

※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ください。

残留農薬等に関するポジティブリスト制度
導入に係る分析法開発
(残留農薬等試験法開発 ベダプロフェン)

ベダプロフェン試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

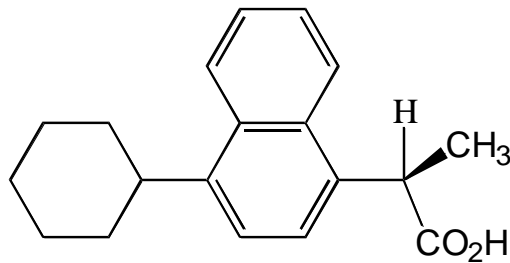
非ステロイド系消炎剤（動物用医薬品）であるベダプロフェン（vedaprofen）の畜水産物中の残留分析法の開発を行った。

1) 規制対象物質

ベダプロフェン

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



化学式：C₁₉H₂₂O₂

分子量：282.38

化学名（IUPAC）：2-(4-cyclohexylnaphthalen-1-yl)propanoic acid

外 観：白色～ほとんど白色の粉末である。

融点：148～152℃

2) 基準値（暫定）

0.02～1 ppm その他の陸棲哺乳類

その他の基準値はなし

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県内の業者から購入した。その他は大阪府内のスーパーマーケットにて購入した。

2) 試料の採取方法

①牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。

②牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。

③牛の肝臓は全体を細切均一化した。

- ④馬の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑤鶏卵は殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑦はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑧うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑨さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑩しじみは貝殻を除き、約5分間水切りを行った後細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

ベダプロフェン標準品：純度 99%、融点 148～152℃*）（社団法人 日本科学飼料協会配付品） *（参考）融点 150℃（Merck Index）

2) 試薬

アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、メタノール、塩酸、ギ酸、酢酸、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム（無水）（以上、試薬特級）
アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：ベダプロフェン標準品 10 mg を精密に量り、メタノールに溶解して 100 mL とし、標準原液（100 mg/L）を調製した。

検量線用標準溶液：ベダプロフェン標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.005～0.1 mg/L の濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：ベダプロフェン標準原液をメタノールで希釈し、1 及び 0.2 mg/L の濃度の標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

1 mol/L 塩酸

塩酸 9 mL に水を加えて 100 mL とした。

5 w/v% 塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 50 g に水 950 mL を加えて溶かし、水を加えて 1000 mL とした。

アセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液

アセトン 500 mL 及び *n*-ヘキサン 500 mL を混合した。

酢酸及びメタノール（1：99）混液

酢酸 1 mL 及びメタノール 99 mL を混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-4000Q トラップ	AB SCIEX
LC 装置	Prominence	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	XBridge C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、 粒子径 3.5 μm 会社：Waters																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：2.5 mmol/Lギ酸溶液 B液：アセトニトリル																				
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>15.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	40	60	15.0	40	60	15.01	20	80	20.00	20	80	20.01	40	60
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	40	60																			
15.0	40	60																			
15.01	20	80																			
20.00	20	80																			
20.01	40	60																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、SRM（選択反応モニタリング）																				
イオン化モード	ESI（－）																				
キャピラリー電圧 (V)	－4500																				
脱溶媒温度 (°C)	450																				
脱溶媒ガス	窒素 80 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (<i>m/z</i>)	281→237 [コーン電圧：－60(V)、コリジョンエネルギー：－12(eV)]																				
定性イオン (<i>m/z</i>)	237→235 [コーン電圧：－91(V)、コリジョンエネルギー：－22(eV)]																				
保持時間 (min)	11.1																				

5. 定量

ベダプロフェン標準品をメタノールに溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この溶液をメタノールで希釈し、0.005、0.01、0.02、0.05 及び 0.1 mg/L の濃度の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積と作成した検量線

からベダプロフェンの量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用標準溶液を使用した。

馬の筋肉（添加濃度：0.05 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉・牛の脂肪・牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（そば蜜）（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

ベダプロフェンは、カルボキシル基を有することから、塩酸酸性下でアセトン抽出し、酢酸エチルに転溶後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

a 馬の筋肉、牛の筋肉・脂肪・肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳及び鶏卵の場合

試料 10.0 g を量り採り、アセトン 100 mL 及び 1 mol/L 塩酸 1 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離を行い、上澄液を綿栓ろ過した。遠心管内の残留物にアセトン 50 mL を加えて振とう機で 5 分間激しく振り混ぜた後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離を行い、綿栓ろ過した。得られたろ液を合わせて 40°C 以下で約 15 mL まで濃縮した。これに 5 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回 5 分間振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 20 mL^{*1} に溶かした。

b はちみつの場合

試料 10.0 g を量り採り、水 10 mL を加えて溶かした後、アセトン 100 mL 及び 1 mol/L 塩酸 1 mL を加え、10 分間振とうした後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離を行い、上澄液を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えて振とう機で 5 分間激しく振り混ぜた後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離を行い、綿栓ろ過した。得られたろ液を合わせて 40°C 以下で約 15 mL まで濃縮した。これに 5 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回 5 分間振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 20 mL に溶かした。

2) 精製

Bond Elut DEA カートリッジ (500 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL、アセトン 10 mL 及びメタノール 5 mL を順次注入し、流出

液は捨てた。次いで酢酸及びメタノール（1：99）混液 5 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶解し、正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

*1 脂肪分が多いものは 10 mL では粘性が高く、精製操作でカラムを通過しにくいいため 20 mL とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g（はちみつの場合は水 10 mL を加えて溶解）

抽 出

- | アセトン 100 mL、1 mol/L 塩酸 1 mL を加え、ホモジナイズ
- | 遠心分離（3,500 rpm、5 分間）
- | 上澄み液を綿栓ろ過する
- | 残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機で 5 分間激しく振り混ぜる
- | 遠心分離（3,500 rpm、5 分間）
- | 上澄み液を綿栓ろ過し、先のろ液と合わせる
- | ろ液を約 15 mL まで減圧濃縮

転 溶

- | 5 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL を加え、
- | 振とう機で 5 分間激しく振り混ぜる
- | 酢酸エチル層を採取し、水層に再度酢酸エチル 50 mL を加え、
- | 振とう機で 5 分間激しく振り混ぜる
- | 酢酸エチル層を採取し、先の酢酸エチル層と合わせ、
- | 無水硫酸ナトリウムで脱水・ろ過し、ろ液を減圧濃縮
- ↓ 残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 20 mL に溶かす

弱塩基性陰イオン交換体ミニカラム精製

- | 抽出で得られた溶液を Bond Elut DEA カートリッジ（500 mg）
- | [アセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL で洗浄済] に注入
- | アセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL、アセトン 10 mL、
- | メタノール 5 mL で順次洗浄
- | 酢酸及びメタノール（1：99）混液 5 mL で溶出
- ↓ 溶出液をで減圧濃縮

LC-MS/MS 定量

残留物をメタノールに溶解し、正確に 10 mL としたものを試験溶液とする

[結果及び考察]

1) 測定条件の検討

① MS 条件の検討

ベダプロフェンは、ESI のネガティブモードにおいて脱プロトン化分子である m/z 281 とカルボキシル基が脱落した m/z 237 が観察された。これらのイオンをプレカーサーイオンとして、プロダクトイオンを確認したところ、 m/z 281 からは m/z 237 が、 m/z 237 からは m/z 235 が観察された。これらの結果から、より高感度な m/z 281 \rightarrow 237 を定量用イオン、 m/z 237 \rightarrow 235 を定性用イオンとした。



図1 ベダプロフェンのマススペクトル

スキャン範囲：235~283 m/z 、測定条件：ESI (-)、コーン電圧：-60 V

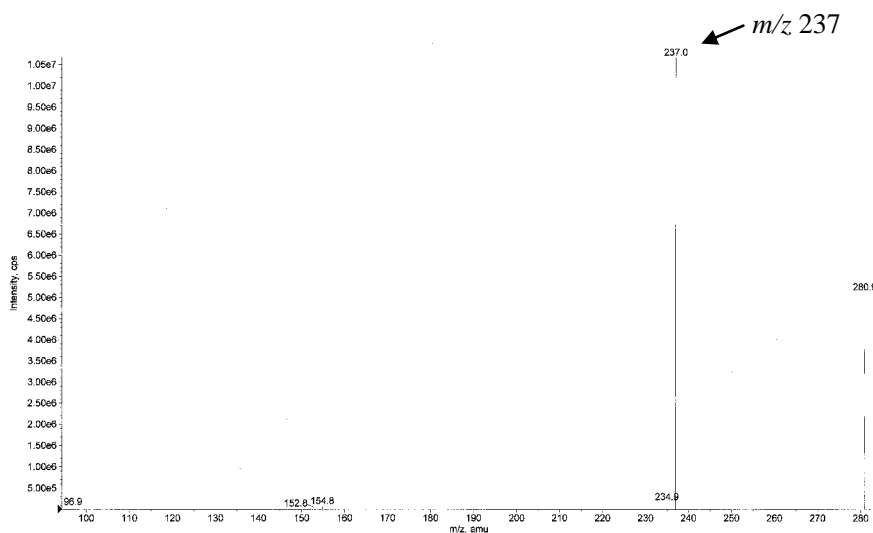


図2 ベダプロフェンのプリカーサーイオン m/z 281 の
プロダクトイオンスペクトル (定量用)

測定条件：ESI(-)、コーン電圧：-60 V、コリジョンエネルギー：-12 eV

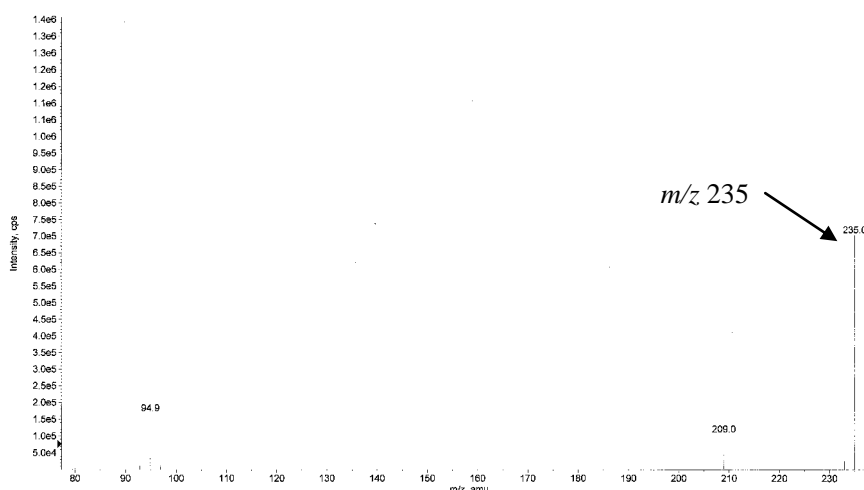


図3 ベダプロフェンのプリカーサーイオン m/z 237 の
プロダクトイオンスペクトル (定性用)

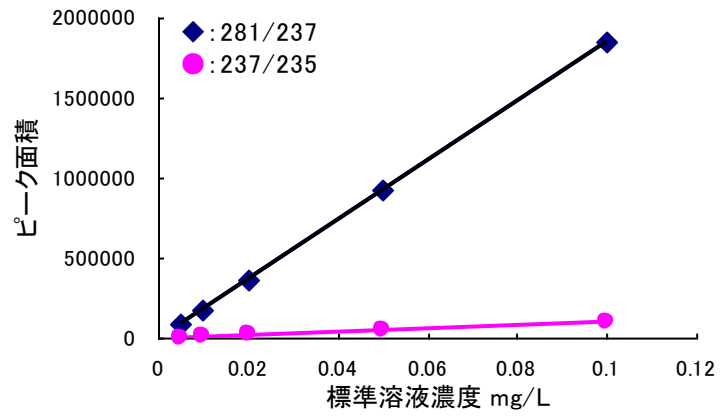
測定条件：ESI(-)、コーン電圧：-91 V、コリジョンエネルギー：-22 eV

② 移動相条件の検討

ベダプロフェンはカルボキシル基を有することから、ODS カラムに保持させる場合、移動相を酸性にする必要があると考えられた。一方で、SRM での測定はネガティブモードで行うことから、酸が強すぎると感度の低下を誘発する可能性がある。そこで、酢酸及びギ酸を用いて、各種濃度について検討したところ、2.5 mmol/L ギ酸溶液とアセトニトリルの混液を用い、アイソクラティックで溶出した場合、ピーク形状、感度とも良好であった。

なお、ギ酸濃度について、25 mmol/L と 2.5 mmol/L で比較したところ、2.5 mmol/L のほうが感度が良かったことから、ギ酸濃度は 2.5 mmol/L (およそ 0.01 vol%) を採用した。また、グラジエント溶出をした場合にはイオン化阻害等の影響を受けやすかったことから、アイソクラティック溶出を採用した。ベダプロフェン溶出後は、試料中の夾雑成分の影響を軽減するために、アセトニトリル濃度の高い移動相条件 (2.5 mmol/L ギ酸及びアセトニトリル (1 : 4) 混液) でカラムを洗浄した。

検量線例を図 4 に、標準溶液のクロマトグラム例を図 5 に示した。検量線は 0.005~0.1 mg/L (0.025~0.5 ng) の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示した。



m/z	281→237	237→235
傾き (b)	18533901.29	1003966.34
切片 (a)	-6511.34790	435.04531
相関係数	0.99999	0.99997

図4 検量線の例

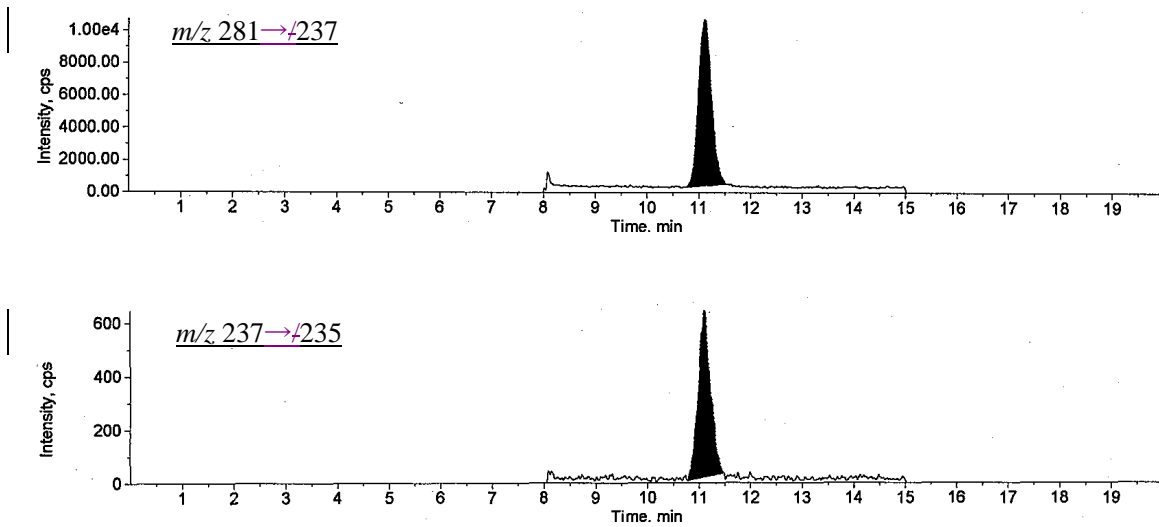


図5 標準溶液のSRMクロマトグラム (0.01 mg/L)

③ 試験溶液の溶解溶媒について

試験溶液の溶解溶媒については、移動相に用いたアセトニトリルでは、最終検液で溶け残るものがあった。メタノールでは、きれいに溶解したため試験溶液の溶解溶媒にはメタノールを用いることにした。試験溶液の溶解溶媒と合わせるために、標準溶液もメタノールで調製した。なお、溶解溶媒にメタノールを用いても、ピーク形状、検量線の相関係数、切片範囲には問題は見られなかった。

2) 抽出方法について

抽出は抽出溶媒として一般的に使用されるアセトンを選択した。なお、ベダプロフェンは構造にカルボキシル基を有していたため、抽出効率を上げる目的で塩酸を添加しての抽出とした。

3) 溶媒転溶の基礎検討

5 w/v%塩化ナトリウム溶液から *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルへの転溶について確認した。すなわち、標準溶液 1 µg 相当を濃縮乾固した後、1 mol/L 塩酸 1 mL、5 w/v%塩化ナトリウム 100 mL 及び *n*-ヘキサン又は酢酸エチル 100 mL を加えて振とうし、溶媒層を分取した。水層に再度 *n*-ヘキサン又は酢酸エチル 50 mL を加えて振とうし、溶媒層を分取しそれぞれ濃縮乾固し、残留物を再溶解して測定した。

その結果、表 1 に示したように、ベダプロフェンは酢酸エチルへの転溶が可能であった。

表 1 溶媒転溶の検討結果

転溶溶媒		回収率 (%)		平均回収率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	1 回目	0	0	0
	2 回目	0	0	0
	合計	0	0	0
酢酸エチル	1 回目	98	97	98
	2 回目	4	4	4
	合計	102	101	102

4) 固相抽出の基礎検討

溶媒転溶の検討結果から、ベダプロフェンは *n*-ヘキサン層へは移行していなかったため、脱脂操作としてアセトニトリル/ヘキサン分配が可能であるかを、うなぎを用いて検討した。その結果、マトリックスの影響で *n*-ヘキサン層に移行することが判明した。この傾向は、マトリックスに依存する可能性があるため、固相抽出による精製について検討することとした。

ベダプロフェンはカルボキシル基を有していることから、陰イオン交換カラムを選択した。カラムは、Bond Elut SAX (500 mg)、Bond Elut PSA (500 mg) 及び Bond Elut DEA (500 mg) を用い、以下の条件で検討した。

n-ヘキサン及びアセトンの混液（1：1）10 mL でコンディショニング後、標準溶液 0.1 mg/L *n*-ヘキサン及びアセトンの混液（1：1）溶液 20 mL を負荷し、*n*-ヘキサン及びアセトンの混液（1：1）10 mL、アセトン 10 mL、メタノール 5 mL、酢酸及びメタノールの混液（1：99）5 mL、トリフルオロ酢酸（TFA）及びメタノールの混液（1：99）5 mL、塩酸及びメタノールの混液（1：99）5 mL を順次流し、溶出フラクションを確認した。

表 2 各陰イオン交換カラムの基礎検討結果（%）

溶出フラクション	SAX	PSA	DEA
流出液 10 mL	34	0	0
ヘキサン及びアセトン（1:1）10 mL	58	0	0
アセトン 10 mL	0	0	0
メタノール 5 mL	0	0	0
酢酸及びメタノール（1:99）5 mL	0	95	106
TFA 及びメタノール（1:99）5 mL	0	0	0
塩酸及びメタノール（1:99）5 mL	0	0	0

Bond Elut SAX では十分な保持が得られなかったため、採用しなかった。Bond Elut PSA 及び Bond Elut DEA では酢酸及びメタノール（1:99）5 mL で溶出が可能であったが Bond Elut PSA ではわずかながら TFA 及びメタノール（1：99）5 mL の画分にピークが認められたため、本検討では Bond Elut DEA（500 mg）を採用し、精製は、抽出で得られた溶液をカラムに注入後、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL、アセトン 10 mL 及びメタノール 5 mL でカラムを洗浄し、酢酸及びメタノール（1：99）混液 5 mL で溶出する操作とした。

5) 添加回収試験

馬の筋肉、牛の筋肉・脂肪・肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（そば蜜）の計 10 試料を用い、添加回収試験を実施した。それぞれ試行数は 5 とした。添加濃度は馬の筋肉については基準値相当濃度（0.05 ppm）、その他については一律基準（＝定量限界）相当濃度（0.01 ppm）とした。また、馬の筋肉については、試行数 2 で定量限界相当量についても実施した。

添加回収試験の結果を表 3 に、試料の SRM クロマトグラムの例を図 6-1～6-10 に示した。いずれも真度 70～120%以内、併行精度（RSD%）は 2%以下の良好な結果であった。

表3 添加回収試験の結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
馬の筋肉	0.05	77	78	78	76	77	77	1.2
	0.01	78	81	—	—	—	79	—
牛の筋肉	0.01	76	77	74	74	75	75	1.8
牛の脂肪	0.01	93	91	92	91	92	92	1.1
牛の肝臓	0.01	84	84	87	87	86	86	1.7
さけ	0.01	71	71	73	73	72	72	1.5
うなぎ	0.01	80	77	78	80	79	79	1.5
しじみ	0.01	75	74	75	73	73	74	1.5
牛乳	0.01	91	94	95	93	95	94	2.0
鶏卵	0.01	76	76	75	74	74	75	1.4
はちみつ (そば蜜)	0.01	94	94	95	94	91	94	1.5

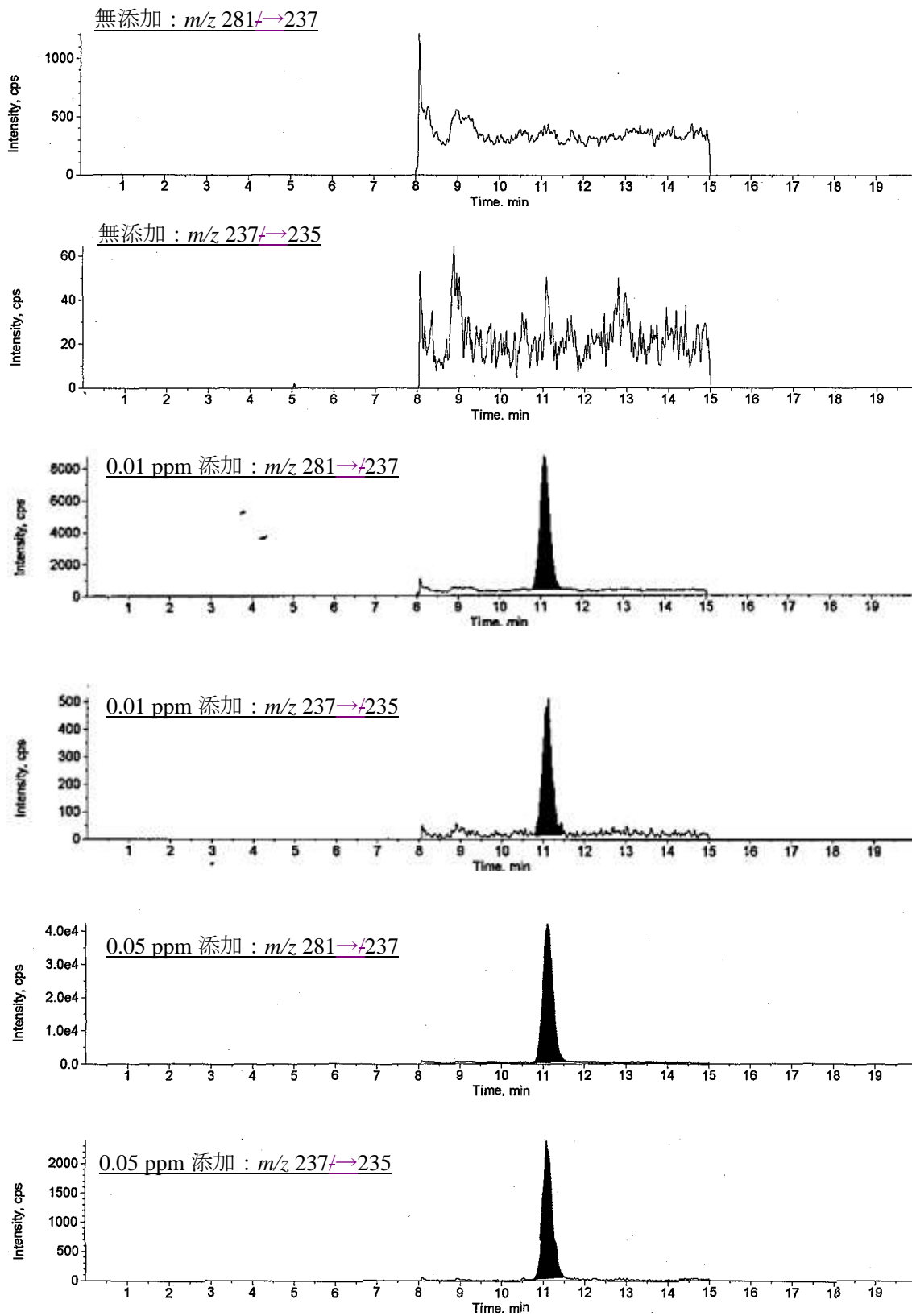


図 6-1 試料（馬筋肉）の SRM クロマトグラム の例

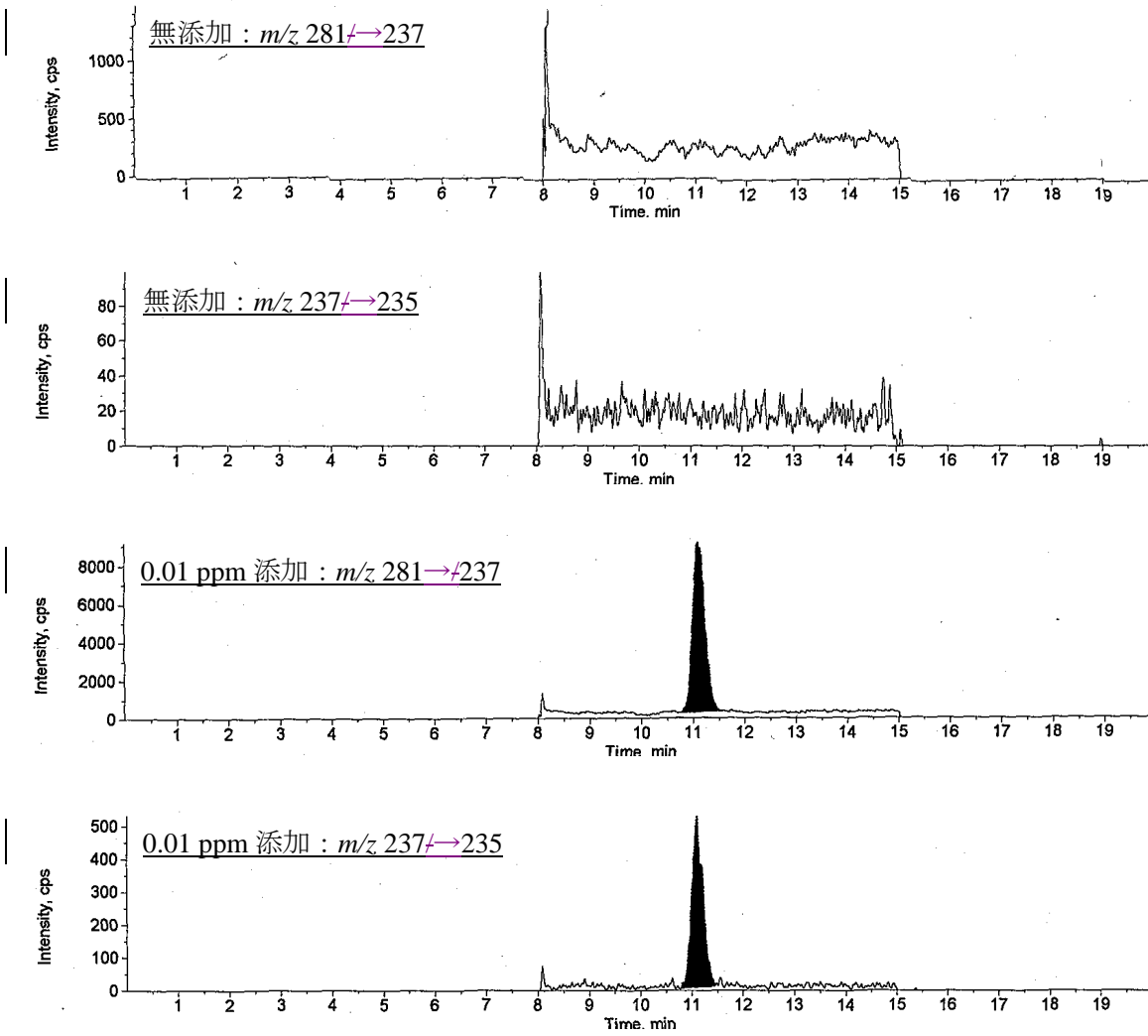


図 6-2 試料（牛筋肉）の SRM クロマトグラム の例

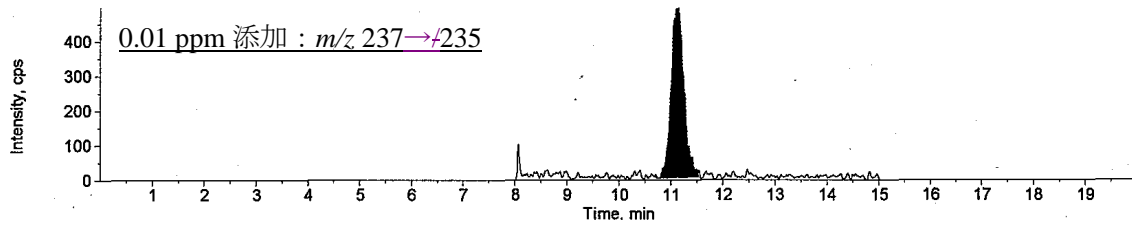
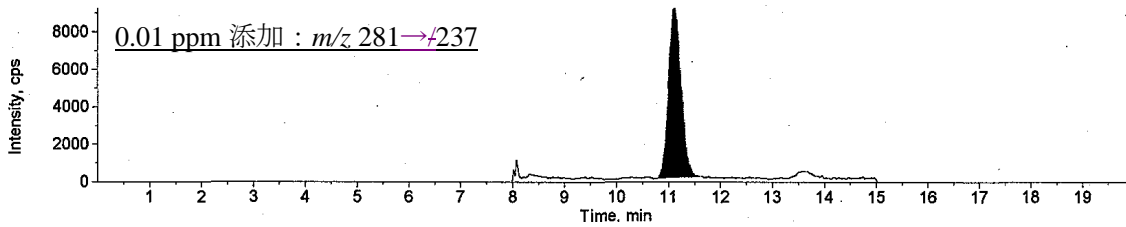
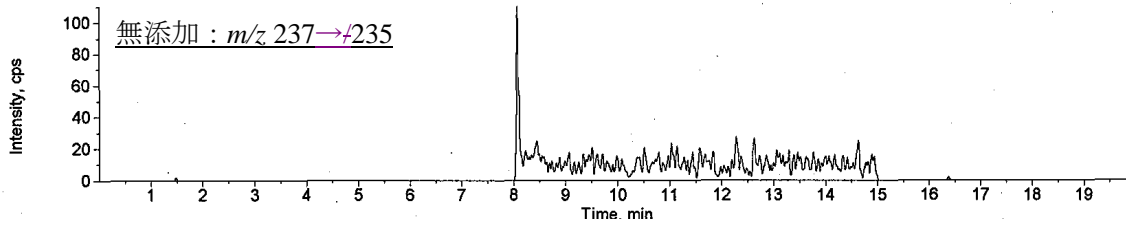
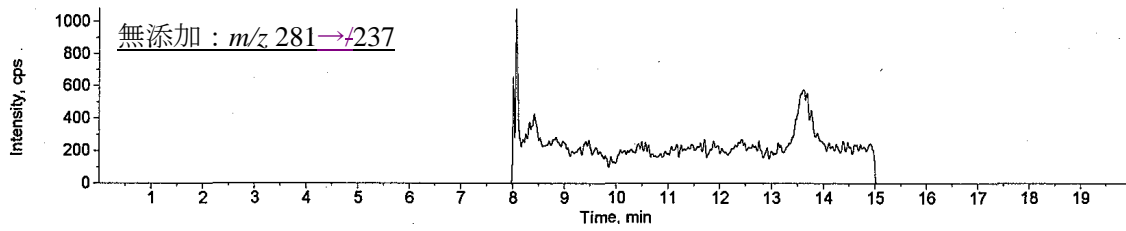


図 6-3 試料 (牛脂肪) の SRM クロマトグラムの例

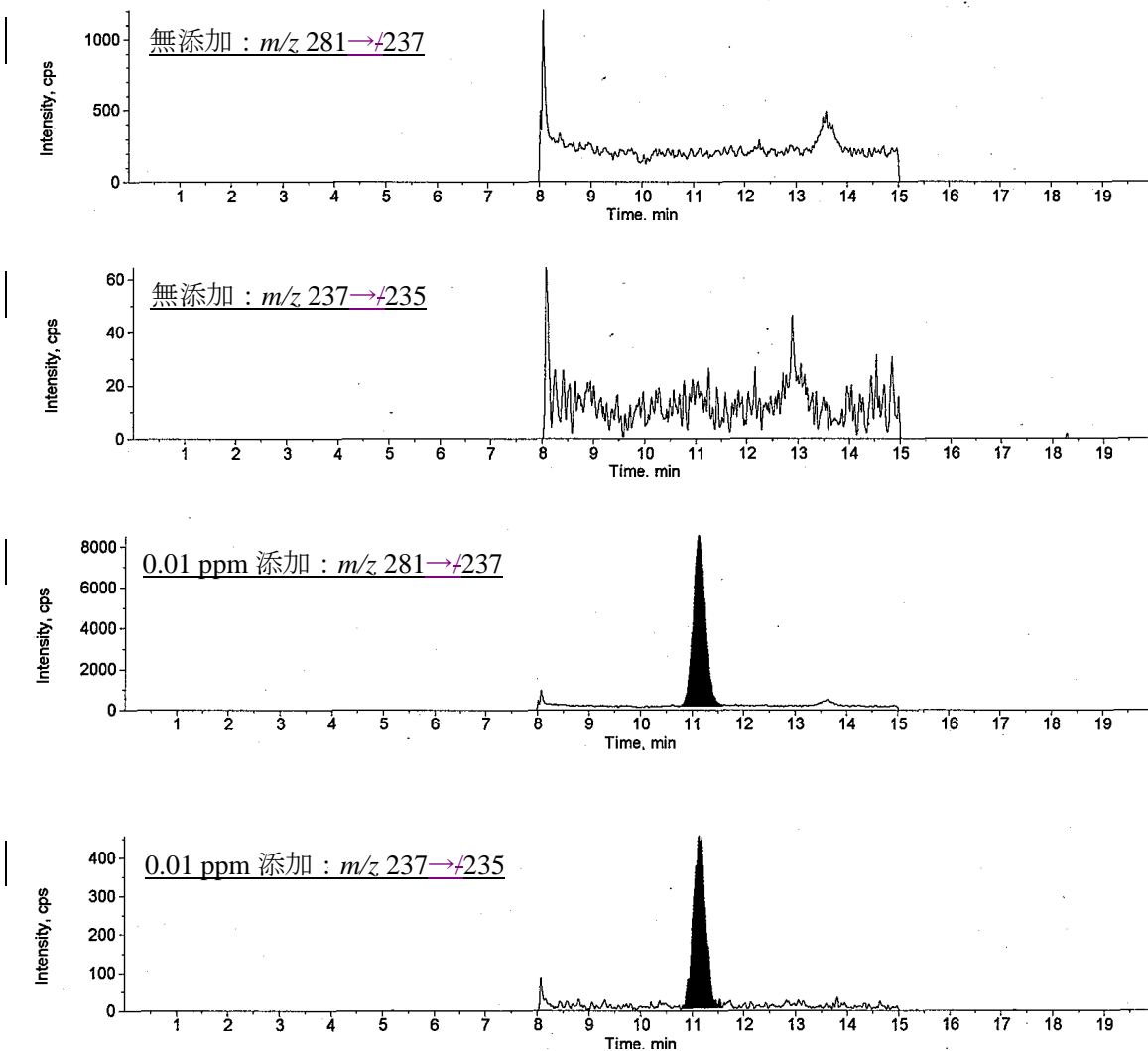


図 6-4 試料 (牛肝臓) の SRM クロマトグラムの例

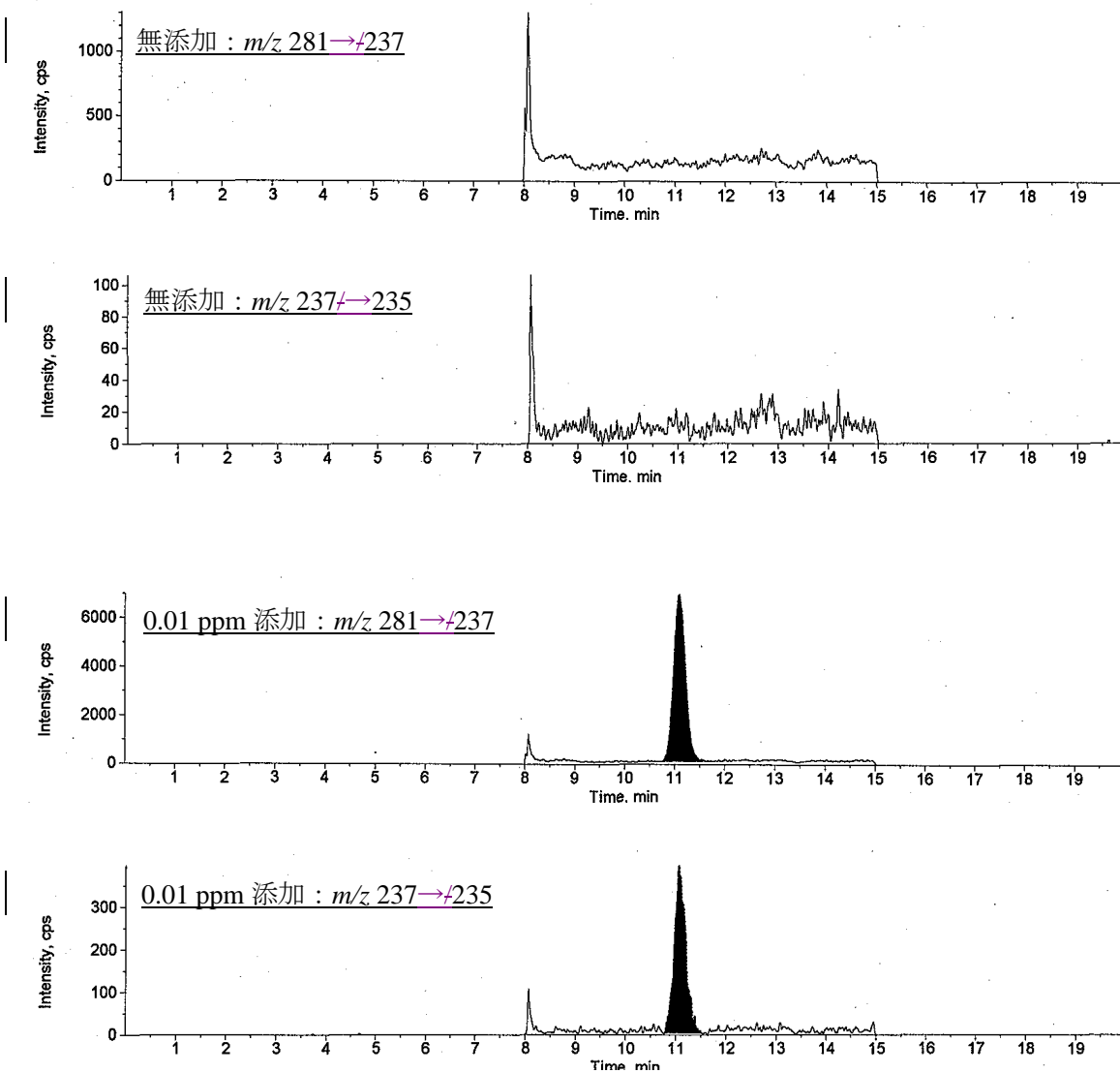


図 6-5 試料 (さけ) の SRM クロマトグラム の例

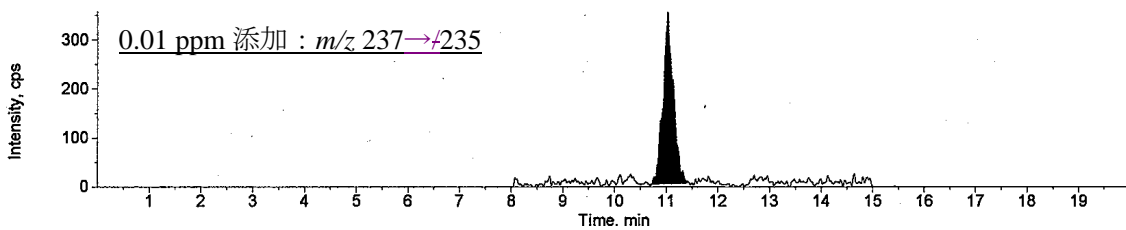
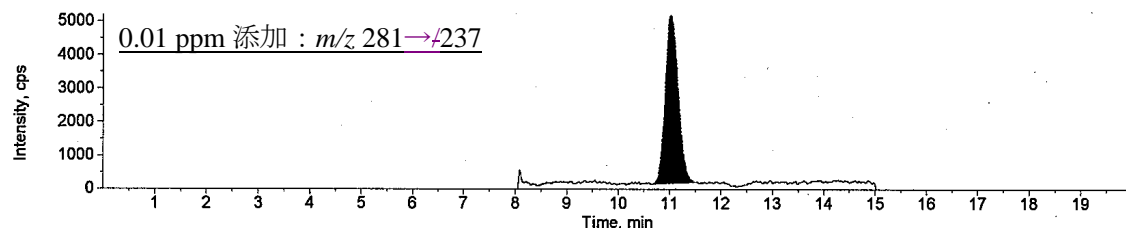
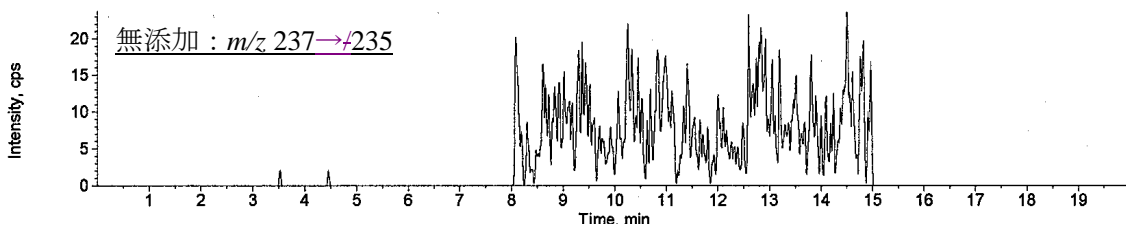
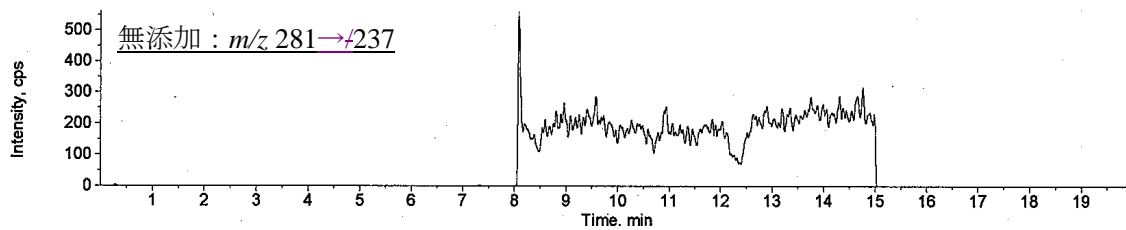


図 6-6 試料 (うなぎ) の SRM クロマトグラムの例

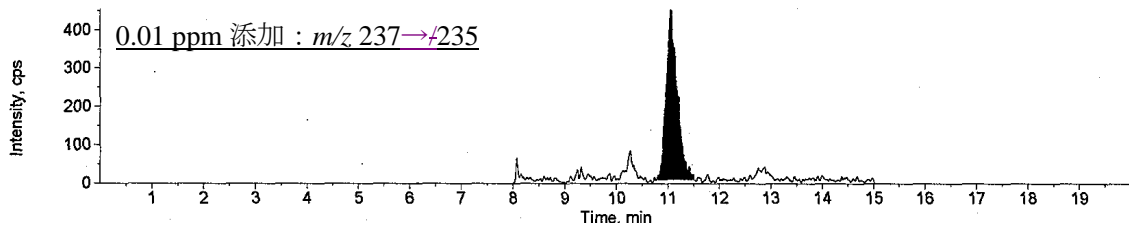
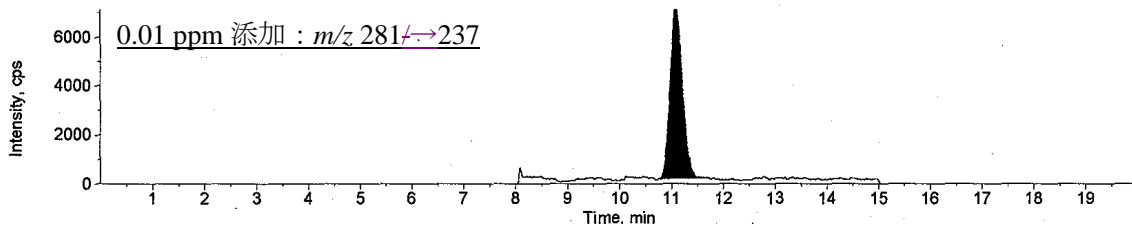
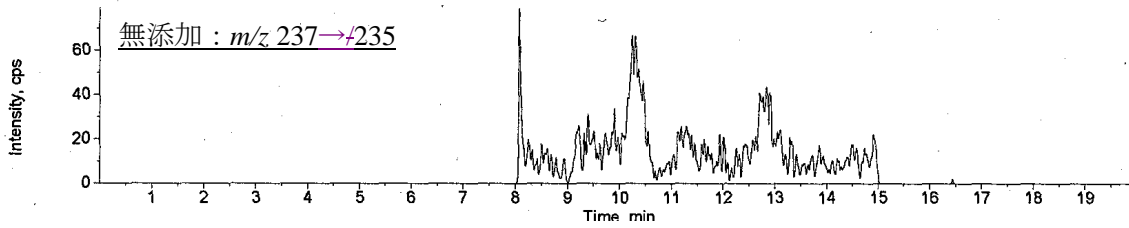
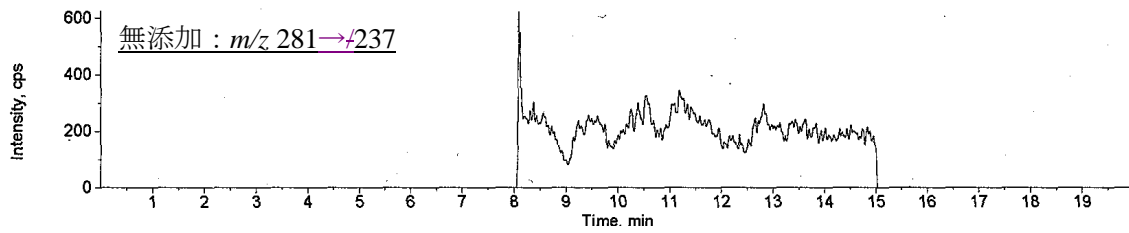


図 6-7 試料 (しじみ) の SRM クロマトグラムの例

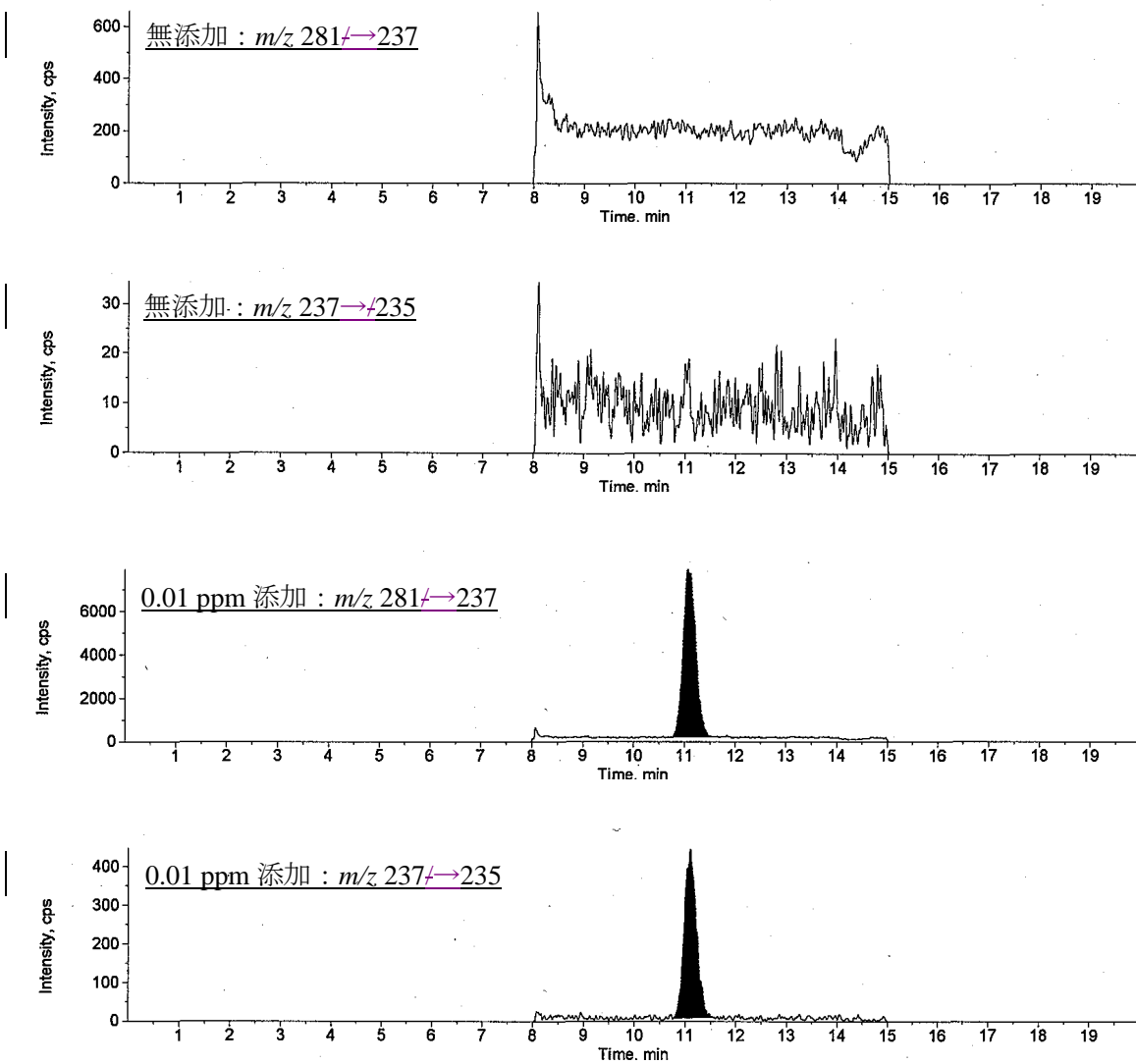


図 6-8 試料 (牛乳) の SRM クロマトグラム の例

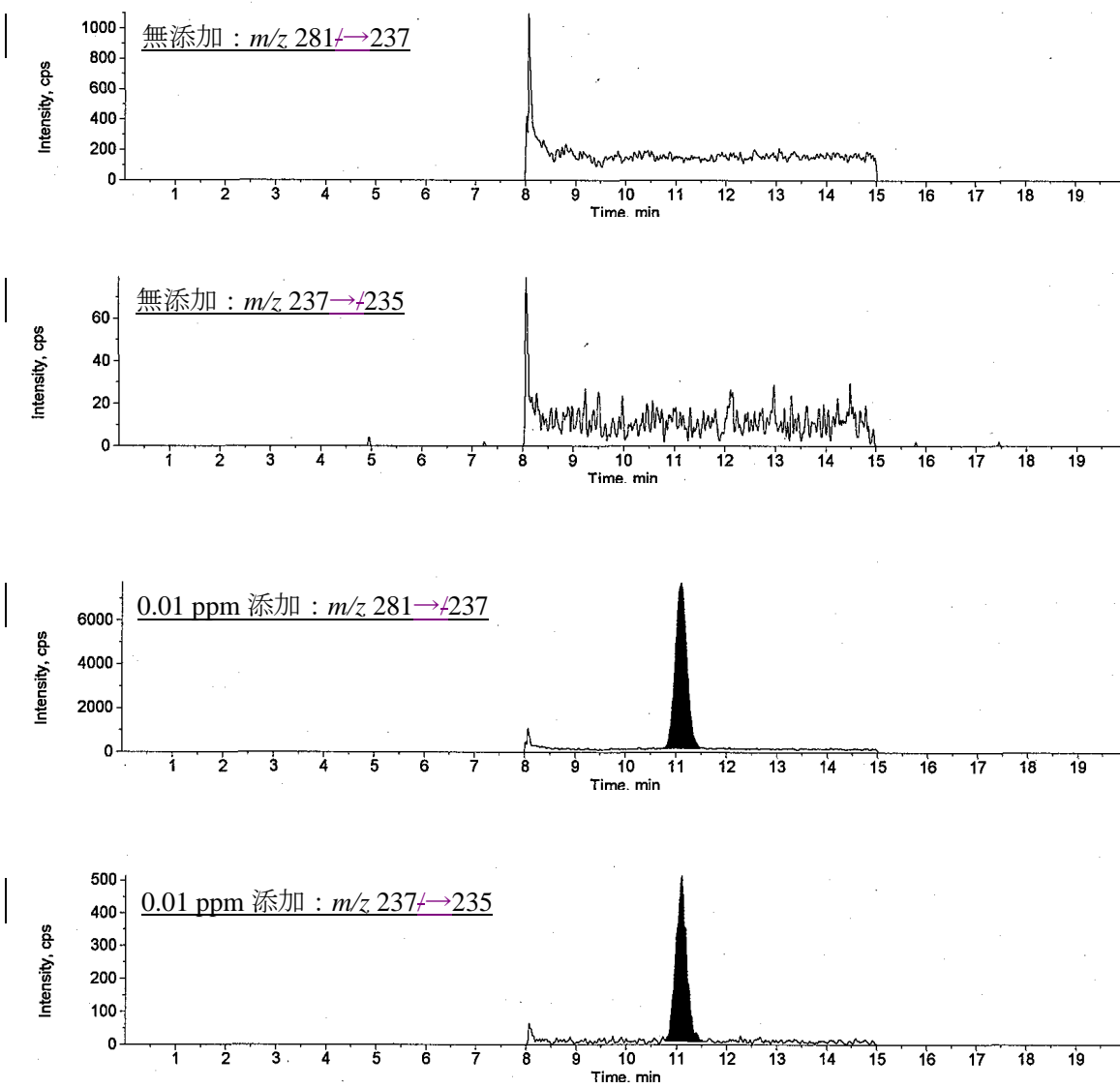


図 6-9 試料 (鶏卵) の SRM クロマトグラム の例

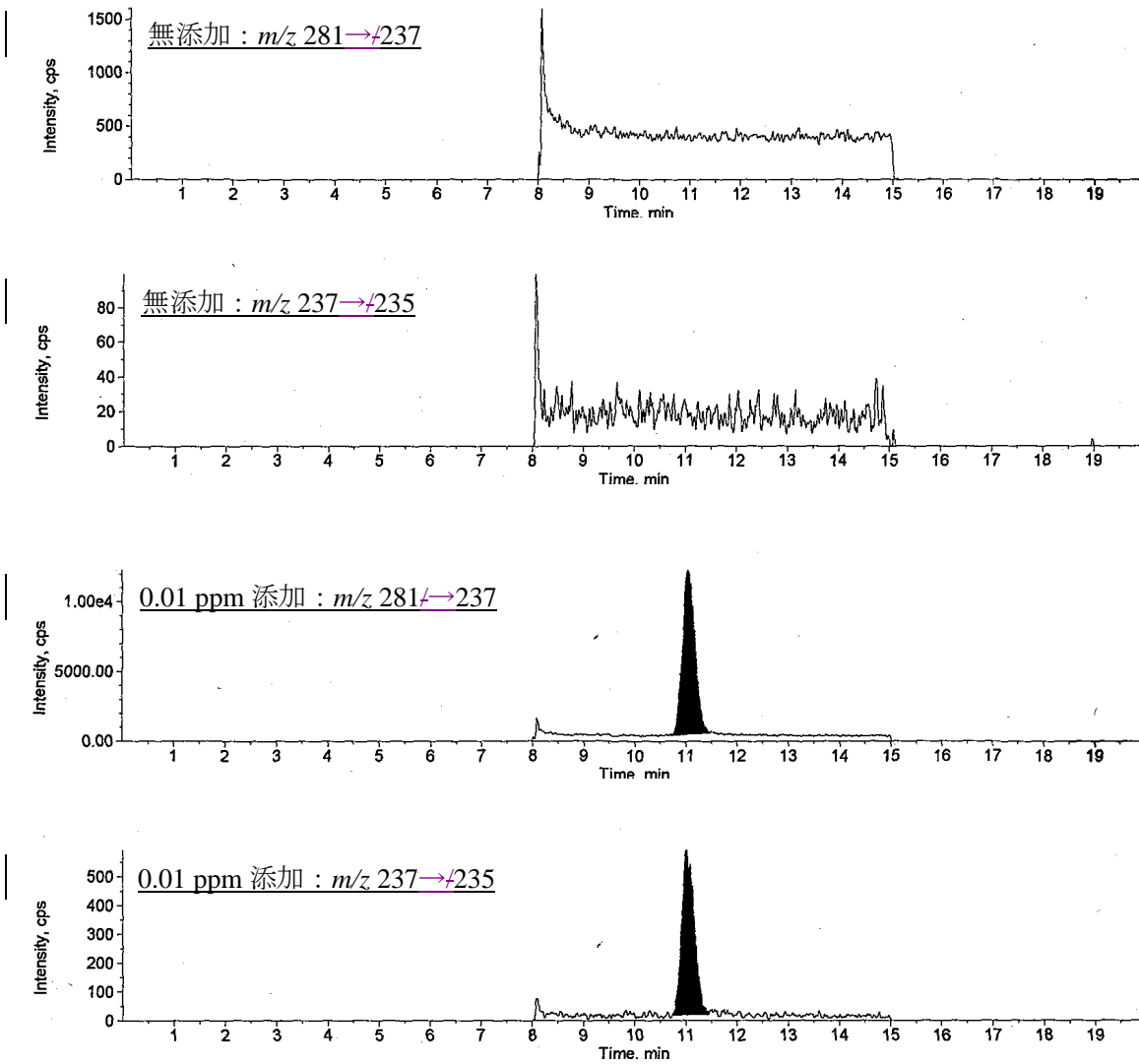


図 6-10 試料 [はちみつ (そば蜜)] の SRM クロマトグラムの例

6) 分析法の評価

① 選択性

図 6 に示したとおり、今回検討した 10 品目の無添加試料では妨害ピークは認められなかった。

② 真度

添加回収試験において検討した 10 食品の真度は 72~94% であり、すべての食品で真度の目標値 (70~120%) に適合していた。

③ 併行精度

併行精度 (RSD%) は、添加濃度 0.01 ppm で 1.1~2.0%、添加濃度 0.05 ppm で 1.2% であり、併行精度の目標値 (添加濃度 0.01 ppm の時 25% 未満、添加濃度 0.05 ppm の時 15% 未満) に適合していた。

④ 定量限界

②、③ で述べたとおり、0.01 ppm 相当の添加回収試験で真度は 70~120% の範囲内、併行精度 (RSD%) は 25% 未満であり、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークが S/N ≥ 10 であったことから、定量限界は 0.01 ppm に設定できるものと考えられた。

7) 試料マトリックスの測定への影響の確認

添加回収試験における回収率相当濃度の標準溶液をブランク試料 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒 (溶媒標準溶液) で調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、各試料マトリックスの測定への影響を確認した。

表 4 に示したように、牛の筋肉、さけ、うなぎ及びしじみは、イオン化抑制を受ける傾向にあるが、添加回収試験の結果は、真度の目標値の下限である 70% を超えているため、分析法の評価基準への影響はないものと考えられた。

表 4 試料マトリックスの測定への影響の確認

試料	ピーク面積比 (%)	補正後の真度
馬の筋肉	90	86
牛の筋肉	82	91
牛の脂肪	98	94
牛の肝臓	95	91
さけ	83	87
うなぎ	81	98
しじみ	86	86
牛乳	99	95
鶏卵	91	82
はちみつ (そば蜜)	100	94

8 結論

ペダプロフェンを試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムで精製して LC-MS/MS で定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を、馬の筋肉、牛の筋肉・脂肪・肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（そば蜜）に適用した場合、添加回収試験における真度及び併行精度はそれぞれ 72～94%及び 1.1～2.0%であり、ブランク試料からはピークは検出されなかった。また、定量限界は 0.01 ppm に設定が可能であることが確認できた。

9 参考文献

なし。