

メベンダゾール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

メベンダゾール

(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」という。)

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]カルバマート(以下「代謝物B」という。)

2. 適用食品

畜水産物

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。

メベンダゾール標準品 本品はメベンダゾール98%以上を含む。

代謝物A標準品 本品は代謝物A98%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① はちみつ以外の場合

試料10.0 gにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLまで濃縮した後、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、水3 mLを加えて40°C以下で約3 mLまで濃縮した後、水20 mLを加える。

② はちみつの場合

試料10.0 gに水20 mLを加え溶解する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLまで濃縮した後、水20 mLを加える。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に、メタノール及び水各5 m

Lを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液を捨てる。次いでギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

メベンダゾール標準品、代謝物A標準品及び代謝物B標準品をそれぞれジメチルスルホキシドに溶かして200 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又は面積法で検量線を作成する。なお、5. 試験溶液の調製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の検量線でメベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの含量を求める。

代謝物A及び代謝物Bを含むメベンダゾールの含量を求める場合には、次式により求める。

メベンダゾール (代謝物A及び代謝物Bを含む。) の含量 (ppm) = $A+B \times 1.245+C \times 0.9932$

A : メベンダゾールの含量 (ppm)

B : 代謝物Aの含量 (ppm)

C : 代謝物Bの含量 (ppm)

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4 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.1 vol%ギ酸及びメタノール混液 (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。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

メベンダゾール : プリカーサーイオン 296、プロダクトイオン 264、105

代謝物A : プリカーサーイオン 238、プロダクトイオン 105、77

代謝物B : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 266、79

注入量 : 5 µL

保持時間の目安

メベンダゾール : 18分

代謝物A : 10分

代謝物B : 12分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

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する（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で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① メベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bは濃縮乾固した後、再溶解操作を行うと回収率の低下がみられることがあるため、抽出液を濃縮する際には乾固させないように注意する。
- ② メベンダゾール、代謝物A及び代謝物B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。

メベンダゾール

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 296、プロダクトイオン 264

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 296、プロダクトイオン 105

代謝物A

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 238、プロダクトイオン 105

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 238、プロダクトイオン 77

代謝物B

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 79

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 266

- ③ 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛の乳、鶏の筋肉、鶏の卵、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C