

## ピリダベン試験法

### 1. 分析対象化合物

ピリダベン

### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器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

ピリダベン 本品はピリダベン99%以上を含む。

融点 本品の融点は111~112°Cである。

### 5. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

##### (1) 豆類及び種実類の場合

検体を420 µmの標準網ふるいを通して粉砕した後、その20.0 gを量り採り、水40 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、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°C以下で約50 mLに濃縮する。

これをあらかじめ5%塩化ナトリウム溶液200 mL及び*n*-ヘキサン100 mLを入れた500 mLの分液漏斗に移す。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°C以下で約1 mLに濃縮する。

この液に*n*-ヘキサン30 mLを加え、100 mLの分液漏斗に移す。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル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、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す。アセトニトリル層をその減圧濃縮

器中に合わせ、40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で窒素を通じて乾固する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）20 mLを加えて溶かす。

#### (2) 果実、野菜、抹茶及びホップの場合

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。

抹茶及びホップの場合は、検体5.00 gを量り採り、水30 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、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50 mLに濃縮する。

これをあらかじめ5%塩化ナトリウム溶液200 mL及び*n*-ヘキサン100 mLを入れた500 mLの分液漏斗に移す。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℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で窒素を通じて乾固する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）20 mLを加えて溶かす。

#### (3) 抹茶以外の茶の場合

検体6.00 gを100℃の水360 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液300 mLを500 mLの分液漏斗に移す。これにアセトン20 mL、塩化ナトリウム15 g及び*n*-ヘキサン100 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300 mLの三角フラスコに移す。水層にアセトン20 mL及び*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℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で窒素を通じて乾固する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）20 mLを加えて溶かす。

#### b 精製法

##### (1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

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合成ケイ酸マグネシウム10 gを*n*-ヘキサンに懸濁したもの、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*n*-ヘキサンが残る程度まで*n*-ヘキサンを流出させる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液10 mLを注入した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン

の混液（1：19）40 mLを注入し，流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）70 mLを注入し，流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り，40℃以下で約1 mLに濃縮し，更に室温で窒素を通じて乾固する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：49）10 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

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150～425 μm）10 gを*n*-ヘキサンの懸濁したものを，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*n*-ヘキサンが残る程度まで*n*-ヘキサンを流出させる。このカラムに(1) 合成ケイ酸マグネシウム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，酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：49）50 mLを注入し，流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）70 mLを注入し，流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り，40℃以下で約1 mLに濃縮し，更に室温で窒素を通じて乾固する。この残留物にアセトンを加えて溶かし，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。試験結果がいずれの操作条件においても標準品と一致しなければならない。

#### 操作条件1

カラム充填剤 カラム担体に対してガスクロマトグラフィー用シリコンを5%含ませる。

クロマトグラフ管 内径2～3 mm，長さ1.0～1.5 mのガラス管を用いる。

カラム温度 210～240℃

試験溶液注入口温度 230～270℃

検出器 250～280℃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。ピリダベンが約6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。

#### 操作条件2

カラム 内径0.53 mm，長さ10～15 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0.5～15 μmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 210～240℃

試験溶液注入口温度 230～270℃

検出器 250～280℃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。ピリダベンが約6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 定性試験の操作条件1又は2のうちいずれかの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

b 定量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

0.01 mg/kg (ホップ及び茶にあっては0.04 mg/kg)

8. 留意事項

なし

9. 参考文献

なし

10. 類型

A