

高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた
畜産物中マクロライド系寄生虫駆除剤迅速一斉試験法の検討

神奈川県食肉衛生検査所 ○岸野巧 井本真理子^{※1} 小菅教仁^{※2}

※1 現生活衛生課 ※2 現動物愛護センター

はじめに

マクロライド系寄生虫駆除剤（以下、「ML系駆虫薬」という。）であるイベルメクチン (IVM)、エプリノメクチン (EPM)、ドラメクチン (DRM) 及びモキシデクチン (MXD) は線虫類及び節足動物の中樞神経系に作用し、幅広い駆虫効果を有しており、動物の治療薬として広範に使用されている。

当所では厚労省より通知された個別試験法（以下、「通知法」という。）[1] に従い、IVM の検査を実施してきたが、通知法の前処理工程は操作手順が多く煩雑であるため、前処理に長時間を要する点が大きな課題であった。

そこで今回、前処理工程の簡便化について検討し、試験法の迅速化を目指すと共に、他の ML 系駆虫薬 (EPM、DRM 及び MXD) を含む 4 剤同時分析について検討したので報告する。

材料及び方法

1 材料、装置及び HPLC 測定条件

使用した検体、標準品、試薬等は表 1、HPLC の装置及び測定条件は表 2 に示した。

2 方法

(1) 分析条件の検討

混合標準溶液を HPLC で測定し、最適な分析条件を検討した。

(2) 前処理工程簡便化の検討

ア 振とう後静置工程の変更

通知法では振とう後 15 分以上の静置が 3 回あり (図 1)、分離が不十分の場合 1 時間以上静置することもあった。そこで静置時間を省略するため、振とう後遠心分離 (3000rpm、5 分) に変更する。

イ 脱脂工程の検討

牛の筋肉、肝臓及び脂肪を図 1 の手順に従い処理し、①～③のポイントで試験溶液を濃縮・窒素乾固後、ナスフラスコの重量を測定する。

表 1 検体、標準品、試薬等

検体	豚筋肉、豚肝臓、豚脂肪、牛筋肉、牛肝臓及び牛脂肪
標準品	・IVM標準品(富士フィルム和光純薬(株)製のHPLC用) ・EPM標準品(Dr. Ehrenstorfer GmbH社製の食品分析用) ・DRM標準品(Dr. Ehrenstorfer GmbH社製の食品分析用) ・MXD標準品(東京化成工業(株)製の試験研究用)
標準溶液	各標準品を精密に量り、メタノールに溶解して標準原液(100 µg/mL)とし、これらを混合し、メタノールで適宜希釈したものを混合標準溶液(STD)とした。
試薬	メタノール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミドはHPLC用、アセトン、n-ヘキサン及び酢酸エチルは残留農薬試験・PCB試験用、無水酢酸は精密分析用、その他の試薬は特級を用いた。

表 2 HPLC の装置及び測定条件

HPLC測定条件	
装置	WATERS ACQUITY Arc Systems (Waters(株)製)
検出器	蛍光検出器 (Waters(株)製)
測定波長	励起波長: 360nm、測定波長: 460nm
分析カラム	CORTECS T3 (2.7µm, 3mm×150mm) Column (Waters(株)製)
カラム温度	40℃
移動相	水:メタノール=8:92 (アイソクラティック分析)
流速	0.4mL/min
注入量	20µL

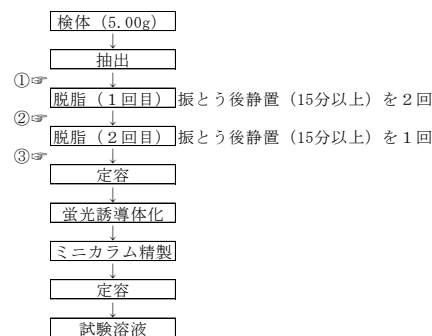


図 1 通知法の前処理工程概略図

使用前のナスフラスコの重量との差から残留物（残存脂肪）の量を算出し、脱脂工程の省略について検討する。

(3) 5回繰り返し添加回収試験による4剤同時分析の検討

(2)の結果から前処理工程を簡便化した試験法を改良法とする。各検体に混合標準溶液（0.01ppm及び0.1ppm）を添加後、改良法の前処理手順に従い試験溶液を調製し、(1)で得られた最適な分析条件でHPLC測定を実施する。得られた結果から平均回収率及び相対標準偏差（RSD）を算出し、妥当性評価ガイドライン（以下、「ガイドライン」という。）[2]の目標値を参考に評価を行う。

成 績

1 分析条件の検討

各分析対象化合物のピーク形状、分離状況等から、分析カラムをCORTECS T3、移動相条件を水：メタノール（8:92）、流速を0.4mL/minとした。

2 前処理工程簡便化の検討

(1) 振とう後静置工程の変更

振とう後遠心分離（3000rpm、5分）に変更することで、前処理時間が大幅に短縮した。

(2) 脱脂工程の検討

工程別の残留物量を表3に示した。牛筋肉及び牛肝臓では脱脂1回目、牛脂肪では脱脂2回目で残留物が0.0gとなった。

(3) 5回繰り返し添加回収試験による4剤同時分析の検討

(1)及び(2)の結果から、振とう後の遠心分離及び脱脂回数を表4のとおり変更した改良法を考案した（図2）。特に筋肉及び肝臓で前処理時間が1検体あたり50分以上短縮した。

改良法による添加回収試験の結果を表5に示した。平均回収率及びRSDは全ての検体でガイドラインの目標値を満たし、良好な結果であった。

表3 工程別の残留物量

残留物	検体	牛筋肉 (g)	牛肝臓 (g)	牛脂肪 (g)
①抽出後 (n=3)		0.4	0.1	4.7
②脱脂1回目後 (n=1)		0.0	0.0	0.1
③脱脂2回目後 (n=1)		0.0	0.0	0.0

表4 通知法及び改良法の前処理比較表

	通知法	改良法		
		筋肉	肝臓	脂肪
脱脂回数	2回	1回	1回	2回
振とう後静置回数 (遠心分離回数)	3回	1回	1回	2回
前処理短縮時間 (1検体あたり)	—	50分以上	50分以上	15分以上

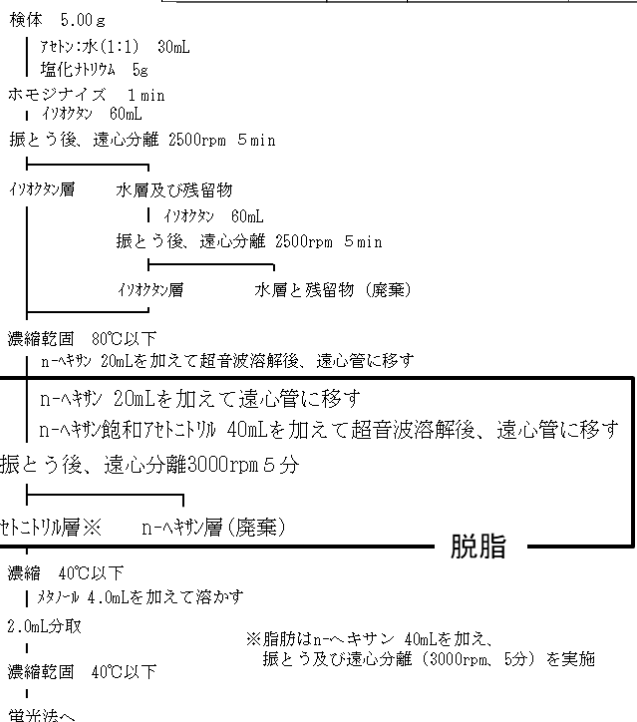


図2 改良法の試験溶液調製手順（蛍光誘導体化前まで）

表5 5回繰り返し添加回収試験結果

化合物	添加濃度 (ppm)	牛筋肉	牛肝臓	牛脂肪	豚筋肉	豚肝臓	豚脂肪
IVM	0.1	90.0 (11.5)	98.6 (4.4)	102.8 (1.8)	88.6 (2.4)	92.5 (4.0)	88.8 (2.6)
	0.01	100.8 (4.2)	88.8 (2.2)	101.7 (1.8)	86.0 (6.4)	101.3 (2.2)	86.1 (1.0)
EPM	0.1	94.0 (12.6)	77.9 (4.0)	101.5 (1.7)	95.0 (1.5)	81.6 (4.7)	100.4 (1.7)
	0.01	100.3 (2.7)	82.2 (1.1)	107.0 (2.2)	90.0 (2.8)	95.3 (2.4)	94.2 (0.5)
DRM	0.1	87.5 (11.0)	99.3 (3.9)	105.5 (1.5)	85.7 (4.0)	92.7 (4.1)	91.0 (2.4)
	0.01	100.9 (4.0)	91.0 (2.0)	105.2 (1.7)	87.5 (5.9)	102.7 (1.9)	89.8 (0.5)
MXD	0.1	86.7 (10.6)	97.2 (4.8)	95.1 (1.1)	89.9 (1.4)	99.0 (8.1)	75.9 (9.4)
	0.01	94.1 (5.7)	82.9 (3.6)	96.0 (1.7)	82.6 (6.0)	91.9 (3.9)	70.0 (2.8)

* 表示は平均回収率% (相対標準偏差RSD%)

* ガイドラインの目標値

平均回収率: 70~120%、添加濃度0.01ppmのRSD: <25%、添加濃度0.1ppmのRSD<15%

考 察

HPLC 分析条件を検討したところ、分析カラムを CORTECS T3、移動相条件を水:メタノール (8:92)、流速を 0.4mL/min とすることで4剤が完全に分離し、良好なピーク形状を得ることができたため、4剤同時測定が可能であると考えられた。

一方、前処理工程の検討では、振とう後に遠心分離を実施することで脱脂溶媒 (n-ヘキサン) とアセトニトリルとの境界面が即座に完全分離し、1検体あたり15分以上の静置時間が省略できたため、大幅に作業時間が短縮した。また、工程別残留物量の結果から、筋肉及び肝臓では、1度の脱脂操作で含有する脂肪分を完全に除去可能であると考えられた。これらの検討結果から前処理工程を一部省略又は変更することで、特に筋肉及び肝臓で1検体あたり50分以上と大幅な作業時間の短縮が実現したものと考えられた。

これらの検討結果から、前処理工程を簡便化した改良法により5回繰り返し添加回収試験を実施したところ、全ての検体でガイドラインの目標値を満たし、良好な結果であった。

まとめ

ML系駆虫薬の通知法について、前処理工程の簡便化及び4剤同時分析の可能性について検討した。前処理工程のうち、振とう後の静置を遠心分離に変更し、脱脂回数を変更することで1検体あたりの前処理時間が短縮した。前処理工程を簡便化した改良法の5回繰り返し添加回収試験結果は全ての検体でガイドラインの目標値を満たしたため、改良法で畜産物中のML系駆虫薬4剤同時迅速分析が可能であると示された。

今後は牛及び豚筋肉等における妥当性評価をさらに実施後、標準作業書(SOP)を整備し、日常検査に役立てていきたい。

引用文献

- [1] 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- [2] 「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の一部改正について」(平成22年12月24日付食安発第1224第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)