

※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

## プレドニゾン試験法（畜産物）

## プレドニゾロン試験法（畜産物）の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的

プレドニゾロンは、グルココルチコイド受容体にリガンドとして結合し、炎症反応、免疫系、糖新生等に関与するタンパク質の遺伝子発現を調節することにより、抗炎症作用、免疫抑制作用、血糖上昇作用等を示す。

国内では、牛に対するケトン症、関節炎及び筋炎の治療、馬及び豚に対する関節炎の治療を目的とした注射剤が承認されている。海外では、牛の乳房炎の治療、馬の再発性気道狭窄症及び慢性肺気腫における炎症の軽減を目的とした経口投与剤が使用されている。また、ヒト用医薬品として国内外で使用されている。

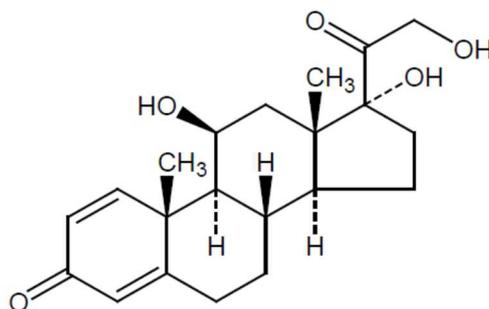
今般、施行通知生食発 0703 第 1 号 (平成 30 年 7 月 3 日) において残留基準値が改正されたことから、新たな基準値に対応可能な試験法の開発が必要となった。そこで、本検討においては、薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜産物中のプレドニゾロン試験法の開発を行った。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：プレドニゾロン

IUPAC 名：(8*S*, 9*S*, 10*R*, 11*S*, 13*S*, 14*S*, 17*R*)-11, 17-Dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10, 13-dimethyl-6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-3*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-one  
11β, 17, 21-Trihydroxypregna-1, 4-diene-3, 20-dione (日本薬局方 17 改訂版)

構造式：



分子式：C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>

分子量：360.44

溶解性<sup>1)</sup>：水に難溶。メタノール、ジオキサンに可溶。エタノール (1 g/30 mL)、クロロホルム (1 g/180 mL)、アセトン (1 g/50 mL)

1-オクタノール/水分配係数 (log P<sub>ow</sub>)<sup>2)</sup>：1.62

出典： 1) The Merck Index 12th Edition

2) Drug Bank, <https://www.drugbank.ca/> (University of Alberta/Department of Computing Science)

### 3. 基準値

食品名	残留基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.004
豚の筋肉	0.001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.001
牛の脂肪	0.004
豚の脂肪	0.001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.001
牛の肝臓	0.01
豚の肝臓	0.001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.001
牛の腎臓	0.01
豚の腎臓	0.001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.001
牛の食用部分	0.01
豚の食用部分	0.001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.001
乳	0.006

#### [実験方法]

##### 1. 試料

すべて東京都内の小売店で購入した。また、試料の調製方法を以下に記載した。

###### 1) 豚の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

###### 2) 豚の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

###### 3) 豚の肝臓

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

###### 4) 牛乳

よく混合して均一化した。

##### 2. 試薬・試液

プレドニゾロン標準品：純度 100% (Sigma-Aldrich 社製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

ギ酸：LC/MS 用 (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

n-ヘキサン：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）

ミニカラム：InertSep C18（500 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：InertSep PSA（500 mg/3 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

標準原液：プレドニゾン標準品 10.0 mg を精秤し、メタノールで 100 mL に溶解して、プレドニゾン 100 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を水/メタノール（9：1）で適宜希釈し、0.000125～0.00075 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈して調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスペルサー PB-95（シャフト：HG-2）（SMT COMPANY 社製）

フードプロセッサ：MK-K58（パナソニック（株）製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーター N-1100（東京理化工機（株））、ポンプ V-703（BUCHI 社製）

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930（久保田商事（株）製）

LC-MS/MS：

装置	型式	会社
MS	API4000QTRAP	SCIEX 社
LC	Prominence LC-20A	（株）島津製作所
データ処理	Analyst Software	SCIEX 社

### 4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件	
カラム	Inertsil ODS-3（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 (mL/min)	0.20
注入量 (μL)	10
カラム温度 (°C)	40
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸溶液 B 液：0.1 vol%ギ酸含有メタノール
グラジエント条件	

	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	60	40
	20.0	40	60
	22.0	10	90
	30.0	10	90
	30.1	60	40
	40.0	60	40
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 (-)		
キャピラリー電圧 (V)	-4500		
脱溶媒温度 (°C)	400		
ネブライザーガス	窒素、60 psi		
脱溶媒ガス	窒素、80 psi		
コリジョンガス	窒素		
定量イオン (m/z)	405.2→329.0 [コーン電圧：40 (V)、コリジョンエネルギー：26 (eV)]		
定性イオン (m/z)	405.2→295.2 [コーン電圧：40 (V)、コリジョンエネルギー：40 (eV)]		
保持時間 (min)	17.3		

## 5. 定量

プレドニゾン標準原液を水/メタノール (9 : 1) で希釈して 0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のプレドニゾンの含量を算出した。なお、基準値相当の添加試料は検量線の範囲内に収まるよう、豚の筋肉、脂肪、肝臓については試験溶液を 2 倍希釈し、牛乳については試験溶液を 10 倍希釈して測定した。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 添加試料の調製

豚の筋肉、豚の肝臓、牛乳の場合は試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。豚の脂肪の場合は試料 10.0 g を 40°C 以下で融解し、添加用標準溶液 1 mL を添加してよく混合した後、再凝固してから 30 分間放置した。各試料において使用した添加用標準溶液の濃度を表 1 に示す。

表 1 各試料における添加用標準溶液の濃度

試料	添加濃度 (ppm)	添加用標準溶液濃度 (mg/L)
豚の筋肉	0.0005	0.005
	0.001	0.01
豚の脂肪	0.0005	0.005
	0.001	0.01
豚の肝臓	0.0005	0.005
	0.001	0.01
牛乳	0.0005	0.005
	0.006	0.06

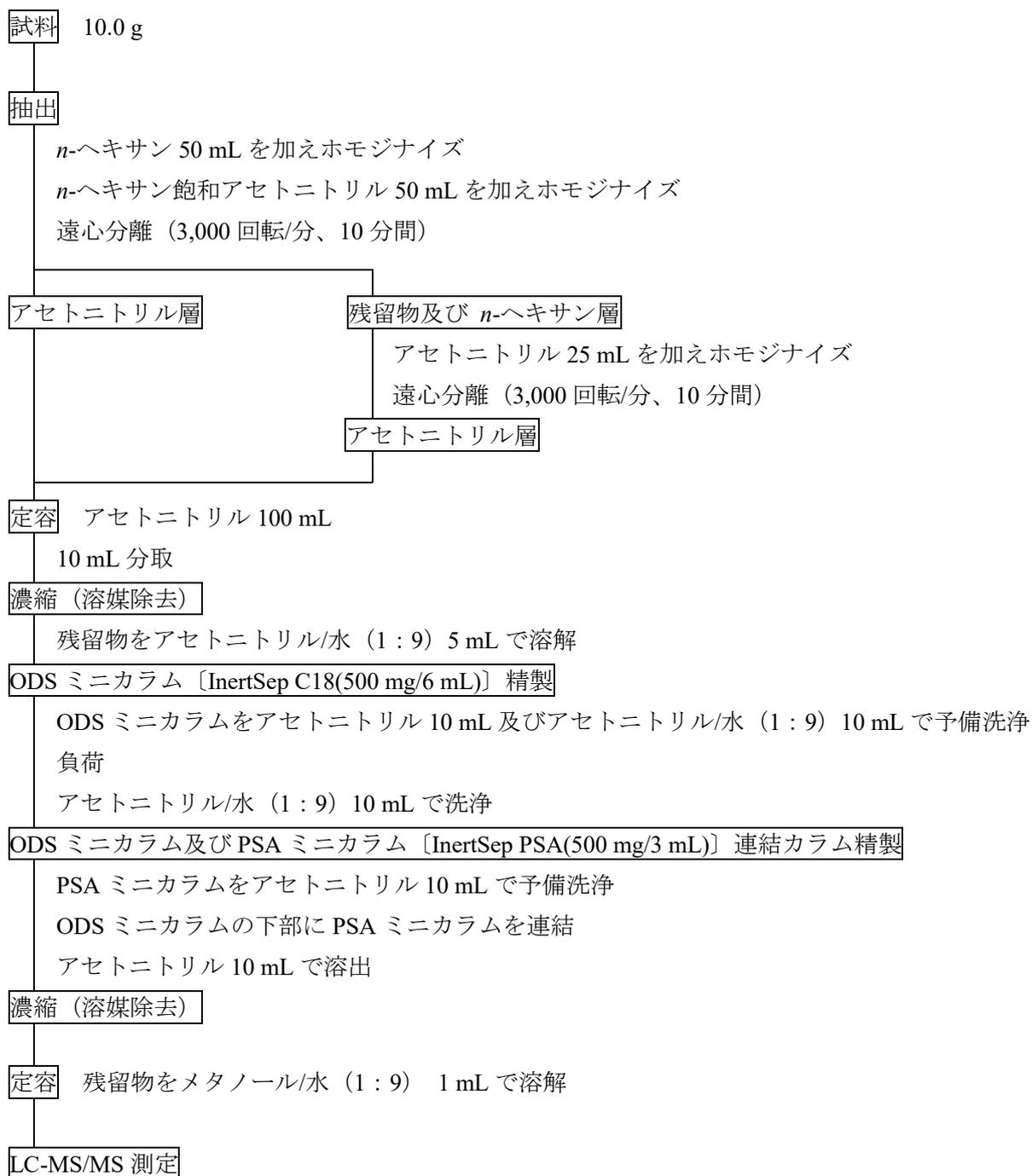
## 2) 抽出

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物及び *n*-ヘキサン層にアセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル/水 (1 : 9) 5 mL を加えて溶かした。

## 3) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (500 mg/6 mL)] にアセトニトリル 10 mL 及びアセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムの下部に、予めアセトニトリル 10 mL で予備洗浄したエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep PSA (500 mg/3 mL)] を接続し、アセトニトリル 10 mL で溶出し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノール/水 (1 : 9) に溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]



7. 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 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 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

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI (+) モードではプレドニゾロンのプロトン付加分子  $m/z$  361.2[M+H]<sup>+</sup>が検出されることを確認した(図1)。また、ESI (-) モードではプレドニゾロンのギ酸付加体  $m/z$  405.2[M+HCOO]<sup>-</sup>が検出されることを確認した(図2)。

ESI (+) モードで、0.1 vol%ギ酸/メタノール (1 : 1) を移動相としてフローインジェクションにて測定を行った。プレドニゾロンのプロトン付加分子である  $m/z$  361.2[M+H]<sup>+</sup>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図3及び図4に示した。 $m/z$  343.2が非常に高い強度で検出され、次いで  $m/z$  147.2が検出されたことから、 $m/z$  361.2→343.2を定量用、 $m/z$  361.2→147.2を定性用の測定イオンの候補とした。

次に、ESI (-) モードで、0.1 vol%ギ酸/メタノール (1 : 1) を移動相としてフローインジェクションにて測定を行った。プレドニゾロンのギ酸付加体である  $m/z$  405.2[M+HCOO]<sup>-</sup>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図5及び図6に示した。 $m/z$  329.0が非常に高い強度で検出され、次いで  $m/z$  295.2が検出されたことから、 $m/z$  405.2→329.0を定量用、 $m/z$  405.2→295.2を定性用の測定イオンの候補とした。

実試料を用いて測定を行ったところ、ESI (+) モードではベースラインの乱れや妨害ピークによりプレドニゾロンの定量が困難であった。一方、ESI (-) モードでは定量を妨害するピークはみられなかった。

以上の結果より、 $m/z$  405.2→329.0を定量用、 $m/z$  405.2→295.2を定性用の測定イオンとしてESI (-) モードで測定を行うこととした。

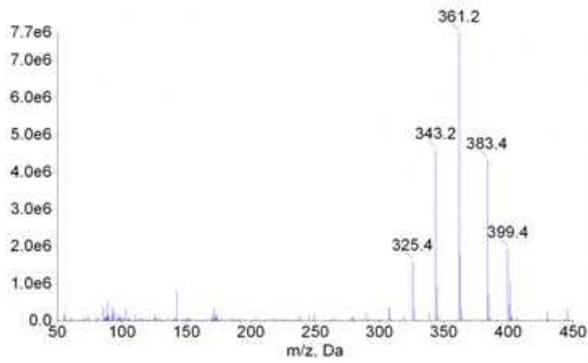


図1 ESI (+) モードにおける  
 プレドニゾロン標準溶液のマススペクトル  
 スキャン範囲：50～450amu  
 測定条件：ESI+, コーン電圧=51 V  
 (コーン電圧：declustering potential)

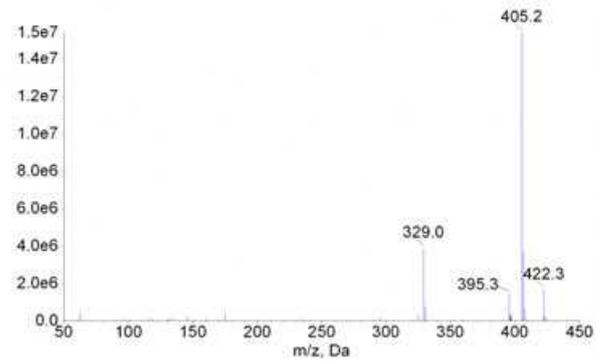


図2 ESI (-) モードにおける  
 プレドニゾロン標準溶液のマススペクトル  
 スキャン範囲：50～450amu  
 測定条件：ESI-, コーン電圧=40 V

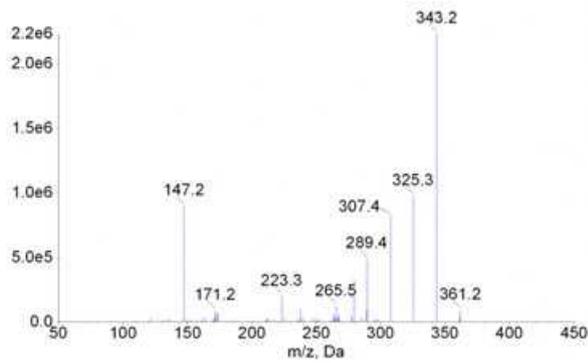


図3 ESI (+) モードにおけるプレドニゾロン  
 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
 プリカーサーイオン： $m/z$  361.2  
 測定条件：ESI+, コーン電圧=51 V, コリ  
 ジョンエネルギー= 20 eV  
 (コリジョンエネルギー=collision energy)

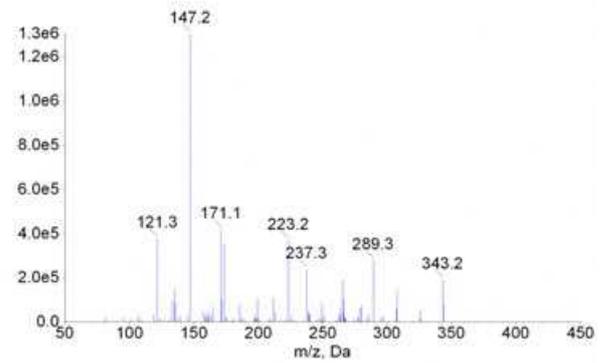


図4 ESI (+) モードにおけるプレドニゾロン  
 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)  
 プリカーサーイオン： $m/z$  361.2  
 測定条件：ESI+, コーン電圧=51 V, コリ  
 ジョンエネルギー=30 eV

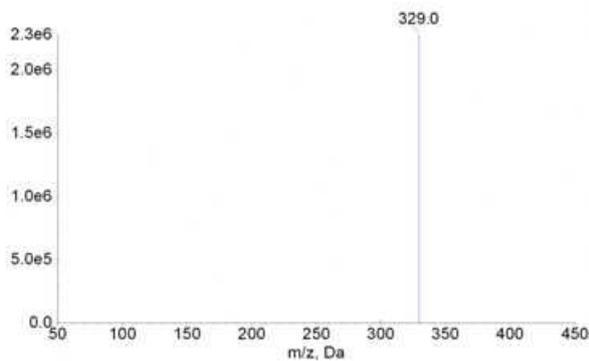


図5 ESI (-) モードにおけるプレドニゾロンのプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
 プリカーサーイオン :  $m/z$  405.2  
 測定条件 : ESI-, コーン電圧=40 V, コリジョンエネルギー= 26 eV

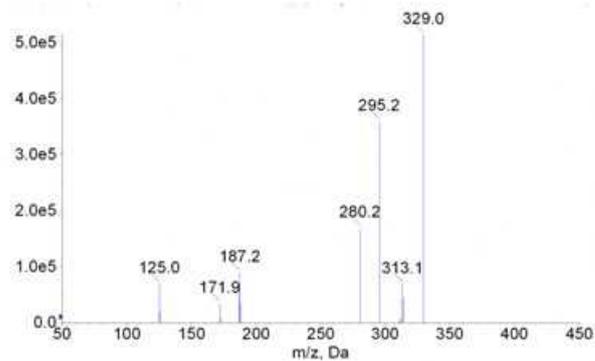


図6 ESI (-) モードにおけるプレドニゾロンのプロダクトイオンスペクトル (定性用)  
 プリカーサーイオン :  $m/z$  405.2  
 測定条件 : ESI-, コーン電圧=40 V, コリジョンエネルギー=40 eV

## 2) LC 条件の検討

分析カラムについてオクタデシルシリル化シリカゲルカラムである Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$  : ジーエルサイエンス (株) 製)、InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$  : ジーエルサイエンス (株) 製)、L-column 2 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$  : (一財) 化学物質評価研究機構製)、Symmetry C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$  : 日本ウォーターズ (株) 製) を用いて検討を行ったところ、いずれのカラムにおいても良好な保持、ピーク形状が得られたが、中でも比較的ピーク形状の良好だった、Inertsil ODS-3 を用いることとした。

移動相条件については、アセトニトリル - 0.1 vol% ギ酸、メタノール - 0.1 vol% ギ酸について検討した結果、いずれの移動相を用いた場合においても良好な感度とピーク形状が得られた。

アセトニトリル - 0.1 vol% ギ酸とメタノール - 0.1 vol% ギ酸を比較した場合、アセトニトリル - 0.1 vol% ギ酸の方がメタノール - 0.1 vol% ギ酸より保持時間が早く、実試料を測定した際に出現する夾雑成分由来のピークとの分離が困難であった。

次にメタノール - ギ酸について添加剤の 3 濃度 (0.05、0.1 及び 0.5 vol%) の比較を行ったところ、表 2 に示したとおり、ギ酸の濃度 0.1 vol% において最も高い感度が得られた。ギ酸の濃度が感度に影響を及ぼすことが確認されたため、測定中のギ酸濃度が一定となるよう、メタノールにもギ酸を添加することとした。

以上の結果より、移動相には 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 - 0.1 vol% ギ酸を用いることとした。

表2 各ギ酸濃度におけるプレドニゾロンの面積比

ギ酸濃度	ピーク面積比※
0.05 vol%	0.75
0.1 vol%	1.00
0.5 vol%	0.37

※0.1 vol%ギ酸を用いた場合のピーク面積を 1.00 としたときのピーク面積比

### 3) 検量線

図7に検量線の例を示した。0.000125~0.00075 mg/Lの濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの検量線も0.999以上であり良好な直線性を示した。

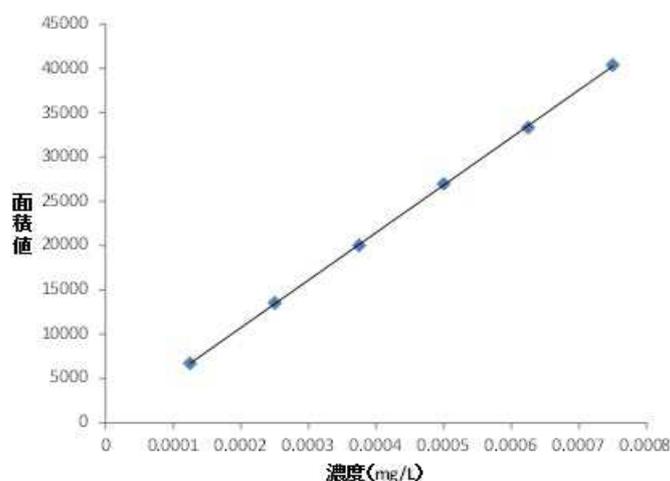


図7 プレドニゾロン検量線の例

$$y=53602743x+36 \quad r^2=0.9999$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出溶媒の検討

豚の脂肪及び肝臓を用いてアセトン、メタノール、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) について抽出溶媒の検討を行った。

#### ① アセトン及びメタノールの場合

試料 (豚の肝臓及び脂肪) 10.0 g に 20 mg/L プレドニゾロン溶液 (アセトン溶液またはメタノール溶液) 1 mL を添加した後、30 分間放置した (脂肪は融解してから添加し、再凝固してから 30 分間放置した)。これにアセトンまたはメタノール 100 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を分取した。残留物にアセトンまたはメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ 200 mL に定容した。ここから 1 mL を分取してメタノール/水 (1 : 1) を加えて 10 mL に定容し、LC-MS/MS で測定した。

② アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) の場合

試料 (豚の肝臓及び脂肪) 10.0 g に 20 mg/L プレドニゾロン溶液 (メタノール溶液) 1 mL を添加した後、30 分間放置した (脂肪は融解してから添加し、再凝固してから 30 分間放置した)。これに *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取した。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、得られたアセトニトリル層を合わせ 200 mL に定容した。ここから 1 mL を分取してメタノール/水 (1 : 1) を加えて 10 mL に定容し、LC-MS/MS で測定した。

抽出溶媒の検討結果を表 3 に示す。いずれの溶媒においても良好な回収が得られたが、抽出液の外観を比較すると、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) を用いた場合に最も着色や混濁が少なかったため、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) を抽出溶媒として用いることとした。

表 3 抽出溶媒の検討結果 (回収率は補正回収率)

試料	アセトン		メタノール		アセトニトリル ( <i>n</i> -ヘキサン存在下)	
	回収率 (%)	マトリックス 影響	回収率 (%)	マトリックス 影響	回収率 (%)	マトリックス 影響
豚の脂肪	99.1	0.997	99.0	0.993	98.0	0.995
豚の肝臓	100.1	0.983	98.5	0.941	95.0	0.966

添加量 : 20 µg

2) カラム精製の検討

① ODS ミニカラム [InertSep C18 (500 mg/6 mL)]

ODS ミニカラムからの溶出状況を確認した。アセトニトリル 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄したカラムに 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) 1 mL を負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 4 に示す。プレドニゾロンは水及びアセトニトリル/水 (1 : 9) では溶出せず、アセトニトリル/水 (2 : 8) 20 mL、アセトニトリル/水 (1 : 1) 10 mL、アセトニトリル 10 mL で溶出した。

表4 ODS ミニカラムからの溶出状況

溶出溶媒量	水	アセトニトリ ル/水 (1:9)	アセトニトリ ル/水 (2:8)	アセトニトリ ル/水 (1:1)	アセトニトリ ル
0-5 mL	0	0	0	83.9	102.9
5-10 mL	0	0	0	17.6	2.5
10-15 mL	0	0	83.2	0	0
15-20 mL	0	0	16.9	0	0
20-25 mL	0	0	0	0	0
計	0	0	100.1	101.5	105.4

添加量：0.1 µg

次にマトリックス (豚の肝臓) 存在下における溶出状況を確認した。豚の肝臓抽出液\*10 mL に 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (アセトニトリル溶液) 1 mL を加えて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、アセトニトリル 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄した ODS ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 5 に示す。プレドニゾロンはアセトニトリル/水 (1:9) では溶出せず、アセトニトリル/水 (2:8) 15 mL、アセトニトリル/水 (3:7) 10 mL、アセトニトリル/水 (1:1) 10 mL、アセトニトリル 10 mL で溶出した。溶出後に濃縮を行うため、溶出液の水比率は低い方が操作性が良いと考えられることから、アセトニトリルで溶出を行うこととした。

※豚の肝臓抽出液の調製法：豚の肝臓 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

表5 マトリックス存在下での ODS ミニカラムからの溶出状況 (%、溶出率は補正值)

溶出溶媒量	アセトニトリ ル/水 (1:9)	アセトニトリ ル/水 (2:8)	アセトニトリ ル/水 (3:7)	アセトニトリ ル/水 (1:1)	アセトニトリ ル
負荷 (5 mL)	0	0	61.4	82.6	88.0
0-5 mL	0	45.0	38.3	25.2	20.7
5-10 mL	0	54.6	1.2	0.8	0.7
10-15 mL	0	2.5	0	0	0
15-20 mL	0	0	0	0	0
計	0	102.1	100.9	108.6	109.4

添加量：0.1 µg

試料：豚の肝臓

これらの結果より、ODS ミニカラムにおいてはアセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL で洗浄、アセトニトリル 10 mL で溶出を行うこととした。

実サンプル (豚の肝臓) を用いた場合に溶出液に黄色の着色があり、ODS ミニカラムによる精製のみでは不十分であると考えられたため、追加精製の検討を行うこととした。

## ②PSA ミニカラム [InertSep PSA (500 mg/3 mL)]

PSA ミニカラムからの溶出状況を確認した。アセトニトリル 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄したカラムに 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) 1 mL を負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 6 に示す。アセトニトリル/水 (1 : 9) 及びアセトニトリルのいずれの溶媒でもプレドニゾロンが溶出した。

表 6 PSA ミニカラムからの溶出状況

溶出溶媒量	アセトニトリル/水 (1 : 9)	アセトニトリル
0-5 mL	84.5	5.4
5-10 mL	16.4	82.0
10-15 mL	0	12.7
15-20 mL	0	1.3
20-25 mL	0	0
計	100.9	101.4

添加量 : 0.1 µg

次にマトリックス (豚の肝臓) 存在下における溶出状況を確認した。豚の肝臓抽出液 10 mL に 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (アセトニトリル溶液) 1 mL を加えて 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、アセトニトリル 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄した PSA ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 7 に示す。実サンプル存在下においても上記と同様にアセトニトリル/水 (1 : 9) 及びアセトニトリルのいずれの溶媒でもプレドニゾロンが溶出した。

表 7 マトリックス存在下での PSA ミニカラムからの溶出状況 (%、溶出率は補正值)

溶出溶媒量	アセトニトリル/水 (1 : 9)	アセトニトリル
負荷 (5 mL)	64.6	56.8
0-5 mL	38.8	43.5
5-10 mL	0	4.0
10-15 mL	0	2.2
15-20 mL	0	0
計	103.4	106.5

添加量 : 0.1 µg

試料 : 豚の肝臓

これらの結果より、PSA ミニカラムにおいてはアセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL またはアセトニトリル 20 mL で溶出可能であることがわかった。また、PSA ミニカラムに色素が吸着したことから、PSA ミニカラムにより色素除去が可能であることもわかった。

### ③ ODS ミニカラム-PSA ミニカラム連結カラム

ODS ミニカラム及び PSA ミニカラムからの溶出状況を確認した。アセトニトリル 5 mL、アセトニトリル/水 (1 : 9) 5 mL で予備洗浄した ODS ミニカラムに 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (アセトニトリル/水 (1 : 9) 溶液) 1 mL を負荷し、アセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL を流下し、流出液を捨てた。アセトニトリル 5 mL で予備洗浄した PSA ミニカラムを ODS ミニカラムの下部に連結し、アセトニトリル 5 mL ずつを流下して各分画を分取した。このときの結果を表 8-a) に示す。

次にマトリックス存在下 (豚の肝臓) における溶出状況を確認した。豚の肝臓抽出液 10 mL に 0.1 mg/L プレドニゾロン溶液 (アセトニトリル溶液) 1 mL を加えて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル/水 (1 : 9) 5 mL を加えて溶解し、アセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル/水 (1 : 9) 5 mL で予備洗浄した ODS ミニカラムに負荷した後、アセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL を流下し、流出液を捨てた。アセトニトリル 5 mL で予備洗浄した PSA ミニカラムを ODS ミニカラムの下部に連結し、アセトニトリル 5 mL ずつを流下して各分画を分取した。このときの結果を表 8-b) に示す。なお、負荷及びアセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL の洗浄画分へのプレドニゾロンの溶出がないことも確認した。この結果より、ODS ミニカラムに負荷、アセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL 洗浄後、ODS ミニカラム-PSA ミニカラム連結カラムからアセトニトリル 10 mL で溶出可能であることがわかった。

表 8 ODS ミニカラム-PSA ミニカラム連結カラムからの溶出状況 (%)

溶出溶媒量	a) マトリックスなし	b) マトリックスあり
0-5 mL	100.5	95.1
5-10 mL	0	11.0
10-15 mL	0	0
15-20 mL	0	0
20-25 mL	0	0
計	100.5	106.1

添加量 : 0.1 µg

以上の結果より、ODS ミニカラムにアセトニトリル/水 (1 : 9) 5 mL を負荷し、アセトニトリル/水 (1 : 9) 10 mL で洗浄した後、ODS ミニカラムの下部に PSA ミニカラムを連結し、ODS ミニカラム-PSA ミニカラム連結カラムからアセトニトリル 10 mL で溶出することとした。

### 3. 添加回収試験

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓及び牛乳の4食品を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図8~11に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図12に示した。

#### 1) 選択性

選択性の検討結果を表9に示した。検討を行ったいずれの食品においても、プレドニゾロンの定量を妨害するピークは認められなかった。

表9 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (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>		
					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)			
	プレドニゾン	豚の筋肉	0.0005	0.001	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	28368	29928	29148	0.000	○
		豚の脂肪	0.0005	0.001	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	29222	29266	29244	0.000	○
		豚の肝臓	0.0005	0.001	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	27143	26441	26792	0.000	○
		牛乳	0.0005	0.006	基準値	0.006	< 0.100	面積	0	0	0	28493	28717	28605	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

真度及び併行精度の検討結果を表10に示した。定量限界値(0.0005 ppm)相当の添加回収試験における真度の平均値は91.2~99.3%、併行精度は1.6~4.0%であり、真度70~120%、併行精度(RSD) < 30%の目標値を満足した。また、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓の基準値相当(0.001 ppm)の添加回収試験における真度の平均値は89.5~97.9%、併行精度は1.4~1.8%であり、真度70~120%、併行精度(RSD) < 30%の目標値を満足した。牛乳の基準値相当(0.006 ppm)の添加回収試験における真度の平均値は99.2%、併行精度は1.0%であり、真度70~120%、併行精度(RSD) < 25%の目標値を満足した。また、定量限界濃度におけるS/N比は110.6~155.6であり、いずれの食品においてもS/N ≥ 10を満足した。

表 10 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 (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%)	S/N <sup>2</sup>		
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
ブレドニゾン	豚の筋肉	0.0005	0.001	0.0005	S/N	60230857	424	0.9998	93.0	95.1	96.6	92.8	97.4	95.0	2.2	171.2	123.1	147.1	
		0.0005	0.001	0.001	—	60038400	726	0.9997	92.7	94.2	95.2	91.8	93.9	93.6	1.4	—	—	#VALUE!	
	豚の脂肪	0.0005	0.001	0.0005	S/N	53602743	36	0.9999	93.8	94.5	94.2	100.2	102.0	96.9	4.0	117.3	168.0	142.6	
		0.0005	0.001	0.001	—	55755886	-404	0.9998	90.5	90.3	86.9	90.1	89.7	89.5	1.7	—	—	#VALUE!	
	豚の肝臓	0.0005	0.001	0.0005	S/N	56429943	98	0.9997	93.4	90.9	89.2	91.2	91.5	91.2	1.6	124.7	96.6	110.6	
		0.0005	0.001	0.001	—	56824000	-43	0.9999	97.0	100.1	95.8	99.2	97.3	97.9	1.8	—	—	#VALUE!	
牛乳	0.0005	0.006	0.0005	S/N	56190171	-446	0.9997	97.1	96.6	102.6	100.1	99.9	99.3	2.5	138.2	173.0	155.6		
	0.0005	0.006	0.006	—	46041371	-243	0.9999	98.8	98.2	98.6	100.8	99.4	99.2	1.0	—	—	#VALUE!		

\*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検討した結果を表 11 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。面積比は 0.95~1.03 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度の平均値を表 11 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 12 に示した。補正真度は 90.9~99.3%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 11 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 (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>								
							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	
ブレドニゾン	豚の筋肉	0.0005	0.001	0.0005	0.0005	面積	0	28368	29928	29148	30103	30495	30299	0.96	
		0.0005	0.001	0.001	0.0005	面積	0	30902	28212	29557	30216	27330	28773	1.03	
	豚の脂肪	0.0005	0.001	0.0005	0.0005	面積	0	29222	29266	29244	28970	28132	28551	1.02	
		0.0005	0.001	0.001	0.0005	面積	0	29080	28630	28855	29334	29409	29372	0.98	
	豚の肝臓	0.0005	0.001	0.0005	0.0005	面積	0	27143	26441	26792	28446	28234	28340	0.95	
		0.0005	0.001	0.001	0.0005	面積	0	27032	27567	27300	27145	28023	27584	0.99	
牛乳	0.0005	0.006	0.0005	0.0005	面積	0	22709	22401	22555	22303	22687	22495	1.00		
	0.0005	0.006	0.006	0.0006	面積	0	28493	28717	28605	28002	28345	28174	1.02		

\*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 12 補正真度

分析対象化合物	添加濃度 (ppm)	ピーク面積比※	真度 (%)	補正真度 (%)
豚の筋肉	0.0005	0.96	95.0	99.0
	0.001	1.03	93.6	90.9
豚の脂肪	0.0005	1.02	96.9	95.0
	0.001	0.98	89.5	91.3
豚の肝臓	0.0005	0.95	91.2	96.0
	0.001	0.99	97.9	98.9
牛乳	0.0005	1.00	99.3	99.3
	0.006	1.02	99.2	97.3

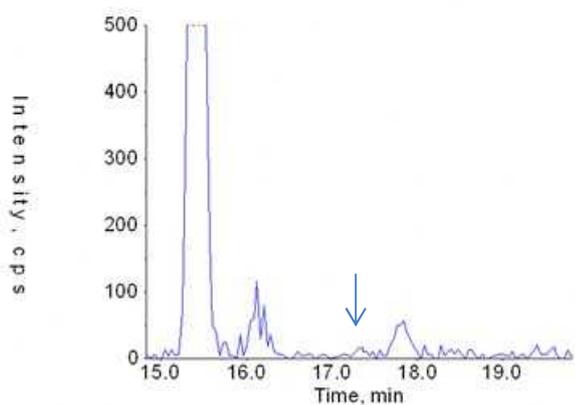
※マトリックス添加標準溶液のピーク面積／溶媒標準溶液のピーク面積

[結論]

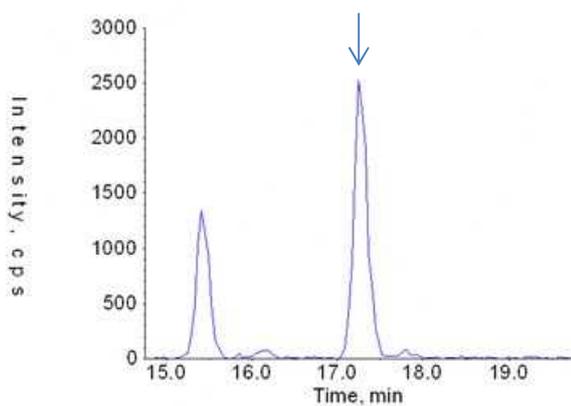
畜産物中のプレドニゾロン試験法として、プレドニゾロンを試料から *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を用いて、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓及び牛乳の添加回収試験を行った結果、真度 89.5~99.3%、併行精度 1.0~4.0%の良好な結果が得られた。いずれの食品においてもプレドニゾロンの定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、本試験法は、豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓及び牛乳のような畜産物に適用可能であると判断された。

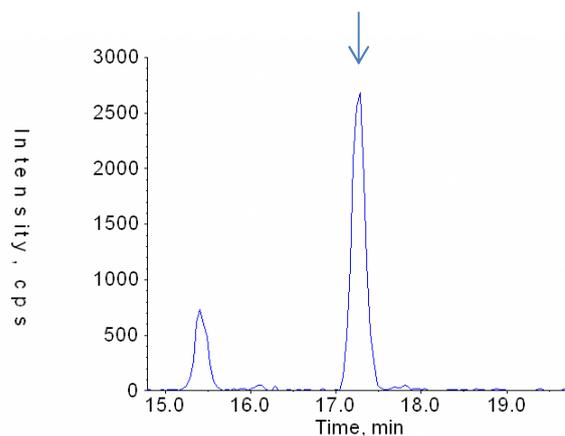
ブランク試料



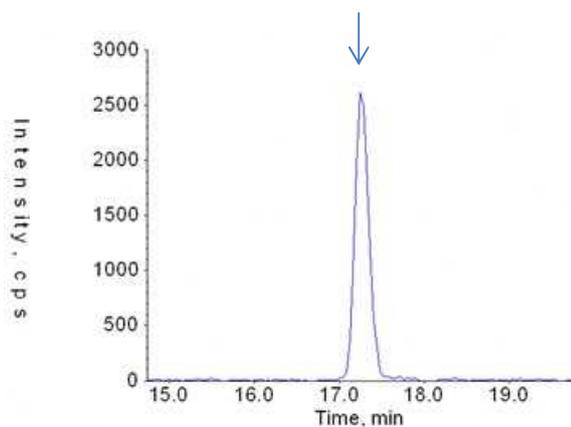
添加試料 (試料中 0.0005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.001 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

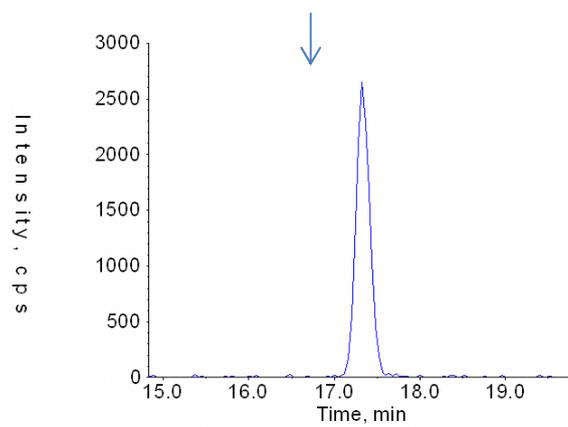
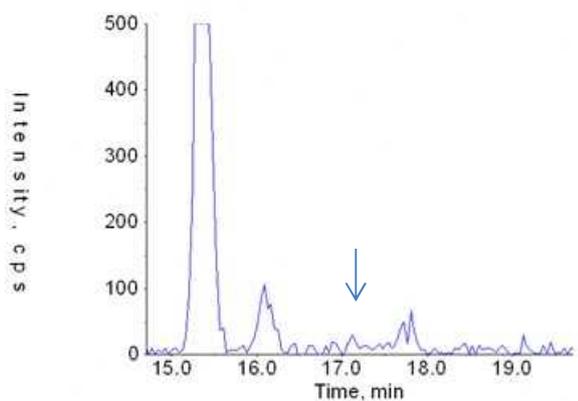
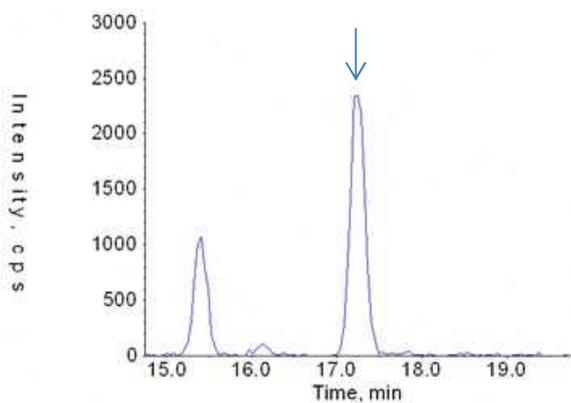


図 8 豚の筋肉の SRM クロマトグラム ( $m/z$  405.2→329.0)

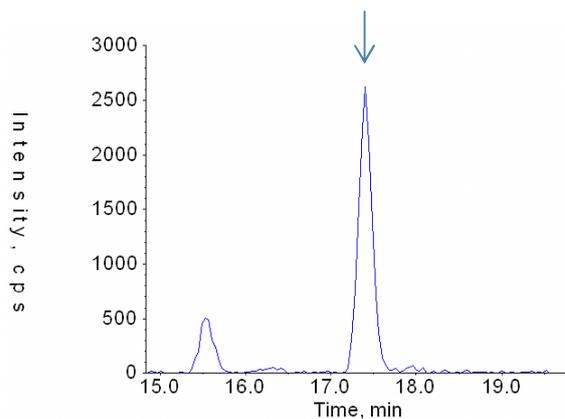
ブランク試料



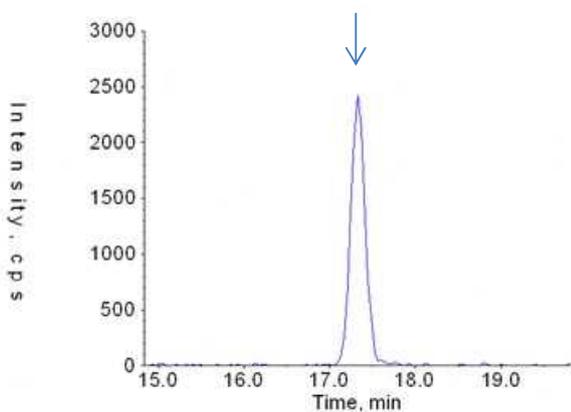
添加試料 (試料中 0.0005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.001 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

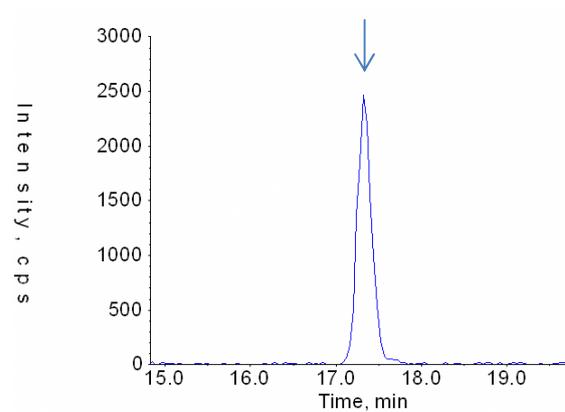
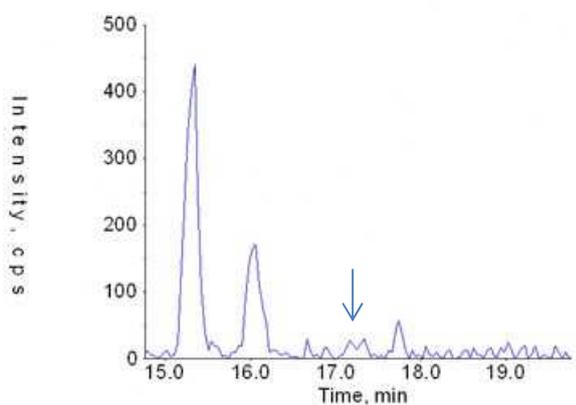
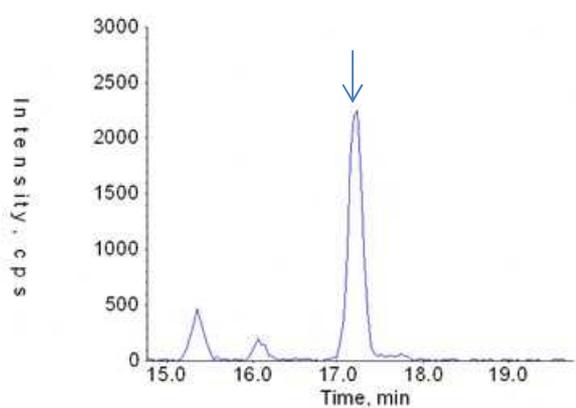


図 9 豚の脂肪の SRM クロマトグラム ( $m/z$  405.2→329.0)

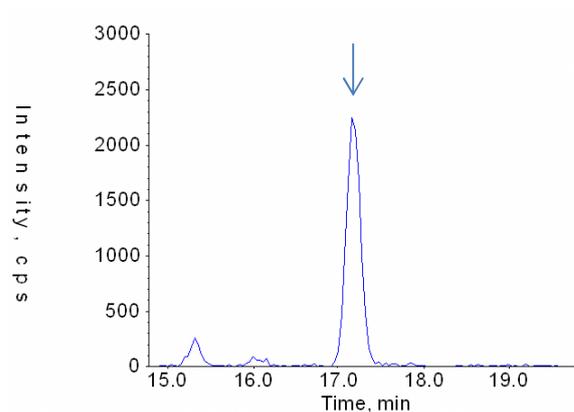
ブランク試料



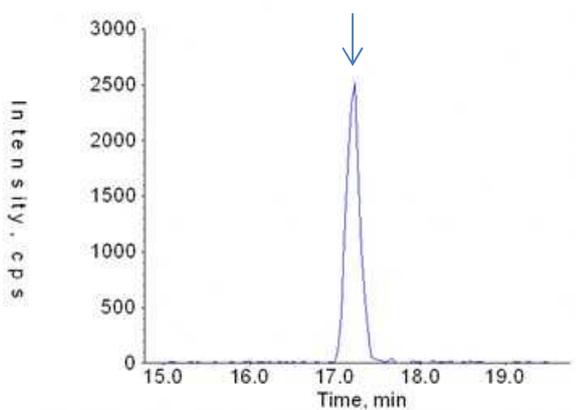
添加試料 (試料中 0.0005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.001 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)

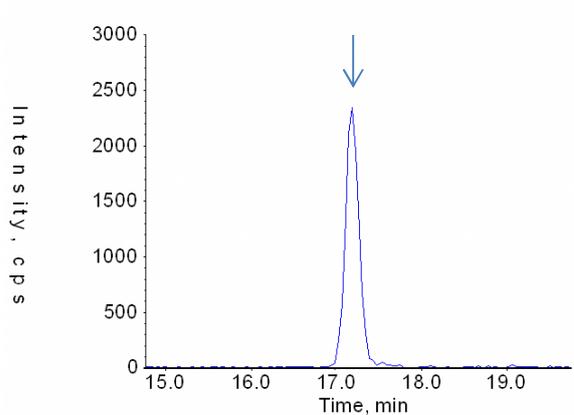
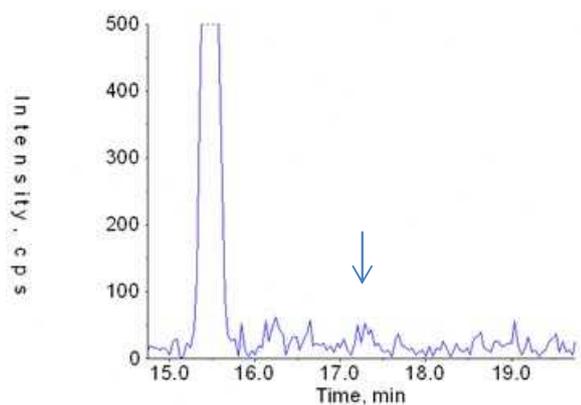
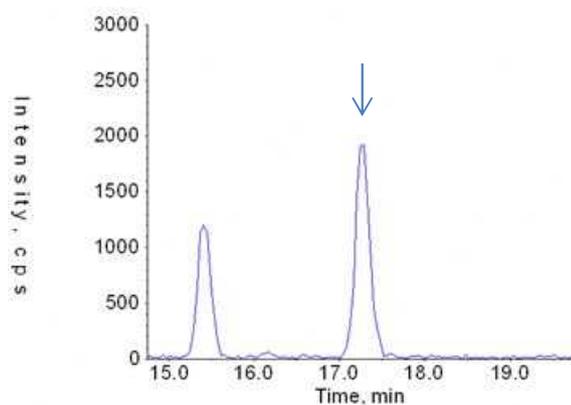


図 10 豚の肝臓の SRM クロマトグラム ( $m/z$  405.2→329.0)

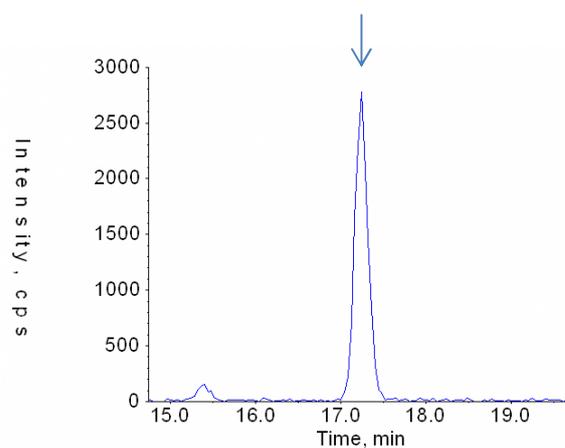
ブランク試料



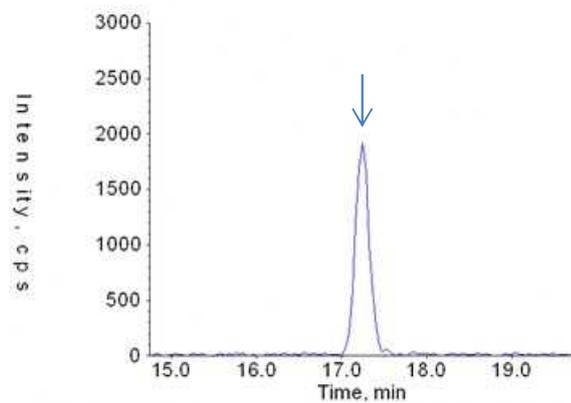
添加試料 (試料中 0.0005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.006 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0006 mg/L)

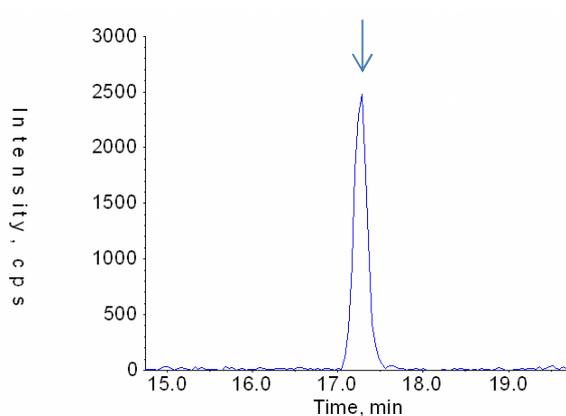
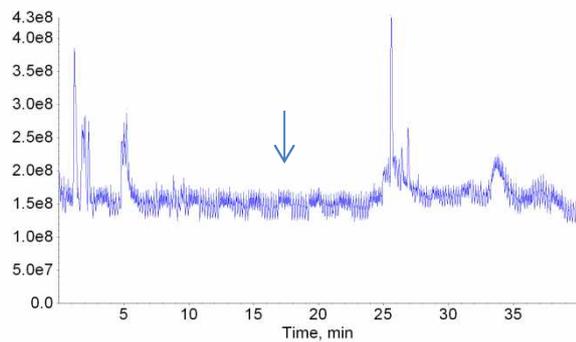
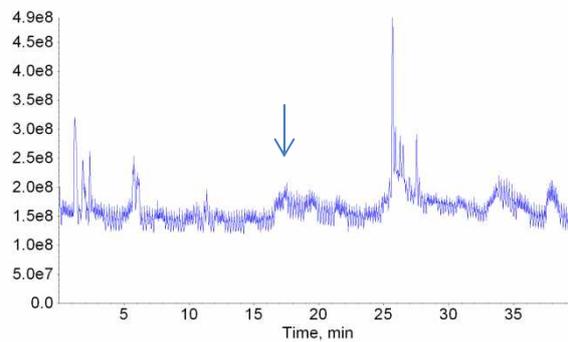


図 11 牛乳の SRM クロマトグラム ( $m/z$  405.2→329.0)

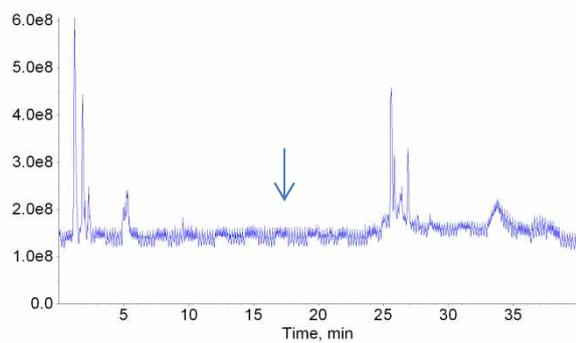
豚の筋肉



豚の肝臓



豚の脂肪



牛乳

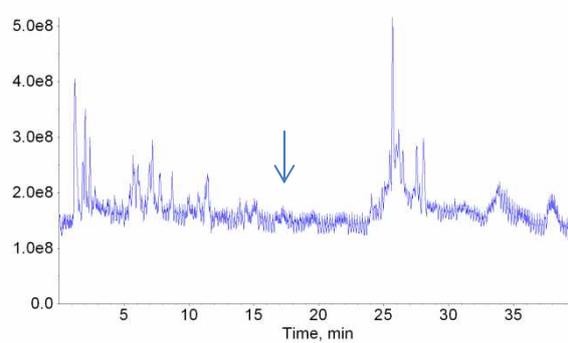


図 12 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～450 amu)