

## アラニカルブ試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

アラニカルブ

### 2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）  
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/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。

0.2 mol/Lリン酸緩衝液（pH 8）

第1液：pH測定用リン酸一カリウム13.61 gを水に溶かし、500 mLとする。

第2液：水酸化ナトリウム4.0 gに新たに煮沸して冷却した水を加えて溶かし、500 mLとする。用時調製する。

第1液250 mLに第2液231 mLを混和し、水を加えて1,000 mLとする。

アラニカルブ標準品 本品はアラニカルブ99%以上を含み、融点は47°Cである。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### (1) 種実類の場合

試料10.0 g量り採り、0.2 mol/Lリン酸緩衝液（pH 8）20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加えて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、40°C以下で約30 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサンを加えて正確に1 mLとする。

##### (2) 果実、野菜、ハーブ及び抹茶の場合

果実の場合は、検体約1 kgを精密に量り、0.2 mol/Lリン酸緩衝液（pH 8）400 mL及び飽和炭酸水素ナトリウム溶液100 mLを加えて、細切均一化する。検体20.0 gに相当する量を量り採る。

野菜及びハーブの場合は、検体約1 kgを精密に量り、0.2 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 8) 500 mLを加えて、細切均一化する。検体20.0 gに相当する量を量り採る。

抹茶の場合は、試料5.00 gに0.2 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 8) 20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加えて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、40°C以下で約30 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサンを加えて正確に2 mLとする。

### (3) 抹茶以外の茶の場合

試料5.00 gに100°Cの水300 mLを加え、室温で5分間放置した後、ろ過する。冷後、ろ液120 mLを採り、塩化ナトリウム40 gを加えて、酢酸エチル150 mLずつで2回抽出する。抽出液を合わせ、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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサンを加えて正確に1 mLとする。

## 2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液10 mL及び*n*-ヘキサン10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、このカラムに1) で得られた溶液0.5 mLを注入し、流出液は捨てる。さらに、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 49) 混液20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液25 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をアセトニトリルに溶解して正確に0.5 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

アラニカルブ標準品の0.1~2 mg/Lアセトニトリル溶液を数点調製する。それぞれ10 µLをHPLC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 µLをHPLCに注入し、5の検量線でアラニカルブの含量を求める。

## 7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

## 8. 測定条件

### HPLC

検出器：UV（波長230 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5  $\mu\text{m}$ ）、内径4.6 mm、長さ150 mm

カラム温度：50°C

移動相：アセトニトリル及び水（1：1）混液

注入量：10  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：10分

### LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5  $\mu\text{m}$ ）、内径 2.0~4.6 mm、長さ150~250 mm

カラム温度：40~50°C

移動相：アセトニトリル及び水（1：1）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ $m/z$ ）：400

注入量：5~10  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：11分

## 9. 定量限界

0.01 mg/kg（茶は0.1 mg/kg）

## 10. 留意事項

### 1）試験法の概要

アラニカルブを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶する。果実、野菜、ハーブ及び抹茶はそのまま、種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-UVで測定し、LC/MSで確認する方法である。

### 2）注意点

- (1) アラニカルブは、酸性及びアルカリ性で速やかにメソミル及びメチルチオアセトヒドロキシマーチンに変化する。酸性の強い試料では、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、抽出時の液性をpH 8付近に保つ必要がある。
- (2) エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製でアラニカルブとともに溶出されたメソミルは、HPLCで分離できる。

11. 参考文献

伊藤正子ら, 食品衛生学雑誌, 39, 218-224 (1998)

12. 類型

C