

グリチルリチン酸試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

グリチルリチン酸

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。

アンモニア溶液 アンモニア水10 mLに水270 mLを加えて混和する。

アンモニア水・メタノール溶液 アンモニア水10 mLにメタノール270 mLを加えて混和する。

グリチルリチン酸標準品 本品はグリチルリチン酸99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

[1] 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及びはちみつの場合

試料10.0 gにアンモニア溶液10 mLを加え、ホモジナイズした後、アンモニア水・メタノール溶液40 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、さらにホモジナイズした後、毎分3,500回転で5分間遠心分離する。*n*-ヘキサン層を除去し、アンモニア水・メタノール溶液層を採る。残留物にアンモニア水・メタノール溶液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。*n*-ヘキサン層を除去し、アンモニア水・メタノール溶液層を採り、先のアンモニア水・メタノール溶液層に合わせた後、吸引ろ過する。ろ液にアンモニア水・メタノール溶液を加えて正確に100 mLとする。

[2] 鶏卵の場合

試料10.0 gにアンモニア溶液10 mLを加え、ホモジナイズした後、アンモニア水・メタノール溶液40 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、さらにホモジナイズした後、毎分3,500回転で5分間遠心分離する。*n*-ヘキサン層を除去し、アンモニア水・メタノール溶液50 mLを加え、軽く振り混ぜた後、上記と同様に遠心分離を行い、アンモニア水・メタノール溶液層を採る。残留物にアンモニア水・メタノール溶液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。*n*-ヘキサン層を除去し、アンモニア水・

メタノール溶液層を採り、先のアンモニア水・メタノール溶液層に合わせた後、吸引ろ過する。ろ液にアンモニア水・メタノール溶液を加えて正確に200 mLとする。

2) 精製

中性アルミナミニカラム (1,710 mg) にメタノール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10 mL (鶏卵の場合は20 mL) を注入した後、アンモニア水・メタノール溶液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水30 mLを注入し、溶出液に1-プロパノール20 mLを加えた後、40°C以下で1-プロパノール及び水を除去する。この残留物を水に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

グリチルリチン酸標準品を水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解して1 mg/mLとし標準原液とする。標準原液を水で希釈して0.005~0.1 mg/L溶液を数点調製し、それぞれ10 mLを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。

6. 定量

試験溶液10 mLをLC-MS/MSに注入し、5の検量線でグリチルリチン酸の含量を求める。

7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

8. 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル、内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径2 mm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、ギ酸及び水混液 (25 : 1 : 475) から (400 : 1 : 100) までの濃度勾配を15分間で行い、(400 : 1 : 100) で1分間保持する。

イオン化モード：ESI (-)

主なイオン (m/z) : プリカーサーイオン821、プロダクトイオン351、113

保持時間の目安：11分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

グリチルリチン酸を試料からアンモニア溶液、アンモニア水・メタノール溶液及び*n*-ヘキサンで抽出する。*n*-ヘキサンを除去後、中性アルミナ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。

2) 注意点

- [1] 抽出の際、乳及びはちみつなどの液体試料では、ホモジナイズ抽出の代わりに振とう抽出を行っても良い。
- [2] 鶏卵の場合、最初の遠心分離後のアンモニア水・メタノール溶液層はゲル化するが、*n*-ヘキサン層を除去した後、再度アンモニア水・メタノール溶液を加えて振り混ぜ、遠心分離することで、ゲル化は解消される。
- [3] 吸引ろ過は、ケイソウ土を2~3 mm程度積層して実施すること。
- [4] グリチルリチン酸は、測定装置内、特にオートサンプラーのニードルに吸着する性質があるため、キャリーオーバー対策を徹底したニードル洗浄機構を有するオートサンプラーを使用することが望ましい。

11. 参考文献

厚生労働省監修「食品衛生検査指針 食品添加物編」p.228-232、社団法人 日本食品衛生協会（2003）

12. 類型

C