

※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。

残留農薬等に関するポジティブリスト 制度導入に係る分析法開発

ジエチルスチルベストロール試験法
(畜水産物)

ジエチルスチルベストロール試験法（告示試験法）の開発（検討内容）

〔目的〕

動物用医薬品であるジエチルスチルベストロールは、ヒトへの発がん性を有する可能性が高いことから、日本では「食品に含有されてはならない物質」として規定されており、試験法が告示されている。現行告示試験法においては、精製操作においてベンゼンやジクロロメタンといった有害試薬が使用されており、また、ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体（以降、「グルクロン酸抱合体」と略す。）の抽出・加水分解操作に長時間（14時間）を要している。加えて、食品によっては良好な分析結果が得られない場合があることも報告されている。

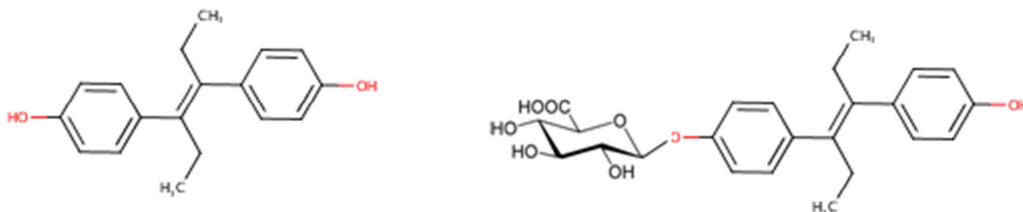
そこで本報告では、有害試薬を使用せず、種々の食品において良好な分析結果が得られるよう、ジエチルスチルベストロール試験法の改良法の開発について検討した。

なお、コーデックス委員会・食品残留動物用医薬品部会において、“ヒトの健康への懸念からFAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会がADI及びMRLを設定すべきではないと勧告している動物用医薬品”に対して、「食用動物への使用を原則禁止するリスク管理勧告案」が作成されている。本リスク管理勧告案の対象となる動物用医薬品は、主として発がん性や変異原性等を有する、もしくは、その可能性を否定できない物質であり、これらの対象物質の一つに「Stilbenes」が挙げられている。従って、本リスク管理勧告案の対象は、ジエチルスチルベストロールだけではなく、類似構造を有するジエネストロール及びヘキセストロールも含まれる可能性がある。このような理由から、本報告書で検討開発したジエチルスチルベストロール試験法について、ジエネストロール及びヘキセストロール分析への適用性についても検討した。なお、告示試験法案については、現行の規制対象であるジエチルスチルベストロール（グルクロン酸抱合体を含む）についてのみ記載した。

〔検討対象化合物（試験法開発）の構造〕

ジエチルスチルベストロール

グルクロン酸抱合体（モノグルクロニド）



ジエチルスチルベストロールについて

IUPAC 名 : 4-[(E)-4-(4-hydroxyphenyl)hex-3-en-3-yl]phenol

CAS 番号 : 56-53-1

Phenol, 4,4'-[(1E)-1,2-diethyl-1,2-ethenediyl]bis-

本検討においては、標準品として Sigma-Aldrich 製の Diethylstilbestrol (純度 99.9%、CAS 番号 56-53-1) を使用した。

また、本検討では使用していないが、Sigma-Aldrich より「Diethylstilbestrol, mixture of *cis* and *trans* (CAS 番号 6898-97-1)」が市販されている。

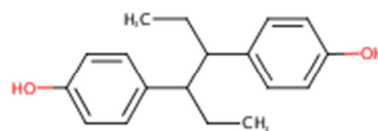
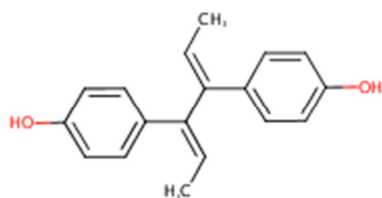
ジエチルスチルベストロールに関する参考情報

- ・国際がん研究機関 (IARC) における発がん性評価は、ジエチルスチルベストロール (CAS 番号 56-53-1) について実施されている
- ・U.S. Department of Health and Human Services が作成したジエチルスチルベストロールに関するレポートに記載されている CAS 番号は 56-53-1
- ・U.S. National Library of Medicine に収載されているジエチルスチルベストロールの CAS 番号は 56-53-1
- ・カリフォルニア州環境保健有害性評価局 (Office of Environmental Health Hazard Assessment, OEHHA) ・The Proposition 65 List の発がん性化合物リストに収載されているジエチルスチルベストロールの CAS 番号は 56-53-1

[検討対象化合物（適用性検証）の構造]

ジェネストロール

ヘキセストロール



[検討対象化合物の物性等]

	モノアイソトピック質量	分子式	融点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}	蒸気圧 (mmHg)	施行通知の検出限界 (ppb)	定量限界の目標値 (ppb)
ジェチルスチルベストロール	268.1463	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	170.5	12	5.07	1.41×10 ⁻⁸	0.5	0.5
グルクロン酸抱合体	444.1784	C ₂₄ H ₂₈ O ₈	—	—	—	—	0.5*	0.5*
ジェネストロール	266.1307	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	227.5	3	5.32	—	—	0.5
ヘキセストロール	270.1620	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	186.5	12	5.60	—	—	0.5

ChemID plus Advanced (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

* : ジェチルスチルベストロールとして

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、さけ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ）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) 肝臓は、細切均一化した。
- 4) 乳は、よく混合して均一化した。
- 5) 卵は、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。
- 6) さけは、可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- 7) しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- 8) はちみつは、よく混合して均一化した。

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。

- ・ ジエチルスチルベストロール：Sigma-Aldrich 製、純度 99.9%、CAS 番号 56-53-1
- ・ グルクロン酸抱合体：Toronto Research Chemicals 製、純度 98%
- ・ ジエネストロール：Sigma-Aldrich 製、純度 97.0%
- ・ ヘキサストロール：Sigma-Aldrich 製、純度 99.8%

ジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキサストロールについては、標準品をそれぞれ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。グルクロン酸抱合体については、標準品をメタノールに溶解して 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①

ジエチルスチルベストロール標準原液、ジエネストロール標準原液及びヘキサストロール標準原液を混合後、アセトンで適宜希釈した。

・ 添加用標準溶液②

グルクロン酸抱合体標準原液をメタノールで適宜希釈した。

・ 検量線作成用標準溶液

ジエチルスチルベストロール標準原液、ジエネストロール標準原液及びヘキサストロール標準原液を混合後、アセトニトリル及び水（1：1）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、LC/MS 用

エタノール：関東化学(株)製、特級（99.5%）

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：アジレント製、

Bond Elut PSA（1,000 mg）

β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液：Roche 製、*Helix pomatia* 由来、

EC 3.2.1.31/EC 3.1.6.1、 β -グルクロニダーゼ 100,000 ユニット/mL 及びアリルスルファターゼ 800,000 ユニット/mL を含む(ただし、 β -グルクロニダーゼにあつては、38°C、pH 4.5~5.0 で1時間にフェノールフタレイン- β -D-グルクロニドからフェノールフタレインを 1 μ g 遊離させる酵素量を 1 ユニットとする。アリルスルファターゼにあつては、38°C、pH 6.2 で1時間に 2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル硫酸から 2-ヒドロキシ-5-ニトロフェノールを 1 μ g 遊離させる酵素量を 1 ユニットとする)。

酢酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製、試薬特級

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)

酢酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製、試薬特級

蒸留水：関東化学(株)製、LC/MS 用

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)

メタノール：関東化学(株)製、LC/MS 用

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：InertSustainSwift C18 HP (粒子径 3.0 μ m、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、ジューエルサイエンス(株)製)

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (3 : 2) 混液

移動相流速：0.3 mL/min

注入量：5 μ L

保持時間

ジエチルスチルベストロール (*trans* 体) : 2.6 分

ジエチルスチルベストロール (*cis* 体) : 3.5 分

ジエネストロール : 2.6 分、ヘキセストロール : 2.6 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 -4.5 kV、脱溶媒温度 500°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 60、カーテンガス流量 50、コリジョンガス (N₂) 流量 12

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)
ジエチルスチル ベストロール	267	-80	237	-42	222	-54
ジエネストロール	265	-85	93	-34	235	-34
ヘキセストロール	269	-55	119	-56	134	-24

DP : Declustering Potential (V)

CE : Collision Energy (eV)

5. 定量

0.000125 mg/L(回収率 25%相当濃度)、0.00025 mg/L(回収率 50%相当濃度)、0.000375 mg/L(回収率 75%相当濃度)、0.0005 mg/L(回収率 100%相当濃度)、0.000625 mg/L(回収率 125%相当濃度)及び0.00075 mg/L(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水(1:1)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 µLをLC-MS/MSに注入し、絶対検量線法により各化合物の含量を求めた。

図1に、各化合物の代表的な検量線、回帰式及び決定係数(R²値)を示した(左:定量イオン、右:定性イオン)。

図1-1 ジエチルスチルベストロールの検量線(左:定量イオン、右:定性イオン)

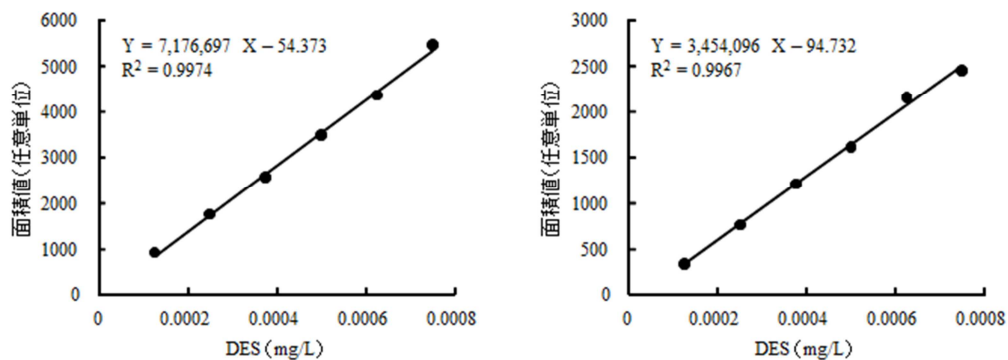
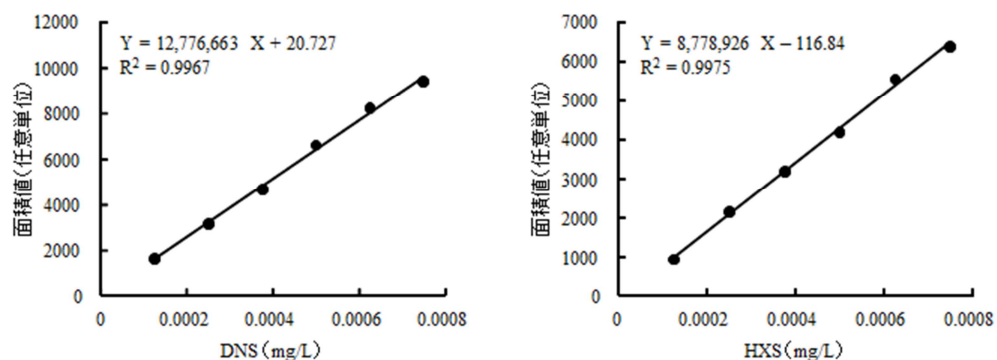


図1-2 ジエネストロール(左)及びヘキセストロール(右)の検量線



6. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採り、エタノール及び水 (9 : 1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズし、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物にエタノール及び水 (9 : 1) 混液 30 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様の条件で遠心分離した。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、エタノール及び水 (9 : 1) 混液を加えて正確に 100 mL とした。

この溶液から正確に 10 mL (試料 1.00 g 相当量) を分取後、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮した。この溶液に 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL を加えて攪拌した。

2) 酵素加水分解

1) で得られた溶液に、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液 0.1 mL を加えて攪拌後、37°C で軽く振とうしながら 1 時間放置した。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮し、穏やかに窒素气流を吹き付けて溶媒を除去した。残留物に酢酸エチル 2 mL を加えて溶解した。

3) 精製

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 (1,000 mg) に酢酸エチル 5 mL を注入し、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、更に酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、エタノール及び酢酸エチル (1 : 9) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採った。この溶出液を 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水 (1 : 1) 混液に溶かし、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

試料 10.0 g を遠心管に量り採り、エタノール及び水 (9:1) 混液 (1 回目 50 mL、2 回目 30 mL) を加えてホモジナイズ抽出、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
上澄液を合わせ、エタノール及び水 (9:1) 混液で 100 mL に定容
定容した溶液 10 mL (試料 1.00 g 相当量) を採り、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮
この溶液に 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL を加えて攪拌 . . . 溶液①

加水分解

溶液①に β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液 0.1 mL を加え、37°C で軽く攪拌しながら 1 時間放置
酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:1) 混液 10 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
有機層を採り、水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:1) 混液 10 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
有機層を採り、先の有機層と合わせ 40°C 以下で濃縮し、溶媒除去
残留物を酢酸エチル 2 mL に溶かす . . . 溶液②

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Bond Elut PSA (アジレント製、1,000 mg) に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液を捨てる
溶液②を注入後、更に酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液を捨てる
エタノール及び酢酸エチル (1:9) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採る
溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する
残留物をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液に溶解し、正確に 1 mL とする

試験溶液

試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して測定

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操作した。PSA 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アセトニトリル及び水（1：1）混液 0.5 mL に溶解した。この溶液 0.1 mL を採り、0.001 mg/L の溶媒標準溶液（ジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキセストロール、アセトニトリル及び水（1：1）混液で希釈したもの）を 0.1 mL 添加・攪拌したものをマトリックス添加標準溶液とした。

なお、調製したマトリックス添加標準溶液中の各化合物の試料中濃度は、0.0005 mg/kg に相当する。

[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検討対象化合物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、検討対象化合物であるジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキセストロールの標準溶液（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、各検討対象化合物の測定イオン（プリカーサーイオン及びプロダクトイオン）の選択、コーン電圧及びコリジョンエネルギーの最適化を行った。

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、各検討対象化合物の脱プロトン分子イオン（[M-H]⁻）と推察されるイオンが検出された。一方、ESI・ポジティブモード（ESI（+））においては、各検討対象化合物について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、検討対象化合物の脱プロトン分子イオンと考えられる [M-H]⁻ のイオン（ジエチルスチルベストロール：*m/z* 267、ジエネストロール：*m/z* 265、ヘキセストロール：*m/z* 269）を選択した。

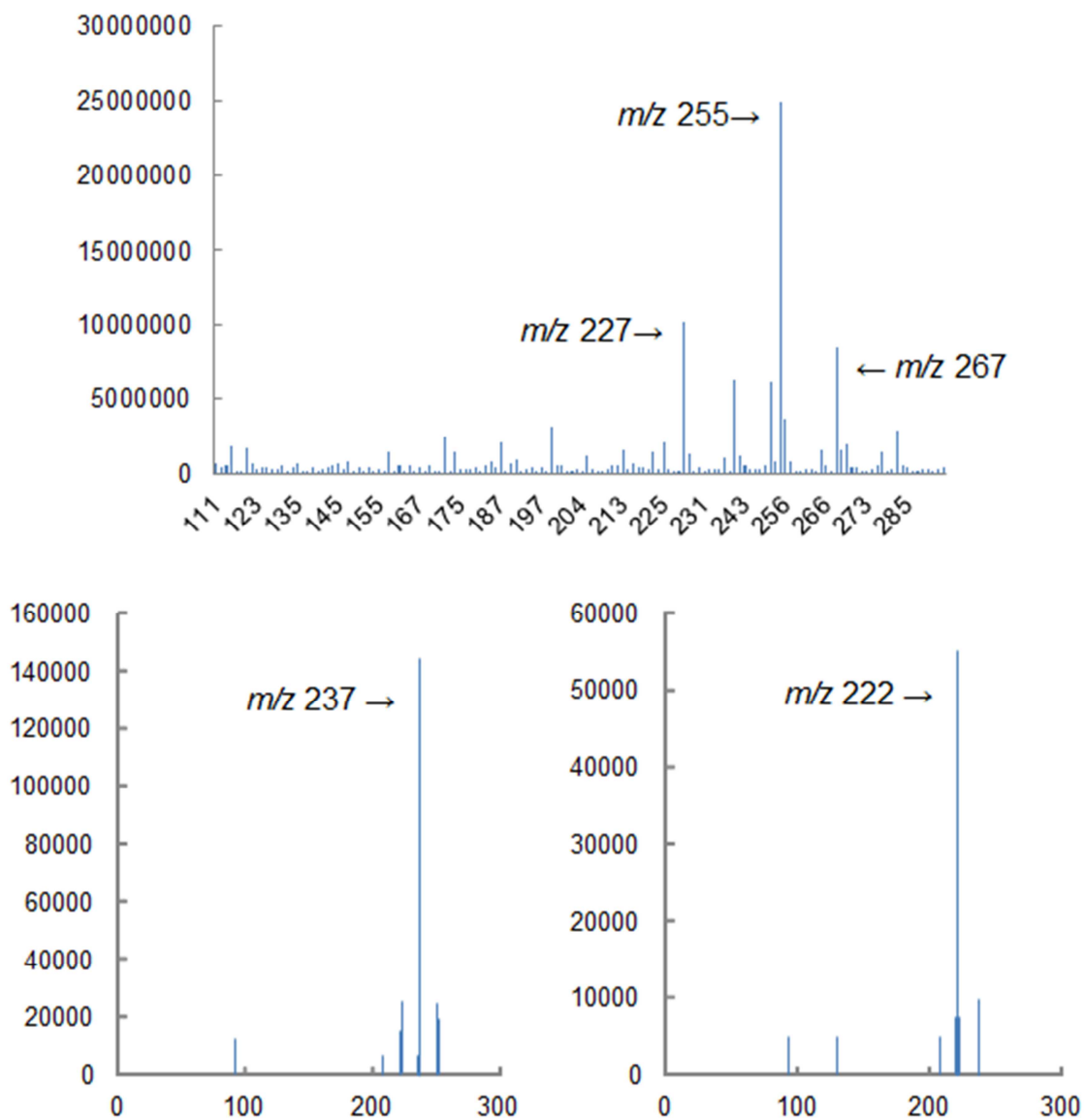
各検討対象化合物について選択したプリカーサーイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化し、プロダクトイオンを選択した。各検討対象化合物について、得られるシグナルが強いプロダクトイオンを 2 つずつ選択し、それぞれ定量イオン及び定性イオンとした。

図 2 に、各検討対象化合物について得られたスペクトル（マススペクトル、プロダクトイオンスペクトル）を示した。

図2 検討対象化合物のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトル

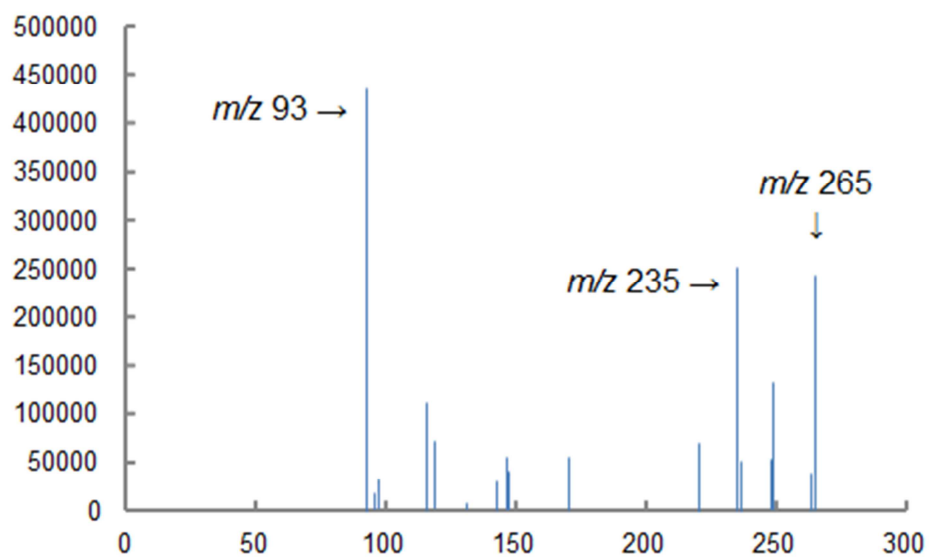
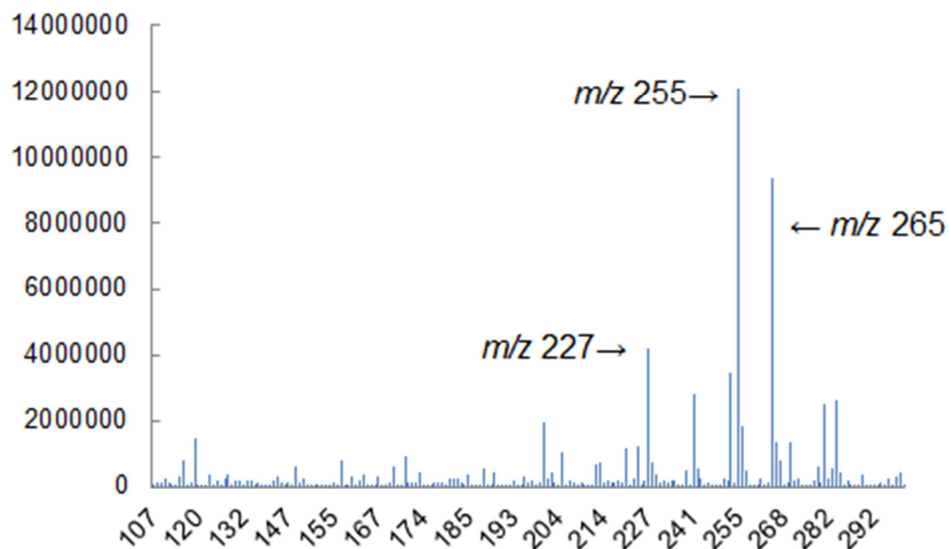
1) ジエチルスチルベストロール

上: マススペクトル (DP -80 V)、下: m/z 267 のプロダクトイオンスペクトル (左: CE -42 eV、右: CE -54 eV)



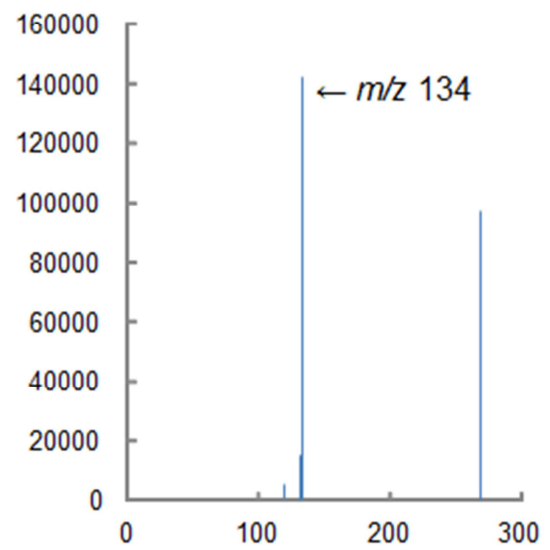
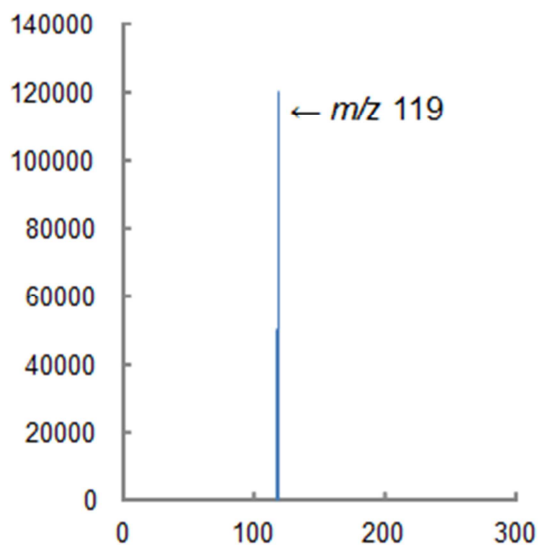
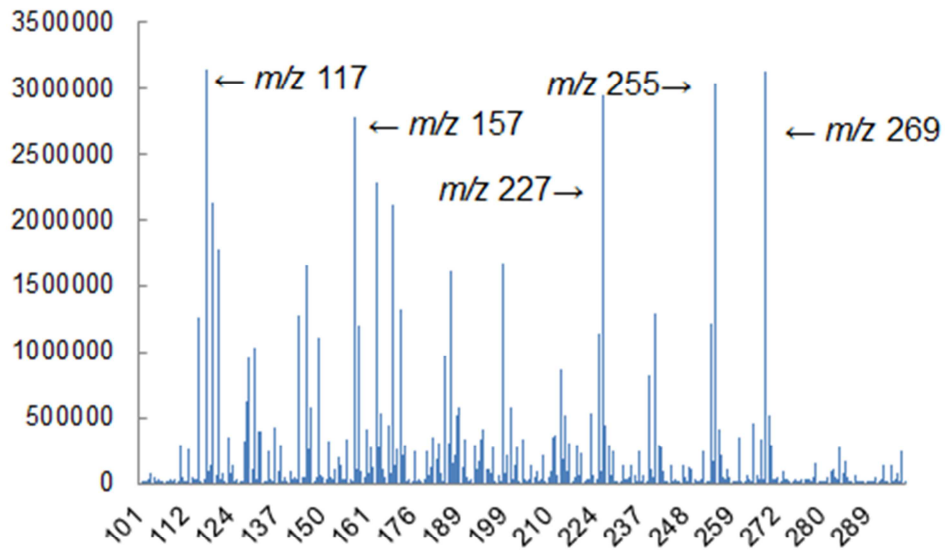
2) ジエネストロール

上：マススペクトル (DP -85 V)、下： m/z 265 のプロダクトイオンスペクトル (CE -34 eV)



3) ヘキサストロール

上：マススペクトル (DP -55 V)、下： m/z 269 のプロダクトイオンスペクトル (左：
CE -56 eV、右：CE -24 eV)



2) HPLC における測定条件について

HPLC 測定条件等は、以下に記載した条件等を使用した。

分析カラム：InertSustainSwift C18 HP（ジーエルサイエンス(株)製、2.1×150 mm、
粒子径 3 μm)

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（3：2）混液

なお、分析カラム及び移動相は、以下の結果等を考慮して選択した。

・分析カラム

数種類のオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）充填カラムを比較・検討した結果、ジーエルサイエンス(株)製 InertSustain C18 HP もしくは InertSustainSwift C18 HP を使用することで、良好なピーク形状と低いベースラインノイズが得られた。これら 2つの分析カラムを比較した結果、測定感度（ジエチルスチルベストロールの S/N）は同等であるが、InertSustain C18 HP では若干ピークがテーリングすることが確認された（図 3 の左）。一方、InertSustainSwift C18 HP ではピークのテーリングは確認されなかった（図 3 の右）ことから、本検討においては InertSustainSwift C18 HP を選択して使用した。

・移動相

現行の告示試験法では、移動相としてアセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液が使用されている。これら移動相を用いて測定を行ったところ、各検討対象化合物について良好なピーク形状及び測定感度が得られた。したがって、本検討においても現行告示試験法と同様に、移動相にはアセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いた。なお、選択した分析カラムを用いた場合、現行告示試験法の移動相条件（アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（1：1）混液）よりもシャープなピークが得られたことから、移動相の混合比率はアセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム（3：2）に変更した。

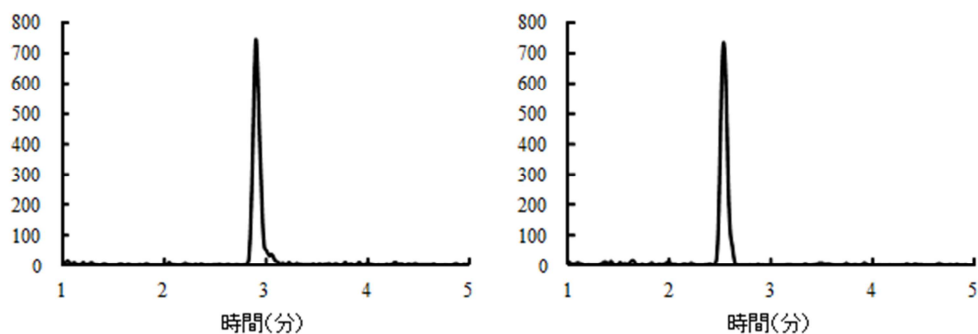


図 3 ジエチルスチルベストロール標準溶液（0.0005 mg/L）のクロマトグラム

左：InertSustain C18 HP

右：InertSustainSwift C18 HP

2. 抽出

現行告示試験法や海外の文献等に記載された方法の多くは、抽出とグルクロン酸抱合体の加水分解を同時に行うため、操作に長時間（14時間～24時間）を要している。ジエチルスチルベストロール及びグルクロン酸抱合体を試料から効率的に抽出した後、少量の溶液中で加水分解を行うことが可能であれば、迅速で効率的な試験法の確立が可能であると考えられたことから、先ず、効率的な抽出法について検討した。

抽出溶媒としては、ホモジナイズした際に種々の畜水産物と混和し易い、もしくは試料を微細な粒子とすることが可能であることから、アセトン、アセトニトリル（*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下）、メタノール、エタノール、水及びメタノール（1：9）混液、エタノール及び水（9：1）混液を用いた。

以下、検討の詳細を示した。

牛の脂肪 10.0 g を量り採り、40℃の湯浴中で溶かした後、グルクロン酸抱合体（ジエチルスチルベストロールとして 50 ng 相当量）を添加・攪拌し、-30℃で約 30 分間放置して固化した。この試料に上記の溶媒をそれぞれ加えてホモジナイズ後、遠心分離した。なお、各溶媒の液量は抽出 1 回目 50 mL、抽出 2 回目 30 mL とした（アセトニトリルの場合、*n*-ヘキサン 50 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を添加して実施）。抽出液を合わせ、100 mL に定容した後、それぞれ 1 mL（試料 0.1 g 相当量）を採った。各溶液に 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液（pH 5.0）10 mL 及びβ-グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液 0.1 mL を加え、37℃で 1 時間加温した。得られた溶液を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：1）混液 10 mL ずつで 2 回振とう抽出し、抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。得られた残留物を酢酸エチル 2 mL に溶解し、予め酢酸エチル 5 mL で予備洗浄した Bond Elut PSA（1,000 mg）に注入した後、酢酸エチル 10 mL で洗浄した。エタノール及び酢酸エチル（1：9）混液 10 mL で溶出後、溶出液を 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水（1：1）混液 1 mL に溶解後、LC-MS/MS で測定し、各抽出液中のグルクロン酸抱合体（ジエチルスチルベストロールとして）の回収率を求めた。

結果を表 2 に示した。表 2 に示される通り、抽出溶媒としてアセトンもしくはアセトニトリルを使用した場合にはグルクロン酸抱合体は全く回収されないことが確認された。一方、メタノールもしくはエタノールを使用した場合には、グルクロン酸抱合体の回収率は改善された（メタノール：85%、エタノール：61%）。若干量の水を含有したメタノールもしくはエタノールを用いた場合には、回収率は更に改善された（水及びメタノール（1：9）混液：99%、エタノール及び水（9：1）混液：91%）。

表 2 各抽出溶媒によるグルクロン酸抱合体の回収率

抽出溶媒	グルクロン酸抱合体の回収率 (%)
アセトン	ND
アセトニトリル (<i>n</i> -ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下)	ND
メタノール	85
エタノール	61
水及びメタノール（1：9）混液	99
エタノール及び水（9：1）混液	91

次いで、グルクロン酸抱合体について良好な回収率が得られた水及びメタノール（1：9）混液、エタノール及び水（9：1）混液を用い、ジエチルスチルベストロールの回収率について調査した。方法は、グルクロン酸抱合体の代わりにジエチルスチルベストロールを添加（添加量は 50 ng）した以外は、上記と同様に実施した。

結果を表 3 に示した。表 3 に示される通り、抽出溶媒として水及びメタノール（1：9）混液、もしくはエタノール及び水（9：1）混液を用いることで、ジエチルスチルベストロールを試料から抽出可能であることが推察された。

表 3 各抽出溶媒によるジエチルスチルベストロールの回収率

抽出溶媒	ジエチルスチルベストロールの回収率 (%)
水及びメタノール（1：9）混液	91
エタノール及び水（9：1）混液	90

以上の結果から、抽出溶媒として水及びメタノール（1：9）混液、もしくはエタノール及び水（9：1）混液を用いることで、ジエチルスチルベストロール及びグルクロン酸抱合体を試料から抽出可能であると推察された。

なお、水及びメタノール（1：9）混液を用いた場合、抽出液を濃縮する際に突沸が起きる試料もあることが確認されたことから、操作性等を考慮し、抽出溶媒としてはエタノール及び水（9：1）混液を選択した。

以上の結果及び考察から、本報告における抽出操作としては、

「試料 10.0 g を量り採り、エタノール及び水（9：1）混液 50 mL を加えてホモジナイズし、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。上澄液を採り、残留物にエタノール及び水（9：1）混液 30 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様の条件で遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、エタノール及び水（9：1）混液を加えて正確に 100 mL とする。」

操作とした。

3. グルクロン酸抱合体の加水分解操作

① 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 中での酵素加水分解

現行の告示試験法や海外の文献等に記載された方法の多くは、抽出とグルクロン酸抱合体の加水分解を同時に行うため、操作に長時間（14時間～24時間）を要している。ジエチルスチルベストロール及びグルクロン酸抱合体を試料から抽出した後、液量の少ない条件下で加水分解を行うことができれば、より効率的な試験法の確立が可能であると考えられたことから、抽出法の検討に続き、効率的な加水分解条件の検討を実施した。

加水分解を行う溶液としては、試料マトリックスの影響や緩衝作用等を考慮し、現行告示試験法で使用されている0.04 mol/Lよりも高濃度である0.1 mol/Lの酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) を選択した。なお、酢酸ナトリウムの液量は、試料マトリックス（試料 1.00 g 相当量）の溶解性と加水分解効率を考慮し、10 mL とした。酵素は現行告示試験法で使用されている酵素の同等品と考えられる *Helix pomatia* 由来の β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液を使用し、添加するユニット量も現行告示試験法と同等とした（100,000 ユニット/mL 溶液を 0.1 mL）。

以下に示す方法により、加水分解に必要な反応時間を検討した。

0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL に、グルクロン酸抱合体 16.56 ng（ジエチルスチルベストロールとして 10 ng 相当量）を添加した。この溶液に、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液を 0.1 mL 添加して軽く攪拌した後、37°C で 0～2 時間加温した。反応後の溶液を、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL ずつで 2 回振とう抽出し、抽出液を濃縮・溶媒除去後、残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

結果を図 4 に示した。図 4 に示される通り、酵素溶液を添加しない場合にはジエチルスチルベストロールは全く回収されなかった。酵素溶液を添加した場合には、グルクロン酸抱合体はジエチルスチルベストロールへと速やかに加水分解され、加水分解反応は 30 分以内に完了することが示唆された。

実際の食品試料の場合には、試料マトリックスの影響等により加水分解効率が低下する可能性もあると予想されたことから、1 時間の反応時間を採用した。

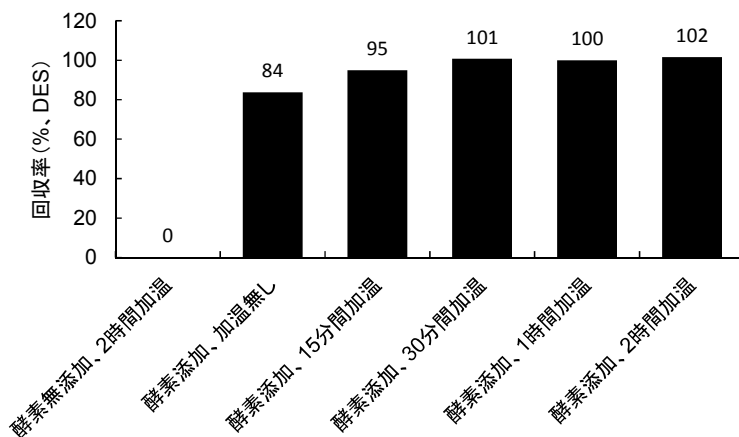


図 4 酵素加水分解条件（加温時間）の検討結果

なお、「酵素添加、加温無し」の場合は、酵素溶液を添加後、直ちに酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液で抽出した。

② エタノール存在下での酵素加水分解

酵素加水分解においては、使用する酵素の活性に影響が無いよう、反応溶液中の有機溶媒量を出来るだけ減らす必要があると考えられた。そこで、抽出液（エタノール及び水（9：1）混液、10 mL）の濃縮について検討したところ、溶媒を完全に除去した場合や約 2 mL まで濃縮した場合には、回収率が低下（約 70%程度）する可能性があることが確認された。抽出液を約 5 mL まで濃縮した場合には、いずれの検討食品においても安定した回収率（90%以上）が得られたことから、エタノール共存下における酵素加水分解について検討した。

エタノール 2 mL、5 mL もしくは 10 mL を採り、それぞれ 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液（pH 5.0）10 mL 及びグルクロン酸抱合体（ジエチルスチルベストロールとして 25 ng）を加えて軽く攪拌した。次いで、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液 0.1 mL を加えて軽く攪拌し、37°C で 1 時間加温した。反応後の溶液を 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液（pH 5.0）で 50 mL に定容し、この 1 mL を採った。これに 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液（pH 5.0）10 mL を加えた後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：1）混液 10 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、溶媒を除去した後、得られた残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、ジエチルスチルベストロールとしての回収率は、エタノール 2 mL：92%、エタノール 5 mL：92%、エタノール 10 mL：82%であり、5 mL 程度のエタノールが共存した場合であっても、加水分解反応の効率には大きな影響は無いことが確認された。

以上の結果から、濃縮によるジエチルスチルベストロールの回収率低下を避けるため、グルクロン酸抱合体を加水分解し、ジエチルスチルベストロールを生成する操作は、

「100 mL に定容後の抽出液を 10 mL (試料 1.00 g 相当量) 採り、約 5 mL まで濃縮する。これに 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL 及び β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液 0.1 mL を添加・攪拌し、37°C で軽く攪拌しながら 1 時間放置する」

操作とした。

4. 転溶

グルクロン酸抱合体を加水分解してジエチルスチルベストロールを生成した後、効率的な精製 (酵素等の除去)、濃縮を目的として、転溶操作を検討した。

ジエチルスチルベストロール 2 ng を 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL に添加後、各溶媒 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した (溶媒①: *n*-ヘキサン、溶媒②: 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液、溶媒③: 酢酸エチル、④酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:1) 混液)。抽出液を濃縮・溶媒除去後、残留物をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液 1 mL に溶解したものを試験溶液とし、LC-MS/MS で測定した。

結果を表 4-1 に示した。ジエチルスチルベストロールは log P_{ow} 値 5.07 と比較的極性が低い物質であるため、*n*-ヘキサンや酢酸エチルなどの溶媒を用いることで、水溶液から効率的に転溶が可能であった。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液、もしくは *n*-ヘキサンを用いて転溶した場合、牛の肝臓試料において若干ではあるが試験溶液の白濁が確認された。酢酸エチルで転溶した場合、試験溶液の濁りは確認されなかったものの、抽出液を濃縮した際に水分が残る場合もあることから、高極性夾雑物の精製効果が低いことが推察された。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:1) 混液を用いた場合には、試験溶液の濁りもなく、抽出液を濃縮した際に水分が残らなかったことから、転溶の際の抽出溶媒としては酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:1) 混液を選択した。

表 4-1 転溶操作の検討結果①

溶媒	回収率 (%)
① <i>n</i> -ヘキサン	96
② 酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液	105
③ 酢酸エチル	99
④ 酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3:1) 混液	101

抽出回数については、表 4-2 に示した通り、1 回の抽出回数で良好な回収率が得られたが、試料マトリックスの影響等を考慮し、抽出回数は 2 回を選択した。

なお、その後の検討において、抽出液を濃縮する際、少ない液量 (約 2 mL) まで濃縮することで回収率が低下する可能性があることが確認されたため、抽出液の濃縮操作は「約 5 mL まで濃縮する」操作とした。したがって、加水分解反応後の溶液中には 4~5 mL 程度の有機溶媒 (抽出溶媒中のエタノール) が存在し、転溶効率に影響を及ぼす可能性もあることが推察されたため、以下の検討を実施した。

エタノール 2 mL、5 mL もしくは 10 mL を採り、それぞれ 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 10 mL 及びジエチルスチルベストロール 0.5 ng を加えて軽く攪拌した。次いで、 β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液 0.1 mL を加えて軽く攪拌し、

37°Cで1時間加温した。反応後の溶液を、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 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、溶媒を除去した後、得られた残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

その結果、ジエチルスチルベストロールの回収率は、エタノール 2 mL : 95%、エタノール 5 mL : 100%、エタノール 10 mL : 102%であり、加水分解反応液中に 5 mL 程度のエタノールが含まれている場合であっても、転溶の際の効率には大きな影響が無いことが確認された。

以上の結果から、加水分解反応後の溶液から、ジエチルスチルベストロール (加水分解により、グルクロン酸抱合体から生成したジエチルスチルベストロールを含む) を有機溶媒に転溶する操作は、

「加水分解反応後の溶液から、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL ずつで2回振とう抽出する」

操作とした。

表 4-2 転溶操作の検討結果②

	回収率 (%)		
	1回目	2回目	3回目
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液	100	ND	ND
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 1) 混液	103	ND	ND

ND : Not Detected (ピークの S/N<3)

5. ミニカラム精製

牛の脂肪（ブランク試料）をエタノール及び水（9：1）混液で抽出し、100 mL 定容後の抽出液 10 mL を採り、40℃で約 2 mL まで濃縮した。これに 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 10 mL を加えて攪拌後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した。得られた抽出液を濃縮・溶媒除去後、残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解したところ、溶液が白濁する場所があることが確認された。*n*-ヘキサンを少量加えて振とう・遠心分離後、*n*-ヘキサン層を除去することで濁りの無い試験溶液が得られたが、マトリックス添加標準溶液を測定したところ、ジエチルスチルベストロールのピーク近傍に夾雑ピークが確認された（図 5・左）。

以上の結果から、ミニカラム精製操作の追加を検討した。

ジエチルスチルベストロールとグルクロン酸抱合体が混在したまま精製する場合よりも、グルクロン酸抱合体をジエチルスチルベストロールに加水分解してから精製する方がより高い精製効果が得られると考えられたことから、加水分解反応後の溶液からジエチルスチルベストロールを酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：1）混液で抽出した後にミニカラム精製を適用することとした。

現行告示試験法においては、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製法が採用されていることから、本検討においても、同様のカラムの適用について検討した。また、現行告示試験法においては、ミニカラム精製の際に有害試薬であるベンゼン及びジクロロメタンが使用されているが、本検討ではこれら有害試薬を使用しない精製法の確立を検討した。

Bond Elut PSA（1,000 mg）に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液を捨てた。次いで、酢酸エチル 5 mL にジエチルスチルベストロール 2 ng を添加し、ミニカラムに注入後、流出液を採った。更に、酢酸エチル 5 mL ずつを 2 回、次いでエタノール及び酢酸エチル（1：9）混液 5 mL ずつを 3 回注入し、それぞれの流出液を採った。各液を濃縮・溶媒除去後、得られた残留物をアセトニトリル及び水（1：1）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。負荷液（酢酸エチル 5 mL）及び洗浄液（酢酸エチル 10 mL）ではジエチルスチルベストロールは溶出せず、エタノール及び酢酸エチル（1：9）混液 5 mL で良好な回収率が得られた。牛の脂肪においては、酢酸エチル 5 mL の洗浄操作で良好な精製効果が得られたが（図 5・右）、牛の肝臓試料においては、洗浄溶媒の液量を 10 mL とした方がより高い精製効果が得られたことから、洗浄溶媒の液量は 10 mL とした。また、負荷の際の液量についても、2 mL の液量で種々の食品マトリックスを十分に溶解可能であったことから、2 mL の酢酸エチルで負荷することとした。

以上の結果から、PSA ミニカラム精製操作は、試料マトリックスによる溶出画分のずれなども考慮し、

「酢酸エチル 2 mL で負荷後、酢酸エチル 10 mL で洗浄し、エタノール及び酢酸エチル（1：9）混液 10 mL で溶出する」

操作とした。

表 5 PSA ミニカラムからの溶出状況

	回収率 (%)	回収率 (累計)
酢酸エチル 5 mL (負荷液)	ND	0
酢酸エチル 5 mL (洗浄液 0-5 mL)	ND	0
酢酸エチル 5 mL (洗浄液 5-10 mL)	ND	0
エタノール及び酢酸エチル (1:9) 混液 5 mL (溶出液 0-5 mL)	107	107
エタノール及び酢酸エチル (1:9) 混液 5 mL (溶出液 5-10 mL)	ND	0
エタノール及び酢酸エチル (1:9) 混液 5 mL (溶出液 10-15 mL)	ND	0

ND: Not Detected.

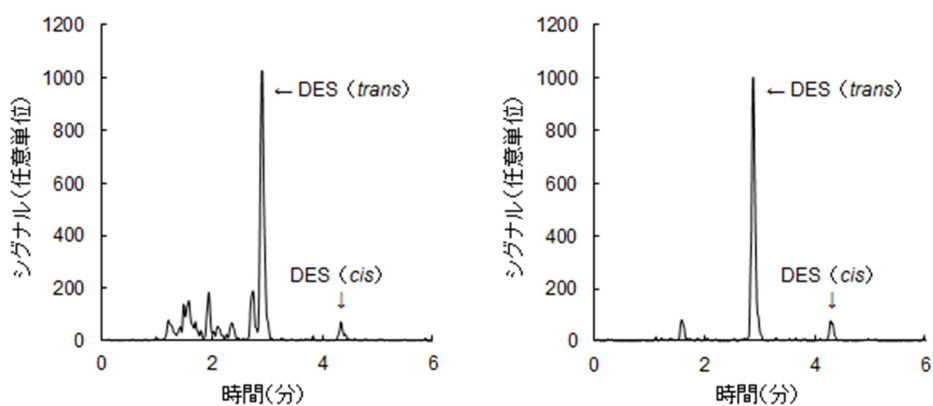


図 5 マトリックス添加標準溶液のクロマトグラム (牛の脂肪)
 左: PSA ミニカラム精製無し、右: PSA ミニカラム精製有り

6. 濃縮操作について

抽出液（試料 10.0 g をエタノール及び水（9：1）混液でホモジナイズ抽出し、抽出液を 100 mL に定容後、10 mL（試料 1.00 g 相当量）を濃縮する際、溶媒を完全に除去することなく 2 mL 程度までの濃縮に留めた場合であっても、回収率が低下（70%程度）する可能性があることが確認された。約 5 mL の液量まで濃縮した場合には種々の検討食品において良好な回収率が得られたこと、5 mL 程度のエタノールが共存した場合であっても加水分解工程及び転溶工程において良好な回収率が得られたことから、抽出液の濃縮操作は「約 5 mL まで濃縮する」こととした。

なお、転溶の際の抽出液（酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：1）混液）やミニカラムからの溶出液（エタノール及び酢酸エチル（1：9）混液）の濃縮・溶媒除去については、ロータリーエバポレーターを用いて 40℃以下で 1 mL 程度まで濃縮後、窒素を吹き付けて溶媒を除去することで、回収率を低下させることなく濃縮・溶媒除去が可能であった。

7. 異性化について

① ジエチルスチルベストロールの異性化について

ジエチルスチルベストロールは、ほとんどが *trans* 体として存在しているが、分析操作中に *cis* 体に変換する可能性があることが報告されている（*Food Chemistry*, 140 (2013) 44-51）。

高濃度のジエチルスチルベストロール標準溶液（10 ng/mL）を LC-MS/MS で測定した場合、全ての測定イオン（定量イオンとして採用した m/z 267→237、定性イオンとして採用した m/z 267→251、並びに、その他良好な測定感度が得られた m/z 267→222）において、2つのピーク（保持時間約 3 分及び約 4.5 分、分析カラム InertSustain C18 HP 使用時）が確認された。これら 2つのピークの面積比（約 4.5 分のピーク的面積値/約 3 分のピーク的面積値）は、いずれの測定イオンにおいても 0.05～0.06 であったことから、確認された 2つのピークは共にジエチルスチルベストロールのピークであると推定された。また、2つのピークの保持時間、並びに、ピーク的面積値の関係から、保持時間約 3 分のピークが *trans* 体（主）、保持時間約 4.5 分のピークが *cis* 体（副）であると考えられた。

ジエチルスチルベストロール標準溶液（アセトニトリル及び水（1：1）混液）を 60℃で 2 時間加温した場合や、遮光せずに一週間程度室温で放置（2 mL のガラス製バイアル中）した場合であっても、*trans* 体と *cis* 体のピーク面積値に増減は無く、このような条件下では *trans* 体と *cis* 体の相互変換は生じないことが推察された。

一方、ジエチルスチルベストロール標準品をアセトンもしくは酢酸エチルに溶解し、約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素を吹き付けて溶媒を除去した場合、僅かではあるが *cis* 体のピーク面積値が増加する可能性があることが確認されたことから、以下の検討を実施した。

- ① 10 ng/mL 標準溶液（アセトニトリル及び水（1：1）混液）をそのまま測定
- ② ジエチルスチルベストロール 10 ng をアセトン 50 mL に添加し、40℃で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素を吹き付けて溶媒除去。残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解して測定

③ ジエチルスチルベストロール 10 ng をアセトン 50 mL に添加し、40℃以下で減圧濃縮し、溶媒を除去。溶媒除去後、更に 10 分間減圧を続ける。残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解して測定。

④ ジエチルスチルベストロール 10 ng をアセトン 50 mL に溶解し、エタノール 10 mL を加え、40℃で濃縮し、溶媒を除去。溶媒除去後、更に 10 分間減圧を続ける。残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL に溶解して測定。

結果を図 6 に示した。図 6 に示される通り、約 1 mL まで濃縮後、窒素を吹き付けて溶媒を除去した場合には、*trans* 体及び *cis* 体のピークにほとんど変化は認められなかった。一方、溶媒除去後も更に減圧を続けた場合、*cis* 体のピークが増加し、*trans* 体のピークが減少することが確認された。なお、エタノールを加えて濃縮・溶媒除去した場合には、*trans* 体から *cis* 体への変換をある程度抑制可能であることが示唆された。

以上の結果から、濃縮・溶媒除去の際に過度な濃縮操作を避ける（約 1 mL まで濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去する）ことにより、ジエチルスチルベストロールの *trans* 体から *cis* 体への異性を抑制可能であると考えられた。

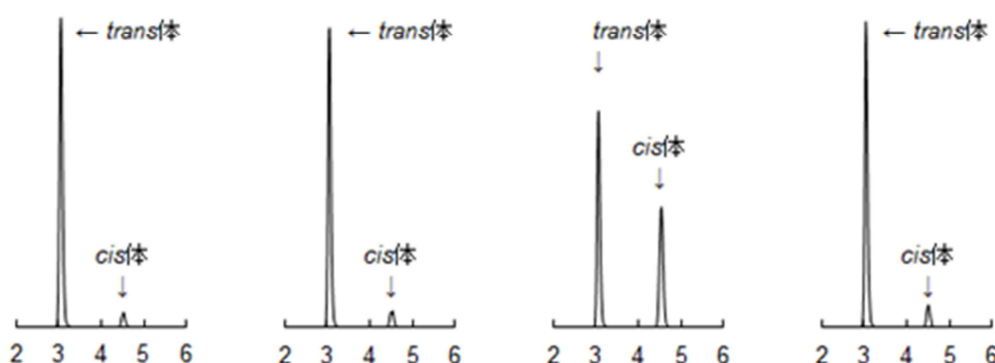


図 6 ジエチルスチルベストロールのクロマトグラム

左から、①標準溶液

②アセトン溶液を濃縮後、窒素を吹き付けて乾固

③アセトン溶液を濃縮、乾固後、10 分間減圧

④アセトン溶液にエタノールを添加して濃縮、乾固後、10 分間減圧

②開発検討した試験法における分析操作中の異性の有無の確認

本報告で開発検討した試験法を用いて添加回収試験を実施した際の *trans* 体から *cis* 体への異性の有無について検討した。

すなわち、検量線作成用標準溶液（0.0005 mg/L、回収率 100%相当濃度）、マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液（ジエチルスチルベストロールもしくはグルクロン酸抱合体を添加）について、*trans* 体ピーク面積値と *cis* 体ピーク面積値の和に対する *cis* 体ピーク面積値の割合（*cis* 体ピーク面積値 / (*trans* 体ピーク面積値 + *cis*

体ピーク面積値) ×100、%) を求め、それぞれを比較・考察した。

結果を表 6-1 (検量線作成用標準溶液) 及び表 6-2 (マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液) に示した。

表 6-1 検量線作成用標準溶液の *cis* 体ピーク面積

	<i>cis</i> 体ピーク面積* (%) の平均値 ±標準偏差 (n=8)
検量線作成用標準溶液 (0.0005 mg/L)	4.22±0.90

* : *cis* 体ピーク面積値 / (*trans* 体ピーク面積値 + *cis* 体ピーク面積値) ×100

表 6-2 マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液の *cis* 体ピーク面積

	<i>cis</i> 体ピーク面積* (%) の平均値±標準偏差		
	マトリックス添加 標準溶液 (n=2)	添加回収試験溶液 (ジエチルスチルベス トロール添加、n=5)	添加回収試験溶液 (グルクロン酸抱合体添 加、n=5)
牛の筋肉	4.28	3.04±0.85	2.67±0.76
牛の脂肪	4.36	4.61±0.37	4.54±0.24
牛の肝臓	3.69	3.24±0.46	3.13±0.94
牛乳	4.14	1.90±0.78	2.15±0.23
鶏卵	4.31	3.16±0.52	3.63±0.64
さけ	4.37	2.40±0.60	2.80±0.54
しじみ	3.42	3.73±0.75	3.90±0.47
はちみつ	3.82	2.53±0.38	2.11±0.32

* : *cis* 体ピーク面積値 / (*trans* 体ピーク面積値 + *cis* 体ピーク面積値) ×100

表 6-1 の通り、検量線作成用標準溶液中のジエチルスチルベストロールの *cis* 体ピーク面積割合は 4.22±0.90%であった。

マトリックス添加標準溶液中の *cis* 体ピーク面積割合 (n=2 の平均値) は 3.42~4.37% であり、検量線作成用標準溶液 (0.0005 mg/L) における割合と同程度であった。

添加回収試験溶液中の *cis* 体ピーク面積割合は、検量線作成用標準溶液及びマトリックス添加標準溶液中の値を大きく超えるものは確認されなかった。

以上の結果から、本検討で確認された *cis* 体のピークは添加した標準溶液に由来するものと考えられ、本検討で開発した試験法においては、分析操作中の *trans* 体から *cis* 体への異性化はほとんど無いことが示唆された。

8. その他の操作について

・アセトニトリル/ヘキサン分配

本報告で開発した試験法においては、抽出溶媒としてエタノール及び水 (9 : 1) 混液を採用したため、牛の脂肪のような低極性マトリックスを多く含む食品であっても、抽出される低極性マトリックス量は少なく、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作は不要と判断し、採用しなかった。

参考までに、アセトニトリル/ヘキサン分配の適用性について、検討結果等を以下に記載した。

牛の脂肪をエタノール及び水 (9 : 1) 混液で抽出し、抽出液を 100 mL に定容後、

10 mL を採った。ロータリーエバポレーターを用いた濃縮・溶媒除去後、残留物にジエチルスチルベストロールもしくはグルクロン酸抱合体を添加した。これに、*n*-ヘキサン 20 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出した。アセトニトリル層を濃縮・溶媒除去後、酵素加水分解を行い、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に転溶した結果、ジエチルスチルベストロールについては良好な回収率が得られたものの、グルクロン酸抱合体については全く回収が得られなかった。一方、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルの代わりにアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液を用いて同様の検討を行った場合、ジエチルスチルベストロール及びグルクロン酸抱合体ともに良好な回収率が得られた。

上記の結果から、グルクロン酸抱合体は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルに溶解し難く、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配を実施する必要がある場合には、含水アセトニトリル及び *n*-ヘキサンを用いる必要があると考えられた。

9. 添加回収試験

検討食品は、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、さけ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ）の合計 8 食品を選択した。

上記の食品に、

① ジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキセストロール
もしくは、

② グルクロン酸抱合体

を 0.0005 mg/kg 相当（②のグルクロン酸抱合体については、ジエチルスチルベストロールとしての濃度）となるように標準溶液をそれぞれ添加、攪拌後、室温で 30 分間放置し、「[実験方法] 6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い、添加回収試験を実施した。

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、標準溶液を加えて攪拌後、-30℃で約 30 分間放置して再固化させたものを用いた。

結果を表 7（選択性）及び表 8（真度、精度、定量限界）に示した。

1) 選択性

ジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキセストロールについて、検討した全ての食品（8 食品）において選択性に問題はなかった。

なお、グルクロン酸抱合体については、加水分解により生成したジエチルスチルベストロールを測定するため、ジエチルスチルベストロールの評価と同様であることから、評価を実施しなかった。

2) 真度及び精度

各検討対象化合物の真度及び併行精度（カッコ内に記載）は、以下の通りであった。

- ・ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237)
86%～101% (2.1%～6.8%)
- ・グルクロン酸抱合体（添加：グルクロン酸抱合体、測定：ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237))
76%～91% (2.7%～7.3%)
- ・ジエネストロール (m/z 265→93)
75%～97% (1.7%～4.5%)
- ・ヘキセストロール (m/z 269→119)
82%～107 (2.5%～5.8%)

上記の結果から、全ての検討対象化合物について真度及び併行精度の目標値（真度 70%～120%の範囲内、併行精度 30 RSD%未満）を満足することが確認された。

3) 定量限界

表 8 に示される通り、添加回収試験溶液中の各検討対象化合物のピークは $S/N \geq 10$ の目標値を満足していた。

- ・ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237)
S/N 57～396
- ・グルクロン酸抱合体（添加：グルクロン酸抱合体、測定：ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237))

S/N 45~326

- ・ ジエネストロール (m/z 265→93)

S/N 95~330

- ・ ヘキセストロール (m/z 269→119)

S/N 33~362

また、上記 2)の項に記載した通り、真度及び精度についても目標値(真度 70%~120%の範囲内、併行精度 30 RSD%未満)を満足していたことから、各検討対象化合物について 0.0005 mg/kg (グルクロン酸抱合体については、ジエチルスチルベストロールとして)の定量限界を設定可能であることが示された。

10. 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 9 に示した。

各検討対象化合物のピーク面積比(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。

- ・ ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237)

1.02~1.06

- ・ ジエネストロール (m/z 265→93)

0.94~1.05

- ・ ヘキセストロール (m/z 269→119)

0.95~1.09

なお、グルクロン酸抱合体については、加水分解により生成したジエチルスチルベストロールを測定するため、ジエチルスチルベストロールの評価と同様であることから、評価を実施しなかった。

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。

1 1. 結論

畜水産物中のジエチルスチルベストロール試験法として、分析対象化合物（グルクロン酸抱合体を含む）を試料からエタノール及び水（9：1）混液で抽出した後、グルクロン酸抱合体を β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼで加水分解してジエチルスチルベストロールに変換し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：1）混液に転溶、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で精製、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

また、ジエチルスチルベストロールと類似構造を有するジエネストロール及びヘキセストロールに対して、開発した試験法の適用性を検討した。

開発した試験法を用いて、畜水産食品 8 食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、さけ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ）を対象に添加回収試験を実施した結果、

- ・ 選択性

ジエチルスチルベストロール、ジエネストロール及びヘキセストロールについて、全ての検討食品で良好な選択性が得られた。（グルクロン酸抱合体については、ジエチルスチルベストロールと同様であることから、評価未実施。）

- ・ 真度及び精度

全ての検討対象化合物と全ての検討対象食品の組み合わせにおいて、真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・ 定量限界

添加回収試験における真度、精度及び得られたピークの S/N から、ジエチルスチルベストロール、グルクロン酸抱合体（ジエチルスチルベストロールとして）、ジエネストロール及びヘキセストロールについて 0.0005 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、本報告で検討開発した方法は、ジエチルスチルベストロールの告示試験法（改良法）として必要な性能を有しており、また、現行告示試験法よりも迅速な方法であることから、より効率的な検査体制の確立に資するものと考えられた。

なお、海外の文献では、ジエチルスチルベストロールは分析操作中に *trans* 体から *cis* 体に変換する場合があることが報告されているが（*Food Chemistry*, 140 (2013) 44-51）、本検討で開発した方法においては、分析操作中の *trans* 体から *cis* 体への変換はほとんど無いことが示された。

一方、生体内における代謝等により、投与されたジエチルスチルベストロールが *cis* 体に変換され、結果として検体中に *cis* 体が存在する可能性は否定できない。

ジエチルスチルベストロールについては、「ジエチルスチルベストロールに関する参考情報（本報告書 p.5）」に記載した情報などから、ジエチルスチルベストロールの規制対象物質としてはジエチルスチルベストロール（*trans* 体）が適切であると考えられる。現状では *cis* 体の標準品が無いため本試験法を用いて *cis* 体を精確に定量可能であるかについては判断できないが、上述の通り検体中に *cis* 体が存在する可能性を否定できないことから、*cis* 体が検出された場合には「*trans* 体と *cis* 体のピーク面積値の和からジエチルスチルベストロールの含有量を求める」取扱いが適切であると考えられる。

表 7-1 選択性の評価 (ジエチルスチルベストロール)

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	ジエチルスチルベストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	2668	0	○
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	2919	0	○
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3838	0	○
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3191	0	○
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3191	0	○
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3366	0	○
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	2919	0	○
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3632	0	○

表 7-2 選択性の評価 (ジエネストロール)

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	ジエネストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	5335	0	○
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	5900	0	○
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	6890	0	○
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	6363	0	○
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	6363	0	○
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	5995	0	○
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	5900	0	○
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	7017	0	○

表 7-3 選択性の評価 (ヘキサエストロール)

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	ヘキサエストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3297	0	○
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3558	0	○
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	4503	0	○
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3830	0	○
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3830	0	○
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3831	0	○
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	3558	0	○
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	4100	0	○

表 8-1 真度、精度及び定量限界 (ジエチルスチルベストロール)

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	ジエチルスチルベストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		5791909	-111	0.9968	100	92	102	95	96	97	3.9	181	288	235
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005		6228446	-74	0.9979	86	87	94	91	87	89	4.1	129	204	167
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005		7107680	199	0.9993	89	82	90	90	82	87	4.6	137	304	221
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005		6436823	-4	0.9993	100	99	98	103	101	2.1	171	278	225	
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005		6436823	-4	0.9993	93	95	92	87	87	91	3.8	180	396	288
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005		6901589	-164	0.9986	90	86	89	85	90	88	2.8	142	257	200
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005		6228446	-74	0.9979	94	88	95	83	87	89	5.8	90	167	129
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005		7004617	27	0.9986	85	80	81	93	91	86	6.8	57	85	71

表 8-2 真度、精度及び定量限界 (グルクロン酸抱合体)

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	ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		5791909	-111	0.9968	80	77	75	89	82	80	6.6	157	213	185
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005		6228446	-74	0.9979	76	75	75	83	78	77	4.2	112	188	160
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005		7107680	199	0.9993	99	89	85	91	84	90	6.7	128	237	183
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005		6436823	-4	0.9993	93	95	92	87	87	91	3.8	178	228	203
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005		6436823	-4	0.9993	80	79	81	87	85	82	3.9	114	326	220
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005		6901589	-164	0.9986	87	73	74	83	82	80	7.3	117	221	169
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005		6228446	-74	0.9979	73	78	82	77	70	76	6.1	62	134	98
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005		7004617	27	0.9986	80	80	79	84	78	80	2.7	45	60	53

表 8-3 真度、精度及び定量限界 (ジエネストロール)

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	ジエネストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		11104343	-187	0.9993	92	100	94	97	100	96	3.9	251	326	289
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005		12002011	-225	0.9963	95	93	92	95	95	94	1.7	194	246	220
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005		13982309	-80	0.9995	82	91	86	91	85	87	4.4	147	334	241
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005		12904989	-18	0.9989	97	91	98	97	101	97	3.8	237	311	274
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005		12904989	-18	0.9989	88	100	93	93	97	94	4.5	232	330	281
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005		11755109	26	0.9986	95	88	90	86	87	89	3.8	168	246	207
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005		12002011	-225	0.9963	94	94	94	98	96	95	1.8	155	190	173
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005		13725987	24	0.9994	73	74	74	77	78	75	3.0	95	171	133

表 8-4 真度、精度及び定量限界 (ヘキサストロール)

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	ヘキサストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005		6804457	-167	0.9981	104	109	111	106	103	107	3.2	173	322	248
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005		6989920	107	0.9980	94	97	101	93	103	98	4.6	177	244	211
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005		8986011	22	0.9996	82	82	91	83	91	86	5.6	122	246	184
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005		7597291	47	0.9997	101	99	105	99	100	101	2.5	158	224	191
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005		7597291	47	0.9997	98	98	101	102	96	99	2.6	212	362	287
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005		7574320	-2	0.9996	92	91	86	83	95	89	5.4	150	228	189
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005		6989920	107	0.9980	96	111	102	104	97	102	5.8	132	188	160
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005		7960251	155	0.9998	79	78	83	81	89	82	5.4	33	72	53

表 9-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (ジエチルスチルベストール)

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	ジエチルスチルベストール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	2873	2748	2810	2668	2721	2694	1.04
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3172	3129	3151	2919	3027	2973	1.06
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	4011	4181	4096	3838	4037	3938	1.04
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3430	3328	3379	3191	3292	3241	1.04
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3343	3449	3396	3191	3292	3241	1.05
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3570	3360	3465	3366	3292	3329	1.04
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3001	3286	3144	2919	3027	2973	1.06
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3716	3678	3697	3632	3607	3620	1.02

表 9-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (ジエネストール)

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	ジエネストール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	5465	5566	5516	5335	5216	5275	1.05
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	5596	5565	5581	5900	5934	5917	0.94
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	6943	6825	6884	6890	6886	6888	1.00
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	6363	6497	6430	6363	6644	6504	0.99
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	6499	6310	6405	6363	6644	6504	0.98
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	5869	5986	5928	5995	5933	5964	0.99
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	5924	5689	5796	5900	5934	5917	0.98
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	6708	6833	6770	7017	6972	6994	0.97

表 9-3 測定の際の試料マトリックスの影響 (ヘキサストロール)

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	ヘキサストロール	牛の筋肉	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3778	3759	3768	3297	3624	3460	1.09
2		牛の脂肪	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3543	3425	3484	3558	3809	3684	0.95
3		牛の肝臓	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	4397	4314	4356	4503	4529	4516	0.96
4		牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3990	3993	3992	3830	4009	3919	1.02
5		鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3999	4021	4010	3830	4009	3919	1.02
6		さけ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3720	3798	3759	3831	3874	3852	0.98
7		じじみ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	3596	3717	3657	3558	3809	3684	0.99
8		はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	面積	0	4037	3812	3924	4100	4072	4086	0.96

図 7-1 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (牛の筋肉)

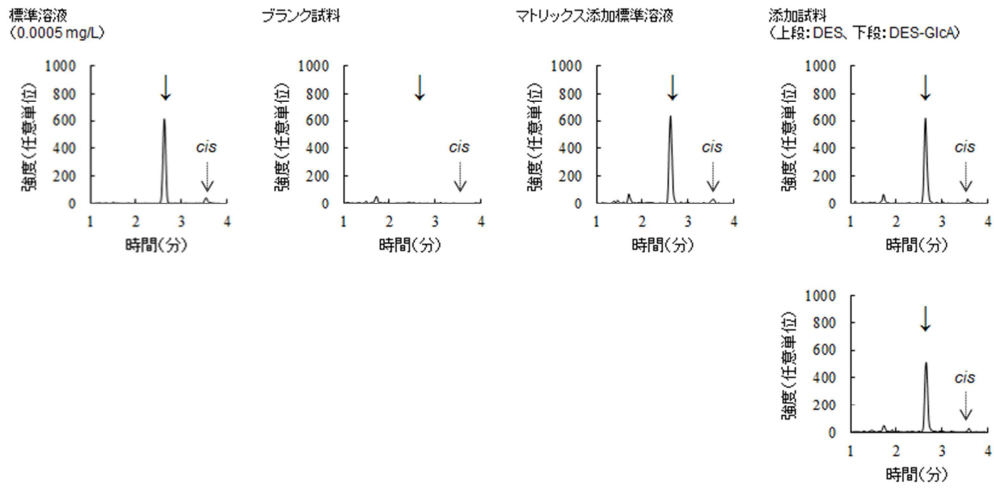


図 7-2 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (牛の脂肪)

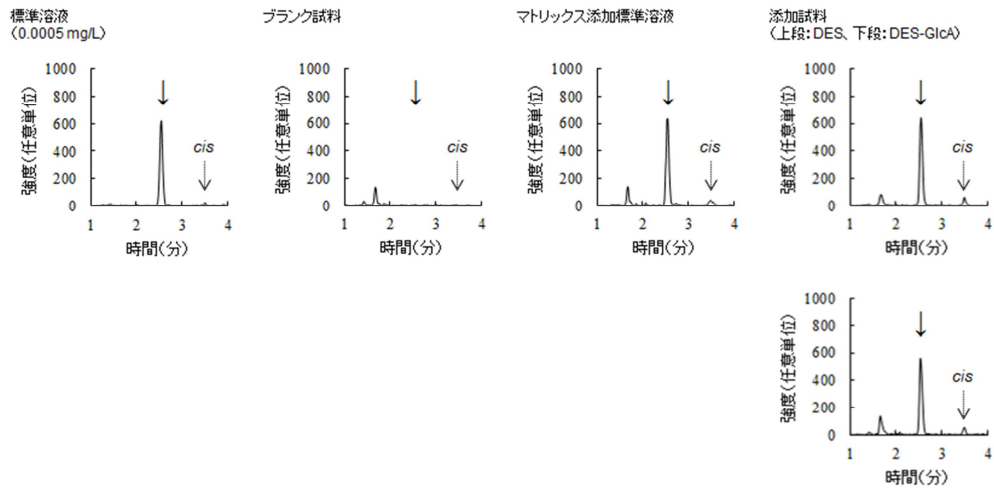


図 7-3 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (牛の肝臓)

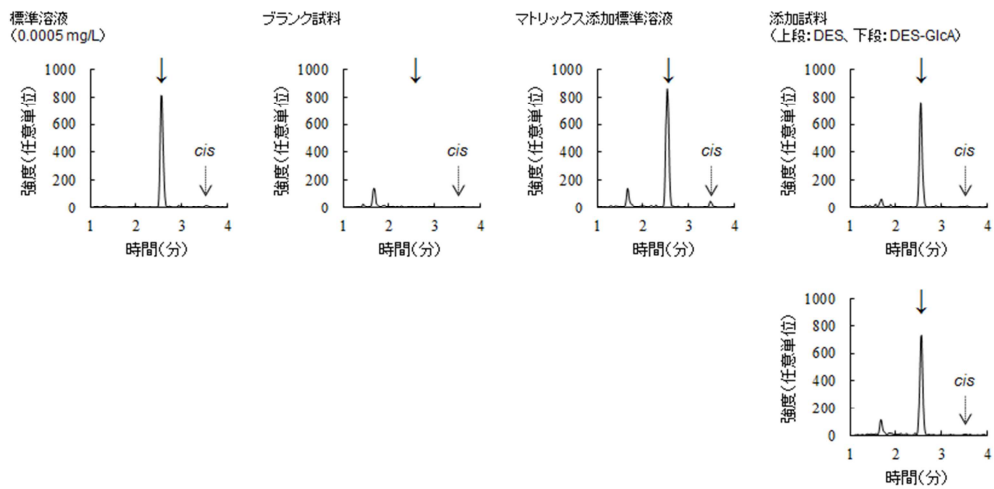


図 7-4 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (牛乳)

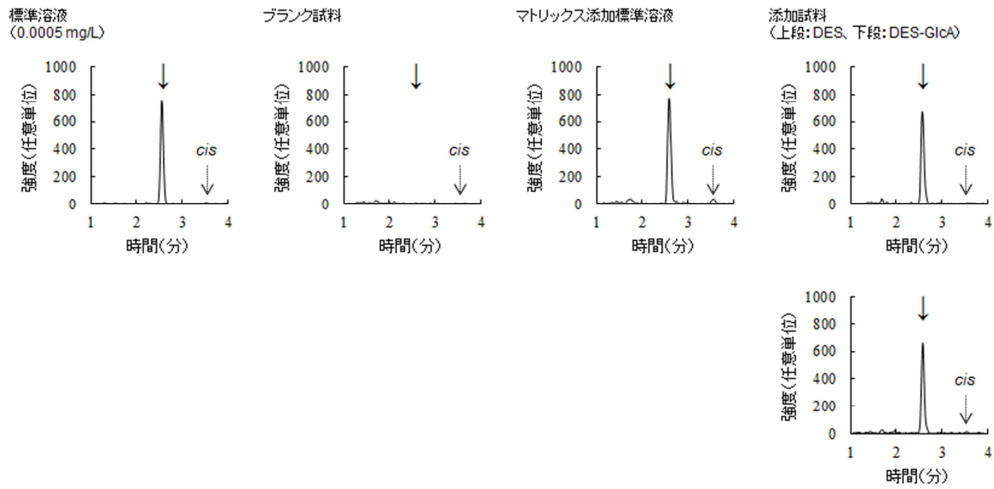


図 7-5 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (鶏卵)

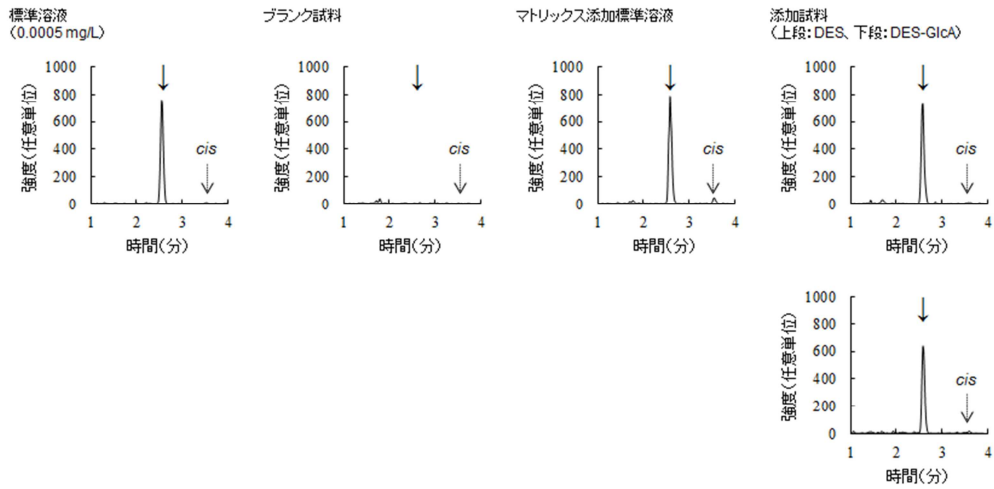


図 7-6 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (さけ)

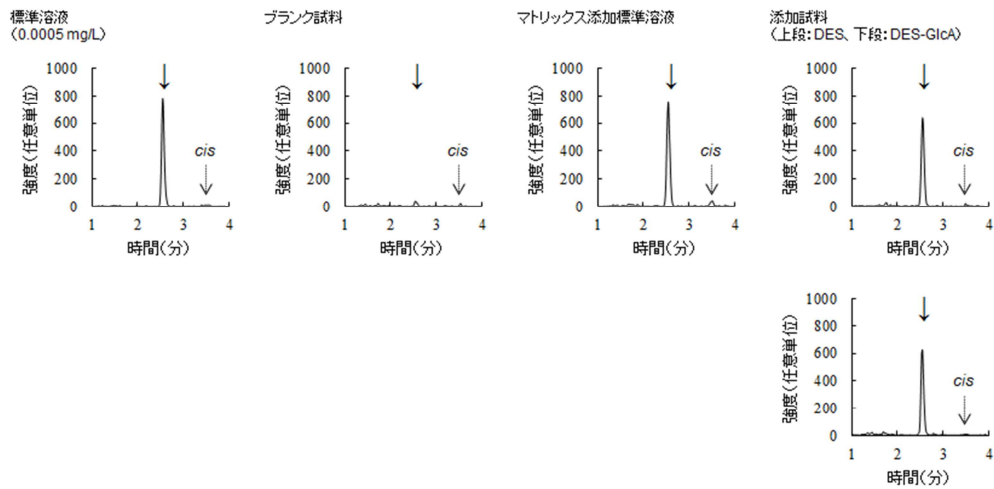


図 7-7 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (しじみ)

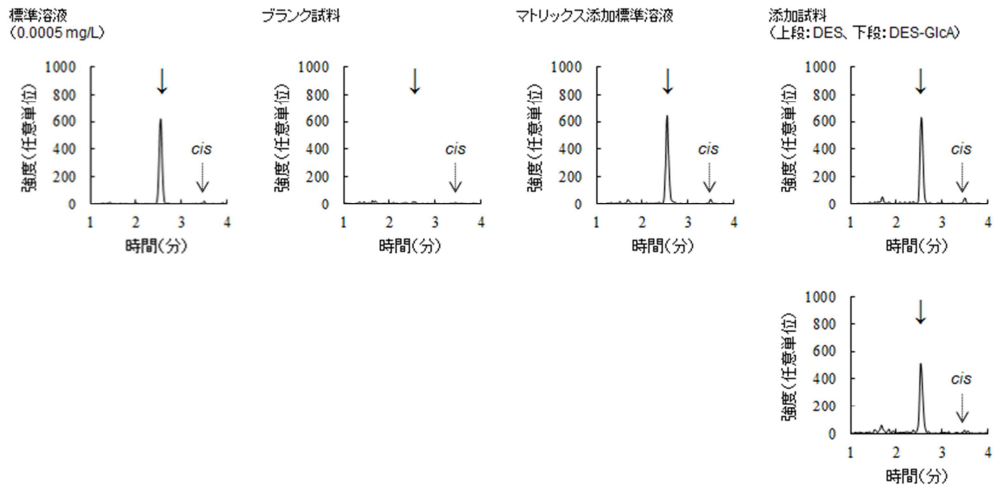


図 7-8 ジエチルスチルベストロール (m/z 267→237) のクロマトグラム (はちみつ)

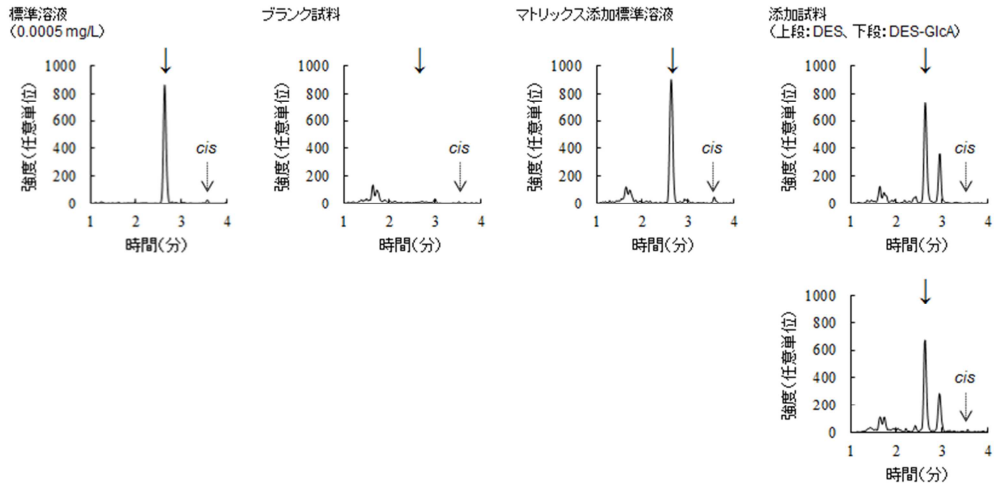


図 8-1 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (牛の筋肉)

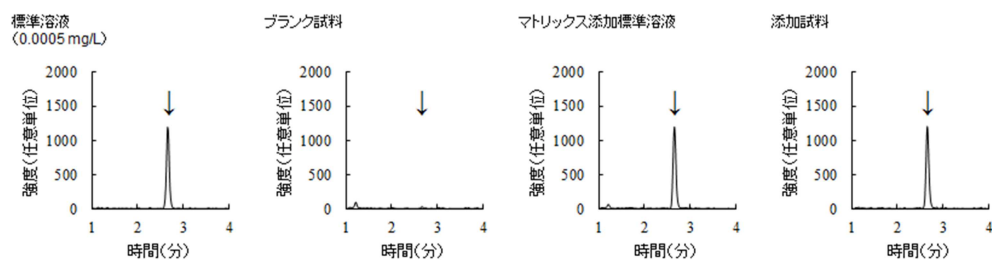


図 8-2 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (牛の脂肪)

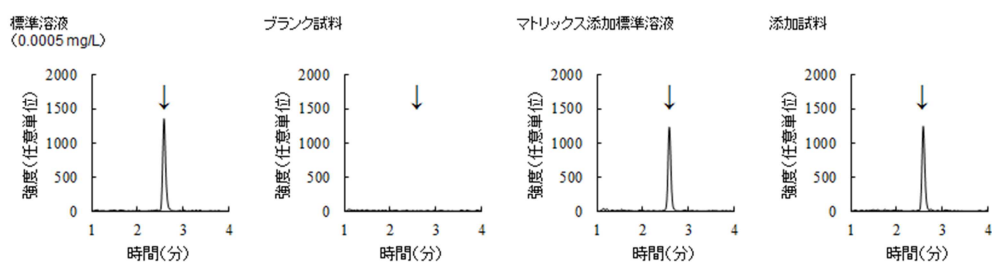


図 8-3 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (牛の肝臓)

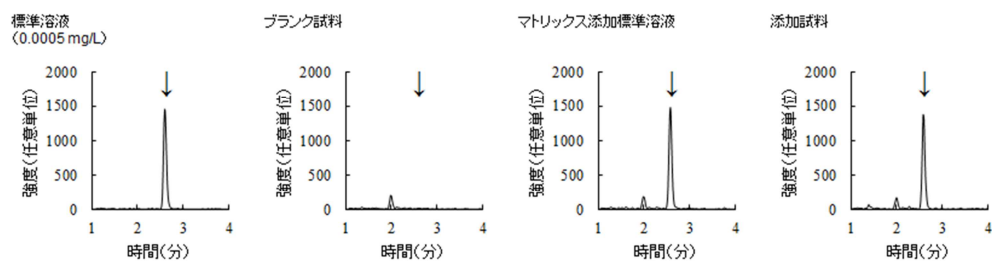


図 8-4 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (牛乳)

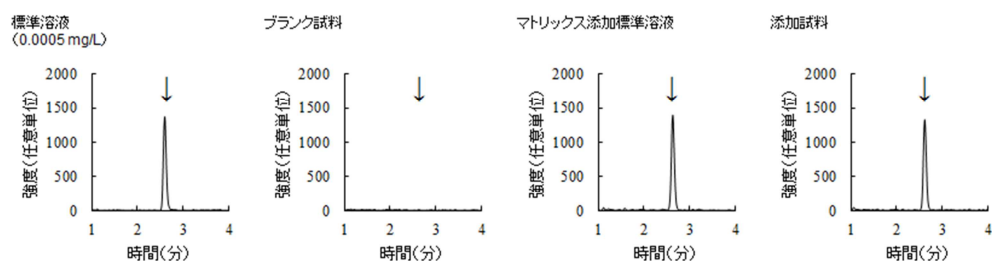


図 8-5 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (鶏卵)

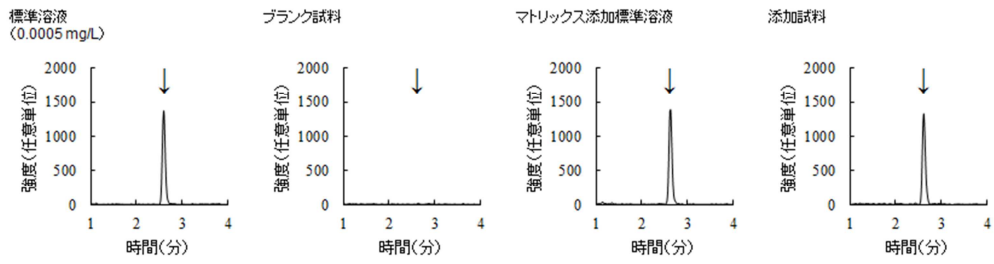


図 8-6 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (さけ)

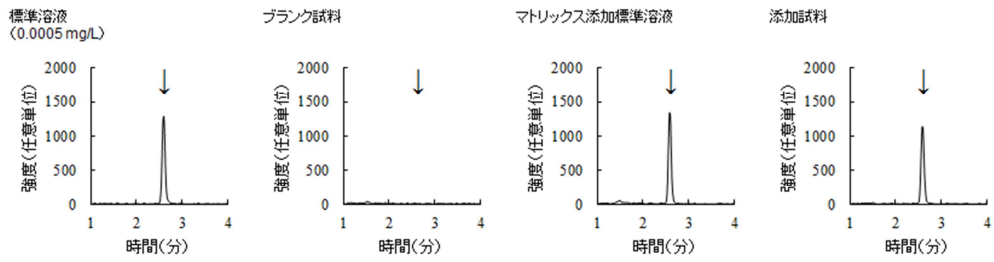


図 8-7 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (しじみ)

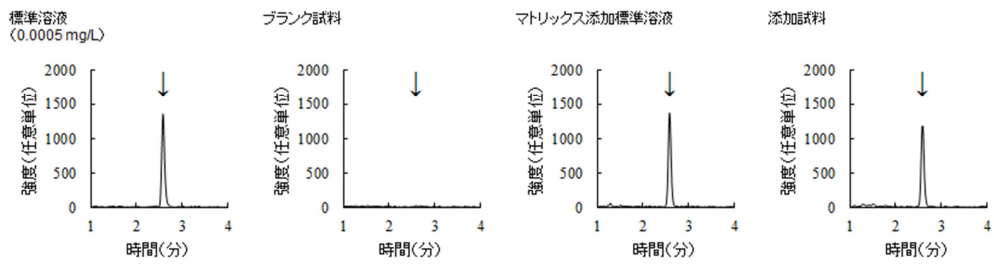


図 8-8 ジエネストロール (m/z 265→93) のクロマトグラム (はちみつ)

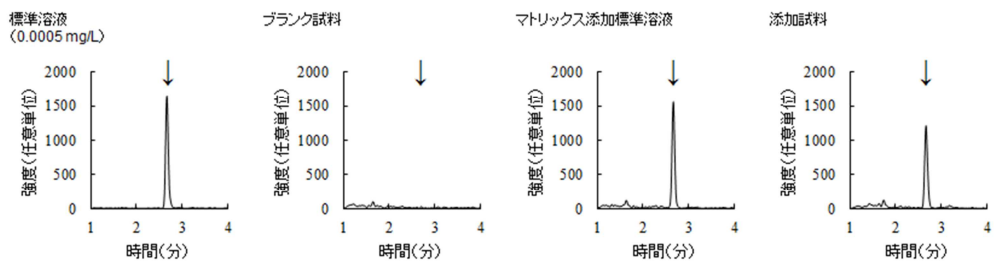


図 9-1 ヘキサステロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (牛の筋肉)

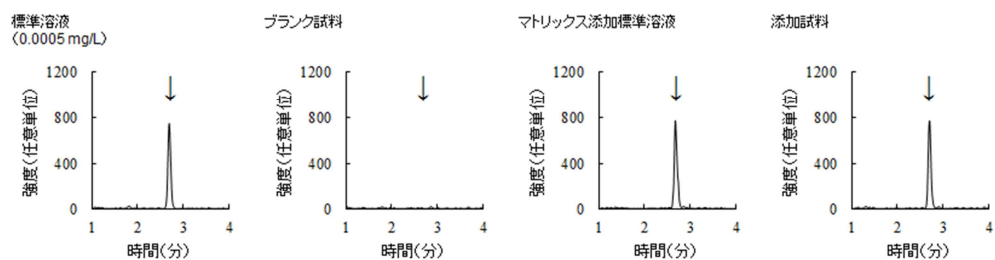


図 9-2 ヘキサステロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (牛の脂肪)

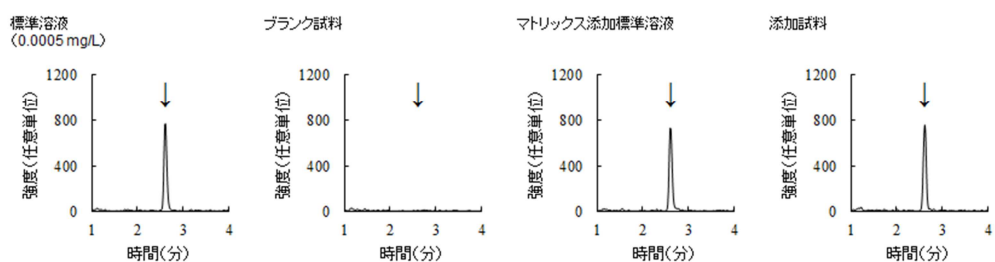


図 9-3 ヘキサステロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (牛の肝臓)

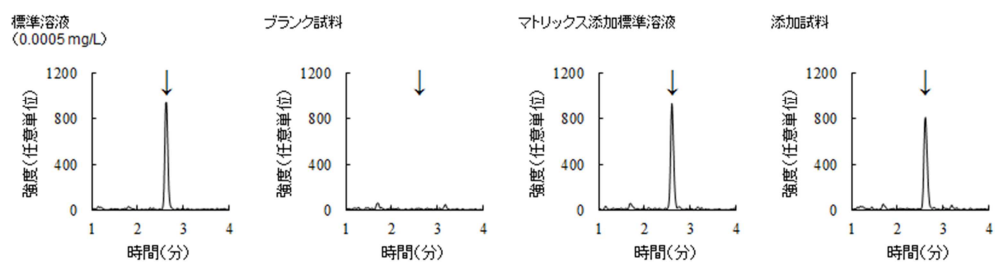


図 9-4 ヘキサステロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (牛乳)

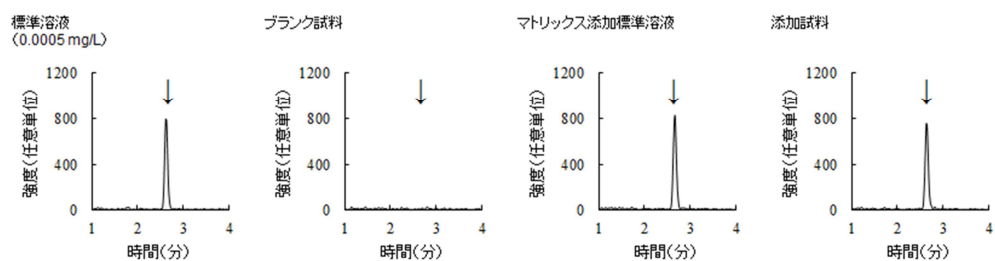


図 9-5 ヘキサストロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (鶏卵)

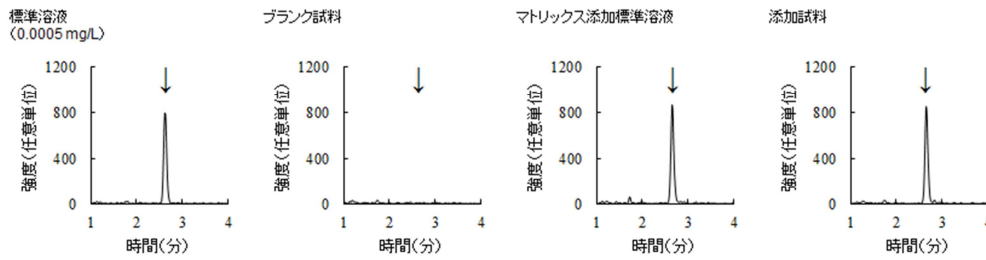


図 9-6 ヘキサストロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (さけ)

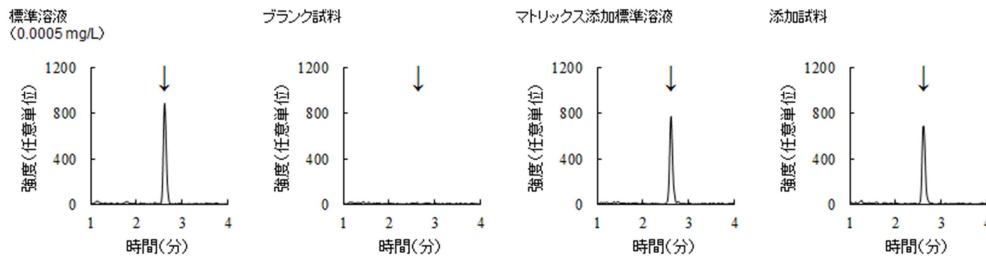


図 9-7 ヘキサストロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (しじみ)

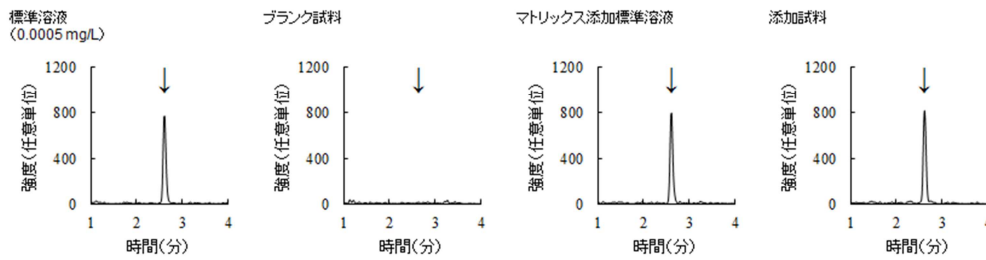


図 9-8 ヘキサストロール定量イオン (m/z 269→119) のクロマトグラム (はちみつ)

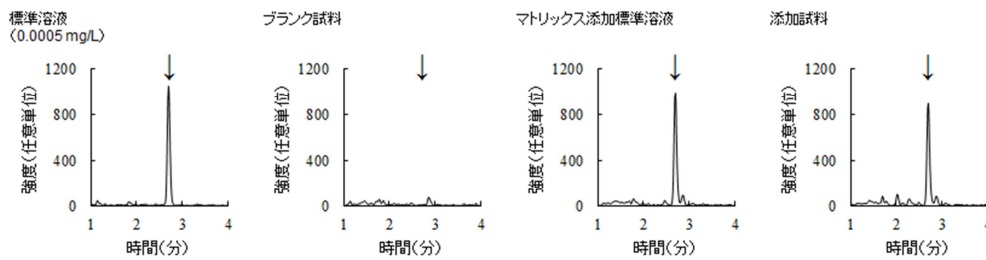


図 10 トータルイオンクロマトグラム (m/z 200~300、DP -80)

図 10-1 牛の筋肉

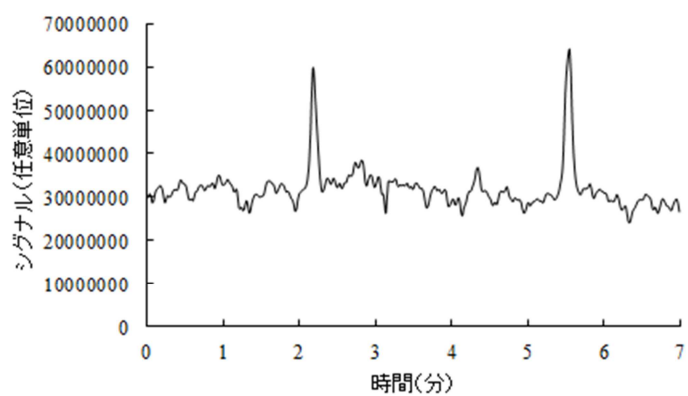


図 10-2 牛の脂肪

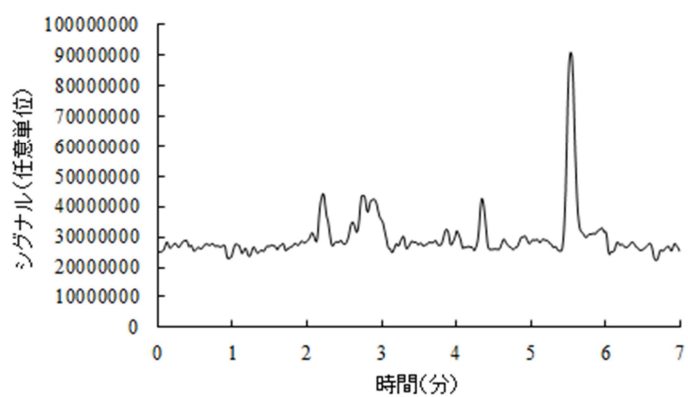


図 10-3 牛の肝臓

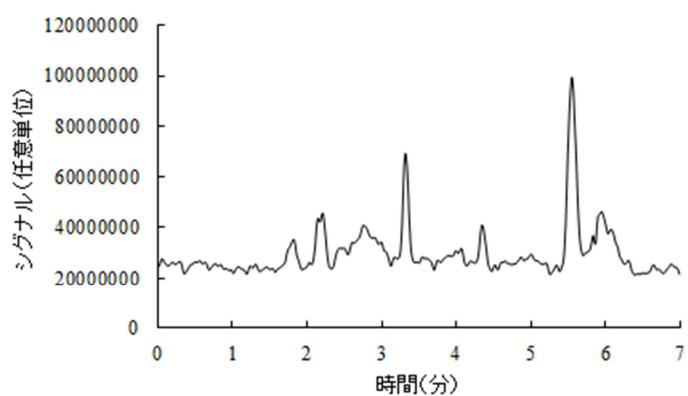


図 10-4 牛乳

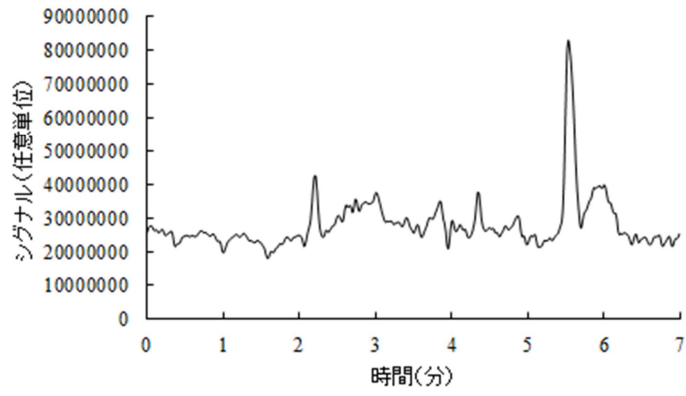


図 10-5 鶏卵

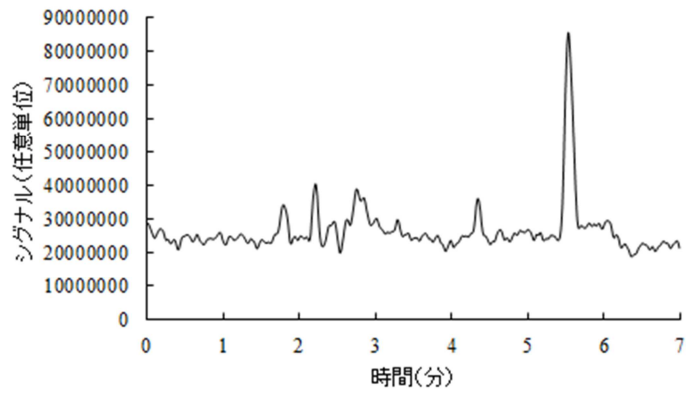


図 10-6 さけ

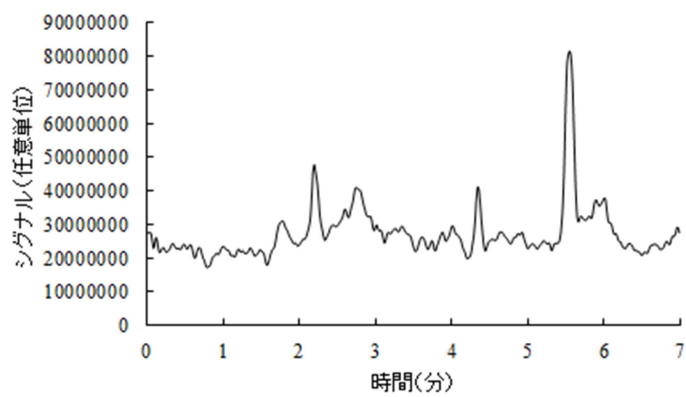


図 10-7 しじみ

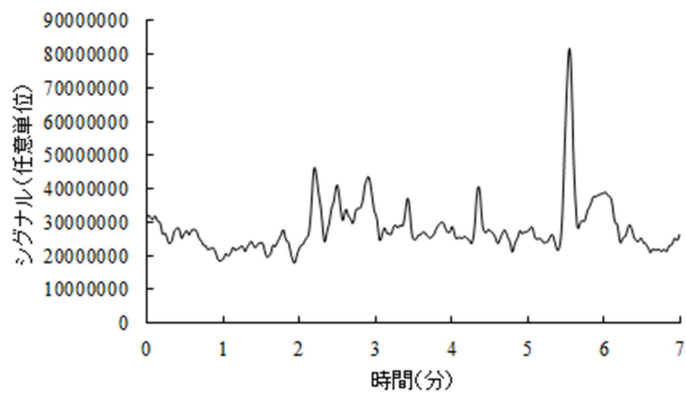


図 10-8 はちみつ

