

フェントラザミド試験法

1. 分析対象化合物

フェントラザミド、CPT [1-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-1*H*-テトラゾール-5-オン]

2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC (FTD)) 又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC (NPD))

ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS)

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。

水素化ナトリウム ヘキサンで洗浄し、同溶媒中に保存したもの

ヨウ化メチル 特級試薬

CPT標準品 本品はCPT97%以上を含み、融点は120°Cである。

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様にろ過して、得られたろ液を合わせ、40°C以下で約30 mLに濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 9) 5 mLを加えて溶かす。

2) 精製 (I)

クロマトグラフ管 (内径15 mm) に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径150 ~ 425 μm) 5 gを*n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、上に無水硫酸ナトリウム約5 gを積層する。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 9) 50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 4) 80 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

3) 加水分解

2) で得られた残留物にエタノール4 mLを加えて溶かし、12 mol/L塩酸16 mLを加える。これに還流冷却器を取り付けて、90℃以上の水浴中で1時間加熱した後、放冷する。加水分解した溶液に10%塩化ナトリウム溶液40 mLを加え、酢酸エチル30 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

4) メチル化

3) で得られた残留物に*n*-ヘキサン0.5 mLを加えて溶かす。これにジメチルスルホキシド0.5 mL、水素化ナトリウム約20 mg及びヨウ化メチル0.5 mLを加え、栓をして時々振り混ぜながら室温で15分間放置する。次いで、蒸留水10 mLを徐々に滴下して加え、水素ガスの発生が止まった後、反応液に蒸留水10 mLを加え、酢酸エチル20 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

5) 精製 (II)

4) で得られた残留物に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:9) 5 mLを加えて溶かす。

シリカゲルミニカラム (690 mg) に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:9) 5 mLを注入し、流出液キサン混液 (1:9) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:4) 20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

CPT標準品の500 mg/Lアセトン溶液を調製し、この1 mLを100 mLのナス型フラスコに取り、室温で窒素ガスを通じて溶媒を除去する。以下、この残留物について4の4) メチル化と同様の操作を行い、その残留物にアセトンを加えて溶かし、50 mLとする。この溶液をアセトンで希釈し、0.025~1 mg/Lアセトン溶液を数点調製し、それぞれ2 µLをGC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。

6. 定量

試験溶液2 µLをGCに注入し、5の検量線でCPTの含量を求め、次式によりフェントラザミドの含量を求める。

$$\text{フェントラザミドの含量 (mg/kg)} = \text{CPTの含量 (mg/kg)} \times 1.78$$

7. 測定条件

GC

検出器：FTD又はNPD

カラム：5%フェニルーメチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 µm

カラム温度：50℃ (1分) -25℃/分-280℃ (1分)

注入口温度：250℃

検出器温度：280℃

キャリアーガス：ヘリウム

保持時間の目安：10分

8. 定量限界

0.01 mg/kg

9. 留意事項

1) 分析値

フェントラザミドは、フェントラザミドをCPTに変換した後、CPTについて定量を行い、その含量に係数を乗じてフェントラザミドの含量に換算し、これを分析値とすること。

2) 試験法の概要

フェントラザミドを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液に転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、シリカゲルカラムで精製する。加水分解してフェントラザミドをCPTとした後、ヨウ化メチルでメチル化する。シリカゲルミニカラムで再度精製した後、GC (FTD) 又はGC (NPD) で測定し、GC/MSで確認する方法である。

10. 参考文献

平成12年環境庁告示第80号「フェントラザミド試験法」

11. 類型

C