

3 飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法

杉本 泰俊*, 野村 昌代*, 鷺尾 和也*

Determination of Oxolinic acid and Flumequine in Feeds by LC

Yasutoshi SUGIMOTO* Masayo NOMURA* and Kazuya WASHIO*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center)

An analytical method for determination of oxolinic acid and flumequine in feeds using liquid chromatography (LC) was developed. Oxolinic acid and flumequine were extracted with 0.2 % metaphosphoric acid solution-acetonitrile (3:2). The extracts were filtered and topped up to 200 mL with the extracting solvent. Sample solutions were purified by C₁₈ cartridge (GL Science, InertSep Slim-J C18-B) and graphitized carbon cartridge (GL Science, InertSep GC), and subjected to LC for determination of oxolinic acid and flumequine. A recovery test was conducted using two kinds of formula feed and fish meal spiked with 5, 1, 0.5 and 0.3 mg/kg of oxolinic acid and flumequine. The mean recoveries of oxolinic acid and flumequine were 71.1~94.4 % and 71.5~90.5 %, and the relative standard deviations (RSD) were within 12 % and 16 %, respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using a formula feed for layer and a fish meal spiked with 3 mg/kg of oxolinic acid and flumequine. The mean recovery of oxolinic acid in the formula feed for layers was 88.7 %, and repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 5.9 %, 6.6 % and 0.48 respectively. For the fish meal, these respective values were 83.0 %, 6.1 %, 9.5 % and 0.68. The mean recoveries of flumequine in the formula feed for layers was 87.7 %, RSD_r, RSD_R and HorRat were 5.5 %, 6.9 % and 0.50 respectively. For the fish meal, these respective values were 82.0 %, 4.1 %, 8.3 % and 0.59.

Key words: オキシリン酸 oxolinic acid ; フルメキン flumequine ; 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; 液体クロマトグラフ liquid chromatograph (LC) ; 飼料 feed; 魚粉 fish meal ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

オキシリン酸は 1966 年に発見されたキノロン系抗菌剤である。キノロン系抗菌剤としてもっとも古いのは、1962 年に合成されたナリジクス酸であり、それ以降類似抗菌剤が数種開発され、動物用としてはピロミド酸及びオキシリン酸などが臨床的に用いられている。近年更に抗菌力を強力にしたニューキノロン系抗菌剤が多数開発されている¹⁾。また、オキシリン酸は農業用殺菌剤としても用いられている。

フルメキンは、1973 年に開発されたキノロン系抗菌剤の一つであり、水産用医薬品としてブ

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

リ、マダイ等の類結節病の予防に使用されていた。しかし、平成 17 年に許可が取り消され、現在は国内での使用はできなくなっている¹⁾。

オキシリン酸及びフルメキンは、いずれも飼料添加物として指定されていない抗菌性物質であり、飼料安全法に基づく成分規格では飼料に含んではならないこととされているが、輸入魚粉への残留が懸念されている。このため、魚粉及び魚粉を含む配合飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの分析法の開発が必要となっている。

オキシリン酸及びフルメキンの分析法としては、厚生労働省より食品中の分析法としてキノロン系合成抗菌剤 10 物質の同時分析法及び HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産) の適用が示されている²⁾。

筆者らは、財団法人日本食品分析センターが「平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの分析法¹⁾ (以下「分析センター法」という。)を基に、飼料分析基準³⁾への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、オキシリン酸及びフルメキンの構造式を Fig. 1 に示した。

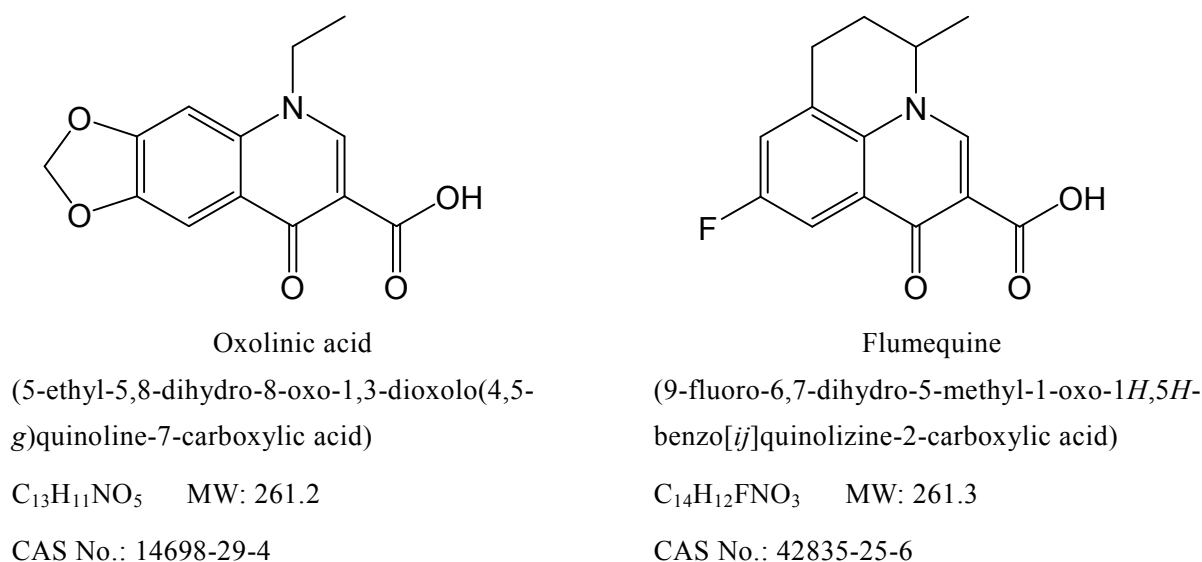


Fig. 1 Chemical structures of oxolinic acid and flumequine

2 実験方法

2.1 試料

市販の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, まだい育成用) 及び飼料原料 (国産魚粉, ペルー産魚粉, エクアドル産魚粉, チキンミール, フェザーミール, ポークチキンミール) をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed used in this study

Formula feed types	Ingredients types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	54	Corn, Polished rice
	Oil meal	28	Corn gluten meal, Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	6	Fish meal, Poultry by-product
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat Salt, Paprika extract, Feed additives
For finishing pig	Grains	74	Corn, Milo, Cleaned rice
	Oil meal	21	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Corn gluten feed
	Others	3	Animal fat, Molasses, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Vegetable oil, Feed additives
For red sea bream	Animal by-products	64	Fish meal, Antarctic krill meal
	Grains	17	Wheat flour
	Oil meal	6	Soybean meal, Corn gluten meal
	Brans	5	Rice bran, Wheat bran
	Others	8	Refined fish oil, Animal fat, Calcium phosphate, Seaweed powder, Banana powder, Feed yeast, Feed additives

2.2 試 薬

1) オキシリン酸標準原液

オキシリン酸標準品（関東化学製，純度 99.5 %）10 mg を正確に量り，100 mL の全量フラスコに入れ，水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）1 mL 及びメタノールを加え，超音波処理して溶かし，更に標線までメタノールを加えてオキシリン酸標準原液を調製した（この液 1 mL はオキシリン酸として 0.1 mg ($f=0.995$) を含有する．）．

2) フルメキン標準原液

フルメキン標準品（関東化学製，純度 99.5 %）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フルメキン標準原液を調製した（この液 1 mL はフルメキンとして 0.1 mg ($f=0.995$) を含有する．）．

3) 混合標準液

使用に際して，オキシリン酸標準原液及びフルメキン標準原液の一定量を混合し，水-メタノール（7+3）で正確に希釈し，1 mL 中にオキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 0.01, 0.25, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 及び 5 μ g を含有する各混合標準液を調製した．

4) 溶出溶媒

アセトニトリル-トルエン（3+1）1,000 mL にギ酸 2 mL を加えてギ酸含有アセトニトリル-トルエン混液を調製した．

5) 試薬等

アセトニトリル，メタノール，トルエン，蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた．ギ酸は Merck 製分析用 GR（純度 98 %以上）を用いた．メタリン酸については塊状、 HPO_3 とし

て 37%以上のものを用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100 シリーズ
- 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 3) ロータリーエバポレーター：柴田科学機械工業製 R-114
- 4) C₁₈ ミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充填量 500 mg)
- 5) グラファイトカーボンミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep GC (充填量 250 mg)
- 6) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45 μm、PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL を加えた後、30 分間静置した。更に 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをプ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 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線まで 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えた。この液 4 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 mL を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

C₁₈ ミニカラムにリザーバーを連結し、アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、圧注して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。

次に C₁₈ ミニカラムの下にあらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラムを連結した。試料溶液の入っていたなす形フラスコを 0.2 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (1+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次 C₁₈ ミニカラムに加え、圧注して液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ、オキシリン酸及びフルメキンをグラファイトカーボンミニカラムに移行させた。

次に C₁₈ ミニカラムをはずし、50 mL のなし形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置き、溶出溶媒 15 mL をグラファイトカーボンミニカラムに加えてオキシリン酸及びフルメキンを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール (7+3) 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でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、Table 2 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

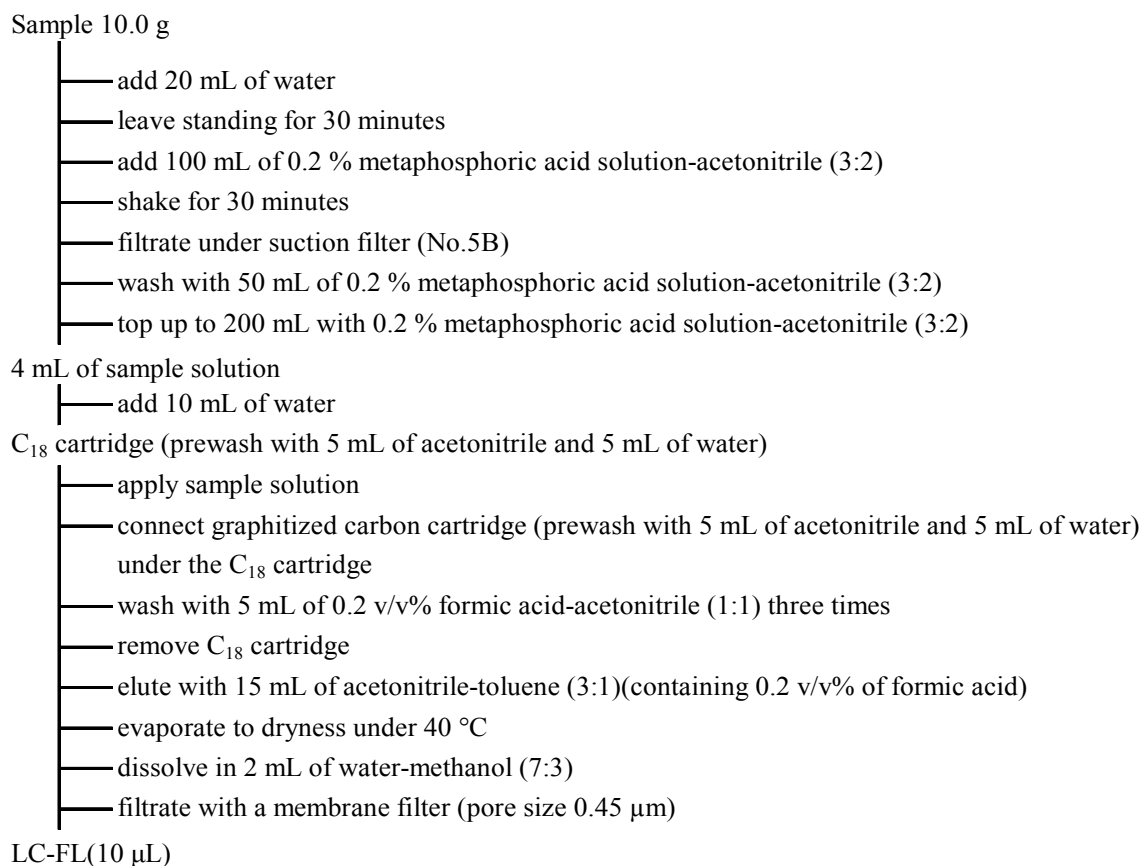
Table 2 Operating conditions for LC for analysing oxolinic acid and flumequine

Column	L-column ODS (4.6 mm i.d.×150 mm; 5 μm)
Mobile phase	0.2 v/v% Formic acid solution-methanol (7:3)→20 min→(6:4)
Detector	Fluorescence detector (Ex: 325 nm, Em: 365 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	40 °C

4) 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、試料中のオキシリン酸量及びフルメキン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for oxolinic acid and flumequine in feeds by using LC

3 結果及び考察

3.1 検量線

調製した 0.01, 0.25, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 及び 5 μg/mL のオキシリン酸及びフルメキン標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した。

その結果、検量線は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおり、オキシリン酸及びフルメキンともに 0.1~50 ng の範囲で直線性を示した。

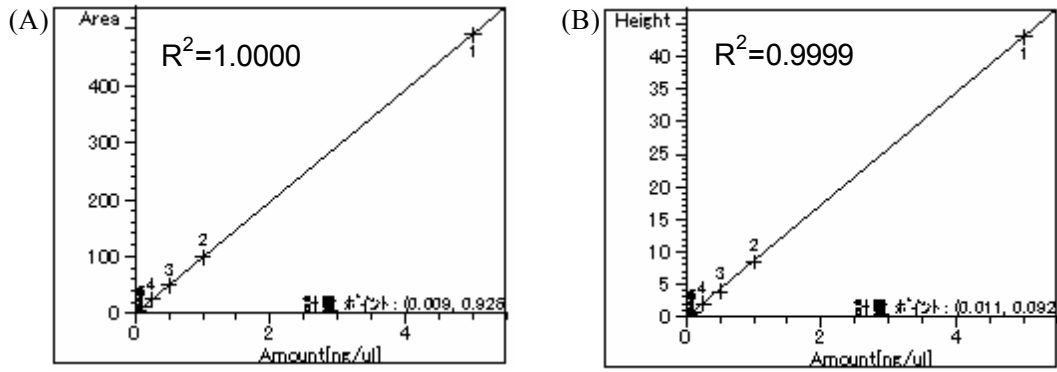


Fig. 2-1 Calibration curves of oxolinic acid by peak area (A) and peak height (B)

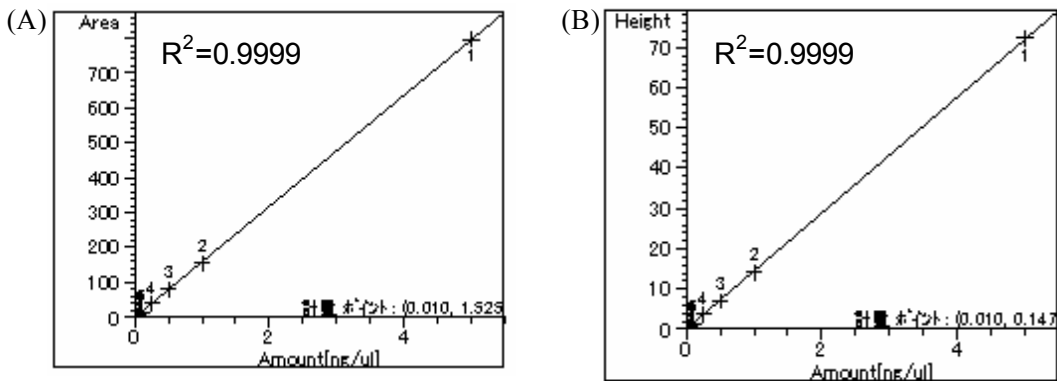


Fig. 2-2 Calibration curves of flumequine by peak area (A) and peak height (B)

3.2 オキシリン酸の安定性の検討

オキシリン酸は、水中光分解半減期が約 4 日¹⁾であることから、最終試料溶液中での経時変化を確認した。

国産魚粉にオキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、本法により操作した直後の最終試料溶液を 0 時間とし、最終試料溶液を実験室の蛍光灯を点灯した状態の下で経時的に 2, 4, 8, 24 時間後の定量値の変化を確認した。また同時に最終試料溶液を遮光バイアルに入れ遮光状態でも 0 及び 24 時間後の定量値の変化を確認した。

その結果 Fig. 3 のとおり時間が経過するに従い定量値は低下した。一方、遮光条件では定量値の低下は見られなかった。

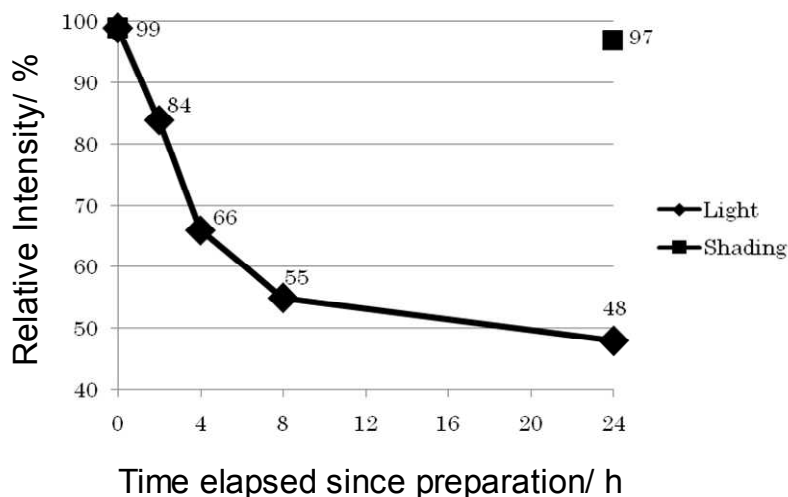


Fig. 3 Results of stability test for oxolinic acid

3.3 C₁₈ ミニカラムの検討

C₁₈ ミニカラム処理によるオキシリン酸及びフルメキンの溶出画分の確認を行った。

国産魚粉を 2.4 の 1)により抽出した液に、オキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、C₁₈ ミニカラム処理を行い、溶出画分の回収率を確認した。

その結果 Table 3 のとおり、0~15 mL に溶出し 15 mL 以上の画分には溶出されなかったため、C₁₈ ミニカラムからの溶出液量は 15 mL で十分と考えられた。

Table 3 Results of recovery test for oxolinic acid and flumequine

Fraction volume (mL)	(%)		
	0~15	15~20	Total
Oxolinic acid	96	0	96
Flumequine	98	0	98

3.4 グラファイトカーボンミニカラムの検討

グラファイトカーボンミニカラム処理によるオキシリン酸及びフルメキンの溶出画分の確認を行った。

国産魚粉を 2.4 の 1)により抽出した液に、オキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、C₁₈ ミニカラムで処理した後に、グラファイトカーボンミニカラムによる処理を行い、溶出画分の回収率を確認した。

その結果 Table 4 のとおり、0~15 mL に溶出し 15 mL 以上の画分には溶出されなかったため、グラファイトカーボンミニカラムからの溶出液量は 15 mL で十分と考えられた。

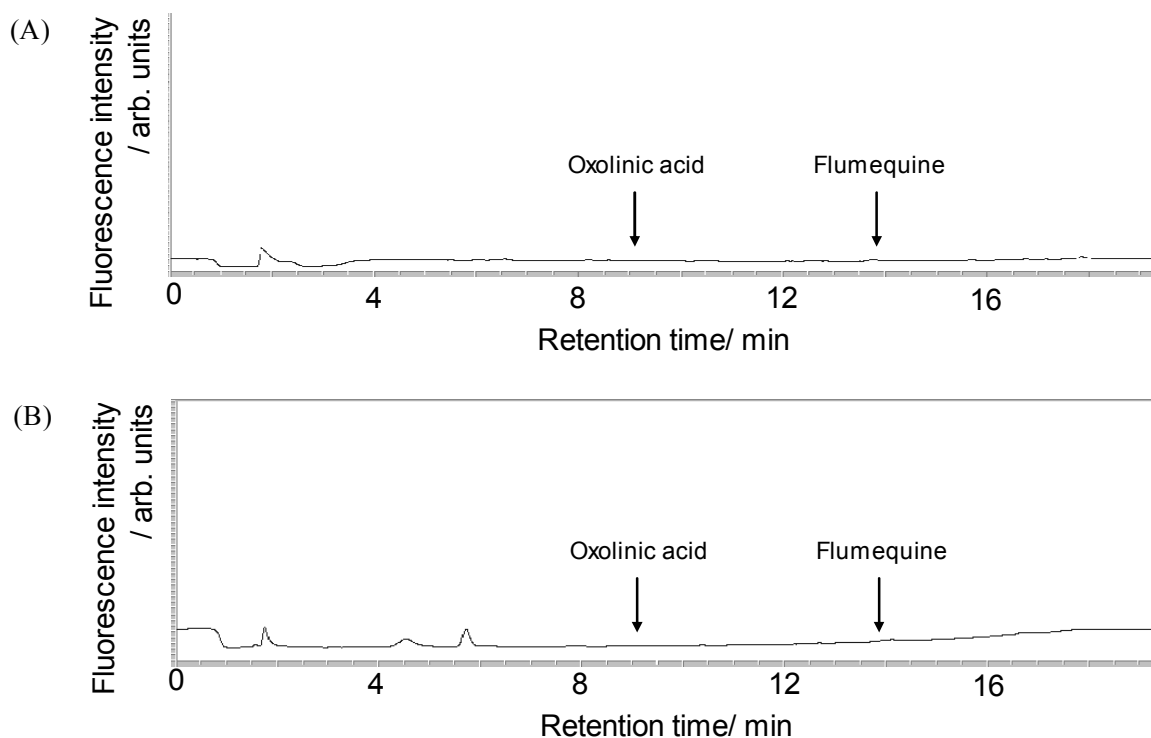
Table 4 Results of recovery test for oxolinic acid and flumequine

Fraction volume (mL)	(%)		
	0~15	15~20	Total
Oxolinic acid	98	0	98
Flumequine	99	0	99

3.5 妨害物質の検討

配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，まだい育成用）及び飼料原料（国産魚粉，ペルー産魚粉，エクアドル産魚粉，チキンミール，フェザーミール，ポークチキンミール）について，本法に従ってクロマトグラムを作成し，オキシリン酸及びフルメキンの定量を妨害するピークの有無を検討した．その結果，オキシリン酸及びフルメキンの定量を妨害するピークは認められなかった．

なお，妨害物質の検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した．

**Fig. 4 Chromatograms of each sample solution**

- (A) Sample solution of formula feed for layer
 (B) Sample solution of fish meal

3.6 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した．

Table 1 の成鶏飼育用配合飼料，まだい育成用配合飼料及び魚粉（国産魚粉，ペルー産魚粉，エクアドル産魚粉）にオキシリン酸及びフルメキンとして 1 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って 3 点併行分析を行い，その回収率及び繰返し精度を求めた．

その結果，Table 5 及び 6 のとおり，オキシリン酸については，平均回収率は 71.1~94.4 %，そ

の繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下, フルメキンについては, 平均回収率は 71.5~90.5 %, その繰返し精度は RSD として 16 %以下の結果が得られた.

なお, 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した.

Table 5 Results of recovery test for oxolinic acid

(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (domestic)		Fish meal (Peru)		Fish meal (Ecuador)	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}
5	94.4	(2.2)	71.1	(11)	90.8	(3.8)	71.8	(1.7)	80.3	(3.6)
1	81.8	(7.3)	74.5	(2.4)	76.3	(10)	83.3	(5.7)	78.2	(1.5)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

Table 6 Results of recovery test for flumequine

(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (domestic)		Fish meal (Peru)		Fish meal (Ecuador)	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}	Rec. ^{a)}	RSD ^{b)}
5	90.5	(2.5)	74.7	(12)	86.7	(1.9)	73.3	(11)	80.5	(5.2)
1	83.3	(1.7)	74.2	(2.6)	71.5	(1.4)	85.3	(16)	82.0	(2.7)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

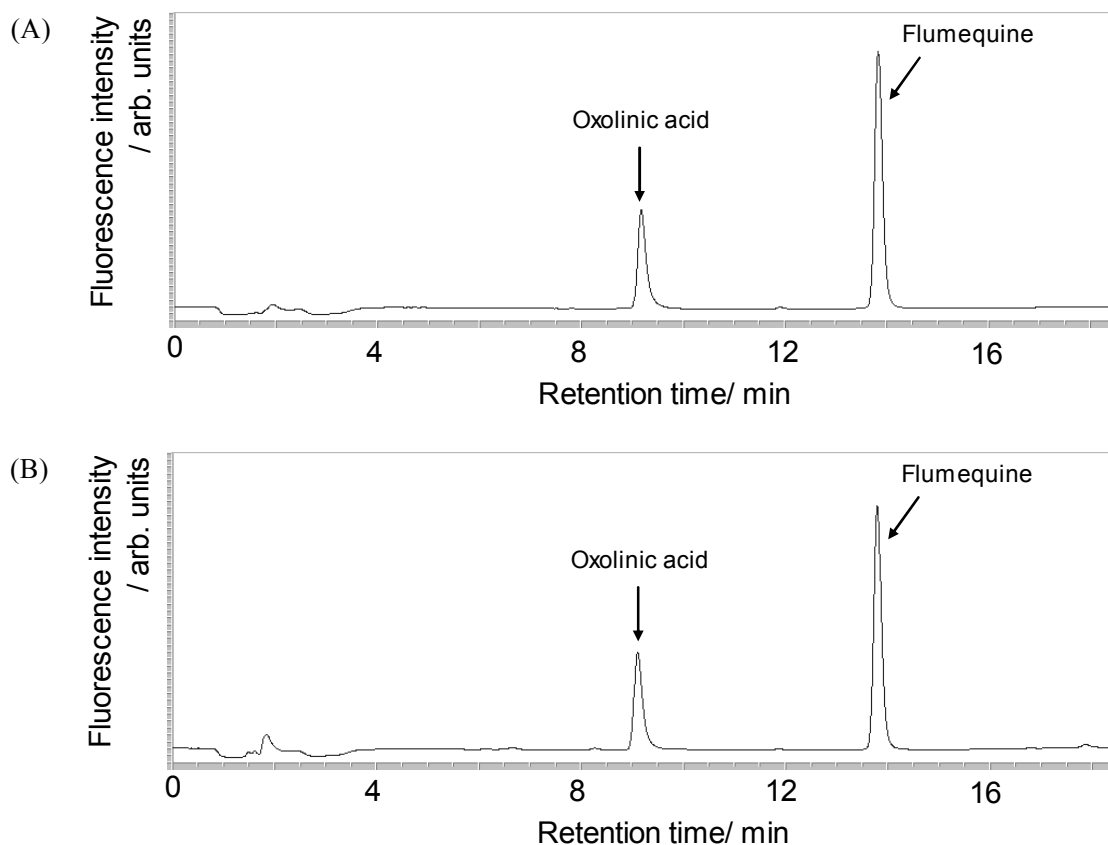


Fig. 5 Chromatograms of standard solution and sample solution

(A) Standard solution of oxolinic acid and flumequine (500 ng/mL)

(B) Sample solution of formula feed for layer (spiked with oxolinic acid and flumequine at 5 mg/kg)

3.7 検出下限

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られるピークの SN 比並びに回収率及び繰り返し精度を求めた。

成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉にオキシリン酸として 0.5 mg/kg, フルメキンとして 0.5 及び 0.3 mg/kg 相当量添加した試料について 3 点併行分析を行った。その結果、平均回収率及び繰り返し精度は Table 7 及び 8 のとおりであった。また、オキシリン酸のピークの SN 比が 10 となる濃度は 0.5 mg/kg, フルメキンは 0.3 mg/kg であった。

以上の結果から、本法は試料中のオキシリン酸を 0.5 mg/kg, フルメキンを 0.3 mg/kg まで検出可能と考えられた。

Table 7 Results of recovery test at the concentration of detection limit for oxolinic acid
(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Domestic fish meal	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5	72.6	(3.5)	77.7	(12)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

Table 8 Results of recovery test at the concentration of detection limit for flumequine

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Domestic fish meal	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5	78.9	(6.8)	72.2	(7.5)
0.3	89.3	(12)	77.5	(11)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

魚粉及び成鶏飼育用配合飼料にオキシリン酸及びフルメキンとして各 3 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター多摩研究所，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，JA 東日本くみあい飼料株式会社本社分析センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター及び同福岡センターの 8 試験室で共同分析を実施した。

オキシリン酸についての結果は Table 9 のとおりであり，魚粉では，平均回収率は 83.0 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 6.1 % 及び 9.5 % であり，HorRat は 0.68 であった。

また，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 88.7 %， RSD_f 及び RSD_R はそれぞれ 5.9 % 及び 6.6 % であり，HorRat は 0.48 であった。

フルメキンについての結果は Table 10 のとおりであり，魚粉では，平均回収率は 82.0 %， RSD_f 及び RSD_R はそれぞれ 4.1 % 及び 8.3 % であり，HorRat は 0.59 であった。

また，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 87.7 %， RSD_f 及び RSD_R はそれぞれ 5.5 % 及び 6.9 % であり，HorRat は 0.50 であった。

なお，参考のため，各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study results of oxolinic acid

Lab.No.	(mg/kg)			
	Sample			
	Fish meal		Formula feed for layer	
1	2.22	2.42	2.47	2.73
2	2.42	2.33	2.43	2.78
3	2.49	2.19	2.27	2.53
4	2.17	2.41	2.72	2.87
5	2.73	2.66	2.78	2.51
6	2.74	2.96	2.75	2.88
7	2.80	2.48	2.66	2.68
8	2.32	2.47	2.84	2.68
Spiked level	3.00		3.00	
Mean value ^{a)}	2.49		2.66	
Recovery (%)	83.0		88.7	
RSD _r ^{b)} (%)	6.1		5.9	
RSD _R ^{c)} (%)	9.5		6.6	
PRSD _R ^{d)} (%)	14		14	
HorRat	0.68		0.48	

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Collaborative study results of flumequine

Lab.No.	(mg/kg)			
	Sample			
	Fish meal		Formula feed for layer	
1	2.31	2.43	2.51	2.71
2	2.47	2.47	2.43	2.57
3	2.33	2.15	2.23	2.61
4	2.13	2.38	2.83	2.96
5	2.59	2.62	2.57	2.50
6	2.69	2.86	2.70	2.79
7	2.68	2.54	2.50	2.79
8	2.32	2.38	2.75	2.63
Spiked level	3.00		3.00	
Mean value ^{a)}	2.46		2.63	
Recovery (%)	82.0		87.7	
RSD _r ^{b)} (%)	4.1		5.5	
RSD _R ^{c)} (%)	8.3		6.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	14		14	
HorRat	0.59		0.50	

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC system	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Agilent Technologies, Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
4	JASCO, Pump PU-980 Auto sampler AS-950 Column oven CO-965 Detector FP-2025 Plus	Showa Denko, Shodex C18M4E (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute, L-column ODS (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
6	Shiseido, NANOSPACE SI-2 Detector NANOSPACE SI-2 3013	Tosoh Bioscience, TSKgel ODS-80TM (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
8	Shimadzu, Pump LC-20A System controller CBM-20A Auto sampler SIL-20AC Column oven CTO-20A Detector RF-10AXL	GL Science, Inertsil ODS-3 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料中のオキシリン酸及びフルメキンについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフを用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) オキシリン酸及びフルメキンの検量線は 0.1~50 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) C₁₈ ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム処理の溶出画分の確認を行ったところ溶出液の必要量はそれぞれ 15 mL で十分であった。
- 3) 最終試料溶液中でのオキシリン酸の安定性を確認したところ、遮光しない場合、経時的に定量値が減少することから、遮光バイアルを用いる必要があると考えられた。
- 4) 3 種類の配合飼料及び 6 種類の飼料原料について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、オキシリン酸及びフルメキンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 5) 2 種類の配合飼料及び 3 種類の魚粉を用いて、オキシリン酸及びフルメキンとして 1 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、オキシリン酸については、平均回収率は 71.1~94.4 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下、フルメキンについては、平均回収率は 71.5~90.5 %、その繰返し精度は RSD として 16 %以下の結果が得られた。
- 6) 本法は試料中のオキシリン酸を 0.5 mg/kg、フルメキンを 0.3 mg/kg で検出可能であった。
- 7) 魚粉及び成鶏飼育用配合飼料にオキシリン酸及びフルメキンとして各 3 mg/kg 相当量をそれぞれ

れ添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同分析を実施した。その結果、オキシリン酸について、魚粉では、平均回収率は 83.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 6.1 % 及び 9.5 % であり、HorRat は 0.68 であった。また、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 88.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 5.9 % 及び 6.6 % であり、HorRat は 0.48 であった。フルメキンについて、魚粉では、平均回収率は 82.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 4.1 % 及び 8.3 % であり、HorRat は 0.59 であった。また、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 87.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 5.5 % 及び 6.9 % であり、HorRat は 0.50 であった。なお、本法は、平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に記載された。

謝 辞

共同試験にご協力頂いた財団法人日本食品分析センター多摩研究所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、JA 東日本くみあい飼料株式会社本社分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2008).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法”，平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号 (2005).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).