

牛肉中の駆虫剤（トリクラベンダゾール）分析法の改良

藤田瑞香* 永吉晴奈* 尾花裕孝*

牛肉中の残留トリクラベンダゾール分析法を改良し、誘導体化効率の改善を図った。牛肉への添加回収試験では、通知法と比較して回収率が15%程度改善し、6検体での平均回収率は80.1%、相対標準偏差は4%と良好な結果が得られた。

キーワード： 駆虫剤、トリクラベンダゾール、高速液体クロマトグラフィー、誘導体化

Key words: Anthelmintic, Triclabendazole, HPLC, Derivatization

トリクラベンダゾールは、ベンゾイミダゾール系駆虫剤の一種で、牛の筋肉では残留基準値が0.2mg/kgと設定されている。この残留基準はトリクラベンダゾールおよびその代謝物の誘導体である5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-ベンズイミダゾール-2-オン（以下ケトトリクラベンダゾール）として設定されており、誘導体化が必要である。厚生労働省が個別試験法としてトリクラベンダゾール試験法を通知しているが¹⁾（以下、通知法）、試料由来成分の影響により誘導体化効率が低下する傾向が認められた。そこで今回、試料由来成分を減少させ、誘導体化効率を改善させるための検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

大阪府内で市販されていた牛肉を用いた。

2 試薬および器具等

2-1 標準品

トリクラベンダゾールは和光純薬工業(株)製を用いた。

2-2 試薬および器具

アセトニトリル、メタノール：関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬

酢酸、過酸化水素、リン酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製試薬特級

その他の試薬：和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬

水：ミリポア社製MILLI-Q SP. TOC.により精製して用いた

固相抽出カラム：Varian BOND ELUT C18 500mg（以下ODSカラム）、Varian BOND ELUT-FL 1g（以下フロリジルカラム）

メンブランフィルター：アドバンテック東洋(株)製DISMIC(親水性PTFE, 13mmφ, 0.45μm)

3 装置および測定条件

3-1 装置

高速ホモジナイザーはポリトロンPT10(KINEMATICA社製)、遠心分離機はhimac CR5B2(日立工機(株)製)を用いた。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)はWaters PDA System 996(Waters社製)を用いた。

3-1 分析条件

分析カラム：GL Sciences Inertsil ODS-3 (250×4.6mm, 3μm)

カラム温度：40℃ 流速：1mL/min 注入量：100μL

移動相：25mmol/L リン酸一ナトリウム：アセトニトリル：

メタノール (18：41：41)

検出波長：297nm

4 抽出および精製方法

4-1 抽出

試料5gを量りとり、アセトニトリル25mLおよび無水硫酸ナトリウム10gを加えてホモジナイズ後、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行い、アセトニトリル層を分液ロート中に移した。残留物にアセトニトリル25mLを加え攪拌後、同

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Improvement of Official Method for Residue Analysis of Anthelmintic (Triclabendazole) in Bovine Muscle.
by Mizuka FUJITA, Haruna NAGAYOSHI, Hirota OBANA

様に遠心分離を行い、アセトニトリル層を分液ロートに移して合わせた。ここに *n*-ヘキサン 25mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とう後、静置した。アセトニトリル 10mL を注入して前処理したフロリジルカラムに、分液ロート中のアセトニトリル層を通過させ、ナスフラスコに採取した。分液ロート中の *n*-ヘキサン層にアセトニトリル 5mL を加えて穏やかに振り、アセトニトリル層をフロリジルカラムに通過させ、ナスフラスコに合わせた。*n*-プロパノール約 10mL を加え、40℃以下で減圧乾固した。残留物にジクロロメタン約 5mL を加えて溶かし、ナスフラスコをジクロロメタン約 5mL で洗い込み、反応用耐圧試験管に移して窒素気流下で濃縮乾固した。

4-2 誘導体化

残留物にエタノール 1mL 及び酢酸 1mL を加えて溶かし、過酸化水素 1mL を加えて密栓し、よく振り混ぜた後、100℃で 2 時間加熱し、室温になるまで放置した。これに水 7mL を加え、よく振り混ぜた。

4-3 精製

メタノール 5mL および水 10mL で前処理した ODS カラムに誘導体化で得られた溶液を注入した後、水 10mL で洗浄した。メタノール 10mL で溶出し、40℃以下でメタノールを除去した。残留物に 85%アセトニトリル水溶液 1mL を加えて溶かして測定溶液を調製し、メンブランフィルターでろ過して HPLC で測定した。

結果および考察

1 LC 条件の検討

通知法では測定溶液にメタノールを用いているが、移動相に比べて極性が高く HPLC 測定時にピーク形状が著しく悪化した。そこで 85%アセトニトリルに溶解したところピーク形状は改善された。ケトトリクラベンダゾールの極大吸収波長付近で試料由来の妨害成分による吸収が少ない 297nm で定量を行った。

2 検量線および定量下限

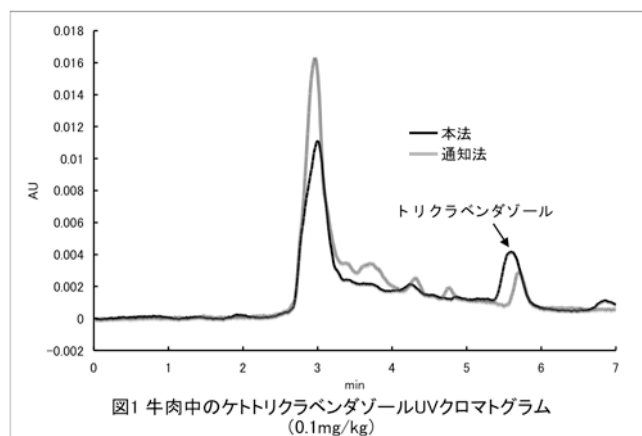
ケトトリクラベンダゾールとして 0.025~1.0mg/L となるように 0.0275~1.1mg/L のトリクラベンダゾール標準溶液を調製し、誘導体化、精製操作を行った。ケトトリクラベンダゾールとして検量線を作成したところ、決定係数 $r^2=0.999$ 以上の良好な直線性が認められた。

定量下限はケトトリクラベンダゾールとして 0.01mg/kg

であった。

3 前処理方法の検討

通知法では、アセトニトリル抽出後、ヘキサンによる脱脂を行い、アセトニトリル層を濃縮乾固して誘導体化を行っている。しかしこの方法では試料由来成分が多く、誘導体化効率が低下し、回収率に影響を与えていたと考えられた。抽出液を濃縮乾固後、残留物をエタノールに溶解すると著しく着色していた。また、ジクロロメタンを用い反応用耐圧試験管に移す時にジクロロメタンに溶解しない成分が多く認められた。このことから妨害成分は極性の高い成分であると考えられた。そこで、厚生労働省の通知試験法である HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 II (畜水産物)¹⁾ を参考にフロリジルによる精製を検討した。アセトニトリル抽出液をフロリジルカラムに通過させることにより高極性の妨害成分を吸着させることができ、ジクロロメタンに溶解しない成分が減少した。これにより誘導体化効率も改善できたと考えられた。牛肉に通知法と本法の前処理を行って得られたクロマトグラムを図1に示した。保持時間3分付近の妨害ピークが減少し、6分付近のケトトリクラベンダゾールのピークが大きくなっていることが確認できる。



4 添加回収実験

あらかじめトリクラベンダゾールが含有していないことを確認した牛肉にトリクラベンダゾールを 0.1mg/kg 添加し、回収率を求めた (n=6)。平均回収率は 80.1%で、相対標準偏差は 4%と良好な結果が得られた。通知法と比較して回収率が 15%程度向上し、フロリジルカラムによる精製によって回収率の改善を行うことができた。

以上の結果より本法は、牛肉中のトリクラベンダゾール試験法として日常検査業務に十分使用できると考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長「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(通知)」平成17年1月24日，食安発第0124001号(2005)