

蛍光検出HPLCによる豚血液中イベルメクチンの

迅速分析と食肉残留モニター効果

豊橋市食肉衛生検査所 ○齊藤奈穂子、吉田亜希子、松田克也、大島由美
高嶋拓也、山内俊平、細井美博、齋藤富士雄

はじめに

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(1998年)を占め、国内では、豚、特に繁殖豚に多用される。管内の養豚農場調査(1999~2001年)でも、56.6%の農家で繁殖豚への本剤の使用が認められた。加えてIVMは体内残留性も高く、当所での豚の残留動物用医薬品検査(1999~2003年)において規格違反率(2,549頭中35頭(1.3%))の最も高い薬剤である。今後も本剤の食肉への残留監視が重要となるが、告示試験によるIVMの分析は長時間を要する。そこで、当所では石井らの報告した脂肪組織中の迅速IVM分析法を日常のスクリーニング検査に利用し、多頭数検査を実施している。しかし、脂肪組織からIVMを抽出分配するには、多量の有機溶剤を必要とし、検査者へのばく露リスクや操作性の面で改善の余地が残る。

今回、我々は前処理が簡易な血液を材料とし、これらの問題解決と一層の迅速化を図った。併せてと畜豚の脂肪組織と血清中のIVM量を比較定量し、本法が豚脂肪組織における規格基準値レベルのIVMの残留監視に十分な感度を有するか検証した。

材料及び方法

1 豚血液中IVMの迅速分析法の検討

豚放血約10mlをファーストチューブ(日水製薬(株))に採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して得られた血清のうち2mlを小試験管に採り、メタノール(MeOH)8mlを加え混和した後、3,000rpmで5分間遠心分離する。上清に蒸留水を加え20mlに定容したものを、MeOH 5ml、蒸留水 5mlでコンタミネーションしたカートリッジ(Sep-Pak Plus C18:Waters社製)に負荷し、50%MeOH 10mlで洗浄後、MeOH 10mlで50mlのフラスコ内に溶出した。溶出液を60℃以下で減圧乾固した後、残留物に1-メチルピピリジン 300 μ l、トリフルオロ酢酸 200 μ lを加え十分に混和し、MeOH 300 μ lを加え攪拌後、室温・遮光下で5分間蛍光誘導体化を行い、試験溶液とした。標準品は林純薬工業(株)製を使用し、厚生労働省通知(H13.11.20 食基発第50号)に従い溶解希釈し標準溶液とした。HPLC及び蛍光検出器は、島津製作所(株)製LC-10AシステムとRF10Aを、分析カラムにMightysil RP-18GP 150-4.6(5 μ m)(関東化学(株)製)、移動相にMeOH-水(97:3)を用い、流速1.0ml/min、カラム温度40℃、注入量80 μ l、励起波長360nm、蛍光波長460nmで測定した。

2 と畜豚の血清と脂肪組織における IVM の定量

2002年8月から2003年9月にと畜した豚で脂肪組織にIVMの残留を認めたもの61頭と陰性対象として残留を認めなかったもの42頭の血清中のIVMを定量した。なお、血清中のIVMは本法を、脂肪組織中のものは石井ら(食衛誌, 39-1,42-45(1998))の方法に準じ、いずれも検量線法により定量した。

成 績

1 検量線および添加回収試験

検量線は0.02~10ngの範囲で良好な直線性($r^2 \geq 0.995$)を示し、0.1ng/ml、1ng/mlおよび5ng/mlの濃度における添加回収率($n=5$)は各々 $82.4 \pm 14.8\%$ 、 $97.6 \pm 6.7\%$ および $95.2 \pm 7.1\%$ 、変動係数は18.0%、6.9%および7.5%といずれも良好な成績が得られた。検量線の直線域から判断される本法の定量下限は0.1ng/mlで、検査時間は、脂肪組織を用いた石井らの方法に比べ1試料あたり約10分短縮した。

2 と畜豚の血清と脂肪組織における IVM の定量

脂肪組織に残留を認めた61頭中43頭(70.4%; 1.72~72.2ng/g)で血清からIVM(0.1~2.14ng/ml)が検出され、血清のIVM量(Y (ng/ml))と脂肪組織のIVM量(X (ng/g))の間には $Y = 0.03X + 0.13$ (相関係数0.76)の比較的強い正の相関が得られた。また、血清からIVMが検出されなかった18頭(29.5%)の脂肪組織のIVM量は、平均2.5ng/g(1.16~6.0ng/g)ときわめて低濃度であった。なお、陰性対象42頭では、いずれも血清からIVMは検出されなかった。

考 察

血清のIVM濃度は脂肪組織中の数%程度が予想されたため、本法では前処理に固相抽出法を用いてクリーンアップ効果を高めるとともに、蛍光誘導体化試薬の量を必要最小限に抑え濃縮率を高めることで検出感度の向上を図った。その結果、本法は検査感度および迅速性において満足できる成績が得られ、また、試験管内で抽出が行えるため操作性にも優れ、加えて使用する有機溶剤が少量で済むことから検査者のばく露リスク回避の上からも有効なものであった。次に、脂肪組織にIVMの残留を認めた豚61頭について、本法を用いて血清中のIVMを定量した。その結果、43頭で血清からもIVMが検出され、両試料のIVM量には比較的強い正の相関が得られた。なお、血液からIVMが検出されなかった18頭の脂肪組織のIVM量は法定残留基準値のおよそ5~30%ときわめて低濃度であり、また、陰性対象(脂肪組織)42頭の血清からはIVMは検出されなかった。以上から本法は脂肪組織に残留する法定基準値レベルのIVMをモニターするのに十分な検出感度と精度を有するものであった。