

ISSN 0286-4746

Research Report of Animal Feed

Vol. 32
April 2007

飼料研究報告

第32号

平成19年4月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)

Saitama, Japan

はしがき

『飼料研究報告』は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（旧（独）肥飼料検査所）の飼料検査担当職員らが飼料及び飼料添加物の分析・鑑定技術の改善、検査・試験法の開発等を目指して行った調査・研究内容を毎年とりまとめているものです。今号は、昭和50年度の創刊以来32巻目（（独）農林水産消費安全技術センターとしては最初）の発刊となります。

2001年9月の我が国における牛海綿状脳症（BSE）発生を契機として、従前の我が国の飼料、畜産物を含めた食品安全行政のあり方が問われることとなりました。2003年7月には、食品安全基本法の制定及び飼料安全法をはじめとする食品の安全に関連する法律の改正がなされ、飼料は、「農業生産資材」の一つから「食の一環（フードチェーン）」としての位置づけに変わり、食品と同様の安全性確保が求められるようになりました。

また、2006年5月には、食品衛生法においていわゆるポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、飼料に残留する農薬（60成分）についても法的な基準が定められたところです。

こうしたことを背景に、飼料及び飼料添加物の分析・鑑定においても、ヒューマンエラーの回避、環境の均一化などによる信頼性の確保・向上が求められるとともに、より迅速、低コストで信頼性の高い分析手法や、新たな有害物質などに対する分析法の研究開発が求められてきています。

従前より（独）肥飼料検査所では、飼料中の農薬やかび毒などの有害物質の複数成分の同時定量法、動物性たん白質検出のためのPCR法やELISA法の応用法、遺伝子組換え体飼料の検出法・定量法の開発などに当たって参りました。

本年4月には、（独）農林水産消費技術センター及び（独）農薬検査所と統合し、文字どおり“農場から食卓まで”のフードチェーン全体を通じて食の安全と消費者の信頼の確保を技術的側面から担う新組織となったところであり、今後は新組織の下より一層の信頼性確保・分析法開発取り組んでまいります。

今回とりまとめた研究成果には、今後、公定法として農林水産省より通知されている「飼料分析基準」の改正、更にはその解説書である『飼料分析法・解説』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際、それぞれ追加収載されるものも少なくないものと考えております。

本研究報告が、飼料及び飼料添加物の品質と安全性の確保の一助となりますよう、関係各位には引き続き御指導、御鞭撻頂きますようお願い申し上げます。

平成19年4月

理事長 山口 勇

目 次

1 粗脂肪の酸分解ジエチルエーテル抽出法の改良 堀米明日香	1
2 飼料中のカドミウムの定量法の簡素化 平岡久明, 森 有希子	4
3 飼料中の HT-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 石橋隆幸, 吉村正寿, 牧野大作	13
4 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 野崎友春, 山多利秋	23
5 飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 堀米明日香, 野崎友春	30
6 飼料中のトリシクラゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法 野崎友春, 山多利秋	45
7 キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計 (ピリジン・ピラゾロン法) による定量法 甲斐茂浩, 白澤優子	54
8 豚用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良 大島慎司, 篠田直樹, 橋本仁康, 千原哲夫	61
9 飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度の吸光光度法による測定 八木寿治, 大島慎司, 堀米明日香, 福本裕二, 石黒瑛一, 岩永知子, 末次暁子, 小泉慶子, 五十嵐友二, 淵上賢一	70

技術レポート

1	ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナの検討 千原哲夫, 橋本仁康, 進藤富枝	81
2	イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のアフラトキシンの定量 青山幸二, 渡部千会	90
3	イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のオクラトキシシ A の定量 青山幸二, 渡部千会	95
4	イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のゼアラレノン類の定量 青山幸二, 渡部千会	99
5	鉛の分析法の標準添加回収率及び定量下限等の確認 森 有希子	104
6	無機ヒ素の分析法の定量下限及び検出下限の確認 八木寿治	106
7	共通試料による飼料中の農薬の一斉分析法の共同試験 野崎友春	108
8	飼料中のカルタップ, チオシクラム及びベンスルタップの液体クロマトグラフ質 量分析計による定量法の添加回収試験 牧野大作, 吉村正寿	140
9	共通試料による飼料中のカルタップの共同試験 山多利秋	144
10	飼料中のトラロメトリンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の添加回 収試験 屋方光則	147
11	共通試料による飼料中のトラロメトリンの共同試験 山多利秋	149
12	ベンタゾンの分析法の定量下限及び検出下限の確認 青山恵介, 松崎美由起	152
13	稲ワラからのゲノム DNA 抽出法の検討 橋本仁康, 会田紀雄	154

精度管理

- 1 平成 18 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
堀米明日香, 白澤優子, 森 有希子, 出納小枝,
林 美紀子, 永原貴子, 小野雄造 161

調査資料

- 1 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレム B のモニタリング等の結果について (平成 18 年度)
山多利秋 190
- 2 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 18 年度)
千原哲夫 193
- 3 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果 (平成 17 年度)
草間豊子 203

他誌掲載論文

- 1 PCR法を用いた飼料中の魚由来DNAの検出法の検討
(食品衛生学雑誌第47巻第5号より転載)
野村哲也, 草間豊子, 門脇光一 219

引用文献

- 1 「平成十八年度 飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発」より転載
財団法人日本食品分析センター 225

CONTENTS

1	Improvement of Hydrolysis and Ether extraction Method to determine Crude Fat in Feed Asuka HORIGOME	1
2	Simplification of Determination of Cadmium in Feed Hisaaki HIRAOKA and Yukiko MORI	4
3	Determination of HT-2 toxin in Feed by LC-MS Takayuki ISHIBASHI, Masatoshi YOSHIMURA and Daisaku MAKINO	13
4	Determination of Imidacloprid in Feed by LC-MS Tomoharu NOZAKI and Toshiaki YAMATA	23
5	Determination of Carbendazim, Thiophanate, Thiophanate-methyl and Benomyl in Feed by LC-MS Asuka HORIGOME and Tomoharu NOZAKI	30
6	Determination of Tricyclazole in Feed by GC-MS Tomoharu NOZAKI and Toshiaki YAMATA	45
7	Determination of Hydrogen cyanide in Cassava by Absorptiometric Analysis Shigehiro KAI and Yuko SHIRASAWA	54
8	Improved Determination of Avilamycin in Formula Feed for Swine by Microbiological Assay Shinji OSHIMA, Naoki SHINODA, Yoshiyasu HASHIMOTO and Tetsuo CHIHARA	61
9	Measurement of Degree of Starch Gelatinization in Flaked Corn for Feeds by Absorption Spectroscopy Toshiharu YAGI, Shinji OSHIMA, Asuka HORIGOME, Yuji FUKUMOTO, Eiichi ISHIKURO, Tomoko IWANAGA, Akiko SUETSUGU, Keiko KOIZUMI, Yuji IGARASHI and Kenichi FUCHIGAMI	70
	§ Technical report	81
	§ Proficiency test	161
	§ Investigative report	190
	§ Copy of other society report etc.	219

1 粗脂肪の酸分解ジエチルエーテル抽出法の改良

堀米 明日香*

Improvement of Hydrolysis and Ether extraction Method to determine Crude Fat in Feed

Asuka HORIGOME*

(* I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters
(Now the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

The former hydrolysis and ether extraction method to determine crude fat had a problem that the quantitative value was higher than designed value because of water-soluble contents. To solve this problem, an addition of a procedure for washing diethyl ether layer by water was examined. The quantitative value by an improved method was 99 to 110% compared to designed value.

Key words: 粗脂肪 crude fat ; 酸分解ジエチルエーテル抽出法 hydrolysis and ether extraction method ; エキスパンド飼料 expanded feed ; 粉末油脂 powdered fat ; 脂肪酸カルシウム calcium soaps of fatty acid ; エーテル抽出 ether extraction ; 飼料 feed

1 緒 言

飼料分析基準¹⁾における飼料中の粗脂肪の定量法にはジエチルエーテル抽出法及び酸分解ジエチルエーテル抽出法があり、脂肪酸カルシウム等加水分解しないと十分に脂肪が抽出されないものについては酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用されている。先に筆者らが酸分解ジエチルエーテル抽出法の適用範囲拡大の検討²⁾を行った中で、現在の酸分解ジエチルエーテル抽出法では粗脂肪設計値（飼料メーカーが配合飼料の配合割合を設計する際に算出する値。実際に含まれる粗脂肪の量にほぼ相当する。以下「設計値」という。）に対して高めの定量値が出ることが明らかになった。

主な原因としてジエチルエーテル層に粗脂肪以外の水溶性物質が含まれることが考えられたので、食品中の脂質の分析法³⁾及び鈴木らの報告⁴⁾を参考にジエチルエーテル層を水洗いする操作を加えた改良法を検討した。

2 実験方法

2.1 試 料

酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用されているエキスパンド状の飼料、粉末状油脂を原料とするほ乳期子豚育成用配合飼料及び脂肪酸カルシウムを原料とする乳用牛飼育用配合飼料を1 mmの網ふるいを通過するまで粉碎し供試試料とした。

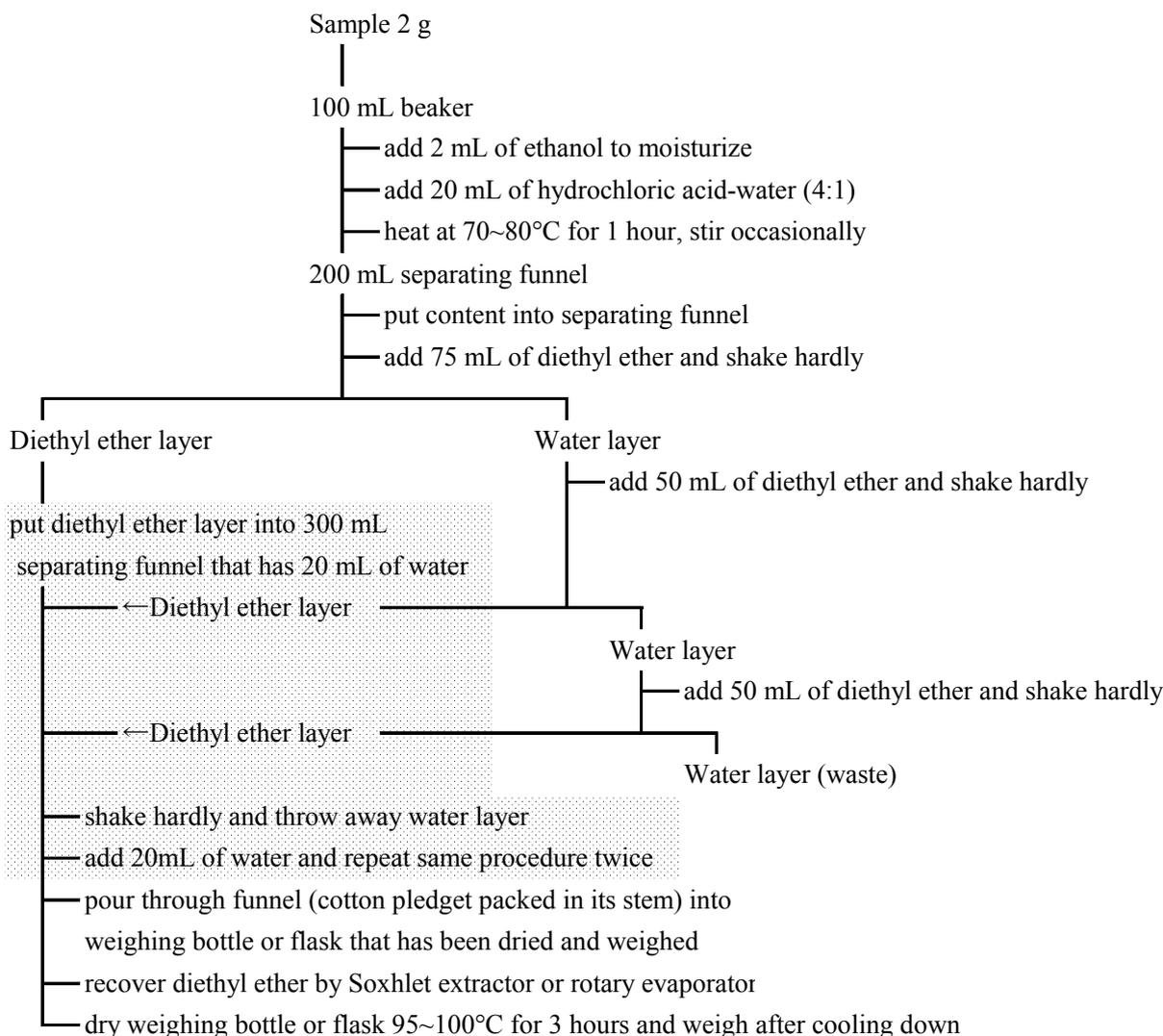
2.2 定量方法

飼料分析基準 3.3.2 酸分解ジエチルエーテル抽出法（以下「従来法」という。）に、ジエチル

* 独立行政法人肥飼料検査所本部，現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

エーテル層をろ過する前に水 20 mL でジエチルエーテル層を 3 回水洗いし、脱水ろ過する操作を加えた（以下「改良法」という.）.

参考のため改良法のフローシートを Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure

(Dotted area stands for the modification made by this method.)

3 結果及び考察

改良法による定量結果を Table 1 に示す. 参考のため、昨年検討時の従来法による定量結果も併記した. 従来法の対設計値は 114%~136% (平均 125%) だったのに対して、改良法では対設計値が 99%~110% (平均 106%) となった. ジエチルエーテル層を水で洗い脱水ろ過することによって水溶性物質が除去されていると考えられた. また、室内繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として従来法は 2.0%以下、改良法では 2.7%以下であった.

Table 1 Quantitative value of improved method and former method

Sample number	Designed value	Improved method			Former method		
		Crude fat (%)	Crude fat/ designed value (%)	RSD _r (%)	Crude fat (%)	Crude fat/ designed value (%)	RSD _r (%)
1 ^{a)}	5.6	6.0	107	2.3	7.6	136	1.1
2 ^{a)}	5.3	5.7	107	1.9	6.6	124	1.9
3 ^{b)}	7.2	7.8	108	2.6	8.8	122	1.6
4 ^{b)}	6.7	7.0	104	1.5	8.3	125	1.7
5 ^{c)}	7.3	8.0	110	2.7	9.3	128	2.0
6 ^{c)}	15.9	15.8	99.4	1.0	18.1	114	1.1

a) Expanded feed

b) Formula feed for suckling pig that contain powdered fat

c) Formula feed for dairy cattle that contain calcium soaps of fatty acid

4 まとめ

従来の酸分解ジエチルエーテル抽出法に、ジエチルエーテル層を水で洗う操作を加えた改良法を検討したところ、より設計値に近い定量値が得られた。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 2) 堀米明日香，八木寿治，石黒瑛一：飼料研究報告，31，1 (2006).
- 3) (財) 日本食品分析センター編集：五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説，46 (2004).
- 4) 鈴木 章，石黒瑛一：飼料研究報告，14，90 (1989).

2 飼料中のカドミウムの定量法の簡素化

平岡 久明*, 森 有希子*

Simplification of Determination of Cadmium in Feed

Hisaaki HIRAOKA* and Yukiko MORI*

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

An analytical method for determination of cadmium content in feed was simplified. Samples were ashed under 500°C and the ash was boiled with hydrochloric acid. Cadmium content was determined by an atomic absorption spectrophotometer.

A recovery test was conducted with 2 kinds of formula feed, chicken meal, feather meal and fish meal spiked with 0.50 and 1.0 mg/kg of cadmium. The mean recoveries of cadmium were 100.7~111.3%, and relative standard deviations (RSD) were within 8.3%.

A collaborative study was conducted with formula feed spiked with 0.5 mg/kg of cadmium and fish meal in 6 laboratories. The mean recovery of cadmium in formula feed was 107.2%, and repeatability and reproducibility as relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 2.7% and 2.0% respectively. For fish meal, the mean value was 0.530 mg/kg, and RSD_r and RSD_R were 2.7% and 4.9% respectively.

Key words: カドミウム cadmium ; 原子吸光光度法 atomic absorption spectrophotometry ; 配合飼料 formula feed ; 共同試験 collaborative study ; D_2 補正 D_2 correction ; 偏光ゼーマン補正 polarization Zeeman correction

1 緒 言

カドミウムは亜鉛鉱石中に存在し、自然界に広く分布している物質である。カドミウムによる中毒には、富山県神通川流域で発生したイタイイタイ病が知られ、骨粗しょう症を伴う骨軟化症と判定されている¹⁾。

カドミウムの分析法は、飼料分析基準²⁾に昭和52年12月28日付け52畜B第3178号により収載された。この分析法は、試料を乾式灰化後、湿式分解を行い、カドミウムをリン酸酸性下でヨウ化物とし、4-メチル-2-ペンタノン (MIBK) で抽出した溶液についてフレイム法の原子吸光光度計を用いて定量する方法である。当該分析法におけるMIBKの使用目的は試料溶液の濃縮効果及び塩類の除去であるが、原子吸光光度計の性能が向上している現在、MIBKによる抽出操作を省略しても十分な感度が得られ、かつ塩類の妨害が補正できると考えられる。

そのため、今回、MIBK抽出を省略し、バックグラウンド補正機能付き原子吸光光度計を用いた飼料中のカドミウムの定量法を検討した。また、原子吸光光度計の2種類の補正方法 (D_2 ランプ及び偏光ゼーマン分裂によるバックグラウンド補正 (以下それぞれ「 D_2 補正」及び「偏光ゼーマン補正」という。)) についても比較検討を実施したので、その概要を報告する。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料（チキンミール，フェザーミール及び魚粉）及び配合飼料を 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し，供試試料とした。

2.2 試薬

- 1) カドミウム標準液　カドミウム [Cd] 0.1 g を正確に量って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，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てカドミウム標準原液を調製した（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，標準原液の一定量を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し，1 mL 中に 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2 及び 0.4 μg を含有する数点のカドミウム標準液を調製した。

- 2) 硝酸，塩酸は有害金属測定用のものを用いた．それ以外の試薬は特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 原子吸光光度計：島津製作所製 AA-6400F 型 (D_2 補正)
- 2) 原子吸光光度計：日立ハイテクノロジーズ製 Z-5010 型 (偏光ゼーマン補正)
- 3) マッフル炉：アドバンテック社製 FUL230FA

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 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 のマッフル炉で加熱して灰化した．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した．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，試料溶液とした．

同時に，試料を用いないで同一操作を行い，空試験溶液を調製した．

2) 原子吸光光度計による測定

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 の吸光度を測定した．空試験溶液について，同様に吸光度を測定し，結果を補正した．

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した．

3 結果及び考察

3.1 検量線の検討

2.2 で調製したカドミウム標準液について，2 種類 (D_2 補正及び偏光ゼーマン補正) の原子吸光光度計を用いて波長 228.8 nm の吸光度を測定し，検量線を作成した．

その結果，いずれの方式においても検量線は 0.01 から 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で直線性を示した．

3.2 飼料中の無機塩類濃度の把握

カドミウムの測定を行う波長域は無機塩類が大きなバックグラウンド吸収を示すことが知られている³⁾．カドミウムの定量を妨害すると考えられる塩類が飼料中にどれぐらい含まれているか飼料分析基準に従って調べた．配合飼料中に多く添加または含有しているナトリウム，カルシウム，カリウム及びマグネシウムの 4 種類を選び，現在市販されている動物質性飼料，穀類，乾牧

草及び 16 種類の配合飼料を用いて、各含有量を測定した。その結果は Table 1 のとおりで、穀類では塩濃度が低かったが、魚粉及びチキンミールでは 5%以上含まれるものもあった。配合飼料について、ナトリウム、カルシウム、カリウム及びマグネシウムを合計した塩濃度の範囲は 1.04~2.79%であった。

Table 1 Concentration of mineral salts in samples

Kind of feed	(%)			
	Na	Ca	K	Mg
Animal by products				
Fish meal	1.23	5.61	0.59	0.20
	1.04	4.47	0.76	0.14
Chicken meal	0.58	5.52	0.67	0.14
	0.44	6.16	0.67	0.12
Feather meal	0.29	0.52	0.19	0.04
Grains				
Wheat	0	0	0.02	0.09
Rye	0.01	0	0.02	0.06
Milo	0	0	0.02	0.08
Corn	0	0	0.32	0.07
Feed crop				
Alfalfa	0.11	1.54	2.71	0.41
Timothy	0.05	0.56	1.42	0.17
Formula feed	0.08~0.30	0.23~1.11	0.63~1.07	0.10~0.31
(n=16)	(0.19) ^{a)}	(0.67)	(0.84)	(0.17)

a) Mean value (n=16)

3.3 陽イオンがカドミウムの測定に及ぼす影響

各試料が含有する無機塩類についてカドミウムの測定に影響するか検討を行った。ナトリウム、カルシウム、カリウム及びマグネシウムの塩化物を用いて、各陽イオン濃度が 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5%となるように塩酸 (0.1 mol/L) 溶液を調製し、2.4 の定量方法の条件で原子吸光光度計に供した。その結果は Table 2 のとおりで、各陽イオンのうちカドミウム量として定量されたのはカルシウムのみであった。従って、カドミウムの測定に干渉を及ぼす塩類はカルシウム塩であると考えられた。

Table 2 Pseudo concentration of cadmium at various concentrations of various mineral salts (Polarized Zeeman correction)

Concentration (%)	(μg/mL as Cd)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Na	0	0	0	0	0
Ca	0.0005	0.0025	0.0046	0.0070	0.0090
K	0	0	0	0	0
Mg	0	0	0	0	0

次に、カドミウムの濃度別にカルシウム干渉の影響について調べた。0.01 から 1 μg/mL の濃度の各カドミウム標準液に 0.5%相当量のカルシウムを添加して、D₂補正及び偏光ゼーマン補正の2機種のアトミ吸光光度計に供した。その結果は Table 3 のとおりであった。

Table 3 Effect of calcium on determination of cadmium

		[Absorbance, (μg/mL as Cd)]					
		D ₂ correction			Polarized Zeeman correction		
		Concentration of calcium ion (%)			Concentration of calcium ion (%)		
		Not added	0.5		Not added	0.5	
Concentration of cadmium (μg/mL)	0	0.0000	0.0046	(0.02)	0.0000	0.0019	(0.00)
	0.01	0.0025	0.0076	(0.03)	0.0021	0.0039	(0.02)
	0.04	0.0080	0.0112	(0.05)	0.0078	0.0101	(0.05)
	0.1	0.0226	0.0224	(0.11)	0.0199	0.0224	(0.11)
	0.4	0.0745	0.0757	(0.41)	0.0803	0.0809	(0.42)
	1	0.1821	0.1776	(0.97)	0.1886	0.1864	(0.97)

いずれの補正方法ともカドミウムの低濃度域 (0.1 μg/mL 未満) では、カルシウム無添加の溶液と比べてカルシウムを添加した溶液の方が吸光値は高めに測定され、D₂補正の方がその影響は大きかった。カドミウムの高濃度域 (0.1 μg/mL 以上) では、添加、無添加溶液ともに吸光値は変わりなかった。以上より、カドミウムの低濃度域 (0.1 μg/mL 未満) ではカルシウムの干渉を受けるが、高濃度域 (0.1 μg/mL 以上) ではほとんど影響を受けないことがわかった。

次に、カルシウム干渉を受けたカドミウムの低濃度域において、上記の検討に使用した溶液を MIBK 抽出し、その溶液を D₂補正及び偏光ゼーマン補正の2機種のアトミ吸光光度計を用いて測定した。その結果は Table 4 のとおりで、両補正とも同程度にカルシウム無添加の溶液と比べてカルシウムを添加した溶液の方がカドミウム濃度として高めに定量された。よって、カルシウムの影響は若干ではあるが MIBK 抽出液にも移行していることが考えられた。

Table 4 Effect of calcium on determination of cadmium by MIBK extraction

		[Absorbance, (μg/mL as Cd)]					
		D ₂ correction			Polarized Zeeman correction		
		Concentration of calcium ion (%)			Concentration of calcium ion (%)		
		Not added	0.5		Not added	0.5	
Concentration of cadmium (μg/mL)	0	0.0018	0.0247	(0.02)	0.0092	0.0258	(0.02)
	0.01	0.0101	0.0360	(0.03)	0.0204	0.0372	(0.03)
	0.02	0.0295	0.0471	(0.04)	0.0314	0.0487	(0.04)
	0.04	0.0513	0.0684	(0.06)	0.0470	0.0700	(0.06)
	0.06	0.0698	0.0913	(0.08)	0.0726	0.0926	(0.08)
	0.08	0.0951	0.1093	(0.09)	0.0972	0.1127	(0.10)
	0.1	0.1129	0.1267	(0.11)	0.1171	0.1328	(0.11)

3.4 添加回収試験

本法による回収率及び分析精度の確認のため、添加回収試験 ($n=3$) を行った。

添加回収試験は、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、チキンミール、フェザーミール及び魚粉にそれぞれ 0.50 mg/kg 及び 1.0 mg/kg 相当量のカドミウムを添加し、2.4 に従って操作を行った。その結果は Table 5 及び Table 6 のとおり、D₂ 補正では平均回収率は 101.3~111.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.3%以下であり、偏光ゼーマン補正では平均回収率は 100.7~104.0%、その繰返し精度は RSD として 5.8%以下であった。

また、本操作で得られた試料溶液を用いて MIBK 法も行った。その結果は Table 7 及び Table 8 のとおり、D₂ 補正では平均回収率は 121.0~131.3%、その繰返し精度は RSD として 9.4%以下であり、偏光ゼーマン補正では平均回収率は 108.7~119.3%、その繰返し精度は RSD として 17%以下であった。以上より、D₂ 補正及び偏光ゼーマン補正の両方法とも、本法は MIBK 抽出による飼料分析基準と同等の結果が得られた。

Table 5 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed (D₂ correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal	(%)
0.50	106.7 ^{a)} (1.1) ^{b)}	110.0 (8.3)	108.7 (4.6)	111.3 (5.5)	108.0 (4.9)	
1.0	105.7 (5.8)	107.7 (6.2)	107.7 (6.0)	106.7 (6.9)	101.3 (4.0)	

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed (Zeeman correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	101.3 ^{a)} (3.0) ^{b)}	101.3 (2.3)	101.3 (1.1)	103.3 (1.1)	104.0 (5.8)
1.0	102.0 (1.0)	101.7 (1.5)	101.0 (3.0)	102.7 (1.1)	100.7 (2.1)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed by MIBK extraction (D₂ correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	127.3 ^{a)} (4.8) ^{b)}	129.3 (7.3)	130.0 (9.4)	122.0 (4.3)	131.3 (2.3)
1.0	131.3 (4.5)	129.7 (5.0)	129.3 (2.9)	123.3 (0.90)	121.0 (3.3)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 8 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed by MIBK extraction (Zeeman correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	116.7 ^{a)} (12) ^{b)}	118.0 (13)	118.7 (15)	114.7 (14)	118.7 (16)
1.0	119.3 (17)	115.3 (16)	116.0 (15)	114.0 (14)	108.7 (17)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

なお、カルシウム濃度が5%程度のチキンミール及びカルシウム濃度が1%程度の配合飼料の定量値を比較したところ、本法及びMIBK法のいずれにおいてもカルシウム濃度の違いによるカドミウムの定量値に対する影響は見られなかった。よって、試料中ではカドミウムの低濃度域でもカルシウムの影響は認められなかった。

魚粉は、いずれの無添加区においても0.49~0.58 mg/kgの定量値が得られ、これはカドミウムの自然汚染による値と考えられた。

魚粉以外の試料では、D₂補正及び偏光ゼーマン補正ともMIBK法の無添加区の定量値が0から0.02 mg/kgであるのに対して、本法では0.01から0.07 mg/kgと高い値が得られた。これはMIBK溶液が本法の試料溶液と比べてバックグラウンドが高く (Table 3 及び 4) , 小さな値を検知しなかったことが考えられた。

3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、カドミウムの標準液と試薬ブランク (10点繰返し) を原子吸光光度計に供して吸光度の比からSN比を算出した。その結果、0.01 µg/mLの標準液のSN比はD₂補正で19, 偏光ゼーマン補正で15であり、両補正ともに10を超えていた。0.01

$\mu\text{g/mL}$ の標準液は本法では 0.1 mg/kg に相当するため、本法の定量下限は 0.1 mg/kg 程度と考えられた。また、検出下限は SN 比が 3 程度となる濃度として 0.03 mg/kg 程度と考えられた。

参考のため、鶏用配合飼料及び魚粉にカドミウムの濃度がそれぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.1 mg/kg となるように添加し、2.4 に従って 3 回併行分析を行った。その結果、カドミウム濃度が 0.1 mg/kg の場合、平均回収率は $98.0\sim 112.0\%$ 、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 16% 以下であった。濃度が 0.05 mg/kg の場合、平均回収率は $96.7\sim 123.3\%$ 、その繰返し精度は RSD として 26% 以下であった。

飼料中のカドミウムの指導基準⁴⁾は、配合飼料、乾牧草等で 1.0 mg/kg 、魚粉等で 2.5 mg/kg であり、本法の定量下限は基準値の $1/10$ 以下であった。

3.6 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

乳牛用配合飼料にカドミウムとして 0.50 mg/kg 相当量を添加した試料及び自然汚染された魚粉を用いて、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）（6 試験室）において、本法に従って共同試験を実施した。

その結果、Table 9 のとおり、魚粉の平均定量値は 0.486 mg/kg 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 2.7% 及び 4.9% であり、HorRat は 0.35 であった。また、乳牛用配合飼料の添加試料の平均回収率は 107.2% 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 2.7% 及び 2.0% であり、HorRat は 0.12 であった。

一方、現行の飼料分析基準である MIBK 法を用いて行った共同試験の結果を Table 10 に示した。魚粉の平均定量値は 0.530 mg/kg 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 4.8% 及び 13% であり、HorRat は 0.46 であった。また、乳牛用配合飼料の添加試料の平均回収率は 116.6% 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 1.4% 及び 6.5% であり、HorRat は 0.37 であった。いずれの場合も HorRat が 0.5 を下回っていたが、この原因として、各試験室が本分析法に熟練していたことが考えられた。

なお、参考のため、各試験室で使用した原子吸光光度計の機種及び補正方法を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study results

Laboratory	(mg/kg)			
	Fish meal		Formula feed for dairy cattle	
1	0.529	0.509	0.511	0.554
2	0.493	0.505	0.529	0.553
3	0.510	0.480	0.530	0.540
4	0.442	0.465	0.530	0.535
5	0.450	0.444	0.535	0.537
6	0.503	0.506	0.540	0.541
Mean value	0.486		0.536	
Recovery (%)	---		107.2	
RSD _T (%) ^{a)}	2.7		2.7	
RSD _R (%) ^{b)}	4.9		2.0	
HorRat	0.35		0.12	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

Table 10 Collaborative study results (MIBK extraction method)

Laboratory	(mg/kg)			
	Fish meal		Formula feed for dairy cattle	
1	0.523	0.522	0.579	0.603
2	0.476	0.498	0.557	0.559
3	0.630	0.560	0.530	0.540
4	0.487	0.511	0.578	0.578
5	0.541	0.502	0.640	0.650
6	0.545	0.560	0.590	0.591
Mean value	0.530		0.583	
Recovery (%)	---		116.6	
RSD _T (%) ^{a)}	4.8		1.4	
RSD _R (%) ^{b)}	13		6.5	
HorRat	0.46		0.37	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

Table 11 Instruments used by collaborators

Laboratory	Background correction	
	Atomic absorption spectrophotometer	
1	SHIMADZU AA-6800	D ₂ correction
2	Thermo SOLAAR969AA	D ₂ correction
3	HITACHI Z-5010	Polarized Zeeman correction
4	HITACHI Z-5310	Polarized Zeeman correction
5	Thermo SOLAAR969AA	D ₂ correction
6	Thermo SOLAAR969AA	D ₂ correction

4 まとめ

飼料中のカドミウムの定量法として、MIBK 抽出操作を省略する簡易法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) D₂ 補正及び偏光ゼーマン補正の両方法とも検量線は、カドミウム濃度 0.01 から 0.4 µg/mL の範囲で直線性を示した。
- 2) カドミウムの低濃度域 (0.1 µg/mL 未満) ではカルシウムの干渉を受けたが、高濃度域 (0.1 µg/mL 以上) では影響が低かった。また、配合飼料等の試料溶液では、カドミウムの低濃度域であっても定量は可能であった。
- 3) 本法による添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 100.7~111.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.3%以下であった。
- 4) 本法の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg と考えられた。

なお、本法は平成 18 年 3 月 24 日付けで飼料分析基準に収載された⁵⁾。本法は MIBK 抽出法と比較して、試料 6 点、標準液 5 点で分析した場合、時間にして 2, 3 時間、コストにして約 1,000 円の削減が可能となる。

文 献

- 1) 薬事・食品衛生審議会食品分科会毒性部会：“カドミウムの毒性評価に当たっての検討事項について”，平成 15 年 6 月，参考資料 4 4-1 一般的事項 (2003)。
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995)。
- 3) 社団法人 日本環境測定分析協会 編：“分析実務者のための新明解環境分析技術手法”，34 (2001)，しらかば出版。
- 4) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 3 月 24 日，17 消安第 12543 号 (2006)。

3 飼料中の HT-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

石橋 隆幸*, 吉村 正寿*, 牧野 大作*

Determination of HT-2 toxin in Feed by LC-MS

Takayuki ISHIBASHI*, Masatoshi YOSHIMURA* and Daisaku MAKINO*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office)

An analytical method for determination of HT-2 toxin in feed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) was developed.

HT-2 toxin was extracted with acetonitrile-water (21+4). The extract was purified with a MultiSep 227 Trich+ and analyzed by LC-MS. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d.×250 mm, 5 µm) using gradient with 10 mmol/L ammonium acetate-methanol as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode using $[M+CH_3COO]^-$ ion at m/z 483.

The mean recoveries of HT-2 toxin from 2 kinds of grain and 2 kinds of formula feed spiked at 15, 20 and 200 µg/kg ranged from 98.0 to 113.3%, and the relative standard deviations (RSD) were within 8.7%.

A collaborative study was conducted with formula feed and barley spiked with HT-2 toxin at 200 µg/kg in 7 laboratories. The mean recovery of HT-2 toxin in formula feed was 106%, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 2.9% and 8.5% respectively, as for barley these were 104%, 2.6% and 9.6% respectively.

Key words: かび毒 mycotoxin ; HT-2 トキシシン HT-2 toxin ; 飼料 feed ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 大気圧光イオン化法 atmospheric pressure photo ionization (APPI) ; 大気圧化学イオン化法 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

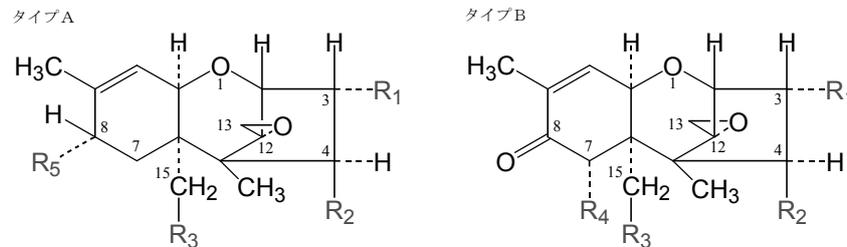
HT-2 トキシシンは *F. acuminatum* 等から産生されるトリコテセン系マイコトキシシン (かび毒) で、その構造から T-2 トキシシンと同じタイプ A に属す (Fig.1 参照) . HT-2 トキシシンを含めトリコテセン系マイコトキシシンは、嘔吐作用、タンパク合成阻害作用等を有しており、デオキシニバレノール (DON) , ニバレノール (NIV) , T-2 トキシシン, HT-2 トキシシン, ジアセトキシシルペノール等の汚染報告が多い^{1)~3)}.

現在、HT-2 トキシシンについてはカナダで規制値が設定されており、その値は飼料中で 100 µg/kg である⁴⁾. また、2001 年に開催された FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) の第 56 回特別部会において検討されたマイコトキシシンのリスク評価にて、T-2 トキシシンと HT-2 トキシシンの含量で 60 ng/kg 体重/日が暫定 1 日耐容摂取量として設定された⁵⁾.

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

飼料分析基準⁶⁾には、T-2 トキシンの定量法として液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾及びガスクロマトグラフ法⁸⁾が収載されているが、HT-2 トキシンの定量法は収載されておらず、これらを踏まえ飼料中の HT-2 トキシンの定量法を確立することが急務となった。

そこで筆者らは、T-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾を基に、多機能カラムを用いた液体クロマトグラフ質量分析計による定量法を検討したところ、良好な成績が得られたので報告する。



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Molecular formula	MW	CAS
Type A	T-2 toxin	OH	OAc	OAc	---	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466.5	21259-20-1
	HT-2 toxin	OH	OH	OAc	---	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424.5	26934-87-2
Type B	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	---	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.3	51481-10-8
	3-Acetyldeoxynivalenol	OAc	H	OH	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.4	50722-38-8
	15-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OAc	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.4	88337-96-6
	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	---	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312.3	23282-20-4
	Fusarenone-X	OH	OAc	OH	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354.4	23255-69-8

Fig. 1 Structure of HT-2 toxin and other trichothecenes

2 実験方法

2.1 試料

市販の配合飼料及び飼料原料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Example of component of formula feed

Kind of formula feed	Classification of ingredient	Ratio (%)	Ingredient
Formula feed for layer	Grains	59	Corn
	Oil meals	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	14	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives
Formula feed for beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meals	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

2.2 試 薬

1) HT-2 トキシシン標準液

HT-2 トキシシン標準品 (Sigma Chemical 製) 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色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た (この液 1 mL は、HT-2 トキシシンとして 0.2 mg を含有する)。更にこの液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に 25 µg を含有する HT-2 トキシシン標準原液を調製した。なお、標準原液は冷凍庫 (-20°C) で保存した。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に希釈して、1 mL 中に HT-2 トキシシンとして 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1 µg を含有する各 HT-2 トキシシン標準液を調製した。

2) メタノール、アセトニトリル及び蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた。その他、特記している以外の試薬は試薬特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Agilent 製 Agilent 1100 Series 及び島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：Agilent 製 Agilent 1100 Series MSD SL 及び島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2 及び
宮本理研工業製 理研式小型シェーカーMW-DR 型
- 4) 遠心分離器：久保田商事製 5200 及び KS-3000P
- 5) 高速遠心分離器：久保田商事製 KM-15200 及び日立製作所製 SCT15B
- 6) 遠心エバポレーター：東京理化学製 CVE-3100 型
- 7) ロータリーエバポレーター：東京理化学機械製 N-1N 型
- 8) 多機能カラム：Romer Labs 製 MultiSep 227 Trich+

2.4 定量方法

1) 抽 出

分析試料 25 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g (2,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨てた。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液の 3 mL を受けた。流出液 2 mL を正確に 50 mL のなす型フラスコに入れ、50°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液の一部をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各 HT-2 トキシシン標準液 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、SIM クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより試料中の HT-2 トキシシン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ (以下「LC」という。) 及び質量分析計 (以下「MS」という。) の測定条件を Table 2, 3 及び 4 に示した。

- Sample 25 g
- add 100 mL of acetonitrile-water (21:4)
 - shake for 60 min
 - centrifuge for 5 min at 1,000×g (2,000 rpm)
- Column (MultiSep 227 Trich+)
- apply supernatant
 - drain the fraction of 0~3 mL
 - collect the fraction of 3~6 mL
- Sample solution 2 mL
- evaporate to dryness
 - dissolve in 1 mL of water-methanol-acetonitrile (18:1:1)
 - centrifuge for 5min at 5,000×g (10,000 rpm)
- LC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for HT-2 toxin in feed

Table 2 Operating conditions for LC

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	10 mmol/L Ammonium acetate-methanol (4:1)→15 min→methanol (5 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40°C
Injection volume	5 μL

Table 3 Operating conditions for MS (Agilent, Agilent 1100 Series MSD SL)

Ionization	Atmospheric pressure photo ionization (APPI)
Mode	Negative
Fragmentor	100 V
Nebulizer	N ₂ (55 psi)
Drying gas	N ₂ (7.0 L/min, 350°C)
Vaporizer	300°C
V cap	1,500 V
Monitor ion	<i>m/z</i> 483

Table 4 Operating conditions for MS (Shimadzu, LC-MS2010EV)

Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Interface Temp.	400°C
Heat block temp.	200°C
CDL temp.	200°C
Monitor ion	<i>m/z</i> 483

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

飼料分析基準に記載されている T-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾のイオン化法は、測定条件例として大気圧光イオン化法 (APPI) 及び大気圧化学イオン化法 (APCI) が記載されている。

そこでイオン化法について、2 種類の液体クロマトグラフ質量分析計 (Agilent 製 1100 Series MSD SL 及び島津製作所製 LCMS-2010EV) にて検討を行った。

その結果、Agilent 製 1100 Series MSD SL においては ESI より APPI、島津製作所製 LCMS-2010EV においては ESI 及び APPI より APCI を用いた場合、他のイオン化法より高感度な測定を行うことができた。

このことから、使用する機種によって最も感度良く測定できるイオン化法を選択することとした。

また、HT-2 トキシンのマススペクトルは Fig. 2 のとおりであり、モニターイオンとして最も感度のよい m/z 483 (HT-2 トキシンの酢酸付加イオン $[M+CH_3COO]^-$) を用いることとした。

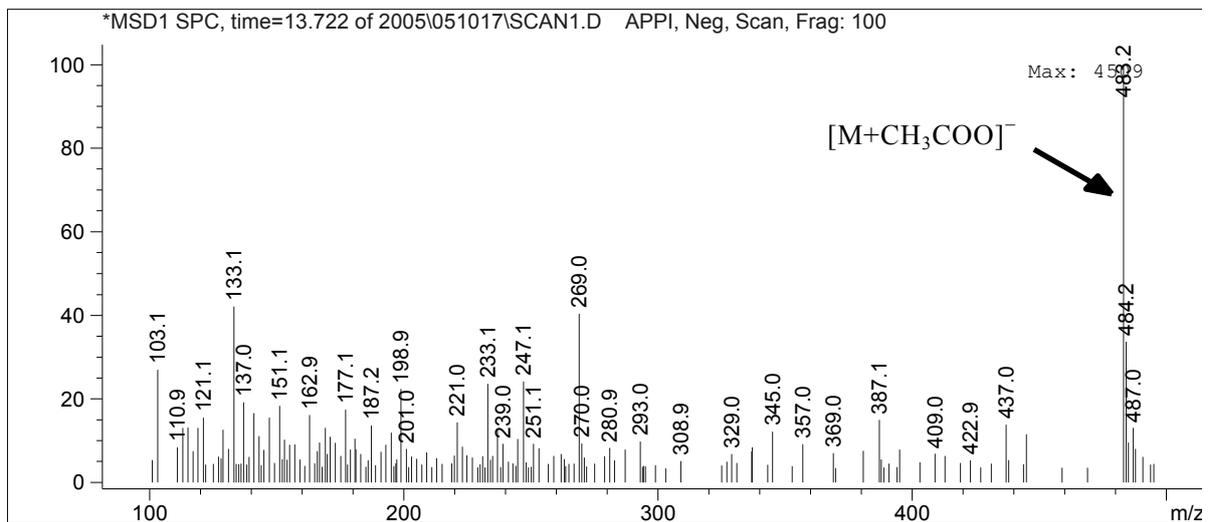


Fig.2 Mass spectrum of HT-2 toxin

3.2 検量線の作成

HT-2 トキシンとして 1 mL 中に 0.001~1 μg を含む 8 点の各標準液を調製し、各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は HT-2 トキシンとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。

3.3 多機能カラムの検討

筆者らは、T-2 トキシンの定量法⁷⁾において、多機能カラム (MultiSep 227 Trich+) による精製を行っており、HT-2 トキシンの定量法においてもこのカラムが適用可能か確認した。

HT-2 トキシンとして 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した大麦の抽出液を多機能カラムに入れ、流出液を 1 mL 毎に分画し、各溶出画分についてそれぞれ本法に従って HT-2 トキシンの回収率を求めた。その結果、Table 5 のとおり、0~1 mL の画分では回収率が低く、1~10 mL の各画分では回

収率は 103~123%であり，かつ定量を妨害するピークは認められなかった．

このことから，本法では基とした定量法と同様に，初めの流出液 3 mL を捨て，その後の流出液 3~6 mL を採取することとした．

Table 5 Elution pattern of HT-2 toxin from MultiSep 227 Trich+

Fraction volume /mL	Barley ^{a)}
0~1	49 ^{b)}
1~2	108
2~3	115
3~4	104
4~5	115
5~6	117
6~7	123
7~8	116
8~9	105
9~10	103

a) Extract from barley spiked with HT-2 toxin at 100 µg/kg

b) Mean recovery ($n=2$)

3.4 妨害物質の検討

配合飼料（鶏用 1 点，牛用 3 点），とうもろこし，マイロ，大麦，ライ麦，玄米，精白米，米ぬか，ビールかす及びホミニーフードについて，本法に従って SIM クロマトグラムを作成し，HT-2 トキシンの定量を妨害するピークの有無を検討した．その結果，HT-2 トキシンの定量を妨害するピークは認められなかった．

なお，妨害物質の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した．

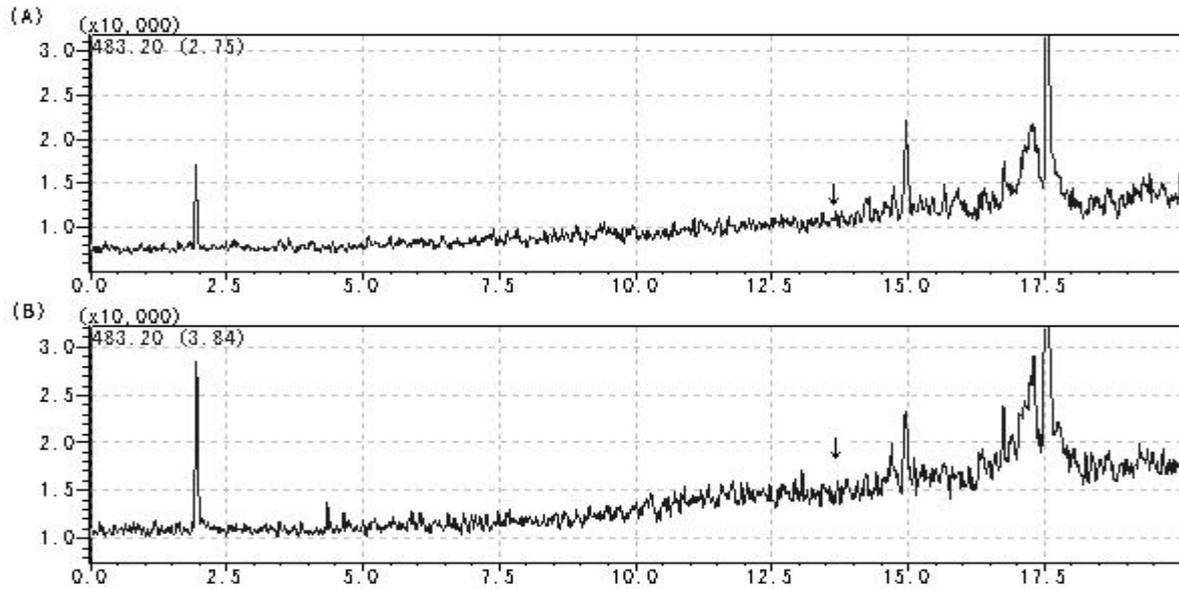


Fig. 3 LC-MS chromatograms of sample solutions

LC-MS conditions are shown in Table 2 and 4.

(A) Sample solution of formula feed for beef cattle (not spiked)

(B) Sample solution of barley (not spiked)

(Peak assignments: HT-2 toxin)

3.5 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

Table 1 の 2 種類の配合飼料，とうもろこし及び大麦に HT-2 トキシンとして 200, 20 及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について，本法に従って 3 回分析を行い，その回収率及び繰返し精度を求めた。その結果，Table 6 のとおり，HT-2 トキシンの平均回収率は 98.0~113.3%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.7%以下であった。

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

Table 6 Recoveries of HT-2 toxin from 4 kinds of feed

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recoveries (%)			
	Corn	Barley	Formula feed for layer	Formula feed for beef cattle
200	101.2 ^{a)} (6.9) ^{b)}	100.6 (4.4)	107.4 (8.7)	103.2 (5.1)
20	108.0 (2.0)	107.3 (7.3)	112.7 (4.7)	113.3 (8.6)
15	110.7 (0.60)	107.1 (5.2)	98.0 (3.1)	106.9 (6.4)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

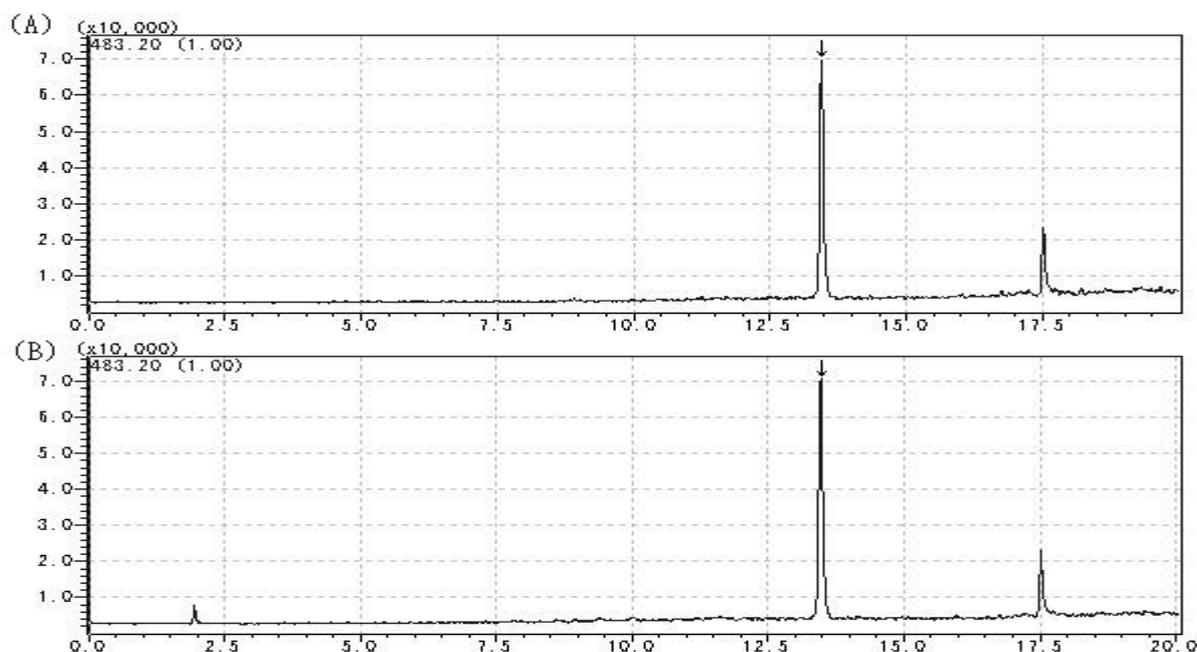


Fig. 4 LC-MS chromatograms of standard solution and sample solution

LC-MS conditions are shown in Table 2 and 4.

(A) Standard solution (The amount of HT-2 toxin is 0.5 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer (spiked at 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

(Peak assignments: HT-2 toxin)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、大麦に HT-2 トキシンとして 15 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について 3 点併行分析を行い、得られたピークの SN 比を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 となる濃度は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、本法の定量下限は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と考えられた。なお、その平均回収率は 107.1%，繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.2%であった。

また、検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と見積もられた。

3.7 共同試験

本法の再現精度を調査するため、鶏用配合飼料及び大麦に HT-2 トキシンとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用いて、株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部東京カスタマーサポートセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び仙台事務所（現 同仙台センター）（7 試験室）において本法に従って共同分析を実施した。

その結果、Table 7 のとおり、鶏用配合飼料の HT-2 トキシンの平均回収率は 106%，それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.9%及び 8.5%であり、HorRat は 0.42 であった。また、大麦においては、平均回収率は 104%，それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.6%及び 9.6%であり、HorRat は 0.47 であった。

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

Table 7 Quantitative value of HT-2 toxin in collaborative study

Laboratory number	Formula feed for layer ^{a)}		Barley ^{a)}	
1	215	223	220	214
2	211	205	198	201
3	224	241	226	241
4	220	229	207	195
5	211	211	206	207
6	175	181	171	173
7	215	215	223	220
Mean value (µg/kg)	212		207	
Recovery (%)	106		104	
RSD _r ^{b)} (%)	2.9		2.6	
RSD _R ^{c)} (%)	8.5		9.6	
HorRat	0.42		0.47	

a) Spiked with HT-2 toxin at 200 µg/kg

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS Instrument	Ionization	Mobile phase	LC column (i.d.×length, particle size)
		Polarity Monitor ion (<i>m/z</i>)		
1	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Acetonitrile	GL Sciences
		Negative 483.2	Methanol 10 mmol/L Ammonium acetate	Inertsil ODS-3 (2.1 mm×250 mm, 5 µm)
2	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Methanol	GL Sciences
		Negative 483.3>58.7	10 mmol/L Ammonium acetate	Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD SL	APPI	Methanol	Shiseido
		Negative 483	10 mmol/L Ammonium acetate	Capcell Pak C18 AQ (3.0 mm×150 mm, 5 µm)
4	SHIMADZU LCMS-2010EV	APCI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×250 mm, 5 µm)
5	Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD SL	APPI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×250 mm, 5 µm)
6	SHIMADZU LCMS-2010EV	APCI	Methanol	SHIMADZU
		Positive 442.2	10 mmol/L Ammonium acetate	Shim-pack VP-ODS (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
7	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×250 mm, 3.5 µm)

4 まとめ

飼料中の HT-2 トキシンの定量法として、アセトニトリル-水 (21+4) で抽出し、多機能カラムにより精製し、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) ODS カラム (ZORBAX Eclipse XDB-C18) を用いることにより、HT-2 トキシンを分離し、質量分析計 (モニターイオン m/z 483) で測定が可能であった。
- 2) ピーク面積又は高さを用いて検量線を作成したところ、HT-2 トキシンとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 3) 抽出液の夾雑成分は、多機能カラム (MultiSep 227 Trich+) により除去できた。
- 4) 飼料原料及び配合飼料について、本法に従って SIM クロマトグラムを作成したところ、HT-2 トキシンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 5) 2 種類の飼料原料及び 2 種類の配合飼料に HT-2 トキシンとしてそれぞれ 200, 20 及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率は 98.0~113.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.7%以下であった。
- 6) 本法による HT-2 トキシンの定量下限は試料中で 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出下限は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と見積もられた。
- 7) 鶏用配合飼料及び大麦に HT-2 トキシンとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用いて、7 試験室において本法に従って共同分析を実施した。

その結果、鶏用配合飼料の HT-2 トキシンの平均回収率は 106%、それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.9%及び 8.5%であり、HorRat は 0.42 であった。また、大麦においては、平均回収率は 104%、それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.6%及び 9.6%であり、HorRat は 0.47 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社島津製作所、全国酪農業協同組合連合会、財団法人日本食品分析センター及び財団法人マイコトキシンの検査協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) M. M. Mossoba, S. Adams, J. A. Roach, M. W. Trucksess: J. AOAC Int., 79, 1116 (1996).
- 2) C. C. Hsueh, Y. Liu, M. S. Freund : Analytical chemistry, 71, 4075 (1999).
- 3) H. M. Muller, J. Reimann, U. Schumacher, K. Schwadorf: Archive of animal nutrition, 54, 173 (2001).
- 4) FAO : FAO Food and Nutrition Paper 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, (2004), FAO, Rome, Italy
- 5) WHO : Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives Series 47), Geneva (2001).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 7) 石橋隆幸，小野雄造：飼料研究報告，29，1 (2004).
- 8) 田中壽雄，石崎和宏：飼料研究報告，13，1 (1988).

4 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

野崎 友春*, 山多 利秋*

Determination of Imidacloprid in Feed by LC-MS

Tomoharu NOZAKI* and Toshiaki YAMATA*

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

An analytical method for determination of imidacloprid in feed by using liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) was developed.

Imidacloprid was extracted with acetonitrile-water and filtered. The filtrate was purified by salting-out, by C₁₈ cartridge chromatography and by graphitized non-porous carbon column chromatography. Imidacloprid was determined by LC-MS.

A collaborative study with corn spiked with imidacloprid at 100 µg/kg and with alfalfa spiked with imidacloprid at 5,000 µg/kg was conducted in 8 laboratories. The mean quantitative value of corn was 83.0 µg/kg (83.0%), and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.0%, 15% and 0.66 respectively. As for alfalfa, they were 4,220 µg/kg (84.3%), 3.5%, 12% and 0.96 respectively.

Key words: イミダクロプリド imidacloprid ; 残留農薬 pesticide residue ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

農林水産省では、食品の安全性を確保する観点から、飼料原料に用いられている農薬を中心に60種類の農薬について、飼料安全法に基づいて残留基準値を設定し、平成18年5月29日付で施行した。

しかしながら、イミダクロプリドについては、飼料中の分析法が確立されていないことから、今回、厚生労働省の食品中のイミダクロプリドの分析法¹⁾を基にして、飼料中のイミダクロプリドの分析法について検討を行ったのでその概要を報告する。

イミダクロプリドは、日本特殊農薬製造(株)(現バイエル クロップサイエンス)が開発した、クロロニコチニル系殺虫剤である。国内では稲、果樹、野菜等の広範囲の主要害虫対策として登録されている²⁾。

国内での飼料中の基準は、乾牧草が6 mg/kg、とうもろこしが0.1 mg/kg、その他穀物が0.05 mg/kgである³⁾。国内での食品中の暫定基準は0.05~10 mg/kgである¹⁾。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2 実験方法

2.1 試料

市販のとうもろこし及び乾牧草（アルファルファ）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) イミダクロプリド標準原液

イミダクロプリド標準品（関東化学製，純度 99.7%）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色メスフラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に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した（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．）。

使用に際して，イミダクロプリド標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にイミダクロプリドとしてそれぞれ 0.002 µg，0.005 µg，0.01 µg，0.02 µg，0.05 µg，0.1 µg 及び 0.2 µg を含有するイミダクロプリド標準液を調製した。

2) アセトニトリル，メタノールは残留農薬分析用試薬を用いた。

特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) エバポレーター：BÜCHI 製 R-200

4) C₁₈カートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge

5) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジ：

Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg)

2.4 定量方法

1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（13+7）を乾牧草は 100 mL，その他の試料は 50 mL 加え，30 分間振り混ぜて抽出した。乾牧草は 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，容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた。200 mL に定容した抽出液の 10 mL を正確に取り，アセトニトリルで 100 mL に定容し，液液分配に供する試料溶液とした。その他の試料は 100 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，容器及び残さをアセトニトリル 25 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えて液液分配に供する試料溶液とした。

2) 液液分配

試料溶液（乾牧草は 10 mL，その他の試料は 20 mL）を正確に取り，100 mL の分液漏斗に入れ，塩化ナトリウム 10 g を加え，0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え，10 分間振り混ぜた後静置した。水層を捨て，アセトニトリル層をカートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした。

3) カートリッジカラムクロマトグラフィー I

C₁₈ カートリッジをアセトニトリル 10 mL であらかじめ洗浄した。100 mL の三角フラスコを C₁₈ カートリッジの下に置き，試料溶液をカートリッジに入れ，液面が充てん剤の上面に達

するまで流下させ、イミダクロプリドを流出させた。アセトニトリル 2 mL を加え同様に流出させた。

三角フラスコに硫酸ナトリウム（無水）を適量加え脱水し、100 mL のなす形フラスコにろ紙（5種B）でろ過した。

ろ液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル-トルエン（3+1）2 mL を加えて残留物を溶かし、カートリッジカラムクロマトグラフィー II に供する試料溶液とした。

4) カートリッジカラムクロマトグラフィー II

グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジを注射筒に連結し、アセトニトリル-トルエン（3+1）10 mL であらかじめ洗浄した。50 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、容器をアセトニトリル-トルエン（3+1）2 mL ずつで2回洗浄し、洗液を順次グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流下させ、イミダクロプリドを流出させた。アセトニトリル-トルエン（3+1）16 mL を加えて同様に流出させた。

溶出液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

メタノール 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質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

5) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及びイミダクロプリド標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出（SIM）クロマトグラムを得た。

6) 計算

得られた SIM 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、試料中のイミダクロプリド量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件を Table 1 に示した。

Sample 10.0 g

- add acetonitrile-water (13:7) (grass hay; 100 mL, others; 50 mL)
- shake for 30 minutes
- filtrate with suction filter (No.5B)
- wash with acetonitrile (grass hay; 50 mL, others; 25 mL)
- grass hay; fill up to 200 mL with acetonitrile
- others; fill up to 100 mL with acetonitrile

100 mL Separating funnel

- grass hay; 10 mL of 1/10 diluted sample solution, others; 20 mL
- add 10 g of NaCl
- add 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffered saline (pH7.0)
- shake for 10 minutes

Upper layer (acetonitrile layer)

Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge (prewash with 10 mL of acetonitrile)

- apply sample solution
- elute with 2 mL of acetonitrile

Elute

- dehydrate with Na₂SO₄ anhydride
- filtrate with filter paper (No.5B)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2.0 mL of acetonitrile-toluene (3:1)

ENVI-Carb/NH₂ cartridge (prewash with 10 mL of acetonitrile-toluene (3:1))

- apply sample solution
- add 4 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- elute with 16 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2.0 mL of methanol

LC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for imidacloprid in feeds by using LC-MS

Table 1 Operating conditions for LC-MS

Column	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
Mobile phase	A: 5 mmol/L ammonium acetate solution, B: 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution B(%) 15%(0 min)→40%(1 min)→40%(3.5 min)→50%(6 min)→55%(8 min)→ 95%(17.5 min)→95%(30 min)→15%(30.1 min)→47 min(15%)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Ionization	Electrospray ionization(ESI) positive mode
Monitor ion	<i>m/z</i> 256

3 結果及び考察

3.1 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

穀類（とうもろこし）及び乾牧草（アルファルファ）を用い、株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本穀物検定協会中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同大阪事務所（現同神戸センター大阪事務所）及び同仙台事務所（現同仙台センター）の8試験室で共同試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、とうもろこし中のイミダクロプリドの平均回収率は 83.0%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 3.0% 及び 15% であり、HorRat は 0.66 であった。また、アルファルファ中のイミダクロプリドの平均回収率は 84.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 3.5% 及び 12% であり、HorRat は 0.96 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 3 に示した。

Table 2 Quantitative value of imidacloprid from corn spiked at 100 µg/kg and alfalfa spiked at 5,000 µg/kg in the collaborative study

Lab No.			(µg/kg)	
	Corn		Alfalfa	
1	89.4	87.0	4,330	4,100
2	101.2	97.8	5,020	4,890
3	84.1	85.4	4,080	4,360
4	89.5	84.7	4,400	4,210
5	71.2	70.0	3,560	3,830
6	71.8	75.8	3,500	3,520
7	68.0	62.6	1,280 ^{e)}	1,230 ^{e)}
8	92.6	96.3	4,490	4,730
Spiked level	100.0		5,000	
Mean value ^{a)}	83.0		4,217	
Recovery (%)	83.0		84.3	
RSD_r ^{b)} (%)	3.0		3.5	
RSD_R ^{c)} (%)	15		12	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	22		13	
HorRat	0.66		0.96	

a) Corn: $n=16$, Alfalfa: $n=14$ (without Lab No. 7)

b) Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

e) Excluded by the single Grubbs test

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab No.	LC/MS	Column
1	SHIMADZU LCMS-2010EV prominence	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
2	LC:Agilent 1100 series MS:Agilent G1956B	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (2.0 mm i.d.×150 mm)
3	SHIMADZU LCMS-2010EV	SHIMAZDU VP-ODS (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
4	LC:Waters alliance2695 MS:Waters Micromass Quattro micro	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
5	Waters Quattro micro API Mass Analyzer	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
6	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
7	SHIMADZU LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5u C18 110A (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
8	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法について検討したところ、次の結果を得た。

とうもろこし及び乾牧草にイミダクロプリドとしてそれぞれ 100 μg/kg 及び 5,000 μg/kg 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果、とうもろこしの平均回収率は 83.0%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.0%及び 15%であり、HorRat は 0.66 であった。また、乾牧草の平均回収率は 84.3%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.5%及び 12%であり、HorRat は 0.96 であった。

なお、本法は、平成 18 年 12 月 18 日付けで飼料分析基準に収載された³⁾。

また、添加回収試験及び定量下限の検討については、財団法人日本食品分析センターで検討を行っている⁵⁾ことからこちらを参照されたい (p.225)。

謝 辞

共同試験にご協力をいただいた株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本穀物検定協会中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び全国酪農業協同組合連合会分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生労働省告示：“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成 17 年 11 月 29 日，平成 17 年厚生労働省告示第 499 号 (2005)。

- 2) 第 188 回食品安全委員会配付資料「資料 2:農薬専門調査会における審議状況について(イミダクロプリド)」(2007).
- 3) 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 12 月 18 日，18 消安第 9921 号 (2006).
- 5) 飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業「飼料中の有害物質等の分析法の開発」，平成 19 年 3 月，財団法人日本食品分析センター (2007).

5 飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

堀米 明日香^{*1}, 野崎 友春^{*2}

Determination of Carbendazim, Thiophanate, Thiophanate-methyl and Benomyl in Feed by LC-MS

Asuka HORIGOME^{*1} and Tomoharu NOZAKI^{*2}

(^{*1} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters
(Now the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

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

An analytical method to determine carbendazim, benomyl and thiophanate-methyl in feed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was developed. Benomyl and thiophanate-methyl are transformed to carbendazim during analytical procedure and carbendazim, benomyl and thiophanate-methyl are determined as total quantity of carbendazim. Thiophanate in feed was also transformed to ethyl-2-benzimidazole carbamate (EBC) and could be detected in this method.

A spike test resulted in the mean recovery of carbendazim, benomyl, thiophanate-methyl and thiophanate of 94.6~98.3%, 101.4~105.8%, 82.1~84.4% and 57.9~64.2%, respectively.

A collaborative study was conducted with corn spiked with thiophanate-methyl and thiophanate at 1.3 mg/kg respectively, and with timothy spiked with thiophanate-methyl and thiophanate at 20 mg/kg respectively. For corn, the mean recovery of thiophanate-methyl was 87.8%, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 3.2% and 15% respectively, and the mean recovery of thiophanate was 53.5%. For timothy, these values of thiophanate-methyl were 83.1%, 4.6% and 19% respectively, and those of thiophanate were 41.6%, 4.3% and 26% respectively.

Key words: カルベンダジム carbendazim ; ベノミル benomyl ; チオファネート thiophanate ; チオファネートメチル thiophanate-methyl ; 高速液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 飼料 feed ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

ベノミルはデュポン社が開発した浸透性殺菌剤で、菌核病、灰色かび病、フザリウム病害などに対して効果がある。チオファネートメチルは日本曹達が開発した殺菌剤で灰色かび病、菌核病、褐斑病、炭そ病、青かび病、緑かび病などに効果がある。カルベンダジムはベノミル及びチオファネートメチルの代謝分解物であり、日本では1999年に農薬登録が失効している。また、チオファネー

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ト（チオファネートエチル）は子のう菌，不完全菌などに効果があるが，現在日本での登録はされていない。

平成 18 年 5 月 29 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）の一部が改正され，これらの農薬については，カルベンダジム，ベノミルをカルベンダジムに換算したもの，チオファネートをカルベンダジムに換算したもの及びチオファネートメチルをカルベンダジムに換算したもの，の総和として基準値が定められた。

本法の検討に先立ち，（財）日本食品分析センターが検討した液体クロマトグラフ質量分析計によるチオファネートメチル，カルベンダジム及びベノミルの残留分析法¹⁾（以下「センター法」）に基づき，最も回収が困難なチオファネートメチルについて共同試験を行った。しかしその結果，必要十分な回収率が得られなかったことから，厚生労働省の分析法²⁾を参考に標準液について次の 2 点について追加検討した。

（1）標準液も閉環反応に供すること

（2）チオファネートメチルの測定にはチオファネートメチル標準液を使用すること

試料の定量操作についてはセンター法をそのまま踏襲した。また，センター法では分析対象となっていないチオファネートについても，省令中の基準値に含まれているため，同一操作でのチオファネートの添加回収試験及び共同試験を行い，本法でチオファネートの定量が可能かあわせて検討した。

なお，本法では操作中に，チオファネートメチル及びベノミルはカルベンダジムに変換されるため，カルベンダジム，チオファネートメチル及びベノミルの三成分をカルベンダジムとして LC-MS で定量した。チオファネートは操作中にエチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート（以下「EBC」）に変換されるため EBC として定量し，厚生労働省の分析法と同様に EBC 量に係数 0.52 を乗じてカルベンダジム量に換算した。

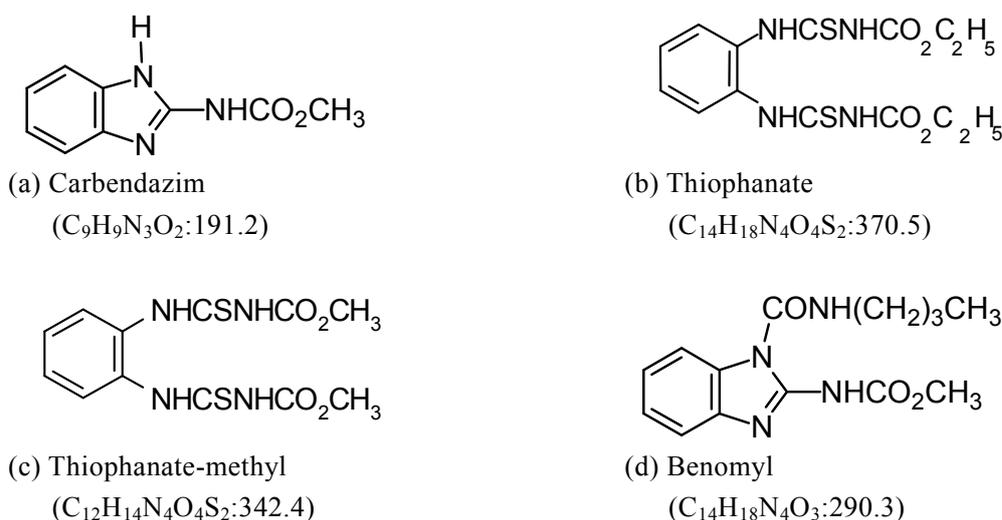


Fig. 1 Structure of carbendazim, thiophanate-ethyl, thiophanate-methyl and benomyl

2 分析方法

2.1 試料

市販の飼料原料（とうもろこし）及び乾牧草（チモシー）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) カルベンダジム標準液

カルベンダジム [$C_9H_9N_3O_2$] (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてカルベンダジム標準原液を調製した (この液 1 mL は, カルベンダジムとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するカルベンダジム標準液を調製した。

2) チオファネートメチル標準液

チオファネートメチル [$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$] (和光純薬工業製, 純度 99.9%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてチオファネートメチル標準原液を調製した (この液 1 mL は, チオファネートメチルとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するチオファネートメチル標準液を調製した。

3) チオファネート標準液

チオファネート [$C_{14}H_{18}N_4O_4S_2$] (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてチオファネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, チオファネートとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するチオファネート標準液を調製した。

4) ベノミル [$C_{14}H_{18}N_4O_3$] 標準品

Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97.5% のものを用いた。

5) メタノール, ジクロロメタン, ヘキサン, 酢酸エチル及び硫酸ナトリウム (無水) は残留農薬分析用試薬を用いた。特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計: Agilent Technologies 製 1100 Series

2) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) エバポレーター: BÜCHI 製 R-200

4) 高速遠心分離機: 久保田商事製 KM-15200

5) ミニカラム: Varian 製 Bond Elut Jr. PSA

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, L-アスコルビン酸 0.4 g 及び水 15 mL (乾牧草は 30 mL) を加え, 30 分間放置した後, メタノール 100 mL (乾牧草は 120 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のトールビーカー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メタノール 50 mL で

洗浄し、洗液をろ液に合わせた。ろ液を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に全量フラスコの標線までメタノールを加えて液液分配 I に供する試料溶液とした。

2) 液液分配 I

試料溶液 10 mL (乾牧草にあつては試料溶液 20 mL) を正確に 500 mL の分液漏斗 A に入れ、L-アスコルビン酸 3 g、塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 150 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置した。

水層 (下層) を 200 mL のトールビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (4 mol/L 及び 0.4 mol/L) を用いて pH を 6.7~7.1 に調整した。

pH 調整後の水層を 500 mL の分液漏斗 B に移し、ジクロロメタン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層 (下層) を 300 mL の共栓三角フラスコに入れた。分液漏斗 B にジクロロメタン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせた。ジクロロメタン層に適量の硫酸ナトリウム (無水) を加えて脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した後、先の三角フラスコを少量のジクロロメタンで洗浄し、洗液をろ液に合わせた。

ろ液に酢酸 0.5 mL を加え、40°C 以下の水浴上で約 0.5 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、閉環反応に供する試料溶液とした。

3) 閉環反応

試料溶液に酢酸 (1+1) 10 mL、酢酸銅 0.2 g 及び沸石 2~3 個を加え、なす形フラスコに還流冷却器を接続した後、120°C の油浴上で 30 分間加熱した。放冷後、塩酸 (1 mol/L) 10 mL を還流冷却器の上部から加えて管壁を洗浄し、試料溶液に合わせ、液液分配 II に供する試料溶液とした。

4) 液液分配 II

試料溶液を 100 mL の分液漏斗 C に移し、試料溶液の入っていたなす形フラスコを塩酸 (1 mol/L) 20 mL で洗浄し、洗液を試料溶液に合わせた。更に塩化ナトリウム 5 g 及びヘキサン 20 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 100 mL の分液漏斗 D に移した。

分液漏斗 D にヘキサン 20 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層を 100 mL のトールビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L 及び 1 mol/L) を用いて pH を 6.8~6.9 に調整した後、300 mL の分液漏斗 E に移した。

分液漏斗 E に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 F に入れ、酢酸エチル層 (上層) を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 F に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨てた。酢酸エチル層を先の三角フラスコに合わせ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した。

ろ液を 40°C 以下の水浴上で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル-メタノール (19+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

5) カラム処理

ミニカラムを注射筒に連結し、酢酸エチル 5 mL で洗浄した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、液面がカラムの上端に達するまで流出させた。

試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル-メタノール (19+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面がカラムの上端に達するまで流出させた。更に酢酸エチル-メタノール (19+1) 10 mL をミニカラムに加えて、カルベンダジム及び EBC を同様に溶出させた。(この時点までに、チオファネートメチル及びベノミルはカルベンダジムに、チオファネートは EBC に変換されている。)

溶出液を 40°C 以下の水浴上で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール (1+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析に供する試料溶液とした。

6) 標準液の閉環反応

カルベンダジム標準液又はチオファネートメチル標準液 1 mL を 200 mL なす形フラスコに正確に入れ閉環反応に供する標準液とした。更に、今回チオファネートについても同一操作での測定が可能か検討するため、チオファネート標準液 1 mL を正確に加え、同時に閉環反応に供した。

閉環反応後、試料と同様に液液分配 II 及びミニカラムから溶出させ、減圧濃縮、乾固したのち水-メタノール (1+1) 20 mL を正確に加えて溶解した。この液の一定量を水-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にカルベンダジム又はチオファネートメチル及びチオファネートとして各々 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng 及び 200 ng 相当量を含む各標準液を調製し、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する標準液とした。

7) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液、各標準液各 2 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 1 の測定条件に従い選択イオン検出 (以下「SIM」) クロマトグラムを得た。

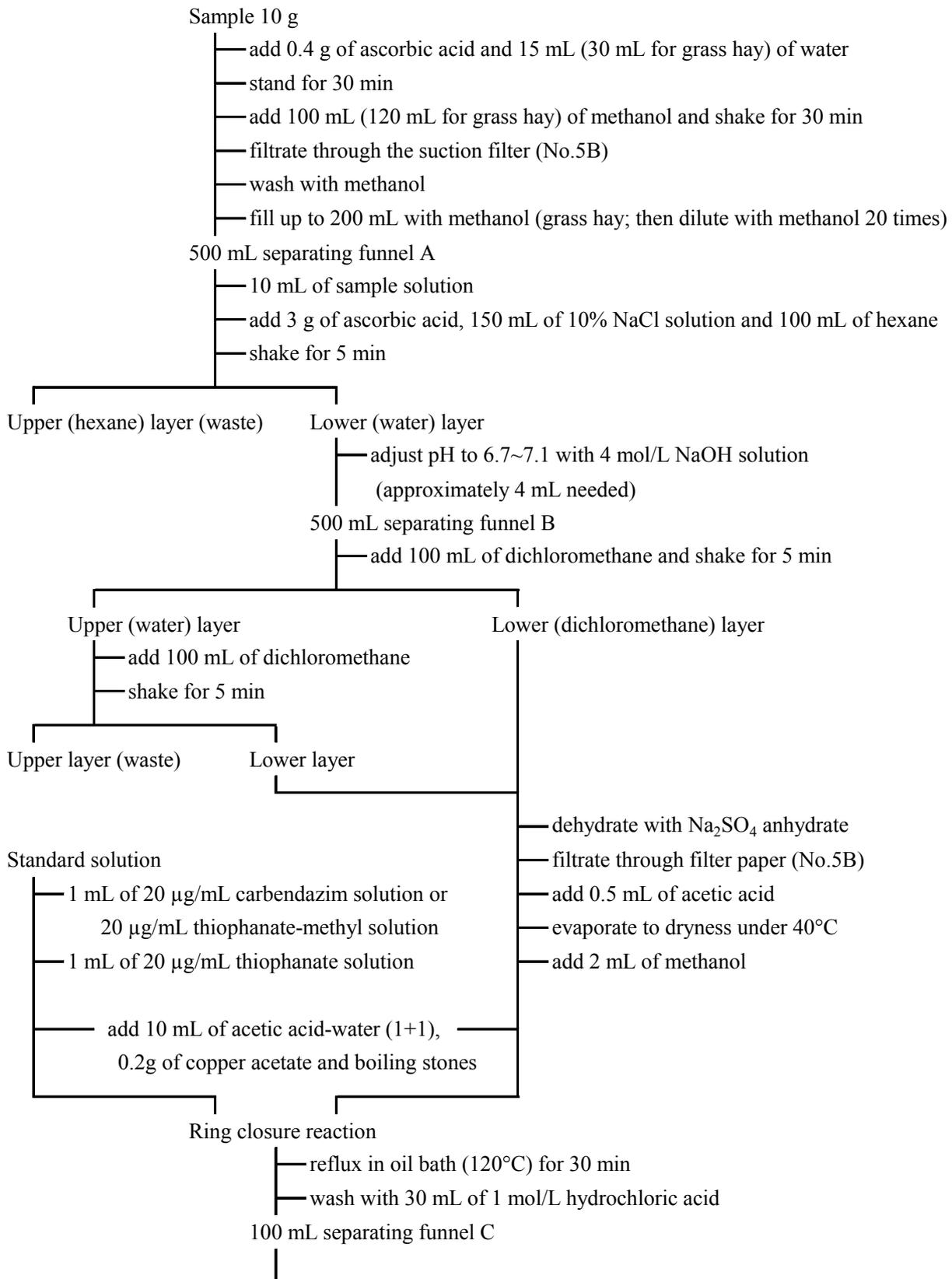
Table 1 Operating conditions for LC-MS

Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 µm)
Mobile phase	A: 2 mmol/L Ammonium acetate solution B: Methanol B(%) 25%→15 min→60%→0.1 min→90%(7 min)→0.1 min→25%(8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Fragmentor	100 V
Nebulizer	N ₂ (50 psi)
Drying gas	N ₂ (10 L/min, 350°C)
Capillary voltage	4,000 V
Monitor ion	<i>m/z</i> 192 (Carbendazim), 206 (EBC)

8) 計算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のカルベンダジム量 (チオファネートメチル及びベノミルをカルベンダジムに変換したものを含む。) 及び EBC 量 (チオファネートを EBC に変換したものを) を算出した。なお、カルベンダ

ジムとしての含量を求める際には、EBC 量に係数 0.52 を乗じてカルベンダジム量へ換算した。
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



(To be continued to next page.)



Scheme 1 Analytical procedure for carbendazim, benomyl, thiophanate and thiophanate-methyl

3 結果及び考察

3.1 標準液の操作について

本法では閉環反応における回収率が低いことが知られており，厚生労働省の分析法²⁾によれば閉環反応（その後の転溶操作も含む）における回収率が，カルベンダジムでは約 73%，チオファネートメチルでは約 60%である．そのため，厚生労働省の分析法では標準液も閉環反応とその後の転溶操作を試料溶液と同様に行うこととしている．

厚生労働省の分析法とセンター法では用いる溶媒などに若干違いがあるため，センター法において閉環反応後の操作での回収率を確認した．閉環反応のみに供した標準液を 100%として，そ

の後の操作での回収率を比較したところ、Table2 のとおり閉環反応後の操作で回収率が 76%程度まで下がることがわかったので、標準液についても閉環反応以降、試料溶液と同様の操作を行うこととした。

Table 2 Recovery after each procedure

Procedure	Carbendazim	EBC
ring closure reaction	100%	100%
ring closure reaction and washing with hexane	96%	100%
ring closure reaction, washing with hexane and ethyl acetate extraction	83%	84%
ring closure reaction, washing with hexane, ethyl acetate extraction and PSA cartridge	76%	76%

3.2 チオファネートメチル標準液の使用について

本法では、チオファネートメチル及びベノミルは分析操作中にカルベンダジムに変換されるため、カルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミルの三成分をカルベンダジムとして定量する。そのため、センター法では上記三成分の測定にはカルベンダジム標準液を希釈して検量線を作成することとなっている。

しかし、(財)日本食品分析センターの検討¹⁾において、閉環反応でのチオファネートメチルからカルベンダジムへの反応率は 80%程度であることがわかっている。また、厚生労働省の分析法においても、チオファネートメチルは閉環反応の回収率が特に低いので、チオファネートメチルを定量する場合はチオファネートメチル標準液を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液として用いることとなっている。以上のことから、本法においても、チオファネートメチルを定量する場合にはチオファネートメチル標準品を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液とするべきと考えられた。

なお、ベノミルについては(財)日本食品分析センターの検討の中で、ベノミルの添加回収試験(ベノミルを添加しカルベンダジム標準液を用いて検量線を引くセンター法で実施)の結果は平均回収率 93%で、カルベンダジムの添加回収試験の平均回収率 93%と同等であった。このことから、ベノミルからカルベンダジムへの変換はほぼ 100%行われていると考えられ、ベノミルを定量する際にはカルベンダジムの標準品を用いて問題ないと考えられる。

以上のことから、厚生労働省の分析法と同様に、カルベンダジム及びベノミルを定量する場合はカルベンダジム標準液を用い、チオファネートメチルを定量する場合にはチオファネートメチル標準液を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液として用いるべきと考えられた。

よって、本法を用いる時には、農薬の使用状況からカルベンダジム及びベノミルの残留が考えられる場合はカルベンダジム標準液を用い、チオファネートメチルの残留が考えられる場合にはチオファネートメチル標準液を用いることとした。

また、チオファネートについては、閉環反応により EBC に変換されるため、チオファネート標準液を閉環反応に供し、生成した EBC を標準液として用いることとした。

3.3 検量線の作成

カルベンダジム標準液又はチオファネートメチル標準液及びチオファネート標準液 1 mL を試

料と同様に閉環反応，液液分配 II 及びミニカラムの操作を行った．ミニカラムから溶出後，減圧濃縮，乾固したのち水-メタノール (1+1) 20 mL を正確に加えて溶解した．さらに水-メタノール (1+1) で希釈し，1 mL 中にカルベンダジム又はチオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng 相当量を含む標準液を作成した．各 2 μ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した．その結果いずれの検量線とも 5~200 ng 相当量の範囲で直線性を示した．

3.4 妨害物質の検討

(財) 日本食品分析センターの検討の中で，飼料 13 種について定量を妨害するピークが検出されないことが確認されている．試料の定量操作はセンター法から変更がないことから，確認は省略した．

3.5 添加回収試験

とうもろこしにカルベンダジムとして 0.70 mg/kg，乾牧草 (チモシー) にカルベンダジムとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 3 のとおり平均回収率 94.6~98.3%，繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.8%以下であった．

Table 3 Spike test of carbendazim

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	94.6 ^{a)} (6.8) ^{b)}	---
10	---	98.3 ^{a)} (0.75) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

更に，とうもろこしにベノミルとして 1.0 mg/kg，チモシーにベノミルとして 15 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 4 のとおり平均回収率 101.4~105.8%，繰返し精度は RSD として 5.0%以下であった．

Table 4 Spike test of benomyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
1.0	101.4 ^{a)} (3.2) ^{b)}	---
15	---	105.8 ^{a)} (5.0) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

更に，とうもろこしにチオファネートメチルとして 0.70 mg/kg 及びチモシーに 10 mg/kg を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 5 のとおり平均回収率 82.1~84.4%，繰返し精度は RSD として 9.5%以下であった．

また，チオファネートについても，チオファネートメチルの添加回収試験と同時にチオファネ

ートとして 0.70 mg/kg 及びチモシーに 10 mg/kg を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した。その結果、Table 6 のとおり平均回収率 57.9~64.2%で、定量法の確立に十分な回収率が得られなかった。なお、繰返し精度は RSD として 8.1%以下であった。

なお、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。

Table 5 Spike test of thiophanate-methyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	84.4 ^{a)} (9.5) ^{b)}	---
10	---	82.1 ^{c)} (6.1) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=5$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Mean recovery ($n=3$)

Table 6 Spike test of thiophanate-ethyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	57.9 ^{a)} (4.4) ^{b)}	---
10	---	64.2 ^{c)} (8.1) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=5$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Mean recovery ($n=3$)

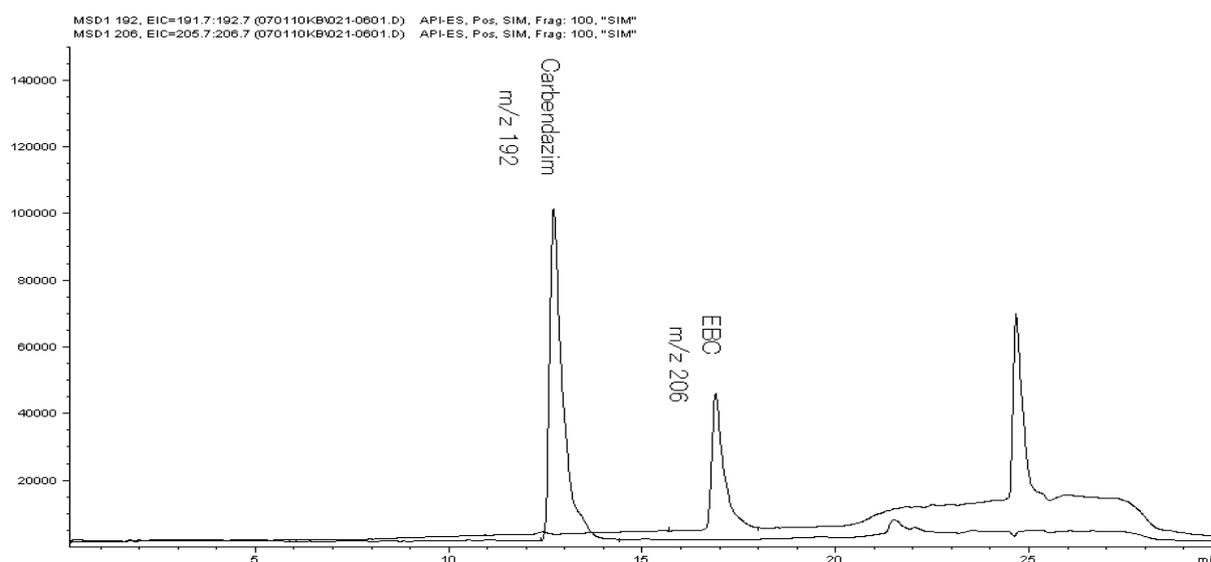


Fig.2 SIM chromatogram of carbenrazim (m/z 192) and EBC (m/z 206)

LC/MS conditions are shown in Table 1.

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限を確認するために、とうもろこしにカルベンダジム、ベノミル及びチオファネートメチルそれぞれを添加し、本法に従って分析を3回実施し、得られたピークのSN比からそれぞれの定量下限及び検出下限を求めた。チオファネートについては、添加回収試験で十分な回収率が得られなかったため、定量下限及び検出下限は求めなかった。

とうもろこしにカルベンダジムとして50 µg/kg及び100 µg/kg相当量を添加した試料を用いて本法に従って分析を3回実施した結果、SN比が10となる濃度は50 µg/kgであり、カルベンダジムの定量下限は50 µg/kgと考えられた。添加量50 µg/kgにおける平均回収率はTable 7のとおり115.0%，繰返し精度はRSDとして12%であった。また、カルベンダジムの検出限界はSN比が3となる濃度から15 µg/kgと見積もられた。

Table 7 Spike test of carbendazim to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level (µg/kg)	Corn
50	115.0 ^{a)} (12) ^{b)}
100	104.6 ^{a)} (3.6) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

同様にベノミルの定量下限は、SN比が10となる濃度からベノミルとしての添加濃度が60 µg/kgであり、添加量60 µg/kgにおける平均回収率はTable 8のとおり113.3%，繰返し精度はRSDとして12%であった。また、ベノミルの検出限界はSN比が3となる濃度から18 µg/kgと見積もられた。

Table 8 Spike test of benomyl to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level (µg/kg)	Corn
60	113.3 ^{a)} (12) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

同様にチオファネートメチルの定量下限は、SN比が10となる濃度から、チオファネートメチルとしての添加濃度が40 µg/kgであり、添加量40 µg/kgにおける平均回収率はTable 9のとおり72.4%，繰返し精度はRSDとして3.2%であった。また、チオファネートメチルの検出限界はSN比が3となる濃度から12 µg/kgと見積もられた。

Table 9 Spike test of thiophanate-methyl to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Corn
40	72.4 ^{a)} (3.2) ^{b)}
80	72.3 ^{a)} (0.86) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

3.6 チオファネートメチル及びチオファネートの共同試験

本法の再現精度を確認するため、カルベンダジム, チオファネートメチル及びベノミルの中で、十分な回収率を得るのがもっとも困難と思われるチオファネートメチルについて共同試験を行った。

また、参考までにチオファネートについても同時に試験を実施した。

チオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 1.3 mg/kg 相当量を添加したとうもろこし並びにチオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 20 mg/kg 相当量を添加した乾牧草（チモシー）を用いて、株式会社島津製作所京都カスタマサポートセンター，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部及び同仙台事務所（現 同仙台センター）の 7 試験室において、本法に従って共同試験を実施した。

チオファネートメチルの結果は Table 10 のとおりであり，とうもろこしでは平均回収率は 87.8%，室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.2% 及び 15% であり，HorRat は 0.95 であった。また，チモシーでは平均回収率は 83.1%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.6% 及び 19% であり，HorRat は 1.8 であった。

チオファネートの結果は Table 11 のとおりであり，とうもろこしでは平均回収率は 53.5%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.6% 及び 14% であり，HorRat は 0.85 であった。また，チモシーでは平均回収率は 41.6%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.3% 及び 26% であり，HorRat は 2.2 であった。乾牧草の HorRat が 2.0 を超えているが，これは添加が高濃度のため HorRat を求める際の分母の予想室間再現精度 PRSD_R（Horwitz 式から求める）が小さくなったことも寄与していると考えられた。

なお，参考のため，各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 12 に示した。

Table 10 Collaborative study of thiophanate-methyl

Laboratory	(mg/kg)			
	Sample			
	Corn		Timothy	
1	0.923	0.911	13.2	13.7
2	2.58 ^{f)}	2.68 ^{f)}	39.4 ^{e)}	46.8 ^{e)}
3	1.20	1.21	18.1	16.5
4	1.03	1.05	17.9	17.1
5	1.37	1.45	21.5	21.9
6	1.20	1.18	12.8	14.6
7	1.04	1.13	16.3	15.8
Spiked level (mg/kg)	1.30		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.14		16.6	
Recovery (%)	87.8		83.1	
RSD _r ^{b)} (%)	3.2		4.6	
RSD _R ^{c)} (%)	15		19	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		10	
HorRat	0.95		1.8	

a) $n=12$ (excluding Laboratory 2)

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

d) Predicted reproducibility relative standard deviation calculated by the modified Horwitz equation

e) Removed by Cochran test

f) Removed by single Grubbs test

Table 11 Collaborative study of thiophanate-ethyl

Laboratory	Sample (mg/kg)			
	Corn		Timothy	
	1	0.629	0.634	8.64
2	1.31 ^{f)}	1.42 ^{f)}	18.2 ^{e)}	2.07 ^{e)}
3	0.810	0.840	10.9	10.8
4	0.586	0.623	8.48	7.97
5	0.220	0.782	9.12	8.40
6	0.592	0.600	4.00	4.64
7	0.728	0.806	9.35	8.79
Spiked level (mg/kg)	1.30		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.696		8.32	
Recovery (%)	53.5		41.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		4.3	
RSD _R ^{c)} (%)	14		26	
PRSD _R ^{d)} (%)	17		12	
HorRat	0.85		2.2	

a) $n=12$ (excluding Laboratory 2)

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

d) Predicted reproducibility relative standard deviation calculated by the modified Horwitz equation

e) Removed by Cochran test

f) Removed by single Grubbs test

Table 12 Instruments used in the collaborative study

Lab No.	LC-MS	Column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: Shimadzu LC-20AD	GL Sciences Inertsil ODS-3
	MS: Shimadzu LCMS-2010EV	(2.1 mm×150 mm)
2	Agilent LC/MS/MS 6410	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(4.6mm×50 mm, 1.8 μm)
3	LC: Agilent 1100 series	Agilent ZORBAX XDB-C18
	MS: Agilent G1946D	(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters Quattro micro API Mass Analyzer	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5u C18 110A
		(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters alliance 2695	GL Sciences Inertsil ODS-3
	MS: Waters Micromass Quattro micro	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

(財) 日本食品分析センターが検討したチオファネートメチル、カルベンダジム及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による残留分析法をもとに、飼料中のカルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルの定量法を検討したところ次の結果を得た。

- 1) 標準液については、閉環反応以降、試料液と同様の操作を行うべきと考えられた。また、チオファネートメチルを定量する場合はチオファネートメチル標準液を用いるべきと考えられた。
- 2) 閉環反応以降の操作を試料液と同様に行った標準液について、ピーク面積を用いて検量線を作成したところカルベンダジム、チオファネートメチル及びチオファネートとも 5~200ng の範囲で直線性を示した。
- 3) カルベンダジムをとうもろこしに 0.70 mg/kg , 乾牧草 (チモシー) に 10 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 96.5%、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.8% 以下の成績が得られた。
- 4) ベノミルをとうもろこしに 1.0 mg/kg, チモシーに 15 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 103.6%、繰返し精度は RSD として 5.0%以下の成績が得られた。
- 5) チオファネートメチルをとうもろこしに 0.70 mg/kg, チモシーに 10 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 83.3%、繰返し精度は RSD として 9.5%以下の成績が得られた。
- 6) 定量下限は試料中で、カルベンダジムとして 50 µg/kg, またはベノミルとして 60 µg/kg 及びチオファネートメチルとして 40 µg/kg 相当量と考えられた。
- 7) チオファネートメチルとしてとうもろこしに 1.3 mg/kg, 及びチモシーに 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いた共同試験の結果、平均回収率 85.5%、室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 4.6%以下及び 19%以下であった。
- 8) 同一操作での定量が可能か検討したチオファネートについては、その回収率が 70%未満であり、定量法の確立には至らなかった。

謝 辞

共同試験に参加して頂いた株式会社島津製作所、社団法人日本科学飼料協会、財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 日本食品分析センター:平成 17 年度 飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業 (分析法の開発) 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2006).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法”,平成 17 年 1 月 24 日,食安発第 0124001 号 (2005).

6 飼料中のトリシクラゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

野崎 友春*, 山多 利秋*

Determination of Tricyclazole in Feed by GC-MS

Tomoharu NOZAKI* and Toshiaki YAMATA*

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

An analytical method for determination of tricyclazole in feed by using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed.

Tricyclazole was extracted with acetonitrile-water and filtered. The filtrate was purified by Chem Elut cartridge chromatography, by gel permeation chromatography (GPC) with a Shodex CLNpak EV-2000AC column, and by silica-gel column chromatography. Tricyclazole was determined by capillary column GC-MS.

A recovery test was conducted with corn and alfalfa spiked with tricyclazole at 20 and 5,000 µg/kg. The mean recoveries of tricyclazole were in the range of 73.2~81.0% and the relative standard deviations (RSD) were within 13.9%.

A collaborative study was conducted with corn and timothy spiked with tricyclazole at 20 and 5,000 µg/kg was conducted in 8 laboratories. The mean quantitative value of corn was 20.1 µg/kg (100.7%), repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 7.1% and 16%, and HorRat was 0.72. As for timothy, these values were 5,090 µg/kg (102%), 6.8%, 17% and 1.3, respectively.

Key words: トリシクラゾール tricyclazole ; 残留農薬 pesticide residue ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

農林水産省では、食品の安全性を確保する観点から、飼料原料に用いられている農薬を中心に60種類の農薬について、飼料安全法に基づいて残留基準値を設定し、平成18年5月29日付で施行した。

しかしながら、トリシクラゾールについては、飼料中の分析法が確立されていないことから、昨年検討したガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の一斉分析法¹⁾及び厚生労働省の試験法²⁾を基にして、今回、飼料中のトリシクラゾールの分析法について検討を行ったのでその概要を報告する。

トリシクラゾールは、ダウアグロケミカルが開発した、メラニン生合成阻害系の殺虫殺菌剤である。国内では他の農薬との合剤として、稲のいもち病及び主要害虫対策として登録されている。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

国内での飼料中の基準は、乾牧草が 5 mg/kg, その他穀物が 0.02 mg/kg である³⁾. 国内での食品中の暫定基準は玄米として 3 mg/kg, その他作物では 0.02 mg である²⁾.

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料（とうもろこし），配合飼料及び乾牧草（チモシー及びフェスク）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し，供試試料とした．

2.2 試薬

1) トリシクラゾール標準原液

トリシクラゾール標準品（和光純薬工業製，純度 100.0%）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてトリシクラゾール標準原液を調製した（この液 1 mL は，各農薬 0.5 mg を含有する．）．

使用に際して，トリシクラゾール標準原液の一定量をアセトンで正確に希釈し，1 mL 中にトリシクラゾールとしてそれぞれ 0.002 µg, 0.005 µg, 0.01 µg, 0.02 µg, 0.05 µg, 0.1 µg 及び 0.2 µg を含有するトリシクラゾール標準液を調製した．

2) アセトニトリル，酢酸エチル，ヘキサン，シクロヘキサン及びアセトンは残留農薬分析用試薬を用いた．

特記している以外の試薬については特級を用いた．

2.3 装置及び器具

1) ガスクロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 GCMS-QP2010

2) ゲル浸透クロマトグラフ：島津製作所製 GPC システム

ポンプ：LC-10ATvp

オートサンプラー：SIL-10A

フラクションコレクター：FRC-10A

3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

4) エバポレーター：BÜCHI 製 R-200

5) 多孔性ケイソウ土カートリッジ：Varian 製 Chem Elut CE 1020 (20 mL 容)

6) シリカゲルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica

7) メンブランフィルター：Waters 製 WTPS フィルター（孔径 0.5 µm, 直径 25 mm）

2.4 定量方法

1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（13+7）を乾牧草にあっては 100 mL, その他の試料にあっては 50 mL 加え，30 分間振り混ぜて抽出した．乾牧草にあっては，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，容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた．抽出液 20 mL を正確に 100 mL のなす形フラスコに入れ，40°C 以下の水浴上で約 5 mL まで減圧濃縮し，カートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした．その他の試料にあっては，300 mL のなす形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，容器及び残さをアセトニトリル

50 mL で洗浄し、吸引ろ過した。ろ液を 40°C 以下の水浴上で約 15 mL まで減圧濃縮し、カートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした。

2) カートリッジカラムクロマトグラフィー I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カートリッジに入れ、容器を水 5 mL で洗浄し、洗液を多孔性ケイソウ土カートリッジに加え 5 分間放置した。200 mL のなす形フラスコを多孔性ケイソウ土カートリッジの下に置き、容器を酢酸エチルーヘキサン (1+1) 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次多孔性ケイソウ土カートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。酢酸エチルーヘキサン (1+1) 40 mL を加えてトリシクラゾールを溶出させ、キーパーとしてジエチレングリコールアセトン (1+49) 1 mL を加え、溶出液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。シクロヘキサンアセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL 遠心沈殿管に入れ、1,000×g で遠心分離をした後、上澄み液メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、トリシクラゾールが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 1 に示した。

ヘキサンアセトン (1+1) 2 mL を加えて残留物を溶かし、カートリッジカラムクロマトグラフィー II に供する試料溶液とした。

Table 1 Operating conditions for GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm)
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	150~190 mL

4) カートリッジカラムクロマトグラフィー II

シリカゲルカートリッジを注射筒に連結し、あらかじめアセトン 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄した。25 mL のなし形フラスコをシリカゲルカートリッジの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。試料溶液の入っていた容器をヘキサンアセトン (1+1) 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次シリカゲルカートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。ヘキサンアセトン (1+1) 4 mL をシリカゲルカートリッジに加えてトリシクラゾールを溶出させ、溶出液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

アセトン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

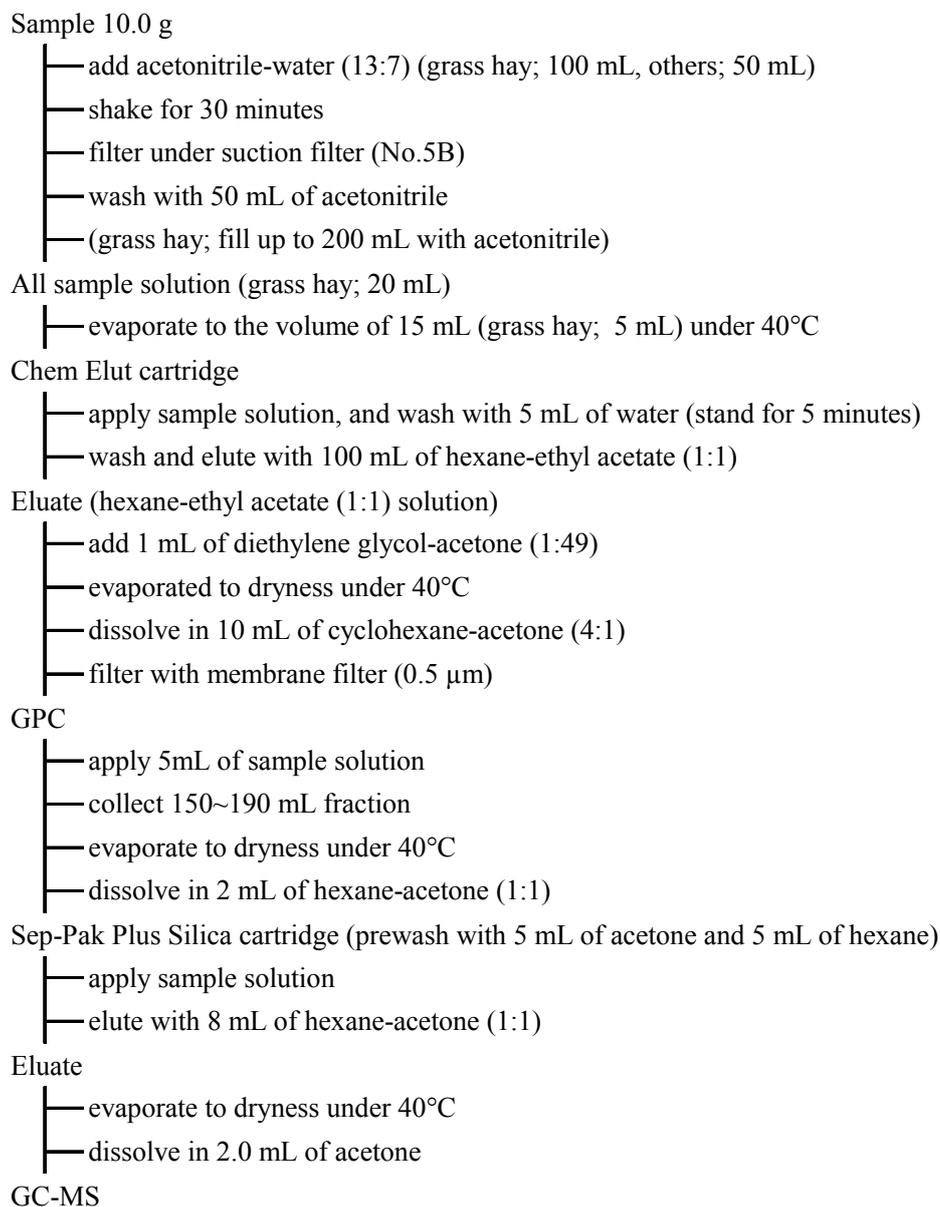
5) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及びトリシクラゾール標準液各 1 μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得た。

6) 計 算

得られた選択イオン検出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、試料中のトリシクラゾールを算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、ガスクロマトグラフィーの測定条件を Table 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for tricyclazole in feeds by using GC-MS

Table 2 Operating conditions for GC-MS

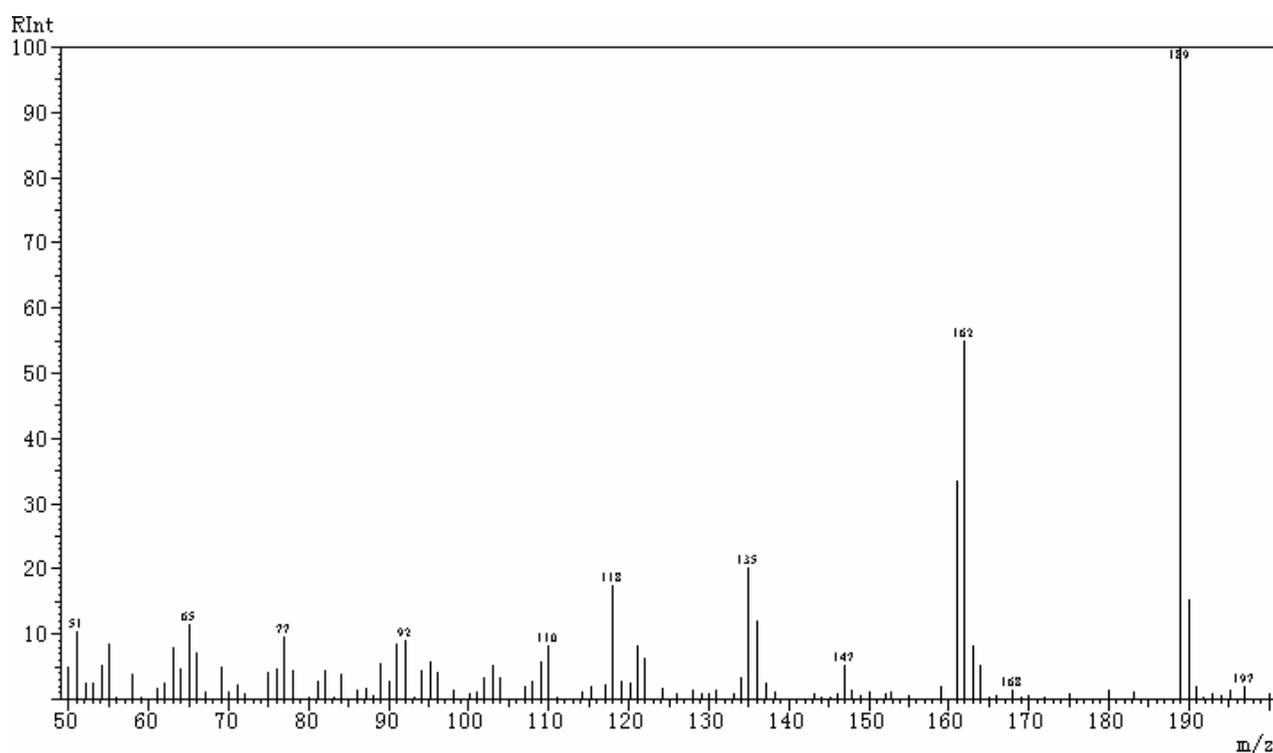
Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m; 0.25 μm film thickness)
Column temp.	70°C (1 min) →25°C/min→200°C→8°C/min→280°C (10 min)
Injection mode	Splitless
Injector temp.	280°C
Carrier gas	He 1.0mL/min
Transferline temp.	250°C
Ion source temp.	230°C
Ionization	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	m/z 189, 162, 161

3 結果及び考察

3.1 測定イオンの設定

0.1 μg/mL トリシクラゾール標準液 1 μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、scan モードで測定した。トリシクラゾールのマススペクトルを Fig. 1 に示す。

この結果から、分子イオンであると考えられる m/z 189 を定量イオンに、 m/z 161 及び 162 を確認イオンとして設定した。

**Fig. 1 Mass spectrum of tricyclazole**

3.2 検量線

調製した 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 及び 0.2 μg/mL のトリシクラゾール標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからトリシクラゾール

ルの検量線を作成した。

その結果、検量線は 0.005~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。

3.3 カートリッジカラムクロマトグラフィーI の検討

先に検討したガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の一斉分析法の精製方法のうち多孔性ケイソウ土カートリッジを用いて、カートリッジカラムクロマトグラフィーI の溶出画分を検討した。

トリシクラゾール標準原液をアセトンで正確に希釈し、1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2.4 の 2) のカートリッジカラムクロマトグラフィーI に供する試料溶液とし、水 15 mL を負荷した後に、試料溶液 1 mL を負荷し、酢酸エチルーヘキサン (1+1) でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 3 のとおりであり、溶出に用いる酢酸エチルーヘキサン (1+1) の量は 100 mL で十分と考えられた。

Table 3 Elution pattern of tricyclazole from Chem Elut cartridge (standard solution)

	Fraction volume (mL)			
	0-50	50-100	100-150	150-200
Tricyclazole	94	5	1	0

3.4 ゲル浸透クロマトグラフィーの検討

ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分を検討した。

3.3 と同様に 1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2 mL を正確にとり、乾固した後に、シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL に溶解し、2.4 の 3) のゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とし、50 mL から 210 mL の間でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 4 のとおりであり、分取する溶出画分は 150~190 mL が適当と考えられた。

Table 4 Elution pattern of tricyclazole from GPC (standard solution)

	Fraction volume (mL)							
	50-70	-90	-110	-130	-150	-170	-190	-210
Tricyclazole	0	0	0	0	0	46	54	0

3.5 カートリッジカラムクロマトグラフィーII の検討

シリカゲルカートリッジカラムクロマトグラフィーの溶出画分を検討した。

3.3 と同様に 1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2.4 の 4) のカートリッジカラムクロマトグラフィーII に供する試料溶液とし、1 mL を負荷した後にヘキサン-アセトン (1+1) でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 5 のとおりであり、溶出に用いるヘキサン-アセトン (1+1) の量は 10 mL で十分と考えられた。

Table 5 Elution pattern of tricyclazole from silica-gel cartridge (standard solution)

	(%)		
	Fraction volume (mL)		
	0-10	10-20	20-30
Tricyclazole	93	7	0

3.6 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし及び乾牧草（フェスク）にトリシクラゾールをそれぞれ 100 µg/kg 相当量添加し，本法に従って分析したところ特に定量に影響する妨害はなかった。

3.7 添加回収試験

とうもろこしにトリシクラゾールとして 20 µg/kg 相当量添加した試料及び乾牧草（フェスク）にトリシクラゾールとして 5,000 µg/kg 相当量添加した試料を用い，本法に従って操作し，その回収率及び分析精度を検討した。

その結果，Table 6 のとおりであった。

Table 6 Recoveries of tricyclazole spiked two kinds of feed

Spiked level (µg/kg)	(%)	
	Corn	Alfalfa
20	73.2 ^{a)} (10) ^{b)}	---
5,000	---	81.0 (14)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため，共通試料による共同試験を実施した。

穀類（とうもろこし）及び乾牧草（チモシー）を用い，株式会社島津総合分析試験センター，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本穀物検定協会中央研究所，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部，同大阪事務所（現同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現同福岡センター）の 8 試験室で共同分析を実施した。

その結果は Table 8 のとおり，とうもろこし中のトリシクラゾールの平均回収率は 100.7%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 7.1%及び 16%であり，HorRat は 0.72 であった。また，チモシー中のトリシクラゾールの平均回収率は 101.8%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 6.8%及び 17%であり，HorRat は 1.3 であった。

なお，参考のため，各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Quantitative value of tricyclazole from corn spiked at 20 µg/kg and timothy spiked at 5,000 µg/kg in the collaborative study

Lab. No.	(µg/kg)			
	Corn		Timothy	
1	17.9	19.2	5,020	4,570
2	19.3	20.2	4,040	4,670
3	16.6	19.6	5,070	4,820
4	21.1	21.2	4,450	4,950
5	14.8	16.8	4,100	4,590
6	54.5 ^{e)}	53.1 ^{e)}	15,900 ^{e)}	15,400 ^{e)}
7	23.0	23.4	6,670	6,040
8	22.6	26.2	5,940	6,330
Spiked level	20.0		5,000	
Mean value ^{a)}	20.1		5,090	
Recovery (%)	101		102	
RSD _r ^{b)} (%)	7.1		6.8	
RSD _R ^{c)} (%)	16		17	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		13	
HorRat	0.72		1.3	

a) $n=14$ (without Lab No. 6)

b) Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

e) Excluded by the single Grubbs test

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
2	GC: Agilent 6890, MS: Agilent 5973	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
3	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
4	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
5	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
6	GC: Agilent 5890II plus, MS: Agilent 5972	Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
7	GC: Agilent 6890N, MS: Agilent 5973	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
8	SHIMADZU GCMS-QP2010	ZB-1 (0.32 mm×30 m, 0.25 µm)

4 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のトリシクラゾールの定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線は 0.005~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 2) とうもろこし及び乾牧草にそれぞれトリシクラゾールとして 20 µg/kg 及び 5,000 µg/kg 相当量を添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 73.2~81.0%、その繰返し精度は相対標

準偏差 (RSD) として、14%以下であった。

- 3) とうもろこし及び乾牧草にトリシクラゾールとしてそれぞれ 20 µg/kg 及び 5,000 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果、とうもろこしの平均回収率は 101%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 7.1%及び 16%であり、HorRat は 0.72 であった。また、乾牧草の平均回収率は 102%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 6.8%及び 17%であり、HorRat は 1.3 であった。

なお、本法は、平成 18 年 12 月 18 日付けで飼料分析基準に収載された⁴⁾。

また、添加回収試験及び定量下限の検討については、財団法人日本食品分析センターで検討を行っている⁵⁾ことからこちらを参照されたい (p.225) . 謝 辞

共同試験にご協力をいただいた株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会、財団法人日本穀物検定協会、財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 2) 厚生労働省告示：“食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成 17 年 11 月 29 日，平成 17 年厚生労働省告示第 499 号 (2005).
- 3) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 12 月 18 日，18 消安第 9921 号 (2006).
- 5) 飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業「飼料中の有害物質等の分析法の開発」，平成 19 年 3 月，財団法人日本食品分析センター (2007).

7 キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計（ピリジン・ピラゾロン法）による定量法

甲斐 茂浩*, 白澤 優子*

Determination of Hydrogen cyanide in Cassava by Absorptiometric Analysis

Shigehiro KAI* and Yuko SHIRASAWA*

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

An analytical method for determination of hydrogen cyanide in cassava by using spectrophotometer was developed.

After acidified with citric acid buffer solution, the samples were incubated for 4 hours at 25~30°C. The cyanogenic glucoside was hydrolyzed to free cyanide, collected with steam distillation, and colored by pyridine-pyrazolone method. Hydrogen cyanide was determined by spectrophotometer.

A recovery test was conducted with cassava at spiked with cyanide ion at 0.5 and 4 mg/kg. The mean recoveries of hydrogen cyanide cassava were 79.0~90.0% and the relative standard deviations (RSD) were within 15.0%.

A collaborative study with two samples of cassavas with different concentration of hydrogen cyanide (samples A and B) was conducted in 8 laboratories. For sample A, the mean value of hydrogen cyanide was 3.18 mg/kg, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 8.0% and 9.6% respectively. For sample B, these values were 3.18 mg/kg, 8.0% and 15% respectively.

Key words: シアン化水素 hydrogen cyanide ; キャッサバ cassava ; ピリジン・ピラゾロン法 pyridine-pyrazolone method

1 緒 言

キャッサバ (Cassava = *Manihot* spp.) は、東南アジア、アフリカ、中南米などの熱帯地方に広く栽培されておりタピオカとも呼ばれ根塊が飼料として利用される。キャッサバは有毒なシアン化合物が配糖体として含まれているが、その含量は、原料の品種、栽培条件、加工処理の条件等により大きく変動するといわれている¹⁾。

キャッサバ等に含まれるシアン配糖体がそしゃくや消化の段階で、分解酵素の働きによりシアンが産生されることにより、しばしば家畜の中毒の原因となっている²⁾。

現在、キャッサバ中のシアン化水素の定量法としては、試料中のシアン化合物を弱酸性下で加水分解し、生成するシアン化水素を水蒸気蒸留してアルカリ液に捕集し、硝酸銀標準液で滴定して求める方法（以下「現行法」という）が飼料分析基準³⁾に記載されている。しかしながら一般的に硝酸銀滴定法でシアン化水素の定量を行う方法は、検出感度と定量精度が低いことが指摘^{4)~6)}されている。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

今回、JIS法^{7),8)}及び衛生試験法⁹⁾等で広く採用されている吸光光度法（ピリジン・ピラゾロン法）を用いるシアン化水素の定量法を基に分析法の検討を行ったので、その概要を報告する。

2 分析方法

2.1 試料

市販のキャッサバ（Table 1）を1 mmの網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

Table 1 Test samples in this study

Sample No.	Name	Country of origin	Shape	pH ^{a)}
1	Tapioca	Thailand	---	4.7
2	CASSABA・P	Thailand	Pellet	5.2
3	Tapioka Pellet	Thailand	Pellet	4.9
4	Tapioca	Thailand	---	5.2
5	Cassaba Pellet	Thailand	Pellet	4.6

a) Dissolved 10 g of sample in 100 mL of water, and measured pH

b) Shape was unidentified.

2.2 試薬

特記している試薬以外は特級を用いた。

1) 0.1 mol/L 硝酸銀標準液

硝酸銀 17 g を量って 1,000 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 0.1 mol/L 硝酸銀標準液を調製し、次によりその濃度を標定した。この標準液は、褐色瓶に保存した。

塩化ナトリウム（標準試薬）（白金るつぼ中で 600°C で 50 分間加熱したもの）1.461 g を量って 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た。この液 25 mL を三角フラスコに正確に入れ、水 25 mL 及びデキストリン水和物溶液（2 w/v%）5 mL を加えた。更にウラニン溶液（0.2 w/v%）数滴を加え、0.1 mol/L 硝酸銀標準液で黄緑の蛍光が消えて微紅色となったときを終点として滴定し、0.1 mol/L 硝酸銀標準液の濃度を標定した。

2) *p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液

p-ジメチルアミノベンジリデンロダニン 20 mg をアセトンに溶かして 100 mL とした。

3) シアン化物イオン標準原液

シアン化カリウム 0.626 g を量って 250 mL の全量フラスコに入れ、少量の水を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液（0.5 mol/L）2.5 mL を加え、更に標線まで水を加えてシアン化物イオン標準原液を調製し、以下によりその濃度を標定した。

標準原液 100 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液 0.5 mL を加えた。この液を 0.1 mol/L 硝酸銀溶液で溶液の色が黄色から赤になったときを終点として、滴定した。次式によりシアン化物イオン標準液の濃度 C (mg CN⁻/mL) を算出した。

$$C = \frac{a \times f \times 5.204}{100}$$

C : シアン化物イオン標準液 (mg CN⁻/mL)

a : 滴定に要した 0.1 mol/L 硝酸銀溶液 (mL)

f : 0.1mol/L 硝酸銀溶液の係数

4) シアン化物イオン標準液

シアン化物イオン標準原液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに正確に入れ、水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mol/L) 25 mL を加え、更に標線まで水を加えた。この液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加えて 1 mL 中にシアン化物イオンとして 1 µg を含有するシアン化物イオン標準液を使用時に調製した。この標準液の係数には、3) で求めたシアン化物イオン標準原液の係数を用いた。

5) クエン酸緩衝液

クエン酸一水和物 128.1 g 及び水酸化ナトリウム 64.4 g を水に溶かして 1,000 mL とした。使用に際して、この液の一定量を水で 10 倍に希釈し、その pH をクエン酸溶液 (2 w/v%) 及び水酸化ナトリウム溶液 (2 w/v%) で 5.9 に調整した。

6) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 3.40 g 及びリン酸水素二ナトリウム 3.55 g を水に溶かして 1,000 mL とした。

7) クロラミン T 溶液

クロラミン T 0.62 g を水に溶かして 50 mL とした (使用時に調製)。

8) ピリジン・ピラゾロン溶液

1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25 g を 75°C の温水 100 mL に溶かして室温まで冷却し (完全に溶けていなくても差し支えない)、ビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) 0.02 g をピリジン 20 mL に溶かした液をこの液に加えた (使用時に調製)。

2.3 装置及び器具

- 1) 分光光度計：日立製 U-3010 型 石英セル
- 2) 塩入・奥田式窒素蒸留装置
- 3) マイクロビュレット (10 mL 容)：柴田科学製
- 4) 恒温装置：東洋製作所製 THM062FA 型

2.4 定量方法

1) 試料液の調製

分析試料 10.0 g を量って 500 mL ケルダールフラスコに入れ、クエン酸緩衝液 100 mL を加え密栓した後、恒温装置を用いて 25~30°C で約 4 時間静置した。水酸化ナトリウム溶液 (2 w/v%) 25 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液の液量が 100 mL に達するまで蒸留した。この時の留出速度は 2~3 mL/min とした。フェノールフタレイン溶液 (0.5 w/v%) 1 滴を留出液に加え、留出液を酢酸 (1+8) で中和した後、この液を水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて試料溶液とした。

2) 試料溶液の発色と測定

試料溶液 5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水 5 mL を加えて 10 mL とし、更にリン酸緩衝液 10 mL 及びクロラミン T 溶液 0.25 mL を加え、直ちに密栓して穏やかに混和した後 5 分間放置した。ピリジン・ピラズロン溶液 15 mL をこの液に加え、更に全量フラスコの標線まで水を加え、密栓して穏やかに振り混ぜた後、恒温装置を用いて 25~30°C で約 50 分間放置した。この液について、試料溶液の代わりに水を用いて試料溶液と同様に操作した液を対照液として、波長 620 nm の吸光度を測定した。

3) 標準液の調製、発色及び測定

シアン化物イオン標準液 0.5, 1, 2, 3 及び 4 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水を加えて 10 mL とした。以下試料溶液と同様に操作した後、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定した。得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のシアン化物イオン量を算出し、この値に換算係数 1.03 を乗じて試料中のシアン化水素量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

1 mL 中にシアン化物イオンとして 0.01, 0.02, 0.06, 0.1 及び 0.18 µg を含む各標準液を調製し、得られた吸光度から検量線を作成した。

その結果、検量線は 0.01~0.18 µg/mL の範囲で原点を通る直線性を示した。

3.2 添加回収試験

本法による回収率及び分析精度を確認するため、添加回収試験を行った。キャッサバ（2.1 の試料による）にシアン化物イオンとして 0.5 及び 4.0 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。なお、今回用いた試料はシアン化水素を自然に含有しているため、試料のブランク値を求めて補正を行った。

その結果、Table 2 のように平均回収率は 90.0% (0.5 mg/kg 相当量添加時) 及び 79.0% (4.0 mg/kg 相当量添加時) であり、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 15% 以下であった。

Table 2 Recovery test of cyanide ion

Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)	Quantitative value (mg/kg)
0.5	90.0 ^{a)} (9.3 ^{b)})	3.69 ^{c)} (3.24 ^{d)})
4	79.0 ^{a)} (15 ^{b)})	6.56 ^{c)} (3.40 ^{d)})

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Spiked sample (Mean recovery: $n=3$)

d) Not spiked sample (Mean recovery: $n=3$)

3.3 定量下限及び検出下限

本法による定量下限及び検出下限を確認するため、低濃度における繰返し試験を実施した。

シアン化水素として約 8 mg/kg 含有する試料を、7 回繰返して加水分解及び蒸留し、各留出液について、検量線上の最低濃度（シアン化物イオンとして 0.01 µg/mL 相当）付近になるよう希釈した後、それぞれ発色及び測定した。

その結果、平均値は、0.0087 $\mu\text{g/mL}$ 、標準偏差は0.0011 $\mu\text{g/mL}$ (RSD 13%)であったことから、本法の定量下限及び検出下限は、得られた標準偏差のそれぞれ10倍及び3.3倍に相当する濃度を求め試料中濃度に換算して、2.0 mg/kg 及び 0.7 mg/kg と見積もられた。

3.4 現行法との比較

本法及び現行法の試験成績を比較するために、供試したキャッサバ5点について、現行法及び本法によりシアン化物イオンを定量した。その結果は Table 3 のとおりであり、分析値に有意な差は認められなかった。

Table 3 Comparison of quantitative value of hydrogen cyanide by two methods

Sample No.	This method	(mg/kg)
		Existing method (Titration by silver nitrate solution)
1	8.5	8.5
2	9.7	10.7
3	3.9	3.2
4	10.8	7.2
5	6.2	5.3

3.5 共同試験

本法の再現精度を調査するため、キャッサバ（試料 A 及び B）を用いて、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の8試験室において本法に従って共同分析を実施した。

その結果は、Table 4 のとおり、キャッサバ（試料 A）の繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 8.0% 及び 9.6% であり、HorRat は 0.82 であった。また、キャッサバ（試料 B）の繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 8.0% 及び 15% であり、HorRat は 1.1 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した分光光度計の機種を Table 5 に示した。

Table 4 Collaborative study results

Laboratory No.	(mg/kg)			
	Sample A		Sample B	
1	7.05	8.12	2.75	2.36
2	8.92	6.97	2.58	3.05
3	8.10	8.19	2.85	3.03
4	8.07	8.07	3.34	2.92
5	7.40	7.70	3.17	3.72
6	9.62	9.57	3.15	3.15
7	10.01 ^{c)}	7.24 ^{c)}	4.10	3.86
8	8.08	8.20	3.26	3.55
Mean value (mg/kg)	8.15		3.18	
RSD _r ^{a)} (%)	8.0		8.0	
RSD _R ^{b)} (%)	9.6		15	
HorRat	0.82		1.1	

- a) Relative standard deviation of repeatability
 b) Relative standard deviation of reproducibility
 c) Data excluded by Cochran test

Table 5 Instruments used in the collaborative study

Laboratory No.	Spectrophotometer	
1	Shimadzu	UV-240
2	Shimadzu	UV-mini1240
3	Shimadzu	UV-mini1240
4	Hitachi	U-1000
5	Shimadzu	UV-1200
6	Shimadzu	UV-mini1240
7	Hitachi	U-3210
8	Hitachi	U-3010

4 まとめ

キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計（ピリジン・ピラゾロン法）による定量法について検討したところ、次の結果が得られた。

- シアン化物イオン標準液の検量線は 0.01~0.18 µg/mL の範囲で直線性を示した。
- キャッサバにシアン化物イオンとして 0.5 mg/kg 及び 4.0 mg/kg 相当量を添加し、本法により添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 79.0~90.0%、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 15%以下の結果が得られた。
- 本法の定量下限及び検出下限は、それぞれ 2.0 mg/kg 及び 0.7 mg/kg と推定された。
- 本法と現行法（硝酸銀滴定法）との定量値を比較した結果、有意差は認められなかった。
- シアン化水素の含有量の異なるキャッサバ A 及び B を用いて、8 試験室において本法による共同試験を実施した。その結果、キャッサバ A（平均定量値 8.15 mg/kg）の室内繰返し精度及び室内再現精度は、相対標準偏差（RSD_r 及び RSD_R）として 8.0% 及び 9.6% であり、HorRat は 0.82 で

あった。また、キャッサバ B (平均定量値 3.18 mg/kg) の室内繰返し精度及び室間再現精度は、それぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 8.0% 及び 15% であり、HorRat は 1.1 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 堀井 聡, 阿部 亮, 森本 宏: 畜産試験場研究報告, 19, 63 (1969).
- 2) 飼料分析基準研究会編著: 飼料分析法・解説, 7-8 (2004). ((社) 日本科学飼料協会)
- 3) 農林水産省畜産局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 4) 近本武次, 米谷 武: 食衛誌, 25, 530 (1984).
- 5) 上田 工, 勝木康隆, 安田和男, 佐藤彌代子, 木村康夫: 東京衛研年報, 24, 269 (1972).
- 6) 勝木康隆, 安田和男, 上田 工, 直井家壽太: 東京衛研年報, 29-1, 261 (1978).
- 7) JIS K 0120: “工場排水試験法”, 127 (1998).
- 8) 環境庁水質保全局海洋汚染・廃棄物対策室監修: “産業廃棄物分析マニュアル”, 152 (1997). (日本環境測定分析協会)
- 9) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解”, 241 (2000). (金原出版)

8 豚用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良

大島 慎司^{*1}, 篠田 直樹^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 千原 哲夫^{*3}

Improved Determination of Avilamycin in Formula Feed for Swine by Microbiological Assay

Shinji OSHIMA^{*}, Naoki SHINODA^{*}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*} and Tetsuo CHIHARA^{*}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Fertilizer and Feed Inspection Department,

^{*2} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office),

^{*3} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Nagoya Regional Center))

An improved microbiological assay was developed for the determination of avilamycin in formula feed for swine.

Avilamycin in formula feeds was extracted with acetone-water (4:1). The extract was diluted with phosphate buffer-acetone (4:1) and phosphate buffer-acetone (19:1) to prepare sample solutions of 0.2 µg(potency)/mL, so that the concentration of acetone in each sample solutions be came 20 percent. *Micrococcus luteus* ATCC 10240 was added as the test organism to the agar medium F-8 added with 30 g/1,000 mL of sodium chloride, and avilamycin was determined by the standard response line method. The recovery test was conducted with 3 kinds of formula feed for swine added with avilamycin at levels of 10, 20, and 40 g(potency)/tons. The mean recovery was 94.1~112.7%, and the relative standard deviations (RSD) were within 7.8%.

The collaborative study was conducted with formula feed for swine added with avilamycin at the level of 20 g(potency)/tons in 8 laboratories. The mean recovery was 101.3%, and the relative standard deviation of repeatability and reproducibility (RSD_r and RSD_R) were 4.0% and 5.5%, respectively.

Key words: アビラマイシン avilamycin ; 抗生物質 antibiotics ; 豚用配合飼料 formula feed for swine ; 微生物学的定量法 microbiological assay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

アビラマイシンは, *Streptomyces viridochromogenes* の産生するオルトソマイシン系の抗生物質で, 飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を用途として, 飼料添加物に指定され¹⁾, 鶏用(幼すう用, 中すう用及びブロイラー用)飼料に 2.5~10 g(力価)/トン及び豚用(ほ乳期用及び子豚期用)飼料に 10~40g(力価)/トン添加することができる²⁾.

配合飼料中のアビラマイシンの定量法は, 菅野ら³⁾が検討した微生物学的定量法が既に飼料分析基準⁴⁾(以下「現行法」という.)に記載されているが, 近年, 加熱加工された配合飼料に現行法を

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*3} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

適用した場合，アビラマイシン添加量に対して低く定量される事例が認められている。

また，現行法は，抽出溶媒にクロロホルムを用いており，環境面，分析者の健康面等から，使用を避けることが望まれている。

今回，以上の問題点を解決し，より簡便な方法となるように，荒木ら^{5),6)}が検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法を基に，豚用配合飼料に適用できる改良法を検討したので，その概要を報告する。

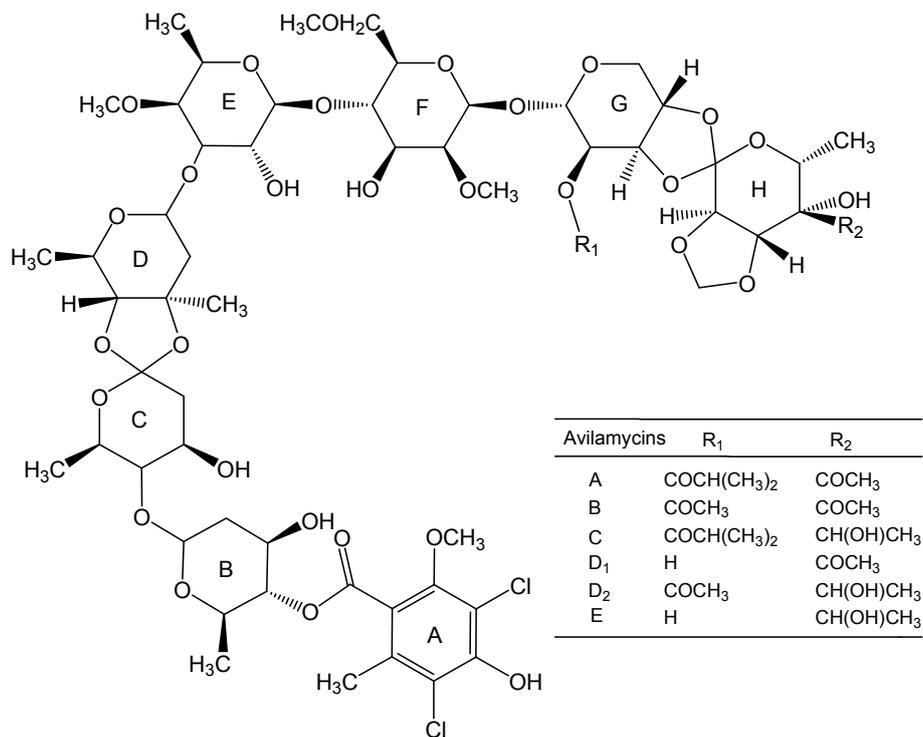


Fig. 1 Chemical structure of avilamycin

2 実験方法

2.1 試料の調製

抗菌性物質を含まない市販の3種類の豚用配合飼料にアビラマイシン製剤（Eli Lilly & Co.製）を添加し，アビラマイシンを10, 20及び40 g(力価)/t含有する試料をそれぞれ調製した。調製後，0.5 mmの網ふるいを通過するまで粉砕した。

試料の調製に用いた配合飼料の配合割合の概要は，Table 1のとおりである。

Table 1 Example of component of formula feed

Kind of formula feed	Classification of ingredient	Ratio (%)	Ingredient
For swine 1 (suckling pig)	Animal by-product feeds	43	Powdered skimmed milk, Fish meal
	Grains	33	Wheat
	Oil meals	3	Soybean protein concentrate
	Others	21	Glucose, Granulated sugar, Feed yeast, Calcium phosphate, Salt, Powdered fat
For swine 2 (suckling pig)	Grains	65	Corn, Wheat, Wheat flour
	Animal by-product feeds	15	Powdered skimmed milk, Fish meal
	Oil meals	7	Soybean protein concentrate
	Others	13	Glucose, Feed yeast, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Powdered fat
For swine 3 (growing pig)	Grains	73	Corn, Wheat flour
	Brans	9	Wheat bran
	Oil meals	9	Soybean meal
	Animal by-product feeds	5	Fish meal
	Others	4	Alfalfa meal, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt

2.2 試薬の調製

1) 7号緩衝液

リン酸二水素カリウム 6.4 g 及びリン酸水素二ナトリウム・12水 18.9 g を水 750 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とし、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

2) 希釈溶媒

7号緩衝液ーアセトン (4+1)

3) アビラマイシン標準液

常用標準アビラマイシン適量を減圧下 (2.67~3.33 kPa 以下)、60°C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、アセトンを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のアビラマイシン標準原液を調製した。

使用に際して、標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し、0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL の各標準液を調製した。

4) F-8 号培地

Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 45 g (ペプトン 7.2 g, 肉エキス 1.8 g, 酵母エキス 3.6 g, ブドウ糖 7.2 g, 塩化ナトリウム 7.2 g 及びカンテン 18 g) を水に溶かして 1,000 mL にし、水酸化ナトリウム 1 mol/L を用いて pH を 7.9~8.1 に調製した後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

5) F-25 号培地

Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 45 g 及び塩化ナトリウム 30 g を水に溶かして 1,000 mL にし、水酸化ナトリウム 1 mol/L を用いて pH を 7.9~8.1 に調製した後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

6) 菌液

試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、飼料分析基準⁴⁾に準じて菌液を調製した。

7) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51°C に保温した培地に菌液の 10 倍希釈液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 20 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm、合成樹脂製）に一様に広がる様に分注し、水平に静置して凝固させた。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔となる位置に、せん孔機（システムサイエンス製 ZP-SM）を用いて 4 個のせん孔（内径 8 mm）を設けた。

8) 抽出溶媒

アセトン-水（4+1）

2.3 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g（アビラマイシンとして 0.1~0.4 mg(力価)相当量）を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、マグネチックスターラー（柴田科学製 MU-4）で 20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙（5 種 A）でろ過した。

2) 希釈

ろ液の一定量を試料液中のアセトン濃度が 20 v/v%となるように、希釈溶媒及び 7 号緩衝液-アセトン（19+1）で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製した。

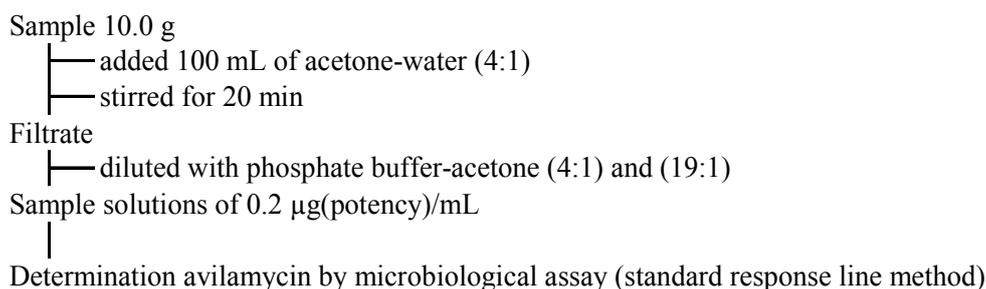
3) 分注及び培養

2.2 の 7) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準⁴⁾の標準曲線法に準じ、標準液及び試料溶液をそれぞれ 100 µL ずつ各せん孔に分注し、9~11°C で 2 時間静置した後、35~37°C で 16~24 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

ゾーンアナライザー（システムサイエンス製 ZA-F MODEL PCA-11）を用い、培養を終えた寒天平板上の阻止円の直径をそれぞれ 0.1 mm まで正確に測定し、飼料分析基準⁴⁾の標準曲線法に準じ、試料中のアビラマイシン濃度を求めた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for avilamycin in formula feed for swine

3 結果及び考察

3.1 培地の検討

試験菌には、アビラマイシンに対する感受性が高いことから、アビラマイシン原体及び製剤の力価試験法²⁾並びに菅野ら³⁾及び荒木ら^{5),6)}も用いている *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用いることとし、豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量に最適な培地を検討することとした。

豚用飼料に対するアビラマイシンの添加量（10~40 g(力価)/t）及び試料採取量を 10 g に設定した場合、参照標準液（RP）の濃度は最高でも 0.2 μg (力価)/mL にしかできず、そのためには、RP 濃度 0.2 μg (力価)/mL での標準液の最低濃度 0.05 μg (力価)/mL においても明瞭な阻止円を形成するような、感度の高い培地の選定が必要であった。

菅野ら³⁾及び荒木⁵⁾が配合飼料及びプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討で用いている F-8 号培地並びに荒木ら⁶⁾がサリノマイシンナトリウム及びラサロシドナトリウムを含むプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討で用いている F-25 号培地について、0.01~2 μg (力価)/mL のアビラマイシン標準液を用い、せん孔法におけるアビラマイシンの *Micrococcus luteus* ATCC 10240 に対する感受性及び阻止円の鮮明度を比較した。

その結果、Fig. 2 のとおり、F-25 号培地は F-8 号培地よりもアビラマイシンに対する感受性が高く、0.025 μg (力価)/mL 程度まで阻止円が明瞭であることを確認した。

以上のことから、以後の検討では F-25 号培地を用いることとし、0.05~0.8 μg (力価)/mL の範囲で標準曲線を作成することとした。

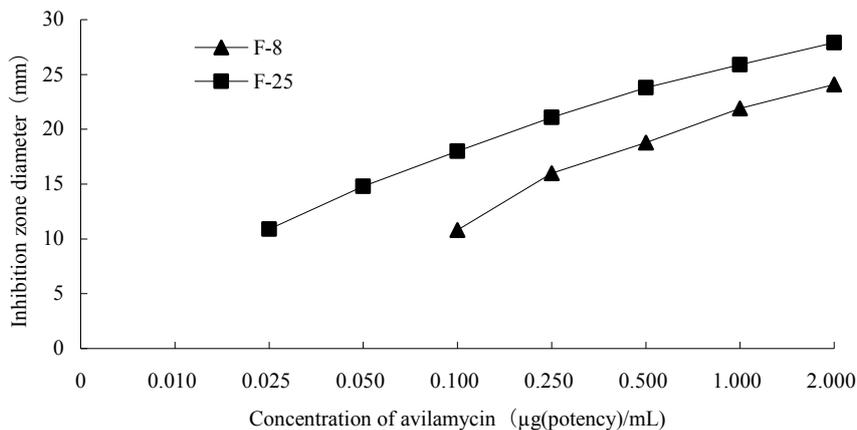


Fig. 2 Sensitivity curve of avilamycin on each culture medium

3.2 抽出溶媒の検討

アビラマイシンが 20g(力価)/t 添加された市販の豚用配合飼料を用い、クロロホルムを用いない抽出溶媒の検討を行った。

配合飼料中のアビラマイシンを荒木⁵⁾が検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法と同様に、7号緩衝液 20 mL を加え、5 分間かき混ぜた後、さらにアセトン 80 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、以下本法に従ってアビラマイシンを定量したところ、回収率にばらつきが認められた。

次に、アセトンと 7号緩衝液を混合し、アセトン濃度を 60%から 90%まで 10%ずつ変えて調整した抽出溶媒 100 mL で 20 分間抽出した後、同様にアビラマイシンを定量した。その結果、アセトン-7号緩衝液 (4+1) で抽出した場合に、回収率が最も高く、またばらつきも小さくなった。

しかし、アセトン-7号緩衝液 (4+1) は、混合液中に塩の析出が認められたため、7号緩衝液を水に変えて同様に回収率の検討を行った。

その結果、Table 2 のとおり、アセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした場合にはアセトン-7号

緩衝液（4+1）で抽出した場合とほぼ同等の回収率が得られたため、以後の検討では同溶媒を抽出溶媒として用いることとした。

Table 2 Recovery of avilamycin in various extracting solvents

Kind of extracting solvent	Mean ^{a)} (RSD) ^{b)} (%)	
	Mean ^{a)}	(RSD) ^{b)}
Acetone-water (9:1)	94.9	(3.5)
Acetone-water (4:1)	112.9	(1.6)
Acetone-water (7:3)	94.7	(10)
Acetone-water (3:2)	73.9	(6.1)

a) Mean recovery ($n=2$)

b) Relative standard deviation

3.3 分析用試料の調製方法の検討

アビラマイシンが添加された市販の豚用配合飼料を 1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、本法に従ってアビラマイシンを定量したところ、マッシュ状の試料で回収率にばらつきが認められた。

荒木ら^{5),6)}はプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討の際に、分析用試料を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、分析値のばらつきを改善しており、配合飼料についても同様の措置を採ることにより改善される可能性が考えられた。そこで、0.5 及び 1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した 5 種類の市販の加熱加工されていないほ乳期子豚用配合飼料（アビラマイシン表示量：20 g (力価)/t）を用い、本法に従って繰り返し 3 回分析し、その回収率を求め、試料の粉砕粒度の違いによる影響を確認した。

その結果、Table 3 のとおり、0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した試料の繰り返し精度は相対標準偏差（RSD）として 4.5%以下となり、1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した試料の結果と比較してばらつきが改善された。

このことから、豚用配合飼料中のアビラマイシンを定量する場合には、試料を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕することが必要であると考えられた。

Table 3 Influence on recovery of avilamycin by the difference of sample preparing method

Sample number	Declared content (g(potency)/ton)	Particle size (%)			
		1.0 mm		0.5 mm	
		Mean ^{a)}	(RSD) ^{b)}	Mean	(RSD)
4 (before heat processing)	20	120.9	(19)	108.1	(4.5)
5 (before heat processing)	20	100.2	(20)	114.3	(4.3)
6 (before heat processing)	20	91.8	(11)	82.8	(4.1)
7 (before heat processing)	20	119.9	(26)	114.9	(3.4)
8 (before heat processing)	20	108.3	(9.9)	100.5	(3.9)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.4 加熱加工飼料への適用性

市販の加熱加工されたほ乳期子豚用配合飼料（アビラマイシン表示量：20 g (力価)/t）5種類を用い、現行法及び本法によりそれぞれ繰り返し3回分析し、アビラマイシンの回収率を求め、本法の加熱加工飼料への適用性について検討した。

その結果、Table 4 のとおり、本法により、加熱加工飼料の回収率に改善が認められた。

Table 4 Comparison of recovery of avilamycin by the existing and this method

Sample number	Declared content (g(potency)/ton)	Methods of analysis (%)			
		Existing method		This method	
		Mean ^{a)}	(RSD) ^{b)}	Mean	(RSD)
4 (after heat processing)	20	75.9	(0.91)	95.7	(1.3)
5 (after heat processing)	20	73.5	(2.1)	90.6	(3.1)
6 (after heat processing)	20	86.4	(16)	91.8	(3.8)
7 (after heat processing)	20	80.2	(6.4)	96.3	(8.1)
8 (after heat processing)	20	102.7	(8.8)	106.9	(5.1)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.5 妨害物質の検討

現在、飼料添加物に指定されている抗菌性物質のうち、豚用配合飼料でアビラマイシンとの併用が可能なものには、クエン酸モランテル、デストマイシン A、ビコザマイシン及び硫酸コリスチンの4種類がある。これらの標準液を用い、F-25号培地における試験菌 *Micrococcus luteus* ATCC 10240 に対する感度曲線を求め、その感受性、阻止円の状態及び配合飼料への添加量等から、これらの併用が豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害する可能性を検討した。

この結果、いずれの抗菌性飼料添加物も試験菌に対して感受性が認められず、豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害することはないと考えられた。

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した試料を用い、本法により3点併行分析を行い、回収率及び繰り返し精度を検討した。

その結果は、Table 5 のとおり、平均回収率は94.1~112.7%、その繰り返し精度は相対標準偏差(RSD)として7.8%以下の成績が得られた。

Table 5 Recovery tests of avilamycin in formula feeds

Added level (g(potency)/ton)	Formula feeds (%)					
	For swine 1		For swine 2		For swine 3	
	Mean ^{a)}	(RSD) ^{b)}	Mean	(RSD)	Mean	(RSD)
40	106.8	(1.6)	100.1	(1.1)	105.8	(4.4)
20	107.5	(6.1)	97.6	(0.49)	94.1	(3.2)
10	95.6	(7.8)	111.2	(4.4)	112.7	(5.6)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.7 共同試験

本法の再現精度を調査するため、Table 1 の豚用配合飼料 3 にアビラマイシンとして 20 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用い、財団法人日本食品分析センター名古屋支所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の 8 試験室において、本法による共同試験を実施した。

その結果、Table 6 のとおり、アビラマイシンの総平均回収率は 101.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）としてそれぞれ 4.0%及び 5.5%であった。

Table 6 Collaborative study results

Laboratory	Recovery (%)	
1	96.1	91.0
2	100.3	101.7
3	104.4	113.5
4	108.1	104.8
5	103.3	92.6
6	99.0	102.4
7	100.5	100.7
8	98.9	102.9
Total ^{a)} (%)	101.3	
RSD_r ^{b)} (%)	4.0	
RSD_R ^{c)} (%)	5.5	

a) Total mean recovery ($n=18$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility

4 まとめ

豚用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良法について検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) F-8号培地に培地 1,000 mL あたり塩化ナトリウムを 30 g 加えた F-25 号培地は F-8 号培地よりもアビラマイシンに対する感受性が高く、0.025 μg (力価)/mL 程度まで阻止円が明瞭であった。
- 2) 抽出溶媒としては、アセトン-水 (4+1) が最適であった。
- 3) 豚用配合飼料中のアビラマイシンを定量する場合には、分析用試料を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕することが必要であった。
- 4) 市販の加熱加工された豚用配合飼料 5 種類について、本法を適用したところ、現行法に比較して回収率に改善が認められた。
- 5) アビラマイシンとの併用が認められている抗菌性物質のうち、豚用配合飼料への使用が認められているクエン酸モランテル、デストマイシン A、ビコザマイシン及び硫酸コリスチンは、アビラマイシンの定量を妨害することはなかった。
- 6) 本法による添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 94.1~112.7%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 7.8%以下であった。
- 7) 豚用配合飼料にアビラマイシンとして 20 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用い、8 試験室において、本法による共同試験を実施した結果、アビラマイシンの総平均回収率は 101.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) としてそれぞれ 4.0%及び 5.5%であった。

謝 辞

共同試験にご協力頂いた財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林省告示：“飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件”，昭和 51 年 7 月 24 日，告示第 750 号 (1976).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 菅野 清，佐々木 隆：飼料研究報告，17，83 (1992).
- 4) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 5) 荒木誠士：飼料研究報告，22，87 (1997).
- 6) 荒木誠士，風間鈴子：飼料研究報告，22，97 (1997).

9 飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度の吸光光度法による測定

八木 寿治^{*1}, 大島 慎司^{*2}, 堀米 明日香^{*3}, 福本 裕二^{*4}, 石黒 瑛一^{*5},
岩永 知子^{*6}, 末次 暁子^{*6}, 小泉 慶子^{*6}, 五十嵐 友二^{*6}, 瀧上 賢一^{*6}

Measurement of Degree of Starch Gelatinization in Flaked Corn for Feeds by Absorption Spectroscopy

Toshiharu YAGI^{*1}, Shinji OSHIMA^{*2}, Asuka HORIGOME^{*3}, Yuji FUKUMOTO^{*4},
Eiichi ISHIKURO^{*5}, Tomoko IWANAGA^{*6}, Akiko SUETSUGU^{*6}, Keiko KOIZUMI^{*6},
Yuji IGARASHI^{*6} and Kenichi FUCHIGAMI^{*6}

(^{*1} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Nagoya Regional Center),

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

^{*3} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*4} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office),

^{*5} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters (Now Japan Food Research Laboratories),

^{*6} Japan Food Research Laboratories)

A possibility of application of an improved analytical method for degree of starch gelatinization in flaked corn for feeds by absorption spectroscopy was examined.

Gelatinized starch in sample was decomposed to glucose by glucoamylase, and the glucose was colored by using glucose measurement kit. Absorbance of 505 nm for the colored glucose was measured by UV-visible spectrophotometer.

We studied technically three critical factors (Sample preparation, Enzyme deactivation time after the enzyme reaction and Difference of measured values for depending on the difference of the used enzyme) to optimize this analysis method.

A collaborative study with three samples was conducted to evaluate the accuracy of this method in 9 laboratories. As a result, the relative standard deviation of repeatability and reproducibility (RSD_r and RSD_R) were in the range of 3.5~5.0%, and 6.6~11%, respectively.

Key words: 圧ぺんとうもろこし flaked corn ; デンプン starch ; 糊化 gelatinization ; グルコアミラーゼ glucoamylase ; グルコース glucose ; 吸光光度法 absorption spectroscopy ; 共同試験 collaborative study

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター,

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部,

^{*3} (独) 肥飼料検査所本部, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課,

^{*4} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*5} (独) 肥飼料検査所本部, 現 財団法人日本食品分析センター,

^{*6} (財) 日本食品分析センター

1 緒 言

高等動物にとって栄養素として重要なデンプンは、結晶構造の差異により α -デンプンと β -デンプンに分類される。 β -デンプンは結晶構造が硬く、 α -デンプンはデンプン分子の隙間に水分子が入り込むことで結晶構造が崩れたものであり、 β -デンプンを加熱すると α -デンプンになる¹⁾。 α -デンプンは β -デンプンと比較して酵素による分解が容易²⁾で、デンプン中の α -デンプンの割合を表したものが糊化 (α 化) 度と呼ばれている。

デンプンは穀類中に多く含まれており、家畜の飼料原料として、とうもろこし、マイロ、大麦、ライ麦等が加熱圧ぺん加工されている。これらデンプンを α 化して消化性、栄養価、嗜好性を高めたものの配合飼料へ添加する割合が最近増加し、牛用配合飼料のほとんどは、 α 化したフレーク状の圧ぺんとうもろこしが添加されており、種豚用及び子豚用飼料にも多用されている²⁾。

圧ぺんとうもろこしは飼料用輸入とうもろこしを原料として製造されることがあるが、この際、承認工場制度により関税上の優遇を受けることが可能である。当該制度の下では飼料用輸入とうもろこしが飼料用以外に使用されることを防止するため、当該とうもろこしを变形加工することが義務づけられ、加工後、糊化度が 30%以上であることの証明が求められている³⁾。しかし、糊化度の測定法には、ジアスターゼ法⁴⁾、グルコアミラーゼ法⁵⁾、 β -アミラーゼ・プルラナーゼ (BAP) 法⁶⁾等多種の分析法が存在し、採用する分析法によっては結果に大きな違いが生じ、取り扱いに問題が生じるようになってきている。今般、公定分析法として分析法の統一化の要望が多数寄せられたため、食品分析法に記載されている「グルコアミラーゼ法」⁷⁾を (財) 日本食品分析センターが一部改良した分析法 (以下、「分析センター法」という。) を基に飼料分析基準⁸⁾ (公定分析法) への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

市販の圧ぺんとうもろこしを供試試料とした。

2.2 試 薬

1) デンプン溶液

可溶性デンプン 0.2 g を 100 mL のビーカーに入れ、水 50 mL を加えて煮沸し、放冷後、水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えた。

2) グルコース標準液

グルコース [$C_6H_{12}O_6$] 0.1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてグルコース標準原液を調製した (この液 1 mL はグルコースとして 1 mg を含有する.)。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中に 20~80 μ g を含有するグルコース標準液を調製した。

3) 酢酸溶液

酢酸 60 g に水を加えて 500 mL とした。

4) 酢酸緩衝液

酢酸ナトリウム三水和物 136 g を水に溶かして 500 mL とし、酢酸溶液で pH を 4.8 に調整した。

5) 1 mol/L 酢酸緩衝液

酢酸緩衝液を水で 2 倍量に希釈した。

6) 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 40.0 g を水に溶かして 100 mL とした。

7) 発色液

グルコース C-II テストワコー（和光純薬工業製）の発色試液を用いた。なお、発色液調製法は取扱説明書に従った。

8) 酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液

グルコアミラーゼ 0.1 g (*Aspergillus niger* 起源, Megazyme 製) を 100 mL の全量フラスコに入れ、1 mol/L 酢酸緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えた（使用時に調製した。）。

9) グルコアミラーゼ溶液

以下の手順により、酵素力価が 1 mL あたり 2.63 U となるようにグルコアミラーゼ溶液を調製した。

U: グルコアミラーゼが可溶性デンプンに 37°C で作用する時、1 分間に 1 μ mol のグルコースを生成する量を 1 単位 (U) とした。

i) グルコース生成量の測定

デンプン溶液 4 mL を 25 mL の試験管に正確に入れ、37°C の恒温槽中で 10 分間予備保温した後、酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL を正確に加えて 37°C で正確に 10 分間反応させた。その後、試験管を沸騰水浴中に正確に 8 分間入れて酵素を失活させた。放冷後 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて酵素力価測定用溶液を調製した。

同時に、予め酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液を沸騰水浴中で 8 分間煮沸し酵素を失活させておいたものを用いて同一操作を行い、空試験溶液とした。

次に酵素力価測定用溶液 1 mL を 25 mL の試験管に正確に入れ、発色液 3 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37°C の恒温槽中で 5 分間放置した。その後、水を対照として波長 505 nm の吸光度を測定した。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正した。

同時に各グルコース標準液について、酵素力価測定用溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して酵素力価測定用溶液中のグルコース濃度 G (μ g/mL) を求めた。

ii) グルコアミラーゼの酵素力価の計算

次式により酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL あたりの酵素力価 E (U/mL) を求めた。

$$E \text{ (U/mL)} = \frac{100 \times G}{180.16 \times 10}$$

iii) グルコアミラーゼ採取量の算出

次式により 2.63 U/mL のグルコアミラーゼ溶液の調製に必要なグルコアミラーゼ採取量 A (g) を算出した。

$$A \text{ (g)} = \frac{B \times 2.63}{E}$$

B: 酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液調製時のグルコアミラーゼ採取量 (g)

iv) グルコアミラーゼ溶液の調製

グルコアミラーゼ A (g) を正確に量って 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た（使用時に調製した。）。

10) 特記する以外の試薬は特級、水はイオン交換水を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 超遠心粉砕機：Retsch 製 ZM-100
- 2) ボールミル粉砕機：CMT 製 TI-100
- 3) 試験管ミキサー：柴田科学製 TTM-1
- 4) ウォーターバス：東京理化機械製 SB-35
- 5) 恒温槽：太洋科学工業製 M-100^N
- 6) 紫外可視分光光度計：島津製作所製 UV-240

2.4 試料の調製

試料 10 g を超遠心粉砕機を用いて、液体窒素による冷却を行いながら粒径 0.15 mm (100 mesh) 以下になるまで粉砕した。次に 250 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、エタノール 150 mL を加えてかき混ぜ、脱脂を行い、100×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を捨てた。次にアセトン 150 mL を加えて同様に処理し、一夜風乾させたものを試料溶液の調製に供する試料とした。

2.5 測定方法

1) 試料溶液の調製

試料 100 mg を量って 25 mL の試験管に入れ、水 8 mL を正確に加え、試験管ミキサーを用いて均一な懸濁液を調製した。懸濁液 2 mL ずつを 25 mL の試験管 3 本に正確に分取しそれぞれ (S)、(R) 及び (R₀) とした。(S) には、酢酸緩衝液 1.6 mL 及び水 0.4 mL を正確に加えた (全量は 4 mL となる。)(R) 及び (R₀) には、振り混ぜながら水酸化ナトリウム溶液 0.2 mL を正確に加え、65°C の水浴で 5 分間加温し完全に糊化させ、水冷後、酢酸溶液 1.6 mL を正確に加えて中和し、更に水 0.2 mL を正確に加えて 4 mL とした。

(S)、(R) 及び (R₀) を、あらかじめ 37°C の恒温槽で 10 分間予備保温した後、(S) 及び (R) にはグルコアミラーゼ溶液 1 mL を加え、(R₀) にはあらかじめグルコアミラーゼ溶液を沸騰水浴中で正確に 8 分間煮沸し失活させておいたもの (失活グルコアミラーゼ溶液) 1 mL を正確に加え、ときどき振り混ぜながら 37°C の恒温槽で正確に 60 分間反応させた。その後、(S)、(R) 及び (R₀) を沸騰水浴中に正確に 8 分間入れて酵素を失活させた。

放冷後、(S)、(R) 及び (R₀) を水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加え、ろ紙 (5 種 B) でろ過してそれぞれ試料溶液 (S)、(R) 及び (R₀) とした。

2) 発色及び吸光度測定

試料溶液 (S)、(R) 及び (R₀) 各 1 mL をそれぞれ別の 25 mL の試験管に正確に入れ、発色液 3 mL ずつを正確に加えて振り混ぜた後、37°C の恒温槽中で 5 分間放置した。その後、水を対照として波長 505 nm の吸光度を測定した。

3) 計算

得られた各吸光度から次式により糊化度を求めた。

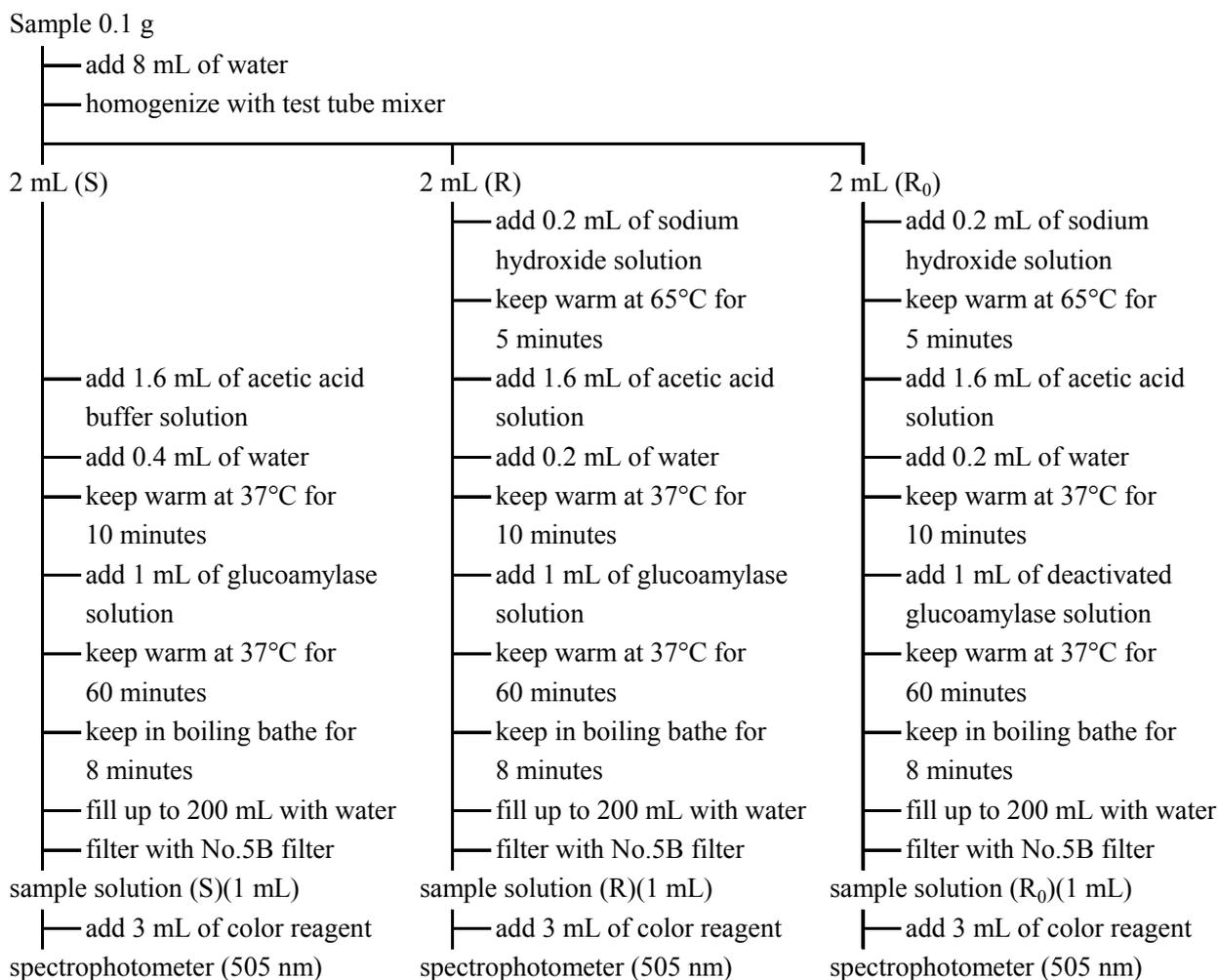
$$\text{糊化度 (\%)} = \frac{A_S - B_R}{A_R - B_R} \times 100$$

A_S : 試料溶液 (S) の吸光度

A_R : 試料溶液 (R) の吸光度

B_R : 試料溶液 (R₀) の吸光度

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for measurement of degree of starch gelatinization

3 結果及び考察

3.1 試料の調製方法の検討

試料の粒径が 0.15 mm (100 mesh) 以下であれば、粒度の不均一は糊化度の測定値の結果に影響を及ぼさないという報告⁹⁾もあることから、分析センター法では試料を粉砕機を用いて粉砕、次いで脱脂処理をした後、0.15 mm の網ふるいを通過したもののみを分析に供している。しかし、試料の種類が圧ぺんとうもろこしの場合では、外皮が硬いため試料を粉砕機にかけても、全量が 0.15 mm の網ふるいを通過するほど細かく粉砕できず、ふるい下には白色の胚乳部等、ふるい上には黄色の果皮部等が残り、大きく分けて 2 つの部位に分離された。

著者らは、ふるい下及びふるい上のこれら 2 つの部位について、糊化度の測定値の同一性に関して疑問を感じたため、糊化度に影響を与えないよう比較的発熱しないと言われているボールミル粉砕機を用いて粉砕を行い、脱脂処理・ふるいによる分離後、2.5 の測定方法に準じて糊化度を求めた (Table 1 試料 A, B)。

その結果、ふるい下 (試料 A) 及びふるい上 (試料 B) の糊化度は異なった値を示したことから、このことは、とうもろこしの部位の違いによるものと考えられた。

なお、ふるい上（試料 B）は 0.15 mm の網ふるいを通過しなかったため分析に供することができるように、液体窒素による冷却を行いながら試料の粒径が 0.08 mm（185 mesh）まで再粉砕を行った。

著者らは、圧ぺんとうもろこしの粒全体の糊化度を求めるために、超遠心粉砕機を用いて 0.08 mm 以下の粒度になるように粉砕を行い、脱脂処理した後、2.5 測定方法に準じて糊化度を求めた（試料 C）。また、熱の影響を避けるために、液体窒素による冷却を行いながら同様に粉砕、脱脂処理したもの（試料 D）との比較検討を行った（Table 1 試料 C, D）。

液体窒素による冷却を行わなかった試料は、冷却を行った試料に対して糊化度が高く測定された。これは、糊化度は 50°C 以上になると熱の影響を受けて変化する⁹⁾と言われており、今回、冷却を行わなかった試料は粉砕途中で摩擦による熱が発生し、糊化度が高くなったと考えられた。よって、粉砕を行う際には、液体窒素による冷却を行いながら、超遠心粉砕機を用いて粉砕を行う方法で試料の調製を行うこととした。

Table 1 Comparison of A_S , A_R and degree of starch gelatinization in sample preparing

Sample		A_S ^{a)}	A_R ^{b)}	Degree of starch gelatinization (%)
A ^{c)}	1	0.326	0.652	49.1
	2	0.334	0.641	51.2
	3	0.340	0.638	52.4
Mean (RSD)		0.333	0.644	50.9 (3.3)
B ^{d)}	1	0.374	0.564	65.5
	2	0.398	0.568	69.4
	3	0.387	0.561	68.2
Mean (RSD)		0.386	0.564	67.7 (2.9)
C ^{e)}	1	0.369	0.702	51.7
	2	0.377	0.705	52.7
	3	0.396	0.711	54.9
Mean (RSD)		0.381	0.706	53.1 (3.1)
D ^{f)}	1	0.290	0.671	42.2
	2	0.281	0.683	40.1
	3	0.277	0.663	40.7
Mean (RSD)		0.283	0.672	41.0 (2.6)

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

c) The sample passed 0.15 mm screen after crushing with ball mill and removing fat.

d) The sample that did not pass 0.15 mm screen after crushing with ball mill and removing fat, and that was recrushed to 0.08 mm under the condition of cooling with liquid nitrogen.

e) The sample passed 0.08 mm screen after crushing with super-centrifugal and disintegrator and removing fat.

f) The sample passed 0.08 mm screen after crushing with super-centrifugal and disintegrator (under the condition of cooling with liquid nitrogen) and removing fat.

3.2 酵素失活時間の検討

酵素反応後、沸騰水浴中に試験管を入れ酵素失活の操作を行うが、その酵素失活時間について検討を行った。2.5 に準じ、60 分間グルコアミラーゼ溶液と反応させた後、沸騰水浴中にて 0, 1, 3, 5, 7 及び 10 分間正確に計時し酵素を失活させ、以下、発色及び吸光度測定に関しては測定方法と同様に行った。その結果を Table 2 に示した。なお、試料は前項で検討したのと同じ試料を用いた。

酵素失活時間と A_S の関係では酵素失活時間を 1 分間とした試料溶液が最も高い吸光度を示し、酵素失活時間が長くなるにつれて吸光度値の低下が認められ、約 7 分間以降は一定になる傾向が見られた。これは十分な酵素失活時間があれば酵素反応は停止し、吸光度値は一定となることを示している。また、酵素失活時間 1 分間付近に最も大きい吸光度を示すことは、試料溶液 (S) に含まれている β -デンプンが熱により糊化されつつ、酵素失活が起こるため、酵素失活時間 1 分間では熱により α -デンプンが増加したところに、酵素失活時間不足により失活しきれなかった酵素が吸光度測定までの間に作用したためであると考えられた。

一方、酵素失活時間と A_R の関係では酵素失活時間が長くなるにつれて吸光度値の低下が認められ、約 7 分間以降は一定になる傾向が見られた。また、吸光度値の変化は試料溶液 (S) に見られたような極大を示さなかった。これは、試料溶液 (R) はアルカリ添加により含有している β -デンプンを完全に α -デンプン化させたものであるため、加熱による変化は受けず、また、酵素は加熱時間に比例して失活し、失活しきれなかった酵素が吸光度測定までの間に作用したことによるためと考えられた。

以上の結果及び酵素失活時間と糊化度の関係より、酵素失活時間は 7 分間以上必要であると考えられたため、本法では安全を見込んで 8 分間とした。

Table 2 Comparison of A_S , A_R and degree of starch gelatinization in examination of enzyme deactivation time

Enzyme deactivation time (min)		A_S ^{a)}	A_R ^{b)}	Degree of starch gelatinization (%)
0	1	0.399	0.772	50.9
	2	0.402	0.760	52.1
Mean (RSD)		0.401	0.766	51.5 (1.7)
1	1	0.435	0.710	60.6
	2	0.426	0.703	59.9
Mean (RSD)		0.431	0.707	60.3 (0.81)
3	1	0.360	0.685	51.7
	2	0.372	0.694	52.8
Mean (RSD)		0.366	0.690	52.2 (1.5)
5	1	0.303	0.678	43.5
	2	0.317	0.687	45.0
Mean (RSD)		0.310	0.683	44.3 (2.4)
7	1	0.281	0.668	41.0
	2	0.284	0.672	41.2
Mean (RSD)		0.283	0.670	41.1 (0.35)
10	1	0.288	0.671	41.9
	2	0.293	0.670	42.7
Mean (RSD)		0.291	0.671	42.3 (1.4)

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

3.3 酵素の相違による測定値の差の検討

酵素の違いによる糊化度の測定値の差について検討した。前項で検討したのと同じ圧ぺんとうもろこしに対して 2.5 に準じ、各メーカーから販売されている酵素を用いて検討を行った結果を Table 3 に示す。

その酵素起源の違いによると思われる測定値の差が顕著に見られた。現在、*Rhizopus* 起源の酵素は数多く市販されているが、 α -デンプンと老化デンプン (β -デンプンの一種で α -デンプンが水を遊離して不溶の状態となったもの) の識別が非常に悪く、食品分析法では *Aspergillus niger* 及び *Endomyces* 起源の酵素の使用を推奨している¹⁰⁾。正確に糊化度を求めるためには、どちらかの起源の酵素の使用が望ましいが、*Endomyces* 起源の酵素は販売されていることは確認できなかった。*Aspergillus niger* 起源の酵素は Megazyme 製のものが販売されているため、使用酵素として *Aspergillus niger* 起源の酵素を本法に適用することにした。

Table 3 Comparison of A_S , A_R and degree of starch gelatinization between different enzymes

Enzyme maker	Enzyme origin		A_S ^{a)}	A_R ^{b)}	Degree of starch gelatinization (%)
Wako	<i>Rhizopus sp.</i>	1	0.244	0.650	36.3
		2	0.231	0.647	34.4
		3	0.236	0.646	35.2
Mean (RSD)			0.237	0.648	35.3 (2.7)
Toyobo	<i>Rhizopus sp.</i>	1	0.219	0.624	33.6
		2	0.217	0.631	32.9
		3	0.213	0.639	31.8
Mean (RSD)			0.216	0.631	32.8 (2.7)
Megazyme	<i>Aspergillus niger</i>	1	0.288	0.663	42.4
		2	0.285	0.665	41.8
		3	0.302	0.672	43.9
Mean (RSD)			0.292	0.667	43.8 (2.5)

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

3.4 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。圧ぺん度合いが異なる 3 種類の圧ぺんとうもろこしを用い、財団法人日本穀物検定協会東京分析センター、同神戸分析センター、同九州分析センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の 9 試験室において共同試験を行った。その結果を Table 4 に示す。得られた試験結果から IUPAC の共同試験のプロトコル¹¹⁾を参考にし、Cochran 及び Grubbs の検定によつてはずれ値を除外した後、総平均測定値と室内繰返し精度及び室間再現精度の相対標準偏差を算出した。

試料 A の総平均測定値は 37.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_I 及び RSD_R ）として 5.0%及び 11%，試料 B の総平均測定値は 58.2%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_I 及び RSD_R として 3.5%及び 6.6%，試料 C の総平均測定値は 47.8%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_I 及び RSD_R として 3.6%及び 8.9%であった。

Table 4 Collaborative study results for measurement of degree of starch gelatinization

Laboratory	Flaked corn A		Flaked corn B		Flaked corn C	
1	32.3	37.0	55.1	53.4	41.9	43.7
2	36.0	35.2	57.1	63.1	46.8	45.3
3	35.8	36.9	59.8	58.5	48.2	49.2
4	38.6	37.7	58.2	58.1	45.1	47.8
5	32.1	32.3	51.9	55.9	43.1	44.7
6	43.1	48.5	67.9 ^{c)}	85.3 ^{c)}	57.2	55.3
7	37.4	36.8	55.9	55.1	47.2	44.7
8	41.2	39.3	63.6	65.1	48.6	53.6
9	37.7	35.7	61.4	59.1	48.9	49.9
Mean (%)	37.4		58.2		47.8	
RSD _r ^{a)} (%)	5.0		3.5		3.6	
RSD _R ^{b)} (%)	11		6.6		8.9	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

c) Excluded by Cochran test

4 まとめ

飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度について吸光光度法による測定について検討したところ次の結果を得た。

- 1) 試料の調製は全量を粒度 0.15 mm 以下に液体窒素による冷却を行いながら、超遠心粉碎機を用いて粉碎を行う方法が最適であると考えられた。
- 2) 酵素反応後、沸騰水浴中に試験管を入れ酵素失活を行うが、その酵素失活時間に関しては7分間以上は必要であり、安全を見込んで8分間とした。
- 3) 酵素起源及び製造メーカーの異なる3種のグルコアミラーゼを用いたところ、糊化度の測定値に差が見られた。このことから起源及び製造メーカーの統一化が望ましく、本法には *Aspergillus niger* 起源の Megazyme 製の酵素を使用することとした。
- 4) 圧ぺん度合いが異なる3種類の圧ぺんとうもろこしを用い、計9試験室において本法による共同試験を行った。その結果、今回用いた試料の室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 3.5~5.0% 及び 6.6~11% の範囲であった。

なお、本報告の一部は日本食品科学工学会第53回大会(2006)において発表された。また、本法は平成18年5月15日付けで飼料分析基準に収載された¹²⁾。

謝 辞

共同試験にご協力いただいた財団法人日本穀物検定協会及び財団法人日本食品分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

また、検討用飼料を提供していただいた協同飼料株式会社鹿島工場、ジェイエイ東海くみあい飼料株式会社清水工場、JA 東日本くみあい飼料株式会社群馬工場、清水港飼料株式会社鹿島工場、全国酪農業協同組合連合会鹿島飼料工場、明治飼糧株式会社鹿島工場、雪印種苗株式会社鹿島工場の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 社団法人 日本科学飼料協会：新編 飼料ハンドブック第二版，220 (2004).
- 2) 化学大辞典編集委員会編：化学大辞典 6 縮刷版，288 (1963).
- 3) 農林水産省生産局長通知：飼料用とうもろこし等の変形加工等証明取扱要領について”，平成 13 年 3 月 31 日，13 生畜第 1441 号 (2001).
- 4) 渡辺長男，長谷 幸：澱粉工業会誌，5，110 (1958).
- 5) 外山忠男，檜作 進，二国二郎：澱粉工業会誌，13，69 (1966).
- 6) 貝沼圭二，松永暁子，板川正秀，小林昭一：澱粉科学，28，235 (1981).
- 7) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，646 (1982).
- 8) 農林水産省畜産局長通達：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 9) 農林省名古屋肥飼料検査所：改訂版 実用飼料検査法，70 (1978).
- 10) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，653 (1982).
- 11) IUPAC Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994, Horwitz, W.: Pure and Appl. Chem., 67 (2), 331 (1995).
- 12) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 5 月 15 日，18 消安第 1333 号 (2006).

技術レポート**1 ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナの検討**千原 哲夫^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 進藤 富枝^{*3}**1 緒 言**

飼料分析基準¹⁾に記載されたポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法^{2)~7)}で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナは、サリノマイシンナトリウム (SL) 及びモネンシンナトリウム (MN) では Alcoa 製の Activated Aluminas F-20 又はこれと同等のもの、ナラシン (NR) では Alcoa Industrial Chemicals 製の Activated Aluminas CG-20 又はこれと同等のもの(粒径はいずれも 74~177 μm (200~80 メッシュ)) を用いることが注記されている。なお、Activated Aluminas CG-20 は Activated Aluminas F-20 を精製したものであり、Activated Aluminas CG-20 が流通してからは、Activated Aluminas F-20 の入手が困難になったことから、Activated Aluminas CG-20 を Activated Aluminas F-20 の同等品として扱ってきた。

平成 18 年 7 月時点での調査では、上記の 2 種類の塩基性アルミナは、一般に流通しておらず、また Alcoa Industrial Chemicals は塩基性アルミナの製造を停止し、Almatis AC, 更に Engelhard がその製造を引き継いだとの情報が得られた。

各試験室内の Activated Aluminas CG-20 の在庫が尽きた場合に、微生物学的定量法によるポリエーテル系抗生物質の定量に支障を来すことが考えられるために、今回、現在流通しているカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナを調査、検討し、これらの代替となる同等品としての知見を得たので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

抗菌性物質を含まない市販の中すう育成用配合飼料及び肉用牛肥育用配合飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

各配合飼料の配合割合は、表 1 のとおりである。

なお、サリノマイシンナトリウム及びナラシンでは中すう育成用配合飼料、モネンシンナトリウムでは肉用牛肥育用配合飼料を用いた。

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*2} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*3} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

表 1 配合飼料の配合割合

飼料の種類	原材料の区分	割合 (%)	原材料名
中すう育成用	穀 類	69	とうもろこし
	植物性油かす類	13	大豆油かす
	そ う こ う 類	7	米ぬか
	動物質性飼料	5	魚粉
	そ の 他	6	アルファルファ, リン酸カルシウム, 炭酸カルシウム, 食塩, 飼料添加物
肉用牛肥育用	穀 類	59	とうもろこし, 大麦, マイロ
	そ う こ う 類	35	ふすま, コーングルテンフィード
	植物性油かす類	5	大豆油かす
	そ の 他	1	炭酸カルシウム, 食塩, 飼料添加物

2.2 試 薬

1) サリノマイシンナトリウム標準液

常用標準サリノマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下), 60°C で 3 時間乾燥した後, 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてサリノマイシンナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は, サリノマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 10 µg(力価)を含有するサリノマイシンナトリウム標準液を調製した.

2) ナラシン標準液

常用標準ナラシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてナラシン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ナラシンとして 0.2 mg(力価)を含有する.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 8 µg(力価)を含有するナラシン標準液を調製した.

3) モネンシンナトリウム標準液

常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてモネンシンナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は, モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 6 µg(力価)を含有するモネンシンナトリウム標準液を調製した.

4) カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ

比較試験を行った塩基性アルミナは, 表 2 のとおりである.

表 2 塩基性アルミナの種類

製品名	粒度	製造番号	製造（販売）業者
① Activated Aluminas CG-20	80-200 mesh	A1-192	Alcoa Industrial Chemicals
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	80-200 mesh	P567098	GFS Chemicals
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	80-200 mesh	P672606	GFS Chemicals
④ Chromatographic alumina CG-20	80-200 mesh	803-04	Engelhard
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1237076	Merck
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1306676	Merck
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1326276	Merck
⑧ Aluminum oxide Type F-20	80-200 mesh	112K0955	Sigma-Aldrich
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	40-200 mesh	L137915	GFS Chemicals

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ

溶離液用ポンプ：島津製作所製 LC-9AD
 オートサンプラー：日本分光製 AS-950
 紫外可視吸光光度検出器：島津製作所製 SPD-10AV
 反応液用ポンプ：島津製作所製 LC-9AD
 反応槽：島津製作所製 CRB-6A
 カラム恒温槽：島津製作所製 CTO-6A
 データ処理機：島津製作所製 C-R6A

2) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4

2.4 定量方法

1) 抽出

試料（サリノマイシンナトリウム及びナラシンでは中すう育成用配合飼料，モネンシンナトリウムでは肉用牛肥育用配合飼料）10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，標準液 100 mL を加え，マグネチックスターラーで 20 分間かき混ぜた後，ろ紙（5 種 A）でろ過し，カラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

2) カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ 12 g をカラム管（内径 14 mm）に乾式で充てんし，クリーンアップ用カラムを調製した。試料溶液をカラムに入れ，流出液 5 mL 毎の画分を採取し，液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び標準液 20 μ L を液体クロマトグラフに注入し，クロマトグラムを得た。

測定条件

検出器：紫外可視吸光光度検出器（測定波長：520 nm）
 カラム：Shim-pack VP-ODS（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μ m）
 溶離液：メタノール-水-酢酸（94+6+0.1）
 反応液：硫酸 10 mL をメタノール 475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後，バニリン 15 g を加えて溶かす（用時調製）。

流 速：溶離液 0.6 mL/min, 反応液 0.6 mL/min

カラム槽温度：40°C

反応槽温度：95°C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、各標準液におけるピーク面積に対する各試料液におけるピーク面積の比を求め、各抗生物質の回収率として算出した。

3 結果及び考察

3.1 液体クロマトグラフィーによる回収率の確認

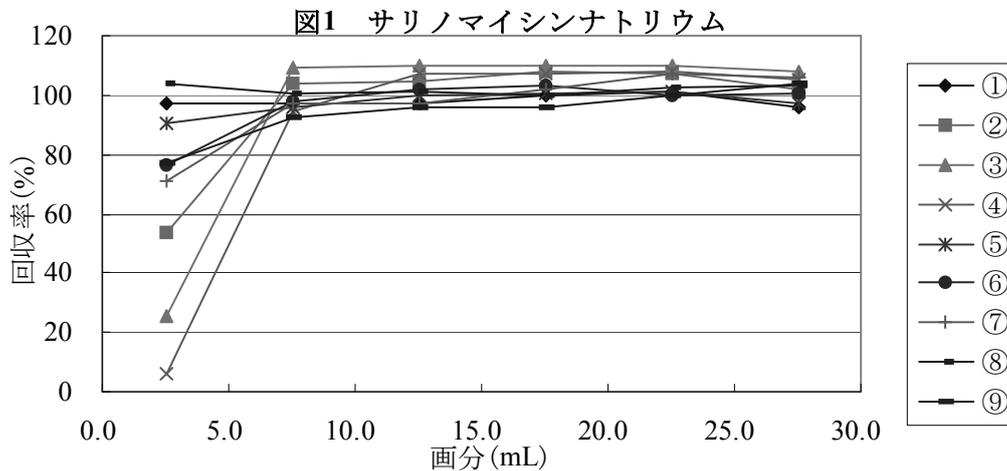
1) サリノマイシンナトリウムについて

中さう育成用配合飼料にサリノマイシンナトリウム標準液（10 µg(力価)/mL）を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、サリノマイシンナトリウムの回収率を求めたところ、表3、図1の結果となった。

通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤及び⑧があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分ではほぼ同等の挙動を示すものとして⑥、⑦及び⑨があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表3 サリノマイシンナトリウム
 中すう育成用配合飼料：10 µg(力価)/mL

製品名	製造番号	流出画分 (mL)						回収率：%
		~5	~10	~15	~20	~25	~30	
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	97	97	97	100	101	96	
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	53	104	105	108	107	102	
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	25	109	110	110	110	108	
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	6	95	107	108	108	105	
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	91	96	100	101	101	97	
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	76	98	102	103	100	101	
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	71	97	98	102	107	106	
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	104	100	101	100	103	103	
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	77	92	96	96	100	104	



2) ナラシン

中すう育成用配合飼料にナラシン標準液（8 µg(力価)/mL）を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、ナラシンの回収率を求めたところ、表4、図2の結果となった。

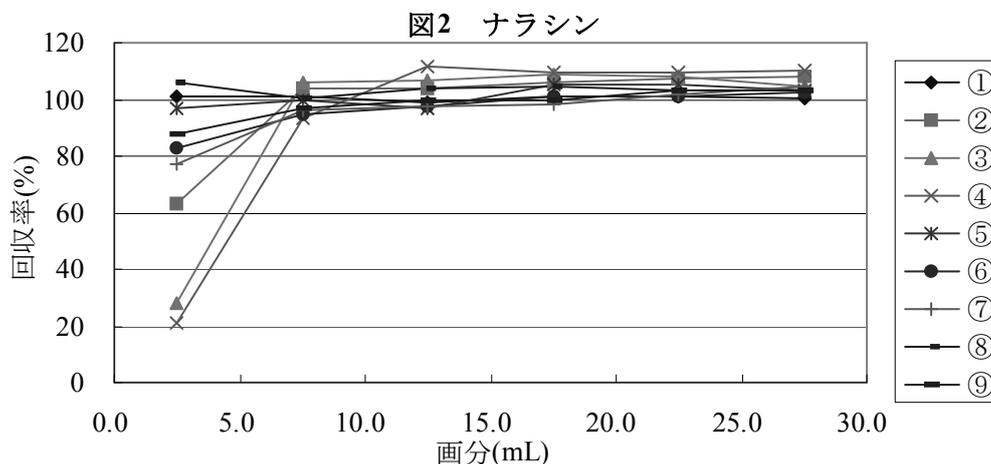
通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤及び⑧があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分ではほぼ同等の挙動を示すものとして⑥、⑦及び⑨があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表4 ナラシン

中すう育成用配合飼料：8 µg(力価)/mL

回収率：%

製品名	製造番号	流出画分 (mL)					
		~5	~10	~15	~20	~25	~30
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	101	101	99	101	101	101
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	63	104	104	106	107	108
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	28	106	107	109	108	105
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	21	93	112	110	109	110
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	97	100	97	105	105	103
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	83	95	97	101	101	102
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	77	96	98	98	102	105
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	106	100	104	104	103	103
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	88	97	100	100	103	103



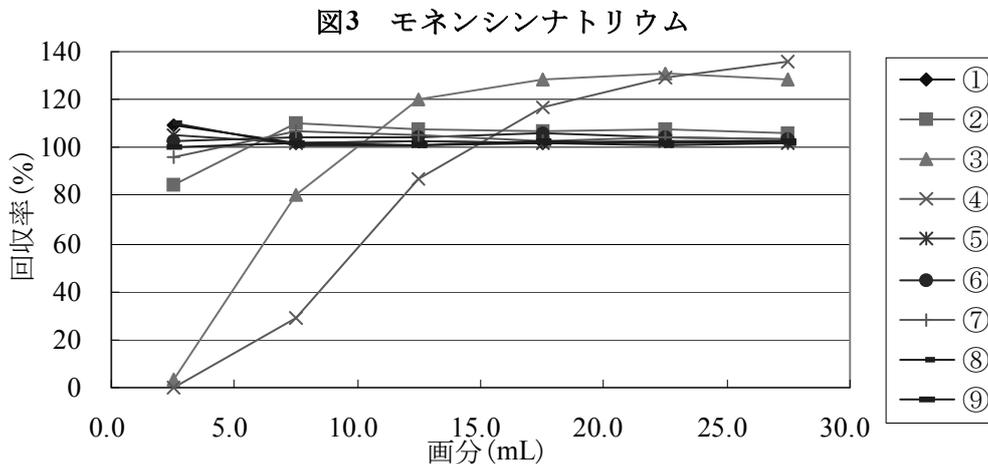
3) モネンシナトリウム

肉用牛肥育用配合飼料にモネンシナトリウム標準液 (6 µg(力価)/mL) を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、モネンシナトリウムの回収率を求めたところ、表5、図3の結果となった。

通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤、⑥、⑧及び⑨があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分でほぼ同等の挙動を示すものとして⑦があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表5 モネンシンナトリウム
肉用牛肥育用配合飼料：6 µg(力価)/mL

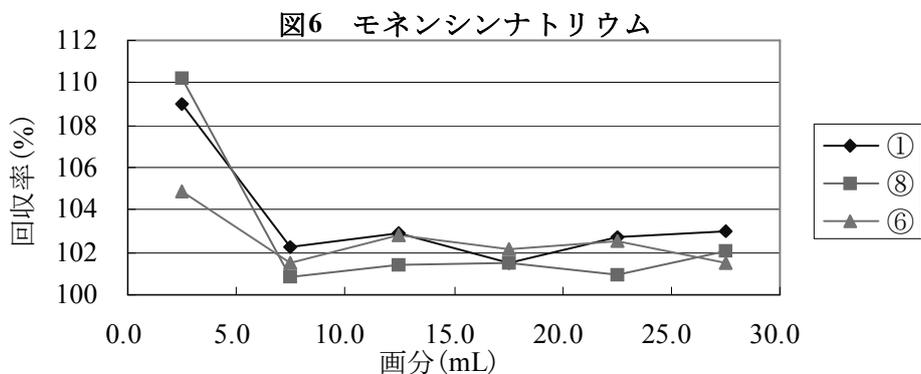
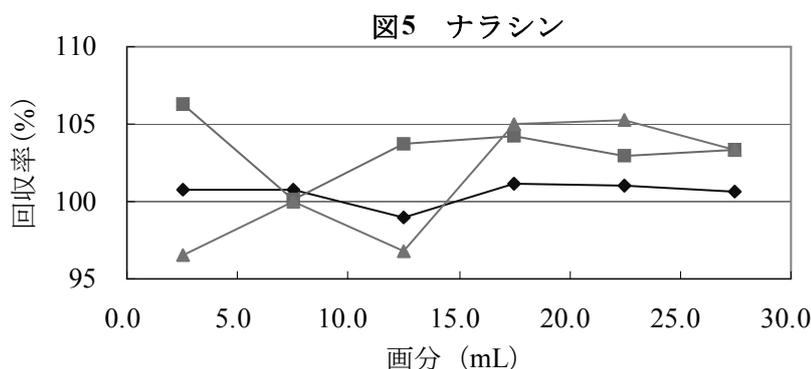
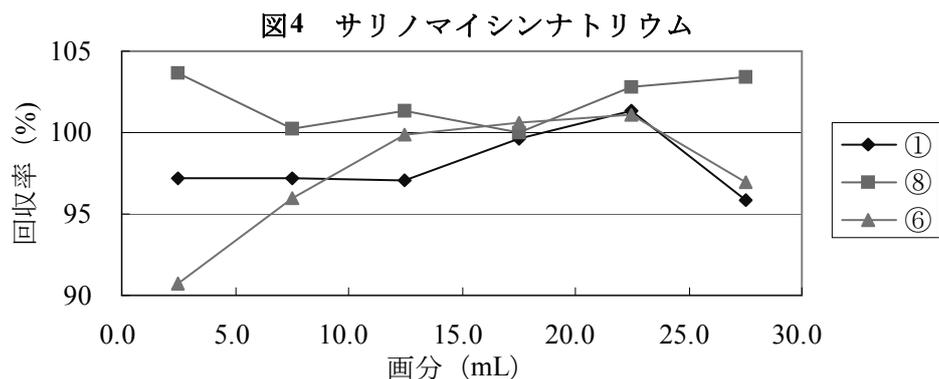
製品名	製造番号	流出画分 (mL)						回収率：%
		~5	~10	~15	~20	~25	~30	
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	109	102	103	102	103	103	
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	85	110	108	107	108	106	
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	3	81	120	128	131	128	
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	0	29	87	117	130	136	
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	105	101	103	102	103	102	
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	102	104	105	106	105	103	
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	96	107	105	103	105	103	
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	110	101	101	101	101	102	
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	100	102	101	102	102	103	



3.2 Activated Aluminas CG-20 の同等品について

3.1 の 1)~3)の試験結果から、また図 4~6 のとおり、3 種類のポリエーテル系抗生物質の定量で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ①Activated Aluminas CG-20 (Alcoa Industrial Chemicals 製) の同等品として、⑥Aluminium Oxide 90 Active Basic Art. 1076 (Merck 製) 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) が比較的良好と判断できた。

しかし、⑥Aluminium Oxide 90 Active Basic Art. 1076 は、粒度が 70-230 mesh と①Activated Aluminas CG-20 の 80-200 mesh と異なり、また多数のロットが流通しており、ロット差も認められたことから、同等品として扱うには問題があると判断した。また、⑧Aluminum oxide Type F-20 は、粒度が 80-200 mesh と①Activated Aluminas CG-20 と同じであったことから、今後はこれを同等品として扱って問題ないと判断した。



3.3 微生物学的定量法による回収率の確認

1) サリノマイシンナトリウム

サリノマイシンが 50 mg(力価)/トン添加された市販の中さう育成用配合飼料及び幼中さう育成用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法（飼料分析基準 10.12.1 の(2)）により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。

その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

2) ナラシン

ナラシンが 80 mg(力価)/トン添加された市販の 2 種類のブロイラー肥育前期用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法

(飼料分析基準 10.31.1 の(2)) により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。

その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

3) モネンシンナトリウム

モネンシンナトリウムが 30 mg(力価)/トン添加された市販の 2 種類の肉用牛肥育用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法 (飼料分析基準 10.25.1 の(3)) により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

表 6 微生物学的定量法による回収率

抗生物質名	飼料の種類	回収率：% (n=2)	
		①Activated Aluminas CG-20	⑧Aluminum oxide Type F-20
サリノマイシン ナトリウム	中すう育成用	117	121
	幼中すう育成用	100	96
ナラシン	ブロイラー肥育前期用	103	103
	ブロイラー肥育前期用	112	111
モネンシンナト リウム	肉用牛肥育用	112	113
	肉用牛肥育用	103	107

4 まとめ

ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナの同等品について検討したところ、飼料分析基準に規定された Activated Aluminas F-20 (Alcoa 製) 及び Activated Aluminas CG-20 (Alcoa Industrial Chemicals 製) の同等品として、Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) が適当と考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省生産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 2) 小山敬之：飼料研究報告，6，163 (1980).
- 3) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，122 (1980).
- 4) 草間豊子：飼料研究報告，11，124 (1986).
- 5) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，114 (1980).
- 6) 草間豊子：飼料研究報告，11，107 (1986).
- 7) 千原哲夫：飼料研究報告，27，80 (2002).

技術レポート

2 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のアフラトキシンの定量

青山 幸二*, 渡部 千会*

1 緒 言

近年注目を浴びているイムノアフィニティーカラム (IAC) は、アガロースゲル等の担体にモノクローナル抗体を固定化したものをミニカラムに詰めた精製用カラムであり、特にカビ毒の分析に利用されている。IAC は選択性の高い抗原抗体反応を利用するため、1 本のカラムで大半の夾雑物質を取り除くことができ、かつ、液体クロマトグラフ等に試料溶液を大量に注入できるため、目的成分を高感度で測定することが可能である。また、有機溶媒の使用量の軽減、操作の簡易性等の利点もある。

カビ毒の中には規制値が数 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) レベルもしくはそれ以下のものも見られるため、その規制値に対応するには ppt (ng/kg) レベルでの定量が可能な分析法が必要である。その上、近年では、迅速性も求められているため、その両方の要求を満たすことが必要となってきた。なお、IAC を用いた分析法は 1991 年以降、AOAC International (AOACI) の Official Methods of Analysis (OMA) ¹⁾ (表 1) にいくつか採用されている。

現在、我が国では、カビ毒の一つであるアフラトキシンについては、配合飼料中のアフラトキシン B₁ (AFB₁) として指導基準値 ²⁾ が設定されている。しかしながら、Codex や EU 等ではトータルアフラトキシン (AFB₁, アフラトキシン B₂ (AFB₂), アフラトキシン G₁ (AFG₁) 及びアフラトキシン G₂ (AFG₂) の総量) として規制値を設定する趨勢である。

そこで、アフラトキシン 4 種類の定量法について、より正確で、より低レベルまでの定量を可能にするため、IAC の適用について検討したので報告する。

表 1 OMA of AOACI に採用されている IAC を用いたカビ毒分析法一覧

番号	カビ毒*	対象試料
991.31	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	とうもろこし, 生ピーナッツ, ピーナッツバター
999.07	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	ピーナッツバター, ピスタチオペースト, イチジクペースト, パプリカパウダー
2000.16	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	ベビーフード
2003.02	AFB ₁	牛用飼料
2000.08	AFM ₁	牛乳
2001.04	FMB ₁ , B ₂	とうもろこし, コーンフレーク
2000.03	OTA	大麦
2000.09	OTA	焙煎コーヒー豆
2001.01	OTA	ワイン, ビール
2004.10	OTA	生コーヒー豆

* AF : アフラトキシン (B₁, B₂, G₁, G₂ 及び M₁),
 FM : フモニシン (B₁ 及び B₂),
 OTA : オクラトキシン A

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料及び分析法検討用に作成された試験飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) アフラトキシスタンダード

AFB₁, AFB₂, AFG₁ 及び AFG₂ スタンダード (3 µg/mL, ベンゼン-アセトニトリル (49+1) 溶液, Supelco 製) それぞれ 1 mL とベンゼン-アセトニトリル (49+1) 2 mL を正確に混合したものをアフラトキシスタンダード混合原液 (この液 1 mL は各アフラトキシスタンダードとして 500 ng を含有する。) とした。アフラトキシスタンダード混合原液をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各アフラトキシスタンダードとして 1 ng 及び 10 ng を含有するアフラトキシスタンダード混合中間標準液を調製した。なお、スタンダード原液及び混合標準原液は-20°C 以下で保存した。

2) 溶媒はすべて液体クロマトグラフ用試薬を用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はタブレット (Sigma 製) を用いて調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ: Agilent Technologies 製 1100 Series
- 2) 振とう器: タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W
- 3) 遠心エバポレーター: 東京理化学製 CVE-3100
- 4) 高速遠心分離器: 久保田商事製 KM-15200
- 5) ろ紙: Advantec 製 5A
- 6) ガラス繊維ろ紙: Whatman 製 934-AH, GF/F 及び Advantec 製 GF-75
- 7) IAC: R-Biopharm Rhône 製 Easi-Extract Aflatoxin, Vicam 製 AflaTest WB 及び Romer Labs 製 AflaStar FIT

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、塩化ナトリウム 5 g 及びメタノール-水 (4+1) 150 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 5 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えて希釈した。希釈した溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を IAC による精製に供する試料溶液とした。

2) IAC による精製

IAC 内の溶液を液面がカラム内ゲルの上面に達するまで 1 秒間に 1 滴程度の流速で流出後、カラム筒の上端まで PBS を加え、同様に流出させた。更に PBS を加え、液面がカラム筒の半分程度になるまで流出させた。IAC の上にリザーバーを連結し、試料溶液 15 mL を正確に加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させた。一旦リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで PBS を加え、半分程度流出させた後、再びリザーバーを取り付け、PBS 15 mL を加え、カラムを洗浄した。PBS 流出後リザーバーを取り外し、カラム筒の半分程度まで水を加え流出させた後、水 15 mL で同様にカラムを洗浄した。リザーバーを取り外し、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた後、褐色スクリーニング試験管をカラムの下に置き、アセトニトリル 1 mL を加えて各アフラトキシスタンダードを溶出させた。5 分程度放置後、アセトニトリル 1 mL を 2 回加え、再び各アフラトキシスタンダードを溶出させた。空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を

溶出させ、すべての溶出液を誘導体化反応に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化反応

試料溶液を 50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。残留物にトリフルオロ酢酸 100 μL を正確に加え、栓をして振り混ぜた後 15 分間放置した。これに水-アセトニトリル (9+1) 900 μL を正確に加えて振り混ぜ、プラスチック製遠心沈殿管に移し、5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時に、1 ng/mL のアフラトキシン混合中間標準液 50 μL 及び 100 μL 、10 ng/mL の中間標準液 100 μL 、500 μL 及び 1,000 μL をそれぞれ褐色スクリー栓試験管に正確に入れた。50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、以下試料溶液と同様に誘導体化を行い、1 mL 中に各アフラトキシンとして 0.05 ng, 0.1 ng, 1 ng, 5 ng 及び 10 ng を含有する各アフラトキシン標準液を調製した。

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各アフラトキシン標準液それぞれ 50 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の各アフラトキシン量を算出した。

なお、液体クロマトグラフの測定条件を表 2 に示した。

表 2 液体クロマトグラフ測定条件

検出器	蛍光検出器 (励起波長360 nm, 蛍光波長450 nm)
カラム	Mightysil RP-18 GP (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μm)
カラム槽温度	45°C
溶離液	水-メタノール-アセトニトリル-0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) (11+6+2+1)
流速	1.0 mL/min

3 結果及び考察

3.1 分析法の検討

本法を検討するにあたっては、OMA of AOACI¹⁾に採用されている方法、ISO に採用予定である方法 (ISO/FDIS 17375) 及び厚生労働省による食品中のカビ毒汚染実態調査に使用された方法³⁾⁻⁵⁾を参考に、飼料及び多種類の IAC に適用可能であると思われる方法を設定した。

とうもろこし、マイロ及び試験飼料 8 種類を用いて回収率の確認を行った。初めに試料溶液の IAC への負荷量を 30 mL (試料 1 g 相当量) で検討を行ったところ、試験飼料の一部で回収率が 70%を下回るものが見られた。

IAC を用いた分析では、オクラトキシン A の分析の際のカフェインのように、特定の物質が抗原抗体反応を阻害し回収率を低下させることがあり^{6),7)}、この現象は IAC に負荷する量を減らすことによりある程度改善されることが知られている。そこで、IAC への負荷量を 15 mL (試料 0.5 g 相当量) に変更したところ回収率が改善された。

3.2 添加回収試験

IAC の種類による回収率及び繰返し精度の違いを確認するために添加回収試験を実施した。

2.3 に示した 3 種類の IAC (A, B 及び C) について回収率及びその相対標準偏差 (RSD) を求めるため、とうもろこし及びマイロに、各アフラトキシンとしてそれぞれ 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加

した試料について、本法に従って3回分析を行った。その結果を表3に、得られたクロマトグラムの一例を図1に示した。なお、マイロの一部で自然汚染によるものと思われる異常値が見られたため、それらは $n=2$ の結果を示した。

表3のとおり、とうもろこしについては、Aではほぼ良好な結果が得られた。B及びCでは全体的に回収率が低かったが、特にアフラトキシンGグループの回収率が低く、CではRSDの値も高かった。また、マイロについては、A及びBでは良好な結果が得られたが、CではアフラトキシンGグループの回収率が多少低かった。

各IACは同じロットのものを用いたが、以上のように、同じロット内でも得られた値にばらつきが多いものが見られた。また、回収率についても低いものが見られた。このため、回収率及びRSDの目標値をそれぞれ70~120%及び20%以下とすると、IACを用いた分析法を飼料分析基準とするには、更なる検討が必要であると考えられた。

表3 添加回収試験（各アフラトキシンとして0.5 µg/kg相当量添加）

試料	IAC	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂	
		回収率 ^{a)}	(RSD ^{b)})	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)
とうもろこし	A	71.8	(3.4)	80.3	(1.5)	73.9	(17.4)	75.6	(15.8)
	B	59.1	(15.5)	67.8	(16.1)	46.8	(5.3)	49.9	(5.8)
	C	68.0	(6.2)	75.6	(5.3)	53.5	(31.8)	52.3	(31.2)
マイロ	A	77.2 ^{c)}	(0.4)	82.9	(1.0)	86.5 ^{c)}	(2.1)	87.5 ^{c)}	(0.6)
	B	75.9	(2.3)	82.0	(0.9)	80.5	(6.8)	81.8	(1.7)
	C	72.3	(4.2)	76.2	(2.1)	69.1	(15.2)	63.9	(7.4)

a) 平均回収率, $n=3$

b) 相対標準偏差

c) $n=2$

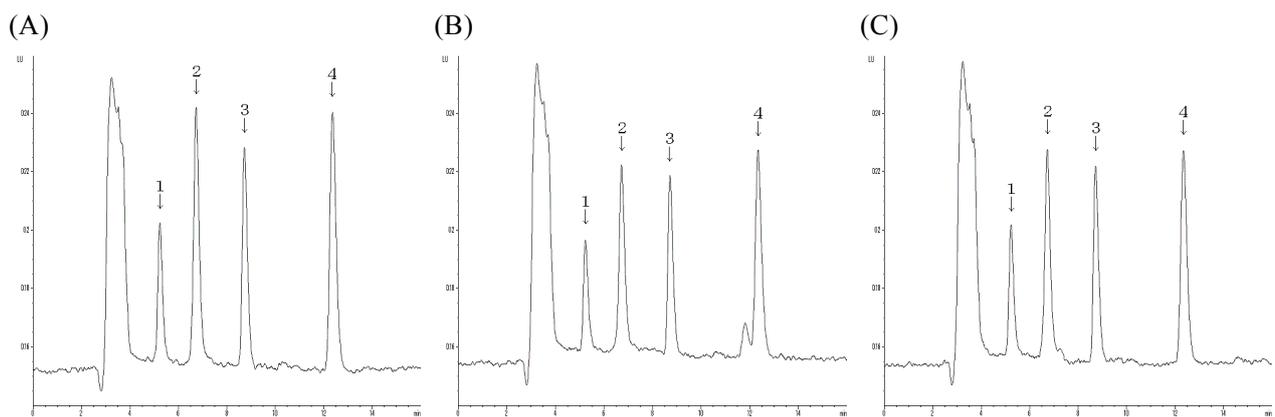


図1 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例

測定条件は表2のとおり。

(A) 標準液（各アフラトキシン 0.25 ng/mL）

(B) とうもろこし

(C) マイロ

矢印は1：AFG₁誘導体（AFG_{2a}），2：AFB₁誘導体（AFB_{2a}），3：AFG₂，4：AFB₂

文 献

- 1) Horwitz, W. ed.: "Official Methods of Analysis of AOAC International", 18th Ed., Maryland, USA, AOAC International (2005).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. and Kumagai, S.: *J. Food Prot.*, **69**, 1365 (2006).
- 4) 厚生労働科学研究費補助金，食品の安全性高度化推進研究事業，食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究，平成 16 年度総括・分担研究報告書（主任研究者 小西良子）(2005).
- 5) 厚生労働科学研究費補助金，食品の安心・安全確保推進研究事業，食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究，平成 17 年度総括・分担研究報告書（主任研究者 小西良子）(2006).
- 6) Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A., Sylla, A. and Pfohl-Leszkowicz, A.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 480 (2006).
- 7) Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Russell, J., Slack, P.T. and Gilbert, J.: *J. AOAC Int.*, **84**, 444 (2001).

技術レポート**3 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のオクラトキシン A の定量**

青山 幸二*, 渡部 千会*

1 緒 言

カビ毒であるオクラトキシン A (OTA) は肝臓及び腎臓に毒性を示し、発がん性も疑われている。OTA は比較的低温地域においても汚染が報告されており、特にヨーロッパでは関心が持たれている。OTA の規制値は、我が国では食品、飼料ともに未だ設定されていないが、ヨーロッパを中心とした国々ではすでに設定されており、その大半は 5 ppb (µg/kg) という値を採用している¹⁾。Codex においても現在、大麦等に規制値を設定するための作業が進められており、その値は 5 ppb もしくは 20 ppb で議論が進められている。

以上のように、OTA の規制値は他のカビ毒と比べると低い値であることから、分析法についても、より低レベルまで定量が可能な分析法が必要となる。そこで、前報²⁾ (p.90) で示したイムノアフィニティーカラム (IAC) を OTA の分析にも適用するための検討を行ったので報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

市販の飼料原料及び分析法検討用に作成された試験飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試 薬**1) OTA 標準液**

OTA 標準品 (Sigma 製) 5 mg を正確に量り、トルエン-酢酸 (99+1) を用いて 50 mL の褐色全量フラスコに移し、同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した (この液 1 mL は OTA として 0.1 mg を含有する。)。なお、標準原液は-20°C 以下で保存した。

使用に際して、標準原液の一定量を取り、溶媒を除去した後、アセトニトリル-水-酢酸 (30+70+1) を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に OTA として 0.05~10 ng を含有する各 OTA 標準液を調製した。

2) 溶媒はすべて液体クロマトグラフ用試薬を用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はタブレット (Sigma 製) を用いて調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ : Agilent Technologies 製 1100 Series
- 2) 質量分析計 : Agilent Technologies 製 1100 Series LC/MSD SL
- 3) 振とう器 : タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W
- 4) 遠心エバポレーター : 東京理化学製 CVE-3100
- 5) 高速遠心分離器 : 久保田商事製 KM-15200

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

- 6) ろ紙：Advantec 製 5A
- 7) ガラス繊維ろ紙：Whatman 製 934-AH, GF/F 及び Advantec 製 GF-75
- 8) IAC：Vicom 製 OchraTest

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+2) 150 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 4 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えて希釈した。希釈した溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を IAC による精製に供する試料溶液とした。

2) IAC による精製

IAC 内の溶液を液面がカラム内ゲルの上面に達するまで 1 秒間に 1 滴程度の流速で流出後、カラム筒の上端まで PBS を加え、同様に流出させた。更に PBS を加え、液面がカラム筒の半分程度になるまで流出させた。IAC の上にリザーバーを連結し、試料溶液 25 mL を正確に加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させた。一旦リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで PBS を加え、半分程度流出させた後、再びリザーバーを取り付け、PBS 15 mL を加え、カラムを洗浄した。PBS 流出後リザーバーを取り外し、カラム筒の半分程度まで 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液を加え流出させた後、10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 15 mL で同様にカラムを洗浄した。リザーバーを取り外し、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた後、容器をカラムの下に置き、メタノール-酢酸 (98+2) 1 mL を加えて OTA を溶出させた。5 分程度放置後、メタノール-酢酸 (98+2) 1 mL を 2 回加え、再び OTA を溶出させた。空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を溶出させ、すべての溶出液を 50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水-酢酸 (30+70+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、プラスチック製遠心沈殿管に移した後、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ィー (LC) あるいは液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) による測定に供する試料溶液とした。

3) LC による測定

試料溶液及び各 OTA 標準液それぞれ 100 µL を LC に注入し、クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の OTA 量を算出した。

なお、HPLC の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC 測定条件

検出器	蛍光検出器 (励起波長 333 nm, 蛍光波長 460 nm)
カラム	Inertsil ODS-3V (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 µm)
カラム槽温度	45°C
溶離液	アセトニトリル-水-酢酸 (55+43+2)
流速	1.0 mL/min

4) LC-MS による測定

試料溶液及び各 OTA 標準液 50 µL を LC-MS に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の OTA 量を算出した。

なお、LC-MS の測定条件を表 2 に示した。

表 2 LC-MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径5 μm)
カラム槽温度	40°C
溶離液	10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (7+3) →15分→ (1+19)
流速	0.2 mL/min
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ポジティブ
ネブライザーガス	N ₂ (60 psi)
乾燥ガス	N ₂ (10 L/min, 350°C)
キャピラリー電圧	4,000 V
フラグメンター電圧	120 V
モニターイオン	<i>m/z</i> 404

3 結果及び考察

3.1 分析法の検討

本法を検討するにあたっては、OMA of AOACI³⁾に採用されている方法及び厚生労働省による食品中のカビ毒汚染実態調査に使用された方法⁴⁾⁻⁶⁾を参考に、飼料及び多種類の IAC に適用可能であると思われる方法を設定した。

また、前報にあるとおり、アフラトキシン分析法検討時に、IAC への負荷量を試料 1 g 相当量で行ったところ回収率が低いものが見受けられたため、本 OTA の分析においても、念のため IAC への負荷量を試料 0.67 g 相当量とした。

3.2 妨害物質の検討

とうもろこし、マイロ、大麦、小麦、玄米、大豆油かす、ふすま及び試験飼料 8 種類について、本法の LC を用いる方法に従って定量を行った。その中で OTA と同じ位置にピークが確認された試料について、蛍光スペクトル及び LC-MS によりピークの確認を行ったところ、小麦及び多くの試験飼料については OTA の定量を妨害するピークが存在することが判明した。

そこで、LC の溶離液の極性を上げて OTA と夾雑ピークとの分離を試みた。その結果、ピークが分離する条件は得られたが、OTA の溶出時間が遅くなり、SN 比による定量下限が 2 μg/kg 以上となった。OTA の想定される基準値 5~20 μg/kg からすると、この定量下限は十分とは言えない。なお、極性を上げて得られた LC の定量値と LC-MS から得られた定量値はほぼ同じ値であったため、夾雑ピークは見られず、LC-MS 分析の際に懸念されるイオン抑制もないものと考えられた。

以上のことから、以下の検討には定量に LC-MS を用いることとした。

3.3 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

マイロ及び大麦に OTA として 0.5 μg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、LC-MS によりその回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、表 3 のとおり、マイロ及び大麦の平均回収率はそれぞれ 87.9%及び 114.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) としてそれぞれ 3.8%及び 4.2%と良好な結果が得られた。

なお、添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を図 1 に示した。

表 3 添加回収試験 (OTA として 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加)
(%)

マイロ	大麦
回収率 ^{a)} (RSD ^{b)})	回収率 (RSD)
87.9 (3.8)	114.3 (4.2)

a) 平均回収率, $n=3$

b) 相対標準偏差

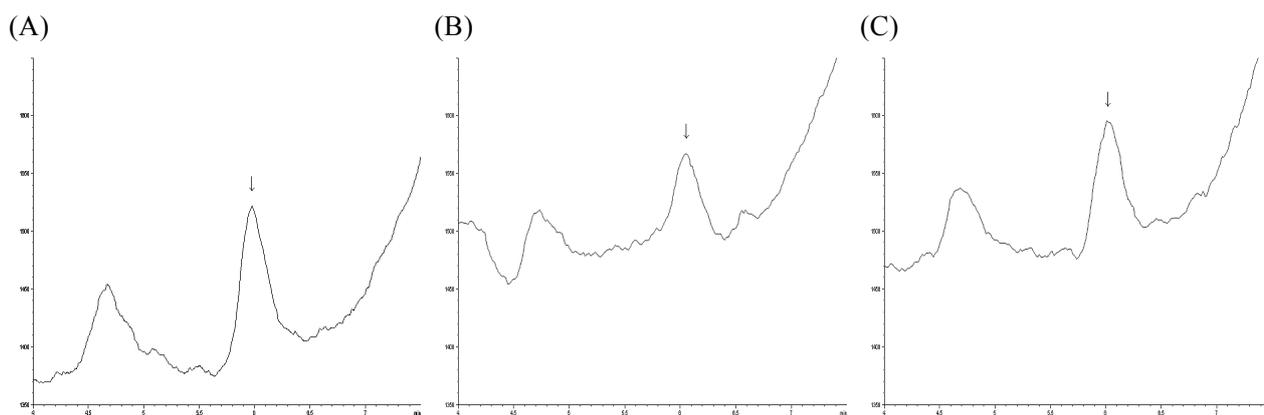


図 1 添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例

測定条件は表 2 のとおり。

(A) 標準液 (OTA 0.5 ng/mL)

(B) マイロ

(C) 大麦

矢印が OTA

文 献

- 1) FAO: FAO Food and Nutrition Paper 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, (2004), FAO, Rome, Italy
- 2) 青山幸二, 渡部千会: 飼料研究報告, 32, 90 (2007).
- 3) Horwitz, W. ed.: "Official Methods of Analysis of AOAC International", 18th Ed., Maryland, USA, AOAC International (2005).
- 4) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. and Kumagai, S.: J. Food Prot., 69, 1365 (2006).
- 5) 厚生労働科学研究費補助金, 食品の安全性高度化推進研究事業, 食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究, 平成 16 年度総括・分担研究報告書 (主任研究者 小西良子) (2005).
- 6) 厚生労働科学研究費補助金, 食品の安心・安全確保推進研究事業, 食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書 (主任研究者 小西良子) (2006).

技術レポート**4 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のゼアラレノン類の定量**

青山 幸二*, 渡部 千会*

1 緒 言

カビ毒の一つであるゼアラレノン (ZEN) は動物の体内で α -ゼアラレノール (α -ZEL), β -ゼアラレノール (β -ZEL), α -ゼアララノール (α -ZAL) 及び β -ゼアララノール (β -ZAL) に代謝されることが知られている。これらの代謝物はカビも産生するという報告^{1), 2)}もあり, 汚染濃度はわずかであるが自然汚染も報告されている³⁾⁻⁷⁾。

ゼアラレノン類はエストロゲン (女性ホルモン) 様作用を有するが, それらのマウスの細胞内エストロゲン受容体に対する親和力は, α -ZAL > α -ZEL > β -ZAL > ZEN > β -ZEL となる。つまり, ZEN によるリスクを考える際には, ZEN だけでなく, その代謝物についても分析を行う必要がある。

著者は以前, ZEN 代謝物も含めた ZEN 類の分析について, 多機能クリーンアップカラム (MultiSep 226 AflaZon+) で精製を行い, 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) で定量する方法を検討した⁷⁾が, 一部の成分で定量を妨害するピークが確認され, 分析法を確立することができなかった。そこで, 今回は ZEN 類の分析に対して, 前報⁸⁾ (p.90) で示したイムノアフィニティーカラム (IAC) の適用を検討したので報告する。なお, ZEN の代謝物についても, 市販の ZEN 用 IAC で精製が可能であることが報告されている^{9), 10)}。

また, 以前の ZEN 類の分析法の検討⁷⁾では, LC-MS の測定で懸念されるイオン化抑制の影響を補正するため, 内標準物質としてゼアララノン (ZAN) を用いていた。しかしながら, ZAN がカビの分析より検出され得ること, IAC は精製能力が高く内標準を用いる必要性が低いこと等から, 今回の検討では ZAN は内標準ではなく, 分析対象成分に含めることとした。

2 実験方法**2.1 試 料**

市販の飼料原料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 供試試料とした。

2.2 試 薬**1) ゼアラレノン類標準液**

ZEN, ZAN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL 及び β -ZAL 標準品 (いずれも Sigma 製) の一定量をアセトニトリルを用いて正確に希釈し, 各 ZEN 類標準原液を調製した (各 50 若しくは 100 μ g/mL)。各標準原液の一定量を混合し, アセトニトリルで正確に希釈して ZEN 類混合標準原液とした (各 2 μ g/mL)。なお, 標準原液及び混合標準原液は -20°C 以下で保存した。

使用に際して, ZEN 類混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に各 ZEN 類としてそれぞれ 5~1,000 ng を含有する各 ZEN 類標準液を調製した。

2) 溶媒はすべて液体クロマトグラフ用試薬を用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はタブレット (Sigma 製) を用いて調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010 EV
- 3) 振とう器：タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W
- 4) 遠心エバポレーター：東京理化学製 CVE-3100
- 5) 高速遠心分離器：久保田商事製 KM-15200
- 6) ろ紙：Advantec 製 5A
- 7) ガラス繊維ろ紙：Whatman 製 934-AH, GF/F 及び Advantec 製 GF-75
- 8) IAC：R-Biopharm Rhône 製 Easi-Extract Zearalenone

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩化ナトリウム 5 g 及びアセトニトリル-水 (9+1) 150 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えて希釈した。希釈した溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を IAC による精製に供する試料溶液とした。

2) IAC による精製

IAC 内の溶液を液面がカラム内ゲルの上面に達するまで 1 秒間に 1 滴程度の流速で流出後、カラム筒の上端まで PBS を加え、同様に流出させた。更に PBS を加え、液面がカラム筒の半分程度になるまで流出させた。IAC の上にリザーバーを連結し、試料溶液 7.5 mL を正確に加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させた。リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで水を加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させ、カラムを洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、カラム筒の上端まで水-メタノール (7+3) を加え、同様に洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた。容器をカラムの下に置き、メタノール 1 mL を加えて ZEN 類を溶出させた。5 分程度放置後、メタノール 1 mL を加え、再び ZEN 類を溶出させた。空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を溶出させ、すべての溶出液を 50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、プラスチック製遠心沈殿管に移した後、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS による測定

試料溶液及び各 ZEN 類標準液それぞれ 10 µL を LC-MS に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の各 ZEN 類量を算出した。

なお、LC-MS の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径3.0 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μ m)
カラム槽温度	40°C
溶離液	アセトニトリル-メタノール-10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 (4+7+9)
流速	0.5 mL/min
イオン化法	大気圧化学イオン化法 (APCI)
モード	ネガティブ
ネブライザーガス	N ₂ (2.5 L/min)
乾燥ガス	N ₂ (6 L/min)
インターフェイス温度	300°C
ヒートブロック温度	200°C
CDL温度	200°C
モニターイオン	m/z 317 (ZEN) , 319 (ZAN, α -ZEL, β -ZEL) , 321 (α -ZAL, β -ZAL)

3 結果及び考察

3.1 分析法について

本法は、ISO に採用予定である、IAC を用いた飼料中の ZEN の定量法 (ISO/FDIS 17372) を参考に検討を行った。

また、前報にあるとおり、アフラトキシン分析法検討時に、IAC への負荷量を試料 1 g 相当量で行ったところ回収率が低いものが見受けられたため、本 ZEN 類の分析においても、念のため IAC への負荷量を試料 0.5 g 相当量とした。

3.2 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

とうもろこし及びマイロに各 ZEN 類として 80 μ g/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、表 2 のとおり、平均回収率は 88.5~109.8%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1%以下となり、良好な結果が得られた。

なお、添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を図 1 に示した。

表 2 添加回収試験 (各 ZEN 類として 80 μ g/kg 相当量添加)

試料	ZEN		ZAN		α -ZEL		β -ZEL		α -ZAL		β -ZAL	
	回収率 ^{a)}	(RSD ^{b)})	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)
とうもろこし	88.5	(1.4)	90.3	(0.7)	97.6	(2.1)	104.1	(3.4)	98.1	(2.4)	107.1	(3.5)
マイロ	103.1	(1.1)	102.2	(3.4)	107.2	(2.2)	108.0	(5.1)	102.0	(2.7)	109.8	(1.7)

a) 平均回収率, $n=3$

b) 相対標準偏差

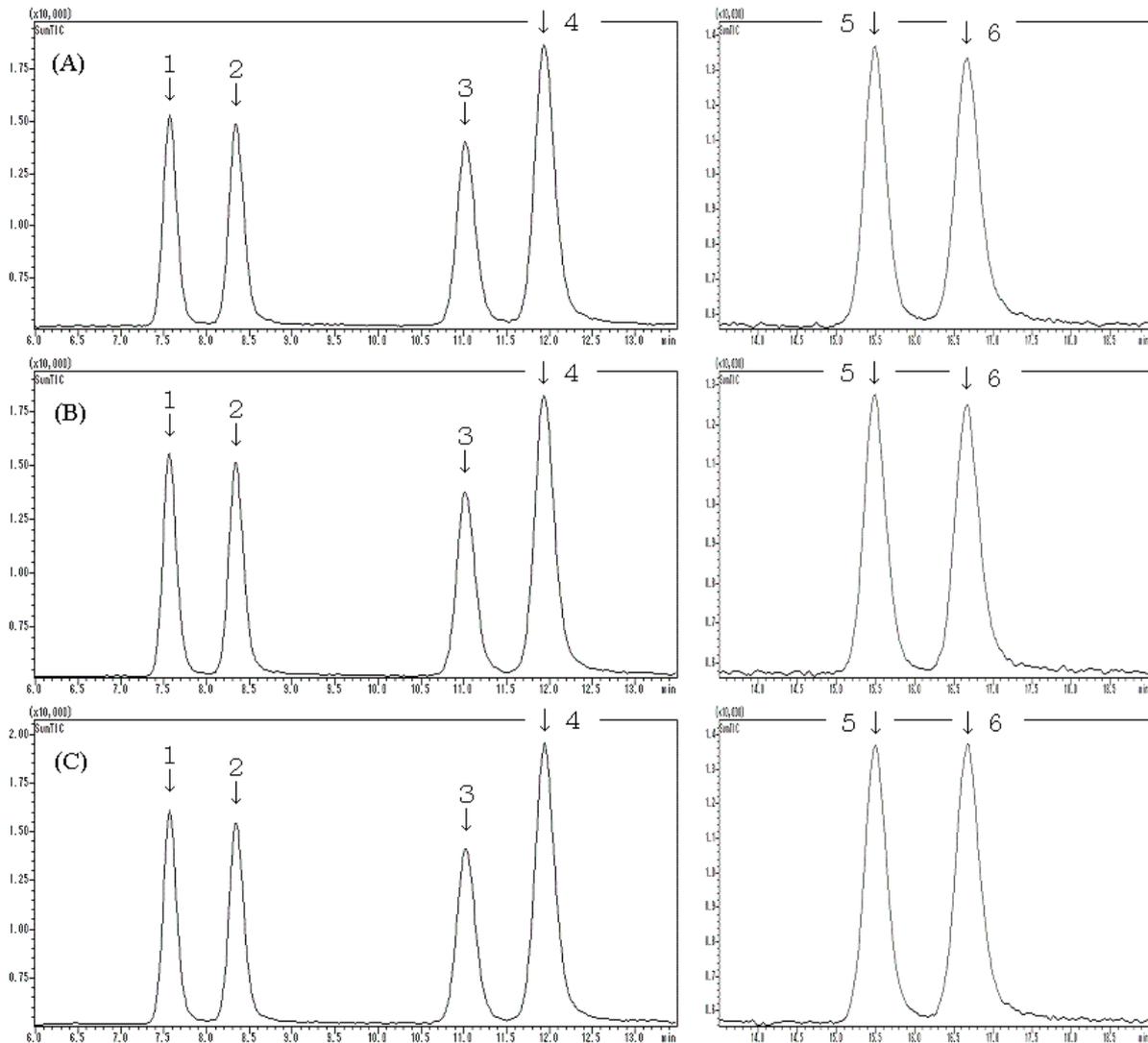


図1 添加回収試験で得られたSIMクロマトグラムの一例

測定条件は表2のとおり。

(A) 標準液 (各ZEN類 40 ng/mL)

(B) とうもろこし

(C) マイロ

矢印は 1 : β -ZAL, 2 : β -ZEL, 3 : α -ZAL, 4 : α -ZEL, 5 : ZAN, 6 : ZEN

文 献

- 1) Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Behrens, J.C.: Appl. Environ. Microbiol., **37**, 849 (1979).
- 2) Richardson, K.E., Hagler, Jr. W.M., and Mirocha, C.J.: J. Agric. Food Chem., **33**, 862 (1985).
- 3) Chang, H.L. and DeVries, J.W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **67**, 741 (1984).
- 4) Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M. and Mirocha, C.J.: Appl. Environ. Microbiol., **49**, 547 (1985).
- 5) Tanaka, T., Teshima, R., Ikebuchi, H., Sawada, J., Terao, T. and Ichinoe, M.: J. AOAC Int., **76**, 1006 (1993).
- 6) Bagnieris, R.W., Gaul, J.A. and Ware, G.M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **69**, 894 (1986).
- 7) 青山幸二: 飼料研究報告, **31**, 31 (2006).

- 8) 青山幸二, 渡部千会 : 飼料研究報告, **32**, 90 (2007).
- 9) Kruger, S.C., Kohn, B., Ramsey, C.S. and Prioli, R.: J. AOAC Int., **82**, 1364 (1999).
- 10) Terada, H.: Mycotoxins, **50**, 129 (2000).

技術レポート**5 鉛の分析法の標準添加回収率及び定量下限等の確認**

森 有希子*

1 目 的

科学的原則に基づいた食品のリスク管理を実施するためには、有害物質による農林水産物、飼料等の実態調査（サーベイランス・モニタリング）を行うことが必要である。農林水産省は、このサーベイランス・モニタリングについて、限られた行政資源を有効に活用するために、統一的な枠組み¹⁾（以下「ガイドライン」という。）を定めたところである。

ガイドラインの中で、有害化学物質のサーベイランス・モニタリングの結果を評価・公表するに当たっては、個々の分析法について、妥当性確認結果、定量限界・検出限界、標準添加回収率等の技術的情報を明らかにすることが求められている。

飼料分析基準²⁾に記載されている鉛の分析法については、策定当時、標準添加回収率、定量下限、共同試験による妥当性確認等が行われていなかった。そのため、今般、標準添加回収率及び定量下限等について改めて検討したのでその結果を報告する。

2 実験方法**2.1 試料**

市販の配合飼料（中すう育成用、子豚育成用）及び飼料原料（魚粉、チキンミール）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通して粉砕し、供試試料とした。

2.2 装置及び器具

- 1) 原子吸光光度計：日立ハイテクノロジーズ製 Z-5010 型
- 2) マッフル炉：アドバンテック社製 FUL230FA

2.3 定量方法

分析法は飼料分析基準 4.15 によった。ただし、標準液及び試料溶液の酸濃度を合わせるため、標準液の希釈には、水ではなく 1 mol/L 塩酸を用いた。

3 結果及び考察**3.1 添加回収試験**

標準添加回収率及び繰返し精度を確認するため、添加回収試験を行った。

鶏用配合飼料、豚用配合飼料及びチキンミールに鉛として 0.5、3.0 及び 7.5 mg/kg 相当量を添加した試料について 3 点分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。なお、魚粉は自然汚染されていたため、鉛として 1.5、3.0 及び 7.5 mg/kg 相当量を添加した試料について 3 点分析を行った。その結果は表 1 のとおりである。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

表 1 添加回収試験結果

試料の種類 添加量	豚用配合飼料		鶏用配合飼料		チキンミール		魚粉	
	0.5 mg/kg	110	^{a)} (5.3) ^{b)}	106	(8.3)	104	(5.6)	---
1.5 mg/kg	---	---	---	---	---	---	86.3	(7.9)
3.0 mg/kg	94.8	(4.7)	102	(4.5)	94.3	(2.1)	95.9	(3.9)
7.5 mg/kg	97.8	(1.0)	102	(0.32)	103	(1.1)	108	(1.1)

a) $n=3$ の平均回収率 (%)

b) 相対標準偏差 (%)

3.2 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、鶏用配合飼料に鉛として 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料及び自然汚染された魚粉について 7 回繰り返して分析を行い、その定量値の標準偏差を求めた。その結果は表 2 のとおりである。

この結果、本法の定量下限及び検出下限は、得られた標準偏差のそれぞれ 10 倍及び 3.3 倍に相当する濃度を求め、更に有効数字を考慮して、配合飼料及び魚粉のいずれもそれぞれ 0.5 mg/kg 及び 0.2 mg/kg と考えられた。

表 2 鉛の定量下限及び検出下限

	鶏用配合飼料	魚粉
	0.5 mg/kg 添加	無添加
平均定量値 ^{a)} (mg/kg)	0.571	0.611
標準偏差 (mg/kg)	0.052	0.043
相対標準偏差 (%)	9.1	7.1

a) $n=7$

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」の制定について”，平成 17 年 6 月 7 日，17 消安第 2330 号 (2005).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).

技術レポート**6 無機ヒ素の分析法の定量下限及び検出下限の確認**

八木 寿治*

1 目 的

農林水産省の定めた有害化学物質のサーベイランス・モニタリングに関するガイドライン¹⁾の中で、当該サーベイランス・モニタリングの結果を評価・公表するに当たっては、個々の分析法について、妥当性確認結果、定量限界・検出限界、標準添加回収率等の技術的情報を明らかにすることが求められている。

飼料分析基準²⁾に記載されている無機ヒ素の分析法については、標準添加回収試験は行われていたが、定量下限及び検出下限の確認に関する検討は行われていなかった。

独立行政法人農林水産消費安全技術センターにおいて魚粉中の無機ヒ素のモニタリングを実施しているが、結果の評価・公表に当たり、定量下限と検出下限について確認する必要性が生じている。そのため、これらについて検討したのでその結果を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

市販の魚粉を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した後、十分混合して調製した。

2.2 装置及び器具

- 1) 原子吸光分光光度計：島津製作所製 AA-6800 型
- 2) ヒ素形態別前処理システム：島津製作所製 ASA-2sp 型
- 3) オートサンプラー：島津製作所製 ASC-6100 型
- 4) クロマトパック：島津製作所製 C-R8A 型

2.3 定量方法

分析法は飼料分析基準 4.21 によった。

3 結果及び考察**3.1 定量下限及び検出下限**

定量下限及び検出下限を確認するため、検量線最低濃度付近における繰返し試験を実施した。自然汚染された魚粉について 7 回繰返し分析を行った。その結果、定量値の平均値は 51 µg/kg、その標準偏差は 9.9 µg/kg (RSD 19%) であったことから、本法の定量下限及び検出下限は、得られた標準偏差のそれぞれ 10 倍及び 3.3 倍に相当する濃度を求め、更に有効数字を考慮して、それぞれ 100 µg/kg 及び 30 µg/kg と見積もられた。

* 独立行政法人肥飼料検査所本部，現（独）農林水産消費安全技術センター名古屋センター

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」の制定について”，平成 17 年 6 月 7 日，17 消安第 2330 号 (2005).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).

技術レポート

7 共通試料による飼料中の農薬の一斉分析法の共同試験

野崎 友春*

Collaborative Study of Pesticides in Feed by GC-MS

Tomoharu NOZAKI*

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

A collaborative study was conducted with a formula feed and alfalfa spiked with 167 kinds of pesticide at 100 µg/kg was conducted in 9 laboratories. The repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) of formula feed were 2.5%~34% and 6.8%~120% respectively, as for alfalfa these were 2.6%~48% and 6.0%~130% respectively. Number of pesticides was 137, of which mean recoveries were in the range of 50~200% and HorRat were within 2.0.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

食品中の農薬等の残留規制の強化に伴い、農林水産省では、飼料原料に用いられている農薬を中心に 60 種類の農薬について、飼料安全法に基づいて残留基準値を設定したところである¹⁾。

そのため、当センターにおいて、飼料中の残留農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法²⁾を開発したところであるが、更に今回、共通試料を用いた共同試験を行ったので、その結果を報告する。

2 試 料

市販の成鶏飼育用配合飼料及び乾牧草（アルファルファ）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。なお、試験に用いた成鶏飼育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Component of formula feed used in this collaborative study

Kind of formula feed	Classification of ingredient	Ratio (%)	Ingredient
Formula feed for layer	Grains	70	Corn
	Oil meals	13	Soybean meal
	Animal by product	7	Fish meal
	Others	3	Calcium carbonate, Alfalfa meal, Calcium phosphate, Salt

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

3 実験方法

3.1 定量方法

Table 2 の 163 成分を測定対象とし、各試料について 2 点併行分析を行った。分析方法は Scheme のとおり行った。

なお、各農薬の定量値は、 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単位で小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位とした。

3.2 試験成績の統計処理

各試験室から報告された各農薬の測定値を AOAC の統計マニュアル²⁾に準拠し、次のとおり解析した。

各農薬成分の試験成績において、各試験室における検出下限未満又は検出不能 (N.D.) を含む成分の試験成績は、はずれ値の検定以前に除外し、各試験室の各成分の試験成績から Cochran 及び Grubbs の検定によってはずれ値を更に除外した後、各成分の平均値、試験室内繰返し精度及び試験室間再現精度を求めた。

4 分析実施試験室

株式会社島津製作所東京カスタマーサポートセンター、横河アナリティカルシステムズ株式会社アプリケーションセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、名古屋市衛生研究所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部及び同福岡事務所（現 同福岡センター）（9 試験室）

5 結果及び考察

9 試験室から報告があり、試験成績及びその統計処理の結果は、Table 3~4 のとおり、解析した農薬の試験室内繰返し精度及び試験室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.5~48% 及び 6.0~130% であり、HorRat は 0.27~5.8 であった。

この解析の結果、平均回収率が 50%~200% であり、なおかつ HorRat が 2.0 以下の農薬は 137 種あり、これらの農薬について本法が適用できると考えられた。

なお、参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 5 に示した。

Table 2 Pesticide list

No.	Japanese pesticide name	Pesticide name	CAS-No.
1	α -BHC	α -BHC	319-84-6
2	β -BHC	β -BHC	319-85-7
3	γ -BHC	γ -BHC	58-89-9
4	δ -BHC	δ -BHC	319-86-8
5	<i>o,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDD	53-19-0
6	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDD	72-54-8
7	<i>o,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDE	3424-82-6
8	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9
9	<i>o,p'</i> -DDT	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6
10	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	50-29-3
11	EPN	EPN	2104-64-5
12	アクリナトリン	acrinathrin	101007-06-1
13	アザメチホス	azamethiphos	35575-96-3
14	アジンホスメチル	azinphos-methyl	86-50-0
15	アセトクロール	acetochlor	34256-82-1
16	アトラジン	atrazine	1912-24-9
17	アニロホス	anilofos	64249-01-0
18	アメトリン	ametryn	834-12-8
19	アラクロール	alachlor	15972-60-8
20	アリドクロール	allidochlor	93-71-0
21	アルドリン	aldrin	309-00-2
22	アレスリン	allethrin	584-79-2
23	イサゾホス	isazofos	42509-80-8
24	イソフェンホス	isofenphos	25311-71-1
25	イソプロチオラン	isoprothiolane	50512-35-1
26	イプロベンホス	iprobefos	26087-47-8
27	イマザメタベンズメチルエステル	imazamethabenz methyl ester	81405-85-8
28	エタルフルラリン	ethalfluralin	55283-68-6
29	エチオン	ethion	563-12-2
30	エディフェンホス	edifenphos	17109-49-8
31	エトフェンブロックス	etofenprox	80844-07-1
32	エトフメセート	ethofumesate	26225-79-6
33	エトプロホス	ethoprophos	13194-48-4
34	エトリジアゾール	etridiazole	2593-15-9
35	エトリムホス	etrimfos	38260-54-7
36	エンドリン	endrin	72-20-8
37	オキサジアゾン	oxadiazon	19666-30-9
38	オキサジキシル	oxadixyl	77732-09-3
39	カズサホス	cadusafos	95465-99-9
40	カルフェントラゾンエチル	carfentrazone-ethyl	128639-02-1
41	キノキシフェン	quinoxifen	124495-18-7
42	キノクラミン	quinochloramine	2797-51-5
43	キントゼン	quintozene	82-68-8
44	クマホス	coumaphos	56-72-4
45	クレソキシムメチル	kresoxim-methyl	143390-89-0
46	クロルタールジメチル	chlorthal-dimethyl	1861-32-1
47	オキシクロルデン	oxychlordan	26880-48-8
48	<i>cis</i> -クロルデン	<i>cis</i> -chlordan	5103-71-9
49	<i>trans</i> -クロルデン	<i>trans</i> -chlordan	5103-74-2
50	クロルピリホス	chlorpyrifos	2921-88-2
51	クロルピリホスメチル	chlorpyrifos-methyl	5598-13-0
52	クロルフェナピル	chlorfenapyr	122453-73-0
53	クロルフェンビンホス (<i>E</i> 体)	(<i>E</i>)-chlorfenvinphos	18708-86-6
54	クロルフェンビンホス (<i>Z</i> 体)	(<i>Z</i>)-chlorfenvinphos	18708-87-7

Table 2 (continued)

No.	Japanese pesticide name	Pesticide name	CAS-No.
55	クロルプロファム	chlorpropham	101-21-3
56	クロルベンジレート	chlorobenzilate	510-15-6
57	シアノホス	cyanophos	2636-26-2
58	ジクロホップメチル	diclofop-methyl	51338-27-3
59	ジクロラン	dicloran	99-30-9
60	ジクロルボス	dichlorvos	62-73-7
61	シハロトリン	cyhalothrin	68085-85-8
62	ジフェナミド	diphenamid	957-51-7
63	ジフェノコナゾール	difenoconazole	119446-68-3
64	シフルトリン	cyfluthrin	68359-37-5
65	シプロコナゾール	cyproconazole	113096-99-4
66	シペルメトリン	cypermethrin	52315-07-8
67	ジメタメトリン	dimethametryn	22936-75-0
68	ジメテナミド	dimethenamid	87674-68-8
69	ジメトエート	dimethoate	60-51-5
70	ジメピペレート	dimepiperate	61432-55-1
71	シラフルオフエン	silafiuofen	105024-66-6
72	ターバシル	terbacil	5902-51-2
73	ダイアジノン	diazinon	333-41-5
74	チオベンカルブ	thiobencarb	28249-77-6
75	ディルドリン	dieldrin	60-57-1
76	テクナゼン	tecnazene	117-18-0
77	テトラクロルビンホス	tetrachlorvinphos	22248-79-9
78	テトラコナゾール	tetraconazole	112281-77-3
79	テトラジホン	tetradifon	116-29-0
80	テブコナゾール	tebuconazole	107534-96-3
81	テブフェンピラド	tebufenpyrad	119168-77-3
82	テフルトリン	tefluthrin	79538-32-2
83	デルタメトリン	deltamethrin	52918-63-5
84	テルブトリン	terbutryn	886-50-0
85	テルブホス	terbufos	13071-79-9
86	トリアジメノール	triadimenol	55219-65-3
87	トリアジメホン	triadimefon	43121-43-3
88	トリアレート	tri-allate	2303-17-5
89	トリフルラリン	trifluralin	0582-09-8
90	トリフロキシストロビン	trifloxystrobin	141517-21-7
91	トリルフルアニド	tolyfluanid	731-27-1
92	ナプロパミド	napropamide	15299-99-7
93	ニトロタルイソプロピル	nitrothal-isopropyl	10552-74-6
94	パラチオン	parathion	56-38-2
95	パラチオンメチル	parathion-methyl	298-00-0
96	ハルフェンブロックス	halfenprox	111872-58-3
97	ピコリナフェン	picolinafen	137641-05-5
98	ビフェントリン	bifenthrin	82657-04-3
99	ピペロホス	piperophos	24151-93-7
100	ピラクロホス	pyraclofos	89784-60-1
101	ピリダフェンチオン	pyridaphenthion	119-12-0
102	ピリダベン	pyridaben	96489-71-3
103	ピリプロキシフェン	pyriproxyfen	95737-68-1
104	ピリミホスメチル	pirimiphos-methyl	29232-93-7
105	ビンクロゾリン	vinclozolin	50471-44-8
106	フィプロニル	fipronil	120068-37-3
107	フェナリモル	fenarimol	60168-88-9
108	フェニトロチオン	fenitrothion	122-14-5

Table 2 (continued)

No.	Japanese pesticide name	Pesticide name	CAS-No.
109	フェノチオカルブ	fenothiocarb	62850-32-2
110	フェノトリン	phenothrin	26002-80-2
111	フェンチオン	fenthion	55-38-9
112	フェントエート	phenthoate	2597/3/7
113	フェンバレレート	fenvalerate	51630-58-1
114	フェンブコナゾール	fenbuconazole	114369-43-6
115	フェンプロバトリン	fenpropathrin	39515-41-8
116	フェンプロピモルフ	fenpropimorph	67306-03-0
117	ブタミホス	butamifos	36335-67-8
118	ブピリメート	bupirimate	41483-43-6
119	フラムプロップメチル	flamprop-methyl	52756-25-9
120	フルジオキシニル	fludioxonil	131341-86-1
121	フルシトリネート	flucythrinate	71611-31-9
122	フルトラニル	flutolanil	66332-96-5
123	フルトリアホール	flutriafol	76674-21-0
124	フルバリネート	fluvalinate	69409-94-5
125	フルミオキサジン	flumioxazin	103361-09-7
126	フルミクロラックペンチル	flumiclorac pentyl	87546-18-7
127	プロシミドン	procymidone	32809-16-8
128	プロパクロール	propachlor	1918-16-7
129	プロバジン	propazine	139-40-2
130	プロパニル	propanil	709-98-8
131	プロパルギット	propargite	2312-35-8
132	プロピコナゾール	propiconazole	60207-90-1
133	プロファム	propham	122-42-9
134	プロフェノホス	profenofos	41198-08-7
135	プロペタンホス	propetamphos	31218-83-4
136	ブロマシル	bromacil	314-40-9
137	プロメトリン	prometryn	7287-19-6
138	ブロモブチド	bromobutide	74712-19-9
139	ブロモプロピレート	bromopropylate	18181-80-1
140	ブロモホス	bromophos	2104-96-3
141	ヘキサコナゾール	hexaconazole	79983-71-4
142	ヘキサジノン	hexazinone	51235-04-2
143	ベノキサコール	benoxacor	98730-04-2
144	ヘプタクロール	heptachlor	76-44-8
145	ヘプタクロールエポキシド	heptachlor epoxide	1024-57-3
146	<i>cis</i> -ペルメトリン	<i>cis</i> -permethrin	61949-76-6
147	<i>trans</i> -ペルメトリン	<i>trans</i> -permethrin	61949-77-7
148	ペンコナゾール	penconazole	66246-88-6
149	ペンディメタリン	pendimethalin	40487-42-1
150	ベンフルラリン	benfluralin	1861-40-1
151	ホサロン	phosalone	2310-17-0
152	ホスチアゼート	fosthiazate	98886-44-3
153	ホスファミドン	phosphamidon	13171-21-6
154	ホスメット	phosmet	732-11-6
155	ホレート	phorate	298-02-2
156	マラチオン	malathion	121-75-5
157	メタクリホス	methacrifos	30864-28-9
158	メタラキシル	metalaxyl	57837-19-1
159	メチダチオン	methidathion	950-37-8
160	メトキシクロール	methoxychlor	72-43-5
161	メトミノストロビン (<i>E</i> 体)	(<i>E</i>)-metominostrobin	133408-50-1
162	メトラクロール	metolachlor	51218-45-2
163	メビンホス	mevinphos	7786-34-7

Sample (grass hay; 5.0 g, others; 10.0 g)

- add 15 mL of water
- allow to stand 30 minutes
- add 100 mL acetonitrile
- shake for 30 minutes
- filter under suction filter (No.5B)
- wash with 50 mL of acetonitrile

Filtrate

- evaporate to the volume of 15 mL under 40°C

Chem Elut cartridge

- apply sample solution, and washed with 5 mL of water
- stand for 5 minutes
- wash with 100 mL of hexane-ethyl acetate (1:1)

Hexane-ethyl acetate solution

- add 1 mL of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 10 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
- filter with membrane filter (0.5 µm)

GPC

- apply 5 mL of sample solution
- collect 60~150 mL fraction
- add a drop of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2 mL of ethyl acetate

ENVI-Carb/NH₂ cartridge (prewash with 10 mL of ethyl acetate)

- apply sample solution
- elute with 8 mL of ethyl acetate
- add a drop of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in hexane-acetone (7:3) (grass hay; 5.0 mL, others; 10.0 mL)

Sep-Pak Plus Florisil cartridge (prewash with 5 mL of acetone and 5 mL hexane)

- apply 4.0 mL of sample solution
- elute with 6 mL of hexane-acetone (7:3)

Elute

- add a drop of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2.0 mL of 2,2,4-trimethylpentane-acetone (4:1)

GC-MS

Scheme Analytical procedure for pesticide in feeds by using GC-MS

Table 3 (1) Collaborative study results for determination of pesticides in formula feed and alfalfa

No.	Pesticide name	Formula feed					Alfalfa				
		Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=	Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=
1	acetochlor	106.5	4.6	26	1.2	9	114.9	5.5	7.7	0.35	7
2	acrinathrin	114.9	6.7	49	2.2	9	105.1	8.8	29	1.3	9
3	alachlor	97.9	4.7	20	0.92	9	112.2	4.6	6.2	0.28	8
4	aldrin	86.6	8.9	27	1.2	9	82.9	4.8	19	0.88	9
5	allethrin	90.9	14	28	1.3	8	111.1	9.8	28	1.3	8
6	allidochlor	101.9	2.5	21	0.95	7	110.7	16	27	1.2	8
7	ametryn	59.9	16	38	1.7	6	88.5	11	19	0.84	8
8	anilofos	131.9	5.2	26	1.2	8	140.3	4.7	18	0.82	8
9	atrazine	87.6	9.5	28	1.3	9	109.0	6.6	7.7	0.35	7
10	azamethiphos	137.1	27	62	2.8	5	206.0	6.5	51	2.3	5
11	azinphos-methyl	154.9	8.2	67	3.1	9	134.8	24	46	2.1	8
12	benfluralin	91.4	8.1	33	1.5	9	102.5	6.9	18	0.81	9
13	benoxacor	106.4	7.5	22	1.0	9	126.7	8.2	32	1.5	9
14	α -BHC	89.7	5.2	19	0.85	9	103.1	4.4	10	0.45	9
15	β -BHC	90.5	5.1	23	1.0	9	96.1	4.2	22	1.0	9
16	γ -BHC	92.6	5.7	25	1.1	9	77.7	6.3	32	1.5	8
17	δ -BHC	89.3	5.2	21	1.0	9	102.7	6.4	10	0.47	8
18	bifenthrin	97.2	6.2	11	0.51	8	101.5	5.9	20	0.92	9
19	bromacil	65.9	20	78	3.5	6	145.0	7.4	33	1.5	8
20	bromobutide	100.7	4.2	19	0.86	8	113.5	3.9	7.6	0.35	8
21	bromophos	94.4	5.7	22	1.0	9	93.2	4.7	18	0.83	8
22	bromopropylate	107.7	3.7	22	1.0	8	113.4	4.2	19	0.84	8
23	bupirimate	72.3	3.6	82	3.7	6	111.9	7.1	8.5	0.39	8
24	butamifos	121.6	7.6	43	2.0	8	137.5	7.3	18	0.80	9
25	cadusafos	107.0	8.9	22	1.0	9	165.8	7.6	34	1.5	9
26	carfentrazone-ethyl	97.6	5.4	23	1.1	8	127.9	6.5	15	0.70	9
27	chlorbenzilate	114.7	3.8	23	1.0	9	113.0	4.7	17	0.79	8
28	cis-chlordane	82.3	6.3	34	1.5	9	92.9	4.8	9.3	0.42	7
29	oxychlordane	81.4	8.8	38	1.7	9	91.1	4.6	10	0.46	7
30	trans-chlordane	98.2	6.1	12	0.52	7	86.8	6.9	27	1.2	9
31	chlorfenapyr	97.5	6.1	13	0.60	9	102.2	4.4	16	0.73	9
32	(E)-chlorfenvinphos	102.5	6.5	25	1.1	9	121.9	6.0	9.3	0.42	9
33	(Z)-chlorfenvinphos	100.2	6.9	23	1.0	9	121.5	5.3	10	0.46	9
34	chlorpropham	106.6	6.1	16	0.73	9	122.0	4.3	16	0.73	9
35	chlorpyrifos	104.2	8.8	33	1.5	9	93.4	4.8	22	1.0	8
36	chlorpyrifos-methyl	100.6	7.4	8.3	0.38	7	93.3	5.0	20	0.90	8
37	chlorthal-dimethyl	88.2	5.9	24	1.1	9	97.3	4.9	19	0.87	9
38	coumaphos	81.6	5.3	81	3.7	8	22.8	48	120	5.3	5
39	cyanophos	109.5	6.5	6.8	0.31	7	291.3	9.6	97	4.4	9
40	cyfluthrin	134.3	7.3	42	1.9	8	183.1	20	70	3.2	9
41	cyhalothrin	129.5	7.8	31	1.4	9	108.5	6.5	22	1.0	7
42	cypermethrin	144.6	24	32	1.5	8	285.3	17	52	2.4	7
43	cyproconazole	60.5	20	74	3.3	7	118.7	11	19	0.88	9
44	<i>o.p'</i> -DDD	86.0	12	21	0.93	7	91.8	4.9	17	0.77	9
45	<i>p.p'</i> -DDD	102.1	4.9	20	0.91	8	102.7	5.3	17	0.76	9
46	<i>o.p'</i> -DDE	93.6	6.6	10	0.45	7	93.1	4.5	9.7	0.44	8
47	<i>p.p'</i> -DDE	92.3	7.6	9.3	0.42	7	87.1	5.6	19	0.86	9
48	<i>o.p'</i> -DDT	111.7	7.1	30	1.4	9	104.4	6.9	24	1.1	9
49	<i>p.p'</i> -DDT	105.7	7.8	24	1.1	9	98.9	4.9	24	1.1	7
50	deltamethrin	121.5	7.7	42	1.9	9	123.6	12	29	1.3	9
51	diazinon	98.9	5.2	19	0.86	9	125.8	4.1	7.8	0.35	7
52	dichlorvos	34.5	14	54	2.4	7	9.6	22	42	1.9	4
53	diclofop-methyl	99.3	6.8	19	0.88	9	114.2	4.8	17	0.75	8
54	dicloran	98.6	12	26	1.2	9	119.0	7.4	22	1.0	9
55	dieldrin	81.1	8.5	29	1.3	8	95.4	5.3	9.2	0.42	8
56	difenoconazole	112.8	7.6	27	1.2	9	144.8	14	24	1.1	9
57	dimepiperate	113.3	6.1	18	0.83	9	135.9	7.4	21	1.0	9
58	dimethametryn	36.3	6.2	120	5.3	5	99.4	9.2	27	1.2	8

RSD_r%: Relative standard deviation of repeatability within same laboratoryRSD_R%: Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

■: Recovery was out of the range of 50~200% or HorRat was over 2.0.

□: HorRat was within the range of 1.5~2.0.

Table 3 (2) Collaborative study results for determination of pesticides in formula feed and alfalfa

No.	Pesticide name	Formula feed					Alfalfa				
		Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=	Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=
59	dimethenamid	97.3	4.5	19	0.84	9	114.1	4.7	6.0	0.27	8
60	dimethoate	112.9	14	33	1.5	9	129.0	21	20	0.93	6
61	diphenamid	97.8	3.4	20	0.92	9	114.2	3.8	10	0.47	8
62	ediphenphos	140.0	13	39	1.8	8	163.8	5.8	14	0.65	7
63	endrin	110.5	7.2	22	1.0	9	129.9	5.6	38	1.7	8
64	EPN	131.9	5.1	37	1.7	9	121.1	5.0	30	1.4	7
65	ethalfuralin	93.1	9.5	31	1.4	9	96.6	8.4	24	1.1	9
66	ethion	117.4	5.7	28	1.3	9	111.5	4.9	25	1.1	8
67	ethofumesate	102.3	4.6	31	1.4	8	107.4	3.7	8.6	0.39	8
68	ethoprophos	105.4	8.5	22	1.0	9	121.8	5.7	8.0	0.36	7
69	etofenprox	113.5	6.9	27	1.2	9	109.9	5.7	25	1.1	8
70	etridiazole	99.1	4.6	31	1.4	8	99.4	20	40	1.8	9
71	etrimphos	105.2	6.8	7.7	0.35	7	107.8	5.8	6.7	0.30	7
72	fenarimol	110.6	4.5	9.2	0.42	8	135.4	7.3	16	0.71	9
73	fenbuconazole	96.5	7.0	14	0.64	8	123.8	12	33	1.5	9
74	fenitrothion	126.7	8.7	42	1.9	9	134.9	7.8	33	1.5	9
75	fenothiocarb	108.4	5.0	14	0.63	9	117.8	6.3	13	0.61	9
76	fenpropathrin	105.6	5.6	22	1.0	8	114.2	13	34	1.5	8
77	fenpropimorph	81.1	5.5	44	2.0	9	108.1	9.4	15	0.68	7
78	fenthion	75.4	3.2	30	1.4	9	78.9	14	29	1.3	9
79	fenvalerate	128.9	9.3	35	1.6	9	123.9	13	20	0.93	8
80	fipronil	98.7	11	37	1.7	8	120.0	5.5	15	0.69	9
81	flamprop-methyl	94.1	4.1	38	1.7	8	113.3	3.5	7.8	0.35	7
82	flucythrinate	132.3	6.6	27	1.2	9	152.1	11	29	1.3	9
83	fludioxonil	147.9	34	70	3.2	7	94.7	6.3	22	1.0	8
84	flumiclorac pentyl	120.2	5.3	21	1.0	7	125.9	4.5	12	0.55	7
85	flumioxazin	134.3	10	44	2.0	9	147.7	5.2	22	1.0	8
86	flutolanil	83.9	8.1	27	1.2	8	120.8	4.5	24	1.1	8
87	flutriafol	70.4	19	37	1.7	4	73.4	20	29	1.3	6
88	fluvalinate	126.4	7.7	33	1.5	9	136.4	10	29	1.3	9
89	fosthiazate	137.3	11	37	1.7	9	182.0	6.1	14	0.65	9
90	halfenprox	108.4	7.4	20	0.91	8	113.9	6.5	35	1.6	8
91	heptachlor	87.8	6.3	35	1.6	9	93.1	9.9	23	1.1	9
92	heptachlor-epoxyde	82.6	5.9	30	1.3	9	87.9	5.6	21	1.0	9
93	hexaconazole	78.7	12	21	0.93	7	126.0	6.7	17	0.78	8
94	hexazinone	32.1	13	120	5.3	8	35.0	9.5	67	3.0	8
95	imazamethabenz methyl ester	64.9	6.8	38	1.7	6	88.1	8.2	55	2.5	9
96	iprobenfos	124.4	12	28	1.3	9	132.2	4.6	13	0.61	8
97	isazofos	109.9	7.8	21	1.0	9	131.4	6.8	26	1.2	9
98	isofenphos	93.8	8.7	22	1.0	8	105.5	9.2	24	1.1	9
99	isoprothiolane	99.5	6.5	33	1.5	8	118.6	5.0	7.7	0.35	7
100	kresoxim-methyl	107.2	4.0	21	1.0	9	113.8	4.9	9.1	0.41	7
101	malathion	108.0	4.9	24	1.1	8	113.6	6.2	19	0.87	8
102	metalaxyl	39.9	24	55	2.5	9	58.5	12	87	4.0	8
103	methacrifos	94.4	5.0	21	0.94	9	101.9	6.6	20	0.91	9
104	methidathion	115.3	12	19	0.87	8	158.7	12	29	1.3	8
105	methoxychlor	107.7	6.3	24	1.1	9	122.0	8.7	30	1.3	9
106	metolachlor	100.6	3.1	21	1.0	9	109.4	5.3	22	1.0	9
107	(E)-metominostrobin	98.3	6.5	29	1.3	7	126.4	6.3	15	0.69	9
108	mevinphos	83.5	11	41	1.9	9	60.8	10	27	1.2	9
109	napropamide	103.6	6.1	17	0.75	7	124.3	6.5	15	0.67	9
110	nitrothal-isopropyl	106.6	10	45	2.0	9	111.8	8.4	34	1.6	9
111	oxadiazon	93.6	5.7	18	0.80	7	96.3	2.6	16	0.71	8
112	oxadixyl	53.2	26	67	3.0	7	42.4	42	130	5.8	5
113	parathion	120.6	9.7	34	1.5	9	133.6	8.9	7.5	0.34	7
114	parathion-methyl	114.5	12	34	1.6	9	130.8	7.5	26	1.2	9
115	penconazole	92.0	3.9	20	0.92	8	110.8	6.2	22	1.0	9
116	pendimethalin	107.3	8.1	39	1.8	9	112.7	8.3	28	1.3	9

RSD_r%: Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

RSD_R%: Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

■: Recovery was out of the range of 50~200% or HorRat was over 2.0.

□: HorRat was within the range of 1.5~2.0.

Table 3 (3) Collaborative study results for determination of pesticides in formula feed and alfalfa

No.	Pesticide name	Formula feed					Alfalfa				
		Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=	Recovery(%)	RSD _r %	RSD _R %	HorRat	n=
117	<i>cis</i> -permethrin	99.8	5.5	15	0.67	8	104.0	6.9	11	0.51	8
118	<i>trans</i> -permethrin	106.9	3.5	24	1.1	9	111.0	5.2	18	0.83	9
119	phenothrin	93.0	5.5	20	0.92	7	103.1	7.1	26	1.2	8
120	phenthoate	92.3	4.0	27	1.2	8	103.9	6.4	11	0.48	7
121	phorate	80.1	8.0	30	1.4	9	86.2	12	34	1.5	9
122	phosalone	124.6	7.3	14	0.62	7	131.4	6.7	21	1.0	8
123	phosmet	119.6	4.4	26	1.2	8	131.6	6.4	22	1.0	8
124	phosphamidon	55.5	18	50	2.3	9	58.7	16	53	2.4	8
125	picolinafen	62.1	11	75	3.4	9	22.3	36	110	4.9	7
126	piperophos	163.0	7.1	38	1.7	9	179.6	5.4	30	1.4	9
127	pirimiphos-methyl	99.0	4.7	23	1.1	9	112.2	5.0	8.1	0.37	8
128	procymidone	99.4	5.6	8.8	0.40	8	106.1	4.5	8.5	0.39	8
129	profenofos	94.0	12	33	1.5	8	119.0	6.2	15	0.68	8
130	prometryn	72.0	19	47	2.1	5	93.9	7.2	9.0	0.41	4
131	propachlor	101.6	4.3	18	0.83	9	125.5	5.0	8.9	0.40	8
132	propanil	107.8	6.4	20	0.93	9	122.6	6.1	6.6	0.30	7
133	propargite	111.5	9.2	15	0.69	8	111.2	11	20	0.93	8
134	propazine	83.0	7.1	28	1.3	9	103.8	4.8	27	1.2	9
135	propetamphos	98.5	7.4	24	1.1	9	115.0	6.7	36	1.6	8
136	propham	105.0	3.8	18	0.81	8	111.5	5.3	7.5	0.34	7
137	propiconazole	116.9	16	24	1.1	9	177.1	13	29	1.3	9
138	pyraclofos	125.1	7.5	56	2.5	9	66.7	36	69	3.1	7
139	pyridaben	101.4	3.5	15	0.70	8	125.7	5.3	23	1.0	9
140	pyridaphenthion	135.2	5.3	34	1.5	8	137.2	4.7	24	1.1	8
141	pyriproxyfen	110.8	6.6	17	0.77	9	124.2	5.4	19	0.86	9
142	quinochloramine	51.1	14	75	3.4	8	15.0	13	71	3.2	5
143	quinoxifen	39.4	17	75	3.4	8	26.6	29	87	4.0	8
144	quintozene	82.0	7.9	43	2.0	8	71.5	10	31	1.4	8
145	silafuofen	103.7	7.0	23	1.1	9	106.5	6.2	19	0.87	9
146	tebuconazole	113.4	5.9	25	1.1	7	126.2	9.8	16	0.71	8
147	tebufenpyrad	111.0	4.6	18	0.84	9	118.2	4.8	14	0.63	9
148	tecnazene	91.4	6.3	10	0.47	7	91.9	10	25	1.1	9
149	tefluthrin	91.0	3.0	21	0.94	8	89.3	5.5	18	0.82	9
150	terbacil	133.2	8.4	23	1.1	8	172.3	3.2	8.9	0.40	6
151	terbufos	85.1	7.6	27	1.2	9	99.4	7.7	28	1.3	9
152	terbutryn	73.1	8.0	41	1.9	7	112.2	6.7	8.2	0.37	7
153	tetrachlorvinphos	116.8	3.4	22	1.0	8	123.0	5.4	17	0.78	8
154	tetraconazole	91.5	4.8	23	1.1	8	104.7	7.0	18	0.81	9
155	tetradifon	95.1	3.6	22	1.0	9	99.6	6.7	22	1.0	9
156	thiobencarb	100.8	13	27	1.2	9	110.1	5.2	18	0.80	9
157	tolylfluamid	94.2	6.2	28	1.3	9	59.8	9.4	35	1.6	9
158	triadimefon	101.6	6.5	19	0.88	8	123.4	6.7	18	0.80	9
159	triadimenol	155.9	7.1	82	3.7	5	148.4	8.1	31	1.4	7
160	tri-allate	90.3	4.6	19	0.87	9	95.1	4.6	17	0.79	9
161	trifloxystrobin	122.7	5.5	44	2.0	8	115.4	4.9	24	1.1	8
162	trifluralin	98.5	9.0	30	1.4	9	108.7	7.7	17	0.78	9
163	vinclozolin	97.3	5.3	24	1.1	9	105.0	4.9	6.1	0.28	7

RSD_r%: Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

RSD_R%: Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

■: Recovery was out of the range of 50~200% or HorRat was over 2.0.

□: HorRat was within the range of 1.5~2.0.

Table 4-1 (1) Collaborative study (formula feed)

(µg/kg)								
Lab. No	acetochlor		acrinathrin		alachlor		aldrin	
1	104.8	105.8	59.3	60.6	105.5	106.4	90.2	102.7
2	109.2	105.0	103.7	104.5	106.1	103.1	47.6	61.9
3	99.1	110.0	97.3	117.9	97.2	112.9	119.8	100.3
4	152.7	160.2	221.2	237.8	116.1	124.3	103.5	109.4
5	87.9	83.7	67.4	79.7	77.1	82.5	73.1	78.4
6	121.0	130.0	44.7	50.6	75.5	74.1	92.5	81.0
7	106.5	113.9	161.7	164.5	113.0	110.2	91.1	95.7
8	103.1	112.5	131.6	134.2	115.9	112.5	113.8	102.8
9	55.2	56.1	108.9	121.7	62.9	66.7	47.7	47.1
Lab. No	allethrin		allidochlor		ametryn		anilofos	
1	97.0	88.6	115.0	120.1	2214.5 ³⁾	3800.0 ³⁾	103.9	112.9
2	94.5	90.0	112.1	108.0	34.8	37.7	141.5	137.5
3	81.0	94.0	73.0	71.3	51.1	73.5	123.2	142.1
4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	131.2	133.6	94.6	103.5	197.6	205.6
5	84.2	69.1	87.3	89.1	57.6	67.8	100.9	105.9
6	104.7	117.8	107.2	110.9	58.0	39.9	183.8 ³⁾	237.6 ³⁾
7	130.5	139.7	81.3	86.0	54.3	46.5	144.9	140.6
8	50.2	94.8	91.1 ³⁾	110.8 ³⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	125.6	137.6
9	57.6	60.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	98.3	92.0
Lab. No	atrazine		azamethiphos		azinphos-methyl		benfluralin	
1	102.4	105.6	90.5	70.7	110.2	110.8	88.1	93.7
2	138.2	120.2	1120.8 ³⁾	596.3 ³⁾	85.1	83.4	102.4	107.5
3	70.0	69.0	102.0	162.0	139.4	175.8	87.2	102.0
4	95.5	96.4	213.9	261.6	264.2	281.7	144.7	159.6
5	77.5	81.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	68.5	79.3	69.2	75.7
6	106.7	103.8	154.0	234.5	122.0	141.5	48.3	54.6
7	71.8	62.6	54.4	27.6	154.0	156.5	92.6	104.3
8	72.0	100.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	44.1	35.9	94.6	107.8
9	50.6	52.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	354.6	380.5	51.0	61.2
Lab. No	benoxacor		α -BHC		β -BHC		γ -BHC	
1	101.2	101.0	98.5	96.5	85.7	87.6	96.6	92.7
2	129.4	124.6	75.2	79.3	80.3	83.1	112.9	117.5
3	93.8	105.4	90.0	103.9	88.8	103.3	93.8	107.2
4	125.2	132.0	103.6	106.7	93.4	97.6	108.3	116.3
5	86.7	87.8	78.4	83.4	81.7	83.5	79.1	84.3
6	116.2	131.0	90.2	83.5	101.6	97.5	80.9	71.8
7	109.3	123.0	94.9	100.2	96.2	100.5	94.7	98.8
8	105.8	128.7	112.0	105.9	120.0	130.0	117.1	107.5
9	56.6	57.4	58.7	53.4	49.2	48.1	44.6	42.8

1) Not Detected

2) Without analysis

3) Data excluded by Cochran test

4) Data excluded by Grubbs test

Table 4-1 (2) Collaborative study (formula feed) (continued)

		(μg/kg)						
Lab. No	δ-BHC	bifenthrin		bromacil		bromobutide		
1	93.2	91.3	103.0	112.2	105.0	114.0	98.9	99.0
2	80.0	84.8	97.9	98.4	653.1 ⁴⁾	624.8 ⁴⁾	94.3	95.9
3	102.7	117.3	87.2	105.2	2.3	4.9	98.8	111.3
4	102.8	106.1	143.7 ⁴⁾	152.9 ⁴⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	121.1	129.3
5	77.9	82.6	75.8	82.9	93.0	93.9	73.2	78.1
6	87.8	79.9	105.7	100.4	102.9	146.6	73.2	73.8
7	95.2	98.9	101.1	100.1	16.8	16.6	116.7	120.4
8	107.4	101.4	111.6	102.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	115.9	111.0
9	49.9	47.4	87.6	83.6	43.0	51.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
Lab. No	bromophos	bromopropylate		bupirimate		butamifos		
1	91.0	91.8	104.7	112.3	102.4	99.5	99.6	111.8
2	90.2	91.0	101.6	102.0	2.6	1.9	100.3	103.5
3	101.9	116.3	98.7	110.2	92.3 ³⁾	59.6 ³⁾	86.5	105.3
4	112.0	117.9	153.1	158.4	128.5 ³⁾	2.2 ³⁾	209.0	232.5
5	66.3	70.8	97.0	98.8	89.9	93.1	73.8	83.3
6	90.4	99.1	211.2 ³⁾	235.6 ³⁾	157.5	164.7	59.8	63.2
7	105.8	115.1	113.7	111.9	15.1	12.6	158.3	172.5
8	109.5	118.7	107.9	110.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	142.5	144.2
9	57.0	55.2	73.2	68.6	65.2	63.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
Lab. No	cadusafos	carfentrazone-ethyl		chlorbenzilate		cis-chlordane		
1	114.7	114.2	102.6	106.6	109.5	107.9	87.8	90.9
2	107.4	105.0	93.3	96.3	113.4	108.7	23.3	31.5
3	99.8	120.8	91.7 ³⁾	124.7 ³⁾	99.5	113.3	86.0	99.2
4	123.4	125.7	139.6	150.0	136.1	144.0	113.2	121.1
5	95.4	95.9	91.9	99.9	92.1	92.3	74.9	80.2
6	135.5	152.8	96.6	94.4	161.2	168.1	93.8	82.8
7	104.6	112.1	79.8	64.6	123.2	122.7	94.2	93.0
8	86.6	114.9	74.0	72.2	114.0	110.5	102.8	107.0
9	56.4	61.6	99.1	99.9	75.4	71.9	50.7	48.1
Lab. No	oxychlordane	trans-chlordane		chlorfenapyr		(E)-chlorfenvinphos		
1	87.9	94.0	90.9	96.3	96.1	102.0	103.2	106.5
2	15.8	21.0	22.9 ⁴⁾	32.4 ⁴⁾	91.0	90.6	87.3	93.9
3	86.8	99.9	89.1	101.0	74.6	86.7	116.1	128.1
4	107.7	119.9	104.7	112.1	115.7	124.9	144.6	150.5
5	69.7	73.8	77.2	82.3	85.9	104.1	69.2	80.6
6	82.1	78.6	107.2	93.0	101.6	102.4	58.8	69.9
7	98.7	80.4	96.6	101.5	102.8	107.4	121.5	118.6
8	120.0	119.3	109.5	113.7	103.5	100.6	95.1	112.2
9	61.8	48.4	54.6 ⁴⁾	52.9 ⁴⁾	83.2	81.8	93.0	96.7

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (3) Collaborative study (formula feed) (continued)

(µg/kg)								
Lab. No	(Z)-chlorfenvinphos		chlorpropham		chlorpyrifos		chlorpyrifos-methyl	
1	101.5	103.3	108.1	119.0	77.7	79.2	89.8	93.5
2	93.4	96.3	116.0	116.5	103.4	100.8	97.8	98.6
3	114.3	127.9	106.5	123.3	101.3	113.3	92.3	104.7
4	134.6	145.1	118.9	129.7	106.9	109.7	104.8	110.2
5	74.3	83.6	87.5	94.2	69.8	71.8	73.4 ⁴⁾	76.5 ⁴⁾
6	63.2	73.6	84.8	95.2	124.7	144.6	88.4	105.7
7	114.3	115.3	117.0	123.3	100.3	102.9	108.8	112.9
8	88.6	104.9	110.7	114.8	157.1	187.8	92.3	108.3
9	80.2	89.8	74.0	79.4	63.6	60.7	50.8 ⁴⁾	50.2 ⁴⁾
Lab. No	chlorthal-dimethyl		coumaphos		cyanophos		cyfluthrin	
1	96.2	98.2	15.7	23.0	117.2	120.8	238.2	250.4
2	55.1	62.8	135.3	131.3	106.0	102.5	89.6	89.8
3	90.9	104.6	60.3 ³⁾	86.7 ³⁾	102.0	113.2	93.4	124.1
4	103.6	110.2	177.0	168.7	107.9	113.6	588.7 ³⁾	660.9 ³⁾
5	76.3	81.1	23.7	19.7	81.2 ⁴⁾	80.7 ⁴⁾	82.5	97.2
6	102.0	89.4	9.3	19.8	95.7	112.1	77.2	83.9
7	94.4	97.1	137.0	132.9	114.0	114.1	160.5	162.2
8	112.3	109.9	125.5	129.0	98.5	114.8	139.2	127.2
9	52.5	51.7	28.7	29.6	55.2 ⁴⁾	55.8 ⁴⁾	169.5	163.8
Lab. No	cyhalothrin		cypermethrin		cyproconazole		<i>o,p'</i> -DDD	
1	127.8	139.5	116.9	123.9	92.8	90.6	94.5	96.7
2	117.9	108.9	173.8	231.2	11.3	11.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
3	85.3	111.4	56.0	146.7	121.6 ²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	79.2	103.0
4	195.8	203.9	173.8	231.2	37.7	20.3	107.8	115.3
5	89.8	98.2	106.5	114.0	31.2	48.6	74.3	80.0
6	169.2	195.4	137.1	166.4	85.9	60.0	89.1	80.8
7	134.3	143.7	478.9 ⁴⁾	545.9 ⁴⁾	18.5	17.7	95.1	69.2
8	119.1	120.9	102.4	141.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
9	86.8	82.7	163.2	129.3	142.7	116.9	61.0	58.4
Lab. No	<i>p,p'</i> -DDD		<i>o,p'</i> -DDE		<i>p,p'</i> -DDE		<i>o,p'</i> -DDT	
1	103.0	113.4	90.3	89.5	91.4	97.7	101.1	111.9
2	92.2	96.0	85.2	87.8	36.5 ⁴⁾	37.2 ⁴⁾	118.6	113.2
3	90.1 ³⁾	127.1 ³⁾	86.0	100.7	82.7	97.3	89.2	107.8
4	125.7	135.9	102.5	106.2	95.5	93.1	121.0	130.5
5	79.3	86.4	79.1	86.1	79.6	83.6	82.9	94.2
6	107.7	98.9	101.9	87.1	102.7	91.1	99.4	89.0
7	123.7	127.3	184.0 ⁴⁾	185.5 ⁴⁾	84.7	87.7	141.1	157.8
8	105.1	99.4	101.2	106.9	110.8	94.4	170.2	165.8
9	70.9	69.3	50.4 ⁴⁾	46.5 ⁴⁾	53.1 ⁴⁾	49.0 ⁴⁾	60.6	56.9

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (4) Collaborative study (formula feed) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	<i>p,p'</i> -DDT		deltamethrin		diazinon		dichlorvos		
1	93.8	105.2	76.5	90.4	111.4	109.8	11.4	3.0	
2	106.3	117.2	105.1	106.0	115.0	114.2	36.8	36.4	
3	86.7	92.1	87.1	106.7	100.5	116.2	25.2	35.6	
4	129.7	142.8	224.0	237.6	111.3	118.3	61.3	72.7	
5	82.4	88.4	81.8	91.4	83.0	91.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
6	118.4	102.3	60.5	66.0	75.6	78.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
7	105.3	111.4	141.1	147.6	103.3	109.4	28.5	30.1	
8	155.9	135.0	139.1	131.9	106.0	108.6	44.2	43.5	
9	66.4	62.9	134.6	159.1	60.1	67.1	27.2	27.7	
Lab. No	diclofop-methyl		dicloran		dieldrin		difenoconazole		
1	100.6	107.8	101.5	103.9	91.3	101.9	82.1	93.9	
2	83.0	89.7	103.0	109.4	47.3	48.6	107.0	102.4	
3	88.9	101.4	79.3	96.5	73.2	84.6	105.8	122.5	
4	134.9	144.0	143.1	153.9	113.4	120.4	181.0	179.0	
5	87.2	94.4	80.2	91.5	90.4	93.3	72.8	92.6	
6	121.8	110.3	46.9	86.5	84.1	100.7	81.8	91.9	
7	93.8	87.4	102.8	115.1	66.5 ³⁾	172.9 ³⁾	121.5	134.3	
8	83.2	70.8	102.4	112.9	65.5	76.0	121.4	128.5	
9	98.9	89.2	66.8	78.4	57.5	49.3	99.2	112.5	
Lab. No	dimepiperate		dimethametryn		dimethenamid		dimethoate		
1	108.9	113.0	0.2 ²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	103.7	102.3	98.1	93.1	
2	134.5	134.5	10.9	6.7	97.0	97.5	118.2	108.8	
3	125.8	144.4	9.7	9.5	101.2	113.5	117.8	134.2	
4	108.8	118.6	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	119.1	125.4	168.3	194.1	
5	87.0	96.0	71.5	74.2	82.9	87.7	81.0	85.9	
6	87.1	101.7	94.7	99.7	79.8	78.2	107.6	108.5	
7	126.6	128.5	10.7	11.0	101.8	110.8	127.6	170.3	
8	134.5	125.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	113.1	107.8	72.3	114.2	
9	79.4	84.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	63.4	66.9	64.5	68.1	
Lab. No	diphenamid		ediphenphos		endrin		EPN		
1	102.1	104.1	129.8	137.0	99.5	114.9	91.3	98.0	
2	102.4	95.9	115.9	106.5	77.1	85.9	167.9	165.9	
3	95.2	104.1	155.8	194.7	119.1	139.0	97.1	108.4	
4	122.8	122.4	195.9	204.4	114.5	129.9	224.9	244.9	
5	82.8	84.0	98.0	117.0	89.2	96.8	97.0	99.7	
6	103.7	107.4	119.5	136.0	151.1	141.8	126.5	137.0	
7	104.7	109.1	77.3	26.7	105.3	100.5	144.2	136.0	
8	104.2	110.6	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	131.9	131.6	143.8	145.8	
9	53.0	52.4	203.6	222.2	83.4	77.7	76.3	69.9	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (5) Collaborative study (formula feed) (continued)

(µg/kg)								
Lab. No	ethalfluralin		ethion		ethofumesate		ethoprophos	
1	83.1	89.9	94.3	106.2	96.6	97.3	113.3	116.6
2	103.3	101.1	110.8	110.2	105.1	100.4	105.7	101.6
3	91.4	101.5	98.2	111.9	100.0	110.4	104.6	115.7
4	143.4	158.1	169.6	175.0	189.0 ³⁾	230.9 ³⁾	127.0	131.3
5	74.2	74.7	91.3	94.0	91.5	95.0	90.0	90.5
6	90.0	91.2	155.4	174.5	84.6	79.8	120.9	135.1
7	99.1	108.8	118.6	122.6	160.3	173.6	109.1	121.7
8	71.2	101.4	115.9	122.6	115.6	113.1	84.3	114.1
9	43.9	49.2	73.4	68.5	58.6	55.6	55.4	59.4
Lab. No	etofenprox		etridiazole		etrimphos		fenarimol	
1	96.6	102.4	101.3	109.6	92.9	94.4	109.4	112.0
2	111.7	106.2	141.1	133.7	109.1	105.4	112.6	112.1
3	87.5	101.9	80.6	81.7	103.7	116.2	91.9	102.9
4	154.5	150.8	108.9	111.7	109.3	115.5	170.9 ⁴⁾	179.7 ⁴⁾
5	79.9	83.2	81.6	83.7	80.3 ⁴⁾	80.6 ⁴⁾	97.7	111.3
6	147.7	175.2	128.0	138.7	95.1	110.3	105.9	107.9
7	127.6	133.1	96.0	105.3	106.3	111.9	113.5	104.6
8	115.1	117.9	103.4 ³⁾	139.7 ³⁾	94.0	109.3	131.1	130.1
9	76.7	75.6	41.4	42.0	51.9 ⁴⁾	50.6 ⁴⁾	113.2	113.8
Lab. No	fenbuconazole		fenitrothion		fenthiocarb		fenpropathrin	
1	92.5	92.5	90.8	92.6	105.5	109.0	105.1	107.2
2	90.5	84.5	135.8	131.0	112.7	113.0	108.0	107.4
3	77.2	87.7	118.5	136.1	88.9	103.4	93.4	113.7
4	155.2 ⁴⁾	169.1 ⁴⁾	232.5	238.7	116.1	121.5	143.1	152.5
5	73.4	94.8	78.5	80.3	90.4	102.5	76.0	79.3
6	103.3	104.9	103.7	114.1	84.2	83.5	88.8	92.6
7	117.0	124.9	164.9	178.9	122.4	133.2	128.2	122.1
8	98.5	106.1	110.8	149.0	124.6	126.6	774.1 ³⁾	235.0 ³⁾
9	98.8	96.8	59.6	65.1	104.9	109.0	85.5	86.0
Lab. No	fenpropimorph		fenthion		fenvalerate		fipronil	
1	3.1	4.0	76.2	78.3	102.7	111.0	59.3	55.8
2	102.1	99.3	92.0	89.8	108.2	124.4	100.3	99.9
3	87.3	98.8	71.4	73.3	91.8	125.3	104.9	116.4
4	109.5	115.8	98.0	102.1	231.0	232.4	154.5	166.4
5	62.5	62.5	36.9	38.0	85.9	85.7	75.9	76.5
6	87.6	94.5	79.0	85.6	136.5	158.2	64.2	67.6
7	109.7	114.4	87.7	91.6	156.9	154.7	131.0	145.0
8	98.1	106.8	89.4	92.1	98.4	123.9	62.6	99.2
9	54.8	49.1	39.4	36.6	95.7	97.9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (6) Collaborative study (formula feed) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	flamprop-methyl		flucythrinate		fludioxonil		flumiclorac pentyl		
1	105.8	107.9	109.1	112.1	259.0	330.6	97.6	101.8	
2	103.7	98.6	115.7	117.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	119.5	130.1	
3	98.4	97.8	124.4	144.2	N.D. ¹⁾²⁾	72.6 ²⁾	108.3	123.4	
4	126.9	133.6	163.2	189.4	112.3	118.9	301.4 ⁴⁾	321.4 ⁴⁾	
5	96.0	96.4	91.0	102.9	67.4	83.8	86.2	90.4	
6	129.7	135.7	69.9	78.0	59.6	51.0	164.9 ³⁾	214.1 ³⁾	
7	29.3	18.6	156.4	161.4	201.0	122.6	151.5	161.3	
8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	153.0	147.4	353.2	202.4	146.2	150.4	
9	64.5	62.0	173.6	173.1	94.1	89.8	103.7	112.6	
Lab. No	flumioxazin		flutolanil		flutriafol		fluvalinate		
1	96.2	99.1	108.6	117.1	80.9	70.7	90.8	101.4	
2	126.2	129.5	71.3	60.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	107.2	109.4	
3	117.7	148.9	65.9	78.3	114.8	82.7	99.2	128.3	
4	233.4	259.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	182.5	201.6	
5	67.4	73.1	96.1	94.4	31.9	47.3	77.2	89.1	
6	63.7	62.1	56.7	39.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	68.2	74.3	
7	155.5	152.8	108.5	113.4	63.3	71.5	165.0	164.7	
8	133.5	119.3	91.8	84.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	154.0	148.6	
9	169.6	209.6	79.1	78.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	150.3	162.7	
Lab. No	fosthiazate		halfenprox		heptachlor		heptachlor-epoxyde		
1	125.5	122.0	85.0	98.7	96.9	106.4	92.8	95.6	
2	173.9	172.1	126.1	116.3	32.0	38.3	33.7	42.8	
3	186.3	234.5	72.4	91.6	97.4	109.4	81.6	93.8	
4	137.0	149.6	230.4 ⁴⁾	224.4 ⁴⁾	112.0	119.1	105.8	114.4	
5	67.1	84.9	95.6	96.1	70.7	77.0	71.1	76.0	
6	54.1	67.5	119.0	130.5	78.9	79.2	86.7	79.6	
7	172.7	205.8	134.5	138.9	98.6	100.8	91.3	95.8	
8	126.5	133.0	118.9	134.0	121.8	135.2	111.8	107.6	
9	122.6	136.5	88.0	88.8	54.5	52.5	54.6	51.7	
Lab. No	hexaconazole		hexazinone		imazamethabenz methyl ester		iprobenfos		
1	94.5	100.7	0.8	1.5	55.0	62.1	105.9	110.0	
2	79.4	89.0	111.3	103.2	81.0	80.2	141.8	138.3	
3	83.8	94.7	2.2	8.0	53.6	63.7	154.7	169.3	
4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	60.4	72.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	149.7	154.9	
5	68.4	88.0	15.4	16.2	40.2	35.0	88.7	88.4	
6	39.2	62.3	3.3	7.5	107.6	102.5	136.0	176.9	
7	77.0	76.5	19.5	19.0	46.5	51.9	131.7	145.6	
8	77.2	71.0	16.2 ³⁾	60.6 ³⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	84.6	128.7	
9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	36.8	35.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	64.4	70.4	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (7) Collaborative study (formula feed) (continued)

(µg/kg)								
Lab. No	isazofos		isofenphos		isoprothiolane		kresoxim-methyl	
1	98.5	97.8	105.0	82.3	103.4	115.1	103.5	105.6
2	126.2	120.5	101.3	96.1	58.0	56.0	103.3	99.2
3	114.9	135.0	89.3	101.2	186.2 ³⁾	86.4 ³⁾	105.8	110.0
4	104.6	104.2	122.6	121.8	141.3	159.4	150.5	153.4
5	99.0	98.5	80.4	81.0	93.5	91.4	96.6	97.0
6	130.7	147.4	98.7	111.0	128.8	135.5	121.8	124.3
7	115.1	118.6	116.9 ³⁾	43.6 ³⁾	115.6	106.7	110.4	96.7
8	109.9	134.3	92.3	107.4	85.4	77.2	113.2	105.4
9	60.6	61.5	56.1	53.9	62.1	61.9	69.7	63.9
Lab. No	malathion		metalaxyl		methacrifos		methidathion	
1	98.5	101.2	61.3	35.6	106.8	115.4	103.4	104.8
2	114.6	98.6	39.4	39.2	87.3	88.3	126.7	123.7
3	110.6 ³⁾	63.5 ³⁾	40.6	25.1	90.1	98.9	97.8	128.4
4	131.6	130.1	65.2	77.5	115.5	119.8	152.5	152.3
5	81.0	83.0	4.6	10.3	86.4	91.1	136.3 ³⁾	233.5 ³⁾
6	117.5	129.1	71.3	53.6	85.0	84.3	80.3	104.2
7	140.1	146.1	33.9	50.5	97.4	108.8	129.0	132.9
8	112.5	114.7	15.6	8.9	104.4	113.2	86.6	121.7
9	64.1	65.6	42.3	43.2	52.0	54.2	94.4	105.6
Lab. No	methoxychlor		metolachlor		(E)-metominostrobin		mevinphos	
1	102.0	103.8	98.1	101.9	109.2	115.5	88.2	71.4
2	131.4	112.6	108.5	106.4	49.6	49.4	91.0	90.5
3	85.6	83.8	96.7	106.9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	88.2	99.8
4	133.9	141.4	124.9	129.9	148.6	136.1	109.5	117.5
5	86.9	96.2	82.7	81.1	87.9	99.6	29.6	48.5
6	112.8	98.0	107.4	108.8	84.4	83.1	24.8	36.4
7	100.9	98.7	111.4	111.3	108.6	93.1	127.9	147.9
8	156.6	148.5	110.4	114.8	74.5 ³⁾	32.7 ³⁾	87.8	93.6
9	75.3	69.7	55.7	54.2	105.2	106.0	71.6	78.9
Lab. No	napropamide		nitrothal-isopropyl		oxadiazon		oxadixyl	
1	121.3	119.5	80.4	89.1	96.6	101.1	4.0	3.2
2	98.9	94.2	130.7	123.8	85.5	85.0	32.6	62.8
3	96.5	93.5	74.9	86.2	96.2	103.4	103.8	123.4
4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	198.6	216.3	112.9	125.6	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
5	84.5	97.9	72.9	74.8	81.6	87.1	23.8	46.8
6	86.1	85.6	76.6	77.9	104.5	93.6	51.7	55.2
7	123.5	139.4	136.9	153.4	101.8 ³⁾	63.4 ³⁾	117.4 ³⁾	29.4 ³⁾
8	109.6	100.0	91.8	126.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	58.6	29.4
9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	49.9	57.3	70.4	66.7	71.3	78.7

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (8) Collaborative study (formula feed) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	parathion		parathion-methyl		penconazole		pendimethalin		
1	96.9	105.9	94.2	100.3	77.8	86.3	68.9	78.5	
2	118.2	128.0	135.2	130.8	92.4	88.6	125.5	119.4	
3	116.9	139.2	111.0	122.0	100.8	108.9	96.4	113.5	
4	180.9	204.6	179.9	192.7	117.4	120.8	187.6	201.0	
5	76.8	83.6	78.9	80.3	86.8	90.7	75.0	75.6	
6	63.3	65.3	96.4	120.8	95.9	100.2	92.3	96.5	
7	146.5	170.6	138.5	161.8	98.2	95.9	125.7	136.5	
8	131.4	150.1	76.0	121.5	54.8 ³⁾	86.7 ³⁾	104.5	129.1	
9	88.9	104.3	55.8	65.7	54.7	56.7	50.5	54.8	
Lab. No	<i>cis</i> -permethrin		<i>trans</i> -permethrin		phenothrin		phenthoate		
1	99.9	109.4	100.6	105.0	235.3 ⁴⁾	250.1 ⁴⁾	82.2	85.2	
2	102.4	105.7	103.9	106.1	89.0	83.7	112.1	110.4	
3	86.0	102.4	97.2	104.1	79.8	91.7	84.0	93.0	
4	176.9 ⁴⁾	186.8 ⁴⁾	162.8	171.2	106.4	118.7	128.9	133.2	
5	73.8	82.9	77.0	83.9	83.4	84.5	73.0	74.0	
6	81.5	82.4	81.4	80.6	247.5 ⁴⁾	273.5 ⁴⁾	86.1	94.5	
7	116.4	116.4	118.9	112.5	122.7	125.3	107.2	112.5	
8	116.0	116.1	114.2	117.2	87.2	87.3	72.2 ³⁾	105.8 ³⁾	
9	106.0	99.9	95.6	91.6	73.9	68.2	51.4	49.8	
Lab. No	phorate		phosalone		phosmet		phosphamidon		
1	83.3	89.5	99.5	109.4	96.1	103.1	67.1	56.8	
2	96.8	93.6	139.2	138.4	133.7	133.5	43.7	33.6	
3	66.3	65.9	105.4 ³⁾	172.2 ³⁾	116.9	130.3	73.8	59.7	
4	105.6	110.7	280.3 ⁴⁾	301.0 ⁴⁾	185.2	191.4	96.5	112.9	
5	55.2	53.0	95.5	111.0	84.5	94.6	18.5	30.3	
6	98.3	111.3	121.4	146.7	331.6 ³⁾	450.1 ³⁾	33.8	32.9	
7	85.8	95.2	125.7	135.7	112.5	108.5	63.6	91.8	
8	69.9	89.8	116.5	124.0	100.6	96.7	24.3	26.8	
9	36.3	35.3	137.4	143.3	116.3	109.6	60.8	71.2	
Lab. No	picolinafen		piperophos		pirimiphos-methyl		procymidone		
1	15.9	22.9	185.8	209.9	101.8	103.4	103.8	104.5	
2	107.0	101.1	133.2	131.9	112.2	110.8	96.2	94.7	
3	37.6	59.1	123.7	117.7	90.6	105.1	92.1	103.5	
4	116.6	125.3	209.3	226.5	124.5	133.1	109.2	111.0	
5	20.0	14.6	103.1	120.1	74.1	80.6	83.4	84.0	
6	7.5	19.4	69.5	74.7	69.5	74.2	97.3	100.4	
7	106.6	101.2	137.9	135.1	109.5	114.8	98.7	108.6	
8	106.0	113.1	245.5	266.7	124.7	121.8	94.0	109.7	
9	22.5	22.0	208.0	234.5	65.8	65.0	54.5 ⁴⁾	49.8 ⁴⁾	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (9) Collaborative study (formula feed) (continued)

								(µg/kg)
Lab. No	profenofos		prometryn		propachlor		propanil	
1	97.0	103.6	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	115.2	114.8	102.2	98.8
2	57.3	56.3	802.5 ⁴⁾	770.2 ⁴⁾	106.5	103.5	103.4	103.2
3	108.4	123.3	43.1	17.4	95.0	108.2	99.3	115.2
4	143.9	159.1	98.9	99.8	123.1	130.0	126.1	132.7
5	81.8	87.9	81.0	81.1	86.1	94.4	76.7	90.8
6	88.0	101.3	86.6	119.4	92.3	91.0	69.1	71.1
7	99.0	64.8	51.4	41.5	106.7	112.8	114.8	126.3
8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	111.8	110.7	113.5	121.7
9	67.3	65.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	61.9	64.8	131.4	143.8
Lab. No	propargite		propazine		propetamphos		propham	
1	118.7	124.4	103.4	96.3	100.4	98.5	121.1	119.8
2	95.6	126.0	89.5	84.0	99.8	97.2	113.1	113.3
3	92.8	110.8	87.1	92.0	90.7	99.4	94.2	105.1
4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	95.0	108.4	135.5	144.0	121.2	129.6
5	88.7	95.4	87.9	88.0	81.3	80.7	98.6	104.1
6	107.9	103.5	104.9	116.6	99.5	116.5	98.0	96.6
7	121.1	111.0	50.8	41.3	109.5	117.1	8313.0 ³⁾	8470.4 ³⁾
8	107.9	95.7	72.7	83.2	87.5	108.4	113.4	118.1
9	146.9	137.5	46.7	46.7	52.4	54.4	65.1	68.1
Lab. No	propiconazole		pyraclofos		pyridaben		pyridaphenthion	
1	109.3	118.7	43.2	53.7	96.9	103.5	104.9	111.3
2	187.9	126.3	192.1	183.3	115.1	116.1	141.6	133.5
3	117.1	141.9	105.5	135.9	99.1	95.5	106.7	119.9
4	113.7	124.3	232.5	243.1	224.3 ⁴⁾	231.7 ⁴⁾	225.9	242.3
5	91.1	104.5	43.8	34.4	77.2	86.0	93.2	97.1
6	77.7	72.6	74.3	85.3	76.0	77.4	269.9 ³⁾	360.7 ³⁾
7	128.5	128.5	194.3	186.7	110.1	116.1	144.0	153.1
8	116.5	73.7	137.8	146.7	110.3	116.0	140.0	153.2
9	135.6	136.1	80.1	79.5	113.3	113.8	97.7	99.3
Lab. No	pyriproxyfen		quinoclamine		quinoxifen		quintozene	
1	98.0	104.0	5.9	10.1	30.4	39.2	74.3	78.6
2	114.6	117.7	88.0	84.2	48.5	52.2	36.4	47.1
3	81.4	106.1	25.7	49.3	24.4	45.0	85.8	102.2
4	130.6	136.5	80.0	76.4	95.9	104.8	136.5	147.9
5	86.8	95.8	18.5	16.3	10.6	3.0	47.4	54.4
6	102.7	105.5	6.9	8.9	14.4	11.5	47.3	43.0
7	114.6	119.5	103.1	101.8	53.6	47.1	92.2	100.6
8	97.4	96.4	64.8	78.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	107.8	110.8
9	149.4	136.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	25.8	24.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (10) Collaborative study (formula feed) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	silafloufen		tebuconazole		tebufenpyrad		tecnazene		
1	101.3	105.7	89.4	90.2	99.0	106.1	99.2	102.8	
2	102.9	102.0	121.0	114.9	125.1	122.9	81.5	84.3	
3	85.7	103.9	97.8	103.5	98.4	112.1	84.7	96.6	
4	140.4	151.1	154.2	163.3	144.5	154.9	131.3 ⁴⁾	138.0 ⁴⁾	
5	68.3	74.5	106.1	94.1	77.6	86.8	76.0	79.1	
6	66.7	85.6	134.0	152.1	99.1	92.7	97.8	95.8	
7	115.3	122.8	22.2 ³⁾	145.4 ³⁾	116.2	116.0	96.3	100.5	
8	127.2	123.1	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	125.8	125.6	84.0	100.5	
9	95.7	93.6	84.4	82.0	97.5	97.7	40.8 ⁴⁾	42.5 ⁴⁾	
Lab. No	tefluthrin		terbacil		terbufos		terbutryn		
1	94.0	93.7	131.2	134.1	86.1	89.7	N.D. ¹⁾²⁾	60.7 ²⁾	
2	95.9	96.2	165.1	160.0	91.7	90.0	45.3	42.6	
3	80.5 ³⁾	97.9 ³⁾	152.7	187.1	76.2	82.2	83.4	86.4	
4	110.3	116.0	143.1	153.2	114.3	119.5	126.1	139.8	
5	76.7	81.0	93.7	106.1	63.2	62.2	72.2	80.8	
6	81.0	80.1	111.5	127.7	96.4	107.6	63.0	69.7	
7	92.3	100.4	140.4	155.1	92.5	98.3	53.5	43.9	
8	112.6	112.2	81.1	88.5	77.9	100.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
9	57.5	55.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	41.5	41.1	60.9	68.7	
Lab. No	tetrachlorvinphos		tetraconazole		tetradifon		thiobencarb		
1	108.9	109.2	83.4	88.8	95.5	100.9	97.5	96.5	
2	117.5	119.1	104.7	100.8	82.2	85.6	89.4	118.2	
3	145.3	157.0	101.6	112.7	93.1	99.2	81.1	104.9	
4	144.1	148.9	114.4	124.7	122.6	129.6	122.5	130.8	
5	85.5	93.9	70.0	70.2	82.1	84.4	79.0	86.5	
6	125.2 ³⁾	159.5 ³⁾	80.6	85.6	108.3	116.7	79.3	80.1	
7	134.2	137.1	105.0	106.5	97.0	98.1	111.5	115.3	
8	105.0	102.8	64.3 ³⁾	95.8 ³⁾	106.1	104.0	166.4	129.5	
9	81.1	79.3	56.2	59.0	54.3	52.2	63.8	62.6	
Lab. No	tolylfluanid		triadimefon		triadimenol		tri-allate		
1	71.9	77.7	99.2	104.6	115.6	124.5	96.0	99.5	
2	140.2	131.6	117.2	118.2	106.9	106.3	89.9	91.0	
3	96.4	111.1	104.6	119.1	382.5	369.3	84.7	98.1	
4	111.6	116.3	124.0	133.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	108.4	116.9	
5	66.9	68.5	71.4	85.6	996.8 ³⁾	3063.7 ³⁾	75.6	79.4	
6	81.7	79.9	75.7	83.4	33.9	61.6	85.2	83.4	
7	108.9	113.8	113.8	109.8	136.5	122.1	92.3	97.2	
8	98.2	113.4	193.3 ³⁾	135.4 ³⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	108.6	107.9	
9	53.1	54.1	78.6	87.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	53.9	56.9	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-1 (11) Collaborative study (formula feed) (continued)

Lab. No	(μg/kg)					
	trifloxystrobin		trifluralin		vinclozolin	
1	105.2	111.0	102.2	112.2	96.9	88.8
2	102.7	95.2	111.5	115.3	97.3	94.2
3	96.2	106.6	93.3	111.4	95.4	106.9
4	166.0	171.9	148.7	164.9	116.0	123.1
5	95.7	97.6	69.6	78.2	79.4	77.8
6	226.4	246.7	60.0	67.8	124.9	127.4
7	99.5	94.5	93.9	107.3	106.4	114.5
8	90.6 ³⁾	29.4 ³⁾	96.3	111.2	96.7	108.9
9	78.1	70.6	57.7	70.6	48.4	47.5

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (1) Collaborative study (alfalfa)

								($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	acetochlor		acrinathrin		alachlor		aldrin	
1	114.2	116.2	54.5	66.5	115.2	113.5	80.3	87.3
2	127.4	116.1	109.8	112.9	118.5	117.8	71.0	75.6
3	109.0	112.6	60.8	70.8	104.4	102.8	89.9	86.2
4	119.3	129.2	147.0	164.2	116.4	122.4	92.1	100.5
5	109.6	119.7	86.4	91.9	102.5	109.5	78.3	83.2
6	154.7 ⁴⁾	160.3 ⁴⁾	89.3	116.6	105.2	117.0	89.2	98.9
7	102.4	99.7	122.5	130.2	109.1	106.3	84.7	84.5
8	109.2	123.4	105.0	114.3	110.5	124.0	99.4	98.2
9	61.9 ⁴⁾	58.4 ⁴⁾	128.7	120.1	71.3 ⁴⁾	66.0 ⁴⁾	48.1	44.8
Lab. No	allethrin		allidochlor		ametryn		anilofos	
1	117.6	143.2	147.0	145.0	1353.0 ³⁾	1557.0 ³⁾	133.4	133.2
2	136.2	122.3	126.3	96.2	92.9	107.8	162.7	151.8
3	105.5	112.7	47.4	99.0	58.9	74.8	129.4	139.3
4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	136.9	144.8	82.5	87.7	185.4	199.8
5	70.6	73.1	76.7	97.4	100.3	95.2	129.4	143.0
6	143.7	161.8	105.2	127.6	83.1	108.2	503.0 ³⁾	587.9 ³⁾
7	109.6	108.3	88.7	83.3	81.7	71.4	132.3	133.2
8	108.5	133.8	115.2	134.1	104.1	117.4	126.3	127.3
9	65.8	64.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	76.7	73.4	113.8	105.1
Lab. No	atrazine		azamethiphos		azinphos-methyl		benfluralin	
1	117.3	118.8	386.9	374.8	143.4	145.4	89.5	94.8
2	114.5	115.8	208.8	234.5	102.4	78.8	123.4	120.1
3	89.6	113.5	110.4	132.9	105.8	121.3	93.5	96.6
4	111.5	112.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	195.2	198.7	129.3	140.5
5	106.4	114.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	16.4	94.0	96.7	108.0
6	144.7 ⁴⁾	162.6 ⁴⁾	151.2	172.9	211.3	249.4	87.9	111.2
7	100.8	101.6	145.1	142.2	143.6	150.1	97.2	97.7
8	99.8	109.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	55.4	145.6	104.3	108.8
9	58.8 ⁴⁾	54.4 ⁴⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	681.6 ⁴⁾	626.9 ⁴⁾	75.5	70.5
Lab. No	benoxacor		α -BHC		β -BHC		γ -BHC	
1	129.8	141.5	104.7	108.6	84.8	86.1	87.8	85.9
2	154.0	132.7	89.5	97.0	89.5	93.2	93.7	99.3
3	98.2	102.0	98.8	102.8	96.9	98.0	65.5	68.1
4	188.9	202.6	107.7	112.6	108.3	111.4	100.8	103.6
5	103.7	118.6	97.7	105.7	107.1	115.7	43.6	47.8
6	154.3	182.9	113.8	123.9	123.3	132.7	92.1	101.7
7	106.5	108.4	89.0	88.0	94.6	90.6	93.7	83.9
8	113.7	124.3	107.5	117.0	91.7	101.1	183.5 ³⁾	120.6 ³⁾
9	60.5	57.1	94.5	96.8	52.9	51.4	43.4	32.3

1) Not Detected

2) Without analysis

3) Data excluded by Cochran test

4) Data excluded by Grubbs test

Table 4-2 (2) Collaborative study (alfalfa) (continued)

		(µg/kg)						
Lab. No	δ -BHC		bifenthrin		bromacil		bromobutide	
1	102.9	108.7	88.6	93.4	138.2	139.1	102.0	107.0
2	107.8	113.3	115.3	113.3	1805.3 ³⁾	995.8 ³⁾	109.8	113.5
3	93.9	97.2	85.8	84.1	126.2	137.8	113.9	114.9
4	93.8	97.1	131.9	143.2	184.2	171.0	122.5	127.0
5	98.8	104.9	79.3	85.7	137.0	144.0	97.5	104.4
6	114.1	127.2	117.9	135.0	254.5	222.2	118.7	126.6
7	91.6	90.6	94.6	92.4	115.5	136.4	112.3	114.9
8	90.8	110.8	104.3	97.0	128.3	131.5	109.4	120.8
9	47.2 ⁴⁾	44.8 ⁴⁾	87.3	77.6	78.6	76.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
Lab. No	bromophos		bromopropylate		bupirimate		butamifos	
1	101.0	100.8	108.7	111.2	110.0	108.4	127.6	140.7
2	104.6	106.6	133.1	126.4	119.9	114.7	147.7	148.5
3	79.0	92.5	96.9	100.6	88.9	109.6	86.4	88.0
4	98.0	105.6	137.7	150.8	112.2	121.2	162.8	172.1
5	81.9	85.6	109.7	119.9	104.7	113.0	122.5	141.8
6	116.9 ³⁾	163.8 ³⁾	276.8 ³⁾	313.6 ³⁾	185.0	219.3	145.0	171.6
7	99.7	96.9	123.8	119.1	15.4 ³⁾	98.4 ³⁾	140.1	143.1
8	108.8	112.4	113.3	112.6	114.2	126.2	133.5	153.0
9	61.0	56.1	76.4	73.6	66.2	64.7	129.9	119.9
Lab. No	cadusafos		carfentrazone-ethyl		chlorbenzilate		<i>cis</i> -chlordane	
1	214.6	206.3	113.3	121.7	121.0	117.5	80.7	89.5
2	125.4	122.7	149.8	144.0	128.1	117.4	36.2 ⁴⁾	48.4 ⁴⁾
3	123.4	132.7	101.7	100.0	100.6	104.6	90.5	87.4
4	175.7	183.1	135.3	139.5	129.1	140.8	92.6	100.4
5	176.1	204.4	123.0	136.3	110.9	120.9	84.9	90.6
6	247.9	274.0	149.2	175.0	210.4 ⁴⁾	228.1 ⁴⁾	103.3	111.8
7	121.1	122.5	118.7	124.7	115.4	114.2	88.4	84.9
8	175.1	208.8	121.9	128.0	119.6	125.9	95.8	99.5
9	87.4	82.9	117.3	103.3	73.7	68.0	53.6 ⁴⁾	49.2 ⁴⁾
Lab. No	oxychlordane		<i>trans</i> -chlordane		chlorfenapyr		<i>(E)</i> -chlorfenvinphos	
1	76.5	82.2	85.1	99.5	94.9	100.2	118.1	125.2
2	28.2 ⁴⁾	35.4 ⁴⁾	38.8	50.7	105.4	112.6	103.3	112.2
3	89.4	87.6	92.3	89.0	81.1	86.0	125.7	128.8
4	98.7	104.7	101.5	110.9	89.2	93.2	130.2	136.0
5	82.6	90.2	86.7	92.1	109.2	114.0	111.3	122.2
6	98.2	108.2	103.7	114.7	123.9	137.4	131.4	148.2
7	84.6	86.9	90.0	89.0	98.7	96.6	112.3	114.7
8	90.7	94.3	102.6	107.0	117.6	116.2	112.6	128.1
9	48.7 ⁴⁾	46.8 ⁴⁾	56.9	51.2	84.6	78.8	122.5	110.5

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (3) Collaborative study (alfalfa) (continued)

									(µg/kg)
Lab. No	(Z)-chlorfenvinphos		chlorpropham		chlorpyrifos		chlorpyrifos-methyl		
1	116.5	121.0	129.1	134.1	104.4	101.8	79.3	78.7	
2	117.9	123.2	131.8	132.8	111.3	112.5	119.9	114.2	
3	124.1	127.8	117.2	123.6	72.9	88.0	85.7	96.4	
4	135.1	139.7	123.9	123.7	95.6	102.7	93.9	104.6	
5	106.4	116.8	118.4	130.2	91.2	96.1	84.7	90.8	
6	129.7	145.6	148.6	161.0	112.8 ³⁾	149.2 ³⁾	137.4 ³⁾	164.8 ³⁾	
7	116.6	115.0	114.5	114.9	97.3	98.4	94.8	96.9	
8	115.5	131.8	108.2	118.1	104.6	106.6	120.9	117.1	
9	104.3	99.1	85.8	80.5	57.4	51.7	58.8	57.0	
Lab. No	chlorthal-dimethyl		coumaphos		cyanophos		cyfluthrin		
1	109.2	107.4	N.D. ¹⁾²⁾	2.4 ²⁾	661.2	649.0	270.8	352.9	
2	79.7	89.6	80.0	49.2	123.6	117.4	108.2	101.3	
3	94.0	95.2	9.9	0.4	113.1	119.5	110.1	97.6	
4	100.6	107.0	41.8	28.7	105.1	111.5	396.3	466.5	
5	96.7	103.7	N.D. ¹⁾²⁾	23.1 ²⁾	101.0	110.6	111.4	211.1	
6	112.8	121.9	6.5	7.4	719.6	646.7	165.5	204.3	
7	94.6	96.3	11.9	12.5	125.2	109.3	125.1	132.0	
8	109.2	119.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	609.0	698.9	10.6	4.9	
9	59.1	54.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	60.1	62.0	225.8	201.3	
Lab. No	cyhalothrin		cypermethrin		cyproconazole		<i>o,p'</i> -DDD		
1	511.0 ⁴⁾	494.6 ⁴⁾	129.2	154.7	111.5	116.3	92.1	96.0	
2	108.1	105.1	508.3	449.3	110.5	92.1	100.7	106.0	
3	101.0	94.0	N.D. ¹⁾²⁾	259.2 ²⁾	98.2	99.8	83.9	81.9	
4	148.4	169.5	508.3	449.3	118.1	115.8	98.9	107.5	
5	90.4	102.4	161.2	167.5	145.2	157.1	88.6	95.4	
6	218.0 ³⁾	294.9 ³⁾	235.1	364.7	157.2	117.2	99.9	110.8	
7	110.4	111.8	325.0	253.3	87.3	113.5	88.9	88.8	
8	101.3	100.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	92.7	111.7	96.4	104.1	
9	91.4	84.3	128.1	186.7	152.5	139.6	58.8	54.4	
Lab. No	<i>p,p'</i> -DDD		<i>o,p'</i> -DDE		<i>p,p'</i> -DDE		<i>o,p'</i> -DDT		
1	97.1	105.9	81.1	86.0	79.7	85.7	86.9	95.7	
2	105.6	109.3	84.0	86.7	89.0	95.2	139.3	125.6	
3	95.8	91.0	94.4	91.3	83.1	78.9	83.8	80.9	
4	109.7	118.2	87.8	97.1	87.4	95.8	106.4	117.9	
5	93.8	100.8	87.0	93.7	90.6	102.0	93.3	101.8	
6	123.5	138.1	100.7	110.5	99.5	107.9	97.9	116.3	
7	108.7	108.4	89.4	87.5	81.4	82.5	121.1	121.0	
8	102.1	101.8	104.6	107.8	100.3	106.6	129.6	139.0	
9	73.7	64.7	51.5 ⁴⁾	45.2 ⁴⁾	53.4	48.1	64.5	58.0	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (4) Collaborative study (alfalfa) (continued)

		(µg/kg)						
Lab. No	<i>p,p'</i> -DDT		deltamethrin		diazinon		dichlorvos	
1	93.7	104.7	72.6	89.2	125.3	129.2	13.3	9.1
2	219.7 ³⁾	185.2 ³⁾	125.9	137.3	128.1	120.9	11.2	11.1
3	82.4	81.3	59.5	67.6	115.2	119.1	9.8	13.9
4	99.8	108.5	137.1	155.5	130.0	136.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
5	98.3	107.6	118.3	136.9	134.8	148.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
6	149.2 ³⁾	212.2 ³⁾	120.9	168.5	115.0 ³⁾	148.0 ³⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
7	95.4	94.7	124.4	129.6	113.9	117.3	4.3	3.7
8	139.9	144.1	107.0	117.4	117.6	126.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
9	70.0	64.4	185.7	171.1	78.7 ⁴⁾	75.8 ⁴⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
Lab. No	diclofop-methyl		dicloran		dieldrin		difenoconazole	
1	105.3	109.0	125.9	131.0	93.6	97.7	119.8	128.9
2	191.1 ³⁾	112.2 ³⁾	118.2	123.3	113.3	109.2	128.9	99.3
3	91.9	94.5	68.2	84.0	85.3	89.2	138.2	161.6
4	124.0	129.7	165.1	168.7	92.7	100.9	150.2	157.0
5	107.3	117.9	109.6	124.6	94.1	102.0	154.7	160.4
6	142.4	154.4	120.8	146.2	84.6	99.4	170.4	238.0
7	103.0	100.0	111.2	111.4	86.0	84.3	88.0	120.5
8	120.1	132.0	116.6	130.2	96.2	98.0	128.2	120.0
9	99.8	96.2	96.7	90.5	50.5 ⁴⁾	46.8 ⁴⁾	174.5	167.4
Lab. No	dimepiperate		dimethametryn		dimethenamid		dimethoate	
1	123.8	122.3	0.2 ²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	106.2	107.8	103.4	103.4
2	150.3	148.9	116.7	112.3	112.1	116.3	124.3	107.5
3	145.2	156.2	82.3	101.8	116.8	118.2	139.1	154.9
4	97.0	104.5	121.0	127.4	115.8	120.4	479.8 ⁴⁾	541.0 ⁴⁾
5	124.3	140.6	93.6	102.8	108.1	115.0	120.4	129.5
6	166.3	191.4	135.6	162.6	113.2	124.8	456.9 ³⁾	1166.3 ³⁾
7	162.9	159.4	98.5	100.7	106.3	104.4	122.2	145.9
8	120.3	147.4	103.9	112.4	112.6	127.8	104.5	192.8
9	93.7	92.3	59.1	58.8	76.6 ⁴⁾	72.3 ⁴⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
Lab. No	diphenamid		ediphenphos		endrin		EPN	
1	122.7	121.7	159.7	153.8	109.0	117.3	113.7	112.9
2	118.7	114.3	162.5	163.1	112.8	116.9	838.4 ³⁾	163.2 ³⁾
3	106.1	111.7	184.8	212.5	151.8	129.8	82.3	93.8
4	114.9	120.3	181.4	193.5	114.5	122.5	179.7	193.0
5	95.4	104.0	153.6	168.5	102.9	118.3	117.6	127.3
6	130.2	138.0	331.4 ⁴⁾	382.8 ⁴⁾	254.3 ⁴⁾	256.9 ⁴⁾	180.8 ³⁾	221.2 ³⁾
7	102.0	99.6	143.8	141.6	101.8	101.2	148.4	141.0
8	109.1	118.1	132.8	141.4	125.5	128.8	114.7	111.1
9	54.7 ⁴⁾	51.6 ⁴⁾	262.1 ⁴⁾	245.2 ⁴⁾	90.4	83.4	83.3	77.2

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (5) Collaborative study (alfalfa) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	ethalfluralin		ethion		ethofumesate		ethoprophos		
1	85.9	90.6	105.8	110.3	105.9	101.4	121.5	124.2	
2	110.3	99.8	132.6	123.7	114.2	116.2	115.5	113.1	
3	91.2	99.1	91.2	94.6	112.9	113.2	113.1	121.1	
4	126.0	144.5	157.7	170.2	120.7	121.8	134.8	135.2	
5	90.8	103.4	101.8	112.6	91.8	97.3	119.3	137.9	
6	102.4	123.5	218.4 ³⁾	255.3 ³⁾	105.5	112.4	189.1 ⁴⁾	223.9 ⁴⁾	
7	93.9	89.2	107.5	99.4	100.9	102.1	111.1	110.4	
8	92.7	91.4	116.4	118.8	95.0	107.0	116.2	131.7	
9	53.2	50.0	73.7	68.1	56.0 ⁴⁾	53.8 ⁴⁾	65.0 ⁴⁾	59.4 ⁴⁾	
Lab. No	etofenprox		etridiazole		etrimphos		fenarimol		
1	96.7	95.4	112.1	108.9	101.2	105.7	130.3	135.5	
2	128.0	116.9	130.3	97.2	122.0	107.4	127.7	132.2	
3	83.9	86.5	39.3	78.9	110.6	116.5	107.5	107.9	
4	157.1	175.0	99.1	107.6	98.0	108.6	162.8	168.5	
5	92.4	101.2	79.8	102.2	98.8	109.3	142.8	166.0	
6	254.1 ³⁾	369.2 ³⁾	138.8	200.8	134.4 ⁴⁾	154.3 ⁴⁾	154.7	149.6	
7	116.4	114.9	84.1	80.2	99.7	104.6	111.2	111.4	
8	113.1	115.4	114.6	127.6	110.9	115.9	126.6	159.4	
9	87.6	78.6	45.6	42.1	58.1 ⁴⁾	53.4 ⁴⁾	124.6	118.3	
Lab. No	fenbuconazole		fenitrothion		fenthiocarb		fenproprathrin		
1	109.1	114.0	111.5	111.0	121.4	121.6	92.0	93.3	
2	105.8	74.6	148.6	138.3	108.7	113.8	134.6	114.6	
3	80.4	93.9	89.0	94.0	106.0	112.6	81.6	85.8	
4	149.1	161.1	183.9	198.9	127.6	132.3	140.7	166.0	
5	165.9	156.6	99.1	115.7	130.4	144.6	80.9	90.0	
6	200.4	182.3	185.3	221.6	128.9	151.0	160.1	208.6	
7	61.7	105.7	165.8	160.9	102.8	102.4	100.7	96.9	
8	99.6	88.2	125.0	129.1	97.3	111.1	90.4	91.1	
9	144.2	136.0	75.1	75.3	105.2	102.4	344.3 ⁴⁾	313.3 ⁴⁾	
Lab. No	fenpropimorph		fenthion		fenvalerate		fipronil		
1	3.4 ⁴⁾	3.8 ⁴⁾	72.1	78.3	98.2	122.3	98.0	102.9	
2	135.5	114.1	111.0	90.4	126.5	123.9	125.3	115.3	
3	96.9	100.3	53.7	91.1	112.8	165.5	108.6	111.9	
4	106.1	114.4	82.9	95.7	152.4	180.4	135.8	148.6	
5	78.6	82.4	53.2	61.1	93.7	106.4	96.2	107.8	
6	108.1	121.1	108.7	120.8	221.6 ⁴⁾	283.2 ⁴⁾	139.7	153.6	
7	130.0	104.0	81.4	85.0	136.9	135.6	125.4	132.6	
8	107.6	114.2	73.1	74.0	109.7	106.7	107.1	111.8	
9	52.2 ⁴⁾	51.0 ⁴⁾	45.4	42.6	110.3	101.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (6) Collaborative study (alfalfa) (continued)

		(µg/kg)							
Lab. No	flamprop-methyl		flucythrinate		fludioxonil		flumiclorac pentyl		
1	115.9	116.3	94.9	102.7	281.5 ⁴⁾	298.4 ⁴⁾	111.3	107.1	
2	118.4	113.8	140.6	138.2	96.7	113.6	145.4	133.1	
3	103.8	107.5	104.5	102.5	52.5	55.6	103.1	110.6	
4	124.9	130.2	169.4	202.2	97.7	100.6	223.1 ⁴⁾	262.5 ⁴⁾	
5	110.0	119.5	142.0	157.3	98.8	106.8	113.9	126.3	
6	148.5 ⁴⁾	159.6 ⁴⁾	164.4	210.2	72.4	79.6	400.6 ³⁾	500.6 ³⁾	
7	99.9	103.4	137.0	138.4	111.5	116.2	142.0	143.8	
8	107.5	115.3	129.6	137.2	112.5	111.3	128.2	120.0	
9	62.3 ⁴⁾	57.7 ⁴⁾	253.1	214.4	99.9	88.8	139.7	137.9	
Lab. No	flumioxazin		flutolanil		flutriafol		fluvalinate		
1	137.8	144.3	125.3	125.7	96.9	98.0	90.7	101.6	
2	167.1	169.8	115.6	116.2	80.6	40.0	131.9	134.6	
3	107.1	108.6	99.3	102.5	71.4	75.4	80.2	85.5	
4	197.3	206.8	169.2	180.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	132.2	161.8	
5	105.2	114.8	114.1	124.1	97.1	79.5	116.2	137.6	
6	169.1	176.7	145.1 ³⁾	101.7 ³⁾	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	135.8	173.0	
7	147.2	151.3	119.2	125.7	33.9	56.6	137.7	148.1	
8	117.7	143.0	126.4	140.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	124.3	127.2	
9	344.4 ⁴⁾	337.8 ⁴⁾	75.6	73.0	80.9	70.6	228.7	208.4	
Lab. No	fosthiazate		halfenprox		heptachlor		heptachlor-epoxyde		
1	184.6	190.2	82.2	90.2	92.4	99.9	97.0	107.8	
2	163.8	168.2	141.6	130.0	49.0	72.5	53.6	62.0	
3	203.1	222.6	72.4	73.2	95.0	95.0	86.9	88.4	
4	181.8	188.0	189.4	211.6	97.7	106.2	95.9	104.4	
5	187.3	196.4	100.1	109.2	91.7	103.2	88.1	94.7	
6	203.3	185.5	181.9 ³⁾	231.7 ³⁾	106.0	131.1	103.3	113.3	
7	134.3	148.8	111.9	117.8	86.1	91.0	85.5	84.8	
8	134.2	165.4	98.6	102.3	114.4	121.8	98.8	101.4	
9	215.7	202.6	99.5	92.0	63.2	60.1	61.0	55.5	
Lab. No	hexaconazole		hexazinone		imazamethabenz methyl ester		iprobenfos		
1	123.4	121.6	4.3	4.2	50.6	52.8	125.6	131.4	
2	112.6	104.6	84.3 ³⁾	30.5 ³⁾	152.0	154.3	154.1	143.4	
3	104.3	105.7	10.0	11.6	89.7	93.6	134.2	142.3	
4	119.8	118.6	72.9	81.0	106.7	96.3	148.1	154.0	
5	159.5	169.0	44.8	46.1	155.5	171.7	122.2	137.6	
6	137.6	149.6	34.4	31.1	116.1	96.9	275.8 ³⁾	338.7 ³⁾	
7	97.8	118.4	24.4	18.6	52.9	50.0	130.3	130.6	
8	126.5	147.1	37.5	45.5	34.5	47.0	130.4	140.4	
9	258.4 ⁴⁾	239.8 ⁴⁾	46.6	46.8	34.1	31.0	94.9	95.3	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (7) Collaborative study (alfalfa) (continued)

									($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	isazofos		isofenphos		isoprothiolane		kresoxim-methyl		
1	104.8	111.7	95.0	99.8	122.4	126.5	114.7	115.3	
2	154.3	145.8	117.2	110.4	120.0	118.1	120.0	108.3	
3	118.9	128.7	90.0	100.6	106.7	103.0	103.5	106.6	
4	118.0	125.7	114.0	126.9	122.0	131.4	126.4	135.7	
5	125.5	140.1	94.8	103.3	104.6	119.8	105.9	116.0	
6	171.2	197.9	131.9	165.5	153.5 ⁴⁾	171.5 ⁴⁾	156.8 ⁴⁾	180.6 ⁴⁾	
7	151.6	165.1	102.5	104.1	125.6	127.0	101.6	102.3	
8	135.5	139.7	106.3	117.7	110.9	123.0	113.6	123.6	
9	68.5	62.8	61.5	57.0	61.5 ⁴⁾	56.5 ⁴⁾	65.7 ⁴⁾	62.6 ⁴⁾	
Lab. No	malathion		metalaxyl		methacrifos		methidathion		
1	121.6	117.0	56.1	57.6	122.2	124.5	136.6	124.6	
2	138.5	128.2	172.7	160.4	96.3	95.5	142.6	144.2	
3	108.2	115.0	21.1	28.8	86.1	102.6	138.2	137.8	
4	128.2	134.6	92.9	100.7	111.4	116.9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
5	99.6	112.8	52.8	31.3	110.0	116.4	197.3	250.1	
6	207.4 ⁴⁾	239.3 ⁴⁾	171.8 ³⁾	43.5 ³⁾	116.9	124.9	210.6	261.8	
7	115.8	110.5	16.6	24.2	96.3	95.9	123.6	123.4	
8	118.3	135.4	19.8	14.2	90.8	110.3	124.8	148.6	
9	71.2	62.6	43.5	43.2	60.6	55.7	143.3	131.9	
Lab. No	methoxychlor		metolachlor		<i>(E)</i> -metominostrobin		mevinphos		
1	98.1	105.6	115.6	115.0	129.6	126.0	82.1	77.1	
2	192.0	160.9	129.2	118.7	111.4	132.5	41.4	40.3	
3	83.2	83.7	102.3	106.9	109.2	100.6	49.5	52.6	
4	120.9	131.4	118.0	125.8	145.7	150.1	62.9	63.4	
5	107.8	119.7	95.5	105.8	133.5	143.8	57.0	52.3	
6	156.9	182.5	133.4	148.7	152.2	154.4	52.3	71.5	
7	97.2	99.2	101.2	102.1	106.1	107.5	74.9	88.0	
8	141.2	150.8	115.0	122.7	120.9	141.3	38.6	41.3	
9	84.0	80.0	58.4	55.1	108.8	101.3	78.7	70.2	
Lab. No	napropamide		nitrothal-isopropyl		oxadiazon		oxadixyl		
1	140.8	138.3	91.0	96.1	99.6	101.3	6.1 ²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
2	136.0	131.3	137.4	124.9	105.2	106.3	33.1	28.2	
3	95.6	105.1	76.0	87.8	93.2	92.5	12.9	16.4	
4	121.3	120.8	179.9	207.9	104.5	110.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
5	121.6	127.1	92.5	103.4	88.3	93.7	18.1	12.6	
6	128.1	151.2	104.6	122.6	107.4 ³⁾	125.1 ³⁾	16.7	8.1	
7	139.8	135.0	125.5	122.6	97.5	96.4	118.4	179.1	
8	120.3	141.2	108.4	109.9	109.1	114.3	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	
9	94.5	88.9	62.0	59.0	63.7	64.6	53.7	47.7	

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (8) Collaborative study (alfalfa) (continued)

(µg/kg)								
Lab. No	parathion		parathion-methyl		penconazole		pendimethalin	
1	123.6	129.1	114.0	113.9	106.1	104.6	82.6	93.4
2	138.7	140.3	156.6	142.3	127.8	117.4	141.4	128.1
3	104.0 ⁴⁾	109.0 ⁴⁾	115.5	121.6	96.6	102.3	99.9	105.4
4	159.9 ⁴⁾	169.0 ⁴⁾	159.8	171.9	111.6	112.7	155.1	172.7
5	117.4	136.2	97.7	112.4	107.8	121.9	94.4	105.8
6	121.0	156.9	170.1	203.3	138.2	157.0	129.6	157.3
7	139.8	126.7	140.4	136.1	100.5	109.3	117.0	112.4
8	127.7	139.1	122.5	124.0	123.8	131.9	103.7	109.1
9	139.0	134.5	78.4	74.7	64.0	60.3	61.1	59.9
Lab. No	<i>cis</i> -permethrin		<i>trans</i> -permethrin		phenothrin		phenthoate	
1	87.8	97.8	89.7	102.5	91.0	98.6	100.5	103.8
2	113.0	115.9	124.1	122.3	123.7	111.6	129.5	114.0
3	93.6	90.3	90.9	87.1	86.1	87.3	90.1	94.4
4	157.2 ⁴⁾	171.2 ⁴⁾	149.2	160.8	150.1	169.6	107.4	116.3
5	95.0	103.2	98.9	106.2	92.7	101.4	90.2	105.0
6	111.6	130.3	117.4	126.2	288.5 ³⁾	339.8 ³⁾	149.6 ⁴⁾	183.3 ⁴⁾
7	99.0	95.6	103.3	104.2	90.0	101.5	104.9	101.3
8	107.0	107.3	104.4	106.3	103.1	102.6	101.6	95.1
9	116.1	99.8	108.8	96.3	73.8	65.9	58.0 ⁴⁾	53.1 ⁴⁾
Lab. No	phorate		phosalone		phosmet		phosphamidon	
1	82.8	85.2	124.4	131.0	127.2	113.0	75.4	80.3
2	112.6	99.9	140.7	142.2	179.4	166.8	52.5	53.1
3	57.6	67.0	77.9	92.0	86.7	108.5	22.4	40.1
4	114.5	104.0	145.4	152.8	171.9	177.5	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾
5	60.9	80.8	125.3	131.1	102.6	107.3	66.9	39.7
6	121.0	153.9	205.3 ³⁾	293.5 ³⁾	858.0 ³⁾	1127.3 ³⁾	88.3	70.2
7	83.6	87.8	121.9	122.8	130.1	131.0	38.1	40.8
8	75.0	81.1	108.2	127.4	120.2	122.6	19.5	22.4
9	42.9	40.1	190.8	168.0	137.6	122.7	115.6	113.2
Lab. No	picolinafen		piperophos		pirimiphos-methyl		procymidone	
1	0.6	4.0	246.7	240.0	113.2	118.6	116.2	113.2
2	77.2	51.6	162.8	162.6	122.1	121.9	117.9	110.7
3	14.9	2.9	126.3	115.4	113.2	114.4	99.1	102.4
4	46.2	47.0	189.1	200.8	105.3	109.2	96.1	103.8
5	11.9	22.0	152.5	168.0	100.2	108.2	92.1	100.5
6	9.1	5.8	164.3	195.1	115.6	132.8	106.4	118.0
7	10.0	9.6	137.1	134.8	101.1	102.9	98.0	95.0
8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	132.9	139.9	102.9	112.9	112.0	115.5
9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	288.1	276.7	72.8 ⁴⁾	68.1 ⁴⁾	52.1 ⁴⁾	49.1 ⁴⁾

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (9) Collaborative study (alfalfa) (continued)

								($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Lab. No	profenofos		prometryn		propachlor		propanil	
1	128.6	122.0	N.D. ¹⁾²⁾	0.4 ²⁾	126.6	124.0	125.5	126.4
2	129.7	127.2	301.2 ³⁾	602.2 ³⁾	125.9	129.1	116.1	115.1
3	120.6	136.4	109.5	122.2	112.2	115.6	93.9 ⁴⁾	92.6 ⁴⁾
4	122.4	138.0	96.1	103.5	133.0	136.9	121.0	122.0
5	104.0	114.2	97.4	109.3	128.6	135.5	124.2	134.3
6	249.7 ³⁾	299.6 ³⁾	146.0 ⁴⁾	148.1 ⁴⁾	134.4	144.9	111.0	126.8
7	136.6	138.2	104.6	102.4	109.0	111.1	115.0	117.8
8	113.3	100.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	110.8	131.1	120.0	140.7
9	89.5	82.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	76.6 ⁴⁾	70.8 ⁴⁾	165.1 ⁴⁾	152.5 ⁴⁾
Lab. No	propargite		propazine		propetamphos		propham	
1	108.8	100.4	114.2	117.5	189.6	192.4	117.7	121.4
2	103.5	73.9	96.6	93.2	118.2	107.7	116.6	114.6
3	100.9	98.5	113.3	121.5	94.0	96.4	97.4	105.1
4	132.4	144.2	103.1	108.5	617.8 ⁴⁾	621.9 ⁴⁾	108.4	112.5
5	117.2	117.8	114.2	125.6	98.8	108.8	113.6	125.1
6	136.6	151.0	143.3	153.0	145.0	155.0	109.3	111.6
7	84.3	90.7	89.4	91.4	99.5	124.3	16911 ³⁾	14750 ³⁾
8	93.8	125.2	88.9	98.1	98.7	103.1	95.7	111.5
9	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	50.5	46.6	54.7	53.0	68.6 ⁴⁾	64.8 ⁴⁾
Lab. No	propiconazole		pyraclofos		pyridaben		pyridaphenthion	
1	162.8	149.0	21.3	29.1	103.5	107.2	129.1	128.7
2	118.7	164.2	151.1	123.1	142.2	147.1	159.5	148.6
3	173.1	195.5	77.0	41.1	95.0	95.3	107.3	118.1
4	190.2	190.7	102.4	119.2	167.6	186.7	204.8	214.4
5	265.6	292.8	23.8	53.3	109.5	118.8	109.8	120.4
6	102.5	122.3	103.0	36.1	158.2	157.4	534.9 ³⁾	620.3 ³⁾
7	105.4	181.6	32.3	20.7	103.4	111.4	140.6	137.4
8	182.6	198.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	100.0	112.8	125.1	132.6
9	203.5	189.0	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	127.7	118.3	115.6	103.1
Lab. No	pyriproxyfen		quinoclamine		quinoxifen		quintozene	
1	101.0	103.5	9.1	12.6	13.8	19.8	90.1	83.2
2	133.1	128.4	54.2 ³⁾	30.7 ³⁾	69.0	55.8	46.6	59.6
3	87.0	90.3	1.7	2.4	26.9	2.4	56.4	55.7
4	115.8	126.2	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	59.1	64.6	102.6	115.3
5	137.9	152.1	15.1	18.9	N.D. ¹⁾²⁾	22.8 ²⁾	53.3	71.0
6	145.3	151.1	29.4	32.6	15.2	6.5	43.8	44.1
7	110.7	111.0	14.3	13.6	9.6	10.4	87.2	82.1
8	104.5	122.8	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	8.5	10.3	82.2	70.0
9	162.7	152.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	25.6	32.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (10) Collaborative study (alfalfa) (continued)

(µg/kg)								
Lab. No	silafloufen		tebuconazole		tebufenpyrad		tecnazene	
1	90.0	93.2	114.3	114.2	109.1	105.2	110.5	110.7
2	118.2	118.8	125.5	109.4	141.8	141.9	96.1	90.4
3	93.6	86.9	88.1	108.9	104.8	107.3	65.7	87.6
4	137.9	148.9	137.4	135.7	125.7	136.9	96.2	97.5
5	76.0	82.7	144.4	165.7	103.3	110.6	92.3	103.7
6	113.9	133.5	254.9 ⁴⁾	291.5 ⁴⁾	133.7	149.5	103.4	134.0
7	99.0	97.7	109.5	135.1	108.3	106.8	92.2	90.1
8	110.5	112.0	128.3	153.3	118.0	119.0	95.7	101.1
9	108.4	95.6	125.8	123.6	108.6	97.8	45.7	41.4
Lab. No	tefluthrin		terbacil		terbufos		terbutryn	
1	80.7	86.7	172.6	162.1	112.7	117.4	59.8 ⁴⁾	55.5 ⁴⁾
2	105.1	103.3	203.8	192.2	109.2	97.7	119.6	114.5
3	78.7	79.0	183.6	180.7	75.7	83.2	102.4	113.5
4	96.5	107.5	160.8	159.8	107.9	119.4	118.1	121.5
5	86.8	93.6	208.0 ³⁾	261.0 ³⁾	75.7	86.1	101.2	112.2
6	94.7	105.8	561.5 ³⁾	669.9 ³⁾	138.0	162.1	105.6	120.5
7	80.8	81.5	162.4	163.8	98.5	101.6	99.8	100.8
8	101.0	110.6	157.8	168.0	102.3	101.2	112.3	129.1
9	59.5	55.7	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	51.1	50.2	85.0 ⁴⁾	80.8 ⁴⁾
Lab. No	tetrachlorvinphos		tetraconazole		tetradifon		thiobencarb	
1	123.5	125.5	102.6	107.7	101.9	104.2	105.7	103.2
2	141.2	133.7	125.5	108.2	112.2	108.1	117.9	119.3
3	145.8	160.3	109.5	113.8	86.2	98.5	100.5	102.2
4	127.7	136.6	99.0	101.5	114.6	120.5	117.1	124.9
5	108.3	118.7	96.5	106.4	94.9	105.9	124.0	127.4
6	272.4 ³⁾	325.3 ³⁾	130.7	135.0	124.5	137.2	126.8	141.4
7	107.7	117.1	88.7	109.7	95.7	78.2	99.7	109.0
8	120.9	133.2	106.1	111.3	100.9	99.8	105.7	119.7
9	85.4	82.7	68.5	63.8	56.7	53.4	71.0	66.7
Lab. No	tolylfluanid		triadimefon		triadimenol		tri-allate	
1	40.5	40.5	114.4	117.1	158.6	165.4	102.0	103.0
2	104.2	103.3	111.9	119.4	139.2	139.9	101.5	103.6
3	40.7	51.0	108.7	109.3	88.8	104.1	87.6	90.9
4	45.6	57.7	129.7	136.4	N.D. ¹⁾²⁾	N.D. ¹⁾²⁾	86.4	92.5
5	52.5	57.2	153.4	175.9	226.1	253.9	97.4	102.0
6	67.3	83.7	128.3	140.7	82.8 ³⁾	177.0 ³⁾	112.2	124.3
7	68.6	63.5	106.0	106.0	114.1	127.0	87.4	92.3
8	62.0	62.4	126.4	147.1	119.5	144.2	99.6	109.3
9	38.4	37.3	96.7	92.9	155.4	141.3	59.7	60.0

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 4-2 (11) Collaborative study (alfalfa) (continued)

Lab. No	(μg/kg)					
	trifloxystrobin		trifluralin		vinclozolin	
1	121.5	115.7	102.8	107.7	107.7	103.7
2	128.5	121.4	127.5	124.3	114.2	107.7
3	95.3	102.7	101.4	104.7	101.1	104.6
4	161.6	175.0	131.8	142.8	104.0	117.6
5	110.1	123.4	102.2	116.4	94.0	100.9
6	309.3 ³⁾	358.2 ³⁾	108.7	136.4	152.7 ⁴⁾	171.6 ⁴⁾
7	108.7	107.5	86.2	81.1	103.0	96.1
8	113.7	118.6	106.0	105.0	105.0	109.9
9	71.3	70.9	91.4	81.0	52.0 ⁴⁾	49.1 ⁴⁾

1)~4) See Table 4-1 (1)

Table 5 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	Shimadzu GCMS-QP2010	Restek Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	Agilent Technologies 6890 5973N	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	Shimadzu GCMS-QP2010	Restek Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	Agilent Technologies 6890GC 5975 inert MSD	Agilent HP-5MSi (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	Agilent Technologies 6890N 5973	Agilent HP-5MSi (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
7	Agilent Technologies 5890series II plus 5972 series	J&W DB-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	Agilent Technologies 6890N 5973 inert MSD	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
9	Agilent Technologies 6890N 5973 inert MSD	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

6 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の定量法の繰返し精度及び再現精度を確認するため、成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファを用いて 9 試験室において共同試験を実施した。

9 試験室より報告があり、試験成績を解析した農薬の試験室内繰返し精度及び試験室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.5~48% 及び 6.0~130% であった。

また、平均回収率が 50%~200% であり、なおかつ HorRat が 2.0 以下の農薬は 137 種であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社島津製作所、全国酪農業協同組合連合会、名古屋市衛生研究所、社団法人日本科学飼料協会、財団法人日本食品分析センター、財団法人マイコトキシン検査協会及び横河アナリティカルシステムズ株式会社の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，昭和 51 年農林省令第 35 号 (1976).
- 2) 野崎友春，堀米明日香，渡部千会：飼料研究報告，31，39 (2006).
- 3) AOAC Official Methods of Analysis, Appendix D (2004).

技術レポート**8 飼料中のカルタップ、チオシクラム及びベンスルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の添加回収試験**

牧野 大作*, 吉村 正寿*

1 緒 言

平成 18 年 5 月 29 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令(昭和 51 年農林省令第 35 号)の一部が改正され, 飼料中の残留農薬(60 種類)の基準値が設定された¹⁾.

カルタップ, チオシクラム及びベンスルタップについても, それらをカルタップに換算したものの総和として基準値が設定されており, その基準値はえん麦, 大麦, 小麦, とうもろこし, マイロ及びライ麦については 0.2 mg/kg, 牧草については 0.7 mg/kg となっている.

飼料分析基準²⁾のカルタップ, チオシクラム及びベンスルタップの分析法は, 財団法人日本食品分析センターが検討した分析法³⁾について, 独立行政法人肥飼料検査所(現(独)農林水産消費安全技術センター)において各種妥当性確認を実施した上で, 平成 18 年 12 月 18 日に収載されたものである.

筆者らは, 本法について添加回収試験, 繰返し精度, 定量下限及び検出下限にかかる検討を行ったので報告する.

2 実験方法**2.1 試 料**

市販の飼料原料(とうもろこし)及び乾牧草(ライグラス)をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 供試試料とした.

2.2 定量方法

飼料分析基準 6.200 によった.

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ: 島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計: 島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) 振とう機: 宮本理研工業製 理研式小型シェーカー MW-DR 型
- 4) 遠心分離器: 久保田商事製 KS-3000P
- 5) 高速遠心分離器: 日立製作所製 SCT15B
- 6) ロータリーエバポレーター: 東京理化機械製 N-1N 型
- 7) 多孔性ケイソウ土カートリッジ: Varian 製 Chem Elut CE2050 (50 mL 容)

3 結果及び考察**3.1 添加回収試験**

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した.

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

カルタップとして、とうもろこしに 20 及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、ライグラスに 40 及び 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 1 のとおり、カルタップの平均回収率は 67.7~90.4%，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1%以下であった。

次に、チオシクラムとして、とうもろこしに 20 及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、ライグラスに 40 及び 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、Table 1 のとおり、チオシクラムの平均回収率は 80.1~92.4%，その繰返し精度は RSD として 9.4%以下であった。

更に、ベンスルタップとして、とうもろこしに 60 及び 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、ライグラスに 120 及び 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。その際、標準液の一定量を添加して、よく混合した後、一夜放置して溶媒を揮散させ、その後、分析操作をおこなったが、ベンスルタップは 20~40%程度の回収率しか得られなかった。

そこで、ベンスルタップは酸性条件下で安定であること³⁾及び抽出溶媒として L-システイン塩酸溶液を使用していることなどを考慮して、標準液添加後、速やかに分析操作を行った。すると、回収率は改善され、その結果は、Table 1 のとおり、ベンスルタップの平均回収率は 57.5~64.8%，その繰返し精度は RSD として 6.5%以下であった。

このことから、ベンスルタップは抽出溶媒が存在しない状態で標準液を添加すると分解されて回収率が低下することがあると考えられた。

なお、添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。

Table 1 Recoveries of cartap, thiocyclam and bensultap from 2 kinds of feed

(%)				
Kind of pesticide	Kind of feed	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
Cartap	Corn	20	90.4	4.0
		200	84.6	4.3
	Ryegrass	40	86.5	5.1
		600	67.7	0.55
Thiocyclam	Corn	20	88.2	4.7
		200	80.1	5.8
	Ryegrass	40	92.4	9.4
		600	85.1	4.9
Bensultap	Corn	60	61.2	1.3
		300	64.8	6.5
	Ryegrass	120	57.5	2.8
		900	57.5	3.1

a) $n=3$

b) Relative standard deviation of repeatability

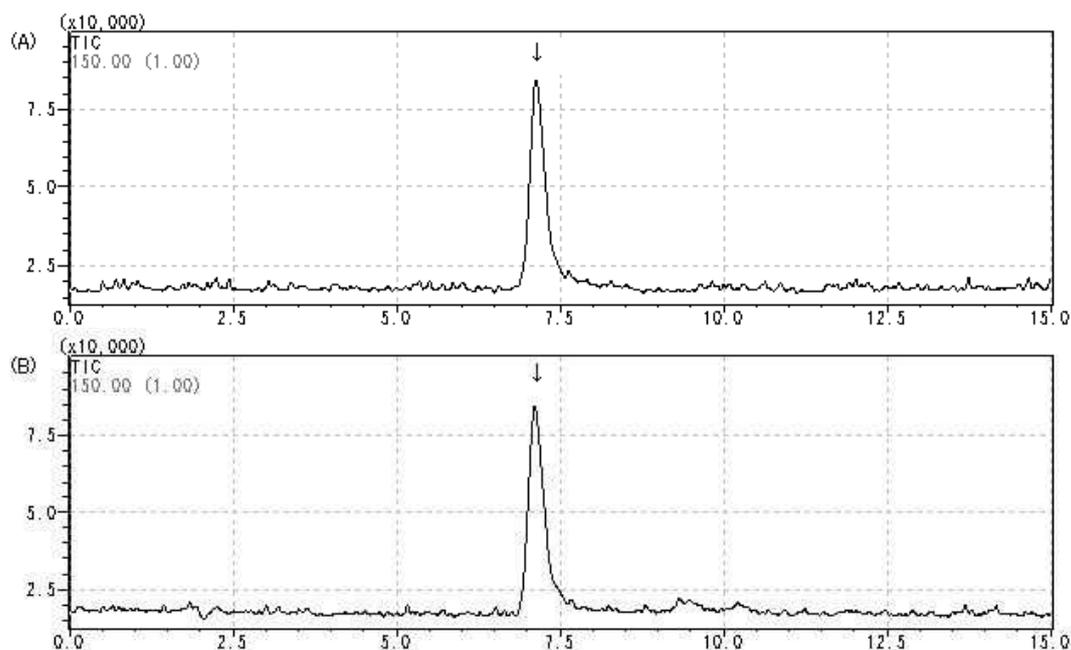


Fig. 1 SIM chromatograms of standard solution and sample solution

(A) Standard solution (The amount is 0.1 ng as nereistoxin.)

(B) Sample solution of corn (spiked with cartap at 200 µg/kg)

(Peak assignments: Nereistoxin)

3.2 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこし及びライグラスにカルタップ、チオシクロラム及びベンスルタップそれぞれを添加した試料について本法に従って3点分析を行い、得られたピークのSN比を求めた。

カルタップでは、得られたピークのSN比が10となる濃度は、とうもろこし及びライグラスにおいて、それぞれ20及び40 µg/kgであった。このことからカルタップの本法の定量下限は飼料中及び乾牧草中でそれぞれ20及び40 µg/kgと考えられた。なお、その平均回収率は90.4及び86.5%、繰返し精度は相対標準偏差(RSD)として4.0及び5.1%であった。

また、検出下限はSN比が3となる濃度から、飼料中及び乾牧草中でそれぞれ6及び12 µg/kgと見積もられた。

チオシクロラムでは、得られたピークのSN比が10となる濃度は、とうもろこし及びライグラスにおいて、20及び40 µg/kgであった。このことからチオシクロラムの本法の定量下限は飼料中及び乾牧草中でそれぞれ20及び40 µg/kgと考えられた。なお、その平均回収率は88.2及び92.4%、繰返し精度はRSDとして4.7及び9.4%であった。

また、検出下限はSN比が3となる濃度から、飼料中及び乾牧草中でそれぞれ6及び12 µg/kgと見積もられた。

ベンスルタップでは、得られたピークのSN比が10となる濃度は、とうもろこし及びライグラスにおいて、60及び120 µg/kgであった。このことからベンスルタップの本法の定量下限は飼料中及び乾牧草中でそれぞれ60及び120 µg/kgと考えられた。なお、その平均回収率は61.2及び57.5%、繰返し精度はRSDとして1.3及び2.8%であった。

また、検出下限はSN比が3となる濃度から、飼料中及び乾牧草中でそれぞれ18及び36 µg/kg

と見積もられた。

4 まとめ

各種妥当性確認を実施した上で飼料分析基準²⁾に記載された、飼料中のカルタップ、チオシクロラム及びベンスルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法について添加回収試験、繰返し精度、定量下限及び検出下限にかかる検討を行ったところ次の結果を得た。

- 1) カルタップとして、とうもろこしに 20 及び 200 µg/kg 相当量、ライグラスに 40 及び 600 µg/kg 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率は 67.7~90.4%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1%以下であった。
- 2) チオシクロラムとして、とうもろこしに 20 及び 200 µg/kg 相当量、ライグラスに 40 及び 600 µg/kg 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率は 80.1~92.4%、その繰返し精度は RSD として 9.4%以下であった。
- 3) ベンスルタップとして、とうもろこしに 60 及び 300 µg/kg 相当量、ライグラスに 120 及び 900 µg/kg 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率は 57.5~64.8%、その繰返し精度は RSD として 6.5%以下であった。
- 4) 抽出溶媒を加える前に標準液を添加して、添加回収試験等を実施すると、ベンスルタップは分解し、その回収率が低下することがあると考えられた。
- 5) 本法によるカルタップ及びチオシクロラムの定量下限は飼料中及び乾牧草中でそれぞれ 20 及び 40 µg/kg、検出下限は試料中及び乾牧草中でそれぞれ 6 及び 12 µg/kg と見積もられた。
- 6) 本法によるベンスルタップの定量下限は試料中及び乾牧草中でそれぞれ 60 及び 120 µg/kg、検出下限は飼料中及び乾牧草中でそれぞれ 18 及び 36 µg/kg と見積もられた。

文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，昭和 51 年農林省令第 35 号 (1976).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 3) (財) 日本食品分析センター：平成 17 年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発）飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2006).

技術レポート**9 共通試料による飼料中のカルタップの共同試験**

山多 利秋*

1 目的

飼料中のカルタップを分析し、分析法の再現精度を調査すること。

2 試料

市販の穀類（とうもろこし）及び乾牧草（チモシー）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

3 分析実施要領**3.1 分析方法**

飼料分析基準¹⁾ 6.200 によることとした。

3.2 分析点数

2 点併行分析を実施した。

3.3 分析値の取扱い

カルタップを変換して得られたネライストキシンとしての分析値に 1.83 を乗じてカルタップとしての分析値とし、これを $\mu\text{g}/\text{kg}$ で表し、小数点以下第一位を四捨五入して記入することとした。

3.4 分析実施期間

平成 18 年 6 月 26 日～平成 18 年 8 月 25 日

4 分析実施試験室

社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本穀物検定協会中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同仙台事務所（現 同仙台センター）及び同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）

5 分析成績

穀類（とうもろこし）にカルタップとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料及び乾牧草（チモシー）にカルタップとして 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、7 試験室において、本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 1 のとおりであり、とうもろこしの分析値については、平均回収率は 74.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 8.1%及び 26% であり、HorRat は 1.3 であった。また、チモシーの分析値については、平均回収率は 72.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 3.7%及び 21% であり、HorRat は 1.2 であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 2 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

Table 1 Result of collaborative study

Lab.	Sample			
	Maize		Timothy	
1	179	157	490	481
2	125	131	392	381
3	185	167	677	649
4	122	120	465	473
5	184	168	495	520
6	171	201	657	601
7	89	83	396	407
Spiked value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	200		700	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	149		506	
Recovery (%)	74.3		72.3	
RSD _r ^{b)} (%)	8.1		3.7	
RSD _R ^{c)} (%)	26		21	
PRSD _R ^{d)} (%)	20		17	
HorRat	1.3		1.2	

a) $n=14$

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility

d) Predicted RSD_R calculated from the modified Horwitz equation**Table 2 Instruments used in the collaborative study**

Lab.	LC-MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
2	LC: Agilent 1100 series MS: Agilent G1956B	Kanto chemical Mightysil RP-18GP (2.0 mm×150 mm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	Shimadzu VP-ODS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
5	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
6	Waters Micromass Quattro micro	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
7	LC: Waters alliance2695 MS: Waters Micromass Quattro micro	GL Science Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

謝 辞

共同試験に参加して頂いた社団法人日本科学飼料協会，財団法人日本穀物検定協会，財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成7年11月15日，7畜B第1660号 (1995).

技術レポート**10 飼料中のトラロメトリンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の添加回収試験**

屋方 光則*

1 目的

飼料中にトラロメトリンを添加し、本法による回収率及び繰返し精度を調査すること。

2 試料

市販の穀類（とうもろこし）及び乾牧草（ライグラス）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

3 分析実施要領**3.1 分析方法**

飼料分析基準¹⁾ 6.202 によることとした。

3.2 分析点数

各濃度及び各試料についてそれぞれ 3 点併行分析を実施した。

3.3 分析値の取扱い

分析値は、トラロメトリンを変換して得られたデルタメトリンとしての含有量を $\mu\text{g}/\text{kg}$ で表し、有効桁数 4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで記入することとした。

3.4 分析実施期間

平成 18 年 9 月 20 日～平成 18 年 10 月 31 日

4 分析実施試験室

独立行政法人肥飼料検査所福岡事務所（現 （独）農林水産消費安全技術センター福岡センター）

5 分析成績

穀類（とうもろこし）にトラロメトリンとして $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $1,200 \mu\text{g}/\text{kg}$ （デルタメトリンとして $71 \mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $710 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）相当量を添加した試料及び乾牧草（ライグラス）にトラロメトリンとして $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $6,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ （デルタメトリンとして $456 \mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $4,560 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）相当量を添加した試料を用いて、本法に従って試験を実施した。

その結果は表 1 のとおりであり、平均回収率は 99.4~115.6%，繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 16%以下であった。

なお、参考のため、分析で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を表 2 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

Table 1 Recoveries of tralomethrin in feed

Spiked level (mg/kg)	Corn		Ryegrass	
	Mean ^{a)}	(RSD) ^{b)}	Mean	(RSD)
0.12	115.6 (1.1)			
1.2	99.4 (16)			
0.60			101.9 (6.1)	
6.0			113.2 (15)	

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 2 Instruments used in the recovery test

GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成7年11月15日，7畜B第1660号(1995).

技術レポート**11 共通試料による飼料中のトラロメトリンの共同試験**

山多 利秋*

1 目的

飼料中のトラロメトリンを分析し、分析法の再現精度を調査する。

2 試料

市販の穀類（とうもろこし）及び乾牧草（アルファルファ）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

3 分析実施要領**3.1 分析方法**

飼料分析基準¹⁾ 6.202 によることとした。

3.2 分析点数

2 点併行分析を実施した。

3.3 分析値の取扱い

分析値は、トラロメトリンを変換して得られたデルタメトリンとしての含有量を $\mu\text{g}/\text{kg}$ で表し、小数点以下第二位を四捨五入して記入することとした。

3.4 分析実施期間

平成 18 年 6 月 26 日～平成 18 年 8 月 4 日

4 分析実施試験室

株式会社島津総合分析試験センター，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本穀物検定協会中央研究所，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部，同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）

5 分析成績

穀類（とうもろこし）及び乾牧草（アルファルファ）にトラロメトリンとして $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ （デルタメトリンとして $76 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）相当量を添加した試料を用いて，8 試験室において，本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 1 のとおりであり，穀類の分析値については，平均回収率は 117.2%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 19%及び 31%であり，HorRat は 1.4 であった。また，乾牧草の分析値については，平均回収率は 156.9%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 6.8%及び 38%であり，HorRat は 1.7 であった。乾牧草の回収率が高くなったことについては，妨害ピークが近接していることが原因として考えられた。なお，野崎らが本法（農薬の GC-MS による一斉分析法）の検討の際実施した乾牧草へのデルタメトリンの添加回収試験（50~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量）において，そ

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

の平均回収率は 111.6~142.4%であった²⁾。

参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 2 に示した。

Table 1 Result of collaborative study

Lab.	(µg/kg as deltamethrin)			
	Sample			
	Maize		Timothy	
1	46.2	46.7	64.3	68.6
2	57.5	58.0	58.9	55.6
3	105.2	139.8	185.6	177.3
4	101.0	112.7	151.2	162.8
5	90.8	98.7	113.5	111.3
6	74.1	126.0	133.9	160.2
7	98.0	84.6	85.6	91.4
8	87.0	98.6	139.4	148.9
Spiked value (µg/kg)	76.0		76.0	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	89.1		119.3	
Recovery (%)	117.2		156.9	
RSD _r ^{b)} (%)	19		6.8	
RSD _R ^{c)} (%)	31		38	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	1.4		1.7	

a) $n=16$

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility

d) Predicted RSD_R calculated from the modified Horwitz equation

Table 2 Instruments used in the collaborative study

Lab.	GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	GC: Agilent 5890 seriesII plus MS: Agilent 5972 series	J&W DB-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	Shimadzu GCMS-QP-2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GC: Agilent 6890 MS: Agilent 5973	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
7	Agilent 6890N-5973	Agilent HP-5MSi (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	Shimadzu GCMS-QP2010	Phenomenex ZB-1 (0.32 mm×30 m, 0.25 μm)

謝 辞

共同試験に参加して頂いた株式会社島津総合分析試験センター，社団法人日本科学飼料協会，財団法人日本穀物検定協会，財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成7年11月15日，7畜B第1660号(1995).
- 2) 野崎友春，堀米明日香，渡部千会：飼料研究報告，31，39(2006).

技術レポート**12 ベンタゾンの分析法の定量下限及び検出下限の確認**青山 恵介^{*1}, 松崎 美由起^{*2}**1 目 的**

農林水産省の定めた有害化学物質のサーベイランス・モニタリングに関するガイドライン¹⁾の中で、当該サーベイランス・モニタリングの結果を評価・公表するに当たっては、個々の分析法について、妥当性確認結果、定量限界、検出限界、標準添加回収率等の技術的情報を明らかにすることが求められている。

飼料分析基準²⁾に記載されている飼料中のベンタゾンの分析法については、開発当時の検討から定量下限を5 µg/kgと報告³⁾している。当該定量下限は、添加回収試験を3回程度繰り返して実施し、平均回収率が70%以上120%以下であり、かつ、相対標準偏差が20%以内という条件を満たせる最低の濃度として求めたものであった。

このたび、検出下限についても確認する必要性が生じたことから、クロマトグラムにおけるシグナル対ノイズに基づく定量下限 (SN比 10) 及び検出下限 (SN比 3) を改めて求めたので、その結果を報告する。

2 実験方法**2.1 試料**

市販の配合飼料（ほ乳期子牛育成用配合飼料）及び乾牧草（チモシー）をそれぞれ1 mmの網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

2.2 装置及び器具

- 1) ガスクロマトグラフ : Agilent 製 GC6890N (NPD 検出器)
- 2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカーSR2-W
- 3) エバポレーター : 柴田科学器械工業製 R-114
- 4) シリカゲルカートリッジ : Waters 製 Sep-Pak Plus Silica

2.3 定量方法

分析法は、飼料分析基準 6.124 によった。

3 結果及び考察**3.1 定量下限及び検出下限について**

定量下限及び検出下限を確認するため、ほ乳期子牛育成用配合飼料及びチモシーにベンタゾンとして10及び5 µg/kg相当量を添加した試料を用いて本法に従って分析を実施し、得られたピークのSN比を求めた。その結果、SN比が10となる濃度は10 µg/kgであり、本法の定量下限は10

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所福岡事務所, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター岡山事務所

^{*2} (独) 肥飼料検査所福岡事務所, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター消費安全情報部

μg/kg 程度と考えられた。また、本法の検出下限は、SN 比が 3 となる濃度から 3 μg/kg 程度と考えられた。なお、得られたクロマトグラムの一例を図 1 に示した。

なお、先の各試料につき、3 回併行分析を実施した結果は、表 1 のとおり、平均回収率は 94.5~98.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 10%以下であった。

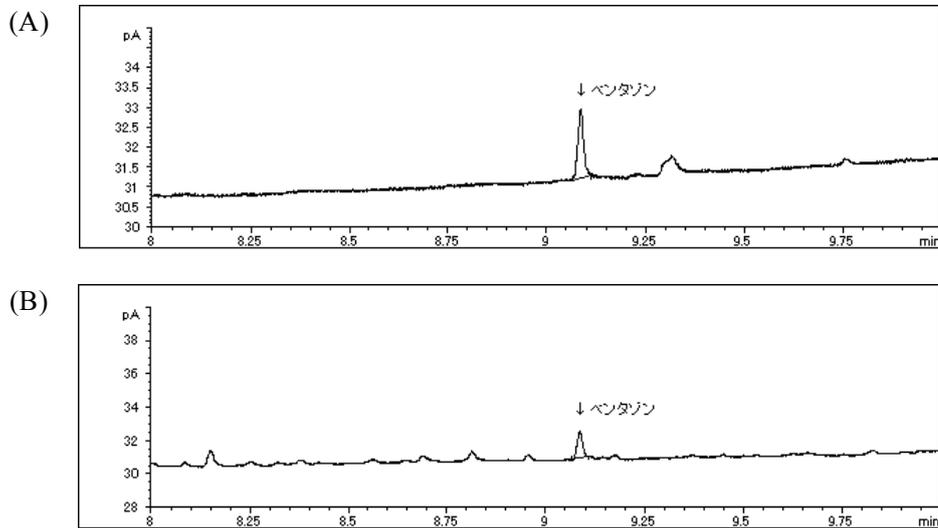


図 1 ベンタゾンのクロマトグラム

(A) 標準液 0.04 ng

(B) ほ乳期子牛育成用配合飼料にベンタゾンとして 10 μg/kg 相当量を添加した試料

表 1 添加回収試験結果

添加濃度 (μg/kg)	回収率 (%)	
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	チモシー
10	94.5 ^{a)} (10 ^{b)})	98.3 (8.5)
5	115.2 (8.8)	80.0 (8.5)

a) n=3

b) 相対標準偏差

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」の制定について”，平成 17 年 6 月 7 日，17 消安第 2330 号 (2005).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 3) 松崎美由起：飼料研究報告，30，26 (2005).

技術レポート**13 稲ワラからのゲノム DNA 抽出法の検討**橋本 仁康^{*1}, 会田 紀雄^{*2}**1 緒 言**

遺伝子組換え技術を用いて開発された作物（GM 作物）は、現在 22 カ国で商業栽培されており、我が国にも、害虫抵抗性や除草剤耐性の性質を付与された GM 作物が、国の審査制度を経て、認可され輸入されている。

我が国で飼料として安全性が認可されていない飼料用 GM 作物の検査は、農林水産消費安全技術センターが行っており、現在は主に、安全性未承認の害虫抵抗性トウモロコシ Bt10 の混入について検査を行っているところである。

平成 17 年 4 月 13 日に環境保護団体であるグリーンピースが、中国湖北省において未承認の害虫抵抗性遺伝子組換え米（Bt GM rice）が栽培、販売されていたと発表し¹⁾、平成 18 年 9 月 5 日には、欧州において中国産米加工品から未承認の遺伝子組換え米が検出されたと発表した²⁾。そして 9 月 27 日には、ドイツ政府が中国産米加工品への Bt GM Rice の混入を確認した³⁾。

我が国においても、食品としての中国産米について、厚生労働省が平成 17 年 4 月より中国産の輸入米の Bt タンパク質の混入検査を開始した⁴⁾。また、ヨーロッパでの混入事例を受けて、平成 18 年 9 月には、中国産米加工品への Bt GM rice の混入検査法を開発し、その混入検査を各検疫所にて開始した⁵⁾。その結果、平成 19 年 1 月に我が国でもコメ加工品（ビーフン等）より Bt GM rice が検出された⁶⁾。

中国産の稲ワラは我が国に飼料用として輸入されていた実績があるが、現在は口蹄疫の影響で輸入が一時停止している。しかし、輸入が再開された場合に備えて、Bt GM rice 由来の稲ワラの検査実施の可能性を検討する必要性が考えられた。しかし、検査に必要な稲ワラからのゲノム抽出法は、現在報告されていないため、EU で公表及び厚生労働省から発出されている米粒からの抽出法^{7), 8)}を参考に、検査のために PCR を行うのに十分な品質と収量を得られる稲ワラからのゲノム DNA の抽出法を検討した。

検討は、GM quicker II（ニッポンジーン製）、ISO PLANT2（ニッポンジーン製）、QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN 製）、QIAGEN Genomic tip 20/G（QIAGEN 製）、の各キット（一部方法を改変したものもある）及び CTAB 法（JAS ハンドブック法）を実施した。その結果、良好な結果が得られた GM quicker II を使用した方法について報告する。

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部，現 （独）農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*2} （独）農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2 実験方法

2.1 試料

平成 18 年度国産稲ワラ (H18 国産), 平成 17 年度国産稲ワラ (H17 国産), 平成 16 年度以前に収去された国産稲ワラ (年度不明国産) 及び輸入一時停止前 (2005 年 5 月) に日本に輸入済みの中国産稲ワラ (中国産) をハサミで 2~3 cm に裁断したものを, 液体窒素で凍結した後, 0.5 mm の網ふるいを通過するまでに粉砕した. なお, 粉砕後の試料は -20°C にて保存した.

2.2 試薬

1) 水

水は, 超純水 (比抵抗値 $17\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上精製したもの) を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したもの.

2) ゲノム抽出キット

GM quicker II (ニッポンジーン製)

3) DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 製)

4) プライマー

厚生労働省通知⁸⁾のコメ内在性遺伝子用プライマーセット (SPSF, SPSR)

5) 陽性コントロール

市販の無洗米 (国産) より抽出したゲノム DNA (GM quicker II を用いて抽出) を水で 10ng/mL に希釈したもの

6) イソプロパノール (特級)

7) エタノール (特級)

8) TAE 緩衝液 (pH 8.0)

50 倍 TAE (ニッポンジーン製) を超純水で 50 倍に希釈したもの.

9) アガロースゲル

アガロース S (ニッポンジーン製) 0.8 g 又は 3 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 加熱して溶かし, $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ に冷却させた後, ゲルの厚さが $3\sim 4\text{ mm}$ になるようゲル成型に流し込み, 固化させた.

10) DNA サイズマーカー

100 bp Ladder (宝酒造製) 又は λ -Hind III (宝酒造製) を用いた

11) 臭化エチジウム溶液

エチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) (Bio-Rad Laboratories 製) を超純水で 10,000 倍に希釈したもの.

12) ローディングバッファー (宝酒造製)

13) Proteinase K, RNaseA, α -アミラーゼ, GE1 緩衝液, GE2-K 緩衝液, GB3 緩衝液, GW 緩衝液, TE 緩衝液

ゲノム抽出キットに付属のもの.

14) PCR 反応液

1 サンプルあたり, 水 $13.24\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR Buffer II}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP (2 mM each) $2\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 (2.5 mM) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, SPSF (50 μM) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, SPSR (50 μM) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, AmpliTaq Gold $0.16\text{ }\mu\text{L}$ を混合したもの.

2.3 試験方法

1) ゲノム抽出

i) 小スケール

- ① 試料 0.1 g を 2 mL ポリプロピレン製チューブに採取し, GE1 緩衝液 700 μ L, Proteinase K 20 μ L, α -アミラーゼ 2 μ L 及び RNase A 10 μ L をそれぞれ添加し, ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した.
- ② 65°C で 15 分間加温した後, GE2-K 緩衝液 85 μ L を添加し, ボルテックスミキサーにて攪拌した.
- ③ 氷中にて 10 分間静置した後, 13,000 \times g で 5 分間遠心分離 (室温) した.
- ④ 上清 400 μ L をポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, 上清の 3/8 倍量の GB3 緩衝液を添加した後, 上清の 3/8 倍量のイソプロパノールを添加し, 液が透明になるまでよく転倒混和した.
- ⑤ ④の混合液を全量キット付属のスピンカラムへ負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑥ GW 緩衝液 650 μ L をスピンカラムに負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑦ スピンカラムを新しいポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, TE 緩衝液 30 μ L を負荷した.
- ⑧ 室温で 3 分間静置した後, 13,000 \times g で 1 分間遠心分離 (4°C) し, 溶出液をゲノム DNA 抽出原液とした.

ii) 大スケール

- ① 試料 0.2~1.0 g を 50 mL ポリプロピレン製チューブに採取し, GE1 緩衝液 7 mL, Proteinase K 60 μ L, α -アミラーゼ 6 μ L 及び RNase A 30 μ L をそれぞれ添加し, ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した.
- ② 65°C で 15 分間加温した後, GE2-K 緩衝液 850 μ L を添加し, ボルテックスミキサーにて攪拌した.
- ③ 氷水中にて 10 分間静置した後, 3,000 \times g で 30 分間遠心分離 (室温) した.
- ④ 上清 3,200 μ L をポリプロピレン製 15 mL チューブに移し, 上清の 3/8 倍量の GB3 緩衝液を添加した後, 上清の 3/8 倍量のイソプロパノールを添加し, 液が透明になるまでよく転倒混和した.
- ⑤ ④の混合液に沈殿がある際は, 3,000 \times g で 5 分間遠心分離 (室温) し, 上清をポリプロピレン製 50 mL チューブに移した.
- ⑥ ④の混合液あるいは⑤の上清 700 μ L をキット付属のスピンカラムへ負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑦ ⑥の操作を④の混合液あるいは⑤の上清が無くなるまで繰り返した.
- ⑧ GW 緩衝液 650 μ L をスピンカラムに負荷し, 13,000 \times g で 30 秒間遠心分離 (4°C) し, 溶出液を除去した.
- ⑨ スピンカラムを新しいポリプロピレン製 1.5 mL チューブに移し, TE 緩衝液 50 μ L を負荷した.
- ⑩ 室温で 3 分間静置した後, 13,000 \times g で 1 分間遠心分離 (4°C) し, 溶出液をゲノム DNA

抽出原液とした。

2) ゲノム DNA 抽出原液の濃度測定、純度確認及び DNA の断片化の確認

抽出原液を水で 11 倍に希釈し、分光光度計で 320, 280, 260, 230 nm の波長における吸光度を測定した。320 nm の吸光度をブランク値として、各々の吸光度から差し引いた値を真の吸光度とし、260 nm の吸光度の値が 1 の時の DNA 濃度を 50 ng/μL として DNA 濃度を求めると同時に、(280 nm の吸光度)/(260 nm の吸光度) 及び、(280 nm の吸光度)/(260 nm の吸光度) の値から抽出原液の DNA の純度を確認した。

また、ゲノム DNA 抽出原液 7.5 μL をローディングバッファーと混合した後、0.8%アガロースに注入して電気泳動を行い、抽出ゲノムの断片化の程度を確認した。

3) PCR 反应用 DNA 試料液の調製

ゲノム DNA 抽出原液, ゲノム DNA 抽出原液を水で 10 倍に希釈したもの及びゲノム DNA 抽出原液を水で 10 ng/μL に希釈したものの 3 種類を調製した。

4) PCR 反応

① 100 μL のプラスチック製チューブに PCR 反応液 20 μL 及び DNA 試料液 5 μL を加えたものを PCR 反应用的試料液とした。

② 同様に、PCR 反応液 20 μL 及び国産無洗米由来の DNA 試料液 5 μL を加えたものを陽性コントロール (PC), PCR 反応液 20 μL 及び水 5 μL を加えたものを陰性コントロール (NC) とした。また、同時に、PC の反応液中の SPSF 及び SPSR の代わりに水を添加したものをプライマー未添加陰性コントロール (NPC) とした。

③ 調製した試料液, PC, NC 及び NPC をサーマルサイクラー (Applied Biosystems 製 Gene Amp PCR System9700) に入れ、94°C 10 分間→[94°C 30 秒間→56°C 30 秒間→72°C 30 秒間] (40 サイクル) →72°C 7 分間の反応条件で PCR 反応を行った。

④ 3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、NC と NPC に増幅産物が認められないこと及び PC と比較して目的の PCR 増幅産物 (81 bp) が認められることを確認することにより、抽出したゲノム DNA が PCR に適用可能であることを確認した。

3 結果及び考察

まず、小スケールで 4 種の稲ワラゲノム DNA の抽出を試みた。その結果を表 1 に示した。

260 nm の吸光度より求めた抽出 DNA 量は、841~1,122 ng であり、260/280 の吸光度比も 1.74~1.84 と良好な結果が得られた。また、230 nm における吸光度がマイナスになってしまっているが、この原因は、カラムに AW 緩衝液が残ってしまったことが考えられる。

次に、このゲノム DNA 抽出原液及びゲノム DNA 抽出原液を水で 10 倍希釈したものをテンプレートとして PCR 反応を行い、3%アガロースゲルにて電気泳動を行った。その結果が図 1 である。ゲノム DNA 抽出原液を 10 倍希釈したものをテンプレートとしたもののうち、中国産と年度不明国産で増幅が弱くなっており、ゲノム DNA 抽出原液をそのままテンプレートとしたもののうち、中国産、年度不明国産では増幅が見られなかった。この原因は、二つのサンプルは荒く粉碎した状態で常温にて数年間保管されていたため、DNA の分解が行われているとともに、PCR 反応を阻害する不純物が多く存在しているためと考えられた。

しかしながら、粉碎されずに常温で保管されていた H17 国産と H18 国産のサンプルについては、PC と比べても同程度の DNA の増幅が見られているので、GM quicker II による抽出法が適用できる

ものと考えた。

表1 各稲ワラの小スケール抽出法による抽出結果

試料名	320 nm	280 nm	260 nm	230 nm	260/280の	260/230の	補正後濃 度 (ng/μL)	補正後絶 対量 (ng)
					補正值	補正值		
H17国産	0.001	0.038	0.069	-0.006	1.84	-9.71	37.4	1,122
H18国産	-0.001	0.036	0.067	-0.004	1.84	-22.67	37.4	1,122
年度不明国産	0.002	0.031	0.053	-0.001	1.76	-17.00	28.1	842
中国産	0.005	0.036	0.059	0.002	1.74	-18.00	29.7	891

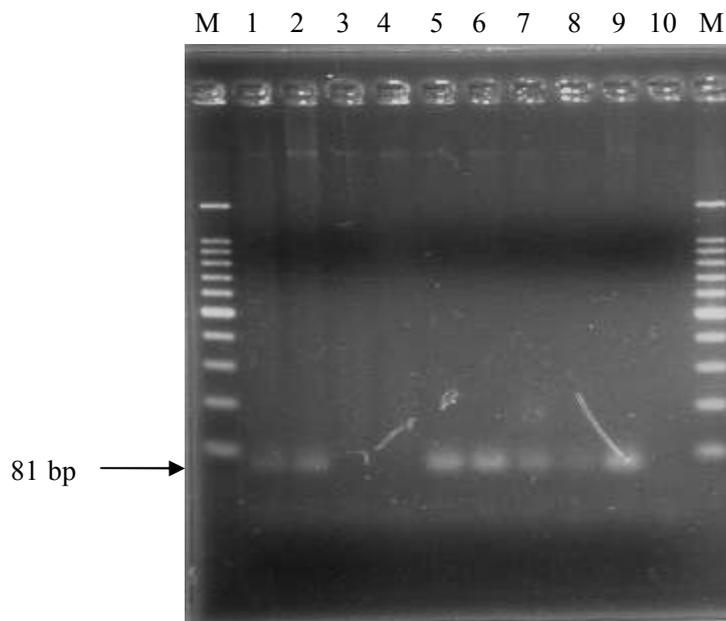


図1 小スケール抽出法による稲ワラ抽出ゲノムのコメ内在性遺伝子をターゲットとしたPCR結果

M : 100 bp ladder standard, レーン1 : H17 産国産, レーン2 : H18 産国産, レーン3 : 年度不明国産, レーン4 : 中国産, レーン5 : H17 産国産 (10 倍希釈液), レーン6 : H18 産国産 (10 倍希釈液), レーン7 : 年度不明国産 (10 倍希釈液), レーン8 : 中国産 (10 倍希釈液), レーン9 : 陽性コントロール

次に、実際に検査法として適用するためには、採取した試料が、そのサンプルを代表するものとならなければならないため、試料採取量を増やす必要がある。そのため、サンプリング量を増やし、抽出液量など全体をスケールアップさせて同一キットでゲノムDNAの抽出を試みた(大スケール)。稲ワラの試料採取量は、0.2 g, 0.5 g, 1.0 g の3種類とし、サンプルはH18国産を用いた。

その結果を表2に示した。

吸光度より求めた抽出DNA量をみると試料採取量0.2 gと0.5 gでは約2倍, 0.5 gと1.0 gでは約1.3倍の違いがみられた。また、DNAの品質では、260/280の吸光度比が1.85~1.88, 260/230の吸光度比が2.36~2.64と良好な結果が得られた。しかし、試料採取量を1.0 gとすると、最初の遠心分離

後に上清を取る作業が困難であったため、通常試験を行う際は、試料採取量を 0.5 g 程度で行うのが妥当であると考えられた。

表 2 H18 国産稲ワラの大スケール抽出法による抽出結果

サンプリング量 (g)					260/280の	260/230の	補正後濃度 (ng/μL)	補正後絶対量 (ng)
	320 nm	280 nm	260 nm	230 nm	補正值	補正值		
0.2	-0.001	0.058	0.11	0.041	1.89	2.64	61.1	3,052
0.5	0.001	0.117	0.218	0.087	1.87	2.52	119	5,995
1.0	0.014	0.161	0.286	0.129	1.85	2.37	150	7,865

これまで行った抽出ゲノムの純度確認は、吸光度比により行ったが、DNA の断片化の問題もあるので、次に、抽出ゲノム DNA 原液を 0.8%アガロースにより電気泳動を行い、ゲノム DNA の断片化の状態を確認した。その泳動図が図 2 である。泳動図より、H17 国産及び H18 国産は、断片化されていないゲノム DNA が認められ、良好な品質であることがわかった。しかし、保存状態が悪かった中国産と年度不明国産については、DNA の断片化が進んでいることが確認された。

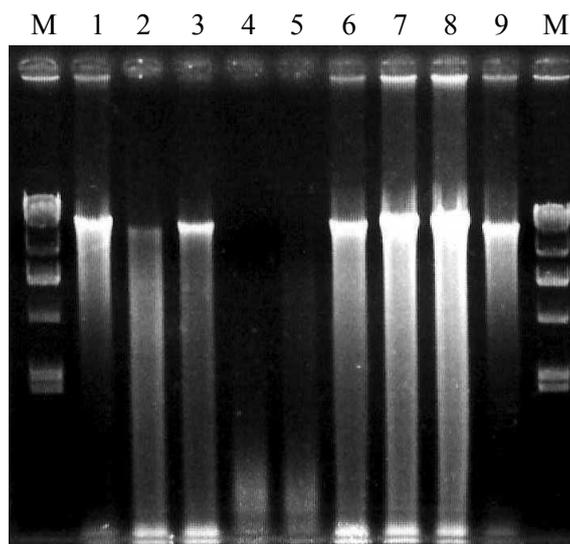


図 2 抽出ゲノムの電気泳動結果

M : λ Hind III standard, レーン 1, 9 : 無洗米, レーン 2 : H17 国産, レーン 3 : H18 国産, レーン 4 : 年度不明国産, レーン 5 : 中国産, レーン 6 : H18 国産 (サンプリング量 0.2 g), レーン 7 : H18 国産 (サンプリング量 0.5 g), レーン 8 : H18 国産 (サンプリング量 1.0 g)

4 まとめ

GM quicker II による稲ワラからのゲノム DNA 抽出の検討を行った結果、比較的新しく、裁断や粉砕などがされていない状態で保管されている稲ワラに関しては、良好な状態のゲノム DNA が抽出でき、PCR 反応も良好に行えた。しかしながら、裁断や粉砕されて室温で保管されていたサンプルについては、吸光度比から見ると良好な状態のゲノム DNA を抽出できているように思われたが、

PCR 反応が良好に行われなかった。

検査分析を行うことになった際に取り扱われると予想される稲ワラは、状態の悪いものが多いと考えられるため、今後、より品質の良い抽出ゲノム DNA が得られるように、更なる改良を行うことが必要であると考えられた。

文 献

- 1) Green peace HP : <http://www.greenpeace.org/international/news/scandal-greenpeace-exposes-il>
- 2) Green peace HP : <http://www.greenpeace.org/international/press/releases/illegal-genetically-engineered>
- 3) European Food Safety Authority : RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED, WEEK 2006/39
- 4) 厚生労働省医薬品食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知：“安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品に係る輸入米の検査について”，平成 17 年 4 月 21 日，食安輸発第 0421002 号 (2005).
- 5) 厚生労働省プレスリリース：“中国における安全性未審査の遺伝子組換え米の流通・混入事例について”，平成 17 年 4 月 14 日（平成 19 年 2 月 8 日改訂） (2005).
- 6) 厚生労働省プレスリリース：“安全性未審査の中国産遺伝子組換え米の混入事例について”，平成 19 年 1 月 26 日 (2007).
- 7) European Comission, Joint Research Centre : Sampling and DNA Extraction of Rice
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：“安全性未審査の中国米加工品の検知法について”，平成 19 年 1 月 26 日，食安監発第 0126005 号 (2007).

精度管理

1 平成18年度飼料の共通試料による分析鑑定について

堀米 明日香^{*1}, 白澤 優子^{*2}, 森 有希子^{*3}, 出納 小枝^{*4},
林 美紀子^{*5}, 永原 貴子^{*6}, 小野 雄造^{*7}

1 目 的

飼料検査指導機関，飼料・飼料添加物業者，民間分析機関等を対象に飼料の共通試料による分析鑑定を行い，分析及び鑑定技術の維持向上を図り，併せて分析誤差を推定し，飼料の製造及び品質管理の適正な実施に資する。

2 共通試料の内容

A 試料	ブロイラー肥育前期用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	飼料原料鑑定用調製試料
D 試料	子豚育成用プレミックス

3 試料の調製

3.1 試料の調製年月日 平成18年7月7日

3.2 調製場所 独立行政法人肥飼料検査所（現 （独）農林水産消費安全技術センター）
本部

(1) A 試料

粉碎した後，1 mm の網ふるいを通過させたブロイラー肥育前期用配合飼料 100 kg を用いて，以下の手順により試料を調製した。

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

表 1 混合区画表

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

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部，現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課，

^{*2} （独）農林水産消費安全技術センター札幌センター，^{*3} 同仙台センター，

^{*4} 同名古屋センター，^{*5} 同神戸センター大阪事務所，^{*6} 同福岡センター，^{*7} 同肥飼料安全検査部

(2) B 試料

粉碎した後、1 mm の網ふるいを通させた魚粉 100 kg を用いて、A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

(3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去し、粉碎した後 3 mm の網ふるいを通させた表 2 に掲げる 10 種類の原料（総量 100 kg）のうち配合割合が 5%未満の原料を V 型混合機を用いて予備配合した。次に予備配合した原料と全ての原料を表 2 の配合割合でよく混合した後 A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

(4) D 試料

子豚育成用プレミックス 100 kg をよく混合した後 A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及び配合割合

原 料 名	配合割合 (%)	原 料 名	配合割合 (%)
とうもろこし	25	大豆油かす	8
マイロ	18	魚粉	8
ライ麦	18	アルファルファミール	3
米ぬか油かす	8	炭酸カルシウム	2
ふすま	8	食塩	2

4 分析鑑定項目及び実施要領

(1) 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，りん及びサリノマイシンナトリウム

B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・原料の検出と配合割合の推定

D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

(2) 実施要領

「第 31 回飼料の共通試料による分析鑑定実施要領」(p.185) による。

5 試料袋間のバラツキ調査

A 試料，B 試料及び D 試料についてそれぞれ 2 成分を分析して Thompson らの harmonized protocol ¹⁾に基づき均質性確認テストを行った。ランダムに抜き取った 10 袋の併行分析の結果は表 3 のとおりであり，その結果から一元配置の分散分析，均質性確認のための計算を行った結果は表 4 のとおりであり，いずれも試料袋間のバラツキは問題なかった。

表3 A, B 及び D 試料の分析成績

	A試料 粗たんぱく質 (%)		A試料 粗灰分 (%)		B試料 粗たんぱく質 (%)		B試料 粗灰分 (%)		D試料 銅 (g/kg)		D試料 亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	23.57	23.64	4.95	4.98	63.78	64.08	16.83	16.49	23.97	23.95	26.87	27.14
2	24.36	24.07	4.94	4.65	63.98	64.45	16.75	16.85	25.00	24.13	27.32	27.67
3	24.98	24.22	4.95	4.81	63.63	64.10	16.77	16.77	24.49	23.91	27.46	27.58
4	24.73	24.35	4.93	4.97	64.50	63.99	16.73	16.75	25.19	24.12	27.81	27.31
5	23.98	24.52	4.86	5.04	63.57	63.41	16.67	16.67	24.62	23.64	26.22	27.46
6	24.16	23.98	4.82	4.85	64.11	64.35	16.80	16.82	25.09	24.55	27.53	27.39
7	24.66	24.34	4.96	4.87	63.84	64.06	16.84	16.75	25.43	24.00	28.82	27.33
8	24.35	23.84	4.99	5.26	64.00	63.19	16.64	16.72	24.95	24.19	26.86	27.72
9	24.37	24.70	4.98	4.90	63.70	64.08	16.67	16.55	24.38	23.87	28.36	26.87
10	24.14	23.99	4.90	5.19	63.79	63.85	16.82	17.03	24.22	23.96	27.59	27.13

表4 A, B 及び D 試料のバラツキ調査

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	S_s/σ^a	
		S	ϕ	V	F_0		
A試料	試料間	A	1.7124	9	0.1903	2.32	
	粗たんぱく質	分析誤差	E	0.8200	10	0.0820	— ^{b)}
		総計	T	2.5323	19		
	粗灰分	A	0.1653	9	0.0184	1.17	
		E	0.1572	10	0.0157		—
		T	0.3225	19			
B試料	粗たんぱく質	A	1.1905	9	0.1323	1.52	
		E	0.8680	10	0.0868		—
		T	2.0586	19			
	粗灰分	A	0.1533	9	0.0170	1.74	
		E	0.0981	10	0.0098		—
		T	0.2514	19			
D試料	銅	A	1.7351	9	0.1928	0.60	
		E	3.2220	10	0.3222		—
		T	4.9571	19			
	亜鉛	A	2.0621	9	0.2291	0.62	
		E	3.7066	10	0.3707		—
		T	5.7687	19			

a) σ の値は Horwitz の式から求めた標準偏差であり, $S_s = \sqrt{(A-E)/2}$ である.

b) 一元配置の分散分析で分散比 $F_0 < F(9,10;0.05) = 3.02$ の場合はそれ以降の計算は行わなかった.

6 参加実験室

- (1) 総数 281
 うち 飼料関係…181
 飼料添加物関係…22
 団体等…30
 検査指導機関…42
- (2) 試料別参加実験室数
 A 試料…280
 B 試料…276
 C 試料…113
 D 試料…159

7 分析鑑定成績及び解析結果

(1) 分析

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

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

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

a : 上四分位の値

c : 下四分位の値

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

x : 各実験室の分析成績

b : 中央値

また、異常値と考えられる z スコアの絶対値が 3 以上の分析値を棄却した後、平均値の 95%信頼区間を求めた。

(2) 鑑定

今回は、10 種類の原料を混合調製した試料について、使用した原料の検出と配合割合の推定を実施した。その成績は表 9 及び 10 のとおりであった。

表5 分析成績(1)

試料番号	A水分		A粗たん白質		A粗脂肪		A粗繊維		A粗灰分		Aカルシウム		Aりん		A SL		A SL (ペイオアッセイ)	
	分析値(%)	No. z-score	分析値(g/力価)	No. z-score	分析値(g/力価)	z-score												
1	13.09	1 0.34	24.38	4 0.29	5.65	2 -0.63	2.79	3 -0.18	4.83	1 -0.75	0.83	1 0.26	0.58	1 0.00				
2	13.11	1 0.42	24.38	4 0.29	5.86	2 0.76	2.91	3 0.25	4.89	1 -0.18	0.82	2 0.00	0.58	1 0.00				
3	13.15	1 0.57	25.49	4 4.33	5.93	2 1.23	2.99	2 0.54	4.88	1 -0.28	0.77	1 -1.34	0.57	1 -0.67				
4	13.14	1 0.53	24.40	4 0.36	5.80	1 0.36	3.11	3 0.98	4.97	1 0.56	0.83	2 0.26	0.58	1 0.00				
5	13.27	1 1.04	24.24	4 -0.21	5.61	2 -0.89	3.21	3 1.34	4.82	1 -0.85	0.82	1 0.00	0.59	1 0.67			49.80	3 0.95
6	12.87	1 -0.50	24.41	2 0.40	5.70	2 -0.29	2.41	2 -1.56	4.93	1 0.18	0.82	2 0.00	0.57	1 -0.67				
7	13.17	1 0.65	24.33	4 0.10	5.80	1 0.36	2.81	2 -0.10	4.94	1 0.28	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00			50.00	1 -0.01
8	13.13	1 0.50	24.15	4 -0.54	5.51	2 -1.56	3.10	3 0.94	4.86	1 -0.47	0.79	1 -0.80	0.56	1 -1.34			48.00	2 -0.84
9	13.03	1 0.11	24.09	4 -0.76	5.36	2 -2.56	2.61	2 -0.83	5.13	1 2.08	0.79	2 -0.80	0.60	1 1.34				
10	13.05	1 0.19	24.36	4 0.21	5.92	1 1.16	3.16	2 1.16	5.02	1 1.04	0.82	2 0.00	0.59	1 0.67				
11	13.20	1 0.77	24.11	4 -0.69	5.70	1 -0.29	3.45	2 2.22	5.01	1 0.94	0.80	2 -0.53	0.59	1 0.67				
12	13.23	1 0.88	24.14	4 -0.58	5.68	1 -0.43	3.30	2 1.67	5.07	1 1.51	0.81	2 -0.26	0.60	2 1.34				
13	13.15	1 0.57	24.17	4 -0.47	5.91	1 1.09	3.11	2 0.98	5.02	1 1.04	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00			47.79	1 -0.93
14	13.10	1 0.38	24.16	2 -0.51	5.60	2 -0.96	2.98	3 0.51	4.86	1 -0.47	0.82	2 0.00	0.59	1 0.67				
15	13.05	1 0.19	24.36	4 0.21	5.90	1 1.03	2.99	2 0.54	4.94	1 0.28	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00				
16	12.68	1 -1.23	24.70	4 1.45	6.11	1 2.43			4.86	1 -0.47								
17	12.80	1 -0.77	24.08	1 -0.80					4.67	2 -2.27								
18	13.60	1 2.31	23.26	2 -3.79					4.31	1 -5.68								
19																		
20	12.80	1 -0.77	24.53	1 0.83	6.05	1 2.03			4.67	1 -2.27								
21	12.76	1 -0.92	24.67	1 1.34	6.09	1 2.29			4.83	1 -0.75								
22	12.80	1 -0.77	24.15	1 -0.54					4.50	1 -3.88								
23	13.05	1 0.19	24.18	4 -0.43					4.79	1 -1.13								
24	11.75	1 -4.81	23.82	2 -1.75	5.99	1 1.63			4.56	1 -3.31								
25	12.77	1 -0.88	24.71	4 1.49	6.20	1 3.03			5.09	1 1.70								
26																		
27	12.96	1 -0.15	23.91	4 -1.42	5.44	2 -2.03			4.88	1 -0.28	0.83	3 0.26	0.56	2 -1.34				
28	12.93	1 -0.26	24.29	2 -0.03	5.68	1 -0.43	2.85	2 0.03	4.84	1 -0.66	0.86	2 1.07	0.58	1 0.00				
29	13.10	1 0.38	24.59	2 1.05			2.48	2 -1.31	5.04	1 1.23			0.60	1 1.34				
30	12.66	1 -1.31	24.44	4 0.51	5.46	2 -1.89	2.79	2 -0.18	5.00	1 0.85	0.77	3 -1.34	0.58	2 0.00				
31	12.69	1 -1.19	24.18	2 -0.43	5.77	1 0.16	2.65	2 -0.69	5.00	1 0.85	0.82	3 0.00	0.59	1 0.67				
32	12.39	1 -2.35	24.34	2 0.14	5.86	1 0.76	2.37	2 -1.71	5.16	1 2.36	0.81	2 -0.26	0.59	1 0.67				
33	13.31	1 1.19	23.50	2 -2.91	5.37	2 -2.49			4.88	1 -0.28	0.69	2 -3.50	0.64	1 4.04				
34	12.96	1 -0.15	24.27	1 -0.10	5.84	1 0.63	3.02	2 0.65	4.98	1 0.66	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00			47.60	3 -0.44
52	12.61	1 -1.50	25.32	2 3.71														
54	13.45	1 1.73	24.66	4 1.31	5.65	2 -0.63	2.60	3 -0.87	4.61	1 -2.84	0.83	1 0.26	0.58	1 0.00			52.40	1 0.98
55	13.00	1 0.00	24.13	2 -0.61	5.62	1 -0.83	2.87	2 0.10	4.88	1 -0.28	0.82	2 0.00	0.60	1 1.34				
56	13.20	1 0.77	23.40	1 -3.28	5.80	1 0.36	2.19	1 -2.36	4.61	1 -2.84	0.87	3 1.34	0.61	2 2.02				
57	13.11	1 0.42	24.16	4 -0.51	6.06	1 2.09	2.87	2 0.10	4.91	1 0.00	0.83	2 0.26	0.58	1 0.00			50.40	1 0.15
59	13.10	1 0.38	24.65	4 1.27	5.86	2 0.76	2.88	2 0.14	4.93	1 0.18	0.90	1 2.15	0.59	1 0.67			48.50	3 0.12
60	13.15	2 0.57	24.41	2 0.40	5.98	1 1.56			4.90	1 -0.09								
63	13.25	1 0.96	24.10	4 -0.72	5.69	1 -0.36	2.81	2 -0.10	4.87	1 -0.37	0.84	1 0.53	0.59	1 0.67				
64	13.23	1 0.88	24.33	4 0.10														
65	13.00	1 0.00							4.87	1 -0.37	0.83	2 0.26	0.59	2 0.67				
65																		
66	12.60	1 -1.54	24.34	4 0.14	5.47	2 -1.83			4.94	1 0.28								
67	13.11	1 0.42	24.54	4 0.87	6.03	1 1.89	3.42	3 2.11	4.75	1 -1.51	0.85	2 0.80	0.58	1 0.00				
68	12.52	1 -1.85	24.48	4 0.65	5.74	1 -0.03	3.14	2 1.09	4.75	1 -1.51	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00			46.10	1 -1.64
69	12.78	1 -0.84	24.41	4 0.40	5.92	1 1.16	3.10	1 0.94	5.02	1 1.04	0.82	1 0.00	0.60	1 1.34				
70	12.95	1 -0.19	24.26	4 -0.14	5.75	2 0.03	2.97	2 0.47	4.85	1 -0.56	0.84	1 0.53	0.56	1 -1.34			48.50	1 -0.64
71	13.10	1 0.38	24.25	4 -0.18	5.60	1 -0.96			4.79	1 -1.13	0.84	2 0.53	0.55	1 -2.02			52.60	1 1.07
72	13.52	1 2.00	24.15	4 -0.54	5.93	1 1.23			5.01	1 0.94								
74	12.84	1 -0.61	24.48	4 0.65	5.65	1 -0.63			4.88	1 -0.28								
75	12.26	1 -2.85	24.90	4 2.18					4.78	1 -1.23								
78	13.23	1 0.88	24.25	2 -0.18	5.76	1 0.09			4.98	1 0.66								
79	13.02	1 0.07	24.38	4 0.29	5.70	1 -0.29	2.85	2 0.03	4.82	1 -0.85	0.79	2 -0.80	0.59	1 0.67				
80	13.26	1 1.00	24.37	4 0.25	5.77	1 0.16	2.75	2 -0.32	4.94	1 0.28	0.83	2 0.26	0.60	1 1.34			49.80	3 0.95
82	12.92	1 -0.30	24.29	4 -0.03	5.86	1 0.76	2.83	2 -0.03	4.98	1 0.66	0.79	2 -0.80	0.59	1 0.67			47.70	1 -0.97
85	13.70	1 2.69	24.48	2 0.65	5.65	2 -0.63	3.02	3 0.65	4.91	1 0.00	0.83	2 0.26	0.58	1 0.00			48.70	3 0.25
87	13.05	1 0.19	24.33	4 0.10	5.94	1 1.29			4.89	1 -0.18								
88	13.34	1 1.31	24.26	4 -0.14	5.78	1 0.23	3.06	2 0.80	4.78	1 -1.23	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00				
89	12.99	1 -0.03	24.37	4 0.25	5.60	2 -0.96			4.95	1 0.37	0.80	2 -0.53	0.57	1 -0.67			50.70	1 0.27
90	12.98	1 -0.07	24.35	1 0.18	5.68	1 -0.43			4.86	1 -0.47								
91	12.04	1 -3.70	24.09	4 -0.76	5.92	1 1.16	3.50	3 2.40	4.89	1 -0.18			0.59	1 0.67				
93	13.43	1 1.65	24.20	4 -0.36	5.82	1 0.49	3.00	1 0.58	4.90	1 -0.09	0.92	2 2.69	0.60	1 1.34				
94	12.84	1 -0.61	24.67	1 1.34					4.74	1 -1.60								
95	13.02	1 0.07	24.25	4 -0.18	5.55	2 -1.29	3.18	2 1.23	4.88	1 -0.28	0.82	2 0.00	0.58	1 0.00			49.70	1 -0.13
100	13.19	1 0.73	24.39	1 0.32	5.82	1 0.49	2.73	2 -0.40	4.97	1 0.56	0.85	2 0.80	0.58	1 0.00			47.80	3 -0.31
101	13.09	1 0.34	24.16	1 -0.51	5.77	1 0.16	2.85	2 0.03	4.92	1 0.09	0.83	2 0.26	0.59	1 0.67				
102	12.75	1 -0.96	24.79	2 1.78	5.72	1 -0.16	3.11	3 0.98	4.82	1 -0.85	0.85	2 0.80	0.58	1 0.00				
103	13.13	1 0.50	24.49	4 0.69	5.76	1 0.09	2.96	3 0.43	4.82	1 -0.85	0.90	2 2.15	0.58	1 0.00				
104	12.41	1 -2.27	24.90	4 2.18	5.67	2 -0.49	2.32	3 -1.89	4.86	1 -0.47	0.80	2 -0.53	0.59	1 0.67				
105	12.19	1 -3.12	23.73	1 -2.07	5.77	1 0.16			5.05	1 1.32	0.80	2 -0.53	0.62	1 2.69				
106	12.83	1 -0.65	24.30	4 0.00	5.48	2 -1.76	2.80	3 -0.14	4.98	1 0.66	0.85	2 0.80	0.57	1 -0.67				
108	12.70	1 -1.15	23.77	4 -1.93	5.63	1 -0.76	3.16	3 1.16	4.97	1 0.56	0.85	2 0.80	0.63	1 3.37				
112	12.75	1 -0.96	24.36	4 0.21	5.49	1 -1.69	2.99	3 0.54	5.02	1 1.04	0.82	2 0.00	0.59	1 0.67				

表 5 分析成績 (2)

試料番号	A 水分		A 粗たん白質		A 粗脂肪		A 粗繊維		A 粗灰分		A カルシウム		A リン		A SL		A SL (バイオアッセイ)		
	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(g/力価)	No. z-score	分析値(g/力価)	No. z-score	
123	12.95	1 -0.19	24.24	1 -0.21	5.71	1 -0.23	2.41	2 -1.56	4.64	1 -2.55	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00					
124	13.08	1 0.30	24.03	4 -0.98	5.72	2 -0.16	2.92	3 0.29	4.99	1 0.75	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00					
125	13.28	1 1.07	23.89	4 -1.49	5.47	2 -1.83	2.85	2 0.03	4.83	1 -0.75	0.93	2 2.96	0.62	1 2.69					
126	12.70	1 -1.15	24.35	4 0.18	5.80	2 0.36	3.72	3 3.20	5.01	1 0.94	0.86	2 1.07	0.60	1 1.34					
127			25.00	3 2.55															
128			24.50	3 0.72															
129	12.79	1 -0.80	24.34	4 0.14	5.70	2 -0.29	2.68	2 -0.58	4.95	1 0.37	0.89	2 1.88	0.58	1 0.00					
130			24.09	2 -0.76	5.67	1 -0.49	2.83	2 -0.03	4.62	1 -2.74	0.86	2 1.07	0.58	1 0.00					
131	13.12	1 0.46	24.12	4 -0.65	5.65	1 -0.63	2.66	2 -0.65	4.85	1 -0.56	0.84	2 0.53	0.59	1 0.67					
132	13.15	1 0.57	24.02	2 -1.02	5.75	1 0.03	2.66	2 -0.65	4.59	1 -3.02									
133	13.02	1 0.07	24.36	4 0.21	5.57	2 -1.16	3.09	3 0.91	4.77	1 -1.32	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00					
134	13.25	1 0.96	24.68	4 1.38	5.64	1 -0.69	2.97	2 0.47	4.73	1 -1.70	0.79	2 -0.80	0.59	1 0.67					
135	13.14	1 0.53	24.69	1 1.42	5.92	1 1.16	2.93	2 0.32	4.59	1 -3.02	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00					
135			24.11	3 -0.69															
136	12.80	1 -0.77	23.60	4 -2.55	5.70	1 -0.29	2.20	2 -2.33	4.80	1 -1.04	0.81	2 -0.26	0.60	1 1.34					
137	12.92	1 -0.30	24.26	4 -0.14	5.61	2 -0.89	3.19	3 1.27	4.84	1 -0.66	0.81	2 -0.26	0.60	1 1.34					
138	12.90	1 -0.38	23.77	2 -1.93	5.83	1 0.56	4.05	2 4.41	5.05	1 1.32	0.74	2 -2.15	0.58	1 0.00					
139	12.57	1 -1.65	24.49	4 0.69	5.69	2 -0.36	2.72	3 -0.43	4.98	1 0.66	0.79	2 -0.80	0.65	1 4.72					
140	13.25	1 0.96	24.30	4 0.00	5.93	2 1.23	2.91	3 0.25	4.88	1 -0.28	0.85	2 0.80	0.58	1 0.00					
141	12.42	1 -2.23																	
142	13.25	1 0.96	24.52	2 0.80	5.76	1 0.09	2.82	2 -0.07	4.97	1 0.56	0.90	2 2.15	0.57	1 -0.67	50.50	1 0.19	49.00	3 0.44	
142			24.28	3 -0.07											50.80	1 0.31	48.90	4 0.38	
143	12.95	1 -0.19	24.17	4 -0.47	5.67	1 -0.49	2.75	2 -0.32	4.63	1 -2.65	0.80	1 -0.53	0.57	1 -0.67	48.10	1 -0.80			
144	12.31	1 -2.65																	
144	12.86	2 -0.53	24.81	4 1.85	5.75	1 0.03													
145	12.99	1 -0.03	23.94	1 -1.31	5.67	1 -0.49	2.48	2 -1.31	4.93	1 0.18	0.82	2 0.00	0.58	1 0.00	47.20	1 -1.18			
146	12.95	1 -0.19	24.42	1 0.43	5.68	1 -0.43	2.92	2 0.29	4.88	1 -0.28	0.80	2 -0.53	0.57	1 -0.67					
147	13.15	1 0.57	24.47	4 0.61	5.70	1 -0.29	2.83	3 -0.03	4.96	1 0.47	0.80	2 -0.53	0.57	1 -0.67			47.60	3 -0.44	
148	12.72	1 -1.07	24.57	4 0.98	5.62	2 -0.83	3.54	3 2.55	5.05	1 1.32	0.80	2 -0.53	0.60	1 1.34			45.90	3 -1.52	
149	12.52	1 -1.85	24.46	4 0.58	5.82	1 0.49	2.53	2 -1.13	4.94	1 0.28	0.81	2 -0.26	0.57	1 -0.67					
150	13.24	1 0.92	24.93	4 2.29	5.67	1 -0.49	2.88	3 0.14	4.71	1 -1.89	0.82	2 0.00	0.57	1 -0.67			51.00	3 1.71	
151	13.44	1 1.69	24.14	4 -0.58	5.52	2 -1.49	3.26	3 1.53	4.87	1 -0.37	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00			45.70	3 -1.65	
151																		48.40	4 0.06
152	13.07	1 0.26	24.30	2 0.00	5.50	1 -1.63	2.88	2 0.14	4.87	1 -0.37	0.79	2 -0.80	0.57	1 -0.67					
153	12.96	1 -0.15	24.28	4 -0.07	5.75	1 0.03	2.89	1 0.18	4.93	1 0.18	0.81	2 -0.26	0.59	1 0.67	44.70	1 -2.22			
155	13.14	1 0.53	24.23	4 -0.25	5.78	1 0.23	2.22	2 -2.26	4.88	1 -0.28	0.81	2 -0.26	0.55	1 -2.02					
156	13.09	1 0.34	24.40	4 0.36	5.80	1 0.36	2.97	2 0.47	4.75	1 -1.51	0.79	2 -0.80	0.58	1 0.00	52.38	1 0.97			
157	13.08	1 0.30	24.53	2 0.83	5.70	1 -0.29	1.55	2 -4.70	4.93	1 0.18	0.85	2 0.80	0.59	1 0.67					
158	13.15	1 0.57	24.00	4 -1.09	5.72	1 -0.16			4.73	1 -1.70	0.81	1 -0.26	0.58	1 0.00					
160	13.27	1 1.04	24.78	1 1.75	5.77	1 0.16	3.12	2 1.02	4.83	1 -0.75	0.95	1 3.50	0.59	1 0.67					
161			24.68	1 1.38	8.74	1 19.95			4.74	1 -1.60									
162	12.96	1 -0.15	24.17	4 -0.47	5.71	2 -0.23	3.13	3 1.05	4.93	1 0.18	0.81	3 -0.26	0.58	1 0.00	50.10	1 0.02			
163	12.91	1 -0.34	24.23	2 -0.25	5.78	1 0.23	2.63	3 -0.76	4.83	1 -0.75	0.84	2 0.53	0.61	1 2.02					
165	12.76	1 -0.92	23.53	2 -2.80	5.38	1 -2.43	2.47	1 -1.34	4.69	1 -2.08	0.97	2 4.04							
166																			
167	12.86	1 -0.53	24.21	4 -0.32	5.98	1 1.56	3.07	3 0.83	5.05	1 1.32	0.71	1 -2.96	0.54	1 -2.69	47.29	1 -1.14			
169	12.42	1 -2.23	24.44	4 0.51	5.90	1 1.03			4.76	1 -1.42			0.64	1 4.04	42.40	1 -3.18			
170	13.11	1 0.42	24.73	4 1.56	6.00	1 1.69	1.77	2 -3.90	4.91	1 0.00			0.60	1 1.34			49.30	3 0.63	
171	13.60	1 2.31	24.86	4 2.04	5.94	2 1.29			5.54	1 5.96	0.88	2 1.61	0.55	1 -2.02	49.80	2 -0.09			
173	13.28	1 1.07	24.19	4 -0.40	5.82	1 0.49			4.92	1 0.09	0.80	2 -0.53	0.56	1 -1.34	47.90	1 -0.89			
174	13.30	1 1.15	23.90	4 -1.45	5.70	2 -0.29	3.30	3 1.67	4.80	1 -1.04	0.59	1 -6.20	0.54	1 -2.69	48.40	1 -0.68			
178	13.22	1 0.84	24.36	2 0.21	5.68	1 -0.43	2.81	2 -0.10	4.90	1 -0.09	0.79	1 -0.80	0.58	1 0.00	51.42	1 0.57			
179	12.88	1 -0.46	24.51	4 0.76	6.15	2 2.69	2.89	3 0.18	4.78	1 -1.23	0.74	1 -2.15	0.61	1 2.02					
181	13.37	1 1.42	24.40	1 0.36	5.73	1 -0.09	2.95	1 0.40	4.80	1 -1.04	0.82	2 0.00	0.57	1 -0.67	54.30	1 1.77			
182			24.38	3 0.29															
183	13.23	1 0.88	24.31	2 0.03	5.66	1 -0.56	2.38	1 -1.67	5.05	1 1.32	0.82	1 0.00	0.58	1 0.00	48.50	1 -0.64	47.10	4 -0.76	
183			24.55	3 0.91			2.32	2 -1.89											
183			24.25	4 -0.18															
185	12.88	1 -0.46	24.44	4 0.51	5.77	1 0.16	2.66	2 -0.65	4.77	1 -1.32	0.84	2 0.53	0.59	1 0.67	46.20	1 -1.60			
186	12.01	1 -3.81							5.30	1 3.69	0.83	2 0.26							
187	13.03	1 0.11	24.34	4 0.14	5.64	2 -0.69	2.97	3 0.47	4.89	1 -0.18	0.76	2 -1.61	0.57	1 -0.67			48.51	3 0.13	
189																			
191	13.02	1 0.07	24.20	1 -0.36	5.91	1 1.09	2.74	1 -0.36	4.91	1 0.00	0.79	1 -0.80	0.58	1 0.00					
192	13.03	1 0.11	24.12	2 -0.65	5.74	1 -0.03	2.87	2 0.10	4.81	1 -0.94	1.13	2 8.36	0.58	1 0.00					
193	13.13	1 0.50	24.16	2 -0.51	5.70	1 -0.29	2.73	2 -0.40	4.92	1 0.09	0.75	1 -1.88	0.58	1 0.00	51.40	1 0.56			
194	13.07	1 0.26	23.90	4 -1.45	5.43	2 -2.09			4.61	2 -2.84			0.52	2 -4.04					
195	13.34	1 1.31	24.47	2 0.61	5.91	1 1.09	2.59	2 -0.91	4.99	1 0.75	0.81	2 -0.26	0.57	1 -0.67	55.00	1 2.07			
196	12.94	1 -0.23	24.30	2 0.00	5.86	1 0.76	2.41	2 -1.56	5.04	1 1.23	0.82	2 0.00	0.58	1 0.00					
197	12.57	1 -1.65	24.67	4 1.34	5.62	2 -0.83	3.21	3 1.34	4.88	1 -0.28	0.90	1 2.15	0.58	1 0.00	50.30	3 1.26			
198	13.37	1 1.42	23.86	4 -1.60	5.77	1 0.16	2.54	2 -1.09	4.95	1 0.37	0.87	2 1.34	0.66	1 5.39					
200	13.07	1 0.26	24.23	4 -0.25	5.74	1 -0.03	3.16	2 1.16	5.05	1 1.32	0.98	2 4.31	0.63	1 3.37					
202	13.36	1 1.38	24.33	4 0.10	5.72	1 -0.16													
203	13.08	1 0.30	24.20	1 -0.36	5.73	1 -0.09	2.74	2 -0.36	4.94	1 0.28	0.86	2 1.07	0.58	1 0.00					
204	13.09	1 0.34	24.54	4 0.87	5.83	2 -0.03	2.83	2 -0.03	4.99	1 0.75			0.57	1 -0.67	60.90	1 4.53			
205	13.28	1 1.07	24.19	1 -0.40	5.82	1 0.49	2.28	2 -2.											

表5 分析成績 (3)

試料番号	A 水分		A 粗たん白質		A 粗脂肪		A 粗繊維		A 粗灰分		A カルシウム		A りん		A SL		A SL (バイオアッセイ)	
	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(g/100g)	No. z-score	分析値(g/100g)	No. z-score
233	12.81	1 -0.73	24.59	4 1.05	5.70	1 -0.29	2.90	1 0.21	4.85	1 -0.56	0.82	1 0.00	0.59	1 0.67				
234	12.60	1 -1.54	23.70	1 -2.18					5.10	1 1.79								
235	13.31	1 1.19	23.82	1 -1.75	5.67	1 -0.49	2.93	2 0.32	4.85	1 -0.56								
236	13.10	1 0.38	24.30	4 0.00	5.58	2 -1.09	2.90	2 0.21	4.89	1 -0.18	0.77	2 -1.34	0.57	1 -0.67			44.30	3 -2.53
237	12.34	3 -2.54	24.70	5 1.45	5.60	3 -0.96	3.23	4 1.42	5.60	2 6.53	1.08	3 7.01	0.67	2 6.07	45.20	1 -2.01		
238	12.89	1 -0.42	24.29	4 -0.03	5.80	1 0.36	2.80	1 -0.14	4.90	1 -0.09	0.84	1 0.53	0.57	1 -0.67	50.30	1 0.11		
239	13.15	1 0.57	24.04	2 -0.94	5.79	1 0.29	2.36	2 -1.75	4.95	1 0.37								
240	13.26	1 1.00	24.49	4 0.69					4.88	1 -0.28	0.82	2 0.00	0.61	1 2.02	51.00	1 0.40		
241	12.71	1 -1.11	24.25	4 -0.18	5.69	1 -0.36	2.94	1 0.36	4.94	1 0.28								
242															51.20	1 0.48		
243	12.91	1 -0.34	24.36	4 0.21	5.62	1 -0.83	2.66	2 -0.65	4.93	1 0.18	0.86	2 1.07	0.60	1 1.34	48.10	1 -0.80		
244	13.01	1 0.03	24.01	4 -1.05	5.72	1 -0.16	2.95	2 0.40	4.79	1 -1.13	0.82	2 0.00	0.56	1 -1.34	46.58	1 -1.44		
245	12.92	1 -0.30	24.30	2 0.00	5.92	1 1.16			4.91	1 0.00								
246	12.43	1 -2.19	24.07	4 -0.83	5.44	1 -2.03			4.65	1 -2.46								
247	13.27	1 1.04	24.62	4 1.16	5.44	1 1.09	2.57	2 -0.98	4.86	1 -0.47	0.87	1 1.34	0.58	1 0.00	50.98	1 0.39		
248	12.93	1 -0.26	23.86	2 -1.60	5.44	1 0.09	2.85	1 0.03	4.93	1 0.18	0.80	2 -0.53	0.58	1 0.00			44.30	3 -2.53
249	12.76	1 -0.92	24.79	2 1.78	5.44	1 1.49			4.99	1 0.75								
250	12.82	1 -0.69	24.21	1 -0.32	5.44	1 2.96			5.08	1 1.60								
251	12.99	1 -0.03	24.43	1 0.47	5.44	1 -0.63	2.60	2 -0.87	4.90	1 -0.09	0.90	1 2.15	0.57	1 -0.67				
253	13.17	1 0.65	24.35	2 0.18	5.44	1 -0.23	3.05	2 0.76	4.80	1 -1.04	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00				
254	12.90	1 -0.38	24.53	1 0.83	5.44	1 0.03	2.51	1 -1.20	4.90	1 -0.09	0.82	1 0.00	0.58	1 0.00				
255	13.07	1 0.26	23.92	2 -1.38	5.44	1 16.95	3.03	1 0.69	4.76	1 -1.42	0.86	3 1.07	0.50	1 -5.39				
256					5.44													
257	12.55	1 -1.73	24.46	4 0.58	5.44	1 -0.56			4.80	1 -1.04								
259	13.11	1 0.42	24.03	4 -0.98	5.44	1 0.49	2.60	2 -0.87	5.08	1 1.60								
260					5.44													
261	12.26	1 -2.85	24.51	4 0.76	5.44	2 -2.49	2.64	2 -0.72	5.00	1 0.85	0.83	2 0.26	0.54	1 -2.69				
262	12.65	1 -1.34	24.21	4 -0.32	5.44	1 0.43	2.41	2 -1.56	5.09	1 1.70								
263	12.84	1 -0.61	24.60	2 1.09	5.44				4.84	1 -0.66								
264	13.32	1 1.23	24.00	4 -1.09	5.44	2 -0.89	2.51	2 -1.20	4.98	1 0.66								
265	13.09	1 0.34	24.42	1 0.43	5.44	1 -0.29	2.64	2 -0.72	4.98	1 0.66	0.82	2 0.00	0.57	1 -0.67				
266	12.40	1 -2.31	24.02	2 -1.02	5.44	1 0.83	2.62	2 -0.80	5.01	1 0.94	1.05	2 6.20	0.56	1 -1.34				
267	12.97	1 -0.11	24.55	2 0.91	5.44	1 1.23	2.33	2 -1.85	4.86	1 -0.47	0.81	1 -0.26	0.55	1 -2.02				
268	12.95	1 -0.19	24.41	4 0.40	5.44	1 1.16	3.00	1 0.58	5.02	1 1.04	0.82	1 0.00	0.59	1 0.67				
269	13.58	1 2.23	22.92	1 -5.03	5.44	1 -0.63			4.70	1 -1.98	1.01	2 5.12	0.63	1 3.37				
270	12.49	1 -1.96	24.05	4 -0.91	5.44	1 -0.83	2.55	1 -1.05	4.99	1 0.75	0.90	2 2.15	0.56	1 -1.34	52.12	2 0.87		
271	13.15	1 0.57	23.74	4 -2.04	5.44	1 1.23	2.68	2 -0.58	5.24	1 3.12	0.82	2 0.00	0.60	1 1.34	46.60	1 -1.43		
272	12.76	1 -0.92	24.35	4 0.18	5.44	1 -0.63	3.04	3 0.72	4.91	1 0.00	0.84	2 0.53	0.61	1 2.02				
273	13.00	1 0.00	24.98	2 2.47	5.44	1 1.49	2.45	1 -1.42	4.76	1 -1.42	0.85	1 0.80	0.59	1 0.67				
274	13.31	1 1.19	24.61	4 1.13	5.44	1 0.09	2.35	2 -1.78	4.76	1 -1.42	0.81	2 -0.26	0.59	1 0.67	46.40	1 -1.51		
275	13.01	1 0.03	23.93	4 -1.34	5.44	1 0.29	2.84	1 0.00	4.95	1 0.37	0.81	2 -0.26	0.59	1 0.67			47.29	3 -0.64
276	12.40	1 -2.31	24.45	4 0.54	5.44	2 -0.49	2.88	1 0.14	4.88	1 -0.28	0.88	2 1.61	0.57	1 -0.67	48.80	2 -0.51		
277	12.34	1 -2.54	23.64	4 -2.40	5.44	1 -0.63	3.55	3 2.58	4.88	1 -0.28	0.72	2 -2.69	0.59	1 0.67				
278	13.05	1 0.19	23.87	4 -1.56	5.44	1 -1.69	2.97	1 0.47	4.99	1 0.75	0.85	2 0.80	0.58	1 0.00			45.13	3 -2.01
279	12.92	1 -0.30	23.74	2 -2.04	5.44	1 0.16	2.43	2 -1.49	4.94	1 0.28	0.77	2 -1.34	0.59	1 0.67	48.60	4 0.19		
280	13.08	1 0.30	25.49	3 4.33	5.44	1 -0.36	2.59	2 -0.91	5.53	1 5.86	0.80	2 -0.53	0.53	1 -3.37				
281	12.68	1 -1.23	23.86	2 -1.60	5.44	1 0.49	2.83	2 -0.03	4.84	1 -0.66	0.81	2 -0.26	0.54	1 -2.69				
282	13.23	1 0.88	24.41	2 0.40	5.44	1 0.76	2.51	2 -1.20	4.95	1 0.37	0.80	1 -0.53	0.57	1 -0.67	48.90	1 -0.47	48.20	4 -0.06
283					5.44													
285	11.42	1 -6.08	24.81	4 1.85	5.44	1 3.76	2.78	1 -0.21	5.08	1 1.60	0.82	2 0.00	0.56	1 -1.34				
286	12.89	1 -0.42	23.80	4 -1.82	5.44	1 0.49	3.34	3 1.82	4.67	1 -2.27	0.87	2 1.34	0.69	1 7.41				
287	11.84	1 -4.47			5.44				5.15	1 2.27	0.81	2 -0.26						
288	12.85	1 -0.57	24.07	4 -0.83	5.44	1 0.09	2.83	2 -0.03	5.20	1 2.74	0.76	2 -1.61	0.59	1 0.67			48.15	3 -0.09
289	12.94	1 -0.23	24.15	4 -0.54	5.44	1 0.56	2.88	2 0.14	4.88	1 -0.28	0.81	3 -0.26	0.59	1 0.67	50.50	1 0.19		
291	12.61	1 -1.50	24.62	4 1.16	5.44	1 -0.96	3.04	2 0.72	5.01	1 0.94	0.84	2 0.53	0.59	1 0.67			43.94	3 -2.76
292	12.87	1 -0.50	23.96	4 -1.23	5.44	1 -1.76	2.62	2 -0.80	4.87	1 -0.37	0.82	2 0.00	0.59	1 0.67				
299	12.94	1 -0.23	24.33	4 0.10	5.44	1 -0.56	2.18	2 -2.40	4.96	1 0.47	0.84	2 0.53	0.60	1 1.34				
301	13.04	1 0.15	24.50	4 0.72	5.44	1 0.76	2.66	1 -0.65	4.96	1 0.47	0.85	2 0.80	0.59	1 0.67				
302	13.13	1 0.50	24.28	4 -0.07	5.44	2 -4.29	2.61	2 -0.83	4.72	1 -1.79								
303	11.30	1 -6.55	23.30	4 -3.64	5.44	2 -8.96												
304	13.15	1 0.57	24.62	1 1.16	5.44	1 -2.09	2.76	2 -0.29	4.93	1 0.18	0.93	1 2.96	0.60	1 1.34			44.00	3 -2.72
318	13.01	1 0.03			5.44				4.82	1 -0.85					50.30	1 0.11		
319	12.75	1 -0.96	24.90	4 2.18	5.44	2 2.56			5.09	1 1.70								
321	12.92	1 -0.30	24.33	2 0.10	5.44		3.09	1 0.91	4.89	1 -0.18			0.58	1 0.00				
322	13.37	1 1.42	24.26	4 -0.14	5.44	2 0.03	2.31	2 -1.93	4.76	1 -1.42	0.82	2 0.00	0.61	1 2.02				
323	12.95	1 -0.19	24.10	4 -0.72	5.44	1 2.89	3.03	2 0.69	4.96	1 0.47	0.86	2 1.07	0.58	1 0.00				
324	12.94	1 -0.23			5.44				4.91	1 0.00	0.81	2 -0.26	0.58	1 0.00				
326	12.75	1 -0.96	24.24	4 -0.21	5.44	1 -0.16	2.63	2 -0.76	4.59	1 -3.02								
327	12.85	1 -0.57	24.91	2 2.22	5.44	1 -0.63			4.86	1 -0.47								
328	13.12	1 0.46	24.34	4 0.14	5.44	1 0.36	3.05	3 0.76	4.90	1 -0.09	0.85	2 0.80	0.57	1 -0.67				
330	10.93	1 -7.97	23.95	2 -1.27	5.44				4.99	1 0.75					37.90	1 -5.06		
331	12.89	1 -0.42	24.72	4 1.53	5.44	1 0.89	2.84	3 0.00	4.87	1 -0.37	0.75	1 -1.88	0.56	1 -1.34			48.61	3 0.19
332	12.38	1 -2.38			5.44										51.00	1 0.40		
333	13.00	1 0.00	24.22	4 -0.29	5.44	1 -0.49	2.61	2 -0.83	4.95	1 0.37	0.85	2 0.80	0.57	1 -0.67	50.07	2 0.01		
334	12.93	1 -0.26	23.81	4 -1.78	5.44	1 0.43	2.64											

表 5 分析成績 (5)

試料 番号	B試料		B粗たん白質		B粗灰分		Bカドミウム		Bエトキシキン		D試料		D銅		D亜鉛		Dクエン酸モランデル	
	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(g/トン)	No. z-score	分析値(g/トン)	No. z-score	分析値(g/kg)	No. z-score						
1	9.85	1 0.74	63.01	4 -0.63	16.96	1 -0.47												
2	9.75	1 0.24	63.64	4 0.51	16.97	1 -0.40							22.80	1 -1.15	25.40	1 -1.22		
3	10.00	1 1.49	66.20	4 5.17	16.75	1 -1.88												
4	9.77	1 0.34	63.71	4 0.63	17.31	1 1.88												
5	9.89	1 0.94	63.37	4 0.01	17.04	1 0.06												
6	9.59	1 -0.54	64.42	2 1.93	17.11	1 0.53												
7	9.78	1 0.39	62.70	4 -1.20	16.92	1 -0.74							23.60	1 -0.12				
8	9.90	1 0.99	63.33	4 -0.05	16.89	1 -0.94												
9	9.67	1 -0.14	63.07	4 -0.52	16.96	1 -0.47												
10	9.77	1 0.34	63.46	4 0.18	17.02	1 -0.06							23.83	1 0.16	26.45	1 -0.38		
11	9.85	1 0.74	63.20	4 -0.29	17.06	1 0.20							23.88	1 0.23	26.28	1 -0.51		
12	9.89	1 0.94	63.39	4 0.05	17.01	1 -0.13							24.27	1 0.73	25.69	1 -0.98		
13	9.82	1 0.59	63.36	4 0.00	17.03	1 0.00							23.78	1 0.10	26.51	1 -0.33		
14	9.83	1 0.64	63.84	2 0.87	17.10	1 0.47							24.59	1 1.14	27.79	1 0.68		
15	9.75	1 0.24	63.56	4 0.36	17.09	1 0.40												
16	9.55	1 -0.74	63.20	4 -0.29	17.02	1 -0.06												
17	9.66	1 -0.19	63.61	1 0.45	17.04	2 0.06												
18	10.50	1 3.99	61.75	2 -2.93	15.90	1 -7.62												
19	10.02	1 1.59	63.31	1 -0.09	19.93	1 19.56												
20	9.83	1 0.64	63.40	1 0.07	17.30	1 1.82												
21	10.03	1 1.64	63.12	1 -0.43	16.92	1 -0.74												
22	9.70	1 0.00	63.21	1 -0.27	16.65	1 -2.56												
23	9.73	1 0.14	63.78	4 0.76	17.33	1 2.02												
24	8.74	1 -4.79	62.34	2 -1.85	17.18	1 1.01												
25	9.90	1 0.99	62.91	4 -0.82	17.12	1 0.60												
26	9.64	1 -0.29	63.17	2 -0.34	16.99	1 -0.26												
27	9.74	1 0.19	63.03	4 -0.60	17.05	1 0.13							23.37	2 -0.42	26.64	2 -0.23		
28	9.54	1 -0.79	63.89	2 0.96	17.36	1 2.22	1.14	1 -0.96	71.08	1 -1.71	24.15	1 0.57	25.90	1 -0.82	26.29	1 -0.51		
29	9.92	1 1.09	63.99	2 1.14	16.95	1 -0.53	1.17	1 -0.67			21.96	1 -2.23						
30	9.72	1 0.09	62.83	4 -0.96	17.24	1 1.41												
31	9.59	1 -0.54	63.20	2 -0.29	16.95	1 -0.53	1.26	1 0.19			24.42	1 0.92	28.11	1 0.94				
32	9.06	1 -3.19	63.51	2 0.27	17.16	1 0.87	1.40	1 1.54			24.10	1 0.51	27.80	1 0.69				
33	9.85	1 0.74	61.48	2 -3.42	17.26	1 1.55												
34	9.80	1 0.49	63.32	1 -0.07	17.10	1 0.47	1.39	2 1.44	97.30	1 0.72	24.16	1 0.59	27.76	1 0.66	15.40	1 0.09		
52	9.02	1 -3.39	65.25	2 3.44														
54	9.58	1 -0.59	62.89	4 -0.85	17.19	1 1.07												
55	9.77	1 0.34	62.90	2 -0.83	16.89	1 -0.94							24.64	1 1.20	28.09	1 0.92		
56	9.65	1 -0.24	64.12	1 1.38	16.56	1 -3.17	0.71	3 -5.10			21.89	2 -2.32	27.08	2 0.11				
57	9.76	1 0.29	63.68	4 0.58	17.34	1 2.09					24.64	1 1.20	30.67	1 2.98				
59	9.47	1 -1.14	63.90	4 0.98	17.06	1 0.20												
60	9.78	2 0.39	63.43	2 0.12	17.02	1 -0.06												
63	9.87	1 0.84	62.94	4 -0.76	17.00	1 -0.20												
64	9.69	1 -0.04	63.51	4 0.27														
65	9.78	1 0.39			17.10	1 0.47	1.42	1 1.73			23.67	1 -0.03	28.37	1 1.14				
65							1.41	2 1.63										
66	9.50	1 -0.99	62.99	4 -0.67	16.87	1 -1.07												
67	9.78	1 0.39	63.21	4 -0.27	17.22	1 1.28												
68	9.45	1 -1.24	62.73	4 -1.14	16.80	1 -1.55							23.70	1 0.00	27.95	1 0.81		
69	9.35	1 -1.74	62.50	4 -1.56	17.06	1 0.20												
70	9.72	1 0.09	62.88	4 -0.87	17.14	1 0.74												
71	9.73	1 0.14	62.92	4 -0.80	17.02	1 -0.06												
72	9.97	1 1.34	63.32	4 -0.07	17.25	1 1.48												
74	9.44	1 -1.29	63.93	4 1.03	16.94	1 -0.60												
75	9.28	1 -2.09	64.46	4 2.00	16.99	1 -0.26												
78	9.97	1 1.34	63.87	2 0.92	16.99	1 -0.26												
79	9.64	1 -0.29	63.45	4 0.16	16.95	1 -0.53							23.93	1 0.29	26.66	1 -0.21		
80	9.87	1 0.84	63.50	4 0.25	17.03	1 0.00	1.12	1 -1.15			23.27	1 -0.55	27.00	1 0.05	14.19	1 -2.23		
82	9.66	1 -0.19	63.96	4 1.09	16.93	1 -0.67					24.76	1 1.36						
85	10.15	1 2.24	63.04	2 -0.58	16.84	1 -1.28	1.20	2 -0.38			26.52	1 3.62	25.83	1 -0.87				
87	9.59	1 -0.54	63.47	4 0.20	17.26	1 1.55												
88	9.91	1 1.04	63.19	4 -0.30	16.74	1 -1.95					23.87	1 0.21	28.07	1 0.90				
89	9.70	1 0.00	63.77	4 0.74	17.13	1 0.67												
90	9.68	1 -0.09	63.41	1 0.09	17.01	1 -0.13												
91	9.40	1 -1.49	62.88	4 -0.87	17.24	1 1.41												
93																		
94	9.60	1 -0.49	62.94	1 -0.76	16.80	1 -1.55												
95	9.72	1 0.09	63.75	4 0.71	17.05	1 0.13	1.06	2 -1.73										
100	9.65	1 -0.24	63.80	1 0.80	16.95	1 -0.53	1.28	2 0.38	89.30	1 -0.01	23.43	1 -0.34	27.11	1 0.14	15.40	1 0.09		
101	9.80	1 0.49	63.53	1 0.30	17.02	1 -0.06												
102	9.55	1 -0.74	64.56	2 2.18	16.98	1 -0.33	1.64	1 3.85			21.36	1 -3.00	29.75	1 2.25				
103	9.60	1 -0.49	63.40	4 0.07	17.21	1 1.21	0.61	1 -6.07			23.39	1 -0.39	28.26	1 1.06				
104	9.40	1 -1.49	64.39	4 1.87	16.87	1 -1.07	1.36	2 1.15			24.21	1 0.65	27.10	1 0.13				
105	9.42	1 -1.39	62.99	1 -0.67	16.81	1 -1.48												
106	9.74	1 0.19	63.51	4 0.27	17.07	1 0.26	1.64	1 3.85			23.14	1 -0.71	26.31	1 -0.49				
108	9.39	1 -1.54	61.68	4 -3.06	17.09	1 0.40												
112	9.43	1 -1.34	63.47	4 0.20	16.90	1 -0.87	1.29	1 0.48	91.60	1 0.19	22.99	1 -0.91	26.01	1 -0.73				
113	9.80	1 0.49	63.69	4 0.60	16.89	1 -0.94			89.00	1 -0.04	23.44	1 -0.33	26.63	1 -0.23	20.41	1 9.75		
114	10.30	2 2.99									24.63	1 1.19	26.49	1 -0.35	15.00	1 -0.67		
115	9.30	1 -1.99	63.11	4 -0.45	17.04	1 0.06					24.24	1 0.69	26.45	1 -0.38				
116	9.78	1 0.39	63.32	4 -0.07	17.23	1 1.34	1.83	2 5.68	95.50	1 0.55	24.47	1 0.98	27.51	1 0.46	15.40	1 0.09		
117																		
119	9.41	1 -1.44	63.89	4 0.96	17.07	1 0.26	1.29	1 0.48	92.20	1 0.25	23.43	1 -0.34	26.21	1 -0.57				
120	9.73	1 0.14	64.28	4 1.67	17.27	1 1.61												
121																		
122	9.58	1 -0.59	62.94	2 -0.76	17.11	1 0.53			90.80	1 0.12					15.30	1 -0.09		

表 5 分析成績 (7)

試料 番号	B試料			D試料				
	B水分 分析値(%) No. z-score	B粗たん白質 分析値(%) No. z-score	B粗灰分 分析値(%) No. z-score	Bカドミウム 分析値(g/トン) No. z-score	Bエトキシキン 分析値(g/トン) No. z-score	D銅 分析値(g/kg) No. z-score	D亜鉛 分析値(g/kg) No. z-score	Dクエン酸モランデル 分析値(g/kg) No. z-score
233								
234	9.50 1 -0.99	54.80 1 -15.60	17.10 1 0.47					
235								
236	9.76 1 0.29	64.42 4 1.93	16.68 1 -2.36		60.00 1 -2.74	22.37 1 -1.70	22.02 1 -3.91	
237	9.40 3 -1.49	64.48 5 2.04	17.01 1 -0.13	1.21 2 -0.28		24.40 1 0.89		16.00 1 1.25
238	9.50 1 -0.99	63.14 4 -0.40	16.94 1 -0.60					
239	9.73 1 0.14	63.28 2 -0.14	17.00 1 -0.20					
240	9.86 1 0.79	63.34 4 -0.03	17.23 1 1.34			23.81 1 0.14	26.92 1 0.00	15.00 1 -0.67
241	9.50 1 -0.99	63.03 4 -0.60	17.12 1 0.60					
242					91.10 1 0.14	23.76 1 0.07	30.30 1 2.69	15.70 1 0.67
243	9.64 1 -0.29	63.42 4 0.10	17.10 1 0.47			22.87 1 -1.06	25.39 1 -1.22	
244	9.72 1 0.09	62.67 4 -1.25	17.13 1 0.67			23.50 1 -0.25	27.21 1 0.22	
245	9.82 1 0.59	63.16 2 -0.36	16.91 1 -0.80	1.22 2 -0.19				
246	9.20 1 -2.49	63.24 4 -0.21	17.02 1 -0.06					
247	9.95 1 1.24	62.73 4 -1.14	16.81 1 -1.48					
248	9.64 1 -0.29	62.49 2 -1.58	17.03 1 0.00	1.15 2 -0.86		25.25 1 1.99	30.24 1 2.64	
249	9.68 1 -0.09	63.27 2 -0.16	16.90 1 -0.87	1.25 2 0.09				
250	9.59 1 -0.54	62.48 1 -1.60	17.11 1 0.53					
251	9.73 1 0.14	63.50 1 0.25	16.95 1 -0.53					
252	9.80 1 0.49	63.80 2 0.80	17.04 1 0.06	1.30 1 0.57		23.67 1 -0.03	26.91 1 -0.01	
254	9.70 1 0.00	63.68 1 0.58	17.02 1 -0.06	1.27 1 0.28		23.00 1 -0.89	26.29 1 -0.51	
255	9.73 1 0.14	62.19 2 -2.13	17.44 1 2.76	10.54 3 89.61		26.50 1 3.59	30.14 1 2.56	
256						27.84 1 5.31	27.43 1 0.39	
257	9.37 1 -1.64	63.61 4 0.45	17.13 1 0.67					
259	9.87 1 0.84	63.23 4 -0.23	17.09 1 0.40	1.37 1 1.25	78.60 1 -1.01			
260	9.51 1 -0.94		16.94 1 -0.60		97.10 1 0.70			
261	8.95 1 -3.74	63.99 4 1.14	16.98 1 -0.33					
262	9.74 1 0.19	61.74 4 -2.95	16.94 1 -0.60					
263	9.77 1 0.34	63.54 2 0.32	16.91 1 -0.80					
264	9.88 1 0.89	63.57 4 0.38	17.16 1 0.87					
265	9.84 1 0.69	63.78 1 0.76	17.04 1 0.06					
266	9.18 1 -2.59	62.70 2 -1.20	16.92 1 -0.74					
267	9.66 1 -0.19	63.12 2 -0.43	17.16 1 0.87					
268	9.35 1 -1.74	62.50 4 -1.56	17.06 1 0.20					
269	9.47 1 -1.14	63.28 1 -0.14	17.36 1 2.22					
270	9.35 1 -1.74	63.41 4 0.09	17.00 1 -0.20					
271	9.80 1 0.49	61.83 4 -2.78	17.14 1 0.74	1.24 1 0.00		23.48 1 -0.28	27.27 1 0.27	15.30 1 -0.09
272	9.63 1 -0.34	63.05 4 -0.56	16.89 1 -0.94					
273	9.78 1 0.39	64.74 2 2.51	17.13 1 0.67					
274	9.88 1 0.89	64.07 4 1.29	17.14 1 0.74	1.20 3 -0.38		23.42 1 -0.35	27.90 1 0.77	
275	9.66 1 -0.19	62.64 4 -1.31	17.13 1 0.67	1.10 1 -1.34	99.30 1 0.91	22.94 1 -0.97	25.03 1 -1.51	
276	9.66 1 -0.19	64.40 4 1.89	16.86 1 -1.14					
277	9.11 1 -2.94	62.90 4 -0.83	16.80 1 -1.55	1.29 2 0.48		24.30 1 0.77	26.34 1 -0.47	
278	9.68 1 -0.09	62.44 4 -1.67	16.84 1 -1.28			23.27 1 -0.55	28.57 1 1.30	15.54 1 0.36
279	9.58 1 -0.59	61.73 2 -2.97	17.11 1 0.53	1.23 2 -0.09	95.30 1 0.53	23.46 1 -0.30	29.45 1 2.01	15.10 1 -0.48
280	9.71 1 0.04	68.70 3 9.73	18.89 1 12.54					
281	9.65 1 -0.24	63.70 2 0.61	16.80 1 -1.55					
282	9.56 1 -0.69	63.72 2 0.65	16.88 1 -1.01	1.08 1 -1.54	101.40 1 1.10	24.07 1 0.47	26.72 1 -0.16	16.10 1 1.44
283						24.21 1 0.65	22.34 1 -3.66	15.50 1 0.28
285	9.26 1 -2.19	64.08 4 1.31	17.19 1 1.07			22.69 1 -1.29	25.67 1 -1.00	
286	9.73 1 0.14	62.20 4 -2.11	17.09 1 0.40					
287	8.80 1 -4.49		17.74 1 4.78					
288	9.54 1 -0.79	63.77 4 0.74	17.36 1 2.22		90.10 1 0.05	23.87 1 0.21	23.15 1 -3.01	15.07 1 -0.53
289	9.71 1 0.04	62.36 4 -1.82	17.12 1 0.60					
291	9.65 1 -0.24	63.16 4 -0.36	16.83 1 -1.34	1.53 2 2.79		20.60 1 -3.98	27.00 1 0.05	
292	9.70 1 0.00	63.32 3 -0.07	16.74 -1.95	1.33 0.86		23.68 1 -0.02	26.46 1 -0.37	
299	9.59 1 -0.54	64.06 4 1.27	16.98 1 -0.33					
301	9.71 1 0.04	64.06 4 1.27	17.01 1 -0.13	1.22 1 -0.19	94.50 1 0.46	22.69 1 -1.29	25.84 1 -0.87	
302	9.51 1 -0.94	62.00 4 -2.47	16.71 1 -2.15					
303	7.30 1 -11.99	61.50 4 -3.39						
304	9.65 1 -0.24	63.18 1 -0.32	17.15 1 0.80		95.70 1 0.57			14.30 1 -2.02
318	9.68 1 -0.09		16.88 1 -1.01		94.00 1 0.41	23.39 1 -0.39	25.77 1 -0.92	15.70 1 0.67
319	9.60 1 -0.49	63.99 4 1.14	17.23 1 1.34					
321	10.12 1 2.09	64.03 2 1.22	17.00 1 -0.20			23.79 1 0.11	25.40 1 -1.22	
322	10.15 1 2.24	63.15 4 -0.38	16.88 1 -1.01			23.76 1 0.07	26.80 1 -0.10	14.70 1 -1.25
323	9.55 1 -0.74	63.26 4 -0.18	17.13 1 0.67					
324	9.50 1 -0.99		16.94 1 -0.60	1.20 2 -0.38		23.94 1 0.30	26.94 1 0.00	
326	9.66 1 -0.19	63.15 4 -0.38	16.70 1 -2.22					
327	9.99 1 1.44	63.15 2 -0.38	17.08 1 0.33		65.00 1 -2.27			
328	9.76 1 0.29	63.50 4 0.25	17.14 1 0.74					
330	8.25 1 -7.24	62.78 2 -1.05	16.98 1 -0.33					
331	9.58 1 -0.59	64.25 4 1.62	17.00 1 -0.20					
332					75.80 1 -1.27	24.28 1 0.74	27.24 1 0.24	15.70 1 0.67
333	9.66 1 -0.19	63.46 4 0.18	16.93 1 -0.67					
334	9.65 1 -0.24	63.81 4 0.82	17.27 1 1.61					
335	9.55 1 -0.74	62.93 2 -0.78	17.10 1 0.47					
336	9.47 1 -1.14	63.44 4 0.14	17.07 1 0.26	1.24 1 0.00	88.00 1 -0.13	20.04 1 -4.70	22.29 1 -3.70	12.59 1 -5.31
338	9.88 1 0.89	63.44 2 0.14	17.03 1 0.00	1.13 2 -1.05	88.50 1 -0.09	24.73 1 1.32	27.87 1 0.75	15.00 1 -0.67
346	9.53 1 -0.84	62.58 4 -1.42	17.08 1 0.33					
347	9.56 1 -0.69	63.49 4 0.23	16.92 1 -0.74					
348	9.80 1 0.49	62.46 4 -1.64	17.08 1 0.33	1.31 1 0.67	67.80 1 -2.01	22.90 1 -1.02	27.92 1 0.79	15.00 1 -0.67
349	9.64 1 -0.29	63.22 4 -0.25	17.09 1 0.40					
350	9.44 1 -1.29	63.66 4 0.54	17.14 1 0.74	1.32 2 0.77		21.79 1 -2.45	26.72 1 -0.16	
351	9.94 1 1.19	63.56 4 0.36	17.25 1 1.48	1.27 2 0.28		25.66 1 2.51	30.57 1 2.90	
352	9.75 1 0.24	62.95 2 -0.74	17.12 1 0.60					

表5 分析成績 (8)

試料 番号	B試料						D試料									
	B水分		B粗たん白質		B粗灰分		Bカドミウム		Bエトキシキン		D銅		D亜鉛		Dクエン酸モランテル	
	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(%)	No. z-score	分析値(g/トン)	No. z-score	分析値(g/トン)	No. z-score	分析値(g/kg)	No. z-score	分析値(g/kg)	No. z-score	分析値(g/kg)	No. z-score
353	9.50	1 -0.99	63.70	4 0.61	17.20	1 1.14										
354	9.90	1 0.99	63.90	4 0.98	17.35	1 2.15										
355	8.66	-5.19	63.91	4 1.00	17.43	2 2.69			107.00	1 1.62						
356	9.84	1 0.69	64.00	2 1.16	16.80	1 -1.55	1.14	-0.96	89.50	1 0.00	20.95	1 -3.53	24.00	1 -2.33	16.30	1 1.83
357	9.32	1 -1.89	62.06	2 -2.36	17.05	1 0.13					24.13	1 0.55	27.13	1 0.15		
358	9.71	1 0.04	62.85	4 -0.92	17.04	1 0.06					19.50	1 -5.39	22.40	1 -3.61		
359	9.26	1 -2.19	63.77	4 0.74	16.97	1 -0.40			93.30	1 0.35	25.18	1 1.90	28.45	1 1.21		
360	9.57	1 -0.64	63.99	4 1.14	17.34	1 2.09					23.88	1 0.23	28.51	1 1.26		
361	9.88	1 0.89	63.43	4 0.12	17.10	1 0.47										
362	9.82	1 0.59	63.20	4 -0.29	17.13	1 0.67					24.30	1 0.77	28.40	1 1.17	14.80	1 -1.05
363	9.97	1 1.34	63.23	4 -0.23	16.98	1 -0.33										
364	9.89	1 0.94	63.04	4 -0.58	17.02	1 -0.06										
365	9.20	1 -2.49	63.62	2 0.47	16.93	1 -0.67										
366	9.92	1 1.09	63.96	4 1.09	16.89	1 -0.94					24.45	1 0.96	30.00	1 2.45		
367	10.15	1 2.24	62.86	4 -0.91	17.12	1 0.60										
368	9.91	1 1.04			16.86	1 -1.14										
369	9.42	1 -1.39	62.93	4 -0.78	17.08	1 0.33	1.00	-2.31			25.08	1 1.77	28.13	1 0.95		
370	9.71	1 0.04	63.25	4 -0.20	16.97	1 -0.40									14.30	1 -2.02
371	9.33	1 -1.84	63.51	2 0.27	16.62	1 -2.76										
372	9.85	1 0.74	62.73	4 -1.14	16.94	-0.60										
373	9.71	1 0.04	63.97	4 1.11	17.11	1 0.53			77.90	1 -1.07	23.25	1 -0.57	26.29	1 -0.51		
374	9.46	1 -1.19	63.33	4 -0.05	17.11	1 0.53	1.80	5.39	78.60	1 -1.01	25.30	1 2.05	27.40	1 0.37	15.40	1 0.09
375	9.77	1 0.34	64.34	4 1.78	16.98	1 -0.33	1.34	0.96	89.00	1 -0.04	24.63	1 1.19	27.92	1 0.79		
376									94.70	1 0.48						
377	10.07	1 1.84	63.43	4 0.12	17.28	1 1.68			80.10	1 -0.87	24.96	1 1.61	28.77	1 1.46		
378	9.66	1 -0.19	63.47	4 0.20	17.01	1 -0.13										
379	9.69	1 -0.04	63.52	4 0.29	17.25	1 1.48			97.30	1 0.72						
380	9.71	1 0.04	63.56	2 0.36	17.29	1 1.75										
381	9.29	1 -2.04	63.04	4 -0.58	16.93	1 -0.67	1.37	2 1.25			23.88	1 0.23	24.91	1 -1.61		
382	9.31	1 -1.94	63.36	1 0.00	17.09	1 0.40										
383	9.59	1 -0.54	63.37	4 0.01	17.23	1 1.34	1.37	1 1.25			23.40	1 -0.38				
384	9.63	1 -0.34	61.33	2 -3.70	16.82	1 -1.41										
434			63.20	4 -0.29												
435	9.54	1 -0.79	63.83	4 0.85	16.88	1 -1.01										
436	9.30	1 -1.99	63.10	4 -0.47	16.91	1 -0.80										

サリノマイシンナ トリウム	カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 管理分析法	1 溶媒抽出法	1 HPLC法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 HPLC法
2 フローインジェク ション法	2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他	2 その他
3 HPLC法	3 不明				
4 バイオアッセイ					

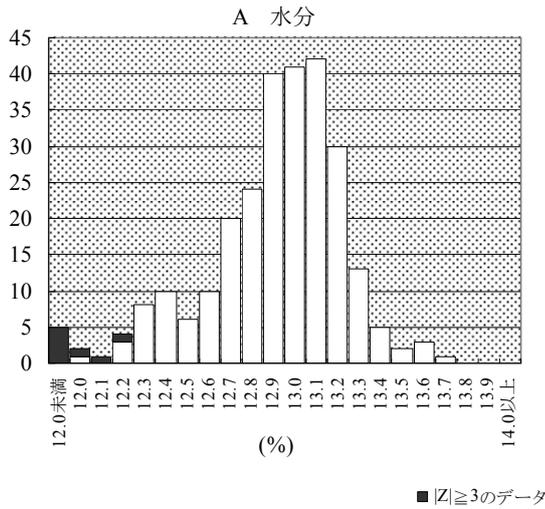


図1 水分の分析成績 (A 試料)

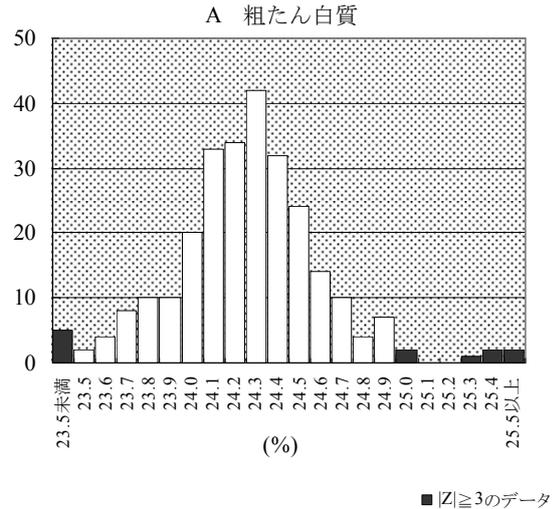


図2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

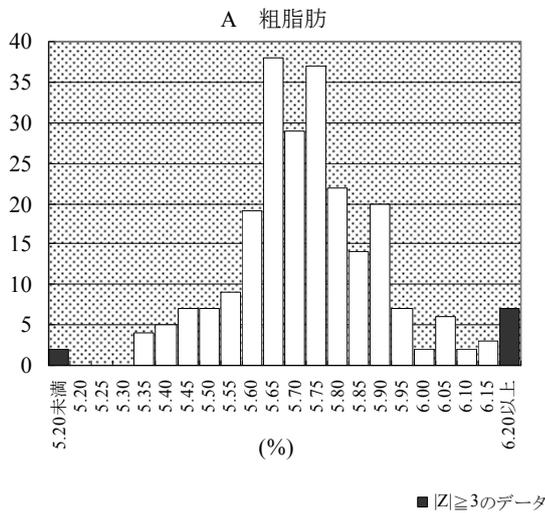


図3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

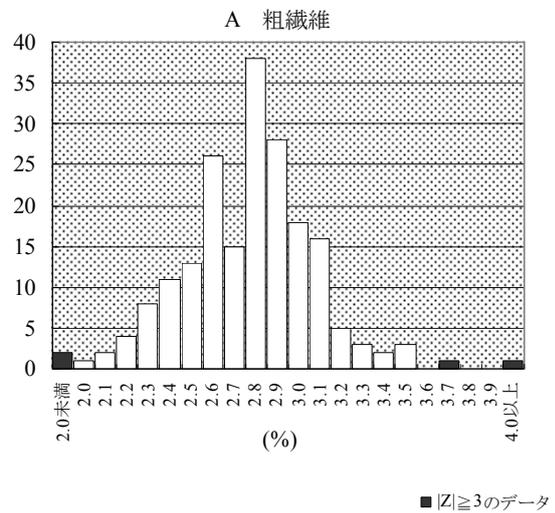


図4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

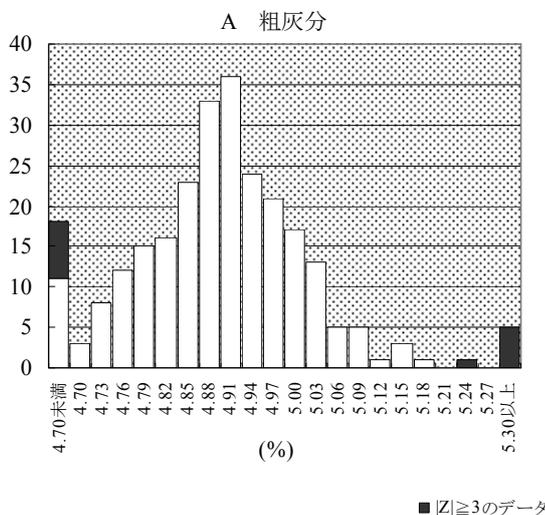


図5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

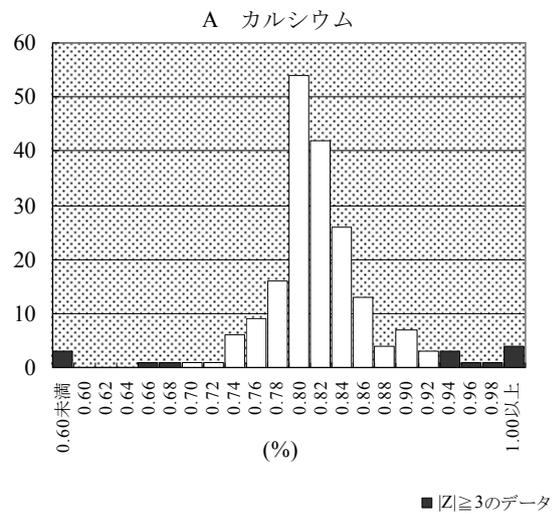


図6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

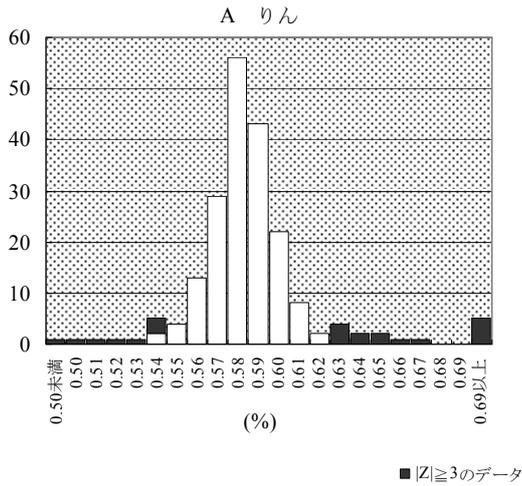


図7 りんの分析成績 (A 試料)

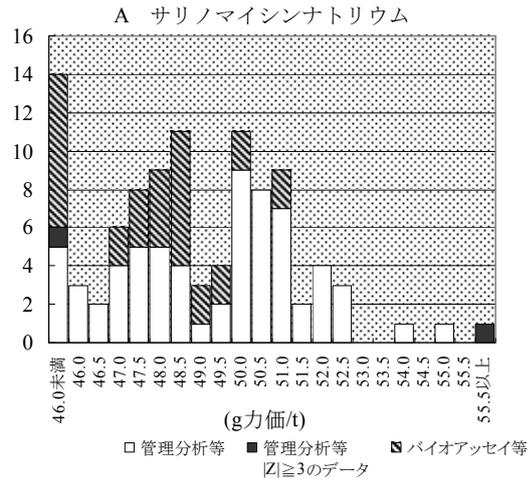


図8 サリノマイシンナトリウムの分析成績 (A 試料)

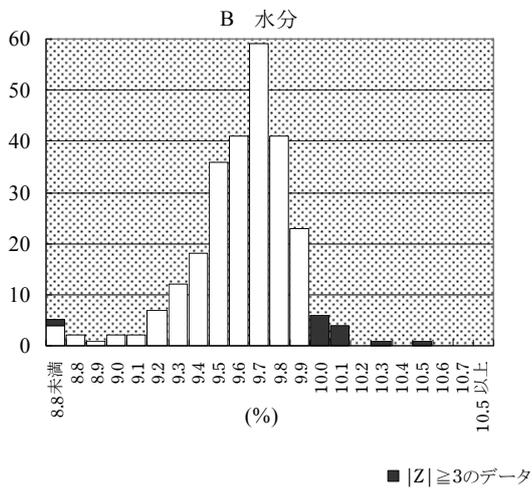


図9 水分の分析成績 (B 試料)

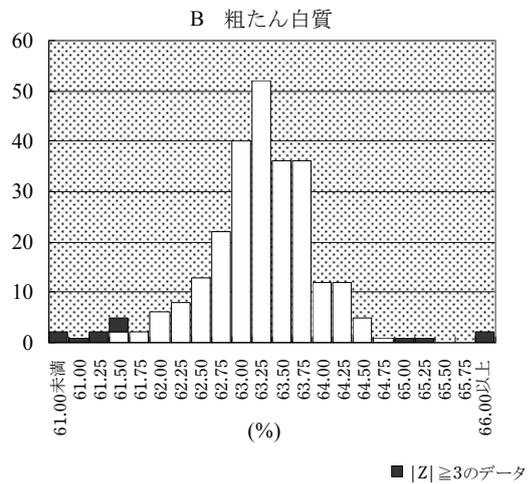


図10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

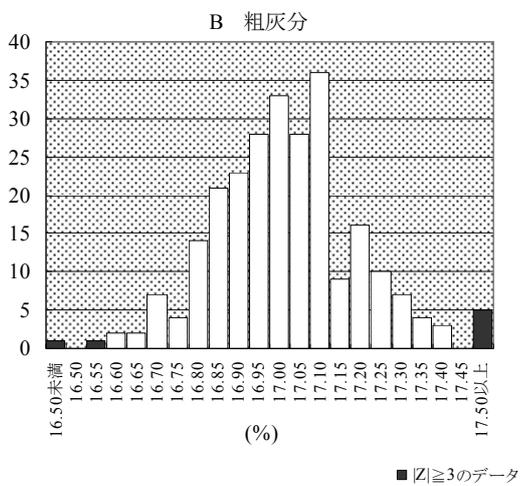


図11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

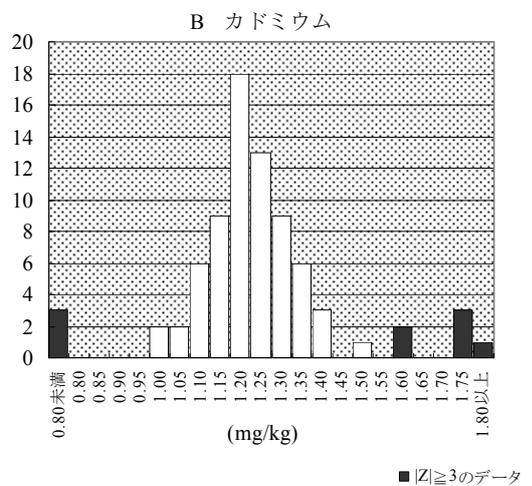
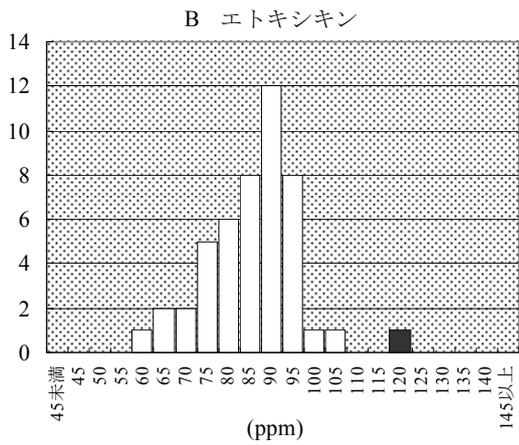
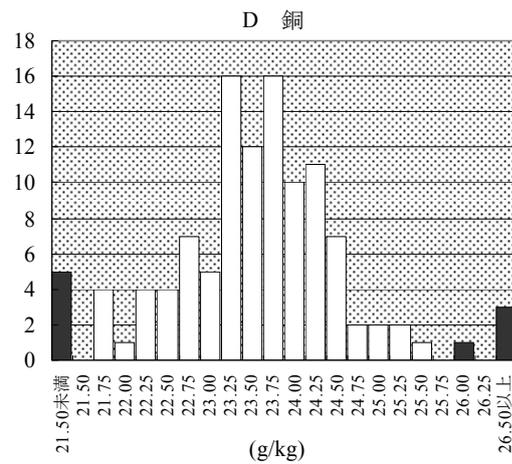


図12 カドミウムの分析成績 (B 試料)



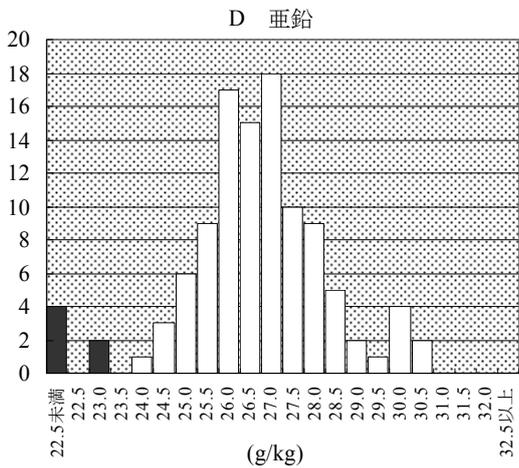
■ |Z|≥3のデータ



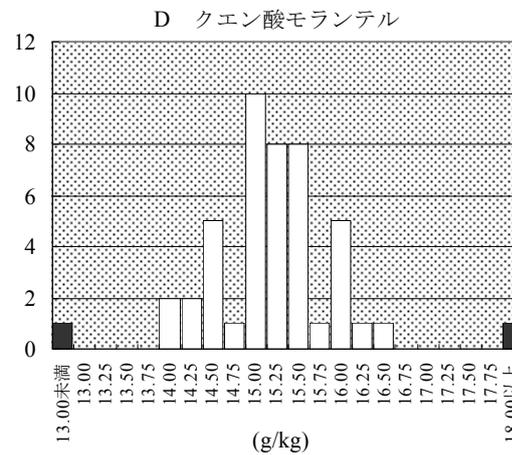
■ |Z|≥3のデータ

図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

図 14 銅の分析成績 (D 試料)



■ |Z|≥3のデータ



■ |Z|≥3のデータ

図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

図 16 クエン酸モランテルの分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分
データ数	267	266	240	197	260
1 中央値	13.00	24.30	5.75	2.84	4.91
1 下限境界値 ^{注2}	12.22	23.48	5.29	2.02	4.59
1 上限境界値	13.78	25.12	6.20	3.66	5.23
2 平均值	12.98	24.30	5.74	2.82	4.90
2 95%信頼区間	12.94~13.01	24.26~24.34	5.72~5.76	2.78~2.85	4.89~4.91

区 分	カルシウム	りん	SL (管理分析等) ^{注3}	SL (HPLC等) ^{注4}
データ数	196	202	68	32
1 中央値	0.82	0.58	50.00	48.30
1 下限境界値 ^{注2}	0.71	0.54	42.85	43.57
1 上限境界値	0.93	0.62	57.22	53.03
2 平均值	0.82	0.58	49.60	47.80
2 95%信頼区間	0.82~0.83	0.58~0.58	49.1~50.1	47.1~48.5

注 1) 区分 1 の数値は報告のあったデータから算出した結果であり，区分 2 は区分 1 で算出した z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除外して算出した結果である。

2) z スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3) SL (管理分析等) は，サリノマイシンナトリウムの管理分析及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4) SL (HPLC 等) は，サリノマイシンナトリウムの HPLC 法及びバイオアッセイを集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン
データ数	261	259	254	78	47
1 中央値	9.70	63.36	17.03	1.24	89.50
1 下限境界値 ^{注2}	9.10	61.71	16.59	0.93	57.21
1 上限境界値	10.30	65.01	17.47	1.55	121.79
2 平均值	9.69	63.38	17.03	1.24	87.30
2 95%信頼区間	9.67~9.71	63.31~63.45	17.01~17.05	1.22~1.27	84.5~90.2

注 1) 区分 1 の数値は報告のあったデータから算出した結果であり，区分 2 は区分 1 で算出した z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除外して算出した結果である。

2) z スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
データ数	113	108	46
1 中央値	23.70	26.93	15.40
1 下限境界値 ^{注2}	21.36	23.17	13.79
1 上限境界値	26.04	30.69	16.91
2 平均値	23.68	27.08	15.30
2 95%信頼区間	23.53~23.83	26.81~27.35	15.1~15.5

注 1) 区分 1 の数値は報告のあったデータから算出した結果であり、
区分 2 は区分 1 で算出した z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除外して算出した結果である。

2) z スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 原料別検出状況

原 料 名	配合割合 (%)	実 験 室 数				不検出	検出率 (%)
		検 出					
		多量	中量	少量	計		
とうもろこし	25	156	2	0	158	1	99
マ イ ロ	18	64	86	9	159	0	100
ラ イ 麦	18	89	58	5	152	7	96
米ぬか油かす	8	0	55	36	91	68	57
ふ す ま	8	13	100	17	130	29	82
大 豆 油 か す	8	10	129	12	151	8	95
魚 粉	8	1	30	122	153	6	96
アルファルファミール	3	0	11	118	129	30	81
炭酸カルシウム	2	0	4	120	124	35	78
食 塩	2	0	0	138	138	21	87

注) 欄中の多量, 中量, 少量及び検出のみは, 検出の内数である。

表 10 配合したもの以外に検出と報告された原料

検出物名	多量	中量	少量	計
あまに油かす	0	1	0	1
えん麦	0	4	1	5
大麦	0	1	4	5
かき殻	0	1	2	3
かに殻粉末	0	0	2	2
キャッサバ	0	1	0	1
玄米	0	2	4	6
コーングルテンフィード	0	1	2	3
ごま油かす	0	0	5	5
小麦	13	2	5	20
サフラワー油かす	0	2	1	3
スクリーニングペレット	0	0	1	1
チキンミール	0	0	1	1
なたね油かす	0	5	4	9
肉骨粉	0	0	1	1
ビートパルプ	0	0	9	9
ビールかす	0	0	1	1
フェザーミール	0	0	1	1
ホミニーフード	0	1	0	1
やし油かす	0	1	2	3
りん酸カルシウム	0	0	9	9

8 まとめ

(1) A 試料 (ブロイラー肥育前期用配合飼料)

1) 水分

267 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 8 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 12.98%、95%信頼区間が 12.94~13.01%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 262 件、平均値が 12.94%、標準偏差が 0.36%及び相対標準偏差が 2.8%であった。

水分測定器を使用した試験では、データ数が 4 件、平均値が 13.18%、標準偏差が 0.31%及び相対標準偏差が 2.3%であった。

その他に、近赤外分析法によるデータ数が 1 件あった。

2) 粗たん白質

266 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 10 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 24.30%、95%信頼区間が 24.26~24.34%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

硫酸標準液吸収法による試験では、データ数が 31 件、平均値が 24.23%、標準偏差が 0.40%及び相対標準偏差が 1.7%であった。

ほう酸溶液吸収法による試験では、データ数が 56 件、平均値が 24.24%、標準偏差が 0.47%及び相対標準偏差が 1.9%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 171 件、平均値が 24.32%、標準偏差が 0.33%及び相対標準偏差が 1.4%であった。

燃焼法による試験では、データ数が 7 件、平均値が 24.62%、標準偏差が 0.48%及び相対標準偏差が 1.9%であった。

その他に、近赤外分析法によるデータ数が 1 件あった。

3) 粗脂肪

240 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 9 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 5.74%、95%信頼区間が 5.72~5.76%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 180 件、平均値が 5.82%、標準偏差が 0.33%及び相対標準偏差が 5.7%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 59 件、平均値が 5.62%、標準偏差が 0.24%及び相対標準偏差が 4.3%であった。

その他に、近赤外分析法によるデータ数が 1 件あった。

4) 粗繊維

197 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 4 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 2.82%、95%信頼区間が 2.78~2.85%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法による試験では、データ数が 30 件、平均値が 2.79%、標準偏差が 0.22%及び相対標準偏差が 8.1%であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、データ数が 120 件、平均値が 2.73%、標準偏差が 0.32%及び相対標準偏差が 12%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 46 件、平均値が 3.04%、標準偏差が 0.26%及び相対標準偏差が 8.6%であった。

その他に、近赤外分析法によるデータ数が 1 件あった。

5) 粗灰分

260 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 13 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 4.90%、95%信頼区間が 4.89~4.91%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による分析では、データ数が 256 件、平均値が 4.90%、標準偏差が 0.14%及び相対標準偏差が 2.9%であった。

その他に、近赤外分析法や実施要領とは異なる灰化方法で分析したデータ等が 4 件あった。

6) カルシウム

196 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 14 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 0.82%、95%信頼区間が 0.82~0.83%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

しゅう酸アンモニウム法による分析では、データ数が 39 件、平均値が 0.82%、標準偏差が 0.08%及び相対標準偏差が 9.2%であった。

原子吸光光度法による分析では、データ数が 148 件、平均値が 0.82%、標準偏差が 0.06%及び相対標準偏差が 7.3%であった。

その他に、近赤外分析法や ICP 法等によるデータ数が 9 件あった。

7) りん

202 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 20 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 0.58%、95%信頼区間が 0.58~0.58%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 194 件、平均値が 0.59%、標準偏差が 0.04%及び相対標準偏差が 7.2%であった。

その他に、近赤外分析法や ICP 法等によるデータ数が 8 件あった。

8) サリノマイシンナトリウム

今回の試験ではサリノマイシンナトリウム無添加試料の配布がなく、その差を差し引くことになっていないため、管理分析及びフローインジェクションによる試験と HPLC 及びバイオアッセイによる試験とで差が生じることが考えられ、両者を分けて集計した。

管理分析及びフローインジェクションによる試験では、68 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 4 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 49.6 g(力価)/トン、95%信頼区間が 49.1~50.1 g(力価)/トンであった。

HPLC 及びバイオアッセイによる試験では、32 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上のデータはなかった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 47.8 g(力価)/トン、95%信頼区間が 47.1~48.5 g(力価)/トンであった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

管理分析法による試験では、データ数が 59 件、平均値が 49.3 g(力価)/トン、標準偏差が 3.4 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 6.9%であった。

フローインジェクション法による試験では、データ数が 9 件、平均値が 49.6 g(力価)/トン、標準偏差が 1.9 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 3.9%であった。

HPLC 法による試験では、データ数が 25 件、平均値が 47.6 g(力価)/トン、標準偏差が 2.2 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 4.6%であった。

バイオアッセイによる試験では、データ数が 7 件、平均値が 48.5 g(力価)/トン、標準偏差が 0.9 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 1.9%であった。

(2) B 試料 (魚粉)

1) 水分

261 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 11 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 9.69%、95%信頼区間が 9.67~9.71%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 256 件、平均値が 9.65%、標準偏差が 0.29%及び相対標準偏差が 3.1%であった。

水分測定器を用いた試験では、データ数が 4 件、平均値が 9.92%、標準偏差が 0.25%及び相対標準偏差が 2.6%であった。

その他に、近赤外分析法によるデータ数が 1 件あった。

2) 粗たん白質

259 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 12 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 63.38%、95%信頼区間が 63.31~63.45%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では、データ数が 28 件、平均値が 63.14%、標準偏差が 1.70%及び相対標準偏差が 2.7%であった。

飼料分析基準・ほう酸溶液吸収法による試験では、データ数が 55 件、平均値が 63.23%、標準偏差が 0.80%及び相対標準偏差が 1.3%であった。

自動分析機を用いた試験では、データ数が 168 件、平均値が 63.28%、標準偏差が 1.15%及び相対標準偏差が 1.8%であった。

燃焼法による試験では、データ数が 8 件、平均値が 64.77%、標準偏差が 1.66%及び相対標準偏差が 2.6%であった。

3) 粗灰分

254 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 7 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 17.03%、95%信頼区間が 17.01~17.05%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 252 件、平均値が 17.06%、標準偏差が 0.31%及び相対標準偏差が 1.8%であった。

その他に、近赤外分析法等によるデータ数が 2 件あった。

4) カドミウム

78 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 9 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 1.24 mg/kg、95%信頼区間が 1.22~1.27 mg/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

溶媒抽出法による試験では、データ数が 36 件、平均値が 1.29 mg/kg、標準偏差が 0.22 mg/kg 及び相対標準偏差が 17%であった。

簡易法による試験では、データ数が 36 件、平均値が 1.24 mg/kg、標準偏差が 0.16 mg/kg 及び相対標準偏差が 13%であった。

その他に、ICP 等によるデータ数が 6 件あった。

5) エトキシキン

47 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 1 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 87.3 mg/kg、95%信頼区間が 84.5~90.2 mg/kg であった。

なお、分析方法は全て飼料分析基準（HPLC 法）による試験であり、標準偏差が 11.1 mg/kg 及び相対標準偏差が 13%であった。

(3) D 試料（プレミックス）

1) 銅

113 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 9 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 23.68 g/kg、

95%信頼区間が 23.53~23.83 g/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 109 件、平均値が 23.68 g/kg、標準偏差が 1.18 g/kg 及び相対標準偏差が 5.0%であった。

その他に、ICP 法等によるデータ数が 4 件あった。

2) 亜鉛

108 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 5 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 27.08 g/kg、95%信頼区間が 26.81~27.35 g/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 104 件、平均値が 26.86 g/kg、標準偏差が 1.70 g/kg 及び相対標準偏差が 6.3%であった。

その他に、ICP 法等によるデータ数が 4 件あった。

3) クエン酸モランテル

46 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による z スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 2 件であった。z スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 15.3 g/kg、95%信頼区間が 15.1~15.5 g/kg であった。

なお、分析方法は全て飼料分析基準（HPLC 法）による試験であり、標準偏差が 1.0 g/kg 及び相対標準偏差が 6.6%であった。

(4) C 試料（鑑定用試料）

鑑定

配合された原料（10 種類）の検出とその配合割合の推定を行うこととした。159 実験室より報告があり、配合した 10 種類の他に 21 種類の原料が報告された。

配合した原料について、とうもろこし（配合率 25%）では、158 実験室（検出率 99%）から報告があり、その内訳は多量（15%以上、以下同じ）と報告した実験室が 156、中量（5~15%、以下同じ）と報告した実験室が 2 であった。

マイロ（配合率 18%）では、159 実験室（検出率 100%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 64、中量と報告した実験室が 86、少量と報告した実験室が 9 であった。

ライ麦（配合率 18%）では、152 実験室（検出率 96%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 89、中量と報告した実験室が 58、少量と報告した実験室が 5 であった。

米ぬか油かす（配合率 8%）では、91 実験室（検出率 57%）から報告があり、その内訳は、中量と報告した実験室が 55、少量と報告した実験室が 36 であった。

ふすま（配合率 8%）では、130 実験室（検出率 82%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 13、中量と報告した実験室が 100、少量と報告した実験室が 17 であった。

大豆油かす（配合率 8%）では、151 実験室（検出率 95%）から報告があり、その内訳は

多量と報告した実験室が 10, 中量と報告した実験室が 129, 少量と報告した実験室が 12 であった.

魚粉 (配合率 8%) では, 153 実験室 (検出率 96%) から報告があり, その内訳は多量と報告した実験室が 1, 中量と報告した実験室が 30, 少量と報告した実験室が 122 であった.

アルファルファ (配合率 3%) では, 129 実験室 (検出率 81%) から報告があり, その内訳は中量と報告した実験室が 11, 少量と報告した実験室が 118 であった.

炭酸カルシウム (配合率 2%) では, 124 実験室 (検出率 78%) から報告があり, その内訳は中量と報告した実験室が 4, 少量と報告した実験室が 120 であった.

食塩 (配合率 2%) では, 138 実験室 (検出率 87%) から報告があり, 全ての実験室がは少量と報告した.

誤って検出したものについては, 小麦が最も多く, 20 実験室から報告があった. 次いで, なたね油かす, ビートパルプ及びりん酸カルシウムが多く, 9 実験室から報告された.

文 献

- 1) Michael Thompson, Roger Wood: Pure Appl. Chem., 65, 2123 (1993).

(参考)

第31回飼料の共通試料による分析鑑定実施要領

1 目的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物業者、民間分析機関等を対象に飼料等の共通試料による分析鑑定を行い、分析及び鑑定技術の維持向上を図り、併せて分析誤差を推定し、飼料等の製造及び品質管理の適正な実施に資する。

2 共通試料の内容

A 試料…ブロイラー肥育前期用配合飼料

B 試料…魚粉

C 試料…飼料原料鑑定用調製試料

D 試料…子豚育成用プレミックス

3 分析・鑑定項目

A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、りん及びサリノマイシンナトリウム

B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・10種類の原料の配合割合の推定

D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

4 分析・鑑定要領

(1) 試料の分析・鑑定方法は、「飼料分析基準」（平成7年11月15日付け7畜B第1660号畜産局長通知）に定める方法及び「サリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法」（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について（昭和53年9月5日付け53畜B第2173号畜産局長通知）の別記）に準拠してください。

なお、参考までに分析法を添付します。

また、各分析方法の末尾に、分析試料採取量等の一例を記載しました。

(2) 上記3に示した分析・鑑定項目のうち、各実験室において実施可能な項目（1項目でも可）について分析・鑑定を行い、報告してください。

(3) サリノマイシンナトリウムについて、微生物学的定量法による分析が可能な実験室は、参考までに、微生物学的定量法により分析を実施するようお願いします。

(4) B試料のエトキシキンの分析における標準品は、今回配布されたものを使用してください。（標準品は冷蔵庫で保管してください。）

(5) 試料は冷蔵庫で保管して、常温に戻してから使用してください。

(6) 複数の方法（例えば粗たん白質のケルダール法及び燃焼法）で分析を実施した場合は複数のデータの報告をお願いします。

5 分析鑑定成績の報告

(1) 報告は「第 31 回飼料の共通試料による分析鑑定成績報告書」の様式により、分析又は鑑定を実施した項目について記入し、報告してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びりんについては%で、サリノマイシンナトリウムについては g(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについては g/kg で、カドミウム、エトキシキンについては g/トンで表してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、りん、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は小数点以下第 3 位を四捨五入して同第 2 位まで記入、サリノマイシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第 2 位を四捨五入して同第 1 位まで記入してください。

分析方法及び使用した分析機器等を備考欄の該当する番号に○印を付し、その詳細を様式に従って記載してください。

また、分析上の特記事項があれば、その旨も記載してください。

なお、参考のため、クエン酸モランテル及びエトキシキンについては、標準液及び試料溶液のクロマトグラムを各 1 部添付してください。

(3) 鑑定成績は、検出物欄に検出した原料名を分析鑑定成績報告書(4)の語群から選んで記入し、配合割合を推定し、多量(15%以上)、中量(5~15%)及び少量(5%以下)欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出物欄に記入しないでください。

なお、C 試料には 10 種類の原料を配合しています。

検出方法を検出方法欄の該当する番号に○印を付してください。(複数可)

(4) 一部の成分を別の事業所(研究所等)で実施した場合は、その事業所名を備考欄に記入してください。

(5) 報告書の提出期限及び送付先

平成 18 年 10 月 6 日(金)

【以下略】

第 31 回飼料の共通試料による分析鑑定成績報告書 (様式)

実験室名 _____

TEL _____

担当者 _____

(1) A 試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.水分測定器 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (硫酸標準液吸収法) 2.飼料分析基準 (ほう酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ()
粗脂肪	(%)	1.飼料分析基準 2.自動分析機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ()
粗繊維	(%)	1.飼料分析基準 (静置法) 2.飼料分析基準 (ろ過法) 3.自動分析機 (メーカー) (型式) 4.その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
カルシウム	(%)	1.飼料分析基準 (しゅう酸アンモニウム法) 2.飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3.その他の方法 ()
りん	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
サリノマイ シン ナトリウム	(g(カ匁)/トン)	1.迅速定量法 2.迅速定量法 (フローインジェクション法) 3.HPLC法 (参考) (g(カ匁)/トン) H P L C (メーカー名) (型式) 検 出 器 (メーカー名) (型式) カ ラ ム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 微生物学的定量法 (参考) (g(カ匁)/トン)

(2) B試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.水分測定機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (硫酸標準液吸収法) 2.飼料分析基準 (ほう酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
カドミウム	(ppm)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
エトキシキン	(ppm)	1.飼料分析基準 測定条件 HPLC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2.その他の方法 ()

(3) D試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
亜鉛	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ()
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1.飼料分析基準 測定条件 HPLC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2.その他の方法 ()

(4) C試料 鑑定成績

試料番号

検出物 (語群から選択して下さい)	配合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()

注) 10種類の原料が配合されています。 多量…15%以上、中量…5～15%、少量…1～5%

検出物の語群

あまに油かす	魚粉	サフラワー油かす	なたね油かす	麦ぬか
アルファルファミール	玄米	食塩	肉骨粉	綿実油かす
えん麦	コーングルテンフィード	スクリーニングペレット	ビートパルプ	やし油かす
大麦	コーングルテンミール	ゼオライト	ビールかす	ライ麦
かき殻	ごま油かす	大豆油かす	フェザーミール	りん酸カルシウム
かに殻粉末	小麦	炭酸カルシウム	ふすま	
カポック油かす	米ぬか油かす	チキンミール	ホミニーフード	
キャッサバ	小麦粉	とうもろこし	マイロ	

(5) 来年度の実施項目等「飼料の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等があれば記入してください。

調査資料**1 輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレム B のモニタリング等の結果について（平成 18 年度）**

山多 利秋*

1 緒 言

平成 8 年以降、米国から輸入されるライグラスやフェスクの採種後の残かん（以下「ライグラスストロー等」という。）を給与した家畜において、エンドファイト（植物の組織内に寄生ないし共生する菌の総称）産生毒素が原因と考えられる中毒事故が多発している。

ライグラスストロー等は、稲わらの代替品として、主に肉牛の肥育農家で使用されており、ライグラスは年間 20 万トン、フェスクは同 13 万トン程度輸入されている。

独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは、平成 10 年度以降、エンドファイト産生毒素であるエルゴバリン及びロリトレム B の分析法について検討を進め^{1),2)}（平成 13 年に飼料分析基準³⁾に収載）、併せて輸入乾牧草中のエルゴバリン及びロリトレム B のモニタリングを開始した。また、国内でエンドファイト産生毒素による中毒（以下「エンドファイト中毒」という。）を疑う事例が発生した場合の原因究明のため、農林水産省からの依頼を受けてエルゴバリン及びロリトレム B の分析を実施している。

平成 17 年度までに実施したこれらモニタリング及び依頼分析の結果については、既に報告⁴⁾⁻⁶⁾したところであるが、今般、平成 18 年度に実施した結果を同様に取りまとめたので報告する。

なお、ライグラスストロー等の主要産地である米国オレゴン州では、乾牧草の輸出業者組合がオレゴン州立大学に分析依頼を行い、エンドファイト中毒の懸念がある下限濃度とされるエルゴバリン 500 µg/kg、ロリトレム B 1,800 µg/kg 以下のものに限って輸出するよう努めている。

2 結果及び考察**2.1 モニタリング試料**

平成 18 年度に実施したモニタリング結果について、エルゴバリン及びロリトレム B の試験結果を草種別に取りまとめ、表 1 に示した。参考として、平成 10 年度から平成 17 年度までの累計値を併記した。

その結果、ライグラスについては、過去 8 年間の試験結果と比較するとエルゴバリン及びロリトレム B のいずれも検出率及び平均定量値の増加が見られた。なお、個々の試料の試験結果を見ると、エルゴバリンとロリトレム B の定量値の間にほとんど相関は見られなかった。

一方、フェスクについては、エルゴバリン及びロリトレム B のいずれも検出率の増加が見られ、また、エルゴバリンの平均定量値には増加が見られた。

ライグラスとフェスクとを比較すると、過去の試験結果と同様、フェスクにおける検出率が低く、特にロリトレム B において顕著であった。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

表 1 平成 18 年度モニタリング結果

(1) エルゴバリン

	試験点数	検出点数 (検出率 (%))	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 超過点数	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ライグラス 平成18年度	7	7 (100)	1	620	336
(参考) 平成10~17年度累計	128	94 (73)	0	410	69
フェスク 平成18年度	5	4 (80)	2	1,100	592
(参考) 平成10~17年度累計	136	77 (57)	0	400	51

(2) ロリトレム B

	試験点数	検出点数 (検出率 (%))	1,800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 超過点数	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ライグラス 平成18年度	6	5 (83)	0	1,000	803
(参考) 平成10~17年度累計	109	78 (72)	1	1,889	430
フェスク 平成18年度	5	1 (20)	0	11	11
(参考) 平成10~17年度累計	82	11 (13)	0	964	41

2.2 依頼分析試料

平成 18 年度に農林水産省から分析依頼のあったエルゴバリン及びロリトレム B の試験結果 (10 検体) について、モニタリング結果と同様に草種別に取りまとめ、表 2 に示した。参考までに、平成 13 年度から平成 17 年度までの累計値 (65 検体) を併記した。

当該試料は、エンドファイト中毒を疑う家畜事故に係る原因究明のため分析を依頼されたものであるため、モニタリング試料の結果と比較すると検出率及び定量値とも総じて高く、多くの場合において当該家畜事故の一因となった可能性が高いものと思われた。

米国から輸入されるライグラスストロー等を多給するとエンドファイト中毒を引き起こすおそれがあることについては、今般、改めて農林水産省から注意喚起がなされた⁷⁾ところであり、この周知徹底により家畜事故の発生は低減されるものと期待される。

表 2 平成 18 年度依頼試験結果

(1) エルゴバリン

	試験点数	検出点数 (検出率(%))	500 µg/kg 超過点数	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)
ライグラス 平成18年度	10	10 (100)	10	1,800	860
(参考)					
平成13~17年度累計	42	38 (90)	4	1,231	250
フェスク 平成18年度	0				
(参考)					
平成13~17年度累計	23	19 (83)	7	1,230	358

(2) ロリトレム B

	試験点数	検出点数 (検出率(%))	1,800 µg/kg 超過点数	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)
ライグラス 平成18年度	10	10 (100)	3	2,800	1,590
(参考)					
平成13~17年度累計	42	37 (88)	15	3,100	710
フェスク 平成18年度	0				
(参考)					
平成13~17年度累計	23	12 (52)	0	90	17

文 献

- 1) 山多利秋, 菅野 清: 飼料研究報告, 25, 1 (2000).
- 2) 小野雄造, 染谷 潔, 古川 明, 菅野 清: 飼料研究報告, 25, 12 (2000).
- 3) 農林水産省畜産局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 4) 石橋隆幸, 石黒瑛一: 飼料研究報告, 29, 205 (2004).
- 5) 石橋隆幸, 石黒瑛一: 飼料研究報告, 30, 117 (2005).
- 6) 山多利秋: 飼料研究報告, 31, 215 (2006).
- 7) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長及び生産局畜産部畜産振興課長連名通知: “輸入乾牧草の飼料利用について”, 平成 19 年 3 月 19 日, 18 消安第 14023 号 (2007).

調査資料

2 飼料のサルモネラ汚染状況（平成18年度）

千原 哲夫*

A Surveillance of *Salmonella* Contamination in Feeds in 2006

Tetsuo CHIHARA*

(* I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Nagoya Regional Center))

A surveillance of *Salmonella* contamination was conducted on 143 samples of feed ingredients and 167 samples of formula feeds, which were collected from mills of feed ingredient or formula feed. Five samples (3.5%) of feed ingredients and two samples (1.2%) of formula feeds were positive for *Salmonella*. The positive rate of fish meal, feather meal and meat-and-bone meal (derived from pork and poultry) was each 4.2%, 10% and 25%.

Key words: サルモネラ *Salmonella* ; 飼料原料 feed ingredient ; 配合飼料 formula feed ; サルモネラ陽性率 *Salmonella*-positive rate

1 緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは、昭和51年以来、飼料検査業務の一環として飼料原料等を対象にサルモネラ検査を実施し、その結果を年次報告してきた^{1)~32)}。

サルモネラに汚染された飼料の使用によって有害畜産物が生産されること、あるいは家畜等に対する被害によって畜産物の生産が阻害されることを防止する観点に立って、平成10年6月に農林水産省から「飼料製造に係るサルモネラ対策のガイドライン」³³⁾が示された。

また、平成10年度から平成14年度にかけて「飼料の安全性確保調査指導事業」を実施し、この中で飼料原料及び配合飼料を対象としたサルモネラのモニタリング調査を行い、その結果を報告してきた^{34), 35)}。

この事業を通じたサルモネラ汚染防止対策等の指導により、配合飼料及び飼料原料におけるサルモネラの年度別（平成10~14年度）の陽性率は5%台から1%台にまで減少した³⁵⁾。一方、平成15年度の陽性率は3.5%³⁰⁾で、平成10~14年度の総陽性率3.4%³⁵⁾と同程度であったが、平成16年度は2.0%³¹⁾、平成17年度は1.5%³²⁾と減少した。今回、平成18年度のサルモネラ汚染状況を取りまとめたので、その概要を報告する。

2 材料及び方法

2.1 材 料

平成18年4月から平成19年3月までに、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消

* 独立行政法人肥飼料検査所本部，現（独）農林水産消費安全技術センター名古屋センター

費安全技術センター)本部,同札幌事務所(現 同札幌センター),同仙台事務所(現 同仙台センター),同名古屋事務所(現 同名古屋センター),同大阪事務所(現 同神戸センター大阪事務所)及び同福岡事務所(現 同福岡センター)が,各管内の飼料原料工場及び配合飼料工場で採取した飼料原料 143 検体(国産 140 検体,輸入 3 検体)及び配合飼料 167 検体(すべて国産)をモニタリング対象とした。

2.2 方法

飼料分析基準³⁶⁾に基づき,次の手順でサルモネラを同定した。

なお,サルモネラの陽性,陰性の判定(①~④)までは本部並びに各事務所が,分離したサルモネラの血清型別(⑤)は本部が行った。

- ① 検体 25g を緩衝ペプトン水 250 mL に入れ, 35~37°C で 18~24 時間前増菌培養した。
- ② 前増菌培養液 10 mL をセレナイトシスチン培地(Difco)及びハーナ・テトラチオン酸塩培地(栄研化学)各 100 mL にそれぞれ加え, 41~43°C で 18~24 時間選択増菌培養した。
- ③ 各選択増菌培養液 1 白金耳ずつを DHL 寒天培地(栄研化学), ブリリアントグリーン寒天培地(Difco)及びクロモアガーサルモネラ寒天培地(CHROMagar)(またはランバック寒天培地(Merck))にそれぞれ画線塗末し, 35~37°C で 18~24 時間選択分離培養した。
- ④ 各選択分離培地上のサルモネラと疑われる集落は, TSI 寒天培地(Difco), SIM 寒天培地(栄研化学)及びリジン脱炭酸試験用培地(Difco)を用い, その生化学的性状を確認し, 更にサルモネラ各 O 群血清(デンカ生研)との凝集の有無により, 陽性, 陰性を判定した。
- ⑤ 分離したサルモネラは, サルモネラ H 血清(デンカ生研)を用い, 血清型別した。

3 結果及び考察

3.1 飼料原料の陽性率

1) 種類別の陽性率

モニタリングした飼料原料の種類別の陽性率を Table 1 に示した。

飼料原料は, 143 検体中 5 検体が陽性で, その陽性率は 3.5%であった。陽性率は, 前々年度の 2.9%, 前年度の 2.5%に比べて高くなった。

飼料原料の区分別の陽性率は, 動物質性飼料が 4.5% (前々年度 3.2%, 前年度 3.2%)であった。一方, 植物性油かす類(前々年度 0%, 前年度 0%), そうこう類(前々年度 0%, 前年度 0%)等は, すべて陰性であった。

飼料原料の種類別の陽性率は, 平成 17 年 4 月に使用解禁³⁷⁾となり, 今年度初めて採取した豚・鶏原料混合肉骨粉が 25%, フェザーミールが 10% (前々年度 0%, 前年度 10%), 魚粉が 4.2% (前々年度 3.8%, 前年度 0%)と高くなった。一方, 陽性率が前々年度 3.8%, 前年度 12%であったチキンミールを含む, その他の飼料原料等は, すべて陰性であった。

なお, 牛に由来する肉骨粉は, 平成 13 年 10 月から BSE 防止対策のため, 飼料として利用できない³⁷⁾ことから採取していない。

Table 1 Salmonella-positive rate of feed ingredients in 2006

Feed ingredient	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Animal protein feed			
Fish meal	72	3	4.2
Poultry by-product meal	18	0	0
Feather meal	10	1	10
Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	4	1	25
Fish extraction processed by enzyme	2	0	0
Fish meal and soybean meal mixed feed	2	0	0
Feather meal and soybean meal mixed feed	1	0	0
Fish scales extraction	1	0	0
Fish soluble absorbed feed	1	0	0
Meat and bone meal (derived from pork)	1	0	0
Subtotal	112	5	4.5
Oil seed meal			
Soybean meal	9	0	0
Rapeseed meal	5	0	0
Palm kernel meal	1	0	0
Sesame meal	1	0	0
Molasses absorbed feed	1	0	0
Subtotal	17	0	0
Bran and food processing by-product			
Wheat bran	7	0	0
Rice bran	2	0	0
Defatted rice bran	1	0	0
Soy sauce cake	1	0	0
Potato pulp	1	0	0
Subtotal	12	0	0
Other			
Wheat flour	1	0	0
Cacao husks	1	0	0
Subtotal	2	0	0
Total	143	5	3.5

2) 産地別の陽性率

モニタリングした飼料原料の産地別の陽性率を Table 2 に示した。

国内製造品の陽性率は 3.6%であり、前々年度の 3.1%、前年度の 2.7%に比べて高くなった。一方、3 検体あった輸入品は、前々年度、前年度と同様、陰性であった。

国内製造品の種類別の陽性率は、魚粉が 4.2%（前々年度 4.0%、前年度 0%）、フェザーミールが 10%（前々年度 0%、前年度 10%）であった。一方、陽性率が前々年度 3.8%、前年度 12%で

あったチキンミールは、すべて陰性であった。

Table 2 Isolation of *Salmonella* from domestic and imported feed ingredients

District or country	Number of samples positive for <i>Salmonella</i> / Number of samples examined									
	Animal protein feed			Oil seed meal			Brans and food processing by-product			
	Fish meal	Poultry by-product meal	Others	Soybean meal	Rapeseed meal	Others	Wheat bran	Rice bran	Others	Total (Positive rate)
Domestic product										
Hokkaido	0/7	0/1	0/2		0/1				0/1	0/12 (0%)
Tohoku	0/9	0/3	0/2		0/1		0/1			0/16 (0%)
Kanto/Ko-Shin-Etsu	0/12	0/1	0/1	0/2		0/1	0/1	0/2	0/1	0/21 (0%)
Chubu/Tokai/Hokuriku	1/16			0/3	0/2	0/1	0/2	0/1		1/25 (4.0%)
Kinki	1/4	0/1	0/1				0/2			1/8 (12.5%)
Chugoku/Shikoku	0/12	0/5	0/4	0/1	0/1					0/23 (0%)
Kyushu/Okinawa	1/12	0/7	2/12	0/1			0/1			3/33 (9.1%)
Subtotal	3/72	0/18	2/22	0/7	0/5	0/2	0/7	0/3	0/2	5/138
(Positive rate)	(4.2%)	(0%)	(9.1%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(3.6%)
Import										
India				0/2						0/2 (0%)
Malaysia						0/1				0/1 (0%)
Subtotal				0/2		0/1				0/3
(Positive rate)				(0%)		(0%)				(0%)
Total	3/72	0/18	2/22	0/9	0/5	0/3	0/7	0/3	0/2	5/141
(Positive rate)	(4.2%)	(0%)	(9.1%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(3.5%)

3) 出荷形態別の陽性率

モニタリングした飼料原料の出荷形態別の陽性率を Table 3 に示した。

飼料原料の出荷形態別の陽性率は、トランスバッグ等の大型輸送容器品が 5.3% (前々年度 1.7%, 前年度 4.6%) , 紙袋等の包装品が 4.2% (前々年度 3.3%, 前年度 0%) であった。一方、陽性率が、前々年度 3.9%, 前年度 2.0% であったバラ積み等の無包装品は、すべて陰性であった。

3.2 配合飼料の陽性率

1) 種類別の陽性率

モニタリングした配合飼料の種類別の陽性率を Table 4 に示した。

配合飼料は 167 検体のうち 2 検体が陽性で、その陽性率は 1.2% (前々年度 1.2%, 前年度 0.6%) であった。

配合飼料の種類別の陽性率は、鶏用及びブロイラー用 (うずら用 2 検体を含む。) が 1.8% (前々年度 0%, 前年度 1.6%) , 豚用が 1.8% (前々年度 0%, 前年度 0%) であった。一方、陽性率が、前々年度 3.2%, 前年度 0% であった牛用は、すべて陰性であった。

Table 3 Salmonella-positive rate of feed ingredients by packing forms

Feed ingredient	Packing form	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Animal protein feed				
Fish meal	Bulk cargo ^{a)}	16	0	0
	Container bag ^{b)}	42	2	4.8
	Sealed bag ^{c)}	14	1	7.1
Poultry by-product meal	Bulk cargo	4	0	0
	Container bag	14	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	4	0	0
	Container bag	15	2	13
	Sealed bag	3	0	0
Subtotal	Bulk cargo	24	0	0
	Container bag	71	4	5.6
	Sealed bag	17	1	5.9
Oil seed meal				
Soybean meal	Bulk cargo	7	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	2	0	0
Rapeseed meal	Bulk cargo	4	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Subtotal	Bulk cargo	12	0	0
	Container bag	2	0	0
	Sealed bag	3	0	0
Bran and food processing by-product				
Wheat bran	Bulk cargo	4	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	3	0	0
Rice bran	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	2	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	0	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Subtotal	Bulk cargo	5	0	0
	Container bag	3	0	0
	Sealed bag	4	0	0
Total	Bulk cargo	41	0	0
	Container bag	76	4	5.3
	Sealed bag	24	1	4.2

a) Loading weight: 1,000 kgs~

b) Packing weight: 120~1,000 kgs

c) Packing weight: 3~25 kgs

Table 4 *Salmonella*-positive rate of formula feeds

Formula feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Chicken and broiler	55	1	1.8
Swine	57	1	1.8
Cattle	55	0	0
Total	167	2	1.2

2) 出荷形態別の陽性率

モニタリングした配合飼料の出荷形態別の陽性率を Table 5 に示した。

配合飼料の出荷形態別の陽性率は、トランスバック等の大型輸送容器品 1.7% (前々年度 0%, 前年度 0%) , 紙袋等の包装品が 1.3% (前々年度 1.9%, 前年度 3.2%) であった。一方、バラ積み等の無包装品は、前々年度、前年度と同様、すべて陰性であった。

Table 5 *Salmonella*-positive rate of formula feeds by packing forms

Formula feed	Packing form	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Chicken and broiler	Bulk cargo ^{a)}	15	0	0
	Container bag ^{b)}	10	1	10
	Sealed bag ^{c)}	30	0	0
Swine	Bulk cargo	9	0	0
	Container bag	26	0	0
	Sealed bag	22	1	4.5
Cattle	Bulk cargo	3	0	0
	Container bag	24	0	0
	Sealed bag	28	0	0
Total	Bulk cargo	27	0	0
	Container bag	60	1	1.7
	Sealed bag	80	1	1.3

a) Loading weight: 1,000 kgs~

b) Packing weight: 500~1,250 kgs

c) Packing weight: 10~20 kgs

3) 配合飼料の加工形態別の陽性率

モニタリングした配合飼料の加工形態別の陽性率を Table 6 に示した。

配合飼料の加工形態別の陽性率は、マッシュ等の非加熱加工飼料が 1.6% (前々年度 0.7%, 前年度 0.7%) であった。一方、ペレット等の加熱加工飼料 (前々年度 3.7%, 前年度 0%) は、前々年度 1 検体が陽性であったが、すべて陰性であった。

Table 6 *Salmonella*-positive rate of thermal processed formula feeds

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Thermally processed ^{a)}	40	0	0
Not thermally processed ^{b)}	127	2	1.6

a) Feeds example; Pellet, Crumble, Pellet & flake

b) Feeds example; Mash, Bulky, Mash & flake

3.3 ギ酸製剤等添加飼料の陽性率

飼料の品質低下を防止する目的で、ギ酸製剤あるいはギ酸・プロピオン酸製剤を添加する飼料原料及び配合飼料がある。今年度、モニタリングした飼料の中には、これらを添加した飼料原料はなかったが、ギ酸製剤あるいはギ酸・プロピオン酸製剤を添加した配合飼料があった。これらの陽性率を Table 7 に示した。

配合飼料 167 検体のうち、豚用 5 検体はギ酸製剤のみを 0.005~0.031% 添加し、豚用 1 検体はギ酸製剤を 0.0016%、プロピオン酸製剤を 0.002% 添加していたが、前々年度、前年度と同様、すべて陰性であった。

Table 7 *Salmonella*-positive rate of feeds added formic acid and propionic acid

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Positive rate (%)
Feed ingredient			
Added acids	0	0	0
Not added acids	143	5	3.5
Formula feed			
Added acid ^{a), b)}	6 ^{c)}	0	0
Not added acid	161	2	1.2

a) Formic acid was added by the density of 0.005~0.031%.

b) Formic acid and propionic acid were each added by the density of 0.0016% and 0.002%.

c) For swine

3.4 陽性検体のサルモネラの血清型

サルモネラが陽性であった魚粉 3 検体、フェザーミール 1 検体、豚・鶏原料混合肉骨粉 1 検体及び配合飼料 2 検体から分離した血清型を Table 8 に示した。

陽性検体から分離した血清型は 6 種類であった。このうち、豚・鶏原料混合肉骨粉 1 検体から 3 種類の血清型を分離したが、その他の検体から分離した血清型は 1 種類のみであった。なお、配合飼料 1 検体から分離したサルモネラは同定不能であった。

S. Senftenberg は前々年度、前年度にも、また *S. Tennessee* は前年度にも飼料から分離されている。

なお、国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報 ³⁸⁾ によれば、これら 6 血清型は、過去 6 年間に国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としての血清型リストに掲載されており、注意が必要であると考えられた。

Table 8 Serotypes isolated in a *Salmonella*-positive sample

Serotype	Number of samples <i>Salmonella</i> -positive				Total
	Fish meal	Feather meal	Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	Formula feed	
<i>S. Amsterdam</i>		1			1
<i>S. Gaminara</i>			1		1
<i>S. Livingstone</i>				1	1
<i>S. Mbandaka</i>			1		1
<i>S. Senftenberg</i>	2		1		3
<i>S. Tennessee</i>	1				1
Unknown				1	1
Total	3	1	3	2	9

4 まとめ

平成 18 年度の飼料のサルモネラ汚染状況は次のとおりであった。

- 1) 飼料原料は、143 検体中 5 検体が陽性であった（陽性率 3.5%）。
- 2) 飼料原料別の陽性率は、豚・鶏原料混合肉骨粉が 25%、フェザーミールが 10%、魚粉が 4.2% であり、その他の飼料原料は、すべて陰性であった。
- 3) 飼料原料の産地別の陽性率は、国内製造品が 3.6%、輸入品が 0% であった。
- 4) 飼料原料の出荷形態別の陽性率は、無包装品が 0%、大型輸送容器品が 5.3%、包装品が 4.3% であった。
- 5) 配合飼料は、167 検体中 2 検体が陽性であった（陽性率 1.2%）。
- 6) 配合飼料の出荷形態別の陽性率は、無包装品が 0%、大型輸送容器品が 1.7%、包装品が 1.3% であった。
- 7) ペレット等の加熱加工飼料は、すべて陰性であった。
- 8) ギ酸製剤等が添加された配合飼料は、すべて陰性であった。
- 9) 陽性検体から 6 血清型のサルモネラを分離した。

文 献

- 1) 吉村治郎：飼料研究報告，5，158 (1979).
- 2) Yoshimura, H., Nakamura, H., Sato, S. : National Institute of Animal Health Quarterly, 19, 107 (1979).
- 3) 菅野 清，安倍豊子，小山敬之：飼料研究報告，6，134 (1980).
- 4) 菅野 清，千原哲夫，草間豊子，小山敬之：飼料研究報告，7，161 (1981).
- 5) 菅野 清，千原哲夫，草間豊子，小山敬之：飼料研究報告，8，144 (1983).
- 6) 菅野 清，山谷昭一，千原哲夫，草間豊子，松原伊左夫：飼料研究報告，9，136 (1984).
- 7) 千原哲夫，松原伊左夫，山谷昭一，菅野 清，草間豊子：飼料研究報告，10，100 (1985).
- 8) 菅野 清，山谷昭一，千原哲夫，草間豊子，松原伊左夫，小山敬之，大宅辰夫，佐藤静夫：畜産の研究，39，29 (1985).

- 9) 千原哲夫, 山谷昭一, 松原伊左夫, 浅木仁志, 草間豊子, 菅野 清, 小山敬之: 飼料研究報告, 11, 200 (1986).
- 10) 千原哲夫, 鳶田秀一, 草間豊子, 浅木仁志, 松原伊左夫, 山谷昭一, 菅野 清, 小山敬之: 飼料研究報告, 12, 222 (1987).
- 11) 木下光明, 鳶田秀一, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 千原哲夫, 小山敬之: 飼料研究報告, 13, 131 (1988).
- 12) 木下光明, 鳶田秀一, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 千原哲夫, 小山敬之: 飼料研究報告, 13, 143 (1988).
- 13) 小林利男, 鳶田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明: 飼料研究報告, 14, 107 (1989).
- 14) 小林利男, 鳶田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明: 飼料研究報告, 14, 115 (1989).
- 15) 木下光明, 鳶田秀一, 菅野 清, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 松原伊左夫, 山谷昭一, 千原哲夫, 浅木仁志, 足立吉數, 宮川栄一, 湊 一, 小山敬之: 畜産の研究, 43, 721 (1989).
- 16) 堀切正賀寿, 鳶田秀一, 小林利男, 福本裕二, 佐々木 隆, 小山敬之, 草間豊子: 飼料研究報告, 15, 81 (1990).
- 17) 福本裕二, 草間豊子, 小山敬之, 小林利男, 佐々木 隆, 白戸綾子, 堀切正賀寿: 飼料研究報告, 16, 201 (1991).
- 18) 國分裕之, 小山敬之, 菅野 清, 福本裕二, 金子昌二, 白戸綾子, 佐々木 隆, 堀切正賀寿: 飼料研究報告, 17, 125 (1992).
- 19) 伊佐まゆみ, 日比野 洋, 金子昌二, 國分裕之, 福本裕二, 菅野 清, 小山敬之: 飼料研究報告, 18, 102 (1993).
- 20) 平成5年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 50 (1994).
- 21) 平成6年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 58 (1995).
- 22) 平成7年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 52 (1996).
- 23) 平成8年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 51 (1997).
- 24) 原田治良, 佐々木 隆, 杉中 求, 草間豊子, 菅野 清, 尾室義典: 飼料研究報告, 23, 161 (1998).
- 25) 菅野 清, 風間鈴子, 佐々木 隆, 原田治良, 草間豊子: 飼料研究報告, 24, 109 (1999).
- 26) 千原哲夫, 荒木誠士, 工藤尚史, 内山 丈, 草間豊子, 佐々木 隆, 山内智憲, 末藤晴子, 野口 淳, 鬼頭敦司, 阿部文浩, 杉村 靖, 下村正之: 飼料研究報告, 25, 42 (2000).
- 27) 千原哲夫, 荒木誠士, 風間鈴子, 工藤尚史, 日比野 洋, 谷淵久之, 山内智憲, 末藤晴子, 坂上光一, 小森谷敏一, 阿部文浩, 山本克己, 下村正之, 舟津正人, 佐々木 隆, 草間豊子: 飼料研究報告, 26, 69 (2001).
- 28) 小嶋二三夫, 荒木誠士, 風間鈴子, 西村真由美, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 谷淵久之, 日比野 洋, 末藤晴子, 橋本 亮, 小森谷敏一, 千原哲夫, 石田有希恵, 伊藤 潤, 青山恵介, 下村正之, 舟津正人: 飼料研究報告, 27, 155 (2002).
- 29) 小嶋二三夫, 風間鈴子, 西村真由美, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 秋元京子, 日比野 洋, 末藤晴子, 野村哲也, 小森谷敏一, 小宮友紀子, 千原哲夫, 青山恵介, 井上智江, 下村正之, 鬼頭敦司, 松崎 学, 牧野大作, 松崎美由起: 飼料研究報告, 28, 110 (2003).

- 30) 小嶋二三夫, 関口好浩, 山本克己, 西村真由美, 石田有希恵, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 秋元京子, 日比野 洋, 山多晴子, 野村哲也, 杉本泰俊, 橋本仁康, 小森谷敏一, 三井友紀子, 千原哲夫, 中村志野, 井上智江, 吉田知太郎, 鬼頭敦司, 松崎 学, 屋方光則, 牧野大作, 林美紀子, 松崎美由起: 飼料研究報告, **29**, 228 (2004).
- 31) 小嶋二三夫, 遠藤 剛, 山本克己, 西村真由美, 高橋亜紀子, 白澤優子, 古川 明, 福中理絵, 草間豊子, 本 広明, 野村哲也, 杉本泰俊, 橋本仁康, 下村正之, 小森谷敏一, 三井友紀子, 内山 丈, 牧野大作, 青山恵介, 吉田知太郎, 鬼頭敦司, 荒木誠士, 屋方光則, 林 美紀子, 永原貴子, 松崎美由起, 児玉恭子: 飼料研究報告, **30**, 129 (2005).
- 32) 千原哲夫, 関口好浩, 本 広明, 杉本泰俊, 大島慎司, 遠藤 剛, 高橋亜紀子, 松崎美由起, 白澤優子, 山本克己, 森 有希子, 下村正之, 小森谷敏一, 辻 由里子, 内山 丈, 牧野大作, 林 美紀子, 吉田知太郎, 山田美帆, 鬼頭敦司, 屋方光則, 青山恵介, 井上智江, 永原貴子, 野村昌代, 児玉恭子: 飼料研究報告, **31**, 218 (2006).
- 33) 農林水産省畜産局流通飼料課長通知: “飼料製造に係るサルモネラ対策のガイドラインについて”, 平成 10 年 6 月 30 日, 10-12 (1998).
- 34) 米田勝紀: 獣医畜産新報, **54**, 568 (2001).
- 35) 小嶋二三夫, 千原哲夫, 菅野 清, 佐藤 剛: 飼料研究報告, **29**, 236 (2004).
- 36) 農林水産省畜産局長通達: “飼料分析基準の制定について”, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 37) 農林水産省令: “飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”, 昭和 51 年 7 月 24 日, 農林省令第 35 号 (1976).
- 38) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>.

調査資料**3 牛海綿状脳症の発生防止対策等における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果（平成17年度）**

草間 豊子*

1 緒 言

牛海綿状脳症（BSE）の発生防止のため、独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは以前から顕微鏡鑑定による配合飼料中の肉骨粉混入検査を実施してきたが、平成13年9月に国内で牛海綿状脳症が発生したのを契機として、試験研究機関の協力の下、顕微鏡鑑定法¹⁾を補完する手法としてPCR法^{9)~14)}及びELISA法^{15)~17)}による肉骨粉の高感度検出及び動物種の識別法の開発に取り組み、飼料分析法^{2), 3)}として確立し、漸次、国内の飼料のモニタリング検査に適用してきた。

平成13年度にこれらの分析手法による魚粉中の牛・豚由来たん白質等のモニタリングを開始し、平成14年度以降は、国内の動物質性飼料及び牛用配混合飼料について、本格的な動物由来たん白質のモニタリングを実施し、その結果を報告^{5)~8)}してきた。

平成17年度は、飼料製造工程において牛用飼料に鶏豚用飼料原料の動物由来たん白質が混入するいわゆる交差汚染の防止及び、飼料規制の実効性を確認するため、牛用配混合飼料中のモニタリング検査を重点的に実施した。また、飼料原料として、ほ乳動物由来たん白質等が含まれないことについて農林水産大臣確認の必要な動物質性飼料のチキンミール、フェザーミール及び魚粉について、引き続きモニタリング検査を行った。平成17年4月から、豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉の鶏豚用飼料への使用が認められたことから、新たに豚肉骨粉等中の反すう動物由来たん白質について大臣確認に伴うモニタリング検査を開始した。さらに、輸入飼料の監視強化に伴い、輸入の牛用混合飼料や飼料原料についてもほ乳動物由来たん白質及び家きん由来たん白質のモニタリング検査を実施した。

平成16年度のモニタリングにおいて、法令上牛用飼料への使用が認められている乳製品や卵製品の混入により、動物由来たん白質が検出される事例が認められたことから、平成17年度は、試験方法として、乳製品の影響を受けないPCR試験法^{2), 13), 14)}及びELISA試験法^{2), 17)}を導入した。さらに分析法の共同分析を実施し、試験法の妥当性確認及び信頼性の向上を図った。

今回、平成17年度に実施した飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果をとりまとめたので、その概要を報告する。

2 材料及び方法**2.1 試 料**

平成17年4月から平成18年3月までに、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部（さいたま市）、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び福岡事務所（現 同福岡センター）が、国内の飼料原料工場、配

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

混合飼料工場及び港湾倉庫等で採取した動物質性飼料 189 検体，国内製造牛用配混合飼料 216 検体及び輸入牛用飼料 35 検体の併せて 440 検体をモニタリング対象とした。

動物質性飼料としては，国内で製造されたチキンミール及びフェザーミール（以下「チキンミール・血粉等」という），豚由来肉骨粉及び原料混合肉骨粉（以下「豚肉骨粉等」という），並びに魚粉や魚荒かす等（以下「魚粉等」という）を主に収集したが，その他に魚粉等を主体とした養魚用混合飼料やフィッシュソリュブル吸着飼料についても収集し，調査を実施した。

牛用配混合飼料としては，育成用，成牛用を問わず幅広く収集した。なお，脱脂粉乳や乾燥ホエー等の乳製品を 10%以上含む代用乳は，対象から除外した。

輸入飼料は，主に牛用配混合飼料及び牛用（A 飼料）単体飼料を採取した。

試料の採取は，飼料等検査実施要領⁴⁾の病原微生物検査用試料の採取方法に従い，滅菌済み手袋及び滅菌済みスコップを使用し，滅菌済み採取袋に約 500 g を採取した。試料は試験までの間，冷蔵保管した。

2.2 試験実施場所

試験は，それぞれ試料の収集先事務所において実施した。

2.3 方法

試験は，以下に示す 3 法により行った。

1) 顕微鏡鑑定

「反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドライン」¹⁾に従い，図 1 の方法で獣骨・獣毛・羽毛等（以下「肉骨粉等」という）の有無を鑑定した。

なお，牛用配合飼料に肉骨粉を 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 及び 1%添加した鑑定用対照試料を，試料と同時に処理し，肉骨粉等の混入量を推定した。

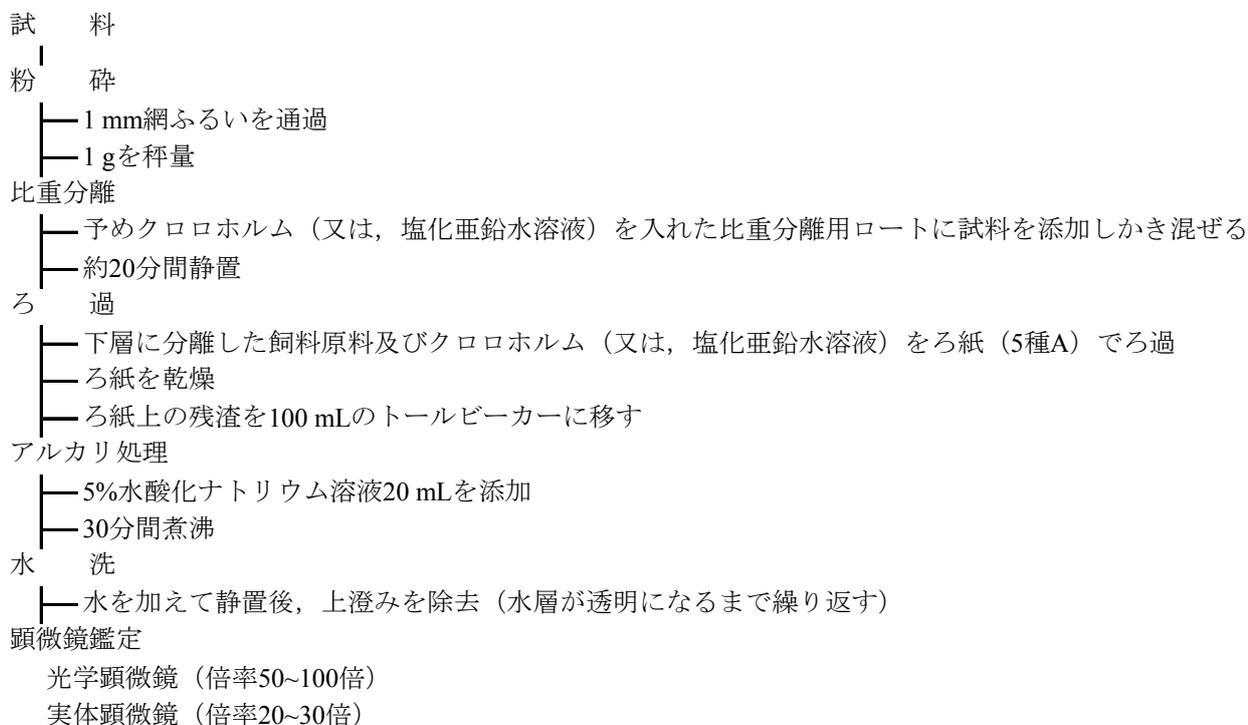


図 1 飼料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

2) ELISA 試験

「ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法」^{2), 3)}に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及びチキンミール・血粉等中の牛及び鶏由来たん白質については「モリナガ加熱処理牛（又は鶏）由来たん白質検出キット」（株森永生科学研究所製）を用い、動物質性飼料中の豚由来たん白質については「ELISA-TEK 加工肉種判別キット」（ELISA Technologies 製）を用い、豚肉骨粉等中の反すう動物由来たん白質については、「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」（ELISA Technologies 製）を用いて試験を実施した。

なお、試験は1検体あたり2点併行で実施し、2点の結果が一致しない場合には、再試験を実施し、再試験の結果が一致しない場合には、陰性と判定した。

試験の概要は以下のとおり。

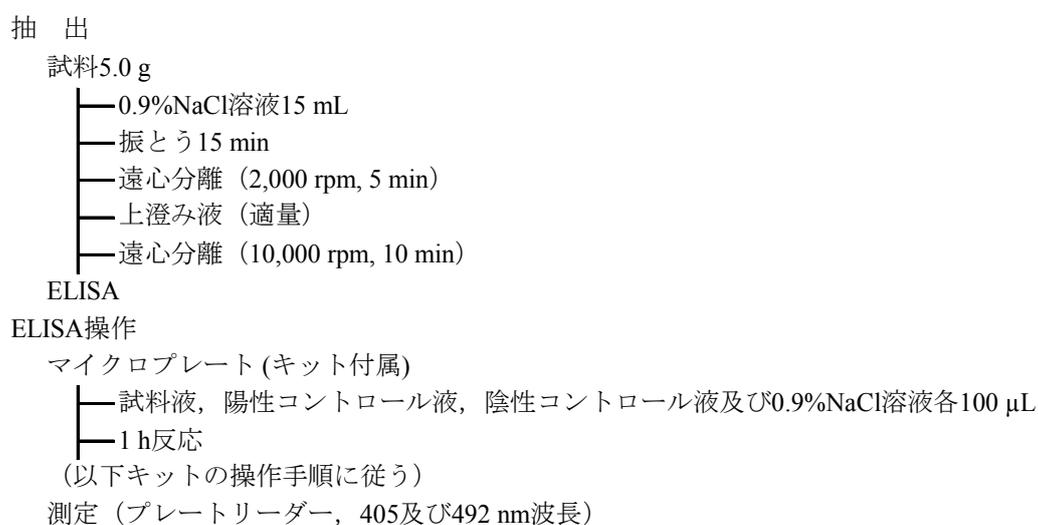


図 2-1 「ELISA-TEK 加工肉種判別キット」による試験方法

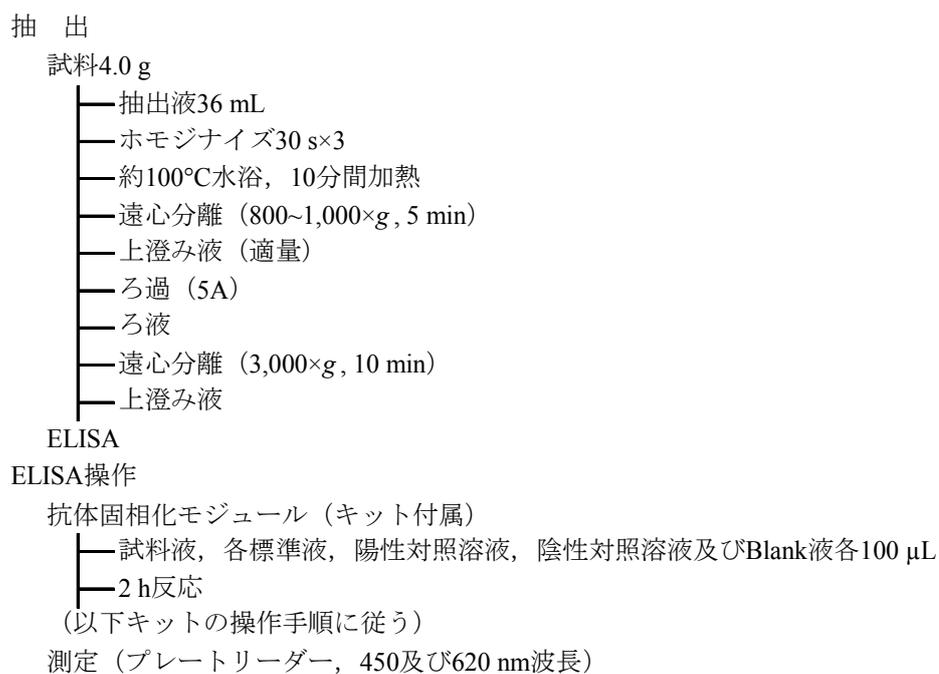


図 2-2 「モリナガ加熱処理動物由来たん白質検出キット」による試験方法

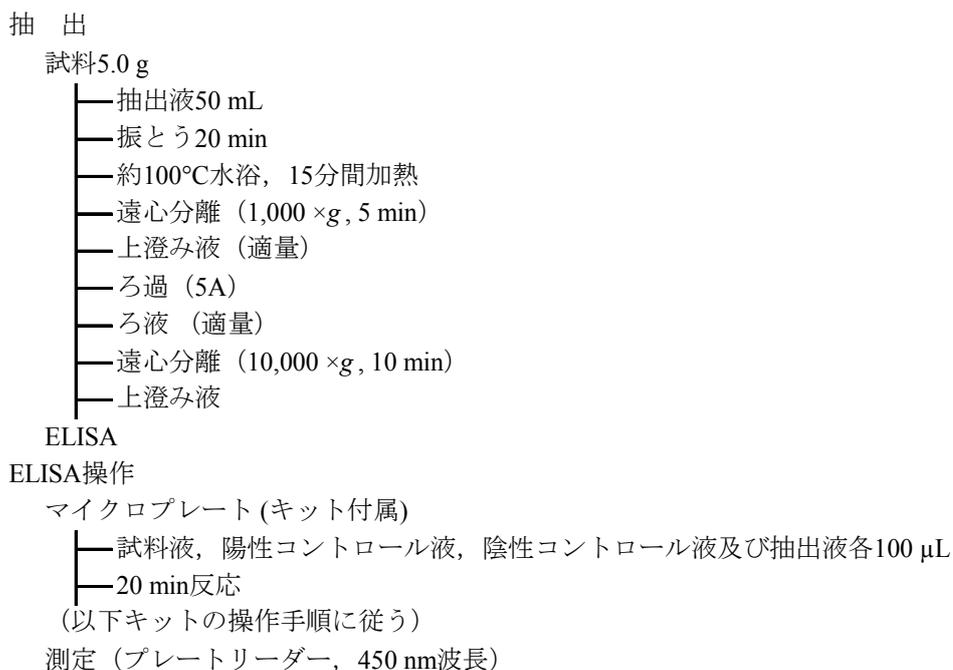


図 2-3 「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」による試験方法

3) PCR 試験

「PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出法」^{2), 3)}に基づき, 豚肉骨粉等以外の飼料中のほ乳動物由来 DNA 及び家きん由来 DNA の検出を行い, ほ乳動物由来 DNA が検出された場合には, 牛由来 DNA 及び豚由来 DNA の検出を行った。豚肉骨粉等の試験では, 反すう動物由来 DNA の検出を行い, 反すう動物由来 DNA が検出された場合には, 牛由来 DNA の検出を行った。乳製品あるいは卵製品の添加又は混入の可能性のある牛用配混合飼料, 輸入飼料及び豚肉骨粉等については, 乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法 (以下「乳製品等除去処理」という。) ^{2), 13), 14)}を行った。

なお, 同時に DNA の抽出確認のためのコントロールとして, 牛用配合飼料については植物由来 DNA の検出を, 魚粉等については魚類由来 DNA の検出¹⁰⁾を, チキンミール等については家きん由来 DNA の検出¹¹⁾を, 豚肉骨粉等についてはほ乳動物由来 DNA の検出を行い, コントロール DNA が検出されない場合には, DNA の再抽出を行った。

プライマーは, ほ乳動物検出プライマー対 (anicon 3, anicon 5) (楸プロメガ製, 以下同じ), 反すう動物検出プライマー対 (rumicon32, rumicon52), 牛検出プライマー対 (cow 31, cow 52), 豚検出プライマー対 (pig 32-2, pig 5-3), 家きん (鶏・うずら) 検出プライマー対 (chick3-1, chick5-1), 植物検出プライマー対 (placon 3, placon 5) 及び魚類検出プライマー対 (FM3, FM5) を用いた。

なお, 試験は1検体当たり2点併行で実施し, 2点ともに陽性の場合に検出と判定し, 2点の結果が一致しない場合及び2点とも陰性の場合には, 不検出と判定した。

試験の概要は, 図3に示した。

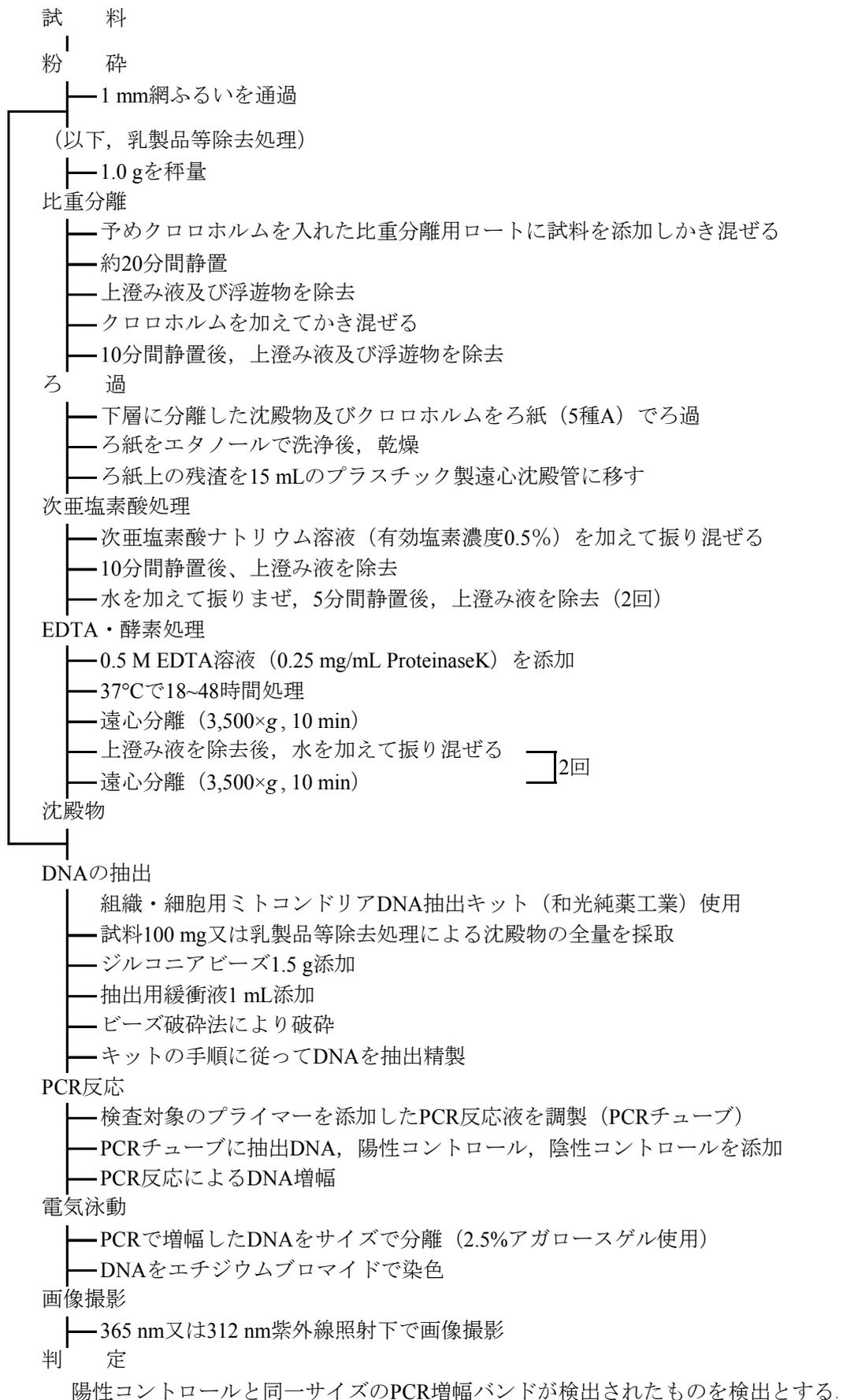


図3 PCR法による動物由来DNAの検出方法

4) 動物由来たん白質等の判定方法

顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験の結果から、以下の手順で動物由来たん白質の有無を判定した。

全試料について顕微鏡鑑定を実施し、獣骨・獣毛・羽毛等が検出された場合には「肉骨粉等検出」と判定した。

顕微鏡鑑定の結果にかかわらず、全試料について ELISA 及び PCR 試験を実施し、試験結果が同一の動物種について一致して陽性であった場合には、動物由来たん白質・DNA（以下「動物由来たん白質等」という）検出と判定した。

なお、ELISA 試験では、反すう動物用飼料への使用が認められている乳製品の添加により牛由来たん白質が検出され、卵製品の添加により鶏由来たん白質が検出される場合があることから、これらの混入の可能性のある飼料については、乳・卵製品等除去処理 PCR 試験を実施し、その結果陽性であった場合にのみ検出と判定した。

3 結果及び考察

3.1 動物質性飼料のモニタリング

動物質性飼料 189 検体について、ほ乳動物由来たん白質等及び家きん由来たん白質等のモニタリングを行った。189 検体の試料の内訳は、チキンミール・血粉等 58 検体、魚粉等 116 検体、豚肉骨粉等 8 検体、その他動物性たん白質を含む飼料 7 検体であった。

これらのモニタリング集計結果は、表 1 に示したとおりであり、動物質性飼料 189 検体のうち、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものは無かったが、魚粉 4 検体で家きん由来たん白質等が検出され、検出率は 2.1%であった。

表 1 動物質性飼料のモニタリング結果（平成 17 年度）

動物質性飼料の 区分	飼料の種類等	試験 検体数	ほ乳動物由来たん白質等		家きん由来たん白質等	
			検出数	検出率 (%)	検出数	検出率 (%)
チキンミール等	チキンミール	35	0	0		
	フェザーミール	23	0	0		
	小 計	58	0	0		
魚粉等 (内訳)	輸入魚粉	3	0	0	0	0
	国内製造魚粉等	113	0	0	4	3.5
	魚粉・魚アラ粕	(97)			(4)	
	だし粕	(6)				
	イカミール	(4)				
	カニ殻	(2)				
	魚鱗コラーゲン	(1)				
	白子ミール	(1)				
	酵素処理魚抽出物	(1)				
	フィッシュソリュブル	(1)				
	小 計	116	0	0	4	3.4
豚肉骨粉等	豚肉骨粉	1	0	0		
	鶏・豚原料混合肉骨粉	7	0	0		
	小 計	8	0	0		
その他	魚介類由来原料を主体とした混合飼料	4	0	0	0	0
	魚粉・大豆油かす 2 種混合飼料	1	0	0	0	0
	フィッシュソリュブル吸着飼料	2	0	0	0	0
	小 計	7	0	0	0	0
合 計		189	0	0	4	2.1

1) チキンミール・血粉等

チキンミール 35 検体及びフェザーミール 23 検体の併せて 58 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを行った。平成 17 年度は、血粉及び発酵血粉の採取は無かった。

試験の結果は、表 2 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、牛由来たん白質がフェザーミール 1 検体で陽性であり、豚由来たん白質が 8 検体（チキンミール 5 検体、フェザーミール 3 検体）で陽性であった。

ELISA 陽性の検体を含む 26 検体について、PCR によりほ乳動物由来 DNA の試験を行った結果、フェザーミール 1 検体でほ乳動物由来 DNA が検出された。ELISA 及び PCR で一致して牛又は豚由来たん白質・DNA が検出されたものはなかったことから、総合判定により全てほ乳動物由来たん白質等不検出と判定された。

表 2 チキンミール・血粉等の試験結果（平成 17 年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	58	0	0
ELISA 試験	牛由来たん白質	58	1	1.7
	豚由来たん白質	58	8	13.8
PCR 試験	ほ乳動物由来 DNA	26	1	3.8
	牛由来 DNA	26	0	0
	豚由来 DNA	26	0	0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定 (内訳)	ほ乳動物由来たん白質・DNA	58	0	0
	牛由来たん白質・DNA	58	0	0
	豚由来たん白質・DNA	58	0	0

2) 魚粉等

国内で製造した魚粉・魚アラ粕 97 検体、だし粕 6 検体、イカミール 4 検体、カニ殻 2 検体、魚鱗コラーゲン 1 検体、白子ミール 1 検体、酵素処理魚抽出物 1 検体及びフィッシュソリュブル 1 検体、並びに輸入魚粉 3 検体の併せて 116 検体について、ほ乳動物及び家きん由来たん白質等のモニタリングを行った。

輸入魚粉については、平成 15 年度以降、農林水産省動物検疫所による輸入時の検査との重複を避けるため、製造事業所での採取を原則として取りやめ港湾倉庫での採取としたことから、平成 17 年度は 3 検体のみであった。3 検体の輸出国の内訳は、エクアドル 2 検体及びチリ 1 検体であった。

ほ乳動物由来たん白質等の試験の結果は、表 3 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では牛由来たん白質が 1 検体で陽性であり、豚由来たん白質が 8 検体で陽性であった。PCR 試験ではほ乳動物由来 DNA が 16 検体で検出され、このうち 8 検体で牛由来 DNA が、3 検体で豚由来 DNA が検出されたが、ELISA 及び PCR 試験で一致して陽性の検体はなく、ほ乳動物由来たん白質等不検出と判定された。

家きん由来たん白質等のモニタリングでは、平成 17 年度から全ての検体で顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験を実施した。試験の結果は、顕微鏡鑑定では 116 検体中 3 検体で鳥骨・羽毛が検

出された。ELISA 試験では 116 検体中 6 検体で鶏由来たん白質が検出され、PCR 試験では 30 検体で家きん由来 DNA が検出された。ELISA 及び PCR 試験で一致して家きん由来たん白質・DNA が検出されたものは 4 検体であり、これらは総合判定で家きん由来たん白質等検出と判定された。検出率は 3.4%であった。

家きん由来たん白質等が検出された 4 検体のうち 3 検体は、顕微鏡鑑定においても鳥骨又は羽毛が検出されており、これらの製造事業場において原料及び製造工程を調査した結果、違反となる家きん由来原料は使用されていなかったが、複数の国内及び輸入魚粉を原料として使用していた。これらの調査結果から原因の特定はできなかったが、原料として使用した輸入魚粉への羽毛等の混入及び都市厨芥残渣への食鳥肉等の混入が疑われた。これらの事業場においては、製造工程のクリーニングを実施し、原料収集先での分別等の指導を徹底した後、再度、確認検査を実施した結果は、顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験において、いずれも家きん由来たん白質等は検出されなかった。

なお、ELISA 及び PCR 試験で多数の検体からはほ乳又は家きん由来たん白質等が検出された原因については、卵白やゼラチンや肉エキスなどを添加した食用の水産練り製品等の混入の可能性が推察されたことから、後日陽性検体について、乳製品等除去処理 PCR による確認試験を実施した結果、表 3 のとおり、多くの検体ではほ乳又は家きん由来 DNA が検出されなかった。平成 18 年度以降は、魚粉についても乳製品等除去処理による確認検査を実施している。

表 3 魚粉等の試験結果（平成 17 年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	(内乳製品等除去処理陽性)	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	116	0		0
	鳥骨・羽毛	116	3		2.6
ELISA 試験	牛由来たん白質	116	1		0.9
	豚由来たん白質	116	8		6.9
	鶏由来たん白質	116	6		5.2
PCR 試験	ほ乳動物由来DNA	116	16	(1)	13.8
	牛由来DNA	116	8	(1)	6.9
	豚由来DNA	116	3	(0)	2.6
	家きん由来DNA	116	30	(5)	25.9
		試験検体数	検出数		検出率 (%)
総合判定 (内訳)	ほ乳動物由来たん白質・DNA	116	0		0
	牛由来たん白質・DNA	116	0		0
	豚由来たん白質・DNA	116	0		0
	家きん由来たん白質・DNA	116	4		3.4

3) 豚肉骨粉等

平成 17 年 4 月に豚肉骨粉及び鶏・豚原料混合肉骨粉の鶏豚用飼料への使用が認められたことから、平成 17 年度から、新たに豚肉骨粉等のモニタリングを開始した。

平成 17 年度中に大臣確認申請のあったものは、豚肉骨粉等 1 検体及び鶏豚原料混合肉骨粉 7 検体の併せて 8 検体であり、これらについて反すう動物由来たん白質等のモニタリングを行っ

た。

顕微鏡鑑定により豚肉骨粉中の牛由来組織を検出することは困難であるため、豚肉骨粉等の試験は、ELISA 及び PCR 試験により実施した。

また、ELISA 試験は、当初「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」により実施したところ、多数の豚肉骨粉検体で陽性反応が見られた。この原因として、子豚に給与した代用乳等の乳製品等が豚肉骨粉中に混入したためと考えられたことから、豚肉骨粉等の ELISA 試験には、乳製品の影響を受けない ELISA キット「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット反すう動物用」を導入し、試験を実施した。PCR 試験は、乳製品等除去処理法を実施した。

試験の結果は、表 4 に示したように、ELISA 及び PCR 試験で反すう動物由来たん白質又は DNA を検出したものはなかった。

表 4 豚肉骨粉等の試験結果（平成 17 年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
ELISA 試験	反すう動物由来たん白質	8	0	0
PCR 試験	反すう動物由来 DNA	8	0	0
	牛由来 DNA	8	0	0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	反すう動物由来たん白質・DNA	8	0	0

4) その他の動物質性飼料

魚介類由来たん白質を含むかあるいは含む可能性のある飼料として、魚粉を主体とした混合飼料 4 検体、フィッシュソリュブル吸着飼料 2 検体及び魚粉大豆かす 2 種混合飼料 1 検体について試験を行った。

試験の結果は、表 1 に示したように、顕微鏡鑑定で肉骨粉等が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、混合飼料 1 検体で牛由来たん白質が陽性であったが、PCR 試験ではほ乳動物由来 DNA が検出されず、ほ乳動物由来たん白質等不検出と判定された。

なお、一部の発酵飼料において、コントロール試験の魚類由来 DNA が検出されなかったが、製造過程において魚類由来 DNA が分解されたものと考えられた。

3.2 国内製造牛用配混合飼料のモニタリング

平成 17 年度は、216 検体の国内製造牛用配混合飼料について、ほ乳動物及び家きん由来たん白質等のモニタリングを実施した。

飼料の種類の内訳は、表 5 に示したように、ほ乳期子牛育成用配合飼料 8 検体、幼令牛育成用配合飼料 18 検体、若令牛育成用配合飼料 6 検体、肉用牛肥育用配合飼料 78 検体、乳用牛飼育用配合飼料 62 検体、繁殖用・種牛用配合飼料 8 検体及び牛用混合飼料 36 検体であった。

モニタリングの結果、ほ乳動物由来たん白質等又は家きん由来たん白質等を検出したものは、なかった。

表5 牛用配混合飼料のモニタリング結果（平成17年度）

飼料の種類	試験 検体数	ほ乳動物由来たん白質等		家きん由来たん白質等	
		検出数	検出率 (%)	検出数	検出率 (%)
牛用配混合飼料					
ほ乳期子牛育成用	8	0	0	0	0
幼令牛育成用	18	0	0	0	0
若令牛育成用	6	0	0	0	0
肉用牛肥育用	78	0	0	0	0
乳用牛飼育用	62	0	0	0	0
繁殖用・種牛用	8	0	0	0	0
混合飼料	36	0	0	0	0
合計	216	0	0	0	0

1) ほ乳動物由来たん白質等

ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングでは、全検体について顕微鏡鑑定（獣骨、獣毛）、ELISA 及び PCR 試験を実施した。

「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による ELISA 試験及び通常の PCR 試験では、法令上牛用配合飼料への使用が認められている乳製品によって陽性反応が生ずる可能性があることから、平成17年度から、PCR 試験について乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法（乳製品等除去処理）^{2),13),14)}を導入した。乳製品が添加されている検体及び通常の PCR 試験ではほ乳動物由来 DNA が検出された検体については、乳製品等除去処理による確認検査を実施した。

試験の結果は、表6に示したように、216検体中顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、216検体のうち34検体で牛由来たん白質が陽性であった。

PCR 試験では、216検体中2検体でほ乳動物由来 DNA が検出されたが、牛由来 DNA 又は豚由来 DNA が検出されたものはなかった。乳製品が添加された配合飼料は7検体であり、乳製品除去処理を実施したものは19検体であった。

216検体のうち PCR 及び ELISA 試験で一致して陽性の検体はなく、総合判定により肉骨粉等の違反となるほ乳動物由来たん白質等を検出したものはなかった。

ELISA 試験で牛由来たん白質陽性の検体が多数あったことについては、配合飼料中の乳製品による陽性反応あるいは大麦、麦芽、ナタネ、ビール粕等による偽陽性反応が原因と考えられ、ELISA キットの改良を検討している。

表6 牛用配混合飼料のほ乳動物由来たん白質等の試験結果（平成17年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	216	0	0
ELISA 試験	牛由来たん白質	216	34	15.7
PCR 試験	ほ乳動物由来DNA	216	2	0.9
	牛由来DNA	216	0	0
	豚由来DNA	216	0	0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	ほ乳動物由来たん白質・DNA	216	0	0

2) 家きん由来たん白質等

家きん由来たん白質等のモニタリングでは、平成17年度から全検体について顕微鏡鑑定（鳥骨、羽毛）、ELISA（鶏由来たん白質）及びPCR試験（家きん由来DNA）を実施した。

「モリナガ加熱処理鶏由来たん白質検出キット」によるELISA試験及び通常のPCR試験では、法令上牛用配混合飼料への使用が認められている卵製品で陽性反応を生ずる可能性があることから、平成17年度から、卵製品が添加されている検体及び通常のPCR試験で家きん由来DNAが検出された検体については、乳製品等除去処理PCRによる確認検査を実施した。

試験の結果は、表7に示したように、216検体中顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA試験では、216検体のうち1検体で鶏由来たん白質が陽性であった。

PCR試験では、216検体中家きん由来DNAが検出されたものはなかった。卵製品が添加された配混合飼料は1検体であり、乳製品等除去処理を実施したものは4検体であった。

216検体のうちPCR及びELISA試験で一致して陽性の検体はなく、総合判定により違反となる家きん由来たん白質等を検出したものはなかった。

表7 牛用配混合飼料の家きん由来たん白質等の試験結果（平成17年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率(%)
顕微鏡鑑定	鳥骨・羽毛	216	0	0
ELISA試験	鶏由来たん白質	216	1	0.5
PCR試験	家きん由来DNA	216	0	0
		試験検体数	検出数	検出率(%)
総合判定	家きん由来たん白質・DNA	216	0	0

3.3 輸入飼料のモニタリング

輸入飼料については、平成16年度までは、輸入魚粉についてのみモニタリングを実施してきたが、平成17年度から、新たに輸入飼料の重点検査を開始し牛用飼料等についてモニタリングを実施した。

試料の種類は、表8に示したように、牛用配混合飼料18検体及び飼料原料17検体の併せて35検体であった。輸入飼料の輸入先国は、表9に示したように、アメリカ合衆国が13検体と最も多く、ついで中華人民共和国が7検体、大韓民国が3検体、台湾、カナダ及びオーストラリアが各2検体、デンマーク、英国、オランダ、ノルウェー、フランス及びマレーシアが各1検体であった。

試験の結果は、表10に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛等が検出されたものはなかった。ELISA試験では、牛由来たん白質が4検体で陽性であり、家きん由来たん白質が2検体で陽性であったが、PCR試験では、乳製品等除去処理による確認試験においてほ乳動物由来DNA又は家きん由来DNAが検出されたものはなく、総合判定では全ての検体がほ乳動物由来たん白質等及び家きん由来たん白質等が不検出と判断された。

表 8 輸入飼料のモニタリング結果 (平成 17 年度)

輸入飼料の区分	飼料の種類等	試験 検体数	ほ乳動物由来たん白質等		家きん由来たん白質等		
			検出数	検出率 (%)	検出数	検出率 (%)	
牛用配混合飼料	牛用配混合飼料	18	0	0	0	0	
飼料原料	大豆油かす	4	0	0	0	0	
	ビール粕	2	0	0	0	0	
	綿実	2	0	0	0	0	
	海藻粉末	2	0	0	0	0	
	ビール酵母	1	0	0	0	0	
	大豆たん白	1	0	0	0	0	
	脂肪酸	1	0	0	0	0	
	乾燥酵母細胞壁	1	0	0	0	0	
	酒粕	1	0	0	0	0	
	ポテトプロテイン	1	0	0	0	0	
	アップルペレット	1	0	0	0	0	
	小計		17	0	0	0	0
	合計		35	0	0	0	0

表 9 輸入飼料の輸入先国 (平成 17 年度)

輸入先国	試験検体数		
	牛用配混合飼料	飼料原料	合計
アメリカ合衆国	8	5	13
中華人民共和国	2	5	7
大韓民国	3	0	3
台湾	2	0	2
カナダ	1	1	2
オーストラリア	0	2	2
デンマーク	1	0	1
英国	1	0	1
オランダ	0	1	1
ノルウェー	0	1	1
フランス	0	1	1
マレーシア	0	1	1
合計	18	17	35

表 10 輸入飼料のモニタリング結果（平成 17 年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛・鳥骨・羽毛	35	0	0
ELISA試験	牛由来たん白質	35	4	11.4
	鶏由来たん白質	21	2	9.5
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	35	0	0
	牛由来DNA	35	0	0
	豚由来DNA	35	0	0
	家きん由来DNA	21	0	0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	ほ乳動物由来たん白質・DNA	35	0	0
	家きん由来たん白質・DNA	21	0	0

4 まとめ

牛海綿状脳症の発生防止対策の一環として、平成 17 年度に採取した動物質性飼料 189 検体、国内牛用配混合飼料 216 検体及び輸入飼料 35 検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験により動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、次のとおりであった。

- 1) チキンミール・血粉等 58 検体についてほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果は、すべてほ乳動物由来たん白質等は検出されなかった。
- 2) 国内製造魚粉等 113 検体及び輸入魚粉 3 検体についてほ乳動物由来たん白質及び家きん由来たん白質のモニタリングを実施した結果、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかったが、家きん由来たん白質等が 4 検体で検出され、検出率は 3.4%であった。これらは、輸入魚粉由来又は都市厨芥残渣中の食肉由来と考えられた。
- 3) 平成 17 年 4 月に豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉の飼料への使用が認められたことから、これらについてもモニタリングを開始した。平成 17 年度は 8 検体について試験を実施した結果、反すう動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。
- 4) 牛用配混合飼料 216 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、34 検体で牛由来たん白質が陽性であったが、乳製品等除去処理による PCR を実施した結果は、いずれも牛由来 DNA が検出されたものはなく、これらは、法令上牛用飼料への使用が認められている乳製品の混入等によるものと推察された。
- 5) 牛用配合飼料 216 検体について、家きん由来たん白質等のモニタリングを実施した。平成 17 年度は、PCR 試験において、卵製品を含む検体及び通常の PCR 試験で陽性であった検体については、卵製品等の除去処理を実施した。その結果、ELISA 及び PCR 試験において一致して家きん由来たん白質等が検出されたものはなかった。
- 6) 平成 17 年度から、新たに輸入飼料についてモニタリングを実施した。輸入の牛用配合飼料 18 検体及び飼料原料 17 検体について、試験を実施した結果、ほ乳動物由来たん白質等又は家きん由来たん白質等が検出されたものはなかった。

文 献

<分析法通知関係>

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について”，平成13年6月1日，13生畜第1366号(2001).
- 2) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検査法について”平成14年4月9日，14生畜第181号(2002).
最終改正 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検査法について」の改正について”，平成18年3月17日，17消安第12305号(2006).
((独) 農林水産消費安全技術センターホームページ(飼料関係/分析法) :
<http://www.ffis.famic.go.jp/>)
- 3) 飼料分析基準研究会編：“飼料分析法・解説”第18章 動物由来たん白質・DNA(社団法人日本科学飼料協会発行)(2004).
- 4) 農林水産省畜産局長通知：“飼料等検査実施要領の制定について”，昭和52年5月10日，52畜B第793号(1977).

<動物由来たん白質のモニタリング関係>

- 5) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，石橋隆幸：飼料研究報告，29，244(2004).
- 6) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，風間鈴子，関口好浩，西村真由美，内山 丈，古川 明，中村行伸，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井(小宮)友紀子，千原哲夫，青山恵介，井上智江，下村正之，鬼頭敦司，松崎 学，牧野大作，松崎美由紀：飼料研究報告，29，252(2004).
- 7) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，関口好浩，西村真由美，山本克己，遠藤 剛，石田有希恵，福中理絵，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井友紀子，中村志野，井上智江，吉田知太郎，鬼頭敦司，松崎 学，屋方光則，牧野大作，林 美紀子，松崎美由紀，児玉恭子：飼料研究報告，30，138(2005).
- 8) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，野口 淳，遠藤 剛，西村真由美，高橋亜紀子，白澤優子，山本克己，福中理絵，森 有希子，下村正之，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井友紀子，牧野大作，吉田知太郎，鬼頭敦司，荒木誠士，屋方光則，林 美紀子，永原貴子，松崎美由紀，児玉恭子：飼料研究報告，31，228(2006).

<PCR 試験法関係>

- 9) T. Kusama, T. Nomura, and K. Kadowaki: J. Food Protection, 67(6), 1289(2004).
- 10) 野村哲也，草間豊子，門脇光一：食品衛生学雑誌，47(5)，222(2006).
- 11) 野村哲也，草間豊子：飼料研究報告，30，52(2005).
- 12) 草間豊子，野村哲也：飼料研究報告，30，60(2005).
- 13) 草間豊子：飼料研究報告，30，79(2005).
- 14) 草間豊子，関口好浩：飼料研究報告，31，147(2006).

<ELISA 試験法関係>

- 15) 日比野 洋：飼料研究報告，29，181(2004).
- 16) 日比野 洋：飼料研究報告，31，155(2006).
- 17) 関口好浩，草間豊子：(社)日本食品衛生学会第92回学術講演会講演要旨集，83(2006).

〔食品衛生学雑誌 第47巻第5号 222～224ページより転載〕

PCR法を用いた飼料中の魚由来DNAの検出法の検討

野村哲也，草間豊子，門脇光一

(なお，上記の論文は，(社)日本食品衛生学会の転載許可をとって転載しています。)

平成18年度

飼料中の有害物質等残留基準を設定するための
分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業

飼料中の有害物質等の分析法の開発（抜粋）

（平成19年3月 財団法人日本食品分析センター）

飼料研究報告編集委員

委員長	杉浦 勝明	副委員長	村崎 史郎
	会田 紀雄		柴田 政人
	浅木 仁志		菅野 清
	草間 豊子		田中 壽雄
	小嶋 二三夫		橋本 亮
	小森谷 敏一		早川 俊明
			山多 利秋

飼料研究報告 第32号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
TEL 048-601-1176
FAX 048-601-1179
<http://www.famic.go.jp/>

平成19年4月

編集 飼料研究報告編集委員会