

飼料研究報告

第40号

平成27年

Research Report of Animal Feed

Vol. 40
2015



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

謝 辞

本報告に掲載した分析法の開発及び報告書の作成に当たり、助言賜り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 26 年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は平成 27 年 3 月現在。)

- | | |
|--------|---|
| 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学術研究院（農学系） 教授 |
| 中島 正博 | 名古屋市衛生研究所 食品部長 |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学 薬学部 教授 |
| 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 教授 |
| 松井 徹 | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授 |
| 松本 清 | 崇城大学 生物生命学部応用微生物工学科 教授 |
| 宮崎 茂 | 一般財団法人生物科学安全研究所 参与 |
| 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 アドバイザー |

目 次

1 乾牧草中の 2,4-D 及びその関連物質の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法	山本 克己, 加藤 耕一	1
2 飼料用イネ中のエチプロール他 5 成分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	義本 将之, 屋方 光則, 齊木 雅一	18
3 飼料用イネ中のオキサジクロメホン, ジメタメトリン及びピリブチカルブ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	吉村 哲史	42
4 稲発酵粗飼料及び粃米中のオキシリニック酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法	牧野 大作, 三井 友紀子, 大谷 俊子	57
5 穀類, 乾牧草, 稲わら及び稲発酵粗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	杉本 泰俊, 船木 紀夫, 榊原 良成	71
6 稲発酵粗飼料及び粃米中のクロロタロニルのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法	桑原 正良	91
7 愛玩動物用飼料 (ドライ製品及びセミドライ製品) 中の油脂の酸価及び過酸化物価の測定法	名塚 英一, 松原 光里	104
技術レポート		
1 飼料中のジカンバのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認	屋方 光則	116
2 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認 ～ カドミウム, 水銀, 鉛, ヒ素, エトキシキン, ジブチルヒドロキシトルエン, ブチルヒドロキシアニソール及び亜硝酸ナトリウムについて ～	杉村 靖, 森口 里美, 浪越 充司, 山西 正将, 若宮 洋市, 永原 貴子	123

3	加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討	橋本 仁康, 山多 利秋, 會田 紀雄	141
4	ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量に用いる塩基性アルミナについて	榎本 舞弓, 橋本 仁康, 山多 利秋	150

精度管理

1	平成 26 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について	小塚 健志, 藤田 敏文, 保田 伊世, 森口 里美, 設楽 賢治, 石塚 優香	158
---	-----------------------------	---	-----

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 26 年度)	肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課	187
2	特定添加物検定結果等について (平成26年度)	肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課	210

他誌掲載論文 (抄録)

1	Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food.	Tomoya YOSHINARI, Hiroshi TAKEUCHI, Koji AOYAMA, Masaru TANIGUCHI, Shigeki HASHIGUCHI, Shigemi KAI, Motoki OGISO, Takashi SATO, Yu AKIYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Setsuko TABATA, Toshitsugu TANAKA, Eiichi ISHIKURO and Yoshiko SUGITA-KONISHI (Journal of Food Protection, 77(11), 1940-1946 (2014), doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-185.).....	225
2	Development and inter-laboratory study of a method for quantification of fumonisin B ₁ , B ₂ and B ₃ in pet foods	M. Nomura, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara and T. Chihara (World Mycotoxin Journal, 8(1), 55-61 (2015).).....	225

3 口蹄疫等の防疫用移動式レンダリング装置から排出される過熱破碎物の充填・運搬手法の検討

田中 康男, 八木 行雄, 末吉 益雄, 勝田 賢,
宮崎 綾子, 鈴木 亨, 池口 厚男, 會田 紀雄,
石田 三佳, 中久保 亮, 上村 涼子, 橋本 仁康,
弓削 正昭, 大崎 慎人, 犬丸 茂樹, 荻野 暁史,
山下 恭広

(家畜衛生学雑誌, 40(4), 203-213 (2015).)..... 225

付 録

飼料研究報告総目録 (第 1 号～第 40 号) 229

CONTENTS

1	Determination of 2,4-D and Related Compounds in Grass Hay for Feed by LC-MS/MS Katsumi YAMAMOTO and Kouichi KATO	1
2	Simultaneous Determination of Ethiprole and 5 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS Masayuki YOSHIMOTO, Mitsunori YAKATA and Masakazu SAIKI	18
3	Simultaneous Determination of Oxaziclomefone, Dimethametryn and Pyributicarb in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS Satoshi YOSHIMURA	42
4	Determination of Oxolinic Acid in Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS Daisaku MAKINO, Yukiko MITSUI and Toshiko OTANI	57
5	Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Grains, Grass Hay, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage for Feed by LC-MS/MS Yasutoshi SUGIMOTO, Norio FUNAKI and Yoshinari SAKAKIBARA	71
6	Determination of Chlorothalonil in Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS Masayoshi KUWABARA	91
7	Determination of Acid Value and Peroxide Value of Fat in Dry and Semi-dry Type Pet Foods Eiichi NAZUKA and Hikari MATSUBARA	104
§ Technical report		
1	Validation of the Determination Method of Dicamba in Feeds by GC-MS Mitsunori YAKATA	116
2	Application to Snack Type Pet Food of Analytical Methods of Cadmium, Mercury, Lead, Arsenic, Ethoxyquin, Dibutylhydroxytoluene, Butylhydroxyanisol and Sodium Nitrite Yasushi SUGIMURA, Satomi MORIGUCHI, Atsushi NAMIKOSHI, Masayuki YAMANISHI, Youichi WAKAMIYA and Takako NAGAHARA	123

3	Study of Detection Test for Contamination of Bovine Protein in Animal By-product Feed Ingredients Containing Food Industrial Waste	Yoshiyasu HASHIMOTO, Toshiaki YAMATA and Norio AITA	141
4	Comparison of Basic Alumina for Use in Microbiological Assays of Polyether Antibiotics	Mayu ENOMOTO, Yoshiyasu HASHIMOTO and Toshiaki YAMATA	150
§ Proficiency test			
1	Proficiency Test (in the Fiscal Year 2014)	Kenji KOZUKA, Toshifumi FUJITA, Iyo YASUDA, Satomi MORIGUCHI, Kenji SHIDARA and Yuka ISHIZUKA	158
§ Investigative report			
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2014)	Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	187
2	Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2014)	Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	210
§ Papers accepted in other journals (abstract)			
1	Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food.	Tomoya YOSHINARI, Hiroshi TAKEUCHI, Koji AOYAMA, Masaru TANIGUCHI, Shigeki HASHIGUCHI, Shigemi KAI, Motoki OGISO, Takashi SATO, Yu AKIYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Setsuko TABATA, Toshitsugu TANAKA, Eiichi ISHIKURO and Yoshiko SUGITA-KONISHI (Journal of Food Protection, 77(11), 1940-1946 (2014), doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-185.)	225

2	Development and inter-laboratory study of a method for quantification of fumonisin B ₁ , B ₂ and B ₃ in pet foods	M. Nomura, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara and T. Chihara (World Mycotoxin Journal, 8(1), 55-61 (2015).)	225
3	Packing and transporting animal carcasses after rendering in mobile facility to control epidemics such as foot-and-mouth disease	Yasuo TANAKA, Yukio YAGI, Masuo SUEYOSHI, Ken KATSUTA, Ayako MIYAZAKI, Toru SUZUKI, Atsuo IKEGUCHI, Norio AITA, Mitsuyoshi ISHIDA, Ryoh NAKAKUBO, Ryoko UEMURA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Masaaki YUGE, Masato OSAKI, Shigeki INUMARU, Akifumi OGINO and Takahiro YAMASHITA (The Japanese Journal of Animal Hygiene (Kachiku Eiseigaku Zasshi), 40(4), 203–213 (2015).)	225
§ Appendix			
	General list of ‘Research Report of Animal Feeds’ (Vol. 1 to 40)		229

1 乾牧草中の 2,4-D 及びその関連物質の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

山本 克己^{*1}, 加藤 耕一^{*2}

Determination of 2,4-D and Related Compounds in Grass Hay for Feed by LC-MS/MS

Katsumi YAMAMOTO^{*1} and Kouichi KATO^{*2}

(*¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Sendai Regional Center)

*² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine levels of 2,4-D and related compounds in grass hay for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

After adding water to the samples, 2,4-D and related compounds were extracted with acetone under acidic condition, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL, furthermore, it was diluted 500-fold with acetone. 2,4-D related compounds, such as 2,4-D-ethyl in the sample solutions were hydrolyzed to 2,4-D by heating for 30 minutes at 80 °C under alkaline condition. Then the sample solution was purified with liquid-liquid extraction with diethylether under acidic condition, and injected into the LC-MS/MS for determination of the 2,4-D level. LC separation was carried out on an ODS column (Atlantis T3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm from Waters; Milford, MA, USA) using 5 mmol/L ammonium acetate solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Spike tests were conducted on 2 kinds of grass hay. Timothy hay was spiked with 260 or 10 mg/kg of 2,4-D. Ryegrass straw was spiked with the same compound at 260, 10 or 5 mg/kg, respectively. 2,4-D mean recoveries ranged from 98.2 % to 105 % for timothy hay and 91.7 % to 98.6 % for ryegrass straw. The repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.2 % for timothy hay and 4.8 % for ryegrass straw. Subsequently, timothy hay and ryegrass straw were spiked with 260 or 10 mg/kg of 2,4-D-ethyl, respectively. 2,4-D-ethyl mean recoveries ranged from 94.9 % to 96.2 % for timothy hay and 90.0 % to 94.7 % for ryegrass straw. The relative standard deviations of repeatability were not more than 5.0 % for timothy hay and 5.7 % for ryegrass straw.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using 2 kinds of grass hay spiked with 2,4-D and 2,4-D-ethyl in the following quantities: 260 mg/kg for timothy hay, and 52 mg/kg for oats hay. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 94.2 %, 3.4 %, 11 % and 1.5 (timothy hay) and 93.5 %, 2.7 %, 15 % and 1.7 (oats hay) for 2,4-D and 84.8 %, 6.9 %, 11 % and 1.5 (timothy hay) and 82.4 %, 3.2 %, 8.0 % and 0.86 (oats hay) for 2,4-D-ethyl.

This method was validated and established for use in the inspection of 2,4-D and related compounds in grass hay for feed.

Key words: 2,4-D and related compounds; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grass hay; collaborative study

キーワード : 2,4-D 及びその関連物質 ; 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 ; 乾牧草 ; 共同試験

*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 仙台センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

1 緒 言

2,4-D は 1950 年に国内登録されたホルモン型の選択性除草剤であり、イネ科作物よりも広葉雑草に対する効果が大きく、水田用除草剤として広く使用されている¹⁾。

我が国では、農林水産省令における飼料の 2,4-D (2,4-D ナトリウム塩, 2,4-D ジメチルアミン塩, 2,4-D エチル, 2,4-D イソプロピル, 2,4-D ブトキシエチル及び 2,4-D アルカノールアミン塩 (以下「2,4-D 関連物質」という。)) を含む。) の残留基準値²⁾は、えん麦, 大麦, マイロ, 小麦及びライ麦で 0.5 mg/kg, とうもろこしで 0.05 mg/kg, 牧草で 260 mg/kg となっている。また、飼料の有害物質の指導基準における残留基準値³⁾は、稲わらで 1 mg/kg となっている。更に、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⁴⁾は、米 (玄米) で 0.1 ppm, とうもろこしで 0.05 ppm, その他穀類では 0.5 ppm となっている。

飼料中の 2,4-D の分析法としては、既に飼料分析基準⁵⁾に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。)) による単成分分析法 (適用範囲: 穀類)⁶⁾及びガスクロマトグラフによる 2,4,5-T との同時分析法⁷⁾ (2,4-D 関連物質は非対象) が記載されている。また、食品中の 2,4-D の分析法としては、厚生労働省通知試験法⁸⁾として個別試験法 (ガスクロマトグラフ (ECD) 及びガスクロマトグラフ質量分析計) が示されている。

既に飼料分析基準に記載されている LC-MS/MS による 2,4-D の分析法を開発するにあたり、この分析法を穀類及び乾牧草に適用した場合の再現精度等を共同試験により確認したところ、穀類では良好な室間再現精度が得られたが、乾牧草では HorRat が 2 を大幅に超え、良好な再現精度を得ることができなかった⁶⁾。よって、穀類を適用範囲とする分析法のみを先行して飼料分析基準に記載し、乾牧草を適用範囲とする分析法は継続検討することとされた。

穀類を対象とした飼料分析基準既記載法は、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事業」において開発した LC-MS/MS を用いた定量法 (以下「JFRL 法」という。))⁹⁾を基にした、2,4-D 関連物質を加水分解により 2,4-D に変換し、2,4-D として定量する方法である。JFRL 法の開発過程において、2,4-D 関連物質のうち最も極性の低い 2,4-D ブトキシエチルの加水分解率の検討が行われ、良好な結果が得られている。穀類を対象とした飼料分析基準既記載法においては、2,4-D エチルを用いて 2,4-D 関連物質を含めた定量法としての妥当性を確認しており、乾牧草を適用範囲とする本検討においても 2,4-D エチルを用いて検討を行った。

飼料分析基準既記載法を乾牧草に適用した場合に良好な室間再現精度が得られなかった原因は、加水分解後の中和操作が困難であった (穀類では中性に達した時点で試料溶液が白濁するため調整が容易であったが、乾牧草では中性に達した時点でも白濁せず、見極めが難しいため、試料溶液が酸性側に片寄ってしまった。) こと、酸性下での抽出液をアセトンで希釈すると酸性が弱まり、その後の酢酸エチル-ヘキサン (1+1) による転溶 (以下「液液分配 I」という。)) が不十分となった可能性があること等が考えられた。そこで、牧草における 2,4-D 及びその関連物質の残留基準値が主要穀類に比べて極めて高く設定されていることから、乾牧草の試料溶液を希釈することにより、穀類を対象とした飼料分析基準既記載法の定量手順のうち、液液分配 I, オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 (供試前の中和操作を含む。以下「カラム処理 I」という。)) 及びグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製 (以下「カラム処理 II」という。)) の操作が省略可能となるのではないかと考え、その実証等を行ったので、その概要を報告する。

参考に 2,4-D 及び 2,4-D エチルの構造式等を Fig. 1 に示した。

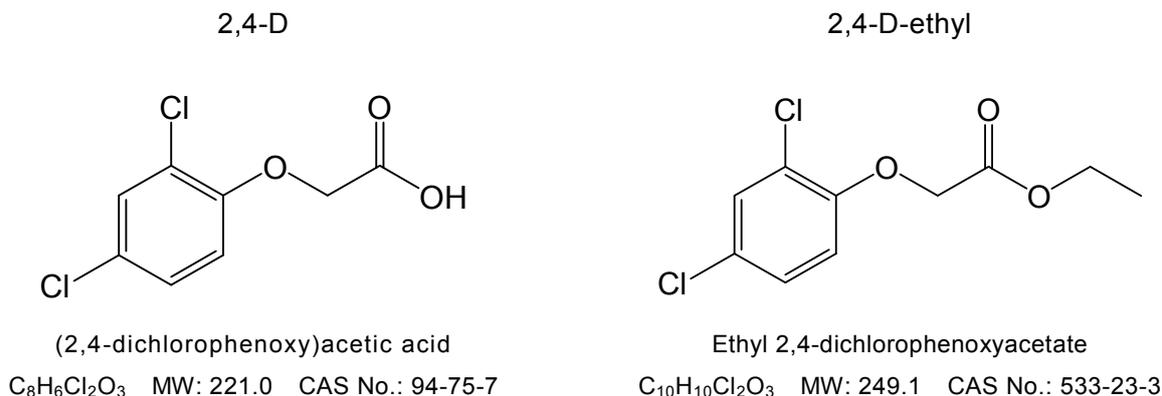


Fig. 1 Chemical structures of 2,4-D and 2,4-D-ethyl

2 実験方法

2.1 試料

チモシー乾草，オーツ乾草及びライグラスわらはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン，ジエチルエーテル，塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは抽出操作には残留農薬・PCB 試験用を，溶離液には LC/MS 用を用いた。酢酸アンモニウム溶液は和光純薬工業製 LC 用 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。その他の試薬は特級（ギ酸は 98 % のもの）を用いた。2,4-D エチル標準品は Dr. Ehrenstorfer 製（純度 99.0 %）を用いた。

2) 2,4-D 標準液

2,4-D 標準品（関東化学製，純度 98.6 %）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，更に標線までアセトンを加えて検量線作成用 2,4-D 標準原液を調製した（この液 1 mL は，2,4-D として 0.5 mg を含有する ($f=0.986$) . .）。

使用に際して，2,4-D 標準原液の一定量を，メタノールーギ酸（1000+1）で正確に希釈し，1 mL 中に 2,4-D として 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, 0.2 及び 0.4 µg を含有する各 2,4-D 標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 1430 rpm）
- 2) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Mega Bond Elut C18 カートリッジ（充てん剤量 1 g）Agilent Technologies 製にリザーバー（20 mL）を連結したもの
- 3) グラファイトカーボン／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：InertSep GC/PSA カートリッジ（充てん剤量 500 mg/500 mg）ジーエルサイエンス製にリザーバー（50 mL）を連結したもの

4) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY Xevo TQD Waters 製

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 30 mL を加え、30 分間静置後、更に塩酸 (4 mol/L) 5 mL 及びアセトン 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。この液をアセトンで正確に 500 倍希釈した後、希釈液 8 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 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、加水分解に供する試料溶液とした。

2) 加水分解

試料溶液の入った 100 mL のなす形フラスコに水酸化ナトリウム溶液 (1.5 mol/L) 1 mL を加え、冷却管を付けて 80 °C の水浴で 30 分間加温した後放冷した。この液を液液分配に供する試料溶液とした。

3) 液液分配

試料溶液をあらかじめ塩酸 (4 mol/L) 5 mL 及び塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 A に加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 A に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、ジエチルエーテル層 (上層) を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 A をジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 B に加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、ジエチルエーテル層を先の三角フラスコに合わせた。ジエチルエーテル層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 A) でろ過した。分液漏斗 B 及び先の三角フラスコを少量のジエチルエーテルで洗浄し、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 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール-ギ酸 (1000+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各 2,4-D 標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) 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	Atlantis T3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), Waters
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate solution - 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (7:3) → 10 min → (0:10) (hold for 10 min) → 1 min → (7:3) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Ion source temperature	150 °C
Desolvation gas temperature	400 °C
Capillary voltage	0.6 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
2,4-D	219	161	-	28	12
	221	-	163		

5) 計 算

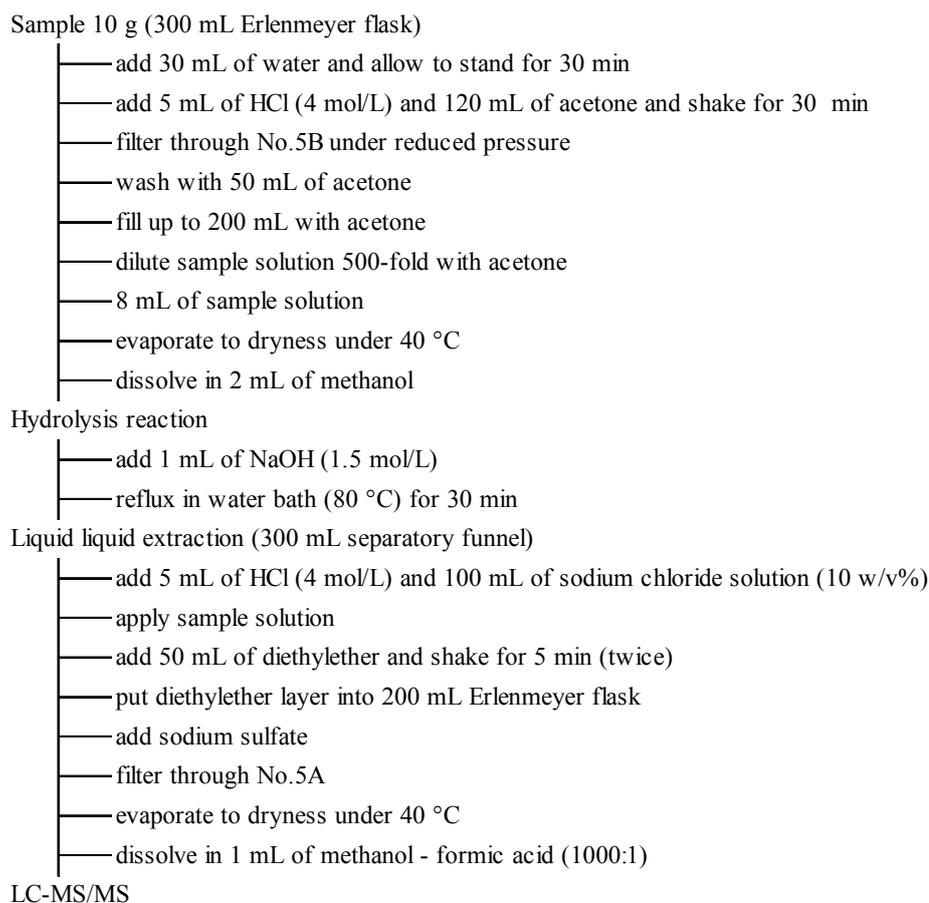
得られた SRM クロマトグラムから 2,4-D のピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の 2,4-D 量を算出した。

また、2,4-D エチル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、検量線から求めた試料中の 2,4-D 量を次式により 2,4-D エチル量に換算し、添加した 2,4-D エチルの試料中濃度で除してその割合を求めることにより行った。

$$\text{試料中の 2,4-D エチル量} = A \times 249.1 / 221.0$$

A : 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for 2,4-D and related compounds in grass hay

2.5 液液分配操作及びカラム処理操作の省略の可否に係る検討で用いた定量方法

穀類を適用範囲とする飼料分析基準収載法（第6章第1節2.1）を基に、各種精製操作の省略の可否に係る検討を行った。ただし、飼料中の2,4-Dの残留基準値は、主要穀類において0.5 mg/kg以下であるのに対し、乾牧草では260 mg/kgと極めて高くなっているため、飼料分析基準収載法の抽出において500倍希釈を加え、更に希釈を行うことにより水層の酸性が弱まるため、液液分配Iにおいてあらかじめ分液漏斗に塩酸を入れる操作をそれぞれ加えた以下の方法を用いた。

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30 mLを加え、30分間静置後、更に塩酸（4 mol/L）5 mL及びアセトン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。この液をアセトンで正確に500倍希釈し、液液分配Iに供する試料溶液とした。

2) 液液分配I

試料溶液8 mLを、あらかじめ塩酸（4 mol/L）5 mL、塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL及び酢酸エチル-ヘキサン（1+1）100 mLを入れた300 mLの分液漏斗Aに正確に加え、5分間振り混ぜた後静置した。水層（下層）を300 mLの分液漏斗Bに入れ、酢酸エチル-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 A を酢酸エチルーヘキサン（1+1）50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 B に加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、酢酸エチルーヘキサン層を先の三角フラスコに合わせた。酢酸エチルーヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した。分液漏斗 B 及び先の三角フラスコを少量の酢酸エチルーヘキサン（1+1）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 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、加水分解に供する試料溶液とした。

3) 加水分解

試料溶液の入ったなす形フラスコに水酸化ナトリウム溶液（1.5 mol/L）1 mL を加え、冷却管を付けて 80 °C の水浴で 30 分間加温した後放冷した。pH を塩酸（1.5 mol/L）で 7.5~8.0 に調整（pH は pH 試験紙を用いて確認）した後、炭酸水素ナトリウム溶液（0.1 w/v%）16 mL を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

4) 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メタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した（吸引マニホールドを用い、流速を 1 mL/min 程度とした。以下同じ。）。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。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを炭酸水素ナトリウム溶液（0.1 w/v%）-メタノール（1+1）5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えて 2,4-D を溶出させ、更に同溶媒 15 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させた。この溶出液を液液分配 II に供する試料溶液とした。

5) 液液分配 II

試料溶液をあらかじめ塩酸（4 mol/L）5 mL 及び塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 C に加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 C に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 D に入れ、ジエチルエーテル層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 C をジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 D に加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、ジエチルエーテル層を先の三角フラスコに合わせた。ジエチルエーテル層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した。分液漏斗 D 及び先の三角フラスコを少量のジエチルエーテルで洗浄し、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 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。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 II に供する試料溶液とした。

6) カラム処理 II

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムをアセトニトリル-トルエン（3+1）10 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に、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-トルエン（3+1）5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに入れ、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをア

セトニトリルトルエン-ギ酸 (75+25+1) 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えて 2,4-D を溶出させ、更に同溶媒 25 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール-ギ酸 (1000+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

2.6 液液分配 I の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.5 の 1)から 6)までの操作を行った (操作の省略なし)。
- 2) 2.4 の 1)の操作を行った後、2.5 の 3)以降の操作を行った (液液分配 I 操作の省略)。

2.7 カラム処理 I の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.4 の 1)の操作を行った後、2.5 の 3)以降の操作を行った (液液分配 I 操作の省略)。
- 2) 2.4 の 2)までの操作を行い得られた試料溶液について、2.5 の 5)以降の操作を行った (液液分配 I 及びカラム処理 I 操作の省略)。

2.8 カラム処理 II の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.4 の 2)までの操作により得られた試料溶液について、2.5 の 5)以降の操作を行った (液液分配 I 及びカラム処理 I 操作の省略)。
- 2) 2.4 の 1)から 3)までの操作を行った (液液分配 I, カラム処理 I 及びカラム処理 II 操作の省略)。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2)に従って調製した 2,4-D として各 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, 0.2 及び 0.4 µg/mL 相当量の各標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さ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、2,4-D で各 0.004~0.4 µg/mL 相当量 (注入量として 0.02~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

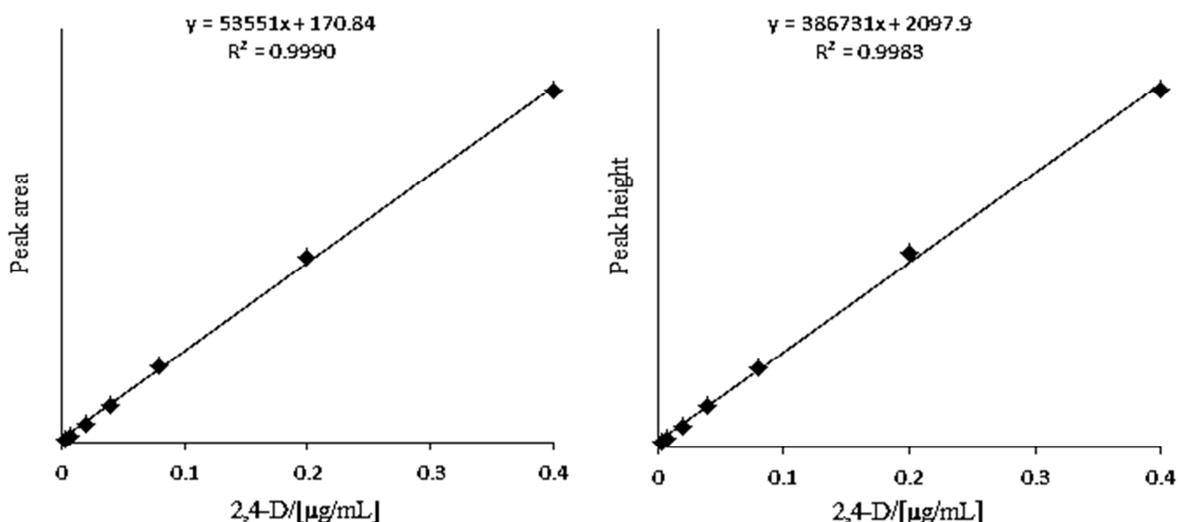


Fig. 2 Calibration curves of 2,4-D by peak area (left) and peak height (right)

3.2 液液分配 I の操作省略の可否に係る検討

2.6 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 3 のとおり、液液分配 I 操作を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、液液分配 I の操作は省略可能と考えられた。

Table 3 Effects of omission of liquid liquid extraction I

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with liquid liquid extraction I	Preparation without liquid liquid extraction I
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	88.9	88.0
	2	87.9	91.2
	3	91.9	91.1
Mean recovery (%)		89.6	90.1
RSD _r ^{a)} (%)		2.4	2.0

a) Relative standard deviation of repeatability

3.3 カラム処理 I の操作省略の可否に係る検討

2.7 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 4 のとおり、カラム処理操作 I を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、カラム処理 I の操作は省略可能と考えられた。

Table 4 Effects of omission of clean-up column I (Mega Bond Elut C18)

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up column I	Preparation without clean-up column I
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	93.0	90.7
	2	92.3	94.1
	3	83.9	89.0
Mean recovery (%)		89.7	91.2
RSD _r ^{a)} (%)		5.7	2.8

a) Relative standard deviation of repeatability

3.4 カラム処理 II の操作省略の可否に係る検討

2.8 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 5 のとおり、カラム処理 II 操作を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、カラム処理 II の操作は省略可能であると考えられた。

Table 5 Effects of omission of clean-up column II (InertSep GC/PSA)

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up column II	Preparation without clean-up column II
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	97.5	92.2
	2	90.5	95.7
	3	87.7	97.0
Mean recovery (%)		91.9	94.9
RSD _r ^{a)} (%)		5.5	2.6

a) Relative standard deviation of repeatability

3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製したチモシー乾草のブランク試料溶液に 2,4-D として 5 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.008 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)に従って調製した同濃度の 2,4-D 標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比はともに 98 % であり、2,4-D は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3.6 妨害物質の検討

小麦わら 1 検体、オーツ乾草 2 検体、クレイングラス乾草 2 検体、スーダングラス乾草 2 検体、チモシー乾草 2 検体、フェスクわら 1 検体及びライグラスわら 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、スーダングラス乾草 1 検体において、検出下限以上（定量下限未満）のピークが認められた。

当該試料では確認イオンでも同様にピークが検出され、このイオンで別途検量線を作成し、確認したところ、定量イオンとほぼ同等の濃度となったことから、2,4-D 及びその関連物質が残留している試料であると判断した。その他の試料では、定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、当該スーダングラス乾草の SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 の B に示した。

3.7 添加回収試験

2,4-D として、チモシー乾草に 260 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.208 及び 0.008 µg/mL 相当量）、ライグラスわらに 260, 10 及び 5 mg/kg を添加（最終試料溶液中で各 0.208, 0.008 及び 0.004 µg/mL 相当量）を添加し、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。

また、2,4-D エチルは、加水分解により 2,4-D に変換されることから、両者が共存している場合には定量値は 2,4-D 及び 2,4-D エチルの含量として算出される。このことから 2,4-D エチルの添加回収試験による試験の際には 2,4-D エチルのみを添加して評価を行うこととした。2,4-D エチルとして、チモシー乾草及びライグラス乾草に 260 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.185 及び 0.007 µg/mL 相当量）を添加し、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 6 及び Table 7 のとおり、2,4-D は、チモシー乾草では平均回収率 98.2~105 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.2 %以下、同様にライグラスわらでは 91.7~98.6 %及び 4.8 %以下であった。一方、2,4-D エチルは、チモシー乾草では平均回収率 94.9~96.2 %、その繰返し精度は、RSD_r として 5.0 %以下、同様にライグラスわらでは 90.0~94.7 %及び 5.7 %以下であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 6 Recoveries for 2,4-D

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Timothy hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
260	105	4.2	93.1	1.9
10	98.2	0.4	91.7	4.0
5	-	-	98.6	4.8

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries for 2,4-D-ethyl

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Timothy hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
260	94.9	2.6	90.0	5.7
10	96.2	5.0	94.7	5.0

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

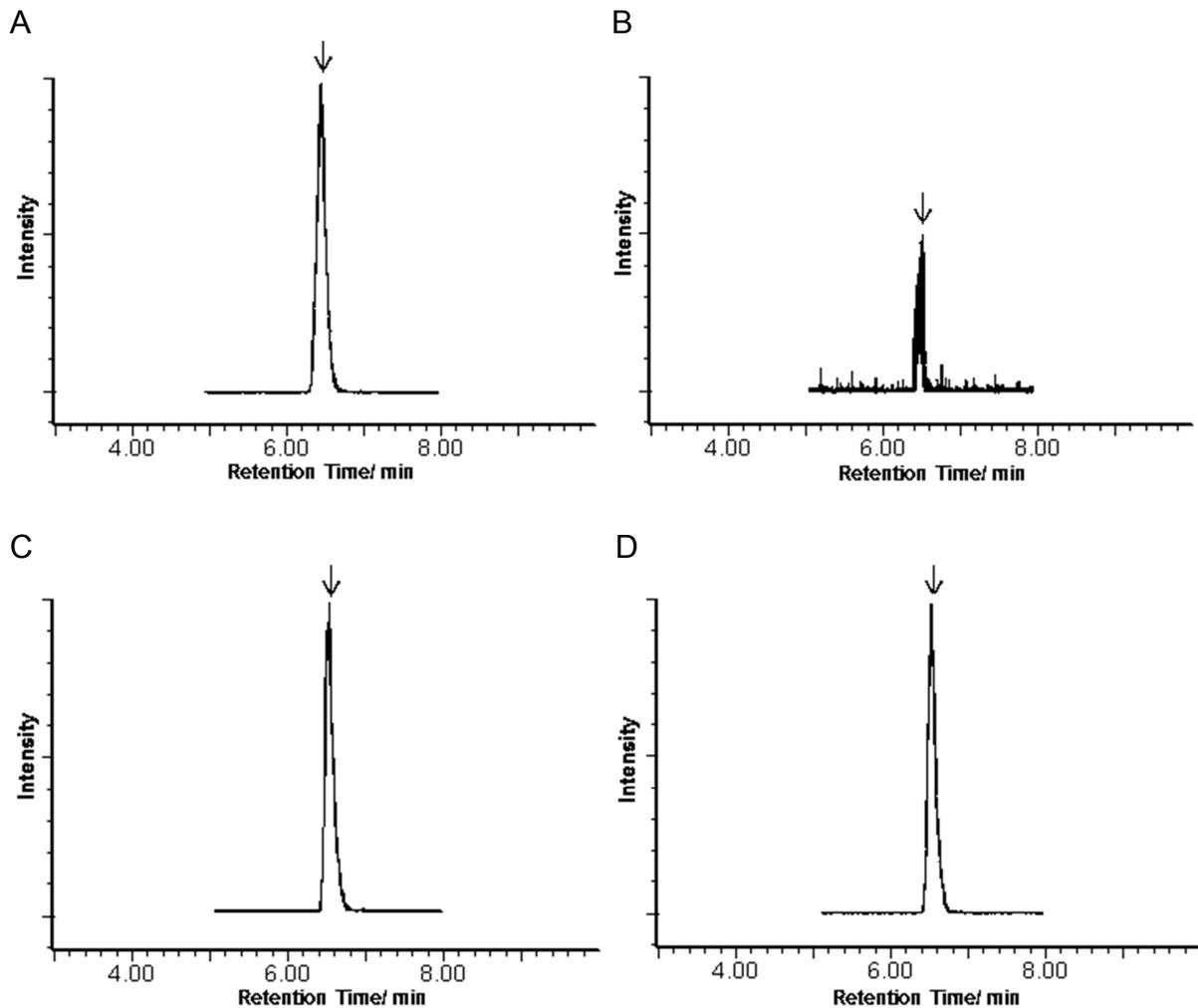


Fig. 3 SRM chromatograms

(Arrows indicate the peak of 2,4-D and each peak is shown as 100 % in each segment except B, in which the peak of 2,4-D in the lowest standard solution (0.004 $\mu\text{g/mL}$) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentration is 0.2 $\mu\text{g/mL}$ for 2,4-D.)

B: Sample solution of sudan grass hay (not spiked with 2,4-D)

C: Sample solution of timothy hay (spiked with 2,4-D at 260 mg/kg)

D: Sample solution of timothy hay (spiked with 2,4-D-ethyl at 260 mg/kg)

3.8 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、2,4-Dを添加した添加回収試験により得られたピークの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5 mg/kgであった。また、SN比が3となる濃度は2 mg/kgであった。

なお、この定量下限濃度における回収率及び繰返し精度は、先にTable 6に示したとおり良好であった。

3.9 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共

同試験を実施した。

共通試料としては、チモシー乾草及びオーツ乾草にそれぞれ 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして 260 及び 52 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 2600 及び 520 μ g 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個別に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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 9 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^{10), 11)}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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式¹²⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 及び Table 9 のとおりであった。2,4-D では、チモシー乾草及びオーツ乾草について、平均回収率は 94.2 及び 93.5 %、 RSD_f は 3.4 及び 2.7 %、 RSD_R は 11 及び 15 %、HorRat は 1.5 及び 1.7 であった。2,4-D エチルでは、チモシー乾草及びオーツ乾草について、平均回収率は 84.8 及び 82.4 %、 RSD_f は 6.9 及び 3.2 %、 RSD_R は 11 及び 8.0 %、HorRat は 1.5 及び 0.86 であった。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 8 Collaborative study results of 2,4-D

Lab. No.	Feed types			
	Timothy hay (mg/kg)		Oats hay (mg/kg)	
1	243	244	52.2	49.8
2	268	257	51.7	49.5
3	229	231	47.7	45.1
4	235	253	52.1	51.1
5	263	254	47.7	48.0
6	228	230	39.4	37.8
7	272	258	47.6	47.8
8	203	184	40.0	41.3
9	285	272	61.9	64.7
Spiked level (mg/kg)	260		52	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	245		48.6	
Recovery ^{a)} (%)	94.2		93.5	
RSD _r ^{b)} (%)	3.4		2.7	
RSD _R ^{c)} (%)	11		15	
PRSD _R ^{d)} (%)	7.0		8.9	
HorRat	1.5		1.7	

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 9 Collaborative study results of 2,4-D-ethyl

Lab. No.	Feed types			
	Timothy hay (mg/kg)		Oats hay (mg/kg)	
1	179	186	34.1	36.5
2	213	207	41.2	43.4
3	191	197	38.1	35.8
4	216	203	42.3	40.2
5	228	192	35.2	36.9
6	188	159	35.2	34.7
7	220	228	41.4	41.3
8	173	165	36.3	35.0
9	177	203	37.6	38.9
Spiked level (mg/kg)	260		52	
Spiked level as 2,4-D (mg/kg)	231		46.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	196		38.0	
Recovery ^{a)} (%)	84.8		82.4	
RSD _r ^{b)} (%)	6.9		3.2	
RSD _R ^{c)} (%)	11		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	7.2		9.3	
HorRat	1.5		0.86	

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 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length,particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP, Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY Xevo TQD, Waters	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-SP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: LC-20A, Shimadzu MS/MS: API4000, Applied Biosystems	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
9	LC: LC-30AD, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Atlantis dc18, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

乾牧草中に残留する 2,4-D 及びその関連物質について、穀類の分析法を基に LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、液液分配 I, カラム処理 I 及びカラム処理 II を省略することにより、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、2,4-D で各 0.004~0.4 μg/mL 相当量（注入量として 0.02~2 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、2,4-D において 0.004, 0.008 及び 0.208 μg/mL 相当濃度、2,4-D エチルにおいて 0.007 及び 0.185 μg/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、2,4-D は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3) 乾牧草について、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。

4) 2,4-D として、乾牧草に 260, 10 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料並びに 2,4-D エチルとして、乾牧草に 260 及び 10 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ところ、良好な結果を得た。

- 5) 本法の 2,4-D の定量下限は 5 mg/kg, 検出下限は 2 mg/kg であった.
- 6) チモシー乾草及びオーツ乾草にそれぞれ 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして 260 及び 52 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財団法人食品環境検査協会東京事業所, 協同飼料株式会社研究所及び全国農業協同組合連合会飼料畜産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) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法, 中央法規出版, 24 (1995) (ISBN 4-8058-1321-0).
- 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) 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) 山本 克己, 野村 昌代, 山本 謙吾: 穀類中の 2,4-D 及びその関連物質の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法, 飼料研究報告, 39, 1-16 (2014).
- 7) 古賀 龍二: 飼料中の 2,4-D 及び 2,4,5-T の定量法の分析精度の検討, 飼料研究報告, 21, 69-79 (1996).
- 8) 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).
- 9) 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事業 (2011).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 11) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 12) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, Analyst, 125, 385-386 (2000).

2 飼料用イネ中のエチプロール他 5 成分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

義本 将之*, 屋方 光則*, 齊木 雅一*

Simultaneous Determination of Ethiprole and 5 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Masayuki YOSHIMOTO*, Mitsunori YAKATA* and Masakazu SAIKI*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of six pesticides (carpropamide, chlorantraniliprole, chromafenozide, ethiprole, pyroquilon and thifluzamide) in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice 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 then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. Sample solutions were then purified with InertSep Slim-J C18-B (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and ENVI-Carb/NH₂ (Supelco Inc.; Bellefonte, PA, USA), and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of six pesticides. 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.; Tokyo, Japan) 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 3.0 or 0.1 mg/kg of carpropamide, 0.1 or 0.01 mg/kg of chlorantraniliprole, 5.0 or 0.1 mg/kg of chromafenozide, 3.0 or 0.1 mg/kg of ethiprole, 3.0 or 0.1 mg/kg of pyroquilon, and 1.0 or 0.1 mg/kg of thifluzamide. Whole-crop rice silage was spiked with 0.89 or 0.044 mg/kg of carpropamide and pyroquilon, and 1.3 or 0.044 mg/kg of other four pesticides. Paddy rice was spiked with 3.0 or 0.1 mg/kg of chromafenozide, and 1.0 or 0.1 mg/kg of other five pesticides. The resulting mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r), respectively, were 83.3 to 105 % and not more than 12 % for carpropamide, 93.5 to 103 % and not more than 10 % for chlorantraniliprole, 85.9 to 105 % and not more than 11 % for chromafenozide, 83.5 to 94.6 % and not more than 16 % for ethiprole, 79.4 to 103 % and not more than 13 % for pyroquilon and 85.2 to 119 % and not more than 20 % for thifluzamide.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using rice straw and paddy rice spiked with the six pesticides. The rice straw was spiked with 0.1 mg/kg of chlorantraniliprole, and with 1.0 mg/kg each of the other pesticides. Paddy rice was spiked with 1.0 mg/kg each of the six pesticides. The mean recoveries of carpropamide were 91.7 to 97.0 % and repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.5 %, 4.0 %, 4.6 %, 4.3 %, 0.28, and 0.27, respectively. The respective values obtained for the other pesticides were as follows: (chlorantraniliprole) 75.8 %, 95.6 %, 11 %, 7.3 %, 25 %, 9.4 %, 1.2, and 0.58; (chromafenozide) 94.8 %, 101 %, 8.1 %, 1.9 %, 8.1 %, 4.3 %, 0.50, and 0.27; (ethiprole) 92.5 %, 98.5 %, 5.0 %, 4.8 %, 6.0 %, 8.0 %, 0.37, and 0.50; (pyroquilon) 90.8 %, 94.2 %, 4.4 %, 3.8 %, 6.3 %, 5.8 %, 0.39, and 0.36; (thifluzamide) 92.6 %, 99.2 %, 5.4 %, 3.5 %, 6.4 %, 5.1 %, 0.40, and 0.32.

This method was validated and established for use in the inspection of six pesticides in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

* 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

Key words: carpropamide; chlorantraniliprole; chromafenozide; ethiprole; pyroquilon; thifluzamide; 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：カルプロパミド；クロラントラニリプロール；クロマフェノジド；エチプロール；ピロキロン；チフルザミド；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；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

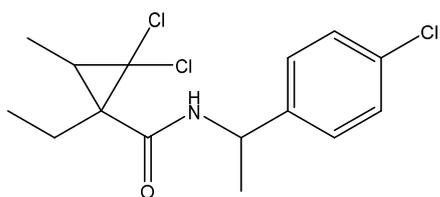
飼料の有害物質の指導基準¹⁾の改正（平成 21 年 1 月 29 日）により，飼料用イネ（稲わら，稲発酵粗飼料及び粃米）について残留農薬の指導基準値が追加設定された．飼料用イネに基準が設定されている農薬のうち，分析法が飼料分析基準²⁾に記載されていない成分があること，基準は設定されていないが国内で稲に適用のある農薬についてもモニタリングする必要があることから，これらの農薬を迅速に定量できる分析法の開発が必要であった．

今回，一般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分析法開発委託事業」において開発した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．）による多成分分析法³⁾（以下「JFRL 法」という．）を基に，JFRL 法が対象とする農薬成分のうちの 5 成分（カルプロパミド，クロマフェノジド，エチプロール，ピロキロン及びチフルザミド）にクロラントラニリプロールを加えた 6 成分を対象とし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を行ったので，その概要を報告する．

なお，今回検討した農薬のうち指導基準値が定められていないチフルザミドを除いた 5 成分について，その指導基準値を Table 1 に示した．また，参考に各農薬の構造式等を Fig. 1-1~1-6 に示した．

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

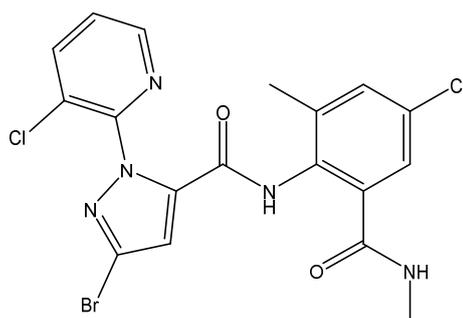
Pesticide	Feed types	Regulation value (mg/kg)
Carpropamide	Rice straw	3
	Whole-crop rice silage	0.7
Chlorantraniliprole	Rice straw	0.1
Chromafenozide	Rice straw	5
	Paddy rice	3
Ethiprole	Rice straw	3
	Paddy rice	1
Pyroquilon	Rice straw	3
	Whole-crop rice silage	0.5



(1*RS*,3*SR*)-2,2-dichloro-*N*-[1-(4-chlorophenyl)ethyl]-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide

$C_{15}H_{18}Cl_3NO$ MW: 334.7 CAS No.: 104030-54-8

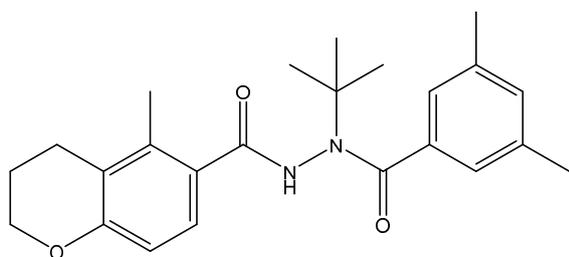
Fig. 1-1 Chemical structure of carpropamide



3-bromo-*N*-[4-chloro-2-methyl-6-(methylcarbamoyl)phenyl]-1-(3-chloropyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide

$C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$ MW: 483.2 CAS No.: 500008-45-7

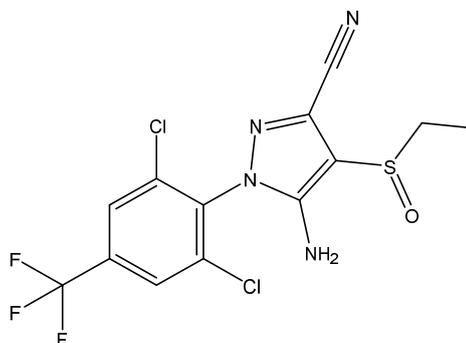
Fig. 1-2 Chemical structure of chlorantraniliprole



2'-*tert*-butyl-5-methyl-2'-(3,5-xyloyl)chromane-6-carbohydrazide

$C_{24}H_{30}N_2O_3$ MW: 394.5 CAS No.: 143807-66-3

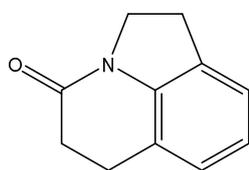
Fig. 1-3 Chemical structure of chromafenozide



5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-ethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile

$C_{13}H_9Cl_2F_3N_4OS$ MW: 397.2 CAS No.: 181587-01-9

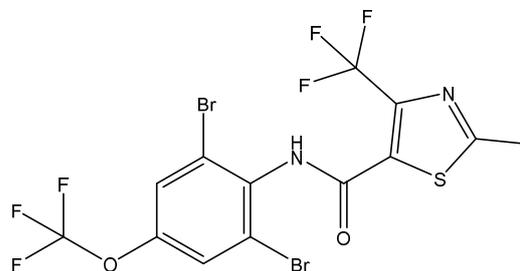
Fig. 1-4 Chemical structure of ethiprole



1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-*ij*]quinolin-4-one

$C_{11}H_{11}NO$ MW: 217.2 CAS No.: 57369-21-1

Fig. 1-5 Chemical structure of pyroquilon



2',6'-dibromo-2-methyl-4'-trifluoromethoxy-4-trifluoromethyl-1,3-thiazole-5-carboxanilide

$C_{13}H_6Br_2F_6N_2O_2S$ MW: 528.1 CAS No.: 130000-40-7

Fig. 1-6 Chemical structure of thifluzamide

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎した。稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）は 60 °C で 5 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びトルエンは残留農薬試験用を用いた。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。

2) 各農薬標準品

カルプロパミド、クロラントラニプロール、クロマフェノジド、エチプロール、ピロキロン及びチフルザミドの標準品は、Table 2 に示した供給業者、純度のものを用いた。

3) 各農薬標準原液

農薬標準品各 50 mg を正確に量ってそれぞれ 100 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。）。

4) 農薬混合標準液

6 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 0.5, 0.1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 及び 50 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

Table 2 Pesticide standards used in this study

Pesticides	Manufacturers	Purity (%)
Carpropamide	Kanto Chemical	98
Chlorantraniliprole	Dr. Ehrenstorfer	99.5
Chromafenozide	Kanto Chemical	99
Ethiprole	Dr. Ehrenstorfer	97.5
Pyroquilon	Wako Pure Chemical Industries	98.0
Thifluzamide	Wako Pure Chemical Industries	99.0

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数 1430 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）
ジーエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（5 mL 保持用）Agilent Technologies 製
- 5) 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：ENVI-

Carb/LC-NH₂ (充てん剤量 500 mg/500 mg) Supelco 製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : Quattro Premier XE Waters 製

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 30 mL (粃米は 20 mL) を加えて、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL (粃米は 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 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 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。以下すべてのカラム処理において同様の操作を行った。)。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) 9 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た。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 まで減圧濃縮した後、水 2 mL を加えてカラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、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 ずつで 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。更に同溶媒 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た。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をアセトニトリル-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を流出させた。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。更にアセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL をミニカラムに加えて同様に流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル-水 (3+2) 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、上澄み液の一定量を同溶媒で正確に 10 倍希釈して LC-MS/MS 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、先の遠心分離した後の上澄み液をクロラントラニプロールの定量に用いるための LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) 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

Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μ m), GL Sciences
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min) → (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ , 450 °C, 600 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Capillary voltage	Positive: 2.0 kV, Negative: 1.0 kV

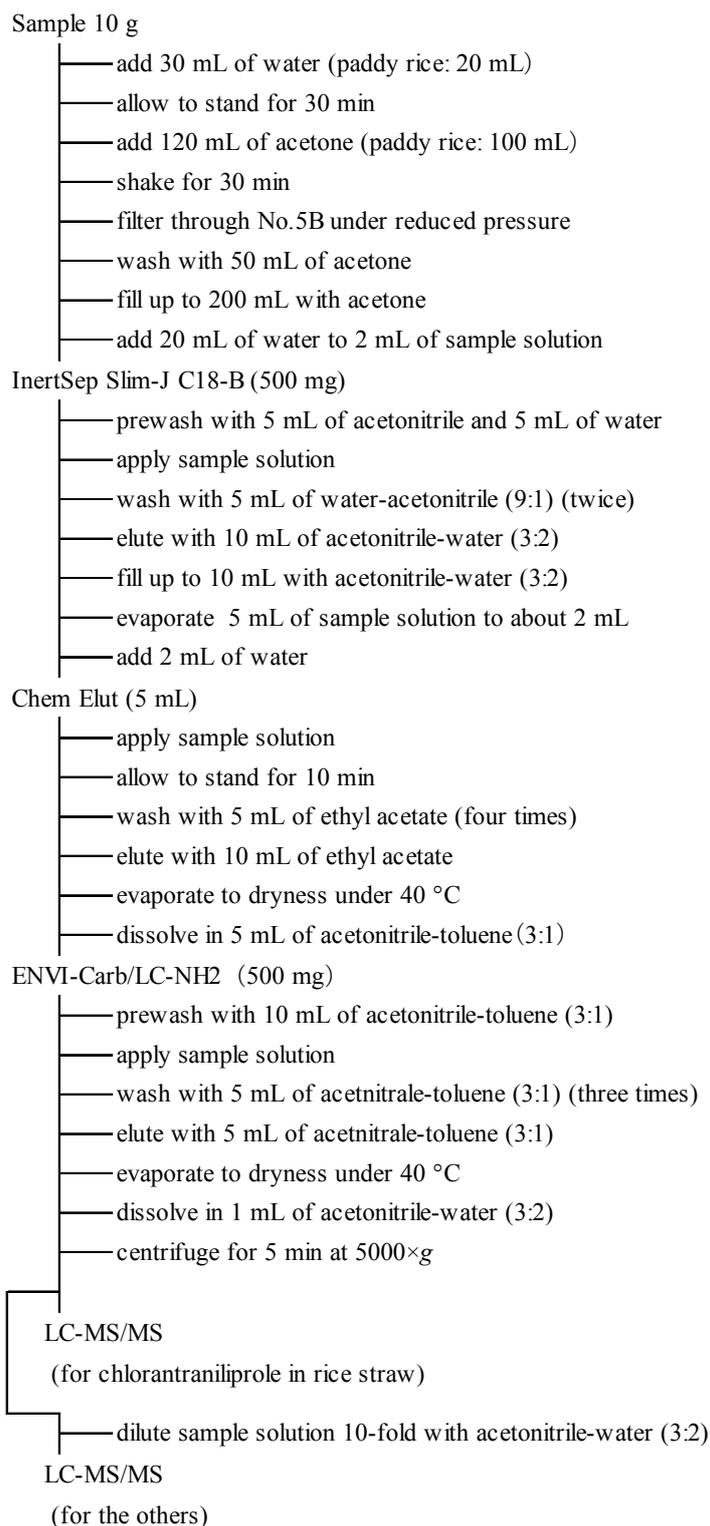
Table 4 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Carpropamide	+	334	139		30	20
				103	30	40
Chlorantraniliprole	+	482	284		25	15
				112	25	50
Chromafenozide	+	395	175		15	15
				91	15	50
Ethiprole	-	395	330		20	15
				250	20	25
Pyroquilon	+	174	132		45	20
				117	45	25
Thifluzamide	-	527	125		25	45
				166	25	30

6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for the 6 pesticides in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4)に従って調製した各農薬混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM 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。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、0.5~50 ng/mL 相当量（注入量として 0.0025~0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

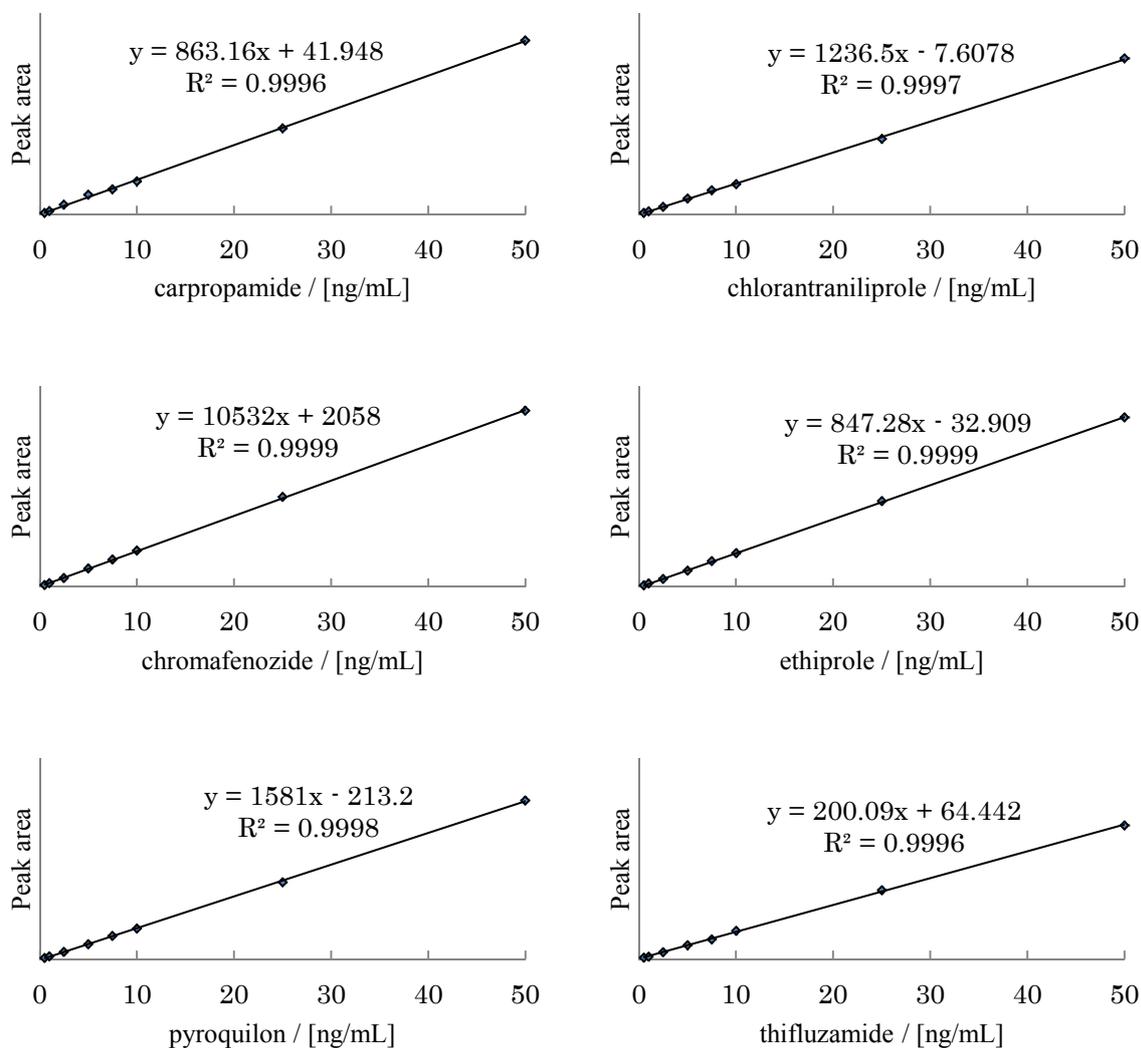


Fig. 2 Calibration curves of six pesticides (carpropamide, chlorantraniliprole, chromafenozide, ethiprole, pyroquilon and thifluzamide)

3.2 抽出液の希釈操作について

稲わら中のクロラントラニプロールについては、指導基準値が 0.1 mg/kg（最終試料溶液中 0.5 ng/mL）と定められている。JFRL 法は、アセトン抽出後 200 mL に定容し、更に 10 倍希釈を行うが、定量下限が指導基準値と同じ 0.1 mg/kg であることから、より低い濃度まで定量下限を下げる必要がある。そのため、抽出液の 10 倍希釈は行わないこととして以後の検討を行った。また、これに合わせて、WCS 及び籾米中のクロラントラニプロール並びに飼料用イネ中のクロラントラニプロール以外の 5 成分の定量においてもアセトン抽出後に 10 倍希釈を行わず、カラム処理 III で得られる試料溶液を 10 倍希釈することとして以後の検討を行った。

3.3 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最終試料溶液中で 8 ng/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。分画したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出液は、それぞれ 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 Table 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 の画分では農薬の溶出は見られず、溶出溶媒であるアセトニトリル-水 (3+2) 0~9 mL の画分にすべての農薬が溶出し、その後の 9~20 mL の画分には溶出しなかった。

JFRL 法では、溶出溶媒であるアセトニトリル-水 (3+2) 10 mL で各農薬を溶出させているが、溶出液を 10 mL の全量フラスコで受けるため、標線を超えるおそれがある。そのため、溶出溶媒量を少なくできないか検討したところ、上記のとおりアセトニトリル-水 (3+2) 9 mL ですべての農薬の溶出が確認されたことから、JFRL 法を一部変更して、アセトニトリル-水 (3+2) 9 mL をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに加えて各農薬を溶出させ、更にアセトニトリル-水 (3+2) で 10 mL に定容させることとした。

Table 5-1 Elution patterns of 6 pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~9 mL	(2:3) 9~20 mL	
Carpropamide	0	96	0	96
Chlorantraniliprole	0	88	0	88
Chromafenozide	0	90	0	90
Ethiprole	0	93	0	93
Pyroquilon	0	90	0	90
Thifluzamide	0	88	0	88

a) Mean ($n=2$)

Table 5-2 Elution patterns of 6 pesticides from InertSep Slim-J C18-B (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~9 mL	(2:3) 9~20 mL	
Carpropamide	0	97	0	97
Chlorantraniliprole	0	86	0	86
Chromafenozide	0	88	0	88
Ethiprole	0	95	0	95
Pyroquilon	0	91	0	91
Thifluzamide	0	85	0	85

a) Mean ($n=2$)

3.4 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の確認

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最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量を添加し、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した。分画した多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液は、それぞれ 2.4 の 4)の精製を行った後定量に供した。その結果は Table 6-1 及び Table 6-2 に示したとおり、JFRL 法と同様にいずれも酢酸エチル 0~30 mL の画分にすべての農薬が溶出し、30~35 mL の画分には溶出しなかった。

Table 6-1 Elution patterns of 6 pesticides from Chem Elut (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~20 mL	20~30 mL	30~35 mL	
Carpropamide	97	0	0	97
Chlorantraniliprole	90	0	0	90
Chromafenozide	93	0	0	93
Ethiprole	98	0	0	98
Pyroquilon	91	0	0	91
Thifluzamide	98	0	0	98

a) $n=1$

Table 6-2 Elution patterns of 6 pesticides from Chem Elut (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~20 mL	20~30 mL	30~35 mL	
Carpropamide	92	4	0	96
Chlorantraniliprole	90	2	0	92
Chromafenozide	91	3	0	94
Ethiprole	99	2	0	101
Pyroquilon	87	0	0	87
Thifluzamide	96	3	0	99

a) $n=1$

3.5 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流出画分の確認

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最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量を添加し、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流出画分を確認した。その結果は Table 7-1 及び Table 7-2 に示したとおり、いずれもアセトニトリル-トルエン (3+1) 0~20 mL の画分にすべての農薬が流出し、20~45 mL の画分には流出しなかった。

JFRL 法では、アセトニトリル-トルエン (3+1) 15 mL で各農薬を流出させているが、JFRL 法の対象ではなく今回の検討に加えたクロラントラニプロールは、15~20 mL の画分にも流出が認められた。そこで、JFRL 法を一部変更して、アセトニトリル-トルエン (3+1) 20 mL で農

薬成分を流出させることとした。

Table 7-1 Elution patterns of 6 pesticides from ENVI-Carb/LC-NH₂ (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)			
	0~15 mL	15~20 mL	20~45 mL	
Carpropamide	92	0	0	92
Chlorantraniliprole	98	2	0	100
Chromafenozide	97	0	0	97
Ethiprole	99	0	0	99
Pyroquilon	90	0	0	90
Thifluzamide	101	0	0	101

a) $n=1$

Table 7-2 Elution patterns of 6 pesticides from ENVI-Carb/LC-NH₂ (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)			
	0~15 mL	15~20 mL	20~45 mL	
Carpropamide	94	0	0	94
Chlorantraniliprole	92	4	0	96
Chromafenozide	96	0	0	96
Ethiprole	98	0	0	98
Pyroquilon	86	0	0	86
Thifluzamide	100	0	0	100

a) $n=1$

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1), 2), 3)及び 4)により調製した稲わら, WCS 及び籾米のブランク試料溶液に各農薬として 1 mg/kg 相当量 (稲わら中のクロラントラニプロールは 0.1 mg/kg 相当量) (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 4)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比は 90~113 %であり, 各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3.7 妨害物質の検討

稲わら 1 検体, WCS 1 検体及び籾米 1 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 SRM 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。

なお, 妨害物質の検討で得られた SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

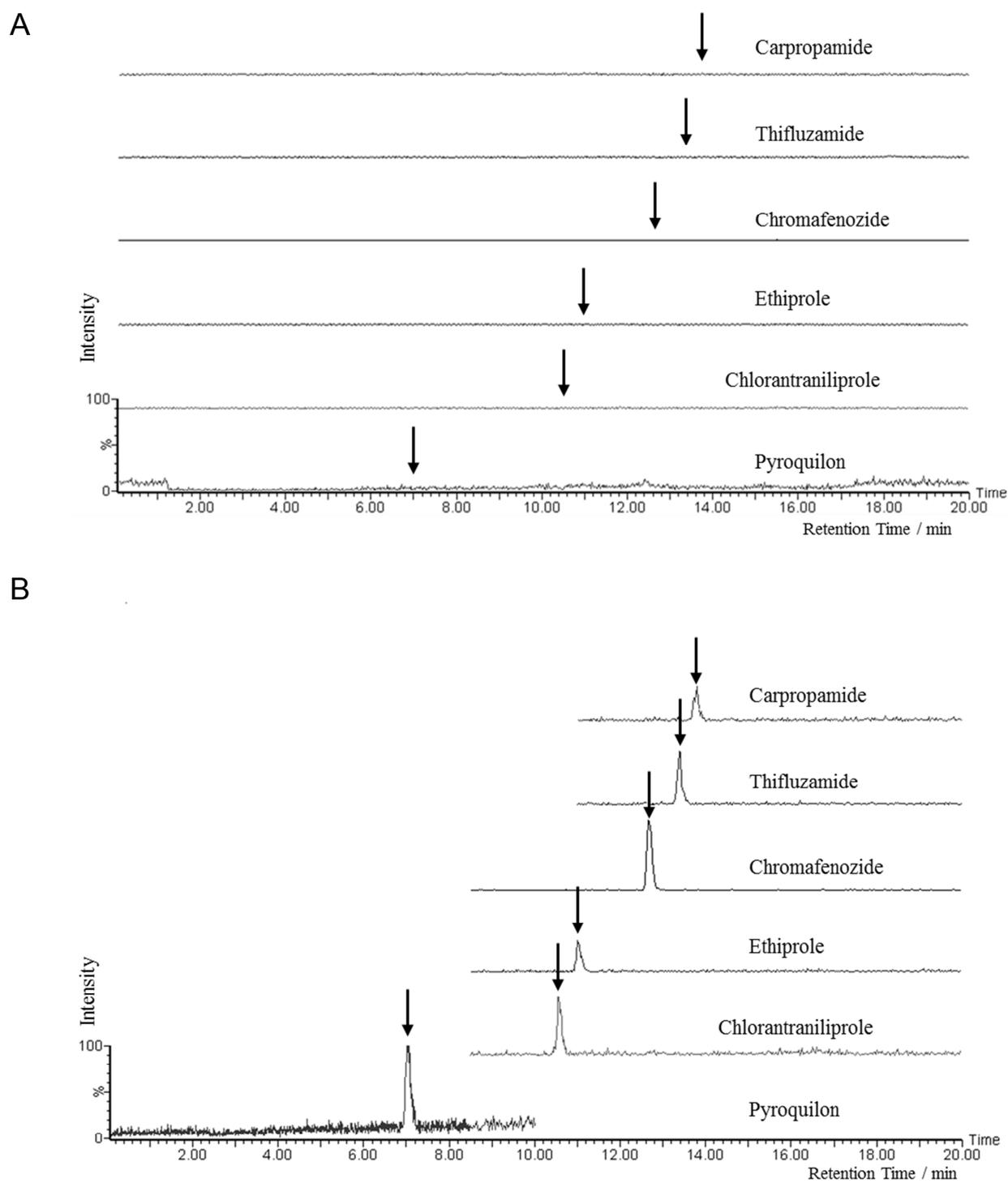


Fig. 3 SRM chromatograms of rice straw (blank) and standard solution (Arrows indicate the retention times of pesticides. Scales of y-axis are the same between A and B for each pesticide.)

A: Rice straw

B: Standard solution (0.5 ng/mL: 2.5 pg as each pesticide)

3.8 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネについて、カルプロパミドとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 0.89 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、クロラントラニリプロールとして、稲わらに 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、クロマフェノジドとして、稲わらに 5.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 25 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、エチプロールとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、ピロキロンとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 0.89 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、チフルザミドとして、稲わらに 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）それぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式から求めた。

その結果は Table 8 のとおり、カルプロパミドについては平均回収率は 83.3~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 12 %以下、クロラントラニリプロールについては平均回収率は 93.5~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 10 %以下、クロマフェノジドについては平均回収率は 85.9~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下、エチプロールについては平均回収率は 83.5~94.6 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 16 %以下、ピロキロンについては平均回収率は 79.4~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、チフルザミドについては平均回収率は 85.2~119 %、その繰返し精度は RSD_r として 20 %以下の成績が得られた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

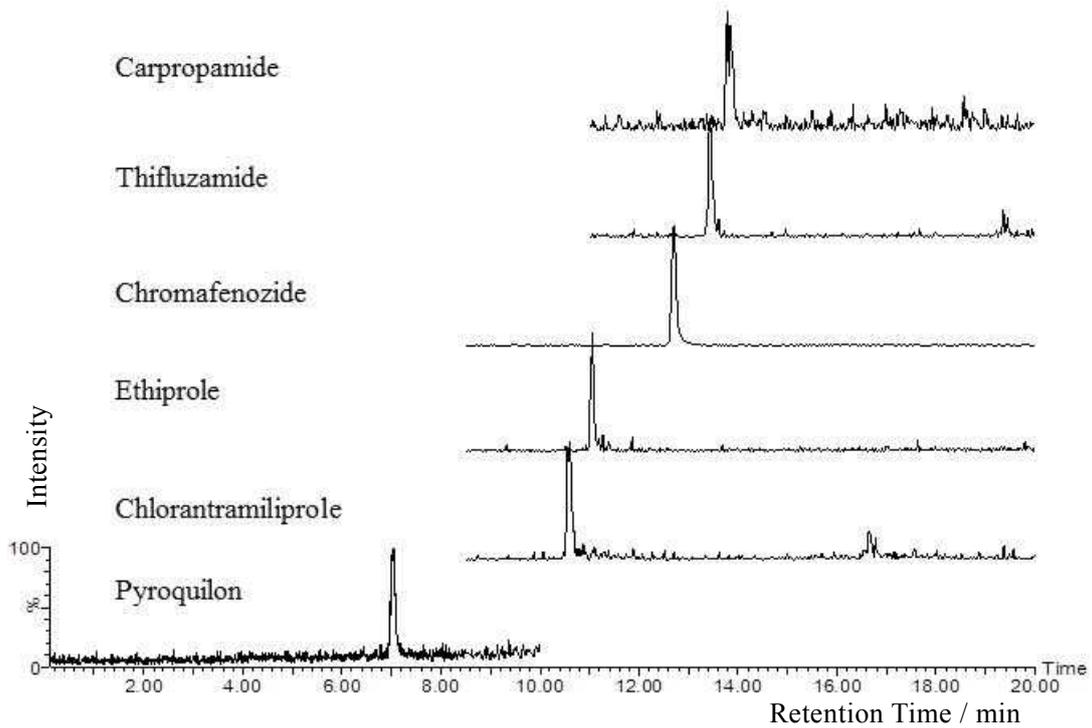
Table 8 Recoveries of pesticides

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)} (%)
Carpropamide	3.0	83.3	3.7	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	91.8	6.6
	0.89	-	-	89.9	4.3	-	-
	0.1	100	12	-	-	102	9.2
	0.044	-	-	105	3.5	-	-
Chlorantraniliprole	1.3	-	-	93.5	5.6	-	-
	1.0	-	-	-	-	103	2.9
	0.1	95.5	2.8	-	-	103	10
	0.044	-	-	98.3	4.2	-	-
	0.01	96.8	10	-	-	-	-
Chromafenozide	5.0	85.9	1.5	-	-	-	-
	3.0	-	-	-	-	92.7	1.1
	1.3	-	-	97.4	2.7	-	-
	0.1	105	11	-	-	101	1.6
	0.044	-	-	99.9	2.8	-	-
Ethiprole	3.0	90.4	5.0	-	-	-	-
	1.3	-	-	86.5	2.2	-	-
	1.0	-	-	-	-	94.6	4.3
	0.1	83.5	16	-	-	86.7	10
	0.044	-	-	88.8	12	-	-
Pyroquilon	3.0	79.4	13	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	88.7	12
	0.89	-	-	97.4	3.7	-	-
	0.1	103	9.9	-	-	102	5.5
	0.044	-	-	103	3.8	-	-
Thifluzamide	1.3	-	-	119	6.6	-	-
	1.0	85.2	6.7	-	-	92.3	4.6
	0.1	87.8	20	-	-	90.8	11
	0.044	-	-	98.2	3.6	-	-

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

A



B

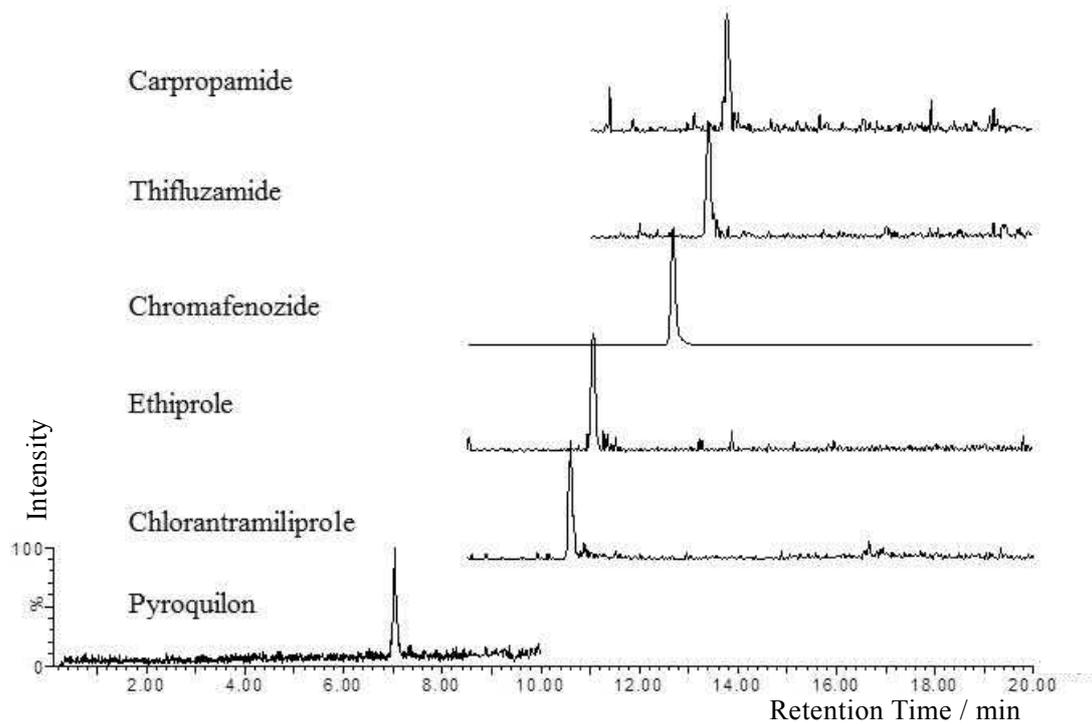


Fig. 4 SRM chromatograms of 6 pesticides

(The highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

A: Standard solution (The concentration is 0.5 ng/mL for all pesticides.)

B: Sample solution of barley (spiked at 0.1 mg/kg of all pesticides)

3.9 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、2.1 に従って調製した飼料用イネを試料として各農薬を添加し、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。

クロラントラニリプロールについては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は、稲わらで 0.01 mg/kg, WCS (風乾物) 及び粃米で 0.1 mg/kg であった。カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドについては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は、稲わら、WCS (風乾物) 及び粃米で 0.1 mg/kg であった。

以上の結果から、本法のクロラントラニリプロールの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg (稲わら 0.01 mg/kg), 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg (稲わら 0.003 mg/kg), カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg, 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg であった。

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知, かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わら及び粃米に各農薬として 1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1 μ g を含有する標準液 1 mL 添加) (稲わら中のクロラントラニリプロールは 0.1 mg/kg 相当量) 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た。参加試験室は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 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、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{4), 5)}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, 外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し, 得られた RSD_R から, 修正 Horwitz 式⁶⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 9-1~9-6 のとおりであった。稲わら及び粃米について、カルプロパミドの平均回収率は 91.7 及び 97.0 %, RSD_r は 3.5 及び 4.0 %, RSD_R は 4.6 及び 4.3 %, HorRat は 0.28 及び 0.27, クロラントラニリプロールの平均回収率は 75.8 及び 95.6 %, RSD_r は 11 及び 7.3 %, RSD_R は 25 及び 9.4 %, HorRat は 1.2 及び 0.58, クロマフェノジドの平均回収率は 94.8 及び 101 %, RSD_r は 8.1 及び 1.9 %, RSD_R は 8.1 及び 4.3 %, HorRat は 0.50 及び 0.27, エチプロールの平均回収率は 92.5 及び 98.5 %, RSD_r は 5.0 及び 4.8 %, RSD_R は 6.0 及び 8.0 %, HorRat は 0.37 及び 0.50, ピロキシロンの平均回収率は 90.8 及び 94.2 %, RSD_r は 4.4 及び 3.8 %, RSD_R は 6.3 及び 5.8 %, HorRat は 0.39 及び 0.36, チフルザミドの平均回収率は 92.6 及び 99.2 %, RSD_r は 5.4 及び 3.5 %, RSD_R は 6.4 及び 5.1 %, HorRat は 0.40 及び 0.32 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものが散見されたが、分析法操作が比較的簡便であることによるものと思われた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 9-1 Collaborative study results of carpropamide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.940	0.857	0.884	0.999
2	0.875	0.869	0.947	0.927
3	0.862	0.902	0.969	0.966
4	0.949	0.974	1.03	1.02
5	0.925	0.910	0.947	0.990
6	0.932	0.860	0.930	0.975
7	0.977	0.931	0.914	0.994
8	0.956	0.951	1.01	1.01
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.917		0.970	
Recovery ^{a)} (%)	91.7		97.0	
RSD _r ^{b)} (%)	3.5		4.0	
RSD _R ^{c)} (%)	4.6		4.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.28		0.27	

a) Rice straw: $n=16$; Paddy rice: $n=16$

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 9-2 Collaborative study results of chlorantraniliprole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.111	0.0872	1.02	1.02
2	0.0589	0.0527	0.867	0.873
3	0.0644	0.0681	0.874	0.795
4	0.0582	0.0558	1.01	1.02
5	0.0980	0.0850	1.08	0.847
6	0.0745	0.0679	0.863	0.958
7	0.0930	0.107	1.07	0.980
8	0.0655	0.0650	1.02	0.994
Spiked level (mg/kg)	0.1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0758		0.956	
Recovery ^{a)} (%)	75.8		95.6	
RSD _r ^{b)} (%)	11		7.3	
RSD _R ^{c)} (%)	25		9.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		16	
HorRat	1.2		0.58	

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 9-3 Collaborative study results of chromafenozide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.956	0.971	1.09	1.06
2	0.912	0.909	0.996	0.990
3	0.914	0.963	1.05	1.00
4	0.984	0.967	1.04	1.04
5	0.877	1.14	0.947	0.970
6	0.965	0.815	0.931	0.975
7	0.952	0.964	1.01	1.01
8	0.926	0.947	1.01	0.999
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.948		1.01	
Recovery ^{a)} (%)	94.8		101	
RSD _r ^{b)} (%)	8.1		1.9	
RSD _R ^{c)} (%)	8.1		4.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16.0		16	
HorRat	0.50		0.27	

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 9-4 Collaborative study results of ethiprole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.906	0.900	1.05	0.933
2	0.903	0.925	0.962	0.972
3	0.875	0.926	0.946	0.985
4	1.01	0.991	0.989	1.02
5	0.909	0.853	1.01	0.876
6	0.950	0.802	0.856	0.896
7	0.924	0.995	1.13	1.12
8	0.964	0.970	0.997	1.01
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.925		0.985	
Recovery ^{a)} (%)	92.5		98.5	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		4.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.0		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.37		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 9-5 Collaborative study results of pyroquilon

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.959	0.952	1.01	0.977
2	0.897	0.895	0.931	0.926
3	0.817	0.896	0.898	0.903
4	0.865	0.823	0.897	0.813
5	0.951	0.930	0.979	0.879
6	0.925	0.800	0.939	0.986
7	0.913	0.952	0.978	0.967
8	0.975	0.974	1.00	0.985
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.908		0.942	
Recovery ^{a)} (%)	90.8		94.2	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.3		5.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.39		0.36	

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 9-6 Collaborative study results of thifluzamide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.925	0.987	1.06	1.04
2	0.950	0.914	0.981	1.01
3	0.884	0.923	0.955	0.933
4	0.998	1.00	1.02	1.07
5	0.892	0.871	1.04	0.997
6	0.951	0.782	0.890	0.992
7	0.946	1.01	0.974	1.02
8	0.885	0.897	0.959	0.934
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.926		0.992	
Recovery ^{a)} (%)	92.6		99.2	
RSD _r ^{b)} (%)	5.4		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	6.4		5.1	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.40		0.32	

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	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: LC-30AD, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
3	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 GP,
	MS/MS: Xevo TQ-S MS, Waters	Kanto Chemical) (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネに残留する農薬 6 成分について、JFRL 法を基に、LC-MS/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、抽出試料溶液を 10 倍希釈する方法からカラム処理試料溶液を 10 倍希釈する方法（稲わら中のクロラントラニリプロールについては、抽出試料溶液及びカラム処理試料溶液の 10 倍希釈を実施しない方法）へ変更し、カラム処理 I における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更し、カラム処理 III における溶出溶媒量を 15 mL から 20 mL に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

1) 各農薬の検量線は、0.5～50 ng/mL（注入量として 0.0025～0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、稲わら、WCS 及び粃米に、各農薬として 0.5 ng/mL 相当濃度、稲わらに、クロラントラニリプロール及びチフルザミドとして 5 ng/mL 相当濃度、クロマフェノジドとして 25 ng/mL 相当濃度、その他 3 農薬として 15 ng/mL 相当濃度、WCS に、カルプロパミド及びピロキロンとして 10 ng/mL 相当濃度、その他の 4 農薬として 15 ng/mL 相当濃度、粃米に、クロマフェノジドとして 15 ng/mL 相当濃度、

その他の 5 農薬として 5 ng/mL 相当濃度とした。

- 2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) 飼料用イネについて、本法に従って得られた SRM 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。
- 4) 1 種類の稲わら及び粃米について、試料共存下での農薬標準品の多孔性ケイソウ土カラムの溶出率を確認したところ、洗浄溶媒と溶出溶媒を合わせた 30 mL で全ての農薬成分が溶出した。
- 5) 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。
- 6) 本法のクロラントラニプロールの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg (稲わら 0.01 mg/kg) , 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg (稲わら 0.003 mg/kg) , カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg, 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg であった。
- 7) 稲わら及び粃米に各農薬成分としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (稲わら中のクロラントラニプロールは 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、良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 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) 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 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 (2008).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 5) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

3 飼料用イネ中のオキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブ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

吉村 哲史*

Simultaneous Determination of Oxaziclomefone, Dimethametryn and Pyributicarb in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Satoshi YOSHIMURA*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, the above 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 InertSep Slim-J C-18B (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of the three pesticides. 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, CA, USA) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution 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. Rice straw was spiked with 0.2 or 0.01 mg/kg of dimethametryn, 0.3 or 0.01 mg/kg of oxaziclomefone and 0.1 or 0.01 mg/kg of pyributicarb. Whole-crop rice silage and paddy rice were spiked with each compound at 0.1 or 0.01 mg/kg, respectively. The mean recoveries ranged from 88.3 % to 105 % for dimethametryn, 91.7 % to 100 % for oxaziclomefone and 84.1 % to 104 % for pyributicarb. Three times repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.7 % for dimethametryn, 7.1 % for oxaziclomefone and 7.8 % for pyributicarb.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, using rice straw, whole-crop rice silage, and paddy rice spiked with dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in the following quantities: 0.1 mg/kg for rice straw, 0.04 mg/kg for whole-crop rice silage, and 0.05 mg/kg for paddy rice. The resulting range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 94.1 to 96.4 % and not more than 3.8 %, 4.0 %, and 0.18 for dimethametryn, 94.1 to 96.8 % and not more than 7.4 %, 7.4 %, and 0.33 for oxaziclomefone, and 81.4 to 88.0 % and not more than 6.6 %, 7.0 %, and 0.32 for pyributicarb.

This method was validated and established for use in the inspection of oxaziclomefone, dimethametryn and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: dimethametryn; oxaziclomefone; pyributicarb; 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：ジメタメトリン；オキサジクロメホン；ピリブチカルブ；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；粳米；共同試験

* 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

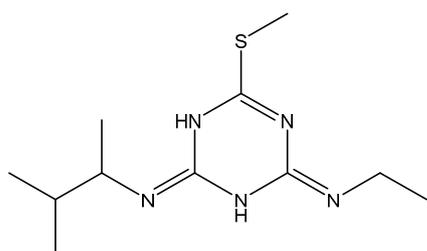
1 緒 言

ジメタメトリンはトリアジン系除草剤として、オキサジクロメホンはオキサジノン系水稲用・芝用除草剤として、ピリブチカルブはカーバメート系ホルモン型除草剤として、それぞれ日本国内で農薬登録されている¹⁾。

我が国では、飼料の有害物質の指導基準の制定について²⁾において、ジメタメトリンの残留基準値は稲わらで 0.2 mg/kg, オキサジクロメホンの残留基準値は稲わらで 0.3 mg/kg 及び稲発酵粗飼料(以下「WCS」という。)で 0.1 mg/kg と設定されている。定量法としては、厚生労働省通知によりガスクロマトグラフ質量分析計による一斉試験法³⁾等が示されているが、飼料に適用できる定量法はなかった。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが、平成 22 年度の飼料中の有害物質等分析法委託事業において開発した液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による定量法³⁾(以下「JFRL 法」という。)を基に、ジメタメトリン、オキサジクロメホン及びピリブチカルブ(以下「オキサジクロメホン等」という。)の液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)による同時定量法について、飼料分析基準⁴⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にオキサジクロメホン等の化学構造式等を Fig. 1 に示した。

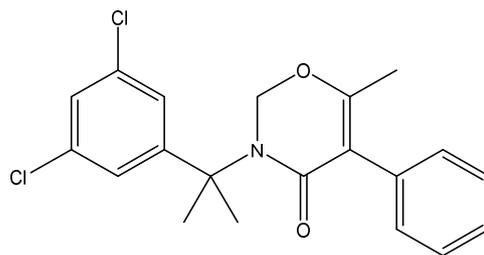


Dimethametryn

*N*₁-(1,2-dimethylpropyl)-*N*₂-ethyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine

C₁₁H₂₁N₅S MW: 255.4

CAS No.: 22936-75-0

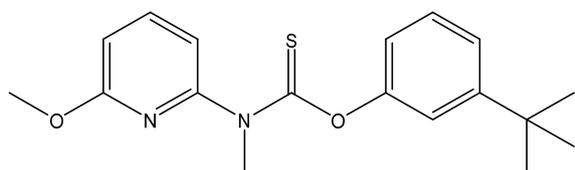


Oxaziclomefone

3-[1-(3,5-dichlorophenyl)-1-methylethyl]-3,4-dihydro-6-methyl-5-phenyl-2*H*-1,3-oxazin-4-one

C₂₀H₁₉Cl₂NO₂ MW: 376.3

CAS No.: 153197-14-9



Pyributicarb

o-3-*tert*-butylphenyl-6-methoxy-2-pyridyl(methyl)thiocarbamate

C₁₈H₂₂N₂O₂S MW: 330.4

CAS No.: 88678-67-5

Fig. 1 Chemical structures of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した。WCS は 60 °C で 24 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン, アセトニトリルは残留農薬・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。酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。

2) ジメタメトリン標準原液

ジメタメトリン標準品 (関東化学製, 純度 99.6 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてジメタメトリン標準原液を調製した (この液各 1 mL は, ジメタメトリンとして 0.5 mg ($f=0.996$) を含有する.)。

3) オキサジクロメホン標準原液

オキサジクロメホン標準品 (関東化学製, 純度 99.8 %) 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オキサジクロメホン標準原液を調製した (この液 1 mL は, オキサジクロメホンとして 0.5 mg ($f=0.998$) を含有する.)。

4) ピリブチカルブ標準原液

ピリブチカルブ標準品 (関東化学製, 純度 98.0 %) 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ピリブチカルブ標準原液を調製した (この液各 1 mL は, ピリブチカルブとして 0.5 mg ($f=0.980$) を含有する.)。

5) 農薬混合標準液

各標準原液各 1 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混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジメタメトリン, オキサジクロメホン及びピリブチカルブとして各 10 µg を含有する.)。

使用に際して, 混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にオキサジクロメホン等としてそれぞれ 0.1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する農薬混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 : ZM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 14000 rpm)

2) 乾牧草用粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 1690 rpm)

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) ジェールサイエンス製にリザーバーを連結したもの

4) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

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 30 mL (粃米は 20 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて

(280 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 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。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 (3+2) 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 (4+1) 9 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、その液の一定量を 5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) 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	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion Source temperature	120 °C
Desolvation gas temperature	N ₂ (650 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.5 kV

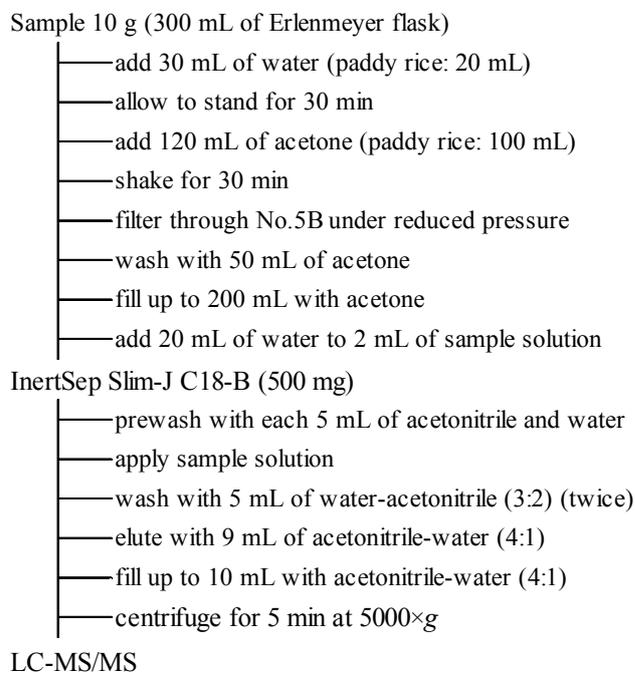
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Dimethametryn	256	186	-	31	27
		-	68		63
Oxaziclomefone	376	190	-	21	23
		-	161		43
Pyributycarb	331	181	-	16	23
		-	108		39

4) 計 算

得られた SRM 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。



Scheme1 Analytical procedure for dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5)に従って調製した各農薬混合標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、オキサジクロメホン等は各 0.1~10 ng/mL 相当量（注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

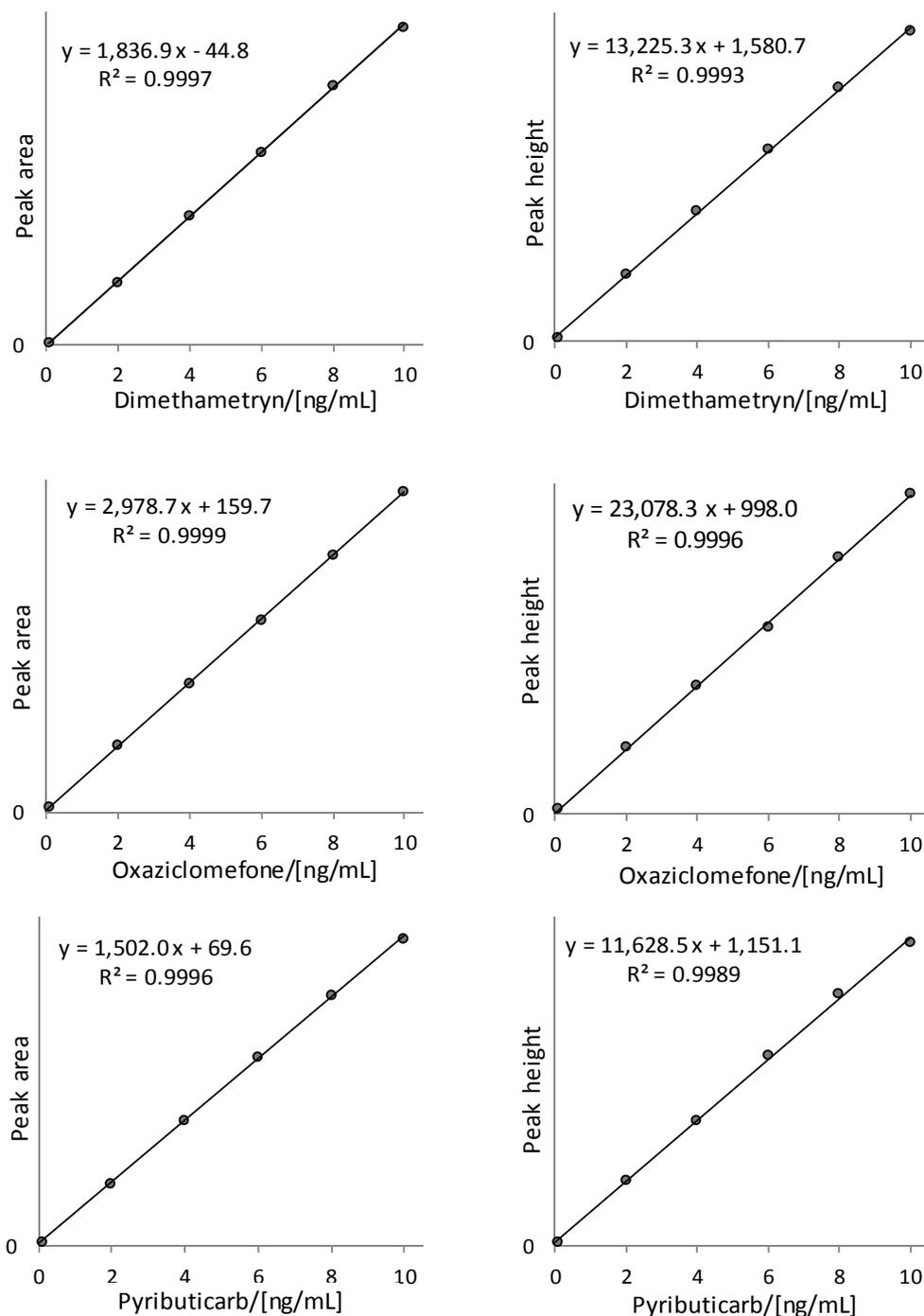


Fig. 2 Calibration curves of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb by peak area (left) and peak height (right)

3.2 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の確認

2.4の1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にオキサジクロメホン等として0.1 mg/kg相当量を添加（最終試料溶液中で1 ng/mL相当量）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。その結果はTable 3のとおりであり、オキサジクロメホン等は洗浄溶媒である水-アセトニトリル（3+2）10 mLの画分では溶出せず、アセトニトリル-水

(4+1) 0~8 mL の画分で全量溶出していた。JFRL 法では 10 mL で溶出させているが、溶出液を受ける容器が 10 mL の全量フラスコであり標線を超えるおそれがあることから、本法では、アセトニトリル-水 (4+1) 9 mL で溶出させた後、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 3 Elution patterns of dimethametryn, oxaziclomefone, and pyributicarb from InertSep Slim-J C18-B

Feed types	Pesticides	Recovery ^{a)} (%)				Total
		Acetonitrile - water				
		(2:3) 10 mL	(4:1) 0~8 mL	(4:1) 8~9 mL	(4:1) 9~10 mL	
Rice straw	Dimethametryn	0	96.1	0	0	96.1
	Oxaziclomefone	0	106	0	0	106
	Pyributicarb	0	95.8	0	0	95.8
Whole-crop rice silage	Dimethametryn	0	97.9	0	0	97.9
	Oxaziclomefone	0	96.2	0	0	96.2
	Pyributicarb	0	95.9	0	0	95.9
Paddy rice	Dimethametryn	0	98.3	0	0	98.3
	Oxaziclomefone	0	97.1	0	0	97.1
	Pyributicarb	0	96.7	0	0	96.7

a) Mean ($n=3$)

3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した稲わら、WCS 及び粳米のブランク試料溶液にオキサジクロメホン等として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 5)に従って調製した同濃度の各標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比は 91.4~105 %であり、オキサジクロメホン等は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3.4 妨害物質の検討

稲わら、WCS 及び粳米各 1 検体を試料として、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM 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。

なお、当該稲わらの SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

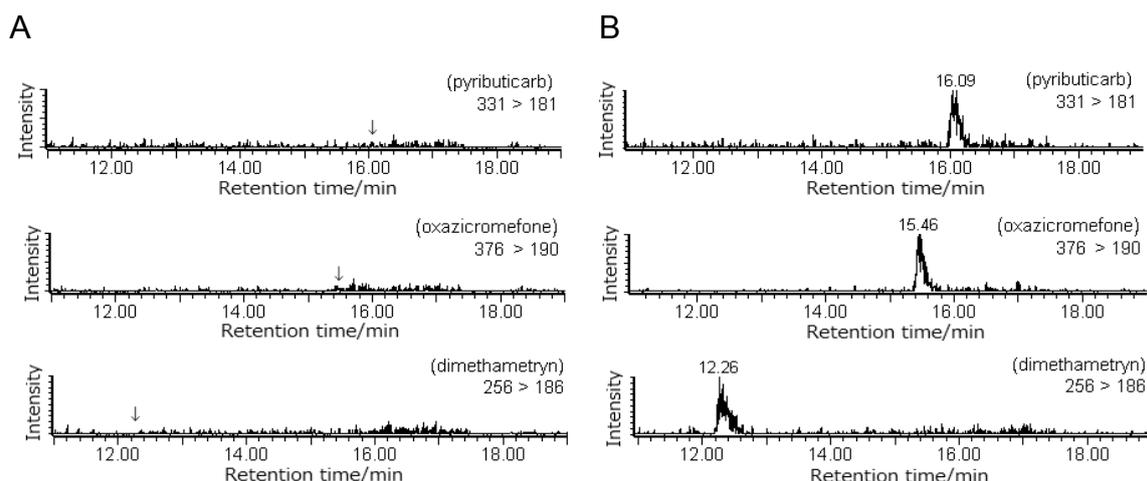


Fig. 3 SRM chromatograms of rice straw (blank) and standard solution

(Arrows indicate the retention times of pesticides.

Scales of y-axis are the same between A and B for each pesticide.)

A: Rice straw

B: Standard solution (0.1 ng/mL: 0.5 pg as each pesticide)

3.5 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネ（稲わら、WCS 及び粃米）について、ジメタメトリンとして、稲わらに 0.2 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL），粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），オキサジクロメホンとして、稲わらに 0.3 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 3 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL），粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），ピリブチカルブとして、稲わら及び粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL）それぞれ添加し、本法に従って 3 点併行による添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量 60 %）中濃度＝風乾物（水分含有量 10 %）中濃度／2.25 の式から求めた。

その結果は Table 4 のとおり、ジメタメトリンについては、平均回収率は 88.3~105 %，その繰返し精度は RSD_r として 4.7 %以下，オキサジクロメホンについては、平均回収率は 91.7~100 %，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として 7.1 %以下，ピリブチカルブについては、平均回収率は 84.1~104 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.8 %以下の成績が得られた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recoveries of pesticides

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)} (%)
Dimethametryn	0.2	92.8	3.4	–	–	–	–
	0.1	–	–	90.8	1.8	98.6	0.6
	0.01	91.0	3.5	105	4.7	88.3	2.2
Oxaziclomefone	0.3	99.0	2.5	–	–	–	–
	0.1	–	–	94.2	2.6	99.5	7.1
	0.01	95.5	3.1	100	4.5	91.7	4.9
Pyributicarb	0.1	84.1	3.9	90.3	5.3	91.2	7.8
	0.01	93.1	1.1	95.5	3.6	104	4.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

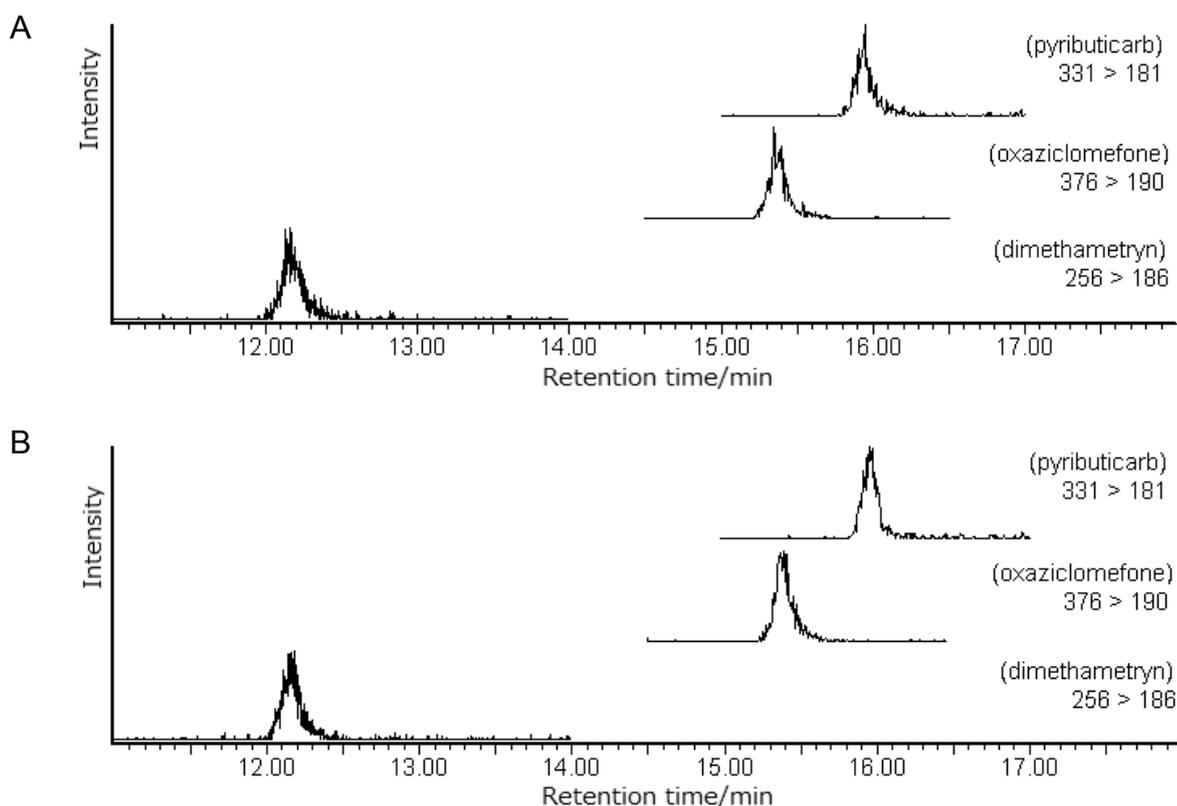


Fig. 4 SRM chromatograms of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb

A: Standard solution (The concentration is 1 ng/mL as each pesticide.)

B: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.1 mg/kg of each pesticide)

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、飼料用イネにオキサジクロメホン等を添加し、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。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.01 mg/kg であり、また、 SN 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であったことから、試料（WCS は風乾物）中の定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお、Table 4 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わらにオキサジクロメホン等として 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、WCS に原物換算してオキサジクロメホン等として 0.04 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 0.9 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、粳米にオキサジクロメホン等として 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 0.5 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、それぞれ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た。参加試験室は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{5), 6)}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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式⁷⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 5~7 のとおりであった。ジメタメトリンについて、平均回収率は 94.1~96.4 %、 RSD_r は 3.8 % 以下、 RSD_R は 4.0 % 以下、HorRat は 0.18 以下であった。オキサジクロメホンについて、平均回収率は 94.1~96.8 %、 RSD_r は 7.4 % 以下、 RSD_R は 7.4 % 以下、HorRat は 0.33 以下であった。ピリブチカルブについて、平均回収率は 81.4~88.0 %、 RSD_r は 6.6 % 以下、 RSD_R は 7.0 % 以下、HorRat は 0.32 以下であった。HorRat がいずれも 0.5 を下回ったが、本分析法がカラムでの精製が 1 回のみの比較的簡便な操作であるためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 5 Collaborative study results of dimethametryn

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.102	0.102	0.0386	0.0397	0.0510	0.0484
2	0.0991	0.0992	0.0396	0.0396	0.0507	0.0513
3	0.0882	0.0887	0.0352	0.0361	0.0442	0.0448
4	0.0859	0.0841	0.0360	0.0364	0.0416	0.0440
5	0.0820	0.0883	0.0421	0.0399	0.0501	0.0498
6	0.0952	0.0978	0.0391	0.0368	0.0462	0.0483
7	0.0981	0.0994	0.0348	0.0389	0.0493	0.0488
8	0.0960	0.0988	0.0374	0.0394	0.0507	0.0520
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0941		0.0381		0.0482	
Recovery ^{a)} (%)	94.1		95.3		96.4	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		3.8		2.3	
RSD _R ^{c)} (%)	3.2		4.0		3.2	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.15		0.18		0.14	

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 6 Collaborative study results of oxaziclomefone

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.0974	0.105	0.0381	0.0410	0.0518	0.0478
2	0.0973	0.0930	0.0384	0.0387	0.0509	0.0481
3	0.0905	0.0934	0.0335	0.0344	0.0445	0.0457
4	0.0944	0.0901	0.0366	0.0366	0.0492	0.0476
5	0.0882	0.0972	0.0421	0.0328	0.0482	0.0496
6	0.0930	0.0945	0.0402	0.0373	0.0482	0.0503
7	0.0916	0.0974	0.0349	0.0385	0.0452	0.0465
8	0.0929	0.0977	0.0408	0.0383	0.0509	0.0502
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0946		0.0376		0.0484	
Recovery ^{a)} (%)	94.6		94.1		96.8	
RSD _r ^{b)} (%)	4.1		7.4		3.1	
RSD _R ^{c)} (%)	4.1		7.4		3.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.19		0.33		0.15	

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 7 Collaborative study results of pyributicarb

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.0816	0.0832	0.0328	0.0327	0.0482	0.0458
2	0.0794	0.0734	0.0320	0.0306	0.0417	0.0383
3	0.0746	0.0787	0.0296	0.0305	0.0401	0.0422
4	0.0824	0.0759	0.0313	0.0320	0.0442	0.0415
5	0.0766	0.0890	0.0311	0.0390	0.0440	0.0498
6	0.0900	0.0886	0.0378	0.0396	0.0495	0.0459
7	0.0809	0.0840	0.0309	0.0339	0.0386	0.0407
8	0.0829	0.0816	0.0342	0.0340	0.0498	0.0439
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0814		0.0333		0.0440	
Recovery ^{a)} (%)	81.4		83.1		88.0	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		6.6		6.1	
RSD _R ^{c)} (%)	5.2		7.0		6.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.23		0.32		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 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Nexere X2, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 GP,
	MS/MS: API-3200, AB Sciex	Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

飼料用イネに残留するオキサジクロメホン等について、JFRL 法を基に、LC-MS/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、カラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更し、以下の結果が得られたことから、適用が可能であると考えられた。

1) 検量線は、0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 ng) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、ジメタメトリンとして、稲わらに 2 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度、粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、オキサジクロメホンとして、稲わらに 3 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度、粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、ピリブチカルブとして、稲わら及び粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、オキサジクロメホン等は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3) 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。

4) 飼料用イネにジメタメトリンとして 0.1 mg/kg (稲わらは 0.2 mg/kg) 及び 0.01 mg/kg、オキサジクロメホンとして 0.1 mg/kg (稲わらは 0.3 mg/kg) 及び 0.01 mg/kg 相当量、ピリブチカルブと

して 0.1 及び 0.01 mg/kg 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ところ良好な結果を得た。

- 5) 本法におけるオキサジクロメホン等の定量下限は試料中で 0.01 mg/kg，検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 6) オキサジクロメホン等として，稲わらに 0.1 mg/kg，WCS に 0.04 mg/kg 及び粳米に 0.05 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全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所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) 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（LC-MS/MS 多成分分析法）（2011）。
- 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) 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) 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) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 6) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 7) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

4 稲発酵粗飼料及び粳米中のオキシリニック酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

牧野 大作*, 三井 友紀子*, 大谷 俊子*

Determination of Oxolinic Acid in Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Daisaku MAKINO*, Yukiko MITSUI* and Toshiko OTANI*

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

An analytical method was developed to determine the level of oxolinic acid in whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

After adding water to the samples, oxolinic acid was extracted with 0.2 w/v% metaphosphoric acid solution-acetonitrile (3:2). The extract was purified with Oasis HLB (Waters; Milford, MA, USA) and injected into the LC-MS/MS. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-4, 3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v% formic acid solution-acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on feed ingredients spiked with oxolinic acid at the levels of 0.1 or 0.01 mg/kg (whole-crop rice silage), and 3, 0.3 or 0.01 mg/kg (paddy rice). The resulting mean recoveries ranged from 83.9 to 101 % and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) was not more than 6.4 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.1 and 3 mg/kg of oxolinic acid, respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 89.4 %, 2.9 %, 9.2 % and 0.42 for whole-crop rice silage and 92.6 %, 4.8 %, 6.3 % and 0.46 for paddy rice.

This method was validated and established for use in the inspection of oxolinic acid in whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: oxolinic acid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：オキシリニック酸；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；稲発酵粗飼料；粳米；共同試験

1 緒 言

オキシリニック酸（オキシリン酸）は 1976 年に住友化学株式会社により開発されたキノリン骨格を有する殺菌剤（抗菌剤）である¹⁾。農薬としての有効成分の一般名はオキシリニック酸とされており¹⁾、我が国では、飼料の有害物質の指導基準において、その基準値は、稲わら中で 10 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 0.1 mg/kg、粳米中で 3 mg/kg と設定されている²⁾。また、食品では米、野菜、果実、食肉等に残留基準値が定められており、玄米中で 0.3 ppm と設定

* 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

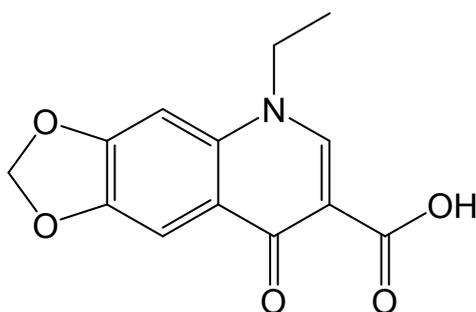
されている³⁾。

また、オキシリニック酸は農薬以外に動物用医薬品としても使用されており、この場合、動物医薬品の有効成分名としてはオキシリン酸とされている⁴⁾。

飼料中の定量法としては、杉本らが検討した蛍光検出器付き液体クロマトグラフ（以下「LC-FL」という。）によるオキシリン酸及びフルメキンの同時定量法⁵⁾が既に飼料分析基準⁶⁾に記載されているが、この方法は、配合飼料及び魚粉を対象とした抗菌剤の残留試験法として開発しており、その定量限界は0.5 mg/kgと高く、飼料用イネ（稲わら、WCS及び粃米）に適用できる農薬としてのオキシリニック酸の分析法の開発が急務であった。一方、食品中の定量法としては、LC-FL、液体クロマトグラフ質量分析計等による農作物を対象とした個別試験法及び畜水産物を対象とした一斉試験法が厚生労働省通知⁷⁾に示されている。

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事業」において開発した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。）を用いた定量法⁸⁾（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。

参考にオキシリニック酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo(4,5-g)quinoline-7-carboxylic acid

C₁₃H₁₁NO₅ MW: 261.2 CAS No.: 14698-29-4

Fig. 1 Chemical structure of oxolinic acid

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ1 mmの網ふるいを通過するまで粉碎した。WCSは60℃で5時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) 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。メタノール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。その他、特記している以外の試薬は特級を用いた。

2) オキシリニック酸標準液

オキシリニック酸標準品（和光純薬工業製、純度99.9%）10 mgを正確に量って100 mLの褐色全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）1 mL及び水-メタノール（1+1）

約 50 mL を加えた。超音波処理してオキシリニック酸を溶かし、更に標線まで水-メタノール (1+1) を加えてオキシリニック酸標準原液を調製した (この液 1 mL は、オキシリニック酸として 0.1 mg ($f=0.999$) を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を、水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にオキシリニック酸としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 及び 50 ng を含有する各オキシリニック酸標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 10000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 1690 rpm)
- 3) ガラス繊維ろ紙 : GFP-95 桐山製作所製
- 4) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 200 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製
- 5) LC-MS/MS :
 LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製
 MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL (粳米は 20 mL) を加え 30 分間静置した後、更に 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 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 の褐色全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線まで 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えた。この液の一定量を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で正確に 10 倍希釈した後、希釈液 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 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

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムをアセトニトリル 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1~2 mL/min 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、水-アセトニトリル (4+1) 20 mL をミニカラムに加えてオキシリニック酸を溶出させた。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。水-メタノール (7+3) 2 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 LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) 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

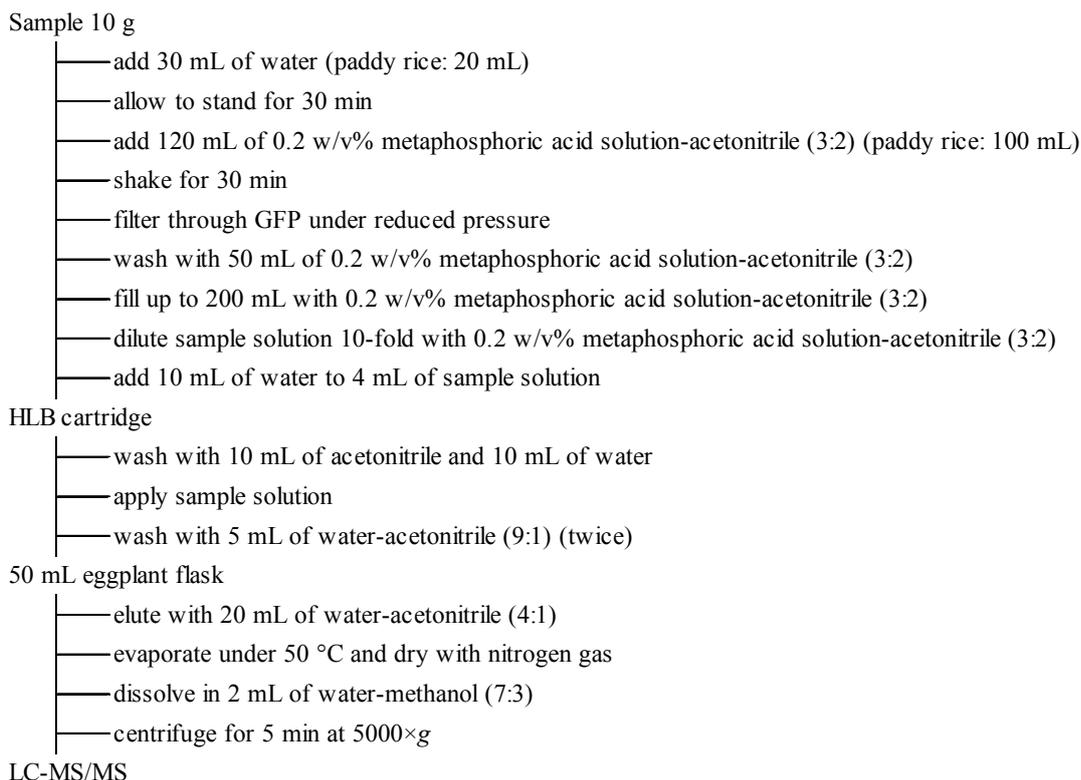
Column	Inertsil ODS-4 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (7:3) (hold for 19 min) → 1 min → (5:95) (hold for 5 min) → 1 min → (7:3) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ , 350 °C, 800 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Capillary voltage	2 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Oxolinic acid	262	244	-	30	15
		-	216	30	25

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のオキシリニック酸量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for oxolinic acid in whole-crop rice silage and paddy rice for feed (analyzed under the shading condition)

2.5 JFRL法の飼料分析基準への適用の可否の検討方法

稲わら及び粳米にオキシリニック酸としてそれぞれ1及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料並びにWCSに原物換算して0.1 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、JFRL法に従って定量を行った。また、WCSは原物の水分含有量を60%と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量60%）中濃度＝風乾物（水分含有量10%）中濃度／2.25の式から求めた。なお、この換算については2.6、2.7、3.6、3.8及び3.10でも同様とした。

2.6 希釈操作及び遮光の有効性の検討方法

稲わら及び粳米にオキシリニック酸としてそれぞれ1及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料及びWCSに原物換算して0.1 mg/kg相当量を添加した試料を用いて添加回収試験を実施した。

定量方法としてJFRL法及びJFRL法で吸引る過後、全量フラスコの標線まで0.2 w/v%メタリン酸溶液－アセトニトリル（3+2）を加え調製した試料溶液について、その一定量を0.2 w/v%メタリン酸溶液－アセトニトリル（3+2）で正確に10倍希釈する操作を追加して以降の操作を行い、定量を行った方法について比較検討を行った。

また、前述の2法について、遮光で定量操作を行った場合も検討した。

2.7 モニターイオンの検討方法

WCSにオキシリニック酸として原物換算して0.1及び0.01 mg/kg相当量及び粳米に3及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、2.4に従って定量した。この際に2.4に記載のm/z 244で定量した結果と、JFRL法に記載のm/z 216で定量した結果を比較検討した。

2.8 ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の確認方法

粃米を用い、2.4 の 1)により得られた抽出精製液にオキシリニック酸として 3 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 2)のカラム処理に供する試料溶液を調製した。その後、本法により操作した後、各溶出画分における回収率を確認した。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件について

JFRL 法の液体クロマトグラフ条件は 0.1 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (7+3) のイソクラティック溶出であるが、夾雑成分からの影響を受けにくくすることを意図して、目的成分溶出後にグラジェント溶出でカラムを洗浄することにした。

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。

3.2 検量線

2.2 の 2)により調製したオキシリニック酸標準液各 5 μ L を LC-MSMS に注入し、得られた SRM 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。その結果、Fig. 2 のとおり、オキシリニック酸は 0.1~50 ng/mL 相当量（注入量として 0.0005~0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

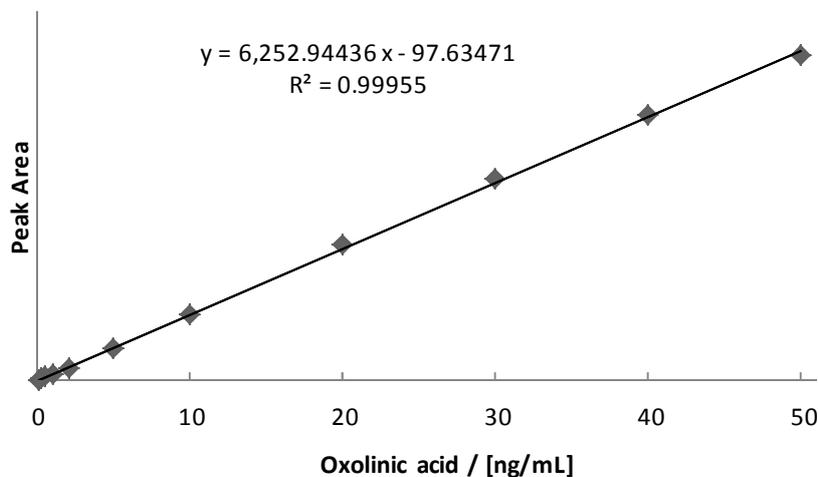


Fig. 2 Calibration curve of oxolinic acid by peak areas

3.3 JFRL 法の飼料分析基準への適用の可否の検討

JFRL 法が飼料分析基準に適用できるか 2.5 により検討した。

その結果は Table 3 のとおりであり、稲わら及び WCS で良好な回収率が得られなかったため、JFRL 法をそのまま適用するのは難しいと考えられた。

Table 3 Recoveries of oxolinic acid by JFRL method

Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
Recovery (%)		Recovery (%)		Recovery (%)	
run1	run2	run1	run2	run1	run2
49.2	28.0	48.0	67.6	73.0	99.1

3.4 JFRL 法の改良の検討

1) 希釈操作及び遮光の有効性の検討

JFRL 法をそのまま飼料分析基準に適用することは難しかったため、その改良を検討した。

筆者らが実施した他の農薬の検討⁹⁾において、夾雑成分に由来するイオン化の阻害が疑われたために希釈を検討し、試料溶液を 10 倍希釈することにより改善が認められた事例があった。そこで今回もこの例を参考に、2.6 に記載のとおり JFRL 法と JFRL 法に 10 倍希釈操作を追加した方法を比較することにより希釈操作の有効性を検討した。

また、オキシロニック酸の水中光分解半減期は、最も短い条件では 2.31 日¹⁾とされており、このことから、オキシロニック酸は、分析操作中にも若干の低下が認められるおそれがあると考えられた。そこで、遮光条件下での分析操作の有効性を検討するために、昼光の入る試験室において蛍光灯をつけた場合を通常の遮光していない条件、昼光が入らないようにした試験室において紫外線を除去した照明をつけた場合を遮光した条件として、2.6 に記載のとおり前述の 2 法を共に遮光条件下で操作し、その有効性を検討した。

すなわち、今回はこの希釈操作の有無及び遮光の有無の 4 法の組み合わせで操作を実施し、最適な操作条件を比較検討することとした。

その結果は Table 4 のとおりであり、JFRL 法の抽出液を 10 倍希釈することによりマトリックスの影響によるイオン化抑制が低減されたこと及び遮光の効果により回収率等が改善されたと考えられた。よって JFRL 法に対して抽出液を 10 倍希釈する操作及び遮光条件下の定量操作を追加して以降の検討を行うことにした。

なお、稲わらについては、改善されたがその回収率は低回収率傾向であり、更なる検討を要することから、今回は本法の適用対象外とすることにした。

Table 4 Effects of dilution of extract and room lighting on recovery tests

Conditions of room lighting and dilution	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery (%)		Recovery (%)		Recovery (%)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2
no shading ^{a)} , no dilution	49.2	28.0	48.0	67.6	73.0	99.1
no shading ^{a)} , dilution	66.5	38.0	74.2	75.0	79.7	92.3
shading ^{b)} , no dilution	35.1	46.3	67.7	58.5	96.6	79.4
shading ^{b)} , dilution	72.4	59.1	93.7	82.2	92.3	79.0

- a) Conducted under the fluorescent lighting, in a laboratory that daylight enters through windows
- b) Conducted under the lighting having been removed ultraviolet rays, in a laboratory that daylight doesn't enter

2) モニターイオンの検討

JFRL 法は分析対象を飼料全般としたため、近接妨害ピークのない m/z 216 が採用されている。しかし、本検討の分析対象は WCS 及び粳米の 2 種類であり、このマトリックスでは妨害がない可能性があること、WCS の基準値相当量の 1/10 の濃度を測定するには m/z 216 では感度が不足することが想定されたことから、モニターイオンとして最も感度が良かった m/z 244 が採用できないか 2.7 により比較検討を行った。

その結果、Table 5 のとおり、 m/z 216 と 244 ではほぼ同等の結果が得られた。しかし、 m/z 216 では WCS について基準値の 1/10 の濃度が感度不足のため測定不可能であった。よって以降の検討はモニターイオン m/z 244 で定量を行うことにした。

また妨害を妨げるピークは 3.7 に記載のとおり認められなかった。

Table 5 Comparison of product ions

Spiked level (mg/kg)	Whole-crop rice silage				Paddy rice			
	m/z 216		m/z 244		m/z 216		m/z 244	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
3	-	-	-	-	90.5	3.0	90.6	2.8
0.3	-	-	-	-	94.5	2.6	92.4	4.2
0.1	87.6	1.9	90.1	1.1	-	-	-	-
0.01	ND	-	95.5	3.4	-	-	-	-

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の確認

JFRL 法に改良を行ったことから、カラム処理の溶出画分にずれが生じていないか確認するために、2.8 によりカラム処理の溶出画分を確認した。

その結果、Table 6 のとおり、オキシロニック酸は水-アセトニトリル (4+1) 5~20 mL で溶出し、その他の画分には溶出は認められなかった。このことから、JFRL 法と同様に水-アセトニトリル (4+1) 20 mL で溶出させることにした。

Table 6 Elution pattern of oxolinic acid from Oasis HLB

Fraction volume (mL)	Water-acetonitrile (9:1)		Water-acetonitrile (4:1)				Total	
	0-5	5-10	0-5	5-10	10-15	15-20		20-25
Recovery (%) ^{a)}	0	0	0	24.5	68.3	7.3	0	100

a) $n=1$

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した WCS のブランク試料溶液にオキシロニック酸として原物換算して 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2.25 ng/mL 相当量) 及び粳米のブランク試料溶液に 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 3 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 2)に従って調製した同濃度のオキシロニック酸標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比は 96.2~105 %であり、オキシロニック酸は試料マトリックスに

よる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3.7 妨害物質の検討

WCS 3 検体及び籾米 3 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM 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。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

3.8 添加回収試験

WCS (2 検体) にオキシリニック酸として原物換算してそれぞれ 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液で 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当量), 籾米 (2 検体) に 3, 0.3 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液で 30, 3 及び 0.1 ng/mL 相当量) を添加した試料を用い、本法により 3 点併行で定量し、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、平均回収率及びその繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として WCS では 90.1~101 % 及び 4.8 % 以下, 籾米では 83.9~95.5 % 及び 6.4 % 以下であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 7 Recoveries for oxolinic acid

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Whole-crop rice silage 1		Whole-crop rice silage 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
3	-	-	-	-	90.6	2.8	95.5	0.4
0.3	-	-	-	-	92.4	4.2	93.5	3.0
0.1	90.1	1.1	92.7	0.8	-	-	-	-
0.01	95.5	3.4	101	4.8	83.9	6.4	93.7	5.6

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

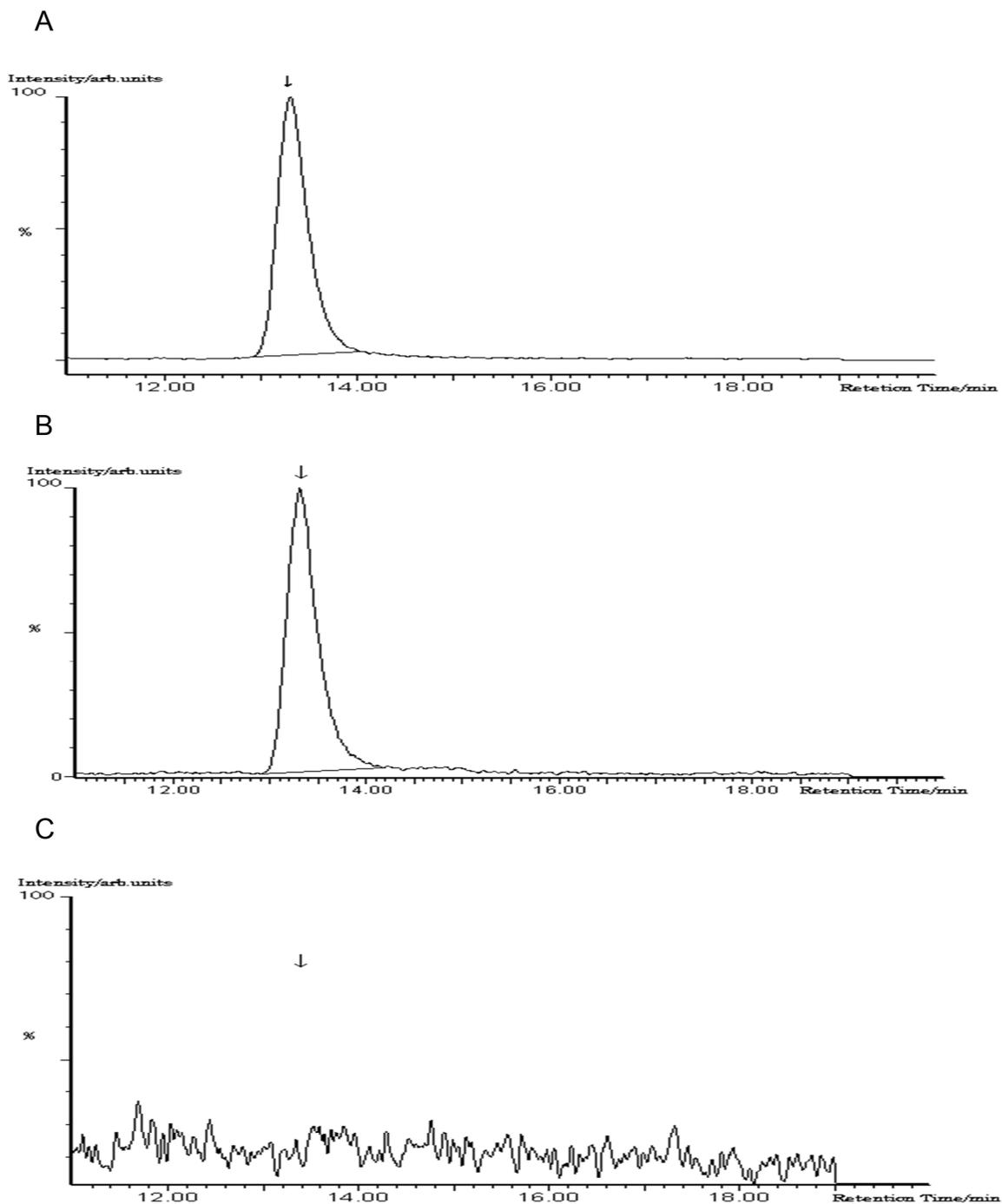


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peak or retention time of oxolinic acid and each peak is shown as 100 % in each segment except C, in which the peak height of the lowest standard solution (0.1 ng/mL) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentration is 5 ng/mL for oxolinic acid.)

B: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.3 mg/kg of oxolinic acid)

C: Sample solution of whole-crop rice silage (blank)

3.9 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、WCS 及び粳米にオキシリニック酸を添加した添加回収試験により得られたピークの 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 WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg, SN 比が 3 となる濃度は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg であったことから、本法の定量下限は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg, 検出下限は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg であった。

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、WCS にオキシリニック酸として原物換算して 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 3 µg を含有する標準液 0.75 mL 添加）及び粳米にオキシリニック酸として 3 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 30 µg 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た。

参加試験室は、協同飼料株式会社研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、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 9 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^{10), 11)}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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式¹²⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 のとおりであった。WCS 及び粳米について、平均回収率はそれぞれ 89.4 及び 92.6 %, RSD_f はそれぞれ 2.9 及び 4.8 %, RSD_R はそれぞれ 9.2 及び 6.3 %, HorRat はそれぞれ 0.42 及び 0.46 であった。なお、HorRat が 0.5 を下回っていたが、特に共同試験の実施要領に異常があったとは考えられず、本定量法が抽出後、ミニカラムで 1 回精製してから LC-MS/MS で測定するという比較的平易なものとなっていることが原因ではないかと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study results of oxolinic acid

Lab. No.	Feed types			
	Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.0908	0.0890	2.98	2.87
2	0.0853	0.0891	2.78	2.82
3	0.0700 ^{a)}	0.0495 ^{a)}	2.56	2.54
4	0.0844	0.0788	2.80	2.51
5	0.0897	0.0956	2.95	2.89
6	0.0785	0.0825	2.87	2.61
7	0.108	0.105	2.98	2.77
8	0.0882	0.0873	2.45	2.77
9	0.0898	0.0890	2.98	2.90
Spiked level (mg/kg)	0.1		3	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.0894		2.78	
Recovery ^{b)} (%)	89.4		92.6	
RSD _r ^{c)} (%)	2.9		4.8	
RSD _R ^{d)} (%)	9.2		6.3	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		14	
HorRat	0.42		0.46	

- a) Data excluded by Cochran test
- b) Whole-crop rice silage: $n=16$; Paddy Rice: $n=18$
- 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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (3.0 mm×150 mm, 3.5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters) MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	LC: Alliance 2695, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留するオキシソリニック酸について、JFRL法を基にLC-MS/MSを用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、飼料用イネのうちWCS及び粳米を対象としてJFRL法の抽出液を10倍希釈する操作の追加及び定量操作を遮光条件下で実施することにより、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、0.1~50 ng/mL相当量（注入量として0.0005~0.25 ng相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、WCSで2.25及び0.225 ng/mL相当濃度、粳米で30、3及び0.1 ng/mL相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、オキシソリニック酸は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3) WCS及び粳米について、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。

4) WCSにオキシソリニック酸として原物中に換算して0.1及び0.01 mg/kg相当量、粳米に3、0.3及び0.01 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ところ良好な結果が得られた。

5) 本法のオキシソリニック酸の定量下限はWCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ0.02及び0.01

mg/kg, 検出下限は WCS (風乾物) 及び粃米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg であった.

- 6) WCS にオキシロニック酸として原物中に換算して 0.1 mg/kg 相当量及び粃米にオキシロニック酸として 3 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ところ, 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協同飼料株式会社研究所, 一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, 一般財団法人日本食品分析センター彩都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: 農薬・動物用医薬品評価書 オキシロニック酸 (第 3 版) 平成 25 年 11 月 (2013).
- 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) 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).
- 4) 農林水産省令: 動物用医薬品等取締規則, 平成 16 年 12 月 24 日, 農林水産省令第 107 号 (2004).
- 5) 杉本 泰俊, 野村 昌代, 鷺尾 和也: 飼料中のオキシロニン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法, 飼料研究報告, **34**, 28-42 (2009).
- 6) 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).
- 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, 食安発第 0124001 号 (2005).
- 8) 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).
- 9) 牧野 大作, 若宮 洋市, 榊原 良成, 上野山 智洋: 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定量法, 飼料研究報告, **38**, 89-107 (2013).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., **67**(2), 331-343 (1995).
- 11) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 12) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, Analyst, **125**, 385-386 (2000).

5 穀類, 乾牧草, 稲わら及び稲発酵粗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

杉本 泰俊*, 船木 紀夫*, 榎原 良成*

Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Grains, Grass Hay, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage for Feed by LC-MS/MS

Yasutoshi SUGIMOTO*, Norio FUNAKI* and Yoshinari SAKAKIBARA*

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

An analytical method was developed to determine the levels of glyphosate, glufosinate and its metabolites (3-(methyl phosphinico) propionic acid and *N*-acetylglufosinate) in grains, grass hay, rice straw and whole-crop rice silage for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

Glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) and *N*-acetylglufosinate (NAG) in the samples were extracted with water. The extract was purified with two types of SPE mini-columns (Oasis HLB and MCX from Waters; Milford, MA, USA). These compounds were then derivatized with trimethyl orthoacetate. The sample solution was further purified with two other types of SPE mini-columns (Sep-Pak Plus NH₂ and Silica from Waters) and injected into the LC-MS/MS for determination of the levels of GLYP, GLUF, MPPA and NAG. 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, CA, USA) using 0.01 v/v % formic acid solution-acetonitrile (93:7 v/v) as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Barley was spiked with GLYP at the levels of 20 or 0.04 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg. Wheat was spiked with GLYP at the levels of 5 or 0.5 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.2 or 0.05 mg/kg. Corn was spiked with GLYP at the levels of 1 or 0.1 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.1 or 0.05 mg/kg. Alfalfa hay was spiked with GLYP at the levels of 120 or 20 mg/kg. Rice straw and whole-crop rice silage were spiked with GLYP at the levels of 0.2 or 0.04 mg/kg and spiked with GLUF and MPPA at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg. Spike tests were conducted on each sample, the resulting mean recoveries ranged from 78.2 to 117 % for GLYP, 84.6 to 112 % for GLUF, and 76.9 % to 117 % for MPPA. Repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 17 % for GLYP, 16 % for GLUF and 17 % for MPPA. Subsequently, barley was spiked with NAG at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg, while wheat, corn, rice straw and whole-crop rice silage were spiked with the same compound at 0.2 or 0.05 mg/kg, 0.1 or 0.05 mg/kg, 0.5 or 0.05 mg/kg and 0.5 or 0.05 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 73.0 to 101 % and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 19 % for NAG.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using barley, corn, rice straw and whole-crop rice silage spiked with GLYP, GLUF and MPPA and grass hay spiked with GLYP in the following quantities: 20 mg/kg of GLYP and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA for barley, 1 mg/kg of GLYP and 0.1 mg/kg of GLUF and MPPA for corn, 0.2 mg/kg of GLYP and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA for rice straw and whole-crop rice silage, and 120 mg/kg of GLYP for alfalfa hay, respectively. For each compounds, the resulting range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 75.4 % to 88.7 %, and not more than 18 %, 32 % and 2.0 for GLYP, 89.1 % to 99.3 %, and

* 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

not more than 11 %, 21 % and 0.96 for GLUF, and 86.2 % to 91.1 % and not more than 13 %, 33 % and 1.5 for MPPA.

This method was validated and established for use in the inspection of GLYP, GLUF, MPPA and NAG in grains, rice straw and whole-crop rice silage for feed, and for use in the inspection of GLYP in grass hay for feed.

Key words: glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico) propionic acid; *N*-acetylglufosinate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grains; rice straw; whole-crop rice silage; grass hay; collaborative study

キーワード：グリホサート；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；穀類；稲わら；稲発酵粗飼料；乾牧草；共同試験

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という。）はモンサント社が開発した非選択性茎葉処理型の含リンアミノ酸系除草剤であり、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す¹⁾。また、グルホシネート（以下「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含リン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、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。）に代謝され、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。）に代謝されることが知られている¹⁾。

GLYP は、国内における飼料中の農薬の残留基準値として、大麦、えん麦及びマイロで 20 mg/kg、小麦で 5 mg/kg、とうもろこしで 1 mg/kg、ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg と定められている²⁾。更に飼料の有害物質の指導基準値として、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）で 0.2 mg/kg と定められている³⁾。

一方、GLUF の残留基準値は、穀類においては GLUF 及び MPPA を GLUF に換算したものと並びに NAG を GLUF に換算したものの総和として設定されており、大麦で 0.5 mg/kg、小麦 0.2 mg/kg、とうもろこし 0.1 mg/kg と定められている²⁾。更に飼料の有害物質の指導基準値は、稲わらで 0.5 mg/kg と定められている³⁾。

これら GLYP, GLUF, MPPA 及び NAG（以下「含リンアミノ酸系農薬」という。）の飼料中の定量法としては、飼料分析基準⁴⁾に記載された穀類、乾牧草及び稲わら中の GLUF, MPPA 及び NAG の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⁵⁾（以下「GLUF 法」という。）並びに穀類及び飼料用イネ中のグリホサートの LC-MS/MS による同時定量法⁶⁾（以下「GLYP 法」という。）がある。

しかし、GLUF 法は小麦が、GLYP 法は乾牧草が適用除外となっており、新たに基準値が設定されたこれらを対象とした分析法の確立が急務となっている。また、分析の効率化のため、含リンアミノ酸系農薬の同時分析法が必要とされている。

そこで筆者らは、GLYP 法を基に、穀類、乾牧草、稲わら及び WCS 中に残留する含リンアミノ酸系農薬の LC-MS/MS による同時定量法を検討したので、その概要を報告する。

なお、飼料分析基準では、単にグルホシネートと記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定していることから、本検討内でも GLUF と記載した場合には同様の扱いとした。

参考に GLYP, GLUF, MPPA 及び NAG の構造式等を Fig. 1 に示した.

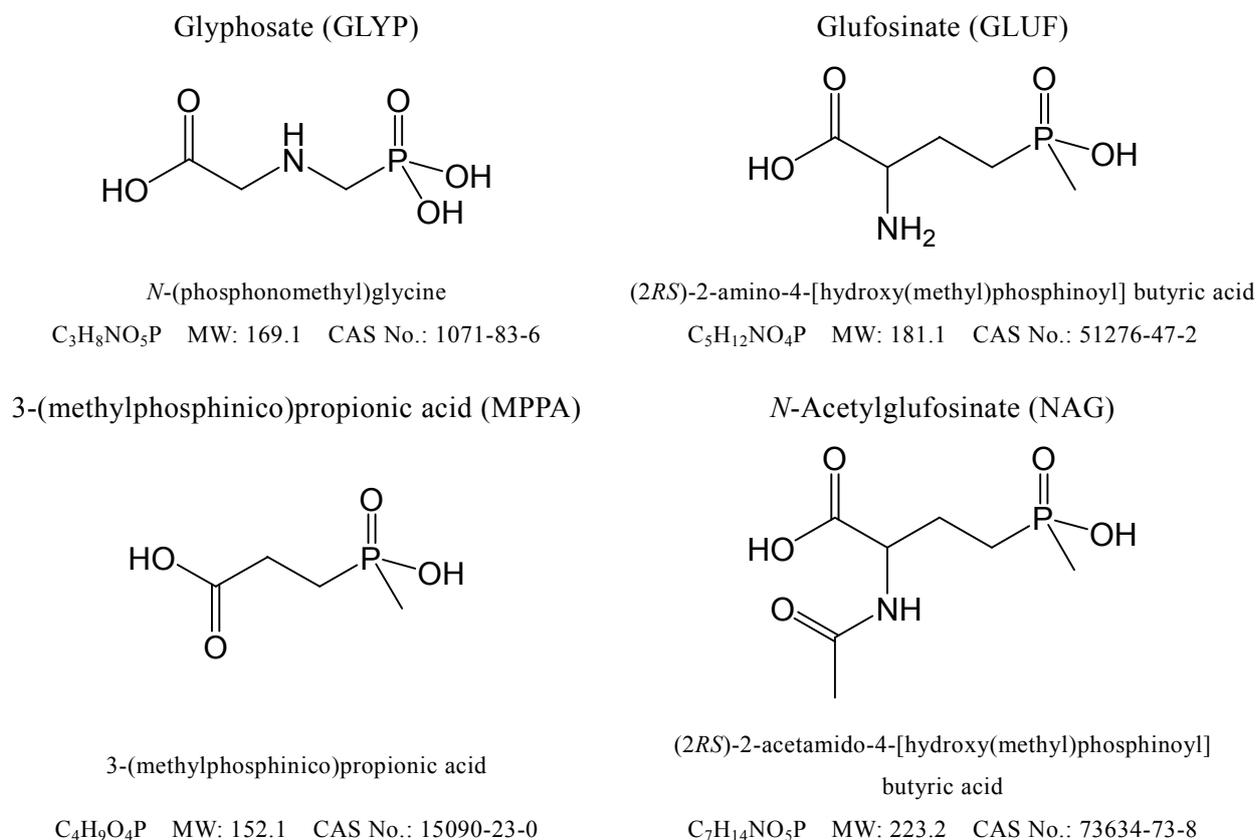


Fig. 1 Chemical structures of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA) and *N*-acetylglufosinate (NAG)

2 実験方法

2.1 試料

大麦, えん麦, ライ麦, 小麦, とうもろこし, マイロ, アルファルファ乾草, 稲わら及び籾米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した.

また, WCS については 60 °C で, 10 時間乾燥し, 更に室内に静置して風乾した後, 同様に粉碎した.

2.2 試薬

- 1) 水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた. アセトニトリル及びメタノールは, 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. ギ酸 (98 % のもの) 及び酢酸は, 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) を用いた.
- 2) 0.01 v/v% ギ酸溶液
ギ酸 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.
- 3) GLYP 標準原液
グリホサート標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.3 %) 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 GLYP 標準原液を調製した (この

液 1 mL は、GLYP として 1 mg を含有する ($f=0.993$) .) .

4) GLUF 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 GLUF 標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLUF として 1 mg を含有する ($f=0.975$) .) .

5) MPPA 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 MPPA 標準原液を調製した (この液 1 mL は, MPPA として 1 mg を含有する ($f=0.997$) .) .

6) NAG 標準原液

N-アセチルグルホシネート標準品 (Dr. Ehrenstorfer 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 NAG 標準原液を調製した (この液 1 mL は, NAG として 1 mg を含有する ($f=0.999$) .) .

7) 検量線作成用混合標準原液

GLYP 標準原液, GLUF 標準原液及び MPPA 標準原液の一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 100 μ g を含有する検量線作成用混合標準原液を調製した.

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 14000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-2000 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 835 rpm)
- 3) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 500 mg) にリザーバー (容量 6 mL) を連結したもの Waters 製
- 4) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis Plus MCX カートリッジ (充てん剤量 225 mg) Waters 製
- 5) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus NH₂ カートリッジ (充てん剤量 360 mg) Waters 製にリザーバー (容量 10 mL) を連結したもの
- 6) シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus Silica カートリッジ (充てん剤量 690 mg) Waters 製
- 7) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

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 で 10 分間遠心分離し, 上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍に希釈 (乾牧草は, 更に水で正確に 500 倍希釈した.) し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを連結し, メタノール 6 mL 及び水 12 mL

で順次洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, 試料溶液 1 mL をミニカラムに正確に入れ, 流速 2~3 mL/min 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。更に水 18 mL をミニカラムに加え, 全量を流出させた。

流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し, 誘導体化に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化

試料溶液を 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。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 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にシリカゲルミニカラムを連結し, 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 をミニカラムに正確に入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え, 同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトン 10 mL 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して各農薬を溶出させた。

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各農薬を溶出させた。

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。

5) 標準液の誘導体化

検量線作成用混合標準原液 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。なお, GLYP, GLUF, MPPA 及び NAG の誘導体化反応を Fig. 2 に示した。

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 GLYP, GLUF 及び MPPA として, それぞれ 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量含有する標準液を調製した。

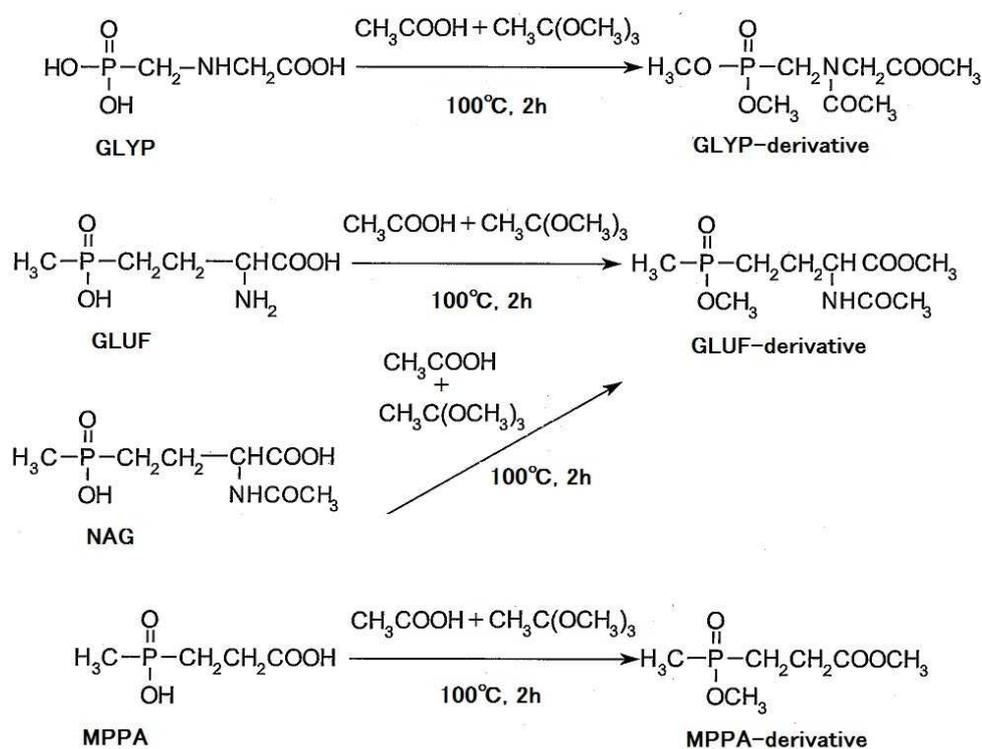


Fig. 2 Scheme of derivatization reactions of GLYP, GLUF, MPPA and NAG

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) 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	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (93:7) (hold for 12 min) → 3 min → (5:95) (hold for 10 min) → 6 min → (93:7) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^\circ\text{C}$
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 $^\circ\text{C}$
Desolvation gas temperature	400 $^\circ\text{C}$
Capillary voltage	3 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
GLYP derivative	254	102	152	22	17
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムから GLYP 誘導体, 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 GLYP, GLUF (NAG 由来含む) 及び MPPA のそれぞれの量を算出した.

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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) を NAG の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) に換算し, 添加した NAG の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 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 Scheme1 に示した.

2.5 乾牧草への適用性の検討

アルファルファ乾草に, GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 120 mg/kg 相当量 (GLYP の基準値相当量, 最終試料溶液でそれぞれ 2.4 ng/mL 相当量) を添加した試料を用い, 2.4 の 1) の操作に従って得られた試料溶液を水で更に 10 倍, 100 倍, 250 倍及び 500 倍に希釈し, 2.4 の 2) のカラム処理 I に供する試料溶液とした.

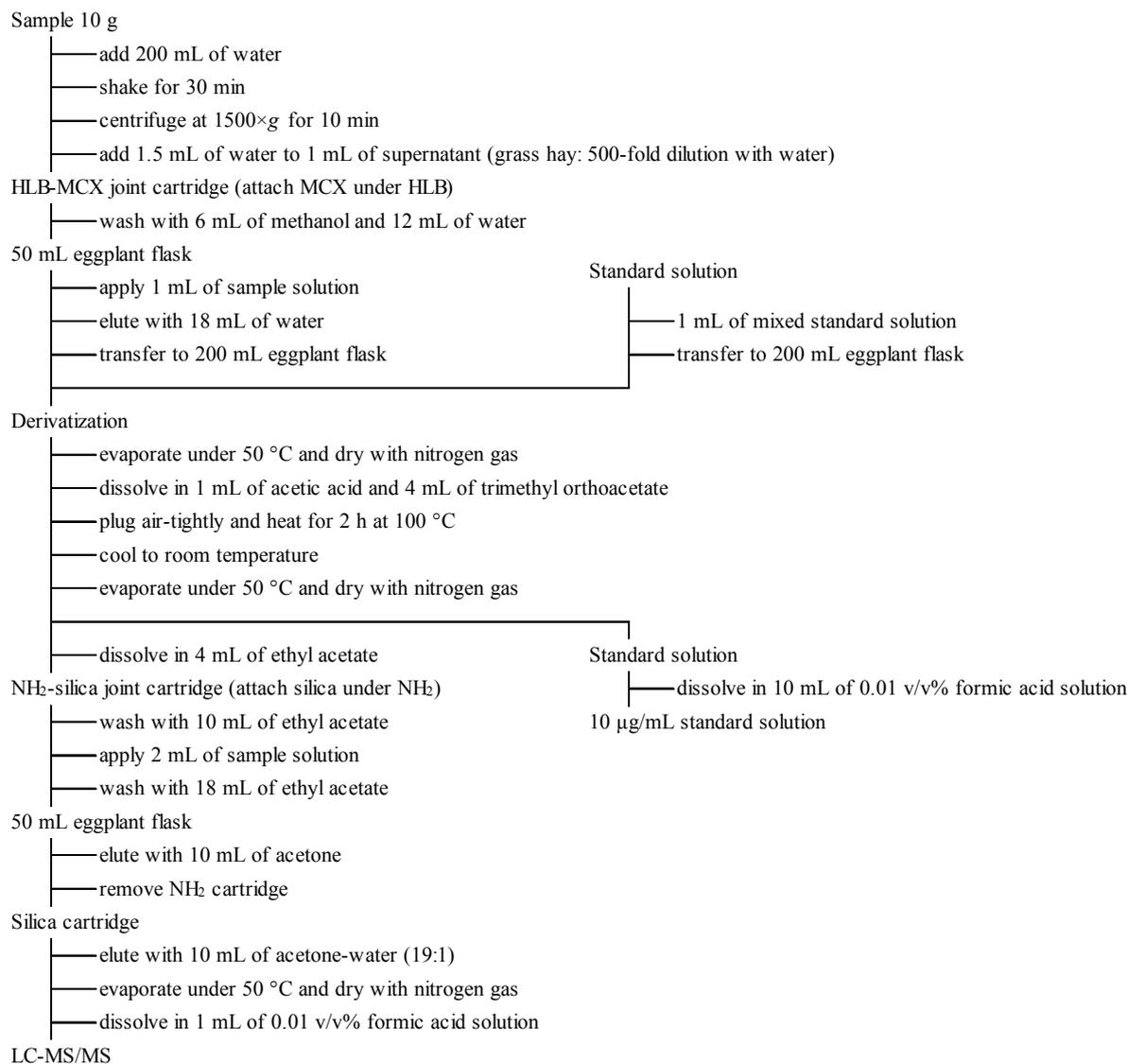
以下, 2.4 の 2)~7) に従い, 定量した.

2.6 小麦の添加回収試験の検討方法

小麦の添加回収試験に用いる含リンアミノ酸系農薬の添加用混合標準液を, 以下のとおり調製した.

2.2 の 3)~6) で調製した各含リンアミノ酸系農薬標準原液の一定量をそれぞれメタノールで正確に 20 倍希釈した. 更にこれらの液の一定量をメタノール-水 (19+1) で正確に希釈して各小麦添加用標準液を調製した.

調製した各小麦添加用標準液を小麦に添加し, 2.4 の操作に従って各含リンアミノ酸系農薬を定量した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA and NAG in grains, grass hay, rice straw and whole-crop rice silage for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.4 の 5) に従って調製した GLYP, GLUF 及び MPPA を含有する混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し, 得られた SRM 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. 3 のとおりであり GLYP, GLUF 及び MPPA で各 0.3~300 ng/mL 相当量 (注入量として 0.0015~1.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

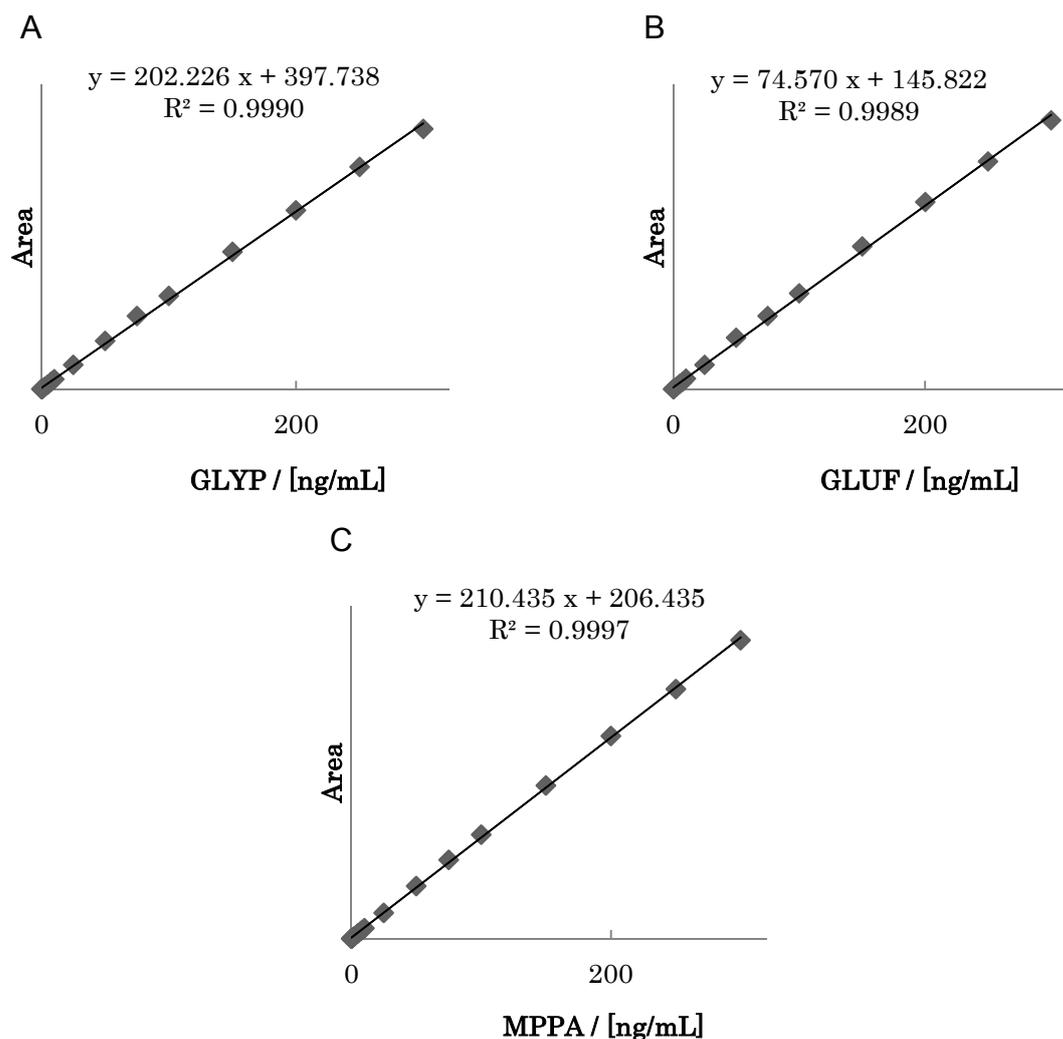


Fig. 3 Calibration curves of GLYP, GLUF and MPPA by peak area

A: GLYP; B: GLUF; C: MPPA

3.2 乾牧草及び粃米への適用性の検討

1) 乾牧草について

牧野らが検討した GLYP 法において, 良好な結果が得られなかった乾牧草は, 適用範囲から外れている. その原因としては, 夾雑物による影響で誘導体化反応や測定時のイオン化が抑制されている等の可能性が考えられた.

そこで, 乾牧草の基準値は GLYP で 120 mg/kg と比較的高濃度であり, GLUF は設定されていないことから, 夾雑物による影響を低減させる目的で, 2.5 の操作に従って抽出液に希釈操作を加え, 回収率の変動を確認することにより希釈操作の有効性を確認した.

その結果は Table 3 のとおりであり, GLYP では希釈倍率が大きくなるにつれて回収率に改善が認められ, 500 倍希釈で最もよい回収率が得られた. 一方, GLUF 及び MPPA では希釈倍率の違いによる回収率に改善は認められず, 良好な結果が得られなかった.

これらのことから, 乾牧草については, 基準値が設定されていない GLUF, MPPA 及び NAG を本検討から除外し, 基準値が設定されている GLYP のみを検討対象とすることとした.

Table 3 Comparison of recoveries of GLYP, GLUF and MPPA

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Dilution factor			
		10-fold	100-fold	250-fold	500-fold
		Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
GLYP	120	52.1	61.4	60.4	82.5
GLUF	120	68.5	49.0	69.9	52.4
MPPA	120	63.4	73.4	60.0	54.1

a) Mean (n=2)

2) 粃米について

粃米に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用い, 2.4 に従い添加回収試験を行ったところ, 粃米において GLUF 及び MPPA はそれぞれ 70 %以上の回収率が得られたが, GLYP は 50 %程度と回収率が低くなった.

GLYP の低回収率の原因は不明であり, 粃米に対しては GLYP 及び GLUF の基準値が設定されていないことから, 粃米を本検討から除外することとした.

3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 4)により調製した大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草のブランク試料溶液に 2.4 の 5)に従って調製した GLYP として, それぞれ 20, 5, 1, 0.2, 0.2 及び 120 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 200, 50, 10, 2, 2 及び 2.4 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液, GLUF として, それぞれ 0.5, 0.2, 0.1, 0.5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 5, 2, 1, 5 及び 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液, MPPA として, それぞれ 0.5, 0.2, 0.1, 0.5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 5, 2, 1, 5 及び 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.4 の 5)に従って調製した同濃度の GLYP, GLUF 及び MPPA 標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比はそれぞれ 91.1~110, 93.0~101 及び 90.5~101 %であり, 3 成分とも試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

3.4 妨害物質の検討

大麦 (2 検体), えん麦 (1 検体), ライ麦 (1 検体), 小麦 (2 検体), とうもろこし (2 検体), マイロ, アルファルファ乾草, 稲わら (2 検体) 及び WCS (2 検体) 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. その結果, 大麦 (1 検体) 及びマイロについて GLYP と同じ保持時間にピークが確認されたが, 定量イオンだけでなく確認イオンでも定量を行ったところ, 定量値が両者で一致したことから残留 GLYP に由来するピークと判断され, 定量を妨げる妨害ピークはないと考えられた.

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した大麦に GLYP として 20 及び 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 200 及び 0.4 ng/mL 相当量), 小麦に 5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 50 及び 5 ng/mL 相当量), とうもろこしに 1 及び 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 及び 1 ng/mL 相当量), 稲わらに

0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.4 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4.5 及び 0.9 ng/mL 相当量），アルファルファ乾草に 120 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.4 及び 0.4 ng/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検討した。

大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL 相当量），小麦にそれぞれ 0.2 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.5 ng/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 1 及び 0.5 ng/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 5 及び 0.5 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 11.25 及び 1.125 ng/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．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 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当量），小麦に 0.2 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 1.78 及び 0.444 ng/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 GLUF として 0.888 及び 0.444 ng/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 GLUF として 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 9.99 及び 0.999 ng/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検討した。

その結果を Table 4, 5, 6 及び 7 に示した．GLYP について，大麦では平均回収率 82.8~117 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD_r) として 17 %以下，同様に小麦では 85.0~86.4 %及び 7.0 %以下，とうもろこしでは 80.1~85.4 %及び 13 %以下，稲わらでは 97.3~100 %及び 14 %以下，WCS では 83.0~88.6 %及び 8.8 %以下，アルファルファ乾草では 78.2~81.4 %及び 9.4 %以下であった。

GLUF について，大麦では平均回収率 88.0~100 %，その繰返し精度は， RSD_r として 14 %以下，同様に小麦では 93.1~102 %及び 16 %以下，とうもろこしでは 103~112 %及び 14 %以下，稲わらでは 94.2~103 %及び 16 %以下，WCS では 84.6~92.7 %及び 11 %以下であった。

MPPA について，大麦では平均回収率 81.2~89.9 %，その繰返し精度は， RSD_r として 17 %以下，同様に小麦では 80.0~98.0 %及び 8.9 %以下，とうもろこしでは 85.7~108 %及び 7.0 %以下，稲わらでは 92.4~117 %及び 7.2 %以下，WCS では 76.9~91.1 %及び 10 %以下であった。

NAG について，大麦では平均回収率 89.0~101 %，その繰返し精度は， RSD_r として 19 %以下，同様に小麦では 74.1~82.2 %及び 11 %以下，とうもろこしでは 85.4~88.0 %及び 11 %以下，稲わらでは 82.4~84.4 %及び 16 %以下，WCS では 73.0~82.3 %及び 10 %以下であった。

なお，添加回収試験で得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recovery test for GLYP

Spiked level (mg/kg)	Feed types											
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage		Alfalfa hay	
	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)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
120			-		-		-		-		78.2	8.3
20	82.8	6.5	-		-		-		-		81.4	9.4
5	-		86.4	6.1	-		-		-		-	
1	-		-		80.1	7.6	-		-		-	
0.5	-		85.0	7.0	-		-		-		-	
0.2	-		-		-		97.3	4.2	88.6	8.8	-	
0.1	-		-		85.4	13	-		-		-	
0.04	117	17	-		-		100	14	83.0	7.2	-	

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recovery test for GLUF

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage	
	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)} (%)
0.5	100	6.5	-		-		94.2	5.4	84.6	2.2
0.2	-		93.1	6.2	-		-		-	
0.1	-		-		112	2.6	-		-	
0.05	88.0	14	102	16	103	14	103	16	92.7	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recovery test for MPPA

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage	
	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)} (%)
0.5	89.9	5.3	-		-		92.4	7.2	76.9	10
0.2	-		80.0	8.9	-		-		-	
0.1	-		-		85.7	7.0	-		-	
0.05	81.2	17	98.0	7.2	108	5.5	117	3.3	91.1	4.1

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recovery test for NAG

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage	
	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)} (%)
0.5	89.0	7.0	–	–	–	–	82.4	13	73.0	8.3
0.2	–	–	82.2	7.4	–	–	–	–	–	–
0.1	–	–	–	–	88.0	5.3	–	–	–	–
0.05	101	19	74.1	11	85.4	11	84.4	16	82.3	10

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

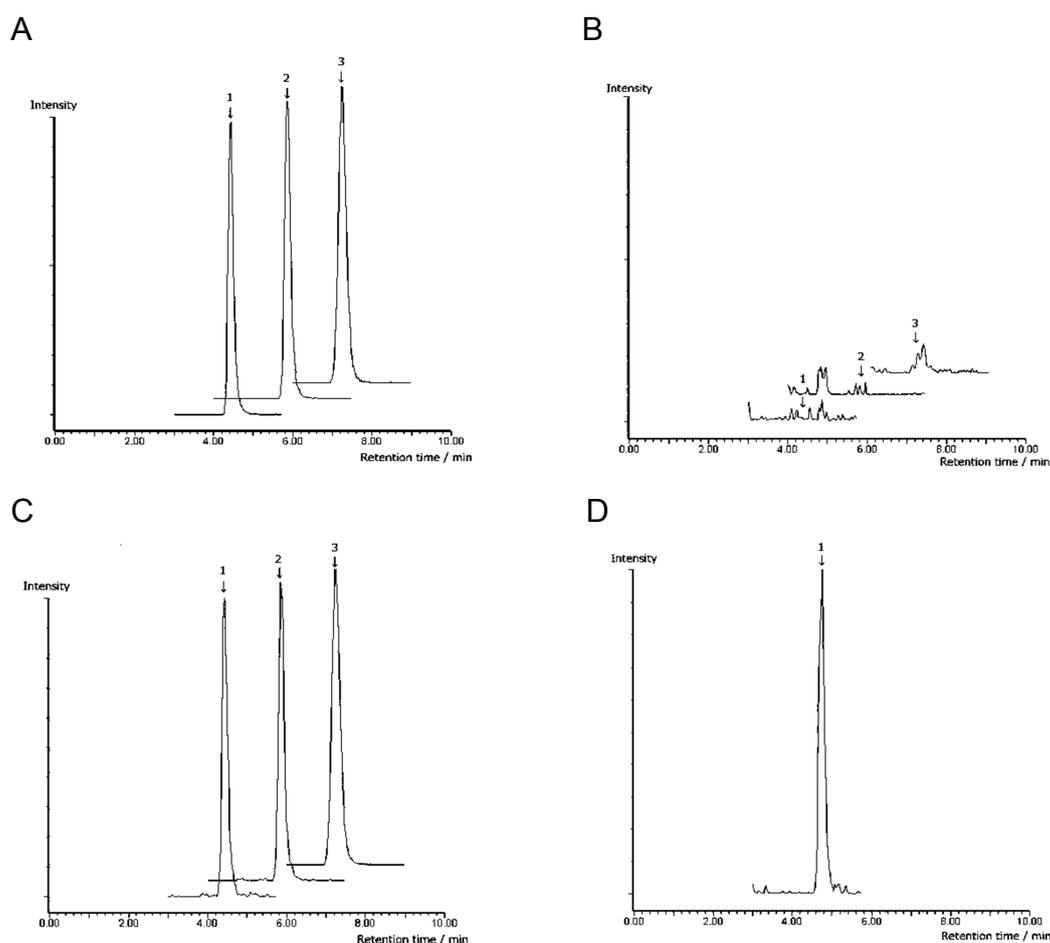


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peaks or retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative, and each peak is shown as 100 % in each segment except B, in which the peak height of the lowest standard solution (0.3 ng/mL) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentrations are 100 ng/mL for GLYP, GLUF and MPPA.)

B: Sample solution of barley (blank)

C: Sample solution of barley (spiked at 20 mg/kg of GLYP, 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA)

D: Sample solution of barley (spiked at 0.5 mg/kg of NAG)

3.6 小麦の添加回収試験の検討方法

牧野らが検討した GLUF 法では、良好な添加回収試験結果が得られなかった小麦については、適用除外とされている⁵⁾。一方、GLYP 法の検討⁶⁾では、小麦の低回収率の原因は、水で調製した添加用標準液を小麦に添加したことによって粘着性の高い塊が形成されて抽出を阻害したのではないかと考え、添加用標準液の組成をメタノール-水 (19+1) に変更したところ、良好な添加回収試験結果を得ている。

そこで、本検討でも昨年度の検討方法を踏襲し、2.6 に従って添加回収試験を実施した結果、3.5 のとおり良好な結果を得ることができた。

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、大麦、小麦、稲わら、WCS (風乾物) 及びアルファルファ乾草に GLYP 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。その結果、SN 比が 10 となる濃度は 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg)、SN 比が 3 となる濃度は 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。

同様に、大麦、小麦、とうもろこし、稲わら及び WCS (風乾物) 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 0.05 mg/kg 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 であった。

以上の結果から、本法の GLYP の定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg)、検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。GLUF、MPPA 及び NAG の定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中でいずれも 0.05 mg/kg、検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中でいずれも 0.02 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、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、大麦に GLYP として、20 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 200 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、とうもろこしに GLYP として、1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.1 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 1 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、稲わらに GLYP として、0.2 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 2 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、WCS に原物換算して GLYP として、0.2 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 4.5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 11.25 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、アルファルファ乾草に GLYP として、120 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1200 µg 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た。参加試験室は、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人マ

イコトキシシン検査協会, 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) 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⁷⁾、⁸⁾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, 外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し, 得られた RSD_R から, 修正 Horwitz 式⁹⁾を用いて HorRat を求めた。

GLYP の結果は Table 8 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草について, 平均回収率は 75.4, 79.7, 88.7, 81.7 及び 77.9 %, RSD_r は 10, 5.1, 18, 12 及び 10 %, RSD_R は 22, 20, 32, 23 及び 12 %, HorRat は 2.0, 1.2, 1.6, 1.1 及び 1.5 であった。

GLUF の結果は Table 9 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS について, 平均回収率は 99.3, 98.3, 96.8 及び 89.1 %, RSD_r は 11, 8.1, 6.5 及び 8.0 %, RSD_R は 15, 21, 17 及び 15 %, HorRat は 0.84, 0.96, 0.93 及び 0.85 であった。

MPPA の結果は Table 10 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS について, 平均回収率は 91.1, 90.5, 91.1 及び 86.2 %, RSD_r は 10, 13, 6.3 及び 5.7 %, RSD_R は 14, 33, 13 及び 17 %, HorRat は 0.77, 1.5, 0.71 及び 0.93 であった。

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 11 に示した。

Table 8 Collaborative study results of GLYP

Laboratory No.	Feed types									
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Alfalfa hay (mg/kg)	
1	15.2	12.6	0.872	0.854	0.160	0.240	0.163	0.154	97.7	72.0
2	18.9	18.3	0.985	0.984	0.205	0.200	0.219	0.263	114	108
3	15.3	15.2	0.747	0.755	0.181	0.226	0.170	0.156	95.5	84.1
4	19.6	15.7	1.00 ^{a)}	0.740 ^{a)}	0.186	0.245	0.170	0.166	99.1	97.3
5	14.7	12.8	0.564	0.615	0.140	0.149	0.165	0.166	88.0	92.0
6	12.2	9.07	0.548	0.640	0.0906	0.113	0.108	0.159	73.4 ^{a)}	128 ^{a)}
7	8.37	11.6	0.569	0.701	0.0889	0.0571	0.114	0.106	15.0 ^{b)}	13.4 ^{b)}
8	19.1	19.0	0.957	0.989	0.214	0.184	0.133	0.173	87.7	85.2
9	16.5	16.8	0.850	0.867	0.264	0.196	0.180	0.212	85.9	89.2
10	15.6	15.1	0.920	0.930	0.219	0.190	0.150	0.140	88.1	112.0
Spiked level (mg/kg)	20		1		0.2		0.2		120	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	15.1		0.797		0.177		0.163		93.5	
Recovery (%)	75.4		79.7		88.7		81.7		77.9	
RSD_r ^{d)} (%)	10		5.1		18		12		10	
RSD_R ^{e)} (%)	22		20		32		23		12	
PRSD _R ^{f)} (%)	11		17		21		21		8	
HorRat	2.0		1.2		1.6		1.1		1.5	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Corn: $n=18$; Barley: $n=20$; Rice straw: $n=20$; WCS: $n=20$; Alfalfa hay: $n=16$

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 9 Collaborative study results of GLUF

Laboratory No.	Feed types							
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)	
1	0.502	0.442	0.100	0.114	0.490	0.553	0.438	0.388
2	0.612	0.583	0.111	0.103	0.546	0.544	0.540	0.614
3	0.583	0.566	0.0875	0.0869	0.438	0.472	0.466	0.473
4	0.536	0.436	0.152	0.132	0.466	0.512	0.467	0.423
5	0.463	0.457	0.0815	0.0834	0.438	0.410	0.438	0.428
6	0.433	0.352	0.0642	0.0688	0.356	0.354	0.402	0.452
7	0.618	0.435	0.0883	0.0911	0.435	0.378	0.346	0.346
8	0.479	0.510	0.105	0.105	0.530	0.447	0.362	0.473
9	0.528	0.545	0.111	0.0868	0.601	0.636	0.507	0.525
10	0.440	0.407	0.0986	0.0963	0.532	0.545	0.406	0.419
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.1		0.5		0.5	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.496		0.0983		0.484		0.446	
Recovery (%)	99.3		98.3		96.8		89.1	
RSD _r ^{d)} (%)	11		8.1		6.5		8.0	
RSD _R ^{e)} (%)	15		21		17		15	
PRSD _R ^{f)} (%)	18		22		18		18	
HorRat	0.84		0.96		0.93		0.85	

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 10 Collaborative study results of MPPA

Laboratory No.	Feed types							
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)	
1	0.463	0.357	0.105	0.0900	0.390	0.312	0.400	0.421
2	0.581	0.550	0.109	0.101	0.452	0.449	0.574	0.586
3	0.429	0.426	0.0838	0.0849	0.551	0.495	0.393	0.409
4	0.922 ^{b)}	0.579 ^{b)}	2.43 ^{a)}	0.741 ^{a)}	0.529 ^{b)}	0.901 ^{b)}	0.376	0.382
5	0.433	0.477	0.0997	0.0881	0.409	0.434	0.347	0.347
6	0.512	0.377	0.308 ^{b)}	0.414 ^{b)}	0.422	0.420	0.393 ^{b)}	0.547 ^{b)}
7	0.416	0.375	0.0257	0.0354	0.454	0.422	0.443	0.395
8	0.521	0.502	0.107	0.142	0.488	0.481	0.440	0.506
9	0.445	0.482	0.0901	0.105	0.519	0.512	0.456	0.512
10	0.458	0.393	1.93 ^{a)}	2.58 ^{a)}	0.524	0.463	0.393	0.377
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.1		0.5		0.5	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.455		0.0905		0.455		0.431	
Recovery (%)	91.1		90.5		91.1		86.2	
RSD _r ^{d)} (%)	10		13		6.3		5.7	
RSD _R ^{e)} (%)	14		33		13		17	
PRSD _R ^{f)} (%)	18		22		18		18	
HorRat	0.77		1.5		0.71		0.93	

a) Data excluded for concern for carry-over of MPPA from standard solution

b) Data excluded by Cochran test

c) Corn: $n=14$; Barley: $n=18$; Rice straw: $n=18$; WCS: $n=18$

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 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	XBridge C18, Waters
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: Shimadzu LC-20AD	Mightysil RP-18 GP, Kanto Chemical
	MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB Sciex	(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
7	LC: UFLC XR, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: TSQ Quantam Ultra , Thermo Scientific	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: LC-30AD, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

穀類，乾牧草，稲わら及び WCS 中の GLYP，GLUF，MPPA 及び NAG の同時定量法として GLYP 法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，穀類，稲わら及び WCS は適用が可能であると考えられた．また，乾牧草については，GLYP 法により抽出した後，遠心分離した試料溶液に希釈操作を追加することで以下の結果が得られ GLYP の単成分分析法としての適用が可能であると考えられた．

1) GLYP，GLUF 及び MPPA の各検量線は，0.3~300 ng/mL 相当量（注入量として 0.0015~1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した．

なお，当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は，GLYP においては，大麦で 200 及び 0.4 ng/mL 相当濃度，小麦で 50 及び 5 ng/mL 相当濃度，とうもろこしで 10 及び 1 ng/mL 相当濃度，稲わらで 2 及び 0.4 ng/mL 相当濃度，WCS で 4.5 及び 0.9 ng/mL 相当濃度，

アルファルファ乾草で 2.4 及び 0.4 ng/mL 相当濃度とした。GLUF 及び MPPA においては、大麦でそれぞれ 5 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、小麦でそれぞれ 2 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、とうもろこしでそれぞれ 1 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、稲わらでそれぞれ 5 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、WCS でそれぞれ 11.25 及び 1.125 ng/mL 相当濃度とした。NAG においては、GLUF として大麦で 4.440 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、小麦でそれぞれ 1.78 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、とうもろこしでそれぞれ 0.888 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、稲わらでそれぞれ 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、WCS でそれぞれ 9.99 及び 0.999 ng/mL 相当濃度とした。

- 2) 乾牧草については、GLYP 法に対して希釈操作を追加したところ、分析対象成分が GLYP のみであれば良好な結果が得られ適用が可能であると考えられた。一方、GLUF, MPPA 及び NAG は本法の適用除外とすることにした。また、粳米については、全ての分析対象成分が本法への適用が困難であったことから、適用除外とすることにした。
- 3) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、GLYP, GLUF 及び MPPA は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) 本法に従って得られた選択反応検出クロマトグラムでは、14 種類の飼料原料において定量を妨げるピークは認められなかった。
- 5) 大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草に GLYP としてそれぞれ異なる 2 種類の濃度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ところ良好な結果が得られた。
- 6) 大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS に GLUF, MPPA 及び NAG としてそれぞれ異なる 2 種類の濃度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ところ良好な結果が得られた。
- 7) 本法による GLYP の定量下限は試料中で 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg), 検出下限は 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。本法による GLUF, MPPA 及び NAG の定量下限は、いずれも試料中で 0.05 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg であった。
- 8) 大麦に GLYP として、20 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, とうもろこしに GLYP として、1 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.1 mg/kg 相当量, 稲わらに GLYP として、0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, WCS に GLYP として、0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, アルファルファ乾草に GLYP として、120 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、良好な結果が得られた。

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, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び一般財団法人マイコトキシン検査協会における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農薬ハンドブック 2005 年版編集委員会: 農薬ハンドブック 2005 年版, 日本植物防疫協会, 631-639 (2005) (ISBN: 978-4889260991).

- 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，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) 牧野 大作，若宮 洋市，榊原 良成，上野山 智洋：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定量法，飼料研究報告，**38**，89-107 (2013).
- 6) 牧野 大作，若宮 洋市，榊原 良成，船木 紀夫：穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサ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定量法，飼料研究報告，**39**，30-43 (2014).
- 7) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 8) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 9) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

6 稲発酵粗飼料及び粃米中のクロロタロニルのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

桑原 正良*

Determination of Chlorothalonil in Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS

Masayoshi KUWABARA*

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

An analytical method was developed to determine level of chlorothalonil in whole-crop rice silage and paddy rice for feed using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

After adding phosphoric acid solution (1:11) to the samples, chlorothalonil was extracted with acetone. The extract was purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and gel permeation chromatography. Resulting solution of whole-crop rice silage was further purified with Sep-Pak Plus Florisil (Waters; Milford, MA, USA). The resulting solution was injected into the GC-MS for determination of chlorothalonil level. The GC separation was carried out on fused silica capillary column (HP-5MS; 0.25 mm i.d. × 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Spike tests were conducted on whole-crop rice silage spiked with 0.089 and 0.0044 mg/kg and paddy rice spiked with 0.2 and 0.01 mg/kg of chlorothalonil respectively. The resulting mean recoveries ranged from 88.5 % to 110 %, and the relative standard deviations (RSD_r) were not more than 8.0 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.089 mg/kg and 0.1 mg/kg of chlorothalonil respectively. The mean recovery, the repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 85.3 %, 4.9 %, 8.7 % and 0.40 for whole-crop rice silage, 93.0 %, 8.6 %, 8.5 % and 0.39 for paddy rice.

This method was validated and established for use in the inspection of chlorothalonil in whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: whole-crop rice silage; paddy rice; chlorothalonil; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); electron ionization (EI); collaborative study

キーワード：稲発酵粗飼料；粃米；クロロタロニル；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化法；共同試験

1 緒 言

クロロタロニルはアメリカのダイアモンド・アルカリ社によって開発された殺菌剤であり、1965年に登録された。園芸作物のほか稲などにも適用があり、有機硫黄殺菌剤や銅殺菌剤に似た効果がある。

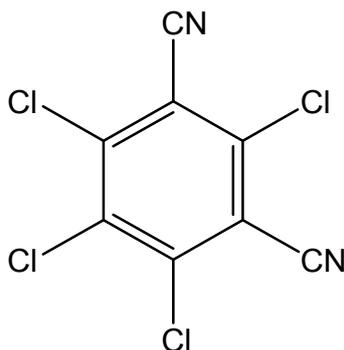
飼料の有害物質の指導基準値¹⁾は稲わらで 0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）

* 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 神戸センター

で 0.1 mg/kg, 食品, 添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾は米(玄米), 小麦, 大麦及びライ麦で 0.1 ppm, とうもろこし及び綿実で 0.01 ppm と定められている. 厚生労働省通知試験法³⁾としてクロロタロニルの個別試験法が定められている.

飼料中の分析法は, 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⁴⁾(以下「JFRL 法」という.)がある. この JFRL 法を基に飼料分析基準⁵⁾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.

参考に, クロロタロニルの構造式等を Fig. 1 に示した.



2,4,5,6-tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile

$C_8Cl_4N_2$ MW: 265.9

CAS No.: 1897-45-6

Fig. 1 Chemical structure of chlorothalonil

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米は, 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した. WCS は, 60 °C で 10 時間乾燥し, 更に室内に静置して風乾した後, 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した.

2.2 試薬

1) アセトン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, シクロヘキサン, ヘキサンは残留農薬試験用を用いた. 水は液体クロマトグラフ用を, ポリエチレングリコール(以下「PEG」という.)は平均分子量 300 のものを, リン酸は特級を用いた.

2) 希釈溶媒

PEG 1 mL にアセトンを加えて 100 mL とし, 更にこの溶液 1 mL にヘキサンを加えて 200 mL とし, 希釈溶媒を調製した.

3) クロロタロニル標準原液

クロロタロニル標準品(関東化学製, 純度 99.6 %) 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クロロタロニル標準原液を調製した(この液 1 mL は, クロロタロニルとして 0.5 mg ($f=0.996$) を含有する.).

4) クロロタロニル標準液

使用に際して, クロロタロニル標準原液の一定量を, 希釈溶媒で正確に希釈し, 1 mL 中にクロロタロニルとして 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 及び 0.2 μ g を含有する各クロロタロ

ニル標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1mm スクリーン，回転数 1690 rpm）
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute（10 mL 保持用） ジーエルサイエンス製
- 4) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.45 μm ，直径 25 mm，PTFE） 東洋濾紙製
- 5) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：GPC システム 島津製作所製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（充てん剤量 910 mL）
Waters 製にリザーバー（20 mL）を連結したもの
- 7) 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：7890A Agilent Technologies 製
質量分析計部：5975C Agilent Technologies 製

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，リン酸（1+11）30 mL（粃米は 20 mL）を加え，30 分間静置した後，更にアセトン 120 mL（粃米は 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 40 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ，40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で約 5 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

試料溶液にリン酸（1+11）5 mL を加えた後，多孔性ケイソウ土カラムに入れ，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，先の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てクロロタロニルを溶出させた。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 $^{\circ}\text{C}$ 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，ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mL を GPC に注入し，クロロタロニルが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し，40 $^{\circ}\text{C}$ 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。

WCS については，ヘキサノージエチルエーテル（4+1）6 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。

粃米については，希釈溶媒 2 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。

Table 1 Operating conditions of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane - acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction Volume	110~140 mL

4) カラム処理 II (WCS)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをヘキサン 5 mL で洗浄した（吸引マニホールドを使用し、流速 1~2 mL/min とした．以下同じ．）．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．

試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサソージエチルエーテル (4+1) 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサソ-酢酸エチル (9+1) 20 mL 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してクロロタロニルを溶出させた．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 2 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

試料溶液及び各クロロタロニル標準液各 2 μL を GC-MS に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを得た．

GC-MS の測定条件を Table 2 に示した．

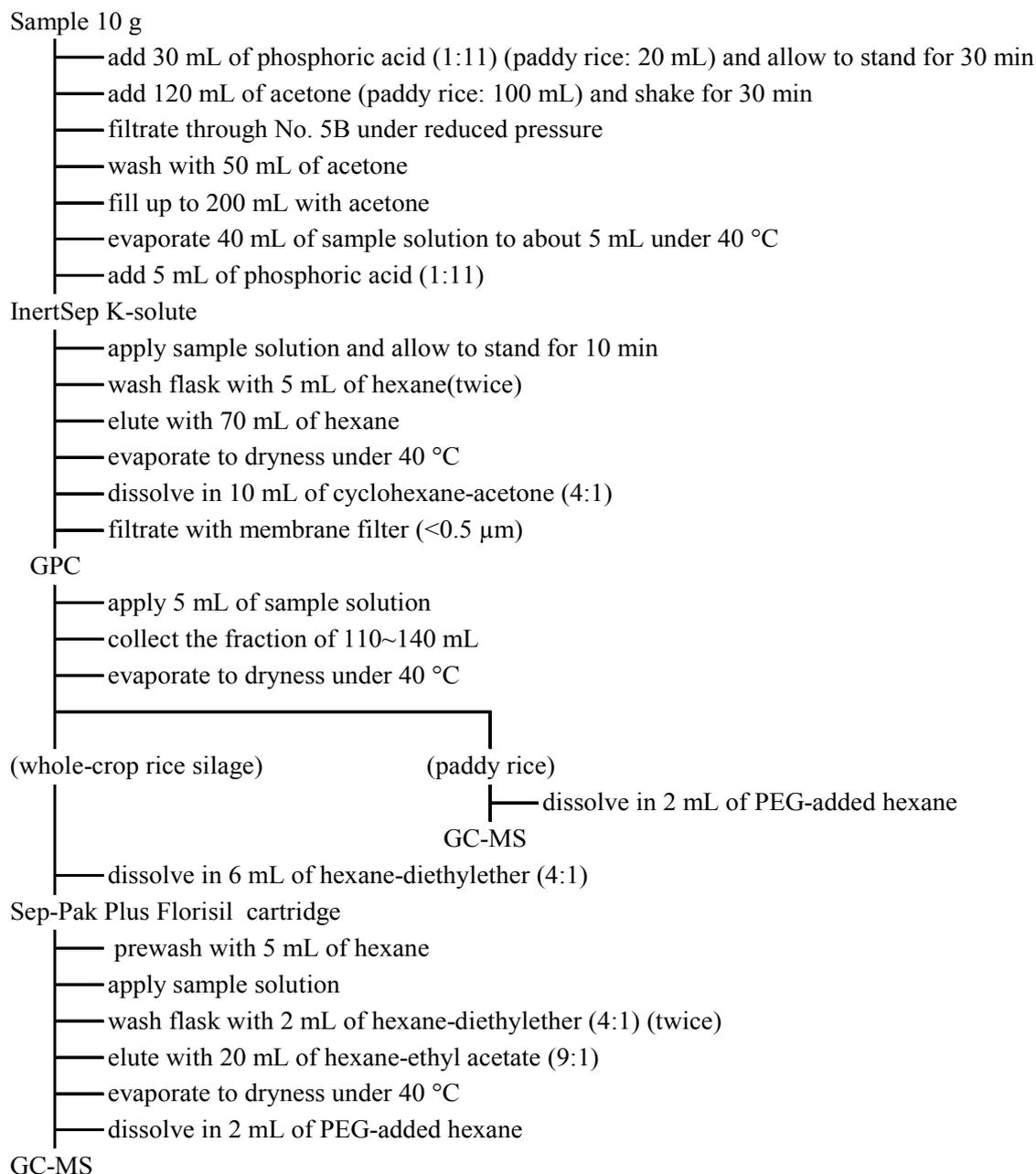
Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	80 °C (hold for 1 min) → 20 °C/min → 280 °C (hold for 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	<i>m/z</i> 264 (for quantification), 266 (for confirmation)

6) 計 算

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、試料中のクロロタロニル量を算出した．

定量法の概要を Scheme 1 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for chlorothalonil in whole-crop rice silage and paddy rice for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

JFRL 法に従い、アセトンを用いて調製したクロロタロニル標準液 (0.1 µg/mL) を GC-MS に注入し、注入再現性を確認したところ、注入毎にレスポンスの著しい減衰がみられた。また、希釈溶媒としてヘキサンを用いて調製した標準液 (0.1 µg/mL) を GC-MS に注入し、注入再現性を求めたところ、相対標準偏差が 10 % ($n=10$) とピーク高さ及び面積にばらつきが認められた。このばらつきを解消するためにヘキサンに PEG を 0.005 v/v% 添加したところ、相対標準偏差が 4 % ($n=10$) に改善が認められた。よって、以後は、GC-MS による測定に供する標準液及び試料溶液の調製には、PEG を 0.005 v/v% 添加したヘキサンを用いることとした。

2.2 の 4) に従って調製した各クロロタロニル標準液各 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 のとおり、検量線はクロロタロニルとして、それぞれ 0.002~0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.004~0.4 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

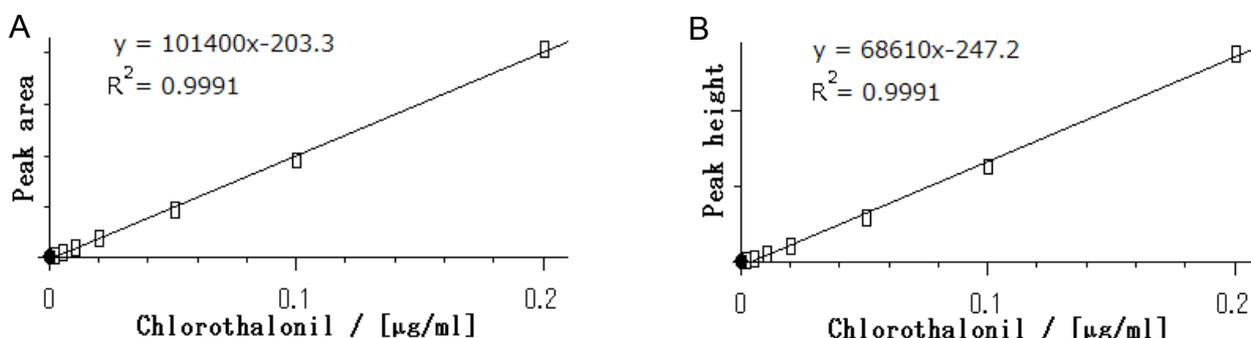


Fig. 2 Calibration curves of chlorothalonil (A: peak area, B: peak height)

3.2 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の確認

粳米を用い、2.4 の 1) に従って調製した試料溶液にクロロタロニルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加し、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 2) 及び 3) の操作を行った。その結果は、Table 3 のとおり、クロロタロニルは 0~80 mL の画分に溶出し、80~120 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、本カラムによる溶出液量はヘキサン 80 mL とした。

Table 3 Elution pattern of chlorothalonil from InertSep K-solute

Spiked level (mg/kg)	Hexane				Total
	0-60 mL	60-80 mL	80-100 mL	100-120 mL	
	Recovery ^{a)} (%)				
0.2	95	1	0	0	96

a) Mean (n=3)

3.3 ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の確認

粳米を用い、2.4 の 1) 及び 2) に従って調製した試料溶液にクロロタロニルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加し、GPC の溶出画分を確認した。その結果は、Table 4 のとおり、クロロタロニルは 110~140 mL の画分に溶出し、100~110 mL 及び 140~150 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、GPC の分取画分は 110~140 mL とした。

なお、GPC として日本分光製ポンプ：PU-2080、日本分光製オートサンプラー：AS-2058、東洋製作所製フラクションコネクター：CHF122SC を用いた場合の分取画分は 100~130 mL であり、飼料分析基準にはこの値が掲載された。

Table 4 Elution pattern of chlorothalonil from GPC

Spiked level (mg/kg)	Cyclohexane-acetone (4:1)					Total
	100-110 mL	110-120 mL	120-130 mL	130-140 mL	140-150 mL	
0.2	0	16	80	4	0	100

a) Mean (n=3)

3.4 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の確認

予備試験として WCS を用い、クロロタロニルとして原物換算して 0.089 mg/kg 相当量（最終試料溶液中に 0.1 mg/mL 相当量）を添加し、2.4 の 1)~3)に従って定量したところ、回収率は 123 %と高くなった。この原因は夾雑成分によるものと推定し、JFRL 法と同様⁴⁾、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を追加検討したところ、回収率の改善がみられた。

そこで、WCS を用い、2.4 の 1)~3)に従って調製した試料溶液にクロロタロニルとして原物換算して 0.089 mg/kg 相当量を添加し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は、Table 5 のとおり、クロロタロニルはヘキサーンジエチルエーテル (4+1) 0~20 mL の画分では溶出せず、ヘキサーン酢酸エチル (9+1) 0~20 mL の画分に溶出し、20~30 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、本ミニカラムによる溶出液量をヘキサーン酢酸エチル (9+1) 20 mL とした。

Table 5 Elution pattern of chlorothalonil from Sep-Pak Plus Florisil cartridge

Spiked level (mg/kg)	Hexane-diethylether (4:1)	Hexane-ethyl acetate (9:1)			Total
	0-20 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
0.089	0	107	1	0	108

a) Mean (n=3)

3.5 妨害物質の検討

WCS (2 検体) 及び粃米 (3 検体) を用い、本法により調製した試料溶液を GC-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、WCS についてはクロロタロニルの定量を妨害するピークは認められなかった。粃米についてはクロロタロニルのリテンションタイム付近に微小のピークが確認されたが、そのピークは定量下限相当のピークの 1/3 以下であったため、定量には影響しないと考えられた。

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。

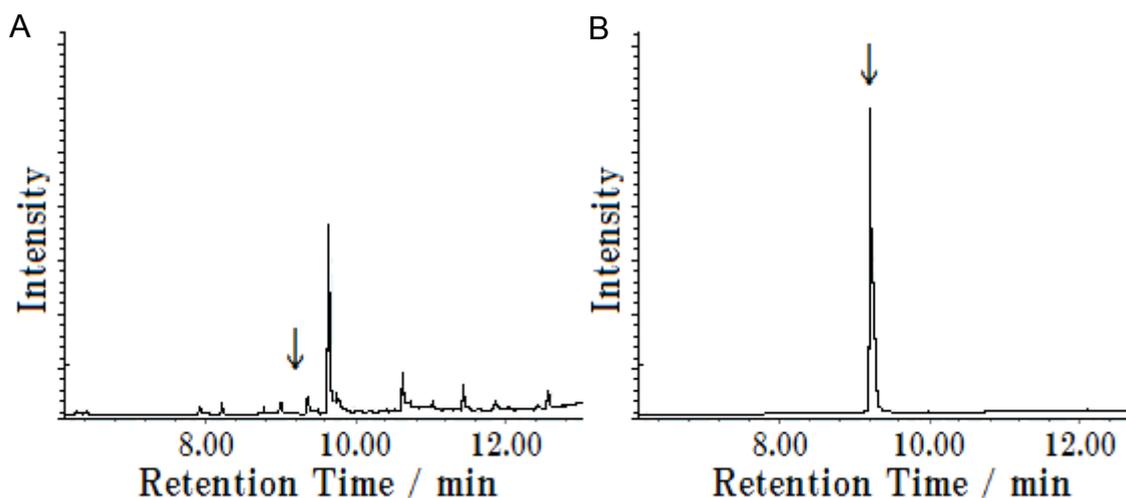


Fig. 3 SIM chromatograms of paddy rice (blank) and standard solution
(Arrows indicate the retention time or peak of chlorothalonil.)

A: Paddy rice

B: Standard solution (0.002 µg/mL: 4 pg)

3.6 稲わらにおける検討

稲わら (4 検体) にクロロタロニルを 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中に 0.1 mg/mL 相当量) を添加した試料を用い, 本法 (2.4 の 4) は行わず) 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 6 のとおり, 試料により回収率にばらつきがみられ, 稲わらに対して更なる検討が必要であると考えられたため, 本法の適用範囲から除外することとした。

Table 6 Recoveries of chlorothalonil in rice straw

Spiked level (mg/kg)	Sample A		Sample B		Sample C		Sample D	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}						
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.2	99.4	5.7	125	2.5	90.7	2.7	68.5	1.5

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 添加回収試験

2.1 により調製した試料について, クロロタロニルとして WCS に原物換算して 0.089 及び 0.0044 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中に 0.1 及び 0.005 mg/mL 相当量), 粳米に 0.2 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中に 0.1 及び 0.005 mg/mL 相当量) を添加し, 本法に従って添加回収試験を実施し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお, WCS については原物の水分含有量を 60 % と想定し, 原物中濃度への換算は, 原物 (水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式から求めた。

その結果は、Table 7 のとおり、WCS では、クロロタロニルの平均回収率は 103~110 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.0 %以下，同様に粃米では，88.5~104 %及び 4.3 %以下の成績が得られた。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Spiked level (mg/kg)	Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
0.2	—	—	104	4.3
0.089	110	6.5	—	—
0.01	—	—	88.5	4.0
0.0044	103	8.0	—	—

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

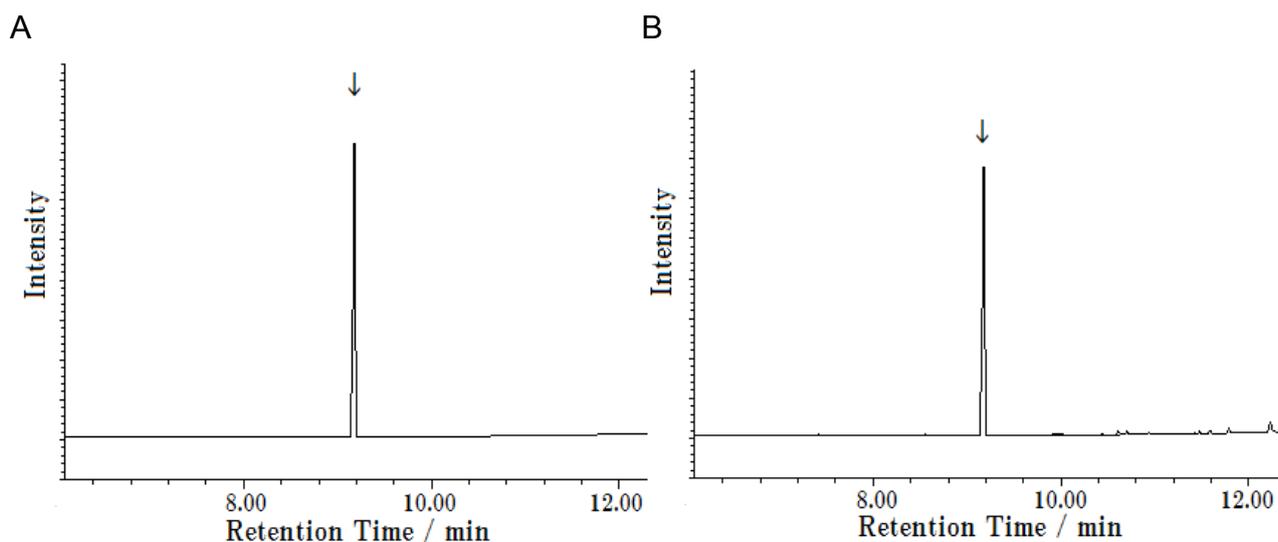


Fig. 4 SIM chromatograms

(Arrows indicate the peaks of chlorothalonil.)

A: Standard solution (The concentration is 0.1 mg/kg as chlorothalonil.)

B: Sample solution of whole-crop silage (spiked at 0.089 mg/kg of chlorothalonil)

3.8 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，WCS 及び粃米にクロロタロニルを添加した添加回収試験により得られたピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果，SN 比が 10 及び 3 となる濃度は，0.01 mg/kg 相当量 (WCS は風乾物) 及び 0.003 mg/kg (WCS は風乾物) であったことから，本法の WCS (風乾物) 及び粃米中の定量下限は 0.01 mg/kg，検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお，Table 7 に示したとおり，当該濃度付近における添加回収試験の結果は良好であった。

3.9 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、WCSにクロロタロニルとして原物換算して0.089 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対し1 mL中に2 µgを含有するクロロタロニル標準液1 mL添加）及び粳米にクロロタロニルとして0.1 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対し1 mL中に1 µgを含有するクロロタロニル標準液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た。

参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、JA 東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部、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）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^{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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度（RSD_t）及び室間再現精度（RSD_R）を算出し、得られたRSD_Rから、修正Horwitz式⁸⁾を用いてHorRatを求めた。

結果はTable 8のとおりであった。

WCS及び粳米について、平均回収率は85.3及び93.0%，RSD_tは4.9及び8.6%，RSD_Rは8.7及び8.5%，HorRatは0.40及び0.39であった。なお、いずれもHorRatの値が0.5を下回ったが、原因の1つとして、本分析法が既存の農薬のGC-MSによる一斉分析法⁵⁾を更に簡略にしたものであり、各試験室が分析操作に習熟していたことが考えられた。

参考のため、各試験室で使用したGC-MSの機種等をTable 9に示した。

Table 8 Collaborative study results of chlorothalonil

Lab. No.	Feed types			
	Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0756	0.0827	0.0960	0.105
2	0.0809	0.0853	0.0803	0.105
3	0.0809	0.0738	0.0906	0.0828
4	0.0831	0.0853	0.0968	0.0976
5	0.0751	0.0747	0.0988	0.103
6	0.0800	0.0751	0.0889	0.0978
7	0.0667	0.0707	0.0875	0.0849
8	0.0702	0.0627	0.0825	0.0981
9	0.0747	0.0693	0.0855	0.0924
Spiked level (mg/kg)	0.089		0.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0759		0.0930	
Recovery ^{b)} (%)	85.3		93.0	
RSD _r ^{b)} (%)	4.9		8.6	
RSD _R ^{c)} (%)	8.7		8.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.40		0.39	

- 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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC colume
		(i.d.×length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	FOCUS GC/POLARIS Q, Thermo Electron	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
3	GCMS-QP2010, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	FOCUS GC/POLARIS Q, Thermo Electron	TR-5MS, Thermo Scientific (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	GC: 6890N, Agilent Technologies MS: 5973N, Agilent Technologies	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
7	GC: 6890A, Agilent Technologies MS: 5973, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	GC: 6890A, Agilent Technologies MS: 5973 inertMSD, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
9	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)

4 まとめ

WCS 及び粃米中に残留するクロロタロニルについて、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、GC-MS 測定時の希釈溶媒をアセトンから PEG を 0.005 v/v% 添加したヘキサンとし、WCS には GPC による精製の後に合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を追加することで、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 0.002~0.2 μg/mL 相当量（注入量として 0.004~0.4 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、0.1 及び 0.005 μg/mL 相当濃度とした。
- 2) 今回、検討に用いた WCS 及び粃米において定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) クロロタロニルとして WCS に原物換算して 0.089 及び 0.0044 mg/kg 相当量並びに粃米に 0.2 及び 0.01 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、本法による回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。
- 4) 本法による定量下限は試料（WCS は風乾物）中で 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 5) クロロタロニルとして WCS に原物換算して 0.089 mg/kg 相当量及び粃米に 0.1 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財団法人日本食品分析センター 多摩研究所, 一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, JA東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部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，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) 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開発事業 (2009).
- 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) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 8) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

7 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中の油脂の酸価及び過酸化物価の測定法

名塚 英一^{*1}, 松原 光里^{*2}

Determination of Acid Value and Peroxide Value of Fat in Dry and Semi-dry Type Pet Foods

Eiichi NAZUKA^{*1} and Hikari MATSUBARA^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Sendai Regional Center),

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine the levels of acid value and peroxide value of fat in dry type and semi-dry type pet foods.

After adding petroleum ether to the sample, the sample was shaken for 2 hours. The petroleum ether in the flask was filtrated and collected in a separatory funnel. After washing with water twice, the petroleum ether layer was dehydrated, filtrated and evaporated by a rotary evaporator. The residue in the flask was then used for determinations of acid value and peroxide value by the titration.

Repetitive tests were conducted on two kinds of dry type dog food, two kinds of dry type cat food and a semi-dry type dog food. The resulting repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) of acid value and peroxide value were not more than 4.6 % and 10 %, respectively. A branching test was conducted on a dry type dog food. The resulting intermediate precision in terms of standard relative deviations (RSD_I) of acid value and peroxide value were 4.3 % and 6.7 %, respectively.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories using dry and semi-dry type dog foods. Repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R), and HorRat for acid value were 1.2 %, 2.9 % and 0.64, respectively, for dry type dog food and 2.4 %, 6.7 % and 1.4, respectively, for semi-dry type dog food. For peroxide value, RSD_r and RSD_R were 4.1 % and 12 %, respectively, for dry type dog food and 3.0 % and 18 %, respectively, for semi-dry type dog food.

This method was validated and established for use in the inspection of acid value and peroxide value of fat in dry and semi-dry type pet foods.

Key words: acid value; peroxide value; pet food; collaborative study

キーワード：酸価；過酸化物価；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

平成19年の米国における愛玩動物用飼料へのメラミン混入を契機に、愛玩動物用飼料の安全性への関心が高まっている。このような背景の中、「愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律」により、愛玩動物用飼料の基準・規格¹⁾が設定され、当該基準・規格に合わない愛玩動物用飼料や愛玩動物に対する健康被害を与える可能性がある有害な物質を含む愛玩動物用飼料の製造等が禁止

^{*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 仙台センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

されている。

愛玩動物用飼料の使用が原因となって、愛玩動物に健康被害が生じた場合に、その原因究明、実態把握等は、原則的に「愛玩動物用飼料等の検査法」²⁾に記載された分析法により実施する必要がある。しかし、酸価及び過酸化物価は、品質劣化の指標となる成分であるにもかかわらず、「愛玩動物用飼料等の検査法」に記載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

今回、一般財団法人化学物質評価研究機構が平成23年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業において開発した愛玩動物用飼料中の酸価・過酸化物価の測定法³⁾（以下「CERI法」という。）を基に、「愛玩動物用飼料等の検査法」への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）を1 mmの網ふるいを通すまで粉砕したものをを用いた。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料の原材料をTable 1に示した。

2.2 試薬

- 1) 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液
容量分析用，和光純薬工業製
- 2) 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液
容量分析用，関東化学製
- 3) ジエチルエーテル
油脂酸価・過酸化物価測定用，同仁化学研究所製及び特級
- 4) エタノール，石油エーテル，2,2,4-トリメチルペンタン，酢酸及びヨウ化カリウムは特級を用いた。
- 5) フェノールフタレイン試液
フェノールフタレイン（特級）1 g をエタノール 100 mL に溶かした。
- 6) ヨウ化カリウム飽和溶液
ヨウ化カリウム 36 g を煮沸冷却した水 25 mL に飽和させたもの。使用の都度調製し，使用時までは暗所に保存した。
- 7) デンプン試液
デンプン（溶性，E. Merck 製）1 g を少量の水で均一なペースト状にしたものを，熱水 100 mL 中にかき混ぜながら加え，更に穏やかに煮沸しながら透明になるまでかき混ぜた後放冷し，上澄み液を使用した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) ガラス繊維ろ紙：GFP-95 桐山製作所製

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry type for old dogs	Grains (Wheat flour, Maize, Hominy feed, Corn gluten meal, Defatted rice bran), Meat (Chicken by-product meal, Meat meal, Powdered chicken meat), Oils and fats (Animal fat, Fish oil, Wheat germ oil), Beet pulp, Alfalfa, Soybean oil, Powdered milk, Fish (Fish meal, Powdered dried sardine), Vegetables (Paprika, Powdered cabbage, Powdered carrot, Powdered spinach, Powdered pumpkin), Oligosaccharide, Beer yeast, Powdered egg yolk, Chlorella, Glucosamine, β -glucan, Clove, Basil, Rosemary, Minerals (Ca, P, Na, Cl, I, Zn, Cu), Vitamins (A, B, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Niacin, Pantothenic acid, Inositol, Choline), Antioxidants (Rosemary extracts)
Dry type for old dogs	Maize, Chicken, Animal fat, Soybean, Linseed, Chicken extracts, Corn gluten, Egg, Glucosamine, Chondroitin sulfate, Minerals (Ca, P, Na, K, chloride, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, I), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, Niacin, Pantothenic acid, Folic acid, Biotin, Choline), Amino acids (Arginine, Taurine, Tryptophan, Lysine), Lactic acid, Phosphoric acid, Antioxidants (Mixed tocopherol, Citric acid, Rosemary extracts)
Dry type for cats of all life stage	Soybean meal, Maize, Tapioca, Meat (Chicken, etc.), Corn gluten meal, Oils and fats (Animal fat, Vege oil, etc.), Fish (Fish meal, etc.), Bonito extracts, Minerals (Ca, P, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), Vitamins (A, D ₃ , E, K ₃ , B ₁ , B ₂ , Pantothenic acid, Niacin, B ₆ , Folic acid, Biotin, Choline, C), Amino acids (Taurine), Preservative (Propionic acid, Ammonium propionate), Green tea extracts
Dry type for adult cats	Chicken meal, Powdered cone, Corn gluten meal, Chicken fat, Powdered brown rice, Whole wheat flour, Powdered herring, Natural flavor, Tomato fiber, Dried chicken liver, Beer yeast, Dried chicory, Abocado oil, Abocado meal, Potassium chloride, Calcium carbonate, Taurine, Lecithin, Dried yucca, Methionine, Dried kelp, Vitamin A, Vitamin D ₃ , Vitamin E, Vitamin B ₁₂ , Vitamin B ₂ , Niacin, Choline chloride, Calcium Pantothenate, Folic acid, Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁ , Biotin, Vitamin C, Zinc polysaccharide complex, Manganese polysaccharide complex, Iron polysaccharide complex, Copper polysaccharide complex, Cobalt polysaccharide complex, Calcium iodate, Sodium selenate
Semi-dry type for over thirteen dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Meat (Chicken by-product meal, Powdered white meat, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose, Oligosaccharide), Animal fat, Beans (Powdered soybean, Defatted soybean, etc.), Beer yeast, Vegetables (Beet pulp, Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Herb, Fish (Dried small fish), Propylene glycol, Glycerin, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Minerals (Cl, Cu, I, K, Zn), Malic acid, Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Glucosamine hydrochloride (derived from shrimp, crab), Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Chondroitin sulfate (derived from shark), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose), Meat (Chicken by-product meal, Beef by-product meal, Chicken extracts, etc.), Animal fat, Beans (Defatted soybean, Powdered soybean, etc.), Fish (White fish meal, Fish meal), Beer yeast, Vegetables (Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Powdered cheese, Propylene glycol, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, Na, P, Zn), Glycerin, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Dry type for adult dogs	Lamb meal, Rice, Steamed oats, Brown rice, Maize, Green field beans, Corn gluten meal, Animal fat, Chicken by-product meal, Chicken digest, Blend oils omega 3&6 (Canola oil, Sunflower oil, Linseed oil, Fish oil), Vitamin A, Vitamin B ₃ , Vitamin E, Vitamin K ₃ , Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁₂ , Folic acid, Biotin, Copper sulfate, Copper chelate, Zinc sulfate, Zinc chelate, Mn oxide, Mn chelate, Iron sulfate, Iron chelate, Se, I, Ca, Domestic fermentation powder, Cartilage of shark, Antioxidants (Vitamin E, Rosemary extracts)
Dry type for adult dogs	Raw meat of chicken, Dried meat of chicken, Brown rice, Coarsely ground rice, Chicken fat, Beet pulp, Pea protein, Potato protein, Protein hydrolyzate, Dried lamb, Dried salmon, Sunflower oil, Oats, Linseed, Fish oil, Dried egg, Tomato, Pomegranate, Blueberry, Cranberry, Pumpkin, Spinach, Carrot, Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, Choline, Niacin, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid), Minerals (K, Chloride, Se, Na, Mn, I, Zn, Fe, Cu), Antioxidants (Mixed tocopherol, Rosemary extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Meat (Chicken by-product meal, Beef by-product meal, Powdered white meat, etc.), Beans (Defatted soybean, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose, Oligosaccharide), Animal fat, Beer yeast, Herb, Vegetables (Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Fish (Dried small fish), Propylene glycol, Glycerin, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, Na, P, Zn), Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)

2.4 定量方法

1) 油脂試料の調製

油脂試料の調製操作は遮光した状態で行った。分析試料一定量（200 g 以下で、抽出される油脂が約 10 g 以上となるよう愛玩動物用飼料に表示されている粗脂肪の量から推定した量）を量って 500 mL の共栓三角フラスコに採取した。分析試料の採取量に対して 1.5 倍容量の石油エーテルを加え、軽く振り混ぜた後、更に 2 時間振り混ぜて（280 rpm）抽出した。500 mL の三角フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙（ただし、セミドライ製品はろ紙（5 種 B））を用いて吸引ろ過した。抽出液の入っていた共栓三角フラスコ及び残さを一定量の石油エーテル（最初の抽出に用いた石油エーテルの 1/2 容量の石油エーテル）で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ただし、ろ液の量は最大でもビーカーの目盛りで 300 mL までとした。得られたろ液を 500 mL の分液漏斗に入れ、ろ液に対して 1/2 容量の水を加え、1 分間激しく振り混ぜた後、10 分間以上静置し、水層と石油エーテル層が十分分離した後、水層（下層）を捨てた。エマルジョンが発生した場合は、エマルジョンを含む水層部分を共栓遠心遠沈管に分取し、1600×g で 5 分間遠心分離を行い、分離した石油エーテル層を分液漏斗に残った石油エーテル層に合わせた。更にろ液の 1/2 容量の水を先の分液漏斗に同量の水を加え、同様に 2 回操作した。

分液漏斗中の石油エーテル層を、あらかじめ脱脂綿を詰め、硫酸ナトリウム（無水）40 g 以上の適量を入れた漏斗で 500 mL なす形フラスコにろ過した。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送って石油エーテルを完全に除去し、油脂試料を得た。

2) 酸価の測定

Table 2 に従い推定される酸価に応じた油脂試料の一定量を正確に量って 200 mL 共栓三角フラスコに入れた。なお、油脂試料が固化している場合は、40 °C 以下の水浴で溶かしてから量った。共栓三角フラスコにジエチルエーテル-エタノール（2+1）100 mL を加えて油脂試料を溶かした。必要に応じて、40 °C 以下の水浴中で共栓三角フラスコを加熱し溶かした。これにフェノールフタレイン試液数滴を加え、滴定前の鮮やかな黄色から約 30 秒間持続する淡いオレンジ色を呈するまで 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定した。同時に空試験を実施（空試験においては、滴定前の無色透明から約 30 秒間持続する淡紅色を呈するまで滴定を行った。）し、先の滴定値を補正し、次式により油脂試料の酸価を算出した。

$$\text{酸価} = (V_S - V_B) \times f \times 5.611/W$$

V_S : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量 (mL)

V_B : 空試験における 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量 (mL)

f : 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

Table 2 Amount of fat sample to be weighed corresponding to estimate acid value

Estimate acid value	Fat sample (g)
1 or less	20
1 ~ 4	10
4 ~ 15	2.5
15 ~ 75	0.5
75 or more	0.1

3) 過酸化物価の測定

Table 3 に従い推定される過酸化物価に応じた油脂試料の一定量を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れた。なお、油脂試料が固化している場合は、40 °C 以下の水浴で溶かしてから量った。酢酸-2,2,4-トリメチルペンタン (3+2) 35 mL を加えて油脂試料を完全に溶かした。必要に応じて、40 °C 以下の水浴中で共栓三角フラスコを加温して溶かした。窒素ガスを 1 分間送って、共栓三角フラスコ内の空気を窒素で置換し、更に窒素ガスを送りながらヨウ化カリウム飽和溶液 1 mL を加え、直ちに栓をして 1 分間円を描くように振り混ぜた後、暗所にて 5 分間静置した。これに水 75 mL を加えて、栓をして激しく振り混ぜた後、デンプン試液 1 mL を加え、水層（下層）において滴定前のデンプン試薬による青色が消失するまで 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液により滴定した。なお、滴定は、溶液の乳化を避けるため溶剤層（上層）と水層（下層）ができるだけ混ざらないよう水平方向に穏やかに振り混ぜた。同時に空試験を行い、デンプン試液で発色しないことを確認した。次式により油脂試料の過酸化物価を算出した。

$$\text{過酸化物価 (meq/kg)} = (V_S - V_B) \times f \times 10/W$$

V_S : 滴定に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の量 (mL)

V_B : 空試験における 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の量 (mL)

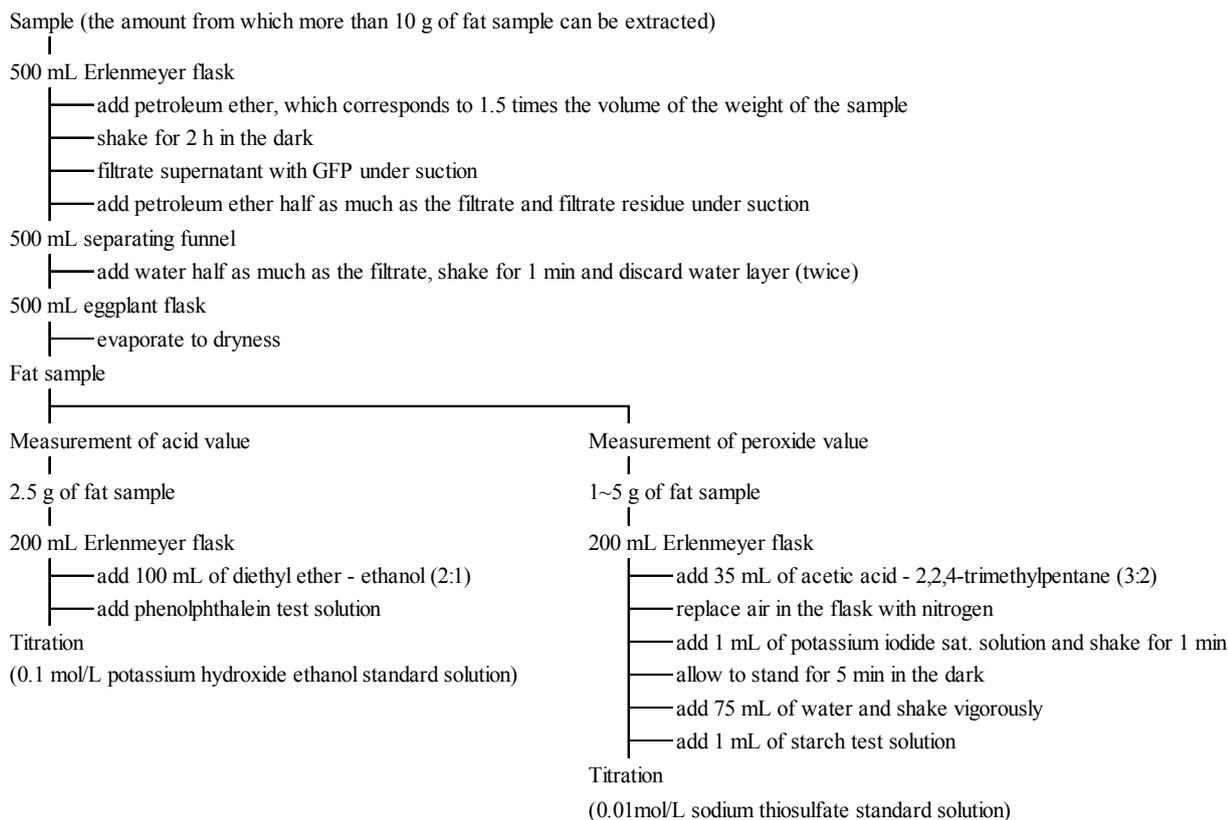
f : 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

Table 3 Amount of fat sample to be weighed corresponding to estimate peroxide value

Estimate peroxide value (meq/kg)	Fat sample (g)
10 or less	5
10 ~ 50	5 ~ 1
50 or more	1 ~ 0.5

参考のため、フローシートを Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Testing procedure of acid value and peroxide value of fat in dry and semi-dry type pet foods

2.5 吸引ろ過方法の検討

2.4 の 1)の吸引ろ過抽出において、CERI 法に示されているろ紙 (5 種 B) の代わりに、ガラス繊維ろ紙を用いて検討した。

2.6 酸価測定用ジエチルエーテルの検討

2.4 の 2)の酸価の測定において、CERI 法に示されている酸化防止剤が封入された油脂酸価・過酸化価測定用のジエチルエーテルの代わりに、ジエチルエーテル (特級) を用いて検討した。なお、測定は 2.4 の 1)及び 2)に従い、ドライ製品 (犬用及び猫用) 及びセミドライ製品を用いてそれぞれ 5 点併行で行った。

3 結果及び考察

3.1 吸引ろ過方法の検討

油脂試料の抽出工程において、ドライ製品を CERI 法に示されているようにろ紙 (5 種 B) を用い、振とう抽出後の残さも含めた抽出液全量を吸引ろ過したところ、ろ紙が目詰まりし、吸引ろ過に非常に時間を要した。そこで、ろ紙 (5 種 B) の代わりに、ガラス繊維ろ紙を用いるとともに、第 1 段階で振とう抽出後の抽出液の上澄みのみを吸引ろ過し、第 2 段階で共栓三角フラスコの残さに最初の半量の石油エーテルを加え、残さを含めて吸引ろ過した場合、ろ紙の目詰まりが改善された。なお、この方法でも目詰まりが解消しない試料があり、その場合には、第 2 段階のろ過の際に、ガラス繊維ろ紙を新しいものに替えることで、目詰まりが改善された。

一方、セミドライ製品においては、供試した試料ではろ紙（5種 B）を使用しても目詰まりは認められなかった。

3.2 酸価測定用ジエチルエーテルの検討

CERI 法では、酸価の測定に使用するジエチルエーテルに酸化防止剤が封入された油脂酸価・過酸化物価測定用の試薬を用いることとなっているが、ジエチルエーテル（特級）で酸価の測定が可能かどうか検討した。ドライ製品（犬用及び猫用）及びセミドライ製品を用いて 5 点併行により、油脂酸価・過酸化物価測定用及び特級における酸価の平均値の差が統計的に有意かどうか確認するため、有意水準 5 % で両側検定の t 検定を行ったところ、 $t(2)=2.65$, $p=0.12$ であり、有意差は認められなかった（Table 4）。また、油脂酸価・過酸化物価測定用及び特級の空試験における 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量は、それぞれ 0.07 mL 及び 0.06~0.10 mL となり、酸価の測定に影響を与えると考えられるような差は認められなかった。このことから、基本的には酸価の測定の際、試薬の用途に合わせたジエチルエーテル（油脂酸価・過酸化物価測定用）を用いることが適切と考えるが、特級試薬による空試験の滴定で 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量が 0.10 mL 以下であることを確認すれば、本検討に用いた試料の酸価の測定に、特級試薬を用いることが可能と考えられた。

Table 4 Comparison of diethyl ether for acid value measurement

Pet food types	Kind of diethyl ether	
	For fat acid value, peroxide value measurement ^{a)}	High grade ^{a)}
Dry type for dogs	6.79	6.63
Dry type for cats	4.72	4.68
Semi-dry type	6.31	6.23

a) Mean value ($n=5$)

3.3 酸価及び過酸化物価の繰返し精度

ドライ製品（犬用及び猫用）各 2 種類、セミドライ製品 2 種類を用い、5 点併行で酸価及び過酸化物価を測定した結果をそれぞれ Table 5 及び Table 6 に示した。ドライ製品（犬用及び猫用）及びセミドライ製品における酸価の繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.6 % 以下、過酸化物価の繰返し精度は、 RSD_r として 10 % 以下であった。

Table 5 Measurement of acid value

Pet food types	No.	Measurement ^{a)}	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for dogs	1	7.43	4.6
	2	5.91	3.9
Dry type for cats	1	7.35	3.4
	2	4.59	1.4
Semi-dry type	1	8.80	3.3
	2	5.57	1.8

a) Mean value ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

Table 6 Measurement of peroxide value

Pet food types	No.	Measurement ^{a)} (meq/kg)	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for dogs	1	12.61	4.0
	2	19.79	6.1
Dry type for cats	1	6.58	5.4
	2	15.53	2.0
Semi-dry type	1	2.14	10
	2	3.26	5.6

a) Mean value ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

3.4 酸価及び過酸化値の中間精度

共同試験を実施前に、滴定における終点の判断等による試験者間の測定値への影響を検証するため、ドライ製品（犬用）1点を用い、試験者と試験日の効果を判定しない枝分かれ試験2名、3日間、各2点併行により酸価及び過酸化値を2.4に従い測定した。厚生労働省通知⁴⁾に従い平均値並びに併行精度及び中間精度の相対標準偏差（RSD_r及びRSD_i）を求めた。その結果はTable 7のとおりであり、酸価の平均測定値は4.80、その併行精度及び中間精度はそれぞれRSD_r及びRSD_iとして4.3%及び4.3%、過酸化値の平均測定値は20.59 meq/kg、その併行精度及び中間精度はそれぞれRSD_r及びRSD_iとして6.1%及び6.7%であった。酸価及び過酸化値において、RSD_r及びRSD_i間に大きな差異は認められなかったことから、試験者間の測定値への影響は併行精度と同程度であると考えられた。

Table 7 Intermediate precision of acid value and peroxide value

No.	Acid value		Peroxide value (meq/kg)	
	1	4.77	4.96	21.56
2	4.91	4.92	22.50	19.82
3	4.48	4.93	18.51	18.65
4	4.95	4.87	21.67	20.57
5	4.49	4.92	19.33	21.26
6	4.83	4.53	22.19	19.60
Mean value ^{a)}	4.80		20.59	
RSD _r ^{b)} (%)	4.3		6.1	
RSD _I ^{c)} (%)	4.3		6.7	

a) $n=12$

b) Relative standard deviations of repeatability within a day

c) Relative standard deviations of intermediate precision within a single laboratory

3.5 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。愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）各約 5 kg を 2.1 に従い、調製した後、約 80 g 及び 140 g に小分けしたものをを用い、非明示の 2 点反復で実施した。なお、共同試験において滴定時に空試験を行い、酸価については測定値を補正し、過酸化価については空試験における溶液の発色が認められないことを確認した。参加試験室は一般財団法人日本食品分析センター名古屋支所、一般財団法人マイコトキシシン検査協会、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、JA 東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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 12 試験室）であった。結果の解析については、酸価は、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順 ^{5), 6)} 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 検定した後、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。その後、酸価の平均値を抽出油脂中のオレイン酸相当の遊離脂肪酸 (%) として換算し ⁷⁾、更に均質性試験時の油脂抽出率から、愛玩動物用飼料中のオレイン酸相当の遊離脂肪酸 (%) を算出し、修正 Horwitz 式 ⁸⁾ を用いて予測室間再現精度 (PRSD_R) を求め、先に算出した RSD_R から HorRat を求めた。過酸化価は、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定した後、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。

酸価の解析結果を Table 8 に示した。ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 1.2 % 及び 2.9 % であり、HorRat は 0.64 であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 2.4 % 及び 6.7 % であり、HorRat は 1.4 であり、良好な結果を得た。

過酸化価の解析結果を Table 9 に示した。ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は

RSD_f及びRSD_Rとして4.1%及び12%であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度はRSD_f及びRSD_Rとして3.0%及び18%であった。過酸化物価については、過酸化物価を物質量に換算する適当な方法がないことから、HorRatは算出しなかった。ただし、参考として、愛玩動物用飼料中の油脂が酸化して生成した過酸化物が全てステアリン酸2個及びオレイン酸1個と仮定した場合、チオ硫酸ナトリウムによる滴定の反応式から過酸化物価を物質量に換算する方法で本法について仮に計算した場合、ドライ製品及びセミドライ製品におけるHorRatはそれぞれ2.0以上となった。過酸化物価は、本共同試験の解析手段として引用できる適当な方法がないことから、今後、過酸化物価を評価する新たな知見が得られた際に、再度共同試験を実施する等により再評価する必要があると考えられた。

Table 8 Collaborative study results of acid value

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type		Semi-Dry type	
	(mg KOH/g-oils)		(mg KOH/g-oils)	
1	7.200	7.162	7.620	7.624
2	6.818	6.762	6.621	6.401
3	6.771	6.582	6.752	6.385
4	6.706	6.680	6.457	6.457
5	6.965	6.975	6.815	6.882
6	6.555	6.556	5.631	6.208
7	6.871	6.734	6.660	6.506
8	7.073	7.236	6.890	6.891
9	7.005	6.935	6.849	6.910
10	7.023	7.049	6.502	6.730
11	6.720	6.961	6.248	6.371
12	6.935	6.804	6.147	6.147
Mean value ^{a)} (mg KOH/g-oils)	6.878		6.613	
Free fatty acids (as oleic) ^{b)} (%)	3.460		3.326	
Crude fat content ^{c)} (%)	12.3		7.6	
RSD _f ^{d)} (%)	1.2		2.4	
RSD _R ^{e)} (%)	2.9		6.7	
PRSD _R ^{f)} (%)	4.5		4.9	
HorRat	0.64		1.4	

a) $n=24$

b) Acid value $\times 0.503$

c) $n=5$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of repeatability between laboratories

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

Table 9 Collaborative study results of peroxide value (meq/kg)

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type (meq/kg)		Semi-Dry type (meq/kg)	
1	29.31	31.45	2.911	2.890
2	30.00	30.15	3.015	3.015
3	32.64	30.67	4.066	3.880
4	42.93	42.93	12.24 ^{a)}	13.77 ^{a)}
5	31.29	31.89	3.405	3.731
6	32.47	32.99	3.843 ^{b)}	3.048 ^{b)}
7	37.77	38.24	5.205	5.205
8	33.23	33.52	3.677	3.742
9	32.55	33.97	4.494	4.521
10	32.81	32.06	3.902	3.813
11	31.27	35.34	4.080	4.236
12	35.92	40.18	4.322	4.010
Mean value ^{c)} (meq/kg)	33.98		3.906	
RSD _r ^{d)} (%)	4.1		3.0	
RSD _R ^{e)} (%)	12		18	

a) Data excluded by Cochran test of the first round

b) Data excluded by Cochran test of the second round

c) Dry type: $n=24$; Semi-Dry type: $n=20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of repeatability between laboratories

4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中の油脂の酸価及び過酸化値の測定法について CERI 法を基に検討し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ、油脂試料の調製時における吸引ろ過でガラス繊維ろ紙を使用し、かつ初めに振とう抽出後の抽出液の上澄みのみを吸引ろ過した後、共栓三角フラスコの残さに最初の半量の石油エーテルを加え、残さを含めて吸引ろ過することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) ドライ製品（犬用及び猫用）各 2 種類、セミドライ製品 2 種類を用い、酸価及び過酸化値の定量値を確認した結果、酸価の繰返し精度は、相対標準偏差（ RSD_r ）として 4.6 %、過酸化値の繰返し精度は、相対標準偏差（ RSD_r ）として 10 %であった。
- 2) ドライ製品（犬用）を用いて中間精度を確認した結果、酸価は相対標準偏差（ RSD_r ）として 4.3 %、過酸化値は相対標準偏差（ RSD_r ）として 6.7 %であった。
- 3) 酸価について、ドライ製品及びセミドライ製品を用いて本法に従い 12 試験室において共同試験を実施したところ、良好な結果を得た。
- 4) 過酸化値について、本法に従い 12 試験室において共同試験を実施したところ、ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 4.1 %及び 12 %であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.0 %及び 18 %であった。現時点で、過酸化値の解析結果を評価する適当な方法がないことか

ら、今後新たな知見が得られた際、再評価する必要があると考えられた。

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名古屋支所，一般財団法人マイコトキシン検査協会，一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所，JA 東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部，協同飼料株式会社研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産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) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，省令第 1 号 (2009).
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 3) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 23 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 (2013).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて，平成 19 年 11 月 15 日，食安発第 1115001 号 (2007).
- 5) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 6) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA
- 7) 日本工業規格 JIS K 0070-1992：化学製品の酸価，けん化価，エステル価，よう素価，水酸基価及び不けん化物の試験方法 (1992).
- 8) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

技術レポート

1 飼料中のジカンバのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認

屋方 光則*

Validation of the Determination Method of Dicamba in Feeds by GC-MS

Mitsunori YAKATA*

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

1 緒 言

ジカンバは、アメリカのベルシコール社が開発したホルモン型の選択性系除草剤であり、イネ科植物には効果はないが広葉植物には一年生、多年生を問わず効果がある¹⁾。

ジカンバは平成 18 年 5 月にポジティブリスト制度導入に伴い暫定的な残留基準値が飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾に定められたが、平成 25 年 10 月に食品安全委員会によるジカンバについての食品健康影響評価が行われたこと及び関連企業からインポートトレランスの設定が申請されたことから、残留基準値の一部を Table 1 のとおり改正する省令が平成 27 年 7 月に公布された。

飼料中のジカンバは、飼料分析基準³⁾に既記載の筆者らが検討したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による分析法⁴⁾により定量が可能である。しかし、基準値が大幅に改正される大麦及び小麦については、改正基準値近辺での妥当性を確認していないことから、今回、設定された改正基準値及びその 1/10 の 2 濃度にて添加回収試験を実施し、分析法の妥当性を確認したので、その概要を報告する。

なお、大豆については、ジカンバ代謝物の DCSA との合量値での基準であることから、別法の検討が行なわれている。

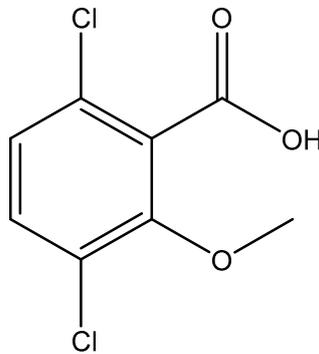
参考までにジカンバの構造式等を Fig. 1 に示した。

* 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

Table 1 Maximum residual limit of dicamba in feeds

Feed types	Maximum residual limits (mg/kg)	
	Before revision	After revision
Barley	0.5	7
Corn	0.5	0.5
Milo	3	4
Oats	3	3
Rye	0.1	0.1
Soybean	-	10*
Soybean meal	-	10*
Wheat	0.5	2
Grass	200	200

* As total of dicamba and DCSA



3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid

C₈H₆Cl₂O₃ MW: 221.0 CAS No.: 1918-00-9

Fig. 1 Chemical structure of dicamba

2 実験方法

2.1 試料

とうもろこし，大麦及び小麦は，それぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン，シクロヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル，ヘキサン及び硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬試験用を用いた。その他，特記している以外の試薬は特級を用いた。

2) ジカンバ標準原液

ジカンバ標準品（Sigma-Aldrich Laborchemikalien 製，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えた（この液 1 mL は，ジカンバとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する。）。

使用に際して，この液の一定量をアセトンで正確に希釈して，1 mL 中にジカンバとして 5.0 µg を含有するジカンバ標準原液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカー SR-2W タイテック製（300 rpm で使用）
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）：Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 4) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.45 μm ，直径 25 mm，PTFE）東洋濾紙製
- 5) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：GPC システム 日本分光製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（充てん剤量 910 mg）Waters 製 にリザーバーを連結したもの
- 7) GC-MS :
 GC 部：GC-2010 島津製作所製
 MS 部：GCMS-QP2010Plus 島津製作所製

2.4 定量方法

飼料分析基準のジカンバ分析法（第 6 章第 1 節 73）に従って定量した。ただし，GC-MS に注入するためのトリフルオロエチルエステル化した標準液は，1 mL 中に 0.002，0.005，0.01，0.025，0.05，0.075，0.1，0.2，0.3，0.4 及び 0.5 μg を含有するものを調製した。

また，基準値相当量を添加した大麦は，得られた抽出液をアセトンで正確に 10 倍希釈してから以降の操作に供した。

GPC 及び GC-MS 測定条件を Table 2 及び 3 に，定量法の概要を Scheme 1 にそれぞれ示した。

Table 2 Operating conditions of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-ethyl acetate (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	75~125 mL

Table 3 Operating conditions of GC-MS

Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness), Restek
Column temperature	80 °C (hold for 2 min) → 5 °C/min → 180 °C → 15 °C/min → 280 °C (hold for 5 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	200 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	m/z 302

- Sample (grass hay 10 g, others 20 g)
- add 30 mL of water and 1 mL of 20 w/v% hydrochloric acid, allow to stand for 30 min
 - add 70 mL acetone and shake for 30 min
 - filtrate under suction filter (No. 5B)
 - wash with 50 mL of acetone and fill up to 200 mL
- 20 mL (grass hay 40 mL) of sample solution
- evaporate to the volume of 5 mL
- Hydrolysis
- add 5 mL of 4 w/v% sodium hydroxide solution
 - allow to stand for 30 min
- Chem Elut cartridge
- add 2 mL of 20 w/v% hydrochloric acid
 - apply sample solution and allow to stand for 5 min
 - wash with 100 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness
 - dissolve with 10 mL of cyclohexane-ethyl acetate (4:1)
 - filtrate with membrane filter (< 0.5 μm)
- GPC (cyclohexane-ethyl acetate (4:1))
- apply 5 mL of sample solution
 - collect 75~125 mL fraction
 - evaporate to dryness
- Esterification
- add 1 mL of 2,2,2-trifluoroethanol and 0.2 mL of sulfuric acid
 - esterify at 90 °C for 30 min
- Liquid-liquid extraction
- add 10 mL of 5 w/v% sodium chloride solution and 5 mL of hexane
 - shake for 5 min and collect hexane layer (twice)
 - dehydrate hexane layer with Na_2SO_4
- Sep-Pak Plus Frolisil Cartridge (prewashed with 5 mL of hexane)
- apply sample solution
 - elute with 10 mL of hexane-diethyl ether (24:1)
 - evaporate to volume of 1 mL
 - fill up to 5 mL with hexane
- GC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for dicamba in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

本法の定量下限は、試料中で 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 相当量）としている。著者らが本法検討時に確認した検量線の直線範囲の下限濃度は 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 相当量であり、本法の定量下限濃度における最終試料溶液中濃度 0.002 $\mu\text{g/mL}$ は、この検量線の直線範囲から外れている。そこで、検量線の下限濃度を 0.002 $\mu\text{g/mL}$ まで下げて検量線を作成し、その直線性を確認した。

2.2 の 2)に従って調製した 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジカンバトリフルオロエチルエステル化物標準液各 2 μL を GC-MS に注入し、得られた選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムからのピーク高さ及び面積から検量線を作成した。

その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 0.002 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.004 ~ 1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

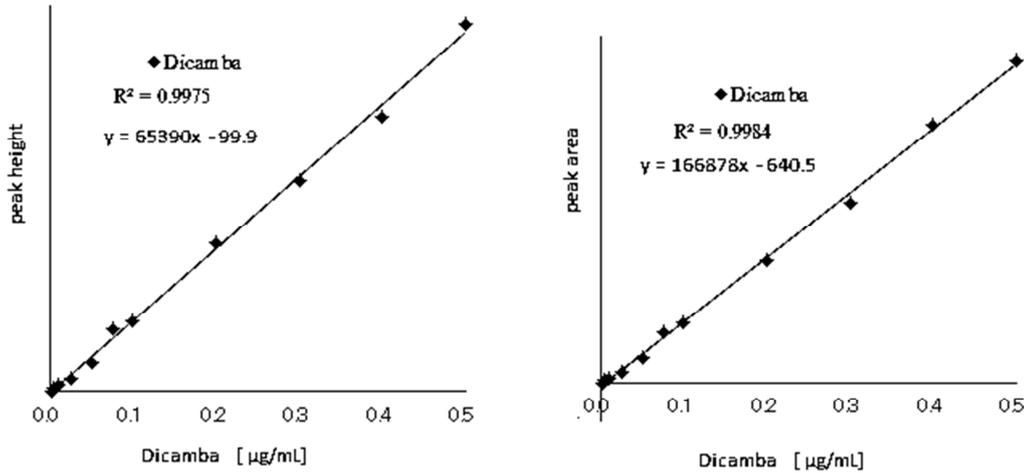


Fig. 2 Calibration curves of dicamba by peak height and area

3.2 妨害物質の検討

添加回収試験に用いた大麦及び小麦について、本法に従って SIM クロマトグラムを作成しジカンバの定量を妨害するピークの有無を検討した。

その結果、ジカンバの定量を妨害するピークは認められなかった。

3.3 添加回収試験

大麦についてはジカンバを 7 及び 0.7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で共に 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量)、小麦については 2 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.4 及び 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量) を添加した試料を用い、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 4 のとおり、大麦では平均回収率が 87.3 及び 94.5 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 11 %以下、小麦では平均回収率が 93.5 及び 92.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下であった。

なお、添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 4 Recoveries of dicamba

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Barley		Wheat	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
7	87.3	4.9	-	-
2	-	-	93.5	9.3
0.7	94.5	11	-	-
0.2	-	-	92.2	11

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

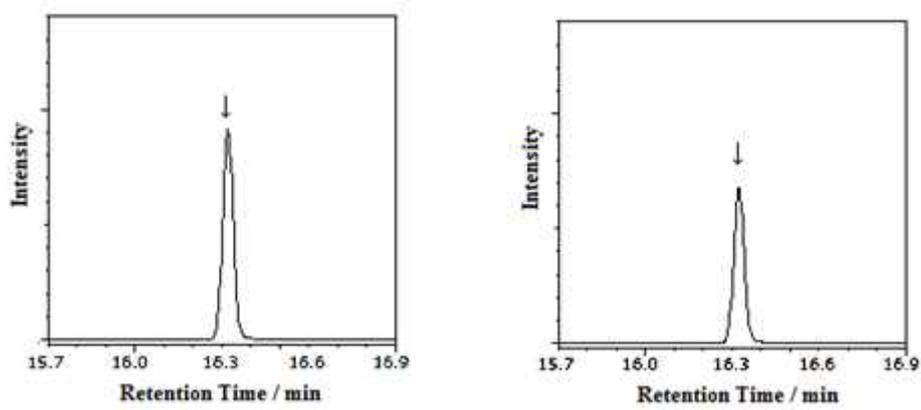


Fig. 3 SIM chromatograms of dicamba

(Arrows indicate the peaks of dicamba derivative.)

(left) Standard solution (The concentration is 0.5 µg/mL as dicamba.)

(right) Sample solution of wheat (spiked at 2 mg/kg of dicamba)

3.4 定量下限及び検出下限

3.1 での検討により、検量線の直線範囲の下限濃度を 0.002 µg/mL まで下げたことから、改めて本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこしにジカンバを添加した試料を用い、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、SN 比が 10 となる濃度は 0.01 mg/kg、SN 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であったことから、本法の定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお、当該定量下限濃度 (0.01 mg/kg 相当量) における添加回収試験の結果は、平均回収率 93.8 %、その繰返し精度は RSD_r として 10 % であり、良好であった。

4 まとめ

飼料中のジカンバの残留基準値等が変更されたことから、飼料分析基準に収載済みのジカンバの定量法について、改めて妥当性を確認したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線は 0.002 ~ 0.5 µg/mL (注入量として 0.004 ~ 1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、大麦で 0.14 µg/mL

相当濃度，小麦で 0.4 及び 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当濃度とした。

- 2) 本法に従って得られた SIM クロマトグラムでは，添加回収試験に用いた大麦及び小麦について，ジカンバの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 大麦に 7 及び 0.7 mg/kg 相当量，小麦に 2 及び 0.2 mg/kg 相当量，とうもろこしに 0.01 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，大麦では平均回収率 87.3 及び 94.5 %，その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下，小麦では平均回収率 93.5 及び 92.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下，とうもろこしでは平均回収率 93.8 %，その繰返し精度は RSD_r として 10 %であった。

- 4) 新たに直線性を確認した検量線の範囲による本法の定量下限は 0.01 mg/kg ，検出下限は 0.003 mg/kg であった。

文 献

- 1) 食品安全委員会：ジカンバ農薬評価書，平成 24 年 6 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，省令第 35 号 (1976).
- 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) 屋方 光則，永原 貴子：飼料研究報告，31，65 (2006).

技術レポート

2 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認

～ カドミウム，水銀，鉛，ヒ素，エトキシキン，ジブチルヒドロキシトルエン，ブチルヒドロキシアニソール及び亜硝酸ナトリウムについて ～

杉村 靖^{*1}，森口 里美^{*1}，浪越 充司^{*2}，
山西 正将^{*3}，若宮 洋市^{*4}，永原 貴子^{*5}

Application to Snack Type Pet Food of Analytical Methods of Cadmium, Mercury, Lead, Arsenic, Ethoxyquin, Dibutylhydroxytoluene, Butylhydroxyanisol and Sodium Nitrite

Yasushi SUGIMURA^{*1}, Satomi MORIGUCHI^{*1}, Atsushi NAMIKOSHI^{*2}, Masayuki YAMANISHI^{*3},
Youichi WAKAMIYA^{*4} and Takako NAGAHARA^{*5}

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

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

^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Sendai Regional Center)

^{*4} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

^{*5} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Planning and Coordination Department))

1 緒 言

「愛玩動物用飼料等の検査法」（以下「検査法」という。）¹⁾は、これまで総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を適用範囲対象としてきた。しかし、平成 25 年 10 月、米国 FDA において、中国産ジャーキーに起因すると推測される原因不明の犬猫への健康被害が発生しているとの公表²⁾があり、これを受け、我が国においてもジャーキー等のスナック製品（以下「スナック製品」という。）に混入する可能性のある有害物質等のリスク管理体制を確立するために、農林水産省からスナック製品を検査法の適用範囲対象とするための検討を要請された。

平成 25 年度は、検査法に既収載のメラミンの分析法について、スナック製品への適用範囲拡大の可否を検討し、平成 26 年 6 月 11 日付けで検査法の一部改正したところである。

平成 26 年度は、検査法に既収載の重金属等（カドミウム，水銀，鉛及びヒ素）及び添加物（エトキシキン，ジブチルヒドロキシトルエン（以下「BHT」という。）），ブチルヒドロキシアニソール

^{*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神戸センター，現 福岡センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 仙台センター

^{*4} 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

^{*5} 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 企画調整部

ル（以下「BHA」という。）及び亜硝酸ナトリウム）の分析法について、同様に検討した。また、総合栄養食（ウェット製品）への適用性を確認していない BHT 及び BHA の分析法についても併せて検討したので、これらの概要を報告する。

なお、農薬（メタミドホス、有機リン系農薬（25種）及び含リンアミノ酸系農薬（3種））の分析法については、平成 26 年度の農林水産省が実施した事業³⁾において一般財団法人日本冷凍食品検査協会が、同様に検討を行い、事業報告書で報告している。

今回検討した成分のうち、成分規格⁴⁾において基準値が定められているものを参考までに表 1 に示した。

表 1 成分規格が定められている成分

重金属等		添加物	
成分名	基準値 ($\mu\text{g/g}$)	成分名	基準値 (g/t)
カドミウム	1	エトキシキン(犬用のみ)	75
鉛	3	エトキシキン, BHT 及び BHA の総和	150
砒素	15	亜硝酸ナトリウム	100

2 実験方法

2.1 試料

市販のスナック製品及び総合栄養食（ウェット製品）を試料に用い、検査法に準じて分析用試料を調製した。すなわち、スナック製品は、粉砕機を用いて、1 mm の網ふるいを通すまで粉砕（粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く。）し、混合した。また、総合栄養食（ウェット製品）は、フードプロセッサを用い、ペースト状にした。

検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名を表 2-1~2-4 に示した。なお、原材料名は、各試料に用いた製品の表記名称に準拠した。

表 2-1 検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名
(カドミウム、鉛及びヒ素の分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20～35%程度)	猫用成型ジャーキー	肉類(鶏肉, 牛肉), 大豆たん白, 小麦粉, 魚肉, 牛脂, またたび, グリセリン, 増粘安定剤(加工澱粉), ソルビトール, ミネラル類(カルシウム, リン, ナトリウム), 保存料(ソルビン酸, デヒドロ酢酸ナトリウム), 調味料, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 消臭剤(ポリアクリル酸ナトリウム), 食用色素(カラメル, 赤106), ビタミンE
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10～15%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	肉類(鶏ササミ等), でん粉類, 豆類, 糖類, ミネラル類(塩化ナトリウム), 増粘安定剤(ソルビトール, グァーガム), 保存料(ソルビン酸カリウム, デヒドロ酢酸ナトリウム), pH調整剤
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)	鶏ササミ, 食塩, グリセリン, プロピレングリコール, 保存料(ソルビン酸カリウム), リン酸塩(Na), 酸化防止剤(亜硫酸ナトリウム), 発色剤(亜硝酸ナトリウム)
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 砂糖, ショートニング, タピオカ澱粉, ミルクパウダー, 膨張剤, ミネラル類(カルシウム, ナトリウム), 香料
粉ミルク	犬用粉ミルク	乳たん白質, デキストリン, 動物性脂肪, 脱脂粉乳, 植物油脂, 食物繊維, ブドウ糖, 動物用ビフィズス菌, 乾燥酵母, コンドロイチン硫酸, グルコサミン, メチオニン, L-アルギニン, L-シスチン, L-カルニチン, ミルクオリゴ糖, pH調整剤, 乳化剤, ビタミン類(A, D, E, B1, B2, B6, B12, C, パントテン酸, ナイアシン, 葉酸, ビオチン, コリン, カロテン), ミネラル類(Ca, P, K, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), イノシトール, ヌクレオチド, 香料(バター, ミルククリーム)

表 2-2 検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名
(水銀の分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20～35%程度)	犬用成型ジャーキー	肉類(鶏肉, 鶏ササミ), 小麦粉, 植物性たん白, パン粉, 糖類, 植物性油脂, 脱脂大豆, ビール酵母, にんじん, ほうれん草, ソルビトール, ミネラル類(カルシウム, ナトリウム, 亜鉛, ヨウ素), プロピレングリコール, ビタミン類(A, B1, B2, B6, B12, D3, E, ナイアシン, パトテン酸), 食用色素(赤106, 黄4, 青1, 二酸化チタン), 保存料(ソルビン酸, デヒドロ酢酸ナトリウム), 膨張剤, ポリリン酸ナトリウム, pH調整剤, くん液, 発色剤(亜硝酸ナトリウム)
	猫用成型ジャーキー	マグロ, 鶏肉, 脱脂大豆, 牛肉, でん粉類, 小麦たん白, 豚脂, 酵母, 食塩, オリゴ糖, ソルビトール, 膨張剤, 調味料, ミネラル類(Ca, P), リン酸塩(Na, K), 乳酸Na, 酸化防止剤(ビタミンC), 保存料(ソルビン酸), ビタミン類(E, A), 乳酸Ca, 発色剤(亜硝酸Na)
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10～15%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	肉類(鶏ササミ等), でん粉類, 豆類, 糖類, ミネラル類(塩化ナトリウム), 増粘安定剤(ソルビトール, グァーガム), 保存料(ソルビン酸カリウム, デヒドロ酢酸ナトリウム), pH調整剤
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)	鶏ササミ, 食塩, グリセリン, 保存料(ソルビン酸K), 酸化防止剤(エリソルビン酸Na)
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 砂糖, 植物油脂, タピオカでん粉, ミルクパウダー, チコリ抽出物(植物繊維, オリゴ糖含有), ミネラル類(カルシウム, ナトリウム), 膨張剤, 香料, 乳化剤, ヌッカエキス
粉ミルク	犬用粉ミルク	ミルクプロテイン, 動物性脂肪, 乳清タンパク, 大豆油, コブラ油, 魚油(DHA源), フルクトオリゴ糖, 大豆レシチン, 香料, アミノ酸類(L-アルギニン, DL-メチオニン, タウリン), ミネラル類(Ca, P, Zn, Fe, Mn, Cu, I, Se), ビタミン類(A, コリン, D3, E, ナイアシン, C, パトテン酸カルシウム, B2, B1, B6, ビオチン, 葉酸, B12, K1), 酸化防止剤(BHA, 没食子酸プロピル)

表 2-3 検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名
(エトキシキン, BHT 及び BHA の分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20~35%程度)	犬用成型ジャーキー	肉類(牛肉), 生ゼラチン, 大豆たん白, パン粉, 小麦粉, 糖類, 植物性油脂, グリセリン, ソルビトール, プロピレングリコール, ミネラル類(ナトリウム), 保存料(ソルビン酸, テヒドロ酢酸ナトリウム), くん液, ポリリン酸ナトリウム, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 酸化防止剤(ビタミンE), 食用色素(赤106)
	猫用成型ジャーキー	肉類(鶏肉, 牛肉), 大豆たん白, 小麦粉, 魚肉, 牛脂, またたび, グリセリン, 増粘安定剤(加工澱粉), ソルビトール, ミネラル類(カルシウム, リン, ナトリウム), 保存料(ソルビン酸, テヒドロ酢酸ナトリウム), 調味料, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 消臭剤(ポリアクリル酸ナトリウム), 食用色素(カラメル, 赤106), ビタミンE
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10~15%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	鶏ササミ, ミネラル類(ナトリウム, カルシウム), 澱粉類, 卵白
	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)1	鶏肉, 保湿剤(プロピレングレコール), 乳化剤(グリセリン), pH調整剤(トリポリリン酸Na, 保存料(ソルビン酸K, テドロ酢酸Na)
	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)2	子牛アバラ肉, 大豆たん白, グリセリン, プロピレングリコール, ソルビトール, 食塩, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 酸化防止剤, リン酸塩(Na), 保存料(ソルビン酸ナトリウム), ビタミンE
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)3	牛レバー, 水飴, 玄米麴粉末, ソルビトール, グリセリン, 酸化防止剤(エリソルビン酸Na), 増粘安定剤(キサンタンガム), 発色剤(亜硝酸Na), 保存料(ソルビン酸K), pH調整剤, 香料
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 砂糖, でん粉, 食用油脂, 野菜(キャベツ, さつまいも, にんじん, カボチャ, トマト), ミルクパウダー, チョリ抽出物(植物繊維, オリゴ糖含有), 膨張剤, ミネラル類(ナトリウム, カルシウム), 香料, ユッカエキス, 食用色素(黄4, 黄5, 青1)
粉ミルク	猫用粉ミルク	乳たん白質, 動物性油脂, 植物性油脂, 脱脂粉乳, 卵黄粉末, ミルクオリゴ糖, 乾燥酵母, pH調整剤, 乳化剤, タウリン, L-アルギニン, L-シスチン, DHA, ビタミン類(A, D, E, K, B1, B2, パントテン酸, ナイアシン, B6, 葉酸, カロテン, ビオチン, B12, C, コリン), ミネラル類(Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), ヌクレオチド, 香料(ミルククリーム)
総合栄養食(ウェット製品. 水分75%程度)	犬用ウェット製品1	肉類(チキン, ビーフ等), 野菜類(にんじん, ほうれんそう), 植物性タンパク, コーンスターチ, 小麦, 食物繊維, キシロース, ビタミン類(B1, E), ミネラル類(Ca, Cl, K, Mn, Se, Zn), アミノ酸(グリシン), 増粘多糖類, 増粘安定剤(アルギン酸Na), 着色料(カラメル, 酸化鉄, 二酸化チタン), pH調整剤, EDTA-Ca, Na, 発色剤(亜硝酸Na)
	犬用ウェット製品2	チキン, オオムギ, トウモロコシ, ホエー, ポーク, ビートパルプ, コーングルテン, チキンエキス, 植物性油脂, フィッシュ, ミネラル類(カルシウム, カリウム, 銅, 鉄, マンガン, セレン, 亜鉛, ヨウ素), ビタミン類(B1, B2, B6, B12, D3, E, ナイアシン, パントテン酸, 葉酸, ビオチン, コリン), アミノ酸類(タウリン), 着色料(酸化鉄)
	猫用ウェット製品1	魚介類(カツオ, かつお節等), オリゴ糖, ミネラル類, ビタミン類
	猫用ウェット製品2	魚介類(かつお, まぐろ, フィッシュエキス等), 油脂類(鶏脂, 大豆油), 穀類(小麦グルテン), 肉類(チキン), 豆類(大豆タンパク), 卵類(卵パウダー), 調味料, 増粘多糖類, ミネラル類(Ca, Cl, Cu, Fe, I, K, Mn, Na, Se, Zn), リン酸塩(Na), ビタミン類(A, B1, B2, B6, B12, D, E, K, コリン, ナイアシン, パンテト酸, ビオチン, 葉酸), アミノ酸類(タウリン), 着色料(二酸化チタン)

表 2-4 検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名
(亜硝酸ナトリウムの分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20～35%程度)	犬用成型ジャーキー	すり身(たら), 米粉, ソルビトール, 保存料(ソルビン酸K), 増粘安定剤(カドラン), グリセリン, リン酸塩(Na)
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10～15%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	肉類(鶏ササミ等), でん粉類, 豆類, 糖類, ミネラル類(塩化ナトリウム), 増粘安定剤(ソルビトール, ギャーガム), 保存料(ソルビン酸カリウム, デヒドロ酢酸ナトリウム), pH調整剤
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)1	鶏ササミ, 食塩, グリセリン, 保存料(ソルビン酸K), 酸化防止剤(エリソルビン酸Na)
	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)2	鶏ささみ, でん粉, 植物たんぱく, グリセリン, ソルビトール, プロピレングリコール, 塩化Na, 乳化剤
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 砂糖, 植物油脂, タビオカでん粉, ミルクパウダー, チョコ抽出物(植物繊維, オリゴ糖含有), ミネラル類(カルシウム, ナトリウム), 膨張剤, 香料, 乳化剤, ユッカエキス
粉ミルク	犬用粉ミルク	ミルクプロテイン, 動物性脂肪, 乳清タンパク, 大豆油, コブラ油, 魚油(DHA源), フルクトオリゴ糖, 大豆レシチン, 香料, アミノ酸類(L-アルギニン, DL-メチオニン, タウリン), ミネラル類(Ca, P, Zn, Fe, Mn, Cu, I, Se), ビタミン類(A, コリン, D ₃ , E, ナイアシン, C, パトテン酸カルシウム, B ₂ , B ₁ , B ₆ , ビオチン, 葉酸, B ₁₂ , K ₁), 酸化防止剤(BHA, 没食子酸プロピル)

2.2 試薬

以下に示した L(+)-アスコルビン酸液のほかは、検査法に既収載の各分析法に規定されている試薬を用いた。

なお、検査法に既収載の各分析法の該当する章・節を表3に示した。

L(+)-アスコルビン酸液

L(+)-アスコルビン酸(試薬特級) 1.0 g を正確に量って 10 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 L(+)-アスコルビン酸原液を調製した(この液 1 mL は、L(+)-アスコルビン酸として 0.1 g を含有する。)

使用に際して、この原液の一定量を、水で正確に希釈し、1 mL 中に L(+)-アスコルビン酸として 0.02 及び 0.004 g を含有する各 L(+)-アスコルビン酸液を調製した。

表 3 愛玩動物用スナック製品等の検討対象とした各成分の検査法収載法

成分	検討対象とした検査法収載法
カドミウム	検査法第4章1の方法 (以下「カドミウム収載法」という。)
水銀	検査法第4章2の方法 (以下「水銀収載法」という。)
鉛	検査法第4章3の方法 (以下「鉛収載法」という。)
ヒ素	検査法第4章4の方法 (以下「ヒ素収載法」という。)
エトキシキン	検査法第7章1の方法 (以下「エトキシキン収載法」という。)
BHT	検査法第7章2の方法 (以下「BHT収載法」という。)
BHA	検査法第7章3の方法 (以下「BHA収載法」という。)
亜硝酸ナトリウム	検査法第7章4の方法 (以下「亜硝酸ナトリウム収載法」という。)

2.3 装置及び器具

各分析法の検討に用いた装置及び器具を表4に示した。

表 4 検討に用いた装置及び器具

成分	装置及び機器
カドミウム, 鉛 及びヒ素	1) 粉碎機: ZM-100, Retsch製(1 mmスクリーン, 回転数 14000 rpm) 2) 乾燥器: DRM420DB, ADVANTEC製 3) 電気炉: FP301, Yamato製 又は KBF828N, Koyo製 4) ホットプレート: HTP552AA, ADVANTEC製 又は AHS-500, アサヒ理化製作所製 5) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2W(使用時振動数300 rpm), タイテック製 6) 偏光ゼーマン方式原子吸光度計: Z-2310, 日立製作所製 7) 水素化物発生付属装置: HFS-3, 日立製作所製
水銀	1) 粉碎機: ZM-200, Retsch製(1 mmスクリーン, 回転数 10000 rpm) 2) ホットプレート: EC-1200N, アズワン製 3) 水銀分析装置: マーキュリーRA-3, 日本インスツルメンツ製
エトキシキン, BHT 及びBHA	1) 乾燥器: WFO-600ND, 東京理化工機製 2) 粉碎機(ウェット製品以外): ZM-100, Retsch製(1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm) 3) フードプロセッサ: MK-M80, National製 4) マグネチックスターラー: TMS-6, アズワン製 5) 液体クロマトグラフ: 1100 Series (FL(エトキシキン), UV(BHT及びBHA)), Agilent Technologies製
亜硝酸ナトリウム	1) 粉碎機: ZM-200, Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数 10000 rpm) 2) ウォーターバス: ラボヴェュー, アズワン製 3) 分光光度計: UV-1800, 島津製作所製

2.4 定量方法

定量方法は、検査法に既記載の各分析法(表3)に規定されているものに準拠した。

3 結果及び考察

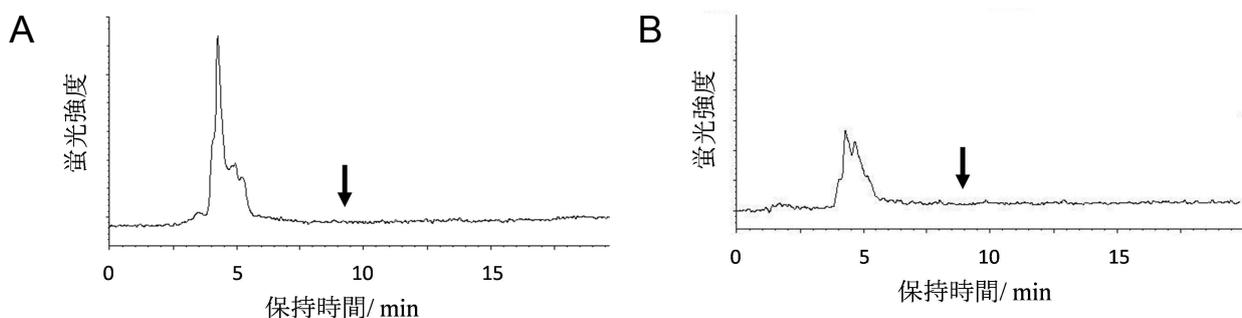
3.1 妨害物質の検討

各成分に係る妨害物質の検討結果を以下の1)~3)に示した。重金属等(カドミウム, 水銀, 鉛及びヒ素)及び亜硝酸ナトリウムは、ブランク値を差し引いた上で定量値を算出するために、検討不要とした。

1) エトキシキン

表2-3に示した試料各1点を用い、エトキシキン収載法により調製した試料溶液を蛍光検出器付き液体クロマトグラフに注入し、得られた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。

なお、得られたクロマトグラムの一例を図1に示した。



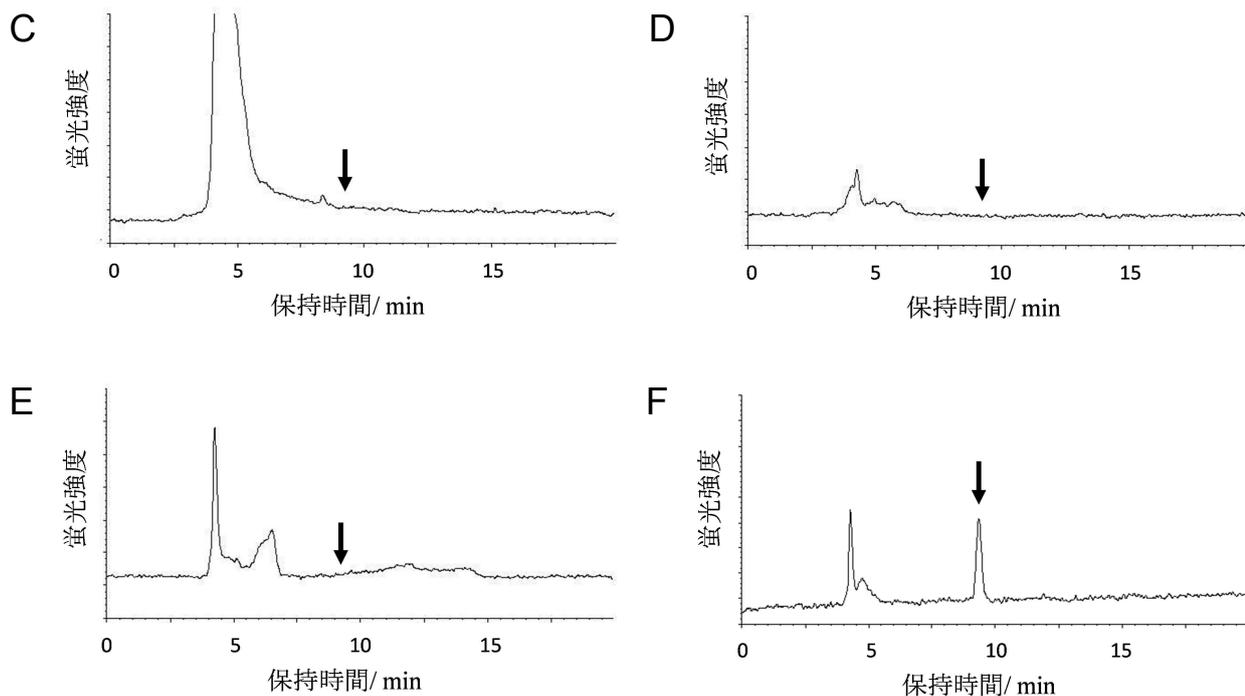


図 1 エトキシキン収載法の妨害物質の検討時に得られたクロマトグラムの場合

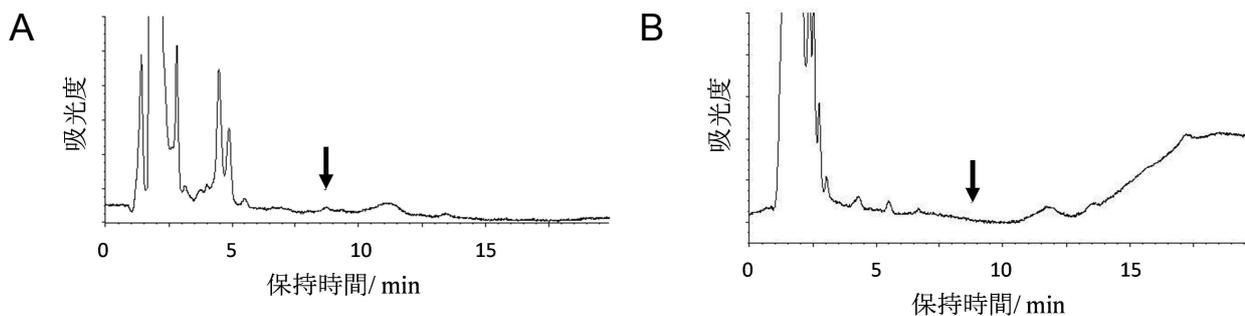
(↓: エトキシキンの保持時間を示す. スケールは全図共通.)

- A: 成型ジャーキー (猫用)
- B: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- C: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- D: ビスケット (犬用)
- E: 粉ミルク (猫用)
- F: 標準液 (10 ng/mL)

2) BHT

表 2-3 に示した試料各 1 点を用い, BHT 収載法により調製した試料溶液を紫外吸光度検出器付き液体クロマトグラフに注入し, 得られた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.

なお, 得られたクロマトグラムの一例を図 2 に示した.



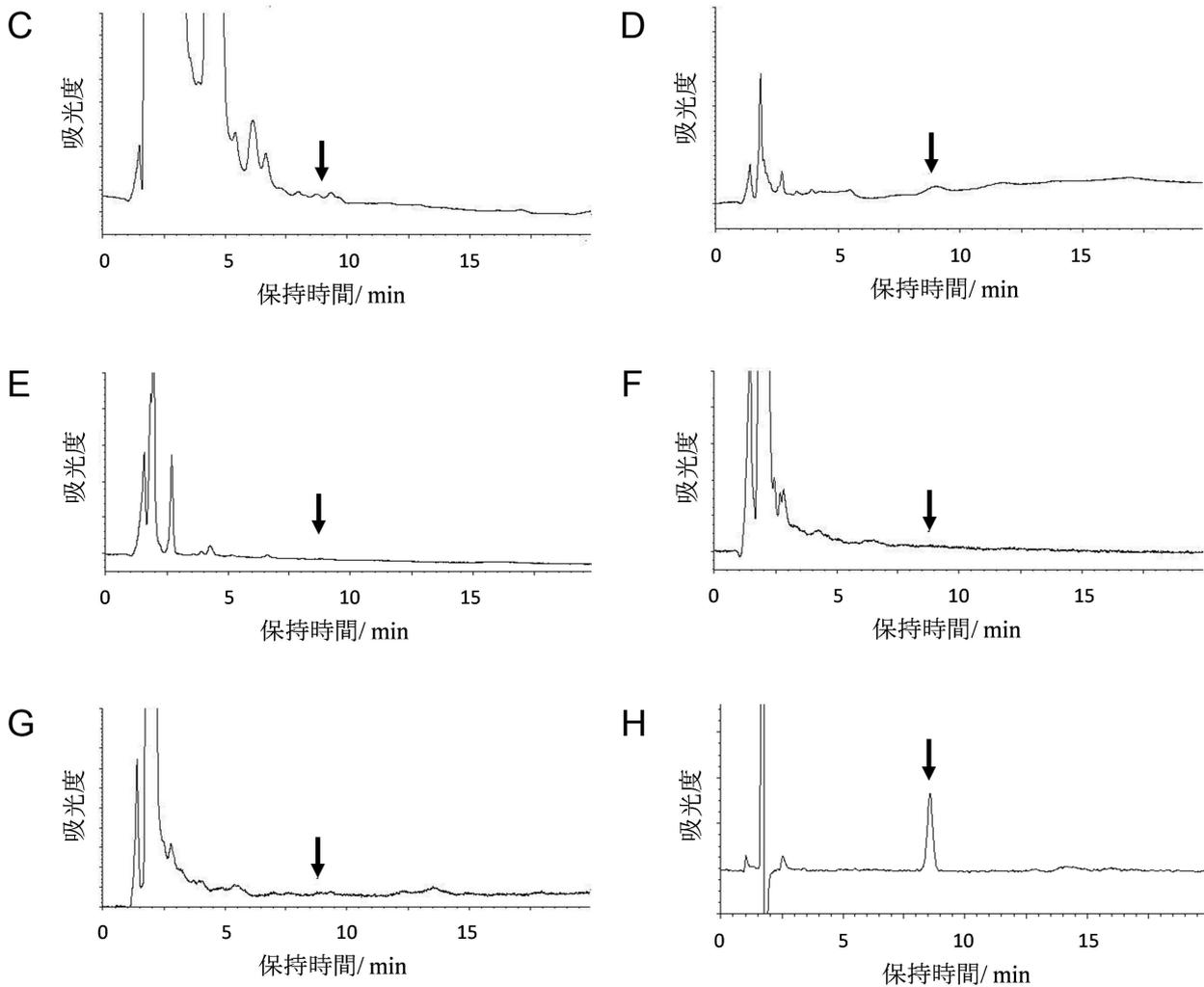


図2 BHT 収載法の妨害物質の検討時に得られたクロマトグラムの例

(↓: BHT の保持時間を示す. スケールは全図共通.)

- A: 成型ジャーキー (猫用)
- B: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- C: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- D: ビスケット (犬用)
- E: 粉ミルク (猫用)
- F: 総合栄養食 (ウェット製品) (犬用)
- G: 総合栄養食 (ウェット製品) (猫用)
- H: 標準液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3) BHA

表 2-3 に示した試料各 1 点を用い, BHA 収載法により調製した試料溶液を紫外吸光度検出器付き液体クロマトグラフに注入し, 得られた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.

なお, 得られたクロマトグラムの一例を図 3 に示した.

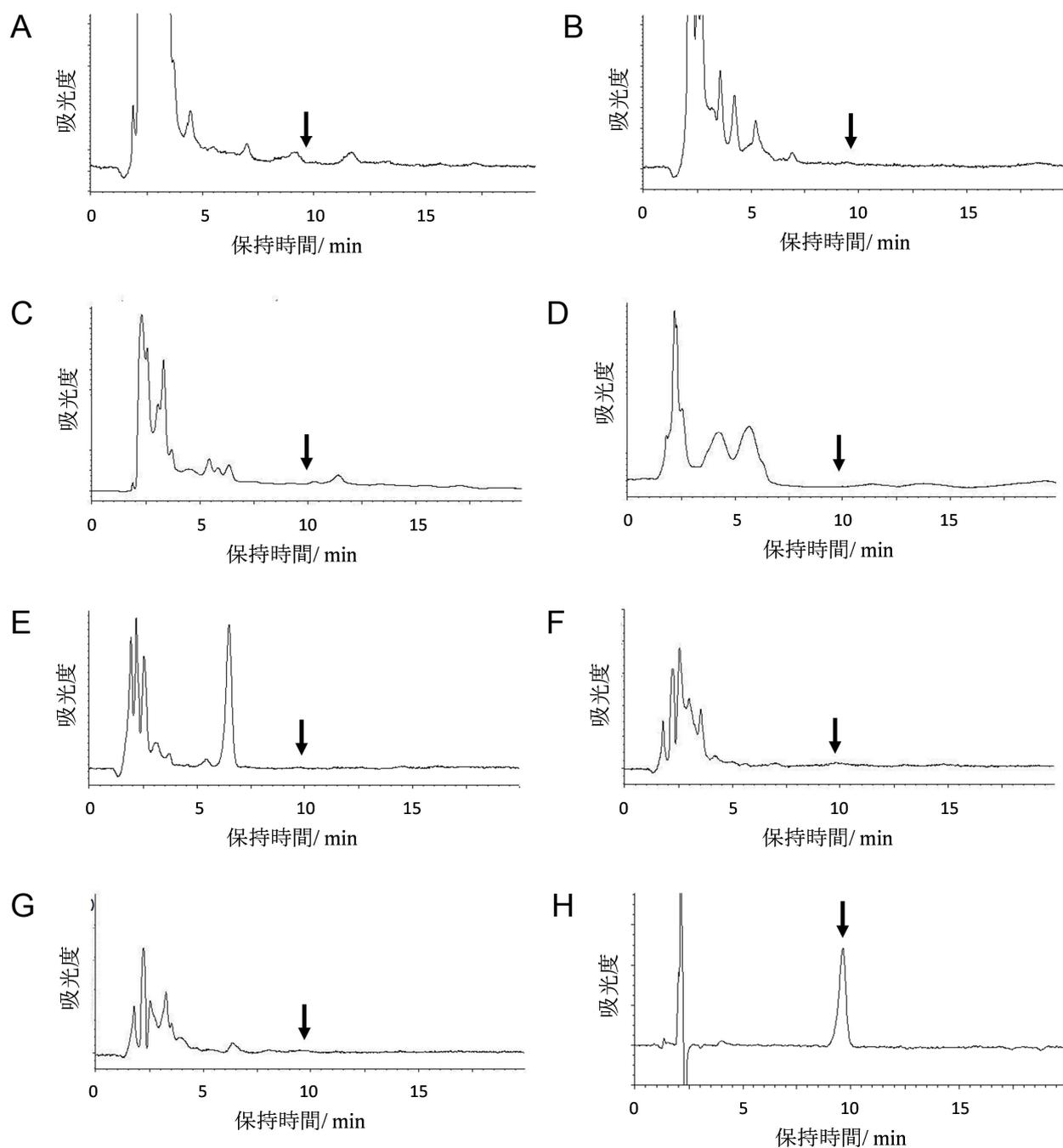


図3 BHA 収載法の妨害物質の検討時に得られたクロマトグラム例

(↓: BHA の保持時間を示す. スケールは全図共通.)

- A: 成型ジャーキー (猫用)
- B: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- C: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- D: ビスケット (犬用)
- E: 粉ミルク (猫用)
- F: 総合栄養食 (ウェット製品) (犬用)
- G: 総合栄養食 (ウェット製品) (猫用)
- H: 標準液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)

3.2 添加回収試験

各成分に係る添加回収試験の検討結果を以下の 1)~8)に示した。

1) カドミウム

表 2-1 に示した成型ジャーキー（猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用），菓子類（犬用）及び粉ミルク（犬用）にカドミウムとして各 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 100 及び 10 ng/mL 相当量）を添加した試料を用い，カドミウム収載法により 5 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-1 のとおり，カドミウムの平均回収率は 84.9~97.8 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 2.0 %以下であった。また，試験に供した試料のブランク値の測定結果は，いずれの試料もカドミウム収載法の検出限界以下であった。

表 5-1 カドミウムの添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
1.0	成型ジャーキー(猫用)	5	94.3	0.4
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	96.8	0.6
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	94.9	1.6
	菓子類(犬用)	5	97.8	0.6
	粉ミルク(犬用)	5	96.8	0.3
0.1	成型ジャーキー(猫用)	5	95.2	2.0
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	93.8	1.2
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	84.9	1.6
	菓子類(犬用)	5	94.0	1.6
	粉ミルク(犬用)	5	90.8	1.3

2) 水銀

表 2-2 に示した成型ジャーキー2種（犬用及び猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用），菓子類（犬用）及び粉ミルク（犬用）に水銀として各 1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 10 及び 0.5 ng/mL 相当量）を添加した試料を用い，水銀収載法により 5 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-2 のとおり，水銀の平均回収率は 85.6~106 %，その繰返し精度は RSD_rとして 4.7 %以下であった。また，試験に供した試料のブランク値の測定結果は，成型ジャーキー（猫用）で 0.40 mg/kg となった以外は，水銀収載法の検出限界以下であった。

表 5-2 水銀の添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
1	成型ジャーキー(犬用)	5	85.8	1.1
	成型ジャーキー(猫用)	5	86.0	1.9
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	92.1	1.0
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	95.2	0.9
	菓子類(犬用)	5	95.6	1.5
	粉ミルク(犬用)	5	89.3	1.9
0.05	成型ジャーキー(犬用)	5	85.6	2.1
	成型ジャーキー(猫用)	5	106	0.9
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	94.9	1.6
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	92.7	4.7
	菓子類(犬用)	5	92.4	1.7
	粉ミルク(犬用)	5	90.7	4.0

3) 鉛

表 2-1 に示した成型ジャーキー（猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用），菓子類（犬用）及び粉ミルク（犬用）に鉛として各 3.0 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 300 及び 50 ng/mL 相当量）を添加した試料を用い，鉛収載法により 5 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-3 のとおり，鉛の平均回収率は 81.9~99.1 %，その繰返し精度は RSD_r として 5.3 %以下であった。また，試験に供した試料のブランク値の測定結果はいずれの試料も鉛収載法の検出限界以下であった。

表 5-3 鉛の添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
3.0	成型ジャーキー(猫用)	5	93.7	0.9
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	98.3	0.8
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	92.6	1.1
	菓子類(犬用)	5	99.1	2.8
	粉ミルク(犬用)	5	96.2	0.8
	0.5	成型ジャーキー(猫用)	5	96.1
素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)		5	95.7	3.4
素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)		5	96.5	2.4
菓子類(犬用)		5	92.9	5.3
粉ミルク(犬用)		5	81.9	3.7

4) ヒ素

表 2-1 に示した成型ジャーキー（猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ，犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ，犬用），菓子類（犬用）及び粉ミルク（犬用）にヒ素として各 15 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 300 及び 4 ng/mL 相当量）を添加した試料

を用い、ヒ素収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-4 のとおり、ヒ素の平均回収率は 89.5~112 %、その繰返し精度は RSD_r として 4.4 %以下であった。また、試験に供した試料のブランク値の測定結果はいずれの試料もヒ素収載法の検出限界以下であった。

表 5-4 ヒ素の添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
15	成型ジャーキー(猫用)	5	104	1.3
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	103	0.8
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	103	0.3
	菓子類(犬用)	5	103	1.6
	粉ミルク(犬用)	5	101	2.9
0.2	成型ジャーキー(猫用)	5	107	4.4
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	112	2.4
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	112	2.0
	菓子類(犬用)	5	89.5	0.6
	粉ミルク(犬用)	5	91.2	0.3

5) エトキシキン

表 2-3 に示した成型ジャーキー(猫用)及び粉ミルク(猫用)にエトキシキンとして各 150 及び 1 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で各 1500 及び 10 ng/mL 相当量)を素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)、素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)及び菓子類(犬用)にエトキシキンとして各 75 及び 1 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で各 750 及び 10 ng/mL 相当量)を添加した試料を用い、エトキシキン収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-5 のとおり、エトキシキンの平均回収率は 92.8~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 5.3 %以下であった。

なお、得られたクロマトグラムの一例を図 4 に示した。

表 5-5 エトキシキンの添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
150	成型ジャーキー(猫用)	5	99.4	1.4
	粉ミルク(猫用)	5	94.6	0.7
75	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	92.8	1.2
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	94.9	2.0
	菓子類(犬用)	5	93.5	2.5
1	成型ジャーキー(猫用)	5	100	3.7
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	99.3	2.3
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	98.6	2.9
	菓子類(犬用)	5	98.4	5.3
	粉ミルク(猫用)	5	103	3.6

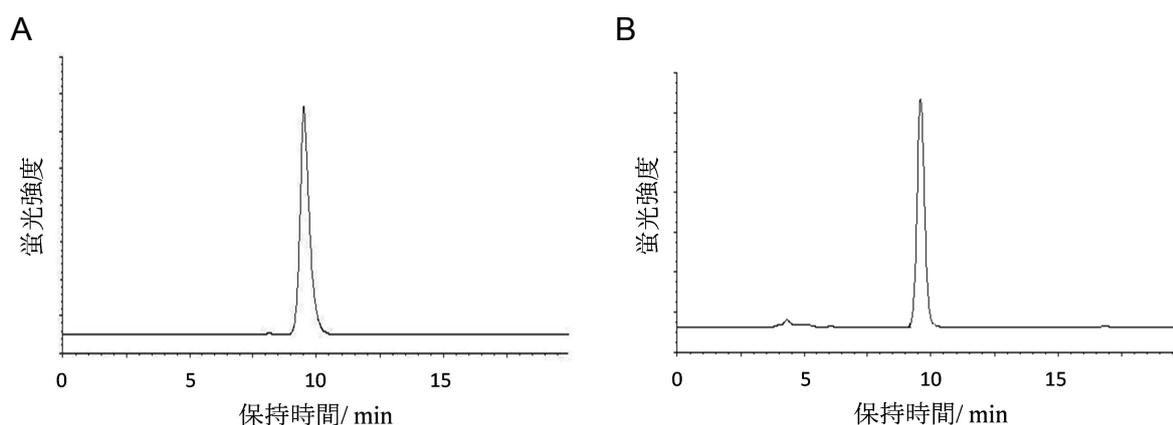


図4 エトキシキンの添加回収試験で得られたクロマトグラム
の例 (スケールは各ピークがそれぞれの縦軸で100%となるように設定.)

A: 標準液 (1.5 µg/mL)

B: 成型ジャーキー (猫用) (150 mg/kg 相当量添加)

6) BHT

表 2-3 に示した成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用), 菓子類 (犬用), 粉ミルク (犬用), 総合栄養食 (ウェット製品) (犬用) 及び総合栄養食 (ウェット製品) (猫用) に BHT として各 150 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 15 及び 1 µg/mL 相当量) を添加した試料を用い, BHT 収載法により 5 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果は表 5-6 のとおり, BHT の平均回収率は 90.0~99.7 %, その繰返し精度は RSD_r として 5.0 %以下であった.

なお, 得られたクロマトグラムの一例を図 5 に示した.

表 5-6 BHT の添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
150	成型ジャーキー(猫用)	5	92.3	0.9
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	93.4	1.5
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	93.9	2.9
	菓子類(犬用)	5	91.5	1.7
	粉ミルク(猫用)	5	90.0	2.0
	総合栄養食(ウェット)(犬用)	5	91.4	3.6
	総合栄養食(ウェット)(猫用)	5	92.7	2.5
10	成型ジャーキー(猫用)	5	94.1	2.1
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	93.9	2.0
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	94.1	2.9
	菓子類(犬用)	5	91.0	1.7
	粉ミルク(猫用)	5	93.7	0.6
	総合栄養食(ウェット)(犬用)	5	99.7	5.0
	総合栄養食(ウェット)(猫用)	5	96.6	4.3

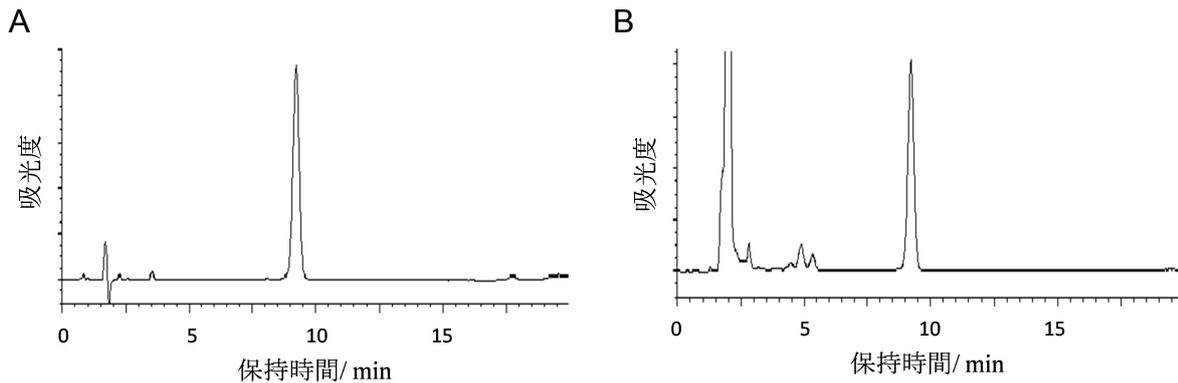


図5 BHTの添加回収試験で得られたクロマトグラム一例
(スケールは各ピークがそれぞれの縦軸で100%となるように設定。)

A: 標準液 (15 µg/mL)

B: 成型ジャーキー (猫用) (150 mg/kg 相当量添加)

7) BHA

表 2-3 に示した成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用), 菓子類 (犬用), 粉ミルク (犬用), 総合栄養食 (ウエット製品) (犬用) 及び総合栄養食 (ウエット製品) (猫用) に BHA として各 150 及び 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 15 及び 0.5 µg/mL 相当量) を添加した試料を用い, BHA 収載法により 5 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-7 のとおり, BHA の平均回収率は 93.9~104 %, その繰返し精度は RSD_r として 6.5 % 以下であった。

なお, 得られたクロマトグラムの一例を図 6 に示した。

表 5-7 BHA の添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
150	成型ジャーキー(猫用)	5	98.7	2.1
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	100	1.0
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	95.0	2.3
	菓子類(犬用)	5	99.7	0.7
	粉ミルク(猫用)	5	96.2	3.8
	総合栄養食(ウエット)(犬用)	5	95.7	0.6
	総合栄養食(ウエット)(猫用)	5	93.9	0.2
5	成型ジャーキー(猫用)	5	94.0	6.5
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	96.2	2.5
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	95.9	4.6
	菓子類(犬用)	5	96.3	5.1
	粉ミルク(猫用)	5	97.1	6.2
	総合栄養食(ウエット)(犬用)	5	100	4.4
	総合栄養食(ウエット)(猫用)	5	104	2.7

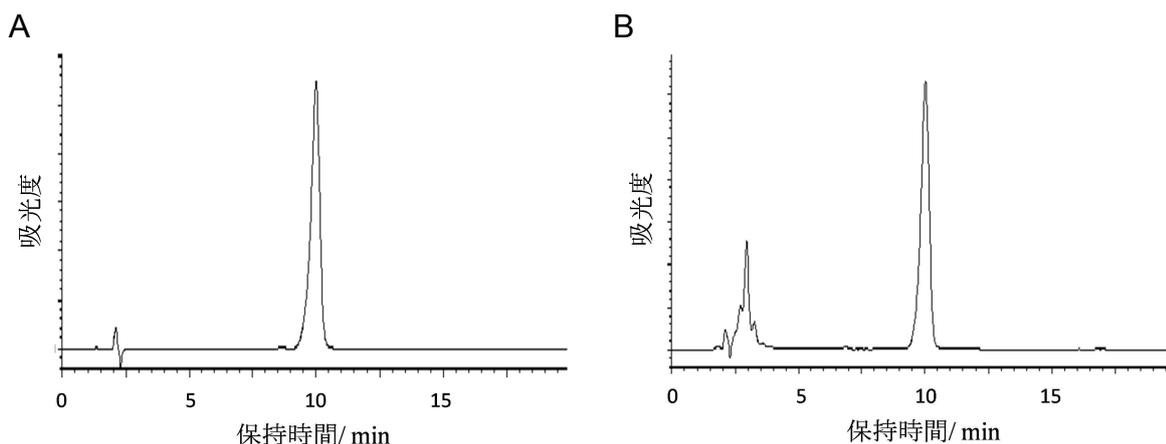


図6 BHAの添加回収試験で得られたクロマトグラム例
(スケールは各ピークがそれぞれの縦軸で100%となるように設定。)

A: 標準液 (15 µg/mL)

B: 成型ジャーキー (猫用) (150 mg/kg 相当量添加)

8) 亜硝酸ナトリウム

表 2-4 に示した成型ジャーキー (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) 2 種, 菓子類 (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) 2 及び粉ミルク (犬用) に亜硝酸ナトリウムとして各 100 及び 20, 4 又は 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 2500 及び 500, 100 又は 50 ng/mL 相当量) を添加した試料を用い, 亜硝酸ナトリウム収載法により 5 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 5-8 のとおり, 成型ジャーキー, 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) 2 及び菓子類における亜硝酸ナトリウムの平均回収率は 81.7~101 %, その繰返し精度は RSD_r として 2.2 %以下であった。しかし, 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) 1 における亜硝酸ナトリウム 100 mg/kg 相当量を添加した試料について平均回収率は 92.1 %, その繰返し精度は RSD_r として 0.5 %と, 良好な結果であったが, 2 及び 4 mg/kg 相当量添加した試料では平均回収率 12.5 %及び 16.5 %, その繰返し精度は RSD_r として 11 %と, 回収率が低い結果となった。また, 粉ミルクにおける平均回収率は 25.8~85.7 %, その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下と, 2 及び 4 mg/kg 相当量添加した試料について回収率が低い結果となった。なお, 試験に供した試料のブランク値の測定結果は成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) で 1.0 mg/kg 及び 3.8 mg/kg であり, その他は亜硝酸ナトリウム収載法の検出限界以下であった。

また, 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) 1 が低回収率であった原因は, 食肉等の亜硝酸ナトリウムの分析法において, アスコルビン酸等の還元物質がジアゾ化法による亜硝酸イオンの定量に妨害を与えるとの報告がある^{5) 6)}ことから, 試料とした素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) 1 に酸化防止目的で添加されているエリソルビン酸ナトリウム (アスコルビン酸の異性体) が亜硝酸ナトリウムの定量を阻害したものと考えられた。このことを確認するために, 表 5-8 で良好な結果が得られているアスコルビン酸等の還元物質を含まない成型ジャーキー (ブランク値 1.0 mg/kg) にアスコルビン酸を添加し, 亜硝酸ナトリウム 2 mg/kg 相当量の添加回収試験を実施したところ, 表 5-9 のとおり, アスコルビン酸の添加量が 0.4 %及び 2 %で

は、亜硝酸ナトリウムの測定値は収載法の検出限界以下となり、添加回収率を算出すると負の値となった。なお、成型ジャーキーへのアスコルビン酸の添加量は、流通実態を踏まえ 0.08、0.4 及び 2 % となるように、試料 5 g に対して 0.004、0.02 及び 0.1 g/mL のアスコルビン酸液をそれぞれ 1 mL ずつ添加した。

試料中の亜硝酸ナトリウム含有量が低い場合、共存する還元物質の影響が顕著になり、低く定量されることが認められた。

表 5-8 亜硝酸ナトリウムの添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
100	成型ジャーキー(犬用)	5	101	0.3
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	96.1	0.6
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)1	5	92.1	0.5
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)2	5	97.4	0.4
	菓子類(犬用)	5	97.8	2.0
	粉ミルク(犬用)	5	85.7	1.2
20	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)1	5	81.5	1.0
	粉ミルク(犬用)	5	71.2	0.9
4	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)1	5	16.5	11
	粉ミルク(犬用)	5	25.8	7.2
2	成型ジャーキー(犬用)	5	98.4	0.03
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	81.7	2.2
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)1	5	12.5	11
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)2	5	90.4	1.6
	菓子類(犬用)	5	85.8	1.8
	粉ミルク(犬用)	5	28.5	11

表 5-9 アスコルビン酸添加による亜硝酸ナトリウムの添加回収率への影響

愛玩動物用スナック製品 の種類	L(+)-アスコルビン酸添加量 (%)					
	0.08		0.4		2	
	添加回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	添加回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	添加回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
成型ジャーキー (犬用)	31.5	5.9	-24.8	0.06	-36.5	14

a) $n=3$ の平均値

b) 相対標準偏差

3.3 定量限界（下限）及び検出限界の検討

各分析法の定量限界（下限）及び検出限界については、今回の添加回収試験における平均回収率及び繰返し精度の標準偏差並びに検査法第 11 章 3（4）から総合的に判断することとした。

その結果、表 6 のとおり、各成分における定量限界（下限）及び検出限界は、検査法収載法に規定された総合栄養食における定量限界（下限）及び検出限界を変更することなく、スナック製品等に適用できると考えられた。

表 6 検討した分析法における愛玩動物用飼料の定量限界（下限）及び検出限界

成分	定量限界 (下限)	検出限界
カドミウム	0.1 mg/ kg	0.03 mg/ kg
水銀	0.05 mg/kg	0.02 mg/kg
鉛	0.5 mg/ kg	0.2 mg/ kg
ヒ素	0.2 mg/ kg	0.05 mg/ kg
エトキシキン	1 mg/ kg	0.2 mg/ kg
BHT	10 mg/ kg	0.1 mg/ kg
BHA	5 mg/ kg	0.1 mg/ kg
亜硝酸ナトリウム	2 mg/kg	1 mg/kg

4 まとめ

重金属等（カドミウム、水銀、鉛及びヒ素）及び添加物（エトキシキン、BHT、BHA 及び亜硝酸ナトリウム）の検査法収載法のスナック製品等への適用範囲の追加について検討した結果、表 7 のとおり、亜硝酸ナトリウムの一部で適用できないものがあつたほかは、すべて適用範囲の追加が可能であつた。

また、定量限界（下限）及び検出限界は、検査法収載法に規定された値を変更することなく、スナック製品等に適用することが可能であつた。

表 7 検討した分析法における愛玩動物用飼料の適用範囲

成分	分析法	追加可能な適用範囲
カドミウム	検査法第4章1のとおり	
水銀	検査法第4章2のとおり	
鉛	検査法第4章3のとおり	成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク
ヒ素	検査法第4章4のとおり	
エトキシキン	検査法第7章1のとおり	
BHT	検査法第7章2のとおり	総合栄養食（ウェット製品）、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー
BHA	検査法第7章3のとおり	（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク
亜硝酸ナトリウム	検査法第7章4のとおり	成型ジャーキー [※] 及び素材乾燥ジャーキー [※] （ハードタイプ及びソフトタイプ）並びに菓子類

※ アスコルビン酸等還元物質が添加されているものでは、亜硝酸ナトリウムの含有量が50 mg/kg程度以下の場合、回収率の低下が認められる。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について、平成 21 年 9 月 1 日、21 消技第 1764 号 (2009).
- 2) U.S. Food and Drug Administration: FDA Releases Progress on Jerky Pet Treat Investigation, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm371450.htm>, cited 8 July 2015.
- 3) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会：平成 26 年度愛玩動物用飼料の有害物質等分析調査委託事業報告書 (2014).
- 4) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，

農林水産省令・環境省令第1号 (2009).

- 5) 平間 裕志, 西村 一彦, 中野 道晴: ジアゾ化法によるタラコ中の亜硝酸イオンの定量における塩酸の効果, 北海道衛生研究所報, **44**, 69-72 (1994).
- 6) 辻 澄子: 第7章 発色剤 24 亜硝酸ナトリウム, 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, 食品衛生検査指針委員会編, 日本食品衛生協会, 142-148 (2003) (ISBN: 978-4889250053).

技術レポート

3 加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討

橋本 仁康^{*}, 山多 利秋^{*}, 會田 紀雄^{*}

Study of Detection Test for Contamination of Bovine Protein in Animal By-product Feed Ingredients Containing Food Industrial Waste

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*}, Toshiaki YAMATA^{*} and Norio AITA^{*}

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

1 緒 言

我が国では BSE 発生防止の観点から、動物由来たん白質の飼料への利用は原則禁止されている。しかし、適切な製造方法によって製造され、反すう動物由来たん白質の混入のおそれがないことを農林水産大臣が確認（以下「大臣確認」という。）したものについては、飼料への利用が認められている¹⁾。今般、「食品の製造工程において発生した残さ」のうち、牛等（牛、めん羊、山羊及びしか）に由来するたん白質を含む食品の製造工程とは完全に分離された製造工程で発生したものであることを農林水産大臣が確認したもの（以下「加工食品残さ」という。）について、豚、鶏、うずら及び養殖水産動物用の飼料原料とすることが可能となった²⁾。

現在、飼料分析基準³⁾に規定されている方法に用いるモリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver. 2（以下「モリナガキット」という。）については、開発当時、加工食品残さが飼料原料に使用されることが想定されなかったため、加工食品残さに対する反応性の検証がなされていなかった。このため、今回改めて市販の加工食品を加熱、乾燥したものを扱い、その特異性を確認することとした。

また、加工食品残さを構成する原材料は多種多様であることを考慮した場合、モリナガキットが抗原抗体反応を利用している以上、原材料の組み合わせ等により非特異的な反応をする可能性を否定できない。この観点から、株式会社森永生科学研究所は、加工食品残さを原料とする動物由来たん白質飼料を対象とした牛由来たん白質の混入確認の試験において、より非特異反応を起こしにくいと予想される試験法（以下「モリナガキット改良法」という。）を開発し、FAMIC ではこの方法について再現精度等を検討したので、その概要を報告する。

なお、このモリナガキット改良法は、加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の確認試験法として、既に平成 26 年 10 月 27 日付けで通知されている⁴⁾。

*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

2 実験方法

2.1 試薬

- 1) ELISA キット：モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2 森永生科学研究所製
- 2) 抽出溶媒：ELISA キットに付属の抽出溶媒濃縮液 A 液 100 mL, 抽出溶媒濃縮液 B 液 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液 100 mL を混合し, 水を加えて 1000 mL とした.
- 3) 洗浄液：ELISA キットに付属の洗浄液 (20 倍濃縮液) 50 mL に水を加えて 1000 mL とした.
- 4) 検体希釈液：ELISA キットに付属の検体希釈液 (10 倍濃縮液) 5 mL に水を加えて 50 mL とした.
- 5) 検体希釈液 II：検体希釈液 1 mL に抽出溶媒 19 mL を加えた.
- 6) 高濃度陽性対照液, 低濃度陽性対照液, 動物由来陰性対照液, 植物由来陰性対照液, 抗体固相化モジュール, 酵素標識抗体溶液, 酵素基質溶液及び反応停止液は, ELISA キットに付属のものを用いた.

2.2 装置及び器具

- 1) 振とう機：VORTEX-GENIE2 Science Industries 製
- 2) マイクロプレートリーダー：Sunrise Rainbow Thermo TECAN 製

2.3 試料

- 1) モリナガキットの加工食品残さに対する特異性確認試験に用いた試料
 - i) 牛肉骨粉：平成 13 年に輸入されたオーストラリア産肉骨粉を 1 mm のふるいを通過するまで粉碎したのものを用いた.
 - ii) 偽陽性確認試験用試料：市販の加工食品及び調味料類でその加工残さが動物由来たん白質飼料原料として用いられる可能性があり, 反すう動物由来原料が原材料表示に記載されていないもの, あわせて 34 品目を加工食品残さの代替として用いた (表 1). なお, 偽陽性確認用試料は動物由来たん白質飼料の製造工程を擬似的に再現する必要があるため, 固形状のものは細断後, 121 °C で 20 分間オートクレーブ処理し, 目視で乾燥したと判断出来るまで 105 °C で乾燥した後, ミルサーで粉碎して調製した. また, 液状のものは, 121 °C で 20 分間オートクレーブ処理して調製した.
 - iii) 偽陰性確認試験用試料：表 1 に示した試料約 0.4 g をポリエチレン製チューブに採取後, 牛肉骨粉を 0.5 %及び 1 %相当量になるように各チューブに直接添加したものを用いた.
- 2) モリナガキット改良法の共同試験に用いた試料
 - i) 牛肉骨粉：2.3 の 1)の i)と同じものを用いた.
 - ii) 陰性確認用試料：豚肉骨粉, ポークチキンミール, チキンミール, フェザーミール及び魚粉は, 国内製造のものを用い, 1 mm のふるいを通過するまで粉碎し, 飼料分析基準収載法による ELISA 分析で陰性を確認したものを用いた.
 - iii) 牛肉骨粉添加試料：各陰性確認用試料に牛肉骨粉を 0.5 %又は 1 %相当量になるように添加 (100 g 程度調製) し, 約 1 g ずつ分取して各 50 個の牛肉骨粉添加試料とした.

2.4 試験方法

- 1) 飼料分析基準収載法
飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)によった.

2) モリナガキット改良法

i) 抽出

分析試料 0.4 g を量ってポリエチレン製チューブに入れ、抽出溶媒 19.6 mL を加え、振とう機で 30 秒間ずつ 3 回振り混ぜた。これを沸騰水浴中で 10 分間加熱し、放冷後、3000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過した。このろ液 50 μL に検体希釈液 950 μL を加え混合した。この液 100 μL に検体希釈液 II 300 μL を加え混合したものを ELISA 操作に供する試料溶液とした。

ii) ELISA 操作

試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液、動物由来及び植物由来陰性対照液並びに検体希釈液（空試験溶液とした。）各 100 μL を、抗体固相化モジュールのそれぞれ別のウェルに入れ、シールをして密閉し軽く振り混ぜた後、25 °C で 1 時間静置した。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μL を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液 100 μL を加え、シールをして密閉し軽く振り混ぜた後、25 °C で 1 時間静置した。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μL を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルにキット添付の酵素基質溶液 100 μL を加え、ふたをして軽く振り混ぜた後、25 °C で 20 分間遮光して静置した。更に各ウェルにキット添付の反応停止液 100 μL を加え、酵素反応を停止させた。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度値から 620 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とした。なお、各試料溶液は、それぞれ 2 ウェル以上に入れ、それぞれの測定値の平均値により判定を行った。

iii) 判定

試料溶液の測定値の平均値が低濃度陽性対照液の平均測定値以上であった場合を陽性と判定した。ただし、モリナガキットの試験成立条件（空試験溶液、動物由来及び植物由来陰性対照液の測定値の平均値が 0.08 以下であり、高濃度陽性対照液の測定値の平均値が 0.6 以上 1.6 以下）を満たさない場合は、試験を不成立とした。

3 結果及び考察

3.1 モリナガキットの加工食品残さに対する特異性確認試験

モリナガキットについては、配混合飼料及び飼料原料として使用される穀類、油かす類、動物由来たん白質飼料等に対する特異性を既に確認しているが⁵⁾、加工食品残さに対する特異性は確認していない。そこで、偽陽性を示すことがないかを確認するため、表 1 に示した試料を用い、飼料分析基準収載法により各試料につき 2 点併行で分析を実施した。その結果、表 1 のとおり、偽陽性を示すものはなかった。

次に、加工食品残さが偽陰性を示すことがないかを確認するため、2.3 の 1) の iii) の偽陰性確認用試料を用い、モリナガキット改良法により各試料につき 2 点併行で分析を実施した。その結果、表 1 のとおり、牛肉骨粉を 1 %相当量添加したものではすべて陽性が確認され、偽陰性を示したものはなかった。

表 1 特異性試験に使用した試料並びにその偽陽性及び偽陰性試験結果

(+:陽性, -:陰性)

試料	原材料	偽陽性試験結果*	偽陰性試験結果**	
			0.5%牛MBM添加	1%牛MBM添加
ロースハム	豚ロース肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 卵たん白, 植物性たん白, 食塩, 乳たん白, ポークエキス, 調味料(有機酸等), リン酸塩(Na), 増粘多糖類, カゼインNa, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 香辛料, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
ペッパーボンレスハム	豚もも肉, 食塩, 砂糖, 香辛料, ブラックペッパー, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(硝酸K, 亜硝酸Na)	-, -	+, -	+, +
ベーコン	豚ばら肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 乳たん白, 食塩, 植物性たん白, 卵たん白, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), くん液, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 香辛料, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, -	+, +
ベーコン(糖質ゼロ)	豚ばら肉, 卵たん白, 食塩, 乳たん白, 大豆たん白, 豚コラーゲン, 酵母エキス, 調味料(有機酸等), リン酸塩(Na), カゼインNa, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 甘味料(アセスルファムK, スクラロース, ネオテーム), 香辛料	-, -	+, -	+, +
焼豚	豚肉, 糖類(砂糖, 水あめ), 植物性たん白, 食塩, しょうゆ, 卵たん白, みりん, カゼインNa, 着色料(野菜色素, カラメル, コチニール), 調味料(アミノ酸等), リン酸塩(Na), 増粘多糖類, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), (原材料の一部に乳成分, 小麦を含む)	-, -	+, -	+, +
豚角煮	豚ばら肉, 砂糖, 水あめ, 発酵調味料, しょうゆ, でん粉, 異性化液糖, たん白加水分解物, みりん風調味料, 食塩, 香辛料, 卵たん白, ポークエキス, オリゴ糖, こんぶエキス, かつお節エキス, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素, 増粘多糖類, 酸味料, (原材料の一部に小麦を含む) ※乳, 卵, 小麦, えびやかにを含む原料を使用した設備で生産	-, -	+, +	+, +
粗挽きポークウィンナー	豚肉, 豚脂肪, 糖類(水あめ, ぶどう糖, 砂糖), 食塩, 香辛料, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na)	-, -	+, -	+, +
ウィンナーソーセージ	豚肉, 鶏肉, 結着材料(ポーク粗ゼラチン, 大豆たん白), 豚脂肪, 還元水あめ, 食塩, ポークエキス, 水あめ, 香辛料, 加工デンプン, 未焼成Ca, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), pH調整剤, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), 香辛料抽出物	-, -	-, -	+, +
魚肉ソーセージ	魚肉(たら, たちうお, ほっけ, その他), 結着材料(でん粉, ベース状小麦たん白, 粉末状大豆たん白)植物油脂, 砂糖, 食塩, 醸造酢, 香味食用油, オニオンエキス, 香辛料, かつおエキス, 酵母エキス, 加工でん粉, 炭酸Ca, 調味料(アミノ酸等), 骨Ca, 着色料(クチナシ, トマトリコピン), 香辛料抽出物, 香料, (原材料の一部にかり, さけを含む)	-, -	+, +	+, +
ソーセージステーキ	豚肉, 豚脂肪, でん粉, 水あめ, 食塩, 砂糖, ぶどう糖, 香辛料, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na)	-, -	+, +	+, +
チルドハンバーグ(チキン)	鶏肉, たまねぎ, パン粉(小麦を含む), ウスターソース, 砂糖, しょうゆ(大豆・小麦を含む), 水あめ, 食塩, 香辛料, 醸造酢(小麦を含む), 揚げ油(なたね油), ソース[ウスターソース, 砂糖, トマトペースト, たまねぎ, しょうゆ(大豆, 小麦を含む), 醸造酢(小麦を含む), でん粉, りんごペースト, 食塩, 香辛料]	-, -	+, +	+, +
甘酢あん肉だんご	鶏肉, たまねぎ, つなぎ(パン粉, でん粉), 粒状大豆たん白, 砂糖, おろししょうが, 食塩, りんご酢, たれ(砂糖, しょうゆ, みりん, 醸造酢, ごま, ごま油, カツオブシエキス, おろししょうが, 香辛料), 増粘剤(加工でん粉), 着色料(カラメル, 紅麹, ラクト), (原材料の一部に小麦, 乳を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍鶏の唐揚げ	鶏肉, 植物油, 砂糖, しょうゆ, 粉末状植物性たん白, 食塩, 鶏油, チャツネ, 粉末卵白, 香辛料, しょうゆ加工品, こんにやく粉, 衣(コーンフラワー, デンプン, 粉末状植物性たん白, 食塩, 粉末しょうゆ, トマトパウダー, 大豆粉, 香辛料, 粉末卵白, 紅茶エキスパウダー), 揚げ油(大豆油), 加工でん粉, 酢, トレハロース, 増粘多糖類, リン酸塩(Na), アセロラ濃縮果汁, 甘味料(ソーマチン), 膨張剤, 乳化剤, (原材料の一部に小麦, 乳成分, りんごを含む)	-, -	+, +	+, +
チキンスターキ	鶏肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 食塩, 植物性たん白, 香辛料, 卵白, でん粉, レモンパウダー, チキンコンソメ, 調味料(有機酸等), pH調整剤, 加工でん粉, カラメル色素, 増粘剤(加工でん粉), グリシン, リン酸塩(Na), 香料, (原材料の一部に乳成分, 小麦, 大豆, ゼラチンを含む) ※乳, 卵, 小麦, えびやかにを含む原料を使用した設備で生産	-, -	+, +	+, +
冷凍餃子	野菜(キャベツ, たまねぎ, にら, にんにく), 食肉(豚肉, 鶏肉), 豚脂, 粒状大豆たん白, 卵白, ごま油, 食塩, 清酒, 砂糖, ゼラチン(豚), オイスターソース, 香辛料, 皮(小麦粉, なたね油, 米粉, 食塩, でん粉, 大豆粉, しょうゆ), 調味料(アミノ酸等), 増粘剤(キサンタン), 乳化剤, カゼインNa, (その他 乳成分由来原材料を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍焼売	豚肉, 玉ねぎ, 豚脂肪, 砂糖, 小麦たん白, しょうゆ, 食塩, オイスターソース, 香辛料, 皮(小麦粉, 卵黄, 砂糖, 大豆粉, 食塩), 加工デンプン, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素	-, -	+, +	+, +

*: 飼料分析基準収載法にて分析

**: モリナガキット改良法にて分析

表 1 特異性試験に使用した試料並びにその偽陽性及び偽陰性試験結果 (続き)

(+:陽性, -:陰性)

試料	原材料	偽陽性試験結果*	偽陰性試験結果**	
			0.5%牛MBM添加	1%牛MBM添加
さつま揚げ	魚肉(ニシン, タラ, アジ, グチ, その他), 大豆たん白, 馬鈴薯でん粉, ぶどう糖, 魚介エキス, 食塩, 発酵調味料, 砂糖, 植物油	-, -	+, +	+, +
つみれ	魚肉, 植物性たん白, でん粉, 卵白, 砂糖, 食塩, 魚醤, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), 酸化防止剤(チャ抽出物), (原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
すじ	魚肉, コラーゲン, 食塩, 植物性たん白, しょうゆ, 砂糖, 卵白, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), 酒精, (原材料の一部に小麦, ゼラチンを含む)	-, -	+, +	+, +
とり肉だんご	鶏肉(鹿児島県産), 液体調味料(砂糖, 米発酵調味料, 水あめ, おろし生姜, たん白加水分解物, 食塩, 醤油, かつおエキス, ポークエキス, 濃縮デーツ果汁, 酵母エキス, こしょう末), 鶏軟骨, たまねぎ, パン粉, 植物性油脂, 甘しょでん粉, 鶏皮, 青ネギ, にんじん, 砂糖, 酸味料, 調味料(アミノ酸等), 増粘多糖類, (原材料の一部に小麦, さば, 大豆, 鶏肉, 豚肉を含む)	-, -	+, -	+, +
はんぺん	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 食塩, 発酵調味液, やまいも, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), セルロース, pH調整剤, 増粘多糖類, (原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
ちくわ	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 発酵調味液, 食塩(天日結晶塩77%, 藻塩23%), ぶどう糖, 植物油, 調味料(アミノ酸等), 加工でん粉, 貝Ca, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
蒲鉾	魚肉(たら, ぐち, たい), 食塩(天日結晶塩94%, 藻塩6%), 砂糖, 発酵調味液, 魚介エキス, 卵白, でん粉, 植物油, 酵母エキス, 調味料(アミノ酸等), 加工でん粉, 貝Ca, 着色料(コチニール), (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	-, -	+, +
カニかま	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 食塩, 発酵調味液, 魚介エキス, コラーゲン, 大豆たん白, 植物油, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), セルロース, 香料, 着色料(パプリカ色素, トマト色素), 貝Ca, (原材料の一部に小麦, えび, かに, ゼラチンを含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍焼きめし	うるち米(国内産), 野菜(ねぎ, にんじん, たまねぎ), 全卵, 植物油, 豚肉, しょうゆ, かまぼこ, 食塩, 卵黄, 砂糖, チキンエキス, 魚醤, 粉末状植物性たん白, 大豆多糖類, ぶどう糖, でん粉分解物, チャーシューペースト, 香辛料, 香味油脂, 卵白粉, 乳たん白, でん粉, 小麦粉, 大豆粉, 加工デンプン, 調味料(アミノ酸等), トレハロース, 酸味料, リン酸塩(Na), 香料, 着色料(カロチノイド, コチニール), 貝Ca, [原材料の一部に乳成分, 魚醤(魚介類)を含む]	-, -	+, -	+, +
冷凍たこ焼き	野菜(キャベツ, ねぎ), たこ, 小麦粉, 全卵, 植物油, 揚げ玉, やまいも, 米粉, 砂糖, でん粉, ねぎ, 紅しょうが, 食塩, かつお節粉末, こんぶエキス, デキストリン, 乳たん白, こんぶ粉末, かつおエキス, たん白加水分解物, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), ベーキングパウダー, 紅麴色素, 炭酸Na, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍エビフライ	衣(パン粉, 鶏卵粉, 小麦粉, 砂糖, パーム油, 食塩, でん粉, 粉末状植物性たん白, こしょう), えび, 加工でん粉, リン酸塩(Na), pH調整剤, 焼成Ca, 調味料(アミノ酸), ベーキングパウダー, アナトー色素, 増粘剤(ゲアー), 乳化剤, 香辛料抽出物, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍トンカツ	豚肉, 豚脂, つなぎ(粉末状植物性たん白, パン粉, でん粉), ポークブイヨン, 粉末卵白, しょうゆ, 食塩, 砂糖, 鶏卵, 植物油, 卵殻粉, 香辛料, 衣(パン粉, 植物油, でん粉, 粉末卵白, コーンフラワー, 食塩), 揚げ油(なたね油), 加工でん粉, 酢, 増粘剤(キサンタンガム), ゲル化剤(増粘多糖類), アセロラ濃縮果汁, (原材料の一部に乳製品を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍カキフライ	カキ(広島産), 衣(パン粉, 小麦粉, でん粉, ぶどう糖, 植物性たん白), 加工でん粉, 増粘剤(ゲアーガム), アナトー色素(原材料の一部に乳, 大豆の成分を含む)	-, -	+, +	+, +
鰻の蒲焼き	うなぎ(愛知県), タレ[しょうゆ, ぶどう糖果糖液糖, 発酵調味料, みりん, 砂糖, 水あめ, 着色料(カラメル, アナトー), 増粘剤(加工澱粉, 増粘多糖類), 調味料(アミノ酸等)]	-, -	-, -	+, +
焼肉のタレ	果実類(りんご, 桃, 梅), 醤油, 砂糖, アミノ酸液, 野菜類(にんにく, 玉ねぎ), 蜂蜜, 還元水あめ, 食塩, 発酵調味料, りんご酢, 白ごま, 蛋白加水分解物, オニオンエキス, ごま油, 香辛料, ポークエキス, カラメル色素(原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
中華スープの素	食塩, 肉エキス(ポーク, チキン), 野菜エキス, 動植物油脂, 砂糖, 乳糖, 小麦粉, 香辛料, 調味料(アミノ酸等)	-, -	+, -	+, +
チキンコンソメ	乳糖, 食塩, 鶏肉, 食用油脂, チキンエキス, 酵母エキス, デキストリン, チキンファット, たまねぎ, しょうゆ, 香辛料, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素, 酸味料, (小麦を原材料の一部に含む)	-, -	+, -	+, +
鶏ガラスープの素	食塩, 乳糖, チキンエキス, 砂糖, 酵母エキス, ポークエキス, 野菜エキス, 香辛料, 加工でん粉	-, -	+, -	+, +

*: 飼料分析基準記載法にて分析

**: モリナガキット改良法にて分析

原材料は商品表示に準じた。

3.2 共同試験に用いた試料の均質性確認

2.3 の 2)で調製した試料からランダムに各 10 本を選び、株式会社森永科学研究所にて新たに開発された 2.4 の 2)の試験法を用いて 1 分析あたり 2 点併行分析を行った。

その結果は表 2 のとおりであり、牛肉骨粉を 1 %相当量添加したものでは、すべて陽性となった。しかし、牛肉骨粉を 0.5 %相当量添加したものでは、飼料の種類により 5~80 %と感度が異なる結果が得られた。これは、今回試験に用いた魚粉などに牛肉骨粉を 0.5 %相当量添加したものでは陽性と判断できる十分な感度が得られていないと考えられ、調製した試料の均質性には問題ないものと判断し、共同試験に用いることとした。

表 2 共同試験に用いた試料の均質性試験結果

試料番号		(+:陽性, -:陰性)													
		魚粉1		魚粉2		チキンミール1		チキンミール2		豚鶏混合肉骨粉1		豚鶏混合肉骨粉2		豚肉骨粉	
		0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*
1	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
2	1	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
3	1	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
6	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
7	1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
9	1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
陽性数		6	20	1	20	16	20	10	20	15	20	10	20	15	20
感度 (%)		30	100	5	100	80	100	50	100	75	100	50	100	75	100

※ 牛肉骨粉の添加濃度

3.3 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、2.3 の 2)の陰性確認用試料及び同牛肉骨粉添加試料（魚粉 2 点、チキンミール 2 点、ポークチキンミール 2 点及び豚肉骨粉 1 点）を用いて共同試験を実施した。参加試験室は、株式会社森永科学研究所、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 7 試験室）であった。各試験室においては、計 21 種類の試料について非明示の 2 回繰返し分析、かつ 1 分析につき 2 点併行分析を行った。結果については、併行分析の 2 点がともに陽性の場合のみ陽性、その他のものを陰性とした。

また、各試験室の結果から、それぞれの試料について偽陽性率及び偽陰性率を算出した。更に分析法の室間再現精度を推定するため、定性分析法の性能の指標である⁶⁾ accordance, concordance 及び COR (concordance odds ratio)を以下の式により求めた結果を表 3 に示した。

$$\text{accordance (\%)} = \frac{\text{同一試験室内で同じ結果 (++) または (--)} \text{を示したペア数の全試験室の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100$$

$$\text{concordance (\%)} = \frac{\text{試験室間で同じ結果 (++) または (--)} \text{を示したペア数の全試験室の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100$$

$$\text{COR} = \frac{\text{accordance (\%)} \times \{100 - \text{concordance (\%)}\}}{\text{concordance (\%)} \times \{100 - \text{accordance (\%)}\}}$$

牛肉骨粉を添加しないもの及び牛肉骨粉を 1 % 添加したものでは、すべての試料において偽陰性率及び偽陽性率は 0 %，accordance 及び concordance はそれぞれ 100 %，COR は 1 であった。牛肉骨粉を 0.5 % 添加したものでは、偽陰性率が 14.3～71.4 %，accordance が 71.4～100 %，concordance が 52.4～73.8 % であった。

以上の結果より、共同試験でも偽陽性を示すものはなく、牛肉骨粉を添加しないもの及び牛肉骨粉を 1 % 添加したものにおいては十分な室間再現精度が得られた。

なお、accordance 及び concordance は、それぞれの定量分析法の併行精度及び室間再現精度に対応する。COR が大きいほど、試験室間の結果の違いが大きいことを意味⁷⁾し、accordance が 100 % の場合に COR は無限大になるが、accordance と concordance が両方とも 100 % の場合に試験室内も試験室間も同じ結果が得られる確率は等しいので COR は 1 となる。

表 3 共同試験結果

(+ : 陽性, - : 陰性)

試験室番号	牛肉骨粉添加量											
	魚粉 1			魚粉 2			チキンミール 1			チキンミール 2		
	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %
1	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
6	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
7	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
偽陽性率 (%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
偽陰性率 (%)	-	28.6	0	-	71.4	0	-	14.3	0	-	28.6	0
Accordance (%)	100	100	100	100	71.4	100	100	100	100	100	71.4	100
Concordance (%)	100	52.4	100	100	54.8	100	100	71.4	100	100	54.8	100
COR	1.0	∞	1.0	1.0	2.1	1.0	1.0	∞	1.0	1.0	2.1	1.0

試験室番号	牛肉骨粉添加量								
	鶏豚混合肉骨粉 1			鶏豚混合肉骨粉 2			豚肉骨粉		
	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %
1	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
6	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
7	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
偽陽性率 (%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-
偽陰性率 (%)	-	14.3	0	-	28.6	0	-	21.4	0
Accordance (%)	100	71.4	100	100	71.4	100	100	85.7	100
Concordance (%)	100	73.8	100	100	54.8	100	100	61.9	100
COR	1.0	0.9	1.0	1.0	2.1	1.0	1.0	3.7	1.0

・各試験は2点併行分析で行っており、2点とも陽性判定のものを陽性とした。

・試料毎に2回試験を行った結果を列記した。

4 まとめ

加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討を行い、次の結果を得た。

- 1) 市販の加工食品、調味料及びエキス類 34 点についてモリナガキットの特異性を確認したところ、偽陽性及び偽陰性を示すものはなかった。
- 2) モリナガキットの改良法について共同試験を行った結果、良好な再現精度が得られた。

謝 辞

本検討にあたり、多大なるご協力を頂きました株式会社森永生科学研究所に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：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の施行について、平成 17 年 3 月 11 日、16 消安第 9573 号 (2005)。

- 2) 農林水産省告示：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づき農林水産大臣が指定するものを指定する件，平成 26 年 5 月 13 日，農林水産省告示第 649 号 (2014).
- 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) 農林水産省消費・安全局畜水産安全課長通知：加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の確認試験法について，平成 26 年 10 月 27 日，26 消安第 3691 号 (2014).
- 5) 武田 然也，橋本 仁康，山本 貴之：飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」の検討，飼料研究報告，**36**，91-100 (2011).
- 6) S. D. Langton, R. Chevennement, N. Nagelkerke and B. Lombard, Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance, *Int. J. Food Microbiol.*, **79**, 175-181 (2002).
- 7) 内藤 成弘：第 3 章第 2 節 データの統計的取扱い，最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック，安井 明美，五十君 静信，後藤 哲久，丹野 憲二，湯川 剛一郎編，サイエンスフォーラム，95-97 (2010) (ISBN: 978-4-905098-00-3).

技術レポート

4 ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量に用いる塩基性アルミナについて

榎本 舞弓*, 橋本 仁康*, 山多 利秋*

Comparison of Basic Alumina for Use in Microbiological Assays of Polyether Antibiotics

Mayu ENOMOTO*, Yoshiyasu HASHIMOTO* and Toshiaki YAMATA*

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

1 緒 言

飼料分析基準¹⁾に記載されたポリエーテル系抗生物質（サリノマイシンナトリウム（以下「SL」という．））、ナラシン（以下「NR」という．）及びモネンシンナトリウム（以下「MN」という．））の微生物学的定量法で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナは、千原ら²⁾がその適用性を検討し、Aluminum oxide Type F-20（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のものをを用いることが飼料分析基準の別表 2 に規定されている。しかし、当該品は既に販売されておらず、また、カタログ番号が同一の後継品 Aluminum oxide Type CG-20 は、予備検討の結果、当該品との同等性が確認できなかった。

今回、複数のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナを比較検討し、Aluminum oxide Type F-20 の代替となり得る同等品に係る知見を得たので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

市販の牛用配合飼料及び鶏用配合飼料について、1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎したものをを用いた。検討に用いた飼料の種類等を表 1 に示した。

2.2 試 薬

- 1) 微生物学的定量法では水は滅菌水、メタノールは試薬特級を用い、液体クロマトグラフ法では水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）、メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。
- 2) サリノマイシンナトリウム、ナラシン及びモネンシンナトリウム標準液
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）に準じて調製した。
- 3) カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ
比較試験を行った塩基性アルミナを表 2 に示し、飼料分析基準に規定されている塩基性アルミナを F とした。

また、Sigma-Aldrich が F の後継品としている Aluminum oxide Type CG-20 について、そのロット番号が異なる 2 ロット（SLBC5525 及び SLBF0856）を入手し、予備検討を実施したとこ

* 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

ろ、MN の流出パターンが F と大きく異なった（A と C の中間程度）ことから、本検討に用いる塩基性アルミナからは除外した。

なお、検討途中（2014年12月）で B のロット番号が変更となったため、変更後の塩基性アルミナを Ba と表記し、区別した。

表 1 検討に用いた飼料の種類等

試料番号	飼料の種類	含有するポリエーテル系 抗生物質の名称及び量	添加したポリエーテル系 抗生物質の名称及び量
M1	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M2	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M3	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M4	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M5	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M6	大すう飼育用配合飼料	なし	MN, 80 g(力価)/t
M7	成鶏飼育用配合飼料	なし	MN, 80 g(力価)/t
S1	ブロイラー肥育前期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S2	ブロイラー肥育前期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S3	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S4	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S5	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S6	幼すう飼育用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S7	肉用牛肥育用配合飼料	なし	SL, 15 g(力価)/t
N1	ブロイラー肥育後期用配合飼料	NR, 80 g(力価)/t	---
N2	ブロイラー肥育後期用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N3	大すう飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N4	成鶏飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N5	成鶏飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t

表 2 検討に用いたカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ

記号	メーカー	品名	ロット番号
A	和光純薬工業	Alumina, Activated	CTR6115
B	Merck Millipore	Aluminium oxide 90 active basic	TA 1897976 405
Ba	Merck Millipore	Aluminium oxide 90 active basic	TA 1929376 442
C	Merck Millipore	Aluminium oxide 60 active basic	TA 1873267 338
D	MP Biomedicals Germany	EcoChrom MP Alumina B, Act. I	13
E	Sigma-Aldrich	Aluminum oxide	MKBQ1135V
F ^{a)}	Sigma-Aldrich	Aluminum oxide Type F-20	112K0955

a) 飼料分析基準の別表 2 に規定されているもの

4) 塩基性アルミナの水分活性度の調整

塩基性アルミナを 130 °C で 2 時間乾燥した後、気密容器に入れ、塩基性アルミナ 94 g に対して水 6 mL を加えてよく混和した後、一夜静置し、Brockmann スケール³⁾の活性度 III（水分含量 6 v/w%）⁴⁾となるように調整した。

なお、活性度を調整しない塩基性アルミナと区別するため、活性度 III に調整した塩基性アルミナを塩基性アルミナ（活性度 III）と表記し、各記号の後ろには(act.III)と付記した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) メンブランフィルター：エキクロディスク CR 日本ポール製（PTFE，孔径 0.45 μm ）
- 3) 液体クロマトグラフ装置
オートサンプラー：SIL-0AD VP 島津製作所製
溶離液用ポンプ：LC-10AD VP 島津製作所製
カラム恒温槽：CTO-10A VP 島津製作所製
反応液用ポンプ：LC-10AD VP 島津製作所製
反応槽：CRB-6A 島津製作所製
紫外可視吸光光度検出器：SPD-10A VP 島津製作所製

2.4 試験方法

2.4.1 液体クロマトグラフ法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ，メタノール-水（9+1）50 mL を加え，20 分間かき混ぜて抽出した．抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し，カラム処理に供する試料溶液とした．なお，抗生物質を含まない配合飼料については，ろ液の一定量に抗生物質の標準原液の一定量を加え，カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ 12 g を乾式で充てんし，カラムを調製した．試料溶液約 35 mL をカラムに入れ，流出液の 15 mL までは 2.5 mL ずつの 6 画分，15 ~ 25 mL までは 5 mL ずつの 2 画分を分取し，それぞれメンブランフィルターでろ過し，液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした．

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各抗生物質標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し，クロマトグラムを得た．

測定条件

検出器：紫外可視吸光光度検出器（測定波長：520 nm）

カラム：Shim-pack VP-ODS 島津製作所製（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μm ，細孔径 12 nm）

溶離液：メタノール-水-酢酸（940+60+1）

反応液：硫酸 10 mL をメタノール 475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後，バニリン 15 g を加えて溶かした（用時調製）．

流速：溶離液 0.6 mL/min，反応液 0.6 mL/min

反応槽温度：95 $^{\circ}\text{C}$

4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し，試料溶液中の各抗生物質量を算出した．

2.4.2 微生物学的定量法

飼料分析基準に規定された SL，NR 及び MN の微生物学的定量法（平板法）により試験し

た。

なお、塩基性アルミナ F と検討に用いた A~E を比較することを目的としているため、2-2 用量法における高濃度標準液及び低濃度標準液は、同一抽出液を F でカラム処理し、調製した高濃度試料溶液及び低濃度試料溶液をそれぞれ用いた。このため、必要な抽出液量に応じて、試料採取量及び抽出溶媒量を等倍（つまり F と比較したい塩基性アルミナの数足したものに、本来、微生物学的定量法で規定された試料採取量及び抽出溶媒量を等倍）して抽出液を調製した。

3 結果及び考察

3.1 塩基性アルミナカラムからの流出状況の比較

飼料分析基準で規定されている塩基性アルミナ F との同等性を確認するため、試料 M1 について、A~F を用い、簡便に定量可能である液体クロマトグラフィーにより回収率を求めた。2.4.1 に従い分画試験を行った結果、MN の流出パターンは図 1 の i のとおり、用いた塩基性アルミナの種類によって顕著な差が認められた。特に、A、C 及び D において、MN は、初めは塩基性アルミナに吸着して低回収となり、その後急速な流出による過回収が認められた。

一方、試料 S1 について同様に試験した結果、SL の流出パターンは図 1 の ii のとおり、用いた塩基性アルミナの種類による影響は認められなかった。

なお、NR は、SL にメチル基が 1 つ付加された化学構造であり、NR の塩基性アルミナにおける挙動が SL に酷似していることが千原ら²⁾の検討結果から推測されたことから、NR についての流出状況の比較は省略した。

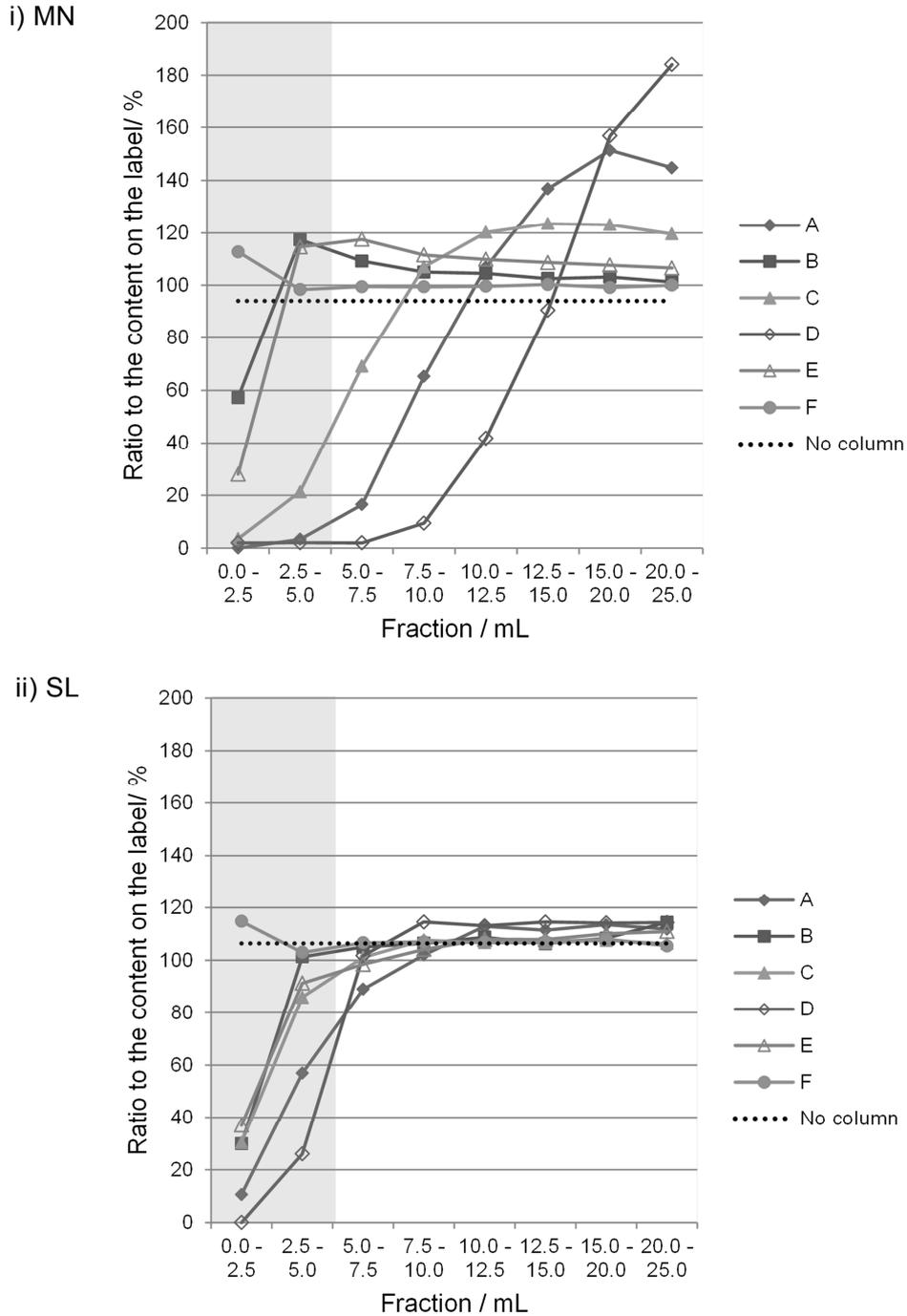


図1 塩基性アルミナカラムからの流出パターン

Ratio to the content on the label : 各画分における定量値の表示量に対する割合 (n = 2)

No column : 試料溶液をカラム処理せずに得られた定量値

灰色範囲 : 飼料分析基準では捨てる画分に該当

3.2 塩基性アルミナ (活性度 III) からの流出状況の確認

塩基性アルミナの活性度 (吸着力) は水分含量に大きく影響されることから, 塩基性アルミナ A~F の水分を測定した. その結果, F が約 6 %であった他はすべて水分をほとんど含まないものであったことから, F は Brockmann スケールの活性度 III に相当し, A~E はいずれも活性度 I に

相当した。

塩基性アルミナの活性度の違いによって、カラム処理における MN の吸着の度合いが異なることが推測されたことから、水を加えて塩基性アルミナの活性度を下げることが検討された。MN の流出パターンが F に最も近似していた B 及び最も相違していた D について、2.2 の 4) により活性度 III に調整し、再度 2.4.1 により分画試験を行った。なお、カラム処理に供する試料溶液は、試料 M7 の抽出液 100 mL に対して MN 標準液を 1600 µg(力価)相当量加えたものを用いた。

その結果、B (act.III)及び D (act.III)を用いた場合の MN の流出パターンは図 2 のとおり、図 1 の i に示した B 及び D のそれらとは異なることが認められ、特に B (act.III)の挙動は、F に近似する効果が認められた。

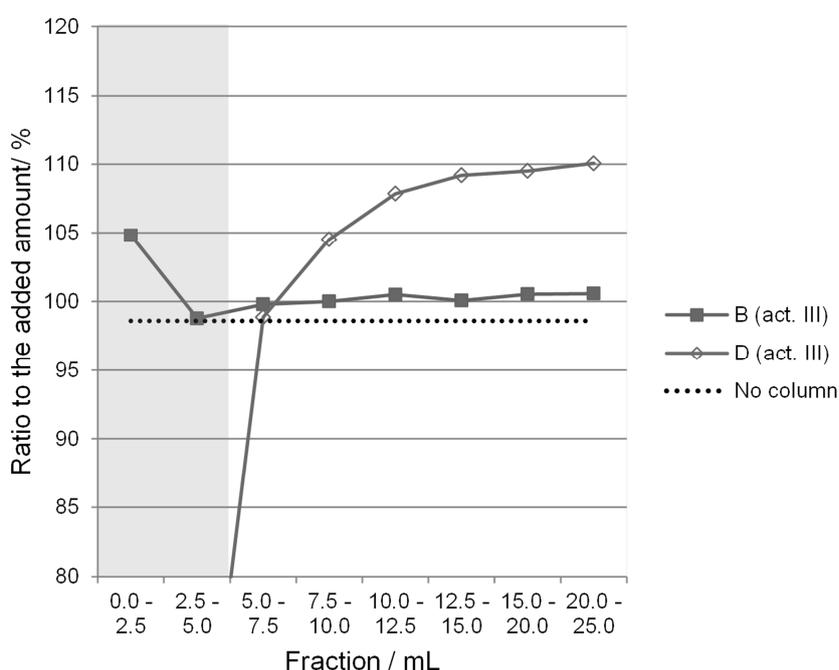


図 2 塩基性アルミナ（活性度 III）カラムからの流出パターン

Ratio to the added amount：各画分における定量値の添加量に対する割合（ $n = 1$ ）

No column：試料溶液をカラム処理せずに得られた定量値

灰色範囲：飼料分析基準では捨てる画分に該当

3.3 微生物学的定量法による活性度調整の必要性の確認

塩基性アルミナ F に最も近似していた B 及び B (act.III)を用い、2.4.2 に従い F を対照として SL, NR 及び MN の微生物学的定量法による回収率をそれぞれ求めた。

その結果は、表 3 の i ~ iii のとおり、B (act.III)では回収率は各試料でほぼ一致し、B の活性度を活性度 III に調整した効果が認められたが、B では SL 及び NR の試料の一部で回収率が高くなる傾向が認められた。

表3 微生物学的定量法による比較（活性度調整の必要性）

i) MN			ii) SL			iii) NR		
試料	回収率 ^{a)} / %		試料	回収率 ^{a)} / %		試料	回収率 ^{a)} / %	
	B ⁺ vs F	B vs F		B ⁺ vs F	B vs F		B ⁺ vs F	B vs F
M1	98.16	102.35	S1	100.77	99.09	N2	97.99	110.44
M2	100.00	101.04	S2	98.65	101.98	N4	99.18	105.96
M3	100.00	100.27	S3	98.47	106.32	N5	100.73	105.16

a) $n = 1$

B⁺ vs F : 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を B (act.III)により調製した液を用いた.

B vs F : 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を B により調製した液を用いた.

3.4 微生物学的定量法による定量値比較

塩基性アルミナ F の同等品として適当であると考えた B (act.III)は, 検討途中でロット番号が変更となったため, 変更後の Ba (act.III)について, 各抗生物質 5 種類以上の試料を用い, 2.4.2 に従い F を対照とした微生物学的定量法による回収率を求め, その結果を表 4 の i ~ iii に示した. t -検定 (有意水準 5 %) の結果, Ba (act.III)による定量値と F による定量値に有意差は認められなかった. また, Ba (act.III)の F に対する回収率の 95 %信頼区間は, MN で 99.98 ~ 100.38 %, SL で 98.94 ~ 100.50 %, NR で 99.53 ~ 100.93 %と問題のない範囲であったことから, Ba (act.III)を F の同等品として用いることができると判断した.

表4 微生物学的定量法による比較 (Ba (act.III)と現行品 F との同等性の確認)

i) MN		ii) SL		iii) NR	
試料	回収率 ^{a),b)} / %	試料	回収率 ^{a),b)} / %	試料	回収率 ^{a),b)} / %
M1	100.26	S1	99.77	N1	100.36
M2	100.27	S2	100.00	N2	100.19
M3	100.51	S4	97.86	N3	100.96
M4	100.25	S5	99.76	N4	100.73
M5	100.00	S6	100.25	N5	98.91
M6	99.80	S7	100.67		
平均値 / %	100.18	平均値 / %	99.72	平均値 / %	100.23
95 %信頼区間	99.98 ~	95 %信頼区間	98.94 ~	95 %信頼区間	99.53 ~
/ %	100.38	/ %	100.50	/ %	100.93

a) 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を Ba (act.III)により調製した液を用いた.

b) $n = 1$

4 まとめ

飼料分析基準に記載されたポリエーテル系抗生物質 (SL, NR 及び MN) の微生物学的定量法で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナの同等品について検討したところ, 飼料分析基準に規定された Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) の同等品として, Aluminium oxide 90 (Merck Millipore 製. ロット番号 : TA 1929376 442) を活性度 III (水分 6 %) に調整したものが適

当と判断した。

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) 千原 哲夫，橋本 仁康，進藤 富枝：ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナの検討，飼料研究報告，32，81-89 (2007).
- 3) Brockmann, H., Schodder, H.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption, Chem. Ber., 74, 73 (1941).
- 4) 和光純薬工業：製品詳細情報，活性アルミナ，<http://www.siyaku.com/uh/Shs.do?dspCode=W01W0101-0152>，cited 9 July 2015.

精度管理**1 平成 26 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について**

Proficiency Test (in the Fiscal Year 2014)

小塚 健志^{*1}, 藤田 敏文^{*2}, 保田 伊世^{*3},
森口 里美^{*4}, 設楽 賢治^{*5}, 石塚 優香^{*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	子豚期用プレミックス

3 共通試料の調製

3.1 調製年月日

平成 26 年 6 月 26 日及び 6 月 27 日

3.2 調製場所

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

3.3 調製方法

1) A 試料

粉碎した後, 1 mm のふるい目を通過させた幼令肉用牛育成用配合飼料 80 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. その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後, 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 380 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

*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 肥飼料安全検査部

*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, 現 肥飼料安全検査部

*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
	1	1	8	9	1	1	4
区画番号	5	6	2	2	4	3	5
	7	3	3	7	8	9	7
	9	4	5	6	6	2	8

2) B 試料

1 mm のふるい目を通過させた魚粉 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 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 に示した 10 種類の原料（総量 80 kg）を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料を用い、A 試料と同様に試料 380 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	ふすま	8
小麦	12	なたね油かす	7
大豆油かす	10	魚粉	3
米ぬか	10	炭酸カルシウム	3
ビートパルプ	10	食塩	2

4) D 試料

子豚期用プレミックス 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 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その混合割合の推定

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 26 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（182 ページ）による。

5 共通試料の均質性確認

A 及び B 試料では粗たん白質及び粗灰分，D 試料では銅及び亜鉛の分析によって，Thompson らの harmonized protocol¹⁾に基づき，各試料の均質性を確認した。

ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析した結果を表 3 に，また，その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 4 に示した。

いずれの試料においても，分散比 F_0 は F 境界値を下回り，有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず，試料の均質性に問題はないと判断した。

表 3 A, B 及び D 試料の分析結果

試料 No.	A試料				B試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	18.13	18.13	5.35	5.29	65.36	65.43	15.40	15.36	5.22	4.94	25.92	26.10
2	17.98	18.08	5.33	5.34	65.94	65.30	15.17	15.38	5.08	4.99	26.43	25.68
3	18.16	18.22	5.39	5.31	65.82	66.34	15.41	15.27	5.28	5.40	25.27	26.02
4	18.16	18.00	5.38	5.40	65.24	65.96	15.36	15.20	5.21	5.00	25.84	25.81
5	18.08	18.23	5.39	5.32	64.62	65.35	15.45	15.39	5.20	5.00	25.72	26.42
6	18.16	18.12	5.37	5.34	65.11	65.96	15.41	15.40	5.24	5.17	25.84	26.06
7	18.14	18.22	5.36	5.38	65.48	65.49	15.25	15.38	5.13	5.00	25.77	25.43
8	18.08	18.06	5.34	5.36	65.75	66.13	15.26	15.35	5.11	5.05	26.00	25.76
9	17.99	18.01	5.31	5.35	65.12	65.21	15.11	15.33	4.97	4.55	25.87	26.92
10	18.16	18.06	5.41	5.34	65.08	66.58	15.24	15.15	5.03	5.13	25.58	25.43

表 4 A, B 及び D 試料の分散分析結果

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	F境界値	
		S	φ	$V=S/\varphi$	$F_0=V_A/V_E$	$F(\alpha=0.05)$	
A試料	粗たん白質	試料間 A	0.0712	9	0.0079	1.97	3.02
		分析誤差 E	0.0403	10	0.0040		
		総計 T	0.1115	19			
	粗灰分	A	0.0082	9	0.0009	0.77	3.02
		E	0.0118	10	0.0012		
		T	0.0200	19			
B試料	粗たん白質	A	2.0258	9	0.2251	0.93	3.02
		E	2.4306	10	0.2431		
		T	4.4565	19			
	粗灰分	A	0.1006	9	0.0112	1.27	3.02
		E	0.0881	10	0.0088		
		T	0.1887	19			
D試料	銅	A	0.3773	9	0.0419	2.11	3.02
		E	0.1984	10	0.0198		
		T	0.5757	19			
	亜鉛	A	1.2584	9	0.1398	0.93	3.02
		E	1.4975	10	0.1497		
		T	2.7559	19			

6 参加試験室

- 6.1 総数 240
- うち 飼料検査指導機関…45
 - 飼料製造業者関係…157
 - 飼料添加物製造業者関係…13
 - 民間分析機関等…25
- 6.2 試料別参加試験室数
- A 試料…237
 - B 試料…234
 - C 試料…128
 - D 試料…97

7 分析成績及び解析結果並びに鑑定成績

7.1 分析成績及び解析結果

A, B 及び D 試料について, その分析成績を表 5 に, ヒストグラムを図 1 に, また, 解析結果を表 6~8 に示した.

分析値の解析は, ロバスト法に基づき以下の手順により行った.

式 1 により頑健な標準偏差の推定量として NIQR (Normalized inter quartile range; 標準四分位範囲) を求めた後, 式 2 により各分析値の z -スコアを求めた. なお, 各四分位数は, 表計算ソフトウェア Microsoft Excel の関数 QUARTILE.INC を用いて求めた.

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

a : 第 1 四分位数

c : 第 3 四分位数

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

x : 各試験室の分析値

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 鑑定成績

C 試料について, その鑑定成績を表 9 及び 10 に示した.

の分析成績 (2)

B試料				D試料				試験番号
水分 分析値 (%) No. z-score	粗たん白質 分析値 (%) No. z-score	粗灰分 分析値 (%) No. z-score	カドミウム 分析値 (g/トン) No. z-score	エトキシキン 分析値 (g/トン) No. z-score	銅 分析値 (g/kg) No. z-score	亜鉛 分析値 (g/kg) No. z-score	クエン酸モランテル 分析値 (g/kg) No. z-score	
10.60 1 0.41	65.00 4 -0.81	15.21 1 -0.83	1.16 2 0.29		5.04 1 -0.29	26.10 1 0.00	14.0 1 -1.10	96
10.68 1 0.77	65.71 3 0.04	15.35 1 0.62			5.95 1 <u>3.24</u>			97
10.53 1 0.09	66.16 3 0.59	15.33 1 0.41						98
10.54 1 0.13	65.31 1 -0.44	15.43 1 1.45						100
10.87 1 1.64	66.39 3 0.88	15.25 1 -0.41	1.19 2 0.74	304.9 1 0.15	5.13 1 0.05	26.20 1 0.11		101
	65.37 4 -0.36							101
10.59 1 0.36	65.32 4 -0.42	15.24 1 -0.51	1.14 2 0.00	312.6 1 0.49	5.16 1 0.17	27.37 1 1.47	14.3 1 -0.36	103
10.57 1 0.27	65.89 3 0.26	15.34 1 0.51		311.0 1 0.42	5.16 1 0.17	25.46 1 -0.74	13.8 1 -1.59	104
	64.65 4 -1.24							104
	66.73 3 1.29							105
	65.63 4 -0.04							105
								106
9.92 1 -2.69	66.20 3 0.64	15.06 1 -2.38	1.14 1 0.00		5.55 1 1.68	26.30 1 0.23		107
10.58 1 0.32	65.10 2 -0.69	15.46 1 1.76					15.4 1 2.33	108
	66.40 3 0.89							109
10.34 1 -0.77	66.36 3 0.84	15.38 1 0.93						110
10.44 1 -0.32	65.58 1 -0.11	15.22 1 -0.72	1.11 2 -0.44		5.28 1 0.64	26.57 1 0.54		111
	66.69 3 1.24							111
10.56 1 0.22	63.98 4 -2.06	15.27 1 -0.20		246.1 1 -2.42				113
10.51 1 0.00	66.46 3 0.96	15.24 1 -0.51		215.0 1 <u>-3.79</u>	4.13 1 <u>-3.82</u>	24.13 1 -2.29	14.3 1 -0.36	114
10.32 1 -0.86		15.38 1 0.93	0.98 2 -2.39		5.17 1 0.21	26.26 1 0.18	13.9 1 -1.34	117
10.69 1 0.82				277.2 1 -1.06	5.15 1 0.13	24.99 1 -1.29	14.5 1 0.12	118
10.78 2 1.23	66.04 3 0.45	15.42 2 1.34						119
	65.06 3 -0.74							120
10.63 1 0.54	65.66 4 -0.01	15.27 1 -0.20	1.18 1 0.59	311.9 1 0.46	5.37 1 0.98	26.07 1 -0.03		121
	66.40 3 0.89							122
10.54 1 0.13	64.13 1 -1.88	15.36 1 0.72	1.14 2 0.00		5.29 1 0.67	26.09 1 -0.01		123
								124
10.57 1 0.27	65.13 4 -0.66	15.27 1 -0.20			5.27 1 0.60	24.42 1 -1.95		125
10.72 1 0.96	65.98 4 0.37	15.33 1 0.41						127
9.62 1 <u>-4.06</u>					5.36 1 0.95	25.40 1 -0.81	14.3 1 -0.36	129
10.54 1 0.13	65.74 3 0.08	15.32 1 0.31	1.16 2 0.29		5.10 1 -0.05	26.06 1 -0.04		130
8.89 1 <u>-7.40</u>	64.81 1 -1.05	15.33 1 0.41			5.17 1 0.21	26.16 1 0.06		131
10.66 1 0.68	65.43 1 -0.29	15.28 1 -0.10	1.20 1 0.89		5.02 1 -0.36			132
	65.90 3 0.28							132
	65.88 4 0.25							132
	65.84 2 0.20	14.70 1 <u>-6.12</u>						133
10.65 1 0.64	65.38 4 -0.35	15.25 1 -0.41	1.16 2 0.29		5.18 1 0.25	26.18 1 0.09		134
10.42 1 -0.41	65.36 1 -0.37	15.46 1 1.76	1.20 2 0.89		5.48 1 1.41	39.16 1 <u>15.18</u>		135
10.13 1 -1.73	66.39 4 0.88	15.13 1 -1.66						136
10.76 1 1.14	65.74 4 0.08	15.27 1 -0.20	1.13 1 -0.14	308.9 1 0.32	5.32 1 0.79	25.71 1 -0.45		137
10.70 1 0.86	66.04 3 0.45	15.36 1 0.72						138
10.68 1 0.77	65.53 4 -0.17	15.33 1 0.41	1.11 2 -0.44	258.1 1 -1.90	4.68 1 -1.68	24.53 1 -1.82	14.0 1 -1.10	139
10.64 1 0.59	65.64 3 -0.03	15.12 1 -1.76	1.15 1 0.14					140
	64.79 4 -1.07							140
10.76 1 1.14	65.87 4 0.24	15.33 1 0.41	1.16 2 0.29					141
								142
10.11 1 -1.82	68.46 2 <u>3.41</u>	15.44 1 1.55						143
10.43 1 -0.36	64.88 2 -0.96	15.07 1 -2.28	1.21 2 1.04	275.3 1 -1.14	5.26 1 0.56	26.62 1 0.60	14.7 1 0.61	144
10.60 1 0.41	64.56 2 -1.35	15.30 1 0.10						145
10.61 1 0.45	64.71 1 -1.17	15.35 1 0.62	1.10 2 -0.59	301.9 1 0.02	5.04 1 -0.29	26.22 1 0.13	14.6 1 0.36	164
	65.14 3 -0.64							164
10.52 1 0.04	65.46 4 -0.25	21.38 1 <u>63.19</u>						165
10.50 1 -0.04	65.58 3 -0.11	15.13 1 -1.66						166
10.36 1 -0.68	64.80 4 -1.06	15.29 1 0.00		325.0 1 1.03			14.4 1 -0.12	167
10.74 1 1.05	66.21 3 0.66	15.25 1 -0.41						168
10.59 1 0.36	65.85 3 0.22	15.20 1 -0.93						169
10.48 1 -0.13	65.20 4 -0.57	15.18 1 -1.14	1.26 2 1.79	310.1 1 0.38	5.10 1 -0.05	26.44 1 0.39	14.3 1 -0.36	170
10.59 1 0.36	64.38 4 -1.57	15.25 1 -0.41						171
10.72 1 0.96	66.51 3 1.02	15.30 1 0.10		289.0 1 -0.54	4.73 1 -1.49	25.29 1 -0.94		172
10.63 1 0.54	65.56 4 -0.13	15.33 1 0.41						173
10.40 1 -0.50	65.39 4 -0.34	15.32 1 0.31						174
10.69 1 0.82	66.24 3 0.69	15.34 1 0.51	1.11 2 -0.44		4.58 1 -2.07	24.77 1 -1.54	14.2 1 -0.61	175
								175
10.82 1 1.41	65.52 4 -0.18	15.02 1 -2.80					14.7 1 0.61	176
10.78 1 1.23	65.54 4 -0.15	14.97 1 <u>-3.32</u>						177
10.72 1 0.96	66.93 3 1.54	15.30 1 0.10						178
								179
9.23 1 <u>-5.85</u>	64.67 4 -1.22	15.17 1 -1.24						180
10.71 1 0.91	65.17 1 -0.61	15.46 1 1.76						181
10.76 1 1.14	66.05 3 0.46	15.37 1 0.83						182
								183
10.56 1 0.22	65.35 1 -0.39	15.29 1 0.00						184
10.38 1 -0.59		15.25 1 -0.41						185
10.63 1 0.54		15.07 2 -2.28						186

表 5 A, B 及び D 試料

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 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	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
187	12.92	1 -0.13	18.03	4 -0.24	3.57	1 1.88	4.97	1 -0.17	5.12	1 -2.11	0.638	2 -0.91	0.599	1 0.64				
188	12.82	1 -0.56	17.97	4 -0.54	3.19	2 -0.67	6.24	2 2.67	5.37	1 0.28	0.730	2 1.90	0.597	1 0.48				
190	12.98	1 0.13	17.09	2 <u>-4.94</u>	3.22	1 -0.47	5.36	2 0.69	5.39	1 0.48	0.646	2 -0.67	0.606	1 1.20				
191	12.43	1 -2.26	18.16	2 0.39	3.31	1 0.13	5.27	2 0.49	5.47	1 1.25	0.677	2 0.27	0.587	1 -0.32				
192	12.99	1 0.17	17.94	4 -0.69	3.40	1 0.74	4.27	2 -1.75	5.33	1 -0.09	0.592	2 -2.33	0.743	1 <u>12.24</u>				
194	13.32	1 1.61	17.57	4 -2.54	3.01	2 -1.88	4.81	3 -0.53	5.21	1 -1.25	0.695	2 0.82	0.573	1 -1.44				
195	13.23	1 1.21	18.17	2 0.44	3.42	1 0.87	4.62	2 -0.96	5.27	1 -0.67	0.674	1 0.18	0.607	1 1.28				
196	12.93	1 -0.08	18.15	2 0.34	3.38	1 0.60	4.87	3 -0.40	5.45	1 1.05	0.672	2 0.12	0.587	1 -0.32				
196			18.07	3 -0.04														
197	13.10	1 0.65			3.35	1 0.40	5.87	2 1.84	5.52	1 1.73	0.669	2 0.03	0.574	1 -1.36	31.4	1 -0.66		
198	13.03	1 0.34	17.86	4 -1.09	3.04	1 -1.68			5.27	1 -0.67								
199	12.64	1 -1.34	18.25	3 0.84	3.21	2 -0.53			5.42	1 0.77								
200	12.41	1 -2.34	18.16	2 0.39	3.30	1 0.06												
201	11.92	1 <u>-4.48</u>	17.29	4 <u>-3.94</u>	2.94	2 -2.36												
202	13.05	1 0.43	18.02	2 -0.29	3.24	1 -0.33	4.82	2 -0.51	5.20	1 -1.34	0.661	2 -0.21	0.594	1 0.24				
203	13.06	1 0.47	17.79	2 -1.44	3.62	1 2.22	5.29	2 0.53	5.18	1 -1.54	0.641	2 -0.82	0.578	1 -1.04				
204	12.96	1 0.04	17.91	4 -0.84	3.12	2 -1.14	4.95	1 -0.22	5.47	1 1.25	0.665	2 -0.09	0.595	1 0.32				
205	12.40	1 -2.39	17.92	4 -0.79	3.35	1 0.40	4.96	1 -0.20	5.44	1 0.96								
206	13.03	1 0.34	18.25	3 0.84	3.37	1 0.53	4.48	1 -1.28	5.34	1 0.00	0.721	1 1.62	0.593	1 0.16				
207	13.35	1 1.74			4.28	2 -1.73			5.38	1 0.38					30.7	1 -1.05		
208	12.99	1 0.17	18.24	2 0.79	3.28	1 -0.06			5.64	1 2.89								
209	12.50	1 -1.95	17.78	4 -1.49	3.18	1 -0.74	4.70	2 -0.78	5.28	1 -0.57	0.665	2 -0.09	0.563	1 -2.25			29.9	3 0.17
210	12.65	1 -1.30	18.22	3 0.69	3.15	2 -0.94			5.51	1 1.63								
211	13.05	1 0.43	18.08	4 0.00	3.56	1 1.82	4.58	2 -1.05	5.35	1 0.09	0.641	2 -0.82	0.592	1 0.08				
212	13.33	1 1.65	18.40	3 1.59	3.20	1 -0.60	5.18	2 0.29	5.21	1 -1.25								
213	12.67	1 -1.21							5.48	1 1.34								
214	13.33	1 1.65	17.93	2 -0.74	3.30	1 0.06	5.10	2 0.11	4.99	1 <u>-3.37</u>	0.572	2 -2.94	0.581	1 -0.80				
215	13.40	1 1.95	18.18	2 0.49	3.21	1 -0.53	5.13	2 0.17	5.25	1 -0.86	0.689	2 0.64	0.591	1 0.00				
216	12.95	1 0.00	18.07	3 -0.04	3.33	1 0.26	4.58	2 -1.05	5.30	1 -0.38	0.643	1 -0.76	0.597	1 0.48				
217	12.95	1 0.00	18.22	3 0.69	3.04	2 -1.68			5.42	1 0.77	0.641	2 -0.82	0.560	1 -2.49				
218	13.24	1 1.26	18.18	4 0.49	3.18	1 -0.74			5.19	1 -1.44					31.0	2 -0.89		
219	12.82	1 -0.56	18.17	3 0.44	3.07	2 -1.48	4.77	2 -0.62	5.37	1 0.28							30.1	3 0.29
220	12.32	1 -2.74	18.08	3 0.00	3.12	2 -1.14	4.85	1 -0.44	5.37	1 0.28	0.710	2 1.28	0.590	1 -0.08				
221	13.27	1 1.39	18.14	3 0.29	3.51	1 1.48	4.85	2 -0.44	5.37	1 0.28	0.645	2 -0.70	0.580	1 -0.88	32.3	1 -0.16		
222	13.00	1 0.21	18.15	1 0.34	3.32	1 0.20	4.70	2 -0.78	5.43	1 0.86	0.642	1 -0.79	0.590	1 -0.08				
223	13.06	1 0.47	18.09	4 0.04	3.35	2 0.40	4.92	2 -0.29	5.23	1 -1.05	0.640	1 -0.85	0.603	1 0.96				
224	12.76	1 -0.82	18.10	3 0.09	3.23	1 -0.40	4.57	2 -1.07	5.27	1 -0.67	0.722	2 1.65	0.583	1 -0.64	31.4	2 -0.66		
225	12.37	1 -2.52	17.94	2 -0.69	3.21	1 -0.53	4.74	2 -0.69	5.27	1 -0.67	0.651	2 -0.52	0.597	1 0.48				
226	12.53	1 -1.82	18.19	4 0.54	3.19	1 -0.67	4.07	2 -2.20	5.31	1 -0.28	0.635	1 -1.01	0.597	1 0.48	35.1	2 1.39		
227	12.59	1 -1.56	18.07	4 -0.04	3.00	2 -1.95	5.19	4 0.31	5.42	1 0.77	0.799	1 <u>4.01</u>	0.586	1 -0.40			32.7	3 1.81
228	13.06	1 0.47	18.11	3 0.14	3.55	1 1.75	5.19	2 0.31	5.37	1 0.28	0.665	2 -0.09	0.594	1 0.24				
229	13.07	1 0.52	17.54	2 -2.69	3.24	1 -0.33	4.69	2 -0.80	5.12	1 -2.11	0.638	3 -0.91	0.567	2 -1.93				
230	12.51	1 -1.91	17.59	1 -2.44	3.23	1 -0.40	4.43	1 -1.39	5.04	1 -2.89	0.666	3 -0.06	0.596	1 0.40				
231	13.33	1 1.65	17.73	1 -1.74	3.37	1 0.53	5.57	2 1.16	5.39	1 0.48	0.630	2 -1.16	0.599	1 0.64				
232	13.08	1 0.56	18.18	3 0.49	3.59	1 2.02	5.45	2 0.89	5.30	1 -0.38	0.633	2 -1.07	0.598	1 0.56			28.1	3 -0.87
233	12.40	1 -2.39	18.54	3 2.29	3.00	2 -1.95	5.88	2 1.86	5.38	1 0.38								
234	12.88	1 -0.30	18.16	2 0.39	3.33	1 0.26	5.00	2 -0.11	5.47	1 1.25	0.691	2 0.70	0.578	1 -1.04			31.0	4 0.82
235	12.92	1 -0.13	18.10	4 0.09	3.46	1 1.14	5.31	1 0.58	5.20	1 -1.34	0.675	1 0.21	0.596	1 0.40				
236	12.54	1 -1.78	17.66	4 -2.09	3.36	1 0.47	5.21	3 0.35	5.06	1 -2.69	0.617	2 -1.56	0.585	1 -0.48				
237	13.16	1 0.91	18.05	2 -0.14	3.53	1 1.61	4.67	2 -0.85	5.36	1 0.19	0.679	3 0.33	0.587	1 -0.32				
238	13.04	1 0.39													34.9	1 1.27		
239	13.07	1 0.52	18.28	2 0.99	3.42	1 0.87			5.51	1 1.63								
240	12.87	1 -0.34	18.04	2 -0.19	3.36	1 0.47	4.67	2 -0.85	5.38	1 0.38	0.660	1 -0.24	0.595	1 0.32			28.5	3 -0.64
254	13.16	1 0.91	18.15	4 0.34	3.47	1 1.21	5.42	2 0.83	5.39	1 0.48	0.646	2 -0.67	0.599	1 0.64				
255	12.93	1 -0.08	18.31	3 1.14	3.34	1 0.33			5.32	1 -0.19	0.727	2 1.80	0.589	1 -0.16				
256	12.67	1 -1.21	17.98	2 -0.49	3.56	1 1.82	5.80	2 1.68	5.42	1 0.77								
257	12.84	1 -0.47	18.07	3 -0.04	3.17	2 -0.80	5.06	3 0.02	5.39	1 0.48	0.653	2 -0.45	0.574	1 -1.36				
258	12.89	1 -0.26	17.86	3 -1.09					5.39	1 0.48					29.1	2 -1.94		
259	13.99	1 <u>4.52</u>	18.26	2 0.89	3.76	1 <u>3.17</u>	5.21	2 0.35	5.29	1 -0.48	0.685	1 0.52	0.572	1 -1.53				
260	12.65	1 -1.30	17.99	4 -0.44	3.31	1 0.13	4.29	2 -1.70	5.34	1 0.00	0.698	2 0.91	0.614	1 1.85				
261	11.19	1 <u>-7.65</u>	18.28	3 0.99					5.36	1 0.19	0.705	2 1.13	0.591	1 0.00				
262	12.77	1 -0.78	18.15	3 0.34	3.49	2 1.34	5.02	2 -0.06	5.35	1 0.09	0.657	2 -0.33	0.579	1 -0.96				
263	12.98	1 0.13	18.20	3 0.59	3.61	2 2.15	4.31	2 -1.66	5.33	1 -0.09	0.665	2 -0.09	0.587	1 -0.32	33.4	1 0.44		
264	13.14	1 0.82	18.07	1 -0.04	3.16	1 -0.87	5.34	2 0.65	5.51	1 1.63	0.646	2 -0.67	0.593	1 0.16			27.5	4 -1.23
265	12.93	1 -0.08	18.09	3 0.04	3.29	2 0.00			5.10	1 -2.31	0.713	2 1.37	0.602	1 0.88	31.9	2 -0.38		
266	12.85	1 -0.43	18.10	3 0.09	3.25	2 -0.26	4.76	2 -0.65	5.34	1 0.00	0.659	2 -0.27	0.593	1 0.16				
267	12.57	1 -1.65	18.48	3 1.99	3.14	1 -1.01	4.81	2 -0.53	5.25	1 -0.86	0.671	2 0.09	0.562	1 -2.33				
268	13.05	1 0.43	18.63	3 2.74	3.37	2 0.53	4.44	2 -1.37	5.49	1 1.44	0.652	2 -0.49	0.586	1 -0.40				
269	13.29	1 1.47	17.69	2 -1.94	3.48	1 1.28	4.46	2 -1.32	5.03	1 -2.98	0.702	2 1.04	0.599	1 0.64				
270	13.01	1 0.26	17.84	3 -1.19	3.45	1 1.07	4.20	2 -1.91	5.37	1 0.28	0.655	2 -0.39	0.575	1 -1.28			32.2	3 1.52
271	12.69	1 -1.13	18.26	3 0.89					5.41	1 0.67	0.648	2 -0.61	0.624	1 2.65				
272	13.21	1 1.13	18.04	4 -0.19	3.41	1 0.80	5.10	2 0.11	5.25	1 -0.86	0.694	1 0.79	0.614	1 1.85			34.6	3 2.93
273	12.44	1 -2.21	18.22															

表 5 A, B 及び D 試料

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 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	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
276	12.98	1 0.13	18.17	3 0.44	3.54	2 1.68	4.68	1 -0.83	5.29	1 -0.48	0.709	2 1.25	0.602	1 0.88	32.6	2 0.00	30.0	3 0.23
277	12.79	1 -0.69	18.43	3 1.74	3.13	2 -1.07	4.55	2 -1.12	5.27	1 -0.67	0.660	2 -0.24	0.570	1 -1.69				
278	11.42	1 <u>-6.65</u>	18.53	3 2.24	3.43	1 0.94	4.97	2 -0.17	5.62	1 2.69	0.710	2 1.28	0.620	1 2.33	27.1	1 <u>-3.05</u>		
279	13.24	1 1.26	18.19	3 0.54	3.44	2 1.01	5.72	3 1.50	5.37	1 0.28	0.710	2 1.28	0.600	1 0.72				
280	13.01	1 0.26	18.02	4 -0.29	3.32	1 0.20	5.60	3 1.23	5.34	1 0.00	0.690	2 0.67	0.587	1 -0.32				
281	13.70	1 <u>3.26</u>	18.50	2 2.09	3.45	1 1.07			5.41	1 0.67	0.644	2 -0.73	0.600	1 0.72				
282	13.33	1 1.65	18.06	3 -0.09	3.05	2 -1.61			5.28	1 -0.57	0.649	2 -0.58	0.572	1 -1.53				
283	12.07	1 <u>-3.82</u>	18.63	3 2.74	3.19	1 -0.67			5.38	1 0.38	0.654	2 -0.42	0.597	1 0.48				
284	12.59	1 -1.56	17.48	4 -2.99	3.39	1 0.67	5.53	2 1.07	5.38	1 0.38	0.618	2 -1.53	0.592	1 0.08				
285	12.57	1 -1.65	17.99	2 -0.44	3.57	2 1.88	5.11	4 0.13	5.43	1 0.86	0.806	1 <u>4.23</u>	0.594	1 0.24				
286	12.92	1 -0.13	17.89	4 -0.94	3.11	1 -1.21	6.53	2 <u>3.32</u>	5.16	1 -1.73								
287	13.03	1 0.34	17.89	2 -0.94	3.59	1 2.02			5.26	1 -0.77								
288	12.18	1 <u>-3.35</u>	17.50	2 -2.89	3.24	1 -0.33			5.01	1 <u>-3.17</u>								
289	13.06	1 0.47	18.42	1 1.69	3.25	1 -0.26	3.63	1 <u>-3.19</u>	5.43	1 0.86								
290	12.78	1 -0.73	18.06	4 -0.09	3.34	1 0.33			5.59	1 2.40								
291	12.86	1 -0.39	18.06	3 -0.09	3.23	1 -0.40			5.43	1 0.86								
292	12.47	1 -2.08	18.23	1 0.74	3.38	1 0.60			5.64	1 2.89			0.567	1 -1.93				
293	12.53	1 -1.82	18.04	4 -0.19	3.15	2 -0.94	4.75	1 -0.67	5.36	1 0.19	0.634	2 -1.04	0.600	1 0.72				
294	12.97	1 0.08	17.98	4 -0.49	3.40	1 0.74			5.24	1 -0.96								
295	12.78	1 -0.73	18.04	2 -0.19	3.25	2 -0.26			5.49	1 1.44	0.613	2 -1.68	0.587	1 -0.32				
296	13.10	1 0.65	17.75	4 -1.64	3.38	2 0.60			13.00	1 <u>73.80</u>								
297	12.08	1 <u>-3.78</u>	18.28	3 0.99					5.38	1 0.38								
298	12.50	1 -1.95	18.30	3 1.09	3.11	2 -1.21	5.32	3 0.60	5.32	1 -0.19	0.657	2 -0.33	0.597	1 0.48				
299	13.14	1 0.82							4.84	1 <u>-4.81</u>	0.709	1 1.25	0.588	1 -0.24				
300	13.05	1 0.43															29.1	3 -0.29
301	12.01	1 <u>-4.09</u>							5.52	1 1.73	0.687	2 0.58					28.8	3 -0.46
302	12.41	1 -2.34	17.32	3 <u>-3.79</u>	3.48	1 1.28	4.81	3 -0.53	5.37	1 0.28	0.712	2 1.34	0.621	1 2.41				
303			18.06	3 -0.09	3.33	2 0.26												
304	12.91	1 -0.17	18.26	2 0.89	3.30	1 0.06	4.54	2 -1.14	5.27	1 -0.67	0.662	2 -0.18	0.591	1 0.00				
305																		

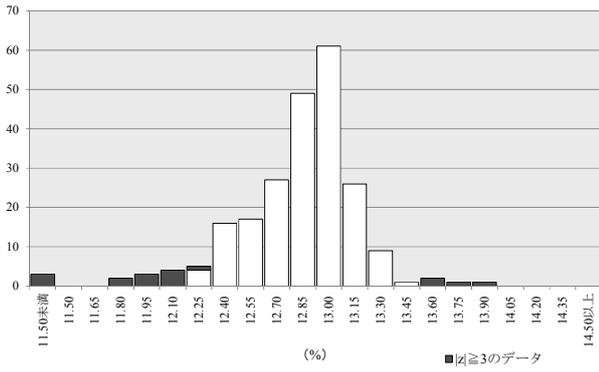
注1：z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。
 注2：各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン	モネンシンナトリウム (MN)
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	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	1 迅速定量法
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 原子吸光度法	2 その他	2 フローインジェクション法
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他		3 液体クロマトグラフ法
	4 自動分析機		4 その他				4 微生物学的定量法
	5 その他						

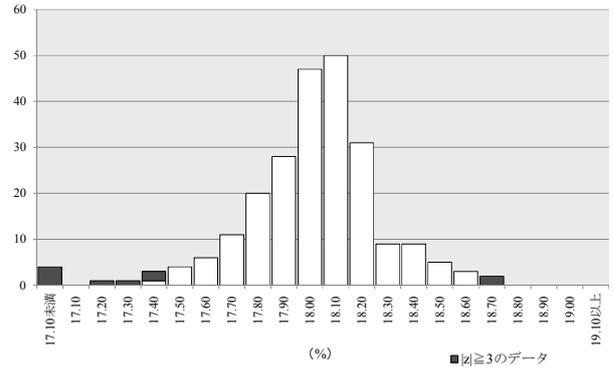
の分析成績 (4)

B試料						D試料						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	
10.62	1 0.50	66.52	3 1.04	15.26	1 -0.31					5.11	1 -0.01	25.75	1 -0.40	16.2	1 <u>4.29</u>	276
10.35	1 -0.73	65.98	3 0.37	15.26	1 -0.31					5.03	1 -0.32	26.08	1 -0.02	11.4	1 <u>-7.48</u>	277
9.21	1 <u>-5.94</u>	66.70	3 1.26	15.51	1 2.28					4.98	1 -0.52	24.07	1 -2.36			278
10.84	1 1.50	66.01	3 0.41	15.30	1 0.10											279
10.42	1 -0.41	65.67	4 0.00	15.26	1 -0.31											280
10.75	1 1.09	66.48	2 0.99	15.27	1 -0.20					5.46	1 1.33	11.32	1 <u>-17.18</u>			281
10.81	1 1.37	66.04	3 0.45	15.22	1 -0.72											282
9.72	1 <u>-3.61</u>	66.62	3 1.16	15.27	1 -0.20											283
10.07	1 -2.01	64.37	4 -1.59	15.32	1 0.31	0.96	1 -2.69			5.64	1 2.03	26.88	1 0.90	15.2	1 1.83	284
10.29	1 -1.00	66.47	2 0.97	15.24	1 -0.51											285
10.54	1 0.13	62.74	4 -3.58	15.21	1 -0.83											286
10.74	1 1.05	65.01	2 -0.80	15.16	1 -1.34											287
10.75	1 1.09	64.56	2 -1.35	14.87	1 <u>-4.35</u>											288
10.70	1 0.86	65.03	1 -0.78	15.17	1 -1.24											289
10.44	1 -0.32	65.69	4 0.02	15.30	1 0.10											290
10.63	1 0.54	66.13	3 0.56	15.24	1 -0.51											291
10.18	1 -1.50	65.44	1 -0.28	15.27	1 -0.20											292
10.27	1 -1.09	64.63	4 -1.27	15.32	1 0.31					6.20	1 <u>4.21</u>	26.56	1 0.53			293
10.66	1 0.68	65.70	4 0.03	15.27	1 -0.20											294
10.55	1 0.18	64.97	2 -0.85	15.35	1 0.62					4.87	1 -0.95	26.49	1 0.45			295
10.77	1 1.18	64.82	4 -1.04	10.63	1 <u>-48.35</u>			320.4	1 0.83							296
10.05	1 -2.10	66.77	3 1.34	15.37	1 0.83											297
10.27	1 -1.09	66.26	3 0.72	15.12	1 -1.76	1.07	2 -1.04			4.46	1 -2.54	27.29	1 1.38			298
10.42	1 -0.41			15.12	1 -1.76	1.16	1 0.29			5.64	1 2.03	26.54	1 0.51			299
10.58	1 0.32					0.42	2 <u>-10.79</u>	312.3	1 0.47	5.02	1 -0.36	25.96	1 -0.16	14.9	1 1.10	300
9.78	1 <u>-3.33</u>			15.44	1 1.55	1.01	2 -1.94			4.90	1 -0.83	26.35	1 0.29	14.7	1 0.61	301
10.30	1 -0.96	66.76	3 1.33	15.24	1 -0.51											302
		66.38	3 0.86													303
10.67	1 0.73	66.02	2 0.42	15.21	1 -0.83	1.07	2 -1.04	294.8	1 -0.29	4.82	1 -1.14	26.17	1 0.08			304
								309.2	1 0.34							305

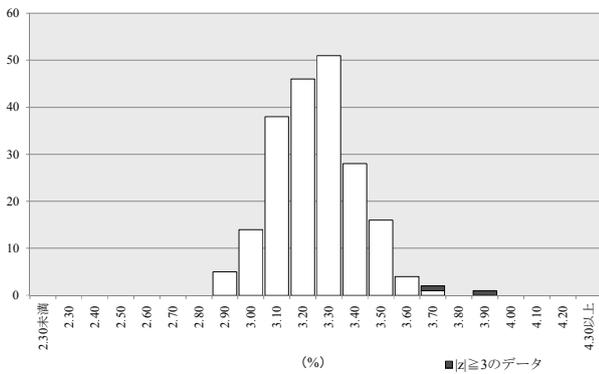
カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
No. 分析方法				
1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他	2 その他
3 その他				



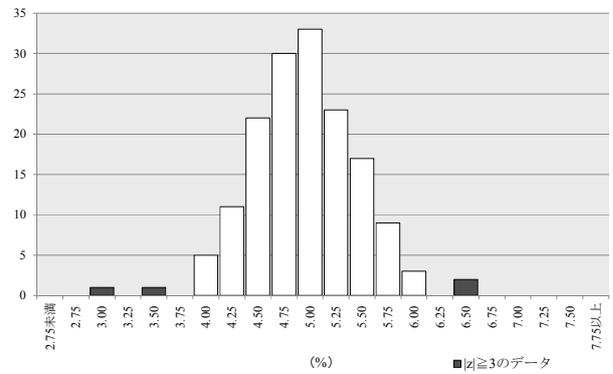
水分 (A 試料)



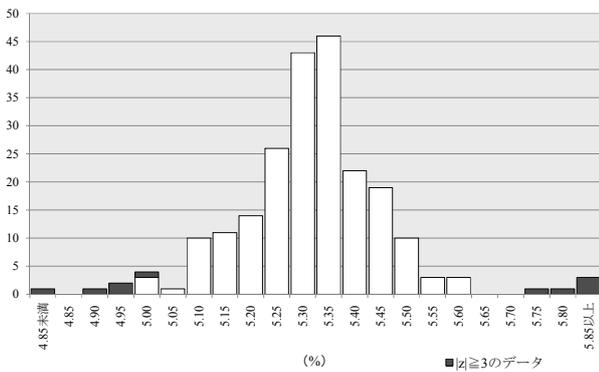
粗たん白質 (A 試料)



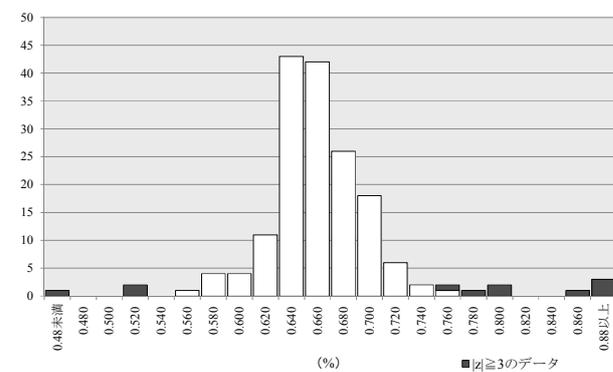
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)



粗灰分 (A 試料)



カルシウム (A 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (1)

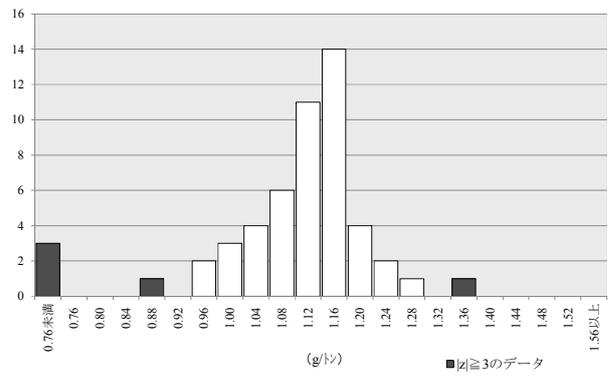
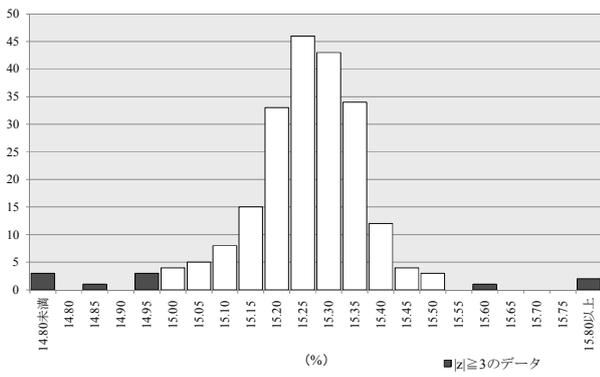
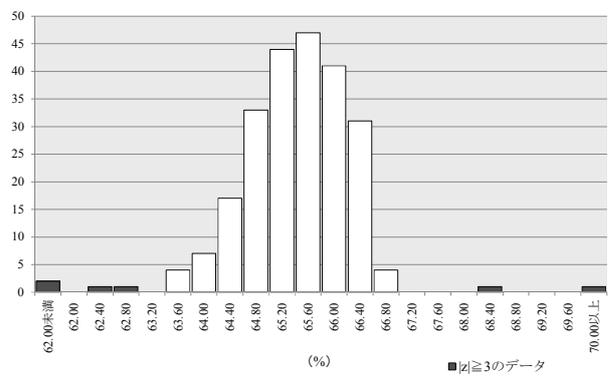
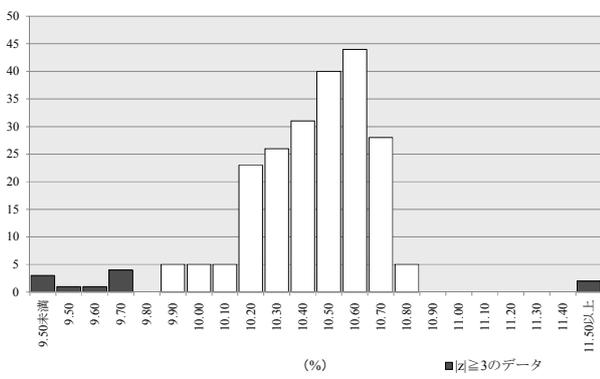
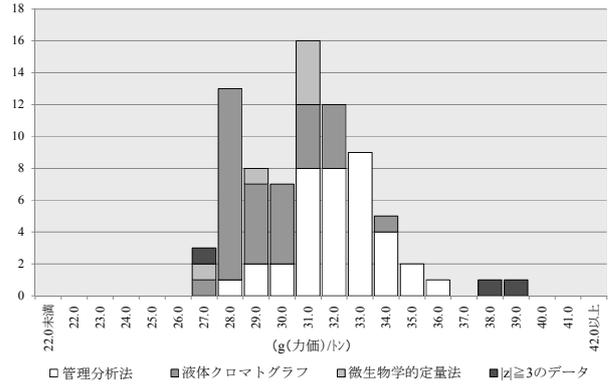
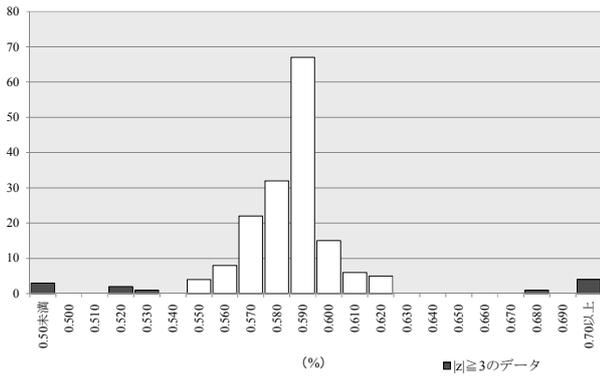
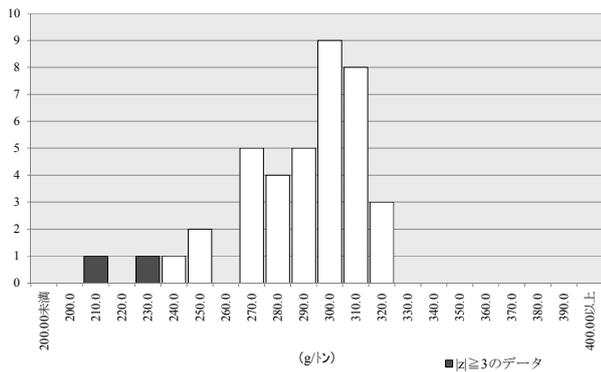
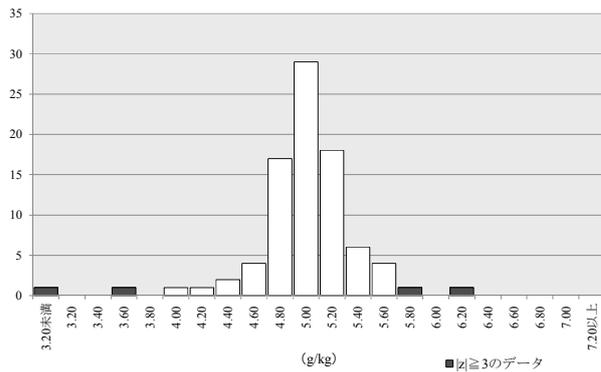


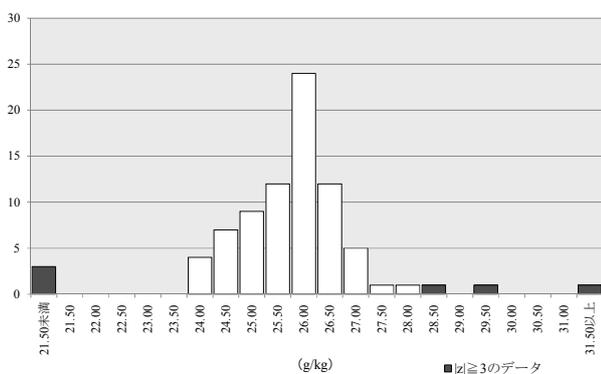
図 1 分析成績のヒストグラム (2)



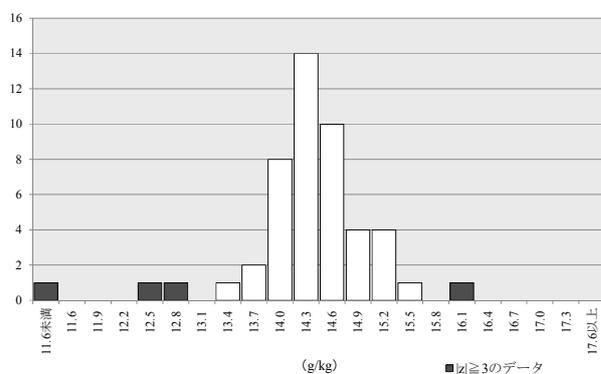
Etokishin (B 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸マンガン (D 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (3)

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	227	238	205	157	221
1 中央値	12.95	18.08	3.29	5.05	5.34
下限境界値 ^{注2}	12.26	17.48	2.85	3.72	5.03
上限境界値 ^{注2}	13.64	18.68	3.73	6.38	5.65
2 平均値	12.93	18.08	3.29	5.07	5.34
標準偏差	0.24	0.22	0.16	0.45	0.12
変動係数 (%)	1.8	1.2	4.8	8.9	2.2
95%信頼区間	12.90~12.96	18.05~18.11	3.27~3.31	4.99~5.14	5.32~5.35

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	169	170	40	38
1 中央値	0.668	0.591	32.6	29.6
下限境界値 ^{注2}	0.570	0.554	27.2	24.5
上限境界値 ^{注2}	0.766	0.628	38.0	34.7
2 平均値	0.669	0.590	32.6	30.0
標準偏差	0.032	0.013	1.8	1.7
変動係数 (%)	4.8	2.3	5.5	5.5
95%信頼区間	0.664~0.674	0.587~0.592	32.0~33.2	29.5~30.5

注 1 区分 1 の数値は報告され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 以上の異常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	223	234	217	52	39
1 中央値	10.51	65.67	15.29	1.14	301.4
下限境界値 ^{注2}	9.85	63.22	15.00	0.94	233.1
上限境界値 ^{注2}	11.17	68.12	15.58	1.34	369.7
2 平均値	10.49	65.64	15.28	1.14	297.1
標準偏差	0.20	0.70	0.10	0.07	19.5
変動係数 (%)	1.9	1.1	0.6	6.2	6.6
95%信頼区間	10.47~10.52	65.54~65.73	15.27~15.30	1.12~1.16	290.8~303.4

注 1 区分 1 の数値は報告され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 以上の異常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	86	81	48
1 中央値	5.12	26.10	14.5
1 下限境界値 ^{注2}	4.34	23.52	13.2
1 上限境界値 ^{注2}	5.89	28.68	15.7
2 平均値	5.12	26.00	14.5
2 標準偏差	0.26	0.85	0.4
2 変動係数 (%)	5.0	3.3	3.1
95 %信頼区間	5.06~5.18	25.81~26.20	14.4~14.6

注 1 区分 1 の数値は報告され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 以上の異常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 混合した原料の鑑定成績

原料名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検出率 (%)	
		検 出			不検出		
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}			計
とうもろこし	35	127	1	0	128	0	100
小麦	12	43	75	3	121	7	95
大豆油かす	10	11	99	11	121	7	95
米ぬか	10	1	39	46	86	42	67
ビートパルプ	10	15	89	10	114	14	89
ふすま	8	24	93	4	121	7	95
なたね油かす	7	6	90	27	123	5	96
魚粉	3	0	10	100	110	18	86
炭酸カルシウム	3	0	0	100	100	28	78
食塩	2	0	0	125	125	3	98

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

表 10 混合した原料以外に検出と報告されたもの

検出原料名	多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計
リン酸カルシウム	0	0	28	28
ごま油かす	0	7	9	16
やし油かす	0	4	6	10
マイロ	3	5	1	9
コーングルテンフィード	0	2	6	8
フェザーミール	0	0	6	6
大麦	1	5	0	6
アルファルファミール	0	4	1	5
ホミニーフード	1	1	3	5
ライ麦	2	1	1	4
あまに油かす	0	2	1	3
スクリーニングペレット	1	1	1	3
精白米	0	1	2	3
チキンミール	0	1	2	3
綿実油かす	0	0	3	3
肉骨粉	0	0	3	3
コーングルテンミール	0	0	2	2
ゼオライト	0	0	2	2
かき殻	0	1	0	1
カポック油かす	0	0	1	1
キャッサバ	0	1	0	1
麦ぬか	0	0	1	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

8.1 A 試料（幼令肉用牛育成用配合飼料）の解析結果

1) 水分

分析値は 227 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 17 件であった。これらを除いた平均値は 12.93 %で、この 95 %信頼区間は 12.90~12.96 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、225 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 17 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.93 %、0.24 %及び 1.8 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた 2 件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 238 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 14 件

であった。これらを除いた平均値は 18.08 %で、この 95 %信頼区間は 18.05~18.11 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、24 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.92 %、0.32 %及び 1.8 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、39 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.02 %、0.23 %及び 1.3 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、92 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.17 %、0.16 %及び 0.9 %であった。

自動分析機による方法では、82 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.01 %、0.17 %及び 1.0 %であった。

3) 粗脂肪

分析値は 205 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらを除いた平均値は 3.29 %で、この 95 %信頼区間は 3.27~3.31 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、133 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.33 %、0.14 %及び 4.2 %であった。

自動分析機による方法では、69 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.21 %、0.16 %及び 4.9 %であった。

4) 粗繊維

分析値は 157 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件であった。これらを除いた平均値は 5.07 %で、この 95 %信頼区間は 4.99~5.14 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法では、20 件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.95 %、0.55 %及び 11.1 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、92 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.96 %、0.46 %及び 9.3 %であった。

自動分析機による方法では、39 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.31 %、0.34 %及び 6.3 %であった。

その他の方法では、自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法等の 6 件の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は 221 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらを除いた平均値は 5.34 %で、この 95 %信頼区間は 5.32~5.35 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、218 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.34 %、0.12 %及び 2.2 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

6) カルシウム

分析値は 169 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 0.669 %で、この 95 %信頼区間は 0.664~0.674 %であった。

分析法別の解析結果は、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では、28 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.681 %、0.048 %及び 7.0 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、133 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.670 %、0.030 %及び 4.5 %であった。

その他の方法では、ICP による測定、キレート滴定法等の 8 件の報告があった。

7) リン

分析値は 170 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 0.590 %で、この 95 %信頼区間は 0.587~0.592 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、164 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.590 %、0.013 %及び 2.1 %であった。

その他の方法では、ICP による測定、モリブデン青吸光光度法等の 6 件の報告があった。

8) モネンシンナトリウム

管理分析法では、分析値はモネンシンナトリウム無添加試料（未配布）のブランク値による補正が必要であるが、今回は補正されない分析値の報告であるため、飼料分析基準による分析値との間に差が生じる可能性があったことから、これらを分離して集計した。

管理分析法（迅速定量法及びフローインジェクション法）では、分析値は 40 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらを除いた平均値は 32.6 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 32.0~33.2 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）では、分析値は 38 件の報告

があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものはなかった。その平均値は 30.0 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間は 29.5~30.5 g(力価)/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

管理分析法・迅速定量法では、28 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 32.8 g(力価)/トン、1.8 g(力価)/トン及び 5.3 %であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、12 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 32.1 g(力価)/トン、1.9 g(力価)/トン及び 6.0 %であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、32 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 29.8 g(力価)/トン、1.5 g(力価)/トン及び 4.9 %であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、6 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 30.9 g(力価)/トン、0.9 g(力価)/トン及び 3.0 %であった。

8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

1) 水分

分析値は 223 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 10.49 %で、この 95 %信頼区間は 10.47~10.52 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、221 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 10.49 %、0.20 %及び 1.9 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた場合等の 2 件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 234 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらを除いた平均値は 65.64 %で、この 95 %信頼区間は 65.54~65.73 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、24 件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.17 %、0.52 %及び 0.8 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、38 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.37 %、0.58 %及び 0.9 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、91 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 66.24 %、0.37 %及び 0.6 %であった。

自動分析機による方法では、81 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.25 %、0.62 %及び 0.9 %であった。

3) 粗灰分

分析値は 217 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらを除いた平均値は 15.28 %で、この 95 %信頼区間は 15.27~15.30 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、214 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 15.28 %、0.09 %及び 0.6 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

4) カドミウム

分析値は 52 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件であった。これらを除いた平均値は 1.14 g/トンで、この 95 %信頼区間は 1.12~1.16 g/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法では、13 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.17 g/トン、0.02 g/トン及び 2.1 %であった。

飼料分析基準・簡易法では、36 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.13 g/トン、0.07 g/トン及び 6.1 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

5) エトキシキン

分析値は 39 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらを除いた平均値は 297.1 g/トンで、この 95 %信頼区間は 290.8~303.4 g/トンであった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 19.5 g/トン及び 6.6 %であった。

8.3 D 試料（子豚期用プレミックス）の解析結果

1) 銅

分析値は 86 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件であった。これらを除いた平均値は 5.12 g/kg で、この 95 %信頼区間は 5.06~5.18 g/kg であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、81 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.13 g/kg、0.26 g/kg 及び 5.1 %であった。

その他の方法では、ICPによる測定等の5件の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は81件の報告があり、ロバスト法によるzスコアの絶対値が3以上のものは6件であった。これらを除いた平均値は26.00 g/kgで、この95%信頼区間は25.81~26.20 g/kgであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、76件（うちzスコアの絶対値が3以上のものは5件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ25.99 g/kg, 0.81 g/kg 及び3.1%であった。

その他の方法では、ICPによる測定等の5件の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は48件の報告があり、ロバスト法によるzスコアの絶対値が3以上のものは4件であった。これらを除いた平均値は14.5 g/kgで、この95%信頼区間は14.4~14.6 g/kgであった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ0.4 g/kg 及び3.1%であった。

8.5 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した10種類の原料の検出とその混合割合の推定を行った。原料混合割合の推定は、15%以上を多量、5%以上15%未満を中量、1%以上5%未満を少量として報告を求めた。

128件の報告があり、混合した原料以外に検出と報告があった原料は22種類であった。

混合した原料について、とうもろこし（混合割合35%）は、128件（検出率100%）の報告があり、原料混合割合の推定の内訳は多量が127件、中量が1件であった。

小麦（混合割合12%）は、121件（検出率95%）の報告があり、その内訳は多量が43件、中量が75件、少量が3件であった。

大豆油かす（混合割合10%）は、121件（検出率95%）の報告があり、その内訳は多量が11件、中量が99件、少量が11件であった。

米ぬか（混合割合10%）は、86件（検出率67%）の報告があり、その内訳は多量が1件、中量が39件、少量が46件であった。

ビートパルプ（混合割合10%）は、114件（検出率89%）の報告があり、その内訳は多量が15件、中量が89件、少量が10件であった。

ふすま（混合割合8%）は、121件（検出率95%）の報告があり、その内訳は多量が24件、中量が93件、少量が4件であった。

なたね油かす（混合割合7%）は、123件（検出率96%）の報告があり、その内訳は多量が6件、中量が90件、少量が27件であった。

魚粉（混合割合3%）は、110件（検出率86%）の報告があり、その内訳は中量が10件、少量が100件であった。

炭酸カルシウム（配合割合3%）は、100件（検出率78%）の報告があり、その内訳は少量

が 100 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、125 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は少量が 125 件であった。

誤って検出された原料としては、リン酸カルシウムが最も多く、28 件の報告があった。次いで、ごま油かすが 16 件、やし油かすが 10 件と続いた。

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 26 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…子豚期用プレミックス

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. 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 53 年 9 月 5 日付け 53 畜 B 第 2173 号、53 水振第 464 号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知)の別記にあるサリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む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、今回配付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「平成 26 年度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) 平成 26 年 9 月 26 日 (金) までに報告してください。

(6) 報告書は、所属する飼料品質改善協議会等により下表に従った報告先に送付してください。

表削除

平成 26 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書 (様式)

試験室名 _____

担当者 _____

TEL _____

(1) A 試料 分析結果

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 μm) 4. 微生物学的定量法 (g(カ匁)/トン)

(2) B 試料 分析結果

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 分析結果

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 鑑定結果

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…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	パイナップルかす	尿素	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 26 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2014)**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の生産が阻害されることを防止する見地から、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律¹⁾（以下「飼料安全法」という。）第 3 条第 1 項の規定に基づき、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾（以下「成分規格等省令」という。）並びに飼料の有害物質の指導基準³⁾、ゼアラレノン⁴⁾及びデオキシニバレノール⁵⁾に係る通知（以下「指導基準等通知」という。）において、成分規格等省令で規定されている飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という。）及び指導基準等通知で規定されている飼料中の有害物質等の指導基準値及び暫定許容値（以下「指導基準値等」という。）が定められている。

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。）では、飼料分析基準⁶⁾等に規定された方法を用いて、省令基準値及び指導基準値等の適合状況のモニタリング及び省令基準値、指導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 26 年度のモニタリング等の結果を取りまとめたので報告する。

2 方 法**2.1 モニタリング等の対象試料**

平成 26 年 4 月から平成 27 年 3 月までの間に、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、単体飼料工場、配混合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施した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

以下の成分をモニタリング等の対象とした。なお、各試料に対するモニタリング等実施成分の選定にあたっては、飼料の原産国、過去の検出実態等を勘案するとともに、配混合飼料の対象家畜等、使用されている原料等にも留意した。

1) 有害物質

i かび毒及びエンドファイト産生毒素 (26 成分)

ア 指導基準値等が定められているもの (3 成分)

配混合飼料に指導基準値が定められているアフラトキシン B₁, 家畜等用飼料に暫定許容値が定められているデオキシニバレノール及び家畜用飼料に暫定許容値が定められているゼアラレノンを対象とした。

イ ア以外のかび毒等 (23 成分)

飼料分析基準に方法が規定されている以下のかび毒 21 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, G₂, ステリグマトシスチン, HT-2 トキシン, T-2 トキシン, ネオソラニオール, フザレノン-X, 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, ニバレノール, フモニシン B₁, B₂, B₃, オクラトキシン A, シトリニン α -ゼアララノール, β -ゼアララノール, ゼアララノン, α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

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 重金属等 (4 成分)

指導基準値が定められているカドミウム, 鉛, 水銀及びヒ素を対象とした。

iii 農薬 (138 成分)

ア 省令基準値が定められているもの (37 成分)

成分規格等省令別表第 1 の 1 の(1)に省令基準値が定められている農薬 (60 成分) のうちの 37 成分を対象とした。

イ ア以外の農薬 (101 成分)

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 101 成分を対象とした。

iv その他の有害物質 (4 成分)

指導基準値が定められているメラミンのほか, 指導基準値等が定められていないが, 飼料中に含まれて問題となった以下の有害物質 3 成分を対象とした。

ア 硝酸態窒素

イ 亜硝酸態窒素

ウ ヒスタミン

2) BSE 発生防止に係る成分

i 動物由来たん白質

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。

ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の(1)に規定された動物性油脂及び特定動物性油脂を対象とした。

3) 病原微生物 (サルモネラ)

配混合飼料及び単体飼料を対象とした。

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			
種類	点数	かび毒	重金属等	農薬	メラミン	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	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			
動物 質性 飼料	魚粉	76		26		16		15	73	73	73		65
	チキンミール	28		2					28	28	28		26
	フェザーミール	16							16	16	16		9
	豚肉骨粉	2		2						2	2		2
	原料混合肉骨粉	23								23	23		18
	イカミール	1							1	1	1		1
	カニ殻粉末	2							2	2	2		
	イカ内臓溶解液	1							1	1	1		
	魚鱗	1							1	1	1		
	コラーゲン	1											1
小計	151		30		16		15	122	147	147		122	
乾 牧 草	アルファルファ	8			8			6					
	スーダングラス	8			8			7					
	チモシー	9			9								
	オーツヘイ	6			6								
	クレイングラス	2			2								
	パミューダグラス	1			1								
	稲わら	5		5									
	小麦わら	1			1								
	大麦わら	2			2								
	フェスク	1	1		1								
小計	43	1	5	38		13							
そ の 他	葉子屑	1	1		1								1
	乾燥酵母細胞壁	1							1	1	1		
	飼料用酵母	1							1	1	1		
	ビートパルプ	1	1		1								
	綿実	1			1								
	りんごジュースかす	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	2											2
	小計	83	3		4				3	3	3		76
合計	967	471	183	449	32	13	15	339	347	347		76	298

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領⁷⁾により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知⁸⁾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の分析用試料

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) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法⁹⁾の試料採取方法に準拠した次の方法¹⁰⁾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。

2.4 試験方法

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り実施した。

ii 重金属等

飼料分析基準第4章第1節に規定された方法により実施した。

iii 農 薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

iv 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り実施した。

v 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り実施した。

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り実施した。

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係る事務連絡¹¹⁾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に係る通知¹²⁾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り実施した。

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。

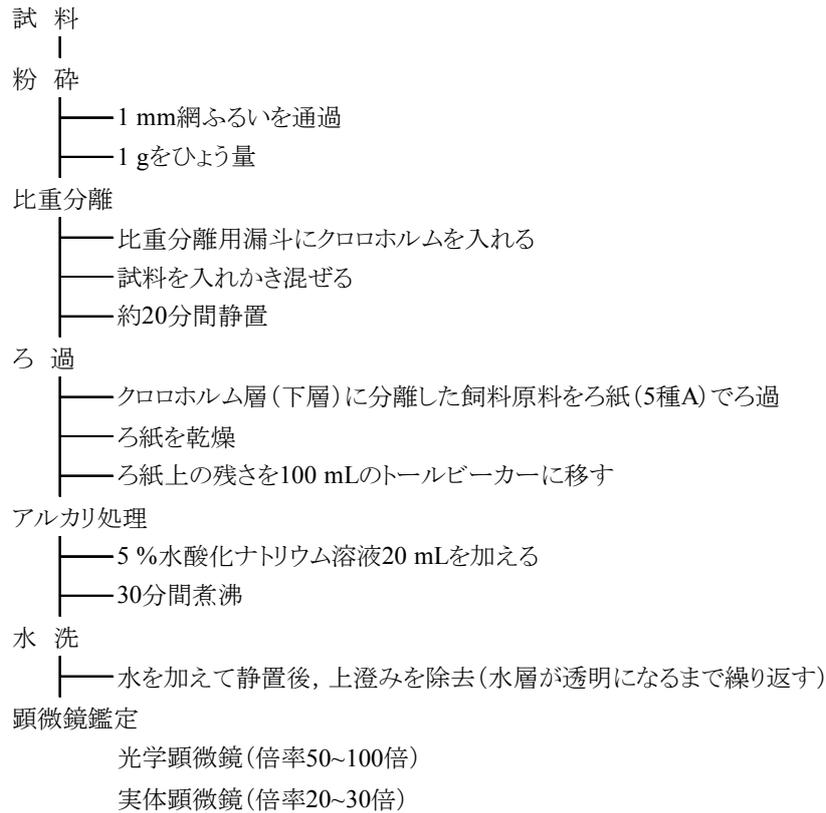


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

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り実施した。

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り実施した。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

配混合飼料 233 点，単体飼料 237 点及び乾牧草 1 点に対し，指導基準値等が定めら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 26 成分について，のべ 6171 点のモニタリング等を実施した。

指導基準値等が定められている 3 成分のモニタリング等の結果を表 2-1 に，指導基準値等が定められてい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。主な各かび毒の結果は，以下のとおりであった。

i アフラトキシン B₁

配混合飼料 221 点中 55 点から検出され（検出率 25 %），検出されたものの最大値は，0.0040 mg/kg，平均値は 0.0009 mg/kg であり，指導基準値（幼すう用，ブロイラー前期用，ほ乳期子豚用，ほ乳期子牛用及び乳用牛用は 0.01 mg/kg，それ以外の配混合飼料は 0.02

mg/kg) を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが、とうもろこし 59 点中 21 点から検出され（検出率 36 %）、検出されたものの最大値は 0.014 mg/kg、平均値は 0.0032 mg/kg であった。

また、とうもろこしの加工副産物 54 点中 22 点から検出され（検出率 41 %）、検出されたものの最大値は 0.009 mg/kg、平均値は 0.0013 mg/kg であった。

ii デオキシニバレノール

家畜等用配混合飼料 215 点中 179 点から検出され（検出率 83 %）、検出されたものの最大値が 0.75 mg/kg、平均値は 0.18 mg/kg であり、暫定許容値（生後 3 ヶ月以上の牛を除く家畜等用飼料は 1 mg/kg、生後 3 ヶ月以上の牛用飼料は 4 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが、とうもろこし 59 点中 58 点から検出され（検出率 98 %）、検出されたものの最大値は 0.57 mg/kg、平均値は 0.19 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり、配混合飼料の暫定許容値（1 mg/kg）を超えて検出されたものは、コーングルテンフィード 17 点（最大値 7.0 mg/kg）、DDGS 3 点（最大値 1.7 mg/kg）及びコーンジャムミール 1 点（最大値 1.3 mg/kg）であった。

上記以外では、小麦 7 点中 5 点から検出され、検出されたものの最大値は 1.2 mg/kg、平均値は 0.47 mg/kg であった。また小麦の加工副産物であるふすま 22 点中 20 点から検出され（検出率 91 %）、検出されたものの最大値は 0.94 mg/kg、平均値は 0.42 mg/kg であった。

iii ゼアラレノン

家畜用配混合飼料 215 点中 204 点から検出され（検出率 95 %）、最大値は 0.10 mg/kg、平均値は 0.022 mg/kg であり、暫定許容値（家畜用飼料で 1 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが、とうもろこし及びその加工副産物 113 点すべてから検出され、検出されたものの最大値は 0.93 mg/kg（コーングルテンミール）、平均値は 0.092 mg/kg であった。

表2-1 指導基準値等が定めら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)	試験点数	うち検出されたもの		暫定許容値 (mg/kg)	試験点数	うち検出されたもの		暫定許容値 (mg/kg)	試験点数	うち検出されたもの							
			検出率 (%)	最大値 (mg/kg)			平均値 (mg/kg)	検出率 (%)			最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)			
配混合飼料 (糞尿に示す飼料)	0.01	71	18	25	0.0030	0.0009	1	133	102	77	0.58	0.14	1	147	137	93	0.10	0.021
配混合飼料 (上記以外の飼料)	0.02	150	37	25	0.0040	0.0009	4	82	77	94	0.75	0.23	-	68	67	99	0.083	0.025
とうもろこし	-	59	21	36	0.014	0.0032	-	59	58	98	0.57	0.19	-	59	59	100	0.22	0.030
コーングルテンフアイード	-	24	7	29	0.0030	0.0013	-	24	24	100	7.0	1.6	-	24	24	100	0.54	0.13
DDG	-	3	2	67	0.0007	0.0006	-	3	3	100	0.71	0.45	-	3	3	100	0.082	0.045
DDGS	-	11	4	36	0.0010	0.0007	-	11	11	100	1.7	0.60	-	11	11	100	0.084	0.039
コーングルテンミンール	-	10	5	50	0.0010	0.0009	-	10	6	60	0.36	0.26	-	10	10	100	0.93	0.41
コーンジャムミール	-	3	2	67	0.0010	0.0009	-	3	1	33	1.3	1.3	-	3	3	100	0.049	0.034
ホミニーフアイード	-	3	2	67	0.0090	0.0050	-	3	3	100	0.58	0.34	-	3	3	100	0.061	0.036
マイロ	-	5	5	100	0.0000	0.0000	-	5	4	80	0.18	0.09	-	5	5	100	0.32	0.24
小麦	-	7	7	100	0.0000	0.0000	-	7	5	71	1.2	0.47	-	7	4	57	0.030	0.0022
ふすま	-	22	22	100	0.0000	0.0000	-	22	20	91	0.94	0.42	-	22	16	73	0.010	0.0044
大麦	-	3	3	100	0.0000	0.0000	-	3	1	33	0.03	0.03	-	3	1	33	0.020	0.0020
ビールかす	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.060	0.0060
圧パン大豆	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000
エクストルーダー処理大豆	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.012	0.012
きなこ	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.080	0.0039
大豆油かす	-	30	3	10	0.0008	0.0006	-	30	3	10	0.10	0.05	-	30	26	87	0.0080	0.0039
酵素分解物脱皮大豆かす	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.020	0.0020
大豆皮	-	1	1	100	0.0006	0.0006	-	1	1	100	0.0006	0.0006	-	1	1	100	0.075	0.075
濃縮大豆たん白	-	2	2	100	0.0000	0.0000	-	2	2	100	0.0000	0.0000	-	2	2	100	0.0090	0.0085
米ぬか	-	4	4	100	0.0000	0.0000	-	4	2	50	0.15	0.09	-	4	3	75	0.033	0.016
脱脂ぬか	-	5	5	100	0.0000	0.0000	-	5	1	20	0.90	0.90	-	5	4	80	0.040	0.0027
酒かす	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.02	0.02	-	1	1	100	0.030	0.0030
しょう油かす	-	2	2	100	0.0000	0.0000	-	2	2	100	0.0000	0.0000	-	2	2	100	0.0090	0.0085
雑穀酒かす	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.070	0.0070
グアミール	-	1	1	100	0.0050	0.0050	-	1	1	100	0.0050	0.0050	-	1	1	100	0.022	0.022
なたね油かす	-	18	18	100	0.0000	0.0000	-	18	18	100	0.0000	0.0000	-	18	5	28	0.016	0.0064
あまに油かす	-	1	1	100	0.016	0.016	-	1	1	100	0.016	0.016	-	1	1	100	0.010	0.010
やし油かす	-	1	1	100	0.016	0.016	-	1	1	100	0.016	0.016	-	1	1	100	0.017	0.017
ごま油かす	-	3	3	100	0.0000	0.0000	-	3	3	100	0.0000	0.0000	-	3	1	33	0.0010	0.0010
菓子屑	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.017	0.017
りんごジュースかす	-	1	1	100	0.0020	0.0020	-	1	1	100	0.0020	0.0020	-	1	1	100	0.057	0.057
ビートパルプ	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.0000	0.0000	-	1	1	100	0.10	0.10
計		449	105	23				443	322	73				443	394	89		

1) 該当する配混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、ほ乳期子牛用及び乳用牛用
 デオキシニバレノール：家畜等（鶏、豚及び牛（生後3ヶ月以上の牛を除く。））用
 ゼアラレノン：家畜（豚及び牛）用

表 2-2 指導基準値等が定められてい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 (mg/kg)	試料点数	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	449	9	2.0	0.0020	0.0008
アフラトキシンG ₁	0.0002	449	5	1.1	0.0060	0.0020
アフラトキシンG ₂	0.0002	449	2	0.4	0.0010	0.0007
ステリグマトシスチン	0.0003	443	135	30.5	0.017	0.0012
HT-2トキシシ	0.005	24	6	25	0.024	0.015
T-2トキシシ	0.002	443	103	23.3	0.067	0.006
ネオゾラニオール	0.002	443	7	1.6	0.005	0.003
フザレノン-X	0.02	443	12	2.7	0.07	0.04
3-アセチルデオキシニバレノール	0.003	5	1	20	0.049	0.049
15-アセチルデオキシニバレノール	0.003	5	4	80	0.038	0.022
ニバレノール	0.02	443	26	5.9	0.21	0.06
フモニシンB ₁	0.0006	77	76	99	3.8	0.35
フモニシンB ₂	0.0006	77	73	95	1.1	0.12
フモニシンB ₃	0.0006	77	70	91	0.50	0.059
オクラトキシンA	0.002	59	2	3	0.010	0.008
シトリニン	0.007	8	1	13	0.039	0.039
α -ゼアララノール	0.002	188	2	1.1	0.002	0.002
β -ゼアララノール	0.002	188	1	0.5	0.003	0.003
ゼアララノン	0.002	188	12	6.4	0.011	0.005
α -ゼアラレノール	0.003	188	3	1.6	0.008	0.007
β -ゼアラレノール	0.003	188	11	5.9	0.012	0.007
エルゴバリン	0.01	1	1	100	0.04	0.04
ロリトレムB	0.01	1				

2) 重金属等

指導基準値が定められているカドミウム、鉛及び水銀について、配混合飼料 144 点、魚粉 26 点、チキンミール等（チキンミール、豚肉骨粉）4 点及び稲わら 1 点、また、ひ素について、配混合飼料 29 点、稲わら 5 点及び魚粉 22 点のモニタリング等を実施し、その結果を表 3 に示した。

各重金属等の結果は、以下のとおりであった。

i) カドミウム

配混合飼料 144 点中 76 点から検出され（検出率 53 %）、検出されたものの最大値は 0.28 mg/kg、平均値は 0.08 mg/kg であった。稲わら 1 点からは 0.11 mg/kg が検出された。いずれも指導基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料は、魚粉では 26 点すべてから検出され、最大値は 1.9 mg/kg、平均値は 0.82 mg/kg であった。チキンミール等では 4 点中 2 点から検出され（検出率 50 %）、検出されたものの最大値は 0.04 mg/kg、平均値は 0.04 mg/kg であった。いずれも指導基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii) 鉛

配混合飼料 144 点中 5 点から検出され（検出率 3 %）、検出されたものの最大値は 0.60

mg/kg, 平均値は 0.44 mg/kg であった. 稲わら 1 点からは 1.0 mg/kg が検出された. いずれも指導基準値 (3 mg/kg) を超えるものはなかった.

単体飼料は, 魚粉 26 点中 11 点から検出され (検出率 42 %) , 検出されたものの最大値は 4.4 mg/kg, 平均値は 0.96 mg/kg であり, 指導基準値 (7 mg/kg) を超えるものはなかった. チキンミール等からは検出されなかった.

iii 水銀

配混合飼料 144 点中 83 点から検出され (検出率 58 %) , 検出されたものの最大値は 0.09 mg/kg, 平均値は 0.03 mg/kg であった. 稲わら 1 点からは 0.02 mg/kg が検出された. いずれも指導基準値 (0.4 mg/kg) を超えるものはなかった.

単体飼料は, 魚粉では 26 点すべてから検出され, 最大値は 0.85 mg/kg, 平均値は 0.34 mg/kg であった. チキンミール等では 4 点中 3 点から検出され (検出率 75 %) , 検出されたものの最大値は 0.05 mg/kg, 平均値は 0.02 mg/kg であった. いずれも指導基準値 (1 mg/kg) を超えるものはなかった.

iv ひ素

配混合飼料 29 点中 14 点から検出され (検出率 48 %) , 検出されたものの最大値は 0.47 mg/kg, 平均値は 0.18 mg/kg であり, 指導基準値 (2 mg/kg) を超えるものはなかった.

単体飼料は, 稲わらでは 5 点すべてから検出され, 最大値は 3.8 mg/kg, 平均値は 3.0 mg/kg であり, 指導基準値 (7 mg/kg) を超えるものはなかった. 魚粉では 22 点すべてから検出され, 最大値は 8.4 mg/kg, 平均値は 4.5 mg/kg であり, 指導基準値 (15 mg/kg) を超えるものはなかった.

表 3 重金属等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	試料点数	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	配混合飼料	144	76	53	0.28	0.08	0.03		
		稲わら	1	1	100	0.11	0.11			
		小計	145	77	53	0.28	0.08			
	3	魚粉	26	26	100	1.9	0.82			
		チキンミール	2	1	50	0.04	0.04			
		豚肉骨粉	2	1	50	0.04	0.04			
		小計	30	28	93	1.9	0.77			
	カドミウム 計			175	105	60	1.9		0.26	
	鉛	3	配混合飼料	144	5	3	0.60		0.44	0.2
			稲わら	1	1	100	1.0		1.0	
小計			145	6	4	1.0	0.53			
7		魚粉	26	11	42	4.4	0.96			
		チキンミール	2							
		豚肉骨粉	2							
		小計	30	11	37	4.4	0.96			
鉛 計			175	17	10	4.4	0.81			
水銀		0.4	配混合飼料	144	83	58	0.09	0.03	0.01	
			稲わら	1	1	100	0.02	0.02		
	小計		145	84	58	0.09	0.03			
	1	魚粉	26	26	100	0.85	0.34			
		チキンミール	2	1	50	0.05	0.05			
		豚肉骨粉	2	2	100	0.02	0.01			
		小計	30	29	97	0.85	0.31			
	水 銀 計			175	113	65	0.85	0.10		
	ひ素	2	配混合飼料	29	14	48	0.47	0.18		0.05
		7	稲わら	5	5	100	3.8	3.0		
15		魚粉	22	22	100	8.4	4.5			
ひ 素 計			56	41	73	8.4	2.8			

3) 農 薬

飼料等 449 点に対し、省令基準値が定められている 37 成分及省令基準値が定められていない農薬 101 成分の計 138 成分について、のべ 52583 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。

省令基準値を超過したものはなかった。全般に、とうもろこし、麦類及びその加工副産物を中心に有機リン系農薬の検出率が高く、牧草では、検出率は低いものの多種類の農薬が検出された。結果の概要は以下のとおりであった。

i マラチオン

省令基準値が定められている穀類 2 種類 23 点及び牧草 38 点について、モニタリング等を実施した結果、いずれも検出されなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 357 点について、モニタリング等を実施した結果、10 点から検出された。その内訳は、ふすま 24 点中 5 点（検出率 21 %，最大値 0.11 mg/kg），コーングルテンフィード 15 点中 1 点（検出率 7 %，0.029

mg/kg) , 牛用配混合飼料 89 点中 2 点 (検出率 2 % , 最大値 0.037 mg/kg) , 鶏用配合飼料 62 点中 2 点 (検出率 3 % , 最大値 0.068 mg/kg) であった.

ii クロルピリホスメチル

省令基準値が定められている穀類 2 種類 23 点について, モニタリング等を実施した結果, いずれも検出されなかった.

また, 配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 395 点について, モニタリング等を実施した結果, 31 点から検出された. その内訳は, ふすま 24 点中 9 点 (検出率 38 % , 最大値 0.075 mg/kg) , 大豆皮 2 点中 1 点 (検出率 50 % , 0.021 mg/kg) , なたね油かす 25 点中 1 点 (検出率 4 % , 0.10 mg/kg) , 配混合飼料 202 点中 20 点 (検出率 10 % , 最大値 0.33 mg/kg (肉豚肥育用)) であった.

iii ピリミホスメチル

省令基準値が定められている穀類 2 種類 23 点について, モニタリング等を実施した結果, とうもろこしは 20 点中 2 点から検出され (検出率 10 % , 最大値 0.72 mg/kg) , マイロは 3 点中 2 点から検出された (検出率 67 % , 最大値 0.038 mg/kg) が, 省令基準値を超えるものはなかった.

また, 配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 395 点について, モニタリング等を実施した結果, 32 点から検出された. その内訳は, ふすま 24 点中 1 点 (検出率 4 % , 0.025 mg/kg) , コーングルテンフィード 15 点中 1 点 (検出率 14.3 % , 0.052 mg/kg) , ビールかす 1 点中 1 点 (0.059 mg/kg) , 配混合飼料 202 点中 29 点 (検出率 14 % , 最大値 0.50 mg/kg (肉豚肥育用)) であった.

iv フェニトロチオン

省令基準値が定められている穀類 2 種類 23 点及び牧草 38 点について, モニタリング等を実施した結果, いずれも検出されなかった.

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 357 点のモニタリング等を実施した結果, 2 点から検出された. その内訳は, 菓子屑 1 点中 1 点 (0.022 mg/kg) , 配混合飼料 202 点中 1 点 (検出率 0.5 % , 0.066 mg/kg) であった.

v その他の検出された農薬

① 穀類

クロルピリホス (とうもろこし) , ビフェンリン (とうもろこし) , デルタメトリン及びトラロメトリン (マイロ) , グルホシネート (とうもろこし) , シハロトリン, ビフェントリン及びプロペタンホス

② 乾牧草

ビフェントリン (チモシー) , シハロトリン (スーダングラス) , アトラジン (スーダングラス) , ジメピペレート (アルファルファ及びオーツヘイ) , テブコナゾール (オーツヘイ, フェスク, 大麦わら) , トリフルラリン (小麦わら) , フェンブコナゾール (スーダングラス) , プロシミドン (オーツヘイ) , プロパルギット (チモシー) , プロピコナゾール (大麦わら) 及びメトラクロール (オーツヘイ)

③ 原料

デルタメトリン及びトラロメトリン (ふすま) , ジフェノコナゾール (ビートパル

プ）、テブコナゾール（ふすま）及びプロペタンホス（菓子屑）

④ 配混合飼料

クロルプロファム、シハロトリン、ビフェントリン及びプロペタンホス

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分）

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)	試料点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
BHC	配混合飼料	0.005	203	0			
	牧草	0.02	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			
DDT	配混合飼料	0.1	203	0			
	牧草	0.1	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	19	0			
	マイロ	0.02	3	0			
	牧草	15	38	2	5	0.072	0.056
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	417	2	0.5		
アラクロール	とうもろこし	0.2	19	0			
	マイロ	0.1	3	0			
	牧草	3	38	0			
	基準値のない飼料	—	358	0			
計	—	418	0				
アルドリン及びディルドリン	配混合飼料	0.02	203	0			
	牧草	0.02	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	19	0			
	基準値のない飼料	—	410	0			
	計	—	429	0			
エチオン	牧草	20	38	0			
	基準値のない飼料	—	392	0			
	計	—	430	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	203	0			
	牧草	0.01	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			
グルホシネート	とうもろこし	0.1	5	2	40	0.049	0.044
	とうもろこし	0.1	20	1	5	0.055	0.055
クロルピリホス	マイロ	0.75	3	0			
	牧草	13	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	1	0.2		
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	20	0			
	マイロ	10	3	0			
	基準値のない飼料	—	395	31	8	0.33	0.061
	計	—	418	31	7		
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	20	0			
	基準値のない飼料	—	401	0			
	計	—	421	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	19	0			
	基準値のない飼料	—	398	1	0.3	0.034	0.034
	計	—	417	1	0.2		
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	19	0			
	基準値のない飼料	—	411	0			
	計	—	430	0			

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，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)	試料点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
シハロトリン	とうもろこし	0.04	19	0			
	マイロ	0.2	3	0			
	牧草	0.6	38	1	3	0.38	0.38
	基準値のない飼料	—	357	1	0.3	0.032	0.032
	計	—	417	2	0.5		
ジメトエート	とうもろこし	1	19	0			
	マイロ	0.2	3	0			
	牧草	2	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	417	0			
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	20	0			
	マイロ	0.1	3	0			
	牧草	10	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
チアベンダゾール	とうもろこし	0.05	9	0			
	マイロ	0.05	1	0			
	計	—	8	0			
デルタメトリン 及び トラロメトリン	とうもろこし	1	19	0			
	マイロ	1	3	1	33	0.13	0.13
	牧草	5	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	1	0.3	0.09	0.09
	計	—	417	2	0.5		
テルブホス	とうもろこし	0.01	20	0			
	マイロ	0.05	3	0			
	牧草	1	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
パラチオン	とうもろこし	0.3	20	0			
	マイロ	0.08	3	0			
	牧草	5	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	20	2	10	0.72	0.62
	マイロ	1	3	2	67	0.38	0.25
	基準値のない飼料	—	395	32	8	0.50	0.12
	計	—	418	36	9		
	フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.01	62	0		
配混合飼料（豚・牛等用）		0.02	140	0			
牧草		0.2	38	0			
基準値のない飼料		—	189	0			
計		—	429	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1	20	0			
	マイロ	1	3	0			
	牧草	10	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	2	0.6	0.066	0.044
	計	—	418	2	0.5		
フェンチオン	とうもろこし	5	20	0			
	基準値のない飼料	—	410	0			
	計	—	430	0			
フェントエート	とうもろこし	0.4	20	0			
	マイロ	0.4	3	0			
	基準値のない飼料	—	395	0			
	計	—	418	0			

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，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)	試料点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	62	0			
	配混合飼料（豚用）	4	51	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	89	0			
	牧草	13	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	429	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	38	0			
	基準値のない飼料	—	391	0			
	計	—	429	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	203	0			
	牧草	0.02	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2	19	0			
	マイロ	2	3	0			
	牧草	55	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	417	0			
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	19	0			
	マイロ	0.1	3	0			
	牧草	0.1	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	417	0			
ホスメット	とうもろこし	0.05	20	0			
	マイロ	0.05	3	0			
	牧草	40	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
ホレート	とうもろこし	0.05	20	0			
	マイロ	0.05	3	0			
	牧草	1.5	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
マラチオン	とうもろこし	2	20	0			
	マイロ	2	3	0			
	牧草	135	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	10	3	0.11	0.046
	計	—	418	10	2		
メチダチオン	とうもろこし	0.1	20	0			
	マイロ	0.2	3	0			
	牧草	12	38	0			
	基準値のない飼料	—	357	0			
	計	—	418	0			
メトブレン	とうもろこし	5	2	0			
	マイロ	5	1	0			
	基準値のない飼料	—	2	0			
	計	—	5	0			
リンデン (γ-BHC)	配混合飼料（鶏・うずら，豚用）	0.05	114	0			
	配混合飼料（牛等用）	0.4	89	0			
	牧草	0.4	38	0			
	基準値のない飼料	—	189	0			
	計	—	430	0			

表5 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められていない成分）

モニタリング等の対象成分	試験点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	試験点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	試験点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)
		点検数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)				平均値 (mg/kg)	点検数	検出率 (%)				最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	点検数	
EPN	430	0			0.02	ターバシル	429	0			0.02	フルシトリネート	429	0		0.02	
アセトクロール	429	0			0.02	チオベンカルブ	429	0			0.02	フルトラニル	429	0		0.02	
アニコホス	429	0			0.02	テクナゼン	429	0			0.02	フルトリアホール	429	0		0.02	
アメトリン	429	0			0.02	テトラクロルピホス	429	0			0.02	フルバリネート	429	0		0.02	
アリドクロール	429	0			0.02	テトラコナゾール	429	0			0.02	フルミオキサジン	429	0		0.02	
アレスリン	429	0			0.02	テトラジホシ	429	0			0.02	フルミクロラックペンチル	429	0		0.02	
イサゾホス	429	0			0.02	テブコナゾール	429	4	0.9	0.66	0.33	プレチラクロール	1	0		0.003	
イソプロチオラン	429	0			0.02	テブフェンピラド	429	0			0.02	プロシミドン	429	1	0.2	0.020	
イブOPENホス	430	0			0.02	テフルトリン	429	0			0.02	プロチオホス	1	0		0.007	
エタルフルラリン	429	0			0.02	テルブトリン	429	0			0.02	プロバクロール	429	0		0.02	
エジフェンホス	430	0			0.02	トリアジメホシ	429	0			0.02	プロバジン	429	0		0.02	
エトフェンプロックス	429	0			0.02	トリアレート	429	0			0.02	プロバニル	429	0		0.02	
エトフメセート	429	0			0.02	トリフルラリン	429	1	0.2	0.028	0.028	プロパルギット	429	1	0.2	0.12	
エトプロホス	430	0			0.02	トリフェキシストロピン	429	0			0.02	プロビコナゾール	429	1	0.2	0.31	
エトリジアゾール	429	0			0.02	トリフルアニド	429	0			0.02	プロフアム	429	0		0.02	
エトリムホス	430	0			0.02	トルクロホスメチル	1	0			0.007	プロフェノホス	429	0		0.02	
エンドスルファエン	1	0			0.0007	ナプロバミド	429	0			0.02	プロペタンホス	429	2	0.5	0.25	
オキサジアゾン	429	0			0.02	ニトロフェン	1	0			0.0007	プロモプロチド	429	0		0.02	
カズサホス	429	0			0.02	ノナクロール	1	0			0.0007	プロモプロピレート	429	0		0.02	
カルフェントザンエチル	429	0			0.02	パラチオンメチル	430	0			0.02	プロモホス	429	0		0.02	
カルボフェノチオン	1	0			0.007	ハルフェンプロックス	429	0			0.02	ヘキサクロロベンゼン	1	0		0.0007	
キナルホス	1	0			0.007	ピフェントリン	429	4	0.9	0.056	0.036	ヘキサコナゾール	429	0		0.02	
キントゼン	429	0			0.02	ピペロホス	429	0			0.02	ペノキサコール	429	0		0.02	
クレシキムメチル	429	0			0.02	ピリダフェンチオン	429	0			0.02	ペンコナゾール	429	0		0.02	
クロルタルジメチル	429	0			0.02	ピリダベン	429	0			0.02	ペンフルラリン	429	0		0.02	
クロルゲン	1	0			0.0007	ピリプロキシフェン	429	0			0.02	ホサロン	430	0		0.02	
クロルフェナピル	429	0			0.02	ピンクロゾリン	429	0			0.02	ホスチアゼート	429	0		0.02	
ジクロホップメチル	429	0			0.02	フェナリメル	429	0			0.02	メカルバム	1	0		0.007	
ジクロラン	430	0			0.02	フェノチオカルブ	429	0			0.02	メタクリホス	429	0		0.02	
ジフェナミド	429	0			0.02	フェノトリン	429	0			0.02	メトキシクロル	430	0		0.02	
ジフェノコナゾール	429	1	0.4	0.030	0.030	フェンプロコナゾール	429	1	0.2	0.032	0.032	メトミノストロピン	429	0		0.02	
ジメテナミド	429	0			0.02	ブタクロール	1	0			0.003	メトラクロール	430	2	0.5	0.046	
ジメピベレート	429	2	0.5	0.039	0.036	ブタミホス	429	0			0.02	メピンホス	429	0		0.02	
シラフルオフェン	429	0			0.02	フラムプロップメチル	429	0			0.02						

4) その他の有害物質

指導基準値が定められているメラミンのほか、指導基準値等は定められていないが、飼料中に多量に含まれると家畜事故を生じるおそれがあることが知られる 3 成分の有害物質について、計 73 点のモニタリング等を実施した。

各成分の結果は、以下のとおりであった。

i メラミン

養魚用飼料及び魚粉のモニタリング等を実施した結果、養魚用配合飼料は 16 点中 1 点から検出され（検出率 6 %，0.08 mg/kg），魚粉は 16 点中 5 点から検出された（検出率 31 %，最大値 2.0 mg/kg）。いずれも指導基準値（2.5 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

牧草 13 点（アルファルファ 6 点，スーダングラス 7 点）のモニタリング等を実施した結果、11 点の試料から硝酸態窒素が検出され（検出率 85 %），最大値は、アルファルファでは 830 mg/kg，スーダングラスでは 1100 mg/kg であった。また、2 点の試料から亜硝酸態窒素が検出され（検出率 15 %），アルファルファ 1 点が 29 mg/kg，スーダングラス 1 点が 15 mg/kg であった。いずれも輸入の際の品質管理による受入れの目安¹³⁾（0.1 %）を超えるものはなかった。

iii ヒスタミン

魚粉のモニタリング等を実施した結果、15 点中 14 点から検出（検出率 93 %，最大値 470 mg/kg）されたが、直ちに家畜事故を生じるおそれが認められるものはなかった。

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	試料点数	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)	
メラミン	2.5	養魚用配合飼料	16	1	6	0.08	0.08	0.06
		魚粉	16	5	31	2.0	0.52	
		計	32	6	19	2.0	0.45	
硝酸態窒素		アルファルファ	6	5	83	830	520	10
		スーダングラス	7	6	86	1100	420	
		計	13	11	85	1100	470	
亜硝酸態窒素		アルファルファ	6	1	17	29	29	10
		スーダングラス	7	1	14	15	15	
		計	13	2	15	29	22	
ヒスタミン		魚粉	15	14	93	470	183	3

3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造された魚粉 73 点及びその他の魚介類由来たん白質 5 点並びにチキンミール 28 点及びフェザーミール 16 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、牛由来たん白質は検出されなかった。豚肉骨粉 2 点及び原料混合肉骨粉 23 点については、ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果、牛由来たん白質は検出されなかった。なお、ELISA 試験において原料混合肉骨粉 1 点から牛由来たん白質が検出されたが、PCR 試験において反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから総合的に不検出と判定した。これらのモニタリング等の結

果を表 7 及び表 8 に示した。

表 7 動物由来たん白質モニタリング等の結果（魚粉等）

	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 (%)	
魚粉	73	0	0	73	0	0	23	0	0	50	0	0	0
カニ殻粉末	2	0	0	2	0	0				2	0	0	0
イカ内臓溶解液	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
イカミール	1	0	0	1	0	0							0
魚醬	1	0	0	1	0	0							0

* 平成 26 年 7 月より，確認対象をほ乳動物由来 DNA から反すう動物由来 DNA に変更している。

表 8 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（チキンミール，豚肉骨粉等）

	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			反すう動物由来DNA			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	28	0	0	28	0	0	28	0	0	0
フェザーミール	16	0	0	16	0	0	16	0	0	0
豚肉骨粉				2	0	0	2	0	0	0
原料混合肉骨粉				23	1	4	23	0	0	0

国内で製造されたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 4 点，ほ乳期子牛育成用配合飼料 5 点，若令牛育成用配合飼料 5 点，乳用牛飼育用配合飼料 41 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 50 点，肉牛繁殖用配合飼料 8 点，種牛飼育用配合飼料 1 点，牛数種用配合飼料 23 点，牛用混合飼料 24 点及び糖蜜吸着飼料 1 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 及び PCR を実施した結果，牛由来たん白質は検出されなかった。なお，ELISA 試験において牛用混合飼料 1 点から牛由来たん白質が検出されたが，PCR 試験においてほ乳動物由来 DNA が検出されなかったことから総合的に不検出と判定した。また，動物由来たん白質を含む混合飼料等 18 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，牛由来たん白質は検出されなかった。これらのモニタリング等の結果を表 9 に示した。

国外から輸入された牛用混合飼料 30 点，飼料用酵母 1 点，乾燥酵母細胞壁 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，牛由来たん白質は検出されなかった。そのモニタリング等の結果を表 10 に示した。

表 9 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（国内製造牛用飼料等）

	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			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 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	4	0	0										0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0
若令牛育成用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	41	0	0	39	0	0	39	0	0				0
幼令肉用牛育成用配合飼料	4	0	0	3	0	0	3	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	50	0	0	46	0	0	46	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	8	0	0	8	0	0	8	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
牛数種用飼料	23	0	0	17	0	0	17	0	0				0
その他の混合飼料	24	0	0	24	1	4	24	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
混合飼料等	18	0	0	18	0	0	4	0	0	14	0	0	0

表 10 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（輸入飼料等）

	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			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料													
大韓民国	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
中華人民共和国	3	0	0	3	0	0				3	0	0	0
台湾	2	0	0	2	0	0				2	0	0	0
シンガポール	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
デンマーク	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
フランス	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
スペイン	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
オーストリア	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
アメリカ合衆国	18	0	0	18	0	0				18	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
飼料用酵母													
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
乾燥酵母細胞壁													
デンマーク	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
複合製剤													
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0				1	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結果，不溶性不純物の成分規格を超えるものはなかった。そのモニタリング等の結果を表 11 に示した。

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	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15 %以下	74	0.14	0.014
特定動物性油脂	0.02 %以下	1	0.005	0.003

3.4 サルモネラ

飼料原料 157 点及び配混合飼料 141 点について、サルモネラのモニタリング等を実施した結果、飼料原料 157 点のうち 2 点が陽性（陽性率 1.3 %）であった。なお、前年度及び前々年度の陽性率は、それぞれ 1.3 %及び 0.7 %であった。区分別にみると、動物質性飼料 122 点中 2 点が陽性（陽性率 1.6 %（前年度 0.9 %，前々年度 1.8 %））であった。一方、植物性油かす類（前年度 5.6 %，前々年度 0 %）及びそうこう類（前年度 0 %，前々年度 0 %）は、すべて陰性であった。そのモニタリング等の結果を表 12 に示した。

原産国別では、国内製造品 147 点中 2 点が陽性（陽性率 1.4 %（前年度 0.7 %，前々年度 0.7 %））であった。また、輸入品 10 点は、すべて陰性（陽性率前年度 12.5 %，前々年度 0 %）であった。そのモニタリング等の結果を表 13 に示した。

配混合飼料は 141 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 2.6 %及び 0.7 %であった。そのモニタリング等の結果を表 14 に示した。

サルモネラ陽性となった魚粉，原料混合肉骨粉及び混合飼料から分離された各血清型を表 15 に示した。これらの血清型は、いずれも過去 5 年以内に飼料から分離された事例があり、*S. Havana* は平成 22 年度に国内産魚粉 1 点から及び平成 25 年度に国内産魚粉 1 点から、*S. Mbandaka* は平成 22 年度に配混合飼料 1 点から、平成 23 年度に国内産魚粉 1 点から及び平成 25 年度に配混合飼料 2 点から、*S. Rissen* は平成 21 年度に国内産魚粉 1 点から及び平成 25 年度に国内産大豆油かす 1 点から、*S. Senftenberg* は平成 21 年度に国内産魚粉 2 点から及び平成 24 年度に配混合飼料 1 点からそれぞれ検出されている。

なお、病原微生物検出情報¹⁴⁾によると、飼料から分離されたこれら 4 種の血清型は、食中毒原因菌としてはここ数年上位 15 血清型に入っていないが、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も分離されていることから、飼料の製造・品質管理におけるサルモネラ対策については、引き続き留意が必要である。

表 12 サルモネラのモニタリング等の結果（飼料原料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	陽性点数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	65	1	1.5
チキンミール	26	0	0
フェザーミール	9	0	0
原料混合肉骨粉	18	1	5.6
豚肉骨粉	2	0	0
コラーゲン	1	0	0
イカミール	1	0	0
小 計	122	2	1.6
植物性油かす類			
大豆油かす	9	0	0
なたね油かす	4	0	0
ごま油かす	3	0	0
あまに油かす	1	0	0
コーングルテンミール	1	0	0
濃縮大豆たん白	1	0	0
酵素分解物脱皮大豆かす	1	0	0
小 計	20	0	0
そうこう類			
ふすま	5	0	0
米ぬか	1	0	0
脱脂ぬか	2	0	0
コーングルテンフィード	2	0	0
とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	2	0	0
麦ぬか	1	0	0
小 計	13	0	0
穀類			
きな粉	1	0	0
小 計	1	0	0
その他			
菓子屑	1	0	0
合 計	157	2	1.3

表 13 サルモネラのモニタリング等の結果（原産国及び飼料原料の種類別）

原産国	動物質性飼料		植物性油かす類		その他		合計 (陽性率)
	魚粉	その他	大豆 油かす	その他	そうこ う類	その他	
国産 (陽性率)	1/62 (1.6%)	1/57 (1.8%)	0/6 (0%)	0/9 (0%)	0/11 (0%)	0/2 (0%)	2/147 (1.4%)
輸入							
中国			0/3				0/3 (0%)
インド	0/1						0/1 (0%)
デンマーク				0/1			0/1 (0%)
オランダ				0/1			0/1 (0%)
アメリカ					0/2		0/2 (0%)
ペルー	0/1						0/1 (0%)
南アフリカ	0/1						0/1 (0%)
小計 (陽性率)	0/3 (0%)		0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)		0/10 (0%)
合計 (陽性率)	1/65 (1.5%)	1/57 (1.8%)	0/9 (0%)	0/11 (0%)	0/13 (0%)	0/2 (0%)	2/157 (1.3%)

表 14 サルモネラのモニタリング等の結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	陽性点数	陽性率 (%)
鶏用配合飼料	47	0	0.0
豚用配合飼料	37	0	0.0
牛用配合飼料	46	0	0.0
動物質性たん白質混合飼料	7	1	14
その他の混合飼料	4	0	0
合計	141	1	0.7

表 15 陽性試料から検出されたサルモネラの血清型

血清型	検出された飼料の種類		
	魚粉 (1点中)	原料混合肉骨粉 (1点中)	混合飼料 (1点中)
S. Havana	1		
S. Mbandaka			1
S. Rissen		1	
S. Senftenberg	1		
合計	2	1	1

文 献

- 1) 法律：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 (1953).
- 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，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) 農林水産省生産局畜産部飼料課長通知：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，14 生畜第 2267 号 (2002).
- 5) 農林水産省生産局畜産部飼料課長通知：ゼアラレノンの検出について，平成 14 年 3 月 25 日，13 生畜第 7269 号 (2002).
- 6) 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).
- 7) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 8) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：飼料中の農薬の検査について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2322 号 (2006).
- 9) 日本油化学会規格試験法委員会編：2.1.1 試料採取方法，基準油脂分析試験法 2013 年版，日本油化学会 (2013) (ISBN: 9784931249066).
- 10) 泉 和夫，石橋 隆幸，青山 幸二，石黒 瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 11) 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：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 (2002).
- 12) 農林水産省生産局長通知：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，13 生畜第 1366 号 (2001).
- 13) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長：輸入乾牧草の安全性確保について，平成 19 年 5 月 7 日，19 消安第 1297 号 (2007).
- 14) 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>, cited 9 July 2015.

調査資料**2 特定添加物検定結果等について（平成 26 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2014)

特定添加物とは、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 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。特定添加物は、飼料安全法第 5 条第 1 項の規定により、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してはならないこととされている。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 26 年度に FAMIC に対して検定の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 26 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等についても併せて報告する。なお、平成 26 年度末の時点で、外国特定飼料等製造業者の登録はない。

1 特定添加物の検定申請業者及び品名等

平成 26 年度に検定の申請があった業者別の特定添加物の種類及び品名等を表 1 に示した。

申請は 8 業者からあり（前年度 9 業者）、その製造形態等は、①製造用原体から製剤を製造しているのが 4 業者、②製造用原体及び製剤から製剤を製造しているのが 1 業者、③製剤を輸入しているのが 3 業者であった。

平成 26 年度に申請があった特定添加物は 11 種類で、品名にして 19 銘柄であり（前年度 9 種類、15 銘柄）、そのうち、ノシヘプタイトを除く 10 種類は、製造用原体又は製剤の製造を海外に依存していた。

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①亜鉛バシトラシン（製剤）、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）、エンラマイシン（製造用原体）及び硫酸コリスチン（製造用原体）が中国、②アビラマイシン（製剤）が英国、③クロルテトラサイクリン（製剤）がシンガポール、④リン酸タイロシン（製剤）及びナラシン（製剤）が米国、⑤モネンシンナトリウム（製造用原体）がブルガリア、⑥サリノマイシンナトリウム（製造用原体）が中国及びブルガリアで、前年度同様 5 カ国であった。

表 1 検定申請業者及び品名等一覧
(平成 26 年度)

管 区	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	株式会社ティエヌビー ※	-	クロルテトラサイクリン	○	CTC F-100	100	
	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	モネンシンナトリウム		モネンシンTZ20	200	
			サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100	
	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	
	ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80	
			サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100	
硫酸コリスチン				硫酸コリスチン10%R	100		
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	
					コリスチン10%AL	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	○	モンテパン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カルシ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	
			ノシヘプタイド	○	ノシフィード40	40	
	ゾエティス・ジャパン株式会社 ※	-	亜鉛バシトラシン	○	アエンバシトラシン150FA	150	6300単位/g
○				アエンバシトラシン100FA	100	4200単位/g	
計	8業者	9事業場	11種類		19銘柄		

※ 輸入業者に該当

2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

平成 26 年度の特定添加物の種類別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を平成 24 年度及び平成 25 年度の結果とともに表 2 に示した。なお、セデカマイシンは、平成 26 年 2 月 6 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）が改正され、飼料添加物としての指定が取り消されている。

平成 26 年度の検定合格件数は 180 件（申請 180 件）で不合格のものはなく、合格数量は 909 トン、実量力価換算量は 105 トン（力価）であった。件数、数量及び実量力価換算量の対前年度比は、それぞれ 91 %、99 %、97 % となり、いずれも減少した。

平成 26 年度の特定添加物の検定合格数量を種類別にみると、ナラシンが全体の 35 %（前年度 21 %）で最も多く、次いでサリノマイシンナトリウム 27 %（前年度 33 %）、硫酸コリスチンが 17 %（前年度 24 %）、アピラマイシンが 10 %（前年度 11 %）、亜鉛バシトラシンが 4 %（前年度 5 %）となった。また、実量力価換算量では、ナラシンが全体の 30 %（前年度 18 %）で最も多く、次いでサリノマイシンナトリウムが 23 %（前年度 29 %）、アピラマイシンが 17 %（前年度 19 %）、硫酸コリスチンが 15 %（前年度 20 %）、リン酸タイロシンが 5 %（前年度 5 %）となった。

平成 26 年度の検定合格数量及び実量力価換算量を前年度と比較すると、モネンシンナトリウム及びナラシンは増加し、一方、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、サリノマイシンナトリウム及びアピラマイシンは減少した。また、前年度検定の申請がなかったエンラマイシン、ノシヘプタイド及び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は実績があり、前年度検定の実績があったフラボフォスフォリポールは申請がなかった。

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、エフロトマイシンは平成 17 年度から、ビコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく、これらは、平成 26 年度も申請がなかった。なお、ラサロシドナトリウムは、後述の表 5 に示したとおり、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表 2 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（種類別）
（平成 24 年度～平成 26 年度）

類別	特定添加物の種類	平成24年度					平成25年度					平成26年度				
		合格 件数 (件)	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 (件)	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 (件)	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	亜鉛バシトラシン	10	54780	6	6220	6	8	44920	5	5241	5	7	34780	4	3727	4
	エンラマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2380	0	190	0
	硫酸コリスチン	60	236200	25	23620	22	56	220320	24	22032	20	41	158120	17	15812	15
	バージニアマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ノシヘプタイト	2	8000	1	320	0	-	-	-	-	-	3	12000	1	480	0
	小計	72	298980	31	30160	28	64	265240	29	27273	25	53	207280	23	20209	19
テトラサイクリン系	クロルテラサイクリン	3	12000	1	1200	1	4	16000	2	1600	1	3	14400	2	1440	1
	アルキルトリメチルアンモニウム カルシウムオキシテラサイクリン	1	2000	0	800	1	-	-	-	-	-	1	2000	0	800	1
	小計	4	14000	1	2000	2	4	16000	2	1600	1	4	16400	2	2240	2
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	19700	2	5418	5	4	20262	2	5572	5	5	19370	2	5327	5
	セデカマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	小計	4	19700	2	5418	5	4	20262	2	5572	5	5	19370	2	5327	5
ポリサッカライド系	フラボフォスフォルボール	1	1250	0	100	0	1	2500	0	200	0	-	-	-	-	-
	小計	1	1250	0	100	0	1	2500	0	200	0	-	-	-	-	-
ポリエーテル系	モネンシンナトリウム	3	10860	1	2172	2	2	7940	1	1588	1	3	12140	1	2428	2
	サリノマイシンナトリウム	58	235178	25	23518	22	76	308122	33	30812	29	61	244875	27	24488	23
	ラサロシドナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	センデュラマイシンナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ナラシン	27	296275	31	29628	27	18	197625	21	19763	18	29	317775	35	31778	30
小計	88	542313	57	55317	51	96	513687	56	52163	48	93	574790	63	58693	56	
その他	アピラマイシン	21	77825	8	15565	14	28	104200	11	20840	19	25	91575	10	18315	17
	ビコザマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	エフロトマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	小計	21	77825	8	15565	14	28	104200	11	20840	19	25	91575	10	18315	17
総計	190	954068	100	108560	100	197	921889	100	107648	100	180	909415	100	104784	100	
対前年度比 (%)	88	96		97		104	97		99		91	99		97		

3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

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 26 年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表 3 に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、検定合格件数全体の 72 %（前年度 69 %）、検定合格数量全体の 79 %（前年度 73 %）、実量力価換算量全体の 77 %（前年度 73 %）を飼料級が占めた。

ノシヘプタイト、硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムは、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、平成 26 年度は、硫酸コリスチンは精製級のみ、ノシヘプタイト及びサリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表 3 検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）
（平成 26 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	亜鉛バシトラスリン	/	/	/	7	34780	3727
	エンラマイシン	/	/	/	2	2380	190
	ノシヘブタイド	-	-	-	3	12000	480
	バージニアマイシン	-	-	-	/	/	/
	硫酸コリスチン	41	158120	15812	-	-	-
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	2000	800	/	/	/
	クロルテトラサイクリン	/	/	/	3	14400	1440
マクロライド系	リン酸タイロシン	5	19370	5327	/	/	/
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	/	/	/	-	-	-
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	-	-	-	61	244875	24488
	センデュラマイシンナトリウム	-	-	-	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	29	317775	31778
	モネンシンナトリウム	3	12140	2428	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	-	-	-	/	/	/
その他	アピラマイシン	/	/	/	25	91575	18315
	エフロトマイシン	-	-	-	/	/	/
	ビコザマイシン	-	-	-	/	/	/
合 計	50	191630	24367	130	717785	80417	

4 特定添加物の類別の検定合格数量等の推移

平成 17 年度から平成 26 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及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。

検定合格数量全体では，平成 17 年度から平成 20 年度までは増減を繰り返しながら減少傾向にあったが，平成 21 年度には特定添加物の検定から登録特定飼料等製造業者による製造に大幅に移行したため減少し，それ以降はほぼ横ばいである。また，実量力価換算量についても同様の傾向であった。

特定添加物の検定合格数量を類別にみると，いずれの年度もポリエーテル系が最も多く，平成 17 年度から平成 21 年度までは全体の 50 %以上を占める割合で推移しており，平成 22 年度に 50 %を切ったものの、平成 23 年度以降も 50 %を超える割合を維持している。平成 26 年度は，過去 10 年間でポリエーテル系の占める割合が最も多く 63 %（前年度 56 %）となり，次いでポリペプチド系が 23 %（前年度 29 %）を占めた。

また，実量力価換算量でも同様にポリエーテル系が最も多く，平成 17 年度から平成 20 年度までは全体の 60 %前後で推移しており，平成 21 年度以降も 40 %を超える割合を維持している。平成 26 年度は，ポリエーテル系が 56 %（前年度 48 %），次いでポリペプチド系が 19 %（前年度 25 %）を占めた。

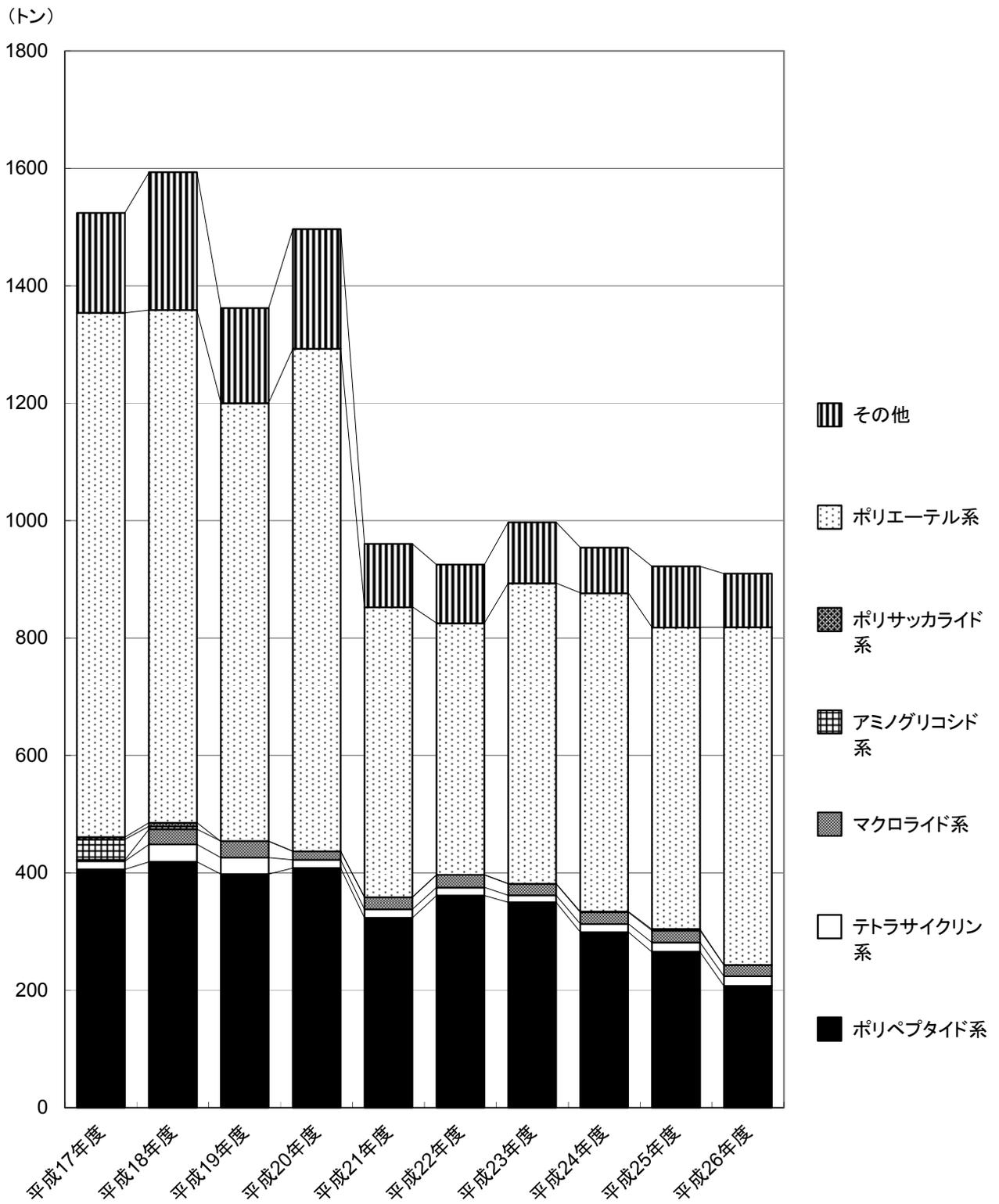


図1 特定添加物の検定合格数量の推移（類別）

(トン(カ価))

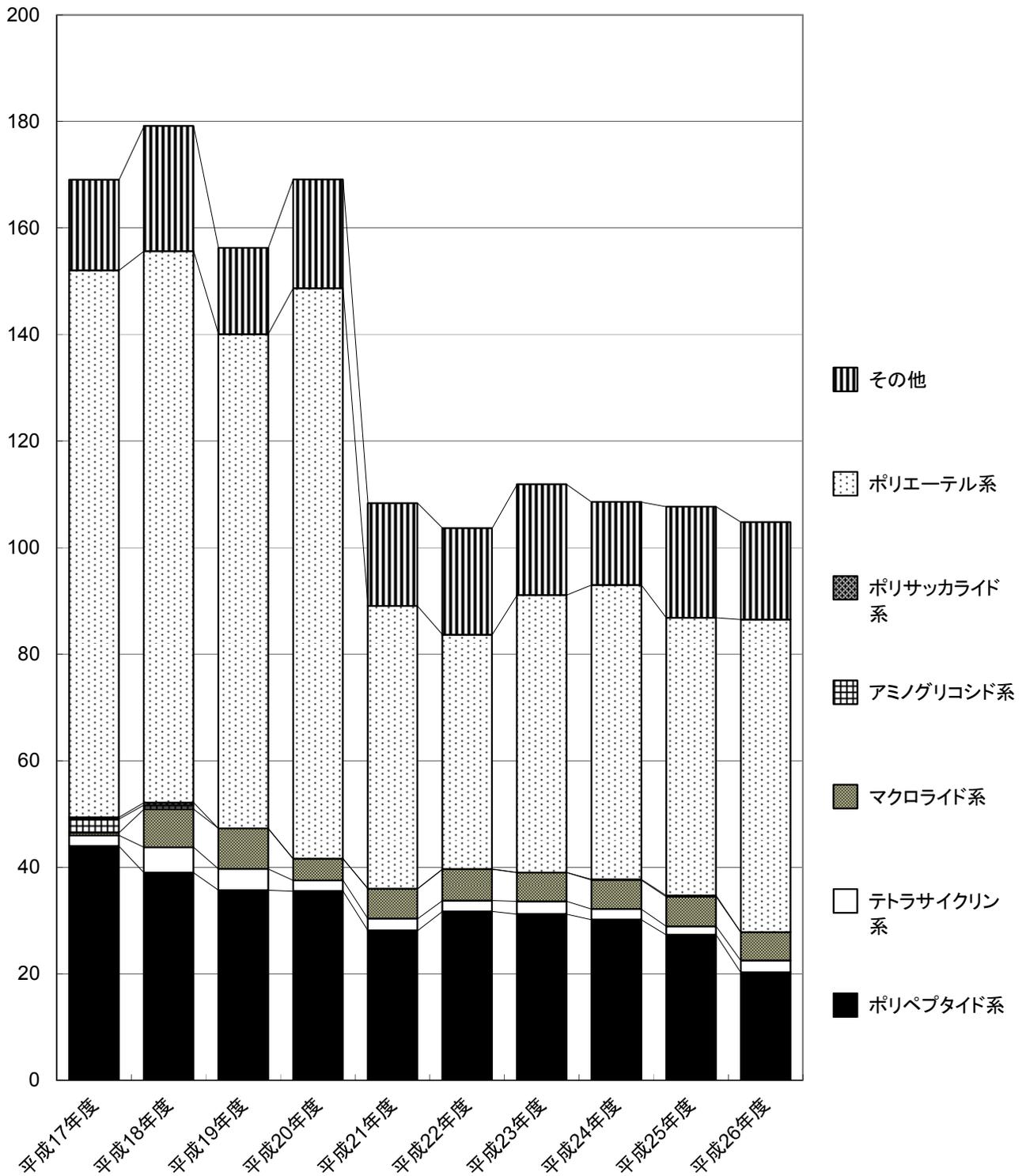


図 2 特定添加物の検定合格実量力価換算量の推移（類別）

5 特定添加物の管区別の検定合格件数等

平成 26 年度の FAMIC 本部及び各地域センター管区における特定添加物の検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。

平成 26 年度の合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸センター管区が最も多く，次いで本部管区，福岡センター管区の順となった。また，合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸センター管区では前年度より増加し，本部管区及び福岡センター管区では減少した。

なお，札幌センター管内は平成 17 年度から，仙台センター管区は平成 7 年度から，名古屋センター管区は平成 19 年度から検定の申請がなく，平成 26 年度も申請がなかった。

表 4 検定合格件数,合格数量及び実量力価換算量（管区別）
（平成 25・26 年度）

管区※	年度	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))
本部	25	55	222042	22948
	26	53	209275	22094
札幌	25	-	-	-
	26	-	-	-
仙台	25	-	-	-
	26	-	-	-
名古屋	25	-	-	-
	26	-	-	-
神戸	25	79	433867	57353
	26	80	507340	63281
福岡	25	63	265980	27347
	26	47	192800	19409
計	25	197	921889	107648
	26	180	909415	104784

※ 本部管区:関東・甲信越・静岡, 札幌管区:北海道, 仙台管区:東北, 名古屋管区:北陸・東海(静岡除く), 神戸管区:近畿・中国(山口除く)・四国, 福岡管区:山口・九州・沖縄

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 26 年度末の時点で，コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイド，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，硫酸コリスチン及びノシヘプタイド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。なお，センデュラマイシンナトリウム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が登録されていたが，平成 26 年 9 月 1 日に廃止された。

平成 26 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及び実量力価換算量を表 5 に示した。なお，ラサロシドナトリウムは，表 2 で示したとおり検定実績はなかったが，登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

平成 26 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 689 トン（対前年度比 101 %），実量力価換算量は 92 トン(力価)（対前年度比 100 %）であった。

平成 26 年度の製造数量は、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、ノシヘプタイド、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイド、硫酸コリスチンの順に多かった。なお、センデュラマイシンナトリウムは製造がなかった。

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 25・26 年度）

類 別	特定添加物の種類	平成25年度		平成26年度	
		製造数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	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	63120	5050	68680	5494
	硫酸コリスチン	4100	410	4020	402
	ノシヘプタイド	57720	2309	55500	2220
	小 計	124940	7768	128200	8116
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	191700	19170	240320	24032
	センデュラマイシンナトリウム	17600	880	-	-
	モネンシンナトリウム	222380	44476	233540	46708
	ラサロシドナトリウム	128480	19272	87300	13095
	小 計	560160	83798	561160	83835
総 計		685100	91566	689360	91951
対前年度比 (%)		95	103	101	100

（各登録特定飼料等製造業者より聞き取り）

7 特定添加物の総数量等

平成 26 年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の合計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を平成 25 年度の結果とともに表 6 に示した。

平成 26 年度の特定添加物の総数量を類別にみると、ポリエーテル系が最も多く、1136 トン（検定：575 トン、登録：561 トン）と全体の 71 %を占め、種類別ではサリノマイシンナトリウム（30 %）、ナラシン（20 %）、モネンシンナトリウム（15 %）の順に多かった。また、実量力価換算量を類別にみると、同様にポリエーテル系が 143 トン（力価）（検定：59 トン（力価）、登録：84 トン（力価））と全体の 72 %を占め最も多く、種類別ではモネンシンナトリウム（25 %）、サリノマイシンナトリウム（25 %）、ナラシン（16 %）の順に多かった。

次に、平成 17 年度から平成 26 年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は、平成 19 年度から開始され、平成 21 年度には、検定から登録特定飼料等製造業者による製造へと大幅に移行している。

特定添加物の総数量及び実量力価換算量ともに、平成 17 年度から平成 21 年度までは増減を繰り返しながらやや減少傾向にあったが、平成 22 年度に増加し、それ以降はほぼ横ばいである。

平成 26 年度は、特定添加物の総数量全体の 43 %（前年度 43 %），実量力価換算量全体の 47 %（前年度 46 %）を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 6 特定添加物の総数量等
（平成 26 年度）

類 別	特定添加物の種類	総数量※		実量力価換算量	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	34780	2	3727	2
	エンラマイシン	71060	4	5685	3
	硫酸コリスチン	162140	10	16214	8
	バージニアマイシン	-	-	-	-
	ノシヘプチド	67500	4	2700	1
	小 計	335480	21	28326	14
テトラサイクリン系	クロルテトラサイクリン	14400	1	1440	1
	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	2000	0	800	0
	小 計	16400	1	2240	1
マクロライド系	リン酸タイロシン	19370	1	5327	3
	小 計	19370	1	5327	3
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリボール	-	-	-	-
	小 計	-	-	-	-
ポリエーテル系	モネンシンナトリウム	245680	15	49136	25
	サリノマイシンナトリウム	485195	30	48520	25
	ラサロシドナトリウム	87300	5	13095	7
	センデュラマイシンナトリウム	-	-	-	-
	ナラシン	317775	20	31778	16
	小 計	1135950	71	142528	72
その他	アピラマイシン	91575	6	18315	9
	ピコザマイシン	-	-	-	-
	エフロトマイシン	-	-	-	-
	小 計	91575	6	18315	9
総 計		1598775	100	196736	100

※ 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の総計

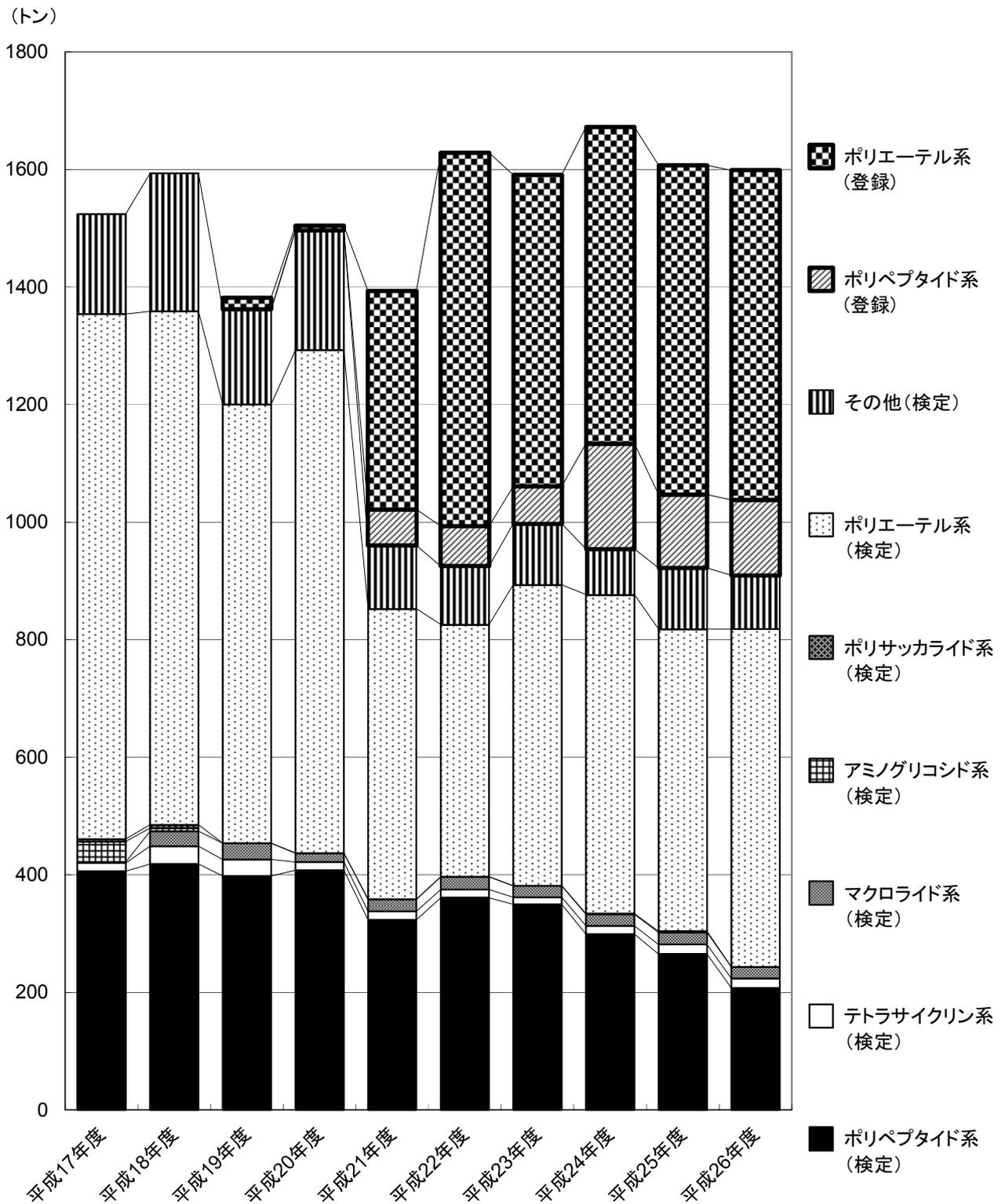


図3 特定添加物の総数量の推移(類別)

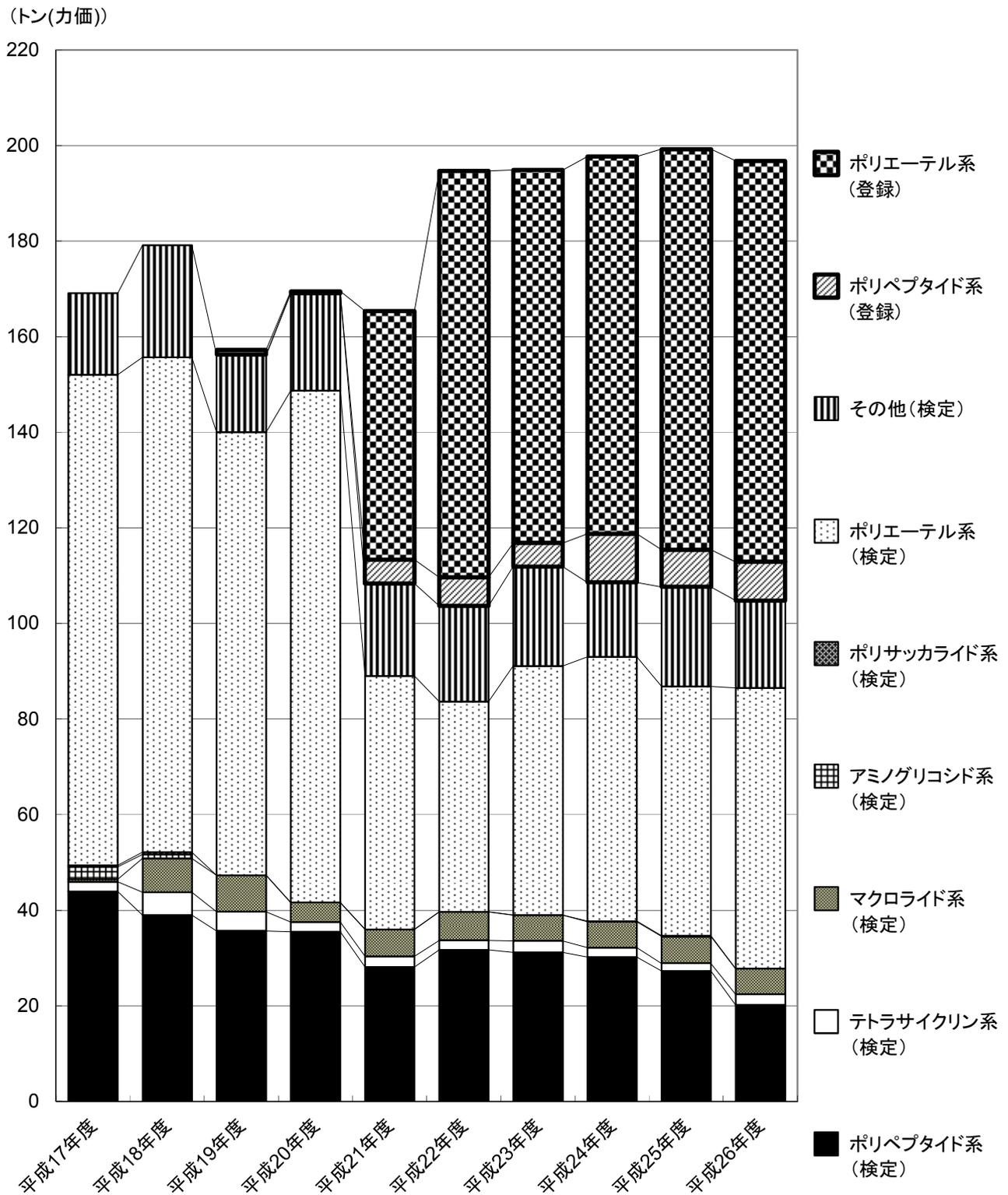


図4 特定添加物の総数の実量カバ換算量の推移(類別)

8 要 約

平成 26 年度の特定添加物の検定及び登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。

- 1) 特定添加物の検定は、8 業者から、11 種類の特定添加物について、19 銘柄の申請があった。
- 2) 特定添加物の検定合格件数は 180 件（申請 180 件）、合格数量は 909 トン、実量力価換算量は 105 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。
- 3) 特定添加物の検定合格数量を種類別にみると、ナラシン、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量では、ナラシン、サリノマイシンナトリウム、アピラマイシンの順に多かった。
- 4) 特定添加物の検定合格数量について、精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 79%を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 77%を占めた。
- 5) 特定添加物の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を管内別にみると、全てにおいて神戸センター管内が最も多かった。
- 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を種類別にみると、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の順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。
- 7) 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製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food.

Tomoya YOSHINARI, Hiroshi TAKEUCHI, Koji AOYAMA,
Masaru TANIGUCHI, Shigeki HASHIGUCHI, Shigemi KAI, Motoki OGISO,
Takashi SATO, Yu AKIYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Setsuko TABATA,
Toshitsugu TANAKA, Eiichi ISHIKURO and Yoshiko SUGITA-KONISHI

Journal of Food Protection, 77(11), 1940-1946 (2014),
doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-185.

2 Development and inter-laboratory study of a method for quantification of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in pet foods

M. Nomura, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara and T. Chihara

World Mycotoxin Journal, 8(1), 55-61 (2015).

3 口蹄疫等の防疫用移動式レンダリング装置から排出される過熱破碎物の
充填・運搬手法の検討

田中 康男, 八木 行雄, 末吉 益雄, 勝田 賢, 宮崎 綾子, 鈴木 亨,
池口 厚男, 會田 紀雄, 石田 三佳, 中久保 亮, 上村 涼子, 橋本 仁康,
弓削 正昭, 大崎 慎人, 犬丸 茂樹, 荻野 暁史, 山下 恭広

家畜衛生学雑誌, 40(4), 203-213 (2015).

飼料研究報告

総目録

第1号～第40号

(昭和41年～平成27年)

飼料研究報告総目録

第 1 号 《昭和 41 年 12 月》

- 1 発刊にさいし
- 2 アミノ酸組成よりみた魚粉の品質
- 3 二種混合飼料の鑑定方法に関する研究
- 4 飼料微量元素の定量法に関する研究
 - I ポーラログラフ分析法による配合飼料の亜鉛定量法
 - II 配合飼料のモリブデン定量法
 - III 配合飼料の銅定量法
 - IV 発光分光分析法による定量法
- 5 末端消費者の入手配合飼料の成分変動について
- 6 ホルマリン処理物質の検出方法に関する研究
- 7 高速度粉砕機による試料調製に関する検討

第 2 号 《昭和 43 年 3 月》

- 1 輸入アルファルファミールの品質について
林 弥太郎, 白藤 卓也, 渋谷 佑彦, 早川 龍雄
- 2 窒素自動定量装置による飼料の粗たん白質の定量について
早川 龍雄, 林 弥太郎, 赤城 万里, 当山 正吉
- 3 飼料に混入されたホルマリン系樹脂の定量法に関する研究
土志田 武彦
- 4 バイカチンの成分量
酒井 博, 田仲 清, 神橋 健一
- 5 微量元素と家畜の栄養障害
早川 龍雄
- 6 配合飼料の取扱い方とその品質の見分け方
寺本 憲太

第 3, 4 号 《昭和 48 年 5 月》

- 1 日本における飼料用としてのメイズの需要と品質について
早川 龍雄
- 2 配合飼料中のフラゾリドンの定量法に関する研究
林 弥太郎, 早川 龍雄
- 3 配合飼料に添加されたアンプロリウムの定量法について
赤城 万里, 早川 龍雄
- 4 飼料に混入されたトリアジン化合物の定性法
土志田 武彦, 大野 静男
- 5 異常卵の生成について
加藤 功

- 6 草炭から分離した繊維に吸着させたフィッシュソリュブル吸着飼料の飼養効果について
加藤 功
- 7 最近の配合飼料の重量検査結果から
大野 静男
- 8 輸入落花生油かす中のアフラトキシンの分析に関する研究
武田 昭七, 津谷川 弘, 早川 龍雄
- 9 飼料中の重金属元素の分析に関する研究
津谷川 弘, 大野 静男

第 5 号 《昭和 54 年 5 月》

昭和 48 年度

- 1 飼料用酵母の安全性に関する飼養試験 (1)
加藤 功
- 2 フラズリドン添加飼料給与豚における筋肉, 肝臓中の当該物質の残留調査
- 3 原子吸光法による飼料中のひ素の定量について
津谷川 弘

昭和 49 年度

- 4 飼料用酵母の安全性に関する飼養試験 (2)
加藤 功
- 5 還元気化—気液平衡法による飼料中の総水銀の定量法 (第 1 報)
津谷川 弘
- 6 配合飼料の品質について
山本 昭次

昭和 50 年度

- 7 バラ積配送飼料のサンプリング法の検討
山本 昭次
- 8 配合飼料の袋間の成分バラツキ調査
山本 昭次
- 9 飼料用酵母中の 3, 4-ベンツピレン定量
石黒 瑛一
- 10 基準分析法原案作成のための共通試料分析試験成績について

昭和 51 年度

- 11 配合飼料に添加されたデコキネートの定量法について
石黒 瑛一
- 12 飼料の粗繊維定量法 (ろ過法) におけるステンレス金網の検討
田中 義次, 大沢 信夫
- 13 配合飼料中の塩酸ロベニディンの定量法の検討
千葉 敏
- 14 配合飼料中のゾーリンの定量法の検討
穴戸 義弘, 鈴木 章

昭和 52 年度

- 15 飼料中の合成抗菌剤（塩酸ロベニディン，デコキネート及びゾーリン）の共通試料による分析成績について
- 16 飼料穀物中のオクラトキシン A の定量法について
 宍戸 義弘
- 17 配合飼料中のナイカルバジンの定量法について
 石黒 瑛一
- 18 Zn, Cu の乾式灰化法における温度の検討
 田中 義次
- 19 配合飼料中のカルバドックスの定量法の検討
 田中 義次
- 20 ゴールドフィッシュ（Gold fish）脂肪抽出装置による粗脂肪定量法の検討
 小原 充，渡久地 章男，石崎 和宏，大沢 信夫
- 21 コンウェイ微量拡散法による配合飼料中の尿素の定量法の検討（第 1 報）
 石黒 瑛一，畠田 秀一
- 22 動物性飼料原料からのサルモネラ分離成績
 吉村 治郎
- 23 コンウェイ微量拡散法による配合飼料中の尿素の定量法の検討（第 2 報）
 畠田 秀一
- 24 配合飼料に添加した抗生物質の迅速定量法について
 河野 敏威，山本 昭次
- 25 試料液調製方法の差がり定量値に及ぼす影響について
 大沢 信夫，菅野 清

第 6 号 《昭和 55 年 11 月》

昭和 53 年度

- 1 配合飼料中のクロピドールの定量法の検討
 畠田 秀一
- 2 配合飼料中のビタミン B₂ 定量法について
 松原 伊左夫
- 3 飼料中のアミノ酸分析法について（第 1 報）
 菅野 清，小原 充
- 4 共通試料によるカルバドックス，ナイカルバジン，アンプロリウム及びオクラトキシン A の共同分析試験成績
 大沢 信夫
- 5 抗生物質製剤中の菌体鑑定法について
 安倍 豊子，金丸 一郎

昭和 54 年度

- 6 薄層クロマトグラフィーによる配合飼料中のアフラトキシンのスクリーニング法について
伊藤 清志
- 7 魚粉中のヒスタミン定量法について (第 2 報)
石黒 瑛一, 田中 義次, 千原 哲夫
- 8 共通試料によるビタミン B₂, クロピドール, エトパペート及びヒスタミンの共同分析試験成績
大沢 信夫
- 9 配合飼料中のアンプロリウムの定量法の追加検討
田中 義次, 蛭川 政次
- 10 飼料中のアミノ酸分析法について (第 2 報)
菅野 清
- 11 りん化アルミニウム剤によるくん蒸後の牧草中のりん化水素残留量について
菅野 清
- 12 輸入牧草中のりん化水素の残留量調査
服部 昌郎
- 13 配合飼料中の塩酸オキシテトラサイクリンの定量法の検討
菅野 清
- 14 配合飼料中の硫酸コリスチンの定量法の検討
小山 敬之, 河野 敏威
- 15 配合飼料中の塩酸クロルテトラサイクリンの定量法の検討
菅野 清
- 16 配合飼料中のモネンシナトリウムの定量法の検討
安倍 豊子, 河野 敏威
- 17 配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの定量法の検討
安倍 豊子, 河野 敏威
- 18 ふすま歩留まりの推定法について
帯金 重人, 松原 伊左夫, 畠田 秀一
- 19 動物性飼料原料のサルモネラ検査成績
菅野 清, 安倍 豊子, 小山 敬之
- 20 配合飼料及びプレミックス中のミネラルの鑑定法
帯金 重人
- 21 魚粉に関する調査について
服部 昌郎
- 22 プレミックス中の抗生物質の定量法の検討
小山 敬之

第 7 号 《昭和 56 年 11 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のオラキンドックスの定量法について
松原 伊左夫

- 2 共通試料によるオラキンドックスの共同分析試験
大沢 信夫
- 3 配合飼料中のプロピオン酸の定量法について
鈴木 章, 田中 義次, 宍戸 義弘
- 4 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の BHT の定量法について
石黒 瑛一, 畠田 秀一
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の BHA の定量法の検討
畠田 秀一
- 6 高速液体クロマトグラフィーによる魚粉中の BHA 及び BHT の定量法の検討
畠田 秀一
- 7 共通試料によるプロピオン酸, BHA 及び BHT の共同分析試験
大沢 信夫
- 8 けい光光度法による配合飼料中のエトキシキンの定量法の検討
畠田 秀一
- 9 共通試料によるエトキシキンの共同分析試験
大沢 信夫
- 10 吸光光度法によるスルファキノキサリンの定量法について (第 1 報)
千葉 敏, 田中 義次, 石黒 瑛一
- 11 吸光光度法によるスルファキノキサリンの定量法について (第 2 報)
千葉 敏, 田中 義次, 石黒 瑛一
- 12 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のスルファキノキサリンの定量法について (第 3 報)
田中 義次, 白井 裕治
- 13 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のエトパペートの定量法の検討
石黒 瑛一
- 14 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の酢酸 *dl*- α -トコフェロール (ビタミン E) の
定量法の検討
宍戸 義弘
- 15 共通試料による配合飼料中の 5 種の抗生物質の共同分析試験について
田中 義次, 中村 久
- 16 配合飼料中のチオペプチンの定量法の検討 (第 1 報)
菅野 清, 小山 敬之
- 17 配合飼料中のりん酸タイロシンの定量法の検討
小山 敬之
- 18 配合飼料中のエンラマイシンの定量法について (第 1 報)
草間 豊子
- 19 動物性飼料原料のサルモネラ検査成績 (第 3 報)
菅野 清, 千原 哲夫, 草間 豊子, 小山 敬之

- 20 原子吸光測光法による Ca の定量法について —試料液の調製法及び測光条件の違いが Ca 定量値に及ぼす影響—

田中 義次

- 21 魚粉中のヒスタミン定量法について (第 1 報)

石黒 瑛一, 田中 義次, 千原 哲夫

- 22 原子吸光測光法による市販プレミックス中の Cu, Zn, Fe 及び Mn 定量上の一知見について

館内 三郎

- 23 レンダリング工場におけるサルモネラの汚染実態調査 (第 1 報)

菅野 清, 小山 敬之, 河野 敏威

第 8 号 《昭和 58 年 2 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによるとうもろこし中のアフラトキシン B₁ の定量法の精度の検討

石黒 瑛一

- 2 くず大豆に混在するチョウセンアサガオ種子について

田口 隆清, 田中 義次, 山谷 昭一, 石黒 瑛一

- 3 高速液体クロマトグラフィーによる魚粉中のエトキシキンの定量法について

石黒 瑛一

- 4 高速液体クロマトグラフィーによる動物油脂中のエトキシキンの定量法について

石黒 瑛一, 泉 和夫

- 5 プレミックス中のビオチンの定量法について

白井 裕治

- 6 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の水溶性ビタミンの定量法の検討

石黒 瑛一, 笠 信一, 須原 正, 畠田 秀一, 伊藤 清志

- 7 共通試料によるプレミックス中の硝酸チアミン, リボフラビン及び塩酸ピリドキシンの共同分析試験成績

石黒 瑛一

- 8 共通試料による酢酸 *dl*- α -トコフェロールの共同分析試験成績

石黒 瑛一

- 9 配合飼料中のバントラシンの定量法について (第 1 報)

千原 哲夫

- 10 配合飼料中のキサマイシンの定量法の検討

小山 敬之

- 11 共通試料による配合飼料中の 5 種の抗生物質の共同分析試験成績について

田中 義次

- 12 保存温度の違いが配合飼料中の抗生物質の定量に及ぼす影響

千原 哲夫, 小山 敬之, 菅野 清, 草間 豊子, 田中 義次

- 13 動物飼料原料のサルモネラ検査成績 (第 4 報)

菅野 清, 千原 哲夫, 草間 豊子, 小山 敬之

14 レンダリング工場におけるサルモネラ汚染実態調査（第2報）

菅野 清, 小山 敬之

第 9 号 《昭和 59 年 2 月》

- 1 ボミトキシシ (デオキシニバレノール) 及びニバレノールの定量法の検討
石黒 瑛一
- 2 共通試料によるアフラトキシシ B₁ の分析成績
石黒 瑛一
- 3 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のビタミン C の定量法の検討
須原 正, 鳥田 秀一
- 4 共通試料によるプレミックス中の d-ビオチンの共同分析試験について
田口 隆清, 白井 裕治, 田中 義次
- 5 FGIS が穀物格付検査に採用しているとうもろこしの水分定量法について
小原 充, 高野 一雄
- 6 配合飼料中のマカルボマイシンの定量法の検討
千原 哲夫
- 7 配合飼料中のラサロシドナトリウムの定量法の検討
菅野 清
- 8 配合飼料中のピコザマイシンの定量法の検討
菅野 清
- 9 配合飼料中のスピラマイシンの定量法
草間 豊子
- 10 配合飼料中のオレアンドマイシンの定量法の検討
山谷 昭一
- 11 配合飼料中のバージニアマイシンの定量法の検討
小山 敬之
- 12 共通飼料による配合飼料中の 6 種類の抗生物質の共同分析試験
松原 伊左夫, 田中 義次
- 13 動物性飼料原料のサルモネラ検査成績 (第 5 報)
菅野 清, 山谷 昭一, 千原 哲夫, 草間 豊子, 松原 伊左夫
- 14 ラサロシドナトリウムの迅速定量法の分析誤差に関する共同試験について
田中 義次, 豊田 友子, 三好 重孝

第 10 号 《昭和 60 年 2 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のアフラトキシシ B₁ の定量法
木下 光明, 佐藤 康宏, 石黒 瑛一
- 2 共通試料によるアフラトキシシ B₁ の共同分析試験
石黒 瑛一

- 3 共通試料によるニバレノールの共同分析試験
石黒 瑛一
- 4 共通試料によるデオキシニバレノールの共同分析試験
石黒 瑛一
- 5 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のシアノコバラミン（ビタミン B₁₂）の定量法
畠田 秀一
- 6 試料液調製方法の相違に基づくりん定量値の変動について
佐藤 康宏, 須原 正
- 7 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のスルファキノキサリンの定量法
石黒 瑛一, 佐藤 康宏, 春日 健二
- 8 共通試料によるスルファキノキサリンの共同分析試験
石黒 瑛一
- 9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のアープリノシッドの定量法
小原 充
- 10 配合飼料中のアープリノシッドの迅速定量法
木下 光明
- 11 配合飼料中のアボパルシンの定量法
松原 伊左夫
- 12 共通試料によるアボパルシンの共同分析試験
鈴木 章
- 13 プレミックス中のラサロシドナトリウムの定量法
菅野 清
- 14 プレミックス中のラサロシドナトリウムの定量法の共同分析試験
菅野 清
- 15 輸入米麦等の事故品の真菌検査法
草間 豊子, 松原 伊左夫
- 16 動物性飼料原料のサルモネラ汚染の状況（昭和 58 年度）
（動物性飼料原料のサルモネラ検査成績：第 6 報）
千原 哲夫, 松原 伊左夫, 山谷 昭一, 菅野 清, 草間 豊子
- 17 比色法によるプレミックス中のニコチン酸の定量法
井澤 清美, 倉光 良造, 鈴木 章
- 18 共通試料によるニコチン酸の共同分析試験
井澤 清美
- 19 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のニコチン酸アミドの定量法
酒井 博, 鈴木 章, 井澤 清美, 新見 豊和
- 20 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のパラアミノ安息香酸の定量法
坂上 光一
- 21 共通試料によるパラアミノ安息香酸の共同分析試験
坂上 光一

- 22 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の葉酸の定量法
安原 靖宏, 久保 明, 泉 和夫, 坂上 光一
- 23 共通試料による葉酸の共同分析試験
安原 靖宏
- 24 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のビタミン B₂の定量法
須原 正, 寫田 秀一, 伊藤 清志, 福本 裕二
- 25 共通試料によるシアノコバラミン (B₁₂) の共同分析試験
帯金 重人
- 26 プレミックス中の鉄, 銅, マンガン, 亜鉛及びマグネシウムの定量法
伊藤 清志
- 27 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のビタミン K₃の定量法
千葉 一則, 石橋 好成, 早川 俊明
- 28 共通試料によるメナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノールの共同分析試験
千葉 一則
- 29 共通試料によるメナジオン亜硫酸水素ナトリウムの共同分析試験
千葉 一則

第 11 号 《昭和 61 年 3 月》

- 1 飼料原料及び配合飼料中のエチレンジブロマイド (EDB) の定量法
石黒 瑛一
- 2 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のビタミン A の定量法について
帯金 重人
- 3 共通試料によるビタミン A の共同分析試験成績
帯金 重人
- 4 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のビタミン D₃ (コレカルシフェロール) の分析法について
帯金 重人
- 5 共通試料によるビタミン D₃ の共同分析試験成績
帯金 重人
- 6 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のリボフラビン酪酸エステル定量法の検討
福本 裕二
- 7 共通試料によるリボフラビン酪酸エステル共同分析試験成績
福本 裕二
- 8 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のアセトメナフトン (ビタミン K₄) の定量法の検討
千葉 一則, 下村 正之
- 9 共通試料によるアセトメナフトンの共同分析試験成績
千葉 一則

- 10 プレミックス中の酢酸 *dl*- α -トコフェロール (ビタミン E) 定量法の追加検討
石黒 瑛一
- 11 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法
石黒 瑛一
- 12 共通試料によるクエン酸モランテルの共同試験成績
石黒 瑛一
- 13 高速液体クロマトグラフィーによるナイカルバジンの定量法
小山 敬之, 畠田 秀一
- 14 共通試料によるナイカルバジンの共同分析試験成績
小山 敬之
- 15 牛用配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量法
草間 豊子
- 16 牛用配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの定量法の検討
草間 豊子
- 17 配合飼料中のハイグロマイシン B の定量法
山谷 昭一
- 18 共通試料によるハイグロマイシン B の共同分析試験成績
鈴木 章
- 19 プレミックス中のバージニアマイシンの定量法の再検討
千原 哲夫
- 20 共通試料によるバージニアマイシンの共同分析試験成績
鈴木 章
- 21 プレミックス中の硫酸コリスチンの定量法の改良について
山谷 昭一
- 22 共通試料による硫酸コリスチンの共同分析試験成績
鈴木 章
- 23 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のリン酸タイロシンの定量法の検討
畠田 秀一
- 24 動物性飼料原料のサルモネラ汚染状況 (昭和 59 年度)
(動物性飼料原料のサルモネラ検査成績: 第 7 報)
千原 哲夫, 山谷 昭一, 松原 伊左夫, 浅木 仁志, 草間 豊子,
菅野 清, 小山 敬之
- 25 肉用牛肥育用配合飼料中のモネンシンナトリウムの迅速定量法
小山 敬之
- 26 肉用牛肥育用配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの迅速定量法
須原 正

第 12 号 《昭和 62 年 3 月》

- 1 原子吸光光度法によるプレミックス中のコバルトの定量法
山口 峻, 倉光 良造
- 2 共通試料によるコバルトの共同分析試験成績
山口 峻
- 3 キャピラリーガスクロマトグラフによる穀類中の有機りん系農薬同時分析法の検討 (第 1 報)
佐藤 康宏, 石黒 瑛一
- 4 キャピラリーガスクロマトグラフによる穀類中の有機りん系農薬同時分析法の検討 (第 2 報)
佐藤 康宏, 石黒 瑛一
- 5 共通試料によるダイアジノンの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 6 共通試料によるフェニトロチオンの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 7 共通試料によるマラチオンの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 8 共通試料によるパラチオンの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 9 高速液体クロマトグラフィーによるアンプロリウムの定量法
福本 裕二, 畠田 秀一
- 10 共通試料によるアンプロリウムの共同分析試験成績
福本 裕二
- 11 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの定量法 (第 1 報)
石黒 瑛一, 佐藤 康宏
- 12 共通試料によるハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 13 プレミックス中のビコザマイシンの定量法
菅野 清, 梶山 正信
- 14 共通試料によるビコザマイシンの共同分析試験成績
小山 敬之
- 15 配合飼料中のノシヘプタイトの定量法の検討
草間 豊子, 山谷 昭一
- 16 共通試料によるノシヘプタイトの共同分析試験成績
小山 敬之
- 17 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のパントテン酸カルシウムの定量法
石崎 和宏, 松原 伊左夫
- 18 共通試料によるパントテン酸カルシウムの共同分析試験成績
松原 伊左夫

- 19 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の塩酸 L-リジンの定量法
白井 裕治
- 20 共通試料による塩酸 L-リジンの共同分析試験成績
白井 裕治
- 21 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の L-グルタミン酸ナトリウム及び DL-メチオニンの定量法
柴田 政人, 白井 裕治
- 22 共通試料による L-グルタミン酸ナトリウム及び DL-メチオニンの共同分析試験成績
柴田 政人
- 23 ガスクロマトグラフィーによる配合飼料中のプロピレングリコールの定量法
安原 靖宏
- 24 共通試料によるプロピレングリコールの共同分析試験成績
安原 靖宏
- 25 高速液体クロマトグラフィーによるクロルテトラサイクリンの定量結果について
—微生物学的定量法との比較—
寫田 秀一
- 26 動物性飼料原料のサルモネラ汚染の状況
千原 哲夫, 寫田 秀一, 草間 豊子, 浅木 仁志, 松原 伊左夫,
山谷 昭一, 菅野 清, 小山 敬之

第 13 号 《昭和 63 年 3 月》

- 1 ガスクロマトグラフィーによる穀類中の T-2 トキシンの定量法
田中 寿雄, 石崎 和宏
- 2 共通試料による T-2 トキシンの共同分析試験成績
田中 寿雄
- 3 ECD-キャピラリーガスクロマトグラフ法による穀類及び配合飼料中の有機塩素系農薬の同時定量法
中村 行伸, 松村 惣一郎, 神津 剛夫, 福本 裕二
- 4 共通試料による有機塩素系農薬の共同分析試験成績
中村 行伸
- 5 ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの迅速定量法
石黒 瑛一, 三堀 美香
- 6 共通試料によるハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム迅速定量法による共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 7 プレミックス中のアボパルシンの定量法
木下 光明
- 8 共通試料によるアボパルシンの共同分析試験成績
木下 光明

- 9 ポリエーテル系抗生物質を含むバルキータイプ牛用飼料の管理方法の簡略化の可否を検討する実験結果
山本 昭次, 吉岡 修
- 10 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の塩酸ジベンゾイルチアミンの定量法
石黒 瑛一, 平岡 久明, 鈴木 章
- 11 共通試料による塩酸ジベンゾイルチアミンの共同分析試験成績
石黒 瑛一
- 12 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の L-トレオニン, DL-アラニン及びアミノ酢酸の定量法
白井 裕治, 柴田 政人
- 13 共通試料による L-トレオニンの共同分析試験成績
白井 裕治
- 14 共通試料による DL-アラニンの共同分析試験成績
白井 裕治
- 15 共通試料によるアミノ酢酸の共同分析試験成績
白井 裕治
- 16 動物性飼料原料のサルモネラ汚染の状況 (昭和 61 年度)
動物性飼料原料のサルモネラ検査成績 (第 9 報)
木下 光明, 寫田 秀一, 草間 豊子, 堀切 正賀寿, 小林 利男,
千原 哲夫, 小山 敬之
- 17 植物性油かす類のサルモネラ汚染の状況 (第 1 報)
木下 光明, 寫田 秀一, 草間 豊子, 堀切 正賀寿, 小林 利男,
千原 哲夫, 小山 敬之

第 14 号 《平成元年 3 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる穀類及び配合飼料中のオクラトキシン A の定量法
下村 正之, 石黒 瑛一
- 2 共通試料によるオクラトキシン A の共同分析試験成績
下村 正之
- 3 共通試料(天然汚染ライ麦)によるオクラトキシン A の共同分析試験成績
下村 正之
- 4 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料及びプレミックス中のデコキネートの定量法
木下 光明
- 5 共通試料によるデコキネートの共同分析試験成績
木下 光明
- 6 プレミックス中のクロルテトラサイクリンの定量法の改良について
草間 豊子
- 7 共通試料によるクロルテトラサイクリンの共同分析試験成績
草間 豊子

- 8 配合飼料中のポリナクチンの定量法
 寫田 秀一, 浅木 仁志
- 9 共通試料によるポリナクチンの共同分析試験成績
 寫田 秀一
- 10 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の塩酸ベタインの定量法
 菅野 清, 春日 美香
- 11 共通試料による塩酸ベタインの共同分析試験成績
 菅野 清, 春日 美香
- 12 脂肪酸カルシウムを含む配合飼料中の粗脂肪定量の検討 (第一報)
 鈴木 章, 石黒 瑛一
- 13 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のラサロシドナトリウムの定量法
 石黒 瑛一
- 14 配混合飼料のサルモネラ汚染状況 (第1報)
 小林 利男, 寫田 秀一, 草間 豊子, 國分 裕之, 堀切 正賀寿,
 小山 敬之, 木下 光明
- 15 飼料原料のサルモネラ汚染の状況 (昭和 62 年度)
 小林 利男, 寫田 秀一, 草間 豊子, 國分 裕之, 堀切 正賀寿,
 小山 敬之, 木下 光明

第 15 号 《平成 2 年 3 月》

- 1 蛍光光度法による飼料中のセレンの定量法
 古賀 龍二, 一井 宏, 梶山 正信
- 2 共通試料によるセレンの共同分析試験成績
 一井 宏
- 3 高速液体クロマトグラフィーによる穀類中のゼアラレノンの定量法
 菅野 清, 石橋 隆幸, 松原 伊左夫
- 4 共通試料によるゼアラレノンの共同分析試験成績
 石橋 隆幸
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度オラキンドックスの定量
 柴田 政人, 松崎 学
- 6 共通試料中によるオラキンドックスの共同分析試験成績
 柴田 政人, 松崎 学
- 7 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの定量法
 泉 和夫, 石黒 瑛一
- 8 共通試料によるハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの共同分析試験成績
 泉 和夫
- 9 合成抗菌剤ナイカルバジンの鶏組織中への残留について
 鈴木 章, 平岡 久明, 佐々木 隆, 須原 正, 菅野 清

- 10 ラサロシドナトリウムの鶏組織への残留について
一井 宏, 佐藤 康彦, 下村 正之, 梶山 正信, 石黒 瑛一
- 11 高速液体クロマトグラフィーによるノシヘプタイトの定量について (第1報)
—微生物学的定量法との比較—
寫田 秀一
- 12 飼料原料のサルモネラ汚染状況 (昭和63年度)
堀切 正賀寿, 寫田 秀一, 小林 利男, 福本 裕二, 佐々木 隆,
小山 敬之, 草間 豊子

第16号 《平成3年3月》

- 1 イオンクロマトグラフィーによる飼料中の臭素の定量法
神津 剛夫, 小森谷 敏一, 須原 正
- 2 共通試料による臭素の共同分析試験成績
神津 剛夫
- 3 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる穀類及び配合飼料中のカーバメイト系農薬 (殺虫剤) の同時定量法
早川 俊明, 中村 行伸
- 4 共通試料によるカーバメイト系農薬の共同分析試験成績
早川 俊明, 中村 行伸
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のピペロニルブトキシドの定量法
齋藤 紀雄
- 6 共通試料によるピペロニルブトキシドの共同分析試験成績
齋藤 紀雄
- 7 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中のピリミホスメチルの定量法
早川 俊明, 中村 行伸
- 8 共通試料によるピリミホスメチルの共同分析試験成績
早川 俊明, 中村 行伸
- 9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度アンプロリウムの定量法
鈴木 章
- 10 共通試料によるアンプロリウムの共同分析試験成績
鈴木 章
- 11 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の低濃度オラキンドックスの定量法
功刀 豊, 橋本 亮
- 12 共通試料による低濃度オラキンドックスの共同分析試験成績
功刀 豊, 橋本 亮
- 13 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度スルファキノキサリンの定量法
下村 正之, 川口 伸司
- 14 共通試料による低濃度スルファキノキサリンの共同分析試験成績
下村 正之, 川口 伸司

- 15 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度デコキネートの定量法
木下 光明
- 16 共通試料による低濃度デコキネートの共同分析試験成績
木下 光明
- 17 高速液体クロマトグラフィーによるエトパペート, ナイカルバジン, ラサロシドナトリウム及びデコキネートの同時定量法
石黒 瑛一
- 18 配合飼料中の低濃度抗菌性物質の同時分析について (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及びリン酸タイロシンのバイオオートグラフィー)
小山 敬之, 小林 利男
- 19 共通試料による配合飼料中の低濃度抗菌性物質同時分析の共同分析試験成績
小山 敬之
- 20 牛用配合飼料中のラサロシドナトリウムの定量法
白戸 綾子, 小山 敬之
- 21 共通試料による配合飼料中のラサロシドナトリウムの共同分析試験成績
白戸 綾子
- 22 配合飼料中のエフロトマイシンの定量法
福本 裕二
- 23 共通試料による配合飼料中のエフロトマイシンの共同分析試験成績
福本 裕二
- 24 飼料のサルモネラ汚染の状況 (平成元年度)
福本 裕二, 草間 豊子, 小山 敬之, 小林 利男, 佐々木 隆,
白戸 綾子, 堀切 正賀寿
- 25 ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの鶏組織内への残留について
一井 宏, 佐藤 康彦, 下村 正之, 梶山 正信, 石黒 瑛一

第 17 号 《平成 4 年 3 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のゼアラレノンの定量法
小木 京子, 松原 伊左夫
- 2 共通試料によるゼアラレノンの共同分析試験成績
小木 京子
- 3 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中の有機りん系農薬 (クロルピリホスメチル及びピリミホスメチル) の同時定量法
早川 俊明, 吉本 都, 中村 行伸
- 4 共通試料による有機りん系農薬 (クロルピリホスメチル及びピリミホスメチル) の共同分析試験成績
早川 俊明, 吉本 都

- 5 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中の有機りん系農薬（ダイアジノン，フェニトロチオン，マラチオン，MPP，パラチオン，PAP，EPN 及び DDVP）の系統分析法
小嶋 二三夫，石田 有希恵
- 6 共通試料による有機りん系農薬（タイアジノン，フェニトロチオン，マラチオン，MPP，パラチオン，PAP，EPN 及び DDVP）の共同分析試験成績
小嶋 二三夫，石田 有希恵
- 7 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のチアベンダゾールの定量法
野口 淳
- 8 共通試料によるチアベンダゾールの共同分析試験成績
野口 淳
- 9 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の低濃度スルファキノキサリンの定量法
川口 伸司
- 10 共通試料によるプレミックス中の低濃度スルファキノキサリンの共同分析試験成績
川口 伸司
- 11 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの定量法
石橋 隆幸，下村 正之，石黒 瑛一
- 12 共通試料による低濃度ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの共同分析試験成績
石橋 隆幸
- 13 プレミックス中のノシヘプタイドの定量法
福本 裕二
- 14 共通試料によるプレミックス中のノシヘプタイドの共同分析試験成績
福本 裕二
- 15 配合飼料中のアビラマイシンの定量法（第1報）
菅野 清，佐々木 隆
- 16 共通試料による配合飼料中のアビラマイシンの共同分析試験成績
菅野 清
- 17 配合飼料中の残留抗菌性物質の同時分析について（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，リン酸タイロシン，キタサマイシン，バージニアマイシン及びノシヘプタイドのバイオオートグラフィー）
小山 敬之
- 18 共通試料による配合飼料中の残留抗菌性物質同時分析の共同分析試験成績
小山 敬之
- 19 飼料のサルモネラ汚染状況（平成2年度）
國分 裕之，小山 敬之，菅野 清，福本 裕二，金子 昌二，
白戸 綾子，佐々木 隆，堀切 正賀寿
- 20 デコキネートの鶏組織内への残留について
一井 宏，佐藤 康彦，齋藤 紀雄，柳沢 茂樹，石橋 隆幸，
石黒 瑛一

第 18 号 《平成 5 年 4 月》

- 1 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中のホサロンの定量法
白井 裕治, 緒方 弘志, 石田 有希恵, 小嶋 二三夫
- 2 共通試料によるホサロンの共同分析試験成績
白井 裕治
- 3 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中の臭化メチルの定量法
早川 俊明, 川口 伸司
- 4 共通試料による臭化メチルの共同分析試験成績
早川 俊明, 川口 伸司
- 5 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中の農薬 (CNA, アラクロール, アレスリン, メトキシクロール及びクロルプロファム) の定量法
齋藤 紀雄
- 6 共通試料による農薬 (CNA, アラクロール, アレスリン, メトキシクロール及びクロルプロファム) の共同分析試験成績
齋藤 紀雄
- 7 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中の低濃度デコキネートの定量法
小森谷 敏一, 佐々木 徳幸, 原田 治良
- 8 共通試料によるプレミックス中の低濃度デコキネートの共同分析試験成績
原田 治良
- 9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度エトパベートの定量法
引地 典雄, 原田 治良
- 10 共通試料による配合飼料中の低濃度エトパベートの共同分析試験成績
原田 治良
- 11 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度クエン酸モランテルの定量法
千原 哲夫, 松村 惣一郎, 橋本 亮, 堀切 正賀寿
- 12 共通試料による配合飼料中の低濃度クエン酸モランテルの共同分析試験成績
千原 哲夫
- 13 配合飼料中のセデカマイシンの定量法
菅野 清, 白戸 綾子
- 14 共通試料による配合飼料中のセデカマイシンの共同分析試験成績
菅野 清
- 15 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 3 年度)
伊佐 まゆみ, 日比野 洋, 金子 昌二, 國分 裕之, 福本 裕二,
菅野 清, 小山 敬之
- 16 配合飼料におけるペレット加工の殺菌効果について
菅野 清, 日比野 洋, 伊佐 まゆみ, 荒木 誠士, 國分 裕之,
福本 裕二, 小山 敬之

17 配合飼料に微量添加したデコキネートの鶏組織内への残留について

一井 宏, 佐藤 康彦, 齋藤 紀雄, 梶山 正信, 柳沢 茂樹,
石橋 隆幸, 帯金 重人

第 19 号 《平成 6 年 4 月》

1 セツパックフロリジルカートリッジを用いた配合飼料中のアフラトキシン B₁ の定量法

菅野 清

2 共通試料による配合飼料中のアフラトキシン B₁ の共同分析試験成績

菅野 清

3 ゲル浸透クロマトグラフィーを用いたキャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中の有機りん系農薬（ダイアジノン, クロルピリホスメチル, フェントロチオン, ピリミホスメチル, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, EPN 及びホサロン）の同時定量法

白井 裕治, 鈴木 茂孝, 石田 有希恵

4 共通試料による飼料中の有機りん系農薬（ダイアジノン, クロルピリホスメチル, フェントロチオン, ピリミホスメチル, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, EPN 及びホサロン）の共同分析試験成績

白井 裕治

5 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のベノミルの定量法

齋藤 紀雄

6 共通試料による飼料中のベノミルの共同分析試験成績

齋藤 紀雄

7 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のジネブ及びマンゼブの定量法

功刀 豊

8 共通試料による配合飼料中のジネブ及びマンゼブの共同分析試験成績

功刀 豊

9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法

千原 哲夫, 堀切 正賀寿

10 共通試料による配合飼料中のクエン酸モランテルの共同分析試験成績

千原 哲夫

11 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のクエン酸モランテルの定量法

千原 哲夫, 堀切 正賀寿

12 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度ナイカルバジンの定量法

石橋 隆幸

13 共通試料による配合飼料中の低濃度ナイカルバジンの共同分析試験成績

石橋 隆幸

14 配合飼料中のオリエンチシンの定量法

山谷 昭一, 内山 丈

15 共通試料による配合飼料中のオリエンチシンの共同分析試験成績

山谷 昭一

- 16 プレミックス中のセデカマイシンの定量法
佐々木 隆, 小野 雄造
- 17 共通試料によるプレミックス中のセデカマイシンの共同分析試験成績
佐々木 隆, 小野 雄造
- 18 ペレット状配合飼料中のビコザマイシンの改良定量法の確認について
荒木 誠士
- 19 配合飼料中のセンデュラマイシンナトリウムの定量法
山谷 昭一
- 20 共通試料による配合飼料中のセンデュラマイシンナトリウムの共同分析試験成績
秋元 京子
- 21 配合飼料に過剰添加したラサロシドナトリウムの鶏組織内への残留について
一井 宏, 佐藤 康彦, 齋藤 紀雄, 梶山 正信, 柳澤 茂樹,
石橋 隆幸, 帯金 重人
- 22 配合飼料に過剰添加したサリノマイシンナトリウムの鶏組織内への残留について
梶山 正信, 佐藤 康彦, 齋藤 紀雄, 柳澤 茂樹, 石橋 隆幸,
山口 保樹, 帯金 重人

他誌掲載論文

Simple and rapid cleanup method for determination of aflatoxin B₁ in mixed feed by Sep-Pak Florisil cartridge
(マイコトキシン Vol. 37, 1993)

Kiyoshi SUGANO, Anong BINTVIHOK,
Panun TANAJAROENWTCH, Lanee SOOKTHINTHAI,
Rumpha INTRARAKSA

第 20 号 《平成 7 年 4 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる牧草中の亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の同時定量法
鈴木 茂孝, 白井 裕治
- 2 ゲル浸透クロマトグラフィーを用いた高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のクロルフルアズロンの定量法
白井 裕治, 伊佐 まゆみ, 石田 有希恵, 鈴木 茂孝, 早川 俊明,
柴田 政人, 小山 敬之, 宍戸 義弘
- 3 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる魚粉中のトリブチルスズ化合物の定量法
平岡 久明
- 4 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中のフェンバレレート及びペルメトリンの同時定量法
齋藤 紀雄
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のエトパペートの定量法
引地 典雄
- 6 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のエトパペートの定量法
引地 典雄

- 7 ペレット状の配合飼料中のセンドュラマイシンナトリウムの定量法
山谷 昭一
- 8 配合飼料中の飼料級ノシヘプタイトの定量法
秋元 京子, 福本 裕二
- 9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料及び魚粉中のエトキシキンの定量法
早川 俊明, 伊佐 まゆみ
- 10 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のフマル酸の定量法
野口 淳
- 11 鶏用配合飼料中のセンドュラマイシンナトリウムの迅速定量法 (分光光度法)
小山 敬之, 鬼頭 敦司
- 12 牛用配合飼料中のラサロシドナトリウムの迅速定量法 (分光光度法)
小山 敬之, 鬼頭 敦司, 鈴木 茂孝
- 13 飼料用 *Bacillus* 属生菌剤 (製剤) 及び飼料用 *Clostridium* 属生菌剤 (製剤) の定量法及び簡易同定法
荒木 誠士
- 14 飼料用 *Enterococcus* 属生菌剤 (製剤) の定量法及び簡易同定法
秋元 京子
- 15 飼料用 *Lactobacillus* 属生菌剤 (製剤) の定量法及び簡易同定法
秋元 京子
- 16 飼料用 *Bifidobacterium* 属生菌剤 (製剤) の定量法及び簡易同定法
荒木 誠士, 秋元 京子

第 21 号 《平成 8 年 4 月》

- 1 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のキャプタンの定量
松崎 学
- 2 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のクロルピクリンの定量
橋本 亮, 松村 惣一郎, 福本 裕二, 鬼頭 敦司
- 3 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のクロルフルアズロンの定量
鈴木 茂孝, 関口 若菜, 白井 裕治
- 4 飼料中のクロルベンジレート of 定量法の分析精度の検討
功刀 豊, 石田 有希恵
- 5 ガスクロマトグラフィーによる飼料中の 35 種類の有機りん系農薬の系統的定量
白井 裕治, 鈴木 茂孝, 日比野 洋, 早川 俊明
- 6 飼料中の 2,4-D 及び 2,4,5-T の定量法の分析精度の検討
古賀 龍二
- 7 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のアンプロリウムの定量
小山 敬之, 白井 裕治
- 8 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のアンプロリウムの定量
小山 敬之, 白井 裕治

- 9 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度アンプロリウムの定量
小山 敬之, 白井 裕治
- 10 プレミックス中のセンデュラマイシンナトリウムの定量法
山谷 昭一
- 11 配合飼料中及びプレミックス中のセンデュラマイシンナトリウムの確認試験法
山谷 昭一
- 12 配合飼料中及びプレミックス中のサリノマイシンナトリウム, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの確認試験法
平岡 久明
- 13 配合飼料に過剰添加したハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムのブロイラー組織内への残留
池澤 昭人, 佐藤 康彦, 齋藤 紀雄, 石橋 隆幸, 山口 保樹,
風間 鈴子, 帯金 重人
- 14 配合飼料に過剰添加したアンプロリウム・エトパベート・スルファキノキサリンのブロイラー組織内への残留
池澤 昭人, 古賀 龍二, 佐藤 康彦, 荒木 誠士, 石橋 隆幸,
山口 保樹, 風間 鈴子

第 22 号 《平成 9 年 4 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによるとうもろこし中のフモニシン B₁ 及び B₂ の定量
日比野 洋, 石田 有希恵
- 2 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中の N-メチルカーバメート系農薬 (エチオフェンカルブ, ベンダイオカルブ, メチオカルブ) の同時定量
會田 紀雄, 吉永 晋
- 3 キャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中のシペルメトリンの定量
石田 有希恵, 功刀 豊, 橋本 亮
- 4 ゲル浸透クロマトグラフィーを用いたキャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中のジメチピンの定量
風間 鈴子, 白井 裕治, 早川 俊明
- 5 キャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中の 32 種類の有機塩素系農薬の系統的定量
白井 裕治, 風間 鈴子
- 6 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量
松村 惣一郎, 福本 裕二, 鬼頭 敦司, 小野 雄造, 千原 哲夫
- 7 プレミックス中のアピラマイシンの定量法
荒木 誠士
- 8 サリノマイシンナトリウム又はラサロシドナトリウムが併用されたプレミックス中のアピラマイシンの定量法
荒木 誠士, 風間 鈴子

- 9 配合飼料中及びプレミックス中の飼料級センデュラマイシンナトリウムの定量法
佐々木 隆, 杉中 求
- 10 プレミックス中の飼料級ノシヘプタイトの定量法
山谷 昭一, 秋元 京子
- 11 配合飼料中及びプレミックス中のリン酸タイロシンの確認試験法
尾室 義典, 高橋 有美
- 12 配合飼料中に過剰添加したオキシテトラサイクリンを給与したブロイラー雛組織内への残留
原田 治良, 尾室 義典, 佐々木 隆, 杉中 求, 山谷 昭一,
帯金 重人, 二階堂 純信
- 13 配合飼料中に過剰添加したバージニアマイシンを給与したブロイラー雛組織内への残留
池澤 昭人, 一井 宏, 白井 裕治, 荒木 誠士, 山口 保樹,
風間 鈴子, 古賀 龍二
- 14 飼料の大腸菌 O-157 汚染状況調査
荒木 誠士, 佐々木 隆, 高橋 有美, 尾室 義典, 山谷 昭一

第 23 号 《平成 10 年 4 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中の 10 種類の *N*-メチルカーバメート系農薬の同時定量
會田 紀雄
- 2 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のクロフェンテジンの定量
橋本 亮, 日比野 洋
- 3 キャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中の水酸化トリフェニルスズの定量
吉永 晋
- 4 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のパラコート
野崎 友春, 松崎 学
- 5 キャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中のビクロゾリンの定量
古川 明, 柴田 政人
- 6 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のメトプレンの定量
池澤 昭人, 白井 裕治
- 7 キャピラリーガスクロマトグラフィーによる飼料中の 13 種類のピレスロイド系農薬の系統的定量
白井 裕治, 関口 好浩, 舟津 正人
- 8 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のスルファキノキサリンの定量
千原 哲夫, 石田 有希恵, 清水 昭
- 9 プレミックス中のアピラマイシンの定量における抽出液の pH の影響
荒木 誠士
- 10 ペレット状配合飼料中のセデカマイシンの定量法
菅野 清
- 11 飼料中の大腸菌 O-157 の検出方法の検討
草間 豊子, 杉中 求

- 12 配合飼料に過剰添加したアビラマイシンを給与したブロイラー雛組織内への残留
池澤 昭人, 白井 裕治, 荒木 誠士, 杉村 靖, 舟津 正人,
関口 好浩, 佐々木 隆, 古賀 龍二
- 13 アボパルシン添加飼料を給与した採卵鶏雛の耐性菌出現調査
原田 治良, 佐々木 隆, 杉中 求, 草間 豊子, 菅野 清, 帯金 重人,
吉田 稔
- 14 飼料のサルモネラ汚染状況 (昭和 54 年～平成 9 年度)
原田 治良, 佐々木 隆, 杉中 求, 草間 豊子, 菅野 清, 尾室 義典
- 15 飼料の大腸菌 O-157 汚染状況調査 (平成 9 年度)
草間 豊子, 佐々木 隆, 杉中 求, 原田 治良, 菅野 清

第 24 号 《平成 11 年 4 月》

- 1 原子吸光光度法による飼料中のクロムの定量
橋本 亮, 原田 治良
- 2 多機能クリーンアップカラム法／高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の同時定量
白井 裕治, 関口 好浩, 下村 正之, 早川 俊明
- 3 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のフモニシン B₁ 及び B₂ の定量
日比野 洋, 白井 裕治, 石黒 瑛一
- 4 ガスクロマトグラフィーによる飼料中の酸化フェンブタズ及びシヘキサチンの同時定量
古川 明, 功刀 豊
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のジフルベンズロンの定量
柴田 政人
- 6 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中の 3-ヒドロキシカルボフランの定量
染谷 潔
- 7 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のスルファキノキサリンの定量
中村 行伸, 石田 有希恵, 千原 哲夫
- 8 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のプロピオン酸, プロピオン酸カルシウム及びプロピオン酸ナトリウムの定量
柴田 政人, 藤原 晃毅, 山多 利秋
- 9 高速液体クロマトグラフィーによる鶏用配合飼料中のラサロシドナトリウムの定量
小野 雄造, 野口 淳
- 10 配合飼料中のエフロトマイシンの改良定量法の確認について
菅野 清
- 11 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 10 年度)
菅野 清, 風間 鈴子, 佐々木 隆, 原田 治良, 草間 豊子
- 12 飼料の大腸菌 O157 汚染状況調査 (平成 10 年度)
草間 豊子, 風間 鈴子, 佐々木 隆, 原田 治良, 菅野 清

- 13 鶏糞便由来腸球菌のグリコペプチド系抗生物質に対する薬剤感受性試験
草間 豊子, 風間 鈴子, 原田 治良, 山谷 昭一, 杉中 求
- 14 エンドファイト菌糸の染色方法の検討
小山 敬之, 秋元 京子

第 25 号 《平成 12 年 4 月》

- 1 高速液体クロマトグラフィーによるトールフェスク及びライグラス中のエルゴバリンの定量
山多 利秋, 菅野 清
- 2 高速液体クロマトグラフィーによるライグラス中のロリトレム B の定量
小野 雄造, 染谷 潔, 古川 明, 菅野 清
- 3 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のエトパペートの定量
日比野 洋, 内山 丈, 池澤 昭人, 秋元 京子, 石黒 瑛一
- 4 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のラサロシドナトリウムの定量
橋本 亮
- 5 配合飼料に過剰添加したセンデュラマイシンナトリウムを給与したブロイラー雛組織内への残留
下村 正之, 早川 俊明, 池澤 昭人, 関口 好浩, 舟津 正人,
小林 郁美, 白井 裕治, 泉 和夫, 帯金 重人
- 6 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 11 年度)
千原 哲夫, 荒木 誠士, 工藤 尚史, 内山 丈, 草間 豊子,
佐々木 隆, 山内 智憲, 末藤 晴子, 野口 淳, 鬼頭 敦司,
阿部 文浩, 杉村 靖, 下村 正之
- 7 「核さんテストサルモネラ」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
草間 豊子, 荒木 誠士, 工藤 尚史, 橋本 亮
- 8 「1-2 テスト」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
千原 哲夫, 石田 有希恵, 阿部 文浩, 福本 裕二, 野口 淳,
舟津 正人, 下村 正之

第 26 号 《平成 13 年 4 月》

- 1 多機能クリーンアップカラム法/高速液体クロマトグラフィーによる飼料穀物中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時定量
白井 裕治, 小野 雄造, 秋元 京子
- 2 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中のキノメチオネートの定量
會田 紀雄
- 3 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のジクワットの定量
松崎 学, 中村 行伸, 石田 有希恵, 野崎 友春, 小林 郁美,
早川 俊明
- 4 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる飼料中のトリアジメホン, トリアジメノール及びプロピコナゾールの同時定量
小嶋 二三夫, 古川 明

- 5 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のホキシムの定量
小林 郁美, 関口 好浩
- 6 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの定量
早川 俊明, 舟津 正人
- 7 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量
早川 俊明, 舟津 正人
- 8 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 12 年度)
千原 哲夫, 荒木 誠士, 風間 鈴子, 工藤 尚史, 日比野 洋,
谷淵 久之, 山内 智憲, 末藤 晴子, 坂上 光一, 小森谷 敏一,
阿部 文浩, 山本 克己, 下村 正之, 舟津 正人, 佐々木 隆,
草間 豊子
- 9 「オクソイド サルモネラ迅速キット」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
荒木 誠士, 工藤 尚史, 鬼頭 敦司, 福本 裕二, 下村 正之,
草間 豊子
- 10 「サンコリサルモネラ」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
工藤 尚史, 荒木 誠士, 鬼頭 敦司, 福本 裕二, 下村 正之,
草間 豊子
- 11 「パススティック」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
野口 淳, 荒木 誠士, 工藤 尚史, 鬼頭 敦司, 福本 裕二,
下村 正之, 草間 豊子
- 12 バージニアマイシン添加飼料を給与した採卵鶏雛の耐性菌出現調査
原田 治良, 風間 鈴子, 佐々木 隆, 草間 豊子, 菅野 清,
帯金 重人
- 13 抗菌性飼料添加物の給与による鶏糞便由来腸球菌の薬剤感受性に及ぼす影響に関する試験
下村 正之, 舟津 正人, 小林 郁美, 牧野 大作, 早川 俊明,
泉 和夫, 松崎 学

他誌掲載論文

(食品衛生学雑誌 第 41 卷)

キャピラリー電気泳動法による配合飼料中の 8 種類の有機酸の同時定量

石黒 瑛一, 日比野 洋, 曾我 朋義, 柳井 博子, 澤田 浩和

第 27 号 《平成 14 年 4 月》

1 多機能クリーンアップカラム法/高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のゼアラレノン及びステリグマトシスチンの系統的定量

白井 裕治, 小林 郁美, 早川 俊明

2 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

白井 裕治, 小野 雄造, 藤原 孝治, 青山 幸二

- 3 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のトリクロロホンの定量
古川 明, 内山 丈
- 4 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のリニューロンの定量
舟津 正人
- 5 プレミックス中のエンラマイシンの微生物学的定量法の改良
小森谷 敏一, 阿部 文浩, 福本 裕二, 中村 行伸
- 6 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のサリノマイシンナトリウムの定量
牧野 大作
- 7 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のモネンシンナトリウムの定量
牧野 大作
- 8 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のセンデュラマイシンナトリウムの定量
小林 郁美
- 9 微生物学的定量法による配合飼料中のナラシンの定量
千原 哲夫
- 10 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のナラシンの定量
千原 哲夫
- 11 バイオオートグラフィーによるプレミックス中のキタサマイシンの確認試験法
風間 鈴子, 荒木 誠士
- 12 「サルモチェック」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
工藤 尚史, 荒木 誠士, 堀切 正賀寿, 福本 裕二, 下村 正之,
古賀 龍二, 草間 豊子
- 13 「ロケート」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
荒木 誠士, 工藤 尚史, 橋本 亮, 谷淵 久之, 福本 裕二,
下村 正之, 草間 豊子
- 14 「スペクテイト」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
荒木 誠士, 工藤 尚史, 橋本 亮, 谷淵 久之, 福本 裕二,
下村 正之, 草間 豊子
- 15 「サルモネラチェック (MB)」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
下村 正之, 荒木 誠士, 工藤 尚史, 小森谷 敏一, 福本 裕二,
草間 豊子
- 16 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 13 年度)
小嶋 二三夫, 荒木 誠士, 風間 鈴子, 西村 真由美, 内山 丈,
古川 明, 草間 豊子, 谷淵 久之, 日比野 洋, 末藤 晴子, 橋本 亮,
小森谷 敏一, 千原 哲夫, 石田 有希恵, 伊藤 潤, 青山 恵介,
下村 正之, 舟津 正人

精度管理

第 26 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (本 部)

小野 雄造, 藤原 孝治, 山多 利秋, 秋元 京子, 水野 和俊,
白井 裕治, 泉 和夫, 三好 重孝, 石黒 瑛一

第 38 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (札幌事務所)

荒木 誠士, 野口 淳

第 38 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (仙台事務所)

古川 明, 會田 紀雄, 内山 丈

第 41 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (名古屋事務所)

堀切 正賀寿, 小森谷 敏一, 中村 行伸, 橋本 亮

第 38 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (大阪事務所)

山本 克己, 福本 裕二, 伊藤 潤, 杉村 靖, 青山 恵介

第 39 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (福岡事務所)

松崎 学, 下村 正之, 小林 郁美, 牧野 大作

共通試料によるフモニシン B₁ 及び B₂ 並びにオクラトキシン A の共同試験

秋元 京子, 白井 裕治, 小森谷 敏一, 中村 行伸, 石黒 瑛一

調査資料

飼料用動物性油脂のサンプリング方法に関する調査

泉 和夫, 石橋 隆幸, 青山 幸二, 石黒 瑛一

配合飼料及び飼料原料中のフモニシン B₁ 及び B₂ の汚染状況 (1998年)

日比野 洋, 石黒 瑛一

技術レポート

Lowry 法によるたん白質の定量法

水野 和俊, 山多 利秋

イオンクロマトグラフィーによる肉骨粉中の塩素の定量法

秋元 京子, 青山 幸二

セレン酵母中の有機態セレン (セレノメチオニン) の定量について

小野 雄造, 石黒 瑛一

脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの定量

菅野 清

配合飼料中のデストマイシン A の定量法の改良

佐々木 隆

鑑定の比重分離操作に用いる比重液について

坂上 光一, 中村 行伸, 小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 橋本 亮

他誌掲載論文

1 (食品衛生学雑誌 第 42 巻第 3 号)

遺伝子組換えトウモロコシ CBH351 系統からの組換え遺伝子の検知法

松岡 猛, 栗原 秀夫, 末藤 晴子, 三浦 裕仁, 日下部 裕子,
亀山 浩, 合田 幸広, 一色 賢司, 豊田 正武, 日野 明寛

2 (日本獣医学会家禽疾病学分科会報 No.5)

飼料中のサルモネラ検査法

草間 豊子

第 28 号 《平成 15 年 4 月》

- 1 キャピラリー電気泳動法による飼料中の塩素の定量
古川 明, 内山 丈
- 2 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のトリコテセン系マイコトキシン (タイプ B) の同時定量
白井 裕治
- 3 高速液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時定量
小野 雄造, 水野 和俊, 石黒 瑛一
- 4 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のアトラジン及びシマジンの系統的定量
風間 鈴子
- 5 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のイプロジオンの定量
松崎 学, 牧野 大作
- 6 キャピラリー電気泳動による魚粉中のヒスタミンの定量
青山 幸二, 小野 雄造, 石黒 瑛一
- 7 キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる配合飼料中のトリブチルスズ化合物の定量
堀切 正賀寿
- 8 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のセンデュラマイシンナトリウムの定量
西村 真由美
- 9 微生物学的定量法によるプレミックス中のナラシンの定量
千原 哲夫, 山本 克己
- 10 高速液体クロマトグラフィーによるプレミックス中のナラシンの定量
山本 克己, 千原 哲夫
- 11 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のカンタキサンチン及び β -アポ-8'-カロチン酸エチルエステルの同時定量
小野 雄造, 秋元 京子, 水野 和俊
- 12 「リヴェール」による飼料中のサルモネラの迅速検出法
野口 淳, 荒木 誠士, 工藤 尚史, 鬼頭 敦司, 福本 裕二,
下村 正之, 草間 豊子
- 13 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 14 年度)
小嶋 二三夫, 風間 鈴子, 西村 真由美, 内山 丈, 古川 明,
草間 豊子, 秋元 京子, 日比野 洋, 末藤 晴子, 野村 哲也,
小森谷 敏一, 小宮 友紀子, 千原 哲夫, 青山 恵介, 井上 智江,
下村 正之, 鬼頭 敦司, 松崎 学, 牧野 大作, 松崎 美由起

精度管理

- 第 27 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (本 部)
吉永 晋, 青山 幸二, 小野 雄造, 伊佐 まゆみ, 水野 和俊,
白井 裕治, 泉 和夫, 三好 重孝, 石黒 瑛一
- 第 39 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (札幌事務所)
風間 鈴子, 西村 真由美

第 39 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (仙台事務所)

古川 明, 會田 紀雄, 内山 丈

第 42 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (名古屋事務所)

小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 小宮 友紀子, 中村 行伸

第 39 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (大阪事務所)

青山 恵介, 千原 哲夫, 福本 裕二, 平岡 久明, 舟津 正人,
山本 克己

第 40 回 飼料の共通試料による分析鑑定成績 (福岡事務所)

牧野 大作, 鬼頭 敦司, 小林 郁美, 松崎 美由起, 松崎 学

共通試料によるエンドファイト (エルゴバリン及びビロリトレム B) の共同試験

小野 雄造, 青山 幸二, 石黒 瑛一

共通試料によるマイロのゼアラレノンの共同試験

泉 和夫

調査資料

飼料用動物性油脂の配合飼料工場における工程内残留調査

青山 幸二, 水野 和俊, 山多 利秋, 藤原 孝治, 野村 哲也,
泉 和夫, 石黒 瑛一

ドイツ産麦類中のニトロフェンの分析

青山 幸二, 石黒 瑛一

技術レポート

近赤外顕微鏡による肉骨粉の判別法

水野 和俊, 伊佐 まゆみ, 石黒 瑛一

ガスクロマトグラフ質量分析計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定量法

小野 雄造

ELISA による畜産物中の Cry9C たん白質の定量

草間 豊子

PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出法

草間 豊子, 門脇 光一

他誌掲載論文

1 (Animal Science Journal 第 73 巻第 3 号 221-228 ページより転載)

遺伝子組換えトウモロコシ event CBH351 (スターリンク) のブロイラー雛における評価

米持 千里, 藤崎 浩和, 原田 千里, 草間 豊子, 花積 三千人

2 (Animal Science Journal 第 74 巻第 2 号 81-88 ページより転載)

遺伝子組換えトウモロコシ (event CBH351 (スターリンク)) 給与による泌乳牛の健康状態への影響
および Cry9C 蛋白質および cry9C 遺伝子の乳汁、血液、肝臓および筋肉への移行

米持 千里, 池田 卓夫, 原田 千里, 草間 豊子, 花積 三千人

3 (マイコトキシン 第53巻第1号 63-68 ページより転載)

かび毒分析の精度管理—当所の試み—

秋元 京子

4 (畜産の研究 第57巻第3号 373-378 ページより転載)

吸光光度法による鶏用飼料中のナラシンの定量法

千原 哲夫, 末藤 晴子, 石田 有希恵

第29号 《平成16年4月》

1 高速液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中のT-2トキシンの定量法

石橋 隆幸, 小野 雄造

2 高速液体クロマトグラフィーによる穀類及び配合飼料中のシトリニン及びオクラトキシン A の同時定量

青山 幸二, 森藤 香, 石黒 瑛一

3 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のシアナジン及びミクロブタニルの定量

福本 裕二, 青山 恵介, 谷口 英樹, 綿原 正志

4 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のジコホール及びトリフルラリンの定量

松崎 学, 松崎 美由起

5 プレミックス中のエフロトマイシンの定量

三井 友紀子, 下村 正之

6 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の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の定量

千原 哲夫, 吉田 知太郎, 井上 智江

7 高速液体クロマトグラフィーによる脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの定量

菅野 清

8 高速液体クロマトグラフィーによる油脂中のエトキシキンの定量

西村 真由美

9 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のコレステロールの定量

青山 幸二, 森藤 香, 石黒 瑛一

10 高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計による飼料中のダイオキシン類の定量

(1) 飼料中のダイオキシン類の定量法ガイドラインの確立のための研究

山多 利秋, 加島 信一, 白井 裕治

(2) 共同試験成績

白井 裕治, 山多 利秋, 秋元 京子

(3) 活性炭シリカゲルリバースカラムによる精製

白井 裕治, 森藤 香, 山多 利秋

(4) 養殖水産動物用配合飼料等への適用

白井 裕治, 森藤 香

技術レポート

- 1 ひ素定量時における分解方法の検討について
吉永 晋, 石黒 瑛一
- 2 X線回折装置及び蛍光X線装置を用いた動物由来りん酸カルシウムの判別法の検討
田村 勉, 林 久実子, 會田 紀雄
- 3 パルスフィールドゲル電気泳動法による飼料由来サルモネラの遺伝子型の解析
杉本 泰俊
- 4 定量PCR法による遺伝子組換え体の検知
山多 晴子
- 5 PCRによる魚粉中の魚由来DNAの検出法
野村 哲也, 草間 豊子
- 6 「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」を用いた飼料中の牛由来たん白質の検出法
日比野 洋

精度管理

平成15年度飼料の共通試料による分析鑑定について

吉永 晋, 関口 好浩, 石田 有希恵, 三井 友紀子, 青山 恵介,
松崎 学

調査資料

- 1 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレムBのモニタリング等の結果について
石橋 隆幸, 石黒 瑛一
- 2 輸入飼料への無登録農薬等の混入実態調査について
石橋 隆幸
- 3 大型容器からの調製魚粉のサンプリング方法の調査について
會田 紀雄, 石黒 瑛一, 三好 重孝, 池澤 昭人, 佐々木 徳幸,
古川 明, 柴田 政人, 吉田 知太郎, 鬼頭 敦司, 小林 郁美,
林 美紀子, 松崎 美由起
- 4 平成14年度食品循環資源利用飼料の安全性及び品質に関する調査結果概要
會田 紀雄, 泉 和夫
- 5 飼料中のダイオキシン類汚染状況(平成12~15年度)
白井 裕治, 山多 利秋, 森藤 香
- 6 飼料のサルモネラ汚染状況(平成15年度)
小嶋 二三夫, 関口 好浩, 山本 克己, 西村 真由美, 石田 有希恵,
古川 明, 草間 豊子, 秋元 京子, 日比野 洋, 山多 晴子,
野村 哲也, 杉本 泰俊, 橋本 仁康, 小森谷 敏一, 三井 友紀子,
千原 哲夫, 中村 志野, 井上 智江, 吉田 知太郎, 鬼頭敦司,
松崎 学, 屋方 光則, 牧野 大作, 林 美紀子, 松崎 美由起
- 7 飼料中のサルモネラに関するモニタリング結果の概要
—飼料の安全性確保調査指導事業における調査結果—
小嶋 二三夫, 千原 哲夫, 菅野 清, 佐藤 剛

- 8 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング
—魚粉等のモニタリング結果（平成13年度）—

草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 石橋 隆幸

- 9 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング
—飼料原料及び牛用配混合飼料のモニタリング結果（平成14年度）—

草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 風間 鈴子, 関口 好浩,
西村 真由美, 内山 丈, 古川 明, 中村 行伸, 小森谷 敏一,
堀切 正賀寿, 三井 友紀子, 千原 哲夫, 青山 恵介, 井上 智江,
下村 正之, 鬼頭 敦司, 松崎 学, 牧野 大作, 松崎 美由起

他誌掲載論文

（「畜産の研究」 第57巻第7号 780-784ページより転載）

飼料等を対象としたサルモネラ検査における選択分離培地の性能比較

千原 哲夫, 谷淵 久之, 山内 智憲, 末藤 晴子, 石田 有希恵,
伊藤 潤, 青山 恵介, 橋本 亮, 佐々木 隆, 草間 豊子

第30号 《平成17年4月》

- 1 飼料中の酸性デタージェント繊維（ADF）定量法の分析精度の検討
福中 理絵, 平岡 久明
- 2 ガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中のテブコナゾール及びフェナリモルの定量
青山 恵介, 井上 智江
- 3 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のニトロフェンの定量
野崎 友春, 須永 善行, 青山 幸二, 八木 寿治
- 4 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のベンタゾンの定量
松崎 美由起
- 5 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクロルテトラサイクリンの定量
牧野 大作, 吉田 知太郎, 千原 哲夫
- 6 Lowry 法による動物性油脂中のたん白質の定量法
水野 和俊, 渡部 千会
- 7 PCR による飼料中の鶏由来 DNA の検出法
野村 哲也, 草間 豊子
- 8 PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出法の共同試験成績
草間 豊子, 野村 哲也

技術レポート

- 1 高速液体クロマトグラフィーによる穀類中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時定量法の追加検討
石橋 隆幸, 渡部 千会, 岩附 かおり, 石黒 瑛一
- 2 エトキシキン標準原液の調製に用いる溶媒の検討
西村 真由美

3 PCRによる乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法

草間 豊子

4 飼料中の鶏由来たん白質の検出を目的とする「モリナガ加熱処理鶏由来タンパク質検出キット」の実用化試験

日比野 洋

精度管理

1 平成16年度飼料の共通試料による分析鑑定について

野崎 友春, 須永 善行, 遠藤 剛, 福中 理絵, 加藤 圭, 井上 智江,
屋方 光則, 林 美紀子

2 共通試料による遺伝子組換えとうもろこし (CBH351) の共同試験

會田 紀雄

調査資料

1 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレム B のモニタリング等の結果について (平成16年度)

石橋 隆幸, 石黒 瑛一

2 輸入飼料への無登録農薬等の混入実態調査 (平成16年度)

石橋 隆幸

3 平成15年度食品循環資源利用飼料の安全性及び品質に関する調査結果の概要について

福本 裕二, 會田 紀雄

4 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成16年度)

小嶋 二三夫, 遠藤 剛, 山本 克己, 西村 真由美, 高橋 亜紀子,
白澤 優子, 古川 明, 福中 理絵, 草間 豊子, 本 広明, 野村 哲也,
杉本 泰俊, 橋本 仁康, 下村 正之, 小森谷 敏一, 三井 友紀子,
内山 丈, 牧野 大作, 青山 恵介, 吉田 知太郎, 鬼頭 敦司,
荒木 誠士, 屋方 光則, 林 美紀子, 永原 貴子, 松崎 美由起,
児玉 恭子

5 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング —飼料原料及び牛用配混合飼料のモニタリング結果 (平成15年度) —

草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 関口 好浩, 西村 真由美,
山本 克己, 遠藤 剛, 石田 有希恵, 福中 理絵, 小森谷 敏一,
堀切 正賀寿, 三井 友紀子, 中村 志野, 井上 智江, 吉田 知太郎,
鬼頭 敦司, 松崎 学, 屋方 光則, 牧野 大作, 林 美紀子,
松崎 美由起, 児玉 恭子

6 抗菌性飼料添加物の薬剤耐性菌実態調査結果について

杉本 泰俊, 秋元 京子, 谷淵 久之, 佐藤 剛

他誌掲載論文

1 (「Mycotoxins」 Vol.54, No.2, 89-94 ページより転載)

Natural occurrence of type B trichothecenes in formula feeds and feedstuffs in Japan

白井 裕治

2 (「Journal of Food Protection」 Vol.67, No.6, 1289-1292 ページより転載)

Development of Primers for Detection of Meat and Bone Meal in Ruminant Feed and Identification of the Animal of Origin

草間 豊子, 野村 哲也, 門脇 光一

3 (「Journal of Agricultural and Food Chemistry」 Vol.53, No.6, 2060-2069 ページより転載)

Comparative Studies of the Quantification of Genetically Modified Organisms in Foods Processed from Maize and Soy Using Real Time PCR

Tomoaki YOSHIMURA, Hideo KURIBARA, Takashi KODAMA,
Seiko YAMATA, Satoshi FUTO, Satoshi WATANABE, Nobutaro AOKI,
Tayoshi IIZUKA, Hiroshi AKIYAMA, Tamio MAITANI,
Shigehiro NAITO and Akihiro HINO

第 31 号 《平成 18 年 4 月》

1 粗脂肪の酸分解ジエチルエーテル抽出法の適用範囲拡大の検討

堀米 明日香, 八木 寿治, 石黒 瑛一

2 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による飼料中の 11 種類のかび毒の一斉分析法

福中 理絵, 平岡 久明

3 液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中のゼアラレノンの定量

青山 幸二

4 ガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の一斉定量法

野崎 友春, 堀米 明日香, 渡部 千会

5 ガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中のジカンバの定量

屋方 光則, 永原 貴子

6 ガスクロマトグラフィーによる飼料中のプロモキシニルの定量

堀切 正賀寿, 出納 小枝, 服部 真由子, 三井 友紀子

7 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のアンプロリウムの定量法の改良の検討

吉田 知太郎, 松崎 学

8 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法の改良

山本 克己

9 多機能クリーンアップカラムを用いた穀類中のオクラトキシン A の定量

青山 幸二, 石黒 瑛一, 金丸 直樹, 南澤 正敏

10 液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中のフモニシン B₁, B₂ 及び B₃ の同時定量

青山 幸二, 石黒 瑛一

11 還元気化-超低温捕集-原子吸光光度計による魚粉中のひ素の形態別定量

吉永 晋, 須永 善行, 八木 寿治, 石黒 瑛一, 種池 康仁

技術レポート

1 乾式(灰化-塩酸抽出)法による第一リン酸カルシウムのりんの不溶化試験

水野 和俊

2 HPLC によるエトキシキン定量時の感度低下の原因について

平岡 久明, 福中 理絵

- 3 PCRによる飼料中の家きん由来DNAの検出法
—乳製品除去処理法の卵製品等除去への適用について—
草間 豊子, 関口 好浩
- 4 「モリナガ加熱処理鶏由来タンパク質検出キット」による飼料中の鶏由来たん白質の検出法
日比野 洋
- 5 PCRによる飼料中のサルモネラの検出
草間 豊子
- 6 PCR法によるサルモネラ特定6血清型の迅速鑑別法の検討
杉本 泰俊, 大島 慎司, 千原 哲夫

精度管理

- 1 平成17年度飼料の共通試料による分析鑑定について
堀米 明日香, 高橋 亜紀子, 森 有希子, 堀切 正賀寿,
吉田 知太郎, 青山 恵介
- 2 共通試料による水銀の手合わせ分析結果
水野 和俊

調査資料

- 1 輸入飼料への無登録農薬等の混入実態調査(平成17年度)
山多 利秋
- 2 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びピロリトレムBのモニタリング等の結果について(平成17年度)
山多 利秋
- 3 飼料のサルモネラ汚染状況(平成17年度)
千原 哲夫, 関口 好浩, 本 広明, 杉本 泰俊, 大島 慎司, 遠藤 剛,
高橋 亜紀子, 松崎 美由起, 白澤 優子, 山本 克己, 森 有希子,
下村 正之, 小森谷 敏一, 辻 由里子, 内山 丈, 牧野 大作,
林 美紀子, 吉田 知太郎, 山田 美帆, 鬼頭 敦司, 屋方 光則,
青山 恵介, 井上 智江, 永原 貴子, 野村 昌代, 児玉 恭子
- 4 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング
—飼料原料及び牛用配混合飼料のモニタリング結果(平成16年度)—
草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 野口 淳, 遠藤 剛,
西村 真由美, 高橋 亜紀子, 白澤 優子, 山本 克己, 福中 理絵,
森 有希子, 下村 正之, 小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 三井 友紀子,
牧野 大作, 吉田 知太郎, 鬼頭 敦司, 荒木 誠士, 屋方 光則,
林 美紀子, 永原 貴子, 松崎 美由紀, 児玉 恭子
- 5 遺伝子組換えトウモロコシ(CBH-351:スターリンク)のモニタリング検査結果
會田 紀雄
- 6 アフラトキシンの分析基準収載法の特定試料の検定方法(成分規格等省令法)への適用に関する調査
石橋 隆幸

他誌掲載論文

- 1 (「Mycopathologia」 Vol. 161, 239~243 ページより転載)

Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol

Yoshiko SUGITA-KONISHI, Toshitsugu TANAKA, Setsuko TABATA,
Masahiro NAKAJIMA, Masanori NOUNO, Yoko NAKAIE,
Takao CHONAN, Mitsutoshi AOYAGI, Nobuyuki KIBUNE,
Kazutoshi MIZUNO, Eiichi ISHIKURO, Naoki KANAMARU,
Masatoshi MINAMISAWA, Norio AITA, Masayo KUSHIRO,
Kenji TANAKA and Kosuke TAKATORI

第 32 号 《平成 19 年 4 月》

- 1 粗脂肪の酸分解ジエチルエーテル抽出法の改良
堀米 明日香
- 2 飼料中のカドミウムの定量法の簡素化
平岡 久明, 森 有希子
- 3 飼料中の HT-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
石橋 隆幸, 吉村 正寿, 牧野 大作
- 4 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
野崎 友春, 山多 利秋
- 5 飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
堀米 明日香, 野崎 友春
- 6 飼料中のトリシクラゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法
野崎 友春, 山多 利秋
- 7 キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計 (ピリジン・ピラゾロン法) による定量法
甲斐 茂浩, 白澤 優子
- 8 豚用配合飼料中のアピラマイシンの微生物学的定量法の改良
大島 慎司, 篠田 直樹, 橋本 仁康, 千原 哲夫
- 9 飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度の吸光光度法による測定
八木 寿治, 大島 慎司, 堀米 明日香, 福本 裕二, 石黒 瑛一,
岩永 知子, 末次 暁子, 小泉 慶子, 五十嵐 友二, 瀧上 賢一

技術レポート

- 1 ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナの検討
千原 哲夫, 橋本 仁康, 進藤 富枝
- 2 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のアフラトキシンの定量
青山 幸二, 渡部 千会
- 3 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のオクラトキシシン A の定量
青山 幸二, 渡部 千会

- 4 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のゼアラレノン類の定量
青山 幸二, 渡部 千会
- 5 鉛の分析法の標準添加回収率及び定量下限等の確認
森 有希子
- 6 無機ヒ素の分析法の定量下限及び検出下限の確認
八木 寿治
- 7 共通試料による飼料中の農薬の一斉分析法の共同試験
野崎 友春
- 8 飼料中のカルタップ, チオシクロラム及びベンスルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の添加回収試験
牧野 大作, 吉村 正寿
- 9 共通試料による飼料中のカルタップの共同試験
山多 利秋
- 10 飼料中のトラロメトリンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の添加回収試験
屋方 光則
- 11 共通試料による飼料中のトラロメトリンの共同試験
山多 利秋
- 12 ベンタゾンの分析法の定量下限及び検出下限の確認
青山 恵介, 松崎 美由起
- 13 稲ワラからのゲノム DNA 抽出法の検討
橋本 仁康, 會田 紀雄

精度管理

- 1 平成 18 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
堀米 明日香, 白澤 優子, 森 有希子, 出納 小枝, 林 美紀子,
永原 貴子, 小野 雄造

調査資料

- 1 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレム B のモニタリング等の結果について (平成 18 年度)
山多 利秋
- 2 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 18 年度)
千原 哲夫
- 3 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果 (平成 17 年度)
草間 豊子

他誌掲載論文

- 1 PCR 法を用いた飼料中の魚由来 DNA の検出法の検討
(食品衛生学雑誌第 47 巻第 5 号より転載)
野村 哲也, 草間 豊子, 門脇 光一

引用文献

- 1 「平成十八年度 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」より転載
財団法人日本食品分析センター

第 33 号 《平成 20 年 4 月》

- 1 飼料中の EPTC 及び二臭化エチレンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法
屋方 光則, 鷺尾 和也
- 2 飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスのガスクロマトグラフ (FPD) による定量法
矢本 亮介
- 3 飼料中のアメトリン, シアナジン及びプロメトリンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
野崎 友春, 山多 利秋
- 4 飼料中のジクロロボス及びナレドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法
杉本 泰俊, 八木 寿治, 加藤 隆久, 伊藤 潤, 三井 友紀子,
白井 小枝
- 5 乾牧草中のテブコナゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法
野村 昌代
- 6 配合飼料中のサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシン
ナトリウム及びラサロシドナトリウムの液体クロマトグラフ質量分析計による一斉微量定量法
牧野 大作, 山田 美帆
- 7 メライザキットによる飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法
関口 好浩, 草間 豊子

技術レポート

- 1 飼料中の粗たん白質の燃焼法による定量法の妥当性確認
八木 寿治, 榊原 良成, 吉永 晋, 福本 裕二, 石黒 瑛一,
安井 明美
- 2 共通試料による飼料中の鉛の共同試験について
森 有希子
- 3 飼料中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量
分析計による同時定量法に係る添加回収率等の確認及び共通試料による共同試験の結果について
小森谷 敏一
- 4 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中の水分の測定
山多 利秋
- 5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法 (中間報
告)
山本 克己
- 6 DDGS からの DNA 抽出について
會田 紀雄, 橋本 仁康

7 コンピューター・プログラムを利用した、複数の動物を検出するプライマーの開発

篠田 直樹, 吉田 知太郎, 草間 豊子

精度管理

1 平成 19 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

小野 雄造, 甲斐 茂浩, 福中 理絵, 杉本 泰俊, 松藤 由貴子,
野村 昌代, 若宮 洋市**調査資料**

1 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 19 年度)

會田 紀雄

2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果 (平成 18 年度)

草間 豊子

第 34 号 《平成 21 年 6 月》

1 飼料中のインドキサカルブの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

牧野 大作, 松野 理恵, 山田 美帆

2 飼料中のピコリナフェン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

3 飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法

杉本 泰俊, 野村 昌代, 鷲尾 和也

4 魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

小森谷 敏一

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

山本 克己, 大島 慎司

技術レポート

1 飼料中のフロルフェニコールの液体クロマトグラフによる定量法 (中間報告)

小野 雄造, 渡部 千会

精度管理

1 平成 20 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

高橋 亜紀子, 矢本 亮介, 青山 幸二, 大島 慎司, 八木 寿治,
橋本 仁康, 野村 昌代**調査資料**

1 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 20 年度)

関口 好浩

2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果 (平成 19 年度)

草間 豊子

他誌掲載論文

- 1 Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum
(食品衛生学雑誌第 50 巻第 2 号より転載)
Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Mariko NISHIWAKI and
Masakatsu ICHINOE
- 2 HPLC による飼料中のゴシポールの分析
(食品衛生学雑誌第 49 巻第 4 号より転載)
青山 恵介
- 3 Developing PCR Primers Using a New Computer Program for Detection of Multiple Animal-Derived Materials in Feed
(Journal of Food Protection, Vol. 71 より転載)
Naoki SHINODA, Toyoko KUSAMA, Tomotaro YOSHIDA,
Tatsuki SUGIURA, Koh-ichi KADOWAKI, Takashi ONODERA and
Katsuaki SUGIURA
- 4 Development of PCR Primers for the Detection of Porcine DNA in Feed Using mtATP6 as the Target Sequence
(食品衛生学雑誌第 50 巻第 2 号より転載)
Tomotaro YOSHIDA, Tetsuya NOMURA, Naoki SHINODA,
Toyoko KUSAMA, Koh-ichi KADOWAKI and Katsuaki SUGIURA
- 5 クオリバックス™システムによる飼料中のサルモネラの迅速検出法の検討
(日本食品微生物学会雑誌第 25 巻第 3 号より転載)
千原 哲夫, 関口 好浩, 橋本 仁康, 大島 慎司, 杉本 泰俊,
本 広昭, 木村 晃一, 上橋 健三
- 6 超微細高密度オゾン水の *Salmonella Enteritidis* に対する殺菌効果と応用
(鶏病研究会報第 44 巻第 4 号より転載)
高木 昌美, 岩田 剛敏, 松村 栄治, 萩原 信子, 秋庭 正人,
神尾 次彦
- 7 超微細高密度オゾン水の *Campylobacter jejuni* に対する殺菌効果の検討
(鶏病研究会報第 44 巻第 4 号より転載)
岩田 剛敏, 秋庭 正人, 高木 昌美, 松村 栄治, 萩原 信子,
神尾 次彦

第 35 号 《平成 22 年 8 月》

- 1 飼料中のジウロンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
野村 昌代, 杉本 泰俊, 鷺尾 和也
- 2 飼料中のスピノサドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
牧野 大作, 山田 美帆, 佐野 好弘

- 3 飼料中のクリスタルバイオレット及びメチレンブルーの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

高橋 亜紀子

技術レポート

- 1 飼料中のイソフェンホスオキシソンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法
山本 謙吾
- 2 鶏用配合飼料中のアピラマイシンの微生物学的定量法の改良法について
関口 好浩, 佐藤 梢, 吉村 哲史
- 3 飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンのガスクロマトグラフによる定量法
野崎 友春, 井手 康人

精度管理

- 1 平成 21 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
高橋 亜紀子, 松尾 伸吾, 大島 慎司, 榊原 良成, 田中 里美,
高橋 雄一, 杉本 泰俊, 矢野 愛子

調査資料

- 1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について (平成 20 年度)
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課
- 2 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について (平成 21 年度)
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課

他誌掲載論文

- 1 Development of Primers for Detection of Heat-Treated Cetacean Materials in Porcine Meat and Bone Meal
(Journal of Food Protection, Vol. 72 より転載)
Naoki SHINODA, Tomotaro YOSHIDA, Toyoko KUSAMA,
Masami TAKAGI, Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA

第 36 号 《平成 23 年 8 月》

- 1 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法
大島 慎司
- 2 配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良
野村 昌代
- 3 飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験法
橋本 仁康, 篠田 直樹
- 4 愛がん動物用飼料 (ウェット製品) 中の水分の測定法
石橋 隆幸, 石田 亜希子, 田端 麻里
- 5 愛がん動物用飼料 (ウェット製品) 中のクロルピリホスメチル, ピリミホスメチル及びマラチオンのガスクロマトグラフによる同時定量法
屋方 光則
- 6 愛がん動物用飼料中のソルビン酸の液体クロマトグラフによる定量法
矢野 愛子

技術レポート

- 1 ライグラス中のロリトレム B の液体クロマトグラフによる定量法の改良
細貝 明理
- 2 飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」の検討
武田 然也, 橋本 仁康, 山本 貴之
- 3 共通試料による飼料中の水銀の共同試験
小森谷 敏一, 甲斐 茂浩, 齋藤 晴文, 岡田 かおり, 高橋 雄一,
佐古 理恵
- 4 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の液体クロマトグラフによる同時定量法の共同試験
野崎 友春, 岩田 典子
- 5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の共同試験
吉村 哲史, 高橋 雄一, 山多 利秋
- 6 愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法の共同試験
甲斐 茂浩

精度管理

- 1 平成 22 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
大島 慎司, 松尾 信吾, 佐藤 梢, 岡田 かおり, 吉村 哲史,
野村 晋平

調査資料

- 1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 22 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課
- 2 飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果について（平成 18~22 年度）
山本 謙吾, 山多 利秋, 小野 雄造
- 3 特定飼料添加物国家検定結果（平成 22 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

他誌掲載論文（抄録）

- 1 Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan
Koji AOYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Setsuko TABATA,
Eiichi ISHIKURO, Toshitsugu TANAKA, Hiroko NORIZUKI,
Yoshinori ITOH, Kazuhiro FUJITA, Shigemi KAI, Toru TSUTSUMI,
Masanori TAKAHASHI, Hiroki TANAKA, Seiichiro IIZUKA,
Motoki OGISO, Mamoru MAEDA, Shigeaki YAMAGUCHI,
Keiichi SUGIYAMA, Yoshiko SUGITA-KONISHI
and Susumu KUMAGAI
(Journal of Food Protection, 73(2), 344–352 (2010).)

- 2 Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis
Hisaki HIRAOKA, Eiichi ISHIKURO and Tetsuhisa GOTO
(Animal Feed Science and Technology, 161, 58–66 (2010).)
- 3 PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal Derived DNA in Animal Feed
Naoki SHINODA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Masami TAKAGI,
Fumio KOJIMA, Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA
(Food Hygiene and Safety Science, 52(1), 24-27 (2011).)
- 4 Guidelines used in Japan to prevent the contamination of feed products with undesirable substances
Masami TAKAGI, Shoichi YAMATANI and Katsuaki SUGIURA
(Veterinaria Italiana, 47(1), 49-52 (2011).)

第 37 号 《平成 24 年 8 月》

- 1 飼料用イネ中のクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサム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
杉本 泰俊
- 2 飼料用イネ中のカルバリル他 8 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
榊原 良成
- 3 脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法
山本 謙吾, 大島 慎司
- 4 愛玩動物用飼料 (ドライ製品及びセミドライ製品) 中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法
上野山 智洋, 田中 里美, 山多 利秋, 高橋 雄一
- 5 愛玩動物用飼料 (ドライ製品及びセミドライ製品) 中のメタミドホスの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法
小森谷 敏一
- 6 愛玩動物用飼料 (ウェット製品) 中の有機塩素系農薬のガスクロマトグラフ (ECD) による同時定量法
屋方 光則
- 7 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
山多 利秋, 吉村 哲史

技術レポート

- 1 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の共同試験
大島 慎司
- 2 愛玩動物用飼料 (ウェット製品) 中の水分の測定法の間精度評価のための枝分かれ実験
石橋 隆幸, 田端 麻里

精度管理

1 平成 23 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

大島 慎司, 齊木 雅一, 佐藤 梢, 武田 然也, 田中 里美,
石塚 優香

調査資料

1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について (平成 23 年度)

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課

2 特定飼料添加物国家検定結果 (平成 23 年度)

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

他誌掲載論文 (抄録)

1 飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討

千原 哲夫, 田中 里美, 八木 寿治

(日本食品微生物学会雑誌, 28(3), 175-185 (2011).)

2 GC-FPD による飼料中のエテホン分析法の開発と性能評価

屋方 光則, 倉光 良造, 甲斐 茂浩, 工藤 尚史, 矢本 亮介,
松尾 信吾

(食品衛生学雑誌, 53(1), 45-51 (2012).)

第 38 号 《平成 25 年 9 月》

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

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

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

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, 榎原 良成

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 洋市, 榎原 良成, 上野山 智洋

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

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

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

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

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

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

Hisaaki HIRAOKA, Rie FUKUNAKA, Eiichi ISHIKURO,
Osamu ENISHI and Tetsuhisa GOTO

(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)

第 39 号 《平成 26 年 9 月》

1 穀類中の 2,4-D 及びその関連物質の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

山本 克己, 野村 昌代, 山本 謙吾

2 飼料中のキャプタンのガスクロマトグラフによる定量法

齊木 雅一

- 3 穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサ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定量法

牧野 大作, 若宮 洋市, 榊原 良成, 船木 紀夫

- 4 飼料用イネ中のピメトロジンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

武田 然也

技術レポート

- 1 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法の妥当性確認
～乾牧草及び稲わら中のペンディメタリンについて～

船木 紀夫, 設楽 賢治, 牧野 大作

- 2 共通試料による飼料中の動物由来たん白質（牛）の検出法の共同試験

武田 然也, 橋本 仁康, 山本 貴之

- 3 遺伝子組換え小麦（MON71800）の1%混入判定試験法の検討

橋本 仁康, 笠原 正輝, 會田 紀雄

精度管理

- 1 飼料中の粗たん白質、カルシウム及びりん分析値に係る不確かさについて

小塚 健志, 永原 貴子

- 2 平成 25 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について

小塚 健志, 藤田 敏文, 風間 鈴子, 三井 友紀子, 山西 正将,
佐古 理恵

調査資料

- 1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 25 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課

- 2 特定添加物検定結果等について（平成 25 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

- 3 アフラトキシン定性用キットについて

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課

- 4 NaI (TI) シンチレーションスペクトロメータによる飼料中の放射性セシウムのスクリーニング法例
—平成 24 年 3 月の暫定許容値見直しを受けた再検証—

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課

他誌掲載論文（抄録）

- 1 口蹄疫等の防疫における移動式レンダリング装置活用のための技術開発

八木 行雄, 末吉 益雄, 勝田 賢, 宮崎 綾子, 鈴木 亨, 田中 康男,
池口 厚男, 會田 紀雄, 石田 三佳, 中久保 亮, 上村 涼子,
橋本 仁康, 弓削 正昭, 大崎 慎人, 犬丸 茂樹
(家畜衛生学雑誌, 39(4), 149-156 (2014))

第 40 号 《平成 27 年 9 月》

- 1 乾牧草中の 2,4-D 及びその関連物質の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

山本 克己, 加藤 耕一

- 2 飼料用イネ中のエチプロール他 5 成分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

義本 将之, 屋方 光則, 齊木 雅一

- 3 飼料用イネ中のオキサジクロメホン, ジメタメトリン及びピリブチカルブ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

吉村 哲史

- 4 稲発酵粗飼料及び粳米中のオキシソリニック酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

牧野 大作, 三井 友紀子, 大谷 俊子

- 5 穀類, 乾牧草, 稲わら及び稲発酵粗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

杉本 泰俊, 船木 紀夫, 榊原 良成

- 6 稲発酵粗飼料及び粳米中のクロロタロニルのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

桑原 正良

- 7 愛玩動物用飼料 (ドライ製品及びセミドライ製品) 中の油脂の酸価及び過酸化物価の測定法

名塚 英一, 松原 光里

技術レポート

- 1 飼料中のジカンバのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認

屋方 光則

- 2 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認

～ カドミウム, 水銀, 鉛, ヒ素, エトキシキン, ジブチルヒドロキシトルエン, ブチルヒドロキシアニソール及び亜硝酸ナトリウムについて ～

杉村 靖, 森口 里美, 浪越 充司, 山西 正将, 若宮 洋市,
永原 貴子

- 3 加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討

橋本 仁康, 山多 利秋, 會田 紀雄

- 4 ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナについて

榎本 舞弓, 橋本 仁康, 山多 利秋

精度管理

- 1 平成 26 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について

小塚 健志, 藤田 敏文, 保田 伊世, 森口 里美, 設楽 賢治,
石塚 優香

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 26 年度)

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課

- 2 特定添加物検定結果等について (平成 26 年度)

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

他誌掲載論文 (抄録)

- 1 Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food.

Tomoya YOSHINARI, Hiroshi TAKEUCHI, Koji AOYAMA,
Masaru TANIGUCHI, Shigeki HASHIGUCHI, Shigemi KAI,
Motoki OGISO, Takashi SATO, Yu AKIYAMA, Masahiro NAKAJIMA,
Setsuko TABATA, Toshitsugu TANAKA, Eiichi ISHIKURO and
Yoshiko SUGITA-KONISHI

(Journal of Food Protection, **77**(11), 1940-1946 (2014),
doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-185.)

- 2 Development and inter-laboratory study of a method for quantification of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in pet foods

M. Nomura, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara and T. Chihara

(World Mycotoxin Journal, **8**(1), 55-61 (2015).)

- 3 口蹄疫等の防疫用移動式レンダリング装置から排出される過熱破砕物の充填・運搬手法の検討

田中 康男, 八木 行雄, 末吉 益雄, 勝田 賢, 宮崎 綾子, 鈴木 亨,
池口 厚男, 會田 紀雄, 石田 三佳, 中久保 亮, 上村 涼子,
橋本 仁康, 弓削 正昭, 大崎 慎人, 犬丸 茂樹, 荻野 暁史,
山下 恭広

(家畜衛生学雑誌, **40**(4), 203-213 (2015).)

付 録

飼料研究報告総目録 (第1号～第40号)

飼料研究報告編集委員

委員長	池田 一樹	副委員長	田村 道宏
	青山 幸二		関口 好浩
	天野 忠雄		高橋 亜紀子
	石橋 隆幸		千原 哲夫
	小野寺 聖		日比野 洋
	功刀 豊		山多 利秋
	小森谷 敏一		

飼料研究報告 第40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27年9月

編集 飼料研究報告編集委員会