

#### 4. 留意点

- 1) 本法で確実に定性出来る最小量はグルホシネートの絶対量として約  $2\mu\text{g}$  である。  
これは  $20\mu\text{l}$  負荷の場合  $100\text{ppm}$  以上の試料について定性が可能ということである。
- 2) 試料中に不溶物が認められる場合には、ろ過あるいは遠心分離により取り除く。
- 3) グルホシネート以外でアミノ酸構造を含む除草剤（ピアラホス剤並びにグリホサート剤）も同様の呈色を示すため、標準液と試料のスポット位置（R f 値）の比較は慎重に行う必要がある（表 1 及び参考文献を参照）。

表 1 : 生体試料中に含まれるグルホシネート及びピアラホス並びにグリホサートの R f 値  
(一例)

生体試料	ピアラホス	グルホシネート	グリホサート
標準品	0.86	0.39	0.18
血清	0.86	0.42	0.20
尿	0.86	0.42	0.20
胃液	0.86	0.41	0.19
ピアラホスの R f 値	: 0.86		
グルホシネートの R f 値	: 0.39 - 0.42		
グリホサートの R f 値	: 0.18 - 0.20		

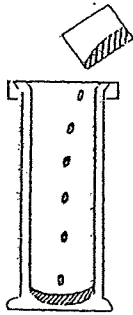
出典 : A.Suzuki, M.Kawana, 1989

Rapid and Simple Method for Identification of Glufosinate-ammonium  
using Paper Chromatography.

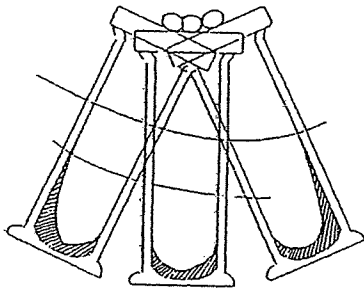
Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology.

Vol.43, No.1 (1989)

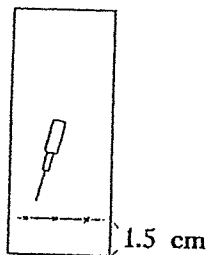
## バスタ定性キット操作手順図説



- 1)  
10%酢酸水溶液を展開槽に入れる  
(50ml)

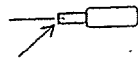


- 2)  
フタをして展開槽を振り、側面に酢酸水溶液をつけ、展開槽内を酢酸蒸気でできるだけ飽和させる。

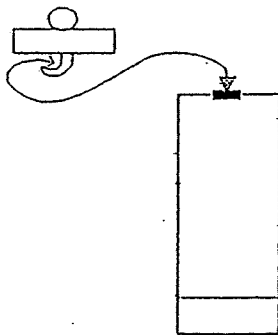


- 3)  
イオン交換セルローズ濾紙に鉛筆で下から約 1.5cm のところに図のように線を引き、その線上にグルホシネート標準液と生体試料をマイクロ毛細管でスポットする。(マイクロ毛細管は試料毎に交換する)

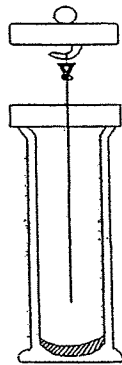
マイクロ毛細管      ピペット



真ん中の穴に差し込む

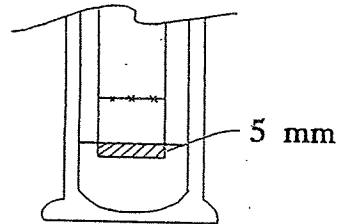


- 4)  
スポットが完全に乾いた後、濾紙をクリップなどで挟み、展開槽のフタの内側にあるフックに引っかける。



5)

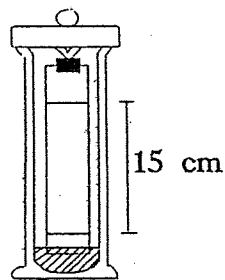
濾紙を展開槽に入れるときは濾紙が展開槽の側面に触れないようにする。



6)

フタをした時、濾紙の下端から約 5 mm が酢酸溶液に浸かるのが良い。

もし、濾紙の下端が酢酸溶液まで届かないときは酢酸溶液を加える。逆に 1 cm 以上浸かりそうなときは、濾紙の上部を少し切り落とし、調製する。

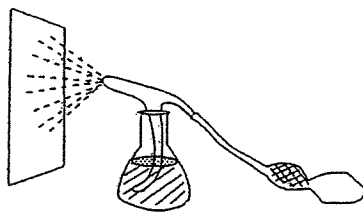


7)

濾紙が酢酸溶液を、試料をスポットした線から約 15 cm 吸い上げた時点で展開を終了する。

8)

取り出した濾紙は 70~100°C の乾燥機内で乾燥させる。乾燥機がない場合にはドライヤーで乾燥させても差し支えない。



9)

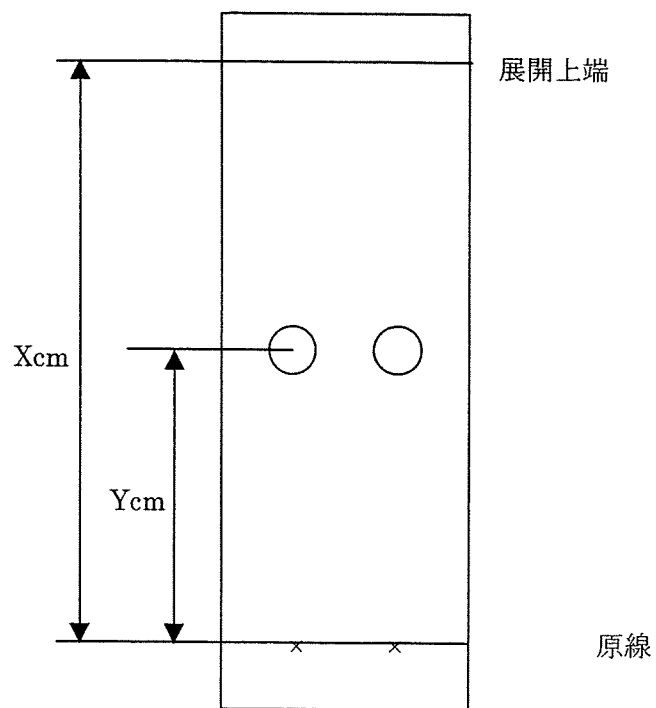
噴霧器に 1% ニンヒドリン水溶液を入れ、ゴムフイゴをつけ、乾燥させた濾紙に噴霧する。(ドラフト等の施設がある場合はその中で行う。ない場合はできるだけ換気の良い場所で行う。)

10)

再度 70~100°C の乾燥機で数分間乾燥し、発色させる。乾燥機がない場合にはドライヤーでも差し支えない。

別紙

R f 値の求め方



$$R f \text{ 値} = Y c m / X c m$$

## **Rapid and Simple Method for Identification of Glufosinate-ammonium Using Paper Chromatography**

A. Suzuki and M. Kawana

Analytical Laboratory, Agricultural Division, Hoechst Japan Limited,  
3-2 Minamidai 1—chome, Kawagoe-shi, Saitama, 350 Japan

Glufosinate-ammonium (ammonium DL-homoalanine-4-yl (methyl)phosphinate) liquid (tradename BASTA liquid) developed by Hoechst AG, F. R. Germany, is a herbicide with a wide field of application. It is the ammonium salt of a phosphorus containing amino acid and therefore reacts with ninhydrin to produce the characteristic color-reaction. Taking note of this feature of glufosinate-ammonium, the authors have developed a rapid and easy method which makes possible the separation and identification of glufosinate-ammonium in samples taken from biological fluids (blood, urine, gastric-juice), even in the presence of other pesticides of similar chemical structure.

### **MATERIALS AND METHODS**

Glufosinate-ammonium (hereinafter called glufosinate), analytical standard (purity 99.5%), was supplied by Hoechst AG. Liquid formulation of glufosinate (content of active ingredient 18.5%), bialaphos (content of active ingredient 32.0%) and glyphosate (content of active ingredient 41.0%) were commercially available products. Acetic acid, trichloroacetic acid (TCA) and ninhydrin were reagent grade. Deionized water was used to prepare solutions. A ion-exchange cellulose filter paper (Whatman® DE-81) was used for paper chromatography.

A centrifuge, an oven, an atomizer (used with rubber bulbs), a micro-syringe, and a chromatographic development chamber (glass, 25(W) × 11(D) × 26(H) cm) were used in this study.

Commercially available glufosinate liquid was diluted 100 fold with deionized water and used as the standard solution. 1 mL of this solution contained about 1 mg of glufosinate.

Human urine and gastric-juice, plasma and serum from dogs were used as samples. To each 1 mL of the above four samples, 0.5 mL of the glufosinate standard solution was added and mixed (500 µg glufosinate / mL). Plasma and serum samples were submitted to a deproteinization process. (Deproteinization: to each 1 mL of plasma or serum, 1 mL of

---

Send reprint requests to A. Suzuki at the above address.

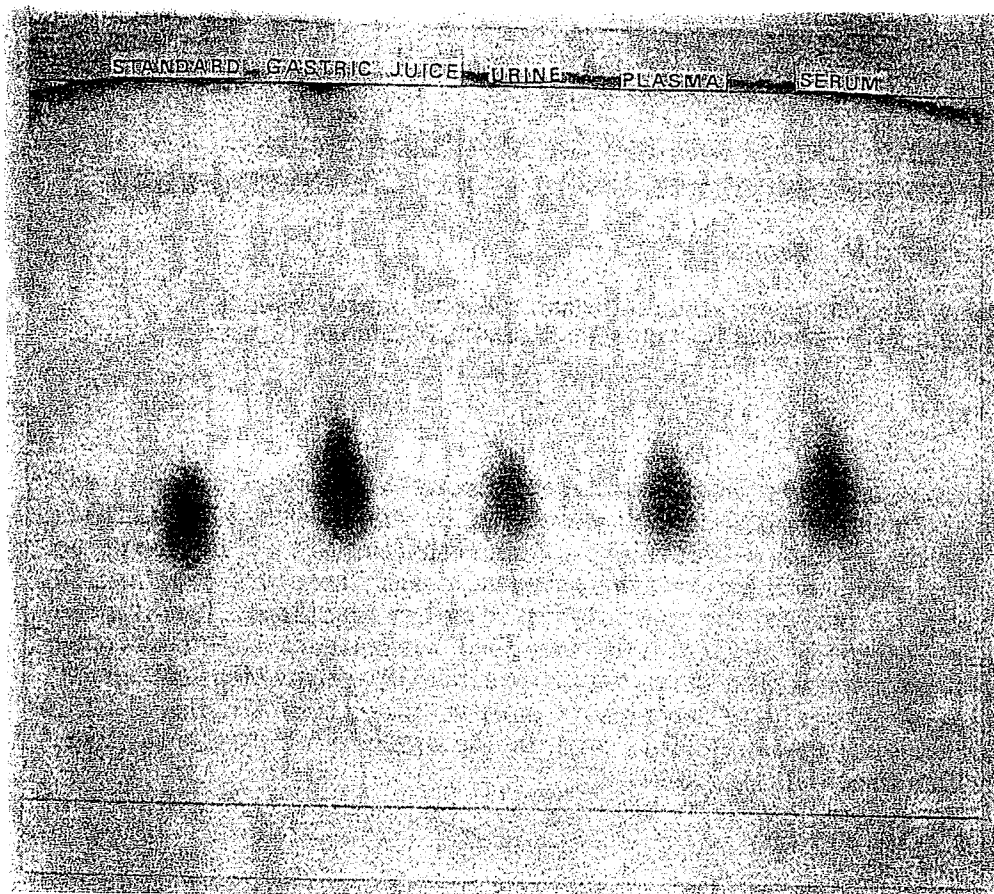


Figure 1. Identification of glufosinate in biological fluids

5% TCA aqueous solution was added. The mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The supernatant was used as sample. The deproteinization was done at room temperature.) Urine and gastric-juice samples were used without deproteinization. The plasma, serum, urine and gastric-juice samples were spotted in that order at even intervals beginning from the right edge of the ion-exchange cellulose filter paper ( $20 \times 20$  cm, hereinafter called filter paper) 1.5 cm from the lower edge of the filter paper. The glufosinate standard solution was spotted lastly as control. For each of the samples and the standard solution, the quantity applied was  $10 \mu\text{L}$ . Microsyringe was used for application. After application, the filter paper was air-dried.

10% aqueous acetic acid was used as the developing solvent mixture. The atmosphere of the chromatographic development chamber was saturated with the vapours of the solvents prior to the experiment. The filter paper was placed in the chamber carefully so that 5 mm of its lower edge was immersed into the solvent without touching the walls of the chamber. The chamber was closed airtight, and the development was allowed to proceed at room temperature. When the solvent front advanced 15 cm over the starting line where the samples had been applied, the filter paper was taken out from the chamber and dried in an oven at  $100^\circ\text{C}$ .

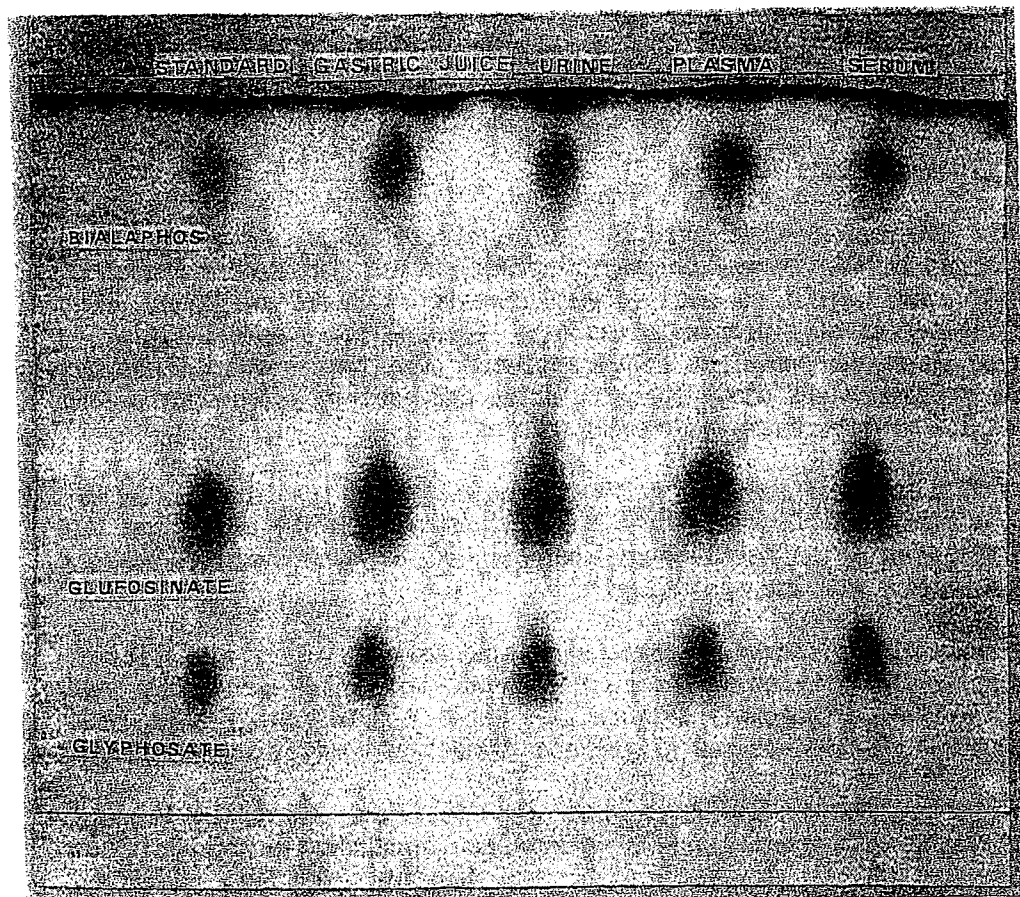


Figure 2. Identification of glufosinate, bialaphos and glyphosate in biological fluids

After drying, 1% ninhydrin aqueous solution was sprayed uniformly onto the filter paper by using an atomizer. The filter paper was put into the oven at 100 °C for 5 min for color development. Sites of the spots of the four samples were compared with that of glufosinate standard solution.

50 mg of analytical grade glufosinate was dissolved in deionized water. The solution volume was adjusted to 100 mL. The solution was further diluted with deionized water in order to prepare solutions of different concentrations of glufosinate. Aliquots of these solutions were added to plasma, serum, urine and gastric-juice. Using these samples, the identification limit for glufosinate was determined according to the method described for the identification of glufosinate.

Bialaphos (Tachibana et al. 1986) and glyphosate (Henriet et al. 1985) are compounds having a similar chemical structure to glufosinate. The above method was applied to distinguish glufosinate from the other two pesticides and to identify the three pesticides simultaneously. Equal amounts of 100 fold diluted solutions of bialaphos and glyphosate liquid formulations and the standard solution of glufosinate were mixed

to obtain the standard mixture. To 1 mL each of plasma, serum, urine and gastric-juice, 0.5 mL of the standard mixture was added. Further procedure was the same as described for the identification of glufosinate.

## RESULTS AND DISCUSSION

On the chromatogram (Figure 1), the spots of 5  $\mu$ g of glufosinate contained in the plasma, serum, urine and gastric-juice were detected at the same height as that of glufosinate standard solution. The identification of glufosinate was easy, because there were no interfering spots derived from coextractives. The time required for the whole procedure was about 1 hr for urine and gastric-juice samples and about 1.5 hr for plasma and serum samples.

In all samples of serum, plasma, urine and gastric-juice, 2  $\mu$ g of glufosinate was identified as the minimum detectable amount on the chromatogram after development when 50  $\mu$ L of each sample (40  $\mu$ g glufosinate / mL) was spotted.

In all samples of serum, plasma, urine and gastric-juice, glufosinate, bialaphos and glyphosate were distinguished from each other and identified simultaneously (Figure 2). Table 1 shows the Rf values of bialaphos, glufosinate and glyphosate in each of the biological fluids.

In summary, the method described above allowed identification of glufosinate with usually available equipments and simple procedures in a very short time. An amount of 2  $\mu$ g of glufosinate was sufficient to be detected. The method also enabled us to distinguish glufosinate from bialaphos and glyphosate. Therefore, the method can be regarded as a useful method to identify water soluble glufosinate easily, selectively and quickly.

Table 1. Rf values of bialaphos, glufosinate and glyphosate contained in biological fluids

	Bialaphos	Glufosinate	Glyphosate
Standard solution	0.86	0.39	0.18
Gastric-juice	0.86	0.41	0.19
Urine	0.86	0.42	0.20
Serum	0.86	0.42	0.20
Plasma	0.86	0.42	0.20

Rf value of bialaphos : 0.86  
 Rf value of glufosinate: 0.39 - 0.42  
 Rf value of glyphosate : 0.18 - 0.20



Acknowledgments. The authors wish to thank Dr. M. Schwalbe-Fehl of Hoechst AG for her helpful advice and Dr. H. Stuebler of Hoechst Japan Limited for his support.

#### REFERENCES

Henriet J, Martijn A, Povlsen HH (1985) CIPAC Handbook 1C.  
Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited,  
Hertfordshire, England

Tachibana K, Kaneko K (1986) Development of a new herbicide, Bialaphos  
Journal of Pesticide Science 11:297-304

Received September 15, 1988; accepted January 16, 1989.

## 2) 薬毒物の簡易検査 (Toxi-Lab)

試料：尿

株式会社サンアクティス

武蔵 徹

## トキシラボについて

(株) サンアクティス東京営業所 所長 山根哲夫

- 1 概要：水溶液中及びヒトや動物の尿・血液または吐瀉物の中に存在する、未知の薬物と、その代謝物を迅速に定性し、スクリーニングすることができる。
- 2 原理：薄層クロマトグラフィー (TLC)
- 3 検体：水溶液及びヒトや動物の尿・血液・吐瀉物・胃内容物等。
- 4 検出可能薬物：日本国内で使用している医薬品のうち約 140 種とその代謝物。さらにデータを集積することにより 4000 種以上可能。
- 5 検出可能濃度：0, 5  $\mu\text{g}$  ~ 数  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- 6 検出所要時間：約 45 分 (但し、数検体を同時に検出可能)。
- 7 特徴：本器と HPLC・GC/MS との併用により、薬物の同定と定量が短時間で可能となる。

## 操作法

今回はトキシラボシステム A のみを行う。

- 1 抽出 検体をトキシチューブの上端の矢印までとり、2 分間転倒混和した後、3000rpm で 5 分間遠心分離する。
- 2 濃縮 トキシディスクを 2 枚とり、オメガ 12 にセットしたアルミカップに 1 枚ずつ入れる。遠心分離されたトキシチューブの上澄液をとり、トキシディスクの入ったアルミカップに量を変えて (一方に 5 滴、もう一方に残り全部) を入れる。次にオメガ 12 をヒートプレート上へのせ加熱乾燥させる。
- 3 接種 目で乾燥を確認したトキシディスクをトキシグラムを中心穴に挿入し凸凹のないようにします。
- 4 展開 規定量の展開液を展開ジャーにとり、強アンモニア水 (量はトキシグラム瓶に表示) を加え、数秒間強振する。トキシグラムを展開ジャーに入れ、フタをした後、展開を見守ります。(約 15 分間) ピンクのマーカがトキシグラム上の口盛り 9.5 の位置に達したら、トキシグラムを展開ジャーから取り出し、ヒートプレート上で加熱、乾燥させる。

- 5 検出操作 検出されたスポットは、全てワークシートに記録します。
- ① 4 のトキシグラムを A-1 瓶に入れ、蓋を閉めてホルマリンガスに約 10~15 分間さらします。
  - ② トキシグラムを取り出しヒートプレート上に下 2/3 を 10 秒間程度かざします。
  - ③ STAGE-I トキシグラムを A-2 の濃硫酸に約 2 秒間浸す。  
(記録) 約 20 秒間放置しスポットに変化あれば記録を付け加える。
  - ④ STAGE-II トキシグラムを H<sub>2</sub>O に約 1 秒間浸す。数秒後、標準薬物の Imipramine の青色のスポットが出たら記録する。その後数回その水で洗浄、変化あれば記録する。
  - ⑤ STAGE-III トキシグラムをペーパータオルで水きりをし、UV ランプで観察する。(スポットの蛍光・吸収・neg を記録)
  - ⑥ STAGE-IV トキシグラムを A-3 のドラゲンドルフ液に約 10 秒間浸し、スポットの状態を記録する。この際、標準薬物の Caffeine の灰色のスポット及び Meprobamate の薄茶色のスポットが出ていることを確認する。
- 5 結果判定 以上すべてを記録したワークシートを基にドラッグコンペンジウムを検索して未知薬物を推定する。この際 R<sub>f</sub> 値の小さい方から検索する。A システムは主に塩基性及び中性薬物、B システムは主に酸性及び中性薬物の検出が中心です。
- 6 同定 要すれば、6 で推定した薬物の既知データを基に、HPLC または GC/MS を使い薬物を同定する。

# 目 次

	<u>ページ</u>
トキシ・ラボの構成 .....	1
トキシ・ラボの操作方法 .....	4
コンペンジウム（トキシ・ラボ専用薬物要覧）について .....	10
トキシ・ラボAにおける代表的薬物の位置と色調（R f 順） .....	11
薬効分類別、最重要ステージについて .....	13
各過程におけるチェックポイント（精度管理） .....	15
トラブルシューティング .....	16

## トキシラボの構成

### 本体

1. ワークステーション	1 式
2. UVランプ	1 個
3. コンペンジューム	1 個
4. トキシ・ラック (展開瓶付)	2 個
5. ヒート・プレート	1 台
6. オメガ12	1 個
7. マイクロディスペンサー	1 式
8. ヒート・ガン (ホルダー付)	1 式
9. 展開瓶	2 個
10. 展開液ストック瓶	2 個
11. 試薬ストック瓶	4 個
12. ディスク処理ピン	3 本
13. 反応瓶	6 本
14. A-1 用蒸気浴瓶	1 本
15. ピンセット	1 個
16. カラー検索ガイド (A, B 各 1 枚)	2 枚
17. 取扱説明書等 (操作ビデオ付)	1 式

### 消耗品

1. トキシ・グラムA	100 枚入	1 瓶
2. トキシ・グラムB	100 枚入	1 瓶
3. トキシ・チューブA	100 本入	1 箱
4. トキシ・チューブB	100 本入	1 箱
5. トキシ・ディスクA	100 枚入	2 個
6. トキシ・ディスクB	100 枚入	2 個
7. ワークシートA	100 枚	1 冊
8. ワークシートB	100 枚	1 冊
9. A-3 試薬	50 回分	2 個
10. B 試薬セット	50 回分 (B-1, 2, 3)	2 個
11. 濃縮用アルミカップ	500 個入	1 箱
12. 酢酸エチル	500 g 入	1 瓶

## 各消耗品の内容説明

### 1. トキシ・チューブ

検体（尿、血清、胃内容物）中より薬物を抽出するためのチューブ。

#### ① トキシ・チューブA

緩衝剤が入っており、pH 9.0 になるよう調整されている。

〔成分〕

炭酸ナトリウム	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.133 g
炭酸水素ナトリウム	$\text{NaHCO}_3$	0.133 g
塩化メチレン	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.684 g
二塩化エチレン	$\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$	0.646 g

#### ② トキシ・チューブB

緩衝剤が入っており、pH 4.5 になるよう調整されている。

〔成分〕

塩化亜鉛	$\text{ZnCl}_2$	1.517 g
塩化メチレン	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1.353 g

### 2. トキシ・ディスク

トキシ・チューブで検体より抽出した薬物を含浸させるための、直径約 3 mm のディスク。

トキシ・ラボA用とB用とがあり、ディスク表面には、“A”又は“B”と印刷されている。

### 3. トキシ・グラム

ガラス繊維にシリカゲルをコーティングした薄層。

トキシ・グラム下部には6ヶ所の穴があいており、その内4ヶ所には、あらかじめ標準ディスク（標準薬物を含浸させてあるディスク）がセットされている。

残り2穴は、ブランクになっており、使用時にトキシ・ディスクをセットできるようになっている。

#### ① トキシ・グラムA

表面にメタバナジン酸アンモニウムをコーティングしてあり、主に塩基性及び中性薬物検出用に使う。

(各標準ディスクに含まれている薬物)

- No.1 \*Propoxyphene \*Methadone \*Meperidine \*Codeine  
\*Morphine
- No.2 Diazepam \*Cocaine Acetaminophen Caffeine Nicotine  
\*Amphetamine \*Methamphetamine \*Pseudoephedrine
- No.3 \*Phencyclidine(PCP) Trimeprazine Triflupromazine  
Chlorpromazine Imipramine Trifluoperazine  
Quinine
- No.4 Methaqualone Meprobamate Amitriptyline  
Doxepin Nortriptyline Strychnine

注：\*印の付いている標準薬物は「麻薬及び向精神薬取締法」の規定により日本向けの商品からは削除してある。

② トキシ・グラムB

酸性及び中性薬物検出用に使う。

(各標準ディスクに含まれている薬物)

- No.1 Secobarbital Phenytoin Phenobarbital
- No.2 Glutethimide Pentobarbital Aprobarbital
- No.3 Ethinamate Amobarbital
- No.4 Diazepam Butobarbital Barbital

※ 各標準ディスクには、あらかじめピンク色のマーカーが含浸されている。



## トキシ・ラボの操作方法

薬物による急性中毒の原因物質を広範囲な対象薬物のなかから、迅速にかつ正確に抽出分離して、臨床救急医の処置に必要な情報を速やかに提供できるように開発された、薄層クロマトグラフィ原理応用の定性分析システムである。

### 1. セットに含まれている試薬の処方

#### 1) A-3 (変法ドラゲンドルフ試薬)

ヨウ化カリウム	KI	5.0 g
ヨウ素	I <sub>2</sub>	2.0 g
次硝酸ビスマス	BiONO <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O	0.2 g

#### 2) B-1 (DPC試薬)

ジフェニル・カルバゾン	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.075 g
メタノール	CH <sub>3</sub> OH	3 ml

#### 3) B-2 (硝酸銀溶液)

硝酸銀	AgNO <sub>3</sub>	1.7 g
精製水		3.0 ml

#### 4) B-3 (硝酸水銀溶液)

硝酸第二水銀	Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	4.0 g
精製水		3.5 ml

### 2. 別に用意する試薬

酢酸エチル	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	トキシラボグレード
強アンモニア水	NH <sub>4</sub> OH (NH <sub>3</sub> )	58% (28%)
濃硫酸	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	特級
メタノール	CH <sub>3</sub> OH	"
氷酢酸	CH <sub>3</sub> COOH	"
ホルマリン	HCHO	37%
クロロホルム	CHCl <sub>3</sub>	特級
塩化メチレン (ジクロロメタン)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	"
精製水	H <sub>2</sub> O	局方

### 3. 試薬の調製

#### 1) トキシラボAに使用するもの

展開液 ; 添付の保存瓶中で混合。

メタノール	3 ml
酢酸エチル	87 ml
精製水	1.5 ml

密栓して強く振盪する (20~30秒)

#### A-1 (ホルマリン気浴)

ホルマリン	25 ml
-------	-------

蒸気浴瓶の目皿の穴からピペットで瓶の底にホルマリンを注入する。(密栓して一週間使用可能)

#### A-2 (マンデリン試薬)

濃硫酸	250 ml
-----	--------

#### A-3 (変法ドラゲンドルフ試薬)

A-3 試薬瓶中の溶液を全量 A-3 保存瓶に入れ、氷酢酸 10 ml を加え、さらに攪拌しながら精製水を加えて全量 250 ml とする。

密栓して常温保存。

#### 2) トキシラボBに使用するもの

展開液 ; 添付の保存瓶中で混合。

塩化メチレン	60 ml
酢酸エチル	40 ml

密栓して振盪 (20~30秒)

#### B-1 (DPC 試薬)

B-1 試薬瓶中の溶液を全量 B-1 保存瓶に入れ、塩化メチレンを加えて全量 250 ml とする。

密栓して常温保存。

#### B-2 (硝酸銀溶液)

B-2 試薬瓶中の溶液を全量 B-2 保存瓶に入れ、精製水を加え全量 250 ml とする。

密栓して常温保存。

#### B-3 (硝酸水銀溶液)

B-3 試薬瓶中の溶液を全量 B-3 保存瓶に入れ、精製水を瓶の 1/4 の量まで満たす。つぎに攪拌しながら注意ぶかく濃硫酸 10 ml を注加し、精製水で全量 250 ml とする。

## 4. 操作方法

トキシラボは、その取扱上にいくつかのポイントがあります。

この操作方法には、それぞれのステップ毎にそのポイントと対処法が書かれています。

### 1) 検体採取

- ① 検体は一般的には、尿、血清あるいは胃内容液を使用します。なお胃内容液はガーゼ3～4枚重ねたもので濾過する。
- ② 検体の採取量は、10ml以上としてください。
- ③ 血清中の脂質は、結果判定に悪影響を与えますので、コンペンジウム中に掲載されているSerum Lipid:Clean-up Procedureを参照してください。

### 2) 準備

- ① ヒートプレートの電源を入れる。
- ② オメガ12にAおよびB用のアルミカップ各2個をセットし、AとBのディスク(ブランク)を各2枚とり、対応するアルミカップに1枚ずつ入れる。

### 3) 抽出

- ① トキシチューブ内の溶媒量が下端の矢印より多いことを確認します。
- ② チューブA, Bとも沈殿している緩衝剤をほぐすように、軽く何回か手掌に当たて下さい。
- ③ トキシチューブに検体を入れる際、必ず上端の矢印まで入れてください。もし検体量が不足している場合は精製水で満たしてください。
- ④ 検体を入れたら、静かに2分間以上転倒混和してください。(強く振盪しないで下さい。)
- ⑤ 混和が終わったら、3000rpmで5分間遠心分離する。(着色層が沈殿する。)

### 4) 濃縮

- ① 2)～②)のオメガ12をヒートプレート上にのせる。
- ② 準備したアルミカップA・B用各2個の、それぞれの適宜の場所に必要に応じて患者名又は検体番号を書き込みます。
- ③ 抽出の終わったトキシチューブABの上澄液をとり、②)でセットしたアルミカップのABそれぞれの、片方に5滴(約250ul)、もう片方に残り全部を入れます。(着色液および沈殿が混入しないように注意する。)
- ④ トキシディスクの乾燥状態を目視で確認しながら次の手順を進めて下さい。(加熱し過ぎないようにする)

## 5) 接 種

- ① トキシグラム A および B を、各一枚ずつとり出し、それぞれの上端部に必要に応じ鉛筆（2 B 以上の濃いもの）で患者名又は検体番号を書き込む。
- ② トキシグラムの下 1 / 3 をずらして数 10 秒ヒートプレート上におきます。
- ③ 4) - ④ の A ディスクはトキシグラム A に、B ディスクはトキシグラム B にそれぞれの中心穴にディスク処理ピンで接種し、その部分に清潔な紙を上下に当てて押さえてフラットにする。（トキシグラムには絶対に手を触れない、また表面にきずをつけないよう注意する。）

## 6) 展 開

- ① 展開瓶 2 本の片方に A の展開液を、もう一方に B の展開液を、それぞれ 3 ml ずつ入れます。
- ② A と B それぞれのトキシグラムの瓶の裏側のラベルに表示されている、強アンモニア水の量を正確にとって、A、B それぞれの展開瓶に滴下します。
- ③ 数秒間、展開瓶を強振します。
- ④ トキシグラムをピンセットで取り上げ、トキシグラム A は A の展開液の、トキシグラム B は B の展開液の入った展開瓶に、それぞれトキシディスクを接種した部分を下にして入れます。  
この時、トキシグラムの両端が展開瓶の器壁に触れないように注意します。
- ⑤ トキシグラムにあらかじめセットしてある標準ディスクのピンク色のマーカが、水平に上がるのを確認します。
- ⑥ マーカーが 9.5 cm の位置に達したら（この間、約 15 分間）、展開瓶からトキシグラムを取り出しヒート・プレート上において乾燥させます。
- ⑦ なおこの際、トキシラックを使用して、トキシグラムを 2 又は 3 枚同時に展開する場合は、展開液及び強アンモニア水の量を次のように変える。

\* トキシグラム 2 枚の場合、展開液は 6 ml、強アンモニア水は表示量の 2 倍入れる。

\* トキシグラム 3 枚の場合、展開液は 6 ml、強アンモニア水は表示量の 3 倍入れる。