装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), TSQ Quantum Ultra EMR

共通操作条件：表 4

個別操作条件：表 5

表 4 MS/MS 共通操作条件

イオン化	スプレー電圧 (V)	コリジョンガス	コリジョンガス圧 (mTorr)	分解能 (mu)
ESI Positive	3000	アルゴン	1.5	Q1:0.7 Q3:0.7

## 2.6 試料

調製後 1 年経過試料として平成 21 年 4 月 10 日から 4 月 21 日に調製した標準原液，2 年経過試料として平成 20 年 4 月 10 日から 5 月 12 日に調製した標準原液を用いた。また，基準とする標準原液は平成 22 年 4 月 5 日から 4 月 20 日に調製したものをを用いた。

## 2.7 試料溶液の調製

超音波処理を 5 分間行い，振とう混和した調製後 1 年及び 2 年経過した標準原液を希釈し，各成分 0.025 $\mu\text{g/mL}$  の試料溶液を調製した。希釈溶媒は，マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについてはアセトニトリル，その他については水・アセトニトリル混液 (6：4) とした。

## 2.8 検量線の作成

平成 22 年 4 月調製の標準原液を希釈し，各成分 0.001 ~ 0.1 $\mu\text{g/mL}$  の検量線用混合標準溶液を調製した。その液 5 $\mu\text{L}$  を高速液体クロマトグラフトリ

プル四重極型質量分析計 (LC/MS/MS) に注入して検量線を作成した。希釈溶媒は、試料溶液と同様にマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについてはアセトニトリル, その他については水・アセトニトリル混液 (6:4) とした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 調製溶媒の検討

通知試験法<sup>1)</sup>で示された調製溶媒はメタノールであるが、留意事項で標準品がメタノールで溶けにくい場合は、少量の N,N-ジメチルホルムアミドに溶解後、メタノールで希釈することとしている。し

かし、具体的にその標準品名は示されていない。

オキシリニック酸等 8 項目は、メタノールを加えて超音波処理を行うと、分散し懸濁するが完全には溶けなかった。そこで、少量の N,N-ジメチルホルムアミドを加え、時々振り混ぜながら超音波処理で溶解させ、メタノールで定容した。

なお、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンは試験法に示されたメタノールで容易に溶解した。

#### 3.2 保存標準原液の状態

褐色試験管中、5℃ (±5℃) で保管した標準原液の内、オキシリニック酸は、1年経過試料、2年

表5 MS/MS 個別操作条件

No.	定量項目	ソース ガス (unit)	A U X ガス (unit)	キャピラ リー温度 (°C)	ペーボラ イザー 温度 (°C)	チューブ レンズオ フセット (unit)	プレカー サイオン (m/z)	コリジョ ンエネ ルギ (V)	プロダク トイオン (m/z)
1	スルファセタミド	49	25	350	350	80	215	11	156
2	スルファジアジン	49	25	350	350	85	251	16	156
3	スルファチアゾール	49	25	350	350	85	256	14	156
4	スルファメラジン	49	25	350	350	85	265	16	172
5	スルファジミジン	49	16	350	350	90	279	17	186
6	トリメトプリム	49	16	350	350	90	291	29	275
7	オルメトプリム	49	16	350	350	90	275	28	259
8	スルファモノメトキシ	49	16	350	350	90	281	18	156
9	スルファクロルピリダジン	49	16	350	350	90	285	15	156
10	スルファドキシ	49	25	350	350	90	311	19	156
11	オキシリニック酸	49	25	350	350	90	262	19	244
12	スルファベンズアミド	49	25	350	350	90	277	12	156
13	スルファジメトキシ	49	25	350	350	90	311	19	245
14	スルファキノキサリン	49	25	350	350	90	301	18	156
15	ナリジクス酸	49	25	350	350	90	233	14	215
16	スルファピリジン	50	25	350	350	84	250	18	156
17	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズ イミダゾール-2-アミン	50	25	350	350	104	240	19	198
18	レバミゾール	50	25	350	350	89	205	25	178
19	スルファメトキシピリダジン	50	25	350	350	90	281	16	156
20	スルファメトキサゾール	50	25	350	350	79	254	30	108
21	ピリメタミン	50	25	350	350	100	249	29	233
22	エトバペート	50	25	350	350	71	238	11	206
23	メベンダゾール	50	25	350	350	89	296	21	264
24	フルベンダゾール	50	25	350	350	89	314	23	282
25	エリスロマイシン	50	25	350	350	120	734	29	158
26	フルメキン	50	25	350	350	100	262	17	244
27	ファミフル	50	25	350	350	80	326	14	281
28	ジフルベンズロン	50	25	350	350	75	311	13	158
29	リンコマイシン	50	25	350	350	90	407	29	126
30	オキシベンダゾール	50	25	350	350	93	250	18	218
31	チアムリン	50	25	350	350	84	494	35	119
32	クロステボル	50	25	350	350	97	323	32	143
33	クロルマジノン	50	25	350	350	97	405	12	345
34	マラカイトグリーン	47	25	300	300	97	323	32	143
35	ロイコマラカイトグリーン	49	23	300	300	97	405	12	345

経過試料とも結晶が析出していた。試料溶液の調製に際しては、超音波処理及び振とうにより再溶解させ使用した。

また、保存中に調製溶媒が最大で5%程度揮散したものがあつた。それらについては試験管の目盛りでメスアップして補正した。

### 3.2 LC/MS/MS 操作条件の検討

移動相等のLC操作条件は、通知試験法<sup>1)</sup>及び告示試験法<sup>2,3)</sup>のとおりとした。なお、オートサンプラーには、サンプルクーラーが装備されているので低濃度の標準溶液等の分解を防ぐため、試料温度を装置で設定可能な下限付近の5℃とした。

また、MS/MS操作条件は動物用医薬品の成分毎に、0.5 µg/mL標準溶液をMS/MSにインフュージョン注入し最適化を行い、ピーク面積やS/N比を考慮して最も感度のよかつたSRM条件等を選定した。

### 3.3 分析結果

保存標準原液から調製した各成分0.025 µg/mLの試料溶液をLC/MS/MSに3回繰返し注入し、それぞれの濃度を求めた。調製直後の濃度を100%として、各標準原液の濃度変化の割合を表6に示した。

調製後1年経過試料では、オキシソリニック酸以下4項目の濃度が95～105%の範囲を超えていたが、90～110%の範囲を超える項目はなかつた。

表6 保存標準原液（調製濃度：100 µg/mL）の定量結果

調製直後を100%とした割合で示した。 (n=3)

No.	定 量 項 目	調製後1年経過		調製後2年経過	
		定量値 (%)	CV (%)	定量値 (%)	CV (%)
1	スルファセタミド	103	4.5	101	3.0
2	スルファジアジン	97	3.9	100	4.0
3	スルファチアゾール	101	0.9	97	4.9
4	スルファメラジン	97	4.6	100	2.1
5	スルファジミジン	102	5.3	98	4.8
6	トリメトプリム	101	2.3	99	2.7
7	オルメトプリム	99	0.8	98	1.7
8	スルファモノメトキシ	104	3.1	103	2.7
9	スルファクロルピリダジン	103	1.3	102	5.0
10	スルファドキシ	99	3.7	104	2.8
11	オキシソリニック酸	92	3.6	94	5.1
12	スルファベンズアミド	104	5.1	97	5.1
13	スルファジメトキシ	99	0.6	96	4.0
14	スルファキノキサリン	102	3.4	100	1.4
15	ナリジクス酸	96	3.3	96	4.4
16	スルファピリジン	104	2.7	109	3.5
17	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	102	5.1	105	4.3
18	レバミゾール	102	2.3	95	2.8
19	スルファメトキシピリダジン	103	2.7	99	2.0
20	スルファメトキサゾール	100	1.7	102	5.1
21	ピリメタミン	98	0.7	99	0.5
22	エトバペート	104	5.2	104	3.8
23	メベンダゾール	103	6.3	100	1.2
24	フルベンダゾール	92	3.6	90	4.5
25	エリスロマイシンA	102	5.8	102	9.9
26	フルメキン	100	1.5	98	6.4
27	ファミフル	96	5.3	96	5.3
28	ジフルベンズロン	90	4.8	81	3.5
29	リンコマイシン	101	6.2	101	0.7
30	オキシベンダゾール	95	1.1	—	—
31	チアムリン	102	6.2	99	6.8
32	クロステボル	107	4.0	—	—
33	クロルマジノン	102	6.2	—	—
34	マラカイトグリーン	97	1.4	101	1.2
35	ロイコマラカイトグリーン	102	1.6	99	2.1

調製後2年経過試料では、当時標準原液を調製していなかった3項目を除き、オキシロニク酸以下4項目の濃度が95～105%の範囲を超え、内1項目が90～110%の範囲を超えた。

#### 4. まとめ

標準原液の保存安定性を確認するため、冷蔵5℃褐色試験管中で1年及び2年保存した標準原液の定量を行い以下の結果が得られた。

- ①保存1年では、調製濃度の±5%を超えた項目が4項目あったが、±10%を超える項目はなく、また、違反等の疑いのある検体の分析に当たっては、標準原液の有効期間内であっても全て用時調製で再分析を実施していることから、現在設定している標準原液の有効期間の1年は妥当だと考えられる。
- ②保存2年では、調製濃度の±5%を超えた項目が4項目あり、その内±10%を超える項目が1項目あったことから、標準原液の有効期間を2年とするには注意が必要である。なお、保存標準原液を調製していなかったため定量できなかった項目が3項目あった。
- ③オキシロニク酸は保存中に結晶が析出する恐れがあるため、保存標準原液の使用には保存期間に関係なく注意が必要である。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(平成17年1月24日付け食安発第0124001号)「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」別添(第2章、一斉試験法、HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物))。
- 2) 食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)に規定する試験法(マラカイトグリーン試験法)。
- 3) 平成18年11月30日付け食安発第1130001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」
- 4) 平成18年10月13日付け食安基発1013001号医薬食品局食品安全部基準審査課長通知、食安監発1013003号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「食品中のマラカイトグリーンの試験法等について」
- 5) 厚生労働省監修(2003)食品衛生検査指針動物用医薬品・飼料添加物編、(社)日本食品衛生協会、26-65。

### Stability of stock standard solution for veterinary drug

Kazushi KOYAMA, Akihiko YAMAMOTO, Ken HOMMA and Fumio NAKANO

Nagano Environmental Conservation Research Institute, Food and Pharmaceutical Sciences Division,  
1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan