

アラクロール試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

アラクロール

加水分解によりDEA【2,6-ジエチルアニリン】へ変換される代謝物

加水分解によりHEEA【2-エチル-6-(1-ヒドロキシエチル)アニリン】へ変換される代謝物

2. 適用食品

畜産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

水蒸気蒸留装置（本装置はガラス製であり、その概略は次の図による。）

A：1,000 mLの丸底フラスコ（水蒸気発生用）

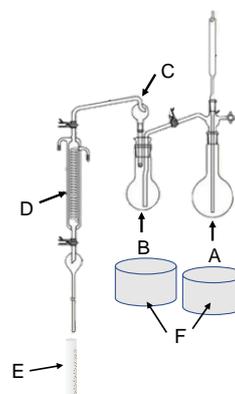
B：500 mLの丸底フラスコ（蒸留用）

C：蒸留トラップ

D：冷却管

E：100 mLのメスシリンダー

F：マントルヒーター



4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（200 mg） 内径12~13 mmポリプロピレン製のカラム管に、窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体200 mgを充てん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。

アラクロール標準品 本品はアラクロール95%以上を含む。

DEA標準品 本品はDEA95%以上を含む。

HEEA標準品 本品はHEEA95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gにメタノール50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にメタノール25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールで正確に100 mLとする。この溶液から正確に50 mLを丸底フラスコ（蒸留用）に分取し、40℃以下で約3 mLに濃縮する。

2) 加水分解

1) で得られた濃縮液に50 w/v%水酸化ナトリウム溶液50 mLを加える。これに消泡用シリコン1~2滴及び沸騰石を加えた後、丸底フラスコ（蒸留用）を直ちに蒸留装置に取り付ける。別に、冷却管を10℃以下に冷却し、流止め連結管の下端を水（捕集液）10 mLを入れた100 mLのメスシリンダー（氷冷）の液中に浸す。また、丸底フラスコ（水蒸気発生用）に水1,000 mLを入れ、沸騰石を加えた後、水蒸気蒸留装置に取り付けて100℃に加熱しておく。丸底フラスコ（蒸留用）を100℃に加熱し、30分間加水分解を行った後に水蒸気蒸留を開始する。留液が75 mL（捕集液と合わせた液量）になるまで水蒸気蒸留し、留液が中性であることをpH試験紙で確認する。捕集した留液に2 vol%トリエチルアミンを加え、100 mLとする。

3) 精製

窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（200 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、水5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で約1 mLに濃縮し、水及びメタノール（3：2）混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

DEA標準品及びHEEA標準品をそれぞれメタノールに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して水及びメタノール（3：2）混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MS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0.002 mg/kg（アラクロール換算）に相当する試験溶液中の濃度は0.001 mg/L（アラクロール換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でDEA及びHEEAの含量を求める。加水分解によりDEA及びHEEAに変換される代謝物を含むアラクロールの含量を求める場合には、次式により求める。

アラクロール（加水分解によりDEA及びHEEAに変換される代謝物を含む。）の含量（ppm）= $A \times 1.808 + B \times 1.633$

A：DEAの含量（ppm）

B：HEEAの含量（ppm）

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

（例）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液の混液（11：9）で1分間保持した後、（1：49）

までの濃度勾配を13分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

DEA：プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン105、77

HEEA：プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン148、118

注入量：5 μ L

保持時間の目安：

DEA：8分

HEEA：4分

10. 定量限界

アラクロール（加水分解によりDEAへ変換。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

DEA（加水分解によりDEAへ変換される代謝物を含む。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

HEEA（加水分解によりHEEAへ変換される代謝物を含む。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

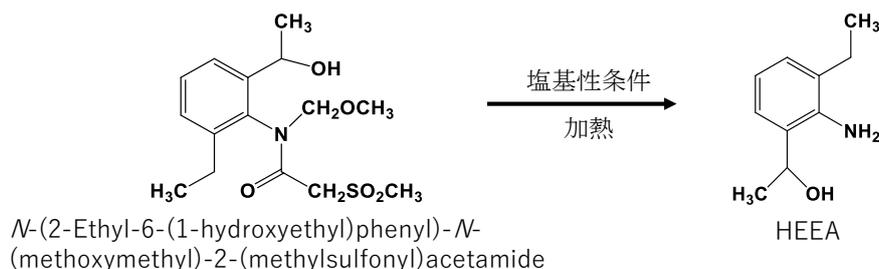
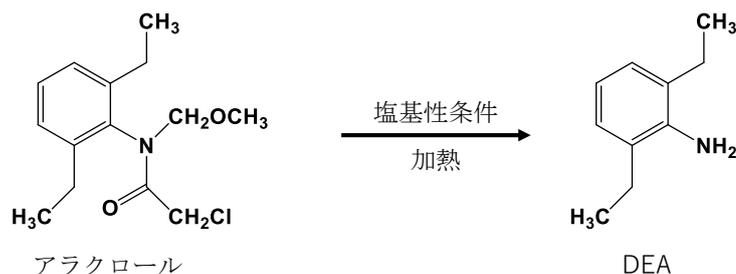
11. 留意事項

1) 試験法の概要

アラクロール及びその代謝物を試料からメタノールで抽出し、水酸化ナトリウム溶液中で加熱してDEA及びHEEAに加水分解した後、水蒸気蒸留によりDEA及びHEEAを捕集する。窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、DEA及びHEEAのそれぞれについて定量を行い、水酸化ナトリウム溶液中でDEA及びHEEAに加水分解される代謝物を含むアラクロールの含量を求める場合には、DEA及びHEEAの含量にそれぞれ換算係数を乗じてアラクロールの含量に換算し、これらの和を分析値とする。DEAの含量には、アラクロール及び加水分解によりDEAへ変換される代謝物が含まれる。

2) 注意点

- ① 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約 $2,130 \times g$ である。
- ② アラクロール標準品を用いて添加回収試験を実施し、DEAへの変換が十分に行われていることを確認すること。アラクロールからDEAへ十分に變換すれば、HEEAへの変換も行われると考えられる。



DEA 及び HEHA への変換

N-(2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)phenyl)-*N*-(methoxymethyl)-2-(methylsulfonyl)acetamide は、HEEA に変換される代謝物の一例として示した。

- ③ 捕集液に流止め連結管の先端（流止め連絡管の先端が破損しないように先端にシリコンチューブを付け、その先にガラス管を接続する）が浸るようにする。蒸留速度は約5～10 mL/分とする。
- ④ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、DEAが溶出した後に移動相のメタノール濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ⑤ 蒸留に用いる丸底フラスコ（蒸留用）は、50 w/v%水酸化ナトリウム溶液を用いるため、使用前にヒビや破損がないか確認する。また、繰り返し使用することによりガラスが劣化するため、ヒビや破損が無くても10回程度で必要に応じて新しいものに交換する。
- ⑥ 留液が中性であることをpH試験紙で確認するが、塩基性になった場合、分析対象化合物の捕集が不十分になる可能性があるため、再試験する必要がある。
- ⑦ DEAは揮発しやすいため、5. 試験溶液の調製の「2）加水分解」における加水分解操作及び水蒸気蒸留操作では、操作中の揮散に注意する。また、実験器具の汚染にも注意する。
- ⑧ DEA及びHEEAのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

DEA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン 105

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン 77

HEEA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン 148

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン 118

- ⑨ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C