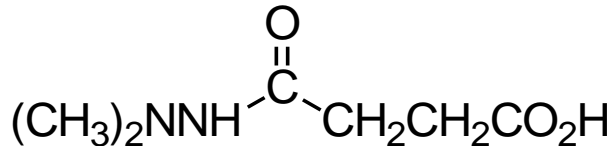


※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る 分析法開発（残留農薬個別試験法開発 ダミノジッド）

ダミノジッド (daminozide) に関する試験法
(検討内容)

1 構造式等



化学式：C₆H₁₂N₂O₃

分子量：160.17

化学名 (IUPAC)：N-dimethylaminosuccinamic acid

外 観：白色粉末、ほのかなアミン臭

融 点：157～164℃

蒸気圧：22.7 mPa (23℃)

溶解性：蒸留水 100 g/kg (25℃)

メタノール 50、アセトン 25 (以上 g/kg、25℃)

オクタノール/水分配係数：-1.50 (pH 5、7、9、21℃)

安定性：pH 5、7、9 で30日以上加水分解は見られなかった。

酸、アルカリ中で加熱により加水分解

水溶液は光照射で徐々に分解

(出典：The e-Pesticide Manual 14th ed.ver.4.0)

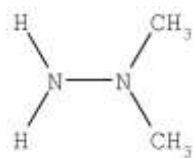
2 基準値

不検出 (全食品対象)

検出限界：0.1 ppm (ミネラルウォーターは 0.002 ppm)

3 分析対象成分

ダミノジッドには基準値が設定されず、不検出とされている。平成4年の食品衛生調査会の答申では分解生成物 1,1-ジメチルヒドラジンを含むことが示されている。



1,1-dimethylhydrazine

C₂H₈N₂ : 60.098

4 試薬・試液

1) 標準品

1,1-ジメチルヒドラジン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

ダミノジッド標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

2) 試薬

アセトン、*n*-ヘキサン、メタノール；残留農薬試験用 (関東化学製)

リン酸一カリウム、リン酸二カリウム；試薬特級 (小宗化学製)

水酸化ナトリウム；試薬特級 (和光純薬工業製)

o-ニトロベンズアルデヒド；試薬特級 (関東化学製)

フェノールフタレイン；試薬一級 (関東化学製)

シリコン (KM-72) ; 消泡用に製造したもの (信越化学工業製)
ケイソウ土 ; セライト 545 (関東化学製)
アルミナ (塩基性) ミニカラム ; Sep-Pak plus Alumina B (充てん量 1,710 mg、Waters 製)

3) 標準溶液・試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液 ; 1,1-ジメチルヒドラジン標準品 25 mg を精秤し、水 50 mL に溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液 ; 1,1-ジメチルヒドラジン標準原液を 1 mL を採り、リン酸緩衝液 (pH 5) 5 mL 及び水 40 mL を加えたものに 1w/v% σ -ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 1 mL を加えて振り混ぜた後、40°C で 16 時間放置する。これに *n*-ヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振とう後、静置し、*n*-ヘキサン層を採り、液層分離ろ紙を用いて 200 mL のナス型フラスコ中にろ過する。水層に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層をナス型フラスコ中に合わせる。*n*-ヘキサン 10 mL を用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液をナス型フラスコ中に合わせ、40°C 以下で *n*-ヘキサンを除去する。この残留物をアセトンで溶解し、0.025 mg/L~0.5 mg/L の溶液を数点調製した。

添加用標準溶液 ; ダミノジッド標準品 25 mg を精秤し、水 50 mL に溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトンで希釈し、0.2、0.5、1、2、20 mg/L の濃度の溶液を調製した。

②試液の調製方法

リン酸緩衝液 (pH 5) ; リン酸一カリウム 13.15 g 及びリン酸二カリウム 0.59 g に水を加えて溶かし、100 mL とする。

1w/v% σ -ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 ; σ -ニトロベンズアルデヒド 100 mg にメタノール 10 mL を加えて溶かす。

アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 ; アセトン 10 mL 及び*n*-ヘキサン 190 mL を混合した。

5 装置

ホモジナイザー (ヒスコトロン) ; バイオミキサーBM-2 (日本精機製作所製)

高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ : 5890 (Agilent Technologies 社製)

ガスクロマトグラフ・質量分析計 : 6890/5973N (Agilent Technologies 社製)

6 試験法の検討内容

落花生について告示試験法を用いて分析を行った場合、十分な回収率が得られないとの情報があった。現行の告示試験法は平成4年に告示されたもので、落花生についての検証がなされていない可能性があった。このため、告示試験法の各操作について再確認を行い、落花生について十分な回収率が得られるよう、操作条件の見直しを行った。また、落花生において適用が確認された試験法において、他の農作物、畜水産物についてもその試験法適用確認を行った。

7 試験法の分析操作

概要 : 水抽出、水蒸気蒸留、誘導体化、塩基性アルミナミニカラムで精製後、GC-NPD で定量、GC-MS で確認する。

1) 分析法フローシート

農産物

秤 取

試料 10.0 g を採取
(果実及び野菜の場合は 20.0 g)
(抹茶及びホップの場合は 5.00 g)
(抹茶以外の茶の場合は浸出液 360 mL (6.00 g 相当))

水抽出

(穀類、豆類、種実類、果実、野菜、抹茶及びホップの場合)
水 80 mL を加え、1 分間ホモジナイズ (ヒスコトロン)、
抽出後、ろ過 (ケイソウ土 2 g、ガラス繊維ろ紙)
残留物は水 40 mL を加え 5 分間振とう
再抽出後、ろ過
ろ液を合わせ、正確に 200 mL とする
この 20 mL (穀類、豆類及び種実類: 1.00 g 相当、果実及び野菜: 2.00 g 相当)、
抹茶及びホップは 40 mL (1.00 g 相当) を丸底フラスコ (蒸留用) に分取
(抹茶以外の茶の場合)
浸出液 120 mL (2.00 g 相当) を丸底フラスコ (蒸留用) に分取

水蒸気蒸留

上記丸底フラスコに水 80 mL を加えた後 (茶浸出液の場合は水不要)、
水酸化ナトリウム 60 g、消泡用シリコン 1~2 滴及び沸騰石を加え、
直ちに蒸留装置 (図 1) に取り付ける
受器にリン酸緩衝液 (pH 5) 5 mL、フェノールフタレイン試液 1 滴を入れる
水蒸気蒸留を行い、約 15 分間で留液 45 mL になるまで採取

誘導體化

1% *o*-ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 1 mL 加え、
40°C、16 時間放置

n-ヘキサン転溶

n-ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう
液層分離ろ紙で脱水ろ過
水層にヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう
ろ液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固
アセトン及び *n*-ヘキサン (1:19) 混液 5 mL に溶解

塩基性アルミナミニカラム精製

アセトン及び *n*-ヘキサン (1:19) 混液 10 mL で予備洗浄
全量負荷
アセトン及び *n*-ヘキサン (1:19) 混液 10 mL で溶出
全溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
アセトンで正確に 1 mL (果実、野菜及び抹茶以外の茶の場合は 2 mL) とし、
試験溶液とする

GC-NPD 定量

2 μ L 注入

A: 500 mL~1000 mL の丸底フラスコ (水蒸気発生用)
B: 500 mL~1000 mL の丸底フラスコ (蒸留用)
C: 蒸留トラップ
D: 冷却管
E: 100 mL の三角フラスコ

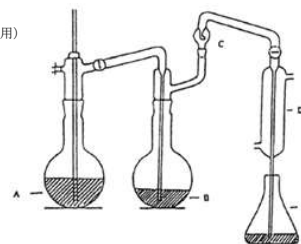


図 1 水蒸気蒸留置

畜水産物

秤 取

試料 10.0 g を採取（乳、鶏卵、ハチミツの場合は丸底フラスコへ直接採取）
（脂肪の場合は 5.00 g）

水抽出

水 80 mL 及び *n*-ヘキサン 40 mL を加え、1 分間ホモジナイズ（ヒスコトロン）
抽出後、300 mL 分液ロートへろ過（ケイソウ土 2 g、ガラス繊維ろ紙）
静置後、水層を 200 mL メスフラスコに分取
残留物及びヘキサン層は水 40 mL を加え 5 分間振とう
再抽出後、ろ過
ろ液を合わせ、正確に 200 mL とする
この 20 mL（1.00 g 相当）、脂肪は 40 mL（1.00 g 相当）を丸底フラスコ（蒸留用）
に分取
乳、鶏卵、ハチミツの場合は抽出操作省略

水蒸気蒸留

上記丸底フラスコに水 80 mL を加えた後、
水酸化ナトリウム 60 g、消泡用シリコン 1～2 滴及び沸騰石を加え、
直ちに蒸留装置（図 1）に取り付ける
受器にリン酸緩衝液（pH 5）5 mL、フェノールフタレイン試液 1 滴を入れる
水蒸気蒸留を行い、約 15 分間で留液 45 mL になるまで採取

誘導体化

1% *o*-ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 1 mL 加え、
40°C、16 時間放置

n-ヘキサン転溶

n-ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう
液層分離ろ紙で脱水ろ過
水層に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう
ろ液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固
アセトン及び *n*-ヘキサン（1：19）混液 5 mL に溶解

塩基性アルミナミニカラム精製

アセトン及び *n*-ヘキサン（1：19）混液 10 mL で予備洗浄
全量負荷
アセトン及び *n*-ヘキサン（1：19）混液 10 mL で溶出
全溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
アセトンで正確に 1 mL（乳、鶏卵及びハチミツの場合は 10 mL）とし、試験溶液とする

GC-NPD 定量

2 μ L 注入

2) ガスクロマトグラフ（GC-NPD）操作条件

カラム：RTX-200（トリフルオロプロピルメチルポリシロキサン）
内径 0.25 mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60°C（2分）→10°C/分→280°C（8分）
注入口温度：250°C
検出器温度：280°C
キャリアーガス：ヘリウム
保持時間の目安：17分

3) ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）操作条件

カラム：RTX-200MS（トリフルオロプロピルメチルポリシロキサン）
内径 0.25 mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μm
カラム温度：80°C（2分）→15°C/分→200°C→30°C/分→250°C（3分）
注入口温度：250°C
インターフェイス温度：280°C
キャリアーガス：ヘリウム
イオン化モード（電圧）：EI（70 eV）
主なイオン（*m/z*）：193、77
保持時間の目安：9分

4) 検出限界

0.1 ppm [残留基準値 不検出]

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）
とも

$$[(1 \text{ mL} / 1.00 \text{ g}^{*1}) \times (0.05 \text{ ng}^{*2} / 2 \text{ } \mu\text{L}) \times 2.665^{*3}]$$

*1 10.0 g × 20 mL / 200 mL

*2 ジメチルヒドラジンとしての最小検出量

*3 ジメチルヒドラジンからダミノジッドへの換算係数

ダミノジッド分子量 160.17 / ジメチルヒドラジン分子量 60.098

8 検討結果

告示試験法において回収率低下の原因と考えられる操作について検討を行い、その結果を以下に示した。

1) 試料の前処理

告示試験法及び通知試験法では「穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を $425\ \mu\text{m}$ の標準網ふるいを通して粉砕」した後に抽出を行うことになっている。落花生には油脂成分が多く存在し、 $425\ \mu\text{m}$ の標準網ふるいを通して粉砕することが困難であった。このため、ミキサー又はスピードカッターで約 $2\ \text{mm}$ 角程度に細切するだけとした。なお、他の穀類、豆類及び種実類においても乾燥が不十分な場合には落花生と同様に、 $425\ \mu\text{m}$ の標準網ふるいを通して粉砕することが困難なものがあつた。

2) 抽出法

1) に記載したように十分に粉砕することが困難であったため、約 $2\ \text{mm}$ 角程度に細切した試料に抽出溶媒である水を加え、ホモジナイザー（ヒスコトロン）を用いた1分間攪拌抽出を行った。

また、抽出液をろ過する際に目詰まりが生じ、ろ過速度が極めて遅くなったため、ろ過器上にガラス繊維ろ紙とろ過補助剤としてケイソウ土を敷いて吸引ろ過を行った。ろ過器上の残留物には水を加えて再抽出（振とう抽出）を行い、全ろ液を合わせて正確に $200\ \text{mL}$ とした。

畜水産物（乳、鶏卵、ハチミツを除く）については *n*-ヘキサンを加えてホモジナイズ後、 $300\ \text{mL}$ 分液ロートへ吸引ろ過を行い、静置、分離を確認後、水層を $200\ \text{mL}$ メスフラスコへ分取した。ろ過器上の残留物には水を加えて再抽出（振とう抽出）を行い、ろ液を先の $200\ \text{mL}$ メスフラスコに合わせて正確に $200\ \text{mL}$ とした。

3) 水蒸気蒸留

抽出液の全量の水蒸気蒸留に供した場合、発泡が起りやすく、それを防ぐため加熱を調整しながら蒸留すると留液 $45\ \text{mL}$ の採取に $40\sim 50$ 分を要した。この条件で添加回収試験を行ったところ、回収率は $10\sim 30\%$ であつた。

発泡の原因が試料成分にあると考え、抽出液の一部、 $20\ \text{mL}$ （穀類、豆類及び種実類： $1\ \text{g}$ 相当、果実及び野菜： $2\ \text{g}$ 相当、抹茶及びホップは $40\ \text{mL}$ （ $1\ \text{g}$ 相当））を水蒸気蒸留に供したところ、蒸留中に発泡は起きず、留液 $45\ \text{mL}$ の採取に要する時間も告示試験法どおり約 15 分となり、回収率も向上した。

本水蒸気蒸留条件は畜水産物にも適用可能であつた。

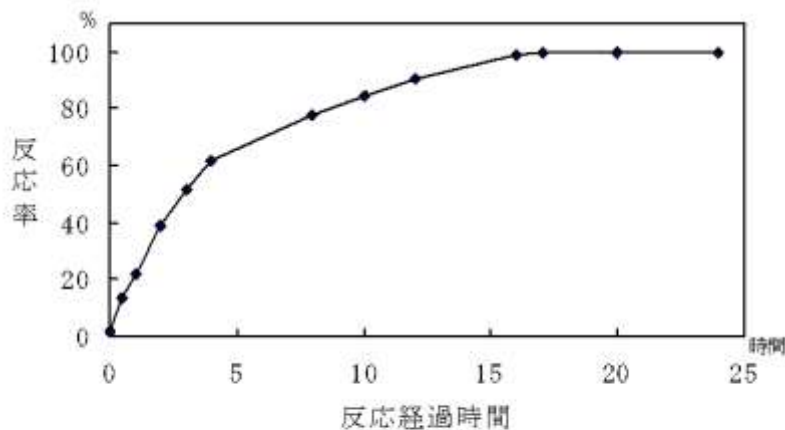
4) 誘導体化

告示試験法では、水蒸気蒸留により得られた $1,1$ -ジメチルヒドラジンに 1% *o*-ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 $1\ \text{mL}$ を加え、 30°C で2時間放置して誘導体化している。この条件での $1,1$ -ジメチルヒドラジンの誘導体化率は約 40% であつたため、誘導体化の条件について検討を行った。

まず、 30°C 、 40°C 、 50°C の温度条件で2時間放置して誘導体化率を比較したところ、温度を 50°C まで上げて誘導体化率は約 70% であつた (Table. 1)。

反応温度 ($^\circ\text{C}$)	誘導体化率 (%)
30	43
40	57
50	72

そこで、 25°C （室温）、反応時間 $0\sim 24$ 時間の条件で誘導体化率を見たところ、 16 時間以降平衡に達した (図2)。



1,1-ジメチルヒドラジン供試量：500 μ g
 反応率：25 $^{\circ}$ C，24時間反応後の濃度を100として算出

図2 1,1-ジメチルヒドラジンの誘導体化反応率

上記結果より反応温度に関わらず、反応時間2時間は不十分と判断され、反応時間は一晚を想定して16時間と設定した。

また、温度に関してはインキュベーターや水浴などで安定した温度設定が可能な40 $^{\circ}$ Cに定め、反応時間の検討を行ったところ、16時間後の誘導体化率は約100%であり、その後24時間後まで一定であることが示唆され (Table 2)、反応条件として40 $^{\circ}$ C、16時間が適当であると判断した。

Table 2 40 $^{\circ}$ Cでの誘導体化率

反応時間 (h)	誘導体化率 (%)
16	101
24	99

*25 $^{\circ}$ C (室温)、16時間後の誘導体化率を100%とした。
 密栓し、インキュベーターで実施

5) 塩基性アルミナミニカラムによる精製

告示試験法どおりの操作で問題は無かった。

Table 3 塩基性アルミナミニカラムの溶出状況 (%)

	アセトン及びn-ヘキサン (1 : 19)			合計
	0-15 mL*	15-20 mL	20-25 mL	
1,1-ジメチルヒドラジン誘導体化物	91	1	0	92

*負荷溶媒 5 mL と溶出溶媒の合量で表示した。

アルミナ (塩基性) ミニカラム ; Sep-Pak plus Alumina B (充てん量 1,710 mg、Waters 製)

6) ガスクロマトグラフ操作条件

① 検量線の直線性

GC-NPD では5、2) の測定条件において、濃度 0.025 mg/L (0.05 ng) ~0.5 mg/L (1 ng) の範囲で良好な直線性を示した。検量線を図3-1に、標準溶液のクロマトグラムを図3-2に示した。

また GC-MS では5、3) の測定条件において、0.025 mg/L (0.05 ng) ~0.25 mg/L (0.5 ng) の範囲で良好な直線性を示した。マススペクトルを図4-1に、検量線を図4-2に、標準溶液のクロマトグラムを図4-3に示した。

② 検出感度

検出限界相当の検出量：0.05 ng (0.025 mg/L×2 μL) のピークの S/N 比は GC-NPD、GC-MS とも 10 以上であった。

③ 分析カラム

告示試験法ではガスクロマトグラフのカラムに 5%フェニル-メチルシリコンを液相とするキャピラリーカラムを使用しているが、このカラムでは試料由来のピークが近接した保持時間に検出した。これにより、ピークの誤認や定量が困難となる場合が想定されたため、種々検討を行い、妨害ピークとの分離が良好であるトリフルオロプロピルメチルシリコンを液相とするキャピラリーカラムに変更することとした。

9 添加回収試験

試料にダミノジッドを 0.1 ppm 相当添加し、5、1) の分析法に従って試験溶液を調製し、GC-NPD、GC-MS に注入した。なお、添加試料の調製方法は以下の通り調製した。

玄米、大豆及びコーヒ豆（添加濃度：0.1 ppm 相当）：試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご及びオレンジ（添加濃度：0.1 ppm 相当）：試料 20.0 g に添加用標準溶液 2 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ホップ（添加濃度：0.1 ppm）：試料 5.00 g に添加用標準溶液 0.5 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

茶（添加濃度：0.1 ppm）：試料 120 mL (2.00 g 相当) に添加用標準溶液 0.2 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛筋肉、牛肝臓、牛乳、鶏卵、サケ、ウナギ、シジミ、エビ及びハチミツ（添加濃度：0.1 ppm 相当）：試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛脂肪（添加濃度：0.1 ppm）：試料 5.00 g に添加用標準溶液 0.5 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

1) 結果

下記農産物 10 試料及び畜水産物 10 試料における GC-NPD 及び GC-MS の回収試験の結果を Table 4 ~7 に示した。農産物 10 試料においては、GC-NPD で平均回収率 78~110% であり、併行精度は 2.9~12.8%、GC-MS で平均回収率 98~118% であり、併行精度は 2.7~14.4% と良好な結果であった。

畜水産物 10 試料においても GC-NPD で平均回収率 71~93% であり、併行精度は 4.3~13.3%、GC-MS で平均回収率 90~116% であり、併行精度は 2.4~10.4% と良好な結果であった。

Table 4 ダミノジッド（農産物）添加回収結果 GC-NPD

	1	2	3	4	5	平均	RSD (%)
玄米	74	85	92	82	93	85	9.1
大豆	118	118	111	98	87	106	12.8
バレイショ	97	105	116	98	113	106	8.1
ほうれんそう	93	90	78	76	76	83	10.0
キャベツ	92	98	106	91	98	97	6.2
りんご	107	100	107	103	103	104	2.9
オレンジ	97	95	114	113	120	108	10.3
茶（浸出液）	67	76	77	87	82	78	9.6
コーヒ豆	120	111	102	96	123	110	10.4
ホップ	108	97	106	110	111	106	5.3

Table 5 ダミノジッド（農産物）添加回収結果 GC-MS

	1	2	3	4	5	平均	RSD (%)
玄米	122	92	88	89	101	98	14.4
大豆	104	122	140	114	107	117	12.3
バレイショ	110	111	102	89	93	101	9.8
ホウレンソウ	108	119	101	97	97	104	8.9
キャベツ	103	98	124	112	113	110	9.1
リンゴ	102	111	98	99	102	102	5.0
オレンジ	110	111	110	106	100	107	4.2
茶（浸出液）	103	117	90	92	98	100	10.8
コーヒー豆	112	109	115	116	116	114	2.7
ホップ	116	95	123	134	122	118	12.2

Table 6 ダミノジッド（畜水産物）添加回収結果 GC-NPD

	1	2	3	4	5	平均	RSD (%)
牛の筋肉	70	84	73	79	75	76	7.2
牛の脂肪	74	68	65	86	72	73	11.0
牛の肝臓	73	67	74	73	66	71	5.4
牛乳	76	76	74	66	73	73	5.6
鶏卵	108	93	85	84	97	93	10.5
サケ	74	74	73	72	65	72	5.3
ウナギ	68	84	73	90	67	76	13.3
シジミ	75	66	71	71	74	71	4.9
エビ	77	81	73	68	67	73	8.1
ハチミツ	72	78	77	71	77	75	4.3

Table 7 ダミノジッド（畜水産物）添加回収結果 GC-MS

	1	2	3	4	5	平均	RSD (%)
牛の筋肉	123	109	102	117	124	115	8.2
牛の脂肪	100	95	99	110	112	103	7.2
牛の肝臓	125	99	119	122	114	116	8.8
牛乳	95	94	96	87	95	93	3.9
鶏卵	92	86	90	89	95	90	3.7
サケ	112	100	111	129	126	116	10.3
ウナギ	107	99	130	115	108	112	10.4
シジミ	112	106	111	115	119	113	4.3
エビ	110	108	95	100	98	102	6.4
ハチミツ	101	104	106	100	104	103	2.4

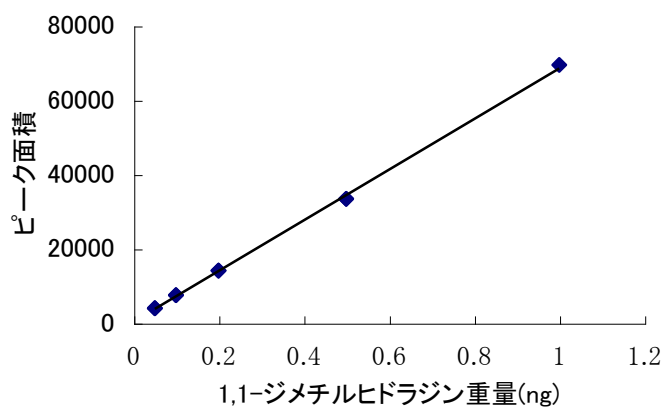
2) ブランク試料の妨害状況

農産物及び畜水産物の何れの試料においても近接部分にピークは検出したが、測定の妨害となるピークは認められなかった。GC-NPDのクロマトグラムを図3-3-1～図3-3-7に、GC-MSのクロマトグラムを図4-4-1～図4-4-7に示した。

1 0 結論

ダミノジッドについて告示試験法の見直しを行った。その結果、水抽出、水蒸気蒸留、誘導体化後、塩基性アルミナミカラム精製、GC-NPD 定量、GC-MS 確認という分析操作の基本的な部分に変更せず、各操作の細部を変更することで各種農産物及び畜水産物の分析が可能となった。

1 1 文献 なし



データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : Chemstation (Agilent technologies製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.05 ng ~ 1 ng
 検量線傾き (a) : $a=68654.77915$
 検量線切片 (b) : $b=249.94265$
 R : 0.999

図 3-1 検量線の一例 (GC-NPD)

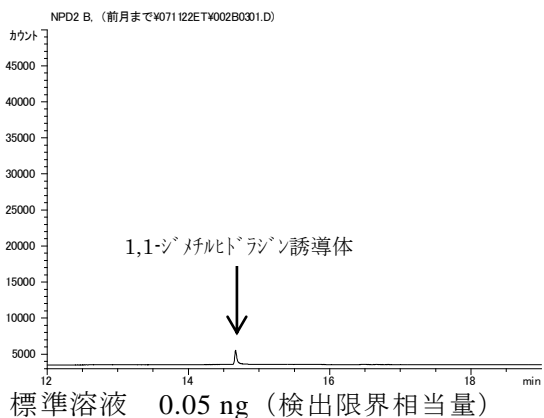
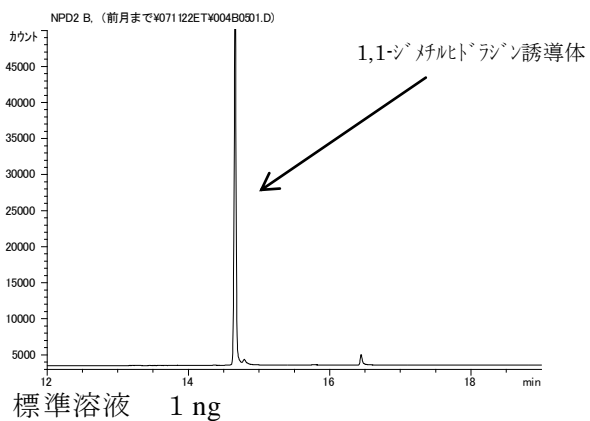


図 3-2 標準溶液のクロマトグラム (GC-NPD : 一例)

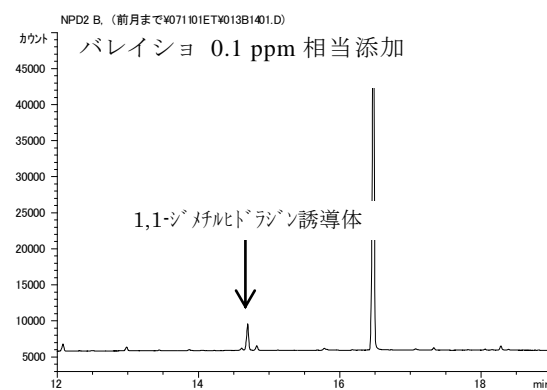
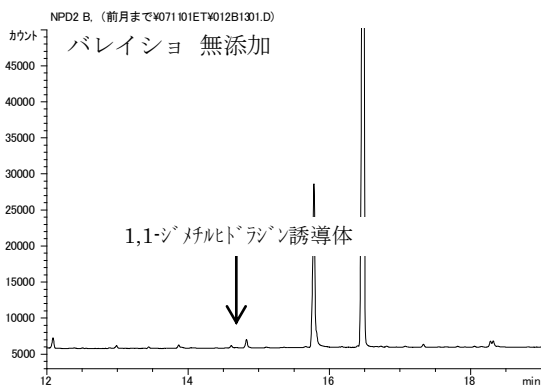
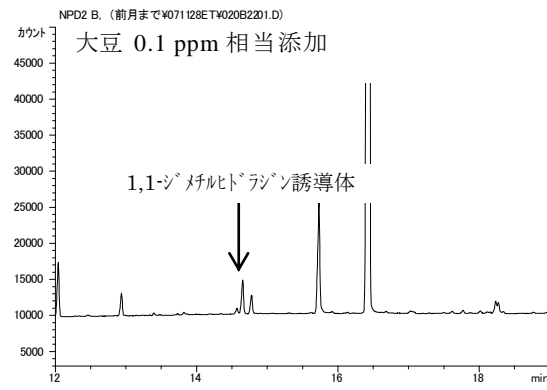
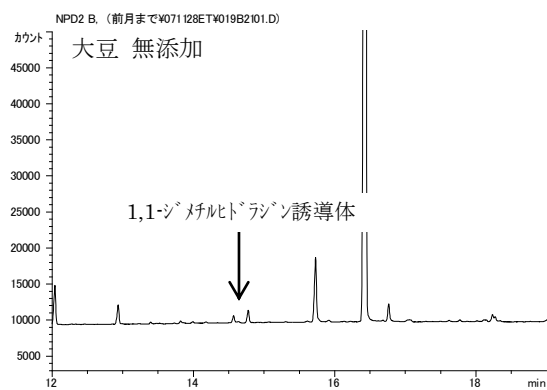
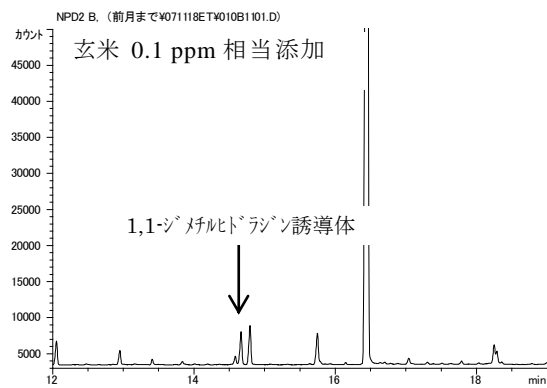
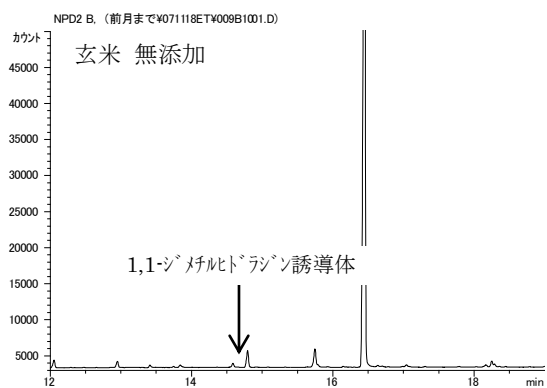


図 3-3-1 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

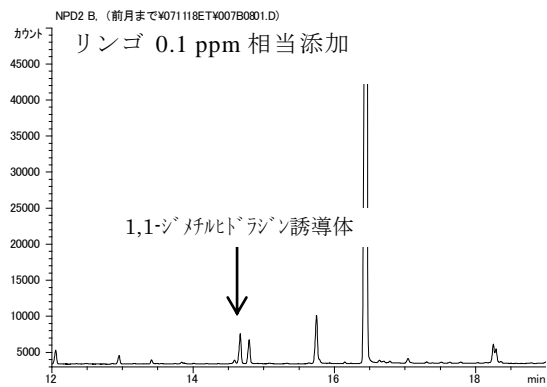
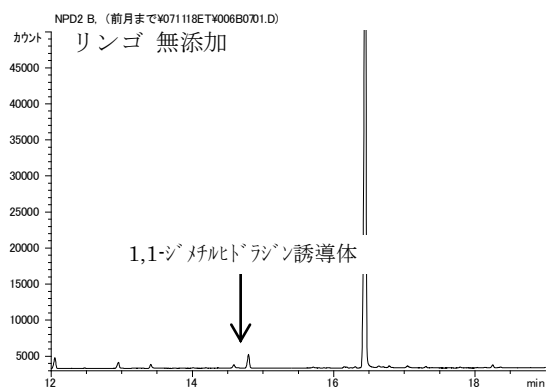
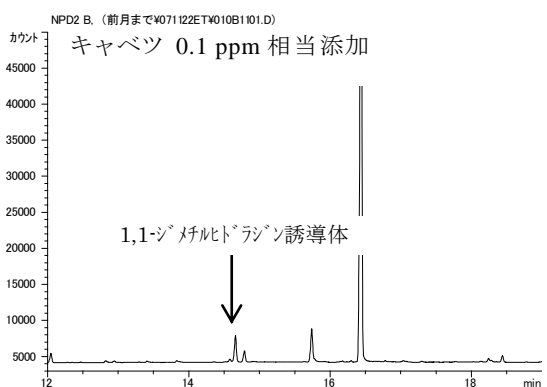
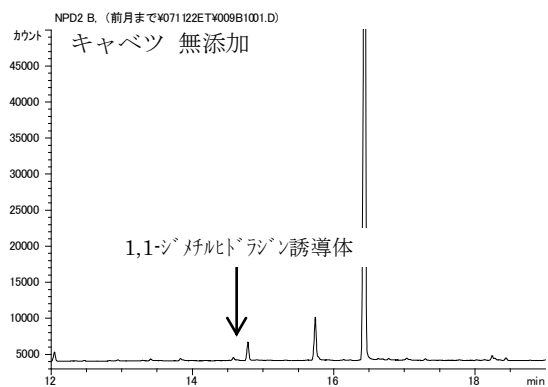
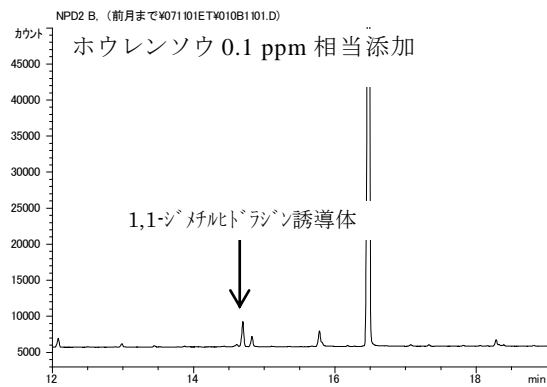
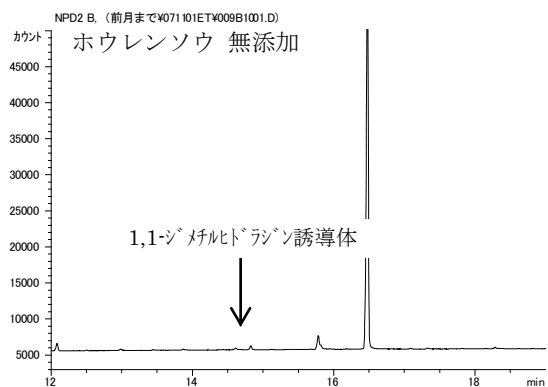


図 3-3-2 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

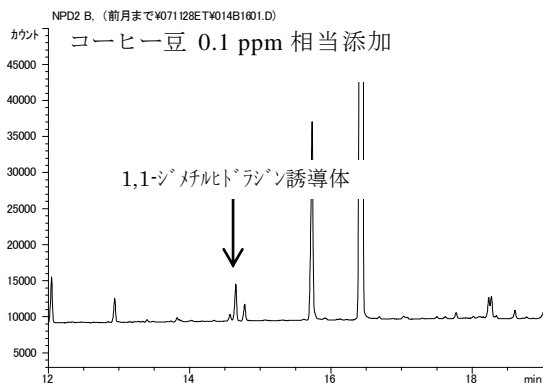
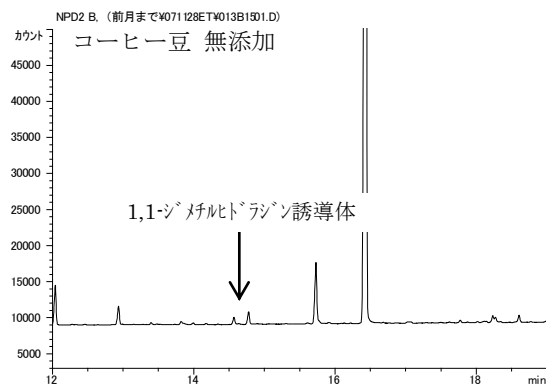
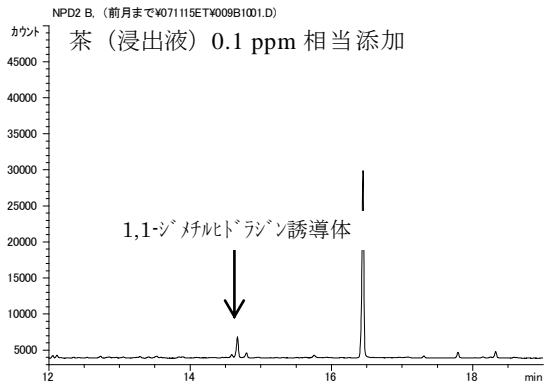
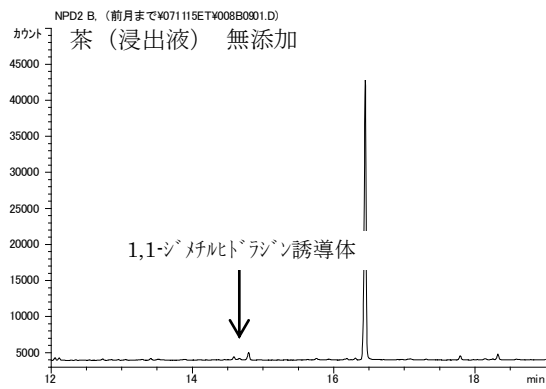
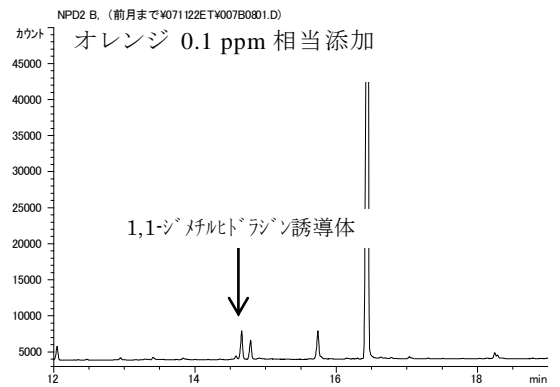
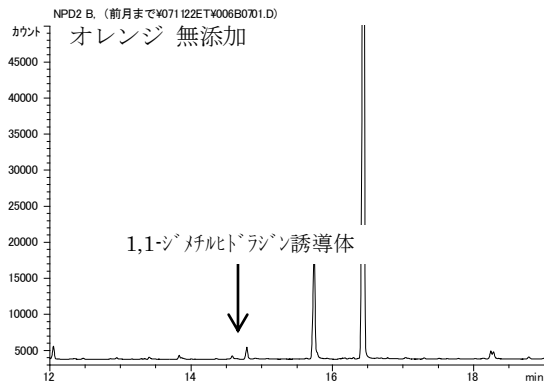


図 3-3-3 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

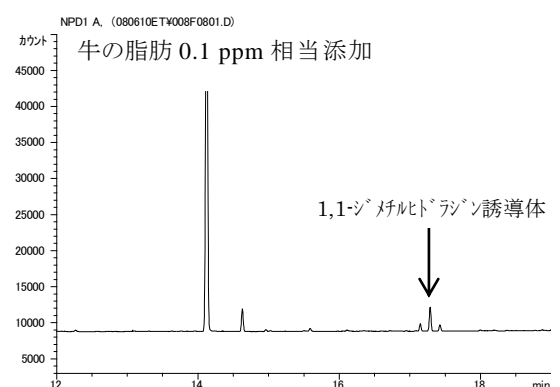
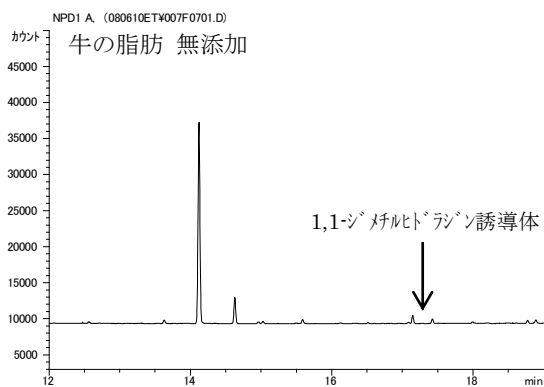
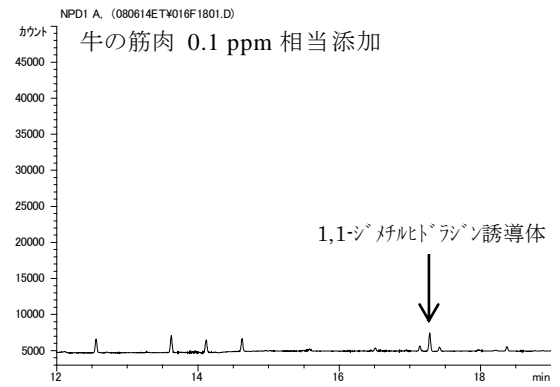
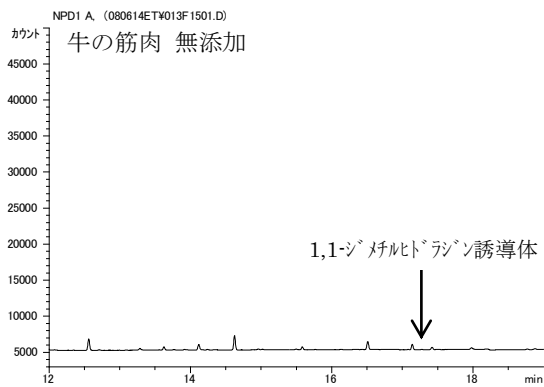
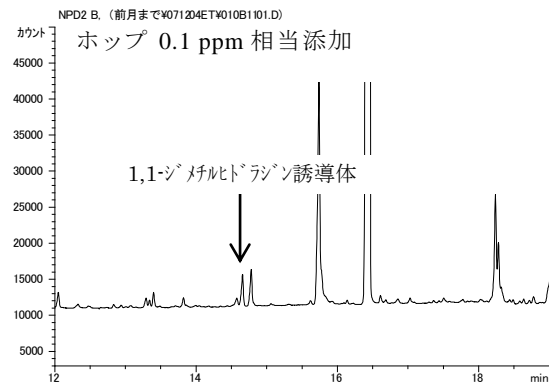
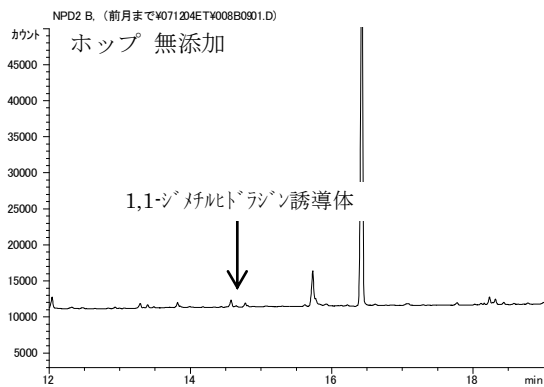


図 3-3-4 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

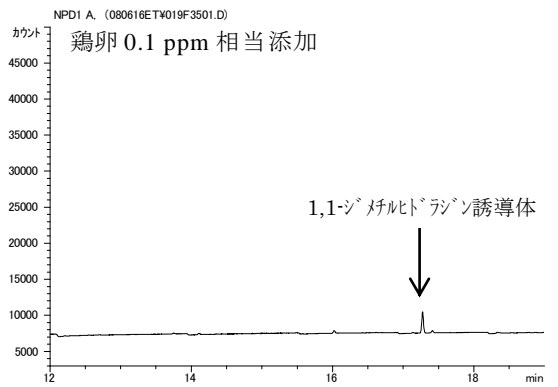
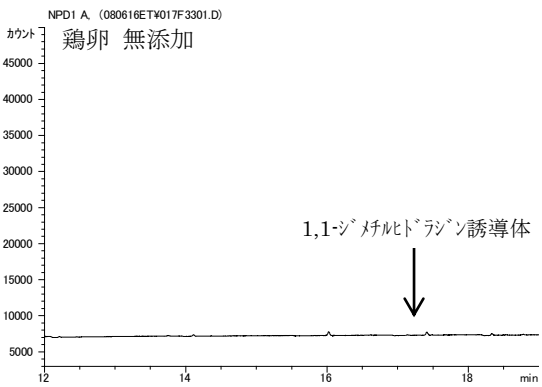
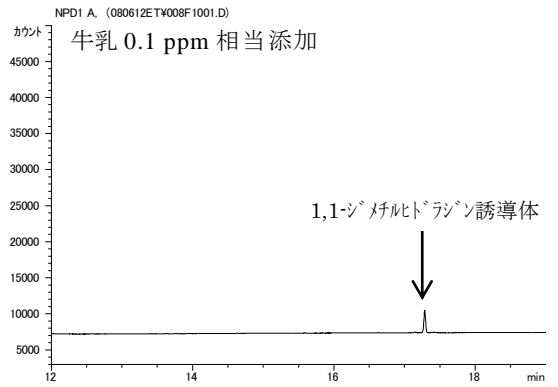
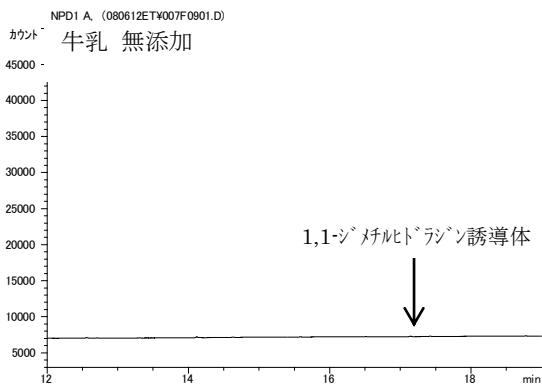
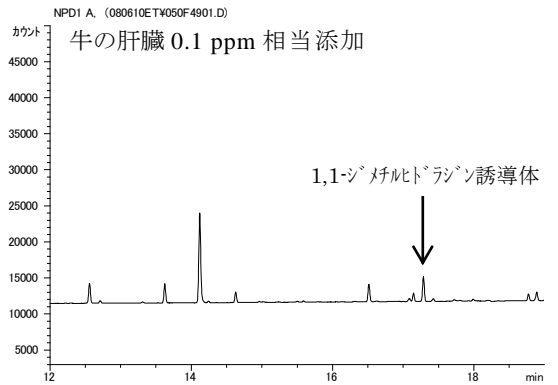
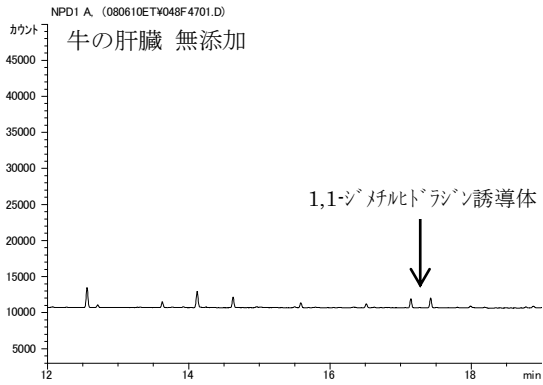


図 3-3-5 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

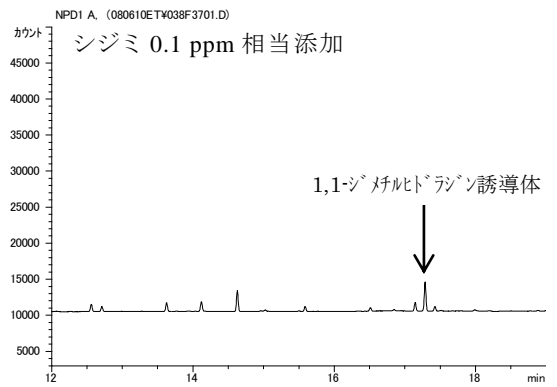
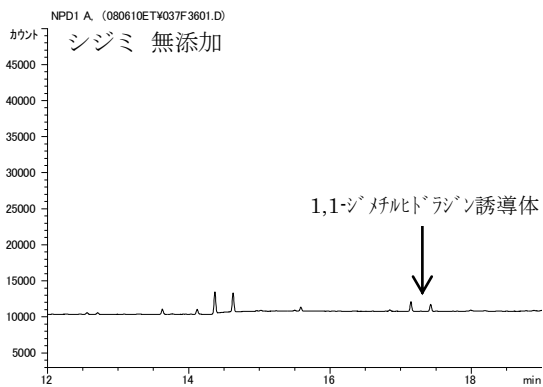
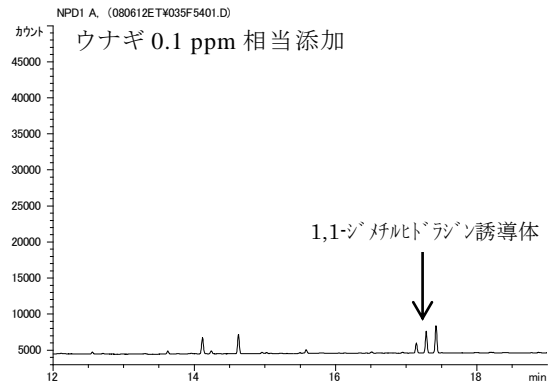
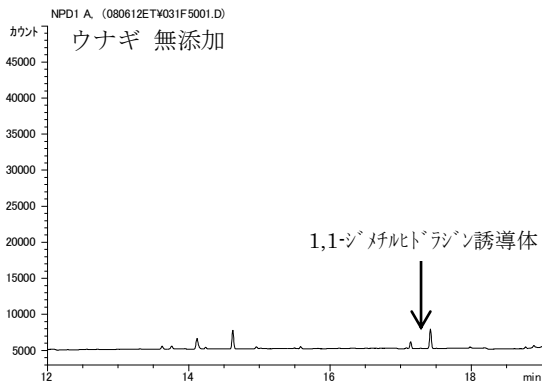
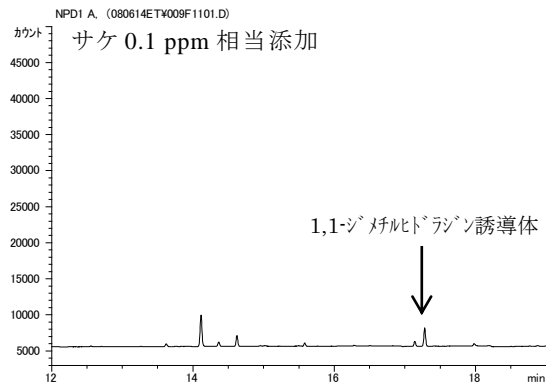
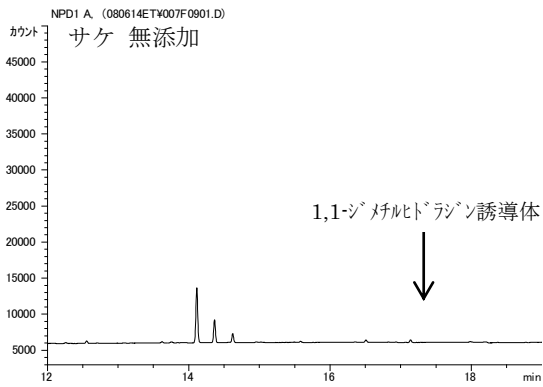


図 3-3-6 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

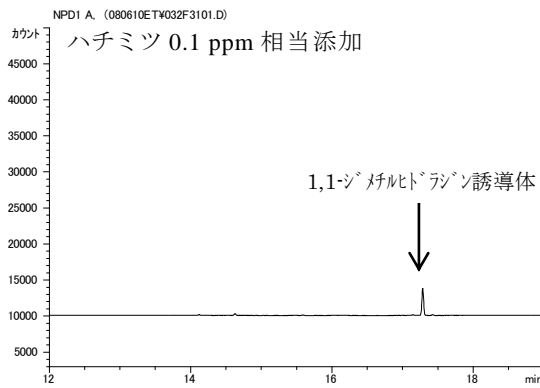
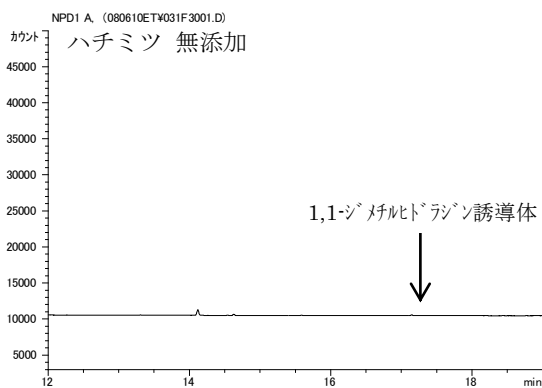
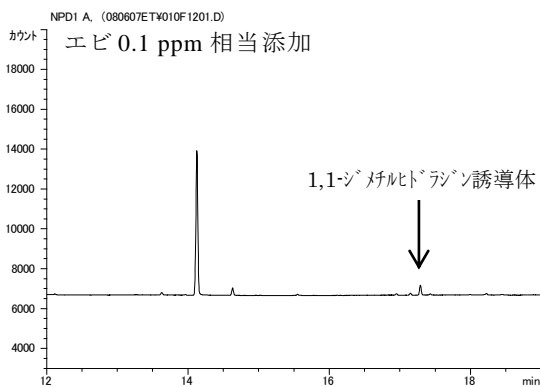
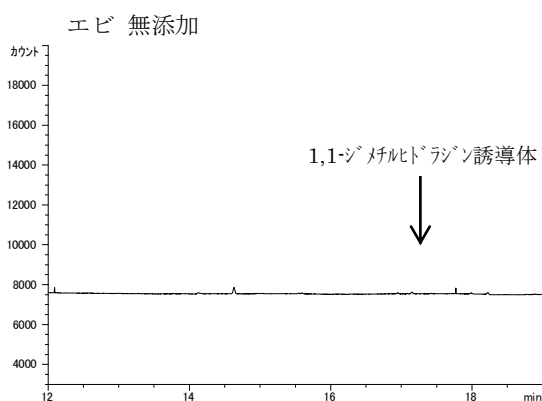


図 3-3-7 試料のクロマトグラム (GC-NPD)

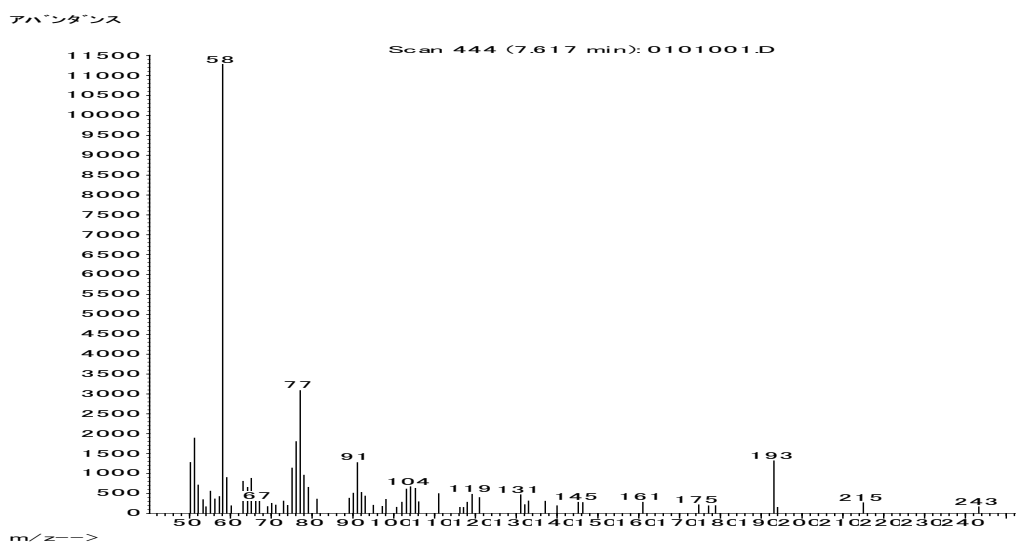
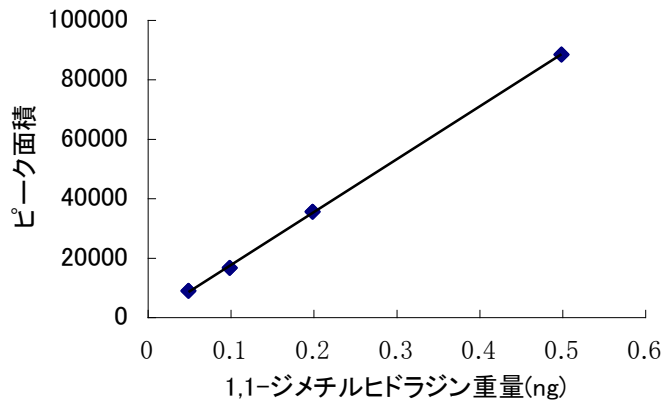


図 4-1 1,1-ジメチルヒドラージン誘導体化物マススペクトル



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：Chemstation（Agilent technologies製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.05 ng～0.5 ng
 検量線傾き (a) : a=177798
 検量線切片 (b) : b=-734.92
 R : 0.999

図 4 - 2 検量線の一例（GC-MS）

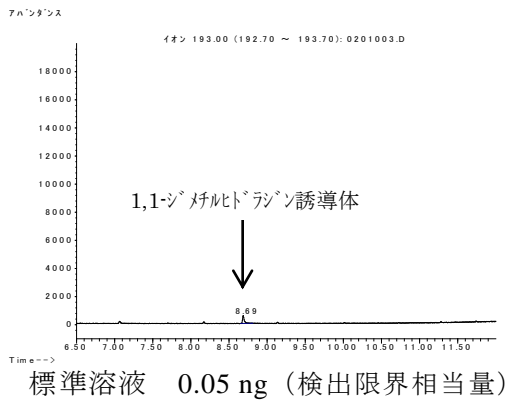
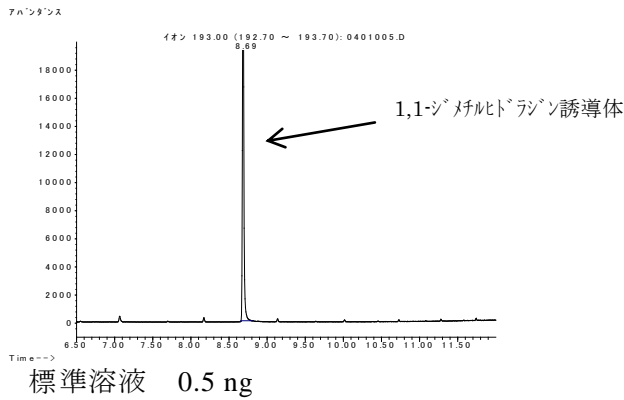


図 4 - 3 標準溶液のクロマトグラム（GC-MS：一例）

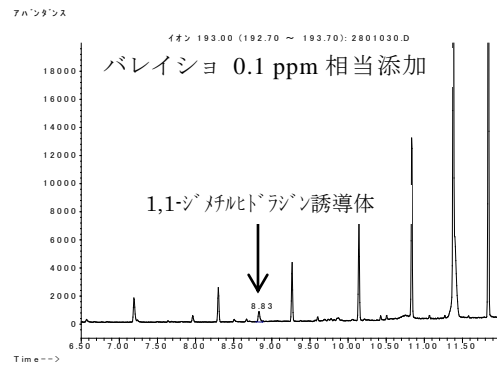
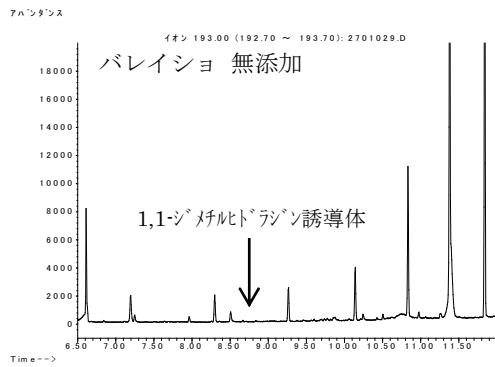
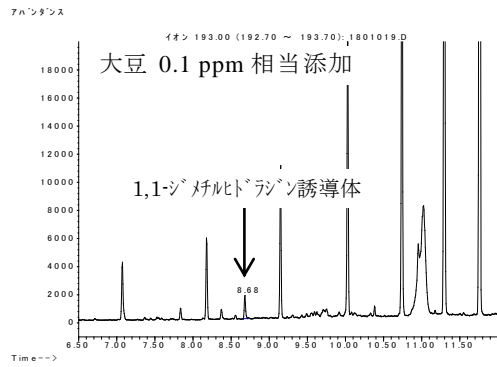
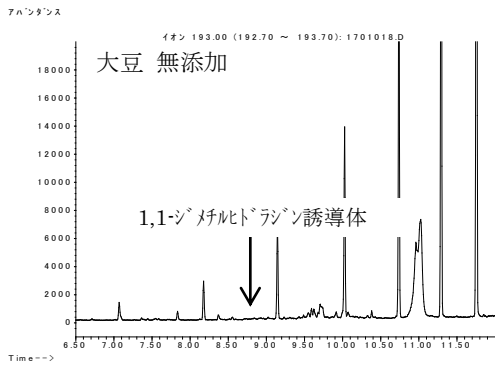
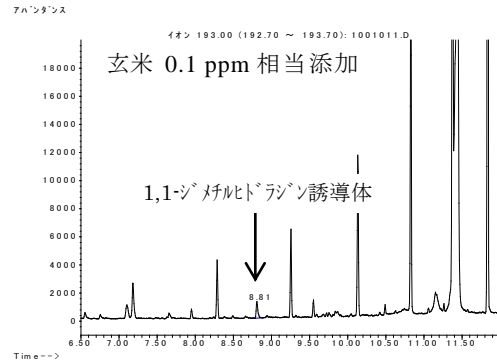
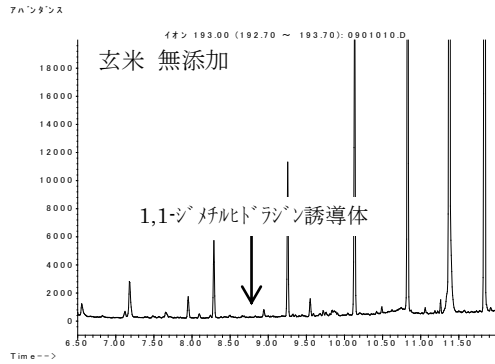


図 4-4-1 試料のクロマトグラム (GC-MS)

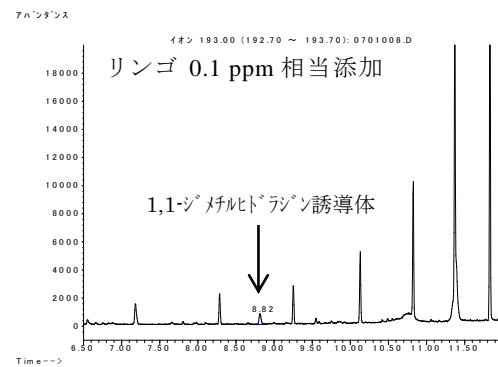
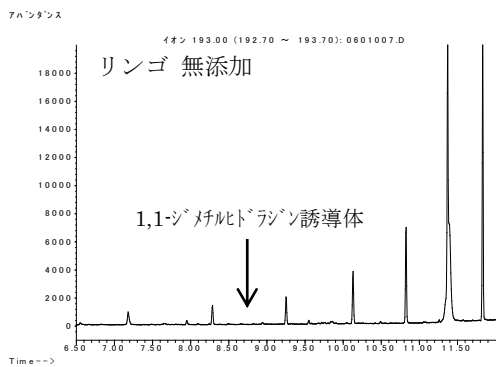
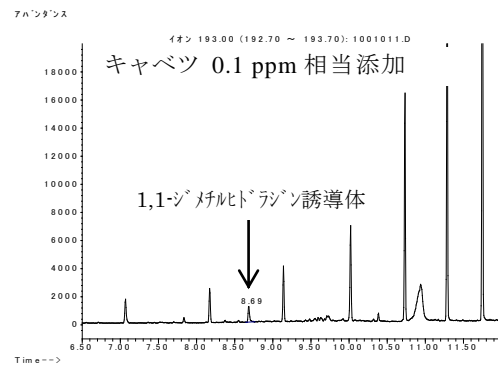
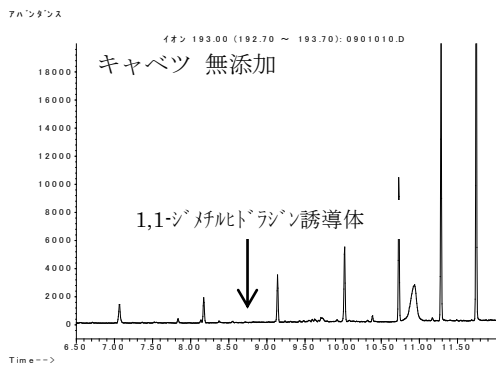
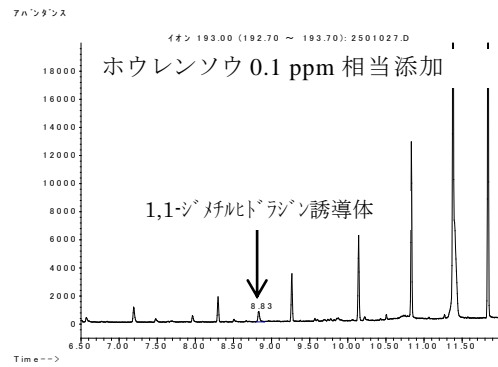
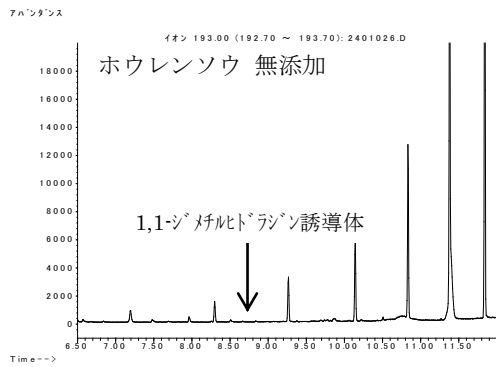


図 4-4-2 試料のクロマトグラム (GC-MS)

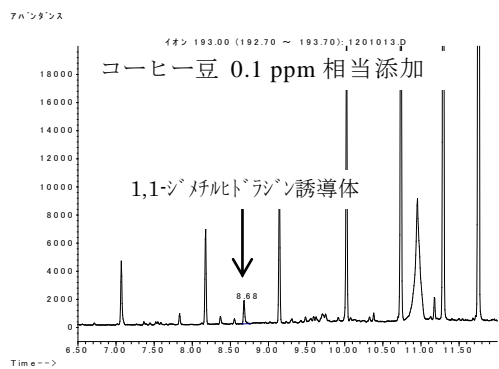
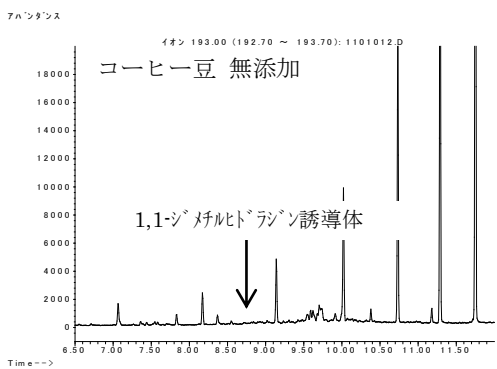
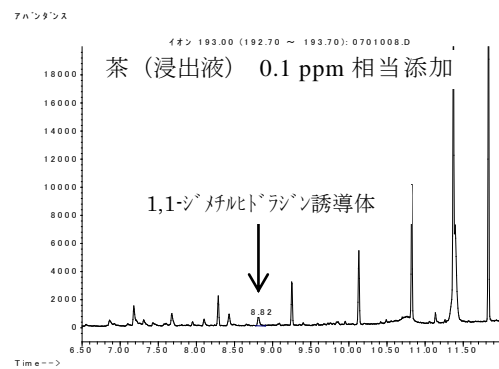
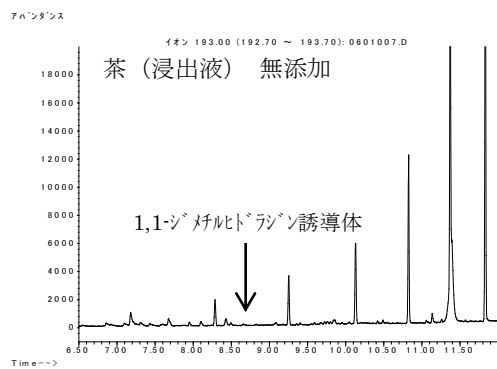
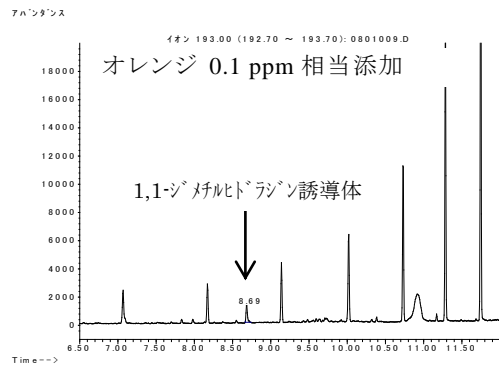
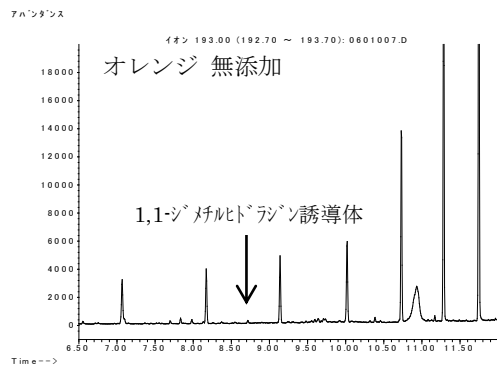


図 4-4-3 試料のクロマトグラム (GC-MS)

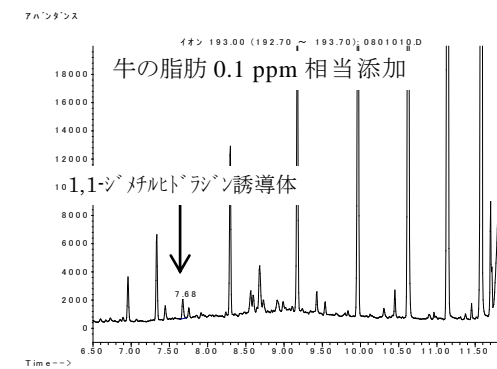
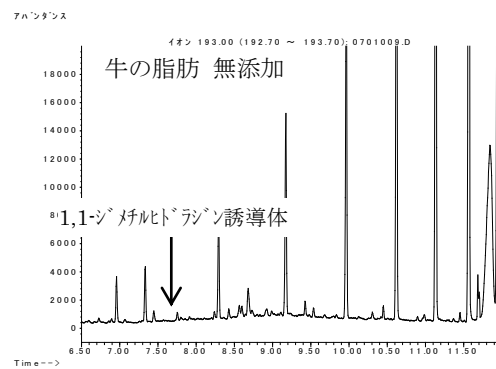
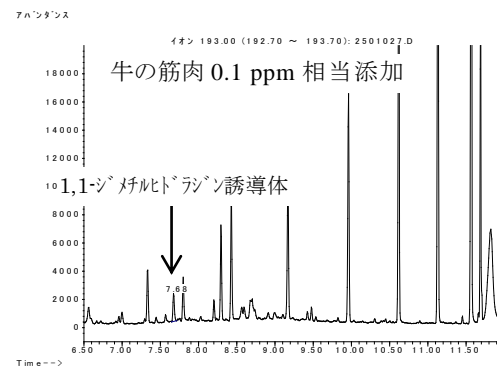
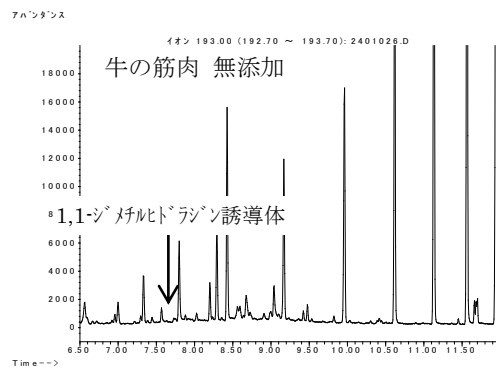
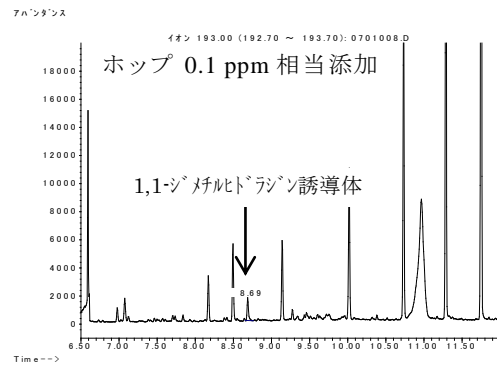
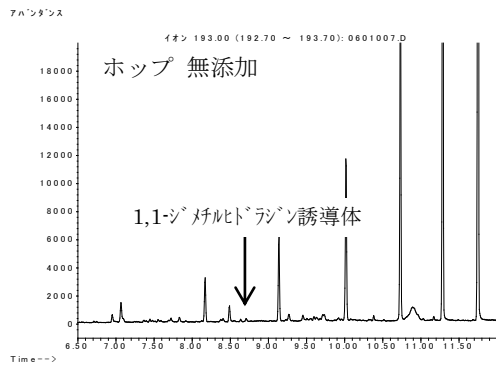


図 4-4-4 試料のクロマトグラム (GC-MS)

/

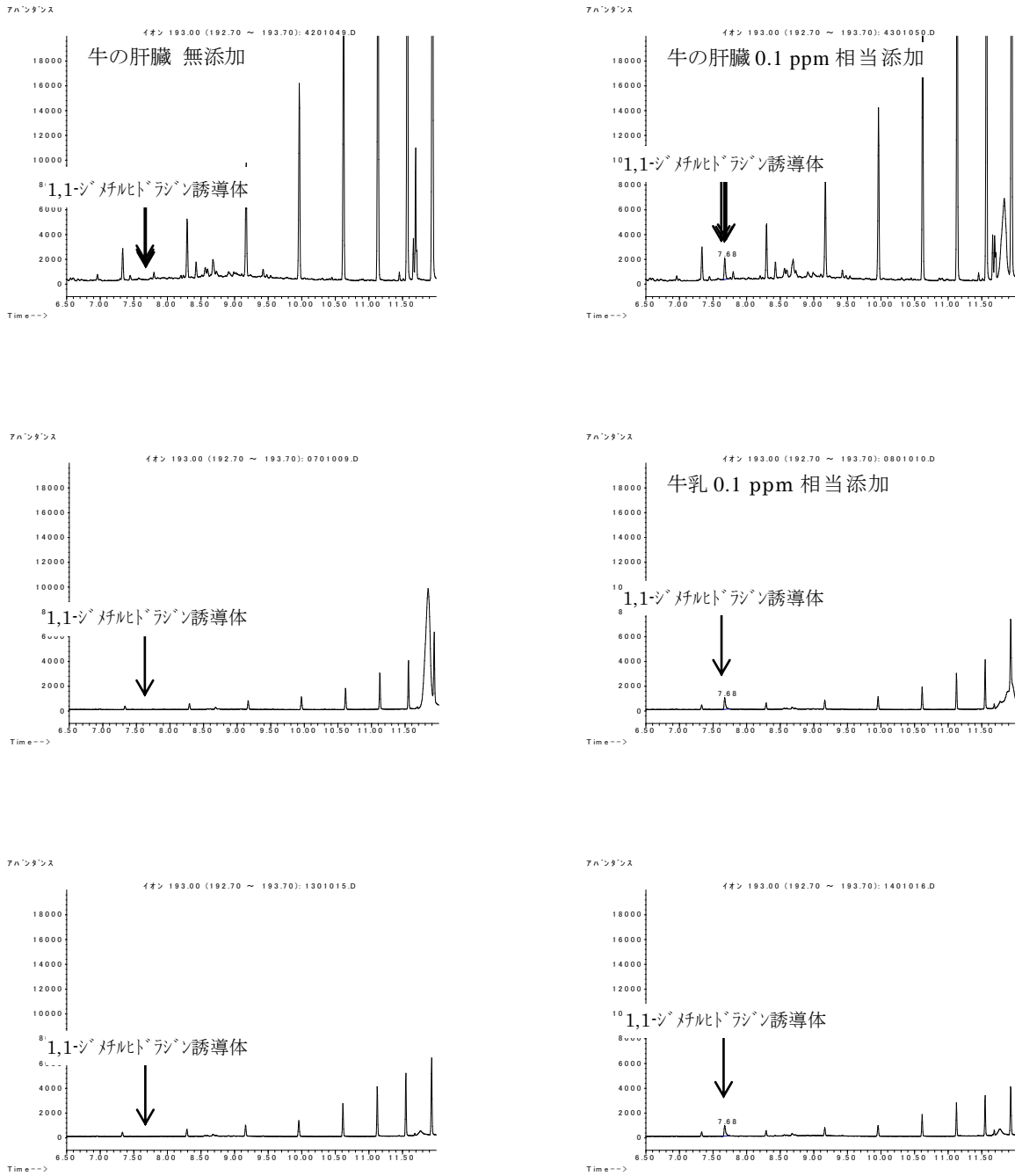


図 4-4-5 試料のクロマトグラム (GC-MS)

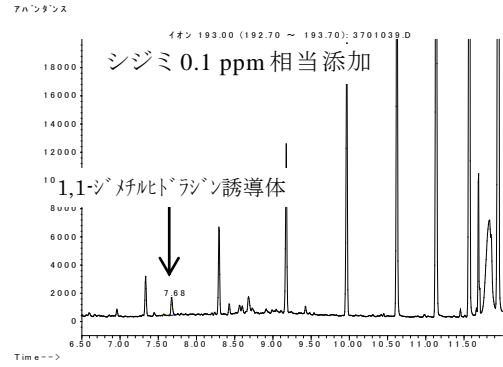
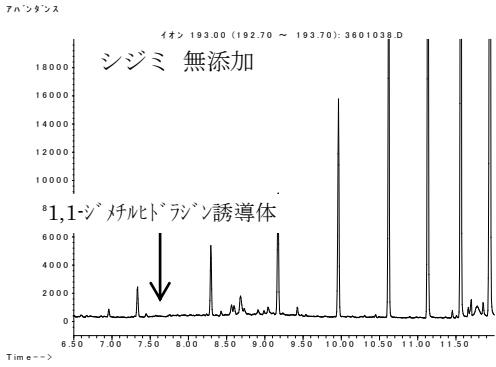
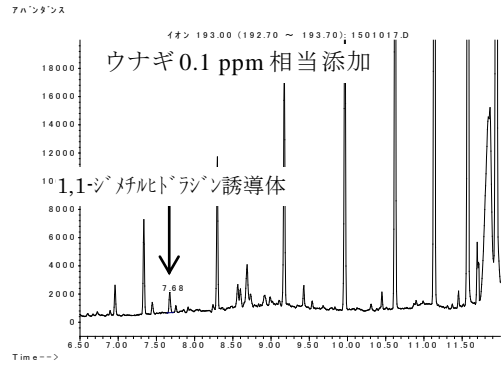
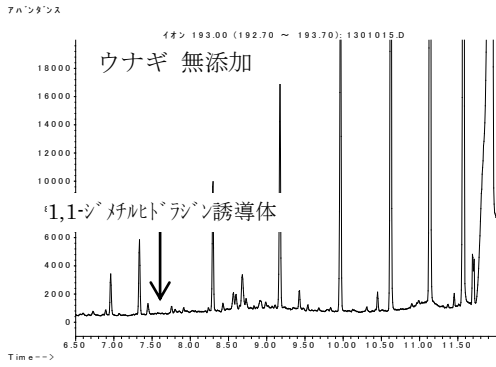
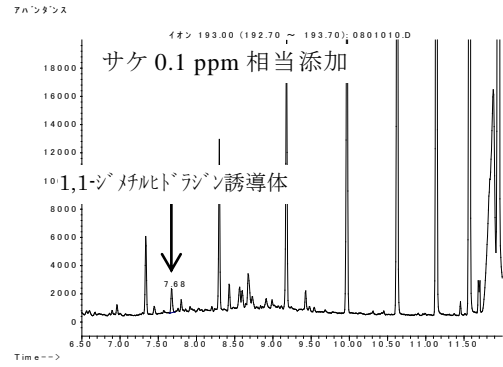
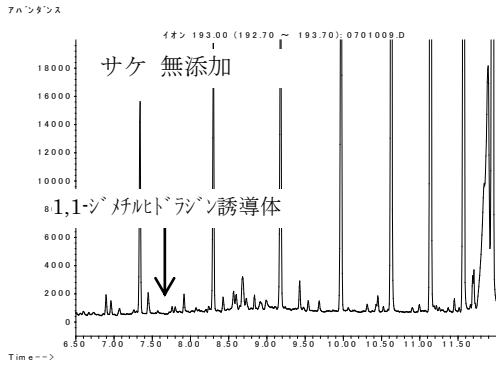


図 4-4-6 試料のクロマトグラム (GC-MS)

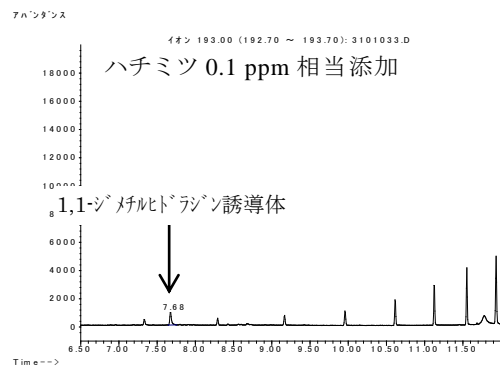
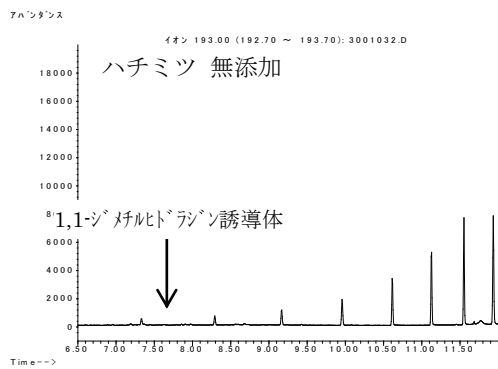
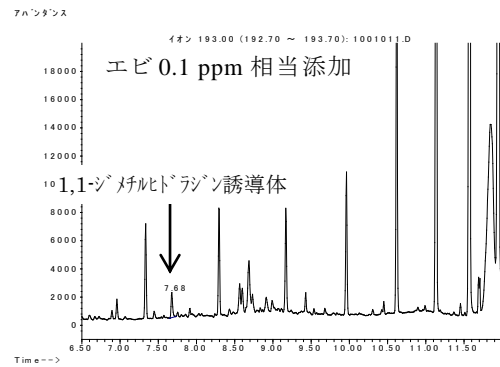
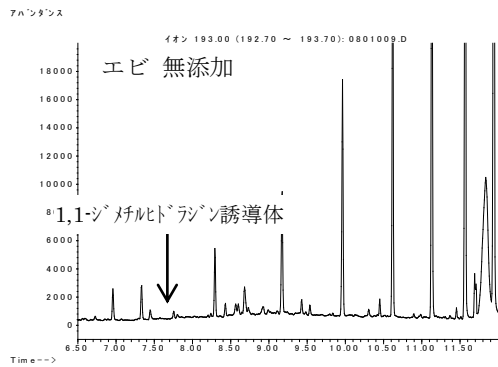


図 4-4-7 試料のクロマトグラム (GC-MS)

GC-FTDによるダミノジッド試験法（新法）の評価

[対象となる試験法及び食品]

1. 対象となる試験法

ダミノジッド試験法（農産物）、ダミノジッド試験法（畜水産物）

2. 対象食品

ほうれんそう、オレンジ、大豆、牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓

[実験方法]

1. 試料

弊社近隣のスーパーにて購入

2. 試薬、試液

試薬・試液	規格・グレード	会社名
アセトン 300	残留農薬試験用	和光純薬工業
n-ヘキサン 300	残留農薬試験用	和光純薬工業
メタノール	HPLC 用	和光純薬工業
o-ニトロベンズアルデヒド	特級	関東化学
フェノールフタレイン	特級	和光純薬工業
エタノール(95)	特級	和光純薬工業
リン酸二水素一カリウム	特級	関東化学
リン酸一水素二カリウム	特級	関東化学
水酸化ナトリウム	特級	和光純薬工業
ケイソウ土(セライト 545)		和光純薬工業
消泡用シリコン KM-72	食品添加物用	信越化学工業

標準品	規格・グレード	会社名
ダミノジッド標準品 (Assay : 97.0%)	残留農薬試験用	Dr.Ehrenstorfer GmbH
1,1-ジメチルヒドラジン 標準品(Assay : 100.2%)	残留農薬試験用	和光純薬工業

ダミノジッド標準原液：ダミノジッド標準品 10mg を精秤し、水で 100mL に定容して 100 μ g/mL としたものを標準原液とした。

添加回収用標準液：ダミノジッド標準原液を水で希釈して $1\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。

処理消耗品	品名等	会社名
ガラス繊維ろ紙	934-AH 90mm	Whatman
液相分離ろ紙	PHASE SEPPARATORS	Whatman
アルミナ（塩基性）ミニカラム	Sep-Pak Plus Alumina B (1710mg)	Waters

3. 装置及び GC-FTD 条件

装置（メーカー）	GC-2010（島津製作所）
検出器	FTD
カラム	DB-200 内径 0.25mm、長さ 30m、膜厚 $0.25\mu\text{m}$ 会社：J&W
カラム温度	$60^{\circ}\text{C}(2\text{min})\rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min}\rightarrow 280^{\circ}\text{C}(8\text{min})$ ランタイム 32min
注入口温度	250°C
検出器温度	280°C
キャリアーガス流速	ヘリウム $1.50\text{mL}/\text{min}$
注入力	$2\mu\text{L}$

水蒸気蒸留装置

装置（メーカー）	SUGIYAMA-GEN
----------	--------------

4. 試験溶液の調製

1) 試料の採取方法

果実及び野菜（オレンジ及びほうれんそう）の場合は、検体約 1kg を精密に量り、細切均一化した後、検体 20.0g に相当する量を量り採った。

豆類（大豆）の場合は、検体を $425\mu\text{m}$ の標準網ふるいを通るように粉砕して均一化した後、その 10.0g を量り採った。

—牛筋肉の場合は可能な限り脂肪層を除き、牛脂肪の場合は可能な限り筋肉層を除き、検体を細切均一化した後、その 10.0g （脂肪の場合は 5.00g ）を量り採った。

牛肝臓の場合は、検体を細切均一化した後、その 10.0g を量り採った。

2) 抽出

① オレンジ、ほうれんそう及び大豆の場合

上記の試料に水 80mL を加えホモジナイズした後、ガラス繊維ろ紙及びろ過補助剤（ケイソウ土）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に水 40mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られた液を合わせ、水を加えて正確に 200mL とした。この溶液から正確に 20mL を丸底フラスコ（蒸留用）に分取し、水 80mL を加えた。

② 畜水産物の場合

上記の試料に水 80mL と n-ヘキサン 40mL を加え、ホモジナイズした後、ガラス繊維ろ紙及びろ過補助剤（ケイソウ土）を用いて吸引ろ過し、水層と n-ヘキサン層をそれぞれ採った。ろ紙上の残留物に先の n-ヘキサン層を加え、さらに水 40mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られた水層を合わせ、水を加えて正確に 200mL とした。この溶液から正確に 20mL（脂肪の場合は正確に 40mL）を丸底フラスコ（蒸留用）に分取し、水 80mL を加えた。

3) 蒸留

2) の丸底フラスコ（蒸留用）に水酸化ナトリウム 60g を水冷しながら、少量ずつ加えて溶かした。これに消泡用シリコン 1~2 滴及び沸騰石を加えた後、直ちに蒸留装置に取り付けた。別に、リン酸緩衝液(pH5)5mL 及びフェノールフタレイン試液 1 滴を入れた 100mL の三角フラスコを水蒸気蒸留装置に取り付け、丸底フラスコ（蒸留気発生用）を加熱しておいた。留液が 45mL になるまで水蒸気蒸留し、留液が着色していないことを確認した。蒸留が約 15 分間で終了するように加熱強度を調節した。

4) 誘導体化

上記の留液に 1w/v% o-ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 1mL を加えて振り混ぜた後、40°C で 16 時間放置した。これに n-ヘキサン 50mL を加えて 5 分間振とう後、静置し、n-ヘキサン層を採り、液相分離ろ紙を用いてろ過した。水層に n-ヘキサン 50mL を加え、上記と同様に操作して、得られた n-ヘキサン層を合わせた。n-ヘキサン 10mL を用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液を先の n-ヘキサン層に合わせ、40°C 以下で n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトン及び n-ヘキサン（1 : 19）混液 5mL を加えて溶かした。

5) 精製

アルミナ（塩基性）ミニカラム(1710mg)にアセトン及び n-ヘキサン（1 : 19）混

液 10mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 4) で得られた溶液を注入し、さらに、アセトン及び n-ヘキサン (1:19) 混液 10mL を注入し、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトンに溶解し、豆類 (大豆) の場合は正確に 1mL、果実及び野菜 (オレンジ及びほうれんそう) の場合は正確に 2mL、畜水産物 (牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓) の場合は正確に 1mL としたものを試験溶液とした。

5. 検量線の作成及び定量

1,1-ジメチルヒドラジン標準品の 500mg/L 水溶液を調製した。この 1mL を採り、リン酸緩衝液(pH5)5mL 及び水 40mL を加えたものに 1w/v% o-ニトロベンズアルデヒド・メタノール溶液 1mL を加えて振り混ぜた後、40℃で 16 時間放置した。これに n-ヘキサン 50mL を加えて 5 分間振とう後、静置し、n-ヘキサン層を採り、液相分離ろ紙を用いてろ過した。水層に n-ヘキサン 50mL を加え、上記と同様に操作して、得られた n-ヘキサン層を合わせた。n-ヘキサン 10mL を用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液を先の n-ヘキサン層に合わせ、40℃以下で n-ヘキサンを除去した。この残留物を溶解してアセトン溶液を数点調製し、それぞれ GC に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。1,1-ジメチルヒドラジンの検量線から得られた濃度の換算係数(2.665)を乗じダミノジッドとして算出し回収率を求めた。

6. 添加回収試験用の試料の調製

ほうれんそう及びオレンジは、試料 20.0g を量り採り、ダミノジッド添加回収用標準液 (1 μ g/mL) を 2mL 添加し(0.1ppm 相当)よく混合した後、30 分間放置した。

大豆は、試料 10.0g を量り採り、ダミノジッド添加回収用標準液 (1 μ g/mL) を 1mL 添加し(0.1ppm 相当)よく混合した後、30 分間放置した。

牛筋肉及び牛肝臓は、試料 10.0g を量り採り、ダミノジッド添加回収用標準液 (1 μ g/mL) を 1mL 添加し(0.1ppm 相当)よく混合した後、30 分間放置した。

牛脂肪は、試料 5.00g を量り採り、ダミノジッド添加回収用標準液(1 μ g/mL) を 0.5mL 添加し(0.1ppm 相当)よく混合した後、30 分間放置した。

また、実施日毎に試料を水(20mL)に変えて上記と同様な操作を行い、工程の回収率を確認した。

7. 試験結果及び試験実施に関連する事項

1) ブランク試料の妨害について

農産物及び畜産物の試料において、1,1-ジメチルヒドラジンの保持時間の前後に接近しているピークは検出されたが、測定の妨害となるピークは認められなかった。
(クロマトグラム参照)

2) 回収率及び併行精度

ダミノジッド(新法)の測定法評価							
添加量: 0.1mg/kg				赤字: 工程回収率			
実施日	食品	添加回収率 (%)			Mean	S.D.	CV(%)
		1	2	3			
1day	ほうれんそう	88.8	84.1	79.0	84.0	4.9	5.8
	オレンジ	71.1	72.6	70.9	71.5	0.9	1.3
	水(工程回収)	(n=1参考)			73.5	-	-
2day	大豆	71.6	71.6	81.9	75.0	5.9	7.9
	水(工程回収)	(n=1参考)			76.2	-	-
3day	牛筋肉	73.7	75.6	78.3	75.9	2.3	3.0
	水(工程回収)	(n=1参考)			81.7	-	-
4day	牛脂肪	72.0	76.0	70.9	72.9	2.7	3.7
	水(工程回収)	(n=1参考)			71.6		
5day	牛肝臓	70.0	73.3	70.1	71.4	1.7	2.4
	水(工程回収)	(n=1参考)			70.5		

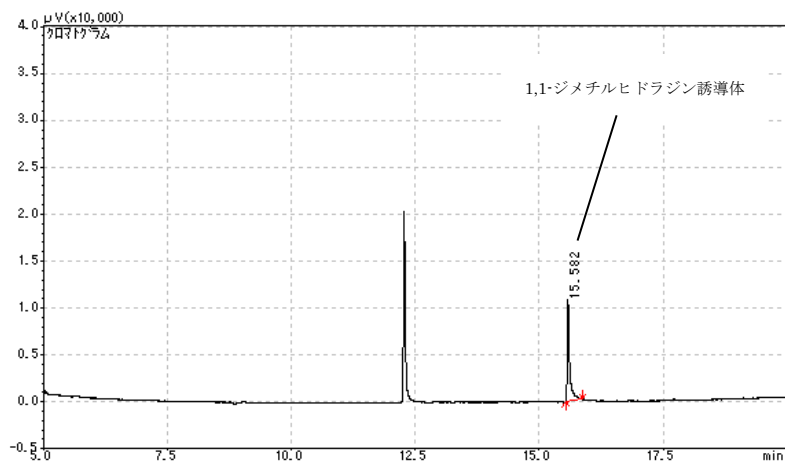
ダミノジッドの添加回収試験において、ほうれんそうは、回収率 84.0% (RSD5.8%)、オレンジは、回収率 71.5%(RSD1.3%)、大豆は、回収率 75.0%(RSD7.9%)、牛筋肉は、回収率 75.9%(RSD3.0%)、牛脂肪は、回収率 72.9%(RSD3.7%)、牛肝臓は、回収率 71.4%(RSD2.4%)であった。

なお、添加回収試験と同時にマトリックスを水に変えて工程回収率を確認した。n=1にて5日間の工程回収試験の結果、回収率は 70.5%~81.7%であった。

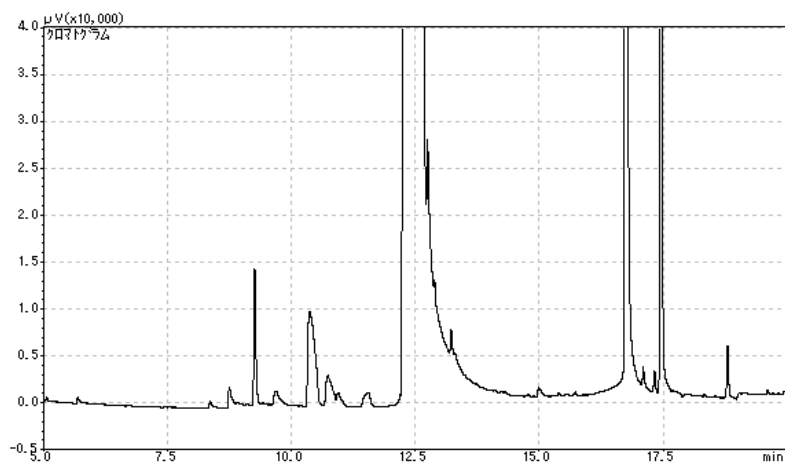
8 添加回収試験の代表的なクロマトグラム

ほうれんそう

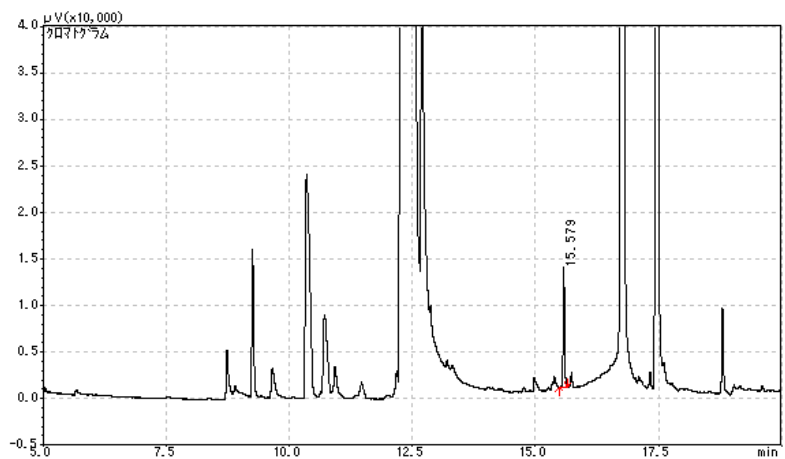
標準溶液



ブランク試料

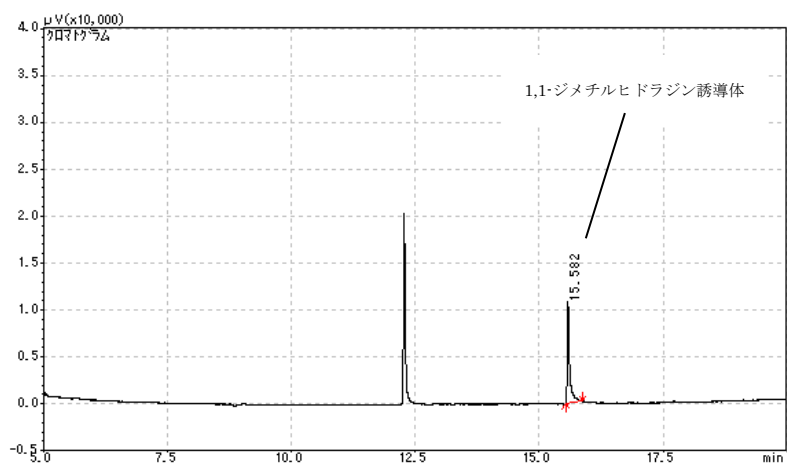


添加試料

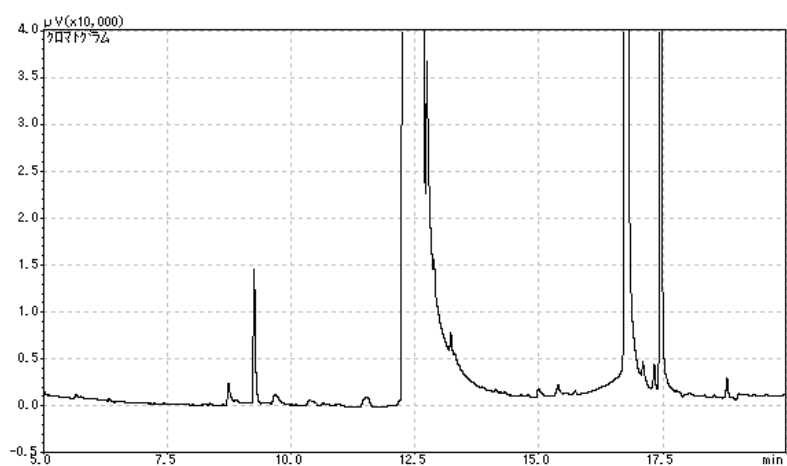


オレンジ

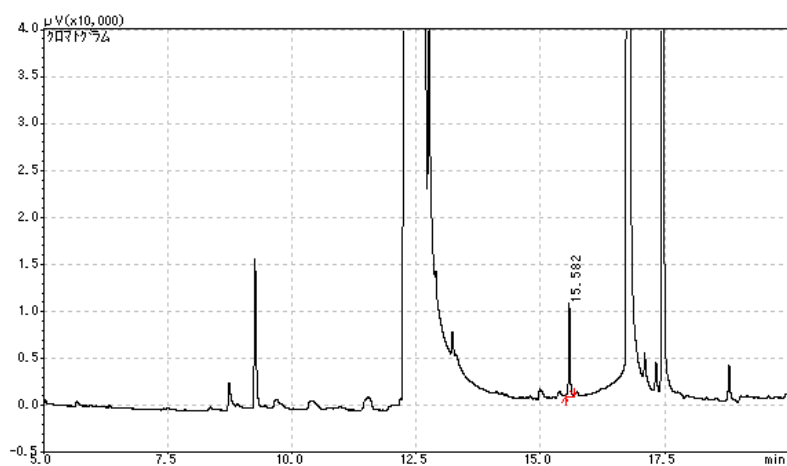
標準溶液



ブランク試料

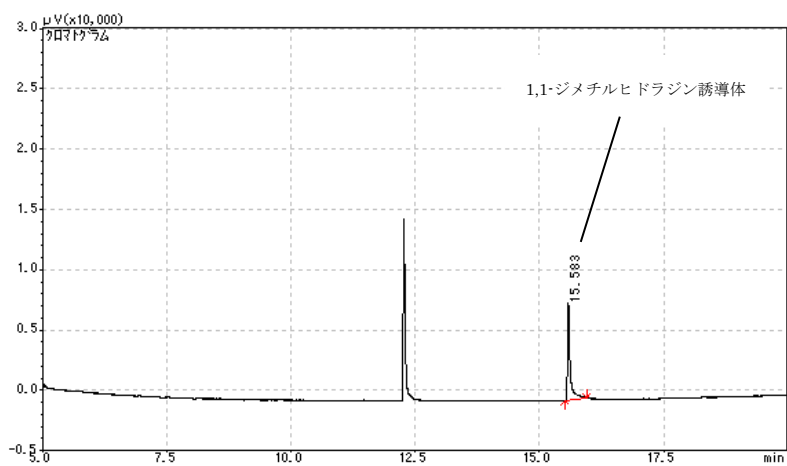


添加試料

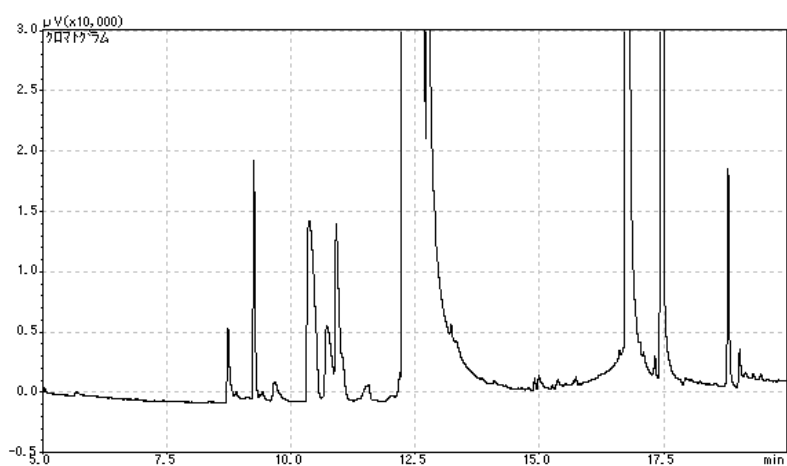


大豆

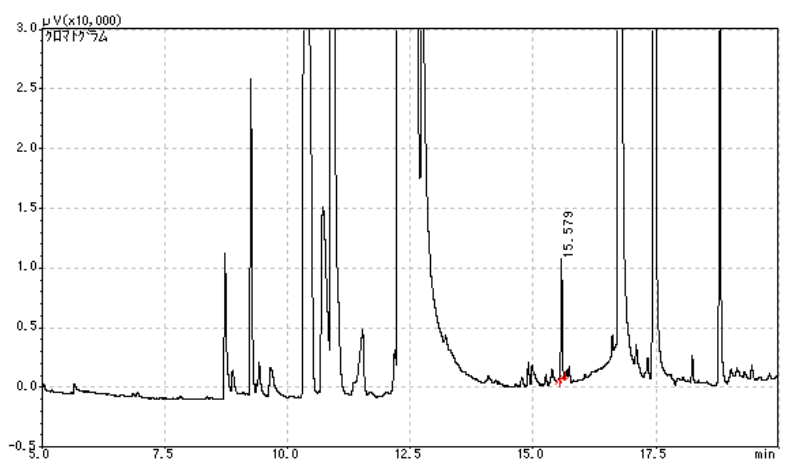
標準溶液



ブランク試料

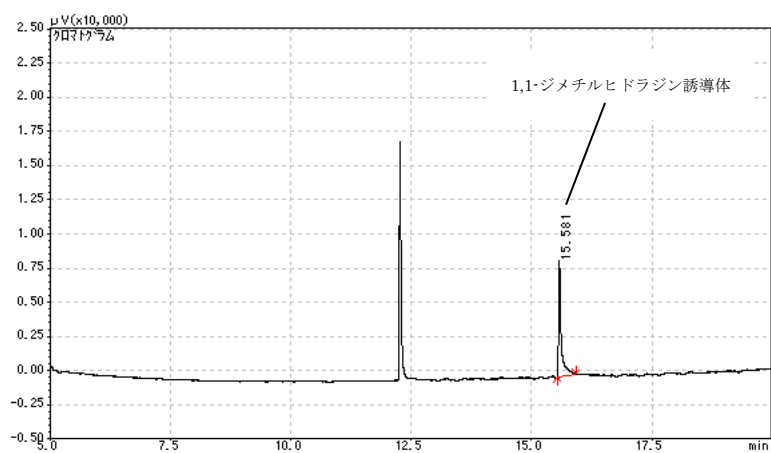


添加試料

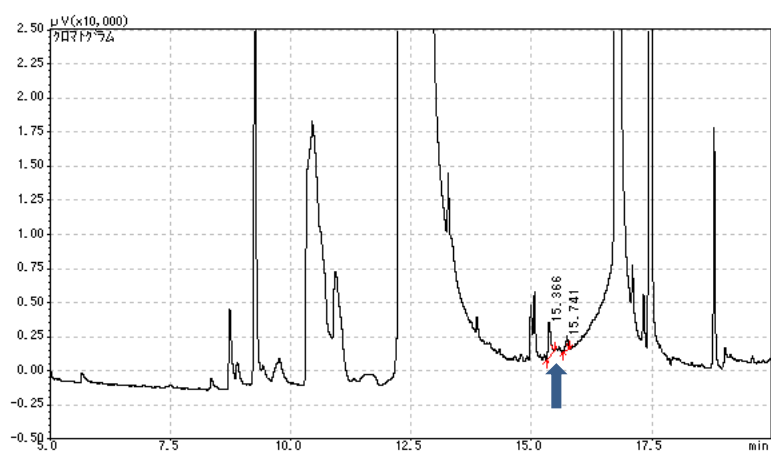


牛筋肉

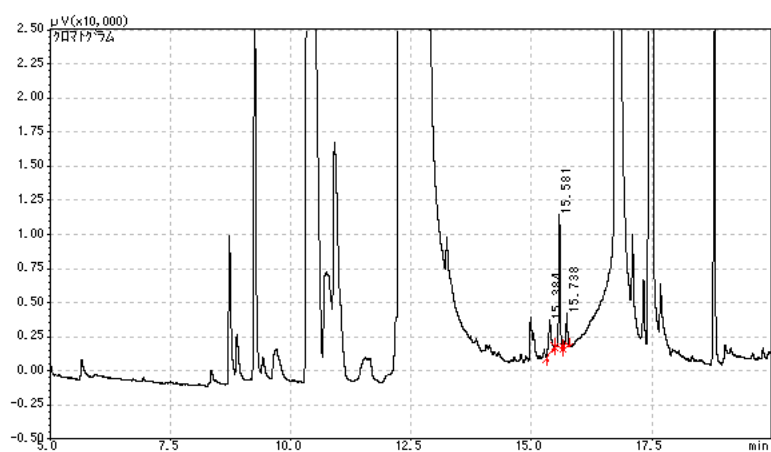
標準溶液



ブランク試料

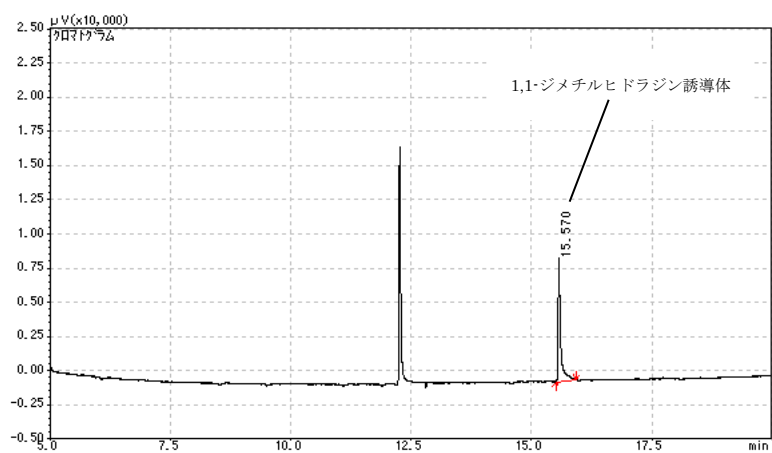


添加試料

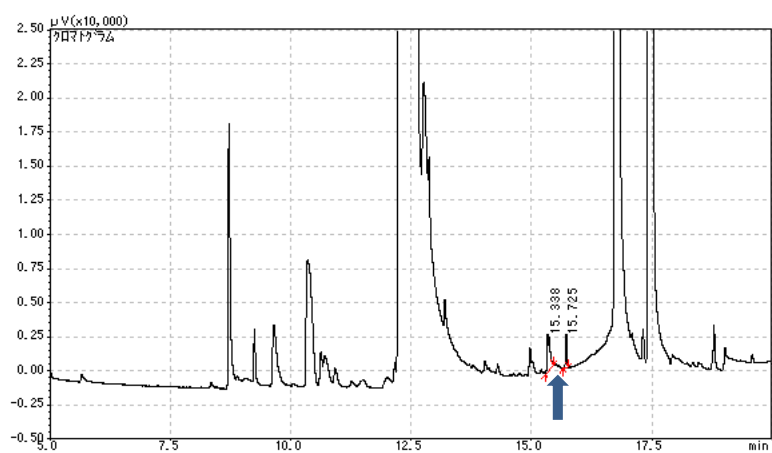


牛脂肪

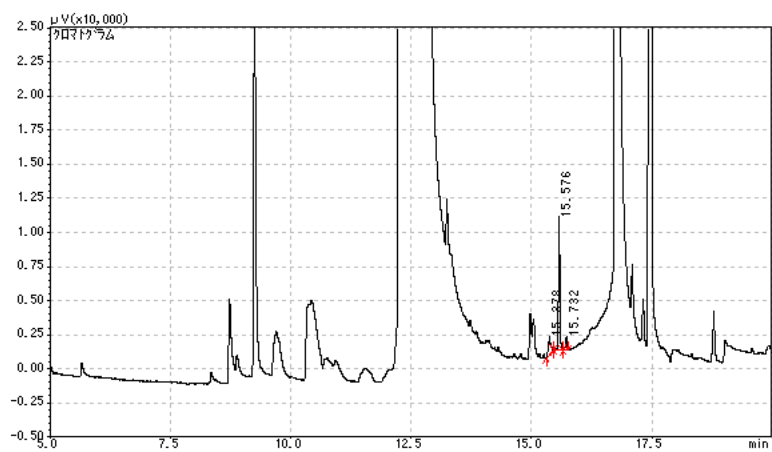
標準溶液



ブランク試料

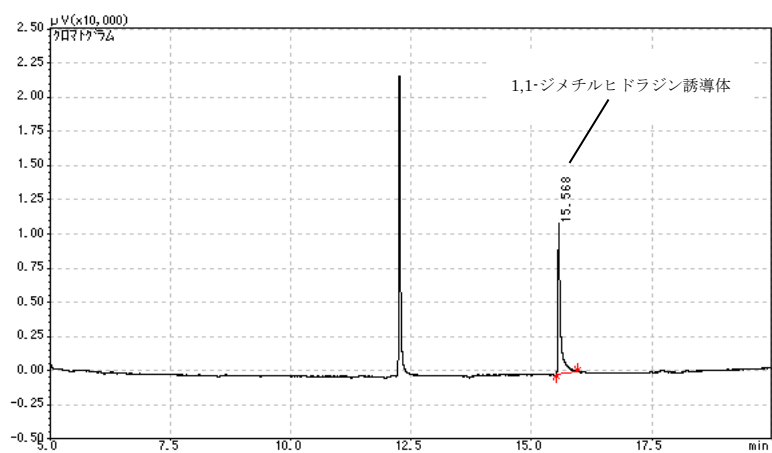


添加試料

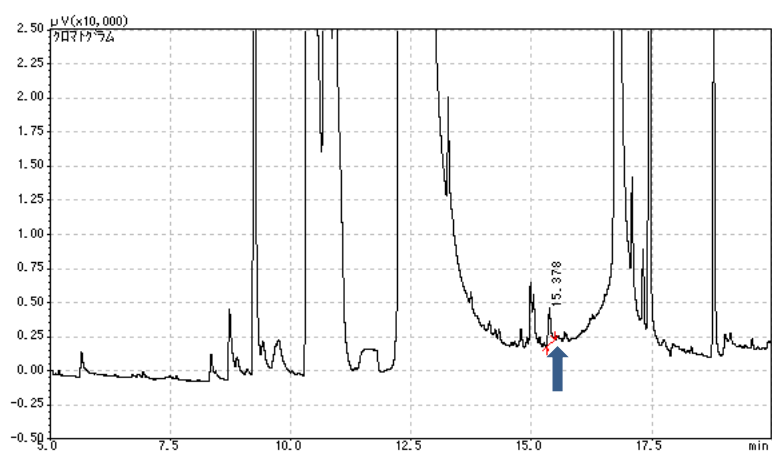


牛肝臓

標準溶液



ブランク試料



添加試料

