4．試験溶液の調製

a　抽出法

試料10.0ｇ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分間遠心分離し、上澄液を採る。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、毎分3,000回転で５分間遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、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／１酢酸ナトリウム溶液(pH5.0)10mlを加えてかくはんする。

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を加えてかくはんした後、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　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により検量線を作成する。なお、４．試験溶液の調製に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.0005mg／kgに相当する試験溶液中の濃度は0.0005mg／１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／１酢酸アンモニウム溶液の混液（３：２）を用いる。

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

⑬～⑱　（略）

硫酸ナトリウムを加え，時々振り混ぜながら15分間放置した後，すり合わせ減圧濃縮器中にろ過し，40℃以下でジクロロメタンを除去する。この残留物にｎ－ヘキサン及びベンゼンの混液（３：１）４mlを加えて溶かす。

b　精製法

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（500mg）に，ｎ－ヘキサン及びベンゼンの混液（３：１）10mlを注入し，流出液は捨てる。このカラムにａ　抽出法で得られた溶液を注入した後，ｎ－ヘキサン及びベンゼンの混液（３：１）２ml，ジクロロメタン４mlを順次注入し，流出液は捨てる。このカラムにジクロロメタン及びメタノールの混液（９：１）８mlを注入し，溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り，40℃以下でジクロロメタン及びメタノールを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液（１：１）0.5mlを加えて溶解し，これを試験溶液とする。

5．操作法

a　定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤　オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径２～５μm）を用いる。

カラム管　内径2.0～6.0mm，長さ100～250mmのステンレス管を用いる。

カラム温度　40℃

移動相　アセトニトリル及び0.002mol／１酢酸アンモニウムの混液（１：１）を用いる。ジエチルスチルベストロールが約７分で流出する流速に調整する。

b　定量試験

ａ　定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき，ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

⑬～⑱　（略）