第 7 章　有害物質

1　PCB [注 1,2]

1.1　ガスクロマトグラフ法

(1)　飼料

A　　試薬の調製

1)　十塩素化ビフェニル標準液　　十塩素化ビフェニル〔$C_{12}Cl_{10}$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、ベンゼンを加えて溶かし、更に標線までベンゼンを加えて十塩素化ビフェニル標準原液を調製する（この液 1 mL は、十塩素化ビフェニルとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をベンゼンで正確に希釈し、1 mL 中に十塩素化ビフェニルとして 0.05~0.5 μg を含有する数点の十塩素化ビフェニル標準液を調製する。

2)　ケイ酸マグネシウム　　合成ケイ酸マグネシウム（粒径 149~250 μm（100~60 メッシュ））[注 3] を 130 °C で 3 時間乾燥する。

3)　シリカゲル　　カラムクロマトグラフ用シリカゲル（粒径 44~149 μm（325~100 メッシュ））[注 4] を 130 °C で 3 時間乾燥し、3 v/w%相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

4)　ケイソウ土　　ケイソウ土[注 5] 200 g（199.5~200.4 g）を 5 L のビーカーに入れ、塩酸（1+1）3 L を加えてかき混ぜた後、一夜静置し、ガラスろ過器（G3）を用いてろ過し、温水で洗浄し、更にエタノール、酢酸エチル及びヘキサンそれぞれ 2 L で順次洗浄した後、風乾する。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 10~50 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、ブレンダーカップに入れ、アセトニトリル－水（13+7）350 mL を加え、5 分間かき混ぜて抽出し、ガラスろ過器（G2）を用いてろ過する。

ろ液の一部（V_1）を 1 L の分液漏斗に入れ、ヘキサン 100 mL を加え、2 分間振り混ぜる。更に分液漏斗に塩化ナトリウム飽和溶液 10 mL 及び水 600 mL を加え、30 秒間振り混ぜた後静置する。水層（下層）を捨て、残留液を水 100 mL ずつで 3 回洗浄し、ヘキサン層（上層）を共栓メスシリンダーに入れ、液量（V_2）を測定した後、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I　　ケイ酸マグネシウム 25 g（24.5~25.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）8 g（7.5~8.5 g）をカラム管（内径 22 mm）に順次乾式で充てんした後、ヘキサンを入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液（V_2）をカラムに入れ、試料溶液の入っていたメスシリンダーを少量のヘキサンで洗浄し、洗液をカラムに加え、流速 5 mL/min で液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサン－ジエチルエーテル

（47+3）200 mL をカラムに加えて PCB を溶出させ、溶出液を 50 °C 以下の水浴で約 5 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　　ケイソウ土 5 g（4.5~5.5 g）及びシリカゲル 20 g（19.5~20.5 g）をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管（内径 22 mm）に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

500 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを少量のヘキサンで洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更にヘキサン 250 mL をカラムに加えて PCB を流出させ、流出液を 50 °C 以下の水浴で 5 mL 以下まで減圧濃縮し、ヘキサンを加えて正確に 5 mL とし、十塩素化ビフェニルの合成に供する試料溶液とする。

十塩素化ビフェニルの合成　　試料溶液 1~2 mL を反応管に正確に入れ、クロロホルム数滴を加え、80 °C 以上の水浴中で約 0.1 mL まで濃縮し、更にクロロホルム 2 mL ずつで同様に 2 回操作した後、反応管に塩化アンチモン（V）[注6] 0.2 mL を加えて密封し、165~175 °C で一夜加熱した後放冷し、反応管を開封する。

反応管に塩酸（1+1）1~3 滴を加え、更に塩酸（1+1）1 mL を加えて残留物を溶かす。この液を 30 mL の分液漏斗 A に入れ、先の反応管を塩酸（1+1）5 mL 及びヘキサン 15 mL で順次洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせて振り混ぜた後静置する。塩酸層（下層）を 30 mL の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン 15 mL を加えて振り混ぜた後静置し、塩酸層を 30 mL の分液漏斗 C に入れ、ヘキサン 15 mL を加えて振り混ぜる。分液漏斗 A、B 及び C のヘキサン層（上層）を 100 mL の分液漏斗に合わせ、水 20 mL ずつで 2 回、炭酸水素ナトリウム溶液（10 w/v%）20 mL で 1 回、水 20 mL ずつで 2 回洗浄する。

300 mL のなす形フラスコをカラム（内径 22 mm、硫酸ナトリウム（無水）60 g（59.9~60.1 g）を乾式で充てんしたもの）の下に置く。先の 100 mL の分液漏斗内のヘキサン層をカラムに入れ、十塩素化ビフェニルを流出させた後、分液漏斗を少量のヘキサンで洗浄し、洗液をカラムに加え、更にヘキサン 100 mL をカラムに加えて同様に流出させる。流出液にメタノール数滴を加え、50 °C 以下の水浴で 5 mL 以下まで減圧濃縮し、ヘキサンを加えて正確に 5 mL とし、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　　試料溶液及び各十塩素化ビフェニル標準液各一部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 用 管：ガラス製（内径 3 mm、長さ 2 m）

カラム充てん剤：ジメチルポリシロキサン（1 %）[注7]/酸処理・シラン化処理ガスクロマトグラフィー用ケイソウ土（粒径 149~177 μm（100~80 メッシュ））[注8]

キャリヤーガス：N_2（80~120 mL/min）

カ ラ ム 槽 温 度：210 °C

試料導入部温度：230 °C

検 出 器 温 度：250 °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 PCB 量を算出する。

$$試料中の\ PCB\ 量（mg/kg）= \frac{A \times 5 \times 10^3}{W \times B \times V} \times 0.6$$

A　：検量線から求めた十塩化ビフェニルの質量（μg）

B　：十塩素化ビフェニルの合成に用いた液量（mL）/5

V　：ガスクロマトグラフに注入した液量（μL）

W　：$W_0 \times \frac{V_1}{350} \times \frac{V_2}{100}$

W_0：分析に用いた試料の質量（g）

V_1：液々抽出に用いた液量（mL）

V_2：ヘキサン抽出液量（mL）

注 1　溶媒は、PCB 試験用試薬又はこれと同等のものを用いる。

2　本法において使用されるベンゼンについて、労働安全上の観点からトルエンを使用することが望ましいが、その場合、別紙 2 の妥当性確認法ガイドラインの 4 の(2)及び(3)に則り分析を行い、単一試験室における真度及び精度の目標値を満たすことを確認した上で使用すること。

3　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

4　Silicic Acid AR 2847（Mallinckrodt 製（販売終了））又はこれと同等のもの

5　Celite 545（Celite Corporation 製）又はこれと同等のもの

6　PCB 測定用（富士フイルム和光純薬製）又はこれと同等のもの

7　Silicone OV-101（Ohio Valley Specialty Chemical 製）又はこれと同等のもの

8　Chromosorb W-AW-DMCS（Celite Corporation 製）又はこれと同等のもの

(2)　油脂

A　試薬の調製

(1)の A による。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の分液漏斗に入れ、ヘキサン 15 mL を加えて溶かし、更にヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 1 分間振り混ぜた後静置する。アセトニトリル層（下層）をあらかじめ水 650 mL、塩化ナトリウム飽和溶液 40 mL 及びヘキサン 100 mL を入れた 1 L の分液漏斗 A に加える。

ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつを残留液に加えて同様に 2 回操作し、各アセトニトリル層を分液漏斗 A に合わせて振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 1 L の分液漏斗 B に入れる。ヘキサン 100 mL を分液漏斗 B に加えて振り混ぜ

た後静置し、分液漏斗 A 及び B のヘキサン層を（上層）300 mL の分液漏斗 C に合わせ、水 100 mL ずつで 2 回洗浄する。ヘキサン層を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I　(1)の B のカラム処理 I の項による。

カラム処理 II　(1)の B のカラム処理 II の項による。

十塩素化ビフェニルの合成　(1)の B の十塩素化ビフェニルの合成の項による。

ガスクロマトグラフィー　(1)の B のガスクロマトグラフィーの項による。

計　算　(1)の B の計算の項による。ただし、W は分析に用いた試料の質量（g）とする。

(3)　フィッシュソリュブル

A　試薬の調製

(1)の A による。

B　定　量

抽　出　分析試料 100 g（水分量 V_3（mL））を 0.1 g の桁まで量り、その数値を記録し、ブレンダーカップに入れ、アセトニトリル 200 mL を加え、2 分間かき混ぜて抽出し、ガラスろ過器（G2）を用いてろ過する。

ろ液の一部（V_4）を 1 L の分液漏斗に入れ、ヘキサン 100 mL を加え、2 分間振り混ぜる。更に分液漏斗に塩化ナトリウム飽和溶液 10 mL 及び水 600 mL を加え、30 秒間振り混ぜた後静置する。水層（下層）を捨て、ヘキサン層（上層）を水 100 mL ずつで 3 回洗浄する。ヘキサン層を共栓メスシリンダーに入れ、液量（V_2）を測定した後、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I　(1)の B のカラム処理 I の項による。

カラム処理 II　(1)の B のカラム処理 II の項による。

十塩素化ビフェニルの合成　(1)の B の十塩素化ビフェニルの合成の項による。

ガスクロマトグラフィー　(1)の B のガスクロマトグラフィーの項による。

計　算　(1)の B の計算の項による。ただし、$V_1/350$ とあるのは $V_4/(200+V_3)$ と読み替えるものとする。

2　ゴシポール

2.1　液体クロマトグラフ法[注1]

A　試薬の調製

ゴシポール標準液　ゴシポール〔$C_{30}H_{30}O_8$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてゴシポール標準原液を調製する（この液 1 mL はゴシポールとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をアセトン－水－酢酸（9+9+2）で正確に希釈し、1 mL 中にゴシポールとして 0.05~20 μg を含有する数点のゴシポール標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料[注2] 5.0 g（綿実は 1.0 g）を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL（綿実は 300 mL）の褐色共栓三角フラスコに入れ、酢酸－水－リン酸（85+15+1）100 mL（綿実は 200 mL）を加え、三角フラスコに栓をし、又は三角フラスコの口をアルミ箔で覆い、沸騰水浴中で 20 分間加熱して抽出する[注3]。抽出液を振り混ぜた後水冷し、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 10 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－水（1+1）を加えた後、室温で 20 分間静置する。この液を 5,000×*g* で 5 分間遠心分離した後、更に上澄み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　　試料溶液及び各ゴシポール標準液各 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：254 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：メタノール－水（9+1）の pH をリン酸で 2.6 に調整したもの
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、試料中のゴシポール量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。
2　綿実が配合されている飼料は粉砕により綿実が偏るため、約 100 g の試料を目開き 1 mm の網ふるいを通過するように粉砕した後、ミルサー（ミクロナイザー装着）（岩谷産業製又はこれと同等のもの）を用いて混合する。
3　三角フラスコに栓をした場合は、加熱時に栓が飛ばないように固定する。
4　Shodex C18 M 4E（レゾナック製）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

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）（測定値（mg/kg））	繰返し精度 RSD_r（%）
乳用牛飼育用配合飼料	58	3	90.9	2.8
	580	3	95.5	1.6
肉用牛肥育用配合飼料	58	3	95.7	2.2
	580	3	96.7	2.7
綿実	自然含有	3	(5,490)	1.6
	1,000	3	105	0.9
	5,000	3	90.8	3.0

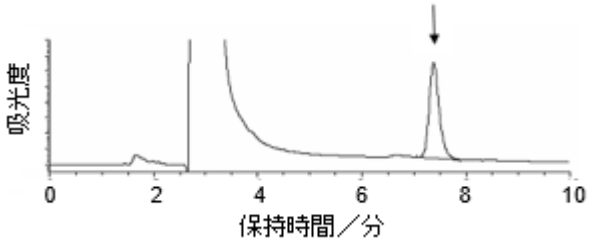
・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率（%）（測定値(mg/kg)）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
乳用牛飼育用配合飼料	8	0	305	87.0	2.7	5.5	0.80
綿実	8	0	自然含有	（6,090）	3.3	4.4	1.0

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　5 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　2 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液（ゴシポールとして 20 ng 注入）のクロマトグラム

3 シアヌル酸

3.1　液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法

（適用範囲：飼料）

A　試薬の調製

1) シアヌル酸標準原液　シアヌル酸〔$C_3H_3N_3O_3$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし[注1]、更に標線まで水を加えてシアヌル酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、シアヌル酸として 500 µg を含有する。）。

2) シアヌル酸-$^{13}C_3$ 内標準原液　安定同位体標識シアヌル酸（シアヌル酸-$^{13}C_3$）5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし[注1]、更に標線まで水を加えてシアヌル酸-$^{13}C_3$ 内標準原液を調製する（この液 1 mL は、シアヌル酸-$^{13}C_3$ として 250 µg を含有する。）。

3) 検量線作成用シアヌル酸標準液[注2]　使用に際して、シアヌル酸標準原液及びシアヌル酸-$^{13}C_3$ 内標準液の一部をギ酸－アセトニトリル（1+24）で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸として 2.5~200 ng を含有し、かつシアヌル酸-$^{13}C_3$ として 10 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。

4) シアヌル酸-$^{13}C_3$ 内標準液[注2]　使用に際して、シアヌル酸-$^{13}C_3$ 内標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸-$^{13}C_3$ として 4 µg を含有する内標準液を調製する。

5) 溶離液

A 液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 5 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とする。

B 液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL にアセトニトリル－水（1+1）を加えて 1 L とする。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 10 mL を加えた後、15 分間超音波処理する。この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え、更にシアヌル酸-$^{13}C_3$内標準液 250 μL を正確に加えた後、ホモジナイザー[注3]で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。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　　強塩基性陰イオン交換体ミニカラム[注4]をアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア水（5+23）5 mL で順次洗浄する。試料溶液 2 mL をあらかじめアンモニア水（5+23）3 mL を入れたミニカラムに加え混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更にアンモニア水（5+23）5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後、全量を流出[注5]させる。10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き、ギ酸－アセトニトリル（1+24）2 mL をミニカラムに加えてシアヌル酸を溶出させた後、全量を溶出[注5]させ混合する。

溶出液を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 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 5 μm）[注6]

ガードカラム：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 20 mm、粒径 5 μm）[注7]

溶離液：A 液－B 液（19+1）（8 min 保持）→2 min→（2+3）（10 min 保持）→2 min→（19+1）（5 min 保持）

流速：0.3 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注8]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（負イオンモード）

ネブライザーガス：N_2（3 L/min）

乾燥ガス：N_2（15 L/min）

ヒートブロック温度：300 °C

DL 温度：250 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

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　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン (*m*/*z*)	プロダクトイオン 定量用 (*m*/*z*)	プロダクトイオン 確認用 (*m*/*z*)	コリジョンエネルギー (eV)
シアヌル酸	128	42	-	17
		-	85	10
シアヌル酸-$^{13}C_3$	131	43	-	16
		-	87	11

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸-$^{13}C_3$ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のシアヌル酸量を算出する。

注 1　十分に溶けない場合は、一夜静置又は超音波処理により溶解する。

2　保存した各標準原液を使用する場合は、超音波処理をした後に使用する。

3　POLYTRON PT20SK（KINEMATICA 製）又はこれと同等のもの

4　Oasis MAX（Waters 製、充てん剤量 150 mg、粒径 60 µm、リザーバー容量 6 mL）又はこれと同等のもの

5　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。

6　SeQuant ZIC-HILIC（Merck Millipore 製、充填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。）又はこれと同等のもの

7　SeQuant ZIC-HILIC Guard（Merck Millipore 製）又はこれと同等のもの

8　LCMS-8040（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

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.5	5	99.0	7.2
	2.5	5	98.9	1.7
ぶり類育成用配合飼料	0.5	5	93.3	2.5
	2.5	5	95.3	1.0
魚粉	0.5	5	98.1	16
	2.5	5	96.2	2.5
大豆油かす	0.5	5	89.9	5.8
	2.5	5	94.4	1.0
脱脂粉乳	0.5	5	107	9.6
	2.5	5	100	4.8

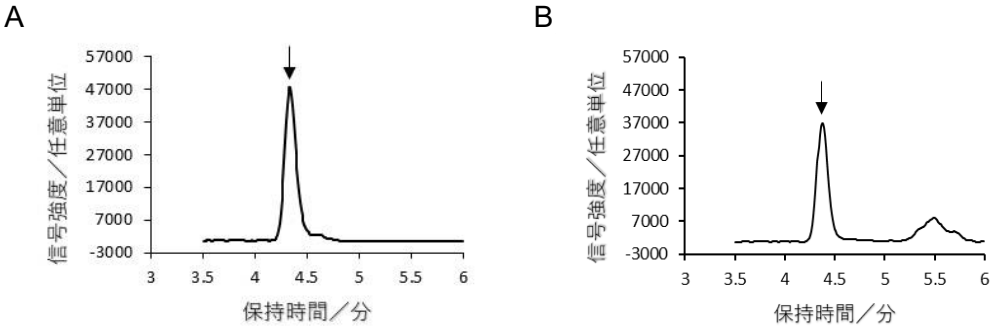
・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
ブロイラー肥育後期用配合飼料	11	0	2.5	99.5	4.1	6.7	0.49
ほ乳期子豚育成用配合飼料	10	1	2	101	5.5	6.4	0.45
ぶり類育成用配合飼料	11	0	1.5	95.9	2.1	6.4	0.43
大豆油かす	11	0	1	97.5	4.8	8.9	0.57
魚粉	11	0	5	99.4	1.9	4.0	0.32
脱脂粉乳	10	1	3	100	3.1	8.7	0.66

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　0.5 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　0.2 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（シアヌル酸として 25 ng/mL）

B：添加試料（魚粉にシアヌル酸として 2.5 mg/kg 相当量添加）

4　シアン化水素

4.1　吸光光度法

（適用範囲：キャッサバ）

A　試薬の調製

1)　0.1 mol/L 硝酸銀標準液　　硝酸銀 17 g を量って 1,000 mL の褐色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 0.1 mol/L 硝酸銀標準液を調製し、次によりその濃度を標定する。この標準液は、褐色瓶に保存する。

塩化ナトリウム（標準試薬）（白金るつぼ中で 500~650 °C で 40~50 分間加熱したもの）1.461 g を量り、その数値を記録し、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る。この液 25 mL を三角フラスコに正確に入れ、水 25 mL 及びデキストリン水和物溶液（2 w/v%）5 mL を加える。更にウラニン溶液（0.2 w/v%）数滴を加え、0.1 mol/L 硝酸銀標準液で黄緑の蛍光が消えて微紅色となったときを終点として滴定し、0.1 mol/L 硝酸銀標準液の濃度を標定する。

塩化ナトリウム 0.1461 g は 0.1 mol/L 硝酸銀標準原液 25 mL に相当する。

2)　*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液　　*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン約 20 mg をアセトンに溶かして 100 mL とする。

3)　シアン化物イオン標準原液　　シアン化カリウム 0.626 g を量って 250 mL の全量フラスコに入れ、少量の水を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液（0.5 mol/L）

2.5 mL を加え、更に標線まで水を加えてシアン化物イオン標準原液を調製し、以下によりその濃度を標定する。

標準原液 100 mL を 200 mL のトールビーカーに正確に入れ、*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液 0.5 mL を加える。この液を 0.1 mol/L 硝酸銀溶液で滴定し、溶液の色が黄色から赤になったときを終点として、次式によりシアン化物イオン標準液の濃度 C（mg CN^-/mL）を算出する。

$$C = \frac{a \times f \times 5.204}{100}$$

C ：シアン化物イオン標準液（mg CN^-/mL）

a ：滴定に要した 0.1 mol/L 硝酸銀溶液（mL）

f ：0.1 mol/L 硝酸銀溶液の係数

4) シアン化物イオン標準液　　シアン化物イオン標準原液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに正確に入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.5 mol/L）25 mL を加え、更に標線まで水を加える。この液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加えて 1 mL 中にシアン化物イオンとして 1 μg を含有するシアン化物イオン標準液を調製する[注1]。

5) クエン酸緩衝液　　クエン酸一水和物 128.1 g（128.05~128.14 g）及び水酸化ナトリウム 64.4 g（64.35~64.44 g）を水に溶かして 1,000 mL とする。使用に際して、この液の一部を水で 10 倍に希釈し、その pH をクエン酸溶液（2 w/v%）及び水酸化ナトリウム溶液（2 w/v%）で 5.9 に調整する。

6) リン酸緩衝液　　リン酸二水素カリウム 3.40 g（3.395~3.404 g）及びリン酸水素二ナトリウム 3.55 g（3.545~3.554 g）を水に溶かして 1,000 mL とする。

7) クロラミン T 溶液　　*p*-トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物 0.62 g（0.615~0.624 g）を水に溶かして 50 mL とする（使用時に調製する。）。

8) ピリジン・ピラゾロン溶液　　3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン 0.25 g（0.245~0.254 g）を 75 °C の温水 100 mL に溶かして[注2]室温まで冷却した後、この液にビス（3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン）約 20 mg をピリジン 20 mL に溶かした液を加える（使用時に調製する。）。

B　試料溶液の調製

分析試料 10~15 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL ケルダールフラスコに入れ、クエン酸緩衝液 100 mL を加えこの容器を密栓した後、25~30 °C で約 4 時間静置する[注3]。このフラスコをあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（0.5 mol/L）25 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液の液量が 100 mL に達するまで蒸留する[注4]。この留出液にフェノールフタレイン試液（0.5 w/v%）1 滴を加え、酢酸（1+8）で中和した後、水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて試料溶液とする。

試料溶液 5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水 5 mL を加えた後、更にリン酸緩衝液 10 mL 及びクロラミン T 溶液 0.25 mL を加え、直ちにこの容器を密栓して穏やかに混和した後 5 分間静置する。この液にピリジン・ピラゾロン溶液 15 mL を加え、更に全量フラスコの標線まで水を加え、この容器を密栓して穏やかに振り混ぜ

た後、25~30 °C で約 50 分間静置する。この液について、波長 620 nm の吸光度を、水 10 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、以下試料溶液と同様に操作した液を対照液として測定する。

同時にシアン化物イオン標準液（1 μg CN^-/mL）0.5~9 mL の間の数点をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水を加えて 10 mL とする。以下試料溶液と同様に操作した後、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定する。得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のシアン化物イオン量を算出し、この値に 1.03 を乗じて試料中のシアン化水素量を算出する。

注 1　使用時に調製する。この標準液の係数は、標準原液で求めたものを用いる。
2　完全に溶けなくても差し支えない。
3　恒温槽等を使用し温度が一定に保たれるようにする。
4　留出速度を 2~3 mL/min 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

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
キャッサバ	0.5	3	90.0	9.3
（自然汚染濃度約3 mg/kg）	4	3	79.0	15

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	測定値（mg/kg）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
キャッサバ1	8	0	3.18	8.0	15	1.1
キャッサバ2	7	1	8.15	8.0	9.6	0.82

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　2 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　0.7 mg/kg

4.2　硝酸銀滴定法

（適用範囲：キャッサバ）

A　試薬の調製

1)　0.01 mol/L 硝酸銀標準液　3.1 の A の 1)により 0.1 mol/L 硝酸銀標準原液を調製し、その濃度を標定する。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に 10 倍に希釈し、0.01 mol/L 硝酸銀標準液を調製する。

2)　*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液　*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン約 20 mg をアセトンに溶かして 100 mL とする。

B　定　量

分析試料 10~15 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の丸底フラスコに入れ、水 200 mL を加えこの容器を密栓した後、25~30 °C で 2 時間以上静置する。この丸底フラスコをあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）20 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が 200 mL に達するまで留出させる。

留出液に *p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液 0.5 mL を加え、0.01 mol/L

硝酸銀標準液で滴定し、次式により試料中のシアン化水素〔HCN〕量を算出する。

$$試料中のシアン化水素量（mg/kg）=\frac{V\times f\times 0.54}{W}\times 10^3$$

V ：滴定に要した 0.01 mol/L 硝酸銀標準液の量（mL）

f ：0.01 mol/L 硝酸銀標準液の係数

W ：分析に用いた試料の質量（g）

5　トリブチルスズ化合物

5.1　ガスクロマトグラフ法[注 1, 2]

A　試薬の調製

1) 塩化トリブチルスズ標準液　　塩化トリブチルスズ〔$C_{12}H_{27}ClSn$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、酢酸エチル 5 mL を加えて溶かし、更に標線までヘキサンを加えて塩化トリブチルスズ標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩化トリブチルスズとして 1 mg を含有する。）。

　使用に際して、標準原液の一部をヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に塩化トリブチルスズとして 0.125~2.0 µg を含有する数点の塩化トリブチルスズ標準液を調製する。

2) 抽出溶媒　　メタノールー酢酸エチルー塩酸（11+10+1）

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。200 mL の三角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抽出溶媒 30 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、ろ液を液液分配に供する試料溶液とする。

液液分配　　試料溶液をあらかじめ塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL 及び酢酸エチルーヘキサン（3+2）50 mL を入れた 500 mL の分液漏斗 A に加え、5 分間激しく振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 500 mL の分液漏斗 B に入れる。酢酸エチルーヘキサン（3+2）50 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜた後静置し、酢酸エチルーヘキサン層（上層）を先の分液漏斗 A に合わせ、更に分液漏斗 A にヘキサン 150 mL を加えて穏やかに振り混ぜた後 30 分間静置し、酢酸エチルーヘキサン層（上層）を 500 mL の共栓三角フラスコに入れる。酢酸エチルーヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、500 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過する。先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサンで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。

　ろ液を 40 °C 以下の水浴で 3 mL 程度まで減圧濃縮した後、濃縮液にヘキサン 10 mL を加え、同様に減圧濃縮し、濃縮液から酢酸臭がなくなるまで同様に減圧濃縮を繰り返した後、窒素ガスを送って乾固する。

　エタノール 10 mL を残留物に加えて溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理　　あらかじめ水酸化ナトリウム溶液（0.2 mol/L）10 mL、蒸留水 20 mL

及びエタノール 20 mL で洗浄した陰イオン交換ミニカラム（1 g）[注3]の下にあらかじめ塩酸（1 mol/L）20 mL、蒸留水 20 mL 及びエタノール 20 mL で洗浄した陽イオン交換ミニカラム（1 g）[注4]を連結する。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流速 1 mL/min で流出させる。試料溶液が入っていたなす形フラスコを少量のエタノールで洗浄した後、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させ、更にエタノール 20 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。

陰イオン交換ミニカラムをはずし、100 mL の分液漏斗 C を陽イオン交換ミニカラムの下に置く。メタノール－塩酸（11+1）15 mL を陽イオン交換ミニカラムに加えて塩化トリブチルスズを溶出させる。

分液漏斗 C に水 30 mL 及びヘキサン－シクロヘキサン[注5]（1+1）5 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 100 mL の分液漏斗 D に入れ、ヘキサン－シクロヘキサン層（上層）を 50 mL の共栓三角フラスコに入れる。

分液漏斗 D にヘキサン－シクロヘキサン（1+1）5 mL を加え、同様に操作し、水層（下層）を捨て、ヘキサン－シクロヘキサン層（上層）を先の共栓三角フラスコに合わせる。ヘキサン－シクロヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、50 mL のなし形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した後、先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサン－シクロヘキサン（1+1）で洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で 1 mL 程度まで減圧濃縮した後、濃縮液を 50 mL の共栓試験管に入れ、先のなし形フラスコを少量のヘキサン－シクロヘキサン（1+1）で洗浄し、洗液を濃縮液に合わせ、これをプロピル化反応に供する試料溶液とする。

プロピル化反応　試料溶液に窒素ガスを送って 1 mL 以下に濃縮し、*n*-プロピルマグネシウムブロミド液 2 mL を加えて振り混ぜた後、40 °C の水浴中で 30 分間静置し、更に氷水で 10 分間冷却する。この液に硫酸（1+19）10 mL を少量ずつ加え、過剰の *n*-プロピルマグネシウムブロミドを分解する。

この液に水 20 mL、メタノール 7 mL 及びヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後、溶液全量を 100 mL の分液漏斗 E に入れる。先の試験管を少量のヘキサンで洗浄し、洗液を分液漏斗 E に合わせて 5 分間振り混ぜた後静置する。水層（下層）を 100 mL の分液漏斗 F に入れ、ヘキサン層（上層）を 50 mL の共栓三角フラスコに入れる。分液漏斗 F にヘキサン 10 mL を加えて 5 分間振り混ぜた後、ヘキサン層（上層）を先の共栓三角フラスコに合わせる。ヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、50 mL のなし形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した後、先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサンで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。ろ液を 40 °C 以下の水浴で 1 mL 程度まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って更に濃縮[注6]した後 2 mL の全量フラスコに入れる。先のなし形フラスコを少量のヘキサンで洗浄し、洗液を先の全量フラスコに合わせ、更に標線までヘキサンを加えて、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

標準液のプロピル化　各塩化トリブチルスズ標準液 1 mL をそれぞれ 50 mL の共栓試験管に正確に入れ、以下プロピル化反応の項と同一条件でプロピル化し、ガスク

ロマトグラフィーに供する各標準液とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び各標準液 2 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（スズ検出用フィルター）

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 0.32 mm、長さ 30 m、膜圧 0.25 μm）注 7

キャリヤーガス：He（1.0 mL/min）

メイクアップガス：N_2（32 mL/min）

燃　料　ガ　ス：H_2（75 mL/min）

助　燃　ガ　ス：乾燥空気（100 mL/min）

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料注入部温度：240 °C

カラム槽温度：80 °C（2 min 保持）→ 昇温 10 °C/min→ 200 °C→ 昇温 30 °C/min→ 230 °C（10 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ピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のトリブチルスズ化合物を塩化物量として算出する。

注 1　メタノール、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール及び硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬試験用試薬を用いる。

2　塩酸及び硫酸は精密分析用を用いる。

3　Bond Elut SAX（6 mL 容量、Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

4　Bond Elut SCX（6 mL 容量、Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

5　シクロヘキサン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。

6　乾固ロスがあるため乾固させない。

7　DB-5（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

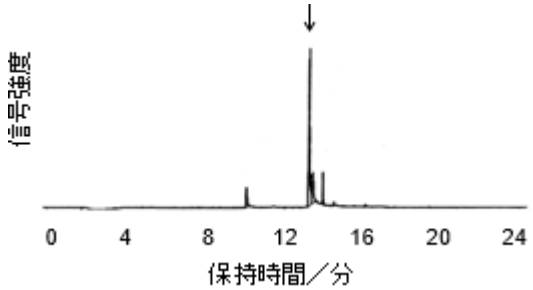
試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
成鶏飼育用配合飼料	0.05	3	93.9	4.3
	0.5	3	93.5	1.7
ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.05	3	101	7.1
	0.5	3	104	6.1
肉用牛肥育用配合飼料	0.05	3	95.3	5.2
	0.5	3	90.2	9.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
ほ乳期子豚育成用配合飼料	6	0	0.05	90.7	8.9	12	0.53

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　0.005 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料に塩化トリブチルスズとして 0.05 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

6　ヒスタミン

6.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法

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〔$C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$〕82.8 mg を量り、その数値を記録し、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、更に標線まで水－メタノール（1+1）を加えてヒスタミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ヒスタミンとしてヒスタミン二塩酸塩採取量（mg）に 0.01208 を乗じた量（mg）を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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、その液の一部を 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]）

検出器：四重極型質量分析計

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：N_2（103 kPa）

乾燥ガス：N_2（6 L/min、300 °C）

キャピラリー電圧：0.9 kV

フラグメンター電圧：100 V

コリジョンガス：N_2（1 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 ヒスタミンの測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン 定量用 (m/z)	プロダクトイオン 確認用 (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
ヒスタミン	112	95	－	12
		－	68	22

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。）又はこれと同等のもの

4 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

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
種鶏飼育用配合飼料	10	5	103	1.5
	50	5	92.5	2.0
種豚飼育用配合飼料	10	5	103	1.2
	50	5	96.0	0.8
海産魚育成用配合飼料	250	5	106	1.2
	500	5	108	0.5
国内調整魚粉	100	5	101	1.5
	500	5	97.3	1.0
輸入魚粉	10	5	99.9	1.9
	50	5	100	0.8

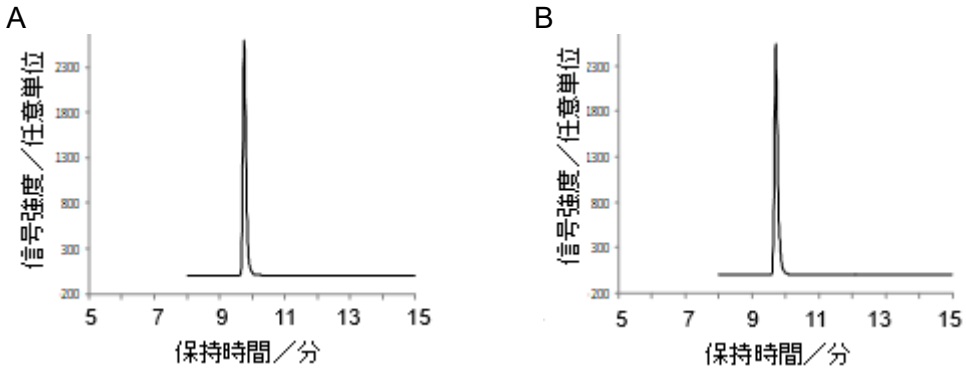
・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）（測定値(mg/kg)）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
種鶏飼育用配合飼料	11	0	50	90.5	2.8	7.7	0.85
			ブランク値0.738				
ます類育成用配合飼料	11	0	自然汚染	（267）	2.2	9.3	1.3
輸入魚粉	11	0	20	88.6	6.8	13	1.3

・定量下限 （単一試験室による確認） 試料中 10 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 3 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（ヒスタミンとして 25 ng/mL）

B：添加試料（輸入魚粉にヒスタミンとして 50 mg/kg 相当量添加）

7 3,4-ベンツピレン[注 1,2]

7.1 蛍光光度法

（適用範囲：トルラ酵母等の飼料用酵母）

A 試薬の調製

1) 3,4-ベンツピレン標準液 3,4-ベンツピレン〔$C_{20}H_{12}$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、ベンゼンを加えて溶かし、更に標線までベンゼンを加えて 3,4-ベンツピレン標準原液を調製する（この液 1 mL は、3,4-ベンツピレンとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をベンゼンで正確に希釈し、1 mL 中に 3,4-ベン

ツピレンとして 5~30 ng を含有する数点の 3,4-ベンツピレン標準液を調製する。

2) アルミナ　　カラムクロマトグラフ用アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））[注3]を 5 倍量の塩酸（1 mol/L）で洗浄し、更に水で洗浄した後、110 °C で 2~3 時間乾燥し、1 v/w%相当量の水を加えて混和する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 100 g を 0.1 g の桁まで量り、その数値を記録し、円筒ろ紙[注4]（直径 45 mm、高さ 150 mm）に入れ、大型ソックスレー抽出器を用い、ベンゼン 500 mL で 8 時間抽出した後、この抽出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。

残留物をシクロヘキサン 100 mL で 300 mL の分液漏斗 A に移し、ジメチルスルホキシド 100 mL を加えて振り混ぜた後静置し、ジメチルスルホキシド層（下層）を 300 mL の分液漏斗 B に入れる。

分液漏斗 B にシクロヘキサン 100 mL を加えて同様に操作し、ジメチルスルホキシド層を 2 L の分液漏斗 C に移す。

分液漏斗 A にジメチルスルホキシド 100 mL を加え、同様に 2 回操作し、各ジメチルスルホキシド層を分液漏斗 C に加える。

ジメチルスルホキシド層に冷却した塩酸（1+4）300 mL を加え、更にシクロヘキサン 400 mL を加えて振り混ぜた後、ジメチルスルホキシドー塩酸層（下層）を 1 L の分液漏斗 D に入れ、シクロヘキサン層（上層）を温水 500 mL で 2 回洗浄し、2 L のなす形フラスコに入れる。

分液漏斗 D にシクロヘキサン 400 mL を加えて振り混ぜた後、ジメチルスルホキシドー塩酸層（下層）を捨て、シクロヘキサン層を温水 500 mL で 2 回洗浄する。シクロヘキサン層を先のなす形フラスコに加え、シクロヘキサン層を 40 °C 以下の水浴で約 30 mL まで減圧濃縮する。濃縮液を硫酸ナトリウム（無水）約 5 g で脱水し、100 mL のなし形フラスコにあらかじめ脱脂綿を詰めた漏斗でろ過する。先のなす形フラスコ及び脱脂綿をシクロヘキサンで洗浄し、洗液を先の漏斗を通してろ液を合わせる。ろ液を 40 °C の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理　　アルミナ 50 g（49.5~50.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）15 g（14.5~15.5 g）をカラム管（内径 20 mm）に順次乾式で充てんし、カラムを調製する。

300 mL のなし形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなし形フラスコを少量のシクロヘキサンで洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。

ヘキサンージエチルエーテル（1+1）100 mL 及びジエチルエーテル 100 mL を順次カラムに加えて 3,4-ベンツピレンを溶出させ、溶出液を 30 °C 以下の水浴で約 0.5 mL まで減圧濃縮して二層一次元薄層クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

二層一次元薄層クロマトグラフィー　　アセチル化セルロース[注5]及び中性アルミナ[注6]の二層薄層板を作成する。

試料溶液全量をマイクロシリンジでアルミナ薄層板上に帯状に塗布し、同時に、

3,4-ベンツピレンの分離位置を確認するための 3,4-ベンツピレン標準液を塗布する。

エタノールージエチルエーテルー水（4+4+1）を展開溶媒として90分間、二層境界より 10 cm の高さまで展開した後風乾する。紫外線（365 nm）を薄層板に照射してアセチル化セルロース薄層上に分離した 3,4-ベンツピレンの蛍光帯を確認し、この部分をかきとって 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れる。この遠心沈殿管に 60 °C のメタノール 25 mL を加え、1,500×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 100 mL のなし形フラスコに入れる。

60 °C のメタノール 25 mL ずつを先の遠心沈殿管に加え、同様に 3 回操作し、上澄み液を先のなし形フラスコに合わせる。上澄み液に *n*-ヘキサデカン 1 mL を加え、この液を 60 °C 以下の水浴で約 1~2 mL まで減圧濃縮した後、ベンゼンで 5 mL 又は 10 mL の全量フラスコに移す。更に全量フラスコの標線までベンゼンを加えて測定に供する試料溶液とする。

測　　定

1) 同　　定　　試料溶液及び 3,4-ベンツピレン標準液について蛍光スペクトル及び励起スペクトルを測定し、ピーク波長及び蛍光強度を比較することにより同定を行う。

2) 定　　量　　試料溶液について、励起波長を 368 nm に設定し、405 nm 付近の蛍光スペクトルを測定する。

同時に、各 3,4-ベンツピレン標準液各一部について、同一条件で蛍光スペクトルを測定し、ナローベースライン法[注7]を用いて検量線を作成し、試料中の 3,4-ベンツピレン量を算出する。

注 1　溶媒は、無蛍光試薬又はこれと同等のものを用いる。

2　本法において使用されるベンゼンについて、労働安全上の観点からトルエンを使用することが望ましいが、その場合、別紙 2 の妥当性確認法ガイドラインの 4 の(2)及び(3)に則り分析を行い、単一試験室における真度及び精度の目標値を満たすことを確認した上で使用すること。

3　Aluminium oxide 90 standardized Art.1097（Merck 製）又はこれと同等のもの

4　No. 84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの

5　薄層クロマトグラフ用アセチルセルロース（富士フイルム和光純薬製）又はこれと同等のもの

6　結合剤として硫酸カルシウム 9 %を含むもの。Aluminium oxide 60 G neutral (type E) Art.1090（Merck 製）又はこれと同等のもの

7　蛍光スペクトルのピーク波長及びピーク波長±3.5 nm における蛍光強度をそれぞれ I_0、$I_{+3.5}$ 及び $I_{-3.5}$ とし、次の式から求まる F により、検量線の作成及び試料溶液の定量を行う。

$$F = I_0 - \frac{\left(I_{+3.5} + I_{-3.5}\right)}{2}$$

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（μg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
飼料用酵母	0.5	5	95.2	16
	1	5	98.7	9.6

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　0.1 μg/kg

8　メラミン

8.1　液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法

A　試薬の調製

1)　メラミン標準原液　メラミン〔$C_3H_6N_6$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリル－水（1+1）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　安定同位体標識メラミン（メラミン-$^{13}C_3{}^{15}N_3$）標準原液（濃度 100 μg/mL）[注1] 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-$^{13}C_3{}^{15}N_3$ 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部をアセトニトリル－ジエチルアミン（49+1）で正確に希釈し、1 mL 中にメラミンとして 1~200 ng を含有し、かつメラミン-$^{13}C_3{}^{15}N_3$ 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。

B　定　　量

抽　　出

1)　脱脂粉乳　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 10 mL を加えた後、15 分間超音波処理する。この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え、更に内標準液 500 μL を正確に加えた後、ホモジナイザー[注2]で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。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。

2)　その他の飼料　分析試料 1.0 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、アセトニトリル－水（1+1）20 mL を加える。更にこの遠心沈殿管に内標準液 500 μL を正確に加えた後、ホモジナイザー[注2]で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。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　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（150 mg）[注3]をアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸（1+24）5 mL で順次洗浄する。試料溶液 2 mL をあらかじめぎ酸（1+24）3 mL を入れたミニカラムに加え

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[注4]して全量を流出させる。10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き、アセトニトリル－ジエチルアミン（49+1）4 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後、圧注[注4]して全量を溶出させ混合する。

溶出液を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 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 5 μm）[注5]

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6]）

検出器：四重極型質量分析計

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：N_2（340 kPa）

乾燥ガス：N_2（10 L/min、350 °C）

キャピラリー電圧：4 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　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン 定量用（m/z）	プロダクトイオン 確認用（m/z）	フラグメンター電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
メラミン	127	68	85	100	33
メラミン-$^{13}C_3{}^{15}N_3$	133	89	－	100	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-$^{13}C_3{}^{15}N_3$ 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　Cambrige Isotope Laboratories Inc.製水溶液又はこれと同等のもの

2　HG-200（Hsiangtai 製）又はこれと同等のもの

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

4　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。

5　SeQuant ZIC-HILIC（MERCK 製、充填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）又はこれと同等のもの

6　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

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
成鶏飼育用配合飼料	0.2	3	115	1.1
	2.5	3	93.0	0.9
肉豚肥育用配合飼料	0.2	3	112	3.0
	2.5	3	95.6	3.1
大豆油かす	0.2	3	117	3.6
	2.5	3	98.0	0.6
魚粉	0.2	3	112	2.6
	2.5	3	99.5	1.4
脱脂粉乳	0.2	3	109	2.9
	2.5	3	96.3	2.9

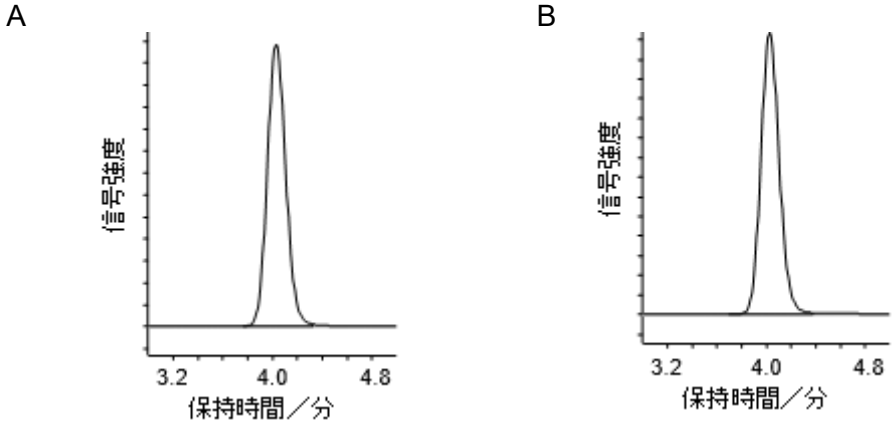
・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
成鶏飼育用配合飼料	9	0	0.4	97.1	4.2	6.3	0.34
魚粉	9	0	1	97.8	3.9	7.0	0.44
脱脂粉乳	9	0	1	99.3	4.7	6.4	0.40

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　0.2 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　0.06 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（メラミンとして 10 ng/mL）

B：添加試料（成鶏飼育用配合飼料にメラミンとして 2.5 mg/kg 相当量添加）