

オクスフェンダゾール、フェバンテル及びフェンベンダゾール試験法

1. 分析対象化合物

オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン、フェバンテル、フェンベンダゾール

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)) 又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC (DAD))

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS)

3. 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。

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 (200 mg) 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管にジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体200 mgを充填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。

ヘプタフルオロ酪酸 ヘプタフルオロ-*n*-酪酸

フェバンテル標準品 本品はフェバンテル99%以上を含み、融点は129~130°Cである。

フェンベンダゾール標準品 本品はフェンベンダゾール98%以上を含み、融点は233°C (分解) である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

細切均一化した検体5.0 gを量り採り、アセトニトリル30 mL、アセトニトリル飽和*n*-ヘキサン20 mLおよび無水硫酸ナトリウム10 gを加えてホモジナイズした後、3,000 rpmで5分間遠心分離する。アセトニトリル層および*n*-ヘキサン層を分液ロートに移し、アセトニトリル層を採る。*n*-ヘキサン層を、遠心分離した残留物に加え、さらにアセトニトリル20 mLを加えて激しく振り混ぜた後、3,000 rpmで5分間遠心分離する。*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせ、*n*-プロパノール10 mLを加えて、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) スルホン化

1) で得られた残留物を無水酢酸0.5 mLに溶解後、過酸化水素0.5 mLを加えて混和し、室温で30分間放置する。これに1 mol/L亜硫酸ナトリウム溶液5 mLを加えて混和し、室温で10分間放置後、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加える。

3) 精製

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 (200 mg) にメタノール10 mL、

水 10 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに、2) で得られた溶液を注入した後、水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにメタノール10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール1 mLを加えて溶解し、試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フェバンテルの試験を行う場合は、フェバンテル標準品の0.05～50 mg/L メタノール溶液を数点調製する。

オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン及びフェンベンダゾールの試験を行う場合は、フェンベンダゾール標準品の0.05～50 mg/Lメタノール溶液を数点調製する。

それぞれの標準品のメタノール溶液1 mLを40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物に4. 試験溶液の調製2) スルホン化及び3) 精製と同様の操作を行い、それぞれHPLC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。

6. 定量

試験溶液をHPLCに注入し、5. の検量線でフェバンテル及びフェンベンダゾールの含量をそれぞれ求め、次式によりオクスフェンダゾールスルホンとしての含量を求める。

$$\begin{aligned} & \text{オクスフェンダゾールスルホンの含量} \\ & = (\text{フェバンテルの含量} \times 0.74) + (\text{フェンベンダゾールの含量} \times 1.11) \end{aligned}$$

7. 測定条件

1) フェバンテルの試験を行う場合

(1) HPLC

検出器：UV又はDAD（波長280 nm付近の極大波長）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径2～5 μm）、内径 2.0～6.0 mm、長さ100～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.005 mol/Lヘプタフルオロ酪酸溶液の混液（2:3）

保持時間の目安：7～10分

(2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 2～5 μm）、内径 2.0～6.0 mm、長さ100～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.005 mol/Lヘプタフルオロ酪酸溶液の混液（2:3）

主なイオン (m/z)：ESI (+) において479

保持時間の目安：7～10分

2) オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン及びフェンベンダゾールの試験を行う場合

(1) HPLC

検出器：UV又はDAD（波長290 nm付近の極大波長）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径2～5 μm）、内径 2.0～6.0 mm、長さ100～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.005 mol/Lヘプタフルオロ酪酸溶液の混液（3:7）

保持時間の目安：7～10分

(2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径2～5 μm）、内径2.0～6.0 mm、長さ100～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.005 mol/Lヘプタフルオロ酪酸溶液の混液（3:7）

主なイオン (m/z)：ESI (+) において332

保持時間の目安：7～10分

8. 定量限界

0.01 mg/kg（オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン、フェバンテル及びフェンベンダゾール共にそれぞれオクスフェンダゾールスルホンとして）

9. 留意事項

1) 試験法の概要

オクスフェンダゾール、オクスフェンダゾールスルホン、フェバンテル及びフェンベンダゾールを試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した後、無水酢酸及び30%過酸化水素によりフェバンテルを酸化しスルホン体にして、フェンベンダゾール及びオクスフェンダゾールを酸化しオクスフェンダゾールスルホンにして、それぞれHPLC（UV又はDAD）により測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

(1) 無水酢酸、30%過酸化水素、亜硫酸ナトリウムは反応性が高いので、取り扱いに注意を要する。また、これらの試薬は経時変化しやすいので、保管にも注意を要する。

(2) スルホン化において、1 mol/L亜硫酸ナトリウム溶液及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えた際に、激しく発熱するので注意を要する。

(3) スルホン化の完了を確認するために、必要に応じてオクスフェンダゾール、フェバンテル及びフェンベンダゾールをHPLC及びLC/MSで測定すること。

それぞれの測定条件の例としては、内径3.0 mm、長さ150 mmのカラムを使用した場合、

オクスフェンダゾールでは、移動相：アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸の混液（1:4）、流速：0.4 mL/min、UV測定波長：290 nm、MS測定イオン：ESI（+）において316（*m/z*）、保持時間：8分、フェバンテルでは、移動相：アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸の混液（1:1）、流速：0.4 mL/min、UV測定波長：280 nm、MS測定イオン：ESI（+）において447（*m/z*）、保持時間：約11分、フェンベンダゾールでは、移動相：アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸の混液（2:3）、流速：0.4 mL/min、UV測定波長：290 nm、MS測定イオン：ESI（+）において300（*m/z*）、保持時間：約5分である。他の測定条件は、7. 測定条件に準じて行うこと。

（4）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（200 mg）に、スルホン化で得られた溶液を注入した際に、過酸化水素が残存すると、ミニカラム中で分解発泡し、溶液が流出しにくくなることがある。このような場合には、吸引または加圧して強制的に流出させること。

10. 参考文献

なし

11. 類型

C