

## 2, 4, 5-T 試験法 (案)

2, 4, 5-Tは、ポジティブリスト制度導入時に、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として新たに定められた。

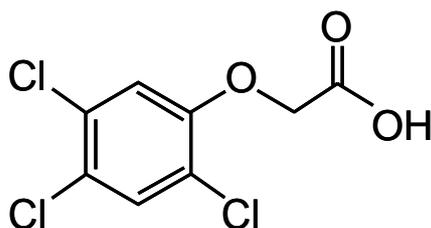
従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。当該成分の試験法については、厚生省告示第370号において示されているが、この試験法は畜水産物について、その試験法の性能が評価されたものではなかった。

そのため、開発が進められてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

### 1. 概要

#### (1) 分析対象の化合物

2, 4, 5-T



#### (2) 分析対象食品

農産物

畜水産物

#### (3) 試験法の概要

2, 4, 5-Tを試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液に転溶する。脂質等が多い試料についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。加水分解した後、オクタデシ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/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で精製した後、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計で定量及び確認する方法である。

#### (4) 検出限界 0.01 mg/kg

### 2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として添加回収試験（添加濃度 0.01 ppm）を行い、真度及び併行精

度の確認を実施した。

農産物：玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶及びコーヒー豆

畜水産物：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

表 検討結果の真度及び併行精度（試行数5で実施）

	対象食品	検討結果	目標値
真度	農産物	80～112%	70～120%
	畜水産物	79～107%	
併行精度	農産物	3～13%	25%未満
	畜水産物	0.4～13%	

### 3. 答申案

別紙のとおり。

(参考) これまでの経緯

平成17年11月29日 残留基準告示

平成28年 9月16日 残留農薬等公示分析法検討会で検討

平成28年12月20日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会

平成28年12月20日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知

平成28年12月21日 薬事・食品衛生審議会へ諮問

平成28年12月27日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
石井 里枝	埼玉県衛生研究所化学検査室長
○大野 泰雄	公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室教授
佐々木 一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤 清	一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
佐野 元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山 敏廣	明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授
根本 了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
宮井 俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)

答申(案)

## 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 を充てん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 500 mg 充てん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 標準品 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 10.0g に水 20 ml 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 100 ml 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 100 ml を加え、酢酸エチル及

びn-ヘキサン（1：1）混液 100 ml 及び 50 ml 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（99：1）混液 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 20.0 g に 4 mol/l 塩酸 5 ml 及びアセトン 100 ml 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 5 ml を分取し、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（1：1）混液 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 20 ml 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 50 ml 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 200 ml とする。

この溶液から正確に 10 ml を採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 ml を加え、酢酸エチル及びn-ヘキサン（1：1）混液 100 ml 及び 50 ml 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（99：1）混液 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 10.0 g に 4 mol/l 塩酸 5 ml 及びアセトン 100 ml 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 50 ml 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 200 mL 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（1：1）混液 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（99：1）混液 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 5.00g 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 20ml 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(1:1)混液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(99:1)混液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10.0gに水20mlを加えて溶かす。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(1:1)混液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2mlを加えて溶かし、1.5mol/l水酸化ナトリウム溶液1ml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、1.5mol/l塩酸を加えてpH7.5~8.0に調整し、0.1w/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)にメタノール及び水各10mlを順次注入し、各流出液は捨てる。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(1:1)混液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(3:1)混液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(3:1)混液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、さらにアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液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(75:1:25)混液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解し、抹茶及びホップ以外の場合は正確に1ml、抹茶及びホップの場合は正確に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、試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は 0.005 mg/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 の検量線で 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

(例)

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

カラム温度：40°C

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（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

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  $\mu$ l

保持時間の目安：12 分