

※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下さい。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発業務報告書

トリクラベンダゾール試験法（畜産物）

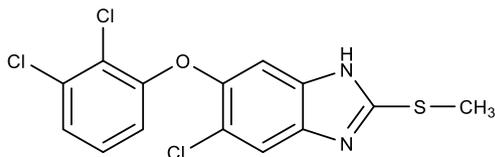
## トリクラベンダゾール試験法（畜産物）

### [緒言]

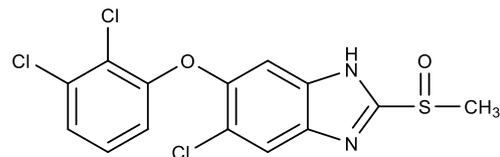
#### 1. 目的及び試験法の検討方針

トリクラベンダゾールは、駆虫作用を示すチアベンダゾール系の肝蛭駆除剤である。国内では、搾乳牛を除く牛の肝蛭の駆除を目的とした経口投与剤が承認されている。食安発0918第1号（平成27年9月18日）により暫定基準値の見直しが行われ、規制対象については、「今回基準値を設定するトリクラベンダゾールとは、トリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾール【5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-1,3-ジヒドロ-2*H*-ベンズイミダゾール-2-オン】に変換される代謝物をトリクラベンダゾールに換算したものの和をいうこと」とされた。トリクラベンダゾール及びその代謝物は細胞組織に結合しているため、結合性残留を完全に抽出するためには、熱アルカリ条件下での抽出操作が必要となる。現行のトリクラベンダゾール通知試験法には、アルカリ分解による抽出操作が含まれていない。本検討では、The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) の報告書に示される申請企業の残留分析法を参考にして、熱アルカリ処理を含む新たな試験法を検討した。

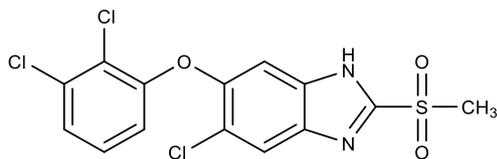
#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



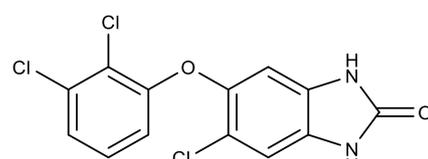
トリクラベンダゾール



トリクラベンダゾールスルホキシド（代謝物A）



トリクラベンダゾールスルホン（代謝物B）



ケト-トリクラベンダゾール（代謝物D）

トリクラベンダゾール

分子式：C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS

化学名（IUPAC）：5-Chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylsulfanyl-1*H*-benzimidazole

分子量：359.66

外観：白色結晶性固体

融点：175-176°C

蒸気圧：5.68 x 10<sup>-10</sup> Torr（25°C）

溶解性：メタノール、アセトンに溶解する。水、ヘキサンに溶解しない。

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：5.39

[出典] SciFinder（化学情報協会）、The MERCK INDEX (FIFTEENTH EDITION).

トリクラベンダゾールスルホキシド (代謝物A)

分子式 :  $C_{14}H_9Cl_3N_2O_2S$

化学名 (IUPAC) : 6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylsulfinyl-1*H*-benzimidazole

分子量 : 375.66

融点 : 200-201°C

蒸気圧 :  $4.81 \times 10^{-12}$  Torr

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow) : 4.31

[出典] SciFinder (化学情報協会)、SIGMA-ALDRICH data sheet.

トリクラベンダゾールスルホン (代謝物B)

分子式 :  $C_{14}H_9Cl_3N_2O_3S$

化学名 (IUPAC) : 6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylsulfonyl-1*H*-benzimidazole

分子量 : 391.66

融点 : 194-195°C

蒸気圧 :  $4.94 \times 10^{-12}$  Torr

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow) : 5.30

[出典] SciFinder (化学情報協会)、SIGMA-ALDRICH data sheet.

ケト-トリクラベンダゾール (代謝物D)

分子式 :  $C_{13}H_7Cl_3N_2O_2$

化学名 (IUPAC) : 5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-1,3-dihydrobenzimidazol-2-one

分子量 : 329.57

蒸気圧 :  $2.22 \times 10^{-4}$  Torr

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow) : 4.62

[出典] SciFinder (化学情報協会) .

### 3. 基準値

トリクラベンダゾールとは、トリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾール【5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-1,3-ジヒドロ-2*H*-ベンズイミダゾール-2-オン】に変換される代謝物をトリクラベンダゾールに換算したものの和をいう。

牛の筋肉 : 0.3 ppm

牛の脂肪 : 0.1 ppm

牛の肝臓 : 0.9 ppm

#### [実験方法]

##### 1. 試料

###### 1) 購入先

牛の筋肉・脂肪は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。牛の肝臓は、インターネットを介して購入したものを用いた。

###### 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。

## 2. 試薬・試液

### 1) 標準品

トリクラベンダゾール標準品：純度99.8%（林純薬工業（株）製）  
代謝物A標準品：純度99.8%（シグマ アルドリッチ製）  
代謝物B標準品：純度99.8%（シグマ アルドリッチ製）  
代謝物D標準品：純度99.9%（林純薬工業（株）製）

### 2) 試薬等

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学（株）製）  
0.1 vol%ギ酸、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液：LC-MS用（関東化学（株）製）  
酢酸エチル、メタノール：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬（株）製）  
エタノール、塩酸、過酸化水素（30%）、酢酸、水酸化ナトリウム：特級（富士フイルム和光純薬（株）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：Oasis MCX（500 mg/6 mL）（ウォーターズ製）  
50 mL容ポリプロピレン製分解容器：DigiTUBEs（ジーエルサイエンス（株）製）

### 3) 標準溶液、試液の調製方法

#### ① 標準溶液の調製方法

トリクラベンダゾール標準原液：トリクラベンダゾール標準品を精秤し、アセトニトリルに溶解して1 mg/mL溶液を調製した。

トリクラベンダゾール添加用標準溶液：トリクラベンダゾール標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2、6、18 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

代謝物A標準原液：代謝物A標準品10.45 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、トリクラベンダゾールとして、1 mg/mL溶液を調製した。なお、換算係数は、1.0445（代謝物Aの分子量をトリクラベンダゾールの分子量で除した値：375.66/359.66）とした。

代謝物A添加用標準溶液：代謝物A標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2、6、18 µg/mLの濃度（トリクラベンダゾールとして）の溶液を調製した。

代謝物B標準原液：代謝物B標準品10.89 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、トリクラベンダゾールとして、1 mg/mL溶液を調製した。なお、換算係数は、1.089（代謝物Bの分子量をトリクラベンダゾールの分子量で除した値：391.66/359.66）とした。

代謝物B添加用標準溶液：代謝物B標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2、6、18 µg/mLの濃度（トリクラベンダゾールとして）の溶液を調製した。

代謝物D標準原液：代謝物D標準品9.16 mgを精秤し、メタノールに溶解して10 mLとして、トリクラベンダゾールとして、1 mg/mL溶液を調製した。なお、換算係数は、0.9163（代謝物Dの分子量をトリクラベンダゾールの分子量で除した値：329.57/359.66）とした。

代謝物D添加用標準溶液：代謝物D標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2、6、18 µg/mLの濃度（トリクラベンダゾールとして）の溶液を調製した。

## ② 試液の調製方法

アセトニトリル及び水（1：1）混液：アセトニトリル500 mL及び水500 mLを混合した。

5 mol/L塩酸：塩酸417 mLに水を加えて混合し、1 Lとした。

5 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム50 gに水を加えて溶解し、250 mLとした。

水及びメタノール（1：1）混液：水500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

水及びメタノール（1：4）混液：水200 mL及びメタノール800 mLを混合した。

## 3. 装置

ヒートブロック：MetaPREP AT-1（ジーエルサイエンス製）

アルミブロック恒温槽：MG-2300（東京理化工機製）

遠心分離機：8100（久保田商事製）

振とう機：SR-2w（タイテック製）

LC-MS/MS：下記に示す2種の装置を用いた。試験法開発の基礎的な検討はAPI 4000を用いたが、検討中に本機器が故障したため、添加回収試験はXevo TQ-Sを用いた。なお、使用機器変更に伴う、試験法の変更等はない。

	型式	会社
LC 装置	ACQUITY	Waters
MS 装置	Xevo TQ-S	Waters
データ処理	TargetLynx Ver.4.1	Waters

	型式	会社
LC 装置	Nexera X2	島津製作所
MS 装置	API 4000	SCIEX
データ処理	Analyst Ver.1.6.2	SCIEX

#### 4. 測定条件

LC装置：ACQUITY、MS装置：Xevo TQ-S

LC 条件																								
カラム	InertSustain C18 HP サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジールサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.3																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸 B 液：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																							
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>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.1</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.1	1	99	11.0	1	99	11.1	50	50	20.0	50	50
時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)																						
0.0	50	50																						
6.0	50	50																						
6.1	1	99																						
11.0	1	99																						
11.1	50	50																						
20.0	50	50																						
MS 条件																								
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (-)																							
キャピラリー電圧 (kV)	1.5																							
脱溶媒温度 (°C)	500																							
イオンソース温度 (°C)	150																							
脱溶媒ガス流量 (L/hr)	1,000																							
コーンガス流量 (L/hr)	150																							
ネブライザーガス (Bar)	7																							
コリジョンガス (ml/min)	0.2 (アルゴン)																							
定量イオン (m/z)	トリクラベンダゾール：m/z 357.0→341.9 [コーン電圧：80 V、コリジョンエネルギー：20 eV] 代謝物 A：m/z 372.8→357.9 [コーン電圧：60 V、コリジョンエネルギー：30 eV] 代謝物 B：m/z 388.8→309.9 [コーン電圧：10 V、コリジョンエネルギー：30 eV] 代謝物 D：m/z 327.0→182.0 [コーン電圧：80 V、コリジョンエネルギー：20 eV]																							
定性イオン (m/z)	トリクラベンダゾール：m/z 357.0→197.0 [コーン電圧：80 V、コリジョンエネルギー：30 eV] 代謝物 A：m/z 372.8→181.1 [コーン電圧：60 V、コリジョンエネルギー：40 eV] 代謝物 B：m/z 388.8→181.0 [コーン電圧：10 V、コリジョンエネルギー：50 eV] 代謝物 D：m/z 327.0→146.2 [コーン電圧：80 V、コリジョンエネルギー：30 eV]																							
保持時間 (分)	4.6 (代謝物 D)																							

LC装置：Nexera X2、MS装置：API 4000

LC 条件																								
カラム	InertSustain C18 HP サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.3																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸 B 液：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																							
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>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.1</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.1	1	99	11.0	1	99	11.1	50	50	20.0	50	50
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	50	50																						
6.0	50	50																						
6.1	1	99																						
11.0	1	99																						
11.1	50	50																						
20.0	50	50																						
MS 条件																								
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	トリクラベンダゾール、代謝物 A、B：ESI (+) 代謝物 D:ESI (-)																							
イオンスプレー電圧 (V)	トリクラベンダゾール、代謝物 A、B：5,000 代謝物 D：-4,500																							
ヒーター温度 (°C)	トリクラベンダゾール、代謝物 D：700 代謝物 A：400 代謝物 B：300																							
エントランス電位 (V)	トリクラベンダゾール、代謝物 A、B：10 代謝物 D：-10																							
カーテングス (psi)	トリクラベンダゾール、代謝物 A、B：50 代謝物 D：40																							
ネブライザーガス (psi)	トリクラベンダゾール：60 代謝物 A：80 代謝物 B：70 代謝物 D：50																							
ターボガス (psi)	80																							
コリジョンガス	8 (窒素)																							
コリジョンセルイグジット電位 (V)	トリクラベンダゾール：16 (定量イオン)、18 (定性イオン) 代謝物 A：14 (定量イオン)、6 (定性イオン) 代謝物 B：24 (定量イオン)、12 (定性イオン) 代謝物 D：-29 (定量イオン)、-9 (定性イオン)																							
定量イオン (m/z)	トリクラベンダゾール：m/z 359→344 [デクラスタリング電位：86 V、コリジョンエネルギー：39 eV] 代謝物 A：m/z 375→152 [デクラスタリング電位：81 V、コリジョンエネルギー：55 eV] 代謝物 B：m/z 391→242 [デクラスタリング電位：136 V、コリジョンエネルギー：53 eV] 代謝物 D：m/z 327→182 [デクラスタリング電位：-85 V、コリジョンエネルギー：-36 eV]																							
定性イオン (m/z)	トリクラベンダゾール：m/z 359→274 [デクラスタリング電位：86 V、コリジョンエネルギー：51 eV]																							

	代謝物 A : $m/z$ 375→139 [デクラスタリング電位 : 81 V、コリジョンエネルギー : 75 eV] 代謝物 B : $m/z$ 391→139 [デクラスタリング電位 : 136 V、コリジョンエネルギー : 77 eV] 代謝物 D : $m/z$ 327→146 [デクラスタリング電位 : -85 V、コリジョンエネルギー : -50 eV]
保持時間 (分)	5 (代謝物 D)

## 5. 定量

代謝物D標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈して、各食品の添加濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) に対して、25、50、75、100、125、150%の回収率に相当する濃度の検量溶液を調製した。なお、代謝物Dの検量溶液は、トリクラベンダゾールとしての濃度で調製した。各濃度に調製した検量溶液5  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.01 mg/kgのトリクラベンダゾールに相当する試験溶液の濃度は、0.0015 mg/Lである。試験溶液は5  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入して、検量線から絶対検量線法によりトリクラベンダゾールの含量を求めた。

## 6. 添加試料の調製

添加濃度はトリクラベンダゾールとしての濃度で示した。

### 1) 基準値濃度の添加試料の作成

牛の筋肉 (添加濃度 : 0.3 mg/kg) : 試料10.0 gに、6  $\mu$ g/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.1 mg/kg) : 試料10.0 gを採り、約40°Cの湯浴で融解し、2  $\mu$ g/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30°Cで30分間放置して凝固させた。

牛の肝臓 (添加濃度 : 0.9 mg/kg) : 試料10.0 gに、18  $\mu$ g/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

### 2) 定量限界濃度の添加試料の作成

牛の筋肉・肝臓 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料10.0 gに、0.2  $\mu$ g/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料10.0 gを採り、約40°Cの湯浴で融解し、0.2  $\mu$ g/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30°Cで30分間放置して凝固させた。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

試料を水酸化ナトリウム存在下100°Cで3時間加熱して加水分解した後、塩酸で酸性としてトリクラベンダゾール及び酸性条件下で代謝物Dに変換される代謝物を酢酸エチルで抽出した。アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配で脱脂した後、エタノール及び酢酸混液の溶液とし、過酸化水素を加えて90°Cで16時間加熱して、トリクラベンダゾール及びその代謝物を代謝物Dに酸化した。酸化反応後の溶液から酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液で抽出した後、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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、代謝物Dについて定量を行い、代謝物Dの含量に換算係数を乗じてトリクラベンダゾール (酸性条件下で代謝物Dに変換される代謝物を含む) の含量に変換したものを分析

値とした。

#### 1) 加水分解

試料10.0 gを分解容器に採り、5 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えて混合し、密栓して100°Cで3時間加熱した。室温に戻した後、内容物を別の容器に移し、5 mol/L塩酸12 mLを加えた。加水分解に用いた容器をメタノール5 mLで洗浄して、洗液を先の内容物に合わせた。酢酸エチル40 mLを加えて振とう抽出し、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を採った。次いで、水層に酢酸エチル40 mLを加えて振とう抽出し、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を採り、先の酢酸エチル層に合わせて、酢酸エチルで正確に100 mLとした。

#### 2) 脱脂

1) で得られた抽出液を正確に6 mLを分取して、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加えて溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを加えて5分間振とうして、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を採取した。次いで、*n*-ヘキサン層に、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを加えて5分間振とうして、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層に合わせた。40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物をエタノール及び酢酸（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとした。

#### 3) 酸化反応

2) で得られた溶液から正確に5 mLを分取し、過酸化水素25 µLを加えて混合した後、密栓して90°Cで16時間加熱した。室温に戻した後、水10 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液15 mLで5分間振とう抽出して、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、有機層を採取した。次いで、水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液15 mLを加えて5分間振とうし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、有機層を採り、先の有機層に合わせた。40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物を水及びメタノール（3：7）混液2 mLを加えて溶かした。

#### 4) 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、メタノール、次いで水及びメタノール（3：7）混液各5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに3) で得られた溶液を全量負荷した後、水及びメタノール（3：7）混液10 mLを順次注入し、流出液は捨てた。次いで、水及びメタノール（1：19）混液20 mLを注入し、溶出液を採った。これを40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

#### 8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように、代謝物D標準溶液1 mLを2 mLバイアルに採った。室温で窒素ガスを吹き付け乾固し、ブランク試験溶液1 mLを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[分析法フローチャート]

**試料**

- ↓ 試料 10.0 g を 50 mL 容ポリプロピレン製分解容器に量り採る
- ↓ 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合後に 30 分間放置
- ↓ 牛の脂肪の場合は、約 40°C の湯浴で融解し、添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合後に 30°C で 30 分間放置して凝固させる

**アルカリ加水分解**

- ↓ 5 mol/L 水酸化ナトリウム 10 mL を加えて、密栓後に 100°C で 3 時間加熱する

**酢酸エチル転溶**

- ↓ 加水分解後の水溶液に、5 mol/L 塩酸 12 mL、メタノール 5 mL、酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とうし、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) 後に有機層を 100 mL 容メスフラスコに採る
- ↓ 水層に酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とうし、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) 後に有機層を合わせ、正確に 100 mL とする

**脱脂**

- ↓ 酢酸エチル抽出液を正確に 6 mL を採取して、40°C 以下で溶媒を除去する
- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL を加えて溶解する
- ↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加えて、5 分間振とうし、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) 後にアセトニトリル層を採取する
- ↓ *n*-ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加えて、5 分間振とうし、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) 後にアセトニトリル層を採取する

**酸化反応**

- ↓ アセトニトリル層全量を 40°C 以下で溶媒を除去する
- ↓ エタノール及び酢酸 (1 : 1) 混液に溶かして正確に 10 mL とする
- ↓ 正確に 5 mL を採取して、試験管に移して、過酸化水素 25 µL を加えて、90°C で 16 時間加熱する

**酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液転溶**

- ↓ 反応溶液を放冷後に、水 10 mL、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 15 mL を加えて、2 回振とう抽出して、有機層を採取する
- ↓ 有機層を濃縮後に、水及びメタノール (3 : 7) 混液 2 mL に溶解する

**Oasis MCX (500 mg) カラム精製**

- ↓ 予めメタノール 5 mL、水及びメタノール (3 : 7) 混液 5 mL を順次注入し流出液を捨てる
- ↓ 上記で得られた溶液を全量、カラムに注入する
- ↓ 水及びメタノール (3 : 7) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ 水及びメタノール (1 : 19) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採り、溶出液を 40°C 以下で濃縮する
- ↓ アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液に溶かし、正確に 2 mL に溶解する

**試験溶液**

- ↓

**LC-MS/MS測定** (0.15 g試料/mL) 試験溶液5 µLを注入

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

① トリクラベンダゾールのMS条件の検討

トリクラベンダゾール標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定したところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。トリクラベンダゾールのスキャン測定におけるマススペクトル（コーン電位：80 V）を図1に示した。トリクラベンダゾールの脱プロトン化分子（ $m/z$  357 [M-H]<sup>-</sup>）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図2及び3には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた $m/z$  357→342（コーン電位：80 V、CE：20 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  357→197（コーン電位：80 V、CE：30 eV）を定性イオンとした。

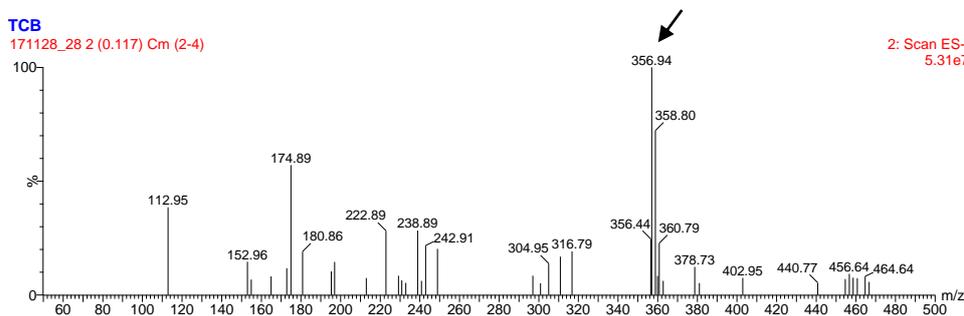


図1 トリクラベンダゾールのマススペクトル

スキャン範囲：50~500  $m/z$ 、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V

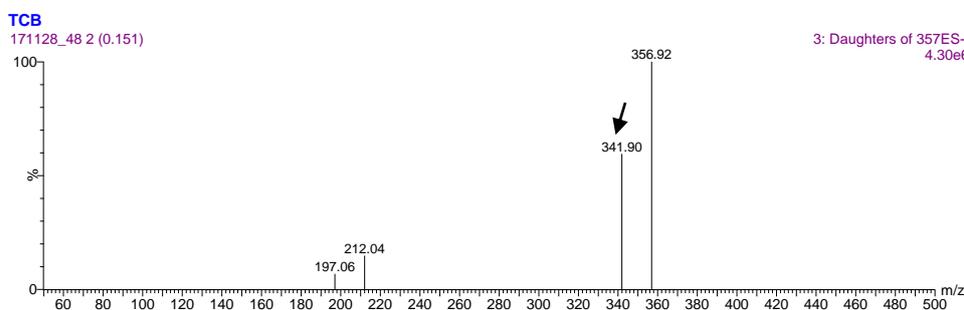


図2 トリクラベンダゾールのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： $m/z$  357、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V、CE = 20 eV

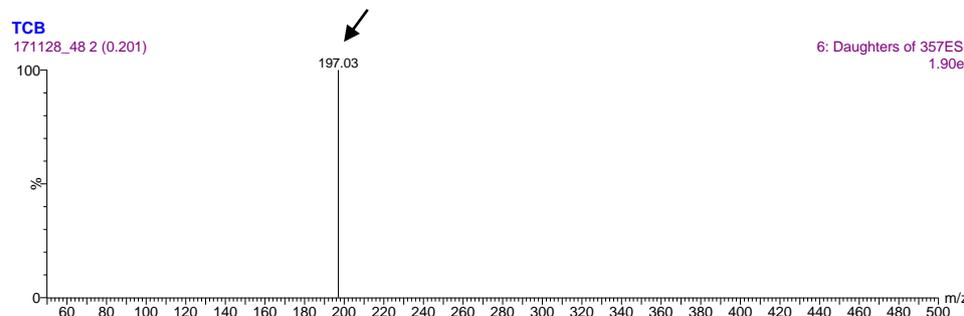


図3 トリクラベンダゾールのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： $m/z$  357、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V、CE = 30 eV

## ② 代謝物AのMS条件の検討

代謝物A標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定したところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。代謝物Aのスキャン測定におけるマススペクトル（コーン電圧：60 V）を図4に示した。代謝物Aの脱プロトン化分子（ $m/z$  373  $[M-H]^-$ ）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図5及び6には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた $m/z$  373→358（コーン電圧：60 V、CE：30 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  373→181（コーン電圧：60 V、CE：40 eV）を定性イオンとした。

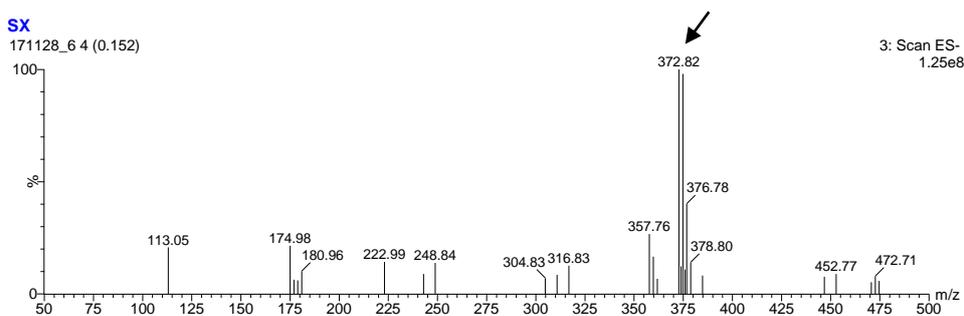


図4 代謝物Aのマススペクトル

スキャン範囲：50～500  $m/z$ 、測定条件：ESI（－）、コーン電圧：60 V

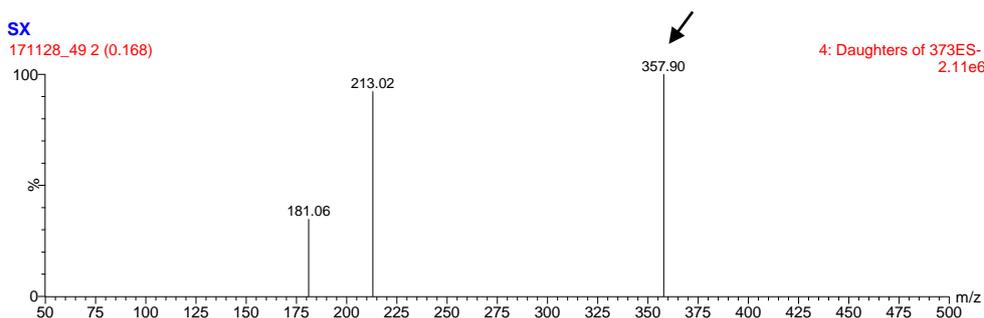


図5 代謝物Aのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： $m/z$  373、測定条件：ESI（－）、コーン電圧：60 V、CE = 30 eV

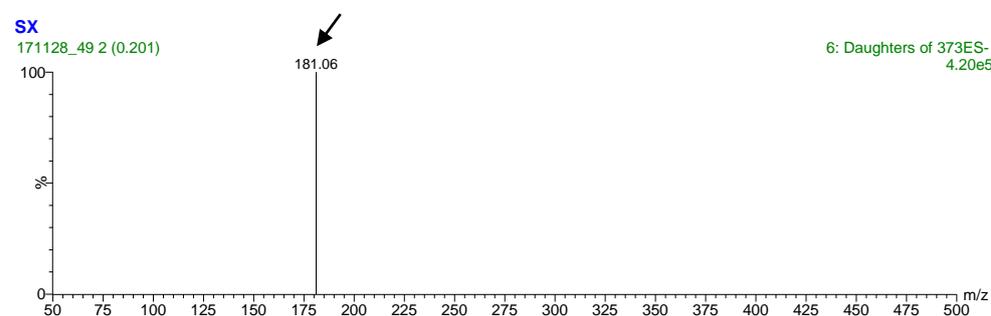


図6 代謝物Aのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： $m/z$  373、測定条件：ESI（－）、コーン電圧：60 V、CE = 40 eV

### ③ 代謝物BのMS条件の検討

代謝物B標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定したところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。代謝物Bのスキャン測定におけるマススペクトル（コーン電位：10 V）を図7に示した。代謝物Bの脱プロトン化分子（ $m/z$  389 [M-H]<sup>-</sup>）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図8及び9には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた $m/z$  389→310（コーン電位：10 V、CE：30 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  389→181（コーン電位：10 V、CE：50 eV）を定性イオンとした。

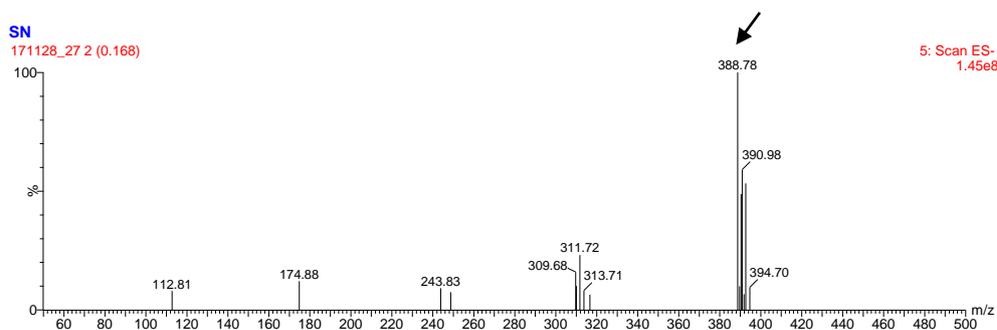


図7 代謝物Bのマススペクトル

スキャン範囲：50～500  $m/z$ 、測定条件：ESI（-）、コーン電位：10 V

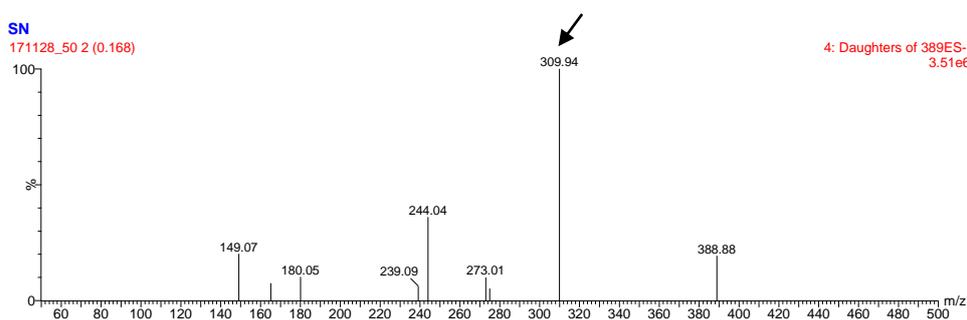


図8 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： $m/z$  389、測定条件：ESI（-）、コーン電位：10 V、CE = 30 eV

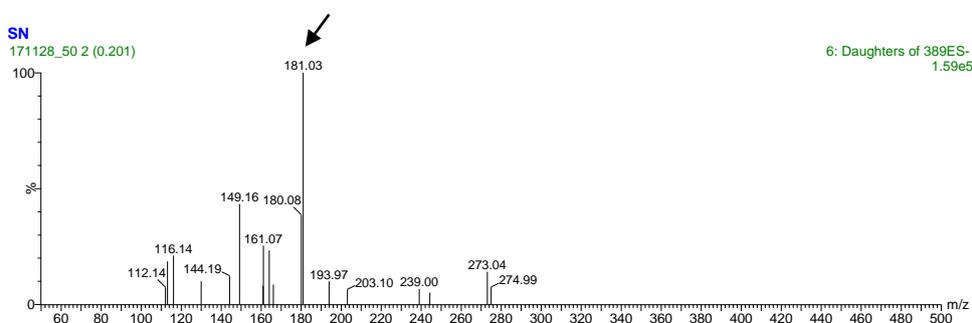


図9代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： $m/z$  389、測定条件：ESI（-）、コーン電位：10 V、CE = 50 eV

#### ④ 代謝物DのMS条件の検討

代謝物D標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定したところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。代謝物Dのスキャン測定におけるマススペクトル（コーン電位：80 V）を図10に示した。代謝物Dの脱プロトン化分子（ $m/z$  327 [M-H]<sup>-</sup>）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図11及び12には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた $m/z$  327→182（コーン電位：80 V、CE：20 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  327→146（コーン電位：-80 V、CE：30 eV）を定性イオンとした。

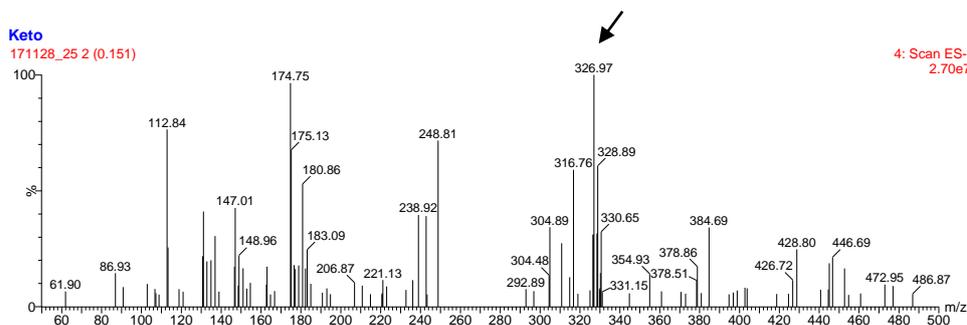


図10 代謝物Dのマススペクトル

スキャン範囲：50～500  $m/z$ 、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V

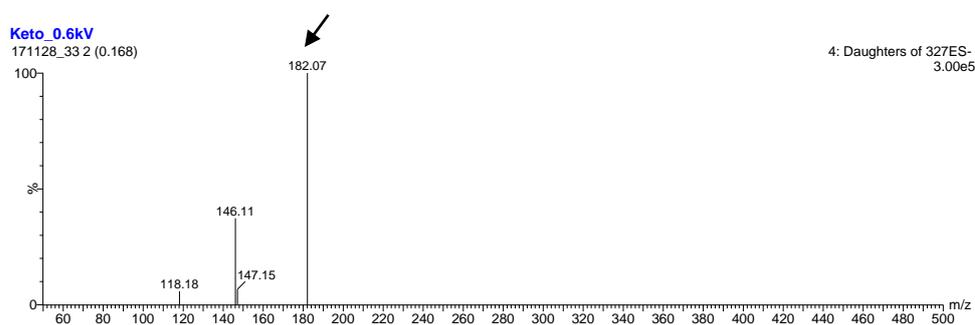


図11 代謝物Dのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： $m/z$  327、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V、CE = 20 eV

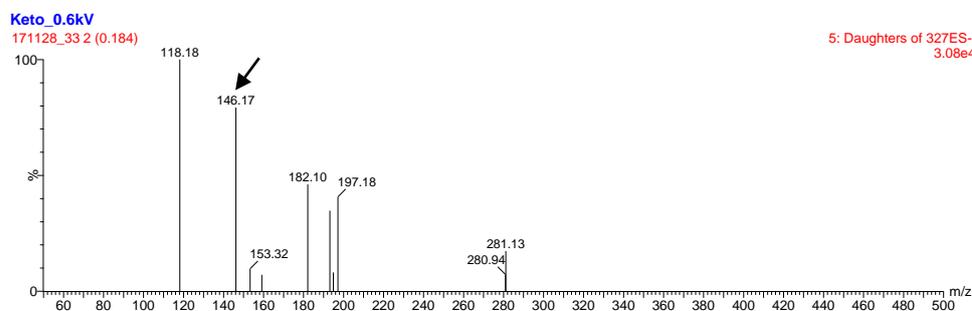


図12 代謝物Dのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： $m/z$  327、測定条件：ESI（-）、コーン電位：80 V、CE = 30 eV

## 2) LC条件の検討

### ① 移動相条件の検討

水系の移動相に加える添加剤の種類について検討した。5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液、0.1 vol%酢酸、0.1 vol%ギ酸を水系の移動相として、有機系の移動相にはアセトニトリルを用いて、代謝物D標準溶液を測定し、ピークのS/Nを比較した。表1に示す通り、3種類の水系溶媒の中では、0.1 vol%ギ酸を用いた場合にS/Nが最大となった。更に、最適なギ酸の濃度を検討するために、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を有機系の移動相に用いて同様に検討した。その結果、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いた方が、ピークのS/Nが大きくなることが明らかになった。以上のことから、移動相には0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル混液を用いることにした。

表1 各移動相条件における代謝物DのS/N

移動相		ピークのS/N
水系	有機系	
5 mmol/L酢酸アンモニウム	アセトニトリル	20,570 ± 796
0.1 vol%酢酸	アセトニトリル	33,347 ± 4,064
0.1 vol%ギ酸	アセトニトリル	39,539 ± 777
0.1 vol%ギ酸	0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル	43,474 ± 1,064

50 ng/mL 代謝物D標準溶液5 µLを注入、n = 3

流速：0.3 mL/min、カラム：InertSustain C18 HP (2.1 x 150 mm, 3µm)

水系移動相：有機系移動相=1：1

### ② 分析カラムの選定

LCの移動相には、代謝物Dが高感度に測定できた、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液を用いることにした。3種の一般的なODSカラムを用いて代謝物D標準溶液を測定し、ピークのS/Nを指標として分析カラムを選択した。表2に示すように、InertSustain C18 HPカラムを用いることで、代謝物DのピークのS/Nが検討したカラムの中では最大となった。以上のことから、分析カラムは、InertSustain C18 HPを用いることにした。なお、本検討では高圧対応の分析カラムを使用した。通常の高圧対応ではない分析カラムでも分析は可能である。

表2. 各分析カラムを用いたときの、代謝物DのピークのS/N

カラム	移動相	保持時間 (分)	ピークの S/N
Inertsil ODS-4 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm (ジーエルサイエンス製)	0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液	5.3	4,767 ± 1,757
InertSustain Swift C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm (ジーエルサイエンス製)	0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (13:12) 混液	4.5	6,480 ± 954
InertSustain C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm (ジーエルサイエンス製)	0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液	4.7	11,010 ± 3,817

10 ng/mL 代謝物D標準溶液5 µLを注入

流速：0.3 mL/min、n = 3

### 3) 検量線

各添加濃度に対する回収率25%、50%、75%、100%、125%、150%に相当する濃度の検量溶液をアセトニトリル及び水（1：1）混液で調製し、5 μLをLC-MS/MSに注入して検量線を作成した。図13には、定量限界濃度（0.01 mg/kg）に対する回収率25%～150%（0.375～2.25 ng/L）（トリクラベンダゾールとして）に相当する濃度範囲の検量線の例を示した。本濃度範囲で作成した検量線の決定係数 $R^2$ は0.999以上と良好な直線性が認められ、最下点の検量溶液（0.375 ng/mL）から得られる代謝物DのピークのS/Nは10以上を十分に満たした。

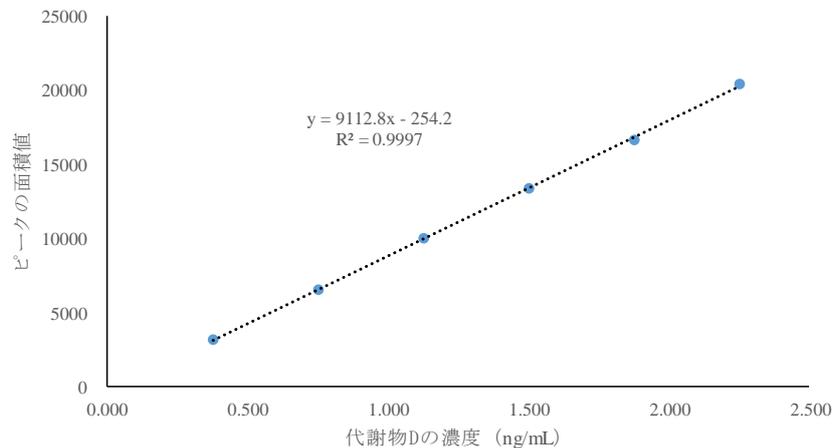


図13 代謝物Dの検量線（トリクラベンダゾールとして）の例

## 2. 試験溶液調製方法の検討

### 1) 申請企業の残留分析法

本試験法の開発検討において参考にした、申請企業の残留分析法<sup>1)</sup>のフローチャートを以下に示す。

[申請企業の残留分析法のフローチャート]

#### 試料

↓ 試料 0.5 g を量り採る

#### アルカリ加水分解

↓ 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を加えて、90°Cで3時間加熱する

↓ 4 mol/L 塩酸 5 mL を加えて、冷凍庫で10分間放置して、内容物を分液ロートに移す

↓ 反応容器をメタノール 5 mL で洗い、洗液を合わせる

#### ジクロロメタン転溶

↓ ジクロロメタン 10 mL で3回振とう抽出する

↓ ジクロロメタン層を採取して濃縮する

#### 脱脂（脂肪及び脂肪の多い筋肉のみ）

↓ *n*-ヘキサン 30 mL を加えて、超音波により溶解する

↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL で3回振とう抽出する

↓ アセトニトリル層を採取して濃縮する

#### 酸化反応

↓ エタノール及び酢酸（1：1）混液 4 mL に溶解する

- ↓ 過酸化水素 100  $\mu$ L を加えて、密栓後に 90°C で 1 晩（16 時間まで）加熱する
- ↓ 反応液を 100 mL 分液ロートに移し、容器を水 10 mL で洗い分液ロートに移す
- ↓ 水 40 mL、4mol/L 塩酸 10 mL を加える

**ジクロロメタン転溶**

- ↓ 飽和食塩水 10 mL、ジクロロメタン 20 mL、加えて 3 回振とう抽出して、ジクロロメタン層を採取する
- ↓ ジクロロメタン層にヘプタン 5 mL を加え、酢酸が完全になくなるまで濃縮する

**陰イオン交換樹脂ミニカラム精製 (Inert Sep SAX (500 mg))**

- ↓ 予めメタノール 3 mL、ジクロロメタン 3 mL を注入し、流出液を捨てる
- ↓ 残留物をジクロロメタン 10 mL に溶解し、カラムに注入する
- ↓ ジクロロメタン 10 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ イソプロピルアルコール及びジクロロメタン（3：22）混液 5 mL で溶出し、溶出液を採る
- ↓ 溶出液を濃縮して、アセトニトリル 0.5 mL に溶解後に膜ろ過し、水 0.5 mL を加える

**試験溶液**

↓

**HPLC-UV 測定 (296 nm)**

2) 抽出方法の検討

① アルカリ加水分解条件の検討

申請企業の残留分析法では、試料0.5 gに2 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mLを加えて、90°Cで3時間加熱して加水分解する方法を採用している。本検討では、試料の均質性を担保するために、供試料量を10 gとした。また、水酸化ナトリウム溶液は、5及び10 mol/Lの2濃度を調製した。なお、試料に加える水酸化ナトリウム溶液の液量は、試料が完全に浸漬する10 mLとした。牛の筋肉（10.0 g）を50 mL容ポリプロピレン製容器に量り取り、5または10 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えた。加熱温度を80、90、100°Cに設定し、2、3、4時間加熱して、各試料の溶解状況を観察した。表3に示すように、100°Cの加熱条件下では、水酸化ナトリウム溶液の濃度及び加熱時間に依らず組織が完全に溶解して液状化することが確認された。以上のことから、アルカリ加水分解は、試料10.0 gに5 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えて、100°Cの加熱条件下で3時間加熱することにした。

表3. 牛の筋肉をアルカリ加水分解したときの溶解状況

反応条件		牛の筋肉の溶解状況					
加熱温度(°C)		80		90		100	
水酸化ナトリウム溶液の濃度(mol/L)		5	10	5	10	5	10
加熱時間(時間)	2	×	×	×	△	○	○
	3	×	×	○	△	○	○
	4	×	×	○	△	○	○

牛の筋肉の試料量：10 g

○：試料が完全に溶解して液状化する、△：筋肉組織はほぼ液状化するが、小さい組織片が認められる、×：筋肉組織の一部が大きな塊として残存する

② 転溶方法の検討

申請企業の残留分析法では、加水分解後の反応溶液を塩酸で酸性としてジクロロメタンに抽出する方法を採用している。本検討では、抽出溶媒を有害性の高いジクロロメタンから、一般の分析操作で汎用される酢酸エチルに変更することが可能かを検討した。併せて、塩酸及びメタノールの液量を変えて、より高い回収率が得られる転溶条件を検討した。

100 mL容PP容器に、トリクラベンダゾール、代謝物A、代謝物B、代謝物D各100 ngを採り、水5 mL、5 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えた。これに、5 mol/L塩酸12、15、20 mLを、またメタノールを5、10 mLを加えて、酢酸エチル40 mLで3回抽出した。各化合物について、それぞれの抽出回数ごとに回収率を求めた。表4に示すように、全ての化合物が塩酸及びメタノールの量が、それぞれ12、5 mLのときに1回の抽出で97%以上の回収率が得られた。以上のことから、転溶操作は、加水分解後の溶液に5 mol/L塩酸 12 mL、メタノール5 mLを加えて、酢酸エチル40 mLで2回振とう抽出することにした。なお、酢酸エチルと*n*-ヘキサンの混液を抽出溶媒として同様の検討を行ったが、*n*-ヘキサンの比率の上昇に伴い、トリクラベンダゾールの回収率が低下したことから不採用とした。

表4 転溶方法の検討

5 mol/L塩酸の添加量(mL)	メタノールの添加量(mL)	抽出回数(回)	回収率(%)			
			トリクラベンダゾール	代謝物A	代謝物B	代謝物D
12	5	1	97	97	98	100
		2	1	0	1	1
		3	0	0	0	0
		2回までの合計	98	97	99	101
	10	1	94	99	96	99
		2	3	0	1	2
		3	0	0	0	0
		2回までの合計	97	99	97	100
15	5	1	93	95	91	96
		2	3	2	2	2
		3	0	0	0	0
		2回までの合計	96	97	93	98
	10	1	92	96	91	98
		2	6	3	2	2
		3	0	0	0	0
		2回までの合計	98	99	93	100
20	5	1	87	97	98	100
		2	4	1	1	1
		3	1	0	0	0
		2回までの合計	92	98	99	101
	10	1	83	94	93	97
		2	11	2	1	2
		3	1	0	0	0
		2回までの合計	93	96	94	99

各化合物の添加量：100 ng（トリクラベンダゾールとして）

抽出溶媒：酢酸エチル（40 mL）

### 3) 脱脂方法の検討

*n*-ヘキサン及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルによる脱脂方法を検討した。トリクラベンダゾール、代謝物A、代謝物B、代謝物D各100 ngを採り、*n*-ヘキサン20 mLに溶解した。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mLを加えて、5分間振とう後に遠心分離した。本操作を3回繰り返す、各抽出回における回収率を求めた。表5に示すように、各化合物は*n*-ヘキサンには残存せず、アセトニトリルによる抽出2回でほぼ100%抽出された。以上のことから、脱脂操作は、*n*-ヘキサンに溶解後に、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加えて2回振とう抽出することにした。なお、使用するLC-MS/MSの検出感度を考慮すると、最終試験溶液は0.15 g試料/mLが妥当と考えられた。試験の操作性を考慮して、100 mLに定容した酢酸エチル抽出液6 mLを正確に採取して、脱脂操作を行うことにした。

表5 各抽出回における回収率 (%)

	回収率 (%)				合計
	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			<i>n</i> -ヘキサン	
	20 mL (1回目)	20 mL (2回目)	20 mL (3回目)	20 mL	
トリクラベンダゾール	102	3	0	0	105
代謝物A	98	1	0	0	99
代謝物B	99	0	0	0	99
代謝物D	95	1	0	0	96

各化合物の添加量：100 ng (トリクラベンダゾールとして)

### 4) 酸化方法の検討

#### ① 通知試験法の酸化方法の検証

通知試験法で採用している酸化方法により、4化合物を過酸化水素により代謝物Dに酸化して回収率を求めた。酸化反応は、無水エタノール 1 mL、酢酸1 mLに、過酸化水素を1 mL加えて、100℃で1、2、3時間 (通知試験法では、2時間) 加熱した。反応後の溶液をODSミニカラムで精製後に回収率を求めた。表6に示すように、代謝物D以外の回収率は75~80%程度と低回収率となったため、本反応条件は不採用とした。また、反応時間に伴う回収率の上昇も認められないことから、反応開始から1時間以内に酸化反応は完結しているものと考えられた。

表6 通知試験法による酸化反応における回収率

反応時間 (h)	回収率 (%)			
	トリクラベンダゾール	代謝物A	代謝物B	代謝物D
1	81	79	76	88
2	81	74	75	95
3	78	78	73	95

添加量：50 ng (トリクラベンダゾールとして)

## ② 酸化反応の溶媒（エタノール及び酢酸混液）の安定性の検証

過酸化水素を用いるトリクラベンダゾールの酸化反応条件の検討では、酸化反応の進行を確認するために、最終酸化反応物である代謝物Dの他にも、トリクラベンダゾール本体、酸化中間体である代謝物A及び代謝物Bも同時にモニターした。トリクラベンダゾールを用いて、酸化反応の複数の条件（反応溶液量、過酸化水素の量、反応温度、反応時間）を変更して検討を行ったが、いずれの条件においても、代謝物Dの回収率は、80%程度と低い回収率となった。これらの反応溶液中には、トリクラベンダゾール及び代謝物Aは検出されないが、代謝物Bは10%程度が検出された。このため、何らかの要因により、代謝物Bから代謝物Dへの酸化反応が進行しないことが低回収となる要因の一つであると考えられた。第一に、反応時の過酸化水素の枯渇が考えられたため、酸化反応後の溶液に過酸化水素を追加で添加して反応を行ったが、代謝物Bから代謝物Dへの酸化は進行しなかった。このため、次に酸化反応時の反応溶媒であるエタノール及び酢酸混液の安定性が疑われた。そこで、用時調製したエタノール及び酢酸（1：1）混液と、調製後、1か月程度が経過したエタノール及び酢酸（1：1）混液を用いて、トリクラベンダゾールの酸化反応を行った。その結果、表7に示すように、用時調製した溶媒を使用した場合には、反応中間体である代謝物Bは1%未満であったが、1か月前に調製した反応溶媒を用いた場合には、代謝物Bが13%程度残存していることが明らかになった。以上のことから、エタノール及び酢酸混液は保存中に変化して、十分な酸化反応が進行しなくなることが考えられたので、用時調製とすることにした。

表7 酸化反応における各化合物の回収率

反応溶媒	回収率 (%)			
	トリクラベンダゾール	代謝物A	代謝物B	代謝物D
エタノール及び酢酸（1：1） 混液（1か月前に調製）	ND	ND	13 ± 0.4	83 ± 1.0
エタノール及び酢酸（1：1） 混液（用時調製）	ND	ND	0.6 ± 0.3	89 ± 1.2

反応溶媒量：2 mL、過酸化水素量：200 mL、

反応温度：100℃、反応時間：3時間

ND：S/N<3

## ③ 酸化反応条件の検討

申請企業の残留分析法では、エタノール及び酢酸（1：1）混液4 mLに、過酸化水素100 µLを加えて、90℃で1晩（16時間まで）加熱する方法を用いている。本検討では、過酸化水素の添加量を変化させて、90℃で16時間まで酸化を行い、経時的に反応の進行を確認した。トリクラベンダゾール20 ngに、エタノール及び酢酸（1：1）混液5 mLに、過酸化水素を25～200 µL加えて、90℃の加熱条件下で1～16時間反応を行った。反応後の溶液を酢酸エチルに転溶して、Oasis MCXミニカラムで精製後に回収率を求めた。図14に示すように、いずれの過酸化水素の添加量においても、反応時間が5時間以下では回収率は95%以下となった。一方で、反応時間が16時間のときは、過酸化水素の添加量が200 µLのときは95%を下回ったが、100 µL以下の場合にはほぼ100%が酸化された。日常の分析操作時間を考慮すると、加熱時間を10時間程度に設定することは適当ではないと考えられるため、加熱時間は、一晩放置可能な実験操作に影響が少ない16時間とした。

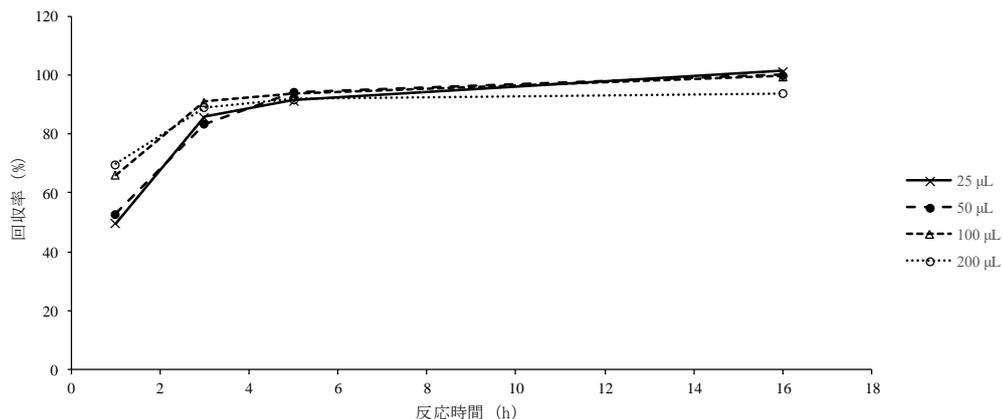


図14 各酸化反応条件におけるトリクラベンダゾールの回収率  
トリクラベンダゾールの添加量：20 ng

#### ④ 過酸化水素の添加量の検討

先の③の検討により、過酸化水素の添加量は100 μL以下が適当であると考えられた。酸化反応は、マトリックスによる影響を受ける可能性があるため、牛の肝臓の抽出液を用いて、添加する過酸化水素の量を検討した。トリクラベンダゾール20 ngに、牛の肝臓のマトリックスを含むエタノール及び酢酸（1：1）混液5 mLに、過酸化水素を25～300 μL加えて、90℃の加熱条件下で16時間反応を行った。反応後の溶液を酢酸エチルに転溶後に、Oasis MCXミニカラムで精製した。図15に示すように、過酸化水素の添加量に依存して回収率は低下する傾向が認められた。過酸化水素の量が25 μLのときに回収率が最大となったため、過酸化水素の量は、25 μLとした。

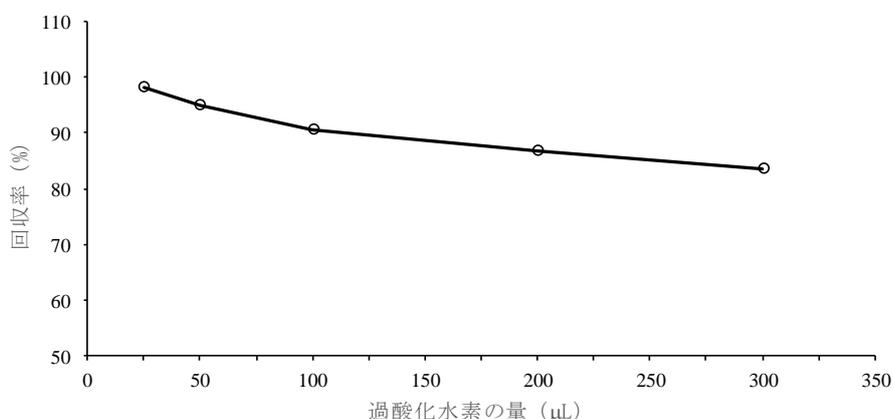


図15 各過酸化水素の添加量におけるトリクラベンダゾールの回収率  
トリクラベンダゾールの添加量：20 ng

#### ⑤ トリクラベンダゾール及び代謝物の酸化反応の確認

トリクラベンダゾール、代謝物A、代謝物B、代謝物Dをそれぞれ20 ngを取り、エタノール及び酢酸（1：1）混液5 mLに、過酸化水素を25 μL加えて、90℃の加熱条件下で16時間反応した。反応後の溶液を酢酸エチルに転溶後に、Oasis MCXミニカラムで精製した。3併行で実施した結果を表8に示す。本酸化条件によりトリクラベンダゾールとその代謝物すべてにおいて、ほぼ100%酸化反応が進行していることが確認された。

表8 トリクラベンダゾール及び代謝物の酸化反応における回収率

	トリクラベンダゾール	代謝物A	代謝物B	代謝物D
n = 1	102	98	99	97
n = 2	100	94	97	97
n = 3	109	96	103	101
average	104	96	100	98
sd	4.76	2.01	2.83	1.97
rsd (%)	4.6	2.1	2.8	2.0

トリクラベンダゾール、代謝物A、代謝物B、代謝物Dの添加量：各20 ng

#### 5) 酸化反応後の溶液からの転溶方法の検討

申請企業の残留分析法は、酸化反応後の溶液を塩酸で酸性として、飽和食塩水を加えてジクロロメタンに抽出する方法である。一方、酸化反応に用いる酢酸は、この後のミニカラム精製の際に、回収率低下の原因となり、除去する必要がある。本検討では、ジクロロメタンではなく、酢酸エチル及びn-ヘキサン混液を用いて、酸化反応後の溶液から代謝物Dを有機層に転溶して、酢酸を除去する方法を検討した。代謝物D 100 ngを採り、エタノール及び酢酸（1：1）混液5 mL、水10 mLに、酢酸エチル及びn-ヘキサン（1：1、1：3、1：5、1：7、1：9）混液15 mLを加えて、3回振とう抽出して有機層を採取した。それぞれについて回収率を求めた。表9に示すように、酢酸エチル及びn-ヘキサン（1：1）混液を用いた場合にのみ、2回の抽出で100%の回収率を得ることが可能であった。以上のことから、転溶操作は、反応後の溶液に水10 mLを加えて、酢酸エチル及びn-ヘキサン（1：1）混液15 mLで2回抽出することにした。

表9 各抽出溶媒への転溶の検討

抽出溶媒	回数	回収率 (%)
酢酸エチル及びn-ヘキサン(1:1)混液 (15 mL)	1	93
	2	7
	3	0
	合計	100
酢酸エチル及びn-ヘキサン(1:3)混液 (15 mL)	1	81
	2	17
	3	2
	合計	100
酢酸エチル及びn-ヘキサン(1:5)混液 (15 mL)	1	75
	2	18
	3	4
	合計	97
酢酸エチル及びn-ヘキサン(1:7)混液 (15 mL)	1	67
	2	22
	3	6
	合計	95
酢酸エチル及びn-ヘキサン(1:9)混液 (15 mL)	1	67
	2	24
	3	7
	合計	98

代謝物Dの添加量：100 ng

## 6) ミニカラム精製方法の検討

### ① 精製方法の検討

ミニカラムの選定には、InertSep C18 FF、Oasis HLB、Oasis MAX、Oasis MCXの4種を用いた。各カラムについて、代謝物Dの標準溶液を用いて精製方法を検討した。各ミニカラムによる精製方法を表10～13に示した。

表10 InertSep C18 FF ミニカラムからの溶出状況

	回収率(%)						合計
	水及びメタノール(1:1)混液			水及びメタノール(1:4)混液			
	3 mL	3-8 mL	8-13 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
代謝物D	0	0	0	90	9	1	100

InertSep C18 FF (6 mL、500 mg、ジーエルサイエンス製)  
 添加量：100 ng (トリクラベンダゾールとして)

表11 Oasis HLBミニカラムからの溶出状況

	回収率(%)						合計
	水及びメタノール(1:3)混液			メタノール			
	3 mL	3-8 mL	8-13 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
代謝物D	0	0	0	101	1	1	103

Oasis HLB (6 mL、500 mg、Waters製)  
 添加量：100 ng (トリクラベンダゾールとして)

表12 Oasis MCXミニカラムからの溶出状況

	回収率(%)								合計
	水及びメタノール(7:13)混液	水及びメタノール(7:13)混液			水及びメタノール(1:9)混液				
	2 mL	3 mL	3-8 mL	8-13 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
代謝物D	0	0	0	0	76	17	3	1	97

Oasis MCX (6 mL、500 mg、Waters製)  
 添加量：100 ng (トリクラベンダゾールとして)

表13 Oasis MAXミニカラムからの溶出状況

	回収率(%)						合計
	水及びメタノール(7:13)混液			水及びメタノール(1:9)混液			
	3 mL	3-8 mL	8-13 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
代謝物D	0	0	0	61	28	3	92

Oasis MAX (6 mL、500 mg、Waters製)  
 添加量：100 ng (トリクラベンダゾールとして)

### ② ミニカラムの選定

4種のミニカラムを用いて精製を行い、得られるマトリックス効果の値から、ミニカラムを評価した。牛の肝臓、牛の脂肪の抽出液に、トリクラベンダゾール10 ngを加えて、酸化反応後に各カラムにて精製を行った。表14に示すように、Oasis MCXを用いた場合にのみイオン化への影

響が低く抑えられた。以上のことから、ミニカラムはOasis MCXを使用することにした。なお、既存通知法では、OSDミニカラム（500 mg）を採用している。

表14 各ミニカラムを用いて精製したときのマトリックス効果の比較

試料	ミニカラム	使用した溶媒	マトリックス効果*
牛の肝臓	InertSep C18 FF (500 mg)	水及びメタノール混液	0.27
	Oasis HLB (500 mg)	水及びメタノール混液	0.43
	Oasis MAX (500 mg)	水及びメタノール混液	0.77
	Oasis MCX (500 mg)	水及びメタノール混液	0.99
牛の脂肪	InertSep C18 FF (500 mg)	水及びメタノール混液	0.58
	Oasis HLB (500 mg)	水及びメタノール混液	0.84
	Oasis MAX (500 mg)	水及びメタノール混液	0.87
	Oasis MCX (500 mg)	水及びメタノール混液	1.06

\* マトリックス添加標準溶液のピークの面積値 / 溶媒標準溶液のピーク面積値

### 3. 添加回収試験

畜水産物3食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓）を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、各食品に設定されている基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）（濃度はいずれもトリクラベンダゾール換算）の2濃度でトリクラベンダゾール及び代謝物A、代謝物B、代謝物Dの添加回収試験を実施した。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16～21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22に示した。

#### 1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表15、16に示した。すべての食品において、代謝物Dの定量を妨害するピークは検出されなかった。以上のことから、選択性は問題が無いと判断した。

表15 選択性の評価（基準値濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>						選択性の 評価 <sup>3)</sup>		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>				面積(高さ)比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	412432	409579	411005	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	129304	126824	128064	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	1087921	1093650	1090785	0.000	○
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	349245	352381	350813	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	134582	134167	134374	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	1070542	1065362	1067952	0.000	○
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	394991	388511	391751	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	125691	123572	124631	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	1160043	1143151	1151597	0.000	○
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	358687	360073	359380	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	142054	145974	144014	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	1146162	1126933	1136548	0.000	○

\*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。）

\*2 試料中の濃度が「評価濃度」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。

\*3 面積（高さ）比が、妨害ピークの許容範囲の評価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。

表16 選択性の評価（定量限界濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>							選択性 の評価 <sup>3)</sup>	
					評価濃度 (ppm)		評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>				面積(高さ)比 (a)/(b)
					評価濃度 (ppm)	評価濃度 (ppm)			n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)		
1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	14140	14034	14087	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	12961	12999	12980	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	14143	13883	14013	0.000	○
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	12370	12535	12452	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	13723	13731	13727	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	13176	13063	13119	0.000	○
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	12594	12544	12569	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	11507	11810	11659	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	13210	13188	13199	0.000	○
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	11493	10609	11051	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	12978	12939	12959	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.9	基準値	0.9	< 0.100	面積	0	0	0	15963	15566	15764	0.000	○

\*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。）

\*2 試料中の濃度が「評価濃度」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。

\*3 面積（高さ）比が、妨害ピークの許容範囲の評価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

基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）における真度、精度の検討結果を表17、18に示した。基準値濃度での真度及び併行精度は、トリクラベンダゾールでそれぞれ93～95%及び0.4～1.6%、代謝物Aでそれぞれ92～102%及び0.4～3.2%、代謝物Bでそれぞれ90～93%及び1～2.5%、代謝物Dでそれぞれ81～85%及び1.3～3.9%であった。また、定量限界濃度での真度及び併行精度は、トリクラベンダゾールでそれぞれ91～95%及び1.6～8.0%、代謝物Aでそれぞれ92～93%及び1.7～2.6%、代謝物Bでそれぞれ90～92%及び2.5～4%、代謝物Dでそれぞれ83～92%及び6.7～8.0%であった。検討した両添加濃度ともに、ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、定量限界濃度における添加試料のピークのS/Nの平均値は、トリクラベンダゾールで1503～5061、代謝物Aで1677～5940、代謝物Bで1054～5554、代謝物Dで1119～5015であり、S/N≧10以上を十分に満たした。

表17 真度、精度の評価（基準値濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>1)</sup>	検査線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>		
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
							1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	—	8863934	5906	0.9993	93.5	95.5	93.5
牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	8065855	1979			0.9998	93.0	91.9	93.2	91.6	94.0	92.7	1.1			#DIV/0!
牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	—	8474902	12293			0.9993	92.9	92.5	92.4	93.3	92.6	92.8	0.4			#DIV/0!
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	—	7575726	7493	1.0000	101.3	101.6	101.5	102.1	101.1	101.5	0.4			#DIV/0!
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	8567065	3092	0.9991	93.7	89.8	90.8	88.5	95.8	91.7	3.2			#DIV/0!
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	—	7492819	29206	0.9995	99.5	100.0	99.1	98.4	97.2	98.9	1.1			#DIV/0!
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	—	8492263	-5332	0.9995	90.3	92.5	90.3	94.1	93.9	92.2	2.0			#DIV/0!
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	8547684	2495	0.9993	89.1	92.0	88.0	89.2	93.3	90.3	2.5			#DIV/0!
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	—	8365911	9771	0.9997	91.9	92.5	92.7	91.9	94.2	92.6	1.0			#DIV/0!
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	—	7956090	-472	0.9997	84.0	85.5	86.0	84.1	86.3	85.2	1.3			#DIV/0!
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	9042662	6408	0.9990	83.4	80.2	83.7	83.2	83.1	82.7	1.7			#DIV/0!
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	—	8132065	17644	0.9996	80.9	83.3	82.3	75.4	81.8	80.7	3.9			#DIV/0!

\*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

\*2 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を求める。

表18 真度、精度の評価（定量限界濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>1)</sup>	検査線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>		
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
							1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	9041155	-18	0.9999	92.9	101.2	91.9
牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	8302431	298			0.9990	93.2	77.5	93.3	94.2	94.1	90.5	8.0	5061.0	3959.0	4510.0
牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	S/N	9234773	-315			0.9992	90.7	91.3	91.5	89.0	93.0	91.1	1.6	2053.0	1503.0	1778.0
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	8069309	98	0.9998	92.8	91.7	93.9	95.8	92.7	93.4	1.7	3394.0	2948.0	3171.0
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	8939755	-80	0.9992	90.9	92.4	95.0	91.7	92.4	92.5	1.7	5940.0	3240.0	4590.0
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	S/N	8691802	-389	0.9989	88.5	89.9	92.9	92.1	94.5	91.6	2.6	3407.0	1677.0	2542.0
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	8141383	-531	0.9992	88.2	90.0	90.0	92.6	93.8	90.9	2.5	3272.0	2657.0	2964.5
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	8619772	-66	0.9994	96.3	87.7	88.7	88.6	88.1	89.9	4.0	5554.0	2708.0	4131.0
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	S/N	9112847	-254	0.9997	91.8	88.4	90.2	92.7	98.2	92.3	4.0	4987.0	1054.0	3020.5
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	8455504	285	0.9989	86.0	86.3	84.7	84.6	70.8	82.5	8.0	5015.0	3066.0	4040.5
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	8444906	-430	0.9997	82.6	83.7	82.4	86.0	96.2	86.2	6.7	3427.0	2157.0	2792.0
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	S/N	9761077	-388	0.9990	87.2	86.1	104.6	89.6	89.6	91.4	8.2	2113.0	1119.0	1616.0

\*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

\*2 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19、20に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度と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。その結果、ピーク面積比は基準値濃度では、0.95~1.04であり、定量限界濃度では、0.93~1.06であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表19 試料マトリックスの測定への影響 (基準値濃度)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>*1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>*2</sup>								
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>*3</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>*4</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 <sup>*5</sup>
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.045	面積	0	412432	409579	411005	409316	413127	411221	1.00
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.015	面積	0	129304	126824	128064	128803	121768	125285	1.02
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	0.135	面積	0	1087921	1093650	1090785	1096485	1083859	1090172	1.00
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.045	面積	0	349245	352381	350813	346082	346670	346376	1.01
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.015	面積	0	134582	134167	134374	132245	136144	134194	1.00
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	0.135	面積	0	1070542	1065362	1067952	1026453	1026336	1026395	1.04
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.045	面積	0	394991	388511	391751	379614	379884	379749	1.03
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.015	面積	0	125691	123572	124631	130303	131834	131069	0.95
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	0.135	面積	0	1160043	1143151	1151597	1130392	1119979	1125185	1.02
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.045	面積	0	358687	360073	359380	360529	358086	359307	1.00
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.015	面積	0	142054	145974	144014	142296	144274	143285	1.01
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.9	0.135	面積	0	1146162	1126933	1136548	1117616	1107378	1112497	1.02

\*1 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。

\*2 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。)

\*3 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。

\*4 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。

\*5 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20 試料マトリックスの測定への影響 (定量限界濃度)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>*1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>*2</sup>								
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>*3</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>*4</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 <sup>*5</sup>
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	トリクラベンダゾール	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	0.0015	面積	0	14140	14034	14087	13734	13811	13773	1.02
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.0015	面積	0	12961	12999	12980	12840	12803	12821	1.01
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	0.0015	面積	0	14143	13883	14013	13499	13697	13598	1.03
2	代謝物A	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	0.0015	面積	0	12370	12535	12452	12047	12207	12127	1.03
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.0015	面積	0	13723	13731	13727	13531	13602	13567	1.01
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	0.0015	面積	0	13176	13063	13119	13201	13269	13235	0.99
3	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	0.0015	面積	0	12594	12544	12569	12246	12117	12181	1.03
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.0015	面積	0	11507	11810	11659	12386	12821	12603	0.93
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	0.0015	面積	0	13210	13188	13199	13192	13216	13204	1.00
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	0.0015	面積	0	11493	10609	11051	13077	9015	11046	1.00
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.0015	面積	0	12978	12939	12959	12439	12579	12509	1.04
		牛の肝臓	0.01	0.9	0.01	0.0015	面積	0	15963	15566	15764	15016	14825	14921	1.06

\*1 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。

\*2 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。)

\*3 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。

\*4 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。

\*5 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。

### [結論]

牛の筋肉・脂肪・肝臓に、水酸化ナトリウム溶液を加えて100℃で3時間加熱してアルカリ加水分解する。加水分解後の反応溶液を塩酸で酸性とした後、酢酸エチルに転溶する。酢酸エチル層の一部を採取して濃縮した後、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配で脱脂する。エタノール及び酢酸混液に溶解後に過酸化水素を加えて90℃で16時間加熱して、トリクラベンダゾール及びその代謝物を代謝物Dに酸化する。酸化反応後の溶液を酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液に転溶する。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。

開発した分析法を、基準値及び定量限界濃度の2濃度で、牛の筋肉・脂肪・肝臓の3食品に適用した。真度及び併行精度（RSD%）は、基準値濃度での真度及び併行精度は、トリクラベンダゾールでそれぞれ93～95%及び0.4～1.6%、代謝物Aでそれぞれ92～102%及び0.4～3.2%、代謝物Bでそれぞれ90～93%及び1～2.5%、代謝物Dでそれぞれ81～85%及び1.3～3.9%であった。また、定量限界濃度での真度及び併行精度は、トリクラベンダゾールでそれぞれ91～95%及び1.6～8.0%、代謝物Aでそれぞれ92～93%及び1.7～2.6%、代謝物Bでそれぞれ90～92%及び2.5～4%、代謝物Dでそれぞれ83～91%及び6.7～8.2%と良好な結果が得られた。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、基準値濃度では0.95～1.04であり、定量限界濃度では0.93～1.06であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。以上のことから、開発した分析法は、畜産物中のトリクラベンダゾール、代謝物A、代謝物B、代謝物Dを添加濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）で精度良く定量することが可能であると考えられた。

申請企業の残留分析法は、供試料量が少ないこと、有害試薬を多量に使用すること、転溶操作が多く非常に煩雑で操作性が悪いこと、酸化反応が16時間に設定されており、分析が2日間に亘ることなど、多くの問題点があった。より簡便で迅速な試験法となるように試験法開発を進めたが、転溶操作を減らすことや、酸化反応の時間を短くすることは出来なかった。これらの操作は、良好な分析結果を得るためには、必須の操作であると考えられた。

本試験法の妥当性評価は、高感度測定が可能なXevo TQ-S（Waters製）を用いて実施したが、試験法開発はAPI 4000（SCIEX製）を用いて検討を行った。API 4000を用いても、比較的感度に余裕があったので、汎用されている多くの機種で実行可能な試験法であると考えられた。

[参考文献]

1) Determination of residues of triclabendazole in animal tissues by HPLC. Analytical procedure 193F.00, Novartis Animal Health Austrasia Pty. Ltd. , Australia, 2004.

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：基準値濃度）

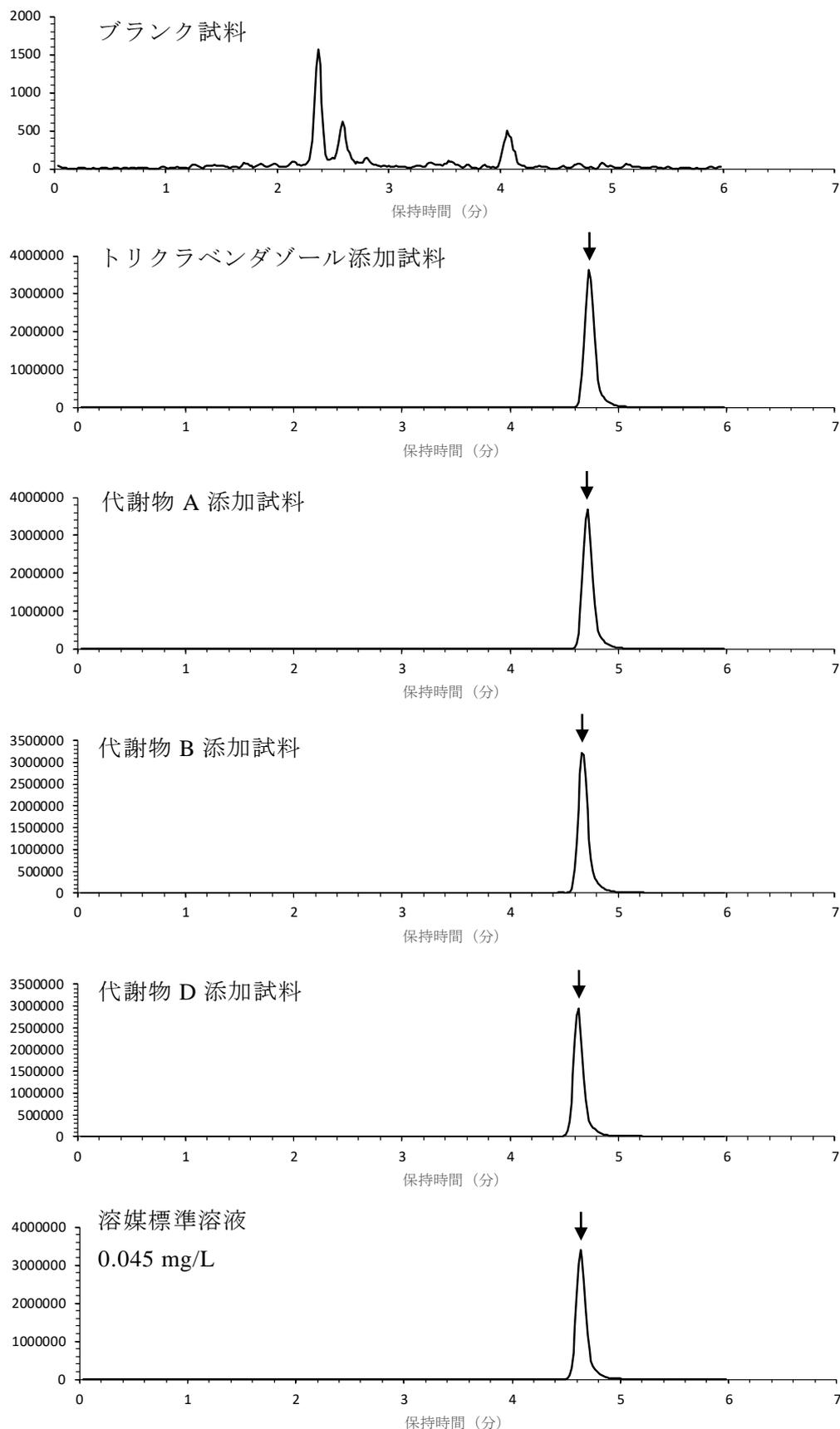


図16 牛の筋肉のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.3 mg/kg（トリクラベンダゾール換算）

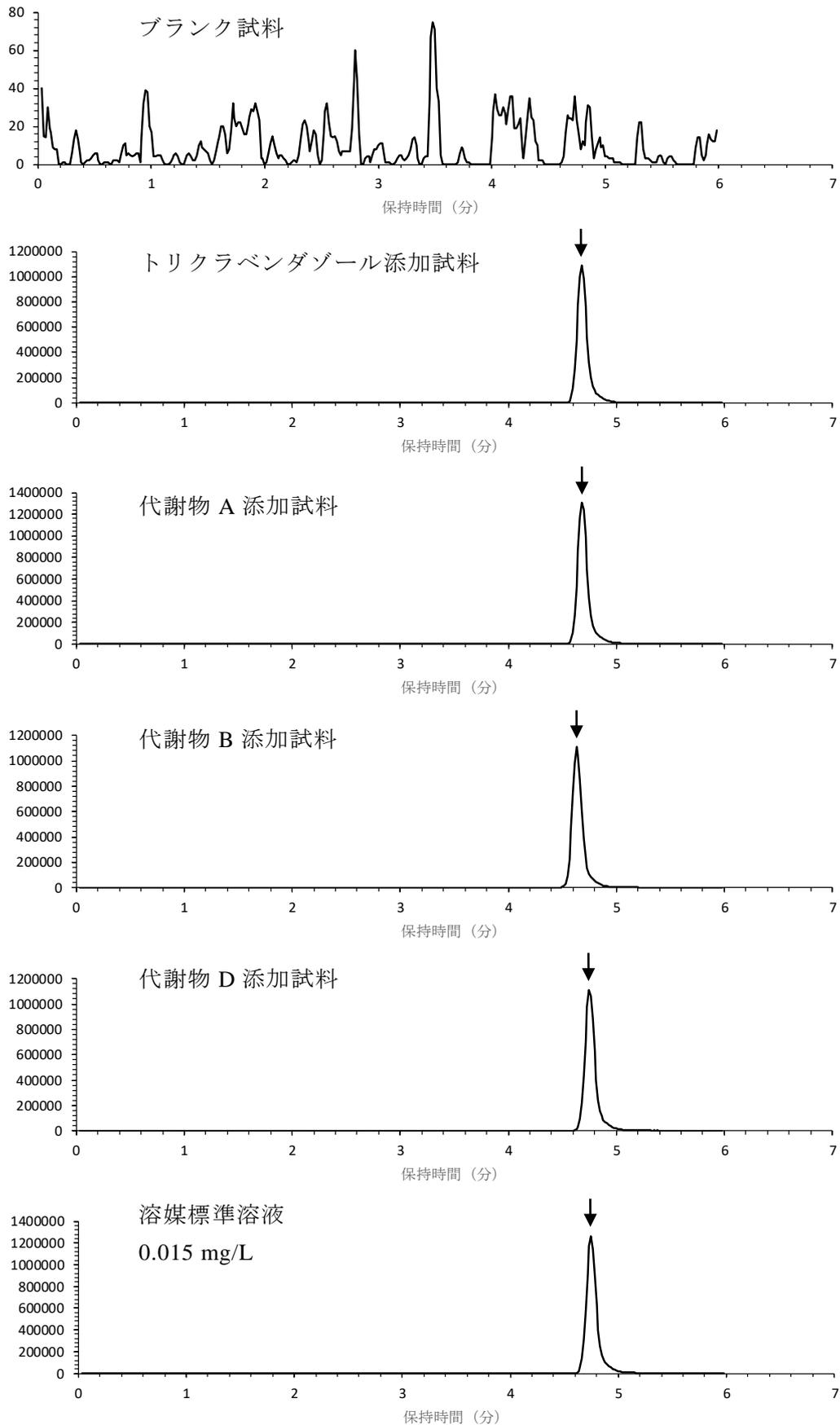


図17 牛の脂肪のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.1 mg/kg (トリクラベンダゾール換算)

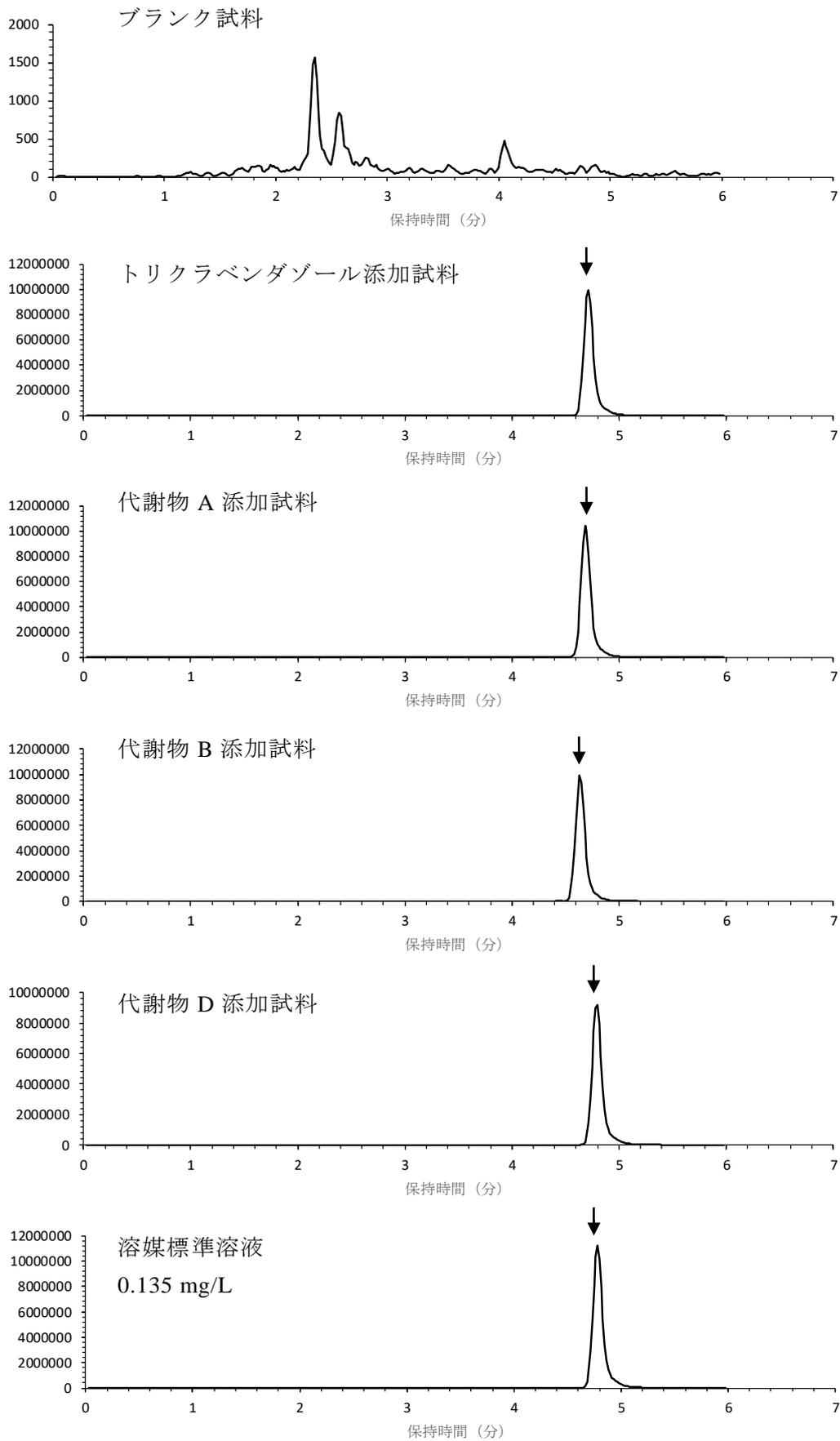


図18 牛の肝臓のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.9 mg/kg (トリクラベンダゾール換算)

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：定量限界濃度）

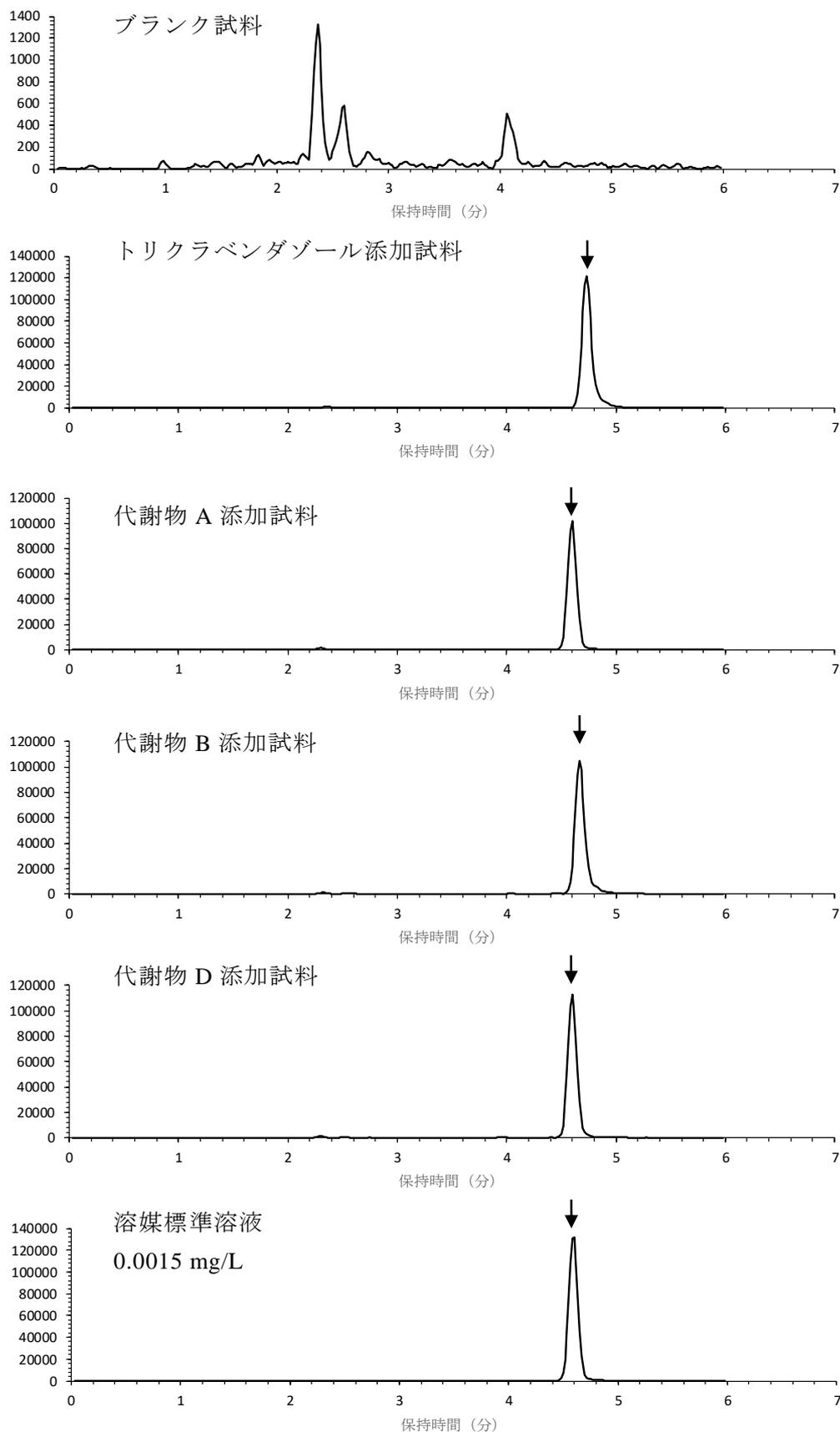


図19 牛の筋肉のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.01 mg/kg（トリクラベンダゾール換算）

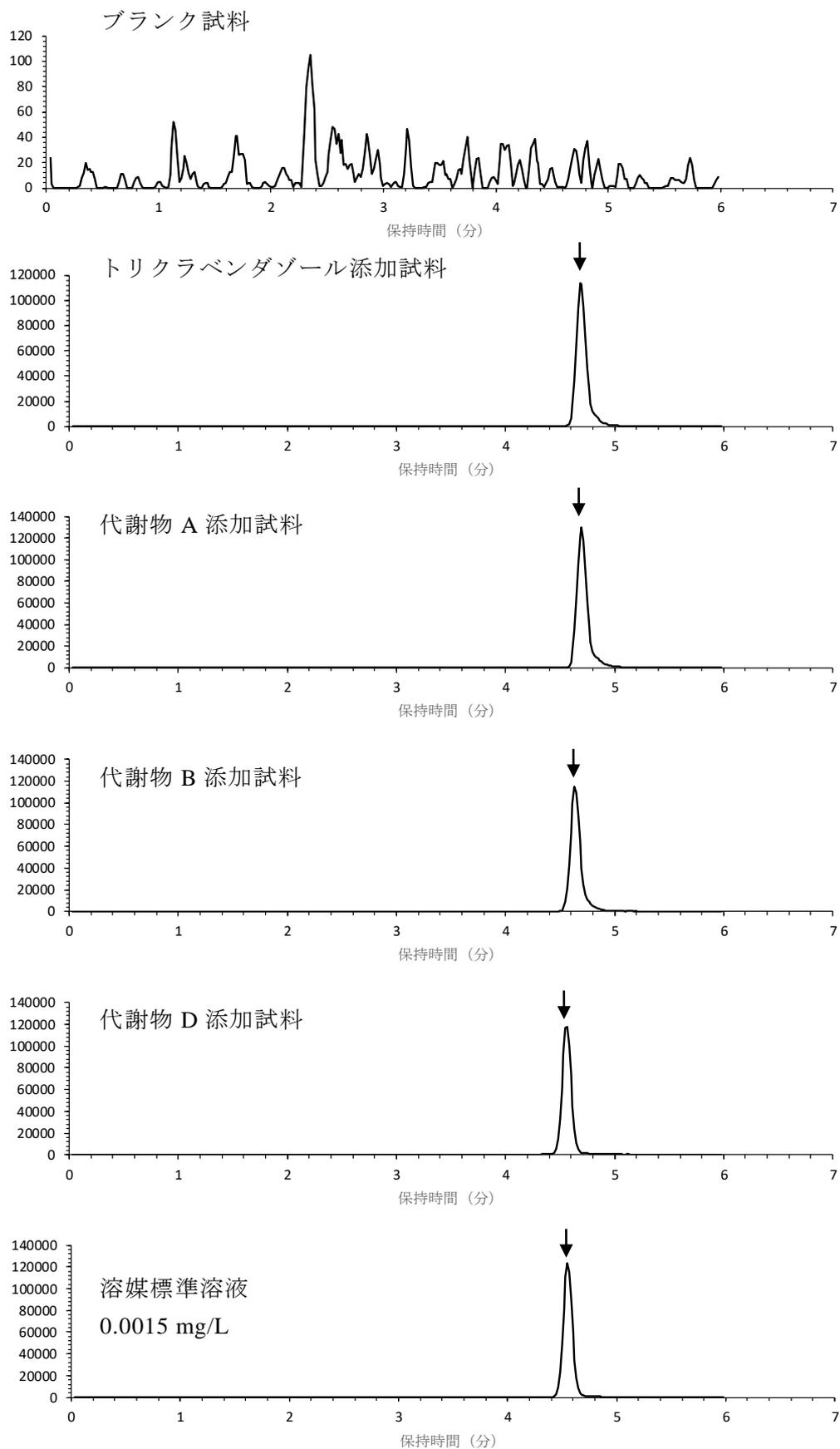


図20 牛の脂肪のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.01 mg/kg (トリクラベンダゾール換算)

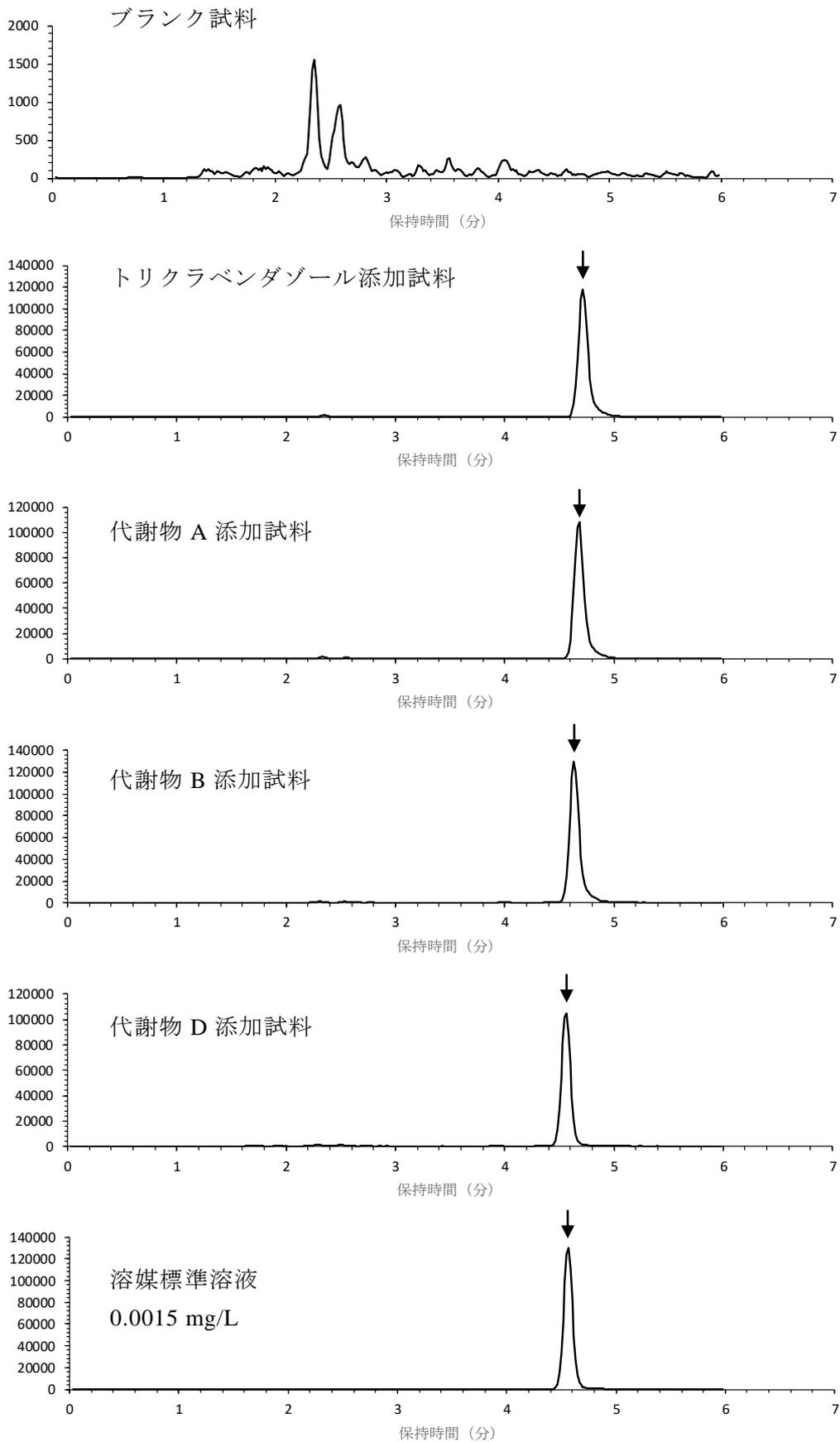


図21 牛の肝臓のSRMクロマトグラム

測定：代謝物D ( $m/z$  327.0→182.0)

添加濃度：各化合物0.01 mg/kg (トリクラベンダゾール換算)

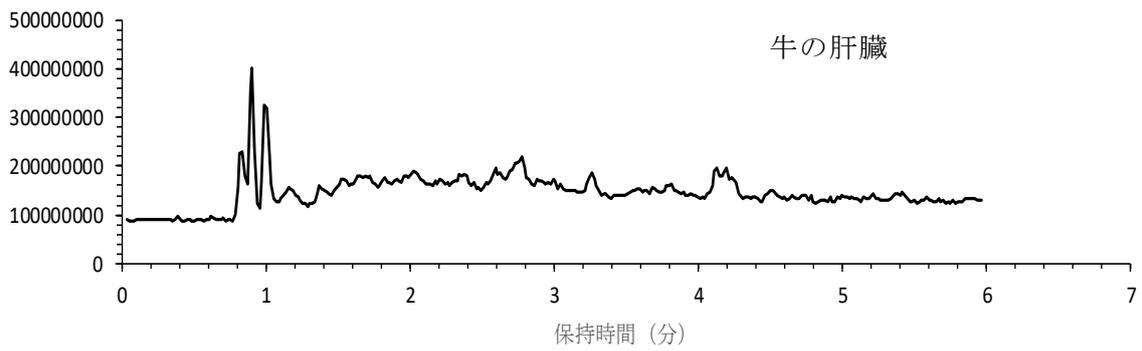
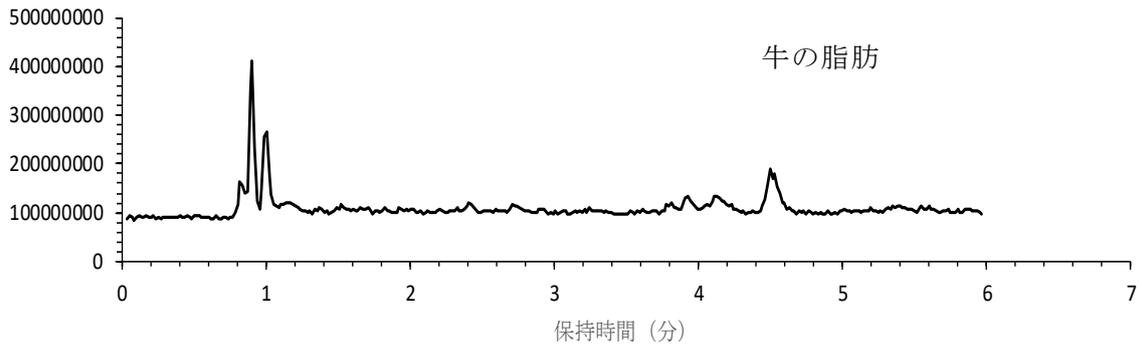
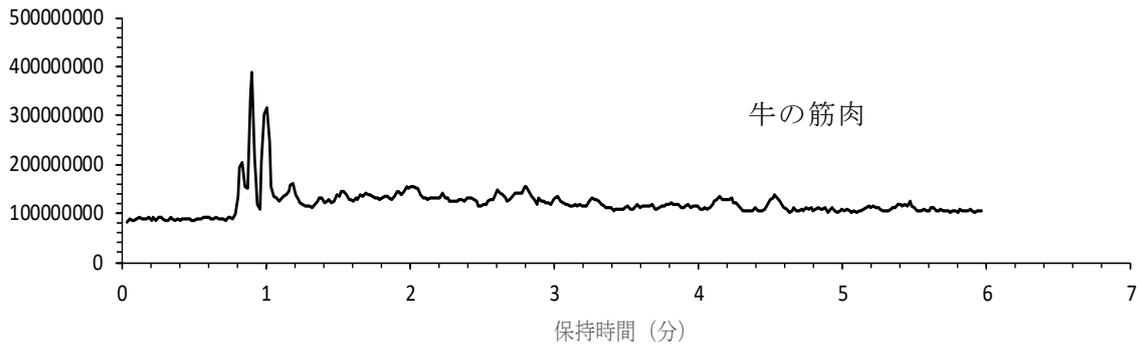


図22 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：50～500  $m/z$ )