

II.総合分担研究報告

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

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）

令和 5～7 年度 総合分担研究報告書

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田（齊藤） 静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長

研究要旨

牛肉等の食肉を EU へ輸出する際には、動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。A 物質が検出された場合には、原因究明及び必要な措置が完了するまで EU への輸出は停止される。さらに、輸出先である EU における輸入時検査で A 物質が検出された場合には、我が国においても当該物質に係る検査を実施し、原因調査を行う必要がある。このような事案に迅速に対応し、輸出再開につなげるためには、原因究明に資する分析法の整備が不可欠である。令和 5 年度は、EU 向けに動物性食品を輸出する際に求められるモニタリング検査において A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立した。本分析法は、試料に塩酸及びエチレンジアミン四酢酸溶液を添加後、3-ヨードベンジルブロミドにより誘導体化し、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 により測定する方法である。また、同様の目的で、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類分析法を確立した。本分析法は、 β -グルクロニダーゼ／アシルスルファターゼによる抱合体の加水分解後、イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。令和 6 年度は、輸出先である EU で行われる検査で牛肉から A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、牛肉中のステロイド類分析法及びスチルベン類分析法を開発した。ステロイド類分析法は、ヘキサン飽和アセトニトリル抽出及びヘキサン洗浄の後、グラファイトカーボン／エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。また、スチルベン類分析法は、エタノール／水 (9:1, v/v) で抽出後、 β -グルクロニダーゼによる加水分解を行い、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。令和 7 年度は、EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β -作動薬分析法を確立した。ニトロイミダゾール類分析法は、アセトン及び酢酸による抽出後、強酸性陽イオン交換ミニカラムで精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。また、 β -作動薬分析法は、アセトン抽出後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。妥当性評価試験の結果、本課題で確立したすべての分析法は、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たし、迅速な原因究明及び輸出再開に資する残留分析法として妥当であることが確認された。

研究協力機関

（一財）日本食品分析センター

A. 研究目的

欧州連合（EU）への牛肉等の動物性食品の輸出に際しては、欧州議会及び理事会規則

(EU) 2017/625、欧州委員会委任規則 (EU) 2022/1644 及び欧州委員会実施規則 (EU) 2022/1646 に基づき、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、抗甲状腺薬、ステロイド類、ゼラノールを含むレゾルシル酸ラクトン、 β -作動薬、クロラムフェニコール等のその他の禁止物質）及びB物質（抗菌性物質、殺虫剤、殺菌剤、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤、その他の薬理活性物質）のモニタリング検査を行う必要がある。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を検査し、基準値を超過した場合には原因の調査が求められる。一方、A 物質が検出された場合には、原因究明及び必要な措置が完了するまで EU への輸出は停止される。また、輸出先である EU で行われる検査で牛肉から A 物質が検出された場合には、我が国においても牛肉の検査を実施し、原因調査を行う必要がある。そこで本研究では、モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合に、原因究明に資する分析法を開発し、原因究明から輸出再開までの対応を迅速化する体制の構築を目的とした。令和 5 年度は、EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合の原因調査に資するため、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの分析法を確立し、その分析性能を評価した。また、レゾルシル酸ラクトン類が検出された場合の原因調査に資するため、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類（ α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN）の分析法を確立し、同様に分析性能を評価した。令和 6 年度は、EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合の原因調

査に資する分析法として、牛肉中のステロイド類（エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシprogesterone）分析法及びスチルベン類（ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール）分析法を確立し、その妥当性を評価した。さらに令和 7 年度は、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β -作動薬（クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール）分析法を確立し、これらの分析法の妥当性を評価した。

B. 研究方法

[令和 5 年度]

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル 2-チオウラシル分析法

1. 試薬・試液

2-チオウラシル：純度99.91%（Toronto Research Chemicals製）

4-チオウラシル：純度98.9%（Merck製）

6-メチル-2-チオウラシル：純度98.3%（Merck製）

[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-チオウラシル（[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル）：純度97%（Toronto Research Chemicals製）

[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル：純度99.3%（Alsachim製）

[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-4-ヒドロキシ-2-メルカプト-6-メチルピリミジン（[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシル）：純度99.8%（Alsachim製）

アセトニトリル：LC-MS用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール、塩酸、酢酸、

リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム：特級（富士フイルム和光純薬製）

エタノール：特級（99.5%：キシダ化学製）

リン酸水素二ナトリウム二水和物：分析用（Merck 製）

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物：試験研究用（同仁化学研究所製）

3-ヨードベンジルブロミド（東京化成工業製）

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（150 mg/6 mL：Waters製）

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

1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 8）：リン酸二水素カリウム2.1 g及びリン酸水素二ナトリウム二水和物86.3 gに水を加えて温めながら溶解後、水を加えて正確に500 mLとした。

6 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム120 gに水を加えて溶解後、水を加えて正確に500 mLとした。

0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液：エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物9.3 gに水約80 mLを加えた後、攪拌しながら6 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpHを8.0に調整し、さらに約10分間攪拌して溶解後、水を加えて正確に100 mLとした。

3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液：3-ヨードベンジルブロミド 20 mg にメタノール 8 mL を加えて溶解した。

標準原液：2-チオウラシル、4-チオウラシル、6-メチル-2-チオウラシルは各標準品約10 mgを精秤し、エタノールに溶解してそれぞれ100 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル、[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル、[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシルは

各標準品 1 mg を精秤し、エタノールに溶解してそれぞれ 50 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：2-チオウラシル標準原液、4-チオウラシル標準原液及び6-メチル-2-チオウラシル標準原液を混合後、エタノールで希釈して0.1 mg/L標準溶液を調製した。

添加用内標準溶液：[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル内標準原液、[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル内標準原液及び[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシル内標準原液を混合後、エタノールで希釈して 1 mg/L 内標準溶液を調製した。

試料：牛尿をよく混合後、毎分 3500 回転で 5 分間遠心分離し、上澄みを試料とした。

2. 装置

ロータリーエバポレーター：N-1000（東京理化学器械製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

pH計：F-72（堀場製）

振とう恒温水槽：BT101（ヤマト科学製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-1-1）

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

水2.5 mLに塩酸10 μ L及び0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加え、標準溶液及び内標準溶液を添加した後、0.5、1、2、5及び10 μ g/L（内標準溶液は5 μ g/L）の濃度の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入して、得られた[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシルに対する2-チオウラシル、[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシルに対する4-チオウラシル及び[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシルに対する6-

メチル-2-チオウラシルのピーク面積比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、検量線から内部標準法により2-チオウラシル、4-チオウラシル及び6-メチル-2-チオウラシルの含量を算出した。

4. 添加試料の調製

牛尿を5 a. に従って前処理を行った後、添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 250 µL及び添加用内標準溶液 (1 mg/L) 125 µLを添加したものを添加試料として用いた。

5. 試験溶液の調製

a. 前処理

試料 2.5 mLを遠心管 (15 mL容) に採取し、塩酸 10 µL 及び 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液 100 µL を加えて混合した。

b. 誘導体化反応

a. で得られた溶液に1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 8) 7.5 mL及び3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液250 µLを加え、40°Cの水浴中で60分間振とうした。

c. 精製

b. で得られた反応液を、あらかじめメタノール5 mL及び水5 mLでコンディショニングしたジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (150 mg/6 mL)] に負荷した。遠心管内を水5 mLで洗い、洗液をミニカラムに負荷した。水5 mL及び水/メタノール (3 : 2) 5 mLで順次洗浄した後、1分間吸引した。アセトニトリル約25 mLで溶出し、全量をフラスコ (25 mL容) に受けた後、アセトニトリルで25 mLに定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

6. マトリックス添加標準溶液の調製

無添加試験溶液2.5 mLをロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、2-チオウラシル、

4-チオウラシル及び6-メチル-2-チオウラシル混合標準溶液 (0.001 mg/L) 2.5 mLを加えて溶解したものをマトリックス標準溶液とした。

7. 妥当性評価試験

牛尿を対象に添加濃度 10 µg/L で性能評価試験を実施した。「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(妥当性評価ガイドライン) に従って 1 日 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求めた。牛尿を 5 a. に従って前処理を行った後、添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 250 µL 及び添加用内標準溶液 (1 mg/L) 125 µL を添加したものを添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出されたため、2-チオウラシルについては、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差し引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. 試薬・試液

β-ZAL 標準品：純度 99.22% (Merck 製)

ZAN 標準品：純度 98.0% (富士フイルム和光純薬製)

ZEN 標準品：純度 99.5% (Merck 製)

α-ZAL 標準品：純度 98.6% (富士フイルム和光純薬製)

メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：高速液体クロマトグラフ用 (富士フイルム和光純薬製)

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)

酢酸、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム：特級 (関東化学製)

β-グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ

(*Helix pomatia* 由来) : 生化学用 (Merck 製)

イムノアフィニティーカラム : ZearalaTest WB
(VICAM 製)

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

0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) : 酢
酸ナトリウム 4.1 g を量り、水 200 mL を加えて
溶かし、酢酸で pH を 4.8 に調整した。

標準原液 : α-ZAL、β-ZAL 及び ZAN は各標
準品約 2 mg (α-ZAL は約 5 mg) を精秤し、そ
れぞれ水/アセトニトリル (1 : 1) に溶解して
100 mg/L 濃度の溶液を調製した。

ZEN は標準品約 10 mg を精秤し、メタノール
(高速液体クロマトグラフ用) に溶解して 100
mg/L 濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液 : 各標準原液を混合後、水/
アセトニトリル (3 : 1) で希釈して 10 及び 20
μg/L 混合標準溶液を調製した。

試料 : 牛尿をよく混合後、毎分 3500 回転で 5
分間遠心分離し、上澄みを試料とした。

2. 装置

ロータリーエバポレーター : N-1300 (東京理
化器械製)

pH 計 : D-72 (堀場製)

振とう恒温水槽 : T-N22S (トーマス科学器械
製)

試験管ミキサー : AUTOMATIC MIXER S-100
(タイテック製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-1-2)

装 置	型 式	メーカー
MS	Triple Quad 4500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

3. 定量

添加用混合標準溶液を水/アセトニトリル
(3 : 1) で希釈し、0.5、1、2、5 及び 10 μg/L
濃度の混合標準溶液を調製した。この溶液 5
μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク
面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5
μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検
量線法により α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN
の含量を算出した。

4. 添加試料の調製

牛尿試料 2 mL に、10 または 20 μg/L 濃度の
混合標準溶液を 0.2 mL 添加したものをそれぞ
れ添加濃度 1 及び 2 μg/L の添加試料として用い
た。

5. 試験溶液の調製

試料 2 mL を遠心管 (50 mL 容) に量り採り、
0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) 2
mL を加えた後、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩
衝液 (pH 4.8) 及び β-グルクロニダーゼ/アリル
スルファターゼの混液 (9 : 1) 20 μL を加え、
試験管ミキサーでよく攪拌した。これを密栓
した後、55°C の水浴中で 2 時間振とうした。

反応液を室温に戻した後、イムノアフィニ
ティーカラム (ZearalaTest WB) に負荷した。
遠心管内を水 20 mL で洗い、洗液を負荷した。
カラムを水/メタノール (9 : 1) 10 mL で 3 回洗
浄後、メタノール 5 mL で溶出した。溶出液を
ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮し、
窒素気流下で溶媒を除去した。残留物を水/ア
セトニトリル (3 : 1) 2 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

ブランク試験溶液 1 mL を遠心管 (50 mL 容) に分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固した。これに、1 または 2 µg/L の混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをそれぞれ 1 及び 2 µg/L 濃度のマトリックス標準溶液とした。

7. 妥当性評価試験

牛尿を対象に添加濃度 1 及び 2 µg/L で性能評価試験を実施した。「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(妥当性評価ガイドライン) に従って 1 日 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求めた。牛尿試料 2 mL に、10 または 20 µg/L 濃度の混合標準溶液を 0.2 mL 添加したものをそれぞれ添加濃度 1 及び 2 µg/L の添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられる ZEN のピークが検出されたため、ZEN については、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差し引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

[令和 6 年度]

[1] ステロイド類 (エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン) 分析法

1. 試料

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

2. 試薬・試液

17β-エストラジオール標準品：純度99.3%(関東化学製)

17β-テストステロン標準品：純度99.6%(Sigma-Aldrich製)

エチニルエストラジオール標準品：純度99.7%(Sigma-Aldrich製)

酢酸メレンゲステロール標準品：純度98.1%(富士フイルム和光純薬製)

メチルテストステロン標準品：純度99.7%(富士フイルム和光純薬製)

α-トレンボロン標準品：純度99.7%(富士フイルム和光純薬製)

β-トレンボロン標準品：純度96.9%(林純薬工業製)

デキサメタゾン標準品：純度99.7%(富士フイルム和光純薬製)

酢酸メドロキシプロゲステロン標準品：純度98.9%(Sigma-Aldrich製)

17β-エストラジオール-2,4,16,16-d₄：純度99%(CDN Isotopes製)

17β-テストステロン-16,16,17-d₃：純度99%(CDN Isotopes製)

エチニルエストラジオール-2,4,16,16-d₄：純度97%(Toronto Research Chemicals製)

酢酸メレンゲステロール-d₃：純度99.50%(Toronto Research Chemicals製)

メチルテストステロン-d₃：純度98.4%(CDN Isotopes製)

[²H₅]-α-トレンボロン：純度95.5%(ALSACHIM製)

[²H₅]-β-トレンボロン：純度98.8%(ALSACHIM製)

デキサメタゾン-4,6α,21,21-d₄：純度98.2%(CDN Isotopes製)

酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 ：純度97%
(Toronto Research Chemicals製)

メタノール：LC-MS用(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル、エタノール(95%)、ヘキサン、
メタノール、炭酸水素アンモニウム：特級(富士フイルム和光純薬製)

無水硫酸ナトリウム：特級(キシダ化学製)

トルエン：特級(関東化学製)

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロ
ピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：
InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL、ジーエル
サイエンス製)

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

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル
400 mL及びヘキサン100 mLを混合し、5分間振
とうを行った。放置後、分離したアセトニトリ
ル層を分取した。

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。

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

アセトニトリル及びトルエンの混液(3 : 1)：ア
セトニトリル45 mL及びトルエン15 mLを混合
した。

1 mol/L炭酸水素アンモニウム溶液：炭酸水素
アンモニウム7.91 gを量り、水を加えて溶かし
正確に100 mLとした。

0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液：1 mol/L
炭酸水素アンモニウム500 μL に水を加えて1000
mLとした。

標準原液：17 β -エストラジオール標準品約10
mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100
mg/L溶液を調製した。17 β -テストステロン標準

品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の
混液(1 : 1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。
エチニルエストラジオール標準品約10 mgを精
秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶
液を調製した。酢酸メレンゲステロール標準品
約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解し
て100 mg/L溶液を調製した。メチルテストステ
ロン標準品約10 mgを精秤し、エタノール
(95%)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。 α -
トレンボロン標準品約10 mgを精秤し、アセト
ニトリル及び水の混液(1 : 1)で溶解して100
mg/L溶液を調製した。 β -トレンボロン標準品約
10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液
(1 : 1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。デ
キサメタゾン標準品約10 mgを精秤し、メタノ
ール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。
酢酸メドロキシプロゲステロン標準品約10 mg
を精秤し、メタノール(特級)で溶解して100
mg/L溶液を調製した。

内標準原液：17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4
約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解し
て100 mg/L溶液を調製した。10 mg容量の17 β -
テストステロン-16,16,17- d_3 をメタノール(特級)
で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100
mg/L溶液を調製した。1 mg容量のエチニルエ
ストラジオール-2,4,16,16- d_4 をメタノール(特級)
で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50
mg/L溶液を調製した。5 mg容量の酢酸メレン
ゲステロール- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、
メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調
製した。10 mg容量のメチルテストステロン- d_3
をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特
級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg
容量の [$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロンをアセトニトリル
で洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50

mg/L溶液を調製した。1 mg容量の $[^2\text{H}_5]$ - β -トレンボロンをアセトニトリルで洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50 mg/L溶液を調製した。10 mg容量のデキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の酢酸メドロキシprogesterone- d_6 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesterone標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $[^2\text{H}_5]$ - α -トレンボロン内標準原液、 $[^2\text{H}_5]$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesterone- d_6 内標準原液をメタノール(特級)で希釈して1 mg/L 混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

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 2-1-1)

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

4. 定量

17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesterone標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L 溶液を調製した。17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $[^2\text{H}_5]$ - α -トレンボロン内標準原液、 $[^2\text{H}_5]$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesterone- d_6 内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。さらに、水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈し、0.1 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈し、0.0005、0.001、0.002、0.0035 及び0.005 mg/L(内標準溶液濃度 0.01 mg/L)内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られた 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対する 17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 のピーク面積に対する 17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対するエチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール- d_3 のピーク面

積に対する酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン- d_3 のピーク面積に対するメチルテストステロン、 $[^2H_5]$ - α -トレンボロンのピーク面積に対する α -トレンボロン、 $[^2H_5]$ - β -トレンボロンのピーク面積に対する β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 のピーク面積に対するデキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 のピーク面積に対する酢酸メドロキシプロゲステロンのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法により 17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロンの含量を算出した。

5. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.1 mg/L)50 μ L[メタノール(特級)]を添加し、30 分間放置した。その後、添加用内標準溶液(1 mg/L)50 μ L[メタノール(特級)]を添加した。

6. 試験溶液の調製

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及びヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した後、さらに無水硫酸ナトリウム 20 g を加えホモジナイザーで撹拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離し、上層を捨てた後、下層を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトニトリルで定容した。

b. 精製

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) をグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA(500 mg/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 50 mL 遠心管に受けた。次いで、アセトニトリル及びトルエンの混液(3 : 1)10 mL で溶出し、先の遠心管に合わせた。全溶出液をナス形フラスコに移し、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(1 : 1)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

0.001 mg/L の 17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン混合標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

8. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 μ g/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

[2] スチルベン類 (ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロ

ール) 分析法

1. 試料

牛の筋肉は、大阪府内の店舗で徳島県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブリクサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ジエネストロール標準品：純度96.11%(LGC製)

ジエチルスチルベストロール標準品：純度99.9%(富士フイルム和光純薬製)

ヘキセストロール標準品：純度99.50%(LGC製)

ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体：純度95.2%(Toronto Research Chemicals製)

ジエネストロール- d_6 ：(WITEGA製)

[2H_8]-ジエチルスチルベストロール：(ALSACHIM製)

ヘキセストロール- d_4 ：(Toronto Research Chemicals製)

メタノール、エタノール(99.5%)、酢酸エチル、ヘキサン、酢酸、酢酸ナトリウム三水和物：特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル：LC-MS用(関東化学製)

β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液：EC 3.2.1.31/EC 3.1.6.1(*Helix pomatia*由来、Roche製)

β -グルクロニダーゼ 100000 ユニット/mL 及びアリルスルファターゼ 800000 ユニット/mL を含む(ただし、 β -グルクロニダーゼにあっては 38°C、pH4.5~5.0 で1時間にフェノールフタレイン- β -D-グルクロニドからフェノールフタレインを 1 μ g 遊離させる酵素量を 1 ユニットとする。アリルスルファターゼにあっては 38°C、pH6.2 で1時間に 2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル硫酸から 2-ヒドロキシ-5-ニトロフェノール

を 1 μ g 遊離させる酵素量を 1 ユニットとする)。

親水性基修飾 SDB ミニカラム：EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL、Biotage 製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus NH2(360 mg、Waters 製)

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

0.1 mol/L酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)：第1液：酢酸ナトリウム三水和物0.82 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。第2液：酢酸0.60 gを量り、水を加えて正確に100 mLとした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを5.0に調整した。

エタノール及び水の混液(9：1)：エタノール(99.5%)900 mL及び水100 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(1：1)：水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(11：9)：水550 mL及びメタノール450 mLを混合した。

酢酸エチル及びメタノールの混液(9：1)：酢酸エチル900 mL及びメタノール100 mLを混合した。

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

標準原液：ジエネストロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。ジエチルスチルベストロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。ヘキセストロール標準品約10 mgを精秤し、メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

内標準原液：ジエネストロール- d_6 約5 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロールをメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して10 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のヘキセストロール- d_4 をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストロール標準原液及びヘキセストロール標準原液をメタノールで希釈して5 mg/L溶液を調製し、さらに、水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈して0.01 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。 $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロール内標準原液及びヘキセストロール- d_4 内標準原液をメタノールで希釈して1 mg/L溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

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)

pH計：F-72(堀場アドバンスドテクノ製)

振とう恒温水槽：BT101(ヤマト科学製)

LC-MS/MS（測定条件：表 2-1-2、表 2-1-3）

装 置	型 式	メーカ ー
MS	Triple Quad 5500 Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作

		所
データ処理	Analyst	SCIEX

装 置	型 式	メーカ ー
MS	Xevo TQ-XS	Waters
LC	ACQUITY Premier QSM	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 定量

ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストロール標準原液及びヘキセストロール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。ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈して1 mg/L溶液を調製し、 $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロール内標準原液及びヘキセストロール- d_4 内標準原液をメタノールで希釈して1 mg/L溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1 : 1)で希釈して0.125、0.25、0.5、1.25 及び 2.5 $\mu\text{g/L}$ (内標準溶液濃度1.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液5 μL をLC-MS/MSに注入して、得られたジエネストロール- d_6 のピーク面積に対するジエネストロール、 $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロールのピーク面積に対するジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール- d_4 のピーク面積に対するヘキセストロールのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液5 μL をLC-MS/MSに注入し、検量線から内部標準法によりジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロールの含量を算出した。

5. 添加試料の調製

試料10 gに添加用標準溶液(0.01 mg/L)500 μL [水及びメタノールの混液(1 : 1)]及び添加用

内標準溶液(0.1 mg/L)250 µL[水及びメタノールの混液(1 : 1)]を添加した。

6. 試験溶液の調製

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、エタノール及び水の混液(9 : 1)50 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にエタノール及び水の混液(9 : 1)30 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、エタノール及び水の混液(9 : 1)で定容した。

b. 加水分解反応

抽出液 5 mL(試料 0.5 g 相当)を 50 mL 容遠心管に分取し、0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及び β-グルクロニダーゼ溶液 100 µL を加え、37℃の水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。

c. 精製

反応液を親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 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。遠心管内を 5 mL の水で洗い、洗液をカラムに負荷した。水及びメタノールの混液 (11 : 9)5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。次いでヘキサン 5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9 : 1)5 mL で洗浄したもの)

を接続し、酢酸エチル及びメタノールの混液 (9 : 1)15 mL で溶出した。溶出液をナス形フラスコに入れて、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留溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(1 : 1)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.25 µg/L のジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキサストロール混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

8. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 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。

[令和 7 年度]

[1] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法

1. 試料

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボキューブブリーカーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ジメトリダゾール標準品:純度 99.6%(富士フイルム和光純薬製) (DTZ 標準品)

ロニダゾール標準品:純度 98.95%(Dr.Ehrenstorfer 製) (RNZ 標準品)

メロニダゾール標準品:純度 100.0%(富士フィルム和光純薬製) (MNZ 標準品)

イプロニダゾール標準品:純度 99.2%(富士フィルム和光純薬製) (INZ 標準品)

ジメトリダゾール代謝産物 A 標準品:純度 99.5% (富士フィルム和光純薬製) (HMMNI 標準品)

メロニダゾール-OH 標準品:純度 99.1%(Sigma-Aldrich 製) (MNZOH 標準品)

イプロニダゾール代謝産物 B 標準品:純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製) (INZOH 標準品)

ジメトリダゾール-d₃:(富士フィルム和光純薬製) (DTZ-d₃)

ロニダゾール-d₃:(林純薬工業製) (RNZ-d₃)

メロニダゾール-d₄:(林純薬工業製) (MNZ-d₄)

イプロニダゾール-d₃:(Sigma-Aldrich 製) (INZ-d₃)

ヒドロキシジメトリダゾール-d₃:(Toronto Research Chemicals 製) (HMMNI-d₃)

ヒドロキシメロニダゾール-d₄:(Toronto Research Chemicals 製) (MNZOH-d₄)

ヒドロキシイプロニダゾール-d₃:(Toronto Research Chemicals 製) (INZOH-d₃)

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

アセトン、28%アンモニア水:特級(関東化学製)

ギ酸:LC-MS 用(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)

強酸性陽イオン交換ミニカラム:Bond Elut SCX(500 mg/3 mL、Agilent 製)

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

水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1):水 900 mL、メタノール 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1):酢酸エチル 95 mL 及び酢酸 5 mL を混合した。

アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1):アセトニトリル(特級)98 mL 及び 28%アンモニア水 2 mL を混合した。

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

標準原液:DTZ 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。RNZ 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。MNZ 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。INZ 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。HMMNI 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。MNZOH 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。INZOH 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。

内標準原液:10 mg 容量の DTZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の RNZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の MNZ-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の INZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。5 mg 容量の HMMNI-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量の MNZOH-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。2.5 mg 容量の INZOH-d₃をメタノールで洗いこみ、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:DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10

mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して 2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：DTZ-d₃内標準原液、RNZ-d₃内標準原液及び HMMNI-d₃内標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。MNZ-d₄内標準原液、INZ-d₃内標準原液、MNZOH-d₄内標準原液及び INZOH-d₃内標準原液をメタノールで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して 20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃ 及び HMMNI-d₃)及び 10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃)混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V(東京理化工械製)

遠心分離機：H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

装置	型 式	メーカー
MS	Xevo TQ-XS	Waters
LC	ACQUITY Premier QSM	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

表3-1に示した。

5. 定量

DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標

準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。

DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及び HMMNI-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 1

mg/L 溶液を調製した。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-d₃ 内標準原液、MNZOH-d₄ 内標準原液及び INZOH-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 0.5

mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して表 3-2 の①～⑤の内標準混合標準溶液を調製した。

DTZ、MNZ 及び INZ はこの溶液 0.4 µL を、RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH は 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られた DTZ-d₃ のピーク面積に対する DTZ、RNZ-d₃ のピーク面積に対する RNZ、MNZ-d₄ のピーク面積に対する MNZ、INZ-d₃ のピーク面積に対する INZ、HMMNI-d₃ のピーク面積に対する HMMNI、MNZOH-d₄ のピーク面積に対する MNZOH 及び INZOH-d₃ のピーク面積に対する INZOH のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。DTZ、MNZ 及び INZ は試験溶液 0.4 µL を、RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH は 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法により DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用混合標準溶液[2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)]1000 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]及び添加用内標準溶液[20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃ 及び HMMNI-d₃)及び

10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃)]500 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]を添加し、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH を試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、強酸性陽イオン交換ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

分析法フローチャートを図 3-1-1 に示した。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 30 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。2250 ×g 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、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 5 mL (試料 0.5 g 相当) に酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を混合した液を Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)(あらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL で洗浄したもの)に負荷した。アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL で洗浄した後、アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL で溶出した。溶出液をナス形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)0.5 mL に溶解

し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)混合標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.2 µg/kg(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 µg/kg(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)]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] β-作動薬(クレンプテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. 試料

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

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブリークサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

クレンプテロール標準品：純度 99.9%(林純薬工業製)(CBT 標準品)

ラクトパミン塩酸塩標準品：純度 96.3%(Sigma-Aldrich 製)(RCP 塩酸塩標準品)

サルブタモール標準品：純度 99.99%(Sigma-Aldrich 製) (SAL 標準品)

ジルパテロール塩酸塩標準品：純度 96.7% (Sigma-Aldrich 製) (ZPT 塩酸塩標準品)

シマテロール標準品：純度 100.0%(Sigma-Aldrich 製) (CMT 標準品)

クレンブテロール- d_9 ：(Sigma-Aldrich 製) (CBT- d_9)

ラクトパミン- d_6 塩酸塩：(Toronto Research Chemicals 製) (RCP- d_6 塩酸塩)

サルブタモール- d_9 ：(Toronto Research Chemicals 製) (SAL- d_9)

ジルパテロール-(イソプロピル- $^{13}C_3$)塩酸塩：(Sigma-Aldrich 製) (ZPT- $^{13}C_3$ 塩酸塩)

シマテロール- d_7 ：(Sigma-Aldrich 製) (CMT- d_7)

メタノール：LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)

ギ酸：LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)

メタノール、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水：特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトン：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)

メンブレンフィルター：TORAST Disc(0.22 μ m、島津ジーエルシー製)

メタノール及び水の混液(1:1)：メタノール(特級)500 mL 及び水 500 mL を混合した。

水及びメタノールの混液(95:5)：水 950 mL 及びメタノール(特級)50 mL を混合した。

水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)：水 98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)：メタノール(特級)98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混液(1000:2:1)：水 1000 mL、1 mol/L 酢酸アンモニウ

ム溶液 2 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液：CBT 標準品約 10 mg を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

RCP 塩酸塩標準品約 11.7 mg(RCP 10 mg 相当)を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。SAL 標準品約 10 mg を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

ZPT 塩酸塩標準品約 5.9 mg(ZPT 5 mg 相当)を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準品約 5 mg を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液：10 mg 容量の CBT- d_9 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量の RCP- d_6 塩酸塩をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。2.5 mg 容量の SAL- d_9 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の ZPT- $^{13}C_3$ 塩酸塩をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の CMT- d_7 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 5 μ g/L(CBT)、50 μ g/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 10 μ g/L(CMT)混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：CBT- d_9 内標準原液及び CMT- d_7 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-

d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 10 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 50 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー: NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

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

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

4. 測定条件

表 3-1 に示した。

5. 定量

CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.625 µg/L(CBT)、6.25 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 1.25 µg/L(CMT)混合溶液、及び 0.0625 µg/L(CBT)、0.625 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.125 µg/L(CMT)混合溶液を調製した。CBT-d₉ 内標準原液及び CMT-d₇ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及

び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 2.5 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 12.5 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して表 3-3 の①～⑤の内標準混合標準溶液を調製した。

この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られた CBT-d₉ のピーク面積に対する CBT、RCP-d₆ のピーク面積に対する RCP、SAL-d₉ のピーク面積に対する SAL、ZPT-¹³C₃ のピーク面積に対する ZPT、CMT-d₇ のピーク面積に対する CMT のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法により CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液[5 µg/L(CBT)、50 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 10 µg/L(CMT)]100 µL[水及びメタノールの混液(95:5)]及び添加用内標準溶液[10 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 50 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)]500 µL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加し、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT を試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

分析法フローチャートを図 3-1-2 に示した。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌

した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。2250 ×g 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、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) に酢酸 500 μL を混合した液をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)] [あらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)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)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出した。溶出液をナス形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL に溶解し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い牛及び鶏の筋肉のブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.0125 μg/L(CBT)、0.125 μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.025 μg/L(CMT) 混合溶液 2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

牛及び鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.05 μg/kg(CBT)、0.5 μg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 μg/kg(CMT)]で妥当性評価試験を実施した。牛の筋肉については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。また、鶏の筋肉

については妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 5 回(5 併行)行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

[令和 5 年度]

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

1.1 MS 条件

2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルは LC-MS (ESI 法及び APCI 法) で測定可能であるが、感度が低い。このため、3-ヨードベンジルブロミドや 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン等で誘導体化後、LC-MS/MS で測定するのが一般的である。本検討では 3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化後、LC-MS/MS で測定することとした。各化合物の 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物をフルスキャン測定した。その結果、いずれも ESI(+) 及び ESI(-)モードで測定が可能であったが、ESI(-)モードの方がバックグラウンドが低く、高い S/N が得られたため、ESI(-)モードで測定することとした。2-チオウラシル及び 4-チオウラシルは位置異性体であるため、ESI (-) モードではいずれも m/z 343 ($[M-H]^-$) が検出された。本イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、2-チオウラシルでは m/z 309、4-チオウラシルでは m/z 249 が観測され、両化合物で異なるイオンが検出された。このため、 m/z 309 及び 249 をそれぞれ 2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの定量用プロダクトイオンとした。その他の S/N が高いプロダクトイオンは両化合物で共通のイオンであったが、保持時間の違いにより両化合物を分離することが可能であるため、最も

S/N が高い m/z 127 を定性用プロダクトイオンとすることとした。

1.2 LC 条件

Blokland ら¹⁾の LC 条件と同一の移動相 (0.1%ギ酸含有水/メタノール)、分析カラム (Acquity UPLC BEH C18 ; 内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm ; Waters 製) 及びグラジエント条件で 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物の測定を行った。その結果、本条件では 2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物を分離することができなかった。そこで、LC 条件 (移動相、分析カラム及びグラジエント条件) を変更することとした。水系溶媒として 0.01 vol%酢酸、有機溶媒としてアセトニトリルを用いたところ、2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物の分離及び S/N が向上した。また、分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm) を用いたところ、2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物のピークの分離度は 1.5 以上となり、良好な分離が得られた。6-メチル-2-チオウラシルの誘導体化物についても本 LC 条件で良好なピーク形状及び強度が得られた。これらの結果から、移動相として 0.01 vol%酢酸及びアセトニトリル、分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 を用いて測定を行うこととした。

2. 試験溶液調製方法の検討

2.1 前処理

2-チオウラシル等は pH 3 以上の尿中では安定性が低い。また、尿中に銅イオン等の金属イオンが共存すると、チオール基と相互作用して分解することが知られている。このため、尿中の 2-チオウラシル等の分析では、分解を抑えるため、試料を塩酸等で pH 1 以下に調整

し、エチレンジアミン四酢酸を加えた後、誘導体化等を行うことが多い。本検討においても牛尿に塩酸及びエチレンジアミン四酢酸を加えた後、誘導体化を行うこととした。

2.2 誘導体化反応

各化合物の誘導体化反応は Blokland ら¹⁾の方法を参考にした。3-ヨードベンジルブロミドを加え、40°C で 60 分間加熱する方法を採用しているため、本条件で誘導体化反応が進行するか確認を行った。

まず、牛尿の代わりに水を試料として用いて検討を行った。実験方法 5.a に従い、塩酸及び 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後、試料中濃度 100 $\mu\text{g/L}$ 相当となるように 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、実験方法 5.b 及び 5.c に従って誘導体化反応及び精製を行った。ただし、誘導体化の反応時間は 20~120 分間とした。120 分 (参考文献¹⁾の 2 倍の反応時間) でのピーク面積値に対する各反応時間でのピーク面積値の割合 (%) を図 1-1 に示した。いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 97% 以上となった。

次に、牛尿を試料として用いて誘導体化の反応時間 (50~120 分) の検討を行った。その結果、いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 94% 以上となった (図 1-2)。これらの結果より、Blokland ら¹⁾の方法と同様に、3-ヨードベンジルブロミドを加えた後、40°C の水浴中で 60 分間加熱することで十分反応が進行すると考えられた。このため、本条件で各化合物を 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物へ変換することとした。

2.3 精製方法

Blokland ら¹⁾は誘導体化後、反応液をケイソ

ウ土が充填された 96 ウェルプレートに負荷し、酢酸エチルで溶出した後、溶媒を除去し、アセトニトリル/水に再溶解して LC-MS/MS で測定する方法を採用している。しかし、本方法では酢酸エチルの除去操作が必要であった。そこで、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 (150 mg/6 mL) を用いて溶媒の除去を必要としない方法を検討した。牛尿の代わりに水を試料として用いて、実験方法 5.a に従い、塩酸 10 μ L 及び 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液 100 μ L を加えた後、試料中濃度 100 μ g/L 相当の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、実験方法 5.b に従って誘導体化反応を行った。得られた反応液を Oasis HLB (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニングしたもの) に負荷し、水 5 mL 及び水/メタノール (3 : 2) 5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリルで溶出した。その結果、アセトニトリル 20 mL で 2-チオウラシルは 98%、4-チオウラシルは 89%、6-メチル-2-チオウラシルは 93% が溶出され、アセトニトリル 20~25 mL の画分にはいずれの化合物も溶出されなかった (表 1-2)。これらの結果から、アセトニトリル約 25 mL で溶出することとした。

3. 性能評価

牛尿を対象に 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルについて添加濃度 10 μ g/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出さ

れたが、定量限界の 1/3 未満であった。4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルはクロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された (図 1-3~1-5)。

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 1-3 に示した。真度 95~100%、併行精度 5% 未満及び室内精度 8% 未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値 (真度 70~120%、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}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル、[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル、[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシルの回収率はいずれも 90% 以上であった。0.5~10 μ g/L (試料中濃度 0.05~100 μ g/L 相当) の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 μ g/L (試料中濃度 10 μ g/L 相当) において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、1.01~1.03 であったことから、いずれの化合物も試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、添加試料から得られたピークはいずれも $\text{S/N} \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法 (定量限界はいずれの化合物も 10 μ g/L) として妥当であると考えられた。牛肉輸出時のモニタリング検査において本分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを

判別することが可能と考えられた。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

カラムとしてInertSustain C18（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm ）、ガードカラムとしてInertSustain C18（内径2.1 mm、長さ10 mm、粒子径3 μm ）を用いて測定条件を検討した。移動相の添加剤は、酢酸アンモニウムを用いると、酢酸と比べて感度が向上することが知られているため、水系移動相として10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いることとした。移動相の有機溶媒は、メタノールよりもアセトニトリルの方が、ベースラインが低くなることが報告されている。そこで、アセトニトリルとアセトニトリル/メタノール（4 : 1）を比較したところ、アセトニトリル/メタノール（4 : 1）の方がピーク形状、ピークの分離、再現性及びピーク強度のいずれも良好な結果が得られた。これらの結果から、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル/メタノール（4 : 1）を移動相として用いることとした。

2. 試験溶液調製方法の検討

レゾルシル酸ラクトン類は抱合体として存在している場合があるため、LC-MS/MS測定を行う前に加水分解を行う必要がある。しかし、本研究ではレゾルシル酸ラクトン類の抱合体の標準品を入手できず、加水分解条件を検討することはできなかった。このため、加水分解反応はArrizabalaga-Larrañagaらの方法²⁾に従い、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを加えて55°Cで2時間振とうすることとした。

牛や豚の尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析では、加水分解後の溶液を液々分配、C18

ミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法や、液々分配、HLBミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法、多孔性ケイソウ土カラム及びNH₂ミニカラムによって精製する方法等が報告されているが、操作が煩雑であった。一方、飼料や食品中のフザリウムトキシシン（ZEN等）の分析ではイムノアフィニティークラムを用いた方法も報告されている。そこで本検討では操作を簡便化するため、イムノアフィニティークラムを用いた精製を尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析に用いることとした。加水分解後の溶液をそのままイムノアフィニティークラム（ZearalaTest WB）に負荷して精製する方法を検討した。

まず、カラムへ負荷後の洗浄方法を検討するため、水/メタノール混液（10 mL）を洗浄溶媒として用いた場合の溶出状況を確認した。水20 mLに α -ZAL、 β -ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μg ）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、水/メタノール混液（9 : 1）、（8 : 2）、（7 : 3）、（6 : 4）及び（5 : 5）各10 mLで順次溶出した（表1-4）。その結果、水/メタノール（9 : 1）の画分にはいずれの化合物も溶出しなかったが、（8 : 2）～（5 : 5）の画分には溶出が認められた。このため、カラムに負荷後、水/メタノール（9 : 1）で洗浄を行うこととした。

次に、洗浄溶媒量を検討するため、水20 mLに α -ZAL、 β -ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μg ）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、水/メタノール（9 : 1）40 mLを注入し、各化合物の溶出状況を確認した（表1-5）。その結果、いずれの化合物も水/メタノール（9 : 1）40 mLまでは溶出しないことが確認された。

ZearalaTest WBからの溶出溶媒の検討を行っ

た。水20 mLに α -ZAL、 β -ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μ g）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、メタノールで溶出した（表1-6）。その結果、いずれの化合物もメタノール5 mLでカラムから十分に溶出された。これらの結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷後、水/メタノール（9：1）で洗浄し、メタノール（5 mL）で溶出することとした。

そこで、水/メタノール（9：1）による洗浄の効果を確認するため、牛尿（2 mL）に α -ZAL、 β -ZAL、ZAN及びZEN（各0.002 μ g）を添加後、実験方法5に従って加水分解を行い、得られた溶液をイムノアフィニティーカラムへ負荷し、水/メタノール（9：1）10、20、30及び40 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出した。回収率を表1-7、クロマトグラムを図1-6に示した。その結果、いずれの化合物も洗浄に用いた水/メタノール（9：1）の量は回収率に影響しなかった（表1-7）。しかし、洗浄に用いる水/メタノール（9：1）の量を増やすほど、 α -及び β -ZALの定性イオンのクロマトグラムにおいて、 α -及び β -ZALの保持時間付近に認められた夾雑成分のピークが小さくなった（図1-6）。洗浄溶媒量30 mLと40 mLでは夾雑成分のピーク強度に差は認められなかった。このため、洗浄に用いる水/メタノール（9：1）の溶媒量は30 mLとすることとした。以上の結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷し、水/メタノール（9：1）30 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出することとした。

3. 性能評価

EU では、牛尿中の β -ZAL 及び ZEN の minimum method performance requirements (MMPR) はそれぞれ 1 及び 2 ppb（1 及び 2 μ g/L）と設定されている。このため、牛尿を対

象に α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN について添加濃度 1 及び 2 μ g/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来フザリウムトキシシンと考えられる ZEN のピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。いずれの化合物もクロマトグラム上に定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された（図 1-7～1-10）。

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 1-8 に示した。真度 92～101%、併行精度 9%未満及び室内精度 13%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値（真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。0.5～10 μ g/L（試料中濃度 0.5～10 μ g/L 相当）の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 及び 2 μ g/L（試料中濃度 1 及び 2 μ g/L に相当）において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、いずれの化合物も 1 μ g/L においては 0.93～1.01、2 μ g/L においては 0.99～1.05 であったことから、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、定量限界濃度（1 μ g/L）を添加した試料から得られたピークはいずれも $S/N \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN 分析法（定量限界はいずれの化合物も 1 μ g/L）として妥当であると考

えられた。

〔令和 6 年度〕

〔1〕 ステロイド類（エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン）分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオールは ESI(－)モードで、その他の分析対象化合物は ESI(＋)モードでの測定が可能であった。全測定対象成分の中で最もピーク強度が小さい 17 β -エストラジオール、エチニルエストラジオール（他成分のピーク強度の 1/5 以下）の測定条件を最適化するように測定条件を検討した。酸性条件下では両物質ともに十分なピーク強度が得られなかったため、以下の中性～塩基性条件の水系移動相を検討した。

- ①0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH7 程度)
- ②0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH8 程度)
- ③0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH9.5 程度)
- ④水
- ⑤水及びアンモニア水の混液（1000：1）(pH10 程度)
- ⑥0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液(pH7.5 程度)

結果として、酢酸アンモニウムを使用した①②③は移動相の pH によらずいずれも十分なピーク強度が得られなかった。このことから、酢酸イオンが両物質の感度を低下させていると推測された。よって①②③は不採用とした。④が最も高いピーク強度を示し、次いで⑤⑥が同程度のピーク強度となった。ただ

し、④⑤は注入の再現性が悪く、測定中の感度変動も起こりやすかったため不採用とした。⑥は④にピーク強度は劣るが、比較的安定して測定することが可能であった。以上より、最も良好に両物質を測定できた⑥の 0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液を採用した。なお、0.5 mmol/L より炭酸水素アンモニウム濃度を上げてピーク強度の上昇は得られず、10 mmol/L 程度から逆に低下が確認されたため、濃度は 0.5 mmol/L とした。有機溶媒系移動相にはメタノールを用いた。

2. 試料前処理の検討

抽出法は酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びベタメタゾンの告示試験法と同様に、試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄する方法とした。加えて、試料マトリックスの除去を目的としてミニカラムによる精製を検討した。

2.1 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び陰イオン交換ミニカラムを用いた精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep C18(1000 mg)及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg) からそれぞれアセトニトリルで負荷、溶出した結果を表 2-2 及び表 2-3 に示した。いずれもアセトニトリル 30 mL で溶出が可能であった。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを連結し、アセトニトリル 30 mL で溶出するという試験設計が可能と考えられた。

2.2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリ

カゲルミニカラムによる精製

農薬一斉分析等で広く使用されている積層カラムであるグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムについても適用可能か検討することとした。まず、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep PSA(1000 mg)を用いた順相条件での溶出が可能か検討した。アセトン及びヘキサンの混液(1 : 19)を用いて各測定対象成分をミニカラムに負荷し、アセトンの比率を上げて順次溶出した結果を表 2-4 に示した。極性に大きく幅があるため、洗浄区を作ることは難しいと判断した。アセトン及びヘキサンの混液(1 : 1)でいずれの成分も概ね溶出可能であった。

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムである InertSep GC(300 mg)を用いた逆相条件での溶出が可能か検討した。各測定対象成分をメタノールでミニカラムに負荷した後、酢酸エチルで溶出した結果を表 2-5 に、アセトン及びヘキサンの混液(1 : 1)で負荷、溶出した結果を表 2-6、アセトニトリル及びトルエンの混液(7 : 3)で負荷、溶出した結果を表 2-7 に示した。メタノール及び酢酸エチルでは一部の成分が溶出できなかったが、アセトン及びヘキサンの混液(1 : 1)又はアセトニトリル及びトルエンの混液(7 : 3)で全成分溶出可能であった。なお、本検討ではアセトニトリル及びトルエンの混液比率は(7 : 3)を用いたが、2.4 の検討では、農薬一斉分析等で広く使用されているアセトニトリル及びトルエンの混液(3 : 1)を用いることとした。

2.4 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-

N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製

2.2 及び 2.3 の検討結果から、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg)を用いた溶出が可能か検討した。濃縮操作を減らした簡便な精製法とするため、抽出液のアセトニトリル溶液 20 mL をカラムに負荷した後、溶出溶媒で溶出させる方法を検討した。各測定対象成分をアセトニトリル 20 mL でミニカラムに負荷した後、それぞれアセトン及びヘキサンの混液(1 : 1)20 mL で溶出した結果を表 2-8、アセトニトリル及びトルエンの混液(3 : 1)20 mL で溶出した結果を表 2-9 に示した。いずれの混液でも全成分の溶出が可能であったが、より溶出力の強いアセトニトリル及びトルエンの混液(3 : 1)を用いることとした。なお、アセトニトリルの溶出区に一部の成分が溶出したためアセトニトリル溶出区も合わせた全溶出液をとる方法とした。

2.1 及び 2.4 のいずれの方法でも精製が可能と考えられたが、2.4 は積層カラム 1 本のみで精製が可能であり、連結カラムを使用する 2.1 よりもより簡便な方法となったため、この方法を採用することとした。開発した試験法で牛の筋肉について試験を行った結果、2.3 より、ESI(+)モードで測定する成分は試料由来のマトリックスの影響を受けていたが、内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であったため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 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）。

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-10 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 、酢酸メレンゲステロール- d_3 、メチルテストステロン- d_3 、[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロン、[$^2\text{H}_5$]- β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 及び酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 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検討した結果を表 2-11 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、17 β -エストラジオールで 1.01、17 β -テストステロンで 0.65、エチニルエストラジオールで 0.98、酢酸メレンゲステロールで 0.63、メチルテストステロンで 0.61、 α -トレンボロンで 0.66、 β -トレンボロンで 0.72、デキサメタゾンで 0.64、酢酸メドロキシプロゲステロンで 0.66 であった。以上のことから、本法では 17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオール以外の分析対象化合物は試料由来のマトリックスの影響を受けていると考えられた。

3.4 検量線の直線性

0.0005~0.005 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。

3.5 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。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法（定量限界 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ）として妥当であることが示された。

[2] スチルベン類（ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール）分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

告示試験法においては水系移動相に 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いているが、より S/N が良好であった水及び酢酸の混液(10000 : 1)を選択した（図 2-2）。分離カラムについては数種類のオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）充填カラムを比較・検討したが、ジエチルスチルベストロールとマトリクス由来の妨害ピークとの分離が不十分であったため、アダマンチル基を有し、ODS カラムとは異なる分離を示す CAPCELL CORE ADME(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm)を選択した。

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

告示試験法開発の報告書において、濃縮操作条件によってはジエチルスチルベストロールの回収率の低下が確認されている。告示試験法では抽出液[エタノール及び水の混液(9 : 1)]を 10 mL 分取し、約 5 mL まで減圧濃縮した後、加水分解操作を行っているが、濃縮に

よるジエチルスチルベストロールの回収率の低下に注意する必要がある。そこで抽出液[エタノール及び水の混液(9 : 1)]を 5 mL 分取し濃縮せずに加水分解操作を行うために、エタノール共存下における酵素加水分解について以下の方法で検討した。

ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体 25 ng(ジエチルスチルベストロールとして約 15 ng 相当) 及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロール 25 ng を添加したエタノール及び水の混液(9 : 1) 5 mL に 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 100 μL を加え、37°Cの水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。また比較対照として、ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロールを同濃度添加したエタノール及び水の混液(9 : 1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した後、0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 100 μL を加え、37°Cの水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。各加水分解後の溶液は、6. 試験溶液の調製の項の 6.c 精製の操作を行いジエチルスチルベストロールの回収率を求めた。

その結果、ジエチルスチルベストロールとしての回収率は、エタノール及び水の混液(9 : 1) を 5 mL 分取した場合(エタノール 4.5 mL 共存) : 94.5%、エタノール及び水の混液(9 : 1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した場合(エタノール約 4 mL 共存) : 93.4%であり、4.5 mL 程度のエタノールが共存した場合であっても、加水分解反応の効率には大きな影響はないことが確認された。なお、各点は試行数 2 で行い、平均値を用いた。

2.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプ

ロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

告示試験法において加水分解反応液を有機溶媒に転溶させ、減圧濃縮した後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製を行っているが、減圧濃縮操作を避けるため、加水分解反応液をそのまま固相カラムに注入し精製を行う試験設計を検討した。

親水性ポリマーベース固相カラムであるジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]及び親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめヘキサン 5 mL、水及びメタノールの混液(11 : 9)5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの)にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロールを各 0.0125 μg 、ジエネストロール- d_6 、 $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール- d_4 を各 0.0125 μg 供した。水及びメタノールの混液(11 : 9)及びヘキサンにて洗浄を行った後、各カラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Sep-Pak Plus NH2(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9 : 1)5 mL で洗浄したもの)を連結し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9 : 1)で溶出した。

結果を表 2-12 に示した。いずれの固相カラムも洗浄液[水及びメタノールの混液(11 : 9)5 mL またはヘキサン 5 mL]では溶出せず、酢酸エチル及びメタノールの混液(9 : 1)15 mL までにほぼ 90%以上が溶出された。

次に、牛の筋肉にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ヘキセストロール、ジエネストロール- d_6 、 $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール- d_4 を添加し

て、抽出、加水分解反応後に同様にカラム精製を行った。

結果を表 2-13 に示した。試料マトリックス存在下では親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN (150 mg/6 mL)]を用いた場合の方がより良好な内標準物質回収率が得られた。なお、マトリックス存在下で分析操作中にジエチルスチルベストロールの *trans* 体から *cis* 体への異性化が確認されたことから、内標準物質を用いて補正を行うこととした。またアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH2(360 mg)]を省いた場合、試験溶液に濁りがみられサプレッションが大きくなった。

以上の結果より、親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]とアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH2(360 mg)]の連結カラムによる精製方法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 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)。

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-14 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いたジエネストロール- d_6 、 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール- d_4 の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 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

検討した結果を表 2-15 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、ジエネストロールで 0.99、ジエチルスチルベストロールで 1.04、ヘキセストロールで 0.96 であった。以上のことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

3.4 検量線の直線性

0.125~2.5 $\mu\text{g/L}$ 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。

3.5 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。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法 (定量限界 0.5 $\mu\text{g/kg}$) として妥当であることが示された。

[令和 7 年度]

[1] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法

1. 分析カラムの検討

分析時間の短縮を目的に、告示試験法の HPLC から UHPLC への測定法の変更を試み、分析カラムの検討を行った。ACQUITY UPLC BEH

C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m)、Shim-pack Scepter C18-120(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μ m)及び Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free](内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μ m)の 3 種類について検討した。ACQUITY UPLC BEH C18 では HMMNI の確認イオンで夾雑物との良好な分離が得られなかった。Shim-pack Scepter C18-120 では DTZ の内標準物質の回収率が 40%程度と良くなかった。そのため、夾雑物との分離が最も良好で、高回収率が得られた Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free]を選択した。

2. 精製カラムの検討

告示試験法では DTZ 及び INZ は減圧濃縮操作により回収率が低下することが示唆されており、また抽出液がアセトンであることから、抽出後の精製工程がヘキサン洗浄、ミニカラム精製、酢酸エチルによる転溶と煩雑である。そこで減圧濃縮操作の回数を減らし、精製工程はミニカラム精製のみとする試験法を試みた。

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Bond Elut SCX (500 mg/3 mL)]、告示試験法で使用されている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)]及び MCX とは異なる物理的特性を持つ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 [EVOLUTE EXPRESS CX(500 mg/6 mL)]の 3 種を比較検討した。

各ミニカラムをあらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL で洗浄し、アセ

トン 5 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL 及び酢酸 50 μ L の混合液に各分析対象化合物を 50 ng(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 25 ng(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)添加した液を供し、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を注入し、ミニカラムからの溶出液を採り、これを負荷区とした。さらにアセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次注入し、各溶出液を採り洗浄区とした。その後、アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)5 mL ずつ 4 回順次注入し各溶出液を採り溶出区とした。各溶出液を水及びギ酸の混液(1000:1)で 50 mL に定容し、LC-MS/MSを用いて各溶出液中の分析対象化合物量を求めた。なお負荷区は濃縮操作を行い、酢酸エチル及びアセトンを除去し系内を酢酸のみの状態とした後、定容を行った。測定については、注入量は全て 2 μ L で行い、HMMNI の定量には感度の良好なイオン m/z 158 $\rightarrow$ 55(コーン電圧:3 V、コリジョンエネルギー:12 eV)を用いた。コーン電圧について DTZ は 34 V、RNZ は 2 V とした。

結果を表 3-4 に示した。負荷区では EVOLUTE EXPRESS CX のみ RNZ で 1%の溶出が認められたが、他は溶出していなかった。洗浄区(アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL)ではいずれのミニカラムからも溶出せず、これらの溶液は洗浄操作に使用することが可能であることが示された。溶出区では、Bond Elut SCX はアセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL までにいずれの物質も 98~103%溶出され良好な結果であった。一方で、Oasis MCX 及び EVOLUTE

EXPRESS CX では RNZ の回収率が、それぞれ 79%、69%と低かった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)による精製法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

(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 3-2)。

(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 3-5 に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。また、内標準物質として用いた DTZ-d₃、RNZ-d₃、MNZ-d₄、INZ-d₃、HMMNI-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(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検討した結果を表 3-6 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、DTZ で 0.97、RNZ で 1.44、MNZ で 0.98、INZ で 0.98、HMMNI で 1.05、MNZOH で 0.98、INZOH で 0.95 であった。本法では RNZ において試料由来のマトリックスの影響を受けていたため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

(4)検量線の直線性

DTZ、RNZ 及び HMMNI は 0.1～1 µg/L、MNZ、

INZ、MNZOH 及び INZOH は 0.05～0.5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

(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。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本試験は鶏の筋肉を対象とした定量限界 0.2 µg/kg(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 µg/kg (MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)での残留分析として妥当であると評価された。

[2] β-作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

CBT の告示試験法に基づき、水系移動相に水及びギ酸の混液を用いて検討を行ったが、β-作動薬(5 化合物)の同時分析では、CMT の検量線は十分な直線性を示さなかった。そこで、塩基性化合物のカラムへの吸着抑制及びピーク形状の改善を目的とし、移動相にギ酸及び酢酸アンモニウムを添加した条件を検討した。その結果、CMT を含む全ての分析対象化合物において良好な直線性が確認されたため、本条件を水系移動相として採用した。

2. 試料前処理の検討

CBT 告示試験法は抽出後の転溶操作に加え、二工程のミニカラム精製を要し、操作が煩雑である。

そこで、精製工程の簡略化を目的とした検討を行った。β-作動薬は塩基性化合物であることから、CBTの告示試験法で使用されている強陽イオン交換カラムを用いた精製を選択した。CBTの告示試験法と同等のベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)]、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)]及びMCXとは異なる物理的特性を持つ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[EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)]の3種を比較検討した。各ミニカラムをあらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mLで洗浄した後、アセトン 10 mLに酢酸 500 µLを混合した液に標準溶液[1.25 µg/L(CBT 及び CMT)及び 6.25 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)]200 µL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加した液を供し、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2) 5 mL 及びメタノール(特級)5 mLで洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)10 mLで溶出し、さらにメタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mLで追加溶出した。各画分をナス形フラスコに採り、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mLに溶解し、LC-MS/MSを用いて各溶液中の分析対象化合物量を求めた。結果を表 3-7 に示した。Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)では水及び 25%アン

モニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄区間においていずれの物質も9~32%の溶出が認められ、かつRCPの合計回収率が13%と著しく低かった。EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)はBond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)に比べて合計回収率は向上したものの、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄時のZPTが34%溶出していた。これらに対して、Oasis MCX (500 mg/6 mL)は3種類のミニカラムの中で最も良好な保持挙動を示した。RCP 及び CMT の合計回収率はそれぞれ 73%、75%に留まったものの、負荷時及び洗浄時における流出はほとんど認められなかった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Oasis MCX (500 mg/6 mL)による精製法を選択した。なお、実試料を用いる際に、内標準物質による補正を行うことで定量性を確保することとした。

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

牛及び鶏の筋肉の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 3-3)。

(2)真度、併行精度及び室内精度

牛の筋肉において真度、併行精度及び室内精度の結果を表 3-8 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)真度

鶏の筋肉において真度の結果を表 3-9 に示した。
真度の目標値(70~120%)を満たした。

また、内標準物質として用いた CBT-d₉、RCP-d₆、
SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれ
も 40%以上であった。

(4)試料マトリックスの測定への影響

牛及び鶏の筋肉において試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 3-10 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、牛の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.90、RCP で 0.84、SAL で 0.83、ZPT で 0.91、CMT で 0.91 であった。また、鶏の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.94、RCP で 0.89、SAL で 0.93、ZPT で 0.91、CMT で 0.93 であった。本法ではいずれの分析対象化合物も試料由来のマトリックスの影響を若干受けていたが、内標準物質による補正を行う方法としたため定量性に問題はないと判断した。

(5)検量線の直線性

0.00625~0.0625 µg/L(CBT)、0.0625~0.625
µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.0125~0.125
µg/L(CMT)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。

(6)定量限界

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

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本試験法は牛及び鶏
の筋肉を対象とした定量限界 0.05 µg/kg(CBT)、
0.5 µg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1
µg/kg(CMT)での残留分析として妥当であると評価
された。

D. 結論

モニタリング検査または EU における輸入時
検査において A 物質が検出された場合に原因
究明に資する分析法を整備した。令和 5 年度は、
EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チ
オウラシルが検出された場合の原因調査に資
するため、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウ
ラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの分析法
を確立した。また、レゾルシル酸ラクトン類
が検出された場合の原因調査に資するため、
牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類 (α -ZAL、 β -
ZAL、ZAN 及び ZEN) の分析法を確立した。
令和 6 年度は、EU での輸入時検査において A
物質が検出された場合の原因調査に資する牛
肉中のステロイド類 (エストラジオール、テ
ストステロン、エチニルエストラジオール、
酢酸メレンゲステロール、メチルテストステ
ロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及
びメドロキシプロゲステロン) 分析法及びス
チルベン類 (ジエネストロール、ジェチルス
チルベストロール及びヘキセストロール) 分
析法を確立した。さらに令和 7 年度は、鶏筋肉
中のニトロイミダゾール類分析法及び牛/鶏
筋肉中の β -作動薬 (クレンブテロール、ラク
トパミン、サルブタモール、ジルパテロール、
シマテロール) 分析法を確立した。妥当性評
価試験の結果、本課題で確立したすべての分
析法は、真度、併行精度、室内精度及び選択
性の目標値を満たし、迅速な原因究明及び輸
出再開に資する残留分析法として妥当である

ことが確認された。以上より、A物質検出時の原因究明に資する分析法を整備し、迅速な原因究明及び輸出再開に対応可能な分析体制を構築した。

[参考文献]

1) Blokland, M. H., van Tricht, F. E., Groot, M. J., Van Ginkel, L. A., Sterk, S. S. Discrimination between the exogenous and endogenous origin of thiouracil in farm animals, the final chapter? Food Addit. Contam. Part A, **38**, 2077-2090 (2021).

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 畑寛子、池側智香子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立及び妥当性評価：欧州連合への牛肉輸出時のモニタリング検査のための分析法. 食品衛生学雑誌 2024; 65(6), 178-184.

2) 高木千陽、中村歩、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. 欧州連合への日本産牛肉輸出時のモニタリング検査のための牛尿中レゾルシル酸ラクトン類分析法の確立及び性能評価. 食品衛生学雑誌 2025; 66(2), 32-38

2. 学会発表

1) 畑寛子、池側智香子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静

夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立.

日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.7)

2) 高木千陽、中村歩、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. イムノアフィニティーカラムを用いた牛尿中におけるレゾルシル酸ラクトン類の同時分析法開発. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.6)

3) 畑寛子、池側智香子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立.

第 7 回日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2.14)

4) 小椋和彦、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. LC-MS/MS による牛筋肉中の高感度ステロイド類一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会 (2025.10.16)

5) 池側智香子、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田(齊藤)静夏. 牛筋肉中のスチルベン類（ジェネストロール、ジェチルスチルベストロール及びヘキセステロール）分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会 (2025.10.16)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

[令和5年度]

表 1-1-1 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び6-メチル 2-チオウラシルの測定条件

LC 条件																											
カラム	Shim-pack Scepter C18-120 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm : 島津製作所製)																										
移動相流速(mL/min)	0.4																										
注入量(μL)	1																										
カラム温度(°C)	40																										
移動相	A液: 水及び酢酸の混液(10000 : 1) B液: アセトニトリル(LC-MS用)																										
グラジエント条件	<table><tr><th>時間(分)</th><th>A 液(%)</th><th>B 液(%)</th></tr><tr><td>0.0</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>2.0</td><td>62</td><td>38</td></tr><tr><td>4.5</td><td>62</td><td>38</td></tr><tr><td>7.5</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.5</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.51</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>14.0</td><td>70</td><td>30</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	70	30	2.0	62	38	4.5	62	38	7.5	5	95	9.5	5	95	9.51	70	30	14.0	70	30
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	70	30																									
2.0	62	38																									
4.5	62	38																									
7.5	5	95																									
9.5	5	95																									
9.51	70	30																									
14.0	70	30																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(－)																										
イオンスプレー電圧(V)	Triple Quad 5500: -4000、 Triple Quad 6500+: -4500																										
ヒーター温度(°C)	650																										
ネブライザーガス	空気、 Triple Quad 5500: 50 psi、 Triple Quad 6500+: 40 psi																										
ターボガス	空気、 Triple Quad 5500: 50 psi、 Triple Quad 6500+: 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)																											
Triple Quad 5500																											
	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)																					
2-チオウラシル	343	-30	309	-22	127	-34																					
チオウラシル- 13C, 15N2	346	-30	312	-20	—	—																					
4-チオウラシル	343	-30	249	-20	127	-40																					
[13C, 15N2]- 4-チオウラシル	346	-30	249	-20	—	—																					
6-メチル チオウラシル	357	-130	127	-34	58	-106																					
[13C5, 15N2]- 4-ヒドロキシ- 2-メルカプト- 6-メチルピリミジン	364	-120	127	-30	—	—																					

Triple Quad 6500+						
	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)	
			(<i>m/z</i>)	コリジョン エネルギー(eV)	(<i>m/z</i>)	コリジョン エネルギー(eV)
2-チオウラシル	343	-70	309	-24	127	-32
チオウラシル- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	346	-55	312	-24	—	—
4-チオウラシル	343	-20	249	-20	127	-40
[¹³ C, ¹⁵ N ₂]- 4-チオウラシル	346	-20	249	-20	—	—
6-メチル チオウラシル	357	-55	127	-34	58	-102
[¹³ C, ¹⁵ N ₂]- 4-ヒドロキシ- 2-メルカプト- 6-メチルピリミジン	364	-80	127	-34	—	—
保持時間(min)		2-チオウラシル 5.0、4-チオウラシル 4.2、 6-メチルチオウラシル 6.2				

表 1-1-2 レゾルシル酸ラクトン類の測定条件

LC 条件																											
カラム	分離カラム InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製) ガードカラム InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 10 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)																										
移動相流速(mL/min)	0.3																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度(°C)	40																										
移動相	A液: 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル及びメタノールの混液(4:1)																										
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.00</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>1.00</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>16.00</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>21.00</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>21.01</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>26.00</td><td>60</td><td>40</td></tr></table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	60	40	1.00	60	40	16.00	20	80	21.00	20	80	21.01	60	40	26.00	60	40
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.00	60	40																									
1.00	60	40																									
16.00	20	80																									
21.00	20	80																									
21.01	60	40																									
26.00	60	40																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(－)																										
イオンスプレー電圧(V)	-4500																										
ヒーター温度(°C)	700																										
ネブライザーガス	空気、70 psi																										
ターボガス	空気、40 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)																					
タレラノール	321	-105	277	-30	303	-30																					
ゼアララノン	319	-115	275	-30	205	-32																					
ゼアラレノン	317	-20	175	-34	131	-36																					
ゼラノール	321	-90	277	-32	303	-32																					
保持時間(min)	タレラノール 5.7、ゼアララノン 9.1、ゼアラレノン 9.3、ゼラノール 7.0																										

表 1-2 Oasis HLB (150 mg) における 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの回収率 (%)

	アセトニトリル					合計
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
2-チオウラシル	86	10	1	1	0	98
4-チオウラシル	83	5	1	0	0	89
6-メチル-2-チオウラシル	72	18	2	1	0	93

表 1-3 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの妥当性評価結果

	真度 (%)	併行精度 (%RSD)	室内精度 (%RSD)
2-チオウラシル	95	4.9	4.9
4-チオウラシル	100	2.3	4.2
6-メチル-2-チオウラシル	97	3.0	7.2

表 1-4 水／メタノール (10 mL) 溶出時における ZearalaTest WB からの α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN の回収率 (%)

	水／メタノール				
	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
α -ZAL	0	0	2	14	53
β -ZAL	0	2	7	52	37
ZAN	0	0	1	9	46
ZEN	0	1	2	18	60

表 1-5 水／メタノール (9:1) 溶出時における ZearalaTest WB からの α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN の回収率 (%)

	水／メタノール (9:1)			
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL
α -ZAL	0	0	0	0
β -ZAL	0	0	0	0
ZAN	0	0	0	0
ZEN	0	0	0	0

表 1-6 メタノール溶出時における ZearalaTest WB からの α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN の回収率 (%)

	メタノール		Total
	0-5 mL	5-10 mL	
α -ZAL	96	0	96
β -ZAL	107	0	107
ZAN	102	0	102
ZEN	100	0	100

表 1-7 水／メタノール (9:1) 溶出時における ZearalaTest WB からの α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN の回収率 (%)

	水/メタノール (9:1)			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
α -ZAL	100	90	98	112
β -ZAL	100	103	99	94
ZAN	92	106	98	109
ZEN	108	111	108	107

表 1-8 α -ZAL、 β -ZAL、ZAN 及び ZEN の妥当性評価結果

	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%RSD)	室内精度 (%RSD)
α -ZAL	1	99	4.6	8.1
	2	98	5.4	5.6
β -ZAL	1	101	6.3	12.7
	2	99	4.6	5.0
ZAN	1	92	6.1	8.9
	2	95	7.4	7.7
ZEN	1	94	8.7	9.5
	2	96	7.2	7.2

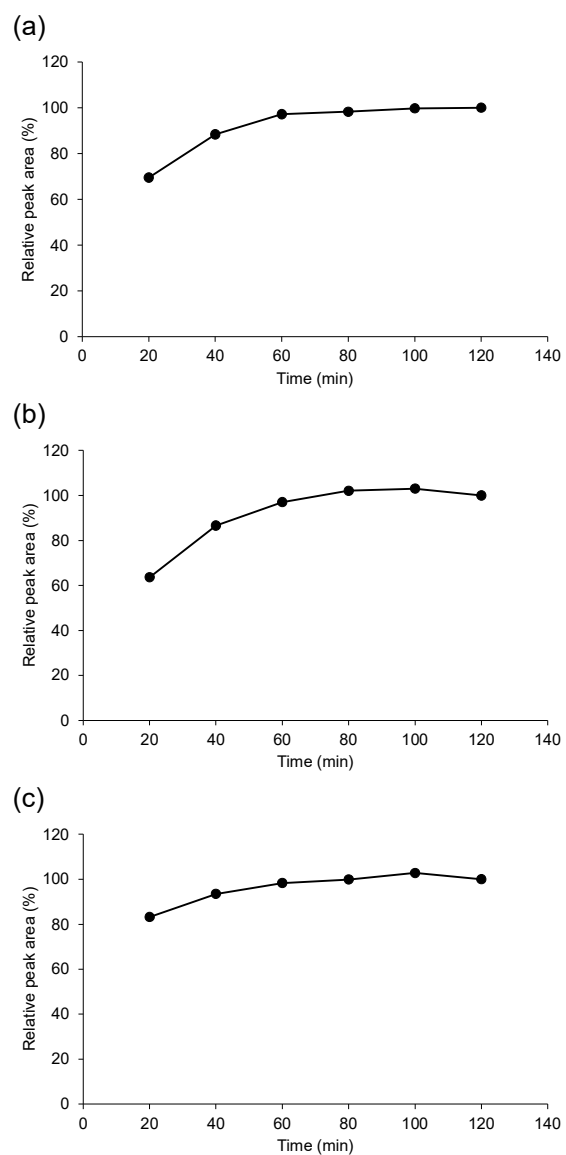


図 1-1 水試料中における 120 分後のピーク面積を基準とした(a) 2-チオウラシル、(b) 4-チオウラシル、(c) 6-メチル-2-チオウラシルの 3-ヨードベンジルブロミド誘導体の相対ピーク面積 (%)

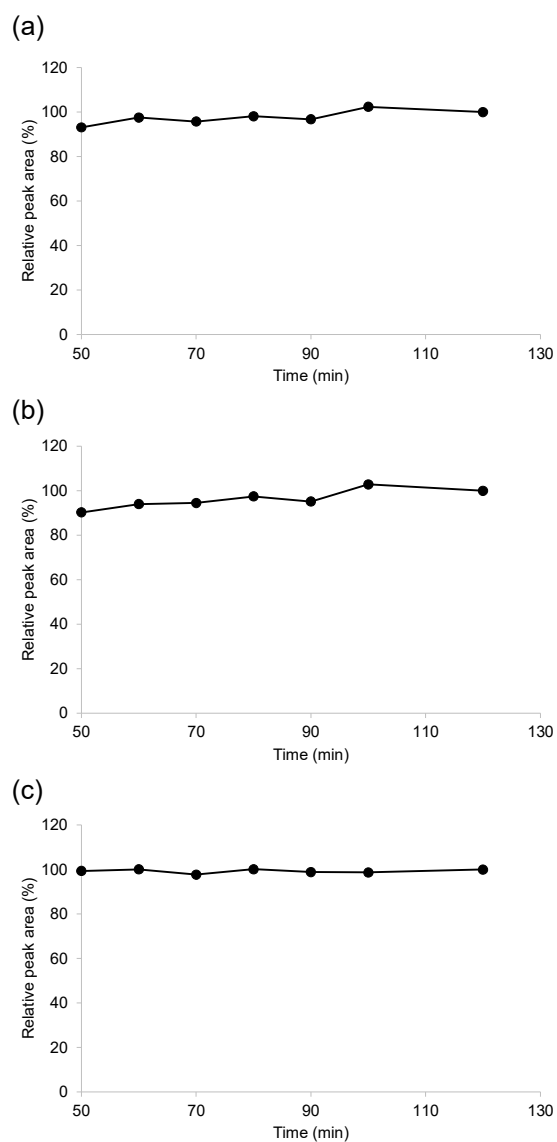


図 1-2 水試料中における 120 分後のピーク面積を基準とした(a) 2-チオウラシル、(b) 4-チオウラシル、(c) 6-メチル-2-チオウラシルの 3-ヨードベンジルブロミド誘導体の相対ピーク面積 (%)

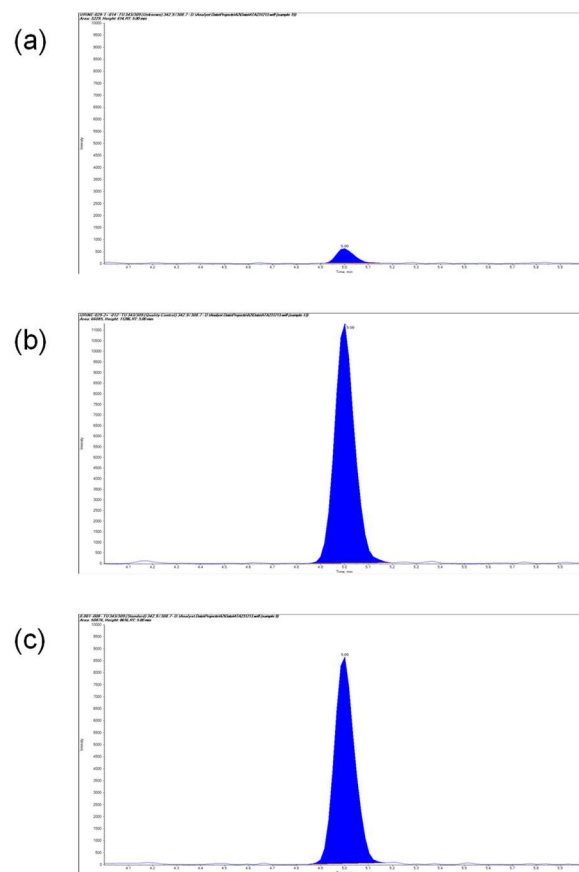


図 1-3 2-チオウラシルの 3-ヨードベンジルブロミド誘導体の SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (10 $\mu\text{g/L}$)、(c) 標準溶液 1 $\mu\text{g/L}$ (試料中濃度 10 $\mu\text{g/L}$ に相当)

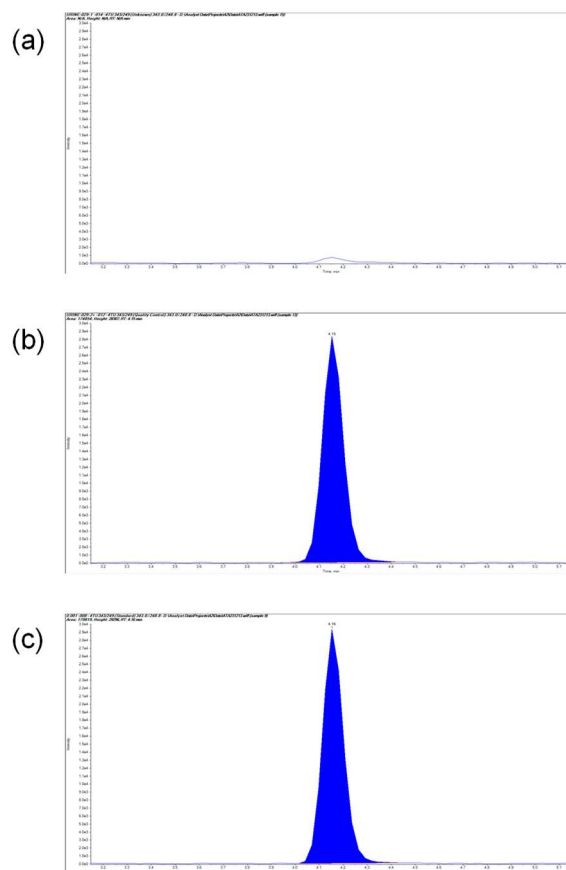


図 1-4 4-チオウラシルの 3-ヨードベンジルブロミド誘導体の SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (10 µg/L)、(c) 標準溶液 1 µg/L (試料中濃度 10 µg/L に相当)

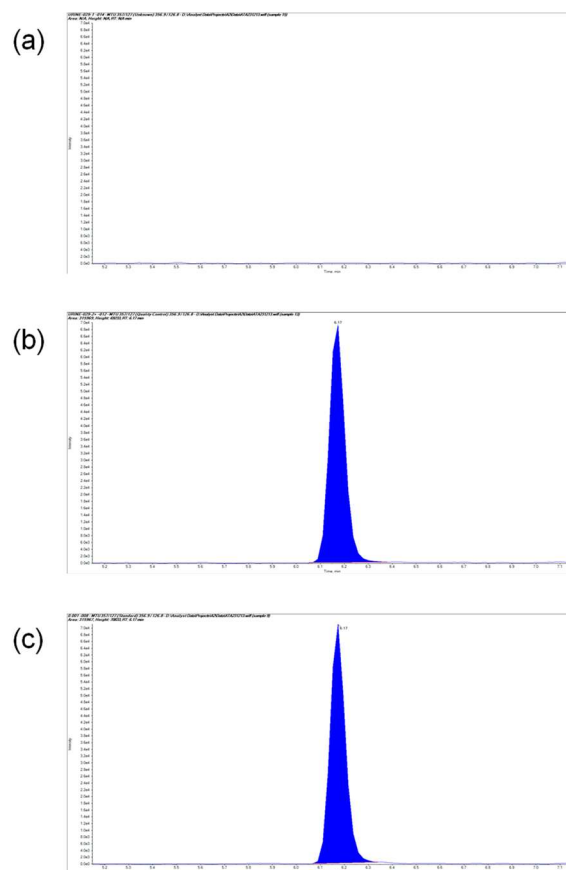


図 1-5 6-メチル-2-チオウラシルの3-ヨードベンジルブロミド誘導体の SRM クロマトグラム
 (a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (10 µg/L)、(c) 標準溶液 1 µg/L (試料中濃度 10 µg/L に相当)

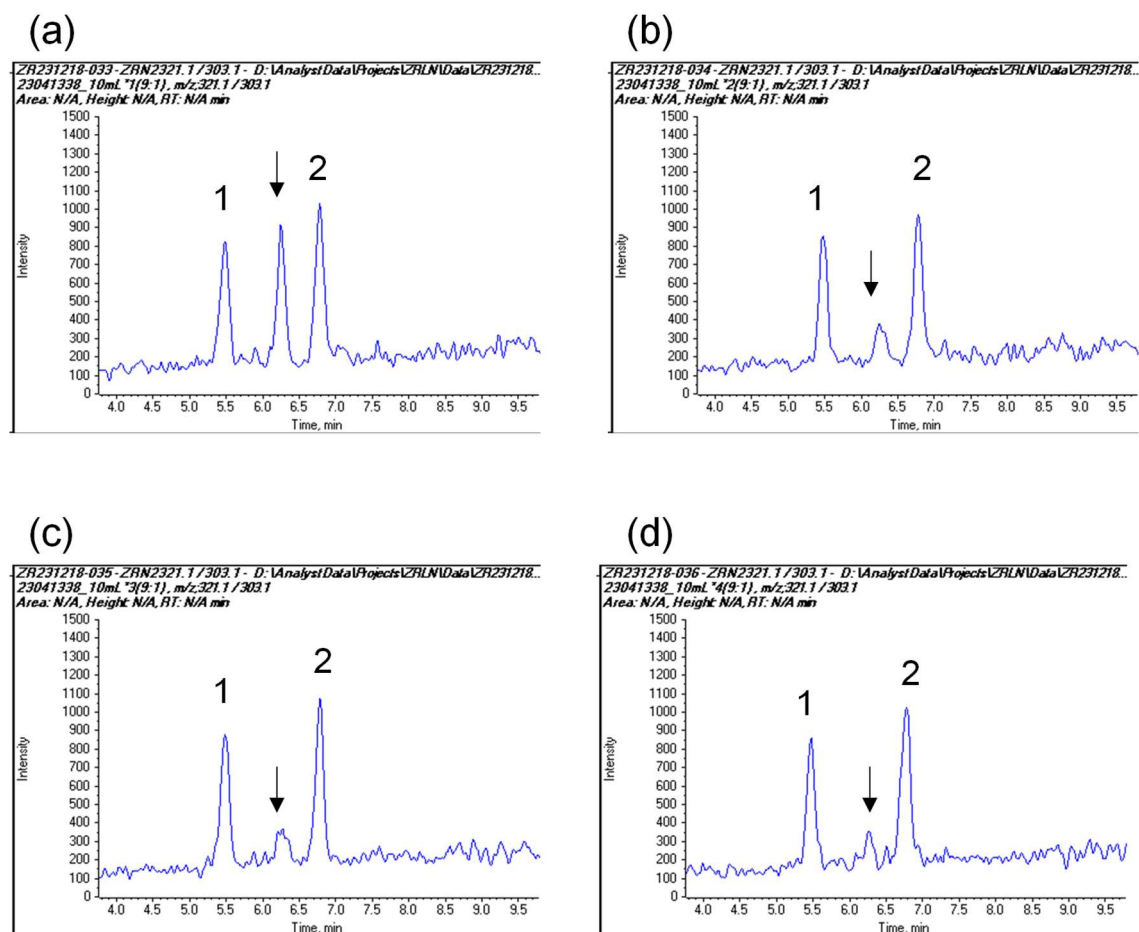


図 1-6 ZearalaTest WB により精製した牛尿試料中の α -ZAL (2) 及び β -ZAL (1) (1 μ g/L 添加) の SRM クロマトグラム (m/z 321 $\rightarrow$ 303 ; 確認イオン)

洗浄溶媒 (水/メタノール=9:1) は (a) 10 mL、(b) 20 mL、(c) 30 mL、(d) 40 mL とした。

矢印は夾雑成分を示す

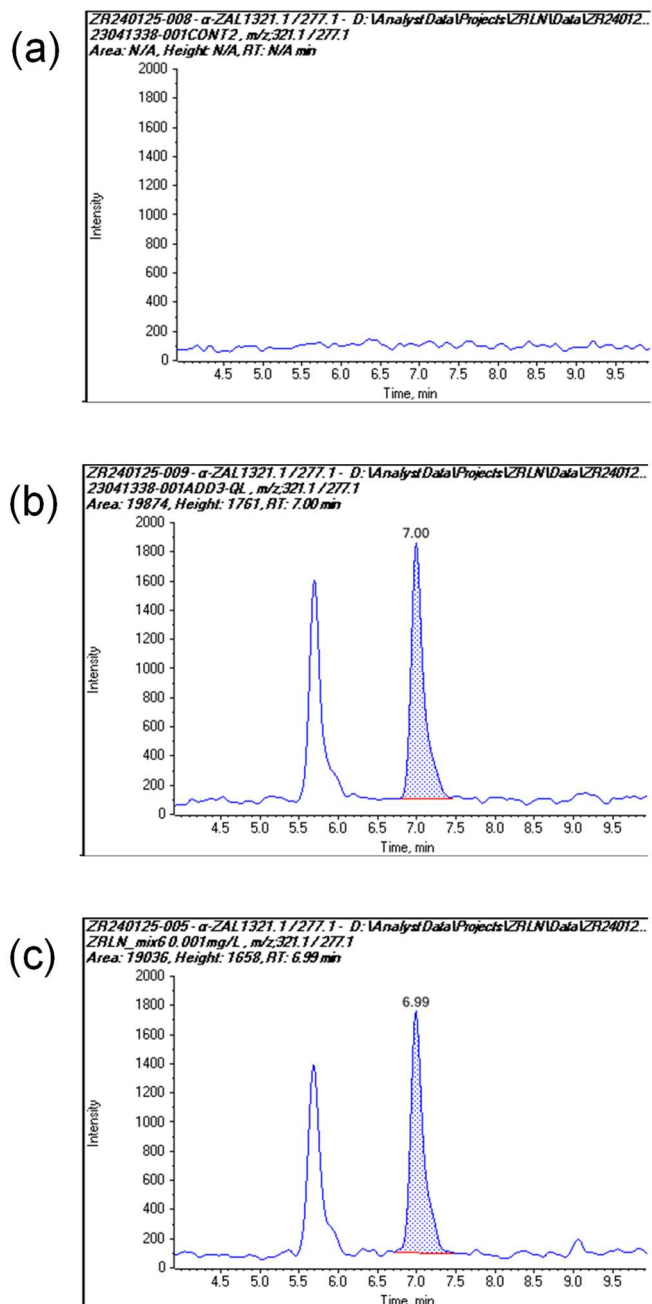


図 1-7 α -ZAL における SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (1 $\mu\text{g/L}$)、(c) 1 $\mu\text{g/L}$ 標準溶液 (試料中 1 $\mu\text{g/L}$ に相当)

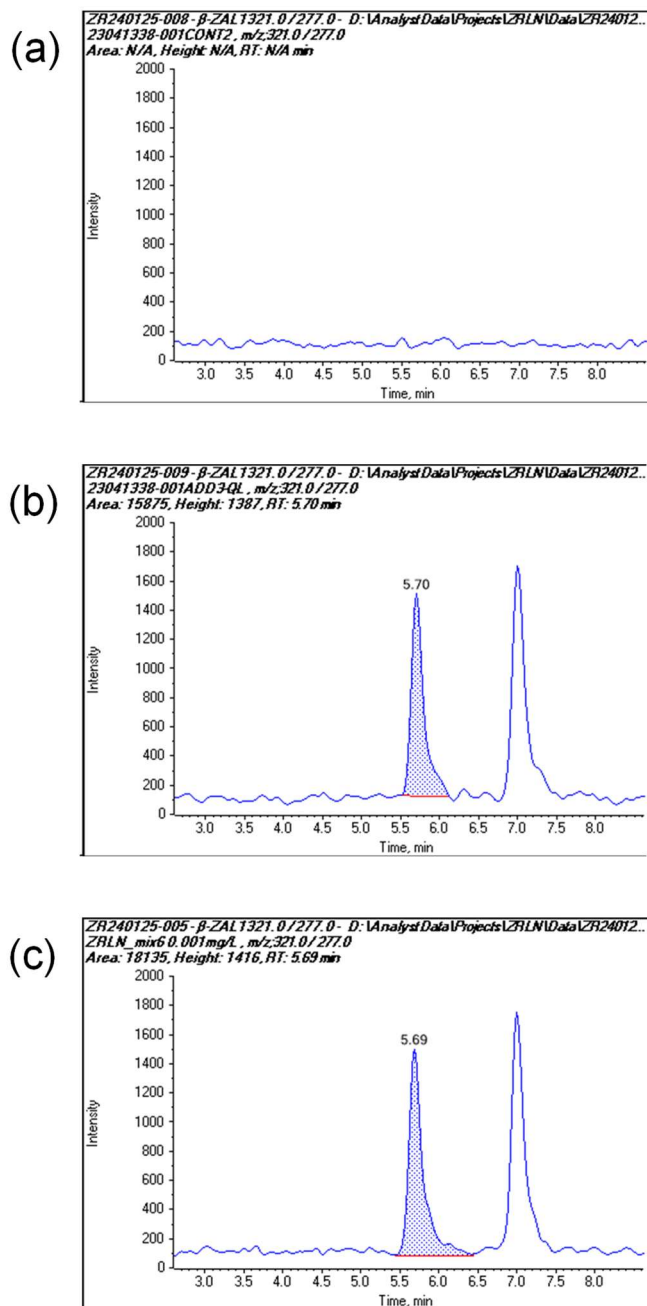


図 1-8 β-ZAL の SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (1 µg/L)、(c) 1 µg/L 標準溶液 (試料中 1 µg/L に相当)

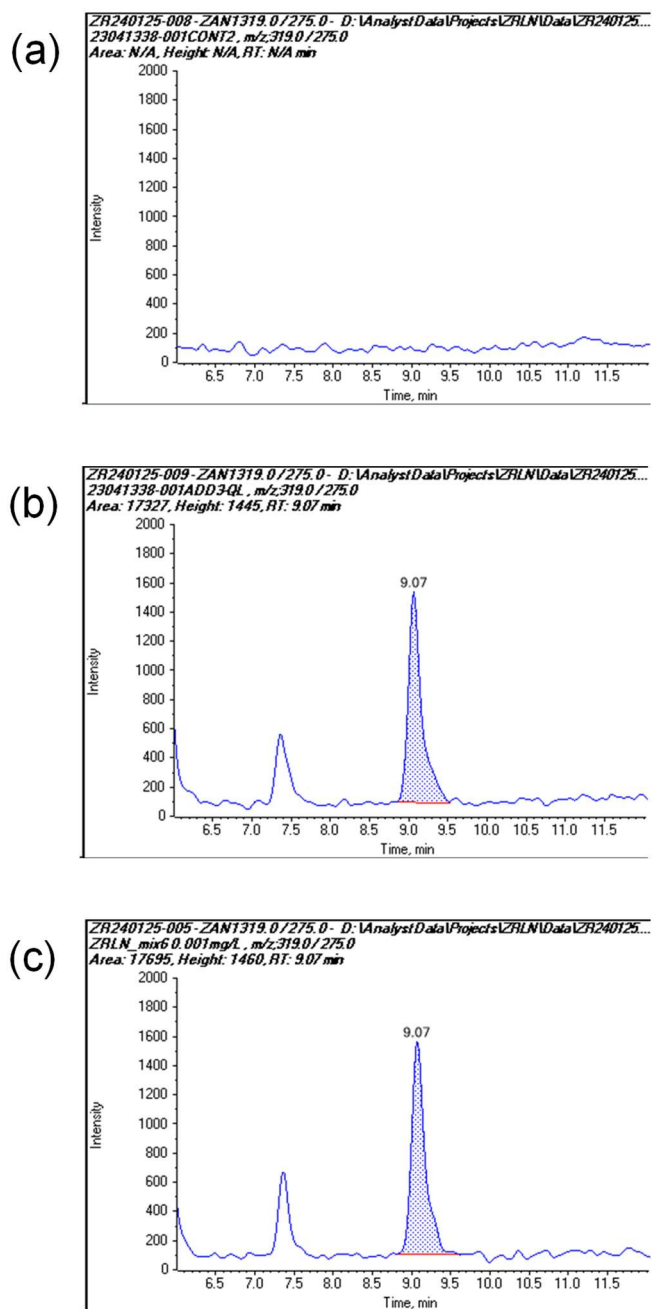


図 1-9 ZAN における SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (1 $\mu\text{g/L}$)、(c) 1 $\mu\text{g/L}$ 標準溶液 (試料中 1 $\mu\text{g/L}$ に相当)

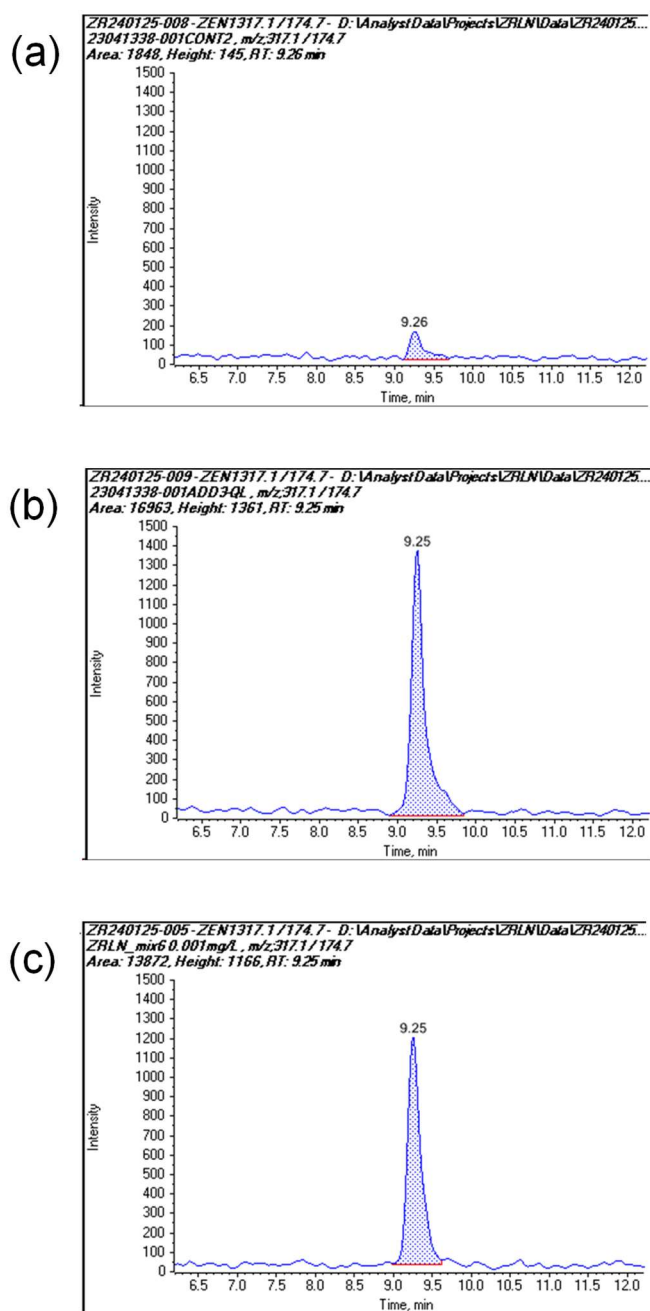


図 1-10 ZEN における SRM クロマトグラム

(a) 牛尿ブランク試験溶液、(b) 牛尿添加試験溶液 (1 $\mu\text{g/L}$)、(c) 1 $\mu\text{g/L}$ 標準溶液 (試料中 1 $\mu\text{g/L}$ に相当)

[令和 6 年度]

表 2-1-1 ステロイド類の測定条件

LC 条件																											
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm : Waters 製)																										
移動相流速(mL/min)	0.3																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度(°C)	40																										
移動相	A液 : 0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 B液 : メタノール(LC-MS用)																										
グラジエント条件	<table><tr><th>時間(分)</th><th>A 液(%)</th><th>B 液(%)</th></tr><tr><td>0.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>2.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>12.0</td><td>15</td><td>85</td></tr><tr><td>12.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.01</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>18.0</td><td>50</td><td>50</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	2.0	50	50	12.0	15	85	12.01	5	95	15.0	5	95	15.01	50	50	18.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
2.0	50	50																									
12.0	15	85																									
12.01	5	95																									
15.0	5	95																									
15.01	50	50																									
18.0	50	50																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+又は-)																										
イオンスプレー電圧(V)	4500 又は-4500																										
ヒーター温度(°C)	600																										
ネブライザーガス	空気、50 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン ① (定量用)		プロダクトイオン ② (定性用)																						
			(m/z)	コリジ ョンエ ネルギー(eV)	(m/z)	コリジ ョンエ ネルギー(eV)																					
17β-エストラ ジオール	271	-120	145	-52	183	-56																					
17β-エストラジ オール-2,4,16,16- d ₄	275	-120	147	-52	—	—																					
17β-テストステ ロン	289	30	97	27	109	31																					
17β-テストステ ロン-16,16,17-d ₃	292	30	97	31	—	—																					
エチニル エストラジオー ル	295	-120	145	-54	143	-76																					
エチニル	299	-120	147	-52	—	—																					

エストラジオール-2,4,16,16- d_4						
酢酸 メレンゲステロール	397	30	337	19	279	27
酢酸メレンゲ ステロール- d_3	400	30	337	19	—	—
メチル テストステロン	303	30	97	27	109	37
メチル テストステロン- d_3	306	30	97	27	—	—
α -トレンボロン	271	30	253	29	178	65
[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロン	276	30	258	29	—	—
β -トレンボロン	271	30	253	29	178	65
[$^2\text{H}_5$]- β -トレンボロン	276	30	258	29	—	—
デキサメタゾン	393	30	373	13	355	17
デキサメタゾン- 4,6 α ,21,21- d_4	397	30	377	13	—	—
酢酸メドロキシ プロゲステロン	387	30	327	19	123	49
酢酸メドロキシ プロゲステロン- d_6	393	30	330	19	—	—
保持時間(min)	17 β -エストラジオール 6.3、17 β -テストステロン 6.9、 エチニルエストラジオール 6.5、 酢酸メレンゲステロール 9.2、メチルテストステロン 7.7、 α -トレンボロン 5.9、 β -トレンボロン 5.3、デキサメタゾン 5.0、 酢酸メドロキシプロゲステロン 9.0					

表 2-1-2 スチルベン類の測定条件 (Triple Quad 5500 及び Triple Quad 6500+)

LC 条件																								
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm ：大阪ソーダ製)																							
移動相流速(mL/min)	0.4																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度(°C)	40																							
移動相	A液：水及び酢酸の混液(10000：1) B液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>6.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>6.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.01</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>12.0</td><td>50</td><td>50</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.01	5	95	9.0	5	95	9.01	50	50	12.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																						
0.0	50	50																						
6.0	50	50																						
6.01	5	95																						
9.0	5	95																						
9.01	50	50																						
12.0	50	50																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																							
イオン化モード	ESI(－)																							
イオンスプレー電圧(V)	-4500																							
ヒーター温度(°C)	600																							
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)																								
Triple Quad 5500																								
	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)																		
ジエネストロール	265	-80	93	-40	236	-26																		
ジエネストロール -d ₆	271	-80	94	-40	—	—																		
ジエチル スチルベストロー ル	267	-75	222	-42	237	-34																		
[² H ₈]-ジエチル スチルベストロー ル	275	-75	245	-40	—	—																		
ヘキセストロール	269	-60	134	-22	119	-50																		
ヘキセストロール -d ₄	273	-65	136	-22	—	—																		
Triple Quad 6500+																								

	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)
ジエネストロール	265	-100	93	-40	236	-26
ジエネストロール -d ₆	271	-100	94	-40	—	—
ジエチル スチルベストロー ル	267	-95	222	-42	237	-34
[² H ₈]-ジエチル スチルベストロー ル	275	-95	245	-40	—	—
ヘキセストロール	269	-80	134	-22	119	-50
ヘキセストロール -d ₄	273	-85	136	-22	—	—
保持時間(min)		ジエネストロール 3.6、ジエチルスチルベストロール 3.5、 ヘキセストロール 3.6				

表 2-1-3 スチルベン類の測定条件 (Xevo TQ-XS)

LC 条件																								
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm ：大阪ソーダ製)																							
移動相流速(mL/min)	0.4																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度(°C)	40																							
移動相	A 液：水及び酢酸の混液(10000：1) B 液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>6.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>6.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>9.01</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>12.0</td><td>50</td><td>50</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.01	5	95	9.0	5	95	9.01	50	50	12.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																						
0.0	50	50																						
6.0	50	50																						
6.01	5	95																						
9.0	5	95																						
9.01	50	50																						
12.0	50	50																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																							
イオン化モード	ESI(－)																							
キャピラリ電圧(V)	1500																							
ソース温度(°C)	150																							
脱溶媒温度(°C)	600																							
コーンガス	窒素、150 L/hr																							
脱溶媒ガス	窒素、1100 L/hr																							

コリジョンガス		アルゴン				
定量イオン(<i>m/z</i>)、定性イオン(<i>m/z</i>)						
	プリカーサー イオン	コーン電 圧 (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)	
			(<i>m/z</i>)	コリジョ ンエネル ギー(eV)	(<i>m/z</i>)	コリジョ ンエネル ギー(eV)
ジエネストロール	265	48	93	26	236	20
ジエネストロール- <i>d</i> ₆	271	48	94	26	—	—
ジエチル スチルベストロー ル	267	48	222	32	237	30
[² H ₈]-ジエチル スチルベストロー ル	275	48	245	30	—	—
ヘキセストロール	269	34	134	16	119	34
ヘキセストロール- <i>d</i> ₄	273	34	136	16	—	—
保持時間(min)		ジエネストロール 3.9、ジエチルスチルベストロール 3.9、 ヘキセストロール 4.0				

表 2-2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep C18 1000 mg	アセトニトリル		合計
	0-20 mL	20-30 mL	
17 β -エストラジオール	91	6	97
17 β -テストステロン	93	6	99
エチニルエストラジオール	89	4	93
酢酸メレンゲステロール	90	5	95
メチルテストステロン	87	5	92
α -トレンボロン	91	4	95
β -トレンボロン	96	5	101
デキサメタゾン	106	5	111
酢酸メドロキシプロゲステロン	97	5	102

予備洗浄：アセトニトリル 5 mL、供試量：各 0.5 μg

表 2-3 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep SAX/PSA	アセトニトリル		合計
500 mg/500 mg	0-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	84	15	99
17β-テストステロン	86	9	95
エチニルエストラジオール	84	14	98
酢酸メレンゲステロール	90	7	97
メチルテストステロン	85	7	92
α-トレンボロン	85	8	93
β-トレンボロン	91	9	100
デキサメタゾン	83	17	100
酢酸メドロキシプロゲステロン	93	8	101

予備洗浄：アセトニトリル 5 mL、供試量：各 0.5 μg

表 2-4 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep PSA	アセトン及びヘキサンの混液						合計
1000 mg	1 : 19	1 : 9	1 : 4	3 : 7	2 : 3	1 : 1	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
17β-エストラジオール	0	0	10	79	0	0	89
17β-テストステロン	0	24	71	2	0	0	97
エチニルエストラジオール	0	0	0	92	4	0	96
酢酸メレンゲステロール	1	76	2	0	0	0	79
メチルテストステロン	0	92	6	1	0	0	99
α-トレンボロン	0	0	80	4	1	0	85
β-トレンボロン	0	0	100	3	1	0	104
デキサメタゾン	0	0	0	0	11	63	74
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	101	4	1	0	0	106

予備洗浄：ヘキサン 5 mL、供試量：各 0.1 μg

表 2-5 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC	メタノール		酢酸エチル			合計
300 mg	0-5 mL	5-10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17 β -エストラジオール	0	0	0	0	0	0
17 β -テストステロン	0	0	83	19	1	103
エチニルエストラジオール	0	0	14	0	0	14
酢酸メレンゲステロール	0	0	96	0	0	96
メチルテストステロン	0	0	111	0	0	111
α -トレンボロン	3	39	59	0	0	101
β -トレンボロン	0	0	103	0	0	103
デキサメタゾン	0	9	57	7	5	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	0	99	0	0	99

予備洗浄：メタノール 5 mL、供試量：各 0.25 μ g

表 2-6 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC	アセトン及びヘキサンの混液 (1 : 1)			合計
300 mg	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17 β -エストラジオール	86	2	0	88
17 β -テストステロン	101	0	0	101
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	100	0	0	100
メチルテストステロン	101	0	0	101
α -トレンボロン	95	0	0	95
β -トレンボロン	88	0	0	88
デキサメタゾン	86	0	0	86
酢酸メドロキシプロゲステロン	104	0	0	104

予備洗浄：アセトン及びヘキサンの混液 (1 : 1) 5 mL、供試量：各 0.1 μ g

表 2-7 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC	アセトニトリル及びトルエンの混液 (7 : 3)			合計
300 mg	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17 β -エストラジオール	97	0	0	97
17 β -テストステロン	101	2	0	103
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	89	1	0	90
メチルテストステロン	97	1	0	98
α -トレンボロン	96	1	0	97
β -トレンボロン	92	1	0	93
デキサメタゾン	117	0	0	117
酢酸メドロキシプロゲステロン	100	1	0	101

予備洗浄：アセトニトリル及びトルエンの混液 (7 : 3) 5 mL、供試量：各 0.1 μ g

表 2-8 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトン及びヘキサン の混液 (1 : 1)		合計
		0-10 mL	10-20 mL	
500 mg/500 mg	20 mL			
17β-エストラジオール	0	85	0	85
17β-テストステロン	0	87	1	88
エチニルエストラジオール	10	73	0	83
酢酸メレンゲステロール	0	87	0	87
メチルテストステロン	0	88	0	88
α-トレンボロン	37	50	0	87
β-トレンボロン	4	87	0	91
デキサメタゾン	5	52	26	83
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	87	0	87

予備洗浄：アセトニトリル 5 mL、供試量：各 0.05 μg

表 2-9 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトニトリル及びトル エンの 混液 (3 : 1)		合計
		0-10 mL	10-20 mL	
500 mg/500 mg	20 mL			
17β-エストラジオール	0	80	0	80
17β-テストステロン	0	95	0	95
エチニルエストラジオール	30	63	0	93
酢酸メレンゲステロール	0	97	0	97
メチルテストステロン	1	91	0	92
α-トレンボロン	93	1	0	94
β-トレンボロン	13	76	0	89
デキサメタゾン	14	63	1	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	1	94	0	95

予備洗浄：アセトニトリル 5 mL、供試量：各 0.05 μg

表 2-10-1 17β-エストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.533	0.478	0.498	0.425	0.474	0.484	96.8	2.4	7.6
	2回目	0.542	0.462	0.486	0.452	0.488				

表 2-10-2 17β-テストステロンの真度、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			
0.5	1回目	0.495	0.456	0.511	0.497	0.508	0.487	97.3	2.4	4.5
	2回目	0.467	0.452	0.489	0.491	0.501				

表 2-10-3 エチニルエストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.484	0.496	0.436	0.413	0.390	0.445	89.1	7.4	13.2
	2回目	0.570	0.440	0.422	0.417	0.384				

表 2-10-4 酢酸メレンゲステロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.473	0.477	0.495	0.474	0.505	0.487	97.3	0.9	2.7
	2回目	0.486	0.482	0.493	0.475	0.506				

表 2-10-5 メチルテストステロンの真度、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			
0.5	1回目	0.500	0.451	0.519	0.474	0.503	0.492	98.3	2.3	5.4
	2回目	0.507	0.460	0.497	0.477	0.527				

表 2-10-6 α-トレンボロンの真度、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			
0.5	1回目	0.463	0.486	0.493	0.482	0.513	0.492	98.4	3.8	3.8
	2回目	0.520	0.474	0.502	0.476	0.510				

表 2-10-7 β-トレンボロンの真度、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			
0.5	1回目	0.520	0.504	0.490	0.492	0.500	0.494	98.8	2.3	3.0
	2回目	0.510	0.480	0.486	0.475	0.483				

表 2-10-8 デキサメタゾンの真度、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			
0.5	1回目	0.480	0.466	0.531	0.498	0.457	0.490	97.9	1.6	5.5
	2回目	0.482	0.489	0.528	0.501	0.464				

表 2-10-9 酢酸メドロキシprogステロンの真度、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			
0.5	1回目	0.476	0.439	0.467	0.467	0.482	0.465	92.9	1.8	3.8
	2回目	0.455	0.444	0.460	0.462	0.495				

表 2-11 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	試料名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ^{*1} ($\mu\text{g/L}$)	ピーク面積(高さ) ^{*2}									備考
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	ジエネストール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	86446	89566	88006	88363	89012	88688	0.99	
2	ジエチルスチルベストール	牛の筋肉	0.5	不検出	0.5	0.25	面積	0	37793	38839	38316	34431	39187	36809	1.04	
3	ヘキサステロール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	27962	25882	26922	27437	28679	28058	0.96	

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒で調製した標準溶液（溶媒標準溶液）を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。（必要に応じて起爆注入を行う。）

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積（又は高さ）の比を求める。

表 2-12-1 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		水及びメタノール の混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及び メタノールの混液(9:1)		合計
		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1 回目	0	0	86	0	86
	2 回目	0	0	95	0	95
ジエチルスチルベストロール	1 回目	0	0	98	0	98
	2 回目	0	0	100	0	100
ヘキセストロール	1 回目	0	0	102	0	102
	2 回目	0	0	97	0	97

表 2-12-2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (スチルベン類)

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		水及びメタノール の混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及び メタノールの混液(9:1)		合計
		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1 回目	0	0	90	4	94
	2 回目	0	0	87	7	94
ジエチルスチルベストロール	1 回目	0	0	94	3	97
	2 回目	0	0	89	5	94
ヘキセストロール	1 回目	0	0	102	4	106
	2 回目	0	0	90	6	96

表 2-13-1 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた牛筋肉中の添加回収試験結果 (スチルベン類)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び Sep-Pak Plus NH2(360 mg)	内標準物質回収率 (%)		添加回収率 (%)	
	マトリックス 無	マトリックス 有	マトリックス 無	マトリックス 有
ジエネストロール	84	78	100	106
ジエチルスチルベストロール	85	53	104	113
ヘキセストロール	97	86	98	99

表 2-13-2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた牛筋肉中の添加回収試験結果（スチルベン類）

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び Sep-Pak Plus NH2(360 mg)	内標準物質回収率 (%)		添加回収率 (%)	
	マトリックス 無	マトリックス 有	マトリックス 無	マトリックス 有
ジェネストロール	86	96	98	98
ジェチルスチルベストロール	103	72	97	108
ヘキセストロール	105	103	105	106

表 2-14-1 ジェネストロールの真度、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			
0.5	1回目	0.516	0.470	0.457	0.504	0.520	0.491	98.3	2.1	5.9
	2回目	0.513	0.448	0.474	0.489	0.522				

表 2-14-2 ジェチルスチルベストロールの真度、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			
0.5	1回目	0.453	0.434	0.448	0.437	0.513	0.471	94.2	4.5	7.0
	2回目	0.487	0.471	0.468	0.469	0.532				

表 2-14-3 ヘキセストロールの真度、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			
0.5	1回目	0.480	0.483	0.514	0.465	0.523	0.499	99.7	4.3	7.8
	2回目	0.482	0.525	0.549	0.428	0.538				

表 2-15 試料マトリックスの測定への影響（ステロイド類）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*2}									備 考
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	17 β -エストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	9888	9820	9854	10215	9331	9773	1.01	
2	17 β -テストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	435503	429753	432628	669636	654218	661927	0.65	
3	エチニルエストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	5371	5468	5420	5214	5817	5516	0.98	
4	酢酸メレンゲステロール	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	272177	252680	262429	424344	415316	419830	0.63	
5	メチルテストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	240014	224851	232433	388172	378709	383441	0.61	
6	α -トレンボロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	337608	323479	330544	499522	498959	499241	0.66	
7	β -トレンボロン	牛の筋肉	0.5	0.002	0.5	0.001	面積	0	158242	156060	157151	214630	220388	217509	0.72	
8	デキサメタゾン	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	12547	12123	12335	20450	18297	19374	0.64	
9	酢酸メドロキシプロゲステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	231024	234715	232870	360658	348484	354571	0.66	

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒で調製した標準溶液（溶媒標準溶液）を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。（必要に応じて起爆注入を行う。）

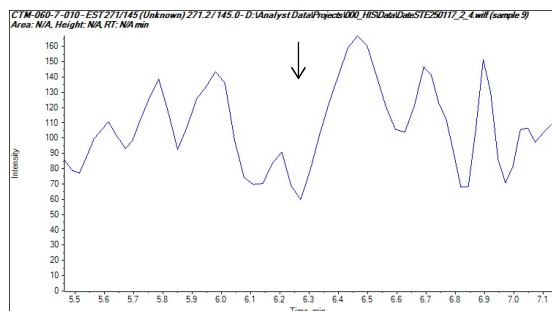
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

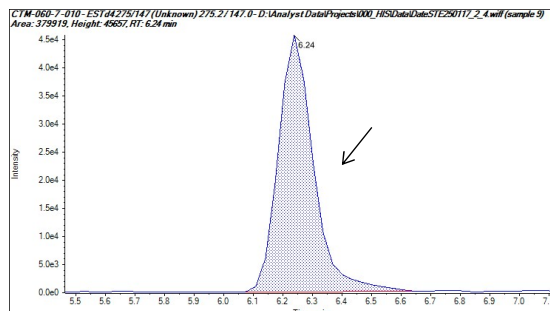
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積（又は高さ）の比を求める。

代表的なクロマトグラム

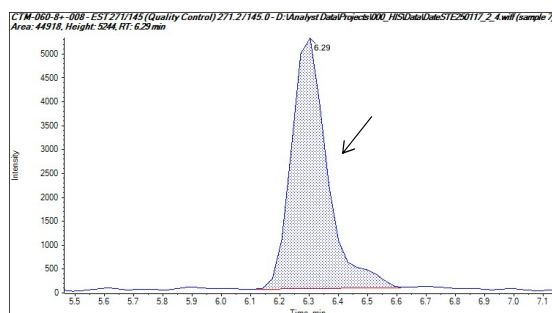
ブランク試料



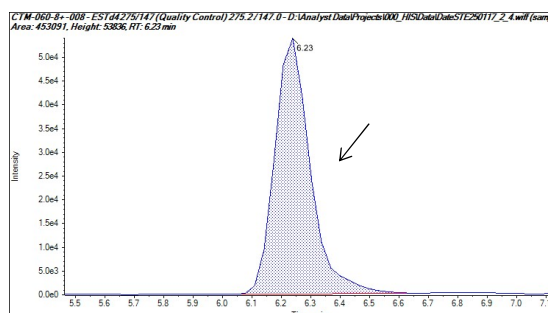
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



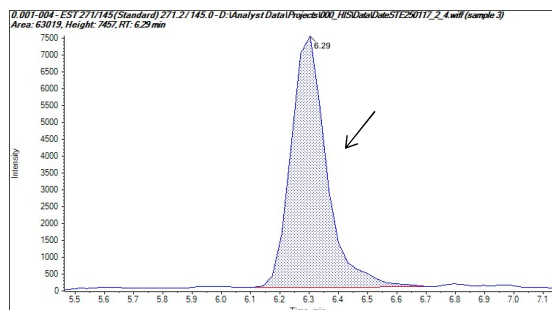
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

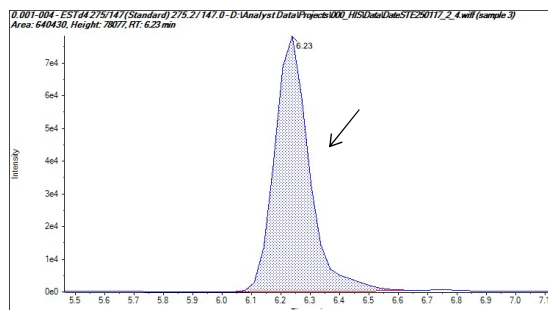
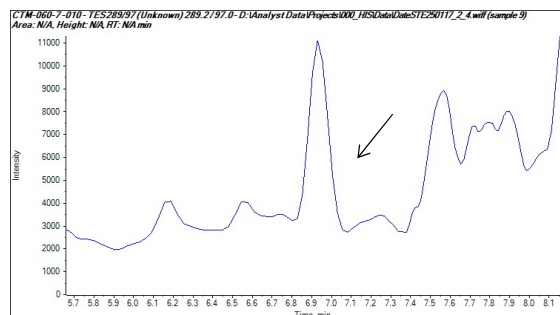


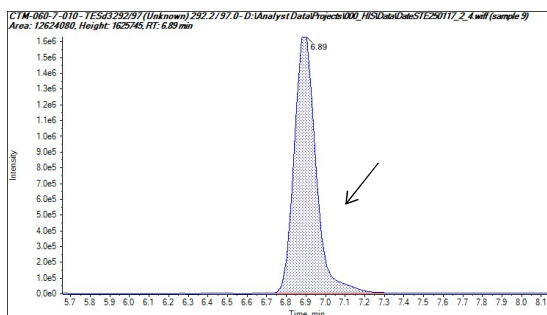
図 2-1-1 17β-エストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 271→145)

添加濃度 : 0.5 μg/kg

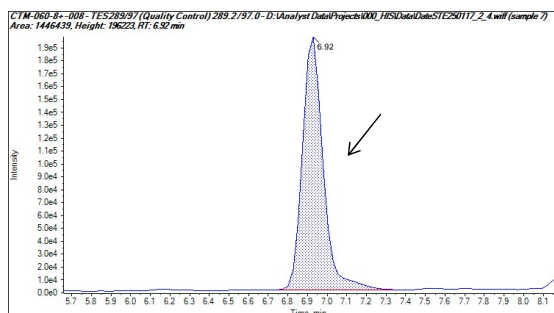
ブランク試料



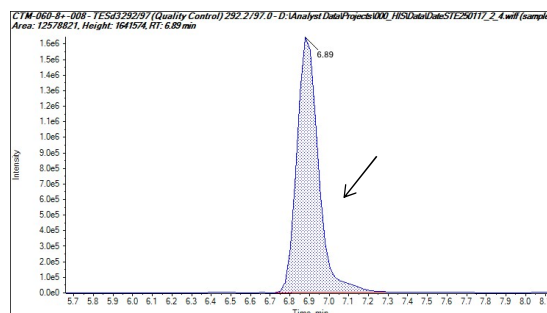
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



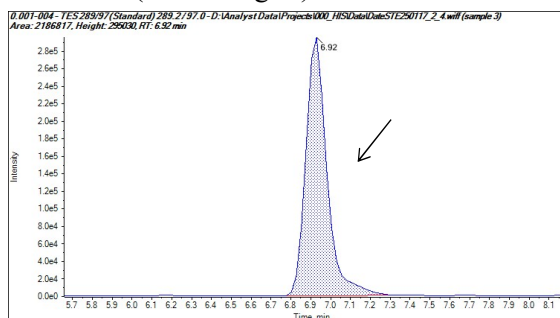
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

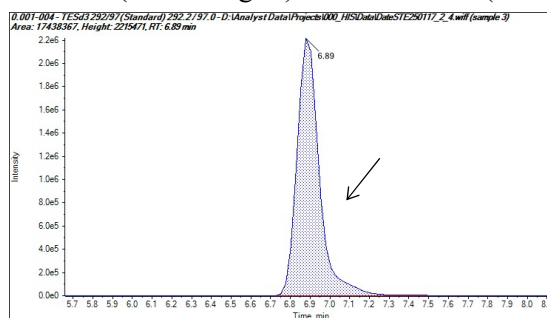
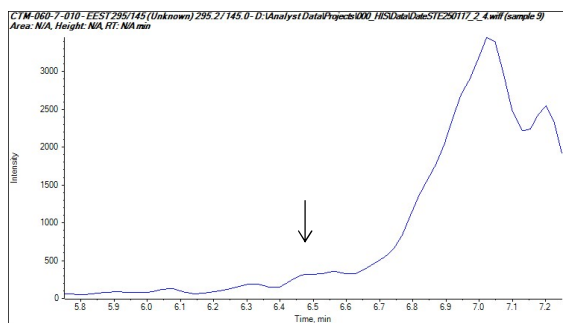


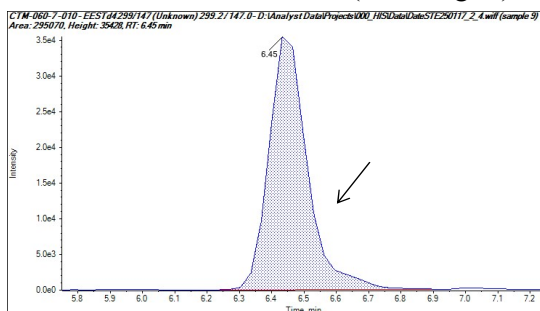
図 2-1-2 17 β -テストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 289 $\rightarrow$ 97)

添加濃度 : 0.5 μ g/kg

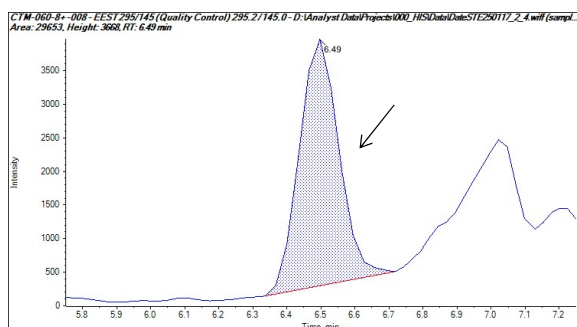
ブランク試料



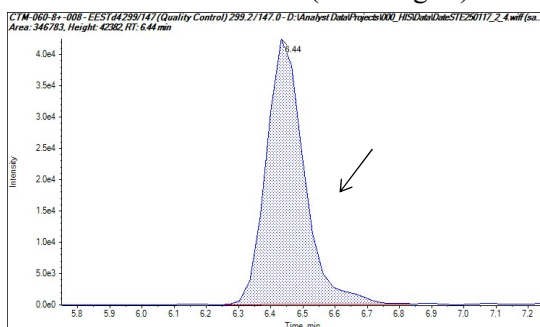
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



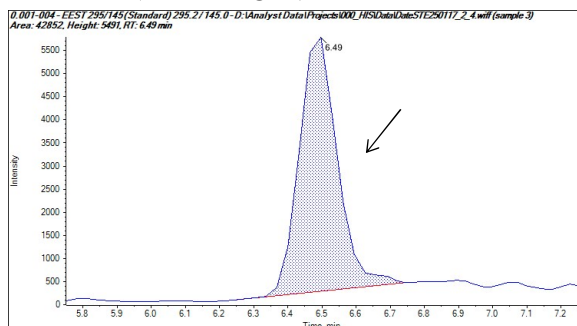
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

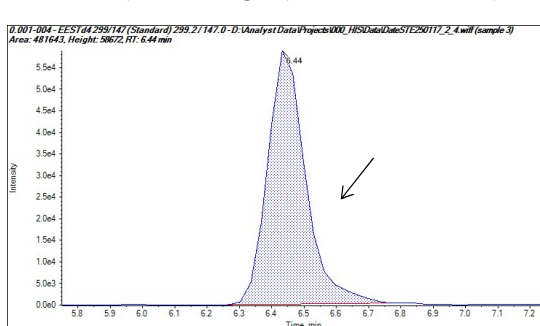
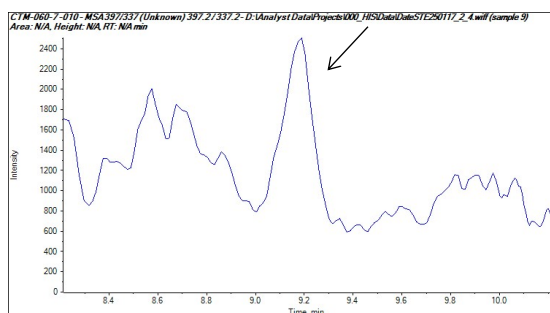


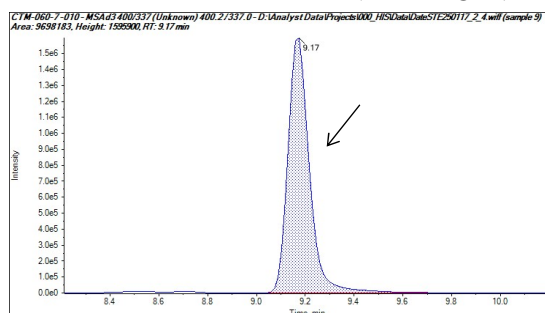
図 2-1-3 エチニルエストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 295→145)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

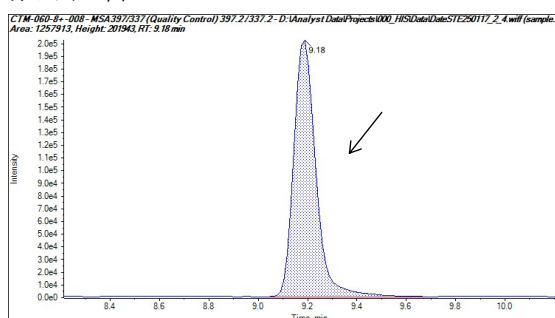
ブランク試料



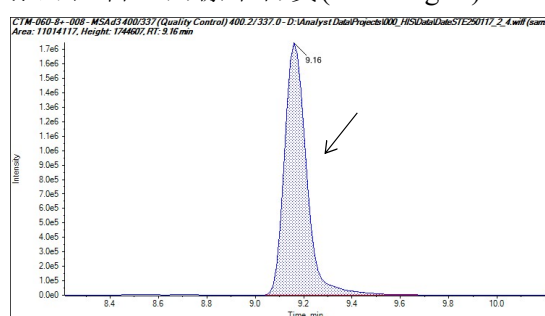
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



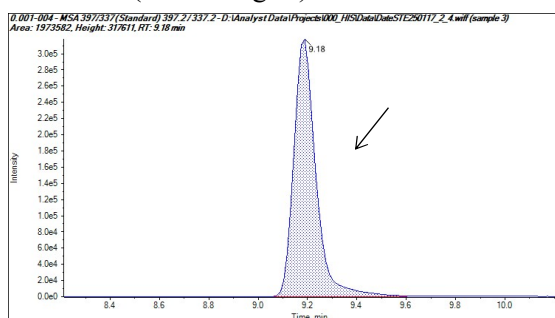
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

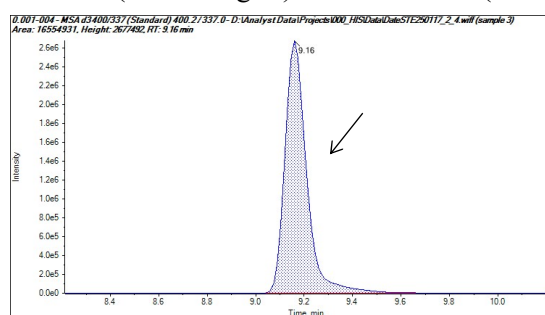
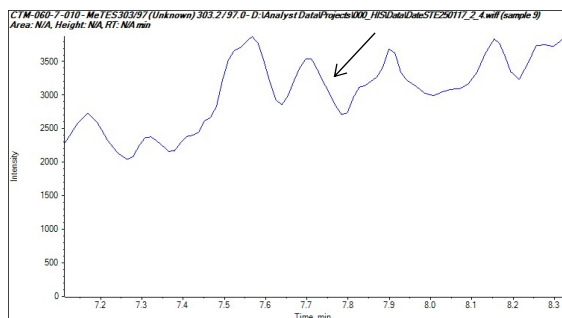


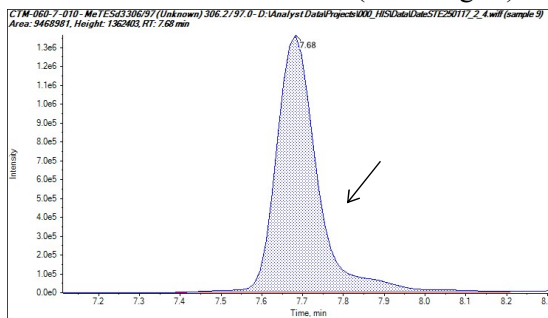
図 2-1-4 酢酸メレンゲステロールの SRM クロマトグラム(m/z 397→337)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

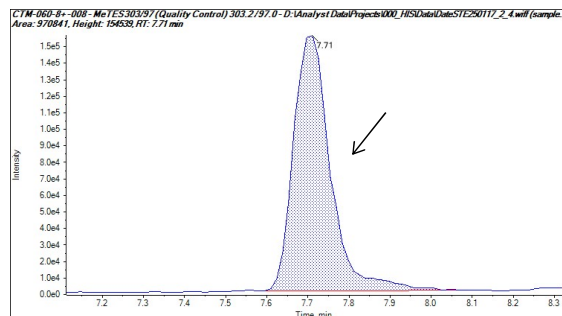
ブランク試料



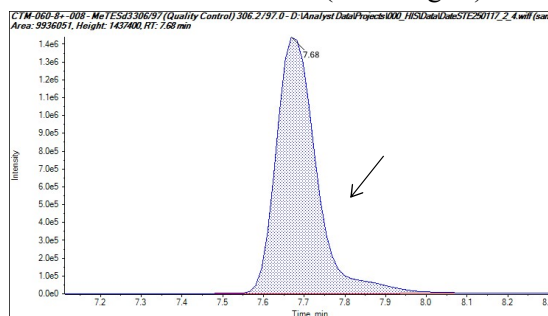
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



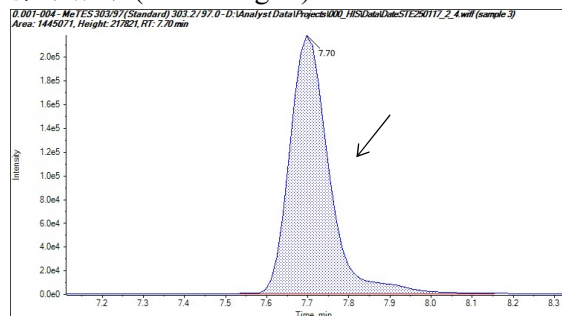
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

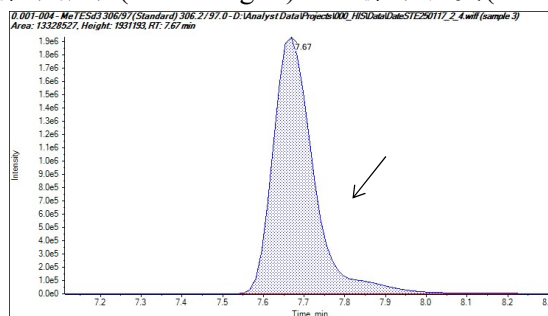
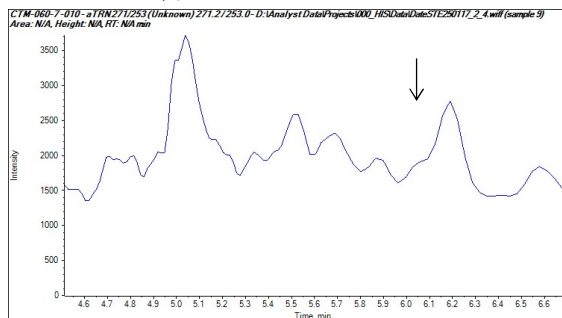


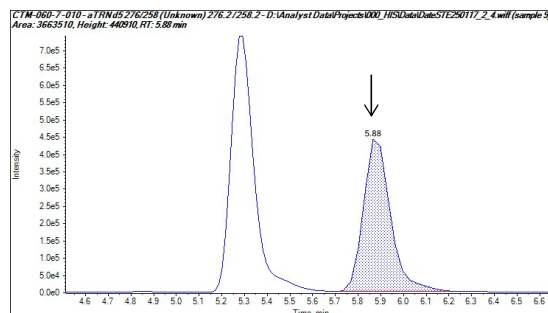
図 2-1-5 メチルテストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 303→97)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

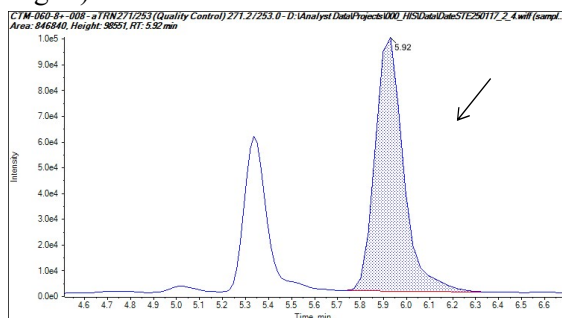
ブランク試料



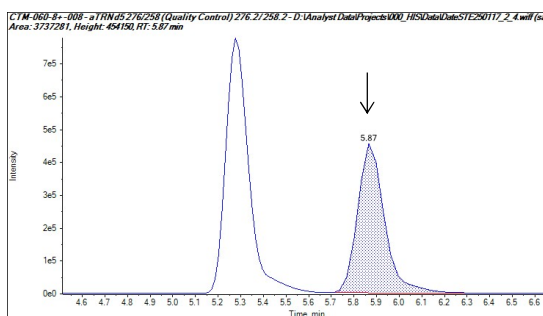
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



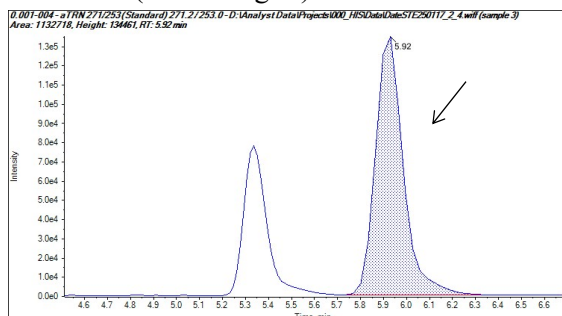
添加試料 mg/L)



添加試料の内標準物質(0.01



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

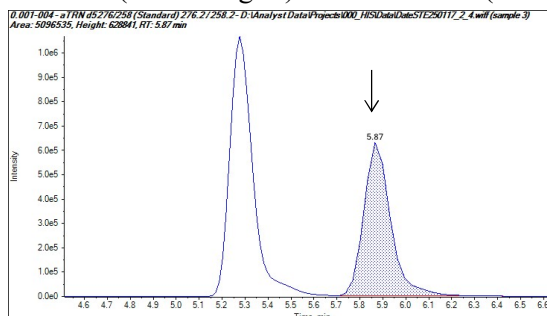
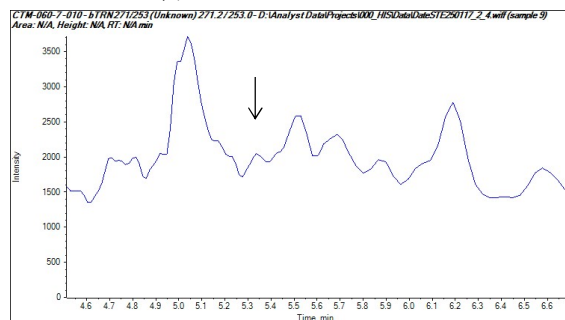


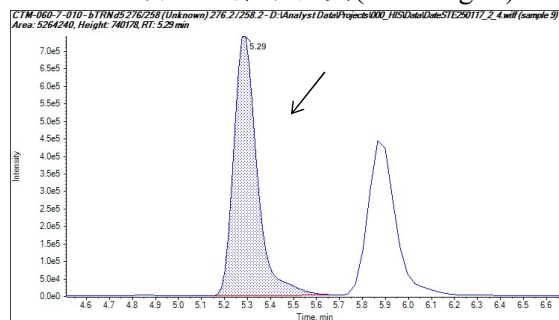
図 2-1-6 α -トレンボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271→253)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

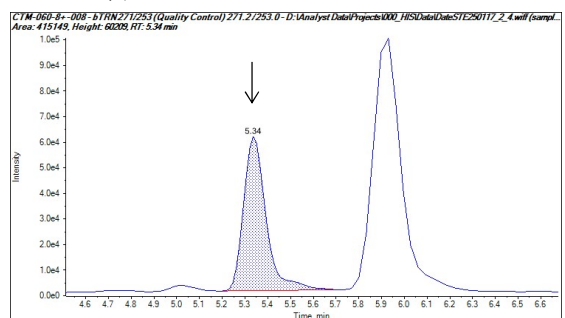
ブランク試料



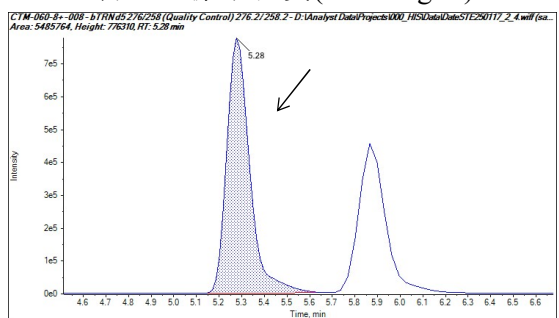
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



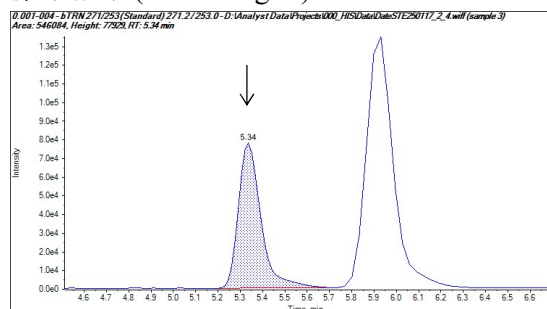
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

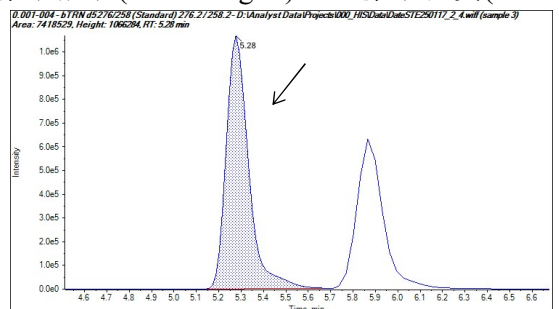
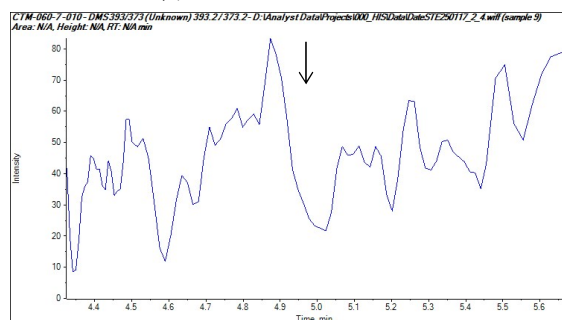


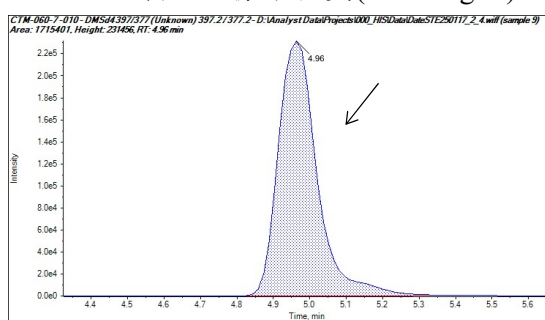
図 2-1-7 β -トレネボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271 $\rightarrow$ 253)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

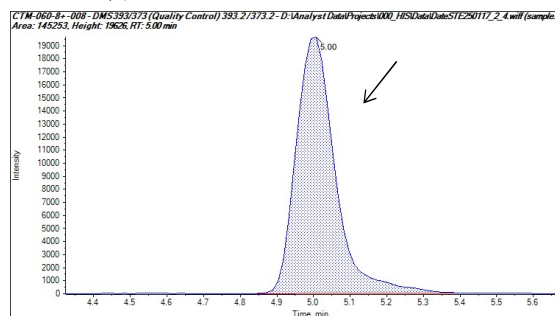
ブランク試料



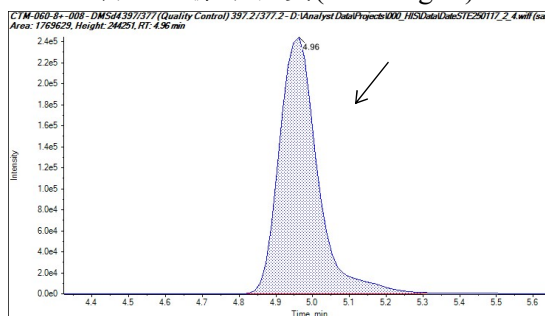
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



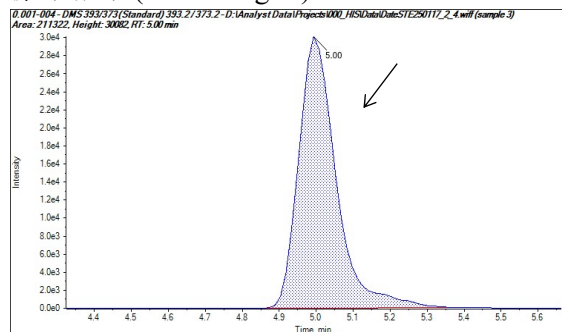
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

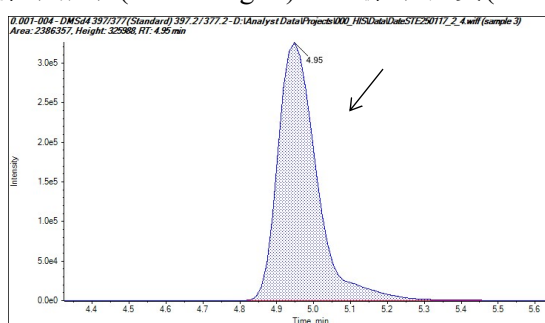
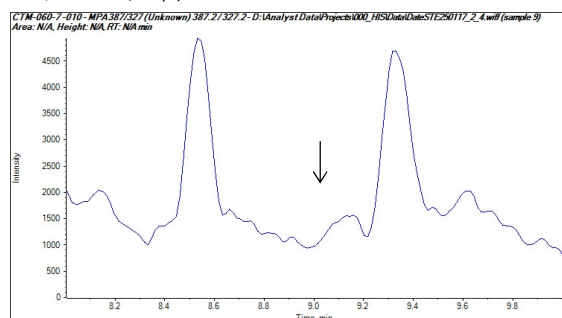


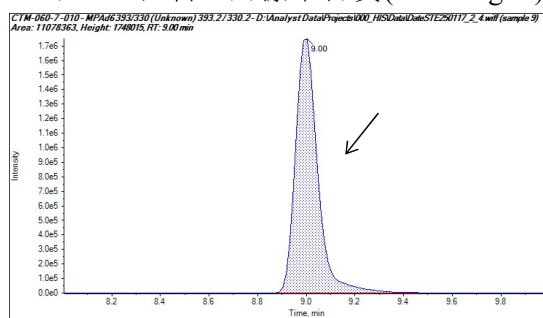
図 2-1-8 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム(m/z 393→373)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

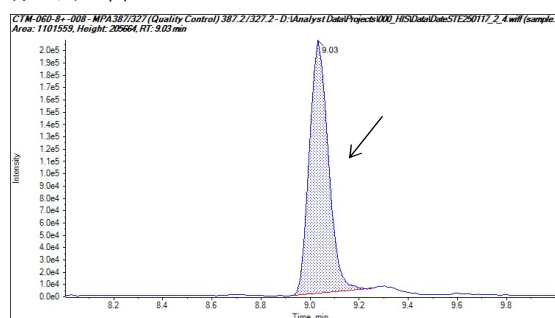
ブランク試料



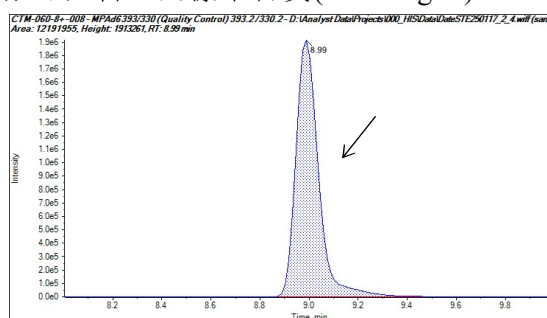
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



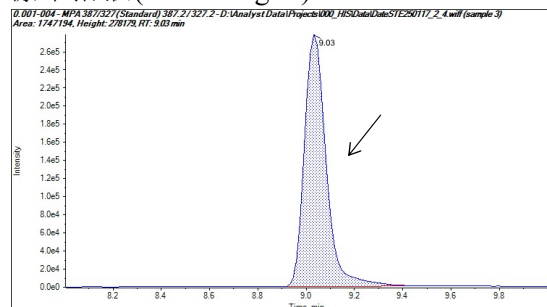
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

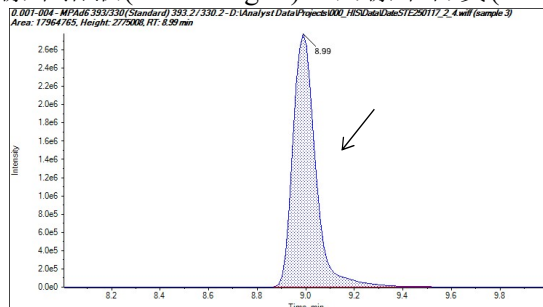
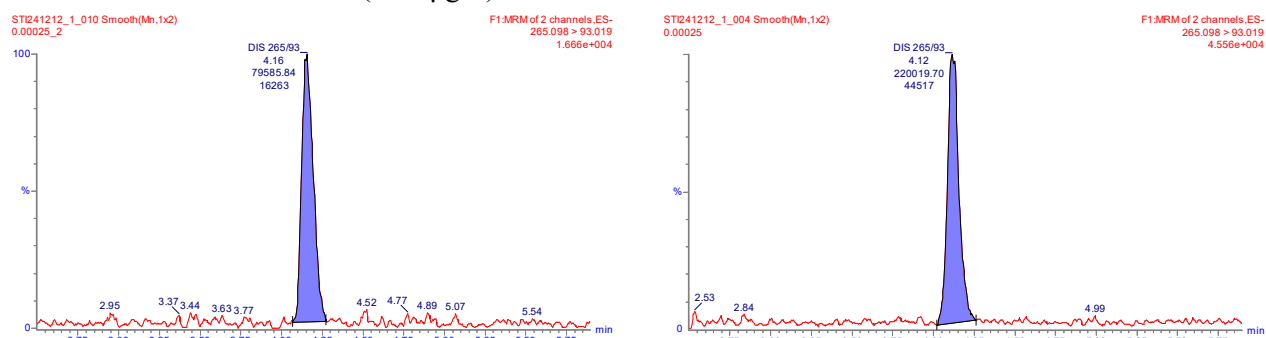


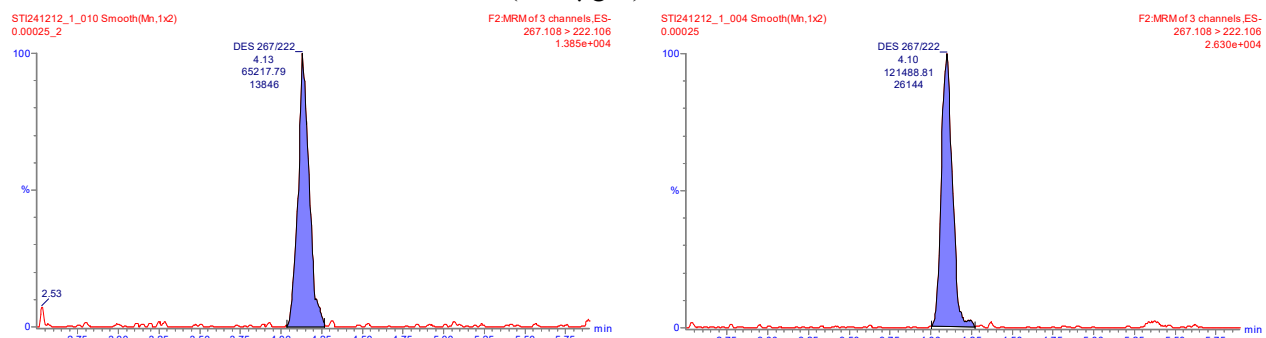
図 2-1-9 酢酸メドロキシprogesteroneの SRM クロマトグラム(m/z 387→327)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

ジエネストロール標準溶液(0.25 µg/L)



ジエチルスチルベストロール標準溶液(0.25 µg/L)



ヘキサエストロール標準溶液(0.25 µg/L)

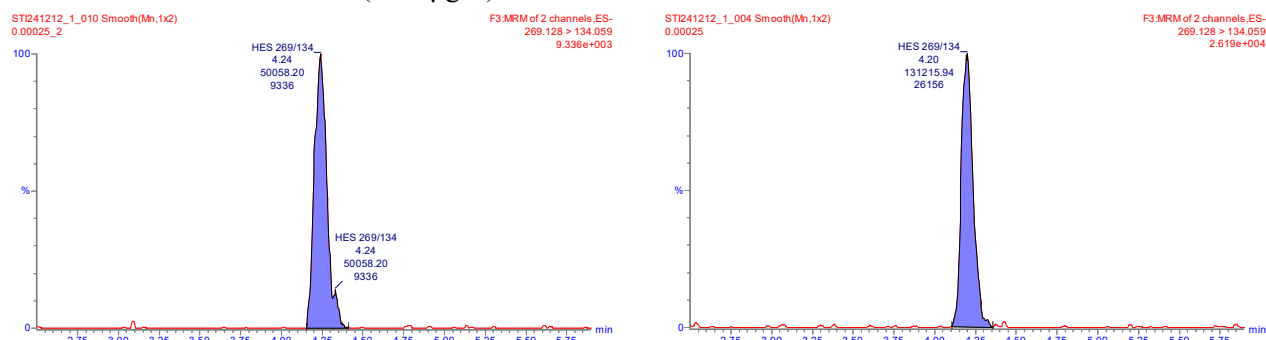
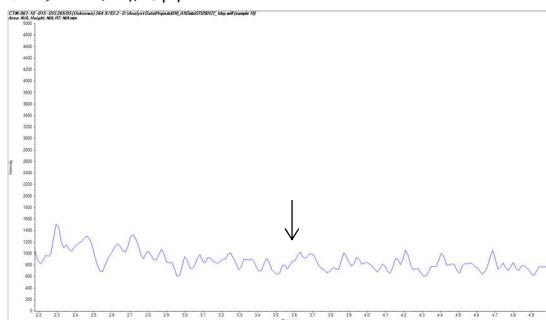
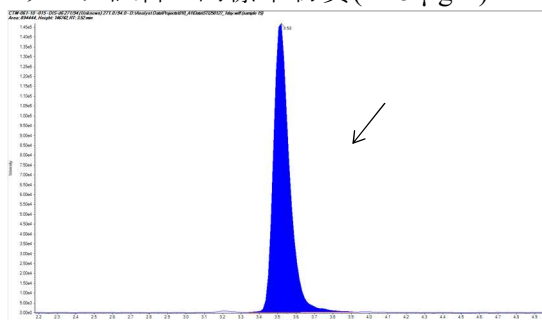


図 2-2 ジエネストロール(m/z 265→93)、ジエチルスチルベストロール(m/z 267→222)及びヘキサエストロール (m/z 269→134)の SRM クロマトグラム
左：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル(1 : 1)
右：水及び酢酸の混液(10000 : 1)及びアセトニトリル(1 : 1)

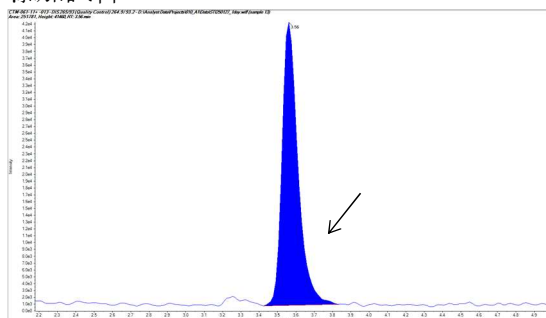
ブランク試料



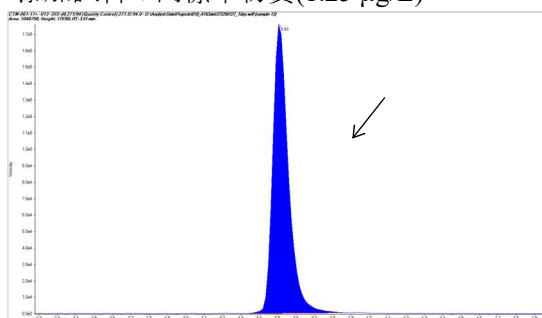
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



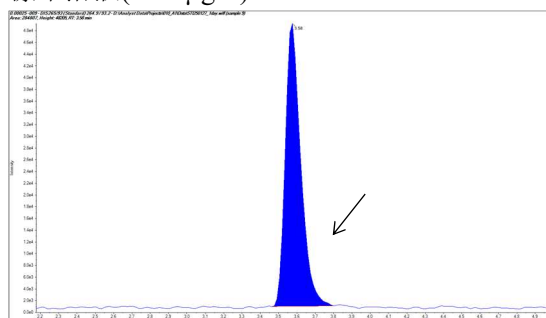
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

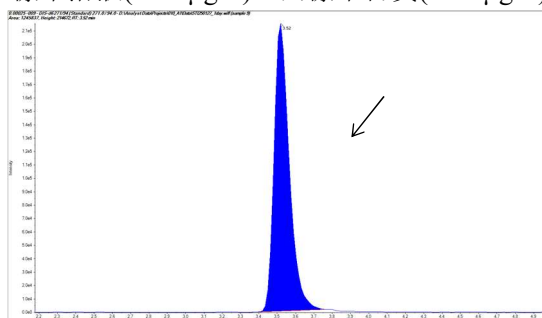
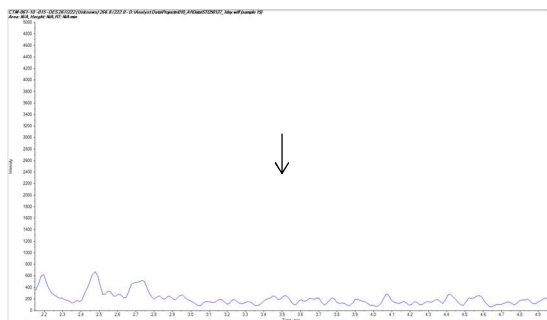


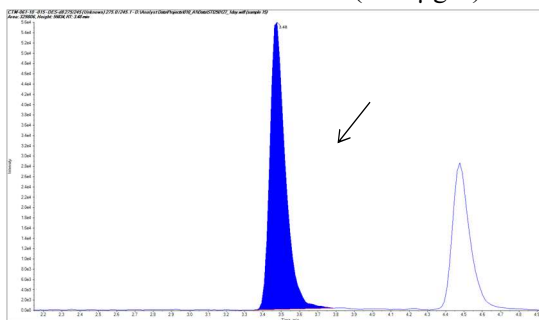
図 2-3-1 ジエネストロールの SRM クロマトグラム(m/z 265 $\rightarrow$ 93)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

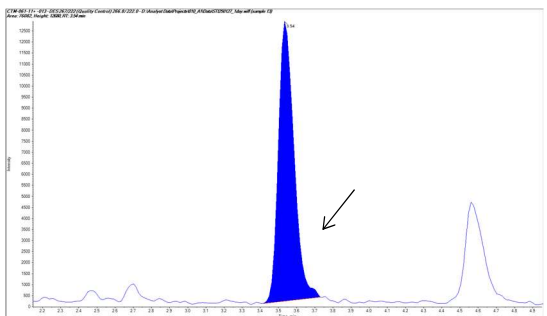
ブランク試料



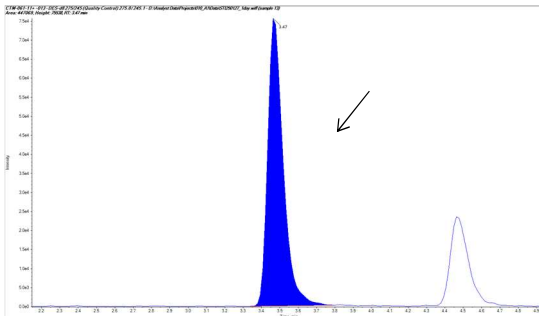
ブランク試料の内標準物質(1.25 µg/L)



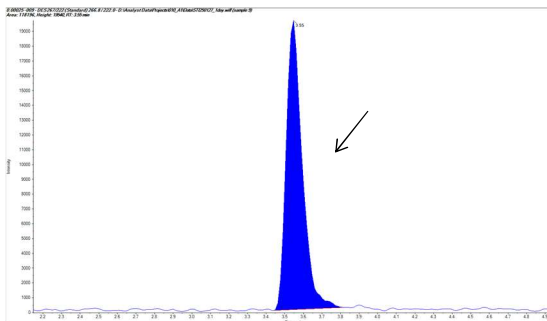
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)の内標準物質(1.25 µg/L)

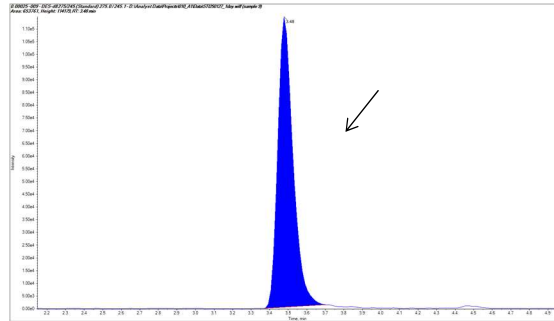
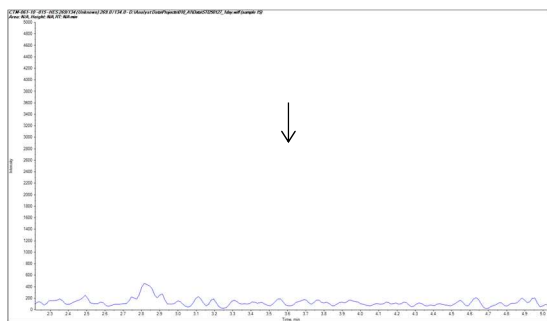


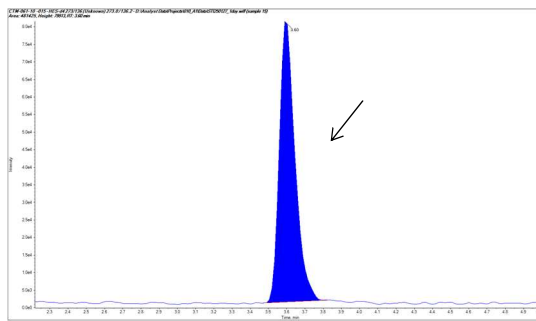
図 2-3-2 ジエチルスチルベストロールの SRM クロマトグラム(m/z 267→222)

添加濃度 : 0.5 µg/kg

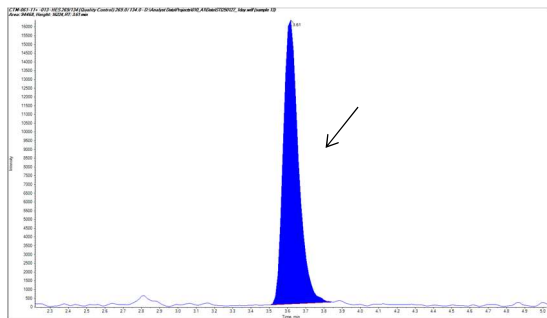
ブランク試料



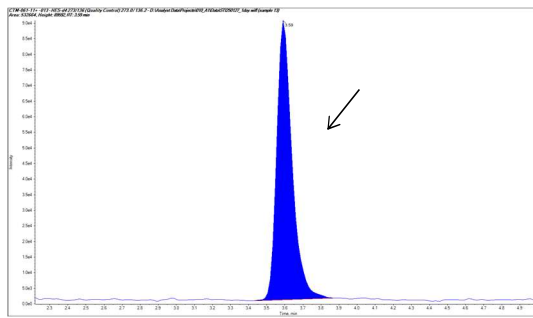
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



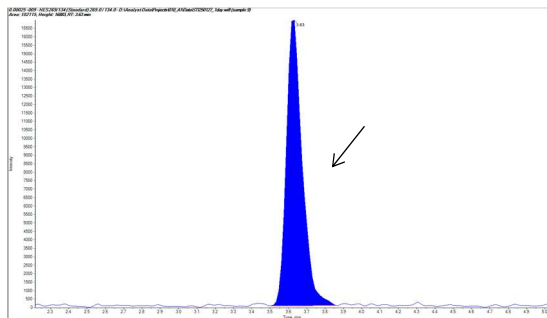
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

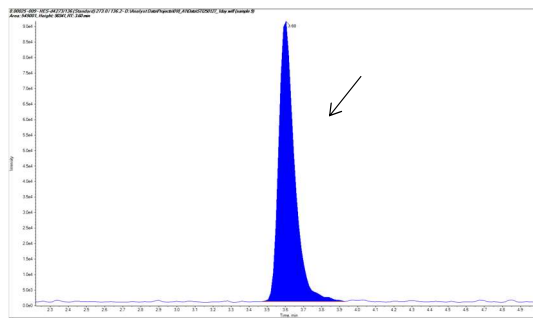


図 2-3-3 ヘキセストロールの SRM クロマトグラム(m/z 269 $\rightarrow$ 134)

添加濃度 : 0.5 $\mu\text{g/kg}$

[令和7年度]

表 3-1-1 ニトロイミダゾール類の測定条件

LC 条件																														
カラム	Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm : 島津製作所)																													
移動相流速(mL/min)	0.4																													
注入量(μL)	DTZ、MNZ 及び INZ:0.4 RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH:4																													
カラム温度(°C)	40																													
移動相	A 液: 水及びギ酸の混液(1000:1) B 液: アセトニトリル(LC-MS 用)																													
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>98</td><td>2</td></tr><tr><td>3.0</td><td>93</td><td>7</td></tr><tr><td>5.5</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>8.5</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>8.51</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>12.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>12.01</td><td>98</td><td>2</td></tr><tr><td>14.5</td><td>98</td><td>2</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	98	2	3.0	93	7	5.5	70	30	8.5	70	30	8.51	0	100	12.0	0	100	12.01	98	2	14.5	98	2
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																												
0.0	98	2																												
3.0	93	7																												
5.5	70	30																												
8.5	70	30																												
8.51	0	100																												
12.0	0	100																												
12.01	98	2																												
14.5	98	2																												
MS 条件																														
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																													
イオン化モード	ESI(+)																													
キャピラリー電圧(V)	300																													
ソース温度(°C)	150																													
脱溶媒温度(°C)	600																													
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)、定性イオン(m/z)																														
	プリカーサーイオン	コーン電圧(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)																								
DTZ	142	2	95	23	96	14																								
DTZ-d ₃	145	2	98	22	—	—																								
RNZ	201	25	140	10	94	28																								
RNZ-d ₃	204	25	143	10	—	—																								
MNZ	172	16	82	22	128	14																								
MNZ-d ₄	176	2	128	12	—	—																								
INZ	170	8	109	24	124	18																								
INZ-d ₃	173	6	112	22	—	—																								
HMMNI	158	3	111	26	94	21																								
HMMNI-d ₃	161	3	58	12	—	—																								
MNZOH	188	30	123	12	68	22																								
MNZOH-d ₄	192	2	127	12	—	—																								

INZOH	186	2	121	25	107	24
INZOH-d ₃	189	2	124	26	—	—
保持時間(min)	DTZ 4.9、RNZ 5.3、MNZ 4.5、INZ 7.8、HMMNI 4.2、MNZOH 3.4、INZOH 6.6					

表 3-1-2 β -作動薬類の測定条件

LC 条件																														
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm: Waters 製)																													
移動相流速(mL/min)	0.35																													
注入量(μL)	5																													
カラム温度(°C)	40																													
移動相	A 液: 水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混液(1000:2:1) B 液: メタノール(LC-MS 用)																													
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>3.0</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>11.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>11.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.00</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.01</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>18.5</td><td>97</td><td>3</td></tr></table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	97	3	3.0	97	3	11.0	50	50	11.01	5	95	15.00	5	95	15.01	97	3	18.5	97	3
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																												
0.0	97	3																												
3.0	97	3																												
11.0	50	50																												
11.01	5	95																												
15.00	5	95																												
15.01	97	3																												
18.5	97	3																												
MS 条件																														
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																													
イオン化モード	ESI(+)																													
イオンスプレー電圧(V)	5000																													
ヒーター温度(°C)	600																													
ネブライザーガス	空気、70 psi																													
ターボガス	空気、50 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン(<i>m/z</i>)、定性イオン(<i>m/z</i>)																														
	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)																									
			<i>m/z</i>	コリジョンエネルギー (eV)	<i>m/z</i>	コリジョンエネルギー (eV)																								
CBT	277	26	203	21	168	37																								
CBT-d ₉	286	41	204	25	—	—																								
RCP	302	61	164	23	107	51																								
RCP-d ₆	308	41	168	23	—	—																								
SAL	240	56	148	25	222	15																								
SAL-d ₉	249	46	149	27	—	—																								
ZPT	262	61	185	33	202	27																								
ZPT- ¹³ C ₃	265	56	185	33	—	—																								
CMT	220	21	143	31	160	21																								
CMT-d ₇	227	60	161	30	—	—																								
保持時間(min)	CBT 9.3、RCP 8.7、SAL 6.1、ZPT 6.0、CMT 5.5																													

表 3-2 内標準混合標準溶液（ニトロイミダゾール類）

測定物質	濃度(μg/L)				
	①	②	③	④	⑤
DTZ、RNZ及びHMMNI	0.1	0.2	0.3	0.4	1
MNZ、INZ、MNZOH及びINZOH	0.05	0.1	0.15	0.2	0.5
DTZ-d ₃ 、RNZ-d ₃ 及びHMMNI-d ₃	1	1	1	1	1
MNZ-d ₄ 、INZ-d ₃ 、MNZOH-d ₄ 及びINZOH-d ₃	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

表 3-3 内標準混合標準溶液（β-作動薬類）

測定物質	濃度(μg/L)				
	①	②	③	④	⑤
CBT	0.00625	0.0125	0.01875	0.025	0.0625
RCP、SAL及びZPT	0.0625	0.125	0.1875	0.25	0.625
CMT	0.0125	0.025	0.0375	0.05	0.125
CBT-d ₉ 及びCMT-d ₇	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
RCP-d ₆ 、SAL-d ₉ 及びZPT- ¹³ C ₃	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625

表 3-4-1 Bond Elut SCX (500 mg/3 mL)からの溶出状況(%)（ニトロイミダゾール類）

	負荷	アセト ン 0-5 mL	メタ ノール 0-5 mL	アセト ニトリル 0-5 mL	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1) 0-5 mL 5-10 mL 10-15 mL 15-20 mL			合計	
DTZ	0	0	0	0	9	94	0	0	103
RNZ	0	0	0	0	9	90	0	0	99
MNZ	0	0	0	0	9	91	0	0	100
INZ	0	0	0	0	9	94	0	0	103
HMMNI	0	0	0	0	9	90	1	0	100
MNZOH	0	0	0	0	7	90	1	0	98
INZOH	0	0	0	0	8	91	2	1	102

表 3-4-2 Oasis MCX (500 mg/6 mL)からの溶出状況(%)（ニトロイミダゾール類）

		アセト ン	メタ ノール	アセト ニトリル	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1)			合計	
	負荷	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
DTZ	0	0	0	0	94	10	0	0	104
RNZ	0	0	0	0	70	9	0	0	79
MNZ	0	0	0	0	81	16	1	0	98
INZ	0	0	0	0	92	11	0	0	103
HMMNI	0	0	0	0	85	15	0	0	100
MNZOH	0	0	0	0	21	77	1	0	99
INZOH	0	0	0	0	91	13	0	0	104

表 3-4-3 EVOLUTE EXPRESS CX(500 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (ニトロイミダゾール類)

	負荷	アセト ン	メタ ノール	アセト ニトリル	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1)				合計
		0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
DTZ	0	0	0	0	101	1	0	0	102
RNZ	1	0	0	0	67	1	0	0	69
MNZ	0	0	0	0	95	3	0	0	98
INZ	0	0	0	0	100	1	0	0	101
HMMNI	0	0	0	0	98	1	0	0	99
MNZOH	0	0	0	0	91	4	0	0	95
INZOH	0	0	0	0	102	1	0	0	103

J

表 3-5-1 DTZ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			
0.2	1回目	0.149	0.233	0.215	0.232	0.211	0.208	103.9	5.0	14.3
	2回目	0.167	0.208	0.225	0.230	0.208				

表 3-5-2 RNZ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			
0.2	1回目	0.190	0.186	0.192	0.208	0.207	0.196	98.1	2.7	4.4
	2回目	0.196	0.193	0.189	0.194	0.208				

表 3-5-3 MNZ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			
0.1	1回目	0.104	0.095	0.101	0.099	0.101	0.098	97.5	3.4	3.9
	2回目	0.099	0.091	0.098	0.093	0.095				

表 3-5-4 INZ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			
0.1	1回目	0.100	0.103	0.100	0.101	0.102	0.101	100.5	2.3	2.3
	2回目	0.101	0.097	0.099	0.103	0.100				

表 3-5-5 HMMNI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			
0.2	1回目	0.225	0.168	0.195	0.182	0.205	0.194	96.9	6.0	11.1
	2回目	0.222	0.188	0.164	0.184	0.205				

表 3-5-6 MNZOH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			
0.1	1回目	0.102	0.112	0.118	0.109	0.106	0.108	108.1	2.3	6.1
	2回目	0.101	0.105	0.118	0.108	0.102				

表 3-5-7 INZOH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			
0.1	1回目	0.097	0.100	0.104	0.100	0.097	0.099	99.2	1.4	2.4
	2回目	0.097	0.101	0.100	0.100	0.096				

表 3-6 試料マトリックスの測定への影響(ニトロイミダゾール類)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (μg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (μg/kg)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (μg/L)	ピーク面積(高さ) ²⁾								備 考	
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	DTZ	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	100717	96435	98576	99564	104376	101970	0.97	
2	RNZ	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	6232697	6230853	6231775	4351571	4314694	4333133	1.44	
3	MNZ	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	136358	138021	137190	138986	139702	139344	0.98	
4	INZ	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	382946	389336	386141	394192	395052	394622	0.98	
5	HMMNI	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	73516	74494	74005	70008	71267	70638	1.05	
6	MNZOH	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	794709	793718	794214	819621	802192	810907	0.98	
7	INZOH	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	1065599	1063208	1064404	1123921	1117923	1120922	0.95	

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 3-7-1 Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水の混液(98:2)		合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	24	52	0	76
RCP	0	0	0	2	9	2	0	13
SAL	0	0	0	1	17	18	1	37
ZPT	0	0	0	0	32	4	0	36
CMT	0	0	0	0	23	61	0	84

表 3-7-2 EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水の混液(98:2)		合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	0	60	1	61
RCP	0	0	0	0	2	63	0	65
SAL	0	0	0	1	3	83	0	87
ZPT	0	0	0	0	34	62	0	96
CMT	0	0	0	0	0	72	1	73

表 3-7-3 Oasis MCX (500 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水の混液(98:2)		合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	2	81	3	86
RCP	0	0	0	0	0	72	1	73
SAL	0	0	0	0	0	80	1	81
ZPT	0	0	0	0	0	99	1	100
CMT	0	0	0	0	0	72	3	75

表 3-8-1 CBT 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			
0.05	1回目	0.0469	0.0473	0.0464	0.0520	0.0448	0.0485	97.0	5.6	5.6
	2回目	0.0490	0.0522	0.0481	0.0483	0.0501				

表 3-8-2 RCP 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			
0.5	1回目	0.476	0.490	0.497	0.488	0.510	0.491	98.1	0.8	2.2
	2回目	0.481	0.484	0.489	0.486	0.504				

表 3-8-3 SAL 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			
0.5	1回目	0.438	0.463	0.457	0.478	0.494	0.464	92.8	2.5	3.5
	2回目	0.453	0.453	0.468	0.473	0.465				

表 3-8-4 ZPT 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			
0.5	1回目	0.487	0.504	0.486	0.500	0.500	0.493	98.6	2.9	3.0
	2回目	0.464	0.484	0.517	0.500	0.487				

表 3-8-5 CMT 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			
0.1	1回目	0.096	0.100	0.110	0.099	0.093	0.098	98.2	6.3	6.7
	2回目	0.092	0.097	0.094	0.108	0.091				

表 3-9-1 CBT の真度

添加 濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.05	0.0528	0.0474	0.0513	0.0514	0.0490	0.0504	100.8

表 3-9-2 RCP の真度

添加 濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.494	0.488	0.505	0.502	0.488	0.495	99.1

表 3-9-3 SAL の真度

添加 濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.453	0.470	0.456	0.466	0.462	0.461	92.3

表 3-9-4 ZPT の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.495	0.499	0.491	0.491	0.500	0.495	99.1

表 3-9-5 CMT の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.1	0.098	0.089	0.086	0.093	0.088	0.091	90.9

表 3-10-1 牛の筋肉における試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ¹ ($\mu\text{g/L}$)	ピーク面積(高さ) ²								備 考	
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ⁵
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	CBT	牛の筋肉	0.05	0.0002	0.05	0.0125	面積	0	45995	51420	48708	52832	55976	54404	0.90	—
2	RCP	牛の筋肉	0.5	0.01	0.5	0.125	面積	0	598481	599843	599162	712757	706151	709454	0.84	—
3	SAL	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	611095	593260	602178	722015	734216	728116	0.83	—
4	ZPT	牛の筋肉	0.5	0.01	0.5	0.125	面積	0	494338	493059	493699	536003	543885	539944	0.91	—
5	CMT	牛の筋肉	0.1	—	0.1	0.025	面積	0	66837	65811	66324	75026	71532	73279	0.91	—

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 3-10-2 鶏の筋肉における試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ^{*1} ($\mu\text{g/L}$)	ピーク面積(高さ) ^{*2}								備 考	
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ^{*5}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	CBT	鶏の筋肉	0.05	不検出	0.05	0.0125	面積	0	48241	49941	49091	52369	52306	52338	0.94	—
2	RCP	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	621291	617223	619257	698654	698976	698815	0.89	—
3	SAL	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	668495	658650	663573	710853	720418	715636	0.93	—
4	ZPT	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	497741	487385	492563	528022	548679	538351	0.91	—
5	CMT	鶏の筋肉	0.1	—	0.1	0.025	面積	0	70530	65492	68011	72522	73771	73147	0.93	—

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

[令和 7 年度]

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ アセトン 30 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g 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

強酸性陽イオン交換ミニカラム[Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)]

↓ メタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 5 mL 及び酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL の混合液を注入

↓ アセトン 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で洗浄

↓ アセトニトリル 5 mL で洗浄

↓ アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)0.5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 3-1-1 ニトロイミダゾール類の分析法フローチャート

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g 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

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(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL 及び酢酸 500 μL の混合液を注入

↓ 水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄

↓ メタノール(特級)10 mL で洗浄

↓ 水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で洗浄

↓ メタノール(特級)5 mL で洗浄

↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL に溶解

試験溶液

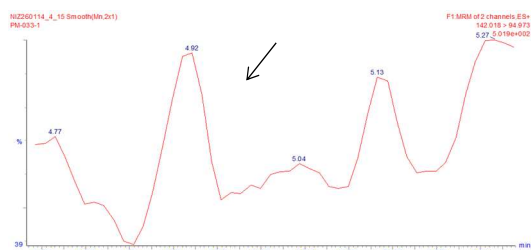
↓

LC-MS/MS

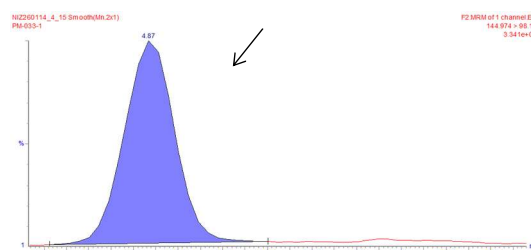
図 3-1-2 β-作動薬類の分析法フローチャート

代表的なクロマトグラム

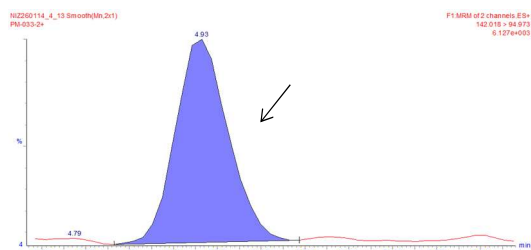
ブランク試料



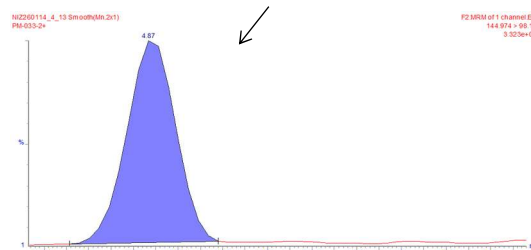
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



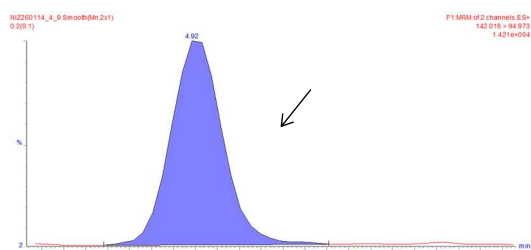
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

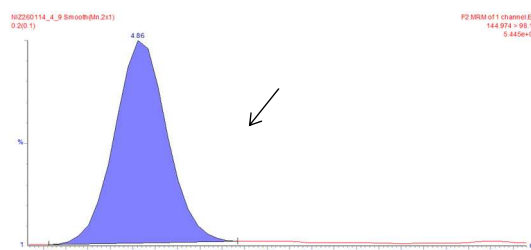
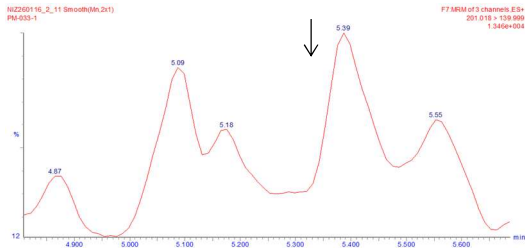


図 3-2-1 DTZ の SRM クロマトグラム

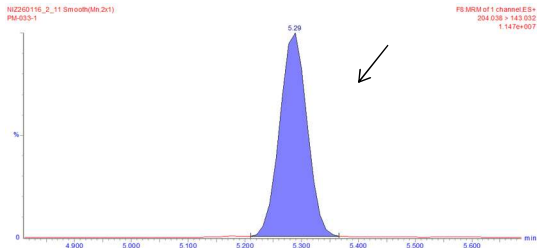
(m/z 142→95)

添加濃度: 0.2 µg/kg

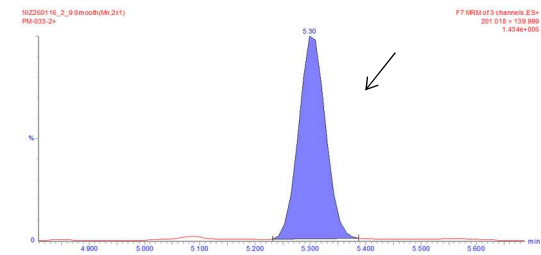
ブランク試料



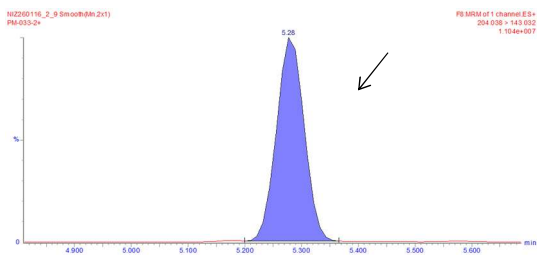
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



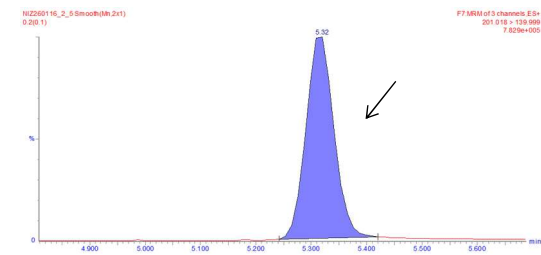
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

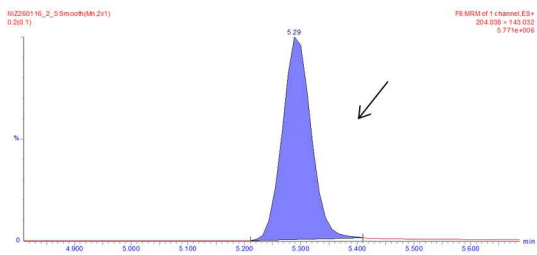
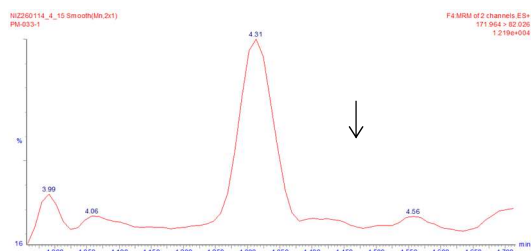


図 3-2-2 RNZ の SRM クロマトグラム

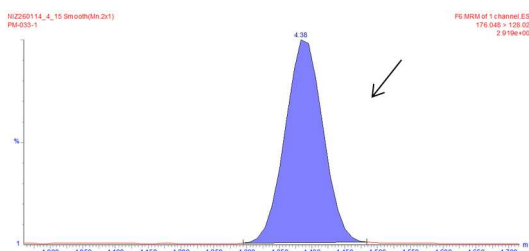
(m/z 201→140)

添加濃度 : 0.2 µg/kg

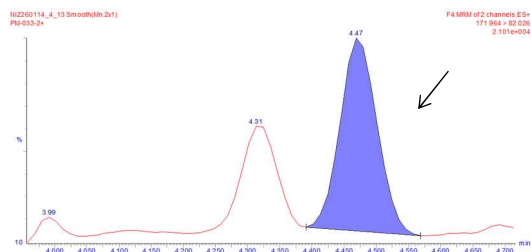
ブランク試料



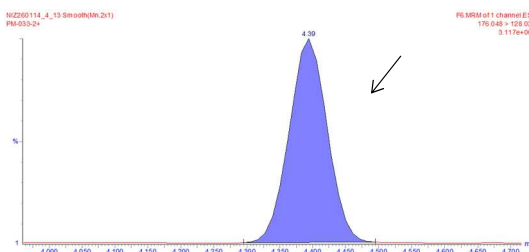
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



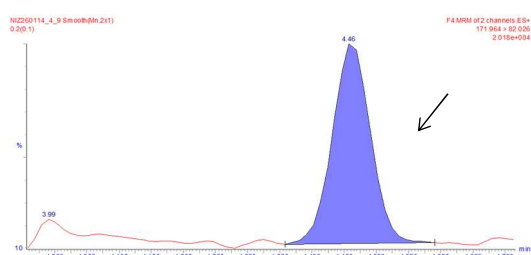
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

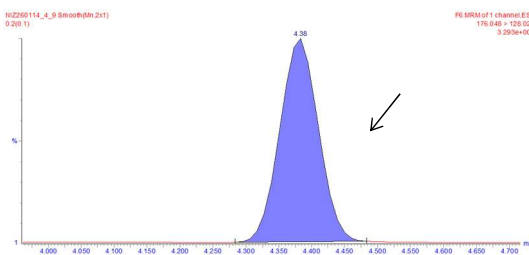
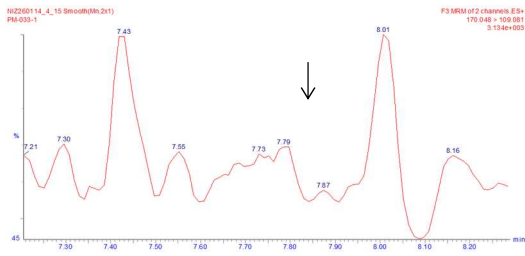


図 3-2-3 MNZ の SRM クロマトグラム

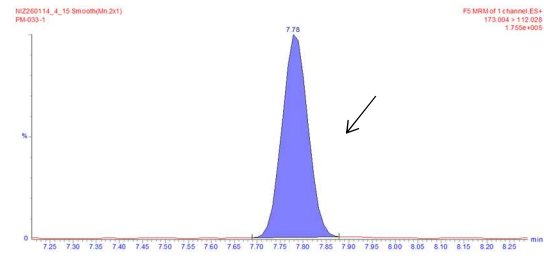
(m/z 172→82)

添加濃度: 0.1 µg/kg

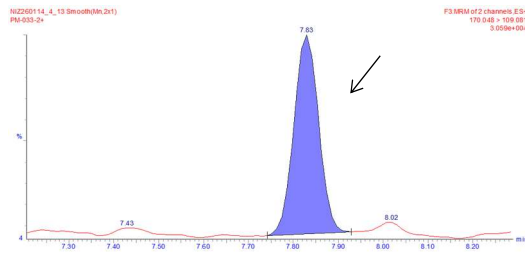
ブランク試料



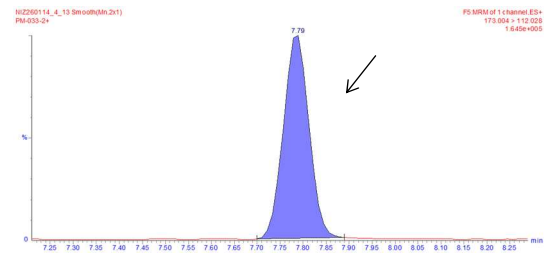
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



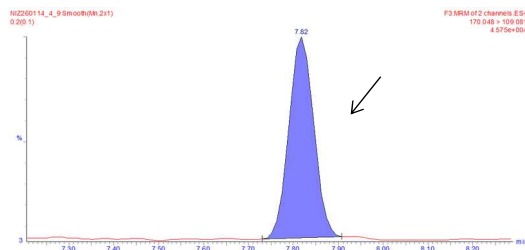
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

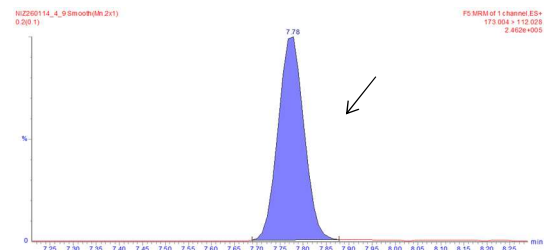
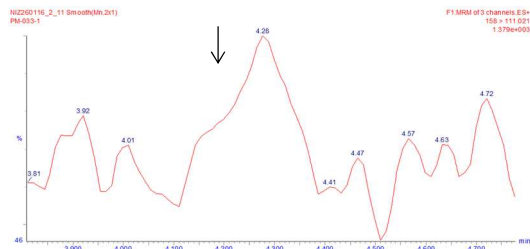


図 3-2-4 INZ の SRM クロマトグラム

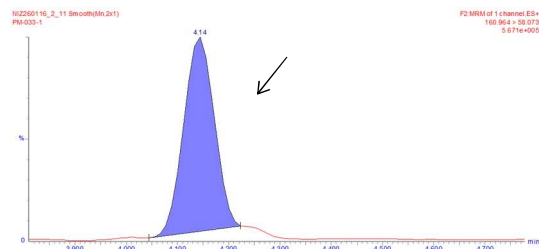
(m/z 170→109)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

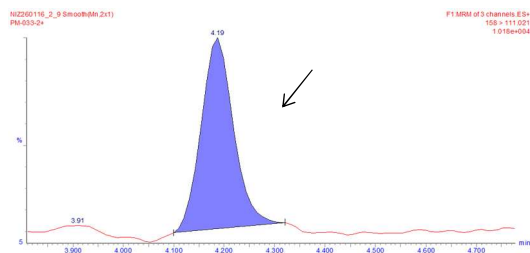
ブランク試料



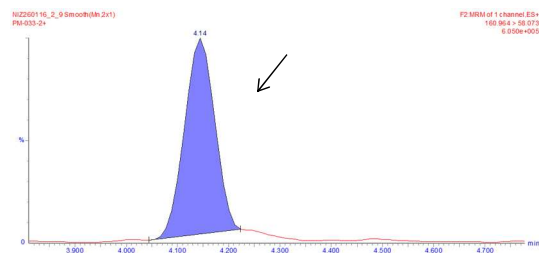
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



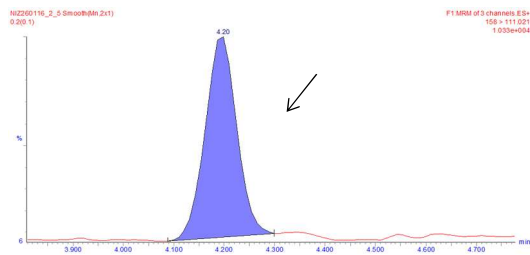
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

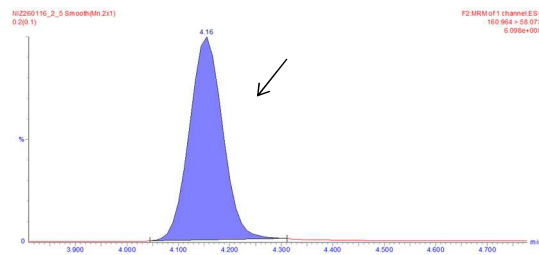
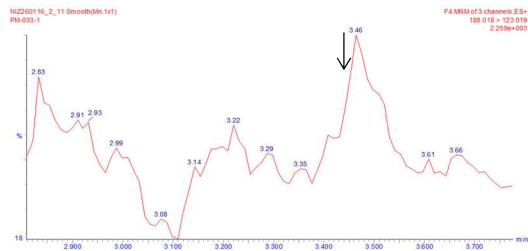


図 3-2-5 HMMNI の SRM クロマトグラム

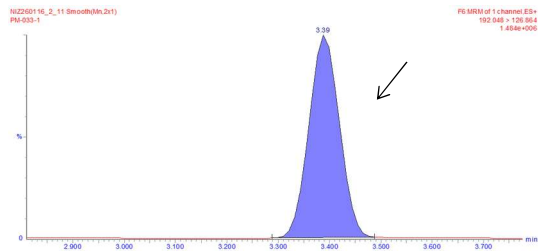
(m/z 158→111)

添加濃度 : 0.2 µg/kg

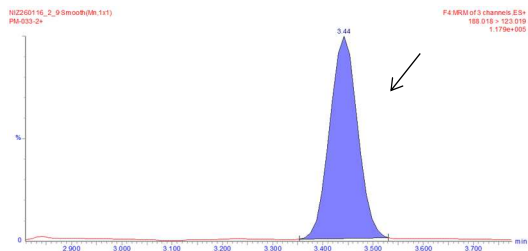
ブランク試料



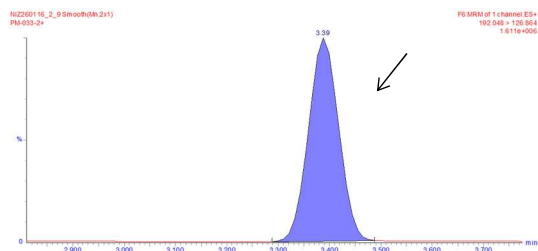
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



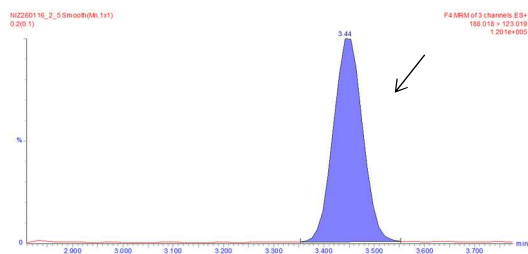
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

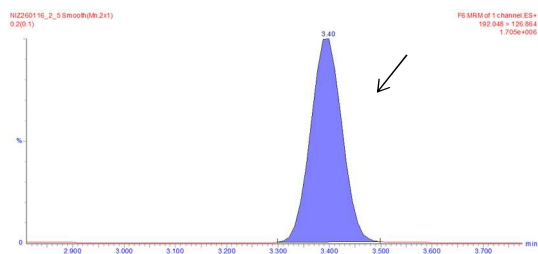
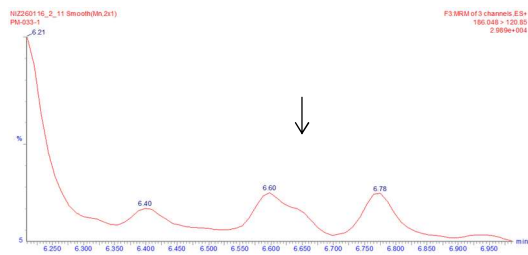


図 3-2-6 MNZOH の SRM クロマトグラム

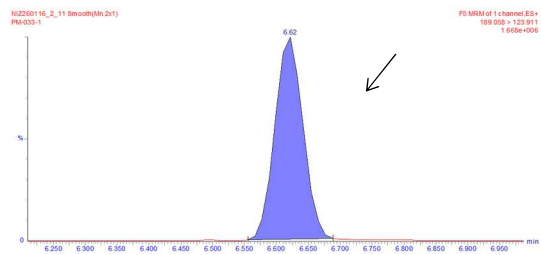
(m/z 188→123)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

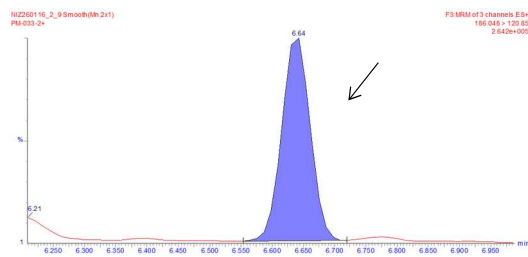
ブランク試料



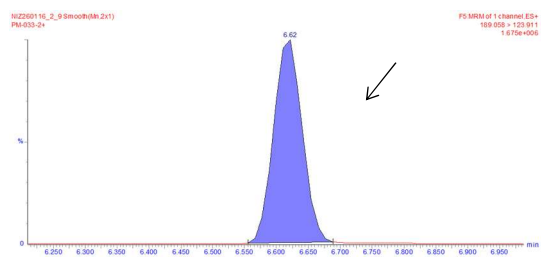
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



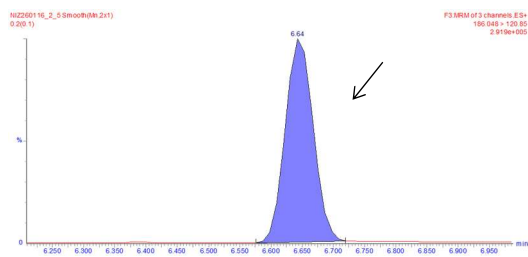
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

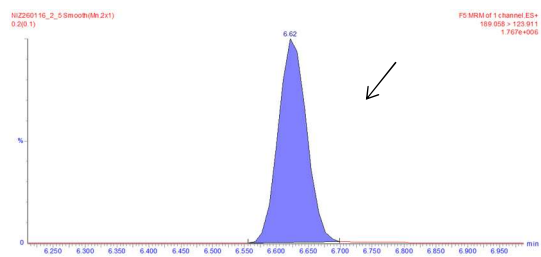
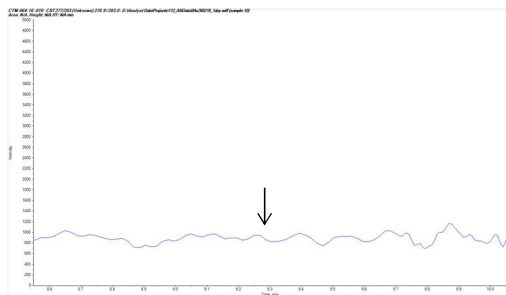


図 3-2-7 INZOH の SRM クロマトグラム

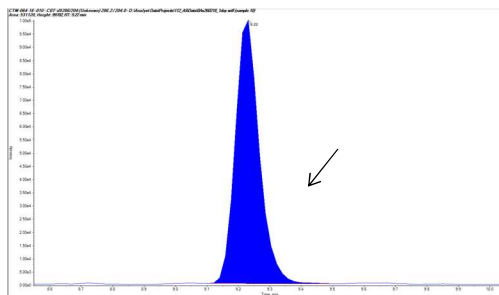
(m/z 186→121)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

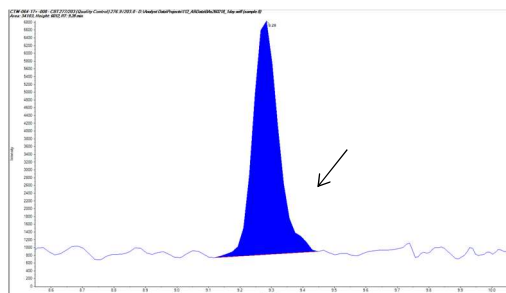
ブランク試料



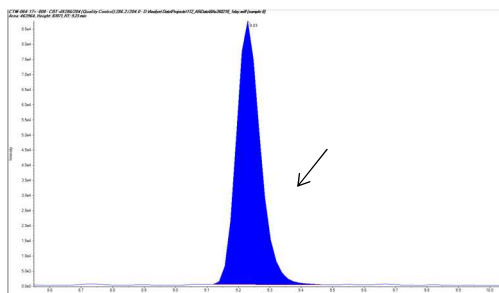
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



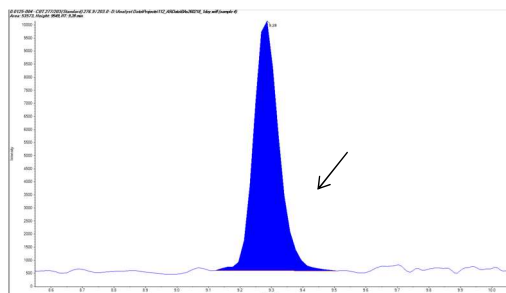
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

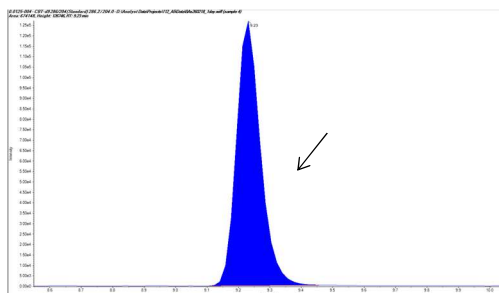


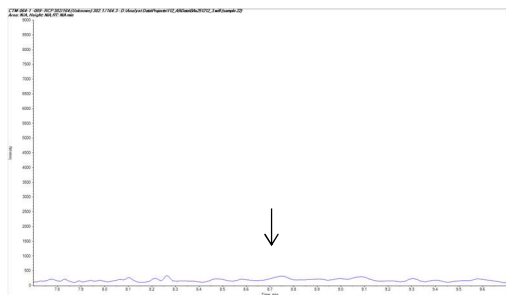
図 3-3-1 CBT の SRM クロマトグラム

(m/z 277→203)

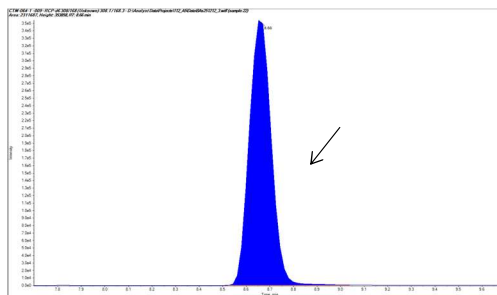
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.05 µg/kg

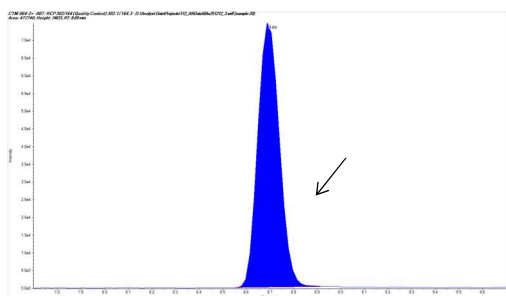
ブランク試料



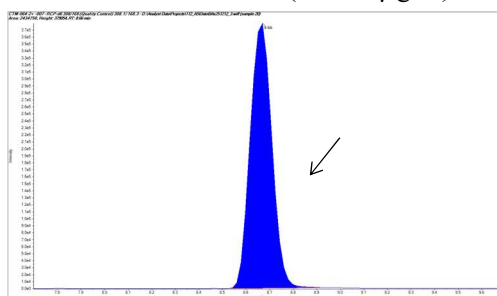
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



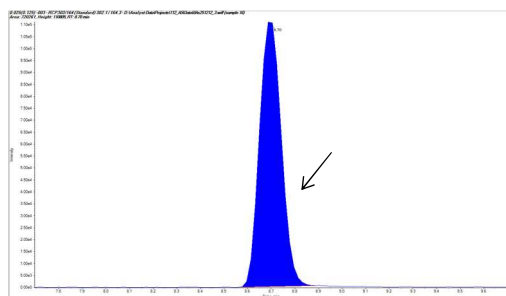
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

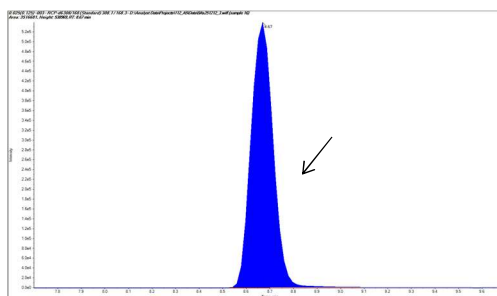


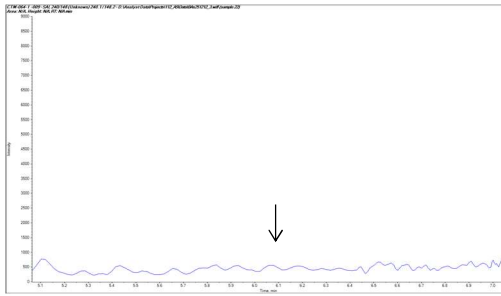
図 3-3-2 RCP の SRM クロマトグラム

(m/z 302→164)

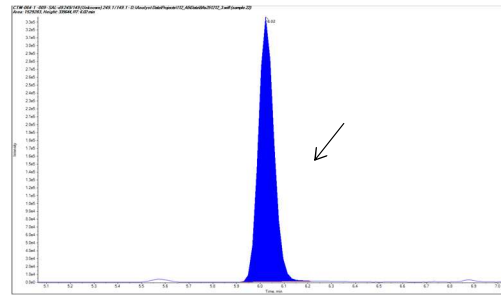
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

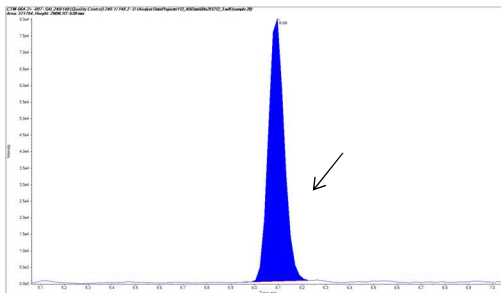
ブランク試料



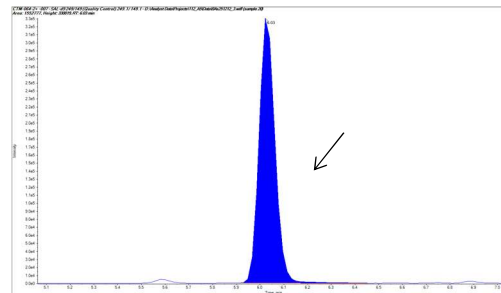
ブランク試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



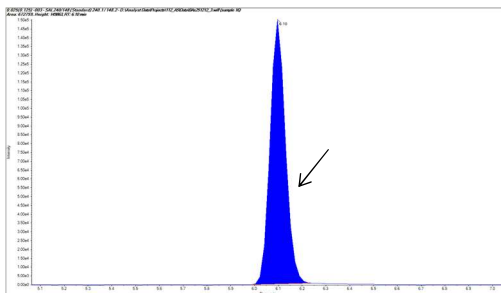
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)

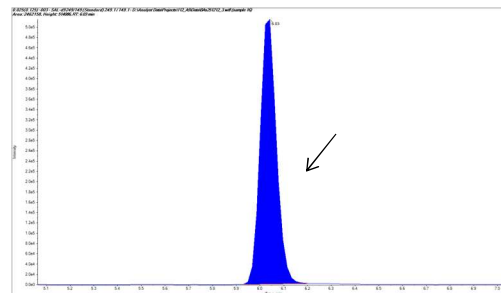


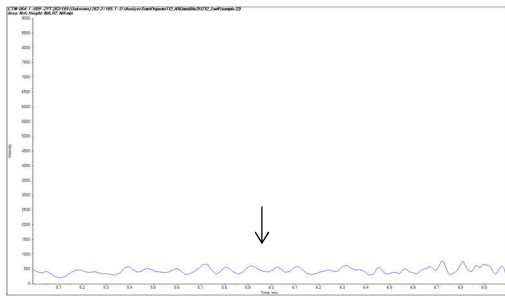
図 3-3-3 SAL の SRM クロマトグラム

(m/z 240 $\rightarrow$ 148)

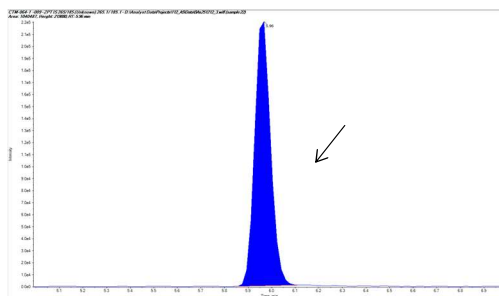
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g/kg}$

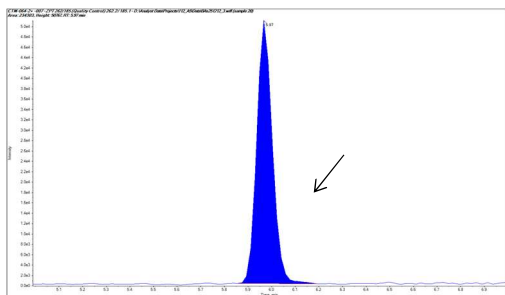
ブランク試料



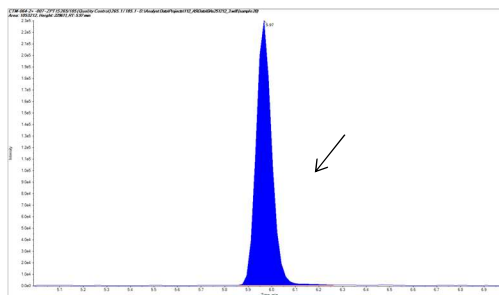
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



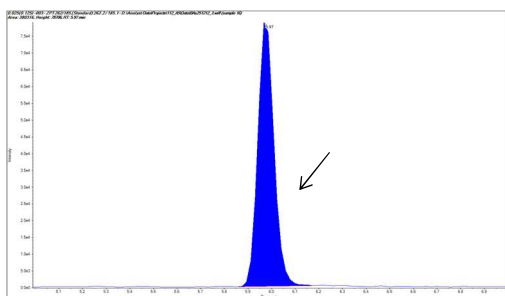
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

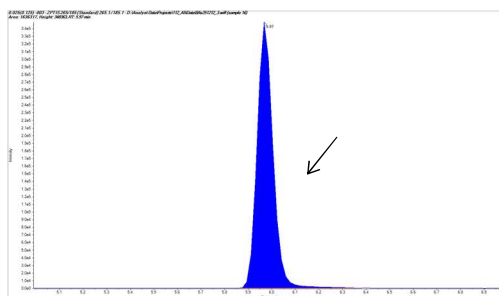


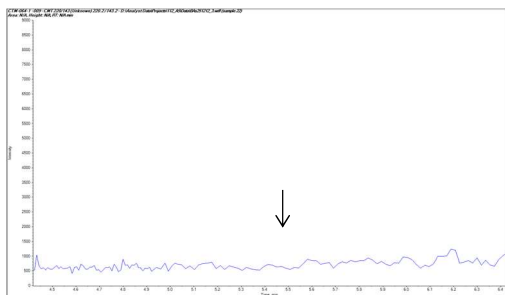
図 3-3-4 ZPT の SRM クロマトグラム

(m/z 262→185)

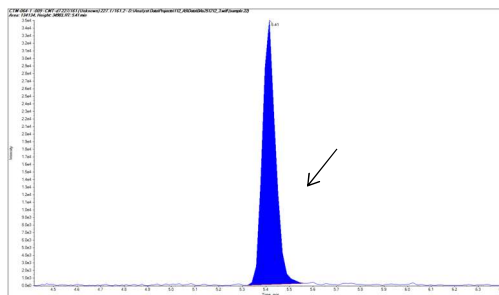
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

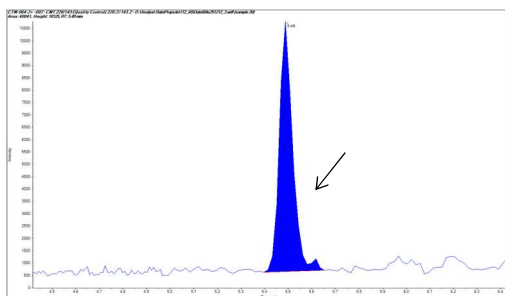
ブランク試料



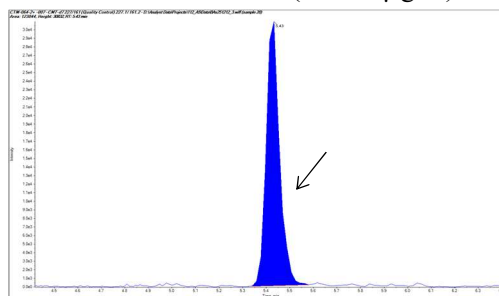
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



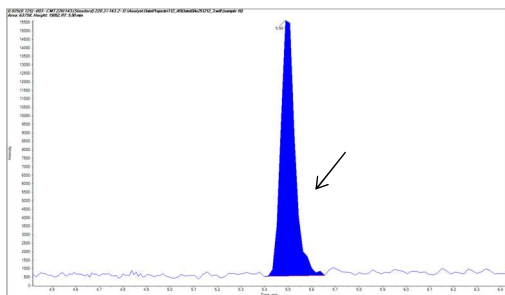
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

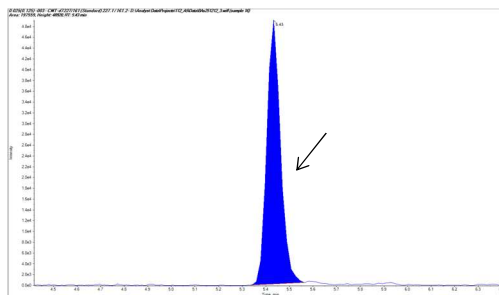


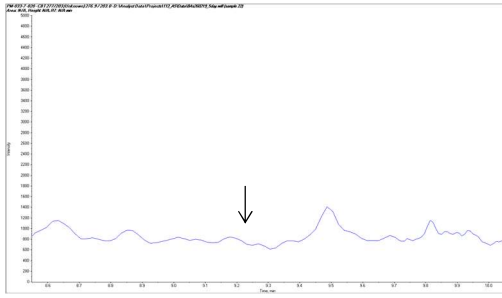
図 3-3-5 CMT の SRM クロマトグラム

(m/z 220→143)

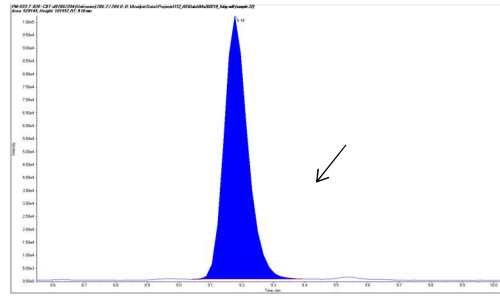
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.1 µg/kg

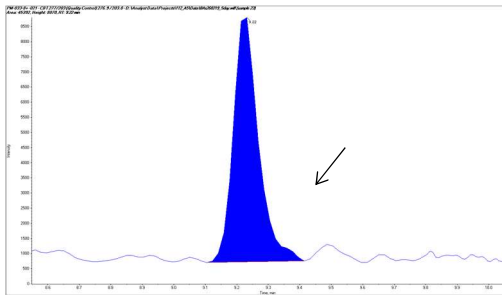
ブランク試料



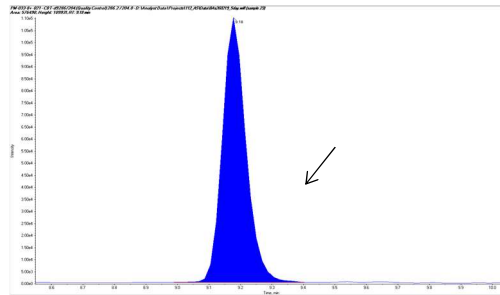
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



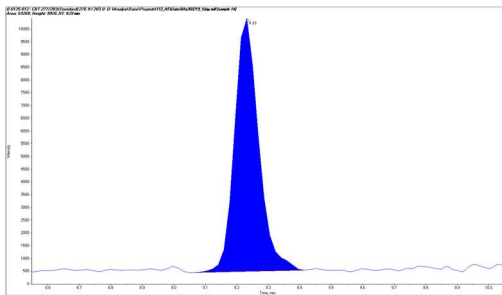
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

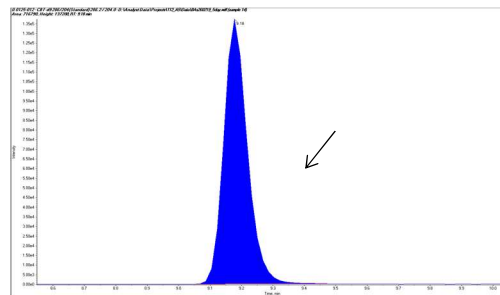


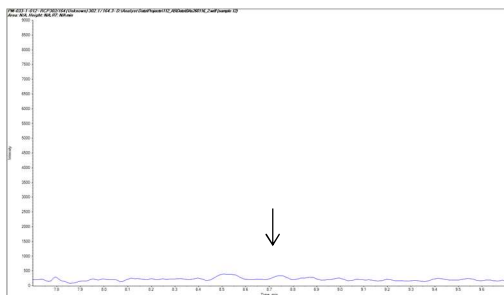
図 3-3-6 CBT の SRM クロマトグラム

(m/z 277→203)

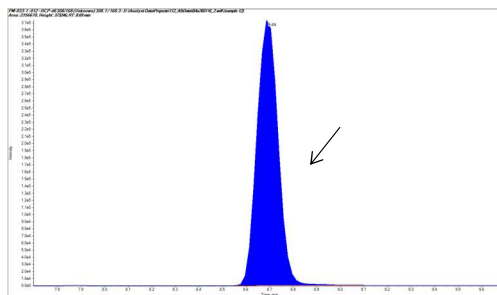
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.05 µg/kg

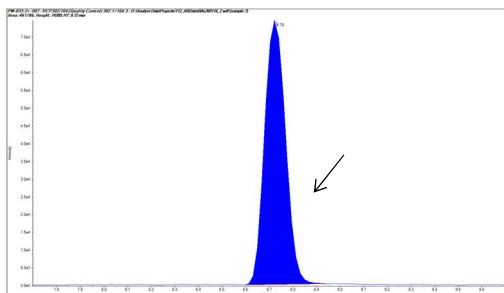
ブランク試料



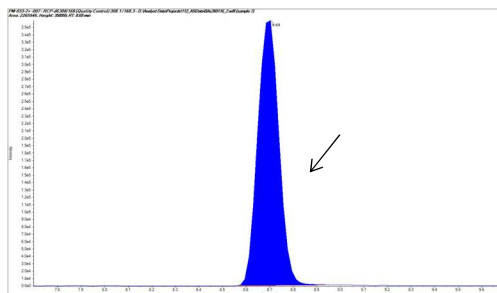
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



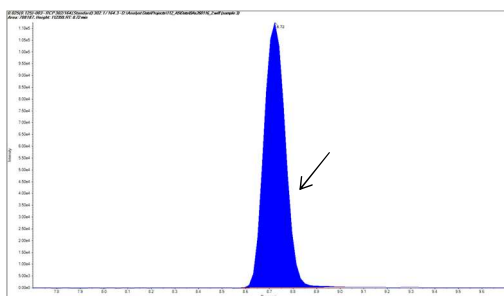
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

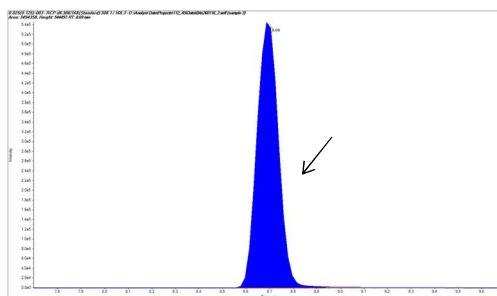


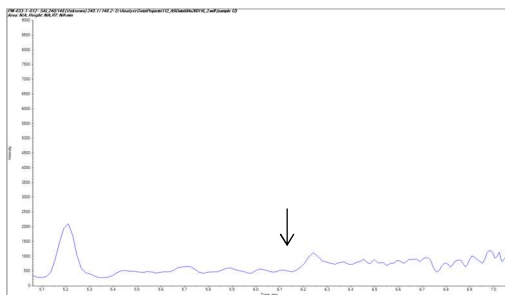
図 3-3-7 RCP の SRM クロマトグラム

(m/z 302→164)

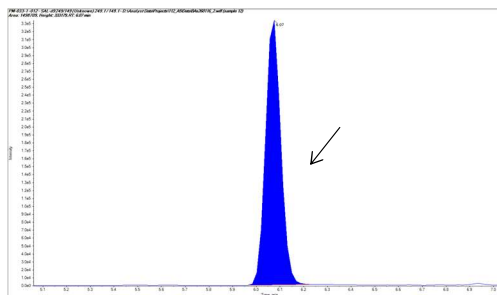
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

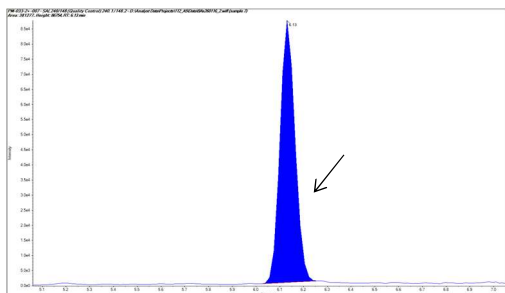
ブランク試料



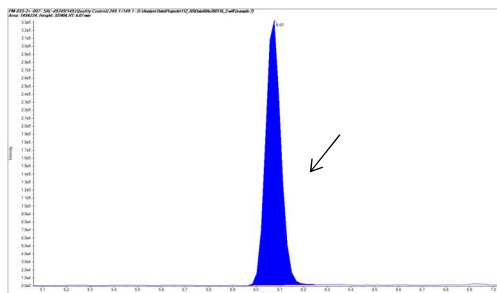
ブランク試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



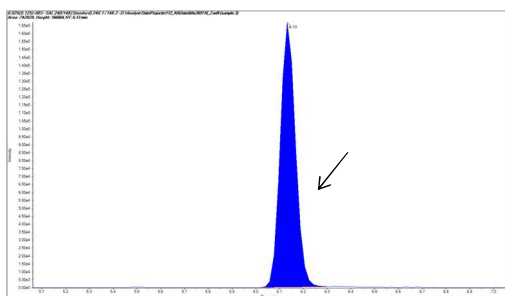
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)

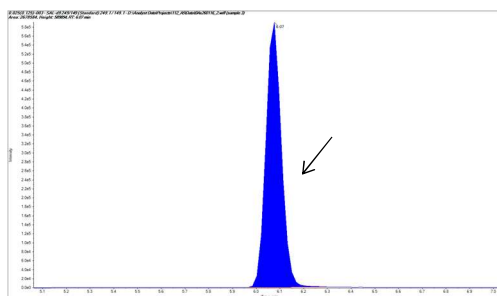


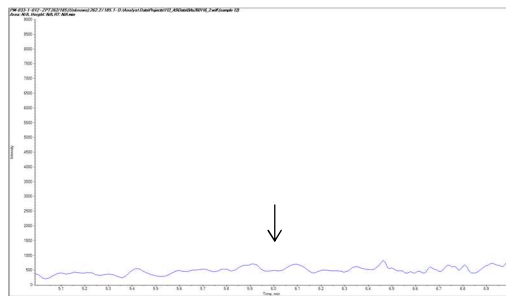
図 3-3-8 SAL の SRM クロマトグラム

(m/z 240 $\rightarrow$ 148)

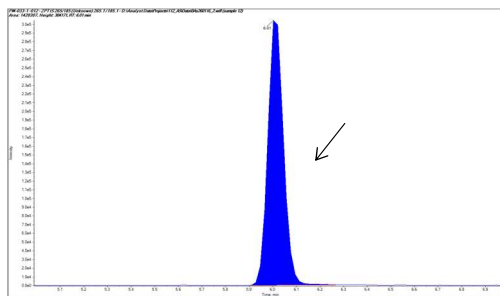
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g/kg}$

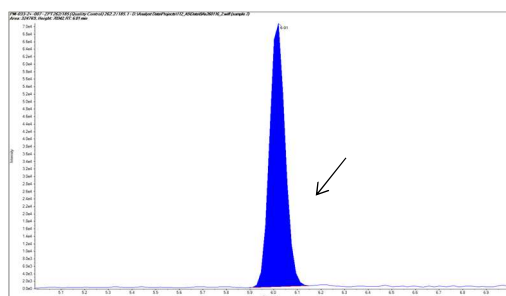
ブランク試料



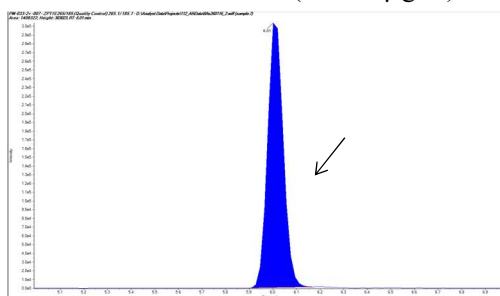
ブランク試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



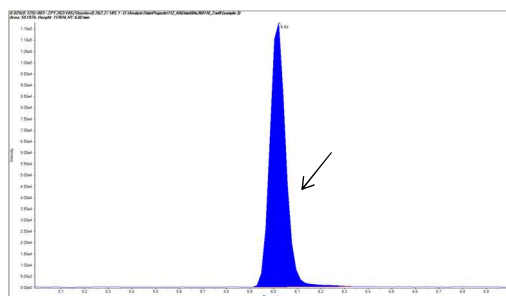
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)

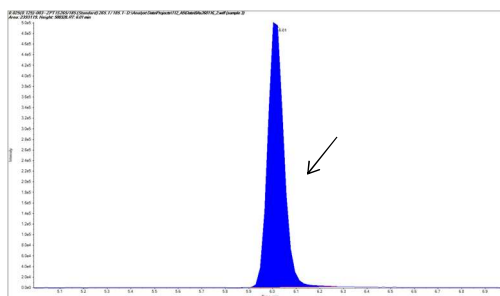


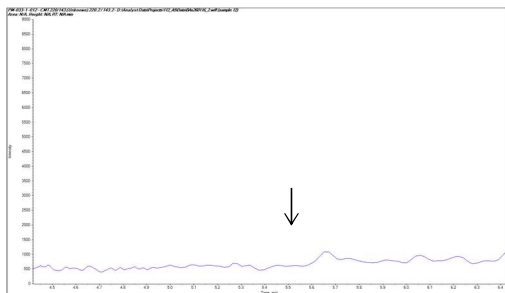
図 3-3-9 ZPT の SRM クロマトグラム

(m/z 262 $\rightarrow$ 185)

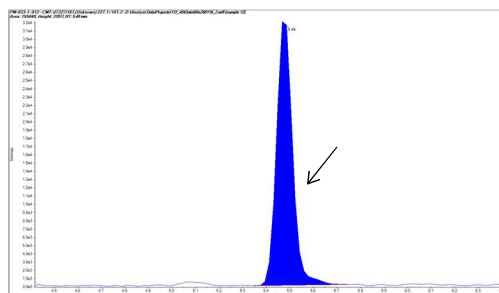
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g/kg}$

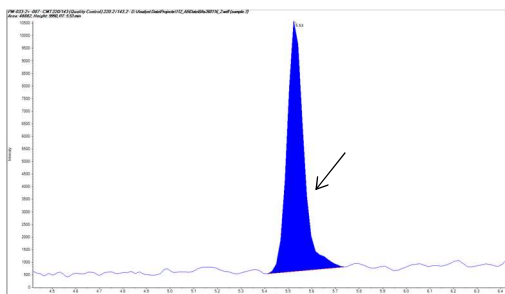
ブランク試料



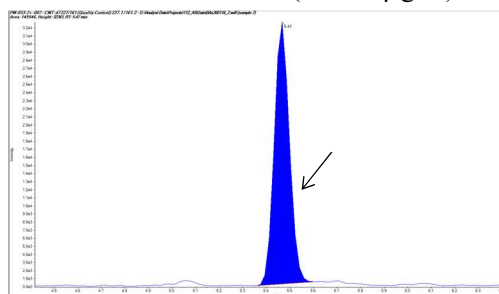
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



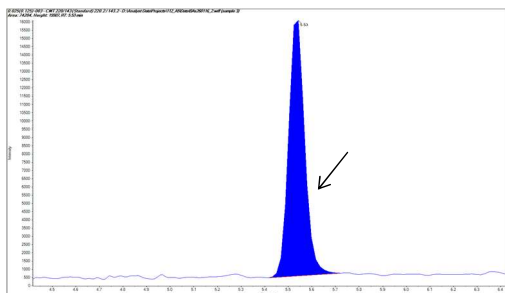
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

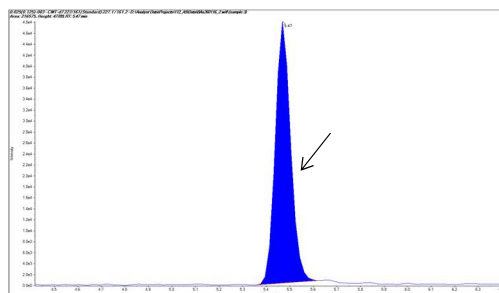


図 3-3-10 CMT の SRM クロマトグラム

(m/z 220→143)

ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.1 µg/kg