

ピリデート試験法

1. 分析対象化合物

ピリデート、ピリデートヒドロキシ体、ピリデートヒドロキシ体抱合体

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を用いる。

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酢酸アンモニウム緩衝液 酢酸アンモニウム15.4 gを蒸留水に溶かして1,000 mLとし、アンモニア水を加えてpH 9に調整する。

4. 標準品

ピリデート 本品はピリデート99%以上を含む。

融点 本品の融点は27°Cである。

ピリデートヒドロキシ体 本品はピリデートヒドロキシ体99%以上を含む。

融点 本品の融点は216~218°Cである。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を420 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

野菜の場合は、検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

これにアセトン、0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液及びモルホリンの混液（100 : 20 : 0.5）120 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、上記の混液50 mLを加え、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で約70 mLに濃縮する。

これをあらかじめ酢酸エチル50 mLを入れた200 mLの分液漏斗(I)に移す。0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液15 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、水層を200 mLの分液漏斗(II)に移す。これに酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に操作して、水層を200 mLの三角フラスコに移す。

b 加水分解

これに1 mol/L硫酸を加えてpH 4に調整し、空冷管を付けて60℃で40分間加熱する。冷後200 mLの分液漏斗に移し、蒸留水15 mLを用いて三角フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせる。これに酢酸エチル50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル層を200 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中をろ過する。次いで酢酸エチル20 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチルを除去する。この残留物に酢酸1滴を加え、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液(1:9) 20 mLを加えて溶かす。

c 精製法

(1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム5 gを*n*-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを入れ、カラムの上端に少量の*n*-ヘキサンが残る程度まで*n*-ヘキサンを流出させる。このカラムにa 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液(1:9) 80 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液(2:8) 60 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトン及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸1滴を加え、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液(2:8) 10 mLを加えて溶かす。

(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(粒径63~200 μm) 5 g、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを*n*-ヘキサンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の*n*-ヘキサンが残る程度まで*n*-ヘキサンを流出させる。このカラムに(1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィーで得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液(2:8) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液(2:8) 100 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトン及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にメタノールを加えて溶かし、正確に1 mLとして、これを試験溶液とする。

6. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果はピリデートヒドロキシ体の標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5 μm)を用いる。

クロマトグラフ管 内径4～6 mm、長さ150～250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長280 nmで操作する。

移動相 メタノール、水及び酢酸の混液（4：6：0.05）を用いる。ピリデートヒドロキシ体が13～14分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法によりピリデートヒドロキシ体の定量を行い、これに係数1.83を乗じてピリデートの含量を求める。

7. 定量限界

0.01 mg/kg（なたねにあっては0.05 mg/kg）

8. 留意事項

ピリデートは、ピリデート及びピリデートヒドロキシ体抱合体をピリデートヒドロキシ体に変換した後、ピリデートヒドロキシ体について定量を行い、その含量に係数を乗じてピリデートの含量に換算し、これを分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A