

プロヘキサジオンカルシウム塩試験法

1. 分析対象化合物

プロヘキサジオンカルシウム塩、プロヘキサジオン

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

プロヘキサジオン 本品はプロヘキサジオン99%以上を含む。

融点 本品の融点は121°Cである。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

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、0.2 mol/L 硫酸20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、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°C以下で約20 mLに濃縮する。

これを200 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン50 mL及び水50 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、*n*-ヘキサン層を捨てる。水層に*n*-ヘキサン及び酢酸エチルの混液（7：3）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、*n*-ヘキサン及び酢酸エチルの層を200 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン及び酢酸エチルの混液（7：3）50 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す、*n*-ヘキサン及び酢酸エチル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*-ヘキサン及び酢酸エチルの混液（7：3）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*n*-ヘキサン及び酢酸エチルを除去する。この残留物に1%炭酸水素ナトリウム溶液5 mLを加えて溶かす。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (850 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、流出液を50 mLの三角フラスコに採る。上記の減圧濃縮器のナス型フラスコの残留物に1%炭酸水素ナトリウム溶液5 mLを加え、上記と同様の操作を3回繰り返す、流出液を上記の三角フラスコに合わせる。これを100 mLの分液漏斗に移す。水10 mL及び酢酸エチル30 mLを用いて上記の三角フラスコを洗い、上記の洗液を分液漏斗に合わせる。これに4 mol/L塩酸3 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100 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル30 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。

c メチル化

この残留物にメタノール4 mL及び硫酸0.05 mLを加えて溶かし、室温で12時間以上放置した後、100 mLの分液漏斗に移す。2%炭酸水素ナトリウム溶液30 mL及び*n*-ヘキサン30 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、*n*-ヘキサン層を捨てる。水層に*n*-ヘキサン30 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返す、*n*-ヘキサン層を捨てる。水層に4 mol/L塩酸5 mL及び*n*-ヘキサン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、*n*-ヘキサン層を200 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す、*n*-ヘキサン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℃以下でヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリル、水及び酢酸の混液 (30 : 70 : 0.5) 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。試験結果は標準品について、5. 試験溶液の調製の c メチル化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℃

検出器 波長275 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル、水及び酢酸の混液（30：70：0.5）を用いる。メチル-3, 5-ジオキソ-4-プロピオニルシクロヘキサンカルボキシラートが約10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プロヘキサジオンの定量を行い、これに係数1.18を乗じてプロヘキサジオンカルシウム塩に換算する。

7. 定量限界

0.02 mg/kg

8. 留意事項

プロヘキサジオンカルシウム塩は、プロヘキサジオンについて定量を行い、その含量に係数を乗じてプロヘキサジオンカルシウム塩の含量に換算し、これを分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A