

ジエチルスチルベストロール試験法

ジエチルスチルベストロール及びジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体を分析対象とする。

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。

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。

エタノール 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。

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 (1,000mg) 内径 12 ~ 13mm のポリエチレン製のカラム管に、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル 1,000mg 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。

β -グルクロニダーゼ溶液 *Helix pomatia* 由来の β -グルクロニダーゼ 100,000 単位/ml を含む。本品の 1 単位は、フェノールフタレイン β -D-グルクロニドを基質として、pH5.0、37 ~ 38 °Cにおいて 1 時間に 1.0 μ g のフェノールフタレインを生成する酵素量とする。又はこれと同等の酵素活性を有するものを用いる。なお、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。

0.1mol / l 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.0)

第1液：酢酸ナトリウム 0.82 g を量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。

第2液：酢酸 0.60 g を量り、水を加えて正確に 100ml とする。

第1液に第2液を加えて混和し、pH を 5.0 に調整する。

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。

3. 標準品

ジエチルスチルベストロール 本品はジエチルスチルベストロール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

試料10.0 g を量り採り、エタノール及び水の混液 (9 : 1) 50ml を加えて細切均一化し、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の混液 (9 : 1) 30ml を加えて細切均一化し、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、エタノール及び水の混液 (9 : 1) を加えて正確に100ml とする。この溶液から正確に10 ml を採り、40°C以下で約 5 ml まで濃縮する。この溶液に0.1mol / l 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.0) 10ml を加えて攪拌する。

b 加水分解

a 抽出法で得られた溶液に β -グルクロニダーゼ溶液0.1ml を加えて攪拌後、37°Cで軽く振

とうしながら1時間放置する。次いで、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(3:1)10mlずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物に酢酸エチル2mlを加えて溶かす。

c 精製法

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(1,000mg)に酢酸エチル5mlを注入し、流出液は捨てる。このカラムにb 加水分解で得られた溶液を注入した後、更に酢酸エチル10mlを注入し、流出液は捨てる。次いで、エタノール及び酢酸エチルの混液(1:9)10mlを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水の混液(1:1)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

ジエチルスチルベストロール標準品のアセトニトリル及び水の混液(1:1)の溶液を数点調製し、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、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.0005mg/kgに相当する試験溶液中の濃度は0.0005mg/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ジエチルスチルベストロールの定量を行う。

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

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル 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: アセトニトリル及び2mmol/l酢酸アンモニウム溶液の混液(3:2)

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法 ネガティブイオンモード

主なイオン(m/z): プリカーサーイオン267、プロダクトイオン237、222

注入量: 5µl

保持時間の目安: 3分