

飼料研究報告

第38号

平成25年

Research Report of Animal Feed

Vol. 38
2013



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
OIE Collaborating Centre for Animal Feed Safety and Analysis
Saitama, Japan

はしがき

『飼料研究報告』は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）の飼料検査担当職員が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析・鑑定技術の改善、検査・試験法の開発等を目指して行った調査・研究内容を年度毎にとりまとめているものです。今号は、昭和41年度の創刊以来38巻目の発刊となります。

FAMICは、農業生産資材（飼料、肥料、農薬など）、ペットフードや食品等を対象として科学的分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、検査等の業務を行う組織です。また、平成21年5月に「飼料の安全と分析」の分野で、国際獣疫事務局（OIE）コラボレーティング・センターに指定され、引き続き、飼料の安全性に関する情報の収集・発信、技術協力等を通じ、安全な畜産物の国際取引の確保に寄与しています。

FAMICの飼料検査担当部署は、「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づき、飼料及び飼料添加物並びにペットフードの製造業者及び輸入業者等に立入検査を実施すると共に、収去又は集取した試料を分析し、飼料等及びペットフードの安全性の確保を図っています。更に、これらの検査業務を迅速かつ的確に実施するための分析法の研究開発等にも取り組んでいます。

平成23年3月11日に発生した東日本大震災に伴う東京電力株式会社福島第一原子力発電所の事故から2年余りが過ぎましたが、その間、FAMICでは農林水産省等からの協力依頼に対し、牧草・稲わら・飼料・土壌・堆肥等の農業生産資材中の放射性物質の測定・調査等を業務の一つとして位置づけ、対応してきたところです。平成25年度も、農林水産省の要請により、飼料関連業者の適切な飼料製造工程管理の支援を行うと共に、安全な飼料供給に資するため、「飼料等への有害物質混入防止のための対応ガイドライン」に基づいた国産飼料原料に対する放射性セシウムの含有実態のサーベイランス調査を実施し、結果を定期的にとりまとめ、情報発信することとしています。

近年、国産飼料として牛への給与割合が増加している稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、残留農薬に係る指導基準値の設定が随時進められていることに対応し、FAMICでは、これらの農薬の同時定量法等の開発に積極的に取り組んでおり、本研究報告においてもその研究成果をとりまとめています。

今回とりまとめた研究成果は、公定法として農林水産省消費・安全局長が通知する「飼料分析基準」に追加収載されております。また、これら飼料等に係る分析法の解説は、既に発刊されている『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際に、追加収載する予定であります。

本研究報告が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの安全性の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位の皆様には、更なるFAMICの技術レベルの向上のために、引き続き、御指導、御鞭撻頂きますよう、お願い申し上げます。

平成25年9月

理事長 木村 真人

謝 辞

本報告に掲載された分析法の開発及び報告書の作成に当たり、御助言頂きました下記の飼料分析基準検討会の各委員に感謝申し上げます。

平成 24 年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。御役職は平成 25 年 3 月時点。)

- | | |
|--------|---|
| 石黒 瑛一 | 一般財団法人日本食品分析センター 顧問 |
| 永西 修 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域 上席研究員 |
| 小田中 芳次 | 公益財団法人日本植物調節剤研究協会 研究所 技術顧問 |
| 後藤 哲久 | 国立大学法人信州大学農学部応用生命科学科 教授 |
| 中島 正博 | 名古屋市衛生研究所 生活環境部部長 |
| 永山 敏廣 | 東京都健康安全研究センター 食品化学部長 |
| 濱本 修一 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部長 |
| 堀江 正一 | 大妻女子大学 家政学部食物学科 食安全学教授 |
| 松井 徹 | 国立大学法人京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻
動物機能開発学講座 動物栄養科学教授 |
| 松本 清 | 崇城大学 生物生命学部応用微生物工学科
食品生物科学講座 教授 |
| 南澤 正敏 | 一般財団法人日本穀物検定協会 技術研究顧問 |
| 宮崎 茂 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所 寒地酪農衛生研究領域長 |
| 安井 明美 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 企画管理部 専門員 |

目 次

1 酸分解ジエチルエーテル抽出法による粗脂肪定量法の油さいへの適用 小森谷 敏一, 松原 光里……………	1
2 飼料用イネ中のアズキシストロビン他 6 成分の農薬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定量法 藤田 敏文 ……………	7
3 穀類及び乾牧草中のアルジカルブ, アルジカルブスルホン及びアルジカルブスルホキシド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定量法 西村 真由美 ……………	33
4 飼料用イネ中のオリサストロビン他 13 成分の農薬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定量法 武田 然也, 岡田 かおり, 榊原 良成……………	53
5 穀類, 乾牧草及び稲わら中のグルホシネート, 3-メチルホスフィニコプロピオン酸及び N-アセチルグルホシネ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 牧野 大作, 若宮 洋一, 榊原 良成, 上野山 智洋 ……………	89
6 稲わら及び粳米中のベンフレセート及びシハロホップブチルのガスクロマトグラフ質量分析計による同時定量法 佐藤 梢, 風間 鈴子……………	108
7 飼料中のモリネートのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法 松尾 信吾……………	126

精度管理

1 平成 24 年度飼料の共通試料による分析鑑定について 田端 麻里, 義本 将之, 齋藤 晴文, 高橋 雄一, 浪越 充司, 佐古 理恵 ……………	140
---	-----

調査資料

1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について (平成24年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 ……	170
---	-----

2 特定添加物検定結果について (平成 24 年度)	肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課	193
----------------------------	------------------------	-----

他誌掲載論文 (抄録)

1 Interlaboratory Study of LC-UV and LC-MS Methods for the Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat	Koji Aoyama, Hajime Akashi, Naoki Mochizuki, Yuji Ito, Takashi Miyashita, Soohyung Lee, Motoki Ogiso, Mamoru Maeda, Shigemi Kai, Hiroki Tanaka, Hiroko Noriduki, Hisaaki Hiraoka, Toshitsugu Tanaka, Eiichi Ishikuro, Yoshinori Itoh, Toshihiro Nagayama, Masahiro Nakajima, Shigehiro Naito and Yoshiko Sugita-Konishi (食品衛生学雑誌, 53(3), 152-156 (2012)).....	207
2 腸球菌の微量液体希釈法を用いた薬剤感受性試験の検討	橋本健志, 橋本亮, 松崎学, 関口好浩, 橋本仁康, 浅尾美由起, 高木昌美 (食品衛生学雑誌, 53(5), 225-232 (2012))	207
3 Improvement and validation of the method to determine neutral detergent fiber in feed	Hisaaki HIRAOKA, Rie FUKUNAKA, Eiichi ISHIKURO, Osamu ENISHI and Tetsuhisa GOTO (Anim Sci J, 83(10), 690-695 (2012)).....	207
4 Modified use of a commercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage	Hisaaki Hiraoka, Katsumi Yamamoto, Yukiko Mori, Naoki Asao, Rie Fukunaka, Kenzaburo Deguchi, Kenzi Iida, Shigeru Miyazaki, Tetsuhisa Goto (Mycotoxin Research, DOI number: 10.1007/s12550-012-0155-6 Published online: 30 December 2012)	208

CONTENTS

1 Study of Application of Acid Hydrolysis and Ether Extraction Method to the Determination of Crude Fat in Oil Fouts	Toshiichi KOMORIYA and Hikari MATSUBARA	1
2 Simultaneous Determination of Azoxystrobin and 6 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS	Toshifumi FUJITA	7
3 Simultaneous Determination of Aldicarb, Aldicarb sulfone and Aldicarb sulfoxide in Grain and Grass Hay by LC-MS/MS	Mayumi NISHIMURA	33
4 Simultaneous Determination of Oryastrobin and 13 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS	Zenya TAKEDA, Kaori OKADA, and Yoshinari SAKAKIBARA	53
5 Simultaneous Determination of Glufosinate, 3-(Methyl phosphinico) propanoic acid and <i>N</i> -Acetylglufosinate in grains, grass hay and rice straw by LC-MS/MS	Daisaku MAKINO, Youichi WAKAMIYA, Yoshinari SAKAKIBARA and Tomohiro UENOYAMA	89
6 Determination of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Rice Straw and Paddy Rice by GC-MS	Kozue SATOU and Reiko KAZAMA	108
7 Determination of Molinate in Feed by GC-MS	Shingo MATSUO	126
§ Proficiency test		
1 Proficiency Test (in the fiscal 2012)	Mari TABATA, Masayuki YOSHIMOTO, Harufumi SAITOU, Yuuichi TAKAHASHI, Atsushi NAMIKOSHI and Rie SAKO	140

§ Investigative report

- 1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the fiscal 2012)
Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed
Inspection Department 170
- 2 Result of official “Testing” of specified feed additives (in the fiscal 2012)
Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection
Department..... 193

§ Papers accepted in other journal (abstract)

- 1 Interlaboratory Study of LC-UV and LC-MS Methods for the Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat
Koji Aoyama, Hajime Akashi, Naoki Mochizuki, Yuji Ito,
Takashi Miyashita, Soohyung Lee, Motoki Ogiso,
Mamoru Maeda, Shigemi Kai, Hiroki Tanaka, Hiroko Noriduki,
Hisaaki Hiraoka, Toshitsugu Tanaka, Eiichi Ishikuro,
Yoshinori Itoh, Toshihiro Nagayama, Masahiro Nakajima,
Shigehiro Naito and Yoshiko Sugita-Konishi
(*Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* ,
53(3), 152–156 (2012))..... 207
- 2 Investigation of Whether CLSI Broth Microdilution Method is Applicable for MICs Determination of Enterococcus species
Takeshi Hashimoto, Sayaka Hashimoto, Manabu Matsuzaki,
Yoshihiro Sekiguchi, Yoshiyasu Hashimoto, Miyuki Asao and
Masami Takagi
(*Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku
Zasshi)* , 53(5), 225–232 (2012)) 207
- 3 Improvement and validation of the method to determine neutral detergent fiber in feed
Hisaaki HIRAOKA, Rie FUKUNAKA, Eiichi ISHIKURO,
Osamu ENISHI and Tetsuhisa GOTO
(*Anim Sci J*, 83(10), 690-695 (2012))..... 207

4 Modified use of a commercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage

Hisaaki Hiraoka, Katsumi Yamamoto, Yukiko Mori,

Naoki Asao, Rie Fukunaka, Kenzaburo Deguchi,

Kenzi Iida, Shigeru Miyazaki, Tetsuhisa Goto

(*Mycotoxin Research*,

DOI number: 10.1007/s12550-012-0155-6

Published online: 30 December 2012) 208

1 酸分解ジエチルエーテル抽出法による粗脂肪定量法の油さいへの適用

小森谷 敏一^{*}, 松原 光里^{*}

Study of Application of Acid Hydrolysis and Ether Extraction Method to the Determination of Crude Fat in Oil Fots

Toshiichi KOMORIYA^{*} and Hikari MATSUBARA^{*}

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

In this work, the application of a hydrolysis and ether extraction method to determine the crude fat content of soybean and rapeseed oil fots was studied.

Samples were hydrolyzed with hydrochloric acid (4:1) by heating to 70~80 °C for 1 hour, and the liberated fatty acids were extracted via liquid-liquid distribution with diethyl ether. After washing diethyl ether layer with water, the diethyl ether was recovered, from the fat solution and the residue was dried at 95~100 °C for 3 hours and weighed and referred to as crude fat.

Determination of the crude fat content of three types each of soybean and rapeseed oil fots was undertaken using the hydrolysis and ether extraction method. Results indicated a crude fat content for soybean oil fots ranging from 60.17 % to 76.74 %, with repeatability in terms of a relative standard deviation (RSD_r) of not more than 1.0 %, and a crude fat content for rapeseed oil fots of 63.01 % to 67.43 %, with RSD_r of not more than 0.97 %.

A collaborative study was conducted in 11 laboratories using soybean and rapeseed oil fots. The RSD_r and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_R) were not more than 0.62 % and 1.1 %, with HorRat values of 0.85 and 0.84, respectively..

This method was validated and applied for use in the inspection of the crude fat content of soybean and rapeseed oil fots.

Key words: crude fat ; hydrolysis and ether extraction method ; soybean oil fots ; rapeseed oil fots ; collaborative study

キーワード：粗脂肪；酸分解ジエチルエーテル法；大豆油さい；なたね油さい；共同試験

1 緒 言

飼料中の粗脂肪の定量法にはジエチルエーテル抽出法及び酸分解ジエチルエーテル抽出法があり、加水分解しないと十分に脂肪が抽出されない試料については酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用されている。現在、飼料分析基準¹⁾において酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用される試料には、エキスパンド状の飼料、粉末油脂を原料とする配合飼料（ほ乳期子牛育成用代用乳配合飼料及びほ乳期子豚育成用配合飼料に限る）及び脂肪酸カルシウムを原料とする乳用牛飼育用配合飼料がある。今回、大豆油さい及びなたね油さい（食用大豆油及び食用なたね油の精製工程（脱ガム後の原油

^{*} 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

の脱酸工程)で発生するアルカリ性油さいを硫酸にて中和したもので脂肪酸ナトリウムが主成分のもの²⁾中の粗脂肪の定量法として酸分解ジエチルエーテル抽出法への適用要請があったことから、その検討結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

大豆油さい及びなたね油さい各3種類(製造ロットの違う3種類)を用いた。使用に際して、40℃の水浴中で約30分間加温した後、ホモジナイザーで5分間かき混ぜて均質にしたものを供試試料とした。

2.2 装置及び器具

- 1) ホモジナイザー：Hsiangtai 製 HG-200 (使用時回転数 6500 rpm)
- 2) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik AG 製 R-200
- 3) 恒温乾燥機：株式会社 東洋製作所製 DRM420DB
- 4) 電子天秤：株式会社 島津製作所製 AW320

2.3 定量方法

分析試料 2 g を正確に量って 100 mL のビーカーに入れ、エタノール 2 mL を加え、ガラス棒で混和して試料を潤した後、塩酸 (4+1) 20 mL を加えて時計皿で覆い、70~80℃の水浴上でときどきかき混ぜながら 1 時間加熱した後放冷した。

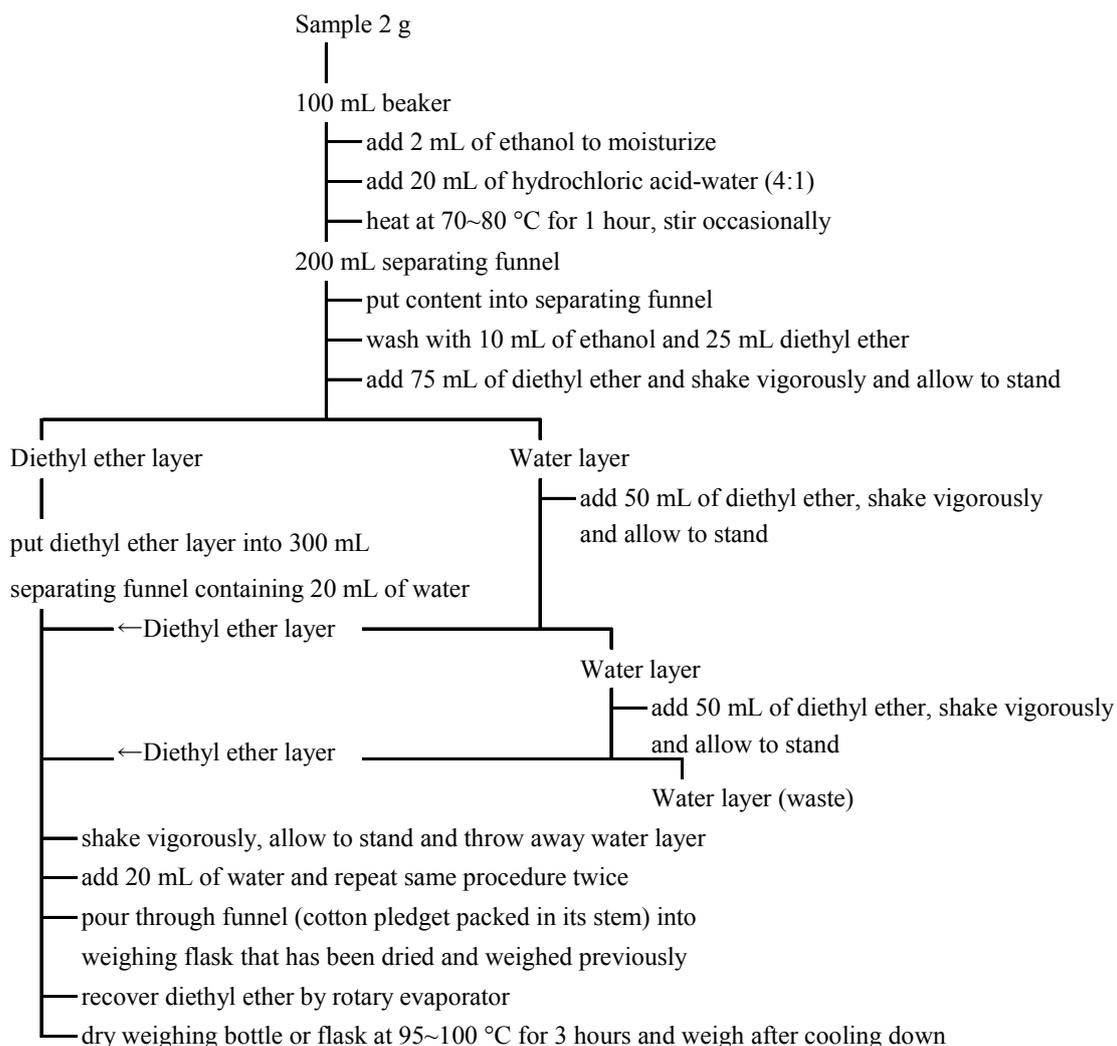
先のビーカーの内容物を 200 mL の分液漏斗 A に入れ、ビーカーをエタノール 10 mL 及びジエチルエーテル 25 mL で順次洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせた。更にジエチルエーテル 75 mL を分液漏斗 A に加え、手で激しく 1 分間振り混ぜた後静置した。ジエチルエーテル層 (上層) をピペット等でとり、あらかじめ水 20 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 B に加えた。

分液漏斗 A にジエチルエーテル 50 mL を加え、同様に 2 回操作し、各ジエチルエーテル層をピペット等でとり、分液漏斗 B に合わせた。

分液漏斗 B を手で激しく 1 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を捨てた。更に水 20 mL を分液漏斗 B に加え、同様に 2 回操作した。ジエチルエーテル層をあらかじめ脱脂綿を詰め硫酸ナトリウム (無水) 15 g を入れた漏斗で 300 mL のなす形フラスコ (あらかじめ 95~100℃で乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの) にろ過した。

次に、ロータリーエバポレーターで先のなす形フラスコ内のジエチルエーテルを回収し、なす形フラスコをはずして窒素ガス流下にてジエチルエーテルを揮散させた。95~100℃で 3 時間乾燥し、デシケーター (シリカゲル) 中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

参考のため、フローシートを Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Testing procedure of crude fat in oil foots

3 結果及び考察

3.1 ジエチルエーテル抽出法による確認

大豆油さい及びなたね油さい各 1 種類を用いてジエチルエーテル抽出法（飼料分析基準¹⁾第 3 章 3.1) による粗脂肪の定量値の確認を行った。その結果は Table 1 のとおりであり、ジエチルエーテルの循環時に油さい自体が固化して、粗脂肪が十分に抽出されていないと考えられた。

Table 1 Crude fat content measured by ether extraction method

Kind of samples	Lot No.	Crude fat (%)	
Soybean oil foots	1	54.28	55.84
Rapeseed oil foots	1	55.81	57.01

3.2 酸分解ジエチルエーテル抽出法による粗脂肪の定量値

大豆油さい及びなたね油さい各 3 種類を用い、2.3 に従って粗脂肪の定量値の確認を行った。その結果は Table 2 のとおりであり、大豆油さいの繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 1.0 %以下、なたね油さいの繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 0.97 %以下であっ

た。

また、3.1 で実施したジエチルエーテル抽出法による粗脂肪の定量値と比較して高く定量されることが確認できた。

参考までに、大豆油さい及びなたね油さい各 1 種類を用い、酸分解ジエチルエーテル抽出法による 2 試験室間（試料提供者及び FAMIC）における比較検討を行った。その結果は Table 3 のとおりであり、*F* 検定においていずれの試料も有意差は認められなかった。

Table 2 Content of crude fat measured by hydrolysis and ether extraction method

Kind of samples	Lot No.	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Soybean oil foots	1	75.04	1.0
	2	76.74	0.66
	3	60.17	0.65
Rapeseed oil foots	1	62.83	0.97
	2	65.68	0.67
	3	67.43	0.18

a) Mean value ($n=7$)

b) Relative standard deviations of repeatability

Table 3 Comparison of crude fat between two laboratories measured by hydrolysis and ether extraction method

Lab.No.		1		2		<i>F</i> -value
Kind of samples	Lot No.	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
Soybean oil foots	2	76.74	0.66	76.17	0.56	$F_0=1.431$
Rapeseed oil foots	2	65.68	0.67	64.81	0.30	$F_0=5.016$

$F(6,6;0.025)=5.820$

a) Mean value ($n=7$)

b) Relative standard deviations of repeatability

3.3 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、以下の方法で共通試料による共同試験を実施した。大豆油さい及びなたね油さい各 1 kg を 2.1 に従い、それぞれ均質化した後、約 80 g に小分けしたものを各試験室に配布し、明示の 2 点反復で実施した。参加試験室は、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、日清丸紅飼料株式会社総合研究所、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、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 11 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{3), 4)}を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った後、繰

返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 4 に示した。大豆油さいでは、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 0.52 %及び 1.1 %であった。また、なたね油さいでは、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 0.62 %及び 1.1 %であった。IUPAC のプロトコールでは化学分析法の妥当性確認を行うにあたり、試験室間共同試験データから求めた RSD_R と修正 Horwitz 式から求めた室間再現精度 ($PRSD_R$) の比である HorRat は 2 以内であることがよいとされているが、粗脂肪のような経験的分析法は HorRat の対象外としている。そこで、本試験結果について、参考までに HorRat を計算したところ、大豆油さい及びなたね油さいでそれぞれ 0.85 及び 0.84 であった。

Table 4 Collaborative study results of crude fat

Lab.No.	Kind of samples			
	Soybean oil foots (%)		Rapeseed oil foots (%)	
1	66.56	66.47	65.04	64.18
2	65.58	66.63	64.53	64.73
3	65.76	65.51	63.72	63.50
4	65.98	65.95	64.22	63.28
5	65.56	65.51	63.02	63.44
6	65.67	66.11	63.64	63.67
7	67.01	66.34	63.57	64.01
8	67.23	66.88	63.76	63.09
9	65.87	65.40	63.93	63.09
10	67.02	67.24	65.03	65.17
11	65.46	64.80	63.64	63.15
Mean value ^{a)} (%)	66.12		63.88	
RSD_r ^{b)} (%)	0.52		0.62	
RSD_R ^{c)} (%)	1.1		1.1	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	1.2		1.3	
(Reference) HorRat	0.85		0.84	

a) $n=22$

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

4 まとめ

以下の結果から、大豆油さい及びなたね油さい中の粗脂肪の定量法として飼料分析基準の酸分解ジエチルエーテル抽出法を適用することは、妥当であると考えられた。

- 1) ジエチルエーテル抽出法ではジエチルエーテルの循環時に油さい自体が固化して十分に抽出されていないことが確認された。
- 2) 大豆油さい及びなたね油さい各 3 種類を用いて酸分解ジエチルエーテル抽出法にて定量した結

果，大豆油さいの繰返し精度は，相対標準偏差（ RSD_r ）として 1.0 %以下，なたね油さいの繰返し精度は，相対標準偏差（ RSD_r ）として 0.97 %以下であった。

- 3) 大豆油さい及びなたね油さいを用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所，JA 東日本くみあい飼料株式会社，協同飼料株式会社研究所，日清丸紅飼料株式会社総合研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

また，本検討に際して試料の提供いただいた日清丸紅飼料株式会社関係者各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 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).
- 2) 第 2 回農業資材審議会飼料分科会飼料栄養部会議事録，(2013).
- 3) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 4) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II*, Gaithersburg, MD, USA (2012).

2 飼料用イネ中のアゾキシストロビン他 6 成分の農薬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定量法

藤田 敏文*

Simultaneous Determination of Azoxystrobin and 6 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage, and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Toshifumi FUJITA*

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

An analytical method was developed to determine the levels of azoxystrobin and six other pesticides (diclocymet, isoprocarb, metalaxyl, metolcarb, pirimicarb and propoxur) in rice and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, the above pesticides were extracted with acetone and resulting solutions were filtered. The filtrate was diluted with acetone to a final volume of 200 mL. Sample solutions were then purified with octadecylsilylated silica gel mini-column (InertSep Slim-J C18-B from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), porous-diatomite cartridge (Chem Elut from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) and layered solid phase extraction (SPE) tube (ENVI-Carb/NH₂ from Supelco Inc.; Bellefonte, PA, U.S.) , and analyzed using LC-ESI-MS/MS. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from GL Sciences Inc.) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile as a mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed. Rice straw was spiked with 1.0 or 5.0 mg/kg of azoxystrobin, 1.0 or 15.0 mg/kg of diclocymet, 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 of other three pesticides. Whole-crop rice silage was spiked with 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 mg/kg of other five pesticides. Paddy rice was spiked with 0.1 or 2.0 mg/kg of azoxystrobin, 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 mg/kg of other four pesticides. The resulting mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r), respectively, were 81.4 to 119 % and not more than 18 % for azoxystrobin, 82.1 to 102 % and not more than 16 % for diclocymet, 81.0 to 107 % and not more than 8.8 % for isoprocarb, 81.8 to 114 % and not more than 8.1 % for metalaxyl, 76.2 to 95.2 % and not more than 19 % for metolcarb, 88.5 to 113 % and not more than 8.8 % for pirimicarb, and 82.3 to 114 % and not more than 15 % for propoxur.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw and paddy rice spiked with seven pesticides. The rice straw was fortified with azoxystrobin and diclocymet at levels of 5.0 mg/kg and 15 mg/kg, respectively, and with each of the other pesticides at respective levels of 1.0 mg/kg. Paddy rice was fortified with azoxystrobin at a level 2.0 mg/kg, which each of the others at respective levels of 1.0 mg/kg. The mean recoveries of azoxystrobin were 79.5 to 84.3 %, while the RSD_r and reproducibility (RSD_R), in terms of relative standard deviations and HorRat were 8.0 %, 8.8 %, 11 %, 8.8 %, 0.90, and 0.61, respectively. The respective measured

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

values obtained for the other pesticides were as follows: (diclocymet) 84.0 %, 85.0 %, 6.3 %, 8.0 %, 10 %, 9.5 %, 0.97, and 0.59; (isoprocarb) 83.5 %, 83.3 %, 7.3 %, 3.9 %, 15 %, 14%, 0.94, and 0.90; (metalaxyl) 94.2 %, 99.5 %, 3.4 %, 3.5 %, 5.3%, 7.7%, 0.33, and 0.48; (metolcarb) 78.8 %, 74.5 %, 7.8 %, 5.7 %, 6.6 %, 12 %, 0.41, and 0.76; (pirimicarb) 97.0 %, 102 %, 4.6 %, 5.0 %, 12 %, 6.3 %, 0.76, and 0.39; (propoxur) 86.3 %, 85.1 %, 6.6 %, 5.9 %, 13 %, 10 %, 0.80, and 0.65.

This method was validated and established for use in the inspection of seven pesticides in rice straw and rice products for feed.

Key words: azoxystrobin; diclocymet; isoprocarb; metalaxyl; metolcarb; pirimicarb; propoxur; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：アゾキシストロビン；ジクロシメット；イソプロカルブ；メタラキシル；メトルカルブ；ピリミカーブ；プロポキスル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

近年、国産飼料として牛への給与割合が増加している飼料用の稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米（本報告では、これらを併せて表現する場合には「飼料用イネ」と表記する。）について、残留農薬に係る指導基準¹⁾の設定が随時進められている。

これら指導基準のある成分のうち飼料分析基準²⁾に分析法が収載されていない成分、あるいは、指導基準は設定されていないがモニタリングの必要性がある農薬成分については、定量可能な分析法の開発が急務とされている。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが、平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において開発した方法³⁾（以下「JFRL 法」という。）及びその基となった分析法^{4), 5)}を基に、JFRL 法が対象とする農薬成分のうちの 7 成分（アゾキシストロビン、イソプロカルブ、ジクロシメット、ピリミカーブ、プロポキスル、メタラキシル及びメトルカルブ）の飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、参考までに、今回検討した農薬のうち指導基準値が設定されている 3 成分について、指導基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

Compound	Subject to feed	Regulation value (mg/kg)
Azoxystrobin	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	1
	Paddy rice	2
Isoprocarb	Rice straw	1
	Whole-crop rice silage	0.1
Metalaxyl	Rice straw	0.5
	Whole-crop rice silage	0.2

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、稲発酵粗飼料については、50 °C で 20 時間乾燥後、同様に粉碎したものを供試試料とした。

2.2 試薬

1) 各農薬標準品

アゾキシストロビン，ジクロシメット，イソプロカルブ，メタラキシル，メトルカルブ，ピリミカーブ及びプロポキシルの標準品は，Table 2 に示した供給業者，純度のものを用いた。

2) 各農薬標準原液

各農薬標準品 25 mg を正確に量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は，各農薬としてそれぞれ 0.5 mg を含有する．）。

3) 農薬混合標準液

7 成分の農薬標準原液各 2 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，各農薬としてそれぞれ 10 µg を含有する．）。

使用に際して，農薬混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水（3+2）で正確に希釈し，1 mL 中に各農薬として 0.25，1.0，2.5，5.0，10 及び 20 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

4) アセトン及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を，溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。酢酸アンモニウムは特級を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。

Table 2 Pesticide standard

Compound	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No.	Purity(%)	Factor of standard solution
Azoxystrobin	Dr. Ehrenstorfer	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403.4	131860-33-8	99.0	0.990
Diclocymet	Wako pure chemical industries	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	313.2	139920-32-4	99.0	0.993
Isoprocarb	Wako pure chemical industries	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.2	2631-470-5	99.0	0.994
Metalaxyl	Kanto chemical	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279.3	57837-19-1	99	0.994
Metolcarb	Dr. Ehrenstorfer	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.1	129-41-5	98.0	0.983
Pirimicarb	Dr. Ehrenstorfer	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.1	23103-98-2	98.7	0.989
Propoxur	Dr. Ehrenstorfer	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	209.2	114-26-1	99.5	0.998

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：

LC部：Waters 製 ACQUITY UPLC

MS部：Waters 製 ACQUITY Quattro Premier XE

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) 高速遠心分離器：日立工機製 SCT15B

4) ロータリーエバポレーター：東京理化工機製 NAJ-160（真空コントローラ DPE-2120 付き）

5) 吸引マニホールド：Waters 製 吸引マニホールド

6) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：ジールサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）

7) 多孔性ケイソウ土カラム：Agilent Technologies 製 Chem Elut（5 mL 保持用）

8) グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH₂（充てん剤量 500 mg / 500 mg）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を正確に量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（粳米は 20 mL）を加え 30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粳米は 100 mL）を加え、30 分間振り混ぜて（300 rpm）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、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液をアセトンで 10 倍希釈した後、希釈試料溶液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えた後、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した（吸引マニホールドを使用して流速 1 mL/min とした。以下同様。）。

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。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル（9+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、この操作を更に同様に流出させた。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、水-アセトニトリル（2+3）10 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させた。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、この液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

試料溶液に水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れた後 10 分間静置した。100 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酢酸エチル 5 mL ずつ 4 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て各農薬を溶出させた。更に酢酸エチル 10 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固し、アセトニトリル-トルエン（3+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 III

グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムにアセトニトリル-トルエン (3+1) 10 mL で洗浄した。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、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下して各農薬流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。水-アセトニトリル (2+3) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×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した。

また、試料が稲わらである場合は、試料溶液は一定量を更に水-アセトニトリル (2+3) で正確に 10 倍希釈し、アゾキシストロビン及びジクロシメットの定量に用いた。

5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という。) に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 3 及び 4 に示した。

Table 3 Operating conditions of LC-MS/MS for determination of the 7 pesticides

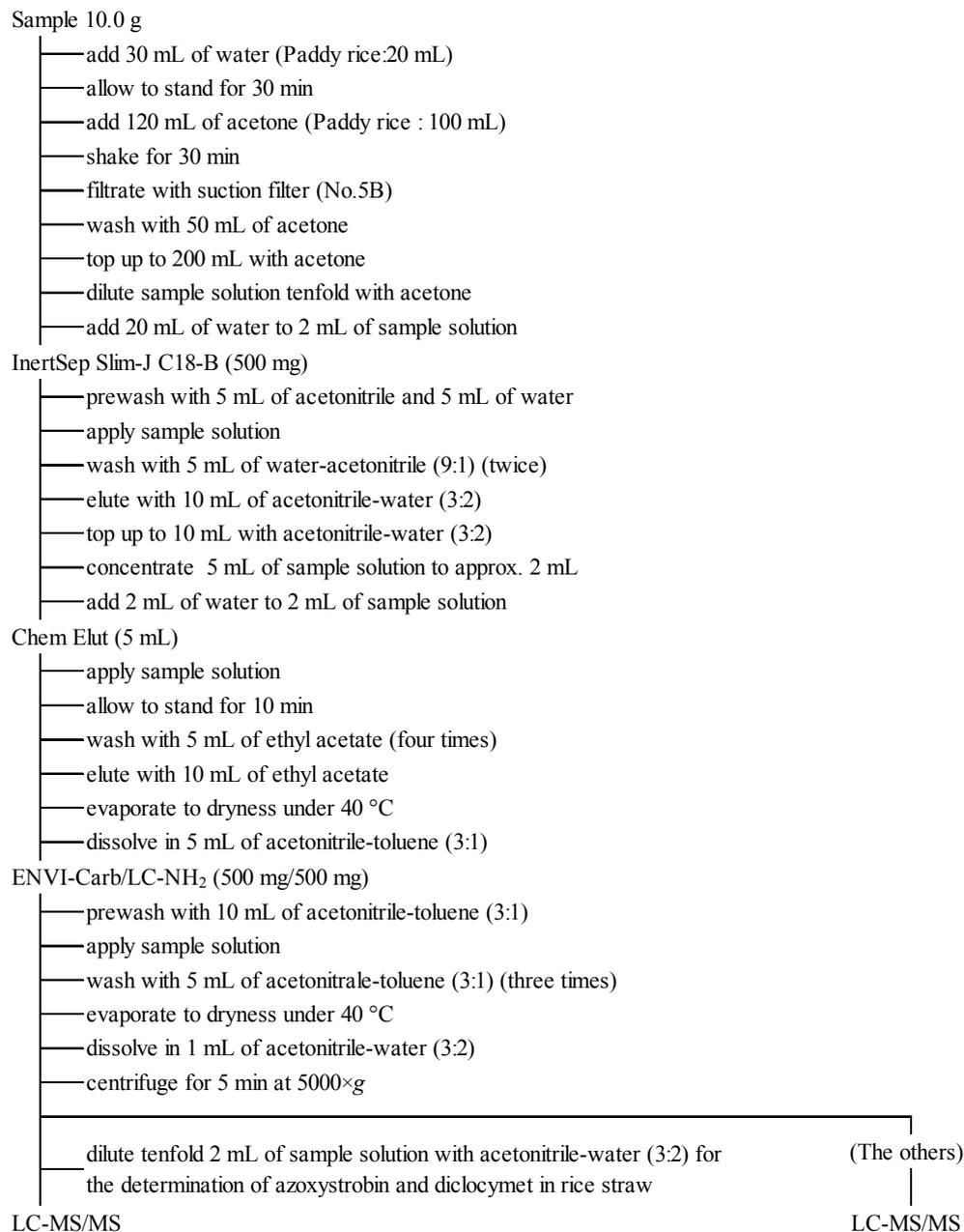
Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	N ₂ (600 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 3.5 kV

Table 4 Mass spectrometry optimized parameters for the determination of the pesticides

Compound	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Azoxystrobin	+	404	372 (Quantitative)	20	15
			344 (Qualifier)		25
Diclocymet	+	313	173 (Quantitative)	35	23
			137 (Qualifier)		47
Isoprocarb	+	194	95 (Quantitative)	30	15
			137 (Qualifier)		10
Metalaxyl	+	280	220 (Quantitative)	30	15
			192 (Qualifier)		20
Metolcarb	+	166	109 (Quantitative)	11	15
			94 (Qualifier)		43
Pirimicarb	+	239	182 (Quantitative)	35	15
			72 (Qualifier)		20
Propoxur	+	210	111 (Quantitative)	25	15
			93 (Qualifier)		25

6) 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、試料中の各農薬量を算出した。定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for the 7 pesticides in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析条件の最適化及び検量線の作成

7成分のうち、アゾキシストロビンについては、JFRL法で用いられた確認イオン及び定量イオンの設定質量数では、1.0 ng/mL以下の濃度の標準液では感度が安定しなかったため、設定質量数を当試験室で使用した機種に最適化した。

また、質量分析条件については、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを当試験室で使用した機種に最適化した。

2.2 の 2) に従って調製した標準液各 5 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及び高さを求めて検量線を作成した。その結果は、Fig. 1-1 及び 1-2 のとおりであり、メトルカルブ以外の農薬は、0.25 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。メトルカルブは 1.0 ng/mL 以下の濃度では SN 比が 10 以下となったため、2.5 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。

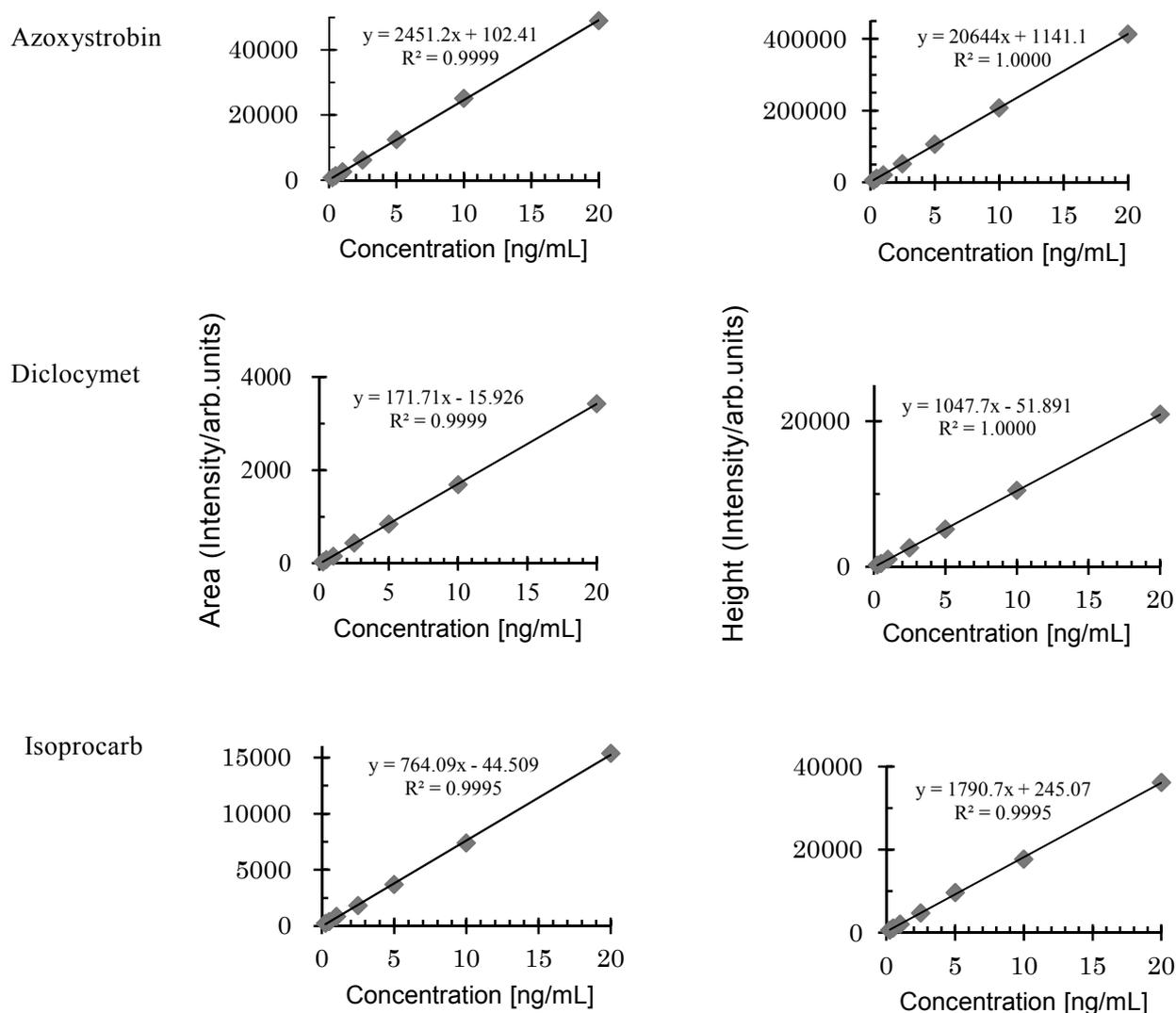
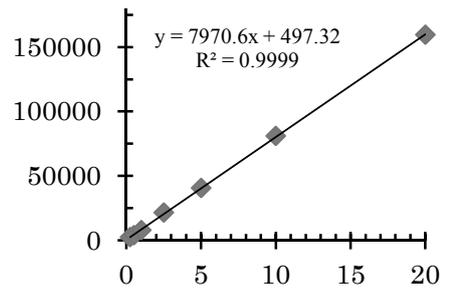
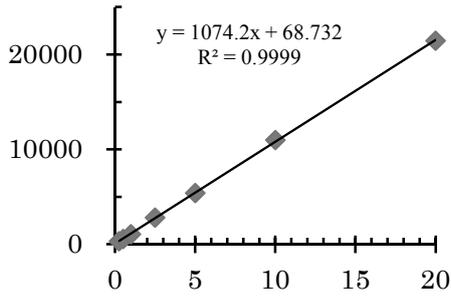
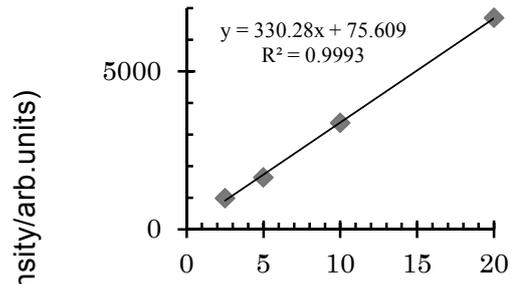
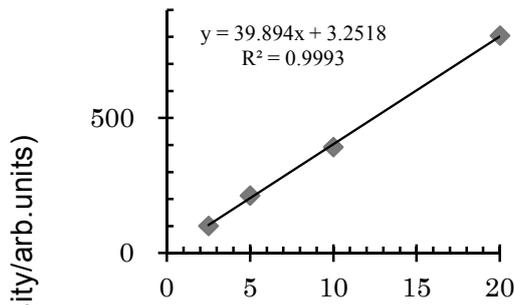


Fig. 1-1 Calibration curves of three pesticides (azoxystrobin, diclocymet and isoprocarb)

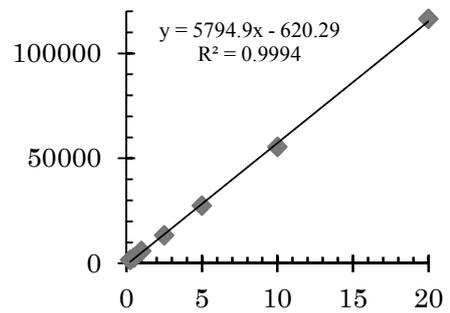
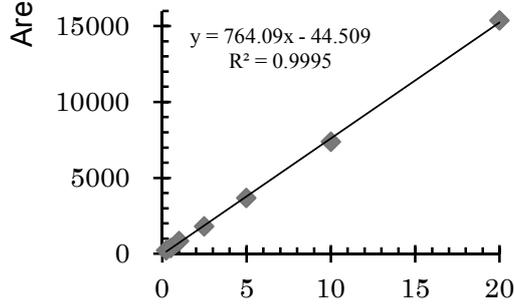
Metalaxyl



Metolcarb



Pirimicarb



Propoxur

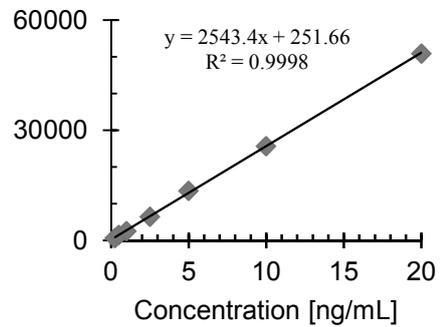
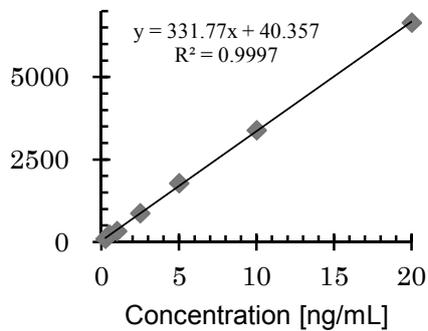


Fig. 1-2 Calibration curves of four pesticides (metalaxyl, metolcarb, pirimicarb and propoxur)

3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1)に従って調製した試料溶液に各農薬として 20 mg/kg 相当量（試料液中 0.1 µg/mL 相当量）を添加し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。ミニカラムからの溶出液はいずれも 2.4 の 3)及び 4)の精製を行った後定量に供した。その結果は Table 5-1 及び 5-2 のとおりであり、いずれの試料においても洗浄溶媒である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL の画分では農薬成分の流出は見られず、抽出溶媒である水-アセトニトリル (2+3) 10 mL の画分に全ての農薬が溶出し、またその後の 10 mL の画分には溶出しなかった。

Table 5-1 Elution pattern of 7 pesticides by InertSep Slim-J (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}			Total (%)
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Azoxystrobin	0	95	0	95
Diclocymet	0	91	0	91
Isoprocarb	0	94	0	94
Metalaxyl	0	96	0	96
Metorcarb	0	98	0	98
Pirimicarb	0	99	0	99
Propoxur	0	92	0	92

a) *n*=1

Table 5-2 Elution pattern of 7 pesticides by InertSep Slim-J (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}			Total (%)
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Azoxystrobin	0	82	0	82
Diclocymet	0	87	0	87
Isoprocarb	0	86	0	86
Metalaxyl	0	94	0	94
Metorcarb	0	91	0	91
Pirimicarb	0	95	0	95
Propoxur	0	82	0	82

a) *n*=1

3.3 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4の1)及び2)に従って調製した試料溶液に各農薬として1 mg/kg 相当量（試料液中5 ng/mL相当量）を添加したものをを用いて、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した。多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液はいずれも2.4の4)の処理を行い、その結果はTable 6-1及び6-2のとおりであり、いずれも酢酸エチル25 mLの画分に全ての農薬が溶出し、25 mL以降の画分には溶出しなかった。

Table 6-1 Elution pattern of 7 pesticides by Chem Elut (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}		
	Ethyl acetate		Total
	0~25 mL	~40 mL	
Azoxystrobin	96	0	96
Diclocymet	91	0	91
Isoprocarb	109	0	109
Metalaxyl	107	0	107
Metorcarb	97	0	97
Pirimicarb	108	0	108
Propoxur	86	0	86

a) $n=1$

Table 6-2 Elution pattern of 7 pesticides by Chem Elut (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}		
	Ethyl acetate		Total
	0~25 mL	~40 mL	
Azoxystrobin	82	0	82
Diclocymet	81	0	81
Isoprocarb	84	0	84
Metalaxyl	92	0	92
Metorcarb	81	0	81
Pirimicarb	98	0	98
Propoxur	82	0	82

a) $n=1$

3.4 グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムの溶出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1), 2)及び 3)に従って調製した試料溶液に各農薬として 1 mg/kg 相当量 (試料液中 5 ng /mL 相当量) を添加したものをを用いて、グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は Table 7-1 及び 7-2 のとおりであり、いずれもアセトニトリル-トルエン (3+1) 15 mL の画分に全ての農薬が溶出し、15 mL 以降の画分には溶出しなかった。

Table 7-1 Elution pattern of 7 pesticides by ENVI-Carb/LC-NH₂ (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}		Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)		
	0~15 mL	~25 mL	
Azoxystrobin	98	0	98
Diclocymet	88	0	88
Isoprocarb	91	0	91
Metalaxyl	99	0	99
Metorcarb	110	0	110
Pirimicarb	99	0	99
Propoxur	90	0	90

a) $n=1$

Table 7-2 Elution pattern of 7 pesticides by ENVI-Carb/LC-NH₂ (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}		Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)		
	0~15 mL	~25 mL	
Azoxystrobin	99	0	99
Diclocymet	97	0	97
Isoprocarb	89	0	89
Metalaxyl	94	0	94
Metorcarb	84	0	84
Pirimicarb	101	0	101
Propoxur	86	0	86

a) $n=1$

3.5 妨害物質の検討

飼料用イネを用い、本法により調製した試料溶液 ($n=1$) 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ところ、試料用イネ中において、妨害とな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選択反応検出 (SRM) クロマトグラムの一例を Fig. 2-1, 2-2 及び 2-3 に示した。

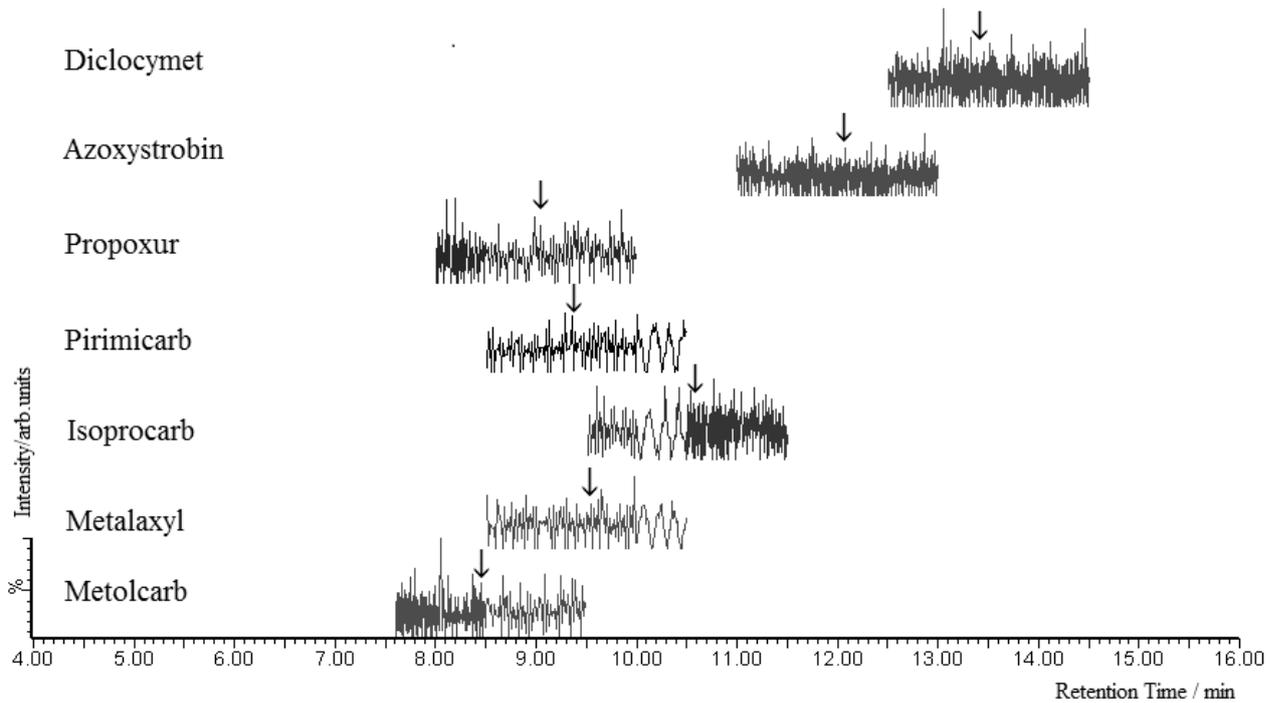


Fig. 2-1 Selected reaction monitoring chromatograms of rice straw (non-spiked)
(Arrows indicate the retention time of each pesticide)

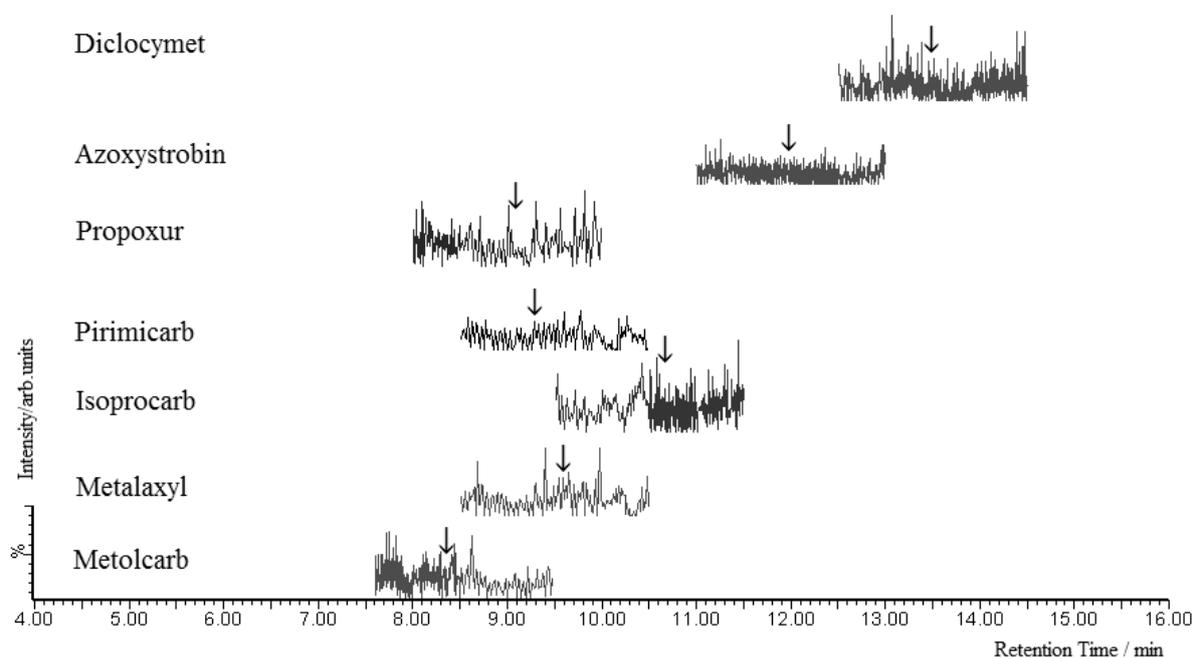


Fig. 2-2 Selected reaction monitoring chromatograms of whole-crop rice silage (non-spiked)

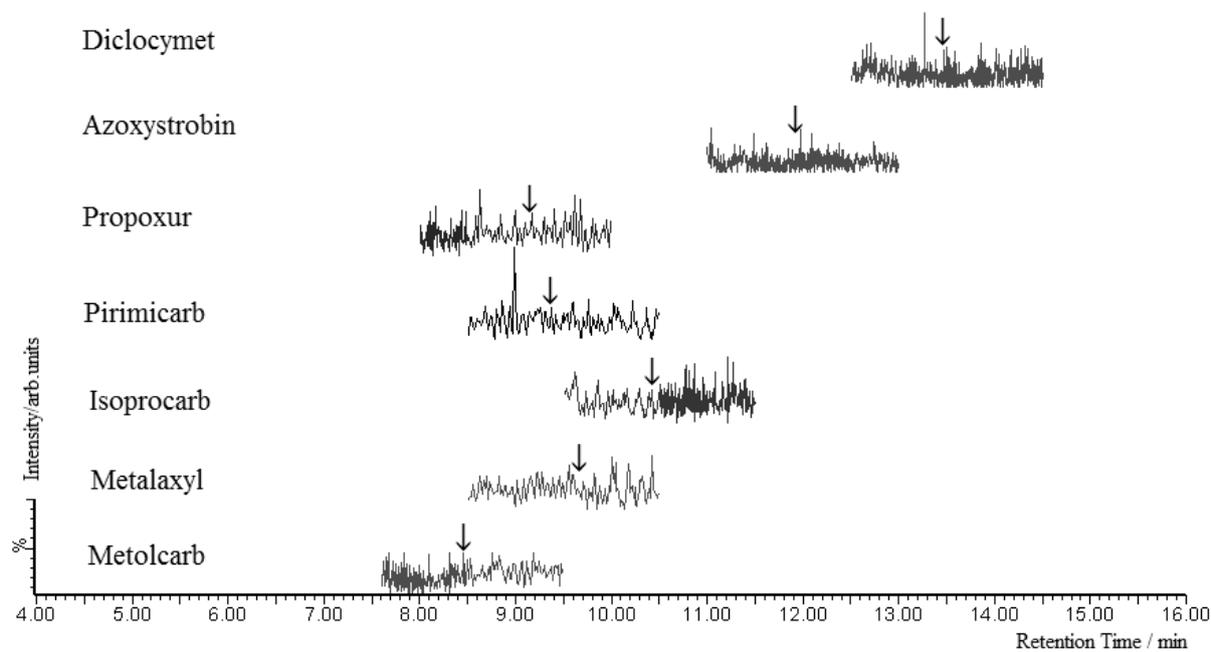


Fig. 2-3 Selected reaction monitoring chromatograms of paddy rice (non-spiked)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した飼料用イネを用いて添加回収試験を行った。アゾキシストロビンについては、稲わらに 5 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料中 25 及び 5 µg 相当量），稲発酵粗飼料に 1 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量）並びに粃米に 2 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 10 及び 0.5 µg 相当量），ジクロシメットについては、稲わらに 15 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料中 75 及び 5 µg 相当量），稲発酵粗飼料及び粃米に 1 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量），メタラキシルについては、試料用イネに 1 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料中 0.5 及び 0.2 µg 相当量），メトルカルブについては、飼料用イネに 5 及び 2 µg（最終試料中 1 及び 0.4 mg/kg 相当量），その他の農薬は、飼料用イネに 1 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量）添加し，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 8 のとおり，アゾキシストロビンについては平均回収率 81.4~119 %，その繰返し精度は，相対標準偏差（RSD_r）として 18 %以下，ジクロシメットについては平均回収率 82.1~102 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 16 %以下，イソプロカルブについては平均回収率 81.0~107 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.8 %以下，メタラキシルについては平均回収率 81.8~114 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.1 %以下，メトルカルブについては平均回収率 76.2~95.2 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 19 %以下，ピリミカーブについては平均回収率 88.5~113 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.8 %以下，プロポキシルについては平均回収率 82.3~114 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 15 %以下の成績が得られた。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 8 Result of recovery tests

Compound	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Azoxystrobin	5.0	89.1	2.1	—	—	—	—
	2.0	—	—	—	—	97.2	3.4
	1.0	106	1.7	81.4	11	—	—
	0.1	—	—	104	18	119	14
Diclocymet	15	94.8	6.8	—	—	—	—
	1.0	101	11	82.1	8.6	102	16
Isoprocarb	0.10	—	—	90.7	7.5	91.0	9.1
	1.0	81.0	6.3	83.5	5.4	87.2	5.4
Metalaxyl	0.10	93.6	8.8	105	6.3	107	6.8
	1.0	91.3	3.9	81.8	8.1	101	5.4
Metolcarb	0.04	90.7	3.6	114	1.7	103	6.8
	1.0	76.2	19	89.2	11	82.0	17
Pirimicarb	0.4	85.6	2.1	95.2	11	94.9	6.4
	1.0	88.8	4.0	88.5	8.8	96.7	1.3
Propoxur	0.10	90.5	2.4	110	2.7	113	5.0
	1.0	82.3	3.1	93.0	6.9	96.7	1.3
	0.10	85.4	4.5	110	15	114	10

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviations of repeatability

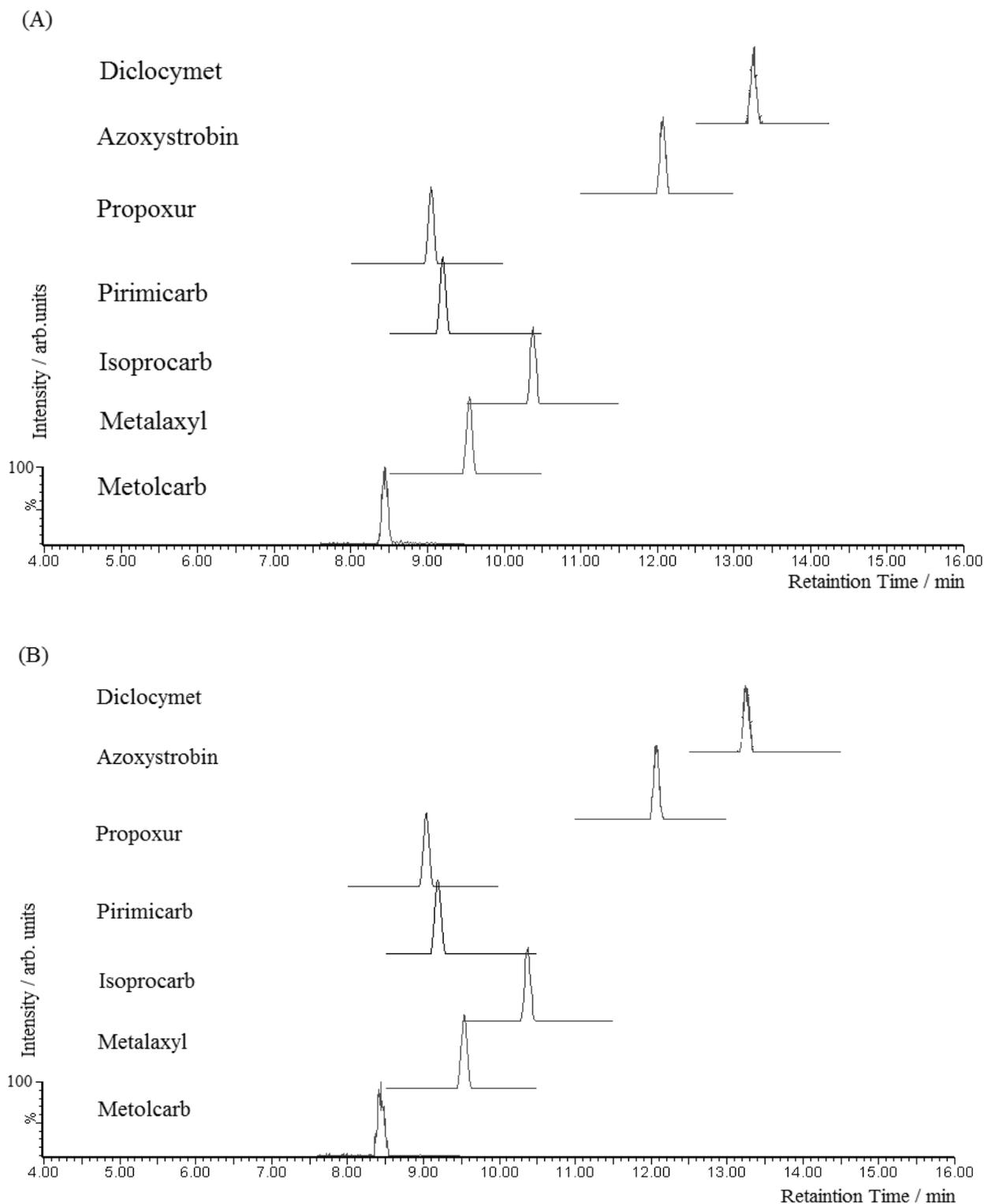


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of pesticide standard

(A) Standard solution (The concentration is 10 ng/mL for all pesticides)

(B) Sample solution of rice straw (Spiked at 1.0 mg/kg of azoxystrobin and diclocymet, 0.4 mg/kg of metolcarb, 0.10 mg/kg of isoprocarb, pirimicarb and propoxur, and 0.04 mg/kg of metalaxyl)

(Highest intensity peak is shown as 100 % in each segment)

3.7 定量下限及び検出下限の検討

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、飼料用イネに 7 成分の各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

アゾキシストロビン及びジクロシメットについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg) であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg) であった。

メタラキシルについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.04 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

メトルカルブについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.4 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.2 mg/kg であった。

その他の 3 成分の農薬については、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であった。

確認のため、飼料用イネに各農薬の SN 比が 10 及び 3 となる濃度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ところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 8 のとおりであった。

以上の結果から、アゾキシストロビン及びジクロシメットの定量下限は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg)、検出下限は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg)、メタラキシルの定量下限は 0.04 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg、メトルカルブの定量下限は 0.4 mg/kg、検出下限は 0.2 mg/kg、イソプロカルブ、ピリミカーブ及びプロポキシルの定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び粳米にアゾキシストロビン他 6 成分の農薬を添加した共通試料を用い、9 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

1) 分析試料の調製

稲わら及び粳米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を量りとった後、濃度非通知の添加用標準液 (水溶液、各 0.5 mL) を分析開始の前日に添加して調製した。2 種類の試料について、非明示の 2 点反復で実施した。

各農薬の添加濃度は、試料 10.0 g に、稲わらについてはアゾキシストロビンとして 5 mg/kg 相当量 (最終試料中 25 µg 相当量)、ジクロシメットとして 15 mg/kg 相当量 (最終試料中 75 µg 相当量)、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料中 5 µg 相当量) である。また、粳米についてはアゾキシストロビンとして 2 mg/kg 相当量 (最終試料中 10 µg 相当量)、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料中 5 µg 相当量) である。

2) 参加試験室

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、協同飼料株式会社研究所、一般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、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター (計 9 試験室)。

3) 結果の解析

各試験室から有効数字 3 けたで分析値を報告させ、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順を^{5), 6)}を参考に、Cochran 検定並びに外れ値 1 個及び 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却等を行った上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。その結果は Table 9 ~ 15 のとおりである。

アゾキシストロビンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 79.5 及び 84.3 %、 RSD_f はそれぞれ 8.0 及び 8.8 %、 RSD_R はそれぞれ 11 及び 8.8 %、HorRat はそれぞれ 0.90 及び 0.61 であった。

ジクロシメットでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 84.0 及び 85.0 %、 RSD_f はそれぞれ 6.3 及び 8.0 %、 RSD_R はそれぞれ 10 及び 9.5 %、HorRat はそれぞれ 0.97 及び 0.59 であった。

イソプロカルブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 83.5 及び 83.3 %、 RSD_f はそれぞれ 7.3 及び 3.9 %、 RSD_R はそれぞれ 15 及び 14 %、HorRat はそれぞれ 0.94 及び 0.90 であった。

メトラキシルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.2 及び 99.5 %、 RSD_f はそれぞれ 3.4 及び 3.5 %、 RSD_R はそれぞれ 5.3 及び 7.7 %、HorRat はそれぞれ 0.33 及び 0.48 であった。

メトルカルブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 78.8 及び 74.5 %、 RSD_f はそれぞれ 7.8 及び 5.7 %、 RSD_R はそれぞれ 6.6 及び 12 %、HorRat はそれぞれ 0.41 及び 0.76 であった。

ピリミカーブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 97.0 及び 102 %、 RSD_f はそれぞれ 4.6 及び 5.0 %、 RSD_R はそれぞれ 12 及び 6.3 %、HorRat はそれぞれ 0.76 及び 0.39 であった。

プロポキシルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 86.3 及び 85.1 %、 RSD_f はそれぞれ 6.6 及び 5.9 %、 RSD_R はそれぞれ 13 及び 10 %、HorRat はそれぞれ 0.80 及び 0.65 であった。いずれも良好な室間再現精度が得られた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 16 に示した。

Table 9 Collaborative study results of azoxystrobin

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	3.32	3.27	1.58	1.51
2	3.74	3.94	1.60	1.70
3	3.36	3.74	1.81	1.77
4	3.56	4.52	1.45	1.97
5	4.38	4.86	1.72	1.95
6	3.98	3.91	1.84	1.73
7	4.32	4.14	1.79	1.60
8	3.68	4.34	1.60	1.64
9	4.19	4.29	1.50	1.59
Spiked level (mg/kg)	5		2	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	3.97		1.69	
Recovery ^{a)} (%)	79.5		84.3	
RSD _r ^{b)} (%)	8.0		8.8	
RSD _R ^{c)} (%)	11		8.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		14	
HorRat	0.90		0.61	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Collaborative study results of diclocymet

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	10.9	10.2	0.830	0.769
2	12.4	12.7	0.788	0.810
3	11.9	11.5	0.852	0.760
4	13.1	10.8	1.05	0.902
5	13.6	14.9	0.824	1.01
6	14.4	13.5	2.24 ^{a)}	1.95 ^{a)}
7	13.8	12.4	0.861	0.837
8	11.8	12.4	0.865	0.833
9	12.9	13.5	0.777	0.827
Spiked level (mg/kg)	15		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	12.6		0.850	
Recovery ^{b)} (%)	84.0		85.0	
RSD _r ^{c)} (%)	6.3		8.0	
RSD _R ^{d)} (%)	10		9.5	
PRSD _R ^{e)} (%)	11		16	
HorRat	0.97		0.59	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n=18$; Paddy rice: $n=16$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Collaborative study results of isoprocarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.874	0.799	0.838	0.844
2	0.580	0.716	0.747	0.798
3	0.697	0.739	0.844	0.808
4	1.01	1.09	0.949	0.898
5	0.683	0.813	0.593	0.537
6	0.897	0.787	0.850	0.880
7	0.920	0.877	0.911	0.827
8	0.928	0.861	0.969	1.01
9	0.872	0.881	0.839	0.845
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.835		0.833	
Recovery ^{a)} (%)	83.5		83.3	
RSD _r ^{b)} (%)	7.3		3.9	
RSD _R ^{c)} (%)	15		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.94		0.90	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 12 Collaborative study results of metalaxyl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.934	0.874	0.922	0.890
2	0.939	0.934	0.977	1.02
3	0.854	0.910	1.06	1.01
4	0.993	0.974	0.908	0.898
5	1.22 ^{a)}	1.29 ^{a)}	1.19	1.08
6	1.06 ^{a)}	1.09 ^{a)}	0.967	1.00
7	1.05	0.973	1.07	1.02
8	0.927	0.940	0.982	1.00
9	0.926	0.961	0.946	0.961
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.942		0.995	
Recovery ^{b)} (%)	94.2		99.5	
RSD _r ^{c)} (%)	3.4		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	5.3		7.7	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.33		0.48	

a) Data excluded by paired Grubbs test

b) Rice straw: $n=14$; Paddy rice: $n=18$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Collaborative study results of metolcarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.752	0.747	0.783	0.770
2	0.466 ^{a)}	0.671 ^{a)}	0.738	0.684
3	0.722	0.851	0.733	0.667
4	0.702	0.829	0.829	0.702
5	0.654 ^{a)}	0.624 ^{a)}	0.542	0.588
6	0.784	0.833	0.813	0.770
7	0.797	0.735	0.736	0.716
8	0.830	0.812	0.888	0.859
9	0.757	0.874	0.827	0.763
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.788		0.745	
Recovery ^{b)} (%)	78.8		74.5	
RSD _F ^{c)} (%)	7.8		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	6.6		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.41		0.76	

a) Data excluded by double Grubbs test

b) Rice straw: $n=14$; Paddy rice: $n=18$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 14 Collaborative study results of pirimicarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.923	0.868	1.04	1.04
2	0.916	0.979	0.951	0.971
3	0.711	0.790	1.04	1.01
4	0.936	0.936	0.963	0.974
5	1.20	1.11	1.04	1.19
6	1.02	0.960	1.07	0.943
7	1.08	0.987	1.08	1.02
8	1.08	1.04	1.04	1.08
9	0.976	0.954	0.934	0.984
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.970		1.02	
Recovery ^{a)} (%)	97.0		102	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	12		6.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.76		0.39	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 15 Collaborative study results of propoxur

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.818	0.878	0.792	0.714
2	0.757	0.826	0.830	0.838
3	0.607	0.691	0.806	0.767
4	0.906	0.905	0.724	0.746
5	0.778	0.948	0.842	0.925
6	0.869	0.889	1.040	0.882
7	0.918	0.829	0.890	0.839
8	1.05	0.984	0.933	0.975
9	0.922	0.967	0.863	0.904
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.863		0.851	
Recovery ^{a)} (%)	86.3		85.1	
RSD _r ^{b)} (%)	6.6		5.9	
RSD _R ^{c)} (%)	13		10	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.80		0.65	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 16 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instrument	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
4	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Quatro Premier XE	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
5	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quatro micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters ACQUITY TQDetector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters ACQUITY TQDetector	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留する農薬 7 成分について、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた同時定量法（以下「本法」という。）の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、メトルカルブは 2.5 ~ 20 ng/mL, その他 6 成分は 0.25 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。
- 2) 飼料用イネについて、本法に従って得られた選択反応検出クロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 飼料用イネを用いて、本法に従って添加回収試験を実施したところ、良好な回収率及び繰返し精度が得られた。
- 4) 本法のアゾキシストロビン及びジクロシメットの定量下限は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg) 検出下限は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg), メタラキシルの定量下限は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg, メトルカルブの定量下限は 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg, 並びにイソプロカルブ, ピリミカーブ及びプロポキシルの定量下限は 0.1 mg/kg, 検出下限は 0.03 mg/kg であった。
- 5) 稲わらにアゾキシストロビン 5 mg/kg 相当量, ジクロシメット 15 mg/kg 相当量, その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料及び籾米にアゾキシストロビン 2 mg/kg 相当量, その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果, 良好な室間再現精度が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，協同飼料株式会社研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号(1988)
- 2) 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).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2009).
- 4) 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について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 5) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 6) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II*, Gaithersburg, MD, USA (2012).

3 穀類及び乾牧草中のアルジカルブ, アルジカルブスルホン及びアルジカルブスルホキシド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定量法

西村 真由美*

Simultaneous Determination of Aldicarb, Aldicarb sulfone and Aldicarb sulfoxide in Grain and Grass Hay by LC-MS/MS

Mayumi NISHIMURA*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department))

An analytical method was developed to simultaneously determine aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide levels in feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide were extracted with acetone, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and InertSep GC/NH₂ (GL Sciences Inc.), followed by LC-ESI-MS/MS analysis for determination of aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, U.S.) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on feed spiked with aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide at levels of 0.01 or 0.05 mg/kg (corn), 0.01 or 0.02 mg/kg (wheat), and 0.05 or 1 mg/kg (sudangrass hay). The resulting values obtained for mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviation (RSD_r), respectively, were 81.3 to 118 % and not more than 13 % for aldicarb, 84.7 to 99.6 % and not more than 12 % for aldicarb sulfone, and 89.5 to 97.4 % and not more than 7.7 % for aldicarb sulfoxide.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using corn, wheat and sudangrass hay spiked with aldicarb, aldicarb sulfone and aldicarb sulfoxide at 0.02, 0.01, 0.1 mg/kg respectively. The mean recoveries of aldicarb were 90.9 % to 105 %, and the repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviation, and HorRat were not more than 9.2 %, 14 % and 0.63, respectively. The values for aldicarb sulfone were 93.6 % to 102 %, with not more than 8.8 %, 11 % and 0.50, respectively. The values for aldicarb sulfoxide were 93.0 % to 97.9 %, with not more than 7.5 %, 8.4 % and 0.38, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of feed for aldicarb, aldicarb sulfone and aldicarb sulfoxide.

* 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, 現 肥飼料安全検査部

Key words: aldicarb ; aldicarbsulfone ; aldicarbsulfoxide ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; collaborative study

キーワード：アルジカルブ；アルジカルブスルホン；アルジカルブスルホキシド；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料；共同試験

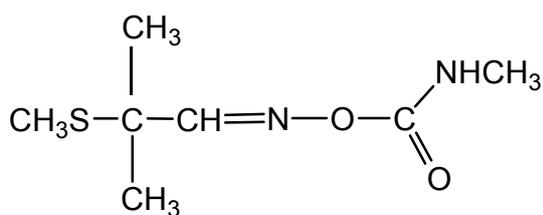
1 緒 言

アルジカルブはユニオン・カーバイド社が開発したカーバメート系の殺虫剤であり，植物及び土壌中で酸化されてスルホキシド化及びスルホン化することが知られている^{1),2)}．これらの酸化代謝物にも生物活性があり，最も極性の高いスルホキシドもコリンエステラーゼ阻害活性を示す．また，スルホン体は欧米ではアルドキシカルブとして，農薬として販売，使用されている．国内で農薬登録されていないが，国内における飼料のアルジカルブの残留基準値³⁾は小麦，大麦及びライ麦で 0.02 ppm，とうもろこしで 0.05 ppm，えん麦及びマイロで 0.2 ppm，乾牧草で 1 ppm となっている．また，食品の残留基準値⁴⁾は，アルジカルブ及びアルドキシカルブ（アルジカルブ，アルジカルブスルホキシドをアルジカルブに換算したもの及びアルジカルブスルホンをアルジカルブに換算したものの和）として，小麦及び大麦で 0.02 ppm，とうもろこしで 0.05 ppm となっている．

アルジカルブ，アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン（以下「アルジカルブ等」という．）の分析法は，飼料では既に飼料分析基準⁵⁾に，カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法（その 1）が示されている．また，食品では厚生労働省通知試験法⁶⁾に，アルジカルブ等の個別試験法（ポストカラム反応蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計）とアルジカルブ及びアルジカルブスルホンの一斉試験法（液体クロマトグラフタンデム型質量分析計）が示されている．

筆者は，一般財団法人日本食品分析センターが，平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において，飼料分析基準収載法を基に開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法⁷⁾（以下「JFRL 法」という．）について，飼料分析基準への適用の可否について検討したので，その概要を報告する．

なお，アルジカルブ等の構造式を Fig. 1 に示した．

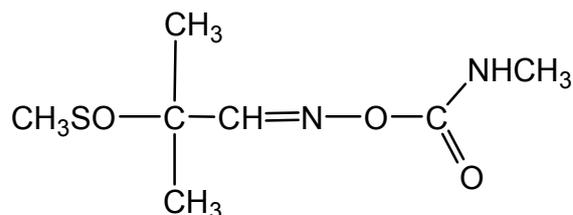


Aldicarb

2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oximeC₇H₁₄N₂O₂S MW: 190.3

CAS No.: 116-06-3

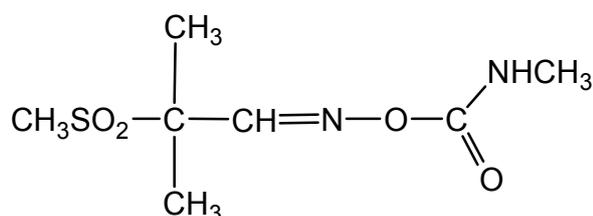


Aldicarb sulfoxide

2-methyl-2-(methylsulfinyl)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oximeC₇H₁₄N₂O₃S MW: 206.3

CAS No.: 1646-87-3



Aldicarb sulfone

2-methyl-2-(methylsulfonyl)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oximeC₇H₁₄N₂O₄S MW: 222.3

CAS No.: 1646-88-4

Fig. 1 Chemical structures of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone

2 実験方法

2.1 試料

小麦、とうもろこし及びスーダングラス乾草をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) アルジカルブ標準原液

アルジカルブ標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 99.9 %) 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アルジカルブ標準原液を調製した (この液 1 mL は, アルジカルブとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する.) .

2) アルジカルブスルホキシド標準原液

アルジカルブスルホキシド標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 96.2 %) 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アルジカルブスルホキシド標準原液を調製した (この液 1 mL は, アルジカルブスルホキシドとして 0.5 mg ($f=0.977$) を含有する.) .

3) アルジカルブスルホン標準原液

アルジカルブスルホン標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 99.4 %) 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アルジカルブスルホン標準原液を調製した（この液 1 mL は、アルジカルブスルホンとして 0.5 mg ($f=1.006$) を含有する。）。

4) 混合標準液

各標準原液 1 mL を 25 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして各 20 μg を含有する。）。

使用に際して、混合標準原液の一定量を、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0008, 0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 及び 0.1 μg を含有する各混合標準液を調製した。

5) メタノール、アセトニトリル、アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用、水は液体クロマトグラフ用を用いた。塩化ナトリウム及び酢酸アンモニウムは特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 振とう機：タイテック製 ストロングシェーカーSR-2DW
- 2) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-210
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep K-solute (5 mL 保持用)
- 4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg)
- 5) 高速遠心分離機：日立工機製 himac TC15D
- 6) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：
液体クロマトグラフ部：Waters 製 ACQUITY UPLC System
タンデム型質量分析計部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を正確に量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は 30 mL）を加えて 30 分間静置した後、更にアセトン 100 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は 120 mL）を加え、30 分間振り混ぜて（250 rpm）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、同様に吸引ろ過した後、更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 4 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 4 mL）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 1 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

試料溶液に塩化ナトリウム 1 g 及び水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れて 10 分間静置した。200 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酢酸エチル 5 mL ずつで 2 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てアルジカルブ等を溶出させた。更に酢酸エチル 80 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

送って乾固した。アセトニトリル 5 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した。

3) カラム処理 II

グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（以下「GC/NH₂ミニカラム」という。）をアセトニトリル 10 mL で洗浄した。

50 mL のなす形フラスコを GC/NH₂ミニカラムの下に置き、試料溶液を GC/NH₂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してアルジカルブ等を流出させた。次に試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次 GC/NH₂ミニカラムに加え、同様に流出させた。更にアセトニトリル 5 mL を GC/NH₂ミニカラムに加えて同様に流出させた。

流出液を 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した。

メタノール 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 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各 2 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、Table 1 及び Table 2 の測定条件に従い、選択反応検出クロマトグラムを得た。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing aldicarb, aldicarbsulfone and aldicarbsulfoxide

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution- methanol(17:3)(2 min)→10 min →(1:9)(3 min)→(17:3)(15 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	150 °C
Desolvation temperature	N ₂ (500 L/h, 250 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 0.8 kV

Table 2 MS/MS Parameters

Substance	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
Aldicarb	208	116	-	10	6
		-	89		18
Aldicarb sulfoxide	207	132	-	20	6
		-	89		12
Aldicarb sulfone	223	86	-	25	16
		-	148		8

5) 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及び高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中のアルジカルブ等のそれぞれの量を算出した。

なお、アルジカルブスルホキシドをアルジカルブに換算して試料中のアルジカルブとしての総和を求める場合には、次式により算出した。

$$\text{試料中のアルジカルブ量 (mg/kg)} = (A + B \times 0.922) \times 5^*$$

A : 検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブの濃度 (μg/mL)

B : 検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブスルホキシドの濃度 (μg/mL)

*スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草については、50 を乗じる

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL of Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (grass hay ; 30 mL) and allow to stand for 30 min
 - add 100 mL of acetone (grass hay ; 120 mL) and shake for 30 min
 - filtrate with suction filter (No.5B)
 - wash with 50 mL of acetone
 - top up to 200 mL with acetone
 - 4 mL of sample solution (grass hay ; 4 mL of 10-fold diluted sample solution with acetone)
 - evaporate to the volume of 1 mL under 40 °C
 - add 2 mL of water and 1 g of NaCl
- InertSep K-solute
- apply sample solution and allow to stand for 10 min
 - wash flask with 5 mL of ethyl acetate (twice)
 - elute with 80 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 5 mL of acetonitrile
- InertSep GC/NH₂
- prewash with 10 mL of acetonitrile
 - apply sample solution
 - wash flask with 5 mL of acetonitrile (twice)
 - elute with 5 mL of acetonitrile
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 1 mL of methanol
 - centrifuge at 5000×g for 5 min
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for aldicarb, aldicarbsulfoxide and aldicarbsulfone

3 結果及び考察

3.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の測定条件の検討

JFRL 法ではイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法（以下「ESI 法」という。）を用いて良好な結果を得ていたことから、本法においても ESI 法を用いて検討を行った。

各標準液について、本法の測定条件によりオートチューン機能を使用し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンのコーン電圧及びコリジョンエネルギーを確認したところ、Table 2 に示した条件が最適であった。

3.2 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した各標準液各 2 μ L を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した。その結果は、Fig. 2 のとおり、検量線は 0.0002 ~ 0.1 μ g/mL（注入量として 0.0004~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

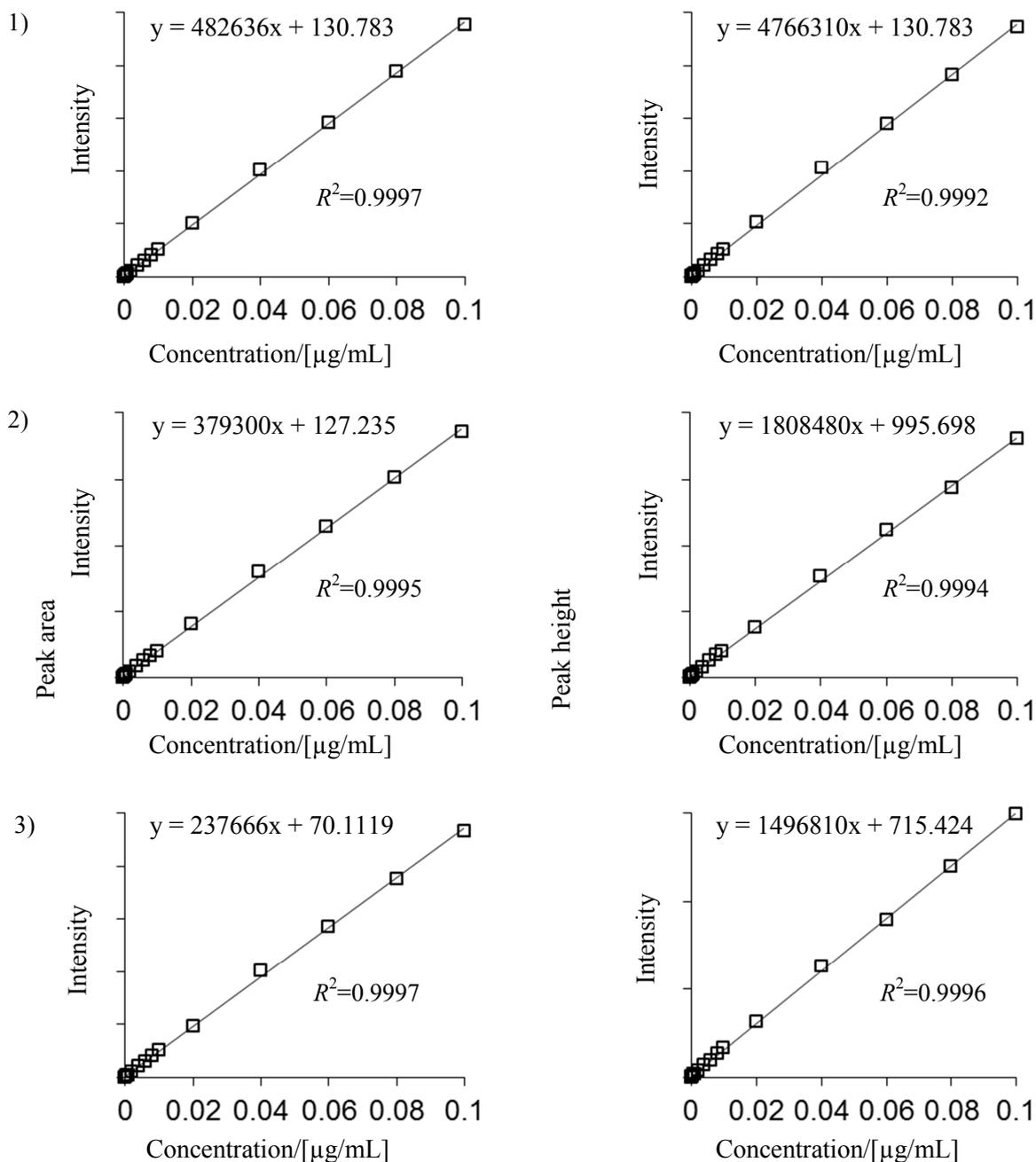


Fig. 2 Calibration curves of 1) aldicarb, 2) aldicarbsulfoxide, 3) aldicarbsulfone
(left : peak area, right : peak height)

3.3 精製方法の検討

アルジカルブは、本法の操作により一部が酸化し、スルホキシド化することを本検討において確認した。したがって、以下の検討は、アルジカルブのみの標準液を添加したものと、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの混合標準液を添加したものを調製して行った。なお、アルジカルブ全量は、分子量に基づきアルジカルブスルホキシド量をアルジカルブ量に換算して合算した。その換算式は以下のとおりである。

$$\text{アルジカルブ全量} = \text{アルジカルブ量} + \text{アルジカルブスルホキシド量} \times 0.922$$

1) 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

小麦及びスーダングラス乾草を 2.4 の 1) に従い処理（ただし、スーダングラス乾草は抽出液を 10 倍希釈せずに処理）した液に、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを分析試料中の濃度として小麦にそれぞれ 0.02 mg/kg 相当量、スーダングラス乾草にそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 2) の多孔性ケイソウ土カラム処理に供する試料溶液として、JFRL 法により溶出画分の回収率を確認した。その結果は Table 3 の 1) 及び 2) のとおり、スーダングラスでは 90~100 mL の溶出画分においてアルジカルブスルホキシドの微小なピークが認められた。そこで、スーダングラス乾草を 2.4 の 1) に従い処理した液をアセトンで正確に 10 倍希釈した後に、同様に溶出画分の回収率を確認した。その結果は Table 3 の 3) のとおり、アルジカルブ等は 0~90 mL に溶出し、90 mL 以後の画分には溶出されなかった。

以上の結果から、乾牧草は抽出液を 10 倍希釈した後に、それ以外の飼料は抽出液をそのまま精製することとし、その溶出溶媒量は酢酸エチル 90 mL で十分と判断した。

Table 3 Elution pattern from InertSep K-solute

1) Wheat

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)									Total
	Ethyl acetate (mL)									
	0~	30~	40~	50~	60~	70~	80~	90~	100	
	30	40	50	60	70	80	90	100		
Aldicarb	98.7	1.8	tr	0	0	0	0	0	0	101
Aldicarb-sulfoxide	75.6	9.4	3.8	1.7	0	0	0	0	0	90.5
Aldicarb-sulfone	99.2	0	0	0	0	0	0	0	0	99.2

a) n=1

2) Sudangrass hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)									Total
	Ethyl acetate (mL)									
	0~	30~	40~	50~	60~	70~	80~	90~	100	
	30	40	50	60	70	80	90	100		
Aldicarb	98.2	1.8	tr	0	0	0	0	0	0	100
Aldicarb-sulfoxide	69.1	13.6	6.0	2.9	1.6	0.9	tr	tr	tr	94.1
Aldicarb-sulfone	99.2	0	0	0	0	0	0	0	0	99.2

a) n=1

Table 3 Elution pattern from InertSep K-solute (contd.)

3) Sudangrass hay (10-fold diluted)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)								Total
	Ethyl acetate (mL)								
	0~ 30	30~ 40	40~ 50	50~ 60	60~ 70	70~ 80	80~ 90	90~ 100	
Aldicarb	108	tr	tr	0	0	0	0	0	108
Aldicarb sulfoxide	67.4	14.4	8.6	4.3	2.3	tr	tr	0	97.0
Aldicarb sulfone	98.6	2.5	0	0	0	0	0	0	101

a) n=1

2) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムの流出画分の検討

JFRL 法では、乾牧草はイオン化阻害が懸念されるため、ゲル浸透クロマトグラフィーにより精製した後に、GC/NH₂ ミニカラムを用いて精製を行っている。しかし、乾牧草は 3.3 の 1) の検討で 10 倍希釈することとしたことから、ゲル浸透クロマトグラフィーによる精製が不要と考え、他の試料と同様の操作で問題がないことを検討した。

乾牧草としてスーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草を 2.4 の 1) 及び 2) に従い処理した液にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして（試料中の濃度として）1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 3) に従ってカラム処理 II を行った。アセトニトリルを洗浄溶媒として GC/NH₂ ミニカラムからの各溶出画分の回収率及び夾雑ピーク等の妨害を確認した。また、小麦についても 2.4 の 1) 及び 2) に従い処理した液にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして（試料中の濃度として）0.02 mg/kg 相当量を添加し、同様に流出画分の回収率を確認した。

その結果は、Table 4 のとおり、試料溶液負荷後にアセトニトリル 15 mL ですべての農薬が流出することが確認され、乾牧草では夾雑ピーク等の妨害も認められなかった。

Table 4 Elution pattern from InertSep GC/NH₂

1) Sudangrass hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	99.3	tr	0	99.3
Aldicarb sulfoxide	93.6	1.7	0	95.3
Aldicarb sulfone	92.8	2.1	0	94.9

a) n=1

Table 4 Elution pattern from InertSep GC/NH₂ (contd.)

2) Alfalfa hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	90.9	1.1	0	90.9
Aldicarbsulfoxide	87.7	1.6	0	89.3
Aldicarbsulfone	92.2	2.8	0	95.0

a) *n*=1

3) Oat hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	96.2	tr	0	96.2
Aldicarbsulfoxide	89.0	tr	0	89.0
Aldicarbsulfone	95.2	1.7	0	96.9

a) *n*=1

4) Wheat

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	111	0	0	111
Aldicarbsulfoxide	105	0	0	105
Aldicarbsulfone	105	0	0	105

a) *n*=1

3.4 妨害物質の検討

穀類（とうもろこし，マイロ），麦類（小麦，大麦），乾牧草（スーダングラス乾草，アルファルファ乾草，えん麦乾草）及び副原料（大豆油かす，ふすま，コーングルテンミール，とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル）を用い，本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認したところ，いずれの試料においても妨害となるピークは認められなかった。

妨害物質の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 の 1) に示した。

なお，Fig. 3 の 1) において保持時間の位置に微小のピークが認められたアルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドについて，比較のため，基準値の 1/20 相当の標準液（0.001 µg/mL（注入量として 2 pg 相当量））の選択反応検出クロマトグラムを Fig. 3 の 2) に示した。

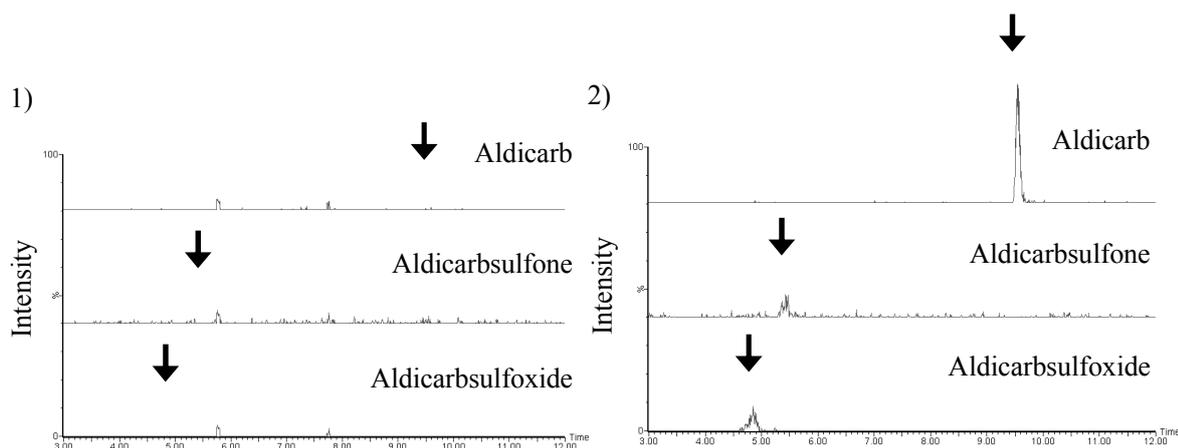


Fig. 3 SRM chromatograms of oat hay (non-spiked)

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

- 1) Oat hay
- 2) Standard solution (0.001 µg/mL : 2 pg as each pesticide.)

3.5 添加回収試験

アルジカルブ等として、とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.01 及び 0.002 µg/mL 相当量），小麦に 0.02 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.004 及び 0.002 µg/mL 相当量），スーダングラスに 1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.02 及び 0.001 µg/mL 相当量）を添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、Table 5 のとおり、アルジカルブの平均回収率は 81.3~118 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r)として 13 %以下，アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 89.5~97.4 %，その繰返し精度は RSD_rとして 7.7 %以下，アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.7~99.6 %，その繰返し精度は RSD_rとして 2.2 %以下となった。

なお、添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 5 Recoveries for aldicarb and it derivatives

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Maize		Wheat		Sudangrass hay	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Aldicarb	1	—	—	—	—	104	4.5
	0.05	81.3	8.3	—	—	118	13
	0.02	—	—	81.7	3.7	—	—
	0.01	101	5.9	93.7	1.6	—	—
Aldicarb sulfoxide	1	—	—	—	—	91.1	1.6
	0.05	95.9	1.6	—	—	89.5	7.7
	0.02	—	—	93.7	2.2	—	—
	0.01	97.2	6.8	97.4	4.1	—	—
Aldicarb sulfone	1	—	—	—	—	95.6	2.4
	0.05	99.6	1.4	—	—	84.7	12
	0.02	—	—	98.7	4.7	—	—
	0.01	93.6	6.0	88.5	6.0	—	—

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

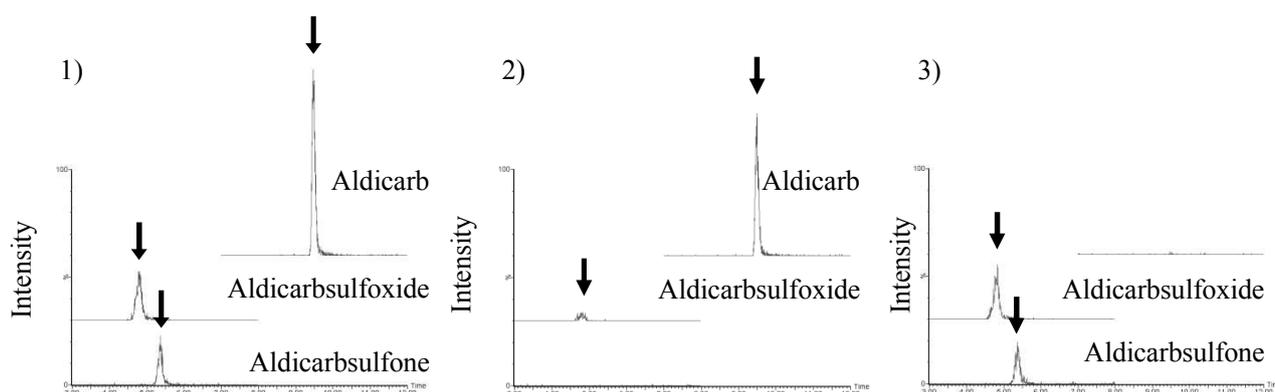


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms
(Arrows indicate the peaks of pesticides)

- 1) Standard solution (0.004 $\mu\text{g/mL}$)
- 2) Sample solution of wheat (Spiked at 0.02 mg/kg of aldicarb)
- 3) Sample solution of wheat (Spiked at 0.02 mg/kg of aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草にアルジカルブ等を添加した試料について、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度はとうもろこし及び小麦で 0.01 mg/kg 及びスーダングラス乾草で 0.05 mg/kg であった。しかし、アルジカルブは、本検討においてスルホキシド化することが確認されており、試料溶液中のアルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドは、添加した濃度より低い濃度で定量されることとなる。そこで、添加回収試験で定量されたそれぞれの試料溶液中の濃度も考慮し、とうもろこし及び小麦にアルジカルブ等として 0.005 及び 0.002 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.001 及び 0.0004 mg/kg 相当量）及びスーダングラス乾草にアルジカルブ等として 0.02 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0004 mg/kg 相当量）を用いて、本法により 3 点併行分析を実施し、その平均回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、Table 6 のとおり、とうもろこし及び小麦にアルジカルブ等として 0.002 mg/kg 相当量を添加した試料では、アルジカルブの平均回収率は 104 及び 90.5 %，その繰返し精度は RSD_r として 6.0 及び 4.8 % 以下，アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 95.8 及び 88.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.8 及び 17 % 以下，アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.5 及び 101 %，その繰返し精度は RSD_r として 4.5 及び 19 % 以下となった。スーダングラス乾草にアルジカルブ等として 0.02 mg/kg 相当量を添加した試料では、アルジカルブの平均回収率は 88.3 %，その繰返し精度は RSD_r として 16 % 以下，アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 82.0 %，その繰返し精度は RSD_r として 6.5 % 以下，アルジカルブスルホンの平均回収率は 91.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 2.2 % 以下となった。

また、 SN 比が 3 となる濃度はとうもろこし及び小麦で 0.0006 mg/kg 及びスーダングラス乾草で 0.006 mg/kg であった。

以上の結果から、アルジカルブ等の定量下限は、それぞれ試料中で 0.002 mg/kg（乾牧草では 0.02

mg/kg), 検出下限はそれぞれ 0.0006 mg/kg (同 0.006 mg/kg) であった。

Table 6 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

pesticides	Spiked level (mg / kg)	Feed types					
		Corn		Wheat		Sudangrass hay	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Aldicarb	0.02	—	—	—	—	88.3	16
	0.005	83.9	8.8	97.3	4.5	—	—
	0.002	104	6.0	90.5	4.8	—	—
Adicarb-sulfoxide	0.02	—	—	—	—	82.0	6.5
	0.005	105	3.5	96.2	5.0	—	—
	0.002	95.8	7.8	88.2	17	—	—
Aldicarb-sulfone	0.02	—	—	—	—	91.2	2.2
	0.005	96.7	12	96.5	3.5	—	—
	0.002	84.5	4.5	101	19	—	—

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを添加した共通試料を用い、8 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

i) 分析試料の調製 とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草を 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎したものを配付し、各試験室において 10 g を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（アルジカルブ標準液及びアルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン混合標準液を各 1 mL）を分析開始の前日に添加して調製した。3 種類の試料について、非明示の 2 点反復で試験を実施した。

それぞれの添加濃度は、とうもろこしに 0.02 mg/kg 相当量（1 mL 中に 0.2 µg を含有する各標準液を添加）、小麦に 0.01 mg/kg 相当量（1 mL 中に 0.1 µg を含有する各標準液を添加）及びスーダングラス乾草に 0.1 mg/kg 相当量（1 mL 中に 1 µg を含有する各標準液を添加）のとおりである。

ii) 参加試験室 一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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、同神戸センター及び同福岡センター（計 8 試験室）

iii) 結果の解析 国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{8), 9)}を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却等を行ったうえで平均回収率、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果の概要は以下のとおりである。

1) アルジカルブ

とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 103, 90.9 及び 105 %, RSD_r はそれぞれ 5.5, 9.2 及び 5.7 %, RSD_R はそれぞれ 11, 14 及び 8.2 %, HorRat はそれぞれ

0.50, 0.63 及び 0.37 であった。なお、スーダングラスの結果において、Grubbs 検定で外れ値とされるデータが認められた。そのデータを除外しなくても前述のとおり良好な成績であったが、参考までにそのデータを除外して平均回収率、 RSD_t 、 RSD_R 及び HorRat について算出した結果、それぞれ 107 %、5.4 %、5.0 % 及び 0.23 であった。

2) アルジカルブスルホキシド

とうもろこし、小麦及びスーダングラスについて、平均回収率は 96.0, 97.9 及び 93.0 %、 RSD_t はそれぞれ 7.5, 3.4 及び 4.1 %、 RSD_R はそれぞれ 8.4, 5.0 及び 6.5 %、HorRat はそれぞれ 0.38, 0.23 及び 0.30 であった。

3) アルジカルブスルホン

とうもろこし、小麦及びスーダングラスについて、平均回収率は 102, 98.2 及び 93.6 %、 RSD_t はそれぞれ 4.4, 6.5 及び 8.8 %、 RSD_R はそれぞれ 7.2, 7.5 及び 11 %、HorRat はそれぞれ 0.33, 0.34 及び 0.50 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タンデム型質量分析計の機種等を Table 10 に示した。

Table 7 Collaborative study results of aldicarb

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0169	0.0167	0.00810	0.00788	0.0875 ^{a)}	0.0872 ^{a)}
2	0.0175	0.0192	0.00698	0.00726	0.102	0.108
3	0.0201	0.0197	0.00971	0.00942	0.113	0.0966
4	0.0219	0.0202	0.00850	0.0104	0.110	0.103
5	0.0207	0.0213	0.00932	0.00825	0.113	0.108
6	0.0229	0.0234	0.0107	0.00846	0.106	0.110
7	0.0216	0.0219	0.0112	0.0103	0.110	0.0972
8	0.0206	0.0243	0.00916	0.00975	0.110	0.112
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.0206		0.00909		0.105	
Recovery ^{b)} (%)	103		90.9		105	
RSD _r ^{c)} (%)	5.5		9.2		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	11		14		8.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.50		0.63		0.37	
Mean value ^{f)} (mg/kg)					0.107	
Recovery ^{f)} (%)					107	
RSD _r ^{f)} (%)					5.9	
RSD _R ^{f)} (%)					5.0	
PRSD _R ^{f)} (%)					22	
HorRat ^{f)}					0.23	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) $n = 16$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

f) Calculated excluding Lab.1

Table 8 Collaborative study results of aldicarbsulfoxide

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0169	0.0182	0.00921	0.00861	0.0947	0.0908
2	0.0190	0.0176	0.0103	0.00962	0.0795	0.0839
3	0.0211	0.0201	0.00989	0.0104	0.100	0.0944
4	0.0171	0.0198	0.00977	0.00937	0.0993	0.0940
5	0.0190	0.0195	0.00964	0.0102	0.100	0.0989
6	0.0220	0.0207	0.0102	0.0104	0.0925	0.0942
7	0.0181	0.0206	0.00987	0.00952	0.0845	0.0958
8	0.0169	0.0205	0.0100	0.00970	0.0943	0.0917
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0192		0.00979		0.0930	
Recovery ^{a)} (%)	96.0		97.9		93.0	
RSD _r ^{b)} (%)	7.5		3.4		4.1	
RSD _R ^{c)} (%)	8.4		5.0		6.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.38		0.23		0.30	

a) $n = 16$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Collaborative study results of aldicarbsulfone

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0195	0.0200	0.00894	0.00989	0.0958	0.0938
2	0.0223	0.0228	0.0111	0.0107	0.0773	0.0768
3	0.0201	0.0222	0.00967	0.0110	0.100	0.101
4	0.0215	0.0189	0.00913	0.00912	0.0770	0.105
5	0.0190	0.0200	0.00910	0.0103	0.103	0.0968
6	0.0214	0.0212	0.0105	0.00966	0.0865	0.0956
7	0.0208	0.0209	0.00970	0.00971	0.0842	0.0960
8	0.0185	0.0179	0.00997	0.00870	0.107	0.101
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0204		0.00982		0.0936	
Recovery ^{a)} (%)	102		98.2		93.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		6.5		8.8	
RSD _R ^{c)} (%)	7.2		7.5		11	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.33		0.34		0.50	

a) $n = 16$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 µm)
3	Waters ACQUITY Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-3200	Tosoh TSK-gel ODS-100V (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

穀類及び乾牧草中のアルジカルブ, アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンについて, 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たところ, 次の結果が得られ, 適用が可能であると考えられた.

- 1) 検量線はそれぞれ 0.0002~0.1 µg/mL (注入量として 0.0004~0.2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.
- 2) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 乾牧草については, 試料溶液を 10 倍希釈した後に負荷することで, 溶出溶媒は 90 mL が適当であった. また, これによりゲル浸透クロマトグラフィーを省略しても夾雑ピーク等の妨害はなく, 良好な結果となった.
- 3) GC/NH₂ ミニカラムの流出画分の検討を行ったところ, 流出溶媒は 15 mL が適当であった.
- 4) 穀類 (とうもろこし, マイロ), 麦類 (小麦, 大麦), 乾牧草 (スーダングラス乾草, アルファルファ乾草, えん麦乾草) 及び副原料 (大豆油かす, ふすま, コーングルテンミール, とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル) について, 本法に従った選択反応検出クロマトグラムでは, アルジカルブ, アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの定量を妨げるピークは認められなかった.

- 5) アルジカルブ等として、とうもろこしにそれぞれ 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量、小麦にそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg 相当量、スーダングラス乾草にそれぞれ 1 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施した。その結果、アルジカルブの平均回収率は 81.3~118 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 89.5~97.4 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.7 %以下、アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.7~99.6 %、その繰返し精度は RSD_r として 2.2 %以下の成績が得られた。
- 6) 本法による定量下限は、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンともに試料中で 0.002 mg/kg (乾牧草では 0.02 mg/kg)、検出下限はそれぞれ 0.0006 mg/kg (同 0.006 mg/kg) であった。
- 7) アルジカルブ等として、とうもろこしにそれぞれ 0.02 mg/kg、小麦にそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量及びスーダングラス乾草にそれぞれ 0.1 mg/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従い共同試験を実施したところ、良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Australia APVMA: The NRA Review of ALDICALB (2001), Section 4: Residue and trade assessment
- 2) Australia APVMA: The NRA Review of ALDICALB (2001), Section 7: Environmental assessment
- 3) 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).
- 4) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号(1959).
- 5) 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).
- 6) 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について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号(2005).
- 7) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 8) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 9) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).

4 飼料用イネ中のオリサストロビン他 13 成分の農薬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定量法

武田 然也^{*1}, 岡田 かおり^{*1}, 榑原 良成^{*2}

Simultaneous Determination of Oryastrobin and 13 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Zenya TAKEDA^{*1}, Kaori OKADA^{*1}, and Yoshinari SAKAKIBARA^{*2}

(^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center,

^{*2}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center)

An analytical method was developed to determine the levels of 14 pesticides (benzofenap, cumyluron, dymron, fenoxanil, mepronil, oryastrobin, oryastrobin metabolite (5Z isomer), paclobutrazol, pencycuron, pyriminobac-methyl (E isomer), pyriminobac-methyl (Z isomer), simeconazole, simetryn, and thenylchlor) in rice straw and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, 14 pesticides were extracted with acetone, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with an octadecylsilylated silica gel mini column (InertSep Slim-J C18-B from GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and analyzed by LC-ESI-MS/MS. LC separation was carried out with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile as a mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage, and paddy rice spiked with 0.05, 1 mg/kg, or regulation value levels of paclobutrazol and 0.1, 1 mg/kg, or regulation value levels of each of the other 13 pesticides, resulting in recovery values ranging from 73.8 % to 110 % with a repeatability values of not more than 16 % in terms of relative standard deviation.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using rice straw and paddy rice spiked with 2.0 mg/kg each of the 14 pesticides. The mean recoveries of the pesticides in rice straw ranged from 89.7 to 97.8 %, and the relative standard deviations of the repeatability (RSD_r) and reproducibility (RSD_R) ranged from 1.8 to 6.1 % and 3.6 to 9.3 %, respectively. The mean recoveries of the pesticides in paddy rice ranged from 93.1 to 97.7 %, and RSD_r and RSD_R ranged from 1.5 to 4.1 % and 4.2 to 8.4 %, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of 14 pesticides in rice straw and rice products for feed.

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 神戸センター

Key words: benzofenap, cumyluron, dymron, fenoxanil, mepronil, orysastrobin, orysastrobin metabolite (5Z isomer), paclobutrazol, pencycuron, pyriminobac-methyl (*E* isomer), pyriminobac-methyl (*Z* isomer), simeconazole, simetryn, thenylchlor, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS), electrospray ionization (ESI), feed, rice straw, whole-crop rice silage, paddy rice, collaborative study

キーワード：ベンゾフェナップ；クミルロン；ダイムロン；フェノキサニル；メプロニル；オリサストロビン；オリサストロビン 5Z 異性体；パクロブトラゾール；ペンシクロン；ピリミノバックメチル (*E* 体)；ピリミノバックメチル (*Z* 体)；シメコナゾール；シメトリン；テニルクロール；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

飼料自給率の向上に向けた取り組みの一つとして、粗飼料における国産割合を高めるために、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）の利用が図られている。これに伴い、飼料の有害物質の指導基準¹⁾が改正され、飼料用イネについて農薬の指導基準値が順次設定されてきた。

指導基準が設定された農薬について、飼料分析基準²⁾に分析法が収載されていない、あるいは指導基準が未設定であってもモニタリングの必要性がある成分について、分析法の開発が急務とされている。

今回、平成 20 年度及び平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において、一般財団法人日本食品分析センターが厚生労働省の試験法³⁾を基に開発した、12 種類 14 成分（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (*E* 体)、ピリミノバックメチル (*Z* 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール) の農薬の系統的分析法^{4,5)}（以下「JFRL 法」という。）について、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

なお、今回、分析法を検討した農薬のうち、指導基準値が設定されている 9 種類に対する基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

Pesticides	Feed types	Regulation value (mg/kg)
Benzofenap	Rice straw	0.7
Cumyluron	Rice straw	2
Dymron	Rice straw	0.7
Fenoxanil	Rice straw	30
	Whole-crop rice silage	3
Mepronil	Rice straw	25
	Whole-crop rice silage	10
	Paddy rice	7
Orysastrobins	Rice straw	5
	Paddy rice	1
Paclobutrazol	Rice straw	0.7
Pyriminobac-methyl	Rice straw	0.2
	Whole-crop rice silage	0.1
Simeconazole	Rice straw	1
	Paddy rice	0.3

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は 60 °C で 5 時間乾燥後、同様に粉碎したものを供試試料とした。

2.2 試薬等

1) 各農薬標準品

ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (E 体)、ピリミノバックメチル (Z 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロールの標準品は、Table 2 に示した供給業者、純度のものを用いた。

2) 各農薬標準原液

農薬標準品各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は、各農薬として 0.5 mg を含有する。）。

3) 農薬混合標準液

14 成分の農薬標準原液各 2.5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 25 µg を

含有する.) .

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、アセトニトリル-水 (3+2) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.05, 0.1, 1, 2, 3, 4 及び 5 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

- 4) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた。

Table 2 Pesticide standards

Pesticides	Manufacturer	Molecular formula	Molecular weight	CAS No	Purity (%)	Factor of standard solution
Benzofenap	Wako ^{a)}	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	431.3	82692-44-2	98.0	1.001
Cumyluron	Wako ^{a)}	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O	302.8	99485-76-4	99.5	1.000
Dymron	Wako ^{a)}	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O	268.4	42609-52-9	99.0	0.996
Fenoxanil	Wako ^{a)}	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₂	329.2	115852-48-7	98.0	0.986
Mepronil	Wako ^{a)}	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	269.3	55814-41-0	99.2	1.005
Oryastrobin	Hayashi ^{b)}	C ₁₈ H ₂₅ N ₅ O ₅	391.4	248593-16-0	99.7	0.997
Oryastrobin metabolite (5Z isomer)	Hayashi ^{b)}	C ₁₈ H ₂₅ N ₅ O ₅	391.4	-	98.5	0.989
Paclobutrazol	Wako ^{a)}	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	293.8	76738-62-0	97.0	0.988
Pencycuron	Wako ^{a)}	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O	328.8	66063-05-6	99.0	1.008
Pyriminobac-methyl (E isomer)	Wako ^{a)}	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₆	361.4	147411-69-6	99.0	1.005
Pyriminobac-methyl (Z isomer)	Hayashi ^{b)}	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₆	361.4	147411-70-9	99.5	0.995
Simeconazole	Wako ^{a)}	C ₁₄ H ₂₀ FN ₃ OSi	293.4	149508-90-7	99.0	1.000
Simetryn	Wako ^{a)}	C ₈ H ₁₅ N ₅ S	213.3	1014-70-6	99.9	0.999
Thenylchlor	Wako ^{a)}	C ₁₆ H ₁₈ ClNO ₂ S	323.8	96491-05-3	99.0	1.000

a) Wako pure chemical industries

b) Hayashi pure chemical industries

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 :

LC 部 : Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 部 : Waters 製 ACQUITY TQ Detector

- 2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム : ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充填剤量 500 mg)

- 4) 吸引マニホールド : ジーエルサイエンス製 GL-SPE 吸引マニホールド

- 5) 高速遠心分離器 : コクサン製 H-51

- 6) ブフナー漏斗 : 桐山製作所製 SU-95

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 30 mL (粳米は 20 mL) を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL (粳米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて (250 rpm) 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、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液をアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1 mL/min 程度で吸引して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル (9+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (3+2) 10 mL をミニカラムに加え、圧注して各農薬成分を溶出させた。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、その液の一定量を 5000×g (10000 rpm) 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した。

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）に注入し、Table 3 及び Table 4 の測定条件等に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

Table 3 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	N ₂ (600 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 1.0 kV

Table 4 MS/MS Parameters

Pesticides	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Benzofenap	431	105	-	48	30
		-	119	48	20
Cumyluron	303	185	-	30	12
		-	125	30	36
Dymron	269	151	-	24	14
		-	91	24	36
Fenoxanil	329	302	-	32	12
		-	86	32	24
Mepronil	270	119	-	34	22
		-	91	34	44
Orysastrobin	392	205	-	31	16
		-	116	31	29
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	392	205	-	31	16
		-	116	31	29
Paclobutrazol	294	70	-	36	18
		-	125	36	42
Pencycuron	329	125	-	36	24
		-	89	36	60
Pyriminobac-methyl (<i>E</i> isomer)	362	330	-	28	12
		-	284	28	32
Pyriminobac-methyl (<i>Z</i> isomer)	362	330	-	28	14
		-	75	28	110
Simeconazole	294	70	-	36	18
		-	73	36	40
Simetryn	214	68	-	44	32
		-	124	44	18
Thenylchlor	324	127	-	18	20
		-	53	18	60

4) 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及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 試料溶液の希釈に関する検討

1) カラム処理前で希釈した場合

稲わら 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 120 mL を加え、30 分間振り混ぜて (250 rpm) 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、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液をアセトンで 1~20 倍としてそれぞれ調製した試料溶液に、最終試料溶液中に各農薬濃度 1 ng/mL を含有するように農薬混合標準液を添加した。その液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とし、2.4 2) のカラム処理を行い、回収率を求めた。

2) カラム処理後に希釈した場合

稲わら 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 120 mL を加え、30 分間振り混ぜて (250 rpm) 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、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。その液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。この液を 2.4 2) のカラム処理を行い、溶出液をアセトニトリル-水 (3+2) で 1~20 倍としてそれぞれ調製した試料溶液に、最終試料溶液中に各農薬濃度 1 ng/mL を含有するように農薬混合標準液を添加し、回収率を求めた。

Sample 10.0 g

- add 30 mL of water (Paddy rice : 20 mL)
- allow to stand for 30 min
- add 120 mL of acetone (Paddy rice : 100 mL)
- shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No.5B)
- wash with 50 mL of acetone
- top up to 200 mL with acetone
- dilute ten-fold with acetone
- add 20 mL water to 2 mL of sample solution

InertSep Slim-J C18-B (500 mg)

- prewash with 5 mL of acetonitrile and 5 mL of water
- apply sample solution
- wash with 5 mL of water-acetonitrile (9:1) (twice)
- elute with 10 mL of acetonitrile-water (3:2)
- top up to 10 mL with acetonitrile-water (3:2)
- centrifuge for 5 min at 5000×g (10000 rpm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for oryastrobin and 13 other pesticides in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

農薬混合標準液各 5 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及び高さを求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 1-1 から 1-3 のとおり、パクロブトラゾールは、0.05~5 ng/mL (注入量として 0.00025~0.025 ng) の範囲で直線性を示した。その他 13 成分の農薬は 0.1~5 ng/mL (注入量として 0.0005~0.025 ng) の範囲で直線性を示した。

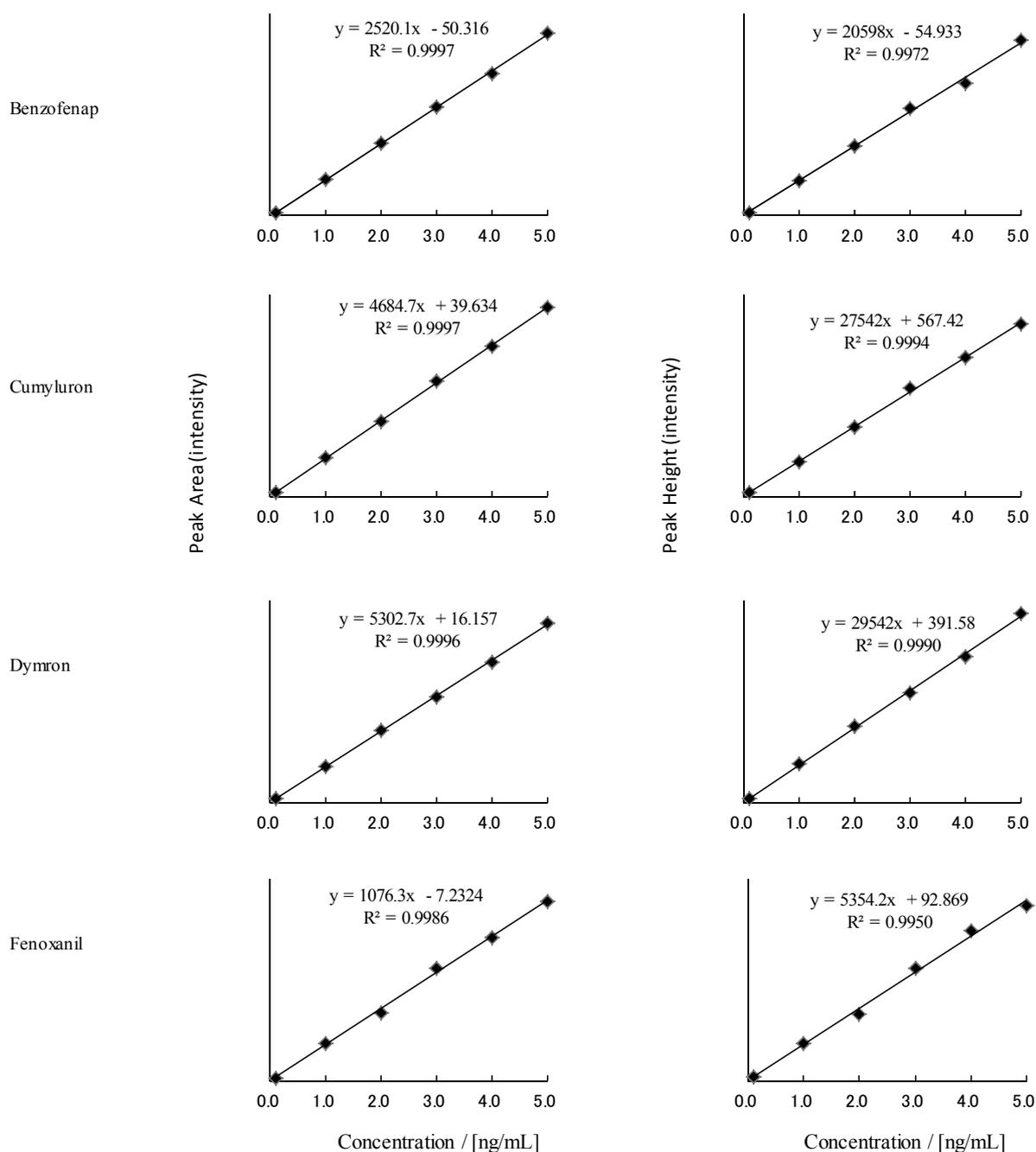


Fig. 1-1 Calibration curves of four pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

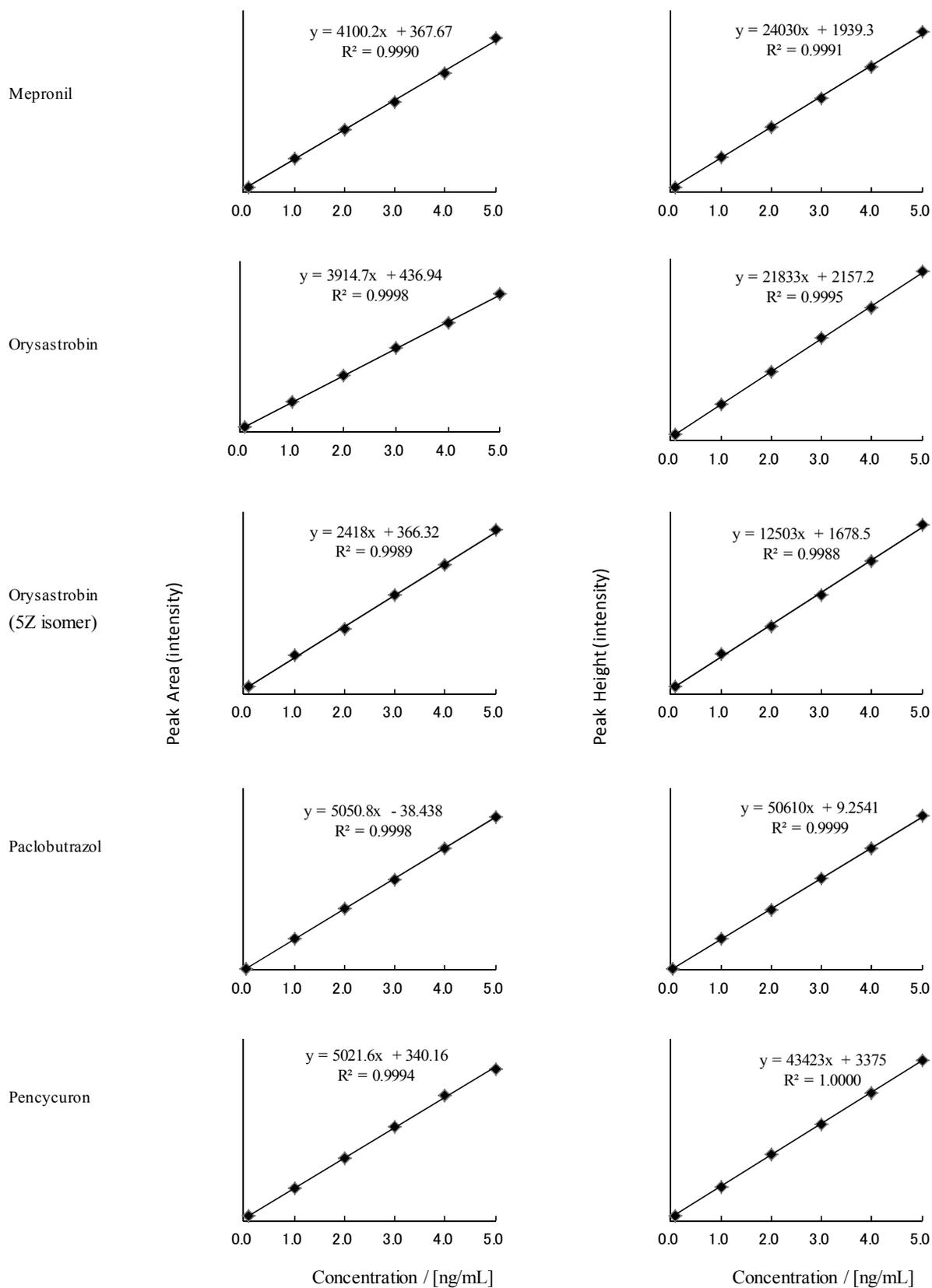


Fig. 1-2 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

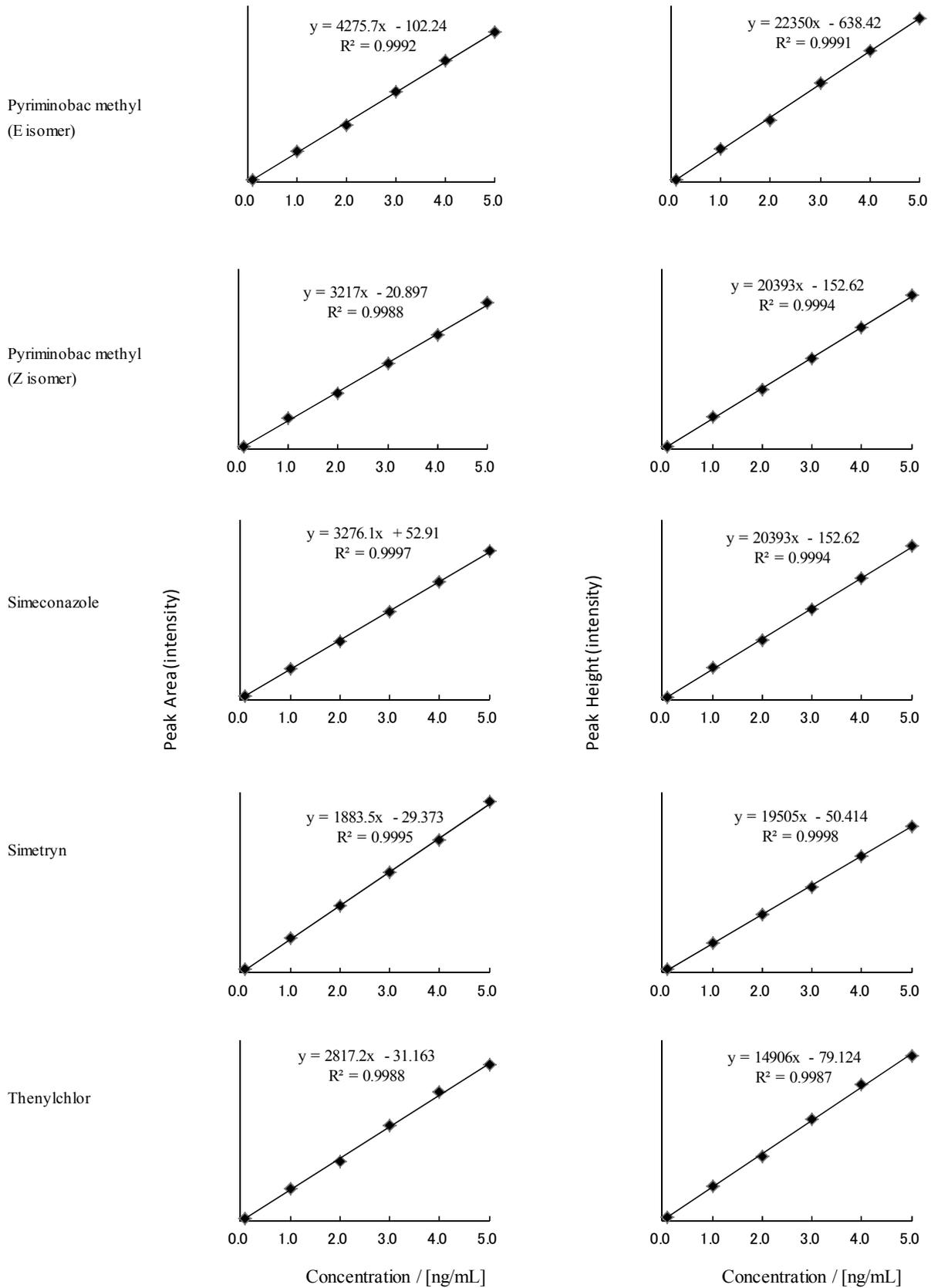


Fig. 1-3 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

3.2 試料溶液の希釈に関する検討

飼料用イネに、各農薬 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、2.4 1) のアセトンによりメスアップされた溶液を 10 倍希釈せずに、回収率を求めたところ、Table 5 のとおり、シメコナゾール、パクロブトラゾール及びフェノキサニルにおける回収率が 70 % を下回る結果となった。

この原因が夾雑物によるイオン化抑制である可能性があったため、希釈操作により、その影響が軽減できると考え、カラム処理操作の前後で試料溶液を 1~20 倍に希釈して回収率を求めた。その結果は Table 6 のとおりであり、5 倍以上に希釈した場合に改善が認められた。

以上により、イオン化抑制を低減させるためには、希釈操作はカラム処理の前後において結果に差はなく、希釈倍率も 5 倍で十分と考えられた。そこで、本法では試料溶液をアセトンで 10 倍希釈した溶液をカラム処理することとした。

Table 5 Recoveries of pesticides by JFRL method

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Benzofenap	0.1	80.3	2.8	82.8	2.8	90.7	1.4
Cumyluron	0.1	86.3	5.5	94.2	2.8	96.2	2.9
Dymron	0.1	87.0	5.0	95.5	1.9	99.1	1.8
Fenoxanil	0.1	67.8	1.6	85.3	1.8	84.7	6.6
Mepronil	0.1	84.2	1.2	92.0	1.3	92.4	2.0
Oryastrobin	0.1	84.9	3.5	94.7	0.7	94.9	2.4
Oryastrobin metabolite (SZ isomer)	0.1	89.0	0.1	100	3.0	100	4.0
Paclobutrazol	0.1	69.9	2.0	88.6	3.6	95.6	1.0
Pencycuron	0.1	85.8	1.9	90.2	3.1	92.4	4.6
Pyriminobac-methyl (<i>E</i> isomer)	0.1	88.9	1.1	96.9	2.3	97.7	3.7
Pyriminobac-methyl (<i>Z</i> isomer)	0.1	85.3	2.9	92.5	3.1	95.7	2.0
Simeconazole	0.1	61.9	1.6	65.5	4.3	86.6	1.2
Simetryn	0.1	87.2	1.2	94.4	2.6	86.6	1.2
Thenylchlor	0.1	89.2	3.4	90.3	0.5	91.0	4.0

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of pesticides compared by dilution level in Rice straw

(A) Dilutions performed before purification with InertSep Slim-J C-18-B

Pesticides	Recovery (%) ^{a)}				
	undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Benzofenap	90.2	92.9	91.6	93.3	91.6
Cumyluron	96.9	96.0	100	101	97.1
Dymron	97.4	94.4	94.2	93.4	95.1
Fenoxanil	80.8	91.4	90.2	96.5	93.6
Mepronil	94.4	94.7	92.2	93.7	97.3
Orysastrobin	95.9	94.7	99.3	97.3	99.5
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	96.2	101	92.8	97.2	95.7
Paclobutrazol	92.8	94.8	100	95.6	93.6
Pencycuron	97.0	95.9	96.0	94.8	96.2
Pyriminobac-methyl (<i>E</i> isomer)	96.4	96.2	98.2	96.4	96.1
Pyriminobac-methyl (<i>Z</i> isomer)	99.8	99.2	99.1	98.0	94.4
Simeconazole	81.4	87.5	94.9	92.8	93.7
Simetryn	101	95.4	96.8	97.2	98.3
Thenylchlor	90.8	90.7	95.3	94.0	96.0

a) $n = 1$

(B) Dilutions performed after purification with InertSep Slim-J C-18-B

Pesticides	Recovery (%) ^{a)}				
	undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Benzofenap	90.8	89.6	93.7	88.6	96.7
Cumyluron	99.8	95.4	101	101	99.7
Dymron	93.4	93.3	97.8	92.1	94.2
Fenoxanil	80.4	88.9	96.6	95.3	96.9
Mepronil	93.6	94.8	94.5	93.3	98.1
Orysastrobin	98.1	95.7	97.8	97.4	96.6
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	92.5	93.3	98.9	97.6	97.5
Paclobutrazol	99.8	99.1	93.9	98.0	97.7
Pencycuron	94.1	94.2	98.5	101	101
Pyriminobac-methyl (<i>E</i> isomer)	98.3	100	96.8	96.6	101
Pyriminobac-methyl (<i>Z</i> isomer)	97.7	99.4	103	102	97.3
Simeconazole	81.6	90.6	94.5	100	98.7
Simetryn	93.8	96.0	104	96.3	96.7
Thenylchlor	86.5	93.9	97.1	96.2	102

a) $n = 1$

3.3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の確認

稲わらを試料として、2.4 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に各農薬として 0.1 ng/mL 相当量を添加して、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は Table 7 のとおりであり、洗浄液である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL では農薬成分の流出は認められず、溶出液であるアセトニトリル-水 (3+2) では最初の 10 mL ではほぼ全ての農薬成分が溶出することが認められた。

Table 7 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticides	Recovery (%) ^{a)}			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0 ~ 10 mL	(2:3) 10 ~ 20 mL	
Benzofenap	0	98	1	99
Cumyluron	0	101	0	101
Dymron	0	99	0	99
Fenoxanil	0	97	0	97
Mepronil	0	102	0	102
Oryastrobin	0	98	0	98
Oryastrobin metabolite (5Z isomer)	0	102	0	102
Paclobutrazol	0	98	0	98
Pencycuron	0	97	0	97
Pyriminobac-methyl (E isomer)	0	98	0	98
Pyriminobac-methyl (Z isomer)	0	100	0	100
Simeconazole	0	97	0	97
Simetryn	0	99	0	99
Thenylchlor	0	99	0	99

a) $n = 1$

3.4 妨害物質の検討

稲わら 2 検体、稲発酵粗飼料 3 検体及び籾米 4 検体を試料として、2.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

妨害物質の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 2-1 に示した。

なお、Fig. 2-1 において保持時間の位置に微小のピークが認められたパクロブトラゾール、オリサストロビン及びテニルクロールについて、定量下限相当のこれらの標準液 (0.05 及び 0.1 ng/mL) から得られた選択反応検出クロマトグラムと比較した結果を Fig. 2-2 に示した。

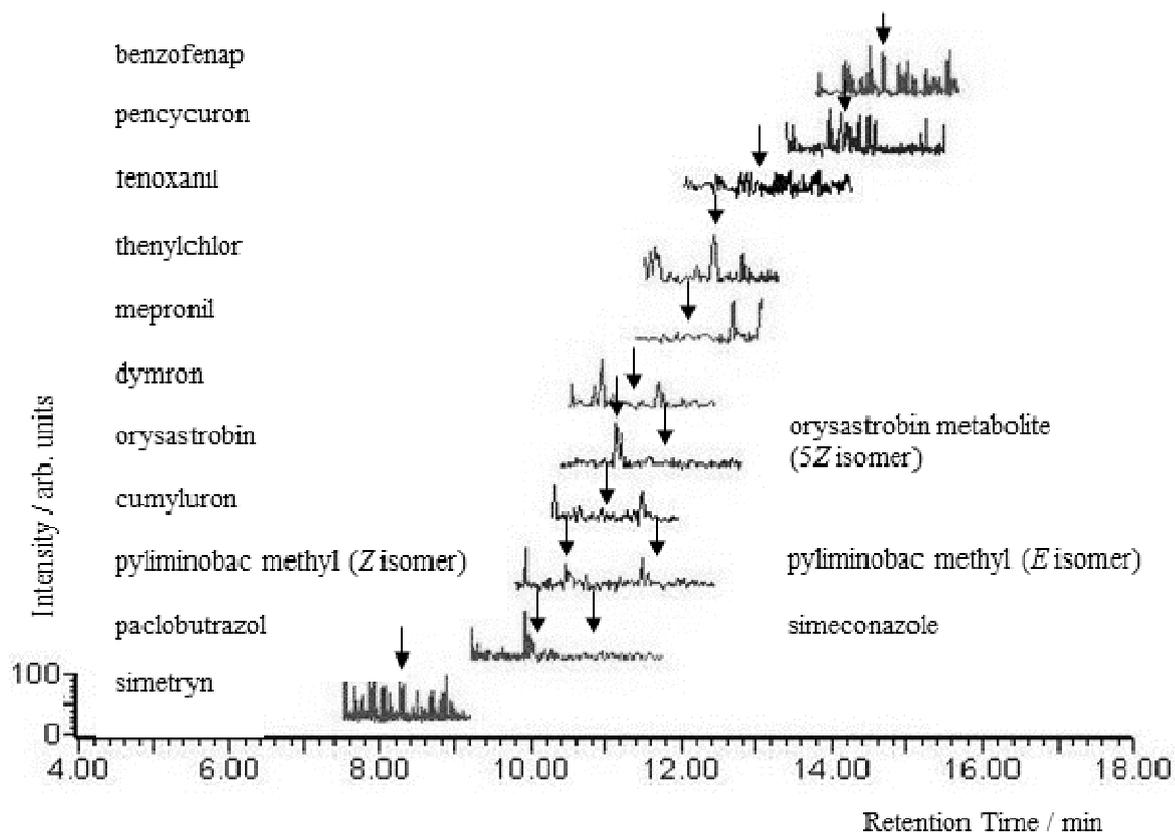


Fig. 2-1 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides and highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

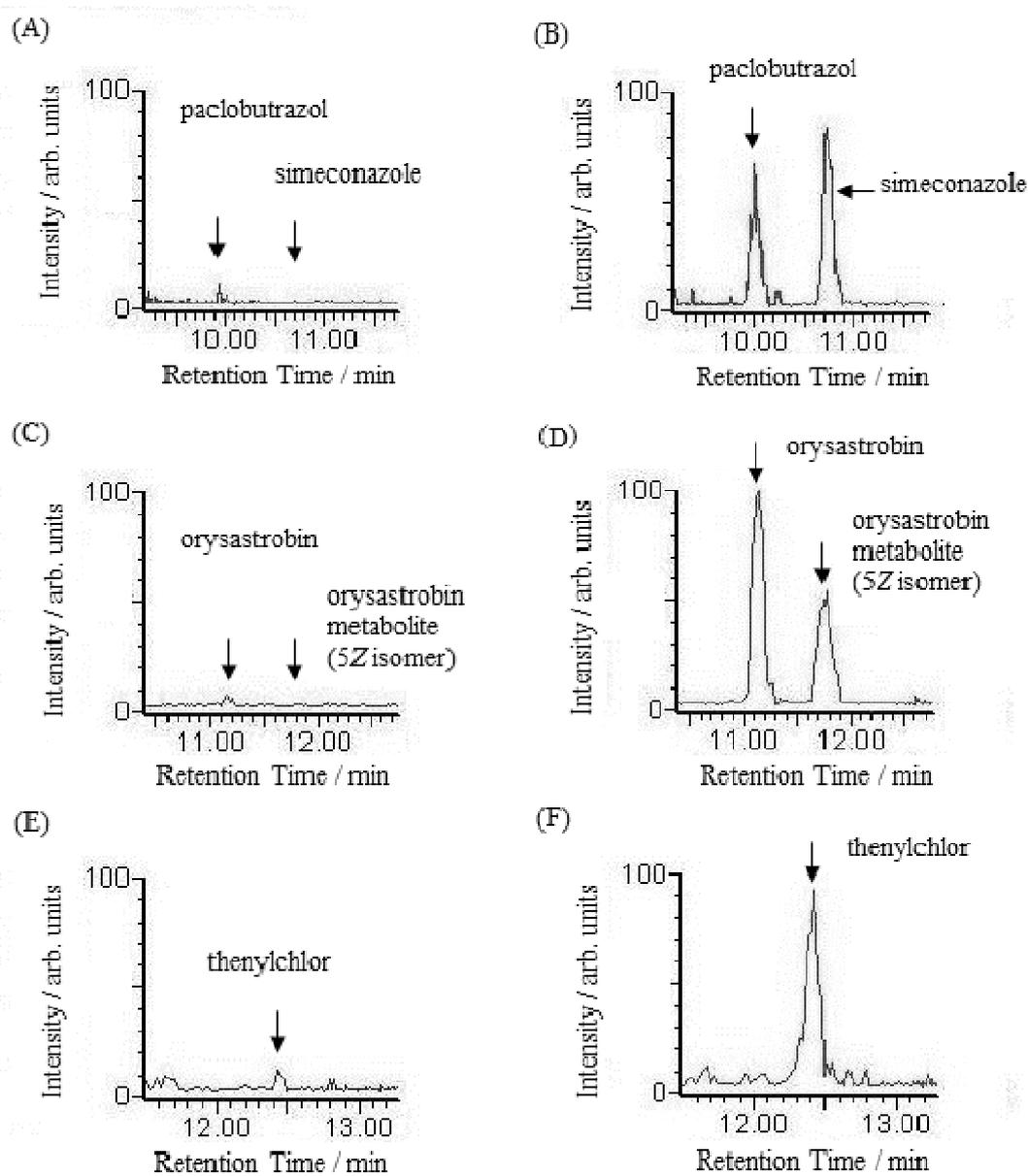


Fig. 2-2 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked) and standard solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

(A) (C) (E) Sample solution of rice straw (non-spiked)

(B) (D) (F) Standard solution (paclobutrazol: 0.05 ng/mL, orysastrobin and thienylchlor: 0.1 ng/mL)

Drawn on the same scale of (B), (D) and (F) respectively.

3.5 添加回収試験

飼料用イネにパクロブトラゾールとして 0.05, 0.5 及び 1.0 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.05, 0.5 及び 1.0 ng/mL 相当量）並びにその他 13 成分の農薬として 0.1 mg/kg（最終試料溶液中で 0.1 ng/mL 相当量）, 1.0 mg/kg 及び基準値（基準値のないものについては 0.5 mg/kg）相当量を添加し、本法に従って 3 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めた。なお、最終試料溶液中の各農薬濃度が検量線範囲を超える場合は、2.4 2) のカラム処理の前に試料溶液を希釈した。

その結果は、Table 8 のとおり、オリサストロビンには平均回収率 81.1~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 4.4 %以下、オリサストロビン 5Z 異性体は平均回収率 73.8~100 %、その繰返し精度は RSD_r として 16 %以下、クミルロンは平均回収率 84.2~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 14 %以下、シメコナゾールは平均回収率 83.5~98.6 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.3 %以下、シメトリンは平均回収率 84.7~100 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.0 %以下、ダイムロンは平均回収率 83.9~101 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、テニルクロールは平均回収率 90.1~109 %、その繰返し精度は RSD_r として 9.3 %以下、パクロブトラゾールは平均回収率 87.6~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 16 %以下、ピリミノバックメチル (E 体) は平均回収率 87.8~101 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、ピリミノバックメチル (Z 体) は平均回収率 88.8~98.7 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下、フェノキサニルは平均回収率 91.8~110 %、その繰返し精度は RSD_r として 14 %以下、ペンシクロンは平均回収率 82.8~107 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下、ベンゾフェナップは平均回収率 88.4~99.1 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.7 %以下、メプロニルは平均回収率 85.4~108 %、その繰返し精度は RSD_r として 9.0 %以下であった。いずれも良好な成績が得られた。

なお、添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

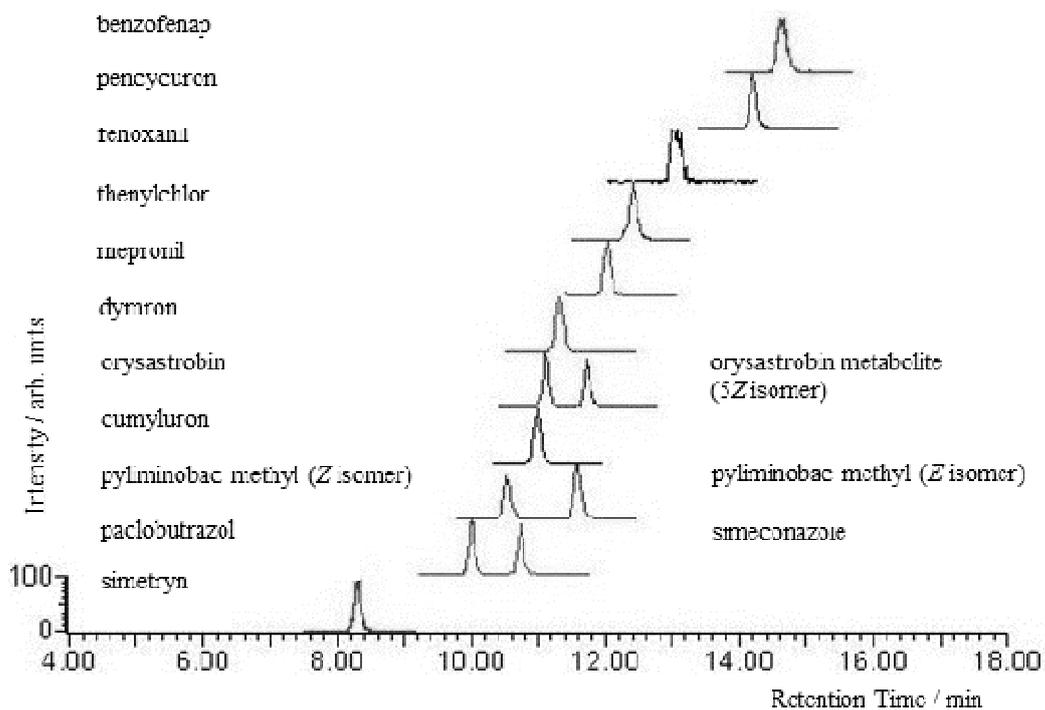
Table 8 Recoveries of pesticides

Pesticides	Feed types								
	Rice straw			Whole-crop rice silage			Paddy rice		
	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Benzofenap	0.1	92.5	3.7	0.1	95.0	4.2	0.1	96.2	7.7
	0.5	89.1	4.9	0.5	93.8	4.3	0.5	93.5	5.9
	1.0	88.5	1.0	1.0	88.4	7.6	1.0	99.1	2.7
Cumyluron	0.1	84.2	14	0.1	86.9	14	0.1	91.3	0.8
	1.0	93.9	1.7	0.5	92.2	2.3	0.5	93.9	4.7
	2.0	99.0	2.3	1.0	100	2.8	1.0	105	4.3
Dymron	0.1	83.9	5.5	0.1	97.8	13	0.1	99.7	3.3
	0.5	90.5	3.9	0.5	95.8	4.0	0.5	96.8	8.6
	1.0	94.4	1.6	1.0	99.2	2.3	1.0	101	3.8
Fenoxanil	0.1	109	14	0.1	109	7.2	0.1	91.8	9.6
	1.0	92.4	4.2	1.0	95.0	3.2	1.0	98.3	3.2
	30	94.3	1.9	3.0	104	1.9	10	110	1.3
Mepronil	0.1	88.4	9.0	0.1	85.4	7.7	0.1	92.8	2.4
	1.0	95.0	1.5	1.0	99.3	2.8	1.0	98.3	3.4
	25	98.3	2.0	10	107	1.6	7.0	108	3.8
Orysastrobin	0.1	81.1	3.5	0.1	92.4	0.8	0.1	101	2.8
	1.0	90.3	0.8	0.5	96.0	1.9	0.5	94.0	4.4
	5.0	92.3	1.2	1.0	98.4	2.8	1.0	99.8	2.5
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	0.1	86.5	5.6	0.1	73.8	12	0.1	94.5	16
	1.0	92.2	5.7	0.5	99.7	4.9	0.5	96.2	1.7
	5.0	91.5	0.5	1.0	98.6	2.4	1.0	100	0.5
Paclobutrazol	0.05	97.9	16	0.05	105	2.6	0.05	105	3.5
	0.5	87.6	4.1	0.5	94.8	3.7	0.5	93.8	4.4
	1.0	90.5	4.7	1.0	98.4	1.2	1.0	96.7	0.6
Pencycuron	0.1	98.0	7.1	0.1	97.3	2.2	0.1	83.5	9.3
	1.0	85.2	3.8	0.5	90.9	2.7	1.0	90.7	1.4
	30	89.2	11	1.0	82.8	2.8	10	107	0.3
Pyriminobac-methyl (<i>E</i> isomer)	0.1	87.8	13	0.1	101	8.8	0.1	98.0	8.7
	0.5	91.0	2.0	0.5	99.3	1.1	0.5	100	3.0
	1.0	90.8	1.5	1.0	99.5	1.3	1.0	101	1.7
Pyriminobac-methyl (<i>Z</i> isomer)	0.1	96.8	2.0	0.1	90.8	10	0.1	95.2	3.8
	0.5	88.8	8.2	0.5	93.2	11	0.5	98.6	5.4
	1.0	93.8	2.9	1.0	98.7	2.4	1.0	97.6	2.6
Simeconazole	0.1	83.5	7.3	0.1	85.2	3.2	0.1	93.1	0.5
	0.5	90.1	0.7	0.5	93.7	6.5	0.5	98.1	3.7
	1.0	86.0	1.0	1.0	95.8	2.1	1.0	98.6	1.9
Simetryn	0.1	86.4	4.7	0.1	100	4.8	0.1	84.7	7.0
	0.5	89.1	4.7	0.5	96.1	3.0	0.5	94.0	5.7
	1.0	92.4	2.0	1.0	94.1	2.5	1.0	96.8	3.9
Thenylchlor	0.1	106	4.3	0.1	109	5.6	0.1	92.3	9.3
	0.5	91.3	4.6	0.5	94.8	5.6	0.5	100	6.3
	1.0	90.1	1.6	1.0	93.4	6.5	1.0	94.1	1.9

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

(A)



(B)

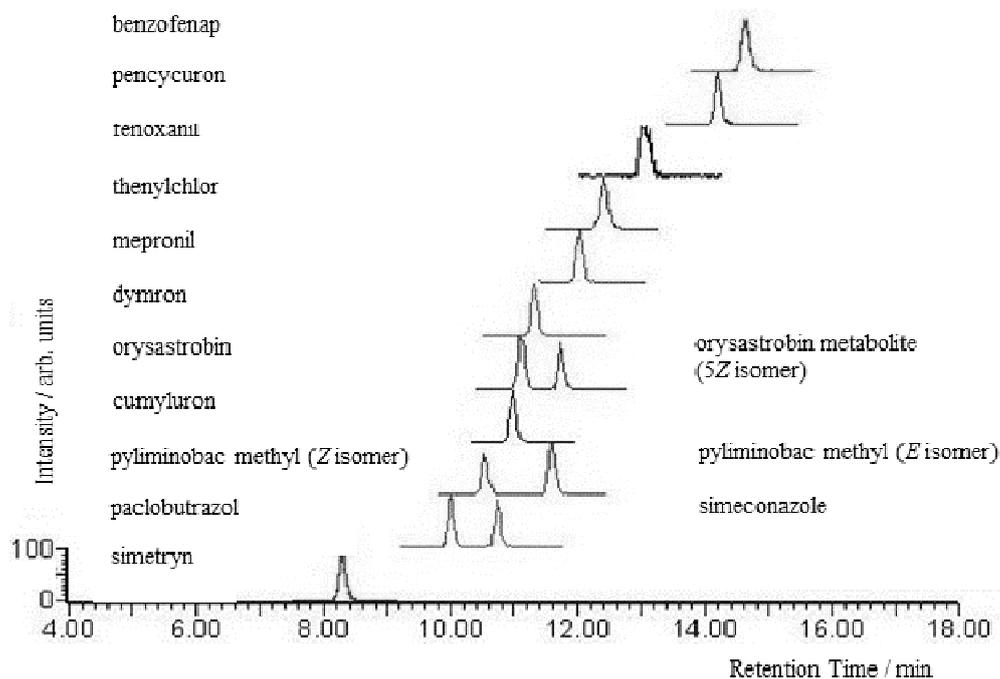


Fig. 3 SRM chromatograms of pesticides

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

- (A) Standard solution (The concentration is 2 ng/mL for each pesticides.)
 (B) Sample solution of rice straw (Spiked at 1 mg/kg of each pesticides)
 (Highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、飼料用イネに 14 成分の各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

パクロブトラゾールは、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.05 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

確認のために、飼料用イネにパクロブトラゾールとして 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.05 ng/mL 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ところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 8 のとおりであった。

その他の 13 成分の農薬は、全て得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であった。

確認のために、飼料用イネにこれら 13 成分の農薬として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1ng/mL 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ところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 8 のとおりであった。

以上の結果から、本法のパクロブトラゾールの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であり、その他 13 成分の農薬の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び籾米に農薬 14 成分（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン及びオリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル（E 体）、ピリミノバックメチル（Z 体）、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール）を添加した共通試料を用いて共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

1) 分析試料の調製

稲わら及び籾米について、2.1 のとおり調製した分析用試料を送付し、各試験室においてそれぞれ 10 g を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（各農薬としてそれぞれ 20 µg/mL）を分析開始の前日に 1 mL 添加して調製した。各試料について、非明示の 2 点併行で試験を実施した。

2) 参加試験室

協同飼料株式会社研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、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、同神戸センター及び同福岡センター（計 10 試験室）

3) 結果の解析

国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{6),7)}を参考に、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却を行った上で平均回収率、繰返し精度の相対標準偏差 (RSD_f) 及び室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。結果を Table 9 から 22 に示した。

4) 結果の解析

ベンゾフェナップでは稲わら及び籾米について、平均回収率は 92.6 及び 93.5 %、 RSD_f はそれぞれ 3.1 及び 2.4 %、 RSD_R はそれぞれ 4.8 及び 6.7 %、HorRat はそれぞれ 0.33 及び 0.46 であった。

クミロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.1 及び 95.6 %, RSD_f はそれぞれ 6.1 及び 3.9 %, RSD_R はそれぞれ 5.9 及び 5.6 %, HorRat はそれぞれ 0.41 及び 0.39 であった。

ダイムロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.0 及び 96.3 %, RSD_f はそれぞれ 2.1 及び 2.1 %, RSD_R はそれぞれ 4.7 及び 6.8 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.47 であった。

フェノキサニルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 89.9 及び 93.8 %, RSD_f はそれぞれ 3.3 及び 3.8 %, RSD_R はそれぞれ 7.2 及び 7.9 %, HorRat はそれぞれ 0.49 及び 0.54 であった。

メプロニルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 96.4 及び 96.5 %, RSD_f はそれぞれ 3.6 及び 3.5 %, RSD_R はそれぞれ 5.3 及び 4.9 %, HorRat はそれぞれ 0.36 及び 0.34 であった。

オリサストビンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.4 及び 96.4 %, RSD_f はそれぞれ 3.3 及び 3.6 %, RSD_R はそれぞれ 4.6 及び 5.8 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.40 であった。

オリサストビン 5Z 異性体では稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.1 及び 96.8 %, RSD_f はそれぞれ 3.0 及び 4.0 %, RSD_R はそれぞれ 3.9 及び 6.6 %, HorRat はそれぞれ 0.27 及び 0.45 であった。

パクロボトラゾールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 91.1 及び 93.7 %, RSD_f はそれぞれ 1.8 及び 2.4 %, RSD_R はそれぞれ 3.6 及び 4.2 %, HorRat はそれぞれ 0.25 及び 0.29 であった。

ペンシクロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.6 及び 96.1 %, RSD_f はそれぞれ 2.4 及び 1.8 %, RSD_R はそれぞれ 5.7 及び 6.4 %, HorRat はそれぞれ 0.39 及び 0.44 であった。

ピリミノバックメチル (E 体) では稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.8 及び 96.1 %, RSD_f はそれぞれ 3.4 及び 2.9 %, RSD_R はそれぞれ 4.7 及び 5.1 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.35 であった。

ピリミノバックメチル (Z 体) では稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.3 及び 95.7 %, RSD_f はそれぞれ 3.0 及び 3.1 %, RSD_R はそれぞれ 5.8 及び 6.9 %, HorRat はそれぞれ 0.40 及び 0.47 であった。

シメコナゾールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 89.7 及び 93.5 %, RSD_f はそれぞれ 3.9 及び 4.1 %, RSD_R はそれぞれ 5.0 及び 6.7 %, HorRat はそれぞれ 0.34 及び 0.46 であった。

シメトリンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.7 及び 93.1 %, RSD_f はそれぞれ 4.0 及び 1.5 %, RSD_R はそれぞれ 6.4 及び 8.4 %, HorRat はそれぞれ 0.44 及び 0.57 であった。

テニクロールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 97.8 及び 97.7 %, RSD_f はそれぞれ 3.6 及び 3.0 %, RSD_R はそれぞれ 9.3 及び 4.9 %, HorRat はそれぞれ 0.64 及び 0.34 であった。

いずれも良好な結果が得られた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 23 に示した。

Table 9 Collaborative study results of benzofenap

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.85	1.86	1.88	1.95
2	2.47 ^{a)}	2.48 ^{a)}	1.81	1.82
3	1.74	1.76	1.79	1.74
4	1.83	1.73	1.57	1.61
5	2.02	1.89	1.94	1.85
6	1.83	1.78	1.92	2.00
7	1.97	1.98	1.99	1.98
8	1.88	1.80	1.93	1.96
9	1.77	1.84	1.85	1.88
10	1.98	1.84	2.03	1.91
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.85		1.87	
Recovery ^{b)} (%)	92.6		93.5	
RSD _r ^{c)} (%)	3.1		2.4	
RSD _R ^{d)} (%)	4.8		6.7	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		15	
HorRat	0.33		0.46	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 18$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Collaborative study results of cumyluron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.65	1.87	1.85	1.71
2	2.42 ^{a)}	2.43 ^{a)}	1.82	1.79
3	1.81	1.83	1.86	1.81
4	1.97	1.81	1.84	1.85
5	2.31 ^{a)}	2.25 ^{a)}	2.15	1.90
6	1.70	2.04	2.02	1.89
7	1.95	1.98	1.97	1.94
8	1.88	1.78	1.88	1.95
9	1.89	1.98	1.96	1.90
10	2.01	1.95	2.08	2.05
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.88		1.91	
Recovery ^{b)} (%)	94.1		95.6	
RSD _r ^{c)} (%)	6.1		3.9	
RSD _R ^{d)} (%)	5.9		5.6	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		15	
HorRat	0.41		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Collaborative study results of dymron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.88	2.00	1.91
2	2.51 ^{b)}	2.41 ^{b)}	1.87	1.81
3	1.79	1.79	1.77	1.75
4	1.86	1.89	1.83	1.81
5	2.35 ^{a)}	1.85 ^{a)}	2.04	1.98
6	1.98	1.88	2.03	2.08
7	1.80	1.88	1.82	1.86
8	1.85	1.78	1.88	1.91
9	1.84	1.88	1.90	1.88
10	2.07	2.05	2.24	2.13
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	1.88		1.93	
Recovery ^{c)} (%)	94.0		96.3	
RSD _r ^{d)} (%)	2.1		2.1	
RSD _R ^{e)} (%)	4.7		6.8	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.47	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 12 Collaborative study results of fenoxanil

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.69	1.87	1.80	1.67
2	2.45 ^{a)}	2.57 ^{a)}	2.00	1.95
3	1.69	1.70	1.80	1.78
4	1.69	1.66	1.77	1.72
5	1.96	1.95	2.04	1.85
6	1.87	1.96	2.13	2.02
7	1.77	1.81	1.95	1.92
8	1.80	1.77	1.86	1.95
9	1.58	1.68	1.65	1.64
10	2.01	1.92	2.08	1.94
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.80		1.88	
Recovery ^{b)} (%)	89.9		93.8	
RSD _r ^{c)} (%)	3.3		3.8	
RSD _R ^{d)} (%)	7.2		7.9	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		15	
HorRat	0.49		0.54	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 18$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Collaborative study results of mepronil

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	2.06	1.97	1.89
2	2.41 ^{a)}	2.45 ^{a)}	1.82	1.86
3	1.82	1.87	1.83	1.84
4	1.94	1.82	1.73	1.95
5	2.12	2.02	1.93	2.07
6	1.92	2.02	1.97	2.06
7	1.99	1.99	2.01	2.02
8	1.82	1.73	1.91	1.86
9	1.90	1.88	1.93	1.86
10	2.00	1.94	2.03	2.04
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.928		1.929	
Recovery ^{b)} (%)	96.4		96.5	
RSD _r ^{c)} (%)	3.6		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	5.3		4.9	
PRSD _R ^{e)} (%)	14		14	
HorRat	0.36		0.34	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 18$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 14 Collaborative study results of orysastrobin

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.80	1.78	1.83	1.86
2	2.46 ^{a)}	2.50 ^{a)}	1.82	1.84
3	1.78	1.80	1.84	1.84
4	1.91	1.75	1.80	1.83
5	2.66 ^{a)}	2.35 ^{a)}	2.13	1.91
6	1.86	2.04	1.95	2.15
7	1.88	1.89	1.91	1.94
8	1.82	1.78	1.88	1.90
9	1.93	1.96	1.99	1.97
10	1.96	1.95	2.12	2.05
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.87		1.93	
Recovery ^{b)} (%)	93.4		96.4	
RSD _r ^{c)} (%)	3.3		3.6	
RSD _R ^{d)} (%)	4.6		5.8	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.40	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 15 Collaborative study results of oryastrobin metabolite (5Z isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.91	1.83	1.85	2.06
2	2.43 ^{b)}	2.44 ^{b)}	1.79	1.82
3	1.81	1.81	1.86	1.84
4	1.81	1.75	1.69	1.76
5	2.40 ^{a)}	2.06 ^{a)}	2.14	1.90
6	1.96	1.92	2.15	2.07
7	1.91	1.92	1.94	1.95
8	1.94	1.77	1.94	1.96
9	1.96	1.93	1.94	1.99
10	1.98	1.89	2.07	2.00
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	1.88		1.94	
Recovery ^{c)} (%)	94.1		96.8	
RSD _r ^{d)} (%)	3.0		4.0	
RSD _R ^{e)} (%)	3.9		6.6	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		14	
HorRat	0.27		0.45	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 16 Collaborative study results of paclobutrazol

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.76	1.66	1.77	1.82
2	2.49 ^{b)}	2.46 ^{b)}	1.88	1.89
3	1.78	1.77	1.76	1.80
4	1.77	1.80	1.74	1.85
5	2.36 ^{a)}	1.89 ^{a)}	1.88	1.86
6	1.86	1.92	1.92	2.05
7	1.86	1.87	1.88	1.89
8	1.83	1.81	1.85	1.88
9	1.83	1.85	1.89	1.93
10	1.91	1.86	2.01	1.94
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	1.82		1.87	
Recovery ^{c)} (%)	91.1		93.7	
RSD _r ^{d)} (%)	1.8		2.4	
RSD _R ^{e)} (%)	3.6		4.2	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		15	
HorRat	0.25		0.29	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 17 Collaborative study results of pencycuron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.85	1.88	1.91
2	2.74 ^{a)}	2.72 ^{a)}	2.04	2.02
3	1.87	1.81	1.88	1.86
4	1.87	1.72	1.70	1.66
5	2.09	2.10	2.08	2.00
6	1.88	1.86	2.07	1.95
7	1.94	1.97	1.97	1.97
8	1.88	1.82	1.92	1.94
9	1.76	1.79	1.78	1.77
10	2.03	1.96	2.03	2.02
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.89		1.92	
Recovery ^{b)} (%)	94.6		96.1	
RSD _r ^{c)} (%)	2.4		1.8	
RSD _R ^{d)} (%)	5.7		6.4	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		14	
HorRat	0.39		0.44	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 18$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 18 Collaborative study results of pyriminobac-methyl (*E* isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.68	1.85	1.94
2	2.44 ^{a)}	2.47 ^{a)}	1.84	1.84
3	1.81	1.81	1.86	1.83
4	1.82	1.80	1.82	1.75
5	2.29 ^{a)}	2.07 ^{a)}	2.05	1.94
6	1.86	1.96	1.94	2.12
7	1.92	1.94	1.95	1.94
8	1.91	1.79	1.86	1.88
9	1.97	1.89	1.97	1.94
10	1.99	1.99	2.08	2.03
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.88		1.92	
Recovery ^{b)} (%)	93.8		96.1	
RSD _r ^{c)} (%)	3.4		2.9	
RSD _R ^{d)} (%)	4.7		5.1	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.35	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 19 Collaborative study results of pyriminobac-methyl (Z isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.88	1.81	1.88	1.82
2	2.48 ^{b)}	2.49 ^{b)}	1.83	1.84
3	1.79	1.84	1.86	1.83
4	1.70	1.76	1.58	1.75
5	2.63 ^{a)}	2.10 ^{a)}	1.95	2.03
6	1.88	1.99	2.00	2.14
7	1.89	1.92	1.91	1.94
8	1.88	1.81	1.86	1.97
9	1.95	1.96	1.97	1.96
10	2.14	1.99	2.09	2.08
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	1.89		1.91	
Recovery ^{c)} (%)	94.3		95.7	
RSD _r ^{d)} (%)	3.0		3.1	
RSD _R ^{e)} (%)	5.8		6.9	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		15	
HorRat	0.40		0.47	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 20 Collaborative study results of simeconazole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.82	1.80	1.75	1.89
2	2.40 ^{a)}	2.40 ^{a)}	1.86	1.85
3	1.79	1.76	1.78	1.83
4	1.78	1.66	1.61	1.79
5	2.47 ^{a)}	2.18 ^{a)}	1.94	2.08
6	2.06	1.85	1.96	2.13
7	1.76	1.76	1.93	1.89
8	1.82	1.77	1.80	1.87
9	1.69	1.76	1.71	1.79
10	1.86	1.75	2.00	1.95
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	1.79		1.87	
Recovery ^{b)} (%)	89.7		93.5	
RSD _r ^{c)} (%)	3.9		4.1	
RSD _R ^{d)} (%)	5.0		6.7	
PRSD _R ^{e)} (%)	15		15	
HorRat	0.34		0.46	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 16$; Paddy rice: $n = 20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 21 Collaborative study results of simetryn

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.74	1.69	1.80	1.79
2	2.39 ^{b)}	2.44 ^{b)}	1.80	1.84
3	1.83	1.84	1.87	1.88
4	1.85	1.70	1.72	1.72
5	2.00	2.06	1.97	1.90
6	1.87	1.67	1.54	1.60
7	1.91	1.95	2.01	1.99
8	1.91	1.86	1.93	1.99
9	1.92	1.99	2.07	2.08
10	1.89	2.05	2.08 ^{a)}	1.89 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	1.87		1.86	
Recovery ^{c)} (%)	93.7		93.1	
RSD _r ^{d)} (%)	4.0		1.5	
RSD _R ^{e)} (%)	6.4		8.4	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		15	
HorRat	0.44		0.57	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 18$; Paddy rice: $n = 18$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 22 Collaborative study results of thenylchlor

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	2.03	2.01	1.98	2.12
2	2.32	2.37	1.81	1.91
3	1.67	1.81	1.82	1.81
4	1.78	1.67	1.83	1.89
5	2.14	1.96	2.04	1.93
6	1.96	1.99	1.99	2.08
7	1.93	1.96	1.98	2.03
8	1.94	1.84	1.89	1.99
9	1.84	1.92	1.92	1.94
10	2.05	1.94	2.07	2.03
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.96		1.95	
Recovery ^{a)} (%)	97.8		97.7	
RSD _r ^{b)} (%)	3.6		3.0	
RSD _R ^{c)} (%)	9.3		4.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	14		14	
HorRat	0.64		0.34	

a) $n = 20$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 23 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-3200	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
5	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Quattro Premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
6	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro microAPI	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
10	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留する 12 種類 14 成分の農薬（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (E 体)、ピリミノバックメチル (Z 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール) について、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たところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、パクロブトラゾールは 0.05~5 ng/mL（注入量として 0.00025~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。その他 13 成分の農薬は 0.1~5 ng/mL（注入量として 0.0005~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。
- 2) カラム処理操作の前後で試料溶液を希釈することで良好な結果が得られたため、本法では平成 20 年度の JFRL 法と同様に、試料溶液をアセトンで 10 倍希釈したものをカラム処理することとした。

- 3) 飼料用イネについて、ミニカラムからの溶出画分を確認したところ、アセトニトリル-水(3+2)の溶出液量は10 mLで十分であった。
- 4) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 5) 飼料用イネにパクロブトラゾールとして0.05, 0.5及び1.0 mg/kg相当量(最終試料溶液中で各0.05, 0.5及び1.0 ng/mL相当量)並びにその他13成分の農薬として0.1 mg/kg(最終試料溶液中で0.1 ng/mL相当量), 1.0 mg/kg及び基準値(基準値のないものについては0.5 mg/kg)相当量を添加し、本法に従って3点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度をもとめたところ良好な結果が得られた。
- 6) 本法のパクロブトラゾールの定量下限は0.05 mg/kg, 検出下限は0.02 mg/kgであり、その他13成分の農薬の定量下限は0.1 mg/kg, 検出下限は0.03 mg/kgであった。
- 7) 稲わら及び粳米に各農薬としてそれぞれ2 mg/kg相当量を添加した試料を用いて10試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所, 一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 昭和63年10月14日, 63畜B第2050号(1988).
- 2) 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).
- 3) 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について, 平成17年1月24日, 食安発0124001号(2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター: 平成20年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発(2009).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成22年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発(2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).

5 穀類、乾牧草及び稲わら中のグルホシネート、3-メチルホスフィニコプロピオン酸及びN-アセチルグルホシネートの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による同時定量法

牧野 大作^{*1}, 若宮 洋市^{*1}, 榊原 良成^{*1}, 上野山 智洋^{*2}

Simultaneous Determination of Glufosinate, 3-(Methyl phosphinico) propanoic acid and N-Acetylglufosinate in grains, grass hay and rice straw by LC-MS/MS

Daisaku MAKINO^{*1}, Youichi WAKAMIYA^{*1}, Yoshinari SAKAKIBARA^{*1} and Tomohiro UENOYAMA^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method was developed to determine levels of glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico) propanoic acid (MPPA), and N-acetylglufosinate (NAG) in feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

GLUF, MPPA, and NAG were extracted with water. These compounds were then derivatized with trimethyl orthoacetate. The sample solution was purified with two types of SPE mini-columns (Sep-pak Plus NH₂ and Silica from Waters; Milford, MA, U.S.) and injected into the LC-MS/MS. LC separation was carried out on ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using 0.01 v/v % formic acid solution-acetonitrile (93:7 v/v) as a mobile phase. In MS/MS, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on feed ingredients. Barley was spiked with 5 or 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA. Corn, alfalfa hay, and rice straw were spiked with the same compounds at 0.1 or 0.05 mg/kg, 15, 1.5, or 0.5 mg/kg, and 0.5 or 0.05 mg/kg, respectively. Recoveries ranged from 76.8 % to 111 % for GLUF and 71.6 % to 93.4 % for MPPA. The relative standard deviations of repeatability ($n = 3$) were not more than 19 % for GLUF and 10 % for MPPA. Subsequently, barley was spiked with 5 or 0.5 mg/kg of NAG, while corn, alfalfa hay, and rice straw were spiked with the same compound at 0.1 or 0.05 mg/kg, 15, 1.5, or 0.5 mg/kg, and 0.5 or 0.05 mg/kg, respectively. NAG recoveries ranged from 87.7 % to 116 %. The relative standard deviations of repeatability ($n = 3$) were not more than 19 % for NAG.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, using feed ingredients spiked with GLUF, MPPA, and NAG in the following quantities: 5 mg/kg of GLUF or MPPA and 5 mg/kg of NAG for barley, and 15 mg/kg of GLUF or MPPA and 15 mg/kg of NAG for alfalfa hay.

For each compound, the resulting range of mean recovery, repeatability, and reproducibility in terms of relative standard deviations and HorRat, respectively, were 100 to 101 % and not more

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 農林水産省消費・安全局 表示・規格課

than 6.7 %, 14 %, and 1.3 for GLUF, 91.4 to 92.8 % and not more than 10 %, 13 %, and 1.2 for MPPA, and 107 to 110 % and not more than 4.4 %, 12 %, and 1.1 for NAG.

This method was validated and established for use in the inspection of GLUF, MPPA, and NAG in grains excluding wheat, grass hay and rice straw.

Key words: glufosinate ; 3-(methyl phosphinico) propanoic acid ; *N*-acetylglufosinate ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; collaborative study

キーワード：グルホシネート；3-メチルホスフィニコプロピオン酸；*N*-アセチルグルホシネート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料；共同試験

1 緒 言

グルホシネート（以下アンモニウム塩を指し、「GLUF」という。）は、ヘキスト社が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す¹⁾。また、GLUFは植物中で代謝され、その主要な代謝物は、非遺伝子組換え植物中では3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という。）、GLUF耐性遺伝子組換え植物中では*N*-アセチルグルホシネート（以下「NAG」という。）となることが知られている¹⁾。国内におけるGLUFの飼料中の基準値²⁾は、穀類はGLUF及びMPPAをGLUFに換算したもの並びにNAGをGLUFに換算したものの総和について、牧草はGLUF及びMPPAをGLUFに換算したものの和として設定されており、大麦で5 ppm、小麦0.2 ppm、とうもろこし0.1 ppm、牧草15 ppmである（平成24年12月現在）。また、飼料の有害物質の指導基準値³⁾は、稲わら中で0.5 mg/kgと設定されている。

飼料中の含リンアミノ酸系農薬の分析法は、既に飼料分析基準⁴⁾にガスクロマトグラフによる系統的分析法⁵⁾が収載されているが、この方法は操作が煩雑であり、またNAGを分析対象としていない。しかし、財団法人日本食品分析センターが「平成20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、飼料分析基準に収載された方法を基に、GLUF並びにその代謝物であるMPPA及びNAGを分析対象とする液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による同時定量法⁶⁾（以下「JFRL法」という。）を開発した。このJFRL法は、GLUF及びNAGは分析操作中に誘導體化処理を行うと、同一の誘導體が生成されることからGLUFとNAGは含量で算出される⁶⁾。この他、国内でGLUF、MPPA及びNAGを分析対象とする定量法としては、ガスクロマトグラフを用いる食品を対象とした厚生労働省の試験法⁷⁾がある。この方法は、JFRL法と同様に誘導體化を行うために、GLUFとNAGは含量で算出される。

今回、飼料中のGLUF及びその代謝物（MPPA及びNAG）を分析対象とするJFRL法の飼料分析基準への適用の可否を検討したのでその概要を報告する。

参考にこれらの農薬の構造式等をFig. 1に示した。

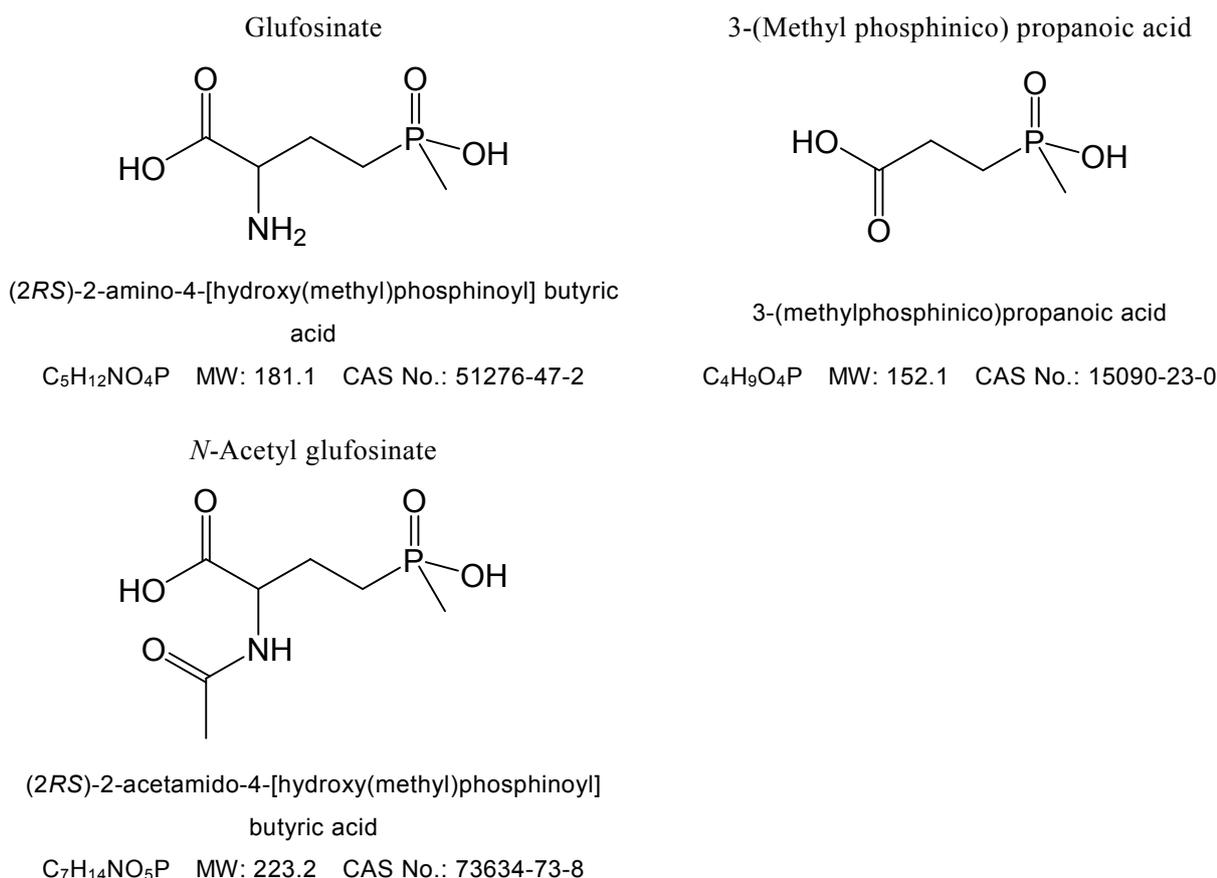


Fig. 1 Chemical structures of glufosinate, 3-(methyl phosphinico) propanoic acid and *N*-Acetyl glufosinate

2 実験方法

2.1 試料

大麦，とうもろこし，アルファルファ乾草及び稲わらをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し，供試試料とした。

2.2 試薬

1) グルホシネート標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 97.5 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えてグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLUF として 1 mg ($f = 0.978$) を含有する．）。

2) 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液

3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準品（和光純薬工業製，純度 99.7 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，MPPA として 1 mg ($f = 1.00$) を含有する．）。

3) *N*-アセチルグルホシネート標準原液

N-アセチルグルホシネート二ナトリウム標準品（林純薬工業製，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えて *N*-アセ

チルグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は、NAG として 1 mg ($f=0.835$) を含有する。）。

4) 検量線作成用農薬混合標準原液

グルホシネート標準原液、3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液の一定量を混合し、更に水で正確に希釈し、1 mL 中に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 100 μg を含有する農薬混合標準原液を調製した。

5) 0.01 v/v% ギ酸溶液

ギ酸（試薬特級、98.0 % 以上のもの）1 mL に水を加えて 1 L とし、更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした。

6) 水及びアセトニトリルは、液体クロマトグラフ用を用いた。アセトン及び酢酸エチルは、残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸は、試薬特級を用いた。オルト酢酸トリメチルは、東京化成工業製（純度 98.0 % 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タンデム型質量分析計：

液体クロマトグラフ部：Waters 製 ACQUITY UPLC System

タンデム型質量分析計部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

2) 振とう機：宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV

3) 遠心分離器：久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200（真空コントローラ V-800 付き）

5) 恒温乾燥機：いすゞ製作所製 SNH-215S（自然対流型）

6) 吸引マニホールド：Waters 製 Extraction manifold

7) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak[®] Plus NH₂ カートリッジ（360 mg）にリザーバー（10 mL）を連結したもの

8) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak[®] Plus Silica カートリッジ（690 mg）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加えて 30 分間振り混ぜて（300 rpm）抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ 1500 \times g（3000 rpm）で 10 分間遠心分離し、上澄み液を誘導体化に供する試料溶液とした。

2) 誘導体化

試料溶液 2 mL（乾牧草では、更に水で正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL）を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °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した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °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した。

酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した（吸引マニホールドを使用し、流速 2~3

mL/min とした。以下同じ。)

試料溶液 2 mL を連結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。更に酢酸エチル 18 mL をカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して MPPA 誘導体を溶出させた。

次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加えて MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。

溶出液を 50 °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した。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、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した。

4) 標準液の誘導体化

検量線作成用農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °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した。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °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した。

0.01 v/v% ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含む各標準液を調製した。

5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (93:7) (12 min) → 3 min → (5:95) (10 min) → 6 min → (93:7) (8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Ion source	120 °C
Capillary voltage	3 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

6) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体のピーク面積を求めてそれぞれ検量線を作成し、試料中の GLUF (NAG 由来を含む) 及び MPPA のそれぞれの量を算出した。

なお、MPPA を GLUF に換算して試料中の GLUF としての総和を求める場合には次式により算出した。

$$\text{試料中の GLUF 量 } (\mu\text{g/kg}) = A + B \times 1.30$$

A : 検量線から求めた試料中の GLUF (NAG 由来を含む) の濃度 ($\mu\text{g/kg}$)

B : 検量線から求めた試料中の MPPA の濃度 ($\mu\text{g/kg}$)

また、NAG のみを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は、検量線から求めた GLUF の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) を NAG の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) に換算し、添加した NAG の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) で除してその割合を求めることにより行った。

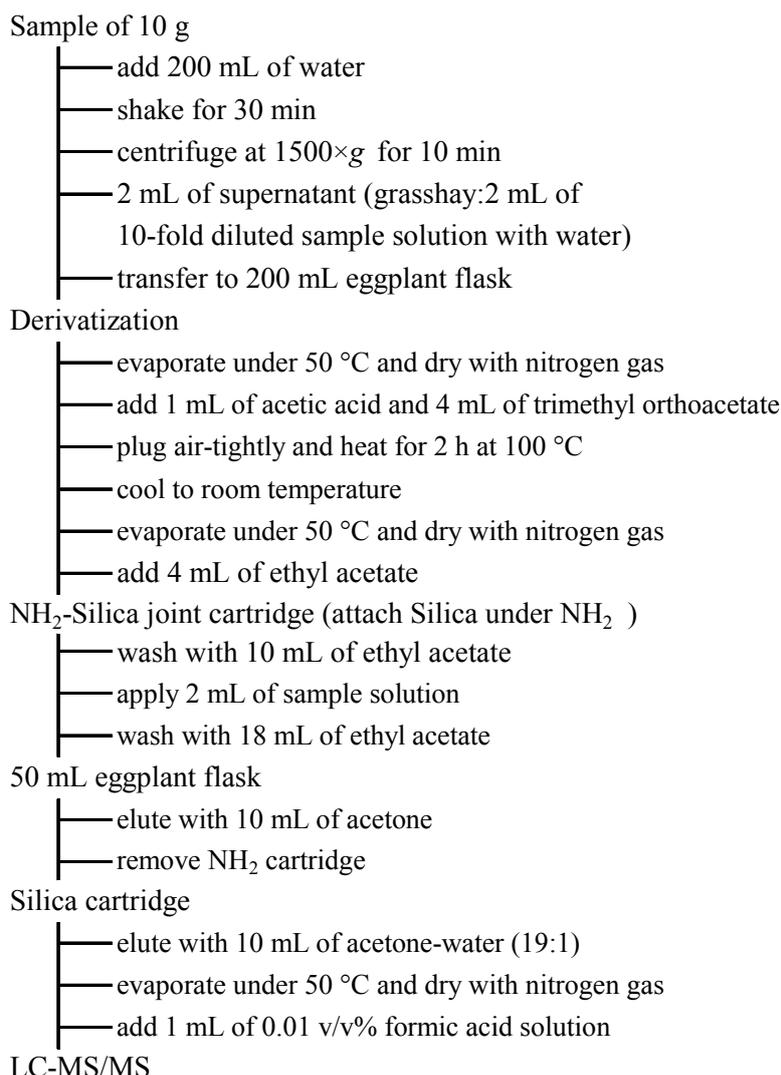
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 小麦を対象とした食品分析センター法の改良で用いた定量法

1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加えた。60 °C で 2 時間静置後、30 分間振り混ぜて (300 rpm) 抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ 1500×g (3000 rpm) で 10 分間遠心分離し、上澄み液を誘導体化に供する試料溶液とした。

以下、2.4 の 2) から 6) に従って定量を行った。



Scheme 1 Analytical procedure for GLUF, MPPA and NAG in feed

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

JFRL 法⁶⁾では液体クロマトグラフ条件は、0.01 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (93+7) によるイソクラティック溶出となっているが、山多らが愛玩動物用飼料を対象として GLUF 等の分析法を検討した際に⁸⁾、試料溶液中の夾雑成分からの影響の軽減を目的として、JFRL 法のイソクラティック溶出から、測定対象成分の溶出後にグラジエント溶出でカラムを洗浄する方法に変更していることから、筆者らも同条件で検討した。

また、質量分析条件についても、山多らの検討⁸⁾と同様にコーン電圧及びコリジョンエネルギーの当試験室で使用した機械への最適化、定量イオン及び確認イオンの一部変更を行った。

3.2 検量線

2.2 の 4)及び 2.4 の 4)に従って調製した GLUF 及び MPPA として各 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng/mL 相当量の各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、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用いて検量線を作成した。得られた検量線は、Fig. 2 のとおりであり、GLUF 及び MPPA で各 1~300

ng/mL 相当量（注入量として 0.005~1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

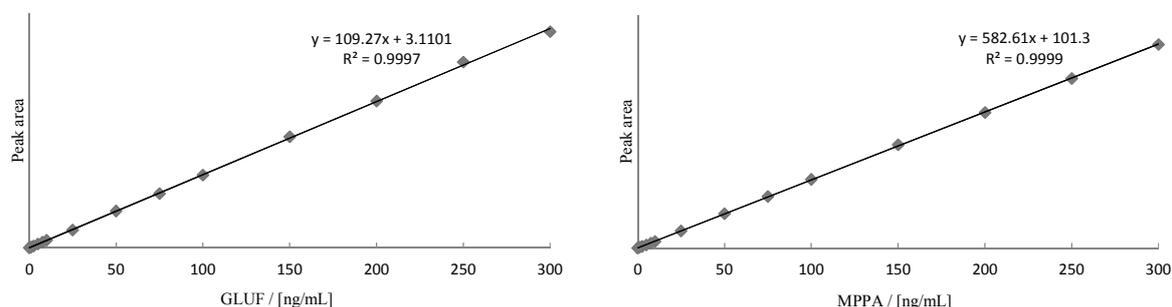


Fig. 2 Calibration curves of GLUF and MPPA by peak area

3.3 乾牧草及び小麦を対象とした JFRL 法の改良の検討について

1) 乾牧草について

乾牧草について、JFRL 法の適用の可否の検討を行ったところ、添加回収試験の結果が全体的に低回収率傾向であったことから、改善の検討を行った。

ここで、夾雑成分に由来するイオン化の阻害が疑われる場合には試料溶液の希釈が有効であることが多いこと、また乾牧草の基準値は 15 ppm と比較的高濃度であり、試料溶液を希釈しても、基準値からその 1/10 程度の濃度を測定するのに支障はないと考えられることから、アルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA として 15 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.075 µg/mL 相当量）及び NAG として 15 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.075 µg/mL 相当量）を用いて、2.4 の 1) で得られた上澄み液を水で 10 倍に希釈した後、2.4 の 2) 以降の操作を行い、希釈操作の有効性を検討した。その結果は Table 3 のとおり良好な結果が得られたことから、乾牧草については JFRL 法を一部変更して、抽出後、水で 10 倍希釈を行う操作を追加することにした。

Table 3 Comparison of recoveries of pesticides in grass hay by dilution level of extract solutions

Pesticide	undiluted		10-fold diluted ^{c)}	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
GLUF	68.5	2.8	90.1	12
MPPA	72.5	5.1	78.6	3.2
NAG	70.6	10	93.5	8.3

a) Mean(n=3). Spiked level was 15 mg/kg in sample.

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract solutions were the same origin of the left column.

2) 小麦について

3 種類の小麦に GLUF 及び MPPA として 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.010 µg/mL 相当量）並びに NAG として 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液

中で 0.010 µg/mL 相当量) について、JFRL 法の適用の可否の検討を行ったところ、全ての小麦において 30~50 %程度の回収率しか得られなかった。

ここで、山多らは愛玩動物用飼料を対象とした GLUF 等の定量法の検討において⁸⁾、ウェット製品以外の愛玩動物用飼料については水を加えた後、振とう抽出前に 60 °C で 2 時間静置をすることとしていることから、筆者らも同条件で検討したが良好な結果は得られなかった。

このように、現在のところ回収率の改善方法が見つからないため、今後更に検討することとし、今回、小麦については本法の適用範囲から除外することとした。

3.4 妨害物質の検討

とうもろこし、マイロ、大麦、えん麦、ふすま、大豆油かす、乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米を用い、本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した大麦に GLUF 及び MPPA として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量及び稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

また、NAG については、GLUF と NAG の誘導体が同一であることから、両者が共存している場合には定量値は GLUF と NAG の含量として算出される⁹⁾。このことから NAG の添加回収試験による試験の際には NAG のみを添加して評価を行うこととし、大麦に NAG として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量及び稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果を Table 4, 5 及び 6 に示した。GLUF について、大麦では平均回収率 95.5 及び 77.3 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 7.8 %以下、同様にとうもろこしでは 99.3 及び 84.5 %並びに 19 %以下、アルファルファ乾草では 90.1 及び 87.9 %並びに 13 %以下、稲わらでは 76.8 及び 84.8 %並びに 7.1 %以下であった。

MPPA について、大麦では平均回収率 87.1 及び 71.6 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 10 %以下、とうもろこしでは 72.3 及び 79.9 %並びに 9.6 %以下、アルファルファ乾草では 78.6 及び 78.4 %並びに 10 %以下、稲わらでは 74.2 及び 90.8 %並びに 8.8 %以下であった。

NAG について、大麦では平均回収率 115 及び 99.0 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 14 %以下、とうもろこしでは 87.7 及び 116 %並びに 19 %以下、アルファルファ乾草では 93.5 及び 97.5 %並びに 8.3 %以下、稲わらでは 94.9 及び 111 %並びに 11 %以下であった。

なお、添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 4 Recoveries of GLUF

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	90.1	13	-	-
5	95.5	4.9	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	87.9	10	-	-
0.5	77.3	7.8	-	-	-	-	76.8	5.0
0.1	-	-	99.3	19	-	-	-	-
0.05	-	-	84.5	5.5	-	-	84.8	7.1

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recoveries of MPPA

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	78.6	3.2	-	-
5	87.1	8.3	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	78.4	10	-	-
0.5	71.6	10	-	-	-	-	74.2	3.1
0.1	-	-	72.3	9.6	-	-	-	-
0.05	-	-	79.9	0.9	-	-	90.8	8.8

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of NAG

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	93.5	8.3	-	-
5	115	14	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	97.5	4.5	-	-
0.5	99.0	5.7	-	-	-	-	94.9	2.3
0.1	-	-	87.7	19	-	-	-	-
0.05	-	-	116	1.6	-	-	111	11

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

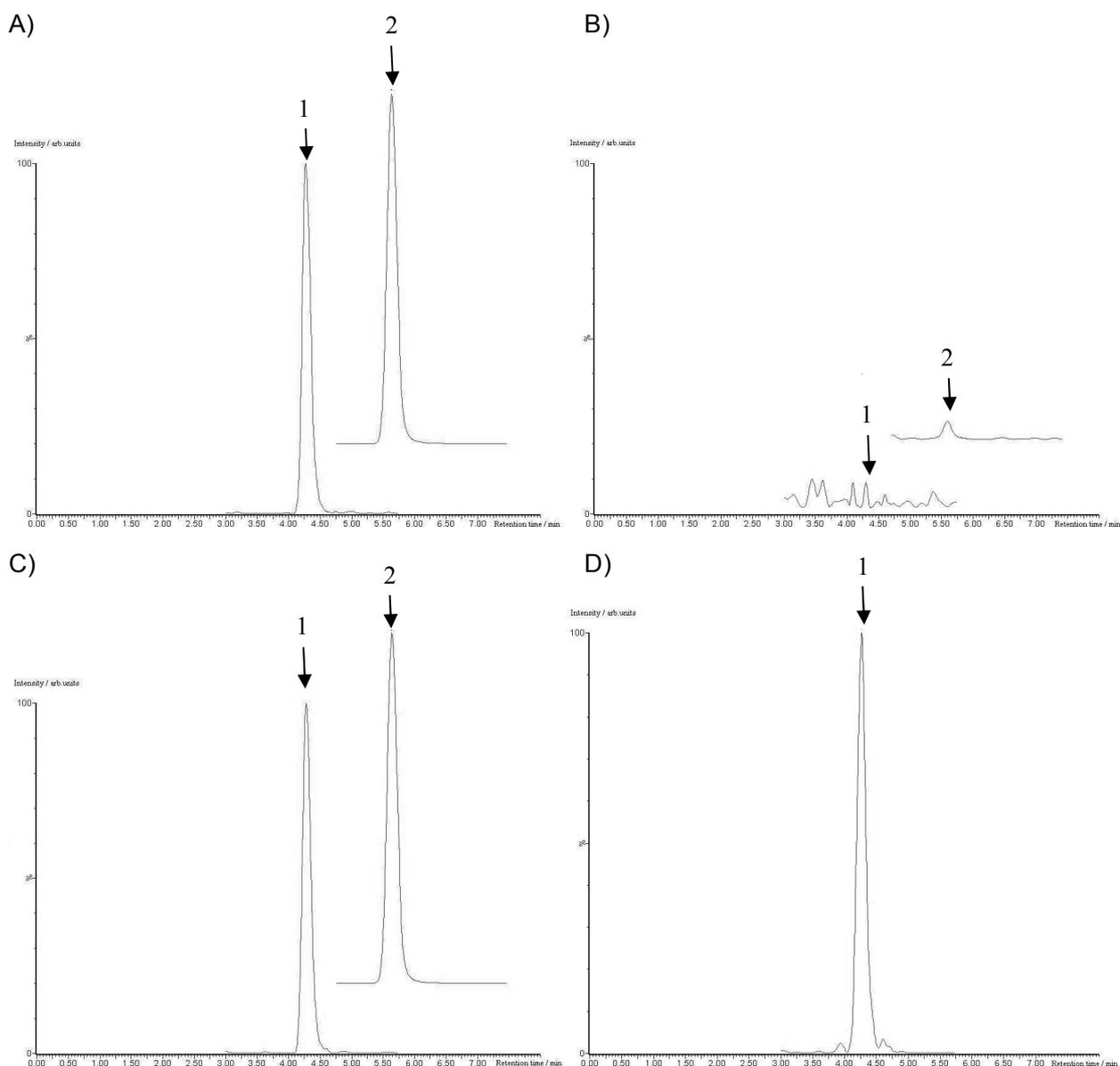


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peaks of 1: GLUF derivative and 2: MPPA derivative and each peak is shown as 100 % in each segment, but the chromatogram of B) is scaled as 100 % of the lowest standard solution (1 ng/mL).)

- A) Standard solution (The concentration is 100 ng/mL for GLUF and MPPA)
- B) Blank sample solution (barley)
- C) Sample solution of barley (Spiked at 5 mg/kg of GLUF and MPPA)
- D) Sample solution of barley (Spiked at 5 mg/kg of NAG)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこし及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA を添加した試料並びに NAG を添加した試料について、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの *SN* 比が 10 以上となる濃度はとうもろこしで 0.05 mg/kg 及びアルファルファ乾草で 0.5 mg/kg であった。

確認のために、とうもろこしに GLUF 及び MPPA として 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0025 µg/mL 相当量）及び NAG として 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.0025 µg/mL 相当量）並びにアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA として 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0025 µg/mL 相当量）及び NAG として 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.0025 µg/mL 相当量）を用いて、本法により 3 点併行分析を実施し、その平均回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は、Table 7 のとおり、とうもろこしにおいて GLUF の平均回収率は 84.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 5.5 %、MPPA の平均回収率は 79.9 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 0.9 %、NAG の平均回収率は 116 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 1.6 % であった。アルファルファ乾草において GLUF の平均回収率は 111 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 18 %、MPPA の平均回収率は 93.4 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 4.5 %、NAG の平均回収率は 110 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 6.7 % であった。

また、*SN* 比が 3 となる濃度はとうもろこしで 0.02 mg/kg 及びアルファルファ乾草で 0.2 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限は 0.05 mg/kg（乾牧草では 0.5 mg/kg）、検出下限は 0.02 mg/kg（乾牧草では 0.2 mg/kg）であった。

Table 7 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Corn		Alfalfa hay	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
GLUF	0.5	-	-	111	18
	0.05	84.5	5.5	-	-
MPPA	0.5	-	-	93.4	4.5
	0.05	79.9	0.9	-	-
NAG	0.5	-	-	110	6.7
	0.05	116	1.6	-	-

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、共通試料による共同試験を実施した。

試料は、大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 50 mg を含有する混合標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 150 mg を含有する混合標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料並びに大麦に NAG として 5 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 50 mg を含有する標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草に NAG として 15 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1

mL中に150 mgを含有する標準液1 mL添加)を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用い、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で実施した。参加試験室は、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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、同神戸センター及び同福岡センター(計8試験室)であった。結果の解析については、平均回収率、繰返し精度(RSD_f)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

また、参考として、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{9), 10)}を参考に、Cochran 検定、外れ値1個の Grubbs 検定及び外れ値2個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却等を行った上で平均回収率、 RSD_f 、 RSD_R 及び HorRat を求めた。

結果は Table 8~10 のとおりである。GLUF については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は101及び100%、 RSD_f はそれぞれ6.7及び5.1%、 RSD_R はそれぞれ8.2及び14%、HorRat はそれぞれ0.66及び1.3であった。MPPA については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は91.4及び92.8%、 RSD_f はそれぞれ8.1及び10%、 RSD_R はそれぞれ12及び13%、HorRat はそれぞれ0.97及び1.2であった。なお、前述のとおり、参考として解析を行ったところ、アルファルファ乾草の結果において、Cochran 検定で外れ値とされるデータが認められ、そのデータを除外して平均回収率、 RSD_f 、 RSD_R 、HorRat について算出した結果は、それぞれ92.1、5.1及び12%並びに1.2であった。NAG については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は110及び107%、 RSD_f はそれぞれ3.1及び4.4%、 RSD_R はそれぞれ10及び12%、HorRat はそれぞれ0.77及び1.1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タンデム型質量分析計の機種等を Table 11 に示した。

Table 8 Collaborative study results of GLUF

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.44	4.73	11.5	13.0
2	4.85	4.60	16.1	15.8
3	4.76	4.94	15.9	14.6
4	5.08	5.29	15.2	13.4
5	5.67	4.65	13.1	13.5
6	5.29	5.97	18.9	19.2
7	4.76	4.97	15.5	14.4
8	5.18	5.34	14.9	15.8
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	5.03		15.1	
Recovery ^{a)} (%)	101		100	
RSD _r ^{b)} (%)	6.7		5.1	
RSD _R ^{c)} (%)	8.2		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		11	
HorRat	0.66		1.3	

a) $n = 16$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Collaborative study results of MPPA

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.88	5.11	17.2 ^{a)}	12.0 ^{a)}
2	4.67	5.66	14.4	12.9
3	4.21	4.35	14.1	13.0
4	4.71	4.65	13.6	12.9
5	4.12	3.13	11.2	11.4
6	4.38	4.73	14.8	15.0
7	4.32	4.32	13.7	13.1
8	4.87	5.04	17.5	15.9
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	4.57		13.9	
Recovery ^{b)} (%)	91.4		92.8	
RSD _r ^{c)} (%)	8.1		10	
RSD _R ^{d)} (%)	12		13	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		11	
HorRat	0.97		1.2	

- a) If this laboratory was excluded by Cochran test, mean value (mg/kg), recovery (%), RSD_r (%), RSD_R (%), PRSD_R (%) and HorRat for alfalfa hay would be 13.8, 92.1, 5.1, 12, 11 and 1.2, respectively.
- b) $n = 16$
- c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Collaborative study results of NAG

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.74	5.12	13.9	14.6
2	4.51	4.50	13.8	13.3
3	4.71	4.77	13.6	12.8
4	4.41	4.59	13.7	13.6
5	4.00	3.63	12.2	13.6
6	5.42	5.37	16.9	17.0
7	4.70	4.73	11.9	11.3
8	4.77	4.86	14.6	13.1
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	4.57		13.4	
Recovery ^{a),b)} (%)	110		107	
RSD _r ^{c)} (%)	3.1		4.4	
RSD _R ^{d)} (%)	10		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		11	
HorRat	0.77		1.1	

a) $n = 16$

b) The determined values of GLUF were converted to the concentration as NAG to calculate recovery.

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Waters 2695 MS/MS: Waters Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 µm)
6	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: AB Sciex API-3200 Q TRAP	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

穀類、乾牧草及び稲わら中に残留する GLUF, MPPA 及び NAG について、LC-MS/MS を用いた同時定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~300 ng/mL 相当量（注入量として 0.005~1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。
- 2) JFRL 法を用いた添加回収試験を行った結果、乾牧草については、抽出後、水で希釈する操作を JFRL 法に追加することにより適用が可能であると考えられた。小麦については本法の適用除外とすることにした。
- 3) 11 種類の飼料原料について、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 大麦に GLUF 及び MPPA として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.25 及び 0.025 µg/mL 相当量）、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.005 及び 0.0025 µg/mL 相当量）、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各

- 0.075 及び 0.0075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), 稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.025 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料並びに大麦に NAG として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.005 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.075 及び 0.0075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), 稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.025 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料を用いて, 本法により 3 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を確認したところ, 良好な結果が得られた.
- 5) 本法による定量下限は GLUF, MPPA 及び NAG とともに試料中で 0.05 mg/kg (乾牧草では 0.5 mg/kg), 検出下限は 0.02 mg/kg (乾牧草では 0.2 mg/kg) であった.
- 6) 大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) 及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料並びに大麦に NAG として 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) 及びアルファルファ乾草に NAG として 15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.075 $\mu\text{g/mL}$ 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従い共同試験を実施し, 室間再現精度を確認したところ, 良好な結果を得た.

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 食品安全委員会: グルホシネート農薬評価書 (第 2 版), 平成 24 年 3 月 (2012).
- 2) 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).
- 3) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 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).
- 5) 白井裕治, 小野雄造, 藤原孝治, 青山幸二: ガスクロマトグラフィーによる飼料中のグリホサート, グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の系統的定量, 飼料研究報告, 27, 13-27 (2002).
- 6) 財団法人日本食品分析センター: 平成 20 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).
- 7) 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について, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発 0124001 号 (2005).
- 8) 山多利秋, 吉村哲史: 愛玩動物用飼料中の含リンアミノ酸系農薬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定量法, 飼料研究報告, 37, 115-146 (2012).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 10) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of

a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).

6 稲わら及び籾米中のベンフレセート及びシハロホップブチルのガスクロマトグラフ質量分析計による同時定量法

佐藤 梢*, 風間 鈴子*

Determination of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Rice Straw and Paddy Rice by GC-MS

Kozue SATOU* and Reiko KAZAMA*

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

An analytical method was developed to determine levels of benfuresate and cyhalofop-butyl in rice straw and paddy rice for feed using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

After adding water to the samples, benfuresate and cyhalofop-butyl were extracted with acetone, and the resulting solutions were filtered. The extract was then purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), gel permeation chromatography (GPC), Bond Elut PSA cartridge (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) connected in tandem over a Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.), and injected into the GC-MS for determination of pesticides. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-5MS+DG; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 µm with 10 m DuraGuard from Agilent Technologies). Mass spectrometer operation was carried out using electron ionization (EI) mode.

Spike tests were conducted on rice straw spiked with 2000, 300 and 20 µg/kg of each pesticide and paddy rice spiked with 2000, 200, 20 and 10 µg/kg of each pesticide. Recoveries ranged from 92.6 to 119 % for benfuresate and from 74.2 to 109 % for cyhalofop-butyl. The relative standard deviations of repeatability were not more than 4.9 % and 18 %, for benfuresate and cyhalofop-butyl, respectively.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw spiked with 300 µg/kg of benfuresate and 2000 µg/kg of cyhalofop-butyl, and paddy rice spiked with 30 µg/kg of benfuresate and 200 µg/kg of cyhalofop-butyl. The range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R), and HorRat, respectively, were 96.3 to 103 % and not more than 6.8 %, 21 %, and 0.96 for benfuresate, and 77.9 to 80.2 % and not more than 9.4 %, 29 %, and 1.8 for cyhalofop-butyl.

This method was validated and established for use in the inspection of benfuresate and cyhalofop-butyl in rice straw and paddy rice for feed.

Key words: benfuresate, cyhalofop-butyl, gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS), feed, rice straw, paddy rice, collaborative study

* 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

キーワード：ベンフレセート；シハロホップブチル；ガスクロマトグラフ質量分析計；飼料；稲わら；粃米；共同試験

1 緒 言

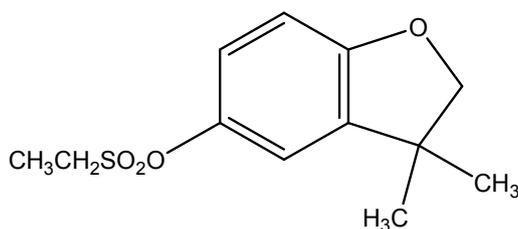
ベンフレセートはシェーリング社により開発されたベンゾフレミルアルキルスルホン酸系の水田用除草剤で、日本では 1994 年に農薬登録されている。飼料中の指導基準はないが、食品中の残留農薬基準値¹⁾は玄米で 0.05 ppm となっている。

シハロホップブチルはダウ・ケミカル社が開発したフェノキシ系の水田用除草剤で、日本では 1996 年に農薬登録されている。飼料中の指導基準²⁾は稲わらで 2 mg/kg、稲発酵粗飼料で 0.1 mg/kg、粃米で 2 mg/kg となっており、食品中の残留農薬基準値は玄米で 0.1 ppm となっている。

両農薬とも飼料分析基準³⁾に分析法はないが、厚生労働省通知⁴⁾には、個別試験法（ガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ質量分析計による方法）及びガスクロマトグラフ質量分析計による一斉試験法が示されている。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において、厚生労働省通知の個別試験法を基に開発した飼料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの分析法⁵⁾（以下「JFRL 法」という。）について、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。

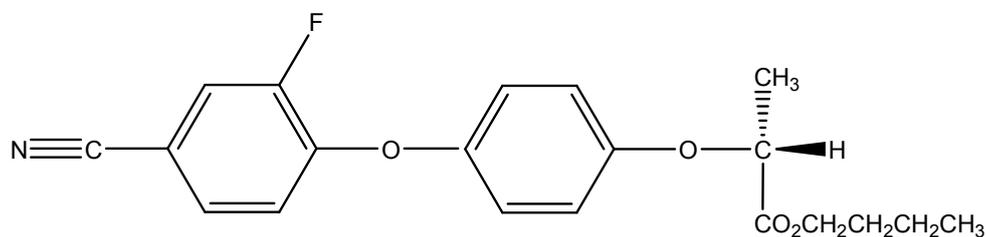
参考にベンフレセート及びシハロホップブチルの構造式等を Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に示した。



2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate

$C_{12}H_{16}O_4S$ MW: 256.3 CAS No.: 68505-69-1

Fig. 1-1 Chemical structure of benfuresate



butyl (*R*)-2-[4-(4-cyano-2-fluorophenoxy) phenoxy] propionate

$C_{20}H_{20}FNO_4$ MW: 357.3 CAS No: 122008-85-9

Fig. 1-2 Chemical structure of cyhalofop-butyl

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は、60 °C で 55 時間乾燥後、同様に粉碎したものを供試試料とした。

2.2 試薬

1) ベンフレセート標準原液

ベンフレセート標準品（和光純薬工業製，純度 99.0 %）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ベンフレセート標準原液を調製した（この液 1 mL はベンフレセートとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する。）。

2) シハロホップブチル標準原液

シハロホップブチル標準品（林純薬工業製，純度 99.9 %）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シハロホップブチル標準原液を調製した（この液 1 mL はシハロホップブチルとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する。）。

3) 農薬混合標準原液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量を混合し，希釈溶媒で正確に希釈し，1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 μg を含有する各農薬混合標準液を調製した。

4) 添加回収試験用混合標準液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量を混合し，アセトンで正確に希釈し，1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.1, 0.2, 2, 3 及び 20 μg を含有する各添加回収試験用混合標準液を調製した。

5) 希釈溶媒 ポリエチレングリコール（平均分子量 400）50 μL をアセトン 100 mL に加えて希釈溶媒を調製した。

6) ゲル浸透クロマトグラフィー（以下「GPC」という。）の溶離液のシクロヘキサン及びアセトンは液体クロマトグラフ用を用いた。それ以外のアセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。その他，特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

2) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1000

3) ガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）：

ガスクロマトグラフ部：Agilent Technologies 製 7890A

質量分析計部：Agilent Technologies 製 5975C inert XL MSD

4) ゲル浸透クロマトグラフ：

ポンプ：ジーエルサイエンス製 G-Prep GPC8100 Plus

オートサンプラー：ジーエルサイエンス製 G-Prep AS

フラクションコレクター：ジーエルサイエンス製 G-Prep GPC8100 Plus

5) 多孔性ケイソウ土カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep K-solute（20 mL 保持用）

6) フロリジルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（充てん剤量 910 mg）

- 7) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム : Agilent Technologies 製 Bond Elut PSA (充てん剤量 500 mg)
- 8) メンブランフィルター : 東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, 親水性 PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL (稲わらは 30 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 mL (稲わらは 120 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて (300 rpm) 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, 同様に吸引ろ過した. 更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた. 定容した抽出液 40 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 4 mL (稲わらは約 6 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

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し, 洗液をカラムに加えた後, 10 分間静置した. 200 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 2 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させ各農薬を溶出させた. 更にヘキサン 70 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した. シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 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, GPC に供する試料溶液とした.

3) GPC

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し, 各農薬が溶出する画分を 200 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した. なお, GPC の条件を Table 1 に示した.

ヘキサン 2 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した.

Table 1 Operating conditions of GPC for purifying benfuresate and cyhalofop-butyl

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm)
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	60~115 mL

4) カラム処理 II

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (以下「PSA ミニカラム」という.) の下にフロリジルミニカラムを連結し, ヘキサン 10 mL で洗浄した. 試料溶液をミニカラムに入れ, 流速 1~2 mL 程度で液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 8 mL で洗浄し, 洗液をミニカラムに加え, 同様

に流出させた。更にヘキサン-アセトン (99+1) 10 mL で試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させた。

次に、PSA ミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコをフロリジルミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (19+1) 20 mL をフロリジルミニカラムに加えて、流速 1~2 mL 程度で液面が充てん剤の上端に達するまで流下してベンフレセート及びシハロホップブチルを溶出させた。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した。希釈溶媒 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

5) GC-MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 2 μ L を GC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。

GC-MS の測定条件を Table 2 に示した。

Table 2 Operating conditions of GC-MS for analyzing benfuresate and cyhalofop-butyl

Column	Agilent Technologies DB-5MS+DG (0.25 mm i.d.×30 m+10 m guard column, 0.25 μ m film thickness)
Column temperature	80 °C (1 min)→20 °C/min→280 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	280 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	Benfuresate: m/z 256 (for quantification) , 163 (for confirmation) Cyhalofop-butyl: m/z 357 (for quantification) , 256 (for confirmation)

6) 計 算

得られた SIM 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、試料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの量を算出した。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 10 g

- add 20 mL of water (rice straw: 30 mL) and allow to stand for 30 min
- add 100 mL of acetone (rice straw: 120 mL) and shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No. 5B)
- wash with 50 mL of acetone
- top up to 200 mL with acetone
- evaporate 40 mL of sample solution to about 4 mL (rice straw: 6 mL) under 40 °C

InertSep K-solute

- apply sample solution
- wash flask with 5 mL of water and apply the solution and allow to stand for 10 min
- wash flask with 5 mL of hexane and apply the solution (twice)
- elute with 70 mL of hexane
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 10 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
- filtrate with membrane filter (<0.5 μm)

GPC

- apply 5 mL of sample solution
- collect the fraction of 60~115 mL
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 2 mL of hexane

Sep-Pak Plus Florisil and Bond Elut PSA cartridges

- connect Sep-Pak Plus Florisil cartridge under Bond Elut PSA cartridge and prewash with 10 mL of hexane
- apply sample solution
- wash flask with 8 mL of hexane and apply the solution
- wash flask with 10 mL of hexane-acetone (99:1) and apply the solution
- remove Bond Elut PSA cartridge
- elute with 20 mL of hexane-acetone (19:1)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 1 mL of acetone-polyethylen glycol (2000:1)

GC-MS
Scheme 1 Analytical procedure for benfuresate and cyhalofop-butyl in feeds
2.5 GPC 溶出画分の検討方法

GPC におけるベンフレセート及びシハロホップブチルの最適な溶出画分は、以下の方法に従い確認した。1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとして 2 μg を含有する標準液を調製し、この液 2 mL をなす形フラスコに入れ、窒素ガスを送って乾固した。シクロヘキサナーアセトン (4+1) 10 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、GPC に供する試料溶液とした。試料溶液を 2.4 の 3) に従って精製し、60~70 mL, 70~80 mL, 80~115 mL 及び 115~125 mL の溶出画分をそれぞれ 100 mL のなす形フラスコに分取し、それぞれの溶出液を 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した。60~70 mL 及び 115~125 mL の画分については希釈溶媒 1 mL を、70~80 mL 及び 80~115 mL の画分については希釈溶媒 5 mL を、正確に加えて残留物を溶かし、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

2.6 稲発酵粗飼料における検討方法

2.1 で調製した稲発酵粗飼料を用いて、以下の方法により本法への適用の可否を検討した。

- 1) 稲発酵粗飼料 10.0 g に 2 及び 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の標準液 1 mL を添加し、一晩放置したものを、以下本法に従って定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。
- 2) 稲発酵粗飼料 10.0 g を本法に従って調製し、2.4 の 4) で得られた溶出液を乾固した後、0.01 $\mu\text{g/mL}$ の標準液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、2.4 の 5) に従って測定した。
- 3) 1) に従って調製した 10 $\mu\text{g/kg}$ 相当量添加した試料液について、希釈溶媒を用いて 2 倍及び 5 倍に希釈し、それぞれを 2.4 の 5) に従って測定した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 3) に従って調製した各農薬混合標準液 2 μL を GC-MS に注入し、得られた SIM クロマトグラムから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、Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおり、ベンフレート及びシハロホップブチルとして 0.005~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.01~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

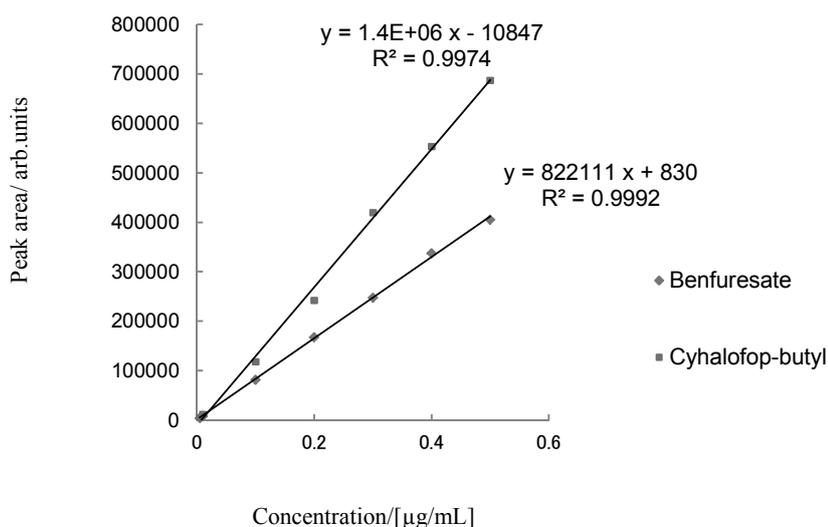


Fig. 2-1 Calibration curves of each pesticide by peak area

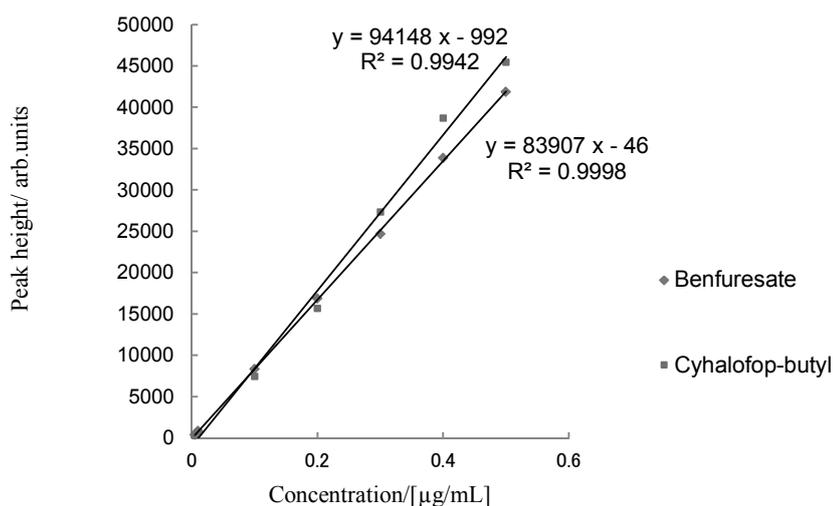


Fig. 2-2 Calibration curves of each pesticide by peak height

3.2 妨害物質の検討

稲わら（3種）、稲発酵粗飼料（4種）、籾米（2種）について、本法に従いGC-MSによる測定に供する試料溶液を調製し、ベンフレセート及びシハロホップブチルの定量を妨げるピークの有無を確認した。妨害物質の検討で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 3-1及びFig. 3-2に示した。その結果、稲発酵粗飼料及び籾米のそれぞれ1試料において、Fig. 3-1の(B)及び(C)のとおり、ベンフレセートのSIMクロマトグラムにピークが認められたが、ベンフレセートは基準値がない農薬であり、定量下限相当ピークの1/3以下であるため、定量に問題はないと考えられた。その他の試料については、定量を妨害するピークは検出されなかった。

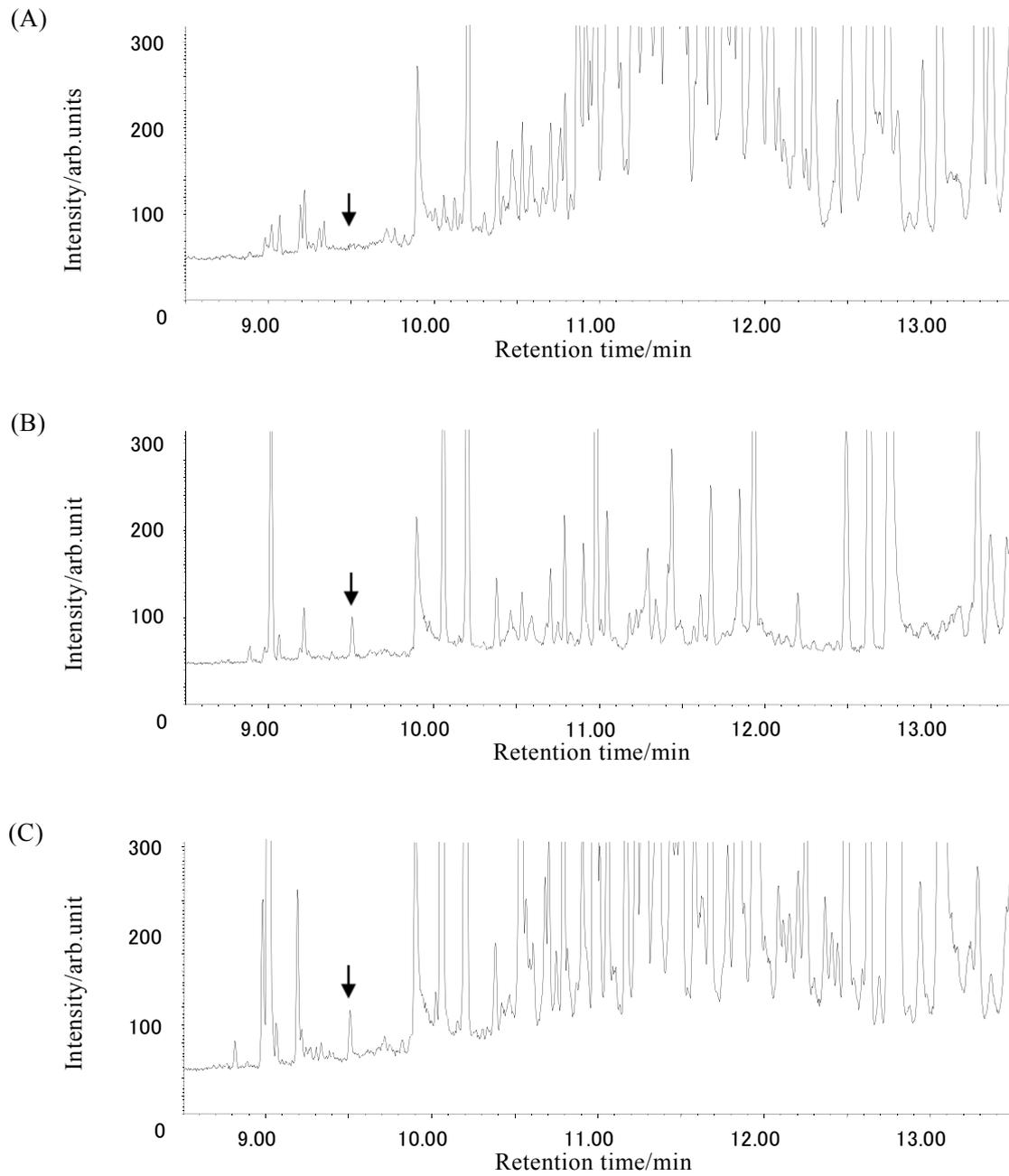


Fig. 3-1 SIM chromatograms of blank samples

(Arrows indicate peaks or retention time of benfuresate)

(A) Rice straw (B) Paddy rice (C) Whole-crop rice silage

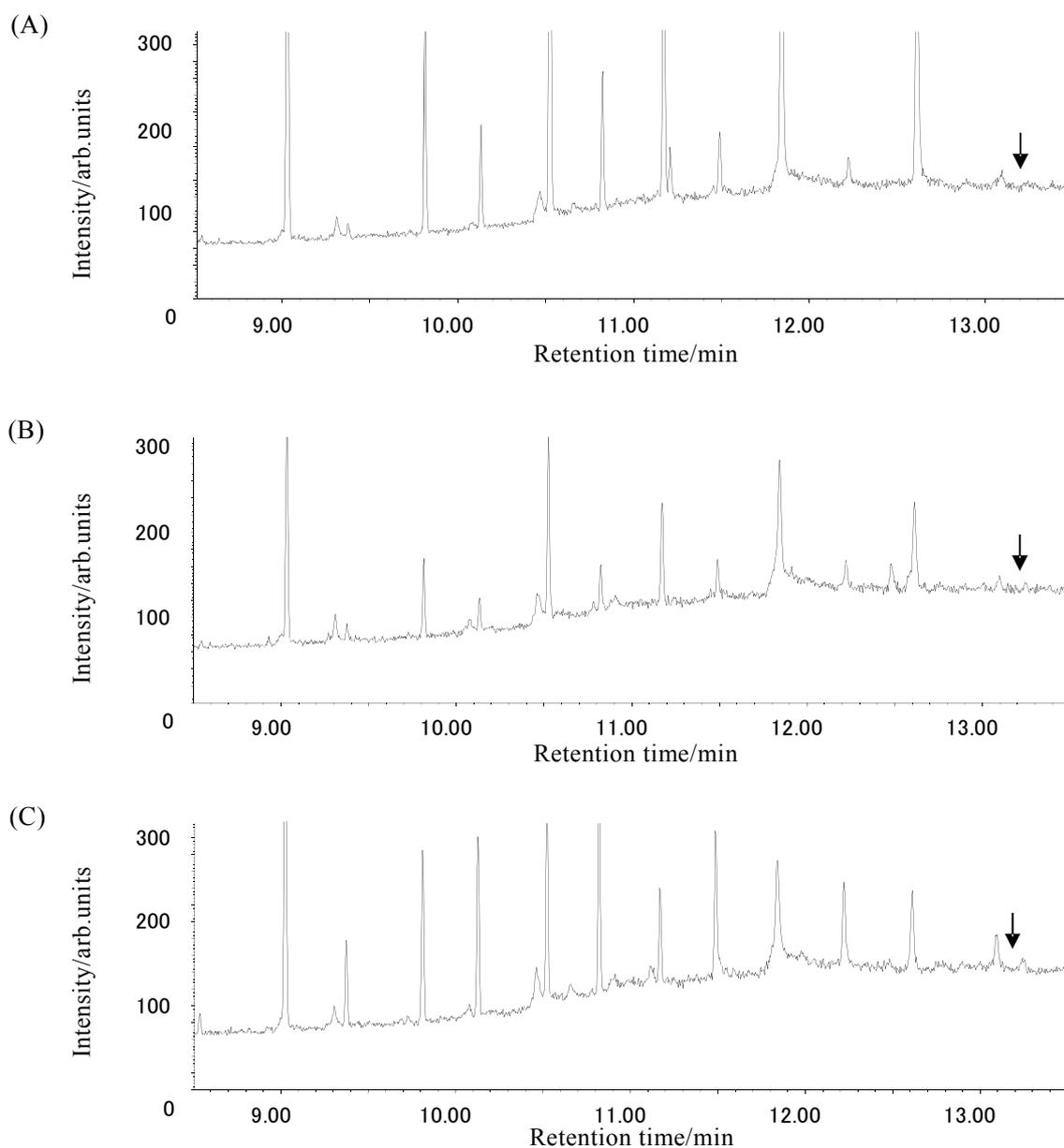


Fig. 3-2 SIM chromatograms of blank samples

(Arrows indicate peaks or retention time of cyhalofop-butyl)

(A) Rice straw (B) Paddy rice (C) Whole-crop rice silage

3.3 GPC 溶出画分の検討

2.5 に従い、GPC におけるベンフレゼート及びシハロホップブチルの溶出画分を検討した。なお、検討はベンフレゼート及びシハロホップブチルが 2 mg/kg (稲わら中のシハロホップブチルの指導基準) 残留していた場合を想定して行った。その結果、Table 3 のとおり、70~80 mL の画分で大半の溶出が認められたが、マトリックスの影響による変動を考慮して分取画分を 60~115 mL とすることとした。

Table 3 Elution pattern from GPC

Fraction volume (mL)	60~70	70~80	80~115	115~125	Total
Recovery of benfuresate (%) ^{a)}	0	92	0	0	92
Recovery of cyhalofop-butyl (%) ^{a)}	0	71	18	0	90

a) $n=1$

3.4 稲発酵粗飼料における検討

2.1 で調製した稲発酵粗飼料にベンフレセート及びシハロホップブチルとして 200 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、2.6 の 1) に従い回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 4 のとおりであり、ベンフレセートの平均回収率は 109 及び 130 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.5 % 以下，シハロホップブチルの平均回収率は 127 及び 136 %， RSD_r は 5.6 % 以下となった。この原因は夾雑成分によるものと推定し、2.6 の 2) 及び 3) の検討を行った。

GC-MS 測定時の問題かどうかを確認するため、2.6 の 2) に従い回収率を求めた結果、ベンフレセートの回収率は 125 %，シハロホップブチルの回収率は 166 % であり、夾雑成分の影響を受けていると思われた。また、2.6 の 3) に従って調製した試料溶液を測定した結果、ベンフレセートについては、2 倍及び 5 倍に希釈した回収率はそれぞれ 129 及び 126 %，シハロホップブチルについてはそれぞれ 138 及び 127 % であり、回収率は多少改善したものの、稲発酵粗飼料についてはさらなる検討が必要であると考えられたため、本法から除外することとした。

Table 4 Recoveries from whole-crop rice silage

Kind of pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
Benfuresate	200	109	7.5
	10	130	2.6
Cyhalofop-butyl	200	127	5.6
	10	136	2.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 添加回収試験

稲わらにベンフレセート及びシハロホップブチルとして 2000, 300, 20 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量（最終試料溶液中で各 2, 0.3, 0.02 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量），粃米にそれぞれ 2000, 200, 20 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量（最終試料溶液中で各 2, 0.2, 0.02 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量）を添加した試料を用いて、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 5 のとおり、ベンフレセートの平均回収率は 92.6~124 %， RSD_r は 5.3 % 以下，シハロホップブチルの平均回収率は 63.4~121 %， RSD_r は 18 % 以下となった。

Table 5 Recoveries of benfuresate and cyhalofop-butyl

Kind of pesticide	Spiked level (µg/kg)	Rice straw		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r (%)
Benfuresate	2000	102	1.0	92.6	4.2
	300	102	4.9	-	-
	200	-	-	113	4.1
	20	119	1.7	116	4.1
	10	124	5.3	102	1.7
Cyhalofop-butyl	2000	84.7	6.3	74.2	13
	300	93.5	10	-	-
	200	-	-	89.9	18
	20	109	4.6	80.6	5.8
	10	121	5.0	63.4	18

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら及び籾米に各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークのSN比が10以上及び3となる濃度を求めた。

その結果、稲わら中のベンフレセートについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 0.3 µg/kg であった。稲わら中のシハロホップブチルについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 2 µg/kg であった。また、籾米中のベンフレセートについては、定量下限は 10 µg/kg、検出下限は 0.3 µg/kg であった。籾米中のシハロホップブチルについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 2 µg/kg であった。

添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

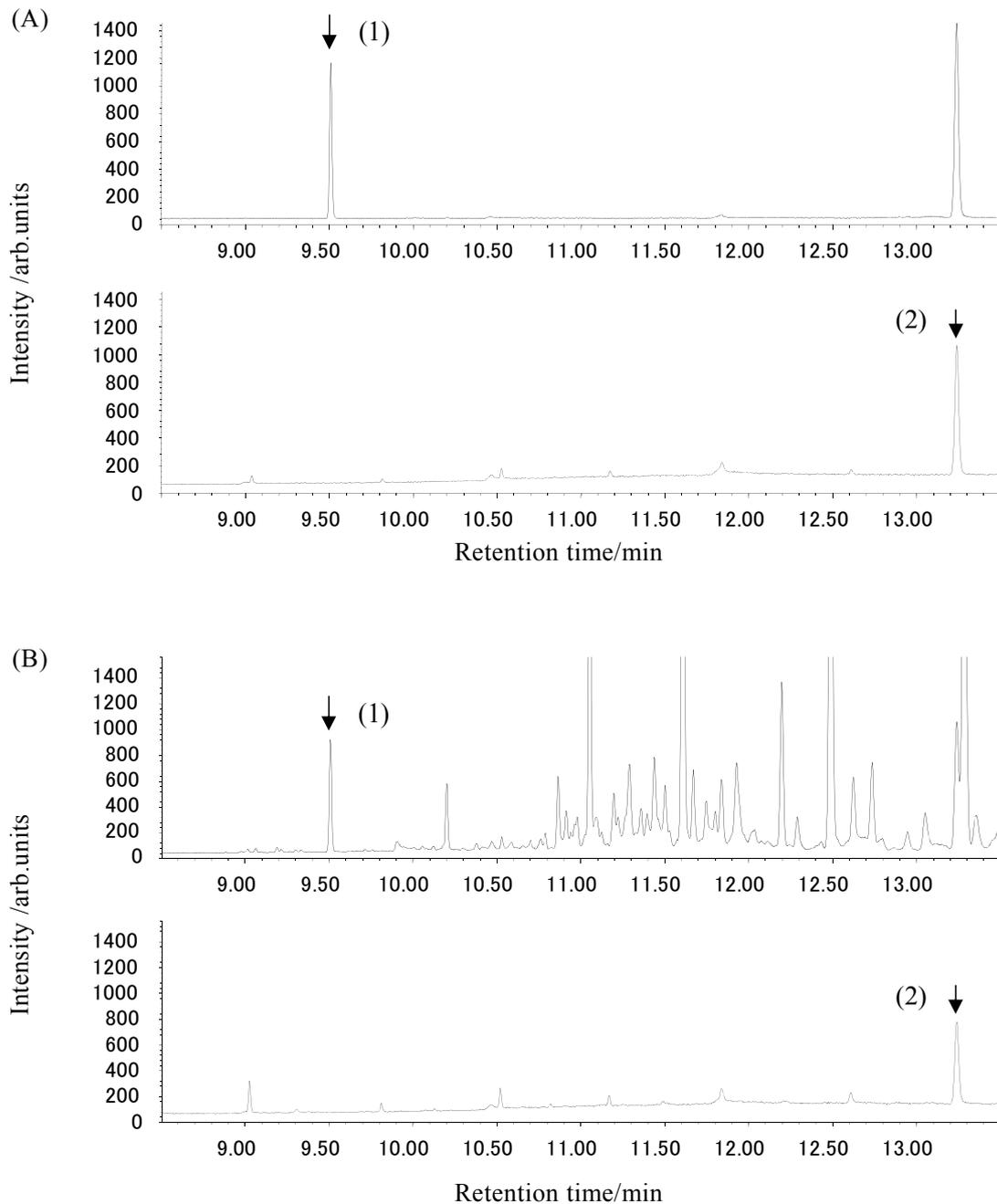


Fig. 4 SIM chromatograms

(Arrows indicate peaks of benfuresate (1) or cyhalofop-butyl (2))

(A) Standard solution (The amount of each pesticide is 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(B) Sample solution of rice straw (Spiked at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of each pesticide)

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び粃米にベンフレート及びシハロホップブチルを添加した共通試料を用い、9 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

i) 分析試料の調製 遠心粉碎機で粉碎した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を

量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 1 mL）を分析開始の前日に添加して調製した。2 種類の試料について、非明示の 2 点反復で試験を実施した。それぞれの添加濃度は Table 12 のとおりである。

ii) 参加試験室 一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、JA 東日本くみあい飼料株式会社、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、同神戸センター及び同福岡センター（計 9 試験室）。

iii) 結果の解析 国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{6), 7)}を参考に、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 2 個の Grubbs 検定を行った後、平均回収率、繰返し精度の相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。なお、各検定により棄却された試験室はなかった。

結果の概要は以下のとおりである。

1) ベンフレセート ベンフレセートの分析結果及び統計解析結果は Table 6-1 のとおりであり、稲わら及び籾米について、平均回収率 (%) はそれぞれ 96.3 及び 103, RSD_r (%) はそれぞれ 5.5 及び 6.8, RSD_R (%) はそれぞれ 15 及び 21, HorRat はそれぞれ 0.80 及び 0.96 であった。いずれも良好な結果であった。

2) シハロホップブチル シハロホップブチルの分析結果及び統計解析結果は Table 6-2 のとおりであり、稲わら及び籾米について、平均回収率 (%) はそれぞれ 77.9 及び 80.2, RSD_r (%) はそれぞれ 9.4 及び 8.2, RSD_R (%) はそれぞれ 27 及び 29, HorRat はそれぞれ 1.8 及び 1.4 であった。

参考のため、各試験室で使用した GC-MS の機種等を Table 7 に示した。

Table 6-1 Collaborative study results of benfuresate

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Paddy rice ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	301	313	27.2	29.6
2	327	339	32.4	32.6
3	258	298	34.8	29.1
4	346	347	40.5	39.3
5	275	304	29.2	26.9
6	199	197	19.2	16.7
7	292	277	27.8	28.9
8	308	296	36.1	31.5
9	281	243	38.3	35.8
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	300		30	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	289		31.0	
Recovery ^{a)} (%)	96.3		103	
RSD _r ^{b)} (%)	5.5		6.8	
RSD _R ^{c)} (%)	15		21	
PRSD _R ^{d)} (%)	19		22	
HorRat	0.80		0.96	

a) $n=18$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 6-2 Collaborative study results of cyhalofop-butyl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Paddy rice ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1790	1920	152	173
2	1640	1790	135	143
3	2180	2140	167	183
4	1790	1760	150	170
5	917	1260	106	132
6	844	856	78.4	73.5
7	1540	1770	184	169
8	1190	1600	219	226
9	1560	1500	228	197
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2000		200	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1560		160	
Recovery ^{a)} (%)	77.9		80.2	
RSD _r ^{b)} (%)	9.4		8.2	
RSD _R ^{c)} (%)	27		29	
PRSD _R ^{d)} (%)	15		21	
HorRat	1.8		1.4	

a) $n=18$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS ^{a)}
1	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
2	Shimadzu GCMS-QP2010
3	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
4	GC: Agilent Technologies 7890 A MS: Agilent Technologies 5975C inertXL MSD
5	Shimadzu GCMS-QP2010
6	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973N
7	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973inert
8	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
9	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973N

a) GC column (i.d. × length, film thickness) : Agilent Technologies

DB-5MS+DG (0.25 mm × 30 m + 10 m guard column (Duraguard), 0.25 μm)

4 まとめ

稲わら，粃米及び稲発酵粗飼料中に残留するベンフレセート及びシハロホップブチルについて，JFRL 法を基に，GC-MS 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たところ，次の結果が得られ，適用が可能であると考えられた。

- 1) ベンフレセート及びシハロホップブチルの検量線は 0.005~0.5 μg/mL (注入量として 0.01~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 稲わら (3 種)，稲発酵粗飼料 (4 種)，粃米 (2 種) 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，定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 稲発酵粗飼料を用いてベンフレセート及びシハロホップブチルの添加回収試験を実施した結果，共に高く定量される傾向が認められたため，本法の適用は難しいと考えられた。
- 4) 稲わら及び粃米にベンフレセート及びシハロホップブチルを添加して，添加回収試験及び共同試験を実施した結果，ベンフレセート及びシハロホップブチルについて，真度，併行精度，室間再現精度のいずれも良好な結果が得られたため，当該 2 成分について本法の適用が可能であった。
- 5) 添加回収試験及びその際のピークの SN 比から定量下限及び検出下限を求めた。その結果，ベンフレセートは，稲わら中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 0.3 μg/kg，粃米中で定量下限が 10 μg/kg，検出下限が 0.3 μg/kg となった。シハロホップブチルは稲わら中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 2 μg/kg，粃米中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 2 μg/kg となった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，JA 東日本くみあい飼料株式会社における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 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).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 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).
- 4) 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について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 5) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).

7 飼料中のモリネートのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

松尾 信吾*

Determination of Molinate in Feed by GC-MS

Shingo MATSUO*

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

An analytical method was developed to determine the level of molinate in feed using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

After adding water to the samples, molinate was extracted with acetone and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The extract was purified in a separatory funnel with sodium chloride solution (10 % w/w) and hexane. The sample solution was purified with Bond Elut PSA (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) connected in tandem over Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.) and injected into the GC-MS system for determination of the molinate level. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (Rtx-5MS ; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm from Restek Corporation; Bellefonte, PA, U.S.). The mass spectrometer was operated using electron ionization (EI).

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.05, 0.1 or 0.3 mg/kg of molinate. Formula feed (cattle and chicken use) was also spiked with molinate at levels of 0.1 or 0.3 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 90.8 % to 111 %, and the relative standard deviations (RSD_r) were not more than 7.6 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, paddy rice, and formula feed (cattle use) spiked with 0.3 mg/kg, 0.05 mg/kg, and 0.1 mg/kg of molinate, respectively. The mean recovery, and the repeatability and reproducibility, in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 105 % and 5.1 %, 16 %, and 0.84 for rice straw, 103 % and 5.6 %, 11 %, and 0.50 for paddy rice, and 107 %, and 7.4 %, 12 %, and 0.54 for formula feed.

This method was validated and established for use in the inspection of molinate in feed.

Key words: rice straw ; rice whole-crop silage roughage ; paddy rice ; feed ; molinate ; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; electron ionization (EI)

キーワード：稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；飼料；モリネート；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化（EI）法

1 緒 言

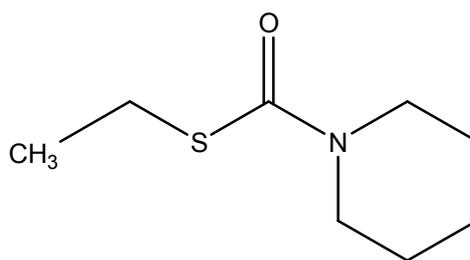
モリネートは、米国のストウファー・ケミカル社が開発した水稲用のチオカーバメイト系除草剤である。日本では 1971 年に農薬登録がされており、海外では米国などの稲作地帯で使用されている。また、飼料中のモリネートの基準値は、飼料の有害物質の指導基準¹⁾により稲わら中で 0.3

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

mg/kg となっており、さらに、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾では、米で 0.1 ppm、それ以外の食品では 0.02 ppm となっている。モリネートの分析法は、食品では厚生労働省通知試験法³⁾として個別試験法 (GC-MS) が示されているが、飼料中では、公定法が設定されておらず、分析法の確立が急務となっている。

そこで、「平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」において一般財団法人日本食品分析センターが開発したガスクロマトグラフ質量分析計による定量法⁵⁾ (以下「JFRL 法」という。) について、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

なお、モリネートの構造式を Fig. 1 に示した。



Molinate

S-ethyl azepane-1-carbothioate

C₉H₁₇NOS MW: 187.3

CAS No.: 2212-67-1

Fig. 1 Chemical structure of molinate

2 実験方法

2.1 試料

稲わら、粳米及び配合飼料はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は、50 °C で 20 時間乾燥後、同様に粉砕したものを供試試料とした。

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 Composition of the formula feed

Kind of formula feed	Group of ingredients	Proportion (%)	Ingredients
For cattle	Grains	76	Corn, barley, wheat, lupins
	Brans	17	Wheat bran, corn gulten feed, cron distiller's dried grains with solubles, screening pellet
	Oil meals	5	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	2	Calcium carbonate, molasses, Salt
For growing chicken	Grains	64	Corn, dehulled rice
	Oil meals	20	Soybean meal, rapeseed meal, corn gulten meal
	Animal by-products	3	Fish meal, dried whey
	Brans	2	Rice bran, bran, corn distiller's dried grains with solubles
	Others	11	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, solanum melanoxydon powder, saccharomyces cerevisiae, processed paprika extract, silica

2.2 試薬

1) モリネート標準液

モリネート標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0 %) 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モリネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, モリネートとして 0.5 mg を含有する ($f=0.990$) .) .

使用に際して, モリネート標準原液の一定量をヘキサンで正確に希釈し, 1 mL 中にモリネートとして 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 μg を含有する各標準液を調製した.

2) アセトン, ジエチルエーテル, ヘキサン, 硫酸ナトリウム (無水) は, 残留農薬・PCB 試験用を用いた. その他, 特記している以外の試薬は特級を用いた. 水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた.

2.3 装置及び器具

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計: 島津製作所 GCMS-QP2010 Plus
- 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: 東京理化機器製 NAJ-160
- 4) エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) : Agilent Technologies 製 Bond Elut PSA LRC カートリッジ (リザーバー容量 10 mL)
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) : Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL (稲わら及び稲発酵粗飼料は 30 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 mL (稲わら及び稲発酵粗飼料は 120 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて (300 rpm) 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, 同様に吸引ろ過した. 更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた. この液 20 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 3 mL まで減圧濃縮し, 液液分配に供する試料溶液とした.

2) 液液分配

試料溶液を 300 mL の分液漏斗 A に入れ、塩化ナトリウム水溶液 (10 w/v%) 100 mL 及びヘキサン 50 mL を加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 25 mL で 2 回洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせた。分液漏斗 A を 5 分間振り混ぜた (300 rpm) 後静置し、水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、残ったヘキサン層 (上層) を 300 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 B にヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振り混ぜた (300 rpm) 後静置し、水層を捨てヘキサン層を先の三角フラスコに合わせた。この三角フラスコに適量の硫酸ナトリウム (無水) を加えてヘキサン層を脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 A) でろ過した。更に、三角フラスコを少量のヘキサンので洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 3 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (以下「PSA ミニカラム」という。) の下に合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (以下「フロリジルミニカラム」という。) を連結し、ヘキサン 10 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 1~2 mL/min 程度とした。以下同じ)。

50 mL のなす形フラスコを連結したミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ、モリネートを流出させた。更に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、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。次に、PSA ミニカラムをはずし、フロリジルミニカラムの上部に注射筒を連結し、ヘキサノージエチルエーテル (9+1) 15 mL を加えてモリネートを溶出させた。溶出液にアセトノージエチレングリコール (100+1) 1 mL を加え、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した。ヘキサン 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質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各モリネート標準液各 2 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 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm film thickness)
Column temperature	80 °C (1 min) → 20 °C/min → 280 °C (10 min) → 300 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injectionport temperatur	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	280 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization energy	70 eV
Ionization	Electron ionization (EI)
Monitor ion	<i>m/z</i> 187 (quantification), 126 (confirmation)

2.5 モリネートの乾固操作による損失の防止検討方法

モリネートの乾固操作による損失を防止するため、残留農薬の分析でキーパーとして汎用されるアセトノージエチレングリコール (100+1) 及び同 (49+1) の使用の可否について、以下の方法に従い確認した。

試料に稲わらを用いて JFRL 法に従い操作を行ったミニカラムからの溶出液にモリネート (分析試料中でモリネートとして 0.3 mg/kg 相当量) を加えた後、それぞれのキーパー 1 mL を加えた。

得られた試料溶液を 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した。その後、ヘキサン 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質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 µg/mL のモリネート標準液各 2 µL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM 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た。

その結果、検量線は 0.03~0.5 µg/mL (注入量として 0.06~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

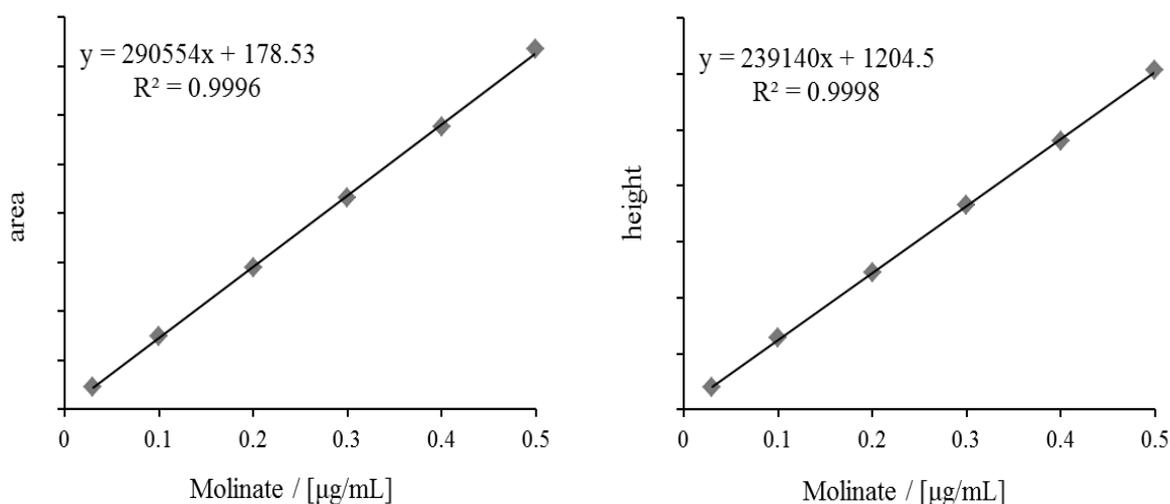


Fig. 2 Calibration curves of molinate
(left : area, right : height)

3.2 モリネートの乾固操作による損失の防止

試料にモリネートとして 0.3 mg/kg 相当量を添加し、JFRL 法に従い 3 回繰り返し定量したところ、稲わらでは、平均回収率は 48.3 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 14 %、また、稲発酵粗飼料では平均回収率は 55.5 %、その繰返し精度は RSD_r として 17 %であった。これらの低回収率の原因として、分析中の乾固操作によるモリネートの損失の可能性が考えられた。

そこで、2.5 に従い検討を行ったところ、Table 3 のとおり、試料溶液の濃縮時にキーパーとしてアセトノージエチレングリコール (100+1) を 1 mL 加えることにより、回収率に改善が認め

られた。また、同(49+1)では過回収となったが、これは、試料溶液中のジエチレングリコール濃度が高いことによる、ガスクロマトグラフの試料導入部でのマトリックス効果の影響と考えられた。

これらの結果から、本法では、ヘキサン転溶後の試料溶液は乾固せずに、ミニカラムへ注入するのに適当な量(3~5 mL)に減圧濃縮することとした。また、ミニカラムからの溶出液には、アセトン-ジエチレングリコール(100+1) 1 mLを加えて乾固操作によるモリネートの損失を防ぐこととした。

Table 3 Recovery test with addition of keeper in sample solution

Spiked level (mg/kg)	Acetone-diethylene glycol			
	100:1 1 mL		49:1 1 mL	
	Recovery(%) ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery(%) ^{a)}	RSD _r ^{b)}
0.3	103	3.5	115	0.0

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviations repeatability

3.3 モリネートのヘキサンへの転溶率

試料に稲わらを使用して JFRL 法に従い得られた抽出液にモリネート 0.3 ng/mL 相当量(分析試料中 0.3 mg/kg 相当量)を添加し、ヘキサンへの転溶率を確認した。

その結果、Table 4 のとおり、モリネートはヘキサン 100 mL で 97 %、その後 50 mL で 3 % 転溶し、その後の 50 mL では転溶が認められなかった。これらのことから、本法では JFRL 法と同様に 1 回目は 100 mL、2 回目は 50 mL のヘキサンを用いて転溶操作を行うこととした。

なお、ヘキサン転溶操作以降は本法に従って回収率を求めた。

Table 4 Result of liquid-liquid extraction

Spiked level (mg/kg)	Hexane			Total
	0-100 mL	100-150 mL	150-200 mL	
	Recovery (%) ^{a)}			
0.3	97	3	0	100

a) Mean ($n=2$)

3.4 ミニカラムからの溶出画分の検討

PSA ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのモリネートの溶出画分を以下の方法により確認した。

JFRL 法に従い、稲わらを含水アセトンで抽出し、ヘキサン転溶を行って得られた試料溶液を約 3 mL まで 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、モリネート 0.3 ng/mL 相当量(分析試料中 0.3 mg/kg 相当量)を添加し、次の 1)及び 2)のとおりミニカラム処理を行い、それぞれの溶出画分における回収率を求めた。

1) PSA ミニカラムからの流出画分

試料溶液を PSA ミニカラムに入れ、更にヘキサンを PSA ミニカラムに加えて、その流出画分についてモリネートを測定し、PSA ミニカラムからのモリネートの流出状況を確認した。

その結果、Table 5 のとおり、モリネートはヘキサン 15 mL で全量流出したことから、本法では PSA ミニカラムにヘキサン 15 mL を加えてモリネートを流出させることとした。

Table 5 Elution pattern from Bond Elut PSA

Spiked level (mg/kg)	Hexane			Total
	0-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
	Recovery(%) ^{a)}			
0.3	95	10	0	105

a) Mean (n=3)

2) PSA ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分

PSA ミニカラムの下に合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを連結したものの（以下「連結カラム」という。）について、1) に従い、試料溶液を連結カラムの上部（PSA ミニカラム）に入れ、更にヘキサン 15 mL を加えて流出させた。次に、PSA ミニカラムをはずし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに注射筒を連結し、ヘキサソージエチルエーテル (9+1) を順次加え、連結カラムからのモリネートの溶出状況を確認した。

その結果、Table 6 のとおり、連結カラムはヘキサン 15 mL を加えた時点でモリネートが回収率にして 5% 流出し、その後 PSA カラムをはずし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムにヘキサソージエチルエーテル (9+1) を 10 mL 加えた時点でほぼ全量が溶出した。

Table 6 Elution pattern from Florisil cartridge

Spiked level (mg/kg)	Recovery(%) ^{a)}				Total
	Hexane 15 mL	Hexane-Diethylether (9:1)			
		0-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
0.3	5	92	Tr	0	97

a) Mean (n=3)

1)及び2)の検討結果から、本法では、モリネートが流出及び溶出する可能性のある画分を広く回収することとし、連結カラムからのヘキサン 15 mL による流出液及び PSA カラムをはずした後の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのヘキサソージエチルエーテル (9+1) 15 mL による溶出液を全て回収する方法とした。

3.5 妨害物質の検討

稲わら、稲発酵粗飼料、粳米、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、とうもろこし及びふすまを用いて、本法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、定量を妨げるピークは検出されなかった。なお、妨害物質の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

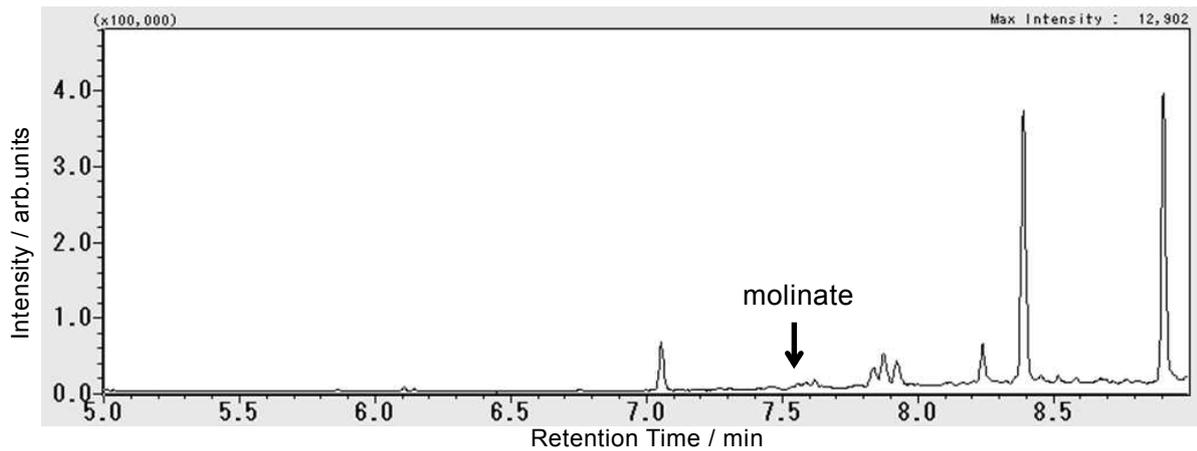


Fig.3 Chromatogram of rice straw (non-spiked)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した試料にモリネートを添加（分析試料中 0.3, 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量）した試料を用い、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について検討した。

その結果は、Table 7 のとおりであり、平均回収率は 90.8~111 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.6 %以下と良好であった。なお、添加回収試験の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recovery test of molinate

Spiked level (mg/kg)	Rice straw		Whole crop rice silage		Paddy rice		Formula feed for cattle		Formula feed for chicken	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
0.3	106	3.1	104	4.2	96.3	0.4	90.8	1.4	91.9	5.2
0.1	110	3.9	98.5	1.2	96.3	2.8	95.7	4.1	94.1	2.0
0.05	111	7.6	108	4.8	94.5	2.4	-	-	-	-

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

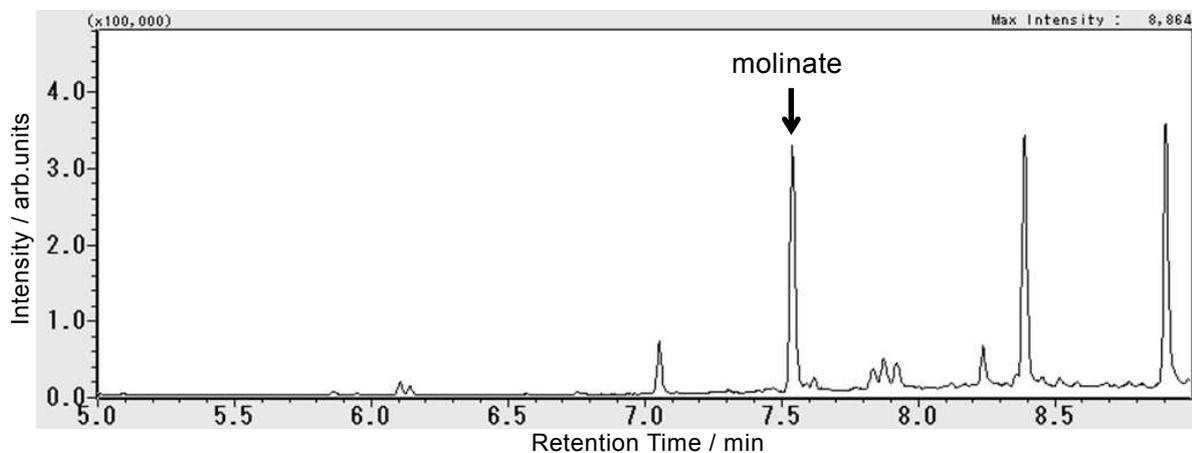


Fig.4 Chromatogram of rice straw (0.3 mg/kg)

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら及び粃米にモリネートを添加し、本法に従って3点併行分析を実施し、得られたピークのSN比及び回収率等を求めた。

その結果、ピークのSN比が10以上となる濃度は0.03 mg/kgであり、またTable 8のとおり添加回収試験の結果も良好であったことから、本法の定量下限を0.03 mg/kgとした。また、本法の検出下限はSN比3以上を満たす濃度として試料中0.01 mg/kgとした。

Table 8 Recovery test at the level of limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Rice straw		Paddy rice	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
0.03	110	2.2	101	12

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら、粃米及び乳用牛飼育用配合飼料にモリネートを添加した共通試料を用い、9試験室で試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

1) 分析試料の調製

稲わら粃米及び乳用牛飼育用配合飼料について、2.1のとおり調製した分析用試料を送付し、各試験室においてそれぞれ10gを量り取った後、濃度非通知の添加用標準液を分析開始の前日に添加して調製した。添加濃度はモリネートとして、稲わらに0.3 mg/kg相当量(3 µg/mLのモリネート添加用標準液を1 mL添加)、粃米に0.05 mg/kg相当量(同様に0.5 µg/mLを1 mL)、乳用牛配合飼料に0.1 mg/kg相当量(同様に1 µg/mLを1 mL)各試料について、非明示の2点併行で試験を実施した。

2) 参加試験室

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般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、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、同神戸センター及び同福岡センター(計9試験室)

3) 結果の解析

結果はTable 9のとおりであった。質量分析計がイオントラップ型検出器の2試験室において、定量用のモニターイオン m/z 187 では、0.5 µg/mL相当のモリネート標準液であってもSN比が10未満のため検量線の作成が困難である等の理由により定量値が得られなかった。ただし、確認用のモニターイオン m/z 126 では良好な感度が得られたため、参考値として確認用のモニターイオンで定量した結果をTable 9に示した。よって、結果の解析は、イオントラップ型検出器の2試験室を除いた7試験室について、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{6), 7)}を参考に、Cochran検定、外れ値1個のGrubbs検定及び外れ値2個のGrubbs検定を行い、外れ値の棄却を行った上で平均回収率、繰返し精度(RSD_r)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られたRSD_Rから、修正Horwitz式を用いてHorRatを求めた。

稲わらでは、平均回収率は105%、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 5.1 % 及び 16 % であり, HorRat は 0.84 であった. 粃米では, 平均回収率は 103 %, 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 5.6 % 及び 11 % であり, HorRat は 0.50 であった. 乳用牛飼育用配合飼料では, 平均回収率は 107 %, 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 7.4 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.54 であった.

参考のため, 各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 10 に示した.

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Feed types				Formula feed for cattle ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Rice straw ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Paddy rice ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
1	353	374	58.8	50.4	123	124
2	297	249	41.2	43.3	103	98.1
3	333	345	50.6	51.1	106	125
4	358	344	53.3	53.8	112	92.3
5	318	300	59.8	57.7	86.7	84.5
6	320	308	50.4	48.9	105	110
7	256	257	47.4	53.2	119	110
8	313 ^{a)}	286 ^{a)}	49.1 ^{a)}	68.0 ^{a)}	113 ^{a)}	131 ^{a)}
9	324 ^{a)}	308 ^{a)}	54.6 ^{a)}	47.4 ^{a)}	108 ^{a)}	108 ^{a)}
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	300		50		100	
Mean value ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	315		51.4		107	
Recovery ^{b)} (%)	105		103		107	
RSD_r ^{c)} (%)	5.1		5.6		7.4	
RSD_R ^{d)} (%)	16		11		12	
$PRSD_R$ ^{e)} (%)	19		22		22	
HorRat	0.84		0.50		0.54	

a) Data obtained by using ion trap type detectors monitoring m/z 126, which were excluded from statistical calculation.

b) $n=14$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC Column (i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N/5973 inert	Agilent Technologies HP-5MSI (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
5	SHIMADZU GCMS-QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
6	SHIMADZU GCMS-QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
7	SHIMADZU GCMS-QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
8	Thermo ELECTRON FOCUS GC/POLARIS Q	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
9	Thermo ELECTRON FOCUS GC/POLARIS Q	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料中のモリネートについて、ガスクロマトグラム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たところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は 0.03~0.5 μg/mL (注入量として 0.06~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 2 種類の稲わら、1 種類の稲発酵粗飼料及び 2 種類の粃米、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、とうもろこし及びふすまについて、本法に従って得られた SIM クロマトグラムからは、モリネートの定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 稲わら、稲発酵粗飼料、粃米、牛用配合飼料及び鶏用配合飼料にモリネートを添加（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に、試料中でモリネートとして 0.3、0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量。牛用配合飼料及び鶏用配合飼料に同じく 0.3 及び 0.1 mg/kg 相当量）した試料を用いて、本法により添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、90.8~111 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.6 %以下と良好な結果であった。
- 4) 本法による定量下限は、試料中 0.03 mg/kg、検出下限は 0.01 mg/kg であった。
- 5) 稲わら、粃米及び牛用配合飼料にモリネートを添加（試料中でモリネートとして 0.3、0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量）した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、2 試験室を除く 7 試験室で良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般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における関係者各位に感

謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号(1959).
- 3) 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について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 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).
- 5) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).

精度管理

1 平成 24 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

田端 麻里^{*1}, 義本 将之^{*2}, 齋藤 晴文^{*3},
高橋 雄一^{*4}, 浪越 充司^{*5}, 佐古 理恵^{*6}

1 目 的

飼料検査指導機関, 飼料・飼料添加物製造等業者, 民間分析機関等を対象に, 飼料等の共通試料による分析鑑定を行うことにより, 分析及び鑑定技術の維持向上を図り, 併せて分析誤差を把握し, 飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

2 共通試料の内容

A 試料	幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料混合試料
D 試料	子豚育成用プレミックス

3 試料の調製

- 3.1 試料の調製年月日 平成 24 年 6 月 26 日及び 6 月 29 日
- 3.2 調製場所 協同飼料株式会社鹿島工場
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
- 3.3 調製方法
- 1) A 試料

粉砕した後, 1 mm の網ふるいを通過させた幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料 100 kg を用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後, 9 等分した。その中から 4 区画を取って混合した後, 4 等分して元に戻した。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量(約 20 g)ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

^{*1} 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, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 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, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

^{*4} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*5} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

^{*6} 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

表 1 混合区画表

回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
	5	1	9	1	5	8	2
区画番号	6	5	7	2	8	3	6
	4	8	3	5	4	7	4
	9	3	1	6	9	2	7

2) B 試料

粉碎した後、1 mm の網ふるいを通過させた魚粉 100 kg を用い、A 試料と同様の手順により、試料 450 個を調製した。

3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去した後、必要に応じて粉碎し、表 2 に掲げる 10 種類の原料（総量 100 kg）を同表の混合割合でよく混合した後、A 試料と同様の手順により、試料 450 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原料名	混合割合 (%)	原料名	混合割合 (%)
とうもろこし	35	ごま油かす	8
小麦	12	ビートパルプ	8
米ぬか	12	アルファルファミール	3
精白米	10	りん酸カルシウム	2
大豆油かす	8	食塩	2

4) D 試料

子豚育成用プレミックス 100 kg をよく混合した後、A 試料と同様の手順により、試料 450 個を調製した。

4 分析・鑑定項目及び実施要領

4.1 分析・鑑定項目

- A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びモネンシンナトリウム
- B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定
- D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

4.2 実施要領

「平成 24 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（165 ページ）による。

5 試料袋間のバラツキ調査

A 試料，B 試料及び D 試料それぞれの 2 分析項目について，Thompson らの harmonized protocol¹⁾ に基づき均質性確認テストを行った。ランダムに抜き取った 10 袋の併行分析の結果を表 3 に示した。また，その結果から一元配置の分散分析，均質性確認のための計算を行った結果を表 4 に示し

た. その結果, いずれの試料においても, 分散比 F_0 が $F(9,10;0.05)=3.02$ を下回り, 有意水準 5 % において試料間に有意差は認められず, 試料は均質であることを確認した.

表 3 A, B 及び D 試料の分析成績

	A試料 粗たん白質 (%)		A試料 粗灰分 (%)		B試料 粗たん白質 (%)		B試料 粗灰分 (%)		D試料 銅 (g/kg)		D試料 亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	17.67	17.37	6.00	6.05	65.93	65.76	19.47	19.61	22.90	22.73	25.32	25.68
2	17.49	17.60	6.01	6.02	66.57	66.26	19.50	19.51	23.69	22.62	26.35	25.17
3	17.60	17.77	5.99	6.05	65.31	65.72	19.53	19.49	22.71	22.53	24.98	25.19
4	17.56	17.53	5.98	6.02	65.33	65.41	19.55	19.61	23.12	23.69	26.15	26.72
5	17.41	17.44	5.99	6.00	65.50	65.17	19.54	19.60	23.16	23.67	26.30	26.37
6	17.49	17.50	5.93	5.97	65.76	66.24	19.53	19.59	23.40	23.35	26.06	26.28
7	17.35	17.58	6.02	5.96	65.33	66.27	19.54	19.59	23.33	23.40	25.74	26.19
8	17.60	17.57	6.01	6.01	66.03	66.13	19.51	19.61	23.33	23.88	25.71	25.98
9	17.27	17.64	5.97	5.94	65.59	66.00	19.50	19.57	22.71	23.69	25.14	26.06
10	17.45	17.48	6.00	5.98	65.20	66.08	19.49	19.51	23.75	23.61	26.11	26.80

表 4 A, B 及び D 試料のバラツキ調査

成分名	要因	偏差平方和 S	自由度 φ	不偏分散 V	分散比 F_0	
A試料	試料間 A	0.1052	9	0.0117	0.72	
	粗たん白質 分析誤差 E	0.1623	10	0.0162		
	総計 T	0.2675	19			
	粗灰分	A	0.0117	9	0.0013	1.81
B試料	粗たん白質	A	2.0048	9	0.2228	1.80
		E	1.2374	10	0.1237	
		T	3.2423	19		
	粗灰分	A	0.0152	9	0.0017	0.68
D試料	銅	A	1.9706	9	0.2190	1.42
		E	1.5384	10	0.1538	
		T	3.5089	19		
	亜鉛	A	3.5904	9	0.3989	2.25
	E	1.7711	10	0.1771		
	T	5.3615	19			

6 参加試験室

6.1 総数 257

うち 検査指導機関…47

飼料製造業者関係…	161
飼料添加物製造業者関係…	16
民間分析機関等…	33

6.2 試料別参加試験室数

A 試料…	256
B 試料…	245
C 試料…	131
D 試料…	107

7 分析鑑定成績及び解析結果

7.1 分 析

各試料の分析成績は表 5 のとおり、ヒストグラムは図 1~16 のとおりであった。また、その解析結果は表 6~8 のとおりであった。なお、解析は次のとおり行った。

分析成績の解析は、次のとおりロバスト法により行った。式 1 により、NIQR（標準四分位範囲—normalised inter quartile range—頑健な標準偏差）を求めた後、式 2 により、各分析成績の z -スコアを求めた。

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

a : 上四分位の値

c : 下四分位の値

$$z\text{-スコア} = \frac{(x-b)}{\text{NIQR}} \dots\dots\dots \text{式 2}$$

x : 各試験室の分析成績

b : 中央値

また、 z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値を異常値と判断し、これを棄却した後、平均値の 95 %信頼区間を求めた。

7.2 鑑 定

今回は、10 種類の原料を混合調製した試料について、混合された原料の検出と混合割合の推定を実施した。その成績を表 9 及び 10 に示した。

表 5 分析成績 (1)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)							
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力価/l)	No. z-score	分析値 (g/力価/l)	No. z-score																		
1	11.98	1	0.10	17.42	4	-0.59	4.19	2	1.65	5.68	3	1.16	5.97	1	0.00	0.853	1	1.12	0.663	1	0.00	32.9	1	-0.99
3	12.21	1	1.04	17.59	2	0.24	4.04	1	0.94	5.40	2	0.47	5.89	1	-0.63	0.723	1	-2.81	0.650	1	-0.94	35.0	2	0.04
4	12.22	1	1.08	17.29	4	-1.24	3.84	1	0.00	5.99	3	1.93	6.00	1	0.23	0.861	2	1.36	0.665	1	0.14	35.2	1	0.14
5	12.03	1	0.30	17.54	4	0.00	3.41	2	-2.03	5.60	3	0.96	5.98	1	0.07	0.830	1	0.42	0.674	1	0.80			
6	11.87	1	-0.34	17.63	3	0.44	3.87	2	0.14				5.98	1	0.07	0.910	2	2.84	0.670	1	0.51	35.9	1	0.49
7	11.81	1	-0.59	17.27	2	-1.34	3.43	1	-1.94	5.48	3	0.66	5.82	1	-1.19	0.813	2	-0.09	0.650	1	-0.94	30.4	1	-2.24
8	11.98	1	0.10	17.60	3	0.29	3.63	2	-0.99	4.96	3	-0.61	6.11	1	1.11	0.813	1	-0.09	0.667	1	0.29	38.5	2	1.79
9	12.32	1	1.49	17.47	4	-0.34	3.53	1	-1.46	5.39	2	0.44	6.01	1	0.31	0.820	2	0.12	0.660	1	-0.21	29.7	1	-2.59
10	11.88	1	-0.30	17.62	2	0.39	4.16	1	1.51	5.90	2	1.70	6.04	1	0.55	0.880	1	1.94	0.645	1	-1.31			
11	12.12	1	0.67	17.39	4	-0.74	3.57	1	-1.27	5.57	2	0.89	6.04	1	0.55	0.860	2	1.33	0.650	1	-0.94	30.3	3	-0.55
12	12.08	1	0.51	17.45	4	-0.44	3.97	1	0.61	5.66	2	1.11	5.89	1	-0.63	0.810	2	-0.18	0.650	1	-0.94	31.0	3	0.00
13	12.19	1	0.96	17.65	3	0.54							5.98	1	0.07	0.813	2	-0.09	0.654	1	-0.65			
13				17.60	4	0.29																		
14	11.89	1	-0.26	17.34	4	-0.99	3.89	1	0.23	4.94	2	-0.66	6.01	1	0.31	0.840	2	0.72	0.650	1	-0.94	35.8	1	0.44
15	11.65	1	-1.24	17.91	3	1.84	3.74	2	-0.47	5.51	3	0.74	5.88	1	-0.71	0.761	2	-1.66	0.583	1	-5.83	29.6	3	-1.11
16	11.92	1	-0.14	17.77	4	1.14	3.83	1	-0.04				6.02	1	0.39									
17	11.79	1	-0.67	17.24	1	-1.49							5.93	2	-0.31									
18	11.72	1	-0.96	17.54	2	0.00							4.85	1	-8.88									
20																								
21	11.70	2	-1.04	17.37	1	-0.84							5.37	2	-4.76									
22	12.02	1	0.26	17.74	3	0.99							5.95	1	-0.15									
23	12.02	1	0.26	17.49	2	-0.24	4.02	1	0.85				6.07	1	0.79									
24	11.16	1	-3.24	17.91	4	1.84	4.14	1	1.42				5.76	1	-1.66									
25	11.86	1	-0.38	17.66	4	0.59	4.28	1	2.08				6.01	1	0.31									
26	11.92	1	-0.14	17.64	3	0.49	3.70	2	-0.66				5.98	1	0.07	0.947	3	3.97	0.664	2	0.07			
26				17.29	4	-1.24																		
27	12.13	1	0.71	17.54	2	0.00	3.87	1	0.14	5.38	2	0.42	5.77	1	-1.58									
28	12.10	1	0.59	17.59	2	0.24	3.96	1	0.56	4.99	2	-0.54	6.13	1	1.26	0.814	2	-0.06	0.668	1	0.36			
29	11.82	1	-0.55	17.42	3	-0.59	3.76	2	-0.37	5.69	2	1.18	5.97	1	0.00	0.817	3	0.03	0.665	2	0.14			
31	10.75	1	-4.92	17.29	2	-1.24	4.00	1	0.75	4.45	2	-1.88	5.83	1	-1.11	0.778	2	-1.15	0.667	1	0.29			
32	12.24	1	1.16	17.62	4	0.39	3.73	2	-0.52				5.83	1	-1.11	0.850	2	1.03						
33	11.71	1	-1.00	17.48	1	-0.29	3.90	1	0.28	4.52	2	-1.70	6.03	1	0.47	0.796	2	-0.60	0.663	1	0.00	31.3	3	0.23
37	11.67	1	-1.16	17.32	4	-1.09	4.00	2	0.75	5.49	3	0.69	5.98	1	0.07	0.821	2	0.15	0.667	1	0.29	29.5	3	-1.19
38				17.11	2	-2.14																		
39	11.91	1	-0.18	17.55	4	0.04	3.34	2	-2.36	5.67	2	1.13	5.99	1	0.15	1.041	1	6.82	0.583	1	-5.83			
40				18.00	2	2.29																		
42	12.26	1	1.24	17.68	1	0.69	3.80	1	-0.18	5.37	3	0.39	5.83	1	-1.11	0.800	2	-0.48	0.630	1	-2.40	31.2	3	0.15
43	11.98	1	0.10	17.41	4	-0.64	3.52	2	-1.51	5.30	3	0.22	5.90	1	-0.55	0.870	3	1.63	0.630	1	-2.40			
44	12.01	1	0.22	17.62	4	0.39	3.94	1	0.47				5.96	1	-0.07	0.818	2	0.06	0.654	1	-0.65			
45	11.77	1	-0.75	17.52	4	-0.09	3.94	1	0.47				5.80	1	-1.34									
46	12.00	1	0.18	17.61	4	0.34	4.08	1	1.13				5.86	1	-0.87									
47	11.80	1	-0.63	17.51	1	-0.14	3.67	1	-0.80				6.22	1	1.98									
48	11.82	1	-0.55	17.50	3	-0.19	3.61	2	-1.08	5.42	2	0.51	6.28	1	2.45	0.806	2	-0.30	0.650	1	-0.94			
52	12.06	1	0.42	17.65	2	0.54	3.70	1	-0.66	5.18	2	-0.07	6.07	1	0.79	0.776	2	-1.21	0.649	1	-1.02			
53	11.94	1	-0.06	17.78	3	1.19	4.28	2	2.08	5.38	3	0.42	5.57	1	-3.17	0.991	2	5.30	0.700	1	2.69			
54	10.74	1	-4.96	17.45	1	-0.44	3.88	1	0.18				6.04	1	0.55	0.786	2	-0.90	0.648	1	-1.09	33.0	1	-0.94
55	11.95	1	-0.02	17.63	4	0.44	3.75	2	-0.42				5.83	1	-1.11									
58										5.11	2	-0.24				0.778	2	-1.15	0.664	1	0.07			
59	11.78	1	-0.71	17.76	4	1.09	3.89	2	0.23				5.63	1	-2.69									
63	11.92	1	-0.14	18.43	1	4.44							5.85	1	-0.95									
67	11.86	1	-0.38	17.48	4	-0.29	3.61	2	-1.08	5.32	3	0.27	6.39	1	3.33	0.792	2	-0.72	0.658	1	-0.36	30.7	3	-0.23
68	11.45	1	-2.06										5.53	1	-3.49	0.708	2	-3.27	0.680	2	1.23			
69	11.79	1	-0.67	17.57	4	0.14	3.79	2	-0.23	5.63	3	1.03	5.84	1	-1.03	0.819	2	0.09	0.660	1	-0.21			
70	11.71	1	-1.00	5.75	1	-58.90	3.81	1	-0.14	6.03	1	2.02	5.61	1	-2.85	0.807	3	-0.27	0.738	2	5.46			
72				17.51	3	-0.14	3.77	2	-0.33	5.31	3	0.24												
73	12.30	2	1.41	17.66	3	0.59							5.82	2	-1.19									
75	12.12	1	0.67	16.63	1	-4.54	3.84	1	0.00	4.89	2	-0.79	5.91	1	-0.47	0.772	2	-1.33	0.663	1	0.00			
76	11.62	1	-1.36	17.78	2	1.19	3.75	1	-0.42	5.44	3	0.56	5.98	1	0.07	0.842	2	0.78	0.666	1	0.21			
77	12.39	1	1.77	17.41	4	-0.64	4.26	1	1.98	6.41	3	2.97	6.18	1	1.66									
78	11.94	1	-0.06	17.47	3	-0.34	3.75	2	-0.42	5.63	3	1.03	5.90	1	-0.55	0.801	2	-0.45	0.651	1	-0.87			
79	12.09	1	0.55	16.99	4	-2.74	3.56	2	-1.32	4.98	3	-0.56	5.96	1	-0.07									
80	11.39	1	-2.30	16.30	4	-6.12	3.38	1	-2.17	6.54	3	3.29	6.16	1	1.50	0.929	2	3.42	0.682	1	1.38			
81	11.48	1	-1.94	17.06	4	-2.39	3.91	1	0.33	5.64	3	1.06	6.23	1	2.06	0.872	2	1.69	0.679	1	1.16			
82	12.02	1	0.26	17.74	1	0.99	3.80	1	-0.18	5.81	2	1.48	6.10	1	1.03	0.750	2	-2.00	0.671	1	0.58	30.2	3	-0.63
92	12.03	1	0.30	17.41	2	-0.64	3.93	1	0.42	4.96	2	-0.61	5.93	1	-0.31	0.807	2	-0.27	0.659	1	-0.29	33.9	1	-0.49
93	12.18	1	0.91	17.46	4	-0.39	3.86	1	0.09				5.80	1	-1.34							32.0	4	0.79
94	12.14	1	0.75	17.85	3	1.54							6.03	1										

表 5 分析成績 (2)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)							
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価/t))	No. z-score	分析値 (g(力価/t))	No. z-score																		
106																	30.1	3	-0.71					
107	12.20	2	1.00	17.59	3	0.24			5.82	2	-1.19													
108	11.98	1	0.10	17.68	3	0.69	3.97	1	0.61	5.15	2	-0.14	6.09	1	0.95	0.801	1	-0.45	0.665	1	0.14			
109	12.17	1	0.87	17.61	2	0.34			5.92	1	-0.39	0.792	2	-0.72	0.669	1	0.43							
110	12.44	1	1.98	17.33	4	-1.04	3.70	1	-0.66	5.06	2	-0.37	5.91	1	-0.47	0.788	2	-0.84	0.674	1	0.80			
111	11.83	1	-0.51	17.63	4	0.44	3.66	2	-0.85	5.31	3	0.24	5.85	1	-0.95	0.810	2	-0.18	0.657	1	-0.43			
111				17.42	3	-0.59																		
113	12.15	1	0.79	17.54	3	0.00			5.19	4	-0.04	5.73	1	-1.90	0.802	2	-0.42	0.663	1	0.00	32.5	1	-1.19	
115	11.94	1	-0.06	17.45	2	-0.44	3.85	1	0.04	5.22	2	0.02	5.79	1	-1.42									
115				17.48	3	-0.29																		
116	12.20	1	1.00	17.29	3	-1.24	3.72	1	-0.56	5.27	1	0.14	5.85	1	-0.95	0.803	2	-0.39	0.659	1	-0.29			
117	11.82	1	-0.55	17.82	4	1.39	3.90	2	0.28	5.43	2	0.54	6.26	1	2.30	0.840	2	0.72	0.594	1	-5.03	33.6	3	2.06
118	12.12	1	0.67	17.53	3	-0.04	4.06	1	1.04	5.65	3	1.08	5.82	1	-1.19	0.809	2	-0.21	0.650	1	-0.94	31.0	3	0.00
120	12.13	1	0.71	17.61	4	0.34	3.68	1	-0.75	5.13	2	-0.19	6.07	1	0.79	0.840	2	0.72	0.648	1	-1.09	34.2	1	-0.34
121	12.19	1	0.96	17.61	3	0.34	3.80	2	-0.18	4.92	3	-0.71	6.02	1	0.39	0.851	2	1.06	0.673	1	0.72			
122	11.96	1	0.02	17.30	4	-1.19	3.91	1	0.33	4.96	3	-0.61	6.06	1	0.71	0.825	2	0.27	0.663	1	0.00	36.3	2	0.69
122				17.53	3	-0.04																31.8	3	0.63
123	11.82	1	-0.55																					
124	11.90	1	-0.22	17.94	3	1.99	3.78	2	-0.28	5.38	3	0.42	6.04	1	0.55	0.882	2	2.00	0.639	1	-1.75			
124				16.68	4	-4.29																		
125	11.63	1	-1.32																			36.8	1	0.94
128	12.16	1	0.83	17.31	3	-1.14	4.15	1	1.46	5.19	2	-0.04	5.98	1	0.07	0.820	1	0.12	0.669	1	0.43	27.1	3	-3.09
128				17.62	4	0.39										0.816	2	0.00						
129				17.79	3	1.24																		
129				17.55	4	0.04																		
132	11.87	1	-0.34	17.28	4	-1.29	3.83	2	-0.04	5.58	3	0.91	5.93	1	-0.31	0.811	2	-0.15	0.673	1	0.72			
133	11.77	1	-0.75	18.62	3	5.39	4.04	1	0.94	5.22	2	0.02	6.19	1	1.74									
134	11.40	1	-2.26													5.67	1	-2.38	0.821	2	0.15			
135	12.34	1	1.57	17.37	4	-0.84	3.89	1	0.23	3.95	1	0.52	5.99	1	0.15	0.808	2	-0.24	0.659	1	-0.29			
136	12.01	1	0.22	17.54	4	0.00	3.95	1	0.52	5.41	1	0.49	5.64	1	-2.61	0.878	3	1.87	0.682	1	1.38			
137	11.94	1	-0.06	17.44	4	-0.49	3.80	1	-0.18	5.38	3	0.42	5.98	1	0.07	0.793	1	-0.69	0.660	1	-0.21	34.9	1	0.00
138	12.07	1	0.47	17.79	2	1.24	3.82	1	-0.09	4.71	2	-1.23	5.93	1	-0.31	0.851	2	1.06	0.667	1	0.29			
139	12.10	1	0.59	17.82	1	1.39	3.94	1	0.47	5.09	2	-0.29	5.80	1	-1.34	0.833	2	0.51	0.658	1	-0.36			
139				17.70	3	0.79																		
140	11.88	1	-0.30	17.53	1	-0.04	3.84	1	0.00	4.47	2	-1.83	5.86	1	-0.87	0.790	2	-0.78	0.680	1	1.23			
141	11.99	1	0.14	17.76	3	1.09	3.86	2	0.09	5.68	3	1.16	5.94	1	-0.23	0.795	2	-0.63	0.635	1	-2.04	37.0	2	1.04
142	12.58	1	2.55	17.34	3	-0.99	4.01	2	0.80	6.05	3	2.07	5.92	1	-0.39	0.741	2	-2.27	0.807	1	10.50			
144				17.97	4	2.14																		
145	12.39	1	1.77	17.75	3	1.04	4.01	1	0.80	5.31	2	0.24	5.97	1	0.00									
146	12.08	1	0.51	17.54	3	0.00	3.68	2	-0.75	5.29	2	0.19	5.90	1	-0.55	0.797	2	-0.57	0.668	1	0.36	31.5	3	0.39
147	11.60	1	-1.45																			40.0	1	2.54
149	12.04	1	0.34	16.71	2	-4.14										5.66	1	-2.45						
153	12.19	1	0.96	17.42	4	-0.59	3.93	1	0.42	5.23	2	0.04	5.95	1	-0.15	0.818	2	0.06	0.646	1	-1.23	34.7	1	-0.09
154	11.35	1	-2.47	17.46	4	-0.39	3.73	2	-0.52	5.07	3	-0.34	5.90	1	-0.55	0.745	1	-2.15	0.648	1	-1.09			
158				17.44	3	-0.49																		
160	11.81	1	-0.59	17.58	3	0.19	3.91	1	0.33	5.64	2	1.06	5.84	1	-1.03	0.804	1	-0.36	0.653	1	-0.72	33.8	1	-0.54
161	12.11	1	0.63	17.50	4	-0.19	3.98	2	0.66	5.47	3	0.64	6.08	1	0.87	0.850	3	1.03	0.678	1	1.09	31.0	3	0.00
176	12.63	1	2.75	17.78	4	1.19	4.14	1	1.42				5.88	1	-0.71									
177	12.16	1	0.83	17.15	1	-1.94	4.15	1	1.46	5.94	1	1.80	5.84	1	-1.03				1.550	1	64.67			
178	11.39	1	-2.30	17.38	4	-0.79	3.77	1	-0.33	4.69	2	-1.28	6.13	1	1.26	1.271	1	13.79	0.637	1	-1.89			
179	11.80	1	-0.63	17.27	4	-1.34							5.92	1	-0.39							33.6	2	-0.64
180	12.06	1	0.42	17.10	3	-2.19	3.91	2	0.33	5.77	3	1.38	5.94	1	-0.23	0.833	2	0.51	0.631	1	-2.33	36.3	1	0.69
181	12.00	1	0.18	17.64	3	0.49	3.96	1	0.56	4.83	3	-0.94	6.02	1	0.39	0.760	2	-1.69	0.679	1	1.16	34.6	1	-0.14
182	11.13	1	-3.32	17.17	1	-1.84	4.10	1	1.23	4.30	2	-2.25	6.17	1	1.58	0.713	1	-3.12	0.608	1	4.01			
183	11.81	1	-0.59	17.62	4	0.39	2.94	2	-2.26	5.18	3	-0.07	6.00	1	0.23	1.003	1	5.66	0.670	1	0.51			
184	12.21	1	1.04	18.13	1	2.94	3.91	1	0.33	5.96	1	1.85	5.43	1	-4.28									
185	12.01	1	0.22	17.94	1	1.99	4.20	1	1.70				5.91	1	-0.47				0.598	1	-4.73			
186	12.03	1	0.30	17.63	3	0.44	4.06	1	1.04	4.83	2	-0.94	6.07	1	0.79	0.903	1	2.63	0.659	1	-0.29	31.9	3	0.71
187	12.25	1	1.20	17.62	4	0.39	4.06	1	1.04	5.16	2	-0.12	5.86	1	-0.87	0.796	2	-0.60	0.664	1	0.07	31.1	3	0.07
188	12.42	1	1.90	17.38	3	-0.79	4.06	1	1.04	3.81	2	-3.46	6.09	1	0.95									
189	11.97	1	0.06	17.50	4	-0.19	3.89	2	0.23				6.09	1	0.95	0.838	2	0.66	0.682	1	1.38			
190	12.01	1	0.22	17.80	3	1.29	3.36	1	-2.27	5.20	2	-0.02	6.08	1	0.87	0.718	2	-2.97	0.636	1	-1.96	31.2	3	0.15
191	12.34	1	1.57	17.59	4	0.24							5.93	1	-0.31									
192	12.31	1	1.45	17.29	4	-1.24	3.70	2	-0.66	5.43	2	0.54	6.00	1	0.23	0.888	3	2.18	0.647	1	-1.16			
193	11.90	1	-0.22	18.12	4	2.89							6.02	1	0.39									
194	11.45	1	-2.06										5.80	1	-1.34									
195	11.67	1	-1.16										5.88	2	-0.71									
196	11.91	1	-0.18	17.60	3	0.29	3.77	1	-0.33				5.98	1	0.07	0.830	3	0.42	0.739	2	5.54			
197	11.89	1	-0.26	17.43	3	-0.54																		

表 5 分析成績 (3)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)								
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力価/t)	No. z-score	分析値 (g/力価/t)	No. z-score																			
230	11.80	1	-0.63	17.96	4	2.09	4.17	1	1.56	5.14	1	-0.17	5.84	1	-1.03	0.779	1	-1.12	0.674	1	0.80				
231	11.90	1	-0.22	17.46	3	-0.39	3.20	2	-0.02	4.87	2	-0.84	6.08	1	0.87				37.5	2	1.29				
232	11.59	1	-1.49	17.28	4	-1.29	4.14	1	1.42	5.60	3	0.96	5.65	1	-2.53	0.798	2	-0.54	0.679	1	1.16				
233	12.11	1	0.63	17.70	4	0.79	3.84	1	0.00	3.84	1	0.00	6.02	1	0.39										
234	11.15	1	-3.29	17.84	3	1.49	3.76	2	-0.37	5.81	3	1.48	5.98	1	0.07										
235	12.44	1	1.98	17.39	1	-0.74	3.98	1	0.66	5.73	2	1.28	6.00	1	0.23	0.774	2	-1.27	0.673	1	0.72				
236	12.01	1	0.22				4.47	2	-1.83	4.47	2	-1.83	6.09	1	0.95				32.7	1	-1.09				
237	12.38	1	1.73	17.57	4	0.14	3.23	2	-2.88	5.38	3	0.42	5.88	1	-0.71	0.791	2	-0.75	0.633	1	-2.18				
238	12.19	1	0.96	17.64	2	0.49	3.84	1	0.00	4.59	2	-1.53	5.80	1	-1.34	0.866	1	1.51	0.652	1	-0.80				
239	12.86	1	3.69	15.26	3	-11.32	3.78	1	-0.28	5.44	2	0.56	5.87	1	-0.79										
240	11.93	1	-0.10	17.71	3	0.84	3.83	1	-0.04	4.81	2	-0.99	5.90	1	-0.55	0.898	1	2.48	0.661	1	-0.14				
241	12.10	1	0.59	17.83	2	1.44	3.85	1	0.04	5.14	2	-0.17	6.09	1	0.95	0.832	1	0.48	0.659	1	-0.29	32.3	1	-1.29	
242	11.98	1	0.10	17.66	4	0.59	3.31	2	-2.50	5.07	1	-0.34	6.04	1	0.55	0.789	2	-0.81	0.660	1	-0.21				
243	12.06	1	0.42	17.59	4	0.24	3.02	2	-3.88	5.26	4	0.12	6.06	1	0.71	0.883	1	2.03	0.658	1	-0.36		31.9	3	0.71
244	11.87	1	-0.34				4.05	1	0.99	4.99	2	-0.54	5.69	1	-2.22	0.820	2	0.12	0.663	1	0.00	36.3	1	0.69	
245	12.39	1	1.77	17.54	2	0.00	3.78	1	-0.28	5.08	2	-0.32	6.08	1	0.87	0.854	2	1.15	0.667	1	0.29				
246	11.91	1	-0.18	17.37	4	-0.84	3.52	1	-1.51				5.83	1	-1.11	0.859	2	1.30	0.683	1	1.45		30.4	3	-0.47
247	11.88	1	-0.30	17.46	3	-0.39	3.76	2	-0.37				6.09	1	0.95										
248	11.35	1	-2.47				3.71	1	-0.61	5.23	2	0.04	5.95	1	-0.15	0.805	2	-0.33	0.672	1	0.65				
249	12.07	1	0.47	17.56	4	0.09	3.94	1	0.47	5.14	1	-0.17	5.98	1	0.07	0.846	1	0.90	0.670	1	0.51				
250	11.95	1	-0.02	18.09	3	2.74	3.67	2	-0.80				6.03	1	0.47				0.673	1	0.72				
251	12.35	1	1.61	17.69	2	0.74	4.08	1	1.13	5.51	2	0.74	5.90	1	-0.55	0.797	2	-0.57	0.662	1	-0.07				
252																							30.1	3	-0.71
253	11.91	1	-0.18	17.43	4	-0.54	4.69	1	4.02	4.66	2	-1.36	5.71	1	-2.06	0.807	2	-0.27	0.656	1	-0.51				
254	11.57	1	-1.57	17.36	4	-0.89	3.38	1	-2.17	4.51	1	-1.73	6.00	1	0.23	0.968	1	4.60	0.560	1	-2.51				
255	12.11	1	0.63	17.71	4	0.84	4.04	2	0.94				6.15	1	1.42										
256	11.79	1	-0.67	17.59	3	0.24	4.10	1	1.23	4.87	2	-0.84	6.14	1	1.34	0.883	2	2.03	0.635	1	-2.04	34.4	2	-0.24	
257	11.82	1	-0.55	17.44	3	-0.49	3.74	2	-0.47				6.10	1	1.03										
258	11.46	1	-2.02	17.29	4	-1.24	4.10	1	1.23	4.77	1	-1.08	6.06	1	0.71										
259	11.73	1	-0.91	17.36	4	-0.89	3.45	2	-1.84																
260	11.80	1	-0.63	17.63	4	0.44	4.23	1	1.84	4.68	2	-1.31	5.93	1	-0.31	0.828	2	0.36	0.640	1	-1.67				
261	11.87	1	-0.34	17.34	4	-0.99	4.15	1	1.46	4.95	1	-0.64	6.10	1	1.03	0.891	2	2.27	0.663	1	0.00		31.7	3	0.55
262	11.75	1	-0.83	17.05	2	-2.44	3.79	1	-0.23	5.71	2	1.23	5.96	1	-0.07	0.893	2	2.33	0.664	1	0.07				
263	12.08	1	0.51	17.97	2	2.14	3.88	1	0.18				6.06	1	0.71										
264	11.89	1	-0.26	17.45	4	-0.44	3.53	2	-1.46	5.09	2	-0.29	5.90	1	-0.55	0.984	1	5.09	0.693	1	2.18				
265	12.06	1	0.42	17.50	1	-0.19	4.10	1	1.23	5.28	1	0.17	6.04	1	0.55	0.800	2	-0.48	0.666	1	0.21				
266	11.93	1	-0.10	17.62	4	0.39	3.72	1	-0.56	5.24	2	0.07	5.58	1	-3.09	0.834	2	0.54	0.676	1	0.94				
267	11.80	1	-0.63	17.58	3	0.19	4.22	1	1.79	4.88	2	-0.81	6.12	1	1.19	0.816	2	0.00	0.623	1	-2.91	34.1	1	-0.39	
268	12.42	1	1.90	17.80	2	1.29	3.96	1	0.56				5.96	1	-0.07										
269	12.03	1	0.30	17.55	4	0.04	4.05	1	0.99	5.06	2	-0.37	6.00	1	0.23	0.836	2	0.60	0.643	1	-1.45				
270	11.84	1	-0.47	17.70	4	0.79	3.74	1	-0.47	4.53	2	-1.68	5.95	1	-0.15	0.799	2	-0.51	0.672	1	0.65		30.1	3	-0.71
271	12.06	1	0.42	17.37	4	-0.84	3.79	1	-0.23				5.96	1	-0.07										
272	11.83	1	-0.51	17.54	2	0.00	4.00	1	0.75	4.91	2	-0.74	6.06	1	0.71	0.807	2	-0.27	0.663	1	0.00		30.6	4	-0.31
298	11.81	1	-0.59	17.93	3	1.94	3.73	2	-0.52	4.86	2	-0.86	5.95	1	-0.15	0.830	2	0.42	0.660	1	-0.21				
300	11.99	1	0.14	17.50	4	-0.19	3.82	2	-0.09	5.19	2	-0.04	5.87	1	-0.79	0.808	2	-0.24	0.638	1	-1.82				
301	12.13	1	0.71	17.61	2	0.34	3.87	1	0.14	4.61	2	-1.48	5.85	1	-0.95	0.804	2	-0.36	0.663	1	0.00				
302	12.20	2	1.00	17.74	4	0.99	4.06	1	1.04	6.00	3	1.95	5.76	1	-1.66	0.789	1	-0.81	0.657	1	-0.43		34.7	3	2.93
303	11.68	1	-1.12	17.67	4	0.64	4.01	1	0.80	5.22	1	0.02	5.95	1	-0.15	0.789	2	-0.81	0.660	1	-0.21				
304	11.76	1	-0.79	17.56	2	0.09	3.90	1	0.28				5.84	1	-1.03										
306	11.98	1	0.10	17.42	4	-0.59	3.84	1	0.00	5.14	2	-0.17	5.98	1	0.07	0.832	2	0.48	0.670	1	0.51				
308	11.57	1	-1.57	17.49	4	-0.24							5.98	1	0.07										
309	11.85	1	-0.42	17.52	3	-0.09							6.07	1	0.79								34.7	2	-0.09
310																									
311	11.56	1	-1.61	17.58	4	0.19	3.89	1	0.23	4.93	1	-0.69	5.95	1	-0.15	0.814	2	-0.06	0.665	1	0.14				
313	12.08	1	0.51	17.79	3	1.24	3.76	2	-0.37	5.10	2	-0.27	6.03	1	0.47	0.798	2	-0.54	0.655	1	-0.58				
314	11.80	1	-0.63	17.62	3	0.39	3.55	1	-1.37	4.71	2	-1.23	5.75	1	-1.74	0.780	2	-1.09	0.680	1	1.23	31.2	1	-1.84	
315	12.32	1	1.49	17.73	3	0.94	3.71	2	-0.61	5.70	3	1.21	6.02	1	0.39	0.772	2	-1.33	0.665	1	0.14				
317	12.10	1	0.59	17.57	3	0.14	3.78	1	-0.28	6.29	2	2.67	5.71	1	-2.06	0.758	2	-1.75	0.603	1	-4.32		33.0	3	1.58
318	11.72	1	-0.96	17.66	4	0.59	3.99	1	0.71	6.61	2	3.46	6.02	1	0.39	0.824	2	0.24	0.660	1	-0.21		36.3	1	0.69
319	11.36	1	-2.43	17.83	3	1.44	3.73	1	-0.52	5.23	2	0.04	6.18	1	1.66	0.833	2	0.51	0.665	1	0.14				
320	11.79	1	-0.67	17.22	1	-1.59	3.84	1	0.00	5.09	2	-0.29	6.09	1	0.95	0.800	2	-0.48	0.664	1	0.07				
321	11.33	1	-2.55	16.35	2	-5.94	4.78	1	4.44	3.34	2	-4.62	6.06	1	0.71	0.841	2	0.75	0.663	1	0.00				
324	11.60	1	-1.45	17.83	3	1.44	4.05	2	0.99	4.69	2	-1.28	6.13	1	1.26	0.837	2	0.63	0.681	1	1.31				
326	12.30	1	1.41	17.72	2	0.89	5.42	1	7.42	4.															

表 5 分析成績 (4)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)						
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価/t))	No. z-score	分析値 (g(力価/t))	No. z-score																	
346	12.28	1	1.32	17.10	3	-2.19	3.68	2	-0.75	4.97	2	-0.59	5.98	1	-0.07	0.750	2	-2.00	0.728	1	4.73		
347	12.08	1	0.51	17.47	4	-0.34	4.15	2	1.46	5.36	2	0.37	5.96	1	-0.07	0.781	1	-1.06	0.663	1	0.00		
348	12.16	1	0.83	17.56	4	0.09	4.10	1	1.23	5.66	3	1.11	5.95	1	-0.15	0.832	2	0.48	0.648	1	-1.09		
349	11.73	1	-0.91	17.89	3	1.74	3.85	1	0.04	5.22	3	0.02	6.04	1	0.55	0.800	2	-0.48	0.710	1	3.42		
350	11.63	1	-1.32	18.13	2	2.94	3.68	2	-0.75	5.18	4	-0.07	6.10	1	1.03	0.813	1	-0.09	0.655	1	-0.58		
351	11.87	1	-0.34	17.69	3	0.74	3.64	2	-0.94	5.16	1	-0.12	6.12	1	1.19	0.814	2	-0.06	0.664	1	0.07		
354	11.98	1	0.10	17.81	2	1.34	4.23	1	1.84	4.67	2	-1.33	5.89	1	-0.63	0.831	1	0.45	0.647	1	-1.16		
355	12.08	1	0.51	17.41	2	-0.64	3.41	1	-2.03	3.41	1	-0.31	5.93	1	-0.31								
356	11.87	1	-0.34	17.62	3	0.39	3.83	2	-0.04				5.92	1	-0.39	0.862	2	1.39	0.663	1	0.00		
361	12.18	1	0.91	17.28	2	-1.29	3.57	1	-1.27	5.83	2	1.53	5.96	1	-0.07	0.805	2	-0.33	0.657	1	-0.43		
363	11.82	1	-0.55	17.54	1	0.00	3.73	1	-0.52				5.94	1	-0.23	0.826	2	0.30	0.660	1	-0.21		
364	11.98	1	0.10	17.16	2	-1.89	3.75	1	-0.42	5.28	2	0.17	5.74	1	-1.82								
365	11.32	1	-2.59	17.48	2	-0.29	3.91	2	0.33				6.10	1	1.03	0.734	2	-2.48	0.692	1	2.11		
366	12.39	1	1.77	17.60	4	0.29	4.04	1	0.94	5.25	2	0.09	6.03	1	0.47	0.826	2	0.30	0.668	1	0.36		
368	11.93	1	-0.10	17.15	1	-1.94	3.63	1	-0.99	4.34	2	-2.15	5.96	1	-0.07	0.830	2	0.42	0.677	1	1.02		
369	12.20	1	1.00	17.36	4	-0.89	3.61	2	-1.08	5.94	3	1.80	5.78	1	-1.50	0.790	2	-0.78	0.668	1	0.36		
370				17.46	1	-0.39	4.11	1	1.27	5.20	2	-0.02	6.01	1	0.31	0.823	1	0.21	0.638	1	-1.82		
371	11.46	1	-2.02	17.38	2	-0.79	4.09	2	1.18	5.49	1	0.69	6.11	1	1.11	0.766	2	-1.51	0.669	1	0.43		
373	12.12	1	0.67	17.81	2	1.34	3.57	1	-1.27	6.41	2	2.97	5.99	1	0.15								
377	11.72	1	-0.96	16.78	1	-3.79	3.91	1	0.33	5.15	2	-0.14	6.15	1	1.42								
378	12.20	1	1.00	17.42	3	-0.59	3.96	1	0.56	5.29	4	0.19	5.92	1	-0.39	0.800	2	-0.48	0.664	1	0.07		
380	11.99	1	0.14	17.35	3	-0.94	3.80	1	-0.18	5.36	3	0.37	6.04	1	0.55	0.815	2	-0.03	0.643	1	-1.45		
381				17.73	3	0.94																	
382																0.828	1	0.36	0.655	1	-0.58		
383	11.86	1	-0.38	17.31	4	-1.14	3.74	1	-0.47	5.21	2	0.00	5.97	1	0.00	0.813	2	-0.09	0.659	1	-0.29		
384	12.14	1	0.75	17.67	4	0.64	3.79	2	-0.23				5.89	1	-0.63	0.682	1	4.06	0.697	1	2.47		
385	11.94	1	-0.06	17.32	1	-1.09	4.01	1	0.80	4.74	2	-1.16	6.02	1	0.39	0.847	2	0.93	0.661	1	-0.14		
386	11.54	1	-1.69										6.19	1	1.74	0.826	2	0.30	0.622	1	-2.98		
387	11.30	1	-2.67	18.63	1	5.44							5.65	1	-2.53						32.7	4	1.34
388				17.51	3	-0.14	3.77	2	-0.33	5.31	3	0.24											

注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液 吸収法	1 飼料分析基準	1 静置法	1 飼料分析基準	1 シュウ酸アン モニウム法	1 飼料分析基準
2 その他	2 ホウ酸溶液 吸収法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光光 度法	2 その他
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他	
	4 自動分析機		4 その他			
	5 その他					

モネンシンナトリウム

- No. 分析方法
- 1 迅速定量法
 - 2 フローインジェク
ション法
 - 3 液体クロマトグラフ法
 - 4 微生物学的定量法

表 5 分析成績 (7)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランテル	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score
230	8.58	1 0.29	66.76	4 0.69	19.59	1 0.10										
231	8.58	1 0.29	66.19	3 -0.01	19.68	1 1.07										
232	8.46	1 -0.41	64.71	4 -1.84	19.41	1 -1.83										
233	8.52	1 -0.05	66.35	4 0.18	19.59	1 0.10										
234	7.57	1 -5.63	67.16	3 1.18	19.77	1 2.05										
235	8.85	1 1.87	64.76	1 -1.78	19.53	1 -0.53										
236	8.63	1 0.58			19.65	1 0.75			178.3	1 0.69	22.82	1 -0.64	25.91	1 0.32	15.4	1 -0.16
237	8.28	1 -1.46	66.13	4 -0.08	19.61	1 0.32										
238																
239	8.78	1 1.46	60.84	3 -6.63	19.48	1 -1.07										
240	8.65	1 0.70	66.29	3 0.11	19.52	1 -0.64										
241	8.62	1 0.52	66.93	2 0.90	19.81	1 2.48	0.22	1 0.00	170.6	1 -0.14	24.08	1 1.06	26.25	1 0.59	16.6	1 1.85
242	8.52	1 -0.05	66.20	4 0.00	19.71	1 1.40			172.9	1 0.10	23.07	1 -0.30	26.93	1 1.11		
243	8.58	1 0.29	65.68	4 -0.64	19.58	1 0.00			202.3	1 3.28						
244	8.64	1 0.64			19.60	1 0.21	0.24	1 0.67			24.55	1 1.71	28.76	1 2.51	15.6	1 0.16
245	8.44	1 -0.52	66.18	2 -0.02	19.67	1 0.97										
246	8.52	1 -0.05	65.70	4 -0.61	19.50	1 -0.86	0.38	2 5.39			22.77	1 -0.71	23.19	1 -1.75		
247	8.55	1 0.11	66.56	3 0.44	19.68	1 1.07										
248	8.16	1 -2.17			19.48	1 -1.07										
249																
250	8.56	1 0.17	67.28	3 1.33	19.59	1 0.10			148.6	1 -2.51						
251	8.73	1 1.17	66.79	2 0.73	19.57	1 -0.10	0.22	1 0.00	168.3	1 -0.38	24.75	1 1.98	27.00	1 1.16		
252									170.0	1 -0.20	23.74	1 0.60	25.16	1 -0.24	15.4	1 -0.16
253	8.56	1 0.17	65.16	4 -1.28	19.86	1 3.02	0.21	2 -0.33	168.7	1 -0.34						
254	8.49	1 -0.23	65.06	4 -1.41	19.60	1 0.21									15.9	1 0.67
255	8.73	1 1.17	66.58	4 0.47	19.47	1 -1.18										
256	8.48	1 -0.29	67.04	3 1.03	19.63	1 0.53										
257	8.48	1 -0.29	66.81	3 0.75	19.63	1 0.53										
258	8.06	1 -2.75	65.28	4 -1.13	19.65	1 0.75										
259	7.73	1 -4.69	65.94	4 -0.32												
260	8.60	1 0.41	65.53	4 -0.82	19.55	1 -0.32										
261	8.60	1 0.41	65.55	4 -0.80	19.60	1 0.21			151.7	1 -2.17	23.23	1 -0.08	26.26	1 0.59	15.1	1 -0.67
262	8.33	1 -1.17	66.57	2 0.45	19.59	1 0.10										
263	8.42	1 -0.64	65.59	2 -0.75	19.57	1 -0.10	0.16	2 -2.02								
264	8.59	1 0.35	66.47	4 0.33	19.48	1 -1.07										
265	8.54	1 0.05	65.55	1 -0.80	19.65	1 0.75	0.22	1 0.00			23.35	1 0.07	25.05	1 -0.32		
266	8.54	1 0.05	66.28	4 0.09	19.34	1 -2.59	0.22	1 0.00			22.69	1 -0.82	24.79	1 -0.52		
267	8.52	1 -0.05	66.54	3 0.42	19.74	1 1.72					22.89	1 -0.55	25.73	1 0.19	16.1	1 1.01
268	8.48	1 -0.29	65.34	2 -1.06	19.53	1 -0.53	0.22	2 0.00								
269	8.55	1 0.11	66.06	4 -0.17	19.65	1 0.75					24.04	1 1.01	26.51	1 0.78	15.4	1 -0.16
270	8.59	1 0.35	67.07	4 1.07	19.61	1 0.32					23.01	1 -0.38	23.42	1 -1.57		
271	8.44	1 -0.52	66.23	4 0.03	19.68	1 1.07										
272	8.53	1 0.00	65.64	2 -0.69	19.62	1 0.43	0.22	2 0.00	178.5	1 0.71	23.34	1 0.06	26.16	1 0.52	15.7	1 0.33
298	8.29	1 -1.40	66.97	3 0.95	19.57	1 -0.10					22.70	1 -0.81	23.44	1 -1.56	15.9	1 0.67
300	8.49	1 -0.23	65.97	4 -0.28	19.59	1 0.10					24.31	1 1.38	25.66	1 0.13	15.0	1 -0.84
301	8.58	1 0.29	66.57	2 0.45	19.44	1 -1.51	0.21	2 -0.33			23.24	1 -0.07	25.34	1 -0.10		
302	8.84	1 1.81	66.33	4 0.16	19.45	1 -1.40									15.7	1 0.33
303	8.37	1 -0.93	66.57	4 0.45	19.53	1 -0.53										
304	8.69	1 0.93	67.58	2 1.70	19.41	1 -1.83										
306	8.85	1 1.87	65.35	4 -1.05	19.56	1 -0.21	0.34	2 4.04			23.04	1 -0.34	22.90	1 -1.97		
308	8.43	1 -0.58	65.69	4 -0.63	19.64	1 0.64										
309	8.45	1 -0.46	65.24	3 -1.18	19.74	1 1.72										
310									200.7	1 3.10						
311	8.38	1 -0.87	66.21	4 0.01	19.54	1 -0.43										
313	8.42	1 -0.64	66.68	3 0.59	19.59	1 0.10										
314	8.36	1 -0.99	66.93	3 0.90	19.44	1 -1.51					21.87	1 -1.94	20.90	1 -3.51		
315	8.68	1 0.87	67.03	3 1.02	19.71	1 1.40	0.11	2 -3.70								
317	8.62	1 0.52	66.52	3 0.39	19.51	1 -0.75			180.6	1 0.93					14.9	1 -1.01
318	8.27	1 -1.52	66.59	4 0.48	19.63	1 0.53	0.23	1 0.33	10.2	1 -17.45	22.34	1 -1.30	27.14	1 1.27	55.6	1 6.61
319	8.38	1 -0.87	67.68	3 1.83	20.07	1 5.28										
320	8.37	1 -0.93	64.96	1 -1.53	19.68	1 1.07	0.22	2 0.00	169.0	1 -0.31	24.55	1 1.71	23.02	1 -1.88	15.6	1 0.16
321	8.48	1 -0.29	61.73	2 -5.53	19.68	1 1.07					23.51	1 0.29	26.66	1 0.90		
324	8.47	1 -0.35	66.93	3 0.90	19.70	1 1.29					22.70	1 -0.81	25.78	1 0.22	15.4	1 -0.16
326	8.73	1 1.17	66.35	2 0.18	19.77	1 2.05										
327	8.57	1 0.23	65.73	4 -0.58	19.58	1 0.00										
328	8.97	1 2.58	65.56	4 -0.79	19.56	1 -0.21										
329	8.61	1 0.46	67.09	3 1.10	19.58	1 0.00					22.84	1 -0.61	25.49	1 0.00		
330	8.79	1 1.52	66.30	4 0.12	19.54	1 -0.43										
331	8.05	1 -2.81	64.11	2 -2.58	19.52	1 -0.64										
333	7.82	1 -4.16	67.44	3 1.53	19.64	1 0.64										
335	8.74	1 1.23	67.18	3 1.21	19.58	1 0.00										
336	8.51	1 -0.11	66.42	3 0.27	19.75	1 1.83					23.58	1 0.38				
337			66.88	3 0.84												
338	8.16	1 -2.17	66.77	3 0.70	19.62	1 0.43										
339	8.66	1 0.76	65.99	2 -0.25	19.55	1 -0.32										
340	8.30	1 -1.34	66.54	3 0.42	19.54	1 -0.43					24.09	1 1.08	24.82	1 -0.50		
342	7.86	1 -3.92			19.68	1 1.07	0.20	2 -0.67			23.93	1 0.86	27.13	1 1.26		
343	8.80	1 1.58	67.18	3 1.21	19.50	1 -0.86										
344									169.3	1 -0.28	23.27	1 -0.03	25.25	1 -0.17	15.5	1 0.00
345	8.17	2 -2.11	64.85	4 -1.67	19.55	1 -0.32	0.21	2 -0.33			26.27	1 4.05	23.40	1 -1.59		

表 5 分析成績 (8)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランテル							
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score						
346	8.73	1	1.17	64.87	3	-1.64	19.50	1	-0.86			22.44	1	-1.16	23.23	1	-1.72	15.3	1	-0.33		
347	8.59	1	0.35	65.84	4	-0.44	19.51	1	-0.75		172.0	1	0.01									
348	8.65	1	0.70	66.17	4	-0.03	19.59	1	0.10													
349	8.21	1	-1.87	67.41	3	1.49	19.72	1	1.51													
350	8.39	1	-0.82	66.83	2	0.77	19.58	1	0.00	0.64	1	14.16		59.86	1	49.82						
351	8.42	1	-0.64	66.73	3	0.65	19.64	1	0.64					23.43	1	0.18	26.61	1	0.86			
351																						
354	8.63	1	0.58	66.69	2	0.60	19.57	1	-0.10													
355	8.70	1	0.99	65.47	2	-0.90	19.49	1	-0.97													
356	8.51	1	-0.11	66.70	3	0.61	19.54	1	-0.43													
361	8.58	1	0.29	65.20	2	-1.23	19.51	1	-0.75													
363	8.54	1	0.05	66.35	1	0.18	19.55	1	-0.32					23.39	1	0.12						
364	8.49	1	-0.23	65.52	2	-0.84	19.57	1	-0.10													
365	8.03	1	-2.93	65.66	2	-0.66	19.66	1	0.86					24.30	1	1.36	28.59	1	2.38			
366	8.72	1	1.11	66.60	3	0.49	19.59	1	0.10	0.21	2	-0.33										
368	8.52	1	-0.05	64.99	1	-1.49	19.77	1	2.05	0.24	2	0.67		21.68	1	-2.20	26.78	1	0.99			
369	8.65	1	0.70	65.97	4	-0.28	19.42	1	-1.72	0.34	2	4.04		23.94	1	0.87	25.27	1	-0.16			
370																						
371	7.69	1	-4.92	65.39	2	-1.00	19.59	1	0.10					21.61	1	-2.29	24.57	1	-0.69			
373																						
377	8.69	1	0.93	64.33	1	-2.31	19.68	1	1.07													
378	8.36	1	-0.99	66.50	3	0.37	19.49	1	-0.97	0.22	2	0.00		22.30	1	-1.35	26.70	1	0.93			
380	8.58	1	0.29	67.09	3	1.10	19.68	1	1.07	0.25	2	1.01		22.48	1	-1.11	25.57	1	0.06	15.3	1	-0.33
381				66.52	3	0.39																
382														23.65	2	0.48	28.03	2	1.95			
383	8.60	1	0.41	65.95	4	-0.30	19.55	1	-0.32													
384	8.55	1	0.11	66.63	4	0.53	19.53	1	-0.53													
385	8.54	1	0.05	64.46	1	-2.15	19.61	1	0.32	0.22	2	0.00		23.00	1	-0.40	25.32	1	-0.12			
386	8.37	1	-0.93				19.93	1	3.72	0.36	2	4.72		23.14	1	-0.21	26.24	1	0.58	16.0	1	0.84
387	8.15	1	-2.22	66.58	1	0.47	19.45	1	-1.40													
388				66.88	3	0.84																

注1：z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。

注2：各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液 吸収法	1 飼料分析基準	1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 その他	2 ホウ酸溶液 吸収法	2 その他	2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他
	3 燃焼法		3 その他			
	4 自動分析機					
	5 その他					
クエン酸モランテル						
No. 分析方法						
1 飼料分析基準						
2 その他						

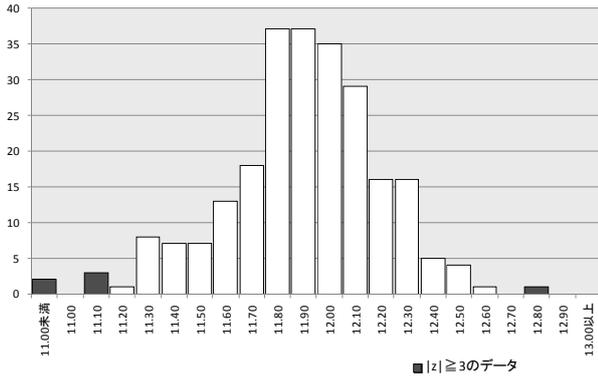


図1 水分の分析成績 (A 試料)

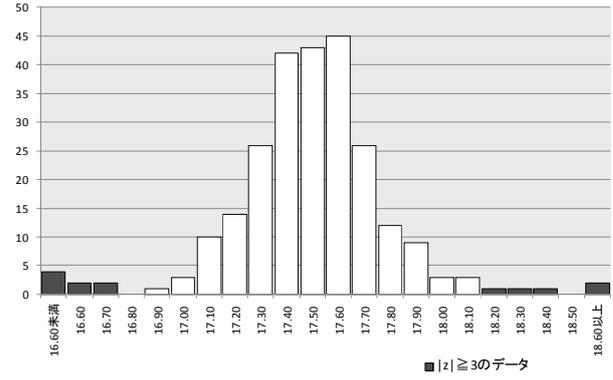


図2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

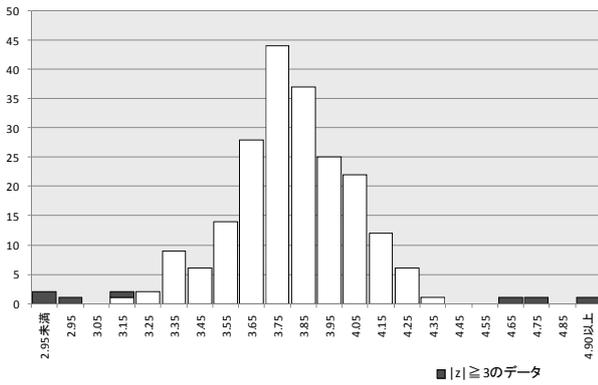


図3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

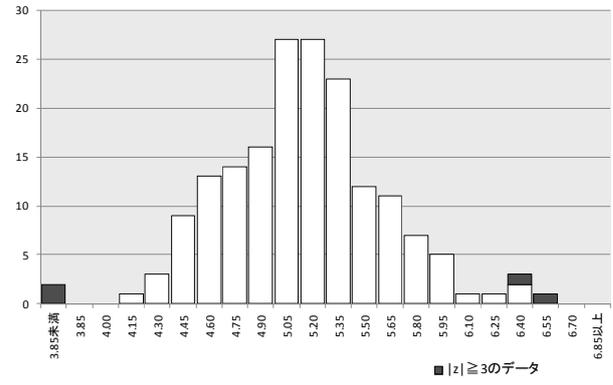


図4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

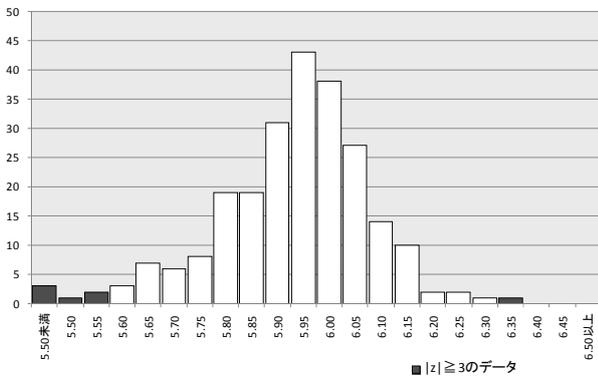


図5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

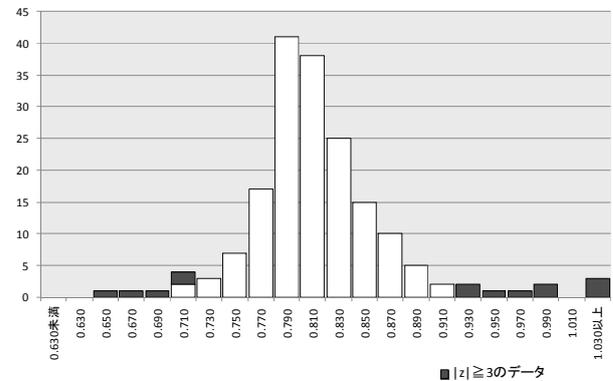


図6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

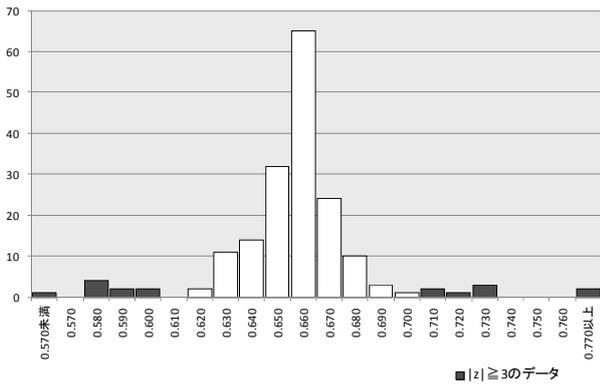


図7 リンの分析成績 (A 試料)

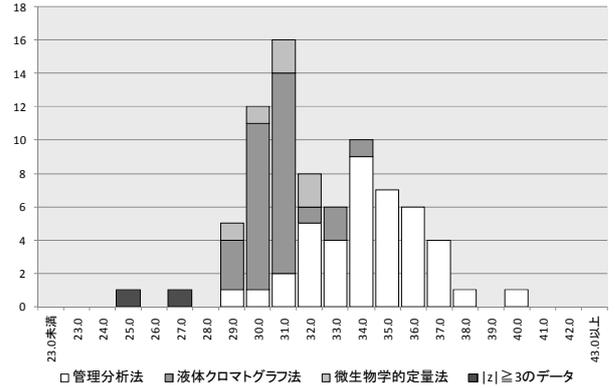


図8 モネンシナトリウムの分析成績 (A 試料)

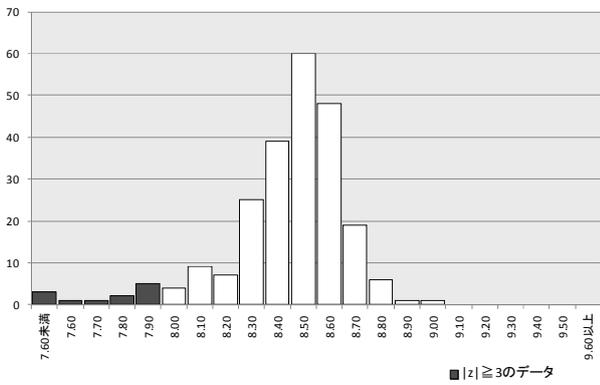


図9 水分の分析成績 (B 試料)

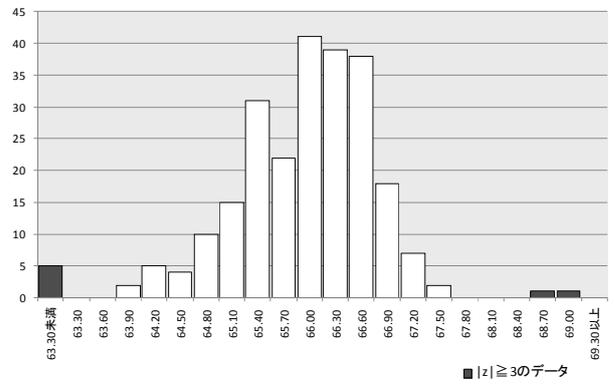


図10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

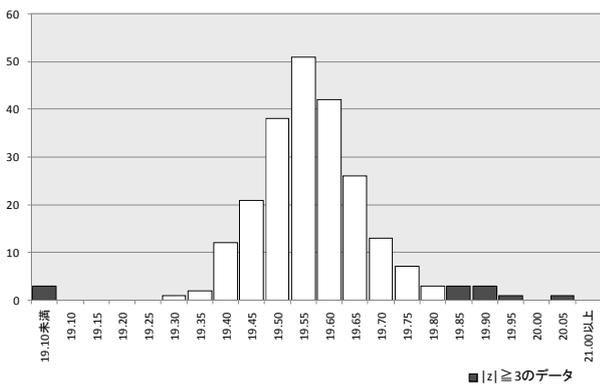


図11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

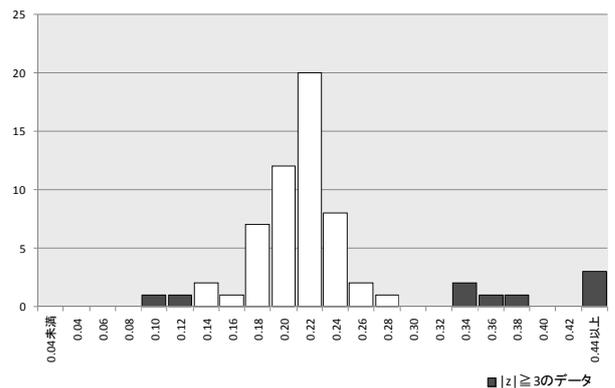


図12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

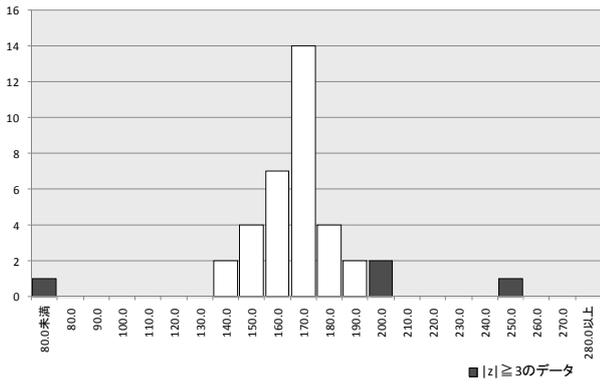


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

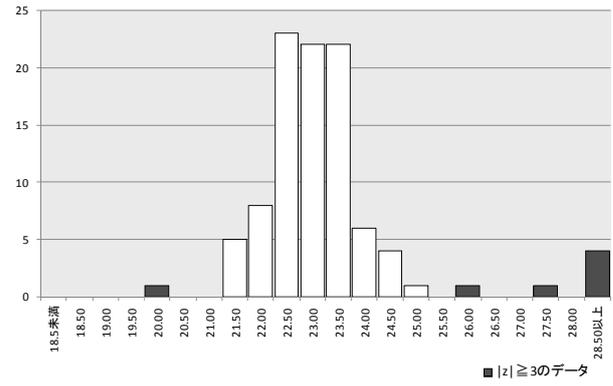


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

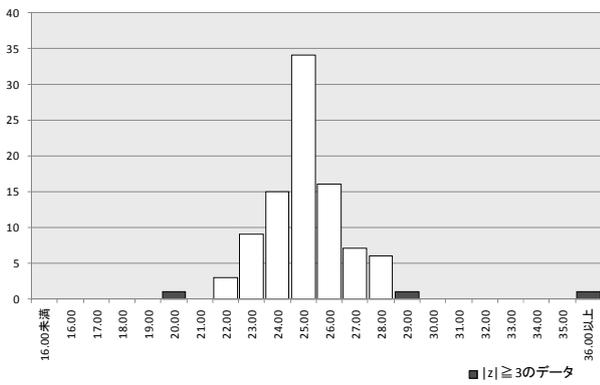


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

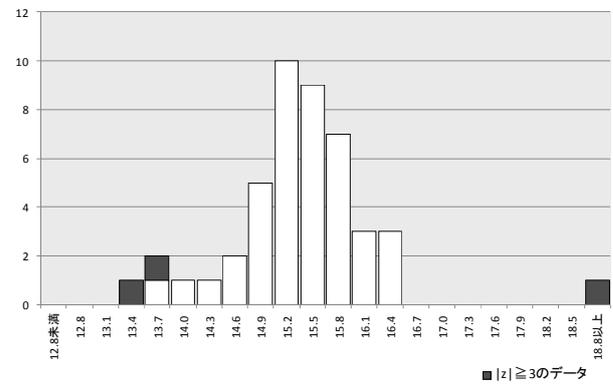


図 16 クエン酸モランテルの
分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	240	250	214	176	237
1 中央値	11.96	17.54	3.84	5.21	5.97
1 下限境界値 ^{注2}	11.22	16.94	3.21	4.00	5.59
1 上限境界値	12.69	18.14	4.47	6.42	6.35
2 平均值	11.96	17.55	3.85	5.21	5.96
2 95%信頼区間	11.92~11.99	17.52~17.57	3.82~3.88	5.15~5.28	5.94~5.98

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	MN(管理分析法) ^{注3} (g(力価)/トン)	MN(飼料分析基準) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	179	179	41	37
1 中央値	0.816	0.663	34.9	31.0
1 下限境界値 ^{注2}	0.717	0.622	28.9	27.2
1 上限境界値	0.915	0.704	40.9	34.8
2 平均值	0.817	0.661	34.8	31.2
2 95%信頼区間	0.811~0.822	0.659~0.663	34.1~35.4	30.8~31.5

注 1 区分 1 の数値は報告のあった分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の分析値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 MN (管理分析法) は、モネンシンナトリウムの迅速定量法及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 MN (飼料分析基準) は、モネンシンナトリウムの液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法を集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗灰分 (%)	カドミウム (g/トン)	エトキシキン (g/トン)
データ数	231	241	227	62	37
1 中央値	8.53	66.20	19.58	0.22	171.9
1 下限境界値 ^{注2}	8.02	63.78	19.30	0.13	144.1
1 上限境界値	9.04	68.62	19.86	0.31	199.7
2 平均值	8.52	66.12	19.58	0.22	170.7
2 95%信頼区間	8.50~8.54	66.03~66.21	19.57~19.59	0.21~0.22	166.9~174.5

注 1 区分 1 の数値は報告のあった分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の分析値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅 (g/kg)	亜鉛 (g/kg)	クエン酸モランテル (g/kg)
データ数	98	93	45
1 中央値	23.30	25.48	15.5
1 下限境界値 ^{注2}	21.09	21.57	13.7
1 上限境界値	25.50	29.39	17.3
2 平均値	23.22	25.54	15.5
2 95%信頼区間	23.07~23.36	25.26~25.82	15.3~15.7

注 1 区分 1 の数値は報告のあった分析値から算出した結果であり，区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の分析値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 原料別検出状況

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検出率 (%)	
		検 出			不検出		
		多量	中量	少量			計
とうもろこし	35	131	0	0	131	0	100
小麦	12	9	104	7	120	11	92
米ぬか	12	3	25	19	47	84	36
精白米	10	56	74	1	131	0	100
大豆油かす	8	12	96	14	122	9	93
ごま油かす	8	0	46	22	68	63	52
ビートパルプ	8	3	91	20	114	17	87
アルファルファミール	3	2	20	76	98	33	75
りん酸カルシウム	2	0	3	100	103	28	79
食塩	2	0	1	108	109	22	83

表 10 混合されたもの以外に検出と報告された原料

検出原料名	多量	中量	少量	計
あまに油かす	0	10	6	16
えん麦	0	1	0	1
大麦	1	10	6	17
カボック油かす	1	0	0	1
キャッサバ	0	2	1	3
魚粉	0	3	25	28
玄米	0	0	1	1
コーングルテンフィード	0	11	5	16
コーングルテンミール	0	1	0	1
小麦粉	0	2	0	2
サフラワー油かす	0	1	0	1
スクリーニングペレット	1	2	0	3
ゼオライト	0	0	3	3
炭酸カルシウム	0	0	28	28
チキンミール	0	1	13	14
なたね油かす	1	52	27	80
肉骨粉	0	0	3	3
フェザーミール	0	0	2	2
ふすま	0	10	4	14
ホミニーフード	0	1	1	2
マイロ	0	7	3	10
麦ぬか	0	1	2	3
綿実油かす	0	1	1	2
やし油かす	0	0	8	8
ライ麦	0	1	1	2

8 まとめ

8.1 A 試料 (幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料)

1) 水分

240 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 6 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 11.96 %、95 %信頼区間は 11.92~11.99 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、235 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 6 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 11.96 %、0.27 %及び 2.2 %であった。

その他の方法 (定温乾燥機以外の機器を用いた場合、定温乾燥機を用いたが加熱温度、時間が飼料分析基準の条件と異なる場合、NIR による測定等) による分析値が 5 件報告された。

2) 粗たん白質

250 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 13 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 17.55 %、95 %信頼区間は 17.52~17.57 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では、28 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.43 %、0.33 %及び 1.9 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では、46 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.56 %、0.24 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、78 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.62 %、0.21 %及び 1.2 %であった。

自動分析機を使用した試験では、98 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.50 %、0.18 %及び 1.0 %であった。

3) 粗脂肪

214 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 7 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 3.85 %、95 %信頼区間は 3.82~3.88 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、146 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.90 %、0.20 %及び 5.2 %で

あった。

自動分析機を使用した試験では、68 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 6 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.74 %、0.19 %及び 5.1 %であった。

4) 粗繊維

176 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 4 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 5.21 %、95 %信頼区間は 5.15~5.28 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法による試験では、23 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.10 %、0.35 %及び 6.9 %であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、101 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 4 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.07 %、0.39 %及び 7.7 %であった。

自動分析機を使用した試験では、48 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.48 %、0.30 %及び 5.5 %であった。

その他の方法（自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法）による分析値が 4 件報告された。

5) 粗灰分

237 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 7 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 5.96 %、95 %信頼区間は 5.94~5.98 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、232 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 7 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.96 %、0.13 %及び 2.2 %であった。

その他の方法（加熱方法、時間が飼料分析基準の条件と異なる方法、自動分析装置による測定等）による分析値が 5 件報告された。

6) カルシウム

179 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 14 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 0.817 %、95 %信頼区間は 0.811~0.822 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・シュウ酸アンモニウム法による試験では、35 件の分析値 (z -スコアの絶対値

が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.835 %, 0.072 %及び 8.6 %であった.

飼料分析基準・原子吸光光度法による試験では, 135 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 8 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.814 %, 0.031 %及び 3.8 %であった.

その他の方法 (ICP による測定, キレート滴定法等) による分析値が 9 件報告された.

7) リン

179 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 17 件であった. これらの分析値を除いた平均値は 0.661 %, 95 %信頼区間は 0.659~0.663 %であった.

なお, 分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め, その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は, 以下のとおりであった.

飼料分析基準による試験では, 173 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 14 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.661%, 0.014 %及び 2.1 %であった.

その他の方法 (ICP による測定, モリブデン青吸光光度法等) による分析値が 6 件報告された.

8) モネンシンナトリウム

今回の試験では, モネンシンナトリウム無添加試料を配布しておらず, そのブランク値を差し引くことができないことから, 管理分析法である迅速定量法及びフローインジェクション法による分析結果と飼料分析基準である液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法による分析結果との間に差が生じるおそれがあるため, これらをを分離して集計することとした.

管理分析法 (迅速定量法及びフローインジェクション法) による試験では, 41 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値はなかった. その平均値は 34.8 g(力価)/トン, 95 %信頼区間が 34.1~35.4 g(力価)/トンであった.

飼料分析基準 (液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法) による試験では, 37 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件であった. これらの分析値を除いた平均値は 31.2 g(力価)/トン, 95 %信頼区間は 30.8~31.5 g(力価)/トンであった.

なお, 分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め, その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は, 以下のとおりであった.

管理分析法・迅速定量法による試験では, 29 件の分析値が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 34.2 g(力価)/トン, 2.2 g(力価)/トン及び 6.3 %であった.

管理分析法・フローインジェクション法による試験では, 12 件の分析値が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 36.1 g(力価)/トン, 1.5 g(力価)/トン及び 4.3 %であった.

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法による試験では, 31 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 31.0

g(力価)/トン, 1.0 g(力価)/トン及び 3.3 %であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法による試験では, 6 件の分析値が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 31.4 g(力価)/トン, 1.0 g(力価)/トン及び 3.3 %であった。

8.2 B 試料 (魚粉)

1) 水分

231 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 12 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 8.52 %, 95 %信頼区間は 8.50~8.54 %であった。

なお, 分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め, その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は, 以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では, 226 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 11 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 8.52 %, 0.17 %及び 2.0 %であった。

その他の方法 (定温乾燥機以外の機器を用いた場合, 定温乾燥機を用いたが加熱温度, 時間が飼料分析基準の条件と異なる場合, NIR による測定等) による分析値が 5 件報告された。

2) 粗たん白質

241 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 7 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 66.12 %, 95 %信頼区間は 66.03~66.21 %であった。

なお, 分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め, その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は, 以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では, 27 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 1 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.55 %, 0.96 %及び 1.5 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では, 44 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.93 %, 0.73 %及び 1.1 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では, 78 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 5 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 66.69 %, 0.43 %及び 0.60 %であった。

自動分析機を使用した試験では, 92 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件) が報告され, その平均値, 標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.95 %, 0.50 %及び 0.80 %であった。

3) 粗灰分

227 件の分析値の報告があり, ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 11 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 19.58 %, 95 %信頼区間は 19.57~19.59 %であった。

なお, 分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め, その絶対値が 3 以上の分析値を除

いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、221件の分析値（ z -スコアの絶対値が3以上の分析値は8件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ19.59%、0.09%及び0.50%であった。

その他の方法（加熱方法、時間が飼料分析基準と異なる方法、自動分析装置による測定等）による分析値が6件報告された。

4) カドミウム

62件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上の分析値は9件であった。これらの分析値を除いた平均値は0.22 g/トン、95%信頼区間は0.21~0.22 g/トンであった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が3以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法による試験では、17件の分析値（ z -スコアの絶対値が3以上の分析値3件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ0.23 g/トン、0.02 g/トン及び9.5%であった。

飼料分析基準・簡易法による試験では、42件の分析値（ z -スコアの絶対値が3以上の分析値は6件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ0.21 g/トン、0.03 g/トン及び12.1%であった。

その他の方法（ICPによる測定）による分析値が3件報告された。

5) エトキシキン

37件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上の分析値は4件であった。これらの分析値を除いた平均値は170.7 g/トン、95%信頼区間は166.9~174.5 g/トンであった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（液体クロマトグラフ法）による試験であった。その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ11.1 g/トン及び6.5%であった。

8.3 D 試料（子豚育成用プレミックス）

1) 銅

98件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上の分析値は7件であった。これらの分析値を除いた平均値は23.22 g/kg、95%信頼区間は23.07~23.36 g/kgであった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が3以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、94件の分析値（ z -スコアの絶対値が3以上の分析値は6件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ23.22 g/kg、0.71 g/kg 及び3.1%であった。

その他の方法（ICPによる測定等）による分析値が4件報告された。

2) 亜鉛

93 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 25.54 g/kg, 95 %信頼区間は 25.26~25.82 g/kg であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を除いて解析した結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、89 件の分析値 (z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 25.52 g/kg, 1.36 g/kg 及び 5.3 %であった。

その他の方法 (ICP による測定等) による分析値が 4 件報告された。

3) クエン酸モランテル

45 件の分析値の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値は 3 件であった。これらの分析値を除いた平均値は 15.5 g/kg, 95 %信頼区間は 15.3~15.7 g/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準 (液体クロマトグラフ法) による試験であった。その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.60 g/kg 及び 3.8 %であった。

8.4 C 試料 (鑑定用試料)

鑑 定

10 種類の混合された原料の検出とその混合割合の推定を行うこととした。131 試験室より報告があり、混合した 10 種類の他に 25 種類の原料が報告された。

混合した原料について、とうもろこし (混合割合 35 %) では、131 試験室 (検出率 100 %) から報告があり、全ての試験室から多量 (15 %以上, 以下同じ。) と報告した。

小麦 (混合割合 12 %) では、120 試験室 (検出率 92 %) から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 9, 中量 (5 %以上~15 %未満, 以下同じ。) と報告した試験室が 104, 少量 (1 %以上~5 %未満, 以下同じ。) と報告した試験室が 7 であった。

米ぬか (混合割合 12 %) では、47 試験室 (検出率 36 %) から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 3, 中量と報告した試験室が 25, 少量と報告した試験室が 19 であった。

精白米 (混合割合 10 %) では、131 試験室 (検出率 100 %) から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 56, 中量と報告した試験室が 74, 少量と報告した試験室が 1 であった。

大豆油かす (混合割合 8 %) では、122 試験室 (検出率 93 %) から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 12, 中量と報告した試験室が 96, 少量と報告した試験室が 14 であった。

ごま油かす (混合割合 8 %) では、68 試験室 (検出率 52 %) から報告があり、その内訳は中量と報告した試験室が 46, 少量と報告した試験室が 22 であった。

ビートパルプ (混合割合 8 %) では、114 試験室 (検出率 87 %) から報告があり、その内

訳は多量と報告した試験室が 3, 中量と報告した試験室が 91, 少量と報告した試験室が 20 であった.

アルファルファミール (混合割合 3 %) では, 98 試験室 (検出率 75 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 2, 中量と報告した試験室が 20, 少量と報告した試験室が 76 であった.

りん酸カルシウム (配合割合 2 %) では, 103 試験室 (検出率 79 %) から報告があり, その内訳は中量と報告した試験室が 3, 少量と報告した試験室が 100 であった.

食塩 (混合割合 2 %) では, 109 試験室 (検出率 83 %) から報告があり, その内訳は中量と報告した試験室が 1, 少量と報告した試験室が 108 であった.

誤って検出したものについては, なたね油かすが最も多く, 80 試験室から報告があった. 次いで, 魚粉及び炭酸カルシウムが 28 試験室, 大麦が 17 試験室, あまに油かす及びコーングルテンフィードが 16 試験室の順で多く報告された.

文 献

- 1) Michael Thompson, Stephen L.R.Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, Pure Appl. Chem., 78(1), 145-196 (2006).

(参考)

平成 24 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

1. 目的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物製造等業者、民間分析機関等を対象に飼料等の共通試料による分析鑑定を行い、分析及び鑑定技術の維持向上を図り、併せて分析誤差を把握し、飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

2. 共通試料の内容

A 試料…幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用配合飼料

B 試料…魚粉

C 試料…鑑定用飼料原料混合試料

D 試料…子豚育成用プレミックス

3. 分析鑑定項目

A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン及びモネンシナトリウム

B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定

D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

4. 分析鑑定要領

(1) 試料の分析鑑定方法は、「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)に定める方法及び「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」(昭和 60 年 10 月 15 日付け 60 畜 B 第 2928 号農林水産省畜産局長、水産庁長官通知)の〔別記〕サリノマイシンナトリウム又はモネンシナトリウムを含む牛用飼料の管理方法に準拠してください。

なお、参考までにこれらの分析法の抜粋(飼料分析基準等(抜粋))を添付します。

また、各分析法の末尾に、試料採取量等の一例を記載しましたので、参考として下さい。

(2) 上記 3 に示した分析鑑定項目のうち、各試験室において実施可能な項目(全項目でなくても可)について分析及び鑑定を行い、報告してください。

(3) B 試料のエトキシキンの分析に用いる標準品は、今回配布したものを使用してください。(当該標準品は冷蔵庫に保管してください。)

(4) 共通試料は冷蔵庫に保管し、使用する際には、常温に戻してください。

(5) 複数の分析法(例えば、粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法)によって分析した場合は、それぞれの分析値を報告してください。

5. 分析鑑定成績の報告

(1) 各分析値及び鑑定結果については、別添の「第 37 回飼料等の共通試料による分析鑑定結果

報告書」に記入し、報告してください。

- (2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、モネンシナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kgで、カドミウム、エトキシキンについてはg/トンの単位で表記してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は、小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、モネンシナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析法及び用いた分析機器等は、備考欄の該当番号に○印を付し、その詳細を報告書様式に従い、記入してください。

また、分析上の特記事項等があれば、その旨も記入してください。

水分について、定温乾燥機を用いて飼料分析基準の条件により測定した場合には、「1. 飼料分析基準」を選択してください。定温乾燥機以外の機器を用いた場合や、定温乾燥機を用いたが、加熱温度、時間が飼料分析基準の条件と異なる場合は、「2. その他の方法」を選択し、用いた機器のメーカー、測定条件等の詳細を記入してください。

なお、クエン酸モランテル、エトキシキン及びモネンシナトリウム（液体クロマトグラフ法）を分析した場合には、標準液及び試料溶液のクロマトグラム各1葉を添付してください。

- (3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書（4）の下欄の検出原料名の選択肢から選んで検出原料名欄に記入し、推定される混合割合は、多量（15%以上）、中量（5%以上15%未満）及び少量（1%以上5%未満）の欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出原料名欄には記入しないでください。なお、C試料には10種類の原料を混合しています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。（複数回答可）

- (4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、その試験室名を備考欄に記入してください。
(5) 報告書の提出期限及び送付先

各地方管轄の独立行政法人農林水産消費安全技術センターにお問い合わせください。

飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書 (様式)

試験室名

担当者

TEL

(1) A 試料 分析成績

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析機 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗脂肪	(%)	1. 飼料分析基準 2. 自動分析機 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ()
粗繊維	(%)	1. 飼料分析基準 (静置法) 2. 飼料分析基準 (ろ過法) 3. 自動分析機 (メーカー) (型式) 4. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
カルシウム	(%)	1. 飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2. 飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3. その他の方法 ()
リン	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
モネンシン ナトリウム	(g(カ匁)/トン)	1. 迅速定量法 2. 迅速定量法 (フローインジェクション法) 3. 液体クロマトグラフ法 (g(カ匁)/トン) LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μ m) 4. 微生物学的定量法 (g(カ匁)/トン)

(2) B試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析装置 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
カドミウム	(g/ト)	1. 飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2. 飼料分析基準 (簡易法) 3. その他の方法 ()
エトキシキン	(g/ト)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(3) D試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
亜鉛	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(4) C 試料 鑑定成績

試料番号 _____

検出原料名	混合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満
 注) 10 種類の原料を混合しています。

検出原料名の選択肢

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか	ビールかす	コーングルテンフィード
スクリーニングペレット	ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす	大豆油かす
カポック油かす	肉骨粉	フェザーミール	チキンミール	魚粉
アルファルファミール	ビートパルプ	かに殻粉末	かき殻	ゼオライト
食塩	炭酸カルシウム	リン酸カルシウム		

(5) 来年度の実施項目等「飼料等の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等
 があれば記入してください。(別紙でも可)

調査資料**1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（平成 24 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（飼料安全法）第 3 条第 1 項の規定に基づき、飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物（家畜等に係る生産物）の生産が阻害されることを防止する見地から、飼料中の有害物質、病原微生物等に対し、農林水産省令及び関係通知で、飼料等の成分規格、飼料中の有害物質の基準値等が定められている。

（独）農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、飼料中の有害物質等の成分規格、基準値等への適合状況のモニタリング、さらに成分規格、基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下、「モニタリング等」という。）を実施している。今回、平成 24 年度に実施したこれらの結果をモニタリング等の結果として取りまとめたので報告する。

2 方 法**2.1 試 料**

FAMIC 肥飼料安全検査部、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターが、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、平成 24 年 4 月から平成 25 年 3 月までに、各管内の飼料原料工場、配合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施し、その際に採取した飼料等を対象とした。

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表 1 に示した。

2.2 モニタリング等の対象成分

モニタリング等の対象成分の選定にあたっては、飼料原料は、原産国、過去の検出実態等を、また、配混合飼料は、使用原料、対象家畜等を考慮した。

1) 有害物質**i かび毒及びエンドファイト産生毒素（20 成分）****ア 指導基準値又は暫定許容値が設定されている 3 成分****① アフラトキシン B₁**

「飼料の有害物質の指導基準の制定について」（昭和 63 年 10 月 14 日付け 63 畜 B 第 2050 号農林水産省畜産局長通知）で指導基準値が設定されている配混合飼料及びこれに汚染されている可能性がある飼料原料を対象とした。

② デオキシニバレノール

「飼料中のデオキシニバレノールについて」（平成 14 年 7 月 5 日付け 14 生畜第 2267 号農林水産省生産局畜産部飼料課長通知）で暫定許容値が設定されている家畜等用飼料及びこれに汚染されている可能性がある飼料原料を対象とした。

③ ゼアラレノン

「ゼアラレノンの検出について」（平成 14 年 3 月 25 日付け 13 生畜第 7269 号農林水産省生産局畜産部飼料課長通知）で暫定許容値が設定されている家畜用飼料及びこれに汚染されている可能性のある飼料原料を対象とした。

イ その他 17 成分

アのかび毒 3 成分以外で、「飼料分析基準の制定について」（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）に分析法が収載されている以下のかび毒 15 成分及びエンドファイト産生毒素 2 成分を対象とした。

かび毒：アフラトキシン B₂, G₁ 及び G₂, ステリグマトシスチン, T-2 トキシン, ネオソラニオール, ニバレノール, 3-アセチルデオキシニバレノール, 15-アセチルデオキシニバレノール, フザレノン-X, フモニシン B₁, B₂ 及び B₃, オクラトキシン A 並びにシトリニン

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

ii 重金属（4 成分）

指導基準値が設定されている飼料中のカドミウム, 鉛, 水銀及びヒ素を対象とした。

iii 農薬（143 成分）

ア 飼料中の基準値等が設定されている 40 成分

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 日付け農林省令第 35 号. 以下「成分規格等省令」という.）別表第 1 の 1 の (1) に省令基準値が設定されている農薬のうちの 40 成分を対象とした。

イ その他 103 成分

アの農薬 40 成分以外で、飼料分析基準に分析法が収載されている農薬のうちの 103 成分を対象とした。

iv その他の有害物質（4 成分）

飼料中に含まれる又は意図的に混入されて問題となった以下の有害物質 4 成分を対象とした。

なお、メラミンについては、平成 24 年 4 月 9 日付けで指導基準値（尿素を除く飼料（飼料原料を含む.）：2.5 mg/kg）が新たに追加されている。

ア 硝酸態窒素

イ 亜硝酸態窒素

ウ メラミン

エ ヒスタミン

2) BSE 発生防止に係る試験

i 動物由来たん白質の混入確認

成分規格等省令別表第 1 の 2 に規定された牛等を対象とする飼料, 動物由来たん白質又は動物由来たん白質を原料とする飼料中のほ乳動物等由来たん白質を対象とした。

表 1 モニタリング等を実施した試料及び点数（続き）

モニタリング等の対象試料		項目別の試料点数												
		有害物質					BSE発生防止に係る試験			病原微生物				
		かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	メラミン	動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ		
顕微鏡鑑定	ELISA試験							PCR試験						
種類	点数													
動物質性飼料	魚粉	91		29			8	16	91	91	91		63	
	チキンミール	29		1					29	29	29		21	
	フェザーミール	20							20	20	20		14	
	豚肉骨粉	2		2						2	2		2	
	原料混合肉骨粉	27		1						27	27		20	
	豚血しょうたん白	1							1	1	1			
	酵素処理魚抽出物	3							3	3	3		1	
	サバすり身	1							1	1	1		1	
	カニ殻粉末	1							1	1	1			
	ホタテ抽出物	1							1	1	1			
小計	176		33				8	16	147	176	176		122	
乾牧草	アルファルファ	11			11								9	
	スーダングラス	14			14								13	
	チモシー	9			9									
	オーツヘイ	10			10									
	クレイングラス	2			2									
	バミューダグラス	2			2									
	ライグラス	1	1		1									
	稲わら	2		2										
	大麦わら	1			1									
ウイートヘイ	2			2										
小計	54	1	2	52								22		
その他	海藻ミール	1							1	1	1			
	菓子くず	1	1		1									
	タビオカ澱粉	1	1											
	パイナップルかす	2	1		1									
	ビートパルプ	1			1									
	フミン酸	1							1	1	1			
	複合製剤	1							1	1	1			
	動物性油脂	74											74	
	特定動物性油脂	1											1	
小計	83	3		3					3	3	3		75	
合計	1,146	496	189	495	22	8	29		392	387	387		75	304

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物分析用試料

試料は、「飼料等検査実施要領の制定について」（昭和 52 年 5 月 10 日付け 52 畜 B 第 793 号農林省畜産局長通知）により、採取、保管した。なお、牧草は、「飼料中の農薬の検査について」（平成 18 年 5 月 26 日付け 18 消安第 2322 号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知）により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第 2 章の規定により、調製した。

2) 動物由来たん白質等分析用試料

試料は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定により、採取、保管及び調製した。

3) 不溶性不純物分析用試料

基準油脂分析試験法の試料採取方法¹⁾に準拠し、次の方法により採取した。

動物性油脂を積み込んだタンクローリー車の上部のふたを開け、ポンプサンプラー（容量約 300 mL）を用いてハッチの上部、中部及び下部の 3 箇所から動物性油脂を採取し、これらを混合、かくはんして試料とした²⁾。

2.4 分析方法

1) 有害物質

i かび毒及びエンドファイト産生毒素

飼料分析基準第 5 章に規定された方法による。

ii 重金属

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法による。

iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法による。

iv 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 に規定された方法による。

v メラミン

飼料分析基準第 7 章 7.1 に規定された方法による。

vi ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5.1 に規定された方法による。

2) 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

以下の 3 法を併用して実施した。なお、混入確認の結果は、「牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いについて」（平成 14 年 11 月 8 日付け農林水産省生産局畜産部飼料課課長補佐（検査指導班担当）事務連絡）の判定手順（例）（以下「混入確認判定手順」という。）に基づき、総合的に判定した。

i 顕微鏡鑑定

「反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について」（平成 13 年 6 月 1 日付 13 生畜第 1366 号）の別紙「配合飼料工場における肉骨粉等の鑑定方法について」に基づき、図 1 の方法により、肉骨粉由来組織断片の有無を確認した。

ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の (3)に規定された方法による。

iii PCR 試験

魚粉等及び牛用配混合飼料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により、ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。チキンミール等、ポークミール等及び輸入飼料の一部は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により、反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により、乳製品等除去処理を行った後、上記試験を実施した。

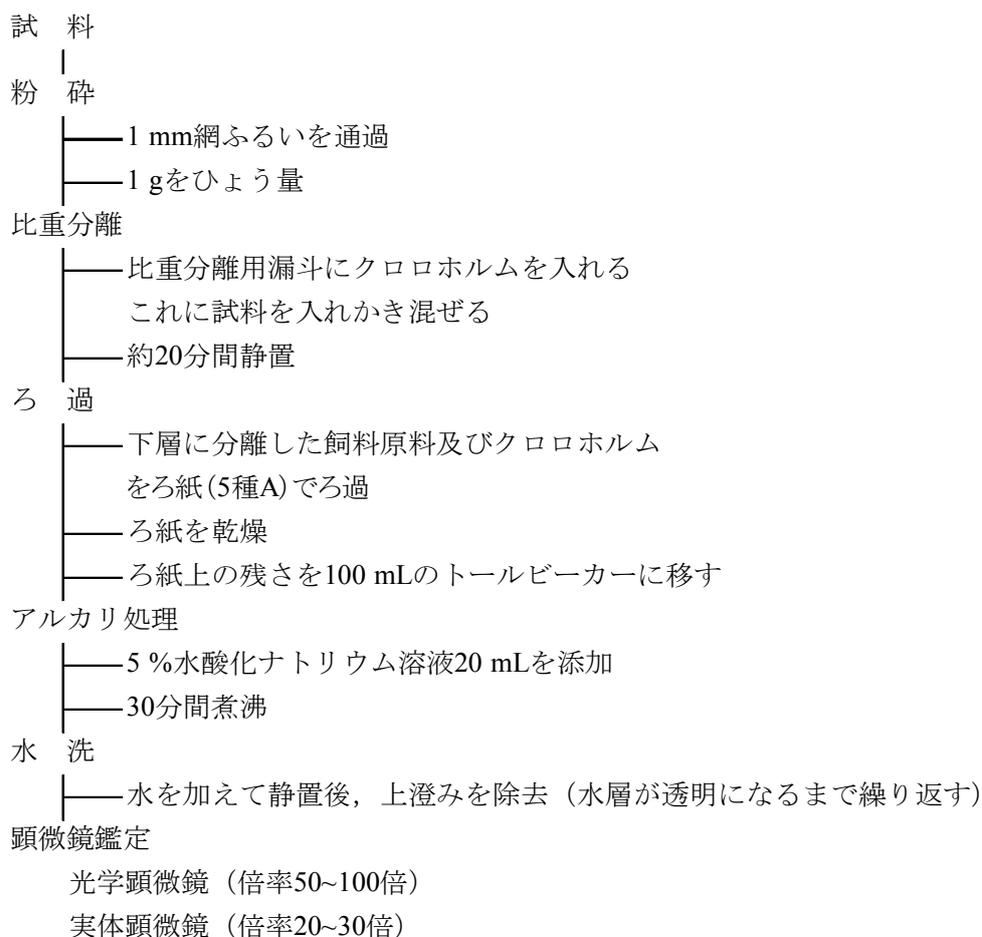


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の (1) のアに規定された方法による。

4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法による。なお、分離したサルモネラは、血清型別を実施した。

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

指導基準値等が設定されているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを含む、計 20 成分について 5,392 点のモニタリング等を実施した。

指導基準値等が設定されている 3 成分のモニタリング等の結果を表 2-1 に、指導基準値等のないかび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング等の結果を表 2-2 に示した。各かび毒の検出状況は、以下のとおりであった。

i) アフラトキシン B₁

配混合飼料 247 点中 108 点（検出率 43.7 %）から検出され、指導基準値を超えるものはなかった。

原料では、基準値等は設定されていないが、とうもろこしの検出率が 62.7 %と例年より高い傾向にあった。検出されたものの最大値は 0.024 mg/kg と平成 23 年度（最大値 0.013 mg/kg）より高かった。

また、とうもろこしの副産原料における検出率は、例年と同程度であった。とうもろこしの副産原料以外の原料では、やし油かす（インドネシア産）1 点から高濃度（0.048 mg/kg）に検出された。東南アジア等の熱帯、亜熱帯産原料を使用する際には留意が必要である。

ii デオキシニバレノール

家畜等用配混合試料 247 点中 221 点（検出率 89.5%）から検出され、暫定許容値を超えるものはなかった。

原料では、基準値等は設定されていないが、とうもろこしの検出率が 92.6%と、平成 23 年度同様に高かったが、定量値は低い結果となった。しかし、とうもろこしの副産原料の一部で、定量値の高いものがあり、1.0 mg/kg を超えて検出されたものがコーングルテンフィードで 17 点（最大値 2.9 mg/kg）、DDGS で 8 点（最大値 3.8 mg/kg）、DDG で 1 点（最大値 2.1 mg/kg）あった。これらの原料を使用する際には留意が必要である。

上記以外では、特に小麦の検出率が 60.0 %（最大値 0.23 mg/kg）及びその副産原料のふすまの検出率が 100 %（最大値 1.0 mg/kg）と高かった。

iii ゼアラレノン

家畜用配混合飼料 166 点中 159 点（検出率 95.8 %）から検出され、例年と同様に高い検出率であったが、暫定許容値を超えるものはなく最大値は乳用牛飼育用で 0.14 mg/kg であった。

原料では、とうもろこし及びその副産原料で検出率が高く、特にコーングルテンミールは検出率が 100 %で、24 mg/kg 検出されたものがあった。また、コメ副産原料は、点数が少なく、また定量値が低いものの検出率は 100 %となっており、今後注視していく必要がある。

表2-1 基準値が設定されているかび毒のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象試料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 0.0002 mg/kg)				デオキシニバレノール (検出下限 0.01 mg/kg)				ゼアラレノン (検出下限 0.0003 mg/kg)									
	指導基準値 (mg/kg)	モニタリング点数	検出率 (%)	うち検出されたもの 最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	モニタリング点数	検出率 (%)	うち検出されたもの 最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	モニタリング点数	検出率 (%)	うち検出されたもの 最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)					
配合飼料 (表外に示す飼料*)	0.01	79	49.4	0.008	0.0011	1	152	129	84.9	0.57	0.14	1	166	159	95.8	0.14	0.016	
配合飼料 (上記以外の飼料)	0.02	168	69	41.1	0.006	0.0012	4	95	92	96.8	0.51	0.22	—	81	78	96.3	0.98	0.041
とうもろこし	—	59	37	62.7	0.024	0.0040	—	54	50	92.6	0.53	0.18	—	54	53	98.2	0.073	0.018
コーングルテンフィード	—	26	15	57.7	0.004	0.0013	—	26	26	100.0	2.9	1.4	—	26	26	100.0	0.14	0.065
DDG	—	2	2	100.0	0.002	0.0012	—	2	2	100.0	2.1	1.4	—	2	2	100.0	0.094	0.081
DDGS	—	19	7	36.8	0.003	0.0009	—	19	19	100.0	3.8	1.1	—	19	18	94.7	0.21	0.077
コーングルテンミール	—	12	7	58.3	0.006	0.0023	—	12	12	100.0	0.69	0.18	—	12	12	100.0	24	2.1
マイロ	—	3	—	—	—	—	—	3	3	100.0	0.090	0.070	—	3	3	100.0	0.022	0.011
小麦 (小麦粉、米粉含む)	—	10	—	—	—	—	—	10	6	60.0	0.23	0.086	—	10	6	75.0	0.004	0.0022
ふすま	—	15	1	6.7	0.0008	0.0008	—	15	15	100.0	1.0	0.40	—	15	13	86.7	0.005	0.0024
大麦 (胚・大麦含む)	—	15	1	6.7	0.0006	0.0006	—	15	6	40.0	0.13	0.072	—	15	6	40.0	0.005	0.0024
麦ぬか	—	2	—	—	—	—	—	2	2	100.0	0.38	0.29	—	2	2	100.0	0.023	0.019
えん麦	—	2	—	—	—	—	—	2	1	50.0	0.18	0.18	—	2	—	—	—	—
大豆 (きな粉を含む)	—	3	—	—	—	—	—	3	2	66.7	0.027	0.023	—	3	2	66.7	0.065	0.035
大豆油かす	—	25	9	36.0	0.001	0.0007	—	25	3	12.0	0.17	0.071	—	25	13	52.0	0.010	0.0023
大豆皮	—	2	1	50.0	0.0008	0.0008	—	2	1	50.0	0.030	0.030	—	2	1	50.0	0.009	0.009
米ぬか	—	1	—	—	—	—	—	1	1	100.0	0.21	0.21	—	1	1	100.0	0.090	0.090
脱脂ぬか	—	6	—	—	—	—	—	6	1	16.7	0.058	0.058	—	6	5	83.3	0.019	0.0082
なたね油かす	—	8	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	—	8	1	12.5	0.0004	0.0004
やし油かす	—	1	1	100.0	0.048	0.048	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
ごま油かす	—	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	2	2	100.0	0.003	0.0025
葉子くず	—	1	—	—	—	—	—	1	1	100.0	0.018	0.018	—	1	—	—	—	—
パイナップルかす	—	1	1	100.0	0.001	0.0010	—	1	1	100.0	0.36	0.36	—	1	1	100.0	0.005	0.005
タピオカ澱粉	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
計	—	463	190	41.0	—	—	—	458	373	81.4	—	—	—	458	404	88.2	—	—

*) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。
 アフラトキシンB₁：幼すう用、プロイラー前期用、ほ乳期子豚用、ほ乳期子牛用、乳用牛用
 デオキシニバレノール：家畜等 (鶏用、豚用、牛用 (生後3ヶ月以上の牛を除く))
 ゼアラレノン：家畜 (豚用、牛用)

表 2-2 基準値等がないかび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	(検出下限)	モニタリング等点数	うち検出されたもの			
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
アフラトキシンB ₂	(0.0002 mg/kg)	463	43	9.3	0.003	0.0009
アフラトキシンG ₁	(0.0002 mg/kg)	463	14	3.0	0.008	0.0016
アフラトキシンG ₂	(0.0002 mg/kg)	463	16	3.5	0.004	0.0009
ステリグマトシスチン	(0.0003 mg/kg)	458	164	35.8	0.033	0.0011
T-2トキシシン	(0.002 mg/kg)	458	213	46.5	0.086	0.008
ネオソラニオール	(0.002 mg/kg)	458	42	9.2	0.21	0.017
フザレノン-X	(0.02 mg/kg)	458	20	4.4	0.14	0.060
ニバレノール	(0.02 mg/kg)	458	71	15.5	1.3	0.16
3-アセチルデオキシニバレノール	(0.01 mg/kg)	9	0			
15-アセチルデオキシニバレノール	(0.01 mg/kg)	9	7	77.8	0.12	0.052
フモニシンB ₁	(0.0006 mg/kg)	80	77	96.3	4.9	0.49
フモニシンB ₂	(0.0006 mg/kg)	80	76	95.0	1.5	0.17
フモニシンB ₃	(0.0006 mg/kg)	80	75	93.8	0.65	0.074
オクラトキシンA	(0.002 mg/kg)	60	5	8.3	0.031	0.013
シトリニン	(0.007 mg/kg)	14	2	14.3	0.070	0.039
エルゴバリン	(0.01 mg/kg)	1	1	100.0	0.057	0.057
ロリトレムB	(0.01 mg/kg)	1	1	100.0	0.20	0.20

2) 重金属

指導基準値があるカドミウム、鉛、水銀及びヒ素について配合飼料 154 点、魚粉 29 点、チキンミール等（チキンミール、豚肉骨粉、原料混合肉骨粉）4 点、稲わら 2 点のモニタリング等を実施し、その結果を表 3 に示した。

各重金属の結果は、以下のとおりであった。

i) カドミウム

配合飼料 149 点中 58 点（検出率 38.9 %）から検出されたが、指導基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.29 mg/kg であった。

原料は、魚粉 29 点中 27 点（検出率 93.1%、最大値 1.9 mg/kg）、チキンミール等は 4 点中 1 点（検出率 25 %、最大値 0.04 mg/kg）からそれぞれ検出されたが、指導基準値を超えるものはなかった。

ii) 鉛

配合飼料 149 点中 23 点（検出率 15.4 %）から検出されたが、指導基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 1.6 mg/kg であった。

原料は、魚粉 29 点中 16 点（検出率 55.2 %、最大値 1.6 mg/kg）、チキンミール等 4 点中 1 点（検出率 25.0 %、最大値 0.3 mg/kg）からそれぞれ検出されたが、指導基準値を超えるものはなかった。

iii) 水銀

配合飼料 149 点中 64 点（検出率 43.0 %）から検出されたが、指導基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.22 mg/kg であった。

原料は、魚粉 29 点中 29 点（検出率 100 %、最大値 0.93 mg/kg）、チキンミール等 4 点中 1 点（検出率 25 %、最大値 0.01 mg/kg）からそれぞれ検出されたが、指導基準値を超えるも

のはなかった。

iv ひ素

配合飼料 15 点中 5 点（検出率 33.3 %，最大値 0.23 mg/kg）から，稲わらは 2 点全てから検出（最大値 6.0 mg/kg）されたが，指導基準値を超えるものはなかった。

表 3 重金属のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	指導基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	モニタリング等点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)		
				点 数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)	
カドミウム	1	配合飼料	149	58	38.9	0.29	0.03		
		小計	149	58	38.9	0.29			
	3	魚粉	29	27	93.1	1.9		0.71	
		チキンミール	1	0					
		原料混合肉骨粉	1	1	100.0	0.04		0.04	
		豚肉骨粉	2	0					
		小計	33	28	84.8	1.9		0.68	
	カドミウム 計		182	86	47.3				
	鉛	3	配合飼料	149	23	15.4		1.6	0.2
			小計	149	23	15.4		1.6	
7		魚粉	29	16	55.2	1.6	0.5		
		チキンミール	1	0					
		原料混合肉骨粉	1	1	100.0	0.3	0.3		
		豚肉骨粉	2	0					
		小計	33	17	51.5	1.6	0.5		
鉛 計		182	40	22.0					
水銀		0.4	配合飼料	149	64	43.0	0.22	0.01	
			小計	149	64	43.0	0.22		
	1	魚粉	29	29	100.0	0.93	0.31		
		チキンミール	1						
		原料混合肉骨粉	1	1	100.0	0.01	0.01		
		豚肉骨粉	2						
		小計	33	30	90.9	0.93	0.30		
	水 銀 計		182	94	51.6				
	ひ素	2	配合飼料	15	5	33.3	0.23		0.05
		7	稲わら	2	2	100.0	6.0		
ひ 素 計		17	7	41.2					

3) 農薬

農薬の残留の可能性のある飼料等 495 点に対し，省令基準値がある 40 成分及びその他の基準値等のない農薬 103 成分の計 143 成分について，56,400 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

農薬が省令基準値を超過して検出された飼料はなかった。

その他，基準値等を超過しなかったものの検出された主な農薬の結果は，以下のとおりであった。

i マラチオン

省令基準値のある原料について、穀類 3 種類 16 点及び牧草 52 点のモニタリング等を実施した結果、いずれも不検出であった。

また、配混合飼料を中心に基準値等のない飼料についても 379 点のモニタリング等を実施した結果、33 点から検出された。その内訳は、ふすま 39 点中 18 点（検出率 46.2 %，最大値 0.26 mg/kg），ふすま（小麦）を主原料とする牛用配合飼料 99 点中 12 点（検出率 12.1 %，最大値 0.063 mg/kg），その他の配合飼料 131 点中 3 点（検出率 2.3 %，最大値 0.086 mg/kg）であり、ふすま（小麦）を原料として使用する際には留意が必要である。

ii クロルピリホスメチル

省令基準値のある原料について、穀類 3 種類 16 点のモニタリング等を実施した結果、とうもろこし 1 点から 0.16 mg/kg 検出されたが、省令基準値をかなり下回る値であった。

また、配混合飼料を中心に基準値等のない飼料についても 431 点のモニタリング等を実施した結果、44 点から検出された。その内訳は、原料ではふすま 39 点中 10 点（検出率 25.6 %，最大値 0.45 mg/kg），コーングルテンフィード 11 点中 1 点（検出率 9.1 %，最大値 0.059 mg/kg）であった。配混合飼料は 230 点中 33 点（検出率 14.3 %）から検出され、最大値は大すう育成用で 0.24 mg/kg であった。

iii ピリミホスメチル

省令基準値のある原料について、穀類 3 種類 16 点のモニタリング等を実施した結果、とうもろこし 14 点中 5 点（検出率 35.7 %，最大値 0.48 mg/kg）から検出されたが、省令基準値を下回る数値であった。

また、配混合飼料を中心に基準値等のない飼料についても 431 点のモニタリング等を実施した結果、49 点から検出された。その内訳は、ふすま 39 点中 1 点（検出率 2.6 %，最大値 0.024 mg/kg），配混合飼料 230 点中 48 点（検出率 20.9 %）から検出され、最大値は牛数種用で 0.42 mg/kg であった。

iv フェニトロチオン

省令基準値のある原料について、穀類 3 種類 16 点及び牧草 52 点のモニタリング等を実施した結果、いずれも不検出であった。

また、配混合飼料を中心に基準値等のない飼料についても 379 点のモニタリング等を実施した結果、3 点から検出された。その内訳は、，麦ぬか 3 点中 1 点（検出率 33.3 %，最大値 0.051 mg/kg），配混合飼料 230 点中 2 点（検出率 0.9 %）から検出され、最大値は肉用牛肥育用で 0.29 mg/kg であった。

v プロピコナゾール

基準値等はないが、459 点（配混合飼料 230 点，飼料原料 229 点）についてモニタリング等を実施した結果、ふすま 37 点中 1 点（検出率 2.7 %），麦ぬか 3 点中 1 点（検出率 33.3 %），ライグラス 1 点中 1 点（検出率 100 %）から検出された。

vi その他の農薬

① 配混合飼料から検出されたもの

クロルピリホス，クロルプロファム，ジフェノコナゾール，フェンブコナゾール及びプロパルギット

② 原料から検出されたもの

カズサホス（オーツヘイ），クロルピリホス（アルファルファ，ふすま，きなこ），シハロトリン（アルファルファ），テブコナゾール（オーツヘイ），トリフルラリン（アルファルファ），フルトラニル（アルファルファ），ペンディメタリン（アルファルファ）及びメトミノストロビン（米ぬか油かす）

農薬については，有機リン系農薬の検出率が高いことから，とうもろこし，麦類及びその副産原料を中心に留意が必要である。また，牧草については，検出率は低いものの多種類の農薬が検出されており，幅広く留意が必要である。

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値のある成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	モニタリング等点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
BHC	配混合飼料	0.005	233	0				0.005
	牧草	0.02	52	0				
	基準値のない飼料	—	177	0				
	計	—	462	0				
DDT	配混合飼料	0.1	233	0				0.02
	牧草	0.1	52	0				
	基準値のない飼料	—	177	0				
	計	—	462	0				
アセフェート	基準値のない飼料	—	8	0				0.007
アトラジン	とうもろこし	0.2	13	0				0.02
	マイロ	0.02	1	0				
	牧草	15	52	0				
	基準値のない飼料	—	373	0				
	計	—	439	0				
アラクロール	とうもろこし	0.2	13	0				0.02
	マイロ	0.1	1	0				
	牧草	3	52	0				
	基準値のない飼料	—	382	0				
	計	—	448	0				
アルドリン 及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	233	0				0.02
	牧草	0.02	52	0				
	基準値のない飼料	—	177	0				
	計	—	462	0				
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	14	0				0.02
	基準値のない飼料	—	453	0				
	計	—	467	0				
イミダクロプリド	とうもろこし	0.1	13	0				0.002
	マイロ	0.05	3	0				
	牧草	6	2	0				
	計	—	18	0				
エチオン	牧草	20	52	0				0.02
	基準値のない飼料	—	415	0				
	計	—	467	0				
エンドリン	配混合飼料	0.01	233	0				0.02
	牧草	0.01	52	0				
	基準値のない飼料	—	177	0				
	計	—	462	0				
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	14	0				0.01
	マイロ	0.75	1	0				
	えん麦	0.75	1	0				
	牧草	13	52	1	2	0.66	0.66	
	基準値のない飼料	—	379	5	1	0.036	0.036	
	計	—	447	6	1			
	とうもろこし	7	14	1	7	0.16	0.16	
クロルピリホスメチル	マイロ	10	1	0				0.02
	えん麦	10	1	0				
	基準値のない飼料	—	431	44	10	0.45	0.080	
	計	—	447	45	10			
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	14	0				0.02
	基準値のない飼料	—	442	0				
	計	—	456	0				
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	13	0				0.02
	基準値のない飼料	—	426	1	0.2	0.031	0.031	
	計	—	439	1	0.2			

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	モニタリング等点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	13	0				0.02
	基準値のない飼料	—	449	0				
	計	—	462	0				
ジクロルボス	とうもろこし	0.2	1	0				0.007
	えん麦	0.2	1	0				
	基準値のない飼料	—	6	0				
	計	—	8	0				
シハロトリン	とうもろこし	0.04	13	0				0.02
	マイロ	0.2	1	0				
	牧草	0.6	52	1	1.9	0.38	0.38	
	基準値のない飼料	—	373	0				
	計	—	439	1	0.2			
ジメトエート	とうもろこし	1	14	0				0.02
	マイロ	0.2	1	0				
	えん麦	0.2	1	0				
	牧草	2	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	14	0				0.02
	マイロ	0.1	1	0				
	えん麦	0.1	1	0				
	牧草	10	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
チアベンダゾール	とうもろこし	0.05	8	0				0.003
	基準値のない飼料	—	2	0				
	計	—	10	0				
デルタメトリン及びトラロメトリン	とうもろこし	1	13	0				0.03
	マイロ	1	1	0				0.03
	牧草	5	52	0				0.045
	基準値のない飼料	—	373	0				0.03
	計	—	439	0				
テルブホス	とうもろこし	0.01	14	0				0.005
	マイロ	0.05	1	0				
	えん麦	0.05	1	0				
	牧草	1	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
二臭化エチレン	とうもろこし	0.01	1	0				0.001
	計	—	1	0				
パラチオン	とうもろこし	0.3	14	0				0.02
	マイロ	0.08	1	0				
	えん麦	0.08	1	0				
	牧草	5	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	14	5	35.7	0.48	0.25	0.02
	マイロ	1	1	0				
	えん麦	1	1	0				
	基準値のない飼料	—	431	49	11.4	0.42	0.10	
	計	—	447	54	12.1			
フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.01	379	0				0.003
	配混合飼料（豚・牛等用）	0.02	447	0				
	牧草	0.2	14	5	35.7	0.48	0.25	
	基準値のない飼料	—	1	0				
	計	—	1	0				

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	モニタリング等点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
フェニトロチオン	とうもろこし	1	14	0				0.02
	マイロ	1	1	0				
	えん麦	1	1	0				
	牧草	10	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	3	0.8	0.29	0.15	
計	—	—	447	3	0.7			
フェンチオン	とうもろこし	5	14	0				0.02
	基準値のない飼料	—	453	0				
	計	—	467	0				
フェントエート	とうもろこし	0.4	14	0				0.02
	マイロ	0.4	1	0				
	えん麦	0.4	1	0				
	基準値のない飼料	—	431	0				
	計	—	447	0				
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	69	0				0.02
	配混合飼料（豚用）	4	61	0				
	配混合飼料（牛等用）	8	99	0				
	牧草	13	52	0				
	基準値のない飼料	—	178	0				
計	—	459	0					
フェンプロパトリン	牧草	20	52	0				0.02
	基準値のない飼料	—	407	0				
	計	—	459	0				
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	233	0				0.02
	牧草	0.02	52	0				
	基準値のない飼料	—	177	0				
	計	—	462	0				
ペルメトリン	とうもろこし	2	13	0				0.02
	マイロ	2	1	0				
	牧草	55	52	0				
	基準値のない飼料	—	373	0				
	計	—	439	0				
ベンディメタリン	とうもろこし	0.2	13	0				0.02
	マイロ	0.1	1	0				
	牧草	0.1	52	1	1.9	0.022	0.022	
	基準値のない飼料	—	373	0				
	計	—	439	1	0.2			
ホスメット	とうもろこし	0.05	14	0				0.02
	マイロ	0.05	1	0				
	えん麦	0.05	1	0				
	牧草	40	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
ホレート	とうもろこし	0.05	14	0				0.02
	マイロ	0.05	1	0				
	えん麦	0.05	1	0				
	牧草	1.5	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	0				
計	—	447	0					
マラチオン	とうもろこし	2	14	0				0.02
	マイロ	2	1	0				
	えん麦	2	1	0				
	牧草	135	52	0				
	基準値のない飼料	—	379	33	8.7	0.26	0.075	
計	—	447	33	7.4				

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング等の 対象成分	モニタリング等の 対象試料	省令 基準値 (mg/kg)	モニタ リング 等点数	うち検出されたもの			検出 下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	
メチダチオン	とうもろこし	0.1	14	0			0.02
	マイロ	0.2	1	0			
	えん麦	0.2	1	0			
	牧草	12	52	0			
	基準値のない飼料	—	379	0			
	計	—	447	0			
メトプレン	とうもろこし	5	1	0			0.02
	計	—	1	0			
リンデン (γ-BHC)	配混合飼料 (鶏・うずら, 豚用)	0.05	133	0			0.005
	配混合飼料 (牛等用)	0.4	99	0			
	牧草	0.4	52	0			
	基準値のない飼料	—	178	0			
	計	—	462	0			

表5 農薬のモニタリング等の結果（基準値のない成分）

モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				うち検出されたもの				うち検出されたもの				
	モニタリング等点度数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	モニタリング等点度数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	モニタリング等点度数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
EPN	467	0		0.02	459	0		0.02	459	1	0.2	0.043	0.02
アセトクロール	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
アニコホス	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
アメトリン	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
アリドクロール	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
アレズリン	459	0		0.02	459	1	0.2	0.46	459	0			0.003
イサゾホス	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
イソプロチオラン	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.007
イプロベンホス	467	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
エジフェンホス	467	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
エタフルラリン	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
エトフェンプロックス	459	0		0.02	459	1	0.2	0.15	459	1	0.2	0.086	0.02
エトフメセート	459	0		0.02	459	0		0.02	459	4	0.9	2.0	0.57
エトプロホス	467	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
エトリジアゾール	459	0		0.02	459	0		0.007	459	0			0.02
エトリムホス	467	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
エンズスルファン	3	0		0.0007	3	0		0.0007	459	0			0.02
オキサジアゾン	459	0		0.02	3	0		0.0007	459	0			0.02
カズサホス	459	1	0.2	0.023	3	0		0.0007	459	0			0.02
カルフェントランエチル	459	0		0.02	467	0		0.0007	459	0			0.02
カルボフェノチオン	8	0		0.007	459	0		0.02	459	0			0.0007
キナルホス	8	0		0.007	459	0		0.02	3	0			0.02
キントゼン	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
クレソキシムメチル	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
クロルタールジメチル	459	1	0.2	0.024	459	0		0.02	459	0			0.02
クロルデン	3	0		0.0007	459	0		0.02	467	0			0.02
クロルフェナピル	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
ジクロホップメチル	459	0		0.02	459	0		0.02	8	0			0.007
ジクロラン	462	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
ジフェナミド	459	0		0.02	459	0		0.02	462	0			0.02
ジフェノコナゾール	459	3	0.7	0.071	8	0		0.007	459	1	0.2	0.022	0.02
ジメテナミド	459	0		0.02	459	2	0.4	0.033	462	0			0.02
ジメピレレート	459	0		0.02	3	0		0.003	459	0			0.02
シラフルオフェン	459	0		0.02	459	0		0.02	459	0			0.02
ターバシル	459	0		0.02	459	0		0.02	8	0			0.007

4) その他の有害物質

近年，飼料中に含まれ，又は混入されて問題となった以下の有害物質 4 成分について，計 81 点のモニタリング等を実施した．その結果を表 6 に示した．

各成分の結果は，以下のとおりであった．

i 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

乾牧草についてアルファルファ 9 点及びスーダングラス 13 点の計 22 点モニタリング等を実施した．硝酸態窒素は，全ての試料から検出された．最大値は，アルファルファが 690 mg/kg，スーダングラスが 1,300 mg/kg であった．亜硝酸態窒素はスーダングラス 1 点から検出された．

特に問題となる牧草はなかったが，硝酸態窒素は検出率が高く今後とも留意が必要である．

ii メラミン

メラミンの指導基準値（尿素を除く飼料（飼料原料を含む．）：2.5 mg/kg）が新規に追加（平成 24 年 4 月 9 日付け）されたが，養魚用飼料及び魚粉についてモニタリング等を実施した結果，養魚用配合飼料 13 点中 3 点（検出率 23.1 %），魚粉 16 点中 3 点（検出率 18.8 %）から検出された．最大値は，養魚用配合飼料が 0.060 mg/kg，魚粉が 0.064 mg/kg であり，指導基準値を超えた飼料はなかったが，今後とも留意が必要である．

iii ヒスタミン

魚粉 8 点についてモニタリング等を実施した結果，全 8 点から検出（検出率 100 %）された．特に問題となる魚粉はなかったが，ヒスタミンは検出率が高く今後とも留意が必要である．

表 6 その他の有害物質のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	指導基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	モニタリング等点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
硝酸態窒素		アルファルファ	9	9	100.0	690	310	10
		スーダングラス	13	13	100.0	1,300	510	
		計	22	22	100.0	1,300	430	
亜硝酸態窒素		アルファルファ	9	0				10
		スーダングラス	13	1	7.7	34	34	
		計	22	1	4.5	34	34	
メラミン	2.5	養魚用配合飼料	13	3	23.1	0.38	0.21	0.06
		魚粉	16	3	18.8	0.10	0.081	
		計	29	6	20.7			
ヒスタミン		魚粉	8	8	100.0	290	130	3

3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造した魚粉 91 点及びその他の魚介類由来たん白質 6 点，また，チキンミール 29 点，フェザーミール 20 点及び豚血しょうたん白 1 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，フェザーミール 1 点が反すう動物由来 DNA 陽性反応を示したが，混入確認判定手順に基づき，動物由来たん白質は不検出と総合的に判定した．豚肉骨粉 2 点及び原料混合肉骨粉 27 点については，ELISA 試験及び PCR 試験のみを実施した結果，原料混合肉骨粉 3 点が反すう動物由来 DNA 陽性（うち 1 点が牛たん白質陽性）反応を示したが，混入確認判定手順に基づき，動物由来たん白質は不検出と総合的に判定した．これらの結果を表 7 及び表 8 に示した．

表 7 魚粉等の試験結果（飼料への動物由来たん白質等の混入確認）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	91	0	0.0	91	0	0.0	91	0	0.0	0
サバすり身	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
カニ殻粉末	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
酵素処理魚抽出物	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0	0
ホタテ抽出物	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0

表 8 チキンミール，豚肉骨粉等の試験結果（飼料への動物由来たん白質等の混入確認）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験					総合 判定 検出 点数				
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来DNA			牛由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数		検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
チキンミール	29	0	0.0	29	0	0.0	1	0	0.0	28	0	0.0				0
フェザーミール	20	0	0.0	20	0	0.0	1	0	0.0	19	1	5.3	1	0	0.0	0
豚血しょうたん白	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
豚肉骨粉				2	0	0.0				2	0	0.0				0
原料混合肉骨粉				27	1	3.7				27	3	11.1	4	2	50.0	0

国内で製造したほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 5 点，ほ乳期子牛育成用配合飼料 4 点，若令牛育成用配合飼料 13 点，乳用牛飼育用配合飼料 49 点，幼令肉用牛育成用配合飼料 4 点，肉用牛肥育用配合飼料 63 点，肉牛繁殖用配合飼料 13 点，種牛等用配合飼料 25 点，二種混合飼料 1 点，その他の混合飼料 52 点及び糖蜜吸着飼料 1 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，肉用牛肥育用配合飼料 1 点が ELISA 試験で牛由来たん白質陽性反応を，その他の混合飼料 1 点が PCR 試験でほ乳動物由来 DNA 陽性判定を示したが，混入確認判定手順に基づき，動物由来たん白質は不検出と総合的に判定した．また，農林水産大臣の確認が必要

な動物由来たん白質及びこれを使用した混合飼料を一連の工程で製造したものについて、最終製品である混合飼料等 12 点について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果、1 点がほ乳動物由来 DNA 陽性反応を示したが、混入確認判定手順に基づき、動物由来たん白質は不検出と総合的に判定した。これらの結果を表 9 に示した。

輸入の牛用混合飼料 33 点、海藻ミール 1 点、加糖加熱大豆油かす 1 点、フミン酸 1 点及び複合製剤 1 点について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果、全ての飼料で不検出であった。その結果を表 10 に示した。

表 9 国内製造牛用飼料等の試験結果（飼料への動物由来たん白質等の混入確認）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験						総合判定 検出 点数		
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来DNA					
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)			
牛用飼料等															
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	5	0	0.0				3	0	0.0	3	0	0.0			0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	4	0	0.0	3	0	0.0									0
若令牛育成用配合飼料	13	0	0.0	12	0	0.0	12	0	0.0						0
乳用牛飼育用配合飼料	49	0	0.0	41	0	0.0	41	0	0.0						0
幼令肉用牛育成用配合飼料	4	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0						0
肉用牛肥育用配合飼料	63	0	0.0	54	1	1.9	54	0	0.0						0
乳肉用牛飼育用配合飼料	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0						0
肉牛繁殖用配合飼料	13	0	0.0	12	0	0.0	12	0	0.0						0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0						0
牛数種用飼料	22	0	0.0	14	0	0.0	14	0	0.0						0
匠べんどうもろこし・アワガク二種混合飼料	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0						0
その他の混合飼料	52	0	0.0	52	0	0.0	21	0	0.0	31	0	0.0			0
糖蜜吸着飼料	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0						0
その他の畜種向け飼料															
混合飼料等	12	0	0.0	12	0	0.0	11	1	9.1	1	0	0.0			0

表 10 輸入飼料等の試験結果（飼料への動物由来たん白質等の混入確認）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験						総合判定 検出 点数		
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来DNA					
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)			
牛用混合飼料															
中華人民共和国	3	0	0.0	3	0	0.0				3	0	0.0			0
台湾	3	0	0.0	3	0	0.0				3	0	0.0			0
大韓民国	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
シンガポール	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
デンマーク	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
ベルギー	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
フランス	2	0	0.0	2	0	0.0				2	0	0.0			0
スペイン	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
イタリア	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
アメリカ合衆国	18	0	0.0	18	0	0.0	1	0	0.0	18	0	0.0			0
オーストラリア	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0			0
加糖加熱大豆油かす															
アメリカ合衆国	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0			0
海藻ミール															
カナダ	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
フミン酸															
カナダ	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0			0
複合製剤															
アメリカ合衆国	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0			0

3.3 不溶性不純物

飼料用として出荷，流通している動物性油脂（確認済動物性油脂，回収食用油，混合油脂等）74 点及び特定動物性油脂 1 点について，不溶性不純物の含有量を測定した．その結果を表 11 に示した．

省令に規定された動物性油脂の不溶性不純物の含有量を超えたものはなかった．

表 11 不溶性不純物のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象試料	成分規格	モニタリング等点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15%以下	74	0.096	0.023
特定動物性油脂	0.02%以下	1	0.0	0.0

3.4 サルモネラ

飼料原料 152 点のうち 1 点が陽性（陽性率 0.7 %）であった．なお，前年度及び前々年度の陽性率は，それぞれ 1.4 %及び 1.2 %であった．区分別にみると，動物質性飼料 122 点中 1 点が陽性（陽性率 1.8 %（前年度 1.8 %，前々年度 0.8 %））であった．一方，植物性油かす類（陽性率前年度 0 %，前々年度 4.2 %）及びそうこう類（前年度 0 %，前々年度 0 %）は，全て陰性であった．その結果を表 12 に示した．

原産国別では，国内製造品 147 点のうち 1 点が陽性（陽性率 0.7 %）であった．なお，前年度及び前々年度の陽性率は 1.5 %及び 0.7 %であった．一方，輸入品 5 点（陽性率前年度 0 %，前々年度 10 %）は，全て陰性であった．その結果を表 13 に示した．

配混合飼料 152 点のうち 1 点が陽性（陽性率 0.7 %）であった．なお，前年度及び前々年度の陽性率は，それぞれ 0 %及び 1.9 %であった．その結果を表 14 に示した．

サルモネラ陽性となった魚粉及び配合飼料から分離された血清型は，各 1 種類であった．その結果を表 15 に示した．*S. Senftenberg* は，最近では，平成 21 年度に国内産魚粉 2 点から分離されている．また，*S. Senftenberg* は国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報³⁾によると，国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としてヒトから分離された上位 15 血清型には入っていないが，毎年分離事例があり，サルモネラに係る飼料の製造，品質管理については，引き続き留意が必要である．

表 12 飼料原料の種類別点数及び陽性率（サルモネラ）

モニタリング等の対象試料	試験点数	陽性点数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	63	1	1.6
チキンミール	21	0	0
フェザーミール	14	0	0
原料混合肉骨粉	20	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
酵素処理魚抽出物	1	0	0
さばすり身	1	0	0
小 計	122	1	0.8
植物性油かす類			
大豆油かす	8	0	0
なたね油かす	4	0	0
ごま油かす	2	0	0
コーンジャムミール	1	0	0
コーングルテンミール	1	0	0
やし油かす	1	0	0
小 計	17	0	0
そうこう類			
ふすま	7	0	0
米ぬか	3	0	0
コーングルテンフィード	2	0	0
大豆皮	1	0	0
小 計	13	0	0
合 計	152	1	0.7

表 13 原産国及び飼料原料の種類別陽性率（サルモネラ）

原産国	動物質性飼料		植物性油かす類				そうこう類		合計 (陽性率)
	魚粉	その他	大豆 油かす	なたね 油かす	やし 油かす	その他	ふすま	その他	
国産 (陽性率)	1/63 (1.6%)	0/59 (0%)	0/6 (0%)	0/3 (0%)		0/4 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/147 (0.7%)
輸入									
中国			0/1	0/1					0/2 (0%)
インド			0/1						0/1 (0%)
インドネシア					0/1				0/1 (0%)
スリランカ							0/1		0/1 (0%)
小計 (陽性率)			0/2 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)		0/1 (0%)		0/5 (0%)
合計 (陽性率)	1/63 (1.6%)	0/59 (0%)	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/1 (0%)	0/4 (0%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)	1/152 (0.7%)

表 14 配混合飼料の点数及び陽性率（サルモネラ）

モニタリング等の対象試料	試験点数	陽性点数	陽性率 (%)
鶏用配合飼料	55	1	1.8
豚用配合飼料	41	0	0
牛用配合飼料	48	0	0
動物質性たん白質混合飼料	5	0	0
その他の混合飼料	3	0	0
合計	152	1	0.7

表 15 陽性飼料の血清型（サルモネラ）

血清型	検出点数	
	魚粉1点中	配合飼料1点中
<i>S. Senftenberg</i>		1
不明 (7:z ₂₉ :-)	1	
合計	1	1

文 献

- 1) (社) 日本油化学会編：基準油脂分析試験法 (I), 1996年版(2), 2.1.1 試料採取方法(1996).
- 2) 泉和夫, 石橋隆幸, 青山幸二, 石黒瑛一：飼料研究報告, 27, 233 (2002).
- 3) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>.

調査資料

特定添加物検定結果について（平成 24 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

Result of official “Testing” of specified feed additives (in the fiscal 2012)

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年 4 月 11 日法律第 35 号，以下「飼料安全法」という。）第 5 条第 1 項の規定により，特定添加物（飼料安全法第 3 条第 1 項の規定に基づき規格が定められた飼料添加物で，飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令（昭和 51 年 7 月 16 日政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう。以下同じ。）は，独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）が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）で定める方法により行う検定を受け，検定合格証紙が付されたものでなければ販売できない。ただし，飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者（以下「登録特定飼料等製造業者」という。）が製造し，同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し，同条第 2 項の表示が付されたものについては，この限りではない。

平成 24 年度に FAMIC に対して検定申請があった特定添加物について，結果をとりまとめたので，その概要を報告する。また，平成 24 年度中の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等について併せて報告する。

1 検定申請業者，品名等

平成 24 年度に申請があった業者別の特定添加物の種類，品名等を表 1 に示した。

申請は 8 業者からあり，その製造形態等は，①製造用原体又は製剤を自社で輸入，あるいは他社から購入し，製剤を製造しているのが 4 業者，②製剤を輸入し，販売のみを行っているのが 4 業者という内訳であった。

申請があった特定添加物は 11 種類（前年度 10 種類）で，品名にして 16 銘柄（前年度 16 銘柄）であった。そのうち，製造用原体又は製剤を海外に依存しているものは 10 種類（前年度 10 種類），15 銘柄（前年度 14 銘柄）であった。

製造用原体又は製剤の輸入先国は，亜鉛バシトラシン（製剤），硫酸コリスチン（製造用原体），アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン（製造用原体）及びモネンシンナトリウム（製造用原体）が中国，サリノマイシンナトリウム（製造用原体）は中国及びブルガリア，クロルテトラサイクリン（製剤）がシンガポール，リン酸タイロシン（製剤）及びナラシン（製剤）はアメリカ，アピラマイシン（製剤）がイギリス，フラボフォスフォール（製剤）がブルガリアで，輸入先国は 5 カ国（前年度 5 カ国）であった。

表 1 検定申請業者及び申請品名等一覧（平成 24 年度）

管内	申請業者名	製造事業場名	特定添加物の種類	飼料級に該当	申請品名	含有力価 mg(力価)/g	備考
本部	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100	
			モネンジンナトリウム		モネンジンTZ20	200	
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100	
			株式会社ティエヌビー	※	クロルテトラサイクリン	○	CTC F-100
	ミヤリサン製薬株式会社	※	フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80	
神戸	株式会社科学飼料研究所	龍野工場	硫酸コリスチン		コリスチン10%G「明治」	100	
			リン酸タイロシン		タイラン275	275	
	日本イーライリリー株式会社	※	アピラマイシン	○	サーマックス200	200	
			ナラシン	○	モンテバン100	100	
			リン酸タイロシン		タイロシン275	275	
福岡	株式会社科学飼料研究所	日向工場	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン「科研」10%G	100	
	コーキン化学株式会社	九州工場	アルキルトリメチルアンモニウムオキシテトラサイクリン		テーエム-400FA	400	
			サリノマイシンナトリウム	○	コクシスタック-100FA	100	
			バシヘプタイド	○	バシフィード40	40	
ファイザー株式会社	※	亜鉛バシトラシン	○	バシトラシン-100	100	4,200単位/g	
				○	バシトラシン-150	150	6,300単位/g
計	8業者	9事業場			16銘柄		

注：「製造事業場名」欄に※が付されている業者は、輸入業者に該当する。

2 特定添加物の種類別の合格件数等

平成 24 年度の特定添加物の種類別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を平成 22 年度及び平成 23 年度の結果とともに表 2 に示した。

平成 24 年度の合格件数は 190 件（申請 190 件）であり、不合格のものはなかった。また、合格数量は 954 トン、その実量力価換算量は 109 トン（力価）で、対前年度比はそれぞれ 88.4 %、95.7 %、97.0 % となり、件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。

特定添加物の種類別の合格数量総計に占める割合は、ナラシンが 31.1 %（前年度 25.3 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチンが 24.8 %（前年度 22.1 %）、サリノマイシンナトリウムが 24.7 %（前年度 25.1 %）、アピラマイシンが 8.2 %（前年度 10.4 %）、亜鉛バシトラシンが 5.7 %（前年度 5.0 %）と、これに続いた。また、実量力価換算量総計に占める割合は、ナラシンが 27.3 %（前年度 22.5 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチンが 21.8 %（前年度 19.7 %）、サリノマイシンナトリウムが 21.7 %（前年度 22.4 %）、アピラマイシンが 14.3 %（前年度 18.6 %）、亜鉛バシトラシンが 5.7 %（前年度 5.3 %）となった。

亜鉛バシトラシン、硫酸コリスチン、クロルテトラサイクリン、リン酸タイロシン、フラボフォスフォリポール、ナラシン及びモネンジンナトリウムは、平成 23 年度に比べて、合格数量及び実量力価換算量がいずれも増加した。一方、ノシヘプタイド、アルキルトリメチルアンモニウムオキシテトラサイクリン、サリノマイシンナトリウム及びアピラマイシンは、いずれも減少した。

また、エンラマイシン、センデュラマイシンナトリウム及びラサロシドナトリウムは平成 22 年度から、バージニアマイシンは平成 20 年度から、エフロトマイシン及びセデカマイシン平成 17 年度から、ピコザマイシンは平成 11 年度から検定実績はなく、平成 24 年度も実績はなかった。なお、表 5 に示したように、平成 24 年度においてはエンラマイシン、センデュラマイシンナトリウム及びラサロシドナトリウムは、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表 2 特定添加物の種類別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量
（平成 22 年度～平成 24 年度）

類別	特定添加物の種類	平成 22 年度					平成 23 年度					平成 24 年度				
		合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトリン	10	52,260.0	5.6	6,121.0	5.9	11	49,880.0	5.0	5,984.0	5.3	10	54,780.0	5.7	6,220.0	5.7
	エンラマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ノシヘプタイド	26	88,360.0	9.6	3,534.4	3.4	22	79,760.0	8.0	3,190.4	2.9	2	8,000.0	0.8	320.0	0.3
	バージニアマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	硫酸コリスチン	57	220,360.0	23.8	22,036.0	21.3	55	220,000.0	22.1	22,000.0	19.7	60	236,200.0	24.8	23,620.0	21.8
小計	93	360,980.0	39.0	31,691.4	30.6	88	349,640.0	35.1	31,174.4	27.9	72	298,980.0	31.3	30,160.0	27.8	
テトラサイクリン系	アモキシシリン	1	2,000.0	0.2	800.0	0.8	2	4,000.0	0.4	1,600.0	1.4	1	2,000.0	0.2	800.0	0.7
	クロルテトラサイクリン	3	12,000.0	1.3	1,200.0	1.2	2	8,000.0	0.8	800.0	0.7	3	12,000.0	1.3	1,200.0	1.1
	小計	4	14,000.0	1.5	2,000.0	1.9	4	12,000.0	1.2	2,400.0	2.1	4	14,000.0	1.5	2,000.0	1.8
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7	5	19,609.0	2.0	5,392.5	4.8	4	19,700.0	2.1	5,417.5	5.0
	小計	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7	5	19,609.0	2.0	5,392.5	4.8	4	19,700.0	2.1	5,417.5	5.0
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	1	1,250.0	0.1	100.0	0.1
	小計	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	1	1,250.0	0.1	100.0	0.1	
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	38	154,120.0	16.7	15,412.0	14.9	64	250,612.0	25.1	25,061.2	22.4	58	235,178.0	24.7	23,517.8	21.7
	センデュラマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	ナラシン	24	262,725.0	28.4	26,272.5	25.3	23	251,875.0	25.3	25,187.5	22.5	27	296,275.0	31.1	29,627.5	27.3
	モネンソナトリウム	4	11,600.0	1.3	2,320.0	2.2	3	9,260.0	0.9	1,852.0	1.7	3	10,860.0	1.1	2,172.0	2.0
	ラサロシナトリウム	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
小計	66	428,445.0	46.3	44,004.5	42.5	90	511,747.0	51.3	52,100.7	46.6	88	542,313.0	56.8	55,317.3	51.0	
その他	アピラマイシン	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3	28	103,975.0	10.4	20,795.0	18.6	21	77,825.0	8.2	15,565.0	14.3
	エフロトマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	セデカマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	ピコザマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	小計	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3	28	103,975.0	10.4	20,795.0	18.6	21	77,825.0	8.2	15,565.0	14.3
総計	194	925,063.0	100.0	103,642.7	100.0	215	996,971.0	100.0	111,862.6	100.0	190	954,068.0	100.0	108,559.8	100.0	
対前年度比 (%)	90.2	96.3		95.7		110.8	107.8		107.9		88.4	95.7		97.0		

3 特定添加物の精製級及び飼料級別の合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した低純度の製造用原体に由来するものである。

平成 24 年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表 3 に示した。

精製級及び飼料級の特定添加物の割合を実量力価換算量で比較すると、飼料級が全体の 70.5 %（前年度 72.4 %）を占めた。

ノシヘプタイド、クロルテトラサイクリン、硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムは、精製級及び飼料級の両規格がそれぞれ設定されているが、平成 24 年度では、硫酸コリスチンは精製級のみ、ノシヘプタイド、クロルテトラサイクリン及びサリノマイシンナトリウムは飼料級のみ申請があった。

表 3 精製級及び飼料級別の合格件数，合格数量及び実量力価換算量
(平成 24 年度)

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級			飼 料 級		
		合格 件数 件	合格数量 kg	実量力価 換算量 kg(力価)	合格 件数 件	合格数量 kg	実量力価 換算量 kg(力価)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	/	/	/	10	54,780.0	6,220.0
	エンラマイシン	/	/	/	0	0	0
	ノシヘプタイド	0	0	0	2	8,000.0	320.0
	バージニアマイシン	0	0	0	/	/	/
	硫酸コリスチン	60	236,200.0	23,620.0	0	0	0
テトラサイクリン系	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	1	2,000.0	800.0	/	/	/
	クロルテトラサイクリン	/	/	/	3	12,000.0	1,200.0
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	19,700.0	5,417.5	/	/	/
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	/	/	/	1	1,250.0	100.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	0	0	0	58	235,178.0	23,517.8
	センデュラマイシンナトリウム	0	0	0	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	27	296,275.0	29,627.5
	モネンシンナトリウム	3	10,860.0	2,172.0	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	0	0	0	/	/	/
そ の 他	アピラマイシン	/	/	/	21	77,825.0	15,565.0
	エフロトマイシン	0	0	0	/	/	/
	セデカマイシン	0	0	0	/	/	/
	ピコザマイシン	0	0	0	/	/	/
合 計		68	268,760.0	32,009.5	122	685,308.0	76,550.3
割 合 (%)		35.8	28.2	29.5	64.2	71.8	70.5

4 特定添加物の類別の合格数量等の推移等

平成 15 年度から平成 24 年度までの過去 10 年間における特定添加物の類別の合格数量及び実量力価換算量の推移を図 1 及び図 2 に示した。

特定添加物の類別の合格数量は，平成 16 年度をピークに平成 20 年度までは増減を繰り返しながら減少傾向にあり，平成 21 年度には一部の特定添加物が登録特定飼料等製造業者による製造に移行したため大幅に減少した。平成 22 年度は過去 10 年間で最低となったが，平成 23 年度はわずかながら増加し，平成 24 年度は再び減少した（前年度比 95.7 %）。また，実量力価換算量についても同様の傾向であった。

特定添加物の類別の実量力価換算量は，平成 15 年度から平成 20 年度まではポリエーテル系が全体の半数を超える割合で推移し，平成 21 年度以降は 40 %台を維持していたが，平成 24 年度は 51.0 %（前年度 46.6 %）を占め，ポリペプチド系が 27.8 %（前年度 27.9 %）でそれに続いた。

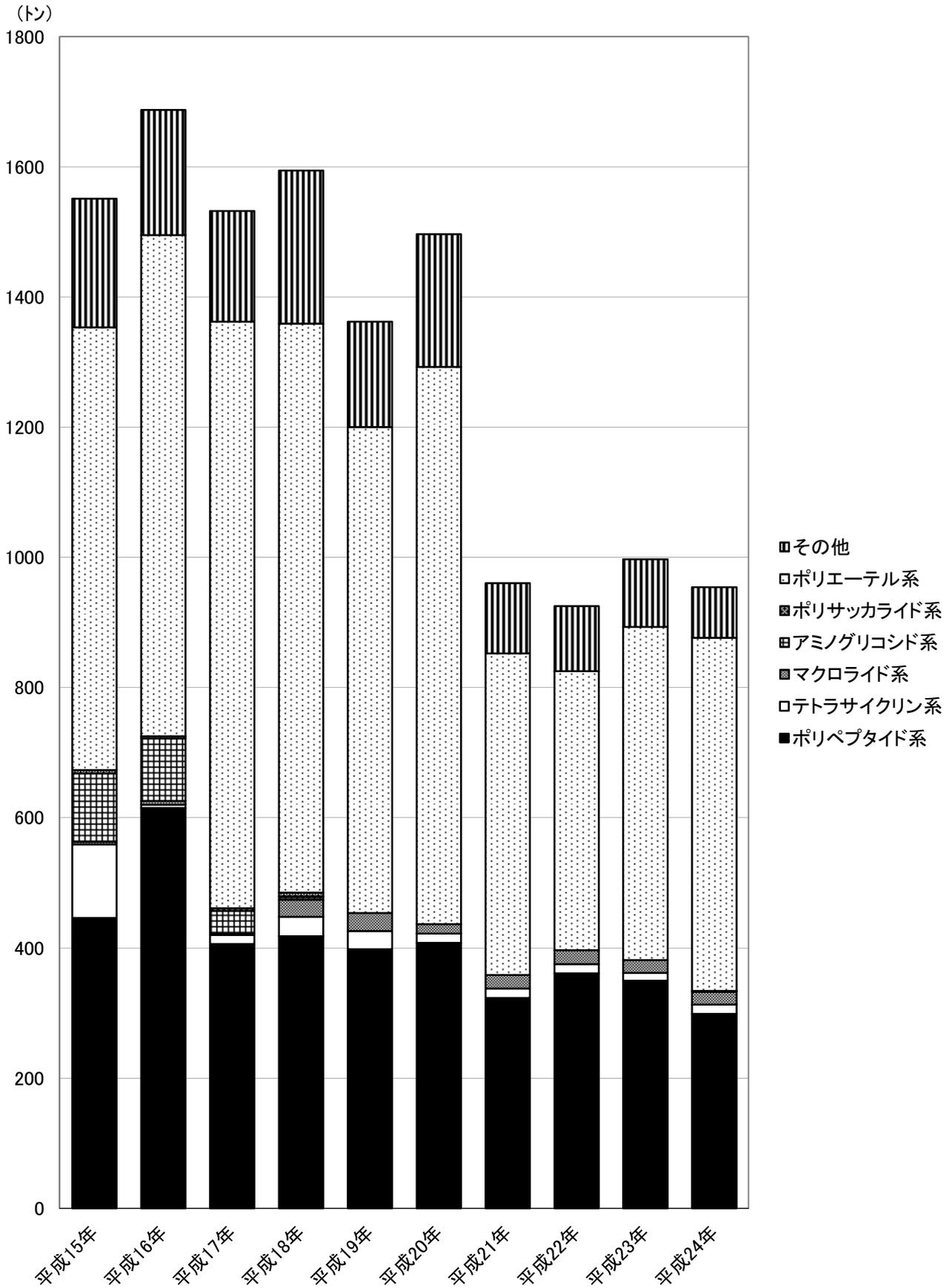


図 1 特定添加物の類別の検定合格数量

(トン力価)

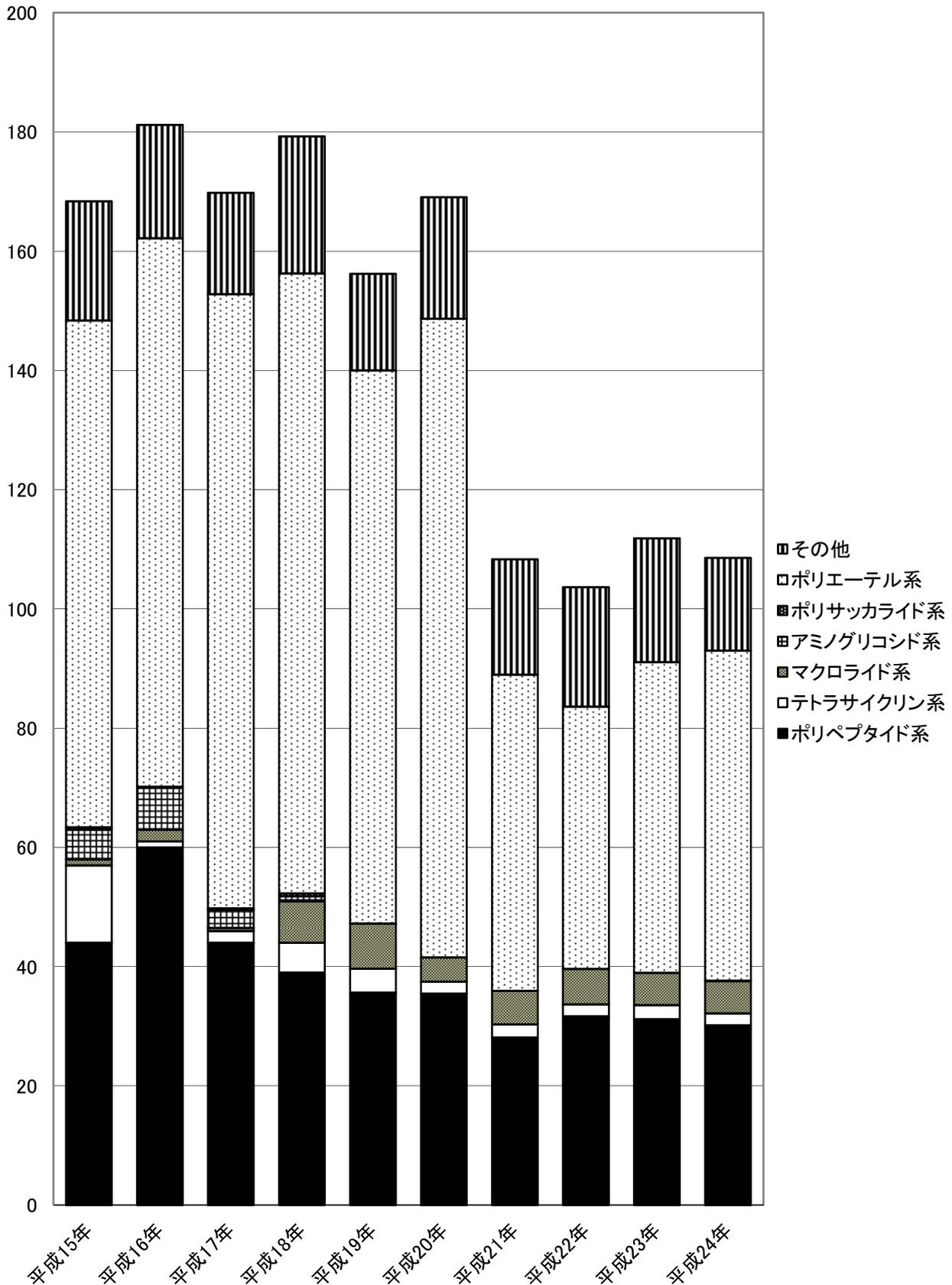


図2 特定添加物の類別の実量力価換算量

5 管内別の特定添加物の合格件数等

平成 24 年度の FAMILIC 本部及び各地域センター管内別の特定添加物の合格件数，合格数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。

平成 24 年度の合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸センター管内が最も多く，次いで福岡センター，本部の順となった。

合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸，福岡センター管内では前年度より増加し，本部では，前年度より減少した。

なお，名古屋センター管内は平成 19 年度から，札幌センター管内は平成 17 年度から，また仙台センター管内は平成 7 年度から検定実績はなく，平成 24 年度も実績はなかった。

表 4 管内別の特定添加物の合格件数,合格数量及び実量力価換算量
(平成 24 年度)

管 内	合格件数 件	合格数量 kg	実量力価換算量 Kg(力価)
本 部	45 (61)	179,288 (241,752)	18,990 (26,097)
札 幌	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
仙 台	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
名 古 屋	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
神 戸	88 (95)	533,800 (531,419)	64,610 (65,065)
福 岡	57 (59)	240,980 (223,800)	24,960 (20,700)
計	190 (215)	954,068 (996,971)	108,560 (111,863)

注:()内の数値は,平成23年度を示す。

6 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

平成 24 年 4 月現在，コーキン化学株式会社九州工場第三工場がセンデュラマイシンナトリウム，株式会社科学飼料研究所龍野工場がサリノマイシンナトリウム，モネンシンナトリウム，ラサロシドナトリウム，エンラマイシン及び硫酸コリスチンに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。また，平成 24 年度には，ノシヘプタイドに係る事業場としてコーキン化学株式会社九州工場第三工場及び株式会社科学飼料研究所龍野工場が追加登録された。

平成 24 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の種類別の製造数量及び実量力価換算量を表 5 に示した。なお，平成 24 年度に特定添加物としての検定実績がないラサロシドナトリウム，センデュラマイシン及びエンラマイシンは，登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

平成 24 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量は 718 トン（対前年度比 121 %）であり，実量力価換算量は 89 トン（力価）（対前年度比 107 %）で，検定合格数量と合計した総実量力価換算量の 45 %を占めた。

平成 15 年度から平成 24 年度までの過去 10 年間における特定添加物の類別の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量を合計した特定添加物の総製造数量並びに総実量力価換算量の推移を図 3 及び図 4 に示した。総実量力価換算量は、昨年度からわずかに増加した。また、類別の総製造数量はサリノマイシンナトリウム (25.8 %)，ナラシン (17.7 %)，硫酸コリスチン (14.7 %) の順で多く、総実量力価換算量ではサリノマイシンナトリウム (21.8 %)，モネンシンナトリウム (20.5 %)，ナラシン (15.0 %) の順で多かった。

表 5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等 (平成 24 年度)

類別	特定添加物の種類	製造数量 kg	実量力価換算量 kg(力価)
ポリペプチド系	エンラマイシン	95,800	6,315
	硫酸コリスチン(精製級)	9,280	928
	ノシヘプチド(飼料級)	74,180	2,967
	小 計	179,260	10,210
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム(飼料級)	195,540	19,554
	センデュラマイシンナトリウム	17,600	880
	モネンシンナトリウム	191,620	38,324
	ラサロシドナトリウム	134,200	20,130
	小 計	538,960	78,888
総 計		718,220	89,098
対前年度比 (%)		121	107

(各登録特定飼料等製造業者より聞き取り)

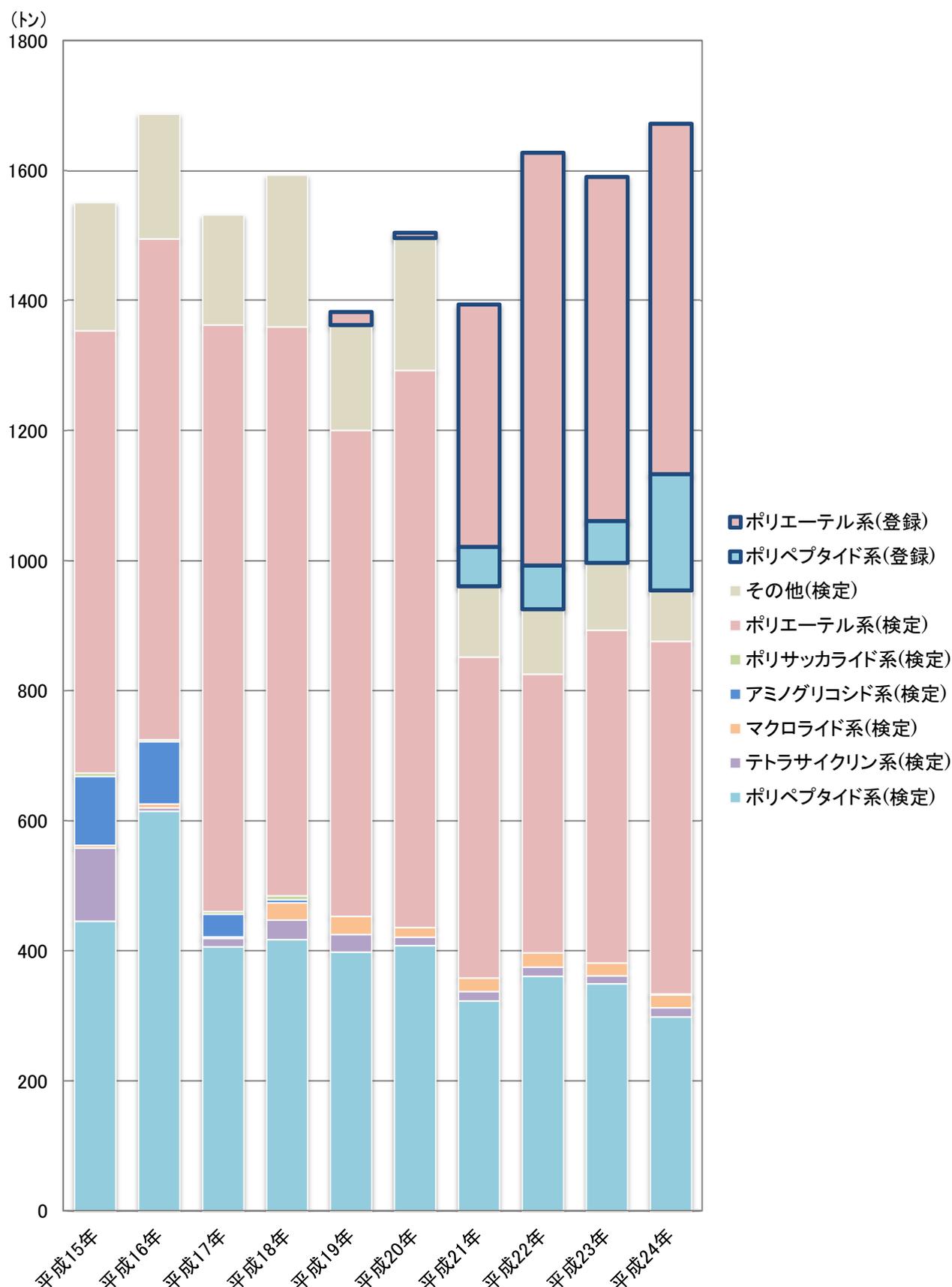


図3 特定添加物の類別の総製造数量
 （検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量との合計）

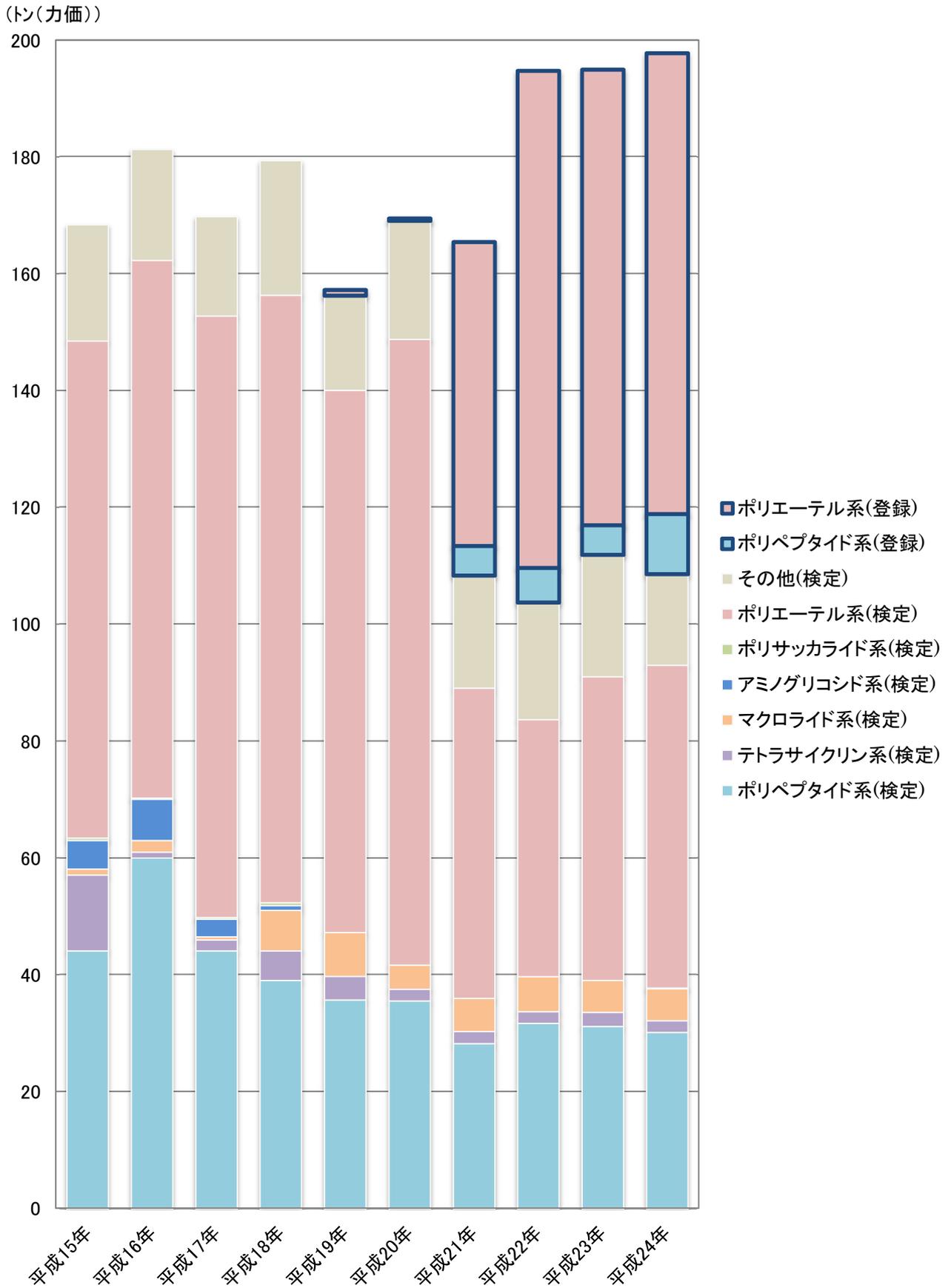


図4 特定添加物の類別の実量力価換算量
 (検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量との合計)

7 要 約

平成 24 年度の特定添加物の検定結果は、以下のとおりであった。

- (1) 検定は、8 業者から、11 種類の特定添加物について、16 銘柄の申請があった。
- (2) 申請があった特定添加物のうち、製造用原体又は製剤を海外に依存しているものは、10 種類、15 銘柄であった。
- (3) 特定添加物の合格件数は 190 件（申請 190 件）、合格数量は 954 トン、その実量力価換算量は 109 トン(力価)で、前年度に比べて、件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。なお、不合格はなかった。
- (4) 特定添加物の合格数量は、ナラシン（31.1 %）で最も多く、硫酸コリスチン、サリノマイシンナトリウム、アピラマイシン、亜鉛バシトラシンがこの順で続いた。
- (5) 合格した特定添加物の実量力価換算量は、ナラシン（27.3 %）で最も多く、硫酸コリスチン、サリノマイシンナトリウム、アピラマイシン、亜鉛バシトラシンがこの順で続いた。
- (6) 合格した特定添加物について、実量力価換算量で精製級及び飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 70.5 %を占めた。
- (7) 合格した特定添加物について、過去 10 年間の実量力価換算量の推移をみると、平成 16 年度以降増減を繰り返しながら減少傾向にあり、平成 22 年度に過去 10 年間で最低となって、平成 23 年度に増加し、平成 24 年度は再び減少した。
- (8) 管内別の特定添加物の合格件数、合格数量及び実量力価換算量は、神戸センターが最も多かった。
- (9) 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造は、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウム（飼料級）、エンラマイシン、ノシヘプタイド（飼料級）、硫酸コリスチン（精製級）及びセンデュラマイシンナトリウムについて行われ、実量力価換算量はこの順に多かった。
- (10) 特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量とを合計した総製造数量はサリノマイシンナトリウム（25.8 %）、ナラシン、硫酸コリスチンの順に多く、総実量力価換算量は、サリノマイシンナトリウム（21.8 %）、モネンシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 Interlaboratory Study of LC-UV and LC-MS Methods for the Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat

Koji Aoyama, Hajime Akashi, Naoki Mochizuki, Yuji Ito, Takashi Miyashita, Soohyung Lee, Motoki Ogiso, Mamoru Maeda, Shigemi Kai, Hiroki Tanaka, Hiroko Noriduki, Hisaaki Hiraoka, Toshitsugu Tanaka, Eiichi Ishikuro, Yoshinori Itoh, Toshihiro Nagayama, Masahiro Nakajima, Shigehiro Naito and Yoshiko Sugita-Konishi

食品衛生学雑誌, 53(3), 152–156 (2012).

2 腸球菌の微量液体希釈法を用いた薬剤感受性試験の検討

橋本健志, 橋本亮, 松崎学, 関口好浩, 橋本仁康, 浅尾美由起, 高木昌美

食品衛生学雑誌, 53(5), 225–232 (2012).

3 Improvement and validation of the method to determine neutral detergent fiber in feed.

Hiraoka H, Fukunaka R, Ishikuro E, Enishi O, Goto T.

Anim Sci J, 83(10), 690-695 (2012).

4 Modified use of a commercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage

Hisaaki Hiraoka, Katsumi Yamamoto, Yukiko Mori, Naoki Asao, Rie Fukunaka, Kenzaburo Deguchi, Kenzi Iida, Shigeru Miyazaki, Tetsuhisa Goto

Mycotoxin Research, DOI number: 10.1007/s12550-012-0155-6

Published online: 30 December 2012.

飼料研究報告編集委員

委員長	片山 信浩	副委員長	大橋 史郎
	會田 紀雄		千原 哲夫
	石橋 隆幸		永原 貴子
	小野寺 聖		野崎 友春
	鬼頭 敦司		山多 利秋
	小森谷 敏一		吉永 晋
	高木 昌美		

飼料研究報告 第38号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
TEL 050-3797-1857
FAX 048-601-1179
<http://www.famic.go.jp/>

平成25年9月

編集 飼料研究報告編集委員会