

蛍光検出 HPLC による豚脂肪組織中イベルメクチンの確認法

豊橋市食肉衛生検査所 ○大島由美 齊藤奈穂子 松田克也
山内俊平 細井美博 齋藤富士雄

はじめに

マクロライド系寄生虫剤イベルメクチン (IVM) は、世界の動物用医薬品販売高のトップを占め[1]、当所管内では豚、特に繁殖豚に汎用されている[2]。本剤の体内残留性及び毒性を併せて考慮すると、食肉への残留監視を最重視すべき薬剤と考えられる。

前回、我々は、脂肪組織を用いた蛍光検出 HPLC 法による IVM 迅速分析法 (スクリーニング分析法) を示し、本法を日常のスクリーニング検査に導入することで高い行政効果が得られたことを報告した[3]。一方、これら蛍光検出 HPLC 法を用いた場合、検査結果の信頼性確保のためには、別に確認試験を実施することが望まれる。当所では、スクリーニング分析法で IVM 陽性となったものにつき、告示試験法により再分析 (確認定量検査) することで検査精度の確保に努めている。しかし、告示試験法は検査に長時間を要することから、より迅速簡易に行える確認法の導入が望まれる。

そこで今回、これまでのスクリーニング分析結果から本剤を確認同定する上で参考となるいくつかの事例とこれらに係る迅速確認法について検証したので報告する。

材料及び方法

1999年6月～2002年10月に実施した豚2021頭のスクリーニング分析法[3]によるIVM残留検査で、IVM標準品と一致する溶出ピーク ($>0.01\text{ppm}$; 時間差 ± 0.1 分以内) が検出された豚64頭(3.1%)の脂肪組織について告示試験法による再分析を実施したところ、57頭(2.8%)で同様にIVMが検出されたが、7頭(0.3%)ではIVM未検出であった(図1、2)。極めて低率ではあるがフィールド試料によってはスクリーニング分析法においてIVMと完全分離されない夾雑物質の存在が判明したことから、今回IVMとこれら夾雑物質を迅速簡易に分離する方法(確認法)について検討した。

1. IVM 標準品保持時間との統計学的検証

告示試験法でIVM陽性となった任意20試料とIVM陰性7試料のスクリーニング分析法におけるIVM標準品保持時間との誤差(絶対値)を比較検討した。

2. HPLC 分析条件等の変更

告示試験法でIVM陽性となった任意3試料とIVM陰性7試料についてスクリーニング

分析法における分析条件を次のとおりとし、それぞれについて再分析を行った。

移動相組成：97%メタノールから93%アセトニトリルに変更し分析した。

蛍光誘導体化条件：1-メチルイミダゾール 600 μ l 及びトリフルオロ無水酢酸 400 μ l により室温で10分間誘導体化する方法から、告示試験法に準じジメチルホルムアミド-1-メチルイミダゾール-無水酢酸（9：2：3）1mlで100 $^{\circ}$ C90分間誘導体化後、シリカゲルカートリッジを用いて精製したものを分析試料とした。

成績

1. 告示試験法でIVMと同定された試料（n=20）とIVM陰性となった試料（n=7）のスクリーニング分析法におけるIVM標準品保持時間との誤差の絶対値は、それぞれ平均 0.010 ± 0.011 分、 0.050 ± 0.017 分で、有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた。

2. 告示試験法でIVMと同定された3試料は、移動相組成又は誘導体化条件を変更した場合のいずれもIVM標準品に一致する溶出ピークが検出されたが、告示試験法でIVM未検出であった7試料からは、標準品に一致するピークを認めなかった（図3、4）。また、併せて実施した聞き取り調査においても上記57試料の生産農家では、いずれもIVMの使用が確認され、7試料の生産農家ではIVM未使用であり検査成績との整合性が認められた。

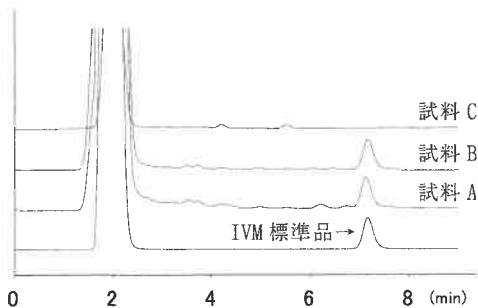


図1 スクリーニング分析法による豚脂肪組織の代表的クロマトグラム
(A及びB：IVM陽性、C：IVM陰性)

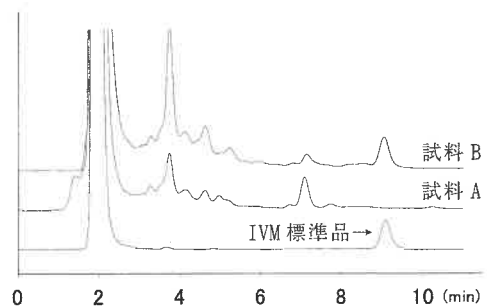


図2 試料A及びB（図1）の告示試験法によるクロマトグラム

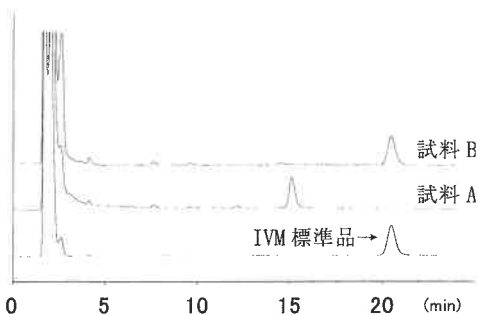


図3 スクリーニング分析法の一部変更（移動相組成）による試料A及びB（図1）のクロマトグラム

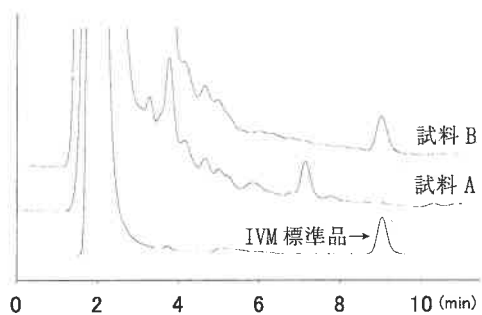


図4 スクリーニング分析法の一部変更（蛍光誘導体化条件）による試料A及びB（図1）のクロマトグラム

考 察

1995年に食肉中IVMの残留検査法(告示試験法)が示された。同法は抽出分配を繰り返すことで精製され、高いクリーンアップ効果が期待できる精度の高い分析法である反面、検査に長時間(約5時間)を要することから多頭数のサンプリング検査には不向きである。そこで前回、我々は石井ら[4]の方法を参考に迅速スクリーニング分析法を報告した。本法は試料中IVMをアセトニトリルで抽出、ヘキサン分配(1回)後に濃縮乾固し、Montigny[5]らが報告した迅速誘導体化を施した簡易なもので、これにより検査時間の大幅な短縮(約50分)が図られるとともに添加回収試験では十分Codex規格に適合するものであった。

本法を用いて1999~2002年に残留IVMのスクリーニング検査に供した豚2021頭中64頭の脂肪組織からIVM標準品に一致する溶出ピーク(>0.01ppm)が検出されたが、そのうち7頭の脂肪組織からは告示試験法ではIVMの残留は確認されなかった。このことから、本法は迅速に検査が行える半面、低率ではあるがフィールド試料の性状によっては溶出時間がIVM標準品にほぼ一致する夾雑ピークにより擬陽性となることが判明した。しかし、同夾雑ピークは、材料及び方法に示したHPLC分析条件の変更を行うことで容易にIVM標準品ピークと分離されたことからいずれの方法もIVMの迅速確認法として有効と考えられる。

今回、スクリーニング分析法で7試料に見られたIVM標準品に溶出時間がほぼ一致する夾雑物質は、2001年12月以降の5養豚農場から出荷された豚試料にのみ見られ、確認法及び告示試験法においても、それぞれ同一の保持時間にあったことから同一性状のマクロライド系寄生虫剤が疑われ精査したところ、いずれのピークもモキシデクチン標準品の溶出時間と一致した。このことから、5養豚農場に対して改めて聞き取り調査を実施したところ、回答のあった3農場では、いずれも牛用のモキシデクチン製剤(外用剤:ポアオン剤)が豚に流用されていた。本剤は、豚肉において残留基準値は設定されていないが、豚への投与は薬事法に基づく使用基準違反(但し書規定除く)に当る。各生産農家へは使用基準遵守を指導する一方、検査においては、IVM、モキシデクチン、近い将来基準値設定が予想されるドラメクチン等を加えた迅速かつ高感度なマクロライド系寄生虫剤の同時分析法の確立が望まれ、これを今後の課題として更なる食肉の安全性確保に努めて行きたい。

[1] 細貝祐太郎、松本昌雄:動物用医薬品・飼料添加物, 22(2001)

[2] 高嶋拓也他:平成13年度食肉衛生技術研修会衛生発表会資料, 92~94

[3] 三浦義明他:平成12年度食肉衛生技術研修会衛生発表会資料, 161~163

[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] De Montigny, P.他:J. Pharm.Biomed.Anal. 8, 507~511(1990)