

メパニピリム試験法

1. 分析対象化合物

メパニピリム、メパニピリムプロパノール体 [1-(2-アニリノ-6-メチルピリミジン-4-イル)-2-プロパノール]

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。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒径150～425 μm）を130℃で12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。これに対して水10%を加える。

酢酸緩衝液 0.2 mol酢酸ナトリウム溶液に0.2 mol/L酢酸を加えてpH 5に調整する。

4. 標準品

メパニピリム 本品はメパニピリム99%以上を含む。

融点 本品の融点は133℃である。

1-(2-アニリノ-6-メチルピリミジン-4-イル)-2-プロパノール（以下「プロパノール体」という。）本品はプロパノール体98%以上を含む。

融点 本品の融点は115～116℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

豆類の場合は、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。

果実及び野菜の場合は、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100 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、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、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℃以下で約30 mLに濃縮する。

これを100 mLの遠心分離管に移す。酢酸緩衝液25 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の遠心分離管に合わせる。1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 5に調整する。これに37℃、pH 5.0で1分間にサリシンからグルコースを約50

μmol 遊離させる量の β -グルコシダーゼ及び 37°C 、 $\text{pH } 5.0$ で1分間にセルロースからグルコースを約 $300 \mu\text{mol}$ 遊離させる量のセルラーゼを加え、栓をして、 37°C で振とう機を用いて軽く振り混ぜながら18時間放置する。これに 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて $\text{pH } 8 \sim 9$ に調整する。

これを 300 mL の分液漏斗に移す。酢酸エチル 50 mL を用いて上記の遠心分離管を洗い、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、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に入ろ過する。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°C 以下で酢酸エチルを除去する。この残留物に酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9) 5 mL を加えて溶かす。

b 精製法

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 10 g を酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9)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酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9)が残る程度まで酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9)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、酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9) 25 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:9) 70 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器(I)中に採る。さらに、酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:3) 40 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:3) 100 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器(II)中に採り、それぞれ 40°C 以下で酢酸エチル及び n -ヘキサンを除去する。すり合わせ減圧濃縮器(I)中に採った流出液の残留物にエーテル及び n -ヘキサンの混液(1:19) 5 mL を加えて溶かし、すり合わせ減圧濃縮器(II)中に採った流出液の残留物に酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液(1:19) 5 mL を加えて溶かす。

(1) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(900 mg)に、エーテル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。 n -ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムにすり合わせ減圧濃縮器(I)中の溶液を注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル及び n -ヘキサンの混液(1:19) 15 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル及び n -ヘキサンの混液(3:7) 20 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、 40°C 以下でエーテル及び n -ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液(1:1)を加えて溶かし、正確に 4 mL (豆類の場合は 2 mL)として、これをメパニピリムの試験溶液とする。

(2) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムクロマトグラフィー

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) に、酢酸エチル5 mLを注入し、流出液は捨てる。*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにすり合わせ減圧濃縮器(II)中の溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 15 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 30 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下で酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) を加えて溶かし、正確に4 mL (豆類の場合は2 mL) として、これをプロパノール体の試験溶液とする。

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4~4.6 mm, 長さ250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長270 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) を用いる。メパニピリムの試験を行う場合は、メパニピリムが約18分で流出する流速に調整する。プロパノール体の試験を行う場合は、プロパノール体が約7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、メパニピリム及びプロパノール体のそれぞれについてピーク高法又はピーク面積法により定量を行い、メパニピリム及びプロパノール体の含量を求め、次式によりプロパノール体を含むメパニピリムの含量を求める。

メパニピリム (プロパノール体を含む。) の含量 (ppm) = A + B × 0.92

A : メパニピリムの含量 (ppm)

B : プロパノール体の含量 (ppm)

7. 定量限界

0.01 mg/kg

8. 留意事項

メパニピリムは、メパニピリム及びメパニピリムプロパノール体のそれぞれについて定量を行い、メパニピリムプロパノール体についてはその含量に係数を乗じてメパニピリムの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A