

酢酸トレンボロン試験法

1. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・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、日本工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。

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (500mg) 内径8～9mmのポリエチレン製のカラム管に、カラムクロマトグラフィー用に製造したジエチルアミノプロピル化弱塩基性陰イオン交換樹脂500mgを充てん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。

カラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストラン カラムクロマトグラフィー用に製造したヒドロキシプロピル基を化学結合したデキストラン (粒径25～100 μ m) を用いる。

ジクロロメタン ジクロロメタン (特級)

3. 標準品

α -トレンボロン 本品は α -トレンボロン94%以上を含む。

融点 本品の融点は110℃である。

β -トレンボロン 本品は β -トレンボロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は186℃である。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

検体を細切均一化した後、その5.00gを量り採る。なお、筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除いた上で細切均一化を行う。

これにアセトニトリル及びメタノールの混液(4:1)20mLを加え、細砕した後、毎分2,600回転で5分間遠心分離を行い、上澄液を100mLの分液漏斗中に移す。沈殿にアセトニトリル及びメタノールの混液(4:1)20mLを加え、上記と同様の条件で遠心分離を行い、アセトニトリル及びメタノールの混液層をその分液漏斗中に合わせる。これに水飽和n-ヘキサン20mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル及びメタノールの混液層を200mLの分液漏斗中に移す。これに5%硫酸ナトリウム溶液40mL及びジクロロメタン40mLを加え、振とう機

を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。水層にジクロロメタン15mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層をそのすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でジクロロメタンを除去する。この残留物にn-ヘキサン及びベンゼンの混液(3:1)1mLを加えて溶かす。

b 精製法

① 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(500mg)に、n-ヘキサン及びベンゼンの混液(3:1)6mL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、n-ヘキサン及びベンゼンの混液(3:1)2mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1)3mLを注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下で窒素を通じて乾固する。この残留物にベンゼン及びメタノールの混液(17:3)0.5mLを加えて溶かす。

② ヒドロキシプロピル化デキストランカラムクロマトグラフィー

内径6mmのポリエチレン製カラム管に、カラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストランをベンゼン及びメタノールの混液(17:3)に懸濁し、12時間放置したものをカラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストラン層の長さが120mmになるように充てんする。カラムの上端に少量のベンゼン及びメタノールの混液(17:3)が残る程度までベンゼン及びメタノールの混液(17:3)を流出させる。このカラムに(1) 弱塩基性陰イオン交換樹脂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、ベンゼン及びメタノールの混液(17:3)10mLを注入する。最初の流出液2.0mLを捨て、次の溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下で窒素を通じて乾固する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液(1:1)0.5mLを加えて溶かし、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5 μ m)を用いる。

カラム管 内径4.0~6.0mm、長さ150mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 吸光波長340nmで操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液(5:6)を用いる。 α -トレンボロンが約10分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。