

## トリフルミゾール試験法

### 1. 分析対象化合物

トリフルミゾール、トリフルミゾール代謝物 [4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン]

### 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  $\mu\text{m}$ )を130°Cで12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。これに対して水を5%加える。

0.01 mol/L炭酸塩緩衝液 0.2 mol/L炭酸ナトリウム溶液0.8 mL及び0.2 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液9.2 mLに水を加えて200 mLとする。

トリフルミゾール及び4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン標準溶液 トリフルミゾール10 mg及び4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン10 mgをアセトニトリルに溶かして100 mLとする。

0.05 mol/Lリン酸塩緩衝液 0.5 mol/Lリン酸一カリウム溶液55.4 mL及び0.5 mol/Lリン酸二ナトリウム溶液48.2 mLに水を加えて1,000 mLとする (pH 6.8)。

### 4. 標準品

トリフルミゾール 本品はトリフルミゾール99%以上を含む。

融点 本品の融点は63.5°Cである。

4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン 本品は4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

##### (1) 穀類及び種実類の場合

検体を420  $\mu\text{m}$ の標準網ふるいを通るように粉碎した後、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吸引ろ過し、ろ液を500 mLの分液漏斗に移す。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、上記と同様に操作して、ろ液を上記の500 mLの分液漏斗に合わせる。

これに5%塩化ナトリウム溶液200 mL及びジクロロメタン（特級）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、ジクロロメタン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン（特級）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（特級）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℃以下でジクロロメタンを除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）5 mLを加えて溶かす。

## (2) 果実、野菜及び抹茶の場合

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り、0.05 mol/Lリン酸塩緩衝液20 mLを加える。

抹茶の場合は、検体20.0 gを量り採り、0.05 mol/Lリン酸塩緩衝液20 mLを加える。

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吸引ろ過し、ろ液を500 mLの分液漏斗に移す。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、上記と同様に操作して、ろ液を上記の500 mLの分液漏斗に合わせる。この液のpHを測定し、酸性であれば0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7付近に調整する。

これに5%塩化ナトリウム溶液200 mL及びジクロロメタン（特級）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、ジクロロメタン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン（特級）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（特級）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℃以下でジクロロメタンを除去する。この残留物にアセトン及び*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4.00 gを100℃の水240 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）に、アセトニトリル5 mL及び水5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のろ液30 mLを注入した後、水10 mL、次いでアセトニトリル及び水の混液（3：7）10 mLを注入し、流出液は捨てる。続いてアセトニト

リル及び水の混液（4：1）5 mLを注入し、流出液を採り、これを試験溶液とする（b 精製法による操作は必要ない。）。

#### 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合成ケイ酸マグネシウム10 gをアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）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アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）が残る程度までアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）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、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：19）50 mLを注入し、流出液は捨てる。次にアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）100 mLを注入し、最初の流出液40 mLを200 mLの三角フラスコ（I）に採り、次の流出液60 mLを200 mLの三角フラスコ（II）に採る。各流出液をそれぞれすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40℃以下でアセトン及び*n*-ヘキサンを除去する。それぞれの残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に10 mLとして、前者は、4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの試験溶液とし、後者はトリフルミゾールの試験溶液とする。

4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの試験溶液を6. 操作法のa 定性試験に準じて試験し、試験溶液中の不純物のため試験が困難な場合は次の操作を行う。

三角フラスコ（I）に採った流出液の残留物にジクロロメタン（特級）100 mLを加えて溶かし、300 mLの分液漏斗（I）に移す。これに1 mol/L塩酸50 mLを加え、よく振り混ぜた後、静置し、水層を300 mLの分液漏斗（II）に移す。ジクロロメタン層に1 mol/L塩酸50 mLを加え、上記と同様に操作して、水層を分液漏斗（II）に合わせる。これに10 mol/L水酸化ナトリウム溶液11 mLを加え、次いでジクロロメタン（特級）50 mLを加え、よく振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を200 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン（特級）50 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。次いで少量のジクロロメタン（特級）を用いて三角フラスコを洗い、洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃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を加えて溶かし、正確に10 mLとして、これを4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの試験溶液とする。

## 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2～5 mm、長さ200～500 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長238 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル、0.01 mol/L炭酸塩緩衝液及び水の混液（7：1：2）に対して4%リン酸を加え、pH 9.0に調整したものを用いる。トリフルミゾールの試験を行う場合は、トリフルミゾールが約10分で流出する流速に調整する。4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの試験を行う場合は、4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンが約6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、トリフルミゾール及び4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジン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、トリフルミゾール及び4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの含量を求め、次式により、4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンを含むトリフルミゾールの含量を求める。

トリフルミゾール（4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンを含む。）の含量（ppm）=A+B×1.17

A：トリフルミゾールの含量（ppm）

B：4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンの含量（ppm）

### 7. 定量限界

0.05 mg/kg

### 8. 留意事項

トリフルミゾールは、トリフルミゾール及びその代謝物である4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンのそれぞれについて定量を行い、4-クロロ- $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*N*-(1-アミノ-2-プロポキシエチリデン) -*o*-トルイジンについてはその含量に係数を乗じてトリフルミゾールの含量に換算し、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