

ダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器を用いた食肉中の駆虫剤分析

Authors

野川 大地
熊谷 浩樹

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

私たちが普段食べている畜産物は、飼育の過程で疾病等を防ぐ目的で駆虫剤が投与されており、そうした食肉中の駆虫剤が人体を傷害しないよう、残留濃度を管理することは非常に重要です。厚生労働省が定める公定法では各薬剤の定量下限濃度や分析方法などが記載されています。そのうち、HPLC を用いた公定法では検出器として質量分析計を用いる一斉分析試験法その他、ダイオードアレイ検出器や蛍光検出器を用いた個別試験法が定められています。近年は、一斉分析試験法への移行が進んでいる一方で、個別試験法も重要視されています。そこで、本アプリケーションノートでは、畜産動物に使用される駆虫剤である、チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール、フルベンダゾール、トリクラベンダゾール、イベルメクチンを、Agilent 1260 Infinity II LC とダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器で分析した結果をご紹介します。

検量線を作成したところ、全ての化合物において決定係数が 0.999 以上と良好な直線性を示すことが確認されました。また、それぞれの化合物において定量下限濃度の SN 比と再現性 (n=6) を解析したところ、全ての化合物で SN 比 39 以上と良好に検出可能であり、再現性は保持時間 (RT) の RSD 0.066% 以下、面積の RSD 4.3% 以下と良好な結果が得られました。

Key words：動物医薬品、駆虫剤、ダイオードアレイ検出器、蛍光検出器

システム

Agilent 1260 Infinity II HPLC システム
1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)
1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129C)
内蔵カラムヒーター、サンプルクーラー付
1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (DAD) (G7115A)
1260 Infinity II 蛍光検出器 (FLD) (G7121B)

測定対象化合物

- ・チアベンダゾール
 - ・5-ヒドロキシチアベンダゾール
 - ・フルベンダゾール
 - ・トリクラベンダゾール)
 - ・イベルメクチン
- (いずれも富士フィルム和光純薬株式会社製)

分析条件

公定法に従い、各化合物の分析条件を表1-5に示します。
なお、チアベンダゾールは公定法にDADまたはFLDで検出すると記載されているため、両方を検出器として用いています。また、イベルメクチンは分析時間を1/4に短縮した高速分析くく条件も作成致しました。

表1 チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール

カラム	Agilent HC-C18 (2) 4.6 × 150 mm、5 μm (P/N 588915-902)
移動相	アセトニトリル (ACN) / 0.025 mol/L リン酸1ナトリウム(1：4)
流速	0.8 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
分析時間	12 min
検出	DAD. 295 (4) nm (チアベンダゾール) DAD. 298 (4) nm (5-ヒドロキシチアベンダゾール) Ref. 360 (50) nm Ex 300 nm, Em 370 nm (チアベンダゾール)

表2 フルベンダゾール

カラム	Agilent HC-C18 (2) 4.6 × 150 mm、5 μm (P/N 588915-902)
移動相	ACN / 0.05 mol/L酢酸アンモニウム(2：3)
流速	0.5 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
分析時間	12 min
検出	DAD. 313 (4) nm, Ref. 450 (100) nm

表3 トリクラベンダゾール

カラム	Agilent HC-C18 (2) 4.6 × 150 mm、5 μm (P/N 588915-902)
移動相	ACN / 0.025 mol/L リン酸1ナトリウム (1：1)
流速	1.0 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
分析時間	8 min
検出	DAD. 295 (4) nm, Ref. 400 (100) nm

表4 イベルメクチン

カラム	Agilent HC-C18 (2) 4.6 × 150 mm、5 μm (P/N 588915-902)
移動相	水 /メタノール (1：9)
流速	0.9 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
分析時間	42 min
検出	Ex. 360 nm, Em. 460 nm

表5 イベルメクチン(高速化)

カラム	Poroshell 120 EC-C18 3.0 × 50 mm、2.7 μm (P/N 699975-302)
移動相	水 /メタノール (1：9)
流速	0.8 mL/min
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
分析時間	10 min
検出	Ex. 360 nm, Em. 460 nm

標準液調製

公定法に記載の濃度、及び溶媒に従い標準原液を作成し、定量下限×(1/10)、定量下限×(1/2)、定量下限、定量下限×2、定量下限×5の計5点の標準液を調製しました。なお、実サンプルは前処理過程で濃縮されるため、表6の通り定量下限濃度は濃縮分を考慮した濃度となっています。

表6 公定法及び濃縮考慮後の定量下限濃度

化合物	公定法 (μg/L)	濃縮考慮後 (μg/L)
5-ヒドロキシチアベンダゾール	20	100
チアベンダゾール	20	100
フルベンダゾール	10	25
トリクラベンダゾール	10	50
イベルメクチン	5	12.5

誘導体化、前処理

トリクラベンダゾール、イベルメクチンは、公定法記載の手順に従い、予め調製した5点の標準液をそれぞれ誘導体

化した後、固相抽出法により精製しました。固相抽出法に使用したカラムを表7に示します。

表7 固相抽出カラム

化合物	カラム
トリクラベンダゾール	Bond Elut C18 (500 mg, 6 mL) (P/N 12102052)
イベルメクチン	Bond Elut SI (1 g, 6 mL) (P/N 12256008)

結果

各化合物の検量線を図1に示します。全ての化合物で検量線の決定係数が0.999以上と良好な直線性を確認しました。また、イベルメクチンを高速分析条件で分析した場合でも、決定係数が0.999以上の良好な直線性が得られました。

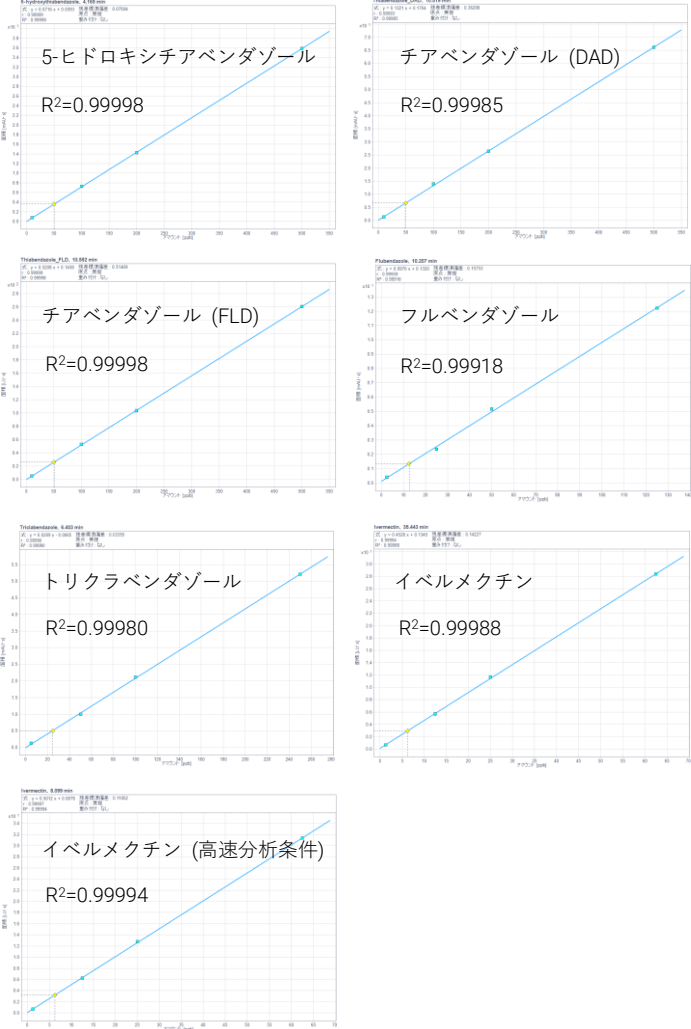


図1 検量線

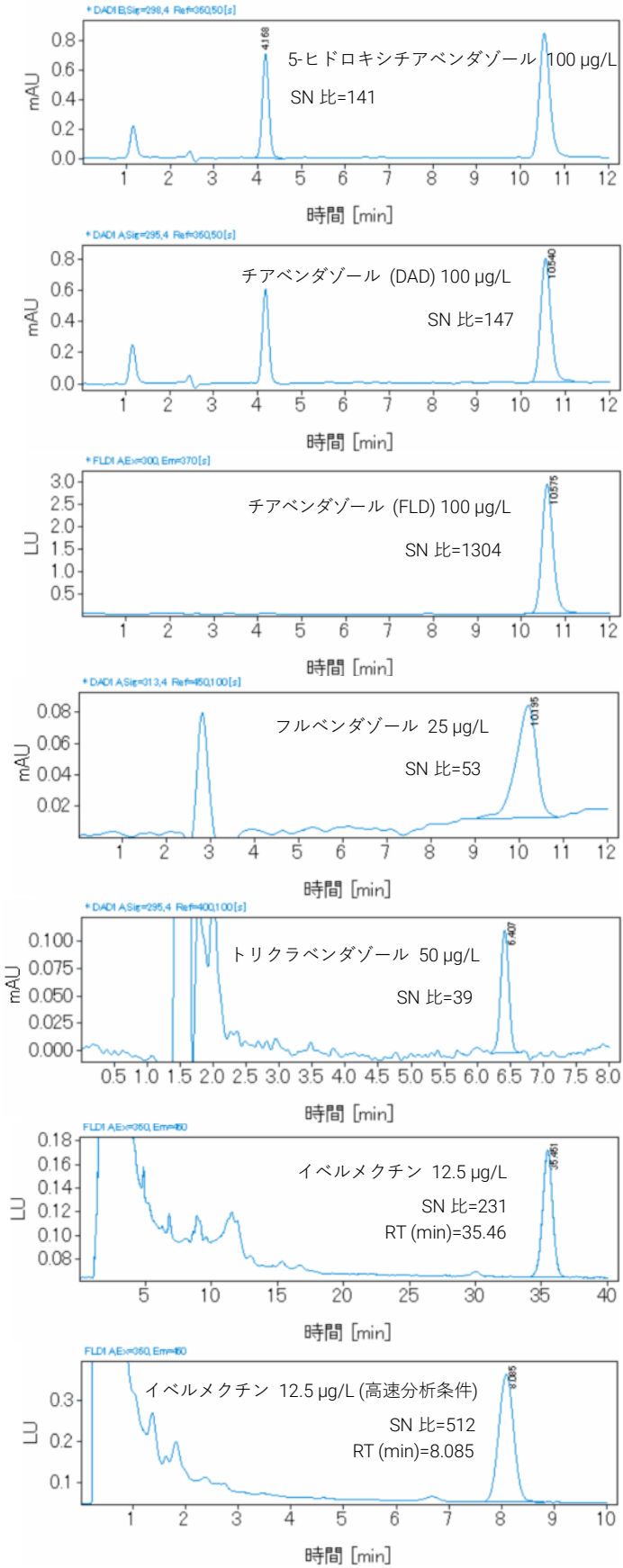


図2 定量下限濃度の標準液のクロマトグラム

次に、各化合物の定量下限濃度におけるSN比と再現性 (n=6)を図2、表8に示します。図と表に示しますように、定量下限濃度において、全ての化合物を良好なピーク形状かつ、SN比 39以上で検出可能でした。再現性に関しては、全ての化合物でRTのRSD 0.066%以下、面積のRSD 4.3%以下と、良好な結果が得られました。また、イベルメクチンを高速分析条件で分析することで、公定法の条件と比較して、SN比は2倍以上向上し、再現性もRT、面積共に向上可能であることが分かりました。

表8 各化合物の定量下限濃度におけるSN比と再現性 (n=6)

	RSD (%)	
	RT	面積
5-ヒドロキシチアベンダゾール 100 µg/L	0.018	0.277
チアベンダゾール (DAD) 100 µg/L	0.032	0.643
チアベンダゾール (FLD) 100 µg/L	0.026	0.109
フルベンダゾール 25 µg/L	0.039	4.300
トリクラベンダゾール 50 µg/L	0.047	1.990
イベルメクチン 12.5 µg/L	0.066	0.506
イベルメクチン 12.5 µg/L (高速分析条件)	0.044	0.121

まとめ

動物用駆虫剤をDAD及びFLDで分析し、検量線の直線性、定量下限濃度でのSN比と再現性を解析しました。全ての化合物の検量線は、定量下限濃度×(1/10)から定量下限濃度×5の範囲で、決定係数が0.999以上と良好な直線性を示しました。また、定量下限濃度においてS/N比 39以上、RTのRSD 0.066%以下、面積のRSD 4.3%以下と良好なS/N比と再現性が得られました。イベルメクチンに関しては、高速分析条件を用いることで、公定法の条件と比較して、分析時間を1/4に短縮、検量線の直線性やSN比、再現性も向上可能であることが分かりました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, January 25, 2021

DE44217.7259606481

LC-202101NW-001