

第1章 通 則

1 原子量

原子量は、最新の国際原子量表による。

2 単 位

主な計量の単位については、次の記号を用いる。

メートル	m	センチメートル	cm
ミリメートル	mm	マイクロメートル	μm
ナノメートル	nm	キログラム	kg
グラム	g	ミリグラム	mg
マイクログラム	μg	ナノグラム	ng
ピコグラム	pg	トン	t
平方メートル	m ²	平方センチメートル	cm ²
立方メートル	m ³	リットル	L
ミリリットル	mL	マイクロリットル	μL
キロパスカル	kPa	パスカル	Pa
時	h	分	min
秒	s	モル	mol

3 百分率

質量百分率は%、質量対容量百分率は w/v%、容量百分率は v/v%、容量対質量百分率は v/w%の記号を用いる。

4 温 度

- (1) 温度表示はセルシウス氏法を用い、アラビア数字の次に°C を付けて示す。
- (2) 標準温度は 20 °C、常温は 15~25 °C、室温は 5~35 °C とする。
- (3) 冷所は、別に規定する場合を除き、1~15 °C の場所とする。
- (4) 熱水は 60 °C 以上、温水は 40~60 °C、冷水は 15 °C 以下の水とする。
- (5) 加温は、室温から 60 °C 以下の範囲で加熱する操作とする。

5 試 薬

- (1) 試薬は、以下に掲げる場合及び別に規定する場合を除き、別紙1に規定するものとする。
 - ア 農薬の分析法に用いる溶媒は、残留農薬試験用試薬又はこれと同等のものを用いる。
 - イ 液体クロマトグラフの溶離液は、液体クロマトグラフ用試薬又はこれと同等のものを用いる。
- (2) 試薬名の次に〔 〕で分子式を付けたものは、化学的純物質を意味する。

標準液の調製に用いる化学的純物質として規定する試薬は、別に規定する場合を除き、純度が明らかなものを用いることとし、あらかじめ溶媒に溶解してある液体試薬（純度が明らかで、かつ、溶媒その他の共存物質が分析を妨げないことを確認したものに限り。）に替えることができる。

- (3) 試薬に（ ）で標準試薬又はヒ素分析用と付けたものは、産業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本産業規格（以下「JIS」という。）の容量分析用標準試薬又はヒ素分析用試薬の規格に該当するものを、また、標準品と付けたものは、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方（以下「日局」という。）の標準品の規格に該当するものを示す。
- (4) 液体試薬の希釈割合を示す場合、例えば、塩酸（1+2）とあるのは、塩酸 1 mL、水 2 mL の割合で調製したものとする。
- (5) 混合溶媒の混合割合を示す場合、例えば、水－アセトニトリル－メタノール（10+8+5）とあるのは、水 100 mL、アセトニトリル 80 mL、メタノール 50 mL の割合で調製したものとする。

6 水

単に水とあるのは、別に規定する場合を除き、以下のいずれかを用いる。なお、以下の水を滅菌する場合は 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌又はこれと同等と認められる方法で処理するものとする。

- (1) 原水を超ろ過（逆浸透、限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製した試験に適した水。
- (2) 電気伝導率 5.6 $\mu\text{S}/\text{m}$ 以下（比抵抗 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上）となるよう精製された水（以下「超純水」という。）。)

7 溶 液

単に溶液とあり溶媒を示さないものは、水溶液とする。

8 計量器

- (1) 計量器は、計量法（平成 4 年法律第 51 号）の規定に基づく検定を受けこれに合格したもの又は同法の規定に基づく指定製造事業者の製造したものをを用いるものとする（同法の特定制量器に限る。）。)
- (2) 化学はかりは、0.1 mg の差を読みとれるものを用い、セミマイクロ化学はかりは、0.01 mg の差を読みとれるものを用いるものとする。
分銅は、直示化学はかりに用いる場合を除き、1 級精密分銅を用いるものとする。
更に正確を必要とする場合は、器差試験を受けた分銅を用いるものとする。
- (3) ガラス製体積計は、別に規定する場合を除き、JIS に該当するものを用いるものとする。

9 器具、機器等

- (1) 分析用ガラス器具、分析用陶磁器、化学分析用白金るつぼ、ふるい及びろ紙は、別に規定する場合を除き、JIS に該当する適当な容量・形状のものを用いるものとする。
- (2) デシケーター中の乾燥剤は、別に規定する場合を除き、シリカゲルを用いるものとする。
- (3) 分析に用いる機器は、別に規定する場合を除き、JIS に該当するもの又はそれと同等以上のものを用いるものとする。

本分析基準に示した測定条件例は、一例を示したものであるため、JIS、機器の取扱い説明書等により、あらかじめ測定の最適条件を設定しておくものとする。

10 カラム等

カラム、ミニカラム、カラム充てん剤等は製品及びロットによって精製効果、目的物の吸着、溶出画分等が異なる場合がある。また、固相や管からの溶出物による測定妨害も考えられるので、確認してから使用する。

11 分析操作等

- (1) 分析操作は、別に規定する場合を除き、常温で行うものとする。ただし、温度の影響のあるものは、別に規定する場合を除き、標準温度で行うものとする。
- (2) 「直ちに」とあるのは、別に規定する場合を除き、30 秒以内に操作するものとする。
- (3) 試料及び試薬の質量並びに液体の体積の計量方法については、別に規定する場合を除き、次によるものとする。

ア 質量を「の桁まで量り」とあるのは、記載された質量の次の桁で四捨五入した値がその数値になり、かつ規格値等の桁数を考慮して必要な桁数となるよう量るものとする。例えば、50 g を 0.01 g の桁まで量りとは、49.50~50.49 g、5.0 g を 0.001 g の桁まで量りとは、4.950~5.049 g、5 mg を 0.01 mg の桁まで量りとは、4.50~5.49 mg を量ることを意味する。また、「約」とあるのは、記載された量の±10%の範囲内で量るものとする。

イ 体積を量る場合に「正確に」とあるのは、全量ピペット、ビュレット又は全量フラスコを用いて正しく量るものとする。

ウ 単に数値のみを示してあるのは、示された数値の最下位まで量るものとする。

- (4) 混合を行う際は、液量の2倍程度の容量を持つ容器を用いて行うものとする。
- (5) 定量分析において検量線を作成する場合は、別に定めのない限り濃度が等間隔となるように5点以上を含めるものとする。
- (6) 遠心分離操作において、遠心加速度が十の位まで記載されている分析法においては、十の位を切り上げて操作しても差し支えないものとする。

12 数値の丸め方

分析値は、有効数字最下位の次のけたまで算出し、JIS Z 8401 規則 B の定めるところ

により丸めるものとする。

13 分析方法

試験に用いる分析方法の妥当性確認は、別紙2に準じて行う。

本分析基準に規定する方法以外の方法であって、本分析基準に規定する方法以上の真度及び精度があると認められるものがある場合には、その方法を用いることができるものとする。ただし、その結果について疑いのある場合は、規定の方法で最終の判定を行うものとする。

また、抗生物質の定量法において、同一条に平板法及び液体クロマトグラフ法が規定されている場合で、結果について疑いのある場合には、平板法で最終の判定を行うものとする。

14 不確かさ

本分析基準による分析値に対して不確かさが設定されている成分等は、別紙3のとおりである。

15 その他

- (1) 「これと同等のもの」として各分析法に記載以外の製品を使用する場合には、当該製品を用いて別紙2の妥当性確認法ガイドライン4の(2)及び(3)に則り分析を行い、単一試験室における真度及び精度の目標値を満たすことを確認した上で使用すること。
- (2) 「風乾物」は、第2章2の(2)のとおり風乾し水分が10%程度のものとする。

第2章 分析用試料の調製法等

1 試料の採取及び保管

試料の採取及び保管は、「飼料等検査実施要領」（昭和52年5月10日付け52畜B第793号農林省畜産局長通知）の別記「飼料等の収去等の方法」により行うものとする。

2 分析用試料の調製

分析用試料は、別に規定する場合を除き、次により調製し、共栓ガラス瓶等の気密容器に貯蔵しておくものとする。

なお、分析用試料の調製に当っては操作を迅速に行い、試料が含有する水分の増減及び試料の化学変化が生じないように留意するものとする。

- (1) 試料が乾燥している場合には、試料を粉砕して目開き1mmの網ふるいを通してよく混合する。
- (2) 試料が湿潤な場合には、試料を混合した後、二分器で縮分して200g以上の必要量をとってその質量を量り、60℃以下で乾燥し、更に室内に静置して風乾し（以下「予備乾燥」という。）、再び質量を量った後、(1)の方法により試料を調製し、その分析値を原試料の含量に換算する。
- (3) 試料の脂肪含量が多いため粉砕することが困難な場合には、試料を混合した後、二分器で縮分して200g以上の必要量をとってその質量を量り、乳ばちの中でつき砕いてビーカーに移し、乳ばちに付着した試料をジエチルエーテルで洗浄して洗液をビーカーに加え、アルミニウム箔でふたをして1日間静置した後、ジエチルエーテルをデカンテーションにより1,000~2,000mLの全量フラスコに移す。

ビーカー内の不溶解物にジエチルエーテルを注ぎ、アルミニウム箔でふたをして1日間静置した後、デカンテーションにより先の全量フラスコに移し、不溶解物をあらかじめ質量を量っておいた大型ろ紙（5種A）でろ過し、ジエチルエーテルで洗浄し、洗液を先の全量フラスコに加える（以下「予備抽出」という。）。

次に、不溶解物をろ紙とともに風乾した後、60~80℃で乾燥し、更に室内に静置して風乾し、再び質量を量った後、(1)の方法により試料を調製し、その分析値を原試料の含量に換算する^{注1}。

注1 第3章3.1（粗脂肪）参照

第3章 一般成分及びデタージェント繊維

1 水分

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、アルミニウム製ひょう量皿（あらかじめ乾燥して質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の水分量を算出する。

ただし、フィッシュソリュブル吸着飼料、糖蜜吸着飼料、グルテンフィード及びとうもろこしジスチラーズグレインソリュブルについては、乾燥温度は 105±2 °C、乾燥時間は 3 時間とする。

（付 記）試料の水分含量が多いため粉碎することが困難な場合には、第 2 章 2 の(2)により分析試料を調製した後、上記定量法により予備乾燥後の試料中の水分量を求め、次式により原試料中の水分量を算出する。

$$\text{原試料中の水分量 (\%)} = A + \frac{(100 - A) \times B}{100}$$

A : 予備乾燥した原試料中の水分量 (%)

B : 予備乾燥後の試料中の水分量 (%)

（参考）分析法バリデーション

・ 共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	262	12.94	2.8	1.0
魚粉	256	9.65	3.1	1.1

2 粗たん白質

2.1 ケルダール法^{注1}

A 試薬の調製

1) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液 水酸化ナトリウムの飽和溶液を調製し、栓をして 10 日間以上静置した後、上澄み液 50 mL に煮沸冷却した水を加えて 10 L とし、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

アミド硫酸（標準試薬）（デシケーター（減圧）中で 48 時間乾燥したもの）2~2.5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 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アミド硫酸標準液を調製する。アミド硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、ブロモチモールブルー試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数 (f_1) を算出する。

$$f_1 = \frac{W \times 10^4}{V \times 97.10}$$

W : 標定に用いたアミド硫酸標準液 (25 mL) 中のアミド硫酸の質量 (g)

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

- 2) 0.05 mol/L 硫酸標準液 硫酸 28 mL を水 1 L にかき混ぜながら徐々に加え、放冷後、水を加えて 10 L として 0.05 mol/L 硫酸標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

0.05 mol/L 硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、メチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.05 mol/L 硫酸標準液の係数 (f_2) を算出する。

$$f_2 = \frac{V \times f_1}{25}$$

f_1 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

B 試料溶液の調製

分析試料 1~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、ケルダールフラスコに入れ、硫酸カリウム約 9 g 及び硫酸銅 (II) 五水和物約 1 g を加え、更に硫酸 30~40 mL を加えて振り混ぜる。これを徐々に加熱し、発泡が収まってからは強熱し、この液が透明になってから更に 2 時間以上加熱した後放冷する。この液を水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。

C 定 量

- 1) 硫酸標準液に吸収させる方法

試料溶液の一部をケルダールフラスコに正確に入れ、強アルカリ性とするのに十分な量の水酸化ナトリウム溶液 (50 w/v%) を加える。これをあらかじめ 0.05 mol/L 硫酸標準液の一部を正確に入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が約 120 mL に達するまで留出させる。

留出液にメチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により窒素 [N] 量を算出する。これに 6.25 (乳製品及び乳製品の配合割合が 50% 以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38) を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。

$$\text{窒素 [N] 量 (\%)} = 1.40 \times f_1 \times (V_1 - V_2) \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_1 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数

V_1 : 受器に入れた 0.05 mol/L 硫酸標準液の量に相当する 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

V_2 : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の質量 (g)

- 2) ホウ酸溶液に吸収させる方法

受器に 0.05 mol/L 硫酸標準液の代わりにホウ酸溶液 (4 w/v%) の一部を入れ、1) と同様に蒸留操作を行う。

留出液にプロモクレゾールグリーン-メチルレッド試液数滴を加え、0.05 mol/L 硫酸標準液で滴定し、次式により窒素 [N] 量を算出する。これに 6.25 (乳製品及

び乳製品の配合割合が 50 % 以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38) を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。

$$\text{窒素 [N] 量 (\%)} = 1.40 \times f_2 \times V_1 \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_2 : 0.05 mol/L 硫酸標準液の係数

V_1 : 滴定に要した 0.05 mol/L 硫酸標準液の量 (mL)

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の質量 (g)

注 1 分析値に対する不確かさは別紙 3 のとおりである。

(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

1) 硫酸標準液に吸収させる方法

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	31	24.23	1.7	0.8
魚粉	28	63.14	2.7	2.1

2) ホウ酸溶液に吸収させる方法

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	56	24.24	1.9	0.8
魚粉	55	63.23	1.3	0.6

2.2 燃焼法^{注 1,2}

定 量

分析試料^{注 3} 0.1~0.5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、窒素 (たん白質) 分析装置^{注 4} に入れ、分析装置を作動させ窒素ガスの検出器応答ピークを得る。

同様に検量線作成用試薬^{注 5} を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、装置に入れ、窒素ガスの検出器応答ピークを得る。得られた応答ピークから面積を求めて検量線を作成し、試料中の窒素 [N] 量を算出し、窒素 [N] 量に 6.25 (乳製品及び乳製品の配合割合が 50 % 以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38) を乗じて試料中の粗たん白質量とする。

分析装置の必要条件

- i) 酸素ガス (純度 99.9 % 以上) 中で試料を熱分解し、反応炉温度が最低 870 °C を保持できる装置
- ii) 遊離した窒素ガスを他の燃焼生成物から分離可能な装置
- iii) 窒素酸化物 (NO_x) を窒素ガス (N₂) に変換する機構を持つこと。もしくは、窒素を NO₂ として測定可能な装置
- iv) 熱伝導度検出器により、窒素ガスを測定可能な装置

注 1 スーダングラス等硝酸態窒素含有量が多い試料は、粗たん白質として高目に定量されるため、別途、硝酸態窒素 [N] 量を測定して差し引くこと。

2 分析値に対する不確かさは別紙 3 のとおりである。

3 分析試料は、全量が目開き 0.5 mm の網ふるいを通過したもの。

- 4 燃焼法に基づく装置を用い、当該装置に適した条件で測定する。
- 5 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物、DL-アスパラギン酸等使用する窒素（たん白質）分析装置指定の試薬を用いる。

（参考）分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
牛用配合飼料	11	13.5	1.5	1.9	0.5
豚用配合飼料	11	19.3	0.5	1.8	0.8
鶏用配合飼料	11	19.6	0.3	1.7	0.8
魚粉（輸入魚粉）	11	67.9	0.7	0.7	0.6
魚粉（調整魚粉）	11	63.1	0.2	0.6	0.5
マイロ	11	9.4	1.0	3.5	0.9
ふすま	11	16.2	0.9	2.8	1.1
大豆油かす	11	50.2	0.2	0.7	0.5
アルファルファヘイ	11	18.3	0.8	2.8	1.2
塩酸L-リジン	11	95.1	0.3	1.3	1.3

3 粗脂肪

3.1 ジエチルエーテル抽出法

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、円筒ろ紙^{注1}（直径 22 mm、高さ 90 mm）に入れ、その上に脱脂綿を軽く押えるようにして入れた後、95~100 °C で 2 時間乾燥する。

これをソックスレー抽出器に入れ、脂肪ひょう量瓶（あらかじめ 95~100 °C で乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）に連結し、ジエチルエーテルを加えて 16 時間抽出する^{注2}。

次に、円筒ろ紙をとり去り、ジエチルエーテルを回収する。脂肪ひょう量瓶をはずしてジエチルエーテルを揮散させ、95~100 °C で 3 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の粗脂肪量を算出する。

注 1 No. 84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの

2 同等の抽出効果のある装置を用いてもよい。

（付 記）試料の脂肪含量が多いため粉碎することが困難な場合には、2 の(3)により分析試料を調製した後、次により原試料中の粗脂肪量を求める。

予備抽出に用いたジエチルエーテルを入れた全量フラスコの標線までジエチルエーテルを加え、その一部を脂肪ひょう量瓶（あらかじめ 95~100 °C で乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）に正確に入れ、上記定量法に準じて、予備抽出した原試料中の粗脂肪量を求める。

次に、予備抽出後の試料中の粗脂肪量を上記定量法によって求め、次式により原試料中の粗脂肪量を算出する。

$$\text{原試料中の粗脂肪量 (\%)} = A + \frac{(100 - B) \times C}{100}$$

A : 予備抽出した原試料から得られた粗脂肪量 (%)

B : 予備抽出による減量 (%)

C : 予備抽出後の試料中の粗脂肪量 (%)

(参考) 分析法バリデーション

・ 共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	180	5.82	5.7	1.9

3.2 酸分解ジエチルエーテル抽出法

(適用範囲：エキスパンド状の飼料、全脂粉乳を原料とする配合飼料、粉末油脂を原料とする配合飼料（ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料及びほ乳期子豚育成用配合飼料に限る。）、脂肪酸カルシウムを原料とする乳用牛飼育用配合飼料、全脂粉乳、大豆油さい及びなたね油さい)

定 量

分析試料^{注1} 2.0 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のビーカー^{注2} に入れ、エタノール 2 mL を加え、ガラス棒で混和して試料を潤した後、塩酸 (4+1) 20 mL を加えて時計皿で覆い、70~80 °C の水浴中でときどきかき混ぜながら 1 時間加熱した後放冷する。

先のビーカーの内容物を 200 mL の分液漏斗 A^{注2} に入れ、ビーカーをエタノール 10 mL 及びジエチルエーテル 25 mL で順次洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせる。更にジエチルエーテル 75 mL を分液漏斗 A に加え、振り混ぜた後静置する。ジエチルエーテル層（上層）をピペット等でとり、あらかじめ水 20 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 B^{注3} に加える。

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

分液漏斗 B を振り混ぜた後静置し、水層（下層）を捨てる。更に水 20 mL（全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料は 60 mL）を分液漏斗 B に加え、同様に 2 回操作する。ジエチルエーテル層をあらかじめ脱脂綿を詰め硫酸ナトリウム（無水）10 g 以上の適量を入れた漏斗で脂肪ひょう量瓶又は 300 mL のなす形フラスコ（あらかじめ 95~100 °C で乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）にろ過する。

次に、ソックスレー抽出器で先の脂肪ひょう量瓶内の、又はロータリーエバポレーターで先のなす形フラスコ内のジエチルエーテルを回収する。脂肪ひょう量瓶又はなす形フラスコをはずしてジエチルエーテルを揮散させ、95~100 °C で 3 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の粗脂肪量を算出する。

注 1 大豆油さい及びなたね油さいについては、40 °C で 30 分間加温した後、ホモジナイザーで 5 分間かき混ぜて均質にしたものを用いる。

- 2 ビーカー及び分液漏斗 A の代わりにマジョニア管を用いてもよい。ただし、抽出に必要なジエチルエーテル量を事前に確認すること。
- 3 試料が全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料である場合は、あらかじめ水 60 mL を入れた 500 mL の分液漏斗とする。

(参考) 分析法バリデーション

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	測定値 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ほ乳期子豚育成用配合飼料	11	1	10.18	0.9	4.1	1.5
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 1	12	0	19.68	1.2	2.7	1.2
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 2	12	0	30.55	1.1	3.1	1.7
ほ乳期子牛育成用代用乳用・ほ乳期子豚育成用配合飼料	11	1	17.86	1.7	3.0	1.3
全脂粉乳 1	10	2	26.72	0.9	1.9	0.97
全脂粉乳 2	11	1	25.72	0.7	1.2	0.62
大豆油さい	11	0	66.12	0.5	1.1	0.85
なたね油さい	11	0	63.88	0.6	1.1	0.84

4 粗繊維

定 量

1) 静置法

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL のトールビーカーに入れ、硫酸 (1+34) 50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とする。

次に、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸した後、水 300 mL を加えて一夜静置し、上澄み液を吸引除去し、再び水を加えて 200 mL とし、以下同様に操作する。

残留物 (酸不溶解物) に水酸化ナトリウム溶液 (5 w/v%) 50 mL を加え、水を加えて 200 mL とし、時計皿又は冷却器で覆い、以下酸処理の場合と同様に操作する。

残留物 (酸・アルカリ不溶解物) をろ紙 (5 種 A) (あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの) でろ過する。ろ紙上の残留物をろ液のアルカリ性反応がなくなるまで熱水で洗浄し、更に少量のエタノール及びジエチルエーテルで順次 2~3 回ずつ洗浄した後、3~4 時間風乾する。

次に、酸・アルカリ不溶解物をろ紙とともに先のひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、試料中の酸・アルカリ不溶解物の量を算出する。ひょう量皿内の残留物をろつば (あらかじめ 550~600 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの) に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、灰分量を求める。

酸・アルカリ不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の粗繊維量を算出する。

2) ろ過法

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL のトールビーカーに入れ、硫酸（1+34）50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とし、時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸した後、残留物を 0.045 mm のステンレス金網でろ過し、熱水で洗浄する。

残留物（酸不溶解物）を水 130~140 mL で先のトールビーカーに移し、水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とする。

次に、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸する。

残留物（酸・アルカリ不溶解物）をろ紙（5 種 A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）でろ過する。ろ紙上の残留物をろ液のアルカリ性反応がなくなるまで熱水で洗浄し、更に少量のエタノール及びジエチルエーテルで順次 2~3 回ずつ洗浄した後、3~4 時間風乾する。

次に、酸・アルカリ不溶解物をろ紙とともに先のひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、試料中の酸・アルカリ不溶解物の量を算出する。ひょう量皿内の残留物をろつぽ（あらかじめ 550~600 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、灰分量を求める。

酸・アルカリ不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の粗繊維量を算出する。

（参考）分析法バリデーション

・共同試験

1) 静置法

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	30	2.79	8.1	2.4

2) ろ過法

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	120	2.73	12	3.5

5 耐熱性 α-アミラーゼ処理中性デタージェント繊維（aNDF 及び aNDFom）

A 試薬の調製

- 1) 中性デタージェント溶液^{註1} エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g（18.55~18.64 g）、四ホウ酸ナトリウム十水和物 6.8 g（6.75~6.84 g）及びリン酸水素二ナトリウム 4.6 g（4.55~4.64 g）を量って 1 L の全量フラスコに入れ、水 500 mL を加えて溶かす。この液に *n*-ドデシル硫酸ナトリウム 30.0 g（29.95~30.04 g）、トリエチレングリコール 10 mL 及び水 250 mL を加えて混合した後、更に全量フラスコの標線まで水を加えて中性デタージェント溶液を調製する。

使用に際して、pH が 6.95~7.05 の範囲にあることを確認する。

- 2) アミラーゼ原液 耐熱性 α -アミラーゼ^{注2} 1 mL を 10 mL の褐色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アミラーゼ原液を調製する^{注3}。
- 3) アミラーゼ溶液 あらかじめ確認試験^{注4}により十分なアミラーゼ原液の添加量 a μ L を確認する。次式により算出したアミラーゼ原液の採取量 b μ L を 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、標線まで水を加えてアミラーゼ溶液を調製する。
アミラーゼ原液の採取量 b (μ L) = 十分なアミラーゼ原液の添加量 a (μ L) \times 50
- 4) ヨウ素液 ヨウ化カリウム 2.0 g (1.95~2.04 g) 及びヨウ素 1.0 g (0.95~1.04 g) を水に溶かして 100 mL とする。

B 定 量

分析試料 0.50 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL のトールビーカーに入れ、亜硫酸ナトリウム^{注5} 0.5 g (0.45~0.54 g) 及び中性デタージェント溶液 50 mL を加えた後、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、あらかじめ加熱した繊維煮沸装置で沸騰するまで加熱する。沸騰が始まった直後、アミラーゼ溶液 2 mL をトールビーカーに加え、蒸発する水分を補いながら 1 時間煮沸する。トールビーカーを繊維煮沸装置から下ろし、更にアミラーゼ溶液 2 mL をトールビーカーに加え、軽く振り混ぜた後 60 秒間静置する。トールビーカーの内容物をガラスろ過器^{注6} (あらかじめ 520~550 °C で 2~5 時間加熱した後、150 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、質量を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの) で吸引ろ過する。ガラスろ過器中の残留物 (中性デタージェント不溶解物) を熱水 40 mL ずつで 3 回洗浄し、更にアセトン 10~20 mL で 3~4 回洗浄した後、アセトン臭が無くなるまで風乾する。

次に、先のガラスろ過器を 135 \pm 2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷した後、質量を 0.01 mg の桁まで量り、試料中の中性デタージェント不溶解物 (aNDF) の量 (%) を算出する。

更に先のガラスろ過器を 520~550 °C で 2~5 時間加熱して中性デタージェント不溶解物を灰化し、150 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、質量を 0.01 mg の桁まで量り、灰分量 (%) を求める。

先に求めた中性デタージェント不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の耐熱性 α -アミラーゼ処理中性デタージェント繊維 (aNDFom) 量 (%) を算出する。

注 1 中性デタージェント溶液は室温で保存する。

2 α -Amylase A3306、 α -Amylase A3403 (いずれも Sigma-Aldrich 製) 又はこれらと同等のもの

3 アミラーゼ原液は 2~8 °C で保存する。

4 確認試験 胚乳部大粒ひき割りとうもろこし (目開き 1 mm の網ふるいを通過するもの) 0.5 g を (0.45~0.54 g) 量って 500 mL のトールビーカーに入れたものを 6 組調製する。中性デタージェント溶液 50 mL ずつを各トールビーカーに加え、各トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、あらかじめ加熱した繊維煮沸装置で加熱する。沸騰が始まった直後、アミラーゼ原液 25、50、100、200 及び 400 μ L (これらは、耐熱性 α -アミラーゼの酵素力が 50,000 unit/mL の場合には、それぞれ 125、250、500、1,000 及び 2,000 unit を含有する。) をそれぞれトール

ビーカーに加える。また、1組のトールビーカーはアミラーゼ原液を加えず、空試験溶液とする。更にこれらを正確に10分間煮沸する。各トールビーカーを繊維煮沸装置から下ろし、先と同量のアミラーゼ原液を各トールビーカーに加え、軽く振り混ぜた後60秒間静置する。各トールビーカーの内容物をガラス繊維ろ紙（GA-100（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの）で100 mLのビーカーにろ過し、氷浴中で5分間冷却して1°C以下にした後、20°Cの恒温槽で常温に戻す。各ビーカーを白紙の上に置き、ヨウ素液0.5 mLを速やかに各ビーカーに加えた後90秒間静置し、30秒以内に溶液の色を確認する。無色～黄色を呈する場合は、アミラーゼ原液添加量が十分であり、紫～ピンクがかった飴色を呈する場合は、不十分であると判断する。アミラーゼ原液400 µLで添加量が不十分と判断した場合には、添加量を増やした同様の試験を行って十分なアミラーゼ原液の添加量を確認する。

5 使用直前に秤量する。

6 P2（細孔の大きさ40~100 µm、Foss Tecator製）又はこれと同等のもの

6 酸性デタージェント繊維（ADF及びADFom）

A 試薬の調製

酸性デタージェント溶液^{注1} 硫酸（1+37）1 Lに臭化セチルトリメチルアンモニウム20.0 g（19.95~20.04 g）を加えて溶解する。

B 定 量

分析試料1.0 gを0.1 mgの桁まで量り、その数値を記録し、500 mLのトールビーカーに入れ、酸性デタージェント溶液100 mLを加えた後、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い煮沸する。蒸発する水分を補いながら1時間煮沸した後、トールビーカーの内容物をガラスろ過器^{注2}（あらかじめ、520~550°Cで2時間加熱し、150°Cで2時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、質量を0.1 mgの桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）で吸引ろ過する。ガラスろ過器中の残留物（酸性デタージェント不溶解物）を熱水で十分洗浄し、更にアセトン10~20 mLで3~4回洗浄した後、アセトン臭がなくなるまで風乾する。

次に、先のガラスろ過器を135°Cで2時間乾燥し、デシケーター中で放冷した後、質量を0.1 mgの桁まで量り、試料中の酸性デタージェント不溶解物（ADF）の量（%）を算出する。

更に先のガラスろ過器を520~550°Cで2時間加熱して酸性デタージェント不溶解物を灰化し、150°Cで2時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、質量を0.1 mgの桁まで量り、灰分量（%）を求める。

先に求めた酸性デタージェント不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の酸性デタージェント繊維（ADFom）量（%）を算出する。

注1 酸性デタージェント溶液は室温で保存する。

2 P2（細孔の大きさ40~100 µm、Foss Tecator製）又はこれと同等のもの

7 粗灰分

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、るつぼ（あらかじめ 550~600 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録しておいたもの）に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の粗灰分量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	256	4.90	2.9	0.9
魚粉	252	17.06	1.8	0.7

8 可溶無窒素物

定 量

可溶無窒素物量は、次式により算出する。

$$\text{可溶無窒素物量 (\%)} = 100 - (\text{水分量 (\%)} + \text{粗たん白質量 (\%)} + \text{粗脂肪量 (\%)} + \text{粗繊維量 (\%)} + \text{粗灰分量 (\%)})$$

第4章 無機成分（有機態金属化合物を含む）

第1節 各条

1 カルシウム

1.1 シュウ酸アンモニウム法^{注1}

A 試薬の調製

0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 過マンガン酸カリウム 3.16 g を量ってビーカーに入れ、水 800 mL を加えて煮沸し、放冷後、水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えた後 1~2 日間静置する。この液をガラスろ過器（G4）でろ過し、0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液を調製し、次によりその濃度を標定し、褐色瓶に保存する。

シュウ酸ナトリウム（標準試薬）（150~200 °C で 1~1.5 時間乾燥したもの）2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 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シュウ酸ナトリウム標準液を調製する。シュウ酸ナトリウム標準液 10 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、あらかじめ煮沸した後 25~30 °C に放冷した硫酸（1+20）70 mL を加える。穏やかにかき混ぜながら 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 10 mL を急速に加え、過マンガン酸の色が完全に消失した後、70 °C に加熱し、更に 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液で滴定を続ける。終点近くでは 1~1.5 mL を徐々に加え、溶液が微紅色となったとき（着色して 30 秒以内に消失するものであってはならない。）を終点として 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液の濃度を標定する。

シュウ酸ナトリウム標準液 10 mL は 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 11.94 mL に相当する。

B 試料溶液の調製

分析試料 2~10 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で加熱して灰化し、放冷する。

残留物を少量の水で潤し、塩酸 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて 30 mL とし、時計皿で覆って 30 分間煮沸した後放冷する。これを水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6 種）でろ過して試料溶液とする。

C 定 量

試料溶液の一部（カルシウム [Ca] として 70 mg 以下）をビーカーに正確に入れ、塩化アンモニウム 1~2 g、酢酸アンモニウム 2.0 g（1.95~2.04 g）及びメチルレッド試液 1 滴を加え、アンモニア水（1+3）で中和する。この液を煮沸した後、ろ紙（5 種 A）でろ過し、先のビーカーを熱水で洗浄し、洗液を同様にろ過してろ液を合わせる。

次に、ろ液を加熱し、かき混ぜながらシュウ酸アンモニウム飽和溶液 20 mL を徐々に加えてシュウ酸カルシウムを沈殿させ、沸騰水浴上で 0.5~2 時間加熱した後、ろ紙（6 種）でろ過し、熱水で洗浄する。

沈殿をろ紙とともに先のビーカーに入れ、硫酸（1+5）50 mL 及び熱水 150 mL を

加えて溶かし、70 °C に加熱する。ろ紙を崩さないようにしながら 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液で滴定し、溶液が微紅色になったとき（着色して 30 秒以内に消失するものであってはならない。）を終点とし、その滴定値から試料中のカルシウム量を算出する。

0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 1 mL は、カルシウム 2.004 mg に相当する。

注 1 分析値に対する不確かさは別紙 3 のとおりである。

(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	39	0.82	9.2	2.2

1.2 原子吸光光度法^{注 1,2}

A 試薬の調製

- 1) 干渉抑制剤液 塩化ストロンチウム六水和物 152.1 g (152.05~152.14 g) を水及び塩酸 420 mL に溶かして 1 L とする。
- 2) カルシウム標準液 炭酸カルシウム [CaCO₃] (180 °C で 1 時間乾燥したもの) 2.497 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、塩酸 (1+3) 20 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてカルシウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、カルシウム [Ca] として炭酸カルシウム採取量 (g) に 0.4004 を乗じた量 (mg) を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水及び最終液量の 1/10 容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1 mL 中にカルシウムとして 5~30 µg を含有する数点のカルシウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

1.1 の B による。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部（カルシウムとして 0.5~3 mg 相当量）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液 10 mL を加え、更に標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フラーム中で波長 422.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カルシウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカルシウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

2 分析値に対する不確かさは別紙 3 のとおりである。

(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	148	0.82	7.3	1.8

2 リン (リン) ^{注1}

A 試薬の調製

- 1) リン標準液 デシケーター中で 24 時間以上乾燥したリン酸二水素アンモニウム [NH₄H₂PO₄] 18.57 g 又はリン酸二水素カリウム [KH₂PO₄] 21.97 g を量り、その数値を記録し、1,000 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リン標準原液を調製する (この液 1 mL は、リン [P] としてリン酸二水素アンモニウム採取量 (g) に 0.2693 を乗じた量又はリン酸二水素カリウム採取量 (g) に 0.2276 を乗じた量 (mg) を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、10 mL 中にリンとして 0.5~4 mg を含有する数点のリン標準液を調製する。

- 2) モリブデン酸アンモニウム溶液 モリブデン酸アンモニウム 27.0 g (26.95~27.04 g) を適量の水に溶かす。
- 3) 発色試薬 バナジン酸アンモニウム 1.12 g (1.115~1.124 g) を適量の水に溶かし、硝酸 250 mL を加えた後、モリブデン酸アンモニウム溶液を加え、更に水を加えて 1 L とし、褐色瓶に保存する。

B 試料溶液の調製

分析試料 2~10 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、^{注2} 100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で加熱して灰化した後放冷する。

残留物を少量の水で潤し、塩酸 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて 30 mL とし、時計皿で覆って 30 分間煮沸した後放冷する。これを水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙 (6 種) でろ過して試料溶液とする。

C 定 量

試料溶液の一部 (リンとして 0.5~4 mg 相当量) を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液 1 滴を加え、アンモニア水 (1+3) を加えて中和し、硝酸 (1+6) で微酸性とする。この液を適量の水で希釈し、発色試薬 20 mL を加え、標線まで水を加えた後 30 分間静置し、波長 400~420 nm 付近の吸光度を次の示差法により測定する。

採取した試料溶液中のリン量より少ないリン量のリン標準液及び採取した試料溶液中のリン量より多いリン量のリン標準液各 10 mL をそれぞれ 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、適量の水で希釈する。これらの液を試料溶液の場合と同様に発色させてそれぞれ第一標準液及び第二標準液とする。第一標準液を対照液として、第二標準液及び試料溶液の吸光度を測定し、試料中のリン量を算出する。

注 1 分析値に対する不確かさは別紙 3 のとおりである。

- 2 試料がリン酸一カルシウムの場合は、分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、塩酸 30 mL 及び硝酸 10 mL を加えて 30 分間煮沸した後放冷する。これを水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6 種）でろ過して試料溶液とする。

(参考) 分析法バリデーション

- ・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	194	0.59	7.2	1.7

3 マグネシウム^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 干渉抑制剤液 塩化ストロンチウム六水和物 152.1 g (152.05~152.14 g) を水及び塩酸 420 mL に溶かして 1 L とする。
- 2) マグネシウム標準液 マグネシウム [Mg] 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、塩酸 10 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてマグネシウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、マグネシウムとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）及び最終液量の 1/10 容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1 mL 中にマグネシウムとして 0.1~5 µg を含有する数点のマグネシウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

1) 灰化法

分析試料 1~10 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500 °C 以下で加熱して灰化する。残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて 30 mL とし、数分間煮沸した後放冷する。これを水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙（6 種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

2) 塩酸抽出法（適用範囲：プレミックス）

分析試料 1~5 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸（1 mol/L）100 mL を正確に加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部（マグネシウムとして 0.01~0.5 mg 相当量）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液 10 mL を加え、更に標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加える。この液について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フラーム中で波長

285.2 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各マグネシウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のマグネシウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

4 カリウム^{注1}

A 試薬の調製

1) 干渉抑制剤液 炭酸カルシウム 12.5 g (12.45~12.54 g) を量ってビーカーに入れ、少量の水を加え、更に塩酸 105 mL を徐々に加える。この液を煮沸した後放冷し、水を加えて 1 L とする。

2) カリウム標準液 塩化カリウム [KCl] (白金るつぼ中で 400~500 °C で 40~50 分間加熱したもの) 1.907 g を量り、その数値を記録し、1,000 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カリウム標準原液を調製する (この液 1 mL は、カリウム [K] として塩化カリウム採取量 (g) に 0.5244 を乗じた量 (mg) を含有する。)。この標準原液は、ポリエチレン瓶に保存する。

使用に際して、標準原液の一部を水及び最終液量の 1/10 容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1 mL 中にカリウムとして 5~30 µg を含有する数点のカリウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

分析試料 2~10 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、白金皿に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500 °C 以下で加熱して灰化する。

残留物を少量の水で 100 mL のトールビーカーに移し、塩酸 10 mL を除々に加え、数分間煮沸した後放冷する。この液を水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙 (6 種) でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部 (カリウムとして 3 mg 以下) を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液 10 mL を加え、標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 766.5 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カリウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカリウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

5 ナトリウム^{注1}

A 試薬の調製

ナトリウム標準液 塩化ナトリウム (標準試薬) (白金るつぼ中で 500~600 °C で 40~50 分間加熱したもの) 2.542 g を量り、その数値を記録し、1,000 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ナトリウム標準原液を調

製する（この液 1 mL は、ナトリウム [Na] として塩化ナトリウム採取量 (g) に 0.3934 を乗じた量 (mg) を含有する。）。この標準原液は、ポリエチレン瓶に保存する。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にナトリウムとして 2~10 µg を含有する数点のナトリウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

4 の B による。

C 定 量

試料溶液の一部（ナトリウムとして 1 mg 以下）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 589.0 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各ナトリウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のナトリウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

6 塩素

(1) 飼料^{注1}

A 試薬の調製

塩素標準液 塩化物イオン標準液（濃度 1,000 µg/mL）^{注2}を標準原液とする。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に塩素 [Cl] として 10~200 µg を含有する数点の塩素標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し、ろ液の一部^{注3}を水で正確に希釈する。希釈液をあらかじめポリプロピレン製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）を連結した限外ろ過膜（分画分子量 30,000）付きフィルターカップ^{注4}に入れ、5,000×g で 15 分間遠心ろ過し、ろ液^{注5}をキャピラリー電気泳動に供する試料溶液とする。

キャピラリー電気泳動 試料溶液及び各塩素標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入し、間接吸光光度法によりエレクトロフェログラムを得る。

測定条件 例

カラム : 熔融石英製キャピラリーカラム（内径 75 µm、有効長 104 cm、全長 112.5 cm）

泳動緩衝液 : クロム酸ナトリウムを含む緩衝液^{注6}

電 圧 : -30 kV

カラム槽温度 : 20 °C

試料注入法 : 加圧注入法（5,000 Pa、6 s）

検 出 器 : 紫外吸光光度検出器（検出波長 : 240 nm、リファレンス波長 : 380 nm）

カラムの洗浄：試料溶液及び各塩素標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入する前に泳動緩衝液で4分間以上洗浄する。

計算 得られたエレクトロフェログラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の塩素量を算出する。

注1 使用する水は、電気伝導率が5.6 $\mu\text{S}/\text{m}$ 以下（比抵抗が18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上）のものを用いる。

2 計量法に基づき値付けされたものを用いる。

3 ろ液を水で2~20倍に希釈する。

4 Microcon YM-30（Millipore 製（販売終了））又はこれと同等のもの

5 得られたろ液の上澄み液を試料溶液とする。

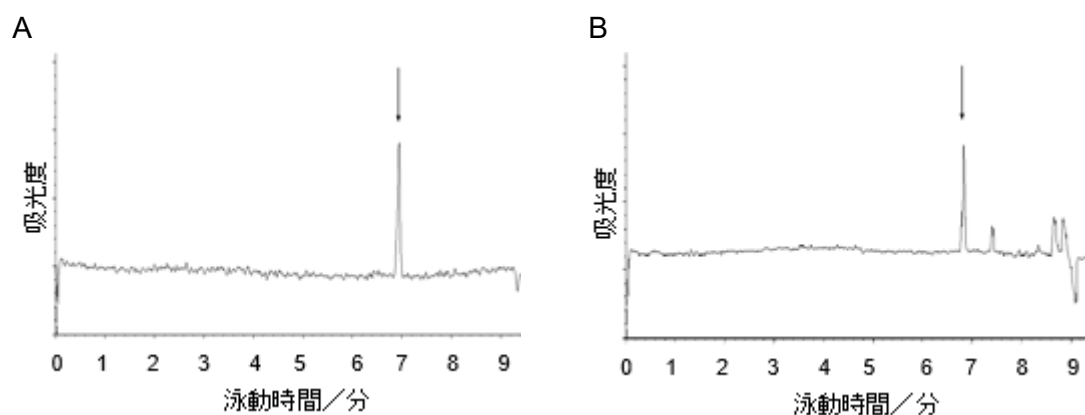
6 Waters Ion Select High Mobility Anion Electrolyte（Waters 製、WAT049385）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (%)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
子豚育成用配合飼料	0.5	3	105	1.1
	1	3	99.5	6.7
	2	3	104	5.0
肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	95.3	3.7
	1	3	103	4.9
	2	3	98.6	6.7
食品残さ飼料化物	0.5	3	100	7.2
	1	3	99.5	6.7
	2	3	102	1.7

（参考）エレクトロフェログラム例



標準液及び添加試料のエレクトロフェログラム

A：標準液（塩化物イオンとして50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

B：添加試料（子豚育成用配合飼料に塩化物イオンとして0.5%相当量添加）

(2) サイレージ

第2節1による。

7 鉄^{注1}

A 試薬の調製

鉄標準液 鉄 [Fe] 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、塩酸 20 mL 及び水 50 mL を加えて煮沸した後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて鉄標準原液を調製する（この液 1 mL は、鉄として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に鉄として 0.5~10 µg を含有する数点の鉄標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3 の B による。ただし、塩酸抽出法（3 の B の 2）は、有機鉄塩を含有するプレミックスには適用できない。

C 定 量

試料溶液の一部（鉄として 0.05~1.0 mg 相当量）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 248.3 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各鉄標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の鉄量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

8 銅

8.1 原子吸光光度法^{注1}

A 試薬の調製

銅標準液 銅（標準試薬）（酢酸（1+49）、水及びエタノールで順次洗浄したもの）1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、硝酸 5 mL を加えて溶かし、塩酸 5 mL を加えて沸騰水浴上で加熱し、蒸発乾固する。塩酸（6 mol/L）10 mL を加えて残留物を溶かし、この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて銅標準原液を調製する（この液 1 mL は、銅 [Cu] として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に銅として 0.5~5 µg を含有する数点の銅標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3 の B による。

C 定 量

試料溶液の一部（銅として 0.05~0.5 mg 相当量）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 324.8 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各銅標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の銅量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。
(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (mg/kg)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
プレミックス	109	23.7	5.0	0.5

8.2 溶媒抽出—原子吸光光度法^{注1}

A 試薬の調製

8.1 の A による。

B 試料溶液の調製

3 の B の 1)による。

C 定 量

試料溶液の一部（銅として 50 µg 以下、液量 30 mL 以下）をあらかじめリン酸 14 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に入れ、ヨウ化カリウム溶液（68 w/v%）5 mL を加え、更に水を加えて 50 mL とし、軽く振り混ぜた後 5 分間静置する。

4-メチル-2-ペンタノン 10 mL を先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜた後静置し、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン—空気フレーム中で波長 324.8 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各銅標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の銅量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

9 コバルト^{注1}

(適用範囲：プレミックス)

A 試薬の調製

コバルト標準液 金属コバルト [Co] 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、硝酸 (1+1) 40 mL を加え、加熱して溶かした後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えてコバルト標準原液を調製する（この液 1 mL は、コバルトとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し、1 mL 中にコバルトとして 0.5~10 µg を含有する数点のコバルト標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3 の B の 2)による。

C 定 量

試料溶液の一部（コバルトとして 0.01~1.0 mg 相当量）を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸 (0.1 mol/L) を加え、原子吸光光度計によりアセチレン—空気フレーム中で波長 240.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各コバルト標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のコバルト量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

10 亜鉛^{注1}

A 試薬の調製

亜鉛標準液 亜鉛（標準試薬）（塩酸（1+3）、水及びアセトンで順次洗浄したもの）1.0 gを0.001 gの桁まで量り、その数値を記録し、1,000 mLの全量フラスコに入れ、塩酸10 mLを加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜鉛標準原液を調製する（この液1 mLは、亜鉛〔Zn〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL中に亜鉛として0.5~5 µgを含有する数点の亜鉛標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3のBによる。

C 定 量

試料溶液の一部（亜鉛として0.05~0.5 mg相当量）を100 mLの全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長213.9 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各亜鉛標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の亜鉛量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

（参考）分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (mg/kg)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
プレミックス	104	26.9	6.3	0.6

11 マンガン^{注1}

A 試薬の調製

マンガン標準液 過マンガン酸カリウム〔KMnO₄〕2.877 gを量り、その数値を記録し、1,000 mLの全量フラスコに入れ、水100 mLを加えて溶かす。この液に硫酸（1+1）1 mLを加え、更に亜硫酸水又は過酸化水素水（3 v/v%）を過マンガン酸の色が消えるまで加え、煮沸した後放冷する。更に全量フラスコの標線まで水を加えてマンガン標準原液を調製する（この液1 mLは、マンガン〔Mn〕として過マンガン酸カリウム採取量（g）に0.3476を乗じた量（mg）を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL中にマンガンとして0.5~10 µgを含有する数点のマンガン標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3のBによる。

C 定 量

試料溶液の一部（マンガンとして0.05~1.0 mg相当量）を100 mLの全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長279.5 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各マンガン標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のマンガン量を算出する。

注1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

12 カドミウム

12.1 溶媒抽出法^{注1}

A 試薬の調製

カドミウム標準液 カドミウム [Cd] 0.10 gを0.1 mgの桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、硝酸（1+9）50 mLを加え、加熱して溶かし、煮沸して窒素酸化物を除去した後放冷する。この液を水で1,000 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えてカドミウム標準原液を調製する（この液1 mLは、カドミウムとして0.1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL中にカドミウムとして0.2~1 µgを含有する数点のカドミウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

分析試料1.0~10 g（稲わらは1.0~5.0 g）を有効数字4桁まで量り、その数値を記録し、100~500 mL^{注2}のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500 °C以下で加熱して灰化する^{注3}。残留物に少量の水及び塩酸10 mLを徐々に加え、更に水を加えて30 mLとし、数分間煮沸した後放冷する。この液を水で100 mLの全量フラスコに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部（カドミウムとして10 µg以下、液量30 mL以下）をあらかじめリン酸14 mLを入れた100 mLの分液漏斗に正確に加え、ヨウ化カリウム溶液（68 w/v%）5 mLを加え、更に水を加えて50 mLとし、軽く振り混ぜた後5分間静置する。

4-メチル-2-ペンタノン10 mLを先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜた後静置し、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長228.8 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カドミウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカドミウム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

2 乾牧草及び稲わらは突沸による試料の飛散を防止するため、それぞれ 200 mL 及び 500 mL のトールビーカーを用いる。

3 乾牧草及び稲わらは、500 °C 程度まで加熱すると定量値が低下する場合がある。その場合は、穏やかに加熱して炭化させた後、400 °C 以下で 8 時間加熱し、残留物に硝酸 5 mL（稲わらの場合は 15 mL）及び過塩素酸 5 mL を加え、時計皿で覆い、これを 150 °C 以下の砂浴上で完全に分解するまで加熱する。なお、黒い残留物が残った状態で液量が減少した場合は砂浴から下ろし、放冷後、硝酸 1 mL 程度を加え、砂浴上で更に加熱を続ける。分解が進み、黒い残留物がなくなり液色が薄くなった後、時計皿をはずし、ほとんど乾固するまで濃縮した後放冷する。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

1) バックグラウンド補正法：D₂ ランプ方式

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用配合飼料	0.5	3	129	7.3
	1	3	130	5.0
牛用配合飼料	0.5	3	127	4.8
	1	3	131	4.5
チキンミール	0.5	3	130	9.4
	1	3	129	2.9
フェザーミール	0.5	3	122	4.3
	1	3	123	0.9
魚粉	0.5	3	131	2.3
	1	3	121	3.3

2) バックグラウンド補正法：ゼーマン方式

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用配合飼料	0.5	3	118	13
	1	3	115	16
牛用配合飼料	0.5	3	117	12
	1	3	119	17
チキンミール	0.5	3	119	15
	1	3	116	15
フェザーミール	0.5	3	115	14
	1	3	114	14
魚粉	0.5	3	119	16
	1	3	109	17

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
乳牛用配合飼料	6	0	0.5	117	1.4	6.5	0.37
魚粉	6	0	自然汚染	(0.530)	4.8	8.1	0.46

12.2 簡易法^{注1}

A 試薬の調製

カドミウム標準液 カドミウム [Cd] 0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を

記録し、トールビーカーに入れ、硝酸（1+9）50 mL を加え、加熱して溶かし、煮沸して窒素酸化物を除去した後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えてカドミウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、カドミウムとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、低濃度試料を測定する場合は 1 mL 中にカドミウムとして 0.02~0.08 µg を含有する数点のカドミウム標準液を、高濃度試料を測定する場合は 0.08~0.4 µg を含有する数点のカドミウム標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

12.1 の B による。

C 定 量

試料溶液を原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 228.8 nm の吸光度を測定する。空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カドミウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカドミウム量を算出する。

測定条件 例

測 定 波 長：228.8 nm

測 定 法：フレイム原子吸光法

バックグラウンド補正：連続スペクトル光源（D₂ ランプ等）方式又はゼーマン方式

以下は連続スペクトル光源方式によりバックグラウンド補正した場合（括弧内はゼーマン方式によりバックグラウンド補正した場合）の測定条件例

ラ ン プ 電 流：8 mA (9 mA)

ス リ ッ ト 幅：0.5 nm (1.3 nm)

バ ー ナ ー 高 さ：7 mm (5 mm)

燃料ガス（アセチレン）流量：1.8 L/min (2.0 L/min)

助燃ガス（空気）流量：15 L/min (15 L/min)

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

1) バックグラウンド補正法：D₂ ランプ方式

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用配合飼料	0.5	3	110	8.3
	1	3	107	6.2
牛用配合飼料	0.5	3	107	1.1
	1	3	106	5.8
チキンミール	0.5	3	109	4.6
	1	3	108	6.0
フェザーミール	0.5	3	111	5.5
	1	3	107	6.9
魚粉	0.5	3	108	4.9
	1	3	101	4.0

2) バックグラウンド補正法：ゼーマン方式

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用配合飼料	0.5	3	101	2.3
	1	3	102	1.5
牛用配合飼料	0.5	3	101	3.0
	1	3	102	1.0
チキンミール	0.5	3	101	1.1
	1	3	101	3.0
フェザーミール	0.5	3	103	1.1
	1	3	103	1.1
魚粉	0.5	3	104	5.8
	1	3	101	2.1
チモシー乾草	0.1	3	84.6	7.0
	1	3	101	5.2
稲わら	0.2	3	112	1.8
	1	3	86.2	4.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
乳牛用配合飼料	6	0	0.5	107	2.7	2.7	0.15
魚粉	6	0	自然汚染	(0.486)	2.7	6.3	0.35

- ・ 定量下限（単一試験室による確認） 試料中 0.1 mg/kg（稲わら 0.2 mg/kg）
- ・ 検出下限（単一試験室による確認） 試料中 0.03 mg/kg（稲わら 0.05 mg/kg）

13 クロム

13.1 原子吸光光度法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) クロム標準液 ニクロム酸カリウム（標準試薬）（めのう乳ばちを用いて粉末とし、100~110 °C で3~4 時間乾燥したもの）0.283 g を量り、その数値を記録し、1,000 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クロム標準原液を調製する（この液 1 mL は、クロム [Cr] としてニクロム酸カリウム採取量 (g) に 0.3535 を乗じた量 (mg) を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にクロムとして 0.5~3 µg を含有する数点のクロム標準液を調製する。

- 2) 抽出溶媒 トリオクチルアミン 3 mL を 4-メチル-2-ペンタノンに溶かして 100 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のハウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化した後、500 °C 以下で加熱して灰化する。残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて 30 mL とし、数分間煮沸した後放冷する。これを水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙（6 種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部（クロムとして 30 µg 以下、液量 25 mL 以下）を 100 mL のトー

ルビーカーに正確に入れ、水酸化ナトリウム溶液（10 mol/L）で中和した後、硫酸（1+17）10 mL 及び過マンガン酸カリウム溶液（0.3 w/v%）少量を加えて煮沸する。溶液の赤紫色が消失した場合には、更に過マンガン酸カリウム溶液（0.3 w/v%）数滴を滴下し、5 分間煮沸しても赤紫色が持続するまでこの操作を繰り返した後放冷する。

この液を水で 100 mL の分液漏斗に移して液量を 50 mL とし、更に硫酸アンモニウム溶液（40 w/v%）10 mL 及び硫酸（1+17）5 mL を加えて軽く振り混ぜる。

抽出溶媒 10 mL を先の分液漏斗に正確に加え、激しく 5 分間振り混ぜた後静置する。抽出溶媒層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 357.9 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各クロム標準液各 10 mL を 100 mL の分液漏斗に入れ、水を加えて 50 mL とし、更に硫酸アンモニウム溶液（40 w/v%）10 mL 及び硫酸（1+17）5 mL を加えて軽く振り混ぜ、以下試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のクロム量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
子豚育成用配合飼料	5	3	94.3	8.9
	10	3	96.3	6.8
	20	3	95.7	7.3
肉用牛用配合飼料	5	3	109	4.9
	10	3	99.7	3.2
	20	3	103	3.7
魚粉	5	3	113	4.9
	10	3	109	2.9
	20	3	105	5.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
乳用牛飼育用配合飼料	6	0	10	102	3.8	6.7	0.59

・定量下限（単一試験室による確認） 試料中 1 mg/kg

13.2 吸光光度法

A 試薬の調製

- 1) クロム標準液 13.1 の A の 1)によりクロム標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にクロムとして 1~5 µg を含有する数点のクロム標準液を調製する。
- 2) 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド液 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド 0.5 g (0.45~0.54 g) をアセトンに溶かして 100 mL とする。
- 3) 希釈酸 硫酸（1+6）に過マンガン酸カリウム溶液（0.3 w/v%）を滴下して微紅色とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、白金るつぼに入れ、穏やかに加熱して炭化し、更に 500 °C で加熱して灰化した後放冷する。

灰化が不完全な場合は、先の白金るつぼに硫酸 (1+1) 0.5~1 mL 及び硝酸 4~5 mL を加え、砂浴上で加熱して蒸発乾固し、更に硝酸 4~5 mL ずつを加えて蒸発乾固を数回繰り返し、試料を完全に分解させる。更に初め低温で後に 450~500 °C で加熱して灰化した後放冷する。

残留物に炭酸ナトリウム 5.0 g (4.95~5.04 g) 及び硝酸ナトリウム 0.5 g (0.45~0.54 g) を混和し、穏やかに加熱した後、約 15 分間加熱して融解し、放冷する。

少量の水を加えて先の白金るつぼ内の凝固物を溶かし、更に不溶解物をガラス棒ですりつぶしたものを水でクロムの含有量に応じて 100~500 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加える。この液を遠心沈殿管に入れ、150×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部 (クロムとして 50 µg 相当量) を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、希釈酸を中和量より 2 mL 過剰に加える。この液に 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド液 1 mL を加え、更に全量フラスコの標線まで水を加えた後 30 分間静置する。この液について、波長 540 nm 付近の吸光度を同様に操作して調製した空試験溶液を対照液として測定する。

同時に、各クロム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のクロム量を算出する。

14 臭素^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 臭素標準液 臭化カリウム [KBr] 0.149 g を量り、その数値を記録し、100 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臭素標準原液を調製する (この液 1 mL は、臭素 [Br] として臭化カリウム採取量 (g) に 6.714 を乗じた量 (mg) を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に臭素として 1~10 µg を含有する数点の臭素標準液を調製する。

- 2) 2-アミノエタノール液 2-アミノエタノール 15 mL 及び水酸化ナトリウム 3.0 g (2.95~3.04 g) を褐色共栓三角フラスコにとり、エタノール 380 mL に溶かして調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、ニッケルるつぼに入れ、炭酸ナトリウム 1.2 g (1.15~1.24 g) を加えてよく混和し、更に 2-アミノエタノール液 10 mL を加えた後 1 時間静置する。熱板上でエタノールを揮散させ、穏やかに加熱して炭化し、更に 550~600 °C で一夜灰化した後放冷する。残留物に水 10 mL 及び過酸化水素 3 滴を加えて煮沸した後、この液を水で 50 mL の全量

フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（2種）でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のトールビーカーに正確に入れ、pH を酢酸（1+5）で 7 に調整した後、水で 50 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、イオンクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

イオンクロマトグラフィー 試料溶液及び各臭素標準液各 100 μL をイオンクロマトグラフ^{注2}に注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：電気伝導度検出器

カラム：強塩基性陰イオン交換体カラム^{注3}

溶離液：炭酸ナトリウム溶液^{注4}—水酸化ナトリウム溶液^{注5}（1+1）

除去液：硫酸 0.84 mL を水 1 L に加える。

流速：溶離液 2.0 mL/min、除去液 2.0 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中の臭素量を算出する。

注 1 使用する水は、化学分析用の水（JIS K0557 A2）又はこれと同等のものを用いる。

2 サプレッサーが装着されたもの。

3 SAX1-205（横河電機製（販売終了））と同等のもの

4 炭酸ナトリウム 0.212 g（0.2115~0.2124 g）を水に溶かして 1 L とする。

5 水酸化ナトリウム 0.400 g（0.3995~0.4004 g）を水に溶かして 1 L とする。

15 水銀^{注1}

A 試薬の調製

1) 水銀標準液 塩化水銀（II） $[\text{HgCl}_2]$ 0.339 g を量り、その数値を記録し、500 mL の全量フラスコに入れ、硝酸（1+1）5 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて水銀標準原液を調製する（この液 1 mL は、水銀 $[\text{Hg}]$ として塩化水銀採取量（g）に 1.478 を乗じた量（mg）を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を硝酸（1+70）で正確に希釈し、1 mL 中に水銀として 2~10 ng を含有する数点の水銀標準液を調製する。

2) 塩化スズ液 塩化スズ（II）二水和物 10.0 g（9.95~10.04 g）に硫酸（1+20）60 mL を加え、かき混ぜながら加熱して溶かした後放冷し、水を加えて 100 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、五酸化バナジウム約 20 mg を加え、更に硝酸 10 mL を加えて試料を十分に潤した後、一夜静置する。

次に、これを 200 $^{\circ}\text{C}$ 以下の砂浴上で 5 分間加熱した後放冷し、更に過塩素酸 10 mL を加えて 1 時間加熱した後放冷し、全量フラスコの標線まで水を加えて試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。
各水銀標準液について、同様の操作を行う。

C 定 量

試料溶液 20 mL をあらかじめ回転子を入れた還元容器（100 mL 程度の三角フラスコ）に正確に入れ、塩化スズ液 2 mL を加えて直ちに水銀分析装置に連結する。2 分かき混ぜた後、空気ポンプを作動させて通気し、発生した水銀蒸気を吸収セル（石英ガラス製 内径 30 mm、長さ 100~300 mm）に導き、波長 253.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液 20 mL について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各水銀標準液各 20 mL について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の水銀量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
配合飼料1	0.4	3	95.2	8.9
配合飼料2	0.4	3	97.0	4.9
米ぬか油かす	0.4	3	104	1.7
魚粉（ペルー産）	0.4	3	107	0.7
魚粉（北米産）	0.4	3	97.0	1.5
肉かす	0.4	3	92.9	3.1

- ・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	測定値 (mg/kg)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
魚粉	6	0	81.0	3.9	9.5	1.2

- ・定量下限（単一試験室による確認） 試料中 0.03 mg/kg
- ・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 0.01 mg/kg

16 セレン^{注1}

A 試薬の調製

- 1) セレン標準液 セレン [Se] 0.50 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、硝酸 10 mL を加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、更に過塩素酸 2 mL を加え、加熱して約 2 mL になるまで濃縮する。更に残留液に塩酸 5 mL を加えて 5 分間加熱した後放冷する。この液を水で 500 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えてセレン標準原液を調製する（この液 1 mL は、セレンとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中にセレンとして 0.02~0.1 µg を含有する数点のセレン標準液を調製する。

- 2) ジアミノナフタレン液 2,3-ジアミノナフタレン 0.10 g (0.095~0.104 g) を 200 mL のトールビーカーに入れ、塩酸（0.1 mol/L）100 mL を加え、50 °C の水浴中で加温しながら溶かした後放冷する。この液を分液漏斗 A に入れ、シクロヘキサン

40 mL を加えて振り混ぜる。水層（下層）を分液漏斗 B に入れ、シクロヘキサン 40 mL を加えて振り混ぜ、水層をろ紙（2 種）でろ過する（使用時に遮光して調製する。）。

- 3) EDTA 溶液 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g (18.55~18.64 g) を水に溶かして 500 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL のトールビーカーに入れ、硝酸 20 mL 及び過塩素酸 5 mL を加え、時計皿で覆い、一夜静置する。

次に、これを砂浴上で穏やかに加熱し、発泡が収まってからは強熱し、乾固直前まで濃縮した後放冷する。更に残留物に塩酸 5 mL を加え、砂浴上で 5 分間加熱して還元した後放冷する。この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一部（セレンとして 0.2~1 µg 相当量）を 100 mL のトールビーカーに正確に入れ、EDTA 溶液 5 mL を加え、pH を塩酸（1+4）で 1.0~1.5 に調整した後、塩酸（0.1 mol/L）で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、ろ紙（2 種）でろ過する。

ろ液 50 mL を 100 mL のトールビーカーに正確に入れ、ジアミノナフタレン液 5 mL を加えて振り混ぜ^{注 2}、50 °C の水浴中で 20 分間加温した後放冷する。この液を塩酸（0.1 mol/L）で 100 mL の分液漏斗に移し、シクロヘキサン 10 mL を正確に加え、5 分間振り混ぜた後静置する。水層（下層）を捨て、残留液に塩酸（0.1 mol/L）25 mL ずつを加え同様に 2 回操作した後、シクロヘキサン層（上層）を共栓試験管に入れる。シクロヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、分液ろ紙でろ過して試料溶液とする。

空試験溶液及び各セレン標準液について、同様の操作を行う。

空試験溶液を対照液として試料溶液について励起波長 378 nm 及び蛍光波長 520 nm で蛍光強度を測定する。

同時に各セレン標準液について、試料溶液と同一条件で蛍光強度を測定し、検量線を作成して試料中のセレン量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とし、溶媒は無蛍光試薬又はこれと同等のものをを用いる。

2 以下の操作は、遮光した状態で行う。

17 鉛^{注 1}

A 試薬の調製

鉛標準液 鉛 [Pb] 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、トールビーカーに入れ、硝酸 10 mL 及び水 30 mL を加え、加熱して溶かした後放冷する。この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて鉛標準原液を調製する（この液 1 mL は、鉛として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に鉛として 0.5~3 µg を含有する数点の鉛標準液を調製する。

B 試料溶液の調製

3のBの1)による。

C 定 量

試料溶液の一部（鉛として 30 µg 以下、液量 30 mL 以下）をあらかじめリン酸 14 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に入れ、ヨウ化カリウム溶液（68 w/v%）5 mL を加え、更に水を加えて 50 mL とし、軽く振り混ぜた後 5 分間静置する。

4-メチル-2-ペンタノン 10 mL を先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜた後静置し、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 283.3 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各鉛標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の鉛量を算出する。

注 1 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用配合飼料	0.5	3	106	8.3
	3	3	102	4.5
	7.5	3	102	0.3
豚用配合飼料	0.5	3	110	5.3
	3	3	94.8	4.7
	7.5	3	97.8	1.0
チキンミール	0.5	3	104	5.6
	3	3	94.3	2.1
	7.5	3	103	1.1
魚粉	1.5	3	86.3	7.9
	3	3	95.9	3.9
	7.5	3	108	1.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	測定値		添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
				添加前 (mg/kg)	添加後 (mg/kg)				
鶏用配合飼料	6	0	3	ND	3.02	101	2.7	3.4	0.25
魚粉	6	0	3	0.607	3.47	95.4	3.1	5.5	0.41

- ・定量下限（単一試験室による確認） 試料中 0.5 mg/kg
- ・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 0.2 mg/kg

18 ヒ素

18.1 総ヒ素^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 総ヒ素標準液 三酸化二ヒ素（標準試薬）（105 °C で 3~4 時間乾燥したもの）132 mg を量り、その数値を記録し、水酸化ナトリウム溶液（4 w/v%）5 mL 及び水 50 mL を加え、加熱して溶かした後放冷する。この液にフェノールフタレイン

試液 1 滴を加え、硫酸 (1+10) で中和した後、水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて総ヒ素標準原液を調製する (この液 1 mL は、ヒ素 [As] として三酸化二ヒ素採取量 (g) に 7.574 を乗じた量 (mg) を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に 0.1 µg を含有する総ヒ素標準液を調製する (使用時に調製する。)

- 2) 水素化ホウ素ナトリウム試液 水酸化ナトリウム 5.0 g (4.95~5.04 g) 及び水素化ホウ素ナトリウム 10.0 g (9.95~10.04 g) を水で溶かして 1 L とする (使用時に調製する。)

B 試料溶液の調製

分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL のトールビーカー^{注2}に入れ、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、時計皿で覆い、一夜静置する。

次に、これを砂浴上で穏やかに 30 分間加熱し、発泡が収まってからは強熱した後放冷する。更にこれに過塩素酸 5 mL を加え、再び時計皿で覆い、完全に分解するまで^{注3}加熱して、液量が 2 mL 以下になるまで濃縮した後放冷する。残留物に塩酸 (ヒ素分析用) (1+10) 5 mL 及び水 20 mL を加え、加熱して溶かした後、この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙 (6 種) でろ過して試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量^{注4}

試料溶液の一部を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、塩酸 (ヒ素分析用) 10 mL 及びヨウ化カリウム溶液 (20 w/v%) 10 mL を順次加えた後 15 分間静置する。更に全量フラスコの標線まで水を加え、原子吸光光度測定に供する試料溶液とする。

水素化ホウ素ナトリウム試液、塩酸 (ヒ素分析用) (2+3) 及び試料溶液を原子吸光光度計に連結した水素化ヒ素発生装置に連続的に流し、混合して反応させる。発生した水素化ヒ素をフレームで加熱した吸収セルにアルゴンで導き、波長 193.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に総ヒ素標準液 2.5~20 mL の間の数点について、試料溶液の場合と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の総ヒ素量を算出する。

注 1 使用する酸は、特記する場合を除き精密分析用を用いる。

2 使用するガラス器具は無ヒ素のホウケイ酸ガラス製のものを用いる。

3 砂温 300~380 °C で強熱する。

液量が減少した場合又は褐色~黒色に変色した場合は、砂浴から下ろし放冷後、硝酸 1 mL 程度を加え、砂浴上で更に加熱を続ける。分解が進み、液が透明 (淡黄~淡赤色を帯びることもある) となり、黒化しなくなった後、時計皿をはずし硫酸の白煙が発生する温度まで加熱し濃縮する。

4 試料溶液に加える塩酸量、ヨウ化カリウム溶液の濃度及び添加量並びに水素化ホウ素ナトリウム試液の添加以降の定量操作は一例であり、使用す

る原子吸光光度計に適した条件で定量すること。

(参考) 分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	測定値 (mg/kg)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
魚粉 (調整)	10	0	8.5	5.7	11	0.91
魚粉 (輸入)	10	0	2.6	6.7	12	0.85

・認証標準試料

試料の種類	認証値 (mg/kg)	繰返し	測定値 (mg/kg)	相対標準偏差 RSD (%)
まぐろミール (CRM-627)	4.8±0.3	3	4.8	2.1

18.2 無機ヒ素

第2節2による。

18.3 モノメチル化ヒ素

第2節2による。

18.4 ジメチル化ヒ素

第2節2による。

18.5 トリメチル化ヒ素

第2節2による。

19 亜硝酸態窒素

19.1 亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の液体クロマトグラフによる同時分析法

第2節3による。

19.2 無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

(適用範囲：サイレージ)

第2節1による。

20 硝酸態窒素

20.1 亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の液体クロマトグラフによる同時分析法

第2節3による。

20.2 無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

(適用範囲：サイレージ)

第2節1による。

第2節 多成分分析法

1 無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

- (1) 分析対象化合物 塩素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、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を含む。）、ギ酸、クエン酸、酢酸、乳酸、*iso*-吉草酸、*n*-吉草酸、*n*-ヘキサン酸及び酪酸（12成分）
- (2) 適用範囲 サイレージ
- (3) 分析法

A 試薬の調製

有機酸・無機イオン混合標準液 下表の各有機酸及び無機イオン標準原液の調製に用いる標準試薬の各量を量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、水^{注1}を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで水を加えて各有機酸及び無機イオン標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、各有機酸及び無機イオンとしてそれぞれ 2 mg を含有する。）。

使用に際して、各有機酸及び無機イオン標準原液の一部を混合し、水で正確に希釈し、1 mL 中に各有機酸及び無機イオンとして 25~100 µg を含有する数点の有機酸・無機イオン混合標準液を調製する。

分析対象化合物	標準原液名	標準試薬	採取量
塩素	塩素標準原液	塩化ナトリウム [NaCl]	0.330 g (0.3295~0.3304 g)
亜硝酸態窒素	亜硝酸標準原液	亜硝酸カリウム [KNO ₂]	0.370 g (0.3695~0.3704 g)
硝酸態窒素	硝酸標準原液	硝酸カリウム [KNO ₃]	0.326 g (0.3255~0.3264 g)
プロピオン酸	プロピオン酸標準原液	プロピオン酸ナトリウム [C ₃ H ₅ O ₂ Na]	0.259 g (0.2585~0.2594 g)
ギ酸	ギ酸標準原液	ギ酸ナトリウム [CHO ₂ Na]	0.296 g (0.2955~0.2964 g)
<i>iso</i> -吉草酸	<i>iso</i> -吉草酸標準原液	<i>iso</i> -吉草酸ナトリウム [C ₅ H ₉ O ₂ Na]	0.243 g (0.2425~0.2434 g)
<i>n</i> -吉草酸	<i>n</i> -吉草酸標準原液	<i>n</i> -吉草酸ナトリウム [C ₅ H ₉ O ₂ Na]	0.243 g (0.2425~0.2434 g)
クエン酸	クエン酸標準原液	クエン酸一水和物 [C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O]	0.218 g (0.2175~0.2184 g)
酢酸	酢酸標準原液	酢酸ナトリウム [C ₂ H ₃ O ₂ Na]	0.273 g (0.2725~0.2734 g)
乳酸	乳酸標準原液	乳酸ナトリウム [C ₃ H ₅ O ₃ Na]	0.249 g (0.2485~0.2494 g)
<i>n</i> -ヘキサン酸	<i>n</i> -ヘキサン酸標準原液	<i>n</i> -ヘキサン酸ナトリウム [C ₆ H ₁₁ O ₂ Na]	0.238 g (0.2375~0.2384 g)
酪酸	酪酸標準原液	<i>n</i> -酪酸ナトリウム [C ₄ H ₇ O ₂ Na]	0.250 g (0.2495~0.2504 g)

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、ろ紙（5種 A）でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液をカルボキシメチルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）^{注2}に入れ、圧注して流出^{注3}させ、この流出液の一部を水で正確に希釈する。希釈液をあらかじめプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）を連結した限外ろ過膜（分画分子量 30,000）付きフィルターカップ^{注4}に入れ、5,000×g で 15 分間遠心ろ過し、ろ液^{注5}をキャピラリー電気泳動に供する試料溶液とする。

キャピラリー電気泳動 試料溶液及び各混合標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入し、間接吸光光度法によりエレクトロフェログラムを得る。

測定条件 例

カラム：キャピラリーカラム（内径 50 µm、有効長 104 cm、全長 112.5 cm）

泳動緩衝液：2,6-ピリジンジカルボン酸（30 mmol/L）・*n*-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシド（0.5 mmol/L）混合溶液（pH 12.0）^{注6}

電 圧：-30kV

カラム槽温度：20 °C

試料注入法：加圧注入法（5,000 Pa、6 s）

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：350 nm、リファレンス波長：275 nm）

カラムの洗浄：試料溶液及び各混合標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入する前に泳動緩衝液で10分以上洗浄する。

計 算 得られたエレクトロフェログラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各有機酸及び無機イオン量を算出する。

注 1 使用する水は、電気伝導率が 5.6 µS/m 以下（比抵抗が 18 MΩ·cm 以上）のものをを用いる。

2 Sep-Pak Accell Plus CM Cartridge（Waters 製）又はこれと同等のもの

3 初流の 0~2 mL を用いる。

4 Microcon YM-30（Millipore 製（販売終了））又はこれと同等のもの

5 得られたろ液の上澄み液を試料溶液とする。

6 2,6-ピリジンジカルボン酸 0.501 g（0.5005~0.5014 g）を 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加え、超音波処理して溶かす。この液に水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）2 mL を加え、更に標線まで水を加えた後、*n*-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシド液 75 µL を加えて振り混ぜる。この溶液を 200 mL のビーカーに入れ、pH を水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で 12.0 に調整する。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	0.3%		0.6%	
	添加回収率 (%)	繰返し精度 (%以下)	添加回収率 (%)	繰返し精度 (%以下)
塩素	99.9~110.5	6.3	103.5~108.9	2.8
亜硝酸態窒素	101.1~106.7	7.1	103.5~107.3	4.1
硝酸態窒素	99.0~109.6	5.0	98.0~100.4	4.9
プロピオン酸	102.1~106.5	6.0	97.6~102.3	5.6
ギ酸	108.8~110.5	8.8	102.2~108.6	5.9
<i>iso</i> -吉草酸	103.5~107.9	5.5	99.2~102.5	5.5
<i>n</i> -吉草酸	99.3~107.0	4.0	100.3~103.3	4.5
クエン酸	101.0~109.4	8.2	97.6~104.5	5.4
酢酸	101.6~105.4	6.6	103.9~106.6	4.6
乳酸	101.8~106.6	5.9	97.1~ 99.7	4.3
<i>n</i> -ヘキサン酸	100.9~109.4	6.5	101.8~108.2	6.1
酪酸	101.0~105.5	5.4	99.2~106.4	5.2

・定量下限（単一試験室による確認） 試料中 各 0.02 %

2 ヒ素の還元気化—超低温捕集—原子吸光光度計による形態別分析法

- (1) 分析対象ヒ素形態 無機ヒ素、モノメチル化ヒ素、ジメチル化ヒ素及びトリメチル化ヒ素（4形態）
- (2) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 無機ヒ素標準原液 三酸化二ヒ素（標準試薬）（105 °Cで3~4時間乾燥したもの）132 mgを量り、その数値を記録し、水酸化ナトリウム溶液（4 w/v%）5 mL及び水50 mLを加え、加熱して溶かした後放冷する。この液にフェノールフタレイン試液1滴を加え、硫酸（1+10）で中和した後、水で100 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて無機ヒ素標準原液を調製する（この液1 mLは、ヒ素〔As〕として三酸化二ヒ素採取量（mg）に0.007574を乗じた量（mg）を含有する。）。
- 2) モノメチル化ヒ素標準原液 メチルアルソン酸〔CH₅AsO₃〕18.7 mgを量り、その数値を記録し、100 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モノメチル化ヒ素標準原液を調製する（この液1 mLは、ヒ素〔As〕としてメチルアルソン酸採取量（mg）に5.353を乗じた量（μg）を含有する。）。
- 3) ジメチル化ヒ素標準原液 ジメチルアルシン酸〔C₂H₇AsO₂〕18.4 mgを量り、その数値を記録し、100 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ジメチル化ヒ素標準原液を調製する（この液1 mLは、ヒ素〔As〕としてジメチルアルシン酸採取量（mg）に5.429を乗じた量（μg）を含有する。）。
- 4) トリメチル化ヒ素標準原液 トリメチルアルシンオキシド〔C₃H₉AsO〕18.2 mgを量り、その数値を記録し、100 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トリメチル化ヒ素標準原液を調製する（この液1 mLは、ヒ素〔As〕としてトリメチルアルシンオキシド採取量（mg）に5.508を乗じた量（μg）を含有する。）。
- 5) 混合標準液 使用に際して、無機ヒ素、モノメチル化ヒ素、ジメチル化ヒ素及びトリメチル化ヒ素各標準原液の一部を混合し、水で正確に希釈し、1 mL中に無機ヒ素、モノメチル化ヒ素、ジメチル化ヒ素及びトリメチル化ヒ素としてそれぞれ1~5 ngを含有する数点の混合標準液を調製する（使用時に調製する。）。
- 6) 水素化ホウ素ナトリウム試液 水酸化ナトリウム1.0 g（0.95~1.04 g）及び水素化ホウ素ナトリウム20.0 g（19.95~20.04 g）を水で溶かして200 mLとする（使用時に調製する。）。

B 試料溶液の調製

分析試料0.30 gを0.1 mgの桁まで量り、その数値を記録し、100 mLのトールビーカー^{注2}に入れ、硝酸5 mLを加え、時計皿で覆い、砂浴上で穏やかに60分間加熱した後放冷する。これに硝酸2 mL及び過塩素酸2 mLを加え、再び時計皿で覆い、200~250 °Cの砂浴上で液量が1 mL以下になるまで濃縮した後放冷する。残留物に塩酸（ヒ素分析用）（1+10）1 mLを加え、この液を水で50 mLの全量フラス

コに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

水素化ホウ素ナトリウム試液、塩酸（ヒ素分析用）（1+30）及び試料溶液を原子吸光光度計に連結した水素化ヒ素発生装置に入れ、混合して^{注3}反応させる。発生した水素化ヒ素、メチルアルシン、ジメチルアルシン及びトリメチルアルシンを液体窒素で冷却した管に捕集した後、室温に戻し、気化した水素化ヒ素、メチルアルシン、ジメチルアルシン及びトリメチルアルシンをマッフル炉で加熱した吸収セルにヘリウムで導き、波長 193.7 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各混合標準液について、試料溶液の場合と同様に操作して吸光度を測定し、ピーク面積又は高さから検量線を作成して試料中の無機ヒ素量、モノメチル化ヒ素量、ジメチル化ヒ素量及びトリメチル化ヒ素量を算出する。

測定条件 例

試料注入量：1 mL

キャリアーガス：He（0.4 L/min）

マッフル炉温度：800 °C

注 1 使用する酸は、特記する場合を除き精密分析用を用いる。

2 使用するガラス器具は無ヒ素のホウケイ酸ガラス製を用いる。

3 発泡が激しいときは、消泡剤としてシリコン油溶液（1%）を用いる。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	
無機ヒ素	魚粉（スケトウダラ由来）	0.5	3	90.0	9.7	
		2	3	96.7	1.5	
	魚粉（ホッケ由来）	0.5	3	92.7	14	
		2	3	90.2	7.8	
	魚粉（アジ由来）	0.5	3	100	3.5	
		2	3	96.5	0.5	
	モノメチル化ヒ素	魚粉（スケトウダラ由来）	0.5	3	80.7	1.4
			2	3	89.3	2.3
魚粉（ホッケ由来）		0.5	3	90.0	2.2	
		2	3	102	7.7	
魚粉（アジ由来）		0.5	3	83.3	3.7	
		2	3	91.0	5.5	
ジメチル化ヒ素		魚粉（スケトウダラ由来）	0.5	3	109	11
			2	3	120	18
	魚粉（ホッケ由来）	0.5	3	90.7	10	
		2	3	89.0	0.6	
	魚粉（アジ由来）	0.5	3	99.3	3.1	
		2	3	96.5	0.5	
	トリメチル化ヒ素	魚粉（スケトウダラ由来）	0.5	3	103	14
			2	3	116	7.3
魚粉（ホッケ由来）		0.5	3	92.0	17	
		2	3	99.2	13	
魚粉（アジ由来）		0.5	3	98.0	7.4	
		2	3	110	4.8	

3 亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の液体クロマトグラフによる同時分析法

- (1) 分析対象化合物 亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素 (2成分)
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) リン酸緩衝液 リン酸水素二ナトリウム・12水 1.79 g (1.785~1.794 g)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g (0.775~0.784 g) 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g (14.035~14.044 g) を水に溶かして 1 L とする。
- 2) 亜硝酸態窒素標準原液 亜硝酸ナトリウム [NaNO₂] (105 °C で 3~4 時間乾燥したもの) 0.493 g を量り、その数値を記録し、100 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亜硝酸態窒素標準原液を調製する (この液 1 mL は、亜硝酸態窒素として亜硝酸ナトリウム採取量 (g) に 2.030 を乗じた量 (mg) を含有する。)。
- 3) 硝酸態窒素標準原液 硝酸ナトリウム [NaNO₃] (105 °C で 3~4 時間乾燥したもの) 0.6070 g を量り、その数値を記録し、100 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硝酸態窒素標準原液を調製する (この液 1 mL は、硝酸態窒素として硝酸ナトリウム採取量 (g) に 1.648 を乗じた量 (mg) を含有する。)。
- 4) 混合標準液 使用に際して、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素各標準原液の一部を混合し、リン酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素としてそれぞれ 0.5~20 µg を含有する数点の混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の共栓三角フラスコに入れ、リン酸緩衝液 250 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出した後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一部をリン酸緩衝液で正確に希釈し、メンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各混合標準液各 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る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：210 nm)

カラム：アミノ基修飾ビニルアルコールポリマーカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm) 注1

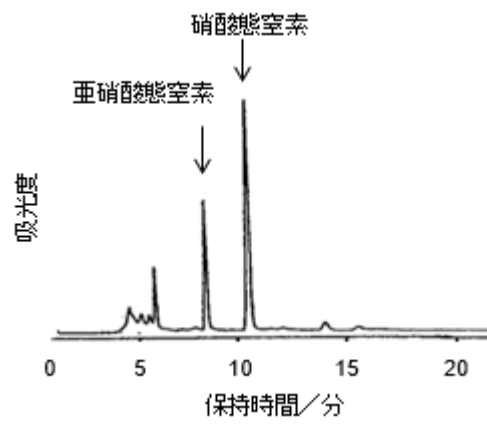
溶離液：リン酸緩衝液

流速：0.8 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸態窒素量及び硝酸態窒素量を算出する。

注 1 Asahipak NH2P-50 4E (レズナック製) 又はこれと同等のもの

(参考) クロマトグラム例



硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素のクロマトグラム