

ヘキシチアゾクス試験法

1. 分析対象化合物

ヘキシチアゾクス（トランス体）

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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム カラムクロマトグラフィー用に製造した合成ケイ酸マグネシウム（粒径150～250 μm）を130℃で12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷し、これに対して水5%を加える。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒径150～425 μm）を130℃で12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷し、これに対して水5%を加える。

凝固液 塩化アンモニウム2 g及びリン酸4 mLに水を加えて400 mLとする。

4. 標準品

ヘキシチアゾクス 本品はヘキシチアゾクス99%以上を含む。

融点 本品の融点は108～109℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 豆類、果実及び野菜の場合

豆類の場合は、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。

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。

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、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を入れた500 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。*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 *n*-ヘキサンを除去する。

この残留物に *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 200 mL の分液漏斗に移す。*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、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記の分液漏斗に合わせる。これにアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 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、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40°C 以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 5 mL を加えて溶かす。

(2) 抹茶及びホップの場合

抹茶の場合は、検体 5.00 g を量り採り、水 20 mL を加え、2 時間放置する。

ホップの場合は、細切均一化した後、その 5.00 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、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、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 を入れた 500 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。*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 *n*-ヘキサンを除去する。

この残留物に *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 200 mL の分液漏斗に移す。*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、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記の分液漏斗に合わせる。これにアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 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、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40℃以下でアセトニトリルを除去する。

この残留物にアセトン 50 mL を加えて溶かし、凝固液 50 mL 及びケイソウ土 2 g を加え、時々振り混ぜながら 5 分間放置し、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を 300 mL の分液漏斗に移す。アセトン及び凝固液の混液 (1 : 1) 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、その洗液でろ紙上の残留物を洗う。洗液を上記の分液漏斗に合わせる。これに塩化ナトリウム 5 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 *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。この残留物にエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 5 mL を加えて溶かす。

(3) 抹茶以外の茶の場合

検体 9.00 g を 100℃の水 540 mL に浸し、室温で 5 分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液 360 mL を 1,000 mL の分液漏斗に移す。これに塩化ナトリウム 15 g、アセトン 50 mL 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 *n*-ヘキサン 100 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。この残留物にエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 5 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 5 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を注入した後、エーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 40 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 60 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。この残留物にエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 5 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 5 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(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、エーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (1 : 19) 40 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル及び *n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 80 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を加えて溶かし、正確に 4 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 150~250 mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長 235nm で操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液 (7 : 3) を用いる。ヘキシチアゾクスが 6~7 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定量を行う。

7. 定量限界

0.01 mg/kg (茶及びホップにあつては 0.04 mg/kg)

8. 留意事項

なし

9. 参考文献

なし

10. 類型

A