調査・資料

食品衛生法告示ダミノジッド試験法の評価

(平成 11 年 12 月 27 日受理)

佐々木久美子^{*1} 辰 濃 隆^{*2} 中村宗知^{*3} 穴 沢 昭^{*4}
 宇都宮 領^{*5} 近 藤 安 昭^{*6} 千 葉 実^{*7} 三 浦 嘉 巳^{*8}
 松田りえ子^{*1} 豊 田 正 武^{*1}

Method-performance Studies of Notified Analytical Method for Daminozide

Kumiko SASAKI^{*1}, Takashi TATSUNO^{*2}, Munetomo NAKAMURA^{*3}, Akira ANAZAWA^{*4}, Osamu UTSUNOMIYA^{*5},
 Yasuaki KONDO^{*6}, Minoru CHIBA^{*7}, Yoshimi MIURA^{*8}, Rieko MATSUDA^{*1} and Masatake TOYODA^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

^{*2}Japan Food Hygiene Association: 2-6-1, Jingumae, Shibuya-ku, Tokyo 150-0001, Japan;

^{*3}Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan;

^{*4}Tokyo Health Service Association: 1-2, Ichigaya-Sadohara, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8402, Japan; ^{*5}Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment: 2-15,

Kitanakatori, Naka-ku, Yokohama-shi 231-0003, Japan; ^{*6}Japan Food Hygiene Association:

22-6, Koyashiki, Yaizu-shi, Shizuoka 425-0076, Japan; ^{*7}Japan Grain Inspection Association:

2-17-3, Arai Ichikawa-shi, Chiba 272-0144, Japan; ^{*8}Research Center of Chiba

Pharmaceutical Association: 1-12-14, Chuoko, Chuo-ku, Chiba-shi 260-0024, Japan)

Method-performance studies were conducted for a new official analytical method for determining daminozide in agricultural products. Daminozide spiked in rice, soybeans, grape, apple and tea extract at the level of 2 µg/g (5 µg/g for tea) was analyzed in replicate in 6 laboratories.

Means of recovery ranged from 69.2 to 84.4%. Repeatability relative standard deviation values ranged from 4.1 to 5.5%. Reproducibility relative standard deviation values ranged from 7.4 to 11.8%. The detection limit depended on the gas chromatographic conditions and was generally 0.1 µg/g.

(Received December 27, 1999)

Key words: 試験法評価 method-performance study; 共同実験 Interlaboratory study; 告示試験法 notified analytical method; ダミノジッド daminozide; 1,1-ジメチルヒドラジン 1,1-dimethylhydrazine; *o*-ニトロベンズアルデヒド *o*-nitrobenzaldehyde; 併行再現性 repeatability; 室間再現性 reproducibility

緒 言

植物成長調整剤ダミノジッドは、平成4年10月に食品衛生法食品成分規格ですべての農作物について「不検出」の基準が定められ、試験法が告示された¹⁾。その後、平成11年11月に試験法が改正された²⁾。旧試験法はダミノジッドを試料から水抽出し、アルカリ分解及び水蒸気蒸留し1,1-ジメチルヒドラジンとして捕集し、発色試薬を加えて分光光度計で測定する方法であった¹⁾。この方法は定性

及び確認に困難を伴い、検出限界が高かった。新試験法は旧試験法と同様にして捕集した1,1-ジメチルヒドラジンを*o*-ニトロベンズアルデヒドで誘導体化してGCで測定する方法である^{2), 3)}。新試験法はGC/MSによる確認が可能であり、旧試験法に比べて検出感度も高い。

アルカリ分解、水蒸気蒸留を伴うダミノジッド試験法は操作が煩雑であることから、試験法の性能について複数の試験室で共同実験 (Interlaboratory study) を行って評価

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 日本食品衛生協会: 〒150-0001 東京都渋谷区神宮前 2-6-1

^{*3} 日本食品分析センター多摩研究所: 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

^{*4} 東京都予防医学協会: 〒162-8402 東京都新宿区市谷砂土原町 1-2

^{*5} 食品環境検査協会: 〒231-0003 横浜市中区北仲通 2-15

^{*6} 日本食品衛生協会食品衛生研究所: 〒425-0076 静岡県焼津市小屋敷 22-6

^{*7} 日本穀物検定協会中央研究所: 〒272-0144 千葉県市川市新井 2-17-3

^{*8} 千葉県薬剤師会検査センター: 〒260-0024 千葉市中央区中央港 1-12-14

Table 1. Results of Recovery Test of Daminozide

Laboratory	Recovery (%)									
	Rice		Soybeans		Grape		Apple		Tea	
A	80.4	86.4	73.4	74.1	80.2	78.1	80.7	85.0	70.2	71.6
B	76.9	85.1	74.5	69.7	79.7	72.0	81.2	83.8	78.1	80.0
C	78.0	81.0	66.8	60.7	88.0	89.2	93.5	97.7	84.3	81.7
D	80.6	88.1	75.9	72.3	88.4	84.8	78.6	85.1	67.9	75.5
E	61.6	66.7	52.6	58.8	91.9	89.8	75.9	74.3	66.2	77.6
F	78.1	83.3	75.3	76.1	89.1	81.4	81.0	89.4	77.4	76.9
Mean (%)	78.8		69.2		84.4		83.9		75.6	
Repeatability (RSD _r , %)	5.5		4.4		4.1		4.3		5.4	
Reproducibility (RSD _R , %)	10.2		11.8		7.4		8.5		7.5	
Spiked level ($\mu\text{g/g}$)	2		2		2		2		5	
Sample size (g)	5.0		5.0		10.0		10.0		2.0*	

* Six g of tea was extracted with 360 mL of hot water and 120 mL of the extract was used for analysis of 1,1-dimethylhydrazine.

することは意義がある。そこで、6 分析機関で添加回収試験を実施し、回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を評価したので報告する。

実験方法

1. 分析法

分析法は告示試験法²⁾に従った。

1.1 試薬

アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用試薬を使用した。

塩基性アルミナミニカラム：Sep-Pak Plus Alumina B (Waters 社製) を 5% アセトン-*n*-ヘキサン混液 10 mL でコンディショニングした。

液相分離ろ紙：1PS (Whatman 社製) 又は 2S (Advantec 社製) を使用した。

1% *o*-ニトロベンズアルデヒド-メタノール溶液：用時調製した。

ダミノジッド標準溶液：蒸留水で 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。

1,1-ジメチルヒドラジン標準溶液：蒸留水で 500 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。

1.2 装置

蒸留装置：ガラス製水蒸気蒸留装置^{1)~3)}

ガスクロマトグラフ：GC-NPD (Hewlett Packard 社製 5890, 6890) 又は GC-FTD ((株)島津製作所製 GC-14B)

ガスクロマトグラフ/質量分析計：Hewlett Packard 社製 HP-5890 (ガスクロマトグラフ), HP-5972 (質量分析計)

1.3 GC 及び GC/MS 測定条件

1) GC

カラム：DB-5 (J & W 社), Rtx-5 (Restek 社) 又は HP-5MS (Hewlett Packard 社), 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25~0.32 μm

カラム温度：60°C (2 min)-10°C/min-280°C (5 min)

注入口温度：260~280°C

検出器温度：280°C

キャリアーガス：ヘリウム

注入方法：スプリットレス (分析機関 D はスプリット)

2) GC/MS

カラム：DB-5MS (J & W 社), 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm

カラム温度：60°C (2 min)-10°C/min-280°C (5 min)

注入口温度：250°C

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化電位：70 eV

1.4 試験溶液の調製

玄米及び大豆は粉碎したもの 5.0 g, おどろ及びりんごはホモジナイズしたもの 10.0 g に水 80 mL を加え、振とう抽出し、吸引ろ過してろ液を得た。残さに水 40 mL を加え、同様に操作して、ろ液を合わせ、蒸留用丸底フラスコに入れた。茶は 6.0 g を 100°C の水 360 mL に浸し、室温で 5 分間放置後にろ過して得たるろ液 120 mL を蒸留用丸底フラスコに移した。

これに水酸化ナトリウム 60 g (野菜及び果実の場合は 65 g) を水冷しながら少量ずつ手早く加えて溶かし、消泡用シリコン 1~2 滴を加え、直ちに蒸留装置に取り付けた。

蒸留装置には、1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 5) 5 mL 及びフェノールフタレイン試液 2~3 滴を入れた 100 mL の三角フラスコを取り付け、あらかじめ水蒸気発生用のフラスコを加熱しておいた。約 15 分間で留液 45 mL を得るように加熱強度を調節し、水蒸気蒸留を行った。

留液に 1% *o*-ニトロベンズアルデヒド-メタノール溶液 1 mL を加え、30°C で 2 時間放置した。*n*-ヘキサン 50 mL ずつで 2 回抽出し、抽出液を液相分離ろ紙でろ過した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮乾固した。残留物を 5% アセトン-*n*-ヘキサン混液に溶かして塩基性アルミナミニカラムに注入し、5% アセトン-*n*-ヘキサン混液 10 mL で

溶出した。溶出液を濃縮後、残留物にアセトンを加えて 5 mL としたものを試験溶液とした。

1.5 検量線用溶液の調製

1,1-ジメチルヒドラジン標準溶液 1 mL に 1 mol/L リ

Fig. 1. Gas chromatogram of the derivative of 1,1-dimethylhydrazine

Peak 1: *o*-nitrobenzaldehyde, Peak 2: derivative of 1,1-dimethylhydrazine 0.50 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to 1.335 $\mu\text{g/mL}$ of daminozide)

Column: HP-5MS (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.32 μm)

Column oven temp.: 60°C (2 min)–10°C/min–280°C (5 min)

ン酸緩衝液 (pH 5) 5 mL 及び水 40 mL を加え、更に 1% *o*-ニトロベンズアルデヒド-メタノール溶液 1 mL を加えて 30°C で 2 時間放置した後、*n*-ヘキサン 50 mL ずつで 2 回抽出した。抽出液を液相分離ろ紙でろ過した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮乾固し、残留物をアセトンに溶解して 100 mL とした。これをアセトンで希釈して 0.1~5 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用溶液を調製した。

1.6 定量

試験溶液 2 μL をガスクロマトグラフに注入し、ピーク高法 (分析機関 B, C, E) 又はピーク面積法 (分析機関 A, D, F) により定量を行い、1,1-ジメチルヒドラジンの含量を求め、係数 2.67 を乗じてダミノジッドの含量を求めた。

2. 共同実験

共同実験のデザインは IUPAC のプロトコール⁴⁾を参考に、試料数: 5 (プロトコールでは最低 5)、試験室数: 6 (プロトコールでは最低 8、高価な機器や特別な試験室を必要とするなどの事情がある場合は 5)、繰り返し数: 2 (プロトコールでは 2) とした。

すなわち、玄米、大豆、ぶどう、りんご及び茶の 5 作物について、6 分析機関でダミノジッドの添加回収試験を実施した。各機関で粉碎又はホモジナイズした各作物 (茶

Fig. 2. Gas chromatograms of sample solutions prepared from unpolished rice (A) and grape (B) spiked with 2 $\mu\text{g/g}$ of daminozide

Fig. 3. Mass spectrum of the derivative of 1,1-dimethylhydrazine

は浸出液)にダミノジッド標準溶液を $2 \mu\text{g/g}$ (茶は $5 \mu\text{g/g}$) となるように添加し、無添加1試料及び添加2試料を分析した。

3. 実験結果の統計処理

各作物について得られた12個(6分析機関×2個)の回収率の値をAOACの統計処理マニュアル⁵⁾に従って解析し、作物ごとに回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。解析に際して、「はずれ値」の棄却は行わなかった。再現性評価の基準としてHorwitzの式⁶⁾を使用した。

結果及び考察

分析機関A, C, E, Fが分析した無添加試料では1,1-ジメチルヒドラジン誘導体の保持時間に一致するピークは検出限界以下であった。分析機関Bでは米($0.48 \mu\text{g/g}$)及び大豆($0.23 \mu\text{g/g}$)から、分析機関Dでは各作物から $0.1 \mu\text{g/g}$ のダミノジッドに相当するピークが検出された。機関B及びDではGC/MSによる確認は行わなかったが、検出されたピークをダミノジッドとして定量し、添加試料の分析値から差し引いて回収率を求めた。

各機関で求めた各作物からの回収率、その平均値、併行再現性の相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現性の相対標準偏差(RSD_R)をTable 1に示した。

大豆からの回収率がやや低かった(平均69.2%)が、他の作物では75.6~84.4%の回収率が得られた。大豆は水抽出時のろ過が困難であったことが低回収率の原因と考えられる。大豆抽出液は蒸留時に突沸しやすいので、一部の分析機関では抽出液の1/2量を採って蒸留した。

各作物の RSD_r は4.1~5.5%であり、作物による差は小さかった。 RSD_R は7.4~11.8%であり、抽出及び蒸留が困難であった大豆では、分析機関による回収率の差が大きかったために RSD_R が比較的高く、11.8%であった。2~ $5 \mu\text{g/g}$ レベルの分析における RSD_R は、Horwitzの式に従えば12.6~14.4%であり、 RSD_r は RSD_R の1/2~

2/3といわれている⁶⁾。今回得られた RSD_R は最大11.8%であり、Horwitzの式から得られる値を下回っていた。また、 RSD_r は最大5.5%であり、併行再現性、室間再現性ともに良好な結果と言える。

標準品及び添加試料のガスクロマトグラム例をそれぞれFig. 1及びFig. 2に示した。また、1,1-ジメチルヒドラジン誘導体のマスペクトルをFig. 3に示した。分析機関Bの米、大豆及び分析機関Dの各作物以外のクロマトグラムには1,1-ジメチルヒドラジン誘導体の保持時間に一致する大きなピークは検出されなかった。

検量線用溶液から求めた検出限界($\text{S/N}=3$)は機関による差が大きかったが、穀類で $0.01\sim0.2 \mu\text{g/g}$ 、野菜で $0.01\sim0.05 \mu\text{g/g}$ 、試料量が少ない茶では $0.03\sim0.3 \mu\text{g/g}$ であった。茶は最終試験溶液量を1 mLにすることで、全機関で $0.1 \mu\text{g/g}$ の検出限界が達成可能であった。なお、旧試験法の検出限界は0.5 ppmと通知されている⁷⁾。

新試験法はGC及びGC/MSを使用するので、旧試験法に比べ感度が高く、同定が容易且つ確実であった。

謝 辞

本研究は厚生省生活衛生局の汎用農薬分析調査研究費により、食品衛生指定検査機関協議会・技術検討委員会(残留農薬作業部会)の協力で実施した。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省告示第239号(1992)“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成4年10月27日。
- 2) 厚生省告示第237号(1999)“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成11年11月22日。
- 3) Noyaku Zanryubunsekiho Kenkyukai ed. “Saishin Noyaku No Zanryu Bunsekiho”, Tokyo, Chuohoki Shuppan, 1995, p. 179. (ISBN 4-8058-1321-0)
- 4) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure Appl.

- Chem., **67**, 331-343 (1995).
- 5) Youden, W. J., Steiner, E. H. "Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists", Arlington, 1975, p. 72~83. (ISBN 0-935584-15-3)
 - 6) Pocklington, W. D., Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. Pure Appl. Chem., **62**, 149-162 (1990).
 - 7) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知 "食品, 添加物等の規格基準の一部改正について" 平成4年10月27日, 衛化第76号 (1992).