

2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

2,4-D

2,4-DB

クロプロップ

2. 適用食品

農産物

3. 装置

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。

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（500 mg/500 mg） 内径約12~13 mm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。

2,4-D標準品 本品は2,4-D 98 %以上を含む。

2,4-DB標準品 本品は2,4-DB 98 %以上を含む。

クロプロップ標準品 本品はクロプロップ 98 %以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これに4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン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を分取し、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、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、アセトニトリル及び水（99 : 1）混液30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C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、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5 mLを分取し、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、ろ液を40°C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5.00 g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、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を分取し、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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

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

2) 加水分解

1) 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°C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pH 7.5～8.0に調整し、0.1 w/v%炭酸水素ナトリウム溶液16 mLを加える。

3) 精製

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（1,000 mg）にメタノール及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、0.1 w/v%炭酸水素ナトリウム溶液及びメタノール（1：1）混液20 mLを注入し、溶出液に4 mol/L塩酸5 mLを加えてpH 1以下に調整する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、エーテル50 mL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°C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3 mL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（500 mg/500 mg）にアセトニトリル及びトルエン（3：1）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、さらにアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液7 mL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30 mL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、茶及びホップ以外の場合は正確に1 mL、茶及びホップの場合は正確に0.5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ各標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれ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、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。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で2,4-D、2,4-DB及びクロプロップの含量を求める。

8. 確認試験

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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μ 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：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）

2,4-D：プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 161

プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 163

2,4-DB：プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 161

プリカーサーイオン 249、プロダクトイオン 163

クロプロップ：プリカーサーイオン 199、プロダクトイオン 127

プリカーサーイオン 201、プロダクトイオン 129

注入量：5 μ L

保持時間の目安

2,4-D：9分

2,4-DB：13分

クロプロップ：8分

10. 定量限界

2,4-D：0.01 mg/kg

2,4-DB：0.01 mg/kg

クロプロップ：0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。2,4,5-Tも同時分析が可能な方法である。

2) 注意点

- ① 2,4-Dには、加水分解により2,4-Dに変換される化合物（2,4-D ナトリウム塩、2,4-D ジメチルアミン塩、2,4-D エチル、2,4-D イソプロピル、2,4-D ブトキシエチル及び2,4-D アルカノールアミン塩等）が含まれる。2,4-DBには、加水分解により2,4-DBに変換される化合物（2,4-DB ナトリウム塩、2,4-DB カリウム塩、2,4-DB ブチル、2,4-DB イソオクチル及び2,4-DB ジメチルアミン塩等）が含まれる。
- ② 2,4-D、2,4-DB及びクロプロップは塩基性で水溶性となるため、抽出及び転溶時には酸性に保つ必要がある。
- ③ 夾雑成分の影響でLC-MS/MSで感度上昇あるいは感度下降が見られる時は、測定条件の濃度勾配の時間を適宜変更するなどして測定すること。

- ④ 2,4-D、2,4-DB及びクロプロップの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。

2,4-D

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 161

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 163

2,4-DB

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 161

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 249、プロダクトイオン 163

クロプロップ

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 199、プロダクトイオン 127

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 201、プロダクトイオン 129

- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：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

12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0315001号「2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ試験法（農産物）」（平成18年3月15日）

平成6年厚生省告示第199号「2,4,5-T試験法」

13. 類型

C