

ピメトロジン試験法

1. 分析対象化合物

ピメトロジン

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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

リン酸緩衝液 (pH 6) 0.2 mol/Lリン酸水素一カリウム溶液に0.2 mol/Lリン酸水素二カリウム溶液を加えてpH 6に調整する。

4. 標準品

ピメトロジン 本品はピメトロジン99%以上を含む。

融点 本品の融点は217°Cである。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 穀類及び豆類の場合

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。

これにメタノール100 mL及び0.5 mol/L炭酸カリウム溶液5 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、メタノール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、45°C以下で約5 mLに濃縮する。

これを100 mLの分液漏斗に移す。水5 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。さらに、*n*-ヘキサン20 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。この分液漏斗を緩やかに1分間振とうした後、放置し、*n*-ヘキサン層を捨てる。更に水層に*n*-ヘキサン20 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、*n*-ヘキサン層を捨てる。次いで水層をすり合わせ減圧濃縮器に移し、分液漏斗を少量の水で洗い、洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、45°C以下で約5 mLに濃縮する。これに水5 mLを加える。

(2) 果実及び野菜の場合

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。

これにメタノール100 mL及び0.5 mol/L炭酸カリウム溶液（うめの場合は3 mol/L炭酸カリウム溶液）5 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、メタノール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、45°C以下で約5 mLに濃縮する。これに水5 mLを加える。

b 精製法

(1) エチルシリル化シリカゲルカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 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a 抽出法で得られた溶液を注入した後、水10 mLを注入し、流出液は捨てる。約1分間吸引し、水分を除去する。別に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。この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エチルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、メタノール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以下でメタノールを除去する。この残留物にエタノール及び*n*-ヘキサンの混液（1：4）5 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

シリカゲルミニカラム（1,000 mg）に*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) エチルシリル化シリカゲルカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲル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、エタノール及び*n*-ヘキサンの混液（1：4）10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでエタノール及び*n*-ヘキサンの混液（2：3）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以下でエタノール及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に水及びメタノールの混液（9：1）5 mLを加えて溶かす。

(3) オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 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(2) シリカゲル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、水及びメタノールの混液（9：1）15 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水及びメタノールの混液（7：3）10 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、45°C以下で水及びメタノールを除去する。この残留物に水及びメタノールの混液（4：1）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250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長298 nmで操作する。

移動相 水、メタノール及びリン酸緩衝液（pH 6）の混液（18 : 5 : 2）を用いる。

ピメトロジンが10～12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う。

c 確認試験

次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。

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2.0 mm、長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

移動相 水及びメタノールの混液（4 : 1）を用いる。ピメトロジンが10～12分で流出する流速に調整する。

7. 定量限界

穀類・豆類0.01 mg/kg、果実・野菜0.005 mg/kg

8. 留意事項

ピメトロジンは、塩基性条件下で抽出を行う必要があること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A