

## 5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

山本 克己\*, 大島 慎司\*

### Determination of Chloramphenicol in Feeds by LC-MS/MS

Katsumi YAMAMOTO\* and Shinji OSHIMA\*

(\*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center)

An analytical method for determination of chloramphenicol in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. Chloramphenicol was extracted with methanol-1 % metaphosphoric acid solution (3:2). The extract was filtered and topped up to 200 mL with water. 20 mL of the sample solution was concentrated and purified with divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer column (Waters, Oasis HLB) and neutral alumina column (Waters, Sep-Pak Plus Alumina N), and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on an ODS column (Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II, 2.0 mm i.d.×150 mm, 2.2 μm) using gradient with 10 mmol/L ammonium formate solution-acetonitrile as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. A recovery test was conducted with fish meal and three kinds of formula feed spiked with chloramphenicol at 5 and 25 μg/kg. The mean recoveries were 93.5~101 % and relative standard deviations (RSD) were within 12 %. A collaborative study was conducted in eight laboratories using a fish meal and a formula feed spiked with chloramphenicol at 5 μg/kg. For the fish meal, the mean quantitative value was 5.19 μg/kg (104 %), repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 4.8 and 5.6 %, respectively, and HorRat was 0.25. For the formula feed, these respective values were 5.21 μg/kg (104 %), 4.5 %, 5.5 % and 0.25.

Key words: 抗生物質 antibiotics ; クロラムフェニコール chloramphenicol ; 魚粉 fish meal ; 配合飼料 formula feed ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 選択反応検出 selected reaction monitoring (SRM) ; 共同試験 collaborative study

### 1 緒 言

クロラムフェニコールは、合成法によって工業的製造が行われている広範囲スペクトルの抗生物質である<sup>1)</sup>。その副作用として、骨髄の造血機能に毒性を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある<sup>2)</sup>。

クロラムフェニコールは、我が国では食品一般の成分規格において不検出とされる農薬等の成分である物質として規定されている<sup>3)</sup>。また、飼料添加物に指定された抗生物質ではないため、飼

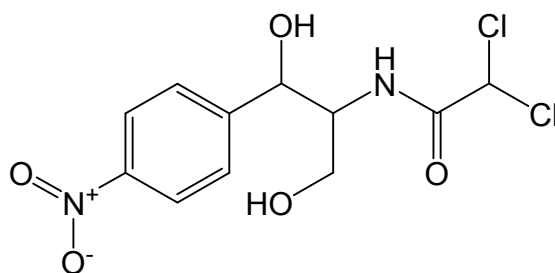
\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

料安全法に基づく成分規格等省令<sup>4)</sup>により、飼料に含まれてはならないとされている。平成 18 年度の輸入食品検査において、ベトナム産のイカ加工品をはじめとする水産動物及び魚類から、クロラムフェニコールが検出された<sup>5)</sup>。

現在、クロラムフェニコールの定量法は、厚生労働省の告示分析法 (LC-MS 法) 等があり、飼料においては、菅野<sup>6)</sup>による脱脂粉乳を対象とした方法 (LC-UV 法) が飼料分析基準<sup>7)</sup>に記載されている。平成 19 年度において、筆者は、この飼料分析基準を参考に魚粉及び魚粉を含む配合飼料への適用の拡大について検討を実施した。しかしながら、この分析法による低濃度での添加回収試験の結果は良好であったものの、試料溶液の精製にクロロホルム等の試薬を多量に使用することによる環境及び分析者における健康面への負担の懸念があり、精製効果が低い試料溶液を感度上昇のため高濃縮しているため、検出器を汚染しやすいなどの問題が認められた。このため、飼料分析基準への適用が困難であると考えられた<sup>8)</sup>。

平成 20 年 3 月に、財団法人日本食品分析センターが「平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業」において開発した分析法<sup>9)</sup> (以下「分析センター法」という。) が示されたことから、この分析法を基に飼料分析基準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、クロラムフェニコールの構造式を Fig. 1 に示した。



2,2-dichloro-*N*-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]acetamide

C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> MW: 323.1 CAS No.: 56-75-7

**Fig. 1** Chemical structure of chloramphenicol

## 2 実験方法

### 2.1 試料

魚粉 (調整魚粉)、配合飼料 (ブロイラー肥育前期用、ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用) をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

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 feeds used in this study**

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For broiler starting chick	Grains	61	Corn, Polished rice
	Oil meal	27	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	6	Fish meal, Chicken meal, Feather meal
	Others	6	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate Salt, Vermiculite, Yucca extract, Feed additives
For suckling pig	Grains	65	Corn, Milo
	Oil meal	22	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	8	Fish meal, Dried skimmilk, Dried whey
	Others	5	Animal fat, Bakery waste, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Feed yeast, Feed additives
For silver salmon	Animal by-products	49	Fish meal
	Grains	22	Wheat flour, Starch
	Oil meal	5	Corn gluten meal, Soybean meal
	Others	24	Animal fat, Vegetable oil, Calcium phosphate Striped bamboo, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) クロラムフェニコール標準液

クロラムフェニコール [ $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ] (和光純薬工業製, 純度 98.0 %) 20 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製した (この液 1 mL は, クロラムフェニコールとして 0.1 mg ( $f=0.98$ ) を含有する). 更に, 標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.5  $\mu$ g を含有する液を調製した.

使用に際して, この液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.05  $\mu$ g を含有するクロラムフェニコール標準液を調製した.

### 2) 内標準液

安定同位体元素標識クロラムフェニコール (CP-d<sub>5</sub>) 標準原液 (和光純薬工業製, 濃度 100  $\mu$ g/mL, 純度 98.0 %) 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を加えて 1 mL 中に CP-d<sub>5</sub>として 1  $\mu$ g ( $f=0.98$ ) を含有する液を調製した.

使用に際して, この液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中に CP-d<sub>5</sub>として 50 ng を含有する内標準液を調製した.

### 3) 検量線作成用標準液

クロラムフェニコール標準液及び内標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 1, 2, 5, 10 及び 20 ng を含有し, かつ CP-d<sub>5</sub>として 2.5 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

### 4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に用いるアセトニトリル及び水は, 高速液体クロマトグラフ用を用いた. その他の試薬は特級を用いた.

## 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Waters 製 Alliance 2695
- 2) タンデム型質量分析計：Waters 製 Quattro micro API Mass Analyzer
- 3) ロータリーエバポレーター：シバタインテック製 RE121
- 4) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 5) マニホールド：ジーエルサイエンス製
- 6) ケイソウ土：Celite 製（和光純薬工業販売）ハイフロスーパーセル
- 7) ガラス繊維ろ紙：Whatman 製 GF/A
- 8) 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：Waters 製 Oasis HLB（充てん剤量：60 mg，リザーバー容量：3 mL）
- 9) 中性アルミナミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Alumina N（充てん剤量：1,710 mg）にリザーバーを連結したもの
- 10) 振とう機：太洋化学工業製 SR-II

## 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、内標準液 1 mL を正確に加えた。更にメタノール-1 %メタリン酸溶液 (3+2) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。先の三角フラスコ及び残さを順次水 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水を加えた。この液 20 mL を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理 I

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メタノール 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、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。水-メタノール (4+1) 4 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄した後、吸引マニホールドを用いて 10 分間減圧しミニカラム内の水分を除去した。

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 10 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させ、溶出液をカラム処理 II に供する試料溶液とした。

### 3) カラム処理 II

中性アルミナミニカラムをアセトニトリル 5 mL で洗浄した。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、更にアセトニトリル 5 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

100 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-水 (19+1) 40 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-アセトニトリル (7+3) 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 (LC-MS/MS) による測定に供する試料溶液とした。

## 4) LC-MS/MS による測定

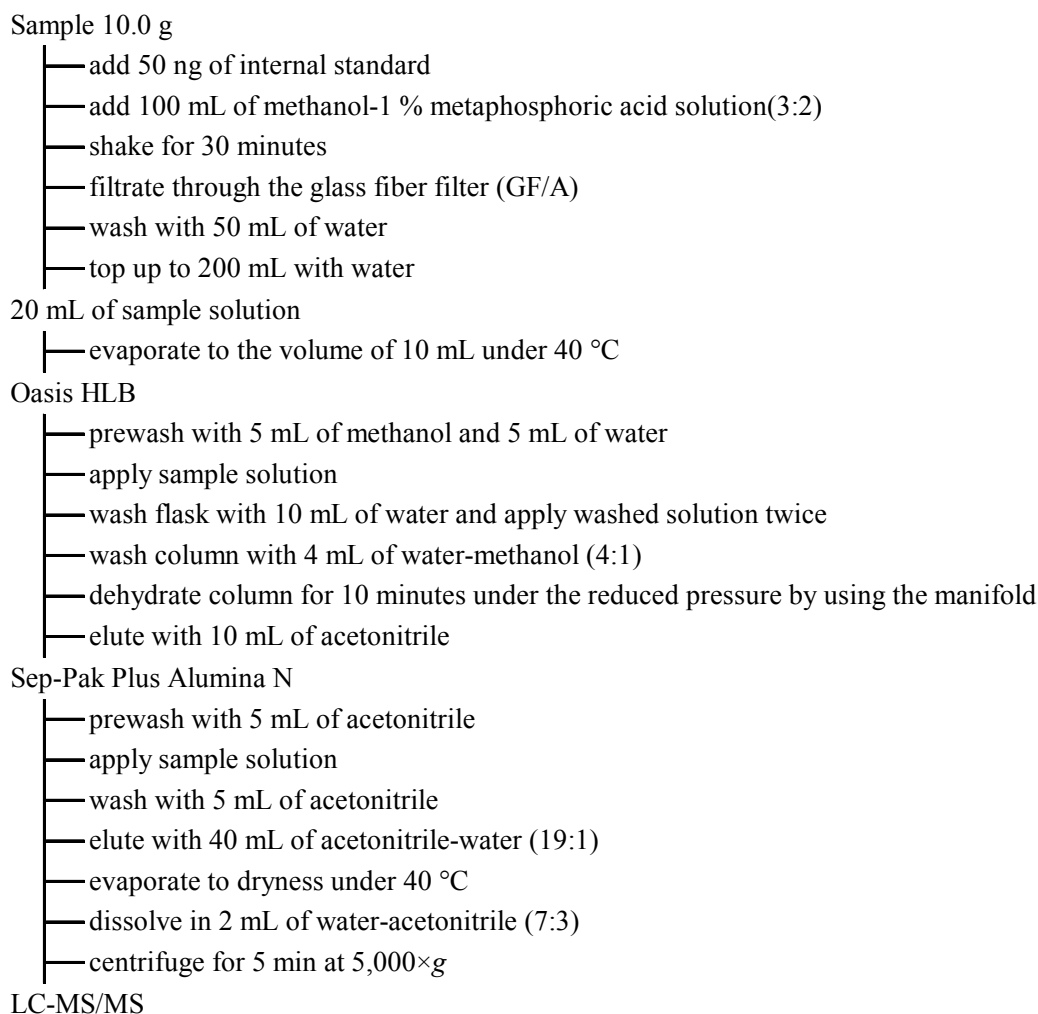
試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、Table 2 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

**Table 2 Operating conditions for LC-MS/MS for analysing chloramphenicol**

Column	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm i.d.×150 mm, 2.2 $\mu$ m)
Mobile phase	A: 10 mmol/L ammonium formate solution B: acetonitrile B 30 v/v%(1 min)→9 min→95 v/v%(10 min)→0.1 min→30 v/v%(10 min)
Flow rate	0.18 mL/min
Column temp.	40 °C
Injection volume	10 $\mu$ L
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (600 L/h)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Cone voltage	25 V
Capillary voltage	1 kV
Collision energy	20 eV
Source temp.	120 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 321 -> 152 (for determination of chloramphenicol) <i>m/z</i> 321 -> 257 (for confirmation of chloramphenicol) <i>m/z</i> 326 -> 157 (for determination of chloramphenicol-d <sub>5</sub> )

## 5) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからクロラムフェニコール及び CP-d<sub>5</sub> のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for chloramphenicol**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

分析センター法では、LC 条件において 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) を溶離液として溶出することで、1 mL 中に 0.1 ng 以上のクロラムフェニコールの検出が可能であるとされている。しかしながら、筆者らが検討したところ、1 mL 中に 5 ng 未満のクロラムフェニコールが検出できなかった。この原因は、使用する LC-MS/MS 機種の違いにより、感度に差が生ずるためと考えられた。そこで、LC の溶離液条件を検討した結果、グラジェントを使用することで、1 mL 中に 1 ng 以上のクロラムフェニコールを検出することが可能となった。

2.2 の 3) に従って調製した検量線作成用標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 10~200 pg の範囲で直線性を示した。

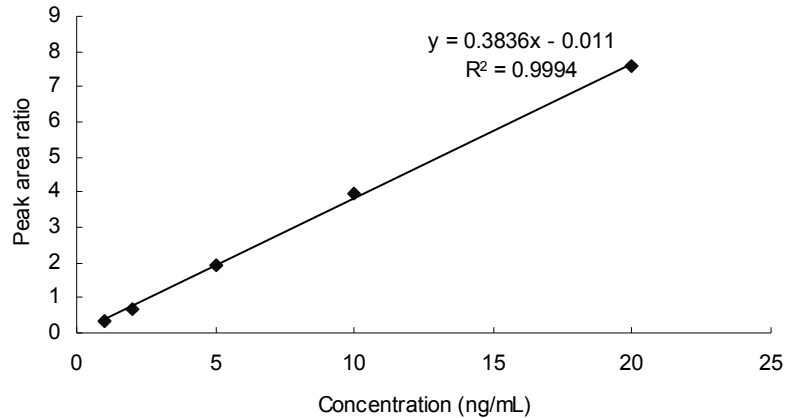


Fig. 2 Calibration curve of chloramphenicol

本法の検量線の直線範囲から、最終試料溶液における定量上限は、クロラムフェニコールとして 20 ng/mL である。従って、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を超えてクロラムフェニコールを含有する試料については、内標準添加量及び最終溶媒量をそれぞれ増やして分析を行う必要があると考えられた。

### 3.2 妨害物質の検討

魚粉（調整魚粉 2 種，輸入魚粉 1 種（ナミビア産）），配合飼料（鶏用（2 種），豚用（2 種）及び養魚用（3 種））を用い，本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した。その結果，すべての試料において，定量を妨害するピークは検出されなかった。

なお，鶏用配合飼料の選択反応検出クロマトグラムの例を Fig. 3 に示した。

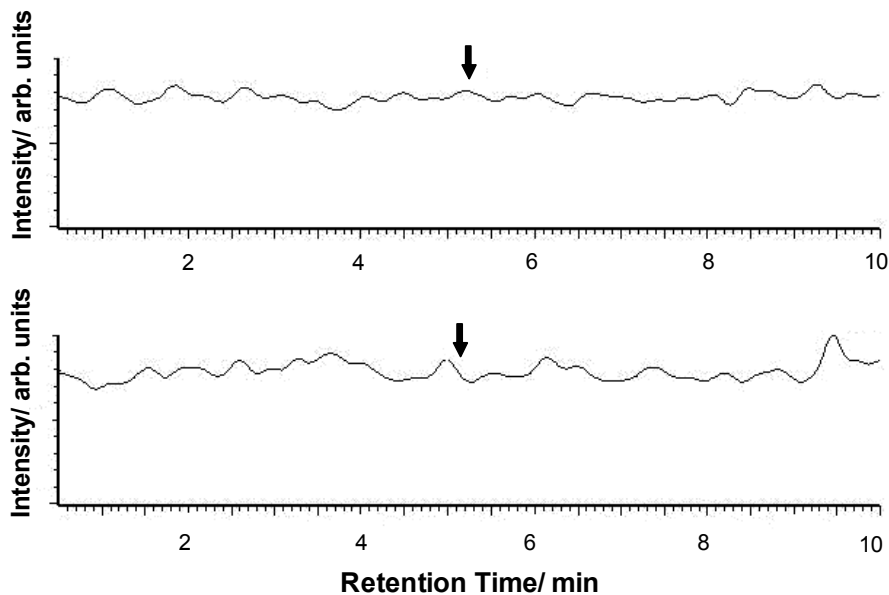


Fig. 3 SRM Chromatograms of formula feed for chicken

(upper: chloramphenicol for determination lower: chloramphenicol for confirmation)

### 3.3 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。

調整魚粉及び配合飼料（ブロイラー肥育前期用，ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用）に，クロラムフェニコールとしてそれぞれ 5 及び 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し，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 3 のとおり，クロラムフェニコールの平均回収率は 93.5~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 12 %以下であった。

また，内標準として添加した CP-d<sub>5</sub> について，ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値は，98.3 %であった。

なお，添加回収試験で得られたほ乳期子豚育成用配合飼料の選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

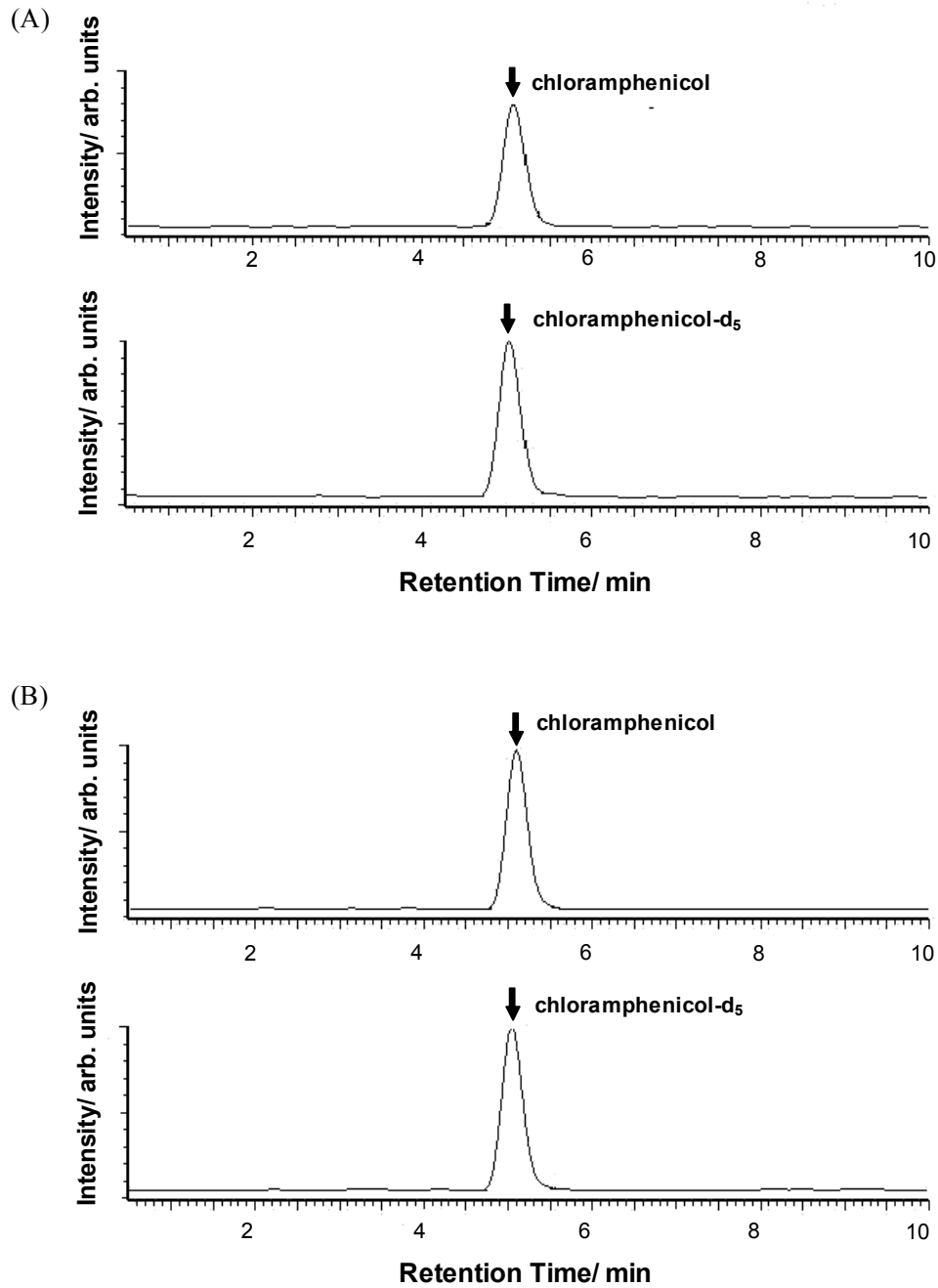
**Table 3 Recovery test for chloramphenicol**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Fish meal		Formula feed for broiler starting chick		Formula feed for suckling pig		Formula feed for silver salmon	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
25	98.4	( 4.7)	101	( 1.6)	99.0	( 5.5)	93.5	( 4.5)
5	99.9	( 6.6)	94.2	(12 )	101	( 2.1)	97.7	( 3.8)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)





**Fig. 4 SRM chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 20 pg)

(B) Sample solution (Formula feed for suckling pig spiked with 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of chloramphenicol)

### 3.4 検出下限

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験を実施し、得られるピークの *SN* 比並びに回収率及び繰返し精度を求めた。

調整魚粉及びぎんざけ育成用配合飼料にクロラムフェニコールとして 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は Table 4 のとおりであり、また、得られたピークの *SN* 比はいずれの試料においても 10 程度となったことから、本法は試料中 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のクロラムフェニコールを検出可能であると考えられた。

**Table 4 Recovery test at the concentration of detection limit for chloramphenicol**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Fish meal		Formula feed for silver salmon	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
2	107	( 9.4)	89.6	(12)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

### 3.5 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。

調整魚粉及び配合飼料（ブロイラー肥育前期用配合飼料）にクロラムフェニコールとして 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用い、全国酪農業協同組合連合会分析センター、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人食品環境検査協会東京事業所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、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及び同仙台センターの 8 試験室で共同試験を実施した。

その結果は Table 5 のとおりであり、調整魚粉では、平均回収率は 104 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) としてそれぞれ 4.8 %及び 5.6 %であり、HorRat は 0.25 であった。

また、配合飼料では、平均回収率は 104 %、 $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  はそれぞれ 4.5 %及び 5.5 %であり、HorRat は 0.25 であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフカラム、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 6 に示した。

**Table 5 Collaborative study results of chloramphenicol**

Lab. No.	Sample			
	Fish meal		Formula feed for broiler starting chick	
1	4.65	5.06	5.49	5.00
2	5.72	5.77	5.27	5.31
3	5.11	5.21	4.87	5.20
4	4.85	4.96	4.90	5.42
5	5.48	5.87	5.70	6.18
6	5.09	4.82	4.86	4.92
7	5.01	5.02	4.74	4.68
8	4.85	5.62	5.46	5.36
Spiked level	5		5	
Mean value <sup>a)</sup>	5.19		5.21	
Recovery (%)	104		104	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.8		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	5.6		5.5	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.25		0.25	

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 6 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	LC-MS/MS	Column (i.d.×length, particle size)
1	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×150 mm, 2.2 μm)
2	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×150 mm, 2.2 μm)
3	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	GL Sciences, ODS-III (2.1 mm×120 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies, 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	GL Sciences, ODS-III (2.1 mm×120 mm, 4 μm)
6	Waters, Quattro Premier	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×120 mm, 2.2 μm)
7	Applied Biosystems, API-3200	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS (2.0 mm×100 mm, 2.2 μm)
8	Agilent Technologies, 6410 Triple Quad LC/MS	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm×120 mm, 2.2 μm)

#### 4 まとめ

飼料中のクロラムフェニコールについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計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) ピーク面積を用いて内標準法により検量線を作成したところ、クロラムフェニコールは 10~200 pg の範囲で直線性を示した。
- 2) 魚粉 3 点及び魚粉を含有する配合飼料 7 点を用い、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、クロラムフェニコールの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 魚粉及び 3 種類の配合飼料を用いて、クロラムフェニコールとして 5 及び 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 93.5~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 12 %以下の成績が得られた。
- 4) 本法は、試料中 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のクロラムフェニコールを検出可能であった。
- 5) 調整魚粉及びブロイラー肥育前期用配合飼料に、クロラムフェニコールとして、それぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて、8 試験室において、本法による共同試験を実施した。その結果、調整魚粉の平均回収率は 104 %、その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) としてそれぞれ 4.8 %及び 5.6 %であり、HorRat は 0.25 であった。また、ブロイラー肥育前期用配合飼料の平均回収率は 87.6 %、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  としてそれぞれ 4.5 %及び 5.5 %であり、HorRat は 0.25 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収載された。

#### 謝 辞

共同試験に御協力頂いた全国酪農業協同組合連合会、財団法人日本食品分析センター、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人食品環境検査協会、財団法人日本冷凍食品検査協会及び社団法人日本科学飼料協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 田中 信夫, 中村 昭四郎: 抗生物質大要 [第 4 版], p160 (1995). (東京大学出版会)
- 2) クリロビッツ (岡見吉郎訳): 抗生物質論, p154 (1978). (学会出版センター)
- 3) 厚生省告示: “食品、添加物等の規格基準”, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示第 370 号 (1959).
- 4) 農林省令: “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 7 月 24 日, 農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知別添: “平成 18 年度畜水産食品の残留物質モニタリング検査結果について”, 平成 20 年 2 月 29 日, 食安監発第 0229003 号 (2008).
- 6) 菅野 清: 飼料研究報告, 29, 60 (2004).
- 7) 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).
- 8) 山本 克己: 飼料研究報告, 33, 110 (2008).
- 9) 財団法人日本食品分析センター: 平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業 (飼料中のマラカイトグリーン等の分析法の開発) (2008).