

Ⅱ. 分担研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

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 主任研究官

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を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として 12 分析法(抗菌性物質 29 化合物)を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。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、12 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。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質のうち抗菌性物質が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鶏の筋肉（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。

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、妥当性評価を実施した。

B. 研究方法

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rik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試験法

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 μm 、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. チルバロシン試験法

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（東京理化工学機械製）

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 容量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. リンコマイシン試験法

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 µm、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 1-3)

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試験法

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. カナマイシン試験法

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 (東京理化学器械製)

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酢酸溶液で抽出し、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、トリクロロ酢酸溶液 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シン、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試験法

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シン一水和物標準品： 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シン一水和物標準品約 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 5500	SCIEX
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0.000125、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試験法

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℃）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 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試験法

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試験法

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°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

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試験法

① 試薬・試液

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

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 (富士フイルム和光純薬製)

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-d₄ 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mpi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*₇N-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mpi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mpi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mpiシリン標準原液及びアmpi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 µL 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mpiシリン-*d*₅ のピーク面積に対するアmpi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 µL 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mpi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mpi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. ノシヘプタイド試験法

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	メーカー
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. エンラマイシン試験法

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 (富士フィルム和光純薬製)

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) 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。

C. 結果及び考察

1. タイロシン及びチルミコシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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

0.00025～0.005 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。

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. チルバロシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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

0.0001～0.002mg/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. リンコマイシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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

0.00025～0.01 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。

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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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. カナマイシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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リン、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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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. ノシヘプタイド試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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. エンラマイシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験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。

D. 結論

鶏の筋肉を対象として B 物質の抗菌性物質分析法（12 分析法、29 化合物）を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果（真度、併行精度、室内精度及び選択性）が得られ、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。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質のうち抗菌性物質が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鶏の筋肉（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。

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

表 1-1 測定条件 (タイロシン及びチルミコシン試験法)

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)	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試験法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件 (チルバロシン試験法)

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 チルバロシン試験法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件 (リンコマイシン試験法)

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)																										
	<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>リンコマイシン</td> <td>407.1</td> <td>66</td> <td>126.0</td> <td>33</td> <td>359.1</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>リンコマイシン-d₃</td> <td>410.2</td> <td>66</td> <td>129.2</td> <td>35</td> <td>362.1</td> <td>27</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)	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
	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 μL 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 リンコマイシン試験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試験法)

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) 10mL 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試験法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件 (カナマイシン試験法)

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 カナマイシン試験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試験法)

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 (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 ($^{\circ}\text{C}$)	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)																											
	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試験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試験法）

LC 条件																											
カラム	Mightysil RP-18GP (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m : 関東化学製)																										
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: 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($^{\circ}$ 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試験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試験法)

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	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 で洗淨

↓ 水及びメタノールの混液(4:1) 10 mL で洗淨

↓ 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試験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試験法)

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試験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試験法)

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試験法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件 (ノシヘプタイド試験法)

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 ノシヘプタイド試験法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件 (エンラマイシン試験法)

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

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-12 エンラマイシン試験法の分析法フローチャート

(1) タイロシン及びチルミコシン試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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) チルバロシン試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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	9.88	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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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	9.65	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) リンコマイシン試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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	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試験法

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) カナマイシン試験法

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試験法

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 ($\mu\text{g/kg}$)	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	10.5	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 ($\mu\text{g/kg}$)	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	9.7	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 ($\mu\text{g/kg}$)	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	8.1	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 ($\mu\text{g/kg}$)	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	9.2	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試験法

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 ($\mu\text{g/kg}$)	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	8.5	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 (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	7.8	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 (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	8.6	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試験法

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 (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	50.2	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 (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	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 (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	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試験法

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試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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) ノシヘプタイド試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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	10.31	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				

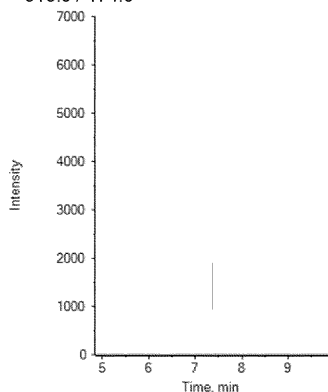
(12) エンラマイシン試験法

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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			
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				

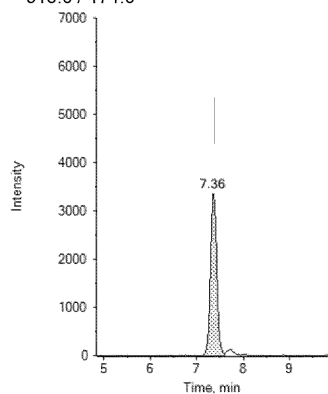
ブランク試料

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

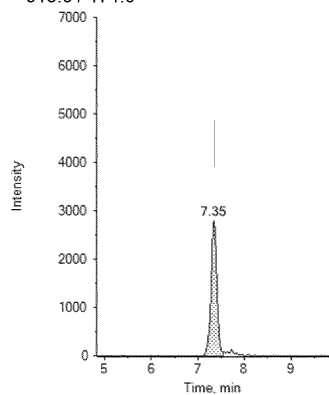


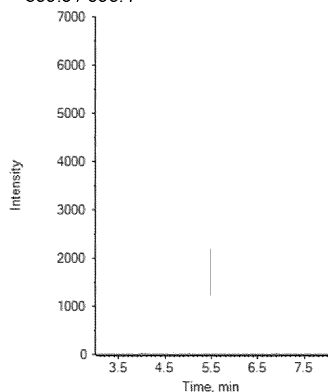
図 2-1 タイロシンの SRM クロマトグラム

(m/z 916.0→174.0)

添加濃度 : 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$

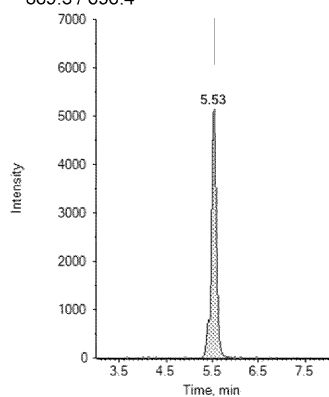
ブランク試料

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

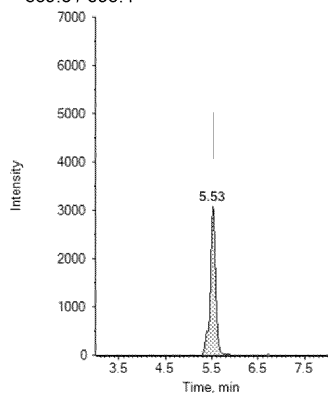
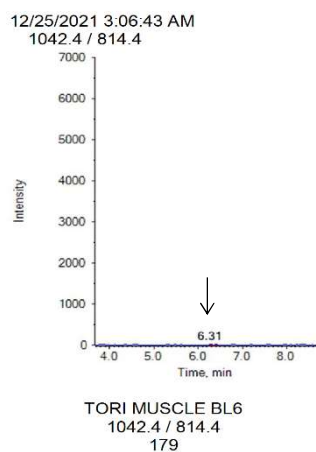


図 2-2 チルミコシンの SRM クロマトグラム

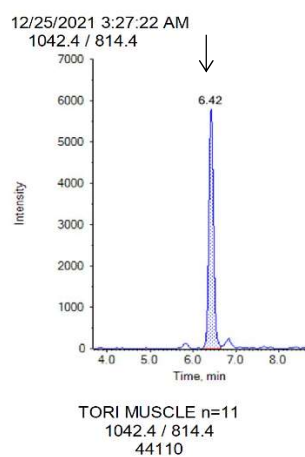
(m/z 869.3→696.4)

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)

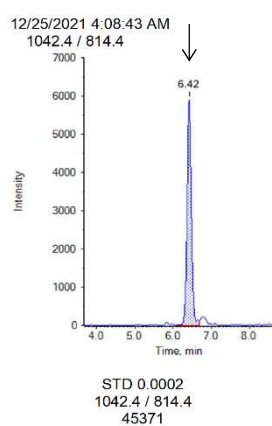
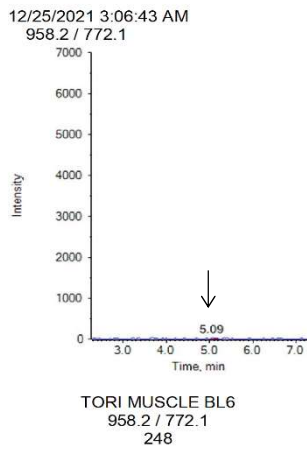
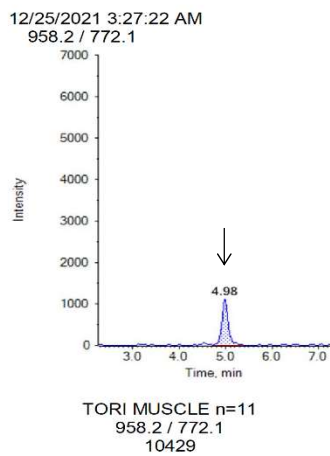


図 2-3 チルバロシンの SRM クロマトグラム
(m/z 1042.4→814.4)
添加濃度 : 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.2 µg/L)

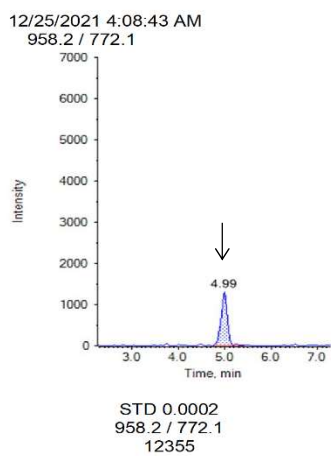
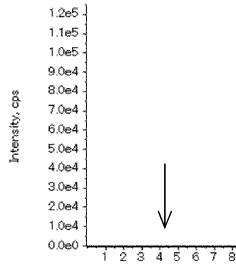


図 2-4 3-O-アセチルタイロシンの SRM クロマトグラム
(m/z 958.2→772.1)
添加濃度 : 10 µg/kg

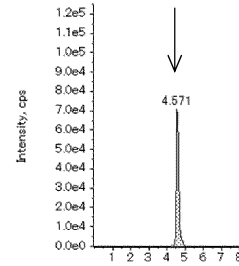
ブランク試料

Mass:407.1 / 126.0
Area:N/A



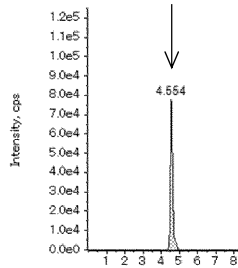
ブランク試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2
Area:672736



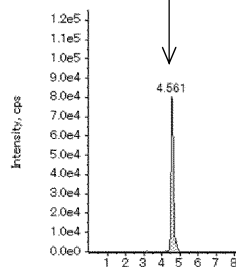
添加試料

Mass:407.1 / 126.0
Area:702100



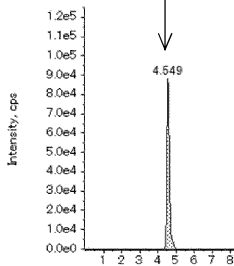
添加試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

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

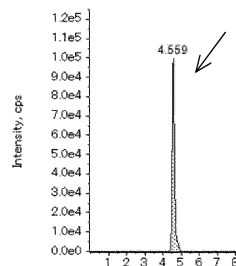
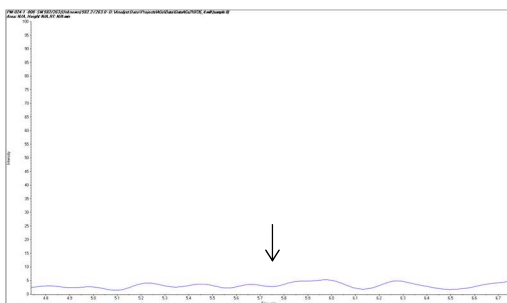


図 2-5 リンコマイシンの SRM クロマトグラム

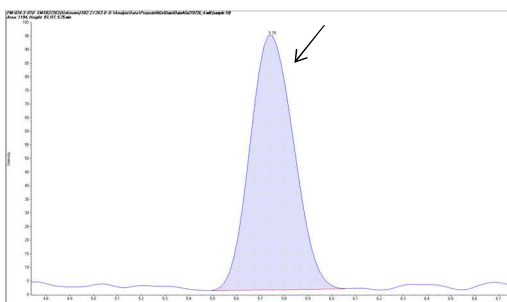
(m/z 407.1→126.0)

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)

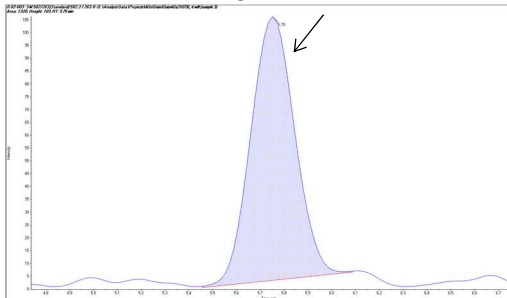
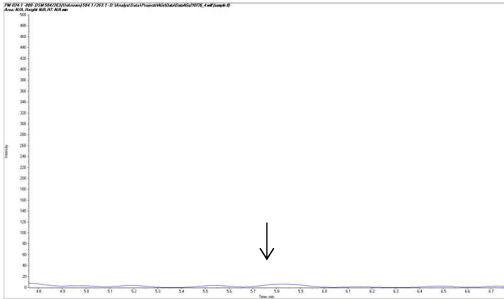
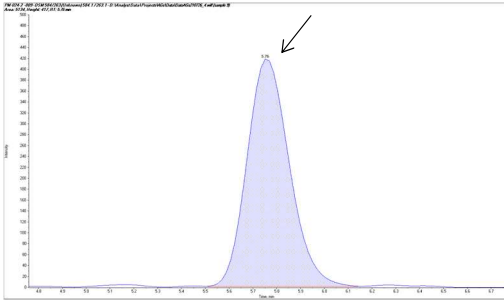


図 2-6 ストレプトマイシンの SRM クロマトグラム
(m/z 582.2→263.0)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.02 mg/L)

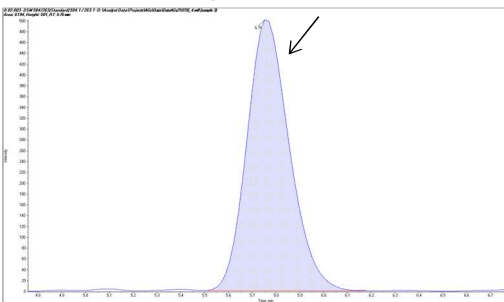
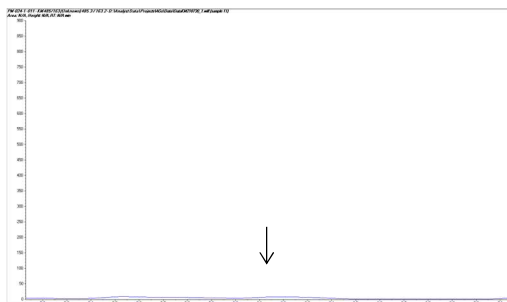
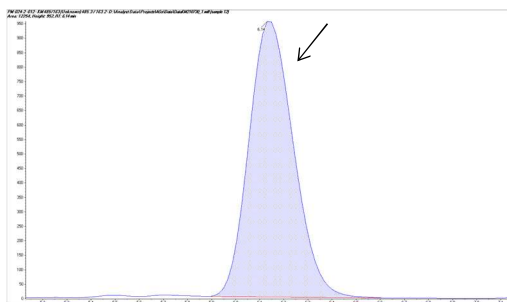


図 2-7 ジヒドロストレプトマイシンの SRM クロマトグラム
(m/z 584.1→263.1)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.01 mg/L)

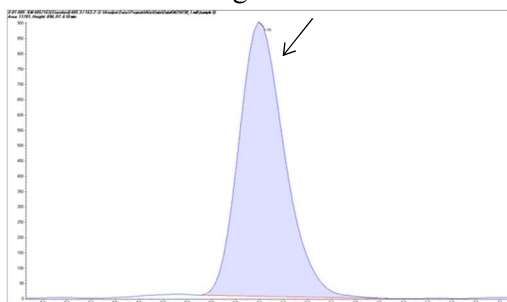
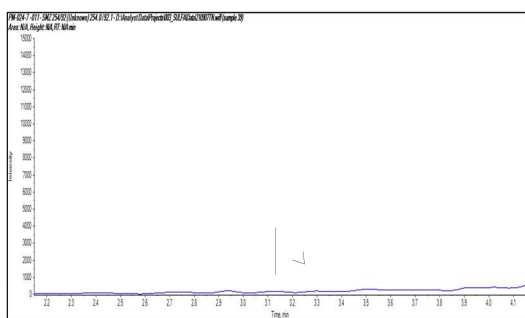
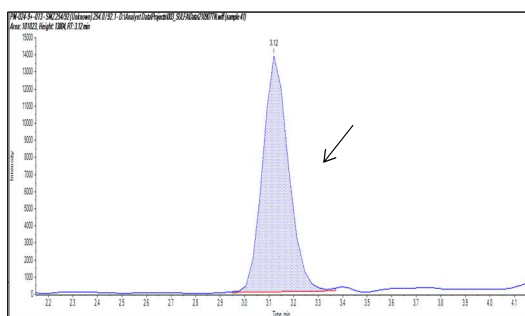


図 2-8 カナマイシン A の SRM クロマトグラム
(m/z 485.3→163.2)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

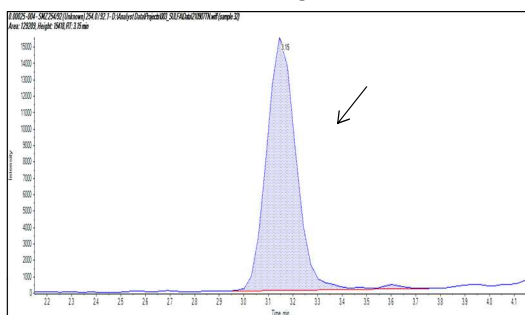
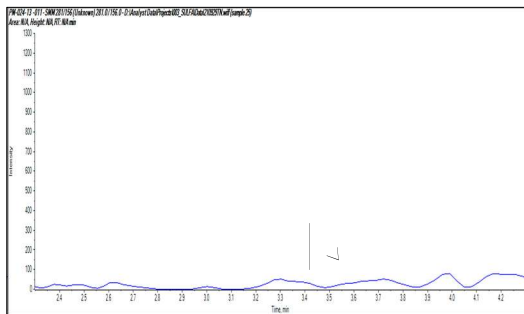
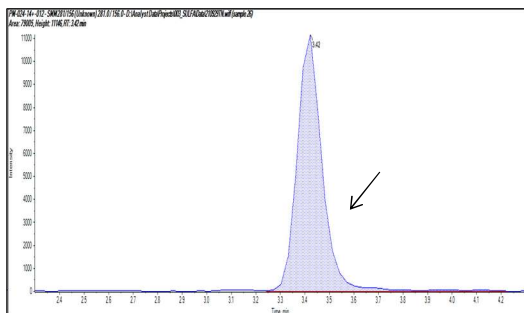


図 2-9 スルファメトキサゾールの SRM クロマトグラム
(m/z 254.0→92.1)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

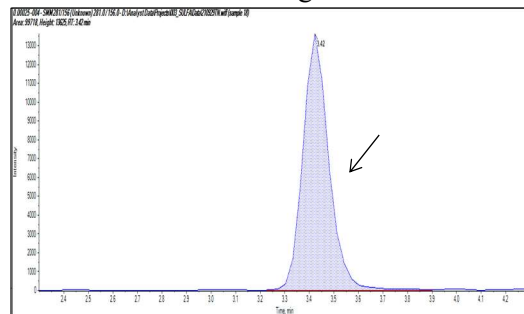
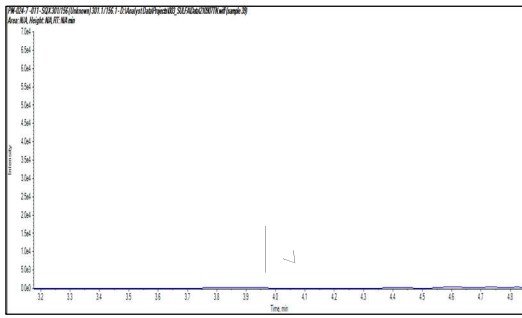
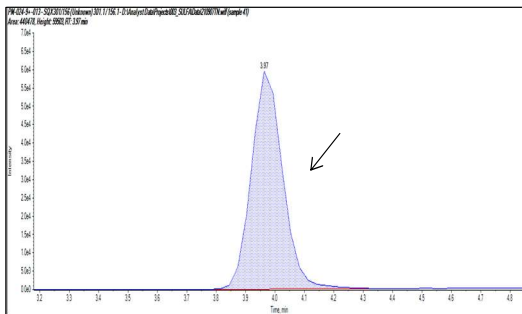


図 2-10 スルファモノメトキシンの SRM クロマトグラム
(m/z 280.9→156.0)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

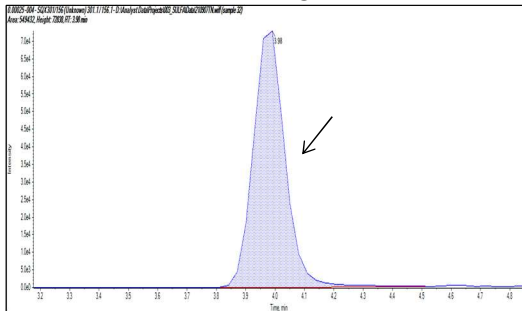
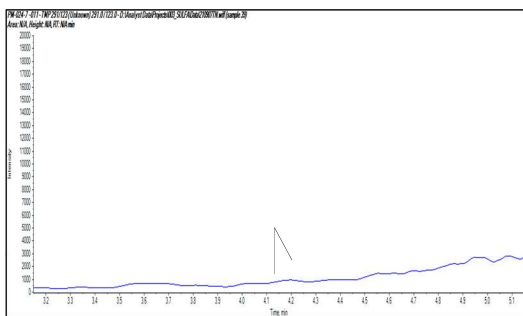


図 2-11 スルファキノキサリンの SRM クロマトグラム

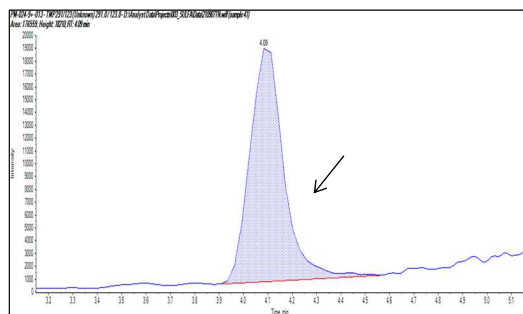
(m/z 301.1→156.1)

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)

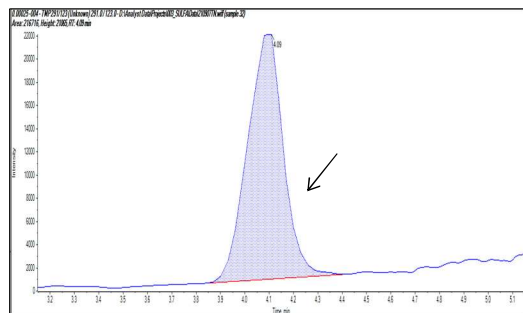
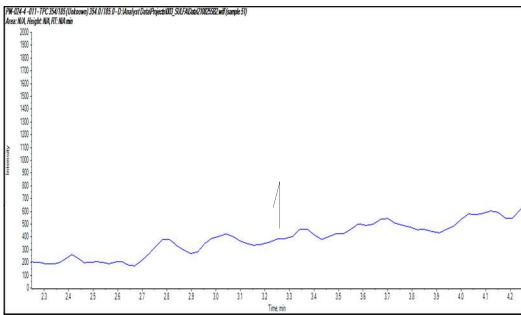
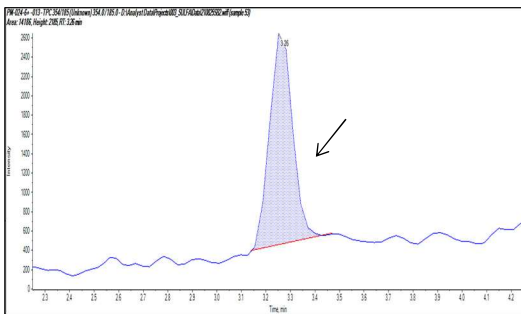


図 2-12 トリメトプリムの SRM クロマトグラム
(m/z 291.0→123.0)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

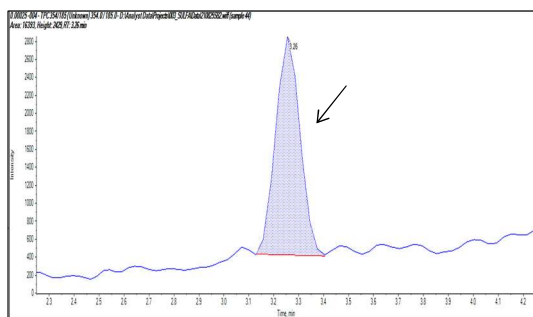
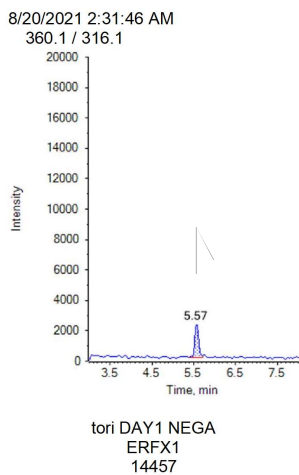
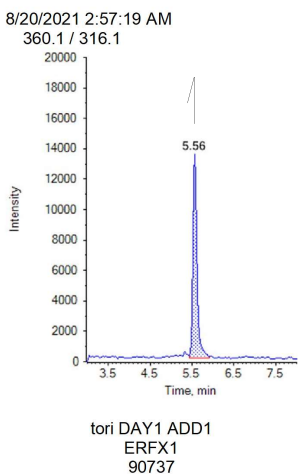


図 2-13 チアンフェニコールの SRM クロマトグラム
(m/z 354.0→185.0)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)

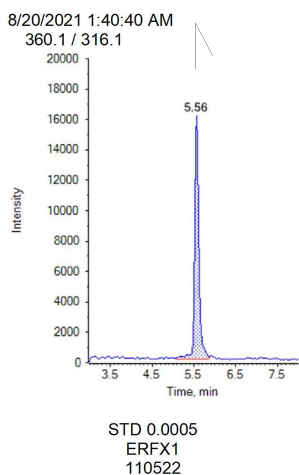


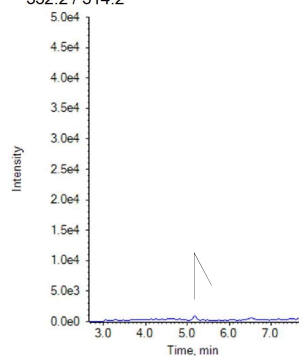
図 2-14 エンフロロキサシンの SRM クロマトグラム

(m/z 360.1→316.1)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料

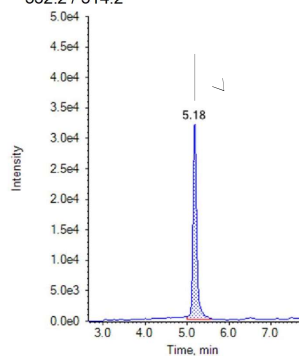
8/20/2021 2:31:46 AM
332.2 / 314.2



tori DAY1 NEGA
CPFX1

添加試料

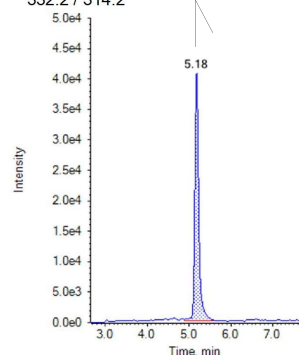
8/20/2021 2:57:19 AM
332.2 / 314.2



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

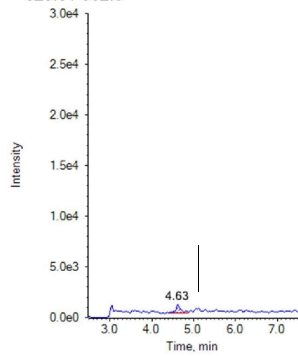
図 2-15 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム

(m/z 332.2→314.2)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料

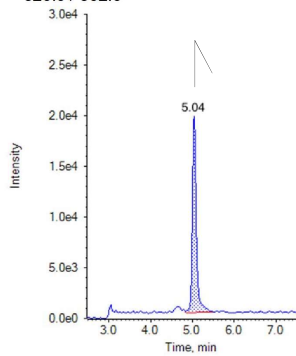
8/20/2021 2:31:46 AM
320.0 / 302.0



tori DAY1 NEGA
NFX1
6650

添加試料

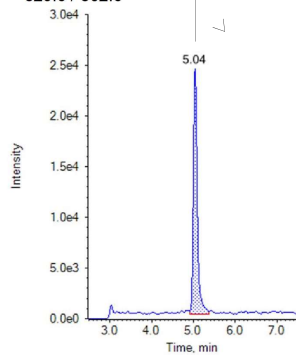
8/20/2021 2:57:19 AM
320.0 / 302.0



tori DAY1 ADD1
NFX1
128429

標準溶液(0.5 µg/L)

8/20/2021 1:40:40 AM
320.0 / 302.0



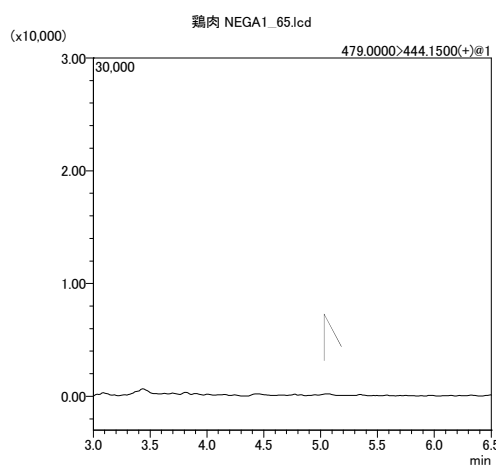
STD 0.0005
NFX1
159196

図 2-16 ノルフロキサシンの SRM クロマトグラム

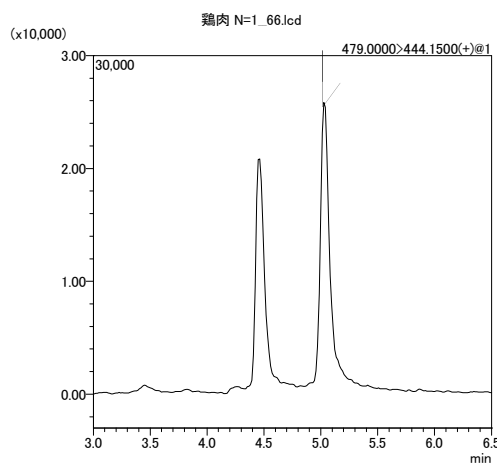
(m/z 320.0→302.0)

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)

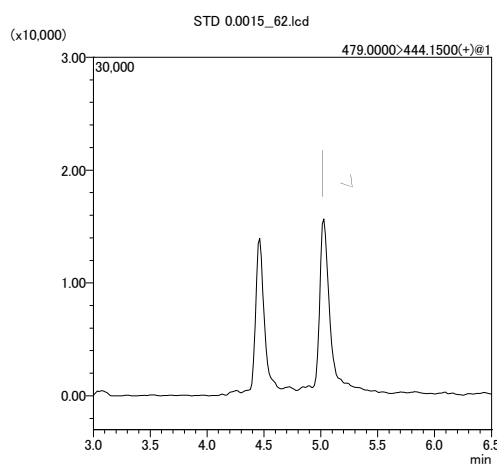
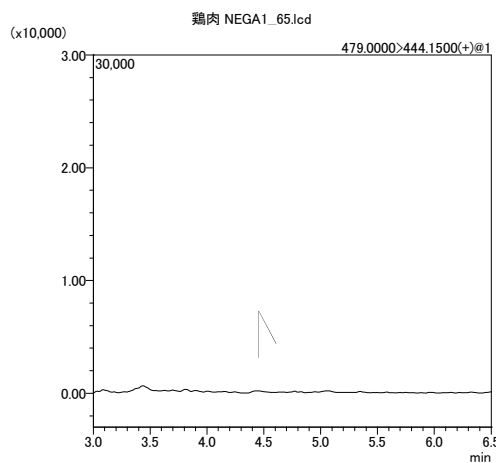
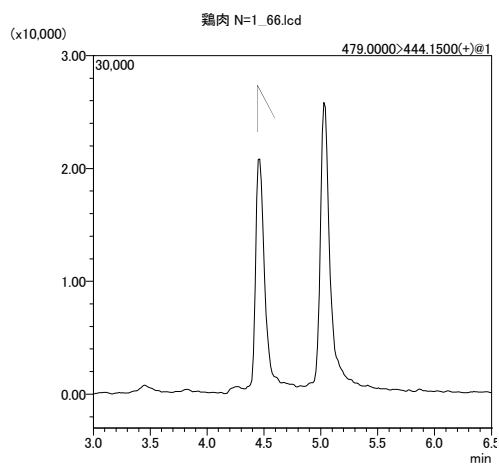


図 2-17 クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 479.0→444.1)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

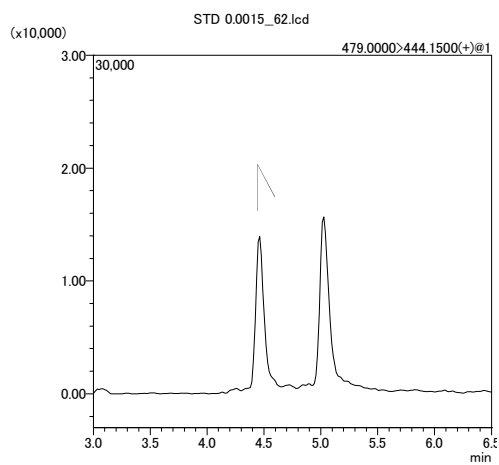
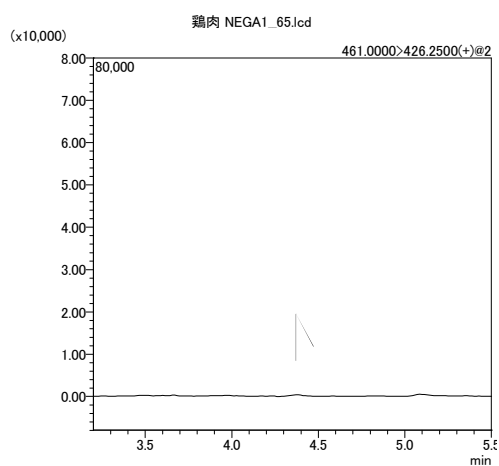
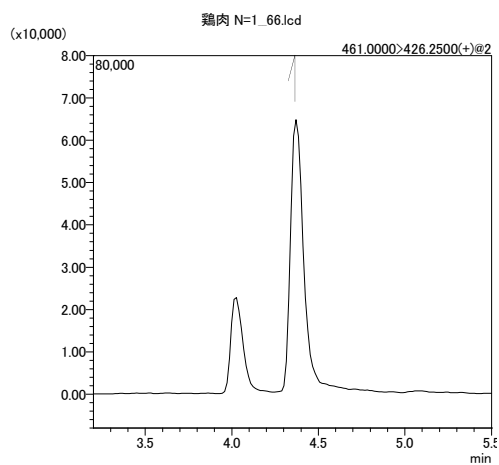


図 2-18 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(*m/z* 479.0→444.1)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

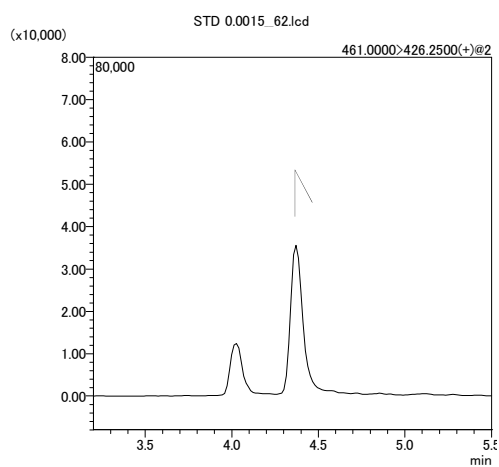
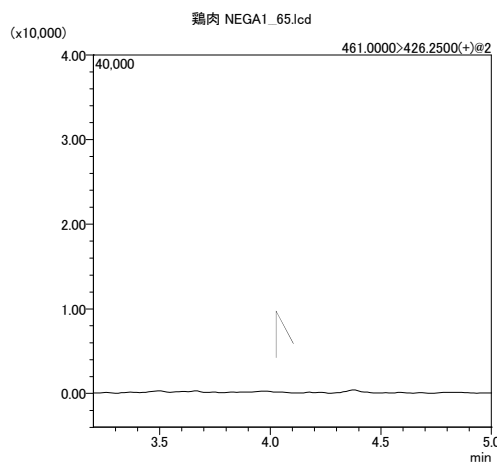
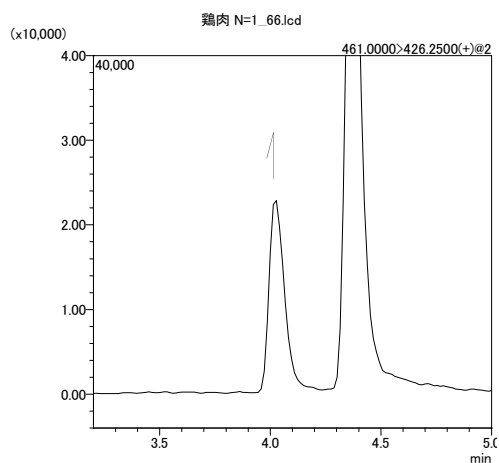


図 2-19 オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 461.0→426.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

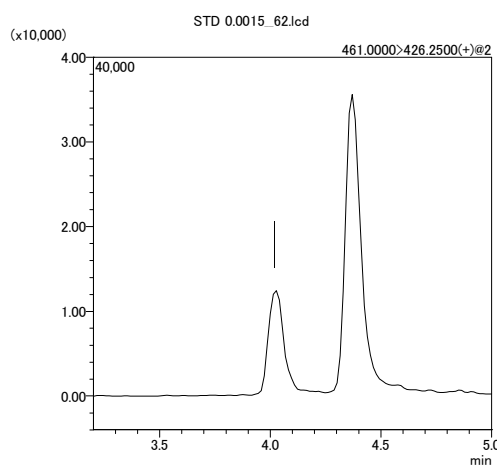
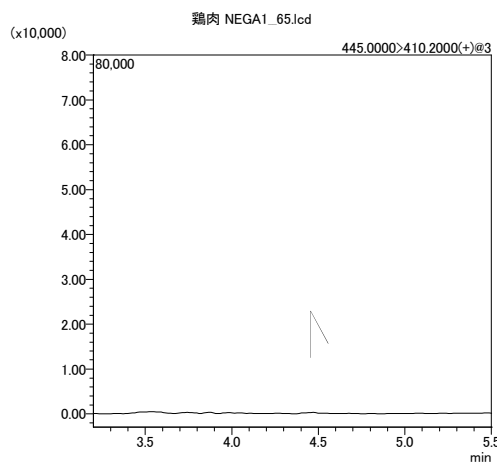
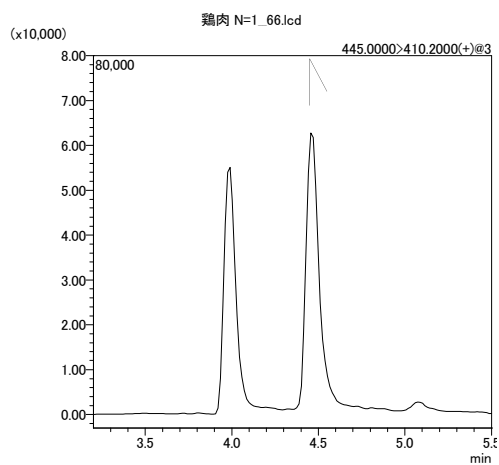


図 2-20 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(*m/z* 461.0→426.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

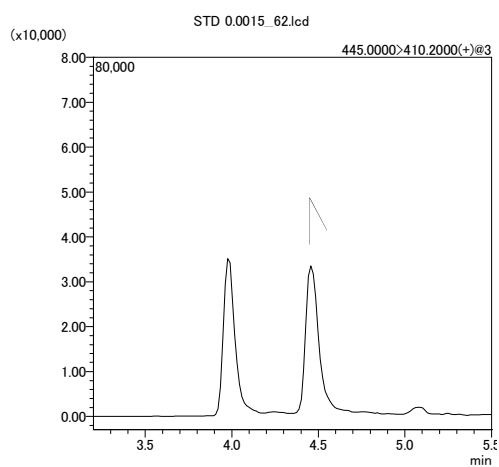
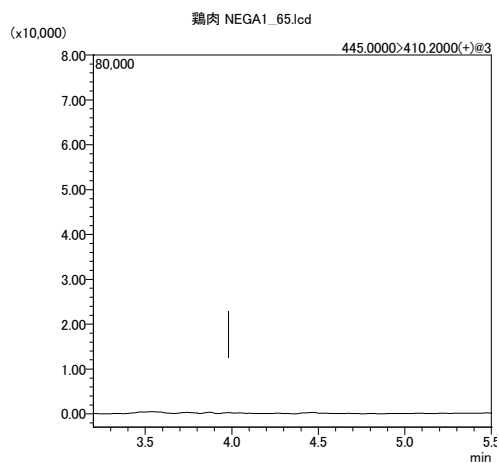
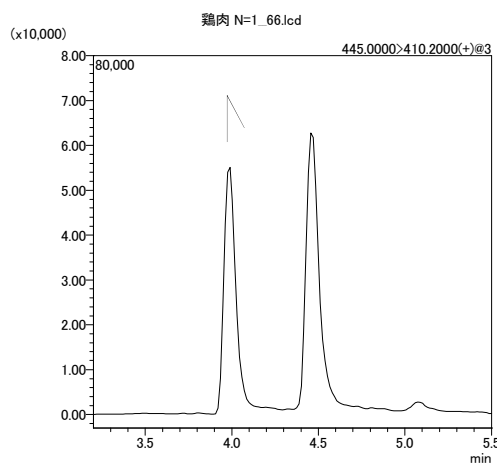


図 2-21 テトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 445.0→410.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

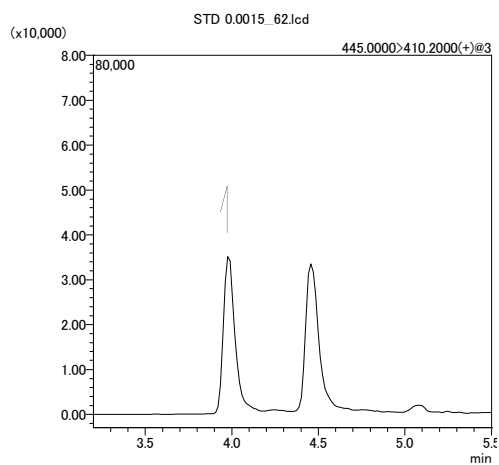
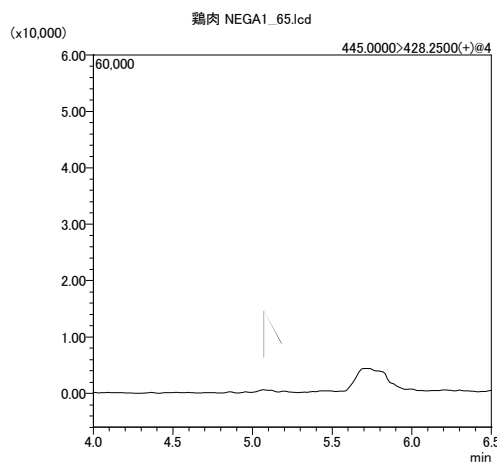
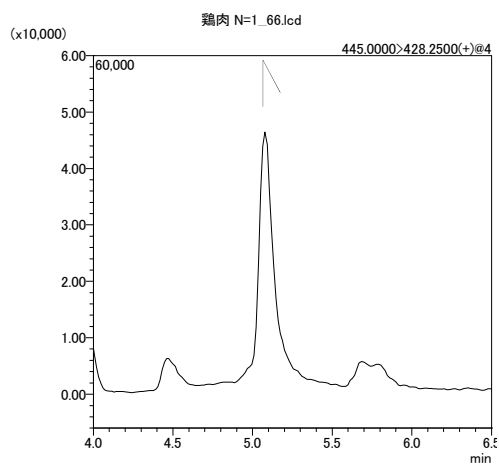


図 2-22 4-*epi*-テトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 445.0→410.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

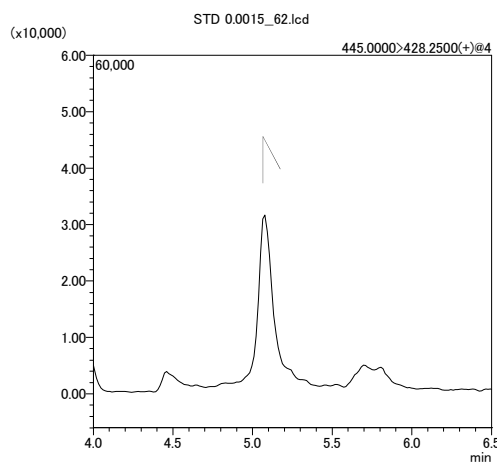
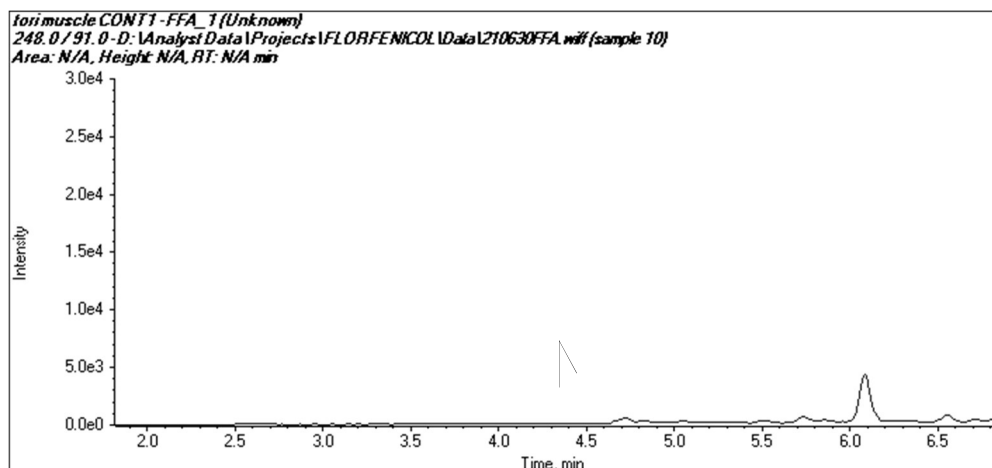
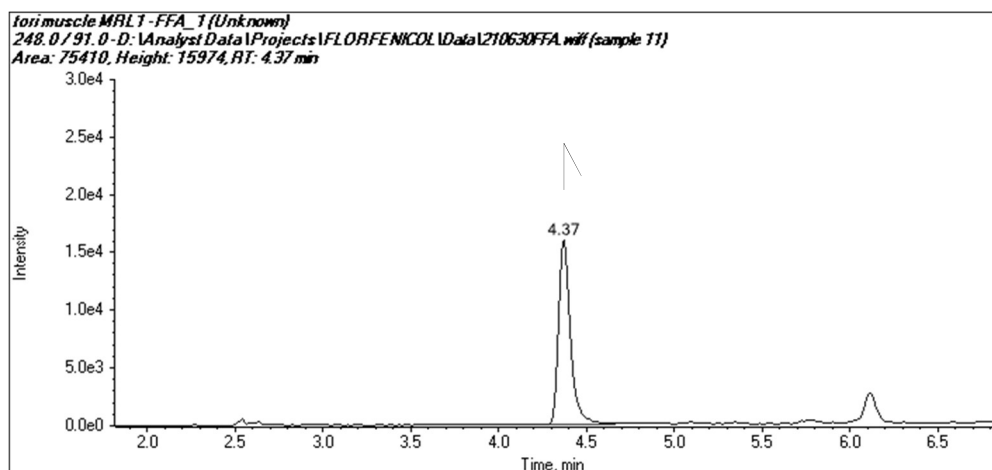


図 2-23 ドキシサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 445.0→428.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

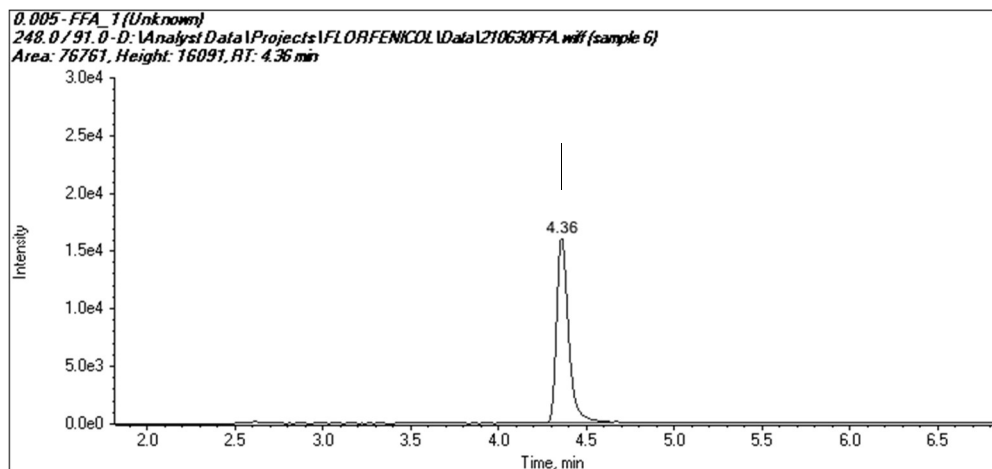
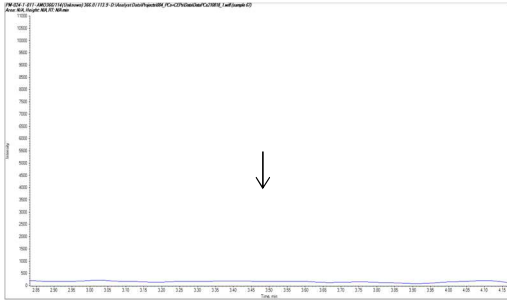
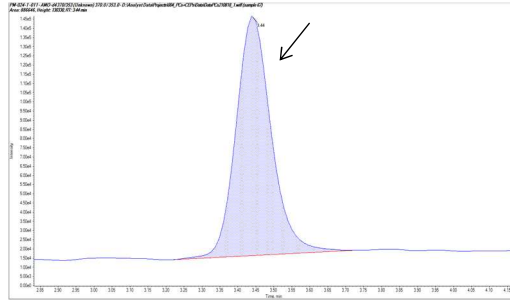


図 2-24 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム
(m/z 248.0→91.0)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

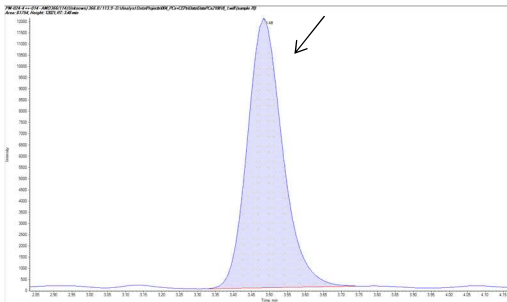
ブランク試料



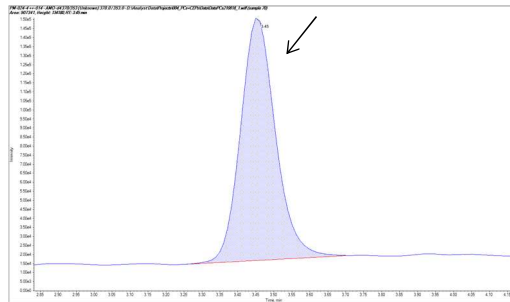
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



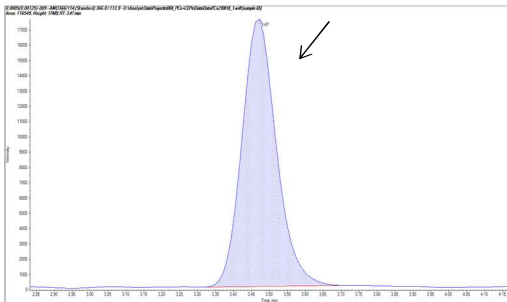
添加試料



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)

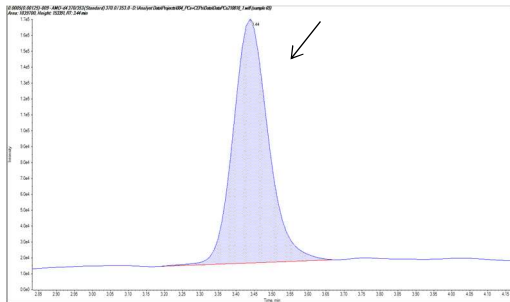
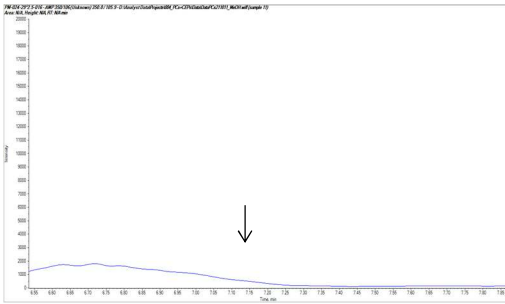
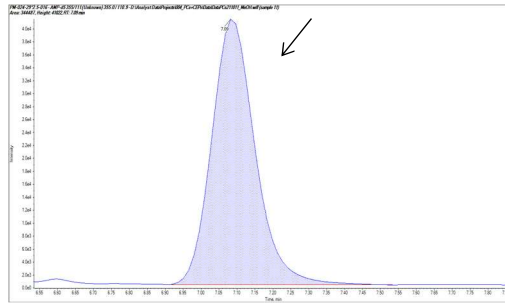


図 2-25 アモキシシリンの SRM クロマトグラム
(m/z 366.0 \rightarrow 113.9)
添加濃度 : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

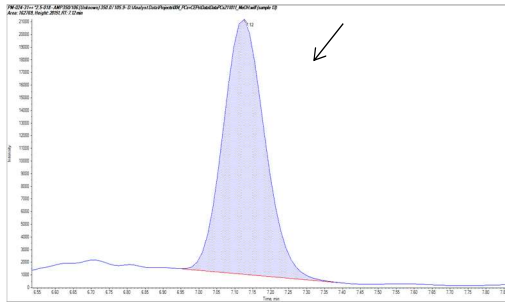
ブランク試料



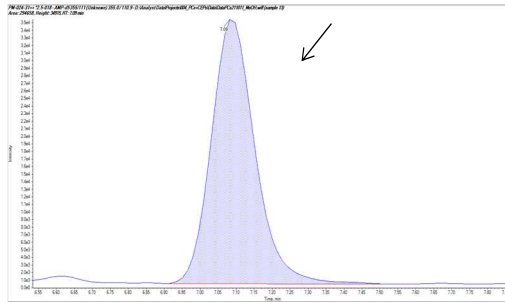
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



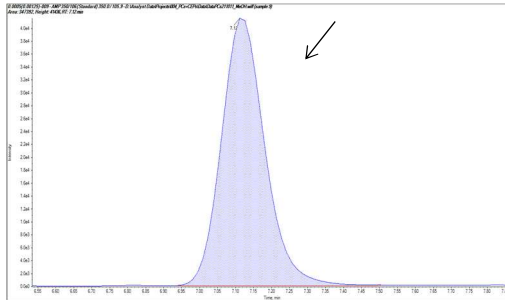
添加試料



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)

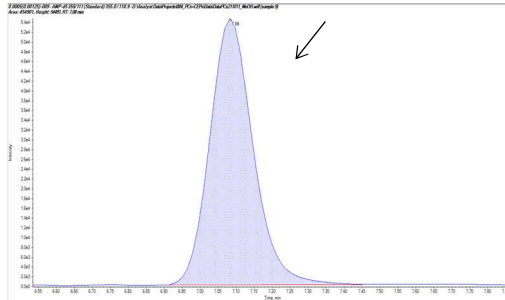
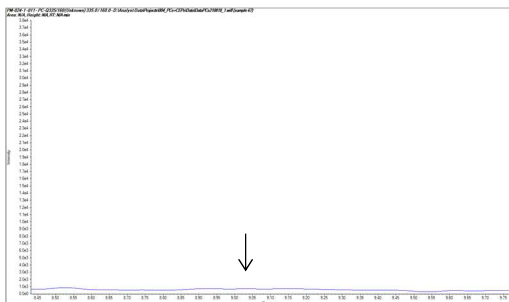
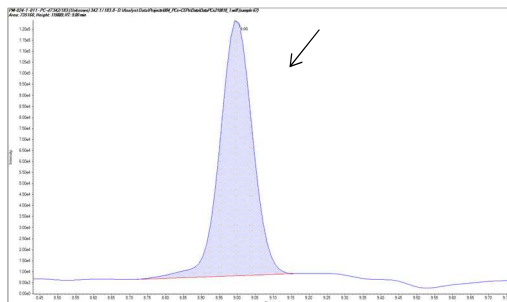


図 2-26 アンピシリンの SRM クロマトグラム
(m/z 350.0→105.9)
添加濃度 : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

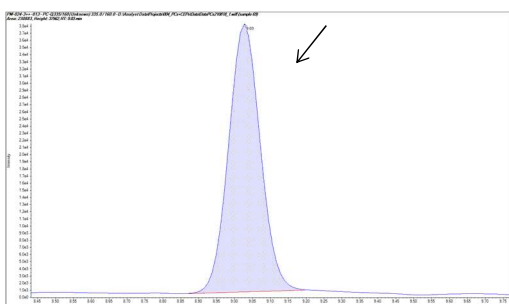
ブランク試料



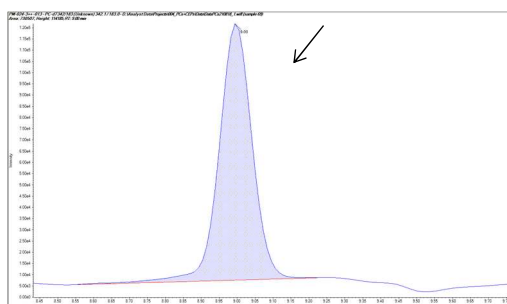
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



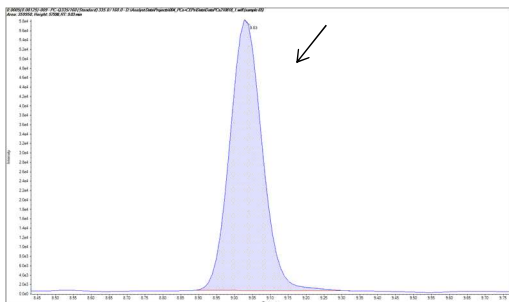
添加試料



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)

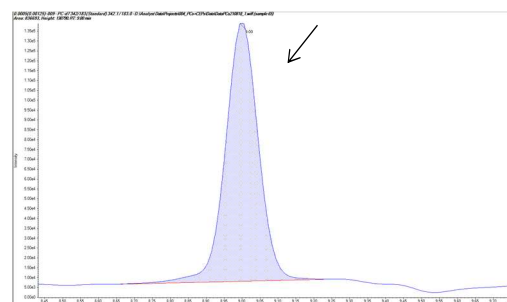
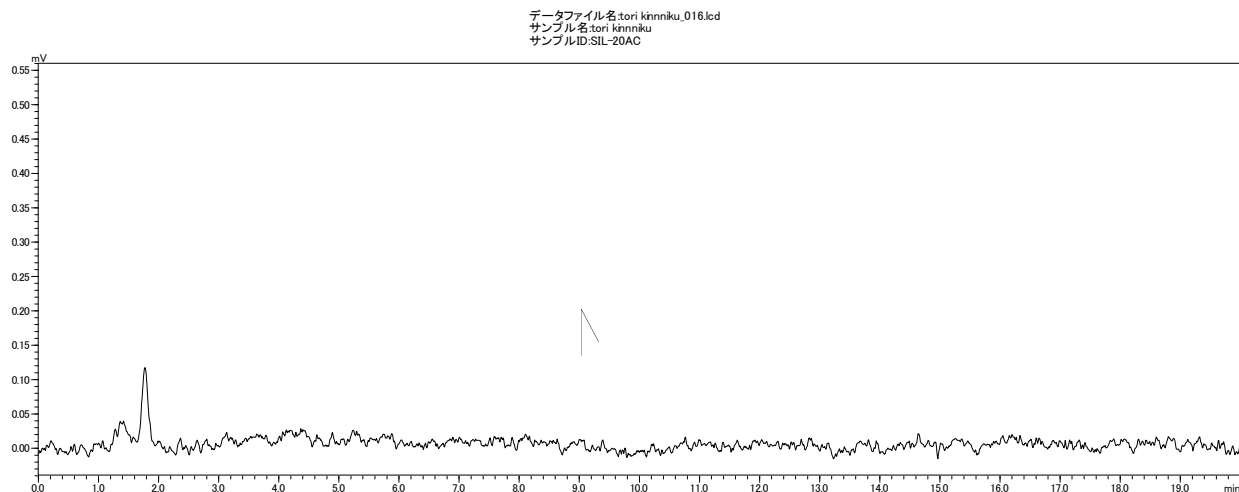


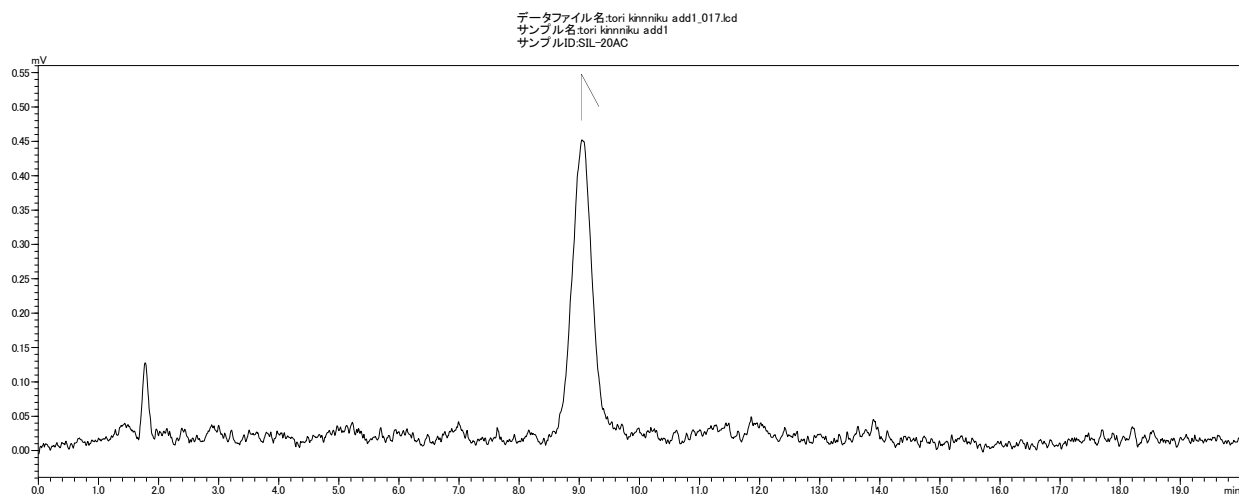
図 2-27 ベンジルペニシリンの SRM クロマトグラム
(m/z 334.9→160.0)

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)

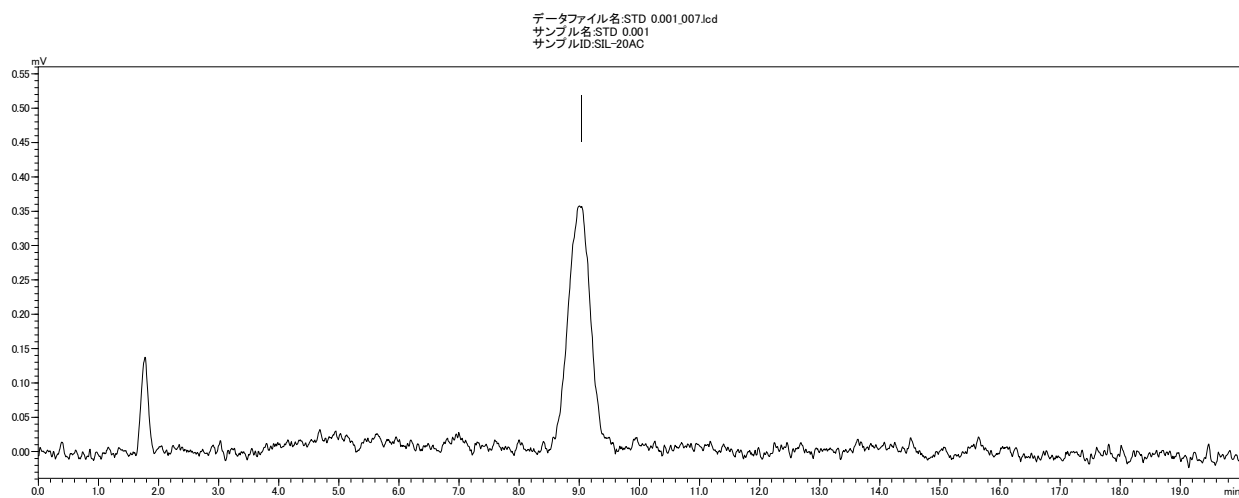
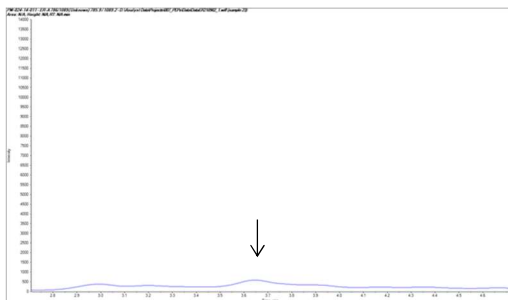


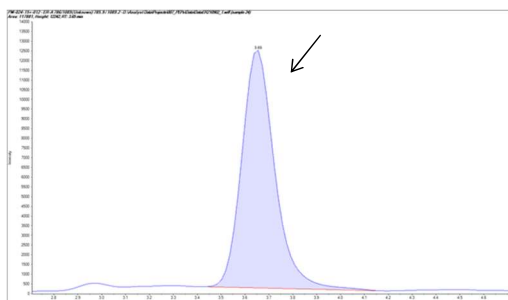
図 2-28 ノシヘプタイトのクロマトグラム

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)

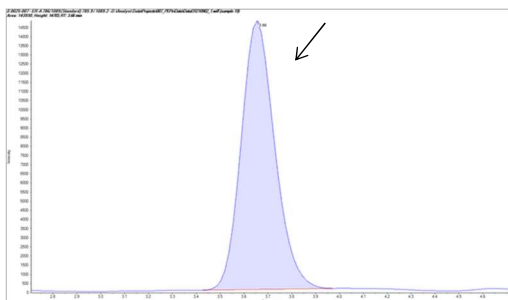


図 2-29 エンラマイシン A の SRM クロマトグラム
(m/z 785.9→1089.2)
添加濃度 : 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$