

# 飼料研究報告

第34号

平成21年

## Research Report of Animal Feed

Vol. 34  
2009



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



## はしがき

『飼料研究報告』は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター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 41 年度の創刊以来 34 巻目の発刊となります。

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、「農場から食卓まで一連の行程（フードチェーン）」を支える農業生産資材の 1 つ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。

2007 年 4 月に統合・再編した独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、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組織であり、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・定量法の開発などを行っております。

今般、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います。

また、FAMIC は、飼料及び飼料添加物の分析における肥飼料検査所時代からの長年にわたる研究や国際貢献の取組みが評価され、2009 年 5 月に開催された国際獣疫事務局（OIE）総会において世界で最初の「飼料の安全及び分析」に関するコラボレイティング・センターに指定されました。

これらを踏まえ、FAMIC においてはより一層の信頼性確保・分析法開発とともに、開発した技術の国際的な普遍化、OIE 加盟国への伝達など一層の国際貢献に取り組んでまいります。

今回とりまとめた研究成果には、既に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」に記載されたものもあるほか、今後、同通知の改正、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ることを期待します。

今後の FAMIC の技術レベルの向上のため、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 21 年 6 月

理事長 吉羽 雅昭

## 謝 辞

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

平成 20 年度飼料分析基準検討会委員  
(敬称略。五十音順。御役職は平成 21 年 5 月時点。)

- |        |  |
|--------|--|
| 青木 葉一  | 財団法人畜産生物科学安全研究所分析試験研究部長                          |
| 浅井 鉄夫  | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部抗生物質製剤検査室長                    |
| 石黒 瑛一  | 財団法人日本食品分析センター顧問                                 |
| 永西 修   | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>畜産草地研究所 畜産温暖化研究チーム長     |
| 箆島 豊   | 九州大学名誉教授   |
| 小田中 芳次 | 財団法人残留農薬研究所化学部 残留担当部長                            |
| 萱野 曉明  | 独立行政法人農業生物資源研究所産学官連携推進室 主任研究官                    |
| 後藤 哲久  | 国立大学法人信州大学農学部応用生命科学科<br>生物制御化学講座教授               |
| 中島 正博  | 名古屋市衛生研究所 生活環境部長                                 |
| 永山 敏廣  | 東京都健康安全研究センター食品化学部 残留物質研究科長                      |
| 堀江 正一  | 大妻女子大学 家政学部食物学科 食安全学教授                           |
| 松井 徹   | 国立大学法人京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻<br>動物機能開発学講座 動物栄養科学教授 |
| 松本 清   | 国立大学法人九州大学大学院農学研究院<br>生物機能科学部門 食品バイオ工学講座教授       |
| 南澤 正敏  | 財団法人日本穀物検定協会 常務理事                                |
| 宮崎 茂   | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>動物衛生研究所 研究管理監 (北海道担当)   |
| 森 康行   | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム長      |
| 安井 明美  | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>食品総合研究所 専門員             |

# 目 次

1 飼料中のインドキサカルブの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 牧野 大作, 松野 理恵, 山田 美帆 .....	1
2 飼料中のピコリナフェンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法 松尾 信吾 .....	15
3 飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法 杉本 泰俊, 野村 昌代, 鷲尾 和也 .....	28
4 魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフ フタンドム型質量分析計による同時定量法 小森谷 敏一 .....	43
5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフフタンドム型質量分析計による 定量法 山本 克己, 大島 慎司 .....	55
<b>技術レポート</b>	
1 飼料中のフロルフェニコールの液体クロマトグラフによる定量法 (中間報告) 小野 雄造, 渡部 千会 .....	67
<b>精度管理</b>	
1 平成 20 年度飼料の共通試料による分析鑑定について 高橋 亜紀子, 矢本 亮介, 青山 幸二, 大島 慎司, 八木 寿治, 橋本 仁康, 野村 昌代 .....	73
<b>調査資料</b>	
1 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 20 年度) 関口 好浩 .....	102
2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング 結果 (平成 19 年度) 草間 豊子 .....	112

## 1 Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum

(食品衛生学雑誌第50巻第2号より転載)

Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Mariko NISHIWAKI and  
Masakatsu ICHINOE .....

129

## 2 HPLC による飼料中のゴシポールの分析

(食品衛生学雑誌第49巻第4号より転載)

青山 恵介 .....

134

## 3 Developing PCR Primers Using a New Computer Program for Detection of Multiple Animal-Derived Materials in Feed

*(Journal of Food Protection, Vol. 71*より転載)Naoki SHINODA, Toyoko KUSAMA, Tomotaro YOSHIDA,  
Tatsuki SUGIURA, Koh-ichi KADOWAKI,  
Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA .....

139

4 Development of PCR Primers for the Detection of Porcine DNA in Feed Using *mtATP6* as the Target Sequence

(食品衛生学雑誌第50巻第2号より転載)

Tomotaro YOSHIDA, Tetsuya NOMURA, Naoki SHINODA,  
Toyoko KUSAMA, Koh-ichi KADOWAKI and  
Katsuaki SUGIURA .....

145

## 5 クオリバックス™システムによる飼料中のサルモネラの迅速検出法の検討

(日本食品微生物学会雑誌第25巻第3号より転載)

千原 哲夫, 関口 好浩, 橋本 仁康, 大島 慎司,  
杉本 泰俊, 本 広昭, 木村 晃一, 上橋 健三 .....

149

6 超微細高密度オゾン水の *Salmonella Enteritidis* に対する殺菌効果と応用

(鶏病研究会報第44巻第4号より転載)

高木 昌美, 岩田 剛敏, 松村 栄治, 萩原 信子,  
秋庭 正人, 神尾 次彦 .....

160

7 超微細高密度オゾン水の *Campylobacter jejuni* に対する殺菌効果の検討

(鶏病研究会報第44巻第4号より転載)

岩田 剛敏, 秋庭 正人, 高木 昌美, 松村 栄治,  
萩原 信子, 神尾 次彦 .....

168

## CONTENTS

1	Determination of Indoxacarb in Feeds by LC-MS Daisaku MAKINO, Rie MATSUNO and Miho YAMADA .....	1
2	Determination of Picolinafen in Feeds by GC-MS Shingo MATSUO .....	15
3	Determination of Oxolinic Acid and Flumequine in Feeds by LC Yasutoshi SUGIMOTO, Masayo NOMURA and Kazuya WASHIO .....	28
4	Simultaneous Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Fish Oil by LC- MS/MS Toshiichi KOMORIYA .....	43
5	Determination of Chloramphenicol in Feeds by LC-MS/MS Katsumi YAMAMOTO and Shinji OSHIMA .....	55
§	Technical report .....	67
§	Proficiency test .....	73
§	Investigative report .....	102
§	Papers accepted in other journal .....	127



# 1 飼料中のインドキサカルブの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

牧野 大作\*, 松野 理恵\*, 山田 美帆\*

## Determination of Indoxacarb in Feeds by LC-MS

Daisaku MAKINO\*, Rie MATSUNO\* and Miho YAMADA\*

(\*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center Osaka Office  
(Now Kobe Regional Center))

An analytical method for determination of indoxacarb in feeds using a liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS) was developed. After the addition of 20 mL (30 mL for grass hay) of water, the sample was left standing for 30 minutes. Indoxacarb was extracted with 100 mL of methanol. The extract was filtered and topped up to 200 mL with methanol. 20 mL of sample solution (20 mL of 100 times diluted sample solution for grass hay) was condensed and purified by Chem Elut cartridge (Varian) with 100 mL of ethyl acetate-hexane (1:1) and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1) and purified by Sep-Pak Plus Silica cartridge (Waters) and Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters) with 20 mL of hexane-acetone (17:3). After the eluate was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile and subjected to LC-APCI-MS for determination of indoxacarb. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm (Agilent Technologies)) using methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A recovery test was conducted using formula feed for layers, and for beef cattle corn and alfalfa hay spiked with 500 and 50 μg/kg (50 and 5 mg/kg for alfalfa hay) of indoxacarb. These resulted in the mean recovery of indoxacarb of 77.7~91.7 %, with relative standard deviations (RSD) of within 4.8 %. A collaborative study was conducted in six laboratories using formula feed for beef cattle and alfalfa hay spiked with indoxacarb at 50 μg/kg and 5 mg/kg. The mean recovery of formula feed for beef cattle was 93.8 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 5.1 %, 8.1 % and 0.37 respectively. These respective values were 87.6 %, 4.9 %, 14 % and 1.1 for alfalfa hay.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 殺虫剤 insecticide ; インドキサカルブ indoxacarb ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 大気圧化学イオン化法 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; 共同試験 collaborative study

\* 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, 現 同神戸センター

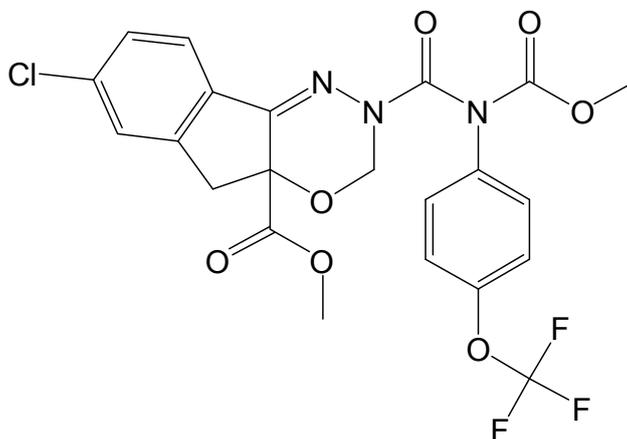
## 1 緒 言

インドキサカルブは DuPont が開発したオキサダイアジン系の殺虫剤で、2001 年に国内で農薬登録されている。神経軸索中のナトリウムチャンネルをブロックし、神経系情報伝達を妨害することにより作用するという、既存の殺虫剤とは異なる作用機構を持つ殺虫剤である。

インドキサカルブは、飼料安全法における基準値は設定されていないが、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値は、とうもろこしで 0.02 ppm、綿実で 2 ppm 等となっており、また米国におけるアルファルファ乾草の基準値は 50 ppm と設定されている。

飼料中のインドキサカルブの定量法は、平成 18 年 5 月 29 日付けで廃止された環境省告示法<sup>1)</sup>を参考に、財団法人日本食品分析センターが「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」において開発した方法<sup>2)</sup>（以下「分析センター法」という。）がある。筆者らは、この分析センター法を基に、飼料分析基準<sup>3)</sup>への適用の可否について検討したので報告する。

なお、インドキサカルブの構造式を Fig. 1 に示した。



methyl (*S*)-*N*-[7-chloro-2,3,4a,5-tetrahydro-4a-(methoxycarbonyl)indeno  
[1,2-*e*][1,3,4]oxadiazin-2-ylcarbonyl]-4'-(trifluoromethoxy)carbanilate  
C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> MW: 527.9 CAS No.: 173584-44-6 ((*S*)-isomer)

**Fig. 1 Chemical structure of indoxacarb**

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販の配合飼料（成鶏飼育用及び肉用牛肥育用），とうもろこし及び乾牧草（アルファルファ乾草）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合は、Table 1 のとおりである。

**Table 1 Compositions of the formula feeds used in this study**

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn
	Oil meal	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
For beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meal	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa hay, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

## 2.2 試 薬

### 1) インドキサカルブ標準液

インドキサカルブ MP 標準品（和光純薬工業製，純度 99.7 %）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてインドキサカルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は，インドキサカルブとして 0.5 mg ( $f=0.997$ ) を含有する．）．

使用に際して，標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にインドキサカルブとして 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1  $\mu$ g を含有する各標準液を調製した．

### 2) メタノール，酢酸エチル，ヘキサン，ジエチルエーテル，アセトン及びアセトニトリルは，残留農薬分析用を用いた．LC-MS に用いるメタノール及び蒸留水は LC-MS 用を用いた．その他，特記している以外の試薬は特級を用いた．

## 2.3 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) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 6) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 Extube Extraction Columns Chem Elut CE 1020 (20 mL 容)
- 7) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの
- 8) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge (充てん剤量 910 mg)

## 2.4 定量方法

### 1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加

えて、30 分間静置後、更にメタノール 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次メタノール 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線までメタノールを加えた。この液 20 mL（乾牧草にあつては、更にメタノールで正確に 100 倍希釈した後、その液 20 mL）を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで（乾牧草はほとんど乾固するまで）減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

## 2) カラム処理 I

試料溶液に水 15 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、5 分間静置した。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチルーヘキサン（1+1）20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、インドキサカルブを溶出させた。更に酢酸エチルーヘキサン（1+1）40 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサージェエチルエーテル（9+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

## 3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサージェエチルエーテル（9+1）5 mL で洗浄した。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサージェエチルエーテル（9+1）5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。更に、ヘキサージェエチルエーテル（17+3）10 mL をミニカラムに加え、洗浄した。

先のミニカラムの下に、あらかじめヘキサージェエチルエーテル（7+3）5 mL で洗浄した合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを連結した。

ヘキサージェエチルエーテル（7+3）20 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、インドキサカルブを合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに移行させた。

次にシリカゲルミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコを合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの下に置き、ヘキサーンアセトン（17+3）20 mL を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに加えてインドキサカルブを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル 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計による測定に供する試料溶液とした。

## 4) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 2 の測定条件に従って選択イオン検出クロマトグラムを得た。

## 5) 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又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のインドキサカルブ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

**Table 2 Operating conditions for LC-MS for analysing indoxacarb**

Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	Methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (2.5 L/min)
Interface temp.	400 °C
Heat block temp.	200 °C
CDL temp.	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 528

## Sample 10 g

- add 20 mL of water (grass hay: 30 mL)
- allow to stand for 30 min
- add 100 mL of methanol
- shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No.5B)
- wash with 50 mL of methanol
- top up to 200 mL with methanol

## 20 mL of sample solution(grass hay: 20 mL of 100 times diluted sample solution)

- evaporate to the volume of 2 mL (grass hay: to the near dryness) under 40 °C

## Chem Elut cartridge

- add 15 mL of water to the sample solution
- apply sample solution
- allow to stand for 5 min
- wash and elute with 20 mL of ethyl acetate-hexane (1:1) (three times)
- elute with 40 mL of ethyl acetate-hexane (1:1)
- evaporate to the dryness under 40 °C
- dissolve in 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1)

## Sep-Pak Plus Silica cartridge (prewash with 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1))

- apply sample solution
- wash with 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1)(three times)
- wash with 10 mL of hexane-diethyl ether (17:3)
- connect Sep-Pak Plus Florisil cartridge (prewash with 5 mL of hexane-diethyl ether(7:3)) under the Sep-Pak Plus Silica cartridge
- elute with 20 mL of hexane-diethyl ether (7:3)
- remove Sep-Pak Plus Silica cartridge

## Sep-Pak Plus Florisil cartridge

- elute with 20 mL of hexane-acetone (17:3)
- evaporate to the dryness under 40 °C
- dissolve in 2 mL of acetonitrile
- centrifuge for 5 min at 5,000×g (10,000 rpm)

## LC-MS

**Scheme 1 Analytical procedure for indoxacarb in feed**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 定量物質について

インドキサカルブは *S* 体と *R* 体の 2 種類の光学異性体が存在しており、このうち殺虫活性を示すのは *S* 体のみである。しかし *S* 体と *R* 体は通常の液体クロマトグラフ条件では分離することができないことから、分析センター法<sup>2)</sup>では標準品として *S* 体と *R* 体の比率が 1 対 1 のラセミ体であるインドキサカルブ MP を用いている。

このことから、本法においても、前述の分析センター法と同様に標準品としてインドキサカルブ MP を用いることにした。

#### 3.2 質量分析計条件の検討

インドキサカルブのイオン化法は、分析センター法<sup>2)</sup>ではエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (以下「ESI 法」という。) の正イオンモードが用いられていたが、分析センター法に従って添加回収試験を行ったところ、筆者らが用いた機種では、回収率が低下することがあった。

この原因として、試料中の共存成分によるイオン化抑制が考えられたことから、その影響が少なくなる方法を検討することにした。

ここで、ESI 法と大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (以下「APCI 法」という。) では、イオン化させやすい対象化合物が異なり、また APCI 法の方がイオン化させやすい対象化合物の範囲が狭いので、インドキサカルブが APCI 法でも分析可能であれば、イオン化抑制の影響がある共存成分のイオン化を減らすことが出来るのではないかと考えた。

そこで、APCI 法の正イオンモードによりスキャンモードで測定したところ、Fig. 2 に示すマスペクトルが得られた。

このマスペクトルにおいて基準ピークは、ESI 法と同様に  $m/z$  528 (プロトン付加分子  $[M+H]^+$ ) であり、前述の ESI 法で測定を行っている分析センター法と比較しても、ほぼ同等の感度が得られた。

よって、イオン化法として APCI 法を、モニターイオンとして  $m/z$  528 を採用することにした。

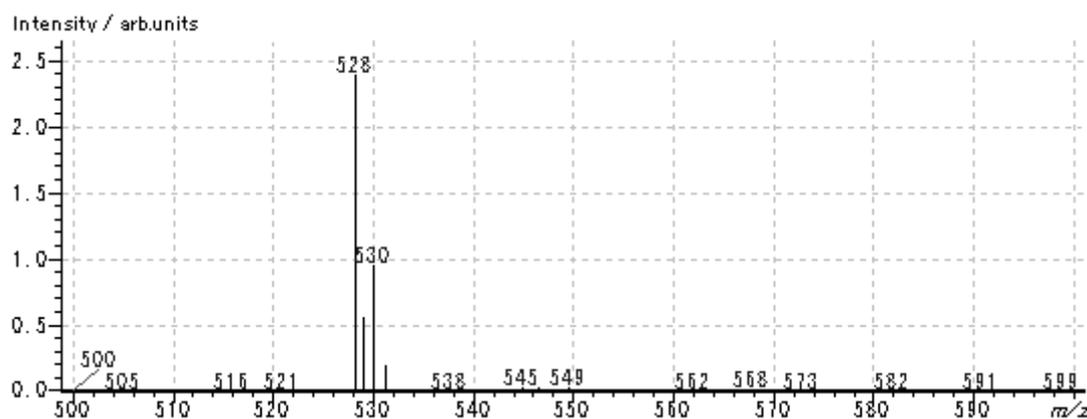


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution

#### 3.3 液体クロマトグラフ条件の検討

インドキサカルブ標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入して、液体クロマトグラフ条件の検討を行った。

分析センター法<sup>2)</sup>では、流速として 0.2 mL/min, 溶離液としてアセトニトリル-0.1 v/v%酢酸溶液

(7+3) , カラムは Unison UK C18 (内径 2.0 mm, 長さ 150 mm) を使用しているが, ESI 法と APCI 法では最適な流量が異なること等から, ESI 法での LC 条件を APCI 法でそのまま適用することは困難であると考えられた。

そこで, 過去に筆者らが他の検討を行った際に採用した APCI 法の測定条件<sup>4)</sup>を参考にして, 流速 0.5 mL/min, カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm) , 溶離液としてメタノール-酢酸アンモニウム溶液を用いて, 溶離液組成と酢酸アンモニウム溶液濃度について検討を行った。

分析センター法<sup>2)</sup>では, インドキサカルブの保持時間が 6 分程度であったことから, 溶離液としてメタノール-酢酸アンモニウム溶液を用いた場合に同程度の保持時間となるように検討を行ったところ, その溶離液組成が (4+1) のとき, 保持時間は 6 分程度となったため, これを採用した。

また, 酢酸アンモニウム溶液の濃度については 5 mmol/L 及び 10 mmol/L を検討したが, 特に差異は無かったことから, 酢酸アンモニウム濃度は 5 mmol/L で十分と考えられた。

これらのことから, 本法では流速 0.5 mL/min, カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm) , 溶離液としてメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) を採用した。

### 3.4 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し, 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又は面積を求めて検量線を作成した。その結果, Fig. 3 のとおり, 検量線はインドキサカルブとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。

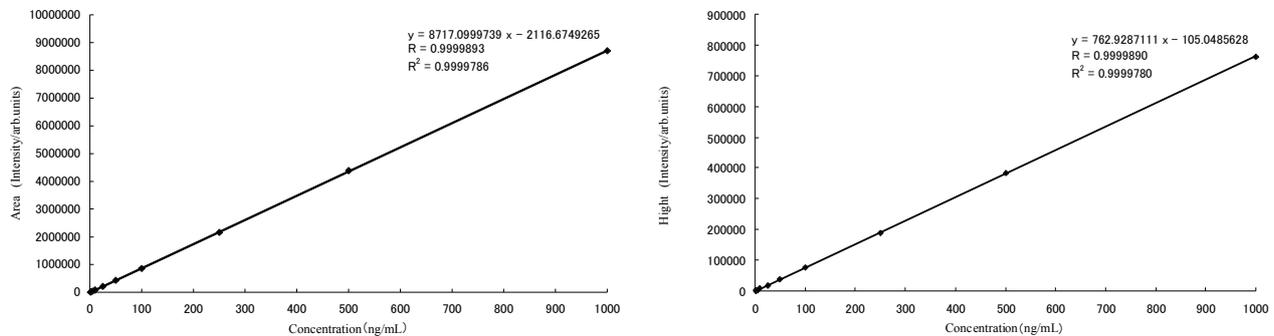


Fig. 3 Calibration curves of indoxacarb by peak area (left) and peak height (right)

### 3.5 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し, この液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 窒素ガスを送って乾固した。水約 2 mL を加えた後, 2.4 の 2) のカラム処理 I に従い, ヘキサノール-酢酸エチル (1+1) による溶出画分の確認を行った。

その結果, Table 3 のとおり, インドキサカルブは 0~100 mL に溶出し, それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から, 本法では分析センター法<sup>2)</sup>と同様にヘキサノール-酢酸エチル (1+1) 100 mL で溶出することとした。

**Table 3 Elution pattern from Chem Elut cartridge**

Fraction volume (mL)					(%)
	0~50	~100	~120	~140	Total
Recovery of indoxacarb <sup>a)</sup>	90	7	0	0	97

a) Mean recovery ( $n=2$ )

### 3.6 シリカゲルミニカラムの溶出画分の検討

シリカゲルミニカラムについて負荷・洗浄液及び溶出液の溶出画分の検討を行った。

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し、この液 1 mL をなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサソージエチルエーテル (9+1) 5 mL を加えて残留物を溶かした。この液を、2.4 の 3) のカラム処理 II の項のシリカゲルミニカラムによる処理操作に従って処理を行い、負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (9+1) 及び (17+3) 並びにシリカゲルミニカラムからの溶出液であるヘキサソージエチルエーテル (7+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリルに溶かしたものを液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供試し、インドキサカルブのシリカゲルミニカラムにおける負荷・洗浄中の流出の有無及び溶出液中の溶出画分を確認した。

その結果、Table 4 のとおり、インドキサカルブは負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (9+1) 及び (17+3) 中には流出していなかった。また、溶出に関してはヘキサソージエチルエーテル (7+3) 0~20 mL に溶出し、それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本法では分析センター法<sup>2)</sup>と同様にヘキサソージエチルエーテル (7+3) 20 mL で溶出することとした。

**Table 4 Elution pattern from Silica-gel mini column**

						(%)
	Hexane-diethyl ether (9:1)	Hexane-diethyl ether (17:3)	Hexane-diethyl ether (7:3)			Total
	0~20 mL	0~10 mL	0~10 mL	~20 mL	~30 mL	
Recovery of indoxacarb <sup>a)</sup>	0	0	98	1	0	99

a) Mean recovery ( $n=2$ )

### 3.7 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムについて負荷・洗浄液及び溶出液の溶出画分の検討を行った。

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し、この液 1 mL をなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサソージエチルエーテル (7+3) 20 mL で残留物を溶かし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに移した。その後、2.4 の 3) のカラム処理 II の項の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる処理操作に従って処理を行い、負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (7+3) 及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出液であるヘキサソージエチルエーテル (17+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリルに溶かしたものを液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供試し、インドキサカルブの合成ケイ酸マグネシウムミニカラムにおける負荷・洗浄中の流出の有無及び溶出液中の溶出画分を確認した。

その結果, Table 5 のとおり, インドキサカルブは負荷・洗浄液であるヘキサーン-ジエチルエーテル (7+3) 中には流出していなかった. また, 溶出に関してはヘキサーン-アセトン (17+3) 0~20 mL に溶出し, それ以降の画分には溶出されなかった. 以上の結果から, 本法では分析センター法<sup>2)</sup>と同様にヘキサーン-アセトン (17+3) 20 mL で溶出することとした.

**Table 5 Elution pattern from Florisil mini column**

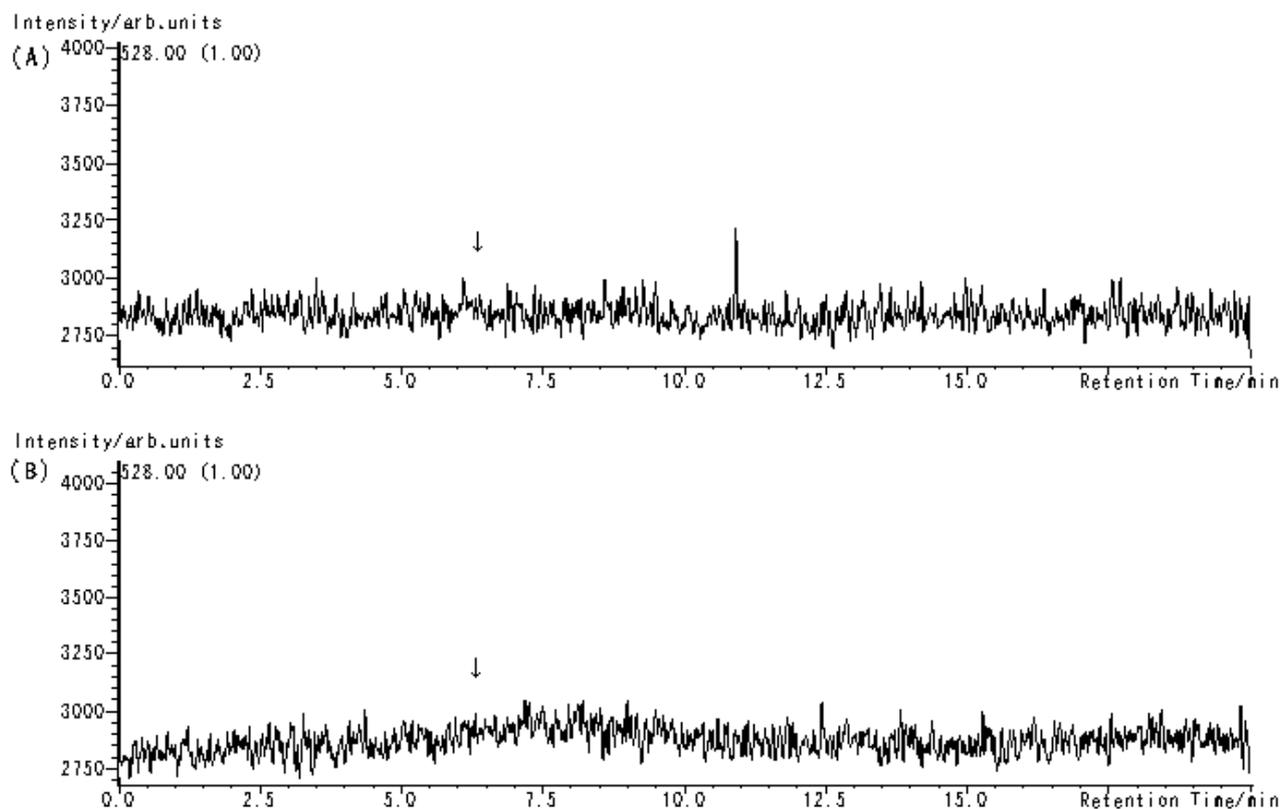
	(%)				Total
	Hexane-diethyl ether (7:3) 0~20 mL	Hexane-acetone (17:3)			
		0~10 mL	~20 mL	~30 mL	
Recovery of indoxacarb <sup>a)</sup>	0	96	1	0	97

a) Mean recovery ( $n=2$ )

### 3.8 妨害物質の検討

市販の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育用), とうもろこし, とうもろこし DDGS, 大麦, 綿実, ビートパルプ及び乾牧草 (スーダングラス乾草, バミューダグラス乾草, アルファルファ乾草, オーツ乾草及びトールフェスクわら) を用い, 本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し, 定量を妨げるピークの有無を確認したところ, 妨害ピークは認められなかった.

なお, 妨害物質の検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.



**Fig. 4 SIM chromatograms of each sample solution**

LC-MS condition are shown in Table 2

- (A) Sample solution of corn (not spiked)
- (B) Sample solution of tall fescue straw (not spiked)
- ( ↓ : Retention time of indoxacarb )

### 3.9 添加回収試験

2.1 で調製した成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにインドキサカルブとして 500 及び 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量，アルファルファ乾草に 50 及び 5  $\text{mg}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

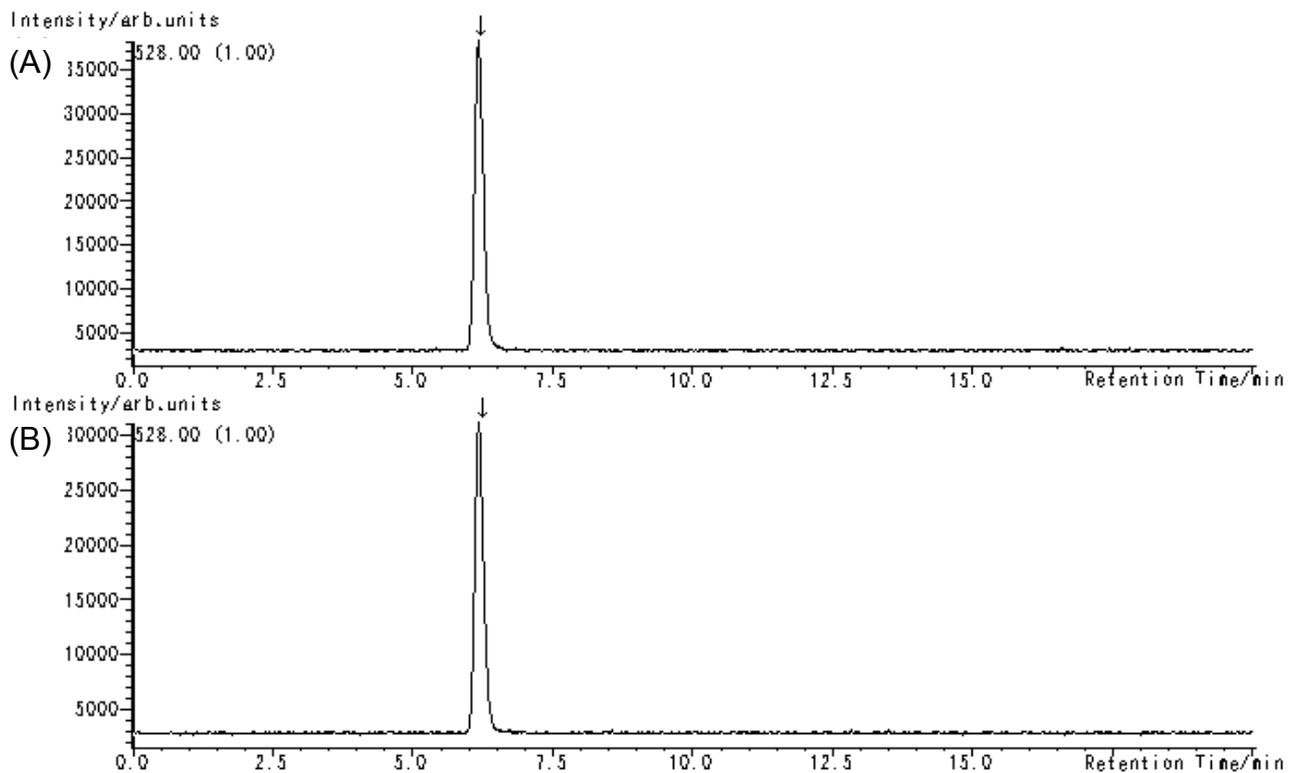
その結果は，Table 6 のとおり，インドキサカルブの平均回収率は 77.7~91.7 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD) として 4.8 %以下の成績が得られた。なお，添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

**Table 6 Results of recovery test for indoxacarb**

Spiked level	(%)							
	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Alfalfa hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
50 mg/kg							78.7	( 2.8)
5 mg/kg							77.7	( 3.0)
500 µg/kg	89.1	( 2.9)	91.7	( 2.5)	82.7	( 4.8)		
50 µg/kg	85.5	( 3.2)	89.4	( 3.8)	85.0	( 1.6)		

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

**Fig. 5 SIM chromatograms of standard solution and sample solution**

LC-MS condition are shown in Table 2

(A) Standard solution (The amount of indoxacarb is 0.125 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer spiked indoxacarb at 50 µg/kg

(↓: Retention time of indoxacarb)

### 3.10 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、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 及び 3 となる濃度をそれぞれ求めた。

その結果、ピークの  $SN$  比が 10 となる濃度は、5 µg/kg (乾牧草では 0.5 mg/kg) であった。

確認のため、成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにインドキサカルブと

して 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量, 乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.5  $\text{mg}/\text{kg}$  相当量を添加した試料について, 本法により 3 点併行で定量を行った. その結果は Table 7 のとおりであり, 成鶏飼育用配合飼料, 肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしについては, 平均回収率は 77.2~83.5 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 9.3 %以下であり, また, 乾牧草 (アルファルファ乾草) については, 平均回収率は 91.8 %, その繰返し精度は RSD として 17 %であった.

以上の結果から, 本法の定量下限は 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (乾牧草では 0.5  $\text{mg}/\text{kg}$ ) と考えられた.

また, 検出下限は, SN 比が 3 となる濃度として 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (乾牧草では 0.2  $\text{mg}/\text{kg}$ ) であった.

**Table 7 Results of recovery test for indoxacarb at the level of limit of quantification**

Spiked level	Results of recovery test for indoxacarb at the level of limit of quantification (%)							
	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Alfalfa hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5 $\text{mg}/\text{kg}$							91.8	(17)
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	81.5	(9.3)	83.5	(4.3)	77.2	(6.3)		

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.11 共同試験

本法の再現精度を調査するため, 肉用牛肥育用配合飼料及びアルファルファ乾草に, インドキサカルブとして, それぞれ 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び 5  $\text{mg}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて, アジレント・テクノロジ株式会社アプリケーションセンター, 株式会社島津総合分析試験センター, 全国酪農業協同組合連合会分析センター, 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, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同仙台センター及び同神戸センター大阪事務所 (8 試験室) において, 本法に従って共同試験を実施した.

ここでイオン化法として ESI 法を採用して共同試験を実施した試験室が 2 試験室あったが, 筆者らの機種で見られたのと同様と考えられる回収率の低下 (3.2 参照) が認められた試験室があったことから, ESI 法による試験結果は除外し, APCI 法で共同試験を実施した 6 試験室について結果の解析を行った.

その結果, Table 8 のとおり, 肉用牛肥育用配合飼料の平均回収率は 93.8 %, その繰返し精度及び室間再現精度は, 相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) としてそれぞれ 5.1 %及び 8.1 %であり, HorRat は 0.37 であった.

また, アルファルファ乾草の平均回収率は 87.6 %, その繰返し精度及び室間再現精度は,  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  としてそれぞれ 4.9 %及び 14 %であり, HorRat は 1.1 であった.

配合飼料において, HorRat が 0.5 を下回っていたが, 特に本分析法の手順及び共同試験の要領に異常があったとは考えられなかった.

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 9 に示した.

**Table 8 Collaborative study results**

Lab. No.	Formula feed for beef cattle		Alfalfa hay	
	(µg/kg)		(mg/kg)	
1	50.3	48.7	4.78	4.74
2	43.2	44.2	3.98	3.82
3	45.5	44.6	4.33	4.18
4	48.6	56.6	5.22	5.48
5	45.4	45.0	3.56	4.16
6	45.6	45.2	4.26	3.99
Spiked level	50.0		5.00	
Mean value <sup>a)</sup>	46.9		4.38	
Recovery (%)	93.8		87.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	5.1		4.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.1		14	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		13	
HorRat	0.37		1.1	

a)  $n=12$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 9 Instruments used in the collaborative study**

Lab.No.	Instrument	LC column
		(i.d. × length, particle size)
1	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
2	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 µm)
3	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
4	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 µm)
5	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
6	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

飼料中のインドキサカルブについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

1) イオン化法として、大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (正イオンモード) , モニターイオンとし

て、 $m/z$  528 (プロトン付加分子 $[M+H]^+$ ) を適用したところ良好に測定が可能であった。

- 2) 液体クロマトグラフ質量分析計の溶離液にメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) , カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5  $\mu$ m) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 3) 検量線はインドキサカルブとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 4) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 100 mL であった。
- 5) シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 7) 成鶏飼育用配合飼料, 肉用牛肥育用配合飼料, とうもろこし及びアルファルファ乾草にインドキサカルブとして 500 及び 50  $\mu$ g/kg 相当量 (アルファルファ乾草については 50 及び 5 mg/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ところ, 平均回収率 77.7~91.7 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 4.8 %以下の成績が得られた。
- 8) 本法によるインドキサカルブの定量下限は試料中で 5  $\mu$ g/kg (乾牧草の試料では 0.5 mg/kg) , 検出下限は 2  $\mu$ g/kg (同 0.2 mg/kg) と考えられた。
- 9) 肉用牛肥育用配合飼料及びアルファルファ乾草に, インドキサカルブとして, それぞれ 50  $\mu$ g/kg 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 6 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, 肉用牛肥育用配合飼料の平均回収率は 93.8 %, そ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  $RSD_R$ ) としてそれぞれ 5.1 %及び 8.1 %であり, HorRat は 0.37 であった。また, アルファルファ乾草の平均回収率は 87.6 %, その繰返し精度及び室間再現精度は,  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 4.9 %及び 14 %であり, HorRat は 1.1 であった。  
なお, 本法は, 平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

## 謝 辞

共同試験に参加して頂いたアジレント・テクノロジー株式会社, 株式会社島津総合分析試験センター, 全国酪農業協同組合連合会, 社団法人日本科学飼料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。

## 文 献

- 1) 環境庁告示：“農薬取締法第 3 条第 1 項第 4 号から第 7 号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める等の件第 1 号イの環境大臣の定める基準”, 昭和 48 年 7 月 24 日, 告示第 46 号 (1973).
- 2) 財団法人日本食品分析センター：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 (2007).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 石橋 隆幸, 吉村 正寿, 牧野 大作：飼料研究報告, 32, 13 (2007).

## 2 飼料中のピコリナフェンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

松尾 信吾\*

### Determination of Picolinafen in Feeds by GC-MS

Shingo MATSUO\*

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

An analytical method for determination of picolinafen in feeds using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed. After addition of water to samples, picolinafen was extracted with acetone. The extract was filtered and topped up to 200 mL with acetone. The sample solution was evaporated to dryness and dissolved in water, and then purified by Chem Elut cartridge (Varian) with hexane. The eluate was evaporated to dryness and dissolved in cyclohexane-acetone (4:1), and then purified by gel permeation chromatography (GPC). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in hexane, and purified by Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters) with hexane-acetone (17:3). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in acetone containing 0.05 v/v% of polyethylene glycol 400, and subjected to GC-MS on a fused silica capillary column (HP-5MS; 0.25 mm i.d×30 m, film thickness: 0.25 μm (Agilent Technologies)) for determination of picolinafen. A recovery test was conducted using two kinds of formula feed, corn, wheat and ryegrass straw spiked with picolinafen at 10 μg/kg and 100 μg/kg. These tests resulted in recoveries of 90.0~109 % of picolinafen with relative standard deviations (RSD) of within 8.9 %. A collaborative study was conducted in nine laboratories using a formula feed and ryegrass straw spiked with picolinafen at 100 μg/kg. The mean recovery of picolinafen in formula feed was 98.0 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 3.9 %, 11 % and 0.50 respectively. The mean recovery of picolinafen in ryegrass straw was 89.6 %, and the repeatability and reproducibility in terms of RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub> and HorRat were 7.0 %, 12 % and 0.55 respectively.

**Key words:** 残留農薬 pesticide residue ; ピコリナフェン picolinafen ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 共同試験 collaborative study ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay

### 1 緒 言

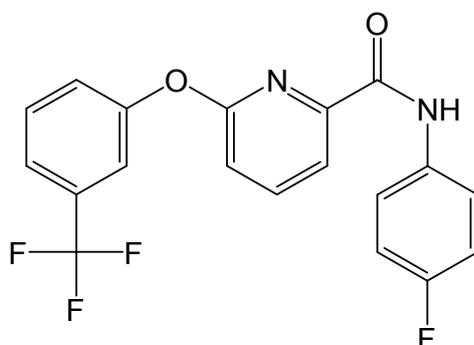
ピコリナフェンは BASF が開発した芳香族カルボン酸系除草剤で、日本では農薬としての登録はされていない。飼料安全法における残留基準は設定されていないが、食品衛生法に基づく食品中の残留基準値は、穀類等で 0.02~0.04 ppm、豆類で 0.02 ppm となっている<sup>1)</sup>。また、オーストラリアでの乾牧草の基準値は 0.05 ppm である。

野崎ら<sup>2)</sup>が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定量法ではピコリナフェンの回収率が低かったことから、「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

\* 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

法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した「ガスクロマトグラフ質量分析計によるピコリナフェンの残留分析法（以下「分析センター法」という。）<sup>3)</sup>」を基に飼料分析基準<sup>4)</sup>への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、ピコリナフェンの構造式を Fig. 1 に示した。



*N*-(4-fluorophenyl)-6-(3-(trifluoromethyl)phenoxy)-2-pyridinecarboxamide  
 $C_{19}H_{12}F_4N_2O_2$  MW: 376.3 CAS No.: 137641-05-5

**Fig. 1 Chemical structure of picolinafen**

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の配合飼料（肉豚肥育用，乳用牛飼育用），小麦，とうもろこし及び乾牧草（ライグラスわら）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

**Table 1 Composition of the formula feed used in this study**

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For cattle	Grains	52	Corn, Dehulled Rice, Wheat, Lupins, Cornstarch
	Oil meal	23	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Brans	19	Corn gluten feed, Corn distiller's dried grains with solubles, Bran, Screening pellet, Rice bran
	Others	6	Molasses, Calcium carbonate, Alfalfa meal, Salt, Feed yeast, Alfalfa
For growing pig	Grains	78	Corn, Rye, Bread crumbs, Wheat flour, Barley, Wheat
	Oil meal	19	Soybean meal, Rapeseed meal
	Others	3	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Vegetable oil, Feed yeast

### 2.2 試薬

#### 1) ピコリナフェン標準液

ピコリナフェン標準品（Riedel-de-Haën 製，純度 99.9%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてピコリナフェン標準原液を調製し

た（この液 1 mL は、ピコリナフェンとして 0.5 mg ( $f=0.999$ ) を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を 2) の希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にピコリナフェンとして 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1  $\mu\text{g}$  を含有する各ピコリナフェン標準液を調製した。

## 2) 希釈溶媒

0.05 v/v% ポリエチレングリコール含有アセトン

## 3) アセトン、ヘキサン、シクロヘキサンは残留農薬分析用試薬を、ポリエチレングリコールは平均分子量 400（関東化学製）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-QP2010Plus

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) ロータリーエバポレーター：東京理化工器製 NAJ-160

4) ゲル浸透クロマトグラフ装置：日本分光製 GPC システム（ポンプ：PU-2080Plus, オートサン  
プラー：AS-2050Plus, フラクションコレクター：SF-212N）

5) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 Chem Elut 20mL 保持用

6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil cartridge（充てん量 910 mg）に  
リザーバーを連結したもの

7) 遠心分離器：久保田製作所製 8410

8) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK 25（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, PVDF）

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え、30 分間静置した。更にアセトン 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 40 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で約 4 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、5 分間静置した。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、先のなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、ピコリナフェンを溶出させた。更に同溶媒 50 mL をカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させた。

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、この液を 10 mL の遠心沈殿管に入れ、2,000 rpm (1,000 $\times$ g) で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ）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、ピコリナフェンが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガス

を送って乾固した。

ヘキサン 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

**Table 2 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	75~105 mL

#### 4) カラム処理 II

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをヘキサン 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (17+3) 10 mL を加えてピコリナフェンを溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

希釈溶媒 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

#### 5) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各ピコリナフェン標準液各 2 μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 3 の測定条件に従って選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを得た。

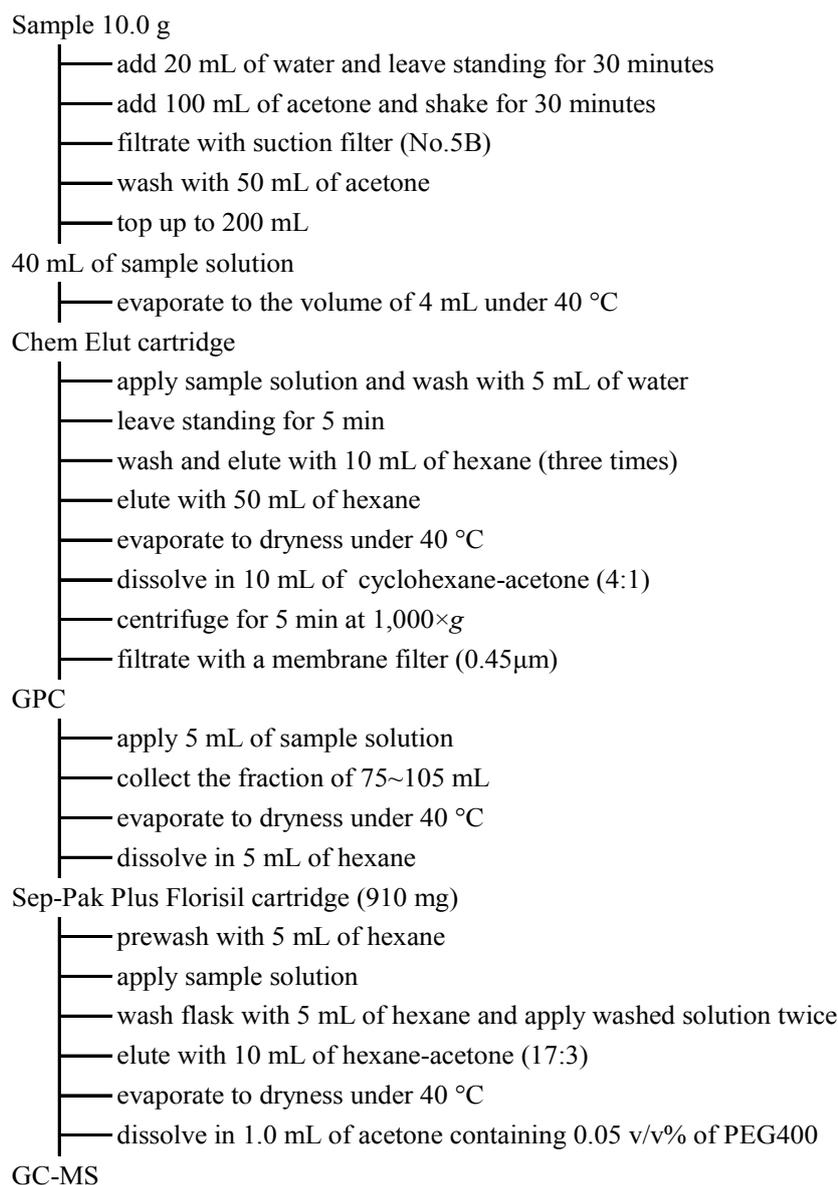
**Table 3 Operating conditions for GC-MS for analysing picolinafen**

Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.× 30 m, 0.25 μm film thickness)
Column temp.	80 °C (1 min)→20 °C/min→280 °C (10 min) →300 °C(10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temp.	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temp.	280 °C
Ion source temp.	230 °C
Ionization energy	70 eV
Ionization	Electron ionization (EI)
Monitor ion	<i>m/z</i> 376 (for quantitation), 238(for confirmation)

#### 6) 計 算

得られた SIM 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、飼料中のピコリナフェン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for picolinafen**

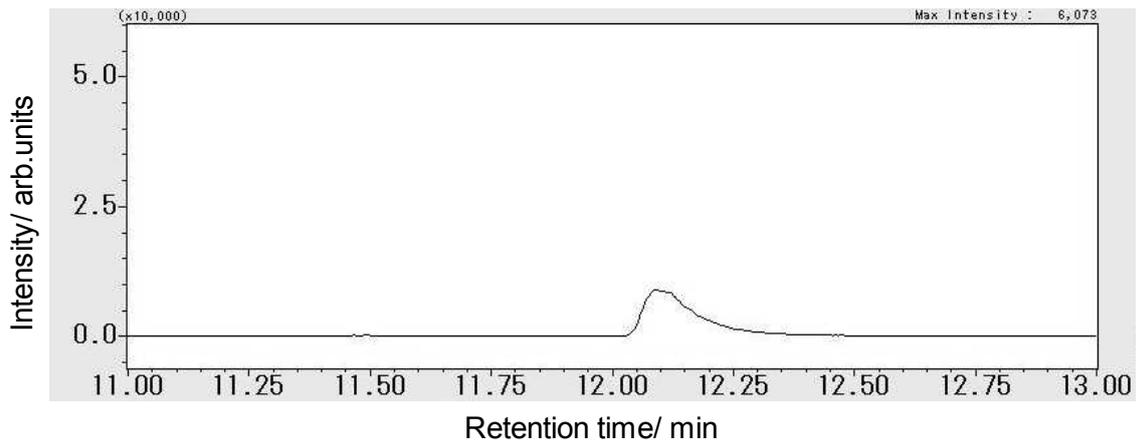
### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

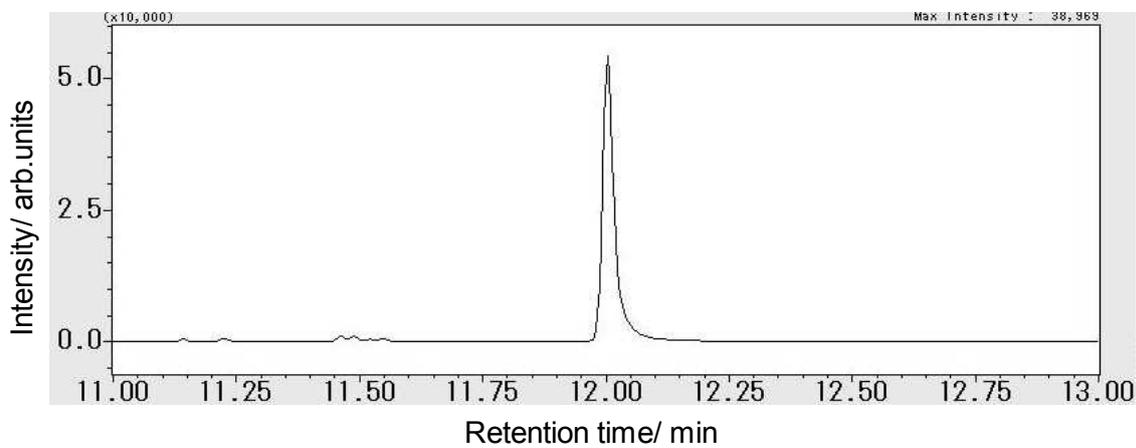
調製した 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 µg/mL の各標準液 2 µL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムから検量線を作成した。

標準原液をアセトンで希釈した標準液のクロマトグラムは Fig. 2 (A) のとおりであり、安定したピーク形状が得られなかった。そのため、ポリエチレングリコール（以下「PEG」という。）を添加することによるピーク形状の改善<sup>5)</sup>を試みた。0.05 v/v%相当量の PEG を添加したアセトンで希釈した標準液のクロマトグラムは Fig. 2 (B) のとおりであり、ピークの形状が改善されたことから、本法では希釈溶媒に PEG 含有アセトンを用いることとした。その結果、検量線は、Fig. 3 のとおり 0.004~2.0 ng の範囲で直線性を示した。

(A)

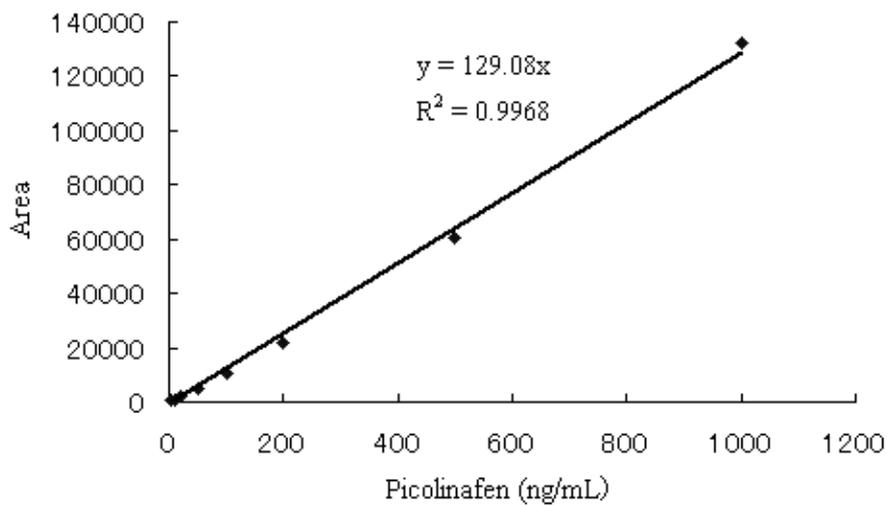


(B)



**Fig. 2 SIM chromatograms of standard solution (0.1  $\mu\text{g/mL}$ )**

- (A) Acetone without polyethylene glycol addition  
(B) Acetone added with polyethylene glycol 400 at 0.05 v/v%



**Fig. 3 Calibration curve of picolinafen**

### 3.2 ゲル浸透クロマトグラフィーの検討

分析センター法では、配合飼料の分析において、多孔性ケイソウ土カラムによる精製の後、試料中の脂質等を除くための精製操作として、ヘキサン-ヘキサン飽和アセトニトリルによる液液分配を行っている。同分析法を用いて、肉豚肥育用配合飼料及びとうもろこしを分析したところ、結果は Table 4 のとおり平均回収率及び繰返し精度（相対標準偏差（RSD））ともに良好な結果が得られなかった。これは液液分配による精製が不十分なことが考えられた。また、脂質の少ない飼料についても、最終試料液中に色素などの夾雑物の残留が確認されたことから、分析機器等への負荷を考慮し、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いた精製を検討した。

1 mL 中にピコリナフェンとして 0.5  $\mu\text{g}$  を含有する標準液 1 mL を正確にとり、乾固した後、その残留物にシクロヘキサン-アセトン（4+1）10 mL を正確に加え、2.4 の 3) のゲル浸透クロマトグラフィー処理を行い、溶出画分の検討を行った。

その結果、Table 5 のとおりピコリナフェンはシクロヘキサン-アセトン（4+1）80~100 mL でほぼ溶出しており、本法では 75~105 mL の画分を分取することとした。

なお、分析センター法では合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる処理の前にヘキサソージエチルエーテルで精製を行っているが、本法ではゲル浸透クロマトグラフィーによる精製で十分であると考えられたことから、ヘキサソージエチルエーテルでの精製操作を省略することとした。

**Table 4 Recovery test of picolinafen (Liquid-liquid extraction)**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for growing pig		Corn	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
100	80.7	(13 )	171	( 8.0)
10	124	(42 )	111	(14 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

**Table 5 Elution pattern from GPC (standard solution)**

	Fraction volume (mL)							Total
	40~50	~60	~70	~80	~90	~100	~110	
Picolinafen recovery	0	0	0	1	72	27	0	100

### 3.3 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのピコリナフェンの溶出画分の検討を行った。

1 mL 中にピコリナフェンとして 1.0  $\mu\text{g}$  を含有する標準液 1 mL を正確に合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに負荷し、ヘキサン-アセトン（17+3）における溶出画分の検討を行った。

その結果、Table 6 のとおりピコリナフェンは、ヘキサン-アセトン（17+3）10 mL の区分で溶出することから、本法ではヘキサン-アセトン（17+3）10 mL で溶出することとした。

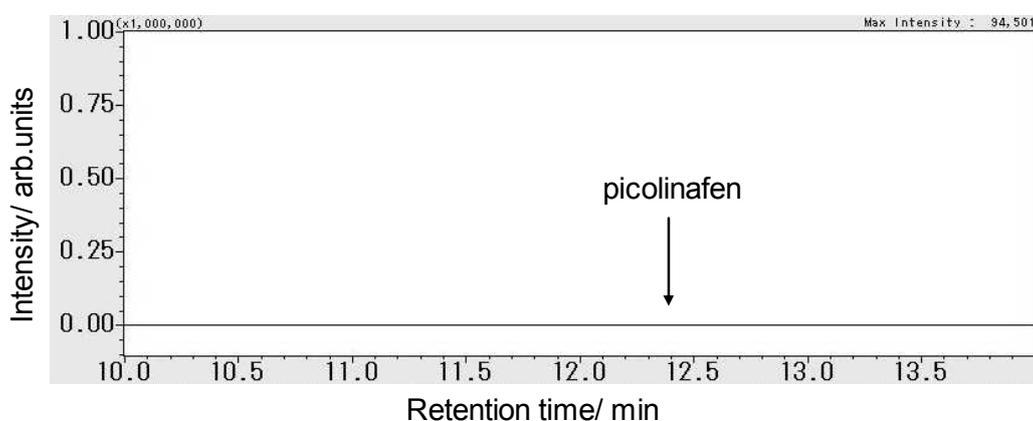
**Table 6 Elution pattern from Florisil cartridge (standard solution)**

					(%)
	Hexane		Hexane-acetone (17:3)		Total
	15 mL	~10 mL	~20 mL	~30 mL	
Picolinafen recovery	0	100	0	0	100

### 3.4 妨害物質の検討

配合飼料 4 種類 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, 乳用牛飼育用 2 種類) 小麦, えん麦, 大麦, ライ麦, ふすま, 綿実, とうもろこし, ライグラスわら及びアルファルファ乾草を用い, 本法に従って SIM クロマトグラムを作成したところ, ピコリナフェ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クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

**Fig. 4 SIM chromatogram of sample solution (Formula feed for cattle)**

### 3.5 添加回収試験

配合飼料 (肉豚肥育用及び乳用牛飼育用), 小麦, とうもろこし及びライグラスわらにピコリナフェンとして 10 及び 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量をそれぞれ添加した試料を用いて, 本法に従って 3 回併行分析を実施し, 回収率及び分析精度を検討した. その結果は, Table 7 のとおりであり, 平均回収率は, 90.0~109 %, 繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.9 %以下であった.

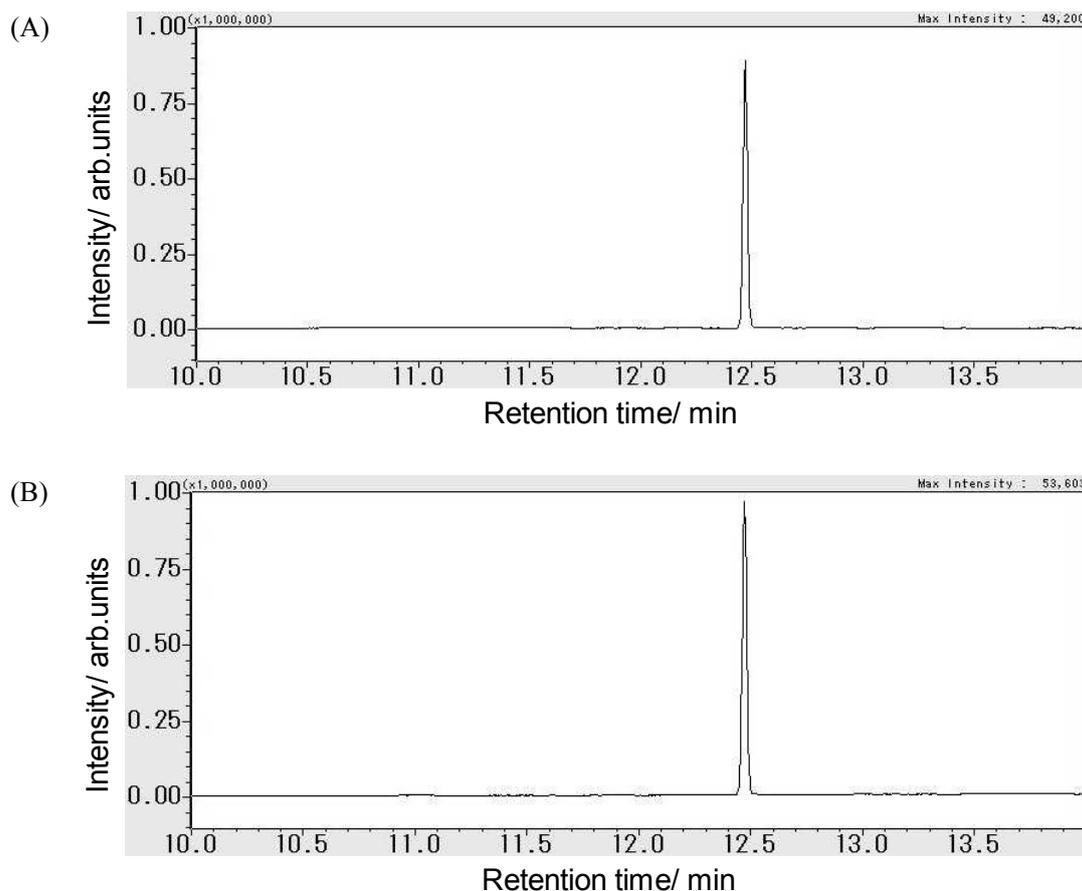
なお, 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した.

**Table 7 Recovery test of picolinafen**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for cattle		Formula feed for cattle		Wheat		Corn		Ryegrass straw	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
100	109	( 4.6)	97.2	( 3.1)	91.5	( 5.2)	90.0	( 6.9)	101	( 8.7)
10	105	( 6.7)	106	( 3.1)	98.2	( 5.5)	97.7	( 8.9)	96.7	( 4.0)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 5** Chromatograms of standard and sample solutions in the recovery test

(A) Standard solution (0.1 µg/mL)

(B) Sample solution of formula feed for cattle (spiked with picolinafen at 100 µg/kg)

### 3.6 定量下限及び検出下限

本法による定量下限を確認するため、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、ピークの  $SN$  比が 10 となる濃度は、2.5 µg/kg であった。

しかし、確認のため乳用牛飼育用配合飼料及びライグラスわらにピコリナフェンとして 2.5 及び 5 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて添加回収試験を実施した結果は、Table 8 のとおり、添加量 2.5 µg/kg の乳用牛飼育用配合飼料において、平均回収率は 63.1 %、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 34.9 %と良好な結果が得られなかった。一方、添加量 5.0 µg/kg の試料では、乳用牛飼育用配合飼料及びライグラスわらともに良好な結果であった。以上の結果から、本法の定量下限は 5 µg/kg 程度であると考えられた。

また、検出下限は、 $SN$  比が 3 となる濃度として 1 µg/kg であった。

**Table 8 Recovery test to define the limit of quantification**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for cattle				Ryegrass Straw	
	Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>		Recovery <sup>a)</sup>	
5.0	99.4	(10 )		89.0	( 7.7)	
2.5	63.1	(35 )		87.0	(16 )	

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.7 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。

配合飼料（乳用牛飼育用）及び乾牧草（ライグラスわら）にピコリナフェンとして 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用い、株式会社島津総合分析試験センター、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、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター及び同福岡センターの計 9 試験室で共同試験を実施した。

その結果は Table 9 のとおりであり、配合飼料（乳用牛飼育用）では、平均回収率は 98.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ）として 3.9 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.5 であった。

また、乾牧草（ライグラスわら）では、平均回収率は 89.6 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 7.0 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.55 であった。

参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフの機種等を Table 10 に示した。

**Table 9 Collaborative study results of picolinafen**

Lab. No.	Sample (µg/kg)			
	Formula feed for cattle		Ryegrass straw	
1	102	101	103	99.3
2	104	105	82.8	83.8
3	112	103	84.7	98.6
4	110	105	104	105
5	81.4	84.5	78.7	73.3
6	77.5	88.1	84.2	70.1
7	94.3	97.2	92.2	92.8
8	111	107	101	86.3
9	89.0	92.6	90.1	82.2
Spiked level	100		100	
Mean value <sup>a)</sup>	98.0		89.6	
Recovery (%)	98.0		89.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.9		7.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	11		12	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.50		0.55	

a)  $n=18$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 10 Instruments used in the collaborative study**

Lab.No.	GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GC-MS QP2010	Phenomenex ZB-1 (0.32 mm×30 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N/5975B	J&W DB-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	Agilent Technologies 6890/5973	J&W DB-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	Agilent Technologies 6890N/5973inert	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	SHIMADZU GC-MS QP2010Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	ThermoELECTORON CORPORATION FOCUS/POLARISQ	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
7	SHIMADZU GCMS-QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	ThermoELECTORON CORPORATION FOCUS/POLARISQ	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
9	SHIMADZU GCMS-QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

飼料中のピコリナフェンについて、分析センター法を基に、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) ピコリナフェンの標準液の検量線は 0.004~2.0 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 分析センター法では、試料中の夾雑物等の除去が不十分であったため、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いた精製を検討したところ良好な結果を得た。
- 3) 希釈溶媒にポリエチレングリコールを 0.05 v/v% 添加したアセトンを使用することで良好なピークが得られた。
- 4) 本法によりピコリナフェンの定量を妨げる妨害ピークは認められなかった。
- 5) 2 種類の配合飼料, 2 種類の穀物及び乾牧草にピコリナフェンとして 10 及び 100 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 90.0~109 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.9 % 以下であった。
- 6) 本法によるピコリナフェンの定量下限は 5 μg/kg, 検出下限は 1 μg/kg と考えられた。

なお, 本法は, 平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に記載された。

#### 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, 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の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 厚生省告示：“食品，添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 2) 野崎 友春，堀米 明日香，渡部 千会：飼料研究報告，31，39 (2006).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 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 (2007).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 畑野 和宏：福岡市保健環境研究所報第 28 号（平成 14 年度），キャピラリー・ガスクロマトグラフ/PEG 共注入法の農産物中の有機リン系農薬同時定量法への適用 (2003).

### 3 飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法

杉本 泰俊\*, 野村 昌代\*, 鷺尾 和也\*

#### Determination of Oxolinic acid and Flumequine in Feeds by LC

Yasutoshi SUGIMOTO\* Masayo NOMURA\* and Kazuya WASHIO\*

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

An analytical method for determination of oxolinic acid and flumequine in feeds using liquid chromatography (LC) was developed. Oxolinic acid and flumequine were extracted with 0.2 % metaphosphoric acid solution-acetonitrile (3:2). The extracts were filtered and topped up to 200 mL with the extracting solvent. Sample solutions were purified by C<sub>18</sub> cartridge (GL Science, InertSep Slim-J C18-B) and graphitized carbon cartridge (GL Science, InertSep GC), and subjected to LC for determination of oxolinic acid and flumequine. A recovery test was conducted using two kinds of formula feed and fish meal spiked with 5, 1, 0.5 and 0.3 mg/kg of oxolinic acid and flumequine. The mean recoveries of oxolinic acid and flumequine were 71.1~94.4 % and 71.5~90.5 %, and the relative standard deviations (RSD) were within 12 % and 16 %, respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using a formula feed for layer and a fish meal spiked with 3 mg/kg of oxolinic acid and flumequine. The mean recovery of oxolinic acid in the formula feed for layers was 88.7 %, and repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 5.9 %, 6.6 % and 0.48 respectively. For the fish meal, these respective values were 83.0 %, 6.1 %, 9.5 % and 0.68. The mean recoveries of flumequine in the formula feed for layers was 87.7 %, RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub> and HorRat were 5.5 %, 6.9 % and 0.50 respectively. For the fish meal, these respective values were 82.0 %, 4.1 %, 8.3 % and 0.59.

Key words: オキシリン酸 oxolinic acid ; フルメキン flumequine ; 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; 液体クロマトグラフ liquid chromatograph (LC) ; 飼料 feed; 魚粉 fish meal ; 共同試験 collaborative study

#### 1 緒 言

オキシリン酸は 1966 年に発見されたキノロン系抗菌剤である。キノロン系抗菌剤としてもっとも古いのは、1962 年に合成されたナリジクス酸であり、それ以降類似抗菌剤が数種開発され、動物用としてはピロミド酸及びオキシリン酸などが臨床的に用いられている。近年更に抗菌力を強力にしたニューキノロン系抗菌剤が多数開発されている<sup>1)</sup>。また、オキシリン酸は農業用殺菌剤としても用いられている。

フルメキンは、1973 年に開発されたキノロン系抗菌剤の一つであり、水産用医薬品としてブ

\* 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

リ、マダイ等の類結節病の予防に使用されていた。しかし、平成 17 年に許可が取り消され、現在は国内での使用はできなくなっている<sup>1)</sup>。

オキシリン酸及びフルメキンは、いずれも飼料添加物として指定されていない抗菌性物質であり、飼料安全法に基づく成分規格では飼料に含んではならないこととされているが、輸入魚粉への残留が懸念されている。このため、魚粉及び魚粉を含む配合飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの分析法の開発が必要となっている。

オキシリン酸及びフルメキンの分析法としては、厚生労働省より食品中の分析法としてキノロン系合成抗菌剤 10 物質の同時分析法及び HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産) の適用が示されている<sup>2)</sup>。

筆者らは、財団法人日本食品分析センターが「平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した飼料中のオキシリン酸及びフルメキンの分析法<sup>1)</sup> (以下「分析センター法」という。)を基に、飼料分析基準<sup>3)</sup>への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、オキシリン酸及びフルメキンの構造式を Fig. 1 に示した。

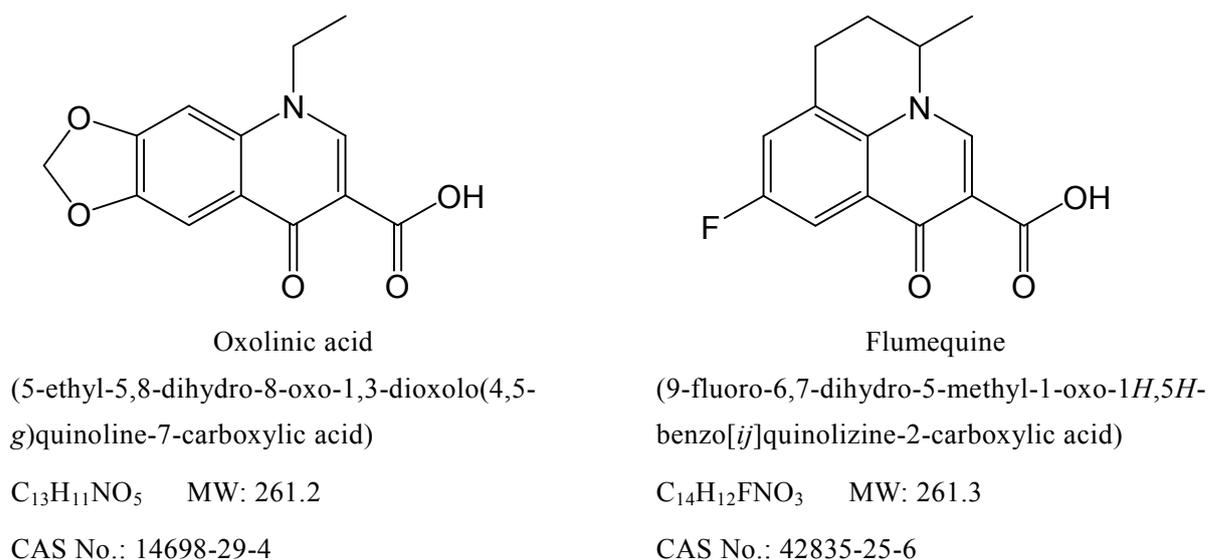


Fig. 1 Chemical structures of oxolinic acid and flumequine

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, まだい育成用) 及び飼料原料 (国産魚粉, ペルー産魚粉, エクアドル産魚粉, チキンミール, フェザーミール, ポークチキンミール) をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

**Table 1 Compositions of the formula feed used in this study**

Formula feed types	Ingredients types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	54	Corn, Polished rice
	Oil meal	28	Corn gluten meal, Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	6	Fish meal, Poultry by-product
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat Salt, Paprika extract, Feed additives
For finishing pig	Grains	74	Corn, Milo, Cleaned rice
	Oil meal	21	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Corn gluten feed
	Others	3	Animal fat, Molasses, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Vegetable oil, Feed additives
For red sea bream	Animal by-products	64	Fish meal, Antarctic krill meal
	Grains	17	Wheat flour
	Oil meal	6	Soybean meal, Corn gluten meal
	Brans	5	Rice bran, Wheat bran
	Others	8	Refined fish oil, Animal fat, Calcium phosphate, Seaweed powder, Banana powder, Feed yeast, Feed additives

## 2.2 試 薬

### 1) オキシリン酸標準原液

オキシリン酸標準品（関東化学製，純度 99.5 %）10 mg を正確に量り，100 mL の全量フラスコに入れ，水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）1 mL 及びメタノールを加え，超音波処理して溶かし，更に標線までメタノールを加えてオキシリン酸標準原液を調製した（この液 1 mL はオキシリン酸として 0.1 mg ( $f=0.995$ ) を含有する．）。

### 2) フルメキン標準原液

フルメキン標準品（関東化学製，純度 99.5 %）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，更に標線まで同溶媒を加えてフルメキン標準原液を調製した（この液 1 mL はフルメキンとして 0.1 mg ( $f=0.995$ ) を含有する．）。

### 3) 混合標準液

使用に際して，オキシリン酸標準原液及びフルメキン標準原液の一定量を混合し，水-メタノール（7+3）で正確に希釈し，1 mL 中にオキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 0.01, 0.25, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 及び 5  $\mu$ g を含有する各混合標準液を調製した。

### 4) 溶出溶媒

アセトニトリル-トルエン（3+1）1,000 mL にギ酸 2 mL を加えてギ酸含有アセトニトリル-トルエン混液を調製した。

### 5) 試薬等

アセトニトリル，メタノール，トルエン，蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた。ギ酸は Merck 製分析用 GR（純度 98 %以上）を用いた。メタリン酸については塊状、 $\text{HPO}_3$  とし

て 37%以上のものを用いた。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100 シリーズ
- 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 3) ロータリーエバポレーター：柴田科学機械工業製 R-114
- 4) C<sub>18</sub> ミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充填量 500 mg)
- 5) グラファイトカーボンミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep GC (充填量 250 mg)
- 6) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45 μm、PTFE)

### 2.4 定量方法

#### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL を加えた後、30 分間静置した。更に 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをプフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線まで 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えた。この液 4 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 mL を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

#### 2) カラム処理

C<sub>18</sub> ミニカラムにリザーバーを連結し、アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、圧注して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。

次に C<sub>18</sub> ミニカラムの下にあらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラムを連結した。試料溶液の入っていたなす形フラスコを 0.2 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (1+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次 C<sub>18</sub> ミニカラムに加え、圧注して液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ、オキシリン酸及びフルメキンをグラファイトカーボンミニカラムに移行させた。

次に C<sub>18</sub> ミニカラムをはずし、50 mL のなし形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置き、溶出溶媒 15 mL をグラファイトカーボンミニカラムに加えてオキシリン酸及びフルメキンを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で 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 (7+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

#### 3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、Table 2 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

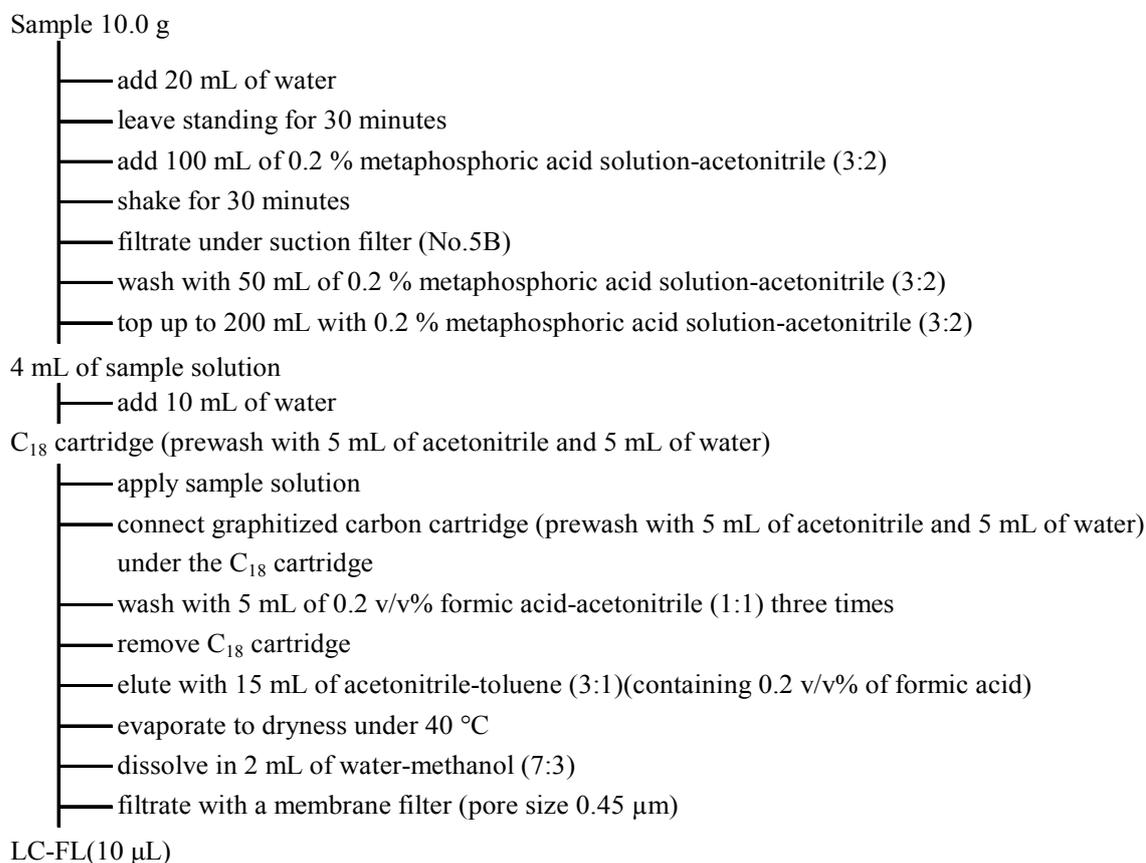
**Table 2 Operating conditions for LC for analysing oxolinic acid and flumequine**

Column	L-column ODS (4.6 mm i.d.×150 mm; 5 μm)
Mobile phase	0.2 v/v% Formic acid solution-methanol (7:3)→20 min→(6:4)
Detector	Fluorescence detector (Ex: 325 nm, Em: 365 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	40 °C

## 4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し，試料中のオキシリン酸量及びフルメキン量を算出した。

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for oxolinic acid and flumequine in feeds by using LC**

## 3 結果及び考察

## 3.1 検量線

調製した 0.01, 0.25, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 及び 5 μg/mL のオキシリン酸及びフルメキン標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し，得られたクロマトグラムのピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した。

その結果，検量線は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおり，オキシリン酸及びフルメキンともに 0.1~50 ng の範囲で直線性を示した。

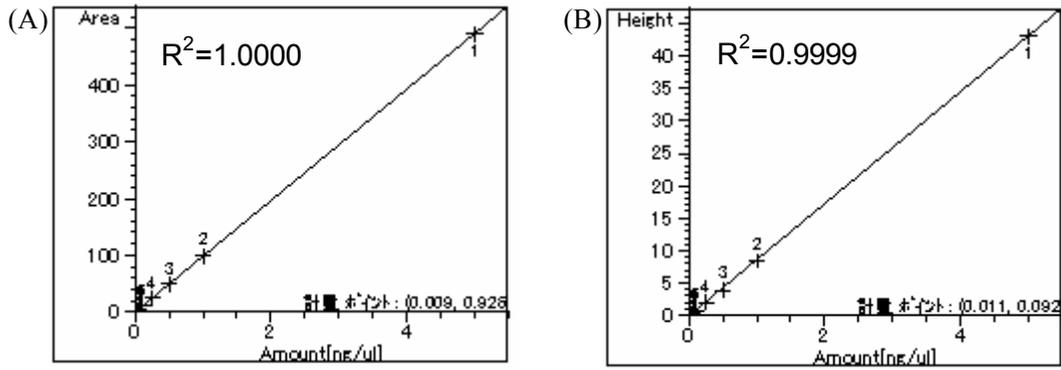


Fig. 2-1 Calibration curves of oxolinic acid by peak area (A) and peak height (B)

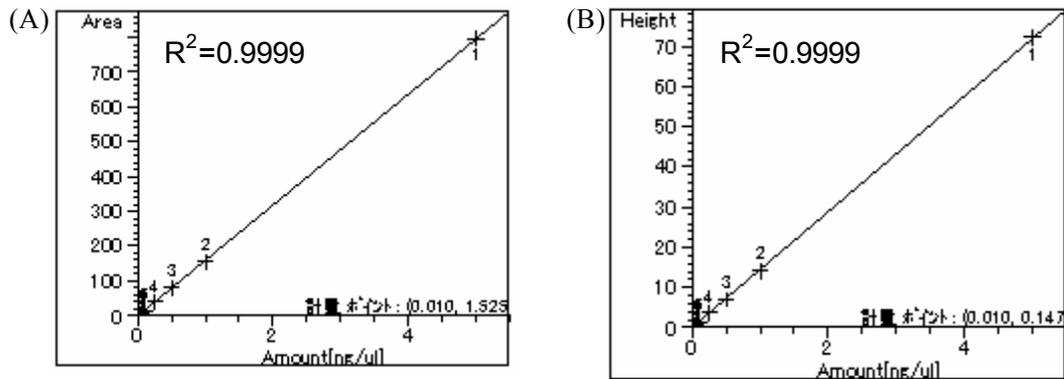


Fig. 2-2 Calibration curves of flumequine by peak area (A) and peak height (B)

### 3.2 オキシリン酸の安定性の検討

オキシリン酸は、水中光分解半減期が約 4 日<sup>1)</sup>であることから、最終試料溶液中での経時変化を確認した。

国産魚粉にオキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、本法により操作した直後の最終試料溶液を 0 時間とし、最終試料溶液を実験室の蛍光灯を点灯した状態の下で経時的に 2, 4, 8, 24 時間後の定量値の変化を確認した。また同時に最終試料溶液を遮光バイアルに入れ遮光状態でも 0 及び 24 時間後の定量値の変化を確認した。

その結果 Fig. 3 のとおり時間が経過するに従い定量値は低下した。一方、遮光条件では定量値の低下は見られなかった。

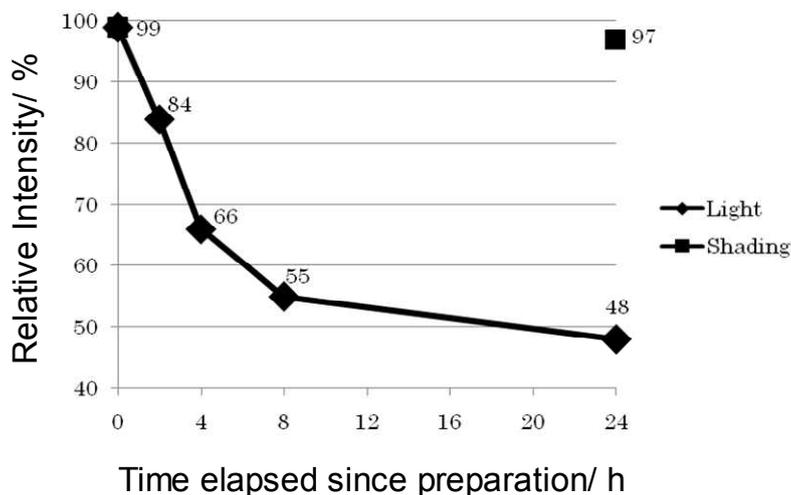


Fig. 3 Results of stability test for oxolinic acid

### 3.3 C<sub>18</sub> ミニカラムの検討

C<sub>18</sub> ミニカラム処理によるオキシリン酸及びフルメキンの溶出画分の確認を行った。

国産魚粉を 2.4 の 1)により抽出した液に、オキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、C<sub>18</sub> ミニカラム処理を行い、溶出画分の回収率を確認した。

その結果 Table 3 のとおり、0~15 mL に溶出し 15 mL 以上の画分には溶出されなかったため、C<sub>18</sub> ミニカラムからの溶出液量は 15 mL で十分と考えられた。

Table 3 Results of recovery test for oxolinic acid and flumequine

Fraction volume (mL)	(%)		
	0~15	15~20	Total
Oxolinic acid	96	0	96
Flumequine	98	0	98

### 3.4 グラファイトカーボンミニカラムの検討

グラファイトカーボンミニカラム処理によるオキシリン酸及びフルメキンの溶出画分の確認を行った。

国産魚粉を 2.4 の 1)により抽出した液に、オキシリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 5 mg/kg 相当量を添加し、C<sub>18</sub> ミニカラムで処理した後に、グラファイトカーボンミニカラムによる処理を行い、溶出画分の回収率を確認した。

その結果 Table 4 のとおり、0~15 mL に溶出し 15 mL 以上の画分には溶出されなかったため、グラファイトカーボンミニカラムからの溶出液量は 15 mL で十分と考えられた。

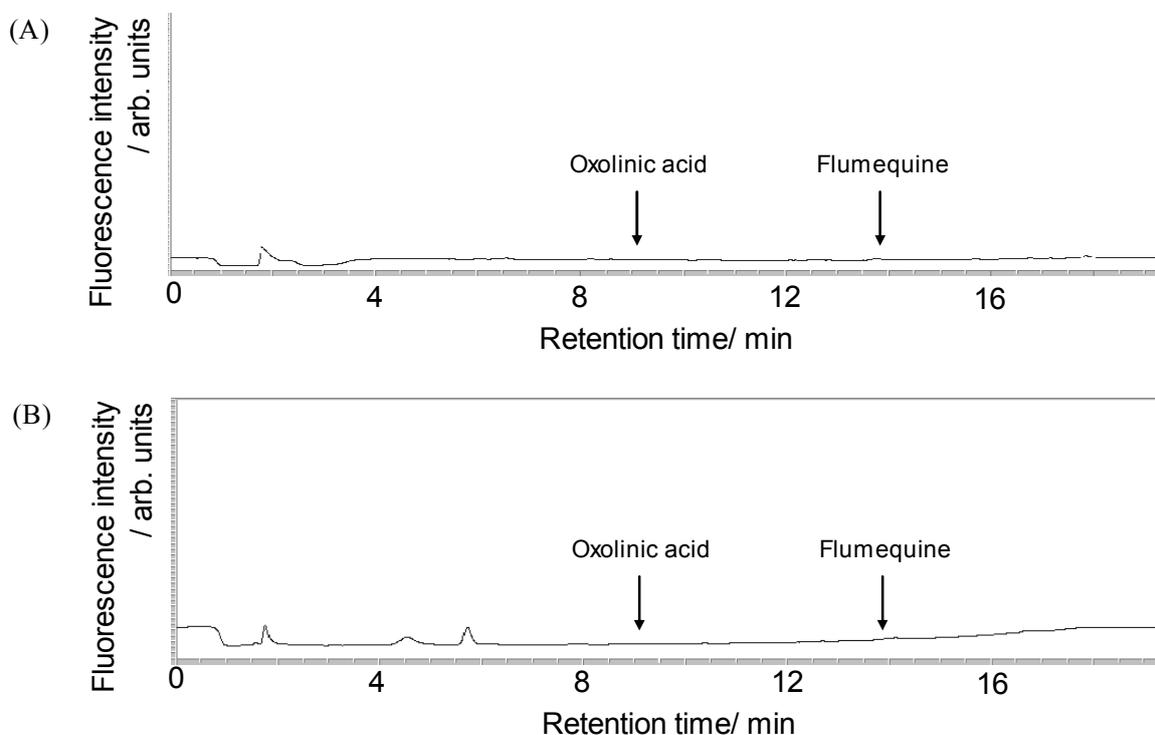
**Table 4 Results of recovery test for oxolinic acid and flumequine**

Fraction volume (mL)	(%)		
	0~15	15~20	Total
Oxolinic acid	98	0	98
Flumequine	99	0	99

### 3.5 妨害物質の検討

配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，まだい育成用）及び飼料原料（国産魚粉，ペルー産魚粉，エクアドル産魚粉，チキンミール，フェザーミール，ポークチキンミール）について，本法に従ってクロマトグラムを作成し，オキシリン酸及びフルメキンの定量を妨害するピークの有無を検討した．その結果，オキシリン酸及びフルメキ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クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した．

**Fig. 4 Chromatograms of each sample solution**

- (A) Sample solution of formula feed for layer  
 (B) Sample solution of fish meal

### 3.6 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 の成鶏飼育用配合飼料，まだい育成用配合飼料及び魚粉（国産魚粉，ペルー産魚粉，エクアドル産魚粉）にオキシリン酸及びフルメキンとして 1 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，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．

その結果，Table 5 及び 6 のとおり，オキシリン酸については，平均回収率は 71.1~94.4 %，そ

の繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下, フルメキンについては, 平均回収率は 71.5~90.5 %, その繰返し精度は RSD として 16 %以下の結果が得られた.

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. 5 に示した.

**Table 5 Results of recovery test for oxolinic acid**

(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (domestic)		Fish meal (Peru)		Fish meal (Ecuador)	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
5	94.4	( 2.2)	71.1	(11 )	90.8	( 3.8)	71.8	( 1.7)	80.3	( 3.6)
1	81.8	( 7.3)	74.5	( 2.4)	76.3	(10 )	83.3	( 5.7)	78.2	( 1.5)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation

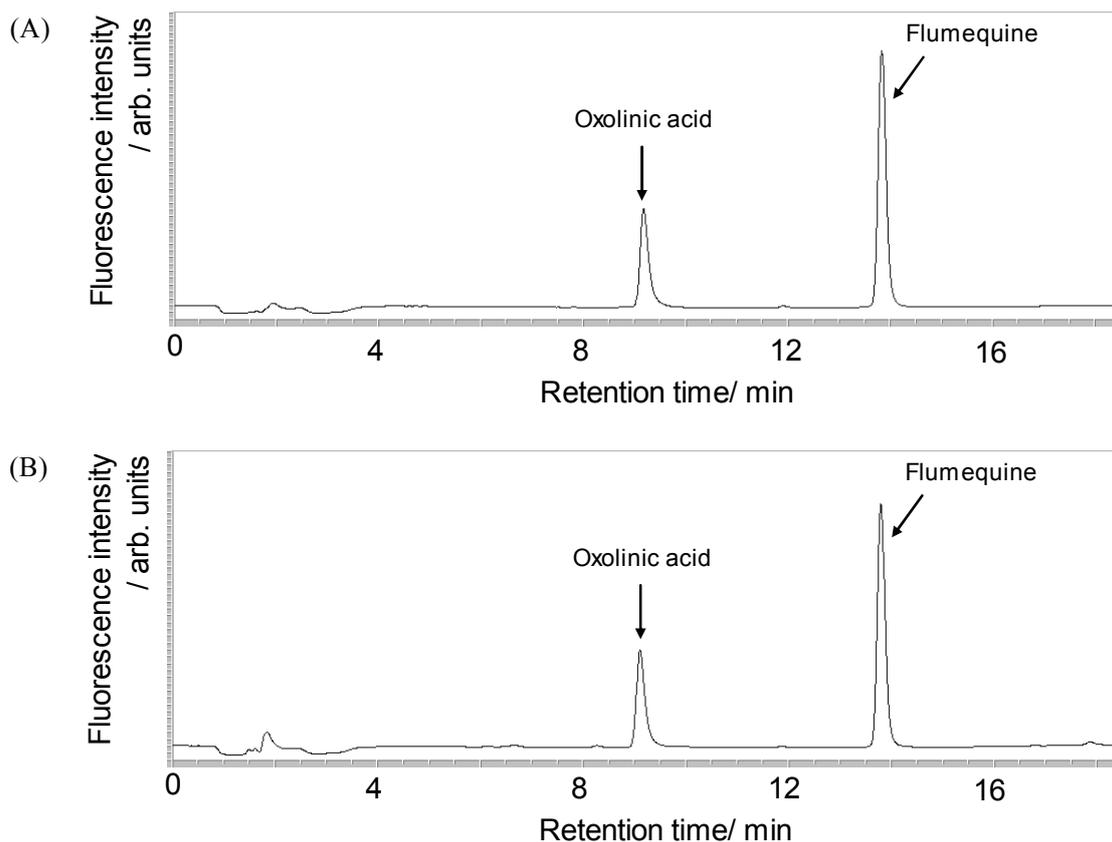
**Table 6 Results of recovery test for flumequine**

(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (domestic)		Fish meal (Peru)		Fish meal (Ecuador)	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Rec. <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
5	90.5	( 2.5)	74.7	(12 )	86.7	( 1.9)	73.3	(11 )	80.5	( 5.2)
1	83.3	( 1.7)	74.2	( 2.6)	71.5	( 1.4)	85.3	(16 )	82.0	( 2.7)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation



**Fig. 5 Chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Standard solution of oxolinic acid and flumequine (500 ng/mL)

(B) Sample solution of formula feed for layer (spiked with oxolinic acid and flumequine at 5 mg/kg)

### 3.7 検出下限

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比並びに回収率及び繰り返し精度を求めた。

成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉にオキシリン酸として 0.5 mg/kg, フルメキンとして 0.5 及び 0.3 mg/kg 相当量添加した試料について 3 点併行分析を行った。その結果、平均回収率及び繰り返し精度は Table 7 及び 8 のとおりであった。また、オキシリン酸のピークの  $SN$  比が 10 となる濃度は 0.5 mg/kg, フルメキンは 0.3 mg/kg であった。

以上の結果から、本法は試料中のオキシリン酸を 0.5 mg/kg, フルメキンを 0.3 mg/kg まで検出可能と考えられた。

**Table 7 Results of recovery test at the concentration of detection limit for oxolinic acid**  
(%)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layer		Domestic fish meal	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5	72.6	( 3.5)	77.7	(12 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

**Table 8 Results of recovery test at the concentration of detection limit for flumequine**

Spiked level (mg/kg)	(%)			
	Formula feed for layer		Domestic fish meal	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5	78.9	( 6.8)	72.2	( 7.5)
0.3	89.3	(12 )	77.5	(11 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

### 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。

魚粉及び成鶏飼育用配合飼料にオキシリン酸及びフルメキンとして各 3 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター多摩研究所，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，JA 東日本くみあい飼料株式会社本社分析センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター及び同福岡センターの 8 試験室で共同分析を実施した。

オキシリン酸についての結果は Table 9 のとおりであり，魚粉では，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それぞれ相対標準偏差（RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub>）として 6.1 % 及び 9.5 % であり，HorRat は 0.68 であった。

また，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 88.7 %，RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub> はそれぞれ 5.9 % 及び 6.6 % であり，HorRat は 0.48 であった。

フルメキンについての結果は Table 10 のとおりであり，魚粉では，平均回収率は 82.0 %，RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub> はそれぞれ 4.1 % 及び 8.3 % であり，HorRat は 0.59 であった。

また，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 87.7 %，RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub> はそれぞれ 5.5 % 及び 6.9 % であり，HorRat は 0.50 であった。

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の機種等を Table 11 に示した。

**Table 9 Collaborative study results of oxolinic acid**

Lab.No.	(mg/kg)			
	Sample			
	Fish meal		Formula feed for layer	
1	2.22	2.42	2.47	2.73
2	2.42	2.33	2.43	2.78
3	2.49	2.19	2.27	2.53
4	2.17	2.41	2.72	2.87
5	2.73	2.66	2.78	2.51
6	2.74	2.96	2.75	2.88
7	2.80	2.48	2.66	2.68
8	2.32	2.47	2.84	2.68
Spiked level	3.00		3.00	
Mean value <sup>a)</sup>	2.49		2.66	
Recovery (%)	83.0		88.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.1		5.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.5		6.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	14		14	
HorRat	0.68		0.48	

a)  $n=16$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 10 Collaborative study results of flumequine**

Lab.No.	(mg/kg)			
	Sample			
	Fish meal		Formula feed for layer	
1	2.31	2.43	2.51	2.71
2	2.47	2.47	2.43	2.57
3	2.33	2.15	2.23	2.61
4	2.13	2.38	2.83	2.96
5	2.59	2.62	2.57	2.50
6	2.69	2.86	2.70	2.79
7	2.68	2.54	2.50	2.79
8	2.32	2.38	2.75	2.63
Spiked level	3.00		3.00	
Mean value <sup>a)</sup>	2.46		2.63	
Recovery (%)	82.0		87.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.1		5.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.3		6.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	14		14	
HorRat	0.59		0.50	

a)  $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 11 Instruments used in the collaborative study**

Lab.No.	LC system	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Agilent Technologies, Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
4	JASCO, Pump PU-980 Auto sampler AS-950 Column oven CO-965 Detector FP-2025 Plus	Showa Denko, Shodex C18M4E (4.6 mm×250 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute, L-column ODS (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
6	Shiseido, NANOSPACE SI-2 Detector NANOSPACE SI-2 3013	Tosoh Bioscience, TSKgel ODS-80TM (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies, LC-1100 Series	Shiseido, CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)
8	Shimadzu, Pump LC-20A System controller CBM-20A Auto sampler SIL-20AC Column oven CTO-20A Detector RF-10AXL	GL Science, Inertsil ODS-3 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

飼料中のオキシリン酸及びフルメキンについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフを用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) オキシリン酸及びフルメキンの検量線は 0.1~50 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) C<sub>18</sub> ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム処理の溶出画分の確認を行ったところ溶出液の必要量はそれぞれ 15 mL で十分であった。
- 3) 最終試料溶液中でのオキシリン酸の安定性を確認したところ、遮光しない場合、経時的に定量値が減少することから、遮光バイアルを用いる必要があると考えられた。
- 4) 3 種類の配合飼料及び 6 種類の飼料原料について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、オキシリン酸及びフルメキンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 5) 2 種類の配合飼料及び 3 種類の魚粉を用いて、オキシリン酸及びフルメキンとして 1 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、オキシリン酸については、平均回収率は 71.1~94.4 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下、フルメキンについては、平均回収率は 71.5~90.5 %、その繰返し精度は RSD として 16 %以下の結果が得られた。
- 6) 本法は試料中のオキシリン酸を 0.5 mg/kg、フルメキンを 0.3 mg/kg で検出可能であった。
- 7) 魚粉及び成鶏飼育用配合飼料にオキシリン酸及びフルメキンとして各 3 mg/kg 相当量をそれぞれ

れ添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同分析を実施した。その結果、オキシリン酸について、魚粉では、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それぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 6.1 % 及び 9.5 % であり、HorRat は 0.68 であった。また、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 88.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 5.9 % 及び 6.6 % であり、HorRat は 0.48 であった。フルメキンについて、魚粉では、平均回収率は 82.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 4.1 % 及び 8.3 % であり、HorRat は 0.59 であった。また、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 87.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 5.5 % 及び 6.9 % であり、HorRat は 0.50 であった。なお、本法は、平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

### 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多摩研究所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、JA 東日本くみあい飼料株式会社本社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) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2008).
- 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 日付け食安発第 0124001 号 (2005).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).

## 4 魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

小森谷 敏一\*

### Simultaneous Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Fish Oil by LC-MS/MS

Toshiichi KOMORIYA\*

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

An analytical method for determination of malachite green and leucomalachite green in fish oil using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. Malachite green and leucomalachite green were extracted with acetonitrile-acetic acid (19+1) and hexane (saturated with acetonitrile). The extracts were purified by Bond Elut SCX (Varian) column, and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of malachite green and leucomalachite green. A recovery test was conducted using refined fish oil and non-refined fish oil spiked with 2 and 100 µg/kg of malachite green and leucomalachite green. The mean recoveries of malachite green were in the range of 89.9~101 % with the relative standard deviation of within 10 %. These respective values were 94.6~112 % and 3.9 % for leucomalachite green. A collaborative study was conducted in eight laboratories using refined fish oil and non-refined fish oil spiked with 5 µg/kg of malachite green and leucomalachite green. The mean recovery of malachite green in the refined fish oil was 87.4 %, and repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 6.8 % and 13 % respectively, and HorRat was 0.60. The mean recovery of leucomalachite green was 108 % with RSD<sub>r</sub> of 3.8 %, RSD<sub>R</sub> of 8.2 % and HorRat of 0.37. For the non-refined fish oil, these respective values were 85.9 %, 2.5 %, 12 % and 0.56 for malachite green, and 101 %, 4.2 %, 6.2 % and 0.28 for leucomalachite green.

Key words: 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; マラカイトグリーン malachite green ; ロイコマラカイトグリーン leucomalachite green ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 liquid chromatograph-tandem mass spectrometer ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 魚油 fish oil ; 共同試験 collaborative study

### 1 緒 言

マラカイトグリーン（以下「MG」という）は、緑色の合成色素で工業的にトリフェニルメタン染料として繊維等の染色に使用されている。また、抗菌活性を示し、水産において水カビ病の治療薬として使用されていたが、近年、発がん性が示唆され、遺伝毒性が疑われている<sup>1)</sup>。また、ロイコマラカイトグリーン（以下「LMG」という）は、MGが生体内で還元されて生じる代謝物である。

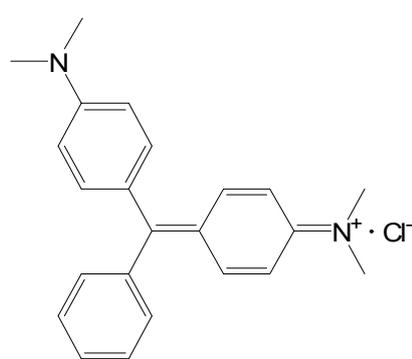
\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

国内では薬事法の一部改正及びそれに伴う動物用医薬品等取締規則の一部改正により現在、すべての食用水産動物に対しての使用が禁止されている。

魚粉及び配合飼料の MG 及び LMG の分析法については、平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知にて飼料分析基準<sup>2)</sup>に記載されているが、魚油については分析法が検討されていない。

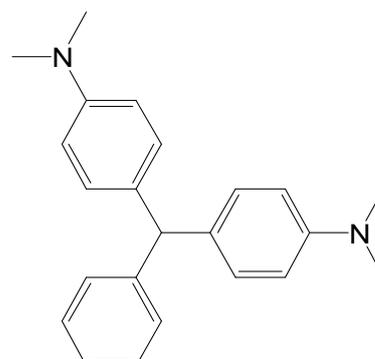
今回、「平成 19 年度 飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した「魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの分析法」<sup>3)</sup>（以下「分析センター法」という。）を基に飼料分析基準への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの構造式を Fig. 1 に示した。



Malachite green (MG) chloride  
N-[4-[[4-(dimethylamino)-phenyl]  
phenylmethylene]-2,5-cyclohexadien-  
1-ylidene]-N-methylmethanaminium  
chloride

$C_{23}H_{25}ClN_2$  MW: 364.9  
CAS No.: 569-64-2



Leucomalachite green (LMG)  
4,4'-benzylidenebis(N,N-dimethylaniline)

$C_{23}H_{26}N_2$  MW: 330.5  
CAS No.: 129-73-7

**Fig. 1 Chemical structures of MG and LMG**

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の精製魚油及び未精製魚油を用いた。

### 2.2 試薬

#### 1) MG 標準原液

MG シュウ酸塩標準品（Sigma-Aldrich 製，純度 97.2 %）12.7 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，更に標線まで同溶媒を加えて MG の標準原液を調製した（この液 1 mL は，MG として 100  $\mu$ g ( $f=0.972$ ) を含有する。）。

#### 2) LMG 標準原液

LMG 標準品（林純薬工業製，純度 99.9 %）10.0 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，更に標線まで同溶媒を加えて LMG の標準原液を調製した（この液 1 mL は，LMG として 100  $\mu$ g ( $f=0.999$ ) を含有する。）。

3) MG-d<sub>5</sub> (安定同位体元素標識 MG) 内標準原液

MG シュウ酸塩-d<sub>5</sub> 標準品 (林純薬工業製, 純度 97.5%) 6.4 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて MG-d<sub>5</sub> の標準原液を調製した (この液 1 mL は, MG-d<sub>5</sub> として 100 µg ( $f=0.975$ ) を含有する. ).

4) LMG-d<sub>6</sub> (安定同位体元素標識 LMG) 内標準原液

LMG-d<sub>6</sub> 標準品 (林純薬工業製, 純度 99.9 %) 5.0 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて LMG-d<sub>6</sub> の標準原液を調製した (この液 1 mL は, LMG-d<sub>6</sub> として 100 µg ( $f=0.999$ ) を含有する. ).

## 5) 混合内標準液

使用に際して, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> 内標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリルを加えて, 1 mL 中に MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> として各 1 µg を含有する混合内標準液を調製した.

## 6) 検量線作成用標準液

使用に際して, MG 及び LMG 各標準原液並びに混合内標準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 MG 及び LMG としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 及び 20 ng を含有し, かつ MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 5 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

## 7) 溶離液調製用アセトニトリルは LC-MS 用, 標準液調製用メタノール及びアセトニトリルは HPLC 用を用いた. 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タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) :

LC 部 : Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部 : Agilent Technologies 製 6410 Triple Quad LC/MS

## 2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

## 3) 遠心分離器 : 久保田製作所製 5200

## 4) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

## 5) ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) :

Varian 製 Bond Elut SCX (リザーバー容量 3 mL) に 10 mL のリザーバーを連結したもの

## 2.4 定量方法

## 1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ, 混合内標準液 50 µL を正確に加えた. 更にアセトニトリル-酢酸 (19+1) 40 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加えた. 10 分間振り混ぜた後, 2,600 rpm (1,300×g) で 5 分間遠心分離し, ヘキサン層 (上層) を駒込ピペットで除去し, アセトニトリル層 (下層) を試料溶液とした.

## 2) 精製

ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル-酢酸 (19+1) 5 mL で洗浄した. 試料溶液 4 mL をミニカラムに正確に加え, 自然流下で液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 更にアセトン 2.5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた.

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトニトリル-アンモニア水 (19+1)

10 mL をミニカラムに加えて MG 及び LMG を溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．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 (容量 1.5 mL) に入れ，10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し，上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

### 3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という。) に注入し，Table 1 及び Table 2 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

**Table 1 Operating conditions for LC-MS/MS for analysing MG and LMG**

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	A: 0.3 v/v % ammonia solution-2 v/v % formic acid solution-water-acetonitrile (10:81:10:8) B: 0.3 v/v % ammonia solution-2 v/v % formic acid solution-water-acetonitrile (10:9:8 B(v/v%) 30 v/v% (1 min)→7 min→100 v/v% (10 min)
Flow rate	0.25 mL/min
Column temp.	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer	N <sub>2</sub> (340 kPa)
Drying gas temp.	N <sub>2</sub> (350 °C)
Capillary voltage	4,000 V

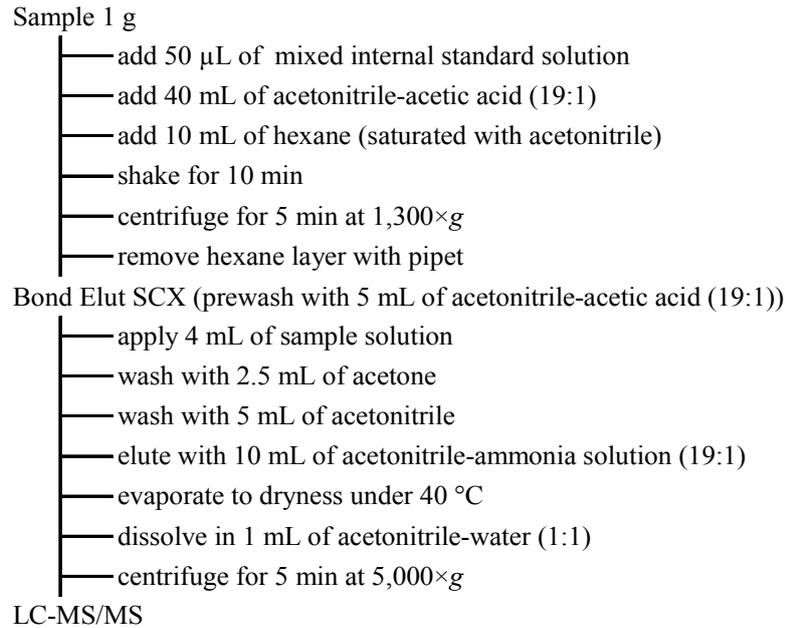
**Table 2 MS/MS Parameters**

Substance	Mode	Precursor ( <i>m/z</i> )	Product ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Collision (eV)
MG	+	329	313	208	100	40
MG-d <sub>5</sub>	+	334	318	—	100	40
LMG	+	331	239	316	100	25
LMG-d <sub>6</sub>	+	337	240	—	100	25

### 4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し，試料中の MG 及び LMG 量を算出した。

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。

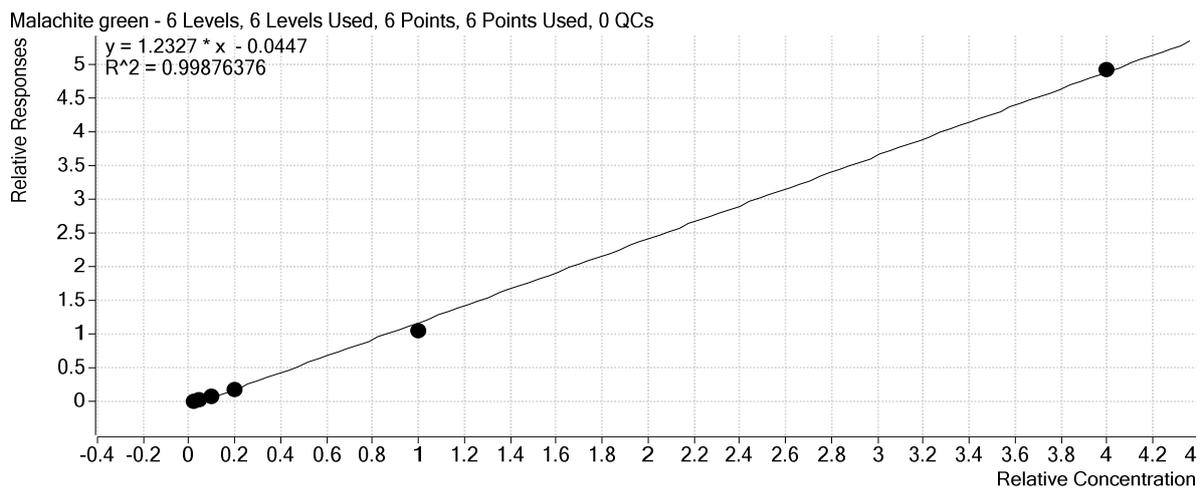


**Scheme 1 Analytical procedure for MG and LMG in fish oil**

### 3 検討内容

#### 3.1 検量線

MG 及び LMG として 1 mL 中に 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 及び 20 ng を含有し、かつ、MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 5 ng を含有する各混合標準液を調製し、これらの液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムから MG 及び LMG と MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 及び Fig. 3 のとおり、MG 及び LMG として 0.5~100 pg の範囲で直線性を示した。



**Fig. 2 Calibration curve of MG**

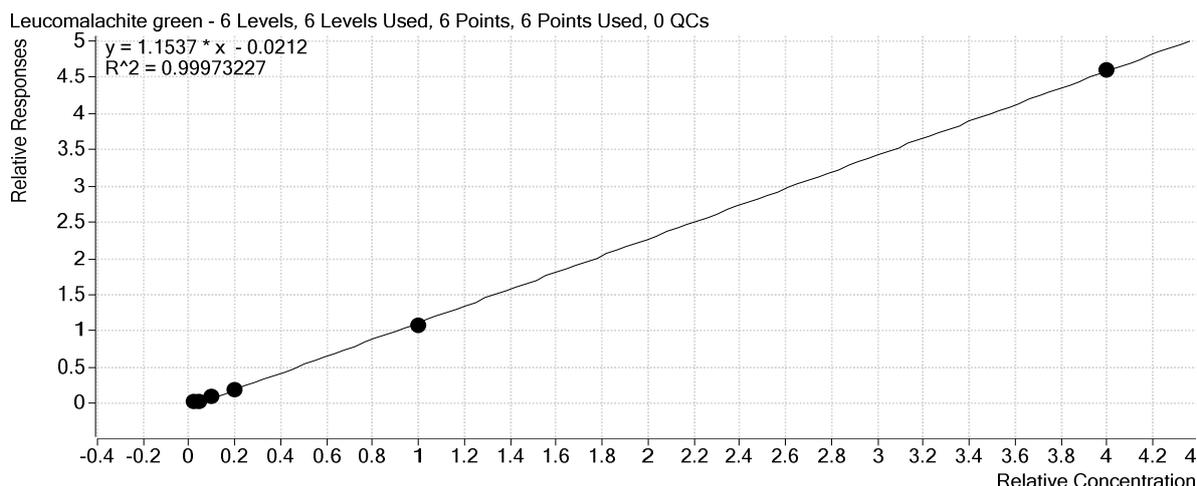


Fig. 3 Calibration curve of LMG

### 3.2 妨害物質の検討

精製魚油 4 点及び未精製魚油 6 点について本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成し、MG 及び LMG の定量を妨害するピークの有無を検討した。その結果、MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった。

### 3.3 窒素ガスによる通気乾燥操作の必要性の有無

分析センター法ではミニカラムにおける精製においてアセトニトリル流出後に溶媒を揮散させるために窒素ガスによる通気乾燥を行うこととなっているが、妨害物質の検討時に内標準物質の回収率が低くなる（10%以下）傾向が見られたので、以降、本操作は行わないこととした。

### 3.4 ミニカラム処理における溶出画分の確認

ミニカラム処理による MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> の溶出状況を確認した。

精製魚油に MG 及び LMG としてそれぞれ 100 µg/kg 相当量ずつを添加し、本法により操作した後、ミニカラム処理を行い、MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> 溶出状況を確認した。

その結果、Table 3 のとおりアセトニトリル-アンモニア水（19+1）10 mL でほぼ溶出され、内標準物質も同様の挙動を示すことから、溶出液量は 10 mL で十分であると思われた。

Table 3 Elution pattern from Bond Elut SCX

Fraction volume (mL)		0~10	10~12	12~14	14~16	16~18	18~20
MG	area (arb. units)	443,558	2,249	1,083	969	758	773
	relative value (%)	100	0.51	0.24	0.22	0.17	0.17
MG-d <sub>5</sub>	area (arb. units)	190,314	1,045	448	360	316	320
	relative value (%)	100	0.55	0.24	0.19	0.17	0.17
LMG	area (arb. units)	162,683	1,271	859	371	443	658
	relative value (%)	100	0.78	0.53	0.23	0.27	0.40
LMG-d <sub>6</sub>	area (arb. units)	74,077	623	382	160	228	331
	relative value (%)	100	0.84	0.52	0.22	0.31	0.45

### 3.5 添加回収試験及び検出下限

本法による回収率及び繰返し精度を確認するため、添加回収試験を実施した。

精製魚油 2 種類及び未精製魚油 2 種類に MG 及び LMG としてそれぞれ 2 及び 100 µg/kg 相当量ずつを添加した試料を用いて、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。

その結果、Table 4 及び Table 5 のとおり、MG の平均回収率は 89.9~101 %、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。また、LMG の平均回収率は 94.6~112 %、その繰返し精度は RSD として 3.9 %以下であった。

また、内標準として添加した MG-d<sub>5</sub> について、ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値は、67.8 %であった。同様に、LMG-d<sub>6</sub> については、41.8 %であった。なお、添加回収試験で得られた精製魚油における選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

以上の結果から、本法は、魚粉及び配合飼料の MG 及び LMG の分析法の検出下限である試料中 2 µg/kg 相当量を魚油において同様に検出可能であると考えられた。

**Table 4 Results of recovery test for MG**

Spiked level (µg/kg)	refined fish oil 1		refined fish oil 2		non-refined fish oil 1		non-refined fish oil 2	
	Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>		Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>						
100	93.3	( 1.8)	89.9	( 3.1)	91.8	( 2.1)	94.2	( 2.5)
2	97.4	( 5.9)	98.0	( 3.3)	98.1	(10.0)	101	( 4.6)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

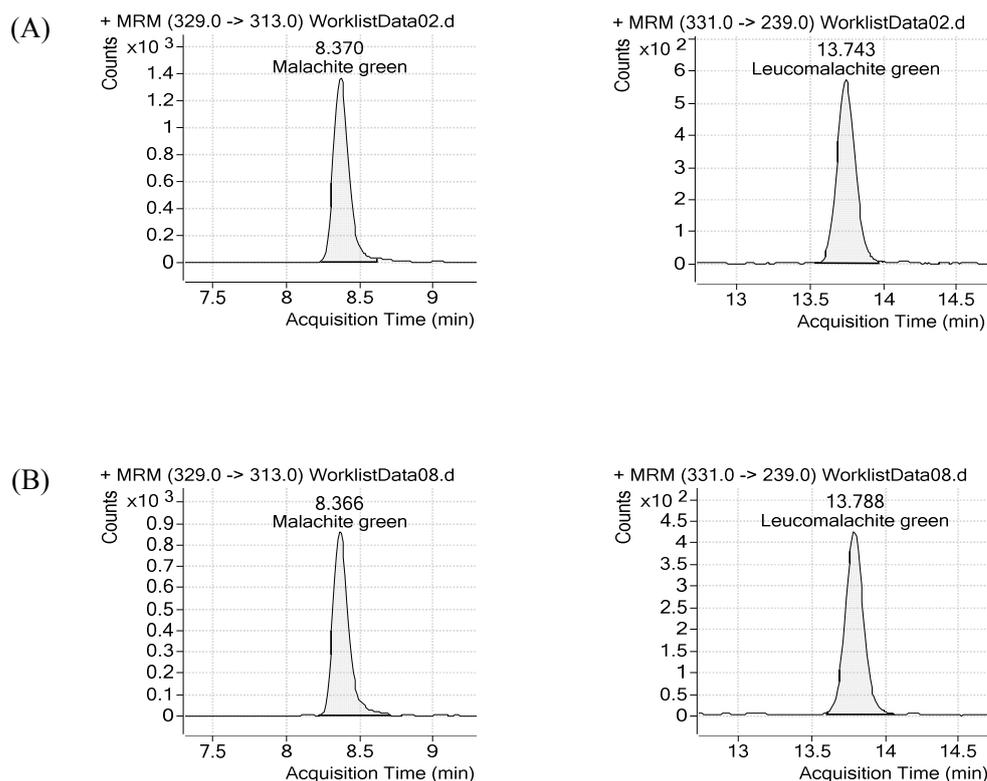
b) Relative standard deviation (RSD)

**Table 5 Results of recovery test for LMG**

Spiked level (µg/kg)	refined fish oil 1		refined fish oil 2		non-refined fish oil 1		non-refined fish oil 2	
	Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>		Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>						
100	99.5	( 0.5)	103	( 3.9)	94.6	( 1.7)	99.4	( 1.6)
2	107	( 3.0)	112	( 3.1)	97.7	( 1.6)	105	( 1.1)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)



**Fig. 4 Chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Standard solution (The amount of MG and LMG are each 1 pg.)

(B) Sample solution of refined fish oil spiked MG and LMG at each 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 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。

精製魚油及び未精製魚油に MG 及び LMG としてそれぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した共通試料を用いて、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、協同飼料株式会社研究所、財団法人食品環境検査協会東京事業所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部及び同仙台センター（8 試験室）において、本法に従って共同試験を実施した。

MG の共同試験の結果は Table 6 のとおりであり、精製魚油における平均回収率は 87.4 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_T$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 6.8 % 及び 13 %，HorRat は 0.60 であった。未精製魚油における平均回収率は 85.9 %，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_T$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.5 % 及び 12 % であり，HorRat は 0.56 であった。

LMG の共同試験の結果は Table 7 のとおりであり、精製魚油における平均回収率は 108 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_T$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 3.8 % 及び 8.2 %，HorRat は 0.37 であった。未精製魚油における平均回収率は 101 %，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_T$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.2 % 及び 6.2 % であり，HorRat は 0.28 であった。

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

**Table 6 Collaborative study results of MG**

Lab. No.	Sample			
	Refined fish oil		Non-refined fish oil	
1	4.95	4.04	4.21	4.35
2	4.39	4.18	4.02	4.13
3	4.57	4.54	4.50	4.57
4	5.10	4.81	4.86	5.03
5	3.86	3.62	3.82	3.88
6	3.58	3.36	3.47	3.31
7	4.70	5.27	5.05	4.74
8	4.55	4.43	4.38	4.40
Spiked level	5.00		5.00	
Mean value <sup>a)</sup>	4.37		4.30	
Recovery (%)	87.4		85.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.8		2.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		12	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.60		0.56	

a) Mean value ( $n=16$ )

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 7 Collaborative study results of LMG**

Lab. No.	Sample			
	Refined fish oil		Non-refined fish oil	
1	5.80	5.47	5.07	4.73
2	4.78	5.38	4.48	4.80
3	5.33	5.53	5.18	5.20
4	6.19	6.02	5.21	5.20
5	5.05	5.05	5.61	5.17
6	5.02	4.95	4.85	4.74
7	5.34	4.96	5.28	4.75
8	5.85	5.90	5.35	5.44
Spiked level	5.00		5.00	
Mean value <sup>a)</sup>	5.41		5.07	
Recovery (%)	108		101	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.8		4.2	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.2		6.2	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.37		0.28	

a) Mean value ( $n=16$ )

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 8 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Premier XE	Shiseido CAPCELL-PAK C18 UG120 (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LC20AD	Applied Biosystems API 3200Q	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Chemicals Evaluation and Research Institute L-Column2 ODS (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Plus-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
8	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) MG 及び LMG の検量線は 0.5~100 pg の範囲で直線性を示した。
- 2) 精製魚油 4 点及び未精製魚油 6 点を用い、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) ミニカラム処理による MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> の溶出画分を確認したところ、溶出液量は 10 mL で十分であった。
- 4) 精製魚油 2 種類及び未精製魚油 2 種類に MG 及び LMG として、それぞれ 2 及び 100 μg/kg 相当量ずつを添加し、添加回収試験を実施したところ、MG の平均回収率は 89.9~101 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 10 %以下, LMG の平均回収率は 94.6~112 %, その繰返し精度は RSD として 3.9 %以下の成績が得られた。
- 5) 本法は試料中の MG 及び LMG を 2 μg/kg で検出可能であった。

なお、本法は、平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

#### 謝 辞

共同試験に参加して頂いたアジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、協同

飼料株式会社研究所，財団法人食品環境検査協会東京事業所，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター彩都研究所，財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 17 年 11 月 24 日，府食第 1140 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業（分析法の開発） (2008).

## 5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

山本 克己\*, 大島 慎司\*

### Determination of Chloramphenicol in Feeds by LC-MS/MS

Katsumi YAMAMOTO\* and Shinji OSHIMA\*

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

An analytical method for determination of chloramphenicol in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. Chloramphenicol was extracted with methanol-1 % metaphosphoric acid solution (3:2). The extract was filtered and topped up to 200 mL with water. 20 mL of the sample solution was concentrated and purified with divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer column (Waters, Oasis HLB) and neutral alumina column (Waters, Sep-Pak Plus Alumina N), and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on an ODS column (Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II, 2.0 mm i.d.×150 mm, 2.2 μm) using gradient with 10 mmol/L ammonium formate solution-acetonitrile as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. A recovery test was conducted with fish meal and three kinds of formula feed spiked with chloramphenicol at 5 and 25 μg/kg. The mean recoveries were 93.5~101 % and relative standard deviations (RSD) were within 12 %. A collaborative study was conducted in eight laboratories using a fish meal and a formula feed spiked with chloramphenicol at 5 μg/kg. For the fish meal, the mean quantitative value was 5.19 μg/kg (104 %), repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 4.8 and 5.6 %, respectively, and HorRat was 0.25. For the formula feed, these respective values were 5.21 μg/kg (104 %), 4.5 %, 5.5 % and 0.25.

**Key words:** 抗生物質 antibiotics ; クロラムフェニコール chloramphenicol ; 魚粉 fish meal ; 配合飼料 formula feed ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 選択反応検出 selected reaction monitoring (SRM) ; 共同試験 collaborative study

### 1 緒 言

クロラムフェニコールは、合成法によって工業的製造が行われている広範囲スペクトルの抗生物質である<sup>1)</sup>。その副作用として、骨髄の造血機能に毒性を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある<sup>2)</sup>。

クロラムフェニコールは、我が国では食品一般の成分規格において不検出とされる農薬等の成分である物質として規定されている<sup>3)</sup>。また、飼料添加物に指定された抗生物質ではないため、飼

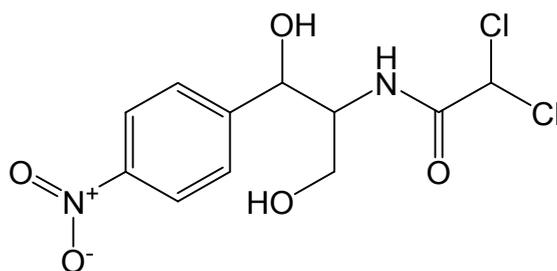
\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

料安全法に基づく成分規格等省令<sup>4)</sup>により、飼料に含まれてはならないとされている。平成 18 年度の輸入食品検査において、ベトナム産のイカ加工品をはじめとする水産動物及び魚類から、クロラムフェニコールが検出された<sup>5)</sup>。

現在、クロラムフェニコールの定量法は、厚生労働省の告示分析法 (LC-MS 法) 等があり、飼料においては、菅野<sup>6)</sup>による脱脂粉乳を対象とした方法 (LC-UV 法) が飼料分析基準<sup>7)</sup>に記載されている。平成 19 年度において、筆者は、この飼料分析基準を参考に魚粉及び魚粉を含む配合飼料への適用の拡大について検討を実施した。しかしながら、この分析法による低濃度での添加回収試験の結果は良好であったものの、試料溶液の精製にクロロホルム等の試薬を多量に使用することによる環境及び分析者における健康面への負担の懸念があり、精製効果が低い試料溶液を感度上昇のため高濃縮しているため、検出器を汚染しやすいなどの問題が認められた。このため、飼料分析基準への適用が困難であると考えられた<sup>8)</sup>。

平成 20 年 3 月に、財団法人日本食品分析センターが「平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業」において開発した分析法<sup>9)</sup> (以下「分析センター法」という。) が示されたことから、この分析法を基に飼料分析基準への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、クロラムフェニコールの構造式を Fig. 1 に示した。



2,2-dichloro-*N*-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]acetamide

C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> MW: 323.1 CAS No.: 56-75-7

**Fig. 1** Chemical structure of chloramphenicol

## 2 実験方法

### 2.1 試料

魚粉 (調整魚粉)、配合飼料 (ブロイラー肥育前期用、ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用) 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配合割合を Table 1 に示した。

**Table 1 Compositions of the formula feeds used in this study**

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For broiler starting chick	Grains	61	Corn, Polished rice
	Oil meal	27	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	6	Fish meal, Chicken meal, Feather meal
	Others	6	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate Salt, Vermiculite, Yucca extract, Feed additives
For suckling pig	Grains	65	Corn, Milo
	Oil meal	22	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	8	Fish meal, Dried skimmilk, Dried whey
	Others	5	Animal fat, Bakery waste, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Feed yeast, Feed additives
For silver salmon	Animal by-products	49	Fish meal
	Grains	22	Wheat flour, Starch
	Oil meal	5	Corn gluten meal, Soybean meal
	Others	24	Animal fat, Vegetable oil, Calcium phosphate Striped bamboo, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) クロラムフェニコール標準液

クロラムフェニコール [ $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ] (和光純薬工業製, 純度 98.0 %) 20 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製した (この液 1 mL は, クロラムフェニコールとして 0.1 mg ( $f=0.98$ ) を含有する). 更に, 標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.5  $\mu$ g を含有する液を調製した.

使用に際して, この液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.05  $\mu$ g を含有するクロラムフェニコール標準液を調製した.

### 2) 内標準液

安定同位体元素標識クロラムフェニコール (CP-d<sub>5</sub>) 標準原液 (和光純薬工業製, 濃度 100  $\mu$ g/mL, 純度 98.0 %) 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線までアセトニトリルを加えて 1 mL 中に CP-d<sub>5</sub>として 1  $\mu$ g ( $f=0.98$ ) を含有する液を調製した.

使用に際して, 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 CP-d<sub>5</sub>として 50 ng を含有する内標準液を調製した.

### 3) 検量線作成用標準液

クロラムフェニコール標準液及び内標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し, 1 mL 中にクロラムフェニコールとして 1, 2, 5, 10 及び 20 ng を含有し, かつ CP-d<sub>5</sub>として 2.5 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

### 4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に用いるアセトニトリル及び水は, 高速液体クロマトグラフ用を用いた. その他の試薬は特級を用いた.

## 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Waters 製 Alliance 2695
- 2) タンデム型質量分析計：Waters 製 Quattro micro API Mass Analyzer
- 3) ロータリーエバポレーター：シバタインテック製 RE121
- 4) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 5) マニホールド：ジーエルサイエンス製
- 6) ケイソウ土：Celite 製（和光純薬工業販売）ハイフロスーパーセル
- 7) ガラス繊維ろ紙：Whatman 製 GF/A
- 8) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Waters 製 Oasis HLB（充てん剤量：60 mg，リザーバー容量：3 mL）
- 9) 中性アルミナミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Alumina N（充てん剤量：1,710 mg）にリザーバーを連結したもの
- 10) 振とう機：太洋化学工業製 SR-II

## 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、内標準液 1 mL を正確に加えた。更にメタノール-1 %メタリン酸溶液 (3+2) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。先の三角フラスコ及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで水を加えた。この液 20 mL を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムをメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。水-メタノール (4+1) 4 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄した後、吸引マニホールドを用いて 10 分間減圧しミニカラム内の水分を除去した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 10 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させ、溶出液をカラム処理 II に供する試料溶液とした。

### 3) カラム処理 II

中性アルミナミニカラムをアセトニトリル 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にアセトニトリル 5 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (19+1) 40 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-アセトニトリル (7+3) 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タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) による測定に供する試料溶液とした。

## 4) LC-MS/MS による測定

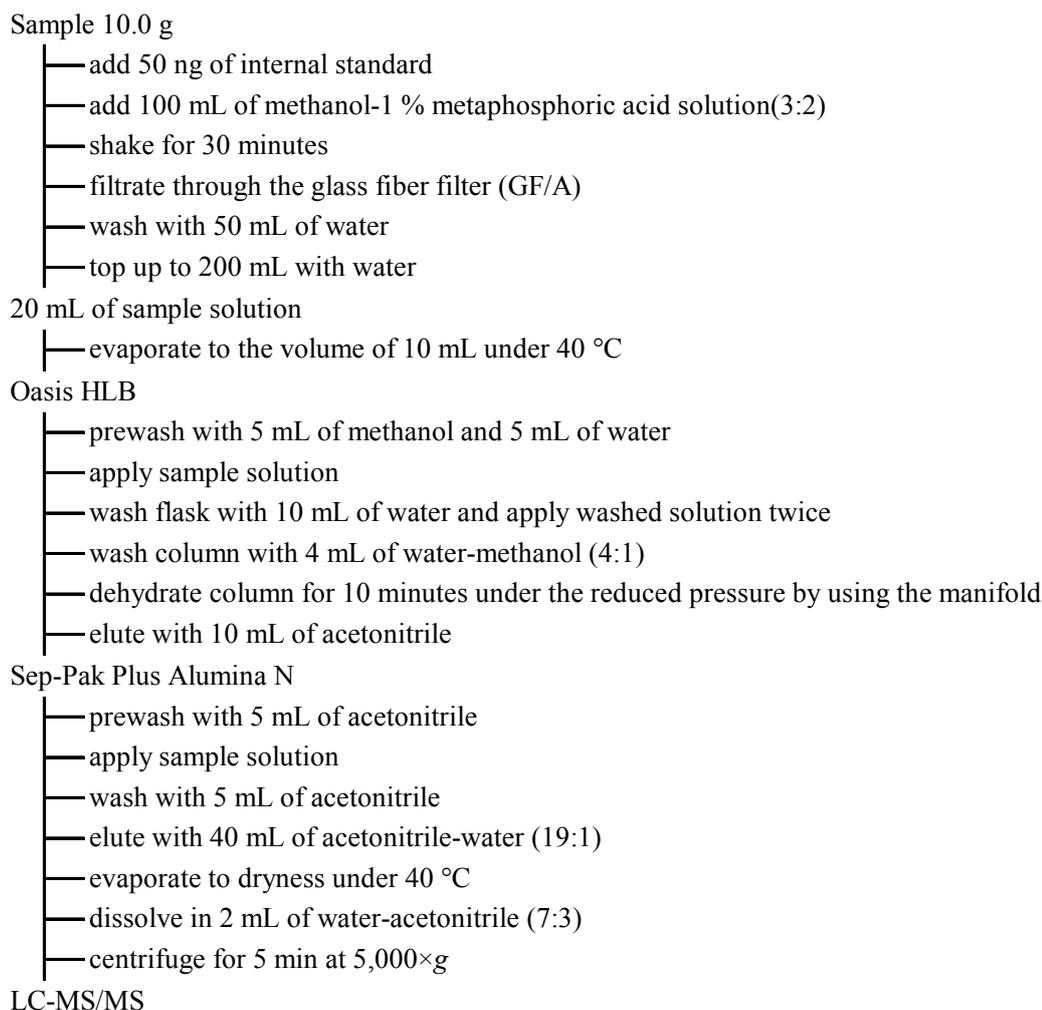
試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、Table 2 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

**Table 2 Operating conditions for LC-MS/MS for analysing chloramphenicol**

Column	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm i.d.×150 mm, 2.2 $\mu$ m)
Mobile phase	A: 10 mmol/L ammonium formate solution B: acetonitrile B 30 v/v%(1 min)→9 min→95 v/v%(10 min)→0.1 min→30 v/v%(10 min)
Flow rate	0.18 mL/min
Column temp.	40 °C
Injection volume	10 $\mu$ L
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (600 L/h)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Cone voltage	25 V
Capillary voltage	1 kV
Collision energy	20 eV
Source temp.	120 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 321 → 152 (for determination of chloramphenicol) <i>m/z</i> 321 → 257 (for confirmation of chloramphenicol) <i>m/z</i> 326 → 157 (for determination of chloramphenicol-d <sub>5</sub> )

## 5) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからクロラムフェニコール及び CP-d<sub>5</sub> のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for chloramphenicol**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

分析センター法では、LC 条件において 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) を溶離液として溶出することで、1 mL 中に 0.1 ng 以上のクロラムフェニコールの検出が可能であるとされている。しかしながら、筆者らが検討したところ、1 mL 中に 5 ng 未満のクロラムフェニコールが検出できなかった。この原因は、使用する LC-MS/MS 機種の違いにより、感度に差が生ずるためと考えられた。そこで、LC の溶離液条件を検討した結果、グラジェントを使用することで、1 mL 中に 1 ng 以上のクロラムフェニコールを検出することが可能となった。

2.2 の 3) に従って調製した検量線作成用標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 10~200 pg の範囲で直線性を示した。

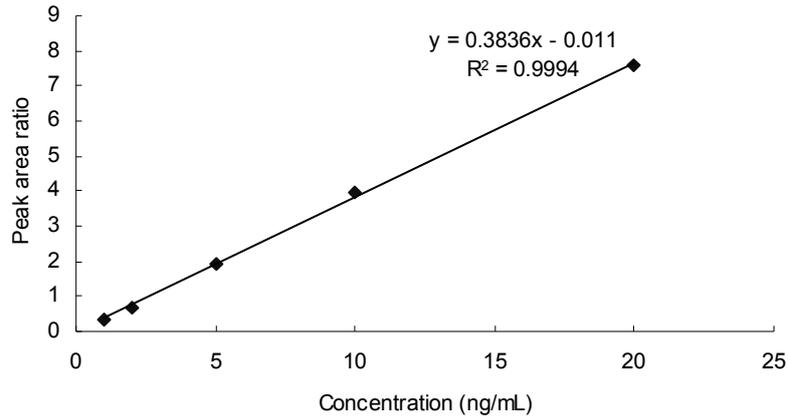


Fig. 2 Calibration curve of chloramphenicol

本法の検量線の直線範囲から、最終試料溶液における定量上限は、クロラムフェニコールとして 20 ng/mL である。従って、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を超えてクロラムフェニコールを含有する試料については、内標準添加量及び最終溶媒量をそれぞれ増やして分析を行う必要があると考えられた。

### 3.2 妨害物質の検討

魚粉（調整魚粉 2 種，輸入魚粉 1 種（ナミビア産）），配合飼料（鶏用（2 種），豚用（2 種）及び養魚用（3 種））を用い，本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した。その結果，すべての試料において，定量を妨害するピークは検出されなかった。

なお，鶏用配合飼料の選択反応検出クロマトグラムの例を Fig. 3 に示した。

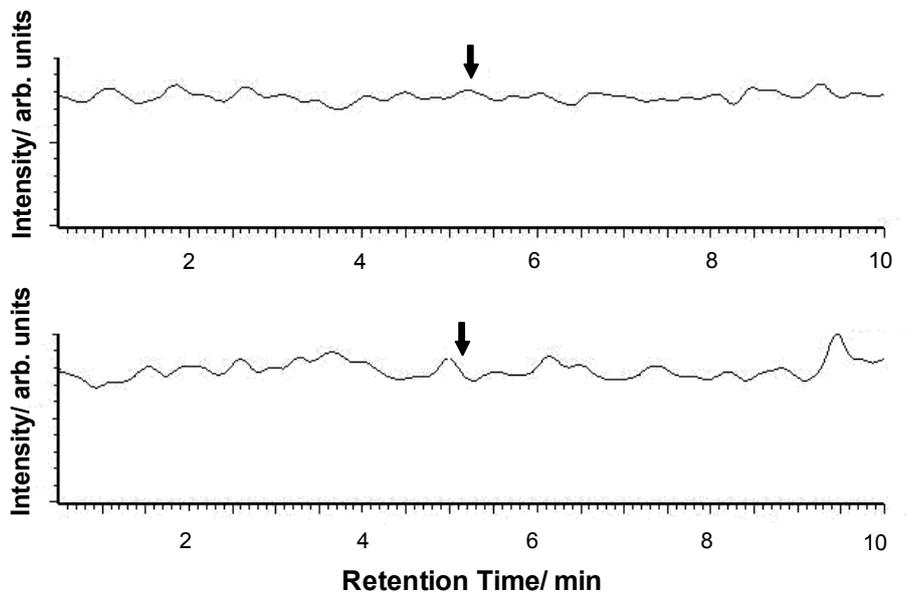


Fig. 3 SRM Chromatograms of formula feed for chicken

(upper: chloramphenicol for determination lower: chloramphenicol for confirmation)

### 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。

調整魚粉及び配合飼料（ブロイラー肥育前期用，ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用）に，クロラムフェニコールとしてそれぞれ 5 及び 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し，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。

その結果，Table 3 のとおり，クロラムフェニコールの平均回収率は 93.5~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 12 %以下であった。

また，内標準として添加した CP-d<sub>5</sub> について，ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値は，98.3 %であった。

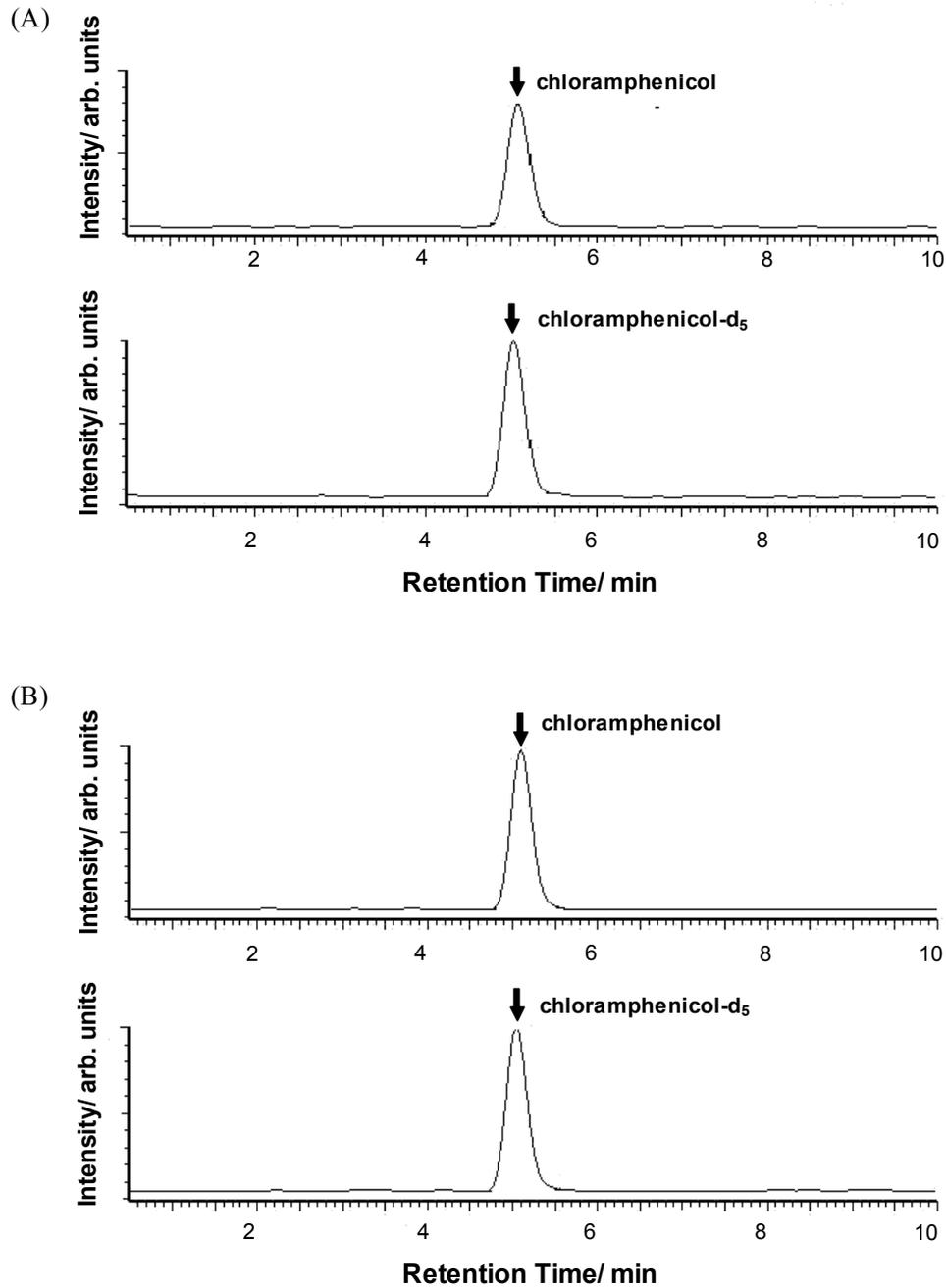
なお，添加回収試験で得られたほ乳期子豚育成用配合飼料の選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

**Table 3 Recovery test for chloramphenicol**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Fish meal		Formula feed for broiler starting chick		Formula feed for suckling pig		Formula feed for silver salmon	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
25	98.4	( 4.7)	101	( 1.6)	99.0	( 5.5)	93.5	( 4.5)
5	99.9	( 6.6)	94.2	(12 )	101	( 2.1)	97.7	( 3.8)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)



**Fig. 4 SRM chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 20 pg)

(B) Sample solution (Formula feed for suckling pig spiked with 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of chloramphenicol)

### 3.4 検出下限

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験を実施し、得られるピークの *SN* 比並びに回収率及び繰返し精度を求めた。

調整魚粉及びぎんざけ育成用配合飼料にクロラムフェニコールとして 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は Table 4 のとおりであり、また、得られたピークの *SN* 比はいずれの試料においても 10 程度となったことから、本法は試料中 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のクロラムフェニコールを検出可能であると考えられた。

**Table 4 Recovery test at the concentration of detection limit for chloramphenicol**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Fish meal		Formula feed for silver salmon	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
2	107	( 9.4)	89.6	(12)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

### 3.5 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。

調整魚粉及び配合飼料（ブロイラー肥育前期用配合飼料）にクロラムフェニコールとして 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用い、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彩都研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人食品環境検査協会東京事業所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、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及び同仙台センターの 8 試験室で共同試験を実施した。

その結果は Table 5 のとおりであり、調整魚粉では、平均回収率は 104 %，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 5.6 %であり、HorRat は 0.25 であった。

また、配合飼料では、平均回収率は 104 %， $RSD_I$  及び  $RSD_R$  はそれぞれ 4.5 %及び 5.5 %であり、HorRat は 0.25 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カラム、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 6 に示した。

**Table 5 Collaborative study results of chloramphenicol**

Lab. No.	Sample			
	Fish meal		Formula feed for broiler starting chick	
1	4.65	5.06	5.49	5.00
2	5.72	5.77	5.27	5.31
3	5.11	5.21	4.87	5.20
4	4.85	4.96	4.90	5.42
5	5.48	5.87	5.70	6.18
6	5.09	4.82	4.86	4.92
7	5.01	5.02	4.74	4.68
8	4.85	5.62	5.46	5.36
Spiked level	5		5	
Mean value <sup>a)</sup>	5.19		5.21	
Recovery (%)	104		104	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.8		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	5.6		5.5	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.25		0.25	

a)  $n=16$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

**Table 6 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	LC-MS/MS	Column (i.d.×length, particle size)
1	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×150 mm, 2.2 μm)
2	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×150 mm, 2.2 μm)
3	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	GL Sciences, ODS-III (2.1 mm×120 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies, 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters, Quattro Micro API Mass Analyzer	GL Sciences, ODS-III (2.1 mm×120 mm, 4 μm)
6	Waters, Quattro Premier	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm×120 mm, 2.2 μm)
7	Applied Biosystems, API-3200	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS (2.0 mm×100 mm, 2.2 μm)
8	Agilent Technologies, 6410 Triple Quad LC/MS	Shimadzu, Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm×120 mm, 2.2 μm)

#### 4 まとめ

飼料中のクロラムフェニコールについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) ピーク面積を用いて内標準法により検量線を作成したところ、クロラムフェニコールは 10~200 pg の範囲で直線性を示した。
- 2) 魚粉 3 点及び魚粉を含有する配合飼料 7 点を用い、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、クロラムフェニコールの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 魚粉及び 3 種類の配合飼料を用いて、クロラムフェニコールとして 5 及び 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 93.5~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 12 %以下の成績が得られた。
- 4) 本法は、試料中 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のクロラムフェニコールを検出可能であった。
- 5) 調整魚粉及びブロイラー肥育前期用配合飼料に、クロラムフェニコールとして、それぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて、8 試験室において、本法による共同試験を実施した。その結果、調整魚粉の平均回収率は 104 %、その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) としてそれぞれ 4.8 %及び 5.6 %であり、HorRat は 0.25 であった。また、ブロイラー肥育前期用配合飼料の平均回収率は 87.6 %、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  としてそれぞれ 4.5 %及び 5.5 %であり、HorRat は 0.25 であった。  
なお、本法は、平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

#### 謝 辞

共同試験に御協力頂いた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、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人食品環境検査協会、財団法人日本冷凍食品検査協会及び社団法人日本科学飼料協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 田中 信夫, 中村 昭四郎: 抗生物質大要 [第 4 版], p160 (1995). (東京大学出版会)
- 2) クリロビッツ (岡見吉郎訳): 抗生物質論, p154 (1978). (学会出版センター)
- 3) 厚生省告示: “食品、添加物等の規格基準”, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示第 370 号 (1959).
- 4) 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).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知別添: “平成 18 年度畜水産食品の残留物質モニタリング検査結果について”, 平成 20 年 2 月 29 日, 食安監発第 0229003 号 (2008).
- 6) 菅野 清: 飼料研究報告, 29, 60 (2004).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 8) 山本 克己: 飼料研究報告, 33, 110 (2008).
- 9) 財団法人日本食品分析センター: 平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業 (飼料中のマラカイトグリーン等の分析法の開発) (2008).

## 技術レポート

1 飼料中のフロルフェニコールの液体クロマトグラフによる定量法  
（中間報告）小野 雄造<sup>\*1</sup>，渡部 千会<sup>\*2</sup>

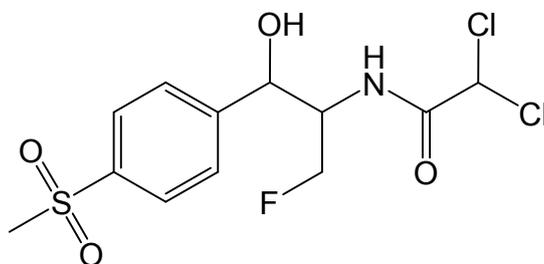
## 1 緒 言

フロルフェニコールは、構造的、作用的にクロラムフェニコールと類似しており、広い抗菌スペクトルを持つ合成抗菌剤である。効果は一部の菌種を除いて静菌的であり、細菌の 70S リボゾームの 50S サブユニットに結合することにより、ペプチド転移酵素を阻害し、たん白質合成を阻害する。フロルフェニコールを主剤とする動物用医薬品は、国内では牛、豚、鶏といった家畜の他、一部の魚類にも使用されている。米国、EU 諸国においても牛、豚、鶏、羊及び魚類（finfish）に対して使用が認められている。ヒト用医薬品としての使用はない<sup>1)</sup>。

フロルフェニコールは飼料添加物として指定されていない抗菌性物質であり、飼料安全法に基づく成分規格では飼料に含んではならないこととされている<sup>2)</sup>。

今回、平成 19 年度「飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した飼料中のフロルフェニコールの分析法<sup>3)</sup>（以下「分析センター法」という。）を基に飼料分析基準への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、フロルフェニコールの構造式を Fig. 1 に示した。



2,2-dichloro-*N*-((1*R*,2*S*)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)propan-2-yl) ethanamide  
C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FNO<sub>4</sub>S MW: 358.2 CAS No.: 76639-94-6

Fig. 1 Chemical structure of florfenicol

## 2 実験方法

## 2.1 試 料

市販の国産魚粉，輸入魚粉及び配合飼料（大すう育成用及びにじます育成用）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。

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 同福岡センター

<sup>\*2</sup> （独）農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 2.2 試 薬

### 1) フロルフェニコール標準液

フロルフェニコール ( $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ ) 標準品 (和光純薬工業製, 純度 98.0 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, 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フロルフェニコール標準原液を調製した (この液 1 mL はフロルフェニコールとして 0.5 mg ( $f=0.98$ ) を含有する. ).

使用に際して, 標準原液の一定量を水-アセトニトリル (17+3) で正確に希釈し, 1 mL 中に 0.05~5  $\mu$ g を含有するフロルフェニコール標準液を調製した.

2) アセトニトリル, アセトン, ヘキサン及び酢酸エチルは残留農薬分析用を用いた. 液体クロマトグラフに用いるアセトニトリル及び水並びにメタノールは, 液体クロマトグラフ用を使用した.

## 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ: Agilent Technologies 製 1100 シリーズ
- 2) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカーSR-2DW
- 3) ロータリーエバポレーター: BÜCHI 製 R-200
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム: Varian 製 Extube Extraction Columns Chem Elut (5 mL 容)
- 5) シリカゲルミニカラム: Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの
- 6) グラファイトカーボンミニカラム: Supelco 製 Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL)
- 7) メンブレンフィルター: ゲルマンラボラトリー製 Ekicrodisc 13CR (孔径 0.45  $\mu$ m, PTFE)

## 2.4 定量方法

### 1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL を加えて潤し, 30 分間静置した後, アセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間かき混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し, 洗液をろ液に合わせた. 更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた. 試料溶液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

### 2) カラム処理 I

試料溶液に水 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 10 分間静置した. 100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き, 試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 3 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下して, フロルフェニコールを溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した.

ヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理 II に供する試料溶液とした.

### 3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL であらかじめ洗浄した.

試料溶液をシリカゲルミニカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた.

試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次シリカゲルミニカラムに加え、同様に流出させた。

先のシリカゲルミニカラムの下に、あらかじめヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラムを連結した。50 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 20 mL をシリカゲルミニカラムに加えてフロルフェニコールを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-アセトニトリル (17+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、液体クロマトグラフによる測定に供する試料溶液とした。

#### 4) 液体クロマトグラフによる測定

試料溶液及び各フロルフェニコール標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、表 1 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

表 1 液体クロマトグラフ測定条件

検出器	紫外吸光度検出器(測定波長225 nm)
カラム	L-column ODS (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 µm)
カラム槽温度	40 °C
溶離液	水-アセトニトリル(17+3)
流速	1.0 mL/min

#### 5) 計算

得られたピーク面積又は高さより検量線を作成し、試料中のフロルフェニコール量を算出した。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液をそれぞれ 20 µL ずつ液体クロマトグラフに注入し、得られた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 1~100 ng の範囲で直線性を示した。

#### 3.2 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

分析センター法では、試料溶液に 5 %塩化ナトリウム溶液 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10 分間静置した後、ヘキサン洗浄を行い、酢酸エチルによりフロルフェニコールを溶出させている。しかしながら、筆者らが検討したところ、国産魚粉を用いて調製した試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに負荷したところ、ヘキサン洗浄の際、流出速度が著しく遅く、かつフロルフェニコールが流出することが確認された。このことから、ヘキサン洗浄によるフロルフェニコールの損失を防ぐため、この操作を省くこととした。また、5 %塩化ナトリウム溶液については、塩化ナトリウムの析出により多孔性ケイソウ土カラム処理以降の操作の妨げになることから、水に変更することとした。

以上のことから、国産魚粉にフロルフェニコールとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、2.4 の 1) に従って調製した試料溶液に水 3 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、

10 分間静置した後，酢酸エチルによる溶出画分の確認を行った。

その結果，表 2 のとおり，フロルフェニコールは 0~20 mL の画分に溶出し，それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から，本法では安全をみて酢酸エチル 30 mL で溶出することとした。

表 2 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

溶出画分 (mL)	酢酸エチル				合計
	0~10	~20	~30	~40	
フロルフェニコール回収率 <sup>a)</sup>	81	12	0	0	93

a)  $n=2$  の平均回収率

### 3.3 精製方法の検討

筆者らが分析センター法に従い輸入魚粉中のフロルフェニコールの定量を行ったところ，その定量を妨害する物質の存在が確認された。分析センター法ではシリカゲルミニカラムを用いた精製を行っているが，Hayes<sup>4)</sup>は，魚粉の配合割合の多い養魚用飼料中のフロルフェニコールの定量にグラファイトカーボンミニカラムを用いた精製を行っていることから，シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムを組み合わせた精製方法が妨害物質の除去に効果があるか検討を行った。

その結果，精製方法として，フロルフェニコールをシリカゲルミニカラムに保持させた後，シリカゲルミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し，フロルフェニコールを溶出させる方法が，妨害物質の除去に効果があることが確認された。以上の結果から，本法ではシリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムを組み合わせた精製方法を用いることとした。

### 3.4 シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの溶出画分の検討

シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムについて溶出画分の検討を行った。輸入魚粉にフロルフェニコールとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 2.4 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製した。2.4 の 3)のカラム処理 II において，溶出液であるヘキサンーアセトン (7+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。以下，本法に従い，各溶出画分中のフロルフェニコール量を算出し，溶出画分を確認した。

その結果，表 3 のとおり，フロルフェニコールは 0~10 mL の画分に溶出し，それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から，本法では安全をみてヘキサンーアセトン (7+3) 20 mL で溶出することとした。

表 3 シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの溶出画分の検討

溶出画分 (mL)	ヘキサンーアセトン (7+3)				合計
	0~10	~20	~30	~40	
フロルフェニコール回収率 <sup>a)</sup>	103	0	0	0	103

a)  $n=2$  の平均回収率

### 3.5 妨害物質の検討

国産魚粉（1 種類），輸入魚粉（2 種類）及び配合飼料（幼すう育成用，大すう育成用，ほ乳期子豚育成用，豚数種用，あゆ育成用，にじます育成用，ぶり育成用及びまだい育成用）を用い，本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し，定量を妨げるピークの有無を確認したところ，妨害ピークは認められなかった。

### 3.6 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。

国産魚粉，輸入魚粉及び配合飼料（鶏用及び養魚用）に，フロルフェニコールとしてそれぞれ 1 及び 10 mg/kg 相当量添加し，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 4 のとおり，フロルフェニコールの平均回収率は 102~117 %，その繰返し精度は RSD として 6.0 % 以下であった。

なお，標準液及び添加回収試験で得られた輸入魚粉におけるクロマトグラムの一例を図 1 に示した。

表 4 添加回収試験結果

試料の種類 添加量		国産魚粉		輸入魚粉		大すう育成用 配合飼料		にじます育成用 配合飼料	
		回収率 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>						
1 mg/kg		103	(5.0)	117	(1.1)	105	(6.0)	102	(3.4)
10 mg/kg		103	(4.0)	106	(4.2)	103	(4.6)	103	(3.8)

a)  $n=3$  の平均回収率

b) 相対標準偏差

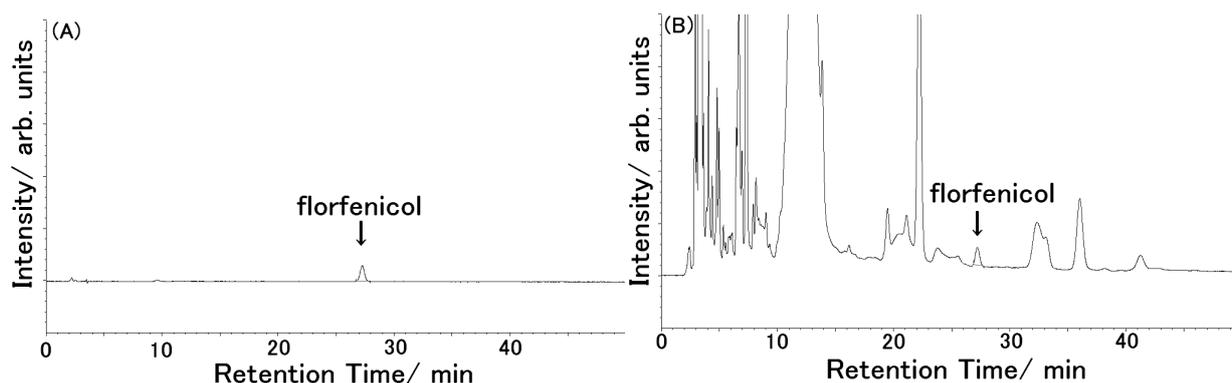


図 1 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例

(A) 標準液（フロルフェニコールとして 4 ng 相当量）

(B) 試料溶液（輸入魚粉，試料中 1 mg/kg 相当量添加）

### 3.7 検出下限

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験を実施し，得られるピークの SN 比並びに回収

率及び繰返し精度を求めた。

国産魚粉及び大すう育成用配合飼料にフロルフェニコールとして 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は表 5 のとおりであり、また、得られたピークの SN 比はいずれの試料においても 10 程度となったことから、本法は試料中 0.5 mg/kg のフロルフェニコールを検出可能と考えられた。

表 5 フロルフェニコールの検出下限付近の添加回収試験結果 (%)

試料の種類 添加量	国産魚粉		大すう育成用 配合飼料	
	回収率 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	回収率 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5 mg/kg	96.3	(10.8)	102	(1.4)

a)  $n=3$  の平均回収率

b) 相対標準偏差

#### 4 今後の検討項目

本法の検討に当たっては、汎用性の観点から液体クロマトグラフを用いて、飼料原料（魚粉）及び配合飼料中のフロルフェニコールの定量法を検討したところである。

今後、魚粉以外の飼料原料でも検討を行う予定であるが、その場合、夾雑物質の影響の低減等の更なる検討が必要と考えられた。また、飼料添加物に指定されていない他の抗菌性物質（クロラムフェニコール等）の分析法が既に飼料分析基準<sup>5)</sup>に収載されており、迅速性の観点から分析操作の共通化を考慮する必要があると考えられた。

以上のことから、今後は、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた方法について更に検討を行う予定である。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 19 年 8 月 30 日，府食第 822 号 (2007).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発）(2008).
- 4) John M. Hayes: J. AOAC Int., 88, 1777 (2005).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).

精度管理
------

# 1 平成 20 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

高橋 亜紀子<sup>\*1</sup>, 矢本 亮介<sup>\*2</sup>, 青山 幸二<sup>\*3</sup>, 大島 慎司<sup>\*3</sup>,  
八木 寿治<sup>\*4</sup>, 橋本 仁康<sup>\*5</sup>, 野村 昌代<sup>\*6</sup>

## 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, 併せて分析誤差を把握し, 飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

## 2 共通試料の内容

A 試料	幼すう育成用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料調製試料
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 20 年 7 月 4 日  
3.2 調製場所 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部  
(1) A 試料

粉碎した後, 1 mm の網ふるいを通過させた幼すう育成用配合飼料 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

<sup>\*1</sup> 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,

<sup>\*2</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター札幌センター,

<sup>\*3</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター仙台センター,

<sup>\*4</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 同肥飼料安全検査部,

<sup>\*5</sup> (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, 現 同神戸センター,

<sup>\*6</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター福岡センター

## (2) B 試料

粉碎した後、1 mm の網ふるいを通過させた魚粉 100 kg を用いて、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、必要に応じ粉碎した後、表 2 に掲げる 10 種類の原料を同表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	30	魚粉	9
ふすま	10	大豆油かす	8
米ぬか	10	コーングルテンミール	8
ごま油かす	10	りん酸カルシウム	3
ビートパルプ	10	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，リン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

## (2) 実施要領

「第 33 回飼料の共通試料による分析鑑定実施要領」(97 ページ)による。

## 5 試料袋間のバラツキ調査

A 試料，B 試料及び D 試料それぞれの 2 分析項目について Thompson らの harmonized protocol<sup>1)</sup>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 粗たん白質 (%)		A 試料 粗灰分 (%)		B 試料 粗たん白質 (%)		B 試料 粗灰分 (%)		D 試料 銅 (g/kg)		D 試料 亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	22.45	22.41	5.95	6.13	68.68	68.26	13.01	13.27	25.57	26.21	31.62	31.57
2	22.53	22.59	5.86	5.96	68.69	68.80	13.48	13.45	25.95	25.78	32.47	32.74
3	22.20	22.53	5.90	5.99	68.88	68.80	13.29	13.01	26.25	26.76	32.35	31.65
4	22.47	22.62	5.97	5.98	68.63	69.13	13.27	13.10	26.41	26.80	32.45	32.71
5	22.67	22.56	5.91	5.96	68.34	68.91	13.45	13.00	25.69	26.09	32.20	32.59
6	22.56	22.61	5.93	6.05	68.50	68.71	13.34	13.29	25.96	26.41	32.57	31.89
7	22.54	22.59	5.94	5.97	69.12	69.07	13.13	12.96	25.90	26.45	32.66	32.45
8	22.59	22.52	5.90	5.99	68.28	68.91	13.37	13.15	26.39	26.14	32.36	32.20
9	22.42	22.37	5.87	5.92	68.78	68.65	13.07	12.89	26.15	26.67	32.24	31.64
10	22.30	22.40	6.06	5.99	68.84	68.74	13.05	13.09	26.55	25.72	31.82	32.80

表 4 A, B 及び D 試料のバラツキ調査

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	$S_s/\sigma$ <sup>a)</sup>	
		$S$	$\phi$	$V$	$F_0$		
A 試料	粗たん白質	試料間 $A$	0.1797	9	0.0200	2.33	
		分析誤差 $E$	0.0856	10	0.0086		— <sup>b)</sup>
		総計 $T$	0.2653	19			
	粗灰分	$A$	0.0391	9	0.0043	1.04	
		$E$	0.0419	10	0.0042		—
		$T$	0.0811	19			
B 試料	粗たん白質	$A$	0.5680	9	0.0631	1.02	
		$E$	0.6201	10	0.0620		—
		$T$	1.1881	19			
	粗灰分	$A$	0.3612	9	0.0401	1.63	
		$E$	0.2460	10	0.0246		—
		$T$	0.6073	19			
D 試料	銅	$A$	1.2286	9	0.1365	1.08	
		$E$	1.2688	10	0.1269		—
		$T$	2.4974	19			
	亜鉛	$A$	1.8830	9	0.2092	1.59	
		$E$	1.3188	10	0.1319		—
		$T$	3.2018	19			

a)  $\sigma$  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 参加試験室

- (1) 総数 276  
 うち 飼料関係…178  
       飼料添加物関係…20  
       団体等…29  
       検査指導機関…49
- (2) 試料別参加試験室数  
 A 試料…271  
 B 試料…260  
 C 試料…150  
 D 試料…122

## 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

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

$x$  : 各試験室の分析成績

$b$  : 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	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析・ 分析値 (g/力価)	No. z-score	SL(HPLC・ 分析値 (g/力価)	No. z-score
	分析値 (%)	No. z-score																
1	11.60	1 -0.77	22.14	4 -0.98	4.97	2 -1.01	2.99	3 -0.31	5.91	1 -0.08	0.980	1 -0.49	0.720	1 0.67				
2	11.80	1 0.04	22.31	4 -0.10	5.19	2 0.47	3.10	3 0.00	5.93	1 0.08	1.010	2 0.26	0.720	1 0.67				
3	11.89	1 0.40	22.47	4 0.72	4.85	2 -1.82	3.26	2 0.45	5.96	1 0.35	0.974	1 -0.65	0.711	1 0.06				
4	11.97	1 0.73	22.23	4 -0.51	5.16	1 0.26	3.27	3 0.48	5.89	1 -0.26	0.970	2 -0.75	0.710	1 0.00				
5	11.81	1 0.08	22.49	4 0.83	4.94	2 -1.21	3.37	3 0.77	5.90	1 -0.17	1.063	1 1.62	0.705	1 -0.33			56.2	3 1.79
6	11.37	1 -1.71	22.60	2 1.40	4.98	2 -0.94	2.84	2 -0.74	5.94	1 0.17	1.000	2 0.01	0.700	1 -0.67				
7	11.78	5 -0.04	22.37	6 0.20	5.08	5 -0.26	3.01	5 -0.25	5.85	5 -0.62	0.977	5 -0.57	0.723	5 0.87	55.8	5 0.19		
8	11.78	1 -0.04	22.33	4 0.00	4.94	2 -1.21	3.10	3 0.00	5.77	1 -1.34	0.993	1 -0.16	0.693	1 -1.14	55.1	2 0.00		
9	11.62	2 -0.69	22.36	4 0.15	4.93	2 -1.28	2.86	2 -0.68	5.97	1 0.44	0.860	2 -3.56	0.590	1 -8.09				
10	11.88	1 0.36	22.31	4 -0.10	5.21	1 0.60	3.45	2 1.00	6.06	1 1.25	1.050	2 1.29	0.710	1 0.00				
11	11.97	1 0.73	22.23	4 -0.51	5.12	1 0.00	3.25	2 0.43	6.04	1 1.07	0.976	2 -0.60	0.710	1 0.00				
12	11.92	1 0.53	22.27	4 -0.31	5.17	1 0.33	3.55	2 1.29	5.99	1 0.62	1.030	2 0.77	0.720	2 0.67				
13	11.79	1 0.00	22.31	4 -0.10	5.11	1 -0.06	3.33	2 0.66	5.81	1 -0.98	0.990	2 -0.24	0.700	1 -0.67			51.9	3 -0.77
14	11.78	1 -0.04	22.42	4 0.46	4.95	2 -1.14	3.30	3 0.57	5.93	1 0.08	0.981	2 -0.47	0.712	1 0.13				
15	11.69	1 -0.40	22.41	4 0.41	5.14	1 0.13	3.20	2 0.28	5.99	1 0.62	0.990	2 -0.24	0.700	1 -0.67				
16	11.85	1 0.24	22.50	4 0.88	5.22	1 0.67			5.91	1 -0.08								
17	11.98	1 0.77	22.49	1 0.83					5.75	2 -1.52								
18	11.80	3 0.04	22.00	5 -1.71					5.30	2 -5.57								
19																		
20	11.79	1 0.00	22.44	1 0.57	4.86	1 -1.75			5.88	1 -0.35								
21	11.73	1 -0.24	22.65	1 1.66	5.19	1 0.47			5.82	1 -0.89								
22	11.50	1 -1.18	22.39	1 0.31					5.50	1 -3.72								
23	11.47	1 -1.30	22.34	4 0.05					5.78	1 -1.25								
24	11.00	5 -3.22	21.93	2 -2.07	5.58	5 3.10			5.67	5 -2.24								
25	11.79	1 0.00	22.69	4 1.86	5.12	1 0.00			6.01	1 0.80								
26																		
27	11.91	1 0.49	22.59	3 1.34	4.65	2 -3.17			6.47	1 4.94	1.076	3 1.95	0.713	2 0.20				
28			21.67	4 -3.42														
29	11.78	1 -0.04	22.68	2 1.81	5.11	1 -0.06	2.98	2 -0.34	5.85	1 -0.62	0.999	2 -0.01	0.718	1 0.53				
30	10.83	1 -3.92	22.20	2 -0.67	5.00	1 -0.80	2.82	2 -0.80	6.74	1 2.37	1.010	2 0.26	0.710	1 0.00				
31																		
32	11.80	1 0.04	22.16	4 -0.88	4.90	2 -1.48	3.84	3 2.12	5.98	1 0.53	0.957	3 -1.08	0.704	2 -0.40				
33	11.17	1 -2.53	22.23	2 -0.51	5.16	1 0.26	2.28	2 -2.35	6.05	1 1.16	0.990	2 -0.24	0.720	1 0.67				
34	12.37	1 2.37			5.65	2 3.57	4.91	2 5.19	6.50	1 5.21								
35	11.72	1 -0.28	22.29	1 -0.20	5.18	1 0.40	2.45	2 -1.86	6.04	1 1.07	0.951	2 -1.24	0.714	1 0.26			56.5	3 1.97
36	11.81	1 0.08	22.14	4 -0.98	5.07	1 -0.33	2.61	2 -1.40	5.95	1 0.26	0.946	2 -1.36	0.758	1 3.23			51.2	3 -1.19
37	12.14	1 1.43	22.34	4 0.05	5.20	1 0.53	3.12	2 0.05	5.83	1 -0.80	1.044	2 1.13	0.700	1 -0.67	52.7	1 -0.66		
38	12.05	1 1.06	22.21	2 -0.62	5.00	2 -0.80	3.25	3 0.43	5.85	1 -0.62	1.010	2 0.26	0.708	1 -0.13			52.2	3 -0.59
39	11.45	1 -1.38	22.01	4 -1.66	5.00	2 -0.80	3.23	3 0.37	5.82	1 -0.89	1.067	3 1.72	0.711	1 0.06	51.1	1 -1.10		
40	11.59	1 -0.81	22.35	4 0.10	4.78	2 -2.29	3.20	2 0.28	5.95	1 0.26	1.050	1 1.29	0.721	1 0.74			54.2	3 0.59
41	11.04	1 -3.06	22.13	2 -1.03														
42	11.51	1 -1.14	22.31	4 -0.10	5.11	1 -0.06			5.85	1 -0.62								
43	10.50	1 -5.27	22.58	4 1.29	6.45	1 8.97			5.73	1 -1.70								
44	12.54	1 3.06	22.00	4 -1.71	5.05	1 -0.47	3.13	2 0.08	5.87	1 -0.44	0.998	2 -0.03	0.706	1 -0.26				
45	12.11	1 1.30	22.27	4 -0.31	5.01	2 -0.74	3.19	2 0.25	5.90	1 -0.17	1.003	2 0.08	0.706	1 -0.26	53.2	1 -0.52		
46	11.92	1 0.53	22.44	4 0.57	5.16	1 0.26			5.85	1 -0.62								
47	11.62	1 -0.69	22.50	4 0.88					5.76	1 -1.43								
48	11.96	1 0.69	22.29	1 -0.20	4.95	1 -1.14			5.87	1 -0.44								
49	12.10	1 1.26	15.57	1 -38.02	5.18	1 0.40	3.17	1 0.20	5.78	1 -1.25	1.011	3 0.29	0.717	2 0.47				
50																		
51	11.93	1 0.57	22.35	4 0.10	5.03	1 -0.60	2.82	2 -0.80	5.92	1 0.00	0.977	1 -0.57	0.719	1 0.60				
52	11.70	1 -0.36	22.21	4 -0.62	4.99	1 -0.87	3.00	2 -0.28	5.73	1 -1.70	1.010	2 0.26	0.710	1 0.00	51.8	1 -0.90		
53	11.83	1 0.16	22.42	4 0.46	5.40	1 1.88	3.40	2 0.86	5.84	1 -0.71	1.010	2 0.26	0.697	1 -0.87				
54	11.77	1 -0.08	22.20	4 -0.67	5.01	2 -0.74			5.85	1 -0.62					51.1	1 -1.10		
55	12.09	1 1.22			5.26	1 0.94	3.18	3 0.22	5.87	1 -0.44			0.704	1 -0.40				
56	10.89	1 -3.67	22.22	1 -0.57					5.56	1 -3.23								
57	11.60	1 -0.77	22.40	4 0.36	5.23	1 0.74	2.90	2 -0.57	5.95	1 0.26	0.974	2 -0.65	0.702	1 -0.53	52.3	1 -0.77		
58	12.00	1 0.85	22.29	4 -0.20	5.10	1 -0.13	3.23	2 0.37	5.90	1 -0.17			0.716	1 0.40				
59	12.05	1 1.06	22.32	4 -0.05	5.02	2 -0.67	3.20	2 0.28	5.82	1 -0.89	1.021	2 0.54	0.713	1 0.20				
60	11.59	1 -0.81	22.40	4 0.36	4.58	2 -3.64			6.03	1 0.98								
61	11.82	1 0.12	22.45	4 0.62	5.04	1 -0.53			5.95	1 0.26	0.950	2 -1.26	0.703	1 -0.47	54.6	1 -0.13		
62																		
63	12.09	1 1.22	22.72	2 2.02	5.23	1 0.74			5.94	1 0.17								
64	11.30	1 -2.00	22.71	4 1.97	5.25	1 0.87			5.90	1 -0.17								
65	11.52	1 -1.10	22.38	4 0.25	5.09	1 -0.20	3.34	1 0.68	5.82	1 -0.89	1.000	1 0.01	0.720	1 0.67				
66	11.80	1 0.04	22.12	4 -1.08														
67	12.03	1 0.98							5.78	1 -1.25	0.992	2 -0.19	0.693	2 -1.14				
68	11.68	1 -0.44	22.27	4 -0.31	4.93	2 -1.28	3.48	3 1.09	6.00	1 0.71	1.006	2 0.16	0.696	1 -0.94			53.6	3 0.23
69	12.33	1 2.20	22.45	4 0.62	5.16	1 0.26			5.89	1 -0.26								
70	11.93	1 0.57	20.52	4 -9.39	5.06	1 -0.40	3.40	3 0.86	6.02	1 0.89	0.955	2 -1.13	0.707	1 -0.20				
71	11.64	1 -0.61	22.48	1 0.77	5.16	1 0.26	3.35	2 0.71	5.95	1 0.26	0.990	2 -0.24	0.710	1 0.00			52.2	4 -0.59
72	11.80	1 0.04	22.26	2 -0.36	4.99	1 -0.87	3.73	2 1.80	5.94	1 0.17								
73																		
74	11.16	1 -2.57	22.34	4 0.05	4.99	1 -0.87	3.45	3 1.00	6.07	1 1.34	1.050	2 1.29	0.727	1 1.14				
75	11.67	1 -0.49	22.51	4 0.93	5.17	1 0.33	2.93	2 -0.48	6.10	1 1.61	0.957	2 -1.08	0.714	1 0.26				
76	11.70	1 -0.36	22.07	4 -1.34	5.39	1 1.82	3.40	3 0.86	5.95	1 0.26	1.020	2 0.52	0.697	1 -0.87				
77	12.07	1 1.14	22.39	1 0.31	5.09	1 -0.20	2.82	2 -0.80	5.92	1 0.00	0.977	2 -0.57	0.718	1 0.53				
78	11.03	1 -3.10	22.44	4 0.57	5.34	2 1.48	3.29	3 0.54	5.85	1 -0.62	1.007	2 0.19	0.707	1 -0.20				

表5 分析成績(2)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析・ 分析値 (g/力価)	No. z-score	SL(HPLC・ 分析値 (g/力価)	No. z-score
	分析値 (%)	No. z-score																
117	12.04	2 1.02	22.39	4 0.31	5.22	2 0.67	3.31	3 0.60	5.89	1 -0.26	1.150	2 3.84	0.699	1 -0.74			53.4	3 0.11
119	11.86	1 0.28	22.26	3 -0.36	5.19	1 0.47	3.17	2 0.20	5.93	1 0.08	0.959	2 -1.03	0.715	1 0.33				
120	11.61	1 -0.73	22.33	4 0.00	5.13	1 0.06	3.38	3 0.80	6.02	1 0.89	1.001	2 0.03	0.704	1 -0.40			53.5	3 0.17
121	11.92	1 0.53	22.58	3 1.29	5.18	1 0.40			6.18	1 2.33	1.099	2 2.54	0.713	1 0.20	56.3	1 0.33		
122	11.78	1 -0.04	22.30	3 -0.15	5.21	1 0.60	3.17	4 0.20	5.82	1 -0.89	1.023	2 0.60	0.721	1 0.74				
123	12.10	1 1.26	22.30	4 -0.15	6.06	2 6.34	3.19	3 0.25	6.06	1 1.25	1.029	2 0.75	0.669	1 -2.76			52.1	3 -0.65
124	11.95	1 0.65	21.92	2 -2.12					5.62	1 -2.69								
126	12.07	1 1.14	22.21	3 -0.62	5.40	2 1.88	2.96	3 -0.40	5.92	1 0.00	0.912	2 -2.23	0.724	1 0.94				
127	11.96	1 0.69	22.43	3 0.51	5.45	1 2.22	3.31	3 0.60	6.00	1 0.71	1.104	2 2.67	0.724	1 0.94	56.5	2 0.38	50.6	3 -1.55
127			22.25	4 -0.41														
128	11.63	1 -0.65	22.26	4 -0.36	4.79	2 -2.22	3.25	3 0.43	5.84	1 -0.71	0.993	1 -0.16	0.697	1 -0.87				
129	12.16	1 1.51	22.33	4 0.00	4.87	2 -1.68	2.89	2 -0.60	5.82	1 -0.89	1.055	2 1.41	0.713	1 0.20				
131	11.74	1 -0.20	22.41	4 0.41	5.00	2 -0.80	3.82	3 2.06	6.00	1 0.71	1.028	2 0.72	0.702	1 -0.53				
133	12.05	1 1.06	22.35	1 0.10	5.12	1 0.00	3.50	2 1.14	5.88	1 -0.35	1.019	2 0.49	0.718	1 0.53	51.7	1 -0.93	50.4	4 -1.67
135	11.91	1 0.49	22.25	3 -0.41	5.02	1 -0.67	3.25	2 0.43	5.85	1 -0.62	1.030	1 0.77	0.690	1 -1.34				
136	11.97	1 0.73	22.39	4 0.31	4.90	2 -1.48			6.13	1 1.88	0.960	2 -1.01	0.690	1 -1.34	55.9	2 0.22		
137	11.55	1 -0.98	22.27	1 -0.31	5.22	1 0.67			5.83	1 -0.80	0.947	2 -1.34	0.721	1 0.74				
138			22.77	3 2.28														
140	11.77	1 -0.08	22.26	2 -0.36	4.91	2 -1.41	3.11	1 0.02	5.92	1 0.00	0.880	2 -3.05	0.682	1 -1.88				
141	11.39	1 -1.63	22.27	2 -0.31	4.08	1 -2.01	4.20	2 3.15	5.94	1 0.17	0.884	2 -2.95	1.406	1 46.94				
143															56.3	1 0.33		
144	11.85	3 0.24	22.27	3 -0.31					5.78	2 -1.25								
154	11.72	1 -0.28	22.56	2 1.19	5.06	1 -0.40	3.08	1 -0.05	5.92	1 0.00	1.005	1 0.14	0.717	1 0.47				
154			22.44	4 0.57			2.72	2 -1.09										
154			22.43	5 0.51														
155	11.61	1 -0.73	22.32	4 -0.05	5.25	2 0.87	3.36	3 0.74	5.97	1 0.44	0.954	2 -1.16	0.714	1 0.26				
156	11.58	1 -0.85	22.34	4 0.05	5.06	1 -0.40	3.36	2 0.74	6.02	1 0.89	0.990	2 -0.24	0.706	1 -0.26				
157			23.12	3 4.09														
158			22.32	3 -0.05														
159	11.97	1 0.73	22.44	4 0.57	5.15	1 0.20	2.82	2 -0.80	5.96	1 0.35	0.978	2 -0.54	0.710	1 0.00				
160	11.96	1 0.69	22.41	1 0.41	5.03	1 -0.60	3.02	2 -0.22	5.58	1 -3.05	0.993	2 -0.16	0.720	1 0.67				
160			22.74	3 2.12														
161	11.86	1 0.28	22.36	2 0.15	5.22	1 0.67	2.31	2 -2.26	5.89	1 -0.26			0.862	1 10.25				
162	11.77	1 -0.08	21.91	1 -2.17	5.31	1 1.28	2.61	2 -1.40	6.06	1 1.25	1.000	2 0.01	0.719	1 0.60				
163			23.22	4 4.61														
164	11.78	1 -0.04	22.63	2 1.55	5.75	1 4.24	2.42	1 -1.95	5.94	1 0.17	1.166	2 4.25	0.710	1 0.00				
165	11.53	1 -1.06	22.43	4 0.51	5.04	2 -0.53	3.50	3 1.14	5.83	1 -0.80	0.972	2 -0.70	0.715	1 0.33				
166	12.29	1 2.04													56.1	1 0.27		
167	11.93	1 0.57							5.94	1 0.17							49.2	3 -2.39
168	11.72	1 -0.28	22.18	1 -0.77	5.13	1 0.06	2.49	2 -1.75	5.68	1 -2.15	1.007	2 0.19	0.691	1 -1.28				
169																	55.1	4 1.13
170	11.45	1 -1.38	22.17	3 -0.83	5.14	1 0.13	1.83	2 -3.64	5.75	1 -1.52	0.959	1 -1.03	0.679	1 -2.09	47.7	1 -2.03		
171	11.72	1 -0.28	22.09	4 -1.24	5.15	2 0.20	3.55	3 1.29	6.14	1 1.97	1.018	2 0.47	0.706	1 -0.26				
173	11.43	1 -1.47	22.40	4 0.36	5.12	1 0.00												
173	11.74	2 -0.20																
174	11.86	1 0.28	22.38	3 0.25	5.08	1 -0.26	3.14	1 0.11	5.88	1 -0.35	1.010	2 0.26	0.681	1 -1.95				
175	12.09	1 1.22	22.35	4 0.10	5.18	1 0.40	3.09	2 -0.02	5.91	1 -0.08	1.003	1 0.08	0.714	1 0.26			51.1	3 -1.25
175											0.968	2 -0.80						
176	11.60	1 -0.77	22.29	4 -0.20	5.14	1 0.13	3.27	1 0.48	5.98	1 0.53	0.976	2 -0.60	0.711	1 0.06	52.4	1 -0.74		
177	11.94	1 0.61	22.10	4 -1.19	4.94	2 -1.21	3.50	3 1.14	5.96	1 0.35	1.001	2 0.03	0.709	1 -0.06	56.5	1 0.38	55.4	3 1.31
177																	53.8	4 0.35
177																		
178	11.61	1 -0.73	22.32	4 -0.05	5.19	1 0.47	3.25	3 0.43	5.87	1 -0.44	0.965	1 -0.88	0.711	1 0.06	52.0	1 -0.85		
179	11.92	1 0.53	22.48	2 0.77	5.05	1 -0.47	3.01	2 -0.25	5.76	1 -1.43	1.020	2 0.52	0.708	1 -0.13				
180	11.96	1 0.69	22.33	2 0.00	5.01	1 -0.74	2.86	2 -0.68	5.93	1 0.08	1.040	2 1.03	0.710	1 0.00				
181	11.81	1 0.08	21.78	2 -2.85	5.17	1 0.33	2.78	2 -0.91	5.55	1 -3.32								
181			22.64	3 1.60														
182	10.71	1 -4.41							5.65	1 -2.42								
183	11.98	1 0.77	22.47	4 0.72	5.09	1 -0.20	2.80	2 -0.86	5.80	1 -1.07	0.992	2 -0.19	0.717	1 0.47				
185	11.47	1 -1.30	22.13	4 -1.03	4.97	2 -1.01	2.93	2 -0.48	5.97	1 0.44	0.963	2 -0.93	0.708	1 -0.13				
186	11.97	1 0.73	22.35	2 0.10	5.14	1 0.13	3.32	2 0.63	5.87	1 -0.44	1.127	2 3.26	0.703	1 -0.47				
187	11.74	1 -0.20	21.88	2 -2.33	5.12	1 0.00	3.26	2 0.45	5.85	1 -0.62	0.992	2 -0.19	0.725	1 1.01				
188	11.89	1 0.40	21.69	4 -3.32	5.20	1 0.53	2.68	2 -1.20	5.93	1 0.08	1.079	2 2.03	0.717	1 0.47				
189	11.95	1 0.65	22.50	4 0.88	5.09	1 -0.20	3.05	2 -0.14	5.91	1 -0.08	1.092	2 2.36	0.708	1 -0.13				
190	11.60	1 -0.77	22.06	4 -1.40	4.27	1 -5.23	3.67	2 1.63	5.93	1 0.08	1.072	2 1.85	0.657	1 -3.52				
191	11.78	1 -0.04	22.30	4 -0.15	5.32	1 1.34	3.04	2 -0.17	5.63	1 -2.60	1.367	2 9.39	0.736	1 1.75				
192	11.60	1 -0.77	22.56	1 1.19	5.15	1 0.20	2.78	2 -0.91	5.95	1 0.26	0.998	2 -0.03	0.730	1 1.34			54.5	4 0.77
206	12.28	1 2.00	22.16	4 -0.88	4.98	1 -0.94			5.94	1 0.17								
207	11.90	1 0.44	21.73	4 -3.11	5.00	1 -0.80	2.51	2 -1.69	6.71	1 7.10	1.160	1 4.10	0.676	1 -2.29				
208	11.76	1 -0.12	22.22	4 -0.57					5.80	1 -1.07								
209	12.17	1 1.55	21.86	2 -2.43	5.15	1 0.20			5.83	1 -0.80								
210	11.89	1 0.40	22.23	4 -0.51	5.00	2 -0.80			5.79	1 -1.16			0.697	2 -0.87				
211	10.84	1 -3.88	21.39	1 -4.82	5.24	1 0.80	2.79	2 -0.88	6.07	1 1.34	0.763	1 -6.04	0.703	1 -0.47				
212	11.78	1 -0.04	22.46	4 0.67	5.05	2 -0.47	3.27	3 0.48	5.89	1 -0.26	1.028	1 0.72	0.713	1 0.20			57.0	3 2.27
213	11.78	1 -0.04	22.45	1 0.62	5.27	1 1.01			5.94	1 0.17								
214	11.95	1 0.65	22.38	2 0.25	5.26	1 0.94	1.32	1 -5.10	5.96	1 0.35	0.960	2 -1.01	0.700	1 -0.67				
215	12.12	1 1.34	22.08	4 -1.29	4.93	2 -1.28			5.91	1 -0.08	0.944	2 -1.41	0.723	1 0.87	53.7	1 -0.38		
216	11.75	1 -0.16	22.13	4 -1.03	5.23	1 0.74	2.60	3 -1.4										

表 5 分析成績(3)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析・フォーシ・シラス)		SL(HPLC・ペイテック)		
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/カヒ)	No. z-score	分析値 (g/カヒ)	No. z-score													
223	12.11	3 1.30	22.16	4 -0.88	5.20	1 0.53	2.69	2 -1.17	6.10	1 1.61	0.910	1 -2.28	0.718	1 0.53	54.1	1 -0.27			
223			22.65	5 1.66	5.12	3 0.00	2.82	4 -0.80	4.71	2 -10.88	0.900	3 -2.54	0.730	2 1.34	56.2	2 0.30			
224	12.10	1 1.26	22.04	4 -1.50	5.00	1 -0.80	3.06	2 -0.11	5.76	1 -1.43	1.095	1 2.44	0.723	1 0.87	57.1	1 0.55			
225	11.30	1 -2.00	21.98	1 -1.81			2.65	2 -1.29	6.00	1 0.71					58.0	1 0.79			
226	11.41	1 -1.55	21.71	1 -3.21					5.81	1 -0.98									
227	11.56	1 -0.94							5.92	2 0.00									
236	12.04	1 1.02	61.80	3 204.78	5.17	1 0.33	2.91	2 -0.54	5.94	1 0.17	1.023	2 0.60							
245	10.72	1 -4.37	21.70	1 -3.26	4.90	1 -1.48			6.00	1 0.71									
246	11.33	1 -1.88	22.43	4 0.51	5.22	1 0.67	3.54	1 1.26	5.93	1 0.08	1.012	2 0.31	0.723	1 0.87					
248	10.94	1 -3.47	22.49	4 0.83	4.97	1 -1.01			5.96	1 0.35									
249	11.60	1 -0.77	22.40	2 0.36					6.00	1 0.71									
250	11.47	1 -1.30	22.41	2 0.41	4.98	1 -0.94			5.89	1 -0.26									
251	11.94	1 0.61	22.36	1 0.15	5.07	1 -0.33	3.17	2 0.20	5.81	1 -0.98	1.010	2 0.26	0.693	1 -1.14	54.1	1 -0.27			
252	10.87	1 -3.76	23.06	4 3.78	4.89	1 -1.55			6.01	1 0.80									
253	10.13	1 -6.78	21.77	4 -2.90	5.27	2 1.01													
254	11.93	1 0.57	22.11	4 -1.14	5.55	1 2.90	3.03	2 -0.20	5.89	1 -0.26	1.427	1 10.93	0.719	1 0.60	48.2	1 -1.89			
255	11.59	1 -0.81	22.36	2 0.15	5.11	1 -0.06			5.96	1 0.35									
256	11.43	1 -1.47	22.11	4 -1.14	5.07	1 -0.33	3.11	2 0.02	5.77	1 -1.34	0.879	2 -3.08	0.633	1 -5.19	55.6	1 0.13			
257	11.50	1 -1.18	22.59	4 1.34	5.08	1 -0.26	2.76	2 -0.97	6.03	1 0.98	0.990	2 -0.24	0.710	1 0.00					
258	12.08	1 1.18	22.10	1 -1.19	5.01	1 -0.74	3.36	2 0.74	5.96	1 0.35	0.960	2 -1.01	0.717	1 0.47					
259	11.61	1 -0.73	22.35	1 0.10	5.06	1 -0.40	3.55	1 1.29	6.02	1 0.89	0.990	2 -0.24	0.680	1 -2.02			53.3	3 0.05	
260	11.90	1 0.44	22.06	2 -1.40	5.16	1 0.26			6.12	1 1.79	1.072	2 1.85	0.713	1 0.20					
261	11.36	1 -1.75	21.79	2 -2.80	4.82	1 -2.02	2.66	1 -1.26	5.76	1 -1.43	0.978	3 -0.54	0.727	1 1.14					
262	12.03	1 0.98							6.03	1 0.98					51.0	1 -1.12			
263	11.66	1 -0.53	22.32	1 -0.05	5.05	1 -0.47	3.13	1 0.08	6.06	1 1.25	0.950	2 -1.26	0.650	1 -4.04	57.2	3 2.39			
264															57.2	1 0.57			
265	11.85	1 0.24	21.95	4 -1.97	5.08	1 -0.26	3.59	3 1.40	6.00	1 0.71									
266	11.91	1 0.49	22.38	2 0.25	5.12	1 0.00	2.95	2 -0.43	5.88	1 -0.35	0.926	2 -1.87	0.720	1 0.67	52.1	4 -0.65			
267	11.70	1 -0.36	22.40	1 0.36	5.05	1 -0.47	3.10	2 0.00	5.93	1 0.08	0.990	1 -0.24	0.710	1 0.00					
268	11.80	1 0.04	22.71	4 1.97	5.20	1 0.53	3.22	2 0.34	5.88	1 -0.35	0.976	3 -0.60	0.720	1 0.67	59.3	1 1.15			
269	11.79	1 0.00	22.67	1 1.76	4.97	1 -1.01			6.04	1 1.07									
270	11.61	1 -0.73	22.40	2 0.36	5.22	1 0.67	2.82	2 -0.80	5.85	1 -0.62	0.936	2 -1.62	0.706	1 -0.26			56.2	3 1.79	
271	11.16	1 -2.57	22.68	4 1.81	5.21	1 0.60	2.57	2 -1.52	5.87	1 -0.44	1.055	2 1.41	0.713	1 0.20	62.0	1 1.89			
272	11.65	1 -0.57	22.12	4 -1.08	5.01	2 -0.74	2.41	1 -1.98	5.96	1 0.35	0.988	1 -0.29	0.711	1 0.06	55.9	2 0.22			
273	11.63	1 -0.65	22.50	4 0.88	4.92	2 -1.34			6.04	1 1.07									
274	11.67	1 -0.49	22.53	1 1.03	5.14	1 0.13	3.04	1 -0.17	5.91	1 -0.08	0.917	2 -2.10	0.709	1 -0.06					
275	11.65	1 -0.57	22.32	4 -0.05	5.13	1 0.06	2.87	1 -0.66	5.93	1 0.08									
276	11.52	1 -1.10	22.38	4 0.25	5.09	1 -0.20	3.34	1 0.68	5.82	1 -0.89	1.000	1 0.01	0.720	1 0.67					
277	11.36	1 -1.75	22.36	4 0.15	5.15	1 0.20	2.87	2 -0.66	6.20	1 2.51	0.990	2 -0.24	0.690	1 -1.34	57.8	2 0.74			
278	11.65	1 -0.57	22.61	4 1.45	4.96	1 -1.07	3.06	2 -0.11	6.05	1 1.16	1.016	2 0.42	0.718	1 0.53			53.0	3 -0.11	
279	11.26	1 -2.16	22.36	2 0.15	5.04	1 -0.53	3.56	2 1.32	5.92	1 0.00	0.990	2 -0.24	0.620	1 -6.07					
280																			
286	11.35	1 -1.79	21.85	4 -2.49	5.09	1 -0.20	3.62	3 1.49	5.99	1 0.62									
295	11.52	1 -1.10	22.58	2 1.29	4.67	2 -3.03	3.18	2 0.22	5.94	1 0.17									
296	11.80	1 0.04	22.45	4 0.62	4.88	2 -1.61	3.31	2 0.60	6.06	1 1.25									
297	11.47	1 -1.30	22.18	2 -0.77	5.45	1 2.22	3.02	2 -0.22	6.05	1 1.16	0.948	1 -1.31	0.628	1 -5.53					
298	11.88	1 0.36	22.55	2 1.14	5.07	1 0.33	2.83	2 -0.77	5.97	1 0.44	1.007	1 0.19	0.723	1 0.87	57.2	1 0.57			
299	10.00	3 -7.31	21.90	1 -2.23					6.10	2 1.61	1.000	2 0.01	0.900	2 12.81					
300	12.13	1 1.38	22.29	4 -0.20	4.75	2 -2.49	3.03	4 -0.20	5.96	1 0.35	1.074	1 1.90	0.733	1 1.55	53.0	3 -0.11			
301	11.82	1 0.12	22.28	2 -0.25	5.05	1 -0.47	2.83	1 -0.77	5.71	1 -1.88	0.966	1 -0.85	0.742	1 2.15					
302	11.30	1 -2.00	22.37	2 0.20					5.91	1 -0.08	0.982	2 -0.44	0.719	1 0.60					
303	11.38	1 -1.67	22.50	4 0.88	5.23	2 0.74	2.69	1 -1.17	6.02	1 0.89									
304	11.89	1 0.40	21.95	4 -1.97	5.12	1 0.00	3.01	1 -0.25	5.82	1 -0.89	0.989	2 -0.26	0.711	1 0.06					
305																			
306	11.86	1 0.28	22.37	4 0.20	4.99	2 -0.87	2.98	1 -0.34	6.01	1 0.80	1.056	2 1.44	0.706	1 -0.26			52.7	3 -0.29	
307	11.06	1 -2.98	22.19	4 -0.72	4.85	2 -1.82	3.13	2 0.08	5.97	1 0.44	0.987	2 -0.31	0.656	1 -3.64					
308	11.42	1 -1.51							5.94	1 0.17									
309	11.67	1 -0.49	22.38	4 0.25	5.17	1 0.33	2.90	2 -0.57	6.04	1 1.07	1.020	2 0.52	0.720	1 0.67					
310	11.47	1 -1.30	22.29	4 -0.20	5.24	1 0.80	3.05	2 -0.14	5.67	1 -2.24	0.974	2 -0.65	0.679	1 -2.09	59.1	1 1.10			
311	12.04	1 1.02	22.59	2 1.34	5.23	1 0.74	2.86	1 -0.68	6.00	1 0.71	1.120	1 3.08	0.740	1 2.02	59.6	1 1.23			
312	11.90	1 0.44	22.35	4 0.10	4.72	2 -2.69			5.94	1 0.17	1.038	2 0.98	0.729	1 1.28	51.4	2 -1.01			
313	11.83	1 0.16	22.00	4 -1.71	5.28	1 1.07	3.23	1 0.37	5.65	1 -2.42									
314	12.17	1 1.55	22.23	4 -0.51	5.33	1 1.41	3.32	1 0.63	5.81	1 -0.98									
315	12.09	1 1.22							5.90	1 -0.17					56.7	1 0.44		53.8	3 0.35
316	11.60	1 -0.77	22.36	2 0.15	5.10	1 -0.13			5.57	1 -3.14									
317	11.68	1 -0.44	22.52	2 0.98	5.23	1 0.74	3.42	2 0.91	5.85	1 -0.62	0.963	2 -0.93	0.726	1 1.07	61.6	1 1.78			
318	11.70	1 -0.36	22.39	4 0.31	5.29	1 1.14	3.09	2 -0.02	5.96	1 0.35	0.900	2 -2.54	0.690	1 -1.34					
320	11.75	1 -0.16	22.38	4 0.25	5.12	2 0.00	2.76	1 -0.97	5.96	1 0.35	1.037	2 0.95	0.697	1 -0.87					
321	12.07	1 1.14	22.25	4 -0.41	5.13	1 0.06	3.25	3 0.43	5.66	1 -2.33	0.902	1 -2.49	0.710	1 0.00			58.1	3 2.93	
322	11.81	1 0.08	22.23	4 -0.51	5.20	1 0.53	3.25	1 0.43	5.88	1 -0.35	0.992	2 -0.19	0.714	1 0.26					
323	11.93	2 0.57	22.35	4 0.10	5.19	1 0.47	2.73	3 -1.06	6.03	1 0.98	0.994	2 -0.14	0.700	1 -0.67					
324	9.10	1 -10.92	21.70	2 -3.26	6.30	1 2.95			6.10	1 1.61									
325	11.39	1 -1.63	22.16	4 -0.88	5.00	1 -0.80	3.05	1 -0.14	5.79	1 -1.16	0.980	2 -0.49	0.700	1 -0.67					
326	11.76	1 -0.12	22.27	4 -0.31	5.25	3 0.87			5.97	1 0.44	0.970	2 -0.75	0.720	1 0.67					
327	11.40	1 -1.59	21.75	4 -3.00	5.														

表5 分析成績(4)

試料番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析・7年以内・29/23) 分析値 No. z-score	SL(HPLC・ハイイロアセイ) 分析値 No. z-score
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力価)	No. z-score												
338	12.07	1 1.14	22.46	4 0.67	5.12	2 0.00	3.35	3 0.71	5.78	1 -1.25	1.006	2 0.16	0.697	1 -0.87		
339	11.95	1 0.65	22.39	4 0.31	5.05	1 -0.47	2.83	2 -0.77	6.04	1 1.07	1.020	2 0.52	0.730	1 1.34		
340	11.80	1 0.04	22.21	4 -0.62	5.02	2 -0.67	2.67	2 -1.23	5.96	1 0.35	0.970	2 -0.75	0.710	1 0.00		
341	11.66	1 -0.53	22.37	4 0.20	5.21	2 0.60	3.05	1 -0.14	6.00	1 0.71	1.090	2 2.31	0.720	1 0.67		
342	11.51	1 -1.14	22.47	2 0.72	5.07	1 -0.33	2.83	2 -0.77	5.89	1 -0.26	1.210	2 5.38	0.710	1 0.00	50.1	1 -1.37
343	11.80	1 0.04	22.13	4 -1.03	4.89	2 -1.55	3.38	3 0.80	5.96	1 0.35	1.001	2 0.03	0.716	1 0.40		
344	11.29	1 -2.04	22.15	2 -0.93	5.23	1 0.74	3.69	2 1.69	5.83	1 -0.80						
345	11.98	1 0.77	22.27	4 -0.31	5.19	2 0.47	2.67	2 -1.23	6.05	1 1.16	0.980	2 -0.49	0.700	1 -0.67	56.3	1 0.33
346	11.77	1 -0.08	22.47	4 0.72	5.16	1 0.26			6.03	1 0.98	0.986	2 -0.34	0.697	1 -0.87	53.2	1 -0.52
347	11.35	1 -1.79	22.28	2 -0.25	5.10	1 -0.13			5.92	1 0.00						
348	12.09	1 1.22	22.37	2 0.20	5.35	1 1.55	3.22	2 0.34	5.87	1 -0.44	0.952	2 -1.21	0.727	1 1.14		
349	11.75	1 -0.16	22.36	4 0.15	5.15	1 0.20			6.07	1 1.34	1.000	1 0.01				
350	12.40	1 2.49	22.47	4 0.72	4.87	1 -1.68	3.34	3 0.68	5.88	1 -0.35	1.020	2 0.52	0.700	1 -0.67		53.3 3 0.05
351	11.88	1 0.36							5.88	1 -0.35						
352	12.16	1 1.51	22.02	4 -1.60	5.08	1 -0.26			5.82	1 -0.89						
353	11.69	1 -0.40							5.85	1 -0.62	1.238	2 6.09	0.721	1 0.74		
354	11.87	1 0.32	22.39	2 0.31	5.25	1 0.87			5.86	1 -0.53						
355	11.87	1 0.32	22.43	4 0.51	5.26	1 0.94	2.92	3 -0.51	6.01	1 0.80	1.011	2 0.29	0.709	1 -0.06		
356	12.14	1 1.43	22.39	4 0.31	5.17	1 0.33	2.61	2 -1.40	5.92	1 0.00	1.325	2 8.32	0.707	1 -0.20	54.0	1 -0.30
357	11.93	1 0.57	22.86	3 2.74	4.90	2 -1.48	3.47	3 1.06	5.88	1 -0.35	1.080	2 2.05	0.710	1 0.00		
358	12.08	1 1.18	22.29	4 -0.20	5.01	1 -0.74	2.68	2 -1.20	6.15	1 2.06	0.930	2 -1.77	0.700	1 -0.67	58.5	1 0.93
359	11.87	1 0.32	22.33	4 0.00	5.05	2 -0.47	3.25	2 0.43	6.00	1 0.71	1.056	2 1.44	0.707	1 -0.20	53.1	2 -0.55
360	11.36	1 -1.75	22.29	4 -0.20	5.41	1 1.95	3.00	2 -0.28	5.98	1 0.53	1.016	2 0.42	0.788	1 5.26		52.7 3 -0.29
361	11.88	1 0.36	22.86	2 2.74	5.25	1 0.87	3.10	2 0.00	5.90	1 -0.17	1.002	1 0.06	0.703	1 -0.47		
362	11.71	1 -0.32	22.21	3 -0.62	5.36	2 1.61	3.54	2 1.26	5.70	1 -1.97	0.762	1 -6.07	0.737	1 1.82		
363	11.93	1 0.57	22.68	2 1.81											52.6	1 -0.68
376	12.15	1 1.47	22.33	4 0.00	5.02	2 -0.67			5.63	1 -2.60	1.044	1 1.13	1.768	1 71.36		
377	10.82	1 -3.96	19.21	1 -16.18	4.53	1 -3.97			5.63	1 -2.60			1.720	1 68.12		
378	12.26	1 1.92	22.12	4 -1.08	5.13	2 0.06	3.64	3 1.54	5.79	1 -1.16	1.082	2 2.10	0.693	1 -1.14		
379	11.68	1 -0.44	22.16	1 -0.88	5.17	1 0.33	3.59	2 1.40	5.84	1 -0.71	0.997	2 -0.06	0.717	1 0.47		
380	12.05	1 1.06	22.25	4 -0.41	4.98	2 -0.94	3.32	3 0.63	5.89	1 -0.26	0.983	2 -0.42	0.724	1 0.94		
381			22.22	2 -0.57	5.12	1 0.00	3.33	2 0.66	5.93	1 0.08	1.062	2 1.59	0.696	1 -0.94		
383	12.00	1 0.85	23.08	2 3.89	4.72	1 -2.69	2.45	2 -1.86	6.01	1 0.80						

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

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

サリノマイシンナトリウム

No. 分析方法
1 迅速定量法
2 フローインジェクション法
3 HPLC法
4 バイオアッセイ
5 不明

表 5 分析成績(5)

試料 番号	B試料				D試料				銅		亜鉛		クエン酸モランデル			
	水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No. z-score	粗灰分 分析値 (%)	No. z-score	カドミウム 分析値 (g/トン)	No. z-score	エトキシキン 分析値 (g/トン)	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	
1	8.21	1 -0.37	67.76	4 -0.81	13.06	1 -0.53										
2	8.08	1 -1.07	68.67	4 0.74	13.14	1 0.17										
3	8.22	1 -0.32	68.34	4 0.17	13.18	1 0.53										
4	8.26	1 -0.10	68.21	4 -0.04	13.12	1 0.00										
5	8.31	1 0.16	68.87	4 1.08	13.09	1 -0.26										
6	7.91	1 -1.99	69.26	2 1.75	13.20	1 0.71										
7	8.13	5 -0.80	67.48	6 -1.28	13.10	5 -0.17				26.23	5 2.68					
8	8.25	1 -0.16	68.36	4 0.21	13.05	1 -0.62										
9	8.44	5 0.86	67.80	6 -0.74	13.05	5 -0.62										
10	8.20	1 -0.43	67.80	4 -0.74	13.71	1 5.30				24.10	1 0.07	29.21	1 -0.78			
11	8.28	1 0.00	68.26	3 0.04	13.22	1 0.89				23.96	1 -0.09	30.31	1 0.01			
12	8.19	1 -0.48	67.97	4 -0.45	13.15	1 0.26				23.94	1 -0.12	29.48	1 -0.58			
13	8.33	1 0.26	68.19	4 -0.07	12.94	1 -1.61				23.94	1 -0.12	28.99	1 -0.94			
14	8.21	1 -0.37	68.51	4 0.46	13.07	1 -0.44				24.78	1 0.90	30.61	1 0.23			
15	8.24	1 -0.21	68.22	6 -0.02	13.19	5 0.62										
16	8.23	1 -0.26	68.70	4 0.79	13.24	1 1.07										
17	8.19	1 -0.48	68.04	1 -0.33	13.17	2 0.44										
18	8.30	3 0.10	67.60	5 -1.08	12.30	2 -7.37										
19	7.70	5 -3.12	68.04	6 -0.33												
20	7.98	1 -1.61	68.59	1 0.60	13.07	1 -0.44										
21	8.04	1 -1.29	68.62	1 0.65	13.23	1 0.98										
22	8.20	1 -0.43	68.51	1 0.46	12.86	1 -2.33										
23	8.09	1 -1.02	68.50	4 0.45	13.22	1 0.89										
24	7.76	5 -2.80	66.95	6 -2.19	13.18	5 0.53										
25	8.10	1 -0.97	68.45	4 0.36	13.10	1 -0.17										
26	8.41	1 0.70	68.35	4 0.19	13.12	1 0.00										
27	8.30	1 0.10	69.86	3 2.77	14.19	1 9.62				22.34	2 -2.08	27.05	2 -2.34			
27			68.68	4 0.75												
28	8.15	1 -0.70	68.87	2 1.08	13.15	1 0.26	0.63	1 -0.29	101.1	1 -2.20	27.17	1 3.83	32.07	1 1.29		
29	7.65	1 -3.39	68.22	2 -0.02	14.30	1 10.61	0.67	1 0.29			23.40	1 -0.78	29.57	1 -0.52		
30	8.40	1 0.64	67.88	4 -0.60	13.24	1 1.07										
32	7.83	1 -2.42	67.64	2 -1.01	13.26	1 1.25	0.54	1 -1.60			24.60	1 0.68	30.80	1 0.36		
33	8.55	1 1.45			14.19	1 9.62										
34	8.23	1 -0.26	67.37	1 -1.47	13.16	1 0.35	0.67	2 0.29	123.7	1 -0.41	24.75	1 0.87	31.27	1 0.71	14.5	1 -1.45
41	8.35	1 0.37	67.83	4 -0.69	13.27	1 1.34	0.65	2 0.00	150.4	1 1.69	23.91	1 -0.15	29.16	1 -0.81	14.7	1 -1.24
42	8.47	1 1.02	68.59	4 0.60	13.11	1 -0.08					24.04	1 0.00				
43	8.69	1 2.21	67.80	2 -0.74	13.05	1 -0.62	0.65	2 0.00			22.44	1 -1.96	27.92	1 -1.71		
44	8.24	1 -0.21	67.75	4 -0.82	13.20	1 0.71										
45	8.23	1 -0.26	68.55	4 0.53	12.99	1 -1.16										
46	7.78	1 -2.69	67.03	2 -2.05												
47	8.11	1 -0.91	67.26	4 -1.66	13.25	1 1.16										
48	7.63	1 -3.50	68.43	4 0.33	13.05	1 -0.62										
50	8.62	1 1.83	67.68	4 -0.94	13.10	1 -0.17					24.87	1 1.01	32.88	1 1.87		
52	8.51	1 1.24	68.56	4 0.55	12.94	1 -1.61										
53	8.37	1 0.48	67.83	4 -0.69	13.17	1 0.44										
54	8.11	1 -0.91	69.33	4 1.86	12.98	1 -1.25										
56	8.45	1 0.91	68.26	1 0.04	13.08	1 -0.35										
57	8.41	1 0.70	68.47	1 0.40	13.01	1 -0.98	0.55	3 -1.45			22.75	2 -1.58	30.01	2 -0.20		
58	7.85	1 -2.32	67.20	4 -1.76	13.11	1 -0.08										
59	8.41	1 0.70	68.05	4 -0.31	13.05	1 -0.62										
60	8.38	1 0.53	68.17	4 -0.11	12.78	1 -3.05					24.33	1 0.35	29.39	1 -0.65	15.9	1 0.00
62	8.34	1 0.32	68.69	4 0.77	13.20	1 0.71										
63	8.28	1 0.00	68.27	4 0.05	13.22	1 0.89										
64	8.24	1 -0.21			13.12	1 0.00										
65	7.53	1 -4.04	67.32	1 -1.56	12.93	1 -1.70										
66	8.22	1 -0.32	68.47	4 0.40	13.00	1 -1.07					24.02	1 -0.02				
68																
69	8.42	1 0.75	68.47	4 0.40	13.15	1 0.26										
70	8.40	1 0.64	69.20	4 1.64	13.21	1 0.80										
71	8.38	1 0.53	68.87	4 1.08	13.24	1 1.07										
72	8.74	1 2.48	68.94	2 1.20	13.14	1 0.17										
73	7.97	1 -1.67	68.13	4 -0.17	13.24	1 1.07										
75	8.35	1 0.37	67.95	4 -0.48	13.18	1 0.53										
78	8.40	1 0.64	67.79	4 -0.75												
79	8.44	1 0.86			13.17	1 0.44	0.90	2 3.64			24.32	1 0.34	30.08	1 -0.15		
80	8.24	1 -0.21	68.87	4 1.08	13.17	1 0.44										
81	8.51	1 1.24	68.61	4 0.64	13.02	1 -0.89										
86	8.50	1 1.18	68.27	4 0.05	13.20	1 0.71	0.56	1 -1.31			23.74	1 -0.36	31.38	1 0.79		
88	8.30	1 0.10	68.63	1 0.67	13.07	1 -0.44	0.63	2 -0.29	125.1	1 -0.30	23.70	1 -0.41	30.36	1 0.05	15.0	1 -0.93
89	8.17	1 -0.59	66.83	2 -2.39	13.17	1 0.44										
90	7.92	1 -1.94	69.09	4 1.45	13.20	1 0.71										
91	8.08	1 -1.07	68.29	4 0.09	13.31	1 1.70					24.28	1 0.29	30.59	1 0.21		
92	8.38	1 0.53	67.58	4 -1.11	13.17	1 0.44	0.75	1 1.45			24.10	1 0.07	30.66	1 0.26		
93	8.45	1 0.91	68.41	1 0.29	13.09	1 -0.26	0.67	1 0.29			23.84	1 -0.24	30.35	1 0.04		
94	7.76	1 -2.80	68.05	4 -0.31	13.11	1 -0.08	0.67	2 0.29			23.82	1 -0.26	28.60	1 -1.22		
95	7.96	1 -1.72	68.65	2 0.70	13.11	1 -0.08	0.83	2 2.62			23.55	1 -0.60			16.0	1 0.10
106	8.40	1 0.64	69.34	3 1.88	12.91	1 -1.88										
107	8.44	1 0.86	67.77	2 -0.79	13.15	1 0.26										
108	8.43	1 0.80	68.21	4 -0.04	13.07	1 -0.44	0.56	2 -1.31	134.6	1 0.44	23.45	1 -0.72	30.02	1 -0.19	13.1	1 -2.90
109	8.43	1 0.80	67.71	4 -0.89	13.24	1 1.07					24.60	1 0.68				
110	8.15	1 -0.70									24.61	1 0.69	31.29	1 0.72	16.6	1 0.72
112	8.05	1 -1.24	67.83	4 -0.69	13.03	1 -0.80					24.13	1 0.11	32.06	1 1.28		
114	8.53	1 1.34	67.94	4 -0.50	13.11	1 -0.08									16.0	1 0.10
115	8.21	1 -0.37	68.22	4 -0.02	13.17	1 0.44										
116	10.00	2 9.28							128.1	1 -0.07	25.41	1 1.68	28.08	1 -1.60	15.3	1 -0.62



表 5 分析成績(7)

試料 番号	B試料		水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		D試料		銅		亜鉛		クエン酸モナシアル							
	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														
223	7.45	3	-4.42		68.36	4	0.21	13.07	1	-0.44										15.5	1	-0.41				
223					68.64	5	0.69																			
224	8.56	1	1.51		67.30	4	-1.59	12.97	1	-1.34																
225	7.77	1	-2.75		68.09	1	-0.24	13.08	1	-0.35																
226	8.17	1	-0.59		70.18	1	3.22	13.17	1	0.44																
227	8.27	1	-0.05					12.83	2	-2.60																
236	8.32	1	0.21		78.36	3	17.28	12.99	1	-1.16																
245	7.36	1	-4.26		67.00	1	-2.10	13.21	1	0.80																
246	8.08	1	-1.07		68.73	4	0.84	13.22	1	0.89				24.15	1	0.13	27.28	1	-2.18							
248	7.69	1	-3.18		68.85	4	1.05	13.25	1	1.16																
249	8.40	1	0.64		67.50	2	-1.25	13.10	1	-0.17																
250	7.99	1	-1.56		67.64	2	-1.01	13.14	1	0.17	0.67	2	0.29													
251	8.33	1	0.26		68.09	1	-0.24	13.16	1	0.35																
252	7.72	1	-3.02		69.22	4	1.68	13.19	1	0.62																
253	7.53	1	-4.04		67.23	4	-1.71																			
254	8.30	1	0.10		68.53	4	0.50	13.05	1	-0.62																
255	8.20	1	-0.43		67.57	2	-1.13	13.05	1	-0.62	0.65	2	0.00													
256	8.19	1	-0.48		67.82	4	-0.70	13.02	1	-0.89				24.45	1	0.50	27.85	1	-1.76	16.1	1	0.20				
257	8.02	1	-1.40		69.06	4	1.40	13.31	1	1.70				23.34	1	-0.85	30.84	1	0.39							
258	8.29	1	0.05		68.56	2	0.55	13.03	1	-0.80	0.73	1	1.16	24.90	1	1.05	30.62	1	0.23							
259	8.17	1	-0.59		68.17	1	-0.11	13.12	1	0.00				23.92	1	-0.14	30.53	1	0.17	15.5	1	-0.41				
260	8.36	1	0.43		67.73	2	-0.86	13.39	1	2.42	0.78	1	1.89	129.0	1	0.00										
261	8.20	1	-0.43		67.04	2	-2.04	13.09	1	-0.26	0.71	3	0.87				23.36	1	-0.83	26.21	1	-2.95				
262	8.42	1	0.75					13.17	1	0.44			135.6	1	0.52	24.05	1	0.01	30.07	1	-0.15	15.5	1	-0.41		
263	8.29	1	0.05		68.25	1	0.02	13.35	1	2.06										27.4	1	11.93				
264													143.8	1	1.17	24.62	1	0.71	29.73	1	-0.40	16.2	1	0.31		
265	8.21	1	-0.37		67.22	4	-1.73	13.05	1	-0.62																
266	8.06	1	-1.18		67.17	2	-1.81	13.14	1	0.17	0.61	2	-0.58	132.9	1	0.30	24.92	1	1.07	30.31	1	0.01	16.4	1	0.51	
267	8.25	1	-0.16		68.10	1	-0.23	13.06	1	-0.53																
268	8.32	1	0.21		69.19	4	1.63	13.22	1	0.89																
269	8.28	1	0.00		68.22	1	-0.02	13.41	1	2.60																
270	8.16	1	-0.64		68.05	2	-0.31	13.12	1	0.00																
271	8.15	1	-0.70		68.74	4	0.86	13.10	1	-0.17	0.33	2	-4.66	94.4	1	-2.73	23.16	1	-1.07	31.80	1	1.09				
272	8.15	1	-0.70		67.83	4	-0.69	13.05	1	-0.62																
273	8.37	1	0.48		67.74	4	-0.84	13.19	1	0.62																
274	8.10	1	-0.97		69.18	1	1.61	13.11	1	-0.08	0.81	1	2.33				23.45	1	-0.72	31.60	1	0.95				
275	7.98	1	-1.61		67.61	4	-1.06	13.10	1	-0.17																
276	8.35	1	0.37		67.95	4	-0.48	13.18	1	0.53																
277	7.92	1	-1.94		68.09	4	-0.24	13.19	1	0.62																
278	8.13	1	-0.80		68.82	4	0.99	13.21	1	0.80	0.91	2	3.79				24.02	1	-0.02	31.68	1	1.00				
279	7.92	1	-1.94		68.18	2	-0.09	13.05	1	-0.62																
280																	28.14	1	5.02	29.57	1	-0.52				
286	8.09	1	-1.02		67.47	4	-1.30	13.12	1	0.00																
295	8.11	1	-0.91		68.08	2	-0.26	12.97	1	-1.34																
296	8.14	1	-0.75		68.50	4	0.45	13.23	1	0.98																
297																										
298	8.30	1	0.10		68.71	2	0.81	13.34	1	1.97	0.67	2	0.29				23.50	1	-0.66	29.72	1	-0.41	16.4	1	0.51	
299																	16.10	1	-9.73	34.80	1	3.22				
300	8.34	1	0.32		68.30	4	0.11	13.09	1	-0.26			140.7	1	0.92											
301																										
302	7.92	1	-1.94		68.34	2	0.17	13.10	1	-0.17																
303																										
304	8.41	1	0.70		66.80	4	-2.45	13.04	1	-0.71	0.64	1	-0.14	117.7	1	-0.89	23.85	1	-0.23	30.05	1	-0.17				
305																		26.56	1	3.09	31.28	1	0.71	17.9	1	2.07
306	8.36	1	0.43		68.11	4	-0.21	13.27	1	1.34	0.60	2	-0.72	102.6	1	-2.08	24.26	1	0.26	34.32	1	2.92				
307	7.84	1	-2.37		68.39	4	0.26	13.27	1	1.34																
308													136.7	1	0.60											
309	8.29	1	0.05		68.47	4	0.40	13.07	1	-0.44	0.67	1	0.29				24.26	1	0.26	30.29	1	0.00				
310	8.20	1	-0.43		68.51	4	0.46	13.04	1	-0.71	0.65	1	0.00	120.4	1	-0.68	21.94	1	-2.57	27.79	1	-1.81	18.1	1	2.28	
311	8.34	1	0.32		67.89	2	-0.58	13.13	1	0.08							25.06	1	1.25	31.08	1	0.57	15.1	1	-0.83	
312	8.36	1	0.43		68.21	4	-0.04	13.08	1	-0.35																
313	8.29	1	0.05		68.38	4	0.24	13.09	1	-0.26																
314	8.51	1	1.24		67.58	4	-1.11	13.06	1	-0.53																
315								13.05	1	-0.62			130.8	1	0.14			24.24	1	0.24	30.87	1	0.42	16.7	1	0.83
316	8.21	1	-0.37		67.22	2	-1.73	13.07	1	-0.44																
317	8.34	1	0.32		69.03	2	1.35	13.03	1	-0.80	0.61	2	-0.58	119.0	1	-0.79	23.63	1	-0.50	29.18	1	-0.80	17.3	1	1.45	
318	8.20	1	-0.43		66.96	4	-2.17	13.10	1	-0.17																
320	8.14	1	-0.75		68.60	4	0.62	13.06	1	-0.53																
321	8.44	1	0.86		67.97	4	-0.45	13.24	1	1.07																
322	8.21	1	-0.37		66.92	4	-2.24	13.18	1	0.53																
323	8.27	2	-0.05		68.22	4	-0.02	13.21	1	0.80																
324	6.60	1	-9.06		67.80	2	-0.74	13.10	1	-0.17																
325	8.12	1	-0.86		68.15	4	-0.14	13.29	1	1.52																
326	8.37	1	0.48		67.95	4	-0.48	13.03	1	-0.80							24.60	1	0.68							
327	8.28	1	0.00		66.83	4	-2.39	13.07	1	-0.44	1.23	1	8.45	120.0	1	-0.71	22.27	1	-2.17	26.52	1	-2.73				
328	7.97	1	-1.67		68.47	1	0.40	12.99	1	-1.16																
329	7.78	1	-2.69		67.84	3	-0.67	13.25	1	1																

表5 分析成績(8)

試料 番号	B試料				D試料				銅	亜鉛	クエン酸モランテル					
	水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No. z-score	粗灰分 分析値 (%)	No. z-score	カドミウム 分析値 (g/トン)	No. z-score				エトキシキン 分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)
338	8.43	1 0.80	67.99	4 -0.41	13.02	1 -0.89										
339	8.29	1 0.05	68.71	4 0.81	13.06	1 -0.53					26.35	1 2.83	30.90	1 0.44		
340	8.19	1 -0.48	67.50	4 -1.25	13.21	1 0.80					26.00	1 2.40	31.53	1 0.89	15.6	1 -0.31
341	8.26	1 -0.10	67.55	4 -1.16	13.11	1 -0.08	0.92	2 3.93			22.44	1 -1.96	30.37	1 0.05		
342	8.17	1 -0.59	68.66	2 0.72	13.08	1 -0.35					21.44	1 -3.18	29.86	1 -0.31	15.3	1 -0.62
343	8.26	1 -0.10	67.42	4 -1.39	13.09	1 -0.26	0.71	2 0.87			23.88	1 -0.19	30.69	1 0.29		
344	8.09	1 -1.02	67.08	2 -1.97	13.14	1 0.17										
345	8.03	1 -1.34	67.45	4 -1.34	13.35	1 2.06					26.07	1 2.48	29.38	1 -0.65		
346	8.38	1 0.53	68.62	4 0.65	13.28	1 1.43					24.13	2 0.11	30.53	2 0.17		
347	8.15	1 -0.70	67.06	2 -2.00	13.12	1 0.00										
348	8.35	1 0.37	68.01	2 -0.38	13.02	1 -0.89										
349	8.27	1 -0.05	68.48	4 0.41	13.15	1 0.26										
350	8.80	1 2.80	68.41	4 0.29	12.90	1 -1.97										
351	8.45	1 0.91			13.03	1 -0.80										
352	8.68	1 2.15	68.42	4 0.31	13.10	1 -0.17										
353	8.26	1 -0.10			12.91	1 -1.88	0.59	2 -0.87			23.25	1 -0.96	28.00	1 -1.66		
354	8.46	1 0.97	67.61	2 -1.06	13.07	1 -0.44			110.0	1 -1.50						
355	8.33	1 0.26	68.41	4 0.29	13.25	1 1.16										
356	8.68	1 2.15	68.42	4 0.31	13.05	1 -0.63			97.3	1 -2.50						
357	8.28	1 0.00	68.59	3 0.60	13.13	1 0.08	0.93	1 4.08	128.8	1 -0.01	25.70	1 2.03	30.40	1 0.07		
358	8.28	1 0.00	69.00	4 1.30	13.49	1 3.32					24.78	1 0.90	31.17	1 0.63	16.9	1 1.03
359	8.47	1 1.02	67.53	4 -1.20	13.18	1 0.53					23.27	1 -0.94	28.35	1 -1.40		
360	7.97	1 -1.67	68.53	4 0.50	13.05	1 -0.63										
361	8.34	1 0.32	68.95	2 1.22	13.07	1 -0.44										
362	8.28	1 0.00	68.28	3 0.07	13.14	1 0.17			143.1	1 1.11						
363	8.07	1 -1.13	68.96	2 1.23	13.13	1 0.08										
376	8.50	1 1.18	68.23	4 0.00	13.05	1 -0.63			133.6	1 0.36						
377	9.00	1 3.88	65.42	1 -4.80	12.98	1 -1.25										
378	8.59	1 1.67	68.14	4 -0.16	13.12	1 0.00	0.58	3 -1.02			19.20	1 -5.93	24.99	1 -3.84		
379	8.35	1 0.37	67.52	1 -1.22	13.15	1 0.26	0.69	1 0.58			24.44	1 0.49	31.37	1 0.78		
380	8.45	1 0.91	68.12	4 -0.19	13.20	1 0.71	0.63	2 -0.29								
381																
383																

注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。

注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液 吸収法	1 飼料分析基準	1 溶媒抽出法	1 HPLC法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 水分測定器	2 ホウ酸溶液 吸収法	2 その他	2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他
3 その他	3 燃焼法	5 不明	3 その他	5 不明	5 不明	5 不明
5 不明	4 自動分析機		5 不明			
	5 その他					
	6 不明					

クエン酸モランテル

No. 分析方法

1 HPLC法

2 その他

5 不明

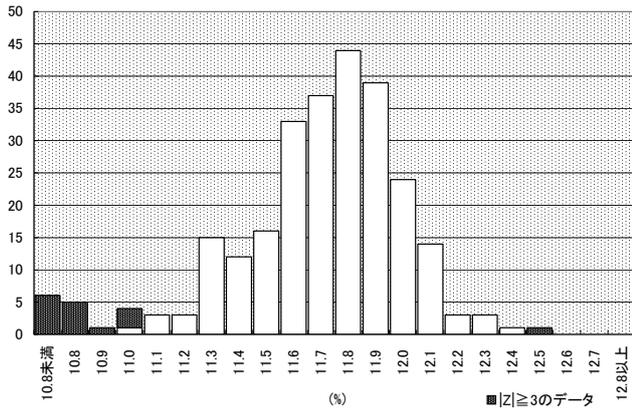


図 1 水分の分析成績 (A 試料)

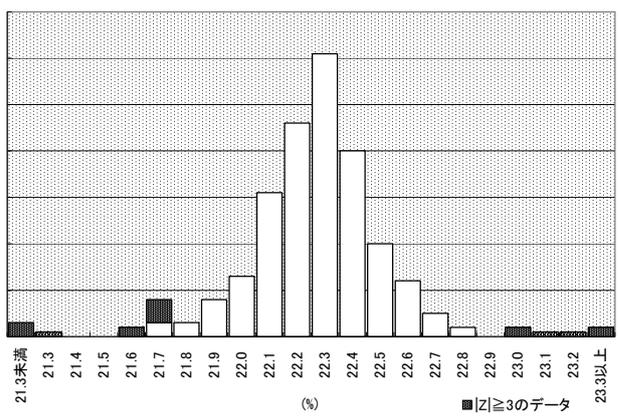


図 2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

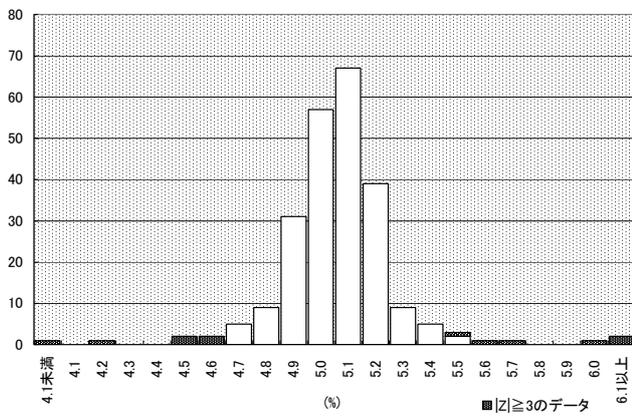


図 3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

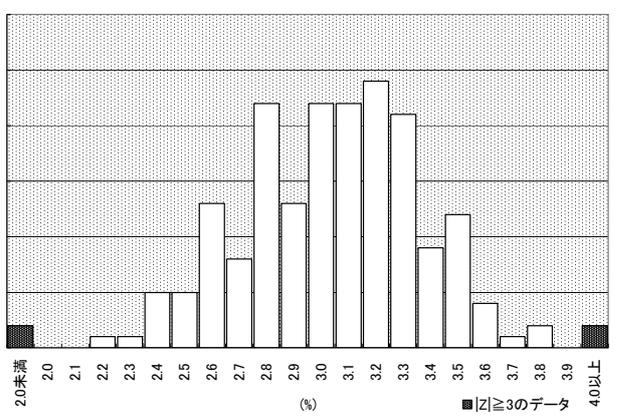


図 4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

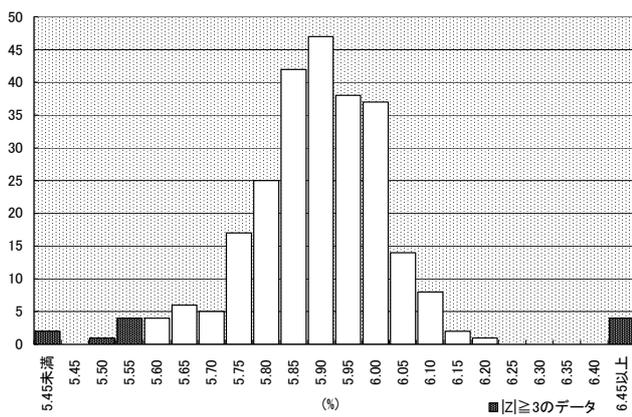


図 5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

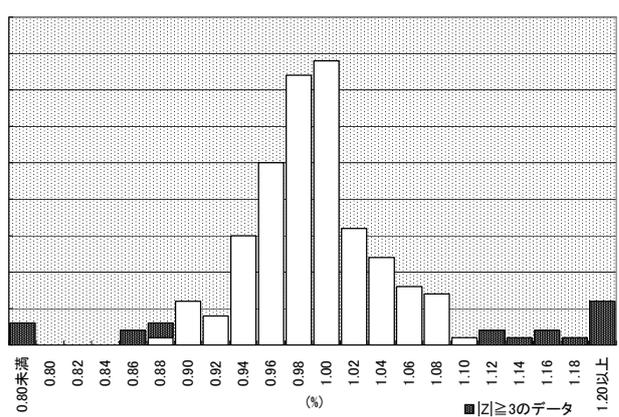


図 6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

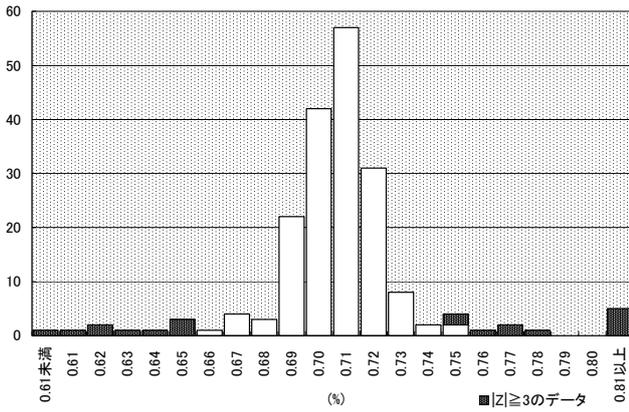


図7 リンの分析成績 (A 試料)

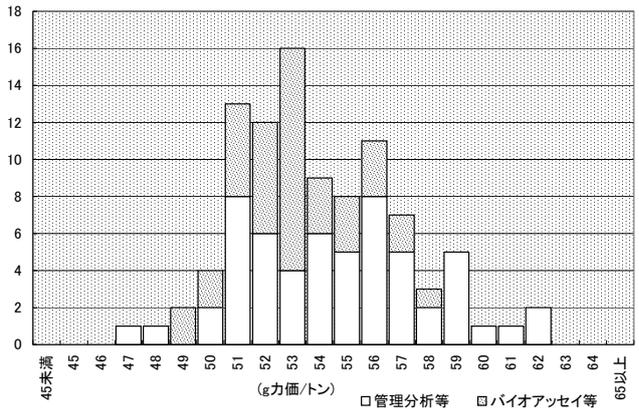


図8 サリノマイシンナトリウムの分析成績 (A 試料)

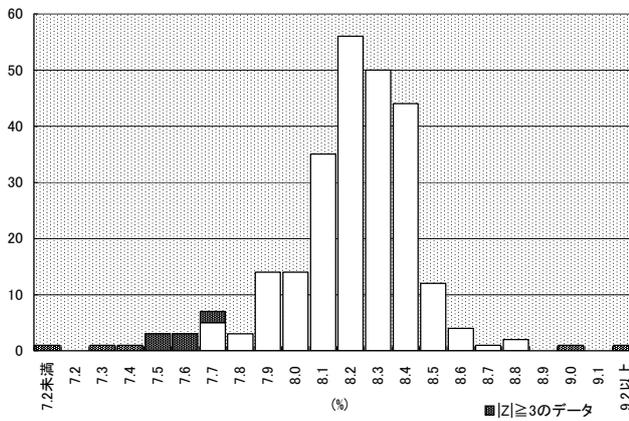


図9 水分の分析成績 (B 試料)

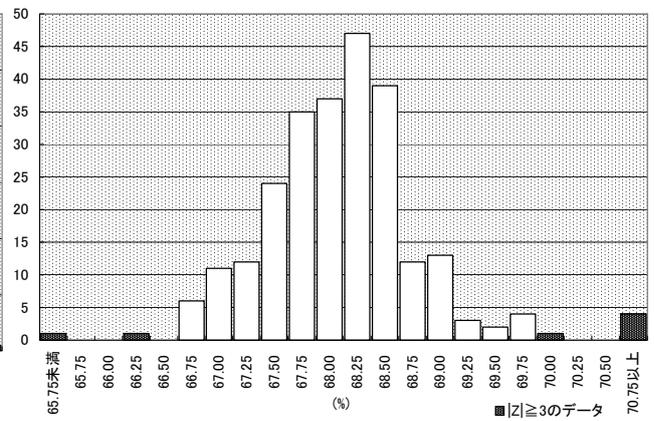


図10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

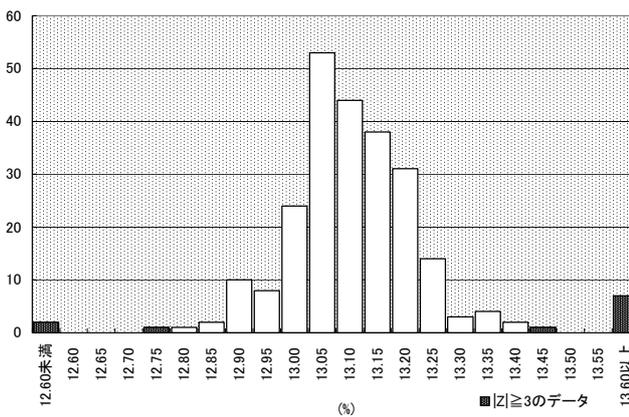


図11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

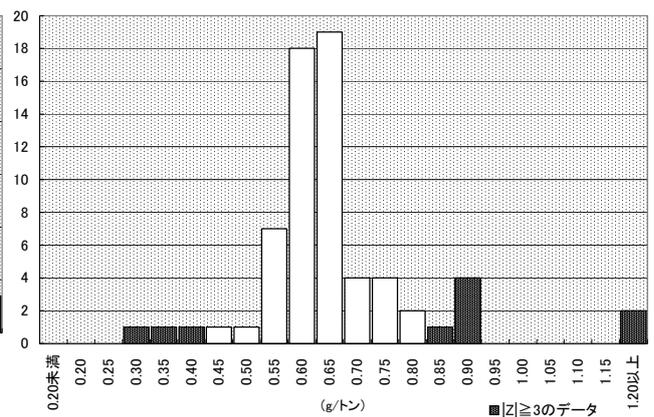


図12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

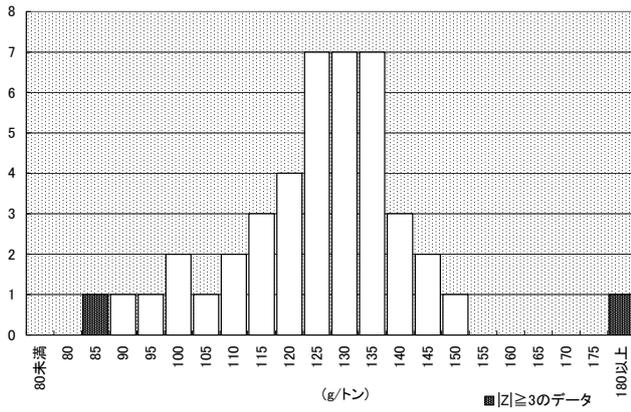


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

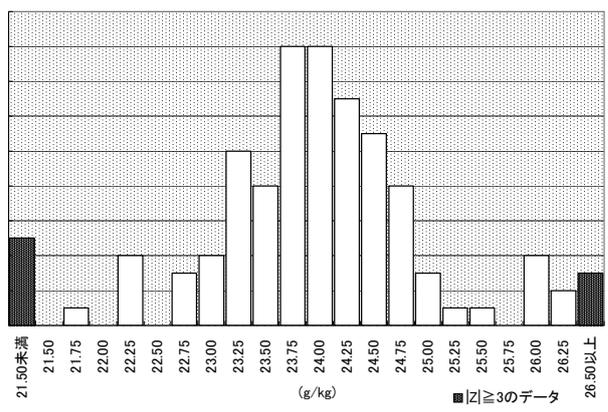


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

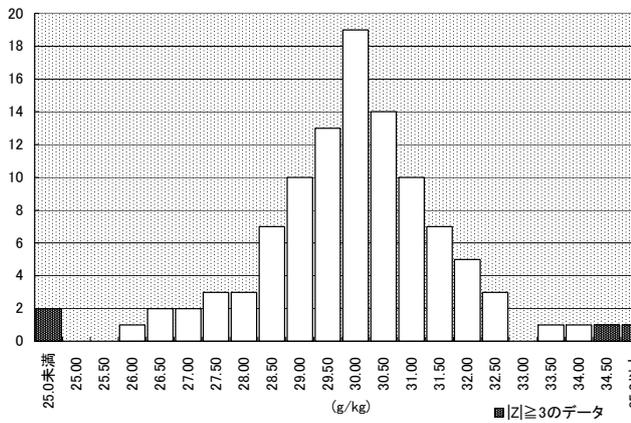


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

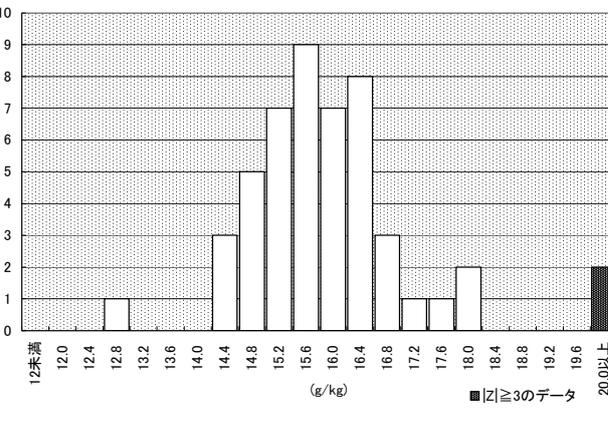


図 16 クエン酸モランテルの  
分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分
データ数	264	261	236	189	257
1 中央値	11.79	22.33	5.12	3.10	5.92
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	11.06	21.75	4.68	2.05	5.59
1 上限境界値	12.52	22.91	5.56	4.15	6.25
2 平均值	11.78	22.32	5.11	3.08	5.92
2 95%信頼区間	11.75~11.81	22.30~22.35	5.09~5.12	3.04~3.13	5.90~5.93

区 分	カルシウム	リン	SL (管理分析等) <sup>注3</sup>	SL (HPLC等) <sup>注4</sup>
データ数	190	192	57	39
1 中央値	1.000	0.710	55.1	53.2
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	0.882	0.666	44.2	48.2
1 上限境界値	1.117	0.754	66.0	58.2
2 平均值	0.999	0.710	55.0	53.4
2 95%信頼区間	0.993~1.005	0.708~0.712	54.1~55.9	52.7~54.0

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 <sup>注1</sup>	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	253	252	245	66	43
1 中央値	8.28	68.24	13.12	0.65	129.0
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	7.72	66.48	12.79	0.44	91.1
1 上限境界値	8.84	69.99	13.45	0.86	166.9
2 平均值	8.27	68.20	13.12	0.65	127.2
2 95%信頼区間	8.25~8.30	68.12~68.28	13.11~13.13	0.63~0.67	123.1~131.3

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 <sup>注1</sup>	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
データ数	113	105	49
1 中央値	24.04	30.29	15.9
下限境界値 <sup>注2</sup>	21.59	26.15	13.0
上限境界値	26.49	34.43	18.8
2 平均値	24.11	30.18	15.9
95%信頼区間	23.95~24.27	29.90~30.47	15.7~16.2

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 9 原料別検出状況

原料名	配合割合 (%)	試験室数					不検出	検出率 (%)
		検出						
		多量	中量	少量	検出のみ	計		
とうもろこし	30	150	0	0	0	150	0	100
ふすま	10	30	95	9	0	134	16	89
米ぬか	10	1	51	40	0	92	58	61
ごま油かす	10	7	63	18	0	88	62	59
ビートパルプ	10	11	71	25	0	107	43	71
魚粉	9	3	84	52	0	139	11	93
大豆油かす	8	17	86	34	0	137	13	91
コーングルテンミール	8	12	98	26	0	136	14	91
りん酸カルシウム	3	0	0	98	0	98	52	65
食塩	2	1	2	138	1	142	8	95

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	検出のみ	計
あまに油かす	0	8	2	0	10
アルファルファミール	0	1	3	0	4
えん麦	0	1	2	0	3
大麦	1	6	3	0	10
かき殻	0	0	1	0	1
かに殻粉末	0	0	4	1	5
カポック油かす	1	8	0	0	9
キャッサバ	0	2	1	0	3
玄米	0	0	2	0	2
コーングルテンフィード	0	3	4	0	7
小麦	8	16	19	0	43
小麦粉	0	0	2	0	2
サフラワー油かす	0	1	3	0	4
スクリーニングペレット	0	0	1	0	1
精白米	0	2	1	0	3
ゼオライト	0	0	2	0	2
炭酸カルシウム	0	1	25	0	26
チキンミール	1	6	5	0	12
なたね油かす	4	20	17	0	41
肉骨粉	0	4	6	0	10
ビールかす	0	2	1	0	3
フェザーミール	0	1	3	0	4
ホミニーフード	1	0	1	0	2
マイロ	1	11	10	0	22
麦ぬか	0	0	1	0	1
綿実油かす	0	2	5	0	7
やし油かす	2	13	5	0	20
ライ麦	2	9	4	0	15

## 8 ま と め

### (1) A 試料 (幼すう育成用配合飼料)

#### 1) 水 分

264 試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 16 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 11.78 %、95 %信頼区間が 11.75~11.81 %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 253 件、平均値が 11.72 %、標準偏差が 0.37 % 及び相対標準偏差が 3.2 %であった。

水分測定器を使用した試験では、データ数が 5 件、平均値が 11.84 %、標準偏差が 0.16 % 及び相対標準偏差が 1.4 %であった。

その他の方法 (近赤外分析法等) によるデータ数が 4 件あった。

#### 2) 粗たん白質

261 試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 17 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 22.32 %、95 %信頼区間が 22.30~22.35 %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 22.02 %、標準偏差が 1.42 % 及び相対標準偏差が 6.4 %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 22.32 %、標準偏差が 0.28 % 及び相対標準偏差が 1.2 %であった。

燃焼法による試験では、データ数が 21 件、平均値が 24.32 %、標準偏差が 8.59 % 及び相対標準偏差が 35.3 %であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 149 件、平均値が 22.29 %、標準偏差が 0.26 % 及び相対標準偏差が 1.2 %であった。

その他の方法 (近赤外分析法等) によるデータ数が 3 件あった。

#### 3) 粗脂肪

236 試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 5.11 %、95 %信頼区間が 5.09~5.12 %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 166 件、平均値が 5.14 %、標準偏差が 0.22 % 及び相対標準偏差が 4.3 %であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 65 件、平均値が 5.04 %、標準偏差が 0.23 % 及び相対標準偏差が 4.5 %であった。

その他の方法 (近赤外分析法等) によるデータ数が 3 件あった。

## 4) 粗繊維

189 試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 3.08 %、95 %信頼区間が 3.04~3.13 %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 28 件、平均値が 2.97 %、標準偏差が 0.43 %及び相対標準偏差が 14.6 %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 112 件、平均値が 3.02 %、標準偏差が 0.39 %及び相対標準偏差が 12.8 %であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 45 件、平均値が 3.32 %、標準偏差が 0.24 %及び相対標準偏差が 7.2 %であった。

その他の方法(近赤外分析法等)によるデータ数が 3 件あった。

## 5) 粗灰分

257 試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 5.92 %、95 %信頼区間が 5.90~5.93 %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 249 件、平均値が 5.92 %、標準偏差が 0.15 %及び相対標準偏差が 2.5 %であった。

その他の方法（近赤外分析法等）によるデータ数が 6 件あった。

## 6) カルシウム

190 試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 19 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 0.999 %、95 %信頼区間が 0.993~1.005 %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。

シュウ酸アンモニウム法による分析では、データ数が 36 件、平均値が 1.005 %、標準偏差が 0.11 %及び相対標準偏差が 10.5 %であった。

原子吸光光度法による分析では、データ数が 145 件、平均値が 1.010 %、標準偏差が 0.08 %及び相対標準偏差が 7.9 %であった。

その他の方法（キレート滴定法等）によるデータ数が 8 件あった。

## 7) リン

192 試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 0.710 %、95 %信頼区間が 0.708~0.712 %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 183 件、平均値が 0.724 %、標準偏差が 0.12 %及び相対標準偏差が 16.9 %であった。

その他の方法（ICP 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、57 試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なかった。平均値が 55.0g(力価)/トン、95 %信頼区間が 54.1~55.9 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、39 試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 53.8 g(力価)/トン、95 %信頼区間が 52.7~54.0 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 46 件、平均値が 55.1 g(力価)/トン、標準偏差が 3.68 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 6.7 %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 10 件、平均値が 54.8 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 4.0 %であった。

HPLC 法による試験では、データ数が 32 件、平均値が 53.5 g(力価)/トン、標準偏差が 2.1 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 3.9 %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 52.6g(力価)/トン、標準偏差が 2.0g(力価)/トン及び相対標準偏差が 3.8 %であった。

### (2) B 試料（魚粉）

#### 1) 水分

253 試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 8.27 %、95 %信頼区間が 8.25~8.30 %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 242 件、平均値が 8.25 %、標準偏差が 0.25 %及び相対標準偏差が 3.0 %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 8.79 %、標準偏差が 0.81 %及び相対標準偏差が 9.2 %であった。

その他の方法（近赤外分析法）によるデータ数が 3 件あった。

#### 2) 粗たん白質

252 試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 68.20 %、95 %信頼区間が 68.12~68.28 %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 29 件、平均値が 68.13 %、

標準偏差が 0.80 % 及び相対標準偏差が 1.2 % であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では、データ数が 49 件、平均値が 68.04 %、標準偏差が 0.65 % 及び相対標準偏差が 1.0 % であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、データ数が 21 件、平均値が 68.84 %、標準偏差が 2.28 % 及び相対標準偏差が 3.3 % であった。

自動分析機を用いた試験では、データ数が 145 件、平均値が 68.18 %、標準偏差が 0.55 % 及び相対標準偏差が 0.8 % であった。

その他の方法（近赤外分析法）によるデータ数が 3 件あった。

### 3) 粗灰分

245 試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 13.12 %、95 % 信頼区間が 13.11~13.13 % 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 237 件、平均値が 13.17 %、標準偏差が 0.48 % 及び相対標準偏差が 3.7 % であった。

その他の方法（実施要領とは異なる灰化方法等）によるデータ数が 4 件あった。

### 4) カドミウム

66 試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 0.65 mg/kg、95 % 信頼区間が 0.63~0.67 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 26 件、平均値が 0.70 mg/kg、標準偏差が 0.15 mg/kg 及び相対標準偏差が 21.3 % であった。

簡易法による試験では、データ数が 35 件、平均値が 0.66 mg/kg、標準偏差が 0.16 mg/kg 及び相対標準偏差が 23.9 % であった。

その他の方法(ICP 法等)によるデータ数が 5 件あった。

### 5) エトキシキン

43 試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 127.2 mg/kg、95 % 信頼区間が 123.1~131.3 mg/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（HPLC 法）による試験であった。

## (3) D 試料（プレミックス）

### 1) 銅

113 試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 24.11 g/kg、95 % 信頼区間が 23.95~24.27 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 23.98 g/kg、標準偏差が 1.50 g/kg 及び相対標準偏差が 6.3 %であった。

その他の方法（ICP 法等）によるデータ数が 3 件あった。

## 2) 亜鉛

105 試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 30.18 g/kg、95 %信頼区間が 29.90~30.47 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 102 件、平均値が 30.15 g/kg、標準偏差が 2.03g/kg 及び相対標準偏差が 6.7 %であった。

その他の方法（ICP 法等）によるデータ数が 3 件あった。

## 3) クエン酸モランテル

49 試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 15.9g/kg、95 %信頼区間が 15.7~16.2 g/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（HPLC 法）による試験であった。

## (4) C 試料（鑑定用試料）

### 鑑 定

10 種類の配合された原料の検出とその配合割合の推定を行うこととした。150 試験室より報告があり、配合した 10 種類の他に 28 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 30 %）では、150 試験室（検出率 100 %）から報告があり、そのすべてが多量（15 %以上、以下同じ）との報告であった。

ふすま（配合率 10 %）では、134 試験室（検出率 89 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 30、中量（5 %以上~15 %未満、以下同じ。）と報告した試験室が 95、少量（1 %以上~5 %未満、以下同じ。）と報告した試験室が 9 であった。

米ぬか（配合率 10 %）では、92 試験室（検出率 61 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 1、中量と報告した試験室が 51、少量と報告した試験室が 40 であった。

ごま油かす（配合率 10 %）では、88 試験室（検出率 59 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 7、中量と報告した試験室が 63、少量と報告した試験室が 18 であった。

ビートパルプ（配合率 10 %）では、107 試験室（検出率 71 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 11、中量と報告した試験室が 71、少量と報告した試験室が 25 であった。

魚粉（配合率 9 %）では、139 試験室（検出率 93 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 3、中量と報告した試験室が 84、少量と報告した試験室が 52 であった。

大豆油かす（配合率 8 %）では、137 試験室（検出率 91 %）から報告があり、その内訳は

多量と報告した試験室が 17, 中量と報告した試験室が 86, 少量と報告した試験室が 34 であった。

コーングルテンミール (配合率 8 %) では, 136 試験室 (検出率 91 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 12, 中量と報告した試験室が 98, 少量と報告した試験室が 26 であった。

りん酸カルシウム (配合率 3 %) では, 98 試験室 (検出率 65 %) から報告があり, そのすべてが少量との報告であった。

食塩 (配合率 2 %) では, 142 試験室 (検出率 95 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 1, 中量と報告した試験室が 2, 少量と報告した試験室が 138, 検出したものの量の報告がなかった試験室が 1 であった。

誤って検出したものについては, 小麦が最も多く, 43 試験室から報告があった。次いで, なたね油かすが 41 試験室, 炭酸カルシウム 26 試験室, マイロが 22 試験室の順で多く報告された。

## 文 献

- 1) Michael Thompson, Roger Wood: Pure Appl. Chem., 65, 2123 (1993).

(参考)

## 第 33 回飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

### 1. 目的

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

### 2. 共通試料の内容

- A 試料…幼すう育成用配合飼料
- B 試料…魚 粉
- C 試料…鑑定用飼料原料調製試料
- 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，リン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 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）に定める方法及び「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 号農林水産省畜産局長通知）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，各試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試験室は，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。（当該標準品は冷蔵庫に保管してください。）
- (5) 分析試料は冷蔵庫に保管し，使用する際には常温に戻してから供試してください。
- (6) 複数の方法（例えば粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法）で分析した場合は各々のデータを報告してください。

## 5. 分析鑑定成績の報告

(1) 報告は、別添の「第 33 回飼料等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載し、報告してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、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、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は小数点以下第 3 位を四捨五入して同第 2 位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第 4 位を四捨五入して同第 3 位まで、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 葉添付してください。

(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、推定される配合割合は、多量 (15 %以上)、中量 (5 %以上~15 %未満) 及び少量 (1 %以上~5 %未満) 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 種類の原料が配合されています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。(複数可)

(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 20 年 10 月 10 日 (金)

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 飼料鑑定第一課 (担当: 高橋亜紀子)

〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2-1 さいたま新都心合同庁舎検査棟

TEL: 048-601-1177

FAX: 048-601-1179

e-mail: akiko\_takahashi@nm.famic.go.jp

### 第 33 回飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書 (様式)

試験室名 \_\_\_\_\_

担当者 \_\_\_\_\_

TEL \_\_\_\_\_

(1) A 試料 分析成績

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.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 (ホウ酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗脂肪	(%)	1.飼料分析基準 2.自動分析機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ( )
粗繊維	(%)	1.飼料分析基準 (静置法) 2.飼料分析基準 (ろ過法) 3.自動分析機 (メーカー) (型式) 4.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カルシウム	(%)	1.飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2.飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3.その他の方法 ( )
リン	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
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) 4.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 (ホウ酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析装置 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カドミウム	(g/ト)	1.飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2.飼料分析基準 (簡易法) 3.その他の方法 ( )
エトキシキン	(g/ト)	1.飼料分析基準 測定条件 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) 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 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) 2.その他の方法 ( )

(4) C 試料 鑑定成績

試料番号 \_\_\_\_\_

検出物 <small>(語群から選択してください)</small>	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 ( )

多量…15%以上, 中量…5%以上~15%未満, 少量…1%以上~5%未満

注) 10 種類の原料が配合されています。

-----  
**検出物の語群**

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか	ビールかす	コーングルテンフィード
スクリーニングペレット	ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす	大豆油かす
カポック油かす	肉骨粉	フェザーミール	チキンミール	魚粉
アルファルファミール	ビートパルプ	かに殻粉末	かき殻	ゼオライト
食塩	炭酸カルシウム	リン酸カルシウム		

-----

(5) 来年度の実施項目等「飼料等の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等があれば記入してください。(別紙でも可)

**調査資料****1 飼料のサルモネラ汚染状況（平成 20 年度）**

関口 好浩\*

**A Surveillance of *Salmonella* Contamination in Feeds in 2008**

Yoshihiro SEKIGUCHI\*

(\* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Headquarters)

In 2008, a surveillance for *Salmonella* contamination was conducted on 167 samples of feed ingredients and 132 samples of formula feeds, collected from mills of feed ingredient or formula feed. Six (3.6 %) of feed ingredient samples were positive and two (1.5 %) of formula feeds were positive for *Salmonella*. 1.3 % of fish meal and 6.3 % of meat-and-bone meal (derived from pork and poultry) samples were contaminated with *Salmonella*.

Key words: サルモネラ *Salmonella* ; 飼料原料 feed ingredient ; 配合飼料 formula feed ; 魚粉 fish meal ; 肉骨粉 meat-and-bone meal

**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のモニタリングを実施し、その結果を年次報告してきた<sup>1)~34)</sup>。

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」<sup>35)</sup>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<sup>36), 37)</sup>。

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 % 台にまで減少したが<sup>37)</sup>、平成 15 年度は 3.5 %<sup>30)</sup>と平成 10~14 年度の総陽性率 3.4 %<sup>37)</sup>と同程度の陽性率となった。平成 16 年度は 2.0 %<sup>31)</sup>、平成 17 年度は 1.5 %<sup>32)</sup>、平成 18 年度は 2.3 %<sup>33)</sup>、平成 19 年度は 0.7 %<sup>34)</sup>と年度により変動があるものの減少傾向にある。今回、平成 20 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。

\* 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 材料及び方法

### 2.1 材 料

平成20年4月から平成21年3月までに、（独）農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターが、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167検体（国産159検体、輸入8検体）及び配混合飼料132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<sup>38)</sup>に基づき、次の手順でサルモネラを検出・分離し、血清型を同定した。

なお、サルモネラの陽性、陰性の判定（i~iv）までは肥飼料安全検査部及び各地域センターが、分離したサルモネラの血清型別（v）は肥飼料安全検査部が行った。

- i 検体25gを緩衝ペプトン水250mLに入れ、35~37℃で18~24時間前増菌培養した。
- ii 前増菌培養液10mL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100mLにそれぞれ加え、41~43℃で18~24時間選択増菌培養した。
- iii 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）（又はランバック寒天培地（Merck））にそれぞれ画線塗末し、35~37℃で18~24時間選択分離培養した。
- iv 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。
- v 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、167検体中6検体が陽性で、その陽性率は3.6%であった。陽性率は、前年度の1.4%に比べて高い値であったが、前々年度の3.5%と同程度であった。

飼料原料の区分別の陽性率は、植物性油かす類が7.1%（前々年度0%、前年度0%）、動物質性飼料が3.4%（前々年度4.5%、前年度1.7%）であった。一方、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、大豆油かすが16.7%（前々年度0%、前年度0%）、フェザーミールが15.4%（前々年10%、前年度0%）、原料混合肉骨粉（豚・鶏原料）が6.3%（前々年度25%、前年度7.7%）及び魚粉が1.3%（前々年度4.2%、前年度1.5%）であった。また、魚粉・大豆油かす二種混合飼料が1検体陽性となった。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<sup>39)</sup>ことから採取していない。

**Table 1** Number and proportion of feed ingredient samples *Salmonella*-positive in 2008

Feed ingredients	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
<b>Animal protein feed</b>			
Fish meal	80	1	1.3
Poultry by-product meal	25	0	0
Feather meal	13	2	15.4
Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	16	1	6.3
Fish meal and soybean meal mixed feed	1	1	100
Fish meal and maize mixed feed	1	0	0
Feather meal and soybean meal mixed feed	1	0	0
Fish scales extraction	1	0	0
Meat and bone meal (derived from pork)	2	0	0
Fishery animal fermentation product and coffee extract residue mixed feed	1	0	0
Squid meal	1	0	0
Squid meal and soybean meal fermentation feed	1	0	0
Crab shell meal	2	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>145</b>	<b>5</b>	<b>3.4</b>
<b>Oil seed meal</b>			
Soybean meal	6	1	16.7
Rapeseed meal	5	0	0
Sesame meal	1	0	0
Copra meal	1	0	0
Corn germ meal	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>7.1</b>
<b>Bran and food processing by-product</b>			
Wheat bran	2	0	0
Brewer's grain	1	0	0
Rice bran	4	0	0
DDGS	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>167</b>	<b>6</b>	<b>3.6</b>

## 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 3.1 % であり、前年度の 1.5 % と比べると高い値であったが、前々年度の 3.6 % と同程度の値であった。一方、輸入品の陽性率は 12.5 % であり、その内訳はインド産大豆油かす 1 検体であった。なお、前々年度、前年度はすべて陰性であった。

国内製造品の種類別の陽性率は、大豆油かすが 16.7 %、フェザーミールが 15.4 %、原料混合肉骨粉が 6.3 %、魚粉が 1.3 %、魚粉・大豆油かす二種混合飼料が 1 検体中 1 検体陽性であった。

**Table 2 Isolation of *Salmonella* from domestic and imported feed ingredients**Number of samples positive for *Salmonella* / Number of samples examined

District or country	Animal protein feed			Oil seed meal			Brans and food processing by-product			Total (Proportion positive)
	Fish meal	Poultry by-product meal	Others	Soybean meal	Rapeseed meal	Others	Wheat bran	Rice bran	Others	
Domestic product										
Hokkaido	0/12	0/1	0/3							0/16 (0%)
Tohoku	1/15	0/7	0/7			0/1	0/1	0/1		1/32 (3.1%)
Kanto/Ko-Shin-Etsu	0/20	0/1	0/6	0/2	0/4			0/3		0/36 (0%)
Tokai/Hokuriku	0/4	0/1	0/3			0/1			0/1	0/10 (0%)
Kinki	0/3	0/1	0/2							0/6 (0%)
Chugoku/Shikoku	0/13	0/6	0/5	0/1	0/1		0/1			0/27 (0%)
Kyushu/Okinawa	0/9	0/8	4/14	0/1						4/32 (12.5%)
Subtotal	1/76	0/25	4/40	0/4	0/5	0/2	0/2	0/4	0/1	5/159
(Positive rate)	(1.3%)	(0%)	(10%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(3.1%)
Import										
Canada				0/1						0/1 (0%)
India				1/1						1/1 (100%)
Mexico	0/1									0/1 (0%)
Myanmar	0/1									0/1 (0%)
Namibia	0/1									0/1 (0%)
Peru	0/1									0/1 (0%)
Philippines						0/1				0/1 (0%)
U.S.A.									0/1	0/1 (0%)
Subtotal	0/4			1/2		0/1			0/1	1/8
(Positive rate)	(0%)			(50%)		(0%)			(0%)	(12.5%)
Total	1/80	0/25	4/40	1/6	0/5	0/3	0/2	0/4	0/2	6/167
(Positive rate)	(1.3%)	(0%)	(10%)	(16.7%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(3.6%)

## 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 4.8 %（前々年度 5.3 %，前年度 2.9 %），紙袋等の包装品が 2.9 %（前々年度 4.2 %，前年度 0 %），バラ積み等の無包装品が 2.0 %（前々年度 0 %，前年度 0 %）であった。

## 3.2 配混合飼料の陽性率

## 1) 種類別の陽性率

モニタリングした配混合飼料の種類別の陽性率を Table 4 に示した。

配混合飼料は 132 検体中 2 検体が陽性で、成鶏飼育用配合飼料及び肉豚肥育用配合飼料でそれぞれ 1 検体が陽性であった。なお、前々年度及び前年度の陽性率はそれぞれ 1.2 %及び 0 %であった。

**Table 3** Number and proportion of feed ingredient samples *Salmonella*-positive

Feed ingredient	Packing form	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
<b>Animal protein feed</b>				
Fish meal	Bulk cargo <sup>a)</sup>	21	0	0
	Container bag <sup>b)</sup>	42	0	0
	Sealed bag <sup>c)</sup>	17	1	5.9
Poultry by-product meal	Bulk cargo	11	0	0
	Container bag	14	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	8	0	0
	Container bag	26	4	15.4
	Sealed bag	6	0	0
Subtotal	Bulk cargo	40	0	0
	Container bag	82	4	4.9
	Sealed bag	23	1	4.0
<b>Oil seed meal</b>				
Soybean meal	Bulk cargo	3	1	33.3
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	3	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	0	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Subtotal	Bulk cargo	8	1	12.5
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	4	0	0
<b>Bran and food processing by-product</b>				
Wheat bran	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Rice bran	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	3	0	0
Others	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	3	0	0
Subtotal	Bulk cargo	3	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	7	0	0
Total	Bulk cargo	51	1	2.0
	Container bag	84	4	4.8
	Sealed bag	34	1	2.9

a) Loading weight: 100 kgs~

b) Packing weight: 300~2,000 kgs

c) Packing weight: 3.5~50 kgs

**Table 4 Number and proportion of formula feed samples *Salmonella*-positive**

Formula feed	Number of samples	Number of samples	Proportion positive
	examined	positive	(%)
Chicken, broiler and quail	50	1	2.0
Swine	31	1	3.2
Cattle	49	0	0
Other Mixed feeds	2	0	0
Total	132	2	1.5

## 2) 配混合飼料の出荷形態別の陽性率

モニタリングした配混合飼料の出荷形態別の陽性率を Table 5 に示した。

出荷形態別の陽性率は、バラ積み等の無包装品については 9.1 %（前々年度 0 %，前年度 0 %）であり，トランスバック等の大型輸送容器品及び紙袋等の包装品については全て陰性であった。なお，前々年度及び前年度の陽性率は，トランスバック等の大型輸送容器品については各々 1.7 % 及び 0 %，紙袋等の包装品については各々 1.3 % 及び 0 % であった。

**Table 5 Number and proportion of formula feed samples *Salmonella*-positive by packing forms**

Formula feed	Packing form	Number of samples	Number of samples	Proportion positive
		examined	positive	(%)
Chicken , broiler and quail	Bulk cargo <sup>a)</sup>	11	1	9.1
	Container bag <sup>b)</sup>	15	0	0
	Sealed bag <sup>c)</sup>	24	0	0
Swine	Bulk cargo	9	1	11.1
	Container bag	7	0	0
	Sealed bag	15	0	0
Cattle	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	23	0	0
	Sealed bag	25	0	0
Others	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	0	0	0.0
	Sealed bag	1	0	0
Total	Bulk cargo	22	2	9.1
	Container bag	45	0	0
	Sealed bag	65	0	0

a) Loading weight: 1,000 kgs~

b) Packing weight: 450~1,000 kgs

c) Packing weight: 15~20 kgs

## 3) 配混合飼料の加工形態別の陽性率

モニタリングした配混合飼料の加工形態別の陽性率を Table 6 に示した。

非加熱加工飼料 96 検体中 2 検体で陽性で，その形態はすべてマッシュであった。加熱加工飼料 36 検体はすべて陰性であった。なお，前々年度及び前年度の加工形態別の陽性率は，マッシュ等の非加熱加工飼料でそれぞれ 1.6 % 及び 0 % で，ペレット等の加熱加工飼料では両年

度とも 0 %であった。

**Table 6 Number and proportion of thermally processed formula feed samples  
*Salmonella*-positive**

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Thermally processed <sup>a)</sup>	36	0	0
Not thermally processed <sup>b)</sup>	96	2	2.1

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、プロピオン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混合飼料がある。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、ギ酸製剤あるいはプロピオン酸製剤を添加した配混合飼料があった。これらの陽性率を Table 7 に示した。

配混合飼料 132 検体のうち、鶏用及び豚用 2 検体はプロピオン酸製剤のみを 0.08 %、牛用 4 検体はプロピオン酸製剤のみを 0.001~0.156 %、糖蜜吸着飼料 1 検体はプロピオン製剤のみを 0.15 %、豚用 1 検体はギ酸製剤のみを 0.005 % 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 Number and proportion of formic or propionic acid  
added feed samples *Salmonella*-positive**

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Feed ingredient			
Acid added	0	0	0
Acid not added	167	6	3.6
Formula feed			
Acid added <sup>a)</sup>	8	0	0
Acid not added	124	2	1.6

a) One sample had been added with formic acid with the density of 0.005 %, one sample with formic acid with the density of 0.001 %; three samples with propionic acid with the density of 0.08 %; and three samples with propionic acid with the density of 0.11~0.156 %.

### 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飼料原料 6 検体及び配混合飼料 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 7 種類であった。

*S. Tennessee* は前々年度、前年度にも、また *S. Livingstone* 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<sup>40)</sup>によれば、これら 6 血清型の内、*S. Livingstone* 及び *S. Weltevreden* を除き、過去 5 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分離された主要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 *Salmonella*-positive samples**

Serotype	Number of samples <i>Salmonella</i> -positive							Total
	Feather meal	Fish meal	Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	Soybean meal	Fish meal and soybean meal mixed feed	Formula feed for chicken	Formula feed for swine	
<i>S. Bareilly</i>				1			1	2
<i>S. Livingstone</i>	1							1
<i>S. Montevideo</i>			1			1		2
<i>S. Schwarzengrund</i>	1							1
<i>S. Tennessee</i>		1						1
<i>S. Weltevreden</i>					1			1
Total	2	1	1	1	1	1	1	8

#### 4 まとめ

平成 20 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、167 検体中 6 検体が陽性であった（陽性率 3.6 %）。
- 2) 飼料原料別の陽性率は、大豆油かすが 16.7 %、フェザーミールが 15.4 %、原料混合肉骨粉が 6.3 %、魚粉が 1.3 %、魚粉・大豆油かす二種混合飼料が 1 検体中 1 検体陽性であり、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 3.1 %、輸入品が 12.5 %（8 検体中 1 検体）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 2.0 %、大型輸送容器品が 4.8 %、包装品が 2.9 %であった。
- 5) 配混合飼料は、132 検体中 2 検体が陽性であった（陽性率 1.5 %）。
- 6) 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 広昭, 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 広昭, 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) 千原 哲夫: 飼料研究報告, **32**, 193(2007).
- 34) 会田 紀雄: 飼料研究報告, **33**, 155(2008).
- 35) 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).
- 36) 米田 勝紀: 獣医畜産新報, **54**, 568 (2001).
- 37) 小嶋 二三夫, 千原哲夫, 菅野 清, 佐藤 剛: 飼料研究報告, **29**, 236 (2004).
- 38) 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).  
現行 農林水産省消費・安全局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 39) 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).
- 40) 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****2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果（平成 19 年度）**

草間 豊子\*

**A Monitoring of Animal Protein Contamination in Feeds  
as a Measure to Prevent BSE in Japan (2007)**

Toyoko KUSAMA\*

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

To prevent the establishment and amplification of bovine spongiform encephalopathy (BSE) through animal feed in Japan, the use of mammalian protein for food-producing animals and the use of animal protein for production of feed for ruminants have been prohibited since October 2001. The Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) is engaged in the analysis of feed samples for presence of animal protein as an audit inspection agency of this feed ban. In fiscal year 2007, the FAMIC analyzed 189 samples of domestic feeds for cattle, 31 samples of imported feeds for cattle and 198 samples of animal by-products for contamination of ruminant protein, using three methods: microscopy, which detects animal origin bone tissue; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), which detects animal origin protein; and polymerase chain reaction (PCR), which detects animal origin DNA. None of domestic and imported feed samples for cattle was contaminated with prohibited animal protein. None of 31 samples of chicken meal, 18 samples of feather meal, 113 samples of fish meal, 27 samples of meat-and-bone meal of pork-origin and pork-and-chicken-origin was contaminated with ruminant protein.

Key words: 牛海綿状脳症 bovine spongiform encephalopathy (BSE); 飼料 feed; 動物質性飼料 animal by-products; 肉骨粉 meat-and-bone meal (MBM); 飼料規制 feed ban; ほ乳動物由来たん白質 mammalian protein; 反すう動物由来たん白質 ruminant protein; 顕微鏡鑑定 microscopy; 酵素免疫測定法 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); PCR 法 polymerase chain reaction

**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<sup>1)</sup>を補完する手法として PCR 法<sup>13)-21)</sup>及び ELISA 法<sup>22)-24)</sup>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<sup>2)-4)</sup>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。

\* 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

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<sup>6)~12)</sup>してきた。

平成 19 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、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、魚粉、豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉等について、引き続き大臣確認に伴うモニタリング検査を行った。さらに、輸入飼料の監視強化に伴い、輸入の牛用の混合飼料や飼料原料についてもモニタリング検査を実施した。

モニタリング試験項目は、BSE 発生リスクを考慮し、反すう動物由来たん白質の検査を重点的に実施することとし、家きんや豚由来たん白質の検査は必要に応じて実施することとした。また、平成 18 年 3 月に、反すう動物由来肉骨粉に対して特異性が高く、乳製品の影響を受けない ELISA 法（メライザキット法）が通知<sup>2), 4)</sup>に記載されたことから、豚肉骨粉及びチキンミール等の検査に適用するとともに、輸入飼料への適用の可否についても検討を行った。

今回、平成 19 年度に実施した飼料中の動物由来たん白質等のモニタリング検査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 19 年 4 月から平成 20 年 3 月までに、独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（さいたま市）、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターが、国内の飼料原料工場、配混合飼料工場及び港湾倉庫等で採取した動物質性飼料 198 検体、国内製造牛用配混合飼料 189 検体及び輸入牛用飼料 31 検体の計 418 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、フェザーミール及び豚血粉（以下「チキンミール等」という。）、豚由来肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉（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、その他にこれらを主体とした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%以上含む代用乳等は、対象から除外した。

輸入飼料は、牛用配混合飼料を主体とし、一部牛用（A 飼料）の単体飼料（加熱加工等処理を行った包装品）及び飼料添加物を採取した。

試料の採取は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>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、それぞれの試料を収集した各センターの試験室において実施した。

## 2.3 方法

試験は、以下に示す3法により行った。また、対象飼料別の試験項目を表1に示した。

### 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」<sup>1)</sup>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、検出した場合には、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。

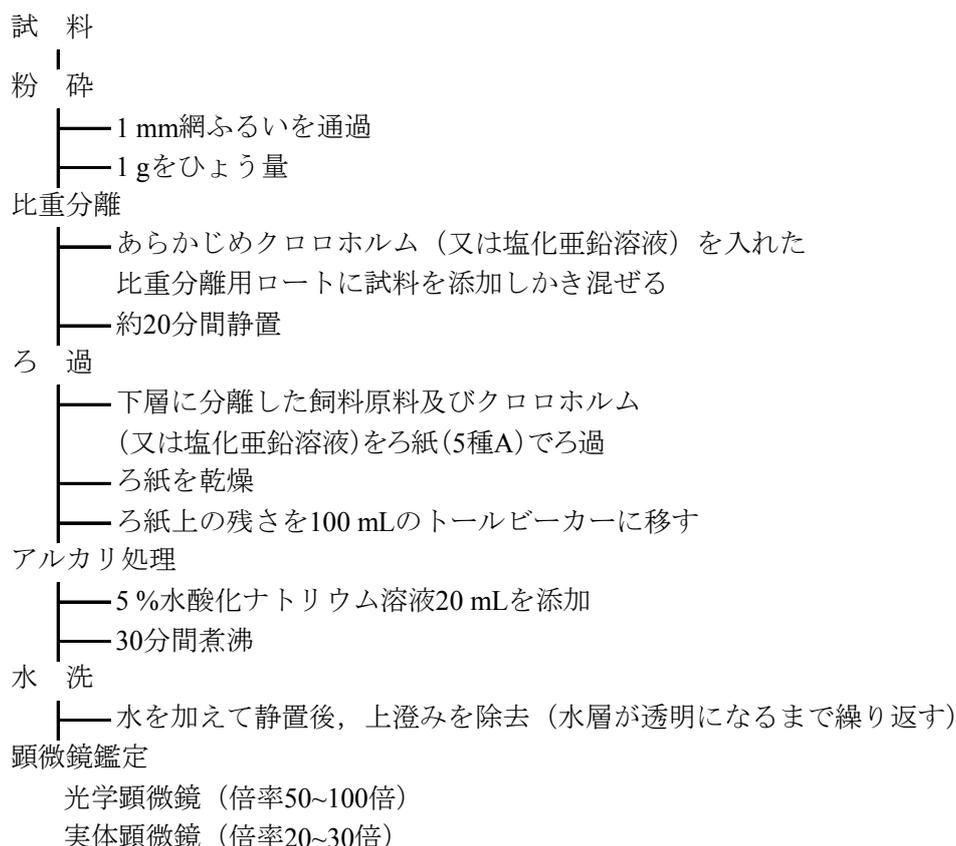


図1 飼料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

### 2) ELISA 試験

「ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法」<sup>2)~4)</sup>に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及び輸入飼料中の牛由来たん白質については「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」（森永生科学研究所製、以下「モリナガキット」という。）を用い、チキンミール等及び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、以下「メライザキット」という。）を用いて試験を実施した。また、輸入飼料へのメライザキットの適用の可否について調査を行った。

なお、平成19年度は、平成18年度と同様に、ELISAによる鶏由来たん白質及び豚由来たん白質の試験は実施しなかった。

試験は1検体あたり2点併行で実施し、2点の結果が一致して陽性あるいは陰性の場合に、陽性あるいは陰性と判定した。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，2点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．

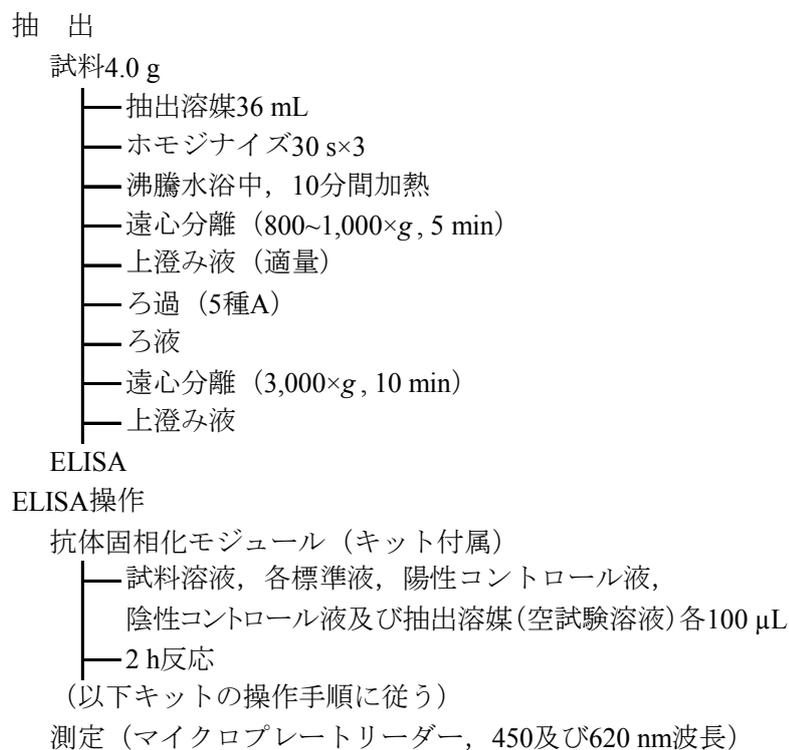


図 2-1 「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による試験方法

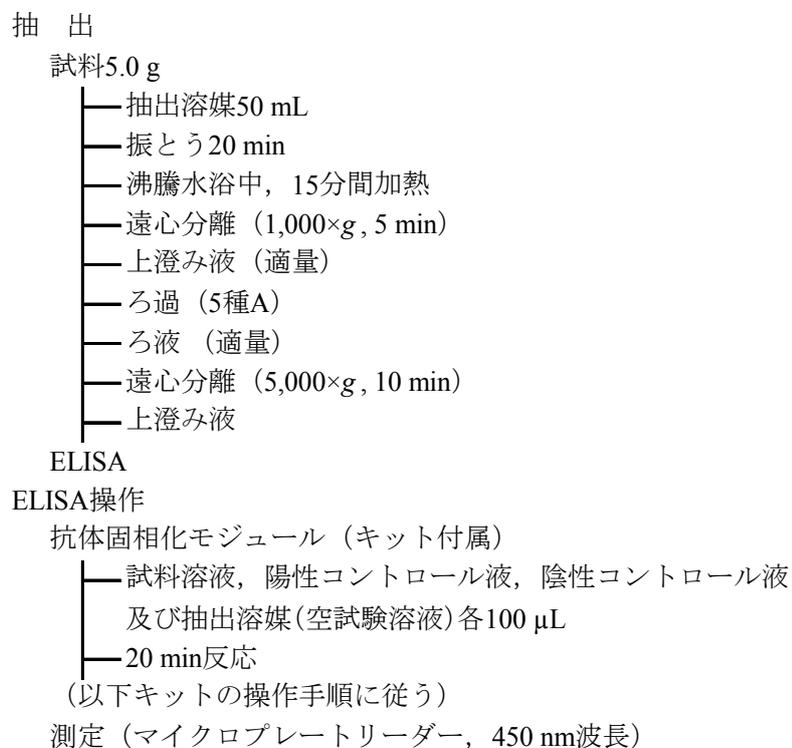


図 2-2 「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」による試験方法

### 3) PCR 試験

「PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出法」<sup>2)~4)</sup>に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及びチキンミール等の飼料ではほ乳動物由来 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。乳製品又はゼラチン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、豚肉骨粉等及び魚粉等については、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。）<sup>2), 4), 17), 18)</sup>を行った。

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<sup>4)</sup>を、魚粉等については魚類由来 DNA の検出<sup>4), 14)</sup>を、チキンミール等及び鶏豚検量混合肉骨粉については家きん由来 DNA の検出<sup>4), 15)</sup>を、豚肉骨粉についてはほ乳動物又は豚由来 DNA の検出等<sup>4), 13), 21)</sup>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]（プロメガ製、平成 19 年度当時はテキサスジェノミクスジャパン製、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、上記の反すう動物検出プライマー対及び豚検出プライマー対については、PCR 反応条件が他のプライマー対と異なることなどから、平成 19 年度に新たに反すう動物検出プライマー対 [rumicon 3D5, rumicon 5D2] 及び豚検出プライマー対 [pig 3-6, pig 5-6] を開発<sup>19)~21)</sup>した。これらのプライマー対は、平成 20 年 4 月に飼料分析基準<sup>4)</sup>に追加収載されたことから、平成 20 年度以降は、これらのプライマー対により検査を行っている。

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。

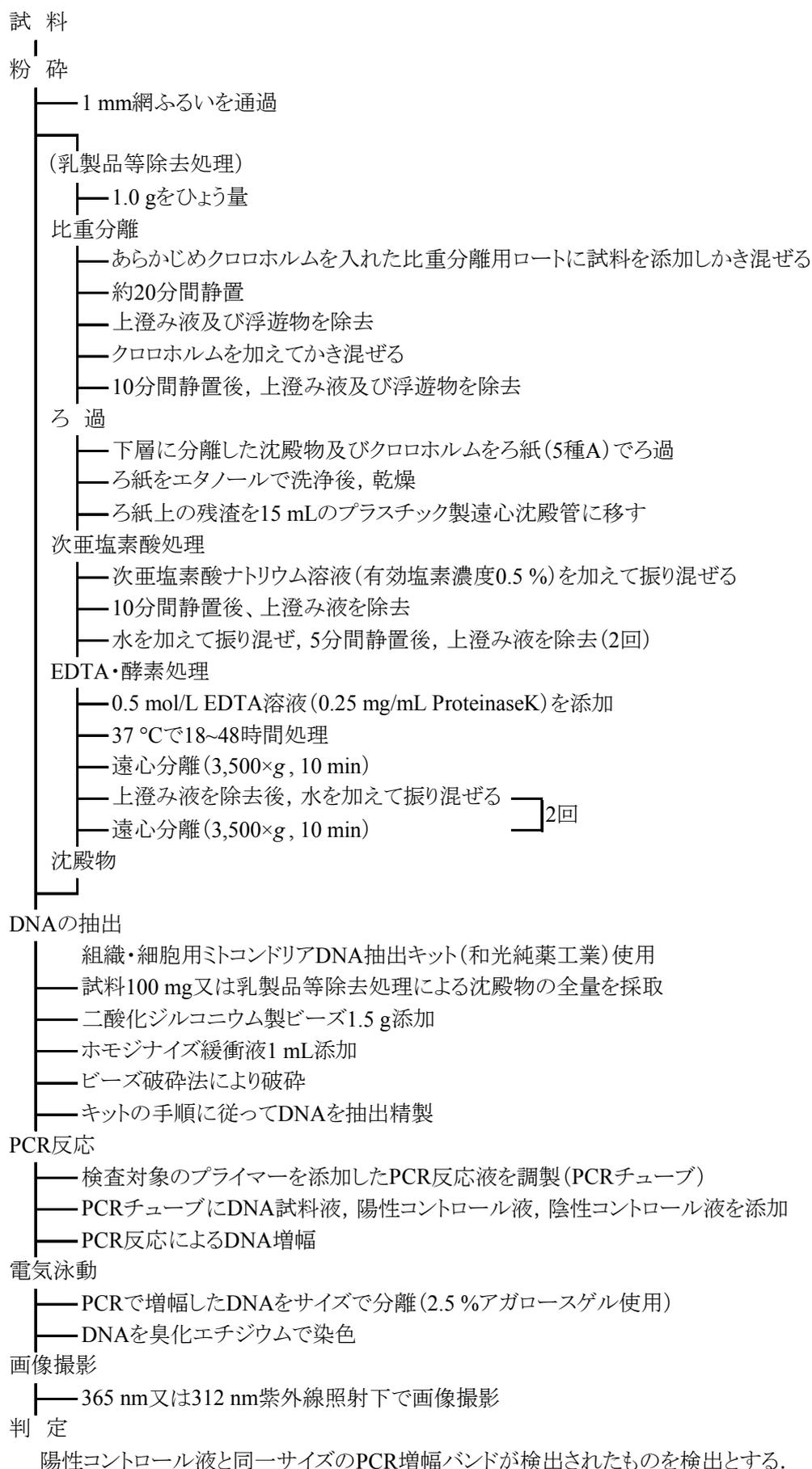


図3 PCR法による動物由来DNAの検出方法

表 1 対象試料別の試験項目

対象試料	顕微鏡鑑定	試験項目									
		ELISA				PCR					
		反すう動物 (メライザキット)	牛 (モリナガキット)	豚 (ELISA-TEK キット)	鶏 (モリナガ キット)	ほ乳動物	反すう動物	牛	豚	鶏	
牛用配混合飼料	○	—	○	—	△	○	—	△ (ほ乳+の場合)	△ (ほ乳+の場合)	△	
魚粉等	○	—	○	△	△	○	—	△ (ほ乳+の場合)	△ (ほ乳+の場合)	△	
チキンミール・ 血粉等	家さん由来	○	○	—	△	—	○注1)	—	△ (ほ乳+の場合)	△ (ほ乳+の場合)	—
	豚又は馬由来	○	○	—	—	△	—	○	△ (反すう+の場合)	—	△
豚由来肉骨粉	—	○	—	—	△	—	○	△ (反すう+の場合)	—	△	
原料混合肉骨粉	豚及び家さん由来	—	○	—	—	—	○	△ (反すう+の場合)	—	—	
輸入飼料	A飼料	○	—	○注2)	—	△	○注1)	—	△ (ほ乳+の場合)	—	△
	B飼料	○	○	—	—	△	—	○	△ (反すう+の場合)	—	△

- 必ず実施する試験項目
- △ 必要に応じて実施する試験項目
- 試験不要

- 注 1) 平成 20 年度以降は反すう動物由来 DNA の検出を実施  
 2) 平成 20 年度以降はメライザキットにより反すう動物由来たん白質の検出を実施

5) 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.

豚肉骨粉等を除く試料について顕微鏡鑑定を実施し, 獣骨・獣毛等の組織が検出された場合には「肉骨粉検出」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, 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, モリナガキットを用いた 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る場合があることから, 乳製品の混入の可能性のある飼料については, 乳製品等除去処理 PCR 試験を実施し, PCR 試験の結果牛由来 DNA が確認され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 198 検体について, ほ乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等のモニタリング

を行った。198 検体の試料の内訳は、チキンミール等 50 検体、魚粉等 113 検体、豚肉骨粉等 27 検体、その他動物性たん白質を含む飼料 8 検体であった。

これらのモニタリング集計結果は、表 2 に示したとおりであり、動物質性飼料 198 検体のうち、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。

平成 17 年度までは、家きん由来たん白質等のモニタリングも同時に実施していたが、平成 18 年度以降は、BSE 発生リスクの高い反すう動物由来たん白質等について重点的にモニタリングを行うこととし、家きん由来たん白質等のモニタリングは実施していない。

表 2 動物質性飼料のモニタリング結果（平成 19 年度）

動物質性 飼料の区分	飼料の種類	試験 検体数	反すう動物由来たん白質等	
			検出数	検出率 (%)
チキンミール等	チキンミール	31	0	0.0
	フェザーミール	18	0	0.0
	豚血粉	1	0	0.0
	小 計	50	0	0.0
魚粉等 (内訳)	輸入魚粉	3	0	0.0
	国内製造魚粉等	110	0	0.0
	魚粉・魚アラ粕	(95)		
	だし粕	( 6)		
	イカミール	( 2)		
	カニ殻	( 2)		
	魚鱗コラーゲン	( 1)		
	イカ内臓発酵物	( 1)		
	酵素処理魚抽出物	( 2)		
	フィッシュソリュブル	( 1)		
小 計	113	0	0.0	
豚肉骨粉等	豚肉骨粉	4	0	0.0
	鶏豚原料混合肉骨粉	22	0	0.0
	豚蒸製骨粉	1	0	0.0
	小 計	27	0	0.0
その他	魚介類由来原料を主体とした混合飼料	5	0	0.0
	魚粉・大豆油かす 2 種混合飼料	1	0	0.0
	フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0.0
	フェザーミール・大豆油かす 2 種混合飼料	1	0	0.0
	小 計	8	0	0.0
合 計		198	0	0.0

#### 1) チキンミール等

チキンミール 31 検体、フェザーミール 18 検体及び豚血粉 1 検体の計 50 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリングを行った。

試験は、すべての検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験を実施した。ELISA 試験は、平成 18 年度にチキンミール等を用いて ELISA キットの評価を行った結果、チキンミール

ル等中の反すう動物由来たん白質の検出には、モリナガキットよりメライザキットが特異性の点で良好であると判断された<sup>11)</sup>ことから、平成 19 年度は、メライザキットを用いて試験を実施した。

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。また、メライザキットを用いた ELISA 試験の結果は、すべての検体で反すう動物由来たん白質が陰性であり、PCR によりほ乳動物由来 DNA の試験を行った結果は、すべての検体でほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、総合判定ではすべて反すう動物由来たん白質等不検出と判定された。

表 3 チキンミール等の試験結果 (平成 19 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	50	0	0.0
ELISA 試験	反すう動物由来たん白質 <sup>注1)</sup>	50	0	0.0
PCR 試験	ほ乳動物由来 DNA	50	0	0.0
	牛由来 DNA	50	0	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	50	0	0.0

注 1) メライザキットによる

## 2) 魚粉等

国内で製造した魚介類由来たん白質を含む魚粉等 110 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。魚粉等の内訳は、表 2 のとおり、魚粉・魚アラ粕 95 検体、だし粕 6 検体、イカミール 2 検体、カニ殻 2 検体、魚鱗コラーゲン 1 検体、イカ内臓発酵物 1 検体、酵素処理魚抽出物 2 検体及びフィッシュソリュブル 1 検体であった。

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たことから、平成 19 年度は 3 検体のみであった。輸入魚粉 3 検体の輸入先国はいずれもタイであった。

ほ乳動物由来たん白質等の試験の結果は、表 4 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く、ELISA 及び PCR 試験で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。モリナガキットによる ELISA 試験では、魚粉 1 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 試験において、牛由来 DNA が検出されなかったことから、総合判定ではほ乳動物由来たん白質等が不検出と判定された。

なお、平成 18 年度に魚粉等の ELISA 及び PCR 陽性事例について調査した結果、乳製品やゼラチンを添加した水産練り製品等の混入の可能性が示唆された。平成 18 年度以降、魚粉等の検査にあたり、PCR 陽性検体については、乳製品等除去処理 PCR による確認試験を実施している。

表 4 魚粉等の試験結果（平成 19 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	113	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	113	1	0.9
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	113	1	0.9
	牛由来DNA	113	0	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	113	0	0.0
	牛由来たん白質・DNA	113	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

### 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 年度以降、豚肉骨粉等のモニタリング検査を実施<sup>10)11)</sup>している。

平成 19 年度は、表 2 に示したように豚肉骨粉 4 検体、鶏豚原料混合肉骨粉 22 検体及び豚蒸製骨粉 1 検体の計 27 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリング検査を行った。

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、豚肉骨粉等には、子豚に給与した代用乳等の牛乳製品等が混入する可能性があることから、豚肉骨粉等の ELISA 試験には、乳製品の影響を受けないメライザキットを用い、PCR 試験では、あらかじめ乳製品等除去処理を行った。

試験の結果は、表 5 に示したように、鶏豚原料混合肉骨粉 1 検体で ELISA 試験で反すう動物由来たん白質が陽性であった。この検体は、PCR 試験では反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから、総合判定では反すう動物由来たん白質等不検出と判定された。メライザキットで反すう動物由来たん白質が陽性で PCR で DNA が検出されなかったことについては、加熱加工処理等により DNA が検出限界以下まで分解されたか、あるいは ELISA 非特異反応などが考えられるが、原因は不明であった。

表 5 豚肉骨粉等の試験結果（平成 19 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	NT		
ELISA試験	反すう動物由来たん白質 <sup>注1)</sup>	27	1	3.7
PCR試験	反すう動物由来DNA	27	0	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	27	0	0.0

注 1) メライザキットによる

### 4) その他の動物質性飼料

魚介類由来たん白質等または家きん由来たん白質を含む混合飼料 8 検体について、ほ乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等の試験を行った。これらの内訳は、魚粉を主体とした混合

飼料 5 検体，フィッシュソリュブル吸着飼料 1 検体，魚粉・大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体及びフェザーミール・大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体であった。

試験の結果は，表 2 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。また，ELISA 試験及び PCR 試験では乳動物あるいは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。

### 3.2 国内製造牛用配混合飼料のモニタリング

平成 19 年度は，189 検体の国内製造牛用配混合飼料について，ほ乳動物由来たん白質等のモニタリング検査を実施した。平成 19 年度は，平成 18 年度と同様に家きん由来たん白質等のモニタリング検査は実施しなかった。

飼料の種類の内訳は，表 6 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 19 検体，若令牛育成用配合飼料 9 検体，肉用牛肥育用配合飼料 72 検体，乳用牛飼育用配合飼料 51 検体，繁殖用・種牛用配合飼料 13 検体及び牛用混合飼料 17 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を検出したものはなかった。

表 6 牛用配混合飼料のモニタリング結果（平成 19 年度）

飼料の種類	試験検体数	ほ乳動物由来たん白質等	
		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
幼令牛育成用	19	0	0.0
若令牛育成用	9	0	0.0
肉用牛肥育用	72	0	0.0
乳用牛飼育用	51	0	0.0
繁殖用・種牛用	13	0	0.0
牛用混合飼料	17	0	0.0
合計	189	0	0.0

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，牛由来たん白質の陽性反応が生ずることから，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<sup>2), 4), 17), 18)</sup>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，確認検査の結果陰性であれば不検出と判定している。

試験の結果は，表 7 に示したように，189 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，189 検体のうち 8 検体で牛由来たん白質が陽性であった。

PCR 試験では，189 検体中乳製品等除去処理法による確認検査の結果，ほ乳動物由来 DNA が検出されたものはなかった。これらの検体のうち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 14 検体であった。

189 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。

表 7 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 19 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	189	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	189	8	4.2
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	189	0	0.0
	牛由来DNA	189	0	0.0
	豚由来DNA	189	0	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	189	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

### 3.3 輸入飼料のモニタリング

輸入飼料については、平成 17 年度から重点検査を開始し、平成 17 年度は 35 検体、平成 18 年度は 44 検体のモニタリング検査を実施している。平成 19 年度は、表 8 に示したように、輸入の牛用混合飼料 29 検体、牛用飼料添加物（複合製剤）1 検体及び植物性単体飼料（大豆油かす）1 検体の併せて 31 検体についてモニタリング検査を実施した。

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 18 検体と最も多く、ついで台湾が 3 検体、中華人民共和国が 2 検体、大韓民国、シンガポール、イタリア、フランス、スペイン、スイス、ペルー及びオーストラリアが各 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。モリナガキットによる ELISA 試験では、4 検体で牛由来たん白質が陽性（陽性率 12.9%）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 が検出されたものはなく、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等が不検出と判断された。

輸入飼料では、平成 18 年度のモニタリング<sup>11)</sup>においてもモリナガキット陽性率が 27.3%と高く、乳製品の添加又は製造工程内混入によるものと推察された。輸入の牛用混合飼料の場合、配合設計の詳細が不明な場合が多く、製造工程での乳製品の混入の確認も困難であることから、できる限り乳製品の影響を受けない検査手法が望まれる。

そこで、輸入飼料へのメライザキットの適用の可否を調べるため、平成 18 年度から 19 年度に採取した輸入飼料 47 検体（総合判定では乳動物由来たん白質等不検出のもの）を用い、メライザキットによる ELISA 試験を実施した。輸入飼料 47 検体の内訳は、モリナガキット陽性 7 検体、モリナガキット陰性 40 検体であった。

メライザキットによる ELISA 試験の結果は、47 検体ともに反すう動物由来たん白質は検出されず、偽陽性反応も認められなかった。これらの結果から、輸入飼料の検査分析には、モリナガキットより、乳製品の影響を受けないメライザキットを適用することがよいと判断され、平成 20 年度以降のモニタリングには、メライザキットを用いることとした。

表 8 輸入飼料のモニタリング結果（平成 19 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	
			検出数	検出率 (%)
配混合飼料	牛用混合飼料	29	0	0.0
飼料添加物	牛用複合製剤	1	0	0.0
植物性単体飼料	大豆油かす	1	0	0.0
合 計		31	0	0.0

表 9 輸入飼料の輸入先国（平成 19 年度）

輸入先国	試験検体数			
	合計	牛用混合飼料	飼料添加物	植物性単体飼料
アメリカ合衆国	18	16	1	1
台湾	3	3		
中華人民共和国	2	2		
大韓民国	1	1		
シンガポール	1	1		
イタリア	1	1		
フランス	1	1		
スペイン	1	1		
スイス	1	1		
オーストラリア	1	1		
ペルー	1	1		
合 計	31	29	1	1

表 10 輸入飼料の試験結果（平成 19 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	31	0	0.0
ELISA 試験	反すう動物由来たん白質 <sup>注1)</sup>	31	0	0.0
	牛由来たん白質 <sup>注2)</sup>	31	4	12.9
PCR 試験	ほ乳動物由来DNA	31	0	0.0
	牛由来DNA	31	0	0.0
総合判定	ほ乳動物由来たん白質・DNA	試験検体数	検出数	検出率 (%)
		31	0	0.0

注 1) メライザキットによる

2) モリナガキットによる

#### 4 まとめ

BSE（牛海綿状脳症）の発生防止対策の一環として、平成 19 年度に採取した動物質性飼料 198 検体、国内牛用配混合飼料 189 検体及び輸入飼料 31 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検査を実施した結果は、次のとおりであった。

1) チキンミール 31 検体、フェザーミール 18 検体及び豚血粉 1 検体の計 50 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、すべての検体で、顕微鏡鑑定、ELISA

及びPCR試験とも陰性であり，反すう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 110 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等のモニタリングを実施した結果は，国内魚粉 1 検体で ELISA 試験が陽性であったが，乳製品除去処理による PCR では陰性であり，総合判定によりすべての検体でほ乳動物由来たん白質等は検出されなかった。
- 3) 豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉 27 検体について，反すう動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は，鶏豚原料混合肉骨粉 1 検体で ELISA 試験で陽性であったが，乳製品等除去処理による PCR では不検出であり，総合判定で反すう動物由来たん白質を検出したものはなかった。
- 4) 国内製造の牛用配混合飼料 189 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。モリナガキットによる ELISA 試験では，8 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 が検出されず，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添加または混入によるものと推察された。
- 5) 輸入の牛用混合飼料 29 検体及び牛用飼料添加物 1 検体及び大豆油かす 1 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，モリナガキットでは 4 検体で ELISA 試験が陽性であったが，乳製品等除去処理 PCR を実施した結果は，ELISA 陽性検体を含めほ乳動物由来 DNA は検出されず，総合的に不検出と判定された。
- 6) 輸入飼料（牛用混合飼料）47 検体を用い，メライザキットによる ELISA 試験を実施した結果，輸入飼料（牛用混合飼料）の検査分析には，メライザキットを適用することが適当であると判断された。

## 文 献

### <分析法通知関係>

- 1) 農林水産省生産局長通知：“反すう動物用飼料への反すう動物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).  
廃止 平成 20 年 4 月 1 日付で飼料分析基準<sup>4)</sup>に収載され，本通知は廃止された。
- 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) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号(2008).
- 5) 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>

- 6) 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).

- 7) 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).
  - 8) 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).
  - 9) 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).
  - 10) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **32**, 203 (2007).
  - 11) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 165(2008).
  - 12) T. Kusama, H. Hibino, T. Onodera, and K. Sugiura: *Veterinaria Italiana*, **45** (2) (2008) (in press).
- <PCR 試験法関係>
- 13) T. Kusama, T. Nomura, and K. Kadowaki: *J. Food Protection*, **67** (6), 1289 (2004).
  - 14) 野村 哲也, 草間 豊子, 門脇 光一 : 食品衛生学雑誌, **47** (5), 222 (2006).
  - 15) 野村 哲也, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **30**, 52 (2005).
  - 16) 草間 豊子, 野村 哲也 : 飼料研究報告, **30**, 60 (2005).
  - 17) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **30**, 79 (2005).
  - 18) 草間 豊子, 関口 好浩 : 飼料研究報告, **31**, 147 (2006).
  - 19) 篠田 直樹, 吉田 知太郎, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 122 (2008).
  - 20) N. Shinoda, T. Kusama, T.Yoshida, T.Sugiura, K. Kadowaki, T. Onodera, and K. Sugiura: *J. Food Protection*, **71** (11), 2257 (2008).
  - 21) 吉田 知太郎, 野村 哲也, 篠田 直樹, 草間 豊子, 門脇 光一, 杉浦 勝明 : 食品衛生学雑誌, **50**, 89 (2009).
- <ELISA 試験法関係>
- 22) 日比野 洋 : 飼料研究報告, **29**, 181 (2004).
  - 23) 日比野 洋 : 飼料研究報告, **31**, 155 (2006).
  - 24) 関口 好浩, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 78 (2008).

他誌掲載論文

- 1 食品衛生学雑誌 第50巻第2号 47~51 ページより転載  
**Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum**  
Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Mariko NISHIWAKI and  
Masakatsu ICHINOE
- 2 食品衛生学雑誌 第49巻第4号 303~307 ページより転載  
**HPLCによる飼料中のゴシポールの分析**  
青山 恵介
- 3 *Journal of Food Protection*, Vol. 71, 2257~2262 ページより転載  
**Developing PCR Primers Using a New Computer Program for Detection of Multiple Animal-Derived Materials in Feed**  
Naoki SHINODA, Toyoko KUSAMA, Tomotaro YOSHIDA, Tatsuki SUGIURA,  
Koh-ichi KADOWAKI, Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA
- 4 食品衛生学雑誌 第50巻第2号 89~92 ページより転載  
**Development of PCR Primers for the Detection of Porcine DNA in Feed Using *mtATP6* as the Target Sequence**  
Tomotaro YOSHIDA, Tetsuya NOMURA, Naoki SHINODA, Toyoko KUSAMA,  
Koh-ichi KADOWAKI and Katsuaki SUGIURA
- 5 日本食品微生物学会雑誌 第25巻第3号 109~119 ページより転載  
**クオリボックス™システムによる飼料中のサルモネラの迅速検出法の検討**  
千原 哲夫, 関口 好浩, 橋本 仁康, 大島 慎司, 杉本 泰俊, 本 広昭,  
木村 晃一, 上橋 健三
- 6 鶏病研究会報 第44巻第4号 150~157 ページより転載  
**超微細高密度オゾン水の *Salmonella Enteritidis* に対する殺菌効果と応用**  
高木 昌美, 岩田 剛敏, 松村 栄治, 萩原 信子, 秋庭 正人, 神尾 次彦
- 7 鶏病研究会報 第44巻第4号 158~165 ページより転載  
**超微細高密度オゾン水の *Campylobacter jejuni* に対する殺菌効果の検討**  
岩田 剛敏, 秋庭 正人, 高木 昌美, 松村 栄治, 萩原 信子, 神尾 次彦

上記1, 2及び4の論文は, 社団法人日本食品衛生学会の許可をとって転載しています。

上記5の論文は, 日本食品微生物学会の許可をとって転載しています。

上記6及び7の論文は, 鶏病研究会の許可をとって転載しています。

Article No. 3: Reprinted with permission from the *Journal of Food Protection*. Copyright held by the International Association for Food Protection, Des Moines, Iowa, U.S.A. Please include the name and affiliation of the authors.



## 飼料研究報告編集委員

委員長	杉浦 勝明	副委員長	片山 信浩
	石橋 隆幸		橋本 亮
	草間 豊子		早川 俊明
	小森谷 敏一		日比野 洋
	高木 昌美		山谷 昭一
	田中 公子		山多 利秋
	中村 行伸		

## 飼料研究報告 第34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21年6月

編集 飼料研究報告編集委員会