

※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ください。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ください。

## 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

### アルベンダゾール試験法（畜産物）

## アルベンダゾール試験法（畜産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的

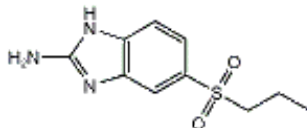
アルベンダゾールはベンズイミダゾール系の駆虫薬である。線虫細胞中のチューブリンに強く結合することで、特に腸管細胞が影響を受けるため、吸収機能が喪失して餓死に至り、駆虫効果を示すと考えられている。日本では、ヒト用医薬品としてのみ承認されているが、海外では、複数の国で、ヒト用及び動物用医薬品として液剤やペレット剤が使用されている<sup>1)</sup>。

平成 29 年 4 月 11 日に食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部が改正され、アルベンダゾールについては、「アルベンダゾールとは、代謝物 I 【5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン】（塩酸酸性条件下の加水分解により代謝物 I に変換される化合物を含む。）とする。」とされた。既存の厚生労働省通知試験法には加水分解操作がないことから、加水分解操作を含む試験法の開発を行った。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

- (1) 分析対象化合物：5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン  
(以下「代謝物 I」とする)

構造式：



分子式：C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

分子量：239.3

IUPAC名：5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン

CAS番号：80983-34-2

外観：白色～わずかに薄い黄色、結晶性粉末～粉末

融点：222～223.5℃

溶解性：水、アセトン、エタノールに不溶。N,N-ジメチルホルムアミドに可溶。

〔出典〕 和光純薬工業（株）製品詳細情報 <https://www.siyaku.com/>

### 3. 基準値

アルベンダゾールとは、代謝物 I 【5-プロピルスルホニル-1*H*-ベンズイミダゾール-2-アミン】（塩酸酸性条件下の加水分解により代謝物 I に変換される化合物を含む。）とする。

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.02
牛の脂肪	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.02
牛の肝臓	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.8
牛の腎臓	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.8
牛の食用部分	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.8
乳	0.02

#### [実験方法]

##### 1. 試料

牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳は、札幌市内の小売店で購入した。

###### (1) 牛の筋肉

脂肪層を取り除いた後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77 を用いて均一化した。

###### (2) 牛の脂肪

筋肉層を取り除いた後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77 を用いて均一化した。

###### (3) 牛の肝臓

松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77 を用いて均一化した。

###### (4) 牛乳

市販品をそのまま使用した。

##### 2. 試薬・試液

代謝物 I 標準品：アルベンダゾール代謝産物動物薬標準品 純度 99.9%〔林純薬工業（株）製〕

アセトニトリル、酢酸エチル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用〔関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製〕

メタノール：LC/MS 用〔関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製〕

蒸留水：LC/MS 用〔関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製〕

塩酸：特級〔関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製〕

炭酸ナトリウム：特級〔ナカライテスク（株）製〕

アンモニア水：特級 [和光純薬工業 (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 (500 mg) : Oasis MCX (500 mg、6 mL、Waters 社製) (以下「MCX ミニカラム」とする)

標準原液：代謝物 I 標準品 10 mg を精密に秤量し、メタノールに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L、2 mg/L 及び 100 mg/L の標準溶液を調製した。

検量線用標準溶液：添加用標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.000125～0.0375 mg/L の標準溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタル (シャフトジェネレーターは S25N-18G) (IKA 社製)

フードプロセッサー：MK-K77 [松下電器産業 (株) (現 パナソニック (株)) 製]

遠心分離機：ユニバーサル冷却遠心機 5930 [久保田商事 (株) 製]

濃縮装置：エバポレーター；N-1000 [東京理化工械 (株) 製]、真空ポンプ；FTP-34A [AGC テクノグラス (株) 製]、真空コントローラ；NVC-2100 [東京理化工械 (株) 製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化工械 (株) 製]

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8050	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A3R	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオーブン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

### 4. 測定条件

#### LC-MS/MS

LC 条件	
カラム	Inertsil ODS-4 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm；ジエールサイエンス (株) 製]
移動相流速	0.20 mL/min
注入量	2 μL
カラム温度	40°C
移動相	A 液：0.05 vol% ギ酸 B 液：0.05 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	95	5
	15.0	60	40
	15.01	5	95
	25.0	5	95
	25.01	95	5
	35.0	95	5
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 (+)		
プローブ電圧	4 kV		
DL 温度	250°C		
インターフェイス温度	300°C		
ヒートブロック温度	400°C		
ネブライザー流量	3.0 L/min		
ドライイングガス流量	10.0 L/min		
ヒーティングガス流量	10.0 L/min		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン ( <i>m/z</i> )	+240.1→133.0 (CE 29 V)		
定性イオン ( <i>m/z</i> )	+240.1→198.1 (CE 18 V)		
保持時間	9.7 分		

## 5. 定量

添加用標準溶液をメタノールで希釈して、以下の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

- ・ 定量限界濃度添加 (0.01 mg/kg)

0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625 及び 0.00075 mg/L

- ・ 基準値濃度添加

牛の筋肉、牛の脂肪、牛乳 (基準値 0.02 mg/kg) : 0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 mg/L

牛の肝臓 (基準値 1 mg/kg) : 0.00625、0.0125、0.01875、0.025、0.03125 及び 0.0375 mg/L

この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて代謝物 I の検量線を作成した。試験溶液 (牛の肝臓ではメタノールでさらに 2 倍希釈) 2 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法により代謝物 I の含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

牛の筋肉 (添加濃度 0.01 mg/kg 及び 0.02 mg/kg) : 試料 10.0 g に 1 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL または 2 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪 : (添加濃度 0.01 mg/kg 及び 0.02 mg/kg) : 試料 10.0 g を約 40°C で湯煎して融解し、1 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL または 2 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、混合し

た。冷凍庫で 10 分間放置し、脂肪を凝固させた後、室温で 30 分間放置した。

牛の肝臓：(添加濃度 0.01 mg/kg 及び 1 mg/kg)：試料 10.0 g に 1 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL または 100 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛乳：(添加濃度 0.01 mg/kg 及び 0.02 mg/kg)：試料 10.0 g に 1 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL または 2 mg/L 添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

試料を塩酸酸性条件下で加熱した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で脱脂し、アセトニトリルで代謝物を抽出した。塩基性条件下で塩析した後、MCX ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### (1) 抽出

試料 10.0 g をねじロガラス製遠沈管に採った。これに 6 mol/L 塩酸 10 mL を加え、密栓した後、110°C の油浴中でときどき振りまぜながら 1 時間加熱した。放冷し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL を加え、振とう機を用いて激しく 1 分間振とうした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を捨てる操作を 2 回繰り返した。水層及び残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採った。得られた上澄液を合わせ、炭酸ナトリウム 4 g を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を分取した。水層及び残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、有機層を分取した。得られた有機層を合わせ、アセトニトリルを加えて 200 mL に定容した。

### (2) 精製

MCX ミニカラム (500 mg、6 mL) にアセトニトリル及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液 4 mL を注入した後、水 5 mL、アセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及びアンモニア水 (49 : 1) 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液 12 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で減圧下濃縮した後、穏やかな窒素気流により溶媒を除去した。この残留物をメタノール 4 mL に溶解したものを試験溶液とした。なお、牛の肝臓の基準値濃度 (1 mg/kg) 添加については、試験溶液をメタノールで 2 倍に希釈した後、LC-MS/MS で測定した。

[分析法フローチャート]

秤取

↓ 試料 10.0 g

↓ 6 mol/L 塩酸 10 mL を加え、密栓

↓ 110°C の油浴中で 1 時間加熱後、放冷

脱脂

- ↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL 加え、振とう
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
- ↓ 有機層を捨てる
- ↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL 加え、振とう
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
- ↓ 有機層を捨てる

#### アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)
- ↓ 上澄液を採取
- ↓ 残留物にアセトニトリル 25 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)
- ↓ 上澄液を採取し、合わせる

#### 塩析

- ↓ 炭酸ナトリウム 4 g を加える
- ↓ ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) し、有機層を採る
- ↓ 水層及び残留物にアセトニトリル 50 mL を加える
- ↓ ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) し、有機層を採る
- ↓ 有機層を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容する (アセトニトリル溶液)

#### MCX ミニカラム [Waters 社製 Oasis MCX (500 mg、6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 5 mL、水 5 mL でコンディショニング
- ↓ アセトニトリル溶液 4 mL を負荷
- ↓ 水 5 mL、アセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及びアンモニア水 (49 : 1) 混液 10 mL で洗浄
- ↓ アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液 12 mL で溶出

#### 濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノール 4 mL に溶解

#### 試験溶液

↓

#### LC-MS/MS 測定

牛の肝臓 (基準値濃度添加) : 試験溶液をメタノールで 2 倍に希釈して測定

#### 8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液から 0.2 mL (基準値濃度添加の牛の肝臓については 0.1 mL) を分取し、穏やかな窒素気流により溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の検量線用標準溶液 0.2 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。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS条件の検討

代謝物Iは、スキャン測定において十分な感度が得られたESI (+) モードで測定することとした。代謝物Iのスキャン測定におけるマススペクトルを図1に示した。代謝物Iのプロトン付加分子 ( $m/z$  240.1  $[M+H]^+$ ) 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2及び図3には、代謝物Iのプロトン付加分子 ( $m/z$  240.1  $[M+H]^+$ ) 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。プロダクトイオンには、強度の強い  $m/z$  133.0 及び  $m/z$  198.1 を選択し、LC-MS/MS測定においてよりS/Nが良かった  $m/z$  240.1  $\rightarrow$  133.0 を定量イオンとし、 $m/z$  240.1  $\rightarrow$  198.1 を定性イオンとした。

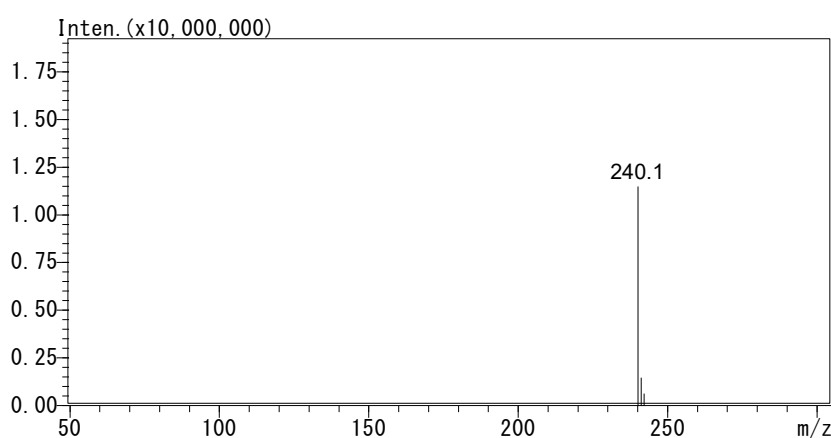


図1 代謝物Iのマススペクトル

スキャン範囲： 50~300 amu、測定条件：ESI(+)

代謝物I：1 mg/L

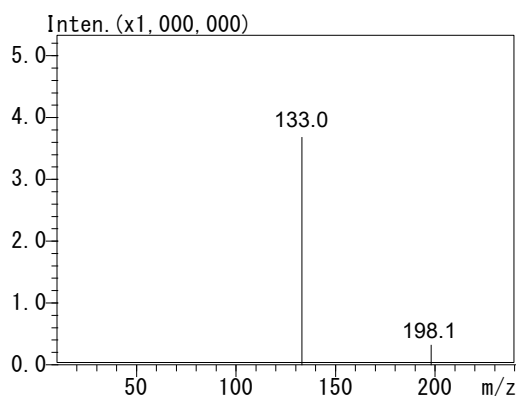


図2 プロダクトイオンスペクトル (定量)

プリカーサーイオン： $m/z$  240.1  
測定条件：ESI(+)  
CE=29 V (CE：collision energy)  
代謝物I：0.2 mg/L

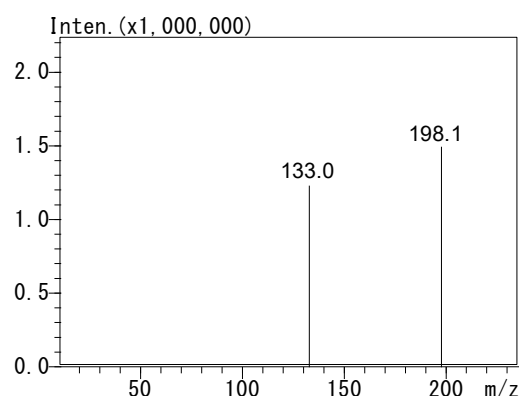


図3 プロダクトイオンスペクトル (定性)

プリカーサーイオン： $m/z$  240.1  
測定条件：ESI(+)  
CE=18 V (CE：collision energy)  
代謝物I：0.2 mg/L





## (2) LC 条件の検討

代謝物 I は、厚労省通知「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）」<sup>2)</sup> の適用化合物であることから、分析カラムは、同通知試験法で用いられているオクタデシルシリル化シリカゲルカラムとし、Inertsil ODS-4、Inertsustain AQ-C18 [ともにジーエルサイエンス（株）社製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm]、Mightysil RP-18 PA 及び Mightysil RP-18 GP aqua [ともに関東化学（株）社製、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm] を比較した。その結果、ピーク形状が最も良好であった Inertsil ODS-4 を選択した。移動相は、通知試験法で用いられているギ酸・アセトニトリルのグラジエント溶出とし、ギ酸濃度を検討した。ギ酸濃度を 0.05、0.1 及び 0.2 vol% と変化させ、最も代謝物 I の検出感度が高かった 0.05 % を選択した。濃度勾配については、0.05 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液及び 0.05 vol% ギ酸混液（1 : 19）から（2 : 3）までを 15 分間で行うこととした。この条件での代謝物 I の保持時間は、9.7 分であった。

## (3) 検量線

代謝物 I の検量線の例を図 4～6 に示した。0.125～0.75 μg/L、0.25～1.5 μg/L 及び 6.25～37.5 μg/L の濃度範囲で作成した各検量線の決定係数 R<sup>2</sup> は 0.998 以上であり、良好な直線性を示した。

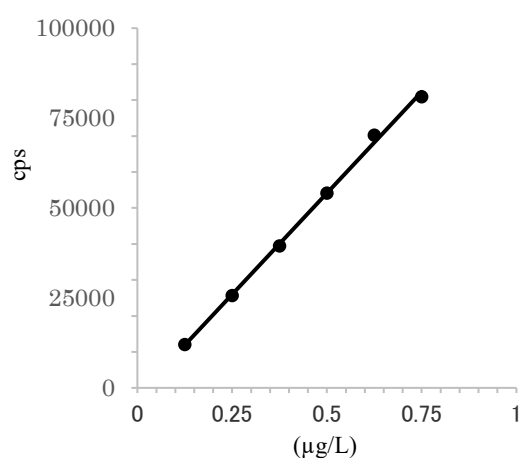


図 4 代謝物 I の検量線の例  
濃度範囲 : 0.125～0.75 μg/L  
 $y=112624x-2180$   
 $R^2=0.998$

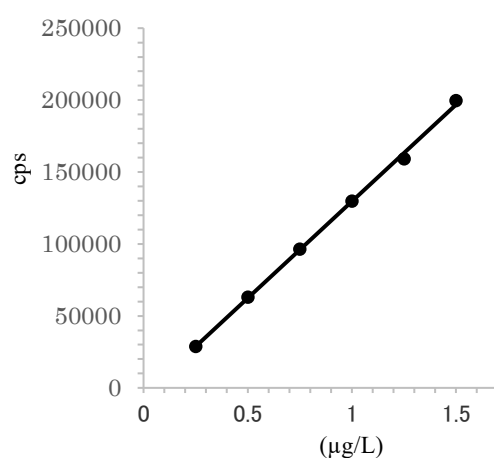


図 5 代謝物 I の検量線の例  
濃度範囲 : 0.25～1.5 μg/L  
 $y=134467x-4887$   
 $R^2=0.999$

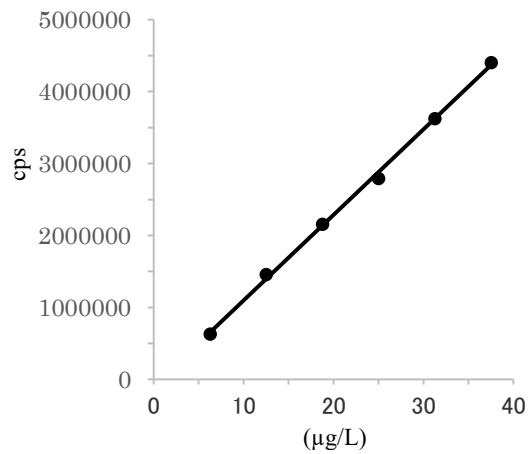


図 6 代謝物 I の検量線の例  
 濃度範囲 : 6.25~37.5 μg/L  
 $y=118903x-91297$   
 $R^2=0.999$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

代謝物 I : 0.01 mg/kg [試験溶液量 4 (mL) /試験溶液中の試料量 0.2 (g) ]  
 × [代謝物 I の定量限界相当量 0.001 (ng) /注入量 2 (μL)]

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出方法

#### ①アルベンダゾール申請企業の抽出方法の検証

アルベンダゾール申請企業の資料<sup>3)</sup>に記載されている前処理及び抽出方法を図7に示した。申請企業の方法では、試料に塩酸を加えて加熱した後、炭酸ナトリウムでアルカリ性とし、酢酸エチルで代謝物Iを抽出している。そこで、代謝物Iが酢酸エチル抽出によりどの程度回収されるかを確認するため、以下の実験を行った。6 mol/L 塩酸 5 mL に代謝物Iを1 µg 添加し、混和した。これに水 4 mL を加えた後、炭酸ナトリウム 2.4 g を加え、pH が8以上となっていることを確認し、酢酸エチル 30 mL で2回振とう抽出して回収率を確認した。その結果、1回目及び2回目の抽出における代謝物Iの回収率は、各々77%及び2% (合計 79%) と満足な結果が得られなかったことから、別抽出法の検討が必要と考えられた。

#### 秤取

- ↓ 試料 2.5 g
- ↓ 6 mol/L 塩酸 2.5 mL を加え、密栓し、Dry oven で 110°C、1 時間加熱
- ↓ 放冷後、水 2 mL を加える
- ↓ 炭酸ナトリウム 1.2 g (pH が 8 以上となっていることを確認する)

#### 酢酸エチル抽出

- ↓ 酢酸エチル 15 mL を加え、振とう
- ↓ 遠心分離 (2,000 rpm、5 分間)
- ↓ 有機層を分取
- ↓ 水層に酢酸エチル 15 mL を加え、振とう
- ↓ 遠心分離 (2,000 rpm、5 分間)
- ↓ 有機層を分取し、合わせる

図7 申請企業の前処理及び代謝物Iの抽出方法

#### ②代謝物Iを塩酸中で加熱したときの安定性

今回、塩酸酸性条件下の加水分解は、原則申請企業の方法 (6 mol/L 塩酸中 110°C で 1 時間) を用いるとされていたことから、同条件での代謝物Iの安定性を確認した。水 5 mL に代謝物Iを 0.1 µg 添加し、6 mol/L 塩酸 10 mL を加え、110°C の油浴中で 1 時間加熱した後、代謝物Iの回収率を求めた。その結果、代謝物Iの回収率は 99% ( $n=3$ ) であり、安定性に問題はないと考えられた。

#### ③脱脂方法

試料に 6 mol/L 塩酸を加え、110°C の油浴中で 1 時間加熱すると、水層の上部に脂質が浮いた状態となっていた。そこで、この脂質の除去を検討した。まず *n*-ヘキサンによる脱脂を検討したが、牛乳の場合、*n*-ヘキサンを加えて振とうすると、溶液がゲル状となり、その後の操作に支障をきたすことがあった。そこで、脱脂に使用する溶媒として、酢酸エチ

ル、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液を検討した。酢酸エチルを用いた場合には、除去した溶媒に 2%程度の代謝物 I が認められたが、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液を用いた場合には、除去した溶媒に代謝物 I は認められず、水層との分離も良好であった。以上の検討結果から、脱脂に用いる溶媒は酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液を選択し、同溶媒 30 mL で 2 回脱脂操作を行うこととした。

#### ④抽出方法

アルベンダゾール申請企業の方法では、①アルベンダゾール申請企業の抽出方法の検証に示したように代謝物 I は 80%程度の回収率しか得られなかったことから、塩酸酸性のまま各種溶媒での抽出を検討した。豚肉 5 g を量り採り、代謝物 I を 0.05 µg (1 mg/L 標準溶液を 0.05 mL) 添加し、6 mol/L 塩酸を 5 mL 加え、110°C の油浴中で 1 時間加熱した。放冷後、アセトン、アセトニトリルまたはメタノール各 25 mL (抽出 1 回目) 及び 12.5 mL (抽出 2 回目) を加えてホモジナイズし、遠心分離後、得られた各抽出液中の代謝物 I の回収率を求めた。その結果、アセトンは 96%、アセトニトリルは 101%、メタノールは 87%であった。アセトンとアセトニトリルの回収率に大きな差は認められなかったが、以後の塩析操作を考慮して抽出溶媒としてアセトニトリルを選択した。以上の結果から、試料中の代謝物 I を塩酸酸性のままアセトニトリルで抽出する方法を採用した。なお、牛の筋肉及び肝臓では、アセトニトリルを加えてホモジナイズし、遠心分離すると水層が分離したので、アセトニトリル層と水層の両方を採ったことから、試験法の注意点に「② 脱脂操作後にアセトニトリルを加えてホモジナイズし、遠心分離すると、アセトニトリル層、水層及び固体の 3 相になることがあるので、その場合には、アセトニトリル層及び水層を分取する。」と記載した。

#### ⑤アセトニトリル抽出液の塩析条件

アセトニトリル抽出液を引き続き実験方法の 7. 試験溶液の調製に示したミニカラム精製を行った場合、牛の筋肉では、LC-MS/MS 測定時に 30%程度のイオン化抑制が認められたが、塩析し、分離した水層を除去した後にミニカラム精製をすることで、イオン化抑制が抑えられることがわかった。代謝物 I は、2-アミノベンズイミダゾール構造を有する塩基性化合物であることから、申請企業の方法を参考に、アセトニトリル抽出液に炭酸ナトリウムを加えて塩基性条件下で塩析し、アセトニトリル層を分取する方法を検討した。

水 5 g に代謝物 I を 5 µg (10 mg/L 標準溶液を 0.5 mL) 添加し、6 mol/L 塩酸 10 mL 及びアセトニトリル 75 mL を加えた後、炭酸ナトリウムを加えてホモジナイズし、遠心分離してアセトニトリル層を分取した (1 回目)。水層にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズし、遠心分離した後、アセトニトリル層を分取し (2 回目)、各アセトニトリル溶液中の代謝物 I の回収率を求めた。6 mol/L 塩酸 10 mL を中和するのに必要な炭酸ナトリウム量は 3.2 g と算出されることから、添加量として 4 g 及び 5 g を検討した結果を表 1 に示した。2 回の合計回収率は、炭酸ナトリウム 4 g では 102%、5 g では 100%であった。遠心分離後の水層の pH を確認したところ、ともに pH 9 であった。以上の結果から、アセトニトリル抽出液に炭酸ナトリウム 4 g を加え、塩析及び抽出することとした。豚肉に塩酸を加えて加熱し、脱脂操作後、アセトニトリルで抽出した抽出液に代謝物 I を 1 µg 添加し、本

操作法での回収を確認したところ、抽出1回目は93%、2回目は6%（合計99%）の高い回収率が得られた。また、添加回収試験において牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳各試料の塩析時の液性をpH試験紙で確認したところ、炭酸ナトリウム添加前はpH1、炭酸ナトリウムを添加してホモジナイズした後はpH6~7、遠心後に分離した水層はpH8~10を示した。そこで、中和反応の進行状況の確認方法として、「炭酸ナトリウムを加えてホモジナイズした後に、pH試験紙等を用いて溶液がpH6以上であることを確認する。」を試験法の注意点に記載した。

表1 アセトニトリル抽出液に加える炭酸ナトリウム量に対する回収率

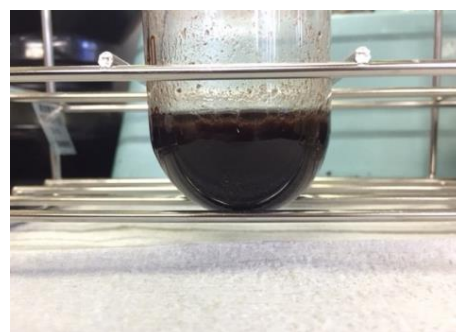
	炭酸ナトリウム量	4 g	5 g
回収率 (%)	1回目	98	98
	2回目	4	2
	合計	102	100

#### ⑥塩酸酸性条件下で加水分解処理したときの試料の状態について

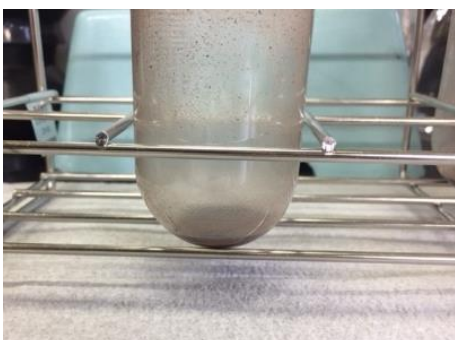
牛の筋肉に塩酸を加え（画像1）、油浴中で加熱を開始すると、加熱後数分で試料は濃い褐色になったが、試料が団子状であったため、ときどき振りまぜて加熱を行った。1時間加熱した後は、上部に油が浮いていて、溶液は懸濁した状態になっていた（画像2）。これを脱脂操作した後、アセトニトリルで抽出した残留物の量は、最初の試料に比べて大幅に減少していた（画像3）。他の試料でも牛の筋肉と概ね同様な状態であったが、牛の脂肪では褐色の色は薄く、残留物の量はごくわずかであった。また、牛乳では、塩酸を加えると白く懸濁した状態となった。



画像1 塩酸を加えた牛の筋肉（加熱前）



画像2 1時間加熱した後の牛の筋肉



画像3 アセトニトリル抽出後の牛の筋肉の残留物

(2) MCX ミニカラム (500 mg、6 mL) による精製

代謝物Iは2-アミノベンズイミダゾール構造を有していることから、強酸性陽イオン交換体ミニカラムであるOasis MCXミニカラムによる精製について検討した。アセトニトリル及び水各5 mLで順次予備洗浄したMCXミニカラムに、代謝物Iを0.5 µg (1 mg/L標準溶液を0.5 mL) 負荷した。その後、水10 mL、アセトニトリル及びアンモニア水 (100 : 0)、(99 : 1)、(98 : 2)、(95 : 5)、(90 : 10) 及び (85 : 15) 混液各10 mLで順次溶出したときの溶出状況を表2に示した。代謝物Iは水、アセトニトリル及びアンモニア水 (100 : 0) ~ (98 : 2) 混液では溶出せず、アセトニトリル及びアンモニア水 (95 : 5) 混液で14%、(90 : 10) 混液で87%溶出した。

表2 MCXミニカラムからの溶出状況

	水	アセトニトリル及びアンモニア水混液						合計
		100 : 0	99 : 1	98 : 2	95 : 5	90 : 10	85 : 15	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
回収率 (%)	0	0	0	0	14	87	0	101

Oasis MCX (500 mg、6 mL、Waters社製)  
 負荷量 : 0.5 µg (1 mg/L標準溶液を0.5 mL)

次に、アセトニトリル及びアンモニア水 (90 : 10) 混液での溶出状況を確認した。アセトニトリル及び水各5 mLで順次予備洗浄したMCXミニカラムに、代謝物Iを0.5 µg (1 mg/L標準溶液0.5 mL) を負荷し、アセトニトリル及びアンモニア水 (90 : 10) 混液で溶出したときの溶出状況を表3に示した。代謝物Iは、アセトニトリル及び水 (90 : 10) 混液4-6 mL画分に54%、6-8 mLに42%、8-10 mLに7%溶出した。

表3 アセトニトリル及びアンモニア水 (90 : 10) 混液によるMCXミニカラムからの溶出状況

化合物名	回収率 (%)						合計
	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	10-12 mL	
代謝物I	0	0	54	42	7	0	103

Oasis MCX (500 mg、6 mL、Waters社製)  
 負荷量 : 0.5 µg (1 mg/L標準溶液を0.5 mL)

以上の検討結果から、アセトニトリル溶液を MCX ミニカラムに負荷した後、水 5 mL、アセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及びアンモニア水 (49 : 1) 混液 10 mL で洗浄し、アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液 12 mL で溶出することとした。

3. 添加回収試験

畜産物4食品 (牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳) を用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って代謝物Iの添加回収試験を実施した。添加濃度は、定量限界濃度 (0.01 mg/kg) 及

び基準値濃度の2濃度とした。なお、基準値濃度添加の牛の肝臓の試験溶液は、メタノールで2倍に希釈し、LC-MS/MSで測定した。添加回収試験における各ブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液のクロマトグラムを図8-1～図8-8に示した。また、各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9に示した。

### (1) 選択性

選択性の評価結果を表4に示した。検討したいずれの試料においても、代謝物Iの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表4 選択性の評価

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>	備考			
					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)	
	代謝物	牛の筋肉	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	115413	116846	116130	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	99455	98864	99160	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	1.	基準値	1.	< 0.100	面積	0	0	0	2740683	2742089	2741386	0.000	○	2倍希釈して測定
		牛乳	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	128093	126346	127220	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、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の評価結果を表5に示した。定量限界濃度では、真度84～98%、併行精度3～6%、基準値濃度では、真度89～97%、併行精度2～4%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nは101～174であり、S/N≥10が得られた。

表5 真度、精度及び定量限界の評価

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>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	SN <sup>2)</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
	代謝物	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	S/N	660	-674	0.9978	90	81	82	81	84	84	4	155	147	151	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	S/N	502	-1376	0.9960	98	96	100	102	87	96	6	135	85	110	
		牛の肝臓	0.01	1.	0.01	S/N	29726	-91297	0.9986	88	89	90	95	88	90	3	98	104	101	
		牛乳	0.01	0.02	0.01	S/N	563	-2180	0.9981	100	101	99	93	97	98	3	164	184	174	
		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	-	1222	1467	0.9976	89	89	92	88	88	89	2				
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	-	1046	-2967	0.9964	94	99	102	94	99	97	4				
		牛の肝臓	0.01	1.	1.	-	567	-920	0.9991	94	95	88	93	87	91	4				2倍希釈して測定
		牛乳	0.01	0.02	0.02	-	1345	-4887	0.9987	90	92	89	86	91	89	2				

\*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評価した結果を表6に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度に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ところ、0.96~1.01 であり、測定に対する試料マトリックスの顕著な影響は認められなかった。添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を表7に示した。補正後の真度は、定量限界濃度では87~97%、基準値濃度では90~99%と良好な結果が得られた。

表6 試料マトリックスの測定への影響

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>							備考		
							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
	代謝物I	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	0.0005	面積	0	58742	61262	60002	61081	64029	62555	0.96	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	0.0005	面積	0	52917	51004	51961	51887	52079	51983	1.00	
		牛の肝臓	0.01	1.	0.01	0.0005	面積	0	55200	55971	55586	55437	56037	55737	1.00	
		牛乳	0.01	0.02	0.01	0.0005	面積	0	50311	53734	52023	53006	50380	51693	1.01	
		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	115413	116846	116130	118950	121288	120119	0.97	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	99455	98864	99160	99614	101653	100634	0.99	
		牛の肝臓	0.01	1.	1.	0.025	面積	0	2740683	2742089	2741386	2854718	2812592	2833655	0.97	2倍希釈して測定
		牛乳	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	128093	126346	127220	126818	128921	127870	0.99	

- \*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7 補正真度

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)	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%) <sup>*1</sup>	備考
1	代謝物I	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	84	0.96	87	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	96	1.00	96	
		牛の肝臓	0.01	1.	0.01	90	1.00	90	
		牛乳	0.01	0.02	0.01	98	1.01	97	
		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	89	0.97	92	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	97	0.99	99	
		牛の肝臓	0.01	1.	1.	91	0.97	94	2倍希釈して測定
		牛乳	0.01	0.02	0.02	89	0.99	90	

\*1 真度をピーク面積比で除した値

#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

##### (1) 申請企業の方法における抽出溶媒のアセトニトリルへの変更

2. 試験溶液調製法の検討 (1) 抽出方法の検討 ①アルベンダゾール申請企業の抽出方法の検証で示したように、申請企業の方法では、代謝物 I の回収率は 79%であった。そこで、抽出溶媒を酢酸エチルからより極性の高いアセトニトリルとし、代謝物 I の回収を検討した。6 mol/L 塩酸 10 mL に代謝物 I を 5 µg (10 mg/L 標準溶液を 0.5 mL) 添加して混和した。ここに十分アルカリ性となるように炭酸ナトリウム 7 g を加え、アセトニトリル 50 mL (抽出 1 回目) 及び 25 mL (抽出 2 回目) を加えてホモジナイズ・遠心分離した。得られたアセトニトリル中の代謝物 I の回収率を求めたところ、98%と良好であった。しかし、牛乳に代謝物 I を定量限界濃度 (0.01 mg/kg 相当) で添加し、塩酸を加えて加熱した後、上記操作による回収試験を行ったところ、回収率は 76%と低下したことから、本操作法は不採用とした。

##### (2) アルベンダゾール及び主要代謝物 (アルベンダゾールスルホキシド体及びアルベンダゾールスルホン体) の塩酸酸性条件下の加水分解による代謝物 I への変換

文献<sup>4),5)</sup>では、塩酸酸性条件下の加水分解は、組織 (特に肝臓) に結合した代謝物 (特に代謝物 I) を切り離すために行うと報告されているが、同条件下の加水分解によるアルベンダゾール及び主要代謝物から代謝物 I への変換に関する報告は見られない。そこで、アルベンダゾール及び主要代謝物であるアルベンダゾールスルホキシド体 (以下「スルホキシド体」とする)、アルベンダゾールスルホン体 (以下「スルホン体」とする) の代謝物 I への変換を確認した。水 5 mL または試料 (牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳) 10 g を 100 mL ねじロガラス製遠沈管に採り、アルベンダゾール、スルホキシド体またはスルホン体 (代謝物 I 換算で 0.1 µg 相当量) を添加した後、6 mol/L 塩酸 10 mL を加え、110°C の油浴中で 1 時間加熱し、変換率を求めた結果を表 8 に示した。アルベンダゾール及びスルホキシド体は、いずれの試料でも代謝物 I への変換は認められなかったが、スルホン体については 14~17%の変換が認められた。以上の結果から、申請企業の塩酸酸性条件下の加水分解により、スルホン体の一部が代謝物 I へに変換することが明らかとなった。

表 8 各化合物の代謝物 I への変換率

試料名	代謝物 I への変換率 (%)		
	アルベンダゾール	スルホキシド体	スルホン体
水	0	0	14
牛の筋肉	0	0	16
牛の脂肪	0	0	17
牛の肝臓	0	0	17
牛乳	0	0	16

## まとめ

申請企業の抽出方法で代謝物 I の回収を確認したところ、改善の必要があった。酢酸エチルに替えてアセトニトリルを用いたところ、試薬・試液のみでの検討ではほぼ定量的に回収されたが、試料を用いると回収率は低下した。塩酸を加えて加熱した試料にアセトニトリルを加え、塩酸酸性のまま抽出したところ、代謝物 I の回収は良好であったことから、本抽出法を採用した。

アセトニトリル抽出液を引き続き MCX ミニカラムで精製すると、LC-MS/MS 測定において、試料により 30%程度のイオン化抑制が認められたが、炭酸ナトリウムを加えて塩析し、分離した水層を除去した後、MCX ミニカラム精製をすることで、イオン化抑制が抑えられた。

牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳に代謝物Iを添加し、開発した方法を用いて回収試験を行なった結果、いずれの試料においても定量を妨害するピークは認められず、真度は84～98%、併行精度は2～6%の良好な結果が得られた。また、各試料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0.96～1.01であり、本法では、LC-MS/MS測定において顕著なマトリックスの影響は認められなかった。定量限界は0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

## 【結論】

アルベンダゾール試験法として、「試料を塩酸酸性条件下で加熱し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で脱脂した後、代謝物 I をアセトニトリルで抽出する。塩基性条件下で塩析した後、MCX ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する」方法を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳の 4 試料に適用したところ、良好な結果が得られたため、本法は畜産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

## 【参考文献】

- 1) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会報告“薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告書について”平成 28 年 11 月 29 日，  
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000144730.pdf>
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬，試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005)。
- 3) ゴエティス・ジャパン株式会社、社内資料
- 4) Csuma, A., Cismileanu. A. LC-MS/MS analysis of albendazole and its metabolites in animal tissues, *Veterinary Drug /Medicamentul Veterinar*, 4, 35-41 (2010)
- 5) FDA : Freedom of Information Summary NADA 110-048. pp.38-39,  
<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/364>

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

【代謝物 I】

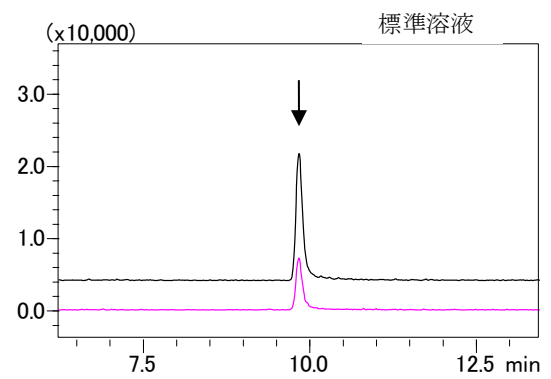
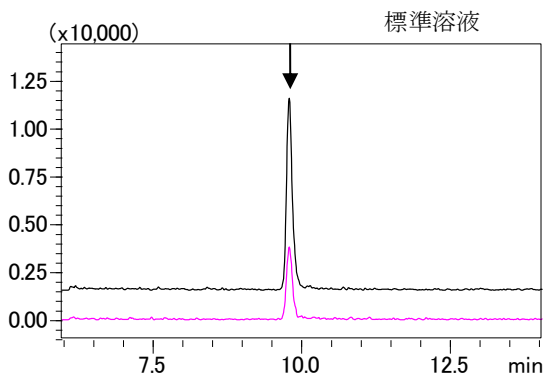
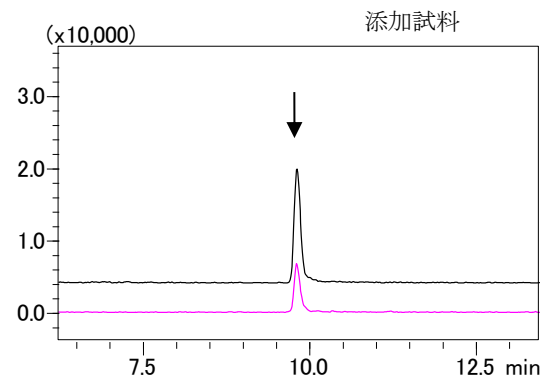
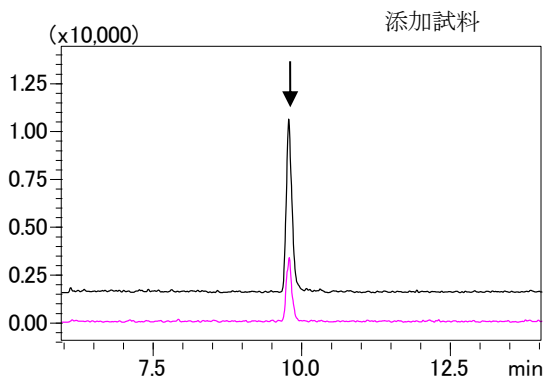
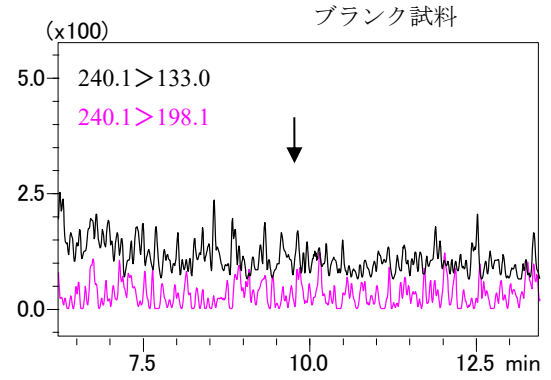
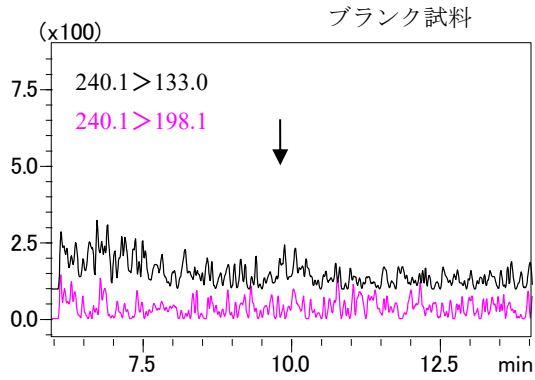


図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 8-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.02 mg/kg)

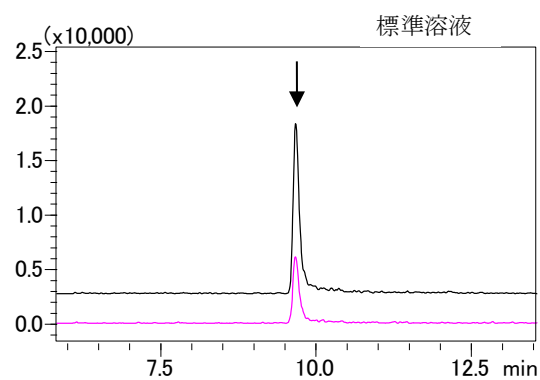
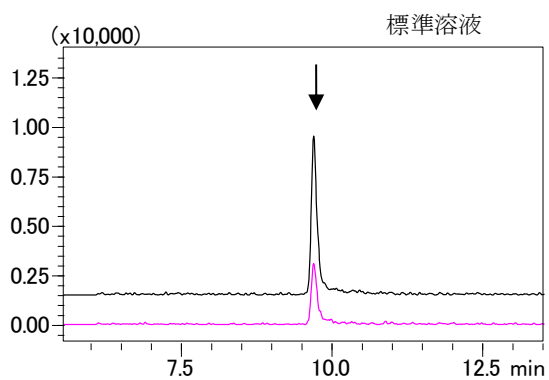
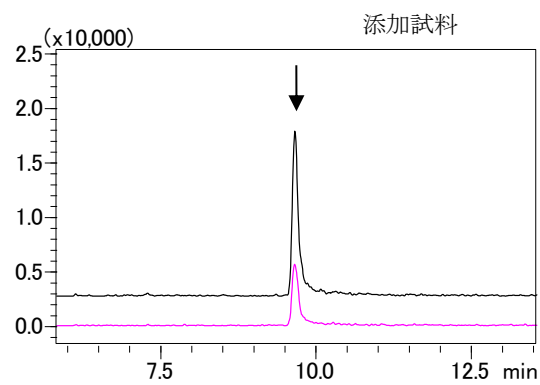
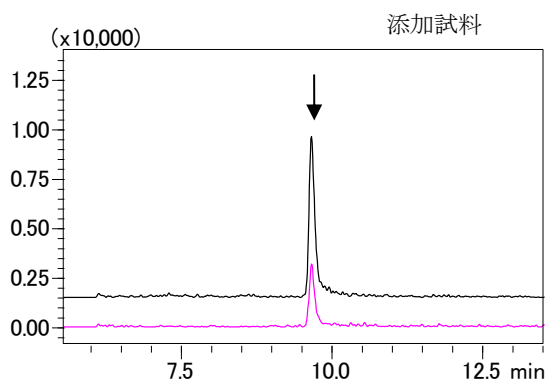
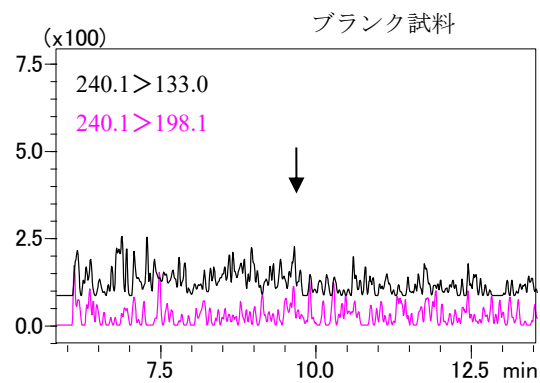
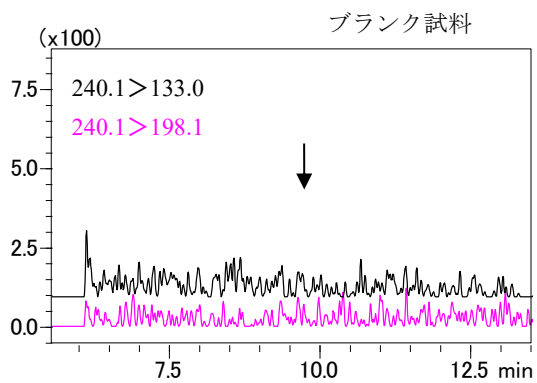


図 8-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 8-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.02 mg/kg)

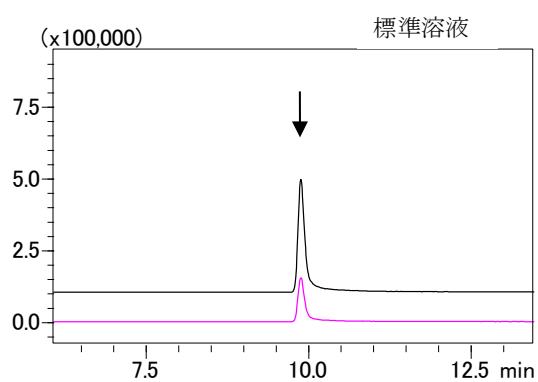
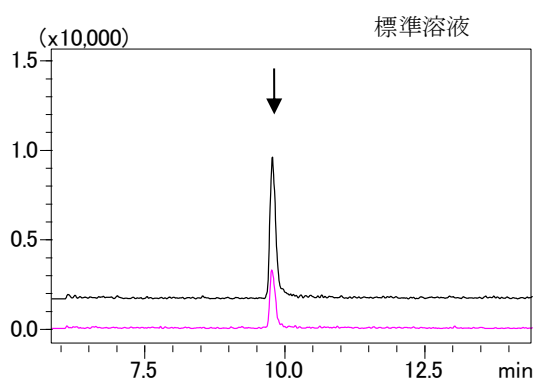
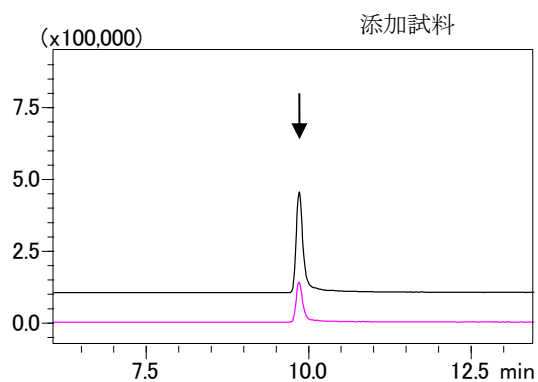
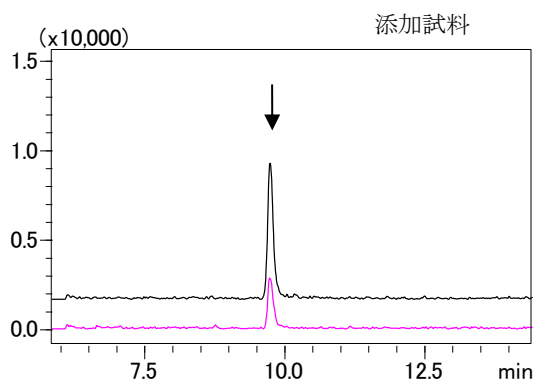
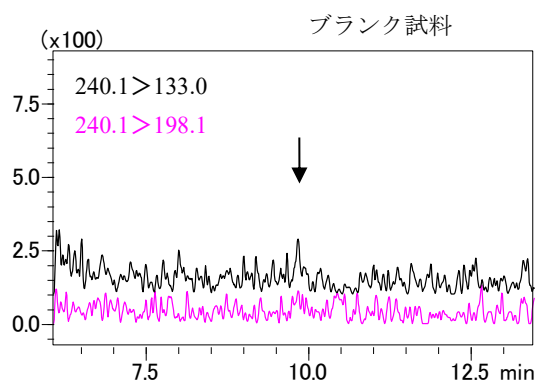
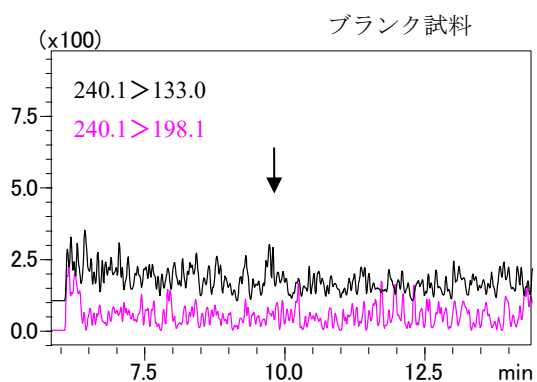


図 8-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 8-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 1 mg/kg)

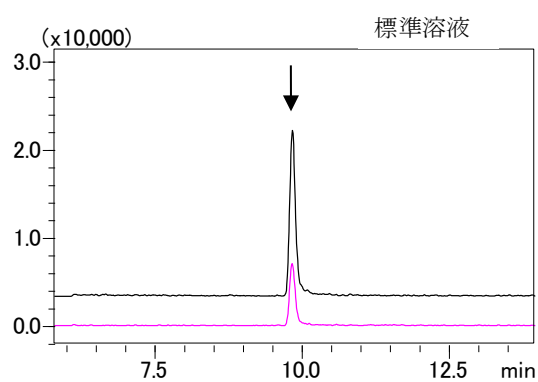
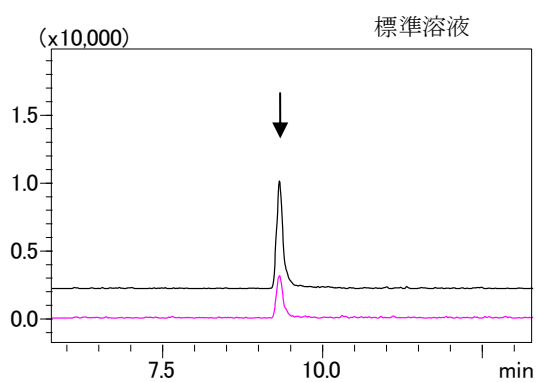
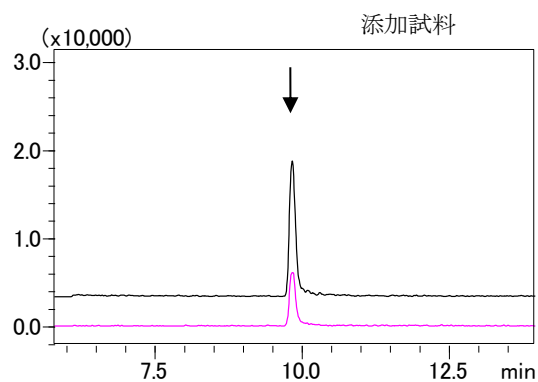
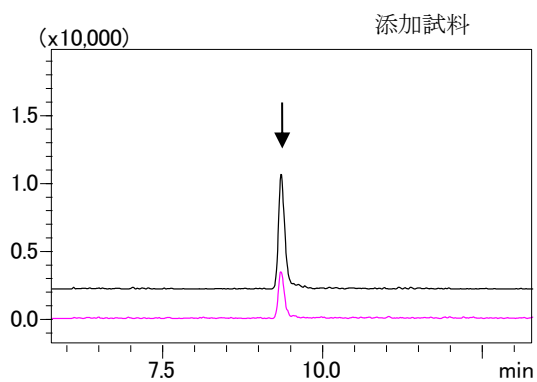
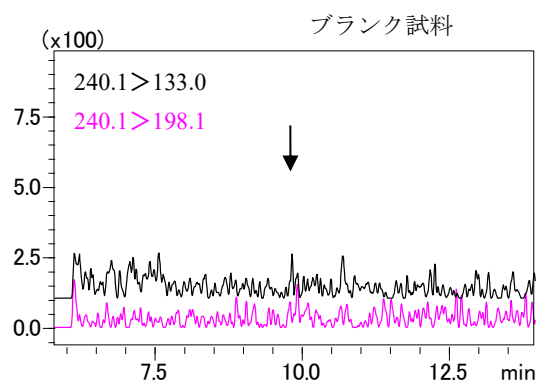
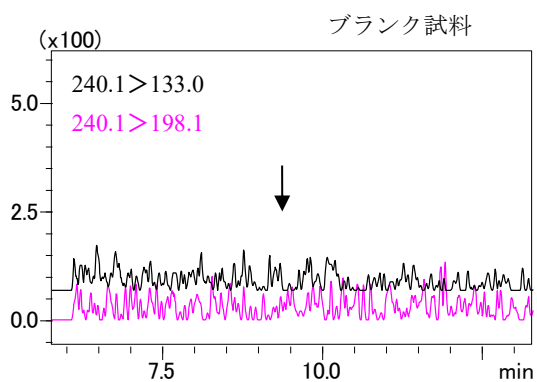


図 8-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 8-8 牛乳の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.02 mg/kg)

② 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

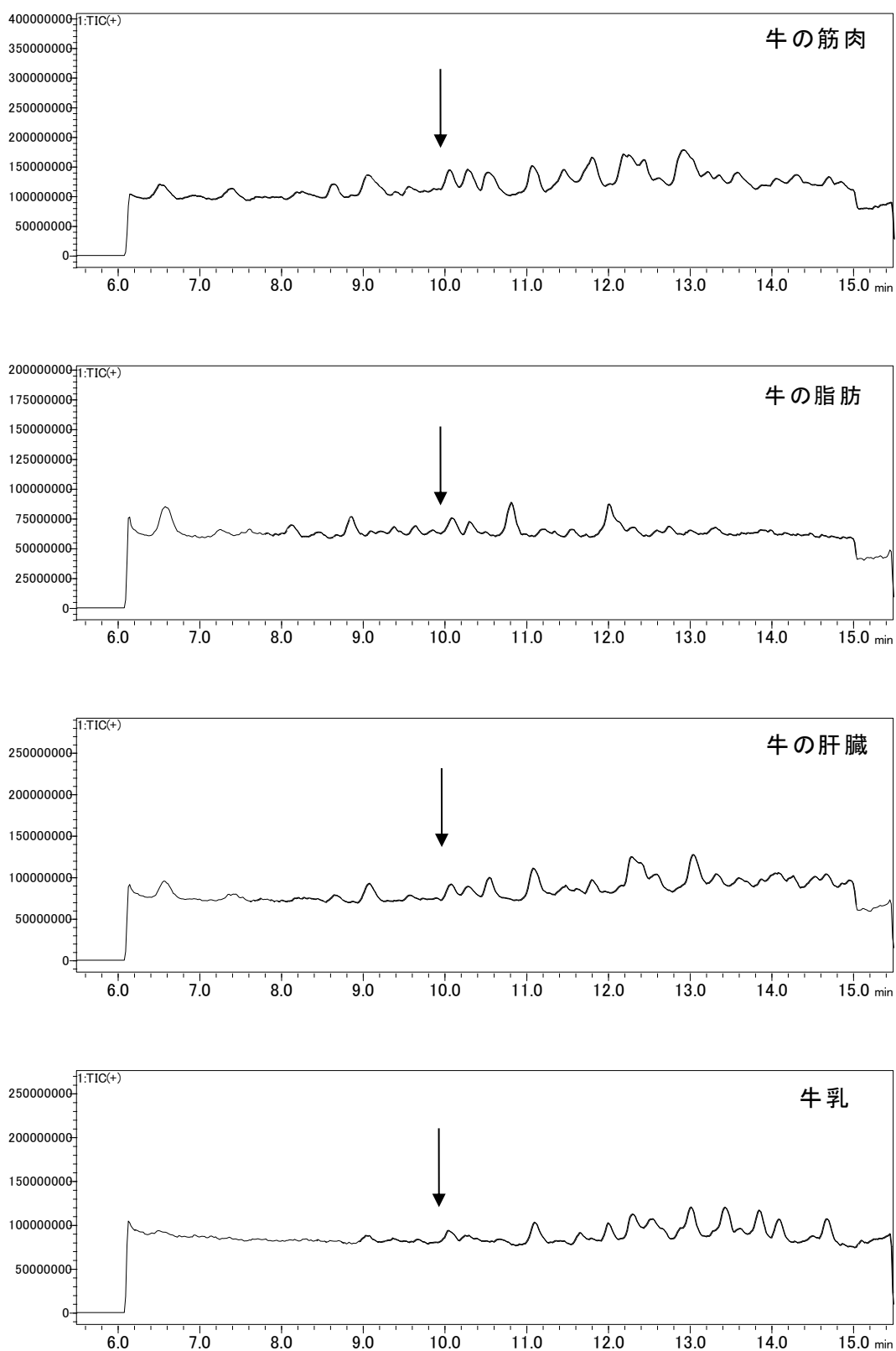


図 9 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：50～550 amu)