

溶液中における合成抗菌剤の安定性

内田耕太郎* 柿本健作* 山口貴弘* 永吉晴奈* 起橋雅浩* 小西良昌* 梶村計志*

合成抗菌剤 41 種類のアセトニトリル溶液を対象に、長期間保存した場合の安定性、ガラス及びポリプロピレン製容器への吸着性、光に対する安定性について検討した。その結果、 -20°C で保存したアセトニトリル溶液、および 4°C で保存した 10% アセトニトリル溶液において、全ての化合物が 1 年間安定であること、また、キノロン剤の多くがガラスに吸着すること、さらに、キノロン剤とサルファ剤の一部が光照射下で分解することがわかった。これらのことから、今回検討した合成抗菌剤を取り扱う場合に、保存容器の材質と遮光に注意が必要であることが示された。

キーワード: 合成抗菌剤、安定性、吸着、光分解、高速液体クロマトグラフ

Key words: Antibiotics, Stability, Adsorption, Photodegradation, HPLC

当所では食品中の動物用医薬品の残留検査を行っており、アセトニトリルで調製した標準溶液を使用している。溶液中における合成抗菌剤の安定性について、いくつか報告があるが^{1) 2) 3)}、当所の検査で適用している条件である、アセトニトリル溶液 (-20°C 保存)、10% アセトニトリル溶液 (4°C 保存) で、キノロン剤、サルファ剤、代謝拮抗剤の安定性を調査した報告はほとんどない。そこで、これらの条件での安定性を検討した。

医薬品の中にはガラスやプラスチックに吸着するものがある。例えば抗がん剤のフルオロウラシルや、糖尿病治療薬のインスリンはガラスやポリ塩化ビニルに吸着することが知られている⁴⁾。そこで、標準溶液の保管に用いることの多い、ガラスまたはポリプロピレン製容器に合成抗菌剤がどの程度吸着するか調べた。

また、医薬品の中には光に弱いため、暗所で取り扱わなければならないものもある。当所で検査を行っているキノロン剤も、光照射下で分解することが報告されているものがある^{5) 6)}。そこで、光に対する安定性についても検討した。

方法

1. 試薬、器具

1-1. 標準品: キノロン剤 15 種類、サルファ剤 22 種類、代謝拮抗剤 4 種類を対象とした。林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Dr Ehrenstorfer 社、Sigma-Aldrich 社、および U.S. Pharmacopeial Convention 製の残留動物薬分析用もしくはその同等品を用いた。

1-2. 標準溶液: 標準品をアセトニトリルまたはメタノールに溶解し、標準溶液 ($100\sim 1000\ \mu\text{g}/\text{mL}$) を調製した。標準溶液を適便、希釈し、アセトニトリル溶液 ($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) と 10% アセトニトリル溶液 ($0.1, 1\ \mu\text{g}/\text{mL}$) の 3 種類を調製した。

1-3. その他の試薬、器具: パラヒドロキシン安息香酸エチルは関東化学(株) 製特級を用いた。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q 純水製造装置 (Elix Advantage、MilliQ Advantage A10) で精製した水 (比抵抗値 $18.2\ \text{M}\ \Omega\cdot\text{cm}$) を使用した。アセトニトリルおよびメタノールは和光純薬工業(株) 製残留農薬 PCB 試験用を用いた。りん酸二水素ナトリウム水和物は和光純薬工業(株) 製試薬特級を使用した。ガラス製インサートはアジレント・テクノロジー(株) 製 $400\ \mu\text{l}$ 透明ガラス平底インサートを用いた。ポリプロピレン (PP) 製インサートはアジレント・テクノロジー(株) 製 $400\ \mu\text{l}$ ポリプ

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Stability of Antibiotics in Solutions

by Kotaro UCHIDA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Haruna NAGAYOSHI, Masahiro OKIHASHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

ロピレン平底インサートを使用した。PP 製遠沈管 (15、50 mL) は AGC テクノグラス (株) 製を用いた。

2. HPLC

LC: Waters 社製 e2695 Separation Module、PDA 検出器: Waters 社製 2998 Photodiode Array Detector、分析カラム: SUPELCO 社製 Ascentis Express C18 (2.7 μm 、4.6 \times 150 mm)

3. 測定条件

3-1. 移動相: A 液: 50 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液、B 液: アセトニトリル、グラジエント条件: (%B) Initial (10) \rightarrow 10 min (70)、流速: 1 mL/min
カラム温度: 40°C、注入量: 10 μL

3-2. PDA 検出器測定条件: それぞれの化合物の極大波長付近でピーク面積を求めた。表 1 に溶出時間と測定波長を示した。

4. 標準溶液の安定性

合成抗菌剤のアセトニトリル溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 約 50 mL を PP 製遠沈管で、1 年間、-20°C、暗所で保存した。また、10%アセトニトリル溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 4°C で同様に保存した。保存の前後のピーク面積を測定し、パラヒドロキシ安息香酸エチル (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10%アセトニトリル溶液) に対するピーク面積比を算出した (式 1)。パラヒドロキシ安息香酸エチルは測定日による PDA 検出器の感度の違いを補正するために使用した。アセトニトリル溶液は水で 10 倍に希釈し、10%アセトニトリル溶液は直接測定した。保管の前後それぞれのピーク面積比から残存率 (%) を算出した (式 2)。

$$\text{式 (1) ピーク面積比} = \frac{\text{合成抗菌剤のピーク面積}}{\text{パラヒドロキシ安息香酸エチルのピーク面積}}$$

$$\text{式 (2) 残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後のピーク面積比}}{\text{保存前のピーク面積比}} \times 100$$

表 1. 溶出時間と測定波長

Compound	Retention time (min)	Wavelength (nm)	Compound	Retention time (min)	Wavelength (nm)
<i>Quinolones</i>			Sulfadimethoxine	6.6	270
Ciprofloxacin	3.9	277	Sulfadimidine	4.6	265
Danofloxacin	4.2	282	Sulfadoxine	5.6	272
Difloxacin	5.3	279	Sulfaethoxyipyridazine	7.7	265
Enoxacin	3.7	270	Sulfaguanidine	1.7	260
Enrofloxacin	4.6	291	Sulfamerazine	4.1	266
Flumequine	7.7	234	Sulfamethoxazole	5.6	269
Marbofloxacin	3.8	298	Sulfamethoxyipyridazine	4.6	265
Nalidixic acid	7.5	256	Sulfamonomethoxine	5.0	272
Norfloxacin	3.8	277	Sulfanilamide	2.0	258
Ofloxacin	4.0	294	Sulfanitran	5.7	263
Orbifloxacin	4.4	277	Sulfaquinoxaline	6.5	247
Oxolinic acid	7.5	260	Sulfathiazole	3.6	285
Pipemidic acid	3.1	275	Sulfatroxazole	5.7	268
Piromidic acid	8.5	282	Sulfisomidine	2.9	283
Sarafloxacin	4.7	279	Sulfisoxazole	5.5	268
<i>Sulfonamides</i>			Sulfisozole	4.7	269
Sulfabenzamide	5.3	264	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfabromomethazine	7.9	271	Diaveridine	3.5	200
Sulfacetamide	2.8	268	Ormethoprim	4.1	202
Sulfachlorpyridazine	5.2	270	Pyrimethamine	5.7	210
Sulfadiazine	3.3	268	Trimethoprim	3.8	204

5. 容器への吸着

ガラス製インサートおよび、PP製インサートに10%アセトニトリル溶液(0.1µg/mL)を入れ、遮光して、キノロン剤は1時間、サルファ剤、代謝拮抗剤は6時間放置した。ピーク面積を測定し、式(3)から残存率(%)を計算した。

$$\text{式(3) 残存率(\%)} = \frac{\text{ピーク面積}}{\text{PP製で保管直後のピーク面積}} \times 100$$

6. 光に対する安定性

合成抗菌剤の10%アセトニトリル溶液(1µg/mL)1mLをそれぞれPP製遠沈管に入れたものを2組用意し、室内(約22°C)に放置した。1つはアルミ箔で包み、もう1つは遮光せず、2週間放置した。HPLCでピーク面積を求め、式(1)、(2)から残存率を計算した。特に分解が進行したエノキサシン、マルボフロキサシン、オルビフロキサシンについては、1、3、6、24、48時間後の残存率も計算した。

結果および考察

1. 標準溶液の安定性

合成抗菌剤のアセトニトリル溶液を-20°C、10%アセトニトリル溶液を4°Cで1年間保存したところ、残存率は95.6~101.7%であった(表2)。今回検討した合成抗菌剤はこれらの条件で安定であり、溶液の状態でも問題ないと考えられた。

2. 容器への吸着

サルファ剤、代謝拮抗剤をガラスまたはPP製インサートに入れて放置したところ、6時間経過後の残存率は96.0~104.1%であった(表3)。一方、キノロン剤をガラス製インサートに入れた場合、ダノフロキサシンやノルフロキサシンなど、多くのキノロン剤がガラス製インサートに吸着した(表4)。このことから、キノロン剤を保存する場合には容器の材質に注意が必要であることが示された。

表2. 標準溶液の安定性

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Acetonitrile (-20°C)	10% Acetonitrile (4°C)		Acetonitrile (-20°C)	10% Acetonitrile (4°C)
<i>Quinolones</i>			Sulfadimethoxine	99.3	99.9
Ciprofloxacin	97.7	95.7	Sulfadimidine	98.5	97.1
Danofloxacin	98.5	96.0	Sulfadoxine	98.8	96.7
Difloxacin	99.2	99.9	Sulfaethoxypyridazine	99.2	97.3
Enoxacin	96.5	96.2	Sulfaguanidine	96.1	97.2
Enrofloxacin	97.2	97.9	Sulfamerazine	99.5	99.3
Flumequine	97.5	99.1	Sulfamethoxazole	100.4	100.1
Marbofloxacin	96.4	98.1	Sulfamethoxy-pyridazine	99.2	99.6
Nalidixic acid	98.1	97.5	Sulfamonomethoxine	99.0	99.2
Norfloxacin	99.0	97.0	Sulfanilamide	96.4	95.7
Ofloxacin	96.2	96.2	Sulfantran	99.1	98.2
Orbifloxacin	98.4	98.9	Sulfaquinolaxaline	99.0	99.0
Oxolinic acid	97.4	97.9	Sulfathiazole	99.0	99.0
Pipemidic acid	97.2	96.8	Sulfatroxazole	99.4	99.6
Piromidic acid	100.3	99.3	Sulfisomidine	99.5	99.1
Sarafloxacin	99.4	99.4	Sulfisoxazole	99.7	99.0
<i>Sulfonamides</i>			Sulfisozole	100.2	99.9
Sulfabenzamide	99.5	99.1	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfabromomethazine	101.7	100.8	Diaveridine	97.7	96.7
Sulfacetamide	100.6	99.0	Ormethoprim	98.8	97.3
Sulfachlorpyridazine	98.9	95.6	Pyrimethamine	97.8	96.5
Sulfadiazine	99.0	96.8	Trimethoprim	100.5	96.6

Test period: 1 year

3. 光に対する安定性

合成抗菌剤の10%アセトニトリル溶液をPP製遠沈管に入れ、室温、暗所で2週間保管したところ、いずれの化合物も分解しなかった。一方、遮光しなかったものでは、キノロン剤とサルファ剤の一部が減少し、分解していると考えられた(表5)。特に、エノキサシン、マルボフロキサシン、オルビフロキサシンは数時間で分解が進むことから(図1)、分析操作中も、遮光に注意する必要があることがわかった。

結論

キノロン剤15種類、サルファ剤22種類、代謝拮抗

剤4種類のアセトニトリル溶液中での安定性、ガラスおよびPP製容器への吸着性、光に対する安定性について検討した。これら合成抗菌剤はいずれも、-20℃で保存したアセトニトリル溶液および4℃で保存した10%アセトニトリル溶液中で1年間安定であった。しかし、キノロン剤の多くがガラス容器に吸着し、10%アセトニトリル溶液を6時間保管した場合、ダノフロキサシンやノルフロキサシンでは50%以下に減少した。また、光に対する安定性を検討したところ、キノロン剤とサルファ剤の一部が減少し照射下で分解していると考えられた。以上の結果から、合成抗菌剤の標準溶液を取り扱う場合には、保存容器の素材と遮光に注意が必要であることが示された。

表3. サルファ剤、代謝拮抗剤の容器への吸着

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Glass	Polypropylene		Glass	Polypropylene
<i>Sulfonamides</i>			Sulfanilamide	101.9	100.6
Sulfabenzamide	100.6	101.5	Sulfantran	102.4	100.4
Sulfabromomethazine	104.1	100.0	Sulfapyridine	101.1	101.9
Sulfacetamide	101.0	102.3	Sulfaquinoxaline	101.5	101.6
Sulfachlorpyridazine	102.4	99.6	Sulfathiazole	100.1	99.7
Sulfadiazine	101.5	99.5	Sulfatroxazole	100.7	100.6
Sulfadimethoxine	98.8	98.8	Sulfisomidine	102.0	100.9
Sulfadimidine	99.6	99.5	Sulfisoxazole	100.1	99.1
Sulfadoxine	100.6	100.3	Sulfisozole	100.5	101.4
Sulfaethoxypyridazine	99.3	98.2	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfaguanidine	98.9	101.3	Diaveridine	98.4	97.3
Sulfamerazine	103.3	100.9	Ormethoprim	100.5	99.7
Sulfamethoxazole	101.2	100.7	Pyrimethamine	98.7	96.0
Sulfamethoxypyridazi	101.7	100.9	Trimethoprim	100.2	99.4
Sulfamonomethoxine	100.0	101.7			

Test period: 6 hours

表4. キノロン剤の容器への吸着

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Glass	Polypropylene		Glass	Polypropylene
Ciprofloxacin	54.5 ± 4.4	97.9 ± 2.7	Nalidixic acid	99.1 ± 0.7	98.2 ± 2.2
Danofloxacin	44.5 ± 4.2	98.8 ± 1.6	Norfloxacin	47.2 ± 4.2	96.2 ± 1.2
Difloxacin	66.8 ± 9.1	98.9 ± 0.8	Ofloxacin	69.1 ± 7.5	99.2 ± 1.6
Enoxacin	57.0 ± 5.2	98.0 ± 1.5	Orbifloxacin	92.8 ± 1.1	98.7 ± 1.6
Enrofloxacin	64.6 ± 5.5	98.3 ± 2.7	Oxolinic acid	100.9 ± 0.0	100.2 ± 0.4
Flumequine	100.0 ± 0.1	98.8 ± 0.7	Pipemidic acid	80.4 ± 4.7	100.8 ± 1.5
Marbofloxacin	80.5 ± 2.6	99.8 ± 0.3	Sarafloxacin	60.3 ± 7.5	95.0 ± 0.4

Test period: 1 hour Value are shown as average ± standard deviation (N=3)

表 5. 光に対する安定性

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Dark	Light		Dark	Light
<i>Quinolones</i>					
Ciprofloxacin	100.8	73.6	Sulfadimethoxine	101.8	97.8
Danofloxacin	102.2	23.8	Sulfadimidine	100.8	95.9
Difloxacin	101.0	34.3	Sulfadoxine	101.1	92.0
Enoxacin	102.4	0.0	Sulfaethoxypyridazine	100.6	100.5
Enrofloxacin	102.3	33.4	Sulfaguandine	102.2	103.4
Flumequine	100.8	95.7	Sulfamerazine	99.8	93.3
Marbofloxacin	102.7	0.0	Sulfamethoxazole	99.9	100.8
Nalidixic acid	101.4	45.2	Sulfamethoxypyridazine	99.3	82.6
Norfloxacin	101.9	78.5	Sulfamonomethoxine	102.5	95.8
Ofloxacin	102.1	97.1	Sulfanilamide	102.6	103.2
Orbifloxacin	101.2	0.0	Sulfantran	100.6	79.4
Oxolinic acid	102.6	97.9	Sulfaquinoxaline	99.1	95.1
Pipemidic acid	100.7	59.8	Sulfathiazole	99.8	99.4
Piromidic acid	100.6	89.2	Sulfatroxazole	101.9	97.1
Sarafloxacin	99.6	71.2	Sulfisomidine	99.8	99.9
<i>Sulfonamides</i>					
Sulfabenzamide	100.0	100.7	Sulfisoxazole	101.5	99.2
Sulfabromomethazine	98.8	98.7	Sulfisozole	99.5	100.3
Sulfacetamide	98.2	98.0	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfachlorpyridazine	100.8	66.1	Diaveridine	102.6	103.8
Sulfadiazine	101.1	91.1	Ormethoprim	103.1	102.7
			Pyrimethamine	100.4	100.7
			Trimethoprim	102.7	102.6

Test period: 2 weeks

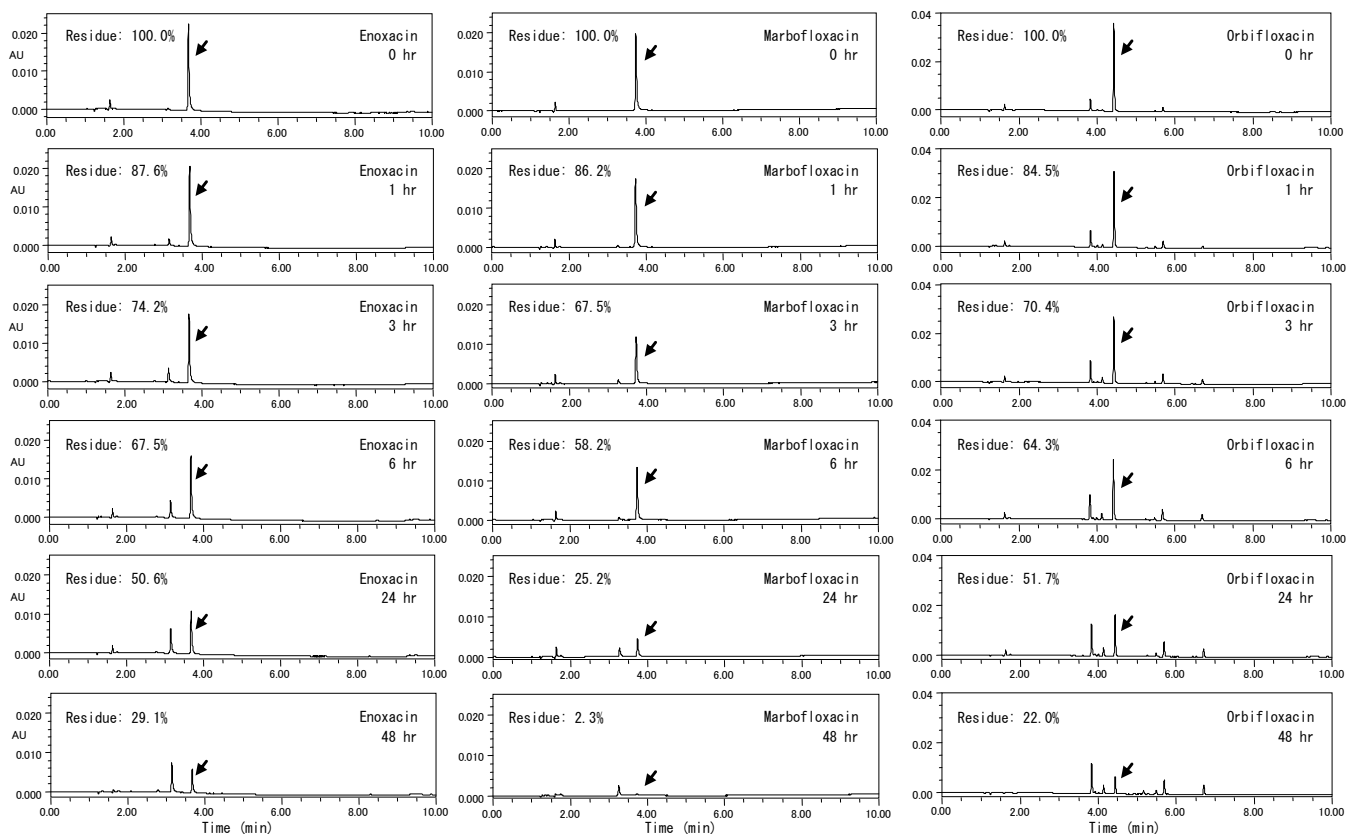


図 1. 光に対する安定性

文献

- 1) Lieve Okerman, Johan Van Hende, Lieven De Zutter : Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing, *Analytica Chimica Acta*, **586**, 284-288 (2007)
- 2) B.J.A. Berendsen , I.J.W. Elbers and A.A.M. Stolker : Determination of stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 1657-1666 (2011)
- 3) Ritva Karinen, Elisabeth Leere Oiestad, Wenche Andreassen, Anne Smith-Kielland, and Asbjorg Christophersen : Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year, *Journal of Analytical Toxicology*, **35**, 583-590 (2011)
- 4) A. M. Yahya, J. C. McElnay, P. F. D'Arcy : Drug sorption to grass and plastics, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **6**, 1-45 (1988)
- 5) Eva-Maria Tiefenbacher, Ekkehard Haen, Bernhard Przybilla, and Hermann Kurz : Photodegradation of some quinolones used as antimicrobial therapeutics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **83**, 463-467 (1994)
- 6) J. Burhenne, M. Ludwig and M. Spiteller : Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS, *Chemosphere*, **38**, 1279-1286 (1999)