

2, 4, 5-T 試験法

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。
アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

エーテル ジエチルエーテル。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、オクタデシルシリル化シリカゲル1,000mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500mg/500mg) 内径約12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にグラファイトカーボンを、下層にエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル各500mg充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

トルエン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

2, 4, 5-T 本品は2, 4, 5-T 98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 g に水20mlを加え、30分間放置する。これに4 mol/l 塩酸5 ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセト

ン50mlを加えて細切均一化した後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に10mlを採り、10w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:1)100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物にn-ヘキサン30mlを加え、アセトニトリル及び水の混液(99:1)30mlずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0gに4mol/l塩酸5ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に5mlを採り、10w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:1)100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

③ 茶及びホップの場合

試料5.00gに水20mlを加え、30分間放置する。これに4mol/l塩酸5ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に10mlを採り、10w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:1)100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物にn-ヘキサン30mlを加え、アセトニトリル及び水の混液(99:1)30mlずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

④ 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵並びに魚介類の場合

試料10.0gに4mol/l塩酸5ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に10mlを採り、10w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:1)100ml及び50mlで2回振とう抽出す

る。抽出液を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に *n*-ヘキサン30mlを加え、アセトニトリル及び水の混液（99：1）30mlずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

⑤ 脂肪の場合

試料5.00 gに4 mol/l塩酸5 ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に20mlを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサンの混液（1：1）100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に *n*-ヘキサン30mlを加え、アセトニトリル及び水の混液（99：1）30mlずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

⑥ はちみつの場合

試料10.0 gに水20mlを加えて溶かす。これに4 mol/l塩酸5 ml及びアセトン100mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50mlを加え、細切均一化した後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。

この溶液から正確に10mlを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサンの混液（1：1）100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

b 加水分解

a 抽出法で得られた残留物にメタノール2 mlを加えて溶かし、1.5 mol/l水酸化ナトリウム溶液1 mlを加える。これに還流冷却器を取り付けて、80℃の水浴中で30分間加熱した後、放冷する。これに1.5 mol/l塩酸を加えてpH7.5～8.0に調整し、0.1 w/v%炭酸水素ナトリウム溶液16mlを加える。

c 精製法

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000mg）にメタノール10ml及び水10mlを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにb 加水分解で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。

次いで、0.1w/v%炭酸水素ナトリウム溶液及びメタノールの混液（1：1）20mlを注入し、溶出液に4mol/l塩酸5mlを加えてpH1以下に調整する。これに10w/v%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、エーテル50mlずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及びトルエンの混液（3：1）3mlを加えて溶かす。

② グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層カラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500mg/500mg）にアセトニトリル及びトルエンの混液（3：1）10ml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、更にアセトニトリル及びトルエンの混液（3：1）7mlを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル、ギ酸及びトルエンの混液（75：1：25）30mlを注入し、溶出液を40℃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かし、正確に1ml（茶及びホップの場合には正確に0.5ml）としたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

2, 4, 5-T標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお、4. 試験溶液の調製に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.01mg/kgに相当する試験溶液中の濃度は0.005mg/lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成により2, 4, 5-Tの含量を求める。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃に保持する。

移動相：5 mmol/l 酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/l 酢酸アンモニウム・メ

タノール溶液の混液（7：3）から（1：9）までの濃度勾配を20分間で行う。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ネガティブイオンモード

主なイオン（m/z）：

プリカーサーイオン253、プロダクトイオン195

プリカーサーイオン255、プロダクトイオン197

注入量：5 μ l

保持時間の目安：12分