

TLCによる脂肪組織中のイベルメクチン及びドラメクチンの 同時スクリーニング法

豊橋市食肉衛生検査所 ○三浦義明 山内俊平
細井美博 斎藤富士雄

はじめに

マクロライド系の寄生虫剤であるイベルメクチン並びにドラメクチンは、その高い駆虫効果により国内の家畜に汎用されている。

食肉に残留するイベルメクチンについては、1995年に最大残留基準値(MRL)に基づく食肉規格により法規制され、一方、ドラメクチンはFAO/WHO添加物専門家委員会による討議[1]を経て、近々国内におけるMRLの設定が予想される。

現在、寄生虫剤の残留検査は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析が中心となっているが、告示試験法に基づく検査は繁雑かつ長時間に及ぶ。演者らは前回[2]、HPLCを用いたイベルメクチンの迅速分析法を示し、これにより検査時間の大幅短縮と多頭数検査が可能となった旨を報じた。その一方で、HPLC分析には高価な機器とその維持管理、高度な専門性を必要とする等のデメリットもみられる。

そこで今回、Abjean[3]らによる薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いたイベルメクチン分析法を参考にイベルメクチンとドラメクチンのTLC同時検査法を検討したところ、比較的良好な成績が得られた。

材料及び方法

1 TLCによるスクリーニング法の検討

(1) 試料及び試薬

試料は豚及び牛の脂肪組織を用いた。イベルメクチン標準品は林純薬工業(株)製を使用し、厚生省通知(衛乳241号、H11.12.22)に従い溶解希釈して標準溶液とした。ドラメクチン標準品はファイザー製薬(株)製を使用し、10mgを100mlのメタノールに溶解し、適宜メタノールで希釈し標準溶液とした。C18カートリッジはWaters社製SepPak Vac 1cc(100mg)を用い、アセトン1ml、0.1%トリエチルアミン溶液1mlの順にコンディショニングしてから使用した。アセトニトリルはHPLC用を、その他の試薬はすべて特級を使用した。

(2) 方法

① TLC 試験溶液の調製方法

試料 1g にアセトニトリル 3ml を加え、1 分間ホモジナイズし、3,000rpm、5 分間遠心分離した。ホモジナイザーをイソオクタン 3ml で洗浄し、上述の操作で得られた上清を加え、超音波洗浄槽で 2 分間抽出分配し、3,000rpm、5 分間遠心分離した。アセトニトリル相を 1.5ml 分取して 100℃ のブロックヒーターまたは水浴上で乾固し、室温まで冷却後、残留物に 1-メチルイミダゾール-アセトニトリル (1:1) 200 μ l、トリフルオロ無水酢酸-アセトニトリル (1:2) 300 μ l を加え、室温で数秒間蛍光誘導体化した。反応液に蒸留水 500 μ l を加え、コンディショニングした C18 カートリッジに負荷し、アセトン-水 (1:1) 1ml で洗浄した後、アセトン 1ml で溶出した。溶出液を 100℃ のブロックヒーターまたは水浴上で乾固し、室温まで冷却後、残留物をアセトン 20 μ l で溶解し、この溶解液を TLC の試験溶液とした。なお、蛍光誘導体化以降の操作は、遮光器具を用いて間接照明下で行った。

② TLC 条件

薄層板：ANALTEC 社製 SILICA GEL G、展開溶媒：イソオクタン-酢酸エチル (1:1)、
展開方法：上昇法 (7 cm)、スポット量：5 μ l、励起波長 366nm

2 枝肉脂肪組織からのイベルメクチン及びドラメクチンの検出状況

本法を用いて 2001 年 8 月にと畜場で解体処理された豚 75 頭、牛 50 頭の脂肪組織を試料として残留検査を実施した。なお、イベルメクチン及びドラメクチンは HPLC による同時分析が可能 [2] [4] [5] であることから、TLC 検査を実施した全試料は既報の方法で HPLC 分析し、残留を認めた場合は、厚生省告示第 370 号による試験法により定量した。

成 績

1 添加試験

標準品を用いて試験したところイベルメクチンは R_f 値 0.56 に、ドラメクチンは R_f 値 0.53 に蛍光スポットを認めた。添加試験はイベルメクチンを豚脂肪に 20ng/g、牛脂肪に 40ng/g、ドラメクチンを豚脂肪に 20ng/g になるよう添加して実施したところ、いずれも標準品と同じ R_f 値に明瞭な蛍光スポットを認めた。検出限界はいずれも 10ng/g であった。なお、今回は R_f 値 0.50 から 0.60 にスポットが確認された試料は全て陽性として判定した。

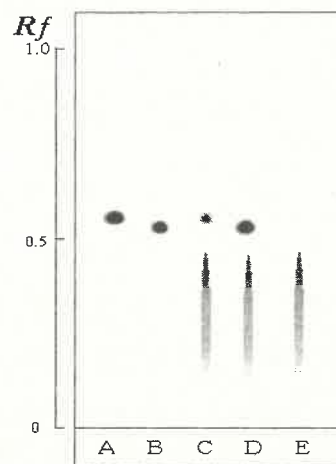


図 1 代表的薄層クロマトグラム

A:イベルメクチン標準品, B:ドラメクチン標準品, C:イベルメクチン陽性検体, D:ドラメクチン陽性検体, E:陰性検体

2 枝肉脂肪組織からのイベルメクチン及びドラメクチンの検出状況

本法により豚脂肪75検体中6検体（いずれも繁殖用豚脂肪）が陽性となり、これらTLC陽性6検体のHPLCによる分析では、イベルメクチンが1検体(0.032ppm)、ドラメクチンが5検体(0.012~0.490ppm)から検出(図2)された。なお、本法による陽性6検体は全てRf値によるイベルメクチンとドラメクチンの判別が可能で、HPLCによる分析結果とも一致した。本法で陰性であった試料のうちHPLCで残留が確認されたものはドラメクチン1検体(繁殖用豚脂肪; 0.006ppm)であった。

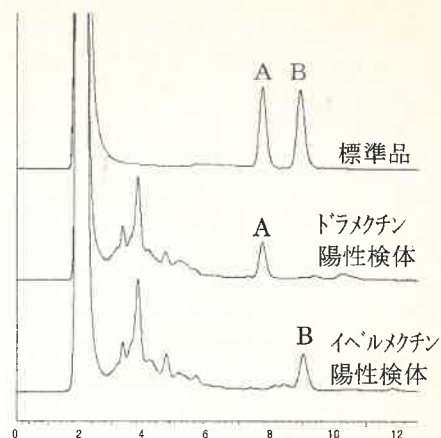


図2 告示法による代表的な高速液体クロマトグラム

A:ドラメクチン, B:イベルメクチン

考 察

演者らが東三河家畜保健衛生所の協力を得て管内家畜飼養農家における寄生虫剤の使用状況調査(2000年4月~2001年3月)を実施したところ、今回、TLC検査法を検討した両剤は、他の駆虫剤と比較していずれも高使用率であった(牛飼養農家;イベルメクチン7.2%、養豚農家;イベルメクチン56.6%ドラメクチン23.8%)。このように畜産業において使用頻度の高いイベルメクチンとドラメクチンは脂肪蓄積性で体内残留性が高い特性も有し、食肉の規格検査において特に重要視する動物用医薬品と考えられる。

TLCによる本法は、特異性及び検出感度共に良好で、食品分析における法定基準値を満たすものであった。さらに高度分析機器を要せず、その手技も比較的簡易であること、加えて多検体の同時定性が可能なることから、スクリーニング検査法として十分有効と考えられる。なお、本法はAbjeenらの方法と比べ検出感度は劣るが、検査が短時間で可能なこと、使用する有機溶剤の種類及び量が少ないこと、2剤の同時分析という点で優れていると思われる。

[1] WHO Technical Report Series: "Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food", No. 864 (1996)

[2] 平成12年度食肉衛生技術研修会衛生発表会資料, 161~163

[3] Abjean, J.-P., Gaugain, M.: J. AOAC Int. 78, 1, 141~1, 144 (1995)

[4] 石井里枝、堀江正一、星野庸二、中澤裕之: 食衛誌, 39-1, 42-45 (1998)

[5] 小田和則、大島克司、上條光喜、原田芳明、五味純、平山功: 神奈川県食肉検