[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛生 化学]
39 (4) 311-316 (1993)

牛肉中のジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体の ガスクロマトグラフィーによる定量

飯島正雄,^a 星野庸二,^a 能勢憲英,^a 徳丸雅一,^a

宮崎奉之,^b 松本昌雄^b

埼玉県衛生研究所,^a 東京都立衛生研究所^b

Determination of Diethylstilbestrol Glucuronide in Beef by Gas Chromatography

MASAO IJIMA,^a YOJI HOSHINO,^a NORIHIDE NOSE,^a YOSHIKAZU TOKUMARU,^a

TOMOYUKI MIYAZAKI^b and MASAO MATSUMOTO^b

Saitama Prefectural Institute of Public Health,^a 639-1 Kamiokubo, Urawa, Saitama 338

and Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 24-1,

Hyakunincho, 3 chome, Shinjuku-ku,

Tokyo, 169, Japan

(Received January 21, 1993)

A gas-liquid chromatographic (GLC) method was developed for the determination of diethylstilbestrol glucuronide (DESG), a metabolite of diethylstilbestrol, in beef.

DESG was extracted from beef with 90% acetonitrile. The extract was cleaned up without hydrolysis of DESG by Sep-pak NH₂ cartridge and C₁₈ cartridge. The purified extract was evaporated to dryness and reacted with pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA) for 50 min at 50°C. PFPA derivatives of DESG were measured by GLC, using a 2% OV-17 column and electron capture detector.

Recoveries of DESG obtained from beef spiked at 0.005–0.02 µg/g (as is DES) levels were 86.8–89.2%. The detection limit of DESG was 0.001 µg/g.

Keywords — diethylstilbestrol glucuronide, GLC, pentafluoropropionic acid anhydride, beef

緒 言

蛋白同化ホルモンは、肉牛の肉質改善や飼料効率の向上を目的に多くの国で使用されている。このため、蛋白同化ホルモンの食肉への残留が食品衛生上問題となっており、人の健康への影響が懸念されている。

日本国内では、エストラジオールやテストステロンなどの天然型の蛋白同化ホルモンの使用は認められているが、トレンボロンやゼラノールなどの合成型のものは認められていない。ECでは、1989年からすべての蛋白同化ホルモンの使用が禁止になったが、米国やオーストラリアでは、合成型のゼラノールや天然型の蛋白同化ホルモンの使用が認められて

おり、ほとんどの肉牛で使用されている。

ジエチルスチルベストロール (DES) は、合成型の蛋白同化ホルモンで、米国を中心に広く利用されてきたが、発ガン性が確認されたことから1979年に米国で使用禁止になり、現在では、国際的に使用が禁止されている。しかし、DESは、肥育効果が高いことから不法に使用される可能性もあり、また、日本では、牛肉の輸入が増加しているため、モニタリングを行っていく必要がある。このために、迅速で精度の高い分析方法の開発が要求されている。

DESの残留分析法は薄層クロマトグラフィーによる方法、¹⁾ 高速液体クロマトグラフィーによる方法、^{2,3)} ガスクロマトグラフィー (GC) による方法^{4,5)} 及びガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS)

による方法⁶⁻⁸⁾が報告されている。DESは組織中の残留レベルが低いため高感度な分析方法が必要となり、GCによる方法では、ジクロロ塩化アセチルや無水トリフルオロ酢酸を用いて誘導体を調製して測定する方法が報告されており、米国農務省では、トリメチルシリル化した後、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)により測定を行っている。

また、Donohoらは、DESは肉組織中では、遊離型では検出されず、結合型で存在し、グルクロニダーゼで加水分解して測定した値とバイオアッセイ法で測定した値がよく一致することから、その多くがグルクロン酸抱合体で存在すると報告している。⁴⁾そこで、従来の分析法は、酸⁵⁾や酵素^{1,2,4,6,8)}を用いて加水分解してDESにした後、液-液分配を繰り返して精製を行っている。このため操作が煩雑になり長時間を要する。

そこで、簡易な分析法として、グルクロン酸抱合体を加水分解せずに抽出、精製した後、無水ペンタフルオロプロピオン酸にて誘導体化し、ガスクロマトグラフィーで測定する方法について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料 埼玉県内で市販されていた牛肉を用いた。

2. 試薬 1) 標準溶液——ジエチルスチルベストロールグルクロナイドはSigma社製を使用した。アンプル中の全量(DESに換算して1mg相当)をメタノールで100 mlに溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

2) 無水ペンタフルオロプロピオン酸(PFPA)——Aldrich社製を用いた。

3) Sep-Pak NH₂及びSep-Pak C₁₈カラムカートリッジ——Waters社製を用いた。NH₂カラムはメタノール10 mlで湿潤させた後、C₁₈カラムはメタノール10 ml及び蒸留水10 mlで湿潤させた後使用した。

4) 0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7)——0.2 Mリン酸水素二ナトリウム溶液30.5 mlと0.2 Mリン酸二水素ナトリウム溶液19.5 mlを混合し、蒸留水で100 mlにした。

5) アセトニトリル、メタノール及びヘキサンは残留農薬試験用を用いた。

3. 装置 1) ガスクロマトグラフ——島津製作所製、GC-4 BM型(検出器ECD: ⁶³Ni, 10 mCi)。

2) 質量分析計——HEWLET PACKARD社製、HP-5989 A型。

3) 反応槽——Advantec社製、HOT BLOCK BATH TPB-32。

4. GC条件 分離カラム——2%OV-17, Chromosorb W (HP), 80—100 mesh, 内径2.6 mm, 長さ1.5 m。

カラム温度——255°C。

注入口温度——265°C。

注入量——2 µl。

キャリアーガス及び流量——窒素, 50 ml/min。

5. GC-MS条件 分離カラム——HP-1 (0.25 mm i.d. × 12 m, 膜厚0.33 µm)。

カラム温度——150°Cで2分間保持した後、5°C/minで250°Cまで昇温し、250°Cで10分間保持した。

イオン源温度——200°C。

四重極温度——100°C。

イオンモード——電子衝撃イオン化法(EI)。

イオン化電圧——70 eV。

キャリアーガス及び流量——ヘリウム, 5 ml/min。

6. 試料溶液の調製 試料10 gを採り、90%アセトニトリル25 mlを加えて1分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。残留物に90%アセトニトリル25 mlを加え同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液に突沸防止のためにイソプロピルアルコール20 mlを加えて減圧乾固し、残留物をメタノールで10 ml溶解した。不溶物をろ過した後、Sep-Pak NH₂カートリッジに通し、メタノール10 mlと蒸留水10 mlで洗浄した後、0.1 Mリン酸緩衝液20 mlで溶出した。この溶出液をSep-Pak C₁₈カートリッジに通し、蒸留水10 mlと5%メタノール10 mlで洗浄した後、メタノール・アセトニトリル混液(6:4)1 mlを用いて、25 mlの試験管に溶出し、誘導体調製用の試験溶液とした。

7. PFPAによる誘導体の調製 試験溶液を45°Cの水浴中で減圧乾固し、これにPFPA 100 µlを加え、ときどき振盪しながら50°Cで50分間反応させた。反応後、ヘキサン1 ml及び蒸留水4 mlを加え20秒間激しく振盪した。下層の水層をピペットで取り除いた後、10%メタノール5 mlでヘキサン層を洗浄した。静置後、ヘキサン層を分取しGC用試験溶液とした。

結果及び考察

1. 分離カラムの検討

測定に用いる分離カラムとして, OV-1, OV-17, OV-101 及び Diasolid を用いて検討した.

その結果, OV-1 は誘導化試薬由来のピークと分離が不十分であり, OV-101 と Diasolid は, 誘導体のピークがブロードであった. OV-17 を用いたときが分離及び感度の点で最も良好であったので, これを用いることにした.

2. DESG の PFPA 誘導体

DESG の PFPA 誘導体を GC-MS を用いて測定した時のトータルイオンクロマトグラム (TIC) とマススペクトルを, Fig. 1 に示した.

マススペクトルには m/z 414 の分子イオンピークがみられ, これは DES の水酸基の 1 つにペンタフルオロプロピオン酸が結合した分子量に一致する. したがって, これらの誘導体は, DESG のグルクロン酸抱合がとれて PFPA 1 分子が付加した化

合物であると推定した.

DESG の *trans* 体は有機溶媒中で *cis* 体に異性体化することが知られており,⁹⁾すでに報告されている残留分析方法においても, *trans* 体と *cis* 体の両方を測定している. 本法による DESG の PFPA 誘導体も, TIC に 2 つのピークがみられた. これらのピークのマススペクトルは, 分子イオンピークとフラグメントピークが一致することから, *trans* 体と *cis* 体であると推定された. したがって, 検討の評価は両者のピークの和をもって行った.

3. 反応条件の検討

反応条件の検討は, DESG に換算して $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように調製した DESG 標準溶液を使用して行った.

3-1. PFPA の添加量 標準溶液 1 ml を 25 ml の共栓試験管に採り, 減圧乾固した後, PFPA を 25–200 μl 加えて 50°C で 50 分間反応させ, 添加量について検討し, その結果を Fig. 2 に示した. PFPA 50 μl 以下では, 75 μl 以上加えたときより

Fig. 1. Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of PFPA Derivatives of DESG

(A) Total ion chromatogram, (B) Mass spectrum of peak (1), (C) Mass spectrum of peak (2).

Fig. 2. Effect of Amount of PFPA on Acylation of DESG

ピーク面積が小さく、反応の再現性も悪かった。75 μ l 以上では、ピーク面積は一定となり、再現性も良好であったことから、反応には、DESG と十分接触できる量の PFPA が必要であると考えられた。この結果から、試料由来の夾雑物も考慮し、PFPA の添加量は 100 μ l とした。

3-2. 反応温度と反応時間 反応温度については室温–60°C まで、反応時間については 20–120 分間まで変化させてピーク面積を測定し、その結果を Fig. 3 に示した。

室温ではピーク面積は 120 分間まで増加し続けたが、30°C では 100 分間で、40°C では 80 分間で、50°C では 40 分間で、60°C では 20 分間でピーク面積は一定になった。しかし、60°C で反応させると測定対象以外のピークが現れ、ピーク面積は 50°C で反応させたときよりも減少していた。

この結果から、反応温度は 50°C、反応時間は 50 分間とした。

3-3. 加水量と振盪時間 過剰試薬の除去及びグルクロン酸結合の加水分解のために必要な水量について検討した。標準溶液 1 ml を PFPA にて誘導体とした後、加える蒸留水の量を 1–10 ml まで変化させてピーク面積を測定した。蒸留水 3 ml 以上でピーク面積は一定になり、9 ml 以上では減少していた。この結果から、加水量は 4 ml とした。

次に、振盪時間について検討した。標準溶液 1 ml を PFPA にて誘導体とした後、蒸留水 4 ml を加え、振盪時間を 10 秒から 60 秒まで変化させてピーク面積を測定した。振盪時間 10 秒間以上で、ピーク面積は一定になった。この結果から、振盪時間は 20 秒間とした。

3-4. 反応の再現性 DES に換算して

Fig. 3. Effect of Reaction Temperature and Time on Acylation of DESG

▼ Room temperature, ■ 30°C, □ 40°C, ● 50°C, ○ 60°C.

TABLE I. Reproducibility of Peak Area of PFPA Derivatives of DESG Obtained by Proposed Method

Conc. (μ g)	Total Peak Area $\pm$ S.D.	C.V. (%)
0.1	97 058 $\pm$ 3 423	3.5
0.2	193 623 $\pm$ 7 098	3.7
0.4	396 219 $\pm$ 12 847	3.2
0.5	480 144 $\pm$ 11 704	2.4

(n=5)

0.1–0.5 μ g の DESG を、以上の条件により PFPA 誘導体を調製し、ピーク面積の再現性について検討した。Table I に示したように、各濃度におけるピーク面積の変動係数は 2.4–3.7% であり、定量分析に十分使用できると思われた。

4. 牛肉からの抽出溶媒の検討

牛肉からの DESG の抽出溶媒として、メタノール⁴⁾や 90%アセトニトリル¹⁰⁾などが用いられている。そこで、メタノールと 90%アセトニトリルについて検討したところ、90%アセトニトリルを用いた方が狭雑物が少なくクロマトグラム上の妨害ピークが少なかったため、これを用いることにした。

5. クリーンアップ法の検討

DESG は、水溶性が高いため液–液分配による精製は困難であるため、固相抽出法による精製を検討した。

5-1. NH₂ カラムによるクリーンアップの検討 DESG は Sep-pak NH₂ カラムに強く保持され、メタノール 10 ml と蒸留水 10 ml のいずれにおいても溶出されなかった。そこで、メタノール 10 ml と蒸留水 10 ml を洗浄液として用いた。

TABLE II. Effect of Eluant on Elution of DESG from NH₂ Cartridge

Eluant	Recovery (%)
0.05 M NaCl	77.4
0.1 M NaCl	86.3
0.2 M NaCl	86.4
0.05 M Phosphate Buffer	94.6
0.1 M Phosphate Buffer	98.8
0.2 M Phosphate Buffer	98.2

1) Extract of beef to which spiked 0.2 µg of DESG was used.

次に、溶出条件について検討した。溶出液には 0.05 M—0.2 M の塩化ナトリウム溶液とリン酸緩衝液を用い、その結果を Table II に示した。標準品のみの時はいずれの溶出液でも完全に溶出されたが、試料抽出液に標準品を添加した場合には溶出量に差がみられ、塩化ナトリウム溶液よりもリン酸緩衝液が優れていた。リン酸緩衝液を用いた場合、0.1 M 以上では溶出量に差はなかったが、0.2 M では溶出液中に狭雑物が多くなった。これらの結果から、溶出液に 0.1 M リン酸緩衝液を用いることにした。

次に、溶出に必要な液量について検討した。NH₂ カラムからの溶出状況は Fig. 4 に示したように、

Fig. 4. Elution Profile of DESG from NH₂ Cartridge with 0.1 M Phosphate Buffer

DESG は 20 ml で完全に溶出したので、溶出液量は 20 ml とした。

5-2. C₁₈ カラムによるクリーンアップの検討
NH₂ カラムにより調製した溶出液を用い、PFPA 誘導体を調製して GC に注入すると、Fig. 5 (C) に示したように、クロマトグラム上にまだ妨害ピークがみられ、再現性も悪かった。そこで、さらに C₁₈ カラ

Fig. 5. Gas Chromatograms of (A) DESG (0.05 µg), (B) Nonspiked Beef, (C) Spiked (0.005 µg/g) Beef without cleaned up by C₁₈ cartridge and (D) Spiked (0.005 µg/g) Beef obtained by Proposed Method

ムによるクリンアップを検討した。

NH₂ カラムからの溶出液を Sep-pak C₁₈ カラムに負荷したところ、DESG は保持された。そこで、洗浄液として蒸留水 10 ml, 5%メタノール 10 ml 及び 10%メタノール 10 ml を用いて検討したところ、蒸留水と 5%メタノールでは溶出されなかった。この結果から、洗浄液は 5%メタノール 10 ml と蒸留水 10 ml を用いることにした。

次に、溶出条件について検討した。メタノール 1 ml で DESG は溶出するが、同時に狭雑物も溶出された。そこで、メタノールとアセトニトリルの混液で検討したところ、メタノール/アセトニトリル(6/4) 混液を用いると狭雑物が少なく、また溶出液量も 1 ml で十分であった。

本法により得られたクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

6. 検量線

標準原液を DES に換算して 0.02—0.5 µg/ml の範囲に希釈し、それぞれの 1 ml をとって、PFPA 誘導体を調製した。GC に注入し、得られた 2 つのピーク面積を合計して検量線を作成した。検量線は、0.02—0.5 µg の範囲で原点をとる直線性を示した。

7. 添加回収実験

市販の牛肉 10 g に、0.005—0.02 µg/g の濃度になるように DESG を添加し、それぞれの濃度について 6 回ずつ回収実験を行い、その結果を Table III に示した。回収率は 86.8—89.2%, 変動係数は 3.5—5.0% であり、良好な結果が得られた。

また、本法による検出限界は 0.001 µg/g であった。

8. 実試料への適用

TABLE III. Recovery of DESG from Spiked Beef

Spiked level (µg/g)	Recovery (%)	C.V. (%)
0.005	88.7	5.0
0.01	86.8	4.4
0.02	89.2	3.5

(n=6)

本法を用いて、市販の国産牛肉と米国産牛肉のそれぞれ 10 検体について検査を行ったところ、いずれからでも DESG は検出されなかった。

ま と め

ジエチルスチルベストロールは、食肉中では、遊離型では検出されず、ほとんどがグルクロン酸抱合体として存在することから、ジエチルスチルベストロールの残留分析法として、グルクロン酸抱合体を測定する方法について検討した。

1) 抽出溶媒に 90%アセトニトリルを用い、NH₂ カラムカートリッジと C₁₈ カラムカートリッジを用いてクリンアップした後、無水ペンタフルオロプロピオン酸で誘導体を調製することにより、高感度に測定することができた。

2) 試料に DESG を 0.005—0.02 µg/g の濃度に添加したとき、回収率は 86.8—89.2% であり、変動係数は 3.5—5.0% であった。また、検出限界は 0.001 µg/g であった。

3) 本法を用いて、市販の国産牛肉と米国産牛肉のそれぞれ 10 検体を検査したところ、DESG は検出されなかった。

謝辞 本研究は、厚生省科学研究費の一部を使用して行ったものです。関係各位に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) R. Verbeke, *J. Chromatogr.*, **177**, 69 (1979).
- 2) E.H.J.M. Jansen, P.W. Zoontjes, R. Both-Miedema, H. Van Blitterswijk, R.W. Stephany, *J. Chromatogr.*, **347**, 379 (1985).
- 3) 宮崎奉之, 橋本常生, 丸山 努, 松本昌雄, 中澤裕之, 食衛誌, **30**, 384 (1989).
- 4) A.L. Donoho, W.S. Johnson, R.F. Sieck, W.L. Sullivan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 785 (1973).
- 5) D.E. Coffin, J.C. Pilon, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 352 (1973).
- 6) F.P. Abramson, M.P. Lutz, *J. Chromatogr.*, **339**, 87 (1985).
- 7) H.A. Stan, B. Abraham, *J. Chromatogr.*, **195**, 231 (1980).
- 8) L.G.M.T. Tuinstra, W.A. Traag, H.J. Keukens, R.J. Van Mazijk, *J. Chromatogr.*, **279**, 533 (1983).
- 9) W.A. White, N.H. Ludwig, *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 388 (1971).
- 10) W.G. Smith, E.E. McNeil, *Anal. Chem.*, **44**, 1084 (1972).