

Fig. 6 Body weight curve in rasH2 or Non-Tg female mice treated with DMA  
For 26 weeks (Exp. II)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書（平成10年度）

## 畜水産食品中の化学物質残留防止対策に関する研究 動物用医薬品の検査方法の確立

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

### 研究要旨

動物用医薬品のうち、内寄生虫用剤のトリクラベンダゾール及びモキシデクチンについて、畜水産食品中の残留検査法を検討した。定量下限は FAO/WHO 合同食品規格委員会（コーデックス委員会）が設定したコーデックス規格の 1/2 ないし 1/10 を目標として検討した。また検査法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準を参考に、コーデックス規格レベル濃度（規格レベル）での添加回収試験における回収率と相対標準偏差から評価した。

トリクラベンダゾールの検査法は、トリクラベンダゾール及びその代謝物を酸化した後、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。

トリクラベンダゾールの定量下限は、肝臓、筋肉及び脂肪においてそれぞれ 0.01ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 85%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

モキシデクチンの検査法は、イベルメクチン試験法（平成7年12月厚生省告示第218号）を基に、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。

モキシデクチンの定量下限は、筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳においてそれぞれ 0.005ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 90%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

本研究で確立した残留検査法は、5 試験研究機関による標準化の結果、畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査法として実用に適すると評価された。

### A. 研究目的

平成7年12月、平成9年3月に食品衛生法が改正され、計11品目の動物用医薬品の食品への残留基準が食品・添加物等の規格基準において新たに設定され、さらに4品目の動物用医薬品の食品への残留規格基準について諮問された。新たに諮問された4品目の動物用医薬品のうち、抗生物質のスピラマイシン及びベンジルペニシリンについては、平成9年度本研究事業において残留検査法を確

立した。本年度は、残り2品目の動物用医薬品、内寄生虫用剤のトリクラベンダゾール及びモキシデクチンについて残留検査法を検討した。

検査法の定量下限は、FAO/WHO 合同食品規格委員会（コーデックス委員会）が設定したコーデックス規格の 1/2 から 1/10 を目標とした。また検査法を評価するために、試験研究機関5カ所により添加回収試験及び残留実態調査を行った。

## I.トリクラベンダゾールの検査方法の検討

### I-B.研究方法

トリクラベンダゾールは、生体内で代謝されて5種類の代謝物を生じるため、本体及び代謝物合わせて6種類の化合物が残留物として知られている。コーデックス委員会の規格では、本体及び2種類の代謝物を酸化処理して生じる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-オンを標的化合物として基準が定められている。

本研究においては、コーデックス委員会の推奨する検査法に従い、トリクラベンダゾール本体及び2種類の代謝物を酸化処理して生じた、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-オンをHPLCにより測定する方法を検討した。また、コーデックス委員会の推奨する検査法は、抽出及び精製操作が煩雑で時間を要するため、抽出及び精製操作については、日本においてすでに告示されている、フルベンダゾール(平成7年12月厚生省告示218号)、チアベンダゾール(平成9年3月厚生省告示72号)等の試験法を基にして検討をおこなった。

#### I-B-1.試料及び試薬

##### 1)試料

牛及び豚の筋肉、肝臓を用いた。

##### 2)試薬

- ・トリクラベンダゾール (5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylthio-1H-benzimidazole、99%以上、ノバルティスアグロ社製)
- ・トリクラベンダゾール-SO 体 (5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methanesulfinyl-1H-benzimidazole、

98%、ノバルティスアグロ社製)

- ・トリクラベンダゾール-SO<sub>2</sub> 体 (5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methanesulfonyl-1H-benzimidazole、

99%、ノバルティスアグロ社製)

- ・トリクラベンダゾール-O 体 (5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-benzimidazole-2-one、99%、ノバルティスアグロ社製)

- ・アセトニトリル、エタノール、30%過酸化水素水、酢酸、n-プロパノール、n-ヘキサン、メタノール、硫酸ナトリウム (以上試薬特級)

- ・Sep-Pak C18 (360mg、Waters社製)、メタノール10mlで洗浄して使用した。

#### 3)器具及び装置

- ・遠沈管 (50ml)
- ・ネジ栓付試験管 (10ml)
- ・ナス形フラスコ (100、50ml)
- ・分液ロート (100ml)
- ・高速ホモジナイザー
- ・振とう装置
- ・遠心分離装置
- ・ロータリーエバポレーター
- ・ブロックヒーター
- ・高速液体クロマトグラフ (フォトダイオードアレイ検出器付)

#### I-B-2.操作

##### 1)試料溶液の調製

試料5gを50ml遠沈管にとり、アセトニトリル 25ml及び無水硫酸ナトリウム10gを加えて2分間ホモジナイズした。3,000rpm、5分間遠心分離後、アセトニトリル層を100ml分液ロートに移した。これにアセトニトリル飽和ヘキサン25mlを加えて5分間振とう後、アセトニトリル層を100mlナス形フラスコに移した。遠沈管の残留物にアセトニトリル25mlを加え、1分間振とう、または超音波洗浄器中でかき混ぜ

た後、上記と同様の条件で遠心分離を行った。アセトニトリル層をとり、先に分離したアセトニトリル飽和ヘキサンの入った分液ロートに移し、5分間振とうした。アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と同じナス形フラスコに合わせ入れ、n-プロパノール10mlを加え、ロータリーエバポレーターで1mlになるまで濃縮した。濃縮液を少量のアセトニトリルで洗い出し、10mlネジ栓付試験管に移し濃縮乾固した。

残留物にエタノール1ml、酢酸1ml、30%過酸化水素水1mlを加えて密栓し、ブロックヒーターで100°、2時間加熱した。室温まで放冷した反応液をSep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジカラムに負荷し、負荷液は捨てた。次いでメタノール10mlで溶出し、溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。残留物にメタノール1mlを加えて溶解し、20 $\mu$ lを高速液体クロマトグラフィーの試験溶液とした。

## 2)HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ：東ソー製
- ・フォトダイオードアレイ検出器：大塚電子製
- ・カラム：Wakosil-II 5C<sub>18</sub> HG、4.6mm ID×150mm（和光純薬工業社製）
- ・移動相：アセトニトリル-25mMリン酸一ナトリウム（5:5）
- ・流速：1.0ml/min
- ・測定波長：295nm

## 3)定量方法

トリクラベンダゾール標準品のメタノール溶液（100 $\mu$ g/ml）をエタノールで適宜希釈して、その1mlを10mlネジ栓付試験管に採り、酢酸1ml、30%過酸化水素水1mlを加えて密栓した。以下、1)と同様に加熱酸化、Sep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジカラム処理を行い、HPLCでピーク面積による絶

対検量線法により定量した。

## I-C.研究結果

### 1)試料溶液の調製

コーデックス委員会の推奨する検査法は、ジクロロメタン等の有害性の高い溶媒を用いる上、6段階の液-液分配及び固相抽出を要するため、煩雑で時間を要する。一方、日本においては同系統の化合物であるフルベンダゾール、チアベンダゾール等の試験法がすでに告示されているので、これを基にして検討をおこなった。

フルベンダゾール、チアベンダゾール等の試験法では、精製効率を上げるために酢酸エチルで抽出した後に、アセトニトリル-ヘキササン分配を行っているが、トリクラベンダゾールは、抽出後に酸化反応を行った結果、夾雑物の妨害ピークが認められなくなったため、アセトニトリルで抽出した後に、アセトニトリル-ヘキササン分配を行い、酸化反応を行うことにした。反応時間は検討の結果、2時間が最も適していた。

酸化反応後の試料溶液の精製は、コーデックス委員会の推奨する検査法ではシリカゲルカラムを用いているが、Sep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジカラムを用いることにより、十分な精製効果が得られた上に、必要とする溶媒、操作手順、時間の削減を図ることができた。

### 2)添加回収試験

牛及び豚の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、筋肉に0.2ppm添加の時、回収率97~103%、肝臓に0.3ppm添加の時、回収率88~92%であり、相対標準偏差は1~3%（n=3）であった。

本法による定量下限は0.01ppmであり、残留基準値の1/10以下であった。

トリクラベンダゾール分析法フローシート

試料5g

硫酸ナトリウム10g  
アセトニトリル25ml  
ホモジナイズ2分間  
遠心分離3,000rpm、5分間

アセトニトリル層

残留物

アセトニトリル飽和ヘキサン25ml  
振とう5分間

アセトニトリル25ml  
振とう1分間  
遠心分離3,000rpm、5分間

アセトニトリル層

ヘキサン層

アセトニトリル層

残留物

振とう5分間

アセトニトリル層

ヘキサン層

n-プロパノール10ml

1mlまで濃縮

濃縮液

アセトニトリル少量で10mlネジ栓付試験管に移し、濃縮乾固

残留物

エタノール1ml  
酢酸1ml  
30%過酸化水素水1ml  
100°、2時間

反応液

C18カートリッジカラムに負荷

メタノール10mlで溶出

溶出液

濃縮乾固

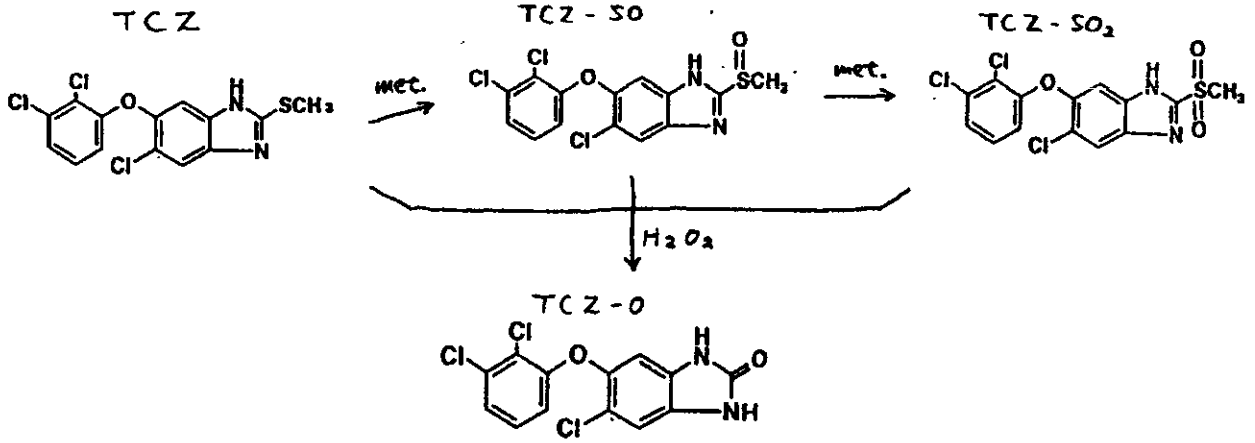
残留物

メタノール1ml

メタノール溶液

高速液体クロマトグラフィー

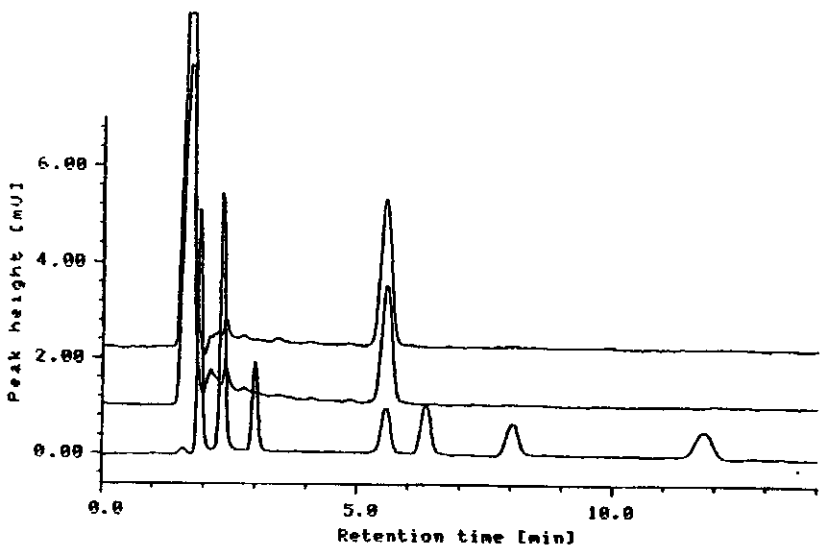
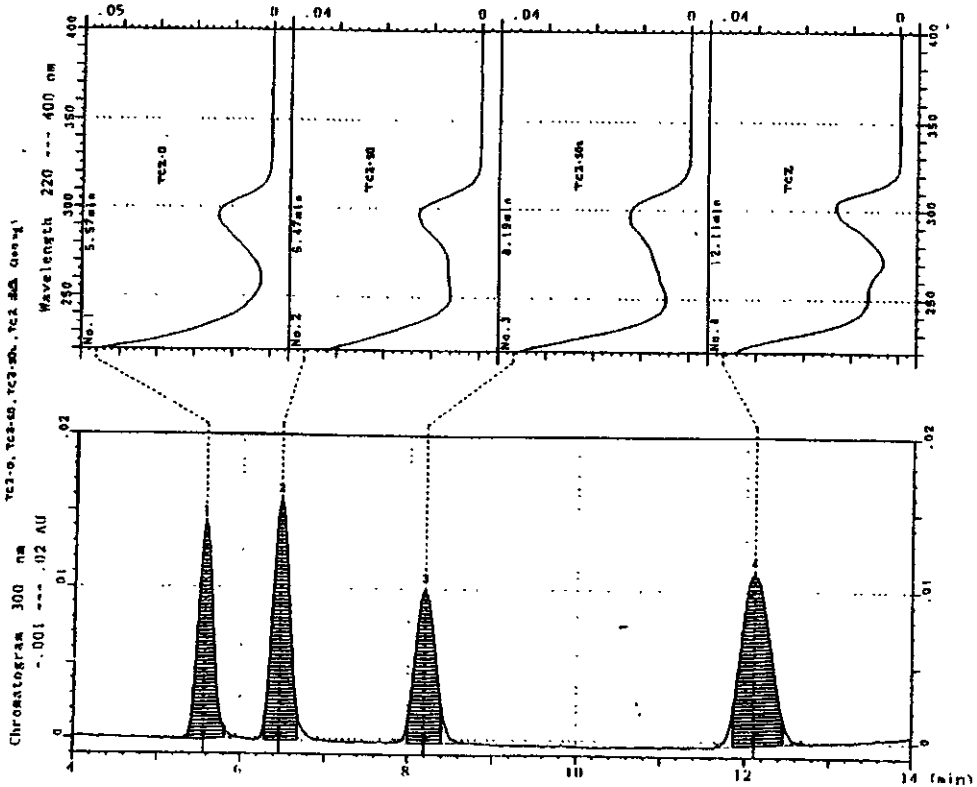
トリクラベンタゾール



```

3600DATA\TCZ090907251.D\1109090725
Sample name TCZ-0
Sampling time 25
Scan range 4
Spectrum 14
Width 0.05
Peak list
-----
No. 1 5.57 min
No. 2 6.47 min
No. 3 8.19 min
No. 4 12.11 min
-----

```



牛肝 + TCZ 0.3 ppm  
 牛肉 + TCZ 0.2 ppm  
 STD 各 0.1 ppm 相当

## II.モキシデクチンの検査方法の検討

### II-B.研究方法

モキシデクチンはイベルメクチンと構造及び作用が類似する内寄生虫用剤で、イベルメクチン試験法は、すでに告示されている（平成7年12月厚生省告示第218号）。そこでイベルメクチン試験法のモキシデクチンへの適用を検討した。

#### II-B-1.実験材料

##### 1)試料

牛の脂肪、肝臓

##### 2)試薬

- ・モキシデクチン（98.8%、アメリカンサイアナミッド社製）
- ・アセトニトリル、アセトン、イソオクタン、塩化ナトリウム、酢酸エチル、n-ヘキサン、メタノール（以上試薬特級）
- ・蛍光誘導体化試薬：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）。用事調製した。
- ・Sep-Pak Silica（690mg、Waters社製）、酢酸エチル-ヘキサン（6:4）10mlで洗浄してから使用した。

##### 3)器具及び装置

- ・共栓付遠沈管（200ml）
- ・ネジ栓付試験管（10ml）
- ・ナス形フラスコ（200、100、50ml）
- ・分液ロート（100ml）
- ・超高速ホモジナイザー
- ・振とう機
- ・遠心分離機
- ・ロータリーエバポレーター
- ・ブロックヒーター
- ・高速液体クロマトグラフ（蛍光検出器付）

#### II-B-2.試験方法

##### 1) 試料溶液の調製

細切均一化した検体5gを200ml共栓付遠

沈管にとり、アセトン-水（1:1）30ml及び塩化ナトリウム5gを加えて2分間ホモジナイズした。イソオクタン60mlでホモジナイザーを洗浄し、さきの共栓付遠沈管に入れ、栓をして5分間振とうした。2,500rpm、5分間遠心分離後、イソオクタン層を200mlナス形フラスコに移した。再びイソオクタン60mlでホモジナイザーを洗浄し、先にイソオクタン層と分離した残留物及び水層に加えて5分間振とう後、2,500rpm、5分間遠心分離した。イソオクタン層を先に分離したイソオクタン層に合わせて、ロータリーエバポレーター、80°以下で濃縮乾固した。

残留物にn-ヘキサン20mlを加えて溶解し、100ml分液ロート（I）に移した。分液ロート（I）にn-ヘキサン飽和アセトニトリル20mlを加えて5分間振とう後、アセトニトリル層を別の100ml分液ロート（II）に移した。再び分液ロート（I）のn-ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル20mlを加えて5分間振とう後、アセトニトリル層を先に分離した分液ロート（II）中のアセトニトリル層に合わせた。分液ロート（II）にn-ヘキサン10mlを加えて5分間振とう後、アセトニトリル層を100mlナス形フラスコに移して、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。

残留物にメタノール4mlを加えて溶解し、沈殿があれば2,500rpm、5分間遠心分離した。上清2mlを10mlネジ栓付試験管に移し、窒素ガス流下、40°以下で乾固した。残留物に蛍光誘導体化試薬0.2mlを加えて栓をし、ブロックヒーターで100°、90分間加熱した。室温まで放冷した反応液をシリカゲルカートリッジカラムに負荷し、酢酸エチル-ヘキサン（6:4）10mlで溶出した。負荷時及び溶出時の溶出液を合わせて、ロータリーエバポレーターで濃縮乾

固した。残留物にメタノール2mlを加えて溶解し、20 $\mu$ lを高速液体クロマトグラフィーの試験溶液とした。

## 2)HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ：東ソー製
- ・カラム：TSK-GEL ODS 80Ts QA、4.6mm ID×150mm（東ソー製）
- ・移動相：メタノール-水（97:3）
- ・流速：1.0ml/min
- ・測定波長：励起 360nm、蛍光 460nm

## 3)定量方法

モキシデクチンのメタノール溶液（100 $\mu$ g/ml）をメタノールで適宜希釈し、一定量を 10ml ネジ栓付試験管にとり、窒素ガス流下、40° 以下で乾固した。以下、アと同様に蛍光誘導体化、シリカゲルカートリッジカラム処理を行い、HPLC でピーク面積による絶対検量線法により定量した。

## II-C.研究結果

### 1) 試料溶液の調製

モキシデクチンはイベルメクチンの類縁化合物であるため、溶媒に対する溶解性、蛍光誘導体化の反応性等がイベルメクチンとほぼ同様であった。従って、すでに告示されているイベルメクチン試験法を修正することなく適用することができた。

モキシデクチンのリテンションタイムは、イベルメクチンよりかなり早いですが、移動相を調製し直すことにより、両者の同時分析が可能であった。

### 2)添加回収試験

牛の脂肪、肝臓に対する添加回収試験の結果は、脂肪に、0.5ppm 添加の時、回収率 92~98%、肝臓に 0.1ppm 添加の時、回収率 96~100%であり、相対標準偏差は 0.5~3%（n=3）であった。

本法による定量下限は 0.005ppm であり、残留基準値の 1/10 以下であった。



モキシデクチン分析法フローシート

検体 5 g

アセトン-水 (1:1) 30 ml  
塩化ナトリウム 5 g  
ホモジナイズ 2 分間  
イソオクタン 60 ml  
振とう 5 分間  
遠心分離 2,500 rpm、5 分間

イソオクタン層

水層、残留物

イソオクタン 60 ml  
振とう 5 分間  
遠心分離 2,500 rpm、5 分間

イソオクタン層

水層、残留物

濃縮乾固

残留物

ヘキサン 20 ml  
ヘキサン飽和アセトニトリル 20 ml  
振とう 5 分間

アセトニトリル層

ヘキサン層

ヘキサン飽和アセトニトリル 20 ml  
振とう 5 分間

アセトニトリル層

ヘキサン層

ヘキサン 10 ml  
振とう 5 分間

アセトニトリル層

ヘキサン層

濃縮乾固

残留物

メタノール 4 ml

メタノール層 2 ml

窒素ガス流下乾固

残留物

蛍光誘導体化試薬 0.2 ml  
100 °、90 分間加熱

反応液

シリカゲルカートリッジカラムに負荷  
酢酸エチル-ヘキサン (6:4) 10 ml で溶出

溶出液 (負荷時の溶出液を含む)

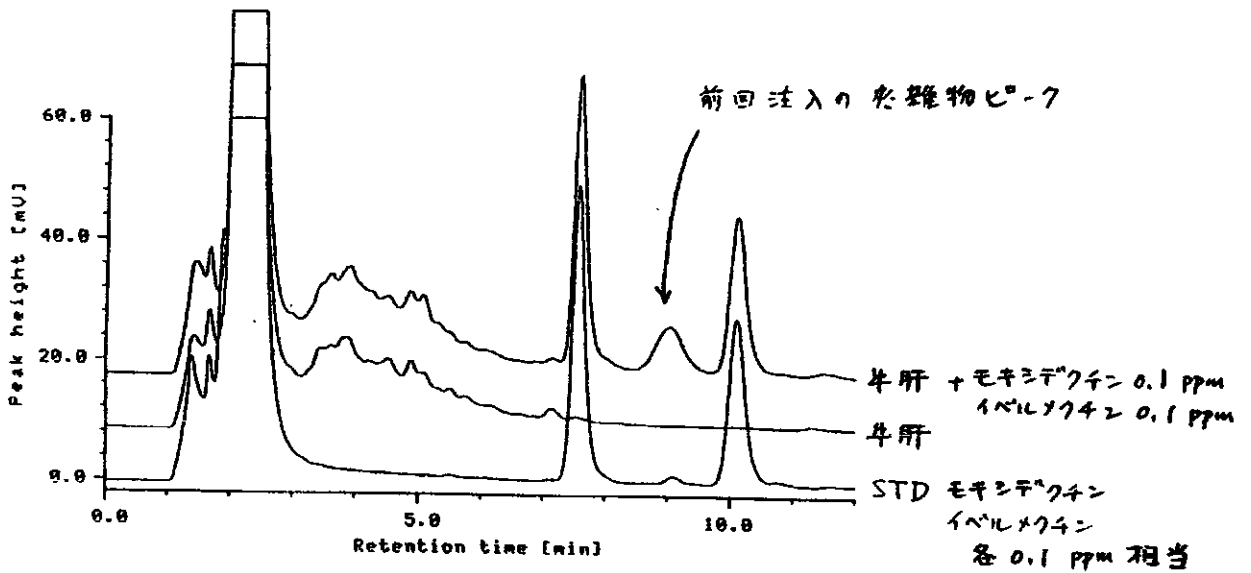
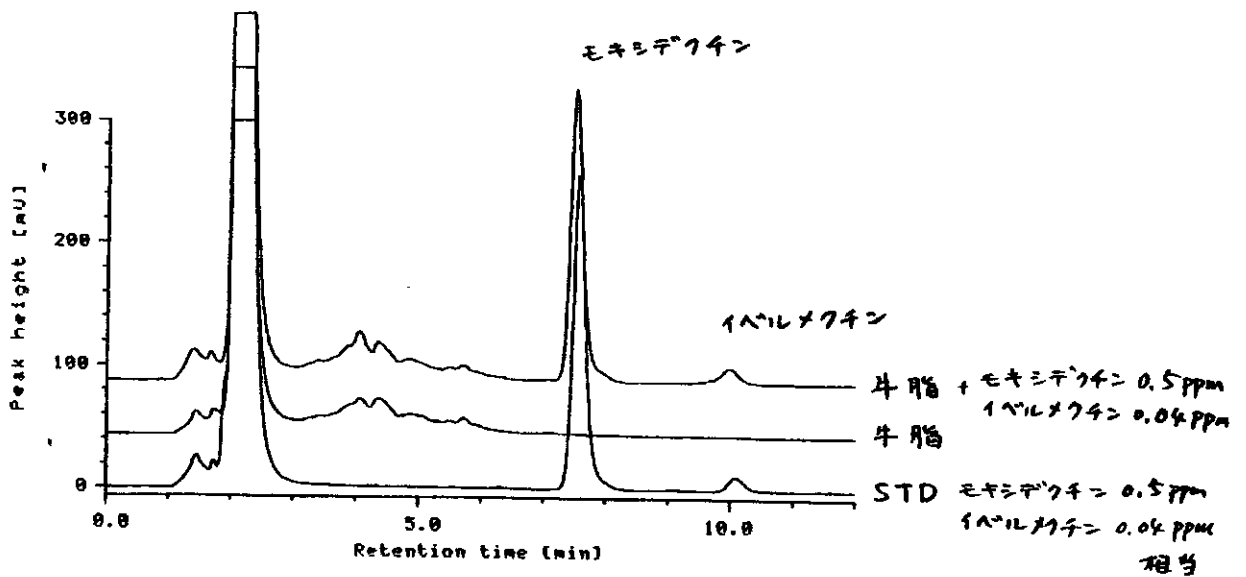
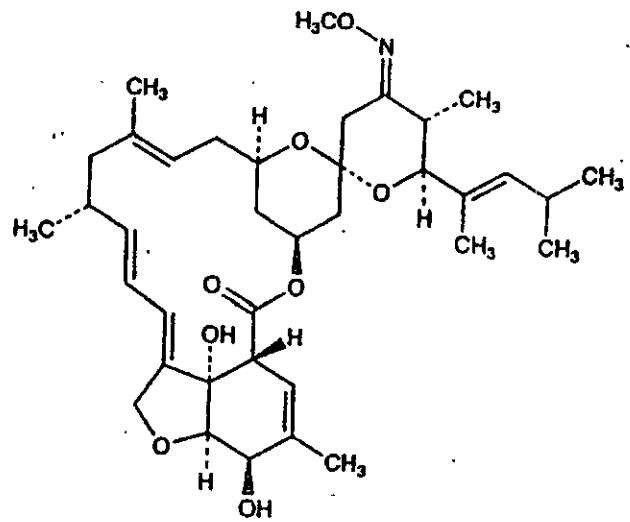
濃縮乾固

残留物

メタノール 2 ml

高速液体クロマトグラフィー

モキシテフチン



#### D. 考察

- 1) トリクラベンダゾールの残留検査法を開発した。トリクラベンダゾールの定量下限は 0.01ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 85%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3%以内であった。
- 2) モキシデクチンの残留検査法について検討した。モキシデクチンの定量下限は 0.005ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 90%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3%以内であった。

#### E. 結論

トリクラベンダゾール及びモキシデクチンの残留検査法を確立した。今回確立した各方法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準に適合している。また、操作、設備等の面でも、現在の各種検査機関において容易に実施、導入が可能であり、残留検査法として有用であると考えられる。