

キザロホップエチル試験法

1. 分析対象化合物

キザロホップ、キザロホップエチル、キザロホップP、キザロホップPエチル、キザロホップPテフリル

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及び液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

3. 試薬、試液

総則の3に示すものを用いる。

4. 標準品

キザロホップ 本品はキザロホップ99%以上を含む。

融点 本品の融点は129～130℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 豆類及び種実類の場合

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。

これにアセトニトリル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、アセトニトリル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。

これをあらかじめ塩化ナトリウム20 g及び0.5 mol/L塩酸100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液(1:1) 100 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、エーテル及び*n*-ヘキサンの層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液(1:1) 50 mLを加え、上記と同様に操作して、エーテル及び*n*-ヘキサンの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ろ過する。次いで*n*-ヘキサン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℃以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、100 mLの分液漏斗に移す。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 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、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す、アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下でアセトニトリルを除去する。

(2) 果実及び野菜の場合

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。

これにアセトニトリル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、アセトニトリル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°C以下で約30 mLに濃縮する。

これをあらかじめ塩化ナトリウム20 g及び0.5 mol/L塩酸100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）100 mLを用いて上記の減圧濃縮器中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、エーテル及び*n*-ヘキサンの層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。水層にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）50 mLを加え、上記と同様に操作して、エーテル及び*n*-ヘキサンの層を上記の減圧濃縮器に合わせ、40°C以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。

b 加水分解

a 抽出法で得られた残留物にアセトニトリル2 mLを加えて溶かす。これに水10 mL及び2 mol/L水酸化ナトリウム溶液2 mLを加え、時々振り混ぜながら30分間放置する。

この溶液をあらかじめエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）50 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。水2 mLを用いて上記の減圧濃縮器を洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせ、緩やかに振り混ぜた後、エーテル及び*n*-ヘキサンの層を除去する。水層に0.5 mol/L塩酸50 mL及びエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）100 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、エーテル及び*n*-ヘキサンの層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）50 mLを加え、上記と同様に操作して、エーテル及び*n*-ヘキサンの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ろ過する。次いでエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）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1 mLを加えて溶かし、水9 mLを加える。

c 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに b 加水分解で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水の混液 (1 : 9) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。別にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの上に上記のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、アセトニトリル及び水の混液 (3 : 7) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをはずして捨てる。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに水10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで0.5 mol/L塩酸10mLを注入し、流出液をあらかじめエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 1) 20 mLを入れた分液漏斗に採る。激しく振り混ぜた後、静置し、エーテル及び*n*-ヘキサンの層をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。水層にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 1) 20 mLを加え、上記と同様に操作してエーテル及び*n*-ヘキサンの層を上記の減圧濃縮器中に合わせ、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0.1%酢酸溶液の混液 (1 : 1) を加えて溶かし、正確に2 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 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 波長240 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル及び0.1%酢酸溶液の混液 (1 : 1) を用いる。キザロホップが約13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定量を行い、キザロホップの含量を求める。さらに、次式により、キザロホップエチルの含量を求める。

キザロホップエチルの含量 (ppm) = キザロホップの含量 (ppm) × 1.08

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

果実・野菜0.005 mg/kg、豆類0.01 mg/kg

8. 留意事項

キザロホップエチルは、キザロホップエチルをキザロホップに変換した後、キザロホップについて定量を行い、その含量に係数を乗じてキザロホップエチルの含量に換算し、これを分析値とすること。

キザロホップエチルの分析値には、キザロホップ、キザロホップエチル、キザロホップP、キザロホップPエチル及びキザロホップPテフリルが含まれる。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A