

[ノート]

LC-FL を用いた畜産物中におけるマクロライド系寄生虫駆除剤の スクリーニング分析法の開発と妥当性評価 —プレカラム自動誘導体化法の適用—

後藤 操^{1*} 林 幸子¹ 服部 涼子¹ 松岡 智郁² 三橋 隆夫¹

Development and Validation of an Analytical Screening Method using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Macrolide Anti-parasitic Agents in Livestock Products —Application of Automated Precolumn Derivatization—

Misao GOTOU^{1*}, Sachiko HAYASHI¹, Ryoko HATTORI¹, Tomofumi MATSUOKA²
and Takao MITSUHASHI¹¹ *Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan,*² *Naka-Harima District Administration Office, Hyogo Prefecture*

This report describes validation of a simple analytical screening method for residual macrolide anti-parasitic agents (abamectin, eprinomectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin) in livestock products by liquid chromatography with fluorescence detection. The analysis was carried out by automated precolumn derivatization at room temperature using a fluorescent indicator derivatized with trifluoroacetic anhydride and 1-methylimidazole. The evaluation was performed by adding each macrolide at its Japanese maximum residue limit (MRL : 0.01–0.1 µg/g) to cattle, swine, and chicken muscles in accordance with the Ministry of Health, Labour and Welfare Guidelines. Among the samples tested, recovery of the five macrolides ranged from 84.3% to 88.1%. Regarding the relative standard deviation (RSD) of precision, repeatability ranged from 2.3% to 10.8%, and intermediate precision ranged from 7.8% to 17.5%; hence, the results fulfilled the requirements of the Guidelines. For all samples tested, the limit of quantitation (LOQ) was confirmed to be 0.005 µg/g. Thus, this method has been proven to be applicable to screening analysis for five aforementioned macrolide anti-parasitic agents in the three kinds of livestock products examined.

I はじめに

マクロライド系寄生虫駆除剤は、牛、豚など畜産物の

¹健康科学部 ²現兵庫県中播磨県民局*別刷請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 後藤 操

駆虫剤として、世界中で広く用いられており、食肉および加工品への残留が懸念されている。我国でも食肉中の残留基準が設けられ、近年では、イベルメクチンが検疫所等において 2010 年、2011 年に続き 2013 年にも基準値超過違反となり、検査命令あるいは検査強化などの措置がとられた。兵庫県においては食の安全安心の確保の一環として、動物用医薬品の検査項目の拡充を進めており、当研究センターでは、マクロライド系寄生虫駆除剤

を新たな対象として検査法の開発に取り組んでいる。畜産物中マクロライド系寄生虫駆除剤の試験法としては「イベルメクチン、エプリノメクチン、ドラメクチン及びモキシデクチン試験法（畜産物）」¹⁾が厚生労働省から通知されている。その試験法は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（LC-FL）を用い高感度分析が可能な方法であるが、蛍光誘導体化など前処理の操作が煩雑といった問題点がある²⁻⁴⁾。

そこで我々は、LC-FLを用い、より簡便で迅速なスクリーニング分析法の確立を目的に、前処理に固相抽出法の採用と蛍光誘導体化にプレカラムでの自動化の適用を検討した。その結果、牛、豚および鶏の筋肉において、5種類（アバメクチン、イベルメクチン、エプリノメクチン、ドラメクチン、モキシデクチン）のマクロライド系寄生虫駆除剤の分析で良好な結果が得られたので報告する。

また、分析法の信頼性を確保するため、厚生労働省が示した「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」⁵⁾（以下、ガイドラインとする）に従って妥当性評価を行った結果も併せて報告する。

II 方法

1. 試料

兵庫県内で流通していた市販の牛、豚および鶏の筋肉部位を用いた。

2. 試薬および試液

寄生虫駆除剤標準品：エプリノメクチン（エプリノメクチン B1a）、アバメクチン（アベルメクチン B1a；94.0%、アベルメクチン B1b；6.0%）は林純薬工業(株)製、モキシデクチン、ドラメクチンは Fluka 社製、イベルメクチンは Dr Ehrenstorfer 社製を用いた。各寄生虫駆除剤の構造式を Fig.1 に示す。各標準品 約 20 mg を精秤後、メタノールに溶解し、全量を 100 mL とした（標準原液：各 0.20 mg / mL）。これら標準原液をメタノールで適宜希釈し、標準溶液および標準混合溶液を調製した。

誘導体化反応試液：1-メチルイミダゾール/無水アセトニトリル混液（1：1,v/v）（以下、MI 溶液とする）およびトリフルオロ酢酸無水物/アセトニトリル混液（2：3,v/v）（以下、TFAA 反応液とする）を用時調製した。

その他の試薬：アセトニトリル、メタノールは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用を用いた。1-メチルイミダゾールは和光純薬工業(株)製を、無水硫酸ナトリウム、トリエチルアミン、トリフルオロ酢酸無水物は和光純薬工業(株)製特級を用いた。

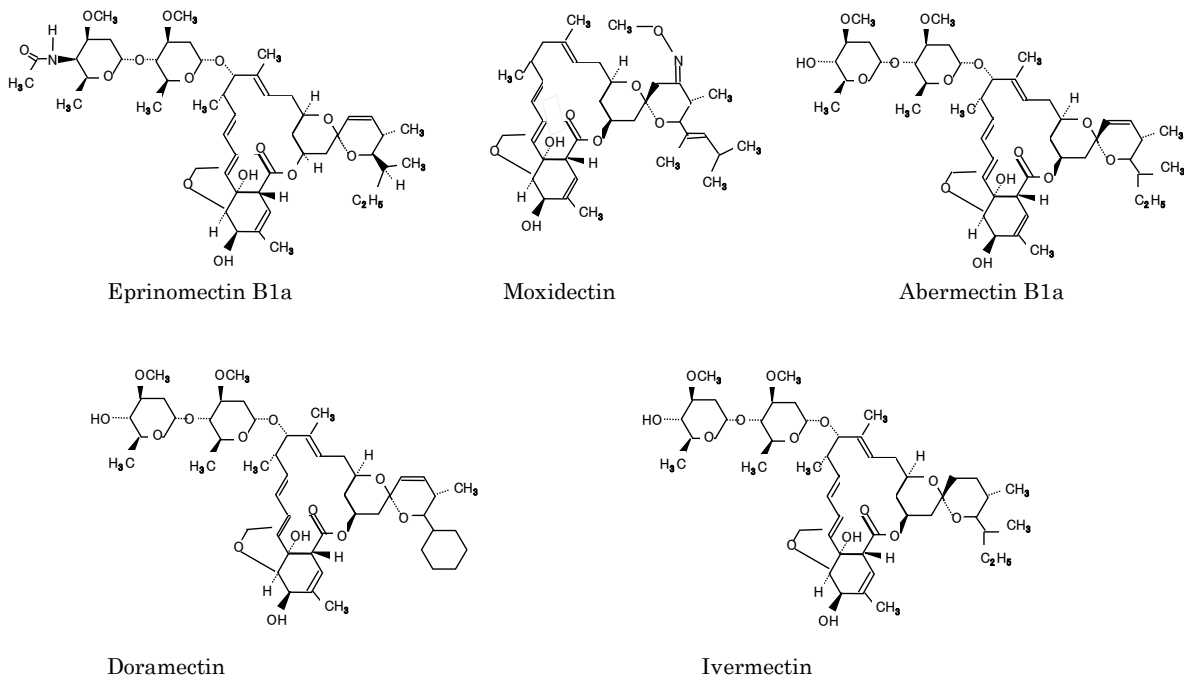


Fig.1 Chemical structures of Eprinomectin B1a, Moxidectin, Abamectin B1a, Doramectin and Ivermectin

固相抽出用カラム：Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters 社製) は、あらかじめアセトニトリル 2 mL および 0.1% トリエチルアミン水溶液/アセトニトリル混液 (7:3,v/v) 2 mL でコンディショニングして使用した。

3. 装置

HPLC-FL：(株)島津製作所製 LC-20A

ホモジナイザー：IKA ジャパン(株)製 ULTRA TURRAX T25 digital

エバポレーター：日本ビュッヒ(株)社製 Rotavapor R-3

4. 測定条件

カラム：Mightysil RP-18 GP II (4.6 mm×150 mm, 5 μ m)

移動相：①；トリエチルアミン/リン酸/水/メタノール混液 (0.1:0.1:50:50)

②；トリエチルアミン /リン酸/メタノール混液 (0.1:0.1:100)

グラジエント (①+②) 条件：② 80% (0 min.)→80% (6 min.)→95% (12 min.)→95% (22 min.)→80% (28 min.)

カラム温度：40°C, 流速：1.0 mL/min., 注入量：30 μ L, 測定波長 (励起波長/蛍光波長)：365 nm / 475 nm

5. 試験溶液の調製

試料 2.0 g にアセトニトリル 20 mL と無水硫酸ナトリウム 5 g を加えてホモジナイズ後、5 A ろ紙 (ADVANTEC) でろ過し、抽出液を得た。このうち 1 mL を分取し、0.1% トリエチルアミン水溶液 2 mL を混和後、HLB カラムに負荷した。0.1% トリエチルアミン/アセトニトリル混液 (7:3,v/v) 1 mL で洗浄後、アセトニトリル 1 mL を用いた溶出液を濃縮乾固し、MI 溶液 0.2 mL で溶解した。この溶解液と TFAA 反応液を等量混合したものを試験溶液とし、LC-FL で分析した。

6. 検量線

検量線用の標準溶液は、標準溶液を乾固し、1-メチルイミダゾール/無水アセトニトリル混液 (1:1,v/v) 0.2 mL で溶解後、TFAA 反応液と等量混合し作成した。

7. 妥当性評価

妥当性を評価するため、ガイドラインに従い、以下の項目について試験を行った。各寄生虫駆除剤は、食品試料に対し、それぞれ基準値相当となるよう添加した。

7.1 選択性

寄生虫駆除剤を含有していないブランク試料を測定し、

定量を妨害するピークが無いことを確認した。

7.2 真度 (回収率) および精度

基準値相当の寄生虫駆除剤を添加した各食肉試料について、分析者 1 名が 1 日に 2 試行を計 4 日間および分析者 1 名が 1 日に 5 試行を 1 日間、それぞれ測定を実施した (n=13)。得られたデータから真度を求め、その結果を一元配置分散分析により解析し、併行精度および室内精度を算出した。

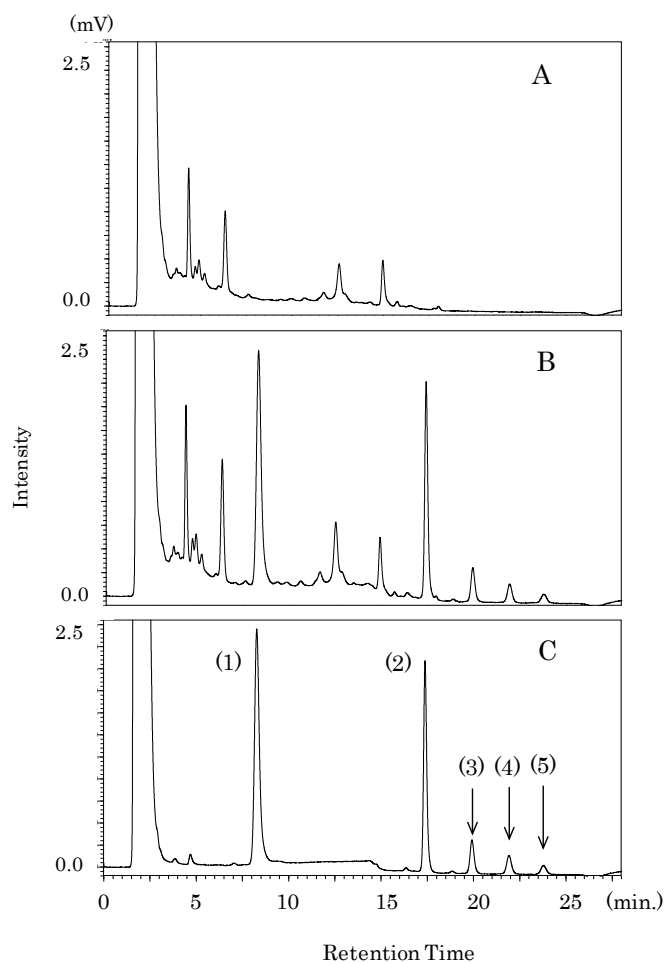


Fig.2 Typical chromatograms of macrolide antiparasitic agents (A) Cattle muscle blank; (B) cattle muscle samples to which eprinomectin (0.025 μ g/mL), moxidectin (0.005 μ g/mL), abamectin (0.0025 μ g/mL), doramectin (0.0025 μ g/mL), and ivermectin (0.0025 μ g/mL) was added; and (C) standard solutions: eprinomectin (0.025 μ g/mL), moxidectin (0.005 μ g/mL), abamectin (0.0025 μ g/mL), doramectin (0.0025 μ g/mL), and ivermectin (0.0025 μ g/mL)

The peaks represent (1) eprinomectin, (2) moxidectin, (3) abamectin, (4) doramectin, and (5) ivermectin.

III 結果および考察

1. LC-FL 移動相の検討

移動相は、通知法と同様のメタノール-水系を用いた。標準溶液によるアイソクラティック分析では、移動相がメタノール/水 (93 : 7) および (95 : 5) の条件でいずれも良好な分離ピークが得られた。しかし、牛肉試料に添加した際、試料由来のピークが分析を妨害した。そこで、グラジエントに変更した結果、妨害ピークの影響が回避できた。さらに、トリエチルアミンおよびリン酸を添加することで、エプリノメクチンのピーク形状は良好であった⁶⁾ (Fig.2)。

2. 蛍光誘導体化条件の検討

蛍光誘導体化は、室温で反応が進行する1-メチルイミダゾールとトリフルオロ酢酸無水物を用いる方法を採用した⁷⁻¹⁰⁾。標準混合溶液を乾固後、1-メチルイミダゾール/無水アセトニトリル混液 (1 : 1, v/v) 0.2 mL で溶解し (以下、MI 標準溶液とする)、その一部を LC 用バイアルに移した。別バイアルに TFAA 反応液を取り、LC のオートサンプラのプログラミングを用いて両液を自動で混合するプレカラム誘導体化¹¹⁾を行った。最大容量 50 μL の LC のサンプルループ内に、MI 標準溶液と TFAA 反応液を交互に等量を連続吸引して保持し、両液をサンドイッチ様の状態で静置して反応させた。

反応条件として、最初に反応時間について検討した。MI 標準溶液を 3 μL 、続いて TFAA 反応液を 3 μL の連

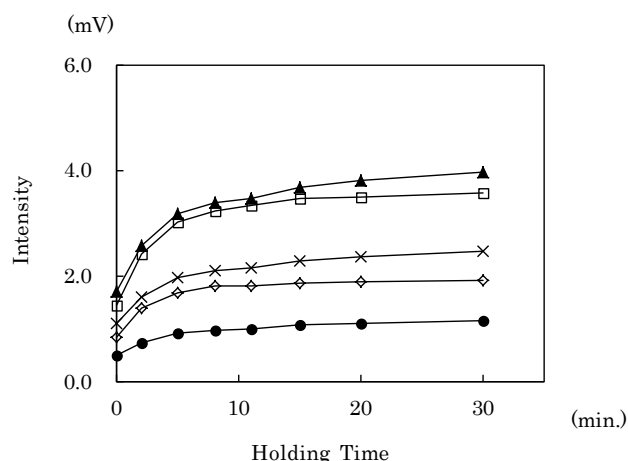


Fig.3 Effect of pre-injection holding time on fluorescence intensity in precolumn autoderivatization (▲) abamectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (◻) moxidectin (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (×) doramectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (◊) eprinomectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and (●) ivermectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

続吸引を1セットとして、繰り返し5セットの計 30 μL の混合溶液をサンプルループ内に保持した条件で、LC への注入前の保持時間、すなわち反応時間による蛍光強度の変化を調べた。その結果、Fig.3 に示すように、蛍光強度は、いずれの寄生虫駆除剤においても反応時間の

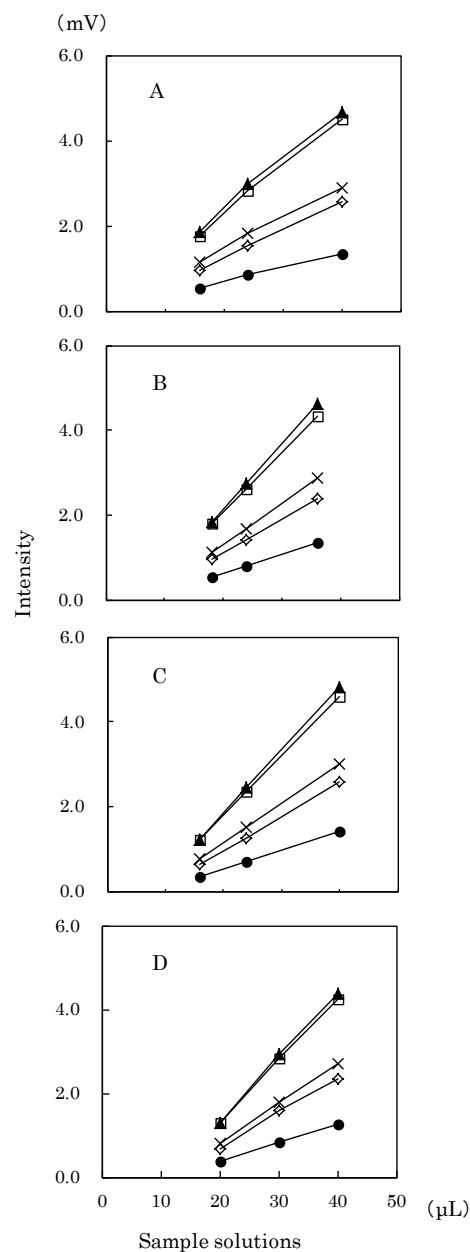


Fig.4 Effects of sample and reagent solution volumes on fluorescence intensity in derivatization (A) 2 μL each of sample and reagent, (B) 3 μL each of sample and reagent, (C) 4 μL each of sample and reagent, and (D) 5 μL each of sample and reagent (▲) abamectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (◻) moxidectin (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (×) doramectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (◊) eprinomectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and (●) ivermectin (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

経過につれて上昇し、0-5分における蛍光強度の上昇は急激であった。蛍光強度の上昇は8分以降でゆるやかとなり、8分と比較して30分の蛍光強度は約110%であった。この傾向は、試薬の混合比は異なるが同試薬を用いた室温で行った石井ら⁷⁾の報告と同様であった。本法においては、迅速なスクリーニングを目的とし、反応時間は8分に設定した。

また、MI標準溶液とTFAA反応液の混合における、両溶液の1セットの吸引量とセット数による蛍光強度の違いを調べた。組み合わせは、MI標準溶液とTFAA反応液が各2 μ L/1セットの場合4,6および10セット、各

3 μ L/1セットの場合3,4および6セット、各4 μ L/1セットの場合2,3および5セット、各5 μ L/1セットの場合2,3および4セットとした。なお、反応時間は全て8分で統一した。1セットの両液の吸引量が各3,4,5 μ Lの場合、蛍光強度は、いずれの寄生虫駆除剤においても容量増加につれて上昇した(Fig.4)。吸収総量と蛍光強度との関係で評価すると、各3 μ Lずつ吸引した場合が最も良好であった。よって、MI試料溶液およびTFAA反応液の1セットの吸引量は各3 μ Lずつとし、繰り返し5セット吸引した組み合わせ(総量30 μ L)に設定した。

Table 1 Results of validation of the five test agents in livestock products

Compound	Sample	Fortified level (μ g/g)	Mean recovery ^{a)} (%)	Repeatability ^{b)} (RSD %)	Intermediate Precision ^{b)} (RSD %)
Abamectin	cattle muscle	0.01	86.0	4.8	9.2
	swine muscle	0.01	85.5	3.3	9.4
	chicken muscle	0.01	85.7	3.3	11.2
Doramectin	cattle muscle	0.01	85.1	5.2	8.4
	swine muscle	0.01	84.5	3.3	8.3
	chicken muscle	0.01	84.5	3.0	11.4
Eprinomectin	cattle muscle	0.1	86.1	6.7	8.2
	swine muscle	0.01	85.7	3.8	13.1
	chicken muscle	0.01	88.1	10.8	17.5
Ivermectin	cattle muscle	0.01	84.3	5.2	7.8
	swine muscle	0.02	84.5	2.4	8.1
	chicken muscle	0.01	86.7	2.3	14.4
Moxidectin	cattle muscle	0.02	87.0	6.3	10.4
	swine muscle	0.01	87.7	2.4	8.1
	chicken muscle	0.01	87.2	2.3	11.5

a) n = 13

b) n = 10

3. 前処理の検討

寄生虫駆除剤を分析する際の試料溶液の前処理では、様々な固相抽出カラムが用いられている¹²⁻¹³⁾。本法では、幅広い極性物質に利用でき、汎用カラムの一つである HLB カラムを用いた¹⁴⁾。その結果、通知法と比較し、作業時間は約 1/3 以下と迅速な分析が可能となった。また、エプリノメクチンの回収率を向上させるために、HLB カラムに負荷する前の試料溶液にトリエチルアミンを添加した¹³⁾。

4. 妥当性評価

ガイドラインに従い実施した添加回収実験（真度）の結果、並びに真度から算出した併行精度および室内精度の値を Table 1 に示した。真度は 84.3%~88.1%、併行精度は 2.3%~10.8%、室内精度は 7.8%~17.5% で全てのパラメータでガイドラインの目標値（添加濃度 0.001~0.01 $\mu\text{g/g}$ ：真度 70%~120%；併行精度<25%；室内精度<30%、添加濃度 0.01~0.1 $\mu\text{g/g}$ ：真度 70%~120%；併行精度<15%；室内精度<20%）を満たしていた。以上の結果から、本法はマクロライド系寄生虫駆除剤の分析法として妥当であることを確認できた。

定量限界値については、今回検討した寄生虫駆除剤の基準値が 0.01~0.1 $\mu\text{g/g}$ であるため、通知法の定量限界値 0.005 $\mu\text{g/g}$ と同程度であれば基準値に対する適否を判断できる。そこでブランク試料に 0.005 $\mu\text{g/g}$ 相当となるよう寄生虫駆除剤を添加した試料について分析した結果、ピーク高さは全て $S/N \geq 10$ であった。また、検量線は 30 μL 注入でエプリノメクチンが 0.2~50 ng/mL 、モキシデクチンが 0.04~20 ng/mL 、アバメクチンが 0.1~50 ng/mL 、ドラメクチンが 0.2~50 ng/mL 、イベルメクチンが 0.4~50 ng/mL の濃度範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示すことを確認した。

IV 結 論

LC-FL による畜産物中のマクロライド系寄生虫駆除剤のスクリーニング分析において、自動プレカラム誘導体化を適用した分析法の妥当性を評価した。誘導体化反応を自動プレカラムで行うことによって、試料と誘導体化反応溶液の混和操作などの煩雑さが解消し、誘導体化反応の迅速性と安定性が向上した。さらに、HLB 固相カラムによる試料のクリーンアップを採用することで、作業時間が大幅に減少し、検査の省力化が図れた。また HPLC 分析において、グラジエント条件を検討したことで、5 種類（アバメクチン、イベルメクチン、エプリノメクチン、ドラメクチン、モキシデクチン）の同時分析が可能

となった。

牛、豚および鶏肉について 5 種類のマクロライド系寄生虫駆除剤の妥当性を評価した結果、回収率は 84.3% から 88.1% の範囲となり、並行精度および室内精度も含め、ガイドラインの基準を満たしていた。本法は、3 種類の食肉を対象とした簡便・迅速なスクリーニング分析法として有用である。今後、今回の対象以外の畜産物および化合物に対して適用性を検討することで検査項目の拡充を進めることができ、県内を流通する畜水産物の安全安心確保に貢献できると考える。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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（2005）、食安発第 0124001 号、別添（最終改正：平成 25 年 10 月 1 日）（2013）
- 2) 山口瑞香，柿本健作，山口貴弘，尾花裕孝：LC-MS/MS による畜産物中のポリエーテル系抗生物質およびマクロライド系駆虫薬の一斉分析。食衛誌，**52**，281-286（2011）
- 3) 坂本美穂，竹葉和江，笹本剛生，草野友子，林洋，金井節子，神田真軌，永山敏廣，森謙一郎：LC-FL 及び LC-MS/MS による食肉中のイベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチンの分析。東京健安研年報，**60**，139-145（2009）
- 4) 佐藤直之，石井敬子，佐藤昭男，日高利夫，長岡登：市販牛肉中モキシデクチンの LC/MS による分析および脂肪，筋肉組織での残留性。食衛誌，**44**，198-202（2003）
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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、食安発 1224 第 1 号（2010）
- 6) Payne L.D., Mayo V.D., Morneweck L.A., Hicks M.B., Wehner T.A. : HPLC-Fluorescence Method for the Determination of Eprinomectin Marker Residue in Edible Bovine Tissue. J. Agric. Food Chem., **45**, 3501-3506（1997）
- 7) 石井里枝，堀江正一，星野庸二，中澤裕之：蛍光検出 HPLC による肝臓，脂肪組織中の残留寄生虫剤の同時分析法。食衛誌，**39**，42-45（1998）
- 8) Berendsen B.J.A., Mulder P.P.J., van Rhijn H.A. : The Derivatisation of Avermectins and Milbemycins in Milk: New Insights and

- Improvement of the Procedure. *Anal. Chim. Acta*, **585**, 126-133 (2007)
- 9) Schenck F.J., Lagman L.H. : Multiresidue Determination of Abamectin, Doramectin, Ivermectin, and Moxidectin in Milk Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J. AOAC Int.*, **82**, 1340-1344 (1999)
- 10) Wang H., Wang Z., Liu S.Y., Liu Z. : Rapid Method for Multi-Residue Determination of Avermectins in Bovine Liver Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **82**, 395-395 (2009)
- 11) Salisbury C.D.C., Sweet J.C., Munro R. : Determination of Sulfonamide Residues in the Tissues of Food Animals Using Automated Precolumn Derivatization and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. AOAC Int.*, **87**, 1264-1268 (2004)
- 12) Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y. : Simultaneous Determination of Residues of Emamectin and Its Metabolites, and Milbemectin, Ivermectin, and Abamectin in Crops by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. AOAC Int.*, **84**, 910-917 (2001)
- 13) Durden D.A., Wotske J. : Quantitation and Validation of Macrolide Endectocides in Raw Milk by Negative Ion Electrospray MS/MS. *J. AOAC Int.*, **92**, 580-596 (2009)
- 14) He L., Zhao D., Su Y., Liu Y., Nie J., Lian J. : Determination of Macrocylic Lactone Drug Residues in Animal Muscle by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.*, **92**, 348-358 (2009)

[平成 26 年 3 月 26 日受理]