

○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）一部改正 新旧対照表

（下線部は改正箇所）

改正後	現 行
目 次	目 次
第 1 章～第 5 章 〔略〕	第 1 章～第 2 章 〔略〕
第 6 章 農 薬	第 6 章 農 薬
第 1 節 各 条 1～211 〔略〕	第 1 節 各 条 1～211 〔略〕
〔新設〕	
212 エテホン	
213 ジウロン	
214 <u>スピノサド（スピノシン A 及びスピノシン D）</u>	
第 2 節 〔略〕	第 2 節 〔略〕
第 3 節 〔略〕	第 3 節 〔略〕
第 7 章 〔略〕	第 7 章 〔略〕
第 8 章 合成抗菌物質	第 8 章 合成抗菌物質
第 1 節 各 条 1～17 〔略〕	第 1 節 各 条 1～17 〔略〕
〔新設〕	
18 <u>クリスタルバイオレット</u>	
19 <u>メチレンブルー</u>	
第 2 節 多成分分析法 1～3 〔略〕	第 2 節 多成分分析法 1～3 〔略〕
〔新設〕	
4 <u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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>	〔以下略〕
〔以下略〕	〔以下略〕

改正後	現 行
第1章～第5章 〔略〕	第1章～第5章 〔略〕
第6章 農 薬	第6章 農 薬
第1節 各 条 1～22 〔略〕	第1節 各 条 1～22 〔略〕
23 イソフェンホスオキソン 〔新設〕	23 イソフェンホスオキソン
23.1 <u>農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法</u> <u>第3節1による。</u>	
23.2 <u>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</u> <u>(その1)</u> <u>第2節2による。</u>	23.1 <u>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</u> <u>(その1)</u> <u>第2節2による。</u>
24～211 〔略〕	24～211 〔略〕
〔新設〕	
212 <u>エテホン</u>	
212.1 <u>ガスクロマトグラフ法</u>	
A <u>試薬の調製</u>	
<u>エテホン標準液 エテホン標準品 [C₂H₆ClO₃P] 25 mg を正確</u>	
<u>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</u>	
<u>かし、更に標線まで同溶媒を加えてエテホン標準原液を調製</u>	
<u>する (この液 1 mL は、エテホンとして 0.5 mg を含有す</u>	
<u>る。)</u>	
<u>使用に際して、エテホン標準原液の一定量をアセトンで正</u>	
<u>確に希釈し、1 mL 中にエテホンとして 20 μg を含有するエテ</u>	
<u>ホン標準液を調製する。</u>	

改正後

現 行

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、酢酸エチル-塩酸 (100+1) 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) で吸引ろ過する。三角フラスコ及び残さを順次同溶媒 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同溶媒を加え、この液 20 mL (乾牧草にあっては、更に同溶媒で正確に 10 倍に希釈した後、その液 20 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。

アセトン-酢酸 (99+1) 0.5 mL を加えて残留物を溶かし、メチル化に供する試料溶液とする。

メチル化 試料溶液にトリメチルシリルジアゾメタン液 0.5 mL を加え、試料溶液の入っているなす形フラスコを密栓し、軽く振り混ぜた後 30 分間静置する。アセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加え、5 °C 以下の水浴でなす形フラスコを冷却しながら穏やかに窒素ガスを送って乾固する。更に以上の操作を 2 回繰り返す。ヘキサン-酢酸エチル (7+3) 10 mL を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。

カラム処理 グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) ^{注 1} 及びシリカゲルミニカラム (690 mg) をそれぞれヘキサン-酢酸エチル (7+3) 5 mL で洗浄する。

改正後

グラファイトカーボンミニカラムの下にシリカゲルミニカラムを連結し、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なす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル (7+3) 2 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。更にヘキサン-酢酸エチル (7+3) 5 mL をミニカラムに加えてエテホンをシリカゲルミニカラムに移行させる。

次に、グラファイトカーボンミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコをシリカゲルミニカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (1+9) 10 mL をミニカラムに加えてエテホンを溶出させる。溶出液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加え、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮した後、5 °C 以下の水浴でなす形フラスコを冷却しながら穏やかに窒素ガスを送って乾固する。酢酸エチル 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。

標準液のメチル化 エテホン標準液 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する。アセトン-酢酸 (99+1) 0.5 mL を加えて残留物を溶かし、トリメチルシリルジアンメタン液 0.5 mL を加え、なす形フラスコを密栓し、軽く振り混ぜた後 30 分間静置する。アセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加え、5 °C 以下の水浴でなす形フラスコを冷却しながら穏やかに窒素ガスを送って乾固する。酢酸エチル 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更にこの液の一定量を酢酸エチルで正確に希釈し、1 mL 中にエテホンとして 0.02~2 µg 相当量を含む数点の標準液を調製する。

現 行

改正後	現 行
<p><u>ガスクロマトグラフィー</u> 試料溶液及び各標準液各 4 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。</p> <p><u>測定条件 例</u></p> <p><u>検 出 器</u> : 炎光光度検出器 (リン検出用フィルター)</p> <p><u>カ ラ ム</u> : 熔融石英製キャピラリーカラム (50%シアノプロピルメチル-50%ジメチルポリシロキサン化学結合型、内径 0.53 mm、長さ 30 m、膜厚 0.5 μm)</p> <p><u>キャリアーガス</u> : He (17 mL/min)</p> <p><u>メイクアップガス</u> : He (30 mL/min)</p> <p><u>水 素</u> : 75 mL/min</p> <p><u>乾 燥 空 気</u> : 100 mL/min</p> <p><u>試料導入法</u> : スプリットレス (60 s)</p> <p><u>試料導入部温度</u> : 230 $^{\circ}$C</p> <p><u>カラム槽温度</u> : 初期温度 80 $^{\circ}$C (1 min 保持) \rightarrow 昇温 10 $^{\circ}$C/min \rightarrow 175 $^{\circ}$C \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}$C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$C (3 min 保持)</p> <p><u>検出器温度</u> : 250 $^{\circ}$C</p> <p><u>計 算</u> 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、試料中のエテホン量を算出する。</p> <p><u>注 1</u> Supelclean ENVI-Carb (Supelco 製) 又はこれと同等のもの</p>	

改正後

現行

(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 (%)
成鶏飼育用配合飼料	1	3	80.2	11
	0.1	3	78.8	14
肉用牛肥育用配合飼料	1	3	84.3	9.3
	0.1	3	82.0	11
	0.05	3	75.3	11
とうもろこし	1	3	87.1	4.5
	0.1	3	85.9	7.9
大麦	1	3	81.6	5.1
	0.1	3	79.6	9.9
アルファルファ乾草	10	3	89.3	10
	1	3	85.1	6.3
	0.5	3	82.2	11

・共同試験

試料の種類	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
肉用牛肥育用配合飼料	7	0.5	81.8	4.0	12	0.69
とうもろこし	7	1	89.0	4.5	12	0.74
アルファルファ乾草	7	10	90.8	2.6	13	1.1

・定量下限 試料中 0.05 mg/kg (乾牧草 0.5 mg/kg)

・検出下限 試料中 0.02 mg/kg (乾牧草 0.2 mg/kg)

改正後

現行

〔新設〕

213 ジウロン

213.1 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

A 試薬の調製

ジウロン標準液 ジウロン $[C_9H_{10}Cl_2N_2O]$ 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ジウロン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジウロンとして 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 中にジウロンとして 0.01~4 μ g を含有する数点のジウロン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出

1) 乾牧草 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 30 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 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）で吸引ろ過する。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、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線までアセトンを加える。この液 20 mL を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で 3 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。

改正後	現 行
<p>2) <u>その他の飼料</u> 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 15 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 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ン 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 15 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。</p> <p><u>カラム処理 I</u> 試料溶液に塩化ナトリウム 5 g (乾牧草は水 10 mL 及び塩化ナトリウム 5 g) を加え、これ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 5 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、ジウロンを溶出させる。更に、ヘキサン 85 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。</p> <p><u>シクロヘキサン-アセトン (4+1)</u> 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×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。</p> <p><u>ゲル浸透クロマトグラフィー</u> 試料溶液 4 mL (乾牧草は 2 mL) をゲル浸透クロマトグラフに注入し、ジウロンが溶出する画分を 50 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。</p>	

改正後

現 行

ヘキサン 10 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：90~110 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。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。50 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-アセトン (17+3) 2 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、ジウロンを溶出させる。更に、ヘキサン-アセトン (17+3) 19 mL をミニカラムに加え、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させる。メタノール 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 試料溶液及び各ジウロン標準液各 2 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。

改正後	現 行
<p>測定条件 例</p> <p>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1}</p> <p>溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－ メタノール（7+13）</p> <p>流速：0.2 mL/min</p> <p>カラム槽温度：40 °C</p> <p>検出器：四重極型質量分析計^{注2}</p> <p>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）</p> <p>ネブライザーガス：N₂（1.5 L/min）</p> <p>ヒートブロック温度：200 °C</p> <p>C・D・L 温度：250 °C</p> <p>モニターイオン：m/z 233^{注3}</p> <p>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、試料中のジウロン量を算出する。</p> <p>注 1 ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製、本測定条件によるジウロンの保持時間は約 4 分）又はこれと同等のもの</p> <p>2 LCMS-2010EV（島津製作所製）による条件例</p> <p>3 ライグラスわらについては、m/z 235 で定量する。</p>	

改正後

現 行

(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(%)
プロイラー肥育後期用配合飼料	0.2	3	84.8	6.9
	0.02	3	95.0	2.6
	0.01	3	93.3	6.2
肉用牛肥育用配合飼料	0.2	3	88.0	4.2
	0.02	3	95.8	5.4
	0.01	3	95.0	5.3
とうもろこし	0.2	3	96.6	2.2
	0.02	3	94.2	3.1
	0.01	3	93.3	3.1
えん麦乾草	4	3	97.2	1.0
	0.4	3	97.5	2.6
	0.2	3	90.0	5.6
ライグラスわら	2	3	98.3	7.8
	1	3	90.3	5.5
	0.4	3	99.2	1.5
	0.2	3	95.0	3.1

・共同試験

試料の種類	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
種鶏飼育用配合飼料	7	0.05	92.3	4.7	12	0.53
とうもろこし	7	0.05	86.9	3.3	12	0.54
えん麦乾草	7	4	91.0	2.6	8.3	0.63

・定量下限 試料中 0.01 mg/kg (乾牧草 0.2 mg/kg)

・検出下限 試料中 0.003 mg/kg (乾牧草 0.06 mg/kg)

改正後	現 行
<p>〔新設〕</p> <p>214 <u>スピノサド (スピノシン A 及びスピノシン D)</u></p> <p>214.1 <u>スピノサドの液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法</u></p> <p style="text-align: center;">A 試薬の調製</p> <p>1) <u>スピノシン A 標準原液</u> <u>スピノシン A 標準品</u> <u>[C₄₁H₆₅NO₁₀] 10 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコ</u> <u>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</u> <u>媒を加えてスピノシン A 標準原液を調製する (この液 1 mL</u> <u>は、スピノシン A として 0.2 mg を含有する。)</u>。</p> <p>2) <u>スピノシン D 標準原液</u> <u>スピノシン D 標準品</u> <u>[C₄₂H₆₇NO₁₀] 10 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコ</u> <u>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</u> <u>媒を加えてスピノシン D 標準原液を調製する (この液 1 mL</u> <u>は、スピノシン D として 0.2 mg を含有する。)</u>。</p> <p>3) <u>混合標準液</u> <u>スピノシン A 及び D 標準原液の一定量を混</u> <u>合し、アセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中</u> <u>にスピノシン A 及び D としてそれぞれ 0.001~1 µg を含有する</u> <u>数点の混合標準液を調製する。</u></p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p><u>抽 出</u> <u>分析試料 10.0 g (稲わらは 5 g を正確に) を量って</u> <u>200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加えて 30 分</u> <u>間静置後、更にアセトニトリル 50 mL を加え、30 分間振り混</u> <u>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</u> <u>置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角</u> <u>フラスコ及び残さを順次アセトニトリル-水 (1+1) 50 mL で</u> <u>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</u> <u>アセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料</u></p>	

改正後

現 行

溶液とする。

カラム処理^{注1} シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g)^{注2} をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗淨する。試料溶液 10 mL (稲わらを除く乾牧草では、更にアセトニトリル-水 (1+1) で正確に 10 倍希釈した後、その液 10 mL) 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下させる。更にアセトニトリル 10 mL を加えてミニカラムを洗淨した後、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-トリエチルアミン (49+1) 10 mL をミニカラムに加えてスピノシン A 及び D 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 (9+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。

改正後	現 行
<p>測定条件 例</p> <p>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}</p> <p>溶 離 液 : アセトニトリル-5 mmol/L 酢酸ア ンモニウム溶液 (9+1)</p> <p>流 速 : 0.2 mL/min</p> <p>カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C</p> <p>検 出 器 : 四重極型質量分析計^{注4}</p> <p>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)</p> <p>ネブライザーガス : N₂ (1.5 L/min)</p> <p>ヒートブロック温度 : 200 °C</p> <p>C D L 温 度 : 250 °C</p> <p>モニターイオン : m/z 732 (スピノシン A) 、 746 (スピノシン D)</p> <p>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、試料中のスピノシン A 及び D 量を算出し、その含量をスピノサド量とする。</p> <p>注 1 流速は 1.0 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。</p> <p>2 Mega Bond Elut CH (Varian 製) 又はこれと同等のもの</p> <p>3 Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製、本測定条件に よるスピノシン A 及び D の保持時間はそれぞれ約 9 分及 び約 10.5 分) 又はこれと同等のもの</p> <p>4 LCMS-2010EV (島津製作所) による条件例</p>	

改正後

現 行

(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 (%)
スピノシンA	成鶏飼育用配合飼料	0.010	3	91.7	5.4
		0.10	3	106	1.6
	若令牛育成用配合飼料	0.010	3	92.9	0.3
		0.10	3	93.4	2.4
	とうもろこし	0.010	3	101	2.2
		0.10	3	95.8	1.2
	アルファルファ乾草	0.10	3	96.8	4.2
		1.0	3	91.6	1.0
	稲わら	0.025	3	86.8	0.9
		0.25	3	98.2	2.6
スピノシンD	成鶏飼育用配合飼料	0.010	3	90.1	2.4
		0.10	3	99.6	4.3
	若令牛育成用配合飼料	0.010	3	95.2	4.8
		0.10	3	94.7	2.9
	とうもろこし	0.010	3	98.9	1.4
		0.10	3	98.0	1.7
	アルファルファ乾草	0.10	3	91.9	6.5
		1.0	3	89.2	1.6
	稲わら	0.025	3	86.5	4.0
		0.25	3	100	2.0

改正後

現行

・共同試験

成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _i (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
スピノシン	成鶏飼育用配合飼料	8	0.10	96.3	2.7	11	0.49
A	・ 稲わら	8	0.25	90.1	1.8	8.5	0.43
	とうもろこし	8	0.10	93.2	4.5	9.2	0.42
スピノシン	成鶏飼育用配合飼料	8	0.10	95.2	3.6	12	0.52
D	・ 稲わら	8	0.25	92.8	2.8	10	0.52
	とうもろこし	8	0.10	93.2	3.7	14	0.62

・定量下限 スピノシン A：試料中 0.0025 mg/kg (乾牧草 0.025 mg/kg、稲わら 0.0050 mg/kg)、スピノシン D：試料中 0.0050 mg/kg (乾牧草 0.050 mg/kg、稲わら 0.010 mg/kg)

・検出下限 スピノシン A：試料中 0.001 mg/kg (乾牧草 0.008 mg/kg、稲わら 0.002 mg/kg)、スピノシン D：試料中 0.002 mg/kg (乾牧草 0.02 mg/kg、稲わら 0.003 mg/kg)

第2節 多成分系統的分析法

[略]

第2節 多成分系統的分析法

[略]

改正後

第3節 多成分同時分析法

1 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法

(1) 分析対象化合物^{註1}

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、EPN、アセトクロール、アトラジン、アニロホス、アメトリン、アラクロール、アリドクロール、アルドリン、アレスリン、イサゾホス、イソフェンホス、イソフェンホスオキシゾン、イソプロチオラン、イプロベンホス、エタルフルラリン、エチオン、エディフェンホス、エトフェンプロックス、エトフメセート、エトプロホス、エトリジアゾール、エトリムホス、エンドリン、オキサジアゾン、オキシクロルデン、カズサホス、カルフェントラゾンエチル、キントゼン、クレソキシムメチル、クロルタールジメチル、*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クロルフェナピル、クロルフェンビンホス (*E* 体)、クロルフェンビンホス (*Z* 体)、クロルプロファミ、クロルベンジレート、ジクロホップメチル、ジクロラン、シハロトリン、ジフェナミド、ジフェノコナゾール、ジメテナミド、ジメトエート、ジメピペレート、シラフルオフエン、ダイアジノン、ターバシル、チオベンカルブ、ディルドリン、テクナゼン、テトラクロルビンホス、テトラコナゾール、テトラジホン、テブコナゾール、テブフェンピラド、テフルトリン、デルタメトリン、テルブトリン、テルブホス、トラロメトリン^{註2}、トリアジメホン、トリアレート、トリフルラリン、トリフロキシストロビン、トリルフルアニド、ナプロパミド、パラチオン、パラチオンメチル、ハルフェンプロックス、ビフェントリン、ピペロホス、ピリダフェンチオン、ピリダベン、ピリプロキシフェ

現 行

第3節 多成分同時分析法

1 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法

(1) 分析対象化合物^{註1}

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、EPN、アセトクロール、アトラジン、アニロホス、アメトリン、アラクロール、アリドクロール、アルドリン、アレスリン、イサゾホス、イソフェンホス、イソプロチオラン、イプロベンホス、エタルフルラリン、エチオン、エディフェンホス、エトフェンプロックス、エトフメセート、エトプロホス、エトリジアゾール、エトリムホス、エンドリン、オキサジアゾン、オキシクロルデン、カズサホス、カルフェントラゾンエチル、キントゼン、クレソキシムメチル、クロルタールジメチル、*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クロルフェナピル、クロルフェンビンホス (*E* 体)、クロルフェンビンホス (*Z* 体)、クロルプロファミ、クロルベンジレート、ジクロホップメチル、ジクロラン、シハロトリン、ジフェナミド、ジフェノコナゾール、ジメテナミド、ジメトエート、ジメピペレート、シラフルオフエン、ダイアジノン、ターバシル、チオベンカルブ、ディルドリン、テクナゼン、テトラクロルビンホス、テトラコナゾール、テトラジホン、テブコナゾール、テブフェンピラド、テフルトリン、デルタメトリン、テルブトリン、テルブホス、トラロメトリン^{註2}、トリアジメホン、トリアレート、トリフルラリン、トリフロキシストロビン、トリルフルアニド、ナプロパミド、パラチオン、パラチオンメチル、ハルフェンプロックス、ビフェントリン、ピペロホス、ピリダフェンチオン、ピリダベン、ピリプロキシフェン、ピリミホスメチル、

改正後	現 行
<p>ン、ピリミホスメチル、ビクロゾリン、フィプロニル、フェナリモル、フェニトロチオン、フェノチオカルブ、フェノトリン、フェンチオン、フェントエート、フェンバレレート、フェンブコナゾール、フェンプロパトリン、ブタミホス、フラムプロップメチル、フルシトリネート、フルトラニル、フルトリアホール、フルバリネート、フルミオキサジン、フルミクロラックペンチル、プロシミドン、プロパクロール、プロパジン、プロパニル、プロパルギット、プロピコナゾール、プロファム、プロフェノホス、プロペタンホス、プロモブチド、プロモプロピレート、プロモホス、ヘキサコナゾール、ベノキサコール、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、<i>cis</i>-ペルメトリン、<i>trans</i>-ペルメトリン、ペンコナゾール、ペンディメタリン、ベンフルラリン、ホサロン、ホスチアゼート、ホスメット、ホレート、マラチオン、メタクリホス、メチダチオン、メトキシクロール、メトミノストロビン (<i>E</i> 体)、メトラクロール及びメビンホス (139 成分)</p>	<p>ビクロゾリン、フィプロニル、フェナリモル、フェニトロチオン、フェノチオカルブ、フェノトリン、フェンチオン、フェントエート、フェンバレレート、フェンブコナゾール、フェンプロパトリン、ブタミホス、フラムプロップメチル、フルシトリネート、フルトラニル、フルトリアホール、フルバリネート、フルミオキサジン、フルミクロラックペンチル、プロシミドン、プロパクロール、プロパジン、プロパニル、プロパルギット、プロピコナゾール、プロファム、プロフェノホス、プロペタンホス、プロモブチド、プロモプロピレート、プロモホス、ヘキサコナゾール、ベノキサコール、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、<i>cis</i>-ペルメトリン、<i>trans</i>-ペルメトリン、ペンコナゾール、ペンディメタリン、ベンフルラリン、ホサロン、ホスチアゼート、ホスメット、ホレート、マラチオン、メタクリホス、メチダチオン、メトキシクロール、メトミノストロビン (<i>E</i> 体)、メトラクロール及びメビンホス (138 成分)</p>
<p>(2) 分析法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬の調製</p> <p>〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>カラム処理 I 〔略〕</p> <p>ゲル浸透クロマトグラフィー 〔略〕</p> <p>カラム処理 II 〔略〕</p> <p>カラム処理 III 〔略〕</p>	<p>(2) 分析法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬の調製</p> <p>〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>カラム処理 I 〔略〕</p> <p>ゲル浸透クロマトグラフィー 〔略〕</p> <p>カラム処理 II 〔略〕</p> <p>カラム処理 III 〔略〕</p>

改正後

ガスクロマトグラフ質量分析計による測定 試料溶液及び各農薬混合標準液各 1 μL 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

〔中略〕

モニターイオン：表1参照

表1 各農薬の測定イオン

項目名	定量イオン	確認イオン
〔中略〕		
イソフェンホス	213	255
イソフェンホスオキシソシ	229	201
イソプロチオラン	118	162
〔以下略〕		

計 算 〔略〕

注 1 本法は、ここに示したすべての化合物の同時分析を保証したものではない。化合物同士の相互作用による分解等及び測定への干渉等の恐れがあるので、分析対象とする化合物の組み合わせごとにあらかじめこれらの点を検証しておくこと。

2~4 〔略〕

現 行

ガスクロマトグラフ質量分析計による測定 試料溶液及び各農薬混合標準液各 1 μL 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

〔中略〕

モニターイオン：表1参照

表1 各農薬の測定イオン

項目名	定量イオン	確認イオン
〔中略〕		
イソフェンホス	213	255
イソプロチオラン	118	162
〔以下略〕		

注 1 本法は、ここに示した全ての化合物の同時分析を保証したものではない。化合物同士の相互作用による分解等及び測定への干渉等の恐れがあるので、分析対象とする化合物の組み合わせごとにあらかじめこれらの点を検証しておくこと。

2~4 〔略〕

改正後

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

1) トラロメトリン

試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 (%以下)
とうもろこし	120~1,200	3	99.0~115.1	16.0
ライグラスわら	600~6,000	3	101.5~112.8	14.9

2) その他の農薬

添加濃度 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量
結果は表 2-1 及び表 2-2 のとおり

・ 共同試験

1) トラロメトリン

試料の種類	試験 室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度		HorRat
				RSD_r (%)	RSD_R (%)	
とうもろこし	8	76	89.1	18.6	31.1	1.41
アルファルファ乾草	8	76	119.3	6.8	38.2	1.74

2) イソフェンホスオキソン

試料の種類	試験 室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度		HorRat
				RSD_r (%)	RSD_R (%)	
成鶏飼育用配合飼料	6	50	98.4	13	21	0.96
アルファルファ乾草	6	50	107	9.8	22	0.99

3) その他の農薬

〔略〕

- ・ 定量下限 〔略〕
- ・ 検出下限 〔略〕

現 行

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

1) トラロメトリン

試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 (%以下)
とうもろこし	120~1,200	3	99.0~115.1	16.0
ライグラス	600~6,000	3	101.5~112.8	14.9

2) その他の農薬

添加濃度 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量
結果は表 2-1 及び表 2-2 のとおり

・ 共同試験

1) トラロメトリン

試料の種類	試験 室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度		HorRat
				RSD_r (%)	RSD_R (%)	
とうもろこし	8	76	89.1	18.6	31.1	1.41
アルファルファ	8	76	119.3	6.8	38.2	1.74

2) その他の農薬

〔略〕

- ・ 定量下限 〔略〕
- ・ 検出下限 〔略〕

改正後

表 2-1 添加回収試験結果（成鶏飼育用配合飼料、繰返し 各 3）

添加成分名	添加濃度					
	50 µg/kg		100 µg/kg		500 µg/kg	
	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
〔中略〕						
イソフェンホス	80.6	6.2	111.5	6.2	107.7	12.1
イソフェンホスオキソン	139	2.2	124	5.2	150	0.7
イソプロチオラン	104.4	7.7	102.4	6.8	118.5	7.7
〔以下略〕						

表 2-2 添加回収試験結果（アルファルファ乾草、繰返し 各 3）

添加成分名	添加濃度					
	50 µg/kg		100 µg/kg		500 µg/kg	
	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
〔中略〕						
イソフェンホス	118.6	1.7	119.7	5.3	102.5	6.6
イソフェンホスオキソン	161	5.6	155	14	147	8.1
イソプロチオラン	120.6	1.5	116.1	6.0	108.3	1.0
〔以下略〕						

表 3-1 共同試験結果（成鶏飼育用配合飼料、各農薬添加濃度 100 µg/kg）

〔略〕

表 3-2 共同試験結果（アルファルファ乾草、各農薬添加濃度 100 µg/kg）

〔略〕

〔以下略〕

現 行

表 2-1 添加回収試験結果（成鶏飼育用配合飼料、繰返し 各 3）

添加成分名	添加濃度					
	50 µg/kg		100 µg/kg		500 µg/kg	
	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
〔中略〕						
イソフェンホス	80.6	6.2	111.5	6.2	107.7	12.1
イソプロチオラン	104.4	7.7	102.4	6.8	118.5	7.7
〔以下略〕						

表 2-2 添加回収試験結果（アルファルファ、繰返し 各 3）

添加成分名	添加濃度					
	50 µg/kg		100 µg/kg		500 µg/kg	
	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
〔中略〕						
イソフェンホス	118.6	1.7	119.7	5.3	102.5	6.6
イソプロチオラン	120.6	1.5	116.1	6.0	108.3	1.0
〔以下略〕						

表 3-1 共同試験結果（成鶏飼育用配合飼料、各農薬添加濃度 100 µg/kg）

〔略〕

表 3-2 共同試験結果（アルファルファ、各農薬添加濃度 100 µg/kg）

〔略〕

〔以下略〕

改正後	現 行
<p data-bbox="488 210 734 242">第7章 有害物質</p> <p data-bbox="152 252 212 284">〔略〕</p> <p data-bbox="459 338 766 370">第8章 合成抗菌物質</p> <p data-bbox="129 379 353 411">第1節 各 条</p> <p data-bbox="161 422 336 454">1~17 〔略〕</p> <p data-bbox="174 466 273 497">〔新設〕</p> <p data-bbox="161 510 564 542">18 <u>クリスタルバイオレット</u></p> <p data-bbox="190 555 1093 630">18.1 <u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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></p> <p data-bbox="250 638 497 670">第2節4による。</p> <p data-bbox="161 683 443 715">19 <u>メチレンブルー</u></p> <p data-bbox="190 726 1093 801">19.1 <u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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></p> <p data-bbox="250 810 497 842">第2節4による。</p> <p data-bbox="129 896 443 928">第2節 多成分分析法</p> <p data-bbox="161 938 318 970">1~3 〔略〕</p> <p data-bbox="174 981 273 1013">〔新設〕</p> <p data-bbox="161 1026 1093 1101">4 <u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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></p> <p data-bbox="190 1109 1093 1184">(1) <u>分析対象化合物</u> <u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー</u> (2成分)</p>	<p data-bbox="1467 210 1713 242">第7章 有害物質</p> <p data-bbox="1131 252 1191 284">〔略〕</p> <p data-bbox="1438 338 1744 370">第8章 合成抗菌物質</p> <p data-bbox="1108 379 1332 411">第1節 各 条</p> <p data-bbox="1140 422 1314 454">1~17 〔略〕</p> <p data-bbox="1140 941 1296 973">1~3 〔略〕</p>

改正後

現行

(2) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

1) クリスタルバイオレット標準原液 クリスタルバイオレット [$C_{25}H_{30}ClN_3$] 10 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クリスタルバイオレット標準原液を調製する（この液 1 mL は、クリスタルバイオレットとして 100 μ g を含有する。）。

2) メチレンブルー標準原液 メチレンブルー [$C_{16}H_{18}ClN_3S$] 10 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メチレンブルー標準原液を調製する（この液 1 mL は、メチレンブルーとして 100 μ g を含有する。）。

3) 安定同位体元素標識物質標準原液及び混合内標準液 安定同位体元素標識クリスタルバイオレット^{注2} (CV-d₄) 5 mg 及び安定同位体元素標識メチレンブルー^{注2} (MB-d₆) 5 mg を正確に量ってそれぞれ 50 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各安定同位体元素標識物質標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、CV-d₄ 及び MB-d₆ として 100 μ g をそれぞれ含有する。）。

更に、各標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を標線まで加えて、1 mL 中に CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 1 μ g を含有する混合内標準液を調製する。

改正後	現 行
<p>4) <u>検量線作成用標準液</u> 使用に際して、<u>クリスタルバイオレット及びメチレンブルー標準原液並びに混合内標準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 中にクリスタルバイオレット及びメチレンブルーとしてそれぞれ 0.25~15 ng を含有し、かつ CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 50 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。</u></p> <p>5) <u>クエン酸-リン酸緩衝液</u> <u>クエン酸一水和物 63.0 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液に、リン酸三ナトリウム・12 水 228 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液 110 mL 程度を加えて pH を 3.0 に調整する。</u></p> <p>6) <u>リン酸緩衝液</u> <u>リン酸二水素カリウム 2.71 g を水に溶かして 1,000 mL とし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7.0 に調整する。</u></p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p><u>抽 出</u> <u>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、混合内標準液 5 mL 及びクエン酸-リン酸緩衝液 20 mL を加えた後 30 分間静置する。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。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) で吸引ろ過する。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、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加える。この液 4 mL を 100 mL の三角フラスコに正確に入れ、水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加えた後、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7 に調整し、カラム処理に供する試料溶液とする。</u></p>	

改正後

現 行

カラム処理^{注3} 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム (1,000 mg)^{注4}をメタノール 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^{注5}、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。試料溶液の入っていた三角フラスコをメタノール 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次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、メタノール-塩酸 (1,000+1) 10 mL をミニカラムに加えてクリスタルバイオレット、メチレンブルー、CV-d₄ 及び MB-d₆ 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、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、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。

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 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 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm)^{注6}

改正後

現行

溶 離 液：5 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸溶
液-アセトニトリル (3+1) →5
min → (9+11) (10 min 保持)
→0.01 min → (1+9) (6 min 保
持) →0.01 min → (3+1) (14
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7

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 各物質のモニターイオン条件

物質名	プリカーサー プロダクト		確認	フラグメンター コリジョン	
	イオン (m/z)	イオン (m/z)	イオン (m/z)	電圧 (V)	エネルギー (eV)
クリスタルバイオレット	372	356	340	100	45
クリスタルバイオレット-d ₄	376	360		100	45
メチレンブルー	284	268	240	100	40
メチレンブルー-d ₆	290	274		100	40

改正後	現 行
<p>計 算 <u>得られた選択反応検出クロマトグラムからクリスタルバイオレット、メチレンブルー、CV-d₄ 及び MB-d₆ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクリスタルバイオレット量及びメチレンブルー量を算出する。</u></p> <p>注 1 <u>定量操作は遮光した状態で行う。</u></p> <p>2 <u>安定同位体元素標識物質として用いるクリスタルバイオレット及びメチレンブルーは、クリスタルバイオレット-d₄ 及びメチレンブルー-d₆ (いずれも林純薬工業製) 又はこれらと同等のもの</u></p> <p>3 <u>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。</u></p> <p>4 <u>Mega Bond Elut CBA (Varian 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの</u></p> <p>5 <u>適当な容量のリザーバーを連結するとよい。</u></p> <p>6 <u>CAPCELLPAK C18 AQ (資生堂製、本測定条件によるクリスタルバイオレット及びメチレンブルーの保持時間は約 13 分及び約 9 分) 又はこれと同等のもの</u></p> <p>7 <u>Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例</u></p>	

改正後

現行

(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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
クリスタル バイオレット	成鶏飼育用配合飼料	100	3	103	0.5
		10	3	109	2.3
		5	3	109	2.4
	肉豚肥育用配合飼料	100	3	103	0.5
		10	3	103	7.6
	まだい育成用配合飼料	100	3	101	0.5
		10	3	108	3.3
		国産魚粉	100	3	98.6
	10		3	99.3	5.3
5	3		116	1.1	
輸入魚粉	100	3	100	1.0	
	10	3	112	5.1	
メチレンブルー	成鶏飼育用配合飼料	100	3	106	0.6
		10	3	108	3.3
		5	3	114	5.5
	肉豚肥育用配合飼料	100	3	105	2.0
		10	3	104	2.4
	まだい育成用配合飼料	100	3	97.2	0.9
		10	3	110	4.0
		国産魚粉	100	3	101
	10		3	99.9	7.4
5	3		112	2.0	
輸入魚粉	100	3	105	0.8	
	10	3	106	2.9	

改正後

現行

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
クリスタル	成鶏飼育用配合飼料	8	20	94.5	3.4	7.5	0.34
バイオレット	まだい育成用配合飼料	8	40	101	2.1	3.1	0.14
	魚粉	8	80	99.1	0.83	3.2	0.15
メチレン	成鶏飼育用配合飼料	8	20	83.5	2.2	13	0.59
ブルー	まだい育成用配合飼料	8	40	93.3	2.6	15	0.70
	魚粉	8	80	97.7	2.9	14	0.62

・検出下限 試料中 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$

第9章～第17章 [略]

第18章 病原微生物

1 サルモネラ

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。

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)~4) [略]

5) ハーナ・テトラチオン酸塩培地^{注2} [略]

第9章～第17章 [略]

第18章 病原微生物

1 サルモネラ

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。

A 試薬等の調製

1)~4) [略]

5) セレナイトシスチン培地^{注2} ペプトン 5 g、ラクトースー水和物 4 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水 10 g、亜セレン酸ナトリウム 4 g 及び L-シスチン 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 6.9~7.1 に調整する。

これを 200 mL の培養瓶に 100 mL 分注する。

6) ハーナ・テトラチオン酸塩培地^{注2} [略]

改正後	現 行
<p>6) <u>ラパポート・バシリアディス培地^{註3}</u> <u>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</u> 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 に調製する。</p>	
<p>7) DHL 寒天培地^{註4} 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。 〔以下略〕</p>	<p>7) DHL 寒天培地^{註2} 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 6.9~7.1 に調整する。 〔以下略〕</p>
<p>8) <u>ブリリアントグリーン寒天培地^{註5}</u> <u>〔略〕</u></p>	<p>8) <u>ブリリアントグリーン寒天培地^{註2}</u> <u>〔略〕</u></p>
<p>9) <u>クロモアガーサルモネラ寒天培地^{註6}</u> <u>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7} 12.9 g 及びカンテン 15 g</u> 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。</p>	<p>9) <u>クロモアガーサルモネラ寒天培地^{註2}</u> <u>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3} 12.9 g 及びカンテン 15 g</u> 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。</p>
<p>10) TSI 寒天培地^{註8} <u>〔略〕</u></p>	<p>10) <u>ランバック寒天培地^{註2}</u> <u>ペプトン 8 g、塩化ナトリウム 5 g、デオキシコール酸ナトリウム 1 g、発色基質混合物^{註4} 1.5 g、プロピレングリコール 10.5 g 及びカンテン 15 g</u> 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。 以下、7)による。</p>
<p>11) SIM 寒天培地^{註8} <u>〔略〕</u></p>	<p>11) TSI 寒天培地^{註2} <u>〔略〕</u></p>
<p>12) リジン脱炭酸試験用培地^{註8} <u>〔略〕</u></p>	<p>12) SIM 寒天培地^{註2} <u>〔略〕</u></p>
<p>12) リジン脱炭酸試験用培地^{註8} <u>〔略〕</u></p>	<p>13) リジン脱炭酸試験用培地^{註2} <u>〔略〕</u></p>

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">B 培 養</p> <p>前増菌培養 [略]</p> <p>選択増菌培養 前増菌培養液 10 mL ずつをハーナ・テトラチオン酸塩培地及びラバポート・バシリアディス培地にそれぞれ加え、振り混ぜた後、41~43 °C で 18~24 時間培養する。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>純粋分離培養 <u>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。</u></p> <p>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。</p>	<p style="text-align: center;">B 培 養</p> <p>前増菌培養 [略]</p> <p>選択増菌培養 前増菌培養液 10 mL ずつを<u>セレナイトシスチン培地及びハーナ・テトラチオン酸塩培地にそれぞれ加え、振り混ぜた後、41~43 °C で 18~24 時間培養^{註5}する。</u></p> <p>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。</p> <p>なお、必要に応じて<u>クロモアガーサルモネラ寒天培地^{註6}又はランバック寒天培地^{註6}</u>についても同様に操作する。</p> <p>純粋分離培養 <u>DHL 寒天培地及びブリリアントグリーン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 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。</u></p> <p>確認培養 上記 DHL 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。</p>
<p style="text-align: center;">C 同 定</p> <p>確認同定 [略]</p>	<p style="text-align: center;">C 同 定</p> <p>確認同定 [略]</p>

改正後	現 行
<p>血清型別^{注9} <u>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。</u></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>注 1 Tween 80 (Atlas Powder 製) 又はこれと同等のもの</p> <p>2 培地は、<u>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。</u></p> <p>3 培地は、<u>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。</u></p> <p>4 培地は、<u>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。</u></p> <p>5 培地は、<u>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。</u></p> <p>6 培地は、<u>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。</u></p>	<p>血清型別^{注7} <u>サルモネラの性状を示した菌を少量かき取り、スライドグラス上に 1 滴滴下した 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。</u></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>注 1 Tween 80 (Atlas Powder 製) 又はこれと同等のもの</p> <p>2 培地は、<u>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。また、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。</u></p>

改正後	現 行
<p>7 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</p> <p>8 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。</p> <p>9 O 群多価血清又は各 O 群血清との凝集は、<u>1 分以内</u>に強く凝集したものを陽性とする。</p>	<p>3 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で、<u>CHROMagar Salmonella (CHROMagar 製) に含まれるもの又はこれと同等のもの</u></p> <p>4 サルモネラに特有の酵素活性により分解され、赤色を呈する発色基質 (<u>5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド</u>) を混合したもので、<u>Rambach agar (CHROMagar 製) に含まれるもの又はこれと同等のもの</u></p> <p>5 <u>次の選択分離培養でサルモネラと疑われる集落が認められない場合には、更に培養時間を 24 時間程度延長した培養液について、再度選択分離培養を行う。</u></p> <p>6 <u>培養後 24 時間で判定する。培地表面にサルモネラと疑われる集落が認められた場合には、次の純粋分離培養及び確認培養を省略し、血清型別を行う。</u></p> <p>7 O 群多価血清又は各 O 群血清との凝集は、<u>30 秒以内</u>に強く凝集したものを陽性とする。</p>
<p>2 [略]</p> <p>第 19 章・第 20 章 [略]</p>	<p>2 [略]</p> <p>第 19 章・第 20 章 [略]</p>

改正後	現 行
<p>別表 1</p> <p>試薬で特級とあるのは、工業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本工業規格の一般試薬の特級の規格に該当するものを、また、日局とあるのは、薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方の規格に該当するものを示す。</p> <p>また、CAS とあるのは、アメリカ化学会発行の <i>Chemical Abstracts</i> 誌で使用される化合物登録番号を示す。</p> <p>〔中略〕</p> <p>アセフェート $C_4H_{10}NO_3PS$ (CAS : 30560-19-1)</p> <p>亜テルル酸カリウム K_2TeO_3 (CAS : 7790-58-1)</p> <p>〔中略〕</p> <p>エディフェンホス $C_{14}H_{15}O_2PS_2$ (CAS : 17109-49-8)</p> <p><u>エテホン $C_2H_6ClO_3P$ (CAS : 16672-87-0)</u></p> <p>エトキシキン $C_{14}H_{19}NO$ (CAS : 91-53-2) 黄褐色～褐色の粘性液体で、わずかに特異なにおいを有する。空気又は光によって徐々に着色する。</p> <p>〔中略〕</p> <p>クリスタルバイオレット $C_{25}H_{30}ClN_3$ (CAS : 548-62-9)</p> <p>〔中略〕</p>	<p>別表 1</p> <p>試薬で特級とあるのは、工業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本工業規格の一般試薬の特級の規格に該当するものを、また、日局とあるのは、薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方の規格に該当するものを示す。</p> <p>また、CAS とあるのは、アメリカ化学会発行の <i>Chemical Abstracts</i> 誌で使用される化合物登録番号を示す。</p> <p>〔中略〕</p> <p>アセフェート $C_4H_{10}NO_3PS$ (CAS : 30560-19-1)</p> <p><u>亜セレン酸ナトリウム $NaSeO_3$ (CAS : 10102-18-8) 97.0%以上。白い結晶性の粉末。</u></p> <p>亜テルル酸カリウム K_2TeO_3 (CAS : 7790-58-1)</p> <p>〔中略〕</p> <p>エディフェンホス $C_{14}H_{15}O_2PS_2$ (CAS : 17109-49-8)</p> <p>エトキシキン $C_{14}H_{19}NO$ (CAS : 91-53-2) 黄褐色～褐色の粘性液体で、わずかに特異なにおいを有する。空気又は光によって徐々に着色する。</p> <p>〔中略〕</p> <p>クリスタルバイオレット <u>特級 $C_{25}H_{30}ClN_3 \cdot 9H_2O$ (CAS : 548-62-9 (無水物))</u></p> <p>〔中略〕</p>

改正後			現行		
ジウレイドイソブタン	$C_6H_{14}N_4O_2$ (CAS : 6104-30-9)	白色粉末 でわずかに特異なにおいを有する。	ジウレイドイソブタン	$C_6H_{14}N_4O_2$ (CAS : 6104-30-9)	白色粉末 でわずかに特異なにおいを有する。
<u>ジウロン</u>	<u>$C_9H_{10}Cl_2N_2O$ (CAS : 330-54-1)</u>				
ジェチレングリコール	$C_4H_{10}O_3$ (CAS : 111-46-6)	無色液体	ジェチレングリコール	$C_4H_{10}O_3$ (CAS : 111-46-6)	無色液体
〔中略〕			〔中略〕		
ステリグマトシスチン	$C_{18}H_{12}O_6$ (CAS : 10048-13-2)		ステリグマトシスチン	$C_{18}H_{12}O_6$ (CAS : 10048-13-2)	
<u>スピノシン A</u>	<u>$C_{41}H_{65}NO_{10}$ (CAS : 131929-60-7)</u>				
<u>スピノシン D</u>	<u>$C_{42}H_{67}NO_{10}$ (CAS : 131929-63-0)</u>				
スルファキノキサリン	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$ (CAS : 59-40-5)	淡黄色～ 黄褐色の結晶又は結晶性の粉末でにおいはない。融点 244～247 °C	スルファキノキサリン	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$ (CAS : 59-40-5)	淡黄色～ 黄褐色の結晶又は結晶性の粉末でにおいはない。融点 244～247 °C
〔中略〕			〔中略〕		
メチルレッド試液	メチルレッド 0.1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。		メチルレッド試液	メチルレッド 0.1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。	
<u>メチレンブルー</u>	<u>$C_{16}H_{18}ClN_3S$ (CAS : 61-73-4)</u>				
メチレンブルー <u>三水和物</u>	特級 $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (CAS : 7220-79-3)		メチレンブルー	特級 $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (CAS : 7220-79-3)	
メチレンブルー試液	メチレンブルー <u>三水和物</u> 0.1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。		メチレンブルー試液	メチレンブルー 0.1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。	
〔以下略〕			〔以下略〕		