

※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。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発業務に関する報告書

デキサメタゾン及びベタメタゾン試験法（畜産物）

## デキサメタゾン及びベタメタゾン試験法の検討

### [目的]

デキサメタゾン及びベタメタゾンは、糖質コルチコイドの合成副腎皮質ホルモンであり、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と考えられている。

デキサメタゾンは、国内において動物用医薬品として承認されており、牛のケトーシス及び筋炎並びに馬の関節炎及び筋炎等に対して効能を有する注射剤として使用されている。海外では、反芻動物のケトーシス等の代謝疾患の治療に用いられている。

デキサメタゾンの立体異性体であるベタメタゾンは、ヒト用医薬品としては国内外で承認・使用されているが、食用動物用の医薬品としては国内外で承認されていない。

今般、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において食品中の農薬等のポジティブリスト制度導入時に設定された基準値（いわゆる暫定基準値）が見直された。

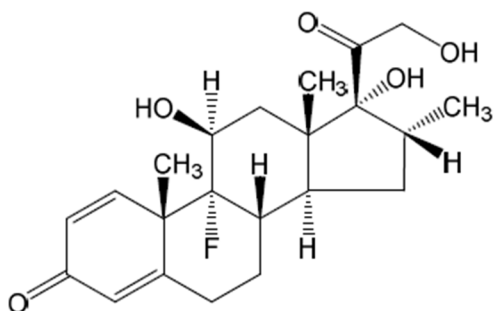
上記の理由から、新たに設定された基準値（本基準値）での検査に対応可能な試験法を整備する必要性が生じたことから、本報告においては、畜産物中のデキサメタゾン及びベタメタゾンの試験法を検討した。

デキサメタゾン及びベタメタゾンの基準値

食品名	基準値 (ppm)	
	デキサメタゾン	ベタメタゾン
牛の筋肉	0.001	不検出
豚の筋肉	0.001	不検出
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.001	不検出
牛の脂肪	0.001	不検出
豚の脂肪	0.001	不検出
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.001	不検出
牛の肝臓	0.002	不検出
豚の肝臓	0.002	不検出
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.002	不検出
牛の腎臓	0.001	不検出
豚の腎臓	0.001	不検出
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.001	不検出
牛の食用部位	0.002	不検出
豚の食用部位	0.002	不検出
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部位	0.002	不検出
乳	0.0003	不検出
鶏の筋肉	不検出	不検出
その他の家きんの筋肉	不検出	不検出
鶏の脂肪	不検出	不検出
その他の家きんの脂肪	不検出	不検出
鶏の肝臓	不検出	不検出
その他の家きんの肝臓	不検出	不検出
鶏の腎臓	不検出	不検出
その他の家きんの腎臓	不検出	不検出
鶏の食用部位	不検出	不検出
その他の家きんの食用部位	不検出	不検出
鶏の卵	不検出	不検出
その他の家きんの卵	不検出	不検出
魚介類		
はちみつ		

[検討対象化合物の構造]

○デキサメタゾン



分子式 : C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>

IUPAC : (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one

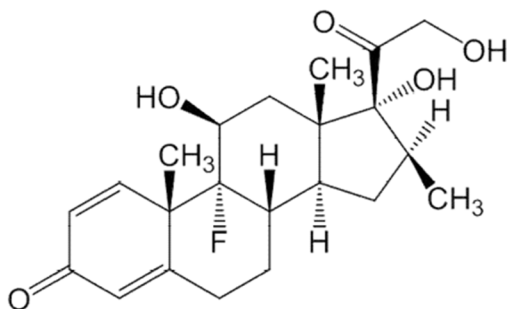
CAS 番号 : 50-02-2

log Pow: 1.83、水溶解度 : 89 mg/L、蒸気圧 : 8.86×10<sup>-14</sup> mmHg

分子量 : 392.46

(出典 : 第十七改正日本薬局方、ChemID plus : <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

○ベタメタゾン



分子式 : C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>

IUPAC名 :

(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16S,17R)-9-Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16S,17R)-9-fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one

CAS 番号 : 378-44-9

log Pow: 1.94、水溶解度 : 66.5 mg/L、蒸気圧 : 8.86×10<sup>-14</sup> mmHg

分子量：392.46

(出典：第十七改正日本薬局方、ChemID plus：<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

## [実験方法]

### 1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、豚の筋肉、鶏の筋肉・肝臓及び鶏卵を用いた。  
以下に各食品の採取方法を示した。

- 1) 筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 肝臓は、細切均一化した。
- 4) 牛乳は、よく攪拌し均一化した。
- 5) 鶏卵は、殻を除き、全卵を均一化した。

### 2. 試薬、試液

#### 1) 標準品、標準原液及び標準溶液

##### ① 標準品

- ・デキサメタゾン：富士フィルム和光純薬(株)製、純度 99.3%
- ・ベタメタゾン：富士フィルム和光純薬(株)製、純度 99.4%

##### ② 標準原液

デキサメタゾン及びベタメタゾンの各標準品 10 mg 程度を精秤し、それぞれアセトニトリルに溶解して 1.0 mg/mL の標準原液を調製した。

##### ③ 検量線作成用標準溶液

###### a. 基準値相当濃度の添加試料を定量する場合

デキサメタゾン標準原液を、0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（3：1）混液で適宜希釈した。

###### b. 定量限界相当濃度の添加試料を定量する場合

デキサメタゾン標準原液及びベタメタゾン標準原液を混合し、0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（3：1）混液で適宜希釈した。

##### ④ 添加用標準溶液

- ・定量限界相当濃度（添加濃度 0.00005 ppm）

デキサメタゾン標準原液及びベタメタゾン標準原液を混合し、アセトンで希釈して 0.005 mg/L 濃度の溶液を調製した。

- ・基準値相当濃度

###### a. 牛の筋肉、牛の脂肪、豚の筋肉（添加濃度 0.001 ppm）

デキサメタゾン標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 濃度の溶液を調製した。

###### b. 牛の肝臓（添加濃度 0.002 ppm）

デキサメタゾン標準原液をアセトンで希釈して 0.2 mg/L 濃度の溶液を調製した。

###### c. 牛乳（添加濃度 0.0003 ppm）

デキサメタゾン標準原液をアセトンで希釈して 0.03 mg/L 濃度の溶液を調製した。

## 2) その他の試薬等

アセトニトリル：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

*n*-ヘキサン：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

無水硫酸ナトリウム：富士フイルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB 試験用

酢酸エチル：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

水：関東化学(株)製、蒸留水、LC-MS 用

メタノール：関東化学(株)製、LC-MS 用

ギ酸：富士フイルム和光純薬(株)製、LC/MS 用

酢酸：富士フイルム和光純薬(株)製、LC/MS 用

0.1 vol%ギ酸：関東化学(株)製、HPLC 用

0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液：関東化学(株)製、HPLC 用

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：Agilent 製、Bond  
Elut PSA（1,000 mg）

## 3. 装置

液体クロマトグラフ：Acquity UPLC（Waters 製）

タンデム型質量分析計：Xevo TQ-S（Waters 製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーターNVC-2100（東京理化工機(株)製）

ホモジナイザー：POLYTRON PT3100（Kinematica AG）

## 4. 測定条件

カラム：CAPCELL PAK ADME S3（粒子径 3 μm、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、(株)  
大阪ソーダ製）

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%酢酸（A 液）及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（B 液）

送液条件：下表

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	75	25
5.0	70	30
10.0	50	50
10.1	5	95
15.0	5	95
15.1	75	25
20.0	75	25

移動相流速：0.4 mL/min

注入量：5 μL

保持時間：

デキサメタゾン 8.6 分、ベタメタゾン 8.4 分

質量分析パラメータ：

キャピラリー電圧 1.0 kV、脱溶媒温度 600°C、脱溶媒ガス流量 1000 L/hr、  
 ーンガス流量 150 L/hr、ネブライザー 7.0 Bar、ソース温度 100°C

表 1 測定イオン (m/z)

	プリカーサー イオン	CV (kV)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
			m/z	CE (eV)	m/z	CE (eV)
デキサメタゾン	450.9	-30	361.0	-25	307.0	-30
ベタメタゾン	450.9	-30	361.0	-25	307.0	-30

CV : Cone Voltage (V) 、 CE : Collision Energy (eV)

## 5. 定量

各添加濃度の回収率 25%相当濃度、回収率 50%相当濃度、回収率 75%相当濃度、  
 回収率 100%相当濃度、回収率 125%相当濃度及び回収率 150%相当濃度の検量線作成  
 用標準溶液 (0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (3 : 1) 混液) を  
 調製した。それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により各化合物の検  
 量線を作成した。

試験溶液 (5 g 試料/1 mL 試験溶液) 5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法に  
 よりデキサメタゾン及びベタメタゾンの含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.00005 mg/kg の場合 (定量限界相当濃度) の検量線、回帰式及  
 び決定係数 (R<sup>2</sup> 値) を示した。

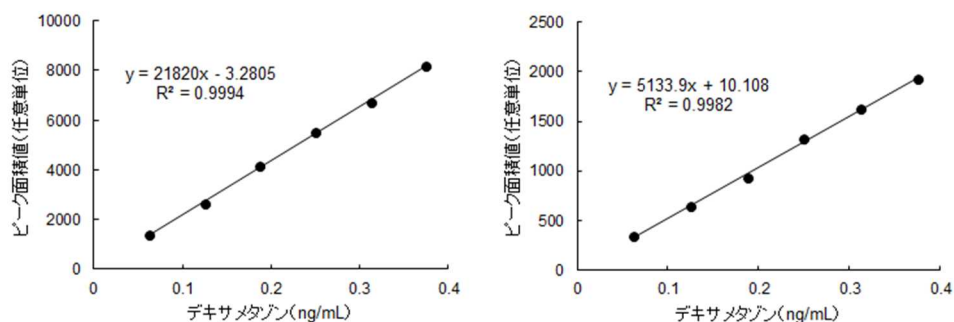


図 1-1 デキサメタゾンの検量線の一例

左 : 測定イオン m/z 451→361、右 : 測定イオン m/z 451→307



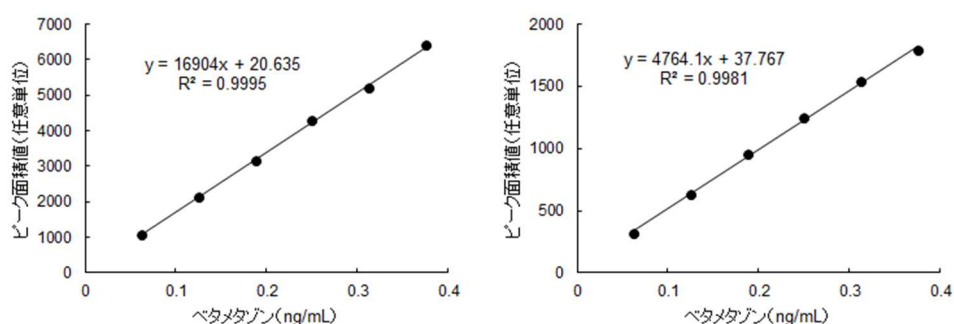


図 1-2 ベタメタゾンの検量線の一例

左：測定イオン  $m/z$  451→361、右：測定イオン  $m/z$  451→307

## 6. 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.10 mL を添加して混合後、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。牛の脂肪の場合は、試料 10.0 g を 40°C の湯浴中で加温して融解し、添加用標準溶液 0.10 mL を添加して混合後、-30°C で 30 分間放置して再固化したものを添加試料とした。

## 7. 試験溶液の調製

### 1) 抽出

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらにホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採った。残留物にアセトニトリル 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た。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、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 50 mL を分取し、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に水 20 mL を加え、酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出した。酢酸エチル層を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸エチル 1 mL を加えて溶かした。

### 2) 精製

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 (1,000 mg) に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、1) で得られた溶液を注入した後、さらに酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を 0.1 vol% 酢酸及び 0.1 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (3 : 1) 混液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

## フローチャート

### 試料 10.0 g

添加試料の場合には、添加用標準溶液を添加・攪拌後、室温で 30 分間放置  
(牛の脂肪の場合は、40℃の湯浴中で加温して融解し、添加用標準溶液を添加して混合後、-30℃で 30 分間放置)

### 抽出

*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加え、1 分間ホモジナイズ  
無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに 2 分間ホモジナイズ  
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採取  
残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、2 分間ホモジナイズ  
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を採取  
アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルで 100 mL に定容  
この 50 mL (試料 5.00 g 相当) を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒除去  
残留物に水 20 mL を加え、酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出  
酢酸エチル層を 40℃以下で濃縮し、溶媒除去  
残留物を酢酸エチル 1 mL で溶解 (抽出溶液)

### 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 (1,000 mg)

カラムを予め酢酸エチル 5 mL で洗浄  
抽出溶液を注入  
容器を酢酸エチル 2 mL ずつで 3 回洗い込んで注入  
更に、酢酸エチル 4 mL を注入  
全流出液を捨てる  
酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 10 mL を注入  
溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去  
残留物を 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (3 : 1) 混液に溶解し、  
正確に 1 mL とする

### LC-MS/MS (5 g 試料/mL)

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を操作した。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からの溶出液を濃縮・溶媒除去して得られた残留物を、検量線作成用標準溶液（回収率 100%相当濃度）1 mL に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. LC-MS/MS 測定条件の検討

##### 1) プリカーサーイオンの選択

まず、フローインジェクション分析により、デキサメタゾン及びベタメタゾンの標準溶液（それぞれ 100 ng/mL、アセトニトリル及び水（1：1）混液で希釈した溶液）をスキャン測定した。ESI（+）におけるデキサメタゾン及びベタメタゾンのマススペクトルをそれぞれ図 2-1-1 及び図 2-1-2 に、ESI（-）におけるデキサメタゾン及びベタメタゾンのマススペクトルをそれぞれ図 2-2-1 及び図 2-2-2 に示した。

デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、ESI（+）においてはプロトン付加分子イオン（ $[M+H]^+$ 、 $m/z$  393）が検出され難いことが確認された。

また、ESI（-）においては脱プロトン分子イオン（ $[M-H]^-$ 、 $m/z$  391）がほとんど検出されないことが確認された。

そこで、デキサメタゾンについて、①0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液、②0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液を用いて希釈した溶液（100 ng/mL）をそれぞれ調製し、スキャン測定を行った。結果を図 2-3-1、図 2-3-2、図 2-4-1 及び図 2-4-2 に示した。

ESI（+）において酸性条件下で測定した場合、若干ではあるがプロトン付加分子（ $[M+H]^+$ 、 $m/z$  393）の強度が増加することが確認された。しかしながら、本イオンをプリカーサーイオンとして選択した場合には、目標とする定量限界（0.00005 ppm）を達成出来ない可能性が高いことが推察された。

ESI（-）においては、酸性条件下で測定した場合であっても脱プロトン分子（ $[M-H]^-$ 、 $m/z$  391）は検出されなかった。一方、ギ酸酸性条件下では  $m/z$  437 のイオンが、酢酸酸性条件下では  $m/z$  451 のイオンが良好な感度で検出された。これらのイオンはそれぞれギ酸付加イオン（ $[M+HCOO]^-$ ）及び酢酸付加イオン（ $[M+CH_3COO]^-$ ）と推察されたことから、これらのイオンをプリカーサーイオンとして選択し、以下、プロダクトイオンの選択、並びに最適な酸濃度の検討を行った。

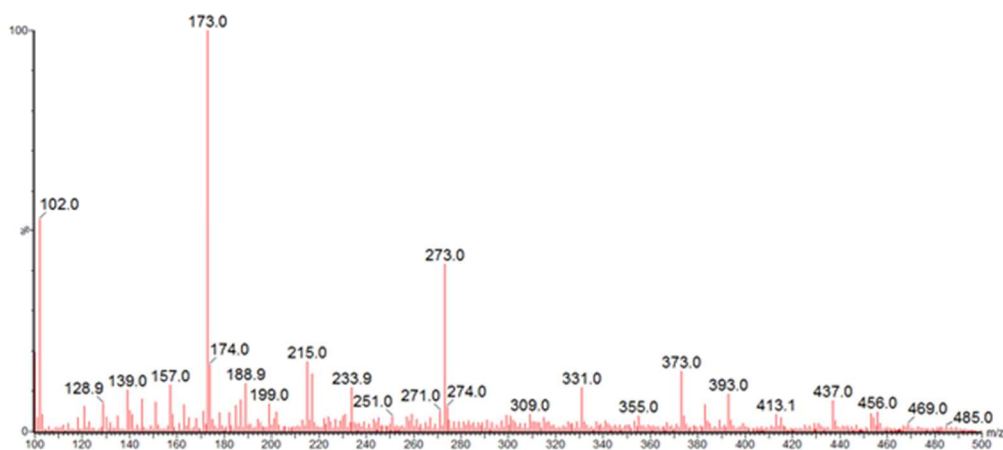


図 2-1-1 ESI (+) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液  
スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV 20 V

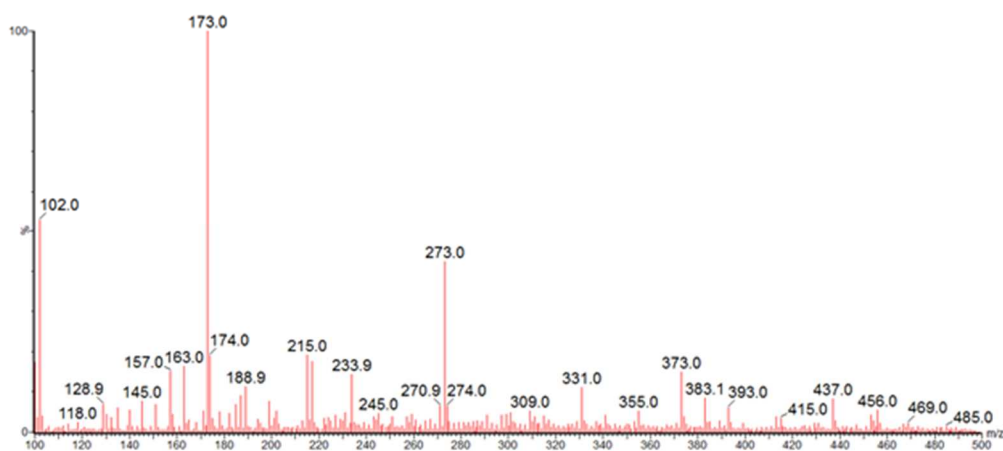


図 2-1-2 ESI (+) におけるベタメタゾンのマススペクトル  
アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液  
スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV 20 V

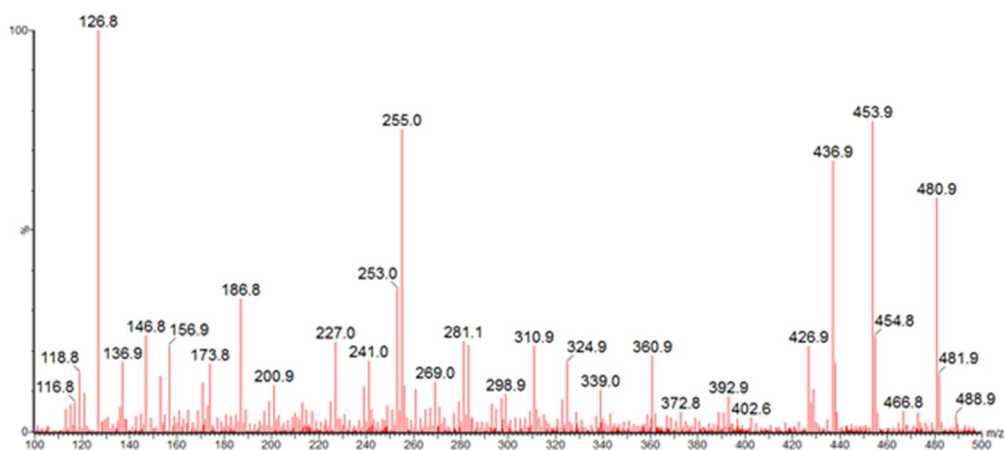


図 2-2-1 ESI (-) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液  
スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V

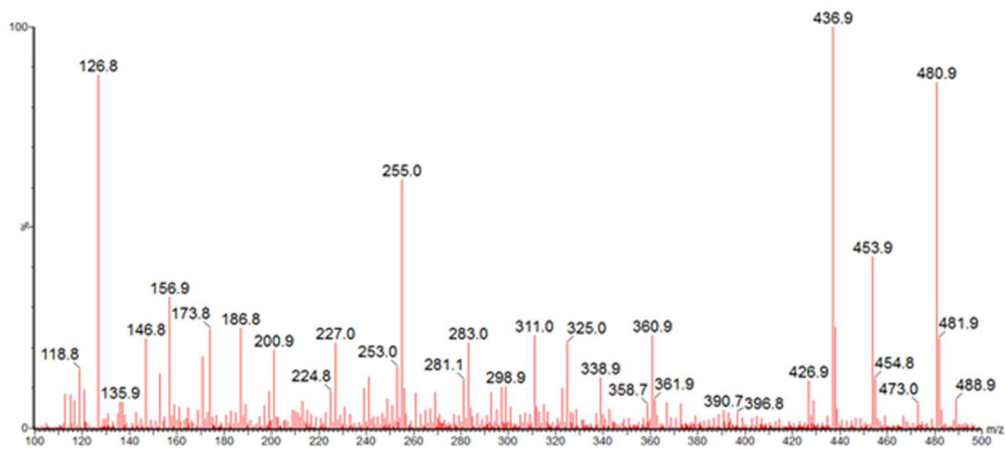


図 2-2-2 ESI (-) におけるベタメタゾンのマススペクトル  
アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液  
スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V

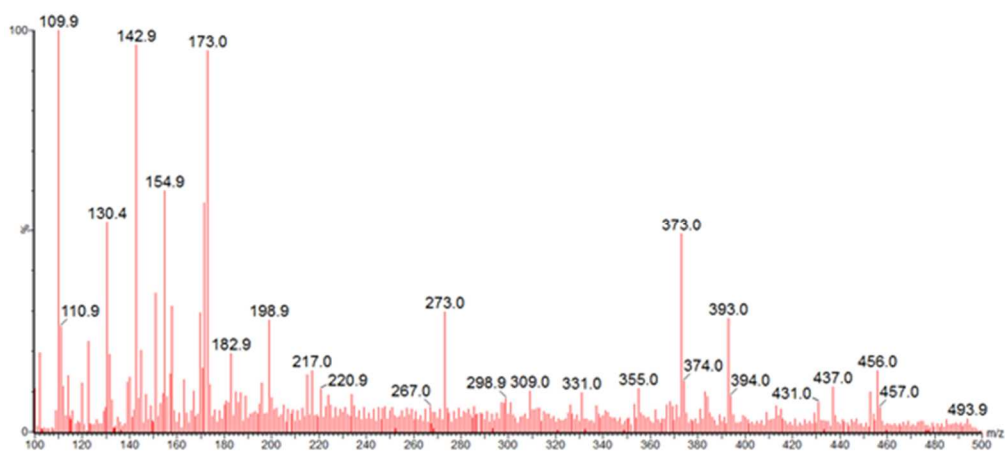


図 2-3-1 ESI (+) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV 20 V

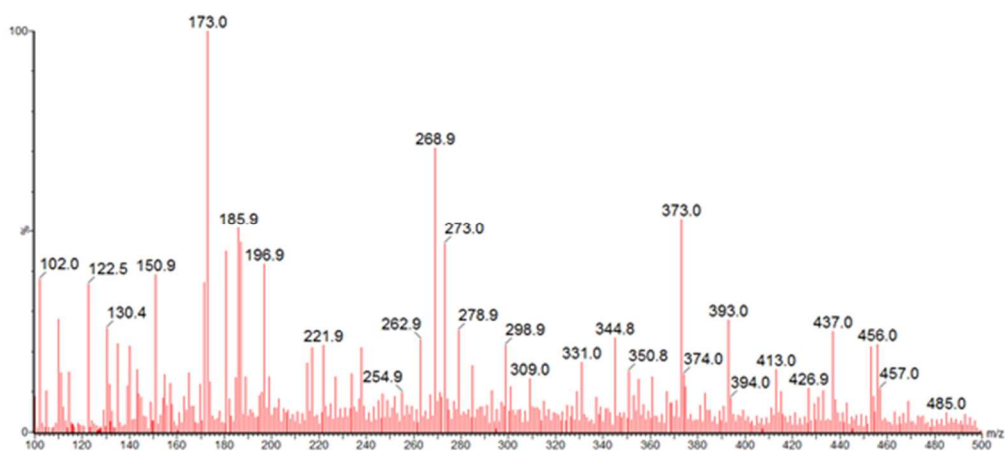


図 2-3-2 ESI (+) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV 20 V

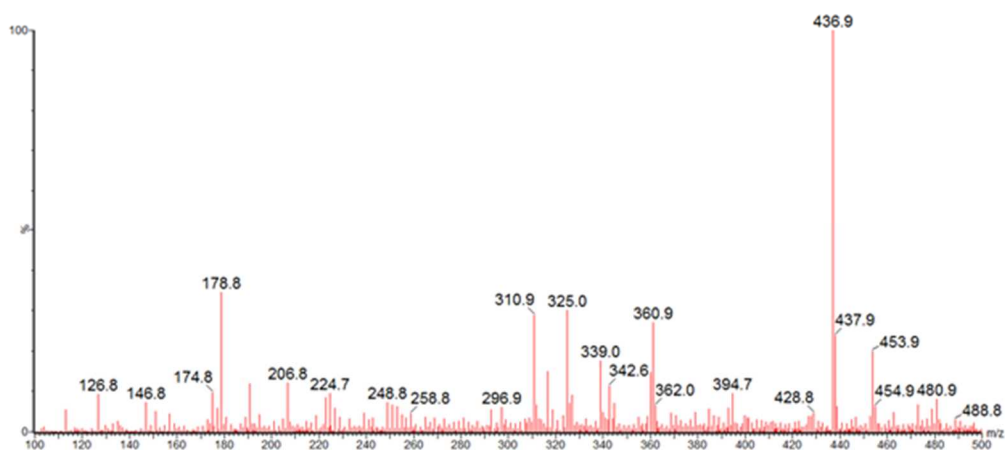


図 2-4-1 ESI (-) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V

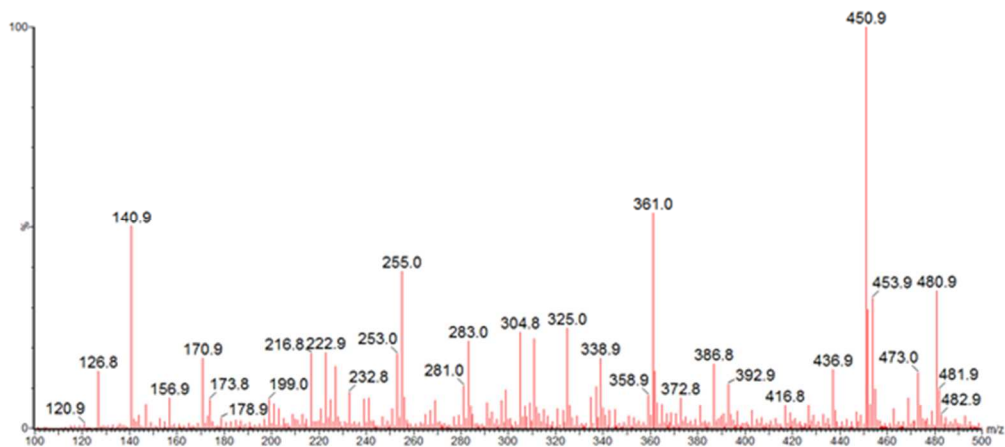


図 2-4-2 ESI (-) におけるデキサメタゾンのマススペクトル  
 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V

## 2) プロダクトイオンの選択

次いで、選択したプリカーサーイオン (ESI (-)、ギ酸酸性条件下では  $m/z$  437、酢酸酸性条件下では  $m/z$  451) についてプロダクトイオンスキャン測定を行った。

### ① ギ酸酸性条件下での測定

$m/z$  361 のイオン (コリジョンエネルギー最適値-20 eV) で良好なシグナル強度が得られた (図 3-1)。次いで、シグナル強度は低い、 $m/z$  307 (コリジョンエネルギー最適値-35 eV) などのイオンが検出された。

### ② 酢酸酸性条件下での測定

$m/z$  361 のイオン (コリジョンエネルギー最適値-20 eV) で良好なシグナル強度が得られ、次いで、 $m/z$  307 (コリジョンエネルギー最適値-35 eV) などのイオンが検出された (図 3-2)。

以上の結果から、ギ酸酸性条件下で測定する場合 (プリカーサーイオンは  $m/z$  437) であっても、酢酸酸性条件下で測定する場合 (プリカーサーイオンは  $m/z$  451) であっても、生成するプロダクトイオンは同様 ( $m/z$  361 など) であることが確認されたことから、本報告においては、タンデム型質量分析におけるデキサメタゾン及びベタメタゾンの測定イオンとして、

#### ・ギ酸酸性条件下で測定する場合

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 437、プロダクトイオン 361

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 437、プロダクトイオン 307

#### ・酢酸酸性条件下で測定する場合

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 451、プロダクトイオン 361

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 451、プロダクトイオン 307

を選択した。



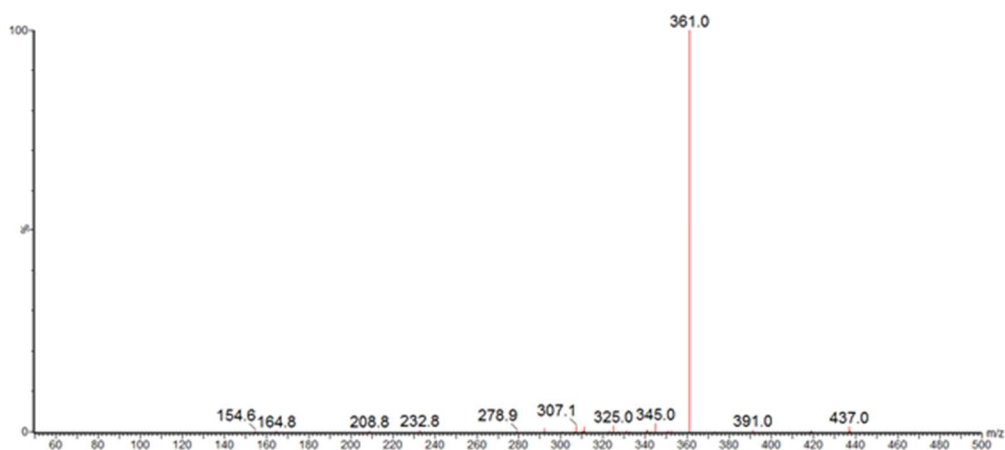


図 3-1 デキサメタゾンのプロダクトイオンスキャンスペクトル①  
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液  
 ESI (-)、プリカーサーイオン  $m/z$  437、  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V、CE -20 eV

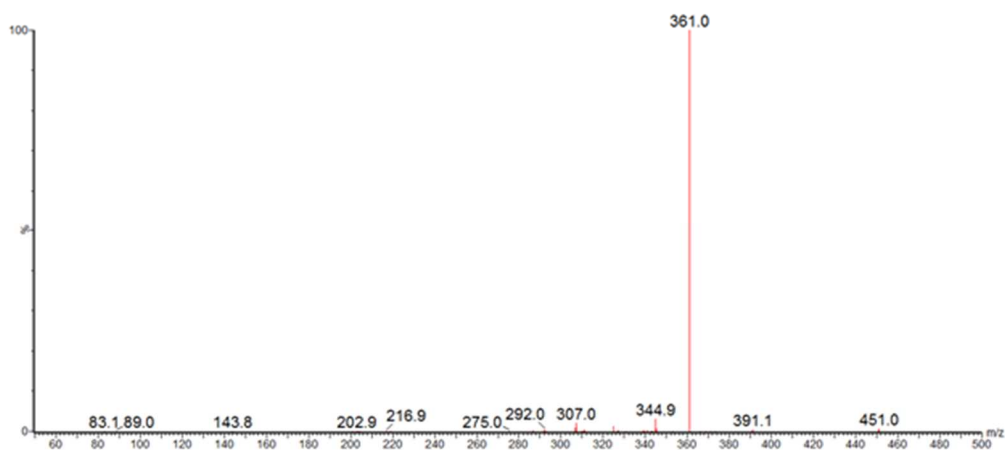


図 3-2 デキサメタゾンのプロダクトイオンスキャンスペクトル②  
 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル (1 : 1) 混液  
 ESI (-)、プリカーサーイオン  $m/z$  451、  
 スキャン範囲  $m/z$  100~500、CV -20 V、CE -20 eV

### 3) LC-MS/MS における測定条件の検討

#### ① デキサメタゾン及びベタメタゾンの測定感度に及ぼす酸濃度の影響

質量分析条件の検討において、ギ酸酸性条件下ではギ酸付加分子イオン ( $m/z$  437) が、酢酸酸性条件下では酢酸付加分子イオン ( $m/z$  451) が検出されたことから、デキサメタゾン及びベタメタゾンの測定感度に及ぼす酸濃度の影響について検討した。

種々の濃度のギ酸もしくは酢酸を含む溶媒（アセトニトリル及び水（1：1）混液）を用いて 100 ng/mL のデキサメタゾン標準溶液を調製し、フローインジェクション分析を行った。測定イオンは、ギ酸を含む標準溶液の測定においては  $m/z$  437→361 及び  $m/z$  437→307 を使用し、酢酸を含む標準溶液の測定においては  $m/z$  451→361 及び  $m/z$  451→307 を使用した。測定時間（X 軸）とシグナル（Y 軸）において得られる曲線下の面積値を積算し、表 2-1 及び表 2-2 に示した。

ギ酸を含む溶液の測定においては、ギ酸濃度が 0.005 vol% の場合に面積値が最大となることが確認された。

一方、酢酸を含む溶液の測定においては、酢酸濃度が 0.1 vol% の場合に面積値が最大になることが確認された。

以上の結果から、ギ酸を含む場合は 0.005 vol%、酢酸を含む場合は 0.1 vol% の濃度の溶液を測定することで良好な測定感度が得られたことから、移動相として『0.005 vol%ギ酸及び 0.005 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液』もしくは『0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液』を使用することで、LC-MS/MS によるデキサメタゾン及びベタメタゾンの高感度測定が可能であると推察された。

表 2-1 デキサメタゾンの測定感度に及ぼすギ酸濃度の影響

溶液中のギ酸濃度 (vol%)	面積値*	
	$m/z$ 437→361	$m/z$ 437→307
0.001	782214	157517
0.005	911522	186566
0.01	732881	145797
0.05	820066	165247
0.1	855295	170190

\* : 3 回の繰り返し測定における平均値

表 2-2 デキサメタゾンの測定感度に及ぼす酢酸濃度の影響

溶液中の酢酸濃度 (vol%)	面積値*	
	$m/z$ 451→361	$m/z$ 451→307
0.05	812585	192514
0.1	1049227	246032
0.5	892689	209897
1	837827	194922

\* : 3 回の繰り返し測定における平均値

② デキサメタゾン及びベタメタゾンの測定感度に及ぼす移動相中の酸の影響

移動相に『0.005 vol%ギ酸及び0.005 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液』もしくは『0.1 vol%酢酸及び0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液』を用い、デキサメタゾン及びベタメタゾン標準溶液（各 1 ng/mL）を測定した。

なお、本検討においては、以下の3種類の溶媒を用いて調製した標準溶液を測定した。

- ・水及びアセトニトリル（17：3）混液
- ・0.005 vol%ギ酸及び0.005 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（17：3）混液
- ・0.1 vol%酢酸及び0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（17：3）混液

結果を表 3-1 及び表 3-2 に示した。

ギ酸を含む移動相を用いて測定した場合には、注入した標準溶液中の酸の有無や種類に関わらず、デキサメタゾン及びベタメタゾンともにギ酸付加分子イオン（ $m/z$  437→361）が検出され、酢酸付加分子イオン（ $m/z$  451→361）は検出されなかった。また、各標準溶液で得られたデキサメタゾン及びベタメタゾンのピーク面積値はそれぞれほとんど同等であった（表 3-1）。

酢酸を含む移動相を用いて測定した場合には、デキサメタゾン及びベタメタゾンともに主に酢酸付加分子イオン（ $m/z$  451→361）が検出され、ギ酸付加分子イオン（ $m/z$  437→361）の検出は僅かであった。また、各標準溶液で得られたデキサメタゾン及びベタメタゾンのピーク面積値はそれぞれほとんど同等であった（表 3-2）。

以上の結果から、質量分析において良好な測定感度が得られるデキサメタゾン及びベタメタゾンのプリカーサーイオンに対する、注入する試験溶液中の酸の有無や種類の影響は小さく、移動相に添加する酸の種類の影響が大きいことが示された。

ギ酸（0.005 vol%）もしくは酢酸（0.1 vol%）を添加した移動相におけるデキサメタゾン及びベタメタゾンのピーク面積値はほとんど同等であったことから、移動相の調製の容易さや緩衝能などを考慮し、本報告では酢酸を含む移動相を選択した。

表 3-1 ギ酸を含む移動相における標準溶液のピーク面積値

	ピーク面積値			
	$m/z$ 437→361		$m/z$ 451→361	
	デキサメタゾン	ベタメタゾン	デキサメタゾン	ベタメタゾン
水及びアセトニトリル（17：3）混液 で調製した標準溶液	11976	10371	ND	ND
0.005 vol%ギ酸及び0.005 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（17：3）混液で調製した標準溶液	12492	10632	ND	ND
0.1 vol%酢酸及び0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（17：3）混液で調製した標準溶液	12713	10877	ND	ND

ND：デキサメタゾンもしくはベタメタゾンのピークの S/N<3

表 3-2 酢酸を含む移動相における標準溶液のピーク面積値

	ピーク面積値			
	<i>m/z</i> 437→361		<i>m/z</i> 451→361	
	デキサメタゾン	ベタメタゾン	デキサメタゾン	ベタメタゾン
水及びアセトニトリル (17:3) 混液 で調製した標準溶液	246	182	11929	9368
0.005 vol%ギ酸及び0.005 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (17:3) 混液で調製した標準溶液	221	221	12232	9513
0.1 vol%酢酸及び0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (17:3) 混液で調製した標準溶液	195	166	11684	9270

## ② 分析カラムの検討

検討対象化合物であるデキサメタゾン及びベタメタゾンは、互いに立体異性体の関係にあるため、質量分析のみでこれらの化合物を区別することはできない。したがって、これら化合物についてそれぞれの含有量を求めるためには、液体クロマトグラフィー等を用いてこれらの化合物を十分に分離する必要がある。

上記の理由から、種々の LC 用分析カラムを用いてデキサメタゾン及びベタメタゾンの分離条件について検討した。

移動相は 0.1 vol%酢酸 (A 液) 及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (B 液) を用い、2 液を isocratic 条件で送液した。デキサメタゾン及びベタメタゾンの混合標準溶液 (各 100 ng/mL) を 5 µL 注入し、測定イオン *m/z* 451→361 におけるピークの分離、ピーク形状、ピーク面積値等を確認した。

得られた SRM クロマトグラムを図 4 に示した。なお、検討したいずれの分析カラムにおいても、ベタメタゾン、デキサメタゾンの順に溶出した。

### a. InertSustain C18 HP

まず、LC 分析で一般的に使用されるオクタデシルシリル化シリカゲルを充填した分析カラム (InertSustain C18 HP、粒子径 3 µm、内径 3 mm、長さ 150 mm、ジューエルサイエンス(株)製) を用いて測定した。移動相中の B 液 (0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液) の比率が 50% の場合には、デキサメタゾンとベタメタゾンは分離できなかった。B 液の比率を低下させることで良好な分離が得られたが、測定感度が著しく低下することが確認された (図 4-1)。

### b. Acquity UPLC BEH C18

次に、粒子径が小さく高い分離能を有する分析カラム (Acquity UPLC BEH C18、粒子径 1.7 µm、内径 2.1 mm、長さ 50 mm、Waters 製) を用いて測定した。InertSustain C18 HP を用いた場合と比較して、分離及び測定感度ともに良好であった (図 4-2)。一方、分析時のカラム圧力が高く (流速 0.4 mL/min の場合 30 MPa 以上)、耐圧性の高い LC を必要とする可能性が示唆された。

### c. CAPCELL PAK ADME

次いで、アダマンチル基化学結合型シリカゲルを充填した分析カラム (CAPCELL PAK ADME、粒子径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2.1 mm、長さ 150 mm) を用いて測定した。分離及び測定感度については Acquity UPLC BEH C18 と同程度であった (図 4-3)。カラム圧力については、Acquity UPLC BEH C18 よりも低く (流速 0.4 mL/min で 15 MPa 程度)、高耐圧の LC だけでなく汎用の LC も使用可能と考えられた。

以上の結果から、本報告では分析カラムとして CAPCELL PAK ADME (粒子径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2.1 mm、長さ 150 mm) を選択した。

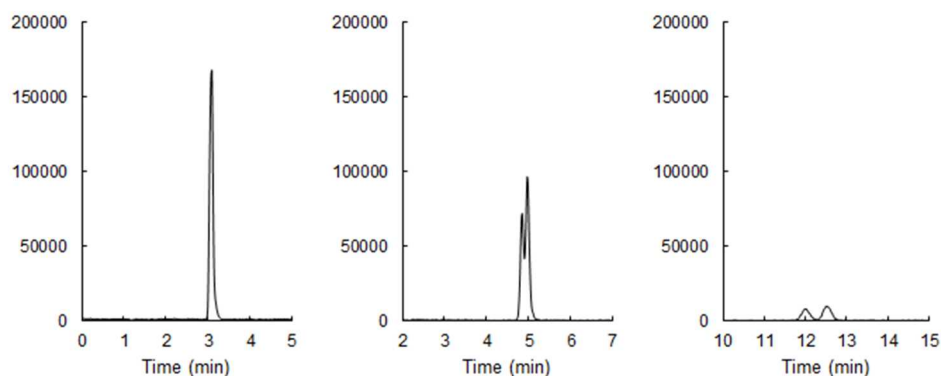


図 4-1 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム①  
 分析カラム : InertSustain C18 HP (粒子径 3  $\mu\text{m}$ 、3 mm $\times$ 150 mm)  
 左 : 移動相 B 液 50%、中 : 移動相 B 液 40%、右 : 移動相 B 液 30%

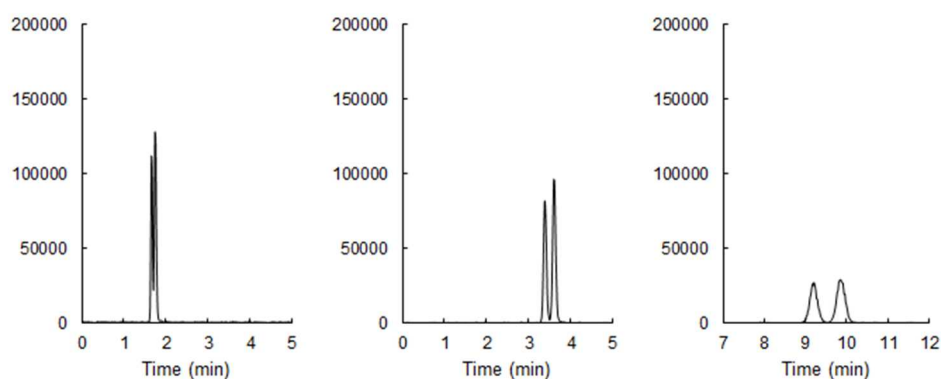


図 4-2 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム②  
 分析カラム : Acquity UPLC BEH C18 (粒子径 1.7  $\mu\text{m}$ 、2.1 mm $\times$ 50 mm)  
 左 : 移動相 B 液 30%、中 : 移動相 B 液 25%、右 : 移動相 B 液 20%

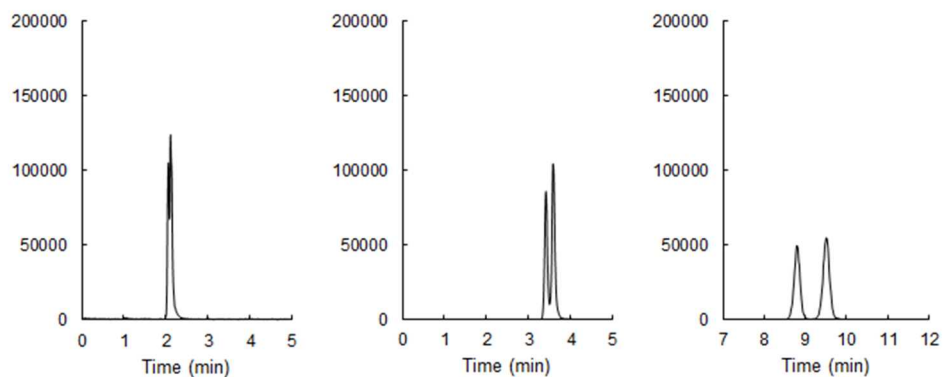


図 4-3 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム③  
 分析カラム：CAPCELL PAK ADME（粒子径 3 μm、2.1 mm×150 mm）  
 左：移動相 B 液 50%、中：移動相 B 液 40%、右：移動相 B 液 30%

③ グラジエント条件の検討

分析カラムとして選択した CAPCELL PAK ADME について、適切なグラジエント条件の設定を検討した。

デキサメタゾンとベタメタゾンの良好な分離、並びに、良好な測定感度を得ることを目的として種々の条件を検討した結果、以下の条件において良好な分離及び測定感度が得られた。

移動相 A 液：0.1 vol%酢酸

移動相 B 液：0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	75	25
5.0	70	30
10.0	50	50
10.1	5	95
15.0	5	95
15.1	75	25
20.0	75	25

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出

国内の残留試験においては、抽出にアセトニトリルもしくはアセトニトリルと水の混液を用いた分析法が採用されている。本報告では、『HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）』で使用されているアセトニトリル抽出（*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下）の適用性を検討した。

牛の脂肪を均一化した後、10.0 g を量り採り、40°Cの湯浴中で融解した。これに、デキサメタゾン及びベタメタゾンを各 0.5 ng 添加（5 ng/mL の添加用標準溶液を 0.1 mL）し、ミクロスパーテルで攪拌後、-30°Cで約 30 分間放置した。

上記の試料を『[実験方法]7. 試験溶液の調製』に記載した方法に従い操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定した結果、デキサメタゾン（回収率 95%）及びベタメタゾン（回収率 96%）ともに良好な回収率が得られた。

以上の結果から、畜水産物からのデキサメタゾン及びベタメタゾンの抽出操作として、アセトニトリル抽出（*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下）を適用可能と考えられたことから、本試験法における抽出操作としては、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、デキサメタゾン及びベタメタゾンを試料からアセトニトリルで抽出する方法を採用した。

### 2) 転溶操作について

検討対象化合物であるデキサメタゾンについては非常に低い定量限界（0.00005 ppm）が設定されているため、汎用の LC-MS/MS で測定する場合には 5 倍程度の濃縮操作が必要と考えられた（例：試料 10.0 g から 1 mL の試験溶液を調製する場合、試料 5.00 g 相当量の抽出液を濃縮・精製する必要がある）。

牛の筋肉 10.0 g について上記（2. 試験溶液調製法の検討 1）抽出）に記載した抽出操作を行い、得られた抽出液 50 mL（試料 5.00 g 相当量）を濃縮・溶媒除去したところ、試料由来の夾雑物が多く、効率的にミニカラム精製を行うことは困難であると判断された。

以上の理由から、ミニカラム精製を行う前に、試料由来の夾雑物を効率的に除去することを目的として、転溶操作について検討した。

デキサメタゾン及びベタメタゾン各 0.5 ng（各 5 ng/mL の添加用標準溶液を 0.1 mL）を採り、水 20 mL を加えた。これに酢酸エチル 20 mL を加えて振とう及び遠心分離後、酢酸エチル層を採った。水層に酢酸エチル 20 mL を加えて振とう及び遠心分離後、酢酸エチル層を採る操作を更に 2 回繰り返した。それぞれの酢酸エチル層を濃縮、溶媒除去後、残留物を 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（3：1）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

結果を表 4 に示した。デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、2 回の転溶操作で酢酸エチル層に良好に分配されることが確認された。

次いで、上述の牛の筋肉試料の抽出液 50 mL（試料 5.00 g 相当量）を濃縮・溶媒除去して得られた残留物に水 20 mL を加え、酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出した。得られた酢酸エチル層を合わせ、濃縮及び溶媒を除去したところ、試料由来

の夾雑物は少なく、以降のミニカラム精製操作における負荷液（酢酸エチル 1 mL）に溶解可能であったことから、本転溶操作の実施により、ミニカラム精製を効率的に行うことが可能と判断した。

以上の結果から、本報告においては、酢酸エチル転溶操作を採用した。

表 4 酢酸エチル転溶におけるデキサメタゾン及びベタメタゾンの回収率

	デキサメタゾン		ベタメタゾン	
	回収率 (%)	累計 (%)	回収率 (%)	累計 (%)
転溶 1 回目	91	91	94	94
転溶 2 回目	4	95	4	98
転溶 3 回目	ND	95	ND	98

ND：デキサメタゾンもしくはベタメタゾンのピークの S/N<3

### 3) ミニカラム精製について

種々の畜産物由来の試料マトリックスの効果的な除去を目的として、ミニカラム精製法を検討した。

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（Agilent 製 Bond Elut PSA、1,000 mg）を用いた精製法について、以下、検討の詳細を示した。

#### ① 負荷及び洗浄操作の検討

予め酢酸エチル 5 mL で洗浄した Bond Elut PSA（1,000 mg）に、デキサメタゾン及びベタメタゾン（各 0.5 ng を酢酸エチル 1 mL に溶解したもの）を負荷した後、酢酸エチルを 5 mL ずつ 2 回注入した。負荷液と 1 回目の酢酸エチル 5 mL を注入した際の流出液、2 回目の酢酸エチル 5 mL を注入した際の流出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% 酢酸及び 0.1 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（3 : 1）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、酢酸エチルを用いた場合には、負荷液を含めて 11 mL の通液においてもデキサメタゾン及びベタメタゾンの溶出は確認されなかった（表 5-1）。

#### ② 溶出液の検討

次に、溶出液について検討した。予め酢酸エチル 5 mL で洗浄した Bond Elut PSA（1,000 mg）に、デキサメタゾン及びベタメタゾン（各 0.5 ng を酢酸エチル 1 mL に溶解したもの）を負荷した後、酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル及びメタノール（9 : 1）混液を 5 mL ずつ注入し、各溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% 酢酸及び 0.1 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（3 : 1）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、酢酸エチル及びメタノール（9 : 1）混液 10 mL で良好な回収率が得られた。



以上の結果から、本報告における Bond Elut PSA ミニカラム (1,000 mg) を用いた精製操作は、

『予め酢酸エチル 5 mL で洗浄した Bond Elut PSA (1,000 mg) に、抽出液 (酢酸エチル転溶後に得られた残留物を酢酸エチル 1 mL に溶解したもの) を注入後、更に酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。』

操作とした。

表 5-1 PSA ミニカラムからのデキサメタゾン及びベタメタゾンの回収率①

	デキサメタゾン		ベタメタゾン	
	回収率 (%)	累計 (%)	回収率 (%)	累計 (%)
負荷液 (酢酸エチル 1 mL) 及び 洗浄液 (酢酸エチル 5 mL)	ND	0	ND	0
洗浄液 (酢酸エチル 5 mL)	ND	0	ND	0

ND : デキサメタゾンもしくはベタメタゾンのピークの S/N < 3

表 5-2 PSA ミニカラムからのデキサメタゾン及びベタメタゾンの回収率②

	デキサメタゾン		ベタメタゾン	
	回収率 (%)	累計 (%)	回収率 (%)	累計 (%)
酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 0-5 mL	89	89	91	91
酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 5-10 mL	10	99	8	99
酢酸エチル及びメタノール (9 : 1) 混液 10-15 mL	ND	99	ND	99

ND : デキサメタゾンもしくはベタメタゾンのピークの S/N < 3

### 3. 添加回収試験

検討食品は、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、豚の筋肉、鶏の筋肉、鶏の肝臓、鶏卵（全8食品）を用いた。

ブランク試料に添加用標準溶液 0.1 mL を添加・攪拌し、室温で約 30 分間放置したものを添加試料とした。

ブランク試料及び添加試料について、「[実験方法]7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い操作し、試験溶液を調製した。調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定し、選択性、真度及び精度、S/N を求めた。

#### ① 選択性

本報告で検討した全ての食品（8食品）のブランク試料において、デキサメタゾン及びベタメタゾンの定量を妨害するピークは検出されなかった。

結果の詳細を表 6-1 及び 6-2 に示した。

表 6-1 選択性の評価結果（デキサメタゾン）

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)						選択性の評価	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				面積(高さ)比 (a)/(b)		
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	デキサメタゾン (m/z 451→361)	牛の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	77	72	74	112942	110903	111922	0.001	○	
2		牛の脂肪(MRL)	0.00005	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	0	0	103078	101143	102110	0.000	○	
3		牛の肝臓(MRL)	0.00005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0	199690	175285	187487	0.000	○	
4		牛乳(MRL)	0.00005	0.0003	基準値	0.0003	< 0.100	面積	66	55	61	32995	32105	32550	0.002	○	
5		豚の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	0	0	107797	111312	109554	0.000	○	
6		牛の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	44	41	43	5952	5817	5884	0.007	○	
7		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4312	4087	4200	0.000	○	
8		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	5229	5303	5266	0.000	○	
9		牛乳(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	66	55	61	4946	4959	4953	0.012	○	
10		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	40	35	38	5893	5864	5878	0.006	○	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	6667	6631	6649	0.000	○	
12		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	5291	5341	5316	0.000	○	
13		鶏卵(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	5410	5456	5433	0.000	○	

表 6-2 選択性の評価結果（ベタメタゾン）

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)						選択性の評価	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				面積(高さ)比 (a)/(b)		
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	ベタメタゾン (m/z 451→361)	牛の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4495	4435	4465	0.000	○	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	3246	3234	3240	0.000	○	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4025	3980	4003	0.000	○	
4		牛乳(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	3761	3788	3775	0.000	○	
5		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4595	4530	4563	0.000	○	
6		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	5124	5134	5129	0.000	○	
7		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4038	4103	4070	0.000	○	
8		鶏卵(LOQ)	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	0	4239	4192	4215	0.000	○	

② 真度及び精度（基準値相当濃度を添加した添加試料の結果）

基準値相当濃度のデキサメタゾンの真度及び併行精度は、それぞれ 95%~97%及び 1.3 RSD%~4.0 RSD%であり（表 7）、全ての検討食品において真度の目標値（70%~120%の範囲内）及び併行精度の目標値（25 RSD%未満）を満足することが確認された。

表 7 真度及び精度の評価結果（デキサメタゾン）

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	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			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	
1	デキサメタゾン (m/z 451→36)	牛の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	0.001	-	21860040	1449	0.9999	96	99	99	97	94	97.0	2.2	26129	22521	24325	
2		牛の脂肪(MRL)	0.00005	0.001	0.001	-	20654418	1065	0.9997	97	96	96	95	94	95.6	1.3	29979	16869	21924	
3		牛の肝臓(MRL)	0.00005	0.002	0.002	-	18296800	2191	0.9987	94	97	95	98	98	96.3	1.7	50200	29766	39963	
4		牛乳(MRL)	0.00005	0.0003	0.0003	-	21497045	138	0.9987	99	89	97	97	95	95.2	4.0	11741	8698	10219	
5		豚の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	0.001	-	21564614	2598	0.9992	99	93	98	95	93	95.6	3.1	29744	17862	23803	

③ 定量限界（0.00005 mg/kg 相当濃度を添加した添加試料の結果）

定量限界相当濃度を添加した場合のデキサメタゾンの真度、併行精度及び S/N は、それぞれ 91%~99%、1.2 RSD%~3.1 RSD%及び 789~2156 であった。また、ベタメタゾンの真度、併行精度及び S/N は、それぞれ 90%~99%、1.5 RSD%~3.7 RSD%及び 598~1665 であった。

結果の詳細を表 8-1 及び表 8-2 に示した。デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、全ての検討食品において真度の目標値（70%~120%の範囲内）及び併行精度の目標値（30 RSD%未満）を満足しており、添加回収試験溶液中のピークは S/N ≥ 10 の目標値を満足することが確認されたことから、0.00005 mg/kg の定量限界を設定可能であることが示された。

表 8-1 定量限界の評価結果（デキサメタゾン）

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	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			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	
1	デキサメタゾン (m/z 451→36)	牛の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	23073113	129	0.9994	91	92	94	91	89	91.2	2.0	1604	949	1276	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	16810782	-14	0.9988	92	96	97	99	97	96.3	3.0	987	590	789	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	21185248	50	0.9992	91	91	92	87	93	90.6	2.6	1465	1362	1413	
4		牛乳(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	18807637	96	0.9998	100	96	100	97	100	98.5	2.0	2502	1344	1923	
5		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	23657061	55	0.9994	93	90	91	92	91	91.2	1.2	2644	1438	2041	
6		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	25872444	58	0.9984	94	95	91	95	97	94.4	2.1	2392	1921	2156	
7		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	20738863	63	0.9993	90	94	96	91	90	92.2	3.1	1969	1543	1766	
8		鶏卵(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	21819510	-3	0.9994	93	89	89	95	93	92.0	3.0	2135	1400	1768	

表 8-2 定量限界の評価結果（ベタメタゾン）

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	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			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	
1	ベタメタゾン (m/z 451→36)	牛の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	17442411	136	0.9996	90	91	92	90	86	90.0	2.7	1197	713	955	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	12585915	65	0.9986	90	94	97	96	97	94.9	3.1	745	452	598	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	16320045	57	0.9984	90	91	91	86	90	89.6	2.1	1105	1059	1082	
4		牛乳(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	14599007	34	0.9999	101	95	99	99	100	98.8	2.3	1900	1032	1466	
5		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	18281231	30	0.9990	92	90	92	94	92	91.8	1.5	2034	1107	1570	
6		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	19978973	88	0.9988	95	95	91	94	95	93.9	1.9	1870	1459	1665	
7		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	15285760	131	0.9992	90	96	99	94	92	94.3	3.7	1547	1189	1368	
8		鶏卵(LOQ)	0.00005		0.00005	S/N	16903657	21	0.9995	93	88	90	95	92	91.5	2.9	1663	1085	1374	

#### 4. 測定の際の試料マトリックスの影響

デキサメタゾンの基準値濃度及び定量限界濃度での測定の際の試料マトリックスの影響を表 9-1 に、ベタメタゾンの定量限界濃度での測定の際の試料マトリックスの影響を表 9-2 に示した。

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に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、デキサメタゾンでは基準値濃度及び定量限界濃度でそれぞれ 0.99~1.03 及び 0.98~1.03 であった。ベタメタゾンでは定量限界濃度で 0.97~1.03 であった。以上の結果から、デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、測定の際の試料マトリックスの影響により定量値が大きく変動する可能性は少ないと考えられた。

表 9-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (デキサメタゾン)

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 (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク	ピーク面積(高さ)						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	デキサメタゾン (m/z 451→361)	牛の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	0.001	0.005	面積	74	112942	110903	111848	110345	107838	109091	1.03	
2		牛の脂肪(MRL)	0.00005	0.001	0.001	0.005	面積	0	103078	101143	102110	103185	103675	103430	0.99	
3		牛の肝臓(MRL)	0.00005	0.002	0.002	0.01	面積	0	199690	175285	187487	190180	187796	188988	0.99	
4		牛乳(MRL)	0.00005	0.0003	0.0003	0.0015	面積	61	32995	32105	32489	32105	31344	31725	1.02	
5		豚の筋肉(MRL)	0.00005	0.001	0.001	0.005	面積	0	107797	111312	109554	109947	106261	108104	1.01	
6		牛の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	43	5952	5817	5842	5827	5776	5801	1.01	
7		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4312	4087	4200	4102	4087	4094	1.03	
8		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	5229	5303	5266	5425	5303	5364	0.98	
9		牛乳(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	61	4946	4959	4892	4832	4917	4874	1.00	
10		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	38	5893	5864	5841	5913	6051	5982	0.98	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	6667	6631	6649	6534	6643	6588	1.01	
12		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	5291	5341	5316	5229	5163	5196	1.02	
13		鶏卵(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	5410	5456	5433	5536	5392	5464	0.99	

表 9-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (ベタメタゾン)

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 (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク	ピーク面積(高さ)						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	ベタメタゾン (m/z 451→361)	牛の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4495	4435	4465	4430	4354	4392	1.02	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	3246	3234	3240	3194	3092	3143	1.03	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4025	3980	4003	4158	4063	4111	0.97	
4		牛乳(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	3761	3788	3775	3661	3794	3728	1.01	
5		豚の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4595	4530	4563	4482	4701	4591	0.99	
6		鶏の筋肉(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	5124	5134	5129	5032	5200	5116	1.00	
7		鶏の肝臓(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4038	4103	4070	3969	3977	3973	1.02	
8		鶏卵(LOQ)	0.00005		0.00005	0.00025	面積	0	4239	4192	4215	4283	4161	4222	1.00	

各検討食品におけるデキサメタゾンの SRM クロマトグラム (基準値濃度) を図 5、デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム (定量限界濃度) を図 6、トータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 m/z 100~500) を図 7 に示した。

## [結論]

畜産物中のデキサメタゾン及びベタメタゾンの試験法について検討した。

抽出法については、アセトニトリル抽出（無水硫酸ナトリウム及び *n*-ヘキサン共存下）を適用可能であった。精製操作については、酢酸エチル転溶を行った後、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を使用することで、種々の畜産物由来のマトリックスを効果的且つ効率的に除去可能であることが確認された。

また、液体クロマトグラフィーにおける移動相として 0.1 vol%酢酸及び 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液を用い、タンデム質量分析におけるプリカーサーイオンとしてデキサメタゾン及びベタメタゾンの酢酸付加分子イオンを選択することで、高感度な測定が可能であった。さらに、アダマンチル基化学結合型シリカゲルを充填した分析カラムを使用することで、デキサメタゾンとベタメタゾンを良好に分離可能であった。

開発した方法を用い、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、豚の筋肉、鶏の筋肉・肝臓・卵を対象に添加回収試験（添加濃度：各検討食品における基準値濃度及び 0.00005 mg/kg）を実施した結果、

- ・ 選択性

検討した全ての食品において、選択性に問題は無いことが確認された。

- ・ 真度及び併行精度

基準値濃度のデキサメタゾンについて、検討した全ての食品において真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・ 定量限界

添加濃度 0.00005 mg/kg の添加試料を用いた添加回収試験において、デキサメタゾン及びベタメタゾンともに、真度、併行精度及びピークの S/N の目標値を満足したことから、定量限界は 0.00005 mg/kg に設定可能であると考えられた。

以上の結果から、畜産物中のデキサメタゾン及びベタメタゾンの試験法として、本報告で開発した方法を適用可能（定量限界はデキサメタゾン及びベタメタゾンともに 0.00005 mg/kg）であると判断された。

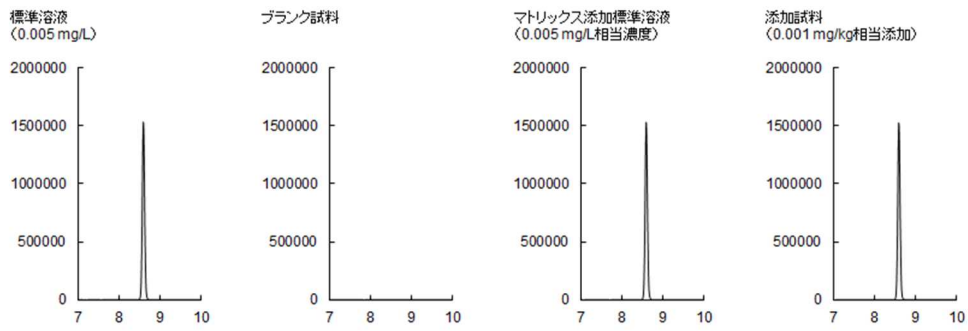


図 5-1 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム  
測定イオン  $m/z$  451→361、牛の筋肉、基準値濃度 (0.001 mg/kg)

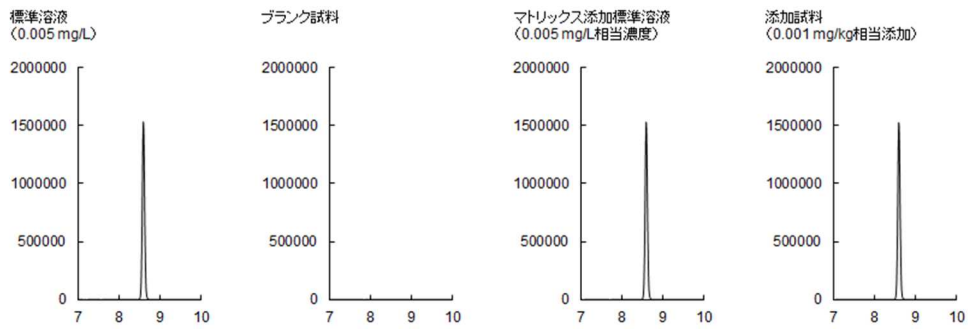


図 5-2 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム  
測定イオン  $m/z$  451→361、牛の脂肪、基準値濃度 (0.001 mg/kg)

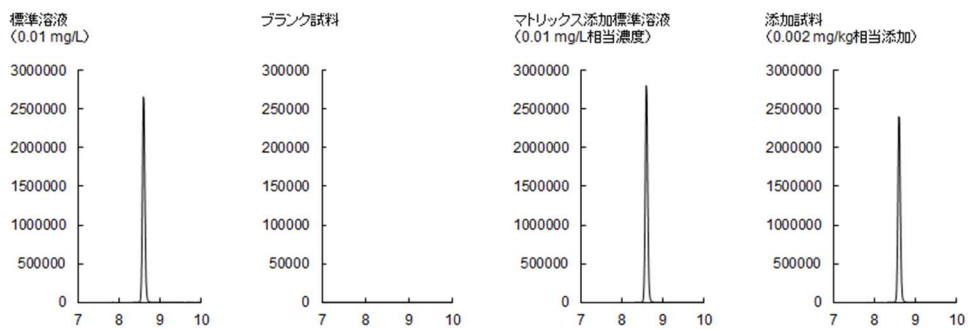


図 5-3 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム  
測定イオン  $m/z$  451→361、牛の肝臓、基準値濃度 (0.002 mg/kg)

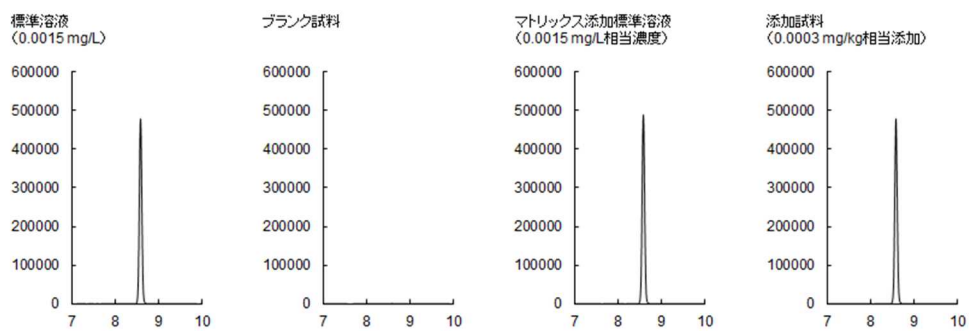


図 5-4 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム  
測定イオン  $m/z$  451→361、牛乳、基準値濃度 (0.0003 mg/kg)

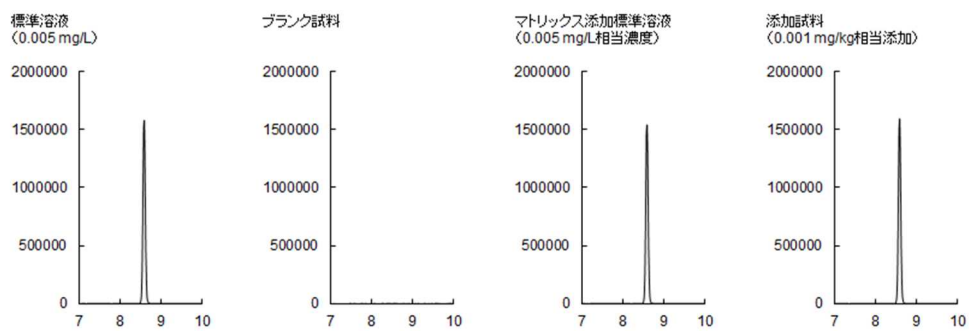


図 5-5 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム  
測定イオン  $m/z$  451→361、豚の筋肉、基準値濃度 (0.001 mg/kg)

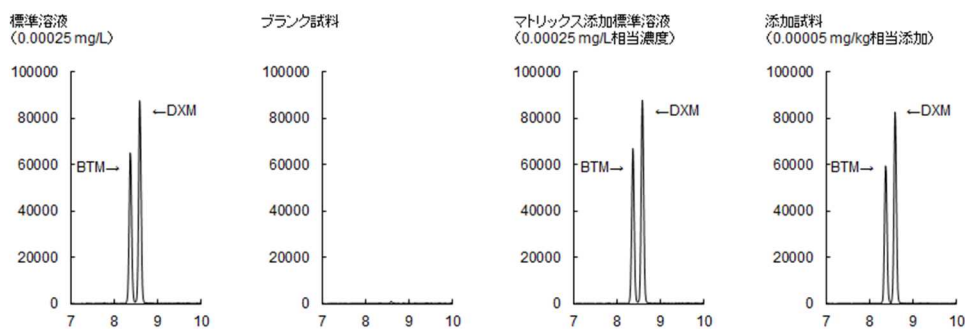


図 6-1 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、牛の筋肉、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

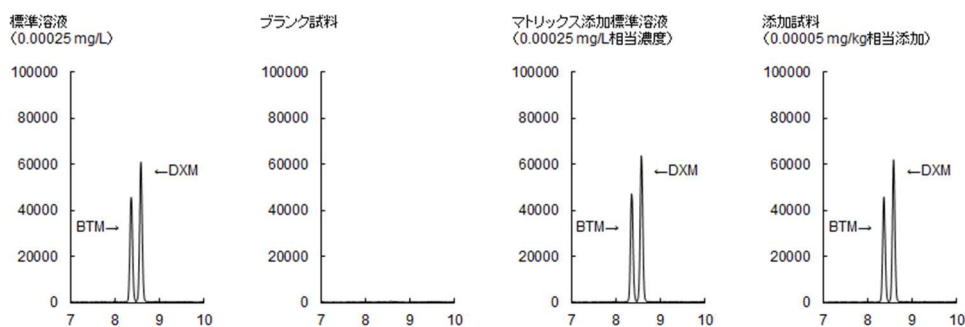


図 6-2 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、牛の脂肪、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

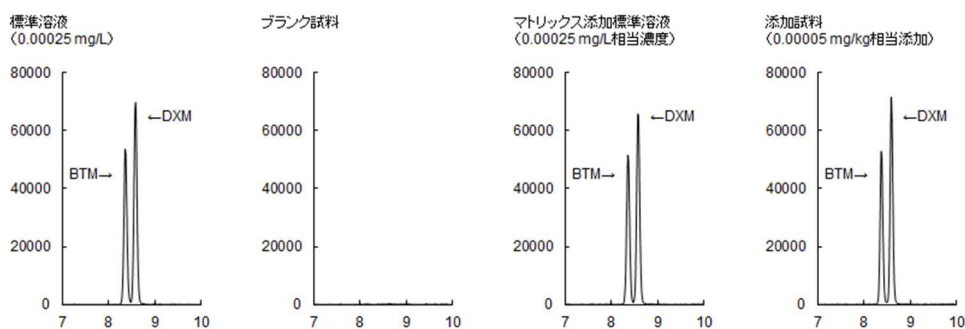


図 6-3 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、牛の肝臓、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM



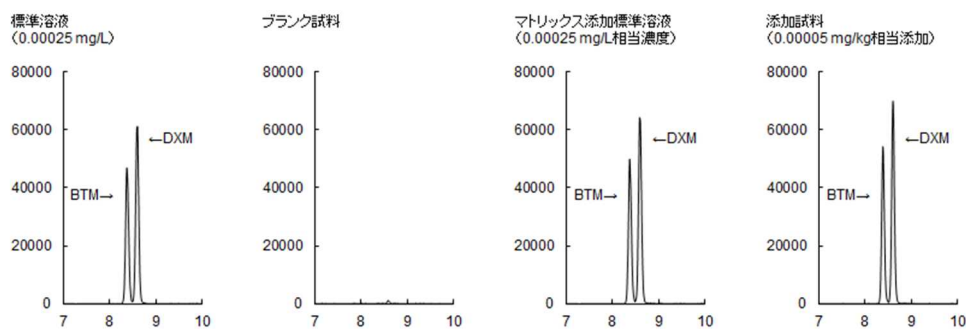


図 6-4 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、牛乳、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

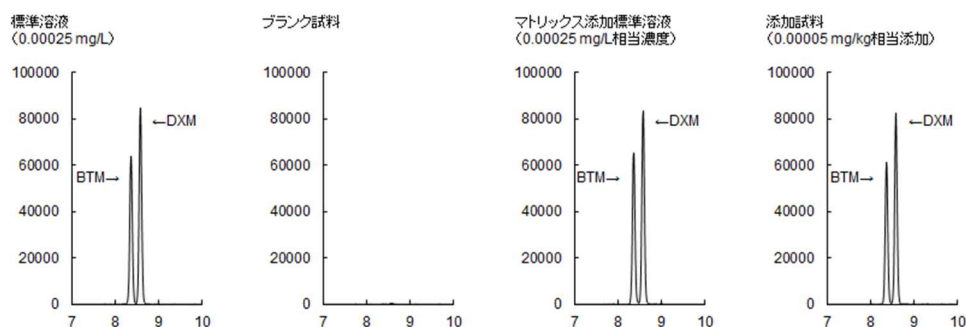


図 6-5 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、豚の筋肉、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

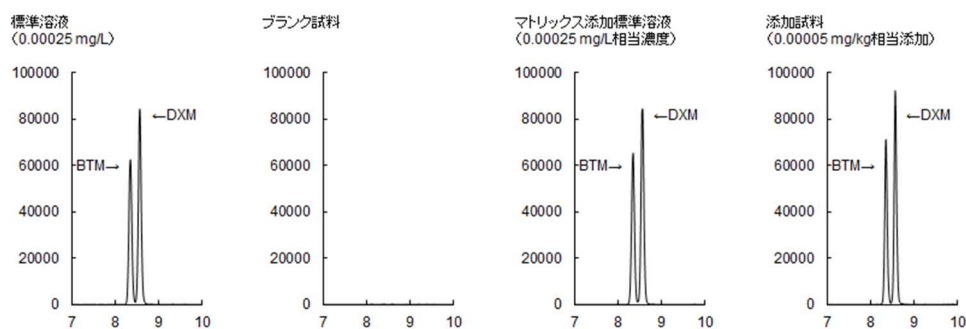


図 6-6 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、鶏の筋肉、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

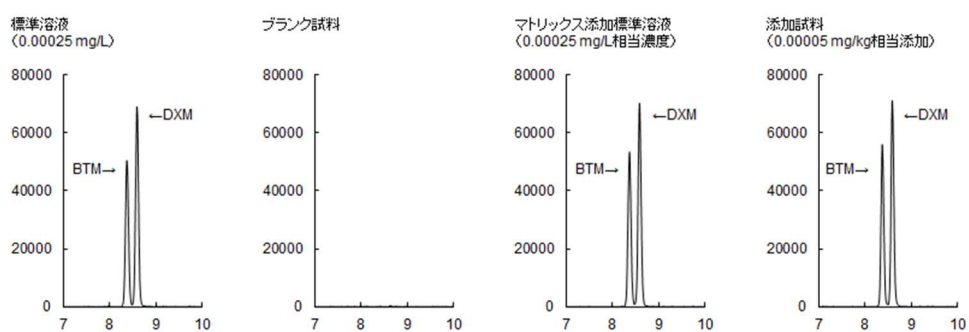


図 6-7 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、鶏の肝臓、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

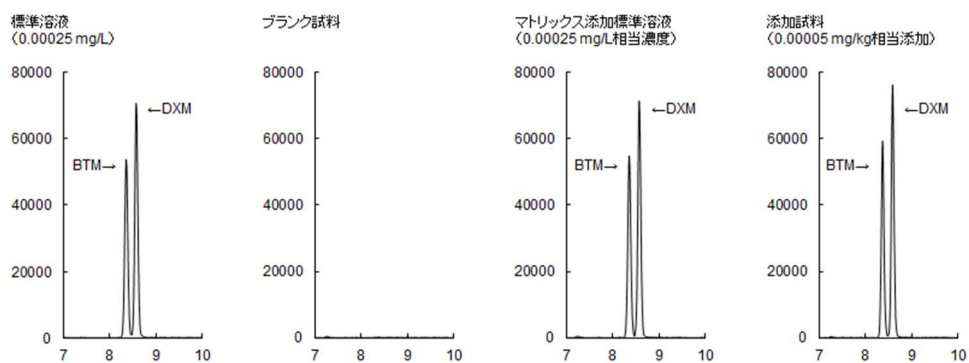


図 6-8 デキサメタゾン及びベタメタゾンの SRM クロマトグラム  
 測定イオン  $m/z$  451→361、鶏卵、定量限界濃度 (0.00005 mg/kg)  
 デキサメタゾン : DXM、ベタメタゾン : BTM

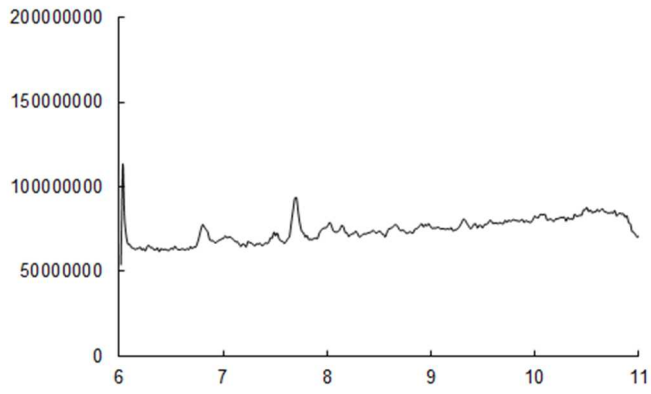


図 7-1 トータルイオンクロマトグラム (牛の筋肉)

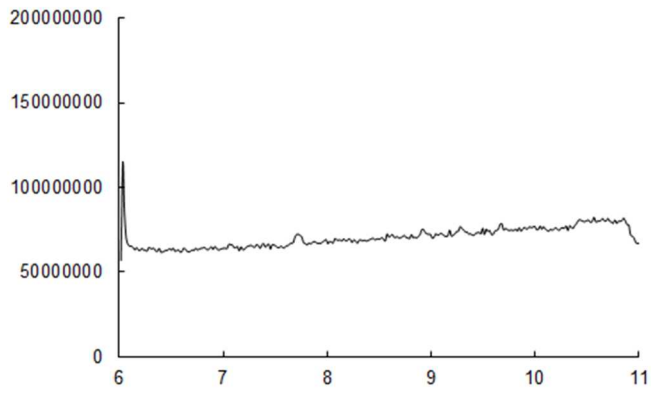


図 7-2 トータルイオンクロマトグラム (牛の脂肪)

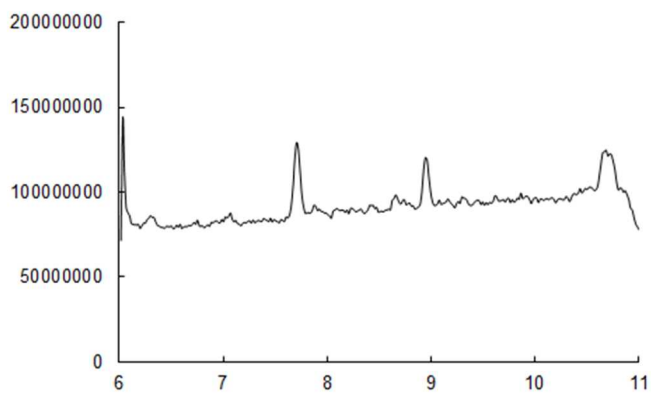


図 7-3 トータルイオンクロマトグラム (牛の肝臓)

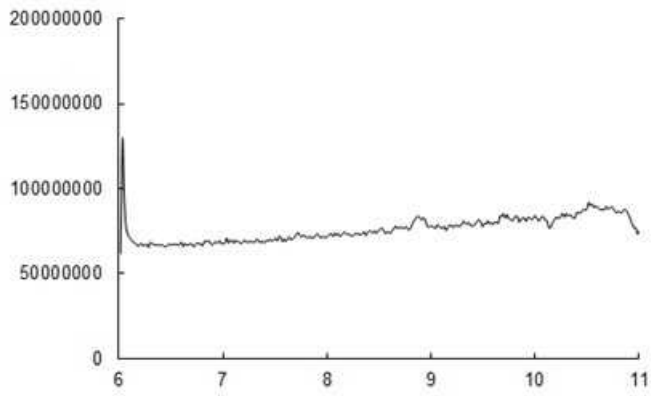


図 7-4 トータルイオンクロマトグラム (牛乳)

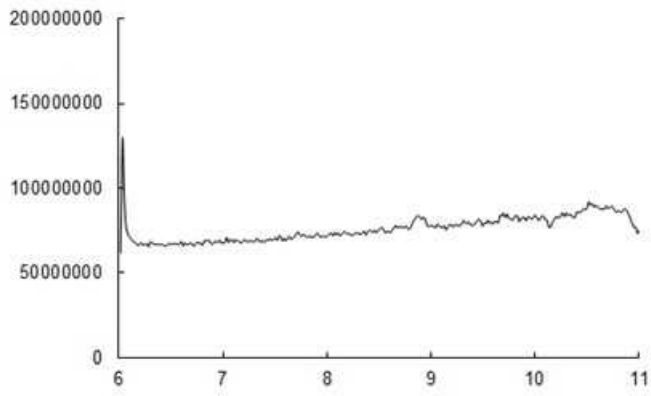


図 7-5 トータルイオンクロマトグラム (豚の筋肉)

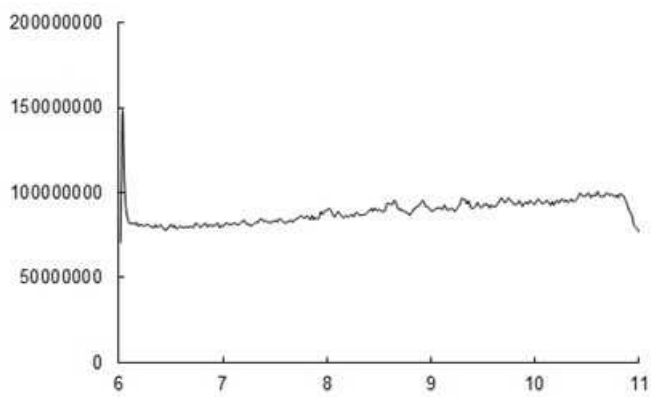


図 7-6 トータルイオンクロマトグラム (鶏の筋肉)

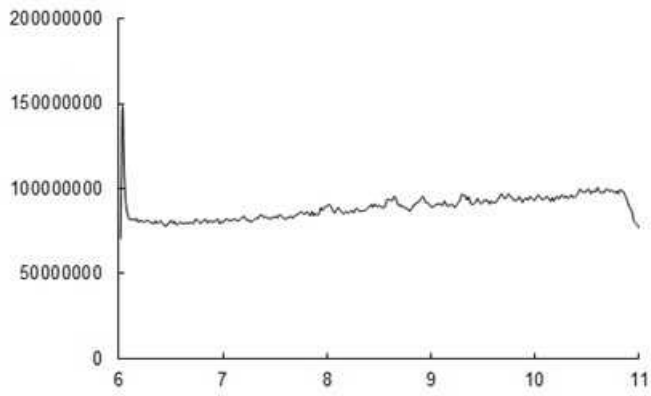


図 7-7 トータルイオンクロマトグラム (鶏の肝臓)

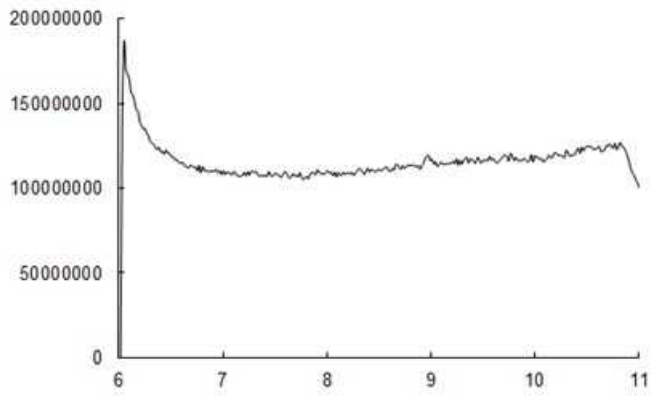


図 7-8 トータルイオンクロマトグラム (鶏卵)