

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

動物性食品輸出の規制対策のための研究

総合研究報告書

研究代表者

星薬科大学薬学部

穂山 浩

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

志田（齊藤）静夏

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

工藤 由起子

令和5年（2023年）5月

目 次

I. 総括研究報告	
動物性食品輸出の規制対策のための研究	
穂山 浩	1
II. 分担研究報告	
1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価	
志田（齊藤）静夏	12
2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究	
工藤由起子	267
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	283

I. 総合研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 榎山浩

(星薬科大学薬学部)

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨

EUに動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A物質（スチルベン類等）及びB物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてB物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。しかし、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究ではB物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法（39分析法）を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度 73.4～115.7%、併行精度 1.1～11.7%、室内精度 2.3～19.9%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかったことから、いずれの分析法も筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定のみ 1 ヶ所を除く 11 ヶ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体（0.6%）から STEC 0157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から 6 種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55℃に加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者

志田（齊藤）静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長）

工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長）

研究協力機関

（一財）日本食品分析センター

研究協力者（*牛枝肉の STEC 調査研究について）

星薬科大学 伊藤里恵

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課* 島田光平、豊岡大輔、

北海道東藻琴食肉衛生検査所* 児山綾子

北海道早来食肉衛生検査所* 石田祥士

北海道帯広食肉衛生検査所* 吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子、鈴木 綾

十和田食肉衛生検査所検査第二課* 東海林明子

十和田食肉衛生検査所検査第三課* 高橋むつみ

秋田市食肉衛生検査所* 山口健一

熊本県食肉衛生検査所* 大迫英夫

岐阜県飛騨食肉衛生検査所* 塚本真由美、荻谷俊宏、山崎翔矢

宮崎県都農食肉衛生検査所* 黒木麻衣

徳島県食肉衛生検査所* 片山直人、飛梅三喜

佐賀県食肉衛生検査所* 瀧下恵里子、大澤加奈子

長崎県諫早食肉衛生検査所* 樋渡佐知子、松尾保雄

国立医薬品食品衛生研究所 廣瀬昌平、千葉由美、都丸亜希子、池内隼佑

A. 研究目的

EU 輸出実施要領(薬生食監発 0627 第 11 号「EU に輸出される豚及び鶏の食肉等、牛の乳並びに鶏卵に係る 2019 年残留物質等モニタリング計画の実施について」)では、輸出される動物性食品のモニタリングにおいて B 物質（抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバメート系農薬等）がモニタリング対象部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合には必要に応じて筋肉（可食部位）の検査等を行うこととなっている。しかしながらモニタリング対象部位（肝臓、腎臓等）の分析法は確立されているが、筋肉を対象とした分析法は整備されていない。そのため、モニタリングで検出された場合に直ちに筋肉（可食部位）の調査を実施することができず、当該施設からの EU への輸出再開が遅れるなどの支障をきたし、円滑な輸出の障害となる。本研究では、B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を開発又は適用拡大し、確立した分析法について妥当性評価を実施することにより、モニタリングで検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とする。

また、国内の対米輸出食肉取扱施設では、牛枝肉の微生物検査として STEC の検査が求められている。STEC が陽性となった陽性となった検体が由来するロットは、原則加熱加工原料用として国内向けに流通するようになる。しかし、他用途としてのブロック肉利用が求められており、STEC リスク低減化の手法を示す必要がある。ブロック肉表面の加熱殺菌及びトリミングによる手法はリスク低減化に効果的であるが、生肉として販売する量が減少することが難点である。このため、効率的なブロック肉利用が可能な方法によるブロック肉表面殺菌が期待されている。しかし、厚生労働省より平成 8 年に通知された腸管出血性大腸菌が検出された枝肉の消毒方法については、科学的根拠データの脆弱性が指摘されており、また、殺菌効果の高いことが近年

知られている過酢酸製剤については、STEC に対する殺菌効果の検証及び妥当性に関する検討が不足している。そこで、本研究では、国産食用ブロック肉の汚染状況を把握した上で、効果的な微生物コントロール方法を明らかにする研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

I.動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

令和2年度は、牛の筋肉を対象として、13分析法（抗菌性物質、駆虫剤、有機塩素系物質）を確立し、B物質36化合物について妥当性評価試験を実施した。令和3年度は、鶏の筋肉を対象として、12分析法を確立し、B物質29化合物について妥当性評価試験を実施した。令和4年度は、鶏の筋肉を対象として、14分析法を確立し、B物質27化合物について妥当性評価試験を実施した。

II.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

2020年10月から2023年1月に国内の食肉検査所12ヶ所にて、ウシ504頭からサンプリングを行った。なお、N施設からの検体（24検体）では、生菌数測定のみを実施した。また、検体液の一部を定量試験用に冷蔵保管した。残りの検体液はサンプリングバッグのまま、42±1℃で15-24時間培養を行った。この培養液からDNAアルカリ熱抽出を行い、このDNA抽出液をSTEC7血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRのテンプレートとして用いた。リアルタイムPCRの結果、*stx* および *eae* 遺伝子陽性の検体は、続けてSTEC7血清群O遺伝子を試験した。選択培地上に発育した疑わしいコロニーについては、STEC7血清群をリアルタイムPCRにより判定を行った。STEC分離株のO血清群

は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）または市販のラテックス凝集試薬を用いて判定した。STEC7血清群に判定された菌株については、H血清群を抗血清およびH-genotypingを用いて決定した。なお、これら以外についてはO血清群を抗血清およびO-genotypingにて決定した。STEC7血清群が陽性となった検体については、冷蔵保存しておいた検体液を最確数法（MPN、3本法）にて同様の培地を用いて定量試験を行った。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

牛屠体の消毒として使う方法のうち科学的な根拠がある方法を調べることを目的として、Carcasses、Dressed Cattle、Block Meat、Disinfection、Decontamination、Disinfectants、acids、hot water、steam、Microorganisms、bacteria、*E.coli*、STECをキーワードとして、PubMedで文献調査を行った。

(2) 菌株

国立医薬品食品衛生研究所で保有しているSTEC血清群O26、O103、O111およびO157の各菌株を供試した。

(3) 牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体（筋膜あり）および筋膜を取り除いた検体（筋膜なし）は、クリーンベンチ内で厚さ約1cm、約5cm角（約25g）に無菌的に切り分けて作製し、冷凍保存した。使用する前に4℃に戻して供試した。

(4) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている菌株を、10mLのTSBに植菌し、37℃で18時間静置培養した。この培養液を4℃、5,000rpm、15分間遠心し、滅菌リン酸緩衝生

理食塩水（PBS）に再懸濁することを2回繰り返し接種菌液を作製した。これら接種菌液中の菌数はTryptone soya agar（TSA）およびクロモアガーSTECに塗抹し、それぞれ37℃で24時間および37℃で20時間培養し、生育したコロニーを計測した。

（5）消毒液の調製

酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に平成28年に使用基準が改正された過酢酸製剤および酸性化した亜塩素酸ナトリウム、従前より使用が認められ指定添加物である過酸化水素、アルカリ性の消毒液として同規格基準で使用が認められ指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール（エチルアルコール）、有機酸として同規格基準で使用が認められ指定添加物である乳酸を用いた。

（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

1）STEC 接種検体の作製

滅菌した1本の竹串に1検体を刺し、菌液を10 μ Lずつ5カ所（合計50 μ L）に接種し、15分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌接種検体を垂直に固定した。

2）消毒液噴霧の方法

消毒液を2回、10回または60回噴霧した。2回（1.6 mL）噴霧では、筋膜なし検体で、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。

3）消毒液 50 mL 浸漬の方法

菌接種検体を滅菌ピンセットで50 mLの消毒液に沈めてから持ち上げることを20秒間で

10回繰り返した。筋膜なし検体を使用し、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。

4）消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの方法

菌接種検体に消毒液 20 mL をシリンジで5回（合計 100 mL、100 mL かけ流し）、または、50 mL をシリンジで10回（合計 500 mL、500 mL かけ流し）かけ流しを行った。

5）25℃および55℃の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法

「洗浄なし」では、菌接種検体ごとに25℃もしくは55℃に加温した消毒液（過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸4%）50 mL をシリンジで10回（合計 500 mL）かけ流しを行った。

6）消毒後検体中の菌数の測定

消毒後、室温で5分間立てた状態で消毒液または洗浄滅菌水の液切りを行った。消毒液が流れ落ちない状態になったことを確認し、各検体を竹串から外し、それぞれストマッカー一袋に入れた。検体の10倍量になるように滅菌済みのPBSを添加し、1分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。これらの乳剤中の菌数を、「（4）接種菌液の調製」と同様の方法で計測した。

（7）消毒液による肉の変色と臭味

菌を接種していない検体にて、消毒液による肉の変色と臭味を確認した。

C. 研究結果

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

[令和2年度]

牛の筋肉を対象として、以下の13分析法を確

立し、B 物質 36 化合物について妥当性評価試験を実施した。

抗菌性物質

- ① チルミコシン分析法
- ② スルファモイルダブソン分析法
- ③ クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法
- ④ エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）分析法
- ⑤ フロルフェニコール分析法

駆虫剤

- ⑥ トリクラベンダゾール分析法

抗コクシジウム剤

- ⑦ サリノマイシン及びモネンシン分析法
- ⑧ トルトラズリル分析法

ピレスロイド系農薬

- ⑨ ペルメトリン分析法

有機塩素系物質

- ⑩ HCB 分析法
- ⑪ DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法
- ⑫ クロルデン及びノナクロル分析法
- ⑬ PCB（28、52、101、138、153 及び 180 の総和）分析法

その結果、真度 77.9～112.6%、併行精度 1.1～10.8%、室内精度 2.3～17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13 分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

[令和 3 年度]

鶏の筋肉を対象として、以下の 12 分析法を確立し、B 物質 29 化合物について妥当性評価

試験を実施した。

- ① タイロシン及びチルミコシン分析法
- ② チルバロシン分析法
- ③ リンコマイシン分析法
- ④ ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法
- ⑤ カナマイシン分析法
- ⑥ スルファメトキサゾール、スルファメトキシム、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール分析法
- ⑦ エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）及びノルフロキサシン分析法
- ⑧ クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法
- ⑨ フロルフェニコール分析法
- ⑩ アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法
- ⑪ ノシヘプタイド分析法
- ⑫ エンラマイシン分析法

その結果、真度 77.3～115.7%、併行精度 1.8～9.3%、室内精度 2.4～14.2%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、確立した分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

[令和 4 年度]

鶏の筋肉を対象として、以下の 14 分析法を確立し、B 物質 27 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ① ドラメクチン分析法
- ② レバミゾール分析法
- ③ トリクラベンダゾール分析法
- ④ ピペラジン分析法
- ⑤ アンプロリウム分析法
- ⑥ エトパベート分析法

- ⑦ ナイカルバジン及びハロフジノン分析法
- ⑧ モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法
- ⑨ カルバリル分析法
- ⑩ ペルメトリン分析法
- ⑪ シフルトリン及びフルメトリン分析法
- ⑫ フルニキシン分析法
- ⑬ DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH並びに γ -HCH分析法
- ⑭ PCB (28、52、101、138、153及び180の総和)分析法

その結果、真度 73.4~109.7%、併行精度 1.3~11.7%、室内精度 3.4~19.9%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、14分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

生菌数は、504 検体のうち 40 検体で検出限界未満であり、他 464 検体での平均は 487.2 CFU/cm²であった。ウシの種類別で比較すると、頭数が少なく、限られた施設由来ではあるが、アングスの生菌数が 9,387.6 CFU/cm²で最も高かった。採材期間を通して、生菌数が最も多かった施設は F 施設であった。また、施設ごとの生菌数が 1,000 CFU/cm²を超える施設は、E および F 施設であり、その生菌数はそれぞれ 1,156.7 および 3,193.0 CFU/cm²であった。月ごとの生菌数では、7 月が最も高く 5,133.4 CFU/cm²、次いで 6 月が 699.9 CFU/cm²であり、気温が高い夏に高い傾向が見られ

た。

STEC 7 血清群を試験した 480 検体のうち、*stx* あるいは *eae* 遺伝子の少なくともいずれかが陽性であった検体は 110 検体であり、そのうち 31 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性となった検体であった。さらに、そのうち 15 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性ならびに STEC 7 血清群遺伝子陽性となった。これらのうち、STEC 7 血清群の分離が可能であった検体は B56、D68 および J23 の 3 検体 (3/480、0.6%) であり、全株とも血清型は O157:H7 であった。これら STEC O157 が分離されたのは、2020 年 12 月に採材された D 施設の褐毛和種、2021 年 8 月に採材された E 施設の交雑種および 2022 年 6 月に採材された M 施設の黒毛和種からであった。これらの施設においては、枝肉の消毒等の適切な措置が講じられた。なお、同一施設において、検体採取時期が異なるにもかかわらず、血清型ならびに *stx* および *eae* 遺伝子保有パターンが同一の大腸菌が分離されることが散見された。

STEC O157 が分離された検体について、MPN 法にて定量したところ、その定量値は、1 検体 (D68) については 1.02 MPN/100cm² (11 MPN/100mL 検体液) であり、その他 2 検体 (B56 および J23) については検出限界未満となる 0.33 MPN/100cm² (3.0 MPN/100mL 検体液) 未満であった。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

検索の結果、31 報見つかった。効果が認められた条件(10 報)で、比較的多い消毒液は乳酸 (8 報) および過酢酸 (2 報) であり、温度としては 55°C (4 報) であった。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

1) 消毒液噴霧の効果

STEC の菌数は、2 回噴霧（筋膜なし検体）では、消毒液で 7.0 - 8.1 log CFU/片、滅菌水で 7.3 - 7.8 log CFU/片であり、10 回噴霧（筋膜なし検体および筋膜あり検体）では、消毒液で 6.9 - 7.4 log CFU/片、滅菌水で 7.2 - 7.3 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。60 回噴霧では、筋膜なし検体において、消毒液で $7.0 \pm 0.1 - 7.2 \pm 0.1$ log CFU/片、滅菌水で 7.3 ± 0.1 log CFU/片であり、筋膜あり検体において、消毒液で $5.9 \pm 0.6 - 6.7 \pm 0.4$ log CFU/片、滅菌水で 6.9 ± 0.3 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

2) 消毒液 50 mL 浸漬の効果

消毒液では 6.8 - 7.1 log CFU/片であり、滅菌水では 7.0 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。

3) 消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの効果

消毒液 100 mL かけ流しでは、筋膜なし検体において、消毒液で $6.8 \pm 0.1 - 7.1 \pm 0.3$ log CFU/片、滅菌水で 7.4 ± 0.3 log CFU/片であり、筋膜あり検体において、消毒液で $5.7 \pm 0.3 - 6.5 \pm 0.2$ log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.2 log CFU/片であり、60 回噴霧より消毒液による STEC の減少効果が認められた。消毒液 500 mL かけ流しでは、消毒液で $4.8 \pm 0.9 - 6.0 \pm 0.4$ log CFU/片、滅菌水で 6.6 ± 0.5 log CFU/片であり、100 mL かけ流しより消毒液による STEC の減少効果が認められた。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった。

4) 25°C および 55°C の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄の効果

25°C の洗浄なしでは、消毒液で $5.4 \pm 0.3 - 5.6 \pm 0.6$ log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.6 log CFU/

片であり、25°C の洗浄ありでは、消毒液で $4.7 \pm 0.8 - 6.1 \pm 0.6$ log CFU/片、滅菌水で 6.3 ± 0.3 log CFU/片であり、55°C 洗浄なしでは、消毒液で $5.4 \pm 1.7 - 5.7 \pm 0.5$ log CFU/片、滅菌水で 6.3 ± 0.1 log CFU/片であり、55°C 洗浄ありでは、消毒液で $5.2 \pm 0.3 - 5.7 \pm 0.5$ log CFU/片、滅菌水では 6.4 ± 0.2 log CFU/片であった。消毒液による STEC の減少効果は認められたが、消毒液の 55°C 加温効果は認められなかった。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液および消毒液と洗浄滅菌水の混合液からは STEC および生菌は検出されなかった。

5) 消毒液による肉の変色と臭味

肉表面の変色に関しては、最大濃度 1,000 ppm を使用しても過酢酸では変色は認められなかったが、200 ppm 以上で使用した亜塩素酸ナトリウム、600 ppm の次亜塩素酸ナトリウムおよび 70% エタノールではやや白色に、3.5% 過酸化水素は白色に、4% 乳酸では茶褐色に変色した。臭味に関しては、過酢酸では最小濃度 50 ppm を使用した場合でも酸臭が、亜塩素酸ナトリウムでは 200 ppm 以上を使用した場合および次亜塩素酸ナトリウムでは 600 ppm を使用した場合に塩素臭が認められたが、70% エタノールでは直後にアルコール臭が残るものの比較的すみやかに消失した。3.5% 過酸化水素および 4% 乳酸では臭味は認められなかった。過酢酸の酸臭は、過酢酸の濃度が高いほど強くなる傾向であったが、滅菌水による消毒後の洗浄によって酸臭は軽減し、55°C の過酢酸では 25°C の過酢酸よりも消毒後の酸臭が弱かった。

C. 考察

I. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉を対象とした13分析法、また鶏の筋肉を対象とした26分析法として妥当であることが示された。確立した分析法を用いることにより、B物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用い STEC 分離に供した 480 検体中、3 検体 (0.6%) から STEC7 血清群のひとつである STEC O157 が分離された。STEC O157 が分離された 3 検体を含む 15 検体 (3.1%) は、*stx* および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかが陽性であった。と畜場でのウシの糞便からは STEC O157 が高頻度に検出されていることと比較し、その汚染率は低率であり、衛生的な管理がなされているとされた。その一方、各年度の分離率は同等であったことならびにその定量値は検出限界未満が多かったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題である。

測定された生菌数は季節的な影響が大きいと考えられた。平均生菌数は7月が最も多く次いで6月、8月であり、その他の月は生菌数が 102 CFU/cm² 以下にとどまっていた。施設 E・F の生菌数が高かったことが要因と考えられ、夏季においては牛肉の衛生状態の低下が推察される。生菌数が高い施設では、汚染防止策などを含む衛生管理を確実に実施する必要がある、衛生状態を改善することが求められる。

stx、*eae* および STEC 7 血清群のいずれかの

遺伝子が陽性の培養液から分離された菌株では、STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。同一施設において、同一の血清型ならびに *stx* および *eae* 保有パターンの大腸菌が継続的に分離されたことから、施設内での汚染あるいは特定の農場での大腸菌の保菌等が原因として疑われた。今後、これらの菌株の病原性について、検討を行う必要があると考えられた。

牛肉の STEC による汚染の低減は食の安全に関わる重要な課題となっている。と畜場での牛肉の汚染は低率であるものの、牛肉の取り扱いには十分な注意が必要である。また、と畜場での衛生管理や施設での消毒処理等は、STEC の主要な汚染防止策であることから、STEC 汚染についての調査を継続するに加えて、それらの管理や消毒方法を改良していく必要があると考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

比較的多い消毒条件 (10 報) すべてにおいて効果を検討し、国内の指定添加物である乳酸は、消毒液としての効果を検討する必要があると考えた。また、効果のある温度条件で最も多かった 55°C に関しても、消毒効果の向上を期待して検討することを考えた。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、噴霧 (2 回計 1.6 mL、10 回計 8 mL および 60 回計 48 mL)、浸漬 (50 mL) およびかけ流し (100 mL および 500 mL) を行った。令和 2 および令和 3 年度で試みた噴霧では、60 回噴霧で消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

令和 2 年度で試みた浸漬では、60 回噴霧とほぼ同量の消毒液を用いたにもかかわらず減

少効果は認められなかった。浸漬では牛肉由来の有機物による消毒液の不活性化や、酸臭および塩素臭の肉深部への浸透が考えられるため、多量の消毒液をかけ流すことにより効果が向上することを期待し、令和3年度では消毒液のかけ流しを試みた。この結果、100 mL かけ流しは、60回噴霧より STEC の減少効果が認められた。また、同じ濃度では 100 mL より 500 mL かけ流しの方が STEC の減少効果が認められ、同じかけ流し量では消毒液の濃度が高い方が STEC の減少効果が高い傾向であった。

令和2および令和3年度の結果から、500 mL かけ流しが最も STEC の減少効果が認められたため、令和4年度でも継続して行った。また、肉色の変化がないことから過酢酸が牛肉の消毒液として最も実用的であると考えられたが、酸臭が残ることが難点であった。令和4年度では、文献調査によって情報収集した米国での使用状況および EU での使用許可状況を鑑みて、過酢酸だけでなく、有機酸である乳酸についても試みた。消毒効果の向上を期待して消毒液の 55°C 加温、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を加えて、STEC O157 の減少効果を試みた。ばらつきはあるが、消毒液の方（約2桁減少）が滅菌水のみ（約1桁減少）より STEC の減少効果が認められ、消毒液による一定の効果が明らかになった。特に、過酢酸による消毒では、菌数減少効果と併せて牛肉表面を変色させない利点が明らかになった。酸臭が残ることが難点であったが、55°C に加温することによって酸臭の軽減されることが判明した。なお、55°C に加温することによる STEC の減少効果は認められなかった。

また、乳酸による消毒では、酸臭は認めら

れなかったが、牛肉表面が茶褐色に変色した。しかし、乳酸消毒による肉質への影響はないとする報告があり、肉表面のトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸も消毒剤として実用性があると考えられる。

C. 結論

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

令和2年度は牛の筋肉を対象として B 物質の分析法（13 分析法）を確立した。令和3年度は鶏の筋肉を対象として B 物質のうち抗菌性物質の分析法（12 分析法）を確立した。令和4年度は鶏の筋肉を対象として B 物質の抗菌性物質以外の分析法（14 分析法）を確立した。確立した分析法の妥当性評価試験を実施した結果、いずれも良好な結果（真度、併行精度、室内精度及び選択性）が得られた。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定のみ 1 ヶ所を除く 11 ヶ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体（0.6%）から STEC O157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。

また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から6種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55°Cに加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S., Akiyama H. Determination of 8 α -hydroxymutilin as a marker residue for tiamulin in swine tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 14, 845-855 (2021).
2. Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J. Evaluation of a risk communication program for pesticide residues, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 62, 187-192 (2021).

2. 学会発表

1. Shizuka Saito-Shida, Seiichiro Iizuka, Ayumu Nakamura, Satoshi Isagawa, Satoru Nemoto, Hiroshi Akiyama. Development and validation of

an analytical method for determining total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2021 AOAC INTERNATIONAL、令和3年8月27日

2. 廣瀬昌平、都丸亜希子、亀山浩、工藤由起子. 牛肉の志賀毒素産生大腸菌汚染に対する消毒液の効果の検討. 日本食品衛生学会第118回学術講演会、長崎市、令和4年11月11日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と 妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤) 静夏

動物性食品輸出の規制対策のための研究

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長

研究要旨

EU へ動物性食品を輸出する際は、残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質（スチルベン類等）及び B 物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。したがって、B 物質はモニタリング部位に加えて筋肉を対象とした分析法が必要であるが、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法（39 分析法）を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度 73.4~115.7%、併行精度 1.1~11.7%、室内精度 2.3~19.9%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかったことから、筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

研究協力機関

(一財) 日本食品分析センター

A. 研究目的

EU へ動物性食品を輸出する際は、欧州理事会指令 96/23/EC および規則 (EU) 2017/625 に従って作成した残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質（スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシン酸ラクトン類、 β -作動薬、Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIV に掲げられた禁止物質（クロラムフェニコール、ニトロフラン類、ニトロイミダゾール等））及び B 物質（抗菌性物質、駆虫剤、抗

コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバマゼート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。このため、B 物質についてはモニタリング部位を対象とした分析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要となる。

しかしながら、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では、B物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を確立し、モニタリング検査で検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。令和2年度(1年目)は、B物質のうち、牛においてモニタリング部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質(チルミコシン等の6項目)、駆虫剤(トリクラベンダゾール)、抗コキシジウム剤(モネンシン等の3項目)、ピレスロイド系農薬(ペルメトリン)及び有機塩素系物質(HCB等の15項目))について、牛の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価試験を実施した。令和3年度(2年目)は、B物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質29化合物)について、鶏の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価試験を実施した。令和4年度(3年目)は、抗菌性物質以外のB物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(ドラメクチン等の27化合物)について、鶏の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価試験を実施した。

B. 研究方法

[令和2年度]

試料：牛の筋肉は、インターネット経由で北海道産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブrikサーを用いて細切均一化した。

1. 抗菌性物質

(1) チルミコシン分析法

① 試薬・試液

チルミコシン標準品：純度 90.0% (Sigma-Aldrich 製)

メタノール、ヘキサン、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸：特級 (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル：LC-MS用 (関東化学製)

ギ酸：LC-MS用 (富士フィルム和光純薬製)

クエン酸一水和物、リン酸水素二カリウム：特級 (関東化学製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム：試験研究用 (同仁化学研究所製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB (60 mg/3 mL、Waters 製)

メンブランフィルター：Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

クエン酸緩衝液 (pH 4.0)：クエン酸一水和物 1.29 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.8 g 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 3.72 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 4.0 に調整した。

リン酸塩緩衝液 (pH 8.0)：リン酸二水素カリウム 0.52 g 及びリン酸水素二カリウム 16.7 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 8.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1)：クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (3 : 1)：水 750 mL 及びメタノール 250 mL を混合した。

水及びギ酸の混液 (1000 : 0.5) : 水 1000 mL 及びギ酸 0.5 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液 (1000 : 0.5) : アセトニトリル 1000 mL 及びギ酸 0.5 mL を混合した。

標準原液 : チルミコシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : チルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 2 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : BM-2 (日本精機製作所製)

遠心分離機 : H-60R (コクサン製)

振とう機 : EL (スギヤマゲン製)

pH 計 : F-72 (堀場アドバンスドテクノ製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-1)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

チルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりチルミコシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.125 mL [メタノール溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

チルミコシンを試料からクエン酸緩衝液

(pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) で抽出し、ヘキサンで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の遠心管に量り取り、クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。ヘキサン 100 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層 10 mL (試料 0.5 g 相当) を遠心管に分取した。リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加えた後、pH 8.0 を確認し、3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

上清をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL で洗浄したものに負荷した。カラムを水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄した後、メタノール 9 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。メタノールで定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (50 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) スルファモイルダプソン分析法

① 試薬・試液

スルファモイルダプソン標準品：純度 99.7%

(富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、酢酸：特級 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール：HPLC 用 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

メンブランフィルター：Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

アセトニトリル飽和ヘキサン：アセトニトリル 30 mL 及びヘキサン 270 mL を混合し、5 分間振とうを行った。放置後、分離したヘキサン層を分取した。

アセトニトリル、水及びギ酸の混液 (300 : 100 : 3)：アセトニトリル 300 mL、水 100 mL 及びギ酸 3 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液 (100 : 1)：アセトニトリル 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (1000 : 0.1)：水 1000 mL 及び酢酸 100 μL を混合した。

標準原液：スルファモイルダプソン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で

溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：スルファモイルダプソン標準原液をメタノール (特級) で希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2 (日本精機製作所製)

遠心分離機：H-60R (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-2)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

スルファモイルダプソン標準原液をメタノール (特級) で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液 (300 : 100 : 3) で希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりスルファモイルダプソンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 100 μL [メタノール (特級) 溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-2)

スルファモイルダプソンを試料からアセト

ニトリルで抽出と同時にアセトニトリル飽和ヘキサンで洗浄し、ギ酸を加えて、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、ギ酸 1 mL を加えた後、アセトニトリルで定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL (試料 1 g 相当) をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH₂ FF (500 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したもの) に負荷し、溶出液を 20 mL 容全量フラスコに受けた。次いで、アセトニトリル及びギ酸の混液 (100 : 1) 5 mL で溶出し、先の全量フラスコに合わせた後、水で定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを

評価した。

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン分析法

① 試薬・試液

4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品：純度 86.5% (Carbosynth 製)

4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品：純度 81% (Acros Organics 製)

アセトニトリル、メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、酢酸、酢酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物：特級 (関東化学製)

クエン酸一水和物：特級 (富士フィルム和光純薬製)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) : 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 20 mL、水 180 mL 及びメタノール 800 mL を混合した。

10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) : クエン酸一水和物 12.9 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 27.6 g を量り、水を加えて溶かし正確に 1000 mL とした。この溶液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 3.7 g を加えて溶解した。

水及びメタノールの混液 (4 : 1) : 水 160 mL とメタノール 40 mL を混合した。

水及び酢酸の混液（1000：1）：水 1000 mL と酢酸 1 mL を混合した。

標準原液：4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg（4-*epi*-クロルテトラサイクリン 25mg 相当）を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品約 25mg を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。添加用標準溶液：4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で希釈して 1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-3）

装置	型式	メーカー
MS	LCMS8050	島津製作所
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	LabSolutions LCMS	島津製作所

③ 定量

4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で希釈して 0.0005、0.001、0.0015、0.005、0.01 及び 0.015 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（1 mg/L）0.5 mL [20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）溶液] を添加した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-3）

4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリンを試料から 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液（pH 4.0）で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液（pH 4.0）100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

抽出液 10 mL（試料 0.5 g 相当）をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2（270 mg/6 mL）]（あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの）に負荷した。水 20 mL、水及びメタノールの混液（4：1）10 mL で順次洗浄した後、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度（100 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(4) エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法

① 試薬・試液

エンロフロキサシン標準品：純度 99.8%（富士フィルム和光純薬製）

シプロフロキサシン塩酸塩標準品：純度 92.3%（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル、メタノール、塩酸、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水、水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：LC-MS用（関東化学製）

ギ酸：LC-MS用（富士フィルム和光純薬製）

メタリン酸：鹿特級（関東化学製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（60 mg/3 mL、Waters製）

メンブランフィルター：Millex-LG（0.2 µm、MILLIPORE製）

1 vol%ギ酸含有 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL、ギ酸 10 mL 及び 25%アンモニア水 6 mL に水を加えて正確に 1000 mL とした。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 77.08 g を量り、水を加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

0.2%メタリン酸溶液：メタリン酸 1 g を量り、水を加えて溶かし正確に 500 mL とした。

0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）：0.2%メタリン酸溶液 600 mL 及びア

セトニトリル（特級）400 mL を混合した。

水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）：水 500 mL、メタノール 500 mL 及び塩酸 1 mL を混合した。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 100 mL とした。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL に水を加えて正確に 100 mL とした。

標準原液：エンロフロキサシン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。シプロフロキサシン塩酸塩標準品約 12 mg（シプロフロキサシン 10 mg 相当）を精秤し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた後、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：エンロフロキサシン標準原液及びシプロフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）で希釈して 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所製）

ロータリーエバポレーター：N-1000V（東京理化学器械製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-4）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

エンロフロキサシン標準原液及びシプロフ

ロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）で希釈して、0.00025、0.0005、0.001、0.0025及び0.005 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（0.5 mg/L）0.1 mL [水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-4）

エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンを試料から 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）で抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、抽出液の上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）で定容した。抽出液 10 mL（試料 0.5 g 相当）をなす形フラスコ

に分取し、ロータリーエバポレーター（40℃）で約 3 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB（60 mg/3 mL）]（あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの）に負荷した。なす形フラスコ内を水 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度（10 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(5) フロルフェニコール分析法

① 試薬・試液

フロルフェニコール標準品：純度 98.8%（富士フィルム和光純薬製）

フロルフェニコールアミン標準品：純度 99.8%（Sigma-Aldrich 製）

アセトニトリル：HPLC 用（関東化学製）

酢酸エチル、ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトン、塩化ナトリウム、酢酸、水酸化ナトリウム：特級（関東化学製）

塩酸：特級（小宗化学薬品製）

25%アンモニア水：特級（富士フイルム和光純薬製）

ケイソウ土：セライト 545（関東化学製）

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute（5 mL、ジーエルサイエンス製）

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis MCX（150 mg/6 mL、Waters 製）

メンブランフィルター：Millex-LG（0.2 μm、MILLIPORE 製）

6 mol/L 塩酸：塩酸 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 60 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

アセトン及び水の混液（1：1）：アセトン 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸：酢酸 1 mL に水を加え、1000 mL に定容した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）：0.1 vol% 酢酸 100 mL 及びメタノール 100 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）：0.1 vol% 酢酸 450 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液（99：1）：メタノール 198 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

水及び酢酸の混液（1000：1）：水 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

アセトニトリル及び酢酸の混液（1000：1）：アセトニトリル 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液：フロルフエニコールアミン標準品約 5 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液：フロルフエニコール標準品約 14.5 mg（フロルフエニコールアミンとして 10 mg 相当）を精秤し、メタノールで溶解してフロルフエニコールアミンとして 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：添加用標準原液をメタノールで希釈して 20 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

オイルバス：THERMO MINDER SH-12（タイテック製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

遠心分離機：H-1000FR（コクサン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-5）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

フロルフェニコールアミン標準原液を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりフロルフェニコールアミンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (20 mg/L) 100 µL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

試料中のフロルフェニコール及び加水分解により代謝物フロルフェニコールアミンに変換される代謝物を塩酸で加水分解し、フロルフェニコールアミンとした後、ヘキサンで洗浄した。その後、多孔性ケイソウ土カラム及びスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 100 mL 容の遠心管に量り取り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、密栓して 100°C のオイルバスで 3 時間 (15 分間置きに攪拌) 加水分解した。30 分間放冷後、試料溶液を 200 mL 容の遠心管に移し、100 mL 容の遠心管内を水 10

mL 及びヘキサン 40 mL で洗い、洗液を 200 mL 容の遠心管に合わせた後、振とう機で 5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、ヘキサン層を捨てた。抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g を加え混合し、吸引ろ過器を用いて抽出液をろ過した後、遠心管内及び残留物をアセトン及び水の混液 (1 : 1) 20 mL で洗い、洗液をろ過した。全ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて水で定容した。

b. 精製

あらかじめ塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた試験管に、抽出液 2.5 mL (試料 0.25 g 相当) を分取し試験管ミキサーで混合した後、多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)] に負荷し 30 分間放置した。試験管内を酢酸エチル 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、溶出する操作を 2 回繰り返す、100 mL 容の遠心管に受けた。次いで酢酸エチル 20 mL で溶出し、先の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 1 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗い、洗

液をカラムに負荷した。遠心管内をメタノール 2 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (99 : 1) 5 mL で溶出し、50 mL 容の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol%酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) 2.5 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (200 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については試験溶液 1 mL を分取し、0.1 vol%酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) で 5 mL に定容したものを測定した。

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール分析法

① 試薬・試液

トリクラベンダゾール標準品 : 純度 99.9% (富士フィルム和光純薬製)

トリクラベンダゾールオキシソン標準品 : 純度

98.6% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、エタノール、酢酸エチル、ヘキサン : 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール : HPLC 用 (関東化学製)

塩酸 : 特級 (小宗化学薬品製)

30%過酸化水素水、水酸化ナトリウム : 特級 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸 : 特級 (関東化学製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニル

ピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis MCX (500 mg/6 mL、Waters 製)

メンブランフィルター : Econofiltr PES (0.2 µm、Agilent Technologies 製)

5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 200 g を量り、水を加えて溶かし 1000 mL とした。

5 mol/L 塩酸 : 塩酸 200 mL 及び水 240 mL を混合した。

ヘキサン飽和アセトニトリル : 分液漏斗にアセトニトリル 100 mL 及びヘキサン 20 mL を入れ、5 分間振とうした後アセトニトリル層を分取した。

エタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) : エタノール 20 mL 及び酢酸 20 mL を混合した。(用時調製)

酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) : 酢酸エチル 500 mL 及びヘキサン 500 mL を混合した。

メタノール及び水の混液 (7 : 3) : メタノール

700 mL 及び水 300 mL を混合した。

メタノール及び水の混液 (95 : 5) : メタノール 950 mL 及び水 50 mL を混合した。

アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) : アセトニトリル 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (10000 : 1) : 水 1000 mL 及び酢酸 100 μ L を混合した。

ケト-トリクラベンダゾール標準原液 : トリクラベンダゾールオキソン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液 : トリクラベンダゾール標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : 添加用標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ロータリーエバポレーター : N-1300 (東京理化器械製)

遠心分離機 : H-80R α (コクサン製)

振とう機 : EL (スギヤマゲン製)

恒温水槽 : BF600 (ヤマト製)

ブロックヒーター : DTU-1C (タイテック製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表1-6)

装置	型式	メーカー
MS	Xevo TQ-S	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

③ 定量

ケト-トリクラベンダゾール標準原液をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) で希釈して 0.4、0.8、2、4 及び 8 μ g/L の標準溶液を調製し

た。この溶液 1 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりケト-トリクラベンダゾールの含量を算出した。換算係数 1.091* を乗じてトリクラベンダゾールの含量を算出した。

* 1.091 = トリクラベンダゾールの分子量 359.66 / ケト-トリクラベンダゾールの分子量 329.57

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (5 mg/L) 0.45 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-6)

試料をアルカリ加水分解した後、塩酸で酸性としてトリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾールに変換される代謝物を酢酸エチルで抽出した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂した後、エタノール及び酢酸混液の溶液とし、過酸化水素を加え酸化反応でトリクラベンダゾール及びその代謝物をケト-トリクラベンダゾールに酸化した。酸化反応後の溶液から酢酸エチル及びヘキサン混液で抽出し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 50 mL 容遠心管 (ポリプロピレン製) に量り取り、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、密栓して 100°C で 3 時間加熱した。

放冷後、内容物を 250 mL 容の広口ポリ瓶に移し、5 mol/L 塩酸 12 mL を加えた。先の遠心管内をメタノール 5 mL で洗浄し、洗液を内容物と合わせた。酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。次いで水層に酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル層を 100 mL 容量フラスコに合わせ、酢酸エチルで定容した。

抽出液 6 mL (試料 0.6 g 相当) を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で減圧乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解した。ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え、5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

b. 酸化反応

残留物をエタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) 10 mL に溶解した。この液 5 mL (試料 0.3 g 相当) をねじ口試験管に取り、過酸化水素水 25 μ L を加えて密栓をし、90°C で 16 時間加熱した。

c. 精製

試験管を放冷した後、反応物を水 10 mL、酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を用いて遠心管 (ポリプロピレン製) に移し、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。次いで水層に同混液 15 mL を加え、5 分間振とうした。

3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。有機溶媒層を遠心管に合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をメタノール及び水の混液 (7 : 3) 4 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を同混液 4 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を 2 回繰り返した。メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 3 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (225 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については残留物をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 15 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを測定した。

3. 抗コクシジウム剤分析法

(1) サリノマイシン及びモネンシン分析法

① 試薬・試液

サリノマイシンナトリウム水和物標準品：純度 93.2% (Sigma-Aldrich 製)

モネンシンナトリウム水和物標準品：純度 85.2% (Sigma-Aldrich 製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

酢酸アンモニウム：特級 (関東化学製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters 製)

アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1)：アセトニトリル 900 mL と水 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (1 : 1)：水 100 mL とメタノール 100 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液：サリノマイシンナトリウム水和物標準品約 25.7 mg (サリノマイシン 25 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。モネンシンナトリウム水和物標準品を約 20.6 mg (モネンシン A 20 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：サリノマイシン標準原液及びモネンシン A 標準原液をメタノールで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件：表1-7)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

サリノマイシン標準原液及びモネンシン A 標準原液をメタノールで希釈して 0.05、0.1、0.25、0.5 及び 1 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりサリノマイシン及びモネンシン A の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.2 mL [メタノール溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-7)

サリノマイシン及びモネンシン A を試料からアセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) で抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) 60 mL を加えた後、ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上

清を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル及び水の混液（9：1）60 mLを加え5分間振とうし、3000 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を200 mL容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル及び水の混液（9：1）で定容した。

b. 精製

抽出液10 mL（試料0.5 g相当）に水15 mL加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB（200 mg/6 mL）]（あらかじめアセトニトリル5 mL及び水5 mLで洗浄したもの）に負荷した。水及びメタノールの混液（1：1）10 mLで洗浄した後、メタノール10 mLで溶出した。溶出液を10 mL容全量フラスコに採り、メタノールで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度（2 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) トルトラズリル分析法分析法

① 試薬・試液

トルトラズリルスルホン標準品：純度 98.7%（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール：HPLC用（関東化学製）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18（1000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製）

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.4 gを量り、水を加えて溶かし正確に200 mLとした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL及び水 1000 mLを混合した。

標準原液：トルトラズリルスルホン標準品約 10 mgを精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：トルトラズリルスルホン標準原液をアセトニトリルで希釈して 1 mg/L溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-8）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

トルトラズリルスルホン標準原液をアセトニトリルで希釈して0.00025、0.0005、0.0025、0.005及び0.01 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液2 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液2 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法によりトルトラズリルスルホンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.5 mL [アセトニトリル溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-8)

トルトラズリルスルホンを試料からアセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した後、ろ紙 (直径 60 mm、GFP、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリルで定容した。抽出液 10 mL (試料 0.25 g 相当) をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 0.5 mL 以下まで濃縮した。

b. 精製

濃縮液にアセトニトリル 3 mL 及び水 7 mL を加え、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1000 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。アセトニトリル 5 mL で溶出し、5 mL 容全量フラスコに受けた。アセトニトリルで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (100 µg/kg)

で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン分析法

① 試薬・試液

cis-ペルメトリン標準品：純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

trans-ペルメトリン標準品：純度 98.3% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)
塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム (粒径 150~250 µm)：Florisil PR (残留農薬試験用、富士フィルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15)：ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液：*cis*-ペルメトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。*trans*-ペルメトリン標準品約 25 mg

を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：*cis*-ペルメトリン標準原液及び *trans*-ペルメトリン標準原液を 1 : 1 で混合、アセトンで希釈してペルメトリンとして 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300 (東京理化学器械製)

GC (測定条件：表1-9)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

cis-ペルメトリン標準原液及び *trans*-ペルメトリン標準原液を 1 : 1 で混合、ヘキサンで希釈してペルメトリンとして 0.005、0.01、0.02、0.04 及び 0.06 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC - ECD に注入して、得られた *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのピーク面積の含量を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法によりペルメトリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (ペルメトリンと

して 0.5 mg/L) 0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図1-9)

ペルメトリンを試料からアセトンで抽出し、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL (試料 0.5 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせて、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用い

て5分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン5 mLに溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム（あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したものに負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液（85：15）70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度（50 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評

価した。

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 分析法

① 試薬・試液

HCB 標準品：純度 99.9%（Dr.ehrenstorfer 製）

アセトン、ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用（関東化学製）

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム（粒径 150～250 µm）：Florisil PR（残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製）

標準原液：HCB 標準品約 25 mg を精秤し、ヘキサンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：HCB 標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

GC（測定条件：表 1-10）

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

HCB 標準原液をヘキサンで希釈して 0.0005、0.001、0.005、0.01 及び 0.02 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 1 μ L を GC - ECD に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 μ L を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により HCB の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図1-10)

HCB を試料からアセトンで抽出、ヘキサンに転溶し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 50 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 20 mL を加え 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 10 mL (試料 1 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操

作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 5 mL まで濃縮した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィ用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 10 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 2 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン 90 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で約 2 mL まで濃縮し、5 mL 容全量フラスコに入れ、ヘキサンで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (5 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法

① 試薬・試液

o,p'-DDT 標準品：純度 98% (Dr.Ehrenstorfer 製)

p,p'-DDE 標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDD 標準品：純度 99.5% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDT 標準品：純度 99.4% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アルドリン 標準品：純度 98.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

ディルドリン 標準品：純度 99.9% (Dr.Ehrenstorfer 製)

エンドリン 標準品：純度 99.8% (AccuStandard 製)

ヘプタクロル 標準品：純度 99.3% (Dr.Ehrenstorfer 製)

cis-ヘプタクロルエポキシド標準品：純度 100% (AccuStandard 製)

trans-ヘプタクロルエポキシド標準品：純度 99.1% (Dr.Ehrenstorfer 製)

α -HCH 標準品：純度 99.5% (AccuStandard 製)

β -HCH 標準品：純度 97.7% (Dr.Ehrenstorfer 製)

γ -HCH 標準品：純度 98.8% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム (粒径 150~250 μm)：Florisil PR (残留農薬試験用、富士フィルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15)：ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル

150 mL を混合した。

標準原液：*o,p'*-DDT 約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。同様に *p,p'*-DDE 標準品、*p,p'*-DDD 標準品、*p,p'*-DDT 標準品、アルドリン標準品、ディルドリン標準品、エンドリン標準品、ヘプタクロル標準品、 β -HCH 標準品及び γ -HCH 標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準品、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準品及び α -HCH 標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：*o,p'*-DDT 標準原液、*p,p'*-DDE 標準原液、*p,p'*-DDD 標準原液、*p,p'*-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、 α -HCH 標準原液、 β -HCH 標準原液及び γ -HCH 標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300 (東京理化学器械製)

GC (測定条件：表1-11)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

o,p'-DDT 標準原液、*p,p'*-DDE 標準原液、*p,p'*-DDD 標準原液、*p,p'*-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、 α -HCH 標準原液、 β -HCH 標準原液及び γ -HCH 標準原液を混合、ヘキサンで希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 μ L を GC - ECD に注入して、得られたピーク高さを用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μ L を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-11)

o,p'-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH を試料からアセトンで抽出、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL (試料 0.5 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に

無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界値濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル分析法

① 試薬・試液

cis-クロルデン標準品 : 純度 99.6% (AccuStandard 製)

trans-クロルデン標準品 : 純度 99.7% (AccuStandard 製)

cis-ノナクロル標準品 : 純度 100% (AccuStandard 製)

trans-ノナクロル標準品 : 純度 99% (AccuStandard 製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン : 残留農薬試験用 (関東化学製)

塩化ナトリウム : 特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム : PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグ

ネシウム (粒径 150~250 µm) : Florisil PR (残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル : アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) : ヘキサン 850 mL とジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液 : *cis*-クロルデン標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。同様に *trans*-クロルデン標準品、*cis*-ノナクロル標準品及び *trans*-ノナクロル標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : *cis*-クロルデン標準原液、*trans*-クロルデン標準原液、*cis*-ノナクロル標準原液及び *trans*-ノナクロル標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-107DF (コクサン製)

振とう機 : EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター : N-1300 (東京理化学器械製)

GC (測定条件 : 表1-12)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

cis-クロルデン標準原液、*trans*-クロルデン標準原液、*cis*-ノナクロル標準原液及び *trans*-ノナ

クロル標準原液を混合、ヘキサンで希釈して0.00025、0.0005、0.001、0.0025及び0.005 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL をGC - ECD に注入して、得られたピーク高さを用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL をGC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロルの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図1-12)

cis-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び*trans*-ノナクロルを試料からアセトンで抽出、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECDで定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。

2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。

抽出液 20 mL (試料 0.5 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を 2 回繰り返した。全アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエ

バポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したものに) 負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテル

の混液（85：15）70 mLで溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター（40℃）で約1 mLまで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン10 mLに溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界値濃度（10 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(4) PCB分析法

① 分析対象化合物

PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153及びPCB180の総和

物質名	略称及びID Number
2,4,4'-trichlorobiphenyl	PCB28、#28
2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	PCB52、#52
2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl	PCB101、#101
2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl	PCB138、#138
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	PCB153、#153
2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl	PCB180、#180

② 試料

牛の筋肉は、インターネット経由で北海道産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブリークサーを用いて細切均一化した。

なお、脂質をソックスレー抽出法により測定したところ、16.8 g/100gであった。

③ 試薬・試液

BP-D7 標準溶液（PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153及びPCB180各10 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-D7 標準溶液（¹³C₁₂ PCB28、¹³C₁₂ PCB52、¹³C₁₂ PCB101、¹³C₁₂ PCB138、¹³C₁₂ PCB153及び¹³C₁₂ PCB180各5 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-19 標準溶液（50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-70 標準溶液（50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-111 標準溶液（50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-159 標準溶液（50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

MBP-170 標準溶液（50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製）

エタノール、ヘキサン：ダイオキシン類分析用（富士フィルム和光純薬製）

デカン：鹿特級（関東化学製）

水酸化カリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB分析用（関東化学製）

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム（粒径150～250 µm）：Florisil PR（残留農薬試験用、富士フィルム和光純薬製）

1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液：水

酸化カリウム 56.11 g を量り、エタノールを加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

標準原液：BP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。

内標準原液：MBP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。

内標準（シリンジスパイク）原液：MBP-19 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。MBP-70、MBP-111、MBP-159 及び MBP-170 についても同様に 500 µg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：BP-D7 標準原液をデカンで希釈して 10 µg/L 溶液及び 20 µg/L 溶液を調製した。

添加用内標準溶液：MBP-D7 標準原液をデカンで希釈して 100 µg/L 溶液を調製した。

添加用内標準（シリンジスパイク）溶液：MBP-19 標準原液、MBP-70 標準原液、MBP-111 標準原液、MBP-159 標準原液及び MBP-170 標準原液をデカンで希釈して 10 µg/L 混合溶液を調製した。

④ 装置

還流装置：GA-13S（いすゞ製作所製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）

GC-MS（測定条件：表 1-13）

装置	型式	メーカー
MS	Agilent 5973N	Agilent Technologies
GC	Agilent 6890N	Agilent

		Technologies
データ処理	GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies

⑤ 定量（図 1-13）

BP-D7 標準原液、MBP-D7 内標準原液、MBP-19 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-70 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-111 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-159 内標準（シリンジスパイク）原液及び MBP-170 内標準（シリンジスパイク）原液をデカンで希釈し、0、2、10、20 及び 50 µg/L [内標準溶液濃度及び内標準（シリンジスパイク）溶液濃度 10 µg/L] 内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC-MS に注入して、得られた内標準のピーク面積に対する対象物質のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC-MS に注入し、検量線から内部標準法により PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 の含量を算出した。各対象物質に対応する内標準物質は表の通り。

対象物質	内標準物質
PCB28	[¹³ C ₁₂] PCB28
PCB52	[¹³ C ₁₂] PCB52
PCB101	[¹³ C ₁₂] PCB101
PCB138	[¹³ C ₁₂] PCB138
PCB153	[¹³ C ₁₂] PCB153
PCB180	[¹³ C ₁₂] PCB180

⑥ 添加試料の調製

0.6 µg/kg 添加（6 種 PCB 合計として 20 ng/g

fat 相当) : 試料 1 g に添加用標準溶液 (10 µg/L) 60 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

1.2 µg/kg 添加 (6 種 PCB 合計として 40 ng/g fat 相当) : 試料 1 g に添加用標準溶液 (20 µg/L) 60 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

1.8 µg/kg 添加 (6 種 PCB 合計として 60 ng/g fat 相当) : 試料 1 g に添加用標準溶液 (20 µg/L) 90 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑦ 試験溶液の調製

概要

試料を 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液でけん化した後、PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 をヘキサンで抽出し、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム (粒径 150~250 µm) で精製し、GC-MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 1 g を 300 mL 容のなす形フラスコに量り取り、100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加 (最終濃度 10 µg/L) した後、1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流した。なす形フラスコを室温に戻した後、ヘキサン 100 mL を加えた。綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移し、振とう機で 10 分間振とうした。ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水

ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター (40 °C) で約 5 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 2.0 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 20 g をヘキサンで湿式充填したもの) に負荷した。なす形フラスコ内をヘキサン約 2 mL で 3 回洗い、洗液をカラムに負荷した。ヘキサン 200 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40 °C) で約 5 mL まで減圧濃縮し、10 mL 容全量フラスコに合わせヘキサンで定容した。あらかじめ 10 µg/L 内標準 (シリンジスパイク) 混合溶液 50 µL を入れたスピッツ管に抽出液 2 mL を分取し、室温で窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮し、試験溶液とした。

⑧ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑨ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値の 0.5 倍、1 倍及び 1.5 倍相当 (各 0.6、1.2 及び 1.8 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。1 日 1 回 (6 併行)、3 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

[令和 3 年度]

試料 : 鶏の筋肉は、インターネット経由で青森県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリスサーを用いて細切均一

化した。

1. タイロシン及びチルミコシン分析法

① 試薬・試液

タイロシン標準品： 純度 97.2% (富士フィルム和光純薬製)

チルミコシン標準品： 純度 98.1% (富士フィルム和光純薬製)

ヘキサン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール： HPLC 用 (関東化学製)

リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸水素二カリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、ギ酸： 特級 (関東化学製)

クエン酸一水和物： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

リン酸二水素カリウム、リン酸： 特級 (小宗化学薬品製)

pH 試験紙： pH-indicator strips (pH0-14、Merck 製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： Oasis HLB (60 mg/3 mL、Waters 製)

メンブランフィルター： PTFE シリンジフィルター (0.22 μ m、中部科学機器製)

クエン酸緩衝液 (pH 4.0)： クエン酸一水和物 1.3 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.8 g 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 3.7 g を量り、水約 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 4.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

リン酸塩緩衝液 (pH 8.0)： リン酸二水素カリウム 0.5 g 及びリン酸水素二カリウム 16.7 g を量り、水約 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 8.0 に調整し、水を加えて正確に

1000 mL とした。

クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1:1)： クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (3:1)： 水 150 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

水及びギ酸の混液 (1000:1)： 水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液： タイロシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。チルミコシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： タイロシン及びチルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 0.7 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機： H-107DF 及び H-80R α (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： D-13 (堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-1)

装置	型式	メーカー
MS	QTRAP 5500	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

タイロシン標準原液及びチルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 μ L を LC-MS/MS に注

入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりタイロシン及びチルミコシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (0.7 mg/L) 0.5 mL [メタノール溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

タイロシン及びチルミコシンを試料からクエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) で抽出し、ヘキサンで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えた、ホモジナイザーで攪拌した。ヘキサン 100 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層 10 mL (試料 0.5 g 相当) を遠心管に分取した。リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加えた後、pH 試験紙で pH 8 を確認し、3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

上清をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL で洗浄したものに負荷した。水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄した後、メタノール 9 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。メタノールで定容し、メンブランフィルターでろ過し

たものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (70 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

2. チルバロシン分析法

① 試薬・試液

チルバロシン標準液： 100 μ g/mL、純度 91.6% (Analytical standard solutions 製)

3-*O*-アセチルタイロシン標準品： 純度 96.0% (Toronto Research Chemicals 製)

アセトン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール： HPLC 用 (関東化学製)

ギ酸： 特級 (関東化学製)

りん酸： 特級 (小宗化学製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters 製)

水及びギ酸の混液 (1000 : 1)： 水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (3 : 2)： 水 600 mL 及びメタノール 400 mL を混合した。

水及びりん酸の混液 (9 : 1)： 水 90 mL 及びりん酸 10 mL を混合した。

標準原液： チルバロシン標準液 1 mL を精密に量り、メタノールで希釈して 10 mg/L 溶液を調製した。3-*O*-アセチルタイロシン標準品

約 1 mg を精秤し、メタノールで溶解して 10 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： チルバロシン標準原液及び 3-O-アセチルタイロシン標準原液をメタノールで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター： N-1300 (東京理化器械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-2)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

チルバロシン標準原液及び 3-O-アセチルタイロシン標準原液をメタノールで希釈して 0.0001、0.0002、0.0005、0.001 及び 0.002 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりチルバロシン及び 3-O-アセチルタイロシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 1 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-2)

チルバロシン及び 3-O-アセチルタイロシンを試料からりん酸酸性下アセトンで抽出した。その後、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、水及びりん酸の混液 (9 : 1) 10 mL 及びアセトン 100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。ろ過器上の残留物を広口ポリ瓶に戻し、アセトン 50 mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。

b. 精製

抽出液 4 mL (試料 0.2 g 相当) を遠沈管に分取し、水 15 mL を加え、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 10 mL、水及びメタノールの混液 (3 : 2) 10 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を水及びメタノールの混液 (3 : 2) 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を 2 回繰り返した。メタノール 9 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。メタノールで定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを

評価した。

3. リンコマイシン分析法

① 試薬・試液

リンコマイシン塩酸塩一水和物標準品： 純度 99.6% (Dr.Ehrenstorfer 製)

リンコマイシン- d_3 標準品： 純度 95% (Tronto Research Chemicals 製)

メタノール： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル： HPLC用 (関東化学製)

ギ酸、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二

ナトリウム十二水和物： 特級 (関東化学製)

硫酸アンモニウム： 特級 (小宗化学製)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム： InertSep PLS-2 (500 mg/6mL、ジーエルサイエンス製)

メンブランフィルター： PTFE シリンジフィルター (0.22 μ m、中部科学機器製)

水及びギ酸の混液 (1000 : 1)： 水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9)： 水及びギ酸の混液 (1000 : 1) 900 mL 並びにアセトニトリル 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (3 : 1)： 水 75 mL 及びメタノール 25 mL を混合した。

リン酸緩衝液 (pH 7.0)： リン酸二水素カリウム 6.4 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 18.9 g を水 750 mL に溶解し、1000 mL に定容した。

標準原液： リンコマイシン塩酸塩一水和物標準品約 28.35 mg (リンコマイシン 25 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液： リンコマイシン- d_3 標準品約 5 mg をメタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター： N-1300 (東京理化工機製)

遠心分離機： H-107DF 及び H-80R α (コクサ製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： D-13 (堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-3)

装置	型式	メーカー
MS	QTRAP 5500	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

リンコマイシン標準原液及びリンコマイシン- d_3 内標準原液を水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9) で希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.005 及び 0.01 mg/L (内標準溶液濃度 0.005 mg/L) 内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたリンコマイシン- d_3 のピーク面積に対するリンコマイシンのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によ

りリンコマイシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.5 mL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-3)

リンコマイシンを試料からメタノールで抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、5 mg/L 添加用内標準溶液 100 μ L 及びメタノール 50 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清み液 5 mL (試料 0.5 g 相当) をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40 $^{\circ}$ C) で濃縮乾固した。

b. 精製

残留物にリン酸緩衝液 (pH7.0) 及び硫酸アンモニウム 10 g を加え、5 分間振とう後、綿栓ろ過し、ろ液をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (500 mg/6mL)] [あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸緩衝液 (pH7.0) 5 mL で洗浄したもの] に負荷した。水 10 mL、水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄後、メタノール 10 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40 $^{\circ}$ C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、アセトニトリル

及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (100 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

4. ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法

① 試薬・試液

ストレプトマイシン硫酸塩標準品 : 754 μ g (力価) /mg (USP)

ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩標準品 : 753 μ g (力価) /mg (USP)

アセトニトリル : LC-MS 用 (関東化学製)

1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム : イオンペアクロマトグラフ用 (富士フィルム和光純薬製)

ヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) : LC-MS 用 (東京化成工業製)

メタノール、リン酸、クロロホルム、トリクロロ酢酸、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 : 特級 (富士フィルム和光純薬製)

メタケイ酸アルミン酸マグネシウム : ノイシリン NS₂N (富士化学工業製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラ

ム： Sep-Pak C18 Classic (360 mg、Waters 製)
メンブランフィルター： Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)： リン酸二水素カリウム 7.0 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 6.0 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。これを 121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌器で滅菌し、滅菌水で 2 倍希釈した。

トリクロロ酢酸溶液： トリクロロ酢酸 20 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした。

6 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナトリウム 120 g を量り、水 375 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナトリウム 20 g を量り、水 375 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナトリウム 2 g を量り、水 375 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

1/15 リン酸溶液： リン酸 20 mL 及び水 280 mL を混合した。

3%塩化ナトリウム溶液： 塩化ナトリウム 15 g を量り、水 485 mL を加えて溶かした。

1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液： 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 37.64 g を量り、水 150 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 200 mL とした。

0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有

リン酸緩衝液 (pH 2.0)： リン酸水素二ナトリウム 3.55 g 及び 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 9.41 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 2.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

水及びメタノールの混液 (1 : 1)： 水 500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10)： 水 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10)： アセトニトリル 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

標準原液： ストレプトマイシン硫酸塩標準品を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60°C で 3 時間乾燥した後、約 66 mg (ストレプトマイシン 50 mg (力価) 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg (力価) /L 溶液を調製した。ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩標準品を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60°C で 3 時間乾燥した後、約 132 mg (ジヒドロストレプトマイシン 100 mg (力価) 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg (力価) /L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： ストレプトマイシン標準原液及びジヒドロストレプトマイシン標準原液を水で希釈して 4 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： BM-2（日本精機製作所製）
ロータリーエバポレーター：N-1000V（東京理化器械製）

遠心分離機： H-60R（コクサン製）

振とう機： EL（スギヤマゲン製）

pH計： F-72（堀場アドバンスドテクノ）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-4）

装置	型式	メーカー
MS	4000 Q TRAP	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

ストレプトマイシン標準原液及びジヒドロストレプトマイシン標準原液を水及びヘプタフルオロ酪酸（約 0.5 mol/L 水溶液）の混液（1000 : 10）で希釈して 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 及び 0.4 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用混合標準溶液（4 mg/L）0.125 mL[水]を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-4）

ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンを試料からトリクロロ酢酸溶液で抽出し、クロロホルムで洗浄後、メタケイ酸アルミ

ン酸マグネシウム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。クロロホルム 100 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、水層 20 mL（試料 2 g 相当）を遠心管に分取し、0.1、1 及び 6 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び 1/15 リン酸溶液で pH 7.0 に調整した。

b. 精製

抽出液をメタケイ酸アルミン酸マグネシウムカラム（あらかじめ 1 cm のクロマトグラム管にノイシリン NS₂N を水に懸濁させて、その 3 mL を充填したもの）に負荷した。遠心管内を水 20 mL で洗い、洗液でクロマトグラム管を洗浄した。3%塩化ナトリウム溶液 20 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液に 1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 1 mL 及び 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液（pH 2.0）10 mL を加え、よく混合し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak C18 Classic (360 mg)]（あらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL、0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液（pH 2.0）5 mL で洗浄したもの）に負荷した。カラムを水で洗浄し、洗浄液の pH が 4~4.5 付近になったところで水及びメタノールの混液

(1 : 1) 10 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (100 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5日間の枝分かかれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

5. カナマイシン分析法

① 試薬・試液

カナマイシン硫酸塩標準品 : 790 µg/mg (USP)

アセトニトリル : LC-MS 用 (関東化学製)

ヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) : LC-MS 用 (東京化成工業製)

メタノール、リン酸、ヘキササン、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素カリウム、トリクロロ酢酸、25%アンモニア水 : 特級 (富士フィルム和光純薬製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis MCX (150 mg/6 mL、Waters 製)

メンブランフィルター : Millex-LG (0.2 µm、MILLIPORE 製)

リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) : リン酸二水素カ

リウム 7.0 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 6.0 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。これを 121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌器で滅菌し、滅菌水で 2 倍希釈した。

トリクロロ酢酸溶液 : トリクロロ酢酸 50 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした。

水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6 : 3 : 1) : 水 120 mL、メタノール 60 mL 及び 25%アンモニア水 20 mL を混合した。

水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) : 水 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) : アセトニトリル 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

標準原液 : カナマイシン硫酸塩標準品を約 31 mg (カナマイシン A 25 mg 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : カナマイシン A 標準原液を水で希釈して 2 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター : N-1000V (東京理化器械製)

遠心分離機 : H-60R (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： F-72 (堀場アドバンスドテクノ)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-5)

装置	型式	メーカー
MS	4000 Q TRAP	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

カナマイシン A 標準原液を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) で希釈して、ブランク試験溶液の溶媒を除去したものに添加し、0.005、0.01、0.02、0.05 及び 0.1 mg/L のマトリックス標準溶液を調製した。この溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりカナマイシン A の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.25 mL[水]を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

カナマイシン A を試料からトリクロロ酪酸溶液で抽出し、ヘキサンで洗浄後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、トリクロロ酪酸溶液 45 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間

遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 250 mL 容の広口ポリ瓶に入れ、ヘキサン 50 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。

3500 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

水層 10 mL (試料 1 g 相当) をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。カラムを水 10 mL、メタノール 5 mL で洗浄した後、水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6 : 3 : 1) 10 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (100 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

6. スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシ、スルファキノキサリン、トリメプリーム及びチアンフェニコール分析法

① 試薬・試液

スルファメトキサゾール標準品： 純度 99.9% (関東化学製)

スルファモノメトキシ-N-水和物標準品：

純度 99.6% (富士フィルム和光純薬製)

スルファキノキサリン標準品： 純度 99.0% (Sigma-Aldrich 製)

トリメトプリム標準品： 純度 99.9% (富士フィルム和光純薬製)

チアンフェニコール標準品： 純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、ギ酸、酢酸アンモニウム： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール： HPLC 用 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、ギ酸： LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム： InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

メンブランフィルター： Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

アセトニトリル飽和ヘキサン： アセトニトリル 30 mL 及びヘキサン 270 mL を混合し、5 分間振とうを行った。放置後、分離したヘキサン層を分取した。

アセトニトリル、水及びギ酸の混液 (100 : 100 : 1)： アセトニトリル 500 mL、水 500 mL 及びギ酸 (LC-MS 用) 5 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液 (100 : 1)： アセトニトリル 100 mL 及びギ酸 (LC-MS 用) 1 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液： 酢酸アンモ

ニウム 38.54 g を量り、水 350 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液： 水 1000 mL 及び 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 0.5 mL を混合した。

標準原液： スルファメトキサゾール標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。スルファモノメトキシニー水和物標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。スルファキノキサリン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。トリメトプリム標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (特級) で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。チアンフェニコール標準品約 10 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： スルファメトキサゾール標準原液、スルファモノメトキシニー水和物標準原液、スルファキノキサリン標準原液、トリメトプリム標準原液及びチアンフェニコール標準原液をメタノール (特級) で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液 (100 : 100 : 1) で希釈して 0.2 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： BM-2 (日本精機製作所製)

遠心分離機： H-60R (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-6)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad	SCIEX

	5500	
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

スルファメトキサゾール標準原液、スルファモノメトキシニン水合物標準原液、スルファキノキサリン標準原液、トリメトプリム標準原液及びチアンフェニコール標準原液をメタノール（特級）で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液（100 : 100 : 1）で希釈して 0.000125、0.00025、0.0005、0.00125 及び 0.0025 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりスルファメトキサゾール、スルファモノメトキシニン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコールの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用混合標準溶液（0.2 mg/L）0.5 mL [アセトニトリル、水及びギ酸の混液（100 : 100 : 1）] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-6）

スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシニン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコールを試料からアセトニトリルで抽出と同時にアセトニトリル飽和ヘキサンで洗浄し、ギ酸（特級）を加え

て、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、ギ酸（特級）1 mL を加えた後、アセトニトリルで定容した。

b. 精製

抽出液 5 mL（試料 0.5 g 相当）をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF（500 mg/6 mL）]（あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したもの）に負荷し、溶出液を 20 mL 容全量フラスコに受けた。次いで、アセトニトリル及びギ酸の混液（100 : 1）5 mL で溶出し、先の全量フラスコに合わせた後、水で定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度（10 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回（2 併行）、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

7. エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)及びノルフロキサシン分析法

① 試薬・試液

エンロフロキサシン標準品：純度 99.8%（富士フィルム和光純薬製）

シプロフロキサシン塩酸塩標準品：純度 100%（富士フィルム和光純薬製）

ノルフロキサシン標準品：純度 99.9%（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール：HPLC 用（関東化学製）

塩酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、水酸化ナトリウム：特級（関東化学製）

メタリン酸：鹿特級（関東化学製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（60 mg/3 mL、Waters 製）

メンブランフィルター：PTFE シリンジフィルター（0.22 μm、中部科学機器製）

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.43 g を量り、水 200 mL に溶解した。

1 vol%ギ酸含有 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL 及びギ酸 10 mL に水を加えて正確に 1000 mL とした。

0.2%メタリン酸溶液：メタリン酸 2 g を量り、水 1000 mL に溶解した。

0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）：0.2%メタリン酸溶液 600 mL 及びアセトニトリル（残留農薬試験用）400 mL を混合した。

水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）：水 500 mL、メタノール（HPLC用）500 mL 及び塩酸 1 mL を混合した。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 100

mL とした。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL と水 90 mL を混合した。

標準原液：エンロフロキサシン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

シプロフロキサシン塩酸塩標準品約 12 mg（シプロフロキサシン 10 mg 相当）を精秤し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた後、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。ノルフロキサシン標準品約 10 mg を精秤し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた後、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：エンロフロキサシン標準原液、シプロフロキサシン標準原液及びノルフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）で希釈して 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-7）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Exion LC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

エンロフロキサシン標準原液、シプロフロキサ

サシン標準原液及びノルフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液（500 : 500 : 1）で希釈して、0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンロフロキサシン、シプロフロキサシン及びノルフロキサシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（0.5 mg/L）0.1 mL [水、メタノール及び塩酸の混液（500 : 500 : 1）] を添加し、よく混合した後、30 分放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-7）

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン及びノルフロキサシンを試料から 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3 : 2）で抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3 : 2）80 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、抽出液の上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3 : 2）で定容した。抽出液 10 mL（試料 0.5 g 相当）をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター（40°C）で約 3 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB（60 mg/3 mL）]（あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの）に負荷した。なす形フラスコ内を水 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター（40°C）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、メタノール及び塩酸の混液（500 : 500 : 1）10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度（10 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回（2 併行）、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

8. クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法

① 試薬・試液

クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.2%（和光純薬製）

4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 86.5%（Carbosynth 製）

オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.4%（和光純薬製）

4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品： 純度 95%（Toronto Research Chemicals 製）

テトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.1%（和光純薬製）

4-*epi*-テトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.4% (Honeywell 製)

ドキシサイクリンヒクラー特標準品： 純度 98.1% (和光純薬製)

アセトニトリル、メタノール： HPLC 用 (関東化学製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、酢酸、酢酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物： 特級 (関東化学製)

クエン酸一水和物： 特級 (富士フイルム和光純薬製)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム： InertSep PLS-2 (270 mg、ジーエルサイエンス製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液： 酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1)： 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 20 mL、水 180 mL 及びメタノール 800 mL を混合した。

10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0)： クエン酸一水和物 12.9 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 27.6 g を量り、水を加えて溶かし正確に 1000 mL とした。この溶液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 3.7 g を加えて溶解した。

水及びメタノールの混液 (4 : 1)： 水 160 mL とメタノール 40 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (1000 : 1)： 水 1000 mL と酢酸 1 mL を混合した。

標準原液： クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg (クロルテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg (4-*epi*-クロルテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.0 mg (オキシテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-オキシサイクリン標準品約 25mg を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

テトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.1 mg (テトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-テトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.1 mg (4-*epi*-テトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。ドキシサイクリンヒクラー特標準品約 28.9 mg (ドキシサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： クロルテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液、オキシテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液、テトラサイクリン標準原液、4-*epi*-テトラサイクリン標準原液及びドキシサイクリン標準原液を 20

mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で希釈して1 mg/L混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機： H-107DF (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-8)

装置	型式	メーカー
MS	LCMS8050	島津製作所
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	LabSolutions LCMS	島津製作所

③ 定量

クロルテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液、オキシテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液、テトラサイクリン標準原液、4-*epi*-テトラサイクリン標準原液及びドキシサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で希釈して0.0005、0.001、0.0015、0.005、0.01及び0.015 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりクロルテトラサイクリン、4-*epi*-クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、4-*epi*-オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、4-*epi*-テトラサイクリン及びドキシサイクリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（1 mg/L）0.25 mL [20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール

及び水の混液（4：1）溶液] を添加した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-8）

クロルテトラサイクリン、4-*epi*-クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、4-*epi*-オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、4-*epi*-テトラサイクリン及びドキシサイクリンを試料から10 mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液（pH 4.0）で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

a. 抽出

試料5 gを250 mL容の広口ポリ瓶に量り取り、10 mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液（pH 4.0）100 mLを加え、ホモジナイザーで1分間攪拌した後、3000 r/minで5分間遠心分離した。

b. 精製

抽出液 10 mL（試料 0.5 g 相当）をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg)]（あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの）に負荷した。水 20 mL、水及びメタノールの混液（4:1）10 mL で順次洗浄した後、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液（4：1）で定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度（50 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

9. フロルフェニコール分析法

① 試薬・試液

フロルフェニコール標準品： 純度 98.8%（富士フィルム和光純薬製）

フロルフェニコールアミン標準品： 純度 99.8%（Sigma-Aldrich 製）

アセトニトリル： HPLC 用（関東化学製）

酢酸エチル、ヘキサン、メタノール： 残留農薬試験用（関東化学製）

アセトン、塩化ナトリウム、酢酸、水酸化ナトリウム： 特級（関東化学製）

塩酸： 特級（小宗化学薬品製）

25%アンモニア水： 特級（富士フィルム和光純薬製）

ケイソウ土： セライト 545（関東化学製）

多孔性ケイソウ土カラム： InertSep K-solute（5 mL、ジーエルサイエンス製）

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： Oasis MCX（150 mg/6 mL、Waters 製）

メンブランフィルター： Millex-LG（0.2 µm、MILLIPORE 製）

6 mol/L 塩酸： 塩酸 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナ

トリウム 60 g を量り、水 200 mL 加え、マグネチックスターラーで攪拌し、溶解した。

アセトン及び水の混液（1：1）： アセトン 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸： 酢酸 1 mL に水を加え、1000 mL に定容した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）： 0.1 vol% 酢酸 100 mL 及びメタノール 100 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）： 0.1 vol% 酢酸 450 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液（99：1）： メタノール 198 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

水及び酢酸の混液（1000：1）： 水 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

アセトニトリル及び酢酸の混液（1000：1）： アセトニトリル 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液： フロルフェニコールアミン標準品約 5 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液： フロルフェニコール標準品約 14.5 mg（フロルフェニコールアミンとして 10 mg 相当）を精秤し、メタノールで溶解してフロルフェニコールアミンとして 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： 添加用標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

オイルバス： THERMO MINDER SH-12 (タイテック製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

遠心分離機： H-1000FR (コクサン製)

ロータリーエバポレーター： N-1300 (東京理化工械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-9)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

フロルフェニコールアミン標準原液を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9:1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりフロルフェニコールアミンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 1 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-9)

試料中のフロルフェニコール及び加水分解により代謝物フロルフェニコールアミンに変換される代謝物を塩酸で加水分解し、フロル

フェニコールアミンとした後、ヘキサンで洗浄した。その後、多孔性ケイソウ土カラム及びスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 100 mL 容の遠心管に量り取り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、密栓して 100°C のオイルバスで 3 時間 (15 分間置きに攪拌) 加水分解した。30 分間放冷後、試料溶液を 200 mL 容の遠心管に移し、100 mL 容の遠心管内を水 10 mL 及びヘキサン 40 mL で洗い、洗液を 200 mL 容の遠心管に合わせた後、振とう機で 5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、ヘキサン層を捨てた。抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g を加え混合し、吸引ろ過器を用いて抽出液をろ過した後、遠心管内及び残留物をアセトン及び水の混液 (1:1) 20 mL で洗い、洗液をろ過した。全ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて水で定容した。

b. 精製

あらかじめ塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた試験管に、抽出液 2.5 mL (試料 0.25 g 相当) を分取し試験管ミキサーで混合した後、多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)] に負荷し 30 分間放置した。試験管内を酢酸エチル 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、溶出する操作を 2 回繰り返す、100 mL 容の遠心管に受けた。次いで酢酸エチル 20 mL で溶出し、先の遠心管に

受けた。溶出液をロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）1 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX（150 mg/6 mL）]（あらかじめメタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）3 mL で洗浄したものに負荷した。遠心管内を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）3 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。遠心管内をメタノール 2 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール及び 25%アンモニア水の混液（99：1）5 mL で溶出し、50 mL 容の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）2.5 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度（100 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

10. アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法

① 試薬・試液

アモキシシリン三水和物標準品： 純度 99.8%
（富士フィルム和光純薬製）

アンピシリン三水和物標準品： 純度 98.9%
（Sigma-Aldrich 製）

ベンジルペニシリンナトリウム標準品： 純度 100.0%（関東化学製）

アモキシシリン-*d*₄：（Toronto Research Chemicals 製）

アンピシリン-*d*₅：（Toronto Research Chemicals 製）

ペニシリン G-*d*₇ N-エチルピペリジニウム塩：
（Sigma-Aldrich 製）

メタノール： LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

アセトン、リン酸水素二カリウム： 特級
（関東化学製）

アセトニトリル、クロロホルム、タングステン（VI）酸ナトリウム二水和物、酢酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸、25%アンモニア水、酢酸： 特級（富士フィルム和光純薬製）

硫酸： 特級（Sigma-Aldrich 製）

炭酸水素アンモニウム： 一級（富士フィルム和光純薬製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： InertSep HLB（200 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製）

メンブランフィルター： Millex-LG (0.2 μm 、MILLIPORE 製)

リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①： リン酸二水素カリウム 7 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 6 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液： 酢酸アンモニウム 38.54 g を量り、水 350 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液： 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL 及び水 950 mL を混合した。

0.17 mol/L 硫酸： 硫酸 4.8 mL に水を加えて正確に 500 mL とした。

5% タングステン酸ナトリウム溶液： タングステン (VI) 酸ナトリウム二水和物 25 g を量り、水 475 mL を加えて溶かした。

リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②： リン酸二水素カリウム 8 g 及びリン酸水素二カリウム 2 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

アセトン及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②の混液 (1 : 1)： アセトン 150 mL 及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②150 mL を混合した。

0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液： 炭酸水素アンモニウム 7.91 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした後、25%アンモニア水で pH を 8.0 に調整した。

アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1)： アセトニトリル 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (1000 : 1)： 水 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

メタノール及び酢酸の混液 (1000 : 1)： メタノール 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液： アモキシシリン三水和物標準品約 58 mg (アモキシシリン 50 mg 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。アンピシリン三水和物標準品約 59 mg (アンピシリン 50 mg 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。ベンジルペニシリンナトリウム標準品約 21 mg (ベンジルペニシリン 20 mg 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液： 1 mg 容量のアモキシシリン- d_4 標準品を水で 10 mL 容全量フラスコに洗いこんだ後、溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量のアンピシリン- d_5 標準品をリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で 10 mL 容全量フラスコに洗いこんだ後、溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量のペニシリン G- d_7 N-エチルピペリジニウム塩標準品をリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で 40 mL 容全量フラスコに洗いこんだ後、溶解して 250 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： アモキシシリン標準原液、アンピシリン標準原液及びベンジルペニシリン標準原液を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

で希釈して 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液： アモキシシリン内標準原液、アンピシリン内標準原液及びベンジルペニシリン内標準原液をそれぞれ 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー： BM-2（日本精機製作所製）

ロータリーエバポレーター： N-1000V（東京理化器械製）

遠心分離機： H-60R（コクサン製）

振とう機： EL（スギヤマゲン製）

pH 計： F-72（堀場アドバンスドテクノ製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-10）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

アモキシシリン標準原液及びアモキシシリン内標準原液、アンピシリン標準原液及びアンピシリン内標準原液、ベンジルペニシリン標準原液及びベンジルペニシリン内標準原液を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈し、0.00005、0.0001、0.0002、0.0005 及び 0.001 mg/L（内標準溶液濃度 0.0025 mg/L）内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたアモキシシリン- d_4 のピーク面積に対するアモキシシリンのピーク面積の比、アンピシリン- d_5 のピーク面積に対するアンピシリンのピーク面積の比、ペニ

シリン G- d_7 のピーク面積に対するベンジルペニシリンのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によりアモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用混合標準溶液（0.5 mg/L）0.2 mL [50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-10）

アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリンを試料からアセトン及びリン酸塩緩衝液（pH 6.0）②の混液（1：1）で抽出し、クロロホルムで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の遠心管に量り取り、0.17 mol/L 硫酸 5 mL 及び 5% タングステン酸ナトリウム溶液 5 mL を加えてスパークテルでよく混合した。アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリンの 5 mg/L 添加用内標準溶液 0.125 mL、アセトン及びリン酸塩緩衝液（pH 6.0）②の混液（1：1）40 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清をろ紙（直径 125 mm、No. 5A、ADVANTEC 製）でろ過した。抽出液 2 mL（試料 0.2 g 相当）を 50 mL 容の遠心管に分取し、0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 20 mL を加えた後、

クロロホルム20 mLを加えて振とう機で5分間振とうした。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上層をなす形フラスコに分取し、窒素ガスでクロロホルムを留去した。

b. 精製

aで得られた溶液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 10 mL、水 10 mL、0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 10 mL で洗浄したもの) に負荷した。なす形フラスコ内を 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。さらに、カラムを 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 5 mL で 2 回洗浄した。アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 4 mL に溶解したものを 2 mL 分取し、50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で 5 mL に定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (20 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

11. ノシヘプタイド分析法

① 試薬・試液

ノシヘプタイド標準品：純度 960 µg (力価) /mg (農林水産消費安全技術センター製)

アセトン：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

酢酸：特級 (関東化学製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18 (1,000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

5%酢酸：水 950 mL 及び酢酸 50 mL を混合した。

水、メタノール及び酢酸の混液 (50 : 50 : 1)：水 50 mL、メタノール 50 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

メタノール及び酢酸の混液 (99 : 1)：メタノール 495 mL 及び酢酸 5 mL を混合した。

メタノール、水及び酢酸の混液 (95 : 5 : 1)：メタノール 95 mL、水 5 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

メタノール、水及び酢酸の混液 (65 : 35 : 1)：メタノール 650 mL、水 350 mL 及び酢酸 10 mL を混合した。

標準原液：ノシヘプタイド標準品約 10 mg を精秤し、メタノール及び酢酸の混液 (99 : 1) で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：ノシヘプタイド標準原液をメタノール及び酢酸の混液 (99 : 1) で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

HPLC（測定条件：表 1-11）

装 置	型 式	メーカ
LC	Prominence LC-20AD	島津製作所
検出器	RF-10A _{XLS}	島津製作所
データ処理	LabSolutions	島津製作所

③ 定量

ノシヘプタイド標準原液をメタノール、水及び酢酸の混液（95：5：1）で希釈して0.0005、0.001、0.002、0.005及び0.01 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液20 µLをHPLCに注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液20 µLをHPLCに注入し、検量線から絶対検量線法によりノシヘプタイドの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料10 gに添加用標準溶液（0.1 mg/L）1 mL [メタノール及び酢酸の混液（99：1）の溶液]を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-11）

ノシヘプタイドを試料から5%酢酸及びアセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLCで定量した。

a. 抽出

試料10 gを250 mL容の広口ポリ瓶に量り取り、5%酢酸20 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイザーで1分間攪拌した後、吸引ろ過した。ろ過器上の残留物を広口ポリ瓶に戻し、アセトン50 mLを加えてホモジナイザーで1分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液

を200 mL容全量フラスコにあわせ、アセトンで定容した。

b. 精製

抽出液10 mL（試料0.5 g相当）を遠心管に分取し、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加え、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18（1,000 mg/6 mL）]（あらかじめメタノール5 mL、5%酢酸5 mLで洗浄したもの）に負荷した。水、メタノール及び酢酸の混液（50：50：1）10 mLで洗浄後、メタノール、水及び酢酸の混液（95：5：1）5 mLで溶出し、5 mL容全量フラスコに受けた。水、メタノール及び酢酸の混液（50：50：1）で定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度（10 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2併行）、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

12. エンラマイシン分析法

① 試薬・試液

エンラマイシン A 標準品： 純度 96.426%
（TOKU-E 製）

アセトニトリル： LC-MS 用（関東化学製）

ジクロロメタン、メタノール、酢酸、塩化ナトリウム： 特級（富士フイルム和光純薬製）

クエン酸一水和物： 特級（関東化学製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： InertSep HLB（200 mg/6 mL、ジューエルサイエンス製）

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：
Sep-Pak Plus NH2 (360 mg、Waters 製)
メンブランフィルター：
Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

クエン酸抽出液：クエン酸一水和物 50 g を量り、水 950 mL を加えて溶かした後、このクエン酸溶液 600 mL 及びメタノール 1200 mL を混合した。この混合溶液に飽和量の塩化ナトリウムを加えてかき混ぜ、上澄み液を使用した。

メタノール及び水の混液 (4 : 1)：メタノール 800 mL 及び水 200 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (7 : 3)：水 700 mL 及びメタノール 300 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (1 : 1)：水 500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (1000 : 1)：水 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000 : 1)：アセトニトリル 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液：エンラマイシン A 標準品約 5 mg を精秤し、メタノール及び水の混液 (4 : 1) で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：エンラマイシン A 標準原液を水及びメタノールの混液 (1 : 1) で希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V (東京

理化器械製)

遠心分離機：H-60R (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-12)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

エンラマイシン A 標準原液を水及びメタノールの混液 (1 : 1) で希釈して 0.00125、0.0025、0.005、0.0125 及び 0.025 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンラマイシン A の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.150 mL [水及びメタノールの混液 (1 : 1)] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-12)

エンラマイシン A を試料からクエン酸抽出液で抽出し、ジクロロメタンで洗浄後、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の遠心管に量り取り、ク

エン酸抽出液50 mL及びジクロロメタン25 mLを加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を100 mL容三角フラスコに分取し、残留物にクエン酸抽出液25 mLを加えた後、振とう機で5分間振とうした。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を100 mL容三角フラスコに合わせた。

抽出液をガラスろ紙（直径40 mm、GA-200、ADVANTEC製）で吸引ろ過した。ろ液を100 mL容全量フラスコに合わせて、クエン酸抽出液で定容した。抽出液5 mL（試料0.25 g相当）をなす形フラスコに分取し、窒素ガスでジクロロメタンを留去した。

b. 精製

a で得られた溶液に水 7 mL を加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL で洗浄したものに負荷した。なす形フラスコ内を水及びメタノールの混液 (7 : 3) 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。さらに、カラムを水及びメタノールの混液 (7 : 3) 5 mL で洗浄した。ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂ (360 mg)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (4 : 1) 5 mL で洗浄したものを接続し、メタノール及び水の混液 (4 : 1) 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃

縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液 (1 : 1) 2.5 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (30 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

[令和4年度]

試料： 鶏の筋肉は、インターネット経由で岩手県産 (ピペラジン分析法は神奈川県川崎市のスーパーで四国産、PCB分析法はインターネット経由で青森県産) を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリークサーを用いて細切均一化した。

1. ドラメクチン分析法

① 試薬・試液

ドラメクチン標準品:純度 98.7%(Sigma-Aldrich製)
酢酸エチル:残留農薬試験用(関東化学製)
メタノール、アセトニトリル:HPLC用(関東化学製)
ギ酸、酢酸アンモニウム、メタノール:特級(関東化学製)
グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム:InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg/20 mL、ジーエルサイエンス製)
酢酸エチル及びギ酸の混液(100:1):酢酸エチル 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液:1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液:ドラメクチン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール(HPLC 用)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:ドラメクチン標準原液をメタノール(HPLC 用)で希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター : N-1300(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-1)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

ドラメクチン標準原液をメタノール (HPLC 用) で希釈して 0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりドラメクチンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.5 mg/L)0.1 mL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

ドラメクチンを試料からメタノールで抽出し、グラファイトカーボン/アミノ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 で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、メタノール (特級) 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙(直径 60 mm、No. 4、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をメタノール (特級) 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、メタノール (特級) で定容した。

b. 精製

抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当)をグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/NH₂(500 mg/500 mg/20 mL)] (あらかじめメタノール (HPLC 用) 10 mL で洗浄したもの)に負荷した後、酢酸エチル及びギ酸の混液(100 : 1)20 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をメタノール (HPLC 用) 2 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(5 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

2. レバミゾール分析法

① 試薬・試液

レバミゾール塩酸塩標準品 : 純度 100%(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル、ヘキサン：残留農薬試験用
(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール：HPLC用(関東
化学製)

ギ酸：特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB分析用(関東化学製)

メンブランフィルター：PTFE シリンジフィル
ター(0.22 μm 、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン：ヘキサン 500
mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL
を混合し、5分間振とう後静置してヘキサン層
を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)：水 120
mL 及びアセトニトリル(HPLC用)80 mL を混合
した。

水及びギ酸の混液(1000 : 1)：水 1000 mL 及び
ギ酸 1 mL を混合した。

標準原液：レバミゾール塩酸塩標準品をレバ
ミゾールとして約 25 mg を精秤し、メタノー
ルで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：レバミゾール標準原液をメ
タノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-
TURRAX(IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF 及び H-80R α (コクサン製)

振とう機：EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300(東京理化
器械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-2)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad	SCIEX

	5500	
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

レバミゾール標準原液を水及びアセトニト
リルの混液(3 : 2)で希釈して 0.125、0.25、0.5、
1、2.5 及び 5 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液を調製した。この
溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られた
ピーク面積を用いて検量線を作成した。試験
溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から
絶対検量線法によりレバミゾールの含量を算
出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(1 mg/L)100 μL [メ
タノール溶液]を添加し、よく混合した後、30
分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-2)

レバミゾールを試料からアセトニトリルで
抽出し、ヘキサンで洗浄した後、LC-MS/MS で
定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、
アセトニトリル(残留農薬試験用)60 mL 及び無
水硫酸ナトリウム 20 g を加えた後、ホモジナ
イザーで 1分間攪拌した。3000 r/min で 5分間
遠心分離した後、アセトニトリル層を綿栓ろ
過した。残留物にアセトニトリル(残留農薬試
験用)40 mL を加え 5分間振とうし、3000 r/min
で 5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を
綿栓ろ過した。

b. 精製

a. で得られたろ液を合わせ、アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう後、アセトニトリル層を 200 mL 容全量フラスコにとり、アセトニトリル(残留農薬試験用)で定容した。抽出液 1 mL(試料 0.05 g 相当)を遠沈管に分取し、ロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(10 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

3. トリクラベンダゾール分析法

① 試薬・試液

トリクラベンダゾール標準品：純度 99.9%(富士フィルム和光純薬製)

トリクラベンダゾールオキシソン標準品：純度 98.4%(富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸、水酸化ナトリウム、塩酸、酢酸アンモニウム：特級(富士フィルム和光純薬製)

エタノール：特級(キシダ化学製)

メタノール：LC-MS 用(富士フィルム和光純薬製)

30%過酸化水素水：精密分析用(富士フィルム和光純薬製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis

MCX(500 mg/6 mL、Waters 製)

メンブランフィルター：Millex-LG(0.2 µm、

MILLIPORE 製)

5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 200 g を量り、水を加えて溶かし 1000 mL とした。

5 mol/L 塩酸：塩酸 450 mL に水を加えて 1000 mL とした。

エタノール及び酢酸の混液(1 : 1)：エタノール 50 mL 及び酢酸 50 mL を混合した(用時調製)。

メタノール及び水の混液(7 : 3)：メタノール 700 mL 及び水 300 mL を混合した。

アセトニトリル及び水の混液(1 : 1)：アセトニトリル 1000 mL 及び水 1000 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 38.54 g を量り、水を加えて溶かし 500 mL とした。

0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：水 1000 mL 及び 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 0.5 mL を混合した。

ケト-トリクラベンダゾール標準原液：トリクラベンダゾールオキシソン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液：トリクラベンダゾール標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：添加用標準原液をメタノールで希釈して 2 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ロータリーエバポレーター：N-1000(東京理化学器械製)

遠心分離機：H-1000FR(コクサン製)

振とう機：EL(スギヤマゲン製)

ブロックヒーター：MG-3200(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-3)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

ケト-トリクラベンダゾール標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル及び水の混液(1 : 1)で希釈して 0.05、0.1、0.2、0.5 及び 1 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりケト-トリクラベンダゾールの含量を算出した。換算係数 1.091* を乗じてトリクラベンダゾールの含量を算出した。

$$* 1.091 = \frac{\text{トリクラベンダゾールの分子量} \quad 359.66}{\text{ケト-トリクラベンダゾールの分子量} \quad 329.57}$$

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(2 mg/L)0.05 mL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-3)

試料をアルカリ加水分解した後、塩酸で酸性としてトリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾールに変換される代謝物を酢酸エチルで抽出した。エタノール及び酢酸混液の溶液とした後、過酸化水素を加え酸化反応でトリクラベンダゾール及びそ

の代謝物をケト-トリクラベンダゾールに酸化した。酸化反応後、スルホン酸塩修飾ジニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

c. 加水分解

試料 10 g を 50 mL 容分解容器(ポリプロピレン製)に量り取り、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、密栓して 100°C で 3 時間加熱した。

d. 抽出

放冷後、内容物を 250 mL 容広口ポリ瓶に移し、先の分解容器内をメタノール 5 mL で洗浄し、洗液を内容物と合わせた。5 mol/L 塩酸 12 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とうした。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。次いで水層に酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とうした。

3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル層を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、酢酸エチルで定容した。

抽出液 0.5 mL(試料 0.05 g 相当)をねじ口試験管に分取して、室温で窒素ガスを通じ溶媒を除去した。

e. 酸化反応

残留物をエタノール及び酢酸の混液(1 : 1)5 mL に溶解し、過酸化水素水 25 µL を加えて密栓をし、90°C で 16 時間加熱した。

f. 精製

試験管を放冷した後、反応物をメタノール 10 mL を用いてなす形フラスコに移し、ロータ

リーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をメタノール及び水の混液(7 : 3)5 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX(500 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液(7 : 3) 5 mL で洗浄したもの)に負荷した。なす形フラスコ内を同混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄した。

メタノール 20 mL で溶出し、なす型フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をアセトニトリル及び水の混液(1 : 1)4 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(10 μg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

4. ピペラジン分析法

① 試薬・試液

ピペラジン標準品:純度 98.0%(Dr.Ehrenstorfer 製)
酢酸エチル、ヘキサン:残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール:HPLC 用(富士フイルム和光純薬製)

トリクロロ酢酸:生化学用(富士フイルム和光純薬製)

25%アンモニア水:試薬特級(富士フイルム和光純薬製)

酢酸アンモニウム:試薬特級(関東化学製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロ

リドン共重合体ミニカラム:Oasis MCX(500 mg/6 cc、Waters 製)

メンブランフィルター(0.2 μm)付きバイアル:(ジールサイエンス製)

10%トリクロロ酢酸:トリクロロ酢酸 50 g を超純水に溶解し、500 mL に定容した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5):メタノール 190 mL と 25%アンモニア水 10 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム 15.41 g に超純水を 200 mL 加え溶解した。

10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液:1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL と超純水 990 mL を混合した。

標準原液:ピペラジン標準品約 2.5 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー: NS-52 PHYSCOTRON(マイクロテック・ニチオン製)

遠心分離機: H-80F(コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-4)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 4500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

ピペラジン標準原液をメタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)で希釈して 0.5、1、5、10 及び 20 μg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりピペラジンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液(1 mg/L)0.05 mL[メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-4)

ピペラジンを試料から 10%トリクロロ酢酸で抽出と同時にヘキサン及び酢酸エチルで洗浄し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製試験管に量り取り、10%トリクロロ酢酸 30 mL、ヘキサン 5 mL 及び酢酸エチル 5 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、10%トリクロロ酢酸層を綿栓ろ過した。残留物に 10%トリクロロ酢酸 15 mL、ヘキサン 2 mL 及び酢酸エチル 2 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、10%トリクロロ酢酸層を綿栓ろ過した。ろ液を 50 mL 容全量フラスコに入れ、10%トリクロロ酢酸で定容した。

b. 精製

抽出液をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX

(500 mg/6 cc)] (あらかじめメタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)10 mL、メタノール 5 mL、水 5 mL 及び 10%トリクロロ酢酸 10 mL で洗浄したものに抽出液 10 mL(試料 1 g 相当)を負荷した。メタノール及び 25%アンモ

ニア水の混液 7.5 mL で溶出し、15 mL 容ポリプロピレン製試験管に受けた。溶出液をメタノール及び 25%アンモニア水の混液で 10 mL に定容し、メンブランフィルター付きバイアルでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

5. アンプロリウム分析法

① 試薬・試液

アンプロリウム塩酸塩標準品:純度 99.3%(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール:HPLC 用(関東化学製)

ギ酸:特級(関東化学製)

ギ酸アンモニウム:特級(関東化学製)

カルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム :Oasis WCX(150 mg/6 mL、Waters 製)

50 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 4.5):ギ酸アンモニウム 3.15 g を超純水 990 mL に加えて溶解し、ギ酸で pH4.5 に調整した後、超純水で 1000 mL とした。

水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2):超純水 900 mL、アセトニトリル(HPLC 用)100 mL 及びギ酸 20 mL を混合した。

標準原液:アンプロリウム塩酸塩標準品約 29 mg(アンプロリウム 25 mg 相当)を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:アンプロリウム標準原液をメタノ

ールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX
(IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-80Rα(コクサン製)

振とう機：EL(スギヤマゲン製)

pH 計：D-13(堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-5)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	AB SCIEX
LC	ExionLC AD	AB SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

アンプロニウム標準原液を水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90 : 10 : 2)で希釈して 0.5、1、2.5、5 及び 10 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりアンプロニウムの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(1 mg/L)100 µL[メタノール溶液]を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

アンプロリウムを試料からアセトニトリルで抽出し、カルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、

アセトニトリル (残留農薬試験用) 50 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。

3000 r/min で 10 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル (残留農薬試験用) 20 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 10 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、アセトニトリル (残留農薬試験用) で定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL をカルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis WCX(150 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル (残留農薬試験用) 10 mL で洗浄したもの)に負荷した。カラムをアセトニトリル (残留農薬試験用) 5 mL で洗浄した後、水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90 : 10 : 2) 10 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。同混液で定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(10 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

6. エトパペート分析法

① 試薬・試液

エトパペート標準品：純度 99.4%(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、ヘキサン：残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール：HPLC 用(関東化学製)

ギ酸：特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム:PCB 分析用(関東化学製)
メンブランフィルター:PTFE シリンジフィルター
(0.22 μm、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン:ヘキサン 500 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3:2):水 120 mL 及びアセトニトリル(HPLC 用)80 mL を混合した。

水及びギ酸の混液(1000:1):水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液:エトパベート標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:エトパベート標準原液をアセトニトリル(HPLC 用)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-107DF 及び H-80Rα (コクサン製)

振とう機 : EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター : N-1300(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-6)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

エトパベート標準原液を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)で希釈して 0.1、0.2、0.5、1 及び 2 μg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエトパベートの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.1 mg/L)1 mL[アセトニトリル溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-6)

エトパベートを試料からアセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル(残留農薬試験用)60 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 40 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。残留物及びヘキサン層にアセトニトリル(残留農薬試験用)40 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル(残留農薬試験用)で定容した。抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当)を遠沈管に分取し、ロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(10 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

7. ナイカルバジン及びハロフジノン分析法

① 試薬・試液

ナイカルバジン標準品:純度 99.7%(富士フィルム和光純薬製)

ハロフジノン臭化水素酸標準品:純度 98.5%(SIGMA-ALDRICH 製)

アセトニトリル、ヘキサン:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール:HPLC用(関東化学製)

ギ酸:特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム:PCB分析用(関東化学製)

メンブランフィルター:PTFE シリンジフィルター(0.22 µm、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン:ヘキサン 500 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL を混合し、5分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3:2):水 120 mL 及びアセトニトリル(HPLC用)80 mL を混合した。

水及びギ酸の混液(1000:1):水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液:ナイカルバジン標準品を 4,4'-ジニトロカルバニリドとして約 12.5 mg を精秤し、N,N-ジメチルホルムアミドを加えて溶解した後アセトニトリル(HPLC用)で 250 mg/L 溶液を調製した。ハロフジノン臭化水素酸標準品をハロフジノンとして約 10.0 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:4,4'-ジニトロカルバニリド標準原液をアセトニトリル(HPLC用)で希釈して 1 mg/L 溶

液を調製した。ハロフジノン標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー:T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

遠心分離機:H-107DF 及び H-80Ra(コクサン製)

振とう機:EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター:N-1300(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-7)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

4,4'-ジニトロカルバニリド標準原液及びハロフジノン標準原液を水及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 0.125、0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により 4,4'-ジニトロカルバニリド及びハロフジノンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に 4,4'-ジニトロカルバニリド添加用標準溶液(1 mg/L)100 µL[アセトニトリル溶液]及びハロフジノン添加用標準溶液(1 mg/L)100 µL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要(図 1-7)

4,4'-ジニトロカルバニリド及びハロフジノン
を試料からアセトニトリルで抽出し、ヘキサ
ンで洗浄した後、LC-MS/MSで定量及び確認し
た。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、
アセトニトリル(残留農薬試験用)60 mL 及び無
水硫酸ナトリウム 20 g を加えた後、ホモジナ
イザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間
遠心分離した後、アセトニトリル層を綿栓ろ
過した。残留物にアセトニトリル(残留農薬試
験用)40 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min
で 5 分間遠心分離した後、アセトニトリル層を
綿栓ろ過した。

b. 精製

a. で得られたろ液を合わせ、アセトニトリル
飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう後、
アセトニトリル層を 200 mL 容全量フラスコに
とり、アセトニトリル(残留農薬試験用)で定容
した。抽出液 1 mL(試料 0.05 g 相当)を遠沈管に
分取し、ロータリーエバポレーター(40 °C)で濃
縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を
除去した。残留物を水及びアセトニトリルの
混液(3 : 2)1 mL に溶解し、メンブランフィルタ
ーでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(10 µg/kg)で
妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイ
ドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝
分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価
した。

8. モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマ

イシン分析法

① 試薬・試液

モネンシンナトリウム水和物標準品:純度 98.7%
(Dr.Ehrenstorfer 製)

ラサロシド A ナトリウム塩標準液(100 mg/L):純度
100%(Dr.Ehrenstorfer 製)

ナラシン A 標準品:純度 86.1%(Sigma Aldrich 製)

サリノマイシンナトリウム塩標準品:純度 79.6%
(Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル:残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール:HPLC 用(関東化学製)

酢酸アンモニウム:特級(関東化学製)

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニ
カラム:Oasis HLB(200 mg/6 mL、Waters 製)

アセトニトリル及び水の混液(9:1):アセトニトリル
900 mL 及び水 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液(1:1):水 100 mL 及びメタ
ノール 100 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム
15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL と
した。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液:1 mol/L 酢酸アン
モニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液:モネンシンナトリウム水和物標準品を約
21.0 mg(モネンシン 20 mg 相当)を精秤し、メタノ
ールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。ラサ
ロシド標準原液は市販の 100 mg/L 溶液を使用し
た。ナラシン A 標準品約 29.1 mg(ナラシン A 25
mg 相当)を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L
溶液を調製した。

サリノマイシンナトリウム塩標準品約 32.3 mg(サリノ
マイシン 25 mg 相当)を精秤し、メタノールで溶解し
て 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:モネンシン標準原液、ラサロシド
標準原液、ナラシン標準原液及びサリノマイシン標

準原液をメタノールで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-8)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

モネンシン標準原液、ナラシン標準原液、サリノマイシン標準原液及びラサロシド標準原液をメタノールで希釈して、モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては 0.1、0.25、0.5、1 及び 2.5 µg/L、サリノマイシンについては 0.05、0.1、0.25、0.5 及び 1 µg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりモネンシン、ナラシン、サリノマイシン及びラサロシドの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては、試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.5 mL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。サリノマイシンについては、試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.2 mL[メタノール溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-8)

モネンシン、ナラシン、サリノマイシン及びラサロシドを試料からアセトニトリル及び水の混液(9 : 1)で抽出し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル及び水の混液(9 : 1)60 mL を加えた後、ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した。ろ紙(直径 60 mm、GFP、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をアセトニトリル及び水の混液(9 : 1)60 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル及び水の混液(9 : 1)で定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL(試料 0.5 g 相当)に水 15 mL 加え、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB(200 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの)に負荷した。水及びメタノールの混液(1 : 1)10 mL で洗浄した後、メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノールで定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に、定量限界濃度 (モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては 5 µg/kg、サリノマイシンについては 2 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

9. カルバリル分析法

① 試薬・試液

カルバリル標準品:純度 99.4%(関東化学製)

アセトン:残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール:HPLC用(関東化学製)

酢酸アンモニウム:特級(関東化学製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム:
InertSep C18(1000 mg/6 mL、ジューエルサイエンス製)

水及びメタノールの混液(8:2):水 800 mL 及びメタノール 200 mL を混合した。

メタノール及び水の混液(8:2):メタノール 800 mL 及び水 200 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液:1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液:カルバリル標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:カルバリル標準原液をアセトンで希釈して 0.2 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー:T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター:N-1300(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-9)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

カルバリル標準原液をメタノール及び水の混液(8:2)で希釈して0.5、1、2、5及び10 µg/Lの標準溶液を調製した。この溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりカルバリルの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(1 mg/L)0.5 mL[アセトン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-9)

カルバリルを試料からアセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、ろ紙(直径 60 mm、No. 4、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をアセトン 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 10 mL(試料 0.5 g 相当)をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター(40°C)で約 1 mL まで濃縮した。

b. 精製

濃縮液に水 20 mL を加え、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18(1000 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの)に負荷した。水及びメタノールの混液(8:2)10 mL で洗浄した後、メタノール及び水の混液(8:2)10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノ

ール及び水の混液(8 : 2)で定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(50 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

10. ペルメトリン分析法

① 試薬・試液

cis-ペルメトリン標準品:純度 99.8%(富士フィルム和光純薬工業製)

trans-ペルメトリン標準品:純度 98.3%(富士フィルム和光純薬工業製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン:残留農薬試験用(関東化学製)

塩化ナトリウム:特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム:PCB分析用(関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム(粒径 150~250 µm):Florasil PR(残留農薬試験用、富士フィルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル:アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15):ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液:cis-ペルメトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

trans-ペルメトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液: cis-ペルメトリン標準原液及び trans-ペルメトリン標準原液を1:1で混合、アセトン

で希釈してペルメトリンとして 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー: T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

遠心分離機: H-80Rα(コクサン製)

振とう機: EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター: N-1300(東京理化学器械製)

GC (測定条件: 表 1-10)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

cis-ペルメトリン標準原液及び trans-ペルメトリン標準原液を 1 : 1 で混合、ヘキサンで希釈してペルメトリンとして 5、10、20、40 及び 60 µ/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC - ECD に注入して、得られた cis-ペルメトリン及び trans-ペルメトリンのピーク面積の含量を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法によりペルメトリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (ペルメトリンとして 0.5 mg/L) 0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-10)

ペルメトリンを試料からアセトンで抽出し、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリ

ル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL (試料 0.5 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター(40°C)で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 25 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a. で得られた溶液をカラムクロマトグラフィ用合成ケイ酸マグネシウムカラム(あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したものに)に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(50 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

11. シフルトリン及びフルメトリン分析法

① 試薬・試液

シフルトリン標準品: 純度 99%(富士フイルム和光純薬工業製)

フルメトリン標準品: 純度 98.5%(Dr.Ehrenstorfer 製)
アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテル: 残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール: HPLC 用(関東化学製)
アセトニトリル及び水の混液(1:1): 水 500 mL 及びアセトニトリル 500 mL を混合した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4): ヘキサン 960 mL 及びジエチルエーテル 40 mL を混合した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: InertSep C18(1000 mg/6mL、ジーエルサイエンス

製)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム: Sep-Pak Plus florisil(910 mg, Waters 製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液: 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液: シフルトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。フルメトリン標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液: シフルトリン標準原液及びフルメトリン標準原液をアセトンで希釈して 0.05 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー: T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

振とう機: EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター: N-1300(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件: 表 1-11)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

シフルトリン標準原液及びフルメトリン標準原液をアセトニトリルで希釈して、0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検

量線から絶対検量線法によりシフルトリン及びフルメトリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液(0.05 mg/L)1 mL[アセトン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-11)

シフルトリン及びフルメトリンを試料からアセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 2 mL(試料 0.05 g 相当)を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び水の混液(1 : 1)5 mL に溶解した。

b. 精製

a. で得られた溶液をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18(1000 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及び水の混液(1 : 1)5 mL で洗浄したもの)に負荷した。遠心管内をアセトニトリル及び水の混液(1 : 1)5 mL で洗い、洗液をカラム

に負荷した。アセトニトリル 15 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)10 mL に溶解し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム [Sep-Pak Plus florisisil(910 mg) (あらかじめヘキサン 10 mL で洗浄したもの)に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)20 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(10 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

12. フルニキシン分析法

① 試薬・試液

フルニキシンメグルミン標準品:純度 100%(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル、ヘキサン、メタノール:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル:HPLC用(関東化学製)

ギ酸:特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム:PCB分析用(関東化学製)

メンブランフィルター :Millex-LG(0.2 µm、MILLIPORE 製)

アセトニトリル飽和ヘキサン:ヘキサン 200 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)40 mL を混合し、5分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

メタノール及びアセトニトリルの混液(3:2):メタノール 120 mL 及びアセトニトリル(残留農薬試験用)80 mL を混合した。

水及びギ酸の混液(1000:1):水 1000 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液:フルニキシンメグルミン標準品約 21 mg(フルニキシン 12.5 mg 相当)を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:フルニキシン標準原液をメタノール及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : ULTRA-TURRAX T25 basic (IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-80 α (コクサン製)

振とう機 : EL(スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-12)

装置	型式	メーカー
MS	LCMS8050	島津製作所
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	LabSolutions LCMS	島津製作所

③ 定量

フルニキシン標準原液をメタノール及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 0.1、0.2、0.5、1 及び 2 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりフルニキシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液(1 mg/L) 50 µL[メタノール及びアセトニトリルの混液(3 : 2)溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-12)

フルニキシンを試料からアセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル (残留農薬試験用) 30 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。残留物及びヘキサン層にアセトニトリル (残留農薬試験用) 20 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル (残留農薬試験用) で定容した。抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当) を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノールで定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 10 µg/kg で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

13. DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、

ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 分析法

① 試薬・試液

o,p'-DDT 標準品:純度 97.6%(Dr.Ehrenstorfer 製)

p,p'-DDE 標準品:純度 99.9%(富士フイルム和光純薬製)

p,p'-DDD 標準品:純度 99.5%(富士フイルム和光純薬製)

p,p'-DDT 標準品:純度 99.4%(Dr.Ehrenstorfer 製)

アルドリン標準品:純度 98.0%(Dr.Ehrenstorfer 製)

ディルドリン標準品:純度 99.9%(Dr.Ehrenstorfer 製)

エンドリン標準品:純度 96.5%(Dr.Ehrenstorfer 製)

ヘプタクロル標準品:純度 99.3%(Dr.Ehrenstorfer 製)

cis-ヘプタクロルエポキシド標準品:純度 100%(AccuStandard 製)

trans-ヘプタクロルエポキシド標準品:純度 99.1%(Dr.Ehrenstorfer 製)

α -HCH 標準品:純度 98.6%(Dr.Ehrenstorfer 製)

β -HCH 標準品:純度 97.7%(Dr.Ehrenstorfer 製)

γ -HCH 標準品:純度 98.8%(Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン:残留農薬試験用(関東化学製)

塩化ナトリウム:特級(関東化学製)

無水硫酸ナトリウム:PCB 分析用(関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム(粒径 150~250 µm):Florisil PR(残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル:アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15):ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液: o,p'-DDT 約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。同様に p,p'-DDE 標準品、p,p'-DDD 標準品、p,p'-DDT 標準品、アルドリン標準品、ディルドリン標準品、エンドリン標準品、ヘプタクロル標準品、β-HCH 標準品及び γ-HCH 標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。cis-ヘプタクロルエポキシド標準品、trans-ヘプタクロルエポキシド標準品及び α-HCH 標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液: o,p'-DDT 標準原液、p,p'-DDE 標準原液、p,p'-DDD 標準原液、p,p'-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、cis-ヘプタクロルエポキシド標準原液、trans-ヘプタクロルエポキシド標準原液、α-HCH 標準原液、β-HCH 標準原液及び γ-HCH 標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー: T 25 digital ULTRA-TURRAX(IKA ジャパン製)

遠心分離機: H-80Rα(コクサン製)

振とう機: EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター: N-1300(東京理化学器械製)

GC (測定条件: 表 1-13)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

o,p'-DDT 標準原液、p,p'-DDE 標準原液、p,p'-

DDD 標準原液、p,p'-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、cis-ヘプタクロルエポキシド標準原液、trans-ヘプタクロルエポキシド標準原液、α-HCH 標準原液、β-HCH 標準原液及び γ-HCH 標準原液を混合、ヘキサンで希釈して 0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を GC - ECD に注入して、得られたピーク高さを用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により o,p'-DDT、p,p'-DDE、p,p'-DDD、p,p'-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、cis-ヘプタクロルエポキシド、trans-ヘプタクロルエポキシド、α-HCH、β-HCH 及び γ-HCH の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液(1 mg/L)50 µL[アセトン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-13)

o,p'-DDT、p,p'-DDE、p,p'-DDD、p,p'-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、cis-ヘプタクロルエポキシド、trans-ヘプタクロルエポキシド、α-HCH、β-HCH 及び γ-HCH を試料からアセトンで抽出、ヘキサンに転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物に

アセトン 50 mL を加え 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL(試料 0.5 g 相当)を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター(40°C)で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター(40°C)で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a. で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム(あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したものに負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フ

ラスコに採った。ロータリーエバポレーター(40°C)で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界相当(10 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

14. PCB 分析法

① 試薬・試液

BP-D7 標準溶液(PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 各 10 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-D7 標準溶液([13C12]PCB28、[13C12]PCB52、[13C12]PCB101、[13C12]PCB138、[13C12]PCB153 及び [13C12]PCB180 各 5 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-19 標準溶液(50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-70 標準溶液(50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-111 標準溶液(50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-159 標準溶液(50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-170 標準溶液(50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

エタノール、ヘキサン:ダイオキシン類分析用(富士フィルム和光純薬製)

デカン:鹿特級(関東化学製)

水酸化カリウム:特級(関東化学製)
 無水硫酸ナトリウム:PCB 分析用(関東化学製)
 カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム
 (粒径 150~250 μm) :Florisil PR(残留農薬試験用、
 富士フイルム和光純薬製)

1mol/L水酸化カリウムのエタノール溶液:水酸化カリウム 56.11 g を量り、エタノールを加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

標準原液:BP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 μg/L 溶液を調製した。

内標準原液:MBP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 μg/L 溶液を調製した。

内標準(シリンジスパイク)原液:MBP-19 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 μg/L 溶液を調製した。MBP-70、MBP-111、MBP-159 及び MBP-170 についても同様に 500 μg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:BP-D7 標準原液をデカンで希釈して 1 μg/L 溶液及び 10 μg/L 溶液を調製した。

添加用内標準溶液:MBP-D7 標準原液をデカンで希釈して 10 μg/L 溶液を調製した。

添加用内標準(シリンジスパイク)溶液:MBP-19 標準原液、MBP-70 標準原液、MBP-111 標準原液、MBP-159 標準原液及び MBP-170 標準原液をデカンで希釈して 10 μg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

還流装置 : GA-13S(いすゞ製作所製)

振とう機 : EL(スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター : R-200(柴田科学製)

GC-MS (測定条件 : 表 1-14)

装置	型式	メーカー
MS	Agilent 5977A	Agilent Technologies

GC	Agilent 7890B	Agilent Technologies
データ処理	GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

BP-D7 標準原液、MBP-D7 内標準原液、MBP-19 内標準(シリンジスパイク)原液、MBP-70 内標準(シリンジスパイク)原液、MBP-111 内標準(シリンジスパイク)原液、MBP-159 内標準(シリンジスパイク)原液及び MBP-170 内標準(シリンジスパイク)原液をデカンで希釈し、0、2、10、20 及び 50 μg/L [内標準溶液濃度及び内標準(シリンジスパイク)溶液濃度 10 μg/L]内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 1 μL を GC-MS に注入して、得られた内標準のピーク面積に対する対象物質のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 μL を GC-MS に注入し、検量線から内部標準法により PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 の含量を算出した。各対象物質に対応する内標準物質は表の通り。

対象物質	内標準物質
PCB28	[¹³ C ₁₂]PCB28
PCB52	[¹³ C ₁₂]PCB52
PCB101	[¹³ C ₁₂]PCB101
PCB138	[¹³ C ₁₂]PCB138
PCB153	[¹³ C ₁₂]PCB153
PCB180	[¹³ C ₁₂]PCB180

④ 添加試料の調製

0.07 μg/kg 添加 : 試料 1 g に添加用標準溶液(1 μg/L) 70 μL [デカン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

0.13 μg/kg 添加 : 試料 1 g に添加用標準溶液(1 μg/L) 130 μL [デカン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

0.2 μg/kg 添加 : 試料 1 g に添加用標準溶液(10 μg/L) 20 μL [デカン溶液]を添加し、よく混合し

た後、30分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-14)

試料を 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液でけん化した後、PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153及びPCB180をヘキサンで抽出し、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム(粒径 150~250 µm)で精製し、GC-MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 1 g を 300 mL 容のなす形フラスコに量り取り、10 µg/L 内標準溶液を 50 µL 添加(最終濃度 10 µg/L)した後、1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流した。なす形フラスコを室温に戻した後、ヘキサン 100 mL を加えた。綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移し、振とう機で 10 分間振とうした。ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター(40 °C)で約 5 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム(あらかじめ内径 2.0 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 20 g をヘキサンで湿式充填したもの)に負荷した。なす形フラスコ内をヘキサン約 2 mL で 3 回洗い、洗液をカラムに負荷した。ヘキサン 200 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40 °C)で約 5 mL まで減圧濃縮した。あらかじめ 10 µg/L 内標準(シリンジスパイク)混合溶液 50 µL を入れたスピッ

ツ管に濃縮液を移した。なす形フラスコ内をヘキサン約 1 mL で 3 回洗い、洗液をスピッツ管に合わせ、室温で窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮し、試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値の 0.5 倍、1 倍及び 1.5 倍相当(各 0.07、0.13 及び 0.2 µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。1 日 1 回(6 併行)、3 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、脂質をソックスレー抽出法により測定したところ、1.3 g/100g であった。

C. 結果及び考察

[令和 2 年度]

1. 抗菌性物質

(1) チルミコシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図 2-1)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-1 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 15%未満、室内精度 20%未満)を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.992$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(2) スルファモイルダブソン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図2-2)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-2に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度25%未満、室内精度30%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 (平成 17 年食安発第 0124001 号) 「HPLCによる動物用医薬品等の一斉分析法 I (畜水産物)」

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-3 及び図 2-4)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-3 及び表 2-4 に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度 15%未満、室内精度 20%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.015 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした 4-*epi*-クロルテトラサイクリンについては定量限界 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4-*epi*-オキシテトラサイクリンについては定量限界 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 オキシテ

トラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン分析法（畜水産物）

(4) エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-5 及び図 2-6）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-5 及び表 2-6 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.995$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（平成 17 年食安発第 0124001 号）「エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン及びフルメキン分析法（畜

水産物）」

(5) フロルフェニコール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-7）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-7に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度10%未満、室内精度15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 フロルフェニコール分析法（畜水産物）

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析した

ところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-8）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-8 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 10%未満、室内精度 15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.4～8 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 トリクラベンダゾール分析法（畜産物）

3. 抗コクシジウム剤分析法

(1) サリノマイシン及びモネンシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-9 及び図 2-10）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-9 及び表 2-10 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.05～1 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 2 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

(2) トルトラズリル分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-11）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-11 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-12）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-12 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

$0.005 \sim 0.06 \text{ mg}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.993$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として

妥当であると評価された。

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-13）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-13 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

$0.0005 \sim 0.02 \text{ mg}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(2) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害する

ピークは検出されなかった（図 2-14）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-14～表 2-26 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-15）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-27～表2-30に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.991$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(4) PCB 分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-16～図 2-20）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-31～表 2-36 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 30%未満、室内精度 35%未満、1.2 及び 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いた [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB28、 [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB52、 [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB101、 [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB138、 [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB153 及び [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB180 の回収率はいずれも 50%以上 120%未満であった。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0～50 $\mu\text{g}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

- 1) 日本薬学会編「衛生分析法・注解」2010
- 2) COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012

[令和3年度]

1. タイロシン及びチルミコシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-1 及び図 2-2）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-1 及び表 2-2 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

$0.00025 \sim 0.005 \text{ mg}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

妥当性評価試験結果から、本試験は鶏の筋肉を対象とした定量限界 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

2. チルパロシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-3及び図2-4）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-3及び表2-4に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

$0.0001 \sim 0.002 \text{ mg}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

3. リンコマイシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-5）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-5に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度30%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いたリンコマイシン- d_3 の回収率はいずれも 40%以上であった。

③ 検量線の直線性

$0.00025 \sim 0.01 \text{ mg}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

4. ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-6及び図2-7）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-6及び表2-7に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.01～0.4 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

5. カナマイシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-8）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-8に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.005～0.1 mg/L の範囲で検量線を作成した。

決定係数 $r^2 > 0.993$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

6. スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシ、スルファキノキサリン、トリメプリーム及びチアンフェニコール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった。（図2-9～図2-13）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-9～表2-13に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.000125～0.0025 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

7. エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)及びノルフロキサシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-14～16）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-14

～16に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

8. クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-17～図2-23）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-17～表2-23に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.0005～0.015 mg/L の範囲で検量線を作成した。テトラサイクリンについては決定係数 $r^2 > 0.998$ 、クロルテトラサイクリン、4-*epi*-クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、4-*epi*-オキシテトラサイクリン、4-*epi*-テトラサイクリン及びドキシサイクリンについては決定係数 $r^2 > 0.999$ となり良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

9. フロルフェニコール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-24）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-24に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

10. アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-25～図2-27）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-25～表2-27に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いたアモキシシリン-*d*₄、アンピシリン-*d*₅及びペニシリンG-*d*₇の回収率はいずれも40%以上であった。

③ 検量線の直線性

0.00005～0.001 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性

が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

11. ノシヘプタイド分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-28）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-28に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

12. エンラマイシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-29）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-29に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

③ 検量線の直線性

0.00125～0.025 mg/L の範囲で検量線を作成

した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

[令和4年度]

1. ドラメクチン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-1）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-1に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.25～5 $\mu\text{g/L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

2. レバミゾール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-2）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-2に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度25%未満、室内精度30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.125～5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

3. トリクラベンダゾール分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図2-3)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-3に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度25%未満、室内精度30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.05～1 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

4. ピペラジン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-4)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-4に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未

満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.5～20 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

5. アンプロロウム分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-5)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-5に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.5～10 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

6. エトパベート分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-6)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-6に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度

の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.1~2 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

7. ナイカルバジン及びハロフジノン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図 2-7-1、2-7-2)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-7-1、2-7-2 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.125~5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

8. モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図 2-8-1~2-8-4)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-8-1~2-8-4 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては 0.1~2.5 µg/L の範囲で、サリノマイシンについては 0.05~1 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

9. カルバリル分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図 2-9)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-9 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 15%未満、室内精度 20%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.5~10 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

10. ペルメトリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析した

ところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-10）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-10 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 15%未満、室内精度 20%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

5~60 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

11. シフルトリン及びフルメトリン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されない、又は許容範囲内であった（図 2-11-1、2-11-2）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-11-1、2-11-2 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.25~5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.9953$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

12. フルニキシン分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-12）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-12 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.1~2 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

13. DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されない又は許容範囲内であった（図 2-13-1~2-13-13）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-13-1~2-13-13 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

③ 検量線の直線性

0.25~5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

14. PCB分析法

① 選択性

ブランク試料を本分析法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図 2-14-1~2-14-5)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-14-1~2-14-6 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた [13C12]PCB28、[13C12]PCB52、[13C12]PCB101、[13C12]PCB138、[13C12]PCB153 及び [13C12]PCB180 の回収率はいずれも 50%以上 120%未満であった。

③ 検量線の直線性

0~50 $\mu\text{g/L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

D. 結論

令和2年度は牛の筋肉を対象としてB物質の分析法(13分析法)を確立した。令和3年度は鶏の筋肉を対象としてB物質のうち抗菌性物質の分析法(12分析法)を確立した。令和4年度は鶏の筋

肉を対象としてB物質の抗菌性物質以外の分析法(14分析法)を確立した。確立した分析法の妥当性評価試験を実施した結果、いずれも良好な結果(真度、併行精度、室内精度及び選択性)が得られた。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

Shizuka Saito-Shida, Seiichiro Iizuka, Ayumu Nakamura, Satoshi Isagawa, Satoru Nemoto, Hiroshi Akiyama. Development and validation of an analytical method for determining total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2021 AOAC INTERNATIONAL、令和3年8月27日

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

[令和2年度]

表 1-1 測定条件(チルミコシン分析法)

LC 条件																														
カラム	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm : Agilent Technologies 製)																													
移動相流速 (mL/min)	0.3																													
注入量 (μL)	2																													
カラム温度 (°C)	40																													
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液 (1000 : 0.5) B液 : アセトニトリル及びギ酸の混液 (1000 : 0.5)																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.01</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	2.0	95	5	2.01	80	20	8.0	50	50	8.01	10	90	11.0	10	90	11.01	95	5	20.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	95	5																												
2.0	95	5																												
2.01	80	20																												
8.0	50	50																												
8.01	10	90																												
11.0	10	90																												
11.01	95	5																												
20.0	95	5																												
MS 条件																														
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 (°C)	500																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)	435.4→174.2 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 35 (eV)]																													
定性イオン (m/z)	435.4→143.0 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 27 (eV)]																													
保持時間 (min)	4.8																													

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えホモジナイズ

ヘキサン洗浄

↓ ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層 10 mL 分取

pH 調整

↓ リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加え pH 8.0 を確認

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上清を注入

↓ 水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-1 チルミコシン分析法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件(スルファモイルダブソン分析法)

LC 条件																								
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm : Waters 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.35																							
注入量 (μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (1000 : 0.1) B液 : メタノール (LC-MS用)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.61</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.9	70	30	5.71	10	90	7.60	10	90	7.61	95	5	10.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	95	5																						
1.9	70	30																						
5.71	10	90																						
7.60	10	90																						
7.61	95	5																						
10.0	95	5																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 (°C)	650																							
ネブライザーガス	空気、60 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	328.1→108.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	328.1→80.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 71 (eV)]																							
保持時間 (min)	3.0																							

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層を綿栓ろ過

↓ ギ酸 1 mL を加えてアセトニトリルで 100 mL に定容

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 5 mL で予備洗浄

↓ 抽出液 10 mL を注入 (全溶出液を採取)

↓ アセトニトリル及びギ酸 (100 : 1) 混液 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ 水で 20 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-2 スルファモイルダブソン分析法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件(4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン分析法)

LC 条件																											
カラム	L-column2 ODS (メタルフリー、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 化学物質評価研究機構製)																										
移動相流速(mL/min)	0.2																										
注入量(μL)	1																										
カラム温度(°C)	30																										
移動相	A 液: 水及び酢酸の混液(1000:1) B 液: アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16.00</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>					時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	95	5	10.00	0	100	12.00	0	100	12.01	95	5	16.00	95	5				
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.00	95	5																									
10.00	0	100																									
12.00	0	100																									
12.01	95	5																									
16.00	95	5																									
MS 条件																											
測定モード	SRM																										
イオン化モード	ESI(+)																										
インターフェイス電圧(kV)	4.0																										
インターフェイス温度(°C)	300																										
脱溶媒管温度(°C)	250																										
ヒートブロック温度(°C)	400																										
ネブライザーガス	窒素、3 L/hr																										
ドライイングガス	窒素、10 L/hr																										
ヒーティングガス	空気、10 L/hr																										
コリジョンガス	アルゴン																										
<p>定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサーイオン</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー(eV)</th> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー(eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4-<i>epi</i>-クロルテトラサイクリン</td> <td>479.0</td> <td>444.1</td> <td>21</td> <td>154.1</td> <td>21</td> </tr> <tr> <td>4-<i>epi</i>-オキシテトラサイクリン</td> <td>461.0</td> <td>426.2</td> <td>28</td> <td>443.2</td> <td>14</td> </tr> </tbody> </table>							プリカーサーイオン	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	21	4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	28	443.2	14
	プリカーサーイオン	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																							
		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)																						
4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	21																						
4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	28	443.2	14																						
保持時間(min)	4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン 4.5、4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン 4.0																										

秤取

↓ 試料 5 g

抽出

- ↓ 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マツキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL を加え、
- ↓ 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ 水 20 mL で洗浄
- ↓ 水及びメタノールの混液 (4:1) で洗浄
- ↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採る)
- ↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン分析法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件(エンロフロキサシン分析法)

LC 条件																														
カラム	ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm : Waters 製)																													
移動相流速 (mL/min)	0.35																													
注入量 (μL)	5																													
カラム温度 (°C)	40																													
移動相	A液 : 1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3.8</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3.81</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.7</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	1.9	80	20	3.8	50	50	3.81	10	90	5.7	10	90	5.71	90	10	9.5	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	90	10																												
1.9	80	20																												
3.8	50	50																												
3.81	10	90																												
5.7	10	90																												
5.71	90	10																												
9.5	90	10																												
MS 条件																														
測定モード	SRM																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 (°C)	600																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																														
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																									
			(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																								
エンロフロキサシン	360.1	84	316.1	24	245.1	37																								
シプロフロキサシン	332.2	86	314.2	25	231.1	49																								
保持時間 (min)	エンロフロキサシン 3.4、シプロフロキサシン 3.1																													

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で 100 mL に定容

↓ 抽出液を 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 3 mL まで濃縮

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及び塩酸の混液 (500 : 500 : 1) 10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-4 エンロフロキサシン分析法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件(フロルフェニコール分析法)

LC 条件																								
カラム	Ascentis Express F5 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.7 μm : Supelco 製) + Ascentis Express F5 Guard Column (内径 2.1 mm、長さ 5 mm、粒子径 2.7 μm : Supelco 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (1000 : 1) B液 : アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000 : 1)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.1</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>24.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	100	0	5.0	60	40	7.0	5	95	17.0	5	95	17.1	100	0	24.0	100	0
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	100	0																						
5.0	60	40																						
7.0	5	95																						
17.0	5	95																						
17.1	100	0																						
24.0	100	0																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 (°C)	400																							
ネブライザーガス	空気、40 psi																							
ターボガス	空気、60 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	248.0→91.0 [DP : 46 (V)、コリジョンエネルギー : 63 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	248.0→131.0 [DP : 46 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV)]																							
保持時間 (min)	4.4																							

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

↓ 6 mol/L 塩酸 20 mL を加え密栓し、100°Cのオイルバスで 3 時間加水分解（15 分間置きに攪拌）

↓ 30 分間放冷

↓ 水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ ヘキサン層除去

↓ 抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g 加え混合

↓ 吸引ろ過

↓ アセトン及び水の混液（1 : 1）20 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせて水で 100 mL に定容

多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)]

↓ 抽出液 2.5 mL に、塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加え混合

↓ 混合液を注入、30 分間放置

↓ 酢酸エチル 30 mL で溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1 : 1）1 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX

(150 mg/6 mL)]

↓ メタノール 2 mL、0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1 : 1）3 mL でコンディショニング

↓ 溶解液を注入

↓ 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1 : 1）3 mL で洗浄

↓ メタノール 2 mL で洗浄

↓ メタノール及び 25% アンモニア水の混液（99 : 1）5 mL で溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9 : 1）2.5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-5 フロルフェニコール分析法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件(トリクラベンダゾール分析法)

LC 条件												
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm : Waters 製)											
移動相流速 (mL/min)	0.35											
注入量 (μL)	1											
カラム温度 (°C)	40											
移動相	A液：水及び酢酸の混液 (10000 : 1) B液：メタノール											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	30	70	3.5	30	70
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)										
0.0	30	70										
3.5	30	70										
MS 条件												
測定モード	SRM											
イオン化モード	ESI (-)											
キャピラリ電圧 (V)	-500											
ソース温度 (°C)	150											
脱溶媒温度 (°C)	500											
コーンガス	窒素、150 L/hr											
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr											
コリジョンガス	アルゴン											
定量イオン (m/z)	327.0→182.0 [コーン電圧：-40 (V)、コリジョンエネルギー：-25 (eV)]											
定性イオン (m/z)	327.0→146.0 [コーン電圧：-40 (V)、コリジョンエネルギー：-35 (eV)]											
保持時間 (min)	2.3											

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

- ↓ 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え 100°C で 3 時間加熱
- ↓ 5 mol/L 塩酸 12 mL、メタノール 5 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え 10 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル 40 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 酢酸エチル層を合わせ、酢酸エチルで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 6 mL 分取

濃縮 (溶媒除去)

↓

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ 残留物にヘキサン 10 mL を加えて溶解
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をエタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) 10 mL に溶解

酸化反応

- ↓ 5 mL を分取し、過酸化水素水 25 μ L を加え 90°C で 16 時間加熱

酢酸エチル及びヘキサン混液転溶

- ↓ 水 10 mL、酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採り、先の有機溶媒層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノール及び水の混液 (7 : 3) 4 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 全量注入
- ↓ メタノール及び水の混液 (7 : 3) 8 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 3 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-6 トリクラベンダゾール分析法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件(サリノマイシン及びモネンシン分析法)

LC 条件																													
カラム	L-column2 ODS(メタルフリー) (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 化学物質評価研究機構製)																												
移動相流速(mL/min)	0.2																												
注入量(μL)	4																												
カラム温度(°C)	40																												
移動相	A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: メタノール																												
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>6.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>18.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	40	60	6.00	5	95	15.00	5	95	15.01	40	60	18.00	40	60										
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																											
0.00	40	60																											
6.00	5	95																											
15.00	5	95																											
15.01	40	60																											
18.00	40	60																											
MS 条件																													
測定モード	SRM																												
イオン化モード	ESI(+)																												
イオンスプレー電圧(V)	4500																												
ヒーター温度(°C)	500																												
ネブライザーガス	空気、70 psi																												
ターボガス	空気、70 psi																												
コリジョンガス	窒素																												
<p>定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>プリカーサー イオン(m/z)</th> <th>プロダクト イオン(m/z)</th> <th>DP (V)</th> <th>コリジョンエ ネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">サリノマイシン</td> <td>(定量用)</td> <td>768.3</td> <td>733.4</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>773.4</td> <td>431.3</td> <td>1</td> <td>67</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">モネンシン A</td> <td>(定量用)</td> <td>688.3</td> <td>635.5</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>693.3</td> <td>675.3</td> <td>1</td> <td>51</td> </tr> </tbody> </table>				プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)	サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27	(定性用)	773.4	431.3	1	67	モネンシン A	(定量用)	688.3	635.5	1	27	(定性用)	693.3	675.3	1	51
		プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)																								
サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27																								
	(定性用)	773.4	431.3	1	67																								
モネンシン A	(定量用)	688.3	635.5	1	27																								
	(定性用)	693.3	675.3	1	51																								
保持時間(min)	サリノマイシン 9.7、モネンシン A 9.0																												

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリル及び水の混液(9:1)で 200 mL に定容

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB(200 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL に水 15 mL を加えて注入

↓ 水及びメタノールの混液(1:1)10 mL で洗淨

↓ メタノール 10 mL で溶出(全溶出液を採る)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-7 サリノマイシン及びモネンシン分析法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件(トルトラズビル分析法)

LC 条件												
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m : ジーエルサイエンス製)											
移動相流速 (mL/min)	0.2											
注入量 (μ L)	2											
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40											
移動相	A 液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	40	60	7.0	40	60
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)										
0.0	40	60										
7.0	40	60										
MS 条件												
測定モード	SRM											
イオン化モード	ESI (-)											
イオンスプレー電圧 (V)	-4500											
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	500											
ネブライザーガス	空気、70 psi											
ターボガス	空気、70 psi											
コリジョンガス	窒素											
定量イオン (m/z)	456.0 \rightarrow 42.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -62 (eV)]											
定性イオン (m/z)	456.0 \rightarrow 399.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -14 (eV)]											
保持時間 (min)	3.9											

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトニトリル 100 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 0.5 mL まで濃縮

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1000 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液にアセトニトリル 3 mL 及び水 7 mL を加えて注入

↓ アセトニトリル 5 mL で溶出 (全溶出液を採る)

↓ アセトニトリルで 5 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-8 トルトラズリル分析法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件(ペルメトリン分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製)
カラム温度(°C)	80°C (2 min) – 30°C/min – 190°C – 3.6°C/min – 280°C (5 min)
注入口温度(°C)	250
検出器温度(°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μL)	1
保持時間(min)	<i>cis</i> -ペルメトリン 23.8、 <i>trans</i> -ペルメトリン 24.4

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

- ↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ ヘキサン 15 mL
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR(粒径 150~250 μm)、
- ↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-9 ペルメトリン分析法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件(HCB 分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度($^{\circ}$ C)	70 $^{\circ}$ C(2 min) – 20 $^{\circ}$ C/min – 280 $^{\circ}$ C(10 min)
注入口温度($^{\circ}$ C)	250
検出器温度($^{\circ}$ C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	9.4

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ アセトン 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 20 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 10 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisol PR (粒径 150~250 μm)、
- ↓ 10 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム 2 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン 90 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃 縮

- ↓ 約 2 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 5 mL に定容

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-10 HCB 分析法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件(DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) -30°C/min-190°C-3.6°C/min-280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	8.0 (α -HCH) 8.8 (γ -HCH) 9.2 (ヘプタクロル) 9.8 (アルドリン) 10.5 (β -HCH) 11.6 (<i>cis</i> -ヘプタクロルエポキシド) 11.7 (<i>trans</i> -ヘプタクロルエポキシド) 13.1 (<i>p,p'</i> -DDE) 13.6 (ディルドリン) 14.3 (エンドリン) 14.7 (<i>o,p'</i> -DDT) 15.9 (<i>p,p'</i> -DDD) 16.5 (<i>p,p'</i> -DDT)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
↓ 綿栓ろ過
↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう
↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
↓ 綿栓ろ過
↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
↓ ヘキサン層を採る
↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
↓ ヘキサン層を採る
↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採る
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採る
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、
↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
↓ 濃縮液を注入
↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-11 DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件(クロルデン及びノナクロル分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) -30°C/min-190°C-3.6°C/min-280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	12.6 (<i>trans</i> -クロルデン) 12.8 (<i>cis</i> -クロルデン) 12.9 (<i>trans</i> -ノナクロル) 16.1 (<i>cis</i> -ノナクロル)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
↓ 綿栓ろ過
↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう
↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
↓ 綿栓ろ過
↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
↓ ヘキサン層を採る
↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
↓ ヘキサン層を採る
↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採る
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採る
↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、
↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
↓ 濃縮液を注入
↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-12 クロロデン及びノナクロル分析法の分析法フローチャート

表 1-13 測定条件(PCB 分析法)

GC 条件																																																	
カラム	Fused Silica HT8-PCB (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 0.25 μ m : 関東化学製)																																																
カラム温度 (°C)	100°C (1 min) - 20°C/min - 180°C (0 min) - 5°C/min - 300°C (0 min)																																																
注入口温度 (°C)	250																																																
インターフェース温度 (°C)	300																																																
キャリアガス	ヘリウム																																																
キャリアガス流量 (mL/min)	1																																																
注入法	スプリットレス法																																																
注入量 (μ L)	1																																																
MS 条件																																																	
測定モード	SIM																																																
イオン化法	EI (+)																																																
イオン化エネルギー (eV)	70																																																
EM 電圧 (V)	オートチューニングでの設定値																																																
イオン源温度 (°C)	230																																																
四重極温度 (°C)	150																																																
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>定量イオン (m/z)</th> <th>定性イオン (m/z)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCB28</td> <td>256.0</td> <td>258.0</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB28</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-19</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>PCB52</td> <td>289.9</td> <td>291.9</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB52</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-70</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>PCB101</td> <td>325.9</td> <td>327.9</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB101</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-111</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>PCB138 及び PCB153</td> <td>359.8</td> <td>361.8</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB138 及び [¹³C₁₂] PCB153</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-159</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>PCB180</td> <td>393.8</td> <td>395.8</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB180</td> <td>405.8</td> <td>407.8</td> </tr> <tr> <td>MBP-170</td> <td>405.8</td> <td>407.8</td> </tr> </tbody> </table>		定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)	PCB28	256.0	258.0	[¹³ C ₁₂] PCB28	268.0	270.0	MBP-19	268.0	270.0	PCB52	289.9	291.9	[¹³ C ₁₂] PCB52	302.0	304.0	MBP-70	302.0	304.0	PCB101	325.9	327.9	[¹³ C ₁₂] PCB101	337.9	339.9	MBP-111	337.9	339.9	PCB138 及び PCB153	359.8	361.8	[¹³ C ₁₂] PCB138 及び [¹³ C ₁₂] PCB153	371.9	373.9	MBP-159	371.9	373.9	PCB180	393.8	395.8	[¹³ C ₁₂] PCB180	405.8	407.8	MBP-170	405.8	407.8
	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)																																															
PCB28	256.0	258.0																																															
[¹³ C ₁₂] PCB28	268.0	270.0																																															
MBP-19	268.0	270.0																																															
PCB52	289.9	291.9																																															
[¹³ C ₁₂] PCB52	302.0	304.0																																															
MBP-70	302.0	304.0																																															
PCB101	325.9	327.9																																															
[¹³ C ₁₂] PCB101	337.9	339.9																																															
MBP-111	337.9	339.9																																															
PCB138 及び PCB153	359.8	361.8																																															
[¹³ C ₁₂] PCB138 及び [¹³ C ₁₂] PCB153	371.9	373.9																																															
MBP-159	371.9	373.9																																															
PCB180	393.8	395.8																																															
[¹³ C ₁₂] PCB180	405.8	407.8																																															
MBP-170	405.8	407.8																																															
保持時間 (min)	PCB28 15.3、PCB52 16.3、PCB101 19.5、PCB138 23.8、PCB153 22.7、PCB180 26.3																																																

秤 取

- ↓ 試料 1 g
- ↓ 100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加

抽 出

- ↓ 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流
- ↓ ヘキサン 100 mL を加え、綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移す
- ↓ 10 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 µm) 、
- ↓ 20 g をヘキサンで湿式充填、内径 2.0 cm]
- ↓ 濃縮液を負荷
- ↓ ヘキサン約 2 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をカラムに負荷
- ↓ ヘキサン 200 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 10 mL に定容
- ↓ 10 µg/L 内標準 (シリンジスパイク) 混合溶液 50 µL を入れたスピッツ管に抽出液 2 mL を分取
- ↓ 窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮

試験溶液

- ↓

GC-MS

図 1-13 PCB 分析法の分析法フローチャート

[令和3年度]

表 1-1 測定条件(タイロシン及びチルミコシン分析法)

LC 条件																												
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジーエルサイエンス製)																											
移動相流速 (mL/min)	0.2																											
注入量 (μL)	2																											
カラム温度 (°C)	40																											
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液 (1000 : 1) B液 : アセトニトリル																											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.02</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	80	20	10.0	40	60	10.01	5	95	15.01	5	95	15.02	80	20	20.0	80	20						
時間(分)	A液(%)	B液(%)																										
0.0	80	20																										
10.0	40	60																										
10.01	5	95																										
15.01	5	95																										
15.02	80	20																										
20.0	80	20																										
MS 条件																												
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																											
イオン化モード	ESI(+)																											
イオンスプレー電圧 (V)	5500																											
ヒーター温度 (°C)	700																											
ネブライザーガス	空気、60 psi																											
ターボガス	空気、60 psi																											
コリジョンガス	窒素																											
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>プリカーサー イオン (m/z)</th> <th>プロダクト イオン (m/z)</th> <th>DP (V)</th> <th>コリジョンエ ネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">タイロシン</td> <td>(定量用)</td> <td>916.0</td> <td>174.0</td> <td>36</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>916.0</td> <td>772.0</td> <td>36</td> <td>41</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">チルミコシン</td> <td>(定量用)</td> <td>869.3</td> <td>696.4</td> <td>81</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>435.0</td> <td>174.0</td> <td>71</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)	タイロシン	(定量用)	916.0	174.0	36	47	(定性用)	916.0	772.0	36	41	チルミコシン	(定量用)	869.3	696.4	81	55	(定性用)	435.0	174.0	71	35
	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)																								
タイロシン	(定量用)	916.0	174.0	36	47																							
	(定性用)	916.0	772.0	36	41																							
チルミコシン	(定量用)	869.3	696.4	81	55																							
	(定性用)	435.0	174.0	71	35																							
保持時間 (min)	タイロシン 7.4、チルミコシン 5.5																											

秤 取

↓ 試料 5 g

抽出

↓ クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1:1) 95 mL を加えホモジナイズ

ヘキサン洗浄

↓ ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層 10 mL 分取

pH 調整

↓ リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加え pH 試験紙で pH 8 を確認

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上清を注入

↓ 水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-1 タイロシン及びチルミコシン分析法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件(チルバロシン分析法)

LC 条件																								
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジューエルサイエンス製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	2																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液:水及びギ酸の混液 (1000 : 1) B液:アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	70	30	10.0	5	95	15.0	5	95	15.1	70	30	20.0	70	30
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	70	30																						
10.0	5	95																						
15.0	5	95																						
15.1	70	30																						
20.0	70	30																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS																							
イオン化モード	ESI(+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 (°C)	450																							
ネブライザーガス	空気、50 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																								
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																			
			(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																		
チルバロシン	1042.4	46	814.4	45	174.1	51																		
3-O-アセチルタイロシン	958.2	11	772.1	45	173.8	45																		
保持時間 (min)	チルバロシン 6.4、3-O-アセチルタイロシン 5.0																							

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ 水及びりん酸の混液(9:1) 10 mL 及びアセトン 100 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)]

↓ メタノール 10 mL、水及びメタノールの混液(3:2) 10 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 4 mL に水 15 mL を加えたものを注入

↓ 水及びメタノールの混液(3:2) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-2 チルバロシン分析法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件(リンコマイシン分析法)

LC 条件																											
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジューエルサイエンス製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.2																										
注入量 (μL)	5																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A液:水及びギ酸の混液 (1000:1) B液:アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.01</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.00	90	10	5.00	70	30	5.01	10	90	10.00	10	90	10.01	90	10	15.00	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.00	90	10																									
5.00	70	30																									
5.01	10	90																									
10.00	10	90																									
10.01	90	10																									
15.00	90	10																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI (+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 (°C)	550																										
ネブライザーガス	空気、60 psi																										
ターボガス	空気、60 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																											
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																					
	リンコマイシン	407.1	66	126.0	33	359.1	25																				
	リンコマイシン-d ₃	410.2	66	129.2	35	362.1	27																				
保持時間 (min)	リンコマイシン 4.6																										

秤 取

- ↓ 試料 5 g
- ↓ 5 mg/L 添加用内標準溶液 100 μ L 添加

抽 出

- ↓ メタノール 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上澄み液 5 mL を分取 (試料 0.5 g 相当)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をリン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL に溶解
- ↓ 硫酸アンモニウム 10 g を加え 5 分間振とう
- ↓ 綿栓ろ過

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (500 mg/6mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸緩衝液 (pH7.0) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 全量注入
- ↓ 水 10 mL、水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール 10 mL で溶出

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物を水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900:100:0.9) 10 mL に溶解

試験溶液

- ↓

LC-MS/MS

図 1-3 リンコマイシン分析法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件 (ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法)

LC 条件																											
カラム	TSKgel SuperODS (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.3 μ m : 東ソー製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.2																										
注入量 (μ L)	2																										
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液: 水及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10) B液: アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.0	95	5	10.0	20	80	16.0	20	80	17.0	95	5	27.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.0	95	5																									
1.0	95	5																									
10.0	20	80																									
16.0	20	80																									
17.0	95	5																									
27.0	95	5																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5000																										
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	450																										
ネブライザーガス	空気、55 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン ① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			m/z	コリジョン エネルギー (eV)	m/z	コリジョン エネルギー (eV)																					
ストレプトマイシン	582	120	263	45	246	45																					
ジヒドロストレプトマイシン	584	120	263	43	246	43																					
保持時間 (min)	ストレプトマイシン 5.7、ジヒドロストレプトマイシン 5.7																										

秤取

↓ 試料 5 g

抽出

↓ トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えホモジナイズ

↓ クロロホルム 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 上層 20 mL 分取

pH 調整

↓ 0.1、1 及び 6 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液及び 1/15 リン酸溶液を加え pH 7.0 に調整

メタケイ酸アルミン酸マグネシウムカラム

↓ [ノイシリン NS₂N、水に懸濁し 3 mL を湿式充填、内径 1 cm]

↓ 抽出液を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 3%塩化ナトリウム溶液 20 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ 1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 1 mL 及び

↓ 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 2.0) 10 mL を加え混合

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak C18 Classic (360 mg)]

↓ メタノール 10 mL、水 10 mL 及び

↓ 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 2.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上記で得られた溶液を注入

↓ 流出液の pH が 4~4.5 付近になるまで水で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液 (1:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000:10) 10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-4 ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件(カナマイシン分析法)

LC 条件																								
カラム	TSKgel SuperODS (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.3 μ m :東ソー製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μ L)	10																							
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																							
移動相	A液:水及びヘプタフルオロ酪酸(約0.5 mol/L水溶液)の混液(1000:10) B液:アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸(約0.5 mol/L水溶液)の混液(1000:10)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	95	5	1.0	95	5	10.0	20	80	16.0	20	80	17.0	95	5	27.0	95	5
時間(分)	A液(%)	B液(%)																						
0.0	95	5																						
1.0	95	5																						
10.0	20	80																						
16.0	20	80																						
17.0	95	5																						
27.0	95	5																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																							
イオン化モード	ESI(+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5000																							
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	450																							
ネブライザーガス	空気、55 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	485.3 \rightarrow 163.2 [DP:106(V)、コリジョンエネルギー:35(eV)]																							
定性イオン (m/z)	485.3 \rightarrow 324.1 [DP:106(V)、コリジョンエネルギー:23(eV)]																							
保持時間 (min)	6.1																							

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ヘキサン 50 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニング

↓ 水層 10 mL を注入

↓ 水 10 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で洗浄

↓ 水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6:3:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水及びヘptaフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000:10) 10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-5 カナマイシン分析法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件 (スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシシ、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール分析法)

LC 条件																																															
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)																																														
移動相流速 (mL/min)	0.35																																														
注入量 (μ L)	5																																														
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																																														
移動相	A液: 0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液: メタノール (LC-MS用)																																														
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.61</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.9	70	30	5.71	10	90	8.60	10	90	8.61	95	5	11.0	95	5																									
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																																													
0.0	95	5																																													
1.9	70	30																																													
5.71	10	90																																													
8.60	10	90																																													
8.61	95	5																																													
11.0	95	5																																													
MS 条件																																															
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																																														
イオン化モード	ESI(+又は-)																																														
イオンスプレー電圧 (V)	5500 又は -4500																																														
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	650																																														
ネブライザーガス	空気、60 psi																																														
ターボガス	空気、70 psi																																														
コリジョンガス	窒素																																														
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサー イオン</th> <th rowspan="2">DP (V)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th>m/z</th> <th>コリジョン エネルギー (eV)</th> <th>m/z</th> <th>コリジョン エネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>スルファメトキサゾール</td> <td>254.0</td> <td>81</td> <td>92.1</td> <td>37</td> <td>108.1</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>スルファモノメトキシシ</td> <td>280.9</td> <td>81</td> <td>156.0</td> <td>23</td> <td>108.0</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>スルファキノキサリン</td> <td>301.1</td> <td>96</td> <td>156.1</td> <td>25</td> <td>92.0</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>トリメトプリム</td> <td>291.0</td> <td>101</td> <td>123.0</td> <td>33</td> <td>230.0</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>チアンフェニコール</td> <td>354.0</td> <td>-45</td> <td>185.0</td> <td>-28</td> <td>289.9</td> <td>-18</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)		m/z	コリジョン エネルギー (eV)	m/z	コリジョン エネルギー (eV)	スルファメトキサゾール	254.0	81	92.1	37	108.1	33	スルファモノメトキシシ	280.9	81	156.0	23	108.0	33	スルファキノキサリン	301.1	96	156.1	25	92.0	45	トリメトプリム	291.0	101	123.0	33	230.0	33	チアンフェニコール	354.0	-45	185.0	-28	289.9	-18
	プリカーサー イオン				DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																																							
		m/z	コリジョン エネルギー (eV)	m/z		コリジョン エネルギー (eV)																																									
スルファメトキサゾール	254.0	81	92.1	37	108.1	33																																									
スルファモノメトキシシ	280.9	81	156.0	23	108.0	33																																									
スルファキノキサリン	301.1	96	156.1	25	92.0	45																																									
トリメトプリム	291.0	101	123.0	33	230.0	33																																									
チアンフェニコール	354.0	-45	185.0	-28	289.9	-18																																									
保持時間 (min)	スルファメトキサゾール 3.1、スルファモノメトキシシ 3.4、 スルファキノキサリン 4.0、トリメトプリム 4.1、 チアンフェニコール 3.3																																														

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層を綿栓ろ過

↓ ギ酸(特級) 1 mL を加えてアセトニトリルで 100 mL に定容

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 5 mL で予備洗浄

↓ 抽出液 5 mL を注入(全溶出液を採取)

↓ アセトニトリル及びギ酸(100:1)混液 5 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ 水で 20 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-6 スルファメトキサゾール、スルファモノメキシシ、スルファキノキサリン、トリメプリーム及びチアンフェニコール分析法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件(エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)及びノルフロキサシン分析法)

LC 条件																											
カラム	Mightysil RP-18GP (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 関東化学製)																										
移動相流速(mL/min)	0.2																										
注入量(μL)	2																										
カラム温度(°C)	40																										
移動相	A液: 1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.01</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	90	10	8.0	50	50	12.0	10	90	18.0	10	90	18.01	90	10	25.0	90	10
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	90	10																									
8.0	50	50																									
12.0	10	90																									
18.0	10	90																									
18.01	90	10																									
25.0	90	10																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧(V)	5500																										
ヒーター温度(°C)	300																										
ネブライザーガス	空気、50 psi																										
ターボガス	空気、80 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)																					
エンロフロキサシン	360.1	46	316.1	27	245.1	37																					
シプロフロキサシン	332.2	9	314.2	31	231.1	49																					
ノルフロキサシン	320.0	66	302.0	23	276.0	23																					
保持時間(min)	エンロフロキサシン 5.6、シプロフロキサシン 5.2、 ノルフロキサシン 5.0																										

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液(3:2)80 mLを加えホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液(3:2)で 100 mL に定容

↓ 抽出液を 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 3 mL まで濃縮

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB(60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及び塩酸の混液(500:500:1)10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-7 エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 及びノルフロキサシン分析法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件(クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法)

LC 条件																							
カラム	L-column2 ODS (メタルフリー) (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 化学物質評価研究機構製)																						
移動相流速 (mL/min)	0.2																						
注入量 (μL)	1																						
カラム温度 (°C)	30																						
移動相	A 液: 水及び酢酸の混液 (1000:1) B 液: アセトニトリル																						
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16.00</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>					時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.00	95	5	10.00	0	100	12.00	0	100	12.01	95	5	16.00	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																					
0.00	95	5																					
10.00	0	100																					
12.00	0	100																					
12.01	95	5																					
16.00	95	5																					
MS 条件																							
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																						
イオン化モード	ESI(+)																						
インターフェイス電圧 (kV)	4.0																						
インターフェイス温度 (°C)	300																						
脱溶媒管温度 (°C)	250																						
ヒートブロック温度 (°C)	400																						
ネブライザーガス	窒素、3 L/hr																						
ドライイングガス	窒素、10 L/hr																						
ヒーティングガス	空気、10 L/hr																						
コリジョンガス	アルゴン																						
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																							
		プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																			
		(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)																		
クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	28																		
4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン																							
オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	21	443.2	14																		
4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン																							
テトラサイクリン	445.0	410.2	20	427.2	15																		
4- <i>epi</i> -テトラサイクリン																							
ドキシサイクリン	445.0	428.2	20	154.1	30																		
保持時間 (min)	クロルテトラサイクリン 5.0、4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン 4.4、 オキシテトラサイクリン 4.3、4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン 4.0、 テトラサイクリン 4.4、4- <i>epi</i> -テトラサイクリン 3.9、ドキシサイクリン 5.0																						

秤 取

↓ 試料 5 g

10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マツキルベイン緩衝液(pH 4.0)抽出

↓ 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マツキルベイン緩衝液(pH 4.0) 100 mL を加え、

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg)]

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液(4:1) 10 mL で洗浄

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液(4:1) 10 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液(4:1) で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-8 クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件(フロルフェニコール分析法)

LC 条件																					
カラム	Ascentis Express F5 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.7 μ m : Supelco 製) + Ascentis Express F5 Guard Column (内径 2.1 mm、長さ 5 mm、粒子径 2.7 μ m : Supelco 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μ L)	5																				
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液: 水及び酢酸の混液 (1000:1) B液: アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000:1)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.1</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	100	0	5.0	60	40	7.0	5	95	17.0	5	95	17.1	100	0
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																			
0.0	100	0																			
5.0	60	40																			
7.0	5	95																			
17.0	5	95																			
17.1	100	0																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	5500																				
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	400																				
ネブライザーガス	空気、40 psi																				
ターボガス	空気、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	248.0 \rightarrow 91.0 [DP:46(V)、コリジョンエネルギー:63(eV)]																				
定性イオン (m/z)	248.0 \rightarrow 131.0 [DP:46(V)、コリジョンエネルギー:29(eV)]																				
保持時間 (min)	4.4																				

秤取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

- ↓ 6 mol/L 塩酸 20 mL を加え密栓し、100°C のオイルバスで 3 時間加水分解 (15 分間置きに攪拌)
- ↓ 30 分間放冷
- ↓ 水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ ヘキサン層除去
- ↓ 抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g 加え混合
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ アセトン及び水の混液 (1:1) 20 mL で洗浄
- ↓ ろ液を合わせて水で 100 mL に定容

多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)]

- ↓ 抽出液 2.5 mL に、塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加え混合
- ↓ 混合液を注入、30 分間放置
- ↓ 酢酸エチル 30 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1:1) 1 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 2 mL、0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1:1) 3 mL でコンディショニング
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1:1) 3 mL で洗浄
- ↓ メタノール 2 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び 25% アンモニア水の混液 (99:1) 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9:1) 2.5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-9 フロルフェニコール分析法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件 (アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法)

LC 条件																											
カラム	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μ m : Agilent Technologies 製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.4																										
注入量 (μ L)	5																										
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液: 水及び酢酸の混液 (1000:1) B液: メタノール及び酢酸の混液 (1000:1)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	100	0	5.0	85	15	10.0	5	95	12.0	5	95	12.01	100	0	16.0	100	0
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.0	100	0																									
5.0	85	15																									
10.0	5	95																									
12.0	5	95																									
12.01	100	0																									
16.0	100	0																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	350																										
ネブライザーガス	空気、70 psi																										
ターボガス	空気、50 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)																					
アモキシシリン	366.0	16	113.9	25	349.0	11																					
アモキシシリン- d_4	370.0	21	353.0	13	-	-																					
アンピシリン	350.0	26	105.9	21	114.0	41																					
アンピシリン- d_5	355.0	26	110.9	23	-	-																					
ベンジルペニシリン	334.9	36	160.0	15	176.0	17																					
ペニシリン G- d_7	342.0	41	183.0	19	-	-																					
保持時間 (min)	アモキシシリン 3.5、アンピシリン 7.2、ベンジルペニシリン 9.0																										

秤取

- ↓ 試料 5 g
- ↓ 0.17 mol/L 硫酸 5 mL 及び 5% タングステン酸ナトリウム溶液 5 mL を加えスパークテルで混合
- ↓ 5 mg/L 内標準溶液を 0.125 mL 添加

抽出

- ↓ アセトン及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②の混液 (1:1) 40 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ ろ紙 (直径 125 mm、No. 5A、ADVANTEC 製) でろ過
- ↓ ろ液 2 mL 分取

pH 調整

- ↓ 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 20 mL を加え pH 8.0 を確認

クロロホルム洗浄

- ↓ クロロホルム 20 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上層分取
- ↓ 窒素ガスでクロロホルムを留去

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL、水 10 mL、0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 10 mL でコンディショニング
- ↓ 上記で得られた溶液を注入
- ↓ 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 5 mL で 3 回洗浄
- ↓ アセトニトリル及び水の混液 (1:1) 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 4 mL に溶解
- ↓ 2 mL 分取し、50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で 5 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-10 アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件(ノシヘプタイド分析法)

LC 条件	
カラム	Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 関東化学株式会社製)
検出器	蛍光光度型検出器 (FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	メタノール、水及び酢酸の混液 (65:35:1)
励起波長 (nm)	365
蛍光波長 (nm)	515
保持時間	9.0

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ 5%酢酸 20 mL 及びアセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1,000 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、5%酢酸 5 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL に水 50 mL 及び酢酸 0.5 mL を加えて負荷
- ↓ 水、メタノール及び酢酸の混液 (50:50:1) 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール、水及び酢酸の混液 (95:5:1) 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)
- ↓ メタノール、水及び酢酸の混液 (95:5:1) で 5 mL に定容

試験溶液

↓

HPLC

図 1-11 ノシヘプタイド分析法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件(エンラマイシン分析法)

LC 条件																					
カラム	ACQUITY UPLC BEH C8 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.4																				
注入量 (μ L)	5																				
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液: 水及び酢酸の混液(1000:1) B液: アセトニトリル及び酢酸の混液(1000:1)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>6.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	95	5	1.0	95	5	6.0	40	60	6.01	95	5	10.0	95	5
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	95	5																			
1.0	95	5																			
6.0	40	60																			
6.01	95	5																			
10.0	95	5																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	4500																				
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	500																				
ネブライザーガス	空気、30 psi																				
ターボガス	空気、70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	785.9 \rightarrow 1089.2 [DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:35 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	785.9 \rightarrow 179.1 [DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:35 (eV)]																				
保持時間 (min)	3.7																				

秤 取

- ↓ 試料 5 g

抽 出

- ↓ クエン酸抽出液 50 mL 及びジクロロメタン 25 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上清分取
- ↓ 残留物にクエン酸抽出液 25 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上清を合わせガラスろ紙(直径 40 mm、GA-200、ADVANTEC 製)で吸引ろ過
- ↓ ろ液をクエン酸抽出液で 100 mL に定容
- ↓ 5 mL 分取
- ↓ 窒素ガスでジクロロメタンを留去

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニング
- ↓ 上記で得られた溶液に水 7 mL を加え注入
- ↓ 水及びメタノールの混液(7:3) 5 mL で 2 回洗浄

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂ (360 mg)]

- ↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液(4:1) 5 mL でコンディショニング
- ↓ ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下に接続
- ↓ メタノール及び水の混液(4:1) 5 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 2.5 mL に溶解

[令和4年度]

表 1-1 測定条件(ドラメクチン分析法)

LC 条件																											
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジーエルサイエンス製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.3																										
注入量 (μL)	2																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A液 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>1.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.00	30	70	1.00	20	80	10.00	20	80	10.01	2	98	20.00	2	98	20.01	30	70	25.00	30	70
時間(分)	A液(%)	B液(%)																									
0.00	30	70																									
1.00	20	80																									
10.00	20	80																									
10.01	2	98																									
20.00	2	98																									
20.01	30	70																									
25.00	30	70																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 (°C)	400																										
ネブライザーガス	空気、60 psi																										
ターボガス	空気、60 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)	916.4→331.2[DP: 111 (V)、コリジョンエネルギー: 33 (eV)]																										
定性イオン (m/z)	916.4→593.3[DP: 111 (V)、コリジョンエネルギー: 21 (eV)]																										
保持時間 (min)	ドラメクチン 6.1																										

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

↓ メタノール 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をメタノール 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、メタノールで 200 mL に定容

グラファイトカーボンアミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/NH₂(500 mg/500 mg/20 mL)]

↓ メタノール 10 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 4 mL 注入

↓ 酢酸エチル及びギ酸の混液(100:1)20 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をメタノール 2 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-1 ドラメクチン分析法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件(レバミゾール分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジューエルサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000:1) B液 : アセトニトリル(HPLC用)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	90	10	15.0	10	90	18.0	10	90	18.1	90	10	23.0	90	10
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	90	10																			
15.0	10	90																			
18.0	10	90																			
18.1	90	10																			
23.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
bb イオン Sprey 電圧 (V)	5500																				
ヒーター温度 (°C)	700																				
ネブライザーガス	空気、60 psi																				
ターボガス	空気、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン(m/z)	205.0→178.0[DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:31 (eV)]																				
定性イオン(m/z)	205.0→91.0[DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:55 (eV)]																				
保持時間 (min)	4.7																				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル 60 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物にアセトニトリル 40 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせる

ヘキサン洗浄

↓ アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採りアセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 1 mL 分取

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)1 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-2 レバミゾール分析法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件(トリクラベンダゾール分析法)

LC 条件																					
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.35																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 ($^{\circ}\text{C}$)	40																				
移動相	A液 : 0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液 : メタノール																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.50</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.51</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>16.50</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	70	30	6.0	5	95	13.50	5	95	13.51	70	30	16.50	70	30
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	70	30																			
6.0	5	95																			
13.50	5	95																			
13.51	70	30																			
16.50	70	30																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(-)																				
イオンスプレー電圧 (V)	-4500																				
ヒーター温度 ($^{\circ}\text{C}$)	650																				
ネブライザーガス	空気、30 psi																				
ターボガス	空気、70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン(m/z)	326.9 \rightarrow 181.9 [DP: -95(V)、コリジョンエネルギー: -30(eV)]																				
定性イオン(m/z)	326.9 \rightarrow 145.9 [DP: -95(V)、コリジョンエネルギー: -42(eV)]																				
保持時間 (min)	5.6																				

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解

↓ 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、100°C で 3 時間加熱

抽 出

↓ メタノール 5 mL、5 mol/L 塩酸 12 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る

↓ 水層に酢酸エチル 40 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る

↓ 酢酸エチル層を合わせ、酢酸エチルで 100 mL に定容

↓ 抽出液 0.5 mL 分取

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をエタノール及び酢酸の混液(1:1)5 mL に溶解

酸化反応

↓ 過酸化水素水 25 μ L を加え 90°C で 16 時間加熱

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をメタノール及び水の混液(7:3)5 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX(500 mg/6 mL)]

↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液(7:3)5 mL でコンディショニング

↓ 上記で得られた溶液を注入

↓ メタノール及び水の混液(7:3)5 mL で洗浄

↓ メタノール 20 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液(1:1)4 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-3 トリクラベンダゾール分析法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件(ピペラジン分析法)

LC 条件																											
カラム	TSKgel VMpak-25 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 7 μ m :東ソー製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.3																										
注入量 (μ L)	5																										
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液 : 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.40</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>2.70</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>11.50</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>11.51</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>17.50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>17.51</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>22.50</td> <td>5</td> <td>85</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	1.40	15	85	2.70	35	65	11.50	35	65	11.51	95	5	17.50	95	5	17.51	15	85	22.50	5	85
時間(分)	A液(%)	B液(%)																									
1.40	15	85																									
2.70	35	65																									
11.50	35	65																									
11.51	95	5																									
17.50	95	5																									
17.51	15	85																									
22.50	5	85																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	700																										
ネブライザーガス	空気、80 psi																										
ターボガス	空気、80 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)	86.9 \rightarrow 44.1 [DP:86(V)、コリジョンエネルギー:86(eV)]																										
定性イオン (m/z)	設定せず																										
保持時間 (min)	7.1																										

秤取

↓ 試料 5 g

抽出

- ↓ 10%トリクロロ酢酸 30 mL、ヘキサン 3 mL 及び酢酸エチル 3 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ ヘキサン層及び酢酸エチル層を廃棄
- ↓ 10%トリクロロ酢酸層を分取
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 10%トリクロロ酢酸 15 mL、ヘキサン 2 mL 及び酢酸エチル 2 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 10%トリクロロ酢酸層を分取
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせて 10%トリクロロ酢酸で 50 mL に定容

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX(500 mg/6 cc)]

- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)10 mL、メタノール 5 mL、
- ↓ 超純水 5 mL 及び 10%トリクロロ酢酸 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ 水 5 mL を 2 回及びメタノール 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)7.5 mL で溶出(全溶出液を採取)

定容

- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-4 ピペラジン分析法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件(アンプロリウム分析法)

LC 条件																					
カラム	XBridge BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μ L)	2																				
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液 : 50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液(pH 4.5) B液 : メタノール																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>12.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	7.0	40	60	12.0	40	60	12.1	90	10	20.0	90	10
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	90	10																			
7.0	40	60																			
12.0	40	60																			
12.1	90	10																			
20.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	4000																				
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	400																				
ネブライザーガス	空気、70 psi																				
ターボガス	空気、70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	243.0 \rightarrow 150.0 [DP: 16(V)、コリジョンエネルギー: 15(eV)]																				
定性イオン (m/z)	243.0 \rightarrow 94.0 [DP: 16(V)、コリジョンエネルギー: 17(eV)]																				
保持時間 (min)	4.4																				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 10 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ アセトニトリル 20 mL を加え 10 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 10 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容

カルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis WCX(150 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 5 mL で洗浄
- ↓ 水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2)10 mL で溶出(全溶出液を採る)
- ↓ 水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2)で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-5 アンプロリウム分析法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件(エトパベート分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m :ジーエルサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μ L)	2																				
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000 : 1) B液 : アセトニトリル (HPLC用)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	80	20	10.0	10	90	15.0	10	90	15.01	80	20	20.0	80	20
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	80	20																			
10.0	10	90																			
15.0	10	90																			
15.01	80	20																			
20.0	80	20																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	5500																				
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	450																				
ネブライザーガス	空気、60 psi																				
ターボガス	空気、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	238.0 \rightarrow 206.0[DP: 11 (V)、コリジョンエネルギー: 17 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	238.0 \rightarrow 136.0[DP: 11 (V)、コリジョンエネルギー: 37 (eV)]																				
保持時間 (min)	6.0																				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

↓ アセトニトリル 60 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 40 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物及びヘキサン層にアセトニトリル 40 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 200 mL に定容

↓ 抽出液 4 mL 分取

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-6 エトパペート分析法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件(ナイカルバジン及びハロフジノン分析法)

LC 条件																										
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジーエルサイエンス製)																									
移動相流速 (mL/min)	0.2																									
注入量 (μL)	5																									
カラム温度 (°C)	40																									
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000:1) B液 : アセトニトリル(HPLC用)																									
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	15.0	10	90	18.0	10	90	18.1	90	10	23.0	90	10							
時間(分)	A液(%)	B液(%)																								
0.0	90	10																								
15.0	10	90																								
18.0	10	90																								
18.1	90	10																								
23.0	90	10																								
MS 条件																										
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																									
イオン化モード	ESI(-)、ESI(+)																									
イオンスプレー電圧 (V)	-4500、5500																									
ヒーター温度 (°C)	700																									
ネブライザーガス	空気、60 psi																									
ターボガス	空気、60 psi																									
コリジョンガス	窒素																									
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサーイオン</th> <th rowspan="2">DP (V)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー (eV)</th> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4,4'-ジニトロカルバニリド</td> <td>301.1</td> <td>-14</td> <td>137.1</td> <td>-18</td> <td>107.0</td> <td>-44</td> </tr> <tr> <td>ハロフジノン</td> <td>415.0</td> <td>88</td> <td>100.0</td> <td>37</td> <td>121.0</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)		(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	4,4'-ジニトロカルバニリド	301.1	-14	137.1	-18	107.0	-44	ハロフジノン	415.0	88	100.0	37	121.0	30
	プリカーサーイオン				DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																		
		(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)		コリジョンエネルギー (eV)																				
4,4'-ジニトロカルバニリド	301.1	-14	137.1	-18	107.0	-44																				
ハロフジノン	415.0	88	100.0	37	121.0	30																				
保持時間 (min)	4,4'-ジニトロカルバニリド 12.3、ハロフジノン 6.9																									

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

↓ アセトニトリル 60 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物にアセトニトリル 40 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせる

ヘキサン洗浄

↓ アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採りアセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 1 mL 分取

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)1 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-7 ナイカルバジン及びハロフジノン分析法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件(モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法)

LC 条件																																																		
カラム	InertSustain C18 PEEK (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm :ジーエルサイエンス製)																																																	
移動相流速 (mL/min)	0.2																																																	
注入量 (μL)	4																																																	
カラム温度 (°C)	40																																																	
移動相	A液 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : メタノール																																																	
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>6.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.00	40	60	6.00	5	95	12.00	5	95	12.01	40	60	15.00	40	60																															
時間(分)	A液(%)	B液(%)																																																
0.00	40	60																																																
6.00	5	95																																																
12.00	5	95																																																
12.01	40	60																																																
15.00	40	60																																																
MS 条件																																																		
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																																																	
イオン化モード	ESI(+又は-)																																																	
イオンスプレー電圧 (V)	4500																																																	
ヒーター温度 (°C)	500																																																	
ネブライザーガス	空気、60 psi																																																	
ターボガス	空気、60 psi																																																	
コリジョンガス	窒素																																																	
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																																																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>プリカーサー イオン(m/z)</th> <th>プロダクト イオン(m/z)</th> <th>DP (V)</th> <th>コリジョンエ ネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">モネンシン</td> <td>(定量用)</td> <td>688.3</td> <td>635.5</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>693.3</td> <td>675.3</td> <td>1</td> <td>51</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">ラサロシド</td> <td>(定量用)</td> <td>589.3</td> <td>235.1</td> <td>-1</td> <td>-46</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>589.3</td> <td>173.1</td> <td>-1</td> <td>-58</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">ナラシン</td> <td>(定量用)</td> <td>782.4</td> <td>747.0</td> <td>1</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>787.4</td> <td>431.3</td> <td>1</td> <td>69</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">サリノマイシン</td> <td>(定量用)</td> <td>768.3</td> <td>733.4</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>773.3</td> <td>431.3</td> <td>1</td> <td>67</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)	モネンシン	(定量用)	688.3	635.5	1	27	(定性用)	693.3	675.3	1	51	ラサロシド	(定量用)	589.3	235.1	-1	-46	(定性用)	589.3	173.1	-1	-58	ナラシン	(定量用)	782.4	747.0	1	29	(定性用)	787.4	431.3	1	69	サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27	(定性用)	773.3	431.3	1	67
	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)																																														
モネンシン	(定量用)	688.3	635.5	1	27																																													
	(定性用)	693.3	675.3	1	51																																													
ラサロシド	(定量用)	589.3	235.1	-1	-46																																													
	(定性用)	589.3	173.1	-1	-58																																													
ナラシン	(定量用)	782.4	747.0	1	29																																													
	(定性用)	787.4	431.3	1	69																																													
サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27																																													
	(定性用)	773.3	431.3	1	67																																													
保持時間 (min)	モネンシン 9.0、ナラシン 9.9、サリノマイシン 9.3、ラサロシド 7.5																																																	

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

↓ アセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリル及び水の混液(9:1)で 200 mL に定容

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(200 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL に水 15 mL を加えて注入

↓ 水及びメタノールの混液(1:1)10 mL で洗浄

↓ メタノール 10 mL で溶出(全溶出液を採る)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-8 モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件(カルバリル分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m :ジールサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μ L)	4																				
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : メタノール																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	60	40	10.00	20	80	15.00	20	80	15.01	60	40	20.00	60	40
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.00	60	40																			
10.00	20	80																			
15.00	20	80																			
15.01	60	40																			
20.00	60	40																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	5500																				
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	450																				
ネブライザーガス	空気、60 psi																				
ターボガス	空気、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	202.1 \rightarrow 145.1[DP:66(V)、コリジョンエネルギー:16(eV)]																				
定性イオン (m/z)	202.1 \rightarrow 127.1[DP:66(V)、コリジョンエネルギー:39(eV)]																				
保持時間 (min)	8.3																				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトン 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 10 mL 分取

濃縮

↓ 約 1 mL まで濃縮

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18(1000 mg/6 mL)]

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液に水 20 mL を加えて注入

↓ 水及びメタノールの混液(8:2)10 mL で洗浄

↓ メタノール及び水の混液(8:2)10 mL で溶出(全溶出液を採る)

↓ メタノール及び水の混液(8:2)で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-9 カルバリル分析法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件(ペルメトリン分析法)

GC 条件	
検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m: Agilent Technologies 製)
カラム温度($^{\circ}$ C)	80 $^{\circ}$ C (2 min) – 30 $^{\circ}$ C/min – 190 $^{\circ}$ C – 2 $^{\circ}$ C/min – 280 $^{\circ}$ C (5 min)
注入口温度($^{\circ}$ C)	250
検出器温度($^{\circ}$ C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量(mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	<i>cis</i> -ペルメトリン 29.6、 <i>trans</i> -ペルメトリン 30.6

秤 取

↓ 試料 5 g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ ヘキサン 25 mL
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR(粒径 150~250 μ m)、
- ↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-10 ペルメトリン分析法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件(シフルトリン及びフルメトリン分析法)

LC 条件															
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジーエルサイエンス製)														
移動相流速(mL/min)	0.2														
注入量(μL)	5														
カラム温度(°C)	40														
移動相	シフルトリン: A液:2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液:メタノール フルメトリン: A液:2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液:アセトニトリル														
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	10	90	8.0	10	90
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)													
0.0	10	90													
8.0	10	90													
MS 条件															
測定モード	MS/MS、選択イオン検出														
イオン化モード	ESI(+)														
イオンスプレー電圧(V)	5500														
ヒーター温度(°C)	150														
ネブライザーガス	空気、60 psi														
ターボガス	空気、60 psi														
コリジョンガス	窒素														
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)															
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)										
			(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)									
シフルトリン	451.0	31	191.0	21	434.0	13									
フルメトリン	527.0	31	267.0	21	239.0	33									
保持時間(min)	シフルトリン 3.9、フルメトリン 4.3														

秤 取

↓ 試料 5 g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 2 mL 分取

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液(1:1)5 mL に溶解

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18(1000 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及び水(1:1)5 mL でコンディショニング
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ アセトニトリル及び水の混液(1:1)5 mL で洗浄
- ↓ アセトニトリル 15 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)10 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム [Sep-Pak Plus florisil(910 mg)]

- ↓ ヘキサン 10 mL でコンディショニング
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)20 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-11 シフルトリン及びフルメトリン分析法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件(フルニキシン分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジールサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000 : 1) B液 : アセトニトリル (HPLC用)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>13.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	8.0	0	100	13.0	0	100	13.01	50	50	18.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	50	50																			
8.0	0	100																			
13.0	0	100																			
13.01	50	50																			
18.0	50	50																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
インターフェイス電圧(kV)	4.0																				
インターフェイス温度(°C)	300																				
脱溶媒管温度(°C)	250																				
ヒートブロック温度(°C)	400																				
ネブライザーガス	窒素、3.00 L/min																				
ドライイングガス	窒素、10.00 L/min																				
ヒーティングガス	空気、10.00 L/min																				
コリジョンガス	アルゴン																				
定量イオン(m/z)	297.1→279.2[コリジョンエネルギー:22(eV)]																				
定性イオン(m/z)	297.1→264.2[コリジョンエネルギー:35(eV)]																				
保持時間(min)	5.1																				

秤 取

↓ 試料 5 g

抽出

↓ アセトニトリル 30 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL 及び無水硫酸ナトリウム 10g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物及びヘキサン層にアセトニトリル 20 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容

↓ 抽出液 4 mL 分取、メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-12 フルニキシン分析法の分析法フローチャート

表 1-13 測定条件 (DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度($^{\circ}$ C)	80 $^{\circ}$ C(2 min)–30 $^{\circ}$ C/min–190 $^{\circ}$ C–3.6 $^{\circ}$ C/min–280 $^{\circ}$ C(5 min)
注入口温度($^{\circ}$ C)	250
検出器温度($^{\circ}$ C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	2
保持時間(min)	7.9(α -HCH) 8.7(γ -HCH) 9.1(ヘプタクロル) 9.7(アルドリン) 10.4(β -HCH) 11.5(<i>cis</i> -ヘプタクロルエポキシド) 11.6(<i>trans</i> -ヘプタクロルエポキシド) 13.0(<i>p,p'</i> -DDE) 13.5(ディルドリン) 14.2(エンドリン) 14.5(<i>o,p'</i> -DDT) 15.8(<i>p,p'</i> -DDD) 16.4(<i>p,p'</i> -DDT)

秤 取

↓ 試料 5 g

アセトン抽出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisol PR(粒径 150~250 μm)、

↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]

↓ 溶解液を注入

↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-13 DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 分析法の分析法フローチャート

表 1-14 測定条件(PCB 分析法)

GC 条件																																																	
カラム	Fused Silica HT8-PCB (内径 0.25 mm、長さ 60 m: 関東化学製)																																																
カラム温度(°C)	100°C(1 min)－20°C/min－180°C(0 min)－5°C/min－300°C(0 min)																																																
注入口温度(°C)	250																																																
インターフェース温度(°C)	300																																																
キャリアーガス	ヘリウム																																																
キャリアーガス流量(mL/min)	1																																																
注入法	スプリットレス法																																																
注入量(μL)	1																																																
MS 条件																																																	
測定モード	MS、選択イオン検出																																																
イオン化法	EI(+)																																																
イオン化エネルギー(eV)	70																																																
EM 電圧(V)	オートチューニングでの設定値																																																
イオン源温度(°C)	230																																																
四重極温度(°C)	150																																																
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>定量イオン (m/z)</th> <th>定性イオン (m/z)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCB28</td> <td>256.0</td> <td>258.0</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂]PCB28</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-19</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>PCB52</td> <td>289.9</td> <td>291.9</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂]PCB52</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-70</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>PCB101</td> <td>325.9</td> <td>327.9</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂]PCB101</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-111</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>PCB138 及び PCB153</td> <td>359.8</td> <td>361.8</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂] PCB138 及び [¹³C₁₂] PCB153</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-159</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>PCB180</td> <td>395.8</td> <td>393.8</td> </tr> <tr> <td>[¹³C₁₂]PCB180</td> <td>407.8</td> <td>405.8</td> </tr> <tr> <td>MBP-170</td> <td>407.8</td> <td>405.8</td> </tr> </tbody> </table>		定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)	PCB28	256.0	258.0	[¹³ C ₁₂]PCB28	268.0	270.0	MBP-19	268.0	270.0	PCB52	289.9	291.9	[¹³ C ₁₂]PCB52	302.0	304.0	MBP-70	302.0	304.0	PCB101	325.9	327.9	[¹³ C ₁₂]PCB101	337.9	339.9	MBP-111	337.9	339.9	PCB138 及び PCB153	359.8	361.8	[¹³ C ₁₂] PCB138 及び [¹³ C ₁₂] PCB153	371.9	373.9	MBP-159	371.9	373.9	PCB180	395.8	393.8	[¹³ C ₁₂]PCB180	407.8	405.8	MBP-170	407.8	405.8
	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)																																															
PCB28	256.0	258.0																																															
[¹³ C ₁₂]PCB28	268.0	270.0																																															
MBP-19	268.0	270.0																																															
PCB52	289.9	291.9																																															
[¹³ C ₁₂]PCB52	302.0	304.0																																															
MBP-70	302.0	304.0																																															
PCB101	325.9	327.9																																															
[¹³ C ₁₂]PCB101	337.9	339.9																																															
MBP-111	337.9	339.9																																															
PCB138 及び PCB153	359.8	361.8																																															
[¹³ C ₁₂] PCB138 及び [¹³ C ₁₂] PCB153	371.9	373.9																																															
MBP-159	371.9	373.9																																															
PCB180	395.8	393.8																																															
[¹³ C ₁₂]PCB180	407.8	405.8																																															
MBP-170	407.8	405.8																																															
保持時間(min)	PCB28 16.3、PCB52 17.2、PCB101 20.4、PCB138 24.9、PCB153 23.8、PCB180 27.4																																																

秤 取

- ↓ 試料 1 g
- ↓ 10 µg/L 内標準溶液を 50 µL 添加

抽 出

- ↓ 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流
- ↓ ヘキサン 100 mL を加え、綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移す
- ↓ 10 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 µm) 、
- ↓ 20 g をヘキサンで湿式充填、内径 2.0 cm]
- ↓ 濃縮液を負荷
- ↓ ヘキサン約 2 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をカラムに負荷
- ↓ ヘキサン 200 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮
- ↓ 10 µg/L 内標準(シリンジスパイク)混合溶液 50 µL を入れたスピッツ管に濃縮液を移す
- ↓ ヘキサン約 1 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をスピッツ管に合わせる
- ↓ 窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮

試験溶液

↓

GC-MS

図 1-14 PCB 分析法の分析法フローチャート

[令和2年度]

(1)チルミコシン分析法

表2-1 チルミコシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	54.1	57.8	55.6	57.8	55.1	56.3	112.6	1.3	3.1
	2回目	55.1	57.2	54.9	59.2	56.2				

(2)スルファモイルダプソン分析法

表2-2 スルファモイルダプソンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.4	7.8	8.4	8.3	8.4	84.2	3.0	8.1
	2回目	9.6	8.1	7.5	8.9	8.0				

(3)4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び4-*epi*-オキシテトラサイクリン分析法

表2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	92	87	84	92	82	89	88.7	3.3	4.1
	2回目	91	91	92	90	86				

表2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	111	101	93	116	117	109	109.1	3.4	7.9
	2回目	110	108	102	117	116				

(4) エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法

表2-5 エンロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.0	8.1	8.1	7.3	9.0	8.1	81.2	6.0	9.5
	2回目	7.7	7.4	8.0	7.3	9.2				

表2-6 シプロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.7	9.3	8.2	9.1	8.7	86.5	5.5	6.6
	2回目	8.0	7.9	8.6	8.3	9.5				

(5) フロルフェニコール分析法

表2-7 フロルフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
200	1回目	192	189	191	153	194	185	92.3	7.5	7.8
	2回目	199	178	168	188	194				

(6) トリクラベンダゾール分析法

表2-8 トリクラベンダゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
225	1回目	168	195	206	166	188	184	81.6	2.4	8.2
	2回目	171	189	200	172	180				

(7) サリノマイシン及びモネンシン分析法

表2-9 サリノマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.94	2.02	1.93	2.00	1.91	1.98	99.0	5.7	6.6
	2回目	1.70	2.05	1.96	2.18	2.10				

表2-10 モネンシンAの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.95	1.92	1.74	1.73	1.70	1.75	87.5	6.9	9.0
	2回目	1.69	1.97	1.48	1.69	1.63				

(8) トルトラズリル分析法

表 2-11 トルトラズリルスルホンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	94	106	103	97	100	100	100.0	1.1	4.9
	2回目	95	107	104	97	98				

(9) ペルメトリン分析法

表2-12 ペルメトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	50.7	50.7	49.5	46.0	53.4	49.9	99.9	6.4	8.1
	2回目	55.3	42.7	53.0	46.0	51.9				

(10) HCB 分析法

表2-13 HCBの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	4.71	3.77	4.17	4.40	4.60	4.41	88.1	6.8	10.7
	2回目	4.68	3.93	4.68	3.91	5.21				

(11) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法

表 2-14 *o,p'*-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.0	8.3	8.8	10.0	13.1	9.9	98.6	10.8	17.6
	2回目	10.2	7.9	8.7	12.0	10.7				

表 2-15 *p,p'*-DDE の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.4	8.9	8.1	9.2	8.8	9.0	89.9	6.8	8.5
	2回目	9.3	8.6	8.2	10.5	9.9				

表 2-16 *p,p'*-DDD の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.6	9.4	8.4	9.1	9.0	9.4	93.9	8.6	10.8
	2回目	10.5	9.3	7.7	11.2	9.8				

表 2-17 p,p'-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	9.4	9.1	10.4	8.6	9.8	97.7	7.8	11.0
	2回目	10.8	8.7	8.7	11.8	10.2				

表 2-18 アルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.6	7.4	7.2	8.0	7.2	7.8	77.9	6.8	8.4
	2回目	8.7	7.2	7.4	9.0	8.0				

表 2-19 ディルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	10.0	8.9	9.8	8.8	9.5	95.2	7.2	7.7
	2回目	10.0	9.0	9.0	11.0	9.8				

表 2-20 エンドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.1	10.0	9.1	9.4	8.1	9.6	95.7	6.4	9.0
	2回目	10.2	9.8	9.0	11.1	9.1				

表 2-21 ヘプタクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	8.8	7.9	8.0	8.3	8.6	85.9	8.7	8.7
	2回目	9.7	8.1	7.9	9.5	9.4				

表 2-22 *cis*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.1	9.5	8.6	9.1	7.6	9.1	90.6	6.9	7.7
	2回目	9.8	8.8	9.1	10.1	8.9				

表 2-23 *trans*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.5	9.1	8.6	9.4	9.0	9.1	91.2	6.6	7.8
	2回目	9.3	8.2	8.9	10.6	9.8				

表 2-24 α -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.2	9.2	8.9	8.7	9.2	92.2	5.8	5.8
	2回目	9.7	8.7	9.3	10.3	9.1				

表 2-25 β -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.2	9.6	9.4	8.8	8.1	9.1	91.3	8.3	8.3
	2回目	9.3	9.0	9.2	10.3	9.4				

表2-26 γ -HCHの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	9.6	9.5	8.7	8.5	9.1	90.6	5.5	5.5
	2回目	8.7	9.0	9.3	9.7	9.3				

(12) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル分析法

表2-27 *cis*-クロルデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.2	8.3	9.3	9.3	9.3	92.5	3.0	8.7
	2回目	10.2	8.6	8.9	9.6	9.5				

表2-28 *trans*-クロルデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.6	8.3	8.3	10.3	10.3	9.4	94.0	3.4	8.8
	2回目	9.7	8.9	8.8	9.7	10.2				

表2-29 *cis*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	8.2	8.8	9.4	9.5	9.3	92.8	5.1	8.2
	2回目	9.7	9.1	8.1	9.9	10.3				

表 2-30 *trans*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.1	8.5	8.6	8.3	8.4	83.8	5.1	5.7
	2回目	8.7	8.4	8.0	7.6	8.5				

(13)PCB 分析法

表2-31 PCB28の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.541	0.522	0.566	0.569	0.567	0.555	0.587	97.8	4.6	7.1
	2日目	0.589	0.590	0.555	0.538	0.600	0.619				
	3日目	0.612	0.653	0.597	0.663	0.587	0.639				
1.2	1日目	1.110	1.147	1.115	1.156	1.093	1.106	1.126	93.8	2.3	2.3
	2日目	1.101	1.127	1.183	1.096	1.100	1.118				
	3日目	1.158	1.121	1.133	1.155	1.120	1.137				
1.8	1日目	1.621	1.526	1.553	1.642	1.633	1.615	1.630	90.6	2.7	3.0
	2日目	1.638	1.639	1.576	1.713	1.626	1.629				
	3日目	1.684	1.675	1.647	1.674	1.669	1.581				

表2-32 PCB52の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.614	0.561	0.578	0.590	0.593	0.518	0.605	100.8	5.0	6.0
	2日目	0.635	0.620	0.620	0.572	0.646	0.643				
	3日目	0.590	0.589	0.652	0.653	0.616	0.598				
1.2	1日目	1.085	1.171	1.190	1.093	1.102	1.137	1.145	95.4	3.4	3.5
	2日目	1.104	1.138	1.205	1.175	1.149	1.072				
	3日目	1.148	1.146	1.171	1.204	1.152	1.163				
1.8	1日目	1.727	1.594	1.738	1.769	1.719	1.694	1.741	96.7	3.8	3.8
	2日目	1.698	1.634	1.896	1.775	1.742	1.801				
	3日目	1.718	1.763	1.777	1.776	1.719	1.799				

表 2-33 PCB101 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.619	0.625	0.604	0.569	0.616	0.623	0.610	101.7	3.7	3.7
	2日目	0.635	0.617	0.574	0.612	0.598	0.632				
	3日目	0.587	0.586	0.612	0.639	0.589	0.635				
1.2	1日目	1.129	1.081	1.057	1.115	1.162	1.173	1.157	96.4	3.4	4.5
	2日目	1.186	1.194	1.209	1.217	1.227	1.167				
	3日目	1.170	1.171	1.192	1.151	1.160	1.064				
1.8	1日目	1.616	1.636	1.739	1.716	1.714	1.618	1.700	94.4	4.0	4.2
	2日目	1.690	1.677	1.780	1.793	1.790	1.721				
	3日目	1.581	1.692	1.578	1.806	1.706	1.746				

表2-34 PCB138の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.621	0.645	0.642	0.612	0.618	0.626	0.609	101.5	4.1	6.5
	2日目	0.555	0.532	0.569	0.563	0.551	0.644				
	3日目	0.623	0.615	0.628	0.624	0.648	0.642				
1.2	1日目	1.152	1.283	1.119	1.237	1.233	1.139	1.161	96.8	4.7	5.3
	2日目	1.144	1.077	1.220	1.125	1.105	1.051				
	3日目	1.191	1.103	1.176	1.193	1.174	1.169				
1.8	1日目	1.646	1.675	1.656	1.645	1.637	1.633	1.691	93.9	1.7	2.6
	2日目	1.678	1.690	1.707	1.729	1.708	1.686				
	3日目	1.746	1.738	1.648	1.757	1.702	1.755				

表2-35 PCB153の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.632	0.619	0.621	0.640	0.635	0.574	0.616	102.7	4.1	4.2
	2日目	0.599	0.623	0.639	0.631	0.634	0.633				
	3日目	0.555	0.607	0.603	0.658	0.592	0.601				
1.2	1日目	1.224	1.196	1.123	1.219	1.199	1.128	1.181	98.4	3.4	3.4
	2日目	1.185	1.183	1.255	1.138	1.196	1.142				
	3日目	1.163	1.139	1.223	1.202	1.158	1.185				
1.8	1日目	1.705	1.730	1.716	1.691	1.641	1.738	1.731	96.2	2.0	2.7
	2日目	1.839	1.746	1.745	1.743	1.746	1.811				
	3日目	1.742	1.701	1.742	1.695	1.738	1.693				

表 2-36 PCB180 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.588	0.519	0.539	0.508	0.523	0.546	0.552	92.0	6.3	7.3
	2日目	0.536	0.530	0.601	0.634	0.619	0.574				
	3日目	0.523	0.539	0.513	0.591	0.507	0.547				
1.2	1日目	1.026	1.093	1.107	1.110	1.099	1.208	1.136	94.7	5.0	6.3
	2日目	1.276	1.240	1.173	1.162	1.092	1.241				
	3日目	1.110	1.061	1.144	1.145	1.114	1.050				
1.8	1日目	1.534	1.684	1.599	1.728	1.559	1.570	1.674	93.0	4.1	5.1
	2日目	1.625	1.699	1.798	1.757	1.826	1.701				
	3日目	1.670	1.682	1.677	1.658	1.768	1.595				

[令和3年度]

(1)タイロシン及びチルミコシン分析法

表2-1 タイロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
70	1回目	60.07	63.47	66.58	74.92	66.03	65.52	93.6	5.1	6.5
	2回目	65.37	64.29	66.23	67.78	60.50				

表2-2 チルミコシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
70	1回目	75.93	77.52	81.55	77.14	77.02	76.90	109.9	3.2	3.2
	2回目	77.20	76.70	74.96	77.76	73.26				

(2)チルバロシン分析法

表2-3 チルバロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.88	10.26	9.19	9.19	8.65	9.25	92.5	7.0	7.0
	2回目	9.29	8.43	9.35	9.86	8.40				

表2-4 3-O-アセチルタイロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.65	9.19	8.76	8.40	7.79	8.82	88.2	5.6	7.1
	2回目	9.58	8.06	9.17	8.89	8.67				

(3)リンコマイシン分析法

表2-5 リンコマイシン真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	105.76	98.96	97.04	98.04	93.72	98.91	98.9	2.6	3.3
	2回目	100.44	98.12	96.80	101.52	98.72				

(4) ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法

表2-6 ストレプトマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	99	87	102	108	100	95	94.9	9.3	9.3
	2回目	90	92	97	96	78				

表2-7 ジヒドロストレプトマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	86	94	111	108	84	95	95.1	5.5	14.2
	2回目	95	89	109	104	72				

(5) カナマイシン分析法

表 2-8 カナマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	109	107	108	124	120	116	115.7	3.2	7.2
	2回目	108	114	115	127	126				

(6) スルファメトキサゾール、スルファモノメキシシ、スルファキノキサリン、トリメプリム及びチアンフェニコール分析法

表2-9 スルファメトキサゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.9	8.4	8.7	7.9	8.9	88.7	3.7	11.0
	2回目	10.2	9.1	7.6	9.1	8.3				

表2-10 スルファモノメトキシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.8	8.5	8.0	9.1	9.0	89.5	6.0	8.1
	2回目	9.5	8.2	8.6	9.3	9.0				

表2-11 スルファキノキサリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.7	8.7	8.3	8.5	8.4	8.6	86.4	4.6	6.2
	2回目	8.9	8.7	7.8	8.4	9.2				

表2-12 トリメトプリムの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.1	8.1	8.3	8.7	8.5	84.7	4.7	4.7
	2回目	8.5	9.2	8.0	8.4	8.4				

表2-13 チアンフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.3	9.9	9.7	8.5	9.1	91.1	7.3	7.3
	2回目	9.1	7.8	8.7	9.7	9.1				

(7) エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)及びノルフロキサシン分析法

表 2-14 エンロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.5	9.7	9.4	9.5	11.2	9.7	97.2	7.6	7.6
	2回目	10.2	9.9	9.5	9.9	9.6				

表 2-15 ノルフロキサシン真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.8	8.2	8.2	7.9	9.5	8.2	82.5	5.1	7.5
	2回目	8.7	8.0	7.5	7.8	8.9				

表2-16 ノルフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.6	9.4	8.5	9.3	8.7	87.2	8.0	8.0
	2回目	9.7	8.9	7.8	8.2	8.1				

(8)クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法

表2-17 クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	50.2	54.0	50.4	47.7	51.0	51.1	102.2	2.0	5.4
	2回目	51.5	55.9	52.5	47.5	50.2				

表2-18 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	47.2	49.5	45.8	43.7	45.1	46.6	93.2	3.2	4.8
	2回目	49.3	47.5	48.6	45.7	43.7				

表2-19 オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	55.7	56.6	54.8	50.9	53.1	54.8	109.5	2.5	4.4
	2回目	57.5	55.5	58.0	52.8	52.7				

表2-20 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	53.4	55.8	53.3	49.6	53.5	54.1	108.1	2.8	5.1
	2回目	56.7	57.5	56.3	50.1	54.5				

表2-21 テトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	55.7	57.3	53.6	52.0	53.0	54.5	109.1	2.3	5.0
	2回目	58.6	56.6	55.6	50.8	52.2				

表2-22 4-*epi*-テトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	49.3	51.8	50.1	46.9	49.5	50.7	101.4	3.6	4.6
	2回目	51.8	53.2	54.4	48.5	51.6				

表2-23 ドキシサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	46.5	49.2	45.0	43.2	45.5	46.3	92.6	2.6	5.9
	2回目	48.3	50.1	48.0	42.2	45.2				

(9) フロルフェニコール分析法

表2-24 フロルフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	95	98	94	86	87	92	91.5	2.2	4.6
	2回目	91	93	95	88	89				

(10) アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法

表2-25 アモキシシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	19.5	19.5	19.6	20.5	20.6	19.9	99.6	1.8	2.4
	2回目	19.4	20.3	19.7	19.7	20.4				

表2-26 アンピシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	18.4	17.8	18.7	19.4	18.7	18.6	92.9	3.2	4.8
	2回目	17.7	18.6	18.4	20.5	17.5				

表2-27 ベンジルペニシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	18.7	19.5	18.9	20.7	20.9	19.7	98.5	2.4	4.4
	2回目	18.7	19.3	20.1	20.1	20.2				

(11) ノシヘプタイド分析法

表2-28 ノシヘプタイドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.31	9.01	9.68	10.14	8.45	9.67	96.7	4.7	7.3
	2回目	10.77	9.18	10.08	9.51	9.59				

(12) エンラマイシン分析法

表 2-29 エンラマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
30	1回目	21.6	22.0	26.2	21.2	21.4	23.2	77.3	7.6	8.2
	2回目	23.4	21.7	24.9	25.6	23.9				

[令和4年度]

(1) ドラメクチン分析法

表2-1 ドラメクチンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	5.79	5.36	4.76	5.30	4.36	5.02	100.3	7.4	11.3
	2回目	4.89	5.36	5.34	5.07	3.94				

(2) レバミゾール分析法

表2-2 レバミゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.5	9.8	9.9	9.1	9.7	9.6	95.9	2.1	3.4
	2回目	9.4	9.3	9.9	9.3	10.0				

(3) トリクラベンダゾール分析法

表2-3 トリクラベンダゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.1	9.1	7.7	8.0	8.9	8.2	81.8	6.2	8.2
	2回目	7.1	9.0	8.0	8.3	7.7				

(4) ピペラジン分析法

表2-4 ピペラジンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.4	11.3	7.9	8.3	9.3	8.8	87.8	10.3	19.9
	2回目	7.1	11.3	7.3	10.4	7.5				

(5) アンプロリウム分析法

表2-5 アンプロリウムの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	日目			
10	1回目	10.2	9.4	9.4	10	10.2	10.2	101.5	5.7	6.4
	2回目	11.2	10.5	9.9	9.6	11.2				

(6) エトパベート分析法

表2-6 エトパベートの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.5	9.9	10.1	10.0	10.3	9.9	99.0	3.5	4.2
	2回目	9.4	9.9	9.3	10.7	10.0				

(7) エトパベート分析法

表2-7-1 4,4'-ジニトロカルバニリドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.2	8.7	9.2	9.8	8.0	8.7	86.8	5.7	10.0
	2回目	7.7	8.4	9.1	9.3	9.4				

表2-7-2 ハロフジノンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.7	8.1	8.0	9.3	7.1	8.0	80.0	11.7	11.7
	2回目	7.1	7.5	9.5	7.4	7.2				

(8) モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法

表2-8-1 モネンシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	4.17	3.66	4.20	4.20	4.77	4.19	83.7	2.6	8.4
	2回目	4.27	3.77	4.26	3.98	4.57				

表2-8-2 ナラシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	3.83	4.41	4.96	4.57	5.16	4.73	94.6	4.8	11.0
	2回目	4.18	4.64	5.04	5.07	5.44				

表2-8-3 サリノマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.76	1.51	2.03	1.84	1.57	1.77	88.6	5.4	12.0
	2回目	1.73	1.48	1.97	2.02	1.80				

表2-8-4 ラサロシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	4.40	4.11	4.33	4.43	4.01	4.23	84.6	3.9	6.0
	2回目	4.03	3.85	4.57	4.51	4.06				

(9)カルバリル分析法

表2-9 カルバリルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	47.0	48.0	51.0	48.9	46.9	49.0	98.0	2.6	4.2
	2回目	50.1	47.4	52.8	50.4	47.7				

(10)ペルメトリン分析法

表2-10 ペルメトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	45.0	54.5	41.0	52.6	53.9	49.4	98.9	9.3	15.0
	2回目	57.1	52.8	35.0	47.5	55.0				

(11)シフルトリン及びフルメトリン分析法

表2-11-1 シフルトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.9	9.7	10.9	8.8	10.2	10.0	99.7	3.6	6.8
	2回目	9.5	10.0	10.5	9.4	10.8				

表2-11-2 フルメトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.1	11.1	12.0	10.1	10.8	11.0	109.7	5.1	9.5
	2回目	10.1	12.0	12.0	10.6	11.9				

(12)フルニキシン分析法

表2-12 フルニキシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.9	8.8	10.0	9.0	9.1	91.3	1.3	5.4
	2回目	9.3	8.7	8.7	9.8	8.8				

(13) DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 分析法

表 2-13-1 *o,p'*-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	9.2	9.3	8.2	8.9	9.5	95.0	4.8	9.3
	2回目	10.8	10.2	10.0	8.8	9.0				

表 2-13-2 *p,p'*-DDE の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.8	8.5	8.4	7.6	7.8	8.3	83.2	2.3	7.2
	2回目	9.3	8.7	8.7	7.7	7.8				

表 2-13-3 *p,p'*-DDD の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.9	9.9	9.2	8.5	8.4	9.3	93.5	3.0	8.3
	2回目	10.5	10.0	9.6	9.1	8.4				

表 2-13-4 *p,p'*-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.3	9.6	9.2	8.1	8.1	9.4	93.7	6.1	12.6
	2回目	11.6	9.9	9.8	9.2	7.9				

表 2-13-5 アルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.7	7.3	6.9	6.7	7.8	7.3	73.4	2.6	6.0
	2回目	7.4	7.7	7.0	7.1	7.9				

表 2-13-6 ディルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.4	9.7	8.8	8.6	7.9	9.0	90.4	3.2	8.6
	2回目	9.9	10.0	9.4	8.7	8.1				

表 2-13-7 エンドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.5	9.7	8.8	9.2	7.1	8.9	89.2	3.8	13.0
	2回目	10.3	9.6	9.4	8.7	6.9				

表 2-13-8 ヘプタクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.6	7.9	7.9	7.2	6.6	7.9	79.1	5.6	10.4
	2回目	8.9	8.4	8.7	8.0	7.0				

表 2-13-9 *cis*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.5	10.4	9.2	9.1	9.9	10.0	100.0	6.1	6.1
	2回目	10.7	10.8	10.2	10.1	10.1				

表 2-13-10 *trans*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.7	9.2	8.3	7.9	7.3	8.6	86.2	6.5	8.5
	2回目	9.7	9.2	9.0	8.7	8.2				

表 2-13-11 α -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	9.1	8.5	8.3	7.9	8.8	87.9	4.2	6.2
	2回目	9.6	9.3	9.1	8.7	8.5				

表 2-13-12 β -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	9.8	8.8	9.0	7.9	9.1	91.5	3.7	7.8
	2回目	10.0	9.7	9.2	9.6	8.2				

表 2-13-13 γ -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.0	8.5	8.3	9.3	8.7	87.4	6.8	6.9
	2回目	9.4	8.9	9.1	8.2	7.5				

(14)PCB 分析法

表2-14-1 PCB28の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0610	0.0728	0.0691	0.0688	0.0596	0.0659	0.0692	98.9	7.4	7.9
	2日目	0.0744	0.0693	0.0750	0.0637	0.0739	0.0728				
	3日目	0.0722	0.0607	0.0763	0.0713	0.0648	0.0741				
0.13	1日目	0.1396	0.1270	0.1313	0.1379	0.1392	0.1321	0.1338	102.9	7.4	7.4
	2日目	0.1350	0.1242	0.1322	0.1413	0.1399	0.1415				
	3日目	0.1422	0.1278	0.1053	0.1423	0.1438	0.1250				
0.2	1日目	0.190	0.217	0.199	0.192	0.210	0.204	0.207	103.4	3.8	4.1
	2日目	0.204	0.219	0.214	0.197	0.204	0.212				
	3日目	0.212	0.215	0.207	0.204	0.211	0.214				

表2-14-2 PCB52の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0718	0.0747	0.0641	0.0616	0.0610	0.0667	0.0700	100.0	6.0	7.1
	2日目	0.0727	0.0750	0.0757	0.0703	0.0716	0.0714				
	3日目	0.0680	0.0744	0.0707	0.0739	0.0734	0.0636				
0.13	1日目	0.1423	0.1421	0.1243	0.1345	0.1417	0.1298	0.1351	103.9	4.0	4.0
	2日目	0.1407	0.1323	0.1322	0.1363	0.1357	0.1362				
	3日目	0.1276	0.1345	0.1385	0.1341	0.1383	0.1298				
0.2	1日目	0.196	0.202	0.195	0.215	0.198	0.196	0.203	101.5	3.7	3.7
	2日目	0.208	0.207	0.210	0.204	0.200	0.209				
	3日目	0.205	0.190	0.199	0.193	0.209	0.217				

表 2-14-3 PCB101 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0698	0.0725	0.0693	0.0746	0.0710	0.0661	0.0721	103.0	3.8	4.5
	2日目	0.0728	0.0675	0.0755	0.0718	0.0713	0.0689				
	3日目	0.0723	0.0751	0.0755	0.0784	0.0723	0.0731				
0.13	1日目	0.1326	0.1319	0.1396	0.1224	0.1419	0.1282	0.1324	101.8	5.7	5.7
	2日目	0.1185	0.1289	0.1372	0.1312	0.1386	0.1324				
	3日目	0.1356	0.1179	0.1398	0.1394	0.1360	0.1307				
0.2	1日目	0.206	0.214	0.210	0.198	0.198	0.213	0.205	102.5	3.8	3.8
	2日目	0.204	0.210	0.195	0.215	0.195	0.194				
	3日目	0.201	0.207	0.212	0.217	0.203	0.198				

表2-14-4 PCB138の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0607	0.0744	0.0743	0.0664	0.0709	0.0637	0.0698	99.7	6.8	6.8
	2日目	0.0737	0.0709	0.0659	0.0738	0.0766	0.0702				
	3日目	0.0693	0.0711	0.0626	0.0708	0.0651	0.0752				
0.13	1日目	0.1112	0.1231	0.1263	0.1355	0.1320	0.1221	0.1288	99.1	5.3	5.6
	2日目	0.1365	0.1236	0.1315	0.1285	0.1395	0.1323				
	3日目	0.1272	0.1375	0.1335	0.1228	0.1326	0.1224				
0.2	1日目	0.208	0.202	0.207	0.208	0.219	0.192	0.207	103.3	4.6	4.6
	2日目	0.218	0.216	0.208	0.210	0.210	0.205				
	3日目	0.191	0.213	0.187	0.214	0.215	0.196				

表2-14-5 PCB153の真度、併行精度及び室内精度

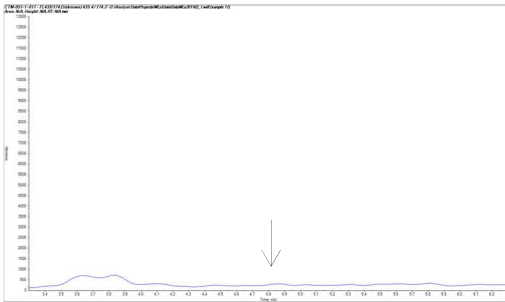
添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0607	0.0749	0.0579	0.0605	0.0674	0.0743	0.0708	101.1	6.8	8.6
	2日目	0.0681	0.0747	0.0728	0.0742	0.0758	0.0740				
	3日目	0.0734	0.0762	0.0733	0.0734	0.0679	0.0747				
0.13	1日目	0.1325	0.1311	0.1319	0.1334	0.1231	0.1282	0.1345	103.4	3.5	4.3
	2日目	0.1295	0.1424	0.1388	0.1289	0.1370	0.1419				
	3日目	0.1422	0.1347	0.1405	0.1317	0.1360	0.1366				
0.2	1日目	0.193	0.204	0.219	0.211	0.201	0.217	0.203	101.5	4.0	4.2
	2日目	0.202	0.194	0.205	0.212	0.189	0.211				
	3日目	0.200	0.204	0.204	0.198	0.194	0.196				

表 2-14-6 PCB180 の真度、併行精度及び室内精度

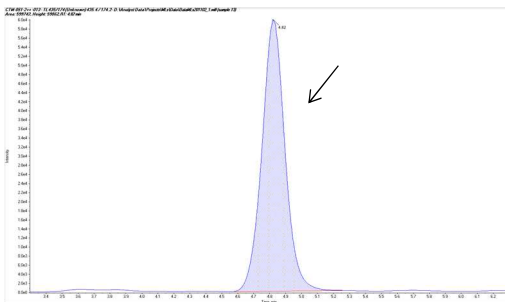
添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0702	0.0650	0.0734	0.0670	0.0659	0.0701	0.0673	96.2	8.2	8.2
	2日目	0.0711	0.0627	0.0701	0.0639	0.0624	0.0742				
	3日目	0.0745	0.0761	0.0606	0.0645	0.0587	0.0618				
0.13	1日目	0.1338	0.1353	0.1303	0.1204	0.1203	0.1269	0.1277	98.3	4.7	4.7
	2日目	0.1252	0.1238	0.1343	0.1276	0.1209	0.1181				
	3日目	0.1361	0.1315	0.1322	0.1195	0.1309	0.1318				
0.2	1日目	0.194	0.207	0.206	0.208	0.201	0.211	0.199	99.7	5.3	5.4
	2日目	0.204	0.211	0.179	0.205	0.189	0.183				
	3日目	0.190	0.196	0.212	0.209	0.200	0.183				

[令和2年度]

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.0025 mg/L)

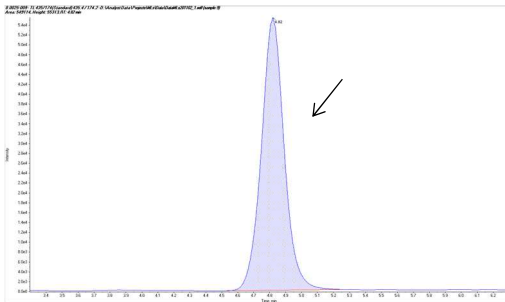
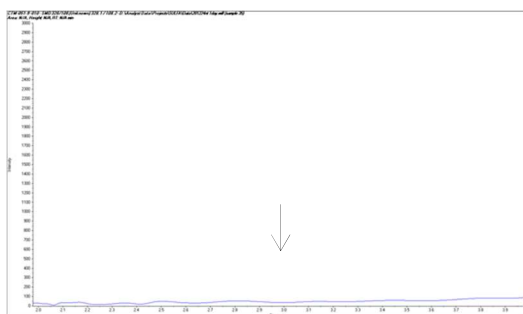
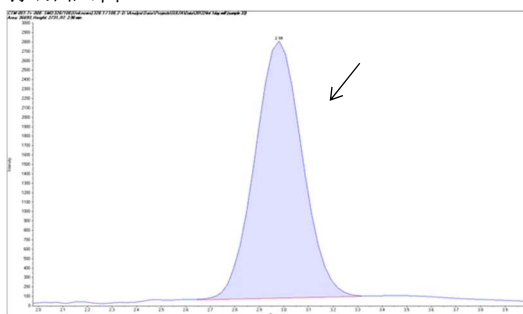


図 2-1 チルミコシンの SRM クロマトグラム
(m/z 435.4 \rightarrow 174.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

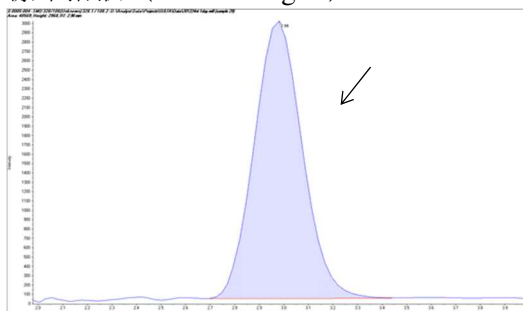
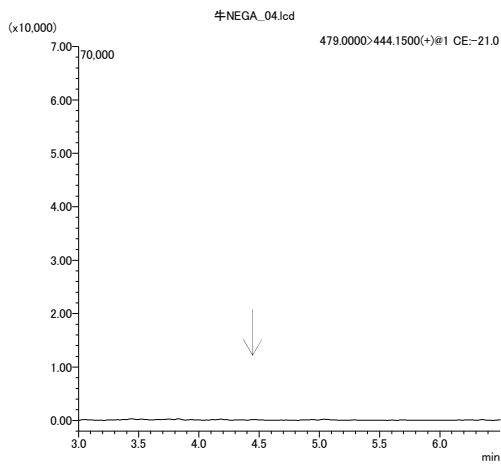


図 2-2 スルファモイルダプソンの SRM クロマトグラム

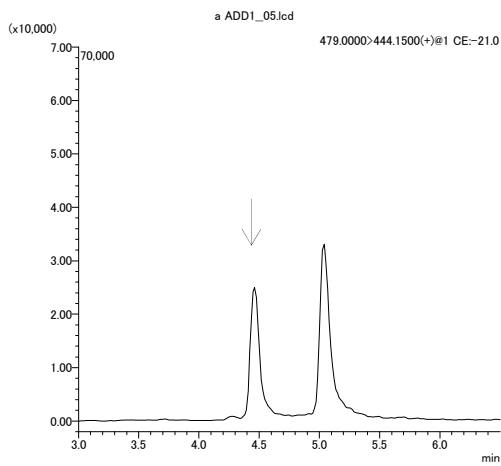
(m/z 328.1 \rightarrow 108.2)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

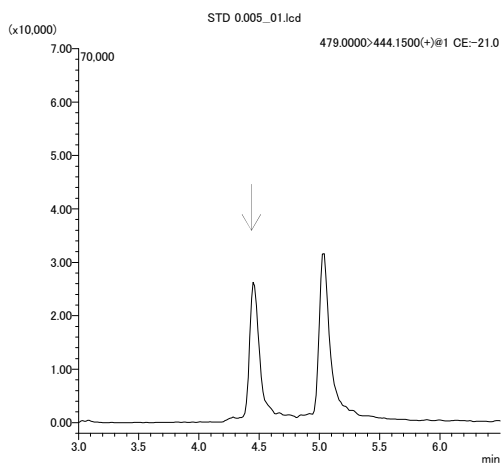
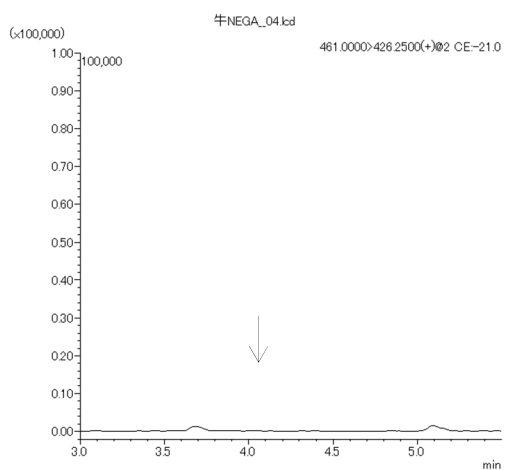
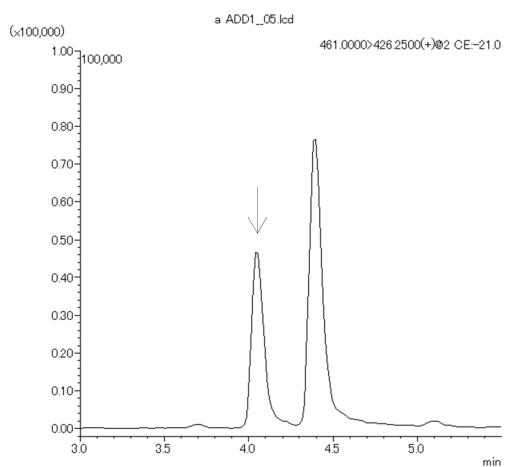


図 2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(*m/z* 479.0→444.1)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

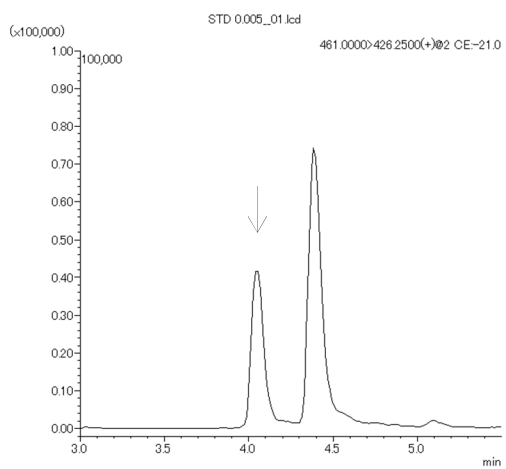


図 2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム

(*m/z* 461.0→426.2)

添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

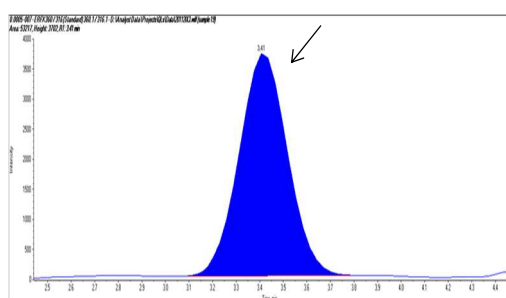
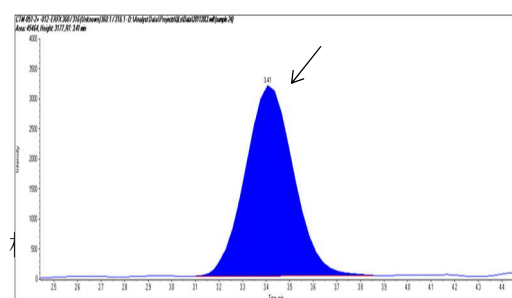
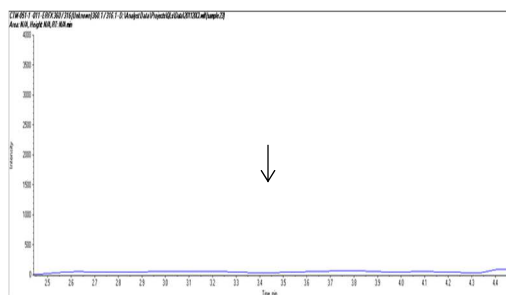


図 2-5 エンロフロキサシンの SRM クロマトグラム
(m/z 360.1→316.1)
添加濃度：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

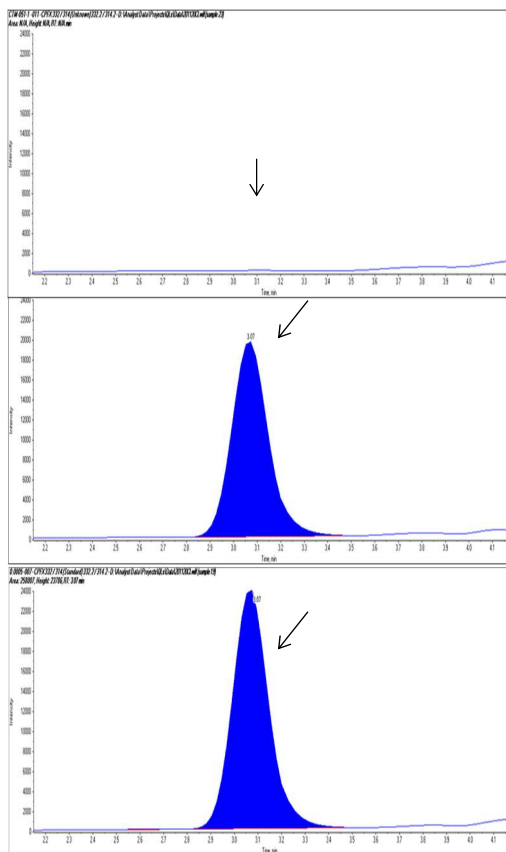
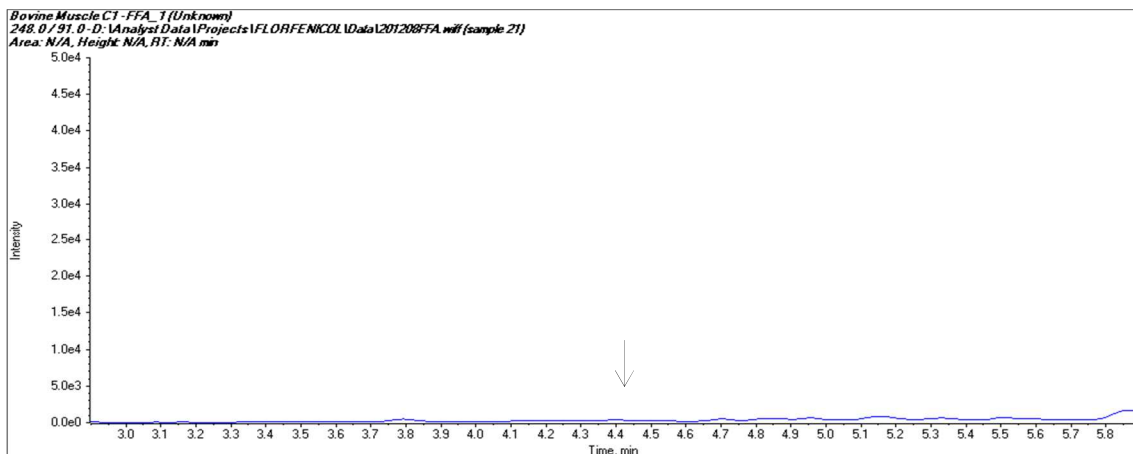


図 2-6 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム

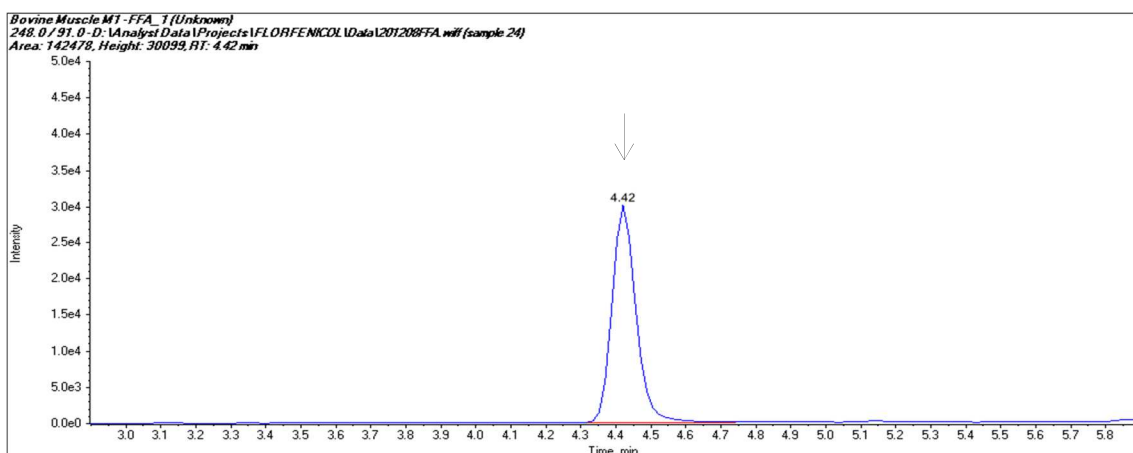
(m/z 332.2→314.2)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

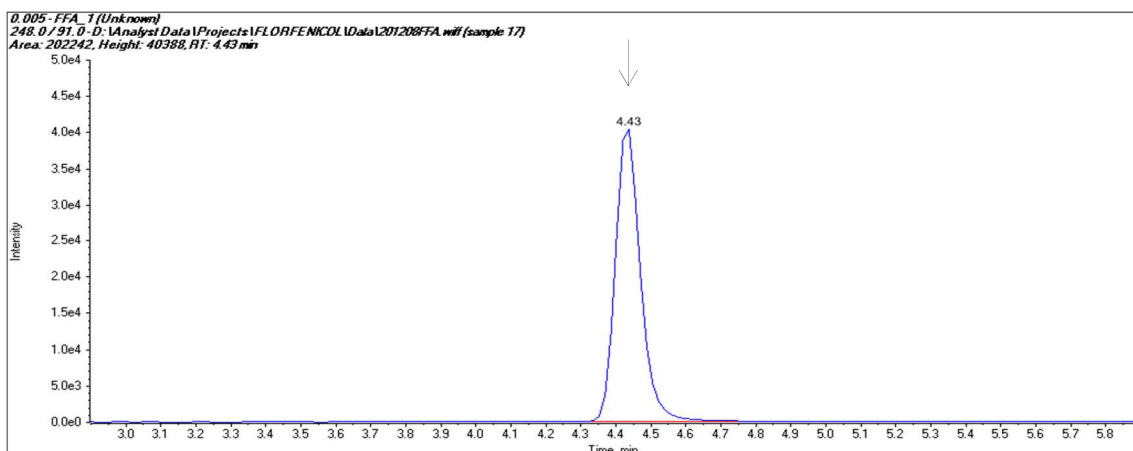
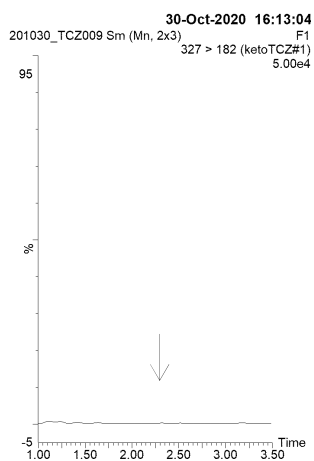


図 2-7 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム

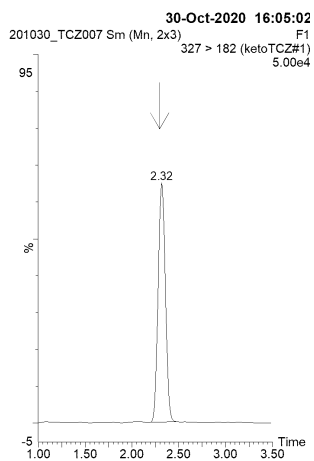
(m/z 248.0→91.0)

添加濃度 : 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



ケト-トリクラベンダゾール標準溶液 (4 µg/L)

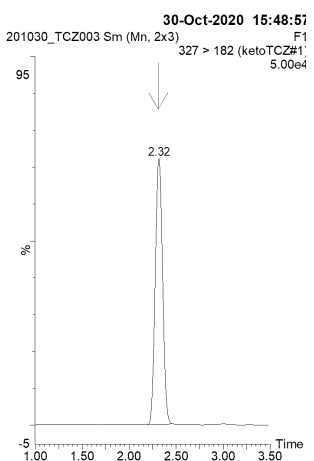


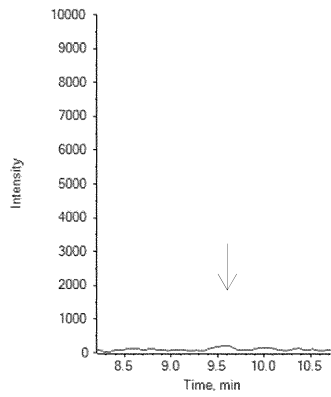
図 2-8 ケト-トリクラベンダゾールの SRM クロマトグラム

(m/z 327.0→182.0)

添加濃度 : 225 µg/kg

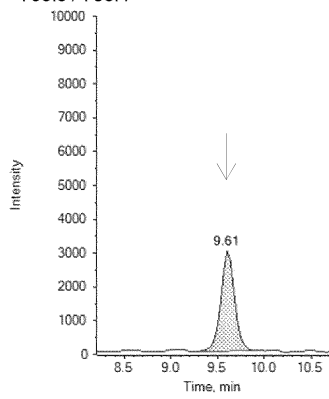
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
768.3 / 733.4



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
768.3 / 733.4



標準溶液(0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
768.3 / 733.4

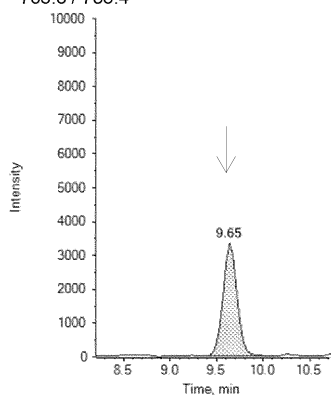


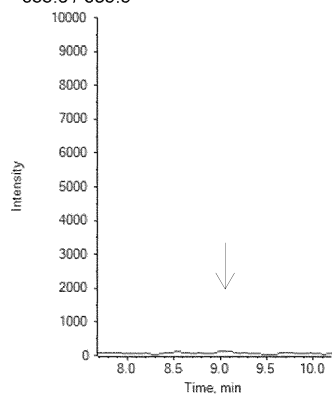
図 2-9 サリノマイシンの SRM クロマトグラム

(m/z 768.3→733.4)

添加濃度: 2 µg/kg

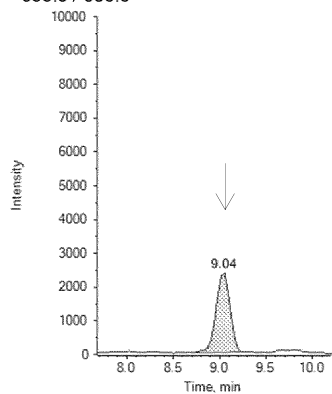
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
688.3 / 635.5



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
688.3 / 635.5



標準溶液 (0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
688.3 / 635.5

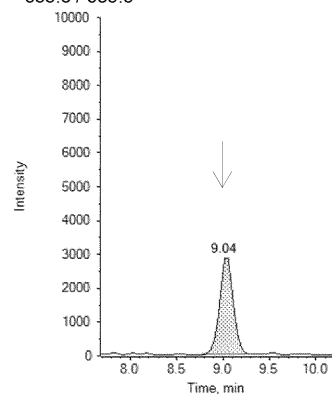


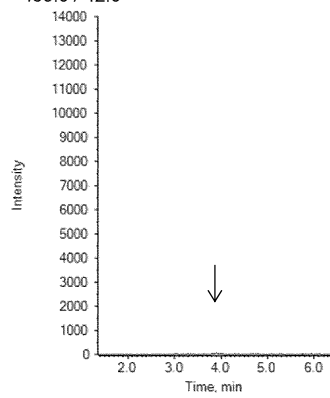
図 2-10 モネンシン A の SRM クロマトグラム

(m/z 688.3→635.5)

添加濃度 : 2 µg/kg

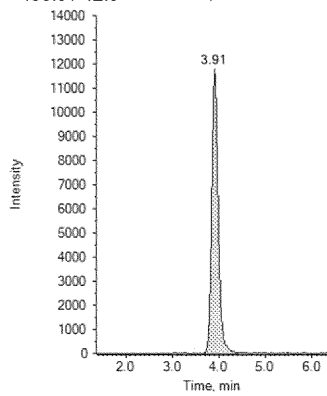
ブランク試料

1/7/2021 4:05:33 PM
456.0 / 42.0



添加試料

1/7/2021 4:13:07 PM
456.0 / 42.0



標準溶液 (0.005 mg/L)

1/7/2021 3:35:18 PM
456.0 / 42.0

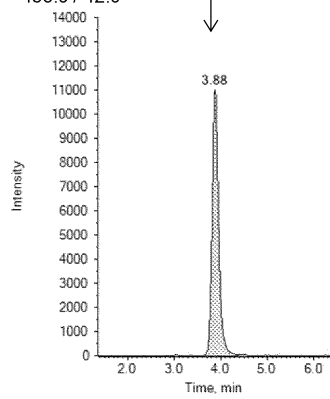
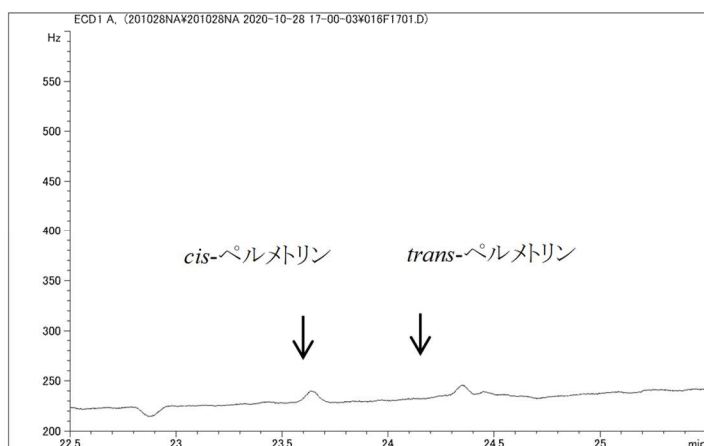


図 2-11 トルトラズリルスルホンの SRM クロマトグラム

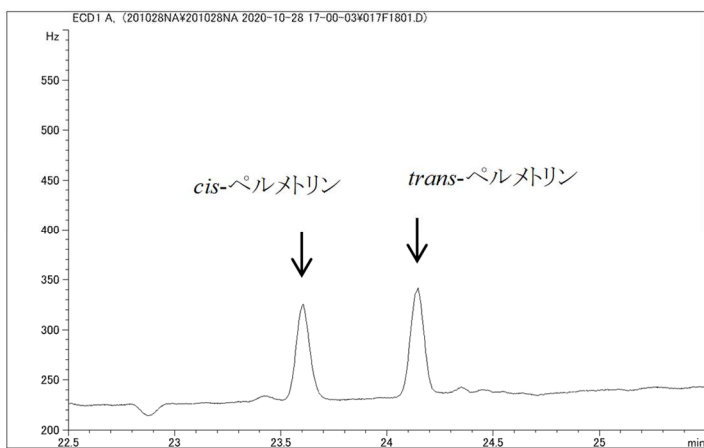
(m/z 456.0 \rightarrow 42.0)

添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.01 mg/L)

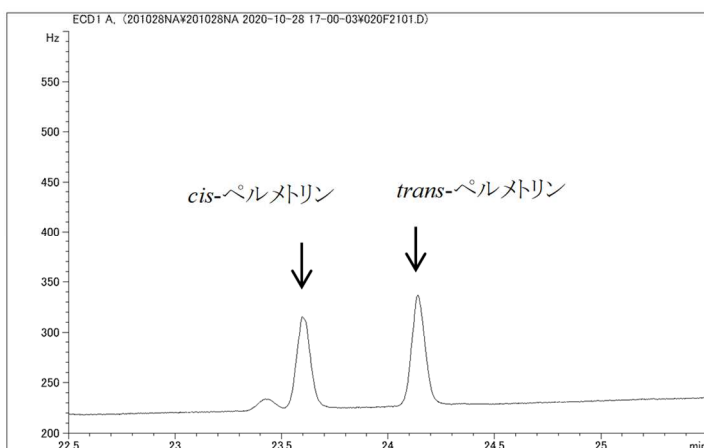
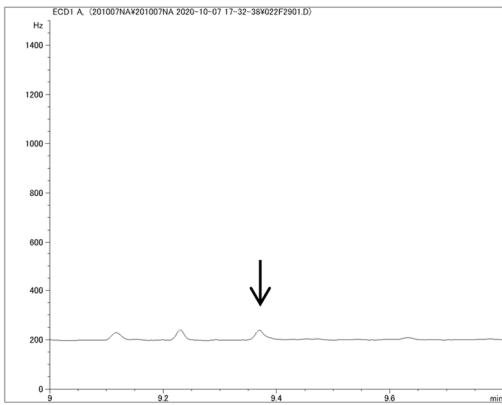
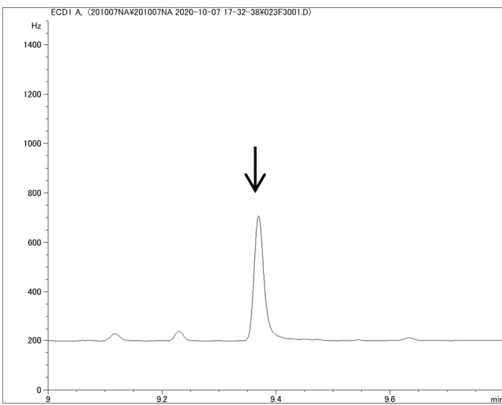


図 2-12 *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのクロマトグラム
添加濃度: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.001 mg/L)

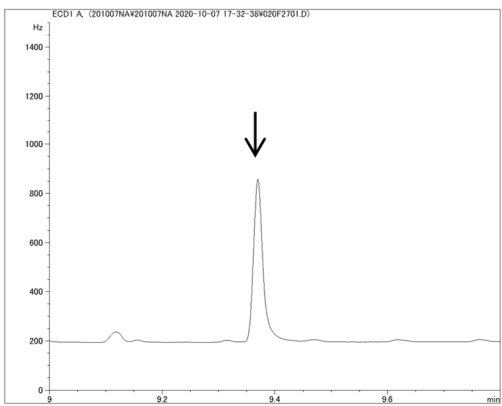
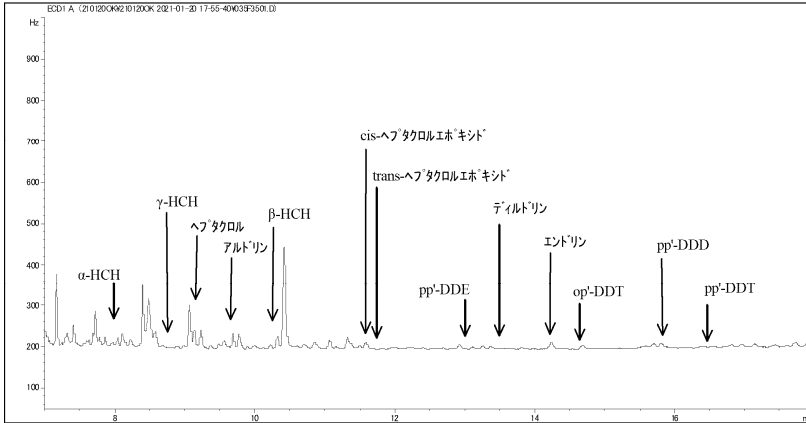


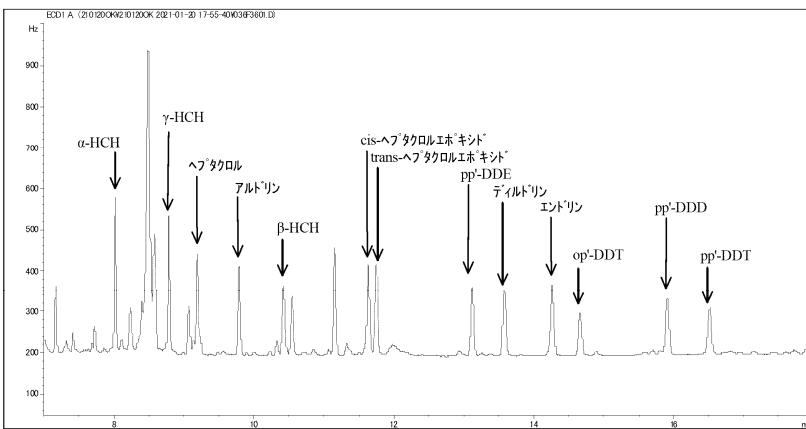
図 2-13 HCB のクロマトグラム

添加濃度 : 5 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

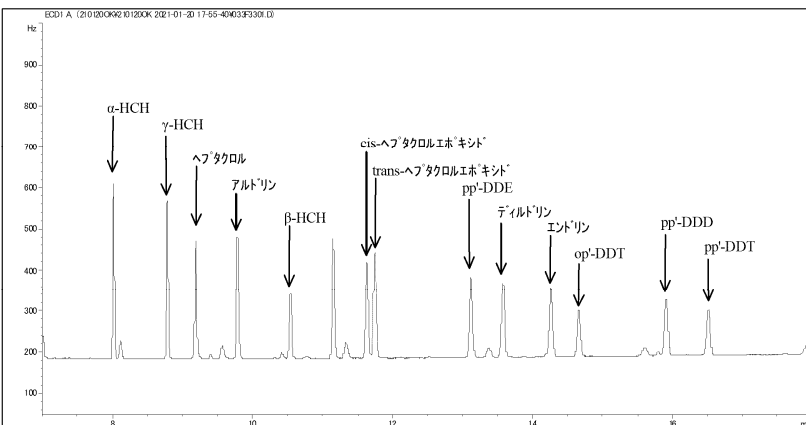
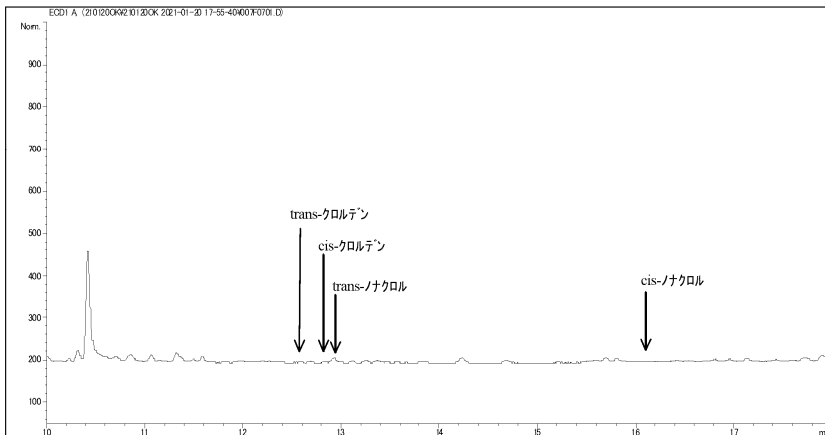
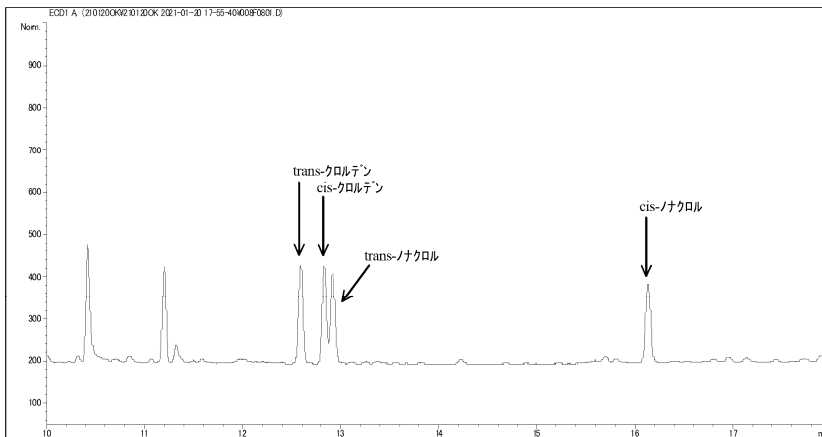


図 2-14 *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、デイルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH のクロマトグラム
 添加濃度 : 10 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

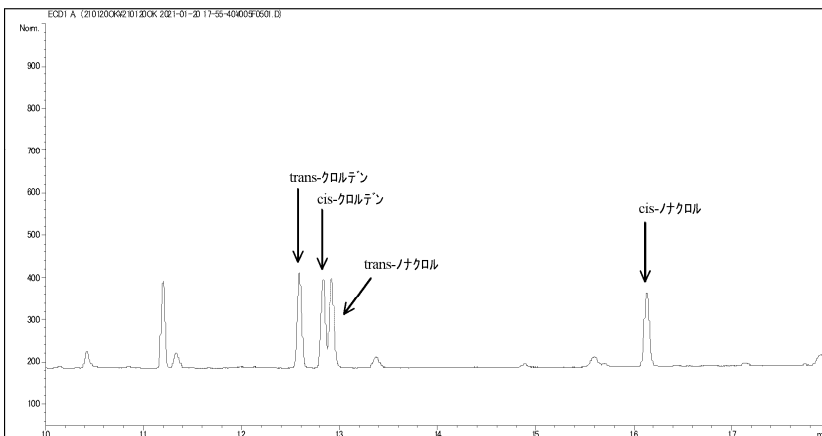
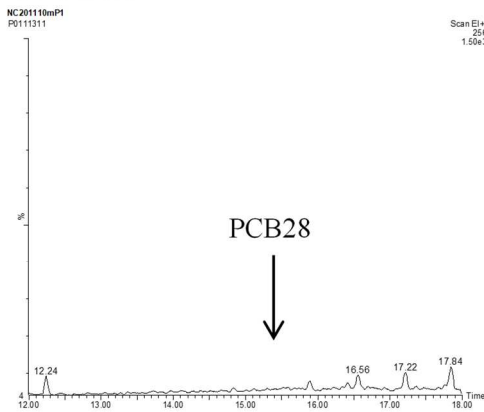
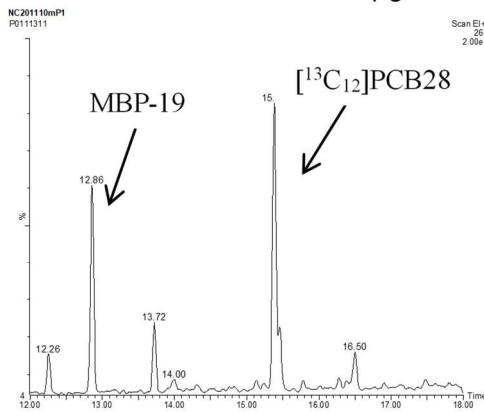


図 2-15 *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロルのクロマトグラム
添加濃度：10 µg/kg

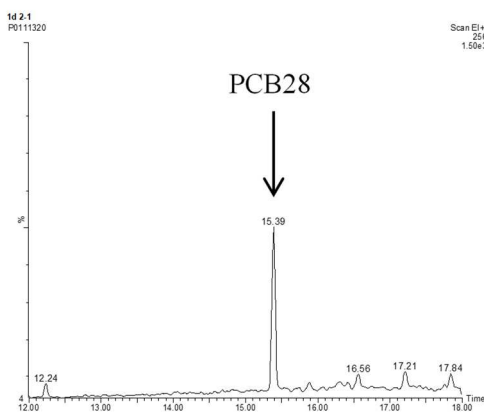
ブランク試料



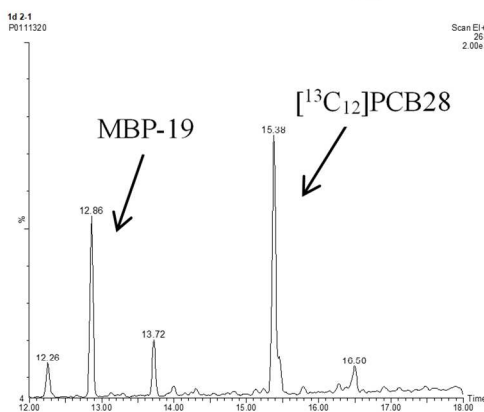
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



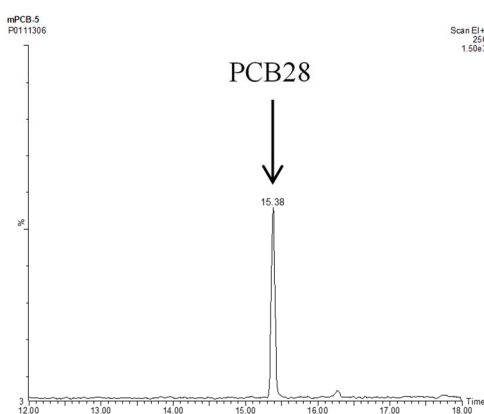
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

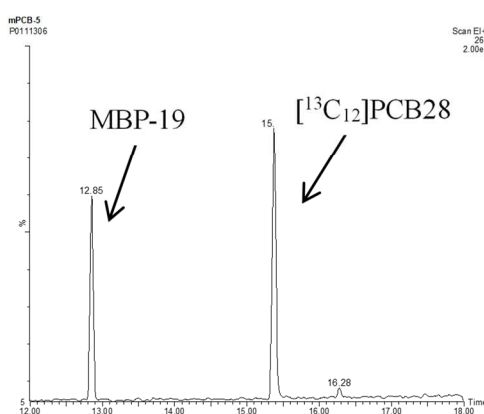


図 2-16 PCB28 の SIM クロマトグラム

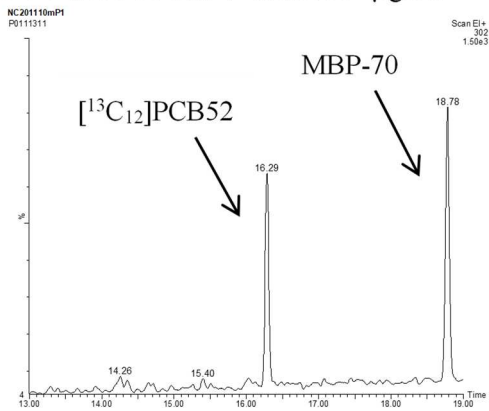
(*m/z* 256.0)

添加濃度 : 1.2 µg/kg

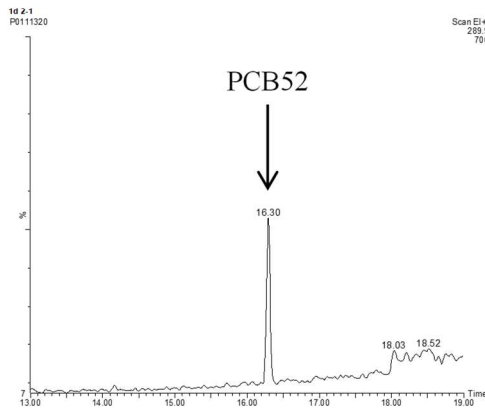
ブランク試料



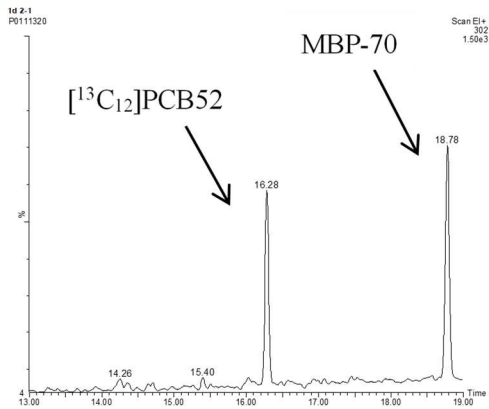
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



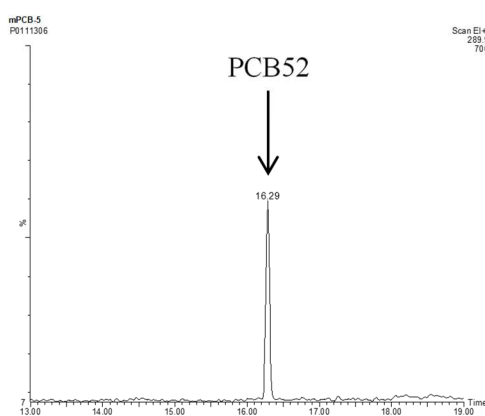
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

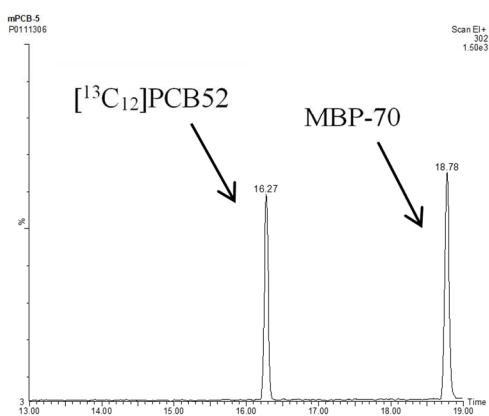
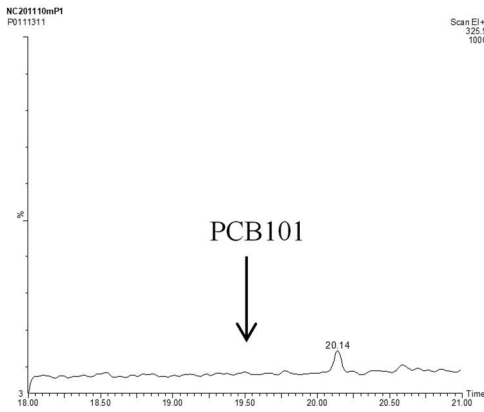


図 2-17 PCB52 の SIM クロマトグラム

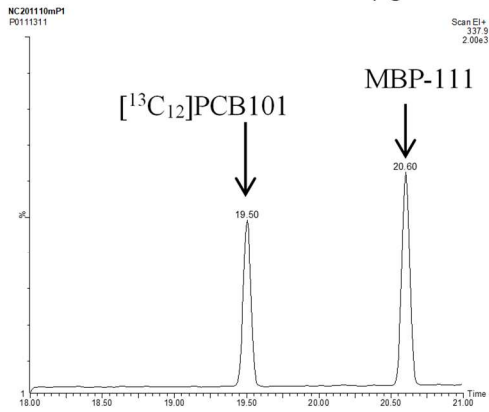
(*m/z* 289.9)

添加濃度 : 1.2 µg/kg

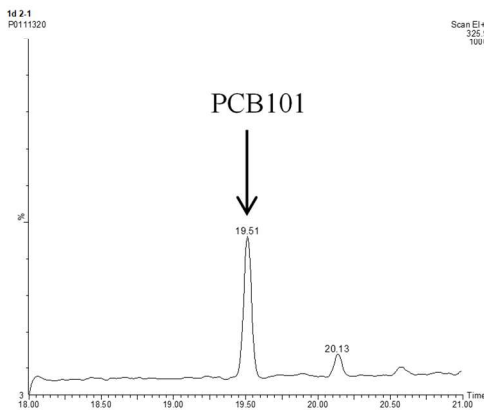
ブランク試料



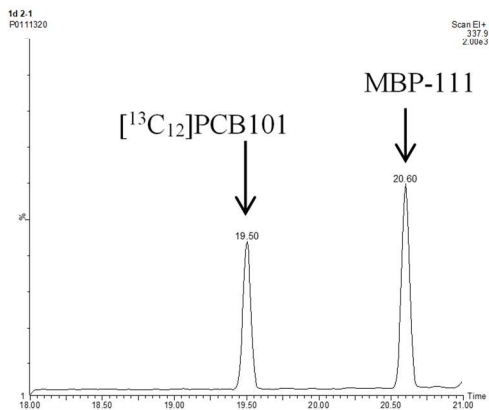
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



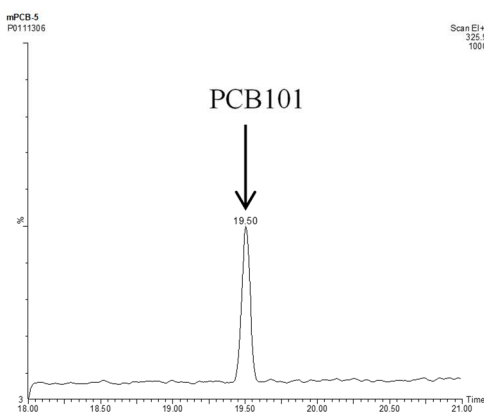
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

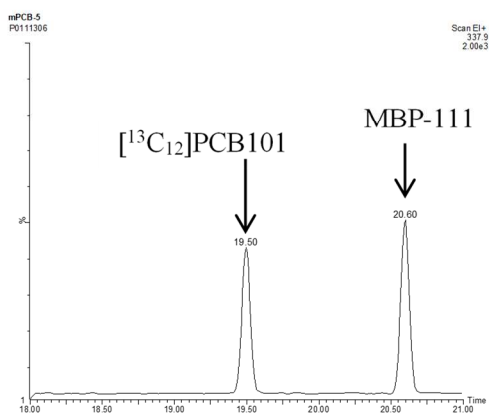
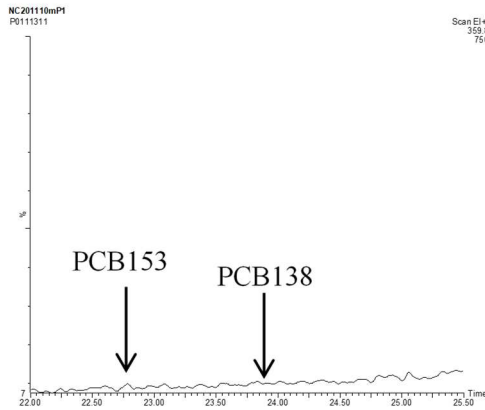


図 2-18 PCB101 の SIM クロマトグラム

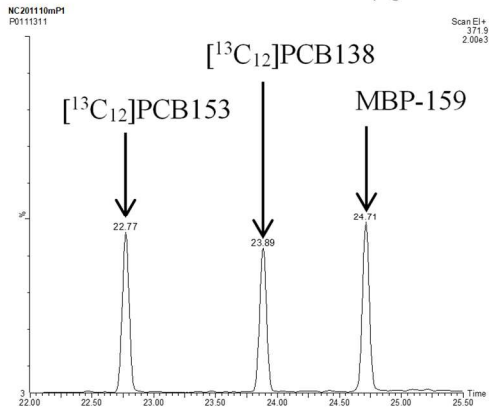
(*m/z* 325.9)

添加濃度 : 1.2 µg/kg

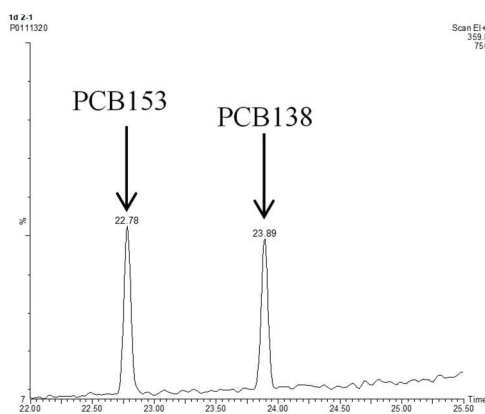
ブランク試料



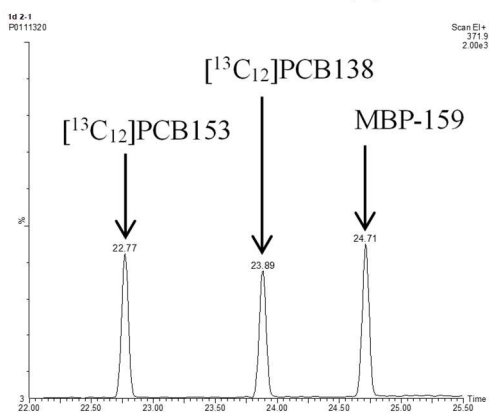
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



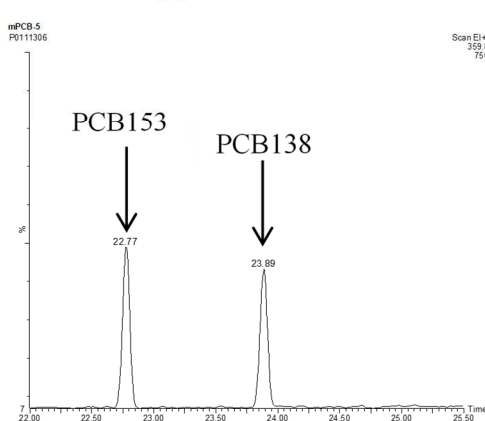
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

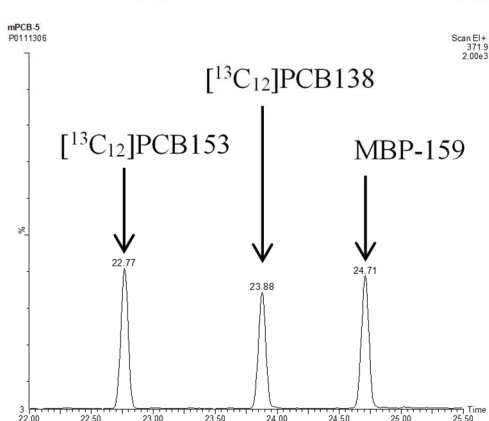
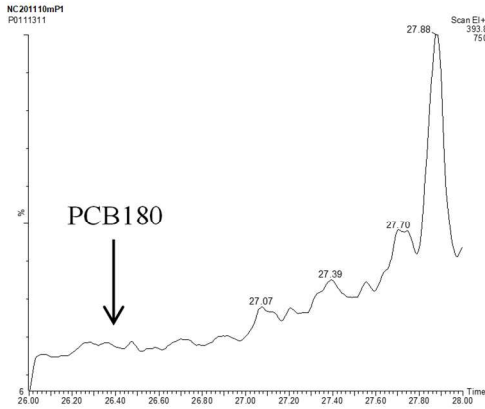


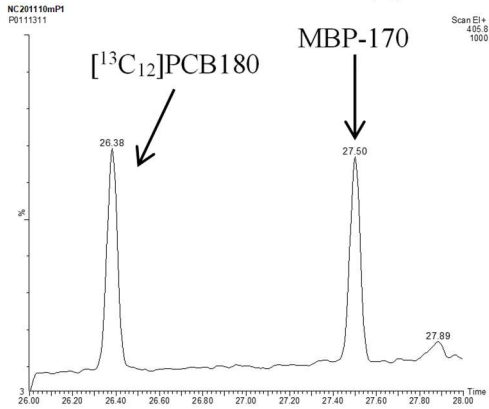
図 2-19 PCB138 及び PCB153 の SIM クロマトグラム
(*m/z* 359.8)

添加濃度 : 1.2 µg/kg

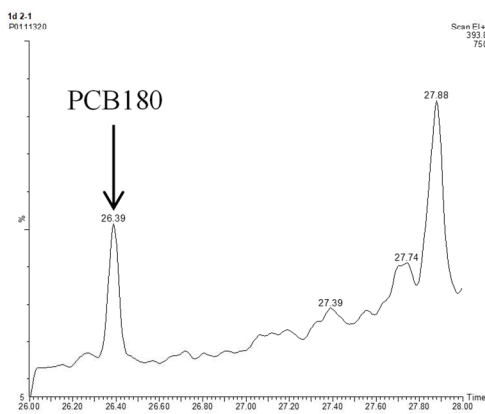
ブランク試料



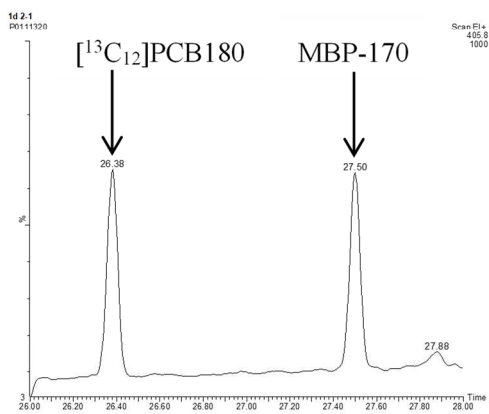
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



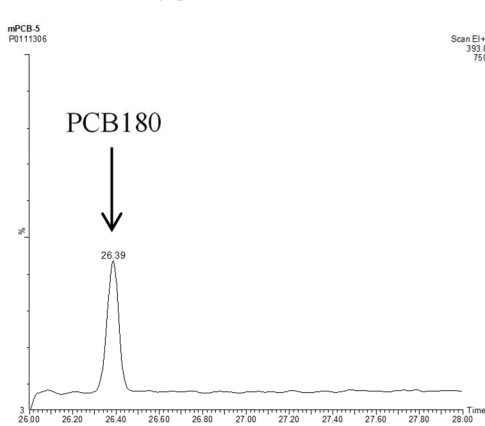
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

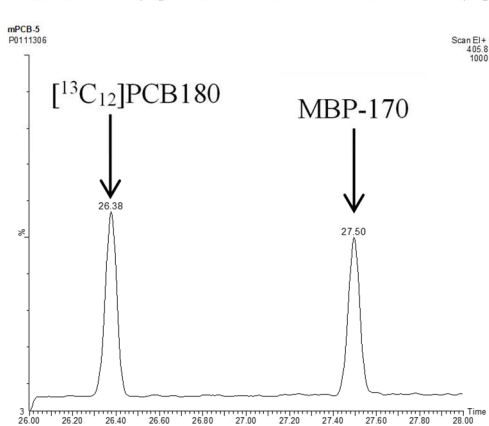


図 2-20 PCB180 の SIM クロマトグラム

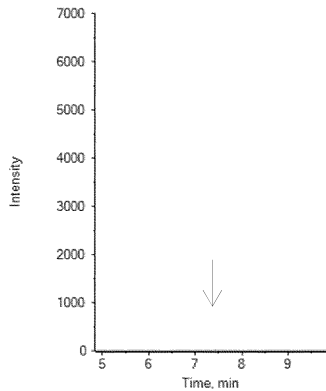
(*m/z* 393.8)

添加濃度 : 1.2 µg/kg

[令和3年度]

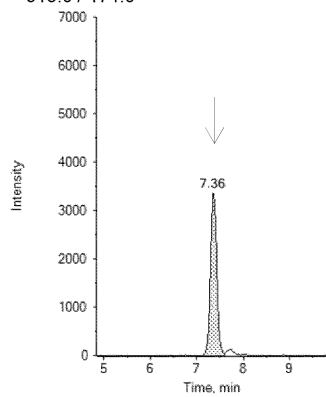
ブランク試料

8/20/2021 5:34:43 AM
916.0 / 174.0



添加試料

8/20/2021 5:55:16 AM
916.0 / 174.0



標準溶液 (0.0025 mg/L)

8/20/2021 3:31:19 AM
916.0 / 174.0

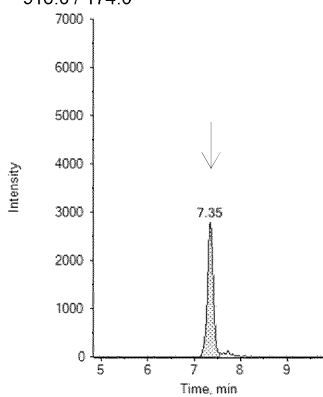


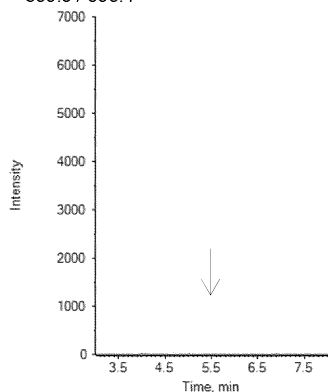
図 2-1 タイロシンの SRM クロマトグラム

(m/z 916.0→174.0)

添加濃度 : 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$

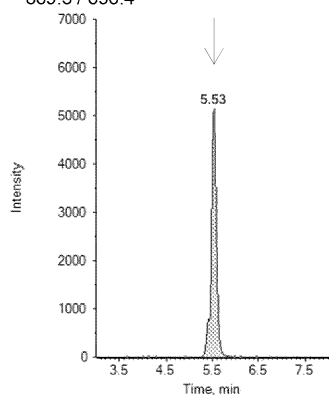
ブランク試料

8/20/2021 5:34:43 AM
869.3 / 696.4



添加試料

8/20/2021 5:55:16 AM
869.3 / 696.4



標準溶液 (0.0025 mg/L)

8/20/2021 3:31:19 AM
869.3 / 696.4

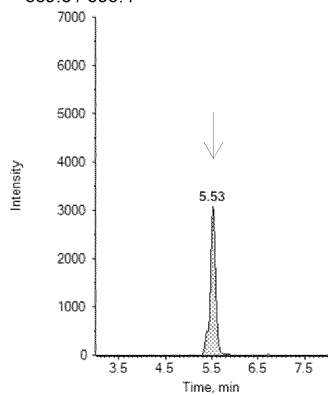
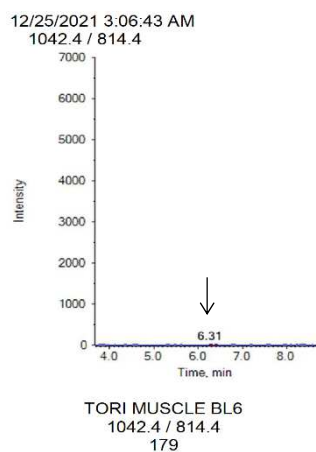


図 2-2 チルミコシンの SRM クロマトグラム

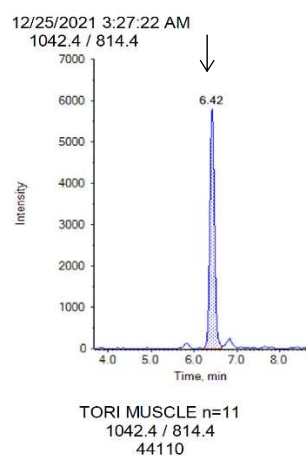
(m/z 869.3→696.4)

添加濃度 : 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.2 µg/L)

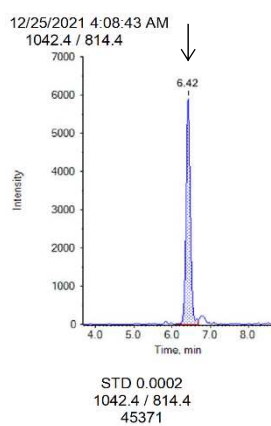
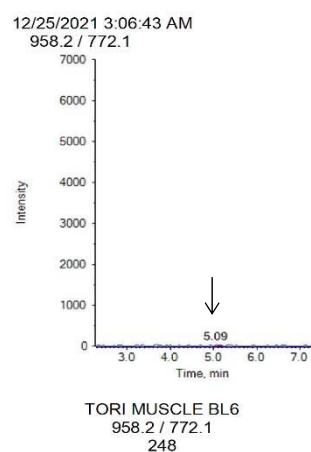


図 2-3 チルバロシンの SRM クロマトグラム

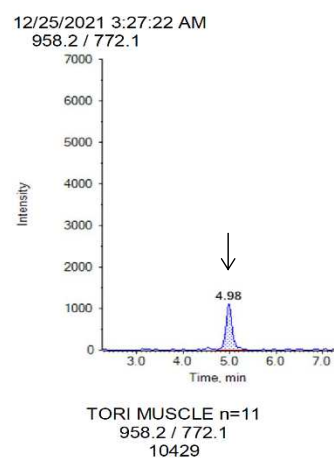
(m/z 1042.4→814.4)

添加濃度 : 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.2 µg/L)

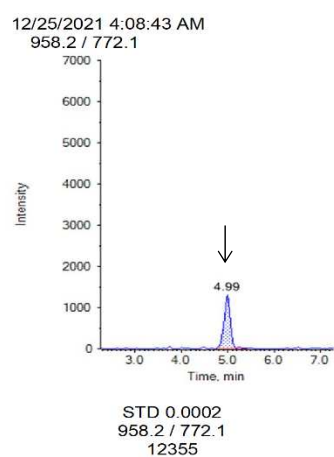
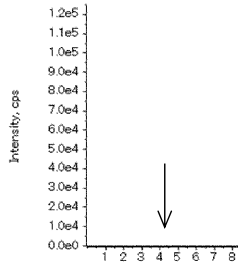


図 2-4 3-O-アセチルタイロシンの SRM クロマトグラム
(m/z 958.2→772.1)
添加濃度 : 10 µg/kg

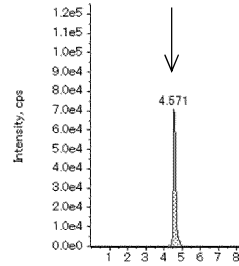
ブランク試料

Mass:407.1 / 126.0
Area:N/A



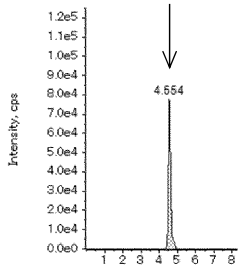
ブランク試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2
Area:672736



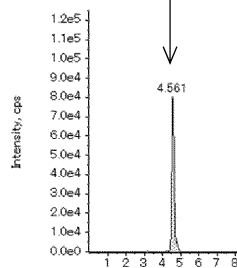
添加試料

Mass:407.1 / 126.0
Area:702100



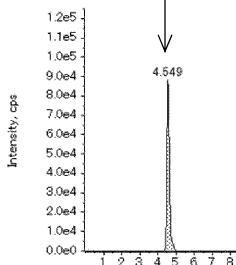
添加試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2
Area:747956



標準溶液 (0.005 mg/L)

Mass:407.1 / 126.0
Area:863001



標準溶液 (0.005 mg/L) の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2
Area:880031

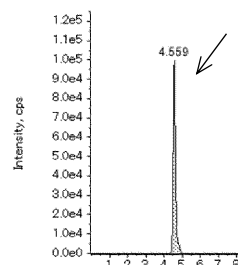
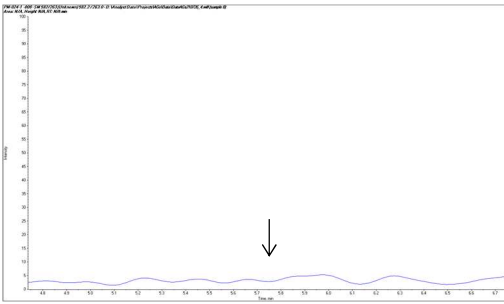


図 2-5 リンコマイシンの SRM クロマトグラム

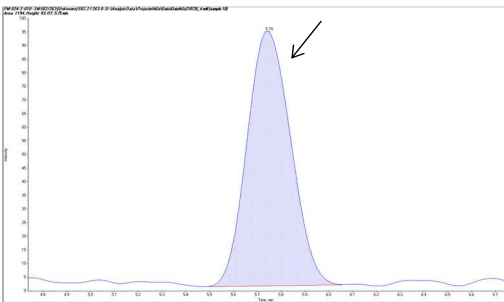
(m/z 407.1→126.0)

添加濃度 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.02 mg/L)

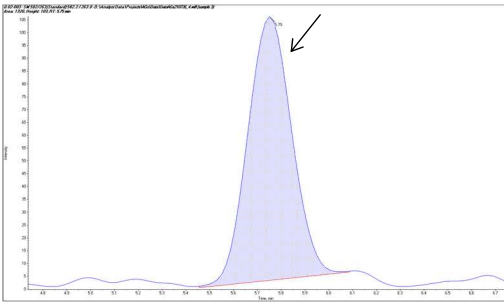
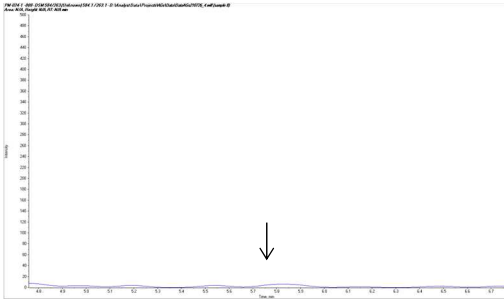
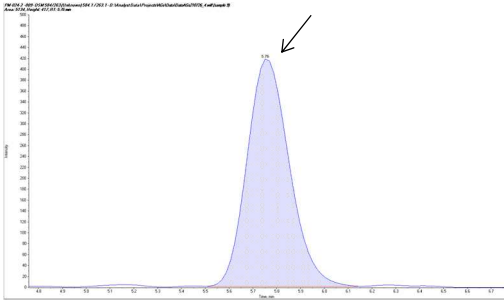


図 2-6 ストレプトマイシンの SRM クロマトグラム
(m/z 582.2→263.0)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.02 mg/L)

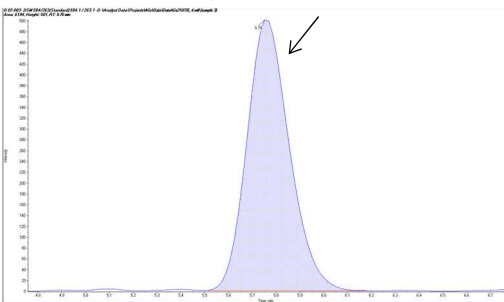
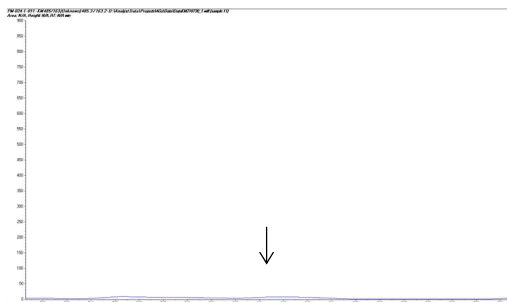
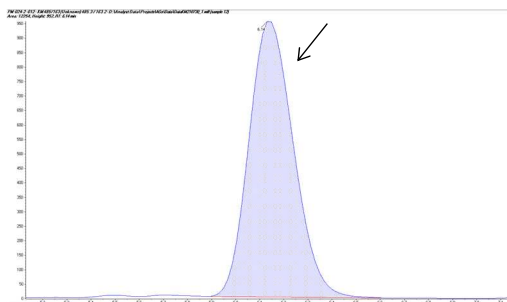


図 2-7 ジヒドロストレプトマイシンの SRM クロマトグラム
(m/z 584.1 \rightarrow 263.1)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.01 mg/L)

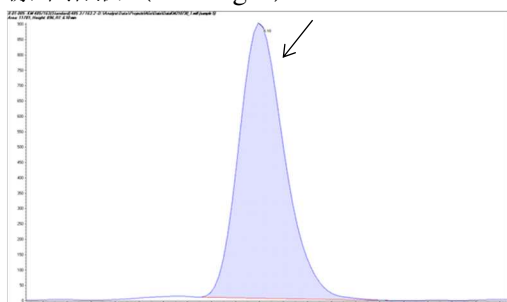
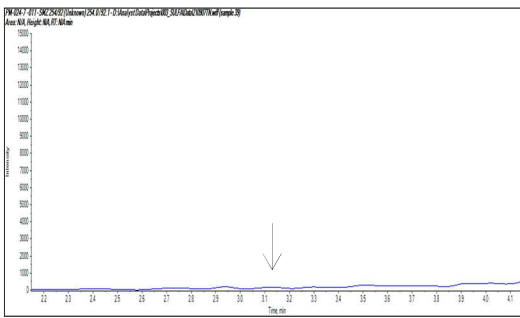
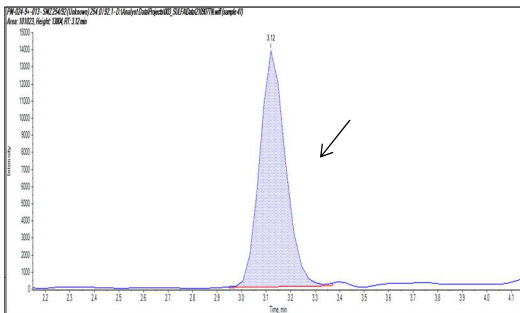


図 2-8 カナマイシン A の SRM クロマトグラム
(m/z 485.3→163.2)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

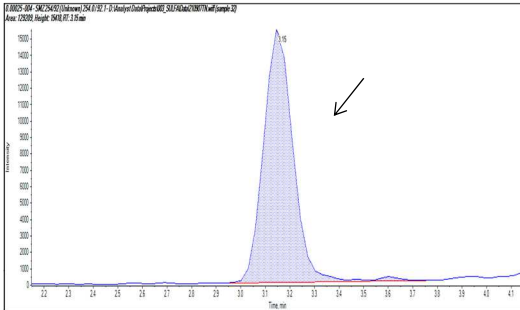
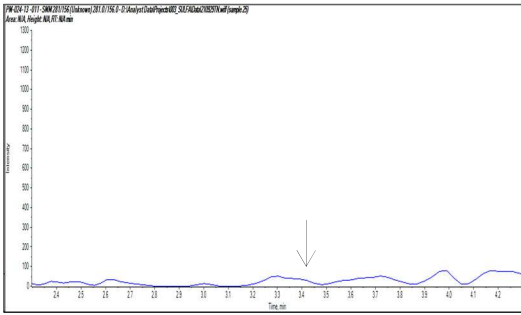


図 2-9 スルファメトキサゾールの SRM クロマトグラム

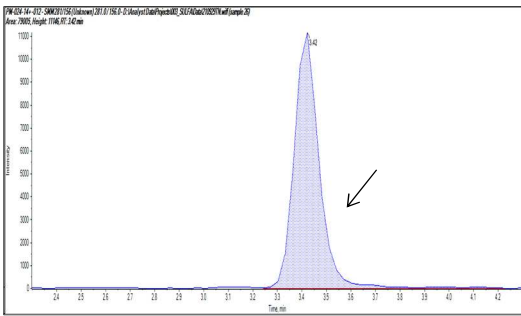
(m/z 254.0→92.1)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

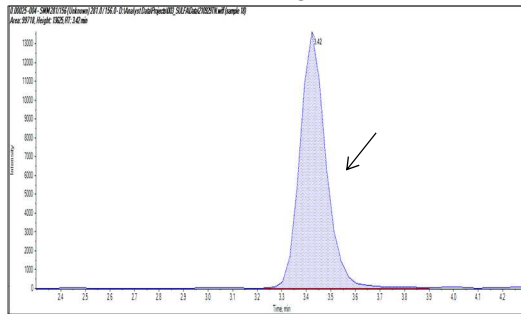
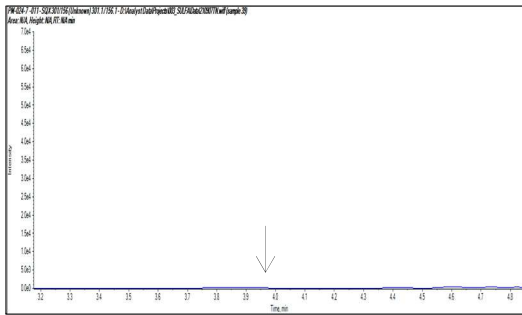
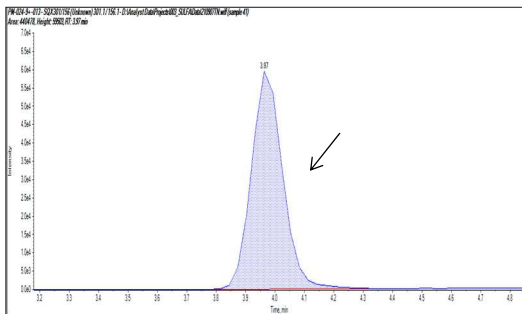


図 2-10 スルファモノメキシンの SRM クロマトグラム
(m/z 280.9→156.0)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

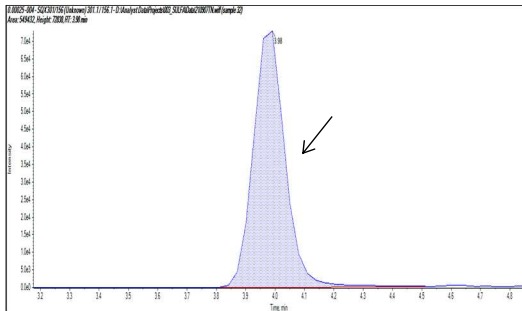
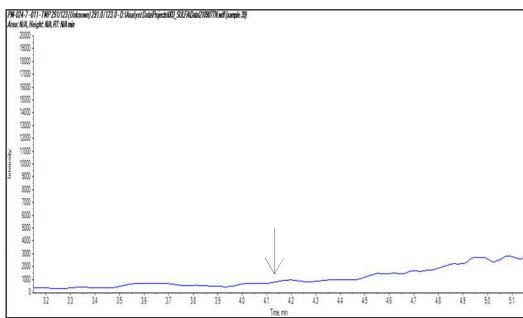


図 2-11 スルファキノキサリンの SRM クロマトグラム

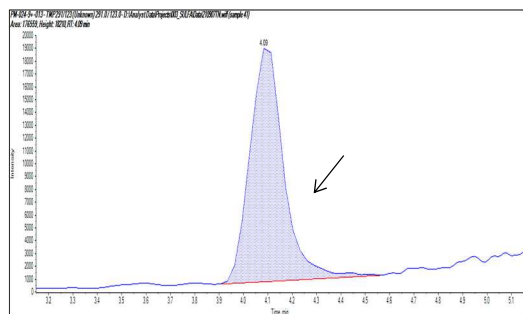
(m/z 301.1→156.1)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

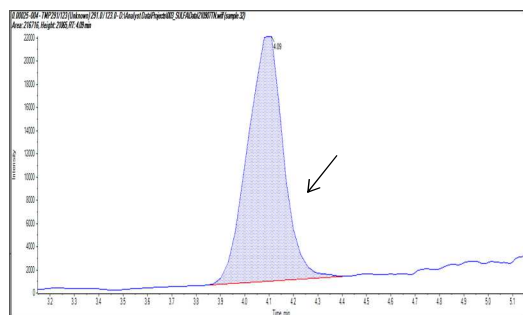
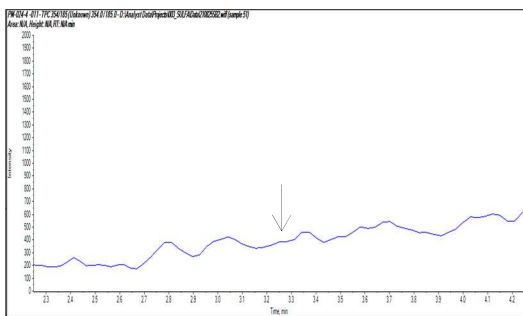


図 2-12 トリメプリアムの SRM クロマトグラム

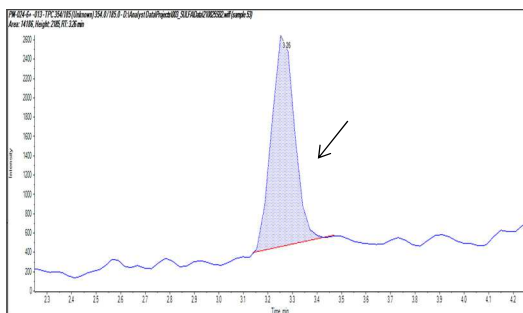
(m/z 291.0→123.0)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

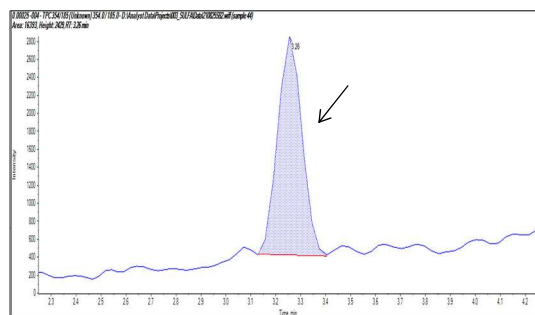
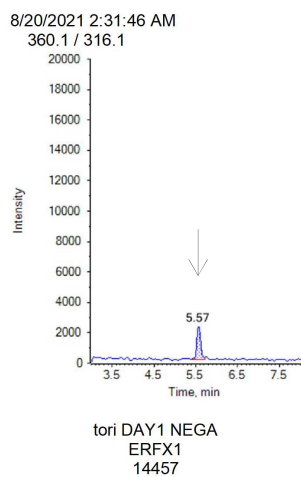


図 2-13 チアンフェニコールの SRM クロマトグラム

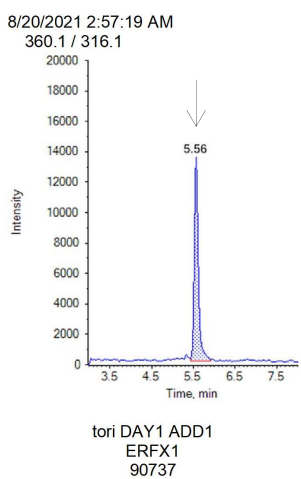
(m/z 354.0 \rightarrow 185.0)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)

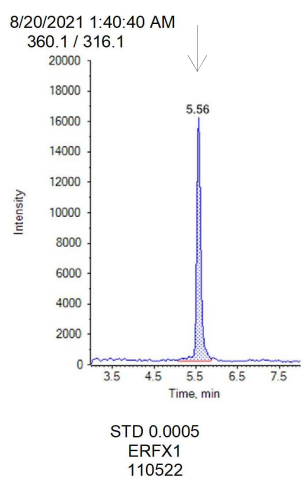


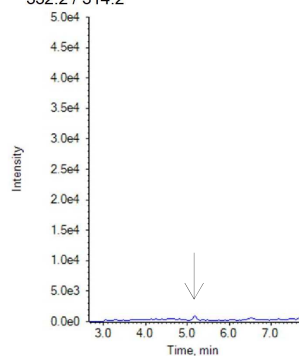
図 2-14 エンフロキサシンの SRM クロマトグラム

(m/z 360.1→316.1)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料

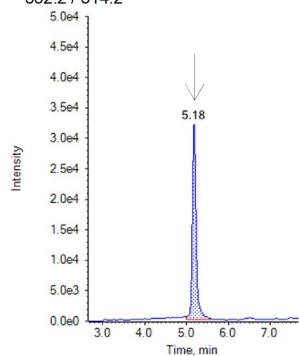
8/20/2021 2:31:46 AM
332.2 / 314.2



tori DAY1 NEGA
CPFX1

添加試料

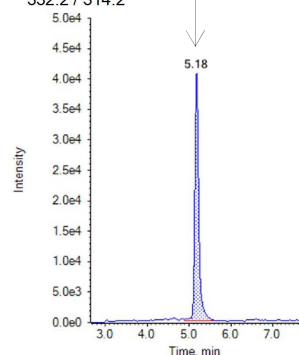
8/20/2021 2:57:19 AM
332.2 / 314.2



tori DAY1 ADD1
CPFX1
204496

標準溶液(0.5 µg/L)

8/20/2021 1:40:40 AM
332.2 / 314.2



STD 0.0005
CPFX1
270353

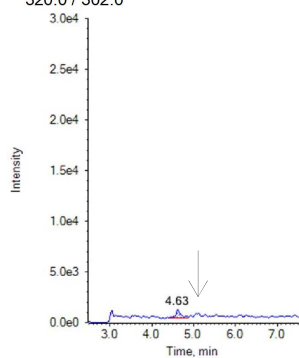
図 2-15 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム

(m/z 332.2→314.2)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料

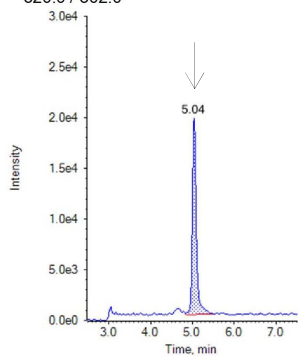
8/20/2021 2:31:46 AM
320.0 / 302.0



tori DAY1 NEGA
NFX1
6650

添加試料

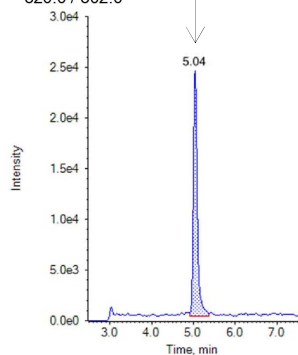
8/20/2021 2:57:19 AM
320.0 / 302.0



tori DAY1 ADD1
NFX1
128429

標準溶液(0.5 µg/L)

8/20/2021 1:40:40 AM
320.0 / 302.0



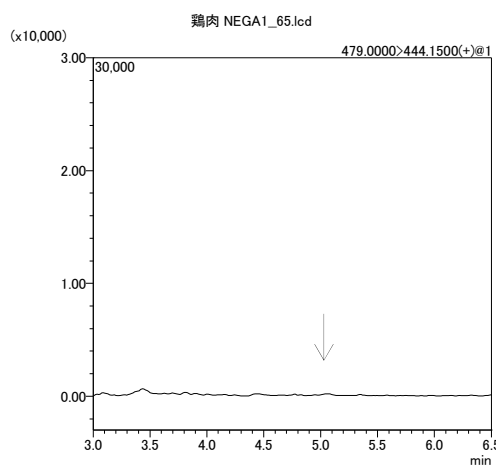
STD 0.0005
NFX1
159196

図 2-16 ノルフロキサシンの SRM クロマトグラム

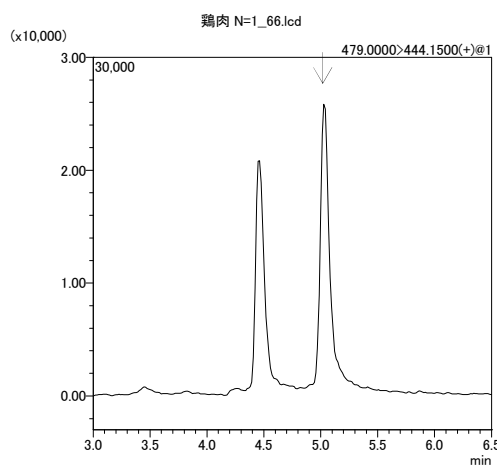
(m/z 320.0→302.0)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

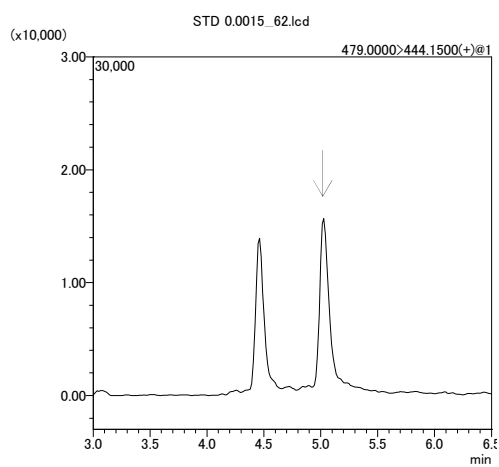
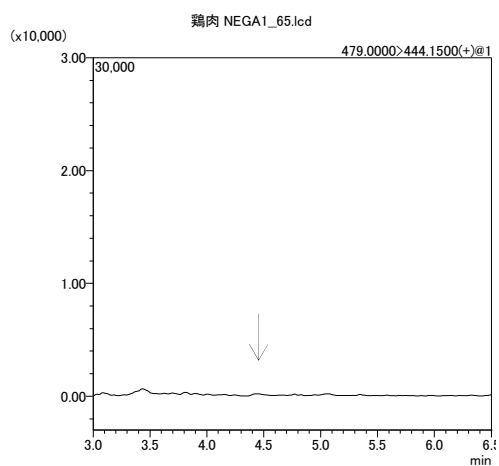


図 2-17 クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム

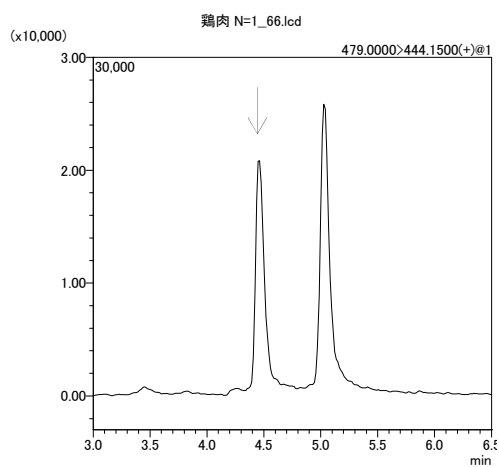
(m/z 479.0→444.1)

添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

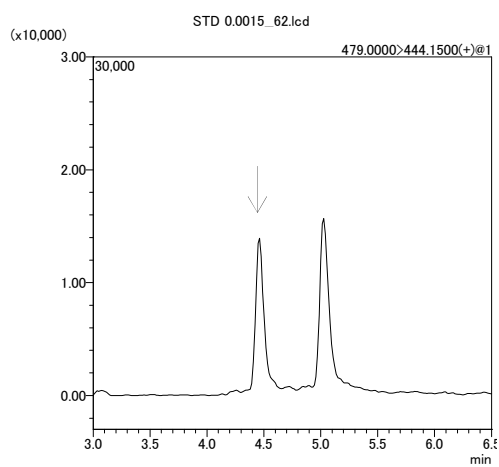
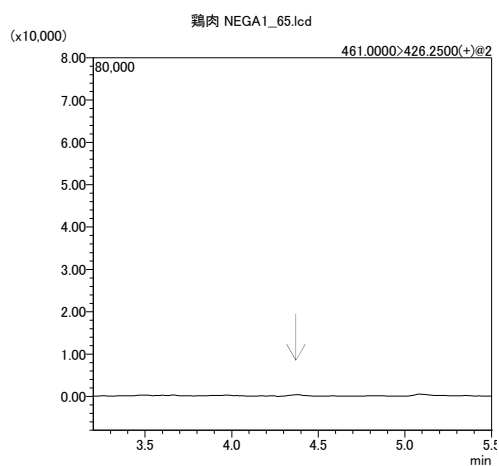
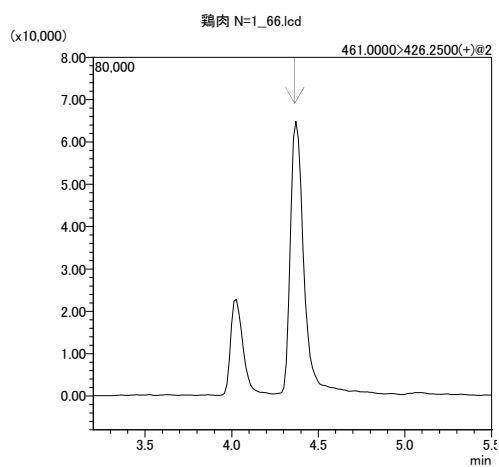


図 2-18 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 479.0→444.1)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

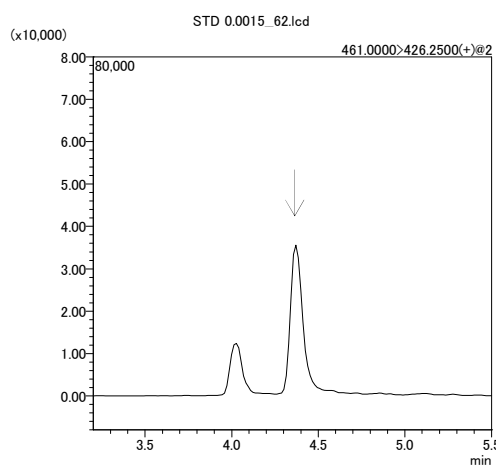
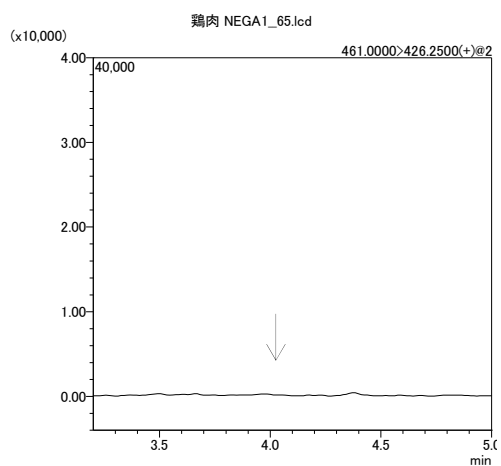


図 2-19 オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム

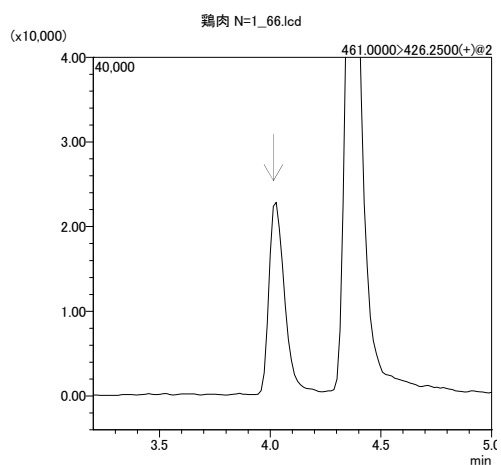
(m/z 461.0→426.2)

添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

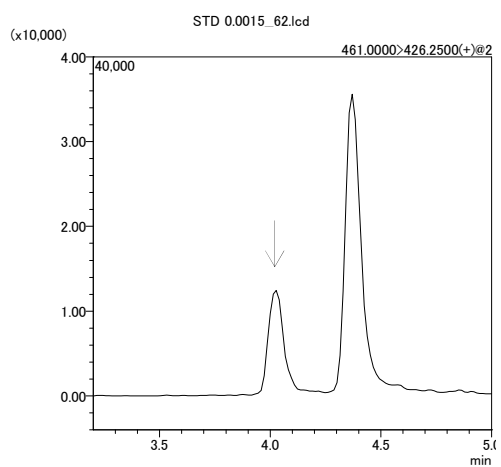
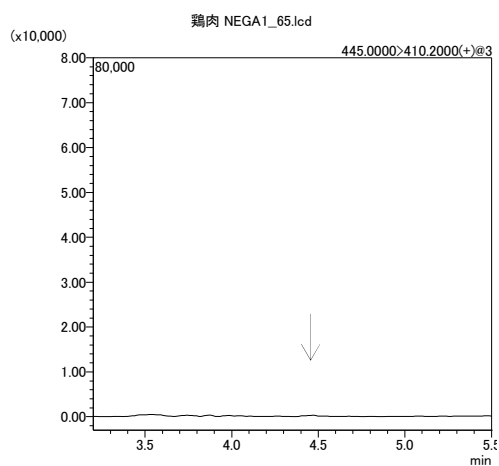
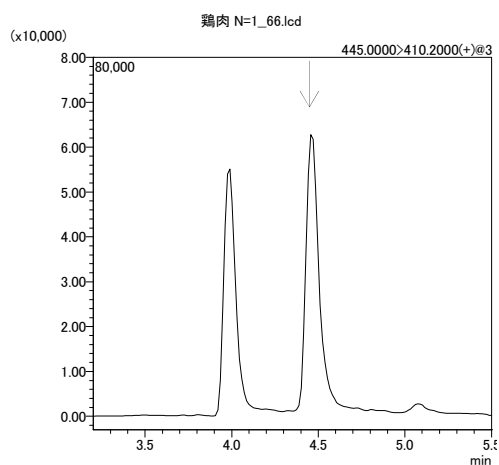


図 2-20 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 461.0→426.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

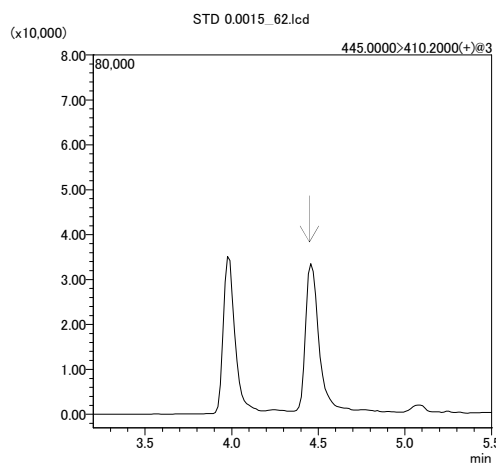
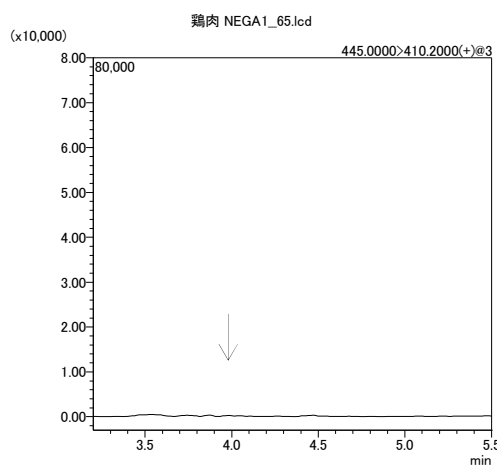
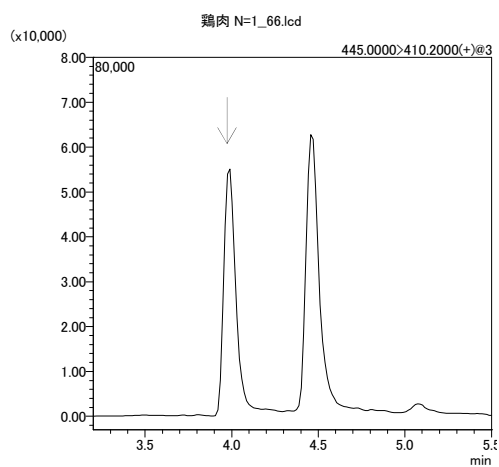


図 2-21 テトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 445.0→410.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

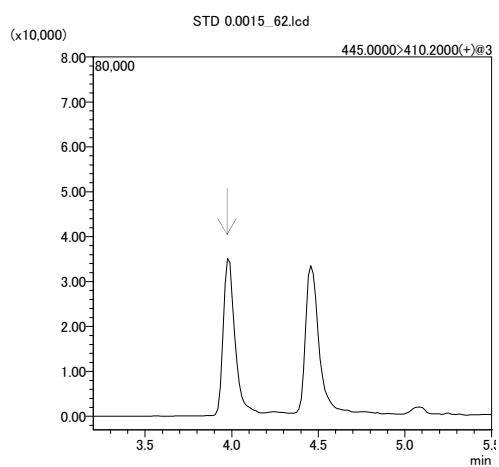
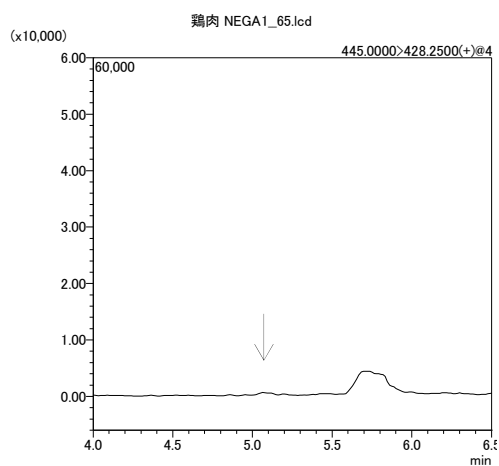


図 2-22 4-*epi*-テトラサイクリンの SRM クロマトグラム

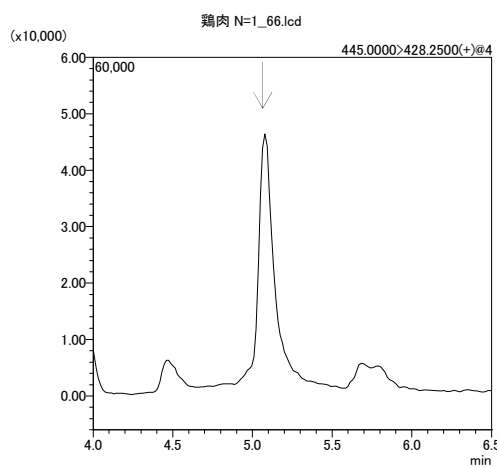
(m/z 445.0→410.2)

添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

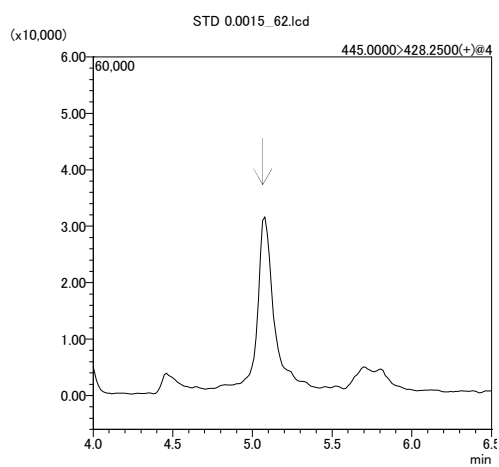
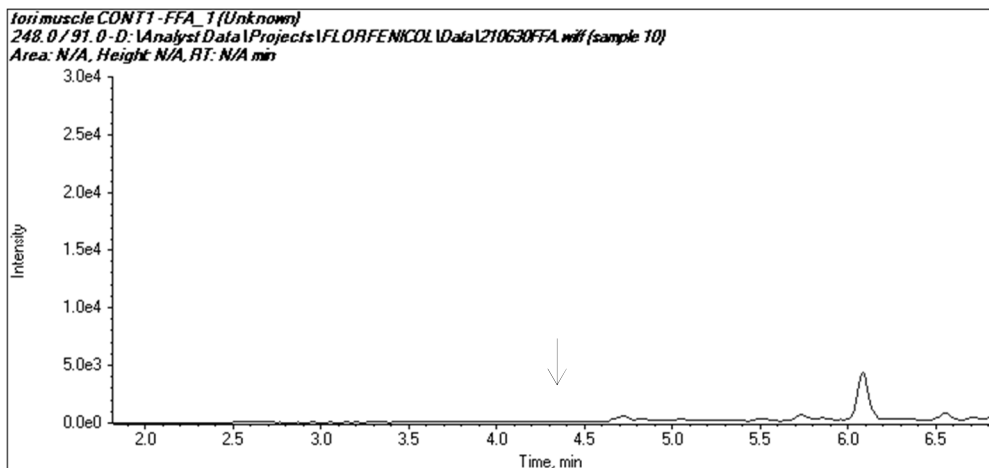


図 2-23 ドキシサイクリンの SRM クロマトグラム

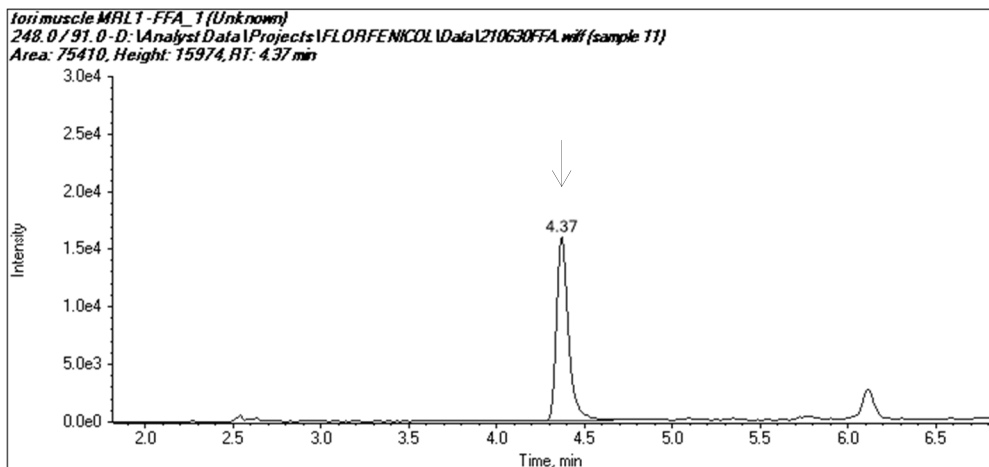
(m/z 445.0→428.2)

添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

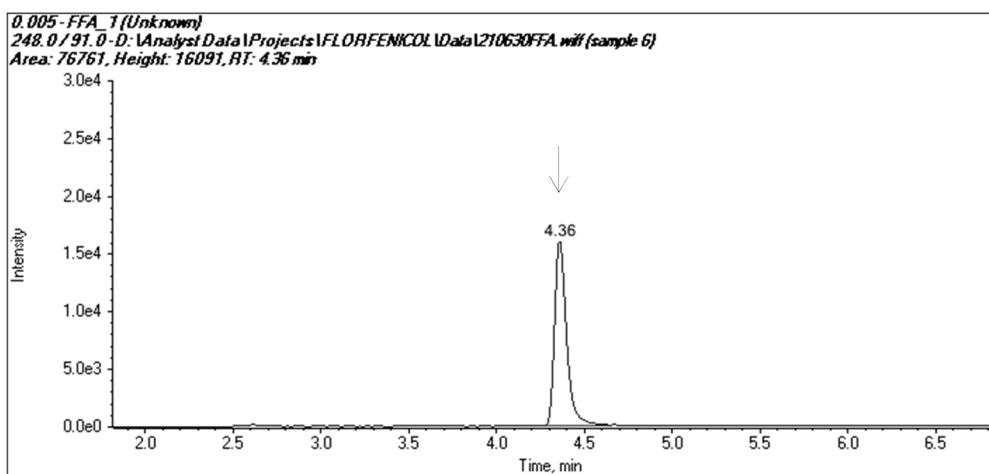
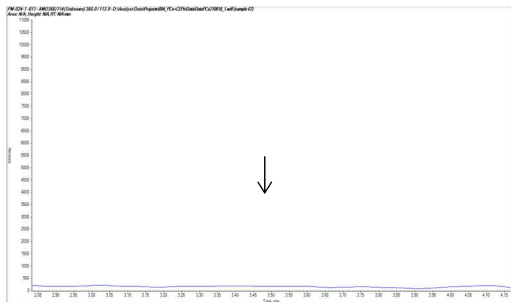


図 2-24 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム

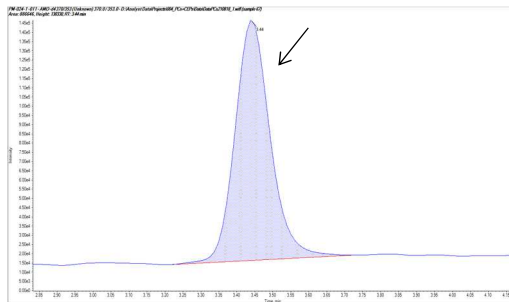
(m/z 248.0 \rightarrow 91.0)

添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

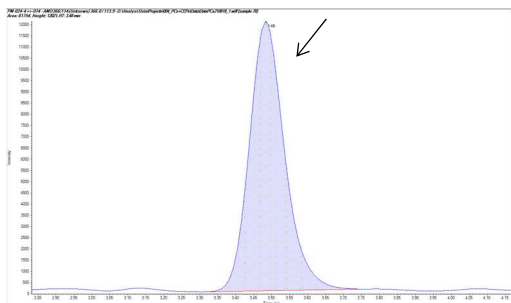
ブランク試料



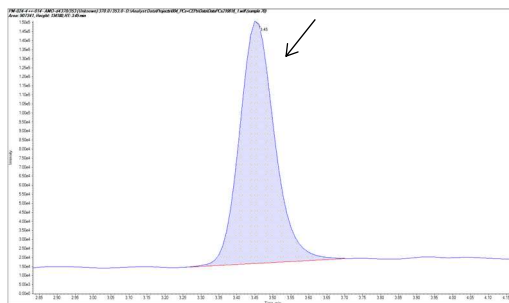
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



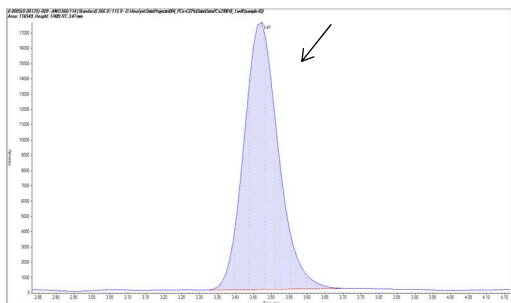
添加試料



添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.0025 mg/L)

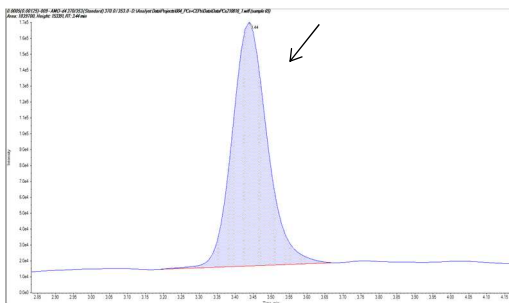
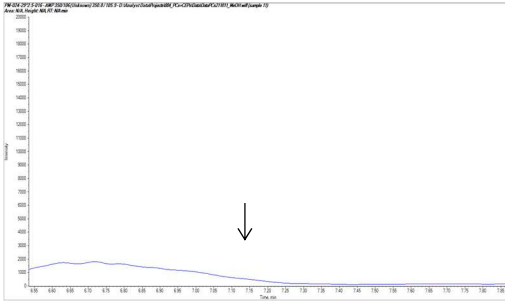


図 2-25 アモキシシリンの SRM クロマトグラム

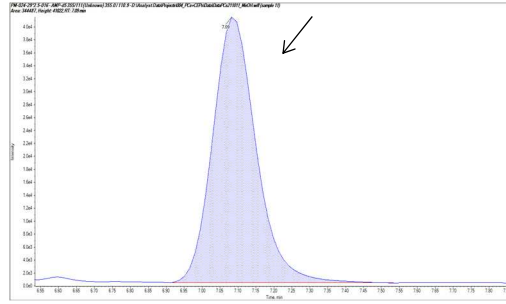
(m/z 366.0 \rightarrow 113.9)

添加濃度 : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

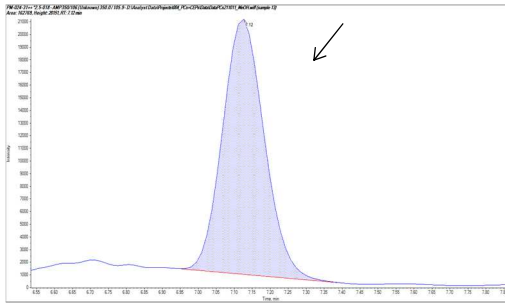
ブランク試料



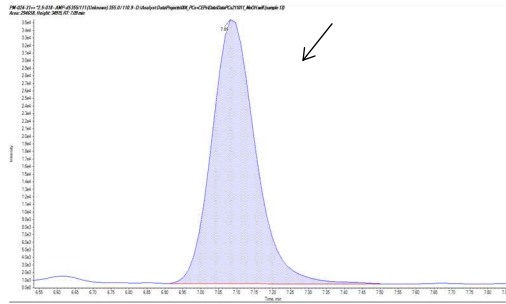
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



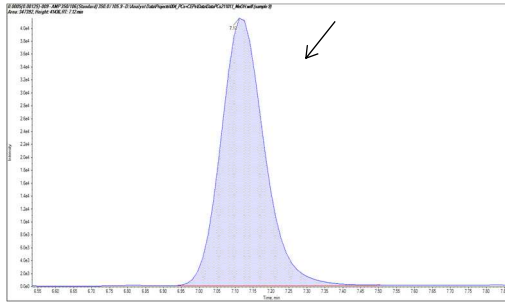
添加試料



添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.0025 mg/L)

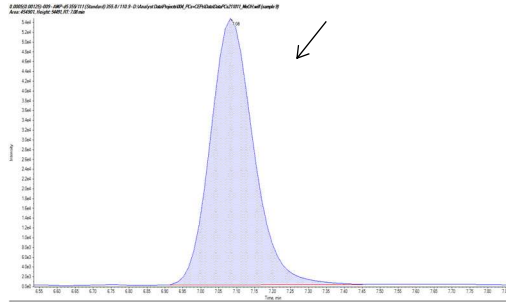
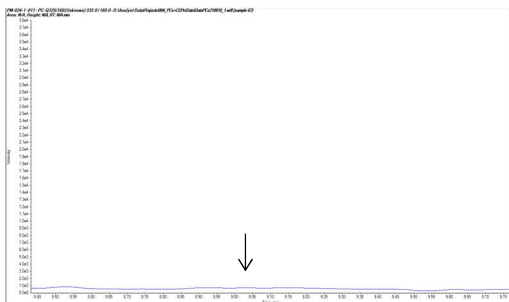


図 2-26 アンピシリンの SRM クロマトグラム

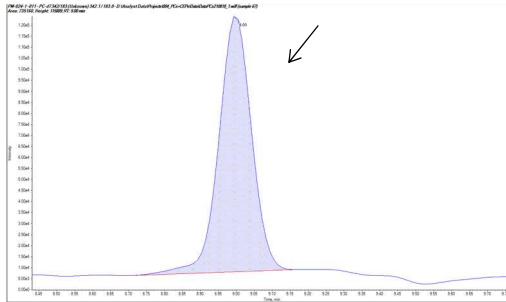
(m/z 350.0→105.9)

添加濃度 : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

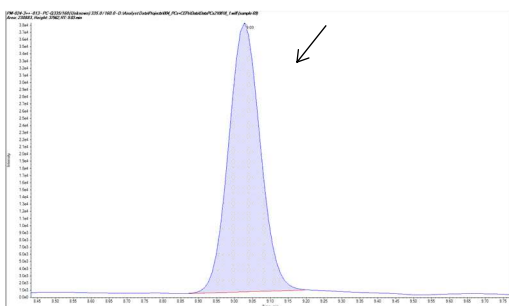
ブランク試料



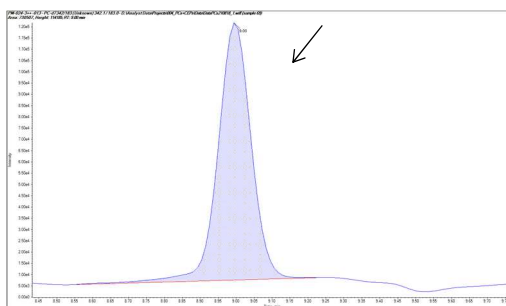
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



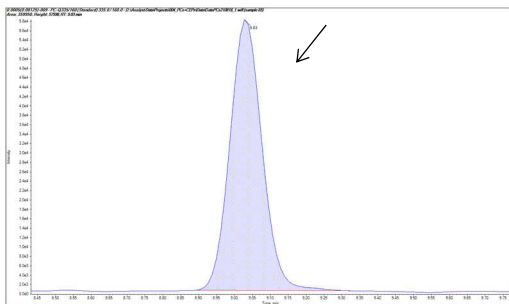
添加試料



添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.0025 mg/L)

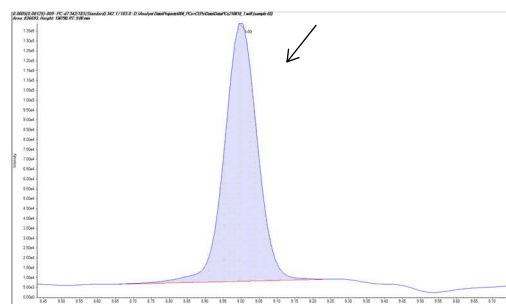
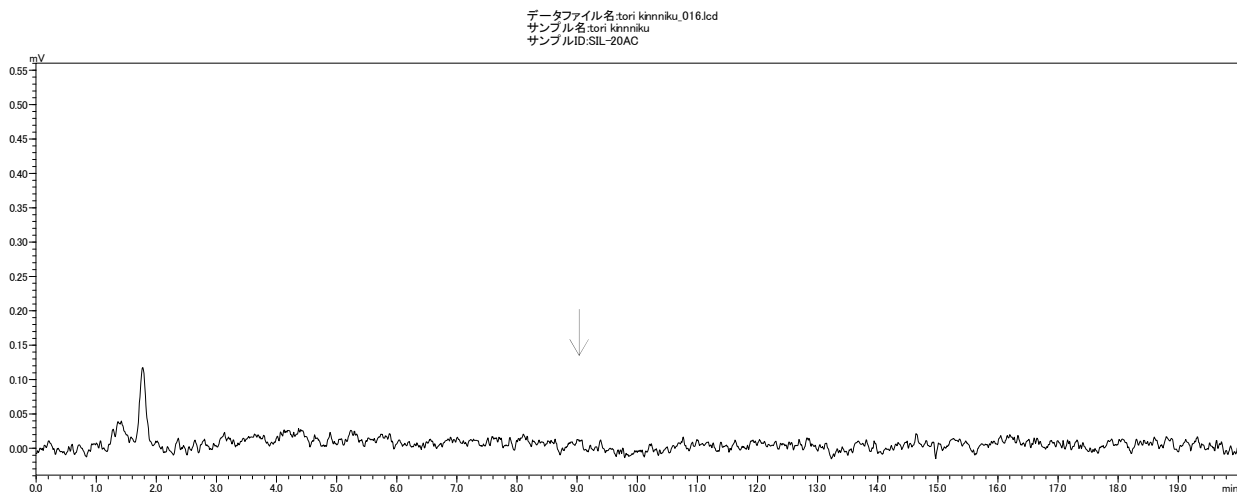


図 2-27 ベンジルペニシリンの SRM クロマトグラム

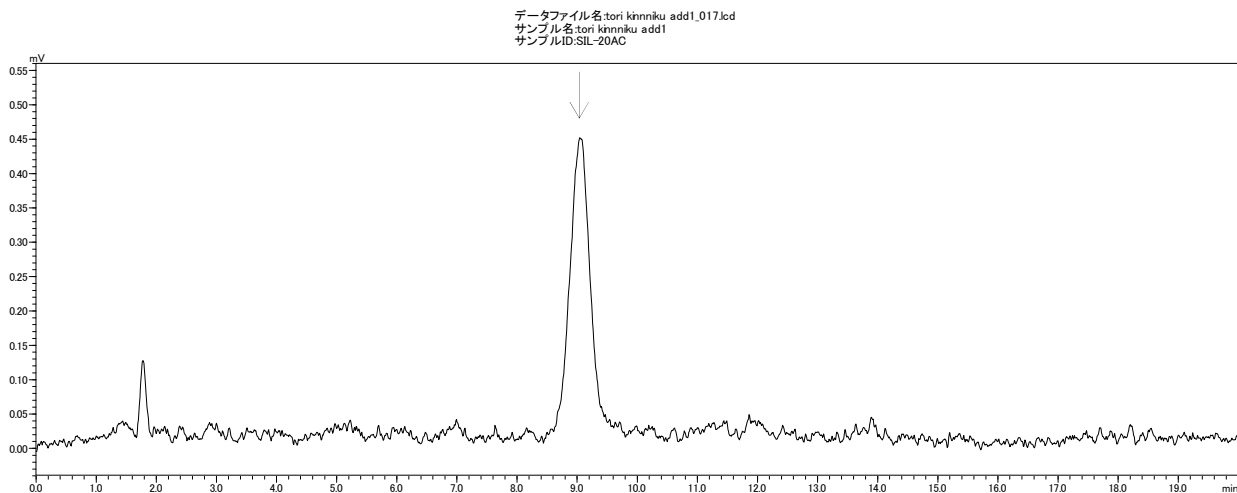
(m/z 334.9→160.0)

添加濃度 : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.001 mg/L)

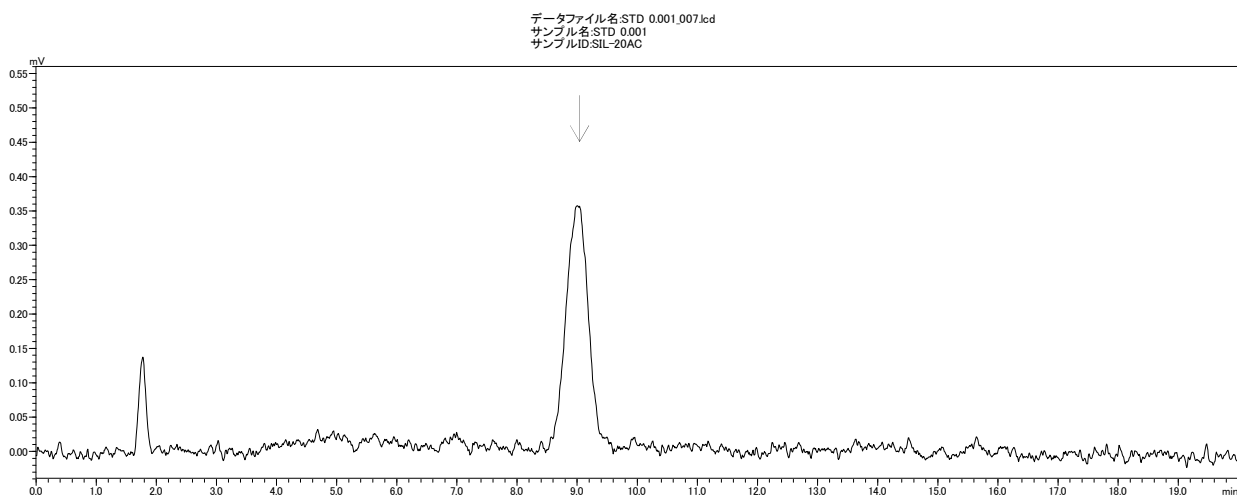
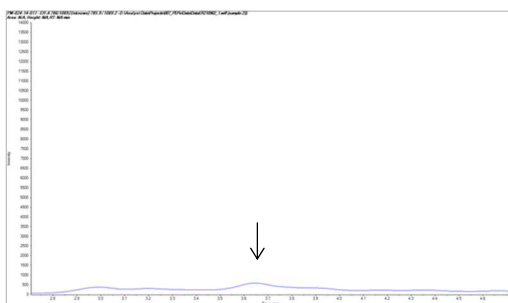


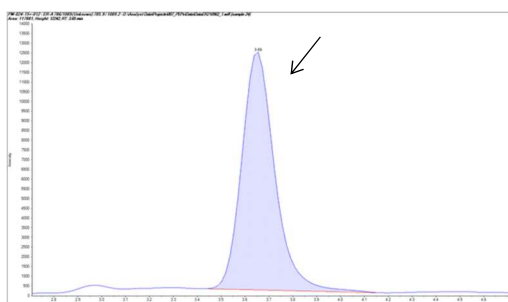
図 2-28 ノシヘプタイトのクロマトグラム

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0025 mg/L)

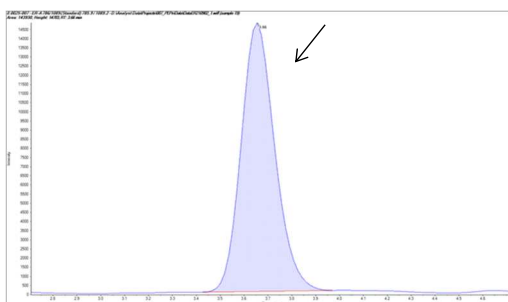


図 2-29 エンラマイシン A の SRM クロマトグラム

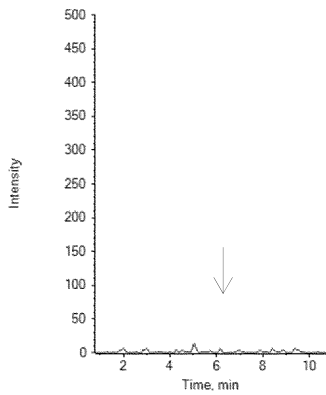
(m/z 785.9→1089.2)

添加濃度 : 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[令和4年度]

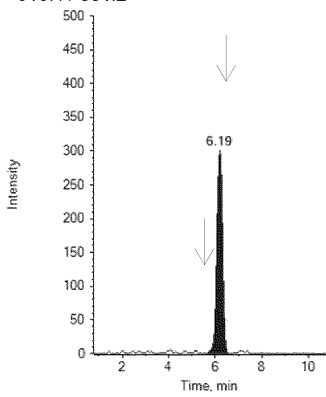
ブランク試料

7/22/2022 9:18:31 PM
916.4 / 331.2



添加試料

7/22/2022 9:44:06 PM
916.4 / 331.2



標準溶液 (0.5 $\mu\text{g/L}$)

7/22/2022 8:52:58 PM
916.4 / 331.2

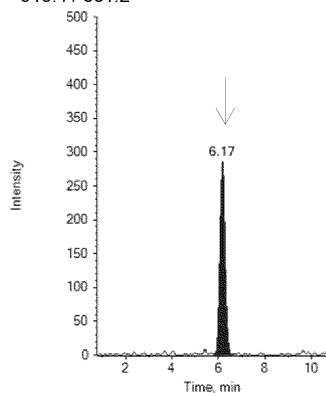
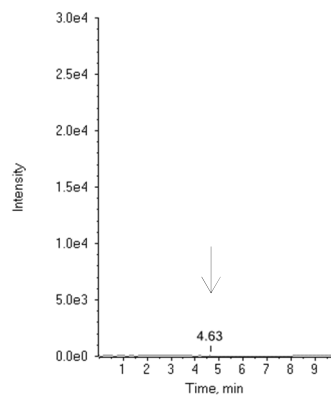


図 2-1 ドラメクチンの SRM クロマトグラム

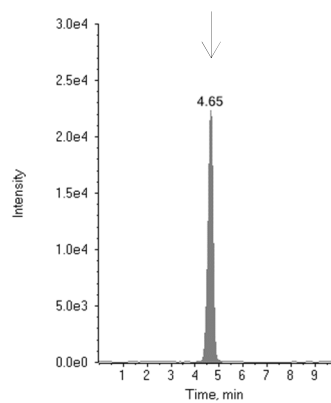
(m/z 916.4→331.2)

添加濃度 : 5 $\mu\text{g/kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 μ g/L)

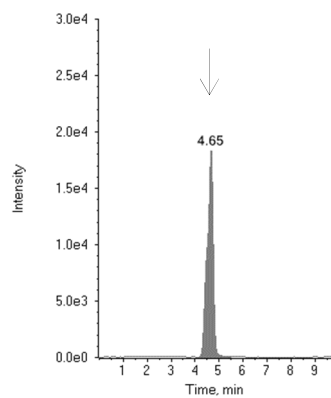
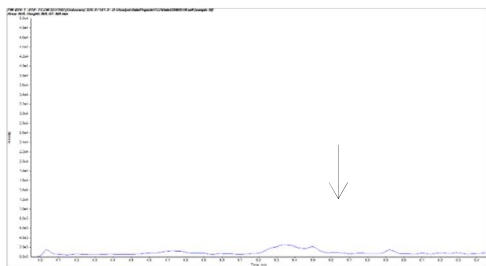


図 2-2 レバミゾールの SRM クロマトグラム

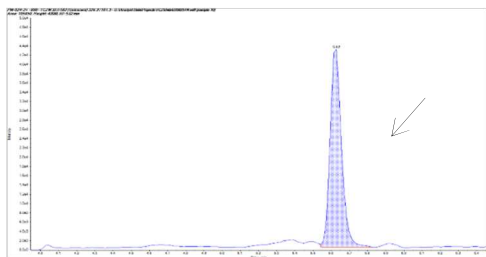
(m/z 205.0→178.0)

添加濃度 : 10 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.1 µg/L)

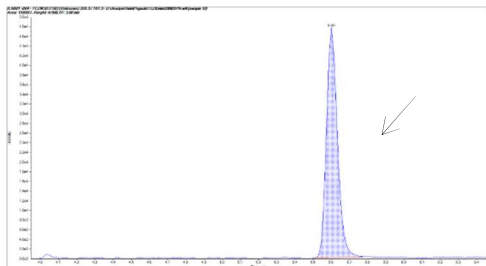
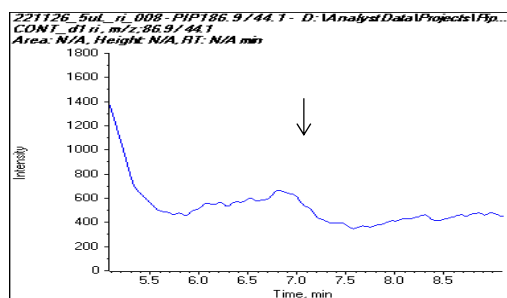


図 2-3 ケト-トリクラベンダゾールの SRM クロマトグラム

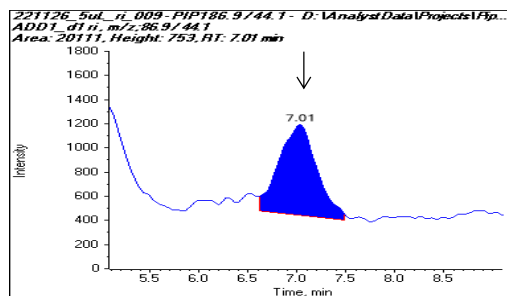
(m/z 326.9→181.9)

添加濃度 : 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (1 µg/L)

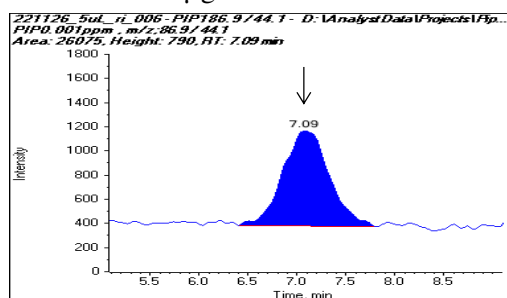
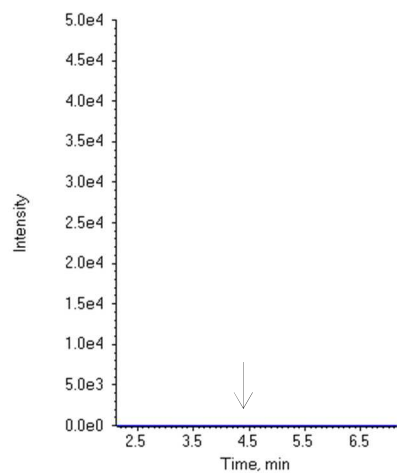
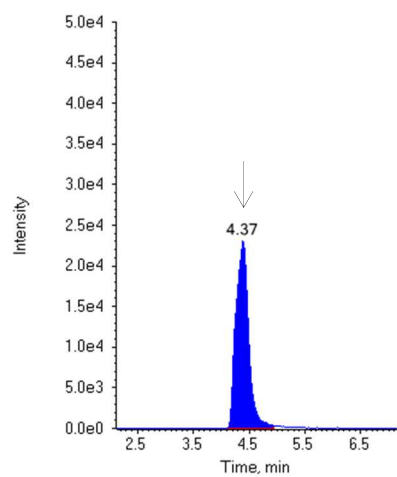


図 2-4 ピペラジンの SRM クロマトグラム
(m/z 86.9→44.1)
添加濃度 : 10 µg/k g

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (1 µg/L)

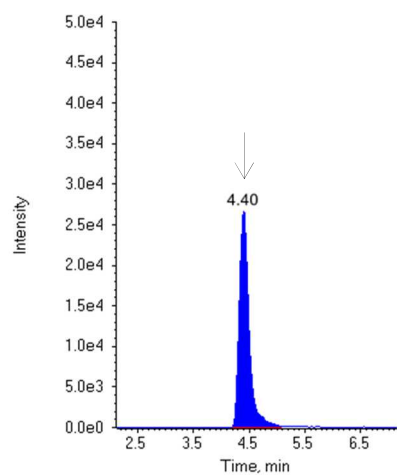


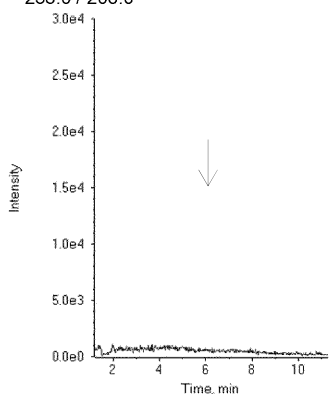
図 2-5 アンプロリウムの SRM クロマトグラム

(m/z 243.0. → 150.0)

添加濃度 : 10 µg/k g

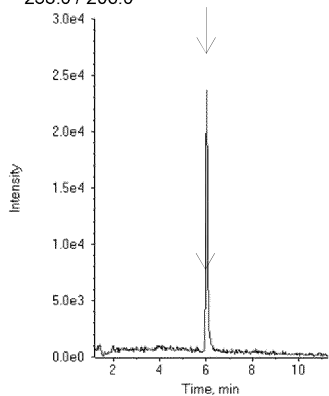
ブランク試料

8/8/2022 3:28:45 PM
238.0 / 206.0



添加試料

8/8/2022 3:49:18 PM
238.0 / 206.0



標準溶液 (0.2 µg/L)

8/8/2022 2:47:39 PM
238.0 / 206.0

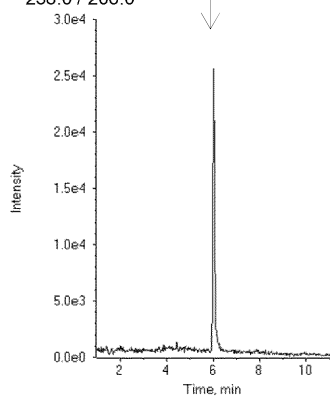
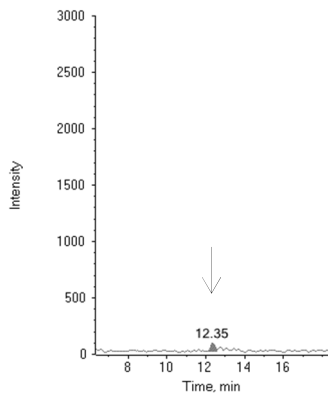


図 2-6 エトパペートの SRM クロマトグラム

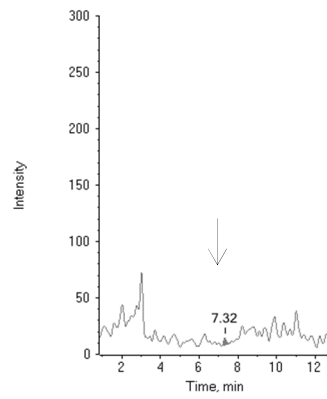
(m/z 238.0→206.0)

添加濃度 : 10 µg/kg

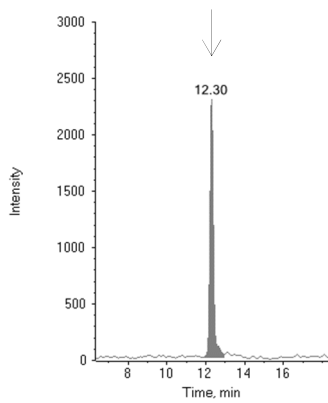
ブランク試料



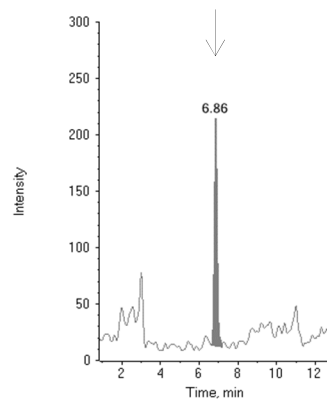
ブランク試料



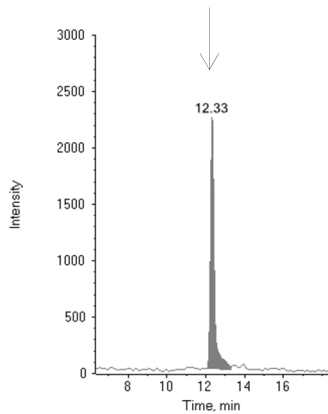
添加試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)



標準溶液(0.5 µg/L)

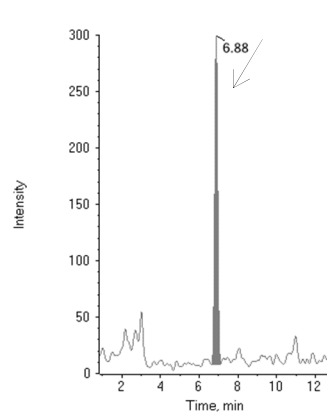
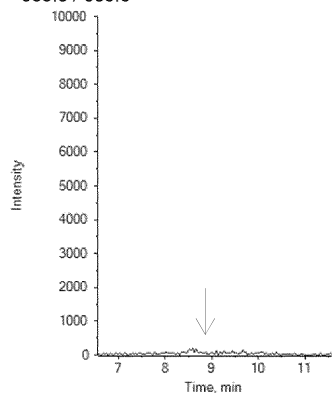


図 2-7-1 4,4'-ジニトロカルバニリドの
SRM クロマトグラム
(m/z 301.1→137.1)
添加濃度: 10 µg/kg

図 2-7-2 ハロフジノンの SRM クロマトグラム
(m/z 415.0→100.0)
添加濃度: 10 µg/kg

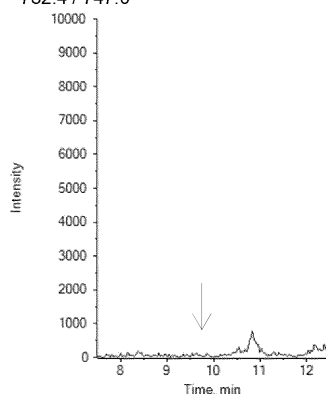
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM
688.3 / 635.5



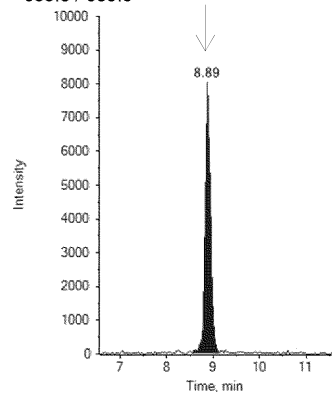
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM
782.4 / 747.0



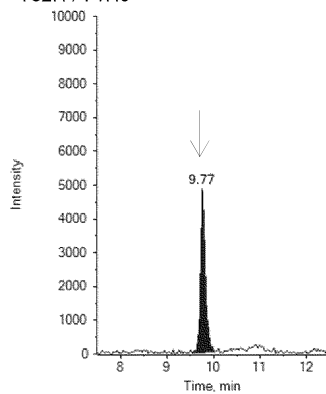
添加試料

8/12/2022 1:18:24 AM
688.3 / 635.5



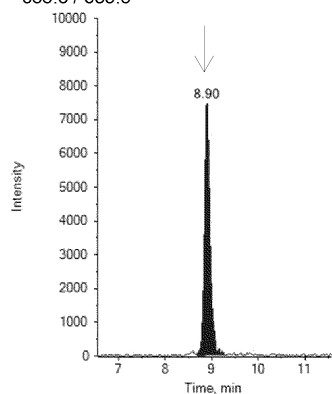
添加試料

8/12/2022 1:33:58 AM
782.4 / 747.0



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM
688.3 / 635.5



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM
782.4 / 747.0

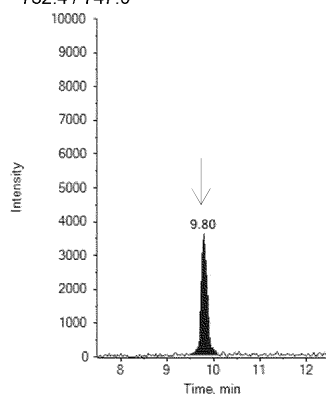


図 2-8-1 モネンシンの SRM クロマトグラム

(m/z 688.3→635.5)

添加濃度: 5 µg/kg

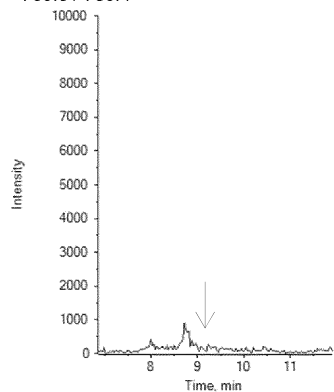
図 2-8-2 ナラシンの SRM クロマトグラム

(m/z 782.4→747.0)

添加濃度: 5 µg/kg

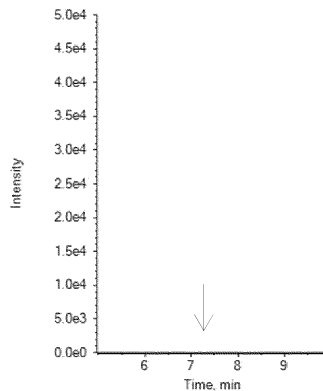
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM
768.3 / 733.4



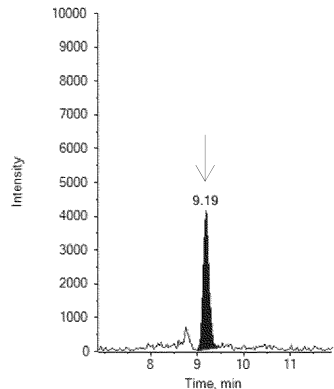
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM
589.3 / 235.1



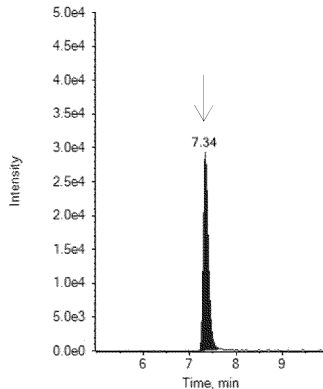
添加試料

8/12/2022 1:33:58 AM
768.3 / 733.4



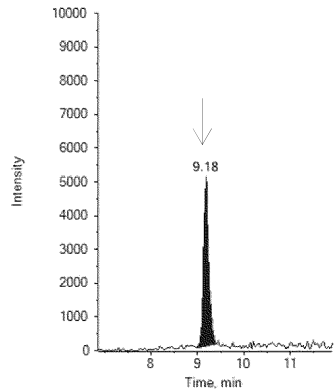
添加試料

8/12/2022 1:18:24 AM
589.3 / 235.1



標準溶液(0.1 µg/L)

8/11/2022 11:44:55 PM
768.3 / 733.4



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM
589.3 / 235.1

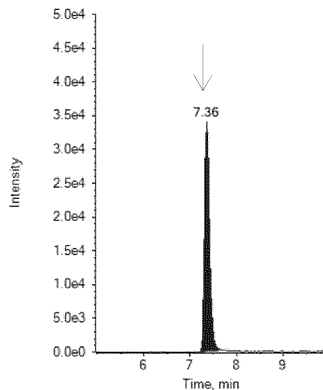


図 2-8-3 サリノマイシンの SRM クロマトグラム

(m/z 768.3→733.4)

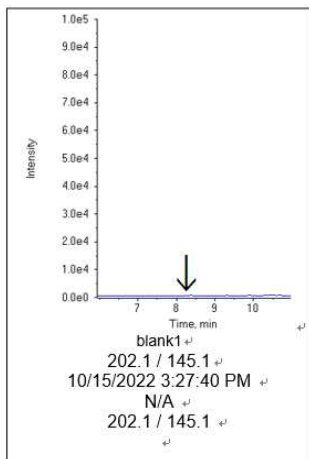
添加濃度: 2 µg/kg

図 2-8-4 ラサロシドの SRM クロマトグラム

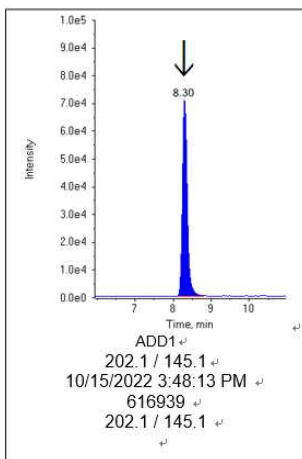
(m/z 589.3→235.1)

添加濃度: 5 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(2 µg/L)

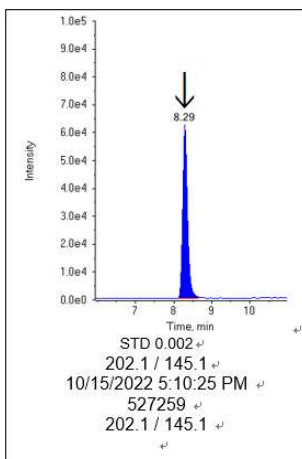
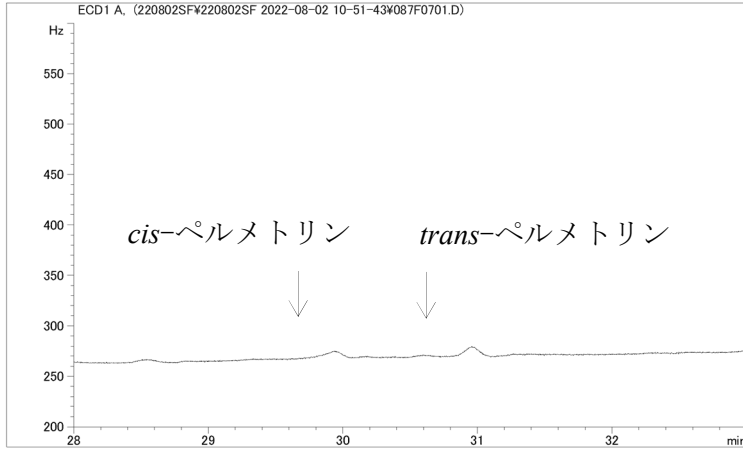
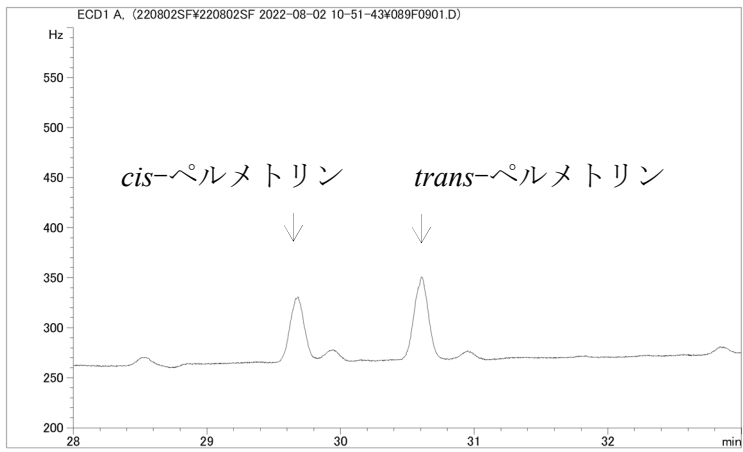


図 2-9 カルバリルの SRM クロマトグラム
(m/z 202.1→145.1)
添加濃度: 50 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(10 µg/L)

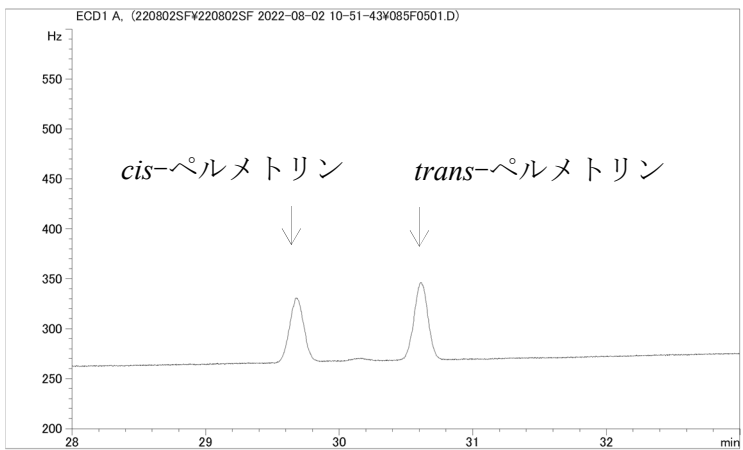
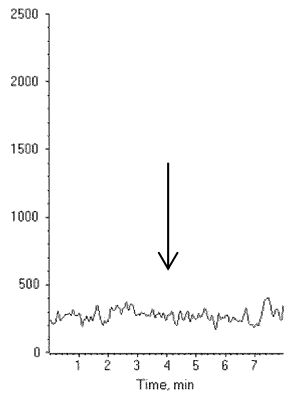


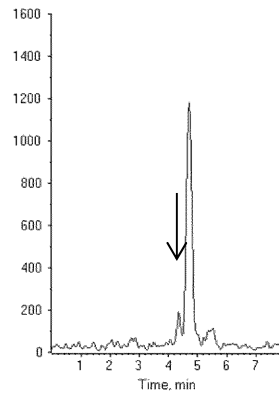
図 2-10 *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのクロマトグラム
添加濃度: 50 µg/kg

ブランク試料



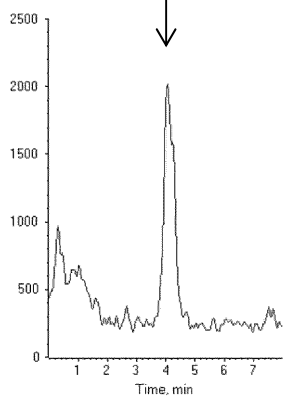
tori muscle nega7
451.0 / 191.0
8/30/2022 3:53:29 PM

ブランク試料



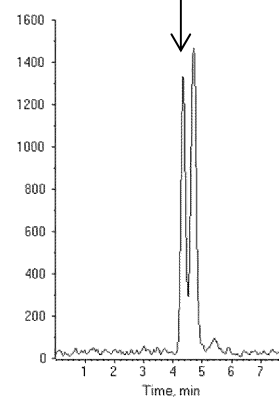
tori muscle nega4
527.0 / 267.1
8/23/2022 8:43:57 PM

添加試料



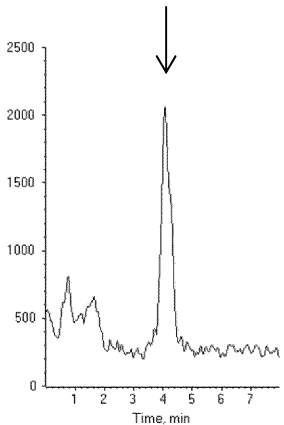
tori muscle add13
451.0 / 191.0
8/30/2022 4:02:20 PM

添加試料



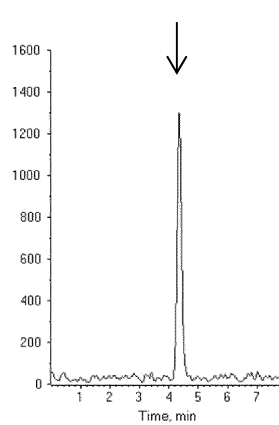
tori muscle add7
527.0 / 267.1
8/23/2022 8:52:48 PM

標準溶液(0.5 µg/L)



STD 0.0005
451.0 / 191.0
8/30/2022 4:20:02 PM

標準溶液(0.5 µg/L)



STD 0.0005
527.0 / 267.1
8/23/2022 8:26:12 PM

図 2-11-1 シフルトリンの SRM クロマトグラム

(m/z 451.0→191.0)

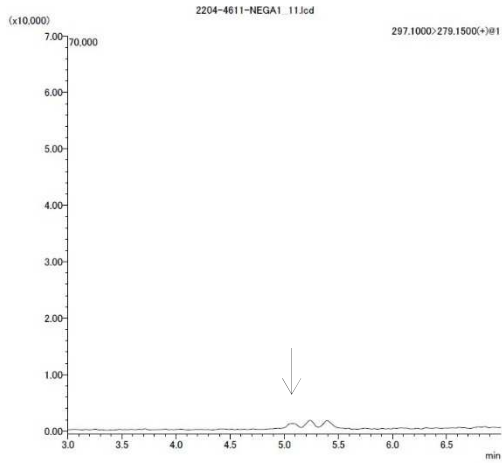
添加濃度: 10 µg/kg

図 2-11-2 フルトリンの SRM クロマトグラム

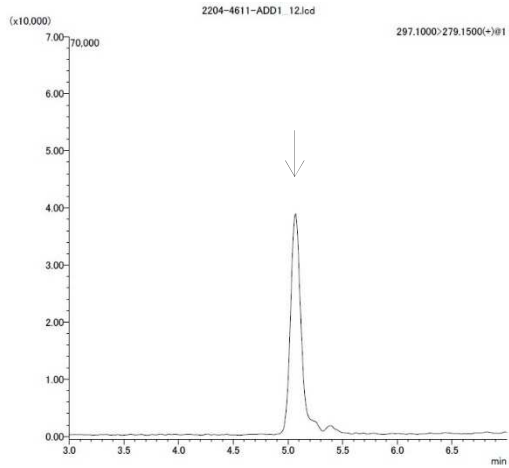
(m/z 527.0→267.0)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.2 µg/L)

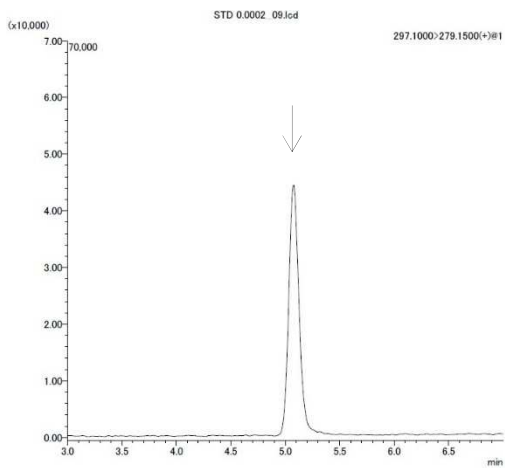
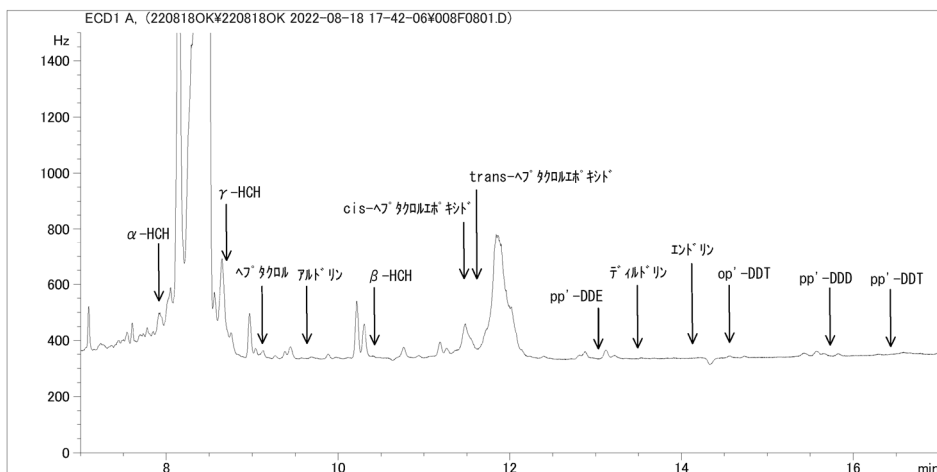


図 2-12 フルニキシンの SRM クロマトグラム

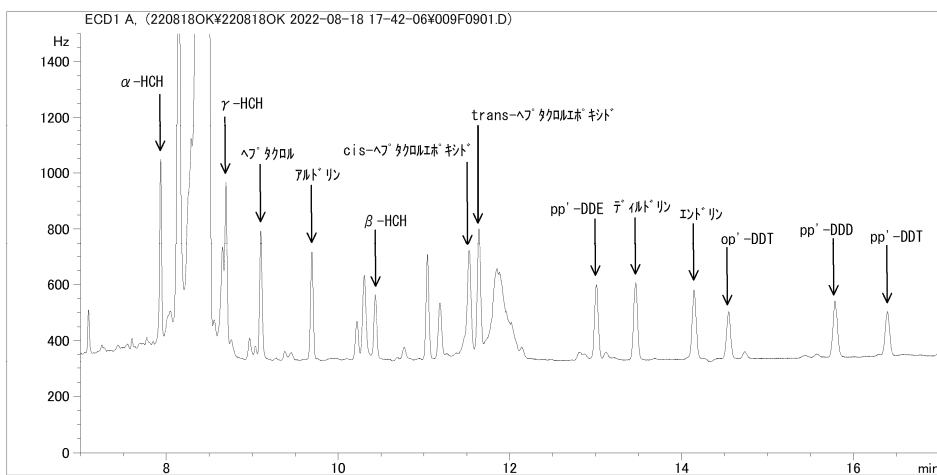
(m/z 297.1→279.2)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 μg/L)

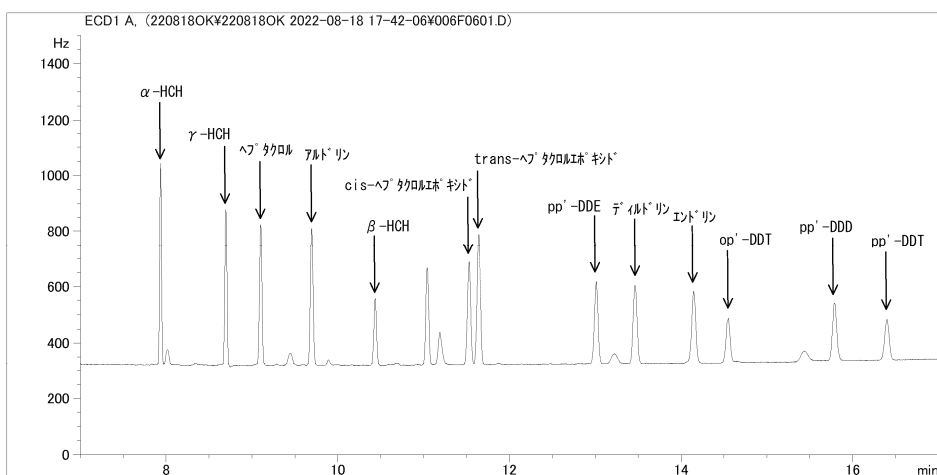
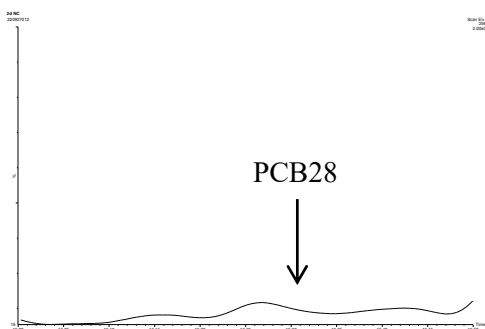
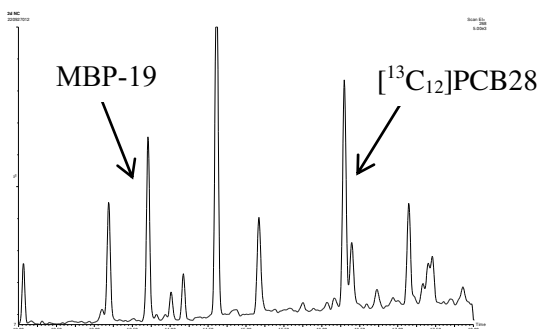


図 2-13 *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、デイルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH のクロマトグラム
 添加濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

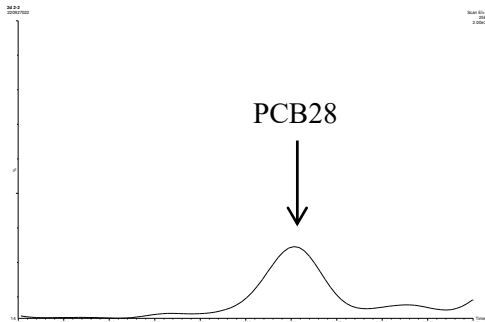
ブランク試料



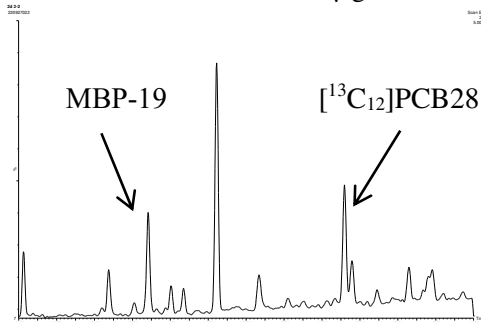
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



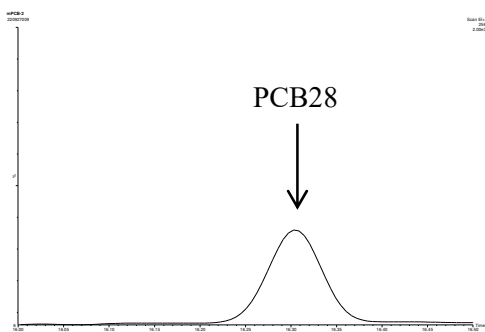
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

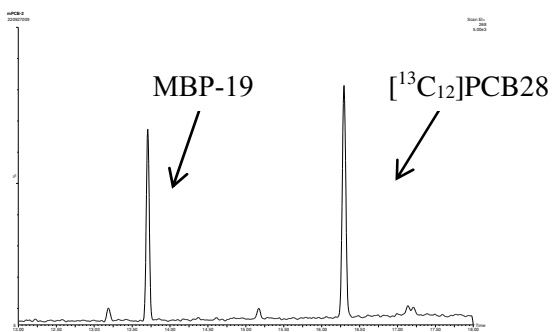
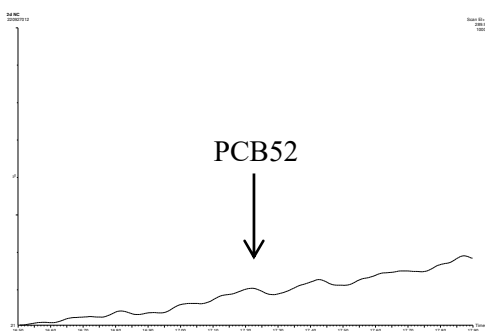


図 2-14-1 PCB28 の SIM クロマトグラム

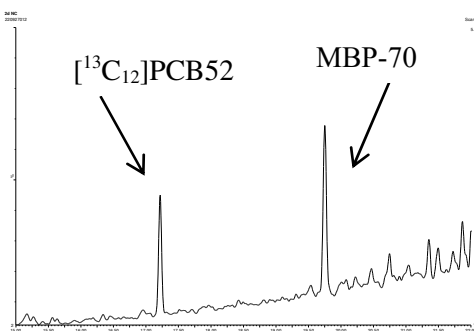
(m/z 256.0)

添加濃度: 0.13 µg/kg

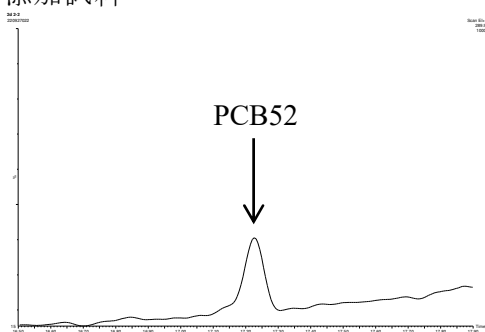
ブランク試料



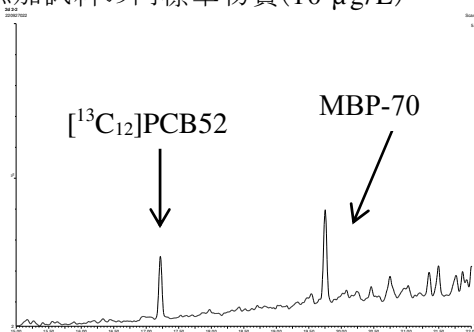
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



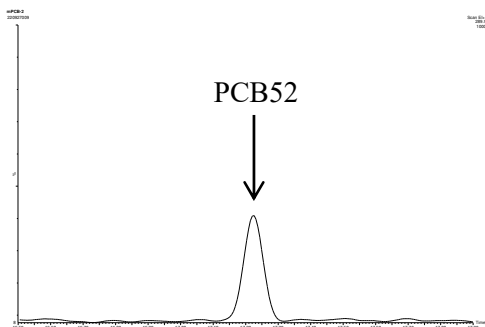
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

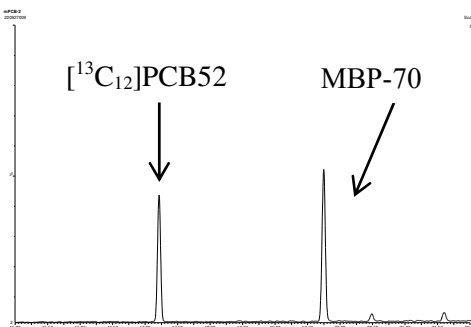
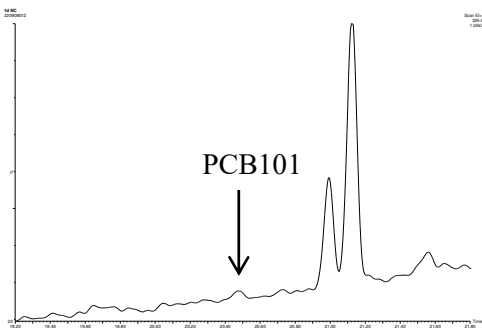


図 2-14-2 PCB52 の SIM クロマトグラム

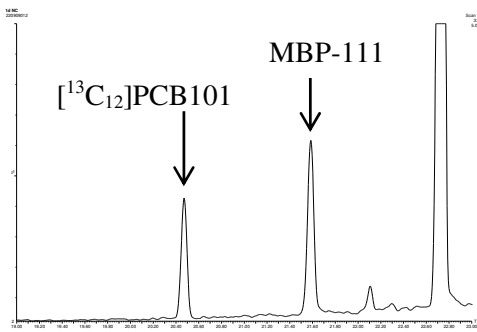
(m/z 289.9)

添加濃度: 0.13 µg/kg

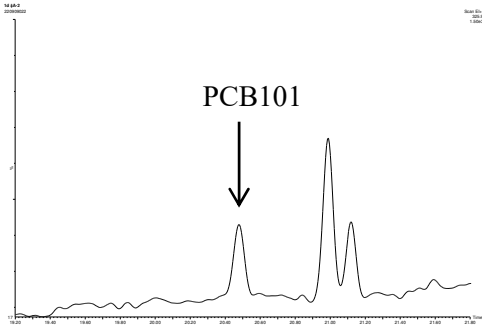
ブランク試料



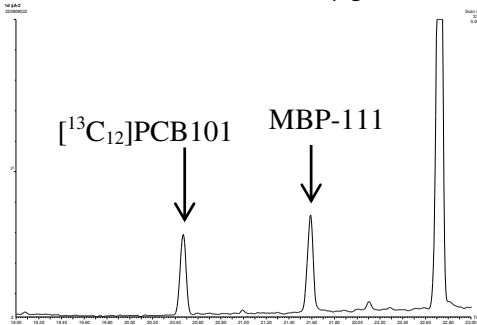
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



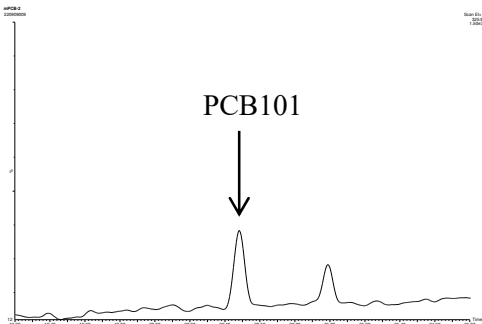
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

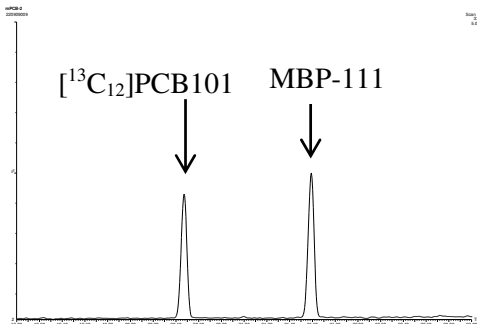
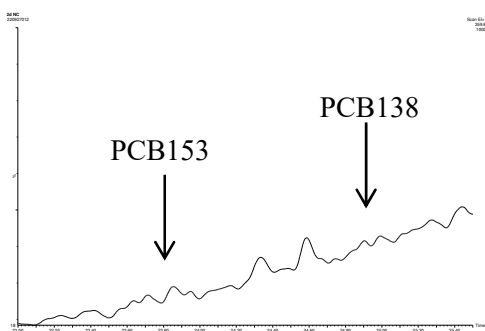


図 2-14-3 PCB101 の SIM クロマトグラム

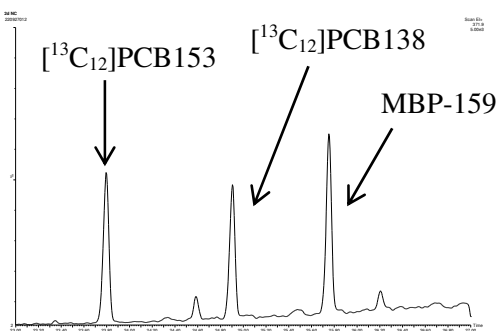
(m/z 325.9)

添加濃度: 0.13 μg/kg

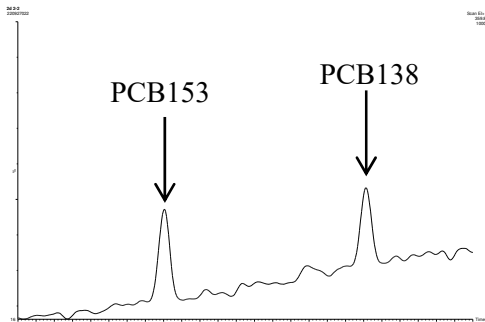
ブランク試料



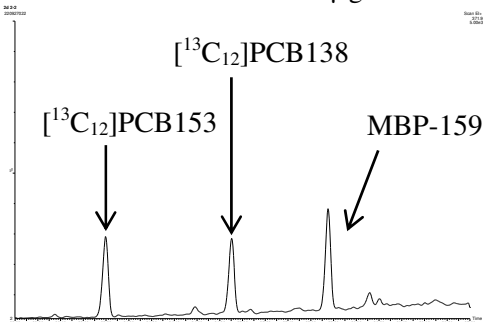
ブランク試料の内標準物質(10 $\mu\text{g/L}$)



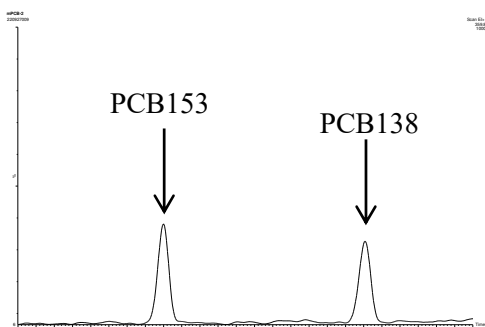
添加試料



添加試料の内標準物質(10 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(2 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(2 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(10 $\mu\text{g/L}$)

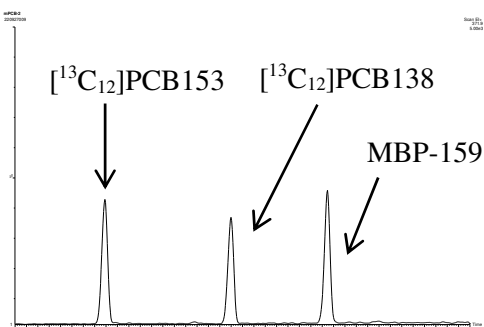
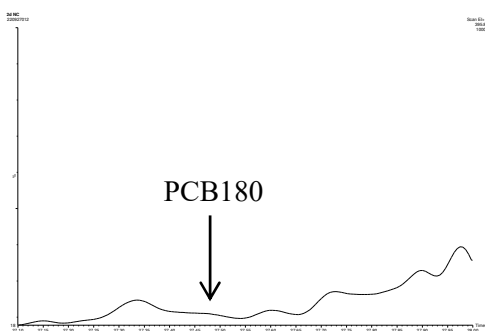


図 2-14-4 PCB138 及び PCB153 の SIM クロマトグラム

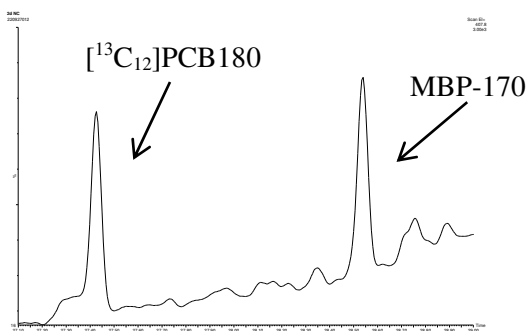
(m/z 359.8)

添加濃度: 0.13 $\mu\text{g/kg}$

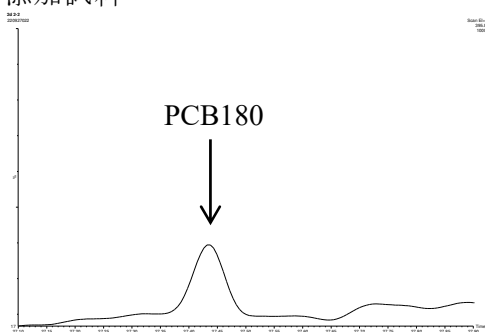
ブランク試料



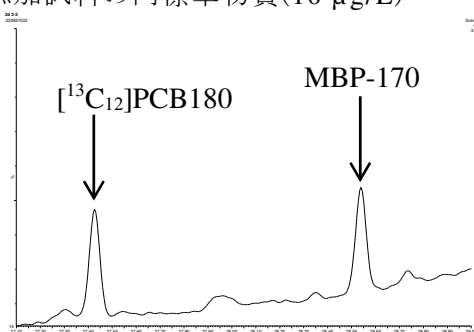
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



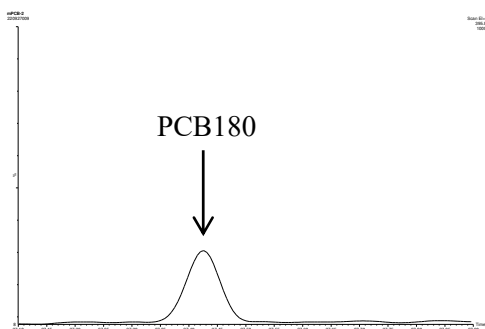
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

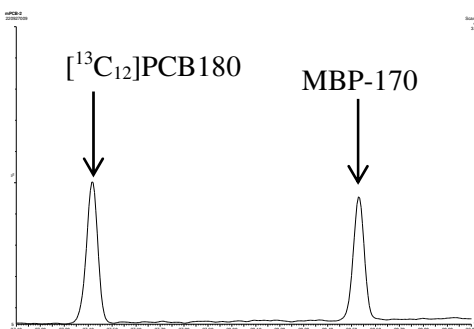


図 2-14-5 PCB180 の SIM クロマトグラム

(m/z 395.8)

添加濃度: 0.13 µg/kg

III. 分担研究報告

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

令和 2～4 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
動物性食品輸出の規制対策のための研究
研究代表者 穠山 浩 (星薬科大学)

分担研究報告書

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定のみ 1 ヶ所を除く 11 ヶ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体(0.6%)から STEC 0157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から 6 種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55℃に加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

研究協力者 (*牛枝肉の STEC 調査研究について)

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課*	島田光平、豊岡大輔
北海道東藻琴食肉衛生検査所*	児山綾子
北海道早来食肉衛生検査所*	石田祥士
北海道帯広食肉衛生検査所*	吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子、鈴木綾
十和田食肉衛生検査所検査第二課*	東海林明子
十和田食肉衛生検査所検査第三課*	高橋むつみ
秋田市食肉衛生検査所*	山口健一
熊本県食肉衛生検査所*	大迫英夫
岐阜県飛騨食肉衛生検査所*	塚本真由美、荻谷俊宏、山崎翔矢
宮崎県都農食肉衛生検査所*	黒木麻衣
徳島県食肉衛生検査所*	片山直人、飛梅三喜
佐賀県食肉衛生検査所*	瀧下恵里子、大澤加奈子
長崎県諫早食肉衛生検査所*	樋渡佐知子、松尾保雄
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、千葉由美、都丸亜希子、池内隼佑

A. 研究目的

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。特に、米国への輸出は2005年から解禁されているが、近年、米国では腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*; STEC）食中毒防止対策のひとつとして牛肉のSTEC検査を行い、検出した関連製品については米国向けに輸出ができないため、現在は国内の加熱加工原料向けに転用している。和牛は畜産食品のなかでも単価の高い高級食材であり、国内に限られた数の対米輸出食肉取扱施設でのと畜、食肉処理による生産量を考えると、加熱加工原料のみならず、効果的な殺菌方法による食中毒の発生予防措置をとった上で、加熱加工原料用以外の転用を可能にすることは、国内生産者や食肉処理関係者の継続的な生産・関連業務にもつながることが期待される。

令和2から4年度に、国内食肉処理施設において、牛枝肉表面のSTECについて定性的・定量的検出を行った。方法としては、USDA/FSISの試験法を参考に志賀毒素遺伝子・大腸菌O抗原遺伝子検出のスクリーニングを行い、分離株の血清型別、毒素型別等の解析を行うこととした。

また、各種消毒液および消毒方法について、牛肉でのSTECの消毒効果の検証し、肉表面の変色や消毒薬由来の臭味を含め、実用的な消毒方法を検討した。

B. 研究方法

1. 牛枝肉のSTEC調査

2020年10月から2023年1月に国内の食肉検査所12ヶ所（A-N、表1-1）にて、ウシ504頭からサンプリングを行った（表1-2）。なお、N施設からの検体（24検体）では、生菌数測定のみを実施した。と畜場での検体の採取は、処理された異なるウシ3頭か

ら枝肉を各1本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の3箇所を選び、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で浸漬した滅菌ガーゼ（30 cm×30 cm）を密着させることによって行った。定性的な検出は下記のように行った。検体は、試験に使用するまで冷蔵保管し、ガーゼのに入ったサンプリングバッグにModified tryptone soya broth（mTSB）を250 mL加えた。この検体液の一部を10倍階段希釈にて適宜希釈し、生菌数測定を行った。また、検体液の一部を定量試験用に冷蔵保管した。残りの検体液はサンプリングバッグのまま、42±1℃で15-24時間培養を行った。この培養液からDNAアルカリ熱抽出を行い、このDNA抽出液をSTEC 7血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRのテンプレートとして用いた。このリアルタイムPCRは、USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01. ならびに EFSA: EFSA Journal. 11:3138、2013の方法を用いて行った。リアルタイムPCRの結果、*stx* および *eae* 遺伝子陽性の検体は、続けてSTEC 7血清群O遺伝子を試験した。STEC 7血清群陽性の検体は、陽性となったO血清群について免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157「生研」（デンカ株式会社）を用いて免疫磁気ビーズ法によるこれら7血清群の濃縮を行った。ビーズ濃縮液を酸処理または希釈して選択培地に塗抹した。選択培地上に発育した疑わしいコロニーについては、STEC 7血清群をリアルタイムPCRにより判定を行った。STEC分離株のO血清群は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）または市販のラテックス凝集試薬を用いて判定した。STEC 7血清群に判定された菌株については、H血清群を抗血清およびH-genotypingを用いて決定した。なお、これら以外についてはO血清群を抗血清およびO-genotypingにて決定した。STEC 7血清群が陽性となった検体については、冷蔵保存しておいた検体液

を最確数法（MPN、3 本法）にて同様の培地を用いて定量試験を行った。

2. 牛肉の消毒効果の検討

（1）文献調査

牛屠体の消毒として使う方法のうち科学的な根拠がある方法を調べることを目的として、Carcasses、Dressed Cattle、Block Meat、Disinfection、Decontamination、Disinfectants、acids、hot water、steam、Microorganisms、bacteria、*E. coli*、STEC をキーワードとして、PubMed で文献調査を行った。

（2）菌株

国立医薬品食品衛生研究所で保有している STEC 血清群 026、0103、0111 および 0157 の各菌株を供試した。

（3）牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体（筋膜あり）および筋膜を取り除いた検体（筋膜なし）は、クリーンベンチ内で厚さ約 1 cm、約 5 cm 角（約 25 g）に無菌的に切り分けて作製し、冷凍保存した。使用する前に 4℃に戻して供試した。

（4）接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている菌株を、10 mL の TSB に植菌し、37℃で 18 時間静置培養した。この培養液を 4℃、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS に再懸濁することを 2 回繰り返して接種菌液を作製した。試験を行うまで、これらの菌液は氷上もしくは 4℃で保管された。これら接種菌液中の菌数は Tryptone soya agar (TSA) およびクロモアガーSTEC に塗抹し、それぞれ 37℃で 24 時間および 37℃で 20 時間培養し、生育したコロニーを計測した。

（5）消毒液の調製

酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）に平成 28 年に使用基準が改正された過酢酸

製剤および酸性化した亜塩素酸ナトリウム、従前より使用が認められ指定添加物である過酸化水素、アルカリ性の消毒液として同規格基準で使用が認められ指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール（エチルアルコール）、有機酸として同規格基準で使用が認められ指定添加物である乳酸を用いた。

過酢酸製剤は「ダイヤパワー（低濃度過酢酸）

（三菱ガス化学株式会社）」（過酢酸 6%、過酸化水素 8%、酢酸 32%、水 54%）を、亜塩素酸ナトリウムは「Keeper Pro®（バイオサイド・インターナショナル社）」（高純度亜塩素酸ナトリウム 8.35%）にクエン酸（食品添加物 富士フィルム和光純薬(株)）を添加し酸性化した亜塩素酸ナトリウム水として、「過酸化水素（富士フィルム和光純薬(株)）」

（35.0 - 36.0%）は 35%とみなして、次亜塩素酸ナトリウムは「ピューラックス（株式会社オーヤラックス）」（次亜塩素酸ナトリウム 6%）を、「DL-乳酸（シグマ アルドリッチジャパン合同会社）」（85.0 - 92.0%）は 90%とみなして、滅菌した純水（滅菌水）で各濃度に希釈し、エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小堺製薬株式会社）（15℃で 76.9 - 81.4 vol%）を販売濃度で供試した。なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

1) STEC 接種検体の作製

滅菌した 1 本の竹串に 1 検体を刺し、菌液を 10 μL ずつ 5 カ所（合計 50 μL）に接種し、15 分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌接種検体を垂直に固定した。

2) 消毒液噴霧の方法

消毒液を 2 回、10 回または 60 回噴霧した。2 回（1.6 mL）噴霧では、筋膜なし検体で、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000

ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。10回噴霧（8 mL）では、筋膜なし検体で、過酢酸 1,000 ppm および次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm で行い、筋膜あり検体で、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm およびエタノールで行なった。60回噴霧（48 mL）では、筋膜なし検体で、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm、1,200 ppm および過酸化水素で行い、筋膜あり検体で、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm、1,200 ppm および過酸化水素で行なった。

3) 消毒液 50 mL 浸漬の方法

菌接種検体を滅菌ピンセットで 50 mL の消毒液に沈めてから持ち上げることを 20 秒間で 10 回繰り返した。筋膜なし検体を使用し、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。

4) 消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの方法

菌接種検体に消毒液 20 mL をシリンジで 5 回（合計 100 mL、100 mL かけ流し）、または、50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL、500 mL かけ流し）かけ流しを行った。

100 mL かけ流しでは、筋膜なし検体で、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm、1,200 ppm および過酸化水素 3.5% で行い、筋膜あり検体で、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素 3.5% で行った。500 mL かけ流しでは、筋膜あり検体で、過酢酸 50 ppm、100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 200 ppm、500 ppm、1,200 ppm および過酸化水素 3.5% で行った。

5) 25°C および 55°C の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法

「洗浄なし」では、菌接種検体ごとに 25°C もしくは 55°C に加温した消毒液（過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸 4%）50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行った。「洗浄あり」では、「洗浄なし」と同様に消毒液のかけ流しを行い、消毒液の液切りを行った後に、常温（23.5 - 24.0°C）の滅菌水 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行った。

6) 消毒後検体中の菌数の測定

消毒後、室温で 5 分間立てた状態で消毒液または洗浄滅菌水の液切りを行った。消毒液が流れ落ちない状態になったことを確認し、各検体を竹串から外し、それぞれストマッカー一袋に入れた。検体の 10 倍量になるように滅菌済みの PBS を添加し、1 分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。これらの乳剤中の菌数を、「(4) 接種菌液の調製」と同様の方法で計測した。

(7) 消毒液による肉の変色と臭味

菌を接種していない検体にて、消毒液による肉の変色と臭味を確認した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC 調査

生菌数は、504 検体のうち 40 検体で検出限界未満であり、他 464 検体での平均は 487.2 CFU/cm² であった（表 1 - 2）。ウシの種類別で比較すると、頭数が少なく、限られた施設由来ではあるが、アンガスの生菌数が 9,387.6 CFU/cm² で最も高かった。月ごとの各施設の生菌数の結果を図 1 に示す。採材期間を通して、生菌数が最も多かった施設は F 施設であった。また、施設ごとの生菌数が 1,000 CFU/cm² を超える施設は、E および F 施設であり、その生菌数はそれぞれ 1,156.7 および 3,193.0 CFU/cm² であった。月ごとの生菌数では、7 月が最も高く 5,133.4 CFU/cm²、次いで 6 月が 699.9 CFU/cm² であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。

STEC 7 血清群を試験した 480 検体のうち、*stx* あるいは *eae* 遺伝子の少なくともいずれかが陽性であった検体は 110 検体であり、そのうち 31 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性となった検体であった。さらに、そのうち 15 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性ならびに STEC 7 血清群遺伝子陽性となった (表 1-3)。これらのうち、STEC 7 血清群の分離が可能であった検体は B56、D68 および J23 の 3 検体 (3/480、0.6%) であり、全株とも血清型は O157:H7 であった (表 1-4)。これら STEC O157 が分離されたのは、2020 年 12 月に採材された D 施設の褐毛和種、2021 年 8 月に採材された E 施設の交雑種および 2022 年 6 月に採材された M 施設の黒毛和種からであった。これらの施設においては、枝肉の消毒等の適切な措置が講じられた。なお、同一施設において、検体採取時期が異なるにもかかわらず、血清型ならびに *stx* および *eae* 遺伝子保有パターンが同一の大腸菌が分離されることが散見された。

STEC O157 が分離された検体について、MPN 法にて定量したところ、その定量値は、1 検体 (D68) については 1.02 MPN/100cm² (11 MPN/100mL 検体液) であり、その他 2 検体 (B56 および J23) については検出限界未満となる 0.33 MPN/100cm² (3.0 MPN/100mL 検体液) 未満であった。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

検索の結果、31 報見つかった。効果が認められた条件 (10 報) で、比較的多い消毒液は乳酸 (8 報) および過酢酸 (2 報) であり、温度としては 55°C (4 報) であった。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

1) 消毒液噴霧の効果

STEC の菌数は、2 回噴霧 (筋膜なし検体) では、消毒液で 7.0 - 8.1 log CFU/片、滅菌水で 7.3 - 7.8 log CFU/片であり (図 2-1)、10 回噴霧 (筋膜なし検体および筋膜あ

り検体) では、消毒液で 6.9 - 7.4 log CFU/片、滅菌水で 7.2 - 7.3 log CFU/片であり (図 2-2、図 2-3)、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。60 回噴霧では、筋膜なし検体において、消毒液で 7.0 ± 0.1 - 7.2 ± 0.1 log CFU/片、滅菌水で 7.3 ± 0.1 log CFU/片であり (図 2-4)、筋膜あり検体において、消毒液で 5.9 ± 0.6 - 6.7 ± 0.4 log CFU/片、滅菌水で 6.9 ± 0.3 log CFU/片であり (図 2-5)、消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

2) 消毒液 50 mL 浸漬の効果

消毒液では 6.8 - 7.1 log CFU/片であり、滅菌水では 7.0 log CFU/片であり (図 2-6)、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。

3) 消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの効果

消毒液 100 mL かけ流しでは、筋膜なし検体において、消毒液で 6.8 ± 0.1 - 7.1 ± 0.3 log CFU/片、滅菌水で 7.4 ± 0.3 log CFU/片であり (図 2-7)、筋膜あり検体において、消毒液で 5.7 ± 0.3 - 6.5 ± 0.2 log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.2 log CFU/片であり (図 2-8)、60 回噴霧より消毒液による STEC の減少効果が認められた。消毒液 500 mL かけ流しでは、消毒液で 4.8 ± 0.9 - 6.0 ± 0.4 log CFU/片、滅菌水で 6.6 ± 0.5 log CFU/片であり (図 2-9)、100 mL かけ流しより消毒液による STEC の減少効果が認められた。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった。

4) 25°C および 55°C の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄の効果

25°C の洗浄なしでは、消毒液で 5.4 ± 0.3 - 5.6 ± 0.6 log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.6 log CFU/片であり (図 2-10)、25°C の洗浄ありでは、消毒液で 4.7 ± 0.8 - 6.1 ± 0.6 log CFU/片、滅菌水で 6.3 ± 0.3 log CFU/片であり (図 2-11)、55°C 洗浄なしでは、消毒液

で $5.4 \pm 1.7 - 5.7 \pm 0.5 \log \text{CFU/片}$ 、滅菌水で $6.3 \pm 0.1 \log \text{CFU/片}$ であり (図 2-12)、 55°C 洗浄ありでは、消毒液で $5.2 \pm 0.3 - 5.7 \pm 0.5 \log \text{CFU/片}$ 、滅菌水では $6.4 \pm 0.2 \log \text{CFU/片}$ であった (図 2-13)。消毒液による STEC の減少効果は認められたが、消毒液の 55°C 加温効果は認められなかった。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液および消毒液と洗浄滅菌水の混合液からは STEC および生菌は検出されなかった。

5) 消毒液による肉の変色と臭味

肉表面の変色に関しては、最大濃度 1,000 ppm を使用しても過酢酸では変色は認められなかったが、200 ppm 以上で使用した亜塩素酸ナトリウム、600 ppm の次亜塩素酸ナトリウムおよび 70% エタノールではやや白色に、3.5% 過酸化水素は白色に、4% 乳酸では茶褐色に変色した。臭味に関しては、過酢酸では最小濃度 50 ppm を使用した場合でも酸臭が、亜塩素酸ナトリウムでは 200 ppm 以上を使用した場合および次亜塩素酸ナトリウムでは 600 ppm を使用した場合に塩素臭が認められたが、70% エタノールでは直後にアルコール臭が残るものの比較的すみやかに消失した。3.5% 過酸化水素および 4% 乳酸では臭味は認められなかった。過酢酸の酸臭は、過酢酸の濃度が高いほど強くなる傾向であったが、滅菌水による消毒後の洗浄によって酸臭は軽減し、 55°C の過酢酸では 25°C の過酢酸よりも消毒後の酸臭が弱かった。

D. 考察

1. 牛枝肉の STEC 調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用い STEC 分離に供した 480 検体中、3 検体 (0.6%) から STEC7 血清群のひとつである STEC 0157 が分離された。STEC 0157 が分離された 3 検体を含む 15 検体 (3.1%) は、*stx* および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかが陽性であった。と畜場でのウシの糞便か

らは STEC 0157 が高頻度に検出されていることと比較し、その汚染率は低率であり、衛生的な管理がなされているとされた。その一方、各年度の分離率は同等であったことならびにその定量値は検出限界未満が多かったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題である。

測定された生菌数は季節的な影響が大きいと考えられた。平均生菌数は 7 月が最も多く次いで 6 月、8 月であり、その他の月は生菌数が 102CFU/cm^2 以下にとどまっていた。施設 E・F の生菌数が高かったこと (図 1) が要因と考えられ、夏季においては牛肉の衛生状態の低下が推察される。生菌数が高い施設では、汚染防止策などを含む衛生管理を確実に実施する必要があり、衛生状態を改善することが求められる。

stx、*eae* および STEC 7 血清群のいずれかの遺伝子が陽性の培養液から分離された菌株では、STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。同一施設において、同一の血清型ならびに *stx* および *eae* 保有パターンの大腸菌が継続的に分離されたことから、施設内での汚染あるいは特定の農場での大腸菌の保菌等が原因として疑われた。今後、これらの菌株の病原性について、検討を行う必要があると考えられた。

牛肉の STEC による汚染の低減は食の安全に関わる重要な課題となっている。と畜場での牛肉の汚染は低率であるものの、牛肉の取り扱いには十分な注意が必要である。また、と畜場での衛生管理や施設での消毒処理等は、STEC の主要な汚染防止策であることから、STEC 汚染についての調査を継続するに加えて、それらの管理や消毒方法を改良していく必要があると考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

比較的多い消毒条件 (10 報) すべてにおいて効果を検討し、国内の指定添加物である乳

酸は、消毒液としての効果を検討する必要があると考えた。また、効果のある温度条件で最も多かった 55℃に関しても、消毒効果の向上を期待して検討することを考えた。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、噴霧（2回計 1.6 mL、10回計 8 mL および 60回計 48 mL）、浸漬（50 mL）およびかけ流し（100 mL および 500 mL）を行った。令和 2 および令和 3 年度で試みた噴霧では、60 回噴霧で消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

令和 2 年度で試みた浸漬では、60 回噴霧とほぼ同量の消毒液を用いたにもかかわらず減少効果は認められなかった。浸漬では牛肉由来の有機物による消毒液の不活性化や、酸臭および塩素臭の肉深部への浸透が考えられるため、多量の消毒液をかけ流すことにより効果が向上することを期待し、令和 3 年度では消毒液のかけ流しを試みた。この結果、100 mL かけ流しは、60 回噴霧より STEC の減少効果が認められた。また、同じ濃度では 100 mL より 500 mL かけ流しの方が STEC の減少効果が認められ、同じかけ流し量では消毒液の濃度が高い方が STEC の減少効果が高い傾向であった。

令和 2 および令和 3 年度の結果から、500 mL かけ流しが最も STEC の減少効果が認められたため、令和 4 年度でも継続して行った。また、肉色の変化がないことから過酢酸が牛肉の消毒液として最も実用的であると考えられたが、酸臭が残ることが難点であった。令和 4 年度では、文献調査によって情報収集した米国での使用状況および EU での使用許可状況を鑑みて、過酢酸だけでなく、有機酸である乳酸についても試みた。消毒効果の向上を期待して消毒液の 55℃加温、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を加えて、STEC 0157 の減少効果を試みた。ばらつきはあるが、消毒液の方（約 2 桁減少）が滅菌水のみ（約 1 桁減

少）より STEC の減少効果が認められ、消毒液による一定の効果が明らかになった。特に、過酢酸による消毒では、菌数減少効果と併せて牛肉表面を変色させない利点が明らかになった。酸臭が残ることが難点であったが、55℃に加温することによって酸臭の軽減されることが判明した。なお、55℃に加温することによる STEC の減少効果は認められなかった。

また、乳酸による消毒では、酸臭は認められなかったが、牛肉表面が茶褐色に変色した。しかし、乳酸消毒による肉質への影響はないとする報告があり、肉表面のトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸も消毒剤として実用性があると考えられる。

E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定の 1 カ所を除く 11 カ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体（0.6%）から STEC 0157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から 6 種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55℃に加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

廣瀬昌平、都丸亜希子、穂山浩、工藤由起子。牛肉の志賀毒素産生大腸菌汚染に対する消毒液の効果の検討。日本食品衛生学会第118回学術講演会，長崎市，令和4年11月11日。

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

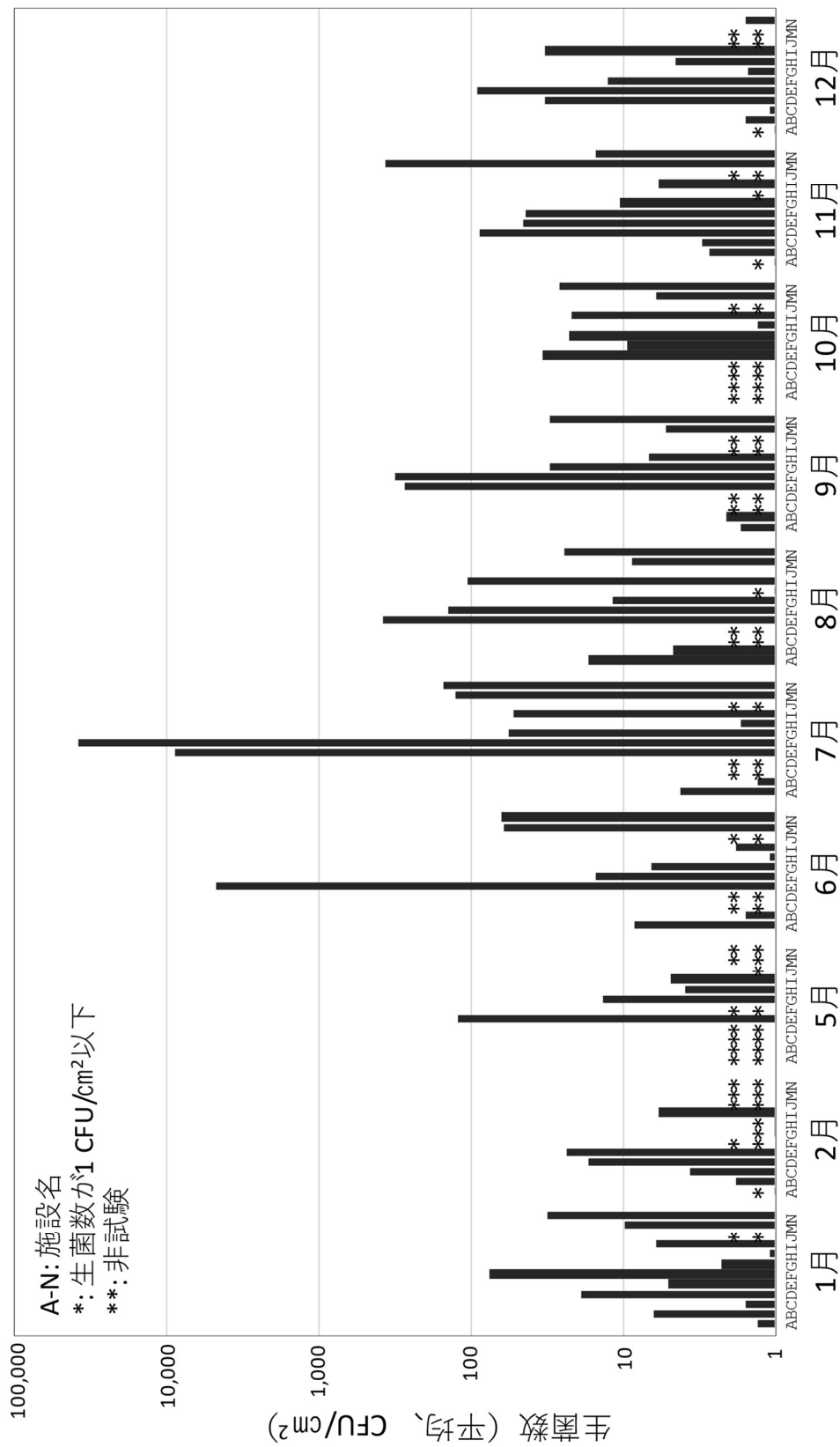


図1 月ごとの各施設の生菌数 (令和 2-4年の平均値)

表1-1 各施設の協力年度

施設 番号	協力年度		
	令和2年度	令和3年度	令和4年度
A施設	●	●	
B施設	●	●	
C施設	●		
D施設	●		
E施設	●	●	●
F施設	●		●
G施設	●	●	●
H施設		●	
I施設		●	●
J施設		●	
M施設			●
N施設			●

表1-2 ウシの種類別、性別の生菌数

		試験 個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)
ウシの種類	ホルスタイン	220	196 (89.1)	777.2±6,923.2
	黒毛和種	164	151 (92.1)	27.7±105.2
	交雑種	74	71 (95.9)	34±67.9
	褐毛和種	35	35 (100)	39.5±55.2
	アンガス	7	7 (100)	9,387.6±10,936.1
	短角	3	3 (100)	4.9±7.9
	ジャージー	1	1 (100)	0.83
性別	雄	318	287 (90.3)	681.3±6,042.0
	雌	186	177 (95.2)	172.4±1,124.6
全体		504	464 (92.1)	487.2±4,805.4

SD: standard deviation

*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**：検出個体のみ平均±SD

表1-3 stx 遺伝子および eae 遺伝子陽性検体の7血清群遺伝子陽性結果

年度	O血清群遺伝子							合計 検体数*
	O26	O45	O103	O111	O121	O145	O157	
令和2年	0	1	1	0	0	0	1	3
令和3年	3	3	3	0	0	0	2	5
令和4年	1	5	0	0	0	0	2	7
合計	4	9	4	0	0	0	5	15

* 遺伝子を重複して持つ検体を含む

表1-4 大腸菌の生化学的性状

培地	性状	分離株			参考		
		検体番号	検体番号	検体番号	血清型	血清型	その他の 主な血清型
		B56	D68	J23			
		血清型	血清型	血清型			
		O157: H7	O157: H7	O157: H7	O157: H7	O157: H-	
TSI寒天	斜面	黄色	黄色	黄色	黄色	黄色	黄色
	高層	黄色	黄色	黄色	黄色	黄色	黄色
	硫化水素産生	-	-	-	-	-	-
	ガス産生	+	+	+	+	+	+
LIM培地	リジン	+	+	+	+	+	+
	インドール	+	+	+	+	+	+
	運動性	+	+	+	+	-	+

検体番号B：令和2年度、検体番号D：令和3年度、検体番号J：令和4年度

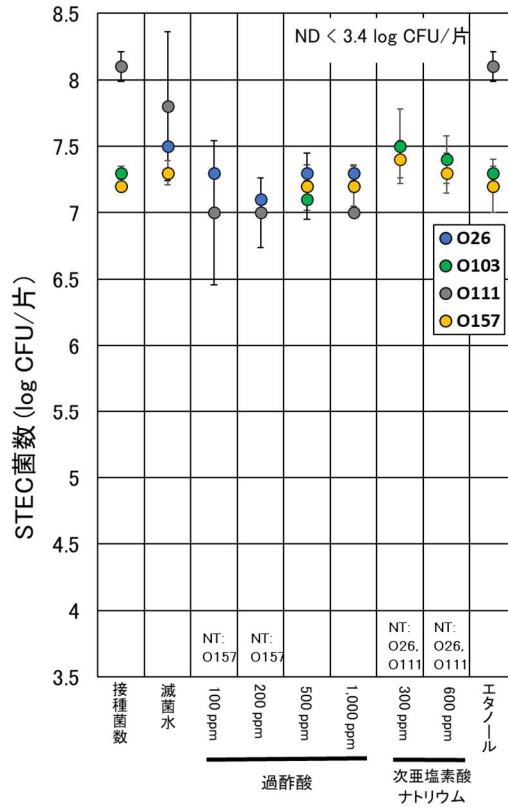


図 2-1 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜なし検体、2回噴霧)

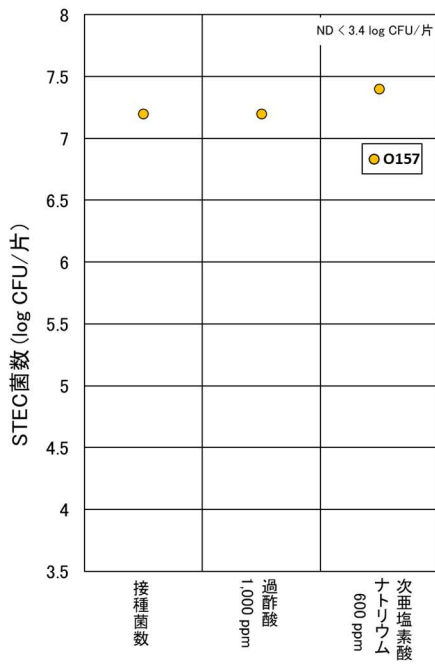


図 2-2 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜なし検体、10 回噴霧)

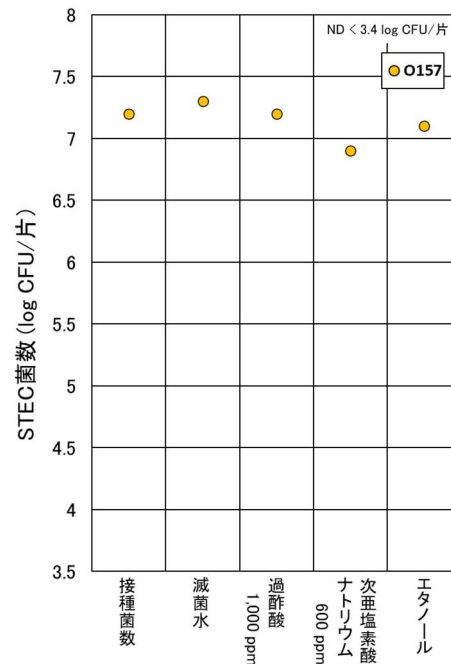


図 2-3 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜あり検体、10 回噴霧)

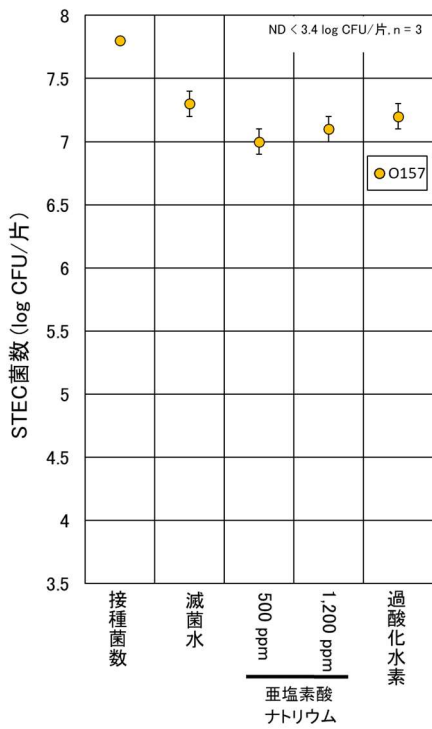


図 2-4 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜なし検体、60 回噴霧)

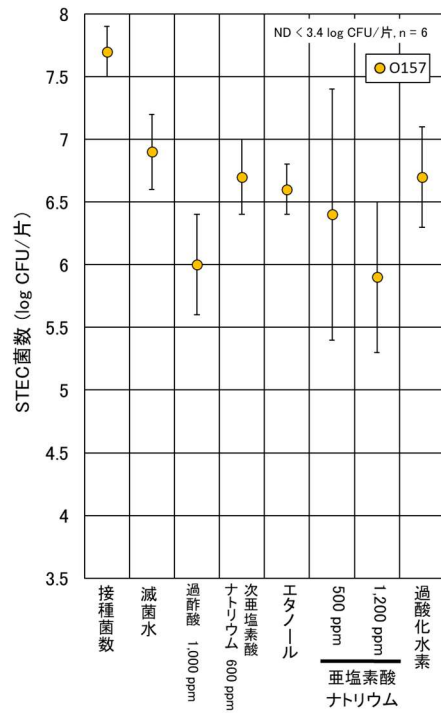


図 2-5 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜あり検体、60 回噴霧)

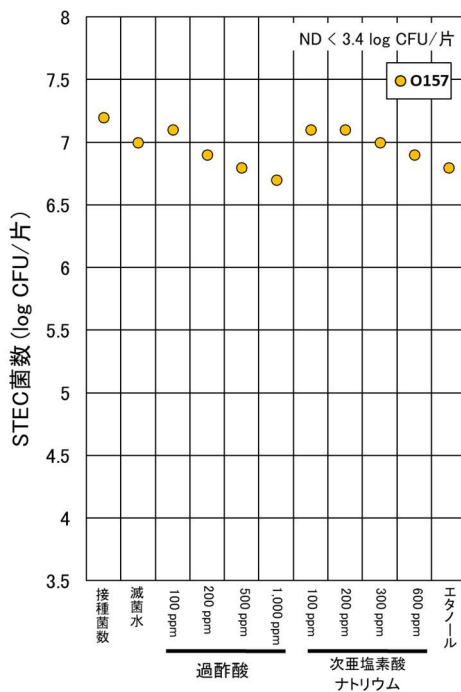


図 2-6 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜なし検体、50 mL 浸漬)

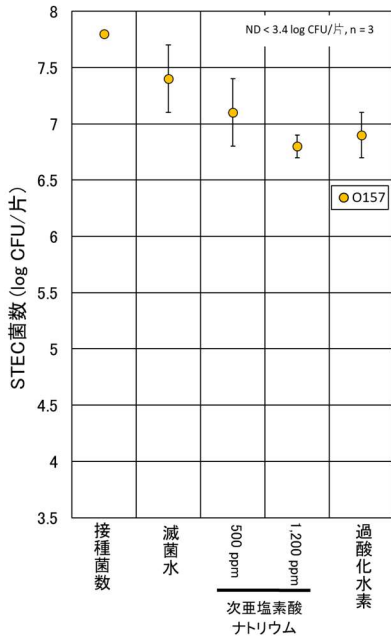


図 2-7 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜なし検体、かけ流し 100 mL)

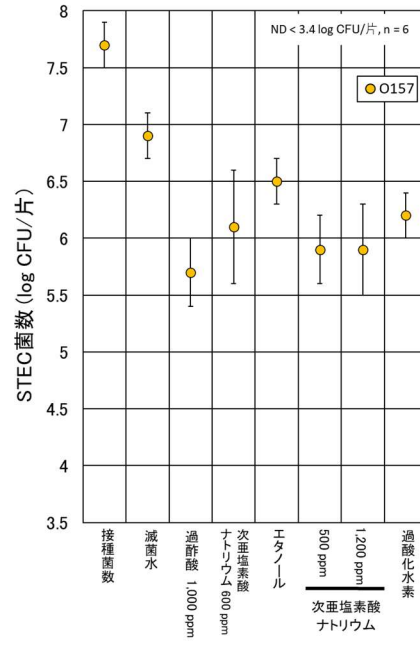


図 2-8 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜あり検体、かけ流し 100 mL)

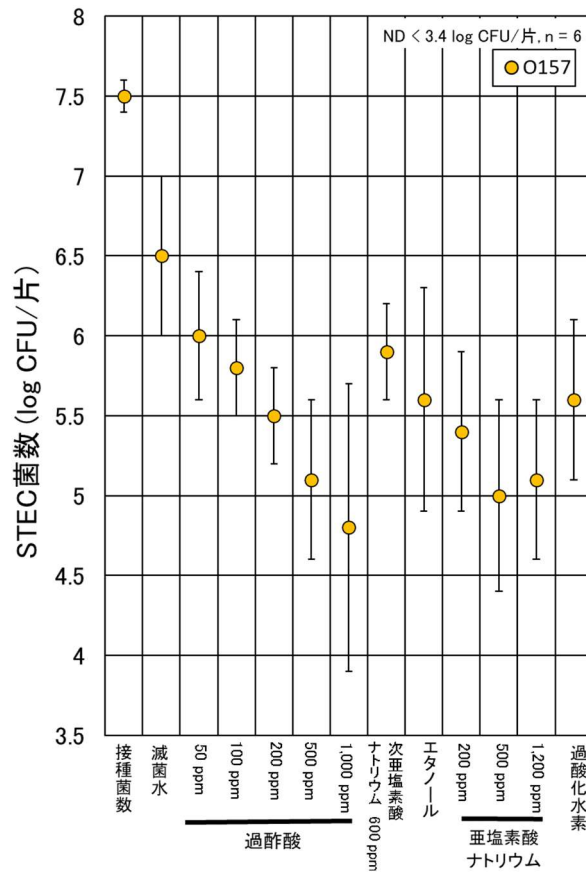


図 2-9 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(筋膜あり検体、かけ流し 500 mL)

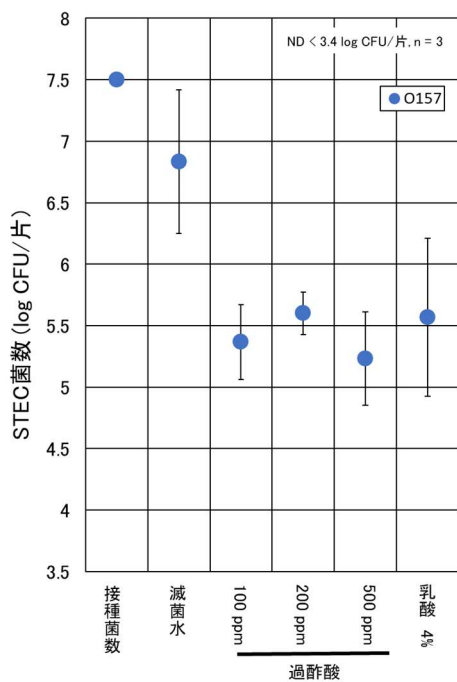


図 2-10 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(25°C、筋膜あり検体、かけ流し 500 mL)

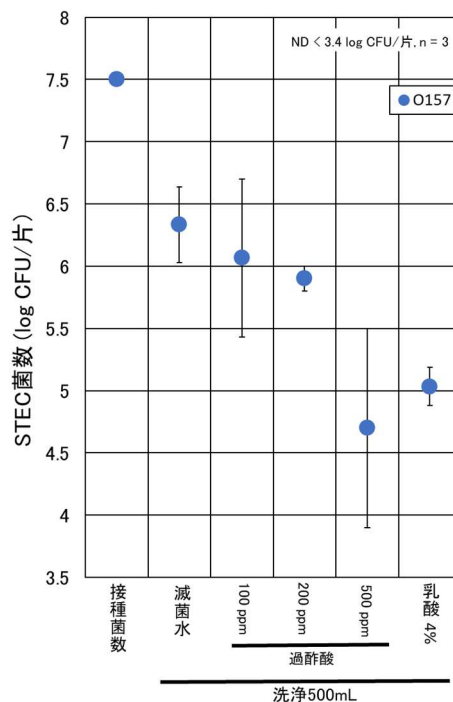


図 2-11 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(25°C、筋膜あり検体、かけ流し 500 mL、
消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

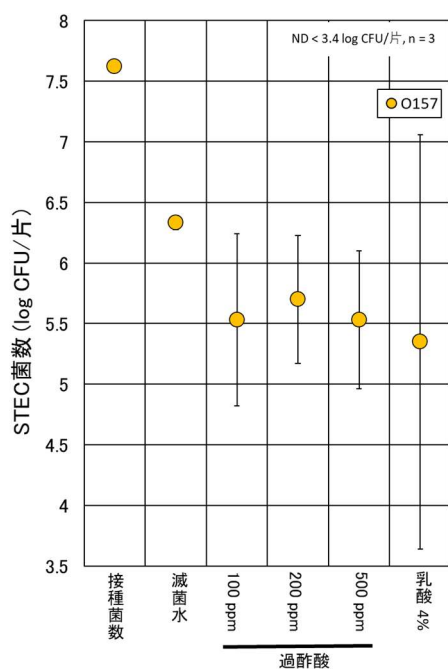


図 2-12 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(55°C、筋膜あり検体、かけ流し 500 mL)

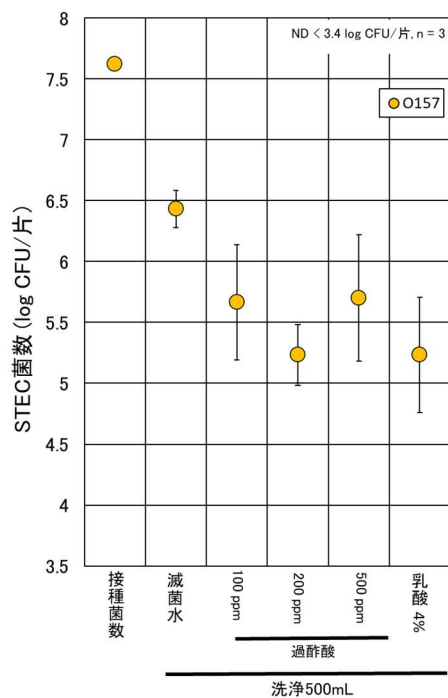


図 2-13 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(55°C、筋膜あり検体、かけ流し 500 mL、
消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S., Akiyama H	Determination of 8 α -hydroxymutillin as a marker residue for tiamulin in swine tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Food Analytical Methods	14	845-855	2021
Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J	Evaluation of a risk communication program for pesticide residues	Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)	62	187-192	2021