

アセトクロール試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アセトクロール

塩基性条件下で EMA 【2-エチル-6-メチルアニリン】に変換される代謝物

塩基性条件下で HEMA 【2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン】に変換される代謝物

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類、とうもろこし（未成熟）

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）

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。

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150 mg） 内径12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に、4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体 150 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。

アセトクロール標準品 本品はアセトクロール 95%以上を含む。

EMA 標準品 本品はEMA97%以上を含む。

HEMA 標準品 本品はHEMA95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。とうもろこし（未成熟）の場合は、試料 20.0 g を量り採る。

これにメタノール 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL（とうもろこし（未成熟）の場合は 10 mL）を分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) EMA及びHEMAへの変換

1) で得られた残留物にメタノール 4 mL を加えて溶かし、反応容器に移す。反応容器を氷冷しながら 50%水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加え、密栓した後、120℃で4時間加熱する。反応容器を室温程度まで放冷した後、氷冷する。反応容器を開栓し、氷冷した反応液を、予め氷冷した水 30 mL に滴下する。反応容器を水 10 mL で洗い、洗液を合わせる。

3) 精製

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150 mg）にアセトニトリル 2 mL 及び水 3 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 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（7：3）混液 4 mL を注入し、溶出液にアセトニトリル及び水（7：3）混液を加えて正確に 10 mL としたものを試験溶液と

する。

6. 検量線の作成

EMA 標準品及び HEMA 標準品のアセトニトリル及び水 (7:3) 混液の溶液を数点調製し、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 0.01 mg/kg (アセトクロール換算) に相当する試験溶液中濃度は 0.001 mg/L (アセトクロール換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線で EMA 及び HEMA の含量を求める。塩基性条件下で EMA 及び HEMA に変換される代謝物を含むアセトクロールの含量を求める場合には、次式により求める。

アセトクロール (塩基性条件下で EMA 及び HEMA に変換される代謝物を含む。) の含量 (ppm) = $A \times 1.995 + B \times 1.784$

A : EMA の含量 (ppm)

B : HEMA 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 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.01 vol% ギ酸及び 0.01 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液の混液 (9:1) で 5 分間保持した後、(1:19) までの濃度勾配を 15 分間で行う。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

EMA : プリカーサーイオン 136、プロダクトイオン 119、117

HEMA : プリカーサーイオン 152、プロダクトイオン 119、91

注入量 : 3 μL

保持時間の目安 :

EMA 15分

HEMA 9分

10. 定量限界

アセトクロール : 0.01 mg/kg

塩基性条件下で EMA に変換される代謝物 : 0.01 mg/kg (アセトクロール換算)

塩基性条件下で HEMA に変換される代謝物 : 0.01 mg/kg (アセトクロール換算)

11. 留意事項

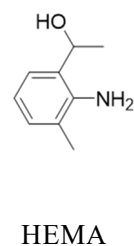
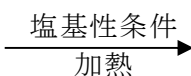
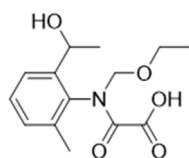
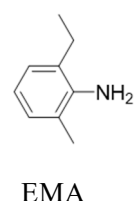
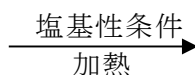
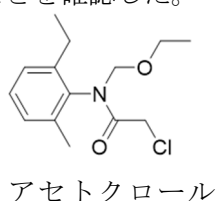
1) 試験法の概要

アセト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た後、塩基性条件下で加熱して EMA 及び HEMA に変換し、4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリド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、EMA 及び HEMA のそれぞれに

ついて定量を行い、塩基性条件下で EMA 及び HEMA に変換される代謝物を含むアセトクロールの含量を求める場合には、EMA 及び HEMA の含量にそれぞれ換算係数を乗じてアセトクロールの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 抽出液の溶媒を除去する際、水が残る場合はエタノールを 10 mL 程度 (約 5 mL ずつ、2 回程度) 加えて濃縮するとよい。
- ② アセトクロール標準品を用いて添加回収試験を実施し、EMA への変換が十分に行われていることを確認すること。アセトクロールから EMA へ十分に変換すれば、HEMA への変換も行われると考えられる。なお、試験法開発時はアセトクロール標準品及び 2-[(エトキシメチル){2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルフェニル}アミノ]-2-オキシ酢酸標準品を用いてそれぞれ EMA 及び HEMA へ変換することを確認した。



EMA及びHEMAへの変換

- ③ 抽出で得られた残留物をメタノールに再溶解した後、50%水酸化ナトリウム溶液を加えて混合するとやや発熱するため、EMA 及び HEMA が揮散するおそれがある。このため、反応容器を氷冷しながら、50%水酸化ナトリウム溶液を加える。
- ④ 変換反応ではアルミシールバイアル等の気密性の高い容器を用いる。
- ⑤ 変換反応後、反応液に水を加えると激しく発熱し、EMA 及び HEMA が揮散するおそれがある。このため、反応液を水で希釈する際は、氷冷した反応液を、予め氷冷した水に滴下する。
- ⑥ 変換反応後、反応液を水で希釈すると浮遊物が生成する場合がある。ミニカラム精製においては浮遊物も含めてミニカラムに注入する。ミニカラムに注入する際、浮遊物をはじめに注入すると流速が遅くなる場合があるため、浮遊物をなるべく採らずに溶液を注入した後、少量残った浮遊物を洗浄操作で用いる水 (約 2 mL ずつ、3 回程度) に懸濁してミニカラムに注入するとよい。浮遊物は、この水に懸濁してミニカラムに注入する操作中に溶解する。なお、流速が遅い場合は必要に応じて吸引するとよい。
- ⑦ EMA 及び HEMA 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。

EMA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 136、プロダクトイオン 119

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 136、プロダクトイオン 117

HEMA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 152、プロダクトイオン 119

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 152、プロダクトイオン 91

- ⑧ HEMA の LC-MS/MS 測定で、感度が不足する場合は以下のイオンを使用するとよい。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 134、プロダクトイオン 115

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 134、プロダクトイオン 119

- ⑨ 試験法開発時に検討した食品 : 大豆、とうもろこし (未成熟)

12. 参考文献

なし

13. 類型

C