

フルベンダゾール分析法（牛及び豚）

1. 分析対象化合物

- ・フルベンダゾール

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

3. 試薬、試液

- フルベンダゾール標準品 : 分析用標準品
- 無水硫酸ナトリウム、酢酸 : 試薬特級
- アンモニウム、クエン酸、
酢酸、メタノール、クロロホルム、アセトニトリル、
石油エーテル

4. 試験溶液の調製

1) 抽出／精製

300 mLのナスフラスコに試料5 gを精秤する。クロロホルム及びメタノール（2：1）混液100 mL及び無水硫酸ナトリウム20 gを加えてホモジナイズし、ガラスウールを通してろ過する。ろ液を0.2 mol/Lクエン酸緩衝液（pH3.0）30 mLで振とうし、クロロホルム層を分取する。水層はクロロホルム30 mLを加えて再抽出する。クロロホルム層を先のクロロホルム層と合わせ、水硫酸ナトリウムを加えて脱水したのち、減圧下、30～35℃で蒸発乾固する。残留物を石油エーテル120 mL及び石油エーテル飽和アセトニトリル40 mLに溶かし、振とうしたのちアセトニトリル層を分取する。石油エーテル層はさらに、石油エーテル飽和アセトニトリル40 mLを加えて抽出する。抽出液を先のアセトニトリル層にあわせて、減圧下、30～35℃で蒸発乾固する。残留物を、メタノール、1%酢酸アンモニウム溶液及び酢酸（30：20：1）混液5mLに溶解後、0.5 μmのメンブランフィルターを通し、ろ液を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルベンダゾール標準品10 mgを精秤してメタノールに溶解、1000 mLとして10 ppm濃度の標準原液を作成する。これをメタノールで希釈してフルベンダゾールとして2.5、5.0及び10.0 ng相当量の標準液を調製し、HPLC-UVに注入し、得られたクロマトグラムの高さを測定して検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液20 μLをHPLC-UVに注入し、5の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

検出器	: UV (波長254 nm)
カラム	: Nucleosil 7C ₁₈ (ナーゲル社製) ステンレス製 (4.6 mm i.d.×150mm)
移動相	: メタノール、1%酢酸アンモニウム溶液及び酢酸 (30 : 20 : 1) 混液
流速	: 1.9 mL/min
レンジ	: 0.005 AUFS

8. 定量限界

0.02 ppm

9. 留意事項

特になし

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について (平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号)」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。

フルベンダゾール分析法（乳）

1. 分析対象化合物

- ・フルベンダゾール

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

3. 試薬、試液

- フルベンダゾール標準品 : 分析用標準品
- 酢酸アンモニウム、氷酢酸、 : 試薬特級
- メタノール、クロロホルム

4. 試験溶液の調製

1) 抽出／精製

試料10 mLを正確に量り、50 mLの共せん遠心沈殿管に入れる。クロロホルム20 mLを正確に加え、10分間振り混ぜたのち、遠心分離（3000 rpm、10分間）する。上層を除き、クロロホルム層4 mLを正確に量り、ナシ型フラスコに入れ、窒素気流下、室温でクロロホルムを留去したのち、移動相1 mLを正確に加え、超音波水槽中で2分間振り混ぜる。10分間氷冷した後、共せん小試験官に移し、遠心分離（3000 rpm、10分間）し、上澄液を試料溶液とする。

5. 検量線の作成

フルベンダゾール標準品約0.01 gを精密に量り、500 mLのメスフラスコに入れ、クロロホルムを加えて溶かし、500 mLとする。この液1 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコ入れ、クロロホルムを加えて200 mLとし標準原液とする。標準原液4 mLを正確に量り、ナシ型フラスコに入れ、窒素気流下、室温でクロロホルムを除去した後、移動相4 mLを正確に加え、超音波水槽中で2分間振り混ぜて溶かし、標準溶液とする。0.050 $\mu\text{g/mL}$ ～0.50 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の溶液を調製し、HPLC-UVに注入し、得られたクロマトグラムの波高を測定して検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液及び0.050 $\mu\text{g/mL}$ ～0.50 $\mu\text{g/mL}$ 濃度に調整した各溶液をそれぞれ正確に100 μL をHPLC-UVに注入し、絶対検量線法を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

- 検出器 : UV（波長254 nm）
- カラム : オクタデシル基を化学結合させたシリカゲル（平均粒子径5 μm ）（Nucleosil 5C18 : M. Nagel製）を長さ15 cm、内径4 mmのカラムに充填したもの、又はこ

れと同等品
移動相 : メタノール、1%酢酸アンモニウム溶液及び酢酸
(30 : 20 : 1) 混液
流速 : 0.8 mL/min
レンジ : 0.02 AUFS
保持時間の目安 : 8分

8. 定量限界
0.025 ppm

9. 留意事項

①クロロホルムは、あらかじめ4 mLをナシ型フラスコに入れ、窒素気流下、室温で乾固し、移動相1 mLを加え溶かしたものを、HPLC-UV法による定量的条件で測定し、フルベンダゾールのピークに影響のないことを確認したものをを用いる。

②クロロホルムの留去は、ロータリーエバポレーターを用いると、加温する必要があり、フルベンダゾールが分解するため、窒素気流下、室温で行う。

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。

フルベンダゾール分析法（馬）

1. 分析対象化合物

- ・フルベンダゾール

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

3. 試薬、試液

- フルベンダゾール標準品 : 分析用標準品
- 無水硫酸ナトリウム、酢酸 : 試薬特級
- アンモニウム、塩酸、酢酸、
メタノール、*n*-ヘキサン、
酢酸エチル

4. 試験溶液の調製

1) 抽出／精製

① 肝臓、腎臓、心臓、小腸、筋肉の場合

試料約10 gを精秤し、50 mLの遠心管に採取する。10%塩化ナトリウム0.2 mol/Lリン酸緩衝液（pH4.0）10 mLを加えてホモジナイズしたのち酢酸エチル15 mLを加え振とうする。3000 rpmで5分間遠心分離して、酢酸エチル層を分取する。残渣には酢酸エチル10 mLを加えて再抽出し、酢酸エチル層を先の酢酸エチル層に合わせる。これに無水酢酸ナトリウムを加えて脱水したのち減圧下、35℃以下で蒸発乾固する。残留物を*n*-ヘキサン50 mLに溶かし、1 mol/L塩酸2.0 mLを加えて振とうしたのち塩酸層を分取し、試料溶液とする。

5. 検量線の作成

フルベンダゾール標準品10 mgを精秤してメタノールに溶解、1000 mLとして10 ppm濃度の標準原液を作成する。これをメタノールで希釈してフルベンダゾールとして2.5、5.0及び10.0 ng相当量の標準液を調製し、HPLC-UVに注入し、得られたクロマトグラムの高さを測定して検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液20 µLをHPLC-UVに注入し、5の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

- 検出器 : UV（波長254 nm）
- カラム : µ Bondapak C₁₈（ウォータース社製）
ステンレス製（4.6 mm i.d.×150 mm）
- 移動相 : メタノール、1%酢酸アンモニウム溶液及び酢酸
（30 : 20 : 1）混液

流速 : 1.8 mL/min
レンジ : 0.01 AUFS

8. 定量限界
0.02 ppm

9. 留意事項
特になし

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。