ノート

HPLC による鶏組織中の残留抗コクシジウム剤
(ジクラズリルおよびナイカルバジン) の簡易分析法

(平成 14 年 5 月 10 日受理)

神田 真軌^{*1,†} 牛山 慶子^{*1} 井草 京子^{*1} 村山 三徳^{*2}
堀江 正一^{*3} 広門 雅子^{*1} 宮崎 奉之^{*1}Simple Determination of Residual Anticoccidial Drugs (Diclazuril
and Nicarbazin) in Chicken Tissues by HPLCMaki KANDA^{*1,†}, Keiko USHIYAMA^{*1}, Kyoko IGUSA^{*1}, Mitsunori MURAYAMA^{*2}, Masakazu HORIE^{*3},
Masako HIROKADO^{*1} and Tomoyuki MIYAZAKI^{*1}(*¹The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; *²National Institute of Health Sciences: 1-18-1,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; *³Saitama Prefectural Institute of Public
Health: 639-1, Kamiokubo, Saitama, Saitama 338-0824, Japan; † Corresponding author)

A simple and rapid determination of anticoccidial drug residues, diclazuril (DCZ) and nicarbazin (NCZ), in chicken tissues has been developed. DCZ and NCZ were extracted with acetonitrile from chicken liver, muscle, and fat. The extract was rinsed with *n*-hexane saturated with acetonitrile and then evaporated. The residue was dissolved in 1.4 mL of acetonitrile-methanol (1:1), then 1.0 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile-methanol (1:1) was added, and the mixture was partitioned by the addition of 0.6 mL of water. DCZ and NCZ in the aqueous layers were determined by HPLC on an Xterra RP-18 column with acetonitrile-0.5% ammonium acetate containing 0.01 mol/L tetra-*n*-butylammonium hydrogen sulfate (43:57) as the mobile phase. The mean recoveries ($n=5$) of DCZ and NCZ spiked in chicken tissues at the maximum residue levels were 92.0~95.6% (CV 2.4~3.0%) and 87.3~89.4% (CV 1.7~2.8%), respectively. The detection limits of DCZ and NCZ were 0.01 and 0.004 $\mu\text{g/g}$, respectively.

(Received May 10, 2002)

Key words: ジクラズリル diclazuril; ナイカルバジン nicarbazin; 抗コクシジウム薬 anticoccidial drug; ニワトリ組織 chicken tissue; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

ジクラズリル (DCZ) およびナイカルバジン (NCZ) は、ニワトリのコクシジウム病の予防および治療薬として、アメリカ、イギリスなどの諸外国で使用されている。わが国では DCZ の使用は認められていないが、NCZ は使用が認められている。

近年、FAO/WHO コーデックス委員会は安全性データなどに基づき畜産食品中の動物用医薬品の最大残留基準値 (MRLs) を順次設定している。わが国においても 2000 年 6 月、厚生労働省は、鶏組織中の DCZ および NCZ (NCZ

は *N,N'*-ビス(4-ニトロフェニル)ウレア (DNC) と 4,6-ジメチル-2-ピリミジノールの等モル複合体であるが、残留基準値は DNC を指標物質として設定している) の残留基準値をそれぞれ肝臓 3.0, 0.2 $\mu\text{g/g}$, 筋肉 0.5, 0.2 $\mu\text{g/g}$, 脂肪 1.0, 0.2 $\mu\text{g/g}$ と設定した¹⁾。

畜産動物の組織中の NCZ の分析法としては UV および MS 検出器を用いた HPLC による分析法^{2)~4)}、飼料中の DCZ の分析法としては HPLC および GC/MS による分析法が報告されているが^{5), 6)}、これらは組織中の DCZ および NCZ の同時分析法ではない。一方、厚生労働省の告示試験法は、鶏組織中から抽出した DCZ および NCZ を C18 カートリッジを用いて精製し HPLC 分析をする方法であるが¹⁾、この方法は肝臓や脂肪組織中のきょう雑物の除去が不十分で分析できない。また操作が煩雑であるなどの問題が見られる。そこで、著者らは DCZ および NCZ をより簡便に分析できる方法を検討した。

† 連絡先

^{*1} 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1^{*3} 埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 埼玉県さいたま市上大久保 639-1

実験方法

1. 試料および試薬

試料: 市販の鶏の肝臓, 筋肉および脂肪を用いた.

標準品: DCZ はヤンセン-シラグ社製, NCZ は大日本製薬(株)製を使用した.

標準原液: DCZ は 10.0 mg にアセトニトリル-メタノール (1:1) 混液を加えて 100 mL の定容とした. NCZ は 14.1 mg (DNC として 10.0 mg) を *N,N*-ジメチルホルムアミド 10 mL に溶解した後, メタノールを加えて 200 mL の定容とした.

標準溶液: 各標準原液をメタノールで適宜希釈した.

硫酸水素テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (tetra-*n*-butyl ammonium hydrogen sulfate, TBAHS) は和光純薬工業(株)製, その他の試薬は試薬特級品あるいは HPLC 用を使用した.

2. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC-10A シリーズを使用した. フォトダイオードアレイ検出器は SPD-M10VP を用いた.

HPLC 測定条件, カラム: Xterra RP-18 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, 3.5 μ m) Waters 社製; 移動相: アセトニトリル-0.01 mol/L TBAHS 含有 0.5% 酢酸アンモニウム (43:57); 流速: 1.0 mL/min; カラム温度: 40°C; UV 検出波長: DCZ は 280 nm, NCZ (残留基準値が設けられている DNC として測定) は 348 nm; 注入量: 10 μ L

3. 試験溶液の調製

3.1 抽出法

試料 5.0 g にアセトニトリル 30 mL および無水硫酸ナトリウム 10 g を加えてホモジナイズした後, 15°C, 3,000

rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を分取した. 遠沈管の沈殿物にアセトニトリル 20 mL を加えて激しく振とうした後, 同様に遠心分離を行い, 上清を合わせた. 次に, アセトニトリルで飽和した *n*-ヘキサン 20 mL を加えて振とうし静置した後, 下層のアセトニトリル層を分取し, これを抽出液とした.

3.2 精製法

得られた抽出液を 40°C 以下で減圧乾固し, 残留物にアセトニトリル-メタノール (1:1) 混液 1.4 mL を加えて, 30 秒間超音波にかけて溶解した. 次に, 溶解液に先の混液で飽和した *n*-ヘキサン 1.0 mL を加えて, さらに水 0.6 mL を加えて, 各段階で超音波を 30 秒間かけながらよくかくはんした. 全液を試験管に移して 15°C, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後, 下層を HPLC 用試験溶液とした.

結果および考察

1. HPLC の条件

カラムに Wakosil-II 5C18 HG および Xterra RP-18 を用いて, DCZ および DNC の標準溶液および鶏の各組織の抽出物を測定し, 最適な HPLC 条件を検討した.

移動相にアセトニトリル-0.025% リン酸 (50:50) を用いた場合, 両者のカラムとも DCZ を妨害する肝臓および脂肪の試料由来のピークが認められた.

そこで DCZ は酸性物質であることから, イオンペア剤の TBAHS を添加した移動相, アセトニトリル-0.01 mol/L TBAHS 含有 0.5% 酢酸アンモニウム (43:57) を用いた. この移動相においては, Wakosil-II 5C18 HG カラムでは, DCZ を妨害する試料由来のピークとの良好な

Fig. 1. HPLC chromatograms of DCZ and DNC spiked in chicken tissues at the MRLs

The MRLs of DCZ and DNC are 3.0, 0.2 μ g/g for liver, 0.5, 0.2 μ g/g for muscle, and 1.0, 0.2 μ g/g for fat, respectively. Units of axes are shown at the left upper window. Upper profile: spiked, lower profile: unspiked, in each window.

HPLC operating conditions; column: Xterra RP-18 (150 $\times$ 4.6 mm i.d., 3.5 μ m); mobile phase: acetonitrile-0.5% ammonium acetate containing 0.01 mol/L TBAHS (43:57); flow rate: 1.0 mL/min; column temp.: 40°C; detection: UV 280 nm for DCZ, 348 nm for DNC; injection volume: 10 μ L

分離が得られなかった。一方, Xterra RP-18 カラムでは, Fig. 1 のクロマトグラムに示すように, いずれのニワトリ組織でも DCZ および DNC のピークと試料由来のきょう雑ピークとの分離が良好であった。これは, Xterra RP-18 カラムがシリカゲルに C18 カルバメートを結合したカラムであり, このカルバメート基との相互作用により極性基を持つ物質は通常の C18 シリカゲルカラムとは異なる分離選択性があるため, きょう雑ピークの保持が変わったことによると考えられる。検出限界は肝臓, 筋肉および脂肪いずれの場合も, DCZ が $0.01 \mu\text{g/g}$, DNC が $0.004 \mu\text{g/g}$ ($S/N=3$) と感度も十分であった。

この HPLC 条件を用いて DCZ および DNC の各種標準溶液を測定し検量線を作成したところ, DCZ は $0.5\sim 500 \text{ ng}$ の範囲で, DNC は $0.5\sim 50 \text{ ng}$ の範囲で直線性 ($r > 0.999$) を示した。

2. 精製法の検討

告示試験法の C18 カートリッジを用いた固相精製法では, 肝臓や脂肪組織中のきょう雑物の除去が不十分で分析できないことがあった。そこで DCZ および DNC のより簡便かつ効率的な精製法として, さまざまな極性を持つ組織中のきょう雑物を除去するため, 幾種かの溶液間の液-液分配法について検討した。村山らは, アセトニトリル-水 (3:7) と *n*-ヘキサン間の液-液分配による精製法を試みているが, 試料により DNC の回収率が悪いという問題点があった²⁾。そこで液-液分配に使用する溶液としてアセトニトリル-メタノール混液を用いることおよび液-液間の分配の順序を変えることを試みた。抽出物存在下の精製効

率を見るために, 残留基準値相当量の DCZ および DNC を添加した肝臓の抽出液および無添加のものをを用いた。

まず, アセトニトリル-メタノールの組成が異なる 5 種類の混液 A(0:1), B(3:7), C(1:1), D(7:3), E(1:0) を用いて各々の分配条件で, 回収率, 操作性および精製効果を比較した。肝臓の抽出液を減圧乾固して得た残留物に, A~E の各混液 1.0 mL を加えて溶解し, これらの溶液に各々の混液で飽和した *n*-ヘキサン 1.0 mL を加えて, さらに水 1.0 mL を加えて液-液分配を行った。下層中の DCZ および DNC を HPLC で測定し回収率を求めた (Table 1a)。

なお上層および下層の液量の変化を A~E の 100 倍量の溶媒を用いて観察したが, 液量の変化はいずれの条件でも見られないことを確認した。

DCZ および DNC の回収率は, A のメタノールのみより B~E にかけてアセトニトリル-メタノール混液中のアセトニトリルの割合が高くなるほど上昇したが, アセトニトリルの割合が 7 割以上の D および E ではばらつきが見られた。また B~D の混液を用いた場合 A および E より精製効果が得られ, HPLC クロマトグラム上のきょう雑ピークが少なくまたベースラインノイズは低かった。これらの結果から, C が層の分離が良好で回収率のばらつきが少なく精製効果も高いことが分かった。しかし回収率は 75% 前後と低かったことから, さらに改善を試みた。

DCZ および DNC は水に溶解しにくいことから, アセトニトリル-メタノール (1:1) 混液の量をできるだけ増やし, 水を減らす方向で検討した。A~C のアセトニトリル-メタノール (1:1) 混液 1.0, 1.2, 1.4 mL を用いて残留

Table 1. Effects of Liquid-Liquid Partition on the Recoveries of Diclazuril (DCZ) and *N,N*-Bis(4-nitrophenyl)urea (DNC) Spiked in Liver Extract

a) Liquid-Liquid Partitions with Various Ratios of Acetonitrile-Methanol Mixture (1.0 mL), *n*-Hexane Saturated with Each Mixture (1.0 mL) and Water (1.0 mL)

Liquid-liquid partition	Acetonitrile-methanol (v : v)	Recovery (mean $\pm$ S.D.) (% , $n=3$)	
		DCZ ($3 \mu\text{g/g}$)*	DNC ($0.2 \mu\text{g/g}$)*
A	0 : 1	39.0 ± 2.9	30.0 ± 2.2
B	3 : 7	61.5 ± 4.1	49.6 ± 2.9
C	1 : 1	76.7 ± 1.1	70.7 ± 1.8
D	7 : 3	79.9 ± 4.2	74.9 ± 4.0
E	1 : 0	90.8 ± 6.7	88.1 ± 8.6

* The concentrations of DCZ and DNC spiked in the liver extract are the maximum residue levels (MRLs).

b) Liquid-Liquid Partitions with Various Amounts of Acetonitrile-Methanol Mixture, *n*-Hexane Saturated with Acetonitrile-Methanol (1 : 1) (1.0 mL) and Various Amounts of Water

Liquid-liquid partition	Acetonitrile-methanol (1 : 1) (mL)	H_2O (mL)	Recovery (mean $\pm$ S.D.) (% , $n=3$)	
			DCZ ($3 \mu\text{g/g}$)*	DNC ($0.2 \mu\text{g/g}$)*
A	1.0	1.0	76.7 ± 1.1	70.7 ± 1.8
B	1.2	0.8	84.8 ± 3.3	82.0 ± 1.9
C	1.4	0.6	97.2 ± 1.1	95.7 ± 1.4

* The concentrations of DCZ and DNC spiked in the liver extract are the maximum residue levels (MRLs).

Table 2. Recoveries of DCZ and DNC Spiked in Chicken Tissues at the MRLs

Compound	Chicken tissue	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	Recovery* (%)	CV** (%)
DCZ	Liver	3.0	92.0	3.0
	Muscle	0.5	95.6	2.4
	Fat	1.0	95.3	2.7
DNC	Liver	0.2	88.0	2.8
	Muscle	0.2	87.3	2.6
	Fat	0.2	89.4	1.7

* Average of 5 trials

** Coefficient of variation

物を溶解し、その混液で飽和した *n*-ヘキサン 1.0 mL を加えた後、水を各々 1.0, 0.8, 0.6 mL 加え、液-液分配を行った。下層中の DCZ および DNC を HPLC で測定し回収率を求めた (Table 1b)。なお、この A~C でも液量の変化は見られないことを確認した。

A~C にかけてアセトニトリル-メタノール (1:1) 混液の量が多くなるほど、DCZ および DNC の回収率は上昇し、1.4 mL を用いたとき DCZ および DNC の回収率は最も高かった。このとき、2 層の分離は良好で回収率のばらつきも少なくまた精製効果も高かった。この液-液分配法を用いることにより、アセトニトリル抽出以後の一連の操作が同一のフラスコ内で行え、操作が簡便となった。

3. 添加回収実験

あらかじめ DCZ および DNC を検出しないことを確認したニワトリの肝臓、筋肉および脂肪に、各々残留基準値相当量の DCZ (0.5~3 $\mu\text{g/g}$) および DNC (0.2 $\mu\text{g/g}$) を添加し、本法を用いて回収実験を行った。各組織での平均回収率および変動係数 (CV) は、DCZ が 92.0~95.6% (CV 2.4~3.0%), DNC が 87.3~89.4% (CV 1.7~2.8%) と良好であった (Table 2)。低濃度の DCZ (0.05 $\mu\text{g/g}$) および DNC (0.02 $\mu\text{g/g}$) を各組織に添加したときの平均回収率 ($n=3$) は、DCZ が 92.7~95.1% (CV 3.0~4.1%), DNC が 82.1~86.3% (CV 3.5~4.4%) であり、そこで本法の定量限界を DCZ が 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、DNC が 0.02 $\mu\text{g/g}$ とした。

ま と め

鶏組織中に残留する DCZ および DNC の固相精製法に代わる方法として、操作が簡便でかつ精製効率のよいアセトニトリル-メタノール (1:1) 混液、同混液で飽和した *n*-ヘキサン、水間の液-液分配法を作成した。

この方法で精製した試料の HPLC 測定には、Xterra RP-18 カラム上においてイオンペアクロマトグラフィーを行う条件が最適であることを示した。

鶏組織に残留基準値相当量の DCZ および DNC を添加

し、本法を用いて回収実験を行ったときの回収率は、87.3% 以上 (CV 3.0% 以下) で、コーデックス委員会が設定した動物用医薬品残留分析法の適格性許容基準⁷⁾を満たしていた。

本法は、鶏組織中の DCZ および NCZ の残留モニタリング検査に有用であると考えられる。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 80 会学術講演会 (2000 年 11 月、郡山) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省告示第 275 号 (2000) “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成 12 年 6 月 30 日。
- 2) Murayama, M., Uchiyama, S., Saito, Y., Rapid determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat by high-performance liquid chromatography with stepwise gradient elution. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **32**, 155-160 (1991).
- 3) Horii, S., Miyakawa, H., Igusa, K., Itoh, T., Analysis of residual synthetic antibacterials in meat and poultry meat by high-performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **35**, 352-356 (1994).
- 4) Yakkundi, S., Cannavan, A., Elliott, C. T., Lovgren, T., Kennedy, D. G., Development and validation of a method for the confirmation of nicarbazin in chicken liver and eggs using LC-electrospray MS-MS according to the revised EU criteria for veterinary drug residue analysis. *Analyst*, **126**, 1,985-1,989 (2001).
- 5) De Kock, J., De Smet, M., Sneyers, R., Determination of diclazuril in animal feed by liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **606**, 141-146 (1992).
- 6) Blanchflower, W. J., Hughes, P. J., Cannavan, A., Kennedy, D. G., Determination of diclazuril in avian feed and premixes with gas chromatography-mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **77**, 1,061-1,065 (1994).
- 7) FAO/WHO ed., “Codex Alimentarius: Residues of veterinary drugs in foods, Vol. 3”, 2nd Ed., 1995, p. 66-69. (ISBN 92-5-103822-8)