

ドジン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ドジン

2. 適用食品

農産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 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。

ドジン標準品 本品はドジン 97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆及び種実類の場合

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液を正確に 20 mL 分取し、40°C 以下で約 5 mL に濃縮する。これに *n*-ヘキサン 20 mL を加え、アセトニトリル及び 0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 40 mL ずつで 3 回振とう抽出する。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で約 20 mL に濃縮する。これに 1 w/v% 炭酸水素ナトリウムを含む 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 mL 及び 25 mL で 2 回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かす。

② 果実及び野菜の場合

試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液を正確に 10 mL 分取し、40°C 以下で約 5 mL に濃縮する。これに 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 mL 及び 25 mL で 2 回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除

去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かす。

③ 茶の場合

試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液を正確に 4 mL 分取し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 mL 及び 25 mL で 2 回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

① 穀類、豆類、種実類、果実及び野菜の場合

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。アセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 2 mL で 1) で得られた溶液が入っていた容器を洗い、洗液を先のカラムに注入する操作を 2 回繰り返す、さらにアセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 6 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶解し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

② 茶の場合

a エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。アセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 2 mL で 1) で得られた溶液が入っていた容器を洗い、洗液を先のカラムに注入する操作を 2 回繰り返す、さらにアセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 6 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸、トルエン及びメタノール (1 : 25 : 75) 混液 3 mL を加えて溶かす。

b グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にギ酸、トルエン及びメタノール (1 : 25 : 75) 混液 10 mL を注入し、溶出液は捨てる。このカラムに a で得られた溶液を注入した後、ギ酸、トルエン及びメタノール (1 : 25 : 75) 混液 7 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶解し、

正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ドジン標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、茶以外の農産物では試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.005 mg/L であり、茶では試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.001 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でドジンの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS 又は LC-MS/MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 µm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び 0.1 vol%ギ酸混液 (1:3) から (1:1) までの濃度勾配を 20 分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)

LC-MS：229、228

LC-MS/MS：プリカーサーイオン 228、プロダクトイオン 57、43

注入量：5 µL

保持時間の目安：12 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ドジンを試料からアセトンで抽出し、果実、野菜及び茶はそのまま、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル及び塩酸混液/ヘキサン分配により脱脂した後、酢酸エチルに転溶する。茶以外の場合はエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで、茶の場合はエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC-MS 又は LC-MS/MS で定量及び確認する方法で

ある。

2) 注意点

- ① ドジンは、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製における洗浄溶媒であるアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液への溶解が不十分なため、容器内に残留して損失の原因となる場合がある。そのため、溶出溶媒のアセトン及びメタノール (4 : 1) 混液で容器を洗い、洗液をカラムに注入する操作を行う必要がある。
- ② 茶以外の農産物で色素の除去が不十分な場合、グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) による精製を追加すると良い。
- ③ エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製後の残留物は、LC-MS (MS) 測定に用いる移動相に対する溶解が不十分であり、また、ドジンは、アセトニトリルに対する溶解が不十分であることから、ドジンが容器に残留して損失の原因となる場合があるが、メタノールを用いれば十分に溶解することから、試験溶液はメタノール溶液とする。
- ④ ドジンの LC-MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : 228
定性イオン (m/z) : 229
- ⑤ ドジンの LC-MS/MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 228、プロダクトイオン 43
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 228、プロダクトイオン 57

12. 参考文献

なし

13. 類型

C