

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

アラクロール試験法（畜産物）

アラクロール試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

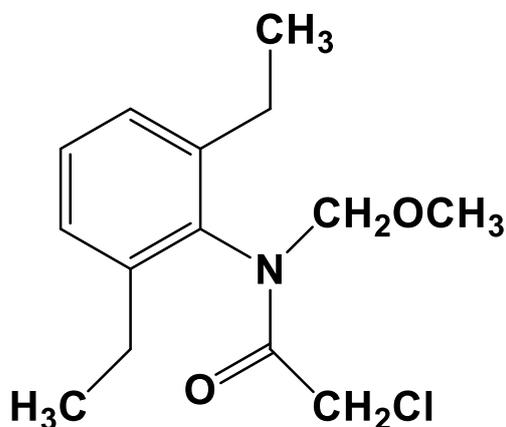
1. 背景・目的

アラクロールは、米国モンサント・カンパニーによって開発された酸アミド系除草剤であり、超長鎖脂肪酸の合成阻害作用により、成長部位での正常な細胞分裂を阻害することによって植物を枯死させると考えられている。アラクロールは米国等で登録が取得されている。一方、日本では1970年に初めて農薬登録が取得された。現在の農畜産物の規制対象に関する留意点〔食安発0310第1号（平成26年3月10日）〕は、「アラクロールとは、畜産物にあつてはアラクロール及び加水分解により2,6-ジエチルアニリン又は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をアラクロールに換算したものの和をいい、その他の食品にあつてはアラクロールのみをいうこと」となっている。そのため、アラクロールの農作物に関する試験法は個別試験法（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号：アラクロール、イソプロカルブ、クレソキシムメチル、ジエトフェンカルブ、テニルクロール、テブフェンピラド、パクロブトラゾール、ピテルタノール、ピリプロキシフェン、ピリミノバックメチル、フェナリモル、ブタクロール、フルトラニル、プレチラクロール、メトラクロール、メフェナセット、メプロニル及びレナシル試験法（農産物））に適用されているが、留意点を考慮した畜産物の試験法はないため、本検討において、新たに個別試験法「畜産物中のアラクロール試験法」を開発した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： アラクロール（Alachlor 以下、ALAと略す）

構造式：



分子式： C₁₄H₂₀ClNO₂

分子量： 269.77

化学名： Alachlor (ISO名)、2-Chloro-2',6'-diethyl-N-methoxymethylacetanilide (IUPAC)

CAS番号： 15972-60-8

外観： 無色、淡黄色固体

溶解性： 水1 Lに170.31 mg溶解する (pH 7, 20°C)

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)： 3.09 (25°C)

沸点： 269°C (22 hPa)

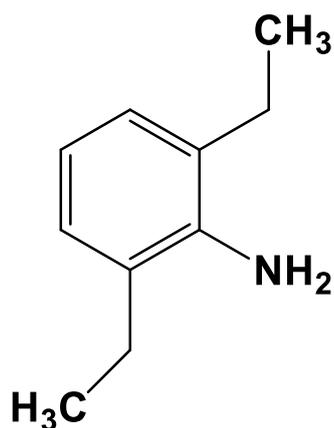
融点： 40.5~41.5°C

蒸気圧： 2.0 mPa (25°C)

出典：最新 農薬の残留分析法、中央法規出版; 改訂版 (2006/09)

分析対象化合物：2,6-ジエチルアニリン (2,6-Diethylaniline 以下、DEAと略す)

構造式：



分子式： $C_{10}H_{15}N$

分子量： 149.24

化学名： 2,6-Diethylaniline (ISO名) Benzamine, 2,6-diethyl- (IUPAC)

CAS番号： 579-66-8

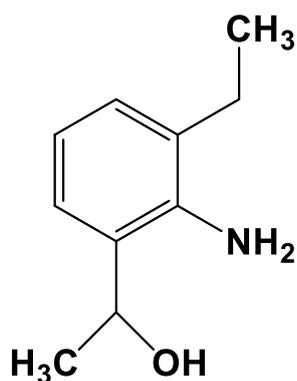
外観： 淡黄色の液体

融点： 3~4°C

出典：富士フイルム和光純薬 製品規格書

分析対象化合物：2-エチル-6-(1-ヒドロキシエチル) アニリン (2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)aniline 以下、HEEAと略す)

構造式：



分子式： $C_{10}H_{15}NO$

分子量： 165.24

化学名： 2-(N-Ethylanilino)ethanol (ISO名) 2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)aniline (IUPAC)

CAS番号： 108562-68-1

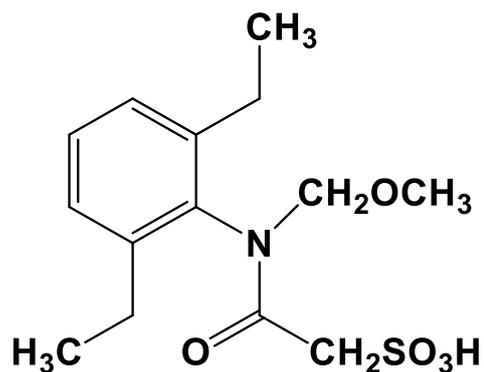
外観： 白色の粉末

融点： 37.0°C

出典：林純薬 製品規格書

分析対象化合物：Alachlor ethane sulfonic acid (以下、S代謝物と略す)

構造式：



分子式：C₁₄H₂₁NO₅S

分子量：315.39

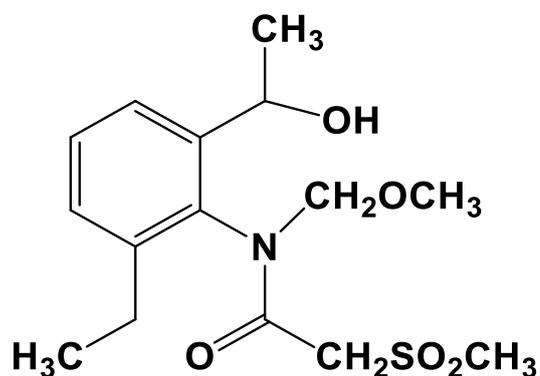
化学名：2-((2,6-Diethylphenyl)(methoxymethyl))-amino-2-oxoethanesulfonic acid (IUPAC)

CAS番号：142363-53-9

外観：白色の粉末

分析対象化合物：N-(2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)phenyl)-N-(methoxymethyl)-2-(methylsulfonyl)acetamide (以下、HM代謝物と略す)

構造式：



分子式：C₁₅H₂₃NO₅S

分子量：329.41

化学名：N-(2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)phenyl)-N-(methoxymethyl)-2-(methylsulfonyl)acetamide (IUPAC)

3. 基準値 [食安発0310第1号 (平成26年3月10日)、抜粋]

畜産物にあつてはアラクロール及び加水分解により2,6-ジエチルアニリン又は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をアラクロールに換算したものの和をいい、その他の食品にあつてはアラクロールのみをいう。

食品分類名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.02
豚の筋肉	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.02
牛の脂肪	0.02
豚の脂肪	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.02
牛の肝臓	0.02
豚の肝臓	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.02
牛の腎臓	0.02
豚の腎臓	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.02
牛の食用部分	0.02
豚の食用部分	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.02
鶏の筋肉	0.02
その他の家さんの筋肉	0.02
鶏の脂肪	0.02
その他の家さんの脂肪	0.02
鶏の肝臓	0.02
その他の家さんの肝臓	0.02
鶏の腎臓	0.02
その他の家さんの腎臓	0.02
鶏の食用部分	0.02
その他の家さんの食用部分	0.02
鶏の卵	0.02
その他の家さんの卵	0.02

[実験方法]

1. 試料

試料は滋賀県内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に記載した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 牛の乳

全体を混合し均一化した。

(5) 鶏卵

殻を除去し卵黄と卵白をよく混合し均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

ALA標準品： 純度98%以上（富士フィルム和光純薬製）

DEA標準品： 純度98%以上（富士フィルム和光純薬製）

HEEA標準品： 純度95%以上（林純薬工業製）

S代謝物： 純度不明（Monsanto Companyから提供）；qNMRにより88.56%とした。

HM代謝物：純度不明（Monsanto Companyから提供）

(2) 試薬等

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン、メタノール： 残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬）

蒸留水、アセトニトリル、メタノール、ギ酸： LC-MS用（富士フィルム和光純薬製）

トリエチルアミン、酢酸アンモニウム、硫酸： 特級（富士フィルム和光純薬製）

50 w/v%水酸化ナトリウム溶液： 精密分析用（富士フィルム和光純薬製）

消泡剤： Antifoam B Emulsion aqueous-silicone emulsion（メルク製）

沸騰石：化学用（富士フィルム和光純薬製）

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： InertSep PLS-3
（200 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス製）

(3) 試液

① 標準原液

ALA標準原液：ALA標準品10 mgを精秤し、メタノール10 mLに溶解して1 mg/mLの濃度の溶液を調製した。なお、純度補正は実施していない。

DEA標準原液：DEA標準品10 mgを精秤し（純度補正は実施していない）、メタノールに溶解して1 mg/mL（ALAとして）の濃度の溶液を調製した。なお、DEAの濃度からALAの濃度への換算は、換算係数1.808（ALAの分子量をDEAの分子量で除した値）を用いて行った。

HEEA標準原液：HEEA標準品10 mgを精秤し（純度補正は実施していない）、メタノールに溶解して1 mg/mL（ALAとして）の濃度の溶液を調製した。なお、HEEAの濃度からALAの濃度への換算は、換算係数1.633（ALAの分子量をHEEAの分子量で除した値）を用いて行った。

S代謝物標準原液：S代謝物標準品10 mgを精秤し（純度補正は実施していない）、メタノールに溶解して1 mg/mL（ALAとして）の濃度の溶液を調製した。なお、S代謝物の濃度からALAの濃度への換算は、換算係数0.855（ALAの分子量をS代謝物の分子量で除した値）を用いて行った。また、純度補正は実施していない。

HM代謝物標準原液：HM代謝物標準品10 mgを精秤し（純度補正は実施していない）、メタノールに溶解して1 mg/mL（ALAとして）の濃度の溶液を調製した。なお、HM代謝物の濃度からALAの濃度への換算は、換算係数0.819（ALAの分子量をHM代謝物の分子量で除した値）を用いて行った。また、純度補正は実施していない。

② 添加用標準溶液（定量限界濃度（0.002 ppm））

ALA標準原液及びDEA、HEEA、S代謝物、HM代謝物標準原液をそれぞれメタノールで希釈してALAとして0.02 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液（基準値濃度（0.02 ppm））

ALA標準原液及びDEA、HEEA、S代謝物、HM代謝物標準原液をそれぞれメタノールで希釈してALAとして0.2 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

④ その他

2 vol%トリエチルアミン：トリエチルアミン 10 mLに水を加えて溶解し、500 mLとした。

3. 装置等

ホモジナイザー： Polytron PT 10-35 GT（Kinematica製）

遠心分離機： Himac CF15RN（日立工機製）

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置Flex3（ELGA製）

ロータリーエバポレーター： N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000（東京理化工機製）

超音波洗浄機：FU-3H（東京硝子器械製）

水蒸気蒸留装置：STR-1D型（宮本理研工業製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC H-Class	Waters
MS	Xevo TQD	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1	Waters

4. 測定条件

LC-MS/MS（ALA, DEA, HEEAの条件）

LC条件	
カラム	TSKgel ODS-100 Z（内径 2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm：東ソー製）
移動相流速（mL/min）	0.2
注入量（µL）	5
カラム温度（℃）	40
移動相	A液：0.1 vol%ギ酸 B液：0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液

グラジエント条件	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
	0.0	55	45
	1.0	55	45
	14.0	2	98
	17.0	2	98
	17.1	55	45
	20.0	55	45
MS条件			
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)		
イオン化モード	ESI (+)		
キャピラリー電圧 (kV)	2.0		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	400		
コーンガス	N ₂ , 50 L/hr		
脱溶媒ガス	N ₂ , 800 L/hr		
コリジョンガス	Ar		
定量イオン (m/z)	ALA MS/MS: 238.0→162.0 [コーン電圧30 (V)、コリジョンエネルギー 15 (eV)] DEA MS/MS: 150.0→105.0 [コーン電圧35 (V)、コリジョンエネルギー 20 (eV)] HEEA MS/MS: 166.0→148.0 [コーン電圧10 (V)、コリジョンエネルギー 10 (eV)]		
定性イオン (m/z)	ALA MS/MS: 238.0→147.0 [コーン電圧30 (V)、コリジョンエネルギー 25 (eV)] DEA MS/MS: 150.0→77.0 [コーン電圧35 (V)、コリジョンエネルギー 30 (eV)] HEEA MS/MS: 166.0→118.0 [コーン電圧10 (V)、コリジョンエネルギー 25 (eV)]		
保持時間 (分)	ALA 13.0 DEA 8.0 HEEA 4.0		

LC-MS/MS (S代謝物, HM代謝物の条件)

LC条件	
カラム	TSKgel ODS-120H (内径 2.0 mm、長さ150 mm、 粒子径3 μm : 東ソー製)
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A液 : 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル

グラジエント条件	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
	0.0	70	30
	3.0	70	30
	10.0	2	98
	13.0	2	98
	13.1	70	30
	17.0	70	30
MS条件			
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)		
イオン化モード	ESI (-)		
キャピラリー電圧 (kV)	2.0		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	400		
コーンガス	N ₂ , 50 L/hr		
脱溶媒ガス	N ₂ , 800 L/hr		
コリジョンガス	Ar		
定量イオン (m/z)	S代謝物 MS/MS:314.0→80.0 [コーン電圧50 (V)、コリジョンエネルギー 30 (eV)] HM代謝物 MS/MS: 328.0→137.0 [コーン電圧15 (V)、コリジョンエネルギー 10 (eV)]		
定性イオン (m/z)	S代謝物 MS/MS: 314.0→121.0 [コーン電圧50 (V)、コリジョンエネルギー 25 (eV)] HM代謝物 MS/MS: 328.0→93.0 [コーン電圧15 (V)、コリジョンエネルギー 30 (eV)]		
保持時間 (分)	S代謝物 7.6 HM代謝物 9.2		

5. 定量

DEA及びHEEAの標準原液を混合して水及びメタノール(3:2)で希釈し、ALA換算濃度として0.00005、0.0001、0.0002、0.0004、0.0008、0.0016、0.0031、0.0063、0.0125、0.025、0.04、0.05、0.08、0.1 mg/Lの標準溶液を調製した。検量線は、低濃度範囲(7点)および高濃度範囲(7点)に分けて実施した。これらの溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積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、検量線から絶対検量線法によりALAの含量を算出した。なお、検量線作成用の標準溶液は、ALAとしての濃度で調製した。なお、ALAとしての濃度からDEA濃度及びHEEA濃度への換算は、以下の換算係数(各化合物の分子量をALAの分子量で除した値)を用いて行った。

換算係数

DEA 0.553

HEEA 0.613

6. 添加試料の調製

(1) 定量限界濃度

牛の筋肉（添加濃度0.002 mg/kg）：試料10.0 gに0.02 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度0.002 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40°Cで加温して融解させたものに0.02 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、放置（室温）して再度凝固させた後、30分放置した。

牛の肝臓（添加濃度0.002 mg/kg）：試料10.0 gに0.02 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

牛の乳（添加濃度0.002 mg/kg）：試料10.0 gに0.02 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

鶏卵（添加濃度0.002 mg/kg）：試料10.0 gに0.02 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

(2) 基準値濃度

牛の筋肉（添加濃度0.02 mg/kg）：試料10.0 gに0.2 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度0.02 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40°Cで加温して融解させたものに0.2 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、放置（室温）して再度凝固させた後、30分放置した。

牛の肝臓（添加濃度0.02 mg/kg）：試料10.0 gに0.2 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

牛の乳（添加濃度0.02 mg/kg）：試料10.0 gに0.2 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

鶏卵（添加濃度0.02 mg/kg）：試料10.0 gに0.2 µg/mL（ALAとして）添加用標準溶液1.0 mLを添加して混合後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ALA及びその代謝物を試料からメタノールで抽出し、水蒸気蒸留法による塩基性条件下で加水分解と蒸留を行う。この留液を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、加水分解によりDEA及びHEEAに変換された代謝物をLC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

試料10.0 gを量り採り、メタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採った。残留物にメタノール25 mLを加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで、100 mLに定容した。この抽出液から正確に50 mL（試料5 g相当）を丸底フラスコ 500 mL（蒸留用）に採り、エバポレーターを用いて40°C以下で約3 mLまで減圧濃縮した。

(2) 蒸留

(1) で得られた丸底フラスコ 500 mL（蒸留用）に50 w/v%水酸化ナトリウム溶液 50 mLを加えた。これに消泡用シリコン1~2滴及び沸騰石を加えた後、直ちに蒸留装置に取り付けた。別に、冷却管を10°C以下（水道に専用のホースを装着し、そのホースを氷水に浸し水冷したもの）で冷やし、それに100 mL

用メスシリンダーに水（捕集液）10 mLを加えて流止め連結管の先端を浸して装着した。また、丸底フラスコ 1000 mL（水蒸気発生用）には、水1000 mLに沸騰石を加え、水蒸気蒸留装置に取り付けた。丸底フラスコ（蒸留用）を装置のマントルヒーターにより100°Cで30分間加熱し、加水分解を行った後に、コックを開けて水蒸気による蒸留を行った。留液が75 mL（捕集液と合わせた量）になるまで水蒸気蒸留し（受け器100 mLのメスシリンダーは氷冷しておく）、留液が中性であることをpH試験紙で確認した。蒸留が5～10 mL/分で加熱強度を調節し、捕集した留液に2 vol%トリエチルアミン溶液を加え、100 mLにした。

(3) ミニカラム精製

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、各流出液は捨てた。（2）で得られた溶液を全量注入した後（2～5 mL/分）、水5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル10 mLを注入し、溶出液をエバポレーターにより40°C以下で約1 mLまで濃縮し、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（約1 mLまで濃縮した溶液）を採り、各検討対象食品の添加用標準溶液を加えて、水及びメタノール（3：2）混液を加えて10 mLに定容したものをマトリックス添加標準溶液とした。なお、添加した混合標準溶液の濃度は、添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように、定量限界濃度と基準値濃度で調製した。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料10.0 g

メタノール抽出

↓ メタノール50 mLを加えホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採る

↓ 残留物はメタノール25 mLを加えホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採る

↓ 上澄液を合わせ、メタノールを加えて100 mL に定容

↓ 抽出液50 mL（試料5 g 相当）を丸底フラスコ（蒸留用）に採り、溶媒を除去（約3 mLまで濃縮）

加水分解

↓ 50 w/v% 水酸化ナトリウム 50 mLを加える

↓ 消泡用シリコン及び沸騰石を加える

↓ 丸底フラスコ（蒸留用）を100°Cで30分間加熱し、加水分解する

↓ 丸底フラスコ（水蒸気発生用）に水 1000 mLを入れ、沸騰石を加えた後、水蒸気蒸留装置に装着し、100°Cで加熱する

↓ 丸底フラスコ（水蒸気発生用）から水蒸気を丸底フラスコ（蒸留用）に導入し蒸留を行う（蒸留速度：5～10 mL/分）

↓ 蒸留後、氷冷した受け器（捕集液として水10 mLを入れた100 mLのメスシリンダー）に留液75 mL（捕集液と合わせた量）を回収する

↓ 2 vol%トリエチルアミン溶液を加えて100 mLにする（0.5 vol%トリエチルアミン溶液）

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 [InertSep PLS-3 (200 mg/20 mL)]

↓ アセトニトリル5 mL及び水5 mLでコンディショニング

↓ 留液を注入

↓ 水5 mLで洗浄

↓ アセトニトリル10 mLで溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

↓ 約1 mLまで濃縮

↓ 水及びメタノール（3：2）混液を加えて10 mLに定容（試料0.5 g相当/1 mL）

試験溶液

↓

LC-MS/MS

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

① MS条件の検討 (ALA, DEA, HEEA)

ESI (-) モードで測定した結果、 $[M-H]^-$ などの明確なイオンが観察されなかった。一方で、ESI (+) モードでは、スキャン測定について検討したところ、ALA、DEA及びHEEAのマススペクトルを検出することができた。ALAのスキャン測定におけるマススペクトル (コーン電圧30 (V)) では、プロトン付加分子に由来するイオン $[M+H]^+$ m/z 270及びナトリウム付加分子に由来するイオン $[M+Na]^+$ m/z 292が観察された。しかし、これらのイオンピークの再現性がなく、マトリックスの影響を受けてしまい十分な感度を得ることができなかった。一方で、フラグメントイオン m/z 238が最も強度が高くかつ夾雑物の影響を受けず安定な感度で観察されたため、本実験ではプリカーサーイオンと選択した (図1 (a))。DEA及びHEEAでは、いずれもプロトン付加分子に由来するイオン $[M+H]^+$ m/z 150及び m/z 166が最も高感度かつ安定に検出され、それらをプリカーサーイオンと選択した (図1 (b), (c))。また、ESI (-) モードでは、いずれも明確なイオンが観察されなかったことから、測定にはESI (+) モードを用いることにした。

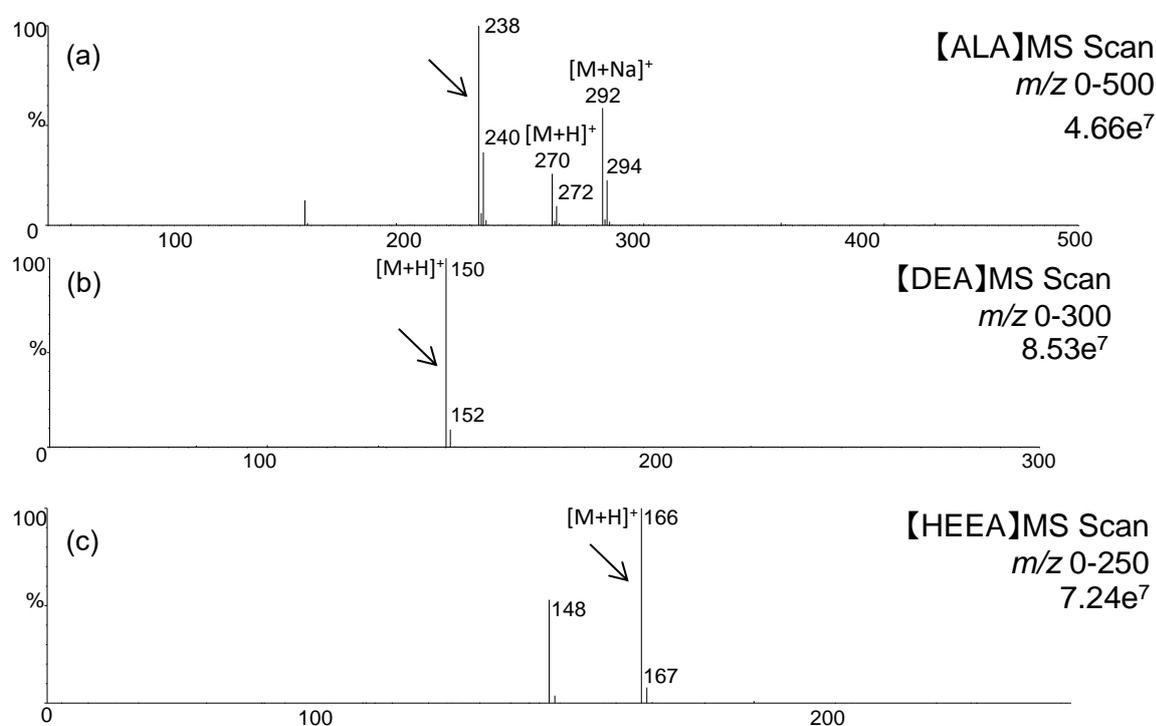


図1 ALA、DEA及びHEEAのスキャン測定により得られるマススペクトル
(a) ALA; スキャン範囲: m/z 50~500、測定条件: ESI(+)、コーン電圧 30V
(b) DEA; スキャン範囲: m/z 50~300、測定条件: ESI(+)、コーン電圧 35V
(c) HEEA; スキャン範囲: m/z 50~250、測定条件: ESI(+)、コーン電圧 10V

次に、各プリカーサーイオンから、プロダクトイオンスペクトルを測定した。ALAにおいて、最も高感度に測定できた m/z 238→162 (コリジョンエネルギー: 15 eV) を定量イオンとし、 m/z 238→147 (コリジョンエネルギー: 25 eV) を定性イオンとした (図2)。DEAにおいて、最も高感度に測定できた m/z 150→105 (コリジョンエネルギー: 20 eV) を定量イオンとし、次に強度の高かった m/z 150→77 (コリジョンエネルギー: 30 eV) を定性イオンとした (図3)。HEEAにおいて、最も高感度に測定できた m/z 166→148 (コリジョンエネルギー: 10 eV) を定量イオンとし、次に強度の高かった m/z 166→118 (コリ

ジョンエネルギー：25 eV) を定性イオンとした (図4)。また、夾雑物の影響などが生じた場合、適時、定量イオンを変更できるようにそれぞれのイオンをモニタリングすることとした。後述するLC条件で測定を行ったところ、いずれの定量・定性イオンも高いS/Nが得られた。以上の結果から、ESI (+) モードで測定し、上記の定量用及び定性用の測定イオンとして採用することとした。

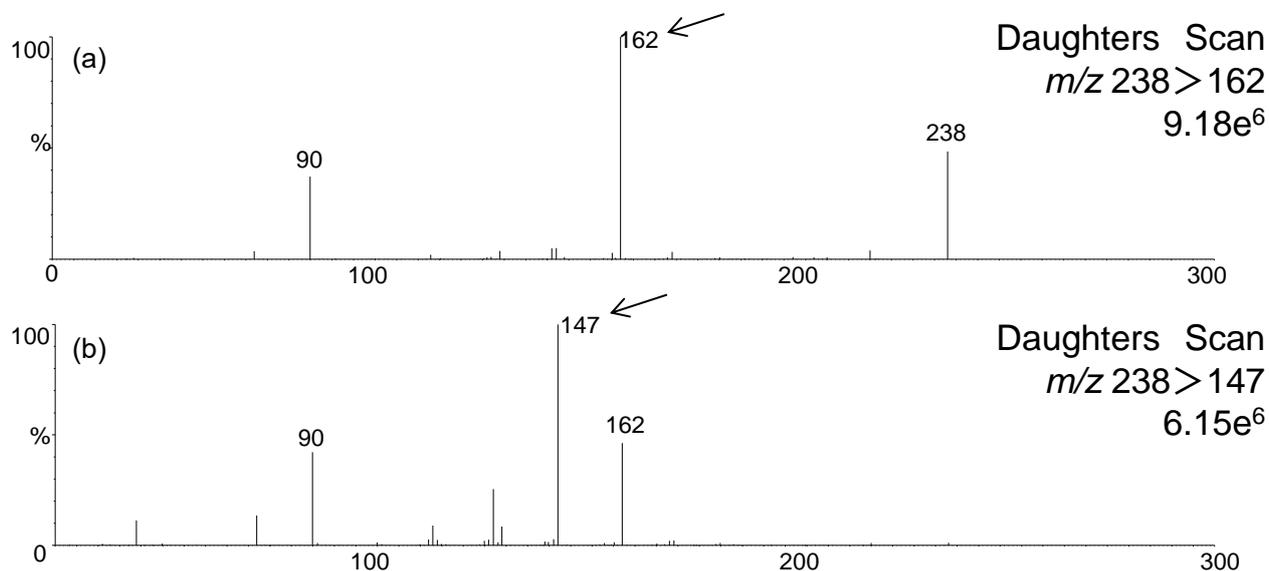


図2 ALAのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル

(a) プリカーサーイオン： m/z 238、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 15 eV

(b) プリカーサーイオン： m/z 238、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 25 eV

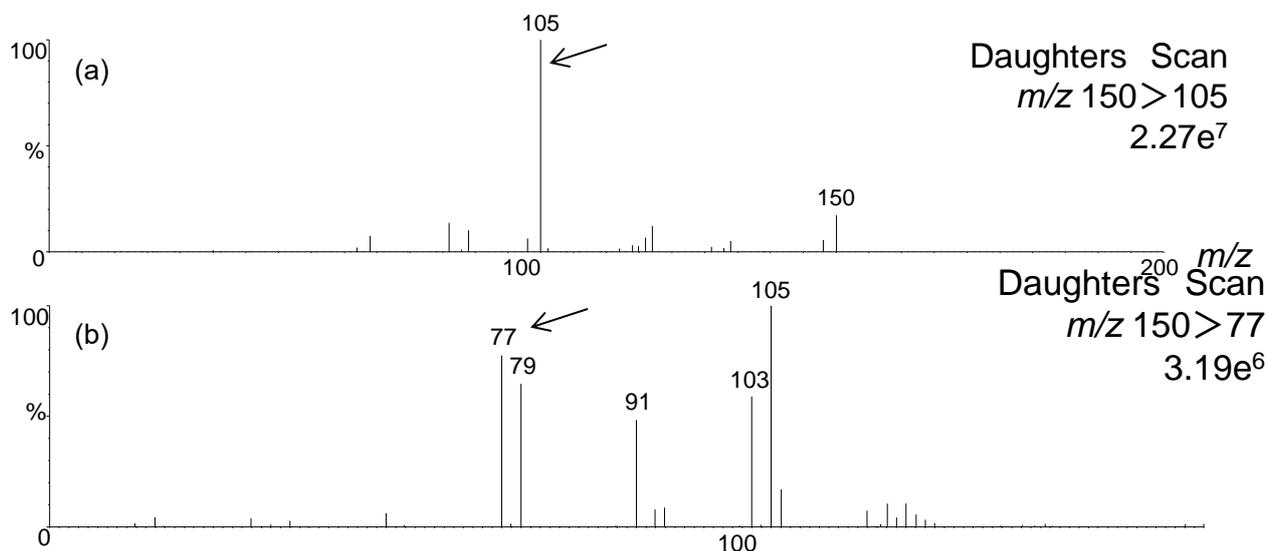


図3 DEAのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル

(a) プリカーサーイオン： m/z 150、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 20 eV

(b) プリカーサーイオン： m/z 150、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 30 eV

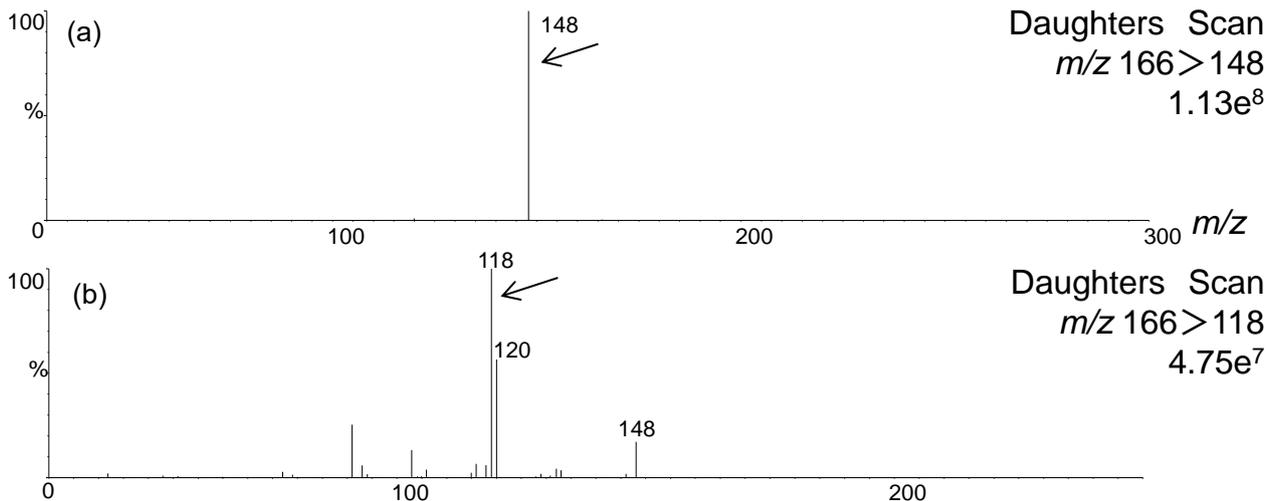


図4 HEEAのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル
 (a) プリカーサーイオン： m/z 166、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 10 eV
 (b) プリカーサーイオン： m/z 166、測定条件：ESI(+)、コリジョンエネルギー 25 eV

② MS条件の検討 (S代謝物, HM代謝物)

追加検討として、S代謝物及びHM代謝物に関してLC-MS/MS分析法を別途開発することとした。本条件も同様に、最適な条件を見つけるために、スキャン測定について検討したところ、ALAなどとは異なり、ESI (+) モードでは全くイオンを検出することができなかった。一方で、ESI (-) モードでは、移動相に酢酸アンモニウムを添加し、良好なマススペクトルを得ることができた。S代謝物のスキャン測定におけるマススペクトル (コーン電圧：50 V) では、脱プロトン分子に由来するイオン[M-H]⁻ m/z 314が観察された (図5 (a))。HM代謝物のスキャン測定におけるマススペクトル (コーン電圧：15 V) では、脱プロトン分子に由来するイオン[M-H]⁻ m/z 328のイオンが観察された (図5 (b))。

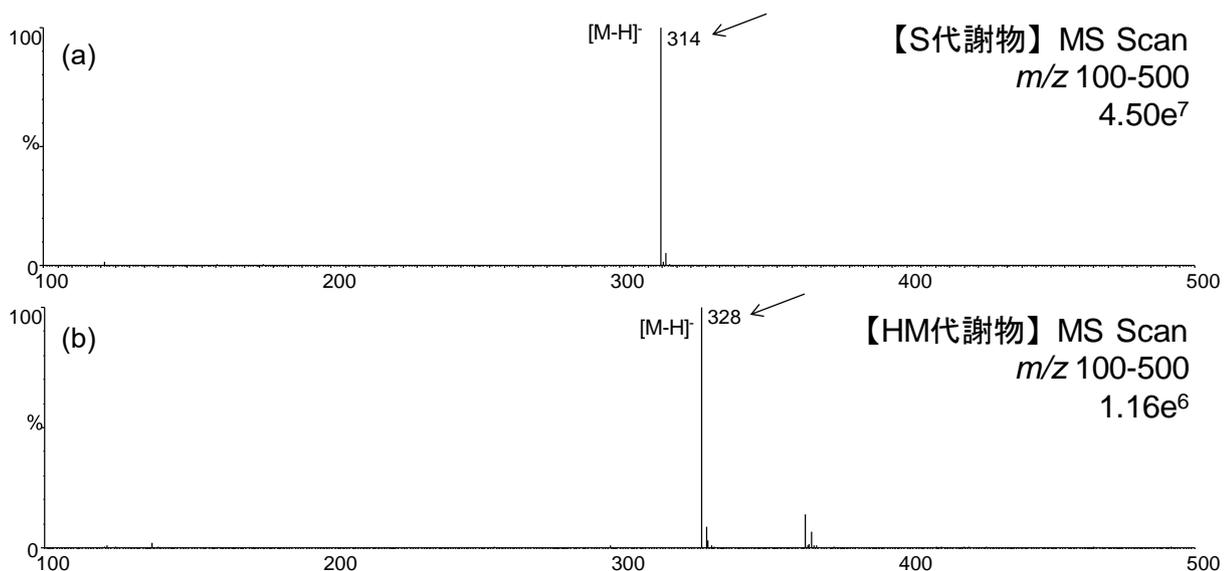


図5 S代謝物及びHM代謝物のスキャン測定により得られるマススペクトル
 (a) S代謝物; スキャン範囲： m/z 100~500、測定条件：ESI(-)、コーン電圧 50V
 (b) HM代謝物; スキャン範囲： m/z 100~500、測定条件：ESI(-)、コーン電圧 15V

次に、各プリカーサーイオンから、プロダクトイオンスペクトルを測定した。S代謝物において、最も

高感度に測定できた m/z 314→80 (コリジョンエネルギー: 30 eV) を定量イオンとし、 m/z 314→121 (コリジョンエネルギー: 25 eV) を定性イオンとした (図6)。HM代謝物において、最も高感度に測定できた m/z 328→137 (コリジョンエネルギー: 10 eV) を定量イオンとし、次に強度の高かった m/z 328→93 (コリジョンエネルギー: 30 eV) を定性イオンとした (図7)。また、夾雑物の影響などが生じた場合、適時、定量イオンを変更できるようにそれぞれのイオンをモニタリングすることとした。後述するLC条件で測定を行ったところ、いずれの定量・定性イオンも高いS/Nが得られた。以上の結果から、ESI (-) モードで測定し、上記の定量用及び定性用の測定イオンとして採用することとした。

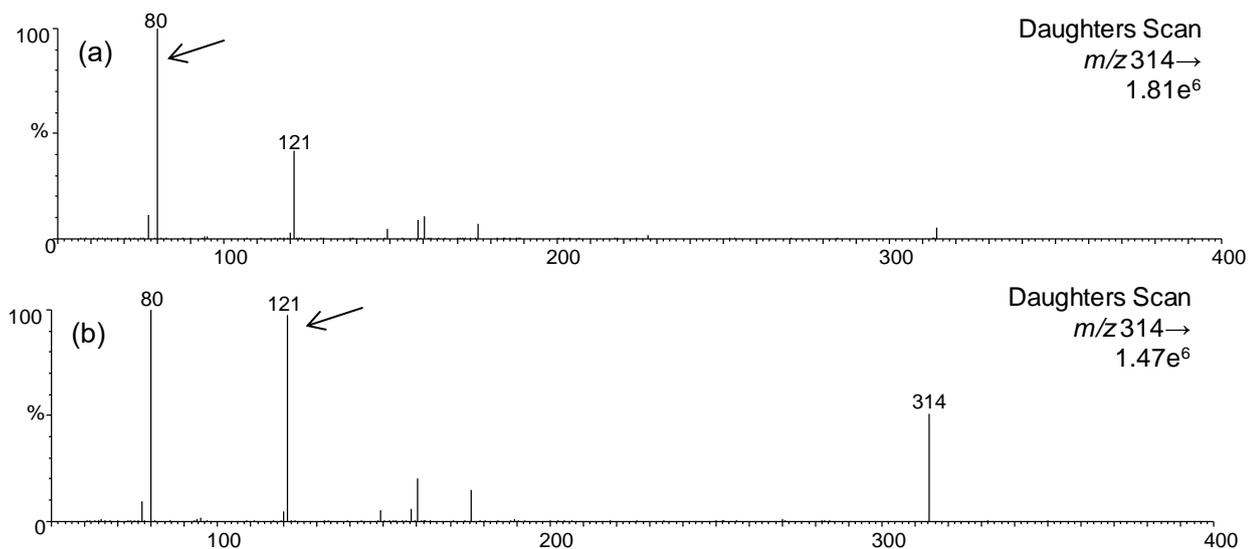


図6 S代謝物のプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル

- (a) プリカーサーイオン: m/z 314、測定条件: ESI(-)、コリジョンエネルギー 30 eV
- (b) プリカーサーイオン: m/z 314、測定条件: ESI(-)、コリジョンエネルギー 25 eV

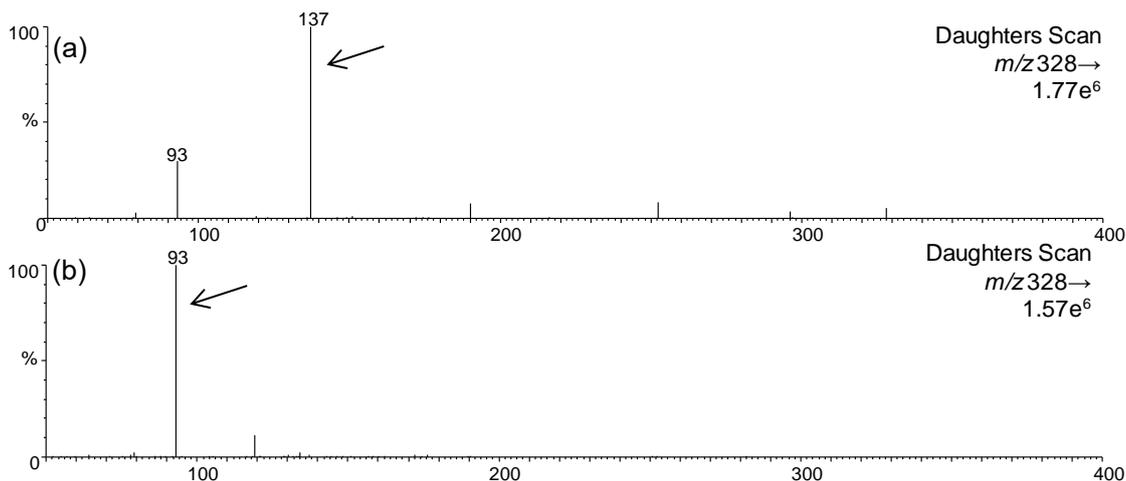


図7 HM代謝物のプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル

- (a) プリカーサーイオン: m/z 328、測定条件: ESI(-)、コリジョンエネルギー 10 eV
- (b) プリカーサーイオン: m/z 328、測定条件: ESI(-)、コリジョンエネルギー 30 eV

(2) LC条件の検討

① 溶解液の検討

アセトニトリル、メタノール及び水を用いて、ALA、DEA、HEEA、S代謝物、HM代謝物の溶解性を検討した。標準品約5 mgを溶媒 1 mLに加え、超音波で5分間攪拌した各種溶媒に溶解し、沈殿物がないかを目視で確認した結果を表1に示した。この結果、標準品はメタノールで溶解することとした。

表1 各溶媒におけるALA、DEA及びHEEAの溶解性

分析対象	アセトニトリル	メタノール	水
ALA	沈殿物あり	沈殿物なし	沈殿物なし
DEA	沈殿物なし	沈殿物なし	僅かな沈殿物あり
HEEA	沈殿物なし	沈殿物なし	僅かな沈殿物あり
S代謝物	沈殿物なし	沈殿物なし	沈殿物なし
HM代謝物	沈殿物なし	沈殿物なし	僅かな沈殿物あり

② 分析カラムの検討

移動相に0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液及び0.1 vol%ギ酸の混液を用いて、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムを検討した。東ソー製のTSKgel ODS-100V、TSKgel ODS-100Z及びTSKgel ODS-120H（すべて内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm）において、S/Nを比較した結果、TSKgel ODS-100ZがS/Nが良好であった（表2）。よって、ALA、DEA、HEEAの一斉分析には、TSKgel ODS-100Zを用いて検討することとした。次に、アイソクラティック及びグラジエント溶出を比較したところ、アイソクラティック溶出（0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液及び0.1 vol%ギ酸の混液）では、ピークバンドが広がり、グラジエント溶出により改善し、良好なピーク形状が得られた。また、添加ギ酸濃度も検討したが、0.1～0.5 vol%の間では、特にピーク形状などの変化はなかったため、濃度が低い0.1 vol%を採用した。以上の結果から、ALA、DEA、HEEAの一斉分析には、移動相として0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液及び0.1 vol%ギ酸の混液を用いて、グラジエント溶出を行うこととした。

表2各カラムにおけるALA、DEA及びHEEAのS/N比の値

分析対象	TSKgel ODS-100V	TSKgel ODS-100Z	TSKgel ODS120H
ALA	1761	3538	2017
DEA	1062	4785	1298
HEEA	1782	3924	4683

追加検討であるS代謝物及びHM代謝物は別途LC-MS/MS条件を検討することとした。ESI（－）モードのため、カラムに逆相系TSKgel ODS-120H、TSKgel ODS-100V及びTSK ODS-100Z（すべて内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm）に酢酸アンモニウム又はギ酸アンモニウムを添加した検討を行った。カラム（図8）、有機溶媒であるアセトニトリル又はメタノール（図9）、酢酸アンモニウム又はギ酸アンモニウム（図10）を検討した結果、TSKgel ODS-120Hを用いた酢酸アンモニウム及びアセトニトリルで良好なピーク形状を得ることができた。

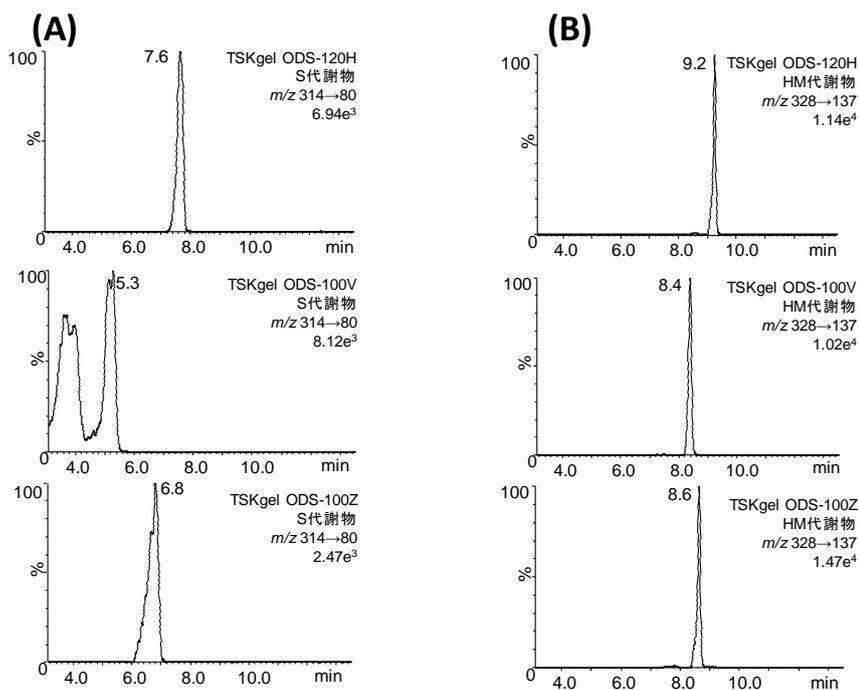


図8 S代謝物 (A) 及びHM代謝物 (B) のSRMクロマトグラム (カラムの検討)
 移動相: 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル
 その他条件: 4. 測定条件を参照

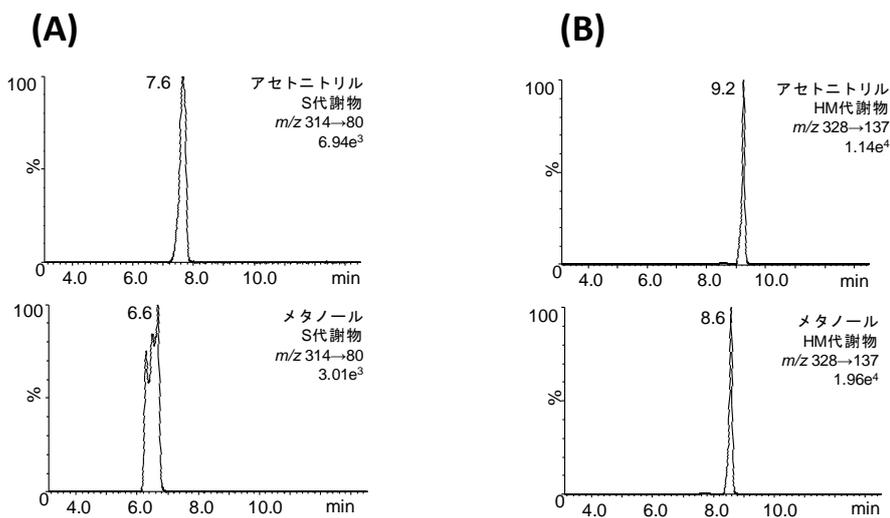


図9 S代謝物 (A) 及びHM代謝物 (B) のSRMクロマトグラム (移動相Bの検討)
 移動相: 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルもしくはメタノール
 その他条件: 4. 測定条件を参照

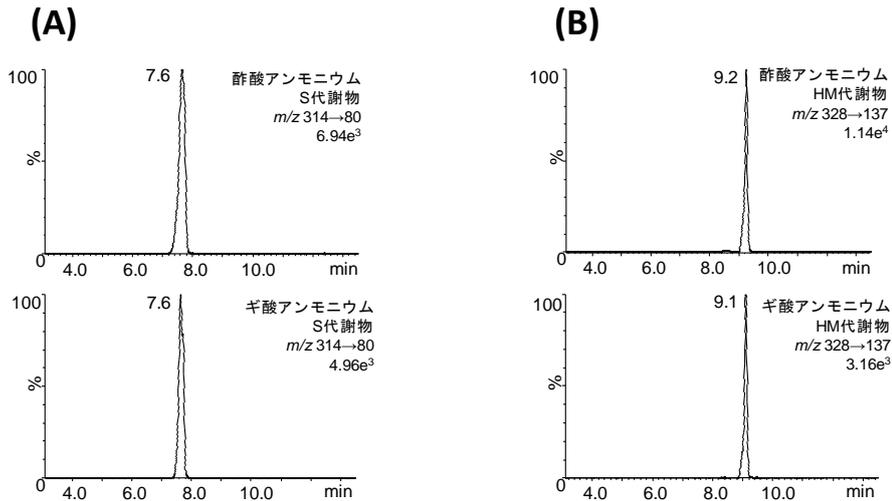


図10 S代謝物 (A) 及びHM代謝物 (B) のSRMクロマトグラム (移動相Aの検討)
 移動相: 20 mmol/L 酢酸アンモニウムもしくはギ酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル
 その他条件: 4. 測定条件を参照

(3) 検量線

図11~13にALA、DEA及びHEEAの検量線の例を示した。検量線は、低濃度 (0.0005~0.0031 mg/L : 7点) と高濃度 (0.0063~0.1 mg/L : 7点) とした。次に、S代謝物及びHM代謝物については、0.001~0.5 mg/L (7点) 及び0.004~0.5 mg/mL (7点) の1範囲とした (図14及び15)。いずれの決定係数は、いずれも $r^2=0.998$ 以上であり良好な直線性を示した。なお、『3. 添加回収実験』では、DEA及びHEEAの検量線を用い、いずれもALA換算とした。

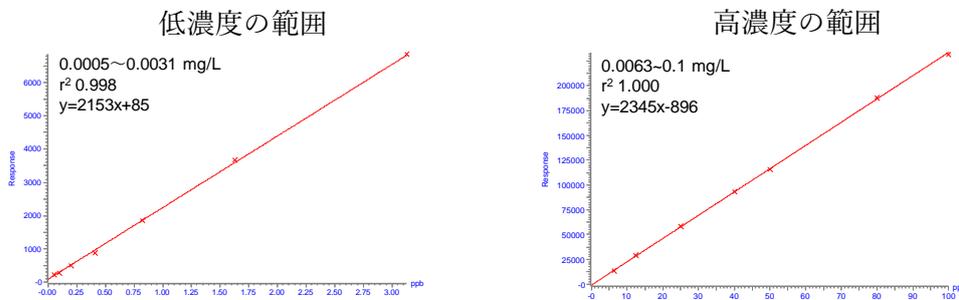


図11 ALAの検量線 (定量イオン) の例
 低濃度 ($r^2=0.998$) および高濃度 ($r^2=1.000$)

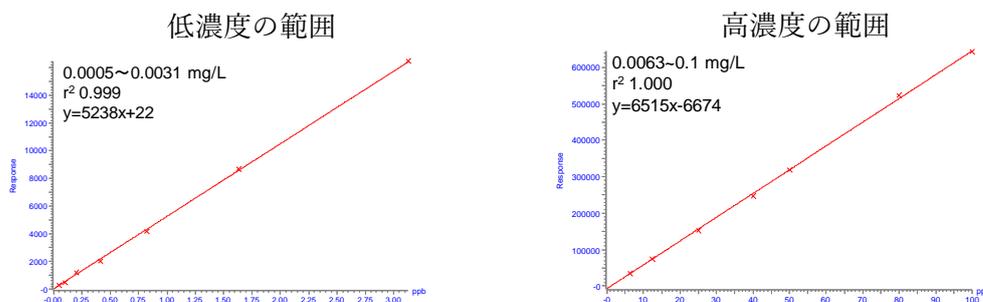


図12 DEAの検量線 (定量イオン) の例
 低濃度 ($r^2=0.999$) および高濃度 ($r^2=1.000$)

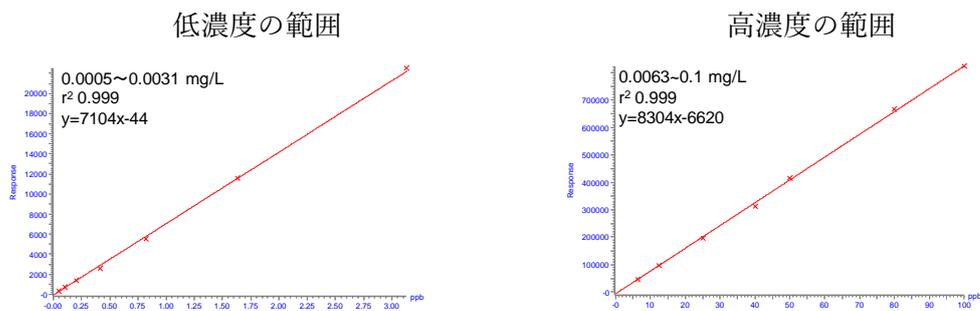


図13 HEEAの検量線（定量イオン）の例
低濃度 ($r^2=0.999$) および高濃度 ($r^2=0.999$)

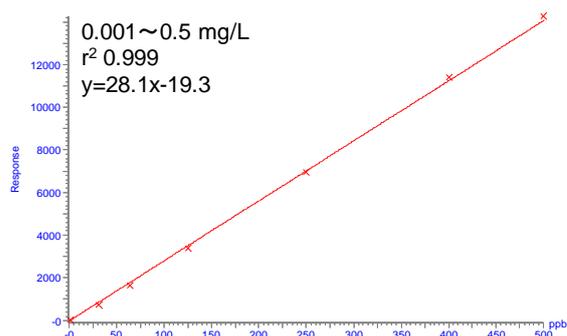


図14 S代謝物の検量線（定量イオン）の例
 $r^2 = 0.999$

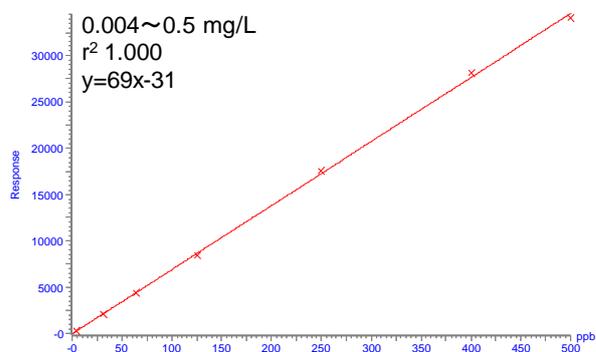


図15 HM代謝物の検量線（定量イオン）の例
 $r^2 = 1.000$

(4) 定量限界

ALA、DEA、HEEAの定量限界の算出結果を示した。

$$\text{ALA} : 0.002 \text{ mg/kg} = [10 \text{ mL}/5\text{g} \times 0.005 \text{ ng}/5 \mu\text{L}]$$

$$\text{DEA (ALA換算)} : 0.002 \text{ mg/kg} = [10 \text{ mL}/5\text{g} \times 0.005 \text{ ng}/5 \mu\text{L}]$$

$$\text{HEEA (ALA換算)} : 0.002 \text{ mg/kg} = [10 \text{ mL}/5\text{g} \times 0.005 \text{ ng}/5 \mu\text{L}]$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

抽出溶媒はアセトン、メタノール及び*n*-ヘキサン/アセトニトリル（1：1）について比較検討した。添加量が基準値（ALA換算：0.02 ppm）となるように試料（牛の筋肉）10.0 gに添加用標準溶液（0.2 µg/mL, 1.0 mL）を添加し、よく混合した後、30分間放置した。これに各検討溶媒50 mLを加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採った。残留物に各検討溶媒25 mLを加えて同様に操作し、上澄液を合わせて各検討溶媒で、100 mLに定容した。牛の筋肉の抽出溶液100 mLのうち、50 mLをナス型フラスコに採り、3 mL程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水（3：2）混液を用いて10 mLに定容し、分析を行った。また、抽出液は、精製を行っていないため、試料由来のマトリックスの影響も予想された。そのため、回収率の比較検討には、マトリックス添加標準溶液との補正回収率を算出した。その結果、アセトンではHEEAの補正回収率が44%程度となり、*n*-ヘキサン/アセトニトリル（1：1）ではALA及びDEAが32%及び4%となった。その一方、メタノールではALA、DEA及びHEEAは、抽出段階において良好な回収率（補正回収率90%以上）が得られた（表3）。

表3 ALA、DEA及びHEEAの抽出溶媒による比較検討

抽出溶媒	回収率 (%)	ALA	DEA	HEEA
メタノール	回収率 ^{※1}	37	82	70
	マトリックス添加溶液 ^{※1}	32	88	65
	補正回収率 ^{※2}	116	93	108
アセトン	回収率	15	38	8
	マトリックス添加溶液	16	42	18
	補正回収率	94	91	44
<i>n</i> -ヘキサン/ アセトニトリル (1/1, v/v)	回収率	12	4	35
	マトリックス添加溶液	38	94	44
	補正回収率	32	4	80

n=1

※1 [検出濃度/添加濃度] × 100（回収率、マトリックス添加溶液）

※2 [回収率/マトリックス添加溶液] × 100（補正回収率）

次いで、メタノールと企業法（図16）^{1,2)}の抽出溶媒の比較検討を実施した。いずれの添加量も基準値（ALA換算：0.02 ppm）となるように試料（牛の肝臓、牛の脂肪、牛の乳）10.0 gに添加用標準溶液（0.2 µg/mL, 1.0 mL）を添加し、よく混合した後、30分間放置した。これに各種検討溶媒50 mLを加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採った。残留物に各種検討溶媒25 mLを加えて同様に操作し、上澄液を合わせて各種検討溶媒で、100 mLに定容した。各試料に対する抽出溶液100 mLのうち、50 mLをナス型フラスコに採り、3 mL程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水（3：2）混液を用いて10 mLに定容し、分析を行った。回収率の比較検討には、マトリックス添

加標準溶液との補正回収率を算出した。その結果、企業法ではALAの補正回収率が33~98%、DEAの補正回収率が1.4~33%、HEEAの補正回収率が37~83%となった（表4）。それに対して、メタノールを用いた場合、各食品の補正回収率80%以上となった。

表4 抽出溶媒に伴う企業法との比較検討

食品名	抽出法	回収率 (%)	ALA	DEA	HEEA
牛の肝臓	メタノール抽出	回収率 ^{※1}	66	44	32
		マトリックス添加溶液 ^{※1}	62	48	32
		補正回収率 ^{※2}	106	93	99
	企業法	回収率	68	1.2	12
		マトリックス添加溶液	69	83	32
		補正回収率	98	1.4	37
牛の脂肪	メタノール抽出	回収率	58	50	22
		マトリックス添加溶液	59	49	20
		補正回収率	99	102	108
	企業法	回収率	28	21	19
		マトリックス添加溶液	56	64	23
		補正回収率	50	33	83
牛の乳	メタノール抽出	回収率	35	24	28
		マトリックス添加溶液	41	30	27
		補正回収率	85	80	101
	企業法	回収率	55	20	21
		マトリックス添加溶液	168	97	67
		補正回収率	33	20	37

n=1

※1 [検出濃度/添加濃度] × 100 (回収率、マトリックス添加溶液)

※2 [回収率/マトリックス添加溶液] × 100 (補正回収率)

牛の乳 (25 g)

- ↓ 200 mL アセトニトリル
- ↓ 高速振とう (20分)
- ↓ 遠心分離 (11,000 rpm, 15分)
- ↓ 上澄液を採る
- ↓ 10滴 Antifoam B emulsion
- ↓ 3~5 mLまで濃縮 (>50°C)

牛の脂肪 (50 g)

- ↓ 100 mL ヘキサン
- ↓ ホモジナイズ (1分)
- ↓ 100 mL 水/アセトニトリル混液 (20/80, v/v)
- ↓ 高速振とう (30分)
- ↓ 遠心分離 (11,000 rpm, 15分)
- ↓ ヘキサン層を除去する
- ↓ Antifoam B emulsion添加 (10滴)
- ↓ 3~5 mLまで濃縮 (>50°C)

牛の腎臓、肝臓および筋肉 (25 g)

- ↓ 100 mL水/アセトニトリル混液 (20/80, v/v)
- ↓ 10滴 Antifoam B emulsion
- ↓ 高速振とう (20分)
- ↓ 遠心分離 (11,000 rpm, 15分)
- ↓ 上澄液を採る
- ↓ 3~5 mLまで濃縮 (>50°C)

図16 企業法の抽出過程 (牛の乳、牛の脂肪、牛の腎臓、肝臓および筋肉)

追加検討として、企業法（図16）^{1,2)}とは異なる溶媒（メタノール）を用いる抽出法のため、他の代謝物に関する確証をとる必要があると判断された。主に、2-hydroxy 代謝物、sulfonic acid代謝物、oxanilic acid代謝物、sulfinyl lactic acid代謝などの回収率を評価することが求められるが、今回、代表的かつ入手が可能であったS代謝物とHM代謝物を用いて、その回収率を再評価することとした。いずれの添加量も基準値（ALA換算：0.02 ppm）となるように試料10.0 gに添加用標準溶液（0.2 µg/mL, 1.0 mL）を添加し、よく混合した後、30分間放置した。これにメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分3,000回転、10分間）し、上澄液を採った。残留物にメタノール25 mLを加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで、100 mLに定容した。各試料に対する抽出溶液100 mLのうち、50 mLをナス型フラスコに採り、3 mL程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水（3：2）混液を用いて10 mLに定容し、分析を行った。その結果、S代謝物及びHM代謝物で、良好な回収率（補正回収率97%以上）が得られた（表5）。

表5 S代謝物及びHM代謝物の抽出溶媒（メタノール）による比較検討

食品名	回収率 (%)	S代謝物	HM代謝物
牛の筋肉	回収率 ^{※1}	72	31
	マトリックス添加溶液 ^{※1}	70	31
	補正回収率 ^{※2}	103	102
牛の脂肪	回収率	72	72
	マトリックス添加溶液	75	72
	補正回収率	97	100
牛の肝臓	回収率	86	30
	マトリックス添加溶液	86	31
	補正回収率	99	97
牛の乳	回収率	140	42
	マトリックス添加溶液	131	37
	補正回収率	107	112
鶏卵	回収率	100	64
	マトリックス添加溶液	101	64
	補正回収率	99	101

n=1

※1 [検出濃度/添加濃度] × 100（回収率、マトリックス添加溶液）

※2 [回収率/マトリックス添加溶液] × 100（補正回収率）

(2) 蒸留の検討

加水分解及び水蒸気蒸留の方法は、企業法^{1~4)}に従い、水蒸気蒸留装置を用いた。その模式図を示す(図17)。企業法では、抽出液(3~5 mL)に50 w/v%水酸化ナトリウム溶液を加え、加水分解のあと、水蒸気蒸留を行う。そして、2 mol/L硫酸 10 mLで留液 75 mLを捕集している(中和)^{1~4)}。しかしそれ以外の条件に関する情報がないため、それらの項目について、再検討を実施した。まず、水蒸気蒸留装置には、宮本理研工業製STR-1D型を採用した(コックにより丸底フラスコ(蒸留用)への経路を変更できる装置)。本装置では、1回の操作ごとに分解し、洗浄を行い、蒸気などの漏れがないか確認し、用いることとした。また、捕集液に流止め連絡管の先端(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)が浸るようにした。蒸留する前に空蒸留を1回行うこととした。

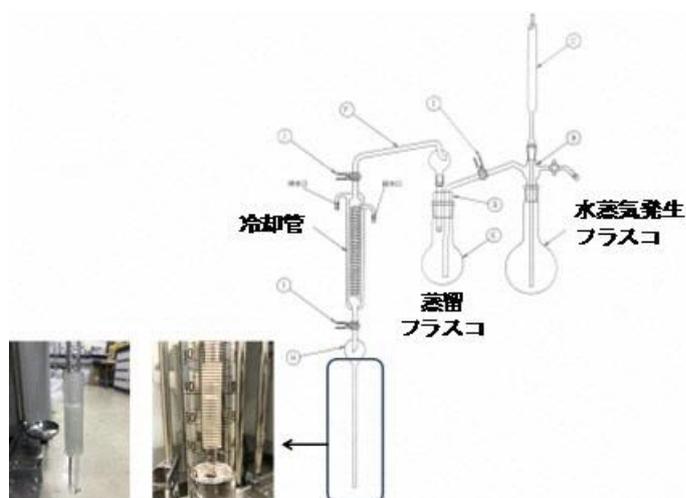


図17 水蒸気蒸留装置の模式図(宮本理研工業ホームページより改変)

7. 試験溶液の調製の(1)抽出に従って調製した100 mL定容後の溶液(抽出液)から正確に50 mLを丸底フラスコ(蒸留用)に採り、エバポレーターで約3 mLまで濃縮する。その後、丸底フラスコ(蒸留用)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、直ちに蒸留装置に取り付ける。別に、冷却管を10℃以下(水冷)で冷やし、それに100 mL用メスシリンダーに水(捕集液) 10 mLを加えて流止め連絡管の先端を浸して装着する。また、丸底フラスコ(水蒸気発生用)には、水1000 mLに沸騰石を加え、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、コックを開けて水蒸気による蒸留を行う。留液が75 mL(以下の検討項目、捕集液と合わせた液量、受け器100 mLのメスシリンダーは水冷しておく)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。まず初めに、50 w/v%水酸化ナトリウム溶液にDEA及びHEEA標準溶液を基準値相当濃度(0.1 µg相当)添加し、蒸留を実施した。そのときに、捕集するときの留液量を検討した。その結果、75 mLで回収率97%以上となり、十分な量と判断した(表6:企業法と同じ捕集する留液量となった)。そのときの蒸留速度は5~10 mL/分に調整した。次に、捕集液に、2 mol/L硫酸および水を用いる方法を比較検討した。いずれも回収率は90%以上となった。一方、硫酸で捕集する場合、炭酸ナトリウム約2.5 gを用い、pH試験紙で中和されたことを確認したのち、次の過程へ進めることとした。

表6 水蒸気蒸留の留液の液量に関するDEA及びHEEAの回収率

留液の液量 (mL)	回収率 (%)	
	DEA	HEEA
0~25	93.2	74.6
25~50	4.5	17.4
50~75	2.2	5.2
75~100	1.2	2.1
100~125	1.0	0.9

n=1

蒸留速度：5~10 mL/分

次に、ALAの加水分解に関して、時間と温度を検討した。丸底フラスコ（蒸留用）に50 w/v%水酸化ナトリウム溶液を採り、これにALA標準溶液を添加し、100℃以上（100~110℃程度）で、30分間加水分解を行った後に、丸底フラスコ（水蒸気発生用）から水蒸気を導入して水蒸気蒸留を行い、留液75 mL（捕集液と合わせた量）を捕集した。また、ALAの加水分解では丸底フラスコ（蒸留用）を100℃に加熱し、30分間加水分解した結果、DEAの回収率が約96%以上となった。なお、HEEAはALAの加水分解では生成されないことが確認された。

表7 水蒸気蒸留によるALA加水分解の比較検討

加熱時間	回収率 (%)		
	ALA	DEA	HEEA
10分	2.9	48.3	ND*2
20分	Trace*1	71.8	ND
30分	Trace	95.8	ND

n = 1

*1: Trace：回収率<1.0%

*2: ND: 回収率 = 0%

追加検討として、本試験法で適用する畜産物にあたっては「アラクロール及び加水分解により2,6-ジエチルアニリン又は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をアラクロールに換算したものの和をいう」となっており、ALA以外の加水分解よりDEA又はHEEAへ変換する代謝物の加水分解率 (%) を検討した。そこで、入手可能なS代謝物及びHM代謝物を用いて、DEA及びHEEAへの変換率を求めることとした。しかし、入手したS代謝物及びHM代謝物の純度が不明なため、いずれもDEA及びHEEAへの変換率を算出することができない。そこで、qNMR（10 mg 1,4-BTMSB-*d*₄を50 mL アセトン-*d*₆に溶解）を用いて、それぞれの純度を測定することとした。Steric Energy (trans: 3.95 kcal/mol, cis: 6.77 kcal/mol) は、既報⁵⁾のALA値を参照し、trans体が安定としNMR上で異性体組成は、常にtrans体> cis体としてシグナルを同定した（スペクトル上のtrans体は赤字、cis体は青字とする）。S代謝物に関して、H-5シグナルを用いてtrans/cis体の純度を算出したNMRスペクトルを図18に示す。その結果、trans (51.36%) /cis (37.20%) 混合標準品として判断し、S代謝物は純度88.56%となった。

アラクロール誘導体における異性体 (rotation isomers)

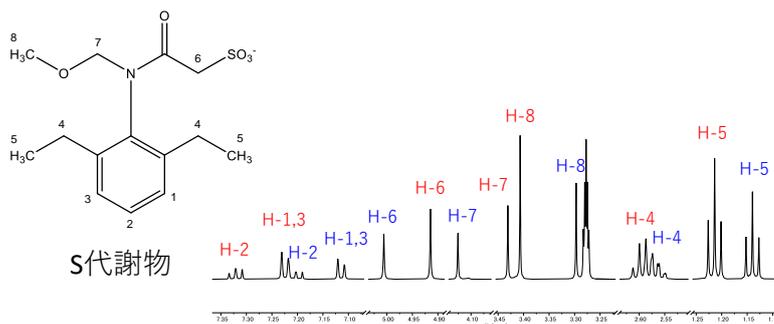
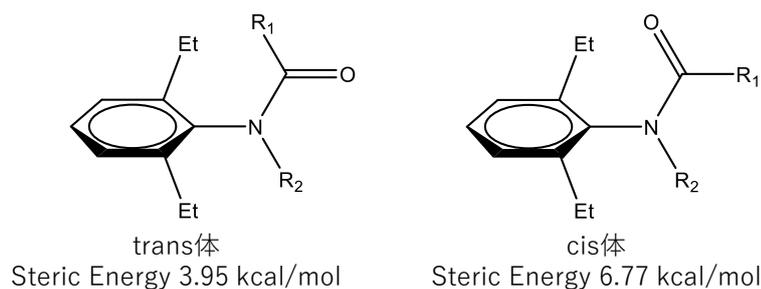


図18 qNMRによるS代謝物の純度評価

次に、HM代謝物のqNMRによる評価を実施した結果、H-10及びH-8とは一致しないシグナルが検出され、いずれもtrans/cis体としての純度評価が達成できなかった。その理由として、不純物質などの夾雑物の影響が懸念された。そこで、HPLCによる純度評価を実施した(図19)。その結果、HM代謝物(保持時間: 9分付近)よりも遅い保持時間に複数のピークが検出され、それらのピーク面積の合計からHM代謝物の純度を算出した結果、58.7%となった。

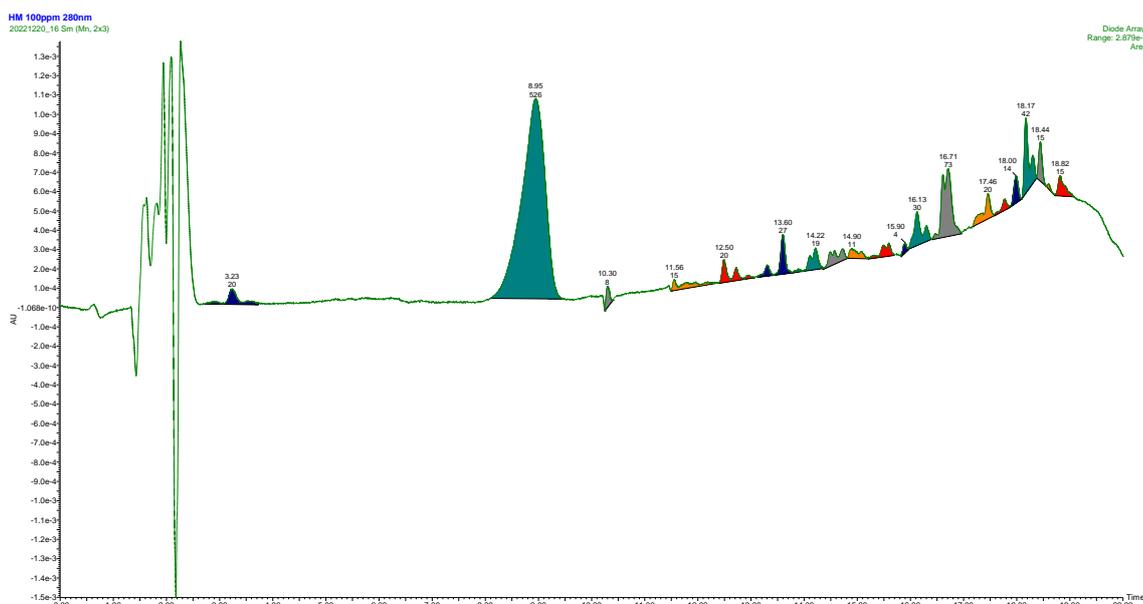


図19 HPLCによるHM代謝物の純度評価

装置: ACQUITY Arc system (UV検出器)

標準溶液の濃度: 100 ppm

その他条件: 4. 測定条件 LC-MS/MS (S代謝物, HM代謝物の条件)

次に、抽出液（牛の筋肉）50 mL（S代謝物及びHM代謝物それぞれ5 µg添加）を丸底フラスコ（蒸留用）に採り、溶媒を除去（約3 mLまで濃縮）し、50 w/v%水酸化ナトリウム 50 mLを加え、これに消泡用シリコン1～2滴及び沸騰石を加えた後、直ちに蒸留装置に取り付けた。別に、冷却管を10℃以下（水冷）で冷やし、それに100 mL用メスシリンダーに水（捕集液）10 mLを加えて流止め連結管の先端を浸して装着した。また、丸底フラスコ（水蒸気発生用）には、水1000 mLに沸騰石を加え、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、水蒸気による蒸留を行った。留液（捕集液と合わせた量）が75 mLになるまで水蒸気蒸留し、留液が中性であることをpH試験紙で確認した。その液を蒸留水100 mLに定容し、LC-MS/MSにてクロマトグラムを得た。qNMRの結果から、S代謝物は純度88.56%、HPLCの結果から、HM代謝物は純度58.7%として、それぞれDEA及びHEEAに変換したものとしてALA同様に回収率（%）を求めた。その結果、S代謝物については、3回の操作により、平均104.2%（相対標準偏差 3.3%）になった（表8）。HM代謝物については、抽出液（牛の筋肉）を用いた3回の操作及び標準溶液を用いた1回の操作（53.0%）の比率、HPLC純度評価（58.7%）で補正した回収率を表9に示した。

表8 S代謝物の加水分解の結果

回数	回収率（%） ^{*1}		
	S代謝物	DEA	HEEA
1回目	ND ^{*2}	100.2	ND
2回目	ND	106.3	ND
3回目	ND	106.1	ND
平均	ND	104.2	ND
相対標準偏差（%）	-	3.3	-

*1: S代謝物標準品の純度を100%と仮定したときの回収率

*2: ND: 回収率 = 0%

表9 HM代謝物の加水分解の結果

回数	回収率（%） ^{*1}			標準溶液の回収率との比率（%） ^{*2}	HPLC純度を用いて補正した回収率（%） ^{*3}
	HM代謝物	DEA	HEEA	HEEA	HEEA
1回目	ND ^{*4}	ND	44.2	83.4	75.3
2回目	ND	ND	44.1	83.4	75.1
3回目	ND	ND	46.0	86.8	78.4
平均	ND	ND	44.8	84.5	76.3
相対標準偏差（%）	-	-	2.4	2.4	2.4

- *1: HM代謝物標準品の純度を100%と仮定したときの回収率
- *2: 標準溶液の回収率を100%と仮定したときの回収率
- *3: HPLC純度評価の純度を100%と仮定したときの回収率
- *4:ND: 回収率 = 0%

それぞれの代表的なクロマトグラムを図20～23に示す。

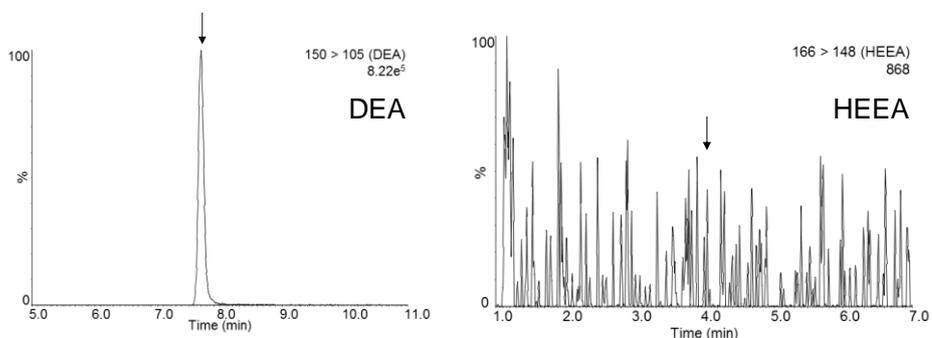


図20 水蒸気蒸留法を用いたALA変換によるDEA及びHEEAのクロマトグラム

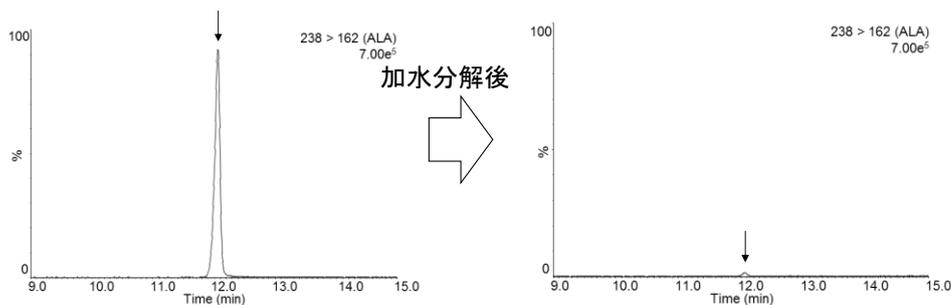


図21 蒸留によるALAのクロマトグラム

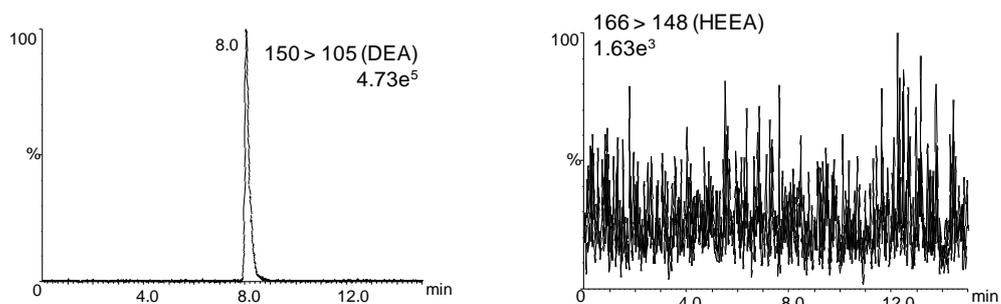


図22 S代謝物を加水分解した後のDEA及びHEEAのクロマトグラム

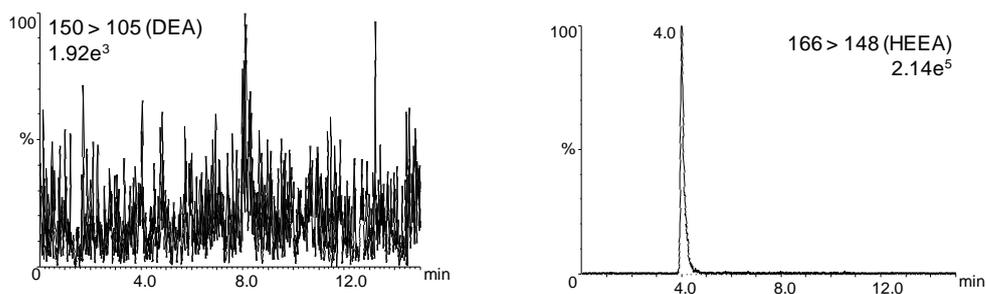


図23 HM代謝物を加水分解した後のDEA及びHEEAのクロマトグラム

(3) 精製方法の検討

精製方法について、企業法^{1~4)}ではジクロロメタンを用いた液-液分配を採用している。しかしながら、塩素系溶媒は今後の分析法開発において、使用の低減化が必要である。まず、ジクロロメタン、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを用いて、液-液分配で使用する有機溶媒を検討することとした。水 100 mLに基準値相当濃度（各標準溶液：0.1 µg/mL, 1 mL）を添加し、各有機溶媒を加えて液-液分配した後、有機層を回収した。この操作を2度繰り返し、回収した有機層を3 mL程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水（3：2）混液を用いて10 mLに定容し、回収率を求めた。その結果を表10に示した。ジクロロメタン、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを検討した結果、ジクロロメタンを用いたときの回収率が91%以上であり、最も良好であった。

表10 ALA、DEA及びHEEAの液-液分配による回収率の比較検討

溶媒抽出 ^{※2}	回収率（%）		
	ALA	DEA	HEEA
ジクロロメタン	93	92	91
酢酸エチル	75	52	38
<i>n</i> -ヘキサン	91	5	36

n=1

以上より、液-液分配を用いて精製するには、企業法どおりジクロロメタンを使用することが最適であった。しかしながら、安全性や環境保全を考慮すると塩素系溶媒を用いることは試験法開発の上で避けるのが好ましいと考えられた。ゆえに、今回は加水分解されたDEA及びHEEAのミニカラムによる精製方法を検討した。本検討では、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（InertSep C18 [500 mg/6 mL]）及び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（InertSep PLS-3 [200 mg/6 mL]）の比較を行った（アダプタを付けて20 mLとした）。コンディショニングにはアセトニトリル及び水を用いて、捕集した留液を仮定して水100 mLに基準値相当濃度（各標準溶液: 0.1 µg/mL, 1 mL）を添加し、アセトニトリル 10 mLで溶出した。その添加回収の結果を表11に示した。DEA及びHEEAの回収率が30%以下となり、更なる検討が必要と考えられた。その後は、InertSep PLS-3を用いて最適化を実施した。

表11 ALA、DEA及びHEEAの固相抽出による回収率の比較検討

固相抽出	回収率, % (RSD, % ^{※1})		
	ALA	DEA	HEEA
InertSep C18 (500 mg/6 mL)	104 (2.9)	9 (5.2)	ND
InertSep PLS-3 (200 mg/6 mL)	119 (4.3)	24 (8.3)	2 (0.1)

※1 6回の繰り返し分析（1日1回（2併行）の3日間）

コンディショニング：アセトニトリル 5 mL及び水 5 mL

サンプリング：水 100 mL（各標準溶液0.1 µg/mL, 1 mL）

洗浄：水 5 mL

溶出：アセトニトリル 10 mL

捕集した留液を仮定して水75 mLに、各種酸塩もしくは塩基塩を加えて、保持の改善を試みた。100 mLとした溶液に基準値相当濃度（各標準溶液: 0.1 µg/mL, 1 mL）を添加し、1 vol%ギ酸、1 vol%アンモニア、

1 vol%トリフルオロ酢酸又は1 vol%トリエチルアミン濃度（すべて揮発性塩を対象としている）となるように、各水溶液を添加して調製した希釈液を負荷し、回収率を求めた（表12）。その結果、トリエチルアミンの添加で回収率の改善があった。

表12 捕集した留液を仮定したALA、DEA及びHEEAの回収率の比較検討

比較溶媒※ ² (1 vol%)	回収率% (RSD%※ ¹)		
	ALA	DEA	HEEA
ギ酸	102 (2.4)	8 (0.1)	ND
アンモニア	108 (1.6)	83 (2.5)	33 (1.7)
トリフルオロ酢酸	109 (2.6)	34 (2.9)	4 (2.6)
トリエチルアミン	96 (1.8)	84 (4.0)	64 (2.6)

※1 6回の繰り返し分析（1日1回（2併行）の3日間）

InertSep PLS-3（200 mg/6 mL）

コンディショニング：アセトニトリル 5 mL及び水 5 mL

サンプリング：比較溶媒（※2）100 mL (0.1 µg/mL, 1 mL)

洗浄：水 5 mL

溶出：アセトニトリル 10 mL

※2 捕集液100 mLあたりの濃度

上記の結果から、トリエチルアミンを添加することで回収率の改善が見られたため、留液中のトリエチルアミンの濃度を検討した。捕集した留液を仮定して水75 mLに、トリエチルアミン溶液（0, 0.04, 0.2, 0.4, 2, 4 vol% : 25 mL）を加えて、最終濃度0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 vol%をInertSep PLS-3（200 mg/6 mL）に負荷した。その結果、図24に示すように、0.1 vol%以上のトリエチルアミン濃度で回収率90%以上を確保できるとして、安定的かつ十分量を考慮して0.5 vol%のトリエチルアミン濃度（2 vol%を25 mL添加し、留液100 mL）とした。そのとき、洗浄の水を測定した際、DEA及びHEEAは不検出であった。さらに、InertSep PLS-3（200 mg/6 mL）からの溶出に用いるアセトニトリル量を5 mL、5~10 mL、10~20 mL取り、それぞれを分析した結果、図25のような結果となった。よって、アセトニトリル量は5 mLで十分であると判断した。そこで、余裕をみて10 mLの溶出液とした。

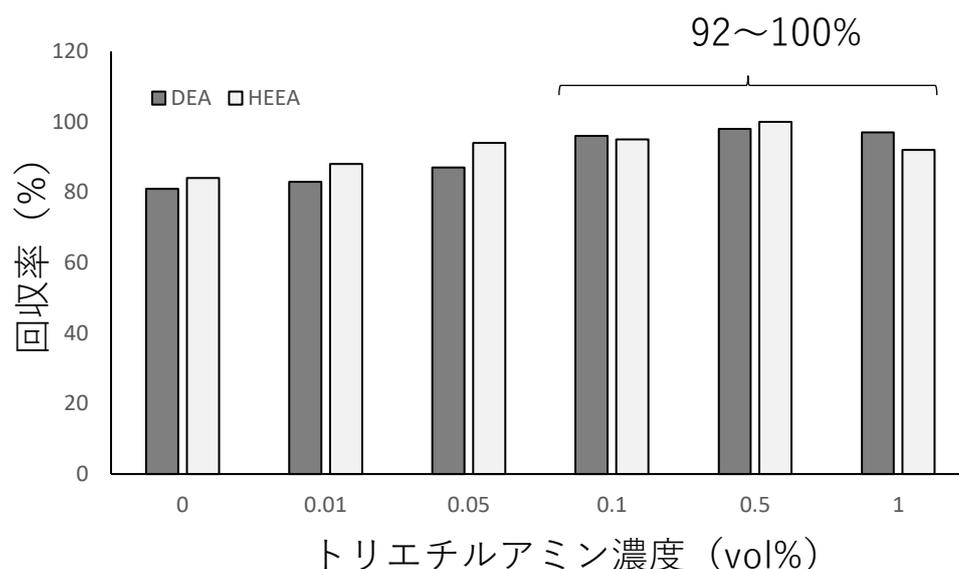


図24 留液中のトリエチルアミン濃度の検討 (n=1)

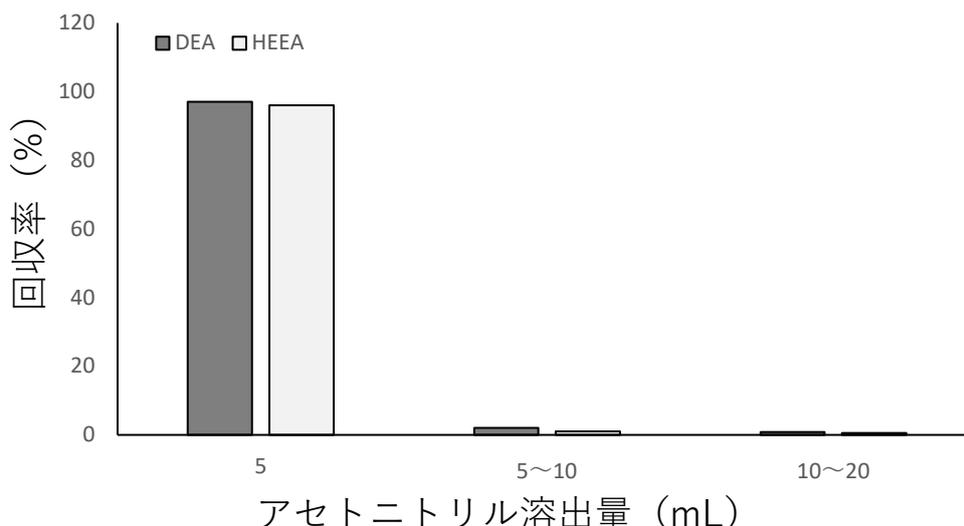


図25 アセトニトリル溶出量に関する検討 (n=1)

3. 添加回収試験

畜産物5食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の乳及び鶏卵）を用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、ALA（加水分解によりDEA）、DEA、HEEAについて定量限界濃度（0.002 mg/kg：DEA及びHEEAはアラクロール換算濃度）及び基準値濃度（0.02 mg/kg：DEA及びHEEAはアラクロール換算濃度）で5併行の添加回収試験を行った。なお、ALA及びDEAの添加回収試験は別々に実施した。添加回収試験におけるブランク試料、添加試料及び回収率100%相当のALA（加水分解によりDEA）、DEA及びHEEA溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図26～40に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラムを図41に示した。

(1) 選択性

いずれの食品においても、DEA及びHEEAの定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった（表13）。

表13 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) ¹⁾						選択性の評価 ³⁾	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾				面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
1	DEA	牛の筋肉	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	3753	3679	3716	0.000	○	
2		牛の脂肪	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	5472	5453	5463	0.000	○	
3		牛の肝臓	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	5044	4850	4947	0.000	○	
4		牛の乳	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	4227	4115	4171	0.000	○	
5		卵	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	3442	3362	3402	0.000	○	
6		牛の筋肉	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	77398	78706	78052	0.000	○	
7		牛の脂肪	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	69225	68282	68754	0.000	○	
8		牛の肝臓	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	61329	60454	60892	0.000	○	
9		牛の乳	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	62716	61123	61920	0.000	○	
10		卵	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	62511	63735	63123	0.000	○	
11	HEEA	牛の筋肉	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	4471	4589	4530	0.000	○	
12		牛の脂肪	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	6246	6147	6197	0.000	○	
13		牛の肝臓	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	5880	6288	6084	0.000	○	
14		牛の乳	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	5648	5626	5637	0.000	○	
15		卵	0.002		定量限界 0.002	< 0.333	面積	0	0	0	4599	4424	4512	0.000	○	
16		牛の筋肉	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	71059	70351	70705	0.000	○	
17		牛の脂肪	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	61403	62917	62160	0.000	○	
18		牛の肝臓	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	64341	64506	64424	0.000	○	
19		牛の乳	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	65622	66014	65818	0.000	○	
20		卵	0.002	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	0	0	0	64863	65008	64936	0.000	○	

¹⁾ ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。)

²⁾ 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、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)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

³⁾ 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度及び併行精度

定量限界濃度及び基準値濃度での真度及び併行精度を表14に示した。ALA（加水分解によりDEA）の

定量限界濃度（ALAとして0.002 mg/kg）の添加回収試験において得られたピークのS/Nは46.0以上であった。また、真度93.1～100.3%及び併行精度2.3～4.7%となった。DEAの定量限界濃度（ALAとして0.002 mg/kg）の添加回収試験において得られたピークのS/Nは57.3以上であった。また、真度73.0～98.7%及び併行精度1.0～3.0%となった。HEEAの定量限界濃度では、S/N=107.2以上と良好な結果であった。また、真度79.8～100.2%及び併行精度1.2～2.4%となった。ALA（加水分解によりDEA）の基準値濃度では、真度86.8～100.2%及び併行精度1.0～2.9%となった。DEAの基準値濃度では、真度72.8～92.2%及び併行精度0.9～4.6%となった。HEEAの基準値濃度では、真度78.6～90.0%及び併行精度0.6～1.5%となった。以上の結果から、妥当性評価ガイドラインの真度及び併行精度の目標値を満たした。

表14 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹⁾	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値	
1	ALA(加水分解によりDEA)	牛の筋肉	0.002	0.02	0.002	S/N	5383	95	0.9994	95.8	89.6	100.0	100.0	97.9	96.7	4.5	97.0	78.0	87.5	
2		牛の脂肪	0.002	0.02	0.002	S/N	3830	480	0.9986	101.5	96.9	100.0	103.0	100.0	100.3	2.3	76.0	58.0	67.0	
3		牛の肝臓	0.002	0.02	0.002	S/N	3379	345	0.9990	92.7	87.3	98.2	96.4	90.9	93.1	4.7	43.0	60.0	51.5	
4		牛の乳	0.002	0.02	0.002	S/N	4763	81	0.9994	101.4	98.6	94.3	95.7	97.1	2.9	51.0	41.0	46.0		
5		鶏卵	0.002	0.02	0.002	S/N	4009	308	0.9996	93.9	98.0	93.9	104.1	100.0	98.0	4.4	80.0	50.0	65.0	
6	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.02	—	5265	188	0.9989	99.8	94.6	95.9	95.6	97.6	96.7	2.1				
7		牛の脂肪	0.002	0.02	0.02	—	4134	667	0.9998	101.4	98.6	94.3	95.7	95.7	97.1	2.9				
8		牛の肝臓	0.002	0.02	0.02	—	3294	286	0.9995	86.2	87.1	87.5	87.6	85.5	86.8	1.0				
9		牛の乳	0.002	0.02	0.02	—	4824	48	0.9996	100.2	100.9	98.9	99.1	101.7	100.2	1.2				
10		鶏卵	0.002	0.02	0.02	—	4067	461	0.9998	88.3	86.7	86.9	89.6	91.2	88.5	2.1				
11	HEEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.002	S/N	3674	60	0.9995	73.2	74.6	70.9	75.6	70.7	73.0	3.0	174.2	101.8	138.0	
12		牛の脂肪	0.002	0.02	0.002	S/N	3727	43	0.9996	87.0	86.1	89.5	87.9	88.0	87.7	1.4	76.7	46.5	61.6	
13		牛の肝臓	0.002	0.02	0.002	S/N	3727	43	0.9996	87.0	85.4	87.3	89.6	84.9	86.8	2.1	69.7	44.8	57.3	
14		牛の乳	0.002	0.02	0.002	S/N	5315	77	0.9996	91.4	90.1	90.1	90.4	88.8	90.2	1.0	124.2	60.3	92.3	
15		鶏卵	0.002	0.02	0.002	S/N	3475	38	0.9999	96.4	101.2	96.9	98.4	100.6	98.7	2.2	151.7	114.7	133.2	
16	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.02	—	3631	118	0.9996	80.0	80.0	79.0	78.0	81.0	79.6	1.4				
17		牛の脂肪	0.002	0.02	0.02	—	8199	35	0.9998	82.0	82.0	83.0	81.0	81.0	81.8	1.0				
18		牛の肝臓	0.002	0.02	0.02	—	8199	35	0.9999	78.0	74.0	72.0	70.0	70.0	72.8	4.6				
19		牛の乳	0.002	0.02	0.02	—	4447	271	0.9996	77.0	79.0	80.0	81.0	80.0	79.4	1.9				
20		鶏卵	0.002	0.02	0.02	—	7807	103	0.9999	93.0	93.0	92.0	92.0	91.0	92.2	0.9				
21	HEEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.002	S/N	4664	7	0.9999	79.9	82.0	79.0	77.4	80.5	79.8	2.1	234.6	132.3	183.5	
22		牛の脂肪	0.002	0.02	0.002	S/N	4329	23	0.9998	96.0	95.6	93.1	94.7	94.8	94.8	1.2	207.9	102.6	155.3	
23		牛の肝臓	0.002	0.02	0.002	S/N	4329	23	0.9998	90.6	90.9	90.5	92.3	92.8	91.4	1.2	132.2	82.1	107.2	
24		牛の乳	0.002	0.02	0.002	S/N	5945	188	0.9996	102.5	97.3	100.5	98.1	102.4	100.2	2.4	222.1	163.7	192.9	
25		鶏卵	0.002	0.02	0.002	S/N	4676	37	0.9997	91.7	88.2	91.9	88.0	91.2	90.2	2.1	201.1	102.2	151.7	
26	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.02	—	5923	17	0.9998	79.0	80.0	78.0	77.0	79.0	78.6	1.5				
27		牛の脂肪	0.002	0.02	0.02	—	7491	45	0.9999	87.0	86.0	86.0	87.0	86.0	86.4	0.6				
28		牛の肝臓	0.002	0.02	0.02	—	8199	35	0.9991	87.0	87.0	87.0	86.0	86.0	86.6	0.6				
29		牛の乳	0.002	0.02	0.02	—	7755	101	0.9999	90.0	89.0	92.0	89.0	90.0	90.0	1.4				
30		鶏卵	0.002	0.02	0.02	—	7753	63	0.9998	90.0	90.0	89.0	90.0	88.0	89.4	1.0				

¹⁾ S/Nを求める必要がある場合にはS/Nと表示される。
²⁾ 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

定量限界及び基準値濃度での試料マトリックスの測定への影響を表15に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、0.88～1.05となり、本試験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であると考えられた。

表15 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	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	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	3597	3683	3640	3491	3552	3522	1.03		
2		牛の脂肪	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	5472	5463	5467	5460	5461	5461	1.00		
3		牛の肝臓	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	5187	5173	5180	5282	5364	5323	0.97		
4		牛の乳	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	4087	4418	4253	4188	3994	4091	1.04		
5		卵	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	3527	3539	3533	3724	3624	3674	0.96		
6	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	76566	75104	75835	79081	77097	78089	0.97		
7		牛の脂肪	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	61853	61403	61628	61396	63208	62302	0.99		
8		牛の肝臓	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	62128	62037	62083	70994	70815	70904	0.88		
9		牛の乳	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	65099	64143	64621	72065	71800	71932	0.90		
10		卵	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	63735	63483	63609	63061	62247	62654	1.02		
11	HEEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	4716	4544	4630	4417	4377	4397	1.05		
12		牛の脂肪	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	6329	6023	6176	6159	6249	6204	1.00		
13		牛の肝臓	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	6054	6036	6045	6197	6074	6136	0.99		
14		牛の乳	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	5880	6009	5945	5887	5707	5797	1.03		
15		卵	0.002	0.02	0.002	0.001	面積	0	4816	4828	4822	4709	4816	4762	1.01		
16	DEA	牛の筋肉	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	70774	71307	71040	72406	72406	72406	0.98		
17		牛の脂肪	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	69218	68516	68867	69815	70822	70319	0.98		
18		牛の肝臓	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	63390	63881	63635	70294	71257	70775	0.90		
19		牛の乳	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	65887	66368	66127	70692	72073	71383	0.93		
20		卵	0.002	0.02	0.02	0.01	面積	0	65144	64539	64842	70294	71875	71085	0.91		

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整した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調整した標準溶液(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。

(4) 補正真度

上記の真度及びマトリックス効果の値より補正真度を求め、表16に示した。なお、補正真度は、真度をマトリックス効果の値で除して算出した。その結果、表16に示したように、補正真度は基準値濃度で80.1～111.3%、定量限界濃度で70.6～102.7%となった。

表16 補正真度

分析対象物質	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
ALA (加水分解によりDEA)	牛の筋肉	0.002	96.7	1.03	93.8
	牛の脂肪	0.002	100.3	1.00	100.3
	牛の肝臓	0.002	93.1	0.97	96.0
	牛の乳	0.002	97.1	1.04	93.4
	鶏の卵	0.002	98.0	0.96	102.1
	牛の筋肉	0.02	96.7	0.97	99.7
	牛の脂肪	0.02	97.1	0.99	98.1
	牛の肝臓	0.02	86.8	0.88	98.6
	牛の乳	0.02	100.2	0.90	111.3
	鶏卵	0.02	88.5	1.02	86.8
DEA	牛の筋肉	0.002	73.0	1.03	70.6
	牛の脂肪	0.002	87.7	1.00	87.7
	牛の肝臓	0.002	86.8	0.97	89.5
	牛の乳	0.002	90.2	1.04	86.7
	鶏の卵	0.002	98.7	0.96	102.7
	牛の筋肉	0.02	79.6	0.97	82.0
	牛の脂肪	0.02	81.8	0.99	82.6
	牛の肝臓	0.02	72.8	0.88	82.7
	牛の乳	0.02	79.4	0.90	88.4
	鶏卵	0.02	92.2	1.02	90.8
HEEA	牛の筋肉	0.002	79.8	1.05	75.7
	牛の脂肪	0.002	94.8	1.00	95.3
	牛の肝臓	0.002	91.4	0.99	92.8
	牛の乳	0.002	100.2	1.03	97.7
	鶏の卵	0.002	90.2	1.01	89.1
	牛の筋肉	0.02	78.6	0.98	80.1
	牛の脂肪	0.02	86.4	0.98	88.2
	牛の肝臓	0.02	86.6	0.90	96.3
	牛の乳	0.02	90.0	0.93	97.2
	鶏卵	0.02	89.4	0.91	98.0

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

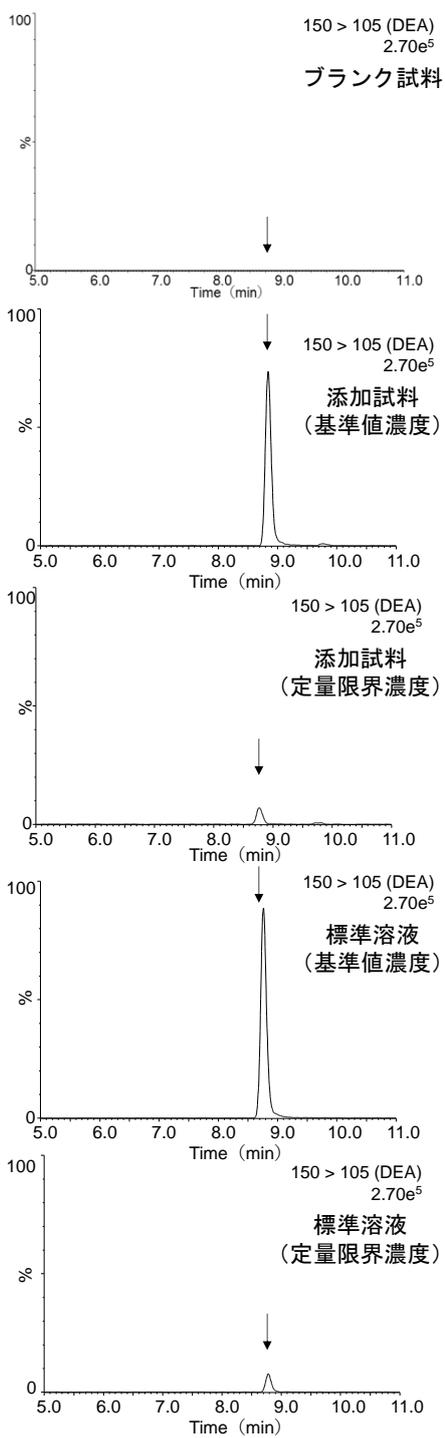


図26 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
 ALA(DEA変換 : m/z 150→105)
 基準値濃度 : 0.02 ppm
 定量限界濃度 : 0.002 ppm

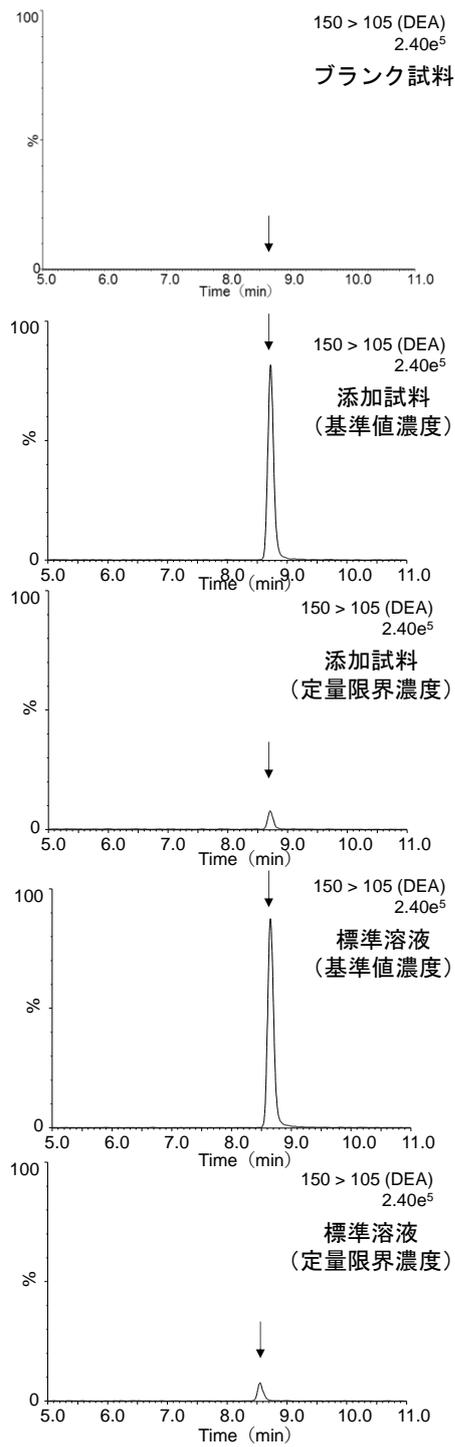


図27 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
 ALA(DEA変換 : m/z 150→105)
 基準値濃度 : 0.02 ppm
 定量限界濃度 : 0.002 ppm

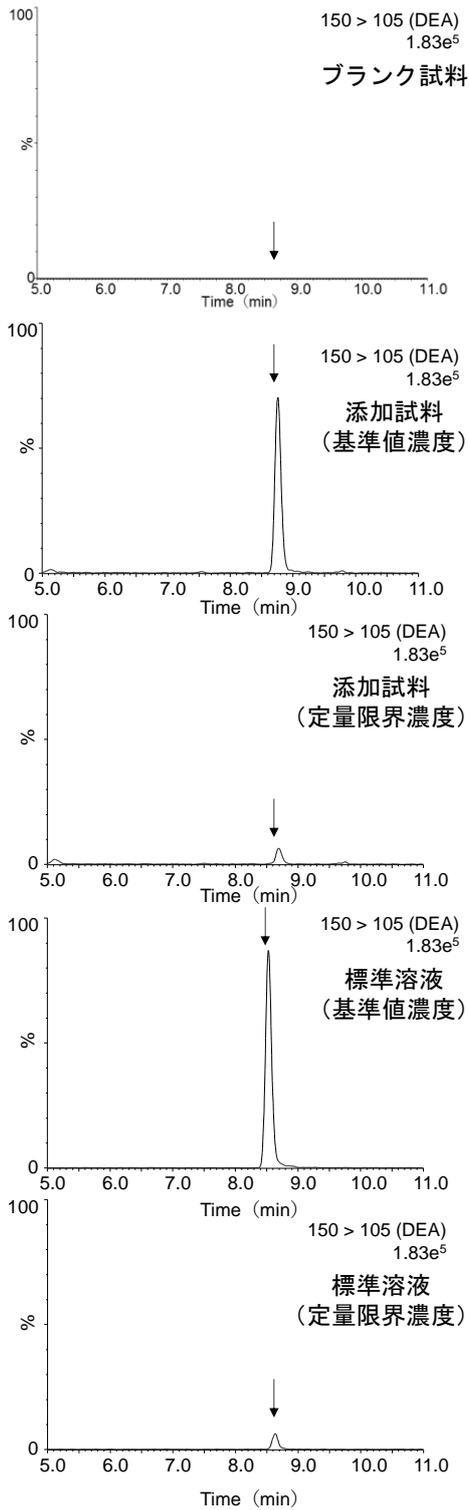


図28 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
 ALA(DEA変換： m/z 150→105)
 基準値濃度：0.02 ppm
 定量限界濃度：0.002 ppm

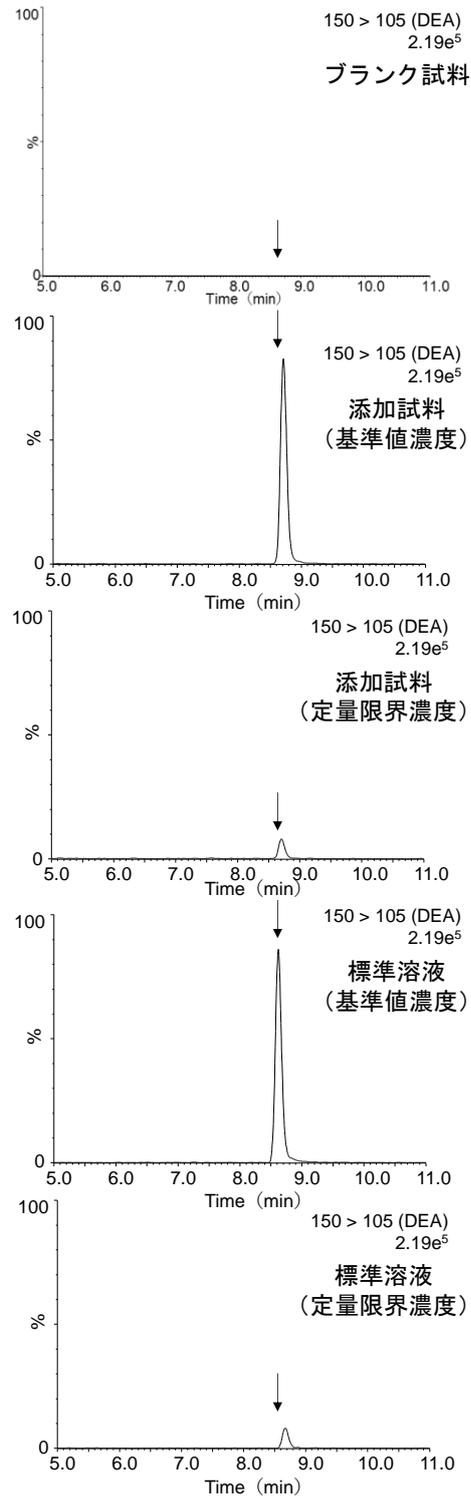


図29 牛の乳のSRMクロマトグラム
 ALA(DEA変換： m/z 150→105)
 基準値濃度：0.02 ppm
 定量限界濃度：0.002 ppm

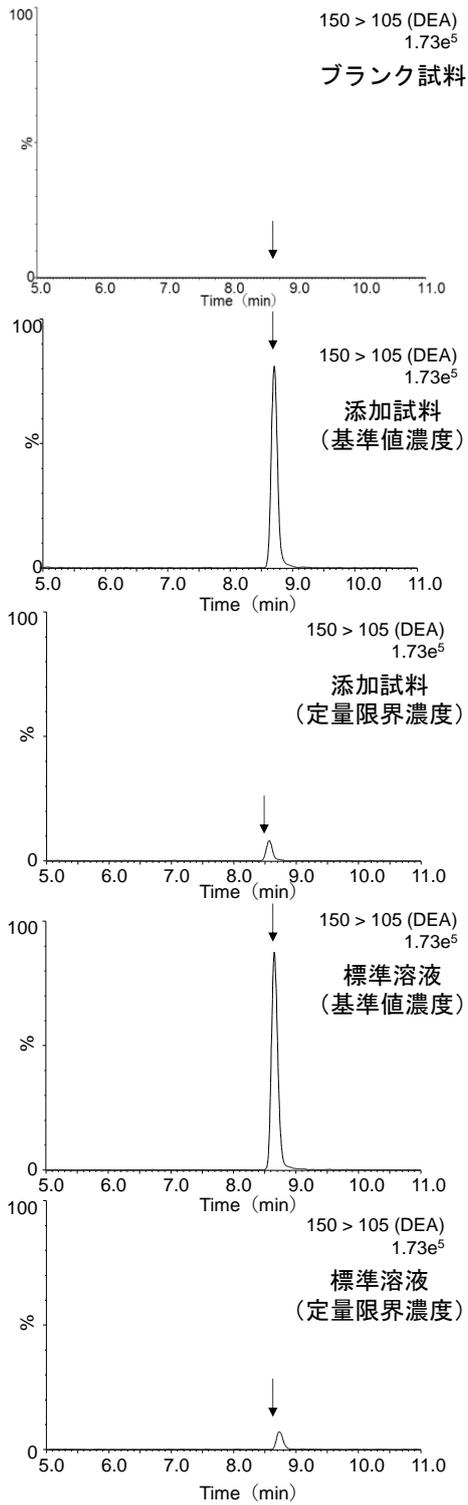


図30 鶏卵のSRMクロマトグラム
 ALA(DEA変換 : m/z 150 \rightarrow 105)
 基準値濃度 : 0.02 ppm
 定量限界濃度 : 0.002 ppm

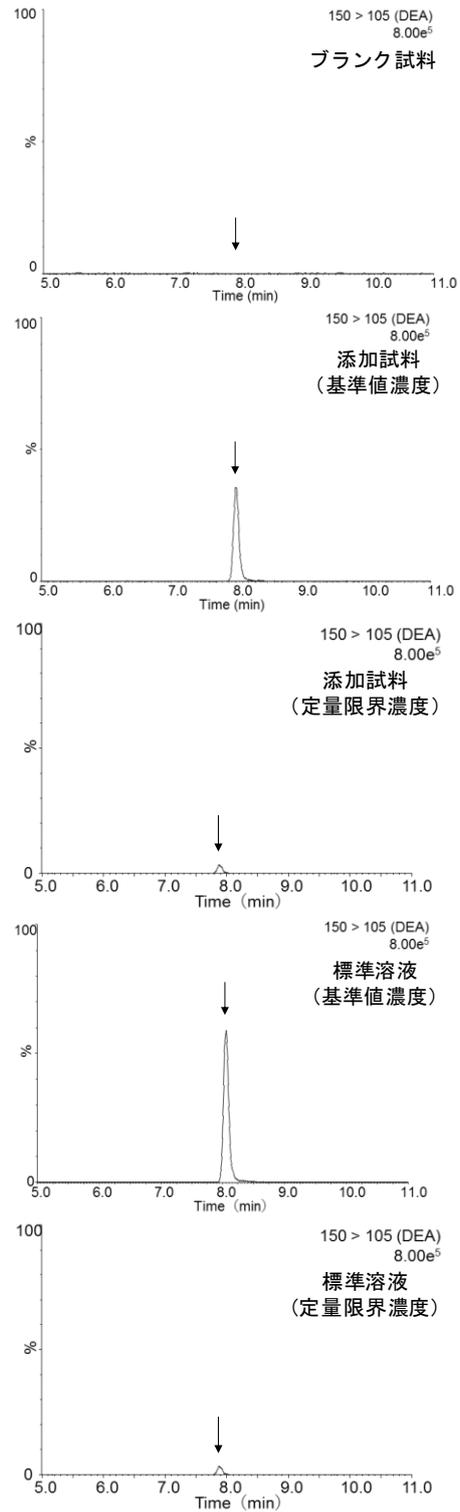


図31 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
 DEA(m/z 150 \rightarrow 105)
 基準値濃度 : 0.02 ppm (ALA換算濃度)
 定量限界濃度 : 0.002 ppm (ALA換算濃度)

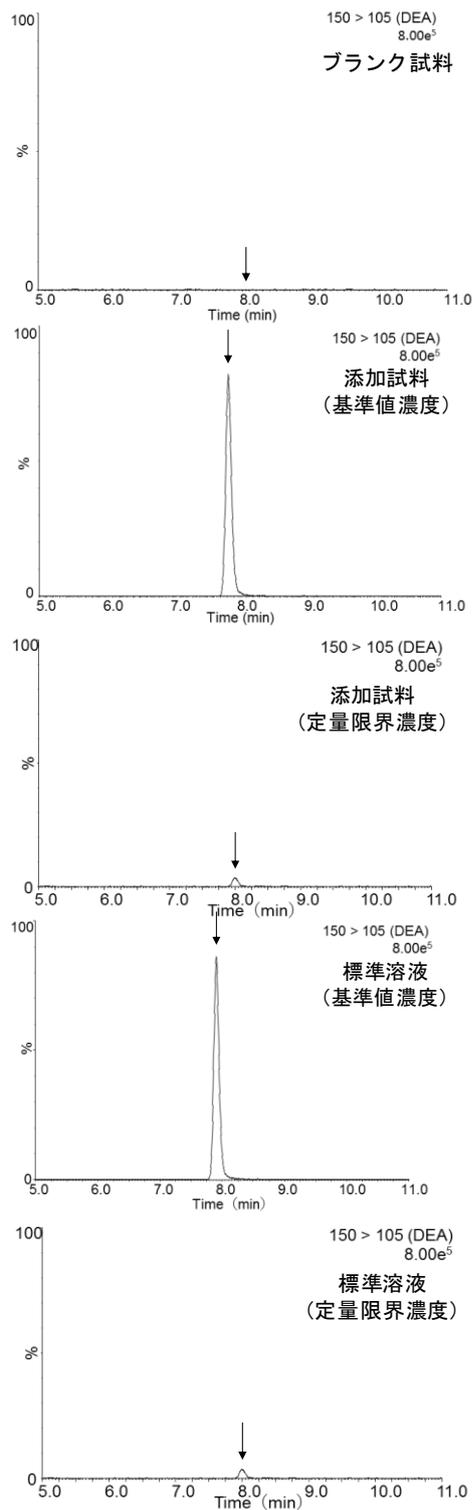


図32 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
DEA(m/z 150→105)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

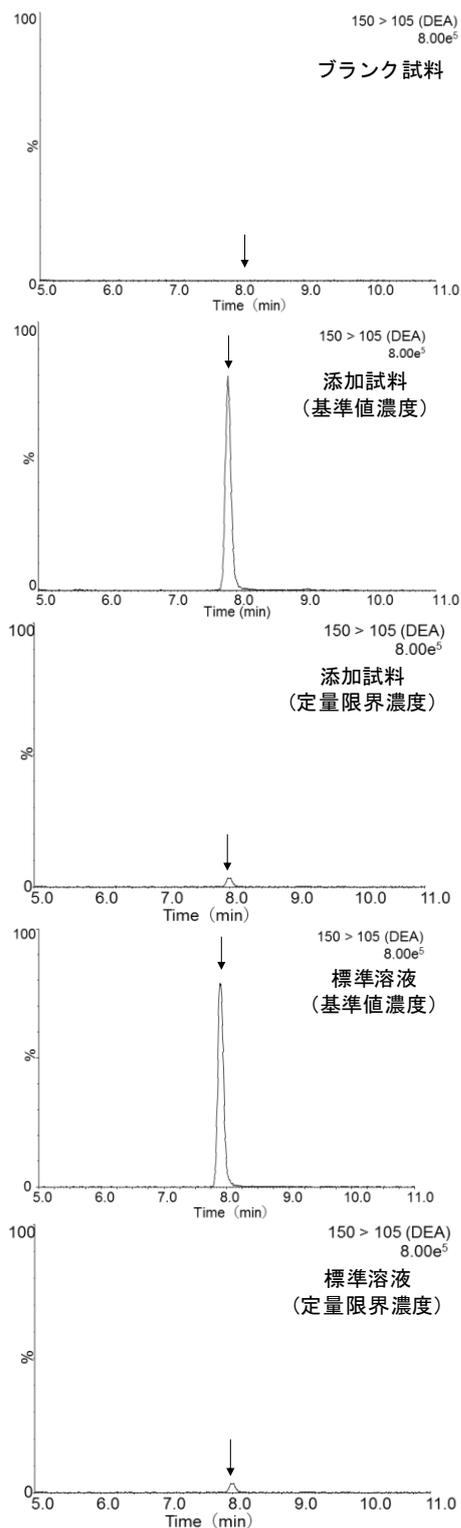


図33 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
DEA(m/z 150→105)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

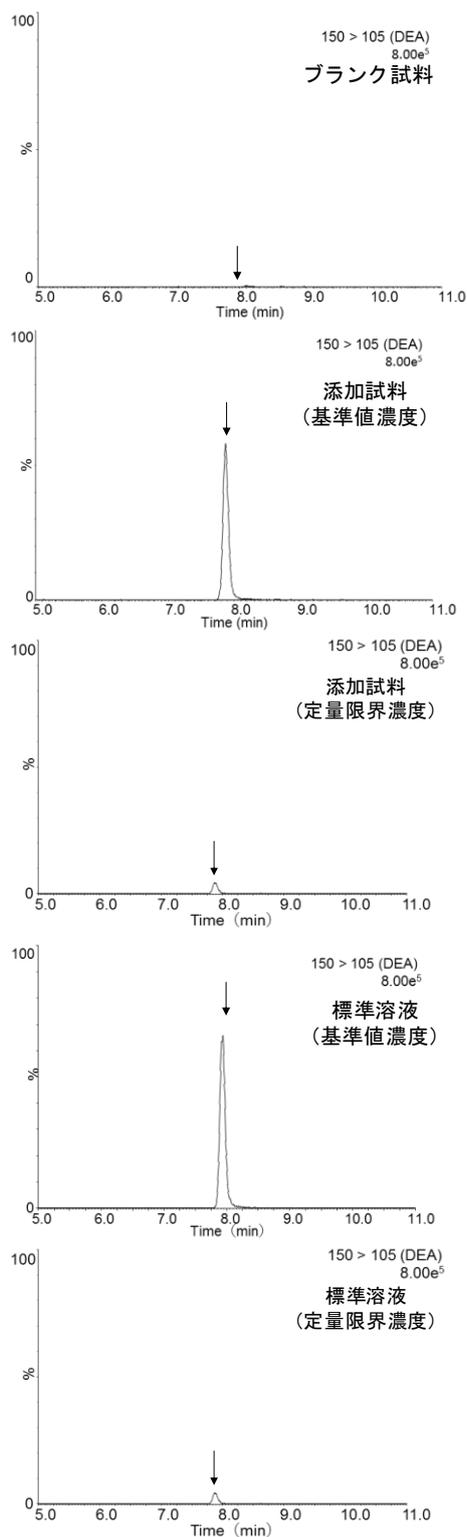


図34 牛の乳のSRMクロマトグラム

DEA(m/z 150→105)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)

定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

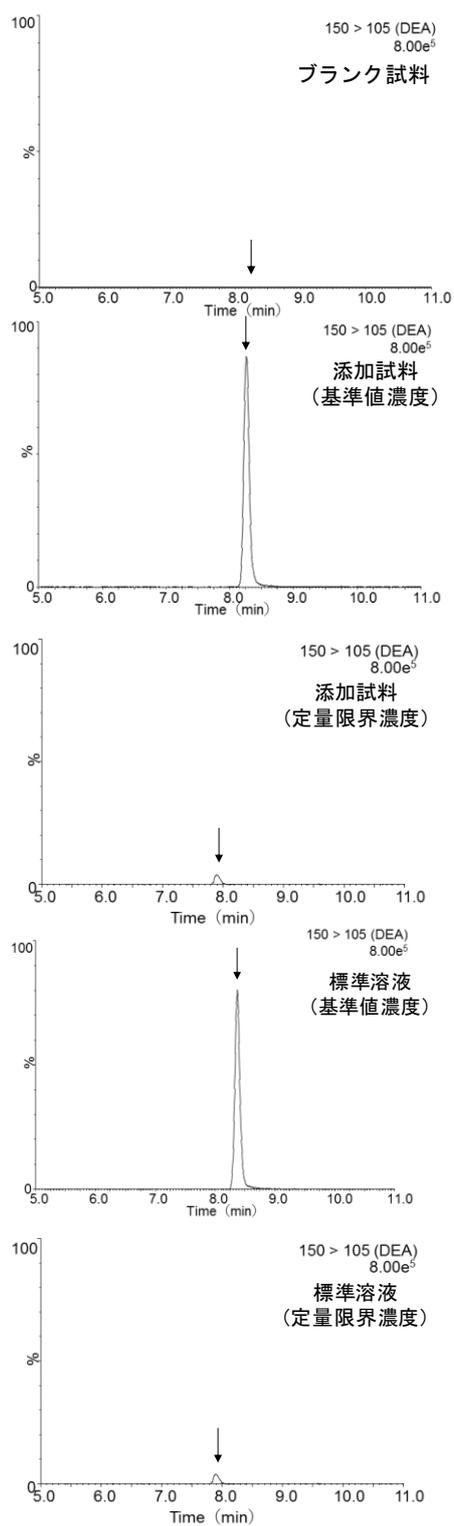


図35 鶏卵のSRMクロマトグラム

DEA(m/z 150→105)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)

定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

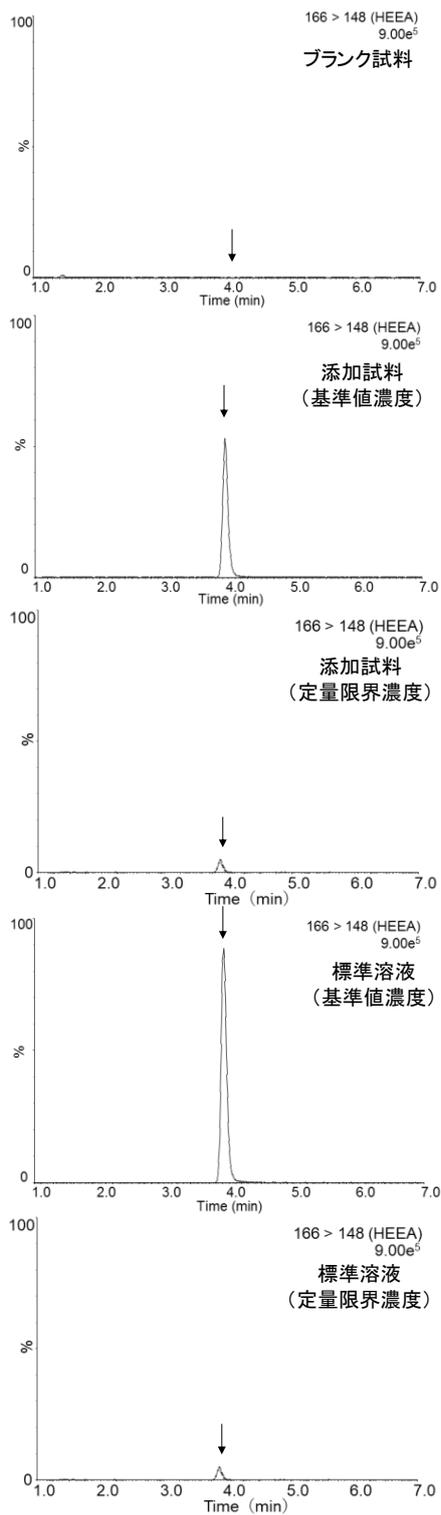


図36 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
HEEA(m/z 166→148)
基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

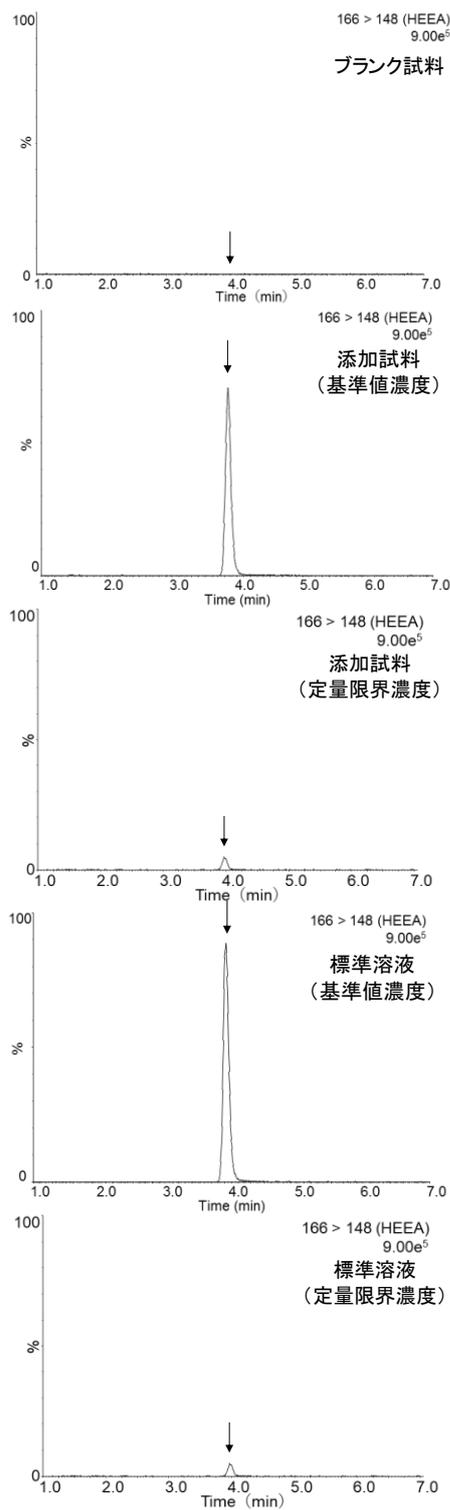


図37 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
HEEA(m/z 166→148)
基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

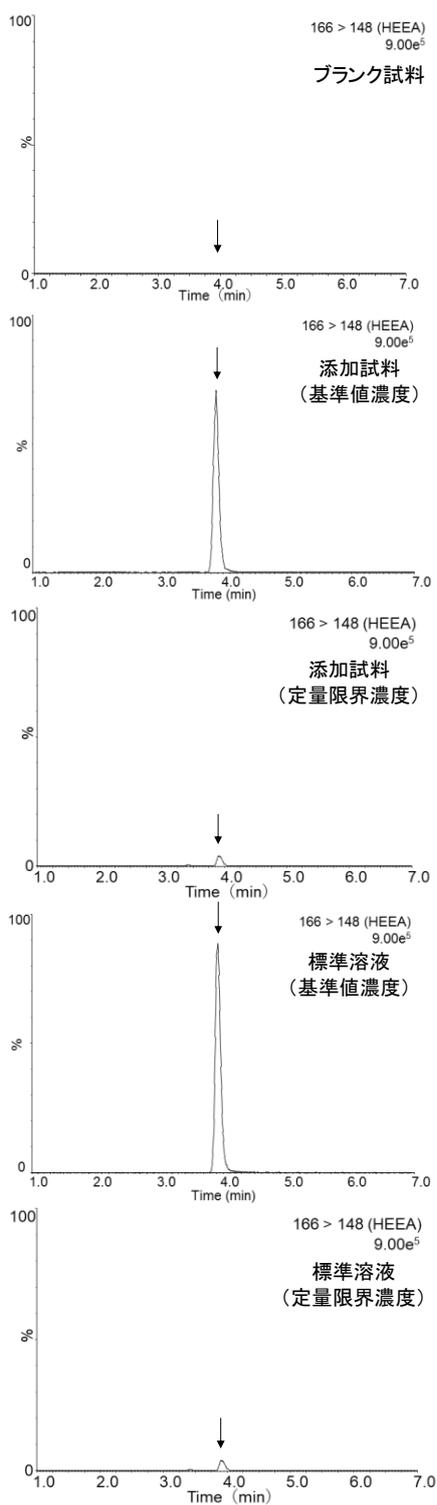


図38 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
HEEA(m/z 166→148)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

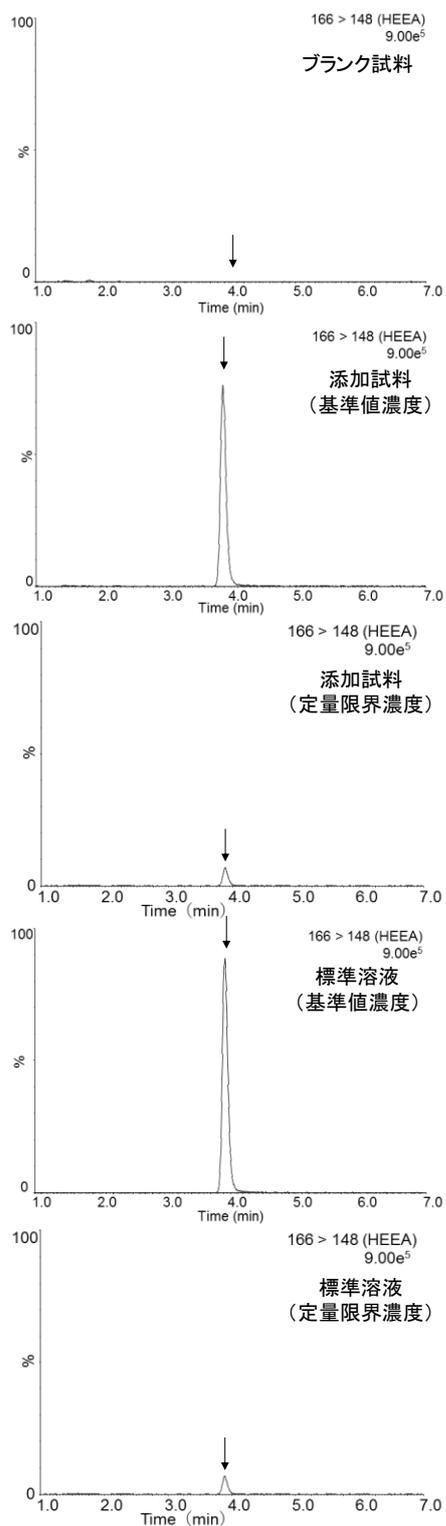


図39 牛の乳のSRMクロマトグラム
HEEA(m/z 166→148)

基準値濃度：0.02 ppm (ALA換算濃度)
定量限界濃度：0.002 ppm (ALA換算濃度)

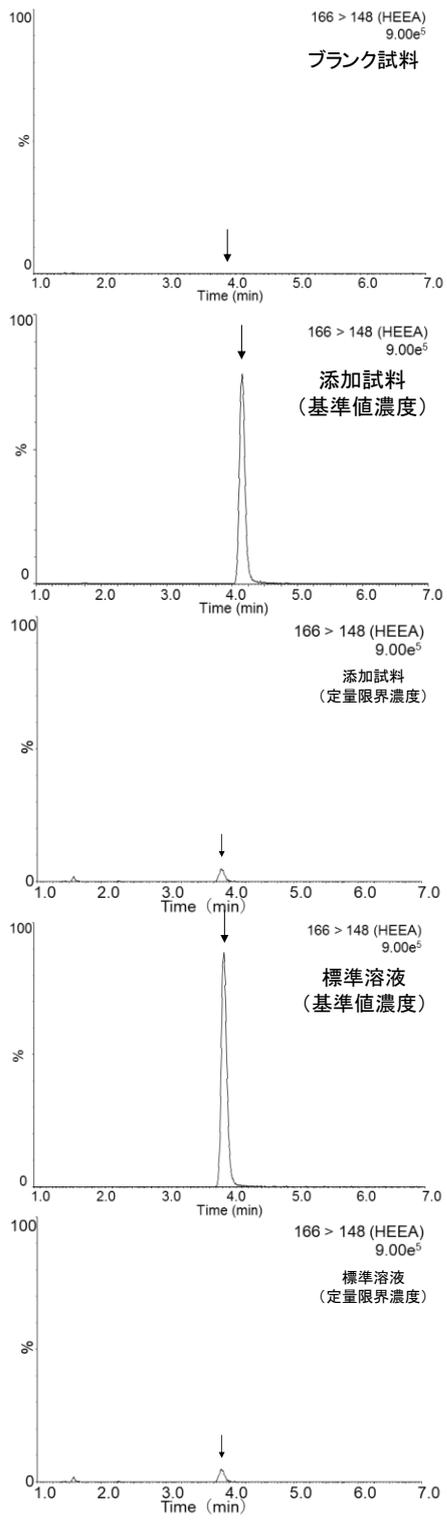


図40 鶏卵のSRMクロマトグラム

HEEA(m/z 166→148)

基準値濃度 : 0.02 ppm (ALA換算濃度)

定量限界濃度 : 0.002 ppm (ALA換算濃度)

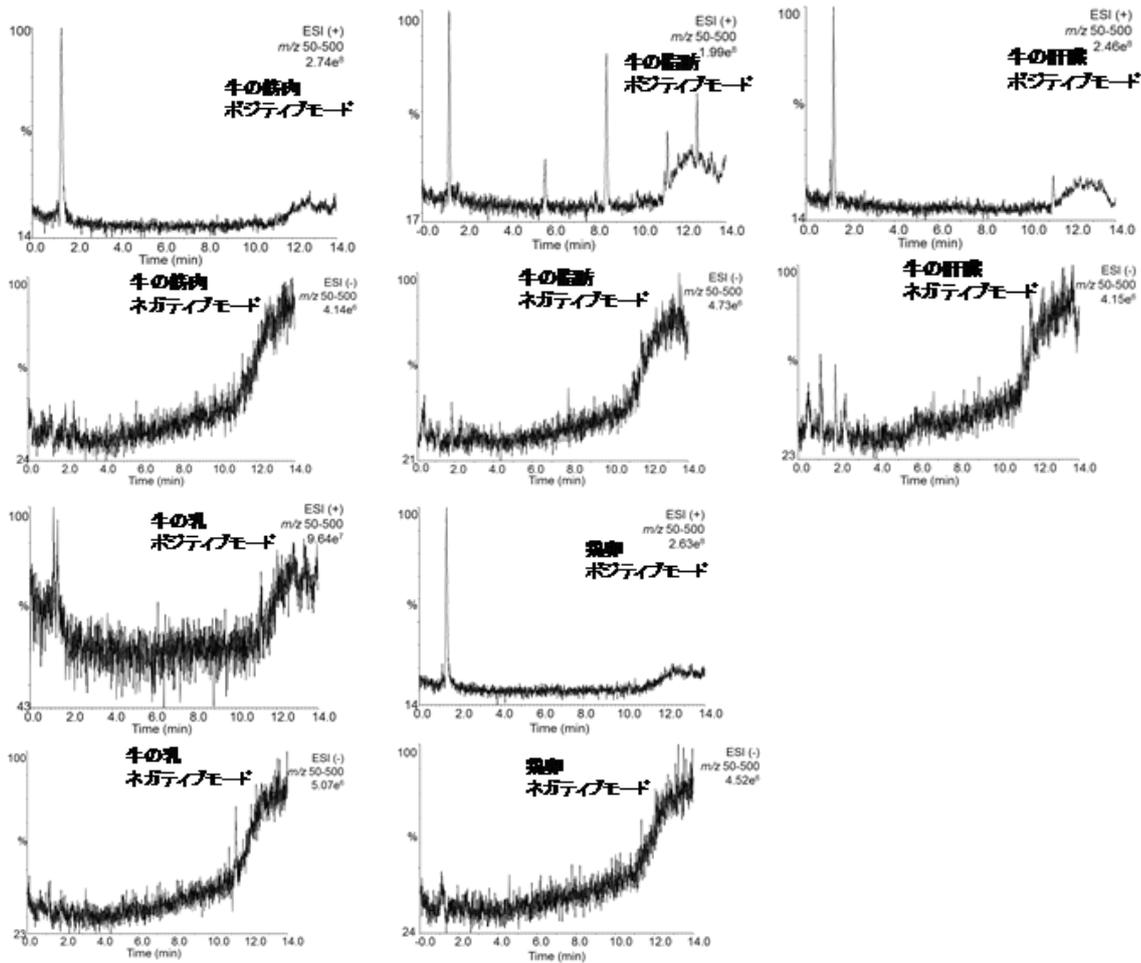


図41 ブランクトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～500 amu)

[結論]

畜産物中のALA及び代謝物を試料からメタノールで抽出し、水蒸気蒸留法による塩基性条件下で加水分解したDEA及びHEEAを含む留出液を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を開発した。本試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の乳及び卵の5食品で添加回収試験を行ったところ、良好な結果が得られたため、本法は畜産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

[参考文献]

- 1) P.J. Nord, R.G. Smith, J.M. Allan, L.M. Horner, R. Lauer, A.J. Klein, Residue determination of alachlor metabolites in milk and beef tissues. MSL-4373 (Monsanto Company), December 1984.
- 2) P.J. Nord, R.G. Smith, S.A. Adams, J.M. Allan, T.R. Bade, L.M. Horner, R. Lauer, A.J. Klein, Residue determination of alachlor metabolites in eggs and chicken tissues. MSL-4514 (Monsanto Company), February 1985.
- 3) D.D. Arras, J.M. Warner, Regulatory enforcement method for the determination of alachlor residues in corn forage, fodder, silage and grain. MSL-11154 (Performing Laboratories) June 1991.
- 4) S.A. Adams, Regulatory enforcement method for the determination of residues of alachlor and its metabolites in various raw agricultural and food commodities. MSL-11613 (Performing Laboratory), December 1991.