

※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報告書

酢酸トレンボロン試験法（畜産物）

酢酸トレンボロン試験法の検討

[目的]

酢酸トレンボロンはタンパク質同化作用を示す合成ステロイドである。海外において、肉牛の飼料効率の改善、成長促進等を目的として、皮下用移植剤が使用されている。国内においては、動物用医薬品としては使用されていない。

なお、酢酸トレンボロンには17 α -エピマー及び17 β -エピマーが存在するが、17 β -エピマーが製剤化されている。

酢酸トレンボロンの規制対象物質は、牛の筋肉および脂肪では β -トレンボロン、牛の肝臓、腎臓および食用部分では α -トレンボロン、残留基準値が不検出と設定された畜産物、魚介類およびはちみつでは α -トレンボロンおよび β -トレンボロンと規定され、既に試験法が告示されている。

既存の告示試験法では、ジクロロメタンおよびベンゼンが使用されているため、これら有害試薬を使用しない分析法の開発を検討した。

酢酸トレンボロンの基準値案（答申案）

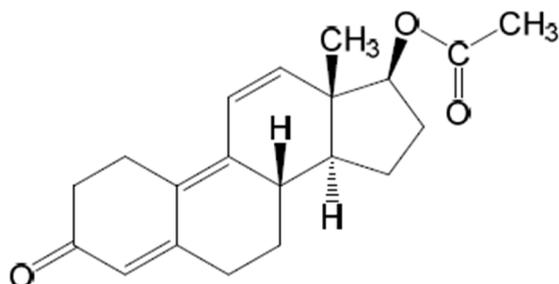
今回基準値を設定する酢酸トレンボロンとは、牛の筋肉及び脂肪においては β -トレンボロン【(17 β)-17-ヒドロキシエストラ-4,9,11-トリエン-3-オン】とし、牛の肝臓、腎臓及び食用部分においては α -トレンボロン【(17 α)-17-ヒドロキシエストラ-4,9,11-トリエン-3-オン】とする。

基準値を不検出と設定する畜産物、魚介類及びはちみつにおいては、 β -トレンボロン及び α -トレンボロンとする。

食品名		残留基準値 ppm
牛	筋肉	0.002
	脂肪	0.002
	肝臓	0.01
	腎臓	0.01
	食用部分	0.01
豚	筋肉	不検出
	脂肪	不検出
	肝臓	不検出
	腎臓	不検出
	食用部分	不検出
その他の陸棲哺乳類に 属する動物	筋肉	不検出
	脂肪	不検出
	肝臓	不検出
	腎臓	不検出
食用部分	不検出	
乳		不検出
鶏	筋肉	不検出
	脂肪	不検出
	肝臓	不検出
	腎臓	不検出
	食用部分	不検出
	卵	不検出
その他の家きん	筋肉	不検出
	脂肪	不検出
	肝臓	不検出
	腎臓	不検出
	食用部分	不検出
卵	不検出	
魚介類		不検出
はちみつ		不検出

[検討対象化合物の構造]

○酢酸トレンボロン



分子式 : $C_{20}H_{24}O_3$

分子量 : 312.40

IUPAC名 : (8S,13S,14S,17S)-13-Methyl-3-oxo-2,3,6,7,8,13,14,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl acetate

CAS : Estra-4,9,11-trien-3-one, 17-(acetyloxy)-, (17β)-

CAS 番号 : 10161-34-9

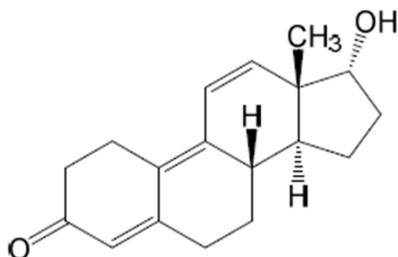
Melting Point (Experimental)Value: 96-97 °C

Boiling Point (Predicted)Value: 486.7±45.0 °C (Condition: Press: 760 Torr)

Density (Predicted)Value: 1.18±0.1 g/cm³(Condition: Temp: 20 °C Press: 760 Torr)

(出典: SciFinder)

○α-トレンボロン



分子式 : $C_{18}H_{22}O_2$

分子量 : 270.38

名称 : (17α)-17-Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one

CAS 番号 : 80657-17-6

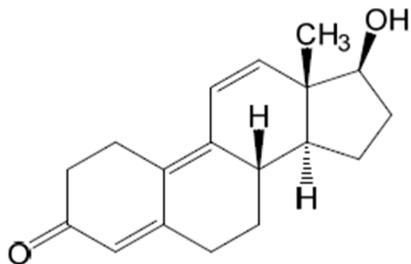
Boiling Point (Predicted)Value: 490.8±45.0 °C (Condition: Press: 760 Torr)

Density (Predicted)Value: 1.19±0.1 g/cm³(Condition: Temp: 20 °C Press: 760 Torr)

pKa (Predicted)Value: 14.73±0.40 (Condition: Most Acidic Temp: 25 °C)

(出典: SciFinder)

○β-トレンボロン



分子式：C₁₈H₂₂O₂

分子量：270.38

名称：(17β)-17-Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one

CAS 番号：10161-33-8

Melting Point (Experimental)Value: 186 °C

Boiling Point (Predicted)Value: 490.8±45.0 °C (Condition: Press: 760 Torr)

Density (Predicted)Value: 1.19±0.1 g/cm³ (Condition: Temp: 20 °C Press: 760 Torr)

pKa (Predicted)Value: 14.73±0.40 (Condition: Most Acidic Temp: 25 °C)

(出典: SciFinder)

[実験方法]

1. 試料

国産の牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、豚の筋肉・脂肪・肝臓を用いた。

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。

2. 試薬、試液

1) 標準品、標準原液及び標準溶液

① 標準品

- ・ α -トレンボロン：林純薬工業(株)製、純度 99.3%
- ・ β -トレンボロン：林純薬工業(株)製、純度 98.1%

② 標準原液

α -トレンボロン及び β -トレンボロンの各標準品 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

α -トレンボロン標準原液及び β -トレンボロン標準原液を混合し、アセトニトリルで適宜希釈した。適量を採取して溶媒除去後、誘導体化した。誘導体化後の反応液の溶媒を除去した後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：1）混液に溶解した。得られた溶液をさらに 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：1）混液で適宜希釈したものを検量線作成用標準溶液とした。

④ 添加用標準溶液

- ・ 定量限界相当濃度

α -トレンボロン標準原液及び β -トレンボロン標準原液を混合し、アセトンで希釈して 0.01 mg/L の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（添加濃度 0.002 ppm）

α -トレンボロン標準原液及び β -トレンボロン標準原液を混合し、アセトンで希釈して 0.02 mg/L の濃度の溶液を調製した。

b. 牛の肝臓（添加濃度 0.01 ppm）

α -トレンボロン標準原液及び β -トレンボロン標準原液を混合し、アセトンで希釈して 0.1 mg/L の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
 トリエチルアミン：富士フイルム和光純薬(株)製、特級
 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩：東京化成工業(株)製、純度 98%以上
 ギ酸：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
 シリカゲルミニカラム：ジーエルサイエンス(株)製、InertSepSI（500 mg）
 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル：Agilent 製、Bond Elut PSA（1 g）

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-XS（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（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%ギ酸（A 液）及び 0.1 vol%ギ酸・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	75	25
10.0	55	45
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：

α-トレンボロン（誘導体化物） 8.3 分

β-トレンボロン（誘導体化物） 8.7 分

質量分析パラメータ：

キャピラリー電圧 2.0 kV、脱溶媒温度 600℃、脱溶媒ガス流量 1000 L/hr、コ

ーンガス流量 150 L/hr、ネブライザー 7.0 Bar、ソース温度 120°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)
α -トレンボロン (誘導体化物)	362.0	40	197.0	20	253.0	15
β -トレンボロン (誘導体化物)	362.0	40	197.0	20	253.0	15

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%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 1) 混液) を調製した。それぞれ 5 μ L 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 (1 g 試料/1 mL 試験溶液) 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法により α -トレンボロン及び β -トレンボロンの含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.001 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^2 値) を示した。

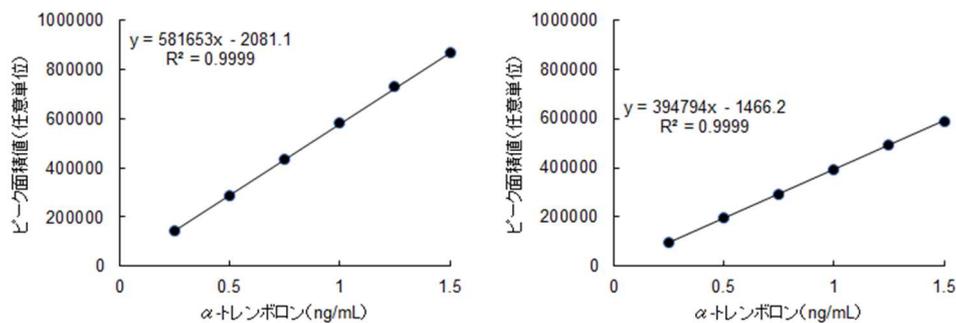


図 1-1 α -トレンボロンの検量線の一例

左 : 測定イオン m/z 362>253、右 : 測定イオン m/z 362>197

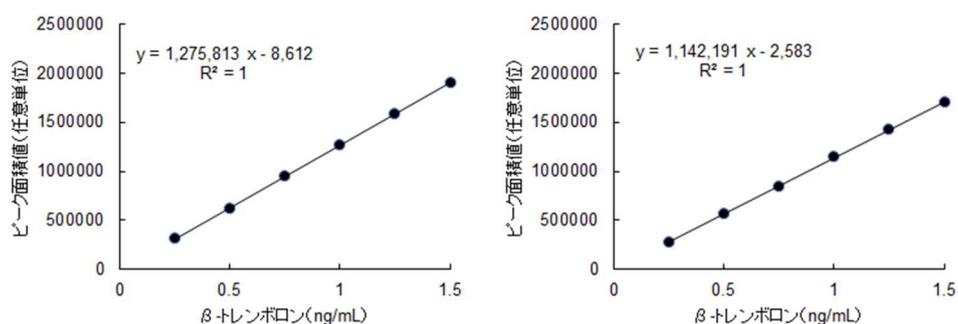


図 1-2 β-トレンボロンの検量線の一例

左：測定イオン m/z 362>253、右：測定イオン m/z 362>197

6. 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 1.0 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。脂肪（牛及び豚）の場合は、試料 10.0g を 40℃ の湯浴中で加熱して融解し、添加用標準溶液 1.0 mL を添加して混合後、-30℃ 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 10 mL を分取し、40℃ 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、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 20 mL ずつで 2 回振とう抽出した。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液層を採り、40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 2 mL を加えて溶かした。

2) 精製

シリカゲルミニカラム（500 mg）に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 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、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40℃ 以下で 1 mL 以下まで濃縮した。

3) 誘導体化

2) で得られた濃縮液を試験管に移し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物に、20 mg/mL 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩・アセトニトリル溶液 1 mL、アセトニトリル及びトリエチルアミン（9：1）混液 0.05 mL を加えて攪拌した後、室

温で 90 分間放置した。誘導体化反応後の溶液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・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（脂肪の場合は、40℃で溶かし、添加用標準溶液を添加、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 10 mL（試料 1.00 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、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 20 mL ずつで 2 回振とう抽出
酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液層を 40℃以下で濃縮し、溶媒除去
残留物を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 2 mL で溶解（抽出溶液）

シリカゲルミニカラム（500 mg）

カラムを予め酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 5 mL で洗浄
抽出溶液を注入
容器を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 2 mL ずつで 3 回洗い込んで注入
更に、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 4 mL を注入
全流出液を捨てる
酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL を注入
溶出液を採り、40℃以下で濃縮

誘導体化

濃縮液を試験管に移し、窒素を吹き付けて溶媒除去
残留物に 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩・アセトニトリル溶液（20 mg/mL）1 mL、アセトニトリル及びトリエチルアミン（9：1）混液 0.05 mL を加えて
室温で 90 分間放置
反応後の溶液を 40℃以下で濃縮、溶媒除去し、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・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

試験溶液（1 g 試料/mL）

LC-MS/MS

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。誘導体化反応液の溶媒を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) 測定イオンの選択

まず、フローインジェクション分析により、 β -トレンボロンの標準溶液（1000 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 β -トレンボロンのマススペクトルを図 2-1 に、ESI（-）における β -トレンボロンのマススペクトルを図 2-2 に示した。ESI（+）においてはプロトン付加分子（ $[M+H]^+$ 、 m/z 270.9）が検出されたが、ESI（-）において脱プロトン分子（ $[M-H]^-$ 、 m/z 269）は検出されなかった。

よって、イオン化モードとして ESI（+）を選択し、プリカーサーイオン m/z 270.9 についてプロダクトイオンスキャン測定を行った。 α -トレンボロンの結果を図 2-3 に、 β -トレンボロンの結果を図 2-4 に示した。図 2-3 及び図 2-4 の通り、 m/z 198.8、 m/z 252.8 などのプロダクトイオンが検出された。

これらの結果から、測定イオン m/z 270.9 > 198.8 及び m/z 270.9 > 252.8 を用いて α -トレンボロン及び β -トレンボロンを測定した。それぞれ 5 ng/mL の標準溶液を測定した際のクロマトグラムを図 3 に示した。

α -トレンボロンと β -トレンボロンは良好に分離可能であり、それぞれのピーク形状は良好であった。また、S/N については、 α -トレンボロンで 800 程度、 β -トレンボロンで 500 程度であった。これらの結果から、5 倍程度の濃縮操作を含む試験法を構築することにより、本検討で使用した LC-MS/MS（Waters 製 Xevo TQ-XS）においては十分な測定感度が得られることが確認された。

一方、本検討で使用した LC-MS/MS は非常に測定感度が高い機種であるため、汎用的な機種においては十分な測定感度が得られない可能性もあることが予想された。

そこで、より汎用的な試験法の開発を目的として、誘導体化による測定感度の向上について検討した。

LC-MS/MS 測定における高感度化、並びに、 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの水酸基の誘導体化を行うことを考慮し、誘導体化試薬には 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム (*p*-トルエンスルホン酸塩) を選択した。

β -トレンボロン 1 μ g を採り、2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩（20 mg/mL、アセトニトリル溶液）1 mL 及びトリエチルアミン 0.01 mL を添加・攪拌後、室温で 60 分放置した。得られた溶液を 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液で 10 倍希釈し、ESI（+）モードでスキャン測定した。

ESI（+）における β -トレンボロン-1-メチルピリジニウム誘導体化物のマススペ

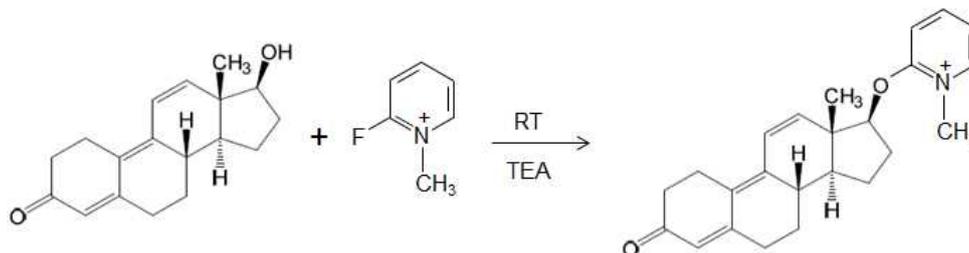
クトルを図 4-1 に示した。誘導体化物の予想される $[M+H]^+$ (m/z 362) が比較的高い強度で検出された。

次いで、検出されたプリカーサーイオン m/z 362 についてプロダクトイオンスクリーン測定を行った。結果を図 4-2 に示した。プロダクトイオンとしては、 m/z 197 及び m/z 253 のイオンが検出された。

スクリーン測定及びプロダクトイオンスクリーン測定の結果から得られた測定イオン (m/z 362 $>$ 197 及び m/z 362 $>$ 253) を用いて α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物を測定した。それぞれ 1 ng/mL (α -トレンボロンまたは β -トレンボロンとして) の標準溶液を測定した際のクロマトグラムを図 5 に示した。

α -トレンボロン誘導体化物と β -トレンボロン誘導体化物は良好に分離可能であり、それぞれのピーク形状は良好であった。また、測定イオン m/z 362 $>$ 197 の S/N については、 α -トレンボロン誘導体化物で 10000 程度、 β -トレンボロン誘導体化物で 30000 程度であった。

以上のように、2-フルオロ-1-メチルピリジニウム (*p*-トルエンスルホン酸塩) を用いて分析対象化合物である α -トレンボロン及び β -トレンボロンを誘導体化することにより、50 倍程度の測定感度の向上が期待されたことから、本検討においては誘導体化した分析対象化合物を測定する分析法について検討した。



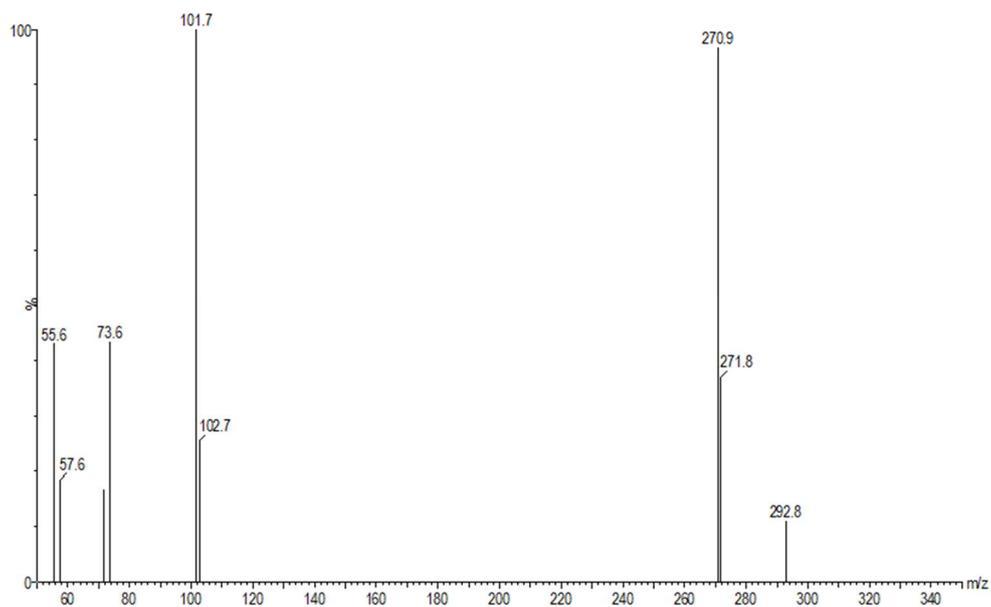


図 2-1 ESI (+) における β -trenbolone のマススペクトル
 スキャン範囲 m/z 50~350、CV 60 V

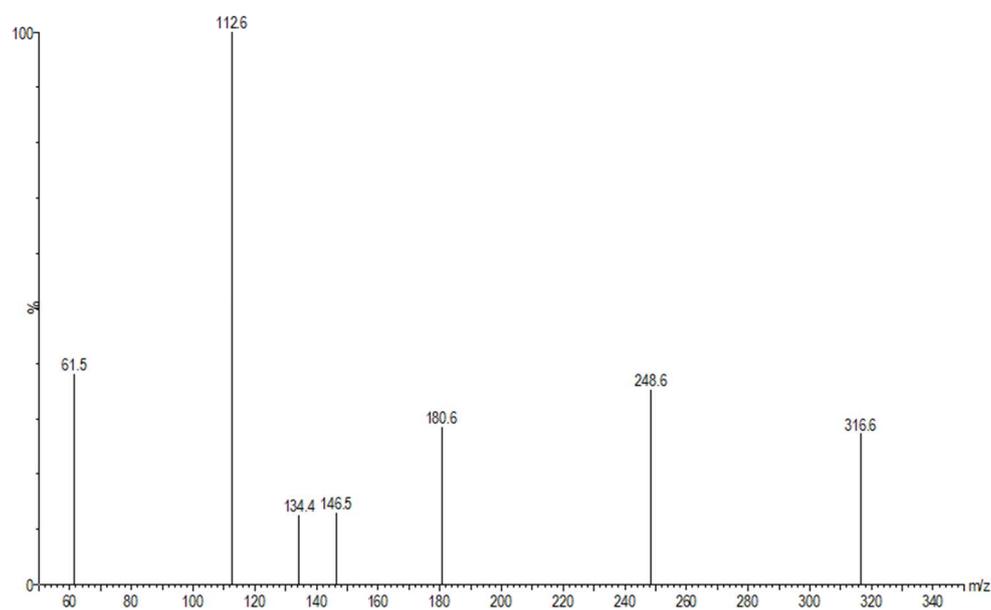


図 2-2 ESI (-) における β -trenbolone のマススペクトル
 スキャン範囲 m/z 50~350、CV 60 V

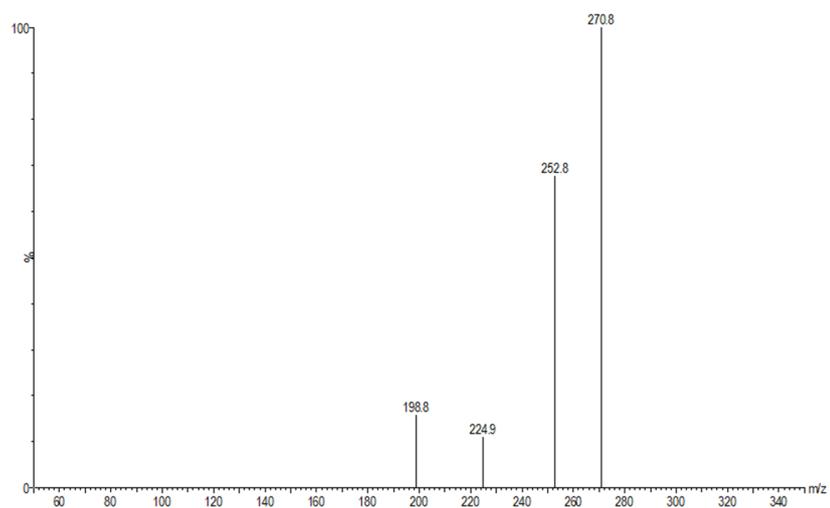


図 2-3 α -trenbolone のプロダクトイオンスキャンスペクトル
 水及びアセトニトリル (1 : 1) 混液
 ESI (+)、プリカーサーイオン m/z 271、
 スキャン範囲 m/z 50~350、CV 60 V、CE 20 eV

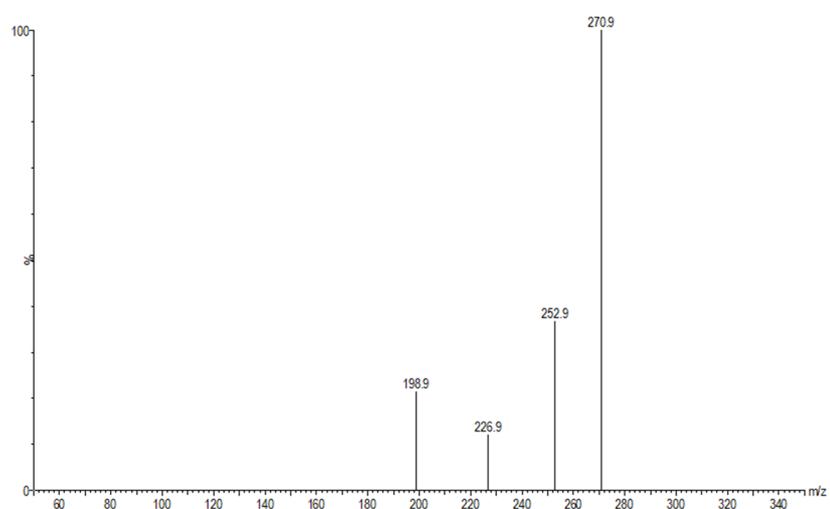


図 2-4 β -trenbolone のプロダクトイオンスキャンスペクトル
 水及びアセトニトリル (1 : 1) 混液
 ESI (+)、プリカーサーイオン m/z 271、
 スキャン範囲 m/z 50~350、CV 60 V、CE 20 eV

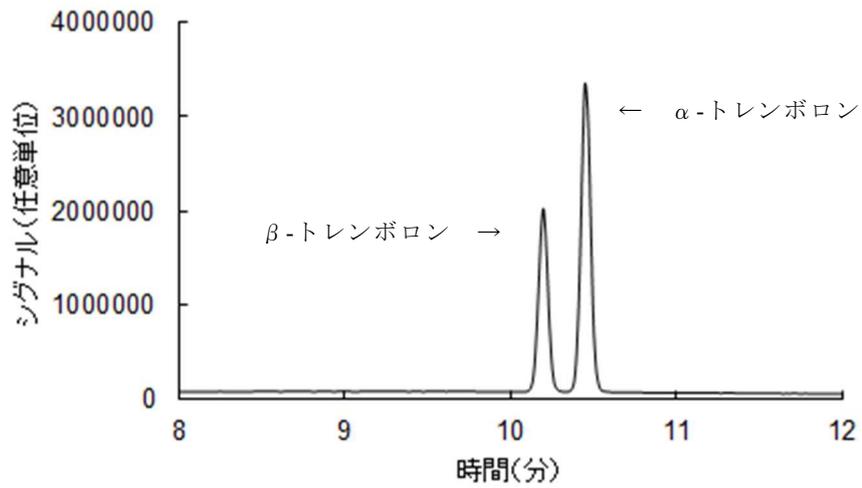


図3 α-トレンボロン及びβ-トレンボロンのクロマトグラム
 それぞれ 5 ng/mL の標準溶液を 5 μL 注入
 測定イオン： m/z 271>253
 分析カラム：CAPCELL PAK ADME（粒子径 3 μm、内径 2.1 mm、長さ 150 mm）
 移動相：0.1 vol%ギ酸（A液）及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（B液）
 グラジエント：A液及びB液（3：1）から（7：3）までの濃度勾配を5分間で行った後、（7：3）から（3：7）までの濃度勾配を10分間で行った
 流速：0.4 mL/min

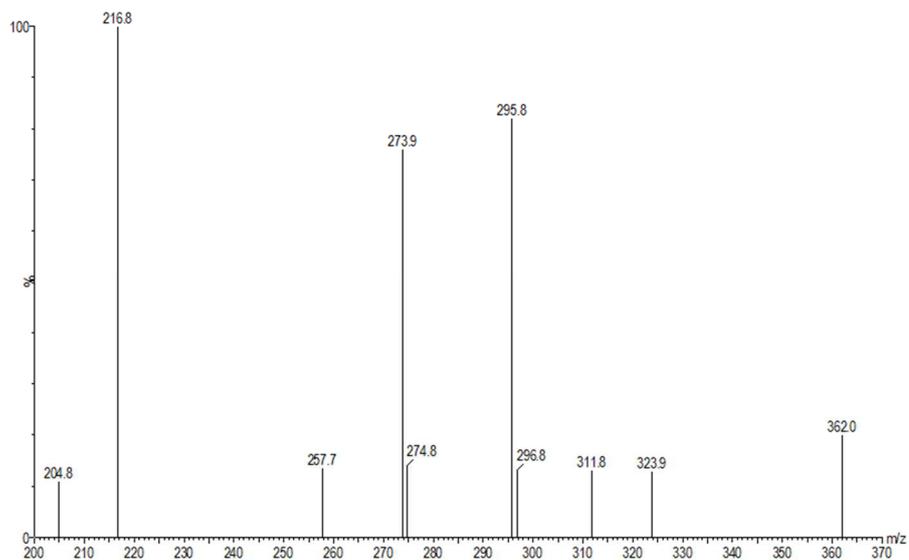


図 4-1 ESI (+) における β -トレンボロン誘導体化物のマススペクトル
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液
 スキャン範囲 m/z 50~400 (表示は m/z 200~380)、CV 40 V

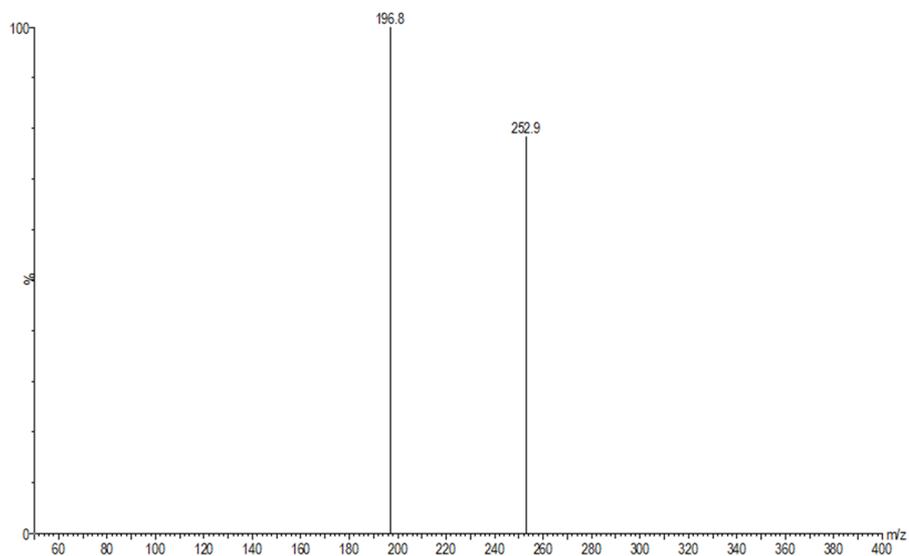


図 4-2 β -トレンボロン誘導体化物のプロダクトイオンスキャンスペクトル
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液
 ESI (+)、プリカーサーイオン m/z 362、
 スキャン範囲 m/z 50~350、CV 40 V、CE 20 eV

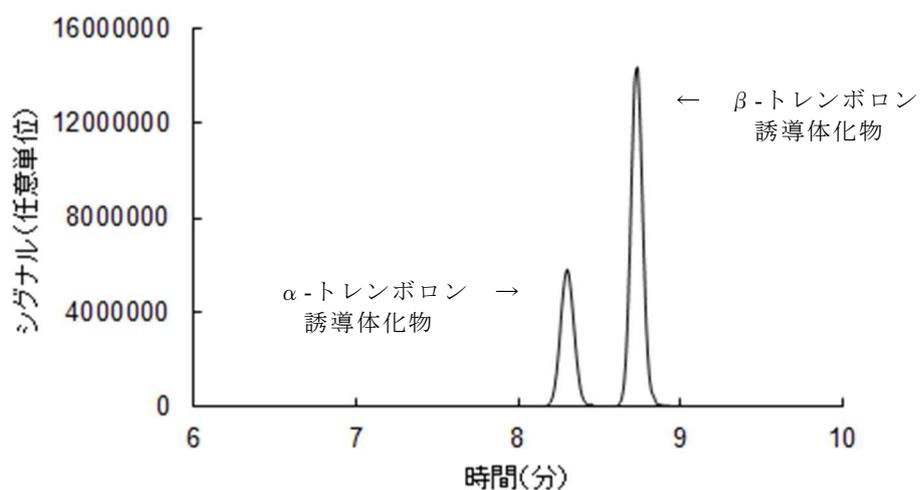
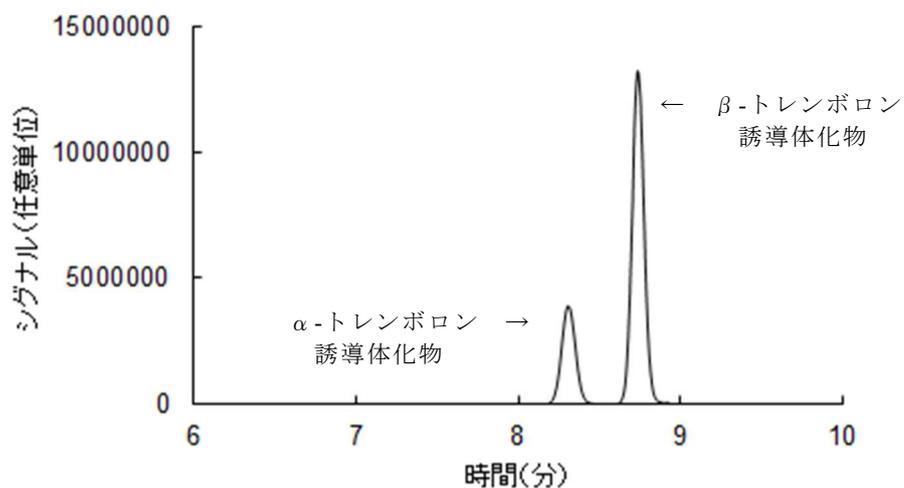


図5 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物のクロマトグラム
 それぞれ 1 ng/mL (トレンボロンとして) の標準溶液を 5 μ L 注入
 測定イオン : m/z 362>197 (上) 及び m/z 362>253 (下)
 分析カラム : CAPCELL PAK ADME (粒子径 3 μ m、内径 2.1 mm、長さ 150 mm)
 移動相 : 0.1 vol%ギ酸 (A 液) 及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (B 液)
 グラジエント : A 液及び B 液 (3 : 1) で 5 分間保持した後、(3 : 1) から (11 : 9) までの濃度勾配を 5 分間で行った。
 流速 : 0.4 mL/min

2) 誘導体化条件の検討

2-フルオロ-1-メチルピリジニウム (*p*-トルエンスルホン酸塩) を用いた α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化における、①トリエチルアミン添加量、②温度及び反応時間について検討した。

① トリエチルアミン添加量

α -トレンボロン及び β -トレンボロン標準溶液 (各 1,000 ng/mL、アセトニトリル溶液) 0.1 mL を試験管に採り、窒素を吹き付けてアセトニトリルを除去した後、2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩・アセトニトリル溶液 1 mL を加えた。マイクロシリンジを用いて各量のトリエチルアミンを添加、攪拌後、室温 (約 25°C) で 60 分放置した。誘導体化反応後の溶液を、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液で 100 倍希釈した。得られた溶液を LC-MS/MS で測定し、各溶液中の α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物のピーク面積を求めた。なお、測定イオンは m/z 362>197 を用いた。

結果を表 1 及び図 6 に示した。 α -トレンボロン及び β -トレンボロンともに、トリエチルアミン添加量 0.005 mL において誘導体化物のピーク面積値が最大となったことから、トリエチルアミンの添加量は 0.005 mL を選択した。

なお、添加量のばらつきや操作の簡便性を考慮し、本検討におけるトリエチルアミンの添加は、『アセトニトリル及びトリエチルアミン (9:1) 混液を 0.05 mL』添加する操作とした。

表 1 トリエチルアミン添加量と誘導体化物のピーク面積値

	トリエチルアミン添加量 (mL)			
	0	0.002	0.005	0.01
α -トレンボロン誘導体化物	27309	168006	316490	292585
β -トレンボロン誘導体化物	91569	809953	1038084	995237

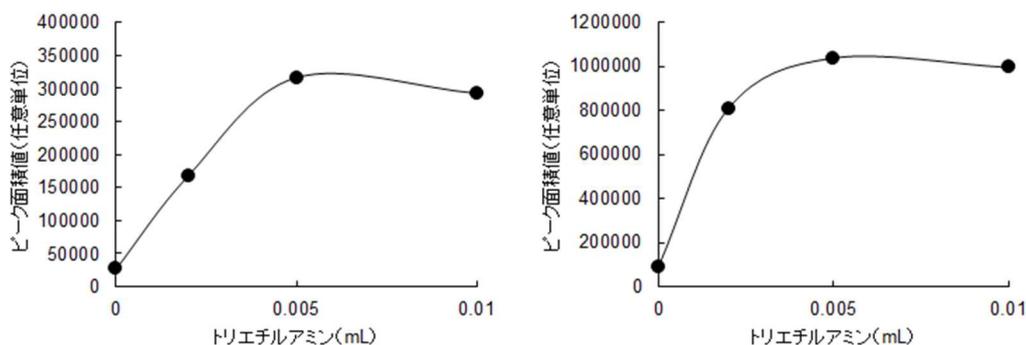


図 6 誘導体化物の生成に及ぼすトリエチルアミン添加量の影響

左： α -トレンボロン誘導体化物、右： β -トレンボロン誘導体化物

②温度及び反応時間

α -トレンボロン及び β -トレンボロン標準溶液（各 1,000 ng/mL、アセトニトリル溶液）0.1 mL を試験管に採り、窒素を吹き付けてアセトニトリルを除去した後、2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩・アセトニトリル溶液 1 mL を加えた。アセトニトリル及びトリエチルアミン（9：1）混液 0.05 mL を添加、攪拌後、室温もしくは 40°C で各時間放置した。誘導体化反応後の溶液を、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液で 100 倍希釈した。得られた溶液を LC-MS/MS で測定し、各溶液中の α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物のピーク面積を求めた。なお、測定イオンは m/z 362>197 を用いた。

結果を表 2 及び図 7 に示した。まず、温度については、若干ではあるが室温で反応を行った場合の方が概ね高いピーク面積値が得られた。反応時間については、 α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物ともに、得られるピーク面積値が 60 分以降はほとんど一定であったことから、90 分の反応時間を選択した。

表 2 反応時間・温度と誘導体化物のピーク面積値

	温度	反応時間（分）			
		30	60	90	120
α -トレンボロン誘導体化物	室温	301192	334981	339029	340100
	40°C	309014	327580	328618	327058
β -トレンボロン誘導体化物	室温	952227	966296	967734	967761
	40°C	912877	925325	932346	931109

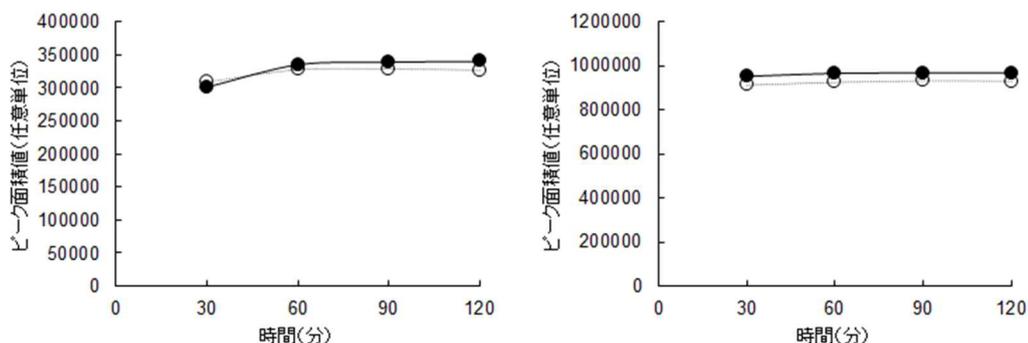


図 7 誘導体化物の生成に及ぼす反応時間及び温度の影響

左： α -トレンボロン誘導体化物、右： β -トレンボロン誘導体化物

●：室温、○：40°C

以上の検討結果から、本検討における誘導体化操作は、

シリカゲルミニカラム精製後の残留物に、20 mg/mL の 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩・アセトニトリル溶液を 1 mL 加えた後、アセトニトリル及びトリエチルアミン（9：1）混液 0.05 mL を添加、攪拌後、室温で 90 分放置する操作とした。

3) 分析カラムの検討

まず、一般的な ODS 系の分析カラムである InertSustain C18 (粒子径 3 μm 、2.1 \times 150 mm) を用いて α -トレンボロン及び β -トレンボロンの標準溶液 (各 10 ng/mL)、 α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物の標準溶液 (トレンボロンとして各 1 ng/mL) を測定した。結果を図 8 に示した。

α -トレンボロン及び β -トレンボロンについては、良好に分離が可能であり、それぞれのピーク形状も良好であった。一方、 α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物については、完全な分離は得られず、ピーク形状もブロードであった。

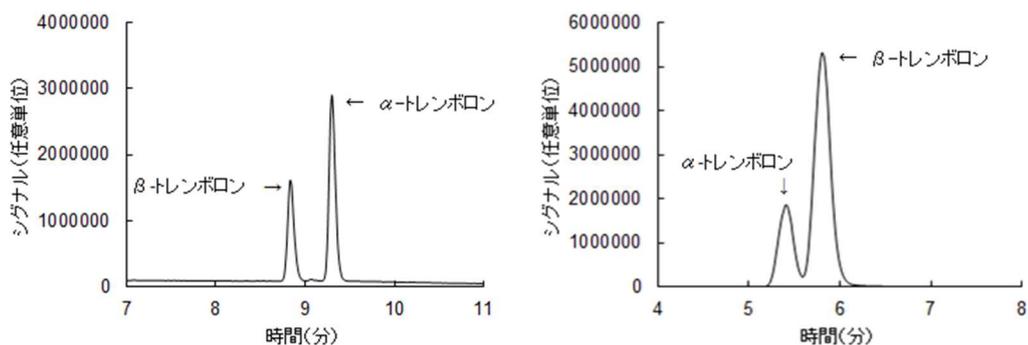


図 8 InertSustain C18 における SRM クロマトグラム

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

左： α -トレンボロン及び β -トレンボロン

測定イオン m/z 271>253

A 液及び B 液 (3 : 1) から (7 : 3) までの濃度勾配を 5 分間で行った後、(7 : 3) から (3 : 7) までの濃度勾配を 10 分間で行った

右： α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物

測定イオン m/z 362>197

A 液及び B 液 (3 : 1) で 5 分間保持した後、(3 : 1) から (11 : 9) までの濃度勾配を 5 分間で行った

次に、アダマンチル基化学修飾型シリカゲルを充填した CAPCELL PAK ADME (粒子径 3 μm 、 $2.1 \times 150 \text{ mm}$) を用いて α -トレンボロン及び β -トレンボロンの標準溶液 (各 5 ng/mL)、 α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物の標準溶液 (トレンボロンとして各 1 ng/mL) を測定した。結果を図 9 に示した。

α -トレンボロン及び β -トレンボロンを良好に分離可能であり、それぞれのピーク形状も良好であった。また、 α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物についても、良好な分離が得られ、それぞれのピーク形状も良好であった。

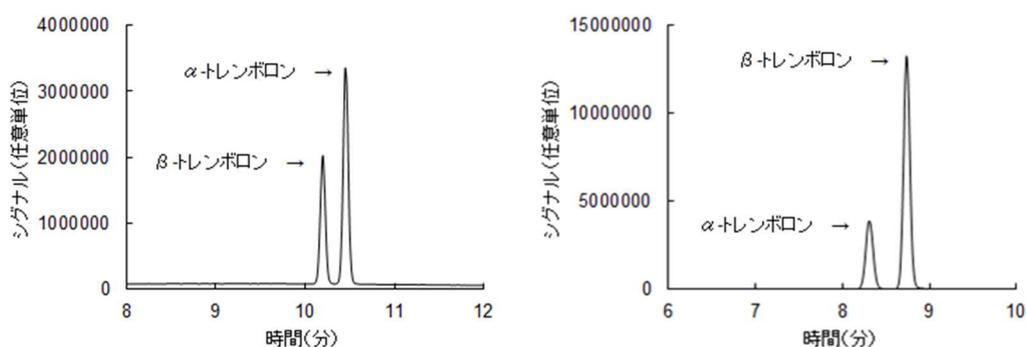


図 9 CAPCELL PAK ADME における SRM クロマトグラム

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

左： α -トレンボロン及び β -トレンボロン

測定イオン m/z 271>253

A 液及び B 液 (3 : 1) から (7 : 3) までの濃度勾配を 5 分間で行った後、(7 : 3) から (3 : 7) までの濃度勾配を 10 分間で行った

右： α -トレンボロン誘導体化物及び β -トレンボロン誘導体化物

測定イオン m/z 362>197

A 液及び B 液 (3 : 1) で 5 分間保持した後、(3 : 1) から (11 : 9) までの濃度勾配を 5 分間で行った

以上の結果から、本検討における分析カラムとして、CAPCELL PAK ADME (粒子径 3 μm 、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、(株)大阪ソーダ製) を選択した。

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出

抽出操作については、分析対象化合物である α -トレンボロン及び β -トレンボロンと同様のコレステロール骨格を有するデキサメタゾン及びベタメタゾンの試験法において採用されている「*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下アセトニトリル抽出」をそのまま採用した。

すなわち、

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する。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る。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する。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 とする。

操作とした。

2) 転溶操作について

分析対象化合物である α -トレンボロン及び β -トレンボロンと共に抽出された食品中の夾雑物の効率的な除去を目的として、先ず、転溶操作を検討した。

α -トレンボロン及び β -トレンボロン各 10 ng (各 100 ng/mL の添加用標準溶液 0.1 mL) を採り、溶媒を除去した後、水 20 mL を加えた。これに、①*n*-ヘキサン、②酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液、③酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (2 : 3) 混液をそれぞれ 20 mL 加えて振とう及び遠心分離後、上層 (*n*-ヘキサン層、もしくは酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液層) を採る操作を更に 2 回繰り返した。それぞれの上層を濃縮、溶媒除去後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・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 3 に示した。溶媒として*n*-ヘキサンをを用いた場合には、3 回転溶操作を行った場合であっても有機溶媒に十分に転溶されていないことが示唆された。溶媒として酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液を用いた場合には、2 回の転溶操作で十分に有機層に転溶された。

表 3 転溶操作における回収率

		回収率 (%)			
		1 回目	2 回目	3 回目	合計
<i>n</i> -ヘキサン	α -トレンボロン	63	23	9	95
	β -トレンボロン	60	25	10	95
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	α -トレンボロン	85	14	0	99
	β -トレンボロン	91	10	0	101
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3) 混液	α -トレンボロン	96	5	0	101
	β -トレンボロン	97	5	0	102

以上の結果から、精製効果などを考慮し、本検討における転溶操作は、抽出液 10 mL を濃縮、溶媒除去して得られた残留物に水 20 mL を加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 20 mL ずつで 2 回振とう抽出する操作とした。

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。

① 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精製

先ず、分析対象化合物である α -トレンボロン及び β -トレンボロンと同様のコレステロール骨格を有するデキサメタゾン及びベタメタゾンの試験法において採用されているエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの適用性を検討した。

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 g) に α -トレンボロン及び β -トレンボロンを注入し、酢酸エチル 10 mL で溶出した結果、回収率は 50%程度であった。酢酸エチル及びメタノール (1 : 1) 混液 10 mL を追加注入した結果、追加の溶出は確認されなかった。また、ギ酸及び酢酸エチル (1 : 99) 混液、トリエチルアミン及び酢酸エチル (1 : 99) 混液を溶出溶媒として用いた場合も、酢酸エチルのみで溶出した場合と同等の回収率であった。更に、酢酸エチル 10 mL で注入し、酢酸エチル 10 mL を追加注入し、全溶出液を採取した場合の回収率は、 α -トレンボロンで 60%、 β -トレンボロンで 65%であった。

以上、良好なカラム回収率が得られなかったことから、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は採用しなかった。

② シリカゲルミニカラム精製

次いで、転溶操作後の低極性夾雑物の除去を目的として、シリカゲルミニカラムの適用性を検討した。

シリカゲルミニカラム (ジューエルサイエンス製 InertSep SI, 500 mg) を用いた精製法について、以下、検討の詳細を示した。

・ 負荷及び洗浄操作の検討

予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄した InertSep SI (500 mg) に、 α -トレンボロン及び β -トレンボロン (各 10 ng を *n*-ヘキサン 10 mL に溶解したもの) を注入した。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液、(2 : 3) 混液、(3 : 2) 混液、(4 : 1) 混液各 10 mL ずつを順次注入した。各溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・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。 α -トレンボロン及び β -トレンボロンともに、*n*-ヘキサンでは溶出されず、一定比率以上の酢酸エチルとの混液を用いることで効率的な溶出が可能であった。得られた結果から、シリカゲルミニカラム精製における負荷及び洗浄操作は「酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 2 mL で負荷し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL で洗浄する」操作とした。

表 4 シリカゲルミニカラムからの溶出状況①

	α-トレンボロン		β-トレンボロン	
	回収率 (%)	合計	回収率 (%)	合計
<i>n</i> -ヘキサン	0	0	0	0
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4)	0	0	0	0
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3)	98.1	98.1	99.3	99.3
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 2)	0.9	99.0	0.4	99.7
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (4 : 1)	0	99.0	0	99.7

・溶出溶媒の検討

続いて、溶出溶媒について検討した。予め酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 5 mL で洗浄した InertSep SI (500 mg) に、α-トレンボロン及びβ-トレンボロン (各 10 ng を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 2 mL に溶解したもの) を負荷した後、更に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (2 : 3) 混液もしくは酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液を 5 mL ずつ注入した。各溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・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 5 に示した。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (2 : 3) 混液で溶出した場合、良好な回収率が得られたものの、15 mL 程度の溶出液量が必要であった。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で溶出した場合には、α-トレンボロン及びβ-トレンボロンともに大部分が 5 mL で溶出し、10~15 mL の画分における溶出は確認されなかった。以上の結果から、シリカゲルミニカラム精製における溶出操作は「酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL で溶出する」操作とした。

表 5 シリカゲルミニカラムからの溶出状況②

		α-トレンボロン		β-トレンボロン	
		回収率 (%)	合計	回収率 (%)	合計
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3)	0 - 5 mL	9.3	9.3	56.5	56.5
	5 - 10 mL	84.3	93.6	40.5	97.0
	10 - 15 mL	4.0	97.6	0.3	97.3
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1)	0 - 5 mL	83.8	83.8	95.2	95.2
	5 - 10 mL	12.9	96.7	0.9	96.1
	10 - 15 mL	0	96.7	0	96.1

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、豚の脂肪、豚の肝臓（全7食品）を用いた。

ブランク試料に添加用標準溶液 1 mL を添加、攪拌し、室温で約 30 分放置したものを添加試料とした。脂肪については約 40℃ で溶かした後、添加用標準溶液 1 mL を添加、攪拌し、-30℃ 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（7食品）のブランク試料において、 α -トレンボロン及び β -トレンボロ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（ α -トレンボロン）

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						選択性の評価		
					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			面積比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2			平均 (b)
1	α -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	788881	789579	789230	0.000	○
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	748402	753235	750818	0.000	○
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	基準値 0.01	<0.100	面積	0	0	0	3696189	3659998	3678093	0.000	○
4		牛の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	388239	389011	388625	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	389394	392611	391002	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	396836	397267	397052	0.000	○
7		牛乳(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	373570	372232	372901	0.000	○
8		豚の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	398637	398759	398698	0.000	○
9		豚の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	408949	402957	405953	0.000	○
10		豚の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	393279	392873	393076	0.000	○

表 6-2 選択性の評価結果（ β -トレンボロン）

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		
					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			面積比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2			平均 (b)
1	β -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	2418217	2421986	2420101	0.000	○
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	2106675	2128529	2118802	0.000	○
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	基準値 0.01	<0.100	面積	0	0	0	11297530	11054170	11175850	0.000	○
4		牛の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1193162	1197765	1195463	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1105678	1118533	1112106	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1196449	1191202	1193825	0.000	○
7		牛乳(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1060232	1089892	1079962	0.000	○
8		豚の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1196554	1210511	1203533	0.000	○
9		豚の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1213825	1217714	1215770	0.000	○
10		豚の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	<0.333	面積	0	0	0	1177634	1173219	1175426	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 α -トレンボロン及び β -トレンボロンを添加した試料（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓）における真度及び併行精度は、

α -トレンボロン：真度 78%～81%、併行精度 0.6 RSD%～1.5 RSD%

β -トレンボロン：真度 75%～82%、併行精度 0.7 RSD%～1.5 RSD%

であり（表 7-1 及び 7-2）、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）を満足した。

表 7-1 真度及び精度の評価結果（ α -トレンボロン）

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		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	α -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	0.002	—	432326883	1954	0.9999	81	81	82	82	81	81.3	0.6	45591	23111	34351
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	0.002	—	418132259	1351	0.9998	79	78	78	79	78	78.4	0.7	37281	23948	30815
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	0.01	—	398339772	30713	0.9996	80	80	79	78	77	78.7	1.5	190086	116411	153249

表 7-2 真度及び精度の評価結果（ β -トレンボロン）

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		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	β -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	0.002	—	1298029986	4788	0.9999	81	82	82	82	81	81.6	0.7	142955	70967	106961
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	0.002	—	1269634964	4527	0.9999	75	74	75	76	74	74.5	0.9	108844	69144	88994
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	0.01	—	1175606257	228372	0.9991	83	82	82	81	80	81.4	1.5	626011	379998	503005

③ 定量限界（0.001 mg/kg 相当濃度を添加した添加試料の結果）

定量限界相当濃度の α -トレンボロン及び β -トレンボロンを添加した試料（牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、豚の筋肉・脂肪・肝臓）における真度及び併行精度は、

α -トレンボロン：真度 78%～84%、併行精度 0.4 RSD%～2.5 RSD%

β -トレンボロン：真度 76%～84%、併行精度 0.4 RSD%～3.0 RSD%

であり（表 8-1 及び 8-2）、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）を満足した。

また、S/Nについては、

α -トレンボロン：9000～20000

β -トレンボロン：28000～69000

であった。

これらの結果から、0.001 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（ α -トレンボロン）

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		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	α -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	420275667	-3924	0.9997	82	84	84	84	85	83.7	1.6	15928	11558	13743
2		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	431877102	-2068	0.9999	81	80	79	76	79	78.9	2.5	12910	9915	11413
3		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	432176252	-4151	0.9998	81	81	80	83	81	81.2	1.5	20980	13261	17120
4		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	S/N	429624048	-4409	0.9999	78	79	78	78	79	78.4	0.4	16820	12690	14755
5		豚の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	450123503	-1474	0.9999	79	79	77	78	80	78.6	1.4	11917	9074	10496
6		豚の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	445868791	-2838	0.9999	82	80	81	80	80	80.8	1.1	17611	12203	14907
7		豚の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	43323950	-2617	0.9999	80	80	80	80	79	79.6	0.4	13748	9249	11499

表 8-2 定量限界の評価結果（ β -トレンボロン）

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		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	β -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1271693044	-6983	0.9999	83	84	84	84	84	83.9	0.8	51495	36832	44163
2		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	12207881284	-1565	0.9998	79	79	76	73	77	76.6	3.0	41984	31345	38904
3		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1279165650	-1730	0.9998	83	83	82	85	83	83.1	1.4	89137	41406	55271
4		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1285016759	-13842	0.9998	76	77	76	77	77	76.4	0.6	52261	40124	46193
5		豚の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1364791067	5272	0.9999	81	82	79	80	81	80.7	1.2	37393	28651	33022
6		豚の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1313238475	-10579	0.9996	85	84	85	83	83	83.9	1.2	55156	40298	47727
7		豚の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	1312287368	-808	0.9997	81	81	81	81	81	80.9	0.4	43374	29029	36202

4. 測定の際の試料マトリックスの影響

α -トレンボロンの基準値濃度及び定量限界濃度における測定の際の試料マトリックスの影響を表 9-1 に、 β -トレンボロンの基準値濃度及び定量限界濃度における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、 α -トレンボロンでは基準値及び定量限界濃度でそれぞれ 0.89~0.93 及び 0.87~0.93 であった。 β -トレンボロンでは基準値及び定量限界濃度でそれぞれ 0.83~0.93 及び 0.85~0.94 であった。

以上の結果から、 α -トレンボロン及び β -トレンボロンともに、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 (α -トレンボロン)

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						
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	α -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	0.002	0.002	面積	0	788881	789579	789230	857825	856453	857139	0.92
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	0.002	0.002	面積	0	748402	753235	750818	837135	855191	846163	0.89
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	0.01	0.01	面積	0	3696189	3659998	3678093	3990416	3929700	3960058	0.93
4		牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	388239	389011	388625	413438	423653	418545	0.93
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	389394	392611	391002	428346	428148	428247	0.91
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	396836	397267	397052	426951	423195	425073	0.93
7		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	373570	372232	372901	422157	433202	427680	0.87
8		豚の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	398637	398759	398698	447464	441363	444413	0.90
9		豚の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	408949	402957	405953	441637	435038	438337	0.93
10		豚の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	393279	392873	393076	433567	425007	429287	0.92

表 9-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (β -トレンボロン)

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)						
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	β -トレンボロン (m/z 362→197)	牛の筋肉(MRL)	0.001	0.002	0.002	0.002	面積	0	2418217	2421986	2420101	2614704	2574955	2594830	0.93
2		牛の脂肪(MRL)	0.001	0.002	0.002	0.002	面積	0	2106675	2126529	2116602	2546769	2569703	2558236	0.83
3		牛の肝臓(MRL)	0.001	0.01	0.01	0.01	面積	0	11297530	11054170	11175850	12127472	11852024	11989748	0.93
4		牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1193162	1197785	1195463	1258991	1288081	1273536	0.94
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1105678	1118533	1112106	1277355	1293387	1285371	0.87
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1196449	1191202	1193825	1268945	1262261	1265603	0.94
7		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1060232	1099692	1079962	1267482	1284239	1275860	0.85
8		豚の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1198554	1210511	1203533	1376680	1332645	1354662	0.89
9		豚の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1213825	1217714	1215770	1300521	1283740	1292130	0.94
10		豚の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.001	面積	0	1177634	1173219	1175426	1323183	1293219	1308201	0.90

各検討食品における α -トレンボロン及び β -トレンボロンの SRM クロマトグラムを図 10 に、トータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 m/z 100~400) を図 11 に示した。

[結論]

畜産物中の α -トレンボロン及び β -トレンボロ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）により、種々の畜産物から α -トレンボロン及び β -トレンボロンを効率的に抽出可能と考えられた。精製操作については、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液に転溶後、シリカゲルミニカラム精製を行うことで、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った。

また、LC-MS/MS 測定における高感度化を目的として、2-フルオロ-1-メチルピリジニウム（*p*-トルエンスルホン酸塩）を用いた誘導体化について検討し、誘導体化された α -トレンボロン及び β -トレンボロンを測定することで、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、誘導体化された α -トレンボロン及び β -トレンボロ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・脂肪・肝臓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及び 0.001 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、選択性に問題は無かった。

- ・ 真度及び併行精度

基準値濃度の α -トレンボロン及び β -トレンボロンについて、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 0.001 mg/kg の添加試料を用いた添加回収試験において、 α -トレンボロン及び β -トレンボロンともに、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、定量限界は各 0.001 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 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの試験法として、本報告で開発した方法を適用可能（定量限界は α -トレンボロン及び β -トレンボロンともに 0.001 mg/kg）であると判断された。

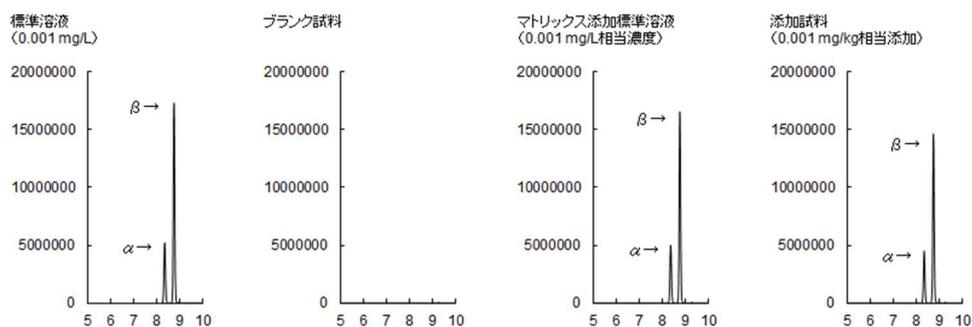


図 10-1 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の筋肉、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

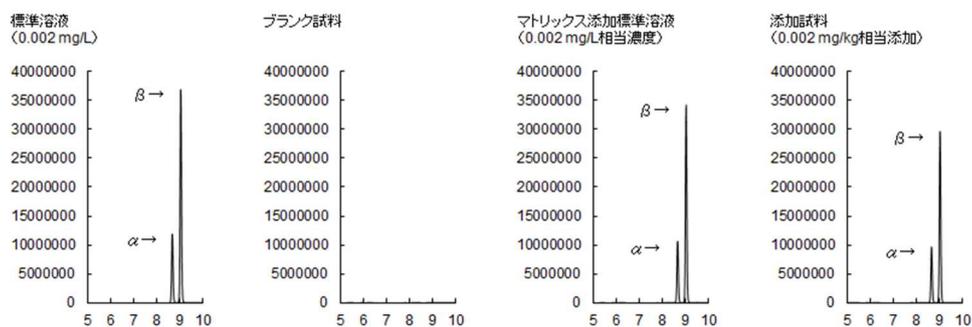


図 10-2 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の筋肉、基準値濃度 (0.002 mg/kg)

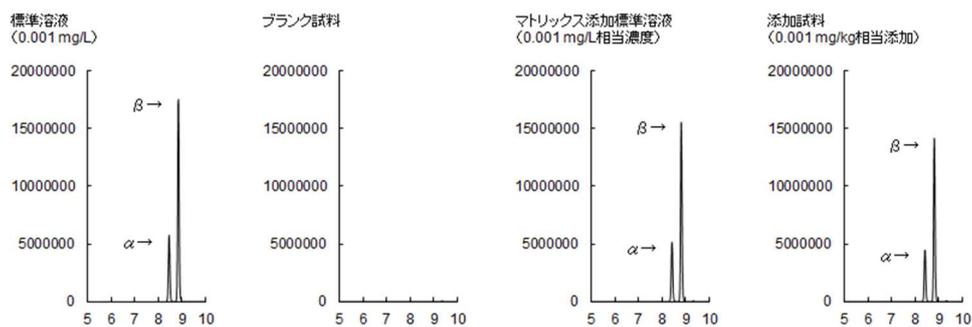


図 10-3 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の脂肪、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

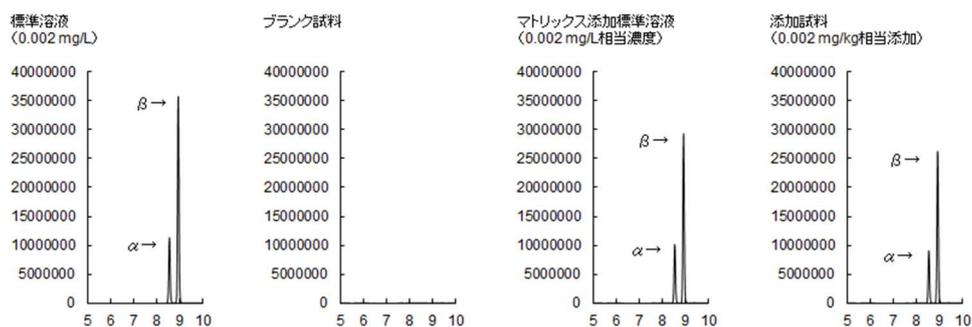


図 10-4 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の脂肪、基準値濃度 (0.002 mg/kg)

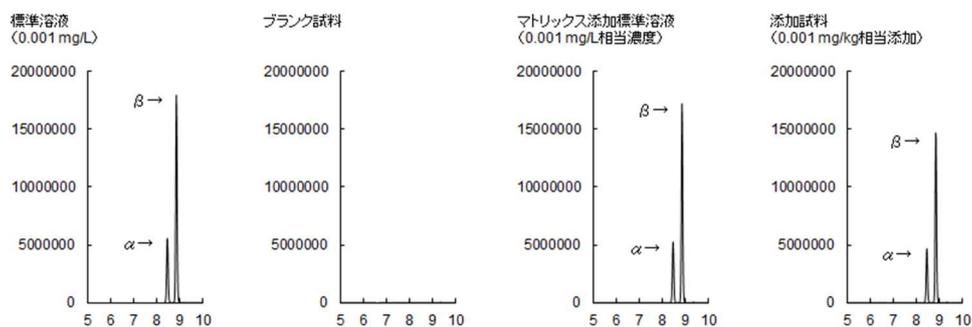


図 10-5 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の肝臓、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

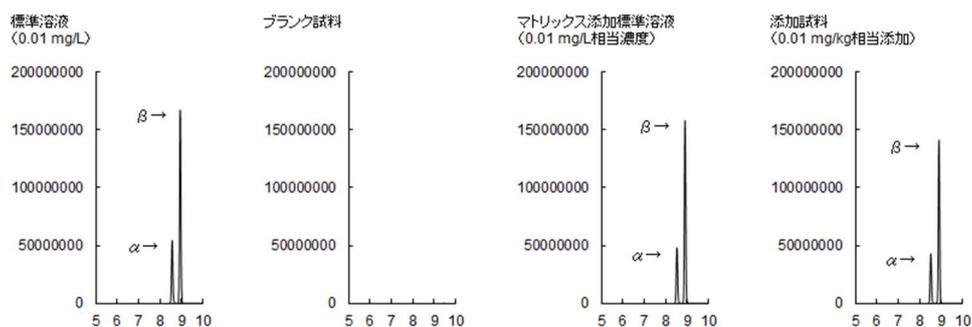


図 10-6 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛の肝臓、基準値濃度 (0.01 mg/kg)

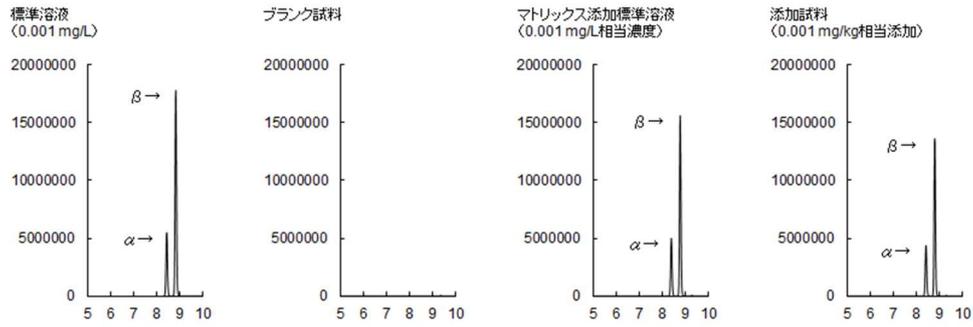


図 10-7 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、牛乳、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

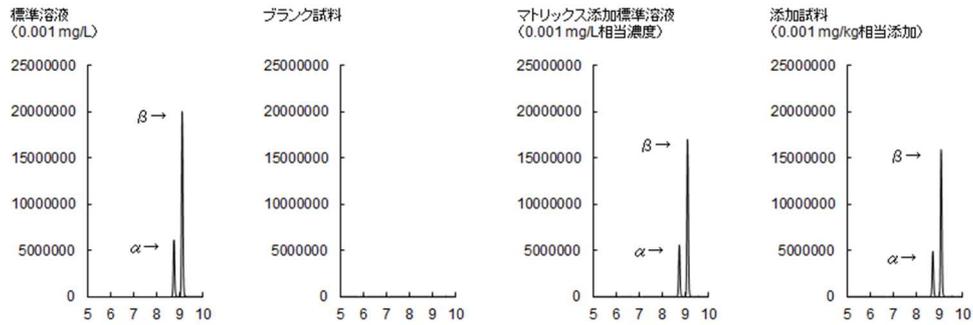


図 10-8 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、豚の筋肉、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

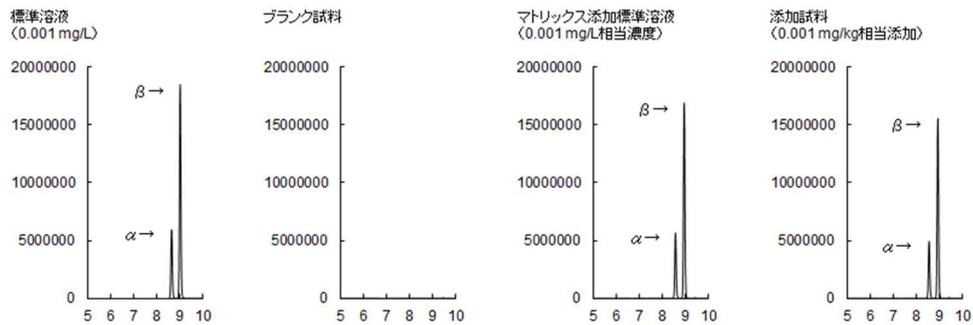


図 10-9 α -トレンボロン及び β -トレンボロンの誘導体化物の SRM クロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、豚の脂肪、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

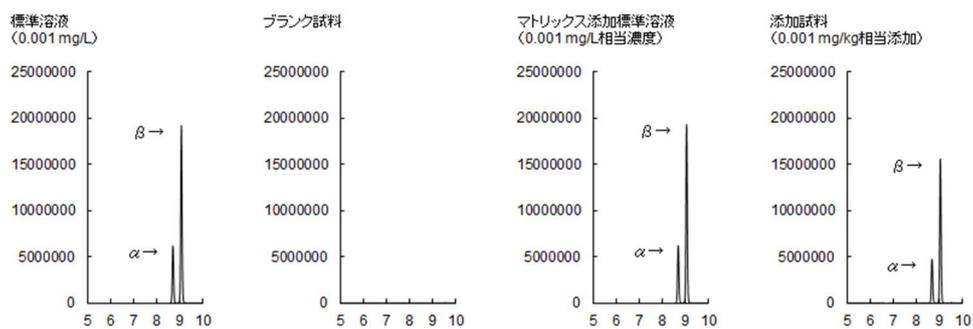


図 10-10 α-トレンボロン及びβ-トレンボロンの誘導体化物のSRMクロマトグラム
測定イオン m/z 362>197、豚の肝臓、定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

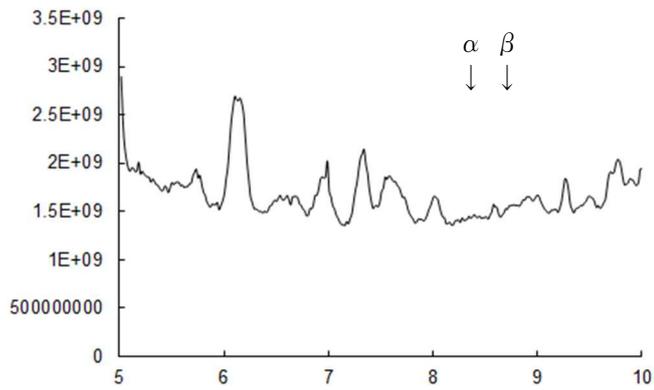


図 11-1 トータルイオンクロマトグラム (牛の筋肉)

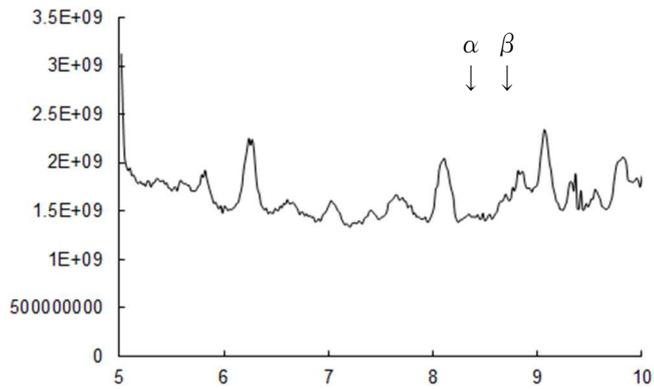


図 11-2 トータルイオンクロマトグラム (牛の脂肪)

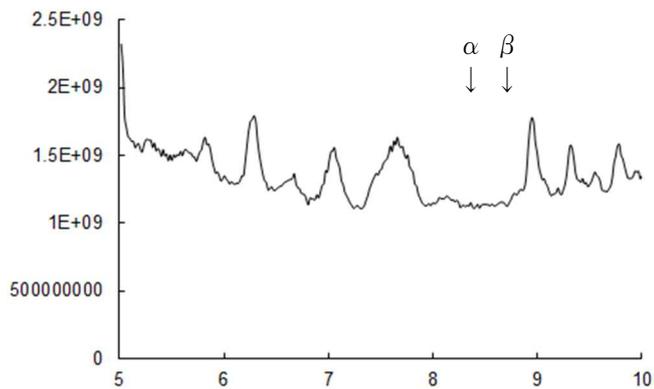


図 11-3 トータルイオンクロマトグラム (牛の肝臓)

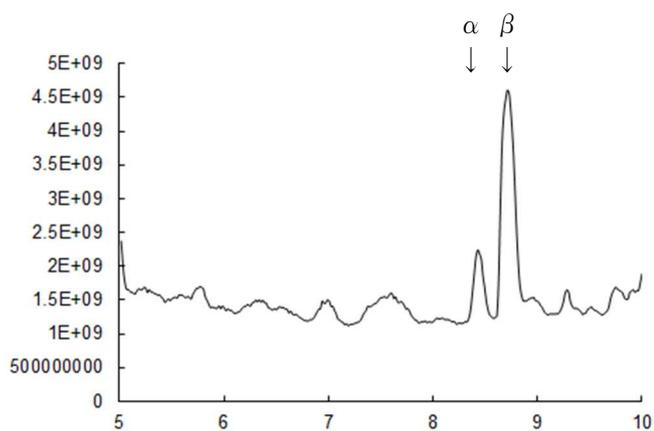


図 11-4 トータルイオンクロマトグラム (牛乳)

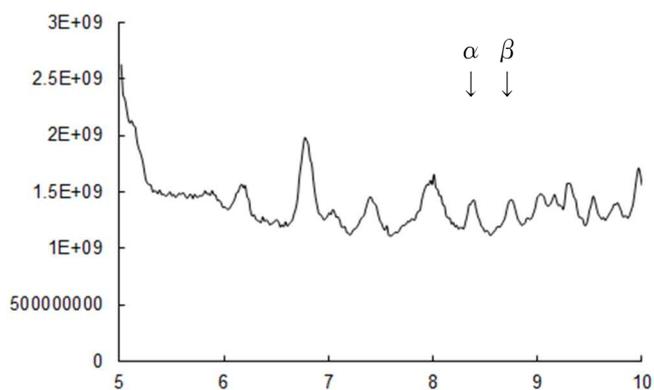


図 11-5 トータルイオンクロマトグラム (豚の筋肉)

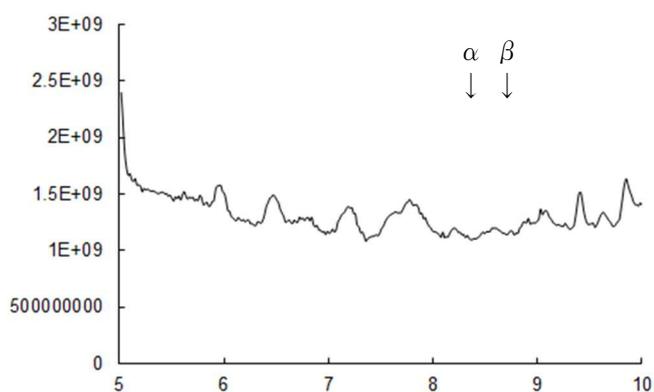


図 11-6 トータルイオンクロマトグラム (豚の脂肪)

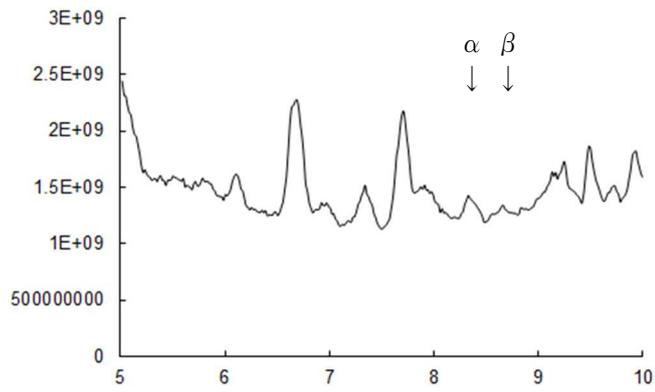


図 11-7 トータルイオンクロマトグラム (豚の肝臓)