

アセキノシル試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

アセキノシル

3-ドデシル-2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン（以下「アセキノシルヒドロキシ体」という。）

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 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。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg） 内径10～12 mmのポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体500 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。

アセキノシル標準品 本品はアセキノシル 95%以上を含む。

アセキノシルヒドロキシ体標準品 本品はアセキノシルヒドロキシ体95%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料10.0 gに0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン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、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この20 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLずつで3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。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かす。

② はちみつの場合

試料10.0 gに水20 mLを加えて溶解する。これに0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン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て、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この20 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かす。

③ 脂肪の場合

試料5.00 gに0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン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、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この40 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLずつで3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。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かす。

2) 精製

① シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (500 mg) に*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 2 mLを加えて溶かす。

② スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 10 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル20 mL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に溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

アセキノシル標準品及びアセキノシルヒドロキシ体標準品をそれぞれアセトンに溶解して500 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.01 mg/Lである。

6. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、5の検量線でアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の含量を求める。アセキノシルヒドロキシ体を含むアセキノシルの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\text{アセキノシル (アセキノシルヒドロキシ体を含む。)} \text{の含量 (ppm)} = A + B \times 1.123$$

A : アセキノシルの含量 (ppm)

B : アセキノシルヒドロキシ体の含量 (ppm)

7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

8. 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℃

移動相 : アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸混液 (1 : 1) から (19 : 1) までの濃度勾配を10分間で行い、(19 : 1) で10分間保持する。

イオン化モード : APCI (-)

主なイオン (*m/z*)

アセキノシル : プリカーサーイオン 384、プロダクトイオン 342、187

アセキノシルヒドロキシ体 : プリカーサーイオン 341、プロダクトイオン 313、200、186

注入量 : 10 µL

保持時間の目安

アセキノシル：18分

アセキノシルヒドロキシ体：17分

9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体を試料から0.4 mol/L塩酸及びアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂（はちみつの場合は省略）した後、シリカゲルミニカラム及び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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

①アセキノシルは、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体のそれぞれについて定量を行い、アセキノシルヒドロキシ体については、その含量に係数を乗じてアセキノシルの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

②アセキノシルは光に不安定であるため、試験は遮光条件下で行うこと。本試験法開発時は、ガラス器具は褐色のものをを用いた。

③アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の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。

アセキノシル

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン384、プロダクトイオン342

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン384、プロダクトイオン187

アセキノシルヒドロキシ体

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン341、プロダクトイオン186

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン341、プロダクトイオン200

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン341、プロダクトイオン313

11. 参考文献

なし

12. 類型

C