

(別紙)

○ 飼料分析基準（令和 5 年 12 月 1 日付け 5 消安第 4714 号農林水産省消費・安全局長通知）一部改正新旧対照表

(下線部は改正箇所)

改 正 後	改 正 前
目 次 第 1 章～第 4 章 （略） 第 5 章 かび毒 第 1 節・第 2 節 （略） 第 3 節 多成分分析法 1～9 （略） <u>10 フモニシン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</u> <u>11～13</u> （略） 第 6 章 農薬 第 1 節 各条 1～7 （略） 8 <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u> 9～276 （略） 第 2 節 （略） 第 3 節 多成分同時分析法 1～7 （略） 8 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢 酸</u> のガスクロマトグラフによる同時分析法 9～35 （略）	目 次 第 1 章～第 4 章 （略） 第 5 章 かび毒 第 1 節・第 2 節 （略） 第 3 節 多成分分析法 1～9 （略） （新設） <u>10～12</u> （略） 第 6 章 農薬 第 1 節 各条 1～7 （略） 8 <u>2,4,5-T</u> 9～276 （略） 第 2 節 （略） 第 3 節 多成分同時分析法 1～7 （略） 8 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-T</u> のガスクロマトグラフに よる同時分析法 9～35 （略）

第 7 章 有害物質 第 1 節 各条 1~6 (略) <u>7 ペルフルオロオクタン酸 (PFOA)</u> <u>8 ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)</u> <u>9 ペルフルオロノナン酸 (PFNA)</u> <u>10 ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)</u> <u>11・12</u> (略) 第 2 節 多成分分析法 1 <u>ペルフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> 第 8 章 合成抗菌物質等 第 1 節・第 2 節 (略) 第 9 章～第 19 章 (略) 第 20 章 その他 第 1 節 成分規格の定められた飼料及び飼料添加物 1 <u>3-ニトロオキシプロパノール</u> <u>2~4</u> (略) 第 2 節・第 3 節 (略) 別紙 1~3 (略) 第 5 章 かび毒	第 7 章 有害物質 (新設) 1~6 (略) (新設) (新設) (新設) (新設) <u>7・8</u> (略) (新設) 第 8 章 合成抗菌物質 第 1 節・第 2 節 (略) 第 9 章～第 19 章 (略) 第 20 章 その他 第 1 節 成分規格の定められた飼料及び飼料添加物 (新設) <u>1~3</u> (略) 第 2 節・第 3 節 (略) 別紙 1~3 (略) 第 5 章 かび毒
--	--

第 1 節 かび毒各条 1~21 (略) 22 フモニシン B₁ 22.1 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 (適用範囲：<u>配合飼料、穀類及び植物性副産物</u>) 第 3 節 9 による。 <u>22.2 フモニシン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</u> (適用範囲：<u>サイレージ</u>) <u>第 3 節 10 による。</u> 22.3 フモニシン B₁ 及び B₂ の液体クロマトグラフによる同時分析法 (適用範囲：配合飼料及びとうもろこし) <u>第 3 節 11</u> による。 23 フモニシン B₂ 23.1 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 (適用範囲：<u>配合飼料、穀類及び植物性副産物</u>) 第 3 節 9 による。 <u>23.2 フモニシン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</u> (適用範囲：<u>サイレージ</u>) <u>第 3 節 10 による。</u>	第 1 節 かび毒各条 1~21 (略) 22 フモニシン B₁ 22.1 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 (適用範囲：<u>飼料</u>) 第 3 節 9 による。 (新設) 22.2 フモニシン B₁ 及び B₂ の液体クロマトグラフによる同時分析法 (適用範囲：配合飼料及びとうもろこし) <u>第 3 節 10</u> による。 23 フモニシン B₂ 23.1 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 (適用範囲：<u>飼料</u>) 第 3 節 9 による。 (新設)
---	---

<u>23.3</u> フモニシン B₁ 及び B₂ の液体クロマトグラフによる同時分析法 (適用範囲：配合飼料及びとうもろこし) <u>第 3 節 11</u> による。 24 フモニシン B₃ 24.1 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 (適用範囲：<u>配合飼料、穀類及び植物性副産物</u>) 第 3 節 9 による。 <u>24.2 フモニシン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</u> (適用範囲：<u>サイレージ</u>) <u>第 3 節 10</u> による。 25・26 (略) 第 2 節 (略) 第 3 節 多成分分析法 1~8 (略) 9 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 <u>配合飼料、穀類及び植物性副産物^{注 1}</u> (3) 分析法 A (略) B 定 量 抽 出 分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を	<u>23.2</u> フモニシン B₁ 及び B₂ の液体クロマトグラフによる同時分析法 (適用範囲：配合飼料及びとうもろこし) <u>第 3 節 10</u> による。 24 フモニシン B₃ 24.1 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 (適用範囲：<u>飼料</u>) 第 3 節 9 による。 (新設) 25・26 (略) 第 2 節 (略) 第 3 節 多成分分析法 1~8 (略) 9 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 <u>飼料</u> (3) 分析法 A (略) B 定 量 抽 出 分析試料 20 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、メタノール－水（3+1）100 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×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 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）^{注2}をメタノール 8 mL 及びメタノール－水（3+1）8 mL で順次洗浄する。

試料溶液 10 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た後、メタノール－水（3+1）8 mL 及びメタノール 8 mL を順次カートリッジに加え、同様に流出させる。

50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール－酢酸（99+1）14 mL をミニカラムに加えてフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 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 試料溶液及び各混合標準液 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

（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：0.1 %ギ酸溶液－アセトニトリル（3+1）→ 5 min→（1+1）（3 min

記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール－水（3+1）100 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×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 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）^{注1}をメタノール 8 mL 及びメタノール－水（3+1）8 mL で順次洗浄する。

試料溶液 10 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た後、メタノール－水（3+1）8 mL 及びメタノール 8 mL を順次カートリッジに加え、同様に流出させる。

50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール－酢酸（99+1）14 mL をミニカラムに加えてフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 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 試料溶液及び各混合標準液 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

（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2}

溶 離 液：0.1 %ギ酸溶液－アセトニトリル（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 (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) フラグメンター電圧 : 220 V ネブライザーガス : N₂ (340 kPa) 乾 燥 ガ ス : N₂ (10 L/min、350 °C) キャピラリー電圧 : 3,000 V モニターイオン : m/z 722 (フモニシン B₁)、706 (フモニシン B₂ 及び B₃) 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高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 量を算出する。 注 1 <u>植物性副産物の一部で真度、精度等の低下が見られる場合があるため、必要に応じて別紙 2 に定めるところにより妥当性を確認すること。</u> 2 Bond Elut LRC SAX (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの 3 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの 4 Agilent 1100 MSD SL (Agilent Technologies 製) による条件例 (参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) 10 <u>フモニシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による</u>	保持) → 2 min → (3+1) 流 速 : 0.2 mL/min カラム槽温度 : 40 °C (質量分析計部^{注3)}) 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) フラグメンター電圧 : 220 V ネブライザーガス : N₂ (340 kPa) 乾 燥 ガ ス : N₂ (10 L/min、350 °C) キャピラリー電圧 : 3,000 V モニターイオン : m/z 722 (フモニシン B₁)、706 (フモニシン B₂ 及び B₃) 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高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 量を算出する。 注 1 (新設) Bond Elut LRC SAX (Agilent Technologies 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 Agilent 1100 MSD SL (Agilent Technologies 製) による条件例 (参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) (新設)
---	--

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 サイレージ

(3) 分析法

A 試薬の調製

フモニシン B₁ 標準原液 フモニシン B₁ [C₃₄H₅₉NO₁₅] 5 mg を
0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、10 mL の全量フラ
スコに入れ、アセトニトリルー水 (1+1) を加えて溶かし、
更に標線までアセトニトリルー水 (1+1) を加えてフモニシン
B₁ 標準原液を調製する (この液 1 mL は、フモニシン B₁ とし
て 500 µg を含有する。) 。

フモニシン B₂ 標準原液 フモニシン B₂ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 5 mg を
0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、25 mL の全量フラ
スコに入れ、アセトニトリルー水 (1+1) を加えて溶かし、
更に標線までアセトニトリルー水 (1+1) を加えてフモニシン
B₂ 標準原液を調製する (この液 1 mL は、フモニシン B₂ とし
て 200 µg を含有する。) 。

フモニシン B₃ 標準原液 フモニシン B₃ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 1 mg を
0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、10 mL の全量フラ
スコに入れ、アセトニトリルー水 (1+1) を加えて溶かし、
更に標線までアセトニトリルー水 (1+1) を加えてフモニシン
B₃ 標準原液を調製する (この液 1 mL は、フモニシン B₃ とし
て 100 µg を含有する。) 。

フモニシン混合標準原液 フモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 各標準原
液の一部を混合し、アセトニトリルー水 (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 10
µg を含有するフモニシン混合標準原液を調製する。

使用に際して、フモニシン混合標準原液の一部をアセトニ
トリルー水 (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0.5~500 ngを含有する数点のフモニシン混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の共栓三角フラスコに入れ、水-アセトニトリル-メタノール (2+1+1) 200 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (5 種 A) を用いてろ過し、ろ液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) ^{注1} をメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液 1 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た後、水 5 mL で 2 回洗浄する。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ギ酸-メタノール (1+49) 5 mL をミニカラムに加えてフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 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) 2 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 0.45 µm) 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 試料溶液及び各混合標準液 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 3 µm) ^{注2}

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 (7+3) → 15
min→ (1+9) (5 min 保持) → 2
min→ (7+3) (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3})

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 : N₂ (3 L/min)

乾 燥 ガ ス : N₂ (15 L/min)

インターフェイス温度 : 350 °C

ヒートブロック温度 : 500 °C

D L 温 度 : 150 °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 フモニシンの測定条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コリジョン
	イオン (<i>m/z</i>)	定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	エネルギー (eV)
フモニシンB ₁	722	334	⋮	47
		⋮	352	40
フモニシンB ₂	706	336	⋮	39
		⋮	318	42
フモニシンB ₃	706	336	⋮	38
		⋮	354	34

計 算 得られた選択反応検出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、試料中のフモニシンB₁、B₂及びB₃量を算出する。

注 1 Oasis MAX (Waters 製) 又はこれと同等のもの

2 InertSustain C18 メタルフリーPEEK カラム (ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの

3 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

添加成分名	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 (%)
フモニシンB ₁	稲発酵粗飼料1	0.022	5	82.4	8.6
		3.111	5	92.5	3.2
	稲発酵粗飼料2	0.022	5	94.2	4.0
		3.111	5	95.1	2.6
	とうもろこしサイレージ1	自然汚染	5	(0.454)	1.6
		3.111	5	92.4	3.8
	とうもろこしサイレージ2	自然汚染	5	(0.382)	3.9
		3.111	5	90.2	1.6
フモニシンB ₂	稲発酵粗飼料1	0.022	5	91.3	5.4
		3.111	5	97.5	1.6
	稲発酵粗飼料2	0.022	5	99.0	5.1
		3.111	5	98.0	2.5
	とうもろこしサイレージ1	自然汚染	5	(0.148)	3.0
		3.111	5	97.7	1.5
	とうもろこしサイレージ2	自然汚染	5	(0.103)	0.73
		3.111	5	90.8	2.3
フモニシンB ₃	稲発酵粗飼料1	0.022	5	93.3	5.3
		3.111	5	90.2	3.6
	稲発酵粗飼料2	0.022	5	92.9	5.5
		3.111	5	92.7	2.0
	とうもろこしサイレージ1	自然汚染	5	(0.059)	2.5
		3.111	5	91.8	3.8
	とうもろこしサイレージ2	自然汚染	5	(0.031)	4.3

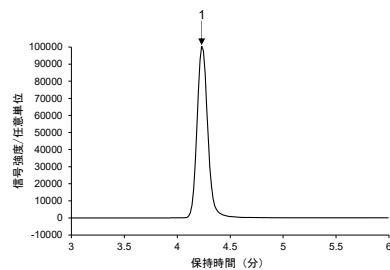
・ 共同試験

成分名	試料の種類	有効試 験車数	棄却試 験車数	添加濃度 ^注 (mg/kg)	測定値 (mg/kg) (回収率 (%))	室内検出精度 RSD _i (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
フモニンB _i	縮醛粗飼料1	11	0	3.46+自然汚染	3.54	6.1	13	1.0
	縮醛粗飼料2	11	0	0.0774+自然汚染	0.0850	5.6	18	0.81
	縮醛粗飼料3	11	0	0.0387+自然汚染	0.0496	7.7	16	0.72
	とうもろこしサイレージ1	11	0	7.74+自然汚染	7.89	9.9	14	1.2
	とうもろこしサイレージ2	11	0	5.96+自然汚染	6.17	8.3	13	1.1
	とうもろこしサイレージ3	11	0	自然汚染	1.06	7.0	10	0.66
フモニンB _s	縮醛粗飼料1	11	0	1.40+自然汚染	1.48	4.8	9.9	0.65
	縮醛粗飼料2	11	0	0.0826+自然汚染	0.0880	7.4	12	0.57
	縮醛粗飼料3	11	0	0.0413+自然汚染	0.0464	6.5	14	0.62
	とうもろこしサイレージ1	9	2	3.30+自然汚染	3.65	8.5	8.5	0.65
	とうもろこしサイレージ2	10	1	2.48+自然汚染	2.75	3.5	8.1	0.59
	とうもろこしサイレージ3	10	1	自然汚染	0.219	4.8	5.8	0.29
フモニンB _h	縮醛粗飼料1	11	0	0.391+自然汚染	0.405	7.7	16	0.89
	縮醛粗飼料2	11	0	0.0867+自然汚染	0.0828	4.8	11	0.50
	縮醛粗飼料3	11	0	0.0434	(101)	7.0	11	0.51
	とうもろこしサイレージ1	9	2	0.867+自然汚染	0.917	7.6	12	0.76
	とうもろこしサイレージ2	11	0	0.607+自然汚染	0.650	7.2	16	0.95
	とうもろこしサイレージ3	11	0	自然汚染	0.133	5.9	13	0.59

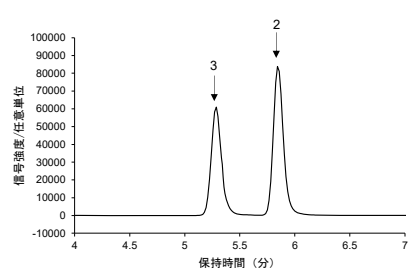
注 1 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

- ・ 定量下限（共同試験による確認） 試料（風乾物）中 各
0.05 mg/kg
- ・ 検出下限（単一試験室による確認） 試料（風乾物）中
各 0.02 mg/kg
（参考）クロマトグラム例

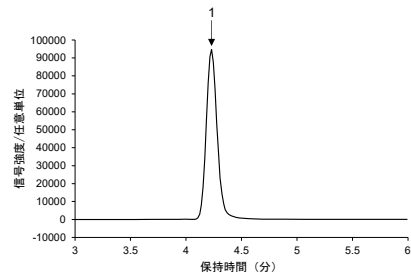
A



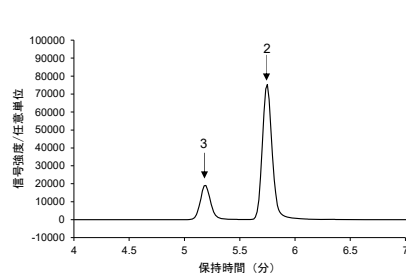
B



C



D



標準液及び添加試料のクロマトグラム

(矢印は 1 : フモニシン B₁、2 : フモニシン B₂、3 : フモニシン B₃の保持時間を示す。)

A : 標準液 (フモニシン B₁として 400 ng/mL)

B : 標準液 (フモニシン B₂及び B₃として各 100 ng/mL)

C、D : 添加試料 (とうもろこしサイレージにフモニシン B₁として 3.111 mg/kg 相当量、フモニシン B₂として 1.111 mg/kg 相当量及びフモニシン B₃として 0.267 mg/kg 相当量添加)

11~13 (略)

第 4 節 (略)

10~12 (略)

第 4 節 (略)

第6章 農薬

第1節 各条

1 (略)

2 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

2.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法 (その1) ^{注1}
(適用範囲: 穀類)

A・B (略)

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

第6章 農薬

第1節 各条

1 (略)

2 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

2.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法 (その1) ^{注1}
(適用範囲: 穀類)

A・B (略)

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロフェ ノキシ酢酸	<u>えん麦</u>	<u>0.05</u>	<u>3</u>	<u>84.8</u>	<u>4.7</u>
		<u>0.5</u>	<u>3</u>	<u>93.6</u>	<u>1.9</u>
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>89.4</u>	<u>1.4</u>
	<u>大麦</u>	<u>0.01</u>	<u>5</u>	<u>100</u>	<u>7.2</u>
		<u>0.05</u>	<u>3</u>	<u>84.8</u>	<u>4.7</u>
		<u>0.5</u>	<u>3</u>	<u>93.6</u>	<u>1.9</u>
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>87.1</u>	<u>1.3</u>
	小麦	0.05	3	90.2	1.7
		0.5	3	86.0	5.0
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>89.0</u>	<u>6.3</u>
	とうもろこし	0.01	3	91.3	5.7
		0.05	3	78.7	2.9
	<u>マイロ</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>91.8</u>	<u>2.8</u>
	ライ麦	0.05	3	84.8	4.7
		0.5	3	93.6	1.9
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>91.1</u>	<u>2.2</u>
2,4-ジクロロフェ ノキシ酢酸エチ ル	<u>えん麦</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>84.2</u>	<u>3.0</u>
		<u>0.01</u>	<u>5</u>	<u>89.2</u>	<u>8.4</u>
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>93.0</u>	<u>3.2</u>
	小麦	0.05	3	94.7	1.9
		0.5	3	91.3	1.8
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>82.5</u>	<u>2.3</u>
	とうもろこし	0.01	3	103	2.7
		0.05	3	84.0	2.4
	<u>マイロ</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>81.2</u>	<u>2.1</u>
	ライ麦	0.05	3	96.2	1.7
		0.5	3	92.1	6.8
		<u>2</u>	<u>5</u>	<u>85.1</u>	<u>3.2</u>

- ・ 共同試験 (略)
 - ・ 定量下限 (単一試験室による確認) (略)
 - ・ 検出下限 (単一試験室による確認) (略)
- (参考) クロマトグラム例 (略)

2.2 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法 (その2) ^{注1} (適用範囲: 乾牧草)

A・B (略)

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロフェ ノキシ酢酸	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	小麦	0.05	3	90.2	1.7
		0.5	3	86.0	5.0
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	とうもろこし	0.01	3	91.3	5.7
		0.05	3	78.7	2.9
	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	ライ麦	0.05	3	84.8	4.7
		0.5	3	93.6	1.9
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
2,4-ジクロロフェ ノキシ酢酸エチ ル	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	小麦	0.05	3	94.7	1.9
		0.5	3	91.3	1.8
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	とうもろこし	0.01	3	103	2.7
		0.05	3	84.0	2.4
	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
	ライ麦	0.05	3	96.2	1.7
		0.5	3	92.1	6.8
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)

- ・ 共同試験 (略)
 - ・ 定量下限 (単一試験室による確認) (略)
 - ・ 検出下限 (単一試験室による確認) (略)
- (参考) クロマトグラム例 (略)

2.2 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法 (その2) ^{注1} (適用範囲: 乾牧草)

A・B (略)

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロ フェノキシ酢酸	チモシーヘイ	10	3	98.2	0.4
		260	3	105	4.2
	ライグラスヘイ	5	3	98.6	4.8
		10	3	91.7	4.0
		260	3	93.1	1.9
	ウィートストロー	5	5	96.8	7.3
2,4-ジクロロ フェノキシ酢酸 エチル	チモシーヘイ	10	3	96.2	5.0
		260	3	94.9	2.6
	ライグラスヘイ	10	3	94.7	5.0
		260	3	90.0	5.7
	ウィートストロー	5	5	81.5	8.3
		400	5	81.4	2.7

・共同試験 (略)

・定量下限 (単一試験室による確認) (略)

・検出下限 (単一試験室による確認) (略)

(参考) クロマトグラム例 (略)

2.3 (略)

3~7 (略)

8 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸

8.1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 のガスクロマトグラフによる同時分析法

第3節8による。

9~163 (略)

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロ フェノキシ酢酸	チモシーヘイ	10	3	98.2	0.4
		260	3	105	4.2
	ライグラスヘイ	5	3	98.6	4.8
		10	3	91.7	4.0
		260	3	93.1	1.9
	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
2,4-ジクロロ フェノキシ酢酸 エチル	チモシーヘイ	10	3	96.2	5.0
		260	3	94.9	2.6
	ライグラスヘイ	10	3	94.7	5.0
		260	3	90.0	5.7
	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
		(新設)	(新設)	(新設)	(新設)

・共同試験 (略)

・定量下限 (単一試験室による確認) (略)

・検出下限 (単一試験室による確認) (略)

(参考) クロマトグラム例 (略)

2.3 (略)

3~7 (略)

8 2,4,5-T

8.1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T のガスクロマトグラフによる同時分析法

第3節8による。

9~163 (略)

164 パラコート

164.1 (略)

164.2 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法

(適用範囲：配合飼料、穀類及び乾牧草)

A 試薬の調製

パラコート標準液 パラコート $[C_{12}H_{14}N_2Cl_2]$ 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL のポリプロピレン製全量フラスコに入れ、塩酸 (0.01 mol/L) を加えて溶かし、更に標線まで塩酸 (0.01 mol/L) を加えてパラコート標準原液を調製する (この液 1 mL は、パラコートとして 0.5 mg を含有する。)。更に標準原液の一部を塩酸 (0.01 mol/L) で正確に希釈しパラコート標準液を調製する (この液 1 mL は、パラコートとして 20 μ g を含有する。)。

B 定 量^{注1}

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、300 mL のなす形フラスコに入れ、水 60 mL 及び硫酸 30 mL を加え、空冷管を付け 120 °C の油浴で 60 分間加熱還流して抽出する。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、放冷後の抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先のなす形フラスコ及び残さを順次水 100 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水を加える。この液 2 mL (乾牧草は、更に硫酸 (3 mol/L) で正確に 25 倍希釈した後、その液 2 mL) をポリプロピレン製ビーカーに正確に入れ、水 30 mL を加え、水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) で pH 5.5~6.5 に調整した後、50 mL 程度となるように水を加え、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} 4 級アンモニウム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^{注3} 及びスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカ

164 パラコート

164.1 (略)

(新設)

ラム^{注4}をそれぞれメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。4 級アンモニウム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の下に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を連結し、試料溶液を連結ミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次連結ミニカラムに加え、同様に流出させる。4 級アンモニウム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をはずし、10 mL ポリプロピレン製全量フラスコをスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下に置き、塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）9 mL をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに加え、パラコートを溶出させる。更に標線まで塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）を加え、酸化処理に供する試料溶液とする。

酸化処理 試料溶液 2 mL をあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに正確に加えて均一になるよう振り混ぜ、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II ^{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を^{注5}アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。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出させる。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 10 mL ずつで 2 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。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えてパラコートを溶出させる。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-メタノール（4+1）1 mL（麦類を除く穀類は2 mL、乾牧草は4 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 0.45 μm 以下）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とする。

標準液の酸化処理及びカラム処理 II パラコート標準液 1 mL
を 20 mL のポリプロピレン製全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて酸化用パラコート標準液を調製する（この液 1 mL は、パラコートとしてそれぞれ 1 μg を含有する。）。塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）2 mL に酸化用パラコート標準液 0.1 mL を正確に加えたものを、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに加える。以下、試料溶液の場合と同様に酸化処理及びカラム処理 II を行い、水-メタノール（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にパラコートとして 0.1~20 ng 相当量の間の数点を含有するパラコート標準液を調製する。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各パラコート標準液各 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 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 4 μm）^{注 6}

溶 離 液：0.1 v/v% ギ酸溶液-メタノール（4+1）→ 10 min →（3+7）（2 min

保持) → 5 min → (4+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7)})

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 : 空気 (3 L/min)

乾 燥 ガ ス : N₂ (15 L/min)

ヒートブロック温度 : 500 °C

D L 温 度 : 100 °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	プロダクトイオン		コリジョン
	イオン (<i>m/z</i>)	定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	エネルギー (eV)
パラコート酸化体	217	174	二	31
		二	104	53

計 算 得られた選択反応検出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、試料中のパラコート
量を算出する^{注8}。

注 1 パラコートはガラス器具に強く吸着するため、使用後
のガラス器具を硝酸 (1+10) 等に一晩漬け置いた後、流
水で濯ぎ、更に流水により水を入れ替えながら水に 1 時
間程度漬け置いた後、流水で濯ぐことによってガラス器
具への残留を防ぐことができる。

2 流速は 1 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 MAX（充てん剤量 500 mg、リザーバー容量 6 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの
- 4 Oasis MCX（充てん剤量 500 mg、リザーバー容量 6 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの
- 5 Oasis HLB（充てん剤量 60 mg、リザーバー容量 20 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの
- 6 Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの
- 7 LCMS-8040（島津製作所製）による条件例
- 8 パラコートイオン量に換算する場合は、これに 0.7243 を乗じる。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

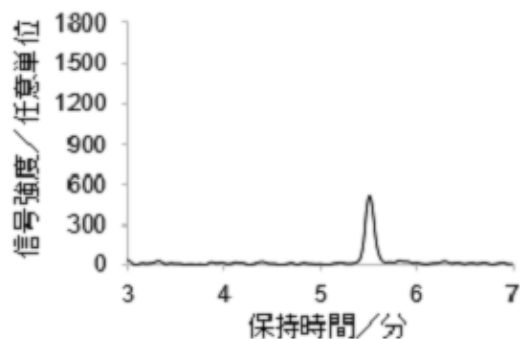
試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.02	6	88.5	9.7
	0.15	6	92.3	4.1
とうもろこし	0.02	5	74.7	15
	0.2	5	88.4	6.8
ライ麦	0.01	6	85.5	17
	0.1	6	90.1	5.2
稲わら	0.01	6	73.4	7.4
	0.3	6	87.0	2.8
ライグラス乾草	1	6	91.5	2.9
	5	6	86.2	4.3

・共同試験

試料の種類	有効 試験 数	基準 試験 数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏飼育用配合飼料	8	2	0.2	73.9	4.0	8.8	0.41
とうもろこし	9	1	0.1	77.1	5.3	21	0.97
ライ麦	9	1	0.01	83.4	9.4	23	1.0
稲わら	10	0	0.6	76.2	7.7	22	1.2
ライグラス乾草	10	0	6	83.3	9.9	23	1.8

- ・ 定量下限（共同試験による確認） 配合飼料及び穀類（麦類を除く）中 各 0.02 mg/kg、麦類及び稲わら中 各 0.01 mg/kg、乾牧草中 1 mg/kg
- ・ 検出下限（単一試験室による確認） 配合飼料及び穀類（麦類を除く）中 各 0.006 mg/kg、麦類及び稲わら中 各 0.003 mg/kg、乾牧草中 0.3 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液（パラコートとして 0.2 ng/mL）のクロマトグラム

164.3 液体クロマトグラフ法

A （略）

B 定 量

抽 出～液体クロマトグラフィー （略）

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、試料中のパラコート量を算出する

注 5。

注 1～4 （略）

5 パラコートイオン量に換算する場合は、これに 0.7243 を乗じる。

164.2 液体クロマトグラフ法

A （略）

B 定 量

抽 出～液体クロマトグラフィー （略）

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、試料中のパラコート量を算出する。

注 1～4 （略）

(参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) 165~276 (略) 第2節 (略) 第3節 多成分同時分析法 1~7 (略) 8 <u>2,4-ジクロロフェノキシ酢酸</u>及び <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>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 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u> (2成分) (2) (略) A 試薬の調製 1) (略) 2) <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>標準原液 <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u> [C₈H₅Cl₃O₃] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 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 <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>標準原液を調製する (この液 1 mL は、<u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>として 0.5 mg を含有する。) 3) メチルエステル化農薬混合標準液 使用に際して、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>各標準原液各 1 mL を 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、メタノール 1 mL 及びトリメチル	(参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) 165~276 (略) 第2節 (略) 第3節 多成分同時分析法 1~7 (略) 8 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-T</u>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 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-T</u> (2成分) (2) (略) A 試薬の調製 1) (略) 2) <u>2,4,5-T</u>標準原液 <u>2,4,5-T</u> [C₈H₅Cl₃O₃] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 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 <u>2,4,5-T</u>標準原液を調製する (この液 1 mL は、<u>2,4,5-T</u>として 0.5 mg を含有する。) 3) メチルエステル化農薬混合標準液 使用に際して、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び <u>2,4,5-T</u>各標準原液各 1 mL を 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、メタノール 1 mL 及びトリメチルシリルジアゾメタン液
---	---

シリルジアゾメタン液 0.5 mL を加え 30 分間静置する。この反応液に窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサンを加えて残留物を溶かし、更にヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 としてそれぞれ 0.002~0.1 µg 相当量を含む数点のメチルエステル化農薬混合標準液を調製する。

4) (略)

B 定 量

抽 出～メチルエステル化 (略)

カラム処理 ケイ酸マグネシウム 5 g (4.5~5.5 g) 及び硫酸ナトリウム (無水) 2 g (1.8~2.2 g) をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管 (内径 10 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、カラムを調製する。

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ヘキサン 5 mL で洗浄して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。ヘキサノーリエチルエーテル (19+1) 50 mL をカラムに加え、同様に流出させる。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサノーリエチルエーテル (4+1) 100 mL をカラムに加えて 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸メチル及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸メチルを溶出させる。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。

ヘキサン 5 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 (略)

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 2,4-ジクロロフェノキシ

0.5 mL を加え 30 分間静置する。この反応液に窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサンを加えて残留物を溶かし、更にヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T としてそれぞれ 0.002~0.1 µg 相当量を含む数点のメチルエステル化農薬混合標準液を調製する。

4) (略)

B 定 量

抽 出～メチルエステル化 (略)

カラム処理 ケイ酸マグネシウム 5 g (4.5~5.5 g) 及び硫酸ナトリウム (無水) 2 g (1.8~2.2 g) をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管 (内径 10 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、カラムを調製する。

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ヘキサン 5 mL で洗浄して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。ヘキサノーリエチルエーテル (19+1) 50 mL をカラムに加え、同様に流出させる。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサノーリエチルエーテル (4+1) 100 mL をカラムに加えて 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸メチル及び 2,4,5-Tメチルを溶出させる。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。

ヘキサン 5 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 (略)

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 2,4-ジクロロフェノキシ

酢酸量及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 量を算出する。

注 1～3 (略)

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	76.7	6.7
		0.25	3	88.3	17
		0.5	3	89.3	13
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	73.7	2.1
		0.25	3	95.3	14
		0.5	3	82.0	15
	イタリアンライグラス	0.05	3	105	15
		0.25	3	94.7	9.6
		0.5	3	86.7	11
<u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	73.0	6.3
		0.25	3	72.7	3.5
		0.5	3	73.7	18
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	82.7	21
		0.25	3	72.7	18
		0.5	3	73.3	21
	イタリアンライグラス	0.05	3	67.3	11
		0.25	3	73.7	8.7
		0.5	3	76.3	18

・共同試験

成分名	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
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	81.4	5.2	8.5	0.42
<u>2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸</u>	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	89.4	-	11	0.54

酢酸量及び 2,4,5-T 量を算出する。

注 1～3 (略)

(参考) 分析法バリデーション

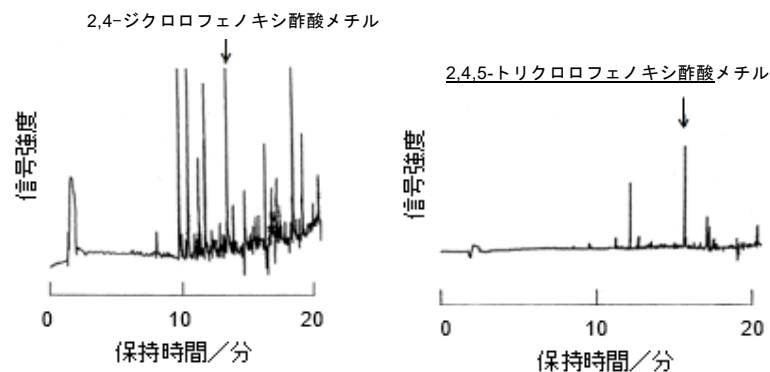
・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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 (%)
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	76.7	6.7
		0.25	3	88.3	17
		0.5	3	89.3	13
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	73.7	2.1
		0.25	3	95.3	14
		0.5	3	82.0	15
	イタリアンライグラス	0.05	3	105	15
		0.25	3	94.7	9.6
		0.5	3	86.7	11
<u>2,4,5-T</u>	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	73.0	6.3
		0.25	3	72.7	3.5
		0.5	3	73.7	18
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	82.7	21
		0.25	3	72.7	18
		0.5	3	73.3	21
	イタリアンライグラス	0.05	3	67.3	11
		0.25	3	73.7	8.7
		0.5	3	76.3	18

・共同試験

成分名	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
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	81.4	5.2	8.5	0.42
<u>2,4,5-T</u>	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	89.4	-	11	0.54

(参考) クロマトグラム例



添加試料（配合飼料に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 として 0.25 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

9~33 (略)

34 ジクワット及びパラコート[®]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)~(3) (略)

A (略)

B 定 量

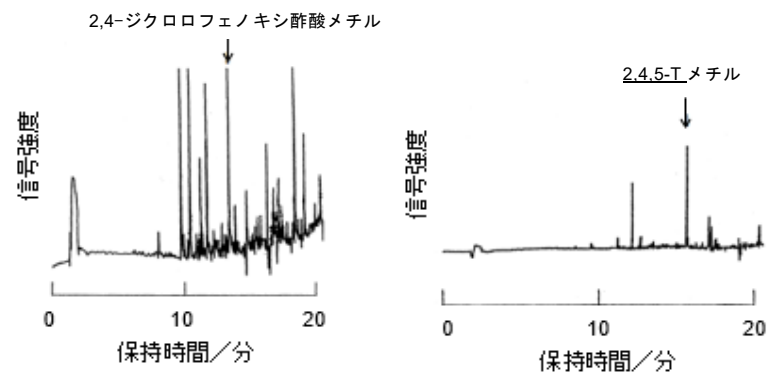
抽 出～液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 (略)

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、試料中のジクワット及びパラコート量を算出する^{注8}。

注 1~7 (略)

8 パラコートイオン量に換算する場合は、これに 0.7243 を乗じる。

(参考) クロマトグラム例



添加試料（配合飼料に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 及び 2,4,5-T として 0.25 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

9~33 (略)

34 ジクワット及びパラコート[®]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)~(3) (略)

A (略)

B 定 量

抽 出～液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 (略)

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、試料中のジクワット及びパラコート量を算出する。

注 1~7 (略)

(参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) 35 (略) 第 7 章 有害物質 <u>第 1 節 各条</u> 1~6 (略) <u>7 ペルフルオロオクタン酸 (PFOA)</u> <u>7.1 ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> <u>第 2 節 1 による。</u> <u>8 ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)</u> <u>8.1 ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> <u>第 2 節 1 による。</u> <u>9 ペルフルオロノナン酸 (PFNA)</u> <u>9.1 ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> <u>第 2 節 1 による。</u>	(参考) 分析法バリデーション (略) (参考) クロマトグラム例 (略) 35 (略) 第 7 章 有害物質 (新設) 1~6 (略) (新設) (新設) (新設)
--	---

<u>10 ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)</u> <u>10.1 ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> <u>第2節1による。</u> <u>11・12 (略)</u> <u>第2節 多成分分析法</u> <u>1 ペルフルオロアルキル化合物 (PFAS) 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</u> <u>(1) 分析対象化合物 PFAS (ペルフルオロオクタン酸 (PFOA)、ペルフルオロノナン酸 (PFNA)、ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS) 及びペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS))</u> <u>(2) 適用範囲 配合飼料、とうもろこし、魚粉、魚油、稲わら、イタリアンライグラスサイレージ及びとうもろこしサイレージ</u> <u>(3) 分析法^{注1}</u> <u>A 試薬の調製</u> <u>1) 各 PFAS 標準原液^{注2,3} PFOA 標準液 (50 µg/mL)、PFNA 標準液 (50 µg/mL)、PFOS 標準液 (50 µg/mL) 及び PFHxS 標準液 (50 µg/mL) を各標準原液とする。</u> <u>2) 各 PFAS 標準液 PFAS 標準原液各 1 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加えて各 PFAS 標準液を調製する (これらの液各 1 mL は、PFOA、PFNA、PFOS 及び PFHxS として各 1 µg を含有する)。</u> <u>3) PFAS 混合標準液 各 PFAS 標準液の一部を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に PFOA、PFNA、PFOS 及び</u>	(新設) <u>7・8 (略)</u> (新設)
---	---

PFHxS として各 200 ng を含有する PFAS 混合標準液を調製する。

- 4) 各安定同位体標識 PFAS 内標準原液^{注3} 安定同位体標識 PFOA ($^{13}\text{C}_8$ -PFOA) 標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$)、安定同位体標識 PFOS ($^{13}\text{C}_8$ -PFOS) 標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$) 及び安定同位体標識 PFHxS ($^{18}\text{O}_2$ -PFHxS) 標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$) を各内標準原液とする。
- 5) 各安定同位体標識 PFAS 内標準液 各内標準原液各 1 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加えて各内標準液を調製する (これらの液各 1 mL は、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 及び $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS として各 1 μg を含有する)。
- 6) 安定同位体標識 PFAS 混合内標準液 各内標準液の一部を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に $^{13}\text{C}_8$ -PFOA、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 及び $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS として各 100 ng を含有する混合内標準液を調製する。
- 7) シリンジスパイク標準原液^{注3} *N*-エチル-d5 ペルフルオロ-1-オクタンスルホン酸アミド酢酸 (d5-*N*-EtFOSAA) 標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$) を標準原液とする。
- 8) シリンジスパイク標準液^{注4} シリンジスパイク標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に d5-*N*-EtFOSAA として 20 ng を含有するシリンジスパイク標準液を調製する。
- 9) 検量線作成用混合標準液 使用に際して、PFAS 混合標準液、安定同位体標識 PFAS 混合内標準液及びシリンジスパイク標準液^{注4}の一部をメタノールで希釈し、1 mL 中に PFOA、PFNA、PFOS 及び PFHxS として 0.025~50 ng を含有し、かつ $^{13}\text{C}_8$ -PFOA、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOS、 $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS 及び d5-*N*-EtFOSAA として 1 ng を含有する数点の検量線作成用混合標準液を調製する。

る。同時に PFAS 混合標準液を加えずに同様に操作し、濃度 0 ng/mL の検量線作成用標準液を調製する。

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 のポリプロピレン製ねじ口試験管に入れ、更に安定同位体標識 PFAS 混合内標準液 20 µL を正確に加えた後、水 15 mL、アセトニトリル 10 mL 及びギ酸 150 µL を加え、1 分間振り混ぜる。硫酸マグネシウム（無水）6 g（5.5~6.4 g）及び塩化ナトリウム 1.5 g（1.45~1.54 g）を加え、直ちに手で振り混ぜ、更に 1 分間振り混ぜた後、2,000×g で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層（上層）を分散型固相抽出に供する試料溶液とする。

分散型固相抽出 試料溶液を分散型固相抽出吸着剤^{注 5}入りの 15 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に入れ、2 分間振り混ぜた後、2,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 5 mL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 2.5 mL）を 15 mL のポリプロピレン製ねじ口試験管に入れ、60 °C 以下に加温しながら窒素ガスを送って約 1 mL まで濃縮した後、水 11 mL を加え混合し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 弱塩基性陰イオン交換体ミニカラム（200 mg）^{注 6}をアンモニア水-メタノール（1+100）6 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。

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出させた後、試料溶液が入っていたポリプロピレン製ねじ口試験管を水 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えて同様に流出させる。更にメタノール 5 mL をミニカラムに加えて流出させた後、ミニカラムの下にあらかじめメタノール 6 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム（500 mg）^注

⁷を連結する。15 mL ポリプロピレン製遠心沈殿管を連結したミニカラムの下に置き、アンモニア水—メタノール（1+100）4 mL を連結したミニカラムに加えて PFAS を溶出させる。

溶出液を 60 °C に加温し、窒素ガスを送ってほとんど乾固するまで濃縮する。残留物にシリンジスパイク標準液^{注 4} 50 µL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 25 µL）を正確に加えた後、メタノール 950 µL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 475 µL）を加えボルテックスミキサーでかき混ぜ、メンブランフィルター（孔径 0.2 µm）でろ過し、液体クロマトグラフタンデム質量型分析計による測定に供する試料溶液とする。

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。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 空試験溶液、試料溶液及び各検量線作成用標準液各 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^{注 8} 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 3.5 µm）^{注 9}

ガードカラム：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 5 mm、粒径 1.7 µm）^{注 10}

ディレイカラム：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 50 mm、粒径 3.5

μm) ^{注9}

溶 離 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液ーメタ
ノール (9+1) (3 min 保持) →0.1 min
→ (3+2) →22.9 min→ (1+9) (4 min
保持) →0.1 min→ (9+1) (3 min 保
持)

流 速 : 0.3 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム質量分析計部^{注11})

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 : 空気 (3 L/min)

乾 燥 ガ ス : 窒素 (10 L/min)

ヒーティングガス : 窒素 (10 L/min)

インターフェイス温度 : 300 °C

ヒートブロック温度 : 400 °C

D L 温 度 : 200 °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	プロダクトイオン		コリジョン
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)	エネルギー (eV)
PFOA	413	369	-	12
		-	169	17
PFNA	463	419	-	10
		-	219	18
PFOS	499	80	-	54
		-	99	42
PFHxS	399	80	-	45
		-	99	37
¹³ C ₈ -PFOA	421	376	-	11
		-	172	18
¹³ C ₈ -PFOS	507	80	-	49
		-	99	43
¹⁸ O ₂ -PFHxS	403	103	-	35
		-	84	42
d5-N-EtFOSAA	589	419	-	21
		-	531	21

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムから PFOA、PFNA、PFOS、PFHxS、¹³C₈-PFOA、¹³C₈-PFOS 及び ¹⁸O₂-PFHxS のピーク面積又は高さを求めて内標準法^{注12}により検量線を作成し、試料中の各 PFAS 量を算出する^{注13}。

注 1 PFAS 溶出の可能性があるので、全ての操作において PTFE 等のフッ素系樹脂が使用されている容器、器具、装置等は可能な限り使用しないこと。また、使用する器具は必要に応じ事前にメタノールで洗浄したものを使用すること。

2 炭素鎖が直鎖状に結合した直鎖体を含有し、この含有量等を保証している標準液を使用すること。なお、PFOS 及び PFHxS はカリウム塩又はナトリウム塩として販売されている。

3 WELLINGTON LABORATORIES 製又はこれと同等のもの

4 シリジンスパイク標準液は各内標準の回収率を算出するため添加する。

検量線作成用混合標準液の各検量点について、各内標準 ($^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$ 、 $^{13}\text{C}_8\text{-PFOS}$ 及び $^{18}\text{O}_2\text{-PFHxS}$ 、以下 k とする。) と d5-*N*-EtFOSAA のピーク面積の比を求め、その平均値を相対感度係数 (RRF_k) とする。

試料溶液において、各内標準のピーク面積と d5-*N*-EtFOSAA のピーク面積の比及び対応する RRF_k を用いて、次式により各内標準の回収率を計算する。

$$\text{Rc}_k = \frac{A_{CS,k}}{A_{SS}} \times \frac{1}{\text{RRF}_k} \times 100$$

Rc_k : 内標準 k の回収率 (%)

A_{CS} : 試料溶液中の内標準 k のピーク面積

A_{SS} : 試料溶液中の d5-*N*-EtFOSAA のピーク面積

5 Q-Sep QuEChERS (Restek 製) 又はこれと同等のもの

6 Strata-XL-AW (Phenomenex 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

7 Supelclean ENVI-Carb (Merck 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

8 ピークがブロードになる場合、水を共注入又は注入量を減らすことで改善する。

9 Xbride BEH C18 (Waters 製) 又はこれと同等のもの

10 ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters 製) 又はこれと同等のもの

11 LCMS-8050 (島津製作所製) による条件例

12 PFOA 及び PFNA は $^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$ を、PFOS は $^{13}\text{C}_8\text{-PFOS}$ を、PFHxS は $^{18}\text{O}_2\text{-PFHxS}$ をそれぞれ内標準とする。

13 試料に含まれる分岐異性体について、直鎖体と分岐異性体の感度は同等であると仮定し直鎖体の標準品で作成

した検量線により定量する場合、分岐鎖異性体の結果は参考値とする。この際、直鎖体と分岐異性体を可能な限り分離し、直鎖体が検出されるピークの測定値を直鎖体の濃度として把握することが望ましい。なお、分岐鎖異性体を定量する場合は、確認イオンで定量することにより真値に近くなる可能性がある。

(参考) 分析法バリデーション

PFOA、PFNA、PFOS、PFHxS はいずれも直鎖体を指すものとする。

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
PFOA	成鶏飼育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>101</u>	<u>7.6</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>105</u>	<u>2.7</u>
	肉豚肥育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>104</u>	<u>6.6</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>101</u>	<u>2.7</u>
	肉用牛肥育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>99.4</u>	<u>2.2</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>100</u>	<u>3.6</u>
	とうもろこし	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>102</u>	<u>6.2</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>93.1</u>	<u>2.6</u>
	魚粉	<u>0.5</u>	<u>5</u>	<u>98.9</u>	<u>2.7</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>99.5</u>	<u>1.8</u>
	魚油	<u>0.5</u>	<u>5</u>	<u>87.3</u>	<u>4.8</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>93.9</u>	<u>3.6</u>
	稲わら	<u>0.2</u>	<u>5</u>	<u>104</u>	<u>4.0</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>105</u>	<u>1.9</u>
	イタリアンライグラス	<u>0.18</u>	<u>5</u>	<u>98.4</u>	<u>2.9</u>
	サイレージ	<u>10</u>	<u>5</u>	<u>96.8</u>	<u>3.9</u>
PFNA	成鶏飼育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>98.3</u>	<u>7.8</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>105</u>	<u>3.6</u>
	肉豚肥育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>103</u>	<u>5.3</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>99.4</u>	<u>2.4</u>
	肉用牛肥育用配合飼料	<u>0.1</u>	<u>5</u>	<u>103</u>	<u>7.7</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>95.2</u>	<u>4.8</u>
	とうもろこし	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>96.3</u>	<u>3.3</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>93.8</u>	<u>1.0</u>
	魚粉	<u>0.5</u>	<u>5</u>	<u>100</u>	<u>5.3</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>96.4</u>	<u>2.6</u>
	魚油	<u>0.5</u>	<u>5</u>	<u>88.0</u>	<u>5.1</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>93.2</u>	<u>4.7</u>
	稲わら	<u>0.2</u>	<u>5</u>	<u>102</u>	<u>4.6</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>101</u>	<u>2.1</u>
	イタリアンライグラス	<u>0.18</u>	<u>5</u>	<u>97.7</u>	<u>2.4</u>
	サイレージ	<u>10</u>	<u>5</u>	<u>101</u>	<u>1.4</u>
	とうもろこしサイレージ	<u>0.18</u>	<u>5</u>	<u>97.1</u>	<u>2.1</u>
		<u>10</u>	<u>5</u>	<u>99.6</u>	<u>2.5</u>

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
PFOS	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	102	11
		10	5	105	2.4
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	90.4	4.6
		10	5	94.4	2.2
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	100	13
		10	5	97.2	3.6
	とうもろこし	2	5	109	7.8
		10	5	94.1	3.1
	魚粉	0.5	5	95.3	12
		10	5	97.5	3.1
	魚油	0.5	5	97.5	5.0
		10	5	98.3	3.9
	稲わら	0.1	5	105	10
		10	5	103	1.1
	イタリアンライグラス サイレージ	0.09	5	102	6.6
		10	5	98.1	2.6
	とうもろこしサイレージ	0.09	5	107	7.3
		10	5	97.8	4.1
PFHxS	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	101	10
		10	5	105	3.0
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	99.2	13
		10	5	100	3.4
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	115	1.7
		10	5	101	4.2
	とうもろこし	2	5	110	6.3
		10	5	93.5	2.3
	魚粉	0.5	5	102	9.1
		10	5	104	2.7
	魚油	0.5	5	94.0	5.9
		10	5	98.5	4.5
	稲わら	0.1	5	102	12
		10	5	104	3.0
	イタリアンライグラス サイレージ	0.09	5	114	5.3
		10	5	97.7	2.2
	とうもろこしサイレージ	0.09	5	101	5.8
		10	5	100	3.4

・ 共同試験

添加成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _i (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
PFOA	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	100	6.6	11	0.50
	とうもろこし	8	2	0.2	102	6.4	14	0.62
	魚粉	9	1	12.5	98.3	7.2	17	0.77
	魚油	10	0	1	79.8	11	18	0.83
	稲わら	9	1	0.2	98.4	9.5	14	0.63
	とうもろこしサイレージ	9	1	2.5 ^{±1}	98.8	5.0	10	0.46
PFNA	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	102	7.7	12	0.54
	とうもろこし	8	2	0.2	104	8.4	11	0.50
	魚粉	9	1	12.5	101	5.7	13	0.60
	魚油	10	0	1	81.4	13	16	0.73
	稲わら	9	1	0.2	111	5.6	11	0.49
	とうもろこしサイレージ	9	1	2.5 ^{±1}	102	6.2	10	0.46
PFOS	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	99.0	7.1	13	0.58
	とうもろこし	8	2	0.1	98.7	14	14	0.64
	魚粉	9	1	12.5	95.1	5.8	12	0.56
	魚油	10	0	1	94.1	5.9	13	0.61
	稲わら	9	1	0.1	94.1	3.3	11	0.51
	とうもろこしサイレージ	10	0	2.5 ^{±1}	96.3	7.2	8.9	0.40
PFHxS	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	104	6.5	9.9	0.45
	とうもろこし	9	1	0.1	105	14	18	0.80
	魚粉	9	1	12.5	104	4.0	17	0.78
	魚油	10	0	1	98.7	6.6	11	0.52
	稲わら	9	1	0.1	108	4.5	18	0.80

注 1 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

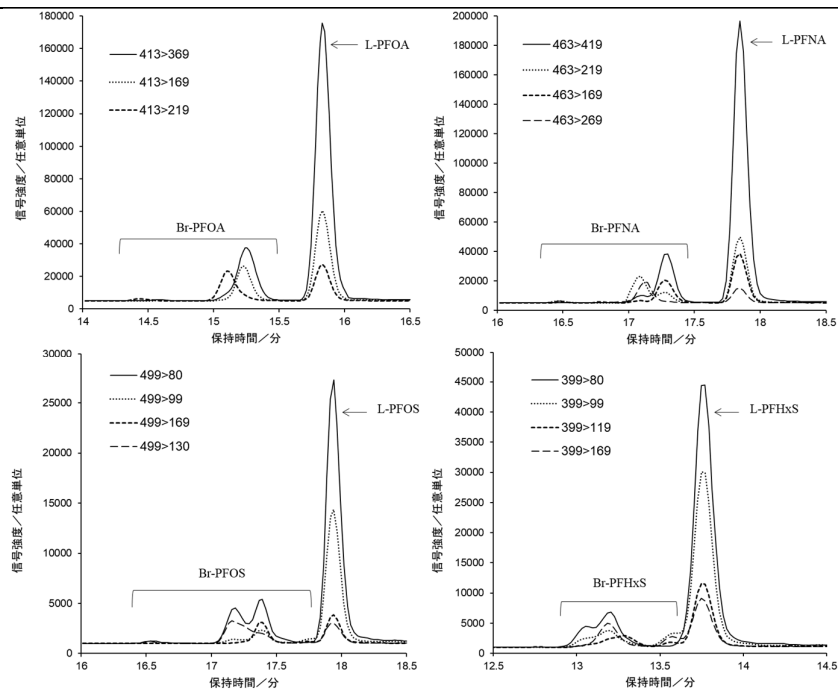
・ 定量下限（共同試験による確認）

配合飼料、 とうもろこし 及び稲わら	魚粉及び魚油	イタリアンライグラスサイレージ（風乾物） 及びとうもろこしサイレージ（風乾物）
($\mu\text{g/kg}$)	($\mu\text{g/kg}$)	($\mu\text{g/kg}$)
PFOA及びPFNA	0.2	0.5
PFOS及びPFHxS	0.1	0.5

・ 検出下限（単一試験室による確認）

配合飼料、とうもろこし及び稲わら	魚粉、魚油、 イタリアンライグラスサイレージ（風乾物） 及びとうもろこしサイレージ（風乾物）
($\mu\text{g/kg}$)	($\mu\text{g/kg}$)
PFOA及びPFNA	0.1
PFOS及びPFHxS	0.05

（参考）クロマトグラム例



分岐鎖異性体を含む標準液のクロマトグラム（各 0.05 ng/mL）
（Br-は分岐鎖異性体、L-は直鎖体の保持時間を示す。）

第 8 章 合成抗菌物質等

第 1 節・第 2 節 （略）

第 9 章 抗生物質

第 1 節 微生物学的試験法通則

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

1 平板法

A 試薬等の調製

第 8 章 合成抗菌物質

第 1 節・第 2 節 （略）

第 9 章 抗生物質

第 1 節 微生物学的試験法通則

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

1 平板法

A 試薬等の調製

1) (略) 2) 標準液 標準液は、第2節各条に規定するところにより調製する。 この場合、標準原液は、常用標準品（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号。<u>以下「成分規格等省令」という。</u>）別表第2の6の(13)に規定する常用標準品又は従前に規定されていた常用標準品）を用いて相対湿度50%以下の大気中で調製し、密封して-20℃以下で保存する。 3)~5) (略) B・C (略) 2 (略) (付 記) (略) 第2節・第3節 (略) 第20章 その他 第1節 成分規格の定められた飼料及び飼料添加物 1 <u>3-ニトロオキシプロパノール</u> (適用範囲：牛用配合飼料) A 試薬の調製 <u>3-ニトロオキシプロパノール標準液</u> 3-ニトロオキシプロパノール〔C₃H₇NO₄〕50 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-ギ酸（180+20+1）を加えて溶かし、更に標線までアセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）を加えて3-ニトロオキシプロパノール標準原液を調製する（この液1 mLは、3-ニトロオキシプロパノール	1) (略) 2) 標準液 標準液は、第2節各条に規定するところにより調製する。 この場合、標準原液は、常用標準品（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）別表第2の6の(13)に規定する常用標準品又は従前に規定されていた常用標準品）を用いて相対湿度50%以下の大気中で調製し、密封して-20℃以下で保存する。 3)~5) (略) B・C (略) 2 (略) (付 記) (略) 第2節・第3節 (略) 第20章 その他 第1節 成分規格の定められた飼料及び飼料添加物 (新設)
--	--

ールとして 0.5 mg を含有する。) 。

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリル－水－ギ酸 (180+20+1) で正確に希釈し、3-ニトロオキシプロパノールとして 2~50 µg を含有する数点の 3-ニトロオキシプロパノール標準液を調製する。

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、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル－水－ギ酸 (180+20+1) 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、16,000×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ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 5 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：210 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 mm、長さ 150 mm、粒径 3 µm) 注 1

溶 離 液：0.1 v/v%メタンスルホン酸溶液－0.1
v/v%メタンスルホン酸メタノール溶液
(23+2) (9 min 保持) → 0.1 min →
(1+4) (6 min 保持) → 0.1 min →
(23+2) (5 min 保持)

流 速：0.4 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、飼料中の 3-ニトロオキシプロパ

ノール量を算出する。

注1 InertSustain C18（ジールサイエンス製）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 (%)
ほ乳期子牛育成用配合飼料	75	5	102	0.7
	150	5	100	0.4
	300	5	101	1.2
乳用牛飼育用・若令牛育成用配合飼料	75	5	103	1.0
	150	5	105	0.7
	300	5	104	0.3
幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料	75	5	103	0.8
	150	5	102	0.2
	300	5	101	0.3

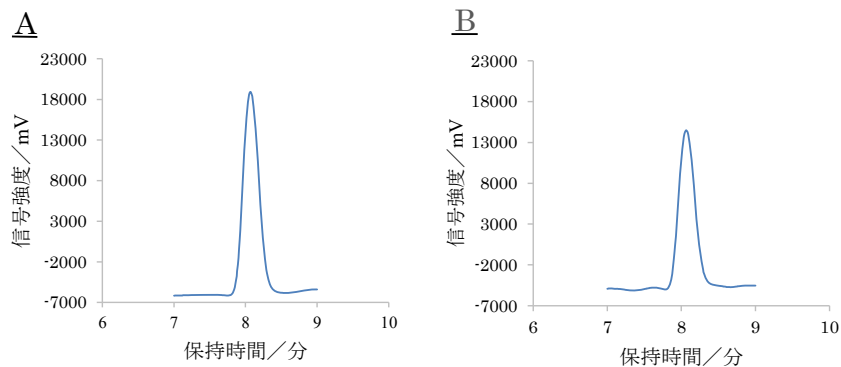
・共同試験

試料の種類	有効 試験 数	棄却 試験 数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ほ乳期子牛育成用配合飼料	13	1	30	91.1	1.6	7.0	0.72
肉用牛肥育用配合飼料	14	0	30	88.7	2.1	10	1.0
	14	0	165	93.8	2.6	6.7	0.90
肉用牛肥育用・肉用牛肥育用配合飼料	13	1	105	88.7	3.9	6.8	0.85
若令牛育成用配合飼料	14	0	270	94.2	1.5	5.9	0.84
乳用牛育成用配合飼料	14	0	375	92.2	2.0	4.6	0.70

・定量下限（共同試験による確認） 試料中 30 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 9 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（3-ニトロオキシプロパノールとして 20 $\mu\text{g/mL}$ ）

B：添加試料（幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料に 3-ニトロオキシプロパノールとして 150 mg/kg 相当量添加）

2~4 （略）

第 2 節・第 3 節 （略）

別紙 1

（略）

α -BHC～O 群多価血清 （略）

2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸

$\text{C}_8\text{H}_5\text{Cl}_3\text{O}_3$ (CAS No.: 93-76-5)

T-2 トキシシン～二臭化エチレン

（略）

1~3 （略）

第 2 節・第 3 節 （略）

別紙 1

（略）

α -BHC～O 群多価血清 （略）

2,4,5-T $\text{C}_8\text{H}_5\text{Cl}_3\text{O}_3$ (CAS No.: 93-76-5)

T-2 トキシシン～二臭化エチレン （略）

<u>3-ニトロオキシプロパノール</u> <u>C₃H₇NO₄ (CAS No.: 100502-66-7)</u> 無色～淡黄色透明の液体 ニトロフェン～ペプトン (略) <u>ペルフルオロオクタン酸 (PFOA)</u> <u>C₈HF₁₅O₂ (CAS No.: 335-67-1)</u> <u>ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)</u> <u>C₈HF₁₇O₃S (CAS No.: 1763-23-1)</u> <u>ペルフルオロノナン酸 (PFNA)</u> <u>C₉HF₁₇O₂ (CAS No.: 375-95-1)</u> <u>ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)</u> <u>C₆HF₁₃O₃S (CAS No.: 355-46-4)</u> ペルメトリン～メタリン酸 (略) <u>メタンスルホン酸</u> <u>CH₄O₃S (CAS No.: 75-75-2)</u> 無色～淡黄褐色透明の液体 メチオカルブスルホン～硫酸ヒドラジニウム (略) <u>硫酸マグネシウム (無水)</u> <u>MgSO₄ (CAS No.: 7487-88-9)</u> 硫酸マグネシウム七水和物～ロリトレム B (略) 別紙 2 試験法の妥当性確認ガイドライン 1～3 (略) 4 確認の方法 (略) (1) (略) (2) 真度 以下のいずれかにより真度を確認する。 i ・ ii (略) 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	(新設) ニトロフェン～ペプトン (略) (新設) (新設) (新設) (新設) ペルメトリン～メタリン酸 (略) (新設) メチオカルブスルホン～硫酸ヒドラジニウム (略) (新設) 硫酸マグネシウム七水和物～ロリトレム B (略) 別紙 2 試験法の妥当性確認ガイドライン 1～3 (略) 4 確認の方法 (略) (1) (略) (2) 真度 以下のいずれかにより真度を確認する。 i ・ ii (略) 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を求め、これを真度とする。 真度の目標値^{注3}は、70 %以上 120 %以下（ただし、<u>成分規格等省令別表第1の1の(1)の表に掲げる飼料添加物の表示量</u>に対する試験にあっては 90 %以上 110 %以下）とする。 注 3 （略） (3)・(4) （略） 5 （略） 別紙 3 （略）	量値の平均値の添加濃度に対する比を求め、これを真度とする。 真度の目標値^{注3}は、70 %以上 120 %以下（ただし、<u>抗菌性飼料添加物の表示量</u>に対する試験にあっては 90 %以上 110 %以下）とする。 注 3 （略） (3)・(4) （略） 5 （略） 別紙 3 （略）
---	---