

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所
研究分担者	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	茂呂 紀寛	埼玉県衛生研究所

研究要旨

サイクラミン酸及びその塩類は、我が国では使用が認められていない指定外添加物（甘味料）である。本研究では、厚生労働省から通知された試験法とは異なる試験法の開発を行ってきた。本年度は、昨年度までに報告した抽出操作及び固相精製操作における課題について追加検討した。その結果、試料採取量を変更することで、これらの課題について改善することが可能であった。さらに、HPLC 測定感度を向上させるため、固相精製後の溶出液全量を誘導体化することで、HPLC 測定におけるピーク面積は、昨年度と比較して約5倍に増大した。検討した試験法について、試料としてブルーベリージャム、りんごゼリー、オレンジジュース及びビスケットを用い、5 併行の添加回収試験を実施した結果、真度は 93.2～103.9%、併行精度は 0.3～4.3(RSD%)と良好であった。

動物用医薬品については、食品マトリクスとの結合が強い薬剤や物理化学的な性質が異なる様々な薬剤があるため、一斉分析では十分な真度が得られないことがある。そこで、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を開発するため、LC-MS/MS を用いた動物用医薬品の試験法の LC-MS/MS 条件及び前処理法について検討した。最近報告された三層分離抽出法は、ギ酸酸性条件下で抽出を行うため、ベンジルペニシリンやエリスロマイシン等の酸性条件下にて分解しやすい動物用医薬品の真度が低いという課題があった。本年度は、酸性条件下で分解しやすい動物用医薬品の真度を向上させることを目的として、抽出時におけるギ酸添加及び抽出液への pH 緩衝液の添加について検討した。検討した試験法について、試料として鶏肉ペーストを用い、5 併行で添加回収試験を実施した結果、測定対象成分 129 成分中 97 成分が真度 70～120%及び併行精度（RSD%）15 未満を満たした。ベンジルペニシリンやエリスロマイシンの真度は約 50%と検討前に比べ大幅に改善されたが、引き続き試験法の改良が必要と考える。

I. 食品添加物試験法の開発に関する検討

A. 研究目的

サイクラミン酸（以下「CY」という。）、

サイクラミン酸ナトリウム（以下「CY-Na」という。）及びサイクラミン酸カルシウムは、日本では使用が禁止されている甘味料である。しかし、諸外国では甘味料として使用されているため、輸入された食品からCY類が検出され、食品衛生法違反となる事例が報告されている。厚生労働省の違反事例速報によれば、令和6年度は複数の検疫所での検査において中華菓子、もものシロップ漬け乾燥マンゴー等からCY類が検出されている¹⁾。

CY類の検査法については、令和5年10月23日付け健生食基発1023第1号及び健生食監発1023第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」の別添6（以下「通知試験法」という。）が示されている。通知試験法は、試料からCYを抽出し、硫酸酸性下で次亜塩素酸ナトリウム溶液と反応させ*N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンに誘導体化し、紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）で測定する方法である。

本研究では、児島らのCYをシクロヘキシルアミン（以下「CA」という。）に分解し、キンヒドロロンで呈色させ定量する分析法²⁾に基づき、通知試験法と異なる誘導体化剤を用いた分析法（以下「新規分析法」という。）を開発した。即ち、試料から抽出したCYを塩酸と過酸化水素でCAに分解した後、水酸化ナトリウム塩基性下で塩化ベンゾイル（以下「BC」という。）と反応させ*N*-シクロヘキシルベンズアミド（以下「*N*-CBA」という。）に誘導体化した後、測定する方法である。

本年度は、本法について試験溶液の調製過程における水抽出操作及び固相精製操

作における課題の改善とHPLC測定感度の向上を図るべく検討を実施した。

B. 方法

1. 試料

埼玉県内で市販されていたオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの加工食品4種を用いた。

2. 試薬等

サイクラミン酸ナトリウム標準品：純度100.4%（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

過酸化水素水（30 vol%）：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ベンゾイル：特級（富士フィルム和光純薬製）

トリエチルアミン：特級（富士フィルム和光純薬製）

逆相固相ミニカラム：Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridges（Waters製）

強陰イオン交換固相ミニカラム：Sep-Pak Vac Accell QMA 500 mg/6 cc（Waters製）

3. 標準原液・標準溶液の調製

CY標準原液：CYの濃度が1000 µg/mLとなるようにCY-Na標準品112.0mgを精秤し、水

を加えて正確に100 mLとした。

CY標準溶液：CYの濃度が100 µg/mLとなるようにCY標準原液を水で希釈して調製した。

検量線用標準溶液：CY標準溶液を適宜希釈し、0.5～50 µg/mLの溶液を調製した。

添加用標準溶液：CY標準原液を使用した。

4. 機器

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52

(マイクロテック・ニチオン製)

遠心機：Model 4000 (久保田商事製)

減圧機：ULBAC MDA-006

ロータリーエバポレーター：Vacuum Pump V-700、Vacuum Controller V-850、Rotavapor R-210及びHeating Bath B-491 (BUCHI製)

分析機器：1260 Infinity 2 (Agilent製)

5. HPLC分析条件

移動相：アセトニトリル及び水 (3:2) 混液

カラム温度：40℃

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18

4.6mm×25 cm (5 µm) (Agilent製)

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：230 nm

6. 検量線及び定量

検量線用標準系列は、CYの濃度が0.5、1、2、10、20、50 µg/mLとなるようにCY標準溶液を水で希釈して調製した。定量は、絶対検量線法により実施した。

7. 試験溶液の調製法

通知試験法及び新規分析法における試験溶液の調製法の概略を図1及び図2に示す。新規分析法における試験溶液の調製法は下記のとおりである。

試料5 gを量り採り、水70 mLを加えて沸騰水浴中で必要に応じてガラス棒等で攪拌しながら15分間加熱した。冷却後、水を加えて正確に100 mLとし、抽出液とした。抽出液の一部を採取し、3,500 rpm、10分間遠心分離して上澄液10 mLを量り採り、Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridges (メタノール10 mL及び水10 mLの順に通過させコンディショニングしたもの) 及び Sep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) (メタノール10 mL、(1→100) 塩酸 10mL 及び水10 mLの順に通過させコンディショニングしたもの) をこの順番に接続し、負荷した。負荷液を捨てた後、水 10 mLで洗浄した。Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridgesを除去した後、Sep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) を塩酸 (1→100) 10 mLで溶出させ、溶出液とした。

溶出液全量に12 mol/L塩酸 2 mL及び30 vol%過酸化水素水0.25 mLを加えて、沸騰水浴中で30分間加熱した。この分解液全量に塩化ナトリウム5 g、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液3 mL及びアセトニトリル15 mLを加え、1分間振とうし、3,500 rpm、5分間遠心分離した。アセトニトリル層を分取した後、下層に再度アセトニトリル15 mLを加え、1分間振とうし、3,500 rpm、5分間遠心分離した。このアセトニトリル層を先のアセトニトリル層とあわせ、0.1 vol%トリエチルアミン含有アセトニトリル 0.3 mL及び1 vol%塩化ベンゾイル含有アセトニ

トリル 0.1 mLを加え混和し、これをロータリーエバポレーターで減圧乾固した。ここにアセトニトリル及び水 (3:2) 混液を加え、5 mLに定容したものを試験溶液とした。

8. 添加回収試験

添加用標準溶液をオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4食品に添加し、5併行の添加回収試験を実施した。添加濃度は、令和6年3月8日付け厚生食基発0308第1号厚生食監発0308第1号「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版食品中の食品添加物分析法」の改正について別添1「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(以下「妥当性ガイドライン」という。)に基づき、試料中 20 µg/gとした。

C. D. 研究結果および考察

1. 昨年度の試験溶液調製法からの変更点

(1) 試料採取量の調整による水抽出操作及び固相精製操作の改善

昨年度までの検討において、試験溶液の調製操作における課題として、以下の2点を報告している。

1点目は抽出操作における課題である。本研究では通知試験法を参考に、水を加え加熱することで試料中のCYを抽出させる方法を採用している。しかし、これまでの検討において、ビスケットなどの食品を試料とした場合、加熱操作中に試料が団子状になることで、試料中のCYが水中に十分抽出されず、添加回収試験における真度の低下が認められた。この問題への対策として、

加熱中にガラス棒等で攪拌する方法が有効であったが、一部のビスケットでは抽出液の粘度が高く、攪拌に労力を要したり、攪拌を続けてもダマが生じるケースもあった。また、別の対策として、加熱後にホモジナイザーを用いて抽出液を均一化する操作も有効であることが確認された。

2点目は、固相精製操作における課題である。本研究では、固相精製する場合、真空マニホールドを用い、吸引しながら上澄液を固相ミニカラムへ負荷する方法(以下「吸引方式」という。)で行っている。しかし、これまでの検討において、ビスケットやチョコレートといった食品を試料とした場合、逆相固相ミニカラムの目詰まりが生じてしまい、溶出が困難となる事例が確認された。この問題への対策として、抽出液の上澄液を希釈してから固相精製する方法が有効であった。また、一部の試料では、吸引方式で目詰まりした場合でも、シリンジポンプを用いて手動で加圧する方法(以下「加圧方式」という。)に切り替えることで固相精製を続行することが可能であった。しかし、加圧方式は多検体処理には時間と労力を要するため、効率的な操作ではないと考える。

以上2点の課題を解決するため、本年度は試料採取量を従来の10 gから5 gに減らして検討した。試料としてビスケットを用いて検討した結果、試料採取量を減少させることで、加熱中の攪拌が容易となり、ダマも生じなかったことから、固相精製操作においても逆相固相ミニカラムの目詰まりは発生しなかった。

(2) HPLC測定における感度向上のための検討

昨年度の報告では、10 mLに定容した溶出液から2mLを採取し、*N*-CBAに誘導体化した後、10 mLに定容したものを試験溶液として使用していた。概略は図3のとおりである。本年度は、HPLCのクロマトグラムにおけるピーク感度を向上させることを目的として、溶出液全量を誘導体化し、試験溶液の最終容量を5 mLとする方法を検討した。昨年度の方法と比較して検体採取量を半分に抑えた一方で、誘導体化に使用するCAの量を5倍に増加させ、さらに誘導体化後の液量を2倍に濃縮した。その結果、HPLCクロマトグラムにおけるピーク面積は昨年度と比べて約5倍に増加した（図4）。なお、この変更に伴い、溶出液の液量増加にあわせて各反応試薬の量及び濃度を適切に増量した。

さらに、昨年度は液-液分配の回数を1回としていたが、その後の検討により水層に約10%のCYが残留していることが判明したため、液-液分配の回数を2回に増やした。

液-液分配を2回実施した結果、アセトニトリル層の総量が約30 mLとなった。そのため、誘導体化した後にロータリーエバポレーターを用いた減圧乾固操作を追加し、溶液を濃縮した。その後、アセトニトリル及び水（3:2）混液で5 mLに定容し、試験溶液とした。

なお、本検討では、CYをCAに分解する操作において、溶出液全量を使用するため、分解から液-液分配までを50 mLPP製遠沈管を用いて検討を行った。しかし、50 mLPP製遠沈管を用いた場合、*N*-CBAと同一の保持時間に夾雑ピークが出現することが確認

された。そこで、CYからCAへの分解操作において、ガラス製15 mL試験管を使用し、分解後に冷却して50 mL PP製遠沈管に分解液を移し、液-液分配したところ、夾雑ピークは出現しなかった。以上の結果より、分解操作においてはガラス製試験管を使用することとした。

2. 添加回収試験

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4食品を用いて、5併行の添加回収試験を実施した。各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図5～8に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にCYの定量を妨害するピークは認められなかった。添加回収試験における真度及び併行精度の検討結果を表1に示した。オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4試料の真度は、それぞれ96.9%、93.2%、103.9%及び94.5%、併行精度はそれぞれ4.1%、0.3%、1.8%及び4.3%であり、すべての試料において良好な結果であった。

E. 結論

昨年度検討した新規分析法について、本年度は試料採取量を半減させることで、溶出操作及び固相精製操作における課題を改善した。また、溶出液全量を誘導体化し、液-液分配の回数を1回増加させるとともに、減圧乾固による濃縮操作により、試験溶液のクロマトグラムにおけるピーク面積が約5倍に増大した。検討した何れの試料においても、ブランク試料に定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4食品に適用した結果、真度93.2～103.9%、併行精度0.3～4.3%は目標値に適合していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日本食品衛生学会第120回学術講演会（愛知県）、2024年11月7～8日、新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分析法の検討
第61回全国衛生化学技術協議会年会（堺市）、2024年11月21～22日、食品添加物検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ（サイクラミン酸）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 動物用医薬品試験法の開発に関する研究

動物用医薬品については、食品マトリクスとの結合が強い薬剤や物理化学的な性質が異なる様々な薬剤があるため、一斉分析では十分な真度が得られないことがあ

る。畜水産物中の動物用医薬品を対象とした一斉分析法では、アセトニトリルなどの高極性溶媒を抽出に用いた報告が多く、それらの脂肪を溶解することの難しい抽出法では抽出効率の点で課題があった。最近、アセトン及びアセトニトリルにより抽出を行い、その後、*n*-ヘキサンによる脱脂精製、アセトニトリルへの分配及び塩析効果による精製を同時に行う三層分離抽出法が報告された³⁾⁴⁾。本研究では、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を検討することを目的として、LC-MS/MSを用いた動物用医薬品の一斉試験法について検討する。本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分について検討し、検討した一斉分析法について、鶏肉ペースト試料を対象とした添加回収試験を実施した。

B. 方法

1. 試料

埼玉県内で市販されていた鶏むね肉のペーストを用いた。

2. 試薬等

混合標準品：富士フイルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準溶液PL-1-3及びPL-2-1を用いた（計45成分）。

標準品：関東化学製、MedChemExpress製、Dr. Ehrenstorfer製及び富士フイルム和光純薬製の標準品を用いた（計102成分）。

蒸留水：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

メタノール：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

ジメチルスルホキシド：特級（関東化学製）

アセトン：残留農薬試験・PCB試験用（関東化学製）

n-ヘキサン：残留農薬試験・PCB試験用（関東化学製）

ギ酸：【移動相用】LC-MS/MS用（和光純薬製）【抽出用】特級（和光純薬製）

エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウムに水和物（以下「ETDA-2Na・2H₂O」という。）：特級（関東化学製）

酢酸アンモニウム：特級（和光純薬製）

塩酸：特級（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

固相ミニカラム：Oasis PRiME HLB（60 mg/3 cc, Waters製）

3. 標準原液・標準溶液の調製

標準原液：必要に応じて標準品をジメチルスルホキシドで溶解したのち、1,000 µg/mLとなるようにメタノールまたはアセトニトリルで定容した。

混合標準溶液：各標準原液1 mLを混合し、アセトニトリルで200 mLに定容した（各5 µg/mL）。この溶液4 mLと各混合標準品1 mLを混合し、アセトニトリルで20 mLに定容し、1,000 ng/mLの混合標準溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：混合標準溶液を用時に希釈し、0.5～20 ng/mLの溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：混合標準溶液を用時に希釈し、100 ng/mLの溶液を調製し、使用した。

4. 機器

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52（マイクロテック・ニチオン製）

遠心機：Model 6200（久保田商事製）

減圧機 ULBAC MDA-006

LC-MS/MS

MS：Xevo TQ-S（AWaters製）

LC：ACQUITY UPLC

5. LC-MS/MS分析条件

表2及び表3に示す。

6. 試験溶液の調製法

概略を図9に示す。

試料5.0 gを正確に50 mL PP製遠沈管に採取し、ETDA-2Na・2H₂O 1 gおよびアセトン6 mLを加えて、1分間、ホモジナイズした。次いで、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mL、アセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mL、塩化ナトリウム3 gおよびセラミックホモジナイザー1個を加えて1分間振とう後、3,040×*g*、10℃で5分間遠心分離し、三液相（上層、中間層及び下層）及び沈殿物に分離した溶液の上層を除き、中間層を採取した。採取した中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液を10 mL加えた。残留物（下層及び沈殿物）にギ酸0.5 mL、アセトン5 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mL及びアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mLを加え、同様に振とう及び遠心分離した。上層を除いた後、この中間層を先の中間層と酢酸アンモニウム溶液の混液に合わせた。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL及びアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mLを加え、同様に振とう及び遠心分離した。上層を除いた後、この中間層を

先の中間層と酢酸アンモニウム溶液の混液に合わせた。この混液に水を加えて50 mLにした後、3,040×g、10℃で5分間遠心分離した。上層を捨て、水を加えて50 mLに定容し、抽出液とした。

抽出液を15 mL PP製遠沈管に5 mL採取し、窒素気流下、40℃で2 mL以下になるまで濃縮した。濃縮した後、水で5 mLとした。

Oasis PRiME HLB (60 mg/3 cc, Waters 製) にメタノール及び水各5mLを順次注入し、各流出液は捨てた。この固相ミニカラムに先の液を全量注入し、負荷液は捨てた後、水5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、メタノール5 mLで溶出し、溶出液を全量採取した。

溶出液に水2 mLを加えたのち、窒素気流下、40℃下で5 mL以下になるまで濃縮した。濃縮後、水で5 mLに定容し、試験溶液とした。

7. 添加回収試験

試料に各分析種の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、30分静置後、6. 試験溶液の調製法に従って、5併行の添加回収試験を行い、真度及び併行精度を評価した。

C. D. 研究結果および考察

1. LC-MS/MS条件の検討

各標準品は、大門らの報告³⁾、齊藤らの報告⁴⁾及び地方衛生研究所の検査状況を基つき、147成分を選定した。

MS条件は、一部は当所SOPを参考に、一部はインフュージョン法及びQuan Optimize 法によりSRM条件を設定した。

分析カラムとして、L-column ODS (2.1 x

100 mm、3 µm、(一財) 化学物質評価研究機構製)、Atlantis dC18 (2.1 x 150 mm、3 µm、Waters製)、Atlantis T3 (2.1 x 150 mm、3 µm、Waters製)、Inertsil Ph-3 (2.1 x 150 mm、3 µm、GL Science製)、Kinetex Biphenyl (2.1 x 100 mm、5 µm、Phenomenex 製)、YMC-Triart Diol-HILIC (2.1 x 150 mm、S-3 µm、12 nm、栄伸ケミカル製) の6 種類について、ピーク形状やMS検出器の感度について比較した。その結果、L-column ODS (2.1 x 100 mm、3 µm、(一財) 化学物質評価研究機構製) が最も多くの成分においてMSの感度 (S/N) とピーク形状が良好となったため、本カラムを採用した。

移動相は、蒸留水、アセトニトリル及びギ酸とした。移動相のギ酸濃度について、0.1及び0.2 vol%の溶液について検討し、より多くの成分でピーク形状が良好であった0.2 vol%を採用した。また、各成分のDwell Timeが十分となるようグラジエント条件を設定した。

2. 測定対象成分の選定

添加回収試験では、試料に各測定対象成分の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加した。この試料から調製される試験溶液の濃度は1 ng/mLとなる。この濃度の1/2である0.5 ng/mLの混合標準溶液 (147成分) を調製し、検討したLC-MS/MS条件で測定を行った。その結果、S/Nが10未満の7成分 (セフロキシム、ラサロシド、モネンシン、モランテル代謝産物A、チルミコシン、セファロニウム及びロキササルソン) と、ピークが2峰に別れた8成分 (5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン、アンピシリン、セファピリン、ジアベ

リジン、ジシクラニル、フラルタドン、レバミゾール及びオルメトプリム)を除外することとした。次に、検量線用混合標準液を調製し、相関係数(r)が0.990未満の3成分(セフキノム、ネオスピラマイシン及びスピラマイシン)を除外することとした。これらの18成分を除いて最終的な測定対象成分数は129成分とした。

3. 試験溶液の調製

(1) 既存の三層分離抽出法を用いた検討

本年度は、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾に基づき試験溶液の調製法を検討した。

大門らの試験溶液調製法は図10のとおりである。大門らの試験溶液調製法は、アセトンによる高効率の抽出、 n -ヘキサンによる脱脂精製、アセトニトリルへの分配及び塩析効果による精製を同時に行う三層分離抽出法を用いた一斉分析法である。

一方、齊藤らの試験溶液調製は図11のとおりである。齊藤らの試験溶液調製法は、大門らの試験溶液調製法に濃縮操作と固相ミニカラムによる精製操作を追加したことで、感度を向上させた一斉分析法である。

これらの一斉分析法に基づき、鶏むね肉ペーストに各測定対象成分の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、3併行の添加回収試験を実施した。その結果、何れの一斉分析法においても真度70～120%を満たさない成分が複数確認されたが、特にベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度はどちらも10%未満と極めて低値であった。この点に関しては、これらの成分が酸性条件下で分解したことが主

な要因であると推察される。

ベンジルペニシリン以外にも動物用医薬品には酸性条件下で分解しやすい成分が存在することが知られている。そこで、本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分の真度を向上させることを目指し、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾を基に試験溶液の調製法を検討した。

(2) 抽出操作の検討

試料として水5 gを用い、0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、齊藤らの試験溶液調製法における水で50mLに定容する抽出操作までを実施し、その抽出液を測定した。その結果、ベンジルペニシリン及びエリスロマイシンの真度はそれぞれ62.7%、3.7%と低い値を示した。この結果は、抽出時にギ酸を加えたことが原因と考えられた。そこで、ギ酸でpHを6、5、4及び3に調製した10 ng/mLの混合標準溶液を測定した。その結果、ベンジルペニシリンの平均濃度はそれぞれ95.7%、95.4%、91.0%及び55.7%、エリスロマイシンはそれぞれ114.0%、113.4%、85.1%及び6.6%となり、試験溶液がギ酸によりpH4以下となると平均濃度が低下する傾向が確認された。なお、本検討において、カラムや装置への影響を考え、pHを3未満にした溶液については検討を実施しなかった。

この結果を踏まえ、ギ酸を加えずに抽出を行った。その結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度は96.3%、95.2%と大幅に改善した。一方、セファゾリンの真度は20.4%と低下する結果が得られた。

ベンジルペニシリンとセファゾリンの両者の真度を良好な値にすることを目的

に、1回目の抽出ではギ酸を加えず、2回目の抽出でギ酸0.1 mL添加する条件で検討を行った。その結果、ベンジルペニシリンの真度は82.8%と良好な値を示したが、エリスロマイシンとセファゾリンの真度はそれぞれ13.0%と33.2%と十分な改善が得られなかった。さらに、先の検討にて調製した抽出液を測定24時間後に再測定したところ、ベンジルペニシリンの真度が7.0%と大幅に低下していることが確認された。この結果は、大門らの報告³⁾に記載されているとおり、一部のギ酸が水層から中間層に移行したことが原因であると考えられる。

中間層への移行が生じにくい酸としては、塩酸や硫酸が候補として挙げられる。10 vol%ギ酸5 mLのpHと同じpHとなる塩酸濃度を確認した結果、0.02 mol/L塩酸5 mLでおおよそ一致した。そこで、1回目の抽出時にギ酸に代わりに0.02 mol/L塩酸5 mL加える条件で抽出液を調製し、検討を行った。その結果、ベンジルペニシリンエリスロマイシンの真度は44.8%、22.9%とギ酸を使用した場合と同様に低い値を示した。ベンジルペニシリン以外の成分についても、ギ酸の代わりに塩酸を使用した場合には複数の成分で真度の低下が見られ、特にセファゾリンは1%未満となった。セファゾリン等の真度が低値となった原因については現時点では究明には至っていないが、真度の確保には塩酸ではなくギ酸を用いることが有効であると考えられた。

そこで、ギ酸を使用しつつも抽出液のpHを5~7程度に保つことを目的に、pH緩衝液を用いる方法を検討した。具体的には、1回目の抽出ではギ酸を加えずに実施し、得られた中間層を分取した後、その中間層にpH

緩衝液を加える方法とした。続いて、2回目の抽出はギ酸を加えて実施し、得られた中間層を先ほどの1回目の中間層に合わせる操作を行う方法である。pH緩衝液としてはさまざまな選択肢があるが、本検討では抽出液をそのままLC-MS/MSに注入することを想定し、揮発性を持ちながらpHを5以上に調整可能な酢酸アンモニウムを採用した。酢酸アンモニウムの濃度及び添加量については、抽出液中のギ酸の濃度が大門らの報告³⁾に基づき1 vol%程度と算出されること、さらに試料に由来する成分がpH緩衝作用を妨害する可能性があることを考慮した。そのため、十分なpH緩衝作用が維持する目的で、1回目の抽出で分取した中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液を10 mL添加する条件とした。この方法で抽出を行った結果、ベンジルペニシリン及びエリスロマイシンの真度はそれぞれ93.4%、95.6%と良好な値を示したが、テトラサイクリン系の成分の真度はやや低く、特にテトラサイクリンの真度は59.9%にとどまった。

この結果からテトラサイクリン系の抽出が不十分であると判断し、抽出回数を2回から3回に増やすこととした。抽出回数の増加に伴い、各抽出操作で使用する溶媒の量を調整した。1回目の抽出では、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルとアセトンの量を大門らの方法や齊藤らの方法と比較してそれぞれ半量の5 mLと6 mLとした。2回目の抽出では、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLに代えて、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLとアセトン6 mLを用いる条件とした。3回目の抽出では、2回目の残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLとアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10

mLを加える条件とした。中間層については、1回目の中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLを加えた上で、2回目以降の中間層を順次あわせる方法とした。この条件で抽出液を調製し、各成分の真度を確認したところ、テトラサイクリン系の成分の真度に若干の向上がみられ、テトラサイクリンの真度は78.7%となった。

さらに抽出回数を増やすことで、テトラサイクリン系の真度が向上する可能性が考えられた。しかし、抽出回数を増やすことにより、抽出液に占める有機溶媒比率が高くなり、その結果、後続の固相精製操作において悪影響を及ぼす可能性がある判断した。このため、抽出回数を現状の3回とすることとした。

(3) 濃縮操作の検討

齊藤らの試験溶液調製法における水で50mLに定容する直前に混合標準溶液を添加し、定容したもの（10 ng/mL）から5 mLを採取し、窒素気流下、40℃で1.5 mL以下となるよう濃縮した。これを50 vol%メタノールで5 mLに定容したものを測定した。その結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンに加え、アレスリン、ビチオノール及びテメホスの真度はそれぞれ0.7%、2.6%、26.2%、54.0%及び35.8%と低い値を示した。

アレスリン以下3成分について、濃縮操作におけるギ酸の影響を調べるため、先の操作からギ酸を添加しない条件で溶液を調製し測定を行った。しかし、測定結果に大きな変化は見られず、真度はそれぞれ23.5%、55.9%及び25.7%であった。

一方、5 mLの抽出液を2.5 mLまで濃縮し

た場合、真度はそれぞれ79.5%、89.3%、78.4%となり、さらに、2 mLまで濃縮した場合にはそれぞれ67.4%、84.2%、59.7%に低下する結果が得られた。

抽出液は、理論上アセトン12 mLとアセトニトリル20 mLを水で50mLに定容したものであり、その組成比は6:10:9と近似される。この抽出液を固相ミニカラム精製に用いる場合、抽出液中の有機溶媒が固相ミニカラムの保持能力に与える影響を考慮する必要がある。このため、5 mLの抽出液を濃縮し、1.8 mL未満、具体的には1.5 mL以下に減容することは有効であると考えられる。しかしながら、アレスリン等の成分が濃縮操作中に揮散することや、1.5 mLまで濃縮するために長時間を要することを考慮した結果、本年度の検討では5 mLの抽出液を2 mL以下まで濃縮し、その後、これを水で5mLに定容して次の固相精製操作に用いることとした。

さらに、アレスリン、クロサンテル、ジョサマイシン、エマメクチンB1a及びエマメクチンB1a異性体等の成分は、濃縮操作において使用した15 mL PP製遠沈管の内壁に一部が吸着することが確認された。このため、濃縮及び定容後に容器を約10秒間超音波処理し、容器内壁に吸着した成分を剥離させた後、固相ミニカラムに負荷することとした。また、固相ミニカラムの洗浄に用いる水5 mL及び溶出に用いるメタノール5 mLについても、濃縮時に使用した15 mL PP製遠沈管に入れ、同様に約10秒間超音波処理してから使用することとした。

(4) 固相精製操作の検討

固相ミニカラムは、Oasis HLB（60 mg/3

cc, Waters製)、Oasis HLB (150 mg/6 cc, Waters製)、Oasis PRiME HLB (60 mg/3 cc, Waters製)、PLS3-20 (AiSTi SCIENCE製) について検討した。いずれの固相ミニカラムもコンディショニング方法は共通とし、メタノール5 mLと水5 mLを順次注入し、流出液を捨てる操作を行った。その後、混合標準溶液を水で希釈して1 ng/mLとしたものを5 mL注入し、負荷液を捨てた。溶出操作については、齊藤らの報告⁴⁾を基に、メタノール1 mL及び0.5 vol%ギ酸含有メタノール1 mLを順次注入し、得られた溶出液を採取した。齊藤らの報告⁴⁾では、溶出液を濃縮した後定容しているが、濃縮操作が真度へ与える影響を排除するため、本検討では溶出液を濃縮せず、そのまま水で5 mLに定容して測定を行った。その結果、多くの成分において、ほぼ同等の真度を示したものの、一部の成分（クロサンテルやミロキサシン等）では、PLS3でのみ極端に真度が低下する現象が確認された。このため、本年度の検討ではPRiME HLBを使用することとした。Oasis HLB 60mgは、PRiME HLB及びPLS3に次いで真度が良好であった。同150 mgについては、複数の成分がメタノール1 mL及び0.5 vol%ギ酸含有メタノール1 mLだけでは固相から溶出しきれず、追加でメタノール5 mLすることで溶出が確認される成分もあった。それでもなお、一部の成分は固相に保持されたままであることが確認された。

PRiME HLBからの溶出液については、齊藤らの報告⁴⁾に基づきギ酸含有メタノールを使用した場合、ベンジルペニシリンやエリスロマイシンがギ酸によって分解されることが確認された。そこで、PRiME HLBの

溶出液については、メタノール5 mLを用いることとした。

4. 添加回収試験

添加回収試験には鶏むね肉ペーストを用い、試料として0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加した。

選択性については、ベンゾカインを除き、検討に用いたブランク試料からは定量を妨害するピークは確認されなかった。

試料マトリックスによる測定への影響については、イベルメクチン、リンコマイシン及びチアベンダゾールで顕著な増強効果が、フロルフェニコールアミン及びリファキシミンで顕著な減弱効果が見られたが、他の成分では顕著なマトリックス効果は確認されなかった。

5併行の添加回収試験の結果、真度70～120%及び併行精度(RSD%)<15を満たしたものは129成分中97成分であった(表4)。

しかしながら、酸性条件下で分解しやすい成分であるベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度は51.5%と55.8%であった。そこで、固相ミニカラム精製前の抽出液について測定した結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンの抽出率は50.8%と96.0%であった(表5)。以上の結果より、ベンジルペニシリンは抽出操作に改善の余地があり、エリスロマイシンは抽出操作がおおむね良好だが、その後の濃縮操作及び固相精製操作に課題があるものと考えられた。

これらの結果を踏まえ、試験溶液調製法の各操作について引き続き検討を進める必要がある。

E. 結論

本研究では、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を開発するための検討を行った。本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分（ベンジルペニシリンやエリスロマイシン）の真度を向上させることを目指し、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾を基に三層分離抽出を用いた試験溶液の調製法を検討した。その一環として、鶏むね肉ペーストを用いた添加回収試験を5併行で実施した結果、測定対象成分129成分中97成分で良好な結果を得ることができた。

一方で、酸性条件下で分解しやすい成分の真度については、目標とした良好な真度には達せず、50%程度に留まった。しかし、検討前の10%未満の真度と比較すると大幅な改善が見られた。本研究で得られた結果を踏まえ、引き続き試験法の改良に取り組み、より良い結果を目指していきたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、高坂典子、渡辺卓穂：食品添加物検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ（サイクラミン酸）：第61回全国衛生化学技術協議会年会（大阪）、2024.

2) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、渡辺卓穂：新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分

析法の検討：第120回日本食品衛生学会学術講演会（愛知）、2024

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

1) 違反事例 | 厚生労働省

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit-suite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html

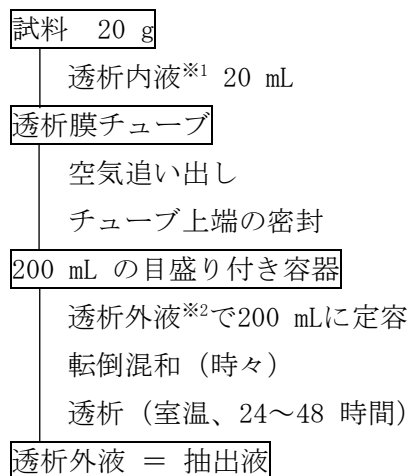
2) 児島昭次，一番ヶ瀬尚：人工甘味料に関する研究(第2報)サイクラミン酸ナトリウムの比色定量 その1，薬学雑誌，83，1108～1114（1963）

3) 大門拓実、立岡秀、高橋邦彦、濱田佳子：三層分離抽出を利用した食肉および水産物中の動物用医薬品迅速一斉分析法の検討、食品衛生学雑誌、61巻3号、95-102（2020）

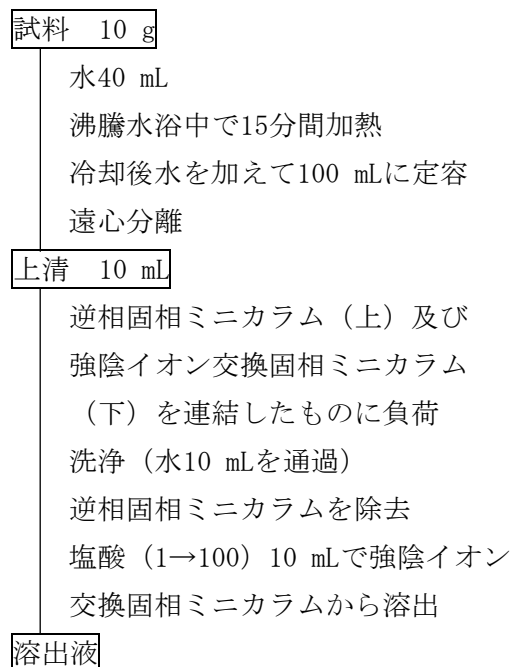
4) 齊藤直樹，中代智菜美，高橋良平，小林保志，今井浩一：LC-MS/MSを用いた三層分離抽出法による動物用医薬品一斉分析法の検討、第120回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集、102（2024）

以下 図表等

a 透析法



b 水抽出法



抽出液 10 mL 又は 溶出液全量

硫酸（1→2） 2 mL
n-ヘキサン 5 mL
次亜塩素酸ナトリウム試薬 1 mL
1分間振とう
遠心分離
水層を除去

n-ヘキサン層

5 w/v %炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL
1分間振とう
遠心分離

試験溶液

※1 透析内液：塩化ナトリウム 100 g を 0.01 mol/L 塩酸に溶解して 1000 mL としたもの

※2 透析外液：0.01 mol/L 塩酸

図1 サイクラミン酸及びその塩類の分析法（通知試験法）

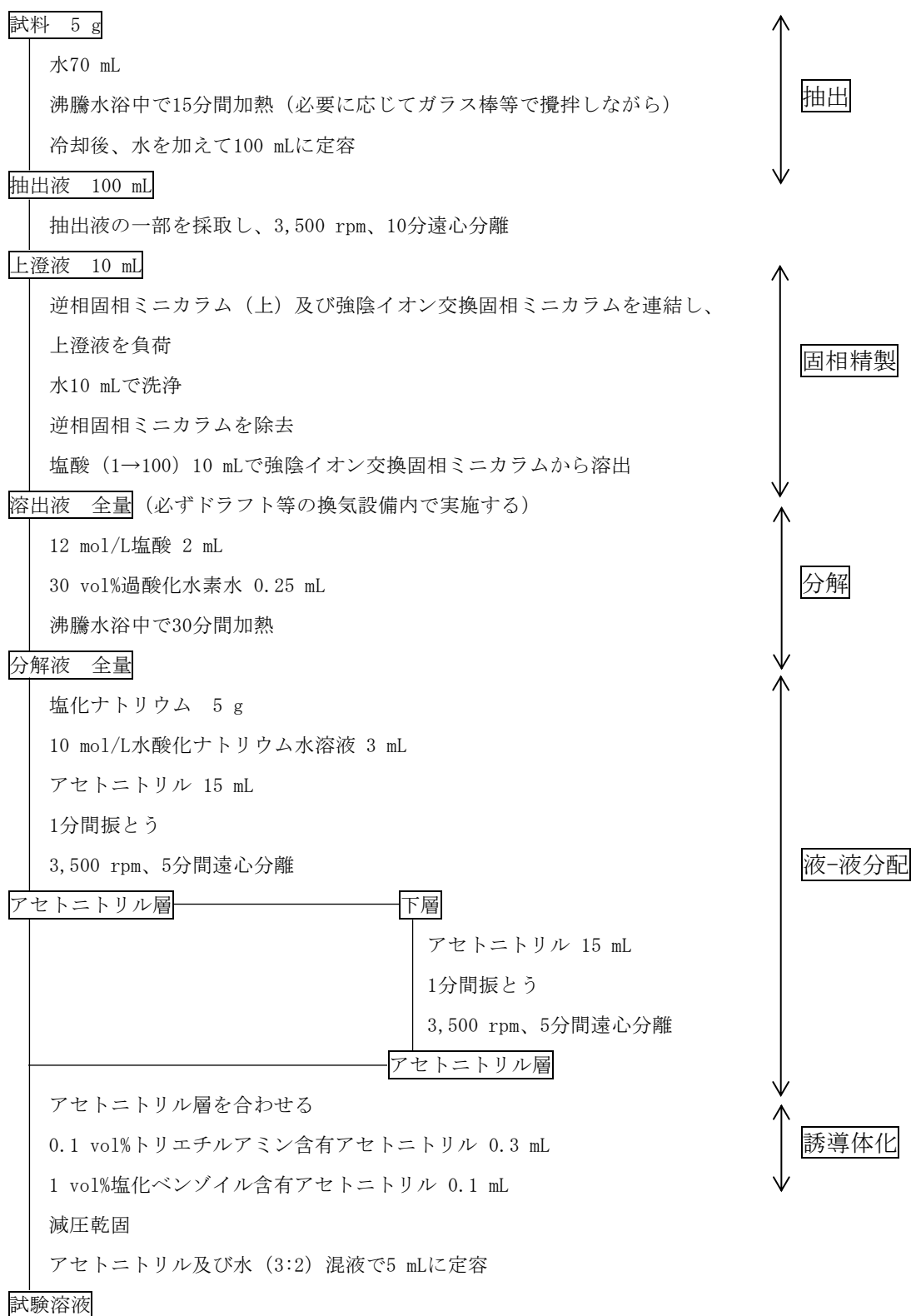


図2 新規分析法の改良法

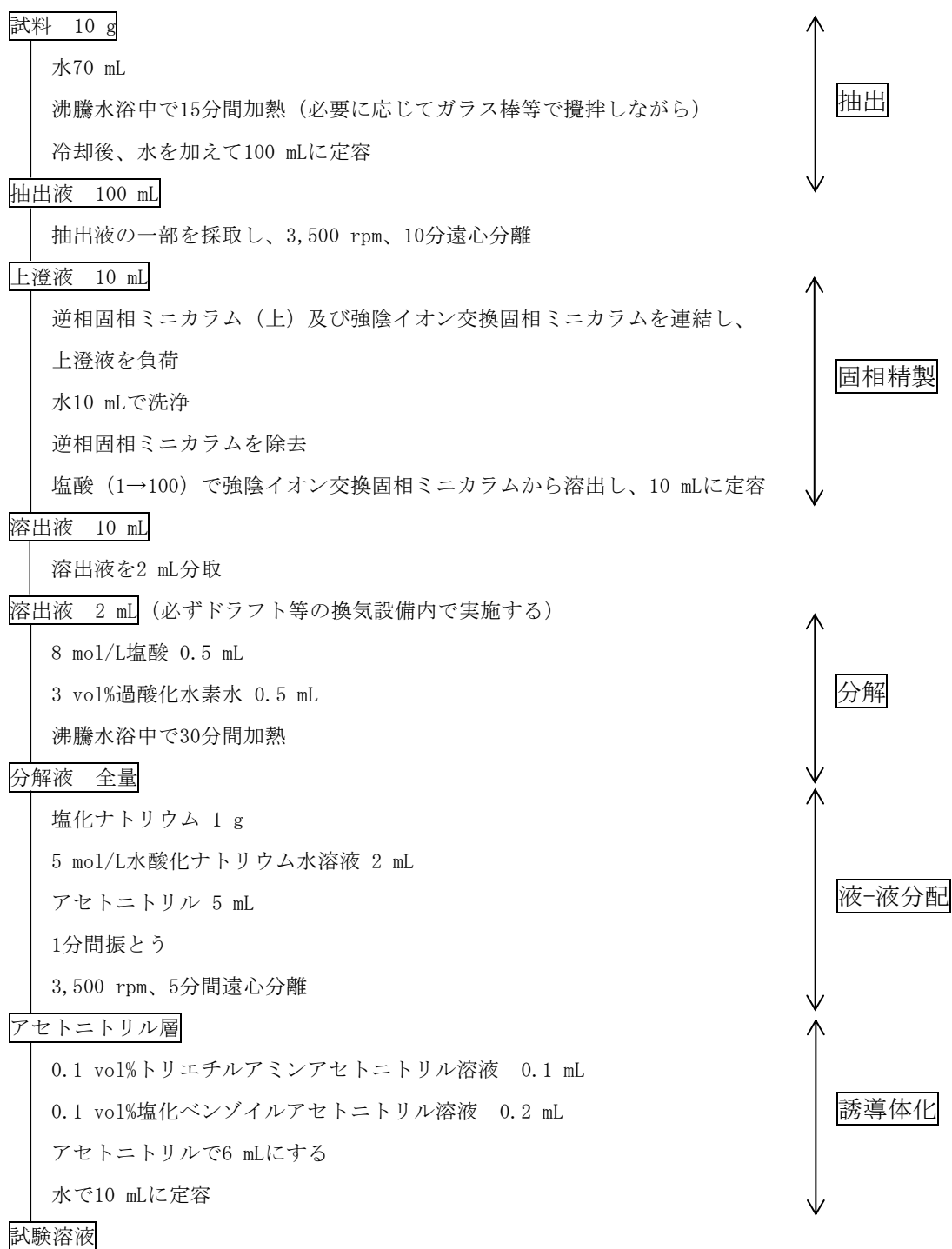
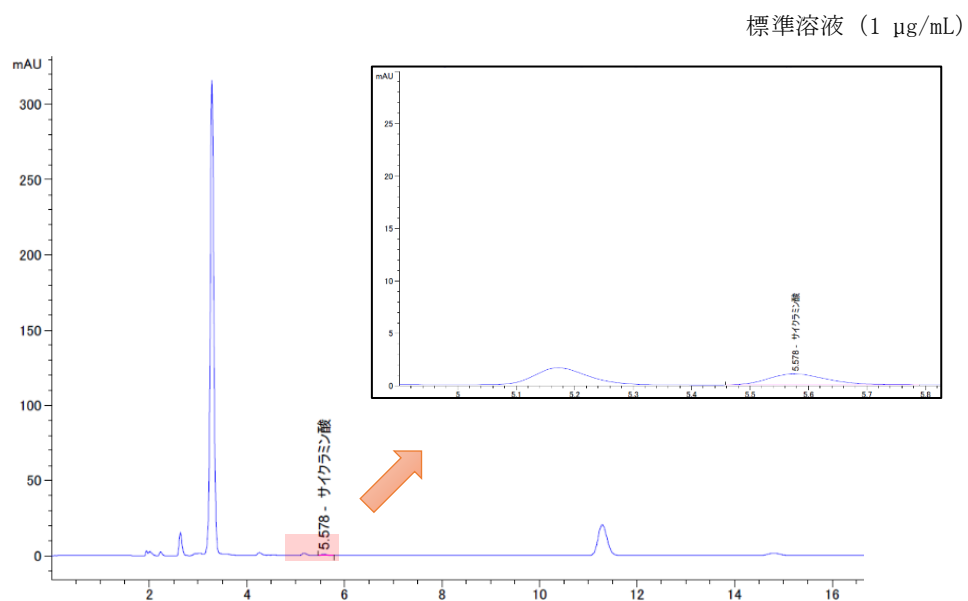


図3 昨年度の試験溶液調製法

改良前（令和5年度実施）



改良後（令和6年度実施）

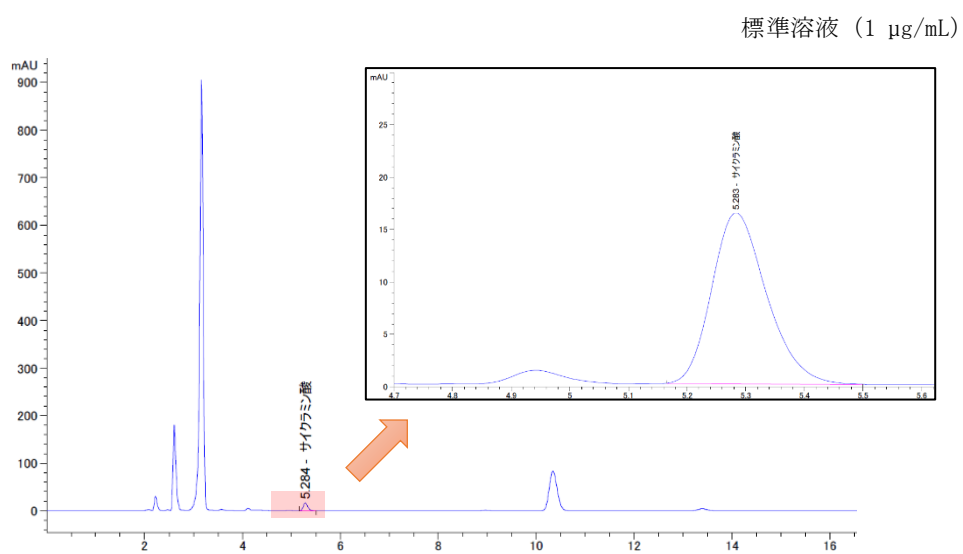
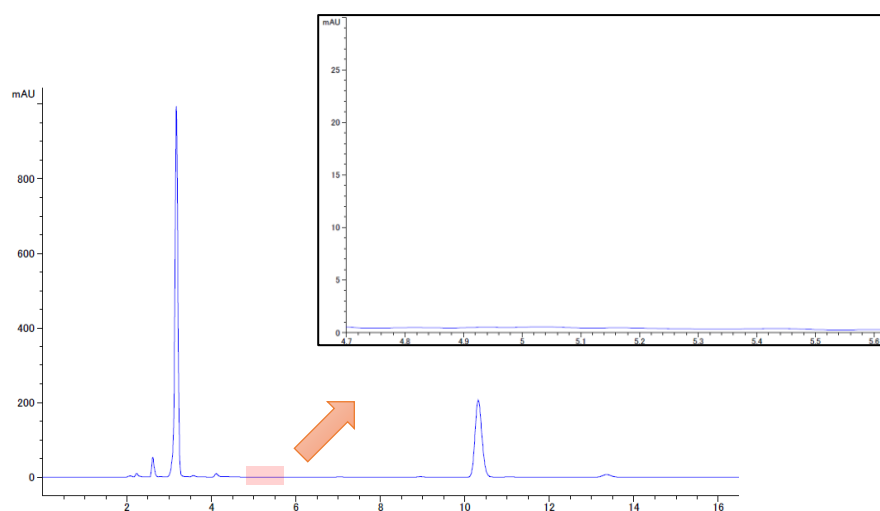
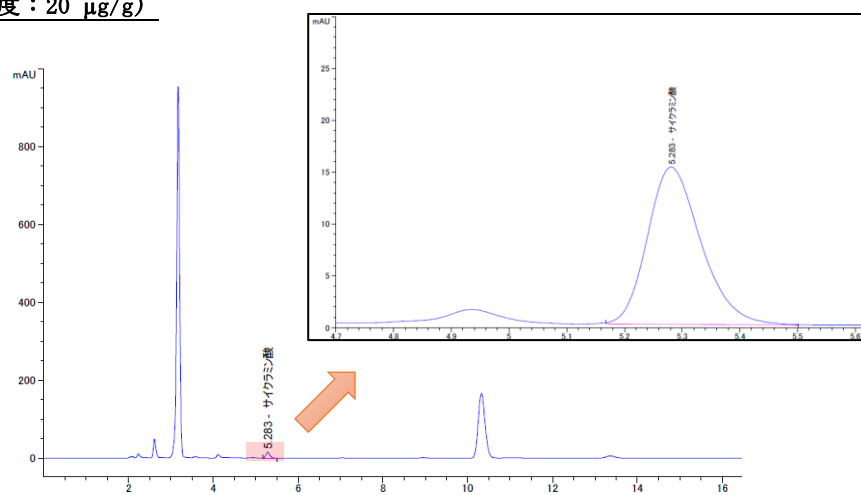


図4 改良前後の新規分析法のクロマトグラム

ブランク試料



添加試料（添加濃度：20 $\mu\text{g/g}$ ）



標準溶液（1 $\mu\text{g/mL}$ ） ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

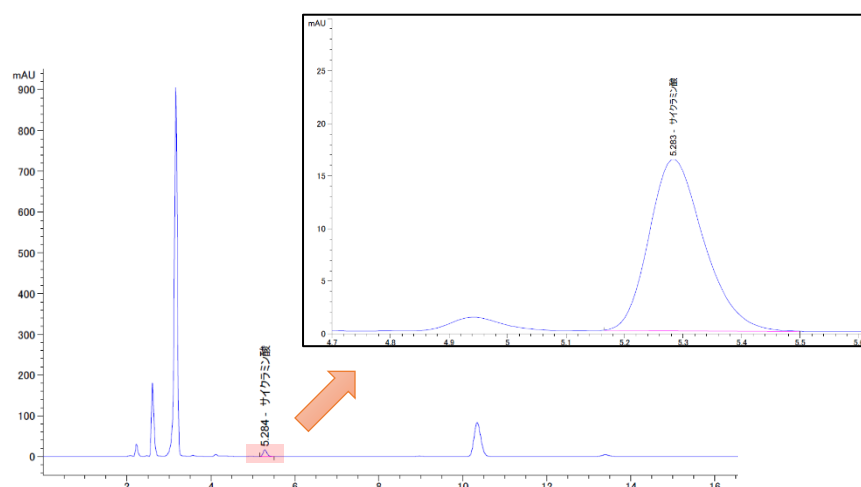
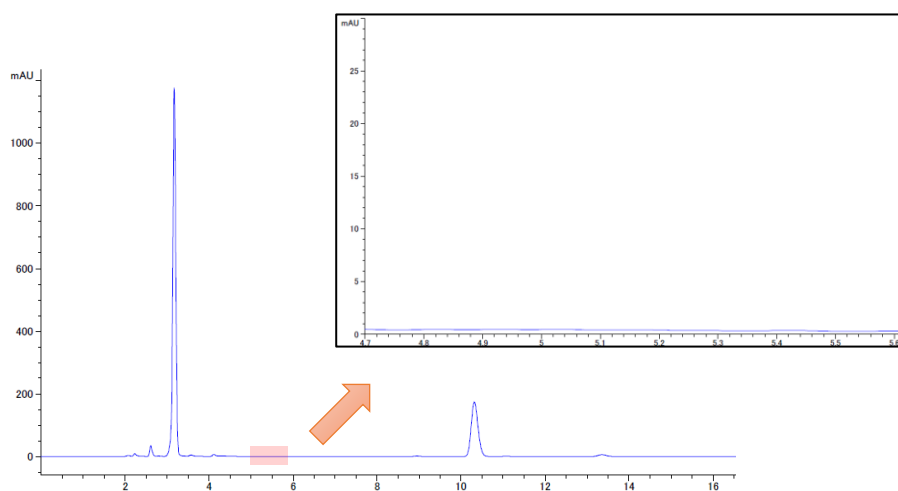
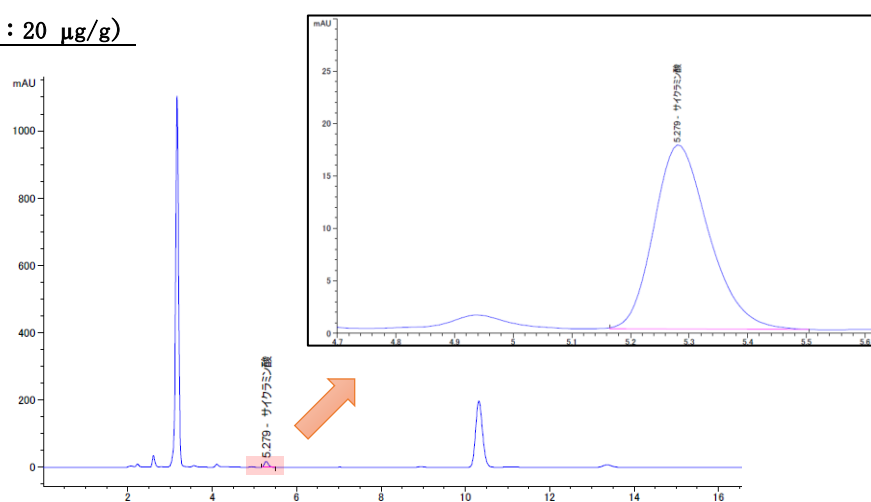


図5 オレンジジュースのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料 (添加濃度: 20 $\mu\text{g/g}$)



標準溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

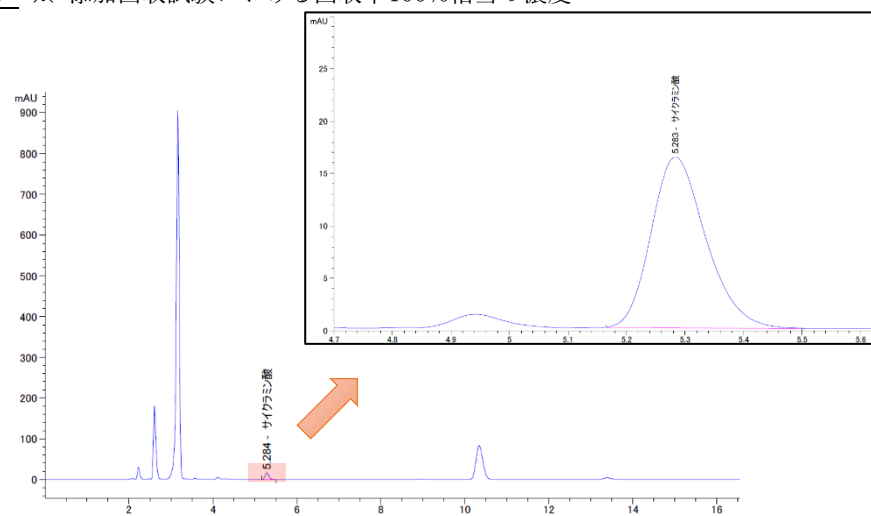
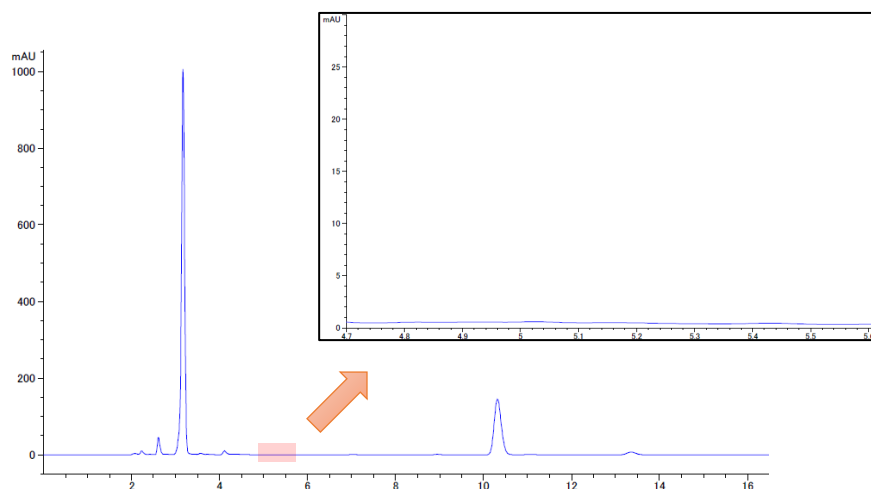
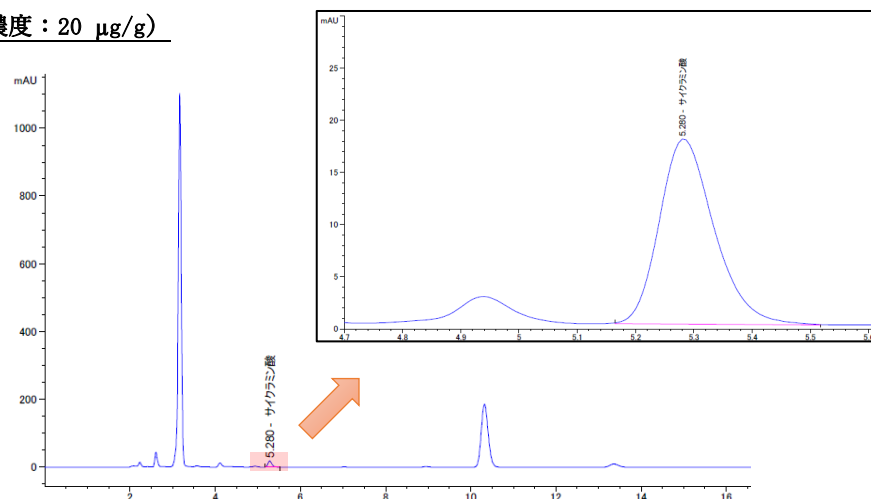


図6 ブルーベリージャムのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料 (添加濃度: 20 $\mu\text{g/g}$)



標準溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

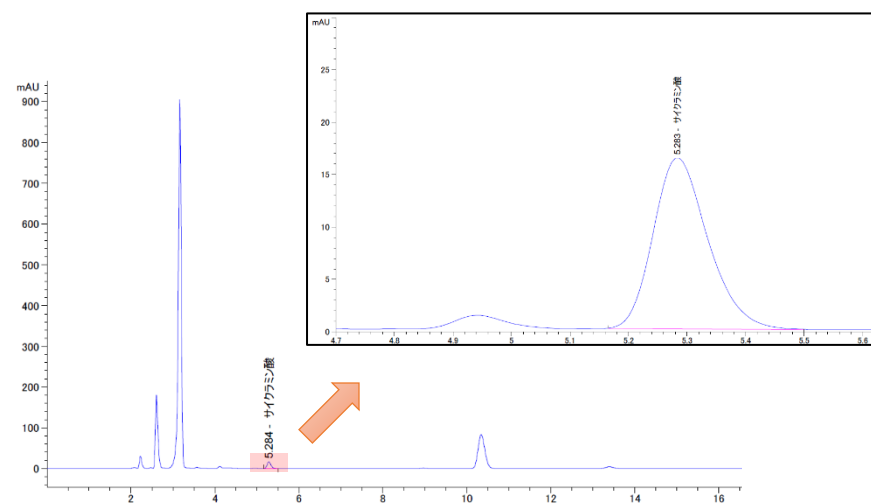
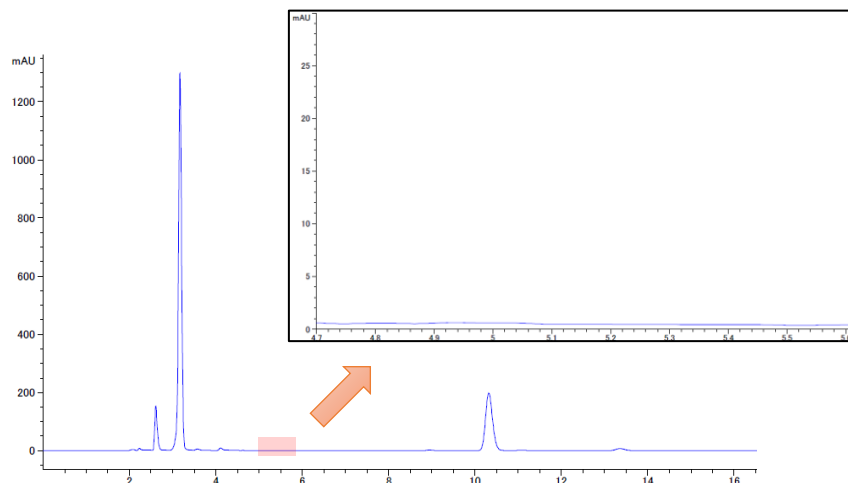
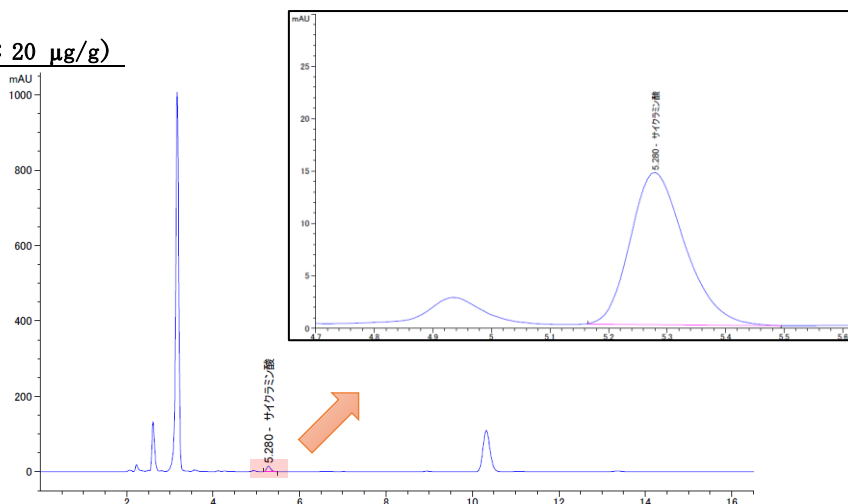


図7 りんごゼリーのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料（添加濃度：20 $\mu\text{g/g}$ ）



標準溶液（1 $\mu\text{g/mL}$ ） ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

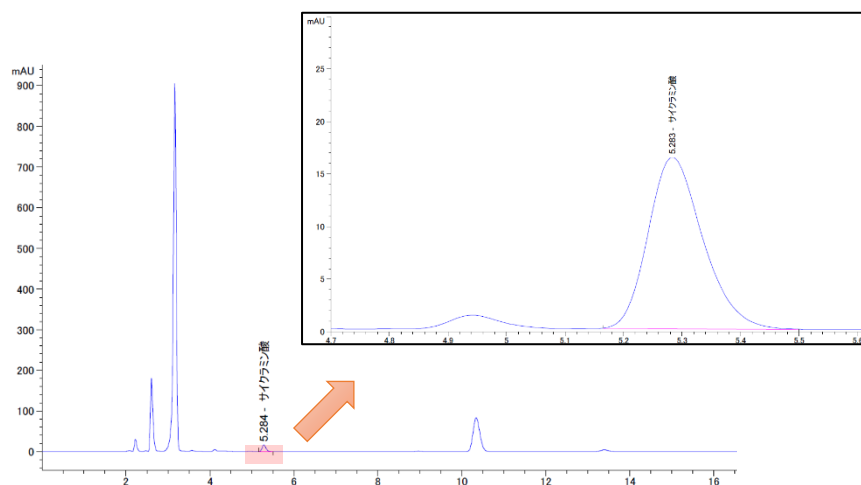


図8 ビスケットのクロマトグラム

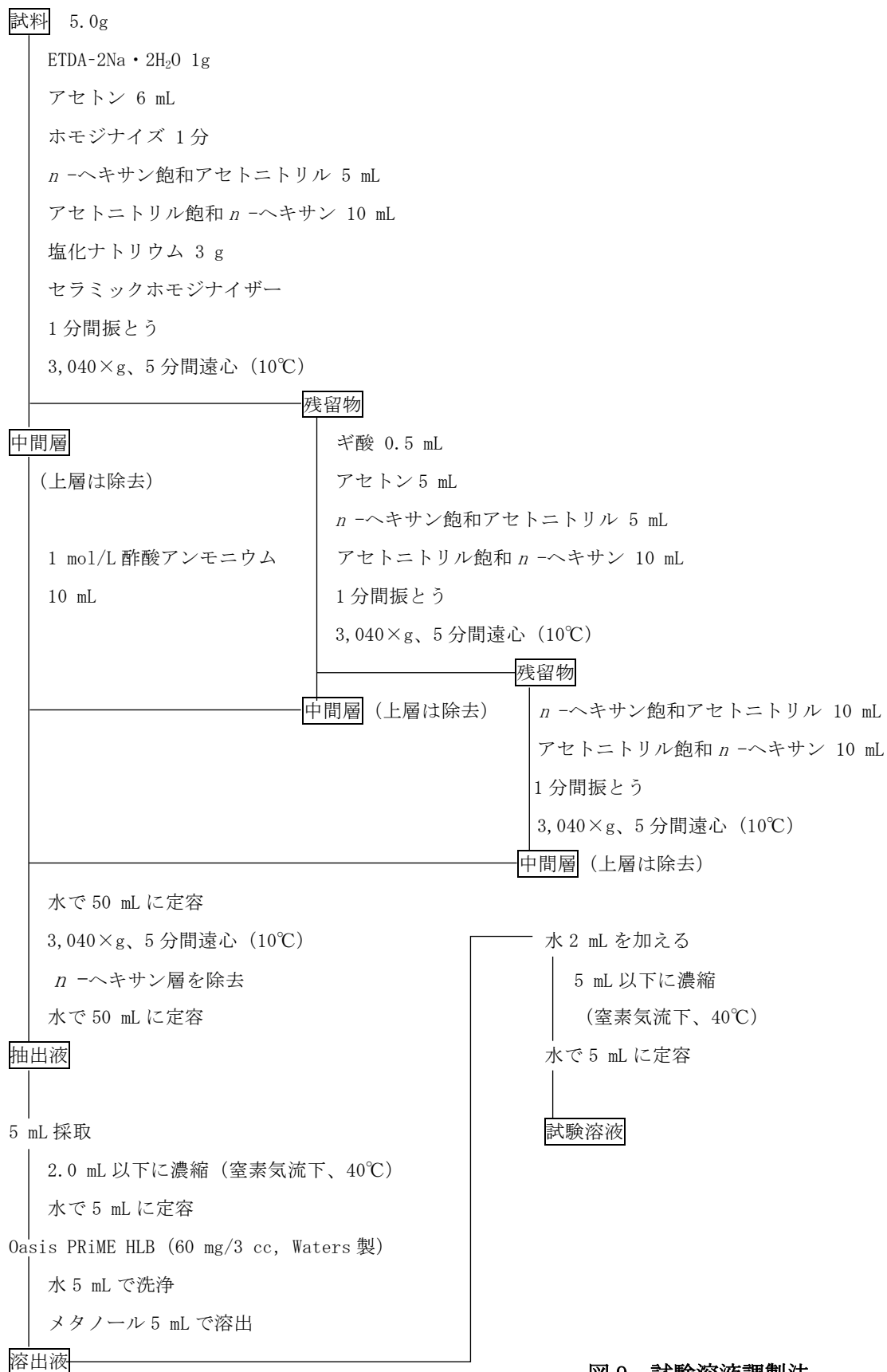


図 9 試験溶液調製法

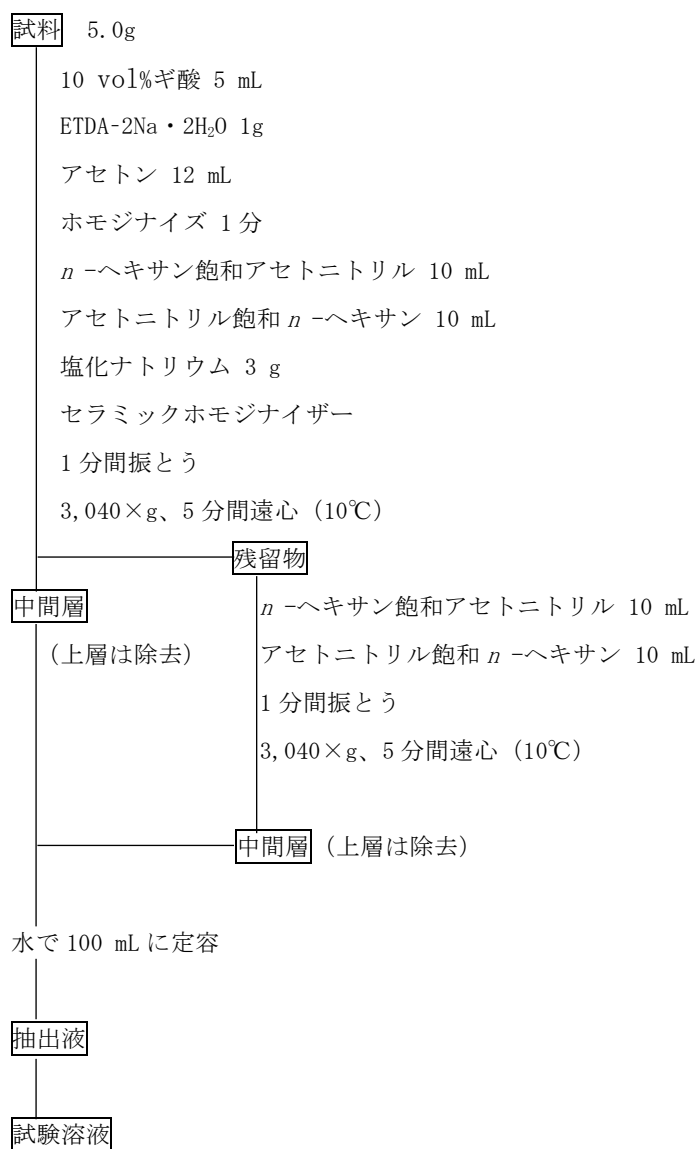


図 10 大門らの試験溶液調製法

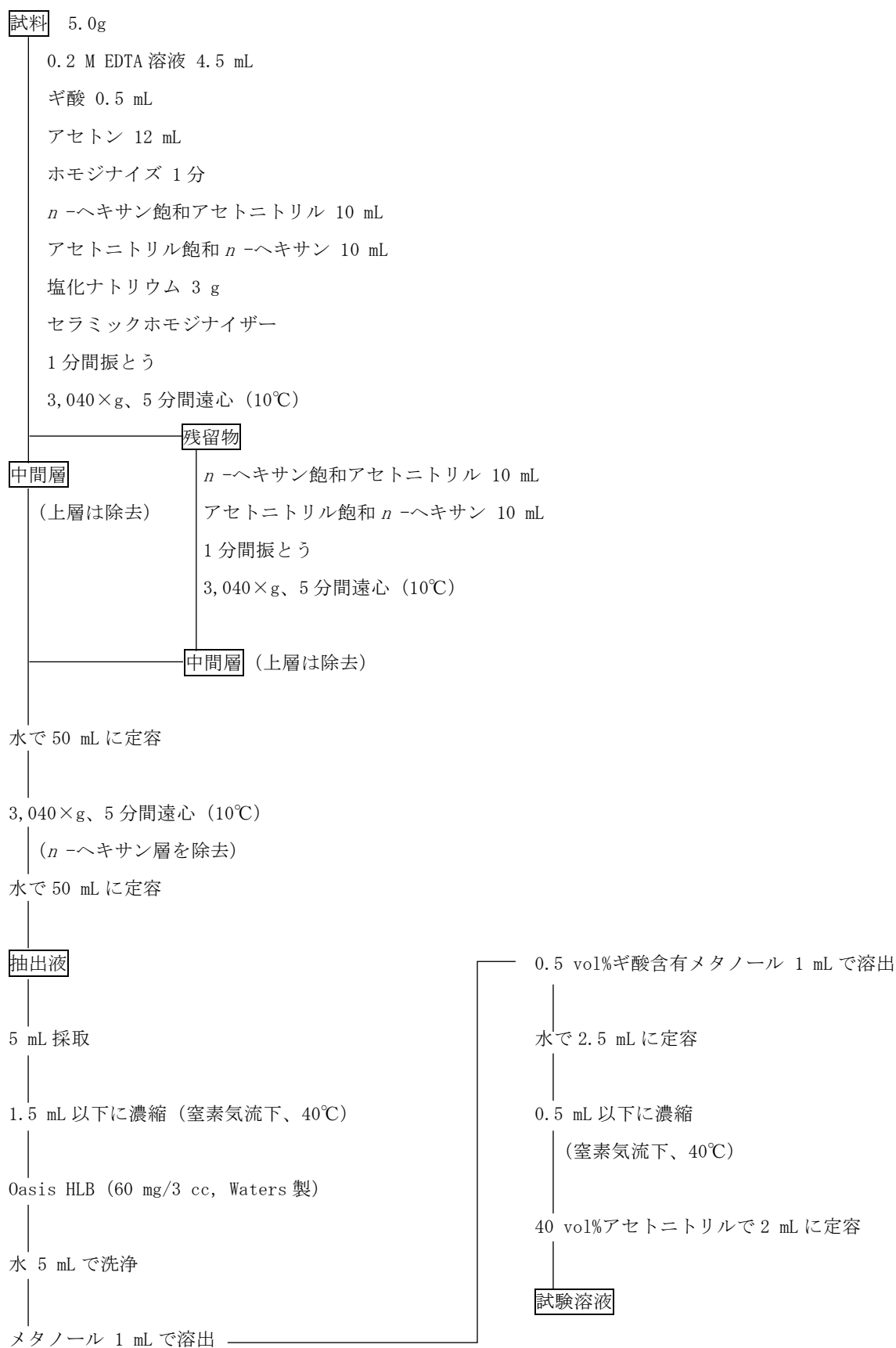


図 11 齊藤らの試験溶液調製法

表 1 新規分析法における添加回収試験結果

検体	オレンジ ジュース	ブルーベリー ジャム	りんごゼリー	ビスケット
真度 (%)	96.9	93.2	103.9	94.5
併行精度 (RSD%)	4.1	0.3	1.8	4.3
20 µg/g 添加				(<i>n</i> =5)

表 2 LC-MS/MS 条件

LC 条件

装置	ACQUITY UPLC H-Class (Waters 製)			
カラム	L-Column ODS (3 µm, 2.1×100 mm, 化学物質評価研究機構製)			
移動相	A : 蒸留水 B : アセトニトリル C : 0.2 vol% ギ酸			
グラジエント条件	時間	A	B	C
	(分)	(%)	(%)	(%)
	0	85	5	10
	16	45	45	10
	20	5	85	10
	26	5	85	10
	26.1	85	5	10
	35	85	5	10
流速	0.2 mL/min			
カラム温度	40°C			
注入量	2 µL			
測定時間	35 分			

MS 条件

装置	Xevo TQ-S (Waters 製)
イオン化モード	ESI (Positive / Negative)
キャピラリー電圧	1.0 kV
ソース温度	150°C
デゾルベーション温度	500°C
コーンガス流量	150 L/hr
デゾルベーションガス流量	1000 L/hr

表3 SRM 条件

No.	化合物名	定量			定性			No.	化合物名	定量			定性		
1	2-Acetyl-amino-5-nitrothiazole	186	>	139	186	>	96	34	Emamectin Bla	887	>	158	887	>	82
2	6a_Methylprednisolone	375	>	357	375	>	161	35	Emamectin Bla Isomer	887	>	158	887	>	82
3	Aklomide	201	>	155	201	>	184	36	Enlofloxacin	360	>	316	360	>	245
4	Allethrin	303	>	135	303	>	93	37	Erythromycin	734	>	158	734	>	83
5	Altrenogest	311	>	227	311	>	269	38	Ethopadate	238	>	206	238	>	136
6	Azaperol	330	>	121	330	>	149	39	Famphur	326	>	93	326	>	217
7	Azaperone	328	>	165	328	>	95	40	Febantel	447	>	415	447	>	383
8	Benzocaine	166	>	138	166	>	77	41	Fenbendazole	300	>	159	300	>	268
9	Benzylpenicillin	335	>	160	335	>	176	42	Fenobucarb	208	>	95	208	>	152
10	Betamethasone	393	>	373	393	>	355	43	Florfenicol	356	>	185	356	>	336
11	Bithionol	355	>	163	355	>	194	44	Florfenicol amine	248	>	230	248	>	130
12	Bromacil	261	>	205	261	>	188	45	Flubendazole	314	>	282	314	>	123
13	Carazolol	299	>	116	299	>	194	46	Flumequine	262	>	244	262	>	202
14	Carprofen	272	>	226	272	>	228	47	Flunixin	297	>	279	297	>	264
15	Cefazolin	455	>	323	455	>	156	48	Furazolidone	226	>	122	226	>	95
16	Cefoperazone	646	>	143	646	>	530	49	Halofuginone	416	>	100	416	>	138
17	Chloramphenicol	321	>	152	321	>	121	50	Hydrocortisone	363	>	121	363	>	91
18	Chlortetracycline	479	>	444	479	>	462	51	Ivermectin Bla	897	>	753	897	>	329
19	Ciprofloxacin	332	>	288	332	>	314	52	Josamycin	829	>	174	829	>	600
20	Clenbterol	277	>	203	277	>	132	53	Ketoprofen	255	>	105	255	>	209
21	Clopidol	192	>	87	192	>	101	54	Lincomycin	407	>	126	407	>	359
22	Clorsulon	378	>	342	378	>	142	55	Mafoprozine	402	>	193	402	>	150
23	Closantel	661	>	127	661	>	345	56	Marbofloxacin	363	>	72	363	>	320
24	Clostebol	323	>	131	323	>	305	57	Mebendazol	296	>	264	296	>	105
25	Cloxacillin	436	>	160	436	>	277	58	Mecillinam	326	>	167	326	>	139
26	Danofloxacin	358	>	96	358	>	82	59	Melengestrol acetate	397	>	279	397	>	337
27	Dexamethason	393	>	373	393	>	355	60	Meloxicam	352	>	115	352	>	141
28	Diclazuril	405	>	334	405	>	299	61	Menbutone	259	>	241	259	>	185
29	Dicloxacillin	470	>	160	470	>	311	62	Miloxacin	264	>	246	264	>	215
30	Difloxacin	400	>	299	400	>	356	63	Mirosamicin	728	>	158	728	>	116
31	Di-flubenzron	311	>	141	311	>	158	64	Morantel	221	>	123	221	>	111
32	Dinitolmide	224	>	181	224	>	151	65	Nafceillin	415	>	199	415	>	171
33	Doxycycline	445	>	428	445	>	154	66	Nalidixic acid	233	>	215	233	>	187

No.	化合物名	定量		定性		No.	化合物名	定量		定性	
67	Nicarbazin	301	> 137	301	> 107	99	Sulfamethoxazole	254	> 92	254	> 156
68	Nifrustyrenate	258	> 214	258	> 114	100	Sulfamethoxypyridazine	281	> 92	281	> 156
69	Nitroxinil	289	> 127	289	> 162	101	Sulfamoidapsone	328	> 311	328	> 108
70	Norfloxacin	320	> 276	320	> 302	102	Sulfamonomethoxine	281	> 92	281	> 156
71	Novobiocin	613	> 189	613	> 218	103	Sulfanitran	334	> 136	334	> 270
72	Ofloxacin	362	> 318	362	> 261	104	Sulfapyridine	250	> 92	250	> 156
73	Oleandomycin	688	> 158	688	> 544	105	Sulfaquinoxaline	301	> 156	301	> 92
74	Orbifloxacin	396	> 295	396	> 352	106	Sulfathiazole	256	> 156	256	> 92
75	Oxacillin	402	> 160	402	> 243	107	Sulfatoroxazole	268	> 92	268	> 156
76	Oxfendazole	316	> 159	316	> 191	108	Sulfisozole	240	> 92	240	> 156
77	Oxfendazole Sulfon	332	> 159	332	> 300	109	Temephos	467	> 125	467	> 419
78	Oxibendazol	250	> 218	250	> 148	110	Tetracycline	445	> 410	445	> 154
79	Oxolinic acid	262	> 244	262	> 216	111	Thiabendazole	202	> 131	202	> 175
80	Oxytetracycline	461	> 426	461	> 444	112	Thiabendazole_5_OH	218	> 147	218	> 191
81	Phenoxymethylpenicillin	351	> 160	351	> 114	113	Thiamphenicol	354	> 185	354	> 79
82	Praziquantel	313	> 203	313	> 174	114	Tiamulin	494	> 192	494	> 119
83	Prednisolone	361	> 147	361	> 343	115	Tolfenamic_acid	262	> 244	262	> 209
84	Prifinium	307	> 86	307	> 91	116	Trichlorfon	257	> 109	257	> 221
85	Pyrantel	207	> 150	207	> 136	117	Triclabendazole	359	> 344	359	> 274
86	Pyrimethamine	249	> 177	249	> 233	118	Triclabendazole Sulfone	391	> 242	391	> 312
87	R35475	256	> 123	256	> 95	119	Trimethoprim	291	> 123	291	> 230
88	Rifaximin	787	> 754	787	> 151	120	Tripelennamine	256	> 211	256	> 91
89	Sarafloxacin	386	> 342	386	> 299	121	Tylosin	917	> 174	917	> 88
90	Sulfabenzamide	277	> 156	277	> 108	122	Valnemulin	565	> 263	565	> 164
91	Sulfabromomethazine	357	> 156	357	> 92	123	Virginiamycin M1	526	> 508	526	> 105
92	Sulfacetamide	215	> 156	215	> 92	124	Virginiamycin S1	824	> 205	824	> 177
93	Sulfachlorpyridazine	285	> 156	285	> 92	125	Warfarin	309	> 163	309	> 251
94	Sulfadiazine	251	> 156	251	> 92	126	Xylazine	221	> 147	221	> 164
95	Sulfadimethoxine	311	> 156	311	> 92	127	Zeranol	321	> 277	321	> 91
96	Sulfadimidine	279	> 92	279	> 186	128	a-Trenbolone	271	> 199	271	> 253
97	Sulfadoxine	311	> 156	311	> 92	129	b-Trenbolone	271	> 199	271	> 253
98	Sulfamerazine	265	> 92	265	> 156						

表 4 添加回收試驗結果

No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	89.4	5.8	34	Emamectin Bla	114.0	1.3
2	6a_Methylprednisolone	99.8	4.3	35	Emamectin Bla Isomer	105.7	1.3
3	Aklomide	97.2	6.9	36	Enlofloxacin	109.4	6.0
4	Allethrin	18.9	14.1	37	Erythromycin	55.8	5.1
5	Altrenogest	79.6	2.7	38	Ethopadate	97.5	2.6
6	Azaperol	91.9	21.0	39	Famphur	96.7	2.0
7	Azaperone	102.8	16.4	40	Febantel	77.6	2.8
8	Benzocaine	151.0	7.4	41	Fenbendazole	92.6	2.5
9	Benzylpenicillin	51.5	10.8	42	Fenobucarb	81.3	3.1
10	Betamethasone	99.9	5.8	43	Florfenicol	91.6	6.8
11	Bithionol	44.3	11.9	44	Florfenicol amine	0.0	-
12	Bromacil	92.8	2.7	45	Flubendazole	102.0	4.2
13	Carazolol	106.4	2.1	46	Flumequine	94.4	3.5
14	Carprofen	80.1	12.0	47	Flunixin	87.6	1.4
15	Cefazolin	76.5	4.4	48	Furazolidone	92.1	11.6
16	Cefoperazone	77.3	15.6	49	Halofuginone	71.8	6.0
17	Chloramphenicol	93.6	13.0	50	Hydrocortisone	101.7	6.9
18	Chlortetracycline	40.2	12.9	51	Ivermectin Bla	417.4	7.7
19	Ciprofloxacin	118.9	2.5	52	Josamycin	104.8	3.2
20	Clenbterol	98.4	2.2	53	Ketoprofen	103.3	1.1
21	Clopidol	31.2	39.8	54	Lincomycin	0.0	-
22	Clorsulon	103.5	5.4	55	Mafopezine	113.6	2.4
23	Closantel	48.1	12.9	56	Marbofloxacin	100.7	6.0
24	Clostebol	86.3	5.6	57	Mebendazol	99.0	1.4
25	Cloxacillin	67.1	4.8	58	Mecillinam	27.4	30.3
26	Danofloxacin	86.3	9.5	59	Melengestrol acetate	83.8	3.5
27	Dexamethason	81.5	5.0	60	Meloxicam	80.8	5.5
28	Diclazuril	104.5	4.6	61	Menbutone	87.7	10.4
29	Dicloxacillin	104.6	5.1	62	Miloxacin	87.5	1.7
30	Difloxacin	85.0	10.4	63	Mirosamicin	108.6	1.8
31	Diqlubenzron	86.6	2.6	64	Morantel	95.8	7.0
32	Dinitolmide	121.6	20.3	65	Nafcillin	65.2	6.4
33	Doxycycline	41.0	6.7	66	Nalidixic acid	94.5	2.9

No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
67	Nicarbazin	69.4	5.7	99	Sulfamethoxazole	94.7	1.7
68	Nifrustyrenate	74.1	10.7	100	Sulfamethoxyipyridazine	89.5	2.9
69	Nitroxinil	90.4	5.6	101	Sulfamoidapsone	94.1	3.1
70	Norfloxacin	76.3	12.4	102	Sulfamonomethoxine	95.9	2.3
71	Novobiocin	64.9	6.3	103	Sulfanitran	97.2	5.5
72	Ofloxacin	101.4	4.8	104	Sulfapyridine	89.8	2.5
73	Oleandomycin	98.4	2.4	105	Sulfaquinoxaline	94.7	1.7
74	Orbifloxacin	98.7	1.9	106	Sulfathiazole	88.0	1.4
75	Oxacillin	64.3	5.4	107	Sulfatoroxazole	95.7	1.8
76	Oxfendazole	95.4	0.8	108	Sulfisozole	93.0	4.2
77	Oxfendazole Sulfon	100.1	1.4	109	Temephos	37.4	9.6
78	Oxibendazol	104.8	1.5	110	Tetracycline	39.6	8.3
79	Oxolinic acid	93.4	2.5	111	Thiabendazole	102.5	1.2
80	Oxytetracycline	36.2	12.3	112	Thiabendazole_5_OH	130.1	10.6
81	Phenoxymethylpenicillin	52.7	14.0	113	Thiamphenicol	116.6	16.2
82	Praziquantel	95.9	1.6	114	Tiamulin	126.2	1.4
83	Prednisolone	94.0	5.7	115	Tolfenamic_acid	60.0	2.9
84	Prifinium	109.8	48.3	116	Trichlorfon	82.1	10.7
85	Pyrantel	109.4	5.8	117	Triclabendazole	76.6	3.9
86	Pyrimethamine	88.8	2.5	118	Triclabendazole Sulfone	92.7	2.9
87	R35475	100.2	1.4	119	Trimethoprim	84.1	3.7
88	Rifaximin	3.1	109.5	120	Tripelennamine	117.2	10.9
89	Sarafloxacin	115.9	2.6	121	Tylosin	101.5	1.7
90	Sulfabenzamide	90.9	2.0	122	Valnemulin	101.3	2.1
91	Sulfabromomethazine	92.2	2.5	123	Virginiamycin M1	100.3	2.7
92	Sulfacetamide	70.4	13.3	124	Virginiamycin S1	99.9	6.9
93	Sulfachlorpyridazine	95.4	1.3	125	Warfarin	102.5	3.1
94	Sulfadiazine	92.9	1.0	126	Xylazine	102.6	4.0
95	Sulfadimethoxine	97.5	1.2	127	Zeranol	106.5	7.3
96	Sulfadimidine	90.0	2.1	128	a-Trenbolone	95.3	1.9
97	Sulfadoxine	97.5	2.1	129	b-Trenbolone	89.8	2.9
98	Sulfamerazine	91.4	2.5				

表 5 各化合物の抽出率

No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)
1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	81.4	6.4	34	Emamectin Bla	119.7	1.5
2	6a_Methylprednisolone	88.1	7.5	35	Emamectin Bla Isomer	116.5	1.6
3	Aklomide	73.2	4.3	36	Enlofloxacin	131.0	6.1
4	Allethrin	40.9	4.1	37	Erythromycin	96.0	3.8
5	Altrenogest	86.9	3.0	38	Ethopadate	99.6	1.6
6	Azaperol	130.2	2.2	39	Famphur	101.2	1.5
7	Azaperone	147.6	1.4	40	Febantel	81.2	1.8
8	Benzocaine	95.0	0.5	41	Fenbendazole	99.5	0.4
9	Benzylpenicillin	50.8	12.4	42	Fenobucarb	85.2	2.3
10	Betamethasone	103.9	5.2	43	Florfenicol	83.8	14.2
11	Bithionol	65.8	6.9	44	Florfenicol amine	3.8	137.5
12	Bromacil	94.7	0.8	45	Flubendazole	101.3	3.0
13	Carazolol	112.4	2.3	46	Flumequine	95.0	1.5
14	Carprofen	90.2	14.4	47	Flunixin	87.2	1.3
15	Cefazolin	72.5	17.9	48	Furazolidone	146.8	5.4
16	Cefoperazone	81.4	36.4	49	Halofuginone	73.4	6.4
17	Chloramphenicol	98.1	6.8	50	Hydrocortisone	94.5	4.0
18	Chlortetracycline	40.7	8.8	51	Ivermectin Bla	139.3	12.4
19	Ciprofloxacin	130.6	1.1	52	Josamycin	107.0	2.8
20	Clenbterol	98.6	3.9	53	Ketoprofen	103.1	0.7
21	Clopidol	102.2	10.1	54	Lincomycin	2.1	61.0
22	Clorsulon	100.5	10.2	55	Mafoprozine	119.2	4.6
23	Closantel	72.6	6.1	56	Marbofloxacin	111.7	2.3
24	Clostebol	90.9	3.0	57	Mebendazol	96.4	2.1
25	Cloxacillin	69.0	5.9	58	Mecillinam	55.8	7.8
26	Danofloxacin	96.7	3.9	59	Melengestrol acetate	92.2	1.9
27	Dexamethason	74.4	7.6	60	Meloxicam	82.5	5.3
28	Diclazuril	101.7	3.5	61	Menbutone	92.9	11.0
29	Dicloxacillin	82.4	14.6	62	Miloxacin	92.1	0.9
30	Difloxacin	97.3	2.9	63	Mirosamicin	109.7	1.8
31	Di flubenzron	92.1	2.1	64	Morantel	105.2	5.9
32	Dinitolmide	135.1	19.6	65	Nafcillin	69.3	4.6
33	Doxycycline	49.6	7.5	66	Nalidixic acid	95.6	2.0

No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)
67	Nicarbazin	81.1	7.0	99	Sulfamethoxazole	89.2	1.2
68	Nifrustyrenate	97.3	9.3	100	Sulfamethoxypyridazine	87.1	4.2
69	Nitroxinil	96.1	4.8	101	Sulfamoidapsone	96.7	8.9
70	Norfloxacin	85.3	5.2	102	Sulfamonomethoxine	85.0	2.0
71	Novobiocin	73.2	10.9	103	Sulfanitran	96.5	3.0
72	Ofloxacin	114.1	2.9	104	Sulfapyridine	86.0	2.9
73	Oleandomycin	99.1	2.6	105	Sulfaquinoxaline	88.1	1.7
74	Orbifloxacin	100.4	3.2	106	Sulfathiazole	76.4	2.5
75	Oxacillin	63.1	6.4	107	Sulfatoroxazole	98.6	1.6
76	Oxfendazole	87.6	2.1	108	Sulfisozole	86.9	4.3
77	Oxfendazole Sulfon	94.7	1.3	109	Temephos	86.6	4.2
78	Oxibendazol	109.4	0.6	110	Tetracycline	35.2	8.8
79	Oxolinic acid	97.7	2.1	111	Thiabendazole	112.0	2.6
80	Oxytetracycline	27.2	12.7	112	Thiabendazole_5_OH	162.4	10.8
81	Phenoxyethylpenicillin	58.1	16.3	113	Thiamphenicol	117.8	11.7
82	Praziquantel	95.7	1.1	114	Tiamulin	118.7	2.2
83	Prednisolone	91.6	4.1	115	Tolfenamic_acid	76.1	1.5
84	Prifinium	80.0	33.8	116	Trichlorfon	111.7	1.8
85	Pyrantel	113.1	2.3	117	Triclabendazole	86.1	0.9
86	Pyrimethamine	88.8	3.1	118	Triclabendazole Sulfone	97.3	2.0
87	R35475	99.8	2.8	119	Trimethoprim	86.1	4.5
88	Rifaximin	31.8	65.9	120	Tripelennamine	147.5	2.4
89	Sarafloxacin	121.0	3.1	121	Tylosin	106.1	2.9
90	Sulfabenzamide	90.1	2.6	122	Valnemulin	102.9	1.3
91	Sulfabromomethazine	91.5	0.7	123	Virginiamycin M1	101.7	3.0
92	Sulfacetamide	117.4	5.7	124	Virginiamycin S1	97.8	4.9
93	Sulfachlorpyridazine	86.0	1.9	125	Warfarin	111.9	2.2
94	Sulfadiazine	84.1	3.3	126	Xylazine	104.4	6.9
95	Sulfadimethoxine	96.8	1.6	127	Zeranol	99.7	5.8
96	Sulfadimidine	88.1	1.9	128	a-Trenbolone	94.4	3.6
97	Sulfadoxine	94.6	1.5	129	b-Trenbolone	91.8	3.1
98	Sulfamerazine	82.5	0.9				