LC-FL及びLC-MS/MSによる食肉中の
イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチンの分析

坂本 美穂，竹葉 和江，笹本 剛生，草野 友子，林 洋
金井 節子，神田 真軌，永山 敏廣，森 謙一郎

Determination of Ivermectin, Eprinomectin, Doramectin and Moxidectin in Edible Meat with LC-FL and LC-MS/MS

Miho SAKAMOTO, Kazue TAKEBA, Takeo SASAMOTO, Tomoko KUSANO, Hiroshi HAYASHI,
Setsuko KANAI, Maki KANDA, Toshihiro NAGAYAMA and Ken'ichiro MORI

東京都健康安全研究センター研究年報　第60号　別刷
2009

東京健安研セ年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 139-145, 2009

LC-FL及びLC-MS/MSによる食肉中のイベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチンの分析

坂　本　美　穂[*]，竹　葉　和　江[**]，笹　本　剛　生[**]，草　野　友　子[**]，林　洋[**]
金　井　節　子[**]，神　田　真　軌[**]，永　山　敏　廣[**]，森　謙　一　郎[*]

平成18年度～平成20年度の間に都内で流通した食肉247試料について，LC-FLを用いた厚生労働省の通知法に準拠してマクロライド系寄生虫駆除剤（イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチン）の分析を行った．その結果，食品衛生法に違反する試料はなかったものの，羊肉1試料からモキシデクチンの保持時間付近に定量限界濃度以下のピークが検出された．そこで，LC-MS/MSによるマクロライド系寄生虫駆除剤の測定条件の検討を行い分析を行ったところ，羊肉から検出されたピークがモキシデクチンであることが確認できた．

キーワード：イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン，モキシデクチン，液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法，食肉

は じ め に

マクロライド系寄生虫駆除剤は, Figure 1のように構造に16員環を有しており，牛や豚などの内部寄生虫や外部寄生虫の駆除のために欧米など世界各国で広範に使用されている[1)]．しかし，畜産の現場で使用された薬剤は，休薬期間の不履行や使用対象外の動物への投与などにより，食肉中へ残留する可能性がある[2)]．わが国では，食肉中のマクロライド系寄生虫駆除剤の残留基準はTable 1のように定められている．

食肉中のマクロライド系寄生虫駆除剤の分析法は，厚生労働省からLC-FLを用いた通知法が示されている[3)]．しかし，通知法の前処理法は，煩雑で操作性が悪いなどの問題があり，また，薬剤を検出した場合の確認試験については「LC-MSにより確認する」という記載のみで具体的な方法は示されていない．

そこで，今回，食肉中のマクロライド系寄生虫駆除剤の前処理方法及びLC-MS/MSを用いた確認方法について検討を行った．また，検討した方法を用いて，平成18年度から平成20年度の間に都内で流通した食肉中のマクロライド系寄生虫駆除剤の実態調査を実施したので, 併せて報告する．

実 験 方 法

1. 試料

平成18年度から平成20年度の間に都内で流通した豚肉148試料，牛肉89試料，羊肉6試料，猪肉2試料，鹿肉2試料の計247試料を用いた．

2. 分析対象化合物

イベルメクチン：22, 23-ジヒドロアベルメクチンB_{1a}，別名イベルメクチンB_{1a}

エプリノメクチン：エプリノメクチンB_{1a}

ドラメクチン：ドラメクチン

モキシデクチン：モキシデクチン

3. 試薬・試液

シリカゲルミニカラム：Varian社製シリカゲルカラムでカラムサイズが500 mg，3 mLのものを酢酸エチル・*n*-ヘキサン（6:4）混液10 mLでコンディショニングしたものを用いた．

酢酸アンモニウム：和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用1 mol/L酢酸アンモニウム溶液を用いた．

ジメチルホルムアミド：関東化学（株）製の高速液体クロマトグラフ用*N, N*-ジメチルホルムアミドを用いた．

無水酢酸：関東化学（株）製の精密分析用無水酢酸を用いた．

メチルイミダゾール：ACROS社製の1-メチルイミダゾー

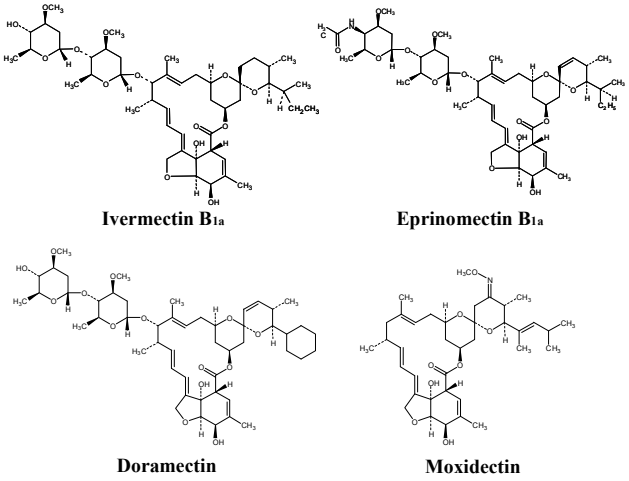

Figure 1. Chemical Structures of Ivermectin B_{1a}, Eprinomectin B_{1a}, Doramectin and Moxidectin

[*] 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町 3-24-1
[**] 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

ルで純度99%のものを用いた．

アセトニトリル，メタノール及び蒸留水は，高速液体クロマトグラフ用を用いた．

上記以外の試薬については，特級を用いた．

4. 標準品・標準原液

イベルメクチン標準品：Calbiochem-Novabiochem社製を用いた．

エプリノメクチン標準品 : Dr.Ehrenstorfer GmbH社製を用いた．

ドラメクチン標準品：Fluka社製を用いた．

モキシデクチン標準品：畜水産品残留安全協議会及び（社）日本科学飼料協会より純度98.0%以上のものを入手した．

標準原液：イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチンの各標準品はそれぞれ100 µg/mLになるようにメタノールを用いて調製した．

混合標準溶液：イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチンの各標準原液を混合して，LC-FLで用いる場合はメタノールで，LC-MS/MSで用いる場合は10 mmol/L酢酸アンモニウム含有90%メタノールで，適宜，希釈を行った．

5. 装置

1) LC-FL

液体クロマトグラフ：（株）日本分光製 GULLIVERシリーズを使用した．

蛍光検出器：（株）日本分光製 RF-920を使用した．

2) LC-MS/MS

液体クロマトグラフ：（株）島津製作所製 Prominence UFLCを使用した．

質量分析装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 TSQ Quantum Discovery MAXを使用した．

6. 測定条件

1) LC-FL条件

分析カラム：（株）住化分析センター製SUMIPAX ODS 粒子径3 µm　4.6 mm i.d.×150 mm，移動相：水・メタノール（10:90）混液，流量：1.0 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：20 µL

2) LC-MS/MS条件

(1) LC条件

分析カラム：（株）資生堂製 Capcell Pak MG II　粒子径3 µm　2.0 mm i.d.×150 mm，移動相 : 10 mmol/L酢酸アンモニウム含有90%メタノール溶液，流量：0.2 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：10 µL

(2) MS条件

イオン化法：ESI(+)，スプレー電圧：4,500 V，キャピラリー温度：270°C，ベーポライザ温度：300°C，シースガス：N_2，30 arb，AUXガス：N_2，5 arb，コリジョンガス：Ar，1.0 arb

化合物毎の測定条件はTable 2に示した．

7. 試験溶液の調製

厚生労働省から通知されている「イベルメクチン，エプリノメクチン，ドラメクチン及びモキシデクチン試験法（畜水産物）」[3)]に準拠した．

1) 抽出法

フードプロセッサーで細切均一化した試料5 gに，アセトン・水（1:1）混液30 mL及び塩化ナトリウム5 gを加え，ホモジナイズした後，イソオクタン30 mLを加え，振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜる．これを毎分3,000回転で5分間遠心分離した後，イソオクタン層を200 mLナス型フラスコに分取する．水層及び沈殿にイソオクタン30 mLを加え，振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後，上記と同様の条件で遠心分離を行い，イソオクタン層を先の200 mLナス型フラスコに合わせ，エバポレーターを用いて45°Cでイソオクタンを留去する．この残留物にアセトニトリル20 mL及び*n*-ヘキサン20 mLを加えて，5分間超音波処理した後，5分間振とう機を用いて激しく振り混ぜ，静置した後，アセトニトリル層を100 mLナス型フラスコに分取し，エバポレーターを用いて40°Cでアセトニトリルを留去する．この残留物にメタノール2 mLを加えて，5分間超音波処理した後，10 mL試験管にメタノールを採る．再度，残さにメタノール2 mLを加えて，同様に操作し，メタノールを10 mL試験管に合わせ，45°Cで窒素を通じて乾固する．

2) 蛍光化法

1) 抽出法で得られたものにジメチルホルムアミド，無水

Table 1. The Japanese maximum residue limits of ivermectin, eprinomectin, doramectin and moxidectin in edible meat

Compound	Cattle muscle (ppm)	Pig muscle (ppm)	Sheep muscle (ppm)	Horse muscle (ppm)	Deer muscle (ppm)
Ivermectin	0.01	0.02	0.01	0.01	――
Eprinomectin	0.1	――	――	――	――
Doramectin	0.01	0.01	――	――	――
Moxidectin	0.02	――	0.05	――	0.02

酢酸及びメチルイミダゾール（9 : 3 : 2）混液0.2 mLを加えて密栓し，よく振り混ぜた後，100°Cで90分間加熱し，室温になるまで放置する．

3) 精製法

コンディショニングをしたシリカゲルミニカラムに2)蛍光化法で得られた溶液を注入した後，酢酸エチル・*n*-ヘキサン（6:4）混液10 mLを注入し，流出液を50 mL遠沈管に採り，40°Cでエバポレーターを用いて酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを留去する．この残留物にメタノール2.0 mLを加えて，5分間超音波処理し，これを試験溶液とする．

ただし，LC-MS/MS用試験溶液は1) 抽出法でアセトニトリルを留去した残留物にメタノール1.0 mLを加えて，5分間超音波処理した後，毎分10,000回転で5分間遠心分離して得られた上清を試験溶液とする．

結 果 及 び 考 察

1. 前処理法の検討

1) 回収率低下の原因に関する検討

通知法[3)]では，添加回収試験で薬剤の回収率が60%程度に低下することがあった．そこで，前処理のどの過程で回収率の低下が生じるかの原因を追求するため，イベルメクチン，エプリノメクチン及びモキシデクチンを0.25 µg/gになるように牛肉に添加し，通知法に従って操作した．その結果，アセトニトリル溶液濃縮後，メタノールで再溶解する過程において，回収率の低下が起きることが分かった．そこで，メタノール4 mLでの再溶解を確実にするために，メタノール2 mLで2回溶解することで，常に80.2～95.1%と良好な回収率が得られるようになった．

また，イソオクタン抽出液を濃縮した後，*n*-ヘキサンを加えて溶解する過程で，エプリノメクチンの回収率が80.2%とイベルメクチンやモキシデクチンの回収率88.6～95.1%に比べて低いことが分かった．そこで，牛肉にエプリノメクチンを0.25 µg/gになるように添加し，抽出液を濃縮した後，*n*-ヘキサンとアセトニトリルを加えて溶解したところ，回収率92.4%とヘキサンで溶解したときの回収率よりも10%以上良好な値が得られた．これは，アセトニトリルを加えることでエプリノメクチンの溶解性が向上したためと考えられる．そこで，イソオクタン抽出液の濃縮後は，*n*-ヘキサンとアセトニトリルを加えて溶解することにした．

2) 抽出法の検討

通知法[3)]では，イソオクタン60 mLで2回抽出と多くの溶媒量を必要とし，抽出液の濃縮操作にも多くの時間を要する．そこで，牛肉に各薬剤を0.01 µg/gとなるように添加し，イソオクタンの量を30 mLにして2回抽出を行った．その結果，各薬剤の回収率が85.7～89.4%とイソオクタン60 mLで2回抽出を行った際の各薬剤の回収率81.5～87.2%と比べてあまり差が認められなかった．そこで，抽出はイソオクタン30 mLで2回行うことにした．

また，抽出時に使用する遠沈管にガラス製のものを用いると遠心分離機の中で容器が割れることがあった．そこで，操作性のよいポリプロピレン製の遠沈管を用いて，豚肉に各薬剤を0.01 µg/gとなるように添加し，添加回収試験を実施したところ，回収率が89.1～89.8%とガラス製の遠沈管の回収率83.0～89.8%と差がなかった．また，クロマトグラム上も容器由来の夾雑ピークは認められなかった．従って，抽出時に使用する遠沈管にポリプロピレン製のものを用い

Table 2. SRM settings for negative ion MS-MS analysis of ivermectin, eprinomectin, doramectin and moxidectin

Compound	Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	Collision energy (eV)	Tube lens (V)
Ivermectin	893 $[M+NH_4]^+$	569	15	198
		567	15	
		551	25	
		307	25	
Eprinomectin	915 $[M+H]^+$	298	24	175
		154	33	
		144	36	
		112	68	
Doramectin	917 $[M+NH_4]^+$	593	17	196
		333	20	
		331	28	
		219	22	
Moxidectin	641 $[M+H]^+$	498	11	182
		478	12	
		416	15	
		199	26	

Table 3. Recoveries of ivermectin, eprinomectin, doramectin and moxidectin from cattle and pig meat [a]

Compound	Spiked level (μg/g)	Cattle muscle		Swine muscle	
		Recovery (%)	RSD [b] (%)	Recovery (%)	RSD [b] (%)
Ivermectin	0.01	88.2	4.5	88.7	4.6
Eprinomectin	0.01	89.8	4.4	88.9	4.0
Doramectin	0.01	86.8	4.6	89.4	4.4
Moxidectin	0.01	83.0	3.0	85.7	3.7

[a] Means of 5-8 replicates.

[b] RSD = Relative standard deviation.

ても問題のないことが分かった．

3) 添加回収試験

検討した前処理法を用いて，牛肉及び豚肉に各薬剤を0.01 μg/gとなるように添加して添加回収試験を行った．その結果，Table 3に示すように，牛肉で回収率83.0～89.8%，相対標準偏差3.0～4.6%，豚肉で回収率85.7～89.4%，相対標準偏差3.7～4.6%と良好な結果が得られた．なお，本分析法のマクロライド系寄生虫駆除剤の定量限界は0.005 μg/g，検量線は0.25～10 ngの範囲で相関係数0.9999の良好な直線性が得られた．

2. LC-MS/MSによる確認方法の検討

マクロライド系寄生虫駆除剤のLC-MS/MS条件を検討した．各マクロライド系寄生虫駆除剤のメタノール標準溶液をシリンジポンプを用いて直接MS/MSに注入してMSスキャンを行ったところ，いずれの薬剤も$[M+Na]^+$が認められた．モニターイオンとして$[M+Na]^+$を採用している報告もあるが[4)]，$[M+Na]^+$はMS/MSでプロダクトイオンが生成しにくいなど問題がある．そこで，ポリプロピレン製の容器を用いて各標準原液を10 mmol/L酢酸アンモニウム含有50%メタノール溶液で希釈し，再度，MSスキャンを実施した．その結果，エプリノメクチンとモキシデクチンでは$[M+H]^+$が，イベルメクチンとドラメクチンでは$[M+NH_4]^+$が認められた．そこで，それぞれのイオン強度が最大になるようにチューブレンズ電圧を設定した後，各イオンをプリカーサーイオンとして，コリジョンエネルギーを変化させてMS/MSスキャンを行った．その結果，Table 2に示したイオン強度の強い4種類のプロダクトイオンをモニターイオンとして採用することにした．チューブレンズ電圧及びコリジョンエネルギー以外のMS条件については，モキシデクチンのプリカーサーイオンのイオン強度が最大になるように設定した．

LC条件は，移動相に10 mmol/L酢酸アンモニウム含有90%メタノール溶液を用いたところ，Figure 2のように保持時間4～8分の間に各マクロライド系寄生虫駆除剤のピークが認められた．

3. 実態調査結果

1) LC-FLによるスクリーニング

本法を用いて，平成18年度から平成20年度の間に都内で流通した豚肉，牛肉，羊肉，猪肉及び鹿肉計247試料について，実態調査を実施した．その結果，食品衛生法上，違反になる試料はなかった．しかし，ニュージーランド産の羊肉からは，Figure 3のようにモキシデクチンの保持時間付近に定量限界濃度以下のピークが検出された．

2) LC-MS/MSによる確認

モキシデクチンと思われるピークが認められた試料について，検出されたピークがモキシデクチンであるかどうかを確認するため，本法のLC-MS/MS条件を使って，羊肉の分析を行った．その結果，モキシデクチンの全てのモニタ

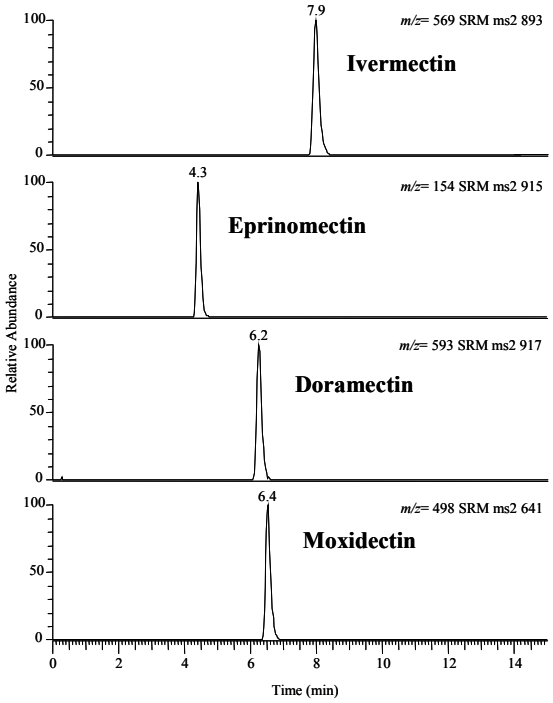

Figure 2. LC-MS/MS chromatograms obtained in MRM mode for ivermectin, eprinomectin, doramectin and moxidectin standard solution at 0.1 μg/mL

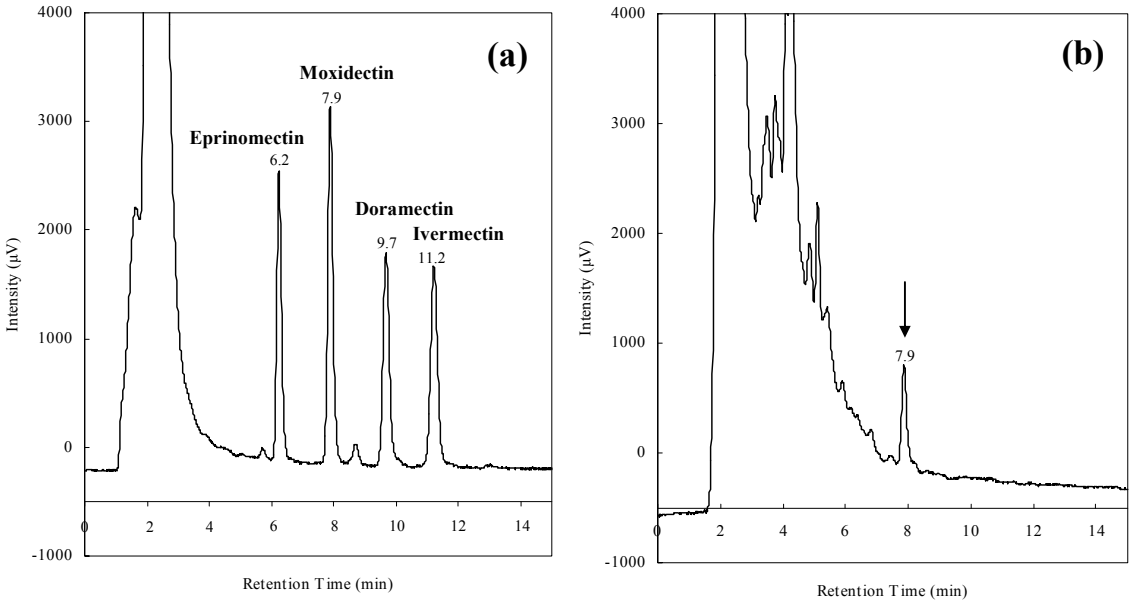

Figure 3. LC-FL chromatograms of eprinomectin, moxidectin, doramectin and ivermectin standard solution at 0.025 μg/mL (a) and sheep meat sample (b)

ーイオンのクロマトグラム上に標準溶液の保持時間と一致するピークが認められた．さらに，最もイオン強度の強いモニターイオンとそれ以外のモニターイオンの相対強度比を標準溶液のものと比較したところ，その変動は± 20%以内とEUのガイドライン[5)]を満足しており，試料から検出されたピークがモキシデクチンであることが確認できた．Figure 4にモキシデクチンの標準溶液とモキシデクチンが検出された試料のマスクロマトグラムを示した．

モキシデクチン以外の薬剤についても，本LC-MS/MS条件を用いて，通知法の検出限界レベルまでの薬剤の確

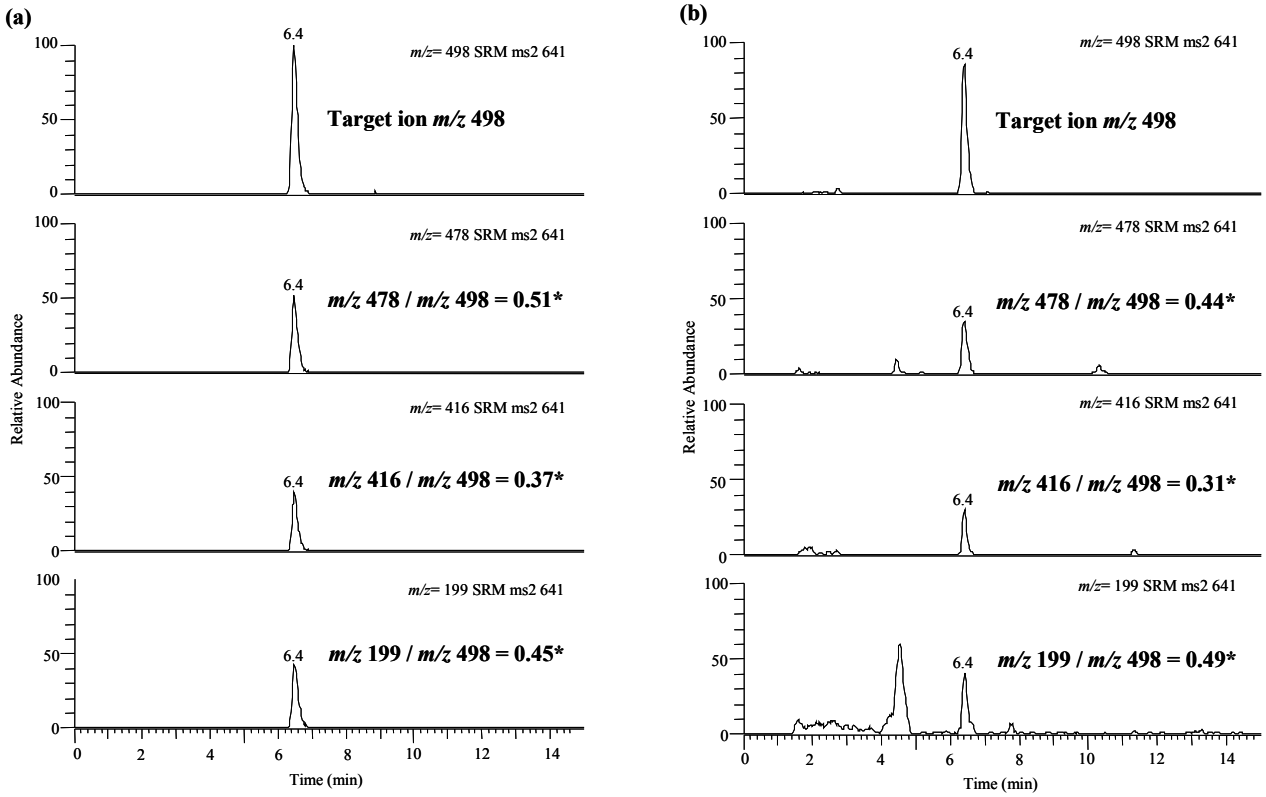

Figure 4. LC-MS/MS chromatograms obtained in MRM mode for 0.1 μg/mL moxidectin standard solution (a) and moxidectin positive sheep muscle sample (b)
* Relative intensity to the target ion

認が可能と考える．

今回の実態調査では，食肉中にマクロライド系寄生虫駆除剤が基準値以上，残留していることはなかったが，海外や他の地方自治体でもマクロライド系寄生虫駆除剤はビーフジャーキーや牛肉の脂肪部位などから検出されているため[6-7]，今後も継続的にモニターしていくことが重要である．

ま と め

食肉中のマクロライド系寄生虫駆除剤の前処理法について検討を行い，抽出溶媒量を半分に減らすことで操作性が向上し，濃縮乾固後の再溶解の過程を工夫することで添加回収試験で常に83.0～89.8%と良好な回収率が得られるようになった．

また，LC-MS/MSを用いたマクロライド系寄生虫駆除剤の確認方法を確立した．

本法を用いて，平成18年度から平成20年度の間に都内で流通した食肉247試料について，実態調査を実施したところ，食品衛生法上，違反になる試料はなかったものの，ニュージーランド産の羊肉からモキシデクチンの保持時間付近に定量限界濃度以下のピークが検出された．

本LC-MS/MS条件を用いて，モキシデクチンと思われるピークが認められた羊肉を分析したところ，検出されたピークがモキシデクチンであることが確認でき，本法で通知法の検出限界レベルまでの薬剤の確認が可能であることが分かった．

文 献

1) Forbes, A. B.: *Vet. Parasitol*. **48**, 19-28, 1993.
2) 青木葉一，石井里枝，城戸靖雅，小久江栄一，竹葉和江，中澤裕之，永田知子，堀江正一：食品安全性セミナー4 動物用医薬品・飼料添加物，24, 2001，中央法規出版，東京．
3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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の一部改正について”平成19年12月12日食安発第1212004号(2007).
4) Hou, X., Li, X., Ding, S. et al.: *Chromatographia*, **63**, 543-550, 2006.
5) EU: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No. SANCO/2007/3131, 2007.
6) 厚生労働省：輸入食品等の食品衛生法違反事例，http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/ihan/index.html（2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
7) 横浜市衛生研究所：食品中の各種有害物質検査，http://www.city.yokohama.jp/me/kenkou/eiken/gai_inf/gyoumu/pdf/h16/biryoosen.pdf（2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

Determination of Ivermectin, Eprinomectin, Doramectin and Moxidectin in Edible Meat with LC-FL and LC-MS/MS

Miho SAKAMOTO[*], Kazue TAKEBA[**], Takeo SASAMOTO[**], Tomoko KUSANO[**], Hiroshi HAYASHI[**], Setsuko KANAI[**], Maki KANDA[**], Toshihiro NAGAYAMA[**] and Ken'ichiro MORI[*]

Ivermectin, eprinomectin, doramectin, and moxidectin in 247 edible meat samples were analyzed by LC-FL. The concentrations of these compounds in all samples were lower than the Japanese maximum residue limits. However, in one sheep meat sample there was a peak, the area of which was below the limit of quantification, near the retention time for moxidectin. With the aim of determining the residue of moxidectin in the sample, we developed a method in which liquid chromatography was coupled with LC-MS/MS. The compounds were determined by reversed-phase LC using a C18 column with 10 mmol/L ammonium acetic acid-acetonitrile. Mass spectral acquisition was performed in the positive mode by applying multiple reaction monitoring. The method was applied to the sheep meat sample, and the residue of moxidectin in the sample was determined.

Keywords: ivermectin, eprinomectin, doramectin, moxidectin, LC-FL, LC-MS/MS, edible meat

[*] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Pharmaceutical Sciences
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan
[**] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Food Safety