

酸性溶媒中での動物用医薬品の加水分解における アセトニトリル濃度及び反応温度の影響

The Effect of Acetonitrile Concentration and Reaction Temperature on
Hydrolysis of Veterinary Drugs in Acidic Solvents

藤井 良昭 上田友紀子 大前 詩穂
青柳 直樹 西村 一彦

Yoshiaki FUJII, Yukiko UEDA, Shiho OMAE,
Naoki AOYANAGI and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : veterinary drug (動物用医薬品) ; hydrolysis (加水分解) ; acetonitrile concentration (アセトニトリル濃度) ; reaction temperature (反応温度) ; reaction rate (反応速度)

緒 言

動物用医薬品は、家畜や家禽の治療や疾病予防に利用される物質である。一方、食品中に残留した場合には、人の健康に影響を及ぼす可能性があるため、食品衛生法により残留規制が行われている¹⁾。残留規制の根幹は残留濃度の正確な分析であり、分析法は添加回収試験による真度や精度などが、妥当性評価の目標値を満足しなければならない²⁾。実際の検査では、試料からの抽出効率、精製時の損失、マトリックス効果、加水分解等、様々な要因により回収率が変動する。このうち加水分解については、例えばスピラマイシン I やタイロシンは酸性条件下では1時間で概ね50%~85%が分解され^{3,4)}、分解速度は温度に依存して温度が高いほど加水分解が速い⁵⁾ことが報告されている。北海道では、上記物質を含む動物用医薬品の検査を行っており、そこで用いている試験法(以下、既法)⁶⁾による抽出液は、酸性かつ塩析・脱水のための無水硫酸マグネシウムを加えた際の発熱により温度が高くなる。このため、抽出工程において上記物質は加水分解しやすいと考えられるが、妥当性評価における真度では70%以上の良好な結果が得られている^{6,7)}。加水分解に関する過去の報告^{3,4)}との差異は、溶媒の違い[過去の報告では酸性水溶液(リン酸塩緩衝液)、既法では酸性含水有機溶媒(ギ酸酸性アセトニトリル)]によると推察されるが、我々の知る限り、既法で用いるギ酸酸性アセトニトリル溶液中での加水分解に関する詳細な報告例はない。分析法の開発や改良を行う際には、分析工程における対象物質の分解を避ける必要があり、分解が生じる条件の把握は重要である。

そこで、ギ酸酸性溶液中での動物用医薬品の分解におけるアセトニトリル濃度と反応温度の影響を明らかにすることを目的に、加水分解実験を実施した。

方 法

1. 分析対象物質

残留動物用医薬品の行政検査で分析している37物質を対象とした(表1)。

2. 試薬・試液

標準品は富士フィルム和光純薬(株)、関東化学(株)、Dr.Ehrenstorfer社及び林純薬工業(株)製の純度が明示されている製品を用いた。試薬は関東化学(株)製LC/MS用のアセトニトリル、メタノール、富士フィルム和光純薬(株)製のギ酸を用いた。

3. 標準溶液

標準原液は各標準品をひょう量し、メタノールで溶解して100 µg/mLとした。当該濃度を溶解しないナイカルバジンは20 µg/mLとし、オキシロニック酸、ダノフロキサシンはアセトニトリルに溶解し、50 µg/mLとした。混合標準溶液は、各標準品が2 µg/mLとなるように標準原液を採取、混合し、メタノールで希釈して調製した。

4. 装置

LCはAgilent Technologies社製1260 Infinity LCを用い、MS/MSは同じくAgilent Technologies社製6495 Triple Quad LC/MSを用いた。

加熱・恒温器は、ヤマト科学(株)製HF-21及びHL-21(使用温度:40,60及び80℃)、タイテック(株)製SM-05(使用温度:20℃)を用いた。いずれも、熱媒体に水を用いて水浴とした。

表1 検討対象物質とLC-MS/MS条件

物質名	メーカー ※1	Q1 (<i>m/z</i>)	定量イオン		確認イオン		極性
			Q3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)	Q3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)	
エトパベート	和光	238	206	4	136	24	+
オキシリニック酸	和光	262	216	28	160	40	+
オクスフェンダゾール	和光	316	159	28	191	20	+
オクスフェンダゾールスルホン	和光	332	300	20	159	36	+
オルビフロキサシン	和光	396	352	16	295	24	+
オルメトプリム	和光	275	123	24	259	24	+
ジアベリジン	和光	261	245	24	123	20	+
ジニトルミド	和光	224	42	16	181	8	-
スピラマイシン I	林	422	101	12	174	16	+
スルファキノキサリン	和光	301	156	12	92	28	+
スルファクロルピリダジン	和光	285	156	12	92	28	+
スルファジミジン	和光	279	186	12	92	32	+
スルファジメトキシシン	和光	311	156	15	92	30	+
スルファドキシシン	和光	311	156	15	92	30	+
スルファメトキサゾール	和光	254	92	24	156	12	+
スルファメトキシピリダジン	和光	281	92	28	156	12	+
スルファメラジン	和光	265	92	28	108	24	+
スルファモイルダプソン	和光	328	108	21	311	9	+
スルファモノメトキシシン	和光	281	92	28	108	24	+
タイロシン	和光	917	174	40	772	28	+
ダノフロキサシン	和光	358	340	20	82	40	+
チアベンダゾール	関東	202	175	24	131	36	+
チアンフェニコール	和光	354	185	16	290	4	-
チルミコシン	Dr	436	174	24	88	40	+
トリメトプリム	和光	291	230	20	123	24	+
α -トレンボロン	林	271	253	20	107	32	+
β -トレンボロン	林	271	253	20	107	32	+
ナイカルバジン	和光	301	137	10	107	20	-
ネオスピラマイシン	和光	350	174	12	160	8	+
5-ヒドロキシチアベンダゾール	和光	218	191	24	147	36	+
ピリメタミン	和光	249	177	28	233	28	+
フェバンテル	和光	447	383	15	415	5	+
フェンベンダゾール	和光	300	268	20	159	20	+
フルベンダゾール	和光	314	282	20	123	40	+
フルベンダゾール代謝物	和光	256	95	41	123	33	+
ミロサマイシン	和光	728	158	25	116	37	+
レバミゾール	和光	205	178	20	91	40	+

Q1：プリカーサイオン，Q3：プロダクトイオン，CE：コリジョンエネルギー

※1 関東：関東化学(株)，林：林純薬工業(株)，和光：富士フィルム和光純薬(株)

Dr：Dr.Ehrenstorfer

5. LC-MS/MS条件

LC分析カラムはWaters社製AtlantisT3(3.0 μ m, 2.1 \times 100 mm)を用いた。カラム温度は40°C、移動相はA液1 mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸とB液アセトニトリルのグラジエント溶出し、その条件は1% B液(0 min) - 20% B液(3.5 min) - 60% B液(9.5 min) - 90% B液(11.5 - 14.5 min) - 1% B液(14.6 - 26 min)とした。流量は0.3 mL/minで、試料注入量は3 μ L、イオン化モードはESI、測定モードは多重反応モニタリング(MRM)

とした。表1に物質ごとのMRM分析条件を示した。

6. 加水分解反応試験

1) アセトニトリル濃度の影響

アセトニトリルと水を混合し、アセトニトリル濃度10、30、50、70及び85% (v/v)を調製し、0.5% (v/v)ギ酸含有となるようにギ酸を加えた。これらの溶液を用いて混合標準溶液を希釈し、20 ng/mLの反応溶液を調製した。1.5 mL容エッペンドルフ製マイクロチューブに1 mL分取し、60°Cの水浴中に置いた。5分に一度程度、手振り

かくはんしつつ、1時間反応させた後、すみやかに氷冷した。40%アセトニトリルを用いて10倍希釈し、LC-MS/MS分析に供した。反応はすべて2併行で実施した。

2) 反応時間の影響

0.5%ギ酸含有30%アセトニトリル溶液を用いて混合標準溶液を希釈し、20 ng/mLの反応溶液を調製した。1.5 mL容エッペンドルフ製マイクロチューブに1 mL分取し、0.25、0.5、1、2及び3時間反応させた。反応後は、6.1（アセトニトリル濃度の影響）と同様に、氷冷、希釈した後、LC-MS/MS分析に供した。反応はすべて2併行で実施した。

3) 温度の影響

6.2（反応時間の影響）と同様に調製、分取した反応溶液を用い、20、40、60及び80℃の水浴中で1時間反応させた。反応後は、6.1（アセトニトリル濃度の影響）と同様に、氷冷、希釈した後、LC-MS/MS分析に供した。反応はすべて2併行で実施した。

結 果

1. アセトニトリル濃度の影響

0.5%ギ酸含有の10、30、50、70及び85%アセトニトリル濃度の溶液を用いて、60℃で1時間加水分解した。反応温度は、既法⁶⁾により鶏筋肉5検体の試験溶液を調製する工程において、塩析・脱水のための塩を加えた直後の抽出液中の温度を測定し、その最高温度の平均値57℃（最高値は66℃）を参考に設定した。分解の影響がみられた物質は、スピラマイシンI、タイロシン及びフェバンテルであった（図1）。なお、スピラマイシンIの分解に伴いネオスピラマイシンの増加が認められたため、別途ネオスピラマイシンのみで加水分解実験を実施したところ、分解は認められなかった。分解の程度は、アセトニトリル濃度が低いほど高く、アセトニトリル濃度10%ではスピラマイシンI及びタイロシンは初期濃度に対して20%、フェバンテルは50%程度まで低下した。一方、アセトニトリル濃度85%の場合、分解は認められなかった。

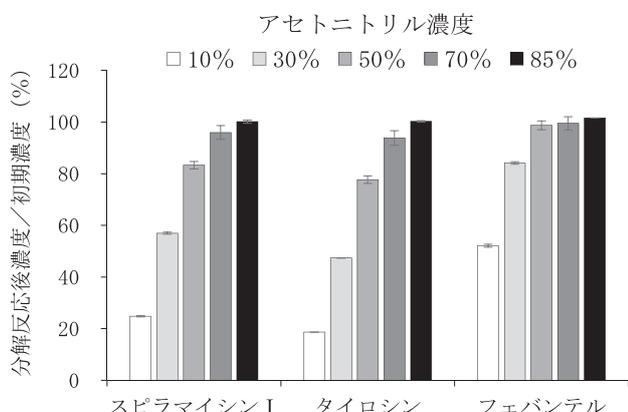


図1 加水分解におけるアセトニトリル濃度の影響

反応温度：60℃、反応時間：1時間

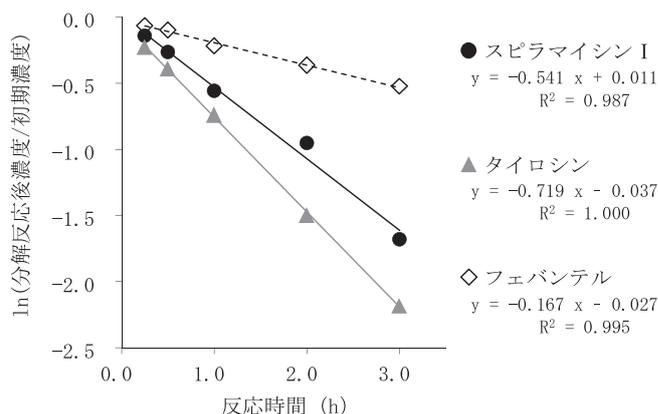


図2 加水分解量と反応時間の関係

反応溶媒：0.5%ギ酸含有30%アセトニトリル溶液
反応温度：60℃

2. 反応時間の影響

0.5%ギ酸含有30%アセトニトリル溶液を用いて、60℃で0.25、0.5、1、2及び3時間加水分解した。なお、反応溶液に選択したアセトニトリル濃度は、1時間の反応時間で一定の分解が期待でき、分解量の評価のしやすさから選択した。この結果、分解影響がみられた物質はスピラマイシンI、タイロシン及びフェバンテルのみであり、前述のアセトニトリル濃度の影響と同様の結果であった。また、図2に示す通り、反応時間と初期濃度に対する分解後濃度の比の自然対数は直線関係にあり、加水分解反応は1次反応で近似可能であることが示された。

3. 反応温度の影響

0.5%ギ酸含有30%アセトニトリル溶液を用いて、20、40、60及び80℃で1時間加水分解した結果を図3に示す。この結果、20℃では、いずれの物質も分解はほとんど認められなかった。高い温度では、前述と同じ3物質で分解が認められ、80℃ではスピラマイシンIとタイロシンは初期濃度に対して10%以下、フェバンテルは50%程度まで分解された。

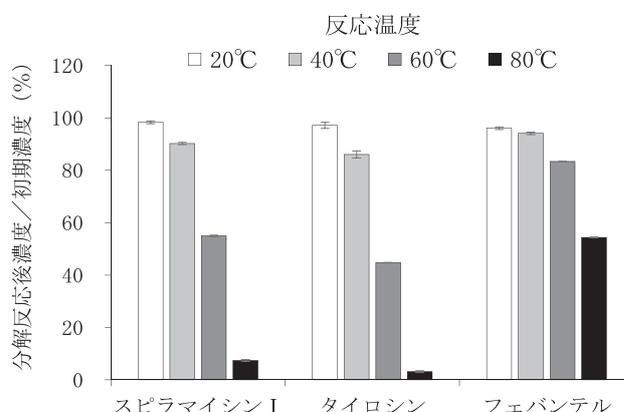


図3 加水分解における反応温度の影響

反応溶媒：0.5%ギ酸含有30%アセトニトリル溶液
反応時間：1時間

表2 反応速度定数及び半減期

(1) アセトニトリル濃度の影響							(2) 反応温度の影響						
濃度 %	SPM		TY		FB		温度 ℃	SPM		TY		FB	
	<i>k</i> 1/h	<i>t</i> _{1/2} h	<i>k</i> 1/h	<i>t</i> _{1/2} h	<i>k</i> 1/h	<i>t</i> _{1/2} h		<i>k</i> 1/h	<i>t</i> _{1/2} h	<i>k</i> 1/h	<i>t</i> _{1/2} h		
10	1.393	0.50	1.676	0.41	0.651	1.06	20	0.017	40.91	0.029	24.25	0.040	17.21
30	0.563	1.23	0.747	0.93	0.172	4.02	40	0.103	6.72	0.150	4.61	0.061	11.41
50	0.183	3.79	0.252	2.75	0.013	54.49	60	0.598	1.16	0.805	0.86	0.182	3.80
70	0.041	16.81	0.064	10.89	0.005	143.06	80	2.603	0.27	3.457	0.20	0.609	1.14

SPM: スピラマイシン I、TY: タイロシン、FB: フェバンテル

考 察

加水分解反応は一次反応で近似できることが示されたため、1時間の分解量から次式を用いて、アセトニトリル濃度、反応温度のそれぞれの条件における反応速度定数及び半減期を算定した(表2)。

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (\text{式 1})$$

ここで、C: 分解反応後の濃度、C₀: 初期濃度、*k*: 反応速度定数 (1/h) 及び *t*: 反応時間 (h) を示す。なお、分解が認められなかったアセトニトリル濃度 85% については算定していない。また、各アセトニトリル濃度及び反応温度に対して、反応速度定数の常用対数をプロットした散布図を図4及び5に示した。

アセトニトリル濃度 10%、分解温度 60℃ では、スピラマイシン I、タイロシン及びフェバンテルの半減期はそれぞれ 0.50、0.41 及び 1.06 時間、アセトニトリル濃度 70% ではいずれも 10 時間以上と算定され、アセトニトリル濃度が分解速度に著しい影響を与えることが示された。アセトニトリル濃度と反応速度定数の対数は負の相関があり (*r* = -0.994 ~ -0.985)、図4に示す線形回帰直線の傾きからアセトニトリル濃度 10% あたりの速度変化を算定すると、スピラマイシン I、タイロシン及びフェバンテルでそれぞれ 0.56 (1/1.8)、0.58 (1/1.7) 及び 0.42 (1/2.4) と推定された。水中と比較して、アセトニトリル中では酸の *pKa* が高くなる⁸⁾、すなわち酸の解離が抑えられるため、水中よりも pH は低下しない。また、スピラマイシン I やタイロシンは中性溶液では分解速度が低い⁵⁾。これらのことから、アセトニトリル濃度が高いほど加水分解速度が低い要因は、アセトニトリル濃度上昇に伴う pH 低下の抑制と推察された。

一方、反応温度と速度定数の対数は正の相関があり (*r* = 0.980 ~ 0.999)、図5に示す線形回帰直線の傾きから温度 10℃ あたりの速度変化を算定すると、スピラマイシン I、タイロシン及びフェバンテルでそれぞれ 2.3、2.2 及び 1.6 倍と推定された。Mitchell ら⁵⁾ はスピラマイシン I 及びタイロシンの酸性 (pH 4) 条件下での分解速度は、10℃ の上昇で概ね 1.5 ~ 2.9 倍になると報告しており、今回の結果と

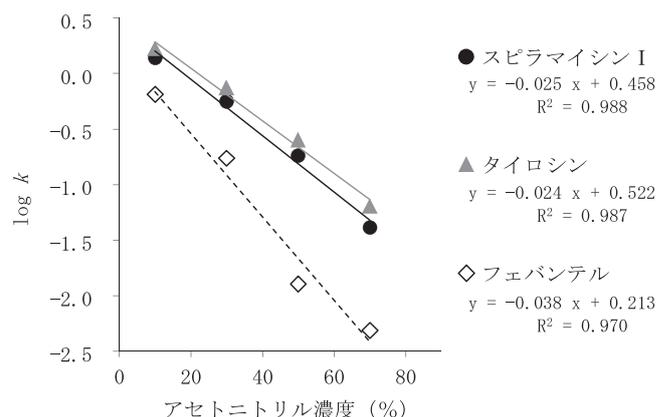


図4 反応速度定数とアセトニトリル濃度の関係

反応温度: 60℃、反応時間: 1時間

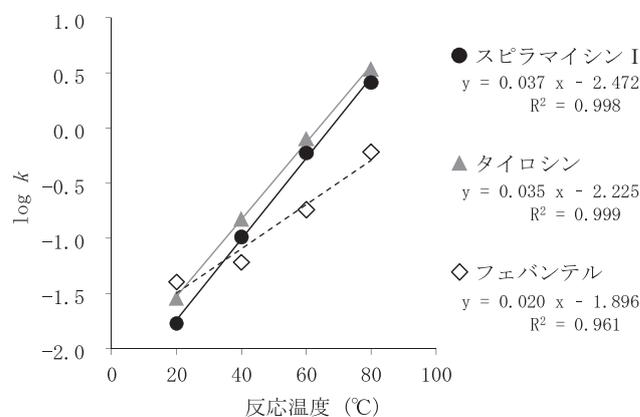


図5 反応速度定数と反応温度の関係

反応溶媒: 0.5%ギ酸含有 30%アセトニトリル溶液
反応温度: 60℃

同様であった。

以上の結果より、今回対象とした動物用医薬品について、スピラマイシン I、タイロシン及びフェバンテルの3物質では酸性溶媒中において加水分解の影響が認められたが、残りの 34 物質については加水分解の影響は認められず、多くの物質では影響がないことが示された。上記3物質については、溶媒中のアセトニトリル濃度が高くなると分解速度は低下し、85%では、いずれの物質も分解は認め

られなかった。一方、温度が高くなると分解速度は上昇し、10℃の温度上昇で分解速度は1.6~2.3倍になった。これらの結果を踏まえると、残留分析において加水分解の影響を抑えるためには、アセトニトリル濃度が高い溶媒を用い、低温下で操作を行う、発熱が生じる場合には、すみやかに冷却するなど、低温に保つことが重要と考えられた。

文 献

- 1) 堀江正一, 竹上晴美: 動物用医薬品の残留規制とLC/MSによる分析. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 91-96 (2006)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部食安発 1224 第 1 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」, 平成 22 年 12 月 24 日
- 3) 堀江正一, 齊藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 中澤裕之: 高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉, 豚肉及び牛肉中のタイロシンの定量. *衛生化学*, **34**(2), 128-134 (1988)
- 4) 堀江正一, 城戸靖雅, 村山三徳, 豊田正武, 中澤裕之: HPLC による畜水産食品中のスピラマイシン I 及び主代謝物ネオスピラマイシン I の定量. *食衛誌*, **40**(5), 401-406 (1999)
- 5) Mitchell SM, Ullman JL, Teel AL, Watts RJ: Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. *Chemosphere*, **134**, 504-511 (2015)
- 6) 西村一彦, 山口博美, 橋本 諭, 平間祐志: LC/MS/MS による動物用医薬品の迅速一斉分析法の改良と妥当性評価. *道衛研所報*, **63**, 57-63 (2013)
- 7) 藤井良昭, 加賀岳朗, 細川 葵, 西村一彦: LC-MS/MS による動物用医薬品の迅速一斉分析法の改良と妥当性評価 (第 2 報). *道衛研所報*, **69**, 55-58 (2019)
- 8) 公益社団法人日本化学会編: 11.7 非水系の平衡定数. *化学便覧基礎編改訂 6 版*, 丸善出版(株), 東京, 2021, pp.839-840