

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン 共重合体固相抽出カラムの動物用 医薬品前処理における性能比較



著者

山下 和之
澤田 有司
栗原 絵里奈

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

厚生労働省の通知法¹⁾の「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 III」にジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを使用することが推奨されています。アジレントの Bond Elut HLB を始め、いくつかのメーカーから相当する固相抽出カラムが発売されていますが、粒子径などのスペックには違いがあります。本研究では本方法に指定されている動物用医薬品を対象として Bond Elut HLB と他メーカーのジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムについて回収率や処理速度について比較しました。その結果、回収率については差はあるもののすべて使用上問題のない範囲であり、処理速度については粒子径などの違いによりかなり差が見られることがわかりました。

はじめに

厚生労働省の通知法¹⁾の中の「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 III」では、抽出した動物用医薬品を充填剤量 60 mg のジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムによりクリーンアップするメソッドが推奨されています。これに相当する製品としてアジレントでは Bond Elut HLB を発売していますが、他メーカーからも何種類かの相当品が発売されています。各メーカーともジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体を基材とした充填剤を使用している点は共通していますが、粒子径などのスペックは異なります。

本研究では「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 III」¹⁾で対象としている動物用医薬品を使用して、Bond Elut HLB と他メーカーのジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体の固相抽出カラムについて回収率と処理時間を調査し、その性能を比較しました。

システム

表 1. 装置構成

型番	装置名
G6470B	6470 トリプル四重極 LC/MS
G7167A	1290 Infinity II マルチサンブラ
G7120A	1290 Infinity II ハイスピードポンプ

実験方法

材料

試薬は以下のものを使用しました。

アセトニトリル	関東化学 LC/MS 用 01033-23
メタノール	関東化学 LC/MS 用 25185-79
メタリン酸	関東化学 特級 32188-00
動物用医薬品標準品	関東化学 食品分析用混合標準液 1 16246-96 関東化学 食品分析用混合標準液 2 16247-96
ギ酸	関東化学 HPLC 用 16233-97
超純水	ミリQ 水

固相抽出カラムは以下のものを使用しました。

固相抽出カラム種類	部品番号
Bond Elut HLB 60 mg/3 mL	5610-2145
他社製品 A ~ D 60 mg/3 mL	

試料調製

「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 III」¹⁾に準じて動物用医薬品標準品を 0.2 % メタリン酸水溶液で希釈して 5 ng/mL の濃度の溶液としたものを試料液としました。試験液 20 mL を 1 mL に濃縮するので LC/MS 分析時の計算上の濃度は 100 ng/mL になります。

固相抽出処理

固相抽出は以下の手順で行いました。

メタノール 5 mL、超純水 5 mL でコンディショニング



試料液 20 mL を通過



超純水 5 mL で洗浄



メタノール 5 mL で溶出、回収



メタノールを減圧濃縮器で除去、乾固



アセトニトリル/水 (9/1) 1 mL に溶解

分析条件

表 2、3 の条件で LC/MS/MS で分析しました。

表 2. 分析条件

カラム	Poroshell 120 CS-C18 2.7µm, 2.1 mm x 50 mm P/N 69975-942
カラムオープン	30 °C
移動相	A : 0.1 % ギ酸 B : アセトニトリル
グラジエント (B%)	0 分 5 % → 0.5 分 5 % → 8 分 50 % → 11 分 99 % → 11.1 分 5 % → 15 分 5 %
流速	0.3 mL/min
ガス温度	250 °C
ガスフロー	11 mL/min
ネプライザー	30 psi
シースガス温度	300 °C
シースガスフロー	12 mL/min
キャピラリー	3000 V
ノズル電圧	0 V
極性	Positive

表 3. MRM 条件と溶出時間

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Fragmentor (V)	Collision Energy (eV)	Retention time (min)
Sulfadiazine	251	92	100	24	1.9
Sulfameradine	265	92	120	28	2.4
Sulfadimidine	279	186	140	12	2.8
Sulfamethoxyipyridazine	281	156	120	12	3.1
Sulfamonomethoxine	281	92	120	28	3.7
Sulfamethoxazole	254	65	100	40	4.1
Sulfisoxazole	268	156	100	20	4.5
Oxolinic acid	262	216	100	32	4.6
Sulfadimethoxine	311	156	140	20	5.1
Sulfaquinosaline	301	156	120	12	5.2
Nalidixic acid	233	215	100	12	5.5
Flumequine	262	244	100	16	5.8
Piromidic acid	289	271	100	15	6.5

結果および考察

動物用医薬品の標準品 25 ng/mL の標準液の MRM クロマトグラムを 図 1 に示します。

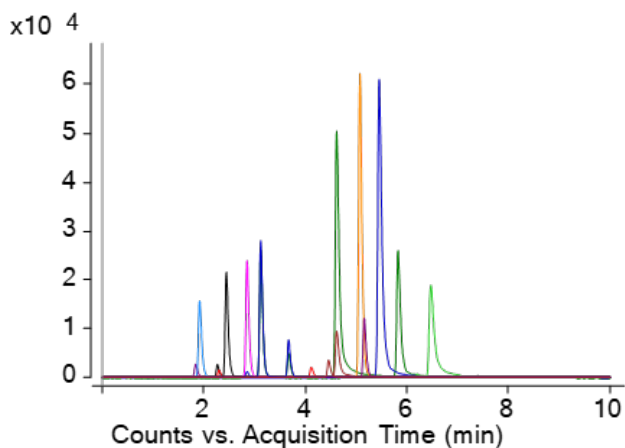


図 1. 動物用医薬品標準品 25 ng/mL の標準液の MRM クロマトグラム

各動物用医薬品は標準品レベルでは良好に分離していることが確認されました。

表 4 にそれぞれの固相抽出カラムでの動物用医薬品の回収率を示します。

表 4. 各固相抽出カラムでの動物用医薬品の回収率 (%)

	Bond Elut HLB	他社製品 A	他社製品 B	他社製品 C	他社製品 D
Sulfadiazine	90.9	108.3	95.8	91.6	117.3
Sulfameradine	92.8	110.6	96.4	92.6	114.1
Sulfadimidine	91.1	107.0	94.6	91.7	113.9
Sulfanethoxypridazine	93.6	107.1	92.4	91.5	113.0
Sulfamonomethoxine	92.1	110.6	94.4	92.7	119.3
Sulfamethoxazole	87.0	108.9	94.3	88.9	118.1
Sulfisoxazole	87.4	107.9	93.5	90.4	119.2
Oxolinic Acid	100.6	120.6	105.9	87.6	109.0
Sulfadimethoxine	92.4	106.6	95.3	92.3	115.3
Sulfaquinoxaline	92.3	107.0	95.1	92.2	115.5
Nalidixic Acid	94.3	114.7	103.9	85.3	107.2
Flumequine	93.6	115.0	101.1	87.8	109.3
Piromidic Acid	83.6	111.1	98.8	84.3	104.9

回収率はブランクの試験液を処理した液に後から標準物質を添加した試料の濃度を 100 % として、処理前に標準物質を添加した試料での濃度の比率で求めました。製品により、高めに出る、低めに出るなどの傾向はありますが、全体としては 80 ~ 120 % の回収率範囲に入っており、いずれの製品も本方法に使用して問題ないと言えます。

表 5 に処理に要した時間を、表 6 に各製品のメーカー公表の粒子径を示します。

表 5. 固相抽出処理に要した時間 (分秒)

	減圧	コンディショニング 1	コンディショニング 2	試料負荷	洗浄	溶出	合計 (時:分:秒)
		メタノール 5 mL	超純水 5 mL	メタリン酸溶液 20 mL	超純水 5 mL	メタノール 5 mL	
Bond Elut HLB	なし	01:30	01:24	04:34	01:31	03:17	0:12:16
	なし	01:48	01:48	05:20	01:50	04:30	0:15:16
	なし	02:33	02:32	06:48	02:45	04:03	0:18:40
	なし	02:23	02:17	06:48	02:22	04:00	0:17:43
他社製品 A	なし	06:59	08:39	33:03	38:35	29:48	1:56:53
	なし	09:34	10:16	33:26	13:50	30:09	1:37:15
	20 mmHg	01:38	00:59	01:59	00:50	01:49	0:07:15
	20 mmHg	01:14	01:52	03:29	00:53	03:37	0:11:05
他社製品 B	なし	14:42	12:21	49:18	17:10	14:40	1:48:11
	なし	13:21	15:30	49:20	22:53	18:13	2:00:17
	20 mmHg	02:33	00:56	06:07	00:36	04:59	0:15:11
	20 mmHg	02:47	01:51	07:13	01:56	04:35	0:18:22
他社製品 C	なし	05:26	05:06	17:08	06:33	09:06	0:43:19
	なし	06:39	05:15	15:10	05:28	09:28	0:42:00
	20 mmHg	01:09	01:02	03:58	01:05	02:05	0:09:19
	20 mmHg	01:20	01:33	04:21	01:08	03:14	0:11:36
他社製品 D	なし	05:37	03:38	16:25	03:54	03:55	0:33:29
	なし	02:58	02:40	12:43	03:57	03:18	0:25:36
	なし	02:01	02:01	24:55	04:30	04:30	0:37:57
	なし	02:07	01:57	11:19	04:10	03:58	0:23:31

表 6. 各製品の粒子径 (μm)

	粒子径
Bond Elut HLB	70
他社製品 A	非公開
他社製品 B	30
他社製品 C	44-75
他社製品 D	55-80

各製品 n=4 で試験しましたが、最初に 2 本の処理時間を自然落下で計測した後、時間が短かった製品は残り 2 本も自然落下で、時間が長かった製品は後の 2 本をマニホールドで減圧して処理しました。Bond Elut HLB は粒子径が 70 μm で大きく、また粒子径が揃っているため、自然落下で短時間で処理ができ、減圧が不要で良好な回収率が得られました。他社製品 A～C は自然落下では長い時間を要し、処理には減圧が必要でした。他社製品 A については粒子径の情報が公開されていませんでしたが、他社製品 B は粒子径が 30μm と小さく、他社製品 C は粒子径に幅があることから、微粒子の影響で通過速度が遅くなっていることが推定されます。他社製品 D は粒子径に幅がありますが、全体的に粒子径が大きいことから、Bond Elut HLB よりは通過時間がかかりましたが、減圧をしなくても使用可能な所要時間範囲で処理が終わりました。表 3 の回収率は減圧の有無に関わらず 4 回を平均しましたが、減圧の有無で回収率に差は見られませんでした。

まとめ

Bond Elut HLB と他社のジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドンの固相抽出カラムについて厚生労働省の通知法の「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 III」¹⁾の方法に準じて動物用医薬品の分析前処理を行ったところ、回収率についてはいずれの製品も良好でしたが、処理時間については Bond Elut HLB が粒子径が大きく揃っていることから減圧吸引なしの自然落下でも非常に短時間で処理できることがわかりました。

参考文献

- 1) 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 | 厚生労働省 (mhlw.go.jp)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE87088803

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 19, 2023

5994-7016JAJP