

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

メベンダゾール試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

メベンダゾールはヤンセン社によって開発されたベンズイミダゾール系駆虫剤であり、虫体のグルコース取り込み阻害作用、グリコーゲンの枯渇、ATP合成抑制作用により駆虫作用を示す。

厚生労働省通知試験法（以下「通知法」と略す）としてアルベンダゾール、オキシベンダゾール、チアベンダゾール、フルベンダゾール及びメベンダゾール試験法（畜水産物）が示されているが、規制対象である（2-アミノ-1*H*-ベンズイミダゾール-5-イル）フェニルメタノン（以下「代謝物A」と略す）及びメチル[5-(1ヒドロキシ-1-フェニル)メチル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-イル]カルバメート（以下「代謝物B」と略す）は測定対象として含まれていない。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、代謝物を含む試験法の開発を行った。

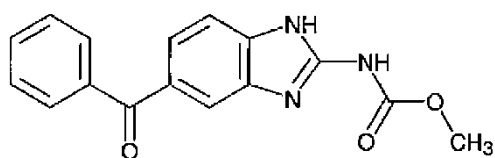
1) 規制対象物質

- ・メベンダゾール
- ・代謝物A
- ・代謝物B

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

メベンダゾール



化学式：C₁₆H₁₃N₃O₃

分子量：295.29

化学名：methyl (5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamate

外観：無臭白色～微黄色粉末

融点：287～289℃

溶解性：水 <0.001 (pH6.3)

ギ酸 22、ジメチルスルホキシド 1.58、ジメチルホルムアミド 0.41、アセトン 0.073、
クロロホルム 0.063、メタノール 0.056、酢酸エチル 0.054、エタノール 0.035、
0.1 N塩酸試液 0.013、ヘキサン <0.001、0.01 N水酸化ナトリウム試液 <0.001

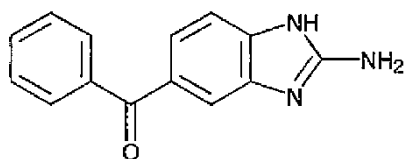
(以上 g/100 mL)

酸塩基解離定数：pK_{a1}=3.53 (ベンズイミダゾール部分)

pK_{a2}=9.97 (カルバメート部分)

安定性：室温で安定、アルカリ側で分解

代謝物A

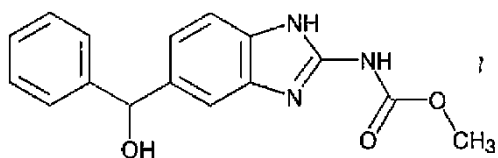


化学式：C₁₄H₁₁N₃O

分子量：237.26

化学名：(2-amino-1*H*-benzimidazole-5-yl) phenylmethanone

代謝物B



化学式：C₁₆H₁₅N₃O₃

分子量：297.31

化学名：[5-(1hydroxy-1-phenyl) methyl-1*H*-benzimidazole-2-yl] carbamate

2) 基準値

なし（一律基準）

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は全体を細切均一化した。
- ④鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑤鶏卵は殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑦はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑧うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑨さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑩しじみは貝殻を除き、約5分間水切りを行った後細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

メベンダゾール標準品：純度99.9% (Sigma-Aldrich製)

代謝物A標準品：純度99.7% (Sigma-Aldrich製)

代謝物B標準品：純度99.5% (Sigma-Aldrich製)

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

メタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸：特級（関東化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

：InertSep C18-C（充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：メベンダゾール標準品10 mgを精秤し、ジメチルスルホキシドに溶かして200 mg/L溶液を調製した。

代謝物A標準品10 mgを精秤し、ジメチルスルホキシドに溶かして200 mg/L溶液を調製した。

代謝物B標準品5 mgをを精秤し、ジメチルスルホキシドに溶かして200 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：メベンダゾール標準原液、代謝物A標準原液及び代謝物B標準原液をギ酸、水及びメタノール（1：30：70）混液で希釈し、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B0.0002～0.0006 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：メベンダゾール標準原液、代謝物A標準原液及び代謝物B標準原液をアセトンで希釈して0.2 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

n-ヘキサン飽和アセトニトリル

n-ヘキサン200 mL及びアセトニトリル1000 mLを混合し、5分間振とうした後アセトニトリル層を採った。

水及びメタノール（4：1）混液

水400 mL及びメタノール100 mLを混合した。

ギ酸、水及びメタノール（1：30：70）混液

ギ酸5 mL、水150 mL及びメタノール350 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200Q トラップ	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1200	Agilent Technologies
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	Inertsil ODS-3 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 4 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液：0.1 vol% ギ酸 B液：メタノール																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>18.1</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>23.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	10.0	40	60	18.0	40	60	18.1	10	90	23.0	10	90	23.1	90	10
時間(分)	A液(%)	B液(%)																						
0.0	90	10																						
10.0	40	60																						
18.0	40	60																						
18.1	10	90																						
23.0	10	90																						
23.1	90	10																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (+)																							
キャピラリ電圧 (V)	5500																							
脱溶媒温度 (°C)	700																							
脱溶媒ガス	窒素 80 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	メベンダゾール： +296→264[コーン電圧：51(V)、コリジョンエネルギー：31(eV)] 代謝物 A： +238→105[コーン電圧：86(V)、コリジョンエネルギー：37(eV)] 代謝物 B： +298→79[コーン電圧：46(V)、コリジョンエネルギー：57(eV)]																							
定性イオン (m/z)	メベンダゾール： +296→105[コーン電圧：51(V)、コリジョンエネルギー：45(eV)] 代謝物 A： +238→77[コーン電圧：86(V)、コリジョンエネルギー：51(eV)] 代謝物 B： +298→266[コーン電圧：46(V)、コリジョンエネルギー：27(eV)]																							
保持時間 (min)	メベンダゾール：17.5 代謝物A：10.4 代謝物B：11.9																							

5. 定量

メベンダゾールをジメチルスルホキシドに溶かし、200 mg/Lの標準原液を調製した。代謝物Aをジメチルスルホキシドに溶かし、200 mg/Lの標準原液を調製した。代謝物Bをジメチルスルホキシドに溶かし、200 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液をギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で希釈し、0.0002、0.0003、0.0004、0.0005及び0.0006 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用混合標準溶液を使用した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.2 mg/Lを0.4 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。なお、添加濃度についてはメベンダゾール及び代謝物Bについては0.008 ppm相当、代謝物Aについてはメベンダゾールに換算して0.01 ppm相当となるように添加した。

7. 試験溶液の調製

メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bを試料からアセトン抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した（はちみつの場合は省略）。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

①はちみつ以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から正確に10 mLを分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで濃縮した後、*n*-ヘキサン30 mLを用いて100 mL分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、水3 mLを加えてロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約3 mLまで濃縮した後水20 mLを加えた。

②はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え、溶解した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から正確に10 mLを分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで濃縮した後水20 mLを加えた。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18-C (1,000 mg)] にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに1) で得られた液を注入した後水及びメタノール (4 : 1) 10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに採り、ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

①はちみつ以外

秤 取

↓ 試料10.0 g

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
 - | 吸引ろ過
 - | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
 - | 吸引ろ過
 - | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液10 mL分取

濃 縮

↓ 約1 mLまで減圧濃縮

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | *n*-ヘキサン30 mL
 - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
 - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル層を採る
 - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
 - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル層を合わせる
- ↓ 水3 mLを加える

濃 縮

↓ 約3 mLまで減圧濃縮後水20 mLを加える

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) 精製

- | メタノール及び水各5 mLでコンディショニング
 - | 全量注入
 - | 水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで洗浄
 - | ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLで溶出
- ↓ ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 µL注入

②はちみつ

秤 取

↓ 試料10.0 gに水20 mLを加え溶解

アセトン抽出

| アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過

| 残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過

| ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする

↓ 抽出液10 mL分取

濃 縮

↓ 約1 mLまで減圧濃縮した後水20 mLを加える

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) 精製

| メタノール及び水各5 mLでコンディショニング

| 全量注入

| 水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで洗浄

| ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLで溶出

↓ ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0004 mg/Lの検量線用混合標準溶液0.5 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

メベンダゾール、代謝物A及び代謝物BはESI (+) モードでの測定が可能であった。メベンダゾールのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして296が得られたので、メベンダゾールのプロトン付加分子 (m/z 296 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 296をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度として m/z 264が強く、次いで m/z 105であったため、 m/z 264を定量用イオン、 m/z 105を定性用イオンとした。

代謝物AのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして238が得られたので、代謝物Aのプロトン付加分子 (m/z 238 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 238をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。強度として m/z 105が強く、次いで m/z 77であったため、 m/z 105を定量用イオン、 m/z 77を定性用イオンとした。

代謝物BのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図5に示した。その結果から、基準ピークとして298が得られたので、代謝物Bのプロトン付加分子 (m/z 298 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 298をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図6に示した。強度として m/z 266が強く、次いで m/z 79であったが、 m/z 266はノイズが大きかったため、より定量性及び選択性の高い m/z 79を定量用イオン、 m/z 266を定性用イオンとした。

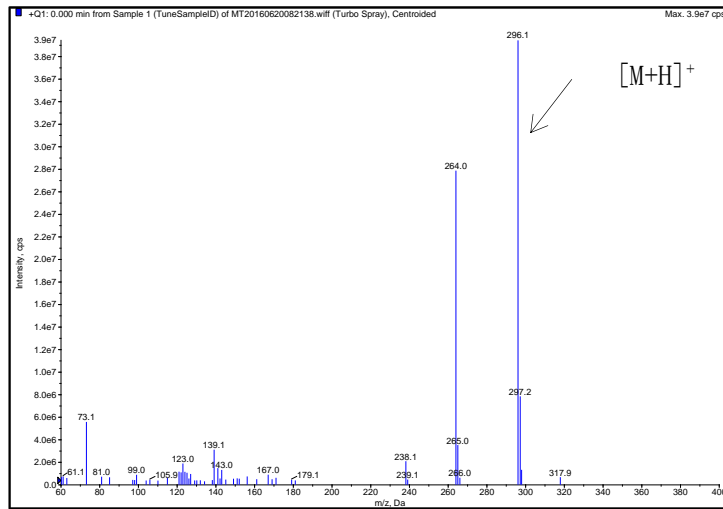


図1 メベンダゾールのマススペクトル
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=51 (CV=コーン電圧)

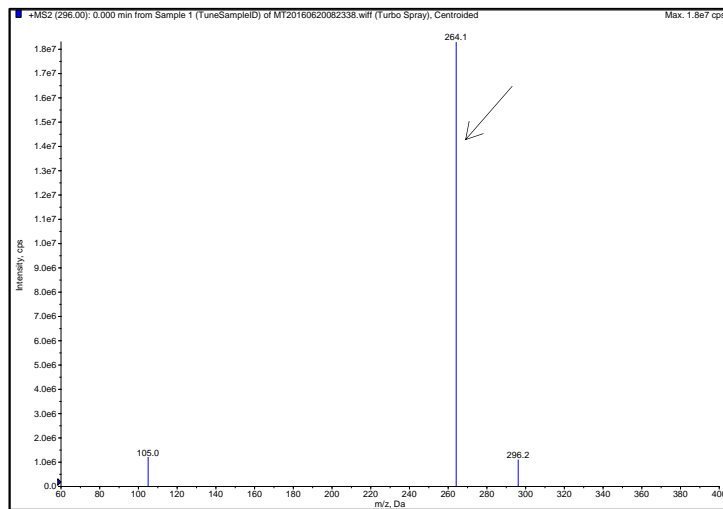


図2-1 メベンダゾールのプリカーサイオン m/z 296のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=51、CE=31 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

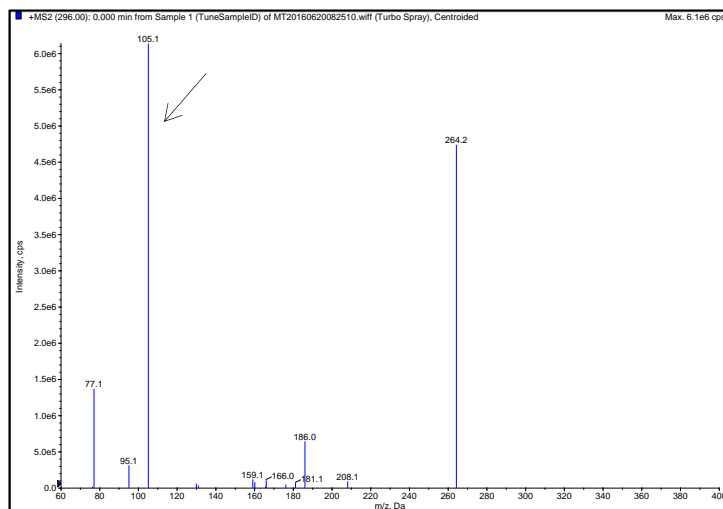


図2-2 メベンダゾールのプリカーサイオン m/z 296のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=51、CE=45 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

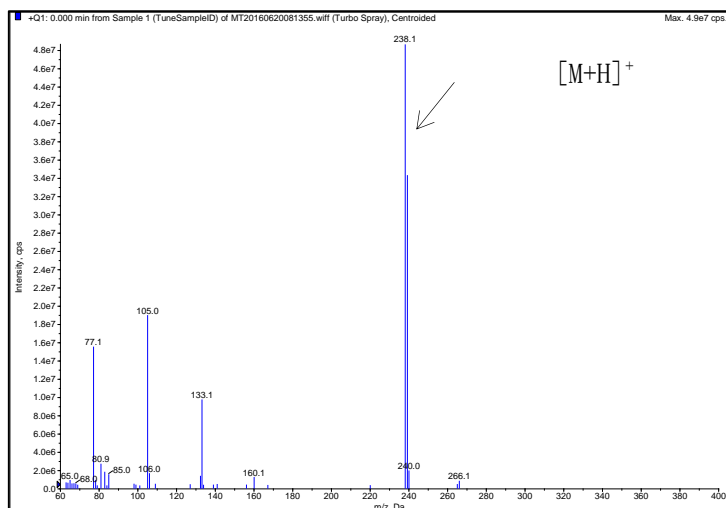


図3 代謝物Aのマススペクトル
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=86 (CV=コーン電圧)

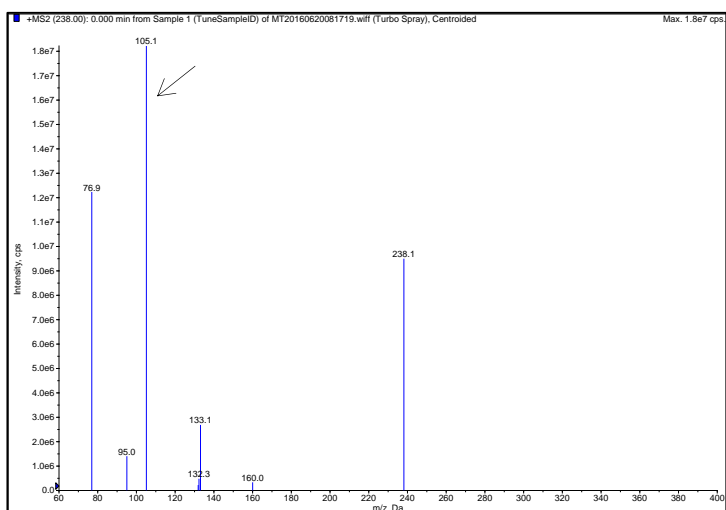


図4-1 代謝物Aのプリカーサーイオン m/z 238のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=86、CE=37 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

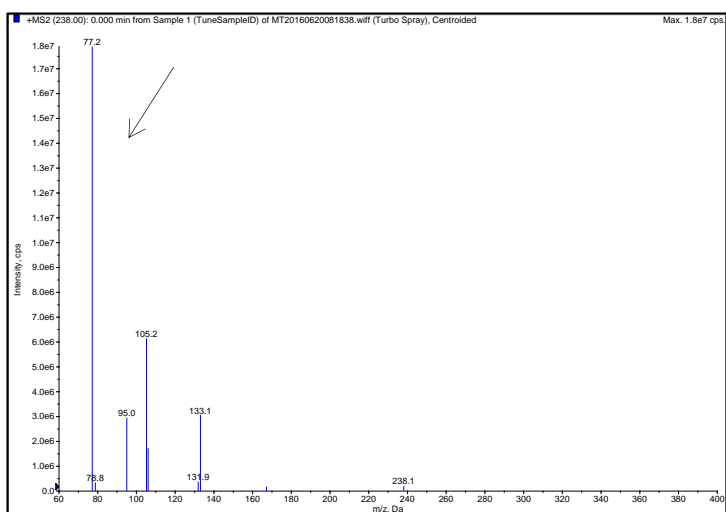


図4-2 代謝物Aのプリカーサーイオン m/z 238のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：60~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=86、CE=51 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

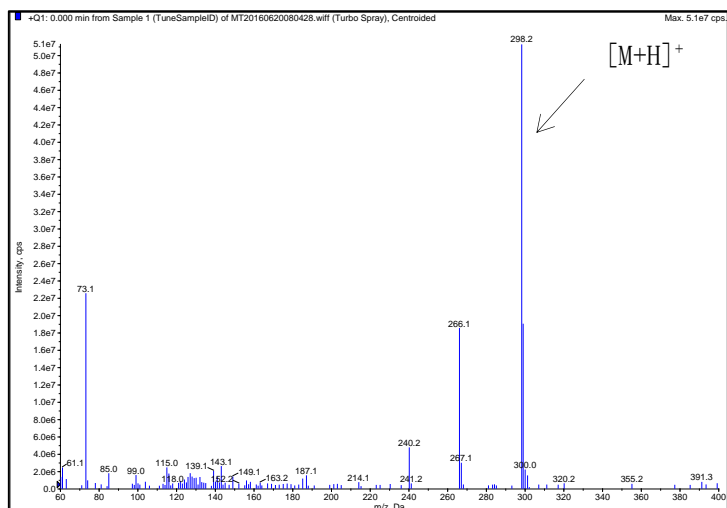


図5 代謝物Bのマススペクトル
 スキャン範囲：60～400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=46 (CV=コーン電圧)

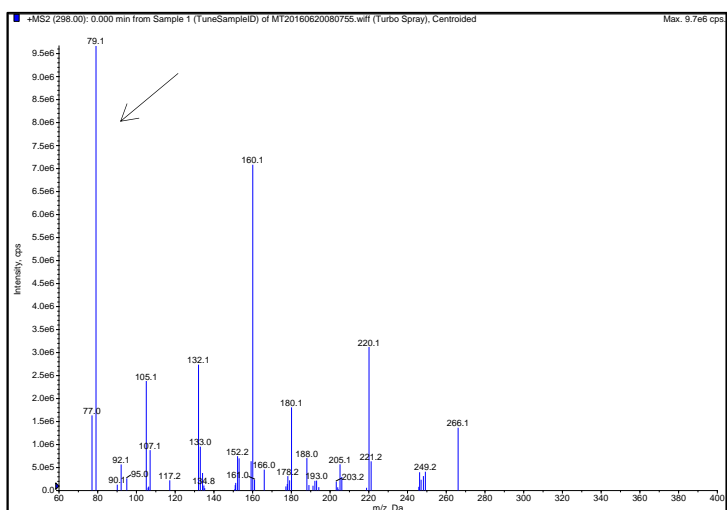


図6-1 代謝物Bのプリカーサーイオン m/z 298のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：60～400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=46、CE=57 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

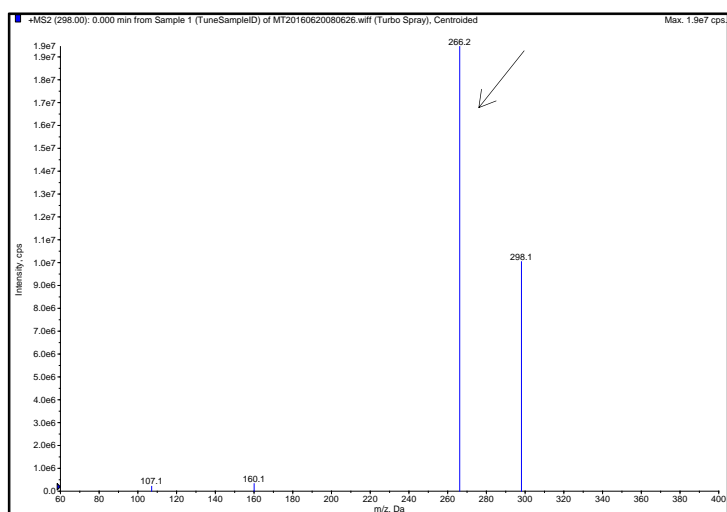


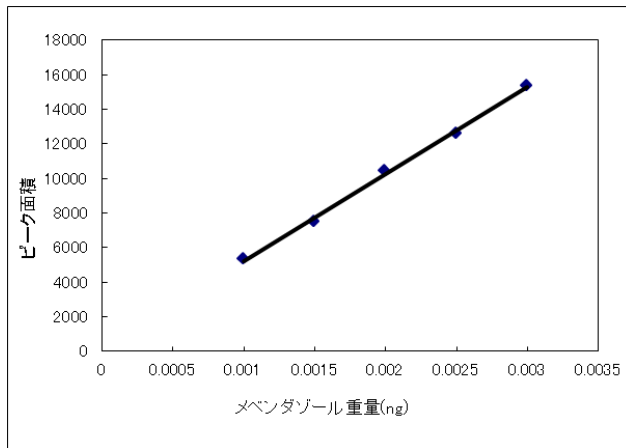
図6-2 代謝物Bのプリカーサーイオン m/z 298のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：60～400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=46、CE=27 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分離カラムとしてInertsil ODS-3（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径4 μm）を用い、移動相条件について、0.1 vol%ギ酸及びメタノールを用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはInertsil ODS-3（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径4 μm）を、移動相には、0.1 vol%ギ酸及びメタノールを用い、0.1 vol%ギ酸及びメタノール（9：1）から（2：3）までの濃度勾配を10分間で行い、（2：3）で8分間保持した後、（1：9）で5分間保持することとした。

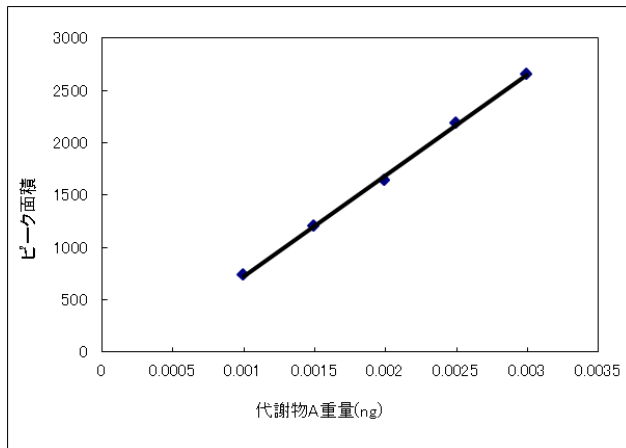
3) 検量線

図7にメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの検量線の例を示した。0.0002 mg/L（0.001 ng）～0.0006 mg/L（0.003 ng）の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は0.997以上であり良好な直線性を示した。



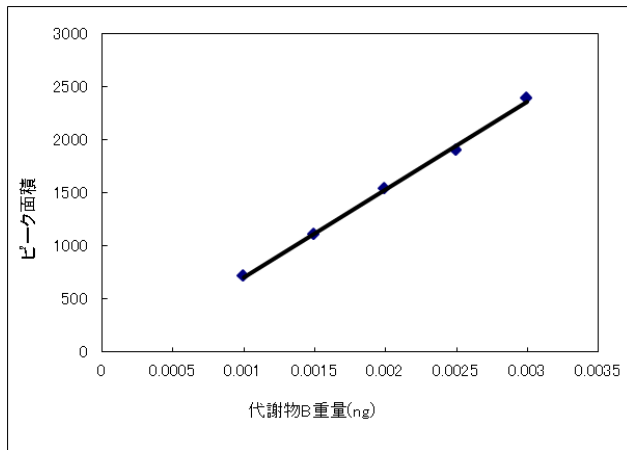
データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst
（AB SCIEX製）
ピークの定量方法：ピーク面積法
検量線の種類：最小二乗法
検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y = 5045200x - 173$
 $R^2 = 0.9976$

図 7-1 メベンダゾール検量線例 (m/z 296→264)



データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst
（AB SCIEX製）
ピークの定量方法：ピーク面積法
検量線の種類：最小二乗法
検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y = 963200x - 240.8$
 $R^2 = 0.9987$

図 7-2 代謝物 A 検量線例 (m/z 238→105)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y = 824680x - 117.7$
 $R^2 = 0.9980$

図 7-3 代謝物 B 検量線例 (m/z 298→79)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.008 \text{ mg/kg} \left[(10 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/5 \mu\text{L}) \right]$$

代謝物Aのメベンダゾールとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.009952 \text{ mg/kg} \left[(10 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/5 \mu\text{L}) \times 1.244^{*2} \right]$$

代謝物Bのメベンダゾールとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.007944 \text{ mg/kg} \left[(10 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/5 \mu\text{L}) \times 0.9932^{*3} \right]$$

*1 10.0 g × 10 mL/200 mL

*2 メベンダゾールの分子量295.29/代謝物Aの分子量237.25

*3 メベンダゾールの分子量295.29/代謝物Bの分子量297.30

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

現行の通知法は、アセトニトリル及び*n*-ヘキサンで抽出を行い、アセトニトリル層を分取する方法であり、この通知法には代謝物A及び代謝物Bは測定対象に含まれていない。本検討では、畜水産物試料との混和性を考慮し抽出溶媒にアセトンを選択し、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの抽出を行うこととした。

2) 濃縮操作の検討

メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bについて濃縮乾固操作による回収率の低下があるか検討した。さけ試料を「分析法フローチャート」に従って抽出した後、アセトニトリル/ヘキサン分配を実施し、アセトニトリル層を試験溶液とした。アセトニトリル層10 mLをとり、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.1 μgを添加した後、①約1 mLまで減圧濃縮後に乾固せずにアセトニトリルで10 mLに再定容したもの、②約1 mLまで減圧濃縮した後に窒素ガスを吹き付けて乾固操作を行い、アセトニトリル10 mLに再溶解したものについて算出した回収率を表1に示した。減圧濃縮後に乾固した場合には、いずれの成分も回収率の低下及びばらつきが確認されたが、乾固せず10 mL再定容した場合は回収率の低下はみられなかった。なお、標準溶液のみでは濃縮乾固操作による回収率の低下は認められなかった。

以上より、分析操作で濃縮操作を行う際には試験溶液を乾固させない方法を採用することとした。

表1 濃縮操作時の乾固の有無による各成分の回収率 (%)

		①乾固なし	②乾固あり	
		(減圧濃縮のみ)	試行数 1	試行数 2
メベンダゾール	標準溶液	95	94	99
	さけ試料共存下	103	84	75
代謝物 A	標準溶液	98	94	98
	さけ試料共存下	95	75	62
代謝物 B	標準溶液	99	95	98
	さけ試料共存下	97	83	74

添加量：各0.1 µg

さけ試料0.5 g相当共存下

濃縮前の溶液の面積を100%として算出

3) 酢酸エチル転溶の検討

10 w/v%塩化ナトリウム100 mLにメベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.01 µgを添加し、酢酸エチル100 mL及び50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表2に示した。

メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bは酢酸エチル2回で抽出可能であったが、2) より、濃縮乾固を行わないフローを採用とするため、不採用とした。

表2 酢酸エチルへの転溶率 (%)

	100 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
メベンダゾール	88	6	0	94
代謝物 A	78	12	1	91
代謝物 B	85	7	0	92

添加量：各0.01 µg

4) 脱脂操作の検討

脱脂操作としてアセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。*n*-ヘキサン30 mLにメベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.01 µgを添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回振とう抽出を行った結果を表3に示した。なお、実際の分析操作を想定し、1回目の抽出には水1 mLを加えた。メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bはいずれも2回の抽出で抽出できたことから、分配操作は*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回抽出することとした。なお、濃縮乾固操作時の損失を防ぐため、アセトニトリルの濃縮操作前には水3 mLを加えてから濃縮することとした。

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL	30 mL	30 mL	
	及び水 1 mL			
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
メベンダゾール	98	5	0	103
代謝物 A	96	5	0	101
代謝物 B	91	7	0	98

添加量：各 0.01 µg

4) 精製方法の検討

①オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製について検討した。C18カラムでも保持力が強めであるInertSep C18-C（充てん量1,000 mg）を用いて検討を行い、良好な精製効果が得られたが、本分析法はメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの3成分を分析対象化合物としているため、種類やメーカーにより保持力の異なるC18カラムについても溶出挙動の確認を行った。使用したカラムは同メーカーで種類の違うInertSep C18（充てん量1,000 mg）及びInertSep C18-B（充てん量1,000 mg）、他メーカー製のBond Elut C18（充てん量1,000 mg）の3種を選択し、下記a)～d)の検討、確認を実施した。

a) 水及びメタノール混液を溶出溶媒として使用した際の溶出状況

InertSep C18（充てん量1,000 mg）、InertSep C18-B（充てん量1,000 mg）、InertSep C18-C（充てん量1,000 mg）及びBond Elut C18（充てん量1,000 mg）を用いて溶出の比較を行った。それぞれメタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.02 µgを水及びメタノールの混液各10 mLでオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表4に示した。各カラムによって大きく溶出挙動が異なる結果となった。保持力はBond Elut C18、InertSep C18-C、InertSep C18-B、InertSep C18の順となる傾向が確認され、特に代謝物Aについて傾向が顕著であり、メタノールではBond Elut C18から代謝物Aを溶出することができなかった。

表4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況① (%)

	溶出量 (mL)	水及びメタノール								メタノール	合計	
		9:1	4:1	7:3	3:2	1:1	2:3	3:7	1:4			1:9
メベンダゾール	InertSep C18	0	0	0	0	22	75	2	0	0	0	99
	InertSep C18-B	0	0	0	0	0	94	0	0	0	0	94
	InertSep C18-C	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	99
	Bond Elut C18	0	0	0	0	0	97	1	0	0	0	98
代謝物A	InertSep C18	0	0	0	11	77	11	3	0	0	0	102
	InertSep C18-B	0	0	0	0	0	0	77	20	0	0	97
	InertSep C18-C	0	0	0	0	0	0	5	97	0	0	102
	Bond Elut C18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
代謝物B	InertSep C18	0	0	0	26	79	0	0	0	0	0	105
	InertSep C18-B	0	0	0	0	100	2	0	0	0	0	102
	InertSep C18-C	0	0	0	0	94	7	0	0	0	0	101
	Bond Elut C18	0	0	0	0	24	71	0	0	0	0	95

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18-B、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、Agilent Technologies製

添加量：各0.02 µg

b) ギ酸及びメタノール混液を溶出溶媒として使用した際の溶出状況

a) の結果より、各ミニカラムの保持の違いは、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの残存シラノールとの相互作用によるものであると推測されたため、残存シラノールの活性を抑えるためギ酸酸性下で溶出を試みた。InertSep C18（充てん量1,000 mg）、InertSep C18-B（充てん量1,000 mg）、InertSep C18-C（充てん量1,000 mg）及びBond Elut C18（充てん量1,000 mg）をそれぞれメタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.02 µgを2 vol%ギ酸及びメタノールの混液各10 mLで各オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表5に示した。保持力はInertSep C18-C、InertSep C18-B、Bond Elut C18、InertSep C18の順となる傾向が確認されたが、いずれのミニカラムを用いた場合でも、メタノール比率60%まででメベンダゾール及び代謝物を溶出することができた。

以上の検討から、洗浄にはより保持の強い水及びメタノールの混液を用い、水及びメタノール（4：1）混液で洗浄を行い、ミニカラムからの溶出には溶出しやすいギ酸含有水及びメタノールの混液を使用することとし、混液中のメタノール濃度は70%とした。

表5 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況②（%）

溶出量 (mL)	2 vol%ギ酸及びメタノール									メタノール	合計	
	9:1	4:1	7:3	3:2	1:1	2:3	3:7	1:4	1:9			
メベンダゾール	InertSep C18	0	0	0	84	23	0	0	0	0	0	107
	InertSep C18-B	0	0	0	0	97	0	0	0	0	0	97
	InertSep C18-C	0	0	0	0	94	5	0	0	0	0	99
	Bond Elut C18	0	0	0	17	83	0	0	0	0	0	100
代謝物A	InertSep C18	0	0	80	17	0	0	0	0	0	0	97
	InertSep C18-B	0	0	0	91	9	0	0	0	0	0	100
	InertSep C18-C	0	0	0	66	28	0	0	0	0	0	94
	Bond Elut C18	0	0	5	91	0	0	0	0	0	0	96
代謝物B	InertSep C18	0	0	87	5	0	0	0	0	0	0	92
	InertSep C18-B	0	0	0	92	0	0	0	0	0	0	92
	InertSep C18-C	0	0	0	92	0	0	0	0	0	0	92
	Bond Elut C18	0	0	14	79	0	0	0	0	0	0	93

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製
 InertSep C18-B、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製
 InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製
 Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、Agilent Technologies製
 添加量：各0.02 µg

c) 溶出溶媒中のギ酸濃度の検討

次に、b) の結果より、今回の試験法で対象である3成分において保持が強いことが示唆されたInertSep C18-C (充てん量1,000 mg) を用いてオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムから溶出に必要なギ酸濃度について検討を行った。メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.02 µgを水20 mLで負荷し、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで洗浄した後、溶出液の調製法をギ酸、水及びメタノール (v/v/v) として、ギ酸濃度について約0.1 vol%、0.5 vol%、1 vol%及び2 vol%でそれぞれ溶出を行った結果を表6に示した。ギ酸濃度0.5 vol%以上であれば溶出ずれなく良好な溶出が確認された。以上より、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからはギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLで溶出することとした。

表6 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況③ (%)

溶出量 (mL)	カラム溶出溶媒 ギ酸、水及びメタノール (v/v/v)							
	(0.1 : 30 : 70)		(0.5 : 30 : 70)		(1 : 30 : 70)		(2 : 30 : 70)	
	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20
メベンダゾール	98	0	98	0	99	0	96	0
代謝物 A	90	6	98	0	97	0	88	0
代謝物 B	98	2	101	0	100	0	94	0

InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.02 µg

負荷、洗浄画分については溶出はみられなかったため記載を省略

d) 分析法に採用した条件での溶出

a) ~c) の結果から、InertSep C18-C (充てん量1,000 mg) を用いてメタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.02 µgを水20 mLで負荷し、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで洗浄した後ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液20 mLで溶出したときの溶出状況を表7に示した。メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bは水20 mL、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLでは溶出されず、ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLで溶出できた。

表7 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況④ (%)

溶出量 (mL)	水	水及びメタノール (4 : 1)	ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70)		合計
	20	10	0-10	10-20	
メベンダゾール	0	0	95	0	95
代謝物A	0	0	106	0	106
代謝物B	0	0	99	0	99

InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.02 µg

また、鶏の筋肉試料共存下においても d) と同様の溶出確認を行った。なお、鶏の筋肉試料共存下での溶出確認には、InertSep C18-C (充てん量 1,000 mg) に加え、InertSep C18 (充てん量 1,000 mg)、InertSep C18-B (充てん量 1,000 mg)、及び Bond Elut C18 (充てん量 1,000 mg) についても溶出の確認を行い、結果を表 8 に示した。

表8 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況⑤ (%)

溶出量 (mL)		水	水及びメタノール (4 : 1)	ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70)		合計
		20	10	0-10	10-20	
メベンダゾール	InertSep C18	0	0	103	0	103
	InertSep C18-B	0	0	103	0	103
	InertSep C18-C	0	0	97	0	97
	Bond Elut C18	0	0	92	0	92
代謝物A	InertSep C18	0	0	101	0	101
	InertSep C18-B	0	0	102	0	102
	InertSep C18-C	0	0	101	0	101
	Bond Elut C18	0	0	111	0	111
代謝物B	InertSep C18	0	0	103	0	103
	InertSep C18-B	0	0	103	0	103
	InertSep C18-C	0	0	93	0	93
	Bond Elut C18	0	0	100	0	100

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18-B、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、Agilent Technologies製

添加量：各0.02 µg

鶏の筋肉0.5 g相当共存下

表8の結果より、保持力の強めのC18カラムであるInertSep C18-C（充てん量1,000 mg）で確立した溶出条件において、試料共存下でも良好な結果が得られ、また、いずれのC18カラムを用いても同様の保持、溶出することが可能であることが確認された。

②ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

イオン交換カラムであるベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムでの検討を行った。メタノール及び0.01 mol/L塩酸各10 mLで予備洗浄した後、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B各0.02 µgをアセトン2 mLに溶解し、さらに0.01 mol/L塩酸10 mLを加え負荷し、メタノール10 mLを流下した後アンモニア水及びメタノール（1：99）混液20 mLで溶出したときの溶出状況を表9に示した。メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bは負荷液及びメタノールでは溶出せず、アンモニア水及びメタノール（1：99）混液10 mLで溶出された。しかし、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製の方が精製効果が高く、イオン交換カラムでの精製は不採用とした。

表9 ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況（%）

溶出量 (mL)	アセトン及び	メタノール	アンモニア水及びメタノール		合計
	0.01 mol/L塩酸		(1：99)		
	12	10	0-10	10-20	
メベンダゾール	0	0	95	0	95
代謝物A	0	0	83	0	83
代謝物B	0	0	90	0	90

Bond Elut SCX、充てん量500 mg、Agilent Technologies製
 添加量：各0.02 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。なお、添加濃度についてはメベンダゾール及び代謝物Bについては0.008 ppm相当、代謝物Aについてはメベンダゾールに換算して0.01 ppm相当となるように添加した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図8~10に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図11に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表10に示した。検討した何れの試料においてもメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表10 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 ²⁾ (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積 (高さ) ³⁾			選択性の評価 ⁵⁾	備考			
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴⁾ (b)			面積 (高さ) 比 (a)/(b)		
1	メベンダゾール	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		鶏卵	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		牛乳	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		はちみつ	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		うなぎ	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		さけ	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		しじみ	0.008	0.01	0.008	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
2	代謝物A	牛の筋肉	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.008	0.01	0.01	*	定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
3	代謝物B	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.008	0.01	0.008		定量限界	0.008	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表11に示した。メベンダゾールの真度は95~108%、併行精度は2~7%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Aの真度は94~105%、併行精度は2~10%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Bの真度は95~107%、併行精度は3~13%であり、目標値を十分に満たした。メベンダゾールのS/N比の平均値は185~400、代謝物AのS/N比の平均値は48~208、代謝物BのS/N比の平均値は38~103でありS/N≥10を十分に満たした。

表11 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³⁾			備考			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値		
1	メベンダゾール	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008		5045200	173	0.9976	96.9	106.7	100.9	103.1	99.0	101.3	3.7	440.8	195.8	318.3			
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008		5045200	173	0.9976	96.5	91.7	92.7	97.6	98.1	95.3	3.1	249.5	234.2	241.8			
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008		5045200	173	0.9976	102.7	99.2	106.6	90.6	104.6	100.7	6.2	343.3	200.8	272.0			
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008		4869600	471	0.9967	95.9	99.0	95.6	99.7	96.4	97.3	1.9	190.8	183.3	187.0			
		鶏卵	0.008	0.01	0.008		4869600	471	0.9967	97.8	103.2	96.5	96.0	84.8	95.7	7.0	222.0	178.5	200.3			
		牛乳	0.008	0.01	0.008		4869600	471	0.9967	100.5	100.7	102.8	93.6	102.8	100.1	3.8	198.3	172.0	185.1			
		はちみつ	0.008	0.01	0.008		4869600	471	0.9967	101.7	104.0	108.6	98.8	102.3	103.1	3.5	323.3	270.8	297.0			
		うなぎ	0.008	0.01	0.008		8839600	743	0.9987	103.9	114.4	113.7	102.7	103.2	107.6	5.5	355.8	328.3	342.0			
		さけ	0.008	0.01	0.008		5039600	-82	0.9966	106.9	106.4	105.5	107.5	103.1	105.9	1.6	405.8	393.3	389.5			
		しじみ	0.008	0.01	0.008		5039600	-82	0.9966	101.6	106.7	99.4	105.0	106.2	103.8	3.0	405.8	368.3	387.0			
		2	代謝物A	牛の筋肉	0.008	0.01	0.01	*	963200	-241	0.9987	93.3	93.3	101.4	115.7	93.9	99.6	9.7	50.1	45.5	47.8	
				牛の脂肪	0.008	0.01	0.01	*	963200	-241	0.9987	91.7	94.6	97.6	106.2	91.2	96.3	6.3	93.3	43.5	68.4	
				牛の肝臓	0.008	0.01	0.01	*	963200	-241	0.9987	108.8	105.0	104.8	95.1	93.1	101.4	6.8	113.3	38.5	75.9	
鶏の筋肉	0.008			0.01	0.01	*	971600	-252	0.9983	92.5	96.5	92.7	93.2	94.0	93.8	1.8	50.2	44.9	47.6			
鶏卵	0.008			0.01	0.01	*	971600	-252	0.9983	105.7	102.4	100.8	105.4	93.8	101.6	4.7	68.3	57.6	62.9			
牛乳	0.008			0.01	0.01	*	971600	-252	0.9983	100.6	108.8	102.4	103.1	108.4	104.7	3.5	58.0	44.8	51.4			
はちみつ	0.008			0.01	0.01	*	971600	-252	0.9983	92.7	91.4	111.1	100.1	109.8	101.0	9.2	68.3	43.8	56.0			
うなぎ	0.008			0.01	0.01	*	2053800	122	0.9970	93.7	98.8	97.9	93.7	88.8	94.6	4.2	225.8	190.8	208.3			
さけ	0.008			0.01	0.01	*	845280	57	0.9959	90.3	98.8	102.5	89.2	87.2	93.6	7.1	63.9	44.1	54.0			
しじみ	0.008			0.01	0.01	*	845280	57	0.9959	97.6	96.5	101.8	95.2	96.1	97.5	2.6	62.9	59.3	61.1			
3	代謝物B			牛の筋肉	0.008	0.01	0.008		824680	-118	0.9980	104.9	108.1	94.2	101.9	92.7	100.4	6.7	56.1	39.6	47.9	
				牛の脂肪	0.008	0.01	0.008		824680	-118	0.9980	105.9	101.4	85.9	104.8	107.7	101.1	8.7	79.1	28.5	53.8	
				牛の肝臓	0.008	0.01	0.008		824680	-118	0.9980	99.2	98.4	102.8	82.9	92.0	95.0	8.3	85.8	38.8	64.2	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008		733200	5	0.9962	111.4	107.8	94.5	105.3	90.8	101.9	8.7	54.5	29.6	42.1			
		鶏卵	0.008	0.01	0.008		733200	5	0.9962	111.3	110.4	98.8	87.1	84.9	98.5	12.6	59.9	36.9	48.4			
		牛乳	0.008	0.01	0.008		733200	5	0.9962	97.9	91.0	106.7	117.8	96.7	102.0	10.3	47.8	30.3	39.0			
		はちみつ	0.008	0.01	0.008		733200	5	0.9962	114.9	94.1	98.9	93.9	106.6	101.7	8.9	75.3	25.6	50.4			
		うなぎ	0.008	0.01	0.008		168880	12	0.9943	105.2	110.8	105.7	110.2	104.9	107.4	2.7	107.5	98.3	102.9			
		さけ	0.008	0.01	0.008		723120	25	0.9972	101.3	106.6	103.1	108.2	105.3	104.9	2.6	40.2	36.4	38.3			
		しじみ	0.008	0.01	0.008		723120	25	0.9972	91.2	108.5	100.4	115.9	117.8	106.8	10.4	42.0	40.2	41.1			

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表12に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。メベンダゾールの面積比は1.02~1.08、代謝物Aの面積比は0.92~1.06、代謝物Bの面積比は0.92~1.07であり、測定への影響はないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表12で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表13に示した。補正真度はメベンダゾール92~104%、代謝物A 91~108%、代謝物B 93~113%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表12 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ²⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ⁴⁾	ピーク面積(高さ) ³⁾					備考				
									マトリックス添加標準溶液 ⁵⁾		溶媒標準溶液		ピーク面積(高さ)比 ⁶⁾					
				n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均									
1	メベンダゾール	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11330	11150	11240.0	10430	10680	10555.0	1.06			
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	10780	10970	10875.0	10480	10490	10485.0	1.04			
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11580	11000	11290.0	10560	10460	10510.0	1.07			
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	10960	10740	10850.0	10430	10740	10585.0	1.03			
		鶏卵	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11010	11710	11360.0	11210	10670	10940.0	1.04			
		牛乳	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11160	11830	11495.0	11200	11240	11220.0	1.02			
		はちみつ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11160	11330	11245.0	10440	10540	10490.0	1.07			
		うなぎ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	16880	16940	16910.0	15570	17020	16295.0	1.04			
		さけ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11030	11430	11230.0	10280	10500	10390.0	1.08			
		しじみ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	11170	11400	11285.0	11140	11020	11080.0	1.02			
		2	代謝物A	牛の筋肉	0.008	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1553	1505	1529.0	1748	1564	1656.0	0.92	
				牛の脂肪	0.008	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1764	1547	1655.5	1564	1551	1557.5	1.06	
				牛の肝臓	0.008	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1496	1511	1503.5	1414	1615	1514.5	0.99	
鶏の筋肉	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1440	1630	1535.0	1657	1468	1562.5	0.98			
鶏卵	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1571	1697	1634.0	1862	1481	1671.5	0.98			
牛乳	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1561	1762	1661.5	1722	1462	1592.0	1.04			
はちみつ	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1568	1779	1673.5	1496	1698	1597.0	1.05			
うなぎ	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	4013	4169	4091.0	3965	3969	3967.0	1.03			
さけ	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1688	1805	1746.5	1698	1713	1705.5	1.02			
しじみ	0.008			0.01	0.01	0.0005	面積	0	1742	1705	1723.5	1674	1908	1791.0	0.96			
3	代謝物B			牛の筋肉	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1454	1645	1549.5	1527	1845	1686.0	0.92	
				牛の脂肪	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1536	1701	1618.5	1703	1630	1666.5	0.97	
				牛の肝臓	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	3724	3751	3737.5	3508	3780	3644.0	1.03	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1741	1439	1590.0	1644	1499	1571.5	1.01			
		鶏卵	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1411	1617	1514.0	1666	1310	1488.0	1.02			
		牛乳	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1666	1627	1646.5	1620	1640	1630.0	1.01			
		はちみつ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1437	1604	1520.5	1552	1676	1614.0	0.94			
		うなぎ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	3938	3738	3838.0	3685	4244	3964.5	0.97			
		さけ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	1621	1429	1525.0	1690	1581	1635.5	0.93			
		しじみ	0.008	0.01	0.008	0.0004	面積	0	4267	4133	4200.0	3717	4127	3922.0	1.07			

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。
 *3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。
 *6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 13 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	メベンダゾール	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008	101.3	1.06	95.2	
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008	95.3	1.04	91.9	
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008	100.7	1.07	93.8	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008	97.3	1.03	94.9	
		鶏卵	0.008	0.01	0.008	95.7	1.04	92.1	
		牛乳	0.008	0.01	0.008	100.1	1.02	97.7	
		はちみつ	0.008	0.01	0.008	103.1	1.07	96.2	
		うなぎ	0.008	0.01	0.008	107.6	1.04	103.7	
		さけ	0.008	0.01	0.008	105.9	1.08	98.0	
		しじみ	0.008	0.01	0.008	103.8	1.02	101.9	
2	代謝物A	牛の筋肉	0.008	0.01	0.01	99.6	0.92	107.8	
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.01	96.3	1.06	90.6	
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.01	101.4	0.99	102.1	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.01	93.8	0.98	95.5	
		鶏卵	0.008	0.01	0.01	101.6	0.98	104.0	
		牛乳	0.008	0.01	0.01	104.7	1.04	100.3	
		はちみつ	0.008	0.01	0.01	101.0	1.05	96.4	
		うなぎ	0.008	0.01	0.01	94.6	1.03	91.7	
		さけ	0.008	0.01	0.01	93.6	1.02	91.4	
		しじみ	0.008	0.01	0.01	97.5	0.96	101.3	
3	代謝物B	牛の筋肉	0.008	0.01	0.008	100.4	0.92	109.2	
		牛の脂肪	0.008	0.01	0.008	101.1	0.97	104.1	
		牛の肝臓	0.008	0.01	0.008	95.0	1.03	92.7	
		鶏の筋肉	0.008	0.01	0.008	101.9	1.01	100.8	
		鶏卵	0.008	0.01	0.008	98.5	1.02	96.8	
		牛乳	0.008	0.01	0.008	102.0	1.01	101.0	
		はちみつ	0.008	0.01	0.008	101.7	0.94	107.9	
		うなぎ	0.008	0.01	0.008	107.4	0.97	110.9	
		さけ	0.008	0.01	0.008	104.9	0.93	112.5	
		しじみ	0.008	0.01	0.008	106.8	1.07	99.7	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

4. 考察

抽出は畜水産物との混和性を考慮して、アセトン抽出を行った。脱脂操作として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討したところ、良好な結果が得られた。精製カラムについて、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、メベンダゾールの真度は95~108%、併行精度は2~7%、代謝物Aの真度は94~105%、併行精度は2~10%、代謝物Bの真度は95~107%、併行精度は3~13%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

[結論]

畜水産物中のメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの試験法として、メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した(はちみつの場合は省略)。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

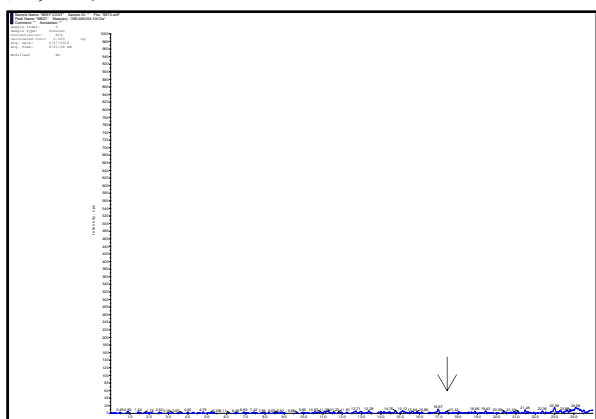
開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、メベンダゾールの真度は95~108%、併行精度は2~7%、代謝物Aの真度は94~105%、併行精度は2~10%、代謝物Bの真度は95~107%、併行精度は3~13%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

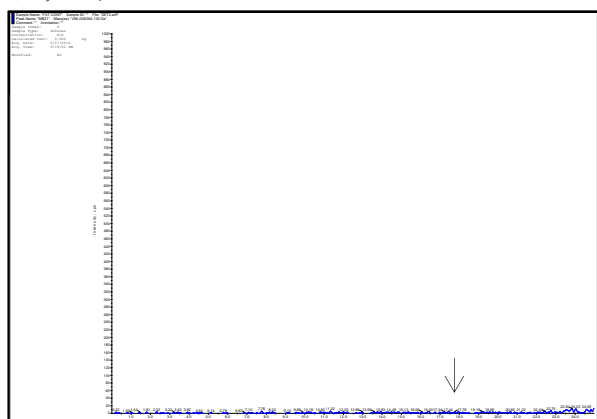
ヤンセンファーマ株式会社資料

メベンダゾールの添加回収試験におけるクロマトグラム

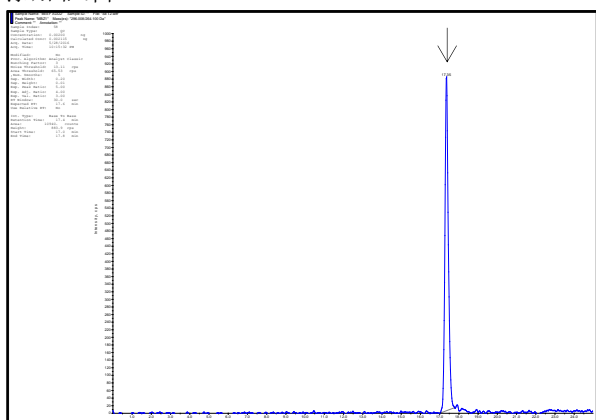
ブランク



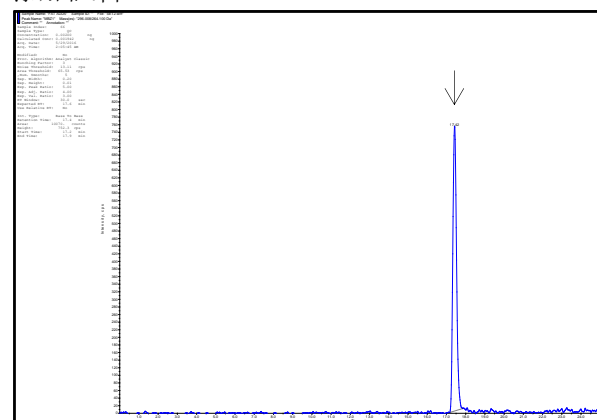
ブランク



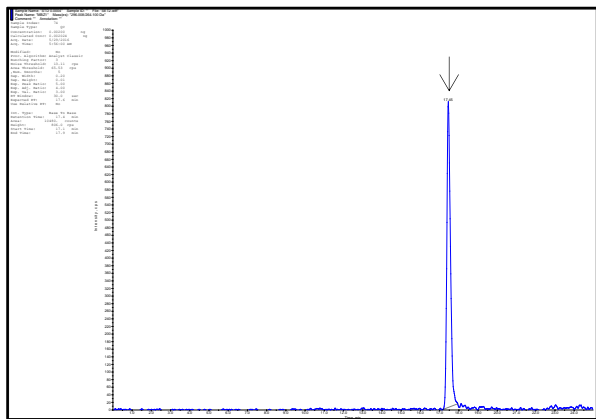
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

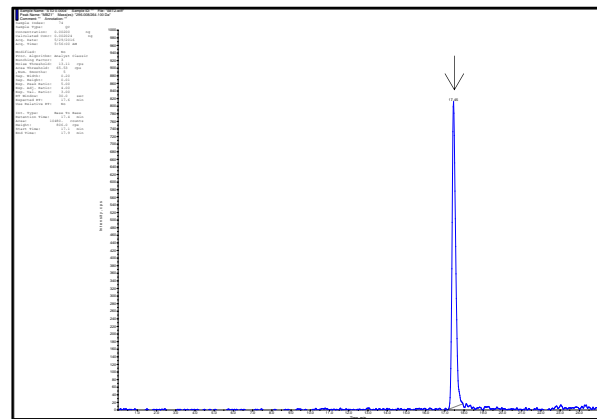
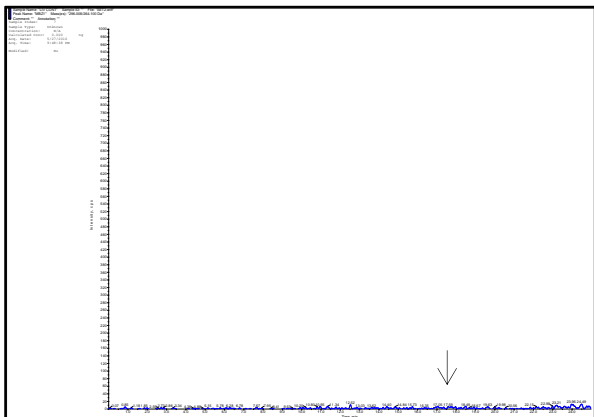


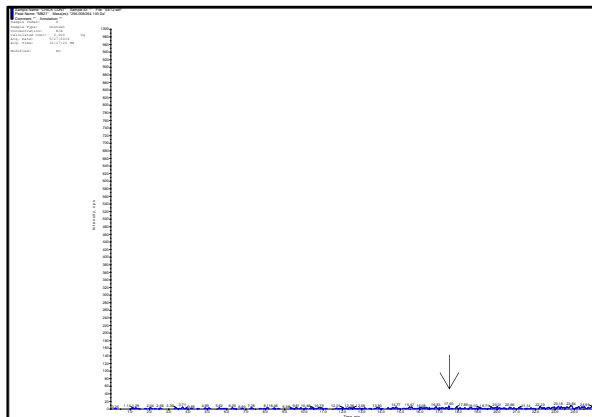
図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 8-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

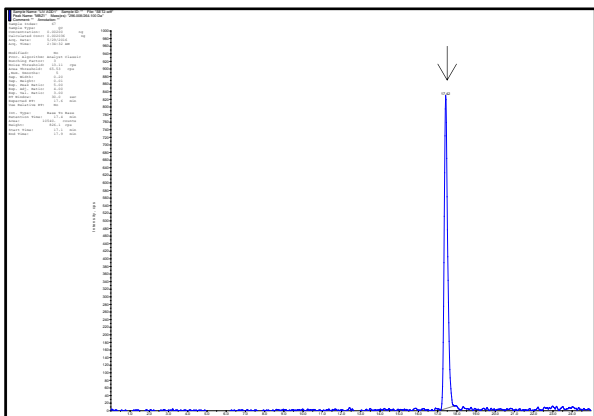
ブランク



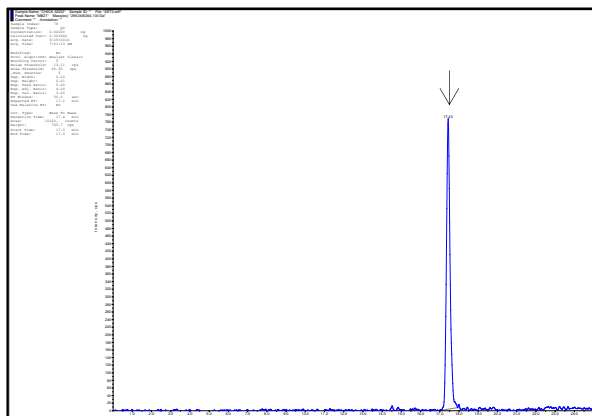
ブランク



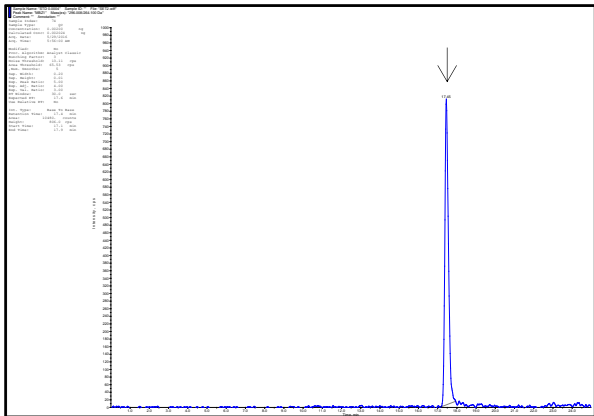
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

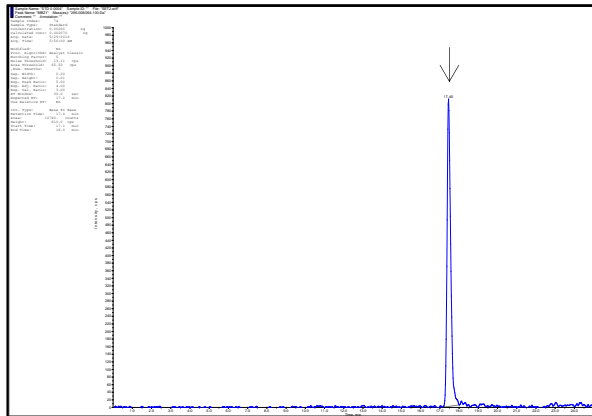
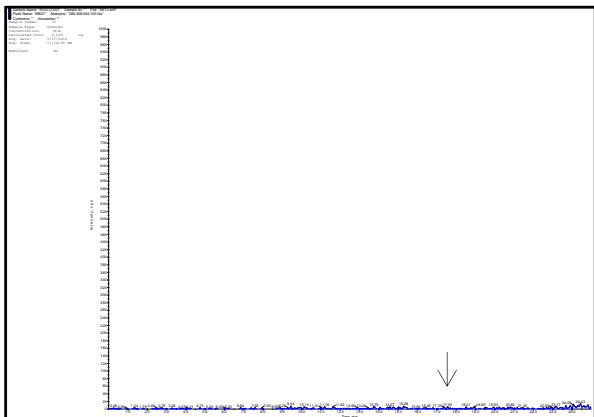


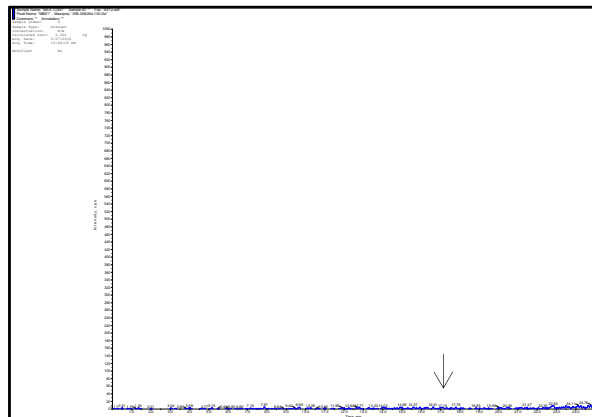
図 8-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 8-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

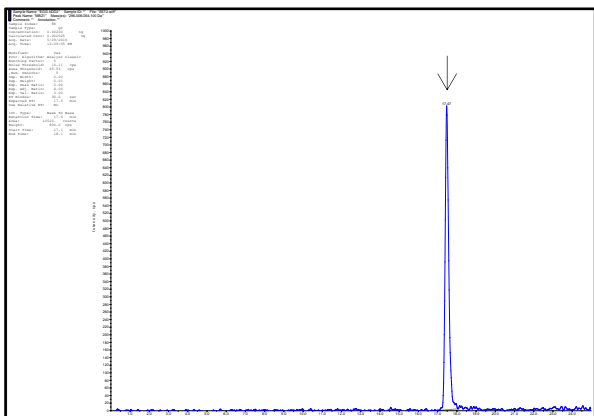
ブランク



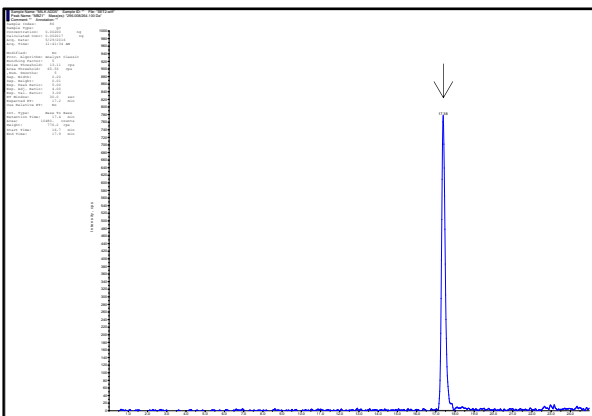
ブランク



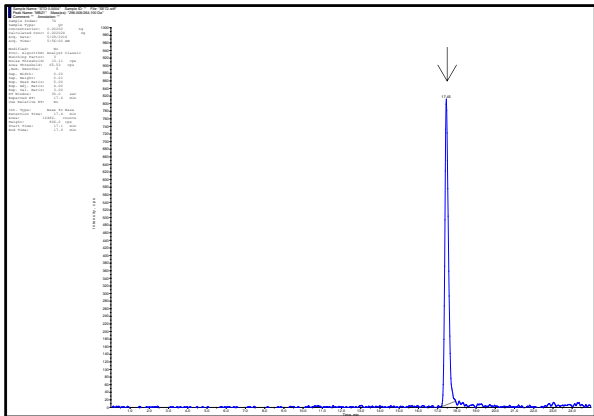
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

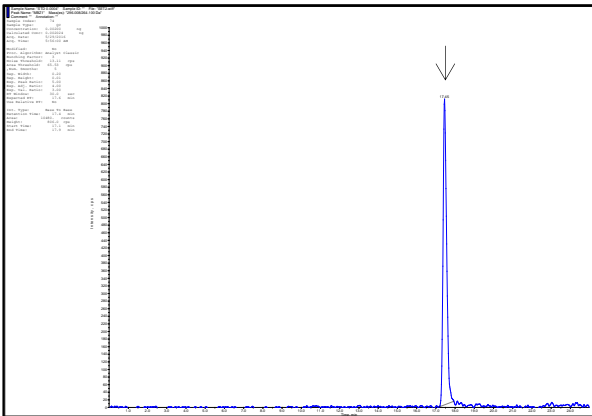
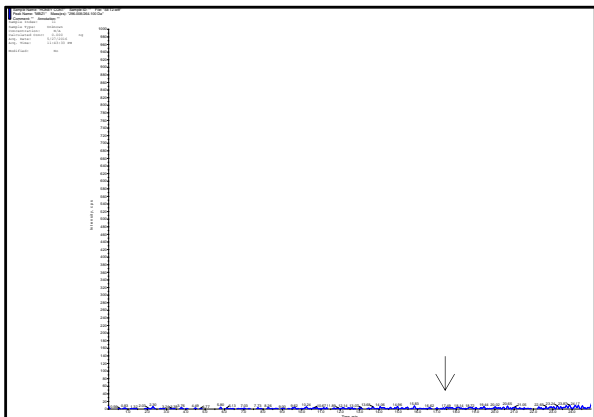


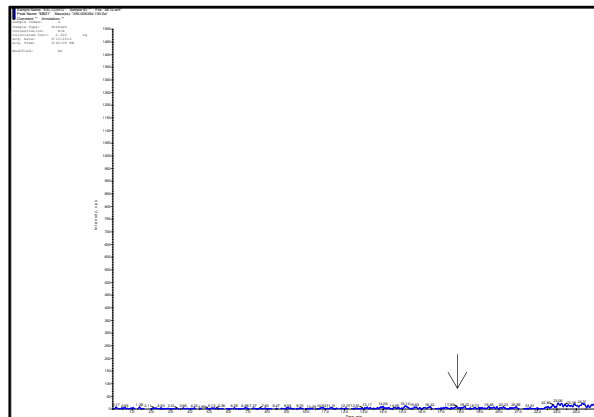
図 8-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 8-6 牛乳の SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

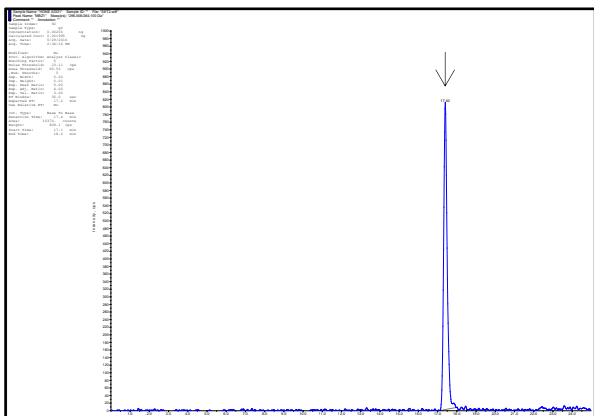
ブランク



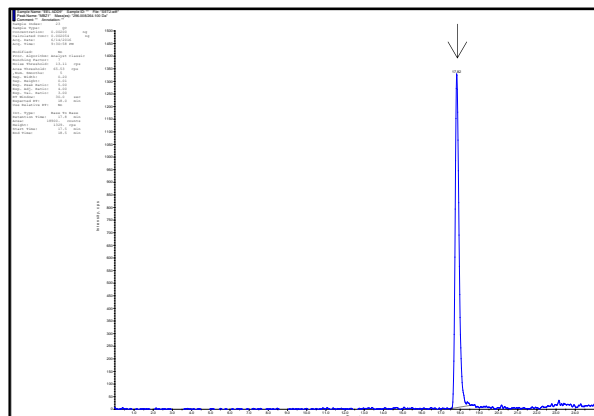
ブランク



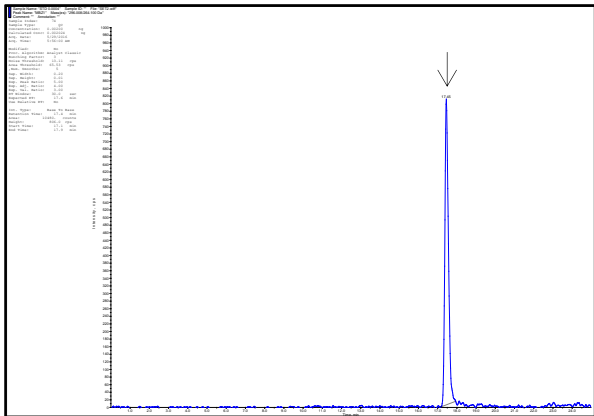
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

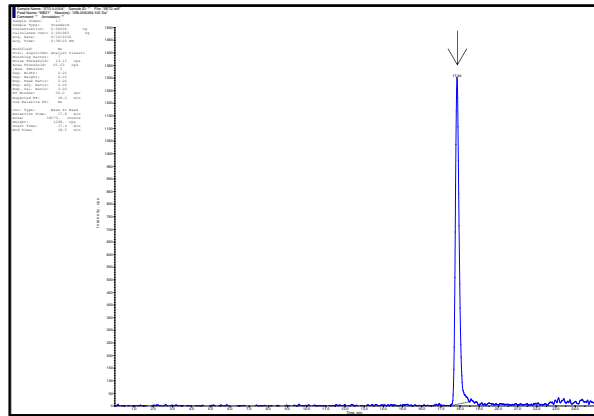
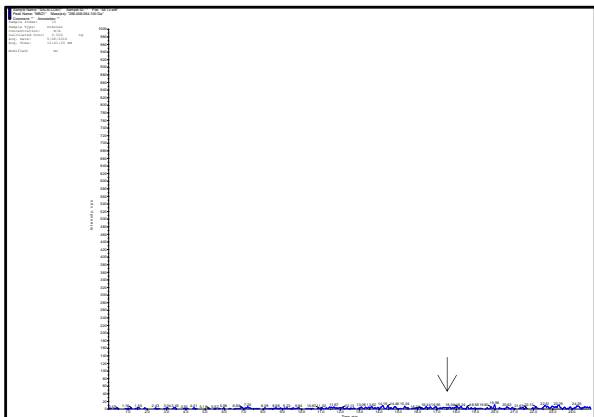


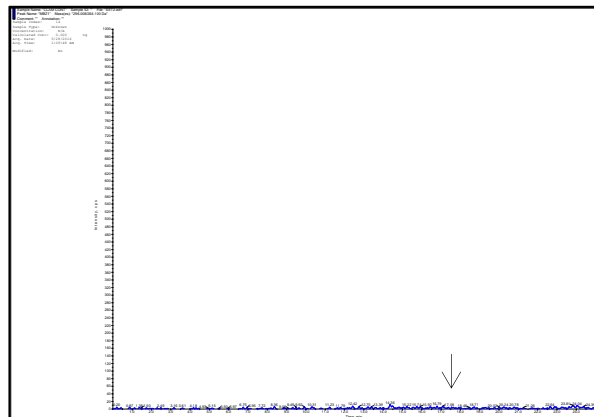
図 8-7 はちみつの SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 8-8 うなぎの SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

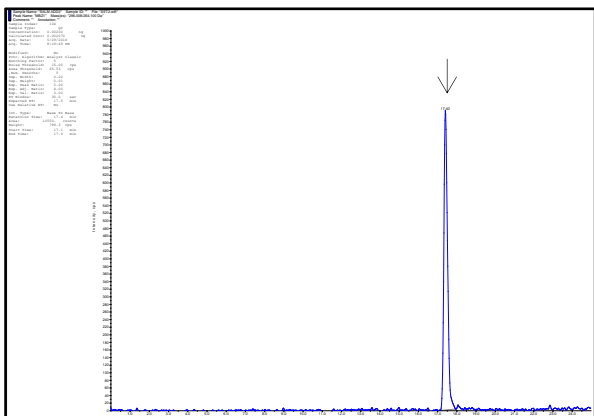
ブランク



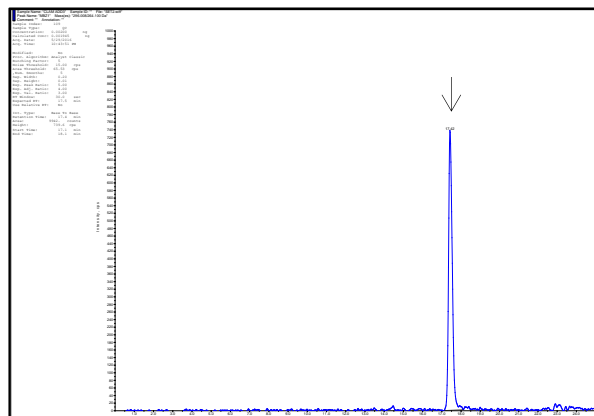
ブランク



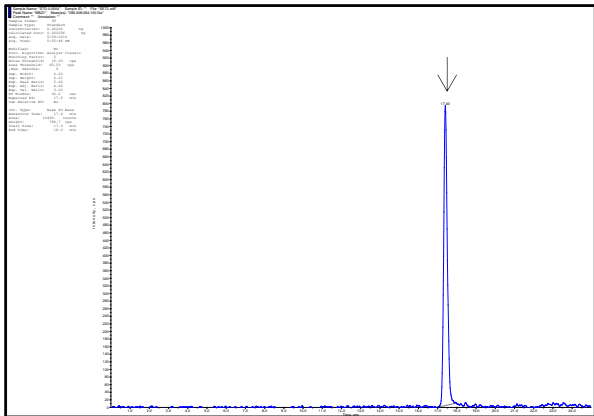
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

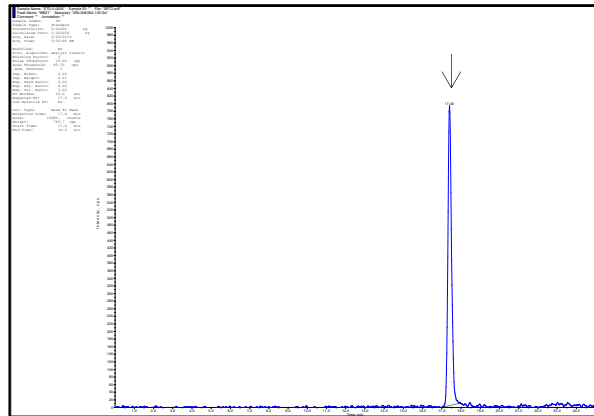
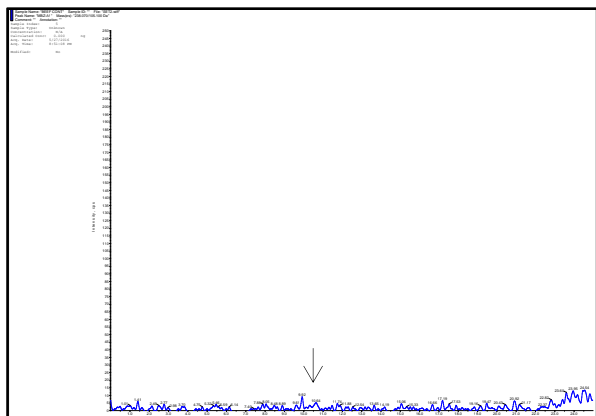


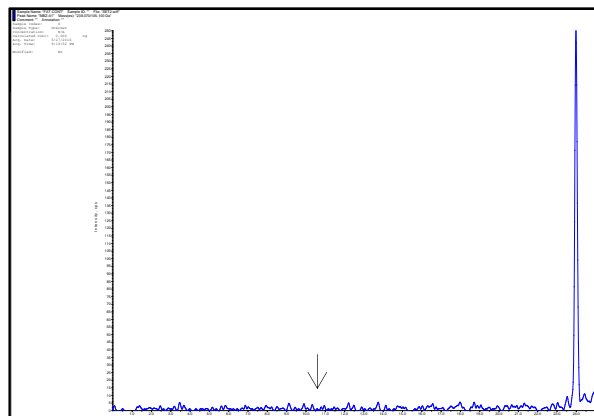
図 8-9 さけの SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 8-10 しじみの SRM クロマトグラム
メベンダゾール (m/z +296→264)
添加濃度 : 0.008 ppm

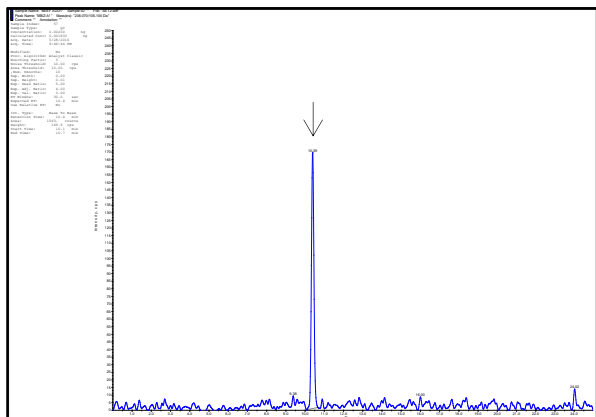
代謝物Aの添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



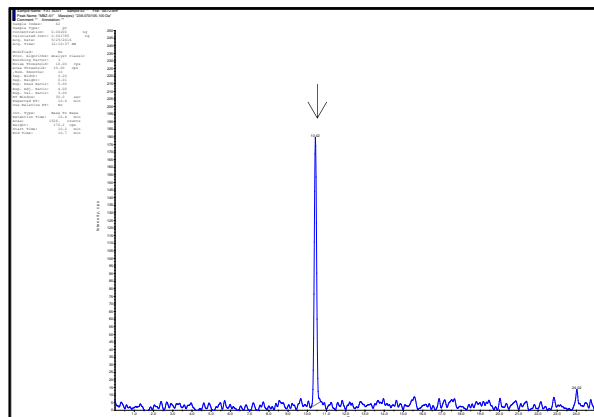
ブランク



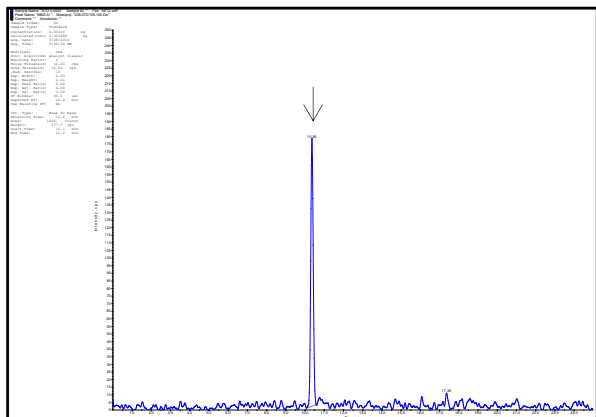
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

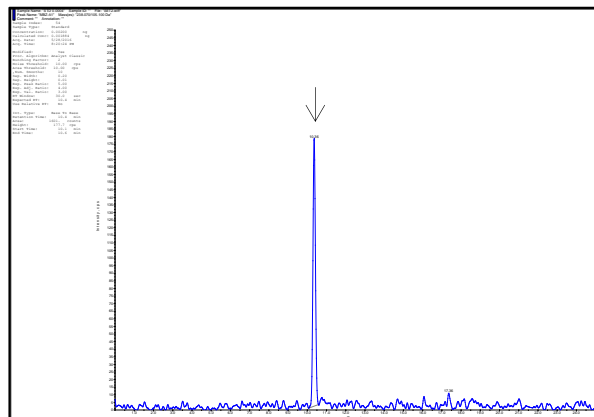
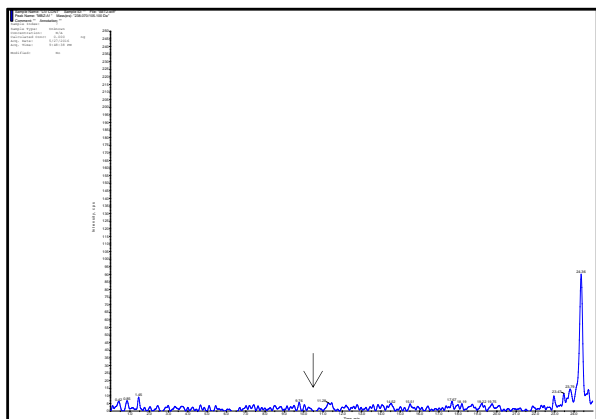


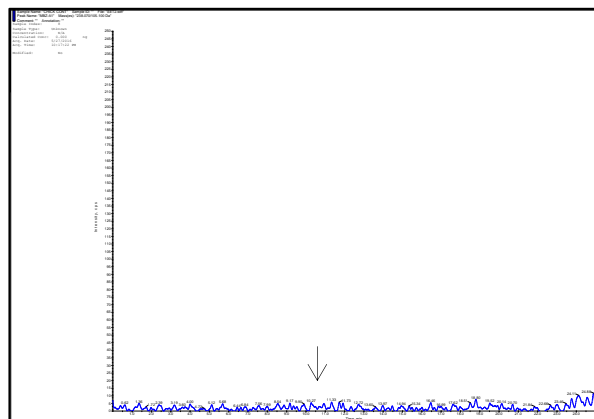
図 9-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 9-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

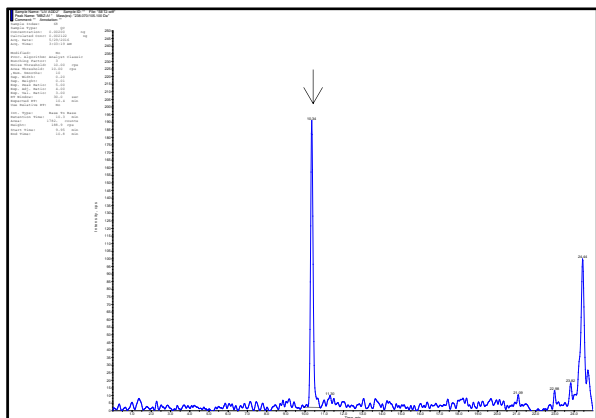
ブランク



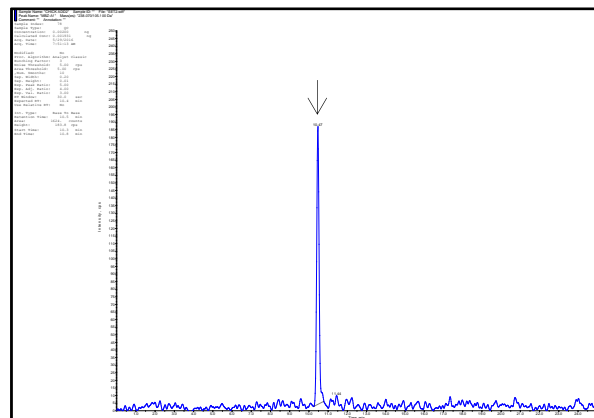
ブランク



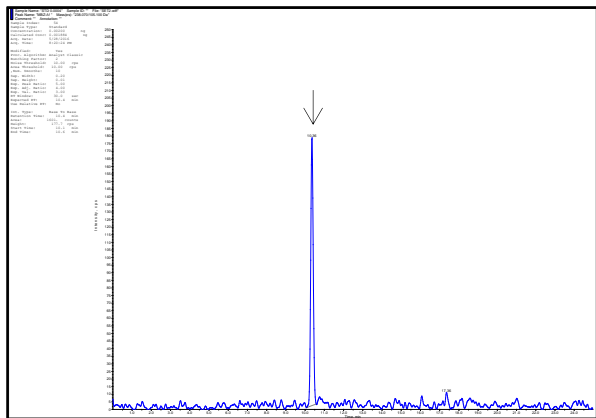
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

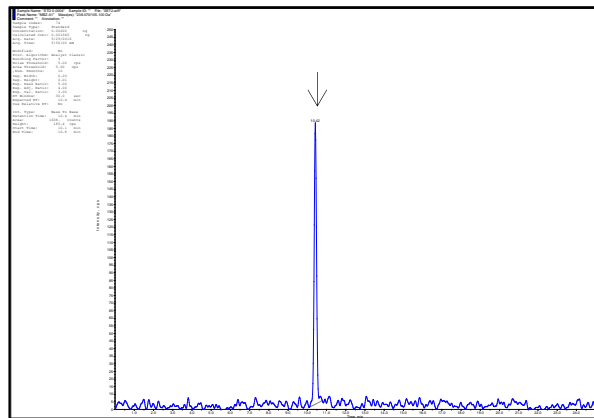
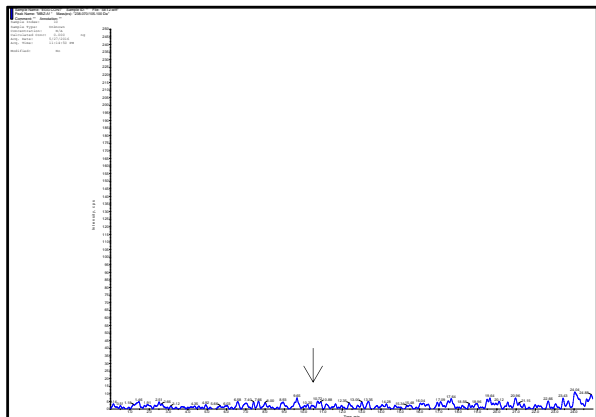


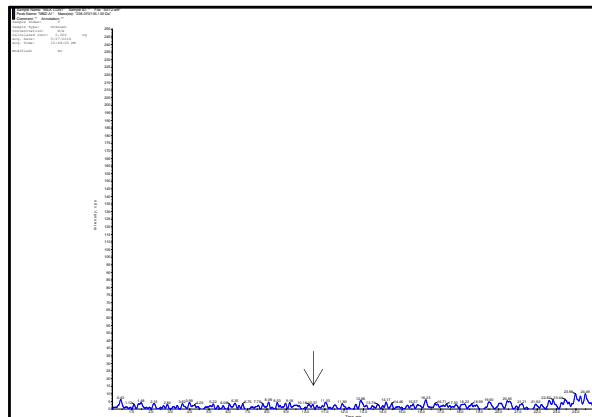
図 9-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 A ($m/z +238 \rightarrow 105$)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 9-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 A ($m/z +238 \rightarrow 105$)
添加濃度 : 0.008 ppm

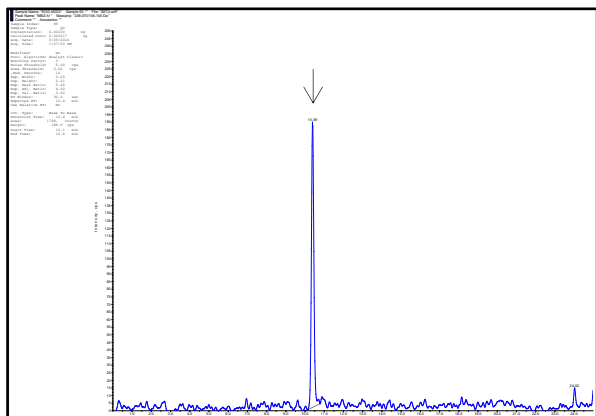
ブランク



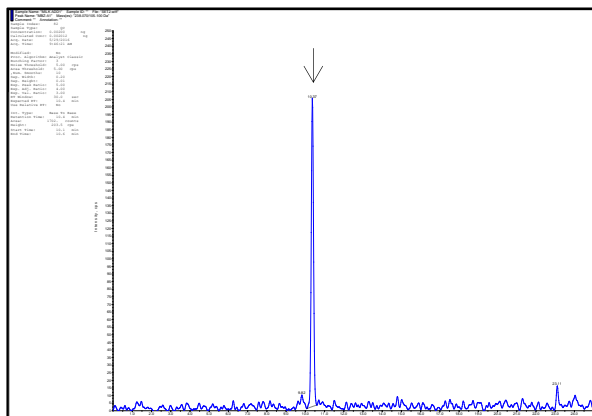
ブランク



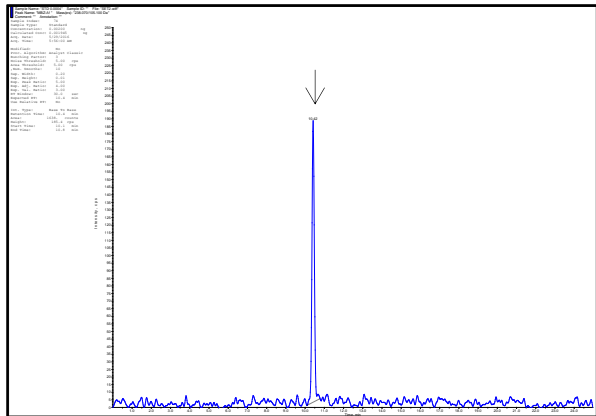
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

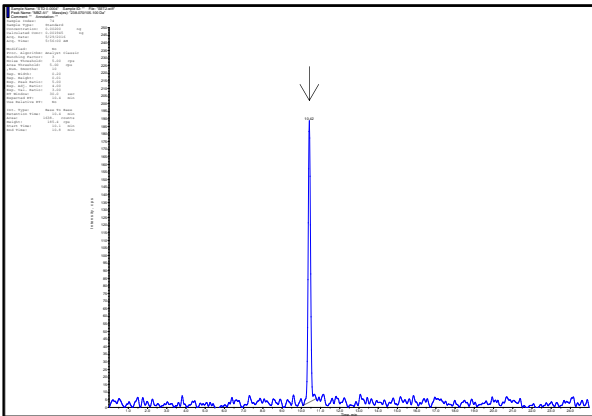
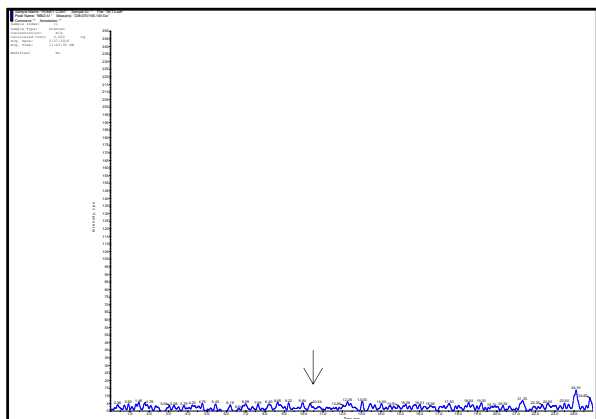


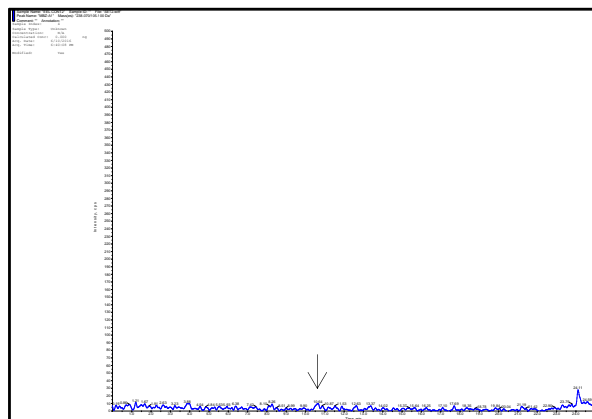
図 9-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 9-6 牛乳の SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

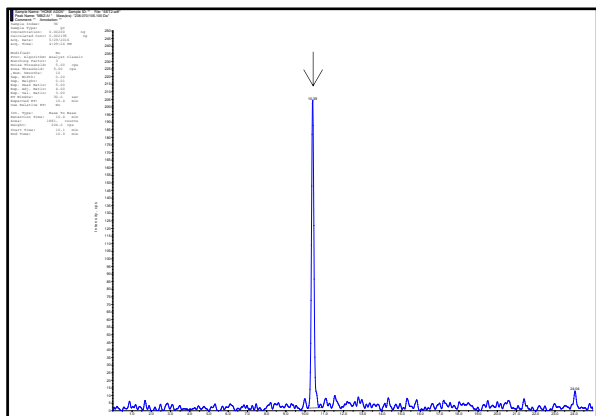
ブランク



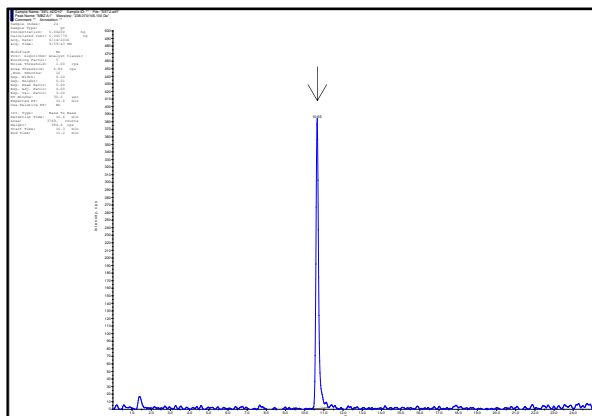
ブランク



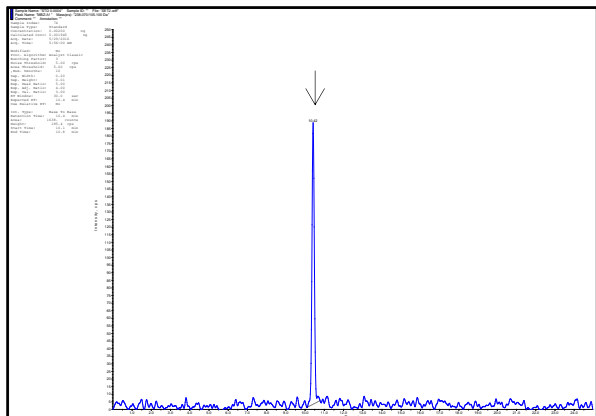
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

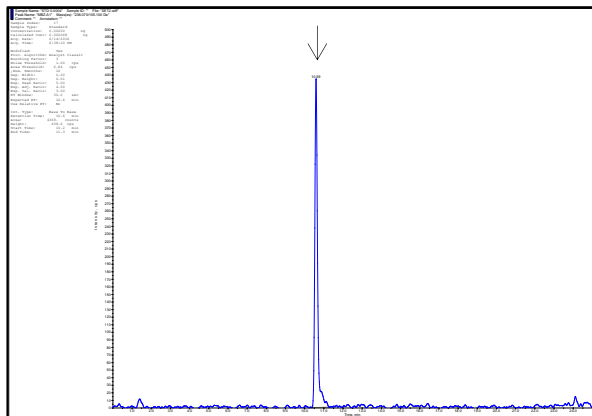
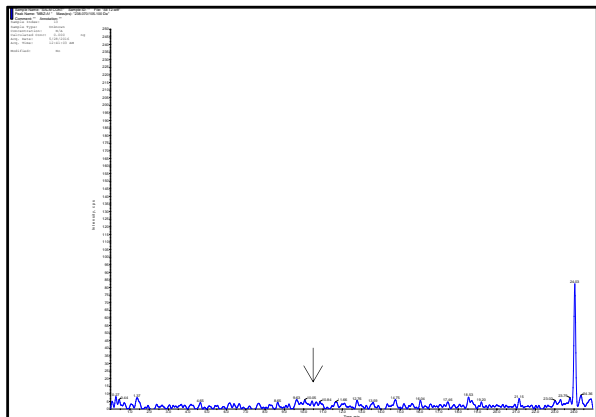


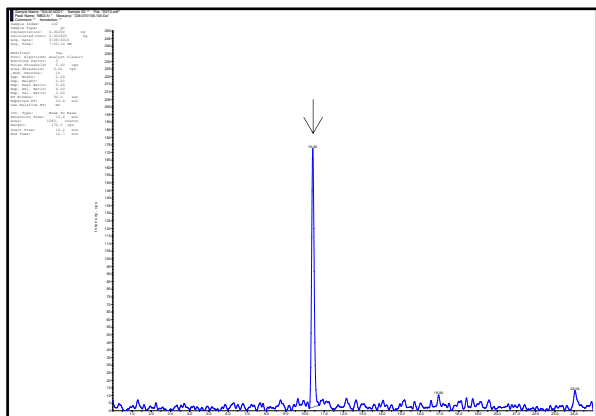
図 9-7 はちみつの SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 9-8 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

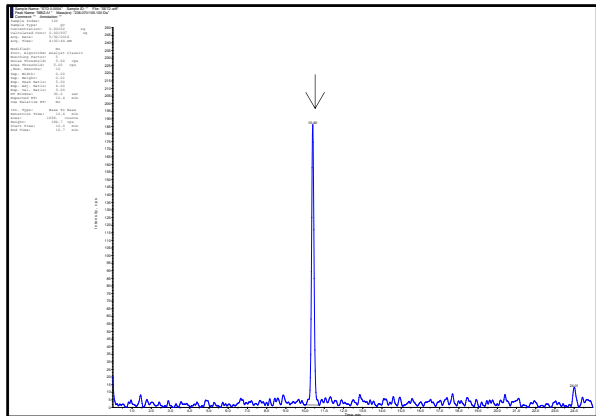
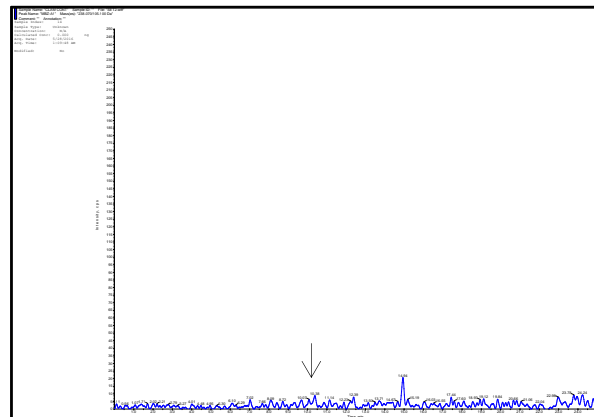
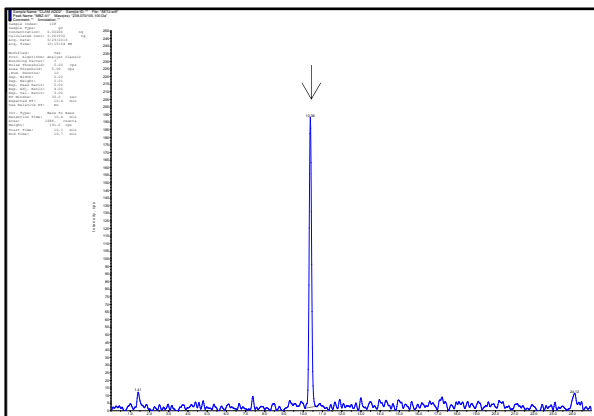


図 9-9 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

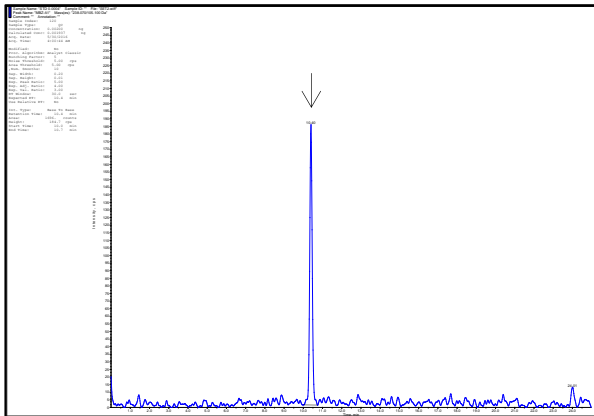
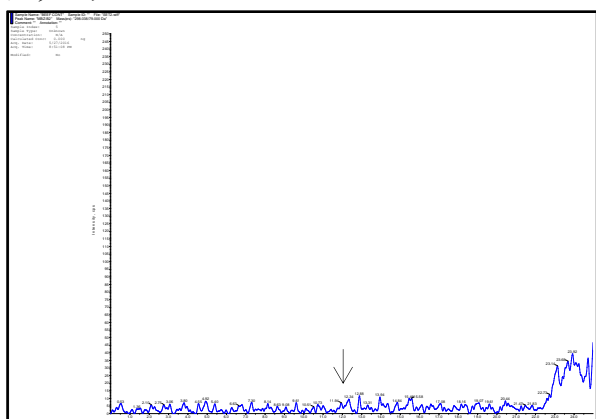
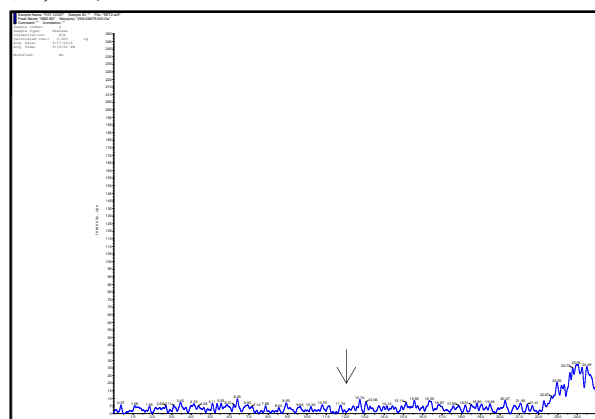


図 9-10 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 A (m/z +238→105)
添加濃度 : 0.008 ppm

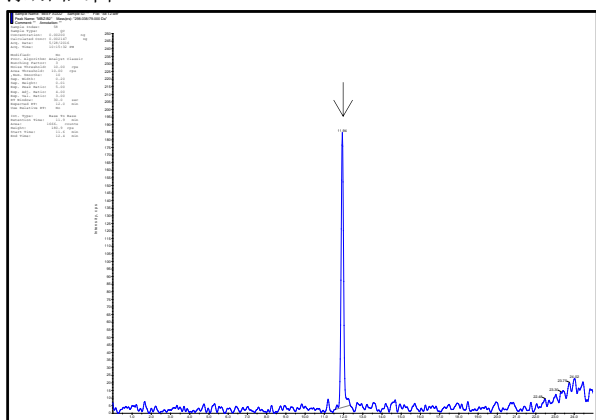
代謝物Bの添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



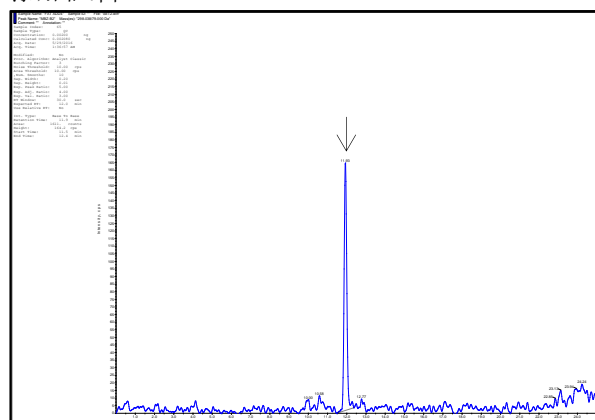
ブランク



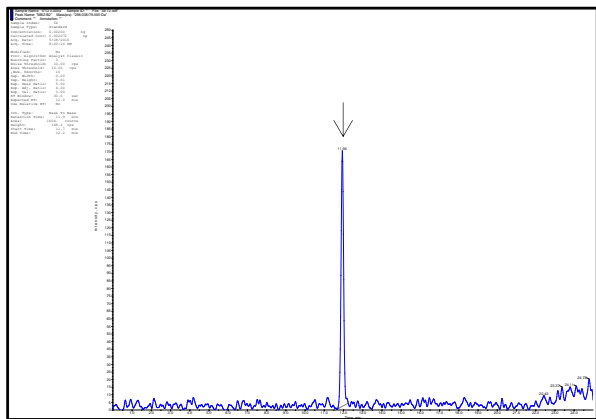
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

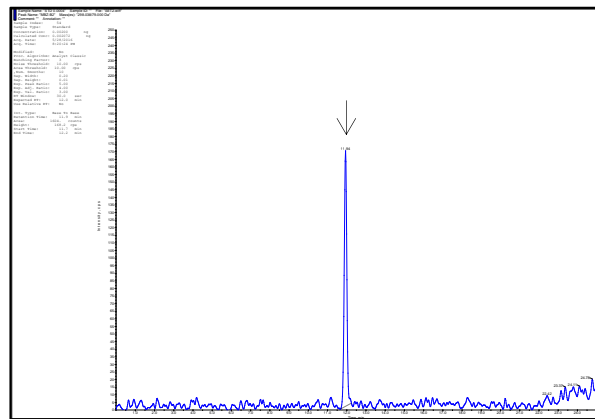
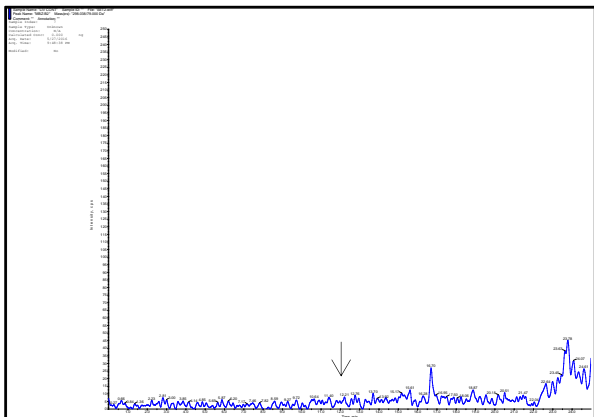


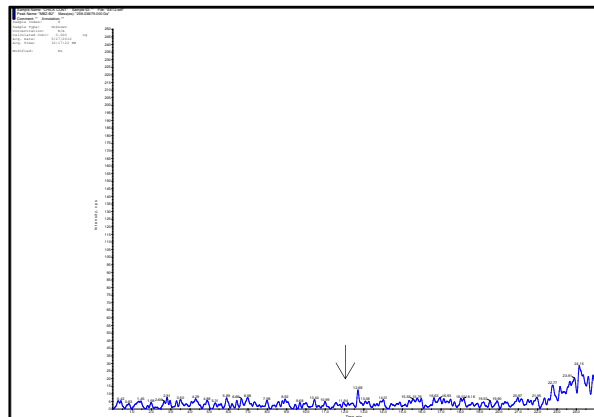
図 10-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 B (m/z +298→79)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 10-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 B (m/z +298→79)
添加濃度 : 0.008 ppm

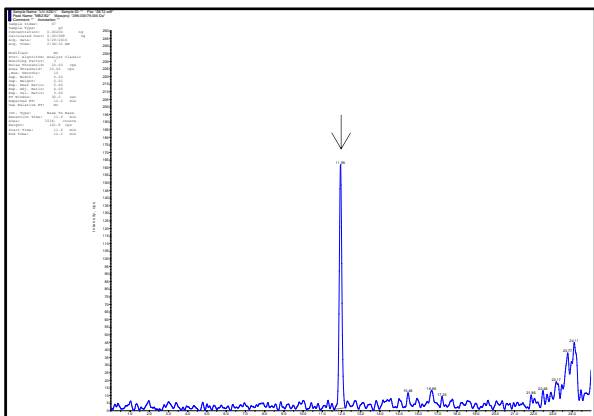
ブランク



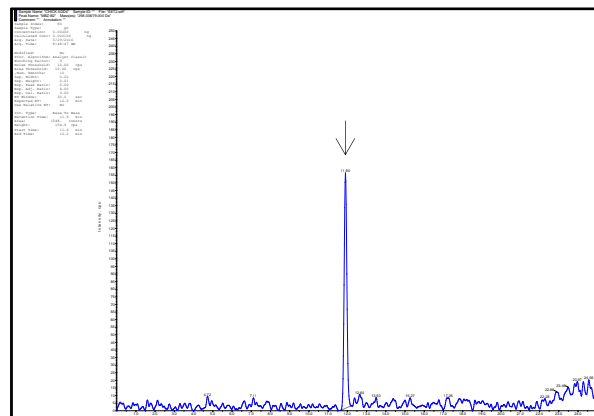
ブランク



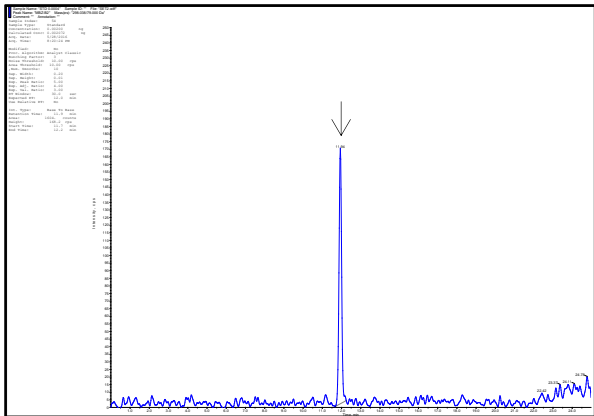
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

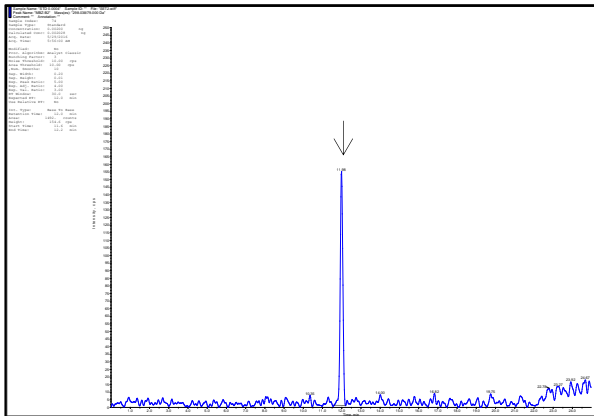
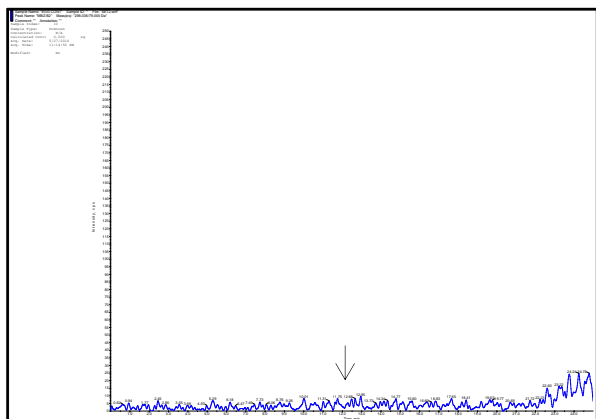


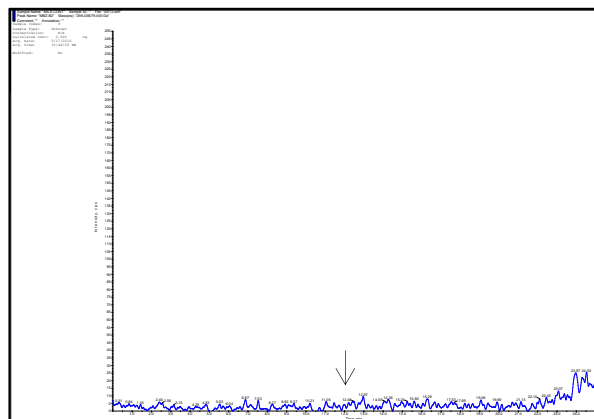
図 10-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 10-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

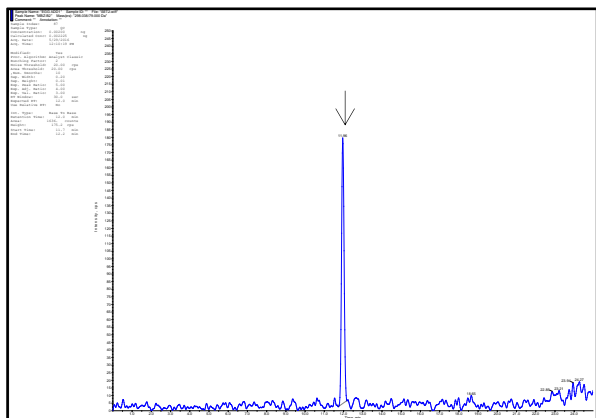
ブランク



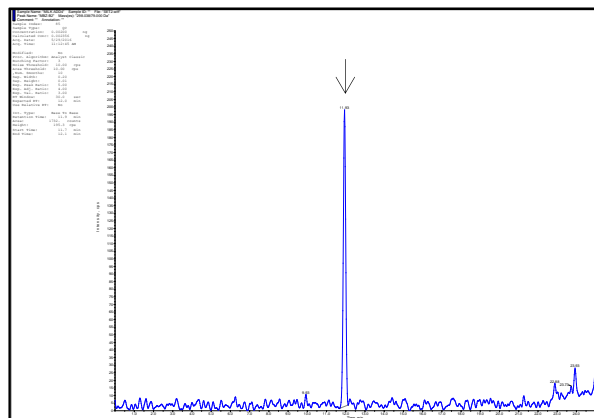
ブランク



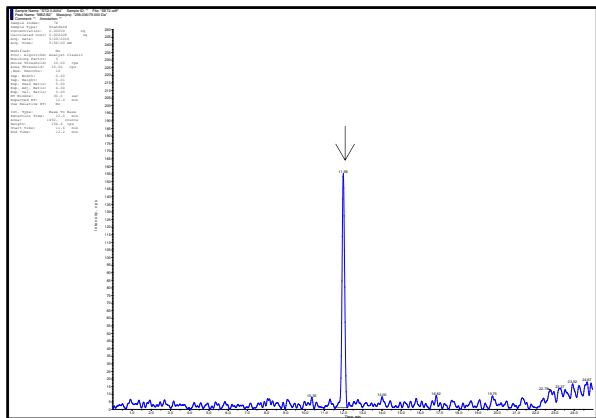
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

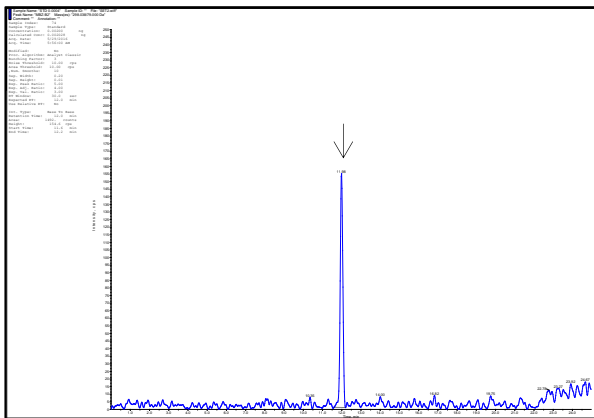
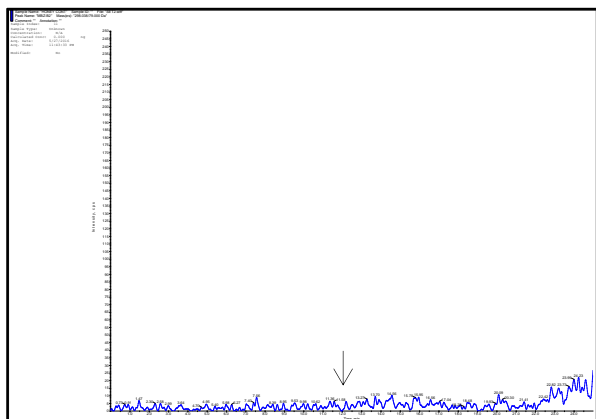


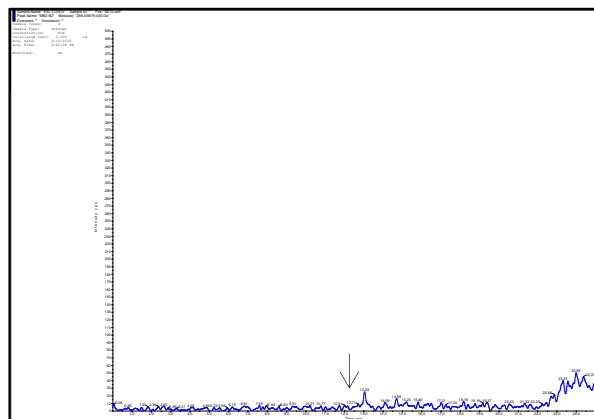
図 10-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 10-6 牛乳の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

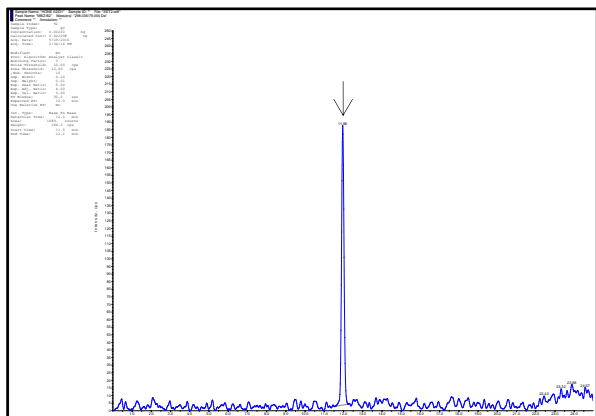
ブランク



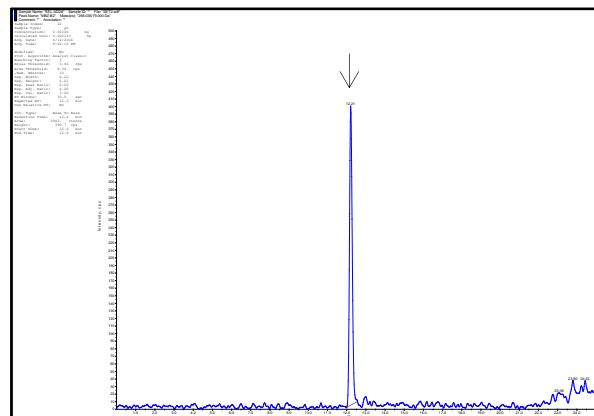
ブランク



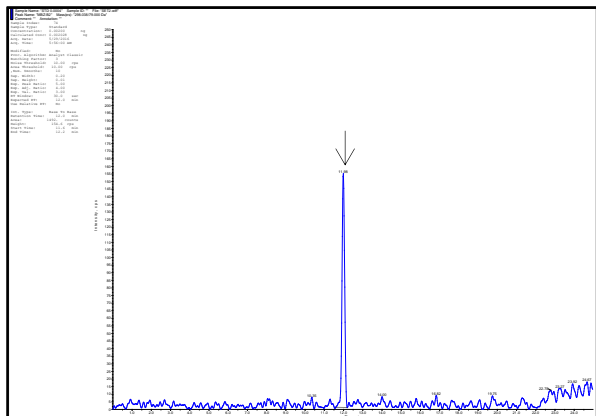
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

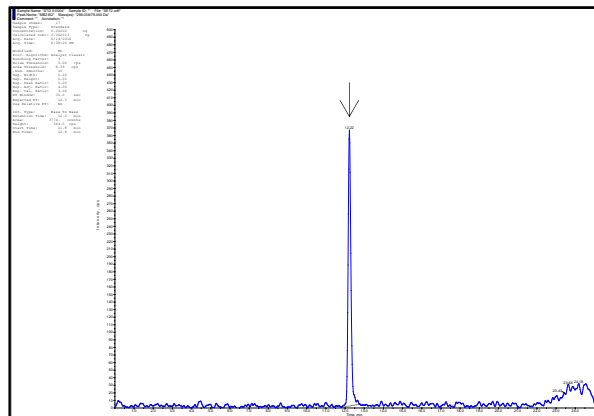
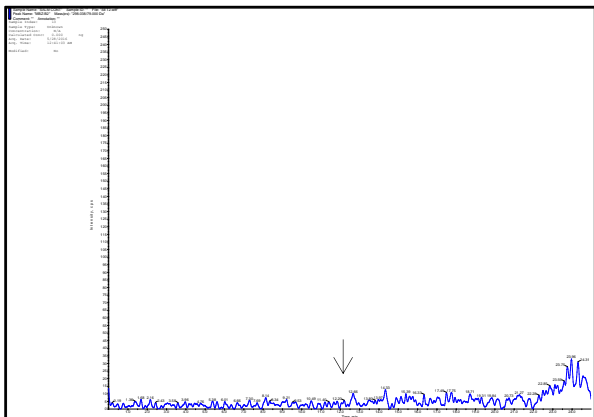


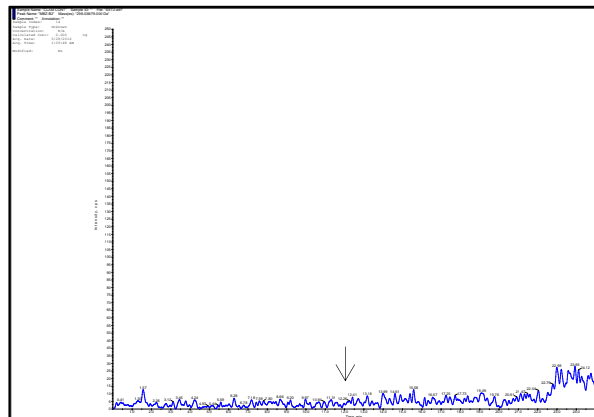
図 10-7 はちみつの SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 10-8 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +298 \rightarrow 79$)
添加濃度 : 0.008 ppm

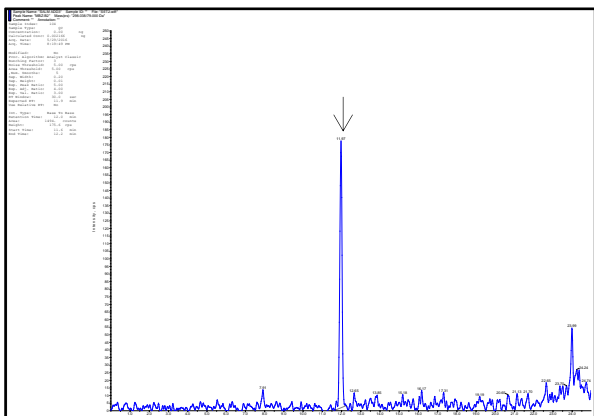
ブランク



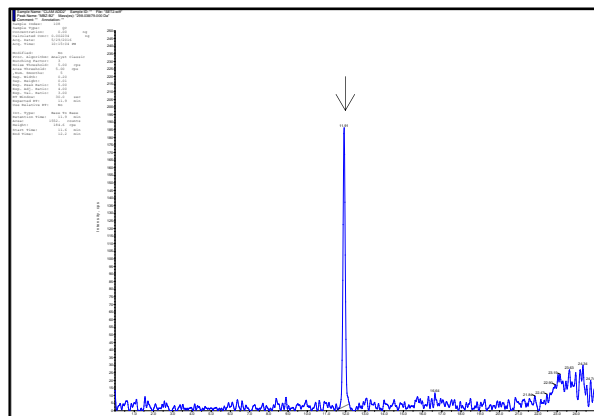
ブランク



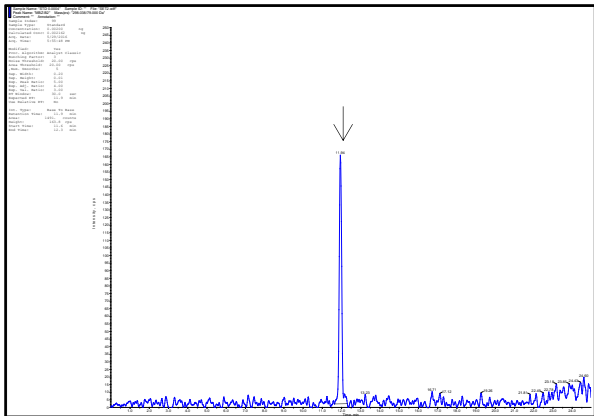
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

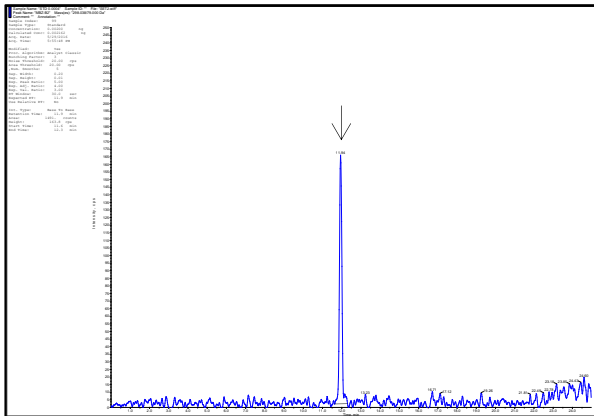
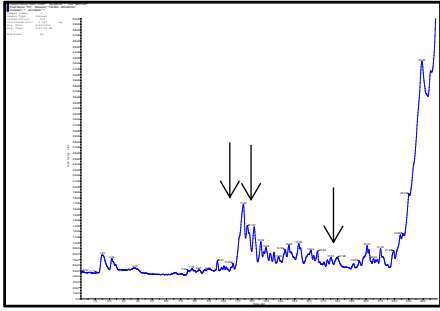


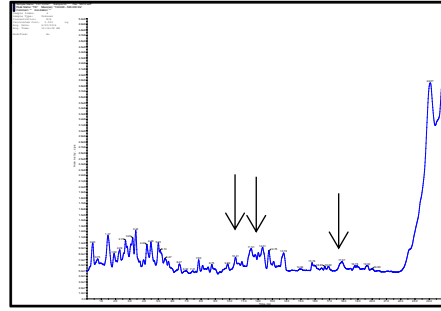
図 10-9 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 B (m/z +298→79)
添加濃度 : 0.008 ppm

図 10-10 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 B (m/z +298→79)
添加濃度 : 0.008 ppm

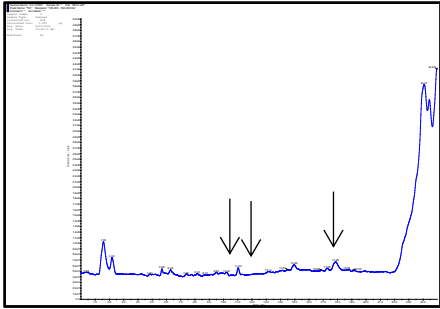
牛の筋肉



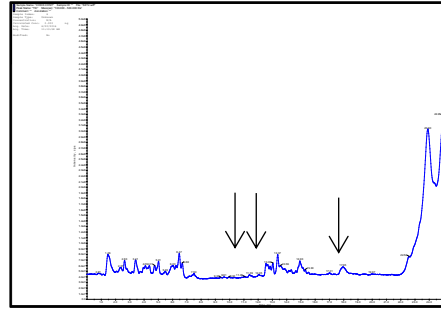
牛の脂肪



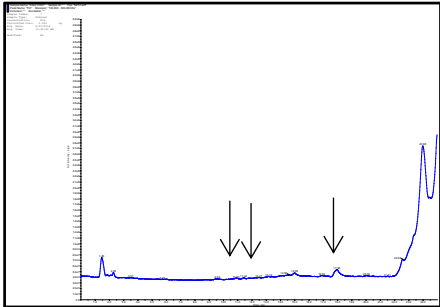
牛の肝臓



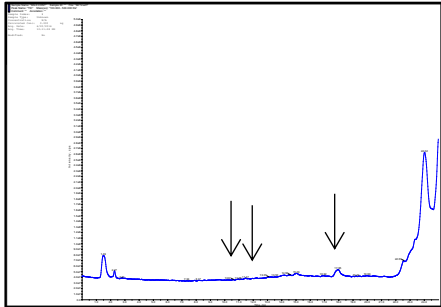
鶏の筋肉



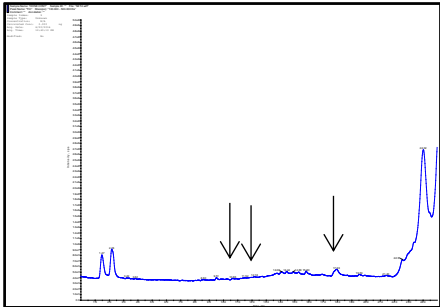
鶏卵



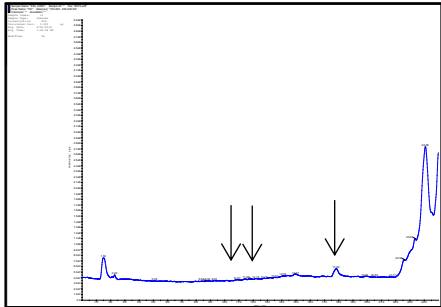
牛乳



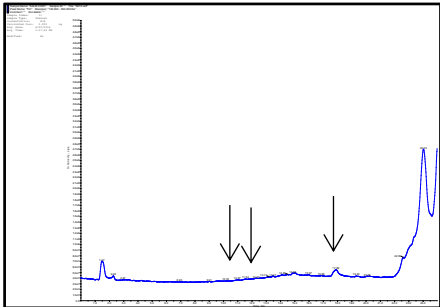
はちみつ



うなぎ



さけ



しじみ

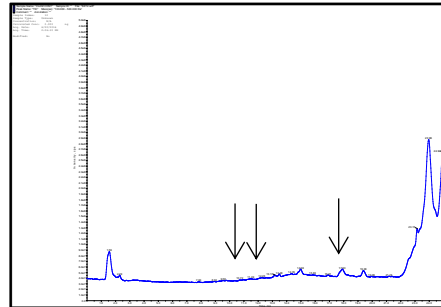


図 11 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 100~500 m/z)