

ゼラノール試験法

1. 分析対象化合物

ゼラノール

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 (HPLC-UV)

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。

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) 内径8~9 mmのポリエチレン製のカラム管に、カラムクロマトグラフィー用に製造したジエチルアミノプロピル化弱塩基性陰イオン交換樹脂500 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

カラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストラン カラムクロマトグラフィー用に製造したヒドロキシプロピル基を化学結合したデキストラン (粒径25~100 μm) を用いる。

4. 標準品

ゼラノール 本品はゼラノール99%以上を含む。

融点 本品の融点は178~180°Cである。

5. 試験溶液調製法

1) 抽出

試料5.00 gを量り採り、これにアセトニトリル及びメタノール (4 : 1) 混液20 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分2,600回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。残留物にアセトニトリル及びメタノール (4 : 1) 混液20 mLを加え、上記と同様の条件で遠心分離を行い、有機層を合わせる。これに水飽和*n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を採る。これに5%硫酸ナトリウム溶液40 mL及びジクロロメタン (特級) 40 mLを加え、5分間激しく振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を採る。水層にジクロロメタン (特級) 15 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を合わせ、40°C以下でジクロロメタンを除去する。この残留物を*n*-ヘキサン及びベンゼン (3 : 1) 混液1 mLに溶かす。

2) 精製

(1) 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) に、*n*-ヘキサン及びベンゼン (3 : 1) 混液6 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン及びベンゼン (3 : 1) 2 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにジクロロメタン (特級) 及びメタノール (9 : 1) 混液3 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にベンゼン及びメタノール (17 : 3) 混液0.5 mLを加えて溶かす。

(2) ヒドロキシプロピル化デキストランカラムクロマトグラフィー

内径6 mmのガラス製カラム管に、カラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストランをベンゼン及びメタノール (17 : 3) 混液に懸濁し、12時間放置したものをカラムクロマトグラフィー用ヒドロキシプロピル化デキストラン層の長さが120 mmになるように充てんする。カラムの上端に少量のベンゼン及びメタノール (17 : 3) 混液が残る程度までベンゼン及びメタノール (17 : 3) 混液を流出させる。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、ベンゼン及びメタノール (17 : 3) 混10 mLを注入する。最初の流出液2.0 mLを捨て、残りの溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液0.5 mLを加えて溶かし、これを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ゼラノール標準品の0.01~1 mg/Lアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液溶液を数点調製し、それぞれ20 µLをHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

7. 定量

試験溶液20 µLをHPLCに注入し、6の検量線でゼラノールの含量を求める。

8. 確認試験

LC/MS又はLC/MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.0~6.0 mm、長さ150 mm、粒径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び水 (5 : 6) 混液 ゼラノールが約10分で流出する流速に調整する。

検出条件：吸光波長230 nm

10. 定量限界

筋肉 0.002 ppm

肝臓 0.01 ppm

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ゼラノールを試料からアセトニトリル及びメタノールの混液で抽出し、ヘキサン分配後、ジクロロメタンに転溶する。陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、デキストランカラムクロマトグラフィーで精製した後、HPLC-UVで測定する方法である。

2) 注意点

- (1) カラムクロマトグラフィー用弱塩基性陰イオン交換樹脂は、ロットにより活性度が異なるので、事前に回収率のチェックを行うこと。
- (2) 検体が肝臓の場合は、試験溶液をアセトニトリル及び水（1：1）混液で5倍に希釈した溶液で実施すること。
- (3) 高速液体クロマトグラフィーにおいて、夾雑物のピークによりゼラノールの測定が困難な場合には、「○ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いるゼラノールの試験法」による試験を実施しても差し支えないこと。

12. 参考文献

なし

13. 類型

A

○ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いるゼラノールの試験法

1. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

2. 試験溶液調製法

ゼラノール試験法にしたがって調製した試験溶液100μLを正確に量り採り、それぞれ内部標準物質としてジエチル-1,1,1',1'-d4-スチルベストロール-3,3',5, 5'-d4（以下DES-d8という。）0.01 μg/mLの酢酸エチル溶液100 μLを加え、窒素ガス気流下、40℃で濃縮乾固する。この残留物に酢酸エチル25 μLを加えて溶かし、これを試験溶液とする。

3. 検量線の作成

0.1 µg/mLのゼラノール標準品溶液20、50及び100 µLを小試験管中に正確に量り採り、DES-d8 0.01 µg/mLの酢酸エチル溶液100 µLを加え、窒素ガス気流下、40°Cで濃縮乾固する。この残留物に酢酸エチル25 µLを加えて溶かし、これを標準品溶液とする。

シリル化剤 (*N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド及び*N*-トリメチルシリルアミド (98 : 2) 混液) 2 µL、空気1 µL及び標準品溶液2 µLの順に同一のマイクロシリンジに採り、これをGC/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

4. 定量

シリル化剤 (*N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド及び*N*-トリメチルシリルアミド (98 : 2) 混液) 2 µL、空気1 µL及び試験溶液2 µLの順に同一のマイクロシリンジに採り、これをGC/MSに注入し、3の検量線でゼラノールの含量を求める。

5. 測定条件

カラム : 5%フェニルメチルシリコン 内径0.2 mm、長さ25 m、膜厚0.11 µm

カラム温度 : 130°C (1分) -30°C/分-250°C (0分) -6°C/分-295°C (2.5分)

注入口温度 : 260°C

注入方式 : スプリットレス

キャリアーガス : ヘリウム

キャリアーガス圧力 : 34 kPa

イオン源温度 : 180°C

イオン化モード (電圧) : EI (70 eV)

主なイオン (*m/z*) : 433及び307 (ゼラノール) 、420 (内部標準物質)

6. 定量限界

筋肉 0.002 ppm

肝臓 0.01 ppm