

酢酸トレンボロン試験法（案）

酢酸トレンボロンについて、食品安全委員会が食品健康影響評価を行い、許容一日摂取量として 0.00002 mg/kg 体重/日を設定した。

この評価結果を踏まえ、令和 3 年 1 月 22 日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会において、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）の見直しを行い、海外で使用が認められている牛の食用組織に基準値を設定するとともに、残留基準値を設定しない畜産物、魚介類及びはちみつについては「食品に含有されるものであってはならない」（以下「不検出基準」という。）とされた。

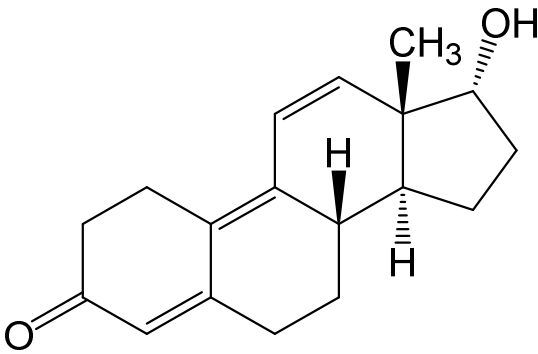
不検出基準を含む動物用医薬品等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。（ここでいう検出限界とは、適切な精確さをもって定量できることが確認された分析対象化合物の最低量又は濃度と定義している（平成 27 年 2 月 20 日付け食安発 0220 第 1 号食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について））。

酢酸トレンボロンについては、すでに規格基準及び試験法の告示がされているが、既存の試験法において有害性の高い試薬（ジクロロメタン及びベンゼン）が使用されていることから、当該試薬を使用しない試験法について開発を進めていたところ、今般その開発が終了したため、当該試験法について審議するものである。

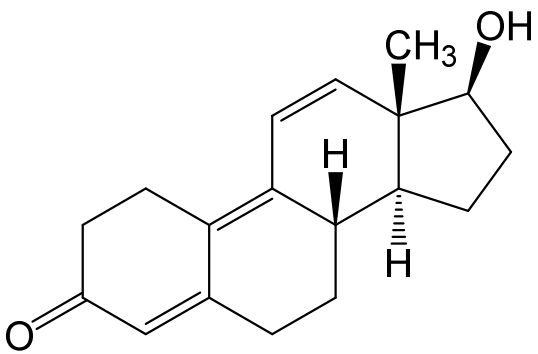
1. 概要

(1) 分析対象の化合物

α-トレンボロン及びβ-トレンボロン



α-トレンボロン



β-トレンボロン

(2) 分析対象食品

畜産物

(3) 試験法の概要

α -トレンボロン及び β -トレンボロンを、*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する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液に転溶した後、シリカゲルミニカラムで精製し、2-フルオロ-1-メチルピリジニウムで誘導体化後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

(4) 検出限界 各化合物 0.001 mg/kg

2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として添加回収試験（添加濃度 0.001 ppm～0.01 ppm）を行い、真度及び併行精度の確認を実施した。

表1 α -トレンボロンの検討結果の真度及び併行精度（試行数5で実施）

食品	残留基準 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 ^{注1)} (%)	併行精度 ^{注2)} (RSD%)
牛の筋肉	0.002	0.002	81.3	0.6
		0.001	83.7	1.6
牛の脂肪	0.002	0.002	78.4	0.7
		0.001	78.9	2.5
牛の肝臓	0.01	0.01	78.7	1.5
		0.001	81.2	1.5
牛乳	不検出	0.001	78.4	0.4
豚の筋肉	不検出	0.001	78.6	1.4
豚の脂肪	不検出	0.001	80.8	1.1
豚の肝臓	不検出	0.001	79.6	0.4

注1) 目標値は70～120%

注2) 目標値は、添加濃度 0.01 ppm 及び 0.002 ppm にあつては 25%未満、添加濃度 0.001 ppm にあつては 30%未満

表2 β -トレンボロンの検討結果の真度及び併行精度（試行数5で実施）

食品	残留基準 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 ^{注1)} (%)	併行精度 ^{注2)} (RSD%)
牛の筋肉	0.002	0.002	81.6	0.7
		0.001	83.9	0.8
牛の脂肪	0.002	0.002	74.5	0.9
		0.001	76.6	3.0
牛の肝臓	0.01	0.01	81.4	1.5
		0.001	83.1	1.4
牛乳	不検出	0.001	76.4	0.6
豚の筋肉	不検出	0.001	80.7	1.2
豚の脂肪	不検出	0.001	83.9	1.2
豚の肝臓	不検出	0.001	80.9	0.4

注1) 目標値は70~120%

注2) 目標値は、添加濃度0.01 ppm及び0.002 ppmにあつては25%未満、添加濃度0.001 ppmにあつては30%未満

3. 答申案

別紙のとおり。

(参考)これまでの経緯

【酢酸トレンボロン】

平成17年11月29日 残留基準告示

平成26年 3月20日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請

令和 2年 8月18日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知

令和 3年 1月27日 薬事・食品衛生審議会へ諮問

令和 3年 1月22日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

【酢酸トレンボロン試験法】

令和 3年11月30日 残留農薬等試験法評価会議で検討

令和 4年 6月14日 薬事・食品衛生審議会へ諮問

令和 4年 6月15日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

- 穂山 浩 学校法人星薬科大学薬学部薬品分析化学研究室教授
石井 里枝 埼玉県衛生研究所化学検査室長
井之上 浩一 学校法人立命館立命館大学薬学部薬学科臨床分析化学研究室教授
大山 和俊 一般財団法人残留農薬研究所化学部長
折戸 謙介 学校法人麻布獣医学園理事（兼）麻布大学獣医学部生理学教授
加藤 くみ子 学校法人北里研究所北里大学薬学部分析化学教室教授
魏 民 公立大学法人大阪大阪公立大学大学院医学研究科
環境リスク評価学准教授
佐藤 洋 国立大学法人岩手大学農学部共同獣医学科比較薬理毒性学研究室教授
佐野 元彦 国立大学法人東京海洋大学学術研究院海洋生物資源学部門教授
須恵 雅之 学校法人東京農業大学応用生物科学部農芸化学科
生物有機化学研究室教授
瀧本 秀美 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
国立健康・栄養研究所栄養疫学・食育研究部長
中島 美紀 国立大学法人金沢大学ナノ生命科学研究所
薬物代謝安全性学研究室教授
永山 敏廣 学校法人明治薬科大学薬学部特任教授
根本 了 国立医薬品食品衛生研究所食品部主任研究官
野田 隆志 一般社団法人日本植物防疫協会信頼性保証室付技術顧問
二村 睦子 日本生活協同組合連合会常務理事

(○：部会長)

答申（案）

酢酸トレンボロン試験法（畜産物）

α -トレンボロン及び β -トレンボロンを分析対象とする。

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「（特級）」と記載したものは、日本産業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

ギ酸 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

シリカゲルミニカラム（500mg） 内径8～9mmのポリエチレン製のカラム管に、シリカゲル500mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

トリエチルアミン トリエチルアミン（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 純度98%以上の試薬を用いる。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

α -トレンボロン標準品 本品は α -トレンボロン95%以上を含む。

β -トレンボロン標準品 本品は β -トレンボロン95%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

試料10.0gにn-ヘキサン飽和アセトニトリル50mL及びn-ヘキサン50mLを加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム20gを加えて更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50mL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に合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100mLとする。この溶液から正確に10mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水20mLを加え、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：4）20mLずつで2回振とう抽出する。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、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：4）2mLを加えて溶かす。

b 精製法

シリカゲルミニカラム（500mg）に酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：4）5mLを注入し、

流出液は捨てる。このカラムに、a 抽出法で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：4）10mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：1）10mLを注入し、溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

c 誘導体化

b 精製法で得られた残留物に、20mg/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 1mL、アセトニトリル及びトリエチルアミンの混液（9：1）0.05mLを加えてかくはんした後、室温で90分間放置する。誘導体化反応後の溶液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1vol%ギ酸及び0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（3：1）に溶かし、正確に1mLとしたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

α-トレンボロン標準品及びβ-トレンボロン標準品をそれぞれアセトニトリルに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合し、アセトニトリルで希釈した溶液を調製する。この溶液から適量を分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に20mg/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 1mL、アセトニトリル及びトリエチルアミンの混液（9：1）0.05mLを加えてかくはんした後、室温で90分間放置する。誘導体化反応後の溶液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1vol%ギ酸及び0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（3：1）に溶かし、更に0.1vol%ギ酸及び0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（3：1）で希釈した溶液を数点調製する。それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、4. 試験溶液の調整に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.001mg/kgに相当する試験溶液中の濃度は0.001mg/Lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成によりα-トレンボロン及びβ-トレンボロンの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

(例)

カラム：アダマンチル基化学結合型シリカゲル 内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3μm

カラム温度：40℃に保持する。

移動相：0.1vol%ギ酸及び0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（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分間で行う。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン（m/z）：

α-トレンボロン-1-メチルピリジニウム誘導体化物 プリカーサーイオン 362、プロダクトイオン 253、197

β-トレンボロン-1-メチルピリジニウム誘導体化物 プリカーサーイオン 362、プロダク

トイオン 253、197

注入量：5 μ L

保持時間の目安：

α -トレンボロン-1-メチルピリジニウム誘導体化物 8分

β -トレンボロン-1-メチルピリジニウム誘導体化物 9分