

○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）一部改正 新旧対照表

（傍線部分は改正部分）

改 正 後	改 正 前
目 次	目 次
第 1 章~第 5 章 （略）	第 1 章~第 5 章 （略）
第 6 章 農 薬	第 6 章 農 薬
第 1 節 （略）	第 1 節 （略）
第 2 節 （略）	第 2 節 （略）
第 3 節 多成分同時分析法	第 3 節 多成分同時分析法
1~17 （略）	1~17 （略）
18 <u>イミダクロプリド、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分析法</u>	18 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分析法
19~31 （略）	19~31 （略）
32 <u>カルバリル、カルボフラン及びフェノブ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分析法</u>	（新設）
第 7 章~第 20 章 （略）	第 7 章~第 20 章 （略）
第 1 章~第 5 章 （略）	第 1 章~第 5 章 （略）
第 6 章 農 薬	第 6 章 農 薬
第 1 節 各条	第 1 節 各条
1~27 （略）	1~27 （略）
28 イミダクロプリド	28 イミダクロプリド
28.1 （略）	28.1 （略）

改正後	改正前
<p><u>28.2 イミダクロプリド、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分析法</u> 第3節18による。</p>	<p>(新設)</p>
<p>29~45 (略)</p>	<p>29~45 (略)</p>
<p>46 カルバリル <u>46.1 カルバリル、カルボフラン及びフェノブ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分析法</u> 第3節32による。</p>	<p>46 カルバリル (新設)</p>
<p><u>46.2 カルバリルその他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分析法</u> 第3節19による。</p>	<p><u>46.1 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法(その1)</u> 第3節3による。</p>
<p><u>46.3 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法(その1)</u> 第3節3による。</p>	<p><u>46.2 カーバメート系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節5による。</p>
<p><u>46.4 カーバメート系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節5による。</p>	<p><u>46.3 カルバリルその他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分析法</u> 第3節19による。</p>
<p>47~49 (略)</p>	<p>47~49 (略)</p>
<p>50 カルボフラン (カルボフラン及び3-OHカルボフラン) <u>50.1 カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの液体クロ</u></p>	<p>50 カルボフラン (カルボフラン及び3-OHカルボフラン) (新設)</p>

改正後	改正前
<p><u>マトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法</u> <u>第3節32による。</u></p> <p><u>50.2 カルバリルその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型</u> <u>質量分析計による同時分析法</u> <u>第3節19による。</u></p> <p><u>50.3 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析</u> <u>法(その1)</u> <u>第3節3による。</u></p> <p>51 3-OHカルボフラン</p> <p><u>51.1 3-OHカルボフランの液体クロマトグラフタンデム型質量分</u> <u>析計による単成分分析法</u></p> <p style="text-align: center;"><b>A 試薬の調製</b></p> <p><u>3-OHカルボフラン標準液 3-OHカルボフラン [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>]</u> <u>10 mgを正確に量って100 mLの全量フラスコに入れ、メタノ</u> <u>ールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて3-OHカル</u> <u>ボフラン標準原液を調製する(この液1 mLは、3-OHカル</u> <u>ボフランとして0.1 mgを含有する。)</u></p> <p><u>使用に際して、3-OHカルボフラン標準原液4 mLを20 mL</u> <u>の全量フラスコに正確に入れ、更に標線までメタノールを加</u> <u>えて、1 mL中に3-OHカルボフランとして20 µgを含有する</u> <u>液を調製する。この液の一定量を、アセトニトリルで正確に</u> <u>希釈し、1 mL中に3-OHカルボフランとして0.1~20 ngを含</u> <u>有する数点の3-OHカルボフラン標準液を調製する。</u></p> <p style="text-align: center;"><b>B 定 量</b></p> <p><u>抽 出 分析試料5 gを正確に量って500 mLのなす形フ</u></p>	<p><u>50.1 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析</u> <u>法(その1)</u> <u>第3節3による。</u></p> <p><u>50.2 カルバリルその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型</u> <u>質量分析計による同時分析法</u> <u>第3節19による。</u></p> <p>51 3-OHカルボフラン (新設)</p>

改正後	改正前
<p><u>ラスコに入れ、塩酸 (1+29) 130 mL、沸騰石 3~4 粒及びシリコン油約 1 mL を加え、還流冷却器を接続し、1 時間加熱して抽出する。200 mL の全量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<sup>注1</sup> で吸引ろ過した後、先のなす形ラスコ及び残さを順次塩酸 (1+29) - アセトン (5+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量ラスコの標線まで塩酸 (1+29) を加えた後、この液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、塩酸 (1+29) 2 mL を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用)<sup>注2</sup> に入れ、10 分間静置する。100 mL のなす形ラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていた試験管をヘキサン-酢酸エチル (1+1) 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 3-OH カルボフランを溶出させる。更に同溶媒 20 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 まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。</u></p> <p><u>酢酸エチル 1 mL を加えて残留物を溶かした後、ヘキサン 9 mL を加えて、カラム処理 II に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理 II<sup>注3</sup> シリカゲルミニカラム (690 mg) を酢酸エチル 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄する。</u></p> <p><u>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る。50 mL のなす形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ラスコをヘキサン-酢酸エチル (3+2) 5 mL ずつで 3 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下して 3-OH カルボフランを溶出させる。更に同溶媒 5 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水</u></p>	

改 正 後	改 正 前
<p><u>浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル 2 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する。</u></p> <p><u>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 試料溶液及び各 3-OH カルボフラン標準液各 2 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。</u></p> <p><u>測定条件 例</u>  <u>(液体クロマトグラフ部)</u>  <u>カ ラ ム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm) 注4</u>  <u>溶 離 液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム-アセトニトリル (95+5) → 10 min → (10+90) (5 min 保持)</u>  <u>流 速 : 0.2 mL/min</u>  <u>カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C</u>  <u>(タンデム型質量分析計部注5)</u>  <u>イ オ ン 化 法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)</u>  <u>イ オ ン 源 温 度 : 150 °C</u>  <u>デソルベーションガス : N<sub>2</sub> (1000 L/h、500 °C)</u>  <u>キャピラリー電圧 : 3.1 kV</u>  <u>コ ー ン 電 圧 : 下表のとおり</u>  <u>コ ー ン ガ ス : N<sub>2</sub> (50L/h)</u>  <u>コリジョンエネルギー : 下表のとおり</u>  <u>コリジョンガス : Ar (0.4 Pa)</u></p>	

## 改正後

## 改正前

モニターイオン：下表のとおり

表 モニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン	クリジョン
	イオン	定量用	確認用	電圧	エネルギー
	(m/z)	(m/z)	(m/z)	(V)	(eV)
3-OHカルボフラン	238	163	二	28	14
		二	181	28	10

計算 得られた選択反応検出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 3-OH カルボフラン量を算出する<sup>注6</sup>。

注 1 GFP-95 (桐山製作所製) 又はこれと同等のもの

2 InertSep K-solute (5 mL 保持用) (ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの

3 流速は 1 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

4 Mightysil RP-18 GP (関東化学製、本測定条件による 3-OH カルボフランの保持時間は約 6 分) 又はこれと同等のもの

5 Xevo TQD (Waters 製) による条件例

6 カルボフラン量に換算する場合は、これに 0.933 を乗じる。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

改 正 後					改 正 前				
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 <sub>r</sub> (%)					
肉豚肥育用配合飼料	0.01	5	87.4	4.8					
	0.05	5	84.8	2.3					
乳用牛飼育用配合飼料	0.01	5	83.0	4.0					
	0.05	5	82.2	2.3					
小麦	0.01	5	85.8	2.8					
	0.1	5	91.3	4.2					
とうもろこし	0.01	5	88.6	1.3					
	0.05	5	88.1	2.3					
アルファルファ乾草	0.01	5	86.2	4.3					
	13	5	83.3	1.1					
稲わら	0.01	5	88.2	6.1					
	0.4	5	84.7	1.4					
稲発酵粗飼料	0.004	5	83.7	6.1					
	0.6	5	83.4	1.3					
・ 共同試験									
試料の種類	有効試験回数	棄却試験回数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室内再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat		
乳用牛飼育用配合飼料	9	0	0.1	81.4	5.8	11	0.50		
小麦	9	0	0.01	87.4	3.0	24	1.1		
とうもろこし	9	0	0.05	89.5	3.4	5.8	0.27		
アルファルファ乾草	9	0	10	95.7	2.8	12	1.0		
稲わら	9	0	0.4	87.6	2.2	11	0.58		
・ 定量下限	試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中						0.01 mg/kg		
・ 検出下限	試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中						0.002 mg/kg		
(削る)									
51.1 液体クロマトグラフ法									
A 試薬の調製									
1) 3-OH カルボフラン標準液 3-OH カルボフラン									
[C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> ] 20 mg を正確に量って、100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて 3-OH カルボフラン標準原液を調製する（この液 1 mL は、3-OH カルボフランとして 0.2 mg を含有す									

改正後	改正前
	<p>る。)。。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.025~2.5 µg を含有する数点の 3-OH カルボフラン標準液を調製する。</p> <p>2) <u>ケイ酸マグネシウム</u> <u>合成ケイ酸マグネシウム</u> (粒径 149~250 µm (100~60 メッシュ)) を 130 °C で 16 時間乾燥する。</p> <p>3) <u>ケイソウ土</u> <u>ケイソウ土<sup>注1</sup></u> を温水及びメタノールで洗浄した後、風乾する。</p> <p style="text-align: center;"><b>B 定 量</b></p> <p><u>抽出</u> <u>分析試料 5~10 g</u> を正確に量って 500 mL のなす形フラスコに入れ、<u>塩酸 (1+29) 100 mL</u>、<u>沸騰石 3~4 粒</u>及び<u>シリコン油約 1 mL</u>を加え、<u>還流冷却器を接続し、1 時間加熱して抽出する。</u><u>200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土 5 g をのせたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過する。</u><u>先のなす形フラスコ及び残さを順次塩酸 (1+29) -アセトン (5+2) 70 mL で洗浄し、洗液を同様に吸引ろ過する。</u><u>更に全量フラスコの標線まで塩酸 (1+29) を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理 I</u> <u>試料溶液 50 mL</u> を多孔性ケイソウ土カラム (50 mL 保持用) に入れ、5 分間静置する。<u>300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、酢酸エチル 200 mL をカラムに加えて 3-OH カルボフランを溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 II に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理 II</u> <u>ケイ酸マグネシウム 5 g</u> をヘキサンに懸濁させてカラム管 (内径 15 mm) に流し込み、液面が充てん剤の上端から 30 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製</p>



改正後	改正前
	<p><u>する。</u></p> <p><u>試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (9+1) 5 mL ずつで 3 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から 30 mm の高さに達するまで流出させ、更に同溶媒 35 mL を加えて同様に流出させる。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (4+1) 50 mL をカラムに加えて 3-OH カルボフランを溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。</u></p> <p><u>アセトニトリル 1 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 (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。</u></p> <p><u>液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各 3-OH カルボフラン標準液各 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。</u></p> <p><u>測定条件 例</u></p> <p><u>検出器：蛍光検出器 (励起波長：340 nm、蛍光波長：445 nm)</u></p> <p><u>カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 3.9 mm、長さ 150 mm、粒径 4 μm) <sup>注2</sup></u></p> <p><u>溶離液：水-メタノール (9+1) →25 min→水-メタノール (7+3) →1 min→水-メタノール (5+95) (14 min 保持) →水-メタノール (9+1)</u></p> <p><u>反応液<sup>注3</sup>：I液 (加水分解液) 水酸化ナトリウム 1 g を水に溶かして 500 mL とする。</u></p> <p><u>II 液 (蛍光化試薬) o-フタルアルデヒド</u></p>

## 改正後

## 改正前

50 mg をメタノール 5 mL で溶かし、更にホウ酸ナトリウム溶液（四ホウ酸ナトリウム十水和物 19.1 g を水に溶かして 1 L とする。）を加えて 500 mL とした後、2-メルカプトエタノール 50 μL を加えて混合する（使用時に調製する。）。

流速：溶離液 1.0 mL/min、反応液 各 0.2 L/min

温度：カラム槽 45 °C、反応槽 90 °C

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 3-OH カルボフラン量を算出し、これに 0.933 を乗じてカルボフラン量に換算する。

注 1 Hyflo Supercel (Celite Corporation 製) 又はこれと同等のもの

2 Carbamate Analysis (Waters 製) 又はこれと同等のもの

3 反応液 I をカラムから溶出した溶離液に合わせて反応槽内の反応コイル内で加水分解させ、この溶液を室温まで冷却し、反応液 II を合わせて蛍光化した後、直ちに蛍光検出器に送る。反応コイルは、RXN 1000 Coil (内径 0.5 mm、長さ約 5 m、反応容量 1 mL、テフロン製、Waters 製) 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

<u>試料の種類</u>	<u>添加濃度 (μg/kg)</u>	<u>繰返 し</u>	<u>添加回収率 (%)</u>	<u>繰返し精度 RSD (%以下)</u>
<u>成鶏飼育用配合飼料</u>	<u>50~500</u>	<u>3</u>	<u>80.3~87.7</u>	<u>9.3</u>
<u>肉用牛肥育用配合飼料</u>	<u>50~500</u>	<u>3</u>	<u>78.7~88.0</u>	<u>10.4</u>
<u>スーダングラス</u>	<u>50~500</u>	<u>3</u>	<u>71.3~84.7</u>	<u>8.2</u>

・共同試験

改 正 後	改 正 前														
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">試料の種類</th> <th style="text-align: center;">試験 室数</th> <th style="text-align: center;">添加濃度 (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</th> <th style="text-align: center;">添加回収率 (%)</th> <th style="text-align: center;">室内繰返し精度 <math>\text{RSD}_r</math> (%)</th> <th style="text-align: center;">室間再現精度 <math>\text{RSD}_R</math> (%)</th> <th style="text-align: center;">HorRat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">肉用牛肥育用配合飼料</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">250</td> <td style="text-align: center;">86.5</td> <td style="text-align: center;">2.9</td> <td style="text-align: center;">4.2</td> <td style="text-align: center;">0.21</td> </tr> </tbody> </table> <p>・ 定量下限 配合飼料：試料中 25 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>、乾牧草：試料中 50 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></p>	試料の種類	試験 室数	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 $\text{RSD}_r$ (%)	室間再現精度 $\text{RSD}_R$ (%)	HorRat	肉用牛肥育用配合飼料	6	250	86.5	2.9	4.2	0.21
試料の種類	試験 室数	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 $\text{RSD}_r$ (%)	室間再現精度 $\text{RSD}_R$ (%)	HorRat									
肉用牛肥育用配合飼料	6	250	86.5	2.9	4.2	0.21									
52~144 (略)	52~144 (略)														
145 フェノブカルブ	145 フェノブカルブ (新設)														
<u>145.1 カルバリル、カルボフラン及びフェノブ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分析法</u> 第3節32による。															
<u>145.2 カルバリルその他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分析法</u> 第3節19による。	<u>145.1 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節3による。														
<u>145.3 カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節3による。	<u>145.2 カーバメート系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節5による。														
<u>145.4 カーバメート系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法</u> 第3節5による。	<u>145.3 カルバリルその他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分析法</u> 第3節19による。														
146~214 (略)	146~214 (略)														
215 クロチアニジン	215 クロチアニジン														

改正後	改正前
<p>215.1 <u>イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム</u>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 第3節18による。</p>	<p>215.1 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分析法 第3節18による。</p>
<p>216 ジノテフラン 216.1 <u>イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム</u>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 第3節18による。</p>	<p>216 ジノテフラン 216.1 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分析法 第3節18による。</p>
<p>217 チアメトキサム 217.1 <u>イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム</u>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 第3節18による。</p>	<p>217 チアメトキサム 217.1 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分析法 第3節18による。</p>
<p>218~266 (略)</p>	<p>218~266 (略)</p>
<p>第2節 (略)</p>	<p>第2節 (略)</p>
<p>第3節 多成分同時分析法 1~17 (略)</p>	<p>第3節 多成分同時分析法 1~17 (略)</p>

改正後	改正前
<p>18 <u>イミダクロプリド、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分析法</u></p> <p>(1) 分析対象化合物 <u>イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム (4成分)</u></p> <p>(2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米</p> <p>(3) 分析法</p> <p style="text-align: center;"><b>A 試薬の調製</b></p> <p>1) <u>イミダクロプリド標準原液</u> <u>イミダクロプリド</u> <u>[C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]</u> 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、<u>更に</u>標線まで同溶媒を加えてイミダクロプリド標準原液を調製する (この液 1 mL は、イミダクロプリドとして 0.5 mg を含有する。)</p> <p>2) <u>クロチアニジン標準原液</u> <u>クロチアニジン</u> <u>[C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S]</u> 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、<u>更に</u>標線まで同溶媒を加えてクロチアニジン標準原液を調製する (この液 1 mL は、クロチアニジンとして 0.5 mg を含有する。)</p> <p>3) <u>ジノテフラン標準原液</u> <u>ジノテフラン</u> <u>[C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]</u> 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、<u>更に</u>標線まで同溶媒を加えてジノテフラン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ジノテフランとして 0.5 mg を含有する。)</p> <p>4) <u>チアメトキサム標準原液</u> <u>チアメトキサム</u> <u>[C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S]</u> 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、<u>更に</u>標線まで同溶媒を加えてチアメトキサム標準原液を調製する (この液 1 mL は、チアメトキサムとして 0.5 mg を含有する。)</p>	<p>18 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分析法</p> <p>(1) 分析対象化合物 クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム (3成分)</p> <p>(2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米</p> <p>(3) 分析法</p> <p style="text-align: center;"><b>A 試薬の調製</b></p> <p>(新設)</p> <p>1) <u>クロチアニジン標準原液</u> <u>クロチアニジン</u> <u>[C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S]</u> 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、<u>さらに</u>標線まで同溶媒を加えてクロチアニジン標準原液を調製する (この液 1 mL は、クロチアニジンとして 0.5 mg を含有する。)</p> <p>2) <u>ジノテフラン標準原液</u> <u>ジノテフラン</u> <u>[C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]</u> 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、<u>さらに</u>標線まで同溶媒を加えてジノテフラン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ジノテフランとして 0.5 mg を含有する。)</p> <p>3) <u>チアメトキサム標準原液</u> <u>チアメトキサム</u> <u>[C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S]</u> 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、<u>さらに</u>標線まで同溶媒を加えてチアメトキサム標準原液を調製する (この液 1 mL は、チアメトキサムとして 0.5 mg を含有する。)</p>

改正後	改正前
<p>5) 農薬混合標準液 使用に際して、<u>イミダクロプリド標準原液</u>、クロチアニジン標準原液、ジノテフラン標準原液及びチアメトキサム標準原液の一定量を混合し、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.25~100 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。</p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p>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、<u>更に</u>アセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。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、同様に吸引ろ過する。<u>更に</u>全量フラスコの標線までアセトンを加える。この液 20 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 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。</p> <p>カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) <sup>注 1</sup> に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置する。先のなす形フラスコをヘキサン 25 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出させる。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酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、各農薬を溶出させる。</p> <p>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する。アセトニトリル 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。</p>	<p>4) 農薬混合標準液 使用に際して、クロチアニジン標準原液、ジノテフラン標準原液及びチアメトキサム標準原液の一定量を混合し、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.25~100 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。</p> <p style="text-align: center;">B 定 量</p> <p>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、<u>さらに</u>アセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。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、同様に吸引ろ過する。<u>さらに</u>全量フラスコの標線までアセトンを加える。この液 20 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 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。</p> <p>カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) <sup>注 1</sup> に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置する。先のなす形フラスコをヘキサン 25 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出させる。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酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、各農薬を溶出させる。</p> <p>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する。アセトニトリル 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。</p>

改正後	改正前
<p>カラム処理 II グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg／500 mg) 注<sup>2</sup>をアセトニトリル 10 mL で洗浄する。</p> <p>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、各農薬を流出させる。さらに、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 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。</p> <p>流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水-メタノール (9+1) 20 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する。</p> <p>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。</p> <p>測定条件 例 (液体クロマトグラフ部)</p> <p>カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 <u>2.1</u> mm、長さ 150 mm、粒径 <u>5</u> µm) 注<sup>3</sup></p> <p>溶 離 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 - アセトニトリル (9+1) → 15 min → アセトニトリル (2 min 保持)</p> <p>流 速：0.2 mL/min</p>	<p>カラム処理 II グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg／500 mg) 注<sup>2</sup>をアセトニトリル 10 mL で洗浄する。</p> <p>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、各農薬を流出させる。さらに、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 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。</p> <p>流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水-メタノール (9+1) 20 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する。</p> <p>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。</p> <p>測定条件 例 (液体クロマトグラフ部)</p> <p>カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 <u>2.0</u> mm、長さ 150 mm、粒径 <u>3</u> µm) 注<sup>3</sup></p> <p>溶 離 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 - アセトニトリル (9+1) → 15 min → アセトニトリル (2 min 保持) → <u>0.1 min</u> → (9+1) (<u>5 min 保持</u>)</p> <p>流 速：0.2 mL/min</p>

## 改正後

カラム槽温度：40 °C  
 (タンデム型質量分析計部<sup>注4</sup>)  
 イオン化法：エレクトロスプレーイオン化  
 (ESI) 法 (正イオンモード)  
 イオン源温度：120 °C  
 デソルベーションガス：N<sub>2</sub> (800 L/h、500 °C)  
 キャピラリー電圧：0.5 kV  
 コーンガス：N<sub>2</sub> (50 L/h)  
 コーン電圧：下表のとおり  
 コリジョンガス：Ar (0.25 mL/min)  
 コリジョンエネルギー：下表のとおり  
 モニターイオン：下表のとおり

表 各農薬のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカー サーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
		定量用 ( <i>m/z</i> )	確認用 ( <i>m/z</i> )		
イミダクロプリド	256	175	—	25	20
		—	209	25	15
クロチアニジン	250	132	—	15	15
		—	169	15	15
ジノテフラン	203	129	—	15	10
		—	157	15	10
チアメトキサム	292	211	—	20	15
		—	132	20	15

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

注 1・2 (略)

3 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるイミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの保持時間はそれぞれ約 5.7、5.3、3.3 及び 4.7 分) 又はこれと同等のもの

## 改正前

カラム槽温度：40 °C  
 (タンデム型質量分析計部<sup>注4</sup>)  
 イオン化法：エレクトロスプレーイオン化  
 (ESI) 法 (正イオンモード)  
 イオン源温度：110 °C  
 デソルベーション温度：400 °C  
 キャピラリー電圧：1 kV  
 (新設)  
 コーン電圧：下表のとおり  
 (新設)  
 コリジョンエネルギー：下表のとおり  
 モニターイオン：下表のとおり

表 各農薬のモニターイオン条件

農薬名	プリカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン ( <i>m/z</i> )	確認イオン ( <i>m/z</i> )	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
ジノテフラン	203	129	157	10	10
クロチアニジン	250	132	169	15	15
チアメトキサム	292	211	132	15	15

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

注 1・2 (略)

3 Mightysil RP-18 GP (関東化学製、本測定条件によるクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの保持時間はそれぞれ約 3.5、4.5 及び 5 分) 又はこれと同等のもの



改正後

4 (略)

(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 <sub>r</sub> (%)
	稲わら1	0.01	5	83.1	5.9
		10	5	90.3	1.8
	稲発酵粗飼料	0.004	5	90.6	8.0
イミダクロプリド		3.1	5	91.5	2.0
	粳米	0.01	5	97.7	9.0
		1	5	93.0	2.3

改正前

4 (略)

(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 (µg/kg)	繰返し	平均回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
(新設)					

改 正 後					改 正 前					
	稲わら2	0.01	3	77.5	7.3	稲わら1	5,000	3	88.0	3.6
		0.02	3	81.6	3.7		2,000	3	99.5	2.4
		0.2	3	91.0	3.5		200	3	91.0	3.5
		2	3	99.5	2.4		20	3	81.6	3.7
		5	3	88.0	3.6		10	3	77.5	7.3
	稲わら3	0.2	3	91.4	2.6	稲わら2	5,000	3	90.0	3.7
		2	3	86.5	0.7		2,000	3	86.5	0.7
		5	3	90.0	3.7		200	3	91.4	2.6
クロチアニジン	稲発酵粗飼料	0.09	3	98.0	3.1	稲発酵粗飼料	5,000	3	83.1	2.7
		0.9	3	101	2.7		2,000	3	101	2.7
		2.2	3	83.1	2.7		200	3	98.0	3.1
	粃米	0.01	3	80.2	16	粃米	5,000	3	87.5	4.5
		0.02	3	93.0	2.3		2,000	3	94.0	1.9
		0.2	3	91.6	7.0		200	3	91.6	7.0
		2	3	94.0	1.9		20	3	93.0	2.3
		5	3	87.5	4.5		10	3	80.2	16
	稲わら2	0.01	3	82.8	4.8	稲わら1	5,000	3	87.0	4.9
		0.02	3	89.1	5.4		2,000	3	99.0	2.8
		0.2	3	95.2	9.1		200	3	95.2	9.1
		2	3	99.0	2.8		20	3	89.1	5.4
		5	3	87.0	4.9		10	3	82.8	4.8
	稲わら3	0.2	3	106	8.9	稲わら2	5,000	3	88.0	4.8
		2	3	85.0	1.4		2,000	3	85.0	1.4
		5	3	88.0	4.8		200	3	106	8.9
ジノテフラン	稲発酵粗飼料	0.09	3	96.0	3.3	稲発酵粗飼料	5,000	3	84.0	6.6
		0.9	3	100	2.2		2,000	3	100	2.2
		2.2	3	84.0	6.6		200	3	96.0	3.3
	粃米	0.01	3	76.9	13	粃米	5,000	3	89.0	5.7
		0.02	3	86.8	2.1		2,000	3	85.7	2.7
		0.2	3	81.5	3.4		200	3	81.5	3.4
		2	3	85.7	2.7		20	3	86.8	2.1
		5	3	89.0	5.7		10	3	76.9	13
	稲わら2	0.01	3	96.1	4.6	稲わら1	5,000	3	95.0	3.0
		0.02	3	79.8	5.9		2,000	3	105	8.0
		0.2	3	102	6.5		200	3	102	6.5
		2	3	105	8.0		20	3	79.8	5.9
		5	3	95.0	3.0		10	3	96.1	4.6

		改正後			
チアメトキサム	稲わら <sup>3</sup>	<u>0.2</u>	<u>3</u>	<u>92.0</u>	<u>8.2</u>
		<u>2</u>	<u>3</u>	<u>96.8</u>	<u>2.3</u>
		<u>5</u>	<u>3</u>	<u>93.0</u>	<u>2.0</u>
	稲発酵粗飼料	<u>0.09</u>	<u>3</u>	<u>87.9</u>	<u>8.7</u>
		<u>0.9</u>	<u>3</u>	<u>101</u>	<u>2.7</u>
		<u>2.2</u>	<u>3</u>	<u>96.0</u>	<u>2.7</u>
	粃米	<u>0.01</u>	<u>3</u>	<u>95.6</u>	<u>6.5</u>
		<u>0.02</u>	<u>3</u>	<u>89.0</u>	<u>2.1</u>
		<u>0.2</u>	<u>3</u>	<u>98.8</u>	<u>5.7</u>
		<u>2</u>	<u>3</u>	<u>95.7</u>	<u>1.4</u>
	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>91.0</u>	<u>2.1</u>	

・共同試験

成分名	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 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
クロチアエニジン	稲わら	9	0	0.2	90.4	8.3	14	0.68
	稲発酵粗飼料	8	1	5 <sup>注</sup>	94.5	4.2	5.9	0.46
	粃米	8	1	3	92.3	1.8	4.4	0.32
ジノテフラン	稲わら	8	1	0.2	89.3	3.4	15	0.71
	稲発酵粗飼料	8	1	5 <sup>注</sup>	94.4	4.0	6.7	0.53
	粃米	8	1	3	92.3	3.5	8.9	0.65
チアメトキサム	稲わら	9	0	0.2	92.1	9.5	11	0.52
	稲発酵粗飼料	9	0	5 <sup>注</sup>	98.6	3.8	9.0	0.72
	粃米	9	0	3	93.7	3.5	5.8	0.43

注 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

- ・ 定量下限 試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 各 0.01 mg/kg
- ・ 検出下限 イミダクロプリド：試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 0.004 mg/kg、その他の農薬：試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 各 0.003 mg/kg

19~31 (略)

32 カルバリル、カルボフラン及びフェノブ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分析法

		改正前			
チアメトキサム	稲わら <sup>2</sup>	<u>5.000</u>	<u>3</u>	<u>93.0</u>	<u>2.0</u>
		<u>2.000</u>	<u>3</u>	<u>96.8</u>	<u>2.3</u>
		<u>200</u>	<u>3</u>	<u>92.0</u>	<u>8.2</u>
	稲発酵粗飼料	<u>5.000</u>	<u>3</u>	<u>96.0</u>	<u>2.7</u>
		<u>2.000</u>	<u>3</u>	<u>101</u>	<u>2.7</u>
		<u>200</u>	<u>3</u>	<u>87.9</u>	<u>8.7</u>
	粃米	<u>5.000</u>	<u>3</u>	<u>91.0</u>	<u>2.1</u>
		<u>2.000</u>	<u>3</u>	<u>95.7</u>	<u>1.4</u>
		<u>200</u>	<u>3</u>	<u>98.8</u>	<u>5.7</u>
		<u>20</u>	<u>3</u>	<u>89.0</u>	<u>2.1</u>
	<u>10</u>	<u>3</u>	<u>95.6</u>	<u>6.5</u>	

・共同試験

成分名	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 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
クロチアエニジン	稲わら	9	0	0.2	90.4	8.3	14	0.68
	稲発酵粗飼料	8	1	5	94.5	4.2	5.9	0.46
	粃米	8	1	3	92.3	1.8	4.4	0.32
ジノテフラン	稲わら	8	1	0.2	89.3	3.4	15	0.71
	稲発酵粗飼料	8	1	5	94.4	4.0	6.7	0.53
	粃米	8	1	3	92.3	3.5	8.9	0.65
チアメトキサム	稲わら	9	0	0.2	92.1	9.5	11	0.52
	稲発酵粗飼料	9	0	5	98.6	3.8	9.0	0.72
	粃米	9	0	3	93.7	3.5	5.8	0.43

(新設)

- ・ 定量下限 試料中 各 10 µg/kg
- ・ 検出下限 試料中 各 3 µg/kg

19~31 (略)

(新設)

改 正 後	改 正 前
<p>(1) <u>分析対象化合物</u> <u>カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ (3成分)</u></p> <p>(2) <u>適用範囲</u> <u>飼料</u></p> <p>(3) <u>分析法</u></p> <p style="text-align: center;"><b>A 試薬の調製</b></p> <p>1) <u>カルバリル標準原液</u> <u>カルバリル [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>] 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カルバリル標準原液を調製する (この液 1 mL は、カルバリルとして 0.5 mg を含有する。)</u></p> <p>2) <u>カルボフラン標準原液</u> <u>カルボフラン [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>] 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カルボフラン標準原液を調製する (この液 1 mL は、カルボフランとして 0.5 mg を含有する。)</u></p> <p>3) <u>フェノブカルブ標準原液</u> <u>フェノブカルブ [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>] 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フェノブカルブ標準原液を調製する (この液 1 mL は、フェノブカルブとして 0.5 mg を含有する。)</u></p> <p>4) <u>農薬混合標準液</u> <u>カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ標準原液の一定量を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 10 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。</u></p> <p><u>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 中にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 0.04~600 ng を</u></p>	

改 正 後	改 正 前
<p>含有する数点の農薬混合標準液を調製する。</p> <p style="text-align: center;"><b>B 定 量</b></p> <p><u>抽出</u> 分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL (乾牧草は 30 mL) を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL (乾牧草は 120 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。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、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線までアセトンを加える。この液 2 mL (乾牧草は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。</p> <p><u>カラム処理<sup>注1</sup></u> オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) <sup>注2</sup> をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。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る。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、同様に流出させる。</p> <p>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、各農薬を溶出させる。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 5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。</p> <p><u>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定</u> 試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを</p>	

## 改正後

## 改正前

得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm) 注<sup>3</sup>

溶離液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 - アセトニトリル (4+1) → 15 min → (1+9) (5 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部注<sup>4</sup>)

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

イオン源温度 : 120 °C

デソルベーションガス : N<sub>2</sub> (650 L/h、350 °C)

キャピラリー電圧 : 1 kV

コーンガス : N<sub>2</sub> (50 L/h)

コーン電圧 : 下表のとおり

コリジョンガス : Ar (0.25 mL/min)

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)		
カルバリル	202	145	—	22	12
		—	127	22	28
カルボフラン	222	165	—	24	12
		—	123	24	23
フェノブカルブ	208	95	—	24	16
		—	77	24	36

改正後	改正前
<p><u>計算</u> 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。</p> <p><u>注 1</u> 流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。</p> <p><u>2</u> <u>InertSep Slim-J C18-B</u> (ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの</p> <p><u>3</u> <u>ZORBAX Eclipse XDB-C18</u> (Agilent Technologies 製、本測定条件によるカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの保持時間は約 7.9、7.5 及び 10.0 分) 又はこれと同等のもの</p> <p><u>4</u> <u>ACQUITY TQD</u> (Waters 製) による条件例</p> <p>(参考) <u>分析法バリデーション</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>添加回収率及び繰返し精度</u></li> </ul>	





改正後									改正前									
成分名	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 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>b</sub> (%)	HorRat										
カルバリル	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.1	99.4	7.2	15	0.68										
	小麦	11	0	2	95.4	5.9	9.4	0.46										
	とうもろこし	11	0	0.1	99.1	4.6	16	0.74										
	マイロ	10	1	10	97.9	2.6	6.5	0.58										
	オーツ乾草	11	0	10	94.9	5.3	11	0.96										
カルボフラン	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.1	96.5	3.1	7.5	0.34										
	小麦	11	0	0.2	94.2	5.6	7.0	0.34										
	とうもろこし	11	0	0.05	96.8	3.4	9.9	0.45										
	マイロ	11	0	0.1	98.7	2.3	5.2	0.24										
	オーツ乾草	11	0	10	94.0	2.2	6.1	0.54										
フェノブカルブ	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.3	94.9	4.7	5.6	0.29										
	小麦	11	0	0.3	92.5	6.0	7.2	0.37										
	とうもろこし	11	0	0.3	96.3	3.4	8.3	0.43										
	マイロ	11	0	0.3	97.8	3.2	6.7	0.35										
	オーツ乾草	11	0	10	95.4	2.8	7.0	0.61										

・ 定量下限 試料中 各 0.01 mg/kg (乾牧草中 各 0.1 mg/kg)

・ 検出下限 試料中 各 0.003 mg/kg (乾牧草中 各 0.03 mg/kg)

第 7 章 有害物質

1~4 (略)

5 ヒスタミン

5.1 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による分析法

A 試薬の調製

1) 溶出溶媒 ギ酸 2 mL に水-メタノール (1+1) を加えて 100 mL とする。

2) 希釈溶媒 溶出溶媒 10 mL に水-メタノール (1+1) を加えて 100 mL とする。

3) ヒスタミン標準液 ヒスタミン二塩酸塩 [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>·2HCl] 82.8 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、水-メタノール (1+1) を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてヒスタミン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ヒスタミンとして 1 mg 含有する。)

改 正 後	改 正 前
<p>使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して、<u>1 mL 中にヒスタミンとして 2~400 ng を含有する数点のヒスタミン標準液を調製する。</u></p> <p style="text-align: center;"><u>B 定 量</u></p> <p><u>抽 出</u> 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、5 w/v% トリクロロ酢酸溶液 100 mL を加え、30 分間振り混ぜてヒスタミンを抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、2,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 5 mL を 50 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、水 20 mL を加える。<u>1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.9~7.1 に調整した後、2,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れる。試料溶液の入っていた共栓遠心沈殿管を少量の水で数回洗浄し、洗液を順次先の全量フラスコに加えた後、更に標線まで水を加えてカラム処理に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理</u> 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム (500 mg) <sup>注1</sup> をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄する。試料溶液 5 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自然流下させる。更に水 10 mL 及びメタノール 10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。100 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、溶出溶媒 10 mL をミニカラムに加えてヒスタミンを溶出させる。更に全量フラスコの標線まで水-メタノール (1+1) を加え、その液の一定量を 5,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。</p> <p><u>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定<sup>注2</sup></u> 試料溶液及び各ヒスタミン標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。</p>	

改正後

改正前

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : 親水性相互作用クロマトグラフィ  
ーカラム (内径 2.1 mm、長さ 150  
mm、粒径 3 μm) 注<sup>3</sup>

溶離液 : 0.1 v/v% ギ酸溶液ーアセトニトリ  
ル (1+9) (1 min 保持) → 6 min  
→ (9+1) (8 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部注<sup>4</sup>)

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化  
(ESI) 法 (正イオンモード)

ネブライザーガス : N<sub>2</sub> (103 kPa)

乾燥ガス : N<sub>2</sub> (6 L/min、300 °C)

キャピラリー電圧 : 0.9 kV

フラグメンター電圧 : 100 V

コリジョンガス : N<sub>2</sub> (1 mL/min)

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 モニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コリジョン
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)	エネルギー (eV)
ヒスタミン	112	95	二	12
		二	68	22

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面  
積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のヒスタミン量を  
算出する。

## 改 正 後

## 改 正 前

注 1 Oasis WCX (Waters 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

2 試料溶液及び各ヒスタミン標準液を入れる液体クロマトグラフ用バイアルは、ヒスタミンが吸着されないポリプロピレン製等のものを用いる。

3 Triart Diol-HILIC (ワイエムシィ製、充てん剤は有機シリカハイブリッド基剤にジヒドロキシプロピル基を化学結合したもの。本測定条件例によるヒスタミンの保持時間は約 9.7 分) 又はこれと同等のもの

4 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例

(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 <sub>r</sub> (%)
種鶏飼育用配合飼料	10	5	103	1.5
	50	5	92.5	2.0
種豚飼育用配合飼料	10	5	103	1.2
	50	5	96.0	0.8
海産魚育成用配合飼料	250	5	106	1.2
	500	5	108	0.5
国内調整魚粉	100	5	101	1.5
	500	5	97.3	1.0
輸入魚粉	10	5	99.9	1.9
	50	5	100	0.8

・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(%) (測定値 (mg/kg))	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>B</sub> (%)	HorRat
種鶏飼育用配合飼料	11	0	50 ブランク値0.738	90.5	2.8	7.7	0.85
海産魚育成用配合飼料	11	0	自然汚染	(267)	2.2	9.3	1.3
輸入魚粉	11	0	20	88.6	6.8	13	1.3

改正後	改正前
<p>・定量下限 試料中 <u>10 mg/kg</u></p> <p>・検出下限 試料中 <u>3 mg/kg</u></p> <p>(削る)</p>	<p>5.1 <u>キャピラリー電気泳動法<sup>注1</sup></u> (適用範囲：魚粉)</p> <p><b>A 試薬の調製</b></p> <p><u>ヒスタミン標準液</u> ヒスタミン二塩酸塩〔C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>·2HCl〕82.8 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ、トリクロロ酢酸溶液 (5 %) を加えて溶かし、更に標線まで同溶液を加えてヒスタミン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ヒスタミンとして 1 mg 含有する。)</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をトリクロロ酢酸溶液 (5 %) で正確に希釈して、1 mL 中にヒスタミンとして 0.5~10 µg を含有する数点のヒスタミン標準液を調製する。</p> <p><b>B 定 量</b></p> <p><u>抽 出</u> 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、トリクロロ酢酸溶液 (5 %) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜてヒスタミンを抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をトリクロロ酢酸溶液 (5 %) 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 2 に入れ、5,000×g で 15 分間遠心ろ過し、ろ液注 3 をキャピラリー電気泳動に供する試料溶液とする。</p> <p><u>キャピラリー電気泳動</u> 試料溶液及び各ヒスタミン標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入し、エレクトロフェログラムを得る<sup>注4</sup>。</p> <p>測定条件 例</p>

改正後	改正前
	<p>カラム：溶融石英製キャピラリーカラム（内径 75 <math>\mu\text{m}</math>、有効長 56 cm、全長 64.5 cm）</p> <p>泳動緩衝液：0.05 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.5）<sup>注5</sup></p> <p>電圧：+15 kV</p> <p>カラム槽温度：20°C</p> <p>試料注入量：加圧注入法（5,000 Pa、4 s）</p> <p>検出器：紫外吸光光度検出器（検出波長 210 nm）</p> <p>カラムの洗浄：試料溶液及び各ヒスタミン標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入する前に、水で2分間、水酸化ナトリウム溶液（0.1mol/L）で2分間、水で2分間及び泳動緩衝液で3分間洗浄する。</p> <p>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、試料中のヒスタミン量を算出する。</p> <p>注 1 使用する水は、電気伝導率が 5.6 <math>\mu\text{S/m}</math> 以下（比抵抗が 18 <math>\text{M}\Omega\cdot\text{cm}</math> 以上）のものを用いる。</p> <p>2 <u>Microcon YM-30（Millipore 製）又はこれと同等のもの</u></p> <p>3 <u>得られたろ液の上澄みを試料溶液とする。</u></p> <p>4 <u>良好なピーク形状が得られない場合は、試料溶液をさらに希釈する。</u></p> <p>5 <u>Agilent Technologies 製又はこれと同等のもの</u></p> <p>（参考）分析法バリデーション</p> <p>・添加回収率及び繰返し精度</p>

改正後

(削る)

改正前

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 (%以下)
ホワイトフィッシュミール	50~500	3	96.2~101.0	5.5
ホッケ粕	50~500	3	97.6~98.4	6.4
オオナゴ粕	50~500	3	93.3~99.9	5.8
調整魚粉	50~500	3	99.4~103.8	4.2

・共同試験

試料の種類	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 <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
魚粉	7	自然汚染	(245)	2.6	5.5	0.39
魚粉	7	100	99.6	3.5	3.7	0.17

・定量下限 試料中 10 mg/kg

5.2 比色法

A 試薬の調製

1) 塩酸ヒスタミン標準液 ヒスタミン二塩酸塩  
[C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>·2HCl] 50 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、塩酸 (0.1 mol/L) を加えて溶かし、更に標線まで同液を加えて塩酸ヒスタミン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ヒスタミン二塩酸塩として 0.5 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し、1 mL 中にヒスタミン二塩酸塩として 1.25~10 µg を含有する数点の塩酸ヒスタミン標準液を調製する。

2) 緩衝液

i) 2 mol/L 酢酸緩衝液 酢酸 115 mL 及び水酸化ナトリウム 40 g を水に溶かして 1 L とする。

ii) 0.2 mol/L 酢酸緩衝液 2 mol/L 酢酸緩衝液の一定量を水で 10 倍に希釈する。

iii) 炭酸ナトリウム緩衝液 炭酸ナトリウム 4 g 及び炭酸水

## 改正後

## 改正前

素ナトリウム 2 g を水に溶かして 100 mL とする。

- 3) 発色試液 p-ニトロアニリン 0.1 g を塩酸 (0.1 mol/L) に溶かして 100 mL とし、この液 15 mL を氷冷し、亜硝酸ナトリウム溶液 (15 w/v%) 0.1 mL を加える (使用時に調製する。)。
- 4) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ (粒径 63~200  $\mu\text{m}$  (230~70 メッシュ) ) <sup>注1</sup> を 120°C で 2 時間乾燥する。

## B 定 量

抽出 分析試料 20.0 g を量ってブレンダーカップに入れ、水 70 mL 及びトリクロロ酢酸溶液 (8 w/v%) 30 mL を加え、5 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙 (2 種) 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 中性アルミナ 30 g をカラム管 (内径 14 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液 50 mL をカラムに入れ、初めの流出液 1~2 mL を捨て、その後の流出液 10 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れる。この液に 0.2 mol/L 酢酸緩衝液 10 mL を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 イオン交換樹脂<sup>注2</sup> 3 g を水に懸濁させてカラム管 (内径 10 mm) に流し込み、塩酸 (1 mol/L) 5 mL、水 5 mL 及び 2 mol/L 酢酸緩衝液 5 mL を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたビーカーを少量の 0.2 mol/L 酢酸緩衝液で洗浄し、洗液をカラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させた後、更に 0.2 mol/L 酢酸緩衝液 50 mL をカラムに加え、同様に流出させる。



改 正 後	改 正 前
	<p><u>100 mL の全量フラスコをカラムの下に置き、塩酸 (0.2 mol/L) 30 mL をカラムに加えてヒスタミンを溶出させ、更に全量フラスコの標線まで塩酸 (0.1 mol/L) を加え、亜硝酸処理に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>亜硝酸処理及び発色</u> <u>試料溶液 5 mL を試験管に正確に入れ、亜硝酸ナトリウム溶液 (15 w/v%) 0.5 mL、塩酸 (1 mol/L) 0.5 mL 及び臭化カリウム溶液 (5 w/v%) 0.1 mL を加えて振り混ぜ、更に 60°C の水浴中で 10 分間反応させた後放冷する。</u></p> <p><u>この反応液にチモールブルー試液数滴を加え、水酸化ナトリウム溶液 (10 w/v%) でアルカリ性とした後、50°C の水浴中で 5~10 分間減圧してアンモニアを揮散除去する。</u></p> <p><u>次に、残留液の pH を塩酸 (0.1 mol/L) で 5~6 に調整し、炭酸ナトリウム緩衝液 1 mL を加え、この液を振り混ぜた後 10 分間氷冷する。更に発色試液 1 mL をこの液に加えて振り混ぜた後 15 分間氷冷して発色させる。</u></p> <p><u>この発色液に酢酸エチル 10 mL を正確に加えて振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を捨て、酢酸エチル層 (上層) を炭酸ナトリウム溶液 (1 w/v%) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、測定に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>同時に、各塩酸ヒスタミン標準液について、試料溶液と同様に操作し、測定に供する各標準液とする。</u></p> <p><u>測 定</u> <u>試料溶液を別の試験管に入れ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、アンモニア水 2~3 滴を加え振り混ぜ、直ちに酢酸エチルを対照液として波長 550 nm の吸光度を測定する。</u></p> <p><u>同時に、各標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定する。</u></p> <p><u>計 算</u> <u>得られた標準液の吸光度から検量線を作成し、次式</u></p>

改正後	改正前
<p>6・7 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 8 章 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 9 章 抗生物質</p> <p>第 1 節 微生物学的試験法通則 水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。</p> <p>1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~3) (略)</p> <p>4) 菌液又は孢子液及び添加量 試験菌の菌液又は孢子液は、次に掲げる方法により調製する。添加量は、第 2 節各条に規定する量を目安とし、2-2 用量法により定量する場合には、高濃度標準液による阻止円直径が 20~25 mm に、かつ、低濃度標準液による阻止円直径が 15~20 mm になるように、また、標準曲線法により定量する場合には、参照標準液による阻止円直径が 20 mm 前後になるように菌液又は孢子液を第 2 節各条に規定する培地に加える。なお、菌液を希釈する場合には、F-2 号培地又は F-202 号培地を用い、孢子液を希釈する場合には、水又は生理食塩液を用いる。</p>	<p>により試料中のヒスタミン [<math>C_5H_9N_3</math>] 量を算出する。 <u>試料中のヒスタミン量 (mg/kg) = <math>A \times 0.603 \times 10^2</math></u></p> <p style="text-align: center;"><u>A : 検量線から求めたヒスタミン二塩酸塩の重量 (μg)</u></p> <p>注 1 <u>Aluminiumoxid 90 aktiv neutral Art. 1077 (Merck 製) 又はこれと同等のもの</u></p> <p>2 <u>Amberlite CG-50 type-1 (Rohm and Haas 製) 又はこれと同等のもの</u></p> <p>6・7 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 8 章 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 9 章 抗生物質</p> <p>第 1 節 微生物学的試験法通則 水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。</p> <p>1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~3) (略)</p> <p>4) 菌液又は孢子液及び添加量 試験菌の菌液又は孢子液は、次に掲げる方法により調製する。添加量は、第 2 節各条に規定する量を目安とし、2-2 用量法により定量する場合には、高濃度標準液による阻止円直径が 20~25 mm に、かつ、低濃度標準液による阻止円直径が 15~20 mm になるように、また、標準曲線法により定量する場合には、参照標準液による阻止円直径が 20 mm 前後になるように菌液又は孢子液を第 2 節各条に規定する培地に加える。なお、菌液を希釈する場合には、F-2 号培地又は F-202 号培地を用い、孢子液を希釈する場合には、水又は生理食塩液を用いる。</p>

改正後	改正前
<p>i) <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617、<i>Escherichia coli</i> ATCC 27166、<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 <u>及び</u> <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 の菌液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、35~37 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。</p> <p>ii) <i>Brevibacterium citreum var. polynactinus</i> の菌液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。</p> <p>iii)~iv) (略)</p> <p>v) <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778、<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 及び <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774 の孢子液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、35~37 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。<u>さらに</u>、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、孢子を浮遊させて孢子液とする。</p> <p>vi) (略)</p> <p>5) (略)</p>	<p>i) <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617、<i>Escherichia coli</i> ATCC 27166、<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341、<u><i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 及び <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P</u> の菌液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、35~37 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。</p> <p>ii) <u><i>Pseudomonas Fluorescens</i> NIHJ B-254 及び <i>Brevibacterium citreum var. polynactinus</i></u> の菌液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。</p> <p>iii)~iv) (略)</p> <p>v) <u><i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185、<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778、<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 及び <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774</u> の孢子液</p> <p>試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、35~37 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。<u>更に</u>、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、孢子を浮遊させて孢子液とする。</p> <p>vi) (略)</p> <p>5) (略)</p>

改正後	改正前
<p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>2 バイオオートグラフ法 (略) (付 記) (略)</p> <p>第2節 各条 1~13 (略)</p> <p>14 セデカマイシン 14.1 定量試験法 (プレミックス) 14.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) (略)</p> <p>3) セデカマイシン標準液 常用標準セデカマイシン又は <u>これと同等のもの</u> 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを 正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のセデカマイシン標 準原液を調製する。 使用に際して、標準原液の一定量を 3 号緩衝液で正確に 希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力 価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>4)~6) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>14.2 定量試験法 (飼料) (略)</p>	<p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>2 バイオオートグラフ法 (略) (付 記) (略)</p> <p>第2節 各条 1~13 (略)</p> <p>14 セデカマイシン 14.1 定量試験法 (プレミックス) 14.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) (略)</p> <p>3) セデカマイシン標準液 常用標準セデカマイシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、 1 mg(力価)/mL のセデカマイシン標準原液を調製する。 使用に際して、標準原液の一定量を 3 号緩衝液で正確に 希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力 価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>4)~6) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>14.2 定量試験法 (飼料) (略)</p>

改正後	改正前
<p>15~16 (略)</p> <p>17 デストマイシン A</p> <p>17.1 定量試験法 (飼料)</p> <p>17.1.1 平板法 (適用範囲 : OTC を含まない飼料)</p> <p>1)~2) (略)</p> <p>3) デストマイシン A 標準液 常用標準デストマイシン A <u>又はこれと同等のもの</u>の適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、4 号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のデストマイシン A 標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、80 µg(力価)/mL、40 µg(力価)/mL、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL 及び 5 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。</p> <p>4)~7) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>	<p>15~16 (略)</p> <p>17 デストマイシン A</p> <p>17.1 定量試験法 (飼料)</p> <p>17.1.1 平板法 (適用範囲 : OTC を含まない飼料)</p> <p>1)~2) (略)</p> <p>3) デストマイシン A 標準液 常用標準デストマイシン A 適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、4 号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のデストマイシン A 標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、80 µg(力価)/mL、40 µg(力価)/mL、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL 及び 5 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。</p> <p>4)~7) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>
<p>18~20 (略)</p> <p>21 バージニアマイシン</p> <p>21.1 定量試験法 (プレミックス)</p> <p>21.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) (略)</p>	<p>18~20 (略)</p> <p>21 バージニアマイシン</p> <p>21.1 定量試験法 (プレミックス)</p> <p>21.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) (略)</p>

改正後	改正前
<p>3) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン<u>又はこれと同等のもの</u> 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>4)~7) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>	<p>3) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>4)~7) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>
<p>22~29 (略)</p>	<p>22~29 (略)</p>
<p>30 硫酸コリスチン</p> <p>30.1 定量試験法 (プレミックス)</p> <p>30.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) (略)</p> <p>2) コリスチン標準液 常用標準コリスチン<u>又はこれと同等のもの</u>適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、5号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を5号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>3)~5) (略)</p>	<p>30 硫酸コリスチン</p> <p>30.1 定量試験法 (プレミックス)</p> <p>30.1.1 平板法</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) (略)</p> <p>2) コリスチン標準液 常用標準コリスチン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、5号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量を5号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。</p> <p>3)~5) (略)</p>

改正後	改正前
<p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>	<p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p>
<p>31~32 (略)</p>	<p>31~32 (略)</p>
<p>第3節 多成分分析法</p>	<p>第3節 多成分分析法</p>
<p>1 (略)</p>	<p>1 (略)</p>
<p>2 キタサマイシン、バージニアマイシン及びリン酸タイロシンのバイオオートグラフによる微量定量試験法</p> <p>(1) 分析対象抗生物質 KT、VM 及び TS</p> <p>(2) 適用範囲 飼料</p> <p>(3) 分析法</p>	<p>2 キタサマイシン、バージニアマイシン及びリン酸タイロシンのバイオオートグラフによる微量定量試験法</p> <p>(1) 分析対象抗生物質 KT、VM 及び TS</p> <p>(2) 適用範囲 飼料</p> <p>(3) 分析法</p>
<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p>	<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p>
<p>1) キタサマイシン標準液 常用標準キタサマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノール 10 mL を加えて溶かし、更に同溶媒を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。</p> <p>2) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5</p>	<p>1) キタサマイシン標準液 常用標準キタサマイシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノール 10 mL を加えて溶かし、更に同溶媒を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。</p> <p>2) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。</p> <p>使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5</p>

改正後	改正前
<p>μg(力価)/mL 及び 1.25 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。 3)~8) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>3~5 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 10 章~第 15 章 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 16 章 動物由来 DNA</p> <p>第 1 節 (略)</p> <p>第 2 節 各条 (略)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">B 検 出<sup>注9</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p> <p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。PCR 反応の終了した試料溶液、陽性対照液、陰性対照液及び DNA 分子量マーカー<sup>注2</sup>各 5 μL に電気泳動用色素溶液 1 μL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でプロモフェノールブルーがウェルから 3~4 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p> <p>電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、</p>	<p>μg(力価)/mL 及び 1.25 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。 3)~8) (略)</p> <p style="text-align: center;">B 試料溶液の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">C 定 量 (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>3~5 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 10 章~第 15 章 (略)</p> <p style="text-align: center;">第 16 章 動物由来 DNA</p> <p>第 1 節 (略)</p> <p>第 2 節 各条 (略)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="text-align: center;">B 検 出<sup>注9</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p> <p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。PCR 反応の終了した試料溶液、陽性対照液、陰性対照液及び DNA 分子量マーカー<sup>注2</sup>各 5 μL に電気泳動用色素溶液 1 μL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でプロモフェノールブルーがウェルから 3~4 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p> <p>電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、</p>



改正後	改正前
<p><u>DNA と結合した臭化エチジウムを励起する波長（例：302 nm、312 nm、365 nm 等）の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認する。</u></p> <p>判定（略） 注 1~11（略） （付記）（略）</p> <p>（参考）<u>検出下限</u>及び特異性（ほ乳動物検出用プライマー対 [anicon5, anicon3] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>検出下限</u> 配合飼料中のほ乳動物由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、肉骨粉の<u>検出</u>の感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>1.2 反すう動物由来 DNA <sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製（略）</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検出 <sup>注3</sup></p> <p>DNA の抽出（略） PCR 反応（略） 電気泳動（略）</p> <p>判定 <u>陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性の疑い有り</u>と判定し、第 4 節 2 により制限酵素による増幅産物確認法を行う。</p>	<p><u>365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認する。</u></p> <p>判定（略） 注 1~11（略） （付記）（略）</p> <p>（参考）<u>検出感度</u>及び特異性（ほ乳動物検出用プライマー対 [anicon5, anicon3] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>検出感度</u> 配合飼料中のほ乳動物由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、肉骨粉の<u>検出感度</u>は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>1.2 反すう動物由来 DNA <sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製（略）</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検出 <sup>注3</sup></p> <p>DNA の抽出（略） PCR 反応（略） 電気泳動（略）</p> <p>判定 <u>1.1 の B の判定の項による。ただし、陽性の疑いがある場合は、第 4 節 2 により制限酵素による増幅産物確認法を行うように読み替えるものとする。</u></p>

改正後	改正前
<p><u>陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。</u></p> <p><u>また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。</u></p> <p><u>同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出を、試料が魚粉等（魚類を含むもの）又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 4 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。</u></p> <p>注 1~3 （略）</p> <p>（参考）検出<u>下限</u>及び特異性（反すう動物検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u> 配合飼料中の豚由来 DNA：豚肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、肉骨粉の検出<u>の感度</u>は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性 （略）</li> </ul> <p>1.3 牛由来 DNA <sup>注 1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p>	<p>注 1~3 （略）</p> <p>（参考）検出<u>感度</u>及び特異性（反すう動物検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>感度</u> 配合飼料中の豚由来 DNA：豚肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、肉骨粉の検出感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性 （略）</li> </ul> <p>1.3 牛由来 DNA <sup>注 1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p>

改正後	改正前
<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略) B 検出<sup>注3</sup></p> <p>DNA の抽出 (略) PCR 反応 (略) 電気泳動 (略)</p> <p>判定 <u>1.2 の B の判定の項による。ただし、陽性の疑いがある場合は、第 4 節 3 により制限酵素による増幅産物確認法を行うように読み替えるものとする。</u></p> <p>注 1~3 (略) (参考) 検出<u>下限</u>及び特異性 (牛検出用プライマー対 [cow52, cow31] を使用した場合) ・検出<u>下限</u></p>	<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略) B 検出<sup>注3</sup></p> <p>DNA の抽出 (略) PCR 反応 (略) 電気泳動 (略)</p> <p>判定 <u>陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合、陽性の疑い有り</u>と判定し、第 4 節 3 により制限酵素による増幅産物確認法を行う。</p> <p><u>陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。</u></p> <p><u>また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。</u></p> <p><u>同様に、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 2 による鶏由来 DNA の検出を、試料が魚粉等 (魚類を含むもの) 又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 3 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。</u></p> <p>注 1~3 (略) (参考) 検出<u>感度</u>及び特異性 (牛検出用プライマー対 [cow52, cow31] を使用した場合) ・検出<u>感度</u></p>

改正後	改正前
<p>配合飼料中の牛由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）</p> <p>なお、肉骨粉の検出の感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>1.4 豚由来 DNA<sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製（略）</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検出<sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出（略）</p> <p>PCR 反応（略）</p> <p>電気泳動（略）</p> <p>判定（略）</p> <p>注 1~5（略）</p> <p>（参考）検出下限及び特異性（豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出下限</li> </ul> <p>配合飼料中の豚由来 DNA：豚肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）</p> <p>なお、肉骨粉の検出の感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>1.5 <u>しか由来 DNA</u> （適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除</p>	<p>配合飼料中の牛由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）</p> <p>なお、肉骨粉の検出感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>1.4 豚由来 DNA<sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製（略）</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検出<sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出（略）</p> <p>PCR 反応（略）</p> <p>電気泳動（略）</p> <p>判定（略）</p> <p>注 1~5（略）</p> <p>（参考）検出感度及び特異性（豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出感度</li> </ul> <p>配合飼料中の豚由来 DNA：豚肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）</p> <p>なお、肉骨粉の検出感度は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性（略）</li> </ul> <p>（新設）</p>

改 正 後	改 正 前
<p>く。))</p> <p><b>A 試薬等の調製</b></p> <p>1) <u>0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。</u></p> <p>2) <u>1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。</u></p> <p>3) <u>ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。</u></p> <p>4) <u>TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。</u></p> <p>5) <u>TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。</u></p> <p>6) <u>TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。</u></p> <p>7) <u>アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。</u></p> <p>8) <u>電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。</u></p> <p>9) <u>ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。</u></p> <p>10) <u>陽性対照 1.1 の A の 10)による。</u></p> <p>11) <u>プライマー溶液 しか検出用プライマー対<sup>注1</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 μmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。</u></p> <p>12) <u>PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。</u></p> <p><b>B 検 出<sup>注2</sup></b></p> <p><u>DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。</u></p> <p><u>PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。</u></p> <p><u>プライマー：しか検出用プライマー対 [deer54, deer33] (増幅産物サイズ 133 bp)</u></p> <p><u>反応温度条件：95 °C (9 min 保持) → [92 °C (30 s 保持) → 55 °C (30 s 保持) → 72 °C (30 s 保持)] (45 サイクル) → 72 °C (5 min 保持)</u></p> <p><u>電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。</u></p> <p><u>判 定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出さ</u></p>	

改正後	改正前
<p><u>れ、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。</u></p> <p><u>陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。</u></p> <p><u>また、試料が豚由来副産物の場合は、第 3 節 2 により豚由来 DNA の検出を行い、豚由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。</u></p> <p><u>同様に、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出を行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。</u></p> <p><u>注 1 しか検出用プライマー対 [deer54, deer33] (北海道システム・サイエンス製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</u></p> <p><u>2 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</u></p> <p><u>(参考) 検出下限及び特異性 (しか検出用プライマー対 [deer54, deer33] を使用した場合)</u></p> <p><u>・検出下限</u></p> <p><u>原料混合肉骨粉中のしか由来 DNA : しか肉粉として 0.05 % 程度 (原物含量%)</u></p> <p><u>なお、肉骨粉の検出の感度は、原料動物の混入比率、製造方法 (加熱処理条件) 及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</u></p>	

改正後	改正前
<p>・特異性  <u>検出することを確認済みの生物種：シカ</u>  <u>検出しないことを確認済みの生物種：ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、クマ、ヒト、クジラ、ニワトリ、ウズラ、アイガモ、サケ、カレイ、アジ、タラ、サバ、サンマ、ニジマス、カツオ、イワシ、マグロ、ケガニ、エビ、イカ、アサリ、トウモロコシ</u></p> <p>2 家きん由来 DNA <sup>注1</sup>  (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検出 <sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p> <p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 (略)</p> <p>判定 <u>陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。</u></p> <p><u>陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。</u></p> <p><u>また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。</u></p>	<p>2 家きん由来 DNA <sup>注1</sup>  (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検出 <sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p> <p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 (略)</p> <p>判定 <u>1.4 の B の判定の項による。</u></p>

改正後	改正前
<p><u>同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、試料が魚粉等（魚類を含むもの）又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 4 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。</u></p> <p>注 1~5 （略）</p> <p>（参考）<u>検出下限</u>及び特異性（鶏検出用プライマー対 [chick5-1, chick3-1] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>検出下限</u> 配合飼料中の家きん由来 DNA：チキンミールとして 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、チキンミールの<u>検出の感度</u>は、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性 （略）</li> </ul> <p>3 魚介類由来 DNA <sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 （略）</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検 出 <sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出 （略）</p> <p>PCR 反応 （略）</p> <p>電気泳動 （略）</p> <p>判 定 <u>陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。</u></p> <p><u>陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行</u></p>	<p>注 1~5 （略）</p> <p>（参考）<u>検出感度</u>及び特異性（鶏検出用プライマー対 [chick5-1, chick3-1] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>検出感度</u> 配合飼料中の家きん由来 DNA：チキンミールとして 0.1~0.01 %（原物含量%） なお、チキンミールの<u>検出感度</u>は、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>・特異性 （略）</li> </ul> <p>3 魚介類由来 DNA <sup>注1</sup> （適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 （略）</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検 出 <sup>注5</sup></p> <p>DNA の抽出 （略）</p> <p>PCR 反応 （略）</p> <p>電気泳動 （略）</p> <p>判 定 <u>1.4 の B の判定の項による。</u></p>



改正後	改正前
<p><u>われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。</u></p> <p><u>また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。</u></p> <p><u>同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。</u></p> <p>注 1~5 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>下限</u>及び特異性 (魚類検出用プライマー対 [FM5, FM3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>検出<u>下限</u> 配合飼料中の魚類由来 DNA : 魚粉として 0.01~0.001 % (原物含量%) なお、魚粉の検出<u>の</u>感度は、原料魚介類の混入比率、製造方法 (加熱処理条件) 及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>特異性 (略)</li> </ul> <p>第 3 節 DNA 抽出確認試験法 (略)</p> <p>1 植物由来 DNA <sup>注 1</sup> (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検 出 <sup>注 5</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p>	<p>注 1~5 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>感度</u>及び特異性 (魚類検出用プライマー対 [FM5, FM3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>検出<u>感度</u> 配合飼料中の魚類由来 DNA : 魚粉として 0.01~0.001 % (原物含量%) なお、魚粉の検出感度は、原料魚介類の混入比率、製造方法 (加熱処理条件) 及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。</li> <li>特異性 (略)</li> </ul> <p>第 3 節 DNA 抽出確認試験法 (略)</p> <p>1 植物由来 DNA <sup>注 1</sup> (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 40px;">B 検 出 <sup>注 5</sup></p> <p>DNA の抽出 (略)</p>

改 正 後	改 正 前
<p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 (略)</p> <p>判 定 (略)</p> <p>注 1~5 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>下限</u>及び特異性 (植物検出用プライマー対 [placon5, placon3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u></li> </ul> <p>配合飼料中の植物由来 DNA : 未確認</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>2~4 (略)</p> <p>第 4 節 増幅産物確認試験法 (略)</p> <p>1 ほ乳動物由来 DNA <sup>注1</sup> (適用範囲 : 油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検 出<sup>注4</sup></p> <p>制限酵素反応 (略)</p> <p>電気泳動 TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。制限酵素反応の終了した試料溶液、陽性対照反応液、陽性対照液 (制限酵素未処理の液) 及び DNA 分子量マーカー各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でプロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p>	<p>PCR 反応 (略)</p> <p>電気泳動 (略)</p> <p>判 定 (略)</p> <p>注 1~5 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>感度</u>及び特異性 (植物検出プライマー対 [placon5, placon3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>感度</u></li> </ul> <p>配合飼料中の植物由来 DNA : 未確認</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>2~4 (略)</p> <p>第 4 節 増幅産物確認試験法 (略)</p> <p>1 ほ乳動物由来 DNA <sup>注1</sup> (適用範囲 : 油脂を除く飼料)</p> <p style="padding-left: 40px;">A 試薬等の調製 (略)</p> <p style="padding-left: 80px;">B 検 出<sup>注4</sup></p> <p>制限酵素反応 (略)</p> <p>電気泳動 TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。制限酵素反応の終了した試料溶液、陽性対照反応液、陽性対照液 (制限酵素未処理の液) 及び DNA 分子量マーカー各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でプロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p>

改正後	改正前
<p>電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、<u>DNA と結合した臭化エチジウムを励起する波長（例：302 nm、312 nm、365 nm 等）の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の制限酵素による消化パターンを確認する。</u></p> <p>判定 (略) 注 1~5 (略)</p>	<p>電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、<u>365 nm 又は 312 nm</u> の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の制限酵素による消化パターンを確認する。</p> <p>判定 (略) 注 1~5 (略)</p>
<p>2・3 (略)</p>	<p>2・3 (略)</p>
<p style="text-align: center;"><b>第 17 章 動物由来たん白質</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>第 17 章 動物由来たん白質</b></p>
<p>第 1 節 (略)</p>	<p>第 1 節 (略)</p>
<p>第 2 節 各条</p>	<p>第 2 節 各条</p>
<p>1 ほ乳動物由来たん白質 (略)</p>	<p>1 ほ乳動物由来たん白質 (略)</p>
<p>1.1 牛由来たん白質</p>	<p>1.1 牛由来たん白質</p>
<p>(1) ELISA による方法 (その 1) <sup>注 1</sup> (適用範囲：動物質性飼料)</p>	<p>(1) ELISA による方法 (その 1) <sup>注 1</sup> (適用範囲：動物質性飼料)</p>
<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略)</p>	<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略)</p>
<p style="text-align: center;">B 検出</p>	<p style="text-align: center;">B 検出</p>
<p>抽出 分析試料 5.0 g を量って 50 mL の遠心チューブに入れ、塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 15 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出した後、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 1.5 mL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とする。</p> <p>なお、本分析においては、分析試料<u>ごと</u>に併行分析を行</p>	<p>抽出 分析試料 5.0 g を量って 50 mL の遠心チューブに入れ、塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 15 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出した後、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 1.5 mL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とする。</p> <p>なお、本分析においては、分析試料<u>毎</u>に併行分析を行</p>

改正後	改正前
<p>う。</p> <p>ELISA 操作 (略)</p> <p>判定 (略)</p> <p>注 1~9 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>検出<u>下限</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>1 %程度</u> (原物含量%) 肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>1 %程度</u> (原物含量%) チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>1 %程度</u> (原物含量%) 感度は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>特異性 (略)</li> </ul> <p>(2) ELISA による方法 (その2) <sup>注1</sup> (適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料。ただし、豚及び鶏に由来するたん白質並びにこれを原料とする飼料<sup>注2</sup>を除く。)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略) B 検 出</p> <p>抽出 (略)</p> <p>ELISA 操作 (略)</p> <p>判定 (略)</p> <p>注 1~8 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p>	<p>う。</p> <p>ELISA 操作 (略)</p> <p>判定 (略)</p> <p>注 1~9 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>検出<u>感度</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>(原物換算) として1%程度</u> 肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>(原物換算) として1%程度</u> チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>(原物換算) として1%程度</u> <u>検出感度</u>は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>特異性 (略)</li> </ul> <p>(2) ELISA による方法 (その2) <sup>注1</sup> (適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料。ただし、豚及び鶏に由来するたん白質並びにこれを原料とする飼料<sup>注2</sup>を除く。)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 (略) B 検 出</p> <p>抽出 (略)</p> <p>ELISA 操作 (略)</p> <p>判定 (略)</p> <p>注 1~8 (略)</p> <p>(参考) 検出<u>感度</u>及び特異性</p>

改 正 後	改 正 前
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>検出下限</u> 配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u> チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u> 感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・ 特異性 （略）</li> </ul> <p>(3) <u>ELISA による方法（その3）</u> <sup>注1</sup> (適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 （略） B 検 出</p> <p>抽 出 （略） ELISA 操作 （略） 判 定 （略） 注 1~9 （略）</p> <p>(参考) <u>検出下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>検出下限</u> 配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u> 豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として <u>0.1 % 程度（原物含量%）</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>検出感度</u> 配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u> チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u> 検出感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・ 特異性 （略）</li> </ul> <p>(3) <u>ELISA による方法（その3）</u> <sup>注1</sup> (適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製 （略） B 検 出</p> <p>抽 出 （略） ELISA 操作 （略） 判 定 （略） 注 1~9 （略）</p> <p>(参考) <u>検出感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>検出感度</u> 配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u> 魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u> 豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉 <u>（原物換算）として 0.1 % 程度</u></li> </ul>

改正後	改正前
<p>感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 特異性 検出することを確認済みの動物種：ウシ、シカ 検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ニワトリ、イノシシ、クマ</li> </ul> <p>1.2 反すう動物由来たん白質<sup>注1</sup> （適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除く。））</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製（略） B 検 出</p> <p>抽 出（略） ELISA 操作（略） 判 定（略） 注 1~9（略）</p> <p>（参考）検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 検出<u>下限</u> 豚由来肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として<u>0.1%程度（原物含量%）</u> チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として<u>0.2%程度（原物含量%）</u></li> </ul> <p>感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 特異性（略）</li> </ul>	<p><u>検出感度</u>は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 特異性 検出することを確認済みの動物種：ウシ 検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ニワトリ</li> </ul> <p>1.2 反すう動物由来たん白質<sup>注1</sup> （適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除く。））</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製（略） B 検 出</p> <p>抽 出（略） ELISA 操作（略） 判 定（略） 注 1~9（略）</p> <p>（参考）<u>検出感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>検出感度</u> 豚由来肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉<u>（原物換算）として0.1%程度</u> チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉<u>（原物換算）として0.2%程度</u></li> </ul> <p><u>検出感度</u>は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 特異性（略）</li> </ul>

改正後	改正前
<p>1.3 豚由来たん白質<sup>注1</sup>            (適用範囲：動物質性飼料)            1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。            注 1~5 (略)            (参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u>                魚粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として <u>1 %程度 (原物含量%)</u>                肉骨粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として <u>1 %程度 (原物含量%)</u>                チキンミール中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として <u>1 %程度 (原物含量%)</u>                感度は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>1.4 <u>しか由来たん白質</u>            (適用範囲：動物質性飼料 (魚介類に由来するものを除く。))  <u>1.1 の(3)による。</u>            (参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u>                原料混合肉骨粉中のしか由来たん白質：しか由来肉粉として <u>0.05 %程度 (原物含量%)</u></li> <li>・特異性  <u>1.1 の(3)を参照のこと。</u></li> </ul>	<p>1.3 豚由来たん白質<sup>注1</sup>            (適用範囲：動物質性飼料)            1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。            注 1~5 (略)            (参考) 検出<u>感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>感度</u>                魚粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉 <u>(原物換算) として 1 %程度</u>                肉骨粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉 <u>(原物換算) として 1 %程度</u>                チキンミール中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉 <u>(原物換算) として 1 %程度</u>  <u>検出感度</u>は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>(新設)</p>

改正後	改正前
<p>2 家きん由来たん白質 (略)</p> <p>(1) ELISA による方法 (その 1) 注<sup>1</sup> (適用範囲：動物質性飼料) 1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。 注 1~5 (略) (参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u> 魚粉中の鶏由来たん白質：チキンミールとして <u>1 %程度 (原物含量%)</u> 肉骨粉中の鶏由来たん白質：チキンミールとして <u>1 %程度 (原物含量%)</u> 感度は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>(2) ELISA による方法 (その 2) 注<sup>1</sup> (略) 注 1 (略) (参考) 検出<u>下限</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>下限</u> 配合飼料中の家きん由来たん白質：チキンミールとして <u>0.1 %程度 (原物含量%)</u> 魚粉中の家きん由来たん白質：チキンミールとして <u>0.1 %程度 (原物含量%)</u></li> </ul>	<p>2 家きん由来たん白質 (略)</p> <p>(1) ELISA による方法 (その 1) 注<sup>1</sup> (適用範囲：動物質性飼料) 1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。 注 1~5 (略) (参考) 検出<u>感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>感度</u> 魚粉中の鶏由来たん白質：チキンミール <u>(原物換算) として 1 %程度</u> 肉骨粉中の鶏由来たん白質：チキンミール <u>(原物換算) として 1 %程度</u> 検出感度は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</li> <li>・特異性 (略)</li> </ul> <p>(2) ELISA による方法 (その 2) 注<sup>1</sup> (略) 注 1 (略) (参考) 検出<u>感度</u>及び特異性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出<u>感度</u> 配合飼料中の家きん由来たん白質：チキンミール <u>(原物換算) として 0.1 %程度</u> 魚粉中の家きん由来たん白質：チキンミール <u>(原物換算) として 0.1 %程度</u></li> </ul>



改正後	改正前
<p>感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p>	<p>検出感度は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。</p>
<p>・特異性（略）</p>	<p>・特異性（略）</p>
<p>第18章~第20章（略）</p>	<p>第18章~第20章（略）</p>
<p>別表1 （略） 二臭化エチレン C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>（CAS：106-93-4） 無色の粘性液体 融点 9.3 °C （削る） ニトロフェン C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>（CAS：1836-75-5） （略）</p>	<p>別表1 （略） 二臭化エチレン C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>（CAS：106-93-4） 無色の粘性液体 融点 9.3 °C <u>p-ニトロアニリン C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（CAS：100-01-6）</u> ニトロフェン C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>（CAS：1836-75-5） （略）</p>
<p>別表2・3（略）</p>	<p>別表2・3（略）</p>