

制定	平成21年	9月	1日	21消技第1764号
改正	平成22年	8月	18日	22消技第1358号
	平成23年	5月	23日	23消技第541号
	平成23年	7月	1日	23消技第947号
	平成24年	6月	26日	24消技第828号
	平成25年	5月	30日	25消技第564号
	平成26年	6月	11日	26消技第635号
	平成27年	6月	29日	27消技第1051号
	平成28年	3月	31日	27消技第3618号
	平成29年	4月	19日	29消技第113号
	平成30年	4月	23日	30消技第65号
	令和元年	5月	8日	31消技第288号
	令和2年	4月	1日	元消技第2917号
	令和3年	3月	22日	2消技第2851号
	令和6年	4月	9日	6消技第37号

「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について

「愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律の施行について」（平成21年5月29日付け21消安第2236号・環自総発第090529009号農林水産省消費・安全局長・環境省自然環境局長連名通知）の記の第4の3の（4）の②の規定に基づき、愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律（平成20年法律第83号）第12条第1項及び第13条第1項の規定に基づく愛玩動物用飼料又はその原材料の検査の方法を別添のとおり定める。

なお、今後、科学的知見の集積等によって、本法の改訂があり得るものである。

愛玩動物用飼料等の検査法

目 次

第1章 通 則		5	デオキシニバレノール	16	
1	分類	1	6	オクラトキシン A	18
2	原子量	1	7	ゼアラレノン	19
3	単位	1	8	フモニシン B ₁	21
4	百分率	1	9	フモニシン B ₂	21
5	温度	1	10	フモニシン B ₃	21
6	試薬	2	11	ニバレノール	21
7	水	2	第2節 多成分分析法		
8	溶液	2	1	アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法 (その1)	21
9	計量器	2	2	アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法 (その2)	23
10	器具、機器等	3	3	フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法	25
11	カラム等	3	4	デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法	27
12	分析操作等	3	第3節 標準品の標定法		
13	数値の丸め方	3	1	かび毒標準液の吸光光度法による標定法	29
14	分析方法	3	第6章 農 薬		
第2章 分析用試料の調製法等			第1節 各条		
1	試料の採取及び保管	5	1	BHC (α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC 及び δ -BHC)	32
2	分析用試料の調製	5	2	DDD (<i>o,p'</i> -DDD 及び <i>p,p'</i> -DDD)	32
第3章 水分及び生菌数			3	DDE (<i>o,p'</i> -DDE 及び <i>p,p'</i> -DDE)	32
1	水分	6	4	DDT (<i>o,p'</i> -DDT 及び <i>p,p'</i> -DDT)	32
2	生菌数	7	5	EPN	33
第4章 重金属等			6	アルドリン (アルドリン及びディルドリン)	33
1	カドミウム	8	7	イプロベンホス	33
2	水銀	8	8	エチオン	33
3	鉛	9	9	エディフェンホス	33
4	砒素	10	10	エトプロホス	33
第5章 かび毒			11	エトリムホス	33
第1節 各条					
1	アフラトキシン B ₁	15			
2	アフラトキシン B ₂	15			
3	アフラトキシン G ₁	15			
4	アフラトキシン G ₂	15			

第1章 通 則

1 分 類

本検査法の対象とする犬及び猫用の愛玩動物用飼料のうち主な種類を次の(1)~(8)に分類する。

- (1) ドライ製品（一般に加熱発泡処理された水分 10 %程度のものをいう。以下同じ。）
- (2) セミドライ製品（一般に加熱成型処理又は加熱発泡処理された水分 25~35 %程度のものをいう。以下同じ。）
- (3) ウェット製品（一般に缶、レトルトパウチ等に密封及び加熱殺菌処理した水分 70~90 %程度のものをいう。以下同じ。）
- (4) 成型ジャーキー（水分 20~35 %程度。）
- (5) 素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ。水分 10~15 %程度。）
- (6) 素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ。水分 25 %程度。）
- (7) 菓子類（ビスケット及びクッキー等の焼き菓子類をいう。以下同じ。）
- (8) 粉ミルク

2 原子量

原子量は、最新の国際原子量表による。

3 単 位

主な計量の単位については、次の記号を用いる。

メートル	m	センチメートル	cm
ミリメートル	mm	マイクロメートル	µm
ナノメートル	nm	キログラム	kg
グラム	g	ミリグラム	mg
マイクログラム	µg	ナノグラム	ng
ピコグラム	pg	リットル	L
ミリリットル	mL	マイクロリットル	µL
時	h	分	min
秒	s	モル	mol

4 百分率

調製試薬の濃度の表記において、重量百分率は w/w%、重量対容量百分率は w/v%、容量百分率は v/v%、容量対重量百分率は v/w%の記号を用いる。

5 温 度

- (1) 温度表示はセルシウス氏法を用い、アラビア数字の次に°C を付けて示す。
- (2) 標準温度は 20 °C、常温は 15~25 °C、室温は 5~35 °C とする。
- (3) 冷所は、別に規定する場合を除き、1~15 °C の場所とする。
- (4) 熱水は 60 °C 以上、温水は 40~60 °C、冷水は 15 °C 以下の水とする。

6 試 薬

(1) 試薬は、以下に掲げる場合及び別に規定する場合を除き、別表 1 に規定するものとする。

ア 農薬の分析法に用いる溶媒は、産業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本産業規格（以下「JIS」という。）に定める残留農薬・PCB 試験用試薬又はこれと同等のものを用いる。

イ 液体クロマトグラフの溶離液は、液体クロマトグラフ用試薬又はこれと同等のものを用いる。

(2) 試薬名の次に〔 〕で分子式を付けたものは、化学的純物質を意味する。

標準液の調製に用いる化学的純物質として規定する試薬は、別に規定する場合を除き、純度が明らかなものを用いることとし、あらかじめ溶媒に溶解してある液体試薬（純度が明らかで、かつ、溶媒その他の共存物質が分析を妨げないことを確認したものに限り。）に替えることができる。

(3) 試薬に（ ）で標準試薬又はヒ素分析用と付けたものは、JIS の容量分析用標準物質又はヒ素分析用試薬の規格に該当するものを示す。

(4) 液体試薬の希釈割合を示す場合、例えば、塩酸（1+2）とあるのは、塩酸 1 mL、水 2 mL の割合で調製したものとする。

(5) 混合溶媒の混合割合を示す場合、例えば、水－アセトニトリル－メタノール（10+8+5）とあるのは、水 100 mL、アセトニトリル 80 mL、メタノール 50 mL の割合で調製したものとする。

7 水

単に水とあるのは、その純度が医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方（以下「日局」という。）の精製水の規定に該当するものとする。

8 溶 液

単に溶液とあり溶媒を示さないものは、水溶液とする。

9 計量器

(1) 計量器は、計量法（平成 4 年法律第 51 号）の規定に基づく検定を受けこれに合格したもの又は同法の規定に基づく指定製造事業者の製造したものを用いるものとする（同法の特定計量器に限る。）。

(2) 化学はかりは、0.1 mg の差を読みとれるものを用い、セミマイクロ化学はかりは、0.01 mg の差を読みとれるものを用いるものとする。

分銅は、直示化学はかりに用いる場合を除き、1 級精密分銅を用いるものとする。更に正確を必要とする場合は、器差試験を受けた分銅を用いるものとする。

(3) ガラス製体積計は、別に規定する場合を除き、JIS に該当するものを用いるものとする。

10 器具、機器等

- (1) 分析用ガラス器具、ふるい及びろ紙は、別に規定する場合を除き、JIS に該当するものを用いるものとする。
- (2) デシケーター中の乾燥剤は、別に規定する場合を除き、シリカゲルを用いるものとする。
- (3) 分析に用いる機器は、別に規定する場合を除き、JIS に該当するもの又はそれと同等以上のものを用いるものとする。

本検査法に示した測定条件例は、一例を示したものであるため、JIS、機器の取扱い説明書等により、あらかじめ測定的最適条件を設定しておくものとする。

11 カラム等

本検査法に示すカラム、ミニカラム、カラム充てん剤等の一般名と代表的な商品名の例は別表 2 のとおりである。製品及びロットによって精製効果、目的物の吸着、溶出画分等が異なる場合がある。また、固相や管からの溶出物による測定妨害も考えられるので、確認してから使用する。

12 分析操作等

- (1) 分析操作は、別に規定する場合を除き、常温で行うものとする。ただし、温度の影響のあるものは、別に規定する場合を除き、標準温度で行うものとする。
- (2) 「直ちに」とあるのは、別に規定する場合を除き、30 秒以内に操作するものとする。
- (3) 試料及び試薬の重さ並びに液体の体積の計量方法については、別に規定する場合を除き、次によるものとする。
 - ア 「正確に」とあるのは、重さを量る場合には、量るべき最小位を考慮し、1 mg、0.1 mg 又は 0.01 mg まで正しく量り、体積を量る場合には、全量ピペット、ビュレット又は全量フラスコを用いて正しく量るものとする。
 - イ 単に数値のみを示してあるのは、示された数値の最下位まで量るものとする。

13 数値の丸め方

分析値は、有効数字最下位の次のけたまで算出し、JIS Z 8401 規則 B の定めるところにより丸めるものとする。

14 分析方法

- (1) 本検査法に定める分析方法の適用範囲は、1 の分類等に従い、各条において定める。ただし、1 の(1)から(8)に分類されない愛玩動物用飼料については、その物性及び成分が類似する分類を適用範囲とする分析方法を適用する。独立行政法人農林水産消費安全技術センターホームページ（<https://www.famic.go.jp/ffis/pet/sub4.html>）に、そのような適用結果の例を掲載する。
- (2) 第 11 章に定める妥当性確認の結果、本検査法以上の真度及び精度があると認めら

れた方法を本検査法に代えて用いることができるものとする。

第2章 分析用試料の調製法等

1 試料の採取及び保管

(1) 製品の試料採取法

同一賞味期限のものを対象として、試験用試料及び保管用試料各3個（ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、菓子類、粉ミルク等で品質が比較的均一であると考えられるものにあつては1個）以上で、合計量がそれぞれ300gを超える個数を任意に採取する。

(2) 原材料の試料採取法

「飼料等検査実施要領」（昭和52年5月10日付け52畜B第793号農林省畜産局長通知の別紙）の別記「飼料等の収去等の方法」により行うものとする。

(3) 試料の保管方法

ア 試料を収納するために使用する容器は、清潔で、かつ、防湿性があり密封できるものとする。

イ 試験用試料及び保管用試料は、品質が変化しないように輸送するとともに、冷暗所において保管する。

2 分析用試料の調製

分析用試料は、別に規定する場合を除き、次により調製し、冷暗所においてポリエチレン袋等の容器中に気密に貯蔵しておくものとする。

なお、分析用試料の調製に当たっては操作を迅速に行い、試料が含有する水分の増減及び試料の化学変化が生じないように留意するものとする。

(1) 試料が乾燥している場合（ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び顆粒状の粉ミルクが該当する。）には、試料を粉砕し、1mmの網ふるいを通してよく混合する。ただし、ジャーキー等の有姿のままでは粉砕が困難な場合には、事前にはさみ等を用いて10~20mmに細断する。

(2) 試料が湿潤な場合（ウェット製品が該当する。）には、試料をフードプロセッサー等で破碎・混合する。

第3章 水分及び生菌数

1 水分

1.1 常圧加熱乾燥法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

定 量

分析試料 2~5 g を正確に量ってアルミニウム製ひょう量皿(あらかじめ乾燥して重さを正確に量っておいたもの)に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の水分量を算出する。

1.2 ケイソウ土添加フィルム法

(適用範囲：ウェット製品)

定 量

ケイソウ土^{注1} 2~3 g をポリエチレンフィルム製袋^{注2}に入れ、袋の口を開いて袋を膨らませた後、105±2 °C で 2 時間乾燥する^{注3}。乾燥後、袋の口を三つ折りにして閉じ、ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後、ゼムクリップをはずして重さを正確に量る^{注4}。

分析試料約 10 g を正確に量って^{注4}先のポリエチレンフィルム製袋に入れ、袋の口を三つ折りにした後、袋の外側から手で揉んで試料とケイソウ土を混和させる^{注5}。混和物を袋の外側から押し伸ばして袋の中に均一に薄く広げる。

次に、袋の口を開いて袋を膨らませ、105±2 °C で 3 時間乾燥する^{注3,6}。乾燥後、袋の口を三つ折りにして閉じ、ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後、ゼムクリップをはずして重さを正確に量り^{注4}、試料中の水分量を算出する。

注 1 ハイフロスーパースセル(和光純薬工業製)又はこれと同等のもの

2 高密度ポリエチレンフィルム製で幅 50~110 mm、長さ 120~150 mm、厚さ 0.028~0.06 mm のものであればよい。検討時にはハイゼックス HD ボトムシール平袋(幅 80 mm、長さ 130 mm、厚さ 0.05 mm)、ハイゼックス写真袋(幅 100 mm、長さ 150 mm、厚さ 0.03 mm、浅沼商会販売)及びショーレックス写真袋(幅 110 mm、長さ 150 mm、厚さ 0.028 mm、ハクバ写真産業販売)を使用した。

3 必要に応じ、袋の口を外側に折り返し、スタンドに立てかける等して乾燥中に袋の口が閉じない状態を保つ。

4 ひょう量の際には、精密天びんの風防内を除電器(STABLO-AP(島津製作所製)又はこれと同等のもの)で天びんのひょう量値が安定するまで除電した後、数値を読み取ること。

5 この時点で混和物が、粘着性がなく水が浮いた状態の場合は、以下の予備乾燥操作を行った後、次の操作に進む。

袋の口を開いて袋を膨らませ、105±2 °C で加熱しながら、ときどき袋の外側から手で揉んで試料とケイソウ土を混和させ、粘着性が出るまで予備乾燥

を行う。

- 6 乾燥途中にときどき袋を取り出し、袋の口の開きを整えるとともに、乾燥が進んで固着して塊状になった混和物を袋の外側から押しつぶしてできるだけ粉末状にする。

(参考) 分析法バリデーション

- ・繰返し精度 別表 3 の 17 のとおり。
- ・中間精度 別表 3 の 17 のとおり。

2 生菌数

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品)

第 2 章の 2 に定める分析用試料の調製は行わず、分析に用いる。

試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものをを用いる。

A 試薬等の調製^{注1}

- 1) リン酸緩衝食塩液 リン酸水素二ナトリウム 1.2 g、リン酸二水素カリウム 0.7 g 及び塩化ナトリウム 6.8 g を量って水 1,000 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。
- 2) 希釈液 リン酸緩衝食塩液又は 0.1 w/w% ペプトン加生理食塩液を 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。
- 3) 標準寒天培地^{注2} カゼイン製ペプトン 5 g、酵母エキス 2.5 g、ブドウ糖 1 g 及びカンテン 15 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

B 培 養

分析試料 25 g を量って滅菌済みストマッカー袋に入れ、希釈液 225 mL を加えた後 30 分間静置する。これをストマッカーにより 200 rpm で 5 分間かくはん混合した後、上澄み液を希釈液で正確に 10 倍段階希釈して試料溶液を調製する。

上澄み液及び各試料溶液各 1 mL をそれぞれ 5 枚のペトリ皿に入れ、あらかじめ加温溶解した標準寒天培地 20 mL ずつを各ペトリ皿に一樣に広がるように分注し、直ちに標準寒天培地をよく混和した後、水平に静置して凝固させる。

各寒天平板をふ卵器に収め、34~36 °C で 48 時間培養する。

C 測 定

30~300 個のコロニーが発生した平板について、そのコロニー数を数え、平均コロニー数を求める。

下式により、試料中の生菌数を算出する。

試料 1 g 中の生菌数=平均コロニー数×希釈倍率×10

注 1 pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。

2 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

第4章 重金属等

1 カドミウム^{注1}

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

カドミウム標準液 カドミウム [Cd] 0.1 g を正確に量ってトールビーカーに入れ、硝酸 (1+9) 50 mL を加え、加熱して溶かし、煮沸して窒素酸化物を除去した後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えてカドミウム標準原液を調製する (この液 1 mL は、カドミウムとして 0.1 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸 (1 mol/L) で正確に希釈し、1 mL 中にカドミウムとして 0.2~1 µg を含有する数点のカドミウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

分析試料 1~10 g を正確に量って 100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500 °C 以下で加熱して灰化する。残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて 30 mL とし、数分間煮沸した後放冷する。これを水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙 (6 種) でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一定量 (カドミウムとして 10 µg 以下、液量 30 mL 以下) をあらかじめリン酸 14 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に加え、ヨウ化カリウム溶液 (68 w/v%) 5 mL を加え、更に水を加えて 50 mL とし、軽く振り混ぜた後 5 分間静置する。

4-メチル-2-ペンタノン 10 mL を先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜた後静置し、4-メチル-2-ペンタノン層 (上層) について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレイム中で波長 228.8 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カドミウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカドミウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 1 のとおり。
- ・定量限界 (下限) 試料中 0.1 mg/kg (繰返し精度)
- ・検出限界 試料中 0.03 mg/kg (繰返し精度)

2 水銀^{注1}

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

1) 水銀標準液 塩化水銀 (II) [HgCl₂] 0.339 g を量って 500 mL の全量フラスコに

入れ、硝酸（1+1）5 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて水銀標準原液を調製する（この液 1 mL は、水銀 [Hg] として 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を硝酸（1+70）で正確に希釈し、1 mL 中に水銀として 2~10 ng を含有する数点の水銀標準液を調製する。

- 2) 塩化スズ液 塩化スズ（II）二水和物 10 g に硫酸（1+20）60 mL を加え、かき混ぜながら加熱して溶かした後放冷し、水を加えて 100 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、五酸化バナジウム 20 mg を加え、更に硝酸 10 mL を加えて試料を十分に潤した後、一夜静置する。

次に、これを 200 °C 以下の砂浴上で 5 分間加熱した後放冷し、更に過塩素酸 10 mL を加えて 1 時間加熱した後放冷し、全量フラスコの標線まで水を加えて試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

各水銀標準液について、同様の操作を行う。

C 定 量

試料溶液 20 mL をあらかじめ回転子を入れた還元容器（100 mL 程度の三角フラスコ）に正確に入れ、塩化スズ液 2 mL を加えて直ちに水銀分析装置に連結する。2 分間かき混ぜた後、空気ポンプを作動させて通気し、発生した水銀蒸気を吸収セル（石英ガラス製 内径 30 mm、長さ 100~300 mm）に導き、波長 253.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液 20 mL について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各水銀標準液各 20 mL について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の水銀量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

（参考）分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 2 のとおり。
- ・ 定量限界（下限） 試料中 0.05 mg/kg（繰返し精度）
- ・ 検出限界 試料中 0.02 mg/kg（繰返し精度）

3 鉛^{注1}

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

A 試薬の調製

鉛標準液 鉛 [Pb] 1 g を正確に量ってトールビーカーに入れ、硝酸 10 mL 及び水 30 mL を加え、加熱して溶かした後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて鉛標準原液を調製する（この液 1 mL は、鉛として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に鉛として 0.5~3 µg を含有する数点の鉛標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

本章 1 の B による。

C 定 量

試料溶液の一定量（鉛として 30 μg 以下、液量 30 mL 以下）をあらかじめリン酸 14 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に入れ、ヨウ化カリウム溶液（68 w/v%）5 mL を加え、更に水を加えて 50 mL とし、軽く振り混ぜた後 5 分間静置する。

4-メチル-2-ペンタノン 10 mL を先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜた後静置し、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 283.3 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各鉛標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の鉛量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

（参考）分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 3 のとおり。
- ・ 定量限界（下限） 試料中 0.5 mg/kg（繰返し精度）
- ・ 検出限界 試料中 0.2 mg/kg（繰返し精度）

4 ^ひ 砒素

4.1 無機砒素の液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析計による分析法^{注1}

- (1) 分析対象化合物 無機砒素（III）及び無機砒素（V）（2成分）
- (2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク
- (3) 分析法^{注2,3}

A 試薬の調製

- 1) 溶離液 1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1.602 g、マロン酸 0.416 g 及び 25 w/v%水酸化テトラメチルアンモニウム（以下「TMAH」という。）溶液^{注4} 1.458 g を水に溶かし、メタノール 0.5 mL を加え、硝酸で pH を 3.0 に調整した後、更に水を加えて 1 L とする。
- 2) 2 w/v% TMAH 溶液 25 w/v% TMAH 溶液 4 mL に水を加えて 50 mL とする。
- 3) 無機砒素（III）標準液 砒素（III）標準液（濃度 1,000 mg/L）^{注5} を標準原液とする。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中に無機砒素（III）〔As(III)〕として 100 μg を含有する無機砒素（III）標準液を調製する。

- 4) 無機砒素（V）標準液 砒酸標準液（濃度 1,000 mg/L）^{注5} を標準原液とする。
使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中に無機砒素（V）〔As(V)〕として 100 μg を含有する無機砒素（V）標準液を調製する。
- 5) 無機砒素混合標準液 使用に際して、無機砒素（III）標準液及び無機砒素（V）標準液の一定量を混合し、水で正確に希釈し、1 mL 中に各砒素〔As〕としてそれぞれ 1 μg を含有する混合標準原液を調製する。

混合標準原液 25~1,250 μL の間の数点をそれぞれあらかじめ溶離液 25 mL を入

れた 50 mL の全量フラスコに加える。各全量フラスコに 0.1 w/v%メチルオレンジ溶液数滴及び 2 w/v% TMAH 溶液 5 mL を加え、0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3（オレンジ色）に調整した後、更に標線まで水を加え、1 mL 中に各砒素として 0.5~25 ng を含有する各無機砒素混合標準液を調製する。

同時に混合標準液を加えずに同様に操作し、濃度 0 ng/mL の無機砒素混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 0.5 g を正確に量って 15 mL の遠心沈殿管^{注6}に入れ、2 w/v% TMAH 溶液 5 mL を加えて振り混ぜる。これにゆるくふたをして 100 °C で 2 時間加熱して抽出した後放冷する。

抽出液に水 5 mL を加えて振り混ぜた後、2,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れる。遠心沈殿管内の残さに水 12.5 mL を加えて振り混ぜた後、2,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加える操作を 2 回繰り返す。先の全量フラスコに 0.1 w/v%メチルオレンジ溶液数滴を加え、0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3（オレンジ色）に調整した後、標線まで水を加える。この液の一定量を 7,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.45 µm 以下）^{注7}でろ過し、液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計による測定に供する試料溶液とする^{注8}。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計による測定 試料溶液、各無機砒素混合標準液及び空試験溶液各 20 µL を液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

（液体クロマトグラフ部）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注9}

溶 離 液：10 mmol/L 1-ブタンスルホン酸ナトリウム・4 mmol/L マロン酸・4 mmol/L TMAH・0.05 %メタノール溶液（pH 3.0）

流 速：0.75 mL/min

カラム槽温度：30 °C

（誘導結合プラズマ質量分析計部^{注10}）

ネブライザーガス：Ar（1.12 L/min）

プラズマガス：Ar（14.0 L/min）

補助ガス：Ar（0.80 L/min）

コリジョンガス^{注11}：He（4.5 mL/min）

高周波出力：1,550 W

モニターイオン： m/z 75

計 算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の無機砒素（III）量及び無機砒素（V）量を算出し、

その含量を無機砒素量とする。

- 注 1 本法では、無機砒素 (III) の多くが無機砒素 (V) に酸化されるため、試料中の無機砒素量は、無機砒素 (III) 量及び無機砒素 (V) 量の含量として定量する。
- 2 使用する水は、電気伝導率 $5.6 \mu\text{S/m}$ 以下 (比抵抗 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上) に精製したものとする。使用する酸は、ICP 分析用の超高純度試薬とする。
 - 3 器具は可能な限りポリプロピレン等の樹脂製を使用することとし、使用する樹脂製器具は、使用の前に硝酸 (1+3) に 12 時間以上浸した後、水で十分すすいでから用いる。全量プラスチック等でガラス器具を用いる場合は、無砒素のホウケイ酸ガラス製のものとし、使用の前に硝酸 (1+1) に 1 日間以上浸した後、水で十分すすいでから用いる。
 - 4 TMAH 25% (多摩化学工業製) 又はこれと同等のもの
 - 5 原液の濃度は一例である。計量法に基づき値付けされたもの又は認証標準物質を用いる。
 - 6 100°C の加熱に耐えるもの
 - 7 親水性ポリエーテルスルホン製、セルロース混合エステル製等の無機砒素が吸着されないもの
 - 8 素材乾燥ジャーキーにおいて、無機砒素 (III) のイオン化を抑制するイオン化干渉等により測定に影響を及ぼす場合があるが、試料溶液を水で 2 倍希釈することで低減される。
 - 9 CAPCELL PAK C18 MG (大阪ソーダ製)、L-column2 ODS (化学物質評価研究機構製) 又はこれらと同等のもの
 - 10 iCAP RQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific 製) による条件例。ガス条件は、チューニング時の一例である。
 - 11 iCAP RQ ICP-MS において、コリジョンガスを使用しない場合でも検量線の直線性、選択性、マトリックス効果に問題がないことを確認している。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 27 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 27 のとおり
- ・ 定量限界 (下限) 試料中 各 0.1 mg/kg (添加回収率及び相対標準偏差並びに SN 比)
- ・ 検出限界 試料中 各 0.03 mg/kg (SN 比)

4.2 総砒素^{注1}

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

- 1) 総ヒ素標準液 酸化ヒ素 (III) (標準試薬) (105°C で 3~4 時間乾燥したもの) 132 mg を量ってビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (4 w/v%) 5 mL 及び水 50 mL を加え、加熱して溶かした後放冷する。この液にフェノールフタレイン試液 1

滴を加え、硫酸（1+10）で中和した後、水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えてヒ素標準原液を調製する（この液 1 mL は、ヒ素〔As〕として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中に 0.1 µg を含有するヒ素標準液を調製する（使用時に調製する。）。

- 2) 水素化ホウ素ナトリウム試液 水酸化ナトリウム 5 g 及び水素化ホウ素ナトリウム 10 g を水で溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

B 試料溶液の調製

分析試料 2 g を正確に量って 100 mL のトールピーカー^{注2}に入れ、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、時計皿で覆い、一夜静置する。

次に、これを砂浴上で穏やかに 30 分間加熱し、発泡が収まってからは強熱した後放冷する。更にこれに過塩素酸 5 mL を加え、再び時計皿で覆い、完全に分解するまで^{注3}加熱して、液量が 2 mL 以下になるまで濃縮した後放冷する。残留物に塩酸（ヒ素分析用）（1+10）5 mL 及び水 20 mL を加え、加温して溶かした後、この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6 種）でろ過して試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量^{注4}

試料溶液の一定量を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、塩酸（ヒ素分析用）10 mL 及びヨウ化カリウム溶液（20 w/v%）10 mL を順次加えた後 15 分間静置する。更に全量フラスコの標線まで水を加え、原子吸光光度測定に供する試料溶液とする。

水素化ホウ素ナトリウム試液、塩酸（ヒ素分析用）（2+3）及び試料溶液を原子吸光光度計に連結した水素化ヒ素発生装置に連続的に流し、混合して反応させる。発生した水素化ヒ素をフレームで加熱した吸収セルにアルゴンで導き、波長 193.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時にヒ素標準液 2.5~20 mL の間の数点について、試料溶液の場合と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のヒ素量を算出する。

注 1 使用する酸は、特記する場合を除き精密分析用を用いる。

2 使用するガラス器具は無ヒ素のホウケイ酸ガラス製のものを用いる。

3 砂温 300~380 °C で強熱する。

液量が減少した場合又は褐色～黒色に変色した場合は、砂浴から下ろし放冷後、硝酸 1 mL 程度を加え、砂浴上で更に加熱を続ける。分解が進み、液が透明（淡黄～淡赤色を帯びることもある）となり、黒化しなくなった後、時計皿をはずし硫酸の白煙が発生する温度まで加熱し濃縮する。

4 試料溶液に加える塩酸量、ヨウ化カリウム溶液の濃度及び添加量並びに水素化ホウ素ナトリウム試液の添加以降の定量操作は一例であり、使用する原子吸光光度計に適した条件で定量すること。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収試験 別表 3 の 4 のとおり。

- ・ 定量限界（下限） 試料中 0.2 mg/kg（繰返し精度）
- ・ 検出限界 試料中 0.05 mg/kg（繰返し精度）

第5章 かび毒

第1節 各条

1 アフラトキシン B₁

1.1 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その1）

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第2節1による。

1.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節2による。

2 アフラトキシン B₂

2.1 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その1）

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第2節1による。

2.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節2による。

3 アフラトキシン G₁

3.1 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その1）

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第2節1による。

3.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節2による。

4 アフラトキシン G₂

4.1 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その1）

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第2節1による。

4.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節2による。

5 デオキシニバレノール

5.1 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

デオキシニバレノール標準液　デオキシニバレノール〔C₁₅H₂₀O₆〕10 mgを正確に量って50 mLの褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加える（この液1 mLは、デオキシニバレノールとして0.2 mgを含有する。）。更にこの液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL中にデオキシニバレノールとして25 µgを含有するデオキシニバレノール標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し、1 mL中にデオキシニバレノールとして0.01~1 µgを含有する数点のデオキシニバレノール標準液を調製する。

B 定 量

抽 出

- 1) ウェット製品以外の試料　分析試料25.0 gを量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（21+4）100 mLを加え、60 °Cで60分間静置した後、60分間振り混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトニトリル-水（21+4）で正確に2倍希釈し、カラム処理に供する試料溶液とする。
- 2) ウェット製品　分析試料25.0 gを量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（21+4）70 mLを加え、30分間振り混ぜて抽出した後、10分間静置する。抽出液を100 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×gで5分間遠心分離し、上澄み液を200 mLの全量フラスコに入れる。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水（21+4）70 mLで洗浄し、洗液を順次先の共栓三角フラスコに移し、同様に30分間振り混ぜて抽出する。内容物を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×gで5分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（21+4）を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理　試料溶液を多機能カラム（トリコテセン系かび毒前処理用）^{注1}に入れ、初めの流出液3 mLを捨て、その後の流出液3 mL（ウェット製品では5 mL）を10 mLの試験管に受ける。流出液2 mL（ウェット製品では4 mL）を50 mLのなす形フラスコに正確に入れ、50 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）1 mLを正確に加えて残留物を溶かし、5,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフ質量分析計による測定　試料溶液及び各デオキシニバレノール

ル標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注2}
溶離液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（19+1）（1 min 保持）→10 min→（1+1）→4 min→（1+19）（15 min 保持）
流速：0.5 mL/min
カラム槽温度：40 °C
検出器：四重極型質量分析計^{注3}
イオン化法：大気圧化学イオン化（APCI）法（負イオンモード）
ネブライザーガス流量：N₂（2.5 L/min）
インターフェース温度：400 °C
ヒートブロック温度：200 °C
CDL 温度：250 °C
モニターイオン：*m/z* 355

計算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のデオキシニバレノール量を算出する。

注 1 MultiSep 227 Trich+（Romer Labs 製）又はこれと同等のもの

2 ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

3 LCMS-2010EV（島津製作所製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 12 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 12 のとおり
- ・定量限界（下限） ウェット製品以外の試料：試料中 0.1 mg/kg（平均回収率及び *SN* 比）、ウェット製品：試料（原物）中 0.02 mg/kg（繰返し精度及び *SN* 比）
- ・検出限界 ウェット製品以外の試料：試料中 0.03 mg/kg（*SN* 比）、ウェット製品：試料（原物）中 0.01 mg/kg（繰返し精度及び *SN* 比）

5.2 デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第 2 節 4 による。

6 オクラトキシシン A

6.1 液体クロマトグラフによる単成分分析法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品)

A 試薬の調製

- 1) オクラトキシシン A 標準液 オクラトキシシン A [$C_{20}H_{18}NO_6Cl$] 5 mg を正確に量って 25 mL の褐色全量フラスコに入れ、トルエン-酢酸 (99+1) を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてオクラトキシシン A 標準原液を調製する (この液 1 mL はオクラトキシシン A として 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を乾固し、アセトニトリル-水 (1+1) を正確に加えて溶かす。更にこの液の一定量を同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシシン A として 0.25~50 ng を含有する数点のオクラトキシシン A 標準液を調製する。

- 2) リン酸緩衝生理食塩液^{注1} (以下「PBS」という。) リン酸水素二ナトリウム 1.15 g、リン酸二水素カリウム 0.2 g、塩化ナトリウム 8 g 及び塩化カリウム 0.2 g を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.4 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

B 定 量

抽出 分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+2) 100 mL を加えた後 5 分間静置し、更に 30 分間振り混ぜて抽出する。250 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙^{注2}で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次 PBS 30 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。全量フラスコの標線まで PBS を加えた後、メンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過し、ろ液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 イムノアフィニティーカラム^{注3}内の保存液を液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、PBS 3 mL を加え、同様に流出させる。更に PBS 3 mL を加え、1~2 mL を流出させた後、カラムにリザーバーを連結する。試料溶液 10 mL を正確にカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる^{注4}。PBS 3 mL ずつを 3 回加え、順次同様に流出させる。更に 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 3 mL ずつを 3 回加え、順次同様に流出させた後、圧注^{注5}して全量を流出させる。4 mL のバイアル^{注6}をカラムの下に置き、メタノール-酢酸 (49+1) 1 mL をカラムに加えてオクラトキシシン A を溶出させる。5 分間静置した後、更にメタノール-酢酸 (49+1) 1 mL ずつで 2 回加え、同様に溶出させた後、圧注^{注5}して全量を溶出させる。溶出液を 45 °C 以下で加温しながら、窒素ガスを送り濃縮及び乾固する^{注7}。アセトニトリル-水 (1+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 50 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長 335 nm、蛍光波長 480 nm）
カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注 8}
溶 離 液：アセトニトリル-水-1 v/v%リン酸（230+230+1）
流 速：1.0 mL/min
カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のオクラトキシン A 量を算出する。

注 1 同等の市販品を用い調製してもよい。

2 GFP-60（Whatman 製）又はこれと同等のもの

3 OCHRAKING（堀場製作所製）又はこれと同等のもの

4 流速は 1 滴/s 程度とする。必要に応じてストップコックを使用する。

5 カラムに注射筒を連結した後、シリンジで加圧する等により、充てん剤中の液体を十分に除去すること。

6 濃縮及び乾固操作に合わせて 10 mL の試験管又は 50 mL のナスフラスコ等を使用してもよい。

7 濃縮及び乾固操作は 45 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固することにより実施してもよい。

8 L-column2 ODS（化学物質評価研究機構製）、Shodex C18M4E（昭和電工製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 18 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 18 のとおり
- ・定量限界（下限） ドライ製品及びセミドライ製品：試料中 2 μg/kg、ウェット製品：試料（原物）中 1 μg/kg（繰返し精度及び SN 比）
- ・検出限界 ドライ製品及びセミドライ製品：試料中 1 μg/kg、ウェット製品：試料（原物）中 0.5 μg/kg（繰返し精度及び SN 比）

7 ゼアラレノン

7.1 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）

A 試薬の調製

ゼアラレノン標準液 ゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 10 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ゼアラレノンとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にゼアラレノンとしてそれぞれ 0.01~1 μg を含有する数点のゼアラ

レノン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 25.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 75 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する^{注1}。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙^{注2}で吸引ろ過した後、ろ紙上の残さを先の三角フラスコに戻し、アセトニトリル-水 (21+4) 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を先のガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後、三角フラスコ及び残さをアセトニトリル-水 (21+4) 20 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過して、先の全量フラスコに合わせる。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム (かび毒前処理用)^{注3}に入れ、初めの流出液 4 mL を捨て、その後の流出液 3 mL を 10 mL の試験管に受ける。流出液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフ型質量分析計による測定 試料溶液及び各ゼアラレノン標準液各 10 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 3.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)^{注4}

溶離液 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液- (アセトニトリル-メタノール (4+7)) (9+11) → 10 min → (1+19)

流速 : 0.5 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

検出器 : 四重極型質量分析計^{注5}

イオン化法 : 大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (負イオンモード)

ネブライザーガス流量 : N₂ (2.5 L/min)

インターフェース温度 : 400 °C

ヒートブロック温度 : 200 °C

C D L 温度 : 200 °C

モニターイオン : *m/z* 317

計 算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからゼアラレノンのピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のゼアラレノン量を算出する。

注 1 分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、抽出溶媒の液量を 100 mL とし、更に 2 回目の抽出溶媒の液量を 80 mL とする。

2 GFP-60 (桐山製作所製) 又はこれと同等のもの

- 3 MultiSep 226 AflaZon+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの
- 4 L-column2 ODS (化学物質評価研究機構製) 又はこれと同等のもの
- 5 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 21 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 21 のとおり
- ・ 定量限界 (下限) ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類: 試料中 0.2 mg/kg、ウェット製品: 試料 (原物) 中 0.1 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)
- ・ 検出限界 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類: 試料中 0.1 mg/kg、ウェット製品: 試料 (原物) 中 0.06 mg/kg (SN 比)

8 フモニシン B₁

8.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法
第 2 節 3 による。

9 フモニシン B₂

9.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法
第 2 節 3 による。

10 フモニシン B₃

10.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法
第 2 節 3 による。

11 ニバレノール

11.1 デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法
(適用範囲: ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)
第 2 節 4 による。

第 2 節 多成分分析法

1 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法 (その 1)

- (1) 分析対象化合物 アフラトキシシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ (4 成分)
- (2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク

(3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン B₁ 標準原液 アフラトキシン B₁ [C₁₇H₁₂O₆] 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてアフラトキシン B₁ 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン B₁ として 0.2 mg を含有する。）。
- 2) アフラトキシン B₂ 標準原液 アフラトキシン B₂ [C₁₇H₁₄O₆] 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてアフラトキシン B₂ 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン B₂ として 0.2 mg を含有する。）。
- 3) アフラトキシン G₁ 標準原液 アフラトキシン G₁ [C₁₇H₁₂O₇] 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてアフラトキシン G₁ 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン G₁ として 0.2 mg を含有する。）。
- 4) アフラトキシン G₂ 標準原液 アフラトキシン G₂ [C₁₇H₁₄O₇] 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてアフラトキシン G₂ 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン G₂ として 0.2 mg を含有する。）。
- 5) アフラトキシン混合標準原液 アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.5 µg ずつを含有するアフラトキシン混合標準原液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 50 g^{注2}を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (9+1) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液 4.5 mL を試験管に入れ、多機能カラム（アフラトキシン前処理用）^{注3}をゆっくり押し込み、充てん剤を通過した流出液を誘導体化反応に供する試料溶液とする。

誘導体化反応 試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、なす形フラスコを密栓し、振り混ぜた後 15 分間静置し、更に水-アセトニトリル (9+1) 0.9 mL を先のなす形フラスコに正確に加えて振り混ぜる。この液をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィに供する試料溶液とする。

同時にアフラトキシン混合標準原液 2~40 µL の間の数点をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加える。以下試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフラトキシ

ン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 1~20 ng 相当量を含む各標準液を調製する。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注4}

溶 離 液：水-メタノール（3+2）

流 速：0.8 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 振り混ぜることが困難な試料については 25.0 g とする。

3 MycoSep 226 AflaZon+、MultiSep 226 AflaZon+（いずれも Romer Labs 製）又はこれらと同等のもの

4 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 5 のとおり。
- ・定量限界（下限） 試料中 各 1 µg/kg（平均回収率及び相対標準偏差並びに SN 比）
- ・検出限界 試料中 各 0.3 µg/kg（SN 比）

2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（その 2）

(1) 分析対象化合物 アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂（4 成分）

(2) 適用範囲 ウェット製品

(3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

1) アフラトキシン B₁ 標準原液 1 の(3)の A の 1)による。

2) アフラトキシン B₂ 標準原液 1 の(3)の A の 2)による。

3) アフラトキシン G₁ 標準原液 1 の(3)の A の 3)による。

4) アフラトキシン G₂ 標準原液 1 の(3)の A の 4)による。

5) アフラトキシン混合標準原液 1 の(3)の A の 5)による。

6) アフラトキシン混合標準液 アフラトキシン混合標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.05 µg ずつを含むアフラトキシン混合標準液を調製する。

7) リン酸緩衝生理食塩液^{注2}（以下「PBS」という。） リン酸水素二ナトリウム 1.15 g、リン酸二水素カリウム 0.2 g、塩化ナトリウム 8 g 及び塩化カリウム 0.2 g を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.4 に調整した後、更に水を加えて

1,000 mL とする。

B 定 量

抽 出 分析試料 50.0 g^{注3}を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (9+1) 70 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出した後 5 分間静置する。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れる。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水 (9+1) 35 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次先の褐色共栓三角フラスコに移し、同様に 15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に標線までアセトニトリル-水 (9+1) を加える。この液 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えた後、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 イムノアフィニティーカラム^{注4}内の保存液を液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、PBS 6 mL を加え、同様に流出させる。カラムにリザーバーを連結し、試料溶液 10 mL を正確に加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。PBS 10 mL を加え、同様に流出させる。更に水 10 mL を加え、同様に流出させた後、圧注^{注5}して全量を流出させる。50 mL のなし形フラスコをカラムの下に置き、アセトニトリル 1 mL をカラムに加えて各アフマトキシンを溶出させた後、5 分間静置する。更にアセトニトリル 2 mL を加え、アフマトキシンを溶出させた後、圧注^{注5}して全量を溶出させ、誘導体化反応に供する試料液とする。

誘導体化反応 試料溶液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。残留物にトリフルオロ酢酸^{注6} 0.1 mL を正確に加え、なし形フラスコを密栓し、振り混ぜた後 15 分間静置し、更に水-アセトニトリル (9+1) 0.9 mL を先のなし形フラスコに正確に加えて振り混ぜる。この液を 5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、アフマトキシシン混合標準液 10~400 µL の間の数点をそれぞれ 50 mL のなし形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加える。以下、試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフマトキシシン B₁、B₂、G₁及び G₂としてそれぞれ 0.5~20 ng 相当量を含有する各標準液を調製する。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出	器：蛍光検出器（励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm）
カ ラ	ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm） ^{注7}
溶 離	液：水-メタノール（3+2）
流	速：0.8 mL/min

カラム槽温度：40℃

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 同等の市販品を用い調製してもよい。

3 振り混ぜることが困難な飼料については 25.0 g とする。

4 AFLAKING（堀場製作所製）又はこれと同等のもの

5 流速は 1~2 mL/min とする。

6 トリフルオロ酢酸 ReagentPlus（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

7 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 13 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 13 のとおり
- ・定量限界（下限） 試料（原物）中 各 2 µg/kg（繰返し精度及び SN 比）
- ・検出限界 試料（原物）中 各 0.6 µg/kg（繰返し精度及び SN 比）

3 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(1) 分析対象化合物 フモニシン B₁、B₂ 及び B₃（3 成分）

(2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品

(3) 分析法

A 試薬の調製

1) フモニシン混合標準液 フモニシン B₁ [C₃₄H₅₉NO₁₅]、フモニシン B₂ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 及びフモニシン B₃ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 各 1 mg を正確に量ってそれぞれ 20 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水（1+1）を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えて各フモニシン標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各フモニシンとしてそれぞれ 0.05 mg を含有する。）。
使用に際して、各フモニシン標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ としてそれぞれ 0.01~1 µg を含有する数点のフモニシン混合標準液を調製する。

2) 0.1 v/v%ギ酸溶液 ギ酸 1 mL に水を加えて 1 L とする。

3) 0.1 v/v%ギ酸アセトニトリル溶液 ギ酸 1 mL にアセトニトリルを加えて 1 L とする。

B 定 量

抽出 分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（1+1）100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。200 mL のビーカーをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙^{註 1} で吸引ろ過した後、ろ紙上の残渣を先の三角フラスコに戻し、アセトニトリル-水（1+1）50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を先のガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後、三角フラスコ及び残さをアセトニトリル-水（1+1）10 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過して、先のビーカーに合わせる。アンモニア水（1+5）でろ液の

pHを6~9に調整した後、200 mLの全量フラスコに移す。ろ液の入っていたビーカーをアセトニトリル-水(1+1) 10 mLで洗浄し、先の全量フラスコに合わせる。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水(1+1)を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理^{注2} 多機能カラム(かび毒前処理用)^{注3}をメタノール5 mL及びメタノール-水(3+1) 5 mLで洗浄する。試料溶液3 mLを20 mLの試験管に正確に入れ、メタノール-水(3+1) 8 mLを加えて振り混ぜた後、全量をカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていた試験管をメタノール-水(3+1) 8 mLで洗浄し、洗液をカラムに加え、同様に流出させた後、メタノール3 mLをカラムに加え、吸引マニホールドを用いて減圧しカラム内の液体を除去する。

50 mLのなす形フラスコをカラムの下に置き、メタノール-酢酸(99+1) 20 mLをカラムに加えて各フモニシンを溶出させる。溶出液を40 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

アセトニトリル-水(1+1) 1 mLを正確に加えて残留物を溶かし、5,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフ質量分析計による測定 試料溶液及び各フモニシン混合標準液各5 µLを液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

カ	ラ	ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注4}
溶	離	液：0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸アセトニトリル溶液(3+1) → 5 min → (1+1) (3 min 保持) → 2 min → (3+1)
流		速：0.2 mL/min
カ	ラ	ム 槽 温 度：40 °C
検	出	器：四重極型質量分析計 ^{注5}
イ	オ	ン 化 法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法(正イオンモード)
ネ	ブ	ライザーガス流量：N ₂ (1.5 L/min)
ヒ	ー	トブロック温度：200 °C
C	D	L 温 度：250 °C
モ	ニ	ターイオン： <i>m/z</i> 722(フモニシン B ₁)、 <i>m/z</i> 706(フモニシン B ₂ 及び B ₃)

計 算 得られた選択イオン検出クロマトグラムから各フモニシンのピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各フモニシン量を算出する。

注 1 GFP-60(桐山製作所製)又はこれと同等のもの

2 流速は1滴/s程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

- 3 MultiSep 211 Fum (Romer Labs 製) 又はこれと同等のものに 20 mL のリザーバーを連結したもの
- 4 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの
- 5 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 22 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 22 のとおり
- ・ 定量限界 (下限) ドライ製品及びセミドライ製品: 試料中 0.2 mg/kg、ウェット製品: 試料 (原物) 中 0.1 mg/kg (繰返し精度及び SN 比)
- ・ 検出限界 ドライ製品及びセミドライ製品: 試料中 0.1 mg/kg、ウェット製品: 試料 (原物) 中 0.06 mg/kg (繰返し精度及び SN 比)

4 デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(適用範囲: ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

かび毒混合標準液 デオキシニバレノール [$C_{15}H_{20}O_6$] 及びニバレノール [$C_{15}H_{20}O_7$] 各 1 mg を正確に量り、アセトニトリル 10 mL を正確に加えて溶かし、各かび毒標準原液を調製する^{注1} (この液 1 mL は、各かび毒としてそれぞれ 0.1 mg を含有する)。更に各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 10 µg を含有するかび毒混合標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にデオキシニバレノール及びニバレノールとしてそれぞれ 0.5~1,000 ng を含有する数点のかび毒混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出

- 1) ウェット製品以外の試料 分析試料 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 200 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置した後、60 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。
- 2) ウェット製品 分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、10 分間静置する。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れる。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水 (21+4) 70 mL で洗浄し、洗液を順次先の共栓三角フラスコに移し、同様に 30 分間振り混ぜて抽出する。内容物を先の共栓遠心

沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム (トリコテセン系かび毒前処理用) ^{注2} に入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 3 mL (ウェット製品では 5 mL) を 10 mL の試験管に受ける。流出液 2 mL (ウェット製品では 4 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター^{注3}を用いてろ過し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液^{注4}とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各かび毒混合標準液 10 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カ ラ ム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注5}

溶 離 液 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (19+1) (1 min 保持) → 14 min → (1+19) (10 min 保持) → 1 min → (19+1) (9 min 保持)

流 速 : 0.2 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注6})

イ オ ン 化 法 : エレクトロスプレーイオン化法 (負イオンモード)

イ オ ン 源 温 度 : 120 °C

デソルベーションガス : N₂ (800 L/h、400 °C)

キャピラリー電圧 : 1.5 kV

コ ー ン 電 圧 : 10 V

コ ー ン ガ ス : N₂ (50 L/h)

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

コリジョンガス : Ar (0.25 mL/min)

モ ニ タ ー イ オ ン : 下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカー サーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン		コリジョン エネルギー (eV)
		定量用 (<i>m/z</i>)	定性用 (<i>m/z</i>)	
デオキシニバレノール	355	265	—	10
		—	295	10
ニバレノール	371	281	—	15
		—	311	10

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のデオキシニバレノール及びニバレノール量を算出する。

注 1 市販の標準品 (Trilogy 製 (アズマックス販売) 等) を用いてもよい。

2 MultiSep 227 Trich+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

3 DISMIC-13HP (東洋濾紙製) 又はこれと同等のもの

4 粉ミルクでは試料溶液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に 5 倍希釈し、ニバレノール測定用に供する。

5 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの

6 ACQUITY TQ Detector (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 30 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 30 のとおり
- ・ 定量限界 (下限)

デオキシニバレノール ウェット製品以外の試料：試料中 0.1 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 0.02 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)

ニバレノール 粉ミルク及びウェット製品以外の試料：試料中 0.1 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 0.02 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、粉ミルク：試料中 0.5 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)

- ・ 検出限界

デオキシニバレノール ウェット製品以外の試料：試料中 0.03 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 0.01 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)

ニバレノール 粉ミルク及びウェット製品以外の試料：試料中 0.05 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 0.008 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)、粉ミルク：0.2 mg/kg (繰返し精度及び *SN* 比)

第 3 節 標準品の標定法

本節は、かび毒標準液の濃度を標定する必要がある場合のその標定法を規定する。

1 かび毒標準液の吸光光度法^{註1}による標定法

(1) 標定対象かび毒 アフラトキシン B₁ [C₁₇H₁₂O₆]、アフラトキシン B₂

[C₁₇H₁₄O₆]、アフラトキシン G₁ [C₁₇H₁₂O₇] 及びアフラトキシン G₂ [C₁₇H₁₄O₇]

(2) 標定法

A 試薬の調製

- 1) ニクロム酸カリウム標準液 ニクロム酸カリウム（標準試薬）（めのう乳鉢を用いて粉末とし、100~110 °C で 3~4 時間乾燥したもの）0.08 g を正確に量って 1 L の全量フラスコに入れ、硫酸（1+2,000）を加えて溶かし、更に標線まで硫酸（1+2,000）を加えて標準液 I とする（この液の濃度（C_S (mmol/L)）は下式により求める。）。

$$C_S = \frac{W}{294.18}$$

W：ニクロム酸カリウム採取量（mg）

標準液 I の一定量を硫酸（1+2,000）で正確に 2 倍及び 4 倍に希釈して、それぞれ標準液 II 及び標準液 III とする。

- 2) かび毒標定用標準液 表 1 に示すかび毒の標準液調製用試薬 1 mg^{注2}を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、各かび毒に対応する希釈溶媒を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加える（この液 1 mL は、各かび毒として 20 µg を含有する。）。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、各かび毒に対応する測定濃度のかび毒標定用標準液を調製する。

表 1 各かび毒の標準液調製用試薬、希釈溶媒及び測定濃度

かび毒名	標準液調製用試薬	希釈溶媒	測定濃度 (µg/mL)
アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₁ [C ₁₇ H ₁₂ O ₆]	アセトニトリル	10
アフラトキシンB ₂	アフラトキシンB ₂ [C ₁₇ H ₁₄ O ₆]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₁ [C ₁₇ H ₁₂ O ₇]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG ₂	アフラトキシンG ₂ [C ₁₇ H ₁₄ O ₇]	アセトニトリル	10

B 吸光度計の校正

ニクロム酸カリウム標準液 I、II 及び III について、硫酸（1+2,000）を対照液として波長 350 nm の吸光度を測定し、下式により吸光率（E）を算出する。

$$E = \frac{A \times 1,000}{C_S}$$

A：吸光度

C_S：標準液の濃度（mmol/L）

各標準液についてそれぞれ算出した吸光率の平均値を算出し、下式により補正係数（CF）を算出する^{注3}。

$$CF = \frac{3,160}{E_A}$$

E_A：吸光率の平均値

C 測定

かび毒標定用標準液について、各かび毒に対応する希釈溶媒を対照液として、表 2 に示す各かび毒に対応する測定波長近傍の吸収スペクトルを測定し、その極大波

長の吸光度を測定する。

下式により、かび毒標定用標準液の濃度（ C （ $\mu\text{g/mL}$ ））を算出する。

$$C = \frac{A \times M \times CF \times 1,000}{\epsilon}$$

A ：吸光度

M ：各かび毒の分子量（下表）

ϵ ：各かび毒のモル吸光係数（下表）

表 2 各かび毒の標準液調製用試薬、希釈溶媒及び測定濃度

かび毒名	分子量 (g/mol)	測定波長 (nm)	モル吸光係数 ϵ
アフラトキシン B_1	312	350	20,700
アフラトキシン B_2	314	350	22,500
アフラトキシン G_1	328	350	17,600
アフラトキシン G_2	330	350	18,900

注 1 光路長 1 cm の石英セルを用いる。

2 標定しようとする標準液の溶媒が本法の希釈溶媒と異なる場合は、10 mg 相当量の当該標準液を正確にとり、溶媒を除去した後以降の操作を行う。

3 補正係数（ CF ）が 0.95 未満又は 1.05 を超える場合は、機器及び手法を確認の上、再測定を行う。

第6章 農薬

第1節 各条

1 BHC (α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC 及び δ -BHC)

1.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その1)

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類)

第2節1による。

1.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その2)

(適用範囲：ウェット製品)

第2節5による。

2 DDD (o,p' -DDD 及び p,p' -DDD)

2.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その1)

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類)

第2節1による。

2.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その2)

(適用範囲：ウェット製品)

第2節5による。

3 DDE (o,p' -DDE 及び p,p' -DDE)

3.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その1)

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類)

第2節1による。

3.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その2)

(適用範囲：ウェット製品)

第2節5による。

4 DDT (o,p' -DDT 及び p,p' -DDT)

4.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その1)

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類)

第2節1による。

4.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その2)

(適用範囲：ウェット製品)

第2節5による。

5 EPN

5.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

6 アルドリン（アルドリン及びディルドリン）

6.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）
（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）
第2節1による。

6.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その2）
（適用範囲：ウェット製品）
第2節5による。

7 イプロベンホス

7.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

8 エチオン

8.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

9 エディフェンホス

9.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

10 エトプロホス

10.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

11 エトリムホス

11.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

12 エンドリン

12.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）
（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）

第2節1による。

12.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節5による。

13 カルボフェノチオン

13.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

14 キナルホス

14.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

15 クロルピリホス

15.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

16 クロルピリホスメチル

16.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

第2節2による。

16.2 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ウェット製品）

第2節3による。

17 ダイアジノン

17.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

18 ディルドリン

18.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）

第2節1による。

18.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その2）

（適用範囲：ウェット製品）

第2節5による。

19 テルブホス

19.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

20 トルクロホスメチル

20.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

21 ニトロフェン

21.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法
第2節1による。

22 パラチオン

22.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

23 パラチオンメチル

23.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

24 ピリミホスメチル

24.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)
第2節2による。

24.2 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法
(適用範囲：ウェット製品)
第2節3による。

25 フェニトロチオン

25.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

26 フェンチオン

26.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

- 27 プロチオホス
- 27.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。
- 28 ヘキサクロロベンゼン
- 28.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法
第2節1による。
- 29 ヘプタクロル（ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド）
- 29.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）
（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）
第2節1による。
- 29.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その2）
（適用範囲：ウェット製品）
第2節5による。
- 30 ヘプタクロルエポキシド
- 30.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）
（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）
第2節1による。
- 30.2 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その2）
（適用範囲：ウェット製品）
第2節5による。
- 31 ホサロン
- 31.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。
- 32 ホスメット
- 32.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。
- 33 ホレート
- 33.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法
第2節2による。

34 マラチオン

34.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)
第2節2による。

34.2 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：ウェット製品)
第2節3による。

35 メカルバム

35.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

36 メチダチオン

36.1 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

第2節2による。

37 メトキシクロール

37.1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

第2節1による。

38 メタミドホス

38.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による単成分分析法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

メタミドホス標準液　メタミドホス〔C₂H₈NO₂PS〕25 mgを正確に量って50 mLの全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてメタミドホス標準原液を調製する(この液1 mLは、メタミドホスとして0.5 mgを含有する。)

使用に際して、メタミドホス標準原液2 mLを50 mLの全量フラスコに正確に入れ、更に標線までアセトンを加える。この液1 mLを正確にとり、窒素ガスを送って乾固した後、水で正確に希釈し、1 mL中にメタミドホスとしてそれぞれ0.002~0.16 µgを含有する数点のメタミドホス標準液を調製する。

B 定 量

抽 出　分析試料10.0 gを量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、水20 mLを加え、30分間静置後、更にアセトン100 mLを加え、30分間振り混ぜて抽出する。200 mLの全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙(5種B)で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン50 mLで

洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線までアセトンを加える。
この液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で 2 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液に水 3 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えた後、多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) ^{注1} に入れ、10 分間静置する。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 4 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

次に、グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) ^{注2} を酢酸エチル 5 mL で洗浄し、先の多孔性ケイソウ土カラムの下に連結する。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えてメタミドホスを溶出させる。更に同溶媒 40 mL をカラムに加え、同様に溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II シリカゲルミニカラム (690 mg) をヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (7+3) 2.5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。更にヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL をミニカラムに加えて同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (1+1) 20 mL をミニカラムに加えてメタミドホスを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

水 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各メタミドホス標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注3}

溶離液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (19+1)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部 ^{注4})

検出器 : タンデム型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

ネブライザーガス圧：340 kPa

乾燥ガス温度：350 °C

キャピラリー電圧：4.0 kV

フラグメンター電圧：下表のとおり

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 メタミドホスのモニターイオン条件

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	確認イオン	フラグメンター電圧	コリジョンエネルギー
(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(V)	(eV)
142	94	125	100	12

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからメタミドホスのピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のメタミドホス量を算出する。

注 1 Chem Elut, 5 mL (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの

2 Supelclean ENVI-Carb (Supelco 製) 又はこれと同等のもの

3 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるメタミドホスの保持時間は約 4.5 分) 又はこれと同等のもの

4 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 11 のとおり。
- ・共同試験 別表 3 の 11 のとおり。
- ・定量限界（下限） ウェット製品以外の試料：試料中 0.01 mg/kg（平均回収率及び繰返し精度並びに *SN* 比）、ウェット製品：試料（原物）中 各 0.005 mg/kg（平均回収率及び繰返し精度並びに *SN* 比）
- ・検出限界 ウェット製品以外の試料：試料中 0.003 mg/kg (*SN* 比)、ウェット製品：試料（原物）中 各 0.002 mg/kg (*SN* 比)

39 グリホサート

39.1 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

第 2 節 4 による。

40 グルホシネート (3-メチルホスフィニコプロピオン酸を含む)

40.1 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

第 2 節 4 による。

第2節 多成分分析法

1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その1）

- (1) 分析対象化合物 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ニトロフェン、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及びメトキシクロール（18成分）
- (2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 α -BHC [C₆H₆Cl₆]、 β -BHC [C₆H₆Cl₆]、 γ -BHC [C₆H₆Cl₆]、 δ -BHC [C₆H₆Cl₆]、*o,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、*p,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、*o,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]、*p,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]、*o,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]、*p,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]、アルドリン [C₁₂H₈Cl₆]、エンドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、ディルドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、ニトロフェン [C₁₂H₇Cl₂NO₃]、ヘキサクロロベンゼン [C₆Cl₆]、ヘプタクロル [C₁₀H₅Cl₇]、ヘプタクロルエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O]、メトキシクロール [C₁₆H₁₅Cl₃O₂] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.005~0.2 μ g を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（3+1）20 mL を加えて潤し、10 分間静置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、塩化ナトリウム飽和溶液を加えて 20 mL とし、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、定量する各農薬を溶出させる。更にヘキサン 60 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。シクロヘキサン-アセトン（4+1）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター（孔径 0.5 μ m 以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 μm）

ガードカラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 μm）

溶離液：シクロヘキサン-アセトン（4+1）

流量：5 mL/min

分取画分：70~120 mL

カラム処理 II 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）をヘキサン 5 mL で洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。ヘキサノジエチルエーテル（9+1）15 mL をミニカラムに加えて各農薬を溶出させる。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液、各農薬混合標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：電子捕獲検出器

カラム：熔融石英製キャピラリーカラム（14%シアノプロピルフェニル-86%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（60 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 60 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→180 °C
→昇温 2 °C/min→260 °C→昇温 5 °C/min→275 °C（1 min 保持）

検出器温度：280 °C

計 算 得られたクロマトグラムから各ピーク高さを求めて検量線を作成し、
試料中の各農薬量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度 別表3の6のとおり。

・定量限界 (下限)

メトキシクロール：試料中 0.01 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)

その他の農薬：試料中 各 0.002 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)

・検出限界

メトキシクロール：試料中 0.003 mg/kg (SN 比)

その他の農薬：試料中 各 0.0007 mg/kg (SN 比)

2 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

(1) 分析対象化合物

A グループ農薬 EPN、イプロベンホス、エチオン、エディフェンホス、エトリムホス、カルボフェノチオン、ダイアジノン、テルブホス、トルクロホスメチル、ピリミホスメチル、フェニトロチオン、フェンチオン、プロチオホス、ホサロン、ホスメット、ホレート、マラチオン及びメチダチオン (18 成分)

B グループ農薬 エトプロホス、キナルホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル及びメカルバム (7 成分)

(2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク

(3) 分析法

A 試薬の調製

A グループ農薬混合標準液 EPN [C₁₄H₁₄NO₄PS]、イプロベンホス [C₁₃H₂₁O₃PS]、エチオン [C₉H₂₂O₄P₂S₄]、エディフェンホス [C₁₄H₁₅O₂PS₂]、エトリムホス [C₁₀H₁₇N₂O₄PS]、カルボフェノチオン [C₁₁H₁₆ClO₂PS₃]、ダイアジノン [C₁₂H₂₁N₂O₃PS]、テルブホス [C₉H₂₁O₂PS₃]、トルクロホスメチル [C₉H₁₁Cl₂O₃PS]、ピリミホスメチル [C₁₁H₂₀N₃O₃PS]、フェニトロチオン [C₉H₁₂NO₅PS]、フェンチオン [C₁₀H₁₅O₃PS₂]、プロチオホス [C₁₁H₁₅Cl₂O₂PS₂]、ホサロン [C₁₂H₁₅ClNO₄PS₂]、ホスメット [C₁₁H₁₂NO₄PS₂]、ホレート [C₇H₁₇O₂PS₃]、マラチオン [C₁₀H₁₉O₆PS₂]及びメチダチオン [C₆H₁₁N₂O₄PS₃] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 A グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各 A グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 A グループ農薬として 0.1~2 µg を含有する数点の A グループ農薬混合標準液を調製する。

B グループ農薬混合標準液 エトプロホス〔C₈H₁₉O₂PS₂〕、キナルホス〔C₁₂H₁₅N₂O₃PS〕、クロルピリホス〔C₉H₁₁Cl₃NO₃PS〕、クロルピリホスメチル〔C₇H₇Cl₃NO₃PS〕、パラチオン〔C₁₀H₁₄NO₅PS〕、パラチオンメチル〔C₈H₁₀NO₅PS〕及びメカルバム〔C₁₀H₂₀NO₅PS₂〕各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 B グループ農薬標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各 B グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各 B グループ農薬として 0.1~2 µg を含有する数点の B グループ農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 5 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトニトリル 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

シクロヘキサン-アセトン（7+3）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各 A グループ及び B グループ農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し、アセトン-ジエチレングリコール（100+1）1 滴を加え、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフ条件 例

カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm）

溶離液：シクロヘキサン-アセトン（7+3）

流速：5 mL/min

分取画分：50~90 mL^{注1}

カラム処理 試料溶液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（500 mg）^{注2}に入れ、初めの流出液 1 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL をガスクロマトグラフィー（A）及びガスクロマトグラフィー（B）にそれぞれ供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー（A） 試料溶液及び各 A グループ農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器（リン検出用フィルター）
カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム（5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（30 mL/min）

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：240 °C

カ ラ ム 槽 温 度：初期温度 60 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→170 °C、
昇温 2 °C/min→260 °C

検 出 器 温 度：270 °C

ガスクロマトグラフィー（B） 試料溶液及び各 B グループ農薬混合標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器（リン検出用フィルター）
カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム（50%トリフルオロプロピルメチル-50%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（30 mL/min）

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：210 °C

カ ラ ム 槽 温 度：初期温度 60 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→150 °C
→昇温 2 °C/min→210 °C→昇温 5 °C/min→235 °C（7.5 min 保持）

検 出 器 温 度：240 °C

計 算 得られたクロマトグラムから各ピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

注 1 当該分取画分はガードカラムなしの条件である。ガードカラムを使用する場合は、分取画分を確認すること。

2 AccuBOND^{II} Florisil（リザーバー容量 3 mL、Agilent Technologies 製。現在、同社から供給されている同等品は、SampliQ Florisil PR に替わっており、これを使用する場合は溶出画分を確認すること。）と同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 7 のとおり。

- ・定量限界（下限） 試料中 各 100 µg/kg
- ・検出限界 試料中 各 30 µg/kg

3 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

- (1) 分析対象化合物 クロルピリホスメチル、ピリミホスメチル、マラチオン（3成分）
- (2) 適用範囲 ウェット製品
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 クロルピリホスメチル〔C₇H₇Cl₃NO₃PS〕、ピリミホスメチル〔C₁₁H₂₀N₃O₃PS〕及びマラチオン〔C₁₀H₁₉O₆PS₂〕各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、各農薬標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~5 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次酢酸エチル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

シクロヘキサノン-アセトン（7+3）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,800×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフ条件 例

カ ラ ム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm）

ガードカラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 µm）

溶 離 液：シクロヘキサノン-アセトン（7+3）

流 速：5 mL/min

分取画分：70~100 mL

カラム処理 試料溶液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（500 mg）^{注1}に入れ、初めの流出液 2 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL をガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各農薬混合標準液各 1 μ L をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器（リン検出用フィルター）

カ ラ ム：熔融石英製キャピラリーカラム（5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：He（30 mL/min）

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：240 $^{\circ}$ C

カ ラ ム 槽 温 度：初期温度 60 $^{\circ}$ C（1 min 保持） \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 170 $^{\circ}$ C \rightarrow 昇温 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 210 $^{\circ}$ C \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C（3 min 保持）

検 出 器 温 度：250 $^{\circ}$ C

計 算 得られたクロマトグラムから各ピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

注 1 SampliQ Florisil PR（リザーバー容量 3 mL、Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 14 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 14 のとおり
- ・定量限界（下限） 試料（原物）中 0.05 mg/kg（平均回収率及び相対標準偏差並びに SN 比）
- ・検出限界 試料（原物）中 0.02 mg/kg（SN 比）

4 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

- (1) 分析対象化合物 グリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（3 成分）
- (2) 適用範囲 ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク

(3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 農薬混合標準原液 グリホサート〔C₃H₈NO₅P〕、グルホシネート〔C₅H₁₅N₂O₄P〕及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸〔C₄H₉O₄P〕各0.1 gを正確に量ってそれぞれ100 mLの全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで水を加える（これらの液各1 mLは、グリホサート、グルホシネート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ1 mgを含有する。）。更にこれらの液の一定量を混合し、水で正確に希釈し、1 mL中にグリホサート、グルホシネート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ100 µgを含有する農薬混合標準原液を調製する。
- 2) 内標準液 安定同位体標識グリホサート^{注1} 2 mgを正確に量って20 mLの全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで水を加える（この液1 mLは、安定同位体標識グリホサートとして0.1 mgを含有する。）。更にこの液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に安定同位体標識グリホサートとして10 µgを含有する内標準液を調製する。
- 3) 0.01 v/v%ギ酸溶液 ギ酸1 mLに水を加えて1 Lとし、更にこの液100 mLに水を加えて1 Lとする。

B 定 量

抽 出

- i) ウェット製品以外の試料 分析試料10.0 gを量って300 mLの共栓三角フラスコに入れ、内標準液0.50 mLを正確に加える。更に水200 mLを加え、60℃で2時間静置後、30分間振り混ぜて抽出する。
抽出液の一定量を1,600×gで10分間遠心分離し、上澄み液の一定量を水で正確に2.5倍に希釈し、カラム処理Iに供する試料溶液とする。
- ii) ウェット製品 分析試料10.0 gを量って100 mLの遠心沈殿管に入れ、内標準液0.25 mLを正確に加える。更に水50 mLを加え、30分間振り混ぜて抽出した後、1,600×gで10分間遠心分離し、上澄み液を200 mLの全量フラスコに入れる。
遠心沈殿管内の残さに水40 mLを加え、更に30分間振り混ぜて抽出した後、1,600×gで10分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加える。更にこの操作を1回繰り返す。
全量フラスコの標線まで水を加え、この液の一定量を5,000×gで5分間遠心分離した後、上澄み液を水で正確に2.5倍に希釈し、カラム処理Iに供する試料溶液とする。

カラム処理 I ^{注2} 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(500 mg) ^{注3}の下にスルホン酸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(225 mg) ^{注4}を連結し、メタノール6 mL及び水12 mLで順次洗浄する。

50 mLのなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液1 mL(ウェット製品は2 mL)をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで

流出させる。更に水 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。

流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とする。

誘導体化 試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし^{注5}、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱^{注6}した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II^{注7} アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg)^{注8} の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄する。

試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してグリホサート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体を溶出させる。

次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体及びグルホシネート誘導体を溶出させる。

溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。0.01 v/v% ギ酸溶液 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

標準液の誘導体化 農薬混合標準原液 1 mL 及び内標準液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし^{注5}、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱^{注6}した後放冷する。この液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

0.01 v/v% ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にグリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ 1 ~ 100 ng 相当量並びに安定同位体標識グリホサートとして 0.1 ~ 10 ng 相当量を含む数点の検量線作成用標準液を調製する。
液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各検量線作成用標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm) ^{注9}

溶離液 : 0.01 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (93+7) (12 min 保持) → 3 min → (5+95) (10 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注10})

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法 (正イオンモード)

イオン源温度 : 120 °C

デソルベーション温度 : 400 °C

キャピラリー電圧 : 3 kV

コーン電圧 : 下表のとおり

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

物質名	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	確認 イオン (<i>m/z</i>)	コーン 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
グリホサート誘導体	254	102	152	22	17
グリホサート- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N誘導体	257	105	154	22	17
グルホシネート誘導体	252	210	150	26	14
3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体	181	149	93	21	14

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからグリホサート誘導体及び安定同位体標識グリホサート誘導体のピーク面積又は高さを求めてそれぞれ検量線を作成し、グリホサート及び安定同位体標識グリホサートのそれぞれの量を求めた後、次式により試料中のグリホサート量を算出する。

$$\text{試料中のグリホサート量 (mg/kg)} = A \times 2.5^{\text{注11}} / B$$

A : 検量線から求めた試料中のグリホサートの濃度 (mg/kg)

B : 検量線から求めた試料溶液中の安定同位体標識グリホサートの濃度 (ng/mL)

同様に、グルホシネート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体のピーク面積又は高さを求めてそれぞれ検量線を作成し、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸のそれぞれの量を求めた後、次式により試料中のグルホシネート量を算出する。

$$\text{試料中のグルホシネート量 (mg/kg)} = C + D \times 1.3$$

C : 検量線から求めた試料中のグルホシネートの濃度 (mg/kg)

D : 検量線から求めた試料中の 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の濃度 (mg/kg)

- 注 1 グリホサート- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N 標準品 (Medical Isotopes 製) 等がある。
- 2 流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。
 - 3 Oasis HLB (Waters 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの
 - 4 Oasis Plus MCX (Waters 製) 又はこれと同等のもの
 - 5 必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。
 - 6 乾燥器等に入れる。乾燥器を用いる場合は、十分にファンを回す。
 - 7 流速は 2~3 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。
 - 8 Sep-Pak Plus NH_2 (Waters 製) 又はこれと同等のものに 10 mL のリザーバーを連結したもの
 - 9 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるグルホシネート誘導体、3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体及びグリホサート誘導体の保持時間はそれぞれ約 4 分、約 6 分、約 7 分) 又はこれと同等のもの
 - 10 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例
 - 11 安定同位体標識グリホサートの添加量、試料溶液の希釈倍率等を変更した場合は、係数 2.5 (ng/mL) を適宜修正すること。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 19 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 19 のとおり
- ・定量限界 (下限) ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク：試料中 各 1 mg/kg、ウェット製品：試料 (原物) 中 各 0.5 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)
- ・検出限界 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク：試料中 各 0.4 mg/kg、ウェット製品：試料 (原物) 中 各 0.2 mg/kg (繰返し精度及び SN 比)

5 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法 (その 2)

- (1) 分析対象化合物 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、 o,p' -DDD、 p,p' -DDD、 o,p' -DDE、 p,p' -DDE、 o,p' -DDT、 p,p' -DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及び *trans*-ヘプタクロルエポキシド (16 成分)
- (2) 適用範囲 ウェット製品
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 α -BHC [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]、 β -BHC [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]、 γ -BHC [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]、 δ -BHC [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]、 o,p' -DDD [$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_4$]、 p,p' -DDD [$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_4$]、 o,p' -DDE

[C₁₄H₈Cl₄] 、 *p,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄] 、 *o,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅] 、 *p,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅] 、 アルドリン [C₁₂H₈Cl₆] 、 エンドリン [C₁₂H₈Cl₆O] 、 デイルドリン [C₁₂H₈Cl₆O] 、 ヘプタクロル [C₁₀H₅Cl₇] 、 ヘプタクロルエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O] 、 *trans*-ヘプタクロルエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O] 各 10 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 10 mL を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.005~0.5 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴で 50 mL 以下になるまで減圧濃縮した後、精製に供する試料溶液とする。

精 製 試料溶液を 200 mL の分液漏斗に移し、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 4 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗に合わせる。ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 100 mL を分析漏斗に加えて 3 秒間振り混ぜた後、液層が 3 層に分離するまで 15 分間静置する。水層 (最下層) を捨て、残った 2 層を 300 mL のなす形フラスコに移し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。飽和食塩水 20 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させて各農薬を溶出させる。更に同溶媒 40 mL をカラムに加えて同様に溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液を 10 mL の遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。酢酸エチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 μm ）

ガードカラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 μm ）

溶離液：シクロヘキサン-アセトン（4+1）

流速：5 mL/min

分取画分：70~105 mL

カラム処理 II グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）^{注1}を酢酸エチル 10 mL で洗浄する。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させて各農薬を流出させる。更に酢酸エチル 4 mL をミニカラムに加え同様に流出させる。流出液を 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とする。

カラム処理 III 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（5 g）^{注2}をジエチルエーテル 20 mL 及びヘキサン 20 mL で順次洗浄する。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させて各農薬を流出させる。更にヘキサジエチルエーテル（9+1）40 mL をミニカラムに加えて同様に流出させる。流出液を 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各農薬混合標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：電子捕獲検出器

カラム：溶融石英製キャピラリーカラム（14%シアノプロピルフェニル-86%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm ）

キャリアーガス：He（1.0 mL/min）

メイクアップガス：N₂（60 mL/min）

試料導入法：パルスドスプリットレス（30 psi、60 s）

試料導入部温度：250 $^{\circ}\text{C}$

カラム槽温度：初期温度 60 $^{\circ}\text{C}$ （1 min 保持）→昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →195 $^{\circ}\text{C}$ →昇温 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →240 $^{\circ}\text{C}$ →昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ →280 $^{\circ}\text{C}$ （7 min 保持）

検出器温度：280 °C

計算 得られたクロマトグラムから各ピーク高さを求めて検量線を作成し、
試料中の各農薬量を算出する。

注 1 ENVI-Carb/LC-NH₂ (リザーバー容量 5 mL、Supelco 製) 又はこれと同等
のもの

2 Sep-pak Vac Florisil Cartridge (リザーバー容量 20 mL、Waters 製) 又はこ
れと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 20 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 20 のとおり
- ・ 定量限界 (下限) 試料 (原物) 中 各 1 µg/kg (平均回収率及び相対標準偏
差並びに *SN* 比)
- ・ 検出限界 試料 (原物) 中 各 0.3 µg/kg (*SN* 比)

第7章 添加物

1 エトキシキン

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

エトキシキン標準液 エトキシキン [C₁₄H₁₉NO] 50 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてエトキシキン標準原液を調製する（この液 1 mL は、エトキシキンとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にエトキシキンとして 0.1~6 µg を含有する数点のエトキシキン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、15 分間かき混ぜて抽出した後 3 分間静置する。抽出液の上澄み 5 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、標線までメタノールを加え、メンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各エトキシキン標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：370 nm、蛍光波長：415 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注1}

溶 離 液：ジブチルヒドロキシトルエン 50 mg をアセトニトリル-水（4+1）に溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

流 速：0.6 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のエトキシキン量を算出する。

注 1 Puresil 5µC₁₈ 120Å（Waters 製）又はこれと同等のもの
(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 8 のとおり。
- ・定量限界（下限） 試料中 1 mg/kg（添加回収率及び繰返し精度）
- ・検出限界 試料中 0.2 mg/kg (SN 比)

2 ジブチルヒドロキシトルエン

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

1) ジブチルヒドロキシトルエン標準液 ジブチルヒドロキシトルエン [C₁₅H₂₄O]

25 mg を正確に量って 250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてジブチルヒドロキシトルエン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジブチルヒドロキシトルエンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にジブチルヒドロキシトルエンとして 2.5~15 µg を含有する数点のジブチルヒドロキシトルエン標準液を調製する。

- 2) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））^{注1}を 120 °C で 2 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液の上澄みをカラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

カラム処理 中性アルミナ 5 g をカラム管（内径 7 mm）に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 5 mL をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ジブチルヒドロキシトルエン標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入しクロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：277 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）^{注2}

溶 離 液：メタノール-水（4+1）

流 速：1.0 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し試料中のジブチルヒドロキシトルエン量を算出する。

注 1 Aluminiumoxid 90 aktiv neutral Art. 1077（Merck 製）又はこれと同等のもの

2 Shodex ODS pak F-411（昭和電工製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 9 のとおり。
- ・定量限界（下限） 試料中 10 mg/kg（添加回収率及び繰返し精度）
- ・検出限界 試料中 0.1 mg/kg（SN 比）

3 ブチルヒドロキシアニソール

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

A 試薬の調製

- 1) ブチルヒドロキシアニソール標準液 ブチルヒドロキシアニソール [C₁₁H₁₆O₂] 25 mg を正確に量って 250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶か

し、更に標線まで同溶媒を加えてブチルヒドロキシアニソール標準原液を調製する（この液 1 mL は、ブチルヒドロキシアニソールとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にブチルヒドロキシアニソールとして 2.5~15 µg を含有する数点のブチルヒドロキシアニソール標準液を調製する。

2) 中性アルミナ 本章 2 の A の 2)による。

B 定 量

抽 出 本章 2 の B の抽出の項による。

カラム処理 本章 2 の B のカラム処理の項による。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ブチルヒドロキシアニソール標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：290 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）^{注1}

溶 離 液：メタノール-水（3+2）

流 速：0.8 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のブチルヒドロキシアニソール量を算出する。

注 1 Shodex ODS pak F-411（昭和電工製）又はこれと同等のもの
（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 10 のとおり。
- ・定量限界（下限） 試料中 5 mg/kg（添加回収率及び繰返し精度）
- ・検出限界 試料中 0.1 mg/kg（SN比）

4 亜硝酸ナトリウム

4.1 液体クロマトグラフによる単成分分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

A 試薬の調製

- 1) 酢酸アンモニウム緩衝液 酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水（1+4）で pH を 9.0 に調整する。使用に際してこの液の一定量を水で 10 倍に希釈する。
- 2) リン酸緩衝液 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1.79 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g を水に溶かして 1 L とする。
- 3) 亜硝酸ナトリウム標準液 亜硝酸ナトリウム [NaNO₂]（105 °C で 4 時間乾燥したもの）500 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をリン酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.1~10 µg を含有する数点の亜硝酸ナトリウム標準液を調製する。

4) 硫酸亜鉛溶液 硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とする。

B 定 量

抽出 分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 10 分間静置する^{注1}。続いて硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) 20 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 5 分間静置する。更に氷中で 5 分間静置した後、水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) 2 mL を加え、10 分間静置する^{注1}。首太全量フラスコの標線までリン酸緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とする。

カラム処理 グラファイトカーボンミニカラム (500 mg)^{注2} を水 5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、自然流下させ、初めの流出液 3 mL を捨てる。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受ける。この液をメンブランフィルター (孔径 0.45 µm) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各亜硝酸ナトリウム標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例^{注3}

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長 210 nm)

カ ラ ム：アミノ基修飾ビニルアルコールポリマーカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)^{注4}

溶 離 液：リン酸緩衝液

流 速：0.8 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出する。

注 1 恒温槽等を使用し、温度が一定に保たれるようにする。

2 ENVI-Carb (500 mg) (Sigma-Aldrich 製) 又はこれと同等のもの

3 本測定条件により得られる試料溶液のクロマトグラムには約 40 分まで試薬由来のピークが認められるため、連続測定の場合、試料溶液を注入した後、次の測定溶液注入までの時間を 45 分程度に設定する必要がある。

4 Asahipak NH2P-50 4E (昭和電工製、本測定条件による亜硝酸ナトリウムの保持時間は約 8 分) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 29 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 29 のとおり
- ・定量限界 (下限) ウェット製品以外の試料：試料中 20 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 各 5 mg/kg (平

均回収率及び繰返し精度並びに *SN* 比)

- ・検出限界 ウェット製品以外の試料：試料中 6 mg/kg (*SN* 比)、ウェット製品：試料（原物）中 各 2 mg/kg (*SN* 比)

4.2 吸光光度法による単成分分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー^{注1}、素材乾燥ジャーキー^{注1}（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）

A 試薬の調製

- 1) 酢酸アンモニウム緩衝液 4.1 の A の 1)による。
- 2) 亜硝酸ナトリウム標準液 亜硝酸ナトリウム [NaNO₂]（105 °C で 4 時間乾燥したもの）50 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 0.1 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一定量を酢酸アンモニウム緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.05~1 µg を含有する数点の亜硝酸ナトリウム標準液を調製する。
- 3) 硫酸亜鉛溶液 4.1 の A の 4)による。
- 4) スルファニルアミド溶液 スルファニルアミド 1 g を塩酸（10 w/v%）に溶かして 100 mL とする（使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。）。
- 5) ナフチルエチレンジアミン溶液 *N*-（1-ナフチル）エチレンジアミン二塩酸塩 0.5 g を水に溶かして 100 mL とする（使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。）。
- 6) 活性炭素 活性炭素を水で洗浄した後、風乾する。

B 試料溶液の調製

分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 10 分間静置する^{注2}。続いて硫酸亜鉛溶液（10 w/v%）20 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 5 分間静置する^{注1}。更に水中で 5 分間静置した後、水酸化ナトリウム溶液（30 w/v%）2 mL を加え、10 分間静置する。首太全量フラスコの標線まで酢酸アンモニウム緩衝液を加え、ろ紙（5 種 C）でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とする。

ろ液が着色していた場合は、更に先のろ液に活性炭素約 0.5 g を加え、ろ紙（5 種 C）でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とする。

同時に、水 5 mL を用いて同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液及び空試験溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、スルファニルアミド溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和する。続いてナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和した後、15 分間静置して試料溶液（A）を得る。

活性炭素による処理を行った場合は、別に試料溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、塩酸（10 w/v%）1 mL を正確に加えた後、密栓して混和し、更にナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加えて以下同様に操作を行い試料溶液（B）を得る。

各亜硝酸ナトリウム標準液及び酢酸アンモニウム緩衝液について、同様の操作を行う。

酢酸アンモニウム緩衝液を対照液として試料溶液（A）及び空試験溶液について、波長 540 nm で吸光度を測定する。試料溶液（A）の吸光度から空試験溶液の吸光度（活性炭素処理を行った場合は空試験溶液の吸光度と試料溶液（B）の吸光度を足した吸光度）を差し引いて吸光度を得る。

同時に酢酸アンモニウム緩衝液及び各亜硝酸ナトリウム標準液について、試料溶液（A）の場合と同一条件で吸光度を測定する。得られた各亜硝酸ナトリウム標準液の吸光度から酢酸アンモニウム緩衝液の吸光度を差し引いて吸光度を得る。得られた吸光度から検量線を作成して、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出する。

注 1 アスコルビン酸等還元物質が添加されているものでは、亜硝酸ナトリウムの含有量が 50 mg/kg 程度以下の場合は、回収率の低下が認められる。

2 恒温槽等を使用し、温度が一定に保たれるようにする。

（参考）分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 15 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 15 のとおり
- ・ 定量限界（下限） 試料（原物）中 2 mg/kg（標準偏差）
- ・ 検出限界 試料（原物）中 1 mg/kg（標準偏差）

5 ソルビン酸

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

A 試薬の調製

- 1) ソルビン酸標準液 ソルビン酸 [C₆H₈O₂] 100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてソルビン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、ソルビン酸として 1 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にソルビン酸として 0.05~100 µg を含有する数点のソルビン酸標準液を調製する。
- 2) 5 mmol/L クエン酸溶液 クエン酸一水和物 0.7 g 及びクエン酸三ナトリウム二水和物 0.6 g を水に溶かして 1,000 mL とする。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、2,000×g で 10 分間遠心分離する。上澄み液の一定量をメタノールで正確に 10 倍希釈し、メンブランフィルター（孔径 0.45 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ソルビン酸標準液各 10 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：260 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm ）^{注1}

溶離液：5 mmol/L クエン酸溶液-アセトニトリル-メタノール（7+2+1）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のソルビン酸量を算出する。

注1 L-column L-C18（一般財団法人化学物質評価研究機構製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 16 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 16 のとおり
- ・定量限界（下限） 試料（原物）中 10 mg/kg（平均回収率及び相対標準偏差並びに SN 比）
- ・検出限界 試料（原物）中 3 mg/kg（SN 比）

6 プロピレングリコール

6.1 ガスクロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ））

A 試薬の調製

プロピレングリコール標準液 プロピレングリコール [C₃H₈O₂] 100 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてプロピレングリコール標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロピレングリコールとして 5 mg を含有する。）。

使用に際して、プロピレングリコール標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にプロピレングリコールとして 5~100 μg を含有する数点のプロピレングリコール標準液を調製する。

B 定 量

脱脂 分析試料 2 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 2 mL（セミドライ製品は 1 mL）を加えて潤した^{注1}後、更にヘキサン 20 mL を加え、10 分間振り混ぜて^{注2}脱脂する。脱脂後の内容物を 2,000 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を捨てる。ヘキサン 20 mL を先の共栓遠心沈殿管に加えて同様に操作した後、窒素ガスを送ってヘキサンを除去し^{注3}、残留物を抽出に供する。

抽出 メタノール 20 mL を残留物に加え、水温 50 °C で 20 分間超音波処理した^{注4}後、2,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れる。先の残さにメタノール 20 mL を加え、10 分間振り混ぜた^{注2}後、2,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに合わせる。更に全量フラスコの標線までメタノールを加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 グラファイトカーボン／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 (500 mg／500 mg／500 mg)^{注5}をメタノール 10 mL で洗浄する。20 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 5 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してプロピレングリコールを流出させる。更にメタノール 10 mL をミニカラムに加えて同様に流出させる。更に全量フラスコの標線までメタノールを加え、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフ質量分析計による測定 試料溶液及び各プロピレングリコール標準液各 1 μ L をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

カラム : 熔融石英製キャピラリーカラム (ポリエチレングリコールコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)

キャリアーガス : He (1.0 mL/min)

試料導入法 : スプリット (スプリット比 1:50)^{注6}

試料導入部温度 : 250 °C

カラム槽温度 : 初期温度 60 °C (1 min 保持) → 昇温 5 °C/min → 145 °C → 昇温 30 °C/min → 250 °C (10 min 保持)

検出器 : 四重極型質量分析計^{注7}

インターフェース温度 : 250 °C

イオン源温度 : 230 °C

イオン化電圧 : 70 eV

イオン化法 : 電子衝撃イオン化 (EI) 法

モニターイオン : 定量イオン m/z 61、確認イオン m/z 45 及び 76

計算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからプロピレングリコールのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のプロピレングリコール量を算出する。

注 1 分析試料全体が水で潤うように振り混ぜる。

2 振とう機等を用いる前に、あらかじめ固形物と溶液が混ざり合うまで手で振り混ぜておく。

3 ヘキサンを効率良く除去するため、必要に応じて、40 °C 以下の水浴中でヘキサン除去操作を行う。

4 共栓遠心沈殿管をときどき振り混ぜる。

5 Supelclean Envi-Carb II/SAX/PSA (リザーバー容量 12 mL、Sigma-Aldrich 製) 又はこれと同等のもの

6 十分に不活性化処理された状態にあるライナーを使用する。

7 GCMS-QP2010 (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 26 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 26 のとおり

- 定量限界（下限） 試料中 500 mg/kg（平均回収率及び繰返し精度並びに *SN* 比）
- 検出限界 試料中 200 mg/kg（*SN* 比）

第 8 章 病原微生物

1 サルモネラ

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品、成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ^{注1}及びソフトタイプ))

第 2 章の 2 に定める分析用試料の調製は行わず、分析に用いる。

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものをを用いる。

培地等で pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。

A 試薬等の調製

- 1) 界面活性剤溶液 界面活性剤^{注2}溶液 (10 v/v%) を 121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 2) ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液 ヨウ化カリウム 20 g を水 50 mL に溶かし、更にヨウ素 12.5 g を加えて溶かした後、水を加えて 100 mL とする。
- 3) 生理食塩液 塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) を 121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 4) 緩衝ペプトン水 ペプトン 10 g、塩化ナトリウム 5 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水 9 g 及びリン酸二水素カリウム 1.5 g を水 1,000 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 5) ハーナ・テトラチオン酸塩培地^{注3} ペプトン 18 g、酵母エキス 2 g、ブドウ糖 0.5 g、マンニトール 2.5 g、塩化ナトリウム 5 g、チオ硫酸ナトリウム (無水) 26 g、デオキシコール酸ナトリウム 0.5 g、炭酸カルシウム 25 g 及びブリリアントグリーン 10 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。
これを 45 °C 以下に冷却した後、ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液 40 mL を加え、かき混ぜながら 25 mL の培養瓶に 10 mL 分注する。
- 6) ラパポート・バシリアディス培地^{注4} パパイン消化大豆 5 g、塩化ナトリウム 8 g、リン酸二水素カリウム 1.6 g、塩化マグネシウム六水和物 40 g 及びマラカイトグリーンシュウ酸塩 40 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 5.1~5.3 に調整する。これを 25 mL の培養瓶に 10 mL 分注する。
- 7) DHL 寒天培地^{注5} ペプトン 20 g、肉エキス 3 g、スクロース 10 g、ラクトース一水和物 10 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸鉄 (III) アンモニウム 1 g、チオ硫酸ナトリウム (無水) 2.2 g、デオキシコール酸ナトリウム 1 g、ニュートラルレッド 30 mg 及びカンテン 15 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.2~7.4 に調整する。
なお、必要に応じてノボビオシンナトリウムを培地 1,000 mL に対して 20 mg 加える。
これをペトリ皿に一様に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させる。
- 8) ブリリアントグリーン寒天培地^{注6} ペプトン 10 g、酵母エキス 3 g、スクロース

10 g、ラクトース一水和物 10 g、塩化ナトリウム 5 g、フェノールレッド 80 mg、ブリリアントグリーン 12.5 mg 及びカンテン 15 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.8~7.0 に調整する。

なお、必要に応じてノボビオシンナトリウムを培地 1,000 mL に対して 20 mg 加える。

以下、7)による。

- 9) クロモアガーサルモネラ寒天培地^{註7} ペプトン・酵母エキス混合物 7 g、選択剤・発色酵素基質混合物^{註8} 12.9 g 及びカンテン 15 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.5~7.7 に調整する。

以下、7)による。

- 10) TSI 寒天培地^{註9} ペプトン 15 g、肉エキス 4 g、スクロース 10 g、ラクトース一水和物 10 g、ブドウ糖 1 g、塩化ナトリウム 5 g、亜硫酸ナトリウム 0.4 g、チオ硫酸ナトリウム（無水）80 mg、硫酸鉄（II）七水和物 0.2 g、フェノールレッド 20 mg 及びカンテン 15 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。

これを小試験管に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、半斜面（上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層）に凝固させる。

- 11) SIM 寒天培地^{註9} ペプトン 30 g、肉エキス 3 g、クエン酸鉄（III）アンモニウム 0.5 g、チオ硫酸ナトリウム（無水）50 mg、L-システイン塩酸塩一水和物 0.2 g 及びカンテン 5 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。

これを小試験管に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、高層に凝固させる。

- 12) リジン脱炭酸試験用培地^{註9} ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、ブドウ糖 1 g、L-リジン一塩酸塩 5 g 及びブロモクレゾールパープル 20 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

これを小試験管に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

B 培 養

前増菌培養 分析試料（成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）は、1カ所以上を切断し、20 mm 以下とする。）25 g を量って滅菌済みストマッカー袋に入れ、緩衝ペプトン水 225 mL を加え、30 分間静置後、ストマッカーにより 200 rpm で 5 分間かくはん混合する。更に界面活性剤溶液 15 mL を加え、35~37 °C で 18~24 時間培養する。

選択増菌培養 前増菌培養液 1 mL 及び 0.1 mL をそれぞれハーナ・テトラチオン酸塩培地及びラパポート・バシリアディス培地に加え、振り混ぜた後、41~43 °C で 18~24 時間培養する。

選択分離培養 上記 2 種類の選択増菌培養液の 1 白金耳ずつを DHL 寒天培地及びブリリアントグリーン寒天培地にそれぞれ画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

なお、必要に応じてクロモアガーサルモネラ寒天培地についても同様に操作する。

純粋分離培養 上記 DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地表面のサルモネラと疑われる集落をそれぞれから 3 個程度釣菌し、それぞれ生理食塩液 0.3 mL 程度で希釈する。各希釈液の 1 白金耳を DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

確認培養 上記 DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地表面のサルモネラと疑われる集落を 1 個釣菌し、TSI 寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、SIM 寒天培地の高層部に穿刺した後、リジン脱炭酸試験用培地に接種する。これらを 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

C 同 定

確認同定 上記 3 種類の確認培地における下記の生化学的性状により、サルモネラを確認する。

サルモネラの多くは、乳糖・白糖発酵 (-)、ブドウ糖発酵 (ガス産生) (+)、硫化水素 (+)、運動性 (+)、IPA (-)、インドール (-)、リジン脱炭酸 (+) の性状を示す。

血清型別^{注 10} スライドグラス上に生理食塩液及びサルモネラ O 群多価血清をそれぞれ 1 滴滴下し、サルモネラの性状を示した菌を TSI 寒天培地斜面上から少量かき取り、生理食塩液と混和した後、続いて O 群多価血清と混和し、スライドグラスを前後に傾けながら凝集の有無を確認する。

O 群多価血清で凝集した菌について、同様に各 O 群血清との凝集の有無を確認し、O 群を決定する。

O 群の決定した菌について、試験管法により H 血清との凝集の有無を確認し、H 抗原を決定する。

O 群及び H 抗原が決定した菌について、Kauffmann-White の抗原表に照合し、サルモネラの血清型を確認する。

注 1 切断できない試料を除く。

2 Tween 80 (Atlas Powder 製) 又はこれと同等のもの

3 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地 (ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (栄研化学製)) を用いてもよい。

4 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地 (Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth (Oxoid 製)) を用いてもよい。

5 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地 (DHL 寒天培地 (栄研化学製)) を用いてもよい。

6 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地 (Brilliant Green Agar (Difco 製)) を用いてもよい。

7 培地は、これと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地 (CHROMagar Salmonella (CHROMagar 製)) を用いてもよい。

8 サルモネラに特有の酵素活性により分解され、紫色を呈する発色基質を混合したもの

- 9 培地は、これらと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。
- 10 O 群多価血清又は各 O 群血清との凝集は、1 分以内に強く凝集したものを陽性とする。

第9章 有害物質

1 メラミン

1.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による単成分分析法

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製^{注1}

- 1) メラミン標準原液　メラミン [C₃H₆N₆] 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてメラミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、メラミンとして 100 µg を含有する。）。
- 2) 内標準液　安定同位体元素標識メラミン（メラミン-¹³C₃¹⁵N₃）標準原液（濃度 100 µg/mL）^{注2} 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加えて 1 mL 中にメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ として 1 µg を含有する内標準液を調製する。
- 3) 検量線作成用標準液　使用に際して、メラミン標準原液及び内標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にメラミンとして 0.5~200 ng を含有し、かつメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ として 5 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。
- 4) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液　水酸化ナトリウム 8 g を水 100 mL に溶かし、更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製する^{注3}。
- 5) 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液　塩酸 8.5 mL に水を加えて 50 mL とし、更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製する^{注3}。

B 定　　量

抽　　出　　分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管^{注4}に入れ、アセトニトリル-水 (1+1) 20 mL を加える。更にこの共栓遠心沈殿管に内標準液 0.5 mL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出する。50 mL の首太全量フラスコ^{注4}をブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土^{注5}をのせたろ紙（5種 B）^{注6}で吸引ろ過する。ケイソウ土上の残さを先の共栓遠心沈殿管に戻し、アセトニトリル-水 (1+1) 10 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を同様に吸引ろ過して、先の首太全量フラスコに加えた後、首太全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理^{注7}　強酸性陽イオン交換体ミニカラム（500 mg）^{注8}を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液 5 mL、0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液 5 mL、アセトニトリル 5 mL 及びギ酸 (1+24) 5 mL で順次洗浄する。試料溶液 2 mL をあらかじめギ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加えて混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更にアセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後、圧注して全量を流出させる。100 mL のなす形フラスコ^{注4}をミニカラム^{注9}の下に置き、アセトニトリル

ージエチルアミン (49+1) 15 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後、圧注して全量を溶出させる。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル 4 mL を正確に加え、5 分間超音波処理して残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.2 μm 以下) 注 10 でろ過し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各検量線作成用標準液各 2 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : 親水性相互作用クロマトグラフィーカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm) 注 11

溶離液 : アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (17+3) (7 min 保持) → 8 min → (2+3) (20 min 保持) → 8 min → (17+3) (7 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部 注 12)

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

イオン源温度 : 150 °C

デソルベーション温度 : 400 °C

キャピラリー電圧 : 0.6 kV

コーン電圧 : 下表のとおり

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 メラミンのモニターイオン条件

物質名	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	確認イオン (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
メラミン	127	85	68	46	16
メラミン- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89		50	18

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量を算出する。

注 1 調製した試薬は、ガラス製容器に保存する。

2 Cambrige Isotope Laboratories Inc. 製又はこれと同等のもの

3 メタノールによる希釈は用時に行う。

4 ガラス製の器具を使用する。使用にあたっては、あらかじめ超音波洗浄した後、水道水、超純水、アセトニトリルで順次洗浄したものを使用する。

- 5 ハイフロスーパーセル（和光純薬工業製）又はこれと同等のもの
- 6 ケイソウ土をアセトニトリル-水（1+1）に懸濁させ、吸引しながらろ紙上に約 5 mm の厚さになる量を流し込み、更にアセトニトリル-水（1+1）を加えて洗浄した後の状態のもの。
- 7 流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。
- 8 Oasis MCX（Waters 製、リザーバー容量 6 mL）又はこれと同等のもの
- 9 ミニカラムにリザーバーを連結して使用する場合、リザーバーはガラス製のシリンジを用いる。このガラス製のシリンジについても注 4 と同様の洗浄をする。
- 10 HLC-DISK 13 溶媒系（関東化学製、孔径 0.2 μm、直径 13 mm、PTFE）又はこれと同等のもの
- 11 SeQuant ZIC-HILIC（MERCK 製、充てん剤はシリカゲル基材にスルホベタイン基（両性イオン型官能基）を化学結合したもの。本測定条件によるメラミンの保持時間は約 4 分）又はこれと同等のもの
- 12 Xevo TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 23 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 23 のとおり
- ・定量限界（下限） ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク：試料中 0.5 mg/kg、ウェット製品：試料（原物）中 0.2 mg/kg
- ・検出下限 ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク：試料中 0.2 mg/kg、ウェット製品：試料（原物）中 0.1 mg/kg

2 ヒスタミン

2.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法

（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）

A 試薬の調製

- 1) 溶出溶媒 ギ酸 2 mL に水-メタノール（1+1）を加えて 100 mL とする。
- 2) 希釈溶媒 溶出溶媒 10 mL に水-メタノール（1+1）を加えて 100 mL とする。
- 3) ヒスタミン標準液 ヒスタミン二塩酸塩 [C₅H₉N₃·2HCl] 82.8 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、水-メタノール（1+1）を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてヒスタミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ヒスタミンとして 1 mg 含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して、1 mL 中にヒスタミンとして 2~400 ng を含有する数点のヒスタミン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、5 w/v%ト

リクロロ酢酸溶液 100 mL を加え、30 分間振り混ぜてヒスタミンを抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、2,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 5 mL を 50 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、水 20 mL を加える。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.9~7.1 に調整した後、2,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れる。試料溶液の入っていた共栓遠心沈殿管を少量の水で数回洗浄し、洗液を順次先の全量フラスコに加えた後、更に標線まで水を加えてカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム (500 mg) ^{注1} をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄する。試料溶液 5 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させる。更に水 10 mL 及びメタノール 10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。100 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、溶出溶媒 10 mL をミニカラムに加えてヒスタミンを溶出させる。更に全量フラスコの標線まで水-メタノール (1+1) を加え、その液の一定量を 5,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 ^{注2} 試料溶液及び各ヒスタミン標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カ ラ ム : 親水性相互作用クロマトグラフィーカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 µm) ^{注3}

溶 離 液 : 0.1 v/v% ギ酸溶液-アセトニトリル (1+9) (1 min 保持) → 6 min → (9+1) (8 min 保持)

流 速 : 0.2 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部 ^{注4})

イ オ ン 化 法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

イ オ ン 源 温 度 : 120 °C

デソルベーションガス : N₂ (800 L/h、350 °C)

キャピラリー電圧 : 2.0 kV

コ ー ン ガ ス : N₂ (50 L/h)

コ ー ン 電 圧 : 下表のとおり

コ リ ジ ョ ン ガ ス : Ar (0.2 mL/min)

コ リ ジ ョ ン エ ネ ル ギ ー : 下表のとおり

モ ニ タ ー イ オ ン : 下表のとおり

表 モニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン	コリジョン
	イオン	定量用	確認用	電圧	エネルギー
	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(V)	(eV)
ヒスタミン	112	95	—	20	15
		—	68	20	20

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のヒスタミン量を算出する。

注 1 Oasis WCX (Waters 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

2 試料溶液及び各ヒスタミン標準液を入れる液体クロマトグラフ用バイアルは、ヒスタミンが吸着されないポリプロピレン製等のものを用いる。

3 Triart Diol-HILIC (ワイエムシィ製、充てん剤は有機シリカハイブリッド基剤にジヒドロキシプロピル基を化学結合したもの。本測定条件例によるヒスタミンの保持時間は約 7.6 分) 又はこれと同等のもの

4 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 28 のとおり
- ・ 共同試験 別表 3 の 28 のとおり
- ・ 定量限界 (下限) 試料中 10 mg/kg (添加回収率及び相対標準偏差並びに SN 比)
- ・ 検出限界 試料中 3 mg/kg (相対標準偏差及び SN 比)

第 10 章 その他

1 過酸化物品

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

- 1) ヨウ化カリウム飽和溶液 ヨウ化カリウムを新たに煮沸して冷却した水に飽和させて調製する^{注1}。
- 2) 0.0167 mol/L ニクロム酸カリウム標準液^{注2} ニクロム酸カリウム (標準試薬) (メノウ乳ばちを用いて粉末とし、100~110 °C で 3~4 時間乾燥したもの) 4.903 g を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 0.0167 mol/L ニクロム酸カリウム標準液を調製する。
- 3) デンプン試液 デンプン (溶性) 1 g を少量の水で均一なペースト状にしたものを、熱水 100 mL にかき混ぜながら加え、更に穏やかに煮沸しながら透明になるまでかき混ぜた後放冷し、上澄み液を使用する。
- 4) 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液^{注2} チオ硫酸ナトリウム五水和物 25.0 g を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、新たに煮沸して冷却した水を加えて溶かし、更に標線まで新たに煮沸して冷却した水を加えて 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液を調製し、密栓して 5~6 日間静置した後、次により濃度を標定する。

ヨウ化カリウム溶液 (10 w/v%) 10 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸 5 mL を加えて軽く振り混ぜ、更に 0.0167 mol/L ニクロム酸カリウム標準液 25 mL を正確に加えて激しく振り混ぜた後 5 分間静置する。

新たに煮沸して冷却した水 100 mL で先の三角フラスコの器壁を洗浄し、軽く振り混ぜ、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液で滴定する (溶液の黄色がほとんど消失するまで滴定し、デンプン試液数滴を加えて徐々に滴定を続け、デンプンの青色が消えて溶液が緑色になったときを終点とする。)

同時に、0.0167 mol/L ニクロム酸カリウム標準液を加えない液について空試験を行い、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液の係数を算出する。

使用に際して、標準原液の一定量を新たに煮沸して冷却した水で正確に 10 倍希釈し、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液を調製する。

B 油脂試料の調製^{注3}

分析試料の一定量^{注4}を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ、分析試料の採取量に対し 1.5 倍容量の石油エーテルを加え、軽く振り混ぜた後、更に 2 時間振り混ぜて抽出する。

500 mL の三角フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙^{注5}で吸引ろ過した後、抽出液の入っていた共栓三角フラスコ及び残さを一定量の石油エーテル^{注6}で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 500 mL の分液漏斗に入れ、ろ液の 1/2 容量の水を加え、1 分間激しく振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を捨てる^{注7}。更にろ液の 1/2 容量の水を分液漏斗に加え、同様に 2 回操作する。石油エーテル層をあらかじめ脱脂綿を詰め硫酸ナトリウム (無水) 40 g 以上の適量を入れた漏斗で 500 mL のなす形

フラスコにろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送って石油エーテルを完全に除去し、油脂試料を得る。

C 定 量

油脂試料の一定量^{注 8,9}を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、酢酸-2,2,4-トリメチルペンタン (3+2) 35 mL を加えて油脂試料を溶かした^{注 10}後、窒素ガスを送って共栓三角フラスコ内の空気を十分に置換する。更にこの三角フラスコに窒素ガスを送りながらヨウ化カリウム飽和溶液 1 mL を正確に加え、直ちに栓をし 1 分間振り混ぜた後、暗所に 5 分間静置する。次に、先の三角フラスコに水 75 mL を加え、再び栓をして激しく振り混ぜた後、デンプン試液 1 mL を加え、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液により滴定する（デンプンによる青色が消失したときを終点とする。）。同時に、空試験を行い、デンプン試液で発色しないことを確認する。次式により過酸化物価を算出する。

$$\text{過酸化物価 (meq/kg)} = \frac{10 \times V \times f}{W}$$

V : 滴定に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の量 (mL)

f : 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

注 1 使用の都度調製する。

- 2 計量法に基づき値付けされた市販の容量分析用標準試薬を用いてもよい。
- 3 油脂試料の調製操作は遮光した状態で行う。
- 4 製品の粗脂肪の表示割合から推定し、得られる油脂試料量が 5 g（同時に酸価の測定を行う場合は 10 g）以上になるように分析試料を採取する。
- 5 GFP-95（桐山製作所製）又はこれと同等のもの。なお、セミドライ製品はろ紙（5種B）を使用することもできる。
- 6 最初の抽出時に分析試料に加えた量の 1/2 容量。
- 7 エマルジョンが発生した場合は、エマルジョンを含む水層部分を共栓遠心沈殿管に分取し、1,650×g で 5 分間遠心分離を行い、分離した石油エーテル層を分液漏斗に残った石油エーテル層に合わせる。
- 8 推定される過酸化物価に応じて以下の量を採取する。

推定過酸化物価 (meq/kg)	油脂試料採取量 (g)
10以下	5
10~50	5~1
50以上	1~0.5

9 油脂試料が固化した場合、軽く加温して溶かす。

10 油脂試料が溶けにくい場合、軽く加温して溶かす。

(参考) 分析法バリデーション

- ・繰返し精度 別表 3 の 24 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 24 のとおり

2 酸価

(適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
(ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルク)

A 試薬の調製

- 1) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液 水酸化ナトリウムの飽和溶液を調製し、栓をして 10 日間以上静置した後、上澄み液 50 mL に新たに煮沸して冷却した水を加えて 10 L とし、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

アミド硫酸(標準試薬)(デシケーター(減圧)中で 48 時間乾燥したもの) 2~2.5 g を正確に量って 250 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてアミド硫酸標準液を調製する。アミド硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、ブロモチモールブルー試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数 (f_1) を算出する。

$$f_1 = \frac{W \times 10^4}{V \times 97.10}$$

W : 標定に用いたアミド硫酸標準液 (25 mL) 中のアミド硫酸の重量 (g)

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

- 2) 0.05 mol/L 硫酸標準液 硫酸 28 mL を水 1 L にかき混ぜながら徐々に加え、放冷後、水を加えて 10 L として 0.05 mol/L 硫酸標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

0.05 mol/L 硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、メチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.05 mol/L 硫酸標準液の係数 (f_2) を算出する。

$$f_2 = \frac{V \times f_1}{25}$$

f_1 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

- 3) 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液^{注1} 水酸化カリウム 7 g を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、適量の水を加えて溶かし、更に標線までエタノールを加え、密栓して 5~6 日間静置する。この液の上澄みをろ紙 (5 種 A) でろ過して 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液を調製し、次により濃度を標定する。

0.05 mol/L 硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定して係数を算出する。

B 油脂試料の調製

1 の B による。

C 定 量

油脂試料の一定量^{注2,3}を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、ジエチルエーテ

ルーエタノール (2+1) 100 mL を加えて油脂試料を溶かした^{注4}後、フェノールフタレイン試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定する（溶液が微紅色となったとき（着色して 30 秒以内に消失するものであってはならない。）を終点とする。）。

同時に、空試験を行い、先の滴定結果を補正し、次式により酸価を算出する。

$$\text{酸価} = \frac{5.611 \times V \times f}{W}$$

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量 (mL)

f : 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

注 1 計量法に基づき値付けされた市販の容量分析用標準試薬を用いてもよい。
なお、その場合は 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液及び 0.05 mol/L 硫酸標準液の調製は不要である。

2 推定される酸価に応じて以下の量を採用する。

推定酸価	油脂試料採取量 (g)
1以下	20
1~4	10
4~15	2.5
15~75	0.5
75以上	0.1

3 油脂試料が固化した場合、軽く加温して溶かす。

4 油脂試料が溶けにくい場合、軽く加温して溶かす。

(参考) 分析法バリデーション

- ・繰返し精度 別表 3 の 25 のとおり
- ・共同試験 別表 3 の 25 のとおり

第 11 章 試験法の妥当性確認法

1 趣 旨

本章は、本検査法に収載しようとする試験法の妥当性を確認するための手順を示すものである。なお、本検査法以外の方法によって試験を実施しようとする各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順も本章に規定する確認法に準ずる^{注1}。

なお、本確認法は、機器分析法を対象とする。

注 1 ここに示す手順は、試験法の妥当性を確認する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできる。

2 用語の定義

本章において、用語の定義は次のとおりとする。

- (1) 「選択性」とは、試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象物を正確に測定する能力をいう。
- (2) 「真度」とは、十分多数の試験結果から得た平均値と承認された標準値との一致の程度をいう。
- (3) 「精度」とは、指定された条件下で繰り返された独立した試験結果間の一致の程度をいう。
- (4) 「併行精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用いて、同一の試験室で、同一の実施者が同一の装置を用いて、短時間のうちに独立した試験結果を得る条件（併行条件）による測定結果の精度をいう。
- (5) 「中間精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用い、同一の試験室で、独立した試験結果を得る条件（中間条件）による測定結果の精度をいう。
- (6) 「室間再現精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用い、異なる試験室で、異なる実施者が異なる装置を用いて独立した試験結果を得る条件（室間再現条件）による測定結果の精度をいう。
- (7) 「定量限界」とは、適切な精確さをもって定量できる分析対象物の最低量又は濃度（定量下限）をいう。本検査法に分析法が収載されていない成分を除き、原則として本検査法に示された定量限界を用いる。
- (8) 「検出限界」とは、試料に含まれる分析対象物（不検出であることが基準とされる物質を除く。）の検出可能な最低量又は濃度をいう。
- (9) 「枝分かれ実験計画」とは、ある因子の全ての水準が、他の全ての因子の一つの水準だけに現れる実験の計画をいう。
- (10) 「標準物質」とは、一つ以上の特性値が十分に均一で、適切に確定されている物質をいう。
- (11) 「認証標準物質」とは、一つ以上の特性値について計量学的に妥当な手順により値付けされ、特性値及びその不確かさ並びに計量学的トレーサビリティを記載した認証書付きの標準物質をいう。

3 確認の方法

本章 4 に規定する愛玩動物用飼料の種類及び濃度ごとに、妥当性を確認する試験法の分析対象である農薬等を添加し、測定結果から以下のパラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

(1) 選択性

分析対象である農薬等を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、

- i 定量限界が基準値の 1/3 以下の場合、そのピークの面積（又は高さ）が、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/10 未満、
 - ii 定量限界が基準値の 1/3 を超える場合は、定量限界濃度に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/3 未満
- であることを確認する（表 1 参照）。

表 1 定量限界及び基準値の比と妨害ピークの許容範囲

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 ≤ 基準値の 1/3	< 基準値ピークの 1/10
定量限界 > 基準値の 1/3	< 定量限界ピークの 1/3

(2) 真度

以下のいずれかにより真度を確認する。

- i 愛玩動物用飼料に似たマトリックスを持つ認証標準物質が利用できる成分及び認証標準物質は利用できないが標準物質が利用できる成分においては、その認証標準物質又は標準物質を試験法に従って繰り返し定量し、測定値の平均値と認証値（特性値）との差の絶対値が、測定値と認証値（特性値）との合成標準不確かさの 2 倍を超えないこと。
- ii 標準物質が利用できず、かつ、妥当性の確認された分析法（以下「標準分析法」という。）が別にある成分においては、同一濃度の分析対象である農薬等を添加した試料（以下「添加試料」という。）2 以上の n 個を試験法 (A) 及び標準分析法 (B) に従って 3 以上の p 回の中間条件で定量し、各測定値の平均値の差の絶対値が、下式により算出される s の 2 倍を超えないこと。

$$s = \sqrt{s_A^2 + s_B^2}$$

$$s_A^2 = \frac{s_{I_A}^2 - (1-1/n)s_{r_A}^2}{p}$$

$$s_B^2 = \frac{s_{I_B}^2 - (1-1/n)s_{r_B}^2}{p}$$

s_{r_A} : 試験法の併行標準偏差の推定値

s_{r_B} : 標準分析法の併行標準偏差の推定値

s_{I_A} : 試験法の中間標準偏差の推定値

s_{I_B} : 標準分析法の中間標準偏差の推定値

- iii 標準物質が利用できず、かつ、標準分析法のない成分においては、添加試料 5 個以上を試験法に従って定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比（回収率）を求める^{注1}。

回収率の目標値は表 2 のとおりとする。

- 注 1 サロゲート（回収率の変動の補正を目的として、分析試料に添加する安定同位体標識標準品）を使用した場合には、サロゲートの回収率が 40 %以上であることを確認する。ただし、サロゲート添加前の分析操作の回収率が分析値に影響を及ぼす可能性に留意すること。

(3) 精度

添加試料の分析を 5 回以上繰り返し、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度を評価する。併行精度の目標値は式 1 のとおりとし、表 2 にその例を示す。

また、共同試験により室間再現精度を評価する。共同試験が実施できない場合は、複数の分析者又は分析日による中間精度を評価する。

i 共同試験を実施する場合

有効データを得る試験室は 8 以上とし、5 種類以上の試料について、非明示の 2 点反復により分析を行う。

上記の条件が困難な場合は、試験室／試料／濃度の組み合わせとして 16 以上×2 反復の有効データを得ることとする。

なお、「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）等において、類似のマトリックスに対する同一の操作による分析法がある場合は、当該分析法の室間再現精度の確認を省略することができる。

室間再現精度の目標値は式 1 のとおりとし、表 2 にその例を示す。

ii 単一試験室内での中間精度により評価する場合

試行の回数は、併行点数 2 以上、かつ、5 日又は分析者数以上とする。この場合、中間精度評価のための枝分かれ実験により、併行精度と中間精度を同時に評価することが可能である。また、内部精度管理データを用いて評価することも可能である。

中間精度の目標値は式 1 のとおりとし、表 2 にその例を示す。

表 2 各濃度における回収率及び精度の目標値

濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%) ^注	中間精度 (RSD%) ^注	室間再現精度 (RSD%) ^注
0.001 ≤ ~ < 0.01	40 ~ 120	22	28	44
0.01 ≤ ~ < 0.1	60 ~ 115	22	28	44
0.1 ≤ ~ < 1	80 ~ 110	22	28	44
1 ≤ ~ < 10	80 ~ 110	16	20	32
10 ≤ ~ < 100	80 ~ 110	11	14	22
100 ≤ ~ < 1,000	90 ~ 107	8	10	16

注 回収率及び精度の目標値は、分析対象物質の濃度が左欄に示す範囲における最小値の場合の例。

式 1 併行精度、中間精度及び室間再現精度の目標値

$$\text{併行精度 (RSD}_r\%) \leq \text{PRSD}_R$$

$$\text{中間精度 (RSD}_I\%) \leq \frac{5}{4} \text{PRSD}_R$$

$$\text{室間再現精度 (RSD}_R\%) \leq 2\text{PRSD}_R$$

$$\left(\begin{array}{l} C : \text{分析対象物質の質量 分率} \\ \text{PRSD}_R(\%) = \begin{cases} C^{-0.5} & C > 0.138 \\ 2C^{-0.1505} & 1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138 \\ 22 & C < 1.2 \times 10^{-7} \end{cases} \end{array} \right)$$

(4) 定量限界及び検出限界（不検出であることが基準とされる物質を除く。）

添加回収試験を実施し、以下の条件に該当する濃度を定量限界とする。

- i 定量限界濃度を添加したブランク試料を繰返し分析したときの分析値の標準偏差の 10 倍。
- ii クロマトグラフィーによる分析では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークが、 $S/N \geq 10$ であること。

また、同様に以下の条件に該当する濃度を検出限界とする。

- i 定量限界濃度を添加したブランク試料を n 回分析したときの分析値の標準偏差に Student の t -値（片側、有意水準 0.05、自由度 $n-1$ ）を乗じた値の 2 倍。
- ii クロマトグラフィーによる分析では、得られるピークが、 $S/N \geq 3$ となる濃度。

基準値の定められた分析対象物質に係る定量限界及び検出限界の目標値は表 3 のとおりである。

表 3 基準値に対する定量限界及び検出限界の目標値

基準値	定量限界の目標値	検出限界の目標値
0.1 mg/kg 以上	(ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルクに対して) 基準値の 1/5 以下	(ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルクに対して) 基準値の 1/10 以下
	(ウェット製品（水分含有量 10 %に換算したもの）に対して) 基準値の 1/2 以下	(ウェット製品（水分含有量 10 %に換算したもの）に対して) 基準値の 1/3 以下

0.1 mg/kg 未満	(ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルクに対して) 基準値の 2/5 以下	(ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルクに対して) 基準値の 1/5 以下
	(ウェット製品 (水分含有量 10 %に換算したもの) に対して) 基準値以下	(ウェット製品 (水分含有量 10 %に換算したもの) に対して) 基準値の 1/2 以下

4 添加を行う愛玩動物用飼料の種類及び添加濃度

(1) 添加を行う愛玩動物用飼料の種類

添加を行う愛玩動物用飼料は、原則試験法を適用しようとする愛玩動物用飼料から選択する。複数の原料の混合物である愛玩動物用飼料について、あらゆるマトリックスを対象として評価するのは不可能であるので、第 1 章の 1 で定めた愛玩動物用飼料の分類ごとに代表的なマトリックスからなるものを選択する。

(2) 添加濃度に関する留意事項 (表 4 参照)

i 農薬等の添加濃度は分析試料原物中濃度で設計することとし、原則として 2 種類の濃度とする。

ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルクにあっては、一方を「基準値又は基準値の 1/2 の濃度」とし、他方を「定量限界濃度 (又はその 2 倍)」とする。

ウェット製品にあっては、一方を「基準値の 1/3 ~ 1/5 の濃度」とし、他方を「定量限界濃度 (又はその 2 倍)」とする。ただし、定量限界濃度とは、表 3 と同様、当該試料について水分含有量 10 %に換算した濃度である。

基準値と定量限界が等しい場合には、添加濃度は「定量限界濃度」の 1 種類の濃度とする。

ii 2 種類の濃度における評価が困難な場合は、「基準値又は基準値の 1/2 の濃度」による評価を優先して実施する。

ただし、多成分分析法において、各農薬等の基準値が異なるために基準値濃度の添加が困難な場合にあっては、「各農薬等の基準値に近い一定の濃度」としてもよい。

表 4 定量限界及び基準値の関係比と添加濃度

定量限界と基準値の関係	添加濃度
定量限界 < 基準値	(ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)、菓子類及び粉ミルクに対して) 「基準値又は基準値の 1/2 の濃度」及び 「定量限界濃度 (又はその 2 倍)」 (ウェット製品に対して) 「基準値の 1/3 ~ 1/5 の濃度」及び 「定量限界濃度 (又はその 2 倍)」
定量限界 = 基準値	定量限界

(3) 添加試料の作製等に当たっての留意事項

- i 添加試料の作製に当たっては変敗のない試料を使用し、均質化してひょう量した後に農薬等を添加する。添加する農薬等の標準溶液の量はできるだけ少量にとどめ 1~2 mL 程度とする。溶媒は試料と混合する又は容易に揮散する溶媒を用いる。農薬等の添加後よく混合し、ウェット製品については 30 分程度静置した後、それ以外の試料については一夜静置し、溶媒を揮散させた後に抽出操作を行う。ただし、化学的に不安定な農薬等にあつてはこの限りでない。

また、酸化防止剤等の添加成分にあつては、特に指定のない限り、添加後直ちに抽出操作を行うこと。

- ii 枝分かれ実験等、数日間にわたり試験を行う場合にあつては、均質化した試料を冷凍保存し、凍結及び融解を繰り返すことを避け、試験を実施する日毎に添加試料を作成すること。