

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

残留農薬等の公示試験法策定のための検討 に関する報告書

酢酸メレンゲステロール試験法 の開発

一斉試験法における酢酸メレンゲステロール分析の適用性検証

[目的]

酢酸メレンゲステロールは、合成プロゲステロゲンであり、経口投与で活性を有する。

海外では、雌の肉牛の飼料効率の改善、成長促進及び発情抑制を目的として使用されており、承認された投与量は 0.25～0.50 mg/頭/日で、肥育期及び肥育仕上げ期にかけて、通常 90～150 日混餌投与される。本剤は単独又は他の成長促進剤と併用して投与される。なお、ヒト用医薬品としては使用されていない。

日本においては、動物用医薬品及びヒト用医薬品として承認されていない。

今般、酢酸メレンゲステロールについて暫定基準値の見直しが行われたことから、新たな基準値での検査に対応可能な試験法を早急に整備する必要性が生じた。

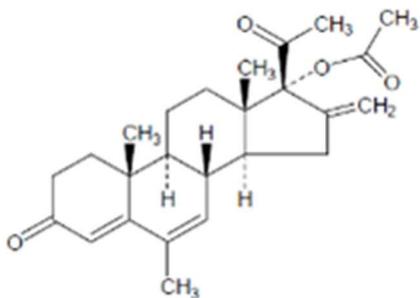
そこで先ず、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」の適用性について検証した。

酢酸メレンゲステロールの基準値

	基準値 (ppm)	
	暫定基準値	本基準値案
牛の筋肉	0.03	0.001
牛の脂肪	0.03	0.02
牛の肝臓	0.03	0.01
牛の腎臓	0.03	0.002

[検討対象化合物の構造]

酢酸メレンゲステロール



分子式：C₂₅H₃₂O₄

IUPAC名：

(17R)-17-acetyl-17-hydroxy-6,10,13-trimethyl-16-methylidene-1,2,8,9,11,12,14,15-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one

CAS 番号：2919-66-6

17-(Acetyloxy)-6-methyl-16-methylenepregna-4,6-diene-3,20-dione

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓を用いた。以下に試料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) 肝臓及び腎臓は、細切均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品及び標準溶液

標準品は、以下のものを用いた。

酢酸メレンゲステロール：林純薬工業(株)製、純度 99.4%

酢酸メレンゲステロール標準品をアセトニトリルに溶解して 1 mg/mL の標準原液を調製した。

以下、添加用標準溶液及び検量線作成用標準溶液の調製法を記載した。

・添加用標準溶液

酢酸メレンゲステロール標準原液をアセトンで適宜希釈した。

・検量線作成用標準溶液

酢酸メレンゲステロール標準原液をアセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸(1:3) 混液で適宜希釈した。

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：和光純薬工業(株)製、残留農薬・PCB 試験用

酢酸：和光純薬工業(株)製、試薬特級

メタノール：関東化学(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

オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) ミニカラム：ジューエルサイエンス(株) 製、InertSep C18 FF (1,000 mg)

3. 装置

液体クロマトグラフ：Nexera X2 シリーズ UHPLC ((株)島津製作所製)

タンデム型質量分析計：API 4000 (SCIEX 製)

濃縮装置：ロータリーエバポレーターNVC-2100 (東京理化工械(株)製)

4. 測定条件

カラム：Inertsil ODS-4 HP (粒子径 3.0 μm、内径 3 mm、長さ 150 mm、ジューエルサイエンス(株)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)

グラジエント：下表

時間 (分)	A 液	B 液
0	99	1
5	99	1
35	1	99
40	1	99
40.1	99	1
50	99	1

移動相流速： 0.4 mL/min

保持時間：28 分

イオン化モード： ESI (+)

質量分析パラメータ：

イオンスプレー電圧 5.5 kV、脱溶媒温度 700°C、イオンソースガス 1 流量 60、
イオンスプレーガス 2 流量 70、カーテングス流量 30、コリジョンガス (N₂)
流量 6

表 1 測定イオン (*m/z*)

	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクト イオン (定量用)	CE (定量用、 eV)	プロダクト イオン (定性用)	CE (定性用、 eV)
酢酸メレンゲステロール	397	76	279	27	337	21

DP : Declustering Potential (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(アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸 (1:3) 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検量線を作成した。

試験溶液 (0.5 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酢酸メレンゲステロールの含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.001 mg/kg の場合の代表的な検量線、回帰式及び決定係数 (R^2 値) を示した (左: 定量イオン、右: 定性イオン)。

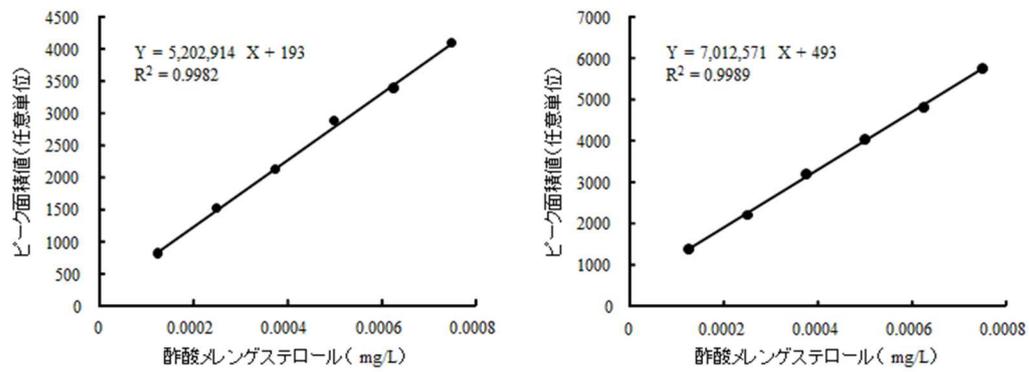


図 1 酢酸メレンゲステロールの検量線の一例 (左: 定量イオン、右: 定性イオン)

6. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採った。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて 2 分間ホモジナイズした。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 2 分間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、アセトニトリルで正確に 100 mL とした。この 5 mL (試料 0.5 g 相当量) を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に 0.1 vol% ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 1 mL を加えて溶かした。

2) 精製

ODS ミニカラム (1,000 mg) にメタノール 5 mL、0.1 vol% ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 5 mL を順次注入し、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、0.1 vol% ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 2 mL ずつで 3 回容器を洗い、各洗液を順次カラムに注入した。更に 0.1 vol% ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 9 mL を注入し、全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸 (1 : 3) 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

抽出

n-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 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 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 5 mL (試料 0.5 g 相当) を正確に採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒除去

残留物を 0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 1 mL で溶解 (抽出溶液①)

ODS ミニカラム (1,000 mg)

カラムを予めメタノール 5 mL、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 5 mL で順次洗浄

抽出溶液①を負荷

容器を 0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 2 mL で 3 回洗い込んで注入

さらに、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液 9 mL を注入

負荷液を含む全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去

残留物をアセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸 (1 : 3) 混液に溶解し、正確に 1 mL とする

LC-MS/MS

(0.5 g 試料/mL)

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を処理した ODS 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. 測定条件の検討

1) タンデム質量分析における測定イオン及び測定パラメータの選択

まず、タンデム型質量分析計における酢酸メレンゲステロールの測定イオンの選択及び測定条件の最適化を試みた。すなわち、酢酸メレンゲステロール標準溶液（100 ng/mL）をタンデム型質量分析計に注入（流速 0.02 mL/min でインフュージョン注入）し、測定イオン（プリカーサーイオン及びプロダクトイオン）の選択、測定条件の最適化を行った。

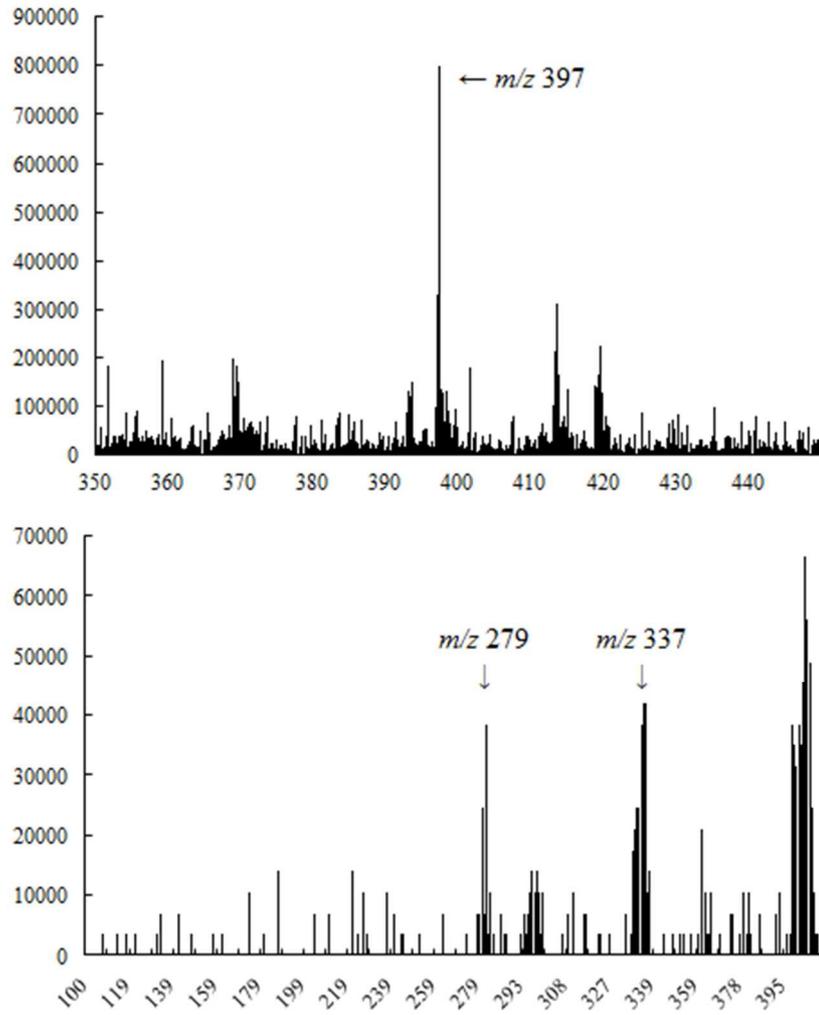
エレクトロスプレーイオン化・ポジティブモード（ESI（+））において、酢酸メレンゲステロールのプロトン付加分子イオン（ $[M+H]^+$ ）と推察されるイオンが検出された。一方、エレクトロスプレーイオン化・ネガティブモード（ESI（-））においては適切な測定イオンは検出されなかった。したがって、イオン化法は ESI（+）を選択した。また、SRM 測定におけるプリカーサーイオンには、酢酸メレンゲステロールのプロトン付加分子イオンと考えられる $[M+H]^+$ のイオン（ m/z 397 のイオン）を選択した。

選択したプリカーサーイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化し、プロダクトイオンを選択した。得られるシグナル強度が高いプロダクトイオンを 2 つ選択し、それぞれ定量イオン及び定性イオンとした。シグナル強度は m/z 397→279 のイオンよりも m/z 397→337 のイオンの方が高かったが、試料マトリックス存在下で測定を行ったところ、 m/z 397→279 のイオンの方が酢酸メレンゲステロールのピーク近傍の夾雑ピークが少なかったことから、 m/z 397→279 のイオンを定量イオン、 m/z 397→337 のイオンを定性イオンとした。

図 2 に、酢酸メレンゲステロールのマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルを示した。

図2 酢酸メレンゲステロールのマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトル

上：マススペクトル (DP 76 V)、下： m/z 397 のプロダクトイオンスペクトル (CE 27 eV)



2) HPLC における測定条件について

HPLC 測定条件等は、先ず、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」で採用した条件の適用を試みた。

条件等の詳細を以下に示した。

分析カラム：Inertsil ODS-4 HP（ジーエルサイエンス(株)製、3×150 mm、粒子径 3 μm)

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

注入量：5 μL

グラジエント条件：下表

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	99	1
5	99	1
35	1	99
40	1	99
40.1	99	1
50	99	1

図 3 に、上記の測定条件における酢酸メレンゲステロール標準溶液のクロマトグラムを示した。

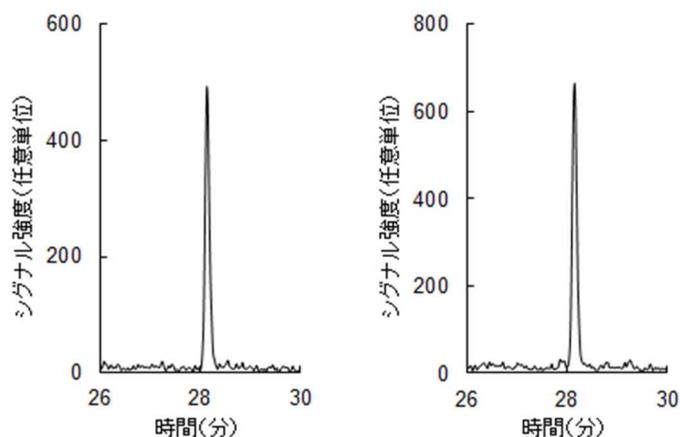


図 3 酢酸メレンゲステロール標準溶液（0.0005 mg/L）のクロマトグラム
左：定量イオン（ m/z 397→279）
右：定性イオン（ m/z 397→337）

2. 一斉試験法の適用性について

迅速且つ簡便な方法で酢酸メレンゲステロールを分析可能であれば効率的な検査体制を確立できることから、先ず、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」の適用性を検証した。

1) 精製カラムからの回収率について

「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」の適用性を検証するにあたり、先ず、本一斉試験法で採用されている精製カラム（ODS ミニカラム、1,000 mg）からの回収率を確認した。

すなわち、予めメタノール 5 mL、0.1 vol%ギ酸及びメタノール（1：4）混液 5 mL を順次通液して平衡化した InertSep C18 FF（1,000 mg）に、酢酸メレンゲステロール 5 ng（5 ng/mL 溶液を 1 mL）注入後、更に 0.1 vol%ギ酸及びメタノール（1：4）混液 15 mL を注入した。負荷液を含む全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸（1：3）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、カラム回収率は 98%であり、本一斉試験法で使用されている精製カラムからの酢酸メレンゲステロールの回収は良好であることが確認された。

2) 添加回収試験

検討食品は、酢酸メレンゲステロールの基準値が設定されている牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓を用いた。

上記の食品を用いてブランク試料及び添加試料を調製した。なお、牛の脂肪については、40℃の湯浴中で加温して融解させ、添加用標準溶液を加えて攪拌後、-30℃で約 30 分間放置して再固化したものを添加試料とした。

調製した試料について、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」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、定量限界を求めた。

① 選択性

検討した 4 食品において、定量イオン及び定性イオンともに、選択性に問題は無いことが確認された（表 2）。

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）

真度及び併行精度（カッコ内に記載）は、以下の通りであった。また、詳細を表 3 に示した。

- ・ 定量イオン (m/z 397→279)
 - 牛の筋肉：89% (1.6 RSD%)
 - 牛の脂肪：93% (1.6 RSD%)
 - 牛の肝臓：95% (5.4 RSD%)
 - 牛の腎臓：96% (1.8 RSD%)
- ・ 定性イオン (m/z 397→337)

- 牛の筋肉：87% (4.1 RSD%)
- 牛の脂肪：93% (1.4 RSD%)
- 牛の肝臓：95% (5.2 RSD%)
- 牛の腎臓：95% (2.5 RSD%)

上記の結果から、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（牛の筋肉は 30 RSD%未満、牛の脂肪は 15 RSD%未満、牛の肝臓及び腎臓は 25 RSD%未満）を満足することが確認された。

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）

真度、併行精度（カッコ内に記載）及び S/N は、以下の通りであった。また、詳細を表 3 に示した。

- ・ 定量イオン (m/z 397→279)

- 牛の筋肉：89% (1.6 RSD%)、S/N 107 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の脂肪：100% (4.1 RSD%)、S/N 143 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の肝臓：96% (2.9 RSD%)、S/N 127 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の腎臓：90% (3.7 RSD%)、S/N 115 (n=5 の Max. と Min. の平均値)

- ・ 定性イオン (m/z 397→337)

- 牛の筋肉：87% (4.1 RSD%)、S/N 67 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の脂肪：106% (7.3 RSD%)、S/N 85 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の肝臓：99% (4.6 RSD%)、S/N 62 (n=5 の Max. と Min. の平均値)
- 牛の腎臓：91% (1.8 RSD%)、S/N 62 (n=5 の Max. と Min. の平均値)

上記の結果から、全ての検討食品において、①添加回収試験溶液（添加濃度 0.001 mg/kg）中の酢酸メレンゲステロールのピークは S/N \geq 10 の目標値を満足しており、②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）を満足することが確認されたことから、0.001 mg/kg の定量限界を設定可能であることが示された。

3) 測定の際の試料マトリックスの影響

「[実験方法]7. マトリックス添加標準溶液の調製」に記載した方法に従い、各検討食品のマトリックス添加標準溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。

結果を表 4 に示した。

各食品におけるピーク面積比（マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値）は、以下の通りであった。

- ・ 定量イオン (m/z 397→279)

- 牛の筋肉：0.98 (基準値相当濃度)
- 牛の脂肪：1.00 (基準値相当濃度) 及び 1.02 (定量限界相当濃度)
- 牛の肝臓：1.00 (基準値相当濃度) 及び 0.99 (定量限界相当濃度)
- 牛の腎臓：1.02 (基準値相当濃度) 及び 0.99 (定量限界相当濃度)

- ・ 定性イオン (m/z 397→337)

- 牛の筋肉：0.97 (基準値相当濃度)
- 牛の脂肪：0.99 (基準値相当濃度) 及び 1.08 (定量限界相当濃度)

牛の肝臓：1.00（基準値相当濃度）及び1.04（定量限界相当濃度）

牛の腎臓：1.16（基準値相当濃度）及び1.05（定量限界相当濃度）

以上の結果から、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。

3. 結論

牛の可食組織中の酢酸メレンゲステロール試験法として、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」の適用性を検証した。なお、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」は、分析対象化合物を、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、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で精製後、LC-MS/MSで測定する方法である。

基準値が設定された4食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓）を対象に添加回収試験（添加濃度は基準値相当濃度及び0.001 mg/kg）を実施した結果、

- ・選択性

全ての検討食品において良好な選択性が得られた。

- ・真度及び併行精度

全ての検討食品において、真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・定量限界

0.001 mg/kg 添加試料を用いた添加回収試験における真度、併行精度及びピークの S/N から、0.001 mg/kg の定量限界を設定可能であると考えられた。

以上の結果から、牛の可食組織中の酢酸メレンゲステロール試験法として、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」を適用可能（定量限界は0.001 mg/kg）であると判断された。

表 2-1 選択性の評価 (定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	2883	0.000	○
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	44175	0.000	○
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	21276	0.000	○
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	4619	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2184	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2252	0.000	○
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2294	0.000	○

表 2-2 選択性の評価 (定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	4047	0.000	○
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	61802	0.000	○
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	29614	0.000	○
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	6512	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3114	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3073	0.000	○
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3219	0.000	○

表 3-1 真度、精度及び定量限界 (定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001		5202914	193	0.9982	88	90	89	87	89	89	1.6	125	89	107
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	*	4489166	-292	0.9996	94	95	93	93	92	93	1.6	2542	2263	2403
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	4142286	391	0.9995	95	100	99	93	87	95	5.4	1570	1170	1370
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	*	4823131	18	0.9994	96	94	94	97	98	96	1.8	296	171	234
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001		4284331	17	0.9996	101	103	99	93	102	100	4.1	162	123	143
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001		435440	59	0.9997	92	97	99	98	95	96	2.9	150	104	127
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001		4544491	-15	0.9994	86	90	95	92	90	90	3.7	127	102	115

表 3-2 真度、精度及び定量限界 (定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001		7012571	493	0.9989	92	84	85	85	89	87	4.1	117	17	67
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	*	6122743	779	0.9997	94	95	92	93	93	93	1.4	2269	830	1550
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	5923896	24	0.9999	96	100	97	94	87	95	5.2	790	134	462
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	*	6456571	60	0.9989	98	94	92	93	97	95	2.5	200	67	134
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001		5874937	119	0.9983	97	114	111	99	110	106	7.3	142	27	85
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001		6162023	-16	0.9997	102	100	94	96	105	99	4.6	86	38	62
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001		8670229	-128	0.9992	92	89	92	93	91	91	1.8	67	57	62

表 4-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)								
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.0005	面積	0	2837	2411	2624	2883	2449	2686	0.98
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	44726	43425	44076	44175	43938	44057	1.00
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	21681	19973	20827	21276	20273	20775	1.00
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	0.001	面積	0	4800	4512	4656	4619	4516	4568	1.02
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2182	2381	2281	2184	2288	2236	1.02
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2239	2167	2203	2252	2217	2235	0.99
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2247	2365	2306	2294	2384	2339	0.99

表 4-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)								
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.0005	面積	0	3950	3626	3788	4047	3750	3898	0.97
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	61862	60822	61342	61802	62412	62107	0.99
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	29711	27962	28837	29614	27791	28703	1.00
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	0.001	面積	0	7479	7236	7358	6512	6136	6324	1.16
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	3504	3498	3501	3114	3394	3254	1.08
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	3244	3111	3177	3073	3046	3059	1.04
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	3180	3776	3478	3219	3386	3302	1.05

図 4-1 定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の筋肉)

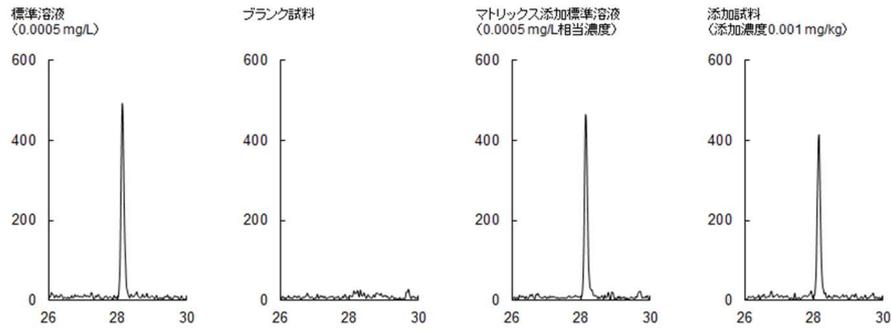


図 4-2 定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の脂肪)

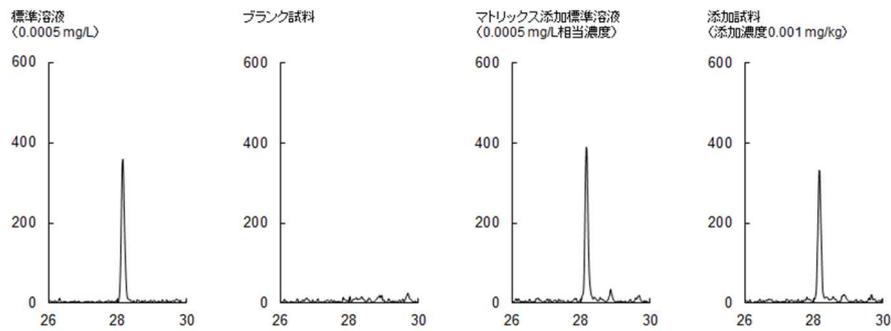


図 4-3 定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の肝臓)

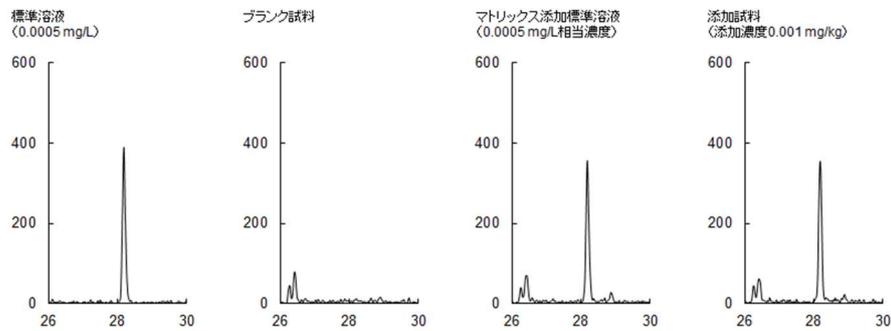


図 4-4 定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の腎臓)

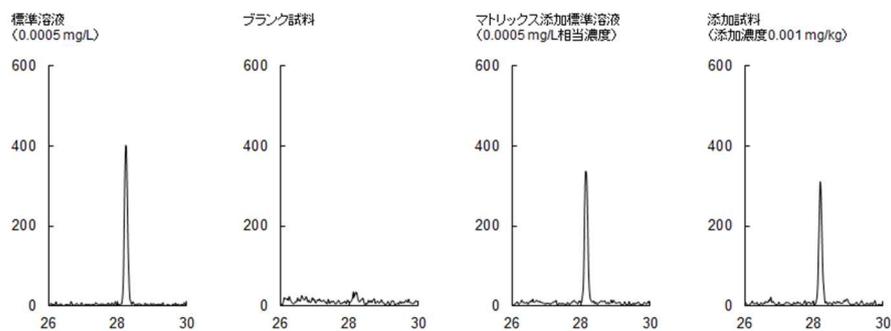


図 5-1 定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の筋肉)

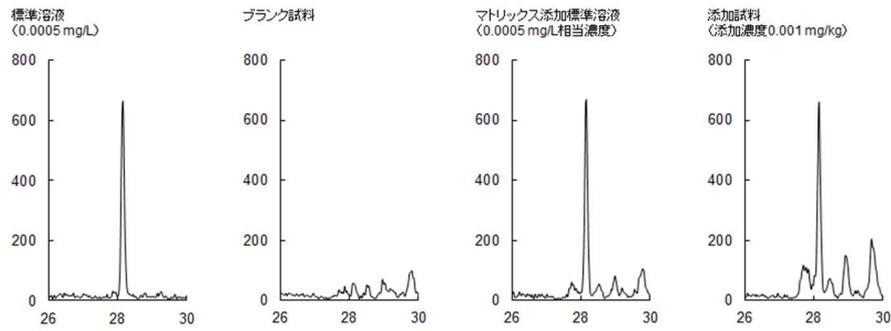


図 5-2 定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の脂肪)

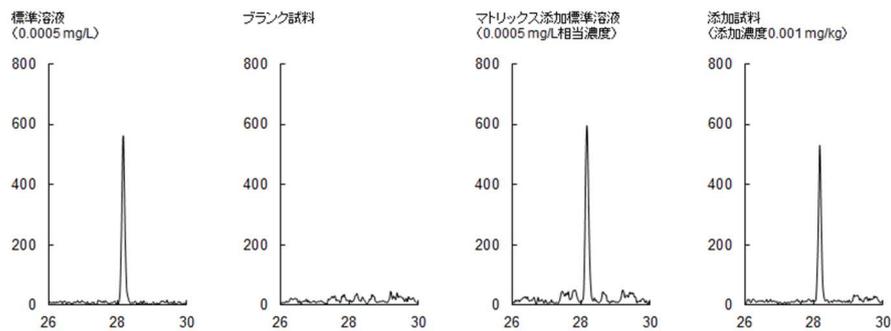


図 5-3 定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の肝臓)

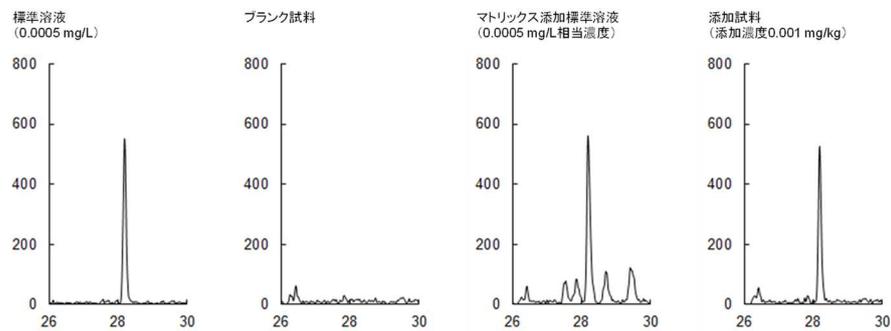
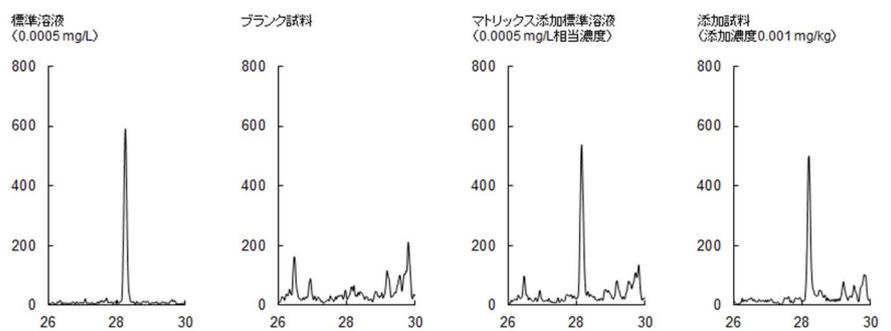


図 5-4 定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の腎臓)



酢酸メレンゲステロール個別試験法としての LC-MS/MS 測定条件の検討

上述の通り、牛の可食組織中の酢酸メレンゲステロール分析に対して、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）・改良法」の適用が可能であった。

しかしながら、本一斉試験法においては、多くの動物用医薬品等を対象としているため、LC-MS/MS 測定に長時間を要する。

酢酸メレンゲステロールのみを分析する場合には、LC 条件を変更することにより更に効率的な検査を実施可能であると考えられたことから、酢酸メレンゲステロールのみを分析する場合の LC 条件（個別分析 LC 条件）の確立について追加検討を実施した。

適用性を検証した一斉試験法で採用されているグラジエント条件における保持時間から、酢酸メレンゲステロールが溶出するアセトニトリル比率を予測し、以下のような LC 条件を設定した。

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	25	75
5	10	90
5.1	1	99
10	1	99
10.1	25	75
15	25	75

設定した上記の個別分析 LC 条件を用いて酢酸メレンゲステロール標準溶液 (0.0005 mg/L) を測定した結果、図 6 の通り良好な形状及び測定感度を有するピークが得られた。

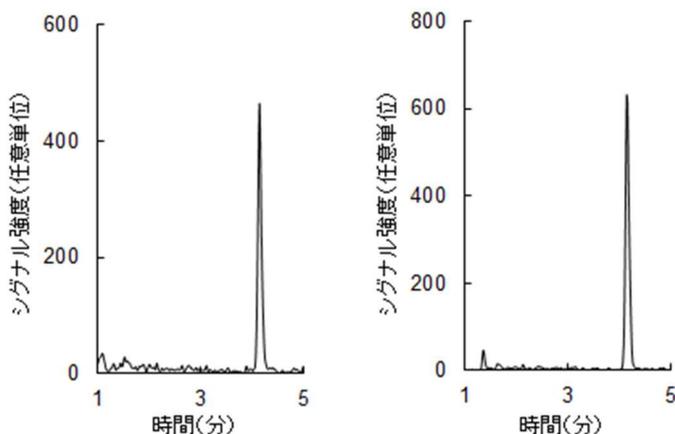


図 6 個別分析 LC 条件における酢酸メレンゲステロール標準溶液 (0.0005 mg/L) のクロマトグラム

左：定量イオン (m/z 397→279)

右：定性イオン (m/z 397→337)

そこで、新たに設定した個別分析 LC 条件を用いて、検量線作成用標準溶液及び添加回収試験溶液（前述の一斉試験法の適用性検証の際に調製したもの）を測定した。

選択性、真度及び精度、S/N について、得られた結果を以下に示した。また、結果の詳細を表 5 及び 6 に示した。

① 選択性

検討した 4 食品において、定量イオン及び定性イオンともに、選択性に問題は無いことが確認された（表 5）。

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）

・ 定量イオン（ m/z 397→279）

牛の筋肉：100%（5.6 RSD%）

牛の脂肪：97%（0.5 RSD%）

牛の肝臓：84%（4.0 RSD%）

牛の腎臓：82%（4.1 RSD%）

・ 定性イオン（ m/z 397→337）

牛の筋肉：95%（4.9 RSD%）

牛の脂肪：98%（1.4 RSD%）

牛の肝臓：85%（4.3 RSD%）

牛の腎臓：78%（2.9 RSD%）

上記の結果から、個別分析 LC 条件で測定した場合であっても、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（牛の筋肉は 30 RSD%未満、牛の脂肪は 15 RSD%未満、牛の肝臓及び腎臓は 25 RSD%未満）を満足することが確認された。

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）

・ 定量イオン（ m/z 397→279）

牛の筋肉：100%（5.6 RSD%）、S/N 121（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の脂肪：111%（6.0 RSD%）、S/N 145（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の肝臓：104%（2.8 RSD%）、S/N 111（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の腎臓：78%（7.0 RSD%）、S/N 107（n=5 の Max. と Min. の平均値）

・ 定性イオン（ m/z 397→337）

牛の筋肉：95%（4.9 RSD%）、S/N 113（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の脂肪：108%（3.7 RSD%）、S/N 166（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の肝臓：97%（1.4 RSD%）、S/N 138（n=5 の Max. と Min. の平均値）

牛の腎臓：81%（5.4 RSD%）、S/N 85（n=5 の Max. と Min. の平均値）

上記の結果から、個別分析 LC 条件で測定した場合であっても、全ての検討食品において、①添加回収試験溶液（添加濃度 0.001 mg/kg）中の酢酸メレンゲステロールのピークは S/N \geq 10 の目標値を満足しており、②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）を満足することが確認されたことから、0.001 mg/kg の定量限界を設定可能であることが示された。

また、各食品におけるピーク面積比（マトリックス添加標準溶液におけるピーク面

積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値)は以下の通りであった。なお、結果の詳細を表7に示した。

・定量イオン (m/z 397→279)

牛の筋肉：1.01 (基準値相当濃度)

牛の脂肪：1.03 (基準値相当濃度) 及び 1.14 (定量限界相当濃度)

牛の肝臓：0.95 (基準値相当濃度) 及び 1.00 (定量限界相当濃度)

牛の腎臓：0.82 (基準値相当濃度) 及び 0.80 (定量限界相当濃度)

・定性イオン (m/z 397→337)

牛の筋肉：0.99 (基準値相当濃度)

牛の脂肪：1.04 (基準値相当濃度) 及び 1.09 (定量限界相当濃度)

牛の肝臓：0.97 (基準値相当濃度) 及び 0.99 (定量限界相当濃度)

牛の腎臓：0.83 (基準値相当濃度) 及び 0.93 (定量限界相当濃度)

以上の結果から、個別分析 LC 条件で測定した場合であっても、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。

以上の結果から、酢酸メレンゲステロールのみを分析する場合には、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)・改良法」を用いて試験溶液を調製し、上記のような迅速な LC 条件で測定することにより、更に効率的な分析が可能であると判断された。

表 5-1 選択性の評価 (個別分析 LC 条件、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
													基準値
1	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	1994	0.000	○
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	45146	0.000	○
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	24670	0.000	○
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	4501	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2182	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2205	0.000	○
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2397	0.000	○

表 5-2 選択性の評価 (個別分析 LC 条件、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
													基準値
1	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	基準値	0.001	< 0.100	面積	0	2795	0.000	○
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	63609	0.000	○
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	34579	0.000	○
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	6375	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3202	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3330	0.000	○
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3178	0.000	○

表 6-1 真度、精度及び定量限界 (個別分析 LC 条件、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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比		
							傾き	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		Max.	Min.	平均値		
																			100	5.6
1	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	*	3920775	-19	0.9992	102	98	95	109	97	100	5.6	153	88	121	
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	*	4612766	-142	0.9995	98	96	96	97	97	97	0.5	3260	2070	2685	
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	4830286	21	0.9992	86	87	87	83	79	84	4.0	1360	826	1093	
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	*	4533714	-28	0.9994	83	87	82	77	82	82	4.1	260	177	219	
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001		3904891	211	0.9992	102	120	109	110	114	111	6.0	179	110	145	
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001		4404366	13	0.9992	103	109	102	102	104	104	2.8	148	74	111	
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001		4867257	-72	0.9993	72	75	84	84	76	78	7.0	112	102	107	

表 6-2 真度、精度及び定量限界 (個別分析 LC 条件、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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比		
							傾き	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		Max.	Min.	平均値		
																			100	4.9
1	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	*	5390057	76	0.9998	99	94	88	100	96	95	4.9 <td>133 <td>92 <td>113</td> </td></td>	133 <td>92 <td>113</td> </td>	92 <td>113</td>	113	
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	*	6475429	-859	0.9991	99	97	95	98	99	98	1.4	4580	3170	3875	
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	6707489	424	0.9990	86	90	87	82	81	85	4.3	632	468	550	
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	*	6523920	-5	0.9989	80	77	79	75	81	78	2.9	252	129	191	
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001		6330863	6	0.9992	109	111	110	101	108	108	3.7	185	146	166	
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001		6713689	-27	0.9995	96	98	98	95	97	97	1.4	173	103	138	
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001		6110823	98	0.9998	76	81	80	82	88	81	5.4	120	50	85	

表 7-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (個別分析 LC 条件、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)								
							面積又は高さの別	ブランク	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	酢酸スリンゴステロール (定量イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.0005	面積	0	2053	2085	2069	1994	2095	2044	1.01
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	46283	47208	46746	45146	45491	45319	1.03
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	22755	23298	23027	24670	23734	24202	0.95
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	0.001	面積	0	3701	3767	3734	4501	4567	4544	0.82
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2531	2470	2501	2182	2216	2199	1.14
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2267	2191	2229	2205	2259	2232	1.00
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	1907	1940	1924	2397	2388	2393	0.80

表 7-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (個別分析 LC 条件、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)								
							面積又は高さの別	ブランク	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	酢酸スリンゴステロール (定性イオン)	牛の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.0005	面積	0	2764	3009	2887	2795	3062	2929	0.99
2		牛の脂肪	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	66612	67430	67021	63609	65070	64340	1.04
3		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	32893	34052	33473	34579	34271	34425	0.97
4		牛の腎臓	0.001	0.002	0.002	0.001	面積	0	5333	5228	5280	6375	6328	6352	0.83
5		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	3474	3630	3552	3202	3288	3245	1.09
6		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	3341	3306	3323	3330	3368	3349	0.99
7		牛の腎臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	0	2992	2963	2977	3178	3223	3200	0.93

図 7-1 個別分析 LC 条件、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の筋肉)

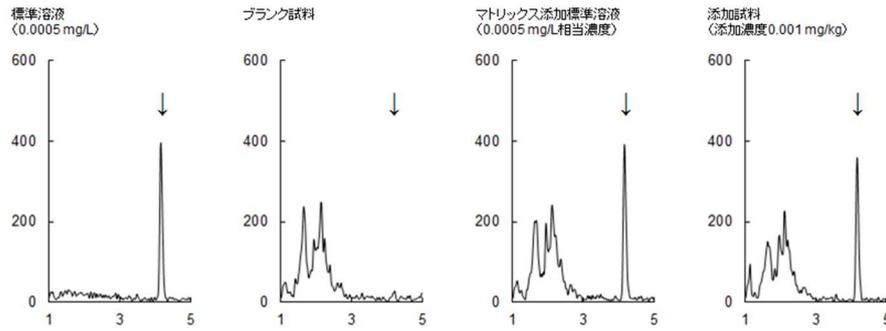


図 7-2 個別分析 LC 条件、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の脂肪)

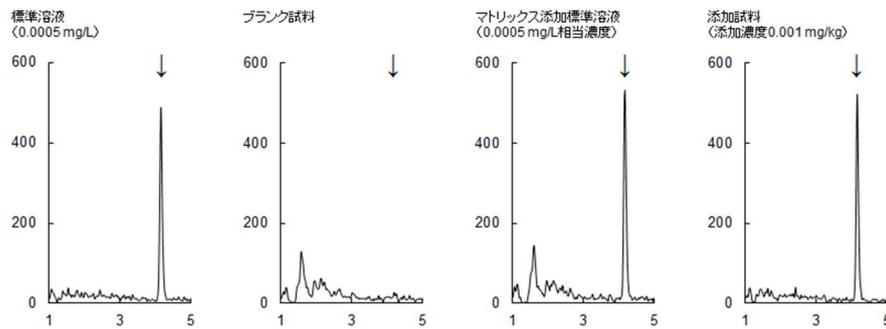


図 7-3 個別分析 LC 条件、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の肝臓)

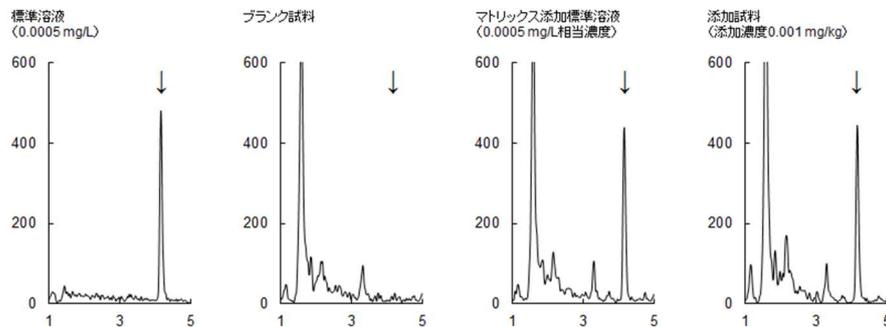


図 7-4 個別分析 LC 条件、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム (牛の腎臓)

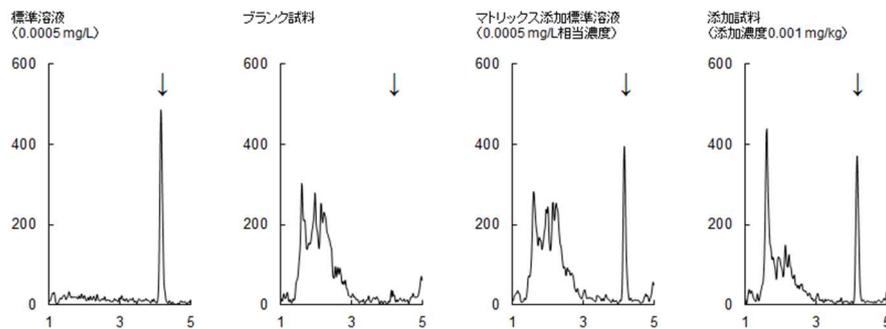


図 8-1 個別分析 LC 条件、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の筋肉)

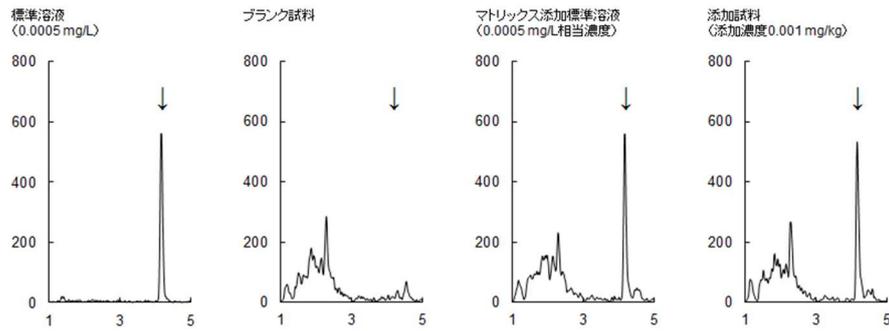


図 8-2 個別分析 LC 条件、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の脂肪)

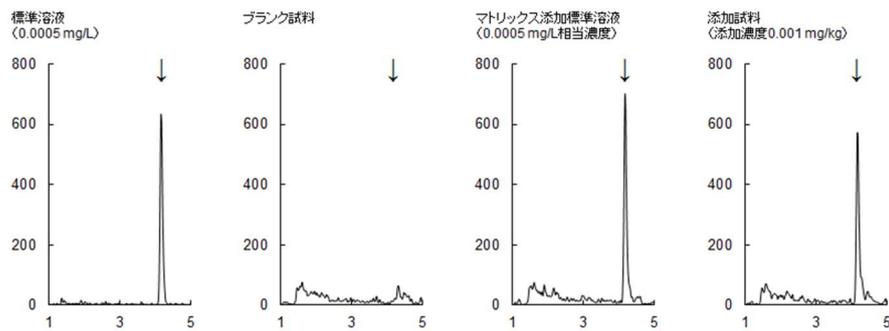


図 8-3 個別分析 LC 条件、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の肝臓)

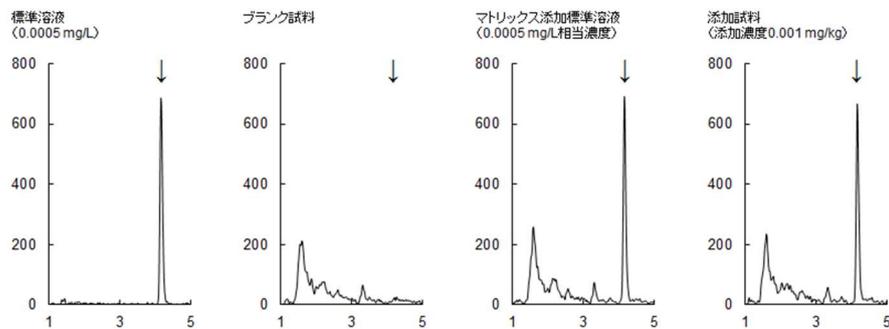


図 8-4 個別分析 LC 条件、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム (牛の腎臓)

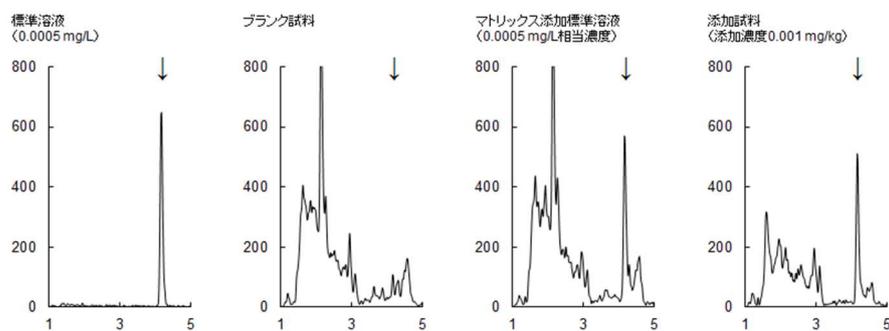
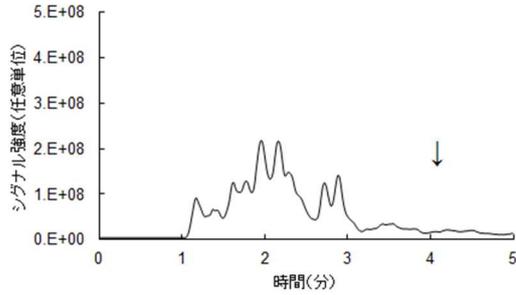
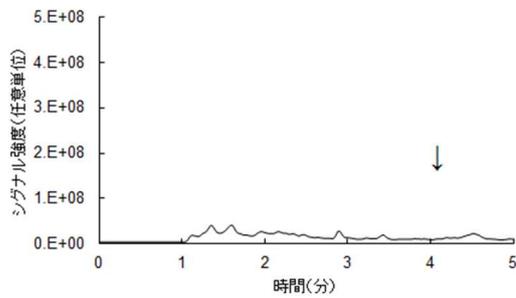


図9 ブランク試験溶液のトータルイオンクロマトグラム
 (スキャン範囲： m/z 350~450、DP：76 V、イオンスプレー電圧：5.5 kV、脱
 溶媒温度：600°C、↓：酢酸メレンゲステロールの溶出位置)

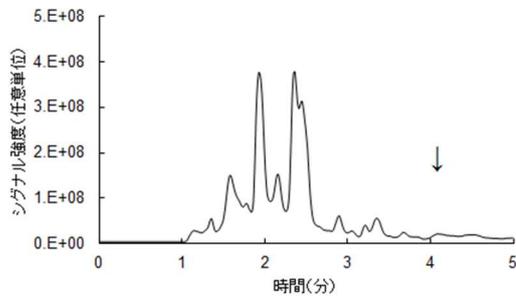
・筋肉



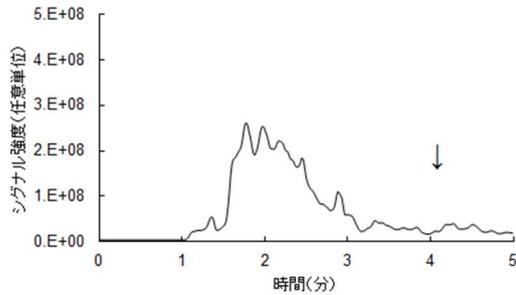
・脂肪



・肝臓



・腎臓



基準値設定食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓）以外の食品についての追加検討

酢酸メレンゲステロールについて、今般の食品安全委員会（平成 28 年 12 月）でのリスク評価において ADI が 0.025 µg/kg/day と設定されたことから、基準値が設定される牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓以外の食品には「不検出」の規格が適用されることとなった。

そのため、急遽「検出限界相当濃度（0.0005 mg/kg）」での添加回収試験の追加実施の必要性が生じたことから、先ず、豚の筋肉を用いて 5 併行の添加回収試験（添加濃度 0.0005 mg/kg）を追加実施したので、結果を報告する。

[実験方法]

試料は、都内のスーパーマーケットで購入した豚の筋肉を用いた。購入した豚の筋肉から可能な限り脂肪層を除き、細切均一化したものを使用した。

「試薬、試液」、「装置」、「測定条件」、「定量」、「試験溶液の調製」、「マトリックス添加標準溶液の調製」については、先に記載した方法、条件等に従い実施した。（測定条件は、酢酸メレンゲステロール個別試験法として採用したグラジエント条件を用いた。）

また、設定される予定の検出限界が 0.0005 mg/kg と低い値であることから、これまでに使用した LC-MS/MS（Nexera-API 4000）での測定に加え、当該機種よりも高い測定感度を有すると考えられる Aquity UPLC-Xevo TQ-S（ともに Waters 製）による測定も実施した。

[結果]

① 選択性

検討した豚の筋肉試料において、測定に用いた 2 機種（API 4000 及び Xevo TQ-S）ともに、選択性に問題は無いことが確認された。結果の詳細を表 8 に示した。

② 真度及び精度（検出限界相当濃度 0.0005 mg/kg を添加した添加試料の結果）

- ・ API 4000、定量イオン（ m/z 397→279）
真度 94%、併行精度 1.6 RSD%、S/N 49（ $n=5$ の Max. と Min. の平均値）
- ・ API 4000、定性イオン（ m/z 397→337）
真度 93%、併行精度 3.1 RSD%、S/N 68（ $n=5$ の Max. と Min. の平均値）
- ・ Xevo TQ-S、定量イオン（ m/z 397→279）
真度 87%、併行精度 1.5 RSD%、S/N 156（ $n=5$ の Max. と Min. の平均値）
- ・ Xevo TQ-S、定性イオン（ m/z 397→337）
真度 89%、併行精度 2.3 RSD%、S/N 191（ $n=5$ の Max. と Min. の平均値）

上記の結果から、測定に用いた 2 機種、各機種における定量イオン及び定性イオンともに、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）を満足することが確認された。また、添加回収試験溶液（添加濃度 0.0005 mg/kg）に

における酢酸メレンゲステロールのピークは $S/N \geq 10$ の目標値を満足していた。

以上の結果から、豚の筋肉においては、酢酸メレンゲステロールの定量限界を 0.0005 mg/kg に設定可能であることが示された。

結果の詳細を表 9 に示した。

また、豚の筋肉におけるピーク面積比（マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値）は以下の通りであった。結果の詳細を表 10 に示した。

- ・ API 4000、定量イオン (m/z 397→279) 0.96
- ・ API 4000、定性イオン (m/z 397→337) 0.98
- ・ Xevo TQ-S、定量イオン (m/z 397→279) 0.90
- ・ Xevo TQ-S、定性イオン (m/z 397→337) 0.93

以上の結果から、測定に用いた 2 機種、各機種における定量イオン及び定性イオンともに、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 8-1 選択性の評価 (API 4000、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	基準値	0.0005	< 0.100	面積	0	1115	0.000	○

表 8-2 選択性の評価 (API 4000、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	基準値	0.0005	< 0.100	面積	0	1743	0.000	○

表 8-3 選択性の評価 (Xevo TQ-S、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	基準値	0.0005	< 0.100	面積	0	1963	0.000	○

表 8-4 選択性の評価 (Xevo TQ-S、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ)			選択性の評価		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)		面積(高さ)比 (a)/(b)	
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	基準値	0.0005	< 0.100	面積	0	1991	0.000	○

表 9-1 真度、精度及び S/N (API 4000、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検査線			回収率 (%)					真度		S/N比		
							繰り	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.	Min.	平均値
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		458199	-31	1.0000	93	92	94	96	94	94	1.6	57	40	49

表 9-2 真度、精度及び S/N (API 4000、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検査線			回収率 (%)					真度		S/N比		
							繰り	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.	Min.	平均値
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		703631	-49	0.9994	97	93	97	91	90	93	3.1	87	49	68

表 9-3 真度、精度及び S/N (Xevo TQ-S、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検査線			回収率 (%)					真度		S/N比		
							繰り	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.	Min.	平均値
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		7599537	33	0.9996	86	86	88	87	89	87	1.5	196	116	156

表 9-4 真度、精度及び S/N (Xevo TQ-S、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検査線			回収率 (%)					真度		S/N比		
							繰り	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.	Min.	平均値
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		764441	-21	0.9989	87	89	88	91	92	89	2.3	199	182	191

表 10-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (API 4000、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)									
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.00025	面積	0	1071	1076	1074	1115	1124	1119	0.96	

表 10-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (API 4000、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)									
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸ベンジルステロール (定量イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.00025	面積	0	1738	1682	1710	1743	1745	1744	0.98	

表 10-3 測定の際の試料マトリックスの影響 (Xevo TQ-S、定量イオン m/z 397→279)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)									
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.00025	面積	0	1762	1760	1761	1963	1932	1947	0.90	

表 10-4 測定の際の試料マトリックスの影響 (Xevo TQ-S、定性イオン m/z 397→337)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積(高さ)									
							面積又は高さの別	ブランク	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	
1	酢酸ベンジルステロール (定性イオン)	豚の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.00025	面積	0	1829	1828	1829	1991	1943	1967	0.93	

図 10-1 API 4000、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム

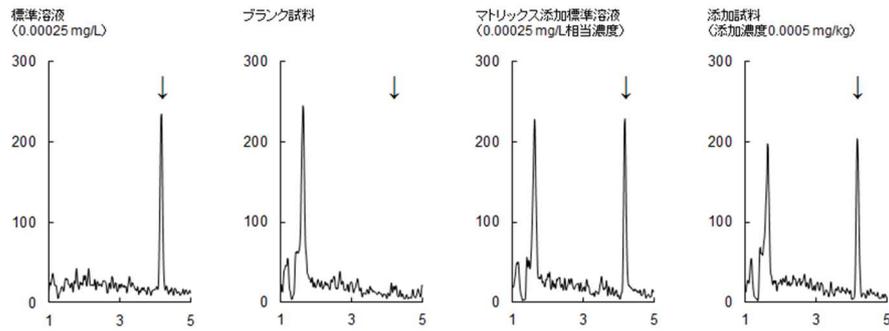


図 10-2 API 4000、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム

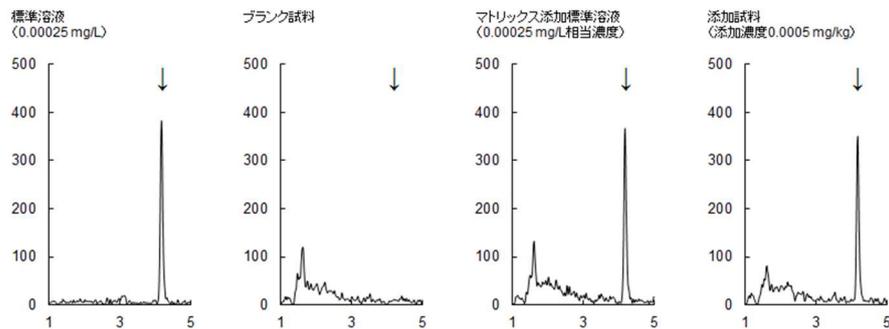


図 11-1 Xevo TQ-S、定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム

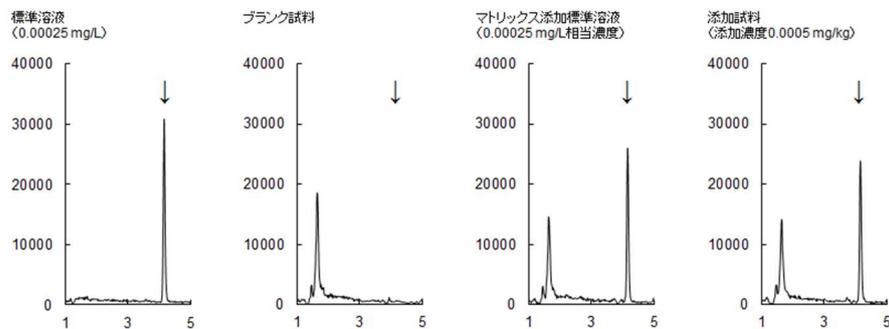
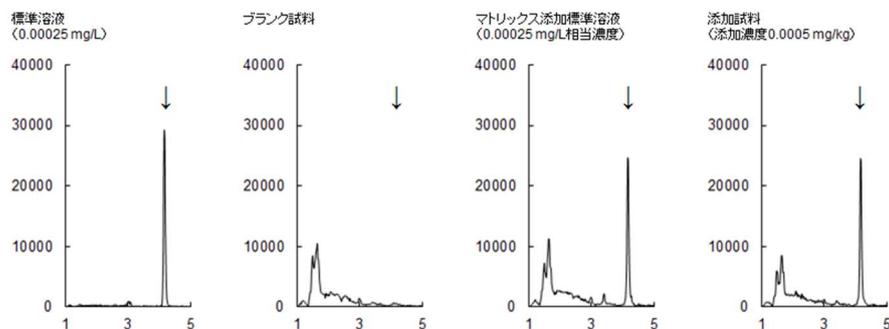


図 11-2 Xevo TQ-S、定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム



追加検討結果について

前述の通り、酢酸メレンゲステロールについては、基準値が設定される牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓以外の食品には「不検出」の規格が適用（検出限界は 0.0005 mg/kg）されることとなった。

設定された検出限界が低濃度であることから、異なる試験機関において、牛の筋肉を用いた検出限界相当濃度（0.0005 mg/kg）の添加回収試験を実施したので、結果を報告する。

[実験方法]

試験溶液の調製は、先に記載した方法に従い調製した。

測定は、LC-MS/MS（(株)島津製作所製 Prominence シリーズ HPLC-SCIEX 製 Triple Quad 5500）を用いた。

試料は牛の筋肉を用いた。均一化した牛の筋肉試料に酢酸メレンゲステロールを添加（添加濃度 0.0005 mg/kg）し、2 併行×5 人の添加回収試験を実施した。

[結果]

① 選択性

検討した牛の筋肉試料において、酢酸メレンゲステロールの測定を妨害するピークは確認されず、選択性に問題は無いことが確認された。

② 真度及び精度（検出限界相当濃度 0.0005 mg/kg を添加した添加試料の結果） 定量イオン（ m/z 397→279）

	添加試料における分析値 (mg/L)				
	実施者①	実施者②	実施者③	実施者④	実施者⑤
試料①	0.000241	0.000236	0.000243	0.000240	0.000236
試料②	0.000219	0.000240	0.000235	0.000245	0.000251

真度 95%、併行精度 3.8 RSD%、室内精度 3.8 RSD%

上記の結果から、牛の筋肉（検出限界相当濃度）の添加回収試験において、妥当性評価ガイドラインにおける真度の目標値（70%～120%の範囲内）、併行精度の目標値（30 RSD%未満）及び室内精度の目標値（35 RSD%未満）を満足することが確認された。

図 12-1 定量イオン (m/z 397→279) のクロマトグラム

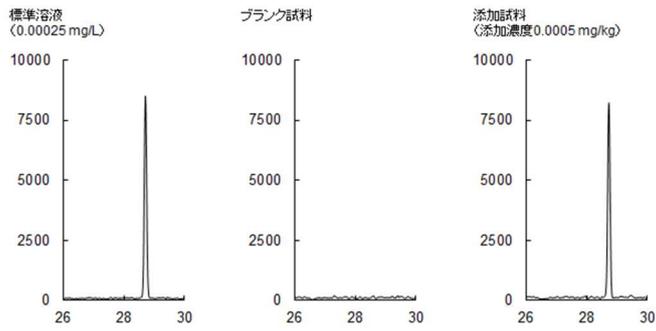


図 12-2 定性イオン (m/z 397→337) のクロマトグラム

