

Ⅱ. 分担研究報告

1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立 と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤) 静夏

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長

研究要旨

牛肉をEUへ輸出する際には動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。ステロイド類やスチルベン類等の禁止・未承認物質(A物質)は牛尿等の検査が必要である。また、輸出先であるEUで行われる検査で牛肉からA物質が検出された場合には、我が国でも牛肉の検査を実施し、原因調査が必要となる。本研究ではEU向けに動物性食品を輸出する際に求められるモニタリング検査やEUでの輸入時検査においてA物質が検出された場合に、その原因を調査するための分析法として、牛肉中のステロイド類分析法及びスチルベン類分析法を開発した。ステロイド類(17β-エストラジオール、17β-テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、α-トレンボロン、β-トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン)分析法として、試料からヘキサン飽和アセトニトリル抽出及びヘキサン洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を確立した。牛肉を用いて妥当性評価試験(添加濃度 0.5 µg/kg)を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。また、スチルベン類(ジエネストール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロール)分析法として、試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、β-グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を確立した。牛肉を用いて妥当性評価試験(添加濃度 0.5 µg/kg)を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、ステロイド類分析法、スチルベン類分析法のいずれも、牛肉中の残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者

田口貴章(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

近年、日本における少子高齢化による人口減少に伴い、国内の食料市場規模は縮小傾向にある。一方、世界的には人口増加や経済成長により食料需要の大幅な増加が予測されている。この状況に対応するため、日本の農林水産業においては、

農林水産物および食品の国際競争力を強化し、海外市場の獲得を図ることが喫緊の課題となっている。特に、輸出拡大に際しては、輸出先国の食品安全規制への適合が重要な要件となる。こうした背景を踏まえ、政府は2020年4月に「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」(令和元年法律第57号)を施行し、農林水産省を中心に「農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略」の下、輸出拡大の取り組みを推進している。

牛肉は海外市場での需要が増加しており、同戦略において輸出重点品目の一つに指定されてい

る。現在、日本産牛肉の主要輸出先は香港や台湾を含むアジア諸国であるが、食肉市場規模の大きい欧州連合 (EU) はさらなる輸出拡大が期待される地域である。牛肉等の動物性食品を EU へ輸出するには、欧州議会および理事会規則 (EU) 2017/625、欧州委員会委任規則 (EU) 2022/1644、および欧州委員会施行規則 (EU) 2022/1646 に準拠した残留物質モニタリング計画に基づき、動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。検査対象となる薬理活性物質は、禁止・未承認物質である A 物質 (スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシル酸ラクトン類、 β -作動薬等) と、使用が認可された B 物質 (抗菌性物質、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤等) に分類される。B 物質がモニタリング部位 (肝臓、腎臓等) から検出された場合は筋肉の追加検査を行い、基準値超過が確認されると原因調査が求められる。一方、A 物質がモニタリング部位 (尿、肝臓、腎臓等) から検出された場合は、原因究明と必要な措置の完了まで輸出が禁止される。また、輸出先である EU での検査で牛肉から A 物質が検出された場合には我が国においても検査を実施し、原因の調査が必要となる。

本研究では、モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合の分析法を開発し、迅速な輸出再開を可能とする体制の整備を目的とする。本年度は、EU での輸入時検査で牛肉から A 物質が検出された場合の原因調査のための分析法として、牛筋肉中のステロイド類 (8 化合物) 分析法およびスチルベン類 (3 化合物) 分析法を開発し、妥当性評価試験を実施した。

B. 研究方法

[1] ステロイド類 (エストラジオール、テストステロン、

エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン) 分析法

1. 試料

牛の筋肉は、インターネット経由で群馬県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリスサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

17 β -エストラジオール標準品：純度99.3%(関東化学製)

17 β -テストステロン標準品：純度99.6%(Sigma-Aldrich製)

エチニルエストラジオール標準品：純度99.7%(Sigma-Aldrich製)

酢酸メレンゲステロール標準品：純度98.1%(富士フィルム和光純薬製)

メチルテストステロン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

α -トレンボロン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

β -トレンボロン標準品：純度96.9%(林純薬工業製)

デキサメタゾン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

酢酸メドロキシプロゲステロン標準品：純度98.9%(Sigma-Aldrich製)

17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 ：純度99%(CDN Isotopes製)

17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 ：純度99%(CDN Isotopes製)

エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 ：純度97%(Toronto Research Chemicals製)

酢酸メレンゲステロール- d_3 ：純度99.50%(Toronto Research Chemicals製)

メチルテストステロン- d_3 : 純度98.4%(CDN Isotopes製)

[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロン: 純度95.5%(ALSACHIM製)

[$^2\text{H}_5$]- β -トレンボロン: 純度98.8%(ALSACHIM製)

デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 : 純度98.2%(CDN Isotopes製)

酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 : 純度97%(Toronto Research Chemicals製)

メタノール: LC-MS用(富士フイルム和光純薬製)
アセトニトリル、エタノール(95%)、ヘキサン、メタノール、炭酸水素アンモニウム: 特級(富士フイルム和光純薬製)

無水硫酸ナトリウム: 特級(キシダ化学製)

トルエン: 特級(関東化学製)

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

メンブランフィルター: PTFEシリンジフィルター(0.22 μm 、中部科学機器製)

ヘキサン飽和アセトニトリル: アセトニトリル400 mL及びヘキサン100 mLを混合し、5分間振とうを行った。放置後、分離したアセトニトリル層を分取した。
アセトニトリル及び水の混液(1:1): アセトニトリル500 mL及び水500 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(1:1): 水500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1): アセトニトリル45 mL及びトルエン15 mLを混合した。

1 mol/L炭酸水素アンモニウム溶液: 炭酸水素アンモニウム7.91 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。

0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液: 1 mol/L炭酸水素アンモニウム500 μL 及び水1000 mLを混合した。

標準原液: 17 β -エストラジオール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。17 β -テストステロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。エチニルエストラジオール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。酢酸メレンゲステロール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。メチルテストステロン標準品約10 mgを精秤し、エタノール(95%)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。 α -トレンボロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。 β -トレンボロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。デキサメタゾン標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。酢酸メドロキシプロゲステロン標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。

内標準原液: 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。10 mg容量の17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のエチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50 mg/L溶液を調製した。5 mg容量の酢酸メレンゲステロール- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。10 mg容量のメチルテストステロン- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロンをアセトニトリルで洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50 mg/L溶液を調製した。1

mg容量の $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロンをアセトニトリルで洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50 mg/L溶液を調製した。10 mg容量のデキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の酢酸メドロキシprogesteron- d_6 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - α -トレンボロン内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron- d_6 内標準原液をメタノール(特級)で希釈して1 mg/L混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V(東京理化学器械製)

遠心分離機：H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX

LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

4. 測定条件

Table 1に示した。

5. 定量

17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L溶液を調製した。17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - α -トレンボロン内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron- d_6 内標準原液をメタノール(特級)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。さらに、水及びメタノールの混液(1:1)で希釈し、0.1 mg/L溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈し、0.0005、0.001、0.002、0.0035及び0.005 mg/L(内標準溶液濃度0.01 mg/L)内標準混合標準溶液を調製した。この溶液5 μL をLC-MS/MSに注入して、得られた17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対する17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 のピーク面積に対する17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対するエチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール- d_3 のピーク面積に対する酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン- d_3 のピーク面積に対するメチルテストステロ

ン、 $[^2\text{H}_5]$ - α -トレンボロンのピーク面積に対する α -トレンボロン、 $[^2\text{H}_5]$ - β -トレンボロンのピーク面積に対する β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 のピーク面積に対するデキサメタゾン及び酢酸メドロキシprogesteron- d_6 のピーク面積に対する酢酸メドロキシprogesteronのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液5 μL をLC-MS/MSに注入し、検量線から内部標準法により17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシprogesteronの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料10 gに添加用標準溶液(0.1 mg/L)50 μL [メタノール(特級)]を添加し、30分間放置した。その後、添加用内標準溶液(1 mg/L)50 μL [メタノール(特級)]を添加した。

7. 試験溶液の調製

概要

17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシprogesteronを試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し、同時にヘキサンで洗浄を行った。その後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

分析法フローチャートを Fig 1 に示した。

7.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及びヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した後、さらに無水硫酸ナトリウム 20 g を加えホモジナイザーで攪

拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離し、上層を捨てた後、下層を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトニトリルで定容した。

7.2 精製

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) をグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したものに) 負荷し、溶出液を 50 mL 遠心管に受けた。次いで、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)10 mL で溶出し、先の遠心管に合わせた。全溶出液をなす形フラスコに移し、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残留溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(1:1)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残留溶媒を除去した。0.001 mg/L の 17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシprogesteron混合標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

[2] スチルベン類(ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキサステロール)分析法

1. 試料

牛の筋肉は、大阪府内の店舗で徳島県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリクサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ジエネストロール標準品：純度96.11%(LGC製)

ジエチルスチルベストロール標準品：純度99.9%(富士フイルム和光純薬製)

ヘキサステロール標準品：純度99.50%(LGC製)

ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体：純度95.2%(Toronto Research Chemicals製)

ジエネストロール- d_6 ：(WITEGA製)

[$^2\text{H}_8$]-ジエチルスチルベストロール：(ALSACHIM製)

ヘキサステロール- d_4 ：(Toronto Research Chemicals製)

メタノール、エタノール(99.5%)、酢酸エチル、ヘキササン、酢酸、酢酸ナトリウム三水和物：特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル：LC-MS用(関東化学製)

β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液：EC 3.2.1.31/EC 3.1.6.1(*Helix pomatia*由来、Roche製)

β -グルクロニダーゼ100000ユニット/mL及びアリルスルファターゼ800000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、pH4.5~5.0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 μg 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、pH6.2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 μg 遊離させる酵素量を1ユニットとする)。

親水性基修飾SDBミニカラム：EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL、Biotage製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus NH₂(360 mg、Waters製)

メンブランフィルター：Millex-LG(0.2 μm 、MILLIPORE製)

0.1 mol/L酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)：第1液：酢酸ナトリウム三水和物0.82 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。第2液：酢酸0.60 gを量り、水を加えて正確に100 mLとした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを5.0に調整した。

エタノール及び水の混液(9:1)：エタノール(99.5%)900 mL及び水100 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(1:1)：水500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(11:9)：水550 mL及びメタノール450 mLを混合した。

酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)：酢酸エチル900 mL及びメタノール100 mLを混合した。

水及び酢酸の混液(10000:1)：水1000 mL及び酢酸100 μL を混合した。

標準原液：ジエネストロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。ジエチルスチルベストロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。ヘキサステロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

内標準原液：ジエネストロール- d_6 約5 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の[$^2\text{H}_8$]-ジエチルスチルベストロールをメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して10 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のヘキサステロール- d_4

をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストール標準原液及びヘキサステロール標準原液をメタノールで希釈して5 mg/L溶液を調製し、さらに、水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して0.01 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストール内標準原液及びヘキサステロール- d_4 内標準原液をメタノールで希釈して1 mg/L溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V(東京理化学器械製)

遠心分離機：H-60R(コクサン製)

pH計：F-72(堀場アドバンスドテクノ)

振とう恒温水槽：BT101(ヤマト科学製)

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500 Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

装置	型式	メーカー
MS	Xevo TQ-XS	Waters
LC	ACQUITY Premier QSM	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

Triple Quad 5500 及び Triple Quad 6500+の測定

条件を Table 2、Xevo TQ-XS の測定条件を Table 3に示した。

5. 定量

ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストール標準原液及びヘキサステロール標準原液をメタノールで希釈して5 mg/L溶液を調製した。ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストール内標準原液及びヘキサステロール- d_4 内標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して 0.125、0.25、0.5、1.25 及び 2.5 $\mu\text{g/L}$ (内標準溶液濃度 1.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたジエネストロール- d_6 のピーク面積に対するジエネストロール、 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストールのピーク面積に対するジエチルスチルベストール及びヘキサステロール- d_4 のピーク面積に対するヘキサステロールのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によりジエネストロール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロールの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.01 mg/L)500 μL [水及びメタノールの混液(1:1)]及び添加用内標準溶液(0.1 mg/L)250 μL [水及びメタノールの混液(1:1)]を添加した。

7. 試験溶液の調製

概要

ジエネストロール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロールを試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、 β -グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム

及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

分析法フローチャートを Fig 2 に示した。

7.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、エタノール及び水の混液(9:1)50 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にエタノール及び水の混液(9:1)30 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、エタノール及び水の混液(9:1)で定容した。

7.2 加水分解反応

抽出液 5 mL(試料 0.5 g 相当)を 50 mL 容遠心管に分取し、0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 100 μ L を加え、37°Cの水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。

7.3 精製

反応液を親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの)に負荷した。遠心管内を 5 mL の水で洗い、洗液をカラムに負荷した。水及びメタノールの混液(11:9)5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。次いでヘキサン 5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したものを)を接続し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL で溶出した。溶出液をなす形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物を水及びメタノールの混液(1:1)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.25 μ g/L のジエネストール、ジエチルステルベストロール及びヘキサステロール混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 μ g/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

[1] ステロイド類(エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン)分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオールは ESI(-)モードで、その他の分析対象化合物は ESI(+)モードでの測定が可能であった。全測定対象成分の中で最もピーク強度が小さい17 β -エストラジオール、エチニルエストラジオール(他成分のピーク強度の 1/5 以下)の測定条件を最適化するように測定条件を検討した。酸性条件下では両物質ともに十分なピーク強度が得られなかったため、以下の中性～塩基性条件の水系移動相を検討した。

①0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH7 程度)

②0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH8 程度)

③0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH9.5 程度)

④水

⑤水及びアンモニア水の混液(1000:1)(pH10程度)

⑥0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液(pH7.5程度)

結果として、酢酸アンモニウムを使用した①②③は移動相の pH によらずいずれも十分なピーク強度が得られなかった。このことから、酢酸イオンが両物質の感度を低下させていると推測された。よって①②③は不採用とした。④が最も高いピーク強度を示し、次いで⑤⑥が同程度のピーク強度となった。ただし、④⑤は注入の再現性が悪く、測定中の感度変動も起こりやすかったため不採用とした。⑥は④にピーク強度は劣るが、比較的安定して測定することが可能であった。以上より、最も良好に両物質を測定できた⑥の 0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液を採用とした。なお、0.5 mmol/L より炭酸水素アンモニウム濃度を上げてもピーク強度の上昇は得られず、10 mmol/L 程度から逆に低下が確認されたため、濃度は 0.5 mmol/L とした。有機溶媒系移動相にはメタノールを用いた。

2. 試料前処理の検討

抽出法は酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びベタメタゾンの告示試験法^{1),2)}と同様に、試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出と同時にヘキサンの洗浄する方法とした。加えて、試料マトリックスの除去を目的としてミニカラムによる精製を検討した。

2.1 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び陰イオン交換ミニカラムを用いた精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep C18(1000 mg)及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep SAX/PSA(500 mg/500 mg)からそれぞれアセトニ

トリルで負荷、溶出した結果を Table 4 及び Table 5 に示した。いずれもアセトニトリル 30 mL で溶出が可能であった。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを連結し、アセトニトリル 30 mL で溶出すという試験設計が可能と考えられた。

2.2 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による精製

農薬一斉分析等で広く使用されている積層カラムであるグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムについても適用可能か検討することとした。まず、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ある InertSep PSA(1000 mg)を用いた順相条件での溶出が可能か検討した。アセトン及びヘキサンの混液(1:19)を用いて各測定対象成分をミニカラムに負荷し、アセトンの比率を上げて順次溶出した結果を Table 6 に示した。極性に大きく幅があるため、洗浄区を作ることは難しいと判断した。アセトン及びヘキサンの混液(1:1)でいずれの成分も概ね溶出可能であった。

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムである InertSep GC(300 mg)を用いた逆相条件での溶出が可能か検討した。各測定対象成分をメタノールでミニカラムに負荷した後、酢酸エチルで溶出した結果を Table 7 に、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)で負荷、溶出した結果を Table 8、アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で負荷、溶出した結果を Table 9 に示した。メタノール及び酢酸エチルでは一部の成分が溶出できなかったが、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)又はアセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で全成分溶出可能であった。なお、本検討ではアセトニトリル及びトルエンの混液比率は(7:3)を

用いたが、2.4の検討では、農薬一斉分析等で広く使用されているアセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)を用いることとした。

2.4 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製

2.2 及び 2.3 の検討結果から、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg)を用いた溶出が可能か検討した。濃縮操作を減らした簡便な精製法とするため、抽出液のアセトニトリル溶液 20 mL をカラムに負荷した後、溶出溶媒で溶出させる方法を検討した。各測定対象成分をアセトニトリル 20 mL でミニカラムに負荷した後、それぞれアセトン及びヘキサンの混液(1:1)20 mL で溶出した結果を Table 10、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)20 mL で溶出した結果を Table 11 に示した。いずれの混液でも全成分の溶出が可能であったが、より溶出力の強いアセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)を用いることとした。なお、アセトニトリルの溶出区に一部の成分が溶出したためアセトニトリル溶出区も合わせた全溶出液をとる方法とした。

2.1 及び 2.4 のいずれの方法でも精製が可能と考えられたが、2.4 は積層カラム 1 本のみで精製が可能であり、連結カラムを使用する 2.1 よりもより簡便な方法となったため、この方法を採用することとした。開発した試験法で牛の筋肉について試験を行った結果、3.3 より、ESI(+)モードで測定する成分は試料由来のマトリックスの影響を受けていたが、内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であったため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、

クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった。

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を Table 12 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた 17 β -エストラジオール-2,4,16,16-*d*₄、17 β -テストステロン-16,16,17-*d*₃、エチニルエストラジオール-2,4,16,16-*d*₄、酢酸メレンゲステロール-*d*₃、メチルテストステロン-*d*₃、[²H₅]- α -トレンボロン、[²H₅]- β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6,21,21-*d*₄ 及び酢酸メドロキシプロゲステロン-*d*₆の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を Table 13 に示した。添加回収試験における回収率 100%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の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、17 β -エストラジオールで 1.01、17 β -テストステロンで 0.65、エチニルエストラジオールで 0.98、酢酸メレンゲステロールで 0.63、メチルテストステロンで 0.61、 α -トレンボロンで 0.66、 β -トレンボロンで 0.72、デキサメタゾンで 0.64、酢酸メドロキシプロゲステロンで 0.66 であった。以上のことから、本法では 17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオール以外の分析対象化合物は試料由来のマトリックスの影響を受けていると考えられた。

3.4 検量線の直線性

0.0005~0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.992$ となり、良好な直線性が得られた。

3.5 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られた

ピークは $S/N \geq 10$ であった。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$)として妥当であることが示された。

[2] スチルベン類(ジエネストール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロール)分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

告示試験法^{3,4)}においては水系移動相に $2 \text{ mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウム溶液を用いているが、より S/N が良好であった水及び酢酸の混液(10000:1)を選択した。分離カラムについては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・検討したが、ジエチルスチルベストールとマトリクス由来の妨害ピークとの分離が不十分であったため、アダマンチル基を有し、ODSカラムとは異なる分離を示す CAPCELL CORE ADME(内径 2.1 mm 、長さ 150 mm 、粒子径 $2.7 \mu\text{m}$)を選択した。

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

告示試験法開発の報告書⁴⁾において、濃縮操作条件によってはジエチルスチルベストールの回収率の低下が確認されている。告示試験法では抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 10 mL 分取し、約 5 mL まで減圧濃縮した後、加水分解操作を行っているが、濃縮によるジエチルスチルベストールの回収率の低下に注意する必要がある。そこで抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 5 mL 分取し濃縮せずに加水分解操作を行うために、エタノール共存下における酵素加水分解について以下の方法で検討した。

ジエチルスチルベストールグルクロン酸抱合体 25 ng (ジエチルスチルベストールとして約 15 ng 相当)及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストール 25 ng を添加したエタノール及び水の混液(9:1) 5 mL に $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0) 10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C の水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。また比較対照として、ジエチルスチルベストールグルクロン酸抱合体及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストールを同濃度添加したエタノール及び水の混液(9:1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した後、 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0) 10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C の水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。各加水分解後の溶液は、7. 試験溶液の調製の項の 7.3 精製の操作を行いジエチルスチルベストールの回収率を求めた。

その結果、ジエチルスチルベストールとしての回収率は、エタノール及び水の混液(9:1)を 5 mL 分取した場合(エタノール 4.5 mL 共存): 94.5% 、エタノール及び水の混液(9:1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した場合(エタノール約 4 mL 共存): 93.4% であり、 4.5 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ないことが確認された。なお、各点は試行数 2 で行い、平均値を用いた。

2.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

告示試験法において加水分解反応液を有機溶媒に転溶させ、減圧濃縮した後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製を行っているが、減圧濃縮操作を避けるため、加水分解反応液をそのまま固相カラムに注入し精製を行う試験設計を検討した。

親水性ポリマーベース固相カラムであるジビニ

ルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB(150 mg/6 mL)]及び親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめヘキサン 5 mL、水及びメタノールの混液 (11:9)5 mL 及び水 5 mL で洗浄したものにジエネ ストロール、ジェチルスチルベストール及びヘキ セステロールを各 0.0125 µg、ジエネストール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘキセステ ロール-*d*₄を各 0.0125 µg 供した。水及びメタノール の混液(11:9)及びヘキサンにて洗浄を行った後、 各カラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲ ルミニカラム[Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじ め酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で 洗浄したものを)を連結し、酢酸エチル及びメタノー ルの混液(9:1)で溶出した。

結果を Table 14 に示した。いずれの固相カラム も洗浄液[水及びメタノールの混液(11:9)5 mL また はヘキサン 5 mL]では溶出せず、酢酸エチル及び メタノールの混液(9:1)15 mL までにほぼ 90%以上 が溶出された。

次に、牛の筋肉にジエネストール、ジェチルス チルベストール、ヘキセステロール、ジエネストロ ール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘ キセステロール-*d*₄ を添加して、抽出、加水分解反 応後に同様にカラム精製を行った。

結果を Table 15 に示した。試料マトリックス存在 下では親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN (150 mg/6 mL)]を用いた場合の方がより良好 な内標準物質回収率が得られた。なお、マトリッ クス存在下で分析操作中にジェチルスチルベストールの *trans* 体から *cis* 体への異性化が確認され たことから、内標準物質を用いて補正を行うこととし た。またアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)]を省いた場合、試験 溶液に濁りがみられサプレッションが大きくなった。

以上の結果より、親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]とアミノプロピルシ リル化シリカゲルミニカラム[Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)]の連結カラムによる精製方法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、 クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出さ れなかった。

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を Table 16 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度 の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未 満)を満たした。

また、内標準物質として用いたジエネストール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘキセステ ロール-*d*₄ の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討し た結果を Table 17 に示した。添加回収試験におけ る回収率 100%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の溶媒標準溶液に対するピー ク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、 ジエネストールで 0.99、ジェチルスチルベストール で 1.04、ヘキセステロールで 0.96 であった。 以上のことから、本法は試料由来のマトリックスの 影響をほとんど受けずに測定することが可能と考 えられた。

3.4 検量線の直線性

0.125~2.5 µg/L の範囲で検量線を作成した。 決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られ た。

3.5 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られ たピークは $S/N \geq 10$ であった。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

D. 結論

牛の筋肉中のステロイド類分析法として、試料からヘキササン飽和アセトニトリル抽出及びヘキササン洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。また、スチルベン類分析法として、試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、β-グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、いずれの分析法も牛の筋肉中の残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

[参考文献]

- 1) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“酢酸トレンボロン試験法”
- 2) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“デキサメタゾン及びベタメタゾン”
- 3) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“ジエチルスチルベストール試験法”
- 4) 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ール試

験法(畜水産物)

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立および妥当性評価: 欧州連合への牛肉輸出時のモニタリング検査のための分析法. 食品衛生学雑誌 65, 178-184 (2024)

2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 欧州連合への日本産牛肉輸出時のモニタリング検査のための牛尿中レゾルシル酸ラクトン類分析法の確立および性能評価. 食品衛生学雑誌 (2025) (in press)

2. 学会発表

1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.7)

2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. イムノアフィニティーカラムを用いた牛尿中におけるレゾルシル酸ラクトン類の同時分析法開発. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.6)

3) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 第 7 回日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2.14)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. ステロイド類の測定条件

LC 条件																											
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m: Waters 製)																										
移動相流速(mL/min)	0.3																										
注入量(μ L)	5																										
カラム温度($^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液:0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 B液:メタノール(LC-MS用)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	2.0	50	50	12.0	15	85	12.01	5	95	15.0	5	95	15.01	50	50	18.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
2.0	50	50																									
12.0	15	85																									
12.01	5	95																									
15.0	5	95																									
15.01	50	50																									
18.0	50	50																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+又は-)																										
イオンスプレー電圧(V)	4500 又は-4500																										
ヒーター温度($^{\circ}$ C)	600																										
ネブライザーガス	空気、50 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										

定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)

	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
			(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)
17β-エストラ ジオール	271	-120	145	-52	183	-56
17β-エストラジオー ール-2,4,16,16-d ₄	275	-120	147	-52	—	—
17β-テストステロン	289	30	97	27	109	31
17β-テストステロン -16,16,17-d ₃	292	30	97	31	—	—
エチニル エストラジオール	295	-120	145	-54	143	-76
エチニル エストラジオール- 2,4,16,16-d ₄	299	-120	147	-52	—	—
酢酸 メレンゲステロー ール	397	30	337	19	279	27
酢酸メレンゲ ステロール-d ₃	400	30	337	19	—	—
メチル テストステロン	303	30	97	27	109	37
メチル テストステロン-d ₃	306	30	97	27	—	—
α-トレンボロン	271	30	253	29	178	65
[² H ₅]- α-トレンボロン	276	30	258	29	—	—
β-トレンボロン	271	30	253	29	178	65
[² H ₅]- β-トレンボロン	276	30	258	29	—	—
デキサメタゾン	393	30	373	13	355	17
デキサメタゾン- 4,6 _α ,21,21-d ₄	397	30	377	13	—	—
酢酸メドロキシ プロゲステロン	387	30	327	19	123	49
酢酸メドロキシ プロゲステロン-d ₆	393	30	330	19	—	—

保持時間(min)

17β-エストラジオール 6.3、17β-テストステロン 6.9、
エチニルエストラジオール 6.5、
酢酸メレンゲステロール 9.2、メチルテストステロン 7.7、
α-トレンボロン 5.9、β-トレンボロン 5.3、デキサメタゾン 5.0、
酢酸メドロキシプロゲステロン 9.0

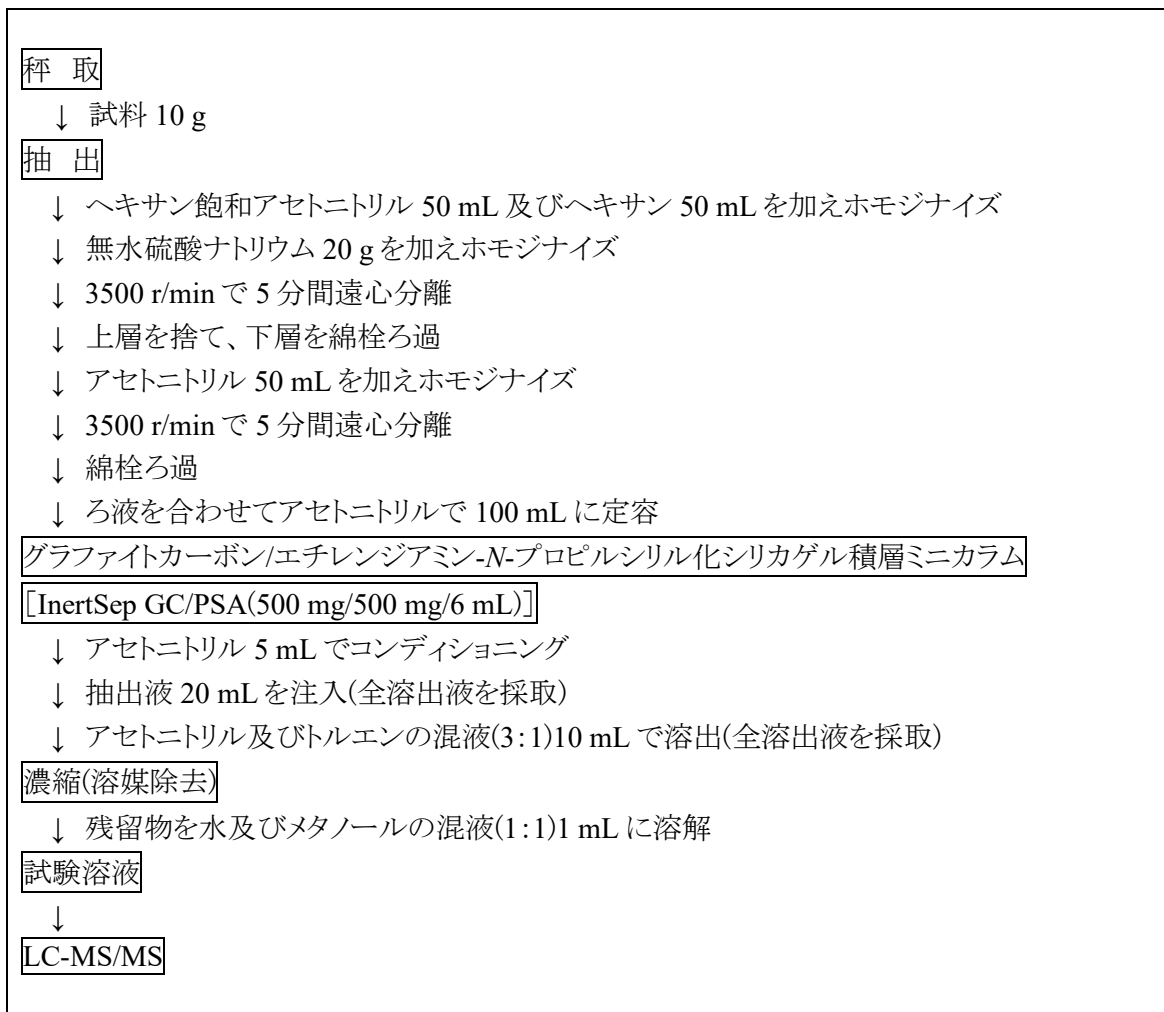


Fig 1. ステロイド類分析法フローチャート

Table 2. スチルベン類の測定条件 (Triple Quad 5500 及び Triple Quad 6500+)

LC 条件																											
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm : 大阪ソーダ製)																										
移動相流速(mL/min)	0.4																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度($^{\circ}\text{C}$)	40																										
移動相	A液: 水及び酢酸の混液(10000:1) B液: アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.01	5	95	9.0	5	95	9.01	50	50	12.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
6.0	50	50																									
6.01	5	95																									
9.0	5	95																									
9.01	50	50																									
12.0	50	50																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(-)																										
イオンスプレー電圧(V)	-4500																										
ヒーター温度($^{\circ}\text{C}$)	600																										
ネブライザーガス	空気、70 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																											
Triple Quad 5500																											
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)																					
ジエネストロール	265	-80	93	-40	236	-26																					
ジエネストロール- d_6	271	-80	94	-40	—	—																					
ジエチル スチルベストロール	267	-75	222	-42	237	-34																					
[$^2\text{H}_8$]-ジエチル スチルベストロール	275	-75	245	-40	—	—																					
ヘキサステロール	269	-60	134	-22	119	-50																					
ヘキサステロール- d_4	273	-65	136	-22	—	—																					
Triple Quad 6500+																											
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)																					

ジエネストロール	265	-100	93	-40	236	-26
ジエネストロール- <i>d</i> ₆	271	-100	94	-40	—	—
ジエチル スチルベストール	267	-95	222	-42	237	-34
[² H ₈]-ジエチル スチルベストール	275	-95	245	-40	—	—
ヘキセステロール	269	-80	134	-22	119	-50
ヘキセステロール- <i>d</i> ₄	273	-85	136	-22	—	—
保持時間(min)	ジエネストロール 3.6、ジエチルスチルベストール 3.5、 ヘキセステロール 3.6					

Table 3. スチルベン類の測定条件 (Xevo TQ-XS)

LC 条件																											
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm : 大阪ソーダ製)																										
移動相流速(mL/min)	0.4																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度(°C)	40																										
移動相	A 液: 水及び酢酸の混液(10000:1) B 液: アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.01	5	95	9.0	5	95	9.01	50	50	12.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
6.0	50	50																									
6.01	5	95																									
9.0	5	95																									
9.01	50	50																									
12.0	50	50																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(-)																										
キャピラリ電圧(V)	1500																										
ソース温度(°C)	150																										
脱溶媒温度(°C)	600																										
コーンガス	窒素、150 L/hr																										
脱溶媒ガス	窒素、1100 L/hr																										
コリジョンガス	アルゴン																										
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																											
	プリカーサーイオン	コーン電圧(V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)																					
ジエネストロール	265	48	93	26	236	20																					
ジエネストロール-d ₆	271	48	94	26	—	—																					
ジエチル スチルベストール	267	48	222	32	237	30																					
[² H ₈]-ジエチル スチルベストール	275	48	245	30	—	—																					
ヘキセステロール	269	34	134	16	119	34																					
ヘキセステロール-d ₄	273	34	136	16	—	—																					
保持時間(min)	ジエネストロール 3.9、ジエチルスチルベストール 3.9、 ヘキセステロール 4.0																										

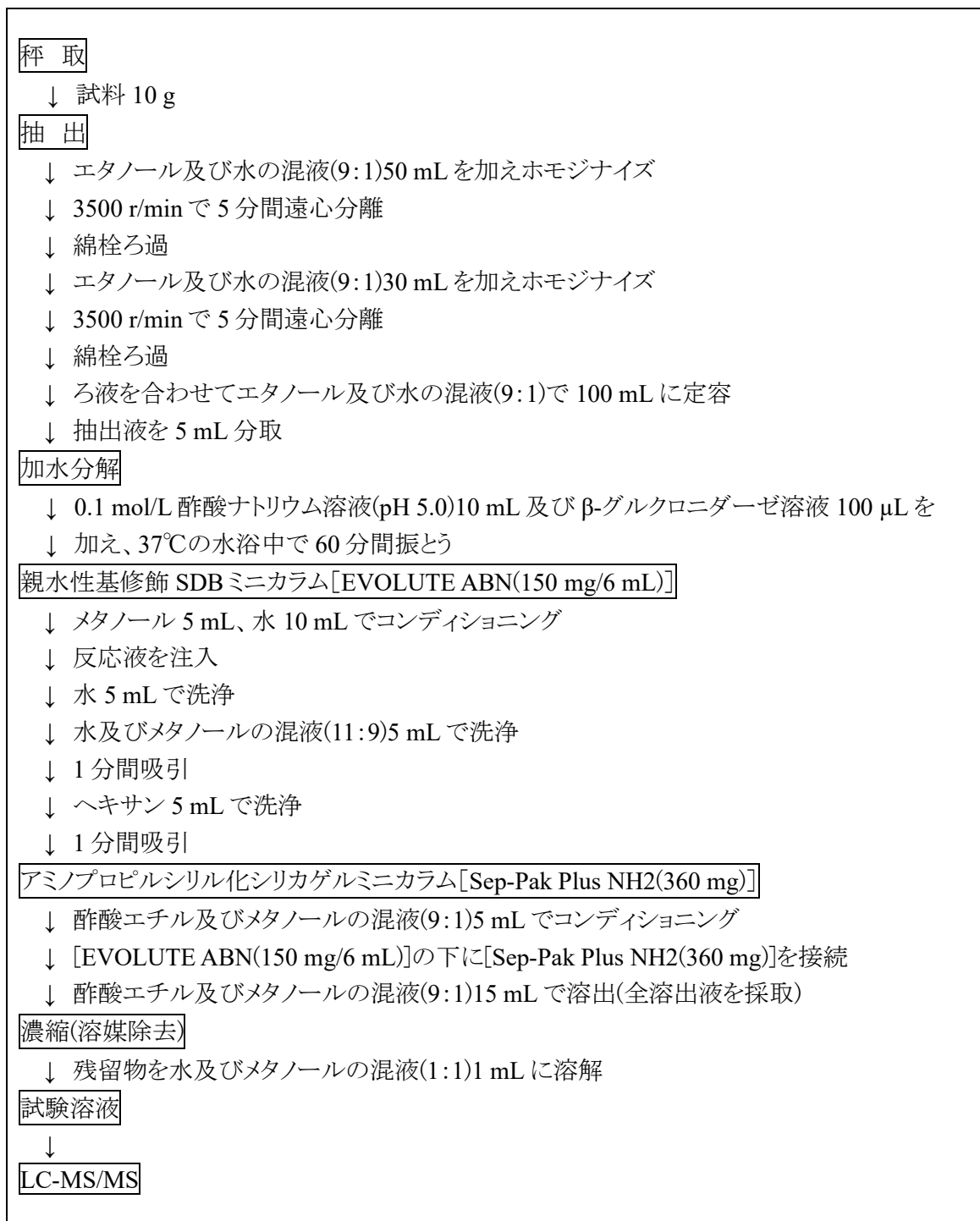


Fig2. スチルベン類の分析法フローチャート

Table 4. オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep C18 1000 mg	アセトニトリル		合計
	0-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	91	6	97
17β-テストステロン	93	6	99
エチニルエストラジオール	89	4	93
酢酸メレンゲステロール	90	5	95
メチルテストステロン	87	5	92
α-トレンボロン	91	4	95
β-トレンボロン	96	5	101
デキサメタゾン	106	5	111
酢酸メドロキシプロゲステロン	97	5	102

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.5 μg

Table 5. トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep SAX/PSA 500 mg/500 mg	アセトニトリル		合計
	0-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	84	15	99
17β-テストステロン	86	9	95
エチニルエストラジオール	84	14	98
酢酸メレンゲステロール	90	7	97
メチルテストステロン	85	7	92
α-トレンボロン	85	8	93
β-トレンボロン	91	9	100
デキサメタゾン	83	17	100
酢酸メドロキシプロゲステロン	93	8	101

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.5 μg

Table 6. 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からの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep PSA 1000 mg	アセトン及びヘキサンの混液						合計
	1:19	1:9	1:4	3:7	2:3	1:1	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
17β-エストラジオール	0	0	10	79	0	0	89
17β-テストステロン	0	24	71	2	0	0	97
エチニルエストラジオール	0	0	0	92	4	0	96
酢酸メレンゲステロール	1	76	2	0	0	0	79
メチルテストステロン	0	92	6	1	0	0	99
α-トレンボロン	0	0	80	4	1	0	85
β-トレンボロン	0	0	100	3	1	0	104
デキサメタゾン	0	0	0	0	11	63	74
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	101	4	1	0	0	106

予備洗浄:ヘキサン 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 7. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	メタノール		酢酸エチル			合計
	0-5 mL	5-10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	0	0	0	0	0	0
17β-テストステロン	0	0	83	19	1	103
エチニルエストラジオール	0	0	14	0	0	14
酢酸メレンゲステロール	0	0	96	0	0	96
メチルテストステロン	0	0	111	0	0	111
α-トレンボロン	3	39	59	0	0	101
β-トレンボロン	0	0	103	0	0	103
デキサメタゾン	0	9	57	7	5	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	0	99	0	0	99

予備洗浄:メタノール 5 mL、供試量:各 0.25 μg

Table 8. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	アセトン及びヘキサンの混液(1:1)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	86	2	0	88
17β-テストステロン	101	0	0	101
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	100	0	0	100
メチルテストステロン	101	0	0	101
α-トレンボロン	95	0	0	95
β-トレンボロン	88	0	0	88
デキサメタゾン	86	0	0	86
酢酸メドロキシプロゲステロン	104	0	0	104

予備洗浄:アセトン及びヘキサンの混液(1:1) 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 9. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	97	0	0	97
17β-テストステロン	101	2	0	103
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	89	1	0	90
メチルテストステロン	97	1	0	98
α-トレンボロン	96	1	0	97
β-トレンボロン	92	1	0	93
デキサメタゾン	117	0	0	117
酢酸メドロキシプロゲステロン	100	1	0	101

予備洗浄:アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3) 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 10. グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトン及びヘキサンの混液(1:1)		合計
		20 mL	0-10 mL	
500 mg/500 mg	20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
17β-エストラジオール	0	85	0	85
17β-テストステロン	0	87	1	88
エチニルエストラジオール	10	73	0	83
酢酸メレンゲステロール	0	87	0	87
メチルテストステロン	0	88	0	88
α-トレンボロン	37	50	0	87
β-トレンボロン	4	87	0	91
デキサメタゾン	5	52	26	83
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	87	0	87

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.05 μg

Table 11. グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)		合計
		20 mL	0-10 mL	
500 mg/500 mg	20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
17β-エストラジオール	0	80	0	80
17β-テストステロン	0	95	0	95
エチニルエストラジオール	30	63	0	93
酢酸メレンゲステロール	0	97	0	97
メチルテストステロン	1	91	0	92
α-トレンボロン	93	1	0	94
β-トレンボロン	13	76	0	89
デキサメタゾン	14	63	1	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	1	94	0	95

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.05 μg

Table 12.1 17 β -エストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.533	0.478	0.498	0.425	0.474	0.484	96.8	2.4	7.6
	2回目	0.542	0.462	0.486	0.452	0.488				

Table 12.2 17 β -テストステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.495	0.456	0.511	0.497	0.508	0.487	97.3	2.4	4.5
	2回目	0.467	0.452	0.489	0.491	0.501				

Table 12.3 エチニルエストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.484	0.496	0.436	0.413	0.390	0.445	89.1	7.4	13.2
	2回目	0.570	0.440	0.422	0.417	0.384				

Table 12.4 酢酸メレンゲステロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.473	0.477	0.495	0.474	0.505	0.487	97.3	0.9	2.7
	2回目	0.486	0.482	0.493	0.475	0.506				

Table 12.5 メチルテストステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.500	0.451	0.519	0.474	0.503	0.492	98.3	2.3	5.4
	2回目	0.507	0.460	0.497	0.477	0.527				

Table 12.6 α-トレンボロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.463	0.486	0.493	0.482	0.513	0.492	98.4	3.8	3.8
	2回目	0.520	0.474	0.502	0.476	0.510				

Table 12.7 β-トレンボロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.520	0.504	0.490	0.492	0.500	0.494	98.8	2.3	3.0
	2回目	0.510	0.480	0.486	0.475	0.483				

Table 12.8 デキサメタゾンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.480	0.466	0.531	0.498	0.457	0.490	97.9	1.6	5.5
	2回目	0.482	0.489	0.528	0.501	0.464				

Table 12.9 酢酸メドロキシプロゲステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.476	0.439	0.467	0.467	0.482	0.465	92.9	1.8	3.8
	2回目	0.455	0.444	0.460	0.462	0.495				

Table 13. 試料マトリックスの測定への影響 (ステロイド類)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (μg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (μg/kg)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²										備考
							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			ピーク面積 (高さ)比 ⁵		
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
1	17β-エストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	9888	9820	9854	10215	9331	9773	1.01		
2	17β-テストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	435503	429753	432628	669636	654218	661927	0.65		
3	エチニルエストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	5371	5468	5420	5214	5817	5516	0.98		
4	酢酸メレンゲステロール	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	272177	252680	262429	424344	415316	419830	0.63		
5	メチルテストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	240014	224851	232433	388172	378709	383441	0.61		
6	α-トレンボロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	337608	323479	330544	499522	498959	499241	0.66		
7	β-トレンボロン	牛の筋肉	0.5	0.002	0.5	0.001	面積	0	158242	156060	157151	214630	220388	217509	0.72		
8	デキサメタゾン	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	12547	12123	12335	20450	18297	19374	0.64		
9	酢酸メドロキシプロゲステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	231024	234715	232870	360658	348484	354571	0.66		

*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。)

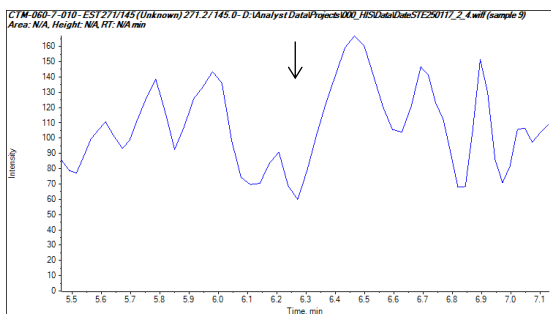
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

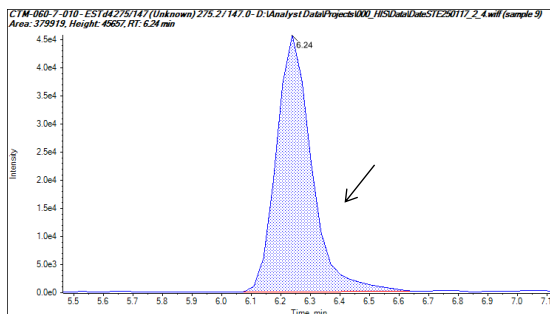
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

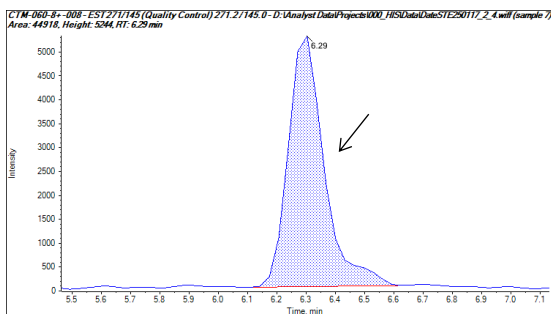
ブランク試料



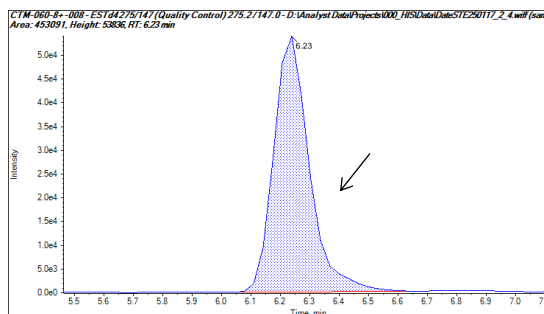
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



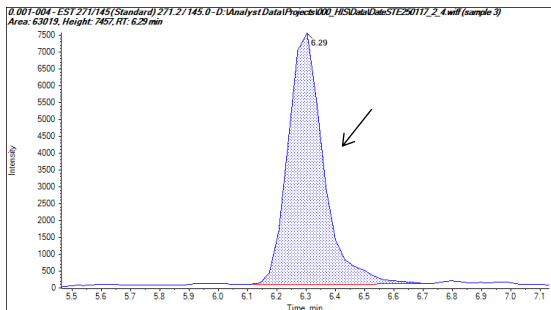
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

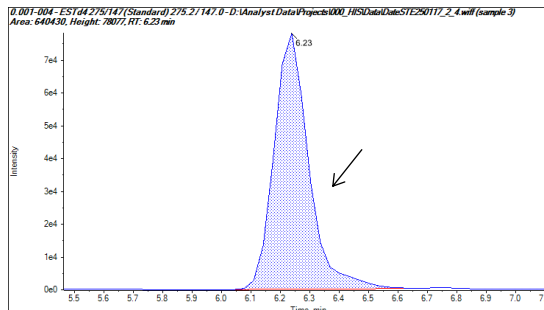
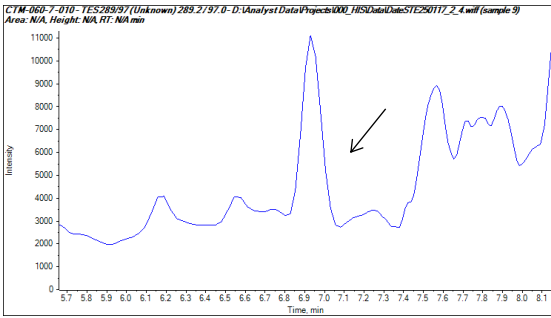


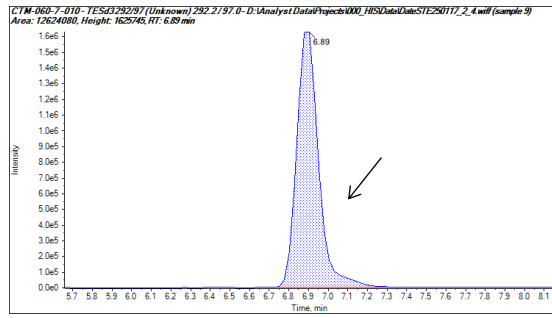
Fig3.1 17β-エストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 271→145)

添加濃度: 0.5 μg/kg

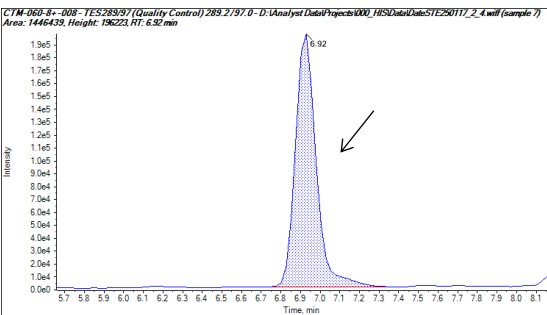
ブランク試料



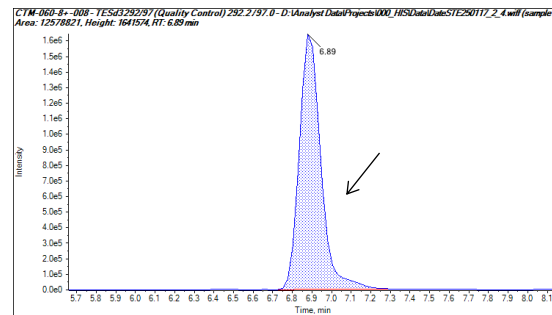
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



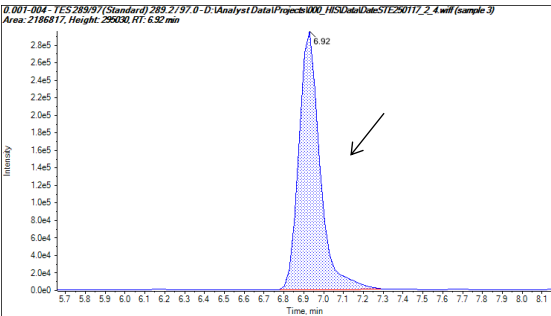
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

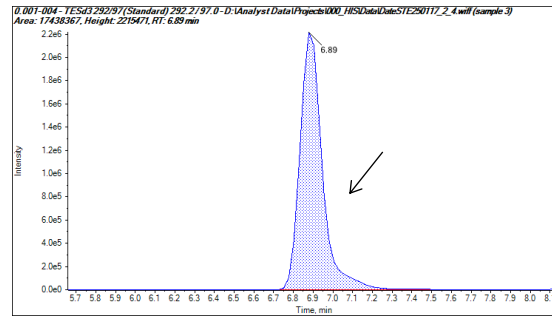
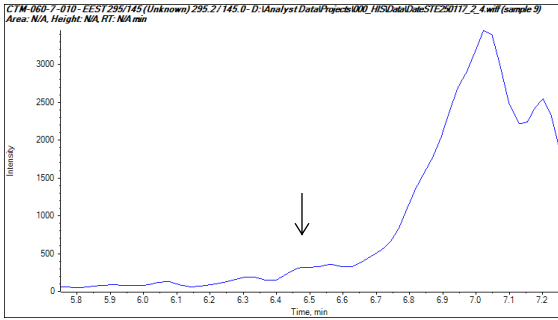


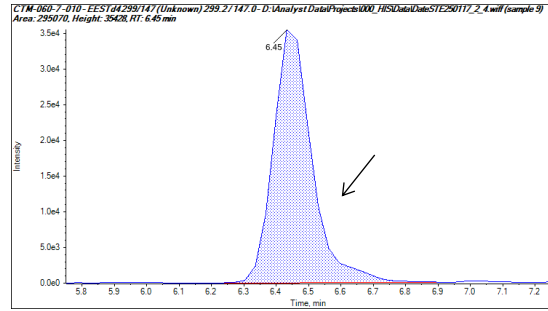
Fig3.2 17β-テストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 289→97)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

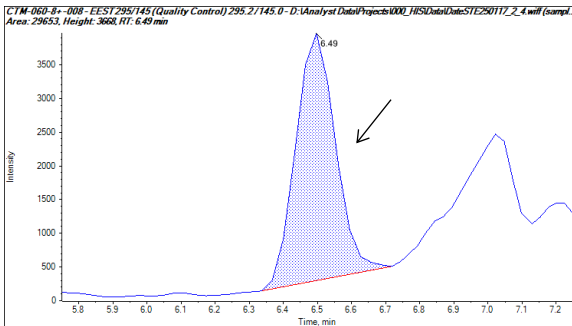
ブランク試料



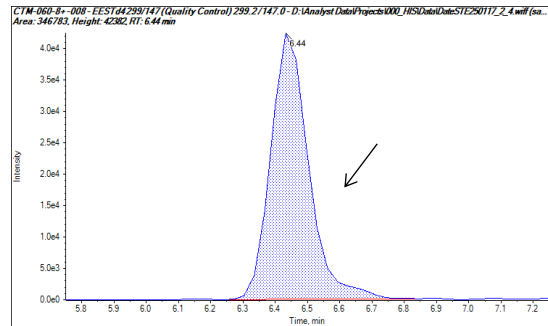
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



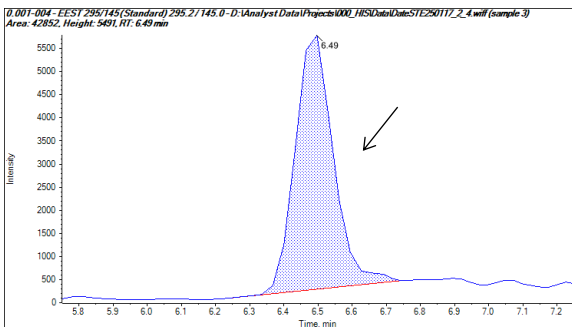
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

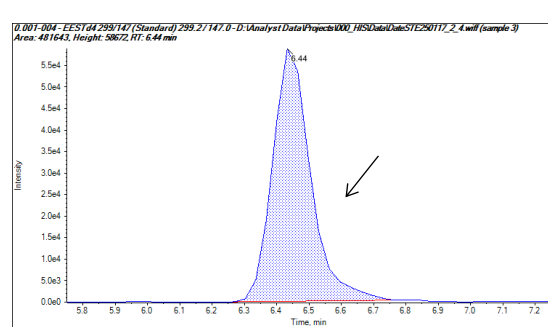
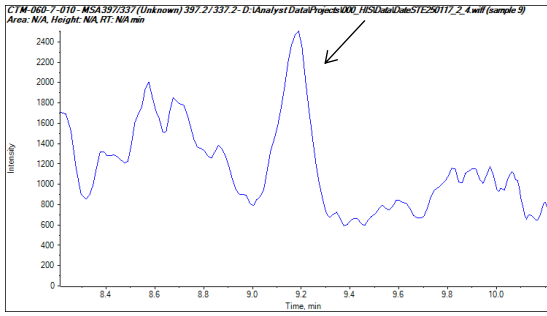
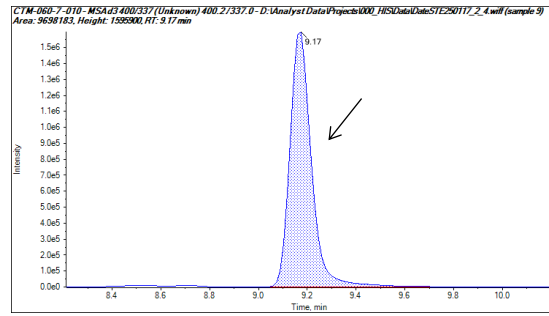


Fig3.3 エチルエストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 295→145)
添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

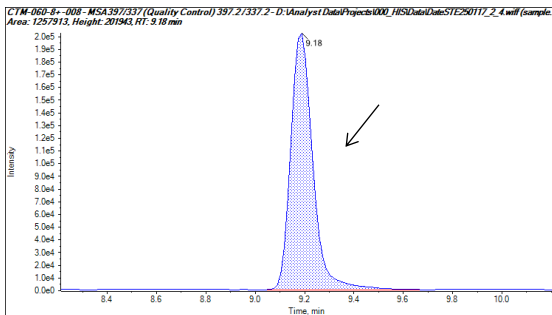
ブランク試料



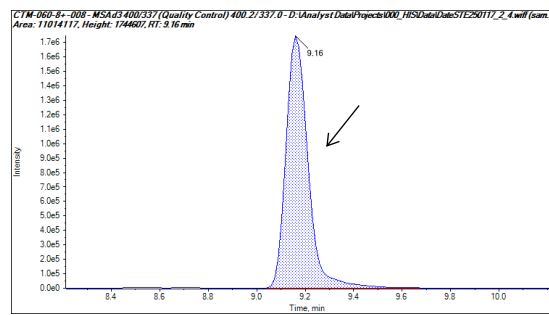
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



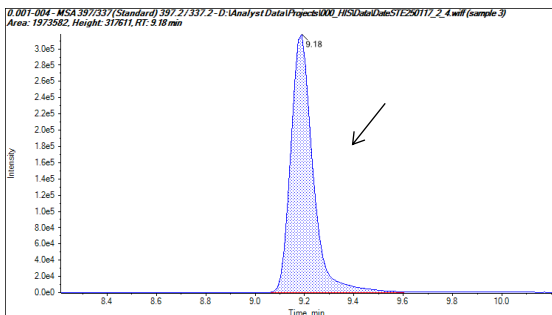
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

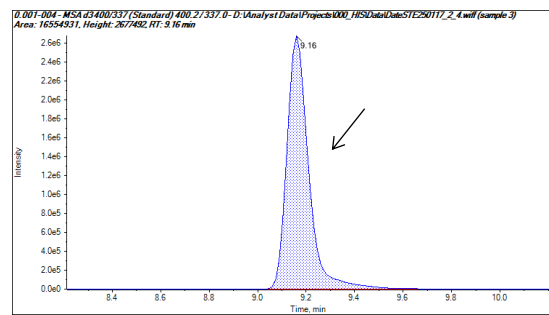
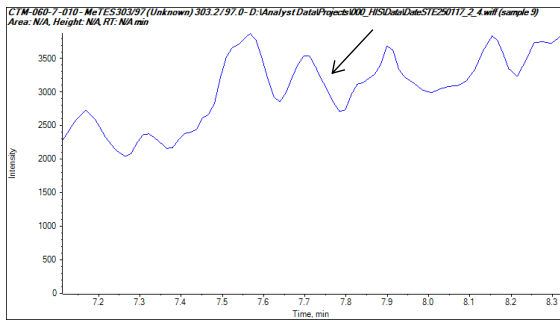


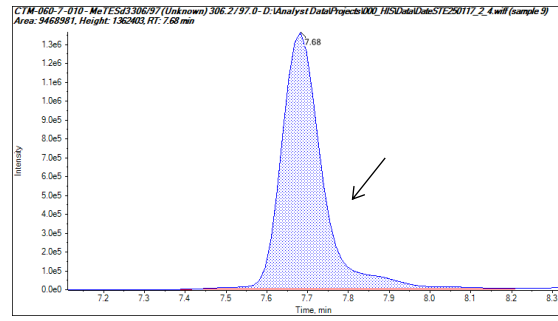
Fig3.4 酢酸メレンゲステロールの SRM クロマトグラム(m/z 397→337)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

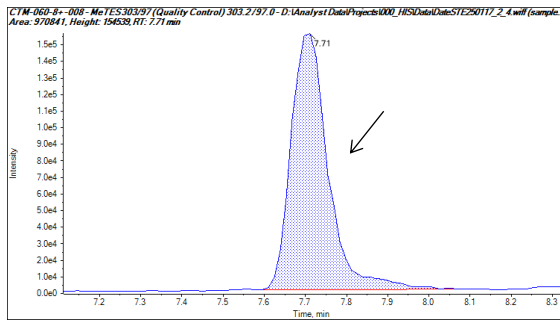
ブランク試料



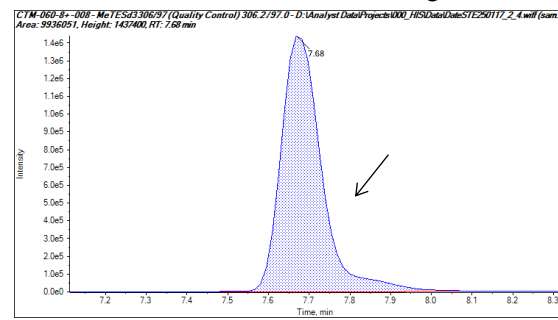
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



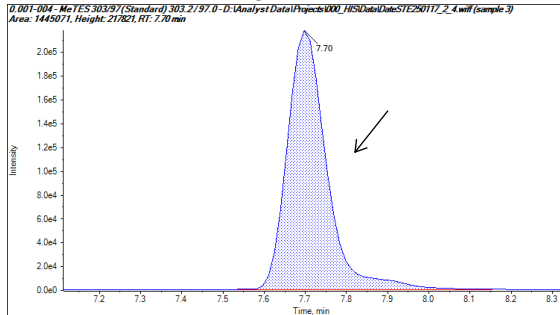
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

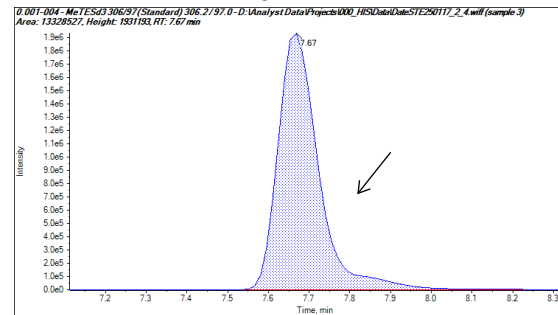
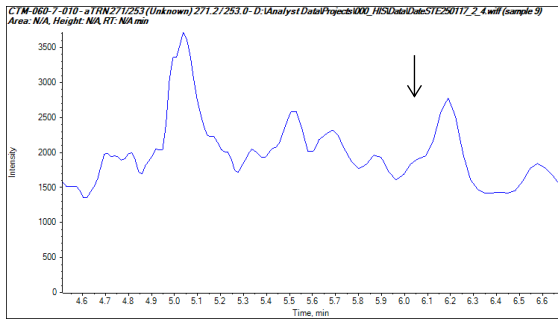


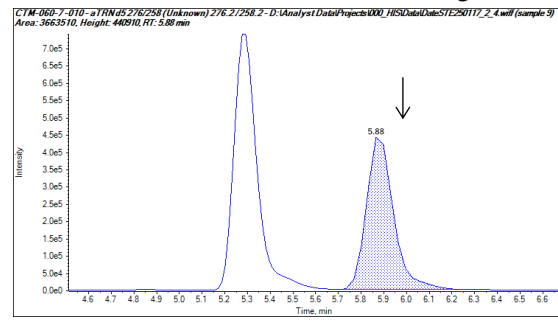
Fig3.5 メチルテストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 303→97)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

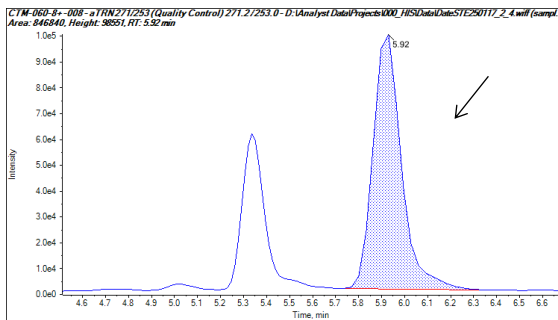
ブランク試料



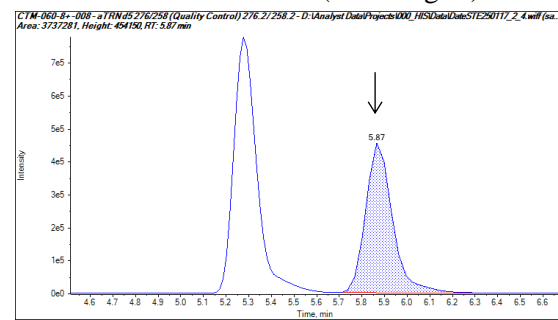
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



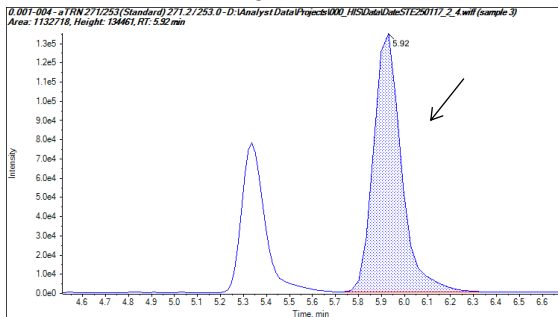
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

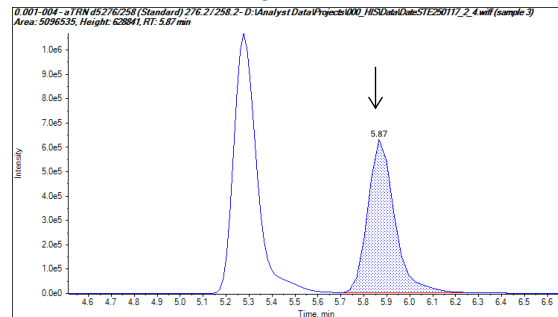
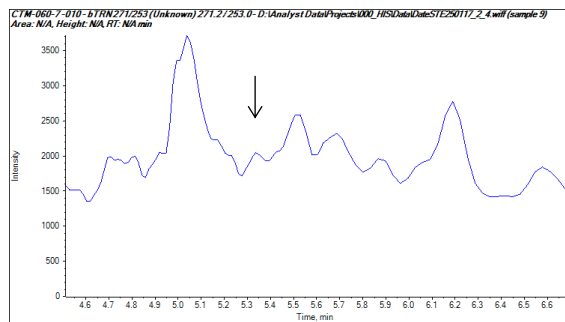


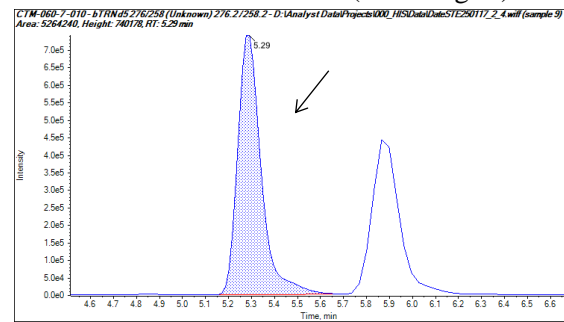
Fig3.6 α -トレンボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271→253)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

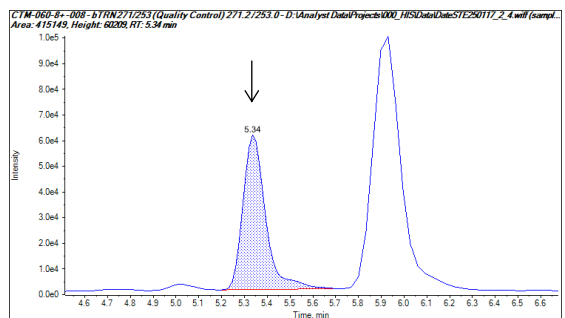
ブランク試料



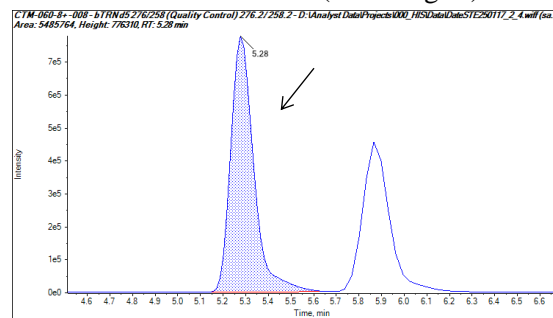
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



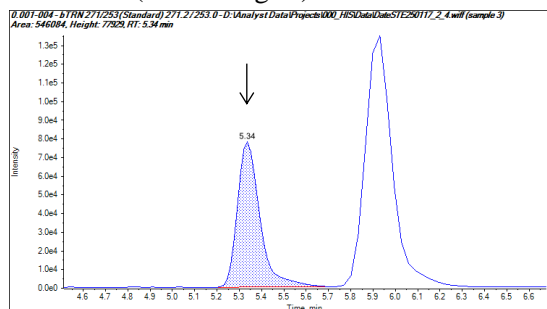
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

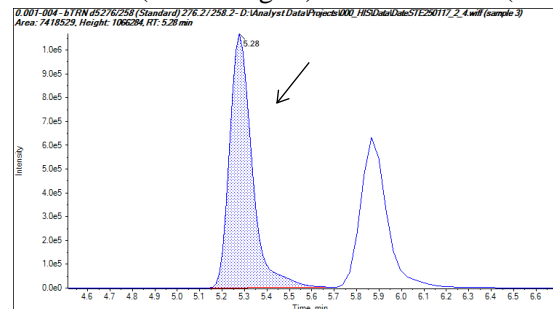
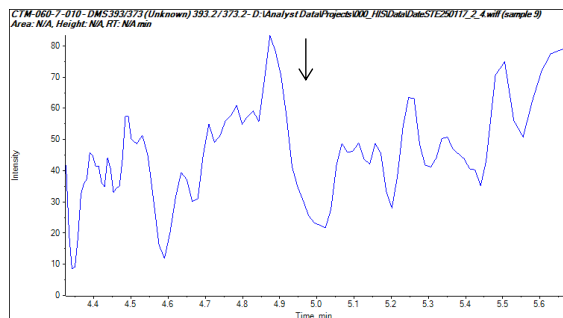


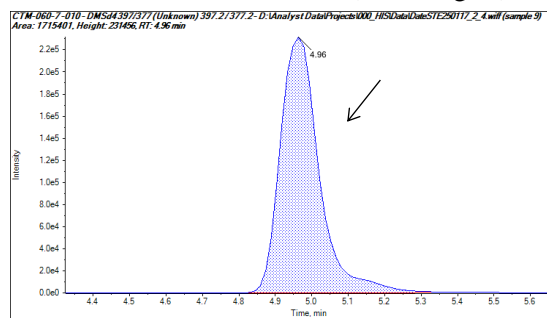
Fig3.7 β-トレンボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271→253)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

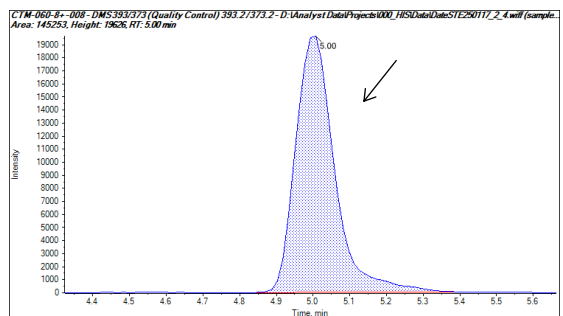
ブランク試料



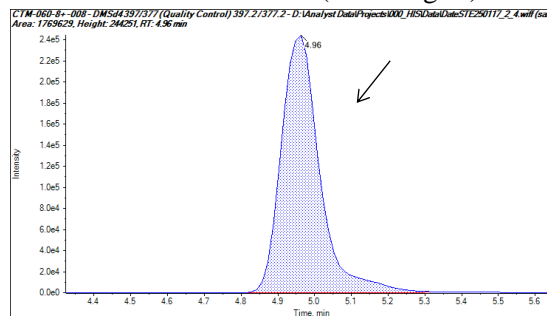
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



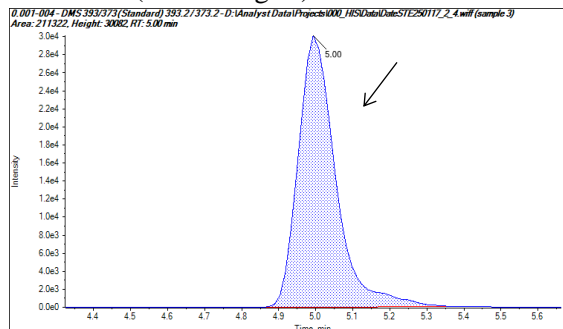
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

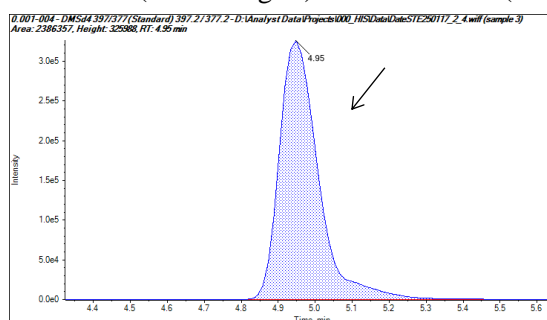
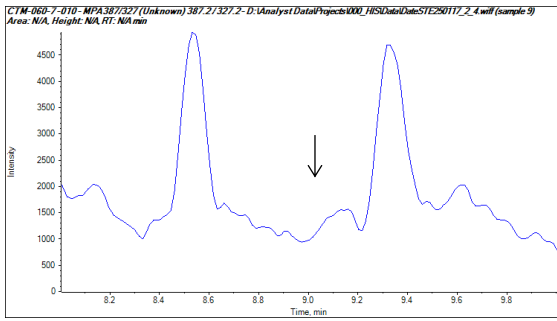


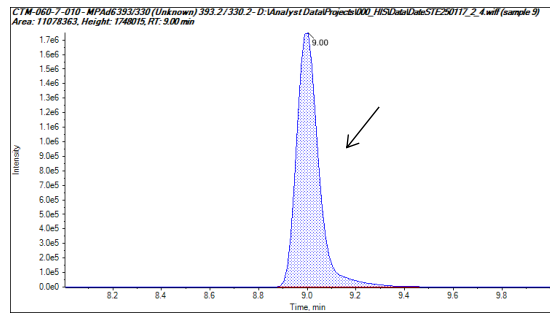
Fig3.8 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム(m/z 393→373)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

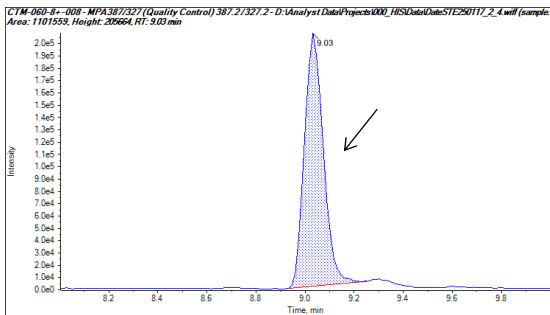
ブランク試料



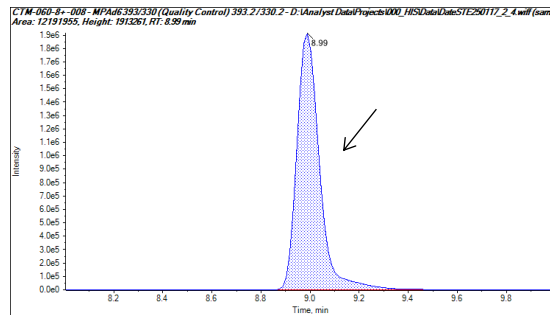
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



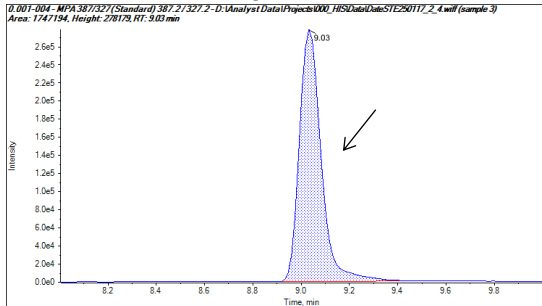
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

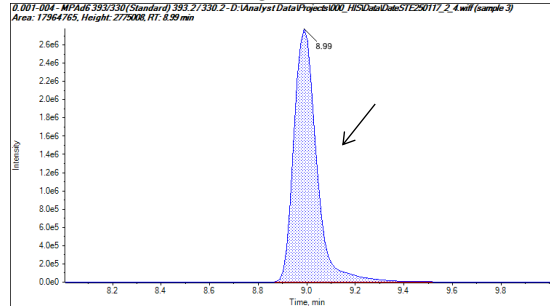
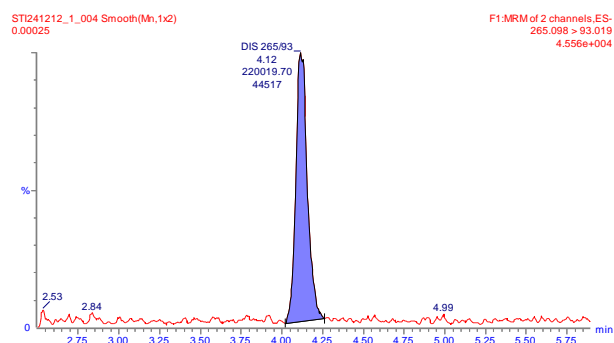
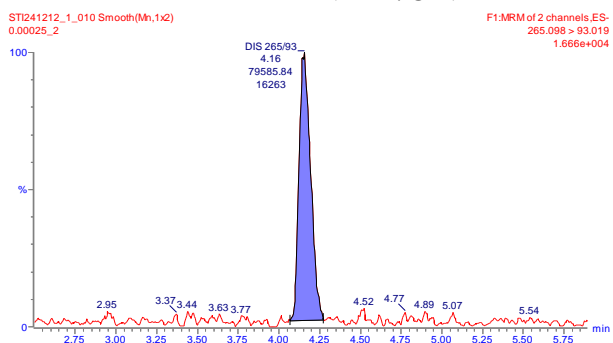


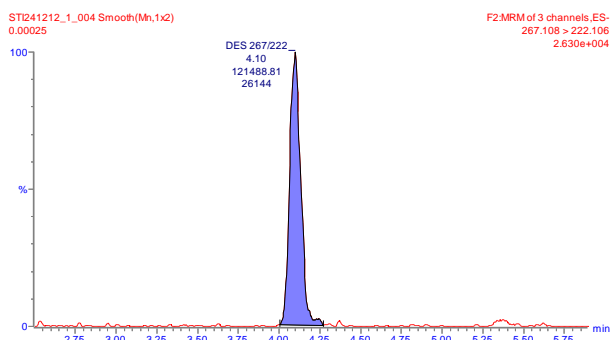
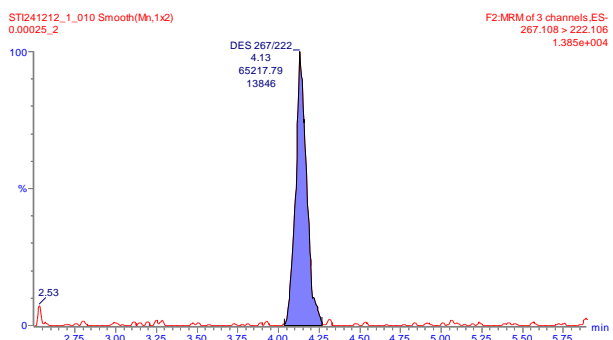
Fig3.9 酢酸メドロキシprogesteroneの SRM クロマトグラム(m/z 387→327)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ジエネストロール標準溶液(0.25 µg/L)



ジエチルスチルベストール標準溶液(0.25 µg/L)



ヘキサステロール標準溶液(0.25 µg/L)

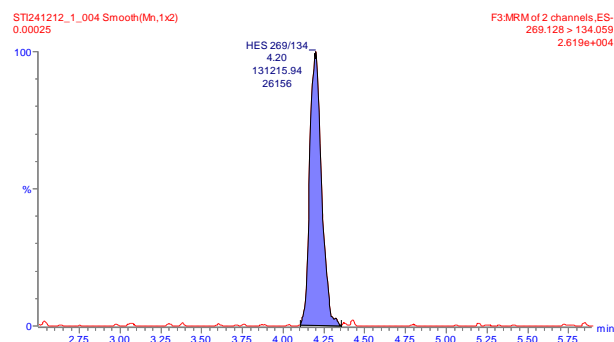
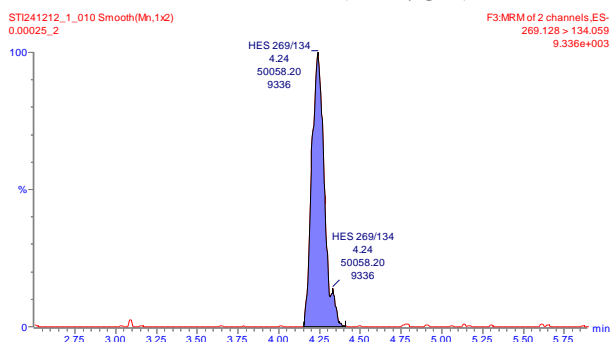


Fig4. ジエネストロール(m/z 265→93)、ジエチルスチルベストール(m/z 267→222)及びヘキサステロール(m/z 269→134)の SRM クロマトグラム
左: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル(1:1)
右: 水及び酢酸の混液(10000:1)及びアセトニトリル(1:1)

Table 14.1 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び		水及びメタノールの混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)		合計
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1回目	0	0	86	0	86
	2回目	0	0	95	0	95
ジエチルスチルベストロール	1回目	0	0	98	0	98
	2回目	0	0	100	0	100
ヘキセステロール	1回目	0	0	102	0	102
	2回目	0	0	97	0	97

Table 14.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの

溶出状況(%) (スチルベン類)

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び		水及びメタノールの混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)		合計
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1回目	0	0	90	4	94
	2回目	0	0	87	7	94
ジエチルスチルベストロール	1回目	0	0	94	3	97
	2回目	0	0	89	5	94
ヘキセステロール	1回目	0	0	102	4	106
	2回目	0	0	90	6	96

Table 15.1 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた牛筋肉中の添加回収試験結果 (スチルベン類)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び	内標準物質回収率(%)		添加回収率(%)	
	マトリックス無	マトリックス有	マトリックス無	マトリックス有
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)				
ジエネストロール	84	78	100	106
ジエチルスチルベストロール	85	53	104	113
ヘキセステロール	97	86	98	99

Table 15.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた

牛筋肉中の添加回収試験結果 (スチルベン類)

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び	内標準物質回収率(%)		添加回収率(%)	
	マトリックス無	マトリックス有	マトリックス無	マトリックス有
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)				
ジエネストロール	86	96	98	98
ジエチルスチルベストロール	103	72	97	108
ヘキセステロール	105	103	105	106

Table 16.1 ジエネストロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.516	0.470	0.457	0.504	0.520	0.491	98.3	2.1	5.9
	2回目	0.513	0.448	0.474	0.489	0.522				

Table 16.2 ジエチルスチルベストロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.453	0.434	0.448	0.437	0.513	0.471	94.2	4.5	7.0
	2回目	0.487	0.471	0.468	0.469	0.532				

Table 16.3 ヘキサステロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.480	0.483	0.514	0.465	0.523	0.499	99.7	4.3	7.8
	2回目	0.482	0.525	0.549	0.428	0.538				

Table 17 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	試料名	定量限界 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	標準溶液 濃度 ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	ピーク面積(高さ) ²⁾							備考		
							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			ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
1	ジエネストロール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	86446	89566	88006	88363	89012	88688	0.99	
2	ジエチルスチルベストロール	牛の筋肉	0.5	不検出	0.5	0.25	面積	0	37793	38839	38316	34431	39187	36809	1.04	
3	ヘキサステロール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	27962	25882	26922	27437	28679	28058	0.96	

*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。)

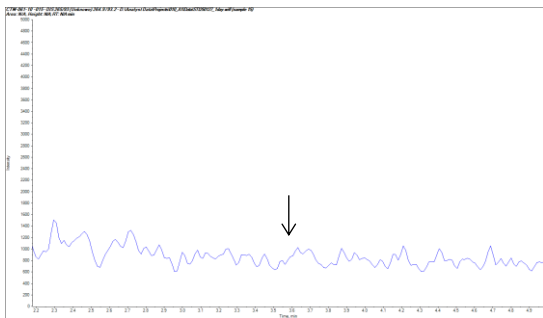
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

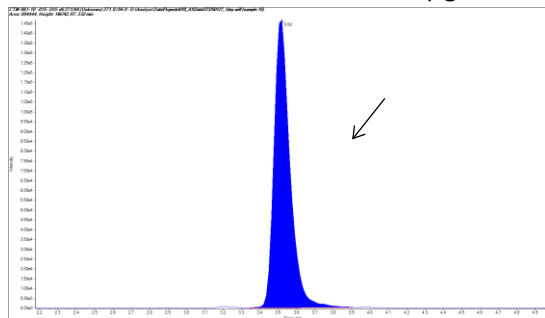
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

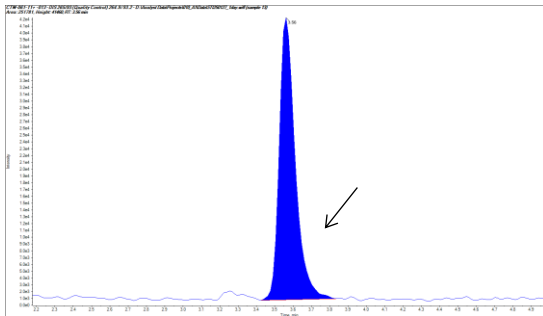
ブランク試料



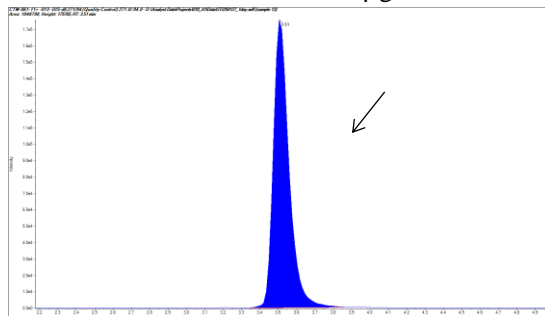
ブランク試料の内標準物質(1.25 µg/L)



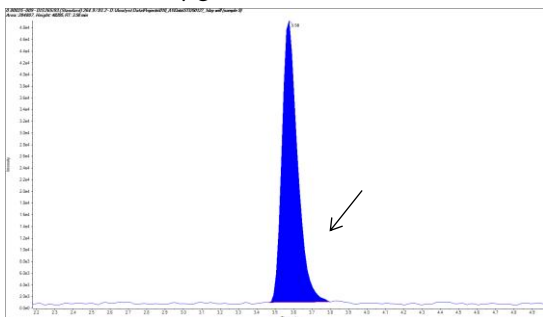
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)の内標準物質(1.25 µg/L)

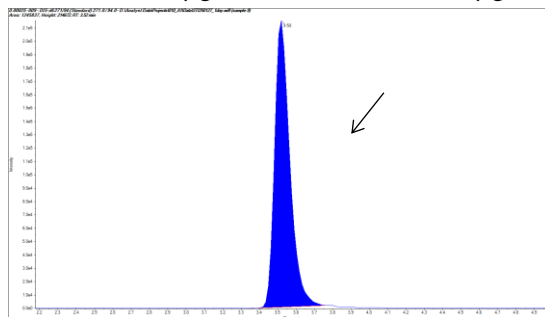
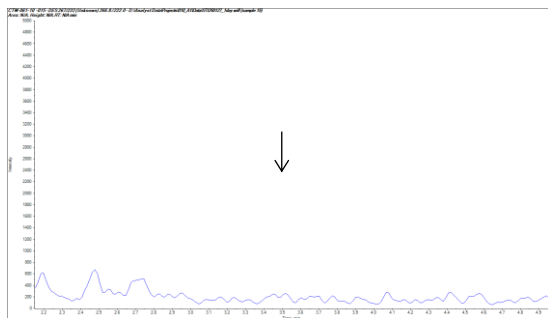


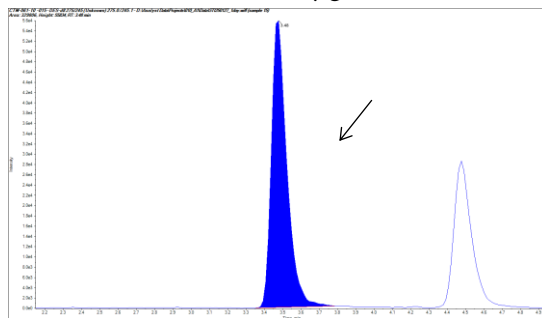
Fig5.1 ジエネストールの SRM クロマトグラム(m/z 265→93)

添加濃度:0.5 µg/kg

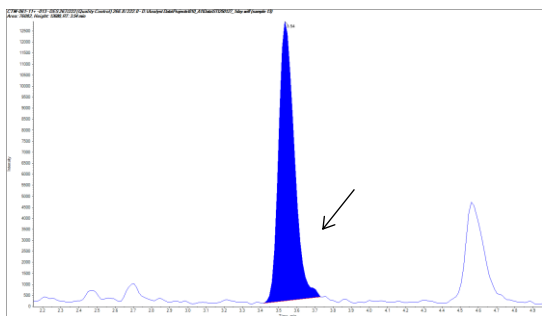
ブランク試料



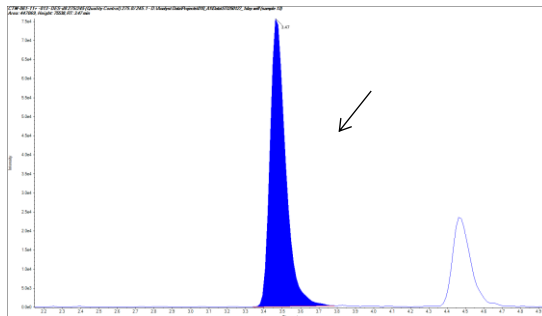
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



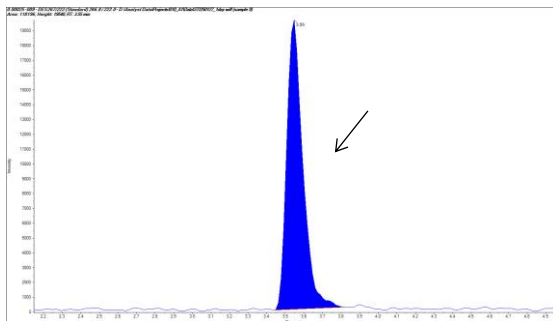
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

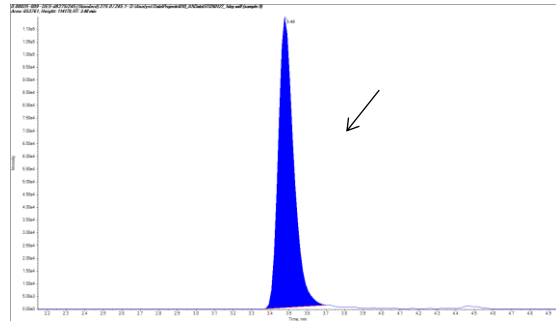
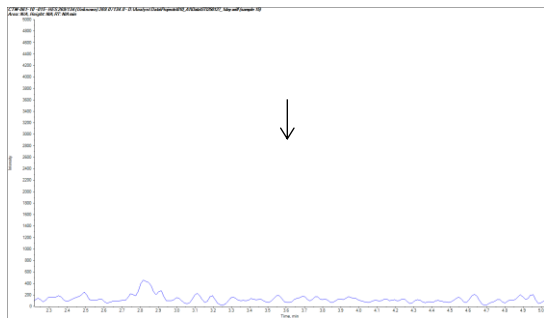
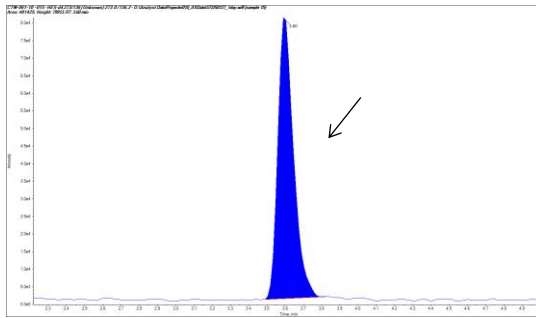


Fig5.2 ジエチルスチルベストロールの SRM クロマトグラム(m/z 267 \rightarrow 222)
添加濃度:0.5 $\mu\text{g/kg}$

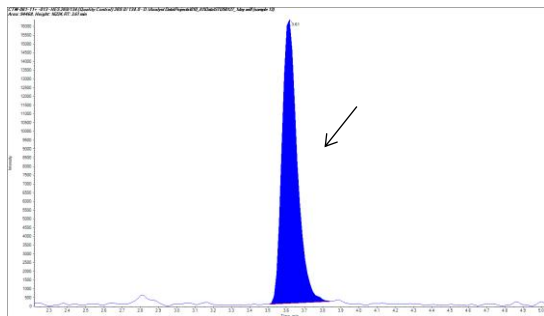
ブランク試料



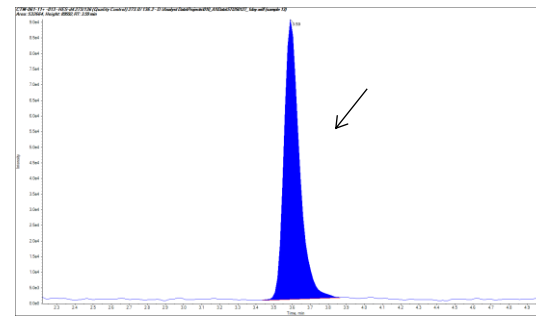
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



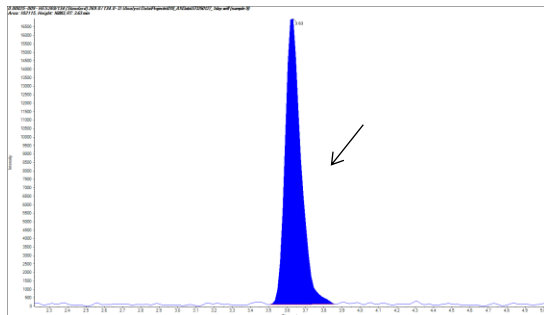
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

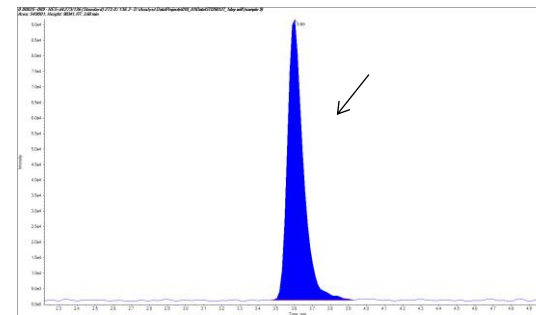


Fig5.3 ヘキサステロールの SRM クロマトグラム(m/z 269 \rightarrow 134)
添加濃度:0.5 $\mu\text{g/kg}$