

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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 試験法開発事業報告書

フルベンダゾール試験法（畜産物）

フルベンダゾール試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

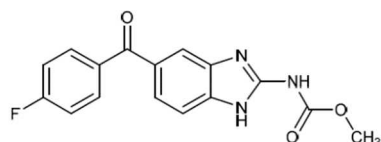
フルベンダゾールはベンズイミダゾール系の寄生虫駆除剤である。細胞骨格を構成する遊離のチューブリンのコルヒチン結合部位に結合して微小管形成を抑制し、有糸分裂を阻害すると考えられている。日本では、牛、豚、馬及びイヌを対象とした動物用医薬品として承認されている。海外では、豚、鶏、七面鳥及び狩猟鳥にペースト剤、錠剤、粒剤または飼料に混入するプレミックス品の形態で投与される¹⁾。

平成 28 年 9 月 16 日付けで食品、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、食品中のフルベンダゾールの残留基準値が設定されたが、その定義については、「フルベンダゾールとは、牛、豚並びにその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分並びに乳については、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 【(2-アミノ-1*H*-ベンズイミダゾール-5-イル)-(4-フルオロフェニル)-メタノン】の和とし、鶏並びにその他の家きんの筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分並びに卵については、フルベンダゾールとする。」とされた。現在、フルベンダゾールを測定対象とする個別試験法及び一斉試験法²⁾は通知されているが、代謝物 R35475 を対象とする試験法は公示されていない。そこで今回、LC-MS/MS を用いた畜産物中のフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を対象とした試験法を開発した。

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：フルベンダゾール

構造式：



分子式：C₁₆H₁₂FN₃O₃

分子量：313.29

IUPAC名：Methyl-*N*-[5-(4-fluorobenzoyl)-3*H*-benzimidazole-2-yl]carbamate

CAS番号：31430-15-6

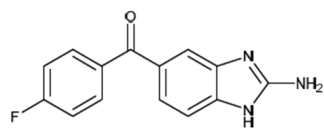
外観：白色～わずかにうすい黄色、粉末

溶解性：ジメチルスルホキシドに溶け、水にほとんど溶けない。

〔出典〕 富士フィルム和光純薬（株）製品詳細情報 <https://www.siyaku.com/>

(2) 分析対象化合物：代謝物 R35475

構造式：



分子式：C₁₄H₁₀FN₃O

分子量：255.25

IUPAC名:(2-Amino-1*H*-benzimidazol-5-yl)-(4-fluorophenyl)-methanone

CAS番号：82050-13-3

外観：白色～うすい黄色、粉末

融点：約 249℃

溶解性：エタノールに溶け、水及びアセトンにほとんど溶けない。

[出典] 富士フイルム和光純薬（株）製品詳細情報 <https://www.siyaku.com/>

3. 基準値

フルベンダゾールとは、牛、豚並びにその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分並びに乳については、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 【(2-アミノ-1H-ベンズイミダゾール-5-イル)-(4-フルオロフェニル)-メタノン】の和とし、鶏並びにその他の家きんの筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分並びに卵については、フルベンダゾールとする。

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.02
豚の筋肉	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物* ¹ の筋肉	0.02
牛の脂肪	0.02
豚の脂肪	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.05
牛の肝臓	0.1
豚の肝臓	0.3
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.3
牛の腎臓	0.06
豚の腎臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.1
牛の食用部分	0.06
豚の食用部分	0.3
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分* ²	0.3
乳	0.7
鶏の筋肉	0.2
その他の家きん* ³ の筋肉	0.2
鶏の脂肪	0.01
その他の家きんの脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.5
その他の家きんの肝臓	0.5
鶏の腎臓	0.4
その他の家きんの腎臓	0.4
鶏の食用部分	0.5
その他の家きんの食用部分	0.5
鶏の卵	0.4
その他の家きんの卵	0.4

*1 「その他の陸棲哺乳類に属する動物」とは、陸棲哺乳類に属する動物のうち、牛及び豚以外のものをいう。

*2 「食用部分」とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

*3 「その他の家きん」とは、家きんのうち、鶏以外のものをいう。

[実験方法]

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵は、札幌市内の小売店で購入した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を取り除き、細切均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を取り除き、細切均一化した。

(3) 牛の肝臓

全体を細切均一化した。

(4) 牛乳

全体をよく混合して均一化した。

(5) 鶏卵

殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し、均一化した。

2. 試薬・試液

フルベンダゾール標準品：フルベンダゾール標準品 純度 98.0% [富士フィルム和光純薬(株)製]

代謝物 R35475 標準品：フルベンダゾール代謝産物 R35475 標準品 純度 97.0% [富士フィルム和光純薬(株)製]

アセトニトリル、アセトン：残留農薬試験用 [関東化学(株)製]

メタノール：LC/MS 用 [関東化学(株)製]

蒸留水：LC/MS 用 [関東化学(株)製]

アンモニア水：28%、特級 [関東化学(株)製]

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg)：InertSep SCX [500 mg、6 mL、ジーエルサイエンス(株)製] (以下 SCX ミニカラムとする)

ケイソウ土：セライト 545 [関東化学(株)製]

標準原液：フルベンダゾール標準品 5 mg を精密に秤量し、メタノール 100 mL に溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。代謝物 R35475 標準品 10 mg を精密に秤量し、メタノール 20 mL に溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：フルベンダゾール標準原液及び代謝物 R35475 標準原液を適宜メタノールで希釈した後、混合し、0.1 mg/L、0.4 mg/L、2 mg/L、8 mg/L 及び 14 mg/L の混合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、0.0000625～0.015 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)

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 [東京理化器械(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 [東京理化器械(株)製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化器械(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
カラムオープン	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 : ジーエルサイエンス (株) 製]																				
移動相流速	0.20 mL/min																				
注入量	5 μL																				
カラム温度	40°C																				
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液																				
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>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>30.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>40.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	40	60	20.0	5	95	30.0	5	95	30.01	40	60	40.0	40	60
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																			
0.0	40	60																			
20.0	5	95																			
30.0	5	95																			
30.01	40	60																			
40.0	40	60																			
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 (+)																				
インターフェース電圧	1 kV																				
脱溶媒管 (DL) 温度	150°C																				
インターフェース温度	300°C																				
ヒートブロック温度	500°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 (m/z)	フルベンダゾール : +314.1 \rightarrow 123.1 (CE 35V) 代謝物 R35475 : +256.0 \rightarrow 123.1 (CE 26 V)																				
定性イオン (m/z)	フルベンダゾール : +314.1 \rightarrow 95.1 (CE 50 V) 代謝物 R35475 : +256.0 \rightarrow 95.2 (CE 41V)																				
保持時間 (min)	フルベンダゾール : 14.6 分 代謝物 R35475 : 11.8 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（フルベンダゾール、R35475 とともに 0.005 mg/kg、両化合物の和で 0.01 mg/kg 相当）

0.0000625、0.000125、0.0001875、0.00025、0.0003125 及び 0.000375 mg/L

- ・ 基準値濃度添加

牛の筋肉、牛の脂肪（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 0.1 mg/kg）

0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625 及び 0.0075 mg/L

牛乳（基準値 0.7 mg/kg）

0.0021875、0.004375、0.0065625、0.00875、0.0109375 及び 0.013125 mg/L

鶏卵（基準値 0.4 mg/kg）

0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 mg/L

この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いてフルベンダゾール及び代謝物 R35475 の検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりフルベンダゾール及び代謝物 R35475 の含量を算出した。なお、基準値濃度添加の牛乳及び鶏卵は、各々試験溶液をメタノールで 4 倍及び 2 倍に希釈し、測定した。

6. 添加試料の調製

定量限界濃度の場合はフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を各々 0.005 mg/kg、残留基準値濃度の場合は両化合物を各々基準値濃度で添加した。

牛の筋肉（添加濃度 0.005 mg/kg 及び 0.02 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL または 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 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 0.005 mg/kg 及び 0.02 mg/kg）：試料 10.0 g を約 40℃ で湯煎して融解し、0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL または 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 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 0.005 mg/kg 及び 0.1 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL または 2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛乳（添加濃度 0.005 mg/kg 及び 0.7 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL または 14 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

鶏卵（添加濃度 0.005 mg/kg 及び 0.4 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL または 8 mg/L 添加用標準溶液 0.5 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

フルベンダゾール及び代謝物 R35475 を試料からアセトンで抽出した後、SCX 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 をガラス製遠沈管に量り採り、アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約 1 cm に敷いたろ紙 [直径 60 mm、No.707、日本理化学器械（株）製] を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を再びガラス製遠沈管に入れ、アセトン 25 mL を加え

てホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで 100 mL とした。

(2) 精製

SCX ミニカラム (500 mg、6 mL) にアセトン 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液 2 mL を注入した後、アセトン 5 mL、水 5 mL、アセトニトリル 5 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 (97 : 3) 混液 10 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に溶かし、4 mL としたものを試験溶液とした。なお、牛乳の基準値濃度 (0.7 mg/kg) 添加及び鶏卵の基準値濃度 (0.4 mg/kg) 添加については、試験溶液をメタノールでそれぞれ 4 倍及び 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

アセトン抽出

↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ紙上の残留物を取り、アセトン 25 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせ、アセトンで 100 mL とする

SCX ミニカラム [ジーエルサイエンス (株) 製 InertSep SCX (500 mg、6 mL)]

↓ アセトン 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 2 mL を注入

↓ アセトン 5 mL、水 5 mL、アセトニトリル 5 mL で洗浄

↓ アセトニトリル及びアンモニア水 (97 : 3) 混液 10 mL で溶出

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をメタノールに溶かして 4 mL とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS 測定

牛乳 (基準値濃度添加) : 試験溶液をメタノールで 4 倍に希釈して測定

鶏卵 (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 (基準値濃度添加の牛乳及び鶏卵については、各々メタノールで 4 倍及び 2 倍に希釈したブランク試験溶液) から 0.2 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

フルベンダゾール及び代謝物R35475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。フルベンダゾールのスキャン測定におけるマススペクトルを図1-1に示した。フルベンダゾールのプロトン付加分子 (m/z 314.1 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンに選択した。 m/z 314.1をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンをしたとき、 m/z 282.0、 m/z 123.1及び m/z 95.1のピークが高い強度で観察された。これらのイオンを用いてフルベンダゾール標準品を測定したところ、 m/z 314.1 \rightarrow 282.0については移動相B液の比率があがるとともにベースラインが大きく上昇し、ピークのベースライン補助線を水平に引くことが困難であったことから本イオンは不採用とし、 m/z 314.1 \rightarrow 123.1を定量イオン、 m/z 314.1 \rightarrow 95.1を定性イオンとした。図1-2及び図1-3にフルベンダゾールのプロトン付加分子 (m/z 314.1 $[M+H]^+$) 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。

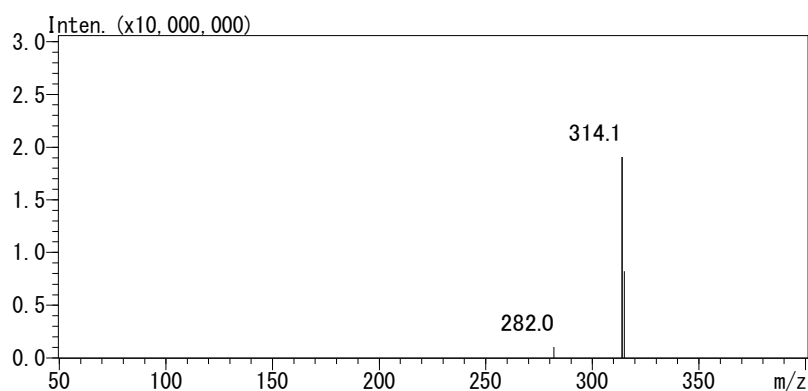


図1-1 フルベンダゾールのマススペクトル

スキャン範囲： 50~400 amu、測定条件：ESI(+)

フルベンダゾール： 1 mg/L

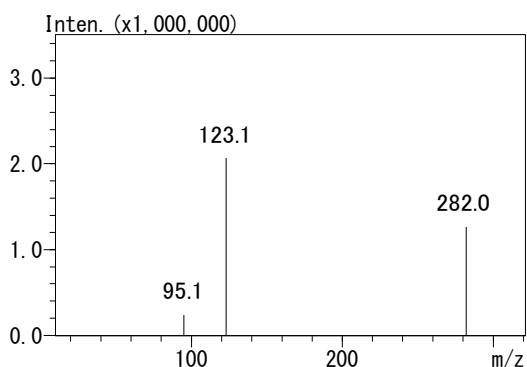


図1-2 プロダクトイオンスペクトル (定量)

プリカーサーイオン： m/z 314.1

測定条件：ESI(+)

CE=35 V (CE：collision energy)

フルベンダゾール： 0.2 mg/L

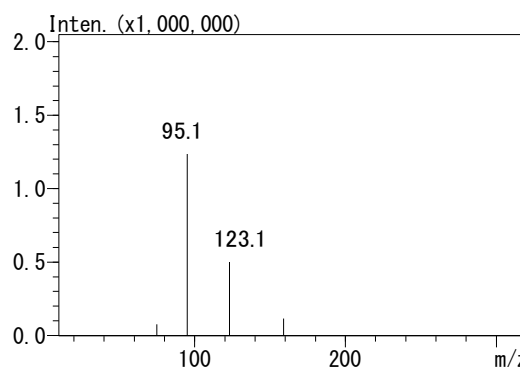


図1-3 プロダクトイオンスペクトル (定性)

プリカーサーイオン： m/z 314.1

測定条件：ESI(+)

CE=50V (CE：collision energy)

フルベンダゾール： 0.2 mg/L

代謝物R35475のスキャン測定におけるマススペクトルを図2-1に示した。代謝物R35475のプロトン付加分子 (m/z 256.0 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンに

選択した。 m/z 256.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンをしたとき、 m/z 123.1及び m/z 95.2のピークが高い強度で観察された。そこで、 m/z 256.0→123.1を定量イオン、 m/z 256.0→95.2を定性イオンとした。図2-2及び図2-3に代謝物R35475のプロトン付加分子 (m/z 256.0[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。

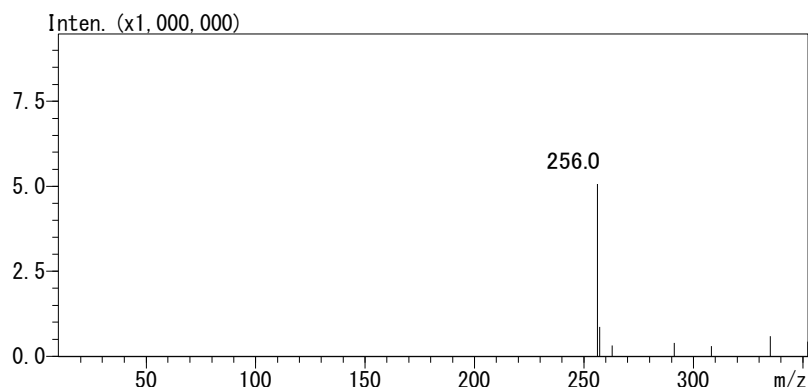


図2-1 代謝物R35475のマスペクトル

スキャン範囲： 50～400 amu、測定条件：ESI(+)

代謝物R35475：1 mg/L

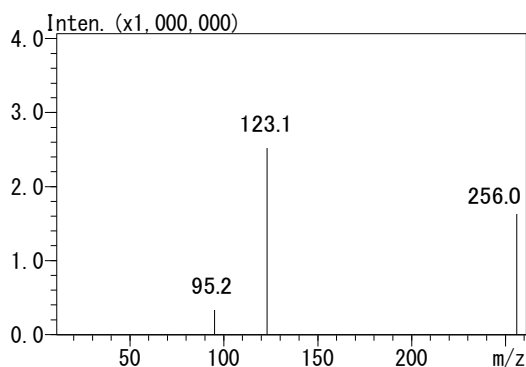


図2-2 プロダクトイオンスペクトル (定量)

プリカーサーイオン： m/z 256.0

測定条件：ESI(+)

CE=26 V (CE：collision energy)

代謝物R35475：0.2 mg/L

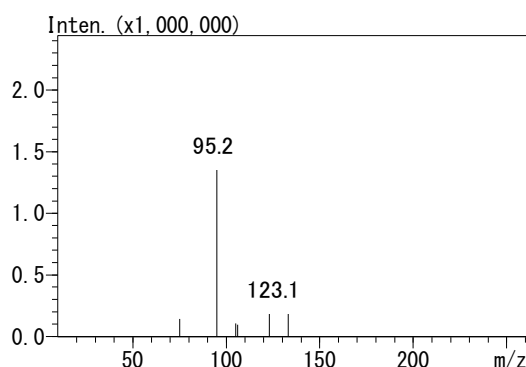


図2-3 プロダクトイオンスペクトル (定性)

プリカーサーイオン： m/z 256.0

測定条件：ESI(+)

CE=41V (CE：collision energy)

代謝物R35475：0.2 mg/L

また、フローインジェクション分析を用いて、インターフェース電圧、脱溶媒管 (DL) 温度及びヒートブロック温度を検討した。インターフェース電圧は1～5 kV、DL 温度は100～300℃、ヒートブロック温度は100～500℃の範囲でパラメータを変化させたときのフルベンダゾール及び代謝物 R35475 のピーク強度を比較した結果、インターフェース電圧は1 kV、DL 温度は150℃、ヒートブロック温度は500℃に設定することとした。

(2) LC 条件の検討

フローインジェクション分析を用いて、移動相を検討した。アセトニトリル及び水 (1:1) 混液、水及びメタノール (1:1) 混液に各種添加剤 (ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウム) を添加し、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 のピーク強度を比較した。その結

果、酢酸アンモニウム添加の水及びメタノール（1:1）混液で最大のピーク強度が得られた。また、酢酸アンモニウムの添加濃度については、1、2.5、5、7.5、10 mmol/L を比較したところ、5 mmol/L で各化合物のピーク強度が最大となった。以上の検討結果から、移動相は 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いることとした。

分析カラムは、フルベンダゾールが厚労省通知「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）」²⁾の適用化合物であることから、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を使用することとし、Inertsil ODS-4、Inertsustain AQ-C18 [ともにジーエルサイエンス（株）製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm] 及び Mightysil RP-18 GP aqua [関東化学（株）製、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm] について、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 の検出感度及びピーク形状を比較した。その結果、最も良好な結果が得られた Inertsil ODS-4 を選択し、濃度勾配については、5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（2：3）から（1：19）までを 20 分間で行うこととした。

（3）検量線

フルベンダゾール及び代謝物 R35475 の検量線の例を図 3-1 及び図 3-2 に示した。0.00025 mg/L～0.015 mg/L の濃度範囲で作成した各検量線の決定係数 R^2 は 0.999 であり、良好な直線性を示した。

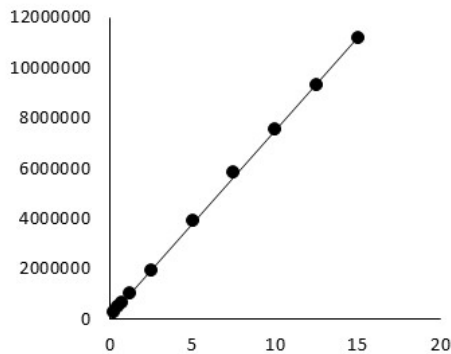


図 3-1 フルベンダゾールの検量線の例
濃度範囲：0.00025 mg/L～0.015 mg/L
 $y=741842x+112726$
 $R^2=0.999$

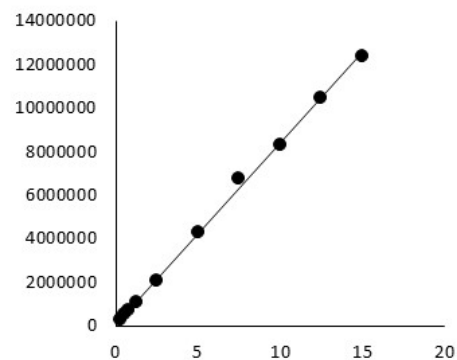


図 3-2 代謝物 R35475 の検量線の例
濃度範囲：0.00025 mg/L～0.015 mg/L
 $y=827740x+113656$
 $R^2=0.999$

（4）定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

フルベンダゾール：0.005 mg/kg [試験溶液量 4 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.2 (g)]
× [フルベンダゾールの定量限界相当量 0.00125 (ng) / 注入量 5 (μL)]

代謝物 R35475：0.005 mg/kg [試験溶液量 4 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.2 (g)]
× [代謝物 R35475 の定量限界相当量 0.00125 (ng) / 注入量 5 (μL)]

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法

抽出溶媒として、アセトニトリル、メタノールまたはアセトンによる抽出を検討した。はじめに、牛の筋肉からフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出したときの回収状況を確認した。牛の筋肉 5 g にフルベンダゾール及び代謝物 R35475 各 2.5 µg (10 mg/L メタノール標準溶液を 0.25 mL) を添加し、30 分間放置した後、*n*-ヘキサン 25 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加え、ホモジナイズした。遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) 後、アセトニトリル層を採り、残留物及び *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 12.5 mL を加え、ホモジナイズした。遠心分離後、アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルで 50 mL に定容した。ブランク試験溶液から調製したマトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた結果、フルベンダゾールは 93%、代謝物 R35475 は 87%であった。次に、メタノールまたはアセトンによる抽出を検討した。牛の筋肉 5 g にフルベンダゾール及び代謝物 R35475 各 2.5 µg (10 mg/L メタノール標準溶液を 0.25 mL) を添加し、30 分間放置した後、抽出溶媒 25 mL (1 回目) 及び 12.5 mL (2 回目) を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) 後、得られた各上澄液を抽出溶媒で 50 mL に定容し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、メタノール抽出によるフルベンダゾールの回収率は 96% (1 回目 82%、2 回目 13%)、代謝物 R35475 は 91% (1 回目 76%、2 回目 15%) (表 1) であった。また、アセトン抽出によるフルベンダゾールの回収率は 101% (1 回目 92%、2 回目 9%)、代謝物 R35475 は 98% (1 回目 91%、2 回目 7%) であり (表 2)、アセトン抽出でほぼ定量的に両化合物が回収された。

一方、富士フイルム和光純薬 (株) の製品詳細情報によれば、代謝物 R35475 は「アセトンにほとんど溶けない」とされている。そこで、抽出溶媒としてのアセトンの適用性について確認した。約 40°C で融解した脂肪 5 g に代謝物 R35475 を 25 mg/kg 相当 (500 mg/L メタノール標準溶液を 0.25 mL) 添加し、よく混合した後、冷凍庫で 10 分間放置し、脂肪を凝固させた。さらに室温で 30 分間放置した後、アセトン 25 mL (1 回目) 及び 12.5 mL (2 回目) を加えてホモジナイズ抽出したところ、回収率は 102% であり、良好であった。畜産物に設定された残留基準値で最も高いのは乳の 0.7 mg/kg であり、この値を十分に超える 25 mg/kg 添加においても良好に回収できたことから、アセトン抽出溶媒としても問題ないと判断した。

以上の検討結果から、抽出溶媒にアセトンを選択し、試料 10 g に対して 50 mL (1 回目) 及び 25 mL (2 回目) を用いてホモジナイズ抽出することとした。

表 1 メタノールによる回収状況 (牛の筋肉)

化合物名	回収率 (%)		
	1 回目	2 回目	合計
フルベンダゾール	82	13	96
代謝物 R35475	76	15	91

表 2 アセトンによる回収状況 (牛の筋肉)

化合物名	回収率 (%)		
	1 回目	2 回目	合計
フルベンダゾール	92	9	101
代謝物 R35475	91	7	98

(2) SCX ミニカラム (500 mg、6 mL) による精製

アセトン抽出液に含まれる畜産物由来の脂質及び水溶性の夾雑成分を除去するためにミニカラムによる精製を検討した。フルベンダゾール及び代謝物R35475は2-アミノ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、強酸性陽イオン交換体ミニカラムであるSCXミニカラムを用いた精製を検討した。SCXミニカラムにフルベンダゾール及び代謝物R35475を0.2 µg (2 mg/Lメタノール標準溶液を0.1 mL) 負荷し、アセトン10 mL、水10 mL、アセトニトリル10 mLを順次注入したとき、フルベンダゾール及び代謝物R35475の溶出は認められなかった。続けて、アセトニトリル及びアンモニア水 (99 : 1)、(98 : 2) 及び (97 : 3) 混液各10 mLを順次注入したときの溶出状況を表3に示した。アセトニトリル及びアンモニア水 (98 : 2) 混液でフルベンダゾール及び代謝物R35475ともにほぼ全て溶出したが、アセトニトリル及びアンモニア水混液 (97 : 3) 混液でも代謝物R35475の溶出がわずかに認められたため、アセトニトリル及びアンモニア水 (97 : 3) 混液で溶出することとした。次に、SCXミニカラムにフルベンダゾール及び代謝物R35475を1 µg (10 mg/Lメタノール標準溶液を0.1 mL) 負荷し、アセトニトリル及びアンモニア水 (97 : 3) 混液で溶出したときの溶出状況を表4に示した。フルベンダゾール及び代謝物R35475は3~6 mL画分までにはほぼ全て溶出したが、6~9 mL画分にフルベンダゾールの痕跡程度の溶出が認められたことから、溶出溶媒量を10 mLとした。また、アセトン抽出液をSCXミニカラムに負荷した後、水、次いでアセトニトリルで洗浄し、アセトニトリル及びアンモニア水 (97 : 3) 混液で溶出した液を濃縮、乾固したところ、脂質とみられる液状の残留物が認められた。一方、アセトンのみで洗浄したときは、固形の残留物が認められたが、アセトン、水及びアセトニトリルで洗浄すると残留物はほとんど認められず、精製効果が高かった。以上の検討結果から、アセトン抽出液をSCXミニカラムに負荷した後、アセトン5 mL、水5 mL及びアセトニトリル5 mLで順次洗浄し、アセトニトリル及びアンモニア水 (97 : 3) 混液10 mLで溶出することとした。本条件を用いて、牛の筋肉のアセトン抽出液を精製し、得られたブランク試験溶液を用いて調製した0.001 mg/Lのマトリックス添加標準溶液のメタノール標準溶液に対するピーク面積比を確認したところ、フルベンダゾール及び代謝物R35475ともに0.97であり、測定に対するマトリックスの影響はほとんど認められなかった。

表3 SCXミニカラムからの溶出状況

	化合物名	アセトン 10 mL	水 10 mL	アセト ニトリ ル 10 mL	アセトニトリル及びアンモニア 水混液			合計
					99 : 1	98 : 2	97 : 3	
					10 mL	10 mL	10 mL	
回収率 (%)	フルベンダゾール	nd	nd	nd	37	66	nd	103
	代謝物R35475	nd	nd	nd	22	79	<0.5	101

Inert-Sep SCX (500 mg、6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製)

負荷量 : 0.2 µg (2 mg/Lメタノール標準溶液を0.1 mL)

nd : 不検出

表4 アセトニトリル及びアンモニア水（97：3）混液による溶出状況

	化合物名	アセトニトリル及びアンモニア水混液			合計
		0～3 mL	3～6 mL	6～9 mL	
回収率 (%)	フルベンダゾール	90	6	<0.5	96
	代謝物R35475	89	12	nd	101

Inert-Sep SCX（500 mg、6 mL、ジーエルサイエンス（株）製）

負荷量：1 µg（10 mg/Lメタノール標準溶液を0.1 mL）

3. 添加回収試験

畜産物5食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵）を用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従ってフルベンダゾール及び代謝物R35475の添加回収試験を実施した。添加濃度は、定量限界濃度及び基準値濃度の2濃度とした。定量限界濃度の場合は両化合物を各々0.005 mg/kg、残留基準値濃度の場合は両化合物を各々基準値濃度で添加した。なお、鶏卵については、規制対象化合物がフルベンダゾールのみであるが、代謝物R35475についても添加回収試験を行った。また、基準値濃度添加の牛乳及び鶏卵については、添加濃度が他の試料に比べて高濃度であり、検量線の直線性が低下したことから、試験溶液をメタノールでそれぞれ4倍及び2倍に希釈して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4-1～図4-20に示した。また、各ブランク試料のスキヤ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5に示した。

(1) 選択性

選択性の評価結果を表5に示した。基準値濃度の添加回収試験における牛の肝臓のブランク試料から、代謝物R35475と同じ保持時間にピークが観察されたが、基準値濃度のピーク面積の1/100以下であったことから、選択性に問題はないと判断した。また、その他の食品からは定量を妨害するピークは認められなかった。

表5 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) ¹⁾						選択性 の評価 ³⁾	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 ²⁾				面積(高さ) 比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2				平均(b)	
1	フルベンダゾール	牛の筋肉	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	828655	808634	818645	0.000	○	
		牛の脂肪	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	858111	894607	876359	0.000	○	
		牛の肝臓	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	4031642	4046145	4038894	0.000	○	
		牛乳	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	5604459	5682145	5643302	0.000	○	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	0	0	0	6864259	6786472	6825366	0.000	○	2倍希釈して測定
2	代謝物R35475	牛の筋肉	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	1008564	996910	1002737	0.000	○	
		牛の脂肪	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	886100	807240	846670	0.000	○	
		牛の肝臓	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	14860	12385	13623	4637364	4570665	4604015	0.003	○	
		牛乳	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	7160615	7254664	7207640	0.000	○	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	0	0	0	8356403	7872756	8114580	0.000	○	2倍希釈して測定

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6に示した。フルベンダゾールでは、定量限界濃度で真度93~98%及び併行精度2~5%、基準値濃度で真度92~106%及び併行精度2~3%が得られた。また、代謝物R35475では、定量限界濃度で真度91~101%及び併行精度2~6%、基準値濃度で真度89~102%及び併行精度2~8%が得られた。これらの真度及び精度は妥当性評価ガイドライン³⁾の目標値を満たしており、良好な結果であった。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、フルベンダゾールは89~120、代謝物R35475は110~201であり、いずれもS/N \geq 10が得られた。

表6 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 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値		
1	フルベンダゾール	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	S/N	676754	4301	0.9993	94	94	95	98	85	93	5	118	121	120		
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	—	876117	-19175	0.9998	90	90	92	93	93	92	2					
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	S/N	836742	12434	0.9976	94	93	94	95	97	94	2	79	99	89		
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	—	877963	39176	0.9986	99	96	96	95	93	96	2					
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	S/N	833929	1872	0.9990	98	92	90	94	90	93	3	126	106	116		
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	—	786613	82747	0.9994	105	97	98	100	98	100	3					
		牛乳	0.005	0.7	0.005	S/N	845848	2840	0.9985	95	95	91	92	95	94	2	97	103	100		
		牛乳	0.005	0.7	0.7	—	828658	111846	0.9999	103	104	109	103	99	104	3				4倍希釈して測定	
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	S/N	815582	-2474	0.9996	101	98	94	98	97	98	3	106	85	96		
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	—	720704	353875	0.9998	105	111	108	103	106	106	3				2倍希釈して測定	
2	代謝物R35475	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	S/N	594217	4762	0.9981	110	98	97	102	100	101	5	177	113	145		
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	—	1080145	-27548	0.9999	92	89	87	90	89	89	2					
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	S/N	719836	4179	0.9984	104	96	97	94	102	98	4	122	98	110		
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	—	828215	88043	0.9957	98	110	110	93	97	102	8					
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	S/N	851347	-10384	0.9979	100	94	85	91	87	91	6	170	127	149		
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	—	877691	249376	0.9962	98	89	90	95	96	94	4					
		牛乳	0.005	0.7	0.005	S/N	701763	3069	0.9996	107	104	97	95	100	100	5	100	120	110		
		牛乳	0.005	0.7	0.7	—	825849	-158939	0.9987	94	97	104	94	92	96	5				4倍希釈して測定	
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	S/N	741670	-5949	0.9992	97	98	98	95	93	96	2	211	191	201		
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	—	823696	89705	0.9996	98	105	109	96	103	102	5				2倍希釈して測定	

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SN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7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、フルベンダゾールでは0.94~1.05、代謝物R35475では0.96~1.04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8に示した。補正後の真度は、フルベンダゾールでは91~103%、代謝物R35475では92~103%と良好な結果が得られた。

表7 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 ¹⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²⁾									備考
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	フルベンダゾール	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	0.00025	面積	0	197133	203769	200451	213686	212663	213175	0.94	
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	0.001	面積	0	828655	808634	818645	844640	847763	846202	0.97	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	0.00025	面積	0	230392	242899	236546	224315	238824	231570	1.02	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	0.001	面積	0	858111	894607	876359	946580	842464	894522	0.98	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	0.00025	面積	0	208165	199664	203915	202764	197048	199906	1.02	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	0.005	面積	0	4031642	4046145	4038894	3974228	4042821	4008525	1.01	
		牛乳	0.005	0.7	0.005	0.00025	面積	0	201780	205572	203676	208085	190277	199181	1.02	
		牛乳	0.005	0.7	0.7	0.00875	面積	0	5604459	5682145	5643302	5683779	5501475	5592627	1.01	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	0.00025	面積	0	207844	207690	207767	206211	192514	199363	1.04	
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	0.01	面積	0	6864259	6786472	6825366	6505927	6440321	6473124	1.05	2倍希釈して測定
2	代謝物R35475	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	0.00025	面積	4674	171337	178312	170151	170111	174917	172514	0.99	
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	0.001	面積	0	1008564	996910	1002737	1046767	1025348	1036058	0.97	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	0.00025	面積	0	180008	193652	186830	190988	197486	194237	0.96	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	0.001	面積	0	886100	807240	846670	846397	859537	852967	0.99	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	0.00025	面積	0	186025	173842	179934	194892	172938	183915	0.98	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	0.005	面積	13623	4637364	4570665	4590392	4534270	4818604	4676437	0.98	
		牛乳	0.005	0.7	0.005	0.00025	面積	0	173004	177512	175258	173283	166868	170076	1.03	
		牛乳	0.005	0.7	0.7	0.00875	面積	0	7160615	7254664	7207640	7298993	7238248	7268621	0.99	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	0.00025	面積	0	186046	181012	183529	181308	180246	180777	1.02	
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	0.01	面積	0	8356403	7872756	8114580	8089279	7527843	7808561	1.04	2倍希釈して測定

*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8 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(%) ^{*1)}	備考
1	フルベンダゾール	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	93	0.94	99	
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	92	0.97	95	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	94	1.02	93	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	96	0.98	98	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	93	1.02	91	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	100	1.01	99	
		牛乳	0.005	0.7	0.005	94	1.02	92	
		牛乳	0.005	0.7	0.7	104	1.01	103	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	98	1.04	94	
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	106	1.05	101	2倍希釈して測定
2	代謝物R35475	牛の筋肉	0.005	0.02	0.005	101	0.99	103	
		牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	89	0.97	92	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.005	98	0.96	102	
		牛の脂肪	0.005	0.02	0.02	102	0.99	102	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	91	0.98	93	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	93	0.98	95	
		牛乳	0.005	0.7	0.005	100	1.03	98	
		牛乳	0.005	0.7	0.7	96	0.99	97	4倍希釈して測定
		鶏卵	0.005	0.4	0.005	96	1.02	95	
		鶏卵	0.005	0.4	0.4	102	1.04	98	2倍希釈して測定

*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(以下 MCX ミニカラムとする)による精製の検討

強酸性陽イオン交換体ミニカラムである MCX ミニカラム [Oasis MCX (500 mg、6 mL、Waters 社製)] を用いた精製を検討した。MCX ミニカラムにフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を 1 µg (10 mg/L メタノール標準溶液を 0.1 mL) 負荷した後、アセトニトリル及びアンモニア水 (4 : 1) 混液を注入し、溶出液を 3 mL ずつ分取して両化合物の溶出状況を確認し

た。その結果、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 が完全に溶出するのに必要な溶媒量は、各々9 mL 及び 15 mL であった。MCX ミニカラムは SCX ミニカラムに比べて対象化合物に対する保持力が強かったため、溶出に必要な溶出溶媒中のアンモニア水の割合が高く、溶媒量も多かった。そのため、その後の溶媒除去操作には時間を要し、操作性が非常に悪かったことから、MCX ミニカラムによる精製は不採用とした。

②フルベンダゾールから代謝物 R35475 への変換

フルベンダゾールを投与した豚において、肝臓及び腎臓中に代謝物 R35475 が主要成分として残留したと報告されている。そのため、添加回収試験においてフルベンダゾールを試料に添加し、30 分間放置したときに、フルベンダゾールが代謝物 R35475 に変換する可能性が考えられたことから、以下の実験を行った。牛の肝臓 10 g にフルベンダゾールを代謝物 R35475 換算で 0.05 µg 相当量 (0.5 mg/L メタノール溶液を 123 µL) 添加し、30 分間放置した後、アセトン 50 mL (1 回目) 及び 25 mL (2 回目) を加えてホモジナイズし、吸引ろ過して得られた抽出液中の代謝物 R35475 を測定した。その結果、フルベンダゾールから代謝物 R35475 への変換は認められなかった。そこで、添加回収試験では、フルベンダゾール及び代謝物 R35475 を同時に添加し、各化合物の回収率を算出することとした。

まとめ

試料からフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を *n*-ヘキサン存在下アセトニトリル、メタノールまたはアセトンで抽出する方法を比較検討したところ、アセトンによる回収状況が最も良好であったことから、抽出溶媒はアセトンを採用した。

アセトン抽出液の精製について、SCX ミニカラム及び MCX ミニカラムを用いた精製を検討した。SCX ミニカラムでは、試料由来マトリックスによる測定値への影響はほとんど認められず、MCX ミニカラムに比べて操作性が優れていたため、SCX ミニカラムを採用した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵にフルベンダゾール及び代謝物 R35475 を添加し、開発した方法を用いて回収試験を行った結果、いずれの試料においても選択性は問題なく、フルベンダゾールでは真度 92~106%、併行精度は 2~5%、代謝物 R35475 では真度 89~102%、併行精度は 2~8% 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、フルベンダゾールでは 0.94~1.05、代謝物 R35475 では 0.96~1.04 であり、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 0.005 mg/kg を設定可能であることが確認された。

【結論】

フルベンダゾール試験法として、「フルベンダゾール及び代謝物 R35475 を試料からアセトンで抽出した後、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲル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、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の 5 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について”平成 28 年 4 月 25 日, <http://www.mhlw.go.jp/file/06->

Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000123322.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，飼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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “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，食安発 1224 第 1 号 (2010).

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

【フルベンダゾール】

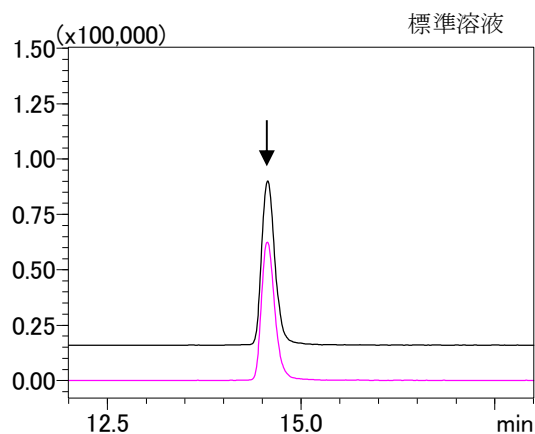
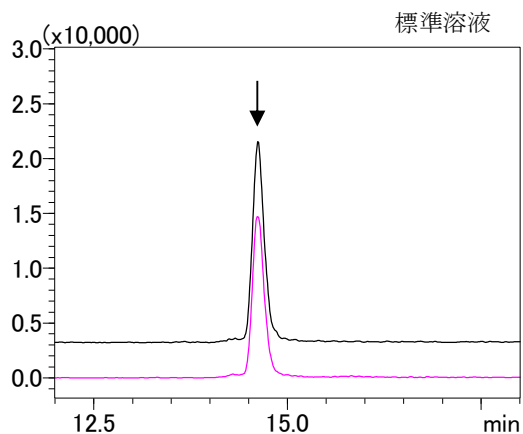
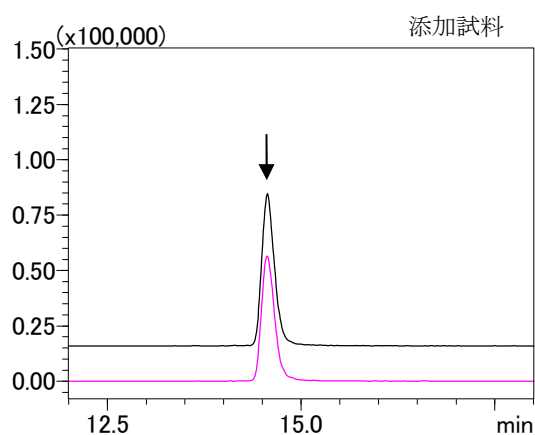
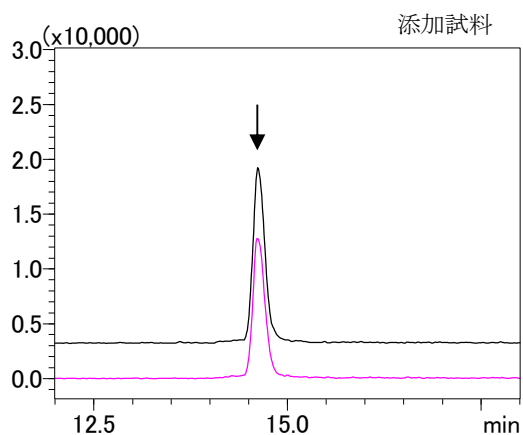
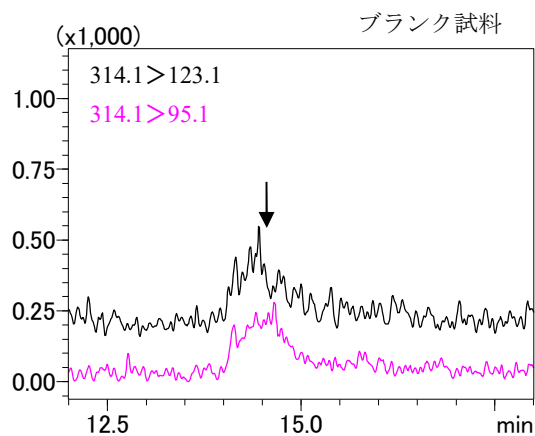
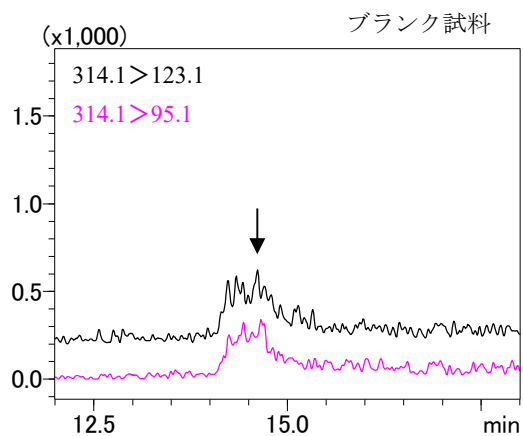


図 4-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.02 mg/kg)

【フルベンダゾール】

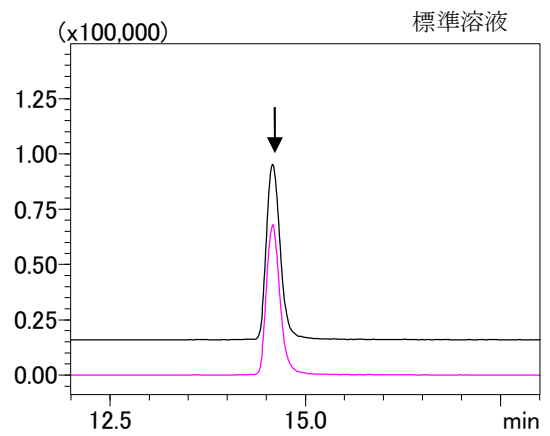
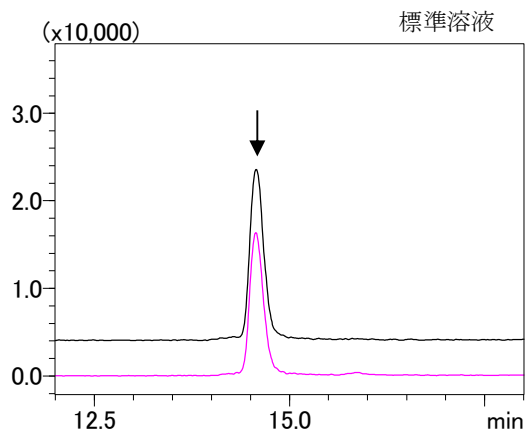
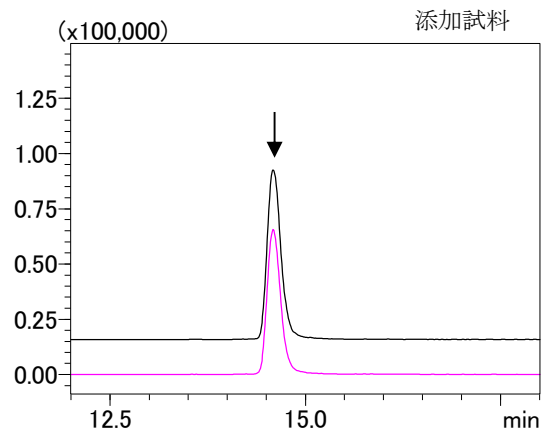
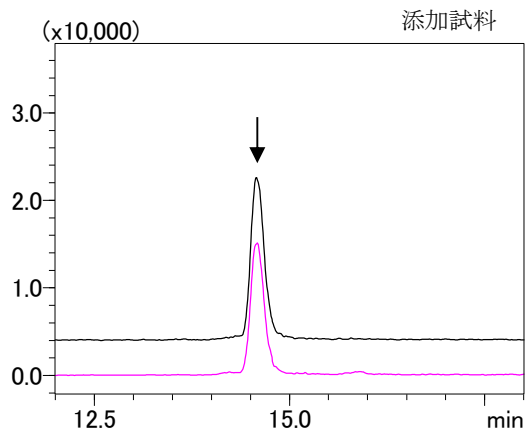
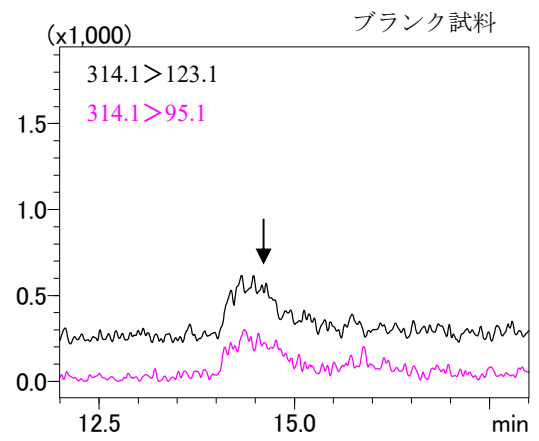
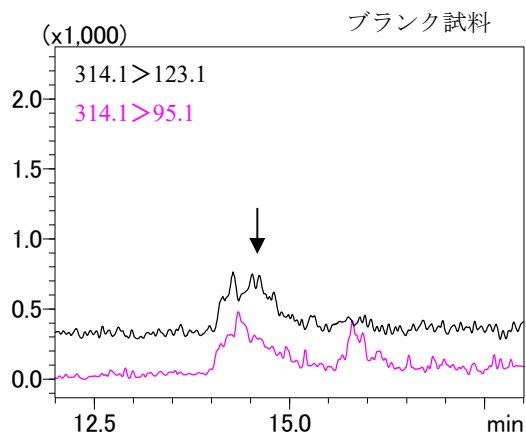


図 4-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

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

【フルベンダゾール】

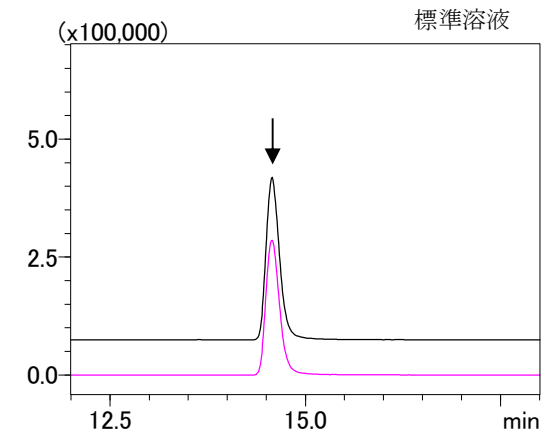
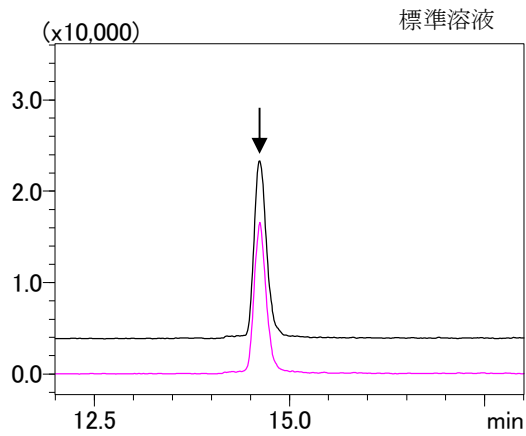
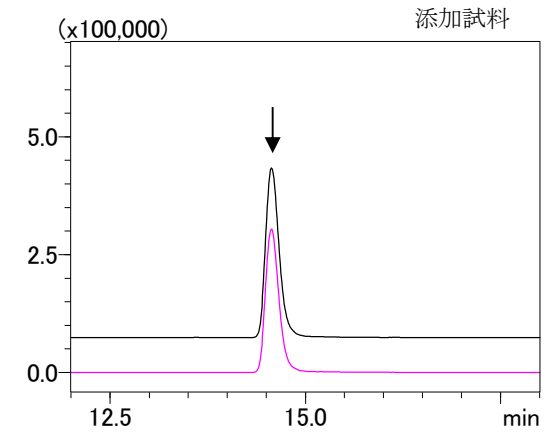
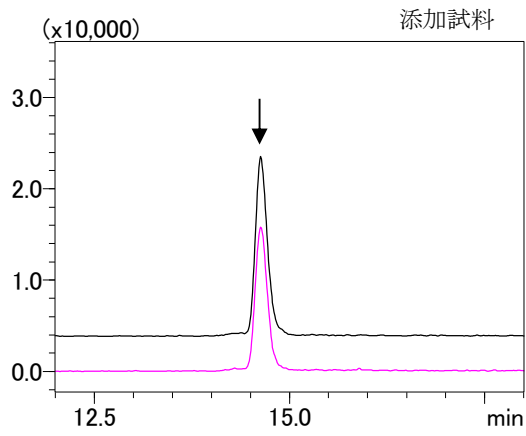
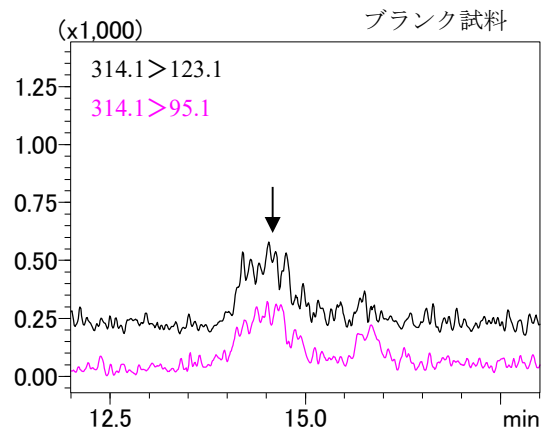
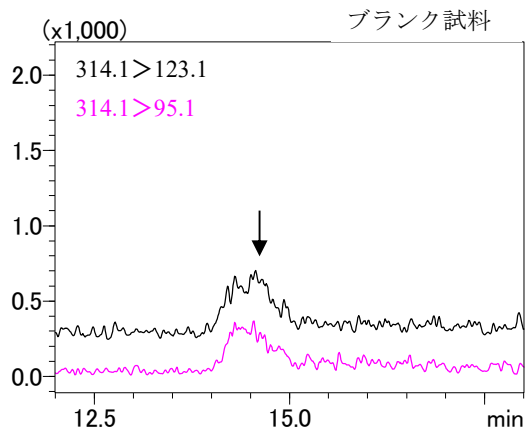


図 4-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

【フルベンダゾール】

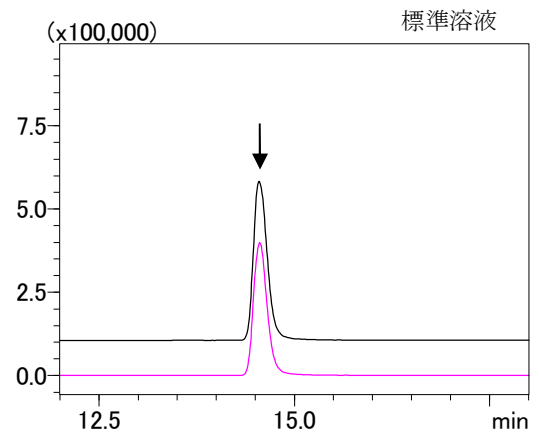
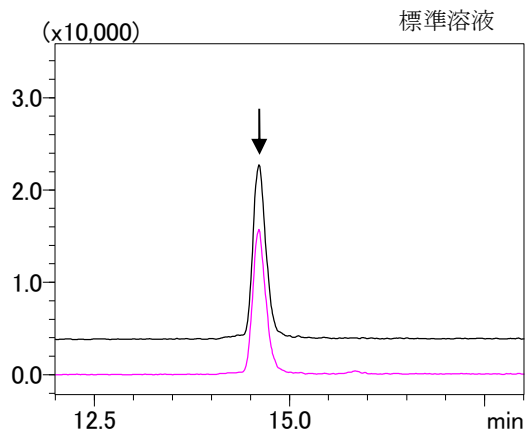
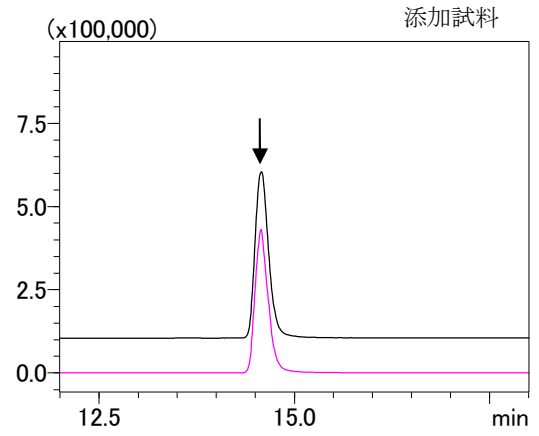
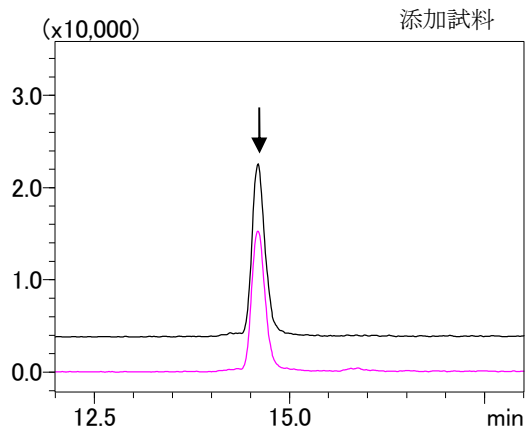
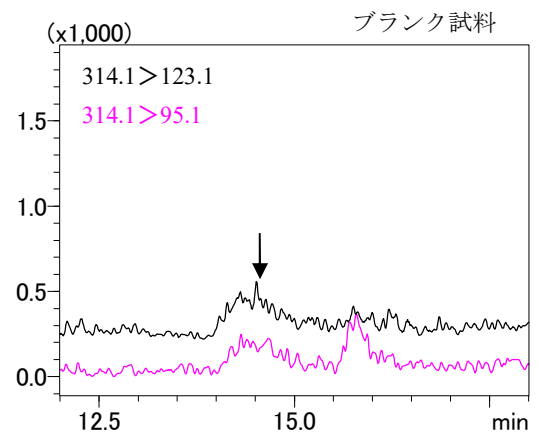
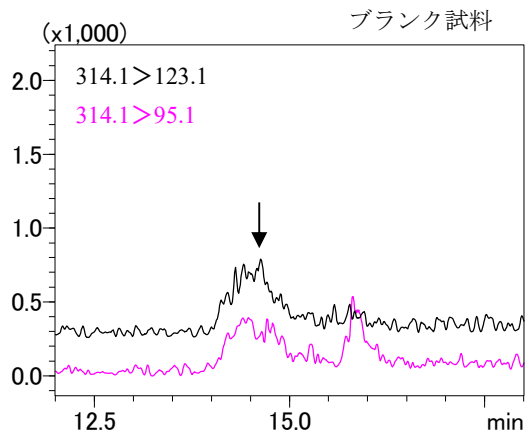


図 4-7 牛乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-8 牛乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.7 mg/kg)

【フルベンダゾール】

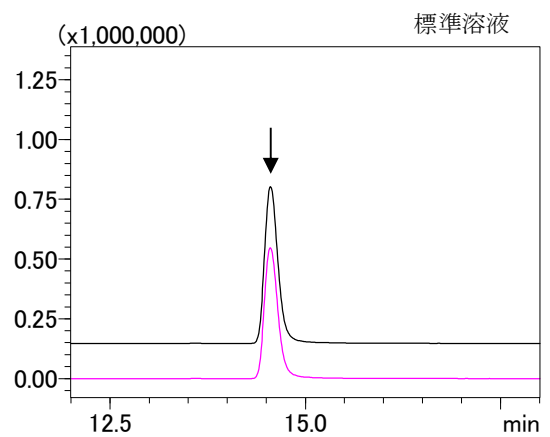
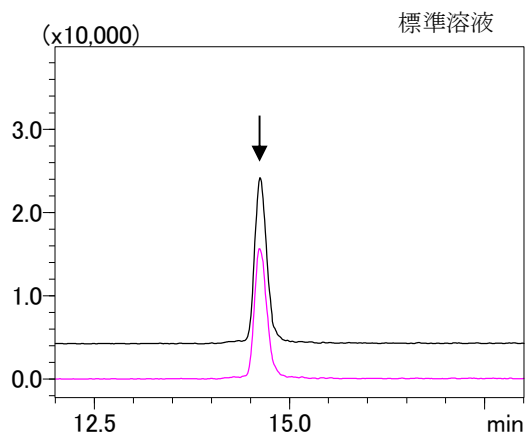
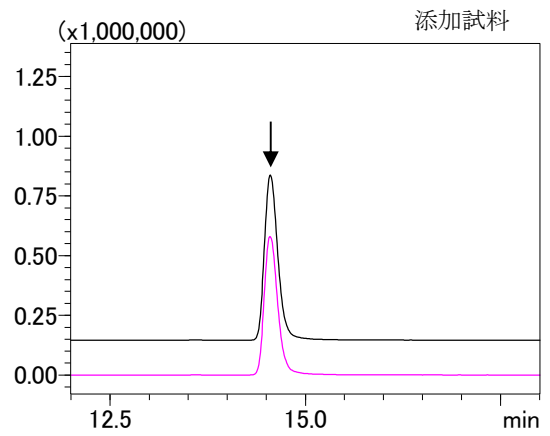
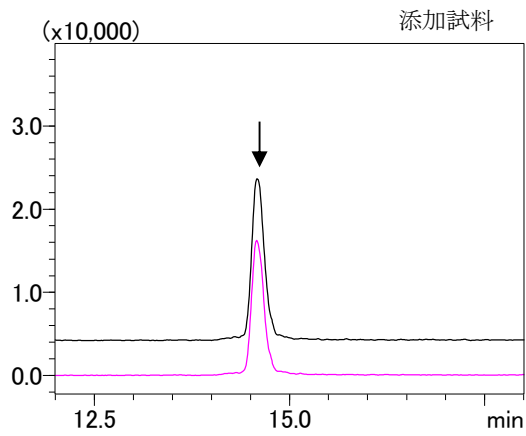
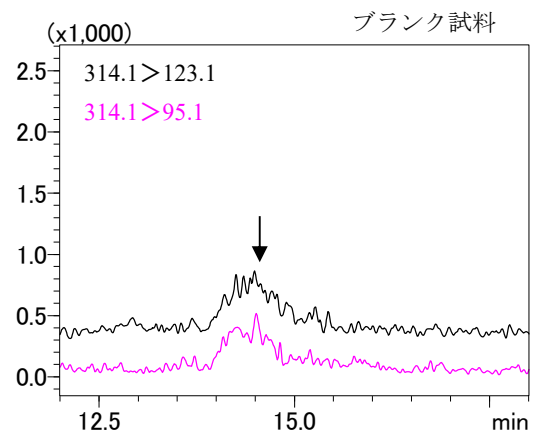
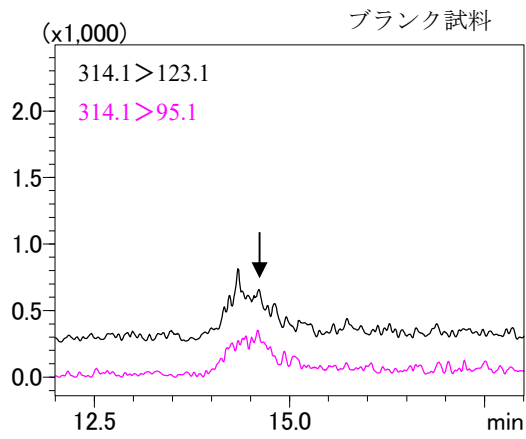


図 4-9 鶏卵の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-10 鶏卵の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.4 mg/kg)

【代謝物 R35475】

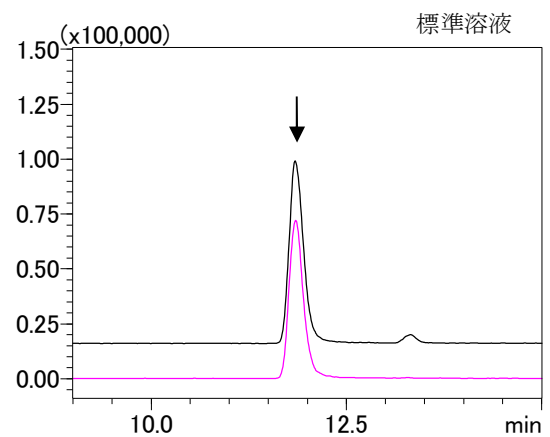
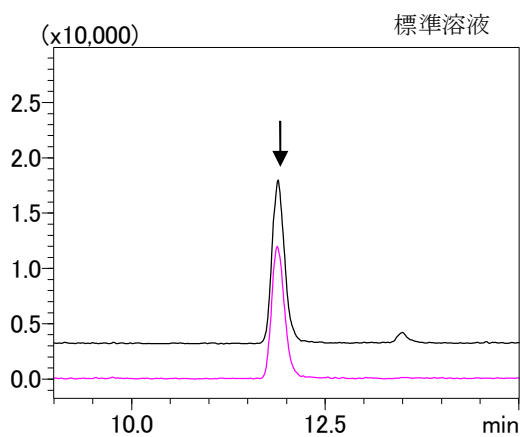
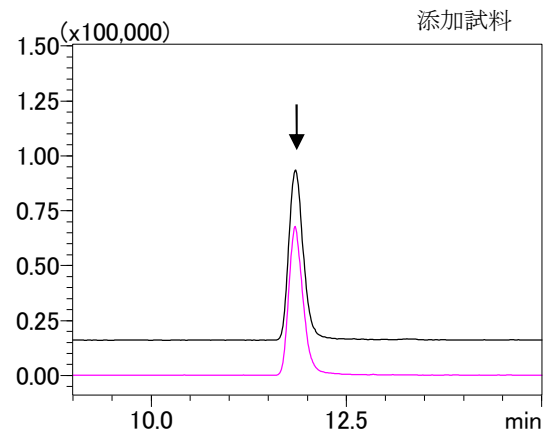
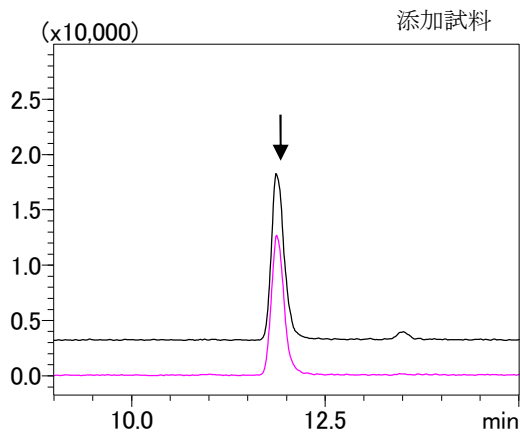
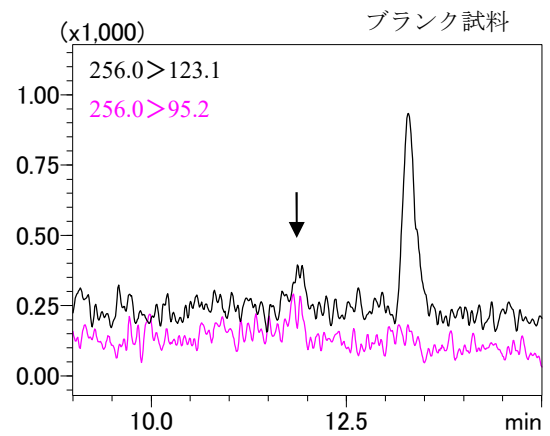
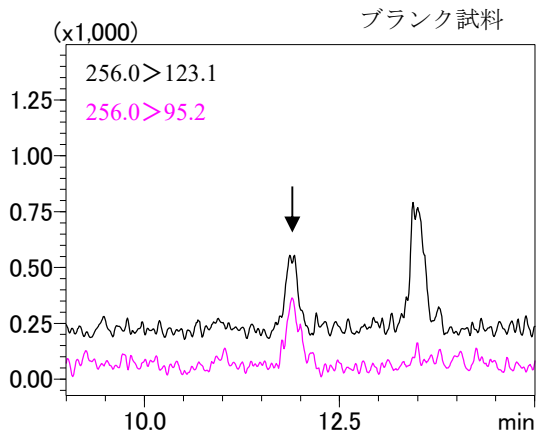


図 4-11 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-12 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.02 mg/kg)

【代謝物 R35475】

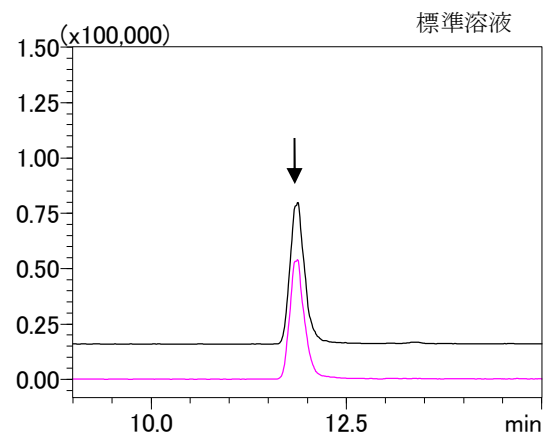
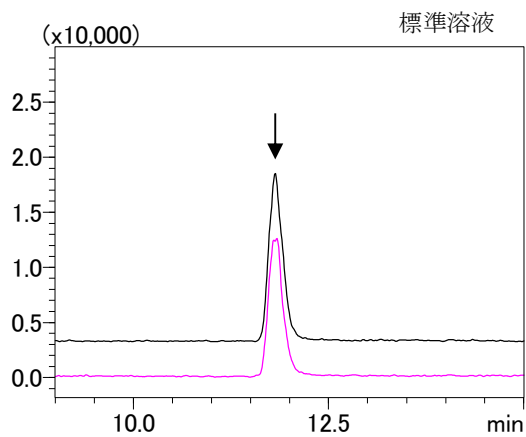
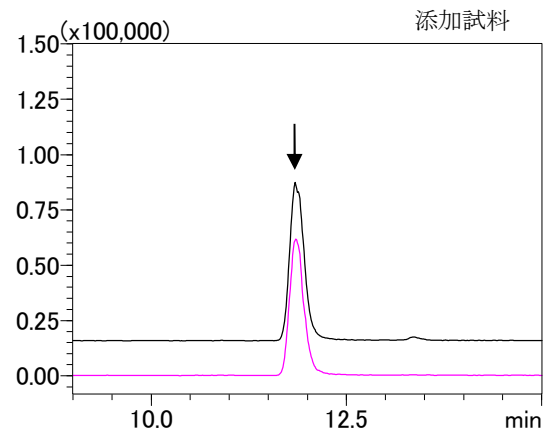
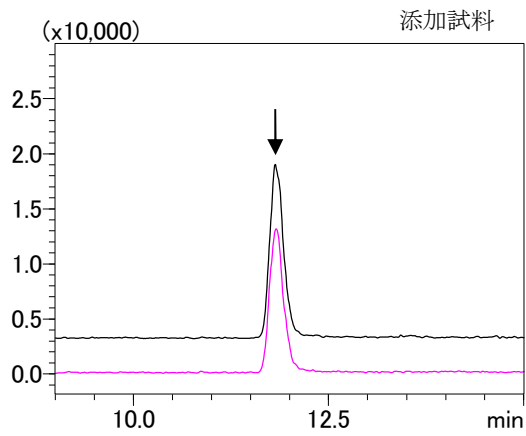
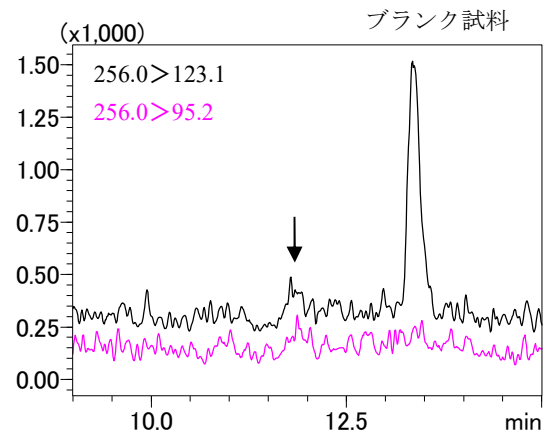
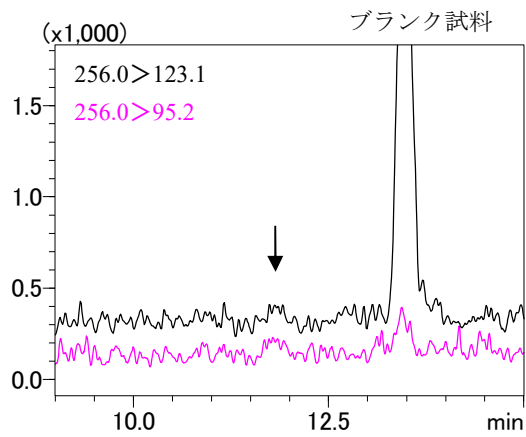


図 4-13 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-14 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.02 mg/kg)

【代謝物 R35475】

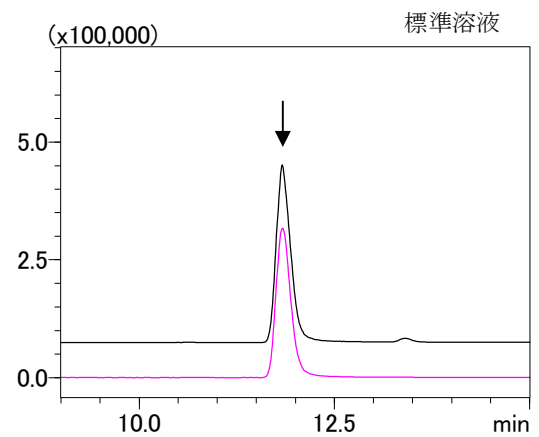
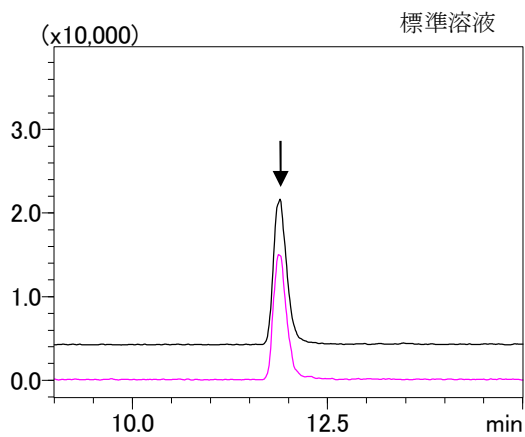
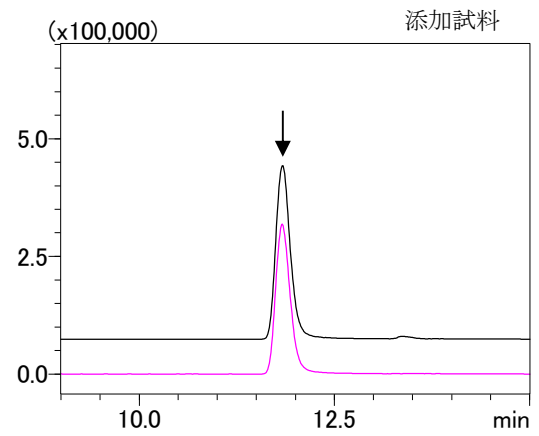
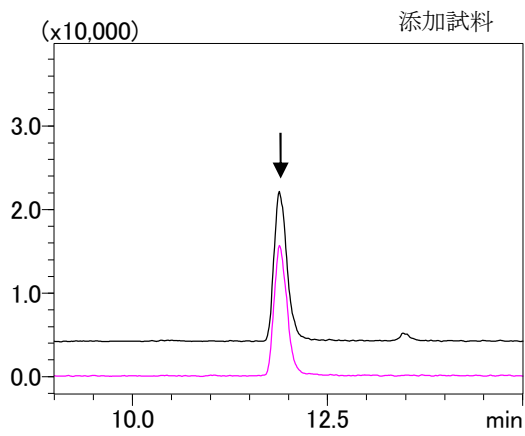
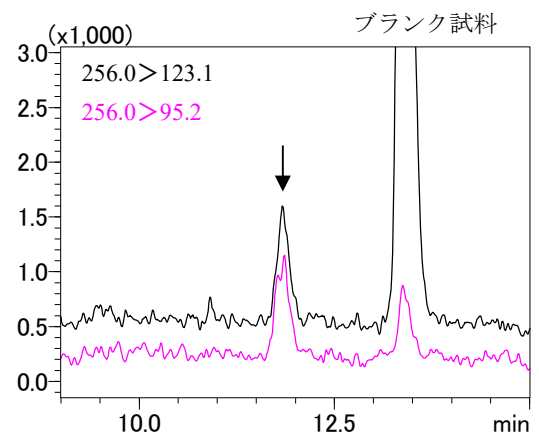
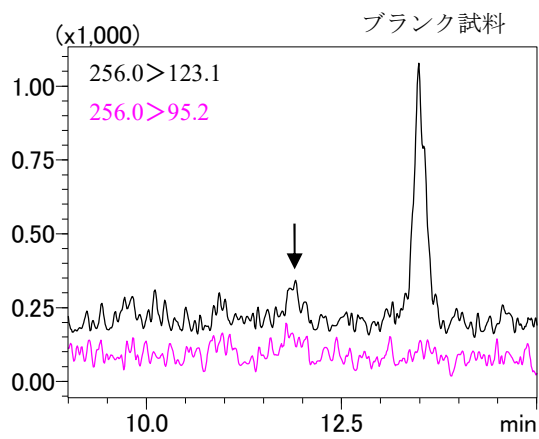


図 4-15 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-16 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

【代謝物 R35475】

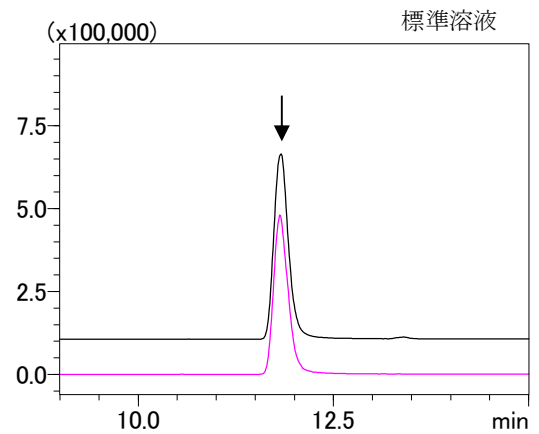
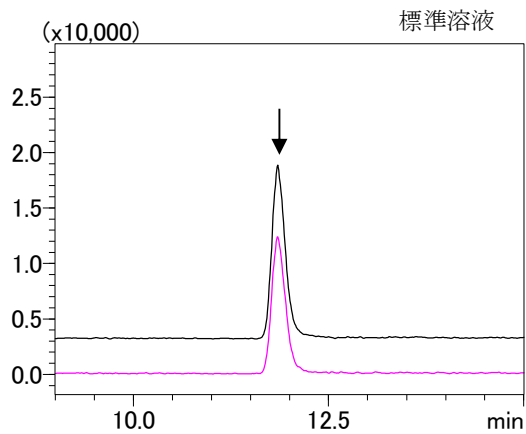
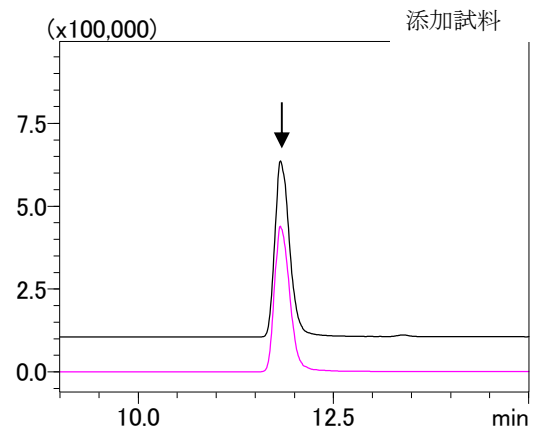
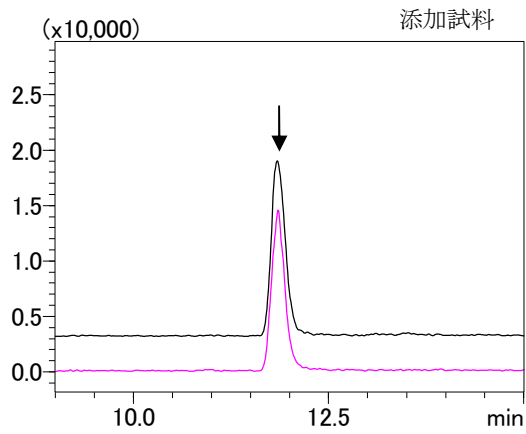
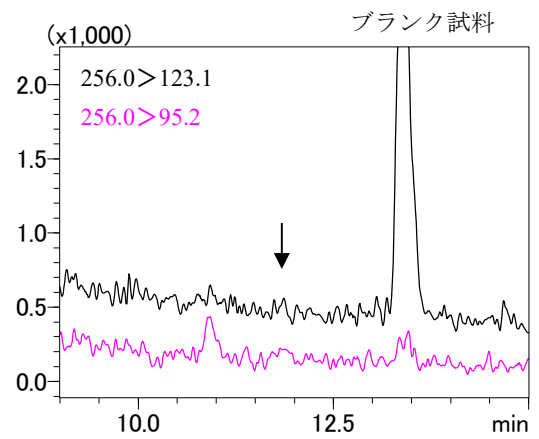
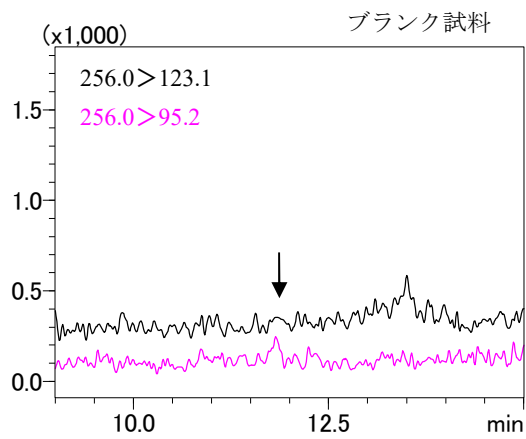


図 4-17 牛乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-18 牛乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.7 mg/kg)

【代謝物 R35475】

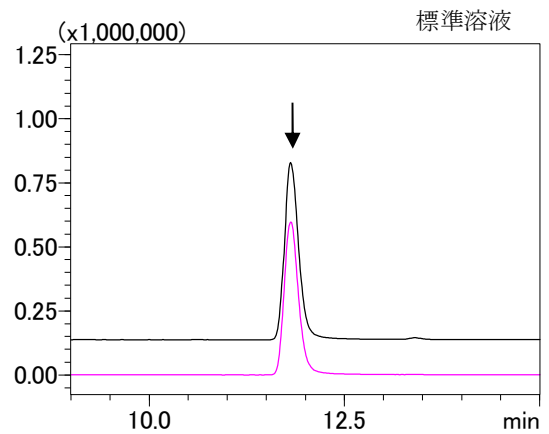
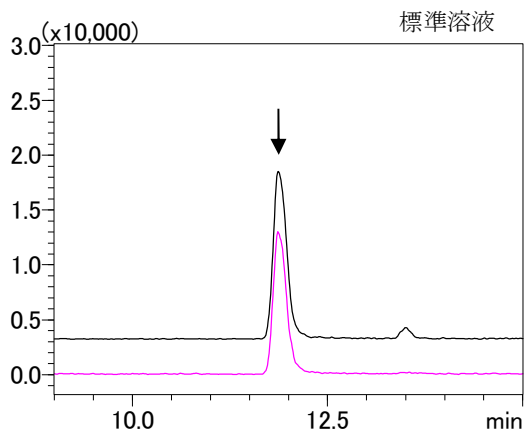
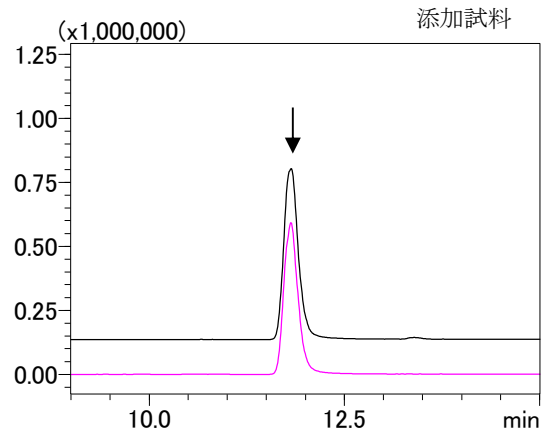
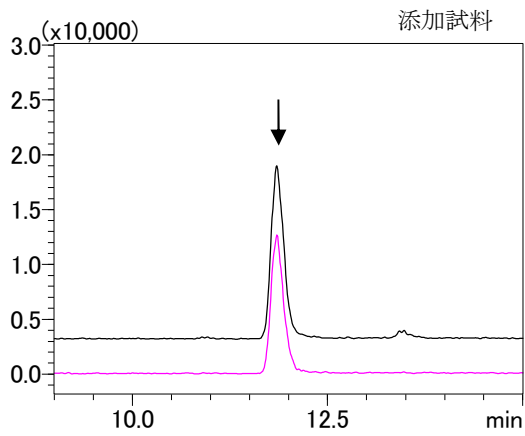
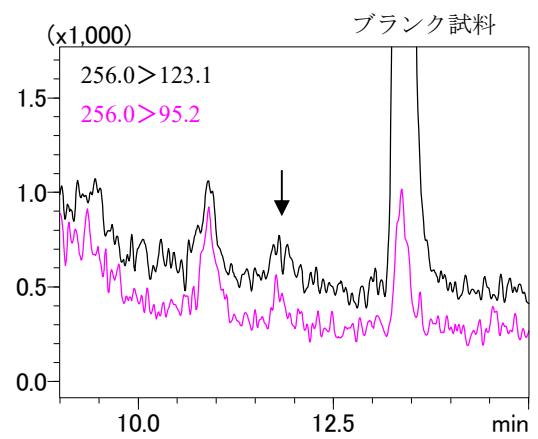
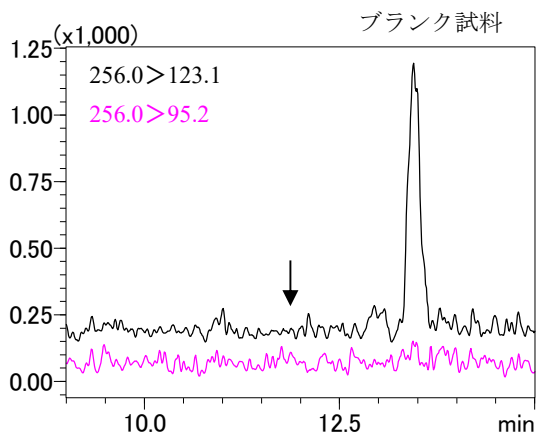


図 4-19 鶏卵の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-20 鶏卵の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.4 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

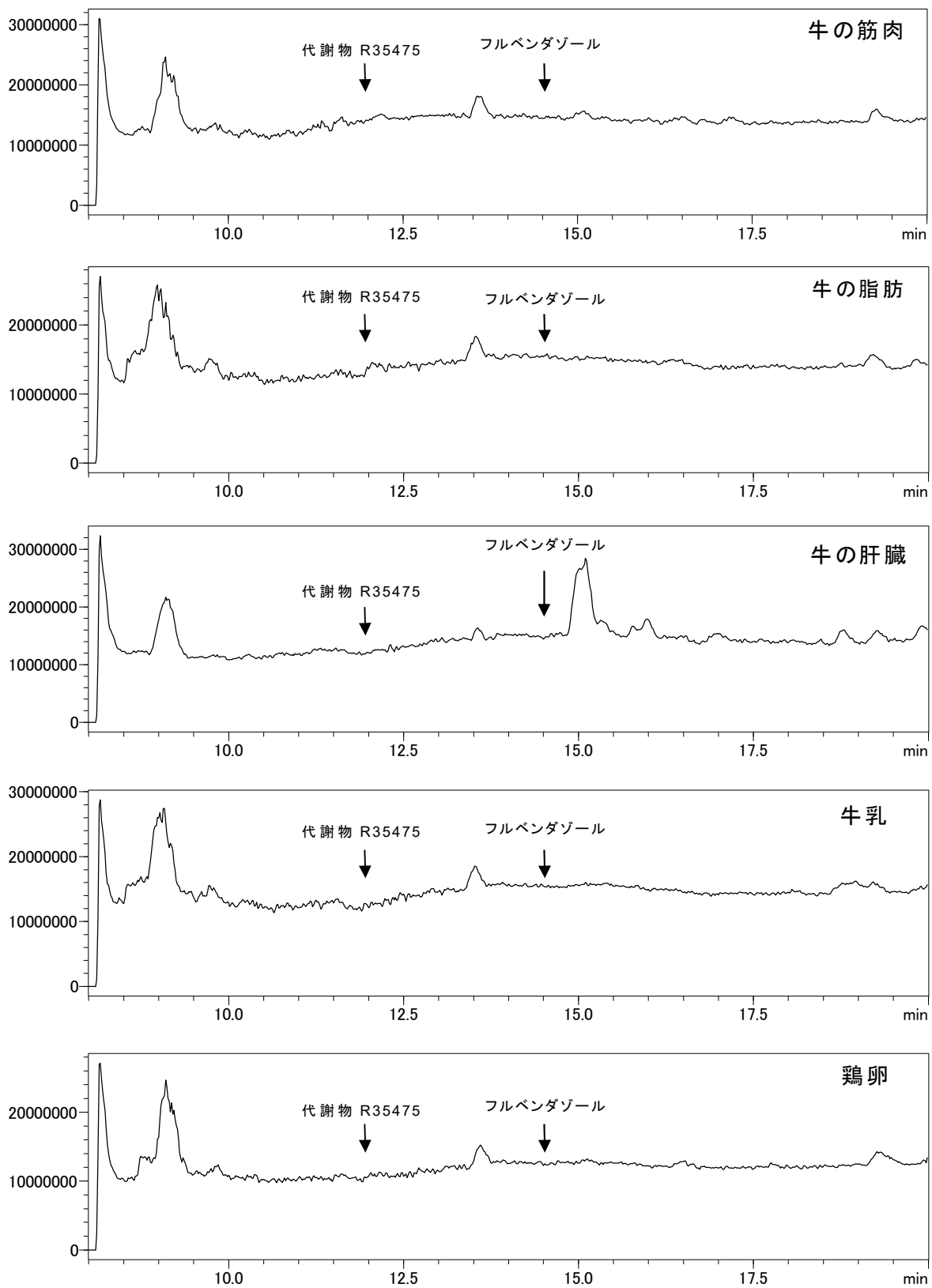


図 5 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~550 amu)