

トリクラベンダゾール試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

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（以下「代謝物A」という。）

トリクラベンダゾールスルホン（以下「代謝物B」という。）

ケト-トリクラベンダゾール（以下「代謝物D」という。）

酸性条件下で代謝物Dに変換される代謝物（代謝物A及び代謝物Bを含む。）

2. 対象食品

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。

トリクラベンダゾール標準品 本品はトリクラベンダゾール98%以上を含む。

代謝物A標準品 本品は代謝物A 98%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 98%以上を含む。

代謝物D標準品 本品は代謝物D 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 加水分解

試料10.0 gを採り、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時間加熱する。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を加える。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る。酢酸エチル40 mLで振とう抽出し、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を採る。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、酢酸エチルで正確に100 mLとする。

2) 脱脂

1) で得られた溶液から正確に6 mLを分取して、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLで振とう抽出し、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

採る。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を加えて振とう抽出し、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る。40℃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とする。

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℃で16時間加熱する。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で振とう抽出し、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、有機層を採る。次いで、水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液15 mLを加えて振とう抽出し、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る。40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物に水及びメタノール（3：7）混液2 mLを加えて溶かす。

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5 mL、次いで水及びメタノール（3：7）混液5 mLを注入し、各流出液は捨てる。このカラムに3) で得られた溶液を注入した後、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。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40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物D標準品のアセトニトリル及び水（1：1）混液の溶液を数点調製し、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（トリクラベンダゾール換算）に相当する試験溶液中濃度は0.0015 mg/L（トリクラベンダゾール換算）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Dの含量を求め、次式により、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）の含量を求める。

$$\text{トリクラベンダゾール（酸性条件下で代謝物Dに変換される代謝物を含む）の含量 (ppm)} = \text{代謝物Dの含量 (ppm)} \times 1.091$$

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°C

移動相：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

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン327、プロダクトイオン182、146

注入量：5 μL

保持時間の目安：5分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（トリクラベンダゾール換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

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する。アセトニトリル/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に酸化する。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する。

2) 注意点

- ① 過酸化水素による酸化反応は、トリクラベンダゾール、代謝物A及び代謝物Bの標準品を用いて、代謝物Dへの酸化反応が十分に進行していることを確認すること。
- ② 酸化反応の際に用いるエタノール及び酢酸混液は、酸化反応の効率に大きな影響を与えることから、用時調製とすること。
- ③ 代謝物D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327、プロダクトイオン182

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン327、プロダクトイオン146

また、参考にトリクラベンダゾール、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。

トリクラベンダゾール

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン357、プロダクトイオン342

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン357、プロダクトイオン197

代謝物A

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン373、プロダクトイオン358

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン373、プロダクトイオン181

代謝物B

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン389、プロダクトイオン310

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン389、プロダクトイオン181

- ④ 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

12. 参考文献

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

13. 類型

C