報 文

ニッケルキレート生成を利用したグリカルピラミドの分析法

(平成 18 年 4 月 26 日受理)

田島 規子*¹ 水野 安晴*² 浜本 好子*²
荒川 秀俊*¹ 前田 昌子*^{1,†}

Determination of Glycarbylamide Based on Formation of Nickel Chelate

Noriko TAJIMA*¹, Yasuharu MIZUNO*², Kouko HAMAMOTO*²,
Hidetoshi ARAKAWA*¹ and Masako MAEDA*^{1,†}(*¹Showa University, School of Pharmaceutical Sciences: 1-5-8,
Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan;*²National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries: 1-15-1, Tokura, Kokubunji-shi,
Tokyo 185-8511, Japan; † Corresponding author)

A new and simple analytical method for glycarbylamide (GB) based on the formation of nickel chelate was developed. The proposed method is as follows: sample solution is mixed with 0.08 mmol/L nickel nitrate in 0.2 mol/L carbonate buffer (pH 9.0), and the absorbance is measured at 290 nm. Under the optimal conditions, GB could be determined in the concentration range from 0.13 $\mu\text{g/mL}$ to 2.6 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$). Using this method for HPLC post column reaction, GB levels in chicken liver extracts could be determined. The recovery of GB was 79.4% ($RSD=2.6\%$, $n=3$) and the quantitation limit was 30 ng/g. The apparent molar extinction coefficient (ϵ) of the GB-nickel complex was 8.5×10^3 . The molar ratio of the complex is GB: nickel ion = 2:1.

(Received April 26, 2006)

Key words: グリカルピラミド glycarbylamide; キレート chelate; ニッケル nickel; 残留 residue; ポストカラム反応 post column reaction

緒 言

グリカルピラミド (glycarbylamide; GB) (Fig. 1) は抗原虫剤の一種であり¹⁾, 国内では鶏のコクシジウム症予防の目的で用いられる動物用医薬品の主要成分である。

畜水産動物に投与される動物用医薬品は, 食肉などに残留して摂取されることによりヒトの健康に影響を及ぼすことのないよう, 投与量や休薬期間が定められており, 一部の動物用医薬品については, 残留基準値を設定し, 基準値を超えた食品の流通を規制している。

平成 15 年 5 月の食品衛生法の改正に伴い, 平成 17 年 11 月にほとんどの動物用医薬品に暫定的に残留基準値が設定され, 平成 18 年 5 月から施行されることとなった。また, 残留基準値が設定された動物用医薬品以外にも, ポジティブリスト制度 (農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止する制度) が導入されることとなった。これらのため, 新たな残留分析法の開発を必要とする動物用医薬品も

数多くあり, GB もその 1 つにあげられている。

GB の分析法としては, これまでに Yamamoto らによって GB の紫外外部吸収を利用した HPLC 法が報告されている²⁾。しかしこの方法では, 鶏筋肉組織中の GB の分析は可能であるが, 鶏の肝臓試料では, 肝臓中の共存成分により GB の定量は不可能であった。

著者らは, GB が構造内にイミノ基およびアミド基を有することから, これらの官能基が金属とキレートを形成する可能性があり, それにより GB の紫外外部吸収を長波長側にシフトさせ, 鶏肝臓中の共存成分の影響を受けることなく GB を定量できるのではと考え, 種々の金属を用いて検討した。その結果, GB は数種の金属とキレート形成することが確認された。本報では, 紫外外部検出 HPLC で分析が不可能であった鶏肝臓中の GB を分析する目的で, キ

Fig. 1. Structure of glycarbylamide

† 連絡先

*¹ 昭和大学薬学部薬品分析化学教室: 〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8*² 農林水産省動物医薬品検査所: 〒185-8511 東京都国分寺市戸倉 1-15-1

レート形成を利用した新たな GB 分析法を検討した。

実験方法

1. 試薬

グリカルピラミド (glycarbylamide; GB: 99.9% (M.W. 154)) は、養日化学(株)から分与されたものを用いた。

金属イオンには、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (関東化学(株)製, 鹿特級) および $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬(株)製, 特級) を用いた。その他の試薬は、特級または HPLC 用を使用した。

GB 標準液は、GB 約 1 mg を精密にひょう量し、0.1 mol/L NaOH を用いて溶解し、正確に 25 mL とした (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 0.259 mmol/L)。これを標準原液として水で適宜希釈して実験に供した。

2. 吸収スペクトルの測定

4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GB 溶液 3.2 mL, 1 mmol/L 金属塩溶液 0.8 mL, 1 mol/L 緩衝液 1.0 mL を混合した後、分光光度計 (JASCO V-530 Spectrophotometer) を用いて吸収スペクトルを測定した。

緩衝液は、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) またはトリスアミノメタン塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.0, 8.0, 9.0) または炭酸塩緩衝液 (pH 9.0, 10.0, 11.0) を用いた。

3. HPLC 装置および操作条件

HPLC 装置は、ポンプに TOSOH CCPM および JASCO PU-980 を用いた。検出器は JASCO UV-970, 記録計は JASCO 807-IT を用いた。カラムは TOSOH TSK-gel ODS80_{TM} (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm または 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm) を用い、室温 (25°C) で操作した。移動相は 0.01% トリフルオロ酢酸とアセトニトリルの混合溶液 (99:1 v/v, 流速 0.8 mL/min), ポストカラム反応液には 0.08 mmol/L 硝酸ニッケルを含む 0.2 mol/L 炭酸塩緩衝液 (pH 10.0, 流速 0.5 mL/min) を用いた。カラム溶出液とポストカラム反応液は反応コイル (約 3.0 m $\times$ 0.25 mm i.d., テフロン製) 中で混合したのち、検出器へ導入した。試料注入量は 20 μL で行った。

4. 鶏肝臓試料の調製

鶏肝臓試料 5 g に、アセトニトリル 50 mL を加えて 2 分間ホモジナイズし、遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) した。上清を分取し、残留物にアセトニトリル 40 mL を加えて再度ホモジナイズ (1 分間), 遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) した。上清を合わせてアセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とうした後、ヘキサン層を除去し、10 mL まで 40°C で減圧濃縮した。これを 2 個連結したカラム (Bond Elut アルミナ中性, 500 mg) に負荷し、アセトニトリル 20 mL で洗浄したのち、アセトニトリルと水の混液 (9:1) 20 mL で溶出した。溶出液は 50°C で減圧乾固し、0.1 mol/L NaOH 1.0 mL で溶解し、さらに 0.1 mol/L KH_2PO_4 1.0 mL を加えて溶かし HPLC 注

Fig. 2. Absorption spectra of GB with/without nickel ion

—: GB with metal, ----: GB without metal,: metal only. GB: 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nickel ion: 0.16 mmol/L, carbonate buffer: 0.2 mol/L

Fig. 3. Absorption spectra of GB with/without zinc or cobalt ion

—: GB with metal, ----: GB without metal,: metal only. GB: 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, zinc or cobalt ion: 0.16 mmol/L, Tris-HCl buffer (for zinc ion) or carbonate buffer (for cobalt ion): 0.2 mol/L

入用の試料とした。

結果および考察

1. キレート生成のための金属イオンの選択

GB が金属とキレート形成するか否かを検討するため、種々の pH 条件 (pH 3.0~11.0) で GB と各種金属塩 (ニッケル, コバルト, 亜鉛, アルミニウム, 銅, マグネシウ

ム、カルシウム、いずれも硝酸塩) 溶液を混合し、吸収スペクトルを測定した。

その結果を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。ニッケル (pH 8.0, 9.0, 10.0), 亜鉛 (pH 8.0, 9.0), コバルト (pH 9.0) では、金属イオンの添加により極大吸収波長のシフトが観察され、GB はこれら金属イオンとキレート化合物を形成すると考えられた。

GB とニッケルイオンは、炭酸塩緩衝液 (pH 9.0, 10.0) および Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 9.0) のいずれの場合でも同じように極大吸収波長のシフトが観察されたことから、どちらの緩衝液でもキレートが生成すると思われた。

一方、亜鉛イオンでは、炭酸塩緩衝液 (pH 9.0) を用いた場合に比べ Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 9.0) を用いた場合により大きな極大吸収波長のシフトが観察された。また、炭酸塩緩衝液 (pH 10.0, 11.0) を用いた場合には、吸光度のわずかな増大が観察されたが、極大吸収波長のシフトは観察されなかった。

コバルトイオンについては、Tris-HCl 緩衝液を用いると GB の極大吸収波長付近に重なる大きな吸収スペクトルが観察され、キレートに基づく吸収スペクトルの観察や吸光度の測定が困難であった。しかし、炭酸塩緩衝液 (pH 9.0) を用いた場合にはキレート生成による吸収スペクトルの測定が可能であった。

亜鉛、コバルトイオンの場合に比べて、ニッケルイオンを用いた場合に極大吸収波長のシフトや極大吸収波長における吸光度の増加が顕著であったことから、以下の研究ではニッケルイオンを用いて GB の定量のための最適条件を検討した。

2. キレート生成のための緩衝液の検討

最初に、炭酸塩緩衝液 (pH 9.0) を用いて緩衝液濃度を検討した。検出波長は 290 nm で行った。Fig. 4 に示すように 0.1 mol/L 以上の炭酸塩緩衝液では、ニッケルイオン溶液よりも GB とニッケルイオン混合溶液のほうが高い吸光度を示し、ほぼ一定の吸光度値が得られた。これらの結果より、炭酸塩緩衝液は 0.2 mol/L を用いることと

Fig. 4. Effect of buffer concentration on absorbance
Carbonate buffer (pH 9.0), GB: 0.26 $\mu\text{g/mL}$, nickel ion: 0.32 mmol/L, wavelength: 290 nm

した。

3. キレート生成のためのニッケルイオン濃度の検討

次にニッケルイオンの最適濃度を検討した。GB 濃度を一定 (2.6 $\mu\text{g/mL}$) とし、ニッケルイオン濃度を 0.016 ~ 0.32 mmol/L の範囲で変化させてキレート生成に基づく波長 290 nm における吸光度を測定した。Fig. 5 に示すように、検討した濃度範囲では、ニッケルイオン濃度の増大に伴って吸光度が増加した。したがって、バッチ法ではニッケルイオン濃度 0.32 mmol/L を最適とした。

一方、HPLC のポストカラム溶液への適用を試みたところ、ニッケルイオン濃度 0.32 mmol/L の溶液では、時間経過に伴いベースラインノイズが大きくなる傾向が認められた。また、バッチ法においても 0.16 mmol/L よりも高濃度の試料溶液は、室温で 2 日間程度放置すると懸濁が認められたことより、これらはニッケルイオンの析出が原因と考えられた。これらの点を考慮し、HPLC 法への応用では硝酸ニッケル濃度 0.08 mmol/L で行うこととした。

4. GB 検量線の作成と HPLC への応用

バッチ法により、GB の検量線を作成した。GB は検討した 0.13 ~ 2.6 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性 ($r = 0.9999$) を示した。検量線の各点における相対標準偏差は 0.02 ~ 0.14% ($n = 3$) であった。このときの GB-ニッケルキレートの見かけのモル吸光係数 ϵ は 8.5×10^3 であった。

次に、確立した方法を HPLC のポストカラム反応に応用した。その際、移動相には、Yamamoto ら²⁾とは異なる 0.01% トリフルオロ酢酸とアセトニトリルの混合溶液 (99:1, v/v) を用いた。これは当初 LC/MS による GB の定量を試みた際に用いた組成であるが、この移動相によっても肝臓中 GB の分離に大きな差は観察されなかった。

試料は HPLC で分離後、ポストカラム反応液として 0.08 mmol/L 硝酸ニッケルを含む 0.2 mol/L 炭酸塩緩衝液 (pH 10.0) を送液して反応させ、290 nm で検出した。HPLC のポストカラム溶液に用いる炭酸塩緩衝液は、酸

Fig. 5. Effect of nickel ion concentration on absorbance
Carbonate buffer (pH 9.0): 0.2 mol/L, GB: 2.6 $\mu\text{g/mL}$, wavelength: 290 nm

Fig. 6. Chromatograms of chicken liver extract spiked with GB

A: GB (1 $\mu\text{g/mL}$), B: chicken liver extract, C: chicken liver extract spiked with GB (1 $\mu\text{g/mL}$). Column length: 250 mm

性の移動相によるキレート生成への影響を考慮して pH 10.0 を用いた。

GB のポストカラム HPLC による検量線を作成したところ、GB は 0.05～5.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性 ($r=0.999$) が得られ、バッチ法と同程度の検量域を示した。

5. 鶏肝臓試料の調製

次に実際試料への応用を指向して、本 HPLC 法を鶏肝臓抽出物中の GB 分析に応用した。肝臓試料は Yamamoto らの方法²⁾に準じ、カラム抽出法により精製した。筋肉に比べ分析時に妨害となる共存成分が多いと考えられる肝臓に適用するため、抽出に用いるアルミナカラムは 2 本直列に連結し、カラムの洗浄および溶出に用いる溶媒量も 20 mL とした。また、始めに肝臓試料に加えるアセトニトリルを 50 mL とした。

6. 鶏肝臓試料中 GB 分析

鶏肝臓抽出物、GB 標準液および鶏肝臓抽出物に GB 標準液を添加した試料を用いて、本 HPLC 法により分析した。このときのクロマトグラムを Fig. 6 に示す。図中 A から分かるように GB は約 23 分にピークが検出された。図中 B の鶏肝臓抽出物ではこの位置にピークが見られず、さらに図中 C に示す鶏肝臓抽出物に GB を添加した試料のクロマトグラムでは、本法により GB はきょう雑物質の妨害なく分離検出できることが確認できた。肝臓試料に GB を 0.1 ppm 添加したときの回収率は 79.4% ($n=3$) であり、相対標準偏差は 2.6% であった。また、検出下限 ($S/N=3$) は 10 ng/g、定量下限は 30 ng/g であり、暫定

Fig. 7. Composition of GB and nickel ion complex using continuous variation method
[GB]+[Ni]=0.05 mmol/L

残留基準 (0.1 ppm) を満たすものであった。この結果より、本法は、鶏肝臓試料中の GB 残留分析法に応用できると考えられた。

7. GB-ニッケルキレートの結合比

GB-ニッケルキレートの結合比を明らかにするため、連続変化法 (Job 法) により検討した。結果を Fig. 7 に示す。2 本の接線の交点における GB/GB+Ni のモル比 $x=0.666$ であり、結合比は $n=x/(1-x)$ の計算から、GB : ニッケルイオン = 2 : 1 のキレートを形成していると考えられた。

ま と め

ニッケルキレート生成による GB 分析法を確立した。GB はニッケルイオンとキレート生成することにより極大吸収波長がシフトし、吸光度も増加した。キレート条件を検討した後、ニッケルとのキレート生成をポストカラム反応に用いる HPLC 法に応用したところ、従来の方法では困難であった鶏肝臓試料中のきょう雑物質と GB との分離検出が可能になった。

文 献

- 1) Otto, W. H., Residues of coccidiostats in poultry tissue, *Poultry Sci.*, **40**, 442-446 (1961).
- 2) Yamamoto, Y., Kondo, F., Determination of glycarbyl-amide in chicken tissue by high-performance liquid chromatography, *J. AOAC Int.*, **82**, 248-250 (1999).