

ジエチルスチルベストロール試験法（案）

ジエチルスチルベストロールは、ポジティブリスト制度導入時に、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として新たに定められた。

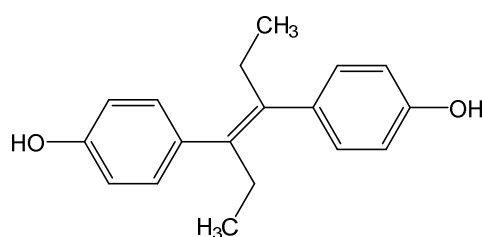
従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。

一方、厚生省告示第370号に規定されている当該成分の試験法は、畜水産物の全般に渡ってその試験法の性能が評価されたものではなかった。また、現行の試験法では有害性の高い試薬を用いていること、加水分解に長時間を要すること、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から、試験法について開発が進められてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

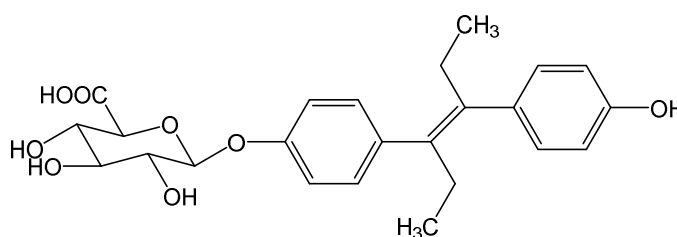
1. 概要

(1) 分析対象の化合物

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



ジエチルスチルベストロール



ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体

(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

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試料からエタノール及び水（9：1）混液で抽出する。ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体を β -グルクロニダ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た後、酢酸エチル及び n -ヘキサン（3：1）混液に転溶する。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で精製した後、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計で定量及び確認する方法である。

(4) 検出限界 0.0005 mg/kg

2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として添加回収試験（添加濃度 0.0005 ppm）を行い、真度及び併行精度の確認を実施した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、さけ、しじみ及びはちみつ

表 検討結果の真度及び併行精度（試行数 5 で実施）

		検討結果	目標値
真度	親化合物	86～101%	70～120%
	抱合体	76～91%	
併行精度	親化合物	2～7%	30%未満
	抱合体	3～7%	

3. 答申案

別紙のとおり。

(参考) これまでの経緯

平成17年11月29日	残留基準告示
平成24年 2月22日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成28年11月29日	残留農薬等公示分析法検討会で検討
平成29年 2月13日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
平成29年 2月21日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
平成29年 1月31日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成29年 3月22日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

○ 穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
石井 里枝	埼玉県衛生研究所化学検査室長
井之上 浩一	立命館大学薬学部薬学科臨床分析化学研究室准教授
折戸 謙介	麻布大学獣医生理学教授
魏 民	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学准教授
佐々木 一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤 清	一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
佐野 元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山 敏廣	明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授
根本 了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
宮井 俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授

(○：部会長)

答申(案)

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℃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。

酢酸ナトリウム 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 10ml

を採り、40℃以下で約5ml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 酵素加水分解

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℃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 酵素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251、237、222

注入量：5µl

保持時間の目安：3分