

# 牛組織中に残留する6種類のマクロライド系内寄生虫用剤の 高速液体クロマトグラフィーによる同時定量

永田 知子, 宮本 文夫, 長谷川康行, 芦澤 英一

Simultaneous Determination of 6 Kinds of Macrolide Parasiticides Residues  
in Bovine Tissues by Liquid Chromatography.

Tomoko NAGATA, Fumio MIYAMOTO  
Yasuyuki HASEGAWA, Eiichi ASHIZAWA

## 1 はじめに

畜水産食品中に残留する動物用医薬品の基準値は、平成7年より平成14年10月現在に至るまで22品目について順次設定されてきている<sup>1)</sup>。そのうち牛、豚、羊、馬、鹿等に用いられるマクロライド系内寄生虫用剤のイベルメクチン (IVM), モキシデクチン (MOX), エブリノメクチン (EPM) は、いずれも主化合物 (80%以上) 及び副化合物 (20%未満) からなっており、それぞれの主化合物を指標にして残留試験法 (公定法) が定められている<sup>2)</sup>。

公定法以外には、IVM<sup>3,13,19,21)</sup>, MOX<sup>9,11,14,15,21)</sup>, EPM<sup>11,16,17,21)</sup>について組織<sup>7,9,11,12)</sup>、牛乳<sup>10)</sup>、血清<sup>13)</sup>を対象とした試験法の報告があり、主に蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (FL-HPLC) で定量試験を行っている。上記以外のマクロライド系内寄生虫用剤には、アバメクチン (ABM), ドラメクチン (DOM) 及びA3とA4の混合物からなるミルベメクチン (MIL A3, MIL A4) があり、今後これらの薬剤にも基準値が設定される可能性がある。ABM<sup>9,11,13,18,21)</sup>, DOM<sup>9,11,21)</sup>及びMIL A3, MIL A4<sup>19)</sup>についても、FL-HPLCで定量試験を行っているが、さらに高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LCMS) を併用して確認試験を行っている報告<sup>14,15,17,19,21)</sup>もある。同時定量法では、2~4種類を同時分析した報告はあるが、残留基準のあるIVM, MOX, EPMを含む6種類の薬剤を同時定量した報告は見受けられない。

今回、検査の迅速化を目的とし、牛組織中の6種類の薬剤をアセトン+水混液 (1+1) 及び2,2,4トリメチルペンタンで抽出し、n-ヘキサン-アセトニトリル分配で脱脂後、蛍光誘導体化し、FL-HPLCを用いて同時定量する方法を検討した。

## II 実験方法

1. 試料 市販の牛肉、牛肝臓を用いた。
2. 試薬、標準品及び装置

### 1) 試薬

アセトニトリル：HPLC用及び特級品、テトラヒドロフラン (THF)：HPLC用、アセトン、n-ヘキサン、2,2,4トリメチルペンタン、メタノール、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、N-メチルイミダゾール、

以上の試薬でHPLC用以外は特級品 (関東化学株式会社製) を用いた。

水：超純水 (18.2M Ω/cm) 無水酢酸、塩化ナトリウム：(和光純薬株式会社製)、

モレキュラーシーブ：(0.3nm, メルク社製)

n-ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル300mlにn-ヘキサン30mlを加え、振とう機を用いて10分間振とうし、静置後、下層を用いる。

誘導体化試液：DMF+無水酢酸+N-メチルイミダゾール (9+3+2) DMF4.5ml, 無水酢酸1.5ml及びN-メチルイミダゾール1mlを混合する。(用時調製)

### 2) 標準品及び標準溶液の作成

イベルメクチン (IVM)：シグマ社製 (Lot. 80K 1435)

モキシデクチン (MOX)：共立製薬社製 (純度：98.20%)

エブリノメクチン (EPM)：メルク社製 (純度：95.90%)

アバメクチン (ABM)：林純薬工業株式会社製 (純度：95.2%)

ドラメクチン (DOM)：Pfizer Pharm Inc.製 (供与品、純度：95.8%)

ミルベメクチンA3 (MIL A3)：林純薬工業株式会社製 (純度：98.7%)

ミルベメクチンA4 (MIL A4)：林純薬工業株式会社製 (純度：99.6%)

### 標準溶液の作成

保存用標準溶液：各標準品5mg精秤し、それぞれメタノールに溶解し、50mlとする。(各100μg/ml) (-20℃で保存)

混合標準溶液：各保存用標準液をそれぞれ1ml採取し、アセトニトリルを加えて正確に10mlとし、混合標準溶液とする。(各10μg/ml) これを順次、アセトニトリルで希釈する。(希釈用アセトニトリルは、予めモレキュラーシーブで脱水したものをを用いる。)

検量線用標準溶液：混合標準溶液 (各10μg/ml) を順次、アセトニトリルで希釈し、0.005μg/ml~0.5μg/mlの混合標準溶液を作成する。各混合標準溶液1mlを50mlのナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃の水浴上で減圧下濃縮乾固し、以下3. 試験溶液の調製の2) 誘導体化の項に従う。

### 3) HPLC装置及び測定条件

HPLC装置：島津製作所製 LC-10シリーズ

(ポンプ：LC-10AT vp, ミキシング部：FCV-10AL vp, デガッサー：DGU-14A, オートサンプラー：SIL-10AxL, 恒温槽：

CTO-10A vp, 蛍光検出器: FL-10A Vp, コントローラー: CBM-10A, データー処理機: CLASS-LC10)

測定条件:

カラム: Wakosil 5C18,  $\phi$  4.6x250mm (和光純薬株式会社)

ガードカラム: TSK guardgel ODS-80TM,  $\phi$  3.2x15mm (東ソー株式会社)

移動相: アセトニトリル+THF+水 (96+3+1)

流速: 0.8ml/min

温度: 50°C

検出波長: 励起波長365nm, 蛍光波長470nm

SENS: MED, GAIN: 2

注入量: 20  $\mu$ l

### 3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、公定法(1)にほぼ準じた。

#### 1) 抽出及びクリーンアップ

細切した試料 5 g を 100ml の遠沈管に秤り採り、アセトン+水混液 (1 + 1) 20ml 及び塩化ナトリウム 5 g 加え、1 分間ホモジナイズし、次いで 2, 2, 4 トリメチルペンタン 40ml を加えさらに 3 分間ホモジナイズ後、2500rpm で 10 分間遠心分離する。上澄液を 200ml のナス型フラスコに (中間層の固形物及び下層の水層が入らないようにし)、駒込ピペットを用いて移す。残渣に 2, 2, 4 トリメチルペンタン 40ml を加え同様にホモジナイズし、遠心分離後、上澄液を先の 200ml のナス型フラスコに駒込ピペットを用いて合わせ入れる。抽出液を 75°C の水浴上で、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下濃縮乾固する。残留物に n-ヘキサン 20ml を加えて溶解し、100ml 分液ロート (I) 中に移す。先の 200ml ナス型フラスコに予め n-ヘキサンで飽和したアセトニトリル 20ml を加え容器内を洗浄し、洗浄液を先の 100ml 分液ロート (I) 中に合わせ入れる。分液ロート (I) を 5 分間振とう機で振とうし、静置後アセトニトリル層を別の 100ml 分液ロート (II) 中に移す。再度分液ロート (I) に予め n-ヘキサンで飽和したアセトニトリル 20ml を加え、振とうし、静置後アセトニトリル層を分液ロート (II) 中に合わせ入れる。分液ロート (II) に n-ヘキサン 10ml を加え振とう機を用いて 5 分間振とうし、静置後アセトニトリル層を 100ml ナス型フラスコに移し、40°C の水浴上でロータリーエバポレーターを用いて減圧下濃縮乾固する (完全に乾固する。)

#### 2) 誘導体化

残留物に誘導体化試液 0.2ml を加え、密栓し、ボルテックスミキサーに 5 秒間掛けた後、100°C で 90 分間誘導体化反応を行う。放冷後、残留物にアセトニトリル (予めモレキュラーシープで脱水済み) 5ml を加え、ボルテックスミキサーに 5 秒間掛け混和した後、この 20  $\mu$ l を HPLC に供する。

## III 結果及び考察

### 1. 抽出

試料からの抽出試薬にはアセトン-水-2, 2, 4 トリメチルペンタン<sup>1, 0</sup>、酢酸エチル<sup>10, 19</sup>、あるいはアセトニトリル<sup>5, 9, 11, 20</sup>が用いられている。本法は公定法に準じて、アセトン-水-2, 2, 4 トリメチルペンタンを用いた。

### 2. クリーンアップ

クリーンアップ操作は、溶媒の使用量が少なく、エマルジョンが生成しない固相抽出 (SPE) 法、すなわち塩基性アルミナ<sup>3, 5, 11, 13</sup>、オクタデシル<sup>3, 5, 7, 11, 12, 19, 21</sup>、オクチル<sup>8, 20</sup>、シリカ<sup>9</sup>、アミノプロピル<sup>19, 20</sup>を用いた試験法が報告されている。また、n-ヘキサン-アセトニトリル系を用いた液々分配法によるクリーンアップ<sup>2, 4, 9, 10, 14, 15</sup>も報告されている。別に極めて簡便な方法として試料から薬剤をアセトニトリルを用いて抽出し、この抽出液と n-ヘキサンを液々分配後、誘導体化する報告<sup>9</sup>もあるが、この方法では脂肪含量の多い試料 (肝臓、脂身の多い筋肉) の場合、誘導体化が阻害される難点があることからクリーンアップ操作を検討した。SPE 法は使用する溶媒量が少ないため、溶媒留去にも時間を要せず、環境や健康にも好ましいが、カートリッジのロットによる差が見られる場合もあることから溶出条件をロット毎に確認する必要があった。そこで本法では、n-ヘキサン-アセトニトリルを用いた液々分配法を採用した。液々分配は、検体によりエマルジョンを生ずる恐れもあるが、分配後の静置時間をより長くすることでエマルジョンを消失させた。今回検討した牛肝臓及び筋肉については振とう後、10~20 分間の静置時間で充分であった。

### 3. 誘導体化

誘導体化試液には、DMF+無水酢酸+N-メチルイミダゾール混合溶液<sup>2, 3, 20</sup>、トリフルオロ無水酢酸 (TFAA)+N-メチルイミダゾール混合溶液<sup>6, 13, 16, 18, 19, 21</sup>が用いられている。後者の TFAA を用いた方法は、通常極めて僅かな時間 (数秒或いは数分間) で、しかも室温で反応が進むことから近年汎用されている。TFAA を用いた誘導体化法を検討したところ、EPM 以外の薬剤は速やかに誘導体化されたが、EPM は、85°C で 80~90 分間反応させる必要があった。さらに EPM 誘導体は、HPLC のクロマトグラム上ブロードな 3 峰のピークとなり、シャープな 1 本のピークを示さなかった。従って、誘導体化反応は DMF+無水酢酸+N-メチルイミダゾール混合溶液を用いた。なお、誘導体化反応を行うには、水分を完全に除去する必要があることから、試験溶液については溶媒留去を完全に行い、検量線用の標準溶液の希釈には、予めモレキュラーシープで脱水したアセトニトリルを用いた。

DMF 法を用いた場合、誘導体化反応が順調に行われると、濁った黒色の反応液が得られる (淡い色調の反応液は誘導体化が順調に行われていない) が、この反応液を SPE 法、すなわちシリカゲル或いはフロリジルカートリッジを用いてクリーンアップする報告がある<sup>1, 3, 5, 11, 20</sup>。本法では操作を簡略化する目的で反応液を比較的少量の溶媒 (予めモレキュラーシープで脱水したアセトニトリル 5ml) で希釈することで SPE 法によるクリーンアップ操作を省いた。HPLC のクロマトグラム上では、溶媒ピークのベースラインへの戻りが遅くなったが、各薬剤の定量には影響を及ぼさなかった。また、標準溶液、試料溶液合わせて約 300 回近く HPLC に注入したが、カラムの劣化は認められなかった。

### 4. HPLC 条件

6 種類 (7 ピーク) の薬剤の HPLC における分離を検討した結果、カラムに、25cm のオクタデシル系のカラムを用い、移動相は、アセトニトリル+THF+水 (96+3+1) を用いることで良好なクロマトグラムを得ることができた。各薬剤の保持時間は、EPM: 9.14min (RSD=0.138%, n=6), MOX: 10.29min (RSD=

0.162%, n = 6), MIL A3 : 10.69min (RSD=0.15%, n = 6), ABM : 11.48min (RSD=0.19%, n = 6), MIL A4 : 12.08min (RSD=0.144%, n = 6), DOM : 13.40min (RSD=0.13%, n = 6) 及び IVM : 16.10min (RSD=0.10%, n = 6) であった。図1に標準溶液、肝臓ブランク及び筋肉ブランクのクロマトグラムを示した。図に示すようにクロマトグラム上、妨害ピークは肝臓、筋肉ともに認められなかった。

#### 5. 添加回収実験

表1に添加回収実験の結果を示した。肝臓、筋肉いずれも0.25  $\mu\text{g}$ 及び0.1  $\mu\text{g}$  (試料当たり0.05ppm及び0.02ppm) の薬剤を添加し、以下3. 試験溶液の調製の項に従った。平均回収率は、肝臓では0.05ppm添加で70.8~82.0%, 0.02ppm添加で66.4~82.0%の回収率を得、筋肉では0.05ppm添加で72.8~81.0%, 0.02ppm添加で

70.0~82.0%の回収率であった。

#### 6. 検量線及び定量下限値

検量線は、ピーク面積対薬剤濃度をプロットして作成した。MOX, MIL3, ABM, DOM及びIVMは0.005  $\mu\text{g}/5\text{ml}$ ~0.5  $\mu\text{g}/5\text{ml}$ の範囲で直線性を示し、相関係数はそれぞれ  $\gamma=0.999$ ,  $\gamma=0.998$ ,  $\gamma=0.998$ ,  $\gamma=0.998$  及び  $\gamma=0.998$  であった。EPM 及び MIL4は、0.01  $\mu\text{g}/5\text{ml}$ ~0.5  $\mu\text{g}/5\text{ml}$ の範囲で直線性を示し、相関係数はそれぞれ  $\gamma=0.998$  及び  $\gamma=0.998$  であった。

検出限界は、検体ブランクのシグナルとノイズの比 (S/N比) の3倍とし、MOX, MIL3, ABM, DOM及びIVMは0.6ppb, EPM 及びMIL4は1.2ppbであった。定量下限値はS/N比の10倍とし、MOX, MIL3, ABM, DOM及びIVMは2 ppb, EPM及びMIL4は4 ppbであった。

Table 1 Recoveries of 6 drugs from bovine liver and muscle samples

Liver							
Fortification		Found ( $\mu\text{g}$ )					
Level	EPM	MOX	MIL A3	ABM	MIL A4	DOM	IVM
0.25 ( $\mu\text{g}$ )	0.205	0.171	0.181	0.179	0.182	0.177	0.181
	0.201	0.175	0.175	0.175	0.193	0.197	0.193
	0.210	0.188	0.172	0.184	0.174	0.190	0.186
	0.200	0.178	0.170	0.192	0.188	0.188	0.185
	0.209	0.184	0.182	0.187	0.192	0.193	0.184
mean	0.205	0.197	0.177	0.183	0.186	0.189	0.186
SD	0.0045	0.0068	0.0053	0.0066	0.0079	0.0075	0.0044
CV (%)	2.21	3.81	3.02	3.63	4.24	3.98	2.39
Muscle							
Fortification		Found ( $\mu\text{g}$ )					
Level	EPM	MOX	MIL A3	ABM	MIL A4	DOM	IVM
0.1 ( $\mu\text{g}$ )	0.081	0.065	0.068	0.065	0.065	0.077	0.071
	0.082	0.070	0.069	0.069	0.068	0.074	0.076
	0.079	0.066	0.075	0.071	0.067	0.075	0.071
	0.079	0.067	0.060	0.067	0.060	0.076	0.072
	0.087	0.064	0.073	0.071	0.073	0.080	0.080
mean	0.082	0.066	0.069	0.069	0.067	0.076	0.074
SD	0.0033	0.0023	0.0058	0.0026	0.0047	0.0023	0.0039
CV (%)	4.03	3.47	8.38	3.80	7.09	3.01	5.32
Fortification		Found ( $\mu\text{g}$ )					
Level	EPM	MOX	MIL A3	ABM	MIL A4	DOM	IVM
0.25 ( $\mu\text{g}$ )	0.216	0.217	0.215	0.212	0.181	0.213	0.195
	0.203	0.204	0.188	0.197	0.172	0.191	0.185
	0.200	0.197	0.202	0.198	0.195	0.197	0.180
	0.196	0.182	0.173	0.207	0.178	0.187	0.182
	0.201	0.199	0.174	0.191	0.186	0.201	0.191
mean	0.203	0.200	0.190	0.201	0.182	0.198	0.187
SD	0.0076	0.0126	0.0181	0.0084	0.0087	0.0100	0.0063
CV (%)	3.74	6.32	9.53	4.18	4.76	5.06	3.36
Fortification		Found ( $\mu\text{g}$ )					
Level	EPM	MOX	MIL A3	ABM	MIL A4	DOM	IVM
0.1 ( $\mu\text{g}$ )	0.078	0.082	0.071	0.071	0.063	0.062	0.068
	0.083	0.082	0.071	0.069	0.066	0.071	0.071
	0.087	0.083	0.084	0.071	0.069	0.078	0.077
	0.081	0.076	0.070	0.069	0.071	0.068	0.069
	0.083	0.081	0.079	0.081	0.079	0.075	0.067
mean	0.082	0.081	0.075	0.072	0.070	0.071	0.070
SD	0.0033	0.0028	0.0062	0.0050	0.0061	0.0062	0.0040
CV (%)	3.99	3.43	8.27	6.95	8.71	8.78	5.64

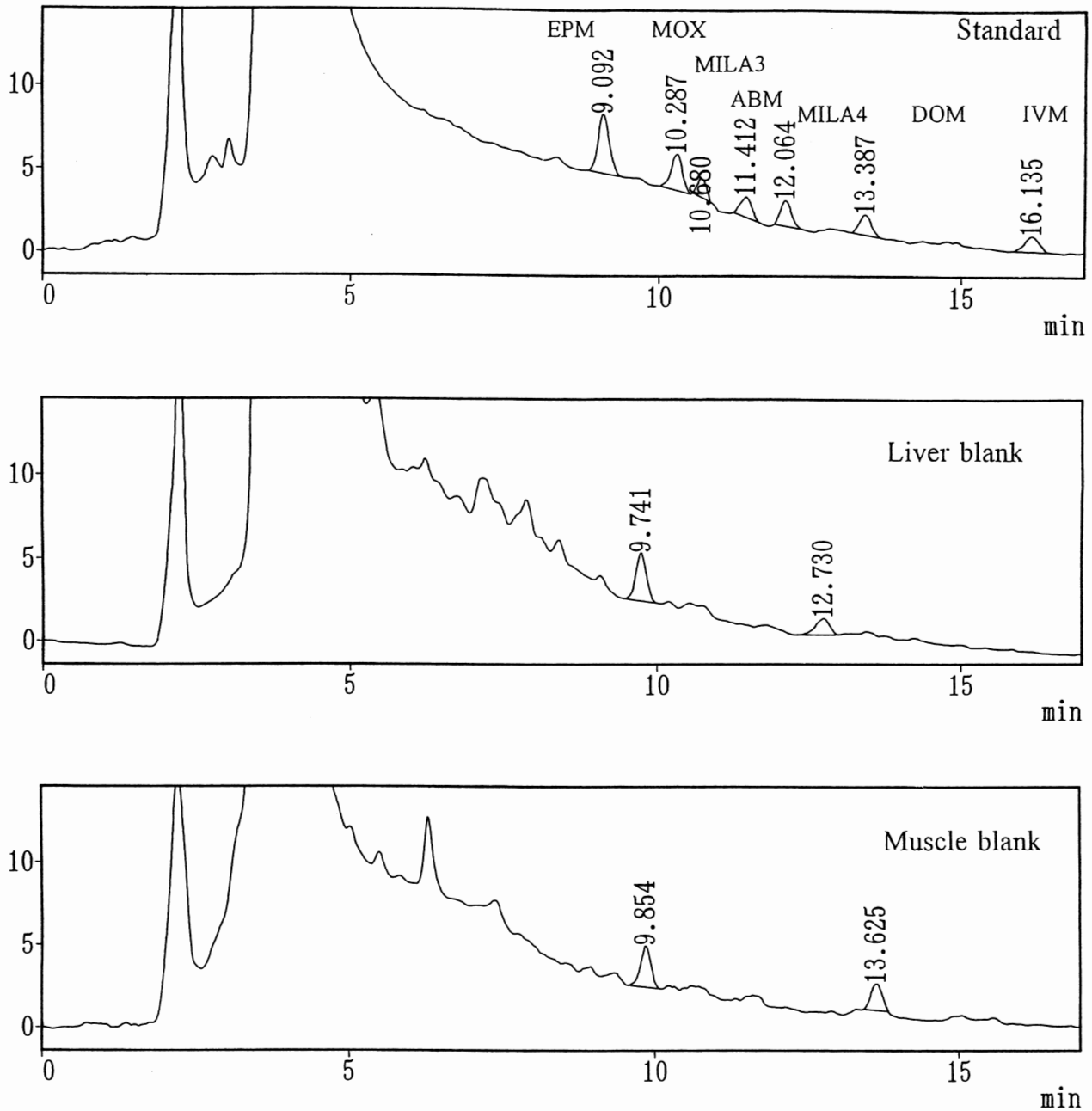


Figure 1. Liquid chromatograms of the fluorescent derivatives of the drugs.  
Standard : limit of quantitation of each drug.

## 文献

- 1) 食品衛生研究会編：平成14年度版食品衛生小六法 254-266  
新日本法規出版株式会社 東京 (2001)
- 2) 中澤裕之, 伊藤祐子, 岡尚男, 竹葉和江, 永田知子, 堀江正一, 宮崎泰之編：動物用医薬品 データブック 147-151  
林純薬工業株式会社 大阪 (1998)
- 3) Schenck, F. J, Barker, S.A., & Long, AR., (1992) : Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and Liquid Chromatographic Determination of Ivermectin in Bovine Liver Tissue.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75, 655-658
- 4) Reising, K.P. (1992) : Rapid Analysis for Ivermectin Residue in Liver and Muscle Tissue by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75, 751-753
- 5) Salisbury, C.D.C., (1993) : Modified Method for the Determination of Ivermectin Residues in Animal Tissues, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 76, 1149-1151
- 6) Abjean, J. P., & Gaugain, M., (1995) : Planar Chromatography for Screening of Ivermectin Residues in Swine and Cattle Tissues, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 78, 1141-1143
- 7) Reising, K.P., & Benedetto, N.M.D., (1998) : Solid-Phase Extraction Cleanup for Ivermectin in Liver Tissue, J.

- Assoc. Off. Anal. Chem., 81, 484-487
- 8) Rupp, H.R., Turnipseed, Walker, C.C., Roybal, J. E., & Long, A.R., (1998) : Determination of Ivermectin in Salmon Muscle Tissue by Liquid Chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 81, 549-553
  - 9) 石井理枝, 堀江正一, 星野庸二, 中澤裕之, (1998) : 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, 食品衛生学雑誌, 39, 42-45
  - 10) Shenck, J. F., & Lagman, L. H., (1999) : Multiresidue Determination of Abamectin, Doramectin, Ivermectin, and Moxidectin in Milk Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 82, 1340-1344
  - 11) Ali, M.S., Sun, T., Meleroy, G.E., & Philippo, E. T., (2000) : Simultaneous Determination of Eprinomectin, Moxidectin, Doramectin, and Ivermectin in Beef Liver with Fluorescence Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 83, 31-38
  - 12) Riet, J.M., Brothers, N.N., Pearce, J.N., & Burns, B.G., (2001) : Simultaneous Determination of Emamectin and Ivermectin Residued in Atlantic Salmon Muscle by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 84, 1358-1362
  - 13) Wei, G.Z., & Li, J.S., (2001) : Improved Method for Determination of Abamectin and Ivermectin in Cattle Plasma, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 84, 1730-1734
  - 14) Khunachak, A., Dacunha, A.R. & Stout, S., (1993) : Liquid Chromatographic Determination of Moxidectin Residues in Cattle Tissues and Confirmation in Cattle Fat by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 76, 1230-1234
  - 15) Stout, S.J., Wickremesinha, E., Cunha, A.R., & Khunachak, A., (2000) : Confirmation of Moxidectin Residues in Cattle Fat by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 83, 1446-1454
  - 16) Paync, L.D., Mayo, V.R., Morneweck, A.A., Hicks, M.B., & Whhner, T.A., (1997) : HPLC-Fluorescence Method for the Determination of Eprinomectin Marker Residue in Edible Bovine Tissues, J. Agric. Food Chem., 45, 3501-3506
  - 17) Ballaardd, J.M., Payne, L.D., Egan, R.S., Wehner, T.A., Rahn, G.S., & Tom, S., (1997) : Development and Validation of an HPLC / MS / MS Method for the Confirmation of Eprinomectin Marker Residue in Bovine Liver, J. Agric. Food Chem., 45, 3507-3510
  - 18) Sundaran, K.M., & Curry, J., (1997) : Determination of Abamectin in some forest matrices by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, J. Liquid Chromatogr. Rel. Techhnol. 20, 1757-1772
  - 19) Yoshii, K., Kaihara, A., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y., (2001) Simutaneous Determination of Emamectin and Its Metabolites, and Milbemectin, Ivermectin, and Abamectin in Crops by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 84, 910-917
  - 20) Chamkasem, N., Papathakis, M.L. & Lee, S.M., (1993) : Liquid Chromatographic Determination of Abamectin in Fruits and Vegetables, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 76, 691-694
  - 21) Ali, M.S., Sun, T., Mcleroy, G.E., & Philippo, E.T., (2000) : Confirmation of Eprinomectin, Moxidectin, Abamectin, Doramectin, and Ivermectin in Beef Liver by Liquid Chromatography / Positive Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 83, 39-52