

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成21年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の
試験法開発事業・検討結果報告

(動物用医薬品：イミドカルブ)

イミドカルブ試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

イミドカルブは抗原虫活性を持つカルバニリド誘導体の寄生虫駆除剤である。一般的にジプロピオン酸塩として皮下あるいは筋肉内投与されることが多い。その作用機序についてはこれまでに①ポリアミンの生産及び/または使用に干渉する作用、②*Babesia*を取り込んだ赤血球へのイノシトールの流入阻害作用の2つが提唱されている。

わが国においては、イミドカルブを含有する動物用医薬品は承認されていないが、海外では、牛、馬、羊及びイヌのバベシア症及びアナプラズマ症を含む原虫症の治療に20年以上使われている。

わが国の食品衛生法では現在のところ牛の筋肉に0.3 ppm、牛の脂肪に0.05 ppm、牛の肝臓に1.5 ppm、牛の腎臓に2 ppm、牛の食用部分に2 ppm、乳に0.05 ppmの残留基準値が設定されている。

イミドカルブの構造式及び物性は以下のとおりである¹⁾。

化学名：1,3-Bis[3-(2-imidazolin-2-yl)phenyl]harnstoff (IUPAC)

分子式：C₁₉H₂₀N₆O

分子量：348.41

常温における性状：灰白色～淡黄色の粉末（イミドカルブジプロピオン酸として）

融点：254°C（イミドカルブジプロピオン酸として）

溶解性：水及びメタノールに溶けやすく、有機溶媒には溶けにくい（イミドカルブジプロピオン酸として）

イミドカルブの構造を図1に示す。

畜水産物中に残留するイミドカルブの分析法に関してはいくつか報告されている²⁻⁵⁾が、いずれも分析対象試料が限定されており、かつ液体クロマトグラフ(LC)-紫外部吸収検出器を用いた分析法である。そこで、LC-MS/MSを用いた分析法を検討した。

[実験方法]

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた1)牛筋肉、2)牛脂、3)牛肝臓、4)牛乳、5)さけ、6)うなぎ蒲焼き、7)しじみ、8)卵、9)はちみつ（れんげ蜜）及びと畜場で入手した10)牛腎臓を用いた。

- 1) 牛筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛脂：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 牛肝臓：全体を細切均一化した。

- 4) 牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- 5) さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- 6) うなぎ：うなぎ蒲焼きをたれを除去せずに，細切均一化した。
- 7) しじみ：殻を除去し，細切均一化した。
- 8) 鶏卵：殻を除去し，卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- 9) はちみつ：れんげ密を使用し，よく混合して均一化した。
- 10) 牛腎臓：全体を細切均一化した。

2. 試薬

標準品：イミドカルブは Dr.Ehrenstorfer GmbH 社製，純度 98%のものを使用した。

標準原液：標準品 50 mg を精秤し，メタノールに溶解して 50mL としたものを標準原液とした。

アセトニトリル及び精製水は高速液体クロマトグラフ用を，無水硫酸ナトリウム及び *n*-ヘキサンは残留農薬試験用を，その他の試薬はすべて特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフは Waters 社製 Alliance 2695 を，質量分析装置は Waters 社製 Quattro premier を，フォトダイオードアレイ検出器は Waters 社製 2996 を，遠心分離器は(株)久保田製作所製 KUBOTA6200 及び KUBOTA3300 を，ロータリーエバポレーターは BUCHI 社製 R-210 シリーズを，ホモジナイザーは(株)日音理科器械製作所製ヒスコトロンを用いた。

4. 測定条件

検出は MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード，SIM (Selected Ion Monitoring) モード，フォトダイオードアレイ（測定波長は 210～400nm）検出を用いた。

測定条件を表 1，2 及び 3 に示す。

5. 定量

イミドカルブ標準原液をアセトニトリル及び水（2：3）混液で希釈し，0.005～0.1 µg/mL の標準溶液を調製し，その 5 µL を LC-MS/MS に注入した。定量には MRM モードを採用し，得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め，絶対検量線法で検量線を作成した。

6. 試験溶液の調製

1) はちみつ以外の試料の場合

脂肪以外の試料は 10.0g を，脂肪試料は 5.00g を量り採り，*n*-ヘキサン飽和アセトニ

トリル 50mL, *n*-ヘキサン 50mL, 30 w/v%水酸化ナトリウム 2 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20g を加え、ホモジナイズした後、3 分間振とうした。毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を採取した。その後、メスフラスコにアセトニトリル層を採取し、先に得た *n*-ヘキサン層を遠心分離した残留物に加え、さらに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50mL を加えて 3 分間振とうした後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を捨て、得られたアセトニトリル層を先のメスフラスコに採取し、100mL に定容した。定容した液の脂肪以外の試料については 10mL を、脂肪試料は 20mL を採取し、2-プロパノール 2mL を加えて、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液に超音波処理により溶解し、正確に 1.0mL としたものにアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 0.5mL を積層した。毎分 13,000 回転で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層を吸引除去後、アセトニトリル-水層を試験溶液とした。

2) はちみつの場合

試料 10.0g を量り採り、水 50mL を加え、溶解する、30 w/v%水酸化ナトリウム 2 mL, アセトニトリル 50mL 及び塩化ナトリウム 25g を加え、3 分間振とうする。毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採り、50mL に定容する。そのうち 5mL を採取し、2-プロパノール 1mL を加え、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液に超音波処理により溶解し、正確に 1.0mL としたものを試験溶液とする。

試験溶液調製法の概略を図 2 及び 3 に示す。

7. マトリックス標準溶液の調製

イミドカルブが含有されていないことを確認した試料を 6 に示した「試験溶液の調製」に従って試験溶液を作成した。残留物にアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液 950 μ L 及び添加回収試験で添加した濃度の 20 倍濃度に相当する標準液 50 μ L を添加して溶解し、マトリックス標準溶液とした。溶媒標準溶液とのピーク面積値と比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

8. 定量下限値の確認

イミドカルブが含有されていないことを確認した試料を 6 に示した「試験溶液の調製」に従って試験溶液を作成した。残留物にアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液を 950 μ L 及び一律基準値の 1/2 濃度 (0.005mg/kg) の 20 倍濃度の標準溶液 50 μ L を添加して溶解して、定量下限値の確認用のマトリックス標準溶液 (0.005 mg/mL) とした。なお、定量下限値 (0.01 mg/kg) を確認するために、その 1/2 濃度を用いて、試料マトリックス存在下における S/N 比を検討した。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) LC 条件の検討

1)-1 分析カラムの検討

これまでに報告されている²⁻⁵⁾ イミドカルブの LC 条件はいずれもシリカベースの逆相系のカラムでイオンペア試薬を含む移動相により溶出，分離する方法である。イオンペア試薬を MS 検出器で用いる場合，LC の流路や MS 検出器にそれらのイオンペア試薬が残存し，その後の分析に影響することから，分析後は流路洗浄やメンテナンスが必須である。そこで，本検討では検出器に MS を用いることを考慮し，イオンペア試薬を使用せずに分離できる条件を検討した。

シリカベースの逆相系のカラム (Symmetry C18 2.1×100mm, 粒子径 3.5µm: Waters 社) を用いて，10 mM の酢酸アンモニウムを含むメタノール-水系のグラジェント条件で溶出状況を検討したところ，イミドカルブはカラムに著しく吸着し，良好なピーク形状が得られなかった。

また，親水性相互作用クロマトグラフィー用カラム (Atlantis HILIC 2.1×100mm, 3µm: Waters 社, Develosil Anidius 2.0 ×150mm: 野村化学社, ZIC-HILIC 2.1×100mm, 5µm: Sequant 社, Inertsil HILIC 2.1×150mm, 3µm: GL サイエンス社) について検討した。酢酸アンモニウム-アセトニトリル系のグラジェント条件で溶出状況を検討したところ，Inertsil HILIC 以外のものでは，イミドカルブはカラムに吸着し，良好なピークが得られなかった。Inertsil HILIC ではイミドカルブは溶出したものの，MS のイオン強度が低く，十分な感度が得られなかった。

シリカベースのカラムでは残存シラノールとイミダゾール基を有するイミドカルブがイオン交換作用により結合しているものと考えられた。そこで，ポリマーベースの逆相系カラム (Capcell Pak C18 2.0×150mm, 5µm: 資生堂社) について水-アセトニトリル系のグラジェント条件で溶出状況を検討したところ，カラムに強く保持され，分析に多くの時間を要し，かつ，感度も十分ではなかった。移動相に 0.01% となるようにギ酸を添加したところ，保持は十分でなく，溶媒ピークとほとんど同時に溶出した。

次に，親水性ビニルポリマーベースのマルチモードカラム (TSK gel VMpak-25 2.0×100mm, 7µm: 東ソー社) について，酢酸アンモニウム-アセトニトリル系のグラジェント条件で溶出状況を検討したところ，良好なピーク形状が得られた。そこで，このカラムを本検討では使用することとし，最適な測定条件を検討した。

1)-2 移動相の検討

TSK gel VMpak-25 カラムは官能基のカルボキシル基によるイオン交換作用と疎水性相互作用のマルチモードで分離を行うカラムである。酢酸アンモニウムの濃度を一定にして，アセトニトリル濃度を 20, 50, 70% と変化させて保持時間を検討したところ，

イミドカルブはほぼ同じ保持時間に溶出した。このことから、有機溶媒濃度は保持時間に影響しないことから、イミドカルブのカラムへの保持は主にイオン交換作用によるものであると考えられた。そこで、アセトニトリル濃度を一定にして、酢酸アンモニウムの濃度について 5, 15, 25, 50 mmol/L の濃度でアイソクラティック溶出条件を検討したところ、酢酸アンモニウムの濃度の上昇に伴い、イミドカルブの溶出が早くなった。次に、酢酸アンモニウムの濃度が 5 mmol/L から 50 mmol/L までのグラジエント溶出について検討した。アイソクラティック溶出よりも、シャープなピーク形状が得られたが、グラジエント溶出の初期条件への安定化に時間を要し、保持時間の変動が大きい傾向であった。そこで、アイソクラティック溶出を採用し、保持時間及びピーク形状を考慮し、酢酸アンモニウム濃度を 15 mmol/L とした。

次に、MS 検出器でのイオン強度を向上させるために、移動相の条件をさらに検討した。アセトニトリル濃度を 20, 50, 70 % と変化させピーク面積値を検討したところ、70 % の時が最もイオン化が促進され、感度良く検出されたことから 70 % 濃度とした。その他、酢酸アンモニウムとギ酸アンモニウムについて検出感度を比較したところ、差が認められなかった。揮発性の酸であるギ酸あるいは酢酸の移動相への添加の有無についても、ピーク形状及び検出感度に影響を及ぼさなかった。また、アセトニトリルとメタノールについて感度及びピーク形状を比較したところ、検出感度はほぼ同じであったが、ピーク形状においてアセトニトリルの方が優れていた。以上の検討結果から、表 1 の LC 測定条件とした。

本測定条件を用いて標準溶液 0.1 μ g/mL を 5 回測定した場合の保持時間の再現性を検証したところ、相対標準偏差は 2.0 % 以内であった。

2) 検出条件の検討

2-1) UV 条件

フォトダイオードアレイ検出器により得られたイミドカルブの UV スペクトルを図 4 に示す。

イミドカルブ標準品は 242nm 付近に極大吸収波長を示した。表 1 に示した LC 条件で測定したイミドカルブ標準溶液 0.1 μ g/mL の 242nm における UV クロマトグラムを図 5 に示す。

保持時間 4.7 分付近にイミドカルブを検出した。しかし、一律基準値 (0.01 μ g/g) を検出するのに十分な感度は得られなかったことから、MS 検出器による測定を検討した。

2-2) MS 条件

イミドカルブは図 1 に示すとおり、構造中に窒素原子を有することからポジティブモードにおいてプロトン付加分子 $[M+H]^+$ m/z 349 が感度良く検出された。また、フラグメントイオンとして m/z 188, 175, 162 が検出された。図 6 にコーン電圧 40V で測定したイミドカルブの MS スペクトルを示す。それぞれのフラグメントイオンに最適な

コーン電圧を表 3 のとおり設定した。定量用イオンとして最もイオン強度の高い m/z 175 を、その他のイオンを確認用イオンに設定した。

2-3) MS/MS 条件

MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード測定条件についてプロトン付加分子 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られる m/z 349→188 を定量イオンに、 m/z 349→162 を確認イオンに採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 2 のとおり設定した。図 7 に m/z 349 のプロダクトイオンスキャンの結果を示す。

3. 検量線

各定量用のイオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.005～0.1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で 6 点の濃度で検量線を作成した。異なる 10 日間で作成した検量線は良好な直線性が得られた(相関係数;SIM 測定 0.992～0.996, MRM 測定:0.993～0.999)。代表的な検量線を図 8 に示す。

4. 前処理法の検討

「HPLC による動物用医薬品等の一斉分析法 I (畜水産物)」(一斉試験法 I) でイミドカルブの分析が可能であるか検討した。水に 0.1 $\mu\text{g/mg}$ となるようにイミドカルブを添加し、一斉試験法 I を用いて添加回収試験を行ったところ、約 95%の回収率を示した。しかし、牛筋肉に 0.1 $\mu\text{g/mg}$ となるように添加し、同様に抽出したところ、約 20%の回収率であった。抽出操作前、アセトニトリル/ヘキサン分配前、アセトニトリル及び水 (2:3) 混液へのヘキサン積層前の各段階にイミドカルブ標準溶液を添加し、どの段階で回収されていないのかを検討したところ、初めの抽出操作で十分に抽出されていないことわかった。このことからイミドカルブは試料組織に強固に結合し、アセトニトリル/ヘキサン抽出では回収されないものと考えられた。そこで、イミドカルブは塩基性を示すことから、水酸化ナトリウム溶液の添加により、塩基性条件下とし、有機層へ抽出する方法を検討した。牛筋肉を用いて、水酸化ナトリウムの濃度を 1, 4, 10, 20 及び 30 w/v%と変化させて回収率を検討したところ、1 及び 4 w/v%では約 40%と十分な回収率が得られず、10%では回収率が向上したものの、変動が認められた。20 w/v%で約 95～100%の安定した回収率が得られたが、過剰量の 30 w/v%溶液を添加することとした。また、アセトニトリル/ヘキサン分配の溶媒量を残留農薬等試験法検討実施要領に記載の 30 mL から 50mL に変更し、検討した。抽出液に標準溶液を試料中濃度として 0.1 $\mu\text{g/g}$ となるように標準溶液を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配での回収率を求めたところ 99%と良好であった。また、MRM 法では良好なクロマトグラムが得られた。牛脂肪の場合は採取量を 5g と、他の試料の半分量に減らし、アセトニトリル/

ヘキサン分配による脱脂操作を行った。抽出、定容した後、脂肪以外の試料の倍量の定容液を採取することによって、定量下限値を他の試料と同一にすることが可能となった。

抽出時に無水硫酸ナトリウムを添加することにより、試料と抽出溶媒が混和しやすく、ホモジナイズが容易となり、遠心分離時には遠心残さと抽出液層の分離が良好となった。

最後に試験溶液にヘキサンを積層して脂質除去を行うことにより、脂質成分の多い牛脂肪等の試料で、アセトニトリル/ヘキサン分配で脂質が除去しきれなかった場合を考慮し、再脱脂精製を図った。さらに、13,000回転の高速で遠心することにより、浮遊物の除去効果が高まった。ただし、毎分13,000回転は試験の性能が同様と確認できれば、毎分3,000回転に変更することが可能である。

はちみつの前処理法は、マトリックスに糖分が多く脂質を含まないことから、別途、前処理法の検討を試みた。はじめに、Tarbinら²⁾が牛腎臓中のイミドカルブの分析に報告している弱カチオン交換カラムによる精製方法を改良して検討した。すなわち、はちみつ10gを酢酸緩衝液(pH 7.0) 50 mLに溶解し、そのうち10 mLをメタノール5 mL及び酢酸緩衝液(pH 7.0) 5 mLでコンディショニングしたBaker Bond Wide-Pore CBX SPEカラム(500 mg)(J.T.Baker社)に負荷した。水5 mLで洗浄した後、酢酸：メタノール(1:9)混液5 mLで溶出した。溶出液を減圧乾固後、アセトニトリル及び水(2:3)混液2 mLに溶解して試験溶液とした。この前処理法ではMRM測定において、若干のイオン増強効果が認められた。そこで、6の「試験溶液の調製法」に示すとおり塩基性条件下、アセトニトリルで抽出した。また、糖分などの水溶性夾雑物が多く含まれることから、添加した水量に対し、過剰量となる塩化ナトリウム(25g)を添加し、有機層と水層とに分離させ、塩析効果により水溶性夾雑物を除去する方法を検討した。その結果、MRM法で良好なクロマトグラム及び回収率が得られたことから検討した方法を採用した。

本前処理法により得られた各ブランク試料のMRMクロマトグラムを図9に、SIMクロマトグラムを図10に示す。

MRM測定では妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られたが、SIM測定ではイミドカルブの保持時間の直前に大きな夾雑ピークが観察された。そこで添加回収試験はMRM法により行った。

5. 添加回収試験

わが国の食品衛生法では現在のところイミドカルブの残留基準値は牛の筋肉に0.3ppm、牛の脂肪に0.05ppm、牛の肝臓に1.5ppm、牛の腎臓に2ppm、牛の食用部分に2ppm、乳に0.05ppmと設定されている。そこで、添加回収試験用試料として残留基準値の設定されている牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、牛腎臓、乳には基準値濃度を、残留基準値の設定されていないさけ、うなぎ蒲焼き、しじみ、卵、はちみつには一律基準

値濃度を添加し、回収率を検討した。添加濃度の 10 倍高い標準溶液濃度（アセトニトリル溶液）を作成し、脂肪以外の試料は 1mL を、脂肪試料は 0.5mL を添加した。脂肪以外の試料では、標準溶液添加後、30 分程度放置した後、抽出操作を実施した。脂肪試料は緩和な条件で加温して脂肪を融解し、標準溶液を添加して均一にした後、再度凝固させ、約 30 分間放置した後、抽出操作を行った。試験溶液は、添加濃度の高い牛筋肉は 6 倍に、牛肝臓は 30 倍に、牛腎臓は 40 倍に希釈して LC-MS/MS に注入し、検量線の直線性の示す濃度範囲で回収率を求めた。各試料に添加した MRM クロマトグラムを図 11 に示す。

これら畜水産食品に対する真度はいずれも 76~109%であり、併行精度は 2~13%以内であった。回収率及び併行精度の相対標準偏差は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」（平成 19 年 11 月 15 日）で示されている目標値を満足するものであった（表 4）。

また、脂肪に溶解する溶媒（アセトン溶液）で作成した添加用標準溶液（0.5ppm）を脂肪に 0.5mL（基準値：0.05ppm 相当）添加し、上記抽出操作と同様に実施し、回収率を求めたところ、平均回収率（n=5）が 76.0%、相対標準偏差が 9.8%と Table 4 に示す回収率とほぼ同様の結果であった。

6. 試料マトリクスの測定値への影響

溶媒標準溶液に対するマトリクス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリクスの測定への影響について検討した。いずれの試料においても 0.92~1.12%の範囲であり、イオン化の抑制、増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられる（表 5）。

7. 定量下限値

各試料のブランク試験溶液に一律基準値の 1/2 濃度（0.005 μ g/mL）になるように標準溶液を添加し、S/N 比を検討した。各試料のクロマトグラムを図 12 に示す。いずれの試料においても S/N 比は 10 以上であった。本法による定量下限値は 0.01 μ g/g と設定した。

8. 標準品の安定性

メタノールで作成した標準原液は 4 $^{\circ}$ C 下の保存で 1 ヶ月、安定であった。

参考文献

- 1) 平成 21 年 12 月 17 日付け 「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告（イミドカルブ）」
- 2) Tarbin A., Shearer G. High-performance liquid chromatographic determination of imidocarb in cattle kidney with cation-exchange clean-up. *J. Chromatogr*, **577**,

376-381 (1992).

3) Wang Z., Li X., So D., Li Y., Wu L., Wang Y., Wu W. Residue depletion of imidocarb in swine tissue. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2324-2328 (2009).

4) Belloli C., Lai O.R., Ormas P., Zizzadro C., Sasso G., Crescenzo G. Pharmacokinetics and mammary elimination of imidocarb in sheep and goats. *J. Dairy Sci.* **89**, 2465-2472 (2006).

5) Gummow B., du Preez J.L., Swan G.E. Paired-ion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of diminazene in cattle plasma: a modified method. *Onderstepoort Vet. Res.* **62**, 1-4 (1995).