

※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。

平成23年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の
試験法開発事業（クレンブテロール）
報告書

クレンブテロール試験法（畜水産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針

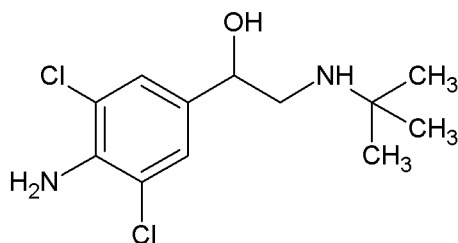
クレンブテロールは、気道平滑筋及び子宮平滑筋の $\beta 2$ 受容体を選択的に刺激し、弛緩作用を示す薬剤である。我が国においては、ヒト用の気管支拡張薬及び牛用の子宮弛緩薬として使用されている。一部の食品（牛及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分並びに乳）には、ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準が設定されているが、これら以外の食品についてはクレンブテロールの ADI(0.004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)が一律基準設定の目安となる ADI (0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)を下回っていることから、不検出基準が採用されている。

クレンブテロールの残留試験法は厚生省告示第 370 号¹⁾により示されているが、この試験法は限定された食品を対象として開発されたものであり、畜水産物の食品分類の全般に渡ってその試験法の性能が評価されたものではない。

そこで本事業では、始めにクレンブテロール告示試験法（以下、告示法という。）について性能の評価を行い、必要な性能が得られない場合には、新規に定量限界の目標値を 0.00005 mg/kg 以下とするクレンブテロールの残留試験法を開発することとした。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

構造式：



化学式： $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$

分子量：277.19

化学名：4-Amino-3,5-dichloro- α - [[(1,1-dimethylethyl) amino] methyl] benzenemethanol

以下、塩酸塩としての物理化学的性質

外観：無色微結晶粉末

融点：174-175.5°C

溶解性：水、メタノール、エタノールに極めて溶けやすい、クロロホルムに溶けにくい、ベンゼンに溶けない

(出典：The Merck Index 14th edition)

pKa：pKa1 9.34（脂肪族アミノ基、吸光度法）、9.33（脂肪族アミノ基、滴定法）、

pKa2 -0.04 (芳香族アミノ基、吸光度法)

(出典：医療用医薬品品質情報集(付録) 日本薬局法外医薬品規格第三部、厚生労働省医薬食品局審査管理課(平成19年9月版))

3. 基準値

牛及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分並びに乳の基準値を表1に示す。

表1 クレンブテロールの基準値

食品名	基準値(案) (ppm)	基準値現行 (ppm)
牛の筋肉	0.0002	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物* ¹ の筋肉	0.0002	0.0002
牛の脂肪	0.0002	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.0002	0.0002
牛の肝臓	0.0006	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.0006	0.0006
牛の腎臓	0.0006	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.0006	0.0006
牛の食用部分* ²	0.0006	0.0001
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.0006	0.0001
乳	0.00005	0.00005

*1：その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類のうち、牛及び豚以外のものをいう。

*2：食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

なお、牛及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分並びに乳以外の食品については、含有されるものであってはならない。

[実験方法]

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉は、横浜市内の量販店で購入した。うなぎは、千葉市の通信販売業者から購入した。

2. 試薬・試液

標準品：クレンブテロール塩酸塩は、和光純薬社製(純度：99.5%)を使用した。

標準溶液：クレンブテロール標準品 20 mg を精密に秤量し、アセトニトリル 100 mL に溶解して標準原液を調製し、適宜アセトニトリル、ギ酸及び水（300：1：700）混液で希釈して標準溶液とした。

シリカゲルミニカラム：Waters 社製 Sep-Pak Vac Silica（1,000 mg）、ミニカラムは予めアセトン 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後に使用した。

フロリジルミニカラム：Waters 社製 Sep-Pak Vac Florisil（1,000mg）、ミニカラムは予めアセトン 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後に使用した。

アミノプロピルミニカラム：Waters 社製 Sep-Pak Vac NH₂（1,000 mg）、ミニカラムは予めアセトン 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後に使用した。

強酸性陽イオン交換体ミニカラムカートリッジ（SCX）：ジールサイエンス社製 InertSep SCX（500 mg）、カートリッジは予めメタノール 5 mL 及び水 5 mL でコンディショニングした後に使用した。

溶媒：アンモニア水、ギ酸及びトリエチルアミンは特級、アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は HPLC 用、アセトン、酢酸エチル及び *n*-ヘキサンは残留分析試験用でいずれも関東化学社製を使用した。

試薬：塩化ナトリウム及び水酸化ナトリウムは、純正化学社製の特級を使用した。炭酸カリウムは、和光純薬社製の特級を使用した。無水硫酸ナトリウムは、関東化学社製の特級を使用した。

10 w/v%塩化ナトリウム溶液は、塩化ナトリウム 100 g を水に溶解し 1,000 mL とした。2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液は、水酸化ナトリウム 8.0 g を水に溶解し 100 mL とした。

3. 装置

ホモジナイザー：日本精機製作所製 バイオミキサーBM-2、シャフト BM-2

高速液体クロマトグラフ：Waters 社製 ACQUITY UPLC

質量分析装置：Waters 社製 ACQUITY TQD

4. 測定条件

分析カラム：Thermo Fischer Scientific 社製 Hypersil Gold aQ（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μm）、Waters 社製 SunFire C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3.5 μm）、Waters 社製 Xbridge C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3.5 μm）、化学物質評価研究機構社製 L-Column ODS（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μm）、資生堂社製 CAPCELL PAK C18（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）、東ソー社製 TSK-gel ODS 100V（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）

カラム温度：40°C

移動相流量：0.25 mL/分

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

注入量：10 μ L

移動相のグラジエント条件は表2に示した。質量分析計の測定条件は表3に示した。

表2 移動相のグラジエント条件

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	5	95
1.0	5	95
14.0	30	70
14.1	5	95

表3 質量分析計の測定条件

Ionization mode	ESI、Positive			
Capillary voltage	3.0 kV			
Source temperature	120°C			
Desolvation temperature	350°C			
Cone gas flow	50 L/hr			
Desolvation gas flow	600 L/hr			
Monitor ion	Precursor	Product	Cone Voltage	Collision Energy
	277	203	27 V	17 eV
	277	132	27 V	30 eV

5. 定量

牛の筋肉及び牛の脂肪の場合は0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 μ g/L、牛の肝臓の場合は0.75、1.5、2.25、3.0、3.75、4.5 μ g/L、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の場合は0.0625、0.125、0.1875、0.25、0.3125、0.375 μ g/Lの濃度に調整した標準溶液10 μ LをLC-MS/MSに注入し、表3のモニターイオンのピーク面積から絶対検量線法により検量線を作成した。

試験溶液10 μ LをLC-MS/MSに注入し、標準品と同一保持時間に出現したピークの面積から検量線により定量した。

6. 試験溶液の調製

1) 試料採取

牛の筋肉及び豚の筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。牛の脂肪の場合は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。牛の肝臓の場合は、細切均一化した。

さけの場合は、頭、内臓、骨を除いた可食部（皮を含む）を細切均一化した。うなぎの場合は、頭を除いた可食部（内臓、骨、皮を含む）を細切均一化した。しじみの場合は、殻を除去し、細切均一化した。牛乳の場合は、よく混合して均一化した。鶏卵の場合は、殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。はちみつの場合は、よく混合して均一化した。

2) 抽出

牛の筋肉、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳及び豚の筋肉の場合は、試料10.0 gを量り採った。脂肪の場合は、5.00 gを量り採った。はちみつの場合は、試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて溶かした。

牛の筋肉の添加回収試験用の試料は、クレンブテロール標準溶液（2 µg/L、メタノール溶液）を1 mL添加後よく混合し、30分間程度放置した。牛の脂肪の添加回収試験用の試料は、試料を加温して融解させたものにクレンブテロール標準溶液（2 µg/L、メタノール溶液）を0.5 mL添加して均一にした後、再度凝固させ30分間程度放置した。牛の肝臓の添加回収試験用の試料は、クレンブテロール標準溶液（6 µg/L、メタノール溶液）を1 mL添加後よく混合し、30分間程度放置した。さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の添加回収試験用の試料は、クレンブテロール標準溶液（0.5 µg/L、メタノール溶液）を1 mL添加後よく混合し、30分間程度放置した。

これにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、遠心分離（3000回転、5分間）した。残留物にアセトン50 mLを加え、上記と同様にホモジナイズ及び遠心分離を行い、得られた上清をナス型フラスコに合わせて約30 mLまで濃縮した。濃縮液を10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLで分液漏斗に移し、これに2 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mLを加えた。ナス型フラスコを酢酸エチル100 mLで洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。5分間振とうした後、酢酸エチル層を三角フラスコに採った。水層に酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に振とうし、酢酸エチル層を三角フラスコに合わせた。抽出液に適量の無水硫酸ナトリウムを加え15分間放置して脱水した。ガラスろ過器を用いて無水硫酸ナトリウムをろ別し、酢酸エチル20 mLで三角フラスコ及び無水硫酸ナトリウムを2回洗浄した。ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン（30：1：170）混液5 mLを加えて溶かした。

3) 精製

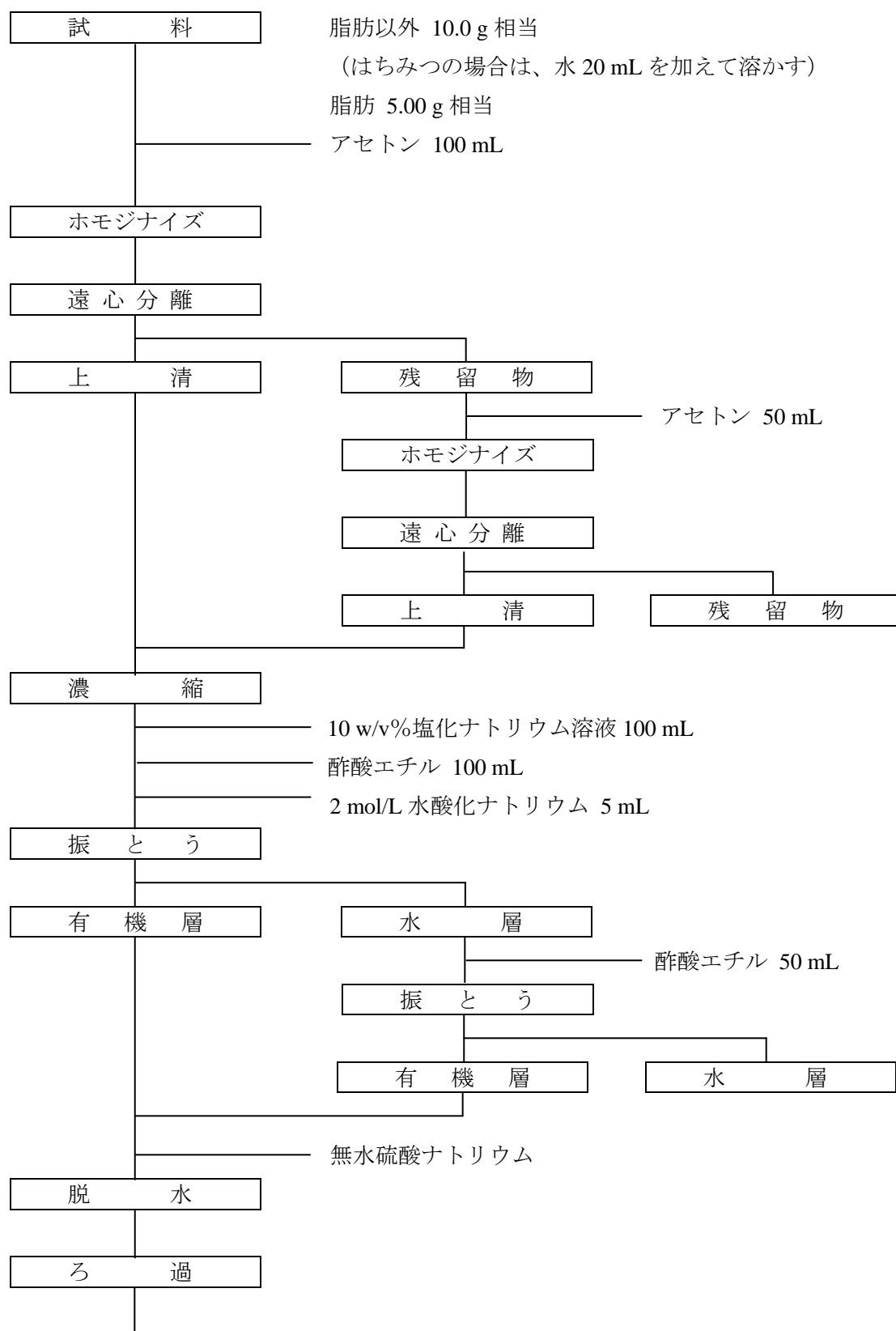
シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、さらにアセトン、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン（30：1：170）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで

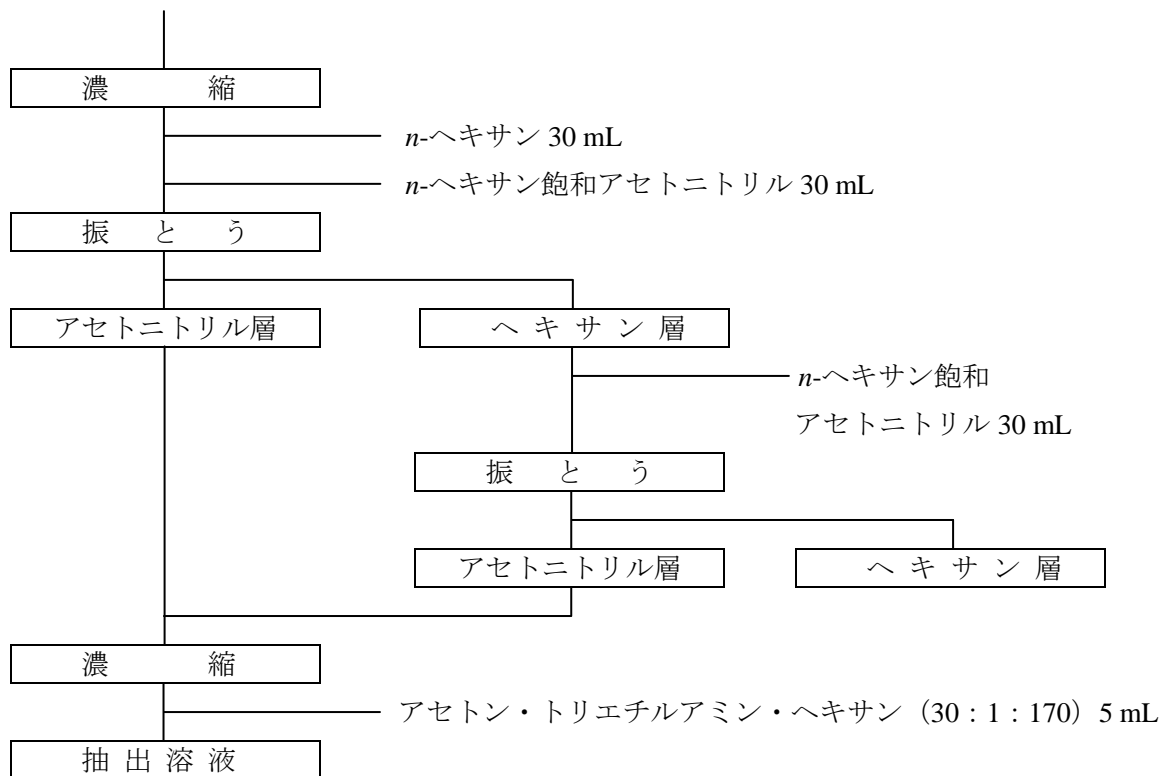
アセトン 15 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に水及びメタノール (1 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かした。

SCX ミニカラム (500 mg) にメタノール及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた溶液を注入した後、メタノール 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いでアンモニア水及びメタノール (1 : 49) 混液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃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、ギ酸及び水 (300 : 1 : 700) 混液に溶解し、牛の筋肉、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、豚の筋肉、牛乳及びはちみつの場合は正確に 2 mL、脂肪の場合は正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

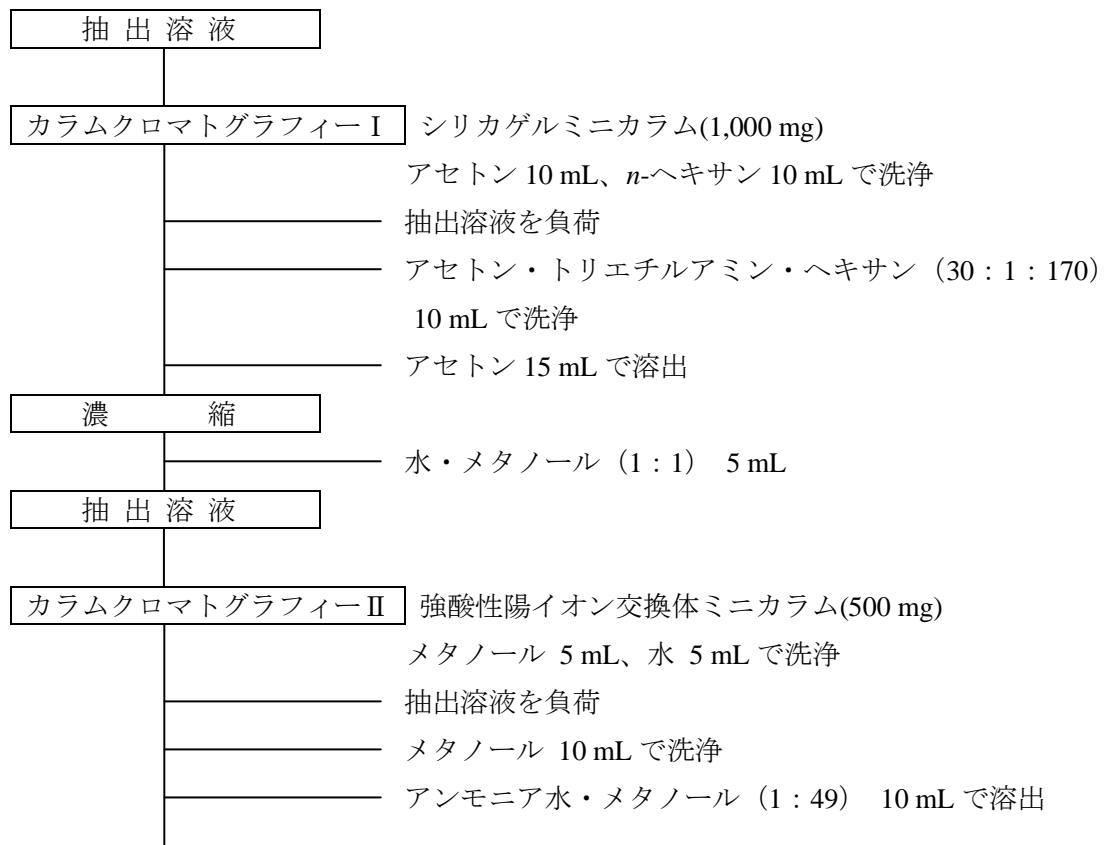
《分析法フローチャート》

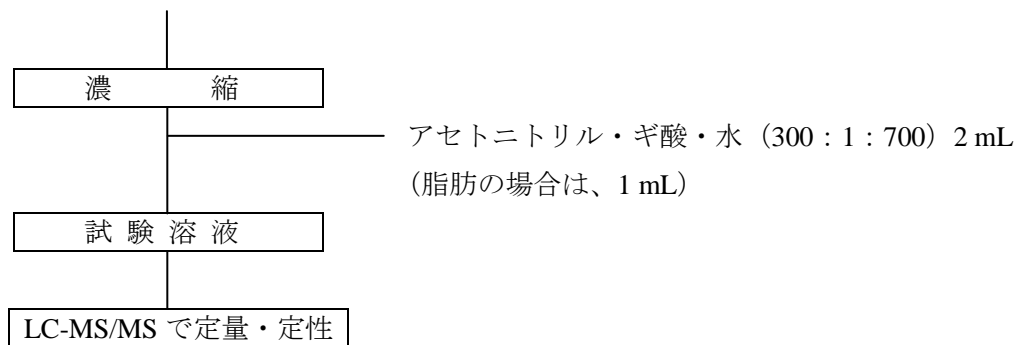
(抽出)





(精製)





7. マトリックス添加標準溶液の調製

6. 試験溶液の調製に従い、試料から調製された抽出溶液を固相抽出カラムで精製を行った。固相抽出カラムからの溶出液の溶媒を除去して得られた残留物に、標準溶液 2 mL (脂肪の場合は 1 mL) を加え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. 既存試験法の適用確認

告示法の性能を評価するため、牛の肝臓、牛の脂肪、はちみつ、鶏卵及び牛乳の5食品について添加回収試験を実施した。添加濃度は、基準値が設定されている食品は基準値相当とし、基準値が設定されていない食品は定量限界相当とした。試験操作は、均一化した試料 5.00 g にクレンプテロール標準品を添加し 30 分経過した後、告示法に従い分析を行った。ただし、告示法に示されたアイソクラティックの移動相条件ではクレンプテロールは分析カラムに保持されないため、4. 測定条件に従い測定を行った。添加回収試験の結果及びマトリックス効果の指標値（マトリックス標準溶液のレスポンスを溶媒標準溶液のレスポンスで除した値）を表 4 に示した。回収率については、牛の脂肪、鶏卵及び牛乳で、それぞれ 90.4%、106.4%、78.3%と目標値 70~120%を満たす結果であったが、牛の肝臓及びはちみつでは、それぞれ 47.8%、124.9%と目標値に達しなかった。相対標準偏差（n=3）については、牛の肝臓以外の食品では 6.0~19.0%と目標値 30% を満たす結果であったが、牛の肝臓では 54.7%と目標値に達しなかった。マトリックス効果の指標値は、1.25~1.92 であった。

以上の結果から、告示法は正のマトリックス効果を受けやすく、一部の食品では測定値がばらつくことや回収率が不良となることが判明した。したがって、本検討では告示法の工程を見直し、より精製度の高い試験法を開発することとした。

表 4 クレンプテロール告示試験法の添加回収試験（n=3）の結果（絶対検量線法）

食品名	添加濃度 (ppb)	回収率 (%)	RSD (%)	マトリックス STD / 溶媒 STD
牛の肝臓	0.6	47.8	51.7	1.27
牛の脂肪	0.2	90.4	12.7	1.92
はちみつ	0.05	124.9	6.0	1.58
鶏卵	0.05	106.4	19.0	1.59
牛乳	0.05	78.3	12.0	1.25

2. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

クレンプテロールのイオン化法として ESI を選択した。標準溶液をインフュージョンにより直接 MS 部に導入し、良好な感度の得られたポジティブモードで、プロトン付加分子 m/z 277 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選択し、測定条件の最適化を行った。プロダクトイオンには、 m/z 203、132、168 を選択し、最も高い感度が得られた m/z 203 を定量イオンとした。各イオンの最も高い感度が得られたコリジョンエネルギーを選択し、MRM モードで測定した（表 3）。マススペクトル、定量イオン及び定性イオンのプロダクトイオンスペクトルを図 1~3 に示した。

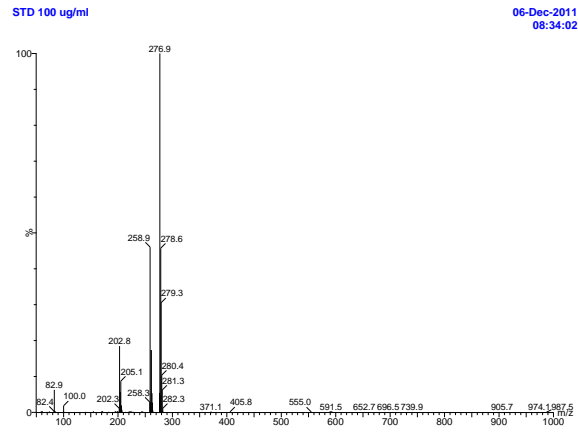


図1 クレンブテロールのマススペクトル (50~1000 Da)
測定条件：ESI+、CV=27 V

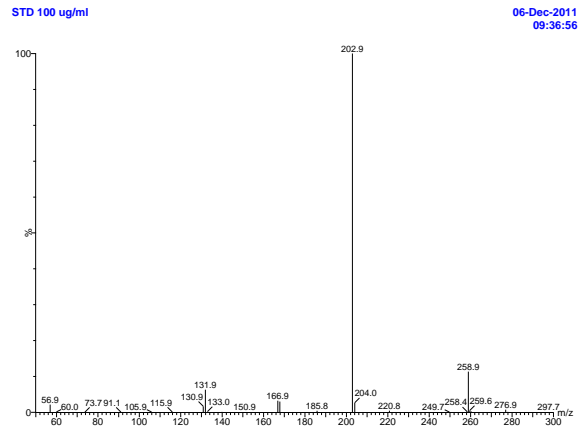


図2 クレンブテロールのプロダクトスキャンスペクトル (定量用)
プリカーサーイオン： m/z 277
測定条件：ESI+、CV=27 V、CE=17 eV

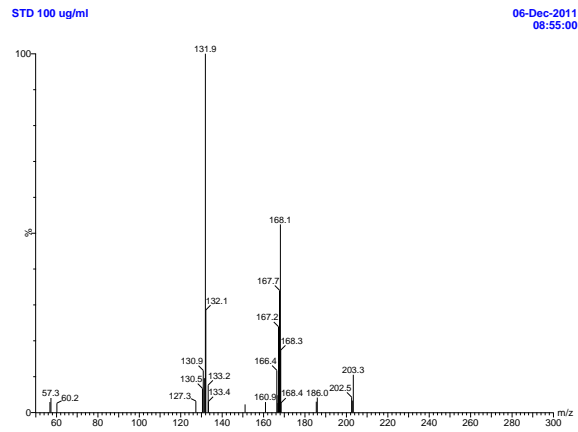


図3 クレンブテロールのプロダクトスキャンスペクトル (定性用)
プリカーサーイオン： m/z 277
測定条件：ESI+、CV=27 V、CE=30 eV

2) LC 条件の検討

LC の分離カラムには、Hypersil Gold aQ、SunFire C18、Xbridge C18、L-Column ODS、CAPCELL PAK C18、TSK-gel ODS 100V について検討し、バックグラウンドが低く、良好なピーク形状及び高い S/N 比が得られた Xbridge C18 を選択した。

溶離液には、水溶性有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリル、添加する揮発性の酸としてギ酸及び酢酸を用いてその組み合わせを検討し、ピークの対称性、イオンの生成量について最も良好であったアセトニトリル及びギ酸を選択し、表 2 に示した条件で測定した。

以上の測定条件で作成した検量線の例を図 4 に示した。決定係数は 0.9994 と良好な直線性が得られた。定量限界は得られたピークの S/N 比が 10 以上かつ検量線の直線性が得られる下限の量 (2.5 pg) とし、図 5 に定量限界の標準溶液のクロマトグラムを示した。

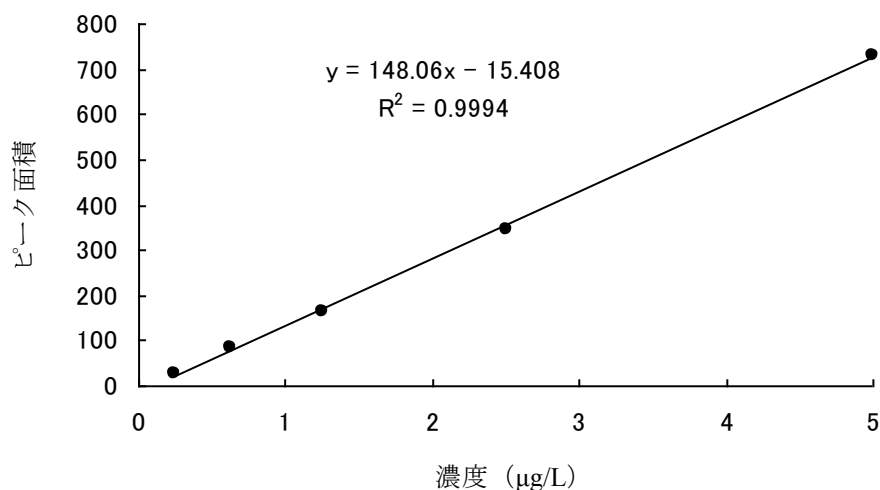


図 4 クレンブテロールの検量線 (m/z 277 > 203)

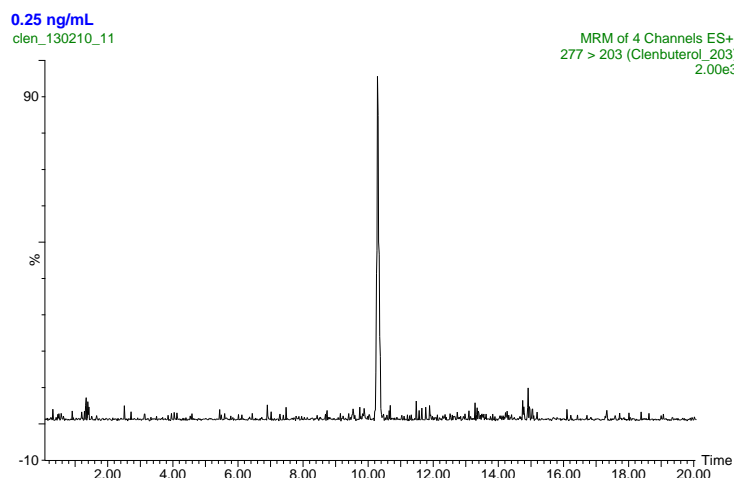


図 5 定量限界(2.5 pg)の標準溶液のクロマトグラム (m/z 277 > 203)

3. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

動物試料からクレンプテロールを抽出する方法としては、塩化バリウム-水酸化バリウム緩衝液²⁾、酢酸緩衝液^{3) ~ 5), 7)}、Tris 緩衝液⁶⁾、酢酸アンモニウム緩衝液^{8), 9)}、リン酸溶液/メタノール (1 : 1) 混液⁹⁾ を用いた方法が報告されており、概して緩衝液による抽出法が採用されている。しかし、本検討では脂肪を分析対象食品としていることから、脂肪を溶解することができない緩衝液は抽出溶液として適していない。そこで、食品から農薬等を抽出する際に使用される代表的な有機溶媒を用いて融解脂肪からの抽出を試みたところ、いずれの溶媒についても 80%以上の回収率が得られた (表 5)。

表 5 融解脂肪からの各種溶媒による抽出率

溶媒	回収率 (%)	RSD (%)
アセトニトリル	81.5	3.2
アセトン	88.4	1.8
エタノール	92.6	2.9
酢酸エチル	94.1	0.8
メタノール	88.0	6.1

※ 加熱融解させた脂肪 5 g にクレンプテロール 5 µg (100 mg/L のアセトン溶液を 50 µL) を添加して均質にした後、再度凝固させた試料から各溶媒 100 mL で 3 分間ホモジナイズ (15,000rpm) 抽出した。遠心分離後の上清に 10 mg/L のクレンプテロール-d9 を 1 mL 添加し、この液 1 mL をメタノールで 25 mL に定容した後、さらに蒸留水で 2 倍希釈し測定に供した (n=3)。

残留農薬等試験法検討実施要領 平成 23 年度版 (以下、実施要領という。) によると、試料量は畜水産物の液体試料で 5.00~20.0 g、固体試料 (脂肪以外) で 10.0~20.0 g、固体試料 (脂肪) で 5.00 g と定められている。そこで、実施要領の規程に適合し、かつ広範な食品分類に対して統一的な試験法を開発するという観点から、試料量は、脂肪の場合 5.00 g、脂肪以外の場合 10.0 g とした。

ところで、クレンプテロールは塩基性化合物であることから、試料を塩基性にするだけで有機溶媒への抽出効率を向上させることができる。告示法では試料 5.00 g に対して 4 mol/L 炭酸カリウム溶液を 1 mL 添加することで、試料を塩基性にして酢酸エチルで抽出する方法を採用している。本開発法においては、種々の食品マトリックスからのクレンプテロールの抽出が可能と考えられるアセトンを用いることにし、塩基の添加が有効かどうか検討を行った。すなわち、試料として牛肝臓 10.0 g に 4 mol/L 炭酸カリウム溶液 0~5 mL を添加した後、アセトンにより抽出し、回収率を求めるとともに残渣の pH を確認した。その結果 (図 6)、試料に炭酸カリウムを加えないで抽出したときの残渣の pH は 6.89 と弱酸性であったにもかかわらず、クレンプテロールの回収率は 98.0% と良好であり、本法では塩基を

添加しないことにした。

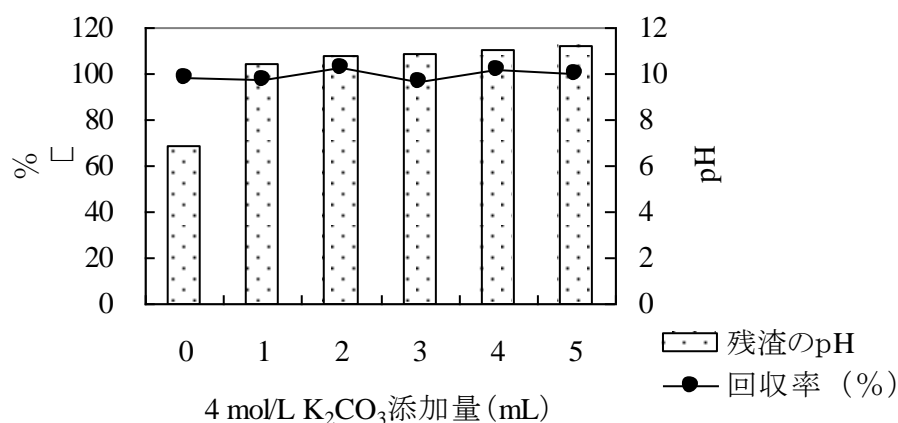


図6 炭酸カリウム溶液の添加による回収率の変化

※ 牛肝臓 10 g にクレンプテロール 5 μ g (10 mg/L のメタノール溶液を 0.5 mL) を添加して均質化し 30 分程度放置した後、4 mol/L 炭酸カリウム溶液 0、1、2、3、4、5 mL を添加し、アセトン 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出した。遠心分離後の上清に 10 mg/L のクレンプテロール-d9 を 0.5 mL 添加し、この液 3 mL をメタノールで 50 mL に定容した後、蒸留水で 2 倍希釈し測定に供した (n=3)。さらに、遠心分離後の残渣に水 10 mL を加えスパークルで攪拌した (残渣に水を浸透させた) 後、遠心分離して得られた上清の pH を確認した。

はちみつの主な成分は糖類 (約 80%) であるが、糖類は抽出溶媒 (アセトン) に溶解しにくいので、はちみつ中のクレンプテロールを他試料と同一条件で抽出することは困難である。そこで、はちみつの場合は、試料 10.0 g を水 20 mL に溶解させてから抽出することとした。

2) 液々分配の検討

水溶性夾雑物の除去に有効な水-有機溶媒による液々分配を検討した。水層には 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液、有機層には酢酸エチルを選択した。基礎検討として、水と酢酸エチルの容量比率を 1 : 1 で分配したところ、回収率は約 50%であった。クレンプテロールは pKa が 9~10 の間にある塩基性化合物であり、pH 11~12 以上の塩基性条件下で有機層への抽出率が高まると考えられるため、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を水層に添加することとした。試料の代わりに水 10 mL を用いてこの方法を適用した結果 (表 6)、良好な回収率が得られたため酢酸エチルによる液々分配の方法を採用した。

表6 NaOH 添加 NaCl 溶液/酢酸エチル分配の回収率 (%)

1 回目	2 回目	合計
97	1	98

※ 水 10 mL にアセトン 150 mL 及びクレンプテロール 50 µg を添加したものを減圧濃縮し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL で分液漏斗に移した。これに 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を添加し、濃縮容器を酢酸エチル 100 mL で洗い、洗液を 1 回目の転溶溶媒とした。5 分間振とう後、水層に 50 mL の酢酸エチルを加え 2 回目の転溶を行った (n=3)。

3) 脱脂方法の検討

クレンプテロールを添加した *n*-ヘキサン 30 mL に対して *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出した結果を表 7 に示した。2 回目までで、ほぼ 100% の回収率が得られたので、分配操作の回数は 2 回とした。

表7 アセトニトリル/ヘキサン分配の回収率 (%)

1 回目	2 回目	3 回目	合計
95	4	0	99

※ クレンプテロール 50 µg をヘキサンに添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った。

4) 固相抽出法の検討

①強陽イオン交換体カラムクロマトグラフィー

塩基性化合物に対して高い精製効果が期待できる強陽イオン交換カラム (SCX) による精製法の検討を行った。カラムへの負荷に用いる溶媒には、複雑な試料マトリックスを溶解することを考慮し、水及びメタノール (1 : 1) 混液を採用した。なお、後述するシリカゲルカラム精製を行わない場合には、抽出液の溶媒除去後の残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液で完全に溶解させることは困難であった。しかし、シリカゲルカラム精製により低極性化合物を除去した後に SCX カラム精製を行う場合には、シリカゲルカラム精製後の残留物は水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解した。カラムの洗浄に用いる溶媒には、試料夾雑成分の除去効果が高く、20 mL 以上の液量でカラムを洗浄してもクレンプテロールを溶出することがなかったメタノールを採用した (表 8)。SCX のようなシリカゲルベースのイオン交換カラムはメーカーやロットの違いにより溶出位置が大きくずれることがあり、たとえ溶出位置が前に大きくずれたとしても十分な余裕を確保する必要があるため、メタノールの液量は 10 mL とした。

表8 SCX からの溶出率

溶出液	溶出率 (%)			
	0~5 mL	6~10 mL	11~15 mL	16~20 mL
水/メタノール (1:1)	0	0	0	0
メタノール	0	0	0	0

※ SCX ミニカラム (500 mg) に水/メタノール (1:1) で調製したクレンプテロール標準溶液 (10 µg/L) 5 mL を負荷し、水/メタノール (1:1) 及びメタノールによりそれぞれ 5 mL×4 で溶出させた。

SCX からの溶出法として、告示法のようにリン酸二カリウム (カリウムイオン) で溶出させる場合、流出液を濃縮する時に塩が析出し乾固に時間がかかることや、塩の存在が定容操作を困難にすることなどの問題がある。よって、濃縮から定容までの操作を短時間でこなうことができるアンモニア水 (アンモニウムイオン) で溶出させる方法を採用した。アンモニア水の濃度は 2 vol% とし、溶出液の有機溶媒にはアセトニトリル、アセトニトリル/メタノール (1:1) 及びメタノールについて検討し、最も溶出力が強いメタノールを採用した (表9)。2 vol% アンモニア水含有メタノールで溶出させた場合、3~4 mL 画分まででほぼ 100% が溶出したが、カラムのロット等の違いによる溶出位置のずれを考慮し、溶出液量は十分量の 10 mL とした。

表9 カラム洗浄後の SCX からの溶出率

溶出液	溶出率 (%)					合計
	0~2 mL	3~4 mL	5~6 mL	7~8 mL	9~10 mL	
NH3(aq)/ACN (2:98)	0	0	105	4	0	109
NH3(aq)/ACN/MeOH (2:49:49)	15	86	0	0	0	101
NH3(aq)/MeOH (2:98)	42	62	0	0	0	104

※ NH3(aq)=アンモニア水、ACN=アセトニトリル、MeOH=メタノール。

※ SCX ミニカラム (500 mg) に水/メタノール (1:1) で調製したクレンプテロール標準溶液 (10 µg/L) 5 mL を負荷し、メタノール 10 mL でカラムを洗浄した後、各溶出液 2 mL×5 で溶出させた。

②シリカゲルカラムクロマトグラフィー

牛の肝臓の抽出溶液について 2) の液々分配、3) の脱脂及び 4) ①の SCX 精製を行ったが、マトリックス効果が観測されたため追加精製の検討を行った。また、試料を用いた検討において、抽出液の溶媒除去後の残留物を SCX カラムへの負荷溶媒である水及びメタノール (1:1) 混液で完全に溶解させることが困難であったことから、残留物の溶解性を改善するために SCX カラム精製の前に追加実施する精製方法について検討した。

シリカゲル、フロリジル、アミノプロピルの 3 種類の固相についてアセトン/ヘキサン (20 : 80) によるクレンブテロールの溶出率を検討し、最も保持力が強かったシリカゲルを選択した (表 1 0)。

表 1 0 順相固相からの溶出率

カラム	溶出率 (%)
シリカゲル	0
フロリジル	13
アミノプロピル	101

※ シリカゲルミニカラム、フロリジルミニカラム、アミノプロピルミニカラム (各 1 g) にアセトン/ヘキサン (20 : 80) で調製したクレンブテロール標準溶液 (50 µg/L) 0.2 mL を負荷し、同混液 10 mL で溶出させた。

アセトン/ヘキサン混液の比率を変えてシリカゲルミニカラムからのクレンブテロールの溶出率を調査した結果 (表 1 1)、アセトンの比率を 90 vol% まで上げてても 11% と低い溶出率であることから、クレンブテロールはシリカゲルへの親和力が大変強いことが分かった。クレンブテロールをシリカゲルから完全に溶出させるためにはシリカゲルへの親和力を低下させる必要があるため、トリエチルアミン (以下、TEA と言う。) をカラムに導入することでシリカゲルの極性を低下させる方法を検討した。

表 1 1 シリカゲルからの溶出率

アセトンの 比率 (vol%)	溶出率 (%)
20	0
30	0
40	2
50	2
60	4
70	4
80	8
90	11

※ シリカゲルミニカラム (1 g) にアセトン/ヘキサン混液で調製したクレンブテロール標準溶液 (50 µg/L) 0.2 mL を負荷し、同混液 10 mL で溶出させた。

カラムへの TEA の導入方法としては、予めカラムへの試料の負荷に用いる溶媒及びカラムの洗浄に用いる溶媒に TEA を 0.5 vol% 濃度に溶解させておき、試料溶液のカラムへの負荷及びカラムの洗浄の際に行なうこととした。0.5 vol% TEA 含有アセトン/ヘキサン混液 5 mL に溶解した標準溶液をカラムに負荷し、同混液で溶出させた結果を表 1 2 に示す。アセトンの比率が 20 vol% 及び 30 vol% の場合はカラムへの負荷の段階で溶出が始まるが、15

vol%の場合には16~20 mL 溶出液の画分まで溶出しないため、試料マトリックスを共注入したときに溶出位置が前にずれることを考慮し、アセトン、トリエチルアミン及び *n*-ヘキサン (30 : 1 : 170) 混液 10 mL でカラムを洗浄することとした。

表 1 2 TEA 含有混液によるシリカゲルからの溶出率

アセトンの 比率 (vol%)	溶出率 (%)				
	負荷液 5 mL	溶出液 0~5 mL	溶出液 6~10 mL	溶出液 11~15 mL	溶出液 16~20 mL
15	0	0	0	0	0
20	1	2	1	1	19
30	1	1	42	39	20

※ シリカゲルミニカラム (1 g) に 0.5 vol% TEA 含有アセトン/ヘキサン混液で調製したクレンブテロール標準溶液 (10 µg/L) 5 mL を負荷し、同混液 5 mL×4 で溶出させた。

アセトン、トリエチルアミン及び *n*-ヘキサン (30 : 1 : 170) 混液 5 mL に溶解した標準溶液をカラムに負荷し、同混液 10 mL で洗浄した後、TEA を含まないアセトン/ヘキサン混液で溶出させた結果を表 1 3 に示す。完全に溶出させるために必要な液量は、アセトンの比率が 50~70 vol% の場合 20 mL、80 vol% 及び 90 vol% の場合 15 mL、100 vol% の場合 10 mL であった。従って、溶出液には 2 液を混合する必要のないアセトンを採用し、液量はカラムのロット等の違いによる溶出位置のずれを考慮し十分量の 15 mL とした。

表 1 3 TEA 含有混液による洗浄後のシリカゲルからの溶出率

アセトンの 比率 (vol%)	溶出率 (%)				
	溶出液 0~5 mL	溶出液 6~10 mL	溶出液 11~15 mL	溶出液 16~20 mL	合計
50	6	67	27	7	107
60	19	68	14	4	105
70	45	51	8	2	106
80	57	39	3	0	99
90	63	36	1	0	100
100	72	24	0	0	96

※ シリカゲルミニカラム (1 g) にアセトン、トリエチルアミン及び *n*-ヘキサン (30 : 1 : 170) 混液で調製したクレンブテロール標準溶液 (10 µg/L) 5 mL を負荷し、同混液 10 mL で洗浄した後、TEA を含まないアセトン/ヘキサン混液 5 mL×4 で溶出させた。

シリカゲルカラム精製ではアセトン 15 mL で溶出する方法であるため、カラムに吸着した色素や高極性化合物の多くがクレンブテロールと一緒に溶出され、そのまま測定すると強いマトリックス効果が観測された。シリカゲルカラムのみでは精製が不十分であったことから、シリカゲルカラム精製の後に、SCX カラム精製を実施する方法を採用した。なお、試料を用いた検討では、シリカゲルカラム精製後の残留物は SCX カラムへの負荷溶媒であ

る水及びメタノール（1：1）混液に溶解可能であった。以上のことから、シリカゲルカラム精製により低極性化合物が除かれ、更に SCX カラム精製で高極性化合物が除かれるものと推察された。

4. 添加回収試験

(1) 選択性

検討対象とした 10 食品について、ブランク試料及びマトリックス添加標準溶液を測定した。全ての食品において妨害ピークは観測されず、妨害ピークの許容範囲の判定基準を満たす結果であった（表 1 4）。

表 1 4 選択性の評価

食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ^{*2}				選択性 の評価 ^{*4}	
				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 ^{*3} (b)	面積(高さ) 比 (a)/(b)			
牛の筋肉	0.00005	0.0002	0.0002	*	基準値	0.0002	< 0.100	面積	0	0	—	○
牛の脂肪	0.00005	0.0002	0.0002	*	基準値	0.0002	< 0.100	面積	0	0	—	○
牛の肝臓	0.00005	0.0006	0.0006	*	基準値	0.0006	< 0.100	面積	0	0	—	○
さけ	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
うなぎ	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
しじみ	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
牛乳	0.00005	0.00005	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
鶏卵	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
はちみつ	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○
豚の筋肉	0.00005	不検出	0.00005		定量限界	0.00005	< 0.333	面積	0	0	—	○

1 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合（定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合）には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*2 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。（必要に応じて起爆注入を行う。）

*3 試料中の濃度が「評価対象濃度（基準値濃度又は定量限界濃度）」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には『0』を入力し、標準溶液のピーク面積（高さ）は求めなくても良い。

*4 面積（高さ）比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度、精度及び定量限界

試行 5 回の添加回収試験を行い、各食品の真度、併行精度及び定量限界を評価した(表 1 5)。添加回収試験の代表的なクロマトグラムは、図 7～図 1 6 に示した。真度は 73.5～94.5%、併行精度は 2.45～9.66 RSD%であり、いずれの食品においても『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(平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1124 第 1 号)』に示された目標値(真度:70～120%、併行精度:30 RSD%>)を満たす結果であった。

定量限界濃度に添加した添加試料を測定した結果、ピークの S/N 比の平均値は 15～31 であった。また、定量限界と基準値が異なる牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓については、試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液から定量限界の推定を行った(表 1 6)。定量限界の推定における代表的なクロマトグラムは、図 1 7～図 1 9 に示した。ピークの S/N 比は 31～35 であった。いずれの食品においても S/N \geq 10 の結果であった。

表 1 5 真度及び精度の評価

食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*1}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{*2}		
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
牛の筋肉	0.00005	0.0002	0.0002	*	501143	13	1	80	89	75	83	77	80.6	6.66	-	-	-
牛の脂肪	0.00005	0.0002	0.0002	*	543314	32	1	72	73	66	85	72	73.5	9.66	-	-	-
牛の肝臓	0.00005	0.0006	0.0006	*	495657	107	1	88	79	85	86	74	82.3	7.25	-	-	-
さけ	0.00005	不検出	0.00005		629029	-5	1	77	82	88	81	88	83.2	5.55	21	18	20
うなぎ	0.00005	不検出	0.00005		373029	-4	1	86	90	86	88	80	85.9	4.18	22	27	25
しじみ	0.00005	不検出	0.00005		541714	7	1	86	86	80	88	86	85.4	3.56	35	20	28
牛乳	0.00005	0.00005	0.00005		591086	-1	1	73	73	77	75	73	74.2	2.45	16	45	31
鶏卵	0.00005	不検出	0.00005		534857	6	1	90	79	76	78	74	79.4	8.08	32	29	31
はちみつ	0.00005	不検出	0.00005		374857	-0	1	91	100	94	95	93	94.5	3.79	16	14	15
豚の筋肉	0.00005	不検出	0.00005		271086	6	1	94	88	99	87	84	90.3	6.60	19	25	22

1 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。ただし、定量限界の推定においてピークが検出されなかった場合には、ここでS/N比を求める。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

表 1 6 定量限界の推定

食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ^{*1}	標準溶液 濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}									S/N比		平均値			
						面積又は 高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2	平均	n=1	n=2	面積(高さ) 比(%) ^{*5}	S/N比
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均							
牛の筋肉	0.00005	0.0002	0.0002	*	0.00025	面積	0	139	133	136	128	127	128	41	30	107	35			
牛の脂肪	0.00005	0.0002	0.0002	*	0.00025	面積	0	143	142	143	150	148	149	35	34	96	34			
牛の肝臓	0.00005	0.0006	0.0006	*	0.00025	面積	0	127	136	132	128	131	130	28	35	102	31			

1 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、定量限界の推定を行う。

*2 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100%相当の濃度になるように調製したマトリックス標準溶液及び溶媒標準溶液をそれぞれ2回測定し、ピーク面積比を求めた結果、0.96~1.02であった(表17)。

表17 試料マトリックスの測定への影響

食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*2}								ピーク面積(高 さ)比 ^{*5}
					面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛の筋肉	0.00005	0.0002	0.0002	0.0001	面積	0	536	522	529	502	531	517	1.02
牛の脂肪	0.00005	0.0002	0.0002	0.0001	面積	0	551	603	577	574	610	592	0.97
牛の肝臓	0.00005	0.0006	0.0006	0.0003	面積	0	1636	1644	1640	1648	1660	1654	0.99
さけ	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	157	164	161	156	164	160	1.00
うなぎ	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	84	80	82	86	84	85	0.96
しじみ	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	148	160	154	155	157	156	0.99
牛乳	0.00005	0.00005	0.00005	0.00025	面積	0	133	134	134	132	134	133	1.00
鶏卵	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	135	127	131	137	127	132	0.99
はちみつ	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	91	89	90	92	84	88	1.02
豚の筋肉	0.00005	不検出	0.00005	0.00025	面積	0	85	87	86	86	84	85	1.01

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

(4) 添加回収試験の代表的なクロマトグラム

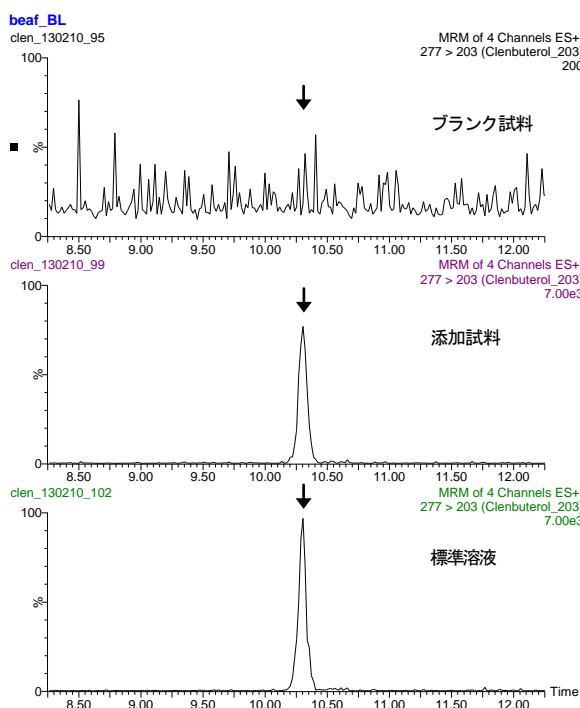


図7 牛の筋肉のクロマトグラム
添加濃度：0.0002 ppm

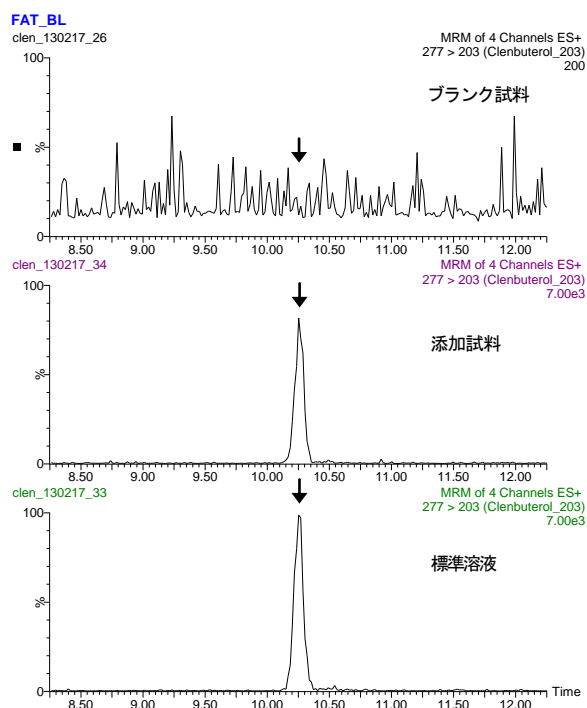


図8 牛の脂肪のクロマトグラム
添加濃度：0.0002 ppm

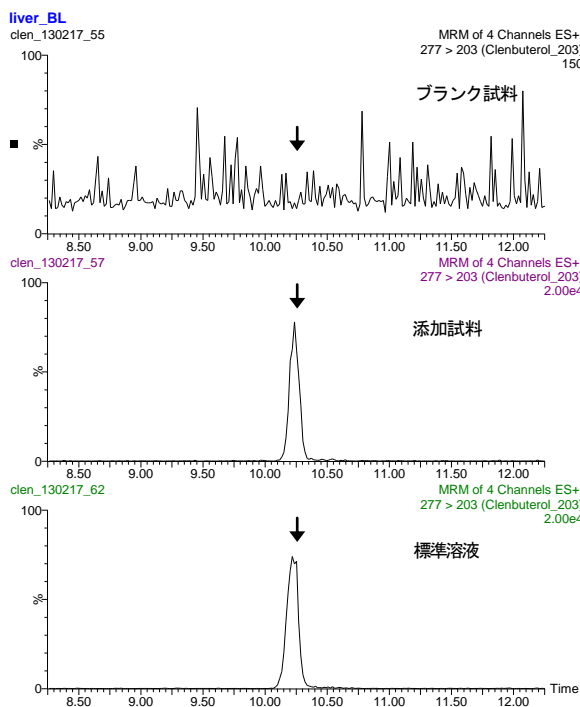


図9 牛の肝臓のクロマトグラム
添加濃度：0.0006 ppm

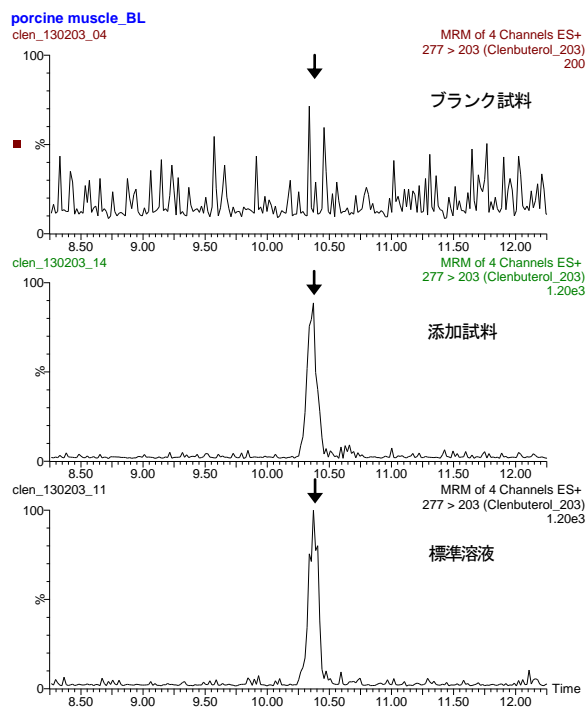


図10 豚の筋肉のクロマトグラム
添加濃度：0.00005 ppm

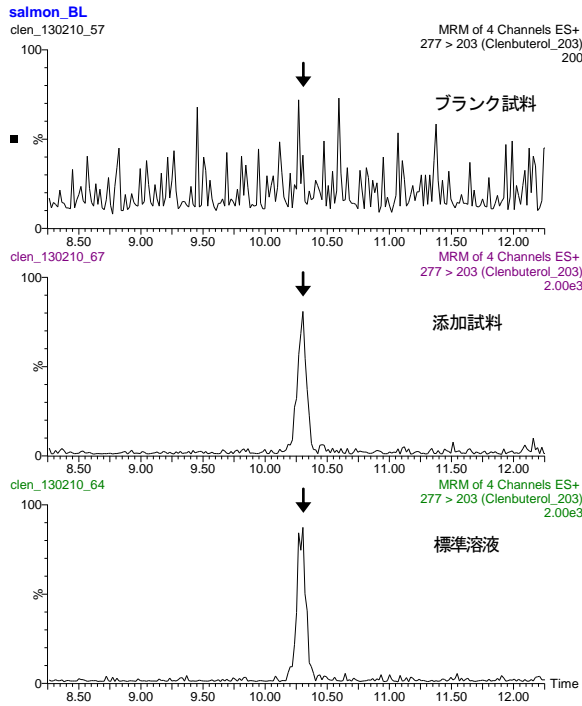


図 1 1 さけのクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

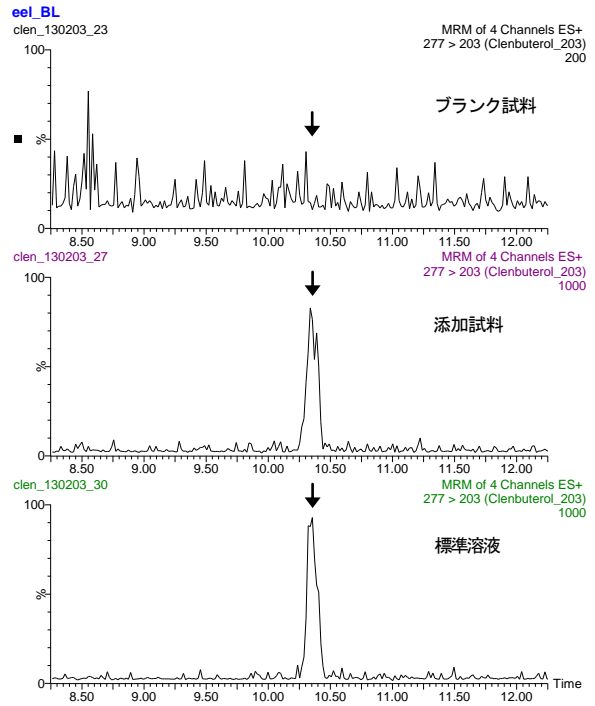


図 1 2 うなぎのクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

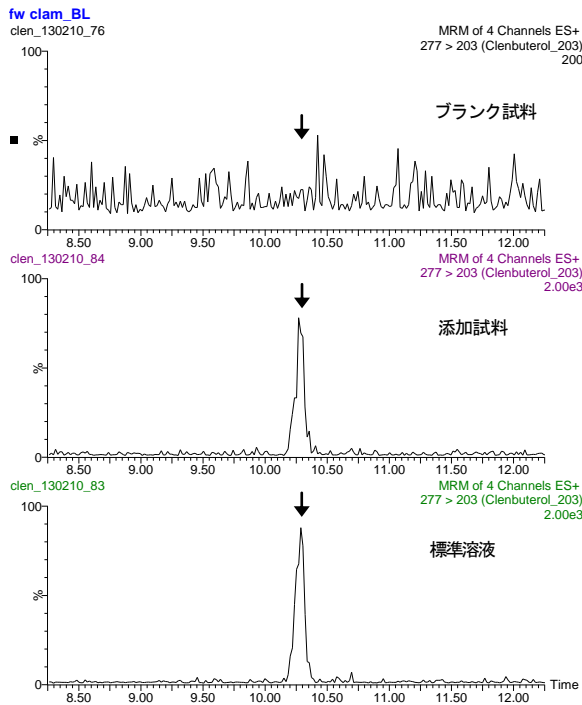


図 1 3 しじみのクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

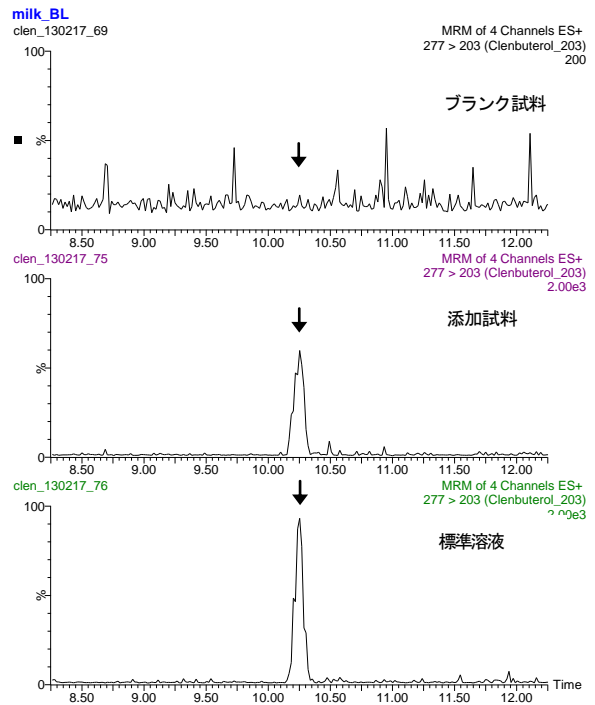


図 1 4 牛乳のクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

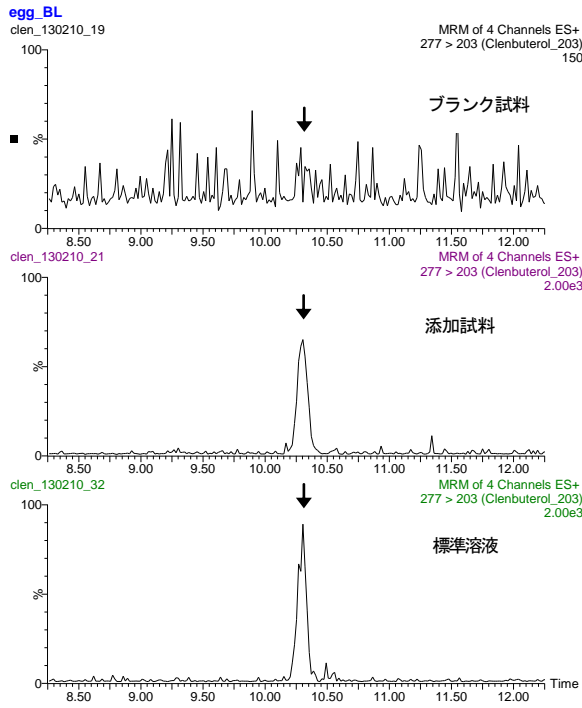


図 1 5 鶏卵のクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

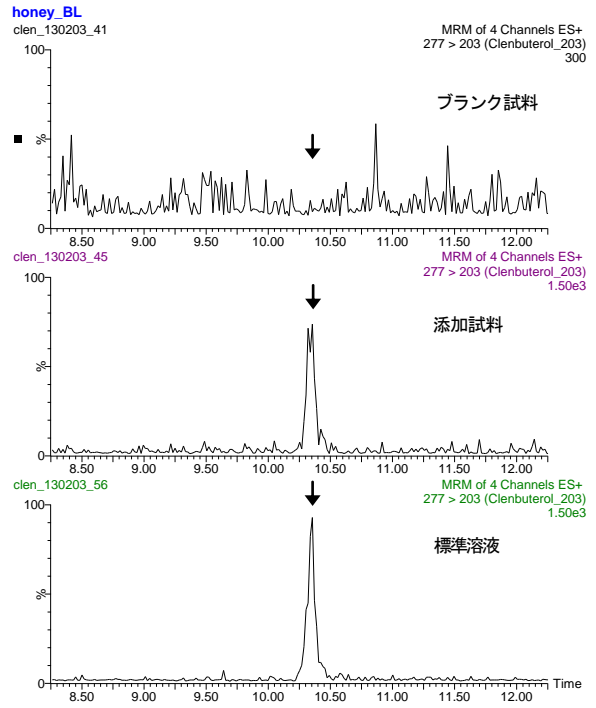


図 1 6 はちみつのクロマトグラム
 添加濃度：0.00005 ppm

(5) 定量限界の推定における代表的なクロマトグラム

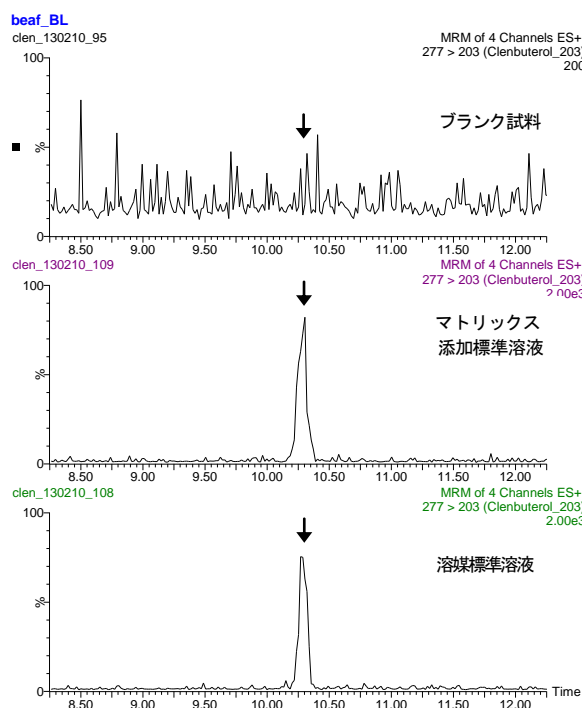


図 1 7 牛の筋肉のクロマトグラム
添加濃度：0.00005 ppm

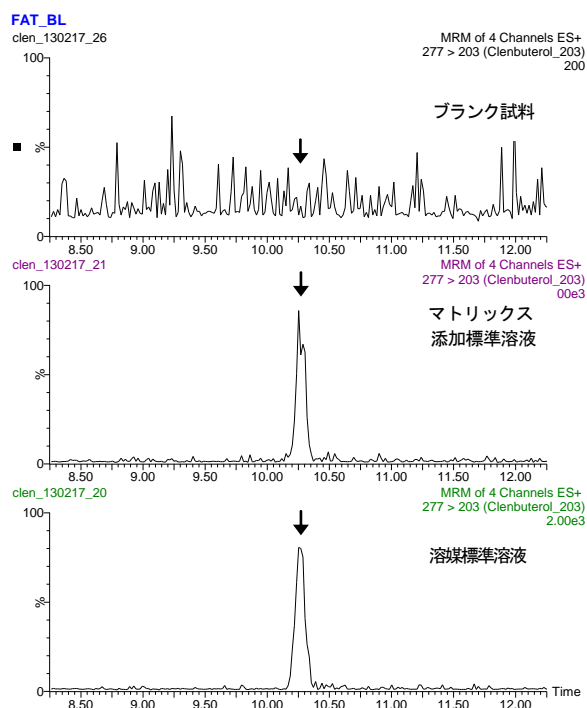


図 1 8 牛の脂肪のクロマトグラム
添加濃度：0.00005 ppm

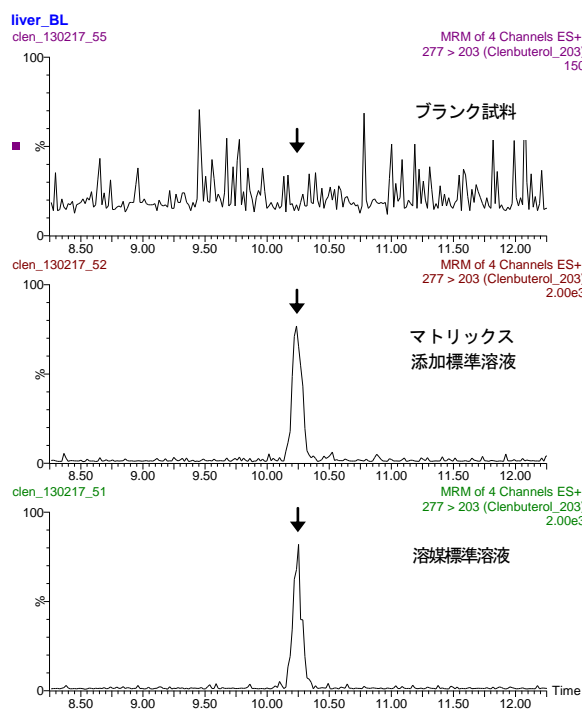


図 1 9 牛の肝臓のクロマトグラム
添加濃度：0.00005 ppm

(6) ブランク試料の代表的なトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラム

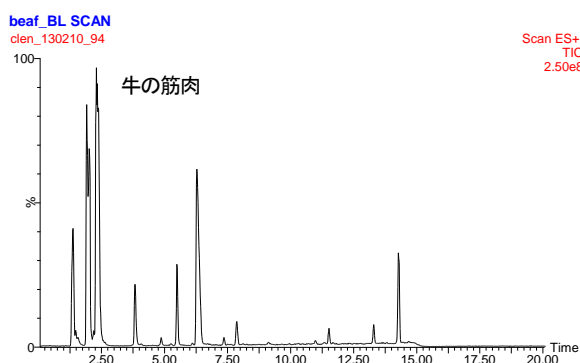


図 2 0 牛の筋肉の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

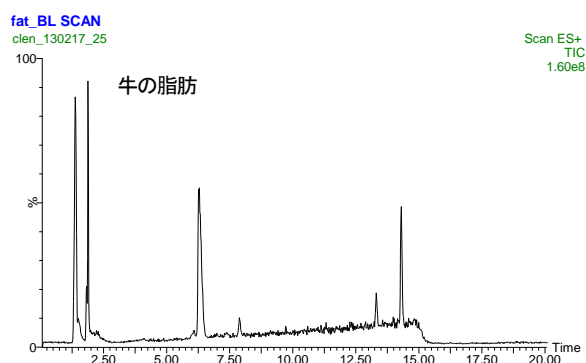


図 2 1 牛の脂肪の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

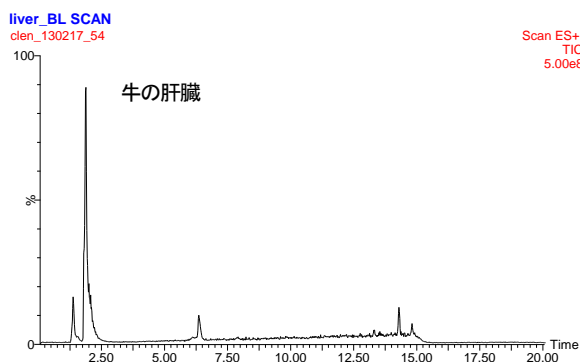


図 2 2 牛の肝臓の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

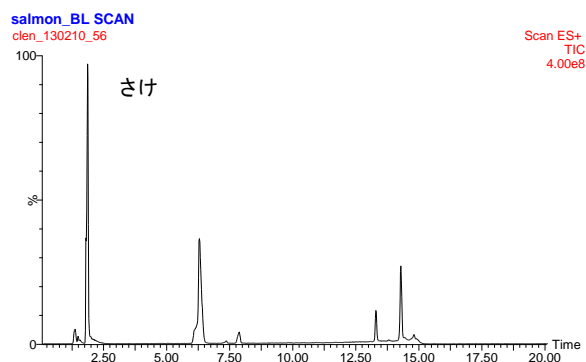


図 2 3 さけの TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

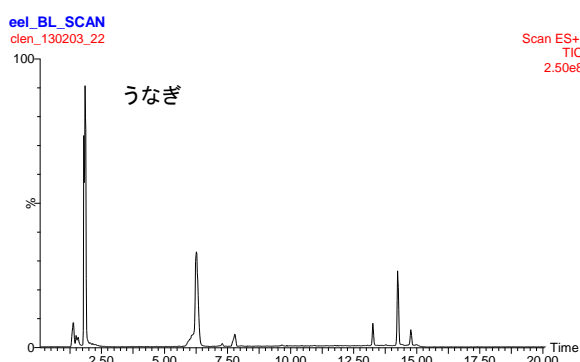


図 2 4 うなぎの TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

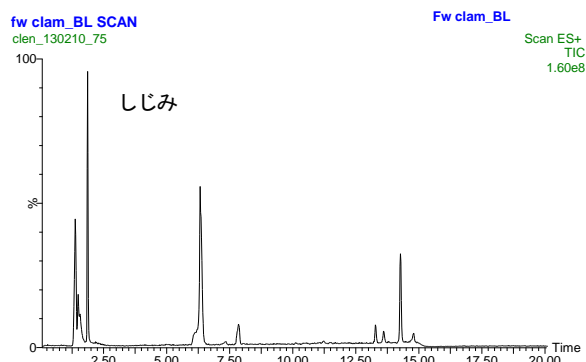


図 2 5 しじみの TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

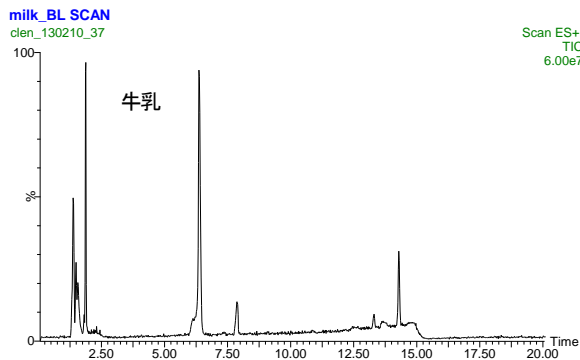


図 2 6 牛乳の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

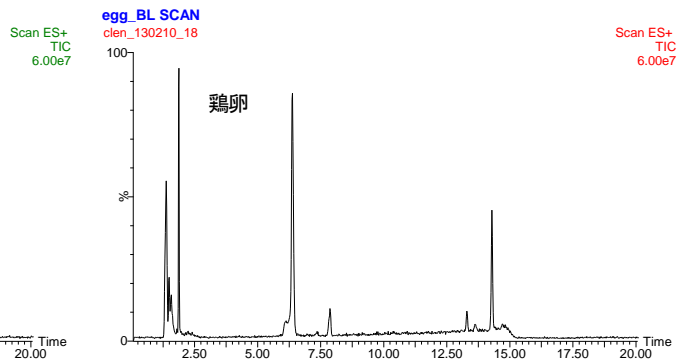


図 2 7 鶏卵の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

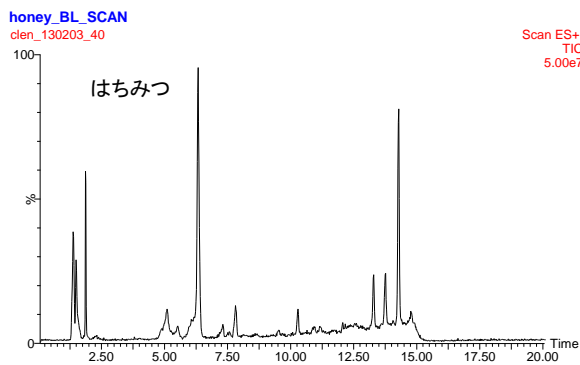


図 2 8 はちみつの TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

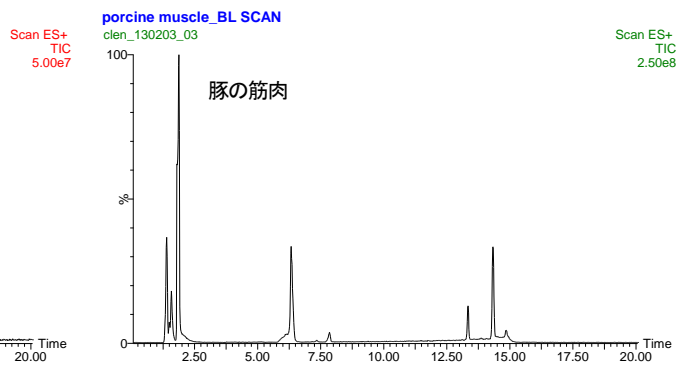


図 2 9 豚の筋肉の TIC クロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~1000 Da)

5. その他の試験法検討に関する事項

1) 安定同位体標識標準品の測定条件について

平成 21 年 7 月 3 日、医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室付でクレンブテロールは中国産豚肉加工品（豚肉が検体重量の 10%以上含まれる食品）について命令検査が行われていた（平成 24 年 10 月 18 日命令解除、30%モニタリング検査に移行）。よって、本開発法は今回検討した 10 食品とは異なるマトリックス組成を持った食品に適用される可能性が高く、絶対検量線法では良好な回収率が得られないことが予想される。

その場合、内部標準法による分析が必要になるため、安定同位体標識標準品の測定条件についても検討した（表 1 8）。安定同位体標識標準品には、塩酸クレンブテロール-d9（林純薬社製、純度：99.5%、*tert*-ブチル基の水素が重水素変換されたもの）を使用した。

表 1 8 安定同位体標識標準品の測定条件

Ionization mode	ESI、Positive			
Capillary voltage	3.0 kV			
Source temperature	120°C			
Desolvation temperature	350°C			
Cone gas flow	50 L/hr			
Desolvation gas flow	600 L/hr			
Monitor ion	Precursor	Product	Cone Voltage	Collision Energy
	286	204	27 V	17 eV
	286	133	27 V	30 eV

HPLC 分析において、重水素でラベル化された化合物は、重水素の数が多いほど早く溶出する傾向がある。そこで、表 2 の測定条件に従い、クレンブテロール及びクレンブテロール-d9 の保持時間の違いを比較した（図 3 0）。その結果、クレンブテロール-d9 はクレンブテロールよりも約 0.05 分早く溶出することが確認された。

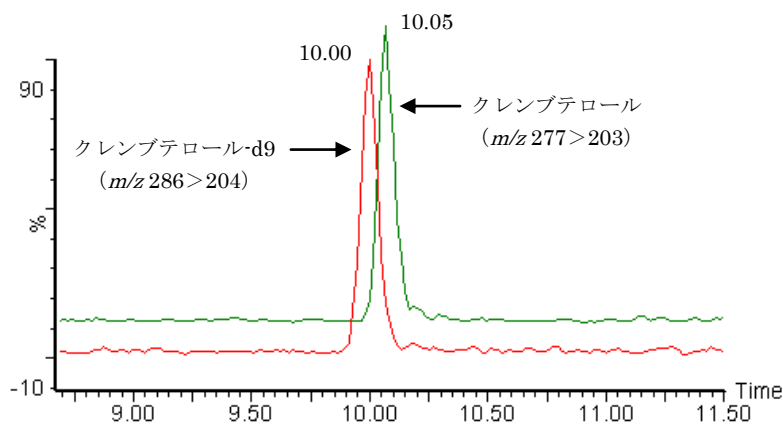


図 3 0 クレンブテロール及びクレンブテロール-d9 のクロマトグラム

また、クレンプテロール-d9 のマススペクトル（図3 1）から、クレンプテロールのプロトン付加分子 m/z 277 $[M+H]^+$ は検出されないことが確認された。

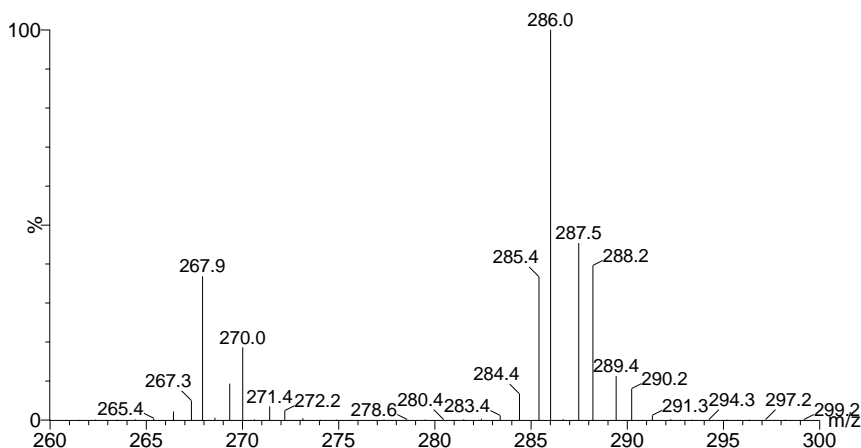


図3 1 クレンプテロール-d9 のマススペクトル (260~300 Da)

測定条件：ESI+、CV=27 V

6. まとめ

検討した全ての食品において、ブランク試料のマスクロマトグラムに定量を妨害するピークはみられず、選択性に問題はなかった。添加回収試験 (n=5) の定量値から求めた真度及び併行精度のパラメータは、それぞれ 73.5~94.5%、2.45~9.66%とそれぞれの目標値 70~120%、30>に適合する結果であった。定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークは、全ての食品において $S/N \geq 10$ であった。ブランク試料のトータルイオンカレントクロマトグラムのクレンプテロールの保持時間近傍には未知のピークは観られず、マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比 (0.96~1.02) は良好であり、本法では明らかなマトリックス効果は認められなかった。

[結論]

LC-MS/MS を用いた畜水産物中のクレンプテロール試験法を検討した。牛の各組織、豚の筋肉、魚介類、乳、卵、はちみつを用いた添加回収試験において良好な結果が得られたため、本法は畜水産物の残留分析法として有用であると考えられる。

[参考文献]

- 1) 厚生省告示第 370 号「クレンブテロール試験法」(昭和 34 年 12 月 28 日)
- 2) GONZALEZ GIGOSOS P, FENTE SAMPAYO C A, FRANCO ABUIN C, VAZQUEZ BELDA B, QUINTO FERNANDEZ E, CEPEDA SAEZ A. Liquid Chromatographic Analysis of Clenbuterol Residues in Food Products of Animal Origin(Cow Liver) using Diphasic Dialysis Extraction. *Chromatographia*. 43. 5-6. 271-274(1996)
- 3) BLANCA J, MUNOZ P, MORGADO M, MENDEZ N, ARANDA A, REUVERS T, HOOGHUIS H. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 529. 1/2. 199-205(2005)
- 4) FIORI M, CIVITAREALE C, MIRANTE S, MAGARO E, BRAMBILLA G. Evaluation of two different clean-up steps, to minimise ion suppression phenomena in ion trap liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of beta agonists in calves urine. *Anal Chim Acta*. 529. 1/2. 207-210(2005)
- 5) DICKSON L C, MACNEIL J D, LEE S, FESSER A C E. Determination of β -Agonist Residues in Bovine Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J AOAC Int*. 88. 1. 46-56(2005)
- 6) FESSER A C E, DICKSON L C, MACNEIL J D, PATTERSON J R, LEE S, GEDIR R. Determination of β -Agonist in Liver and Retina by Liquid Chromatography-Tandem Mass. *J AOAC Int*. 88. 1. 61-69(2005)
- 7) VAN HOOF Nathalie, POELMANS Sofie, NOPPE Herlinde, DE BRABANDER Hubert, COURTHEYN Dirk, VAN DE WIELE Mieke, Antignac Jean-Philippe. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 19. 19. 2801-2808(2005)
- 8) ZHANG Yantu, ZHANG Zhujun, SUN Yonghua, WEI Yue, ZHANG Yantu. Development of an Analytical Method for the Determination of β 2-Agonist Residues in Animal. *J Agric Food Chem*. 55. 13. 4949-4956(2007)
- 9) NIELEN M. W. F., LASAROMS J. J. P., ESSERS M. L., OOSTERINK J. E., MEIJER T., SANDERS M. B., ZUIDEMA T., STOLKER A. A. M., NIELEN M. W. F. Multiresidue analysis of beta-agonists in bovine and porcine urine, feed and hair using liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 391. 1. 199-210(2008)