報 文

HPLC によるウシおよびブタ組織中のメトクロプラミドの
残留分析法開発と投与実験

(平成 18 年 5 月 8 日受理)

堀内 隆史*† 峯戸松勝秀* 水野 安晴* 関谷 辰朗* 浜本 好子*

Residue Analysis of Metoclopramide in Bovine and Swine Tissues
by HPLC and Administration ExperimentTakashi HORIUCHI†, Katsuhide MINETOMATSU, Yasuharu MIZUNO,
Tatsuro SEKIYA and Kouko HAMAMOTO(National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries:
1-15-11, Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-18511, Japan; † Corresponding author)

A reversed-phase ion-pair HPLC method with ultraviolet detection has been developed for determination of metoclopramide (MCP) in bovine and swine muscle, liver, kidney, fat and intestine. MCP was extracted from samples with acetonitrile, and the extracts were cleaned up on an Oasis HLB cartridge (60 mg) after liquid-liquid extraction. The limit of detection of MCP was $0.002 \mu\text{g/g}$ and the limit of quantitation was $0.007 \mu\text{g/g}$. Recoveries of MCP spiked at 0.03 ppm ranged from 74.1 to 93.3% for bovine tissues and from 86.1 to 92.7% for swine tissues. The present method was used for the analysis of bovine and swine tissues 1 day after withdrawal following drug administration. The MCP concentrations in all tissues were lower than the Japanese provisional MRLs.

(Received May 8, 2006)

Key words: メトクロプラミド metoclopramide; 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム 1-heptanesulfonic acid sodium salt; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 残留 residue; ウシ bovine; ブタ swine; 投与実験 administration experiment

緒 言

メトクロプラミド (MCP, Fig. 1) は、ドパミン拮抗作用を有するベンザミド系の薬で、消化器機能異常に対する治療薬であり、消化管の運動調整作用と制吐作用を有している。国内ではウシ、ブタ、イヌおよびネコの消化不良、食滞、胃炎および腸炎による食欲不振や嘔吐などの治療に用いられている。

2003 年 5 月の食品衛生法改正により国内における畜水産食品中の規制として、ポジティブリスト制が導入されることとなり、2005 年 11 月にほとんどの動物用医薬品成分に暫定残留基準値 (暫定 MRL) が設定された。農林水産省では、厚生労働省の MRL の設定に伴って、動物に動物用医薬品を用いる場合の使用禁止期間¹⁾の設定または見直しを行っていることから、暫定 MRL が設定された MCP 製剤について用法用量に従って使用した場合の使用禁止期間を確認する必要がある。設定された MCP の暫定 MRL は、ウシおよびブタの筋肉、肝臓、腎臓、脂肪お

Fig. 1. Structure of metoclopramide

よび食用部分でそれぞれ 0.03 ppm であったが、MCP の分析法としては、これまでにヒトやウシの血漿および尿中での分析法の報告^{2)~7)}はあるものの、これらの方法は畜水産物中の残留分析法として利用するには十分な感度を有していなかった。そこで、著者らは実用的な HPLC による残留分析法を検討したところ、固相抽出カートリッジによる精製法とイオンペア高速液体クロマトグラフィーを用いることで、高感度できょう雑物の少ない残留分析法を確立できた。

また、ウシおよびブタに市販の MCP 製剤を用法用量の最大用量および最大回数を筋肉内に投与し、現行の休薬期間終了時 (投薬後 1 日) にと殺して採材し、MRL 対象組

† 連絡先

* 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

織における MCP 濃度が基準値以下であることを確認する試験を行ったので報告する。

実験方法

1. 動物試験および試料

ウシ：ホルスタイン種のウシ3頭（雄1頭，雌2頭，試験開始時の平均体重：183.3 kg）を，室温で飼育した。馴化期間として35日間，朝夕2回ヘイクューブ，大麦およびふすまを給餌し，自由飲水にて飼育後，プリンペラン注（塩酸 MCP：5 mg/mL 配合，大洋薬品工業（株）製）を体重 1 kg 当たり塩酸 MCP として 0.4 mg を 1 時間間隔で 1 日 2 回，筋肉内注射により投薬した。投与部位は 1 回目は左臀部に，2 回目は右臀部に部位を変えて投与し，投与部位は毛を刈って印を付けた。休薬期間中は，馴化期間と同様に飼育した。休薬 1 日目にと殺し，筋肉（背部），1 回目投与部位筋肉，2 回目投与部位筋肉，肝臓，腎臓，脂肪および腸管（回腸遠位部（小腸の最後約 2 m の部分）を除く）を採取した。投与部位筋肉は，投与部位を中心とした 100 g の肉塊をミキサーにかけて均質化した。採取した試料は，分析まで -80°C で凍結保存した。コントロール（無投薬）試料は同じ由来，同じ飼料で別途飼育したウシから採取した。

ブタ：中ヨークシャー種のブタ3頭（雄1頭，雌2頭，試験開始時の平均体重：39.5 kg）を，室温で飼育した。馴化期間として22日間，朝1回子ブタ用 SD 飼料（日本配合飼料（株）製，試験用薬剤無添加飼料）を給餌し，自由飲水にて飼育後，プリンペラン注を体重 1 kg 当たり塩酸 MCP として 0.5 mg を 1 時間間隔で 1 日 2 回，筋肉内注射により投薬した。投与部位 1 回目は左臀部に，2 回目は右臀部に部位を変えて投与し投与部位は入れ墨により印を付けた。休薬期間中は，馴化期間と同様に飼育した。休薬 1 日目にと殺し，筋肉（背部），1 回目投与部位筋肉，2 回目投与部位筋肉，肝臓，腎臓，脂肪および腸管を採取した。投与部位筋肉は，投与部位を中心とした 100 g の肉塊をミキサーにかけて均質化した。採取した試料は，分析まで -80°C で凍結保存した。コントロール試料は同じ由来，同じ飼料で別途飼育したブタから採取した。

2. 試薬

標準原液：MCP（和光純薬工業（株）製，生化学用，純度 98.5% 以上）をアセトニトリルで 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈して標準原液とした。

1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム：和光純薬工業（株）製，イオンペアクロマトグラフィー用を用いた。

前処理用カートリッジ：Oasis HLB（3 cc, 60 mg, Waters 社製）をあらかじめメタノール 1 mL および精製水 1 mL でコンディショニングしたものをを用いた。

その他の試薬はすべて和光純薬工業（株）製の特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ装置：PU-2085 型 HPLC ポン

プ，DG-2080-53 型デガッサー，860-CO 型カラムオーブン，AS-950 型オートサンプラー，UV-970 型紫外可視検出器，JASCO-BORWIN データ処理システム，いずれも日本分光（株）製を用いた。

4. HPLC 測定条件

カラム：L-column ODS（4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μm , (財)化学物質評価研究機構製）

移動相：アセトニトリル-5 mmol/L ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有 0.2% 酢酸（25：75）

流速：1.0 mL/min

カラム温度： 40°C

測定波長：280 nm

注入量：10 μL

5. 検量線の作成

標準原液を移動相で希釈し，MCP 濃度として 0.03～2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製し，その 10 μL を HPLC 装置に注入し，ピーク面積法により検量線を作成した。

6. 試験溶液の調製

(1) 抽出法

均一に細切した試料 5.0 g にアセトニトリル 20 mL を加え，2 分間ホモジナイズした後，3,000 rpm で 10 分間遠心分離し上清を分取した。残さにアセトニトリル 5 mL を加え，10 分間激しく振とうした後，3,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を分取し，以前の上清と合わせた。次に，合わせた上清にアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 20 mL を加え，10 分間激しく振とうした後，アセトニトリル層を分取した。

(2) 精製法

抽出法で得られたアセトニトリル層を 50°C 以下で減圧乾固した後，0.1 mol/L 水酸化ナトリウム 3 mL を加え溶解し，Oasis HLB カートリッジに負荷した。カートリッジを 30% メタノール 3 mL, 0.5 mol/L 酢酸 1 mL の順で洗浄後，95% メタノール 3 mL で MCP を溶出した。溶出液を 50°C 以下で減圧乾固した後，残留物を移動相 1.0 mL に溶解して，HPLC 用試験溶液とした。

(3) 添加回収試験

添加回収試験は，コントロール試料に MCP を暫定 MRL の濃度となるように，各組織 1 g 当たり 0.03 μg を添加して，試料と同様の操作を行い，回収率を求めた ($n=3$)。

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

UV 測定波長は MCP をアセトニトリルおよび水に溶解した場合の UV スペクトルを測定したところ，280 nm 付近に吸収極大が観測できたためこれを採用した。移動相に 0.2% 酢酸-アセトニトリルを用いた場合，MCP はカラムに保持されなかった。そこでアミノ基を有する MCP の物性を考慮し，5 mmol/L の 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを用いたイオンペアクロマトグラフィーを採用したと

ころ、良好なピークが得られた。アセトニトリルと5 mmol/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有0.2%酢酸の比率は30:70, 25:75および20:80で検討したところ、25:75の割合でMCPときょう雑成分のピークが良好に分離したため、これを移動相として用いることにした。

2. 精製法の検討

固相抽出カートリッジによる精製方法にOasis HLBおよびOasis MCX (3 cc, 60 mg, Waters社製)について、ウシおよびブタの筋肉および肝臓を用い検討した結果、Oasis HLBは高い回収率を示したが、Oasis MCXは約50%程度であり、十分な回収率を得られなかった。また、カートリッジの洗浄を30%メタノールのみで行った場合には、MCPの検出には影響がなかったが、分析時間約80分前後にきょう雑成分のピークが認められた。そこできょう雑成分のピークを除くために、30%メタノールで洗浄後、0.5 mol/L 酢酸1 mLでさらに洗浄したところ、きょう雑成分のピークを除去することが可能であった。

Table 1. Recoveries of Metoclopramide from Bovine and Swine Tissues

Tissue	Bovine		Swine	
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Muscle	91.5	4.5	92.7	0.5
Liver	91.3	2.2	86.1	2.1
Kidney	88.7	1.6	87.4	5.0
Fat	74.1	1.7	90.3	2.5
Intestine	93.3	4.7	90.4	1.7

$n=3$; spiked at $0.03 \mu\text{g/g}$

3. 添加回収試験

MCPの検量線は $0.03 \sim 2.5 \mu\text{g/mL}$ の範囲で高い相関係数($r \geq 0.999$)となり、良好な直線性を示した。薬剤無投与のウシおよびブタから採取したコントロール試料にMCPを $0.03 \mu\text{g/g}$ となるように添加し、回収率を求めた。Table 1に示すとおり、平均回収率($n=3$)は74.1~93.3%の範囲であり、変動係数は0.5~5.0%の範囲と、残

Table 2. MCP Concentrations in Various Bovine and Swine Tissues 1 Day after Withdrawal

Bovine tissue	Bovine No.			Mean
	1	2	3	
Muscle	ND	ND	ND	—
Injection site first time	ND	ND	ND	—
Injection site second time	ND	ND	ND	—
Liver	ND	ND	ND	—
Kidney	TR	TR	TR	—
Fat	ND	ND	ND	—
Intestine	ND	TR	TR	—

Swine tissue	Swine No.			Mean
	1	2	3	
Muscle	ND	ND	ND	—
Injection site first time	ND	ND	ND	—
Injection site second time	ND	ND	ND	—
Liver	0.013	0.010	0.010	0.011
Kidney	0.011	0.021	0.015	0.016
Fat	ND	ND	ND	—
Intestine	TR	ND	0.007	0.002

Unit: $\mu\text{g/g}$, ND: not detected ($< \text{LOD}$), TR: trace ($\text{LOD} \leq \text{TR} < \text{LOQ}$)

Fig. 2. Typical chromatograms of (A) standard solution of metoclopramide ($0.03 \mu\text{g/mL}$), (B) extract of bovine muscle, (C) extract of bovine liver and (D) extract of swine liver
Upper profile: spiked at $0.03 \mu\text{g/mL}$ of metoclopramide, lower profile: unspiked, in each of (B), (C) and (D).

Fig. 3. Typical chromatograms of (A) extract from bovine injection site, second time, (B) extract from bovine liver, (C) extract from bovine kidney, (D) extract from bovine fat, (E) extract from bovine intestine, (F) extract from swine injection site, second time, (G) extract from swine liver, (H) extract from swine kidney, (I) extract from swine fat and (J) extract from swine intestine

留分析法として満足できる値⁸⁾が得られた。MCP 標準溶液、ウシおよびブタのコントロールおよび MCP を添加した試料のクロマトグラムの例を Fig. 2 に示す。なお、本法による検出限界は $0.002 \mu\text{g/g}$ ($S/N=3$)、定量限界は $0.007 \mu\text{g/g}$ ($S/N=10$) であった。

4. 動物試験

試験中に一般症状の観察を行った結果、異常は観察されなかった。ウシの平均増体率は、 0.78 kg/日 であり、ブタの平均増体率は 0.27 kg/日 であった。

各組織中の MCP 濃度の分析結果を Table 2 に示した。また、組織中 MCP の分析結果のクロマトグラムの例を Fig. 3 に示した。ウシの腎臓および腸管、ブタの肝臓、腎臓および腸管で MCP が検出あるいは定量された。しかしこの数値は、いずれも暫定 MRL の値より低く、その他の組織においてはすべて検出限界未満 ($< 0.002 \mu\text{g/g}$) であった。以上の結果から、ウシおよびブタに MCP 製剤を用法用量の最大投与量で投与した後、現在の使用禁止期間経過後にと殺した場合に、それぞれの動物の組織中における MCP 濃度は暫定 MRL 以下であることが確認された。

ま と め

MCP 製剤を用法用量に従ってウシおよびブタに投与した場合の使用禁止期間の確認を行うことを目的として、MCP の残留分析法の開発を行った。MCP のアミノ基を有するという特性を考慮し、移動相にイオンペア試薬を用いたことで、MCP は HPLC カラムに保持できた。また、検体の精製過程に Oasis HLB カートリッジを用い、検体負荷後に 30%メタノール、 0.5 mol/L 酢酸の順で洗浄後、95%メタノールで溶出することで、きょう雑物の影響のない HPLC による MCP の残留分析を行うことができた。この方法を用いて、市販の MCP 製剤を用法用量に従ってウシおよびブタに投与し、休薬期間経過後にと殺し、採取した組織中での MCP 残留濃度は、すべて暫定 MRL 以下

もしくは検出限界 ($0.002 \mu\text{g/g}$) 以下であることが確認された。

文 献

- 1) 農林水産省令第 42 号 (1980) “動物用医薬品の使用の規制に関する省令” 昭和 55 年 9 月 30 日。
- 2) Jones, R. D., Bowen, J. M., Determination of metoclopramide in the serum and urine of cattle. *Veterinary and Human Toxicology*, **33**, 551–553 (1991).
- 3) de Jong, A. P., Wittebrood, A. J., du Chatinier, W. M., Bron, J., Liquid chromatographic analysis of alizapride and metoclopramide in human plasma and urine using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, **419**, 233–242 (1987).
- 4) Takahashi, H., Ogata, H., Echizen, H., Ishizaki, T., Determination of metoclopramide and its glucuronide and sulphate conjugates in human biological fluids (plasma, urine and bile) by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **419**, 243–251 (1987).
- 5) R., R., Brodie, L., F., Chasseaud, L., Rooney, Determination of bromopride in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **310**, 353–360 (1984).
- 6) Lamparczyk, H., Chmielewska, A., Konieczna, L., Plenis, A., Zarzycki, P., K., RP-HPLC method with electrochemical detection for the determination of metoclopramide in serum and its use in pharmacokinetic studies. *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 513–517 (2001).
- 7) Popovic, J., High-pressure liquid chromatographic method for determination of metoclopramide in serum, urine, and saliva, with a pharmacokinetic study in patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, **6**, 77–82 (1984).
- 8) 農林水産省消費・安全局長通知 “薬事法関係事務の取扱について” 平成 12 年 3 月 31 日, 12 畜 A 第 729 号 (2000).