

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に動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A物質(スチルベン類等)及びB物質(抗菌性物質等)のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてB物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉(可食部位)の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。しかし、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究では、牛の筋肉を対象として13分析法(チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフェニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメリン分析法、HCB分析法、DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH及び γ -HCH分析法、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB分析法)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77.9~112.6%、併行精度1.1~10.8%、室内精度2.3~17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉(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。

研究協力者

飯塚誠一郎 ((一財) 日本食品分析センター)

中村歩 ((一財) 日本食品分析センター)

小杉正樹 ((一財) 日本食品分析センター)

伊佐川聡 ((一財) 日本食品分析センター)

A. 研究目的

EUに動物性食品を輸出するためには、欧州理事会指令96/23/ECに基づき残留物質モニタリング計画を作成し、規則(EU)2017/625に従って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、カルバメート系農薬、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物質がモニタリング部位から検出された場合は、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）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、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究では、B物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を開発又は適用拡大し、確立した分析法について妥当性評価を実施することにより、モニタリングで検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。令和2年度（1年目）は、B物質のうち、牛においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質（抗菌性物質（チルミコシン等の6項目）、駆虫剤（トリクラベンダゾール）、抗コクシジウム剤（モネンシン等の3項目）、ピレスロイド系農薬（ペルメトリン）及び有機塩素系物質（HCB等の15項目））について、牛の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実施した。

B. 研究方法

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

1. 抗菌性物質

(1) チルミコシン試験法

① 試薬・試液

チルミコシン標準品：純度 90.0% (Sigma-Aldrich 製)

メタノール、ヘキサン、リン酸水素二ナトリウ

ム十二水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸：特級（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：LC-MS 用（関東化学製）

ギ酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

クエン酸一水和物、リン酸水素二カリウム：特級（関東化学製）

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム：試験研究用（同仁化学研究所製）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

調製した。

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

② 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

pH 計：F-72（堀場アドバンスドテクノ製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-1）

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

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

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

a. 抽出

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

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

(2) スルファモイルダプソン試験法

① 試薬・試液

スルファモイルダプソン標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、酢酸：

特級（富士フィルム和光純薬製）

メタノール：HPLC 用（富士フィルム和光純薬製）

メタノール、ギ酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

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

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

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

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

アセトニトリル及びギ酸の混液（100：1）：アセトニトリル 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
水及び酢酸の混液（1000：0.1）：水 1000 mL 及び酢酸 100 μL を混合した。

標準原液：スルファモイルダプソン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール（HPLC 用）で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

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

② 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-2）

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

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-2）

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

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、

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

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法

① 試薬・試液

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

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

アセトニトリル、メタノール: HPLC 用 (関東化学製)

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

クエン酸一水和物: 特級 (富士フイルム和光純薬製)

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/6 mL、ジーエルサイエンス製)

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

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

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

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

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

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

ールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で希釈して 1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

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

遠心分離機 : H-107DF (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-3)

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

③ 定量

4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0015、0.005、0.01 及び 0.015 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 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 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-3)

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

a. 抽出

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

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

(4) エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 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 92.3% (富士フィルム和光純薬製)

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

アセトニトリル：LC-MS 用 (関東化学製)

ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

メタリン酸：鹿特級 (関東化学製)

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

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

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

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

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

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

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

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

とした。

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

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

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

② 装置

ホモジナイザー：BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V (東京理化学器械製)

遠心分離機：H-60R (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-4)

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

③ 定量

エンロフロキサシン標準原液及びシプロフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液 (500:500:1) で希釈して、0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標

準溶液を調製した。この溶液 5 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 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-4)

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

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) 80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、抽出液の上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で定容した。抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 3 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 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。

(5) 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（富士フイルム和光純薬製）

ケイソウ土：セライト 545（関東化学製）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

標準原液：フロルフ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 20 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

オイルバス：THERMO MINDER SH-12（タイテック製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

遠心分離機：H-1000FR（コクサン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-5）

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

③ 定量

フロルフェニコールアミン標準原液を 0.1

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

試料中のフロルフエニコール及び加水分解により代謝物フロルフエ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、フロルフエ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 回繰り返し、100 mL 容の遠心管に受けた。次いで酢酸エチル 20 mL で溶出し、先の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

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

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール試験法

① 試薬・試液

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

トリクラベンダゾールオキシソン標準品 : 純度 98.6% (富士フィルム和光純薬製)

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

アセトニトリル、メタノール : HPLC 用 (関東化学製)

塩酸 : 特級 (小宗化学薬品製)

30%過酸化水素水、水酸化ナトリウム : 特級 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸 : 特級 (関東化学製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis MCX (500 mg/6 mL、Waters 製)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ケト-トリクラベンダゾール標準原液 : トリクラ

ベンダゾールオキソン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

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

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

② 装置

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

遠心分離機：H-80R α （コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

恒温水槽：BF600（ヤマト製）

ブロックヒーター：DTU-1C（タイテック製）

LC-MS/MS（測定条件：表1-6）

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

③ 定量

ケト-トリクラベンダゾール標準原液をアセトニトリル及び水の混液(1:1)で希釈して 0.4、0.8、2、4 及び 8 $\mu\text{g/L}$ の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ケト-トリクラベンダゾールの含量を算出した。換算係数 1.091* を乗じてトリクラベンダゾールの含量を算出した。

* 1.091 = トリクラベンダゾールの分子量

359.66 / ケト-トリクラベンダゾールの分子量 329.57

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-6)

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

a. 加水分解及び抽出

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

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

ラスコに合わせ、酢酸エチルで定容した。

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

b. 酸化反応

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

c. 精製

試験管を放冷した後、反応物を水 10 mL, 酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を用いて遠心管 (ポリプロピレン製) に移し、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。次いで水層に同混液 15 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。有機溶媒層を遠心管に合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をメタノール及び水の混液 (7:3) 4 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管

内を同混液 4 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を 2 回繰り返した。メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

3. 抗コキシジウム剤試験法

(1) サリノマイシン及びモネンシン試験法

① 試薬・試液

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

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

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

酢酸アンモニウム：特級 (関東化学製)

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

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

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

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

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

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

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

② 装置

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

遠心分離機 : H-107DF (コクサン製)

振とう機 : EL (スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表1-7)

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

③ 定量

サリノマイシン標準原液及びモネンシン A

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-7)

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

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) 60 mL を加えた後、ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) 60 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) で定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) に水 15 mL 加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。水及びメタノールの混液 (1 : 1) 10 mL で洗浄した後、メタノー

ル 10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノールで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

(2) トルトラズリル試験法

① 試薬・試液

トルトラズリルスルホン標準品:純度 98.7%(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール:HPLC 用(関東化学製)

酢酸アンモニウム:特級(関東化学製)

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

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

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

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

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

② 装置

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

ロータリーエバポレーター:N-1300 (東京理化器械製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-8)

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

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-8)

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

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した後、ろ紙 (直径 60

mm、GFP、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリルで定容した。抽出液 10 mL (試料 0.25 g 相当)をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 0.5 mL 以下まで濃縮した。

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

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

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン試験法

① 試薬・試液

cis-ペルメトリン標準品：純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

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

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

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

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

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15)：ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

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

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

② 装置

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

遠心分離機：H-107DF (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300 (東京理化学器械製)

GC (測定条件：表1-9)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies

データ処理	ChemStation	Agilent Technologies
-------	-------------	----------------------

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図1-9)

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

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を

綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL（試料 0.5 g 相当）を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター（40℃）で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

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

液（85：15）70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 試験法

① 試薬・試液

HCB 標準品：純度 99.9%（Dr.ehrenstorfer 製）
アセトン、ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用（関東化学製）

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

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

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

② 装置

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

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

GC（測定条件：表 1-10）

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

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要（図1-10）

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

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 50 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1

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

b. 精製

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

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

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

① 試薬・試液

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

p,p'-DDE 標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDD 標準品：純度 99.5% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDT 標準品：純度 99.4% (Dr.Ehrenstorfer 製)
アルドリン標準品：純度 98.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

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

エンドリン標準品：純度 99.8% (AccuStandard 製)

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

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

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

α -HCH 標準品：純度 99.5% (AccuStandard 製)

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

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

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

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

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

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

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

標準原液：*o,p'*-DDT 約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

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

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

② 装置

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

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

GC（測定条件：表1-11）

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

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-11）

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

a. 抽出

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

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

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界値濃度 (10 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。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル試験法

① 試薬・試液

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

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

cis-ノナクロル標準品：純度 100% (AccuStandard 製)

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

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

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用（関東化学製）

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

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル
500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振
とう後静置してアセトニトリル層を分取した。
ヘキサン及びジエチルエーテルの混液（85：
15）：ヘキサン 850 mL とジエチルエーテル 150
mL を混合した。

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

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

② 装置

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

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化
器械製）

GC（測定条件：表1-12）

装置	型式	メーカー
----	----	------

GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

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

④ 添加試料の調製

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

⑤ 試験溶液の調製

概要（図1-12）

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

a. 抽出

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

1分間撈拌した。

2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン50 mLを加え5分間振とうし、2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を200 mL容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液20 mL (試料0.5 g相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム10 g、水200 mL及びヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン50 mLを加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約50 gをのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン20 mLで洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (40°C) で約5 mLまで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン15 mL及びヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を2回繰り返した。全アセトニトリル層を先のなす形フ

ラスコに合わせ、ロータリーエ

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

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィ用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑦ 妥当性評価試験

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

(4) PCB 試験法

① 分析対象化合物

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

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

② 試料

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

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

③ 試薬・試液

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

MBP-D7 標準溶液 ($[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB28、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB52、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB101、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB138、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB153 及び $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB180 各 5 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

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

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

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

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

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

エタノール、ヘキサン：ダイオキシン類分析用 (富士フイルム和光純薬製)

デカン：鹿特級 (関東化学製)

水酸化カリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

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

1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液：水酸化カリウム 56.11 g を量り、エタノールを加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

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

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

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

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

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

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

④ 装置

還流装置：GA-13S (いすゞ製作所製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：R-200 (柴田科学製)

GC-MS（測定条件：表 1-13）

装置	型式	メーカー
MS	Agilent 5973N	Agilent Technologies
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies

⑤ 定量（図 1-13）

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

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

PCB138	[¹³ C ₁₂] PCB138
PCB153	[¹³ C ₁₂] PCB153
PCB180	[¹³ C ₁₂] PCB180

⑥ 添加試料の調製

0.6 µg/kg 添加（6 種 PCB 合計として 20 ng/g fat 相当）：試料 1 g に添加用標準溶液（10 µg/L）60 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

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

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

⑦ 試験溶液の調製

概要

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

a. 抽出

試料 1 g を 300 mL 容のなす形フラスコに量り取り、100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加（最終濃度 10 µg/L）した後、1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約

90 °Cの水浴で 1 時間加熱還流した。なす形フラスコを室温に戻した後、ヘキサン 100 mL を加えた。綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移し、振とう機で 10 分間振とうした。ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター (40 °C) で約 5 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

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

⑧ マトリックス添加標準溶液の調製

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

⑨ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値の 0.5 倍、1 倍及び 1.5 倍相当 (各 0.6、1.2 及び 1.8 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。1 日 1 回 (6 併行)、3

日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

1. 抗菌性物質

(1) 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)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-1 に示した。真度の目標値 (70~120%) 及び精度の目標値 (併行精度 15%未満、室内精度 20%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025~0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.992$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

(2) スルファモイルダプソン試験法

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2-2）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-2に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（平成 17 年食安発第 0124001 号）「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法

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 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.015 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした 4-*epi*-クロルテトラサイクリンについては定量限界 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4-*epi*-オキシテトラサイクリンについては定量限界 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法（畜水産物）

(4) エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）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 及び図 2-6）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-5 及び表 2-6 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.995$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（平成 17 年食安発第 0124001 号）「エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）」

(5) 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2-7）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-7に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度10%未満、室内精度15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 フロルフェニコール試験法（畜水産物）

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール試験法

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 2-8）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-8 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 10%未満、室内精度 15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.4～8 $\mu\text{g}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象

とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 トリクラベンダゾール試験法（畜産物）

3. 抗コキシジウム剤試験法

(1) サリノマイシン及びモネンシン試験法

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 2-9 及び図 2-10）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-9 及び表 2-10 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.05～1 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 2 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

(2) トルトラズリル試験法

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 2-11）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-11 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン試験法

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 2-12）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-12 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.005～0.06 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。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 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 2-13)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-13 に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度 25%未満、室内精度 30%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.02 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得ら

れたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

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

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-14 ～表 2-26 に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度 25%未満、室内精度 30%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル試験法

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2-15）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-27～表2-30に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.991$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(4) PCB 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 2-16～図 2-20）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-31～表 2-36 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 30%未満、室内精度 35%未満、1.2 及び 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いた $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB28、

$[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB52、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB101、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB138、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB153 及び $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB180 の回収率はいずれも 50%以上 120%未満であった。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0～50 $\mu\text{g}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

- 1) 日本薬学会編「衛生試験法・注解」2010
- 2) COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012

D. 結論

牛の筋肉を対象としてB物質の分析法(13分析法)を確立し、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、牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉(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

Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S.,
Akiyama H. Determination of 8 α -hydroxymutilin as
a marker residue for tiamulin in swine tissue by
liquid chromatography–tandem mass spectrometry.
Food Analytical Methods (印刷中)

2. 学会発表

志田（齊藤）静夏、柏原 奈央、根本 了、穉山
浩. 畜産物中のチアムリン試験法の開発. 第 57
回全国衛生化学技術協議会年会、令和 2 年 11 月
9 日～令和 2 年 11 月 10 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1-1 測定条件 (チルミコシン試験法)

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)	0.3																													
注入量 (μ L)	2																													
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																													
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液 (1000 : 0.5) B液 : アセトニトリル及びギ酸の混液 (1000 : 0.5)																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.01</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	2.0	95	5	2.01	80	20	8.0	50	50	8.01	10	90	11.0	10	90	11.01	95	5	20.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	95	5																												
2.0	95	5																												
2.01	80	20																												
8.0	50	50																												
8.01	10	90																												
11.0	10	90																												
11.01	95	5																												
20.0	95	5																												
MS 条件																														
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	500																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)	435.4 \rightarrow 174.2 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 35 (eV)]																													
定性イオン (m/z)	435.4 \rightarrow 143.0 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 27 (eV)]																													
保持時間 (min)	4.8																													

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えホモジナイズ

ヘキサン洗浄

↓ ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層 10 mL 分取

pH 調整

↓ リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加え pH 8.0 を確認

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

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

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上清を注入

↓ 水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-1 チルミコシン試験法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件 (スルファモイルダプソン試験法)

LC 条件																								
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.35																							
注入量 (μ L)	5																							
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																							
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (1000 : 0.1) B液 : メタノール (LC-MS用)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.61</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.9	70	30	5.71	10	90	7.60	10	90	7.61	95	5	10.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	95	5																						
1.9	70	30																						
5.71	10	90																						
7.60	10	90																						
7.61	95	5																						
10.0	95	5																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	650																							
ネブライザーガス	空気、60 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	328.1 \rightarrow 108.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	328.1 \rightarrow 80.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 71 (eV)]																							
保持時間 (min)	3.0																							

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層を綿栓ろ過

↓ ギ酸 1 mL を加えてアセトニトリルで 100 mL に定容

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 5 mL で予備洗浄

↓ 抽出液 10 mL を注入 (全溶出液を採取)

↓ アセトニトリル及びギ酸 (100 : 1) 混液 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ 水で 20 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-2 スルファモイルダプソン試験法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件 (4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法)

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	SRM				
イオン化モード	ESI(+)				
インターフェイス電圧(kV)	4.0				
インターフェイス温度(°C)	300				
脱溶媒管温度(°C)	250				
ヒートブロック温度(°C)	400				
ネブライザーガス	窒素、3 L/hr				
ドライイングガス	窒素、10 L/hr				
ヒーティングガス	空気、10 L/hr				
コリジョンガス	アルゴン				
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)					
	プリカーサーイオン	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)
4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	21
4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	28	443.2	14
保持時間(min)	4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン 4.5、4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン 4.0				

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL を加え、

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)]

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液 (4:1) で洗浄

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採る)

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件 (エンロフロキサシン試験法)

LC 条件																														
カラム	ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm : Waters 製)																													
移動相流速 (mL/min)	0.35																													
注入量 (μL)	5																													
カラム温度 (°C)	40																													
移動相	A液 : 1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3.8</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3.81</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.7</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	1.9	80	20	3.8	50	50	3.81	10	90	5.7	10	90	5.71	90	10	9.5	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	90	10																												
1.9	80	20																												
3.8	50	50																												
3.81	10	90																												
5.7	10	90																												
5.71	90	10																												
9.5	90	10																												
MS 条件																														
測定モード	SRM																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 (°C)	600																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																														
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																									
			(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																								
エンロフロキサシン	360.1	84	316.1	24	245.1	37																								
シプロフロキサシン	332.2	86	314.2	25	231.1	49																								

保持時間 (min)	エンロフロキサシン 3.4、シプロフロキサシン 3.1
------------	-----------------------------

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で 100 mL に定容

↓ 抽出液を 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 3 mL まで濃縮

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

↓ メタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及び塩酸の混液 (500 : 500 : 1) 10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-4 エンロフロキサシン試験法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件 (フロルフェニコール試験法)

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> <tr> <td>24.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	100	0	5.0	60	40	7.0	5	95	17.0	5	95	17.1	100	0	24.0	100	0
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	100	0																						
5.0	60	40																						
7.0	5	95																						
17.0	5	95																						
17.1	100	0																						
24.0	100	0																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 ($^{\circ}$ 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 1-5 フロルフェニコール試験法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件（トリクラベンダゾール試験法）

LC 条件												
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)											
移動相流速 (mL/min)	0.35											
注入量 (μ L)	1											
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40											
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (10000 : 1) B液 : メタノール											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	30	70	3.5	30	70
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)										
0.0	30	70										
3.5	30	70										
MS 条件												
測定モード	SRM											
イオン化モード	ESI (-)											
キャピラリ電圧 (V)	-500											
ソース温度 ($^{\circ}$ C)	150											
脱溶媒温度 ($^{\circ}$ C)	500											
コーンガス	窒素、150 L/hr											
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr											
コリジョンガス	アルゴン											
定量イオン (m/z)	327.0 \rightarrow 182.0 [コーン電圧 : -40 (V)、コリジョンエネルギー : -25 (eV)]											
定性イオン (m/z)	327.0 \rightarrow 146.0 [コーン電圧 : -40 (V)、コリジョンエネルギー : -35 (eV)]											
保持時間 (min)	2.3											

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

- ↓ 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え 100°C で 3 時間加熱
- ↓ 5 mol/L 塩酸 12 mL、メタノール 5 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え 10 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル 40 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 酢酸エチル層を合わせ、酢酸エチルで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 6 mL 分取

濃縮 (溶媒除去)

↓

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ 残留物にヘキサン 10 mL を加えて溶解
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をエタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) 10 mL に溶解

酸化反応

- ↓ 5 mL を分取し、過酸化水素水 25 μ L を加え 90°C で 16 時間加熱

酢酸エチル及びヘキサン混液転溶

- ↓ 水 10 mL、酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採り、先の有機溶媒層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノール及び水の混液 (7 : 3) 4 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 全量注入
- ↓ メタノール及び水の混液 (7 : 3) 8 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液（1：1）3 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-6 トリクラベンダゾール試験法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件 (サリノマイシン及びモネンシン試験法)

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)	4				
カラム温度(°C)	40				
移動相	A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: メタノール				
グラジエント条件	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)		
	0.00	40	60		
	6.00	5	95		
	15.00	5	95		
	15.01	40	60		
	18.00	40	60		
MS 条件					
測定モード	SRM				
イオン化モード	ESI(+)				
イオンスプレー電圧(V)	4500				
ヒーター温度(°C)	500				
ネブライザーガス	空気、70 psi				
ターボガス	空気、70 psi				
コリジョンガス	窒素				
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)					
		プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)
サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27
	(定性用)	773.4	431.3	1	67
モネンシン A	(定量用)	688.3	635.5	1	27
	(定性用)	693.3	675.3	1	51
保持時間(min)	サリノマイシン 9.7、モネンシン A 9.0				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ アセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリル及び水の混液(9:1)で 200 mL に定容

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

- ↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL に水 15 mL を加えて注入
- ↓ 水及びメタノールの混液(1:1)10 mL で洗淨
- ↓ メタノール 10 mL で溶出(全溶出液を採る)
- ↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-7 サリノマイシン及びモネンシン試験法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件（トルトラズリル試験法）

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 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.0	40	60	
	7.0	40	60	
MS 条件				
測定モード	SRM			
イオン化モード	ESI (-)			
イオンスプレー電圧 (V)	-4500			
ヒーター温度 (°C)	500			
ネブライザーガス	空気、70 psi			
ターボガス	空気、70 psi			
コリジョンガス	窒素			
定量イオン (m/z)	456.0→42.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -62 (eV)]			
定性イオン (m/z)	456.0→399.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -14 (eV)]			
保持時間 (min)	3.9			

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトニトリル 100 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 0.5 mL まで濃縮

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1000 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液にアセトニトリル 3 mL 及び水 7 mL を加えて注入

↓ アセトニトリル 5 mL で溶出 (全溶出液を採る)

↓ アセトニトリルで 5 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-8 トルトラズリル試験法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件 (ペルメトリン試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m :Agilent Technologies 製)
カラム温度(°C)	80°C (2 min) – 30°C/min – 190°C – 3.6°C/min – 280°C (5 min)
注入口温度(°C)	250
検出器温度(°C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	<i>cis</i> -ペルメトリン 23.8、 <i>trans</i> -ペルメトリン 24.4

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

- ↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ ヘキサン 15 mL
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR(粒径 150~250 μm)、
- ↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解

試験溶液



GC-ECD

図 1-9 ペルメトリン試験法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件 (HCB 試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度($^{\circ}$ C)	70 $^{\circ}$ C(2 min)–20 $^{\circ}$ C/min–280 $^{\circ}$ C(10 min)
注入口温度($^{\circ}$ C)	250
検出器温度($^{\circ}$ C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	9.4

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ アセトン 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 20 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 10 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μ m) 、
- ↓ 10 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム 2 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン 90 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃 縮

- ↓ 約 2 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 5 mL に定容

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-10 HCB 試験法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件 (DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) - 30°C/min - 190°C - 3.6°C/min - 280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	8.0 (α -HCH) 8.8 (γ -HCH) 9.2 (ヘプタクロル) 9.8 (アルドリン) 10.5 (β -HCH) 11.6 (<i>cis</i> -ヘプタクロルエポキシド) 11.7 (<i>trans</i> -ヘプタクロルエポキシド) 13.1 (<i>p,p'</i> -DDE) 13.6 (ディルドリン) 14.3 (エンドリン) 14.7 (<i>o,p'</i> -DDT) 15.9 (<i>p,p'</i> -DDD) 16.5 (<i>p,p'</i> -DDT)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、

↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]

↓ 濃縮液を注入

↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-11 DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件 (クロルデン及びノナクロル試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) - 30°C/min - 190°C - 3.6°C/min - 280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	12.6 (<i>trans</i> -クロルデン) 12.8 (<i>cis</i> -クロルデン) 12.9 (<i>trans</i> -ノナクロル) 16.1 (<i>cis</i> -ノナクロル)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、

↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]

↓ 濃縮液を注入

↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-12 クロルデン及びビノナクロル試験法の分析法フローチャート

表 1-13 測定条件 (PCB 試験法)

GC 条件		
カラム	Fused Silica HT8-PCB (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 0.25 μm : 関東化学製)	
カラム温度 (°C)	100°C (1 min) -20°C/min-180°C (0 min) -5°C/min-300°C (0 min)	
注入口温度 (°C)	250	
インターフェース温度 (°C)	300	
キャリアーガス	ヘリウム	
キャリアーガス流量 (mL/min)	1	
注入法	スプリットレス法	
注入量 (μL)	1	
MS 条件		
測定モード	SIM	
イオン化法	EI (+)	
イオン化エネルギー (eV)	70	
EM 電圧 (V)	オートチューニングでの設定値	
イオン源温度 (°C)	230	
四重極温度 (°C)	150	
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)		
	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)
PCB28	256.0	258.0
[¹³ C ₁₂] PCB28	268.0	270.0
MBP-19	268.0	270.0
PCB52	289.9	291.9
[¹³ C ₁₂] PCB52	302.0	304.0
MBP-70	302.0	304.0
PCB101	325.9	327.9
[¹³ C ₁₂] PCB101	337.9	339.9
MBP-111	337.9	339.9
PCB138 及び PCB153	359.8	361.8
[¹³ C ₁₂] PCB138 及び [¹³ C ₁₂] PCB153	371.9	373.9
MBP-159	371.9	373.9
PCB180	393.8	395.8
[¹³ C ₁₂] PCB180	405.8	407.8

	MBP-170	405.8	407.8	
保持時間 (min)	PCB28 15.3、PCB52 16.3、PCB101 19.5、PCB138 23.8、 PCB153 22.7、PCB180 26.3			

秤 取

- ↓ 試料 1 g
- ↓ 100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加

抽 出

- ↓ 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流
- ↓ ヘキサン 100 mL を加え、綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移す
- ↓ 10 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 µm) 、
- ↓ 20 g をヘキサンで湿式充填、内径 2.0 cm]
- ↓ 濃縮液を負荷
- ↓ ヘキサン約 2 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をカラムに負荷
- ↓ ヘキサン 200 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 10 mL に定容
- ↓ 10 µg/L 内標準 (シリンジスパイク) 混合溶液 50 µL を入れたスピッツ管に抽出液 2 mL を分取
- ↓ 窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮

試験溶液

- ↓

GC-MS

図 1-13 PCB 試験法の分析法フローチャート

(1) チルミコシン試験法

表2-1 チルミコシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	54.1	57.8	55.6	57.8	55.1	56.3	112.6	1.3	3.1
	2回目	55.1	57.2	54.9	59.2	56.2				

(2) スルファモイルダプソン試験法

表2-2 スルファモイルダプソンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	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	9.3	8.4	7.8	8.4	8.3	8.4	84.2	3.0	8.1
	2回目	9.6	8.1	7.5	8.9	8.0				

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法

表2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	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			
100	1回目	92	87	84	92	82	89	88.7	3.3	4.1
	2回目	91	91	92	90	86				

表2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	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			
100	1回目	111	101	93	116	117	109	109.1	3.4	7.9
	2回目	110	108	102	117	116				

(4) エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 試験法

表2-5 エンロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.0	8.1	8.1	7.3	9.0	8.1	81.2	6.0	9.5
	2回目	7.7	7.4	8.0	7.3	9.2				

表2-6 シプロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.7	9.3	8.2	9.1	8.7	86.5	5.5	6.6
	2回目	8.0	7.9	8.6	8.3	9.5				

(5) フロルフェニコール試験法

表2-7 フロルフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
200	1回目	192	189	191	153	194	185	92.3	7.5	7.8
	2回目	199	178	168	188	194				

(6) トリクラベンダゾール試験法

表2-8 トリクラベンダゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
225	1回目	168	195	206	166	188	184	81.6	2.4	8.2
	2回目	171	189	200	172	180				

(7) サリノマイシン及びモネンシン試験法

表2-9 サリノマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.94	2.02	1.93	2.00	1.91	1.98	99.0	5.7	6.6
	2回目	1.70	2.05	1.96	2.18	2.10				

表2-10 モネンシンAの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.95	1.92	1.74	1.73	1.70	1.75	87.5	6.9	9.0
	2回目	1.69	1.97	1.48	1.69	1.63				

(8) トルトラズリル試験法

表 2-11 トルトラズリルスルホンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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	94	106	103	97	100	100	100.0	1.1	4.9
	2回目	95	107	104	97	98				

(9) ペルメトリン試験法

表2-12 ペルメトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	50.7	50.7	49.5	46.0	53.4	49.9	99.9	6.4	8.1
	2回目	55.3	42.7	53.0	46.0	51.9				

(10) HCB 試験法

表2-13 HCB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			
5	1回目	4.71	3.77	4.17	4.40	4.60	4.41	88.1	6.8	10.7
	2回目	4.68	3.93	4.68	3.91	5.21				

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

表 2-14 o,p' -DDT 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	9.0	8.3	8.8	10.0	13.1	9.9	98.6	10.8	17.6
	2回目	10.2	7.9	8.7	12.0	10.7				

表 2-15 p,p' -DDE の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	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	8.4	8.9	8.1	9.2	8.8	9.0	89.9	6.8	8.5
	2回目	9.3	8.6	8.2	10.5	9.9				

表 2-16 p,p' -DDD の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	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	9.6	9.4	8.4	9.1	9.0	9.4	93.9	8.6	10.8
	2回目	10.5	9.3	7.7	11.2	9.8				

表 2-17 *p,p'*-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	9.4	9.1	10.4	8.6	9.8	97.7	7.8	11.0
	2回目	10.8	8.7	8.7	11.8	10.2				

表 2-18 アルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.6	7.4	7.2	8.0	7.2	7.8	77.9	6.8	8.4
	2回目	8.7	7.2	7.4	9.0	8.0				

表 2-19 ディルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	10.0	8.9	9.8	8.8	9.5	95.2	7.2	7.7
	2回目	10.0	9.0	9.0	11.0	9.8				

表 2-20 エンドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.1	10.0	9.1	9.4	8.1	9.6	95.7	6.4	9.0
	2回目	10.2	9.8	9.0	11.1	9.1				

表 2-21 ヘプタクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	8.8	7.9	8.0	8.3	8.6	85.9	8.7	8.7
	2回目	9.7	8.1	7.9	9.5	9.4				

表 2-22 *cis*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.1	9.5	8.6	9.1	7.6	9.1	90.6	6.9	7.7
	2回目	9.8	8.8	9.1	10.1	8.9				

表 2-23 *trans*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.5	9.1	8.6	9.4	9.0	9.1	91.2	6.6	7.8
	2回目	9.3	8.2	8.9	10.6	9.8				

表 2-24 α -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.2	9.2	8.9	8.7	9.2	92.2	5.8	5.8
	2回目	9.7	8.7	9.3	10.3	9.1				

表 2-25 β -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.2	9.6	9.4	8.8	8.1	9.1	91.3	8.3	8.3
	2回目	9.3	9.0	9.2	10.3	9.4				

表2-26 γ -HCHの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	9.6	9.5	8.7	8.5	9.1	90.6	5.5	5.5
	2回目	8.7	9.0	9.3	9.7	9.3				

(12) *cis*-クロロデン、*trans*-クロロデン、*cis*-ノナクロル及び*trans*-ノナクロル試験法

表2-27 *cis*-クロロデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.2	8.3	9.3	9.3	9.3	92.5	3.0	8.7
	2回目	10.2	8.6	8.9	9.6	9.5				

表2-28 *trans*-クロロデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.6	8.3	8.3	10.3	10.3	9.4	94.0	3.4	8.8
	2回目	9.7	8.9	8.8	9.7	10.2				

表2-29 *cis*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	8.2	8.8	9.4	9.5	9.3	92.8	5.1	8.2
	2回目	9.7	9.1	8.1	9.9	10.3				

表 2-30 *trans*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.1	8.5	8.6	8.3	8.4	83.8	5.1	5.7
	2回目	8.7	8.4	8.0	7.6	8.5				

(13) PCB 試験法

表2-31 PCB28の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.541	0.522	0.566	0.569	0.567	0.555	0.587	97.8	4.6	7.1
	2日目	0.589	0.590	0.555	0.538	0.600	0.619				
	3日目	0.612	0.653	0.597	0.663	0.587	0.639				
1.2	1日目	1.110	1.147	1.115	1.156	1.093	1.106	1.126	93.8	2.3	2.3
	2日目	1.101	1.127	1.183	1.096	1.100	1.118				
	3日目	1.158	1.121	1.133	1.155	1.120	1.137				
1.8	1日目	1.621	1.526	1.553	1.642	1.633	1.615	1.630	90.6	2.7	3.0
	2日目	1.638	1.639	1.576	1.713	1.626	1.629				
	3日目	1.684	1.675	1.647	1.674	1.669	1.581				

表2-32 PCB52の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.614	0.561	0.578	0.590	0.593	0.518	0.605	100.8	5.0	6.0
	2日目	0.635	0.620	0.620	0.572	0.646	0.643				
	3日目	0.590	0.589	0.652	0.653	0.616	0.598				
1.2	1日目	1.085	1.171	1.190	1.093	1.102	1.137	1.145	95.4	3.4	3.5
	2日目	1.104	1.138	1.205	1.175	1.149	1.072				
	3日目	1.148	1.146	1.171	1.204	1.152	1.163				
1.8	1日目	1.727	1.594	1.738	1.769	1.719	1.694	1.741	96.7	3.8	3.8
	2日目	1.698	1.634	1.896	1.775	1.742	1.801				
	3日目	1.718	1.763	1.777	1.776	1.719	1.799				

表 2-33 PCB101 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.619	0.625	0.604	0.569	0.616	0.623	0.610	101.7	3.7	3.7
	2日目	0.635	0.617	0.574	0.612	0.598	0.632				
	3日目	0.587	0.586	0.612	0.639	0.589	0.635				
1.2	1日目	1.129	1.081	1.057	1.115	1.162	1.173	1.157	96.4	3.4	4.5
	2日目	1.186	1.194	1.209	1.217	1.227	1.167				
	3日目	1.170	1.171	1.192	1.151	1.160	1.064				
1.8	1日目	1.616	1.636	1.739	1.716	1.714	1.618	1.700	94.4	4.0	4.2
	2日目	1.690	1.677	1.780	1.793	1.790	1.721				
	3日目	1.581	1.692	1.578	1.806	1.706	1.746				

表2-34 PCB138の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均回収率 (%)	並行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.621	0.645	0.642	0.612	0.618	0.626	0.609	101.5	4.1	6.5
	2日目	0.555	0.532	0.569	0.563	0.551	0.644				
	3日目	0.623	0.615	0.628	0.624	0.648	0.642				
1.2	1日目	1.152	1.283	1.119	1.237	1.233	1.139	1.161	96.8	4.7	5.3
	2日目	1.144	1.077	1.220	1.125	1.105	1.051				
	3日目	1.191	1.103	1.176	1.193	1.174	1.169				
1.8	1日目	1.646	1.675	1.656	1.645	1.637	1.633	1.691	93.9	1.7	2.6
	2日目	1.678	1.690	1.707	1.729	1.708	1.686				
	3日目	1.746	1.738	1.648	1.757	1.702	1.755				

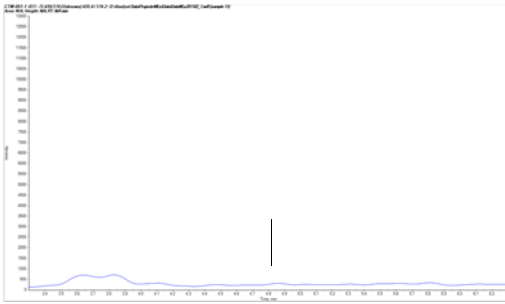
表2-35 PCB153の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均回収率 (%)	並行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.632	0.619	0.621	0.640	0.635	0.574	0.616	102.7	4.1	4.2
	2日目	0.599	0.623	0.639	0.631	0.634	0.633				
	3日目	0.555	0.607	0.603	0.658	0.592	0.601				
1.2	1日目	1.224	1.196	1.123	1.219	1.199	1.128	1.181	98.4	3.4	3.4
	2日目	1.185	1.183	1.255	1.138	1.196	1.142				
	3日目	1.163	1.139	1.223	1.202	1.158	1.185				
1.8	1日目	1.705	1.730	1.716	1.691	1.641	1.738	1.731	96.2	2.0	2.7
	2日目	1.839	1.746	1.745	1.743	1.746	1.811				
	3日目	1.742	1.701	1.742	1.695	1.738	1.693				

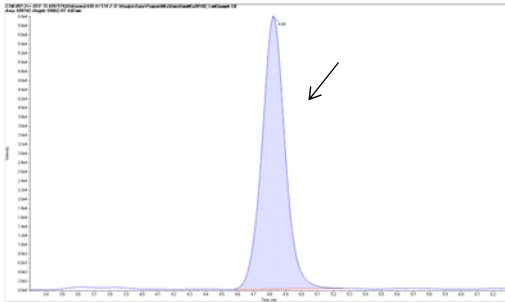
表 2-36 PCB180 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均回収率 (%)	並行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.588	0.519	0.539	0.508	0.523	0.546	0.552	92.0	6.3	7.3
	2日目	0.536	0.530	0.601	0.634	0.619	0.574				
	3日目	0.523	0.539	0.513	0.591	0.507	0.547				
1.2	1日目	1.026	1.093	1.107	1.110	1.099	1.208	1.136	94.7	5.0	6.3
	2日目	1.276	1.240	1.173	1.162	1.092	1.241				
	3日目	1.110	1.061	1.144	1.145	1.114	1.050				
1.8	1日目	1.534	1.684	1.599	1.728	1.559	1.570	1.674	93.0	4.1	5.1
	2日目	1.625	1.699	1.798	1.757	1.826	1.701				
	3日目	1.670	1.682	1.677	1.658	1.768	1.595				

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.0025 mg/L)

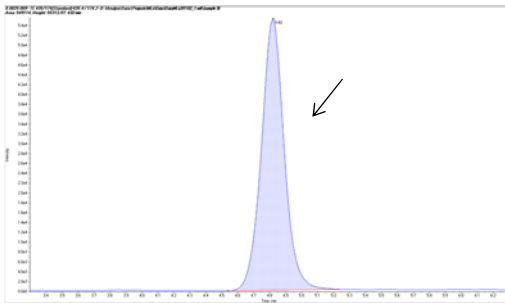
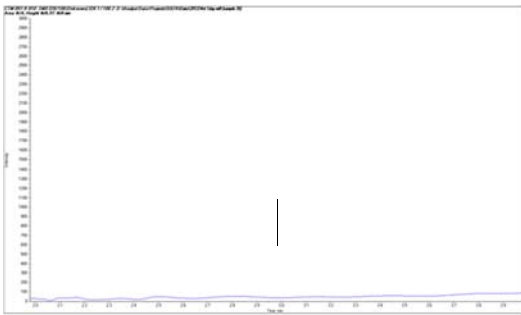
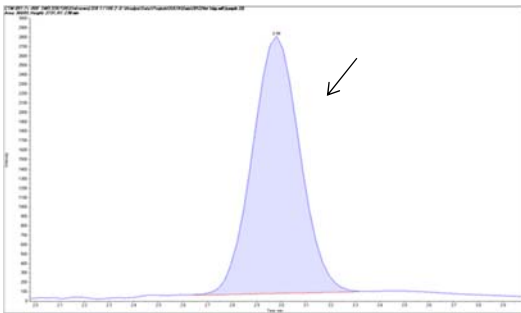


図 2-1 チルミコシンの SRM クロマトグラム
(m/z 435.4 \rightarrow 174.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

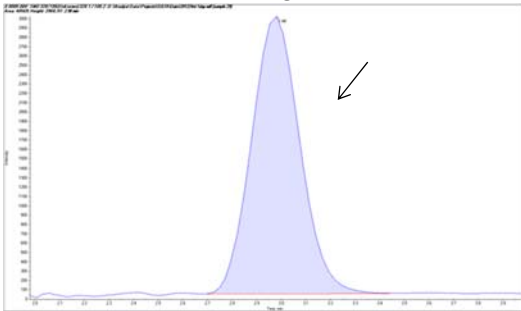
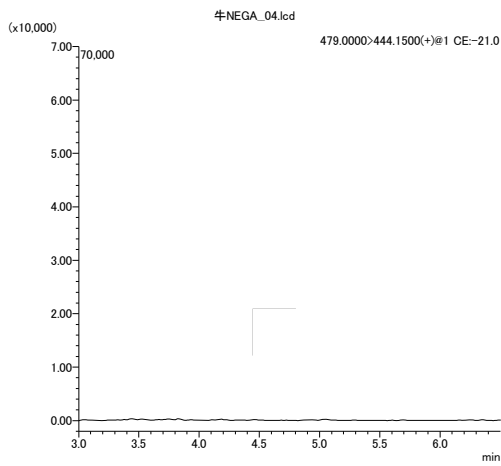


図 2-2 スルファモイルダプソンの SRM クロマトグラム

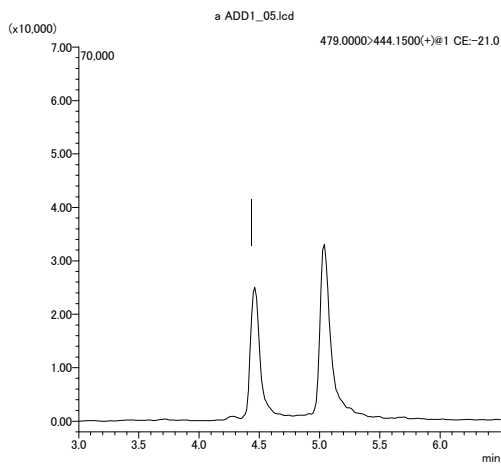
(m/z 328.1 \rightarrow 108.2)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

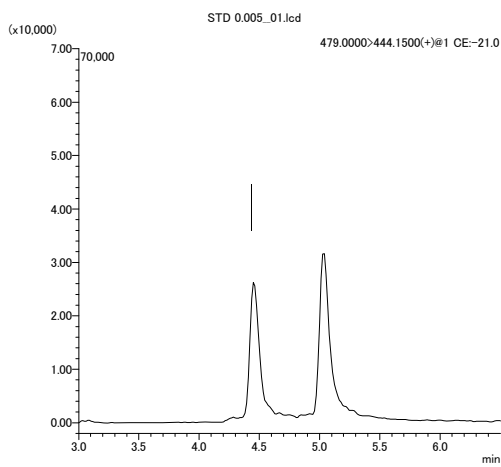
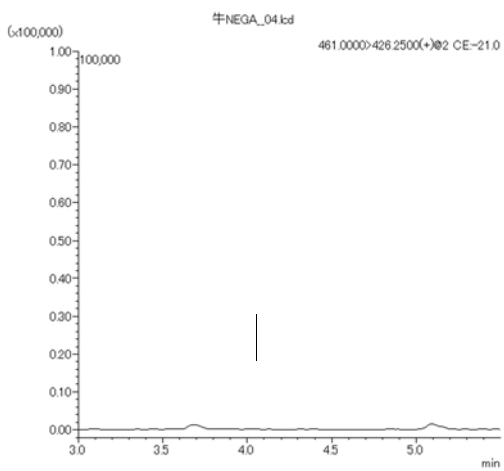
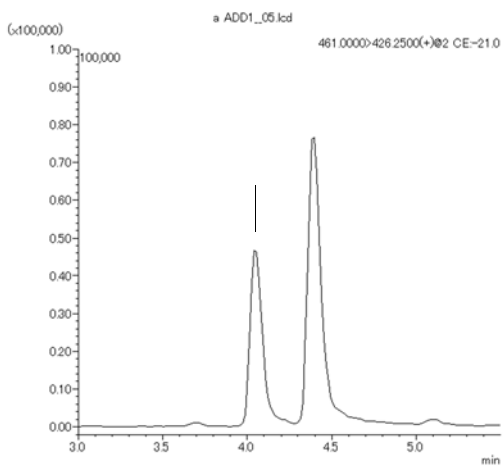


図 2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 479.0→444.1)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

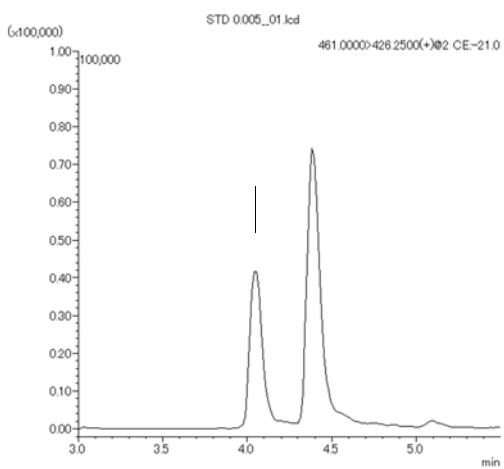


図 2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 461.0→426.2)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

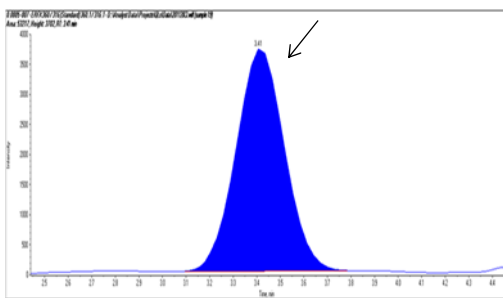
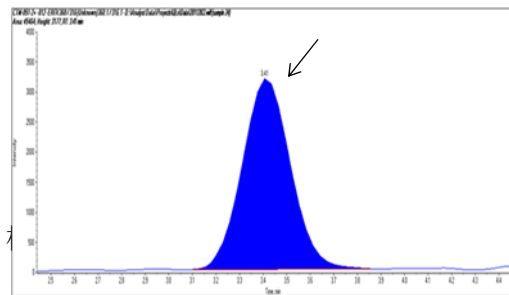
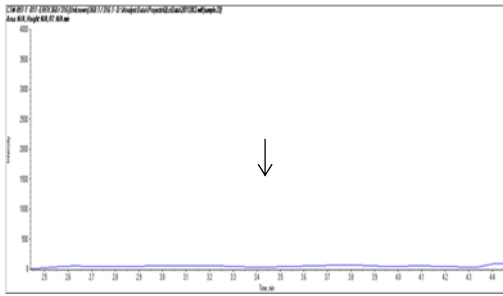


図 2-5 エンロフロキサシンの SRM クロマトグラム
(m/z 360.1→316.1)
添加濃度：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

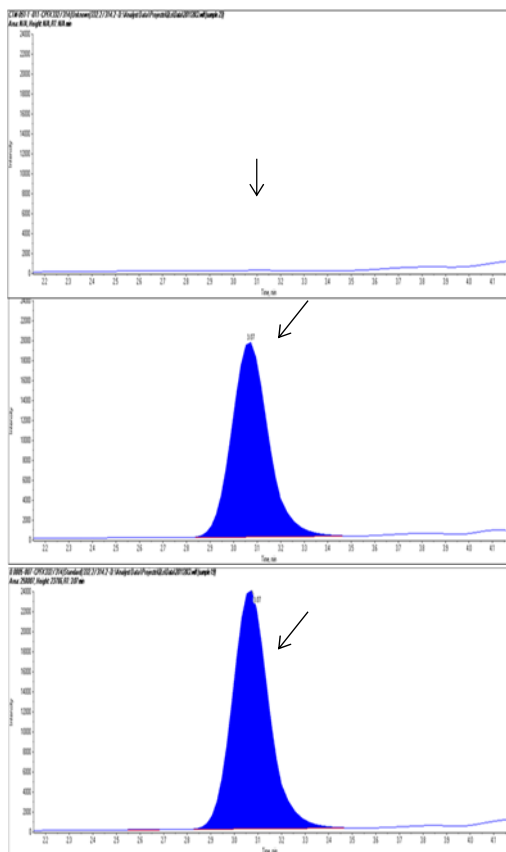
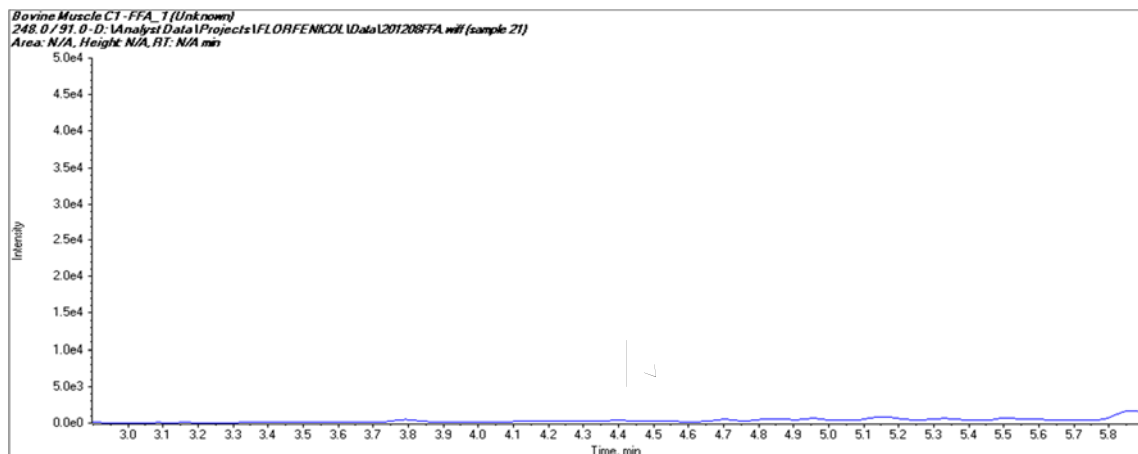
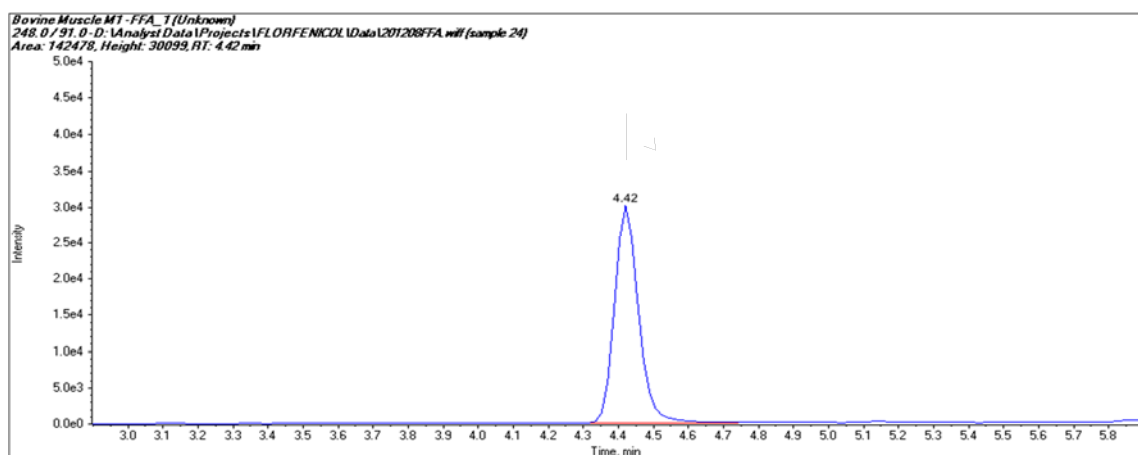


図 2-6 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム
(m/z 332.2→314.2)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

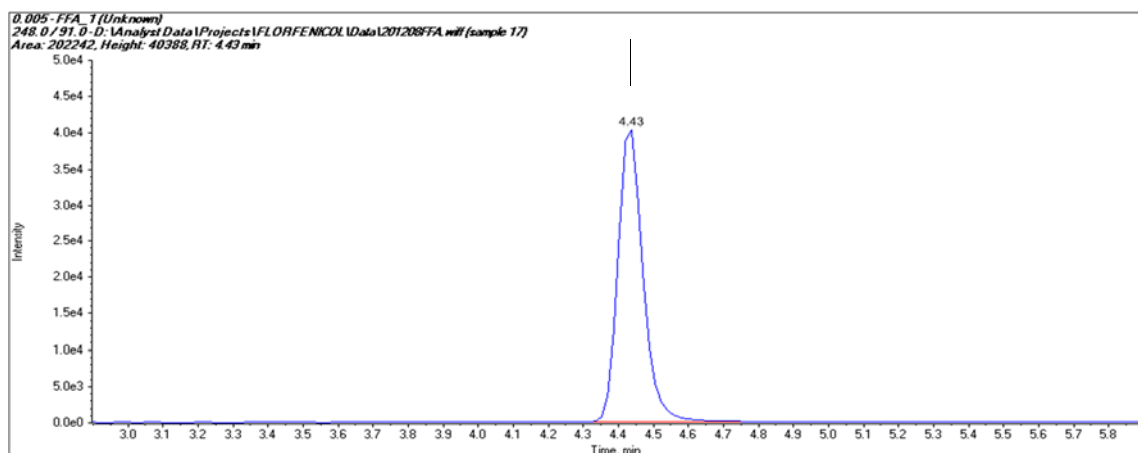
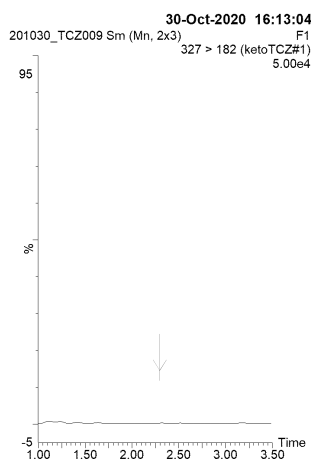


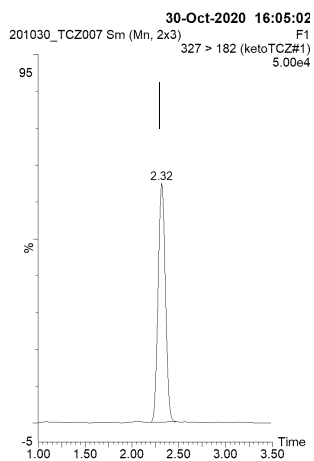
図 2-7 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム
(m/z 248.0→91.0)

添加濃度 : 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



ケト-トリクラベンダゾール標準溶液 (4 µg/L)

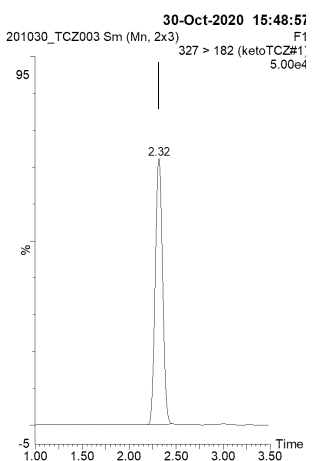
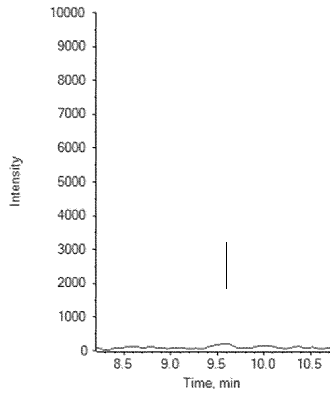


図 2-8 ケト-トリクラベンダゾールの SRM クロマトグラム
(m/z 327.0→182.0)

添加濃度 : 225 µg/kg

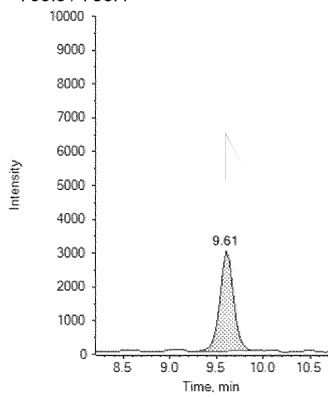
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
768.3 / 733.4



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
768.3 / 733.4



標準溶液(0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
768.3 / 733.4

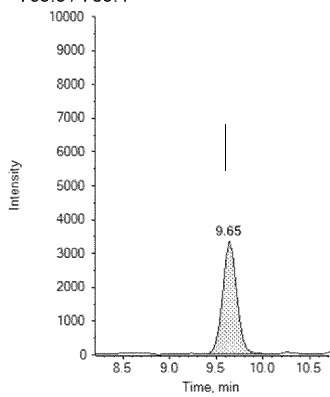


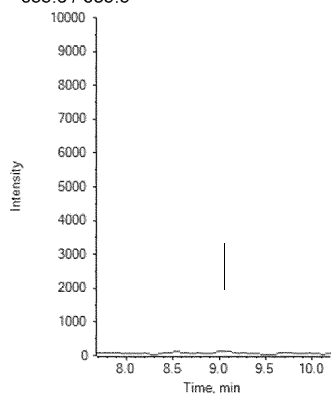
図 2-9 サリノマイシンの SRM クロマトグラム

(m/z 768.3→733.4)

添加濃度: 2 µg/kg

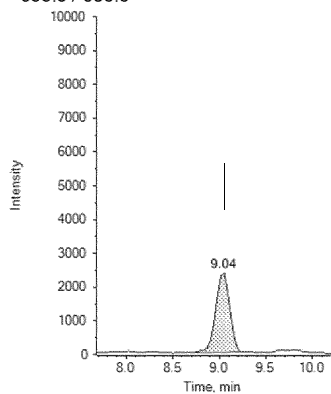
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
688.3 / 635.5



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
688.3 / 635.5



標準溶液 (0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
688.3 / 635.5

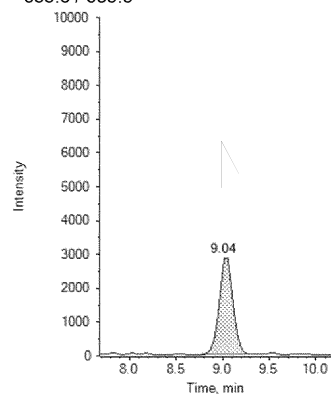


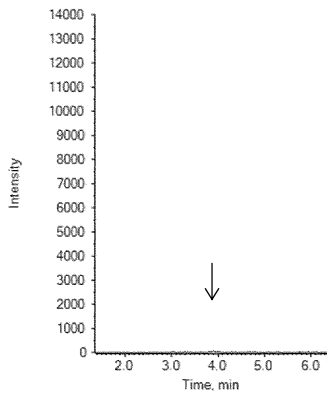
図 2-10 モネンシン A の SRM クロマトグラム

(m/z 688.3→635.5)

添加濃度 : 2 µg/kg

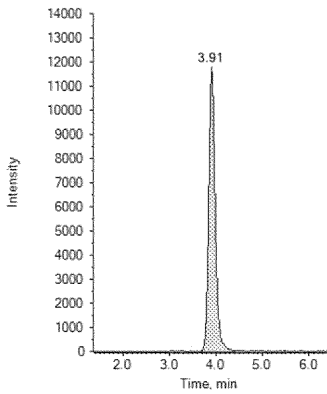
ブランク試料

1/7/2021 4:05:33 PM
456.0 / 42.0



添加試料

1/7/2021 4:13:07 PM
456.0 / 42.0



標準溶液 (0.005 mg/L)

1/7/2021 3:35:18 PM
456.0 / 42.0

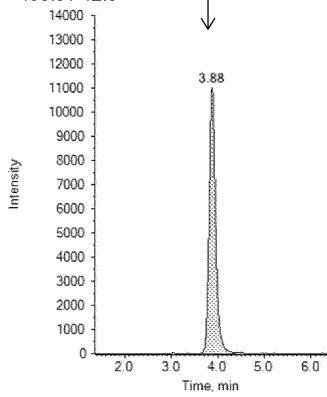
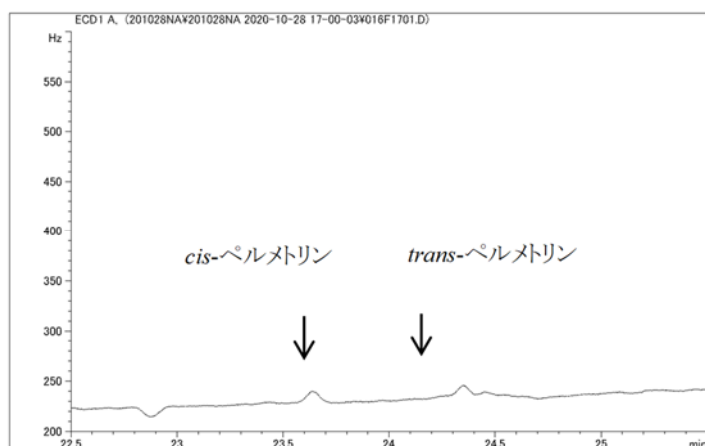
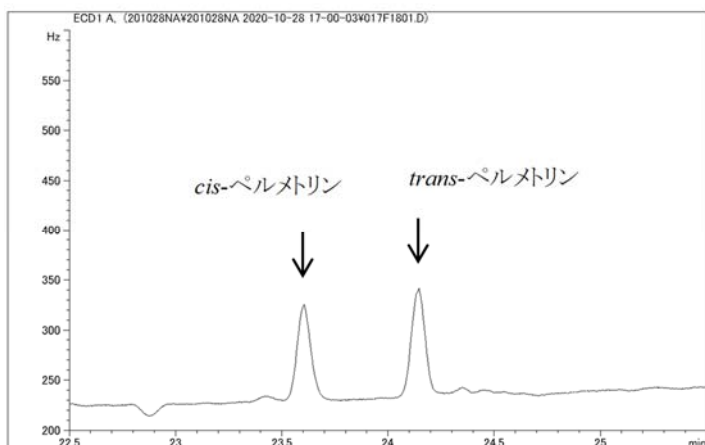


図 2-11 トルトラズリルスルホンの SRM クロマトグラム
(m/z 456.0→42.0)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.01 mg/L)

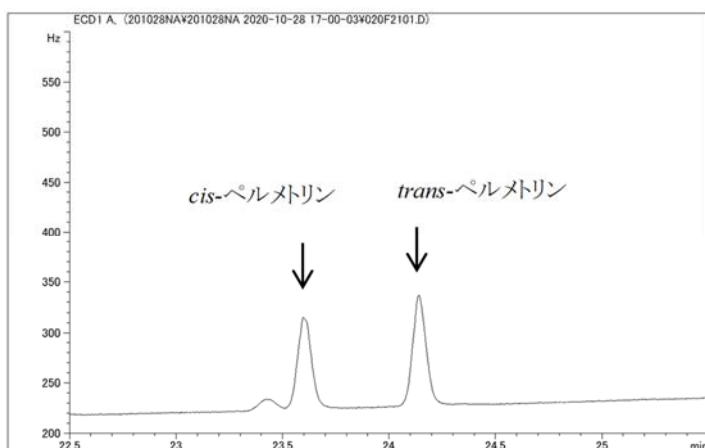
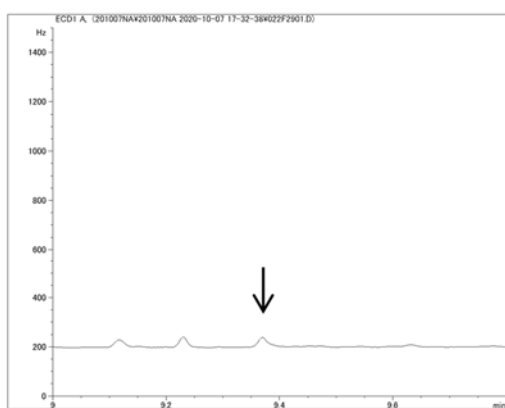
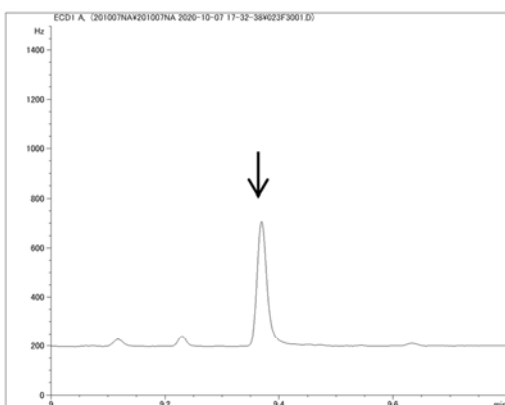


図 2-12 *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのクロマトグラム
添加濃度: 50 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.001 mg/L)

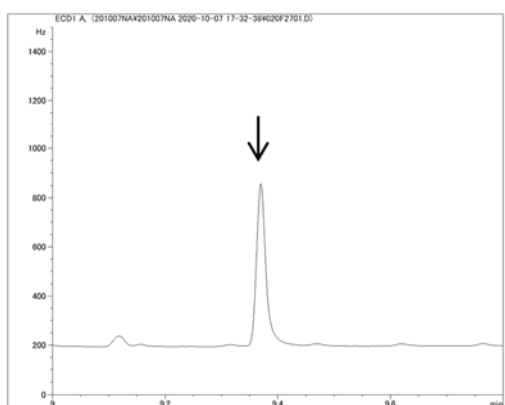
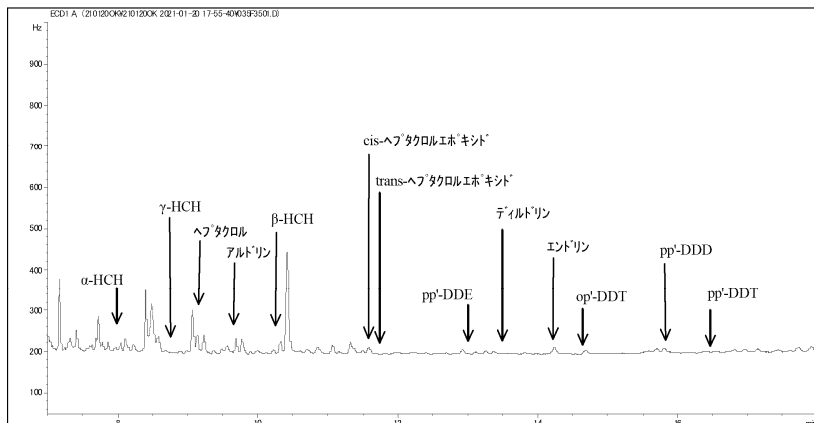


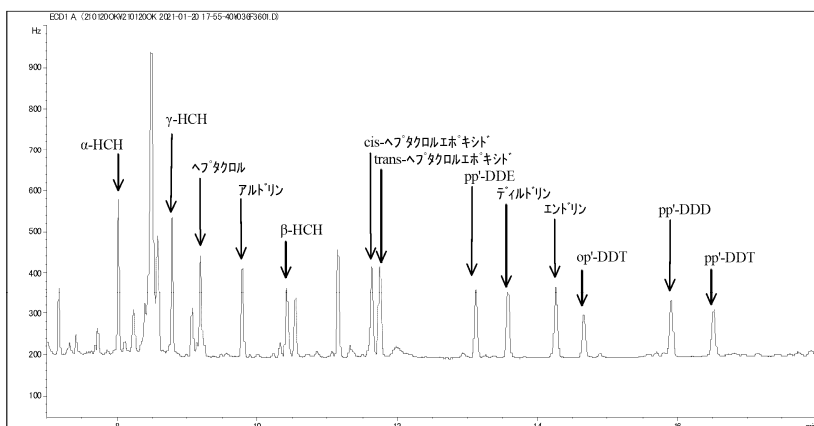
図 2-13 HCB のクロマトグラム

添加濃度： 5 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

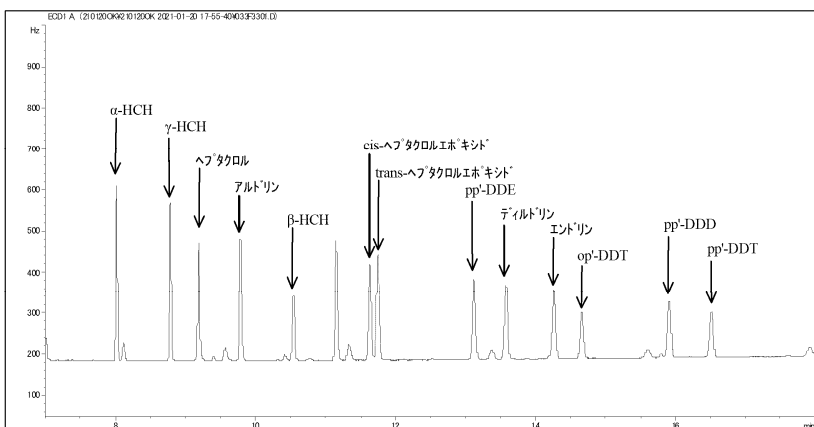
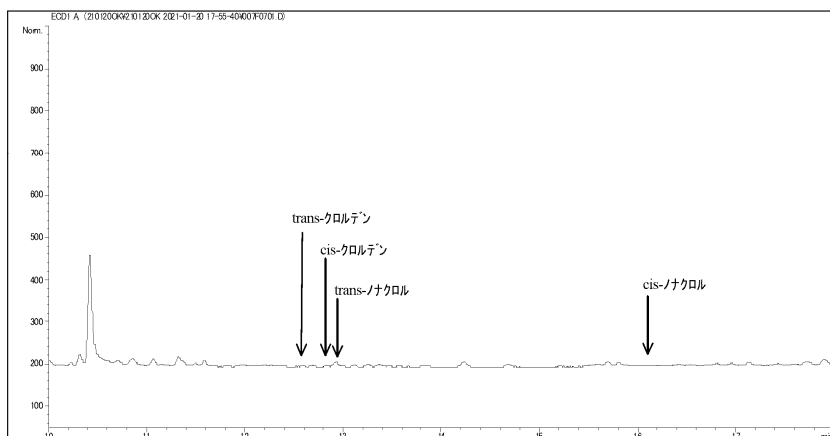


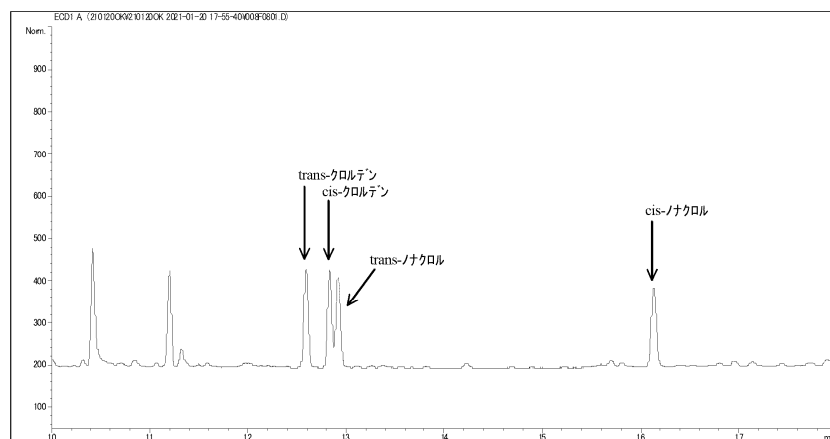
図 2-14 *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、デイルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH のクロマトグラム

添加濃度 : 10 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

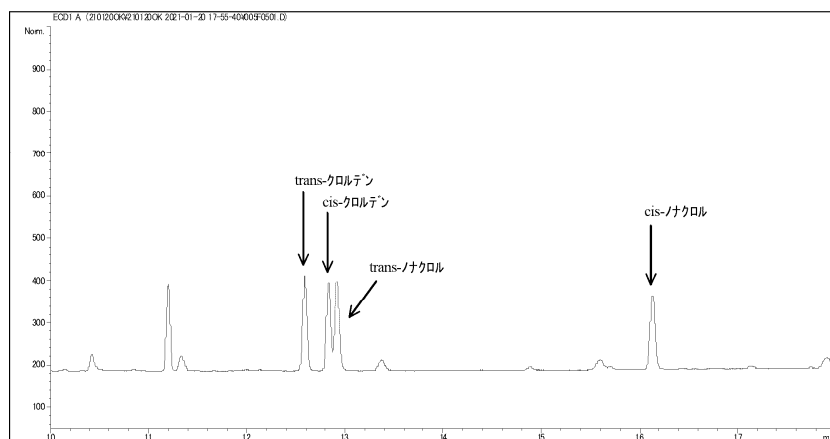
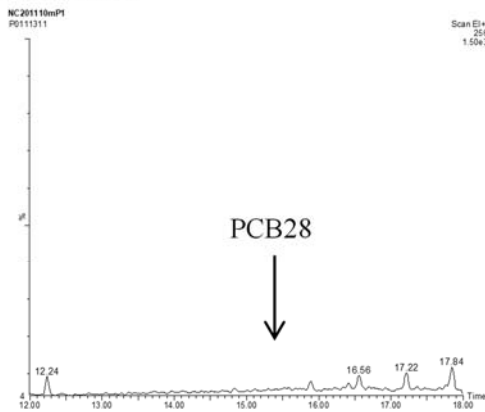
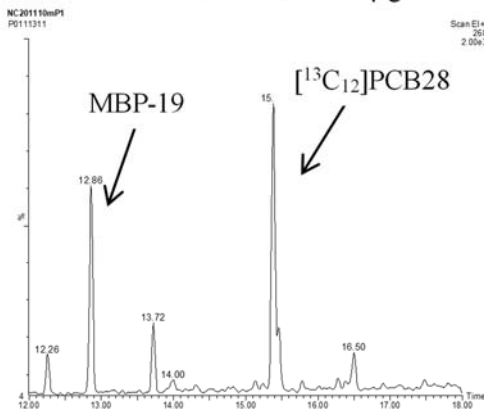


図2-15 *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び*trans*-ノナクロルのクロマトグラム
添加濃度：10 µg/kg

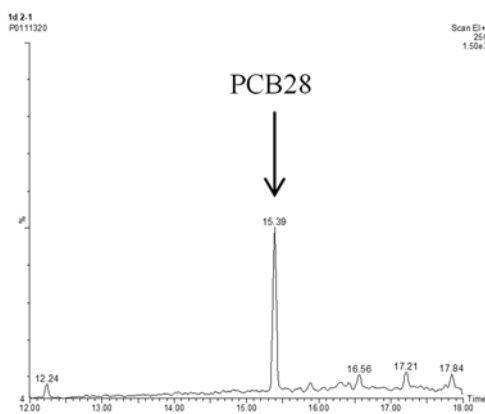
ブランク試料



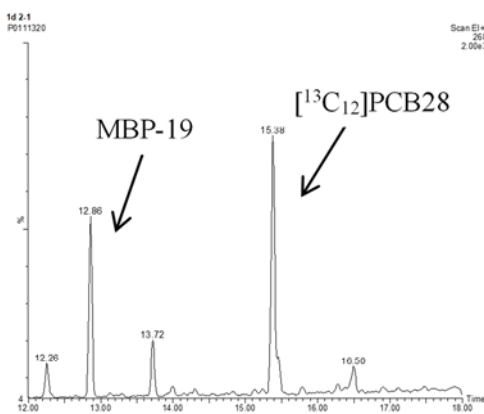
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



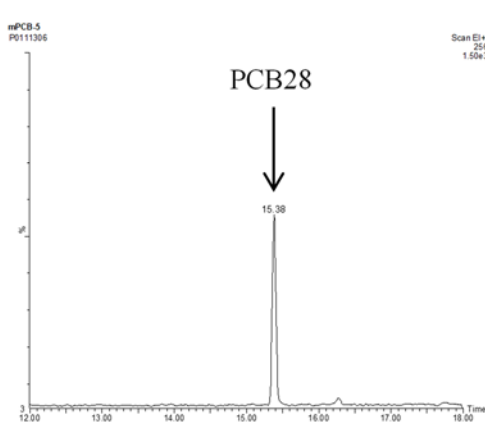
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(5 μg/L)



標準溶液(5 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

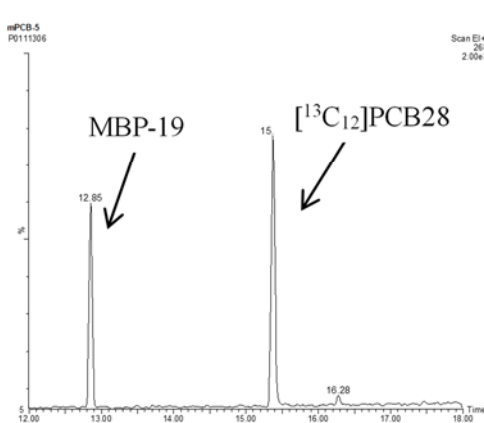


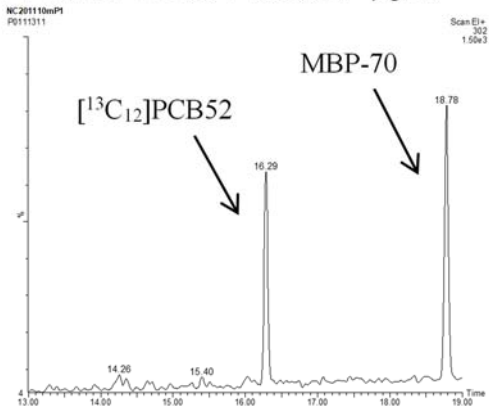
図 2-16 PCB28 の SIM クロマトグラム
(m/z 256.0)

添加濃度: 1.2 μg/kg

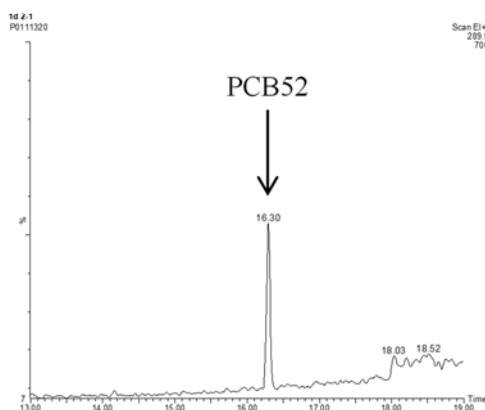
ブランク試料



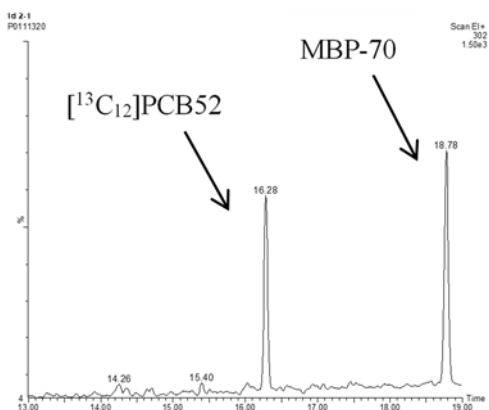
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



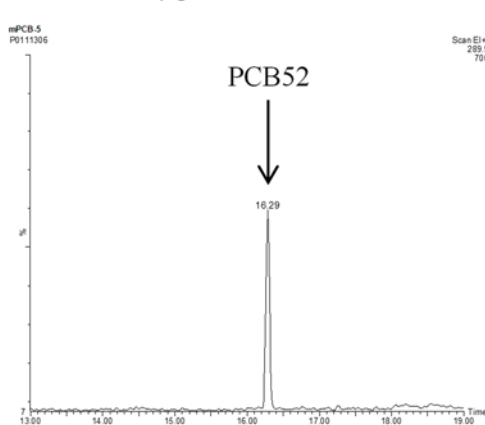
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

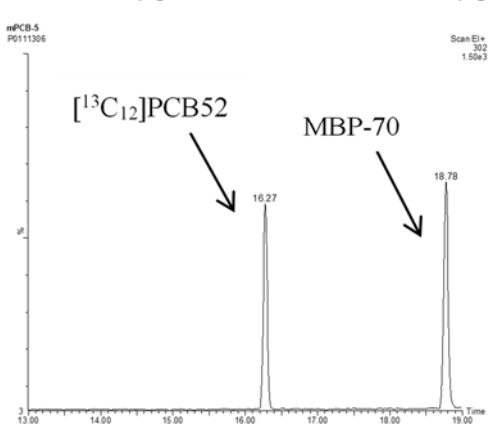
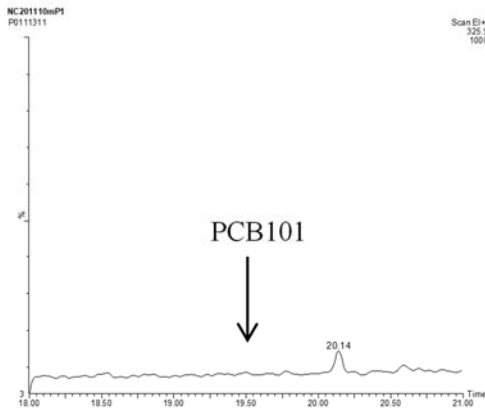


図 2-17 PCB52 の SIM クロマトグラム

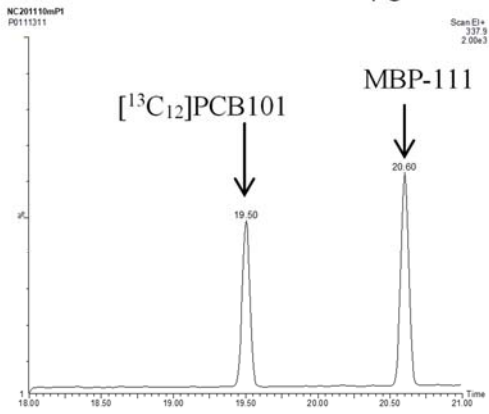
(*m/z* 289.9)

添加濃度: 1.2 µg/kg

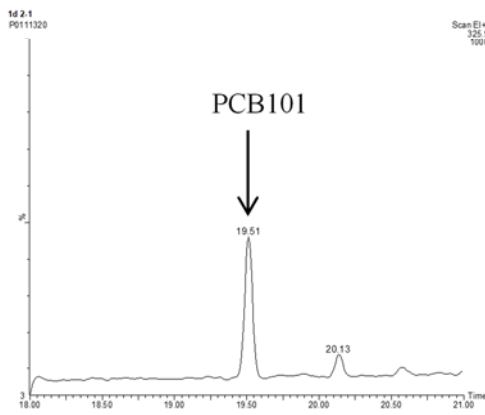
ブランク試料



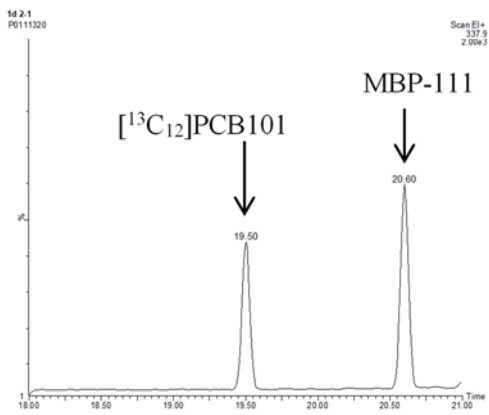
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



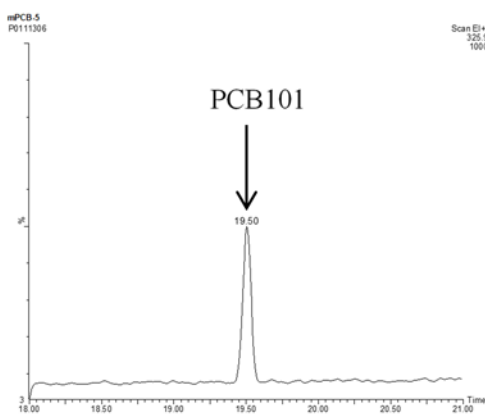
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

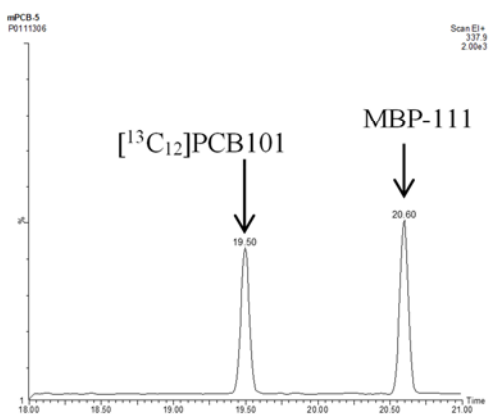
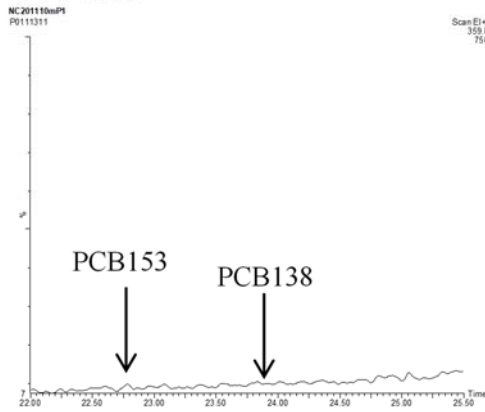


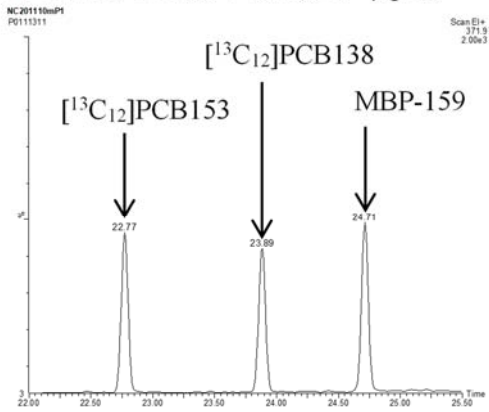
図 2-18 PCB101 の SIM クロマトグラム
(m/z 325.9)

添加濃度: 1.2 µg/kg

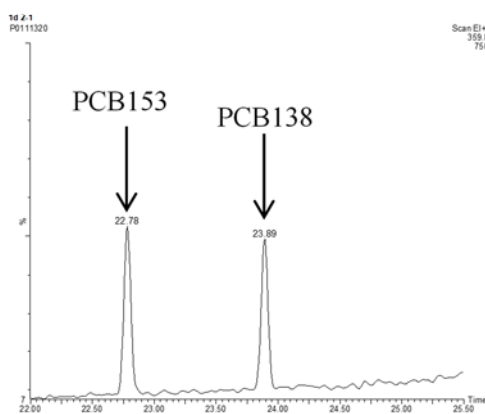
ブランク試料



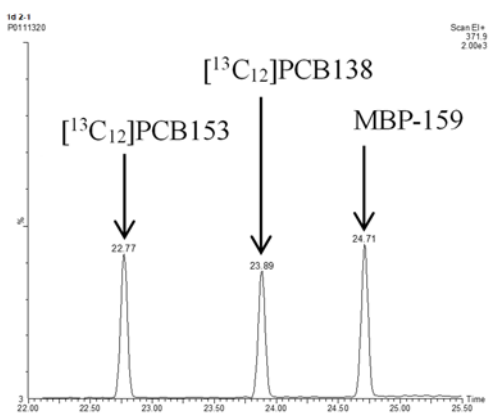
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



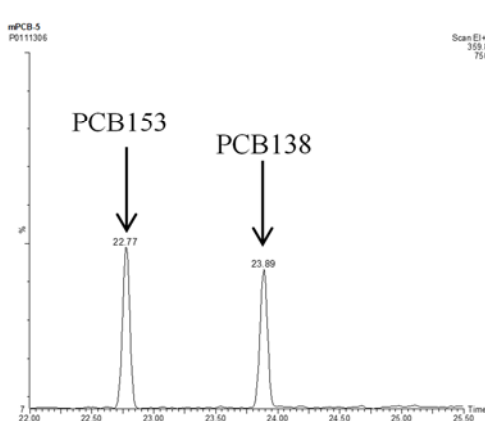
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

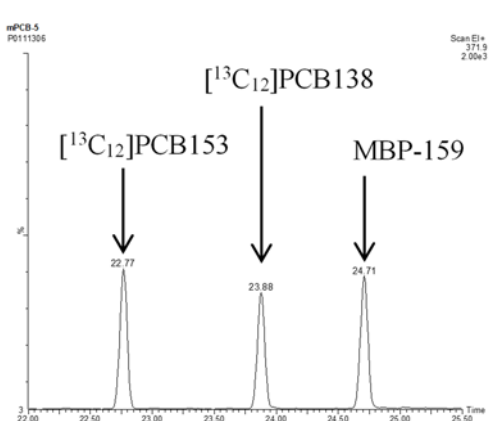
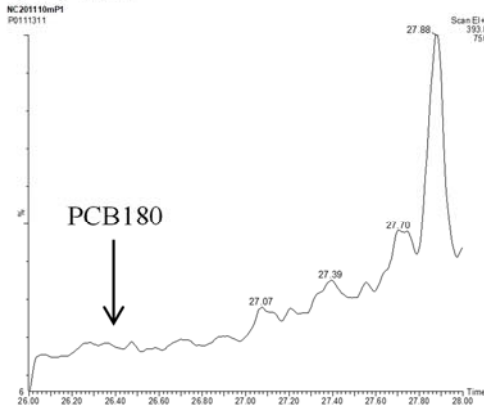


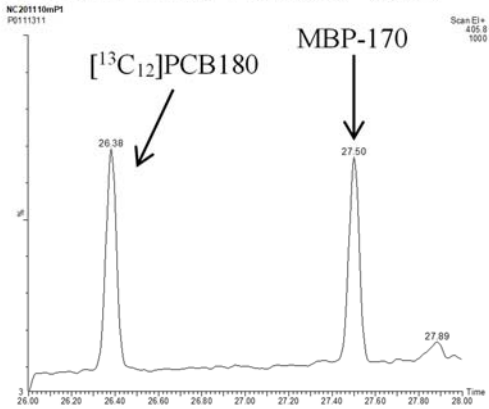
図 2-19 PCB138 及び PCB153 の SIM クロマトグラム
(m/z 359.8)

添加濃度: 1.2 µg/kg

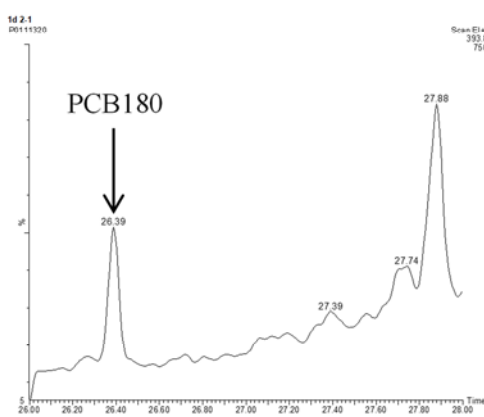
ブランク試料



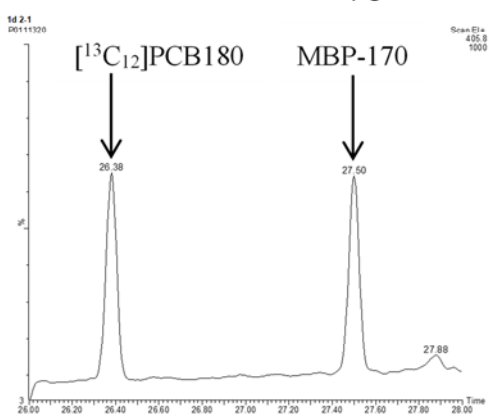
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



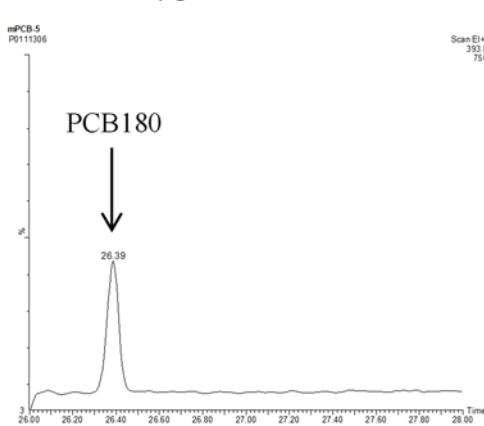
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

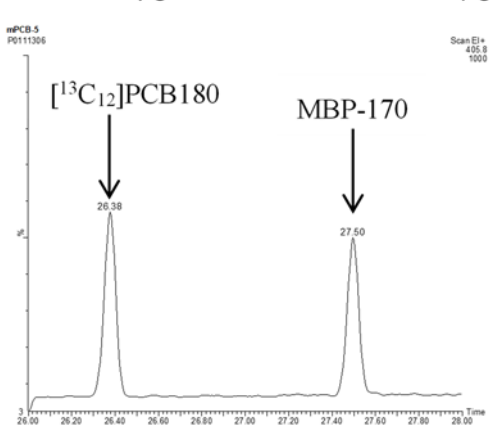


図 2-20 PCB180 の SIM クロマトグラム
(m/z 393.8)

添加濃度: 1.2 µg/kg