

ルバベグロン分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

・ルバベグロン

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

メタノール、アセトニトリル : HPLC 用
氷酢酸 : ACS 規格
水 : HPLC 用、蒸留水又は Milli-Q システム
(Millipore 製) で精製した脱イオン水
ルバベグロンヘミフマル酸 : 分析用標準品
塩
LSN543100 (内標準物質、 : 分析用標準品
ルバベグロンのピリジン-3-
カルボアミド体のフマル酸
塩)

4. 試験溶液の調製

1) 前処理

筋肉、肝臓及び腎臓の場合、試料を 2.5～5 cm 角に刻み、液体窒素を加えて完全に凍結する。凍結した試料をあらかじめ冷やしたミキサーで粉碎し、粉末化した試料はドライアイス上又は $-20\pm 10^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

2) 抽出

均一化した試料 10.0 ± 0.5 g に内標準溶液 200 μL を加える。アセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液 25 mL を加え、20 秒間ホモジナイズする。10～15 秒間ボルテックスした後、3700 rpm (1750 rcf)、 20°C で 5 分間遠心分離する。上清を共栓メスシリンダーに分取し、残渣にアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液 25 mL を加えて攪拌した後、20 秒間ホモジナイズする。10～15 秒間ボルテックスした後、3700 rpm (1750 rcf)、 20°C で 5 分間遠心分離する。上清を抽出液と混合し、アセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液を加えて 60 mL とする。この液 10 mL を 3700 rpm (1750 rcf)、 20°C で 5 分間遠心分離する。上清を孔径 0.45 μm の PTFE フィルターでろ過し、ろ液を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ルバベグロン標準品 50.0 ± 0.5 mg をメタノールに溶解し、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製する。標準原液 2.5 mL 及び 0.25 mL を更にアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液で希釈し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液

(1)及び 10 µg/mL の標準原液(2)を調製する。

LSN543100 10.0±0.1 mg をメタノールに溶解し、100 µg/mL の内標準原液を調製する。内標準原液 200 µL にメタノールを加えて 20 mL としたものを内標準溶液とする (1 µg/mL)。

①筋肉の場合

均一化した対照試料 10.0±0.5 g にアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液 25 mL を加え、20 秒ホモジナイズする。10～15 秒間ボルテックスした後、3700 rpm (1750 rcf)、20°C で 5 分間遠心分離する。上清を共栓メスシリンダーに分取し、残渣にアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液 25 mL を加えて攪拌した後、20 秒間ホモジナイズする。10～15 秒間ボルテックスした後、3700 rpm (1750 rcf)、20°C で 5 分間遠心分離する。上清を抽出液と混合し、内標準溶液 200 µL を加えた後、アセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液を加えて 60 mL とする。この液 10 mL 4 つを 3700 rpm (1750 rcf)、20°C で 5 分間遠心分離する。上清を合わせてブランク試験溶液とする。

標準原液(2)をアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液で適宜希釈し、0.0167、0.0334、0.0666、0.1、0.1334 及び 0.1666 µg/mL の溶液を調製する。この液 50 µL にブランク試験溶液 4950 µL を加えて混合し、孔径 0.45 µm の PTFE フィルターでろ過して検量線用のマトリックス添加標準溶液を調製する。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

②肝臓の場合

上記①と同様にブランク試験溶液を調製する。

標準原液(1)及び標準原液(2)をアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液で適宜希釈し、0.05、0.075、0.1、0.2、0.3 及び 0.5 µg/mL の溶液を調製する。この液 50 µL にブランク試験溶液 4950 µL を加えて混合し、孔径 0.45 µm の PTFE フィルターでろ過して検量線用のマトリックス添加標準溶液を調製する。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

③腎臓の場合

上記①と同様にブランク試験溶液を調製する。

標準原液(1)をアセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液で適宜希釈し、0.133、0.267、0.4、0.533、0.667 及び 0.8 µg/mL の溶液を調製する。この液 50 µL にブランク試験溶液 4950 µL を加えて混合し、孔径 0.45 µm の PTFE フィルターでろ過して検量線用のマトリックス添加標準溶液を調製する。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

カラム : Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 5 μ m
(2.0 mm i.d.×50 mm, Phenomenex 社製)
もしくはこれと同等のもの (Phenomenex Synergi Fusion-RP C18 (2.5 μ m, 2.0 mm i.d.×50 mm) または ThermoScientific Accucore phenyl-hexyl (2.6 μ m, 2.1 mm i.d.×50 mm))

カラム温度 : 40°C

移動相 : 移動相 A : 0.1% 氷酢酸
移動相 B : アセトニトリル、メタノール及び氷酢酸 (500 : 500 : 1) 混液

グラジエント
プログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	90	10
1	90	10
4	20	80
4.1	0	100
6	0	100
6.1	90	10
10	90	10

流量 : 0.5 mL/min

注入量 : 1-30 μ L

保持時間の目安 : ルバベグロン ; 3.6 分
内標準物質 ; 3.2 分

イオン化モード : ESI (+)

イオン検出法 : MRM 法

モニタリング
イオン

	プレカーサー イオン (m/z)	プロダクトイ オン (m/z)
ルバベグロン	500	250
内標準物質	518	250

8. 定量限界

筋肉 ; 0.001 ppm、肝臓 ; 0.003 ppm、腎臓 ; 0.008 ppm

9. 留意事項

1) 標準品の IUPAC 名

ルバベグロン： Bis(2-{4-[2-({(2*S*)-2-hydroxy-3-[2-(thiophen-2-yl) phenoxy] propyl} amino)-2-methylpropyl]phenoxy}pyridine-3-carbonitrile) (2*E*)-but-2-enedioate

LSN543100： 2-(4-(2-{{(2*S*)-2-hydroxy-3-(2-thiophen-2-ylphenoxy) propyl} amino)-2-methylpropyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (2*E*)-but-2-enedioate

2) 注意点

- ① 注入量は検量線の直線性（相関係数 0.995 以上）が維持されていれば、変更可能である。
- ② 遮光下、室温又は冷蔵（5±3℃）条件下で、肝臓及び腎臓の抽出液は 7 日間、筋肉の抽出液は 4 日間安定である。
冷蔵（5±3℃）条件下で標準溶液系列は 30 日間、マトリックス添加標準溶液は 3 日間安定である。

10. 参考文献

Determination and Confirmation of Lubabegron in Bovine Liver, Muscle, and Kidney Tissue by LC-MS/MS
(Laboratory Procedure for Method G 1886)

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「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 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。