ノ ー ト

HPLC による牛組織及び乳中の残留イソメタミジウムの分析

(平成 10 年 11 月 25 日受理)

近 藤 一 成^{*1} 堀 江 正 一^{*2} 村 山 三 徳^{*1}
鈴 木 隆^{*1} 豊 田 正 武^{*1}

Determination of Residual Isometamidium in Cattle Tissues and Milk by HPLC

Kazunari KONDO^{*1}, Masakazu HORIE^{*2}, Mitsunori MURAYAMA^{*1},
Takashi SUZUKI^{*1} and Masatake TOYODA^{*1}(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; *²Saitama Prefectural Institute of Public Health: 639-1, Kamiokubo, Urawa, Saitama 338-0824, Japan)

A determination method for the antitripanosomal agent, isometamidium (IMD) in cattle muscle, liver, fat and milk has been developed by using HPLC. The drug was extracted from a sample with acetonitrile-0.25 mol/L ammonium formate methanol solution, and purified by liquid-liquid partition with ethyl acetate and water, followed by extraction of the water layer in the presence of NaCl with acetonitrile. After evaporation of acetonitrile, the residue was taken up in 1 mL of 0.25 mol/L ammonium formate methanol solution. The drug was determined by HPLC with detection at 380 nm using an octyl column (TSK-GEL Octyl-80Ts, 4.6 mm i.d. × 150 mm), and acetonitrile-0.03 mol/L citric acid containing 0.005 mol/L sodium 1-heptanesulfonate (3 : 7) as an eluent. Recoveries of the drug from cattle muscle, liver, fat and milk were 76.0, 75.3, 88.0 and 89.0%, respectively, when 0.1 µg/g of IMD was spiked. The detection limit was 0.01 µg/g. The analysis of IMD by LC/MS was also investigated.

(Received November 25, 1998)

Key words: 抗トリパノゾーマ薬 antitripanosomal agent; 牛組織 cattle tissues; イソメタミジウム isometamidium; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

動物用医薬品は畜産動物の生産性向上を目的に使用されている。その中で、イソメタミジウムはトリパノソーマ症予防に用いられる内寄生虫用剤で^{1)~3)}、平成 8 年食品衛生法の改正により残留基準値が定められた。そこで、イソメタミジウムの畜産食品中への残留実態を把握するため迅速かつ正確な分析法が求められる。イソメタミジウムの分析法はすでに報告があるが⁴⁾、回収率は極めて低く(30% 以下)、妨害ピークも見られた。今回前処理カラムを用いず、溶媒抽出法により回収率、精製と

もに良好な結果が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料及び試薬

試料は市販の牛筋肉、肝臓、脂肪及び牛乳を用いた。標準品としてイソメタミジウムクロライド(純度 55% 以上)は Rhône Mérieux 社製を使用した。イソメタミジウム(IMD と略す)標準品は純度を考慮し、18 mg を 10 mL メタノールに溶解し標準溶液(イソメタミジウムクロライドとして 1 mg/mL)とした(55% 換算)。その他の試薬はすべて特級又は HPLC 用を用いた。

2. 装 置

高速液体クロマトグラフ: (株)日立製作所製 L-6000 型ポンプ; 同 L-7250 型紫外可視検出器; 同 AS-4000

*¹ 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

*² 埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 埼玉県浦和市上大久保 639-1

型オートサンプラー; 同 D-2500 型インテグレーター

3. HPLC 条件

分析カラム: TSK-GEL Octyl-80Ts (4.6 mm i.d. × 150 mm, 東ソー(株)製); 移動相: 0.005 mol/L の 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有 0.03 mol/L クエン酸-アセトニトリル (7:3); 流速: 0.8 mL/min; カラム温度: 40°C; 測定波長: 380 nm; 注入量: 10 μL

4. 試料の調製法

遠沈管に試料 5 g とアセトニトリル-0.25 mol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液 (1:1) 30 mL を入れ, 2 分間ホモジナイズした後, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した. 次に上清をろ過, 残さはアセトニトリル-0.25 mol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液 30 mL で再度抽出, 双方合わせて濃縮乾固した. この残さを酢酸エチル-水 (1:1) 30 mL で 2 回分配, 酢酸エチル相は捨

て, 水相に塩化ナトリウム 1 g 添加後アセトニトリル (15 mL) で 2 回抽出, 濃縮乾固した. これに 0.25 mol/L ギ酸アンモニウムメタノール溶液 1 mL を加え HPLC 分析のための試料溶液とした. 以上の手順を Scheme 1 に示した. なお, 溶媒濃縮の操作で突沸防止にイソプロパノールを必要に応じて用いた.

5. 添加回収実験

市販の牛筋肉, 肝臓, 脂肪及び牛乳各 5 g をホモジナイズし, 0.1 μg/g のイソメタミジウム標準品を添加した. 以下の操作は試料の調製法に従った.

6. LC/MS 条件

高速液体クロマトグラフ ((株)日立製作所製 L-7000 シリーズ) にイオントラップ型質量分析計 (Thermoquest: LCQ) を連結した装置を用いた. イオン化はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) で positive モードで測定した. その他の条件は, 移動相に 1% 酢酸-アセトニトリル (7:3) を用いた以外は HPLC 分析条件と同じにした.

結果及び考察

1. 試料調製法の検討

Fig. 1 に IMD の構造式を, Fig. 2 に IMD 標準品の HPLC クロマトグラムと各ピークの吸収スペクトルを示した. IMD 本体の他, 異性体と考えられるピークも見られる. IMD は不安定で溶液中で徐々に分解する. 0°C ではメタノール中で 1 週間安定であったが, 水溶液中では 30% 以上が分解 (IMD 本体) した. そのため,

Isometamidium chloride (IMD)
(m.w. 495)

Fig. 1. Structure of isometamidium chloride

Fig. 2. Typical chromatogram of isometamidium and its isomers

Scheme 1. Analytical procedure for isometamidium in cattle muscle, liver, fat and milk

Fig. 3. Chromatograms of blank cattle muscle (left) and cattle muscle spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride (right) by HPLC (380 nm)

標準溶液はメタノール溶液とし、保存は -30°C で行い 1 週間以内に使用した。室温では、抽出から HPLC 分析までの半日の一連の操作で分解は認められなかった。これまで著者らは試料調製法として、アセトニトリル-0.25 mol/L 甲酸アンモニウムメタノール溶液 (1:1) で

抽出後、ヘキサン-水で分配、水相を C_{18} カートリッジによりクリーンアップを行ってきた。しかしながら、30% 以下の低い回収率しか得られなかった。また、すでに報告されている方法においても牛組織中からの回収率は 30% 前後あるいはそれ以下とされている⁴⁾。そこ

Fig. 4. Chromatograms of blank cattle liver (left) and cattle liver spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride (right) by HPLC (380 nm)

Fig. 5. Chromatograms of blank cattle fat (left) and cattle fat spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride (right) by HPLC (380 nm)

Fig. 6. Chromatograms of blank milk (left) and milk spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride (right) by HPLC (380 nm)

Table 1. Recoveries of Isometamidium from Cattle Tissues and Milk by the Improved Method ($n=6$)

	Added (µg/g)	Recovery (%)	C.V. (%)
Muscle	0.10	73.0	7.1
Liver	0.10	72.8	5.0
Fat	0.10	80.0	10.5
Milk	0.10	84.7	5.7

で今回種々検討した結果、イソメタミジウムが特に水溶液中で分解しやすい化合物であること、 C_{18} カートリッジへの保持が悪いことから固相抽出法による精製を行わず、有機溶媒による抽出精製法を用いて検討することにした。すなわち、試料をアセトニトリル-0.25 mol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液 (1:1) で抽出後、脂溶性の夾雑物を最大限除くため酢酸エチル-水で分配した。次に水相に移行した IMD を直ちに塩化ナトリウムを加えてアセトニトリルで 2 回抽出することにした。なお、水相を n -ブタノールで抽出すれば 1 回の操作で 100% IMD が有機相に抽出でき、塩を用いる必要もなかった。しかしながら、 n -ブタノールの沸点が高く濃縮に時間を要するため今回適用しなかった。

2. 添加回収実験

Scheme 1 に示した方法により調製したブランク及び IMD 添加各試料の HPLC クロマトグラムを Fig. 3～Fig. 6 に示した。いずれの牛試料においても夾雑ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。一方、牛脂肪試料の場合には、保持時間 12 分に小さなピークが見

Fig. 7. Total ion chromatogram of cattle fat spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride

られたが IMD とは保持時間が明らかに異なっており、分析上支障はなかった (Fig. 5)。Table 1 に添加回収実験の結果を示した。平均回収率は、最も低い肝臓の 72.8% から牛乳の 84.7% と良好な結果が得られた。また、本法を市販の牛筋肉、肝臓、脂肪、乳の各 10 試料に適用した結果、いずれの検体からもイソメタミジウムは検出されなかった。なお、本法の検出下限は 0.01 µg/g で残留基準値 (肝臓 0.5 µg/g, 筋肉、脂肪、牛乳 0.1 µg/g) の 1/10 以下であった。

3. LC/MS による定性法の検討

今回用いた標準品は異性体と考えられる化合物を含んでいた。そのため Fig. 5 (右) において IMD の保持時

Fig. 8. Mass chromatogram (left) and spectrum (right) of cattle fat spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride

Fig. 9. Chromatogram of cattle fat spiked with 0.1 µg/g isometamidium chloride (left) and spectrum of peak A (right)

間近にもう一つのピークが見られたことから LC/MS によるピークの同定を試みた。Fig. 7 には IMD 0.1 µg/g 添加した牛脂肪のトータルイオンクロマトグラムを示した。LC/MS ではイオンペア試薬を使用できないため上述の HPLC 分析の結果と比べて保持時間が異なるが、3.92 分のピークと 4.86 分のピークが Fig. 5 (右) のクロマトグラムの 2 つのピークに対応する。Fig. 8 左は質量範囲 m/z 455~465 のマスキングクロマトグラムであり、IMD 以外のピークは見られない。右にはそのマススペクトルを示した。IMD の擬似分子イオン $[M-Cl]^+$ (m/z 460) 及びそのフラグメントイオン (m/z

312) が認められ、標準品のマススペクトルと一致した。Fig. 9 には Fig. 5 (右) のクロマトグラムの保持時間が遅いピーク (peak A) のマススペクトルを示した。これは、IMD の後に溶出される化合物のそれと全く一致した。以上の結果から、IMD 0.1 µg/g 添加した牛脂肪の 2 本のピークのうち前のピークが間違いなく IMD 本体であると確認できた。

以上の結果から明らかなように、IMD は有機溶媒抽出法により良好な回収率が得られた。更に LC/MS を用いれば HPLC より更に選択的な分析ができ、構造情報も得られるため、IMD 分析に極めて有効な手段の一つ

であることが分かった。IMD 本体の異性体と考えられる化合物の一つは吸収スペクトルが酷似しているため、フォトダイオードアレイで同定することは困難であるが、LC/MS ではそれが可能であった。LC/MS による定量は現在更に検討中である。

本報告の要旨は日本食品衛生学会第 76 回学術講演会（1998 年 11 月，新潟）において発表した。

文 献

- 1) Kinabo, L. D. B., McKellar, Q. A., Eckersall, P. D.: Res.

Vet. Sci. **50**, 6~13 (1991).

- 2) Anene, B. M., Chime, A. B., Anika, S. M.: Br. Vet. J. **147**, 275~282 (1991).
- 3) Zhang, Z. Q., Giroud, C., Baltz, T.: Exp. Parasitol. **77**, 387~394 (1993).
- 4) Kinabo, L. D. B., Bogan, J. A.: Acta Trop. **45**, 165~170 (1988).