

アセキノシル試験法

1. 分析対象化合物

アセキノシル、アセキノシルヒドロキシ体(3-ドデシル-2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン)

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

総則の3に示すものを用いる。

4. 標準品

アセキノシル 本品はアセキノシル99%以上を含む。

融点 本品の融点は58～60℃である。

3-ドデシル-2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン(以下「アセキノシルヒドロキシ体」という。)

本品はアセキノシルヒドロキシ体99%以上を含む。

融点 本品の融点は95～96℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

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0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン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。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン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300 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、*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*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に*n*-ヘキサンを加えて溶かし、正確に10 mLとする。

b 精製法

(1) 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 (500 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a 抽出法で得られた溶液5 mLを注入した後、エーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 49) 4 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 (1 : 49) 10 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器 (I) 中に採る。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 4) 10 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器 (II) 中に採る。すり合わせ減圧濃縮器 (I) 中に採った流出液について40℃以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリル及び酢酸の混液 (200 : 1) を加えて溶かし、正確に2 mLとして、アセキノシルの試験溶液とする。

(2) ベンゼンスルホニル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

すり合わせ減圧濃縮器 (II) 中に採った流出液について40℃以下で酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを除去する。ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) に*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにすり合わせ減圧濃縮器 (II) 中に採った流出液の残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かしたものを注入した後、*n*-ヘキサン5 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 (1 : 49) 8 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酢酸の混液 (200 : 1) を加えて溶かし、正確に2 mLとして、これをアセキノシルヒドロキシ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4.0~4.6 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273 nmで操作する。

移動相 酢酸、水及びメタノールの混液 (1 : 10 : 190) を用いる。アセキノシルが約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、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ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、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の含量を求め、次式により、アセキノシルヒドロキシ体を含むアセキノシルの含量を求める。

アセキノシル（アセキノシルヒドロキシ体を含む。）の含量（ppm） $=A+B\times 1.12$

A：アセキノシルの含量（ppm）

B：アセキノシルヒドロキシ体の含量（ppm）

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

0.02 mg/kg

8. 留意事項

1) 分析値

アセキノシルは、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体のそれぞれについて定量を行い、アセキノシルヒドロキシ体については、その含量に係数を乗じてアセキノシルの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

2) アセキノシルは光に不安定であるため、試験は遮光条件下で行うこと。また、本試験法については、酸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