

シクロキシジム試験法

1. 分析対象化合物

シクロキシジム

2. 装置

炎光光度型検出器（硫黄用干渉フィルター、波長394 nm）付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・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

シクロキシジム 本品はシクロキシジム99%以上を含む。

融点 本品の融点は37°Cである。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

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。

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。

これにイソプロパノール100 mLを加え、3分間細砕した後、ろ紙を用いて共栓付き三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、イソプロパノール及び水の混液（7：3）50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその共栓付き三角フラスコ中に合わせる。

これに水酸化カルシウム5 gを加え、振とう機を用いて10分間激しく振り混ぜた後、10分間静置し、ろ紙を用いてナス型フラスコ中に吸引ろ過する。次いで、イソプロパノール及び水の混液（7：3）10 mLを用いて、共栓付き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3回繰り返す。洗液をナス型フラスコ中に合わせる。

b 酸化

これに20%水酸化カリウム溶液30 mLを加え、還流冷却器を付け、ホットプレート上で加熱還流する。10分間沸騰後、過酸化水素4 mLを還流冷却器上から加える操作を3回繰り返し、沸騰させる。10分間沸騰後、ナス型フラスコを還流冷却器からはずし、ナス型フラスコ中の溶液のpHが12以上であることを確認する。pHが12以下の場合は、20%水酸化カリウム溶液を加え、pH 12以上とする。次いで、ヨウ化カリウム・デンプン紙に6 mol/L塩

酸1滴を滴下し、ナス型フラスコ中の溶液1滴を滴下するとき、ヨウ化カリウム・デンプン紙が直ちに深青色になることを確認する。深青色とならない場合は、ナス型フラスコを還流冷却器につけ、過酸化水素5 mLを還流冷却器上から加え、ホットプレート上で10分間沸騰させ、上記と同様の操作を行い、ヨウ化カリウム・デンプン紙が深青色となることを確認する。

pH及びヨウ化カリウム・デンプン紙の反応を確認後、ナス型フラスコを再び還流冷却器に付け、ホットプレート上で更に50分間沸騰させる。

c 活性炭への吸着

放冷後、6 mol/L塩酸を用いてナス型フラスコ中の溶液をpH 7付近にし、次いで亜硫酸カリウム4 gを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、20%水酸化カリウム溶液を用いてpH 12以上にする。これを、あらかじめ塩化ナトリウム35 gを入れた500 mLの分液漏斗に移す。水20 mLを用いて上記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500 mLのナス型フラスコに移す。イソプロパノール層に飽和塩化ナトリウム溶液30 mLを加え、上記と同様に操作して水層をナス型フラスコ中に合わせる。6 mol/L塩酸を用いて上記のナス型フラスコ中の溶液をpH 1付近にし、70°Cで濃縮してイソプロパノールを完全に除去する。放冷後、ナス型フラスコ中の溶液に不溶の塩がある場合は、適量の水を加え、完全に溶解する。これに活性炭5 gを加え、振とう機を用いて10分間激しく振り混ぜた後、ろ紙を用いて吸引ろ過する。水40 mLを用いてナス型フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を3回繰り返した後、5分間強く吸引する。次いで*n*-ヘキサン100 mLでろ紙上の残留物を洗った後、5分間強く吸引する。

d メチル化

ろ紙上の残留物を200 mLのナス型フラスコに移し、メタノール40 mL、硫酸10 mL、オルトギ酸トリメチル13 mL、ペルオキシ二硫酸カリウム1 gを加える。これに、還流冷却器を付け、ホットプレート上で加熱還流し、沸騰させる。1時間沸騰後、熱時にろ紙を用いて三角フラスコ中に吸引ろ過する。次いで、メタノール25 mLを用いて、ナス型フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。更に、ギ酸及びメタノールの混液（1：9）50 mLを用いて、ナス型フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液を上記の三角フラスコに合わせ、これをあらかじめ水300 mLを入れた1,000 mLの分液漏斗に移す。クロロホルム100 mLを用いて、上記の三角フラスコを洗い、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、クロロホルム層をあらかじめ飽和炭酸水素ナトリウム溶液50 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。水層にクロロホルム50 mLを加え、上記と同様に操作して、クロロホルム層を上記の分液漏斗に合わせる。この分液漏斗を振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、クロロホルム層を、ガラスウールをつめ、無水硫酸ナトリウム約50 gを充てんした直径9 cmの漏斗に注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。

分液漏斗の水層にクロロホルム30 mLを加え、上記と同様に操作して、クロロホルム層を漏斗に注入して流出液を上記のすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でクロロホルムを除去する。この残留物にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：3）10 mLを加えて溶かす。

e 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（粒径63~200 µm）10 gをアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：3）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アセトン及びn-ヘキサンの混液（1：3）が残る程度までアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：3）を流出させる。このカラムにd メチル化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（1：3）200 mLを注入し、最初の80 mLは捨てる。次の流出液120 mL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。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に0.5 mLとして、これを試験溶液とする。

f 検量線

シクロキシジム2~16 µgを採り、これにイソプロパノール及び水の混液（7：3）180 mLを加え、b 酸化、c 活性炭への吸着、d メチル化及びe 精製法と同様に操作する。

6. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品について5. 試験溶液の調製 b 酸化、c 活性炭への吸着、d メチル化及びe 精製法と同様に操作して得られたものと一致しなければならない。

操作条件

カラム 内径0.25 mm、長さ30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用メチルシリコンを0.25 µmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 60℃で3分間保持し、その後毎分20℃で昇温し、260℃に到達後5分間保持する。

試験溶液注入口温度 260℃

検出器 280℃で操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。シクロキシジムの分解・酸化・メチル化体が約15分で流出する流速に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

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う。

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品について5. 試験溶液の調製b 酸化、c 活性炭への吸着、d メチル化及びe 精製法と同様に操作して得られたもの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

0.05 mg/kg

8. 留意事項

活性炭に吸着させる際には、イソプロパノールを完全に除去すること。また、メチル化は水を完全に除去して実施すること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A