

## メトリブジン試験法

### 1. 分析対象化合物

メトリブジン、メトリブジン脱アミノ体 (DA) [6-(1,1-ジメチルエチル)-3-(メチルチオ)-1,2,4-トリアジン-5(4*H*)-オン]、メトリブジンメチルチオ基脱離酸化体 (DK) [4-アミノ-6-(1,1-ジメチルエチル)-1,2,4-トリアジン-3,5(2*H*,4*H*)-ジオン]、メトリブジンメチルチオ基脱離酸化物脱アミノ体 (DADK) [6-(1,1-ジメチルエチル)-1,2,4-トリアジン-3,5(2*H*,4*H*)-ジオン]

### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器, 高感度窒素・リン検出器又は電子捕獲型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

メトリブジン 本品はメトリブジン99%以上を含む。

融点 本品の融点は125°Cである。

4-アミノ-6-(1,1-ジメチルエチル)-1,2,4-トリアジン-3,5(2*H*,4*H*)-ジオン (以下「DK」という。) 本品はDK99%以上を含む。

融点 本品の融点は164~166°Cである。

6-(1,1-ジメチルエチル)-1,2,4-トリアジン-3,5(2*H*,4*H*)-ジオン (以下「DADK」という。) 本品はDADK99%以上を含む。

融点 本品の融点は279~283°Cである。

6-(1,1-ジメチルエチル)-3-(メチルチオ)-1,2,4-トリアジン-5(4*H*)-オン (以下「DA」という。) 本品はDA99%以上を含む。

融点 本品の融点は192~194°Cである。

### 5. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

穀類、豆類及び種実類の場合は、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。

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。

茶及びホップの場合は、検体を粉砕した後、5.00 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにメタノール100 mLを加え、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた後、静置し、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、メタノール50 mLを加え、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた後、静置し、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以下でメタノールを除去する。

これに20%塩化ナトリウム溶液200 mL及びジクロロメタン100 mLを加え、500 mLの分液漏斗に移し、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を500 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン100 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタ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。次いでジクロロメタン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。洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下でジクロロメタンを除去する。

この残留物にアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン30 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて溶かす。これを100 mLの分液漏斗に移し、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採り、40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にジクロロメタン10 mLを加えて溶かす。

#### b 精製法

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(63~200 μm) 10 gをジクロロメタンに懸濁したものを、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ジクロロメタンが残る程度までジクロロメタンを流出させる。このカラムにa 抽出法で得られた溶液を注入した後、ジクロロメタン200 mLを注入し、最初の流出液100 mLは捨てる。次の流出液100 mLを200 mLの三角フラスコ(I)に採る。次いでジクロロメタン及びメタノールの混液(97:3) 150 mLを注入し、流出液を200 mLの三角フラスコ(II)に採り、これに2%ジエチレングリコールメタノール溶液0.1 mLを加える。各流出液をそれぞれすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40°C以下でジクロロメタン及びメタノールを除去する。三角フラスコ(I)に採った流出液の残留物にメタノールを加えて溶かし、正確に4 mLとして、これをメトリブジンの試験の試験溶液とする。三角フラスコ(II)に採った流出液の残留物にメタノールを加えて溶かし、正確に2 mLとして、これをDK、DADK及びDAの試験の試験溶液とする。

## 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 内径0.53 mm, 長さ30 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50%トリフルオロプロピル-メチルシリコン又はガスクロマトグラフィー用ポリエチレングリコールを1.5 μmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 180~220℃

試験溶液注入口温度 270~280℃

注入方式 電子捕獲型検出器の場合はスプリットレス

検出器 270℃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。メトリブジンの試験を行う場合は, メトリブジンが約6分で流出する流速に調整する。DK, DADK及びDAの試験を行う場合は, DAが約8分で流出する流速に調整する。アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器を用いる場合は, 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 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき, メトリブジン, DK, DADK及びDA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, メトリブジン, DK, DADK及びDAの含量を求め, 次式により, DK, DADK及びDAを含むメトリブジンの含量を求める。

メトリブジン (DK, DADK及びDAを含む。) の含量 (ppm) =  $A + B \times 1.17 + C \times 1.27 + D \times 1.08$

A : メトリブジンの含量 (ppm)

B : DKの含量 (ppm)

C : DADKの含量 (ppm)

D : DAの含量 (ppm)

#### c 確認試験

a 定性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

### 8. 留意事項

メトリブジンは, メトリブジン, メトリブジン脱アミノ体 (DA) 、メトリブジンメチルチオ基脱離酸化体 (DK) 及びメトリブジンメチルチオ基脱離酸化物脱アミノ体 (DADK) のそれぞれについて定量を行い, メトリブジン脱アミノ体 (DA) 、メトリブジンメチルチ

オ基脱離酸化体 (DK) 及びメトリブジンメチルチオ基脱離酸化物脱アミノ体 (DADK) についてはそれぞれの含量に係数を乗じてメトリブジンの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

#### 9. 参考文献

なし

#### 10. 類型

A