報 文

高速液体クロマトグラフィーによる畜産物中のレバミゾールの分析

(平成 13 年 8 月 16 日受理)

坂本美穂^{*†} 竹葉和江^{*} 藤沼賢司^{*}
神保勝彦^{*} 宮崎奉之^{*}Determination of Levamisole in Livestock Products Using
High Performance Liquid ChromatographyMiho SAKAMOTO[†], Kazue TAKEBA, Kenji FUJINUMA, Katsuhiko JIMBO and Tomoyuki MIYAZAKI(*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; [†] Corresponding author)

A method is described for the determination of the anthelmintic levamisole in muscle, liver, kidney and fat of cattle, swine and poultry using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. Levamisole was extracted from an alkaline sample with ethyl acetate and back-extracted with 0.1 mol/L hydrochloric acid. The extract was applied to an SCX solid-phase extraction column. The column was washed with water and methanol. Levamisole was eluted with a solution of ammonia in methanol. The eluate was evaporated to dryness and the residue was dissolved in the mobile phase and injected into the HPLC system. Mean recoveries from 0.01~0.10 $\mu\text{g/g}$ fortified muscle, liver, kidney and fat samples ranged from 78.3 to 99.8%. The detection limit for the assay was 0.005 $\mu\text{g/g}$.

(Received August 16, 2001)

Key words: レバミゾール levamisole; 寄生虫駆除剤 anthelmintic; 畜産物 livestock products; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

レバミゾールはテトラミゾールの左旋性鏡像異性体で、広い駆虫スペクトルを持つ寄生虫駆除剤である (Fig. 1)。国内ではウシ、ブタ、ニワトリに対して使用され、平成 12 年 12 月、食品衛生調査会において残留基準値の案が答申された。しかし、現在のところ試験法は提示されておらず、その確立が急務となっている。

レバミゾールの残留基準値案は牛、豚、鶏の筋肉、腎臓、脂肪で 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓で 0.10 $\mu\text{g/g}$ であり、他の多くの寄生虫駆除剤の基準値に比べて 1/10 と低い濃度となっている。そのため、より多くの夾雑物を除去する必要がある。畜産物中のレバミゾールの分析法には、これまでに GC^{1), 2)} や HPLC³⁾ を用いた報告があるが、残留分析法として利用するには十分な感度が得られず、また、LC/MS⁴⁾ を用いた報告もあるが、すべての試験検査機関に LC/MS 装置が必ずしも配備されていないなどの問題点がある。そこで、著者らは高感度で実用的なレバミゾールの残留分析法として、レバミゾールが塩基性化合物であると

いう物性を利用したイオン交換カートリッジカラムによる精製法及び HPLC による定量法について検討したところ良好な結果を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

平成 12 年度に東京都内で購入した牛筋肉 (国内産 3, アメリカ産 3, オーストラリア産 4)、豚筋肉 (国内産 5, アメリカ産 4, メキシコ産 1)、鶏筋肉 (国内産 2, アメリカ産 1, タイ産 1, 中国産 2, ブラジル産 4) の各 10 検体、国内産の牛、豚、鶏の肝臓、腎臓及び脂肪の各 5 検体を用いた。

2. 試 薬

標準品: Sigma 社製のレバミゾール塩酸塩を用いた。

Fig. 1. Structure of levamisole

[†] 連絡先^{*} 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

標準原液：標準品 23.6 mg をメタノールに溶解して 50 mL とした。本液 1 mL はレバミゾール 400 μ g を含有する。

標準溶液：標準原液を移動相で適宜希釈した。

炭酸緩衝液：炭酸水素ナトリウムを水に飽和させた溶液 90 mL と炭酸ナトリウムを水に飽和させた溶液 10 mL を混合した（約 pH 9）。

アンモニア水-メタノール（4：96）混液：アンモニア水 1 mL とメタノール 24 mL を混合した。

0.02 mol/L リン酸二水素カリウム・ジエチルアミン緩衝液：リン酸二水素カリウム 2.44 g を水 897 mL に溶解したものとジエチルアミン 3 mL を混合して、10 vol% リン酸で pH 7.5 に調整した。

前処理用カートリッジカラム：Varian 社製 BOND ELUT® SCX（充てん剤量 500 mg）

水は市販の HPLC 用蒸留水、アンモニア水は試薬特級品の 28% アンモニア含有アンモニア水を用いた。

アセトニトリル、メタノールは HPLC 用、他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：ポンプ PU-980, カラムオーブン CO-965, フォトダイオードアレイ検出器 MD-915, デガッサー DG-980-50, オートサンプラー AS-950-10, データ処理システム JASCO-BORWIN, いずれも日本分光(株)製を用いた。

4. HPLC 測定条件

カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μ m), 東ソー(株)製

移動相：0.02 mol/L リン酸二水素カリウム・ジエチルアミン緩衝液-アセトニトリル（7：3）

流速：1.0 mL/min, カラム温度：40℃, 測定波長：220 nm, スペクトル測定範囲：200～300 nm, 注入量：20～50 μ L

5. 試験溶液の調製

5.1 抽出法

試料はフードプロセッサーを用いて細碎し均一化した。この試料 5.0 g に無水硫酸ナトリウム 10 g を加えかくはん棒を用いて混合した。これに炭酸緩衝液 1 mL, 酢酸エチル 20 mL を加えホモジナイズした後、2,000 rpm で 5 分間遠心分離し酢酸エチル層を分取した。このとき脂肪試料では綿栓ろ過を行った。残留物に酢酸エチル 15 mL を加え 5 分間激しく振とうした後、同様に遠心分離を行い酢酸エチル層を合わせた。次に、酢酸エチル層に 0.1 mol/L 塩酸 15 mL を加え 5 分間激しく振とうした後、塩酸溶液層を分取した。残りの酢酸エチル層に 0.1 mol/L 塩酸 10 mL を加え同様に振とうし、塩酸溶液層を分取し、これを合わせた。

5.2 精製法

抽出法で得られた塩酸溶液層をあらかじめメタノール 10 mL, 0.1 mol/L 塩酸 10 mL で前処理したベンゼンス

Fig. 2. Effect of pH of buffer solution on recovery of levamisole

Levamisole was extracted with 20 mL of ethyl acetate from 20 mL of buffer solution adjusted to pH 3～12. Data points in the figure represent mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

ルホン酸(SCX)カートリッジカラムに負荷した。カラムを水 10 mL, メタノール 10 mL で洗浄した後、アンモニア水-メタノール（4：96）混液 5 mL でレバミゾールを溶出した。溶出液は 50℃ 以下、減圧下で濃縮乾固した後、移動相 1.0 mL を加えて溶解し、この溶液を HPLC 用試験溶液とした。

結果及び考察

1. 試験溶液の調製方法の検討

1.1 抽出法

酢酸エチルで抽出する際の至適 pH について検討した。Fig. 2 に酢酸エチルと等量の緩衝液を用いて、緩衝液の pH を 3 から 12 まで変化させたときのレバミゾールの回収率を示した（酢酸エチル 1 回抽出）。pH が 8 以上のときレバミゾール回収率は約 80% で一定となった。しかし、レバミゾールがアルカリ性条件下で不安定な薬物であること⁵⁾、抽出溶媒の酢酸エチルがアルカリ性条件下で加水分解することを考慮し酢酸エチル抽出を行うときの pH を 9 に設定し、pH 調整には炭酸緩衝液を用いた。

更に、レバミゾールを添加した牛肝臓を用いて酢酸エチル抽出時に硫酸ナトリウムを添加した場合と添加しなかった場合の回収率を比較した。その結果、硫酸ナトリウムを 10 g 添加することで回収率は 64.0% から 84.9% となり、約 20% の改善が認められた。これは水層で硫酸ナトリウムが飽和することによる塩析効果により回収率が改善したものと考えられる。

1.2 精製法

プロピルスルホン酸 (PRS), ベンゼンスルホン酸 (SCX) 及びカルボン酸 (CBA) カートリッジカラムの 3 種類のイオン交換カートリッジカラムについて、レバミゾールの標準溶液を用いて回収率を比較した。検討したすべてのイオン交換カートリッジカラムで回収率 95% 以上と良好な値が得られた。そこで、試料負荷時に pH 調整が不要であること、レバミゾールがベンゼン環を有する化合物であること、また、他のカートリッジカラムと比較して若干高い回収率を示したことを考慮し SCX カートリッジカラムを用

Fig. 3. UV spectrum of levamisole in mobile phase (1 $\mu\text{g/mL}$)

Table 1. Recoveries of Levamisole from Muscle, Liver, Kidney and Fat Samples Fortified with Levamisole

Sample	Amount added ($\mu\text{g/g}$)	Mean recovery (%)	CV (%)
Cattle	muscle 0.01	82.7	2.1
	liver 0.10	84.9	2.0
	kidney 0.01	82.1	3.4
	fat 0.01	96.5	5.6
Swine	muscle 0.01	78.3	4.5
	liver 0.10	86.8	2.8
	kidney 0.01	82.5	5.6
	fat 0.01	78.3	8.2
Poultry	muscle 0.01	81.6	2.3
	liver 0.10	90.4	1.8
	kidney 0.01	92.9	2.1
	fat 0.01	99.8	4.2

($n=3$)

いることにした。

SCX カートリッジカラムからのレバミゾールの溶出溶媒はアンモニア水-メタノール (4:96) 混液を用いた⁶⁾。これを用いて溶出パターンを調べたところ溶出溶媒量が 2 mL でレバミゾールは 97% 以上が回収された。そこで、溶出溶媒量は余裕をもって 5 mL とした。

2. HPLC 条件の検討

カラムに TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm) を用いて移動相の検討を行った。0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5)-アセトニトリル (7:3) を移動相として用いた場合、レバミゾールのピークにテーリングが認められた。そこで、ジェチルアミンを添加したところ、良好な形状のピークが得られたため、これを移動相として用いることにした。

測定波長を決定するため、レバミゾールを移動相に溶解し、200~300 nm の紫外吸収スペクトルを測定した。移動相中のレバミゾールの極大吸収波長は 210 nm 付近であった (Fig. 3)。共存物質の影響を考慮して感度は若干低下するが測定波長を 220 nm に設定した。

各種濃度の標準溶液を測定し、検量線を作成したところ、0.035~1.5 $\mu\text{g/mL}$ (注入量 20 μL) の範囲で相関係数 0.999 と良好な直線性を示した。

3. 添加回収試験

レバミゾールを検出しないことを確認した牛、豚、鶏の

Fig. 4. HPLC chromatograms of (A) 0.50 $\mu\text{g/mL}$ standard solution of levamisole, (B) control cattle liver, and (C) cattle liver fortified with 0.10 $\mu\text{g/g}$ levamisole

HPLC operating conditions were as follows.

Column: TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm); mobile phase: 0.02 mol/L KH_2PO_4 -diethylamine (299:1, pH 7.5)-acetonitrile (7:3); flow rate: 1.0 mL/min; column temp.: 40°C; detection: UV 220 nm; injection volume: 20 μL

筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪を試料として添加回収試験を行った。筋肉、腎臓及び脂肪にレバミゾールが 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓に 0.10 $\mu\text{g/g}$ となるようにレバミゾールを添加した。本法の回収率は 78.3~99.8%、変動係数はいずれも 8.2% 以下と良好な結果であり (Table 1)、回収率及び変動係数ともにコーデックス規格⁷⁾を満足していた。本法の検出限界は筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪いずれの場合も 0.005 $\mu\text{g/g}$ であった ($S/N=3$)。

Fig. 4 にレバミゾール標準溶液、牛肝臓、牛肝臓にレバミゾールを添加した試料のクロマトグラムを示した。レバミゾールの保持時間は約 7.5 分であった。肝臓及び腎臓試料ではレバミゾールの保持時間付近に試料由来のピークが若干認められたが、レバミゾールのピークとの分離は良好であった。また、筋肉及び脂肪試料ではレバミゾールの保持時間付近に試料由来の妨害ピークはなく、良好なクロマトグラムが得られた。

本分析法は畜産物中のレバミゾールの残留分析法として実用的な方法であると考ええる。

4. 市販食肉中のレバミゾール残留実態調査

本分析法を用いて東京都内で市販されていた牛、豚、鶏の筋肉の各 10 検体及び肝臓、腎臓、脂肪の各 5 検体、計 75 検体についてレバミゾールの残留実態調査を実施したが、いずれの検体からもレバミゾールは検出されなかった。

ま と め

HPLC による畜産物中のレバミゾールの分析法について検討し、以下のような知見が得られた。

1. 畜産物中よりレバミゾールを酢酸エチルで抽出した。抽出時の pH が 8 以上のとき約 80% 以上の回収率が得られたことから、抽出時の pH を 9 に設定した。また、無水硫酸ナトリウムの添加により回収率の改善が認められた。

2. イオン交換カートリッジカラムとして PRS, SCX, CBA カートリッジカラムについて検討したところ, SCX カートリッジカラムが回収率, 操作性で最も優れていた.

3. HPLC によるレバミゾールの測定で移動相にジエチルアミンを添加したところ, 塩基性化合物のレバミゾールは良好な形状のピークを示した.

4. 牛, 豚, 鶏の筋肉, 肝臓, 腎臓及び脂肪を試料として食品衛生調査会に答申された残留基準値案濃度のレバミゾールを添加し添加回収試験を行ったところ, 回収率は 78.3~99.8%, 変動係数は 8.2% 以下であった.

5. 市販の牛, 豚, 鶏の筋肉, 肝臓, 腎臓及び脂肪, 計 75 検体についてレバミゾールの残留調査を行ったが, いずれの検体からもレバミゾールは検出されなかった.

なお, 本研究の一部は日本食品衛生学会第 80 回学術講演会 (2000 年 11 月, 郡山) において発表した.

文 献

- 1) Woestenborghs, R., Michielsen, L., Heykants, J., Determination of levamisole in plasma and animal tissues by gas chromatography with thermoionic specific detection. *J. Chromatogr.*, **224**, 25-32 (1981).
- 2) Stout, S. J., Dacunha, A. R., Tondreau, R. E., Boyd, J. E., Confirmation of levamisole residues in cattle and swine livers by capillary gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1,150-1,153 (1988).
- 3) Bukanski, B. W., Degroodt, J. M., Beernaert, H., Determination of levamisole and thiabendazole in meat by HPLC and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **193**, 545-547 (1991).
- 4) Cannavan, A., Blanchflower, W. J., Kennedy, D. G., Determination of levamisole in animal tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *Analyst*, **120**, 331-333 (1995).
- 5) Janssen, P. A. J., The levamisole story. *Prog. Drug. Res.*, **20**, 347-383 (1976).
- 6) GL Sciences Inc., "Saishin Kosou Chushutsuho Gaidobukku", 1st Ed., Tokyo, GL Sciences Inc., 1996, p.151-152.
- 7) FAO/WHO ed., "Codex Alimentarius: Residues of veterinary drugs in foods, Vol. 3", 2nd Ed., 1995, p. 66-69. (ISBN 92-5-103822-8)