

## 短報

# アルミナカラム使用におけるフルベ ンダゾール溶出挙動に関する検討

藤巻照久, 岸 美智子, 佐藤修二

## Case of study on flubendazole elution using alumina column

Teruhisa FUJIMAKI, Michiko KISHI  
and Shuji SATOH

### はじめに

現在, 我が国をはじめとして諸外国では家畜の生産性を向上させるために抗菌性物質, ホルモン剤及び寄生虫用剤などの動物用医薬品が汎用されている. なかでも家畜の飼育過程で線虫, 回虫及び吸虫などの寄生虫による畜産動物の被害を未然に防ぐため多くの寄生虫用剤が用いられている<sup>1) 2)</sup>. これらの寄生虫駆除剤が食品中に残留していないかどうか食品衛生上の観点から残留分析を行う必要があり, 平成7年に食品衛生法が改正され, いくつかの寄生虫駆除剤の残留基準値が設定された. その中でベンズイミダゾール系線虫駆除剤のフルベンドゾールの規格基準値が豚, 鶏, 七面鳥, あひるの筋肉, 肝臓及び鶏卵に設定され, その試験法(以後, 公定法)が示された<sup>3)</sup>.

行政検査で主に分析対象となっている鶏肉及び豚肉において公定法を用いた添加回収実験は, しばしば回収率にばらつきがみられた. 本研究においてはその原因として考えられるカラムの溶出挙動を検討し, 一部分析法の改良を行ったので報告する.

### 方法

#### 1 試料

鶏肉及び豚肉は, 市販品を可能な限り脂肪層を取り除き, 細切均一化した.

#### 2 試薬

フルベンドゾールは, 関東化学社製食品分析用フルベンドゾール標準品(>99.0%)を用いた. 標準溶液は, フルベンドゾール(以下, FBZ) 10.0mgを500mLのメタノールに溶かし20 $\mu$ g/mLの標準原液を調製し, 逐次メタノールにて希釈して調製した. カラムクロマトグラフィ用アルミナ(酸性)は, Waters社製Sep-Pak用充填剤Alumina A(粒子径50-300 $\mu$ m)を, またミニカートリッジカラム(以下, ミニカラム)は, Waters社製Sep-Pak Plus Alumina A(粒子径50-300 $\mu$ m, 充填剤量1.71g)を用いた. その他の試薬は, 残留農薬用または特級を用いた.

#### 3 装置及び測定条件

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ: ヒューレットパッカード社製HP-1100(以下, HPLC)(測定条件)

分離カラム: Inertsil ODS-3 4.6 $\times$ 150mm

移動相: アセトニトリル: 水 (7:13)

測定波長: 313nm

流速: 1.2mL/min

注入量: 20 $\mu$ L

定量下限値: 0.001 $\mu$ g/mL (S/N=3)

#### 4 充填カラム及びミニカラムの調整

カラムクロマトグラフィ用アルミナ(酸性)の充填カラムは, 用時調整した. アルミナは130 $^{\circ}$ C, 15hr活性化後デシケーター内で放冷し, 表1に従って活性度I, II, IIIに調整した<sup>4)</sup>. 公定法ではミニカラムの充填量は1.85gであるが現在, 一般に市販されているミニカラムの充填量は, 1.71gであるので活性度を調整したアルミナの充填量は1.7gとした. これをガラスウールで綿栓した内径1cmのガラス製注射筒に均一に充填した. 充填カラムはマニホールドに装着し, 酢酸エチル10mLであらかじめコンデショニングした. ミニカラムも同様に酢酸エチル10mLであらかじめコンデショニング後使用した.

表1 アルミナAの活性度と水分含量 (%)

活性度	アルミナの水分含量
I	0
II	3
III	8

アルミナAを130℃、15時間活性化し、  
放冷後、精製水を添加し均一に混和した

## 5 カラム負荷用の試料溶液の調製

市販の鶏肉及び豚肉試料250g（25検体分）をカラムに負荷する直前まであらかじめ公定法に従って抽出した。FBZの標準溶液（1 $\mu$ g/mL 25mL）を減圧乾固し、これを各々の肉試料250gからの抽出溶液約200mLで溶解し、酢酸エチルで250mLとし、0.1 $\mu$ g/mLのカラム負荷用の試料溶液を調製した。

## 結果および考察

### 1 活性度の違いによる充填カラムの溶出挙動

活性度ⅠからⅢの充填カラムにFBZ標準品0.1 $\mu$ g/mLの酢酸エチル溶液及びカラム負荷用試料溶液を各々公定法とおり10mL負荷した。カラムの滴下速度はマニホールドを調整し、2~3mL/minとした。実験の繰り返し回数はn=3とした。10mLの酢酸エチル溶液をカラムに負荷した直後の溶出液をF1（以後、負荷液）とし、次に

酢酸エチル10mLで洗浄した直後の溶出液をF2（以後、洗浄液）とした。さらに20%エタノール-酢酸エチル溶液（以後、エタノール-酢酸エチル溶出液）を80mLまで10mLずつ溶出させた各フラクションはF01からF08とした。

表2に示すとおり活性度Ⅰ（含水率0%）から活性度Ⅲ（含水率8%）までのアルミナ（酸性）において公定法では捨てる溶出液である負荷液と洗浄液には、標準品の酢酸エチル溶液負荷後、FBZの溶出が認められなかった。しかし、鶏肉、豚肉の負荷液及び洗浄液からはいずれの負荷液、洗浄液からも溶出が認められた。その溶出は、カラムの水分含量が増えるに従って増加の傾向にあり、鶏肉で約3~10%、豚肉で約10~20%であった。その溶出の大部分は、負荷液（F1）に起因するものであった。

しかしながら負荷用試料液を濃縮して酢酸エチル溶液2mLとした時、いずれの活性度でも負荷液、洗浄液に溶出はなかった。

公定法で分取する部分は、20%エタノール-酢酸エチ

表2 フラクションによるカラムの回収率及びカラムからの総回収率

試料名及びカラム種別	(%)									
	F1	F2	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08total(F1~F08)
標準品(活性度Ⅰ)	0	0	84.1 $\pm$ 3.0	3.6 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.4	0	0	0	0	089.2 $\pm$ 2.6
標準品(活性度Ⅱ)	0	0	79.1 $\pm$ 2.4	4.0 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.4	0	0	0	0	085.0 $\pm$ 2.2
標準品(活性度Ⅲ)	0	0	58.6 $\pm$ 16.8	10.6 $\pm$ 2.4	3.8 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	078.8 $\pm$ 18.0
鶏肉(活性度Ⅰ)	1.8 $\pm$ 2.1	1.1 $\pm$ 1.8	77.5 $\pm$ 2.3	3.2 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.8	0	0	0	0	084.5 $\pm$ 0.6
鶏肉(活性度Ⅱ)	5.7 $\pm$ 2.5	1.2 $\pm$ 1.1	76.7 $\pm$ 7.1	4.4 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 1.5	0	0	0	0	091.3 $\pm$ 9.9
鶏肉(活性度Ⅲ)	8.3 $\pm$ 5.7	1.3 $\pm$ 1.3	73.0 $\pm$ 5.4	7.6 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 2.6	1.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.6	0	0	093.7 $\pm$ 1.8
豚肉(活性度Ⅰ)	8.8 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 1.1	81.4 $\pm$ 3.6	3.8 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 0.6	0	0	0	0	098.8 $\pm$ 4.0
豚肉(活性度Ⅱ)	15.0 $\pm$ 3.1	1.4 $\pm$ 1.2	65.7 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.8	0	0	0	094.8 $\pm$ 10.2
豚肉(活性度Ⅲ)	17.1 $\pm$ 5.9	1.2 $\pm$ 2.1	59.9 $\pm$ 2.1	9.2 $\pm$ 2.5	9.2 $\pm$ 2.5	2.8 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.6	0	096.7 $\pm$ 7.3
鶏肉(Sep-Pak Plus A)	0	0	74.1 $\pm$ 8.7	13.2 $\pm$ 5.7	13.2 $\pm$ 5.7	2.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.8	0	0	093.4 $\pm$ 1.0
鶏肉(Sep-Pak Plus B)	0	0	58.3 $\pm$ 0.8	20.3 $\pm$ 1.2	20.3 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3	0	0	091.5 $\pm$ 1.4
鶏肉(Sep-Pak Plus C)	0	0	71.3 $\pm$ 3.9	8.0 $\pm$ 3.6	8.0 $\pm$ 3.6	3.1 $\pm$ 2.7	0	0	0	087.8 $\pm$ 8.1
鶏肉(Sep-Pak Plus D)	4.1 $\pm$ 1.9	0.5 $\pm$ 0.9	68.2 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 1.0	3.7 $\pm$ 2.0	1.5 $\pm$ 0.2	0	0	095.9 $\pm$ 3.6
鶏肉(Sep-Pak Plus E)	0	0	60.9 $\pm$ 3.8	15.0 $\pm$ 3.0	15.0 $\pm$ 3.0	3.0 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	0	088.7 $\pm$ 0.8

n=3

充填カラム:アルミナA 1.7g      活性度Ⅰ:水分含量 0%      活性度Ⅱ:水分含量 3%      活性度Ⅲ:水分含量 8%

Sep-Pak Plus:アルミナA 1.71g      Sep-Pak Plus A:平成11年12月購入      Sep-Pak Plus B:平成11年9月購入

Sep-Pak Plus C:平成12年1月購入      Sep-Pak Plus D:平成12年11月購入      Sep-Pak Plus E:平成12年12月購入

標準品:フルベンダゾール 0.1 $\mu$ g/mL酢酸エチル溶液 10mL

鶏肉:フルベンダゾール 0.1 $\mu$ g/mLを添加した酢酸エチル抽出溶液 10mL

豚肉:フルベンダゾール 0.1 $\mu$ g/mLを添加した酢酸エチル抽出溶液 10mL

F1:酢酸エチル抽出溶液10mLのカラム負荷直後の溶出液(負荷液) 10mL

F2:酢酸エチル10mLで洗浄直後の溶出液(洗浄液) 10mL

F01~F08:20%エタノール-酢酸エチル溶液 10mLずつ流した溶出液(エタノール-酢酸エチル溶出液) 各10mL

ル溶液15mLと定められている。このフラクションは、本実験のF01及びF02の最初の5mLを合わせた部分(F01～F02の一部)に相当する。F01～F02は標準品と鶏肉及び豚肉の間に顕著な差は認められなかった。また、いずれにおいても分取の主要なフラクションであるエタノール-酢酸エチル溶出液F01のFBZは、カラムの含水率が増えるに従って減少する傾向にあった。従って、カラムの含水率が増えると公定法では捨てるべきフラクションにFBZが溶出し、分取すべきフラクションにFBZが回収されない傾向が明らかとなった。

また、FBZはいったん保持されるとカラムの含水率が高いほどエタノール-酢酸エチル溶出液で溶出されにくい傾向にあり、FBZが検出されるフラクションは、含水率が高いほど増える傾向にあった(表2)。

2 ミニカラムのロット差による溶出挙動

平成11年9月から平成12年12月までに購入した市販のミニカラム5ロットについて鶏肉の試料溶液を用い、その溶出挙動を検討した。

充填カラムと同様に公定法では、負荷液と洗浄液は捨てるフラクションであるが、表2からカラムDは、5%前後の溶出が認められ、ロットによって市販のミニカラムの中には負荷液と洗浄液からFBZが溶出することがわかった。公定法ではミニカラムにより分取するエタノール-酢酸エチル溶出液は15mLであるが、各ロットともに表2に示すとおりF01及びF02の20mLを越えてもまだ、FBZの溶出が認められ、溶出が完了しているはずの表2のエタノール-酢酸エチル溶出液F03～F07で約6～13%のFBZの溶出が認められた。また、F01～F05までにほとんどのロットでFBZの溶出は終わるが、ロットによってはF06まで溶出するもの(ミニカラムE)があった。また、ミニカラムDは充填カラムの溶出挙動に比較すると本実験の活性度Ⅱ～Ⅲに相当していた(表2)。

市販ミニカラムの活性度は、メーカーによれば含水率0～3%の間であるとしているが、F03～F07の溶出挙動から充填カラムとミニカラムは、同じ挙動を示していないことがわかった(表2)。その違いは充填カラムが、ミニカラムのアルミナAと同じ充填剤を使用しているので今回の活性化の条件がメーカーと異なるため溶出時の保持に影響が生じたものと思われる。

3 改善した公定法と添加回収実験

3.1 公定法の改善点

公定法では負荷液を10mLとしているが、鶏肉、豚肉の試料液ではどの活性度の充填カラムからもFBZの溶出が認められ、ミニカラムにおいてもFBZを溶出する

ロットがあるため負荷液をできるだけ少量とし、カラム負荷時の容量は1mLで2回とした。

公定法のミニカラムのエタノール-酢酸エチル溶出液は15mLであるが、ミニカラムの各ロットの溶出挙動からエタノール-酢酸エチル溶出液F06まで溶出するものがあり、エタノール-酢酸エチル溶出液は70mLとした。なお、鶏肉及び豚肉の充填カラムのエタノール-酢酸エチル溶出液の分析では、クロマトグラム上、エタノール-酢酸エチル溶出液80mLまで妨害ピークは認められなかった。

公定法では試験溶液の最終溶媒は、移動相と同じアセトニトリル-水(7:13)であるが、本法ではFBZの標準溶液調製時に用いたメタノールを使用することとした。

これらの改善点を図1の分析法のスキームに示した。

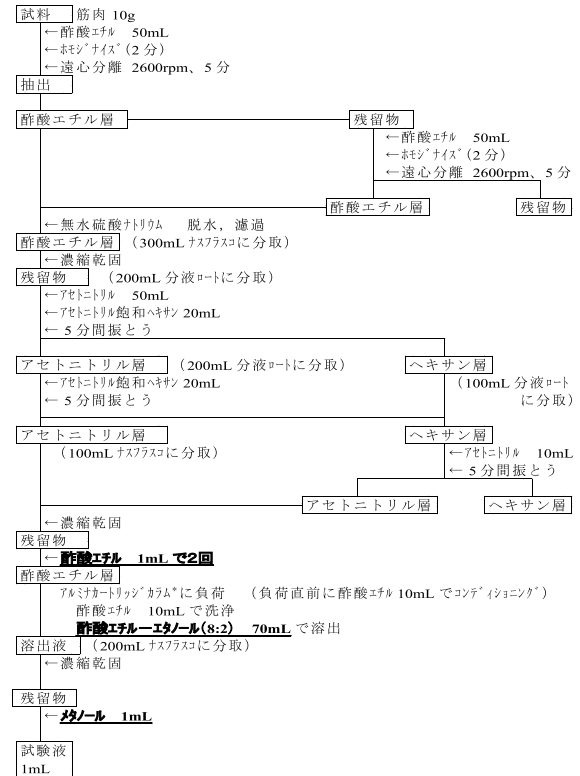


図1 フルベンダゾール分析法

改善点は下線部分

\*アルミナカートリッジカラム : Sep-Pak Plus Alumina A (充填剤量1710mg) 公定法では充填剤量1850mg

3.2 添加回収実験

市販の鶏肉10.0gを用いてFBZ 0.1μg (0.1μg/mL 1mL)を添加し、上記の改善試験法を用いて試験溶液を

調製し、HPLCで測定した。使用したミニカラムは、Dであった。添加回収実験の繰り返し回数はn=6とした。検量線は、0.1, 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4点で相関係数0.99976の原点を通る良好な直線性を示した。図2に代

表的なクロマトグラムを示した。また、添加回収実験の結果を表3に示した。回収率の平均値は101.4%、標準偏差3.5、変動係数3.5%と良好な結果が得られた。

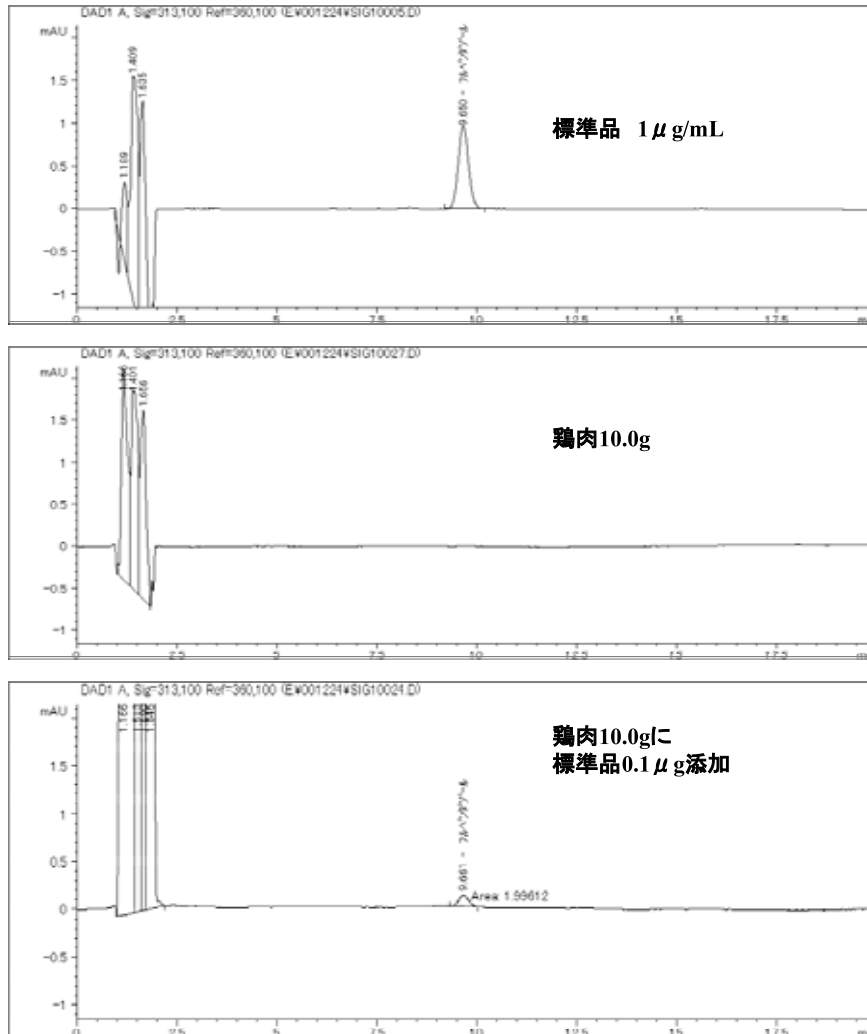


図2 添加回収実験（鶏肉）のクロマトグラム

表3 フルベンダゾール添加回収実験結果

sample No.	回収率(%)
1	98.8
2	101.0
3	95.9
4	103.9
5	104.7
6	103.9

鶏肉10.0gにFBZ 0.1 $\mu\text{g}$ を添加

### まとめ

従来、当所の行政依頼検査において鶏肉及び豚肉の分析時に行っている添加回収実験は概ね鶏肉が54~78%、豚肉が62~94%の結果が得られており、公定法通り行ってもかなり回収率に差があることが知られていた。今回の検討によってその原因の一つにアルミナカラムの使用法によることが明らかとなった。アルミナ A についてはロット差が大きく分析前にあらかじめロットごとの溶出フラクションの確認が必要であるが、改善した本試験法を用いればミニカラムのロット差があっても分析値に及ぼすカラムの影響をかなり少なくすることができ

るものと考え。また、このロット差は水分含量によるものと思われるが、市販ミニカラムを用いて活性度を調製することは困難であり、今後、水分含量または活性度が明らかな製品の供給が望まれる。

#### 文献

- 1) 中澤裕之, 堀江正一: 食品に残留する動物用医薬品の新知識, 食品化学新聞社, 東京 (1998)
- 2) 中澤裕之監修: 動物用医薬品データブック, 林純薬工業, 大阪 (1998)
- 3) 厚生省生活衛生局: 厚生省告示第218号, 平成7年12月26日
- 4) 大岳 望, 鈴木昭憲, 高橋信孝, 室伏 旭, 米原 弘: 物質の単離と精製, 東京大学出版会, pp. 67-68, 東京 (1976)