

アルベンダゾール試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

代謝物I【5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン】（塩酸酸性条件下の加水分解により代謝物Iに変換される化合物を含む。）

2. 適用食品

畜産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体500 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

代謝物I標準品 本品は代謝物I 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに6 mol/L塩酸10 mLを加え密栓し、110°Cに設定した油浴中で時々振り混ぜながら1時間加熱する。放冷後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液30 mLを加え、振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を捨てる操作を2回繰り返す。水層及び残留物にアセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせて炭酸ナトリウム4 gを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。水層及び残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、有機層を採る。得られた有機層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

2) 精製

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を正確に4 mLを分取して注入した後、水5 mL、アセトニトリル5 mL、アセトニトリル及びアンモニア水（49：1）混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液12 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物I標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で代謝物Iの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40℃

移動相：0.05 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.05 vol%ギ酸混液（1：19）から（2：3）までの濃度勾配を15分間で行う。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン240、プロダクトイオン198、133

注入量：2 µL

保持時間の目安：10分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料を塩酸酸性条件下で加熱した後、酢酸エチル及び n -ヘキサン（1：1）混液で脱脂し、代謝物Iをアセトニトリルで抽出する。塩基性条件下で塩析した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン- N -ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① 代謝物IのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン240、プロダクトイオン133

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン240、プロダクトイオン198

② 脱脂操作後にアセトニトリルを加えてホモジナイズし、遠心分離すると、アセトニトリル層、水層及び固体の3相になることがあるので、その場合には、アセトニトリル層及び水層を分取する。

③ 炭酸ナトリウムを加えてホモジナイズした後に、pH試験紙等を用いて溶液がpH 6以上であることを確認する。

④ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させる

ため、代謝物 I が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。

⑤ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳

12. 参考文献

なし

13. 類型

C