

飼料研究報告

第35号

平成22年

Research Report of Animal Feed

Vol. 35
2010



The OIE Collaborating Centre for
Animal Feed Safety and Analysis

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35巻目の発刊となります。

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、「農場から食卓まで一連の行程（フードチェーン）」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。

また、2009年6月に愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律が施行され、愛がん動物用飼料（ペットフード）又はその原材料の法令への適合状況を確認するための検査は、FAMICの理事長が定めた方法によることとされたことを受けて、2009年9月に愛がん動物用飼料等の検査法を制定いたしました。今後は、ペットフード等を対象にした分析法の研究開発も求められているところであり、その研究成果も本研究報告でとりまとめてまいります。

さらに、FAMICは、2009年5月に「飼料の安全及び分析」の分野で、国際獣疫事務局（OIE）コラボレイティング・センターに指定されました。2010年7月にはアジア太平洋地域のOIE加盟国を対象とした国際会議を主催し、わが国における飼料の安全及び分析に関する講演を行うとともに参加各国の飼料規制や検査体制について情報交換・討議を行いました。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、さらには、飼料の安全性確保に関する情報の世界に向けた発信など一層の国際貢献に取り組んでまいります。

今回とりまとめた農薬や残留する合成抗菌物質の定量法は、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」改正に際して収載されるほか、2009年12月に発刊された解説書『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際、追加収載される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22年8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 21 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 22 年 3 月時点。)

- | | |
|--------|--|
| 青木 葉一 | 財団法人畜産生物科学安全研究所 理事 (分析試験研究部担当) |
| 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
畜産草地研究所 畜産温暖化研究チーム長 |
| 箆島 豊 | 国立大学法人九州大学名誉教授 |
| 小田中 芳次 | 財団法人残留農薬研究所 技術顧問 |
| 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 上級研究員 |
| 後藤 哲久 | 国立大学法人信州大学農学部応用生命科学科
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
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
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
動物衛生研究所 研究管理監 (北海道担当) |
| 安井 明美 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 企画管理部業務推進室 専門員 |

目 次

1 飼料中のジウロンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 野村 昌代, 杉本 泰俊, 鷲尾 和也	1
2 飼料中のスピノサドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 牧野 大作, 山田 美帆, 佐野 好弘	15
3 飼料中のクリスタルバイオレット及びメチレンブルーの液体クロマトグラフタン DEM型質量分析計による同時定量法 高橋 亜紀子	30

技術レポート

1 飼料中のイソフェンホスオキシソンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量 法 山本 謙吾	47
2 鶏用配合飼料中のアピラマイシンの微生物学的定量法の改良法について 関口 好浩, 佐藤 梢, 吉村 哲史	56
3 飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンのガスクロマトグラフによる 定量法 野崎 友春, 井手 康人	65

精度管理

1 平成 21 年度飼料の共通試料による分析鑑定について 高橋 亜紀子, 松尾 伸吾, 大島 慎司, 榊原 良成, 田中 里美, 高橋 雄一, 杉本 泰俊, 矢野 愛子	78
--	----

調査資料

1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について (平成 20 年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課	108
2 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について (平成 21 年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課	131

1 Development of Primers for Detection of Heat-Treated Cetacean Materials in Porcine Meat and Bone Meal

(*Journal of Food Protection*, Vol. 72より転載)

Naoki SHINODA, Tomotaro YOSHIDA, Toyoko KUSAMA,

Masami TAKAGI, Takashi ONODERA and

Katsuaki SUGIURA 153

CONTENTS

1	Determination of Diuron in Feeds by LC-MS Masayo NOMURA, Yasutoshi SUGIMOTO and Kazuya WASHIO	1
2	Determination of Spinosad in Feeds by LC-MS Daisaku MAKINO, Miho YAMADA and Yoshihiro SANO	15
3	Determination of Crystal violet and Methylene blue in Feeds by LC-MS/MS Akiko TAKAHASHI	30
§	Technical report	47
§	Proficiency test	78
§	Investigative report	108
§	Papers accepted in other journal	151

1 飼料中のジウロンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

野村 昌代^{*1}, 杉本 泰俊^{*2}, 鷲尾 和也^{*2}

Determination of Diuron in Feeds by LC-MS

Masayo NOMURA^{*1}, Yasutoshi SUGIMOTO^{*2} and Kazuya WASHIO^{*2}

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

*²Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center)

An analytical method for determination of diuron in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) was developed. After addition of 15 mL (30 mL for grass hay) of water, the sample was left for 30 minutes. Diuron was extracted with 100 mL of acetone and filtered. (The extract was topped up to 200 mL for grass hay.) All sample solution (20 mL of the sample solution for grass hay) was condensed. After the addition of 5 g of sodium chloride (10 mL of water and 5 g of sodium chloride for grass hay) into the condensed solution, the sample solutions were purified by Chem Elut cartridge with hexane and evaporated to dryness. The residue was dissolved in cyclohexane-acetone (4:1). It was purified by gel permeation chromatography (GPC) with cyclohexane-acetone (4:1) and Sep-Pak Plus Florisil cartridge with hexane-acetone (17:3). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in 2 mL of methanol, and subjected to LC-ESI-MS for determination of diuron. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm (Agilent Technologies)) using methanol-2 mmol/L ammonium acetate solution (13:7) as a mobile phase. The determination was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using $[M(^{12}C_9^1H_{10}^{35}Cl_2^{14}N_2^{16}O)+H]^+$ ion at m/z 233 ($[M(^{12}C_9^1H_{10}^{35}Cl^{37}Cl^{14}N_2^{16}O)+H]^+$ ion at m/z 235 for ryegrass straw). A recovery test was conducted using two kinds of formula feed, corn, oats hay and ryegrass straw spiked with diuron at 0.2 and 0.02 mg/kg (4 and 0.4 mg/kg for oats hay, 2, 1 and 0.4 mg/kg for ryegrass straw). The mean recoveries of diuron were 84.8~99.2 % and the relative standard deviations (RSD) were within 7.8 %. A collaborative study was conducted in seven laboratories using formula feed for breeding hen and corn and oats hay spiked with diuron at 0.05 mg/kg (4 mg/kg for oats hay). The mean recovery of formula feed for breeding hen was 92.3 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) were 4.7 % and 12 % respectively. These values were 86.9 %, 3.3 % and 12 % for corn ; 91.0 %, 2.6 % and 8.3 % for oats hay respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; フェニル尿素系除草剤 phenylurea herbicide ; ジウロン diuron ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 同肥飼料安全検査部

*² (独) 農林水産消費安全技術センター福岡センター

(LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 飼料 feed ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

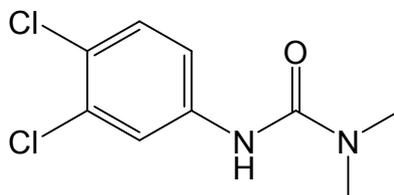
ジウロンはデュポン社によって開発された非ホルモン型のフェニル尿素系除草剤であり、光合成電子伝達系 II を阻害する。日本では 1960 年に登録されており、畑地、果樹園、非農耕地などで広く使用されている¹⁾。

国内の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値は、小麦及びとうもろこしで 0.7 ppm、大麦及びライ麦で 0.6 ppm、その他の穀類で 0.05 ppm となっている。

ジウロンの定量法は、「平成 17 年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業」において、液体クロマトグラフ質量分析計一斉分析法²⁾が検討されたが、鶏用配合飼料及び乾牧草での添加回収試験の回収率が低かったことから、一斉分析法への適用は不可能と判断された。また、食品では、厚生労働省よりウレア系 6 農薬の液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ質量分析計を用いた同時分析法³⁾が試験法として通知されている。

飼料中のジウロンの個別定量法としては、(財)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」において開発した方法(以下「分析センター法」という。)⁴⁾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⁵⁾への適用の可否について検討したので報告する。

なお、ジウロンの構造式を Fig. 1 に示した。



Diuron

3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

$C_9H_{10}Cl_2N_2O$ MW: 233.1

CAS No.: 330-54-1

Fig. 1 Chemical structure of diuron

2 実験方法

2.1 試 料

市販の配合飼料(ブロイラー肥育後期用及び肉用牛肥育用)、とうもろこし及び乾牧草(えん麦乾草及びライグラスわら)をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

なお、添加回収試験に用いた配合飼料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For broiler finishing chick	Grains	67	Milo, Corn
	Oil seed meal	22	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	2	Fish meal, Chicken meal, Feather meal
	Others	9	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Garlic powder, Green tea extract, Fermented milk powder, Dried yeast cell wall, Cinnamon, Pumpkin seed, Feed additives
For beef cattle	Grains	75	Corn, Barley
	Brans	17	Wheat bran, Corn gluten feed
	Oil seed meal	7	Soybean meal, Rapeseed meal
	Othes	1	Calcium carbonate, Salt

2.2 試薬

1) ジウロン標準液

ジウロン標準品（関東化学製，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ジウロン標準原液を調製した（この液 1 mL はジウロンとして 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メタノールで正確に希釈し，1 mL 中にジウロンとして 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 及び 4 μg を含有する各ジウロン標準液を調製した．

2) 試薬等

アセトニトリル，メタノール及び蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた．アセトン，ヘキサン及びシクロヘキサンは残留農薬試験用試薬を用いた．特記している以外の試薬については特級を用いた．

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計：

LC 部：島津製作所製 Prominence

MS 部：島津製作所製 LCMS-2010EV

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

3) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 R-210

4) 遠心分離器：久保田製作所製 5100

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

6) ゲル浸透クロマトグラフ：島津製作所製 GPC システム

ポンプ：LC-10ATvp

オートサンプラー：SIL-10AP

フラクションコレクター：FRC-10A

7) 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) にリザーバーを連結したもの

8) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm , 直径 25 mm, PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

i 乾牧草 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 30 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 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。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、更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。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 3 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

ii その他の飼料 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 15 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、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。ろ液を 40 °C 以下の水浴で 15 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

試料溶液に塩化ナトリウム 5 g（乾牧草は水 10 mL 及び塩化ナトリウム 5 g）を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れ、5 分間静置した。300 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ヘキサン 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、ジウロンを溶出させた。更に、ヘキサン 85 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。

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 の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×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 4 mL（乾牧草は 2 mL）をゲル浸透クロマトグラフに注入し、ジウロンが溶出する画分を 50 mL のなす形フラスコに分取し、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。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 2 に示した。

ヘキサン 10 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 of GPC for analyzing diuron

Column	Shodex CLNpak EV-2000AC (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	90~110 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。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていた容器をヘキサ-

アセトン (17+3) 2 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してジウロンを溶出させた。更に、ヘキサン-アセトン (17+3) 19 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。

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。

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

5) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各ジウロン標準液各 2 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 3 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。

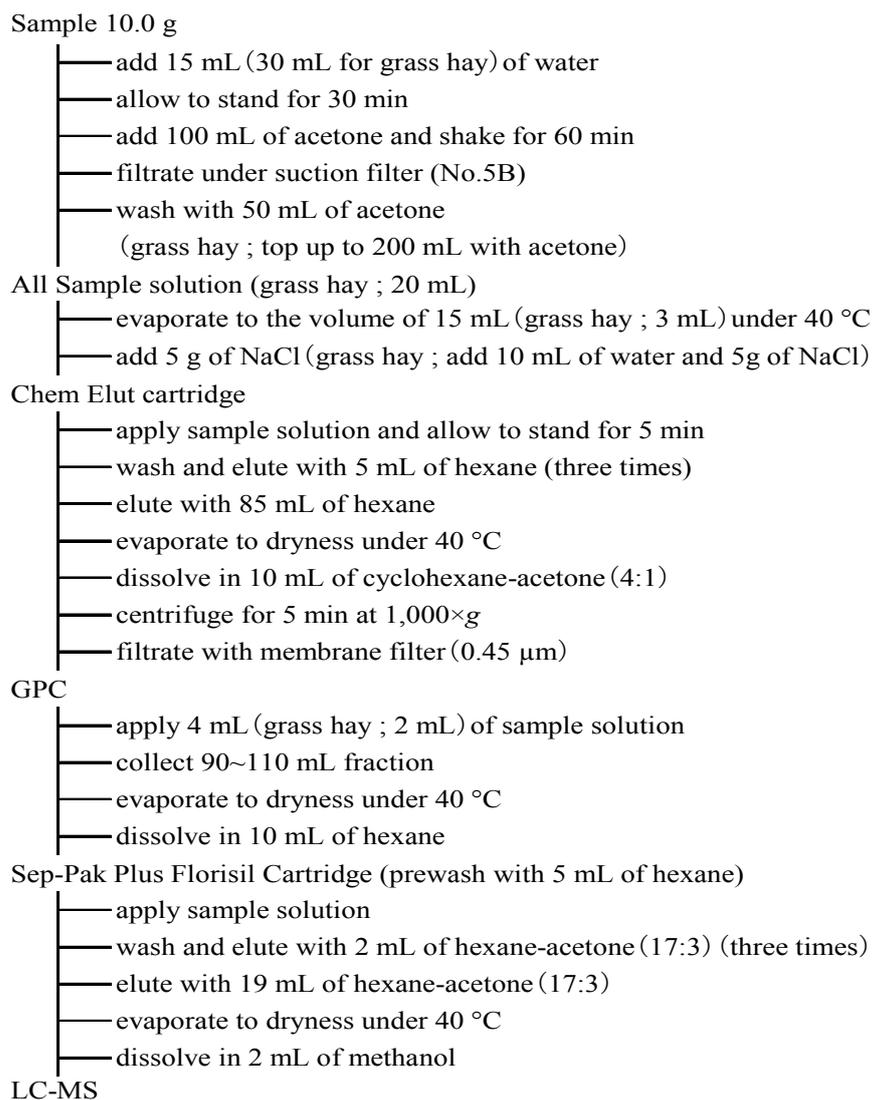
Table 3 Operating conditions of LC-MS for analyzing diuron

Column	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	Methanol-2 mmol/L ammonium acetate solution(13:7)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 233 (235 for rye grass straw)

6) 計 算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のジウロン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for diuron in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

分析センター法では、ジウロンのイオン化法として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ることから、本法においても ESI 法を用いて検討を行った。

ジウロンの標準液を、今回の分析条件においてスキャンモードにて測定したところ、Fig. 2 のようなマススペクトルが得られ、モニターイオンとして最も感度のよい m/z 233 ($^{35}\text{Cl}_2$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}_2^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) を用いることとした。ライグラスわらについては、 m/z 233 では妨害ピークが認められたため、 m/z 233 の次に感度のよい m/z 235 ($^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) を用いることとした。

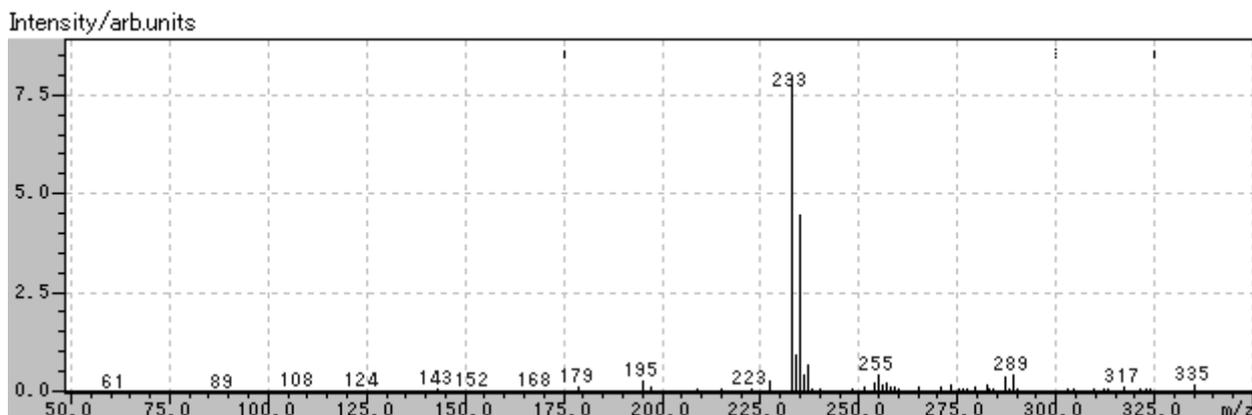


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution of diuron

3.2 検量線の作成

調製した 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 及び 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジウロン標準液各 2 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、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. 3 のとおり 0.01~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.02~8 ng) の範囲で直線性を示した。

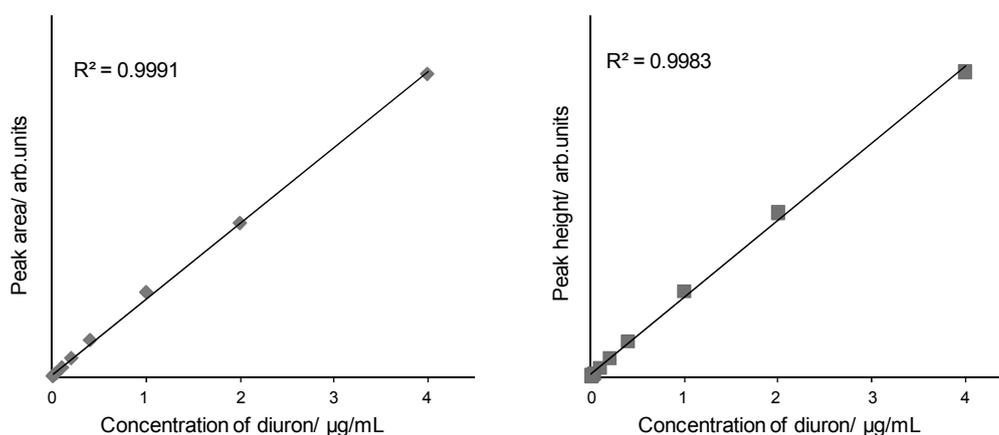


Fig. 3 Calibration curves of diuron by peak area (left) and peak height (right)

3.3 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

多孔性ケイソウ土カラム処理の溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1) により抽出した液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 2) の多孔性ケイソウ土カラム処理に供する試料溶液とし、その後、本法により操作した後、溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 4 のとおりジウロンは 0~100 mL に溶出し、100 mL 以後の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本カラムにおける溶出には分析センター法と同様にヘキサン 100 mL を用いることとした。

Table 4 Elution pattern from Chem Elut cartridge

Fraction volume (mL)	0~50	~100	~150	~200	Total
Recovery of diuron ^{a)} (%)	93	5	0	0	98

a) Mean (n=2)

3.4 ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の検討

ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1) 及び 2) により操作した試料溶液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 3) のゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とし、80 mL から 115 mL の間を 5 mL 間隔で分画した。その後、本法により操作した後、溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 5 のとおりジウロンはシクロヘキサン-アセトン (4+1) 90~110 mL の画分に溶出され、90 mL 以前及び 110 mL 以後の画分には溶出されなかった。分析センター法では、シクロヘキサン-アセトン (4+1) 85~105 mL の溶出画分を分取しているが、本法ではシクロヘキサン-アセトン (4+1) 90~110 mL の溶出画分を分取することとした。

Table 5 Elution pattern from GPC

Fraction volume (mL)	80~85	~90	~95	~100	~105	~110	~115	Total
Recovery of diuron ^{a)} (%)	0	0	9	54	31	3	0	97

a) Mean (n=2)

3.5 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の溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1), 2) 及び 3) により操作した試料溶液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 4) のカラム処理 II に供する試料溶液とし、10 mL を負荷した後にヘキサン-アセトン (17+3) でジウロンを画分に溶出した。その後、本法により操作した後、溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 6 のとおりジウロンはヘキサン-アセトン (17+3) 0~25 mL の画分で溶出し、25 mL 以後の画分には溶出しなかった。以上の結果から、本カラムにおける溶出には分析センター法と同様にヘキサン-アセトン (17+3) 25 mL を用いることとした。

Table 6 Elution pattern from Florisil mini column

	Hexane	Hexane-acetone (17:3)				Total
	0~10 mL	0~10 mL	~20 mL	~25 mL	~30 mL	
Recovery of diuron ^{a)} (%)	0	84	11	1	0	96

a) Mean (n=2)

3.6 妨害物質の検討

市販の配合飼料（肉用牛肥育用、乳用牛飼育用、ブロイラー肥育後期用、種鶏飼育用、子豚育成用及び種豚飼育用）、とうもろこし、大麦、小麦、えん麦、マイロ、ふすま及び乾牧草（えん麦乾草、アルファルファ乾草及びライグラスわら）を用い、本法に従って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、妨害ピークの有無を確認したところ、ライグラスわらのみにおいて定量を妨げるピークが認められたが、モニターイオンを m/z 235 に変更すると妨害ピークは認められなかった。このため、ライグラスわらの測定においては、モニターイオンを m/z 235 に変更する必要がある。

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。

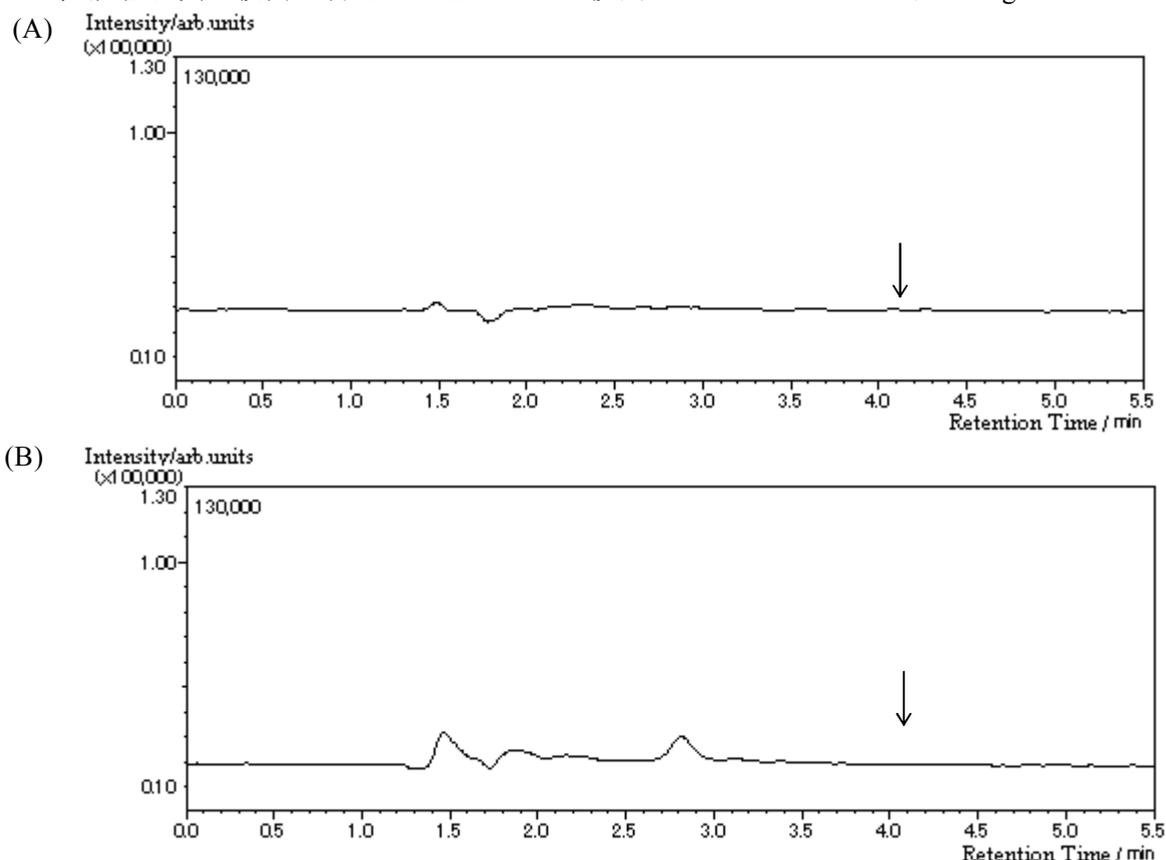


Fig. 4 SIM chromatograms of blank solutions

LC-MS conditions are shown in Table 3.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

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

(Arrows indicate the retention times of diuron.)

3.7 添加回収試験

2.1 で調製したブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにジウロンとして 0.2 及び 0.02 mg/kg 相当量、えん麦乾草に 4 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。その結果は、Table 7 のとおり、ジウロンの平均回収率は 84.8~97.5%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 6.9 % 以下の成績が得られた。また、妨害ピークが認められたライグラスわらに 2, 1 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、 m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果、平均回収率は 90.3~99.2%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 7.8 % 以下の成績が得られた。

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 7 Recoveries of diuron from five kinds of feed

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for broiler finishing chick		Formula feed for beef cattle		Corn		Oats hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
4							97.2	1.0		
2									98.3	7.8
1									90.3	5.5
0.4							97.5	2.6	99.2	1.5
0.2	84.8	6.9	88.0	4.2	96.6	2.2				
0.02	95.0	2.6	95.8	5.4	94.2	3.1				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

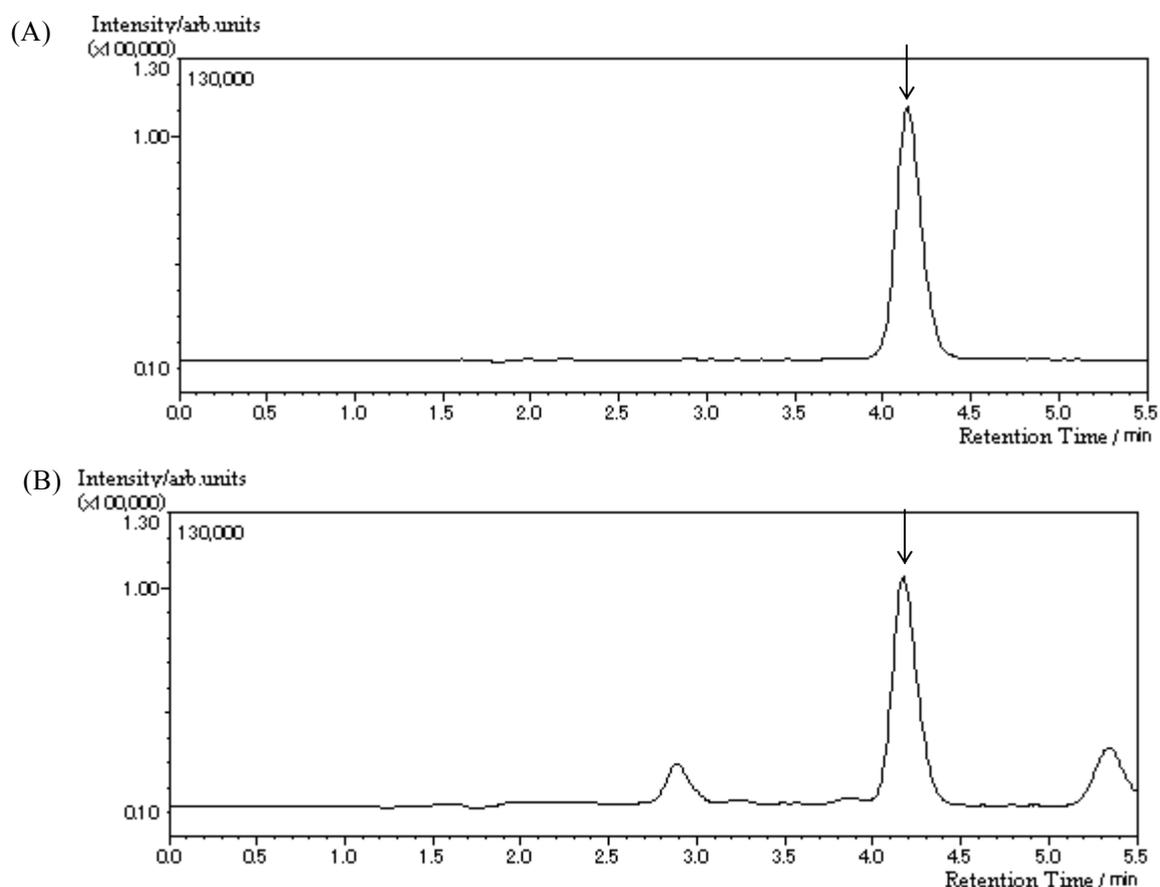


Fig. 5 SIM chromatograms of diuron

LC-MS conditions are shown in Table 3.

(A) Standard solution (The amount of diuron is 0.8 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for broiler finishing chick spiked diuron at 200 µg/kg

(Arrows indicate the peak of diuron.)

3.8 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、ブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、とうもろこし及び乾牧草（えん麦乾草）に、ジウロンをそれぞれ添加し、本法に従って分析を3点併行で実施し、得られたピークのSN比が10及び3となる濃度をそれぞれ求めた。

ブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしに、ジウロンとして0.005及び0.01 mg/kg相当量、乾牧草（えん麦乾草）に0.1及び0.2 mg/kg相当量を添加した試料について、本法に従って分析を3点併行で実施した結果、SN比が10となる濃度は、0.01 mg/kg（乾牧草では0.2 mg/kg）であり、本法の定量下限は0.01 mg/kg（乾牧草では0.2 mg/kg）であった。なお、その結果はTable 8のとおり、0.01 mg/kg相当量添加における平均回収率は93.3~95.0%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として6.2%以下であり、0.2 mg/kg相当量添加の乾牧草（えん麦乾草）については、平均回収率は90.0%，その繰返し精度はRSDとして5.6%であった。検出下限はSN比が3となる濃度から0.003 mg/kg（乾牧草では0.06 mg/kg）であった。

また、ライグラスわらにおいて、添加回収試験により m/z 235 のモニターイオンを用いて得られるピークのSN比を求めた。その結果、ピークのSN比が10となる濃度は0.2 mg/kgであり、本法の定量下限は0.2 mg/kgであった。なお、その結果はTable 8のとおり、平均回収率は95.0%，その繰返し精度はRSDとして3.1%であった。検出下限はSN比が3となる濃度から0.06 mg/kgであった。

Table 8 Recoveries and near level of limit of quantification of diuron

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for broiler finishing chick		Formula feed for beef cattle		Corn		Oats hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.2							90.0	5.6	95.0	3.1
0.1							86.7	29		
0.01	93.3	6.2	95.0	5.3	93.3	3.1				
0.005	90.0	19	76.7	20	100	10				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.9 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（種鶏飼育用配合飼料）及びとうもろこしにジウロンとして0.05 mg/kg相当量、乾牧草（えん麦乾草）にジウロンとして4 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、株式会社島津総合分析試験センター、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、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計7試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

その結果はTable 9のとおりであり、配合飼料では平均回収率は92.3%，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_I及びRSD_R）として4.7%及び12%であり、HorRat

は 0.53 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 86.9 %, 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 3.3 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.54 であった. 乾牧草では, 平均回収率は 91.0 %, 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 2.6 % 及び 8.3 % であり, HorRat は 0.63 であった.

参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 10 に示した.

Table 9 Collaborative study results of diuron

Lab. No.	Formula feed for breeding hen		Corn		Oats hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0460	0.0395	0.0385	0.0430	3.89	4.06
2	0.0509	0.0490	0.0489	0.0475	4.04	4.08
3	0.0426	0.0425	0.0370	0.0392	3.43	3.20
4	0.0516	0.0531	0.0472	0.0480	3.41	3.56
5	0.0453	0.0446	0.0452	0.0447	3.71	3.64
6	0.0389	0.0392	0.0363	0.0363	3.35	3.28
7	0.0492	0.0535	0.0489	0.0478	3.70	3.61
Spiked level (mg/kg)	0.050		0.050		4.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0461		0.0435		3.64	
Recovery ^{a)} (%)	92.3		86.9		91.0	
RSD_r ^{b)} (%)	4.7		3.3		2.6	
RSD_R ^{c)} (%)	12		12		8.3	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	22		22		13	
HorRat	0.53		0.54		0.63	

a) $n=14$

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.	Instrument	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
2	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	Shimadzu Shim-pack VP-ODS (2.0×150 mm, 5 μm)
4	Waters micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)
5	Agilent Technologies Agilent 1100 Series G1946A	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0×150 mm, 5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
7	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料中に残留しているジウロンについて、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たところ、次の結果を得た。

- 1) イオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)、モニターイオンとして、 m/z 233 ($^{35}\text{Cl}_2$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}_2^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) (ライグラスわらについては、 m/z 235 ($^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$)) を適用したところ良好な測定が可能であった。
- 2) 検量線はジウロンとして 0.02~8 ng の範囲で直線性を示した。
- 3) 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。
- 4) ゲル浸透クロマトグラフィーにおけるジウロンの溶出画分の検討を行ったところ、分取する溶出画分は 90~110 mL が適当と考えられた。
- 5) 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 25 mL であった。
- 6) 6 種類の配合飼料及び 9 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、ライグラスわらのみにおいて、ジウロンの定量を妨げるピークが認められた。そこで、ライグラスわらの測定において、モニターイオンを m/z 235 に変更したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 7) ジウロンとして、2 種類の配合飼料に 0.2 及び 0.02 mg/kg 相当量を、ライグラスわらを除く 2 種類の飼料原料に 4 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、84.8~97.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 6.9 %以下の成績が得られた。また、ライグラスわらに 2, 1 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加し、 m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果、平均回収率は 90.3~99.2 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD)

として 7.8 %以下の成績が得られた.

- 8) 本法によるジウロンの定量下限は, 試料中で 0.01 mg/kg (乾牧草では 0.2 mg/kg), 検出下限は 0.003 mg/kg (同 0.06 mg/kg) であり, ライグラスわらについて, m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果, 定量下限は, 試料中で 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.06 mg/kg であった.
- 9) 種鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにジウロンとして 0.05 mg/kg 相当量, えん麦乾草にジウロンとして 4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 7 試験室において, 本法による共同試験を実施した. その結果, 種鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 92.3 %, 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 4.7 %及び 12 %であり, HorRat は 0.53 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 86.9 %, 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 3.3 %及び 12 %であり, HorRat は 0.54 であった. えん麦乾草では, 平均回収率は 91.0 %, 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 2.6 %及び 8.3 %であり, HorRat は 0.63 であった.

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社島津総合分析試験センター, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編: “最新 農薬の残留分析法 [改訂版]”, 中央法規出版, 338 (2006).
- 2) 財団法人日本食品分析センター: 平成 17 年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業 (分析法の開発) 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2005).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: “食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安第 0124001 号 (2005).
- 4) 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, 110 (2007).
- 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).

2 飼料中のスピノサドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

牧野 大作^{*1}, 山田 美帆^{*2}, 佐野 好弘^{*2}

Determination of Spinosad in Feeds by LC-MS

Daisaku MAKINO^{*1}, Miho YAMADA^{*2} and Yoshihiro SANNO^{*2}

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

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

An analytical method for determination of spinosad in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) was developed. After addition of 50 mL of water, the sample was left standing for 30 minutes. Spinosad was extracted with 50 mL of acetonitrile. The extract was filtered and topped up to 200 mL with acetonitrile-water (1:1). 10 mL of sample solution (10 mL of 10 times diluted sample solution for grass hay except rice straw) was purified by Mega bond Elut CH with 10 mL of acetonitrile-triethylamine (49:1). After the elute was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile-water (9:1) and subjected to LC-ESI-MS for determination of spinosyn A and D. Spinosad were determined as sum total quantity of spinosyn A and D. The LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm (GL Sciences)) using acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (9:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A spike test was conducted with formula feed for layer, for growing cattle, corn, alfalfa hay and rice straw spiked with 0.10 and 0.010 mg/kg (1.0 and 0.10 mg/kg for alfalfa hay, 0.25 and 0.025 mg/kg for rice straw) of spinosyn A and D. The spike test resulted in recoveries ranging from 86.8 % to 106 % for spinosyn A and from 86.5 % to 100 % for spinosyn D, and in relative standard deviations (RSD) within 5.4 % and 6.5 % respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layer, rice straw and corn spiked with spinosyn A and D at 0.10 mg/kg (0.25 mg/kg for rice straw). The mean recovery of spinosyn A in the formula feed for layer was 96.3 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 2.7 %, 11 % and 0.49 respectively. These values were 90.1 %, 1.8 %, 8.5 % and 0.43 for rice straw, 93.2 %, 4.5 %, 9.2 % and 0.42 for corn respectively. The mean recovery of spinosyn D in the formula feed for layer was 95.2 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.6 %, 12 % and 0.52 respectively. These values were 92.8 %, 2.8 %, 10 % and 0.52 for rice straw, 93.2 %, 3.7 %, 14 % and 0.62 for corn respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 殺虫剤 insecticide ; スピノサド spinosad ; スピノシン A spinosyn A ; スピノシン D spinosyn D ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay ; 稲わら

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 同肥飼料安全検査部

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター

rice straw ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 共同試験 collaborative study

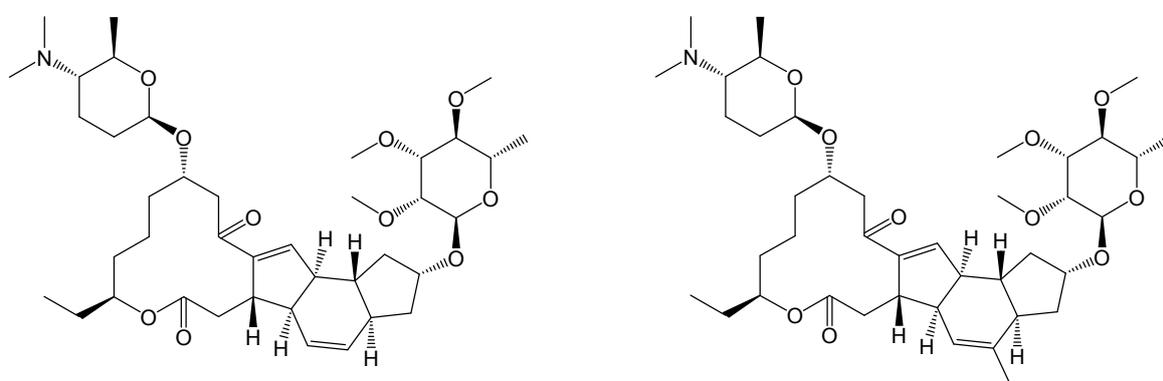
1 緒 言

スピノサドは 1985 年にダウ・エランコ社（現ダウ・アグロサイエンス社）が発見したスピノシン A 及び D からなる混合物を有効成分とするマクロライド系殺虫剤で、1999 年に国内で農薬登録されている。その作用機構は、ニコチン性アセチルコリン受容体を活性化することにより筋肉にけいれんを引き起こし、最終的に死に至らしめ¹⁾、抗菌活性はない。

わが国における飼料中のスピノサドの基準値²⁾は、稲わらで 0.5 ppm に設定されている。また、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、大麦等穀類で 0.02~1 ppm、綿実で 0.02 ppm 等となっており、諸外国の乾牧草の基準値は 5~30 ppm に設定されている。

定量法としては、国内では厚生労働省通知試験法³⁾があり、スピノシン A 及び D について個別に定量を行い、その和をスピノサドの定量値としている。この定量法を参考にして（財）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⁴⁾（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⁵⁾への適用の可否について検討したので報告する。

なお、スピノシン A 及び D の構造式を Fig. 1 に示した。



Spinosyn A

$C_{41}H_{65}NO_{10}$ MW: 732.0

CAS No.: 131929-60-7

Spinosyn D

$C_{42}H_{67}NO_{10}$ MW: 746.0

CAS No.: 131929-63-0

Fig. 1 Chemical structures of spinosyn A and D

2 実験方法

2.1 試 料

市販の配合飼料（成鶏飼育用及び若令牛育成用配合飼料）、とうもろこし、アルファルファ乾草及び稲わらをそれぞれ 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は、Table 1 のとおりである。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn
	Oil seed 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 growing cattle	Grains	56	Corn, Wheat flour
	Brans	21	Wheat bran
	Oil seed meal	11	Soybean meal
	Others	12	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Alfalfa hay, Molasses, Salt, Feed additives

2.2 試薬等

1) スピノシン A 標準原液

スピノシン A 標準品（林純薬工業製，純度 94.9 %）10 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スピノシン A 標準原液を調製した（この液 1 mL は，スピノシン A として 0.2 mg ($f = 0.949$) を含有する。）。

2) スピノシン D 標準原液

スピノシン D 標準品（林純薬工業製，純度 99.2 %）10 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スピノシン D 標準原液を調製した（この液 1 mL は，スピノシン D として 0.2 mg ($f = 0.992$) を含有する。）。

3) 混合標準液

使用に際して，スピノシン A 及び D 標準原液の一定量を混合した後，アセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し，1 mL 中にスピノシン A 及び D として 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1 μg を含有する各標準液を調製した。

4) アセトニトリルは，残留農薬試験用及び液体クロマトグラフ用を用いた。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質量分析計：

LC 部：島津製作所製 Prominence

MS 部：島津製作所製 LCMS-2010EV

2) 振とう機：宮本理研工業製 理研式小型シェーカー MW-DR 型

3) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型

4) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B

5) シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム：Varian 製 Mega Bond Elut CH（充てん剤量 1 g）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g (稲わらは 5 g を正確に) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加えて 30 分間静置後、更にアセトニトリル 50 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ニトリルー水 (1+1) 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ニトリルー水 (1+1) 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

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。

試料溶液 10 mL (稲わらを除く乾牧草では、更にアセトニトリルー水 (1+1) で正確に 10 倍希釈した後、その液 10 mL) 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。

更にアセトニトリル 10 mL を加えてミニカラムを洗浄した後、50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリルトリエチルアミン (49+1) 10 mL をミニカラムに加えてスピノシン A 及び D 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。

アセトニトリルー水 (9+1) 1 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。

3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 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。

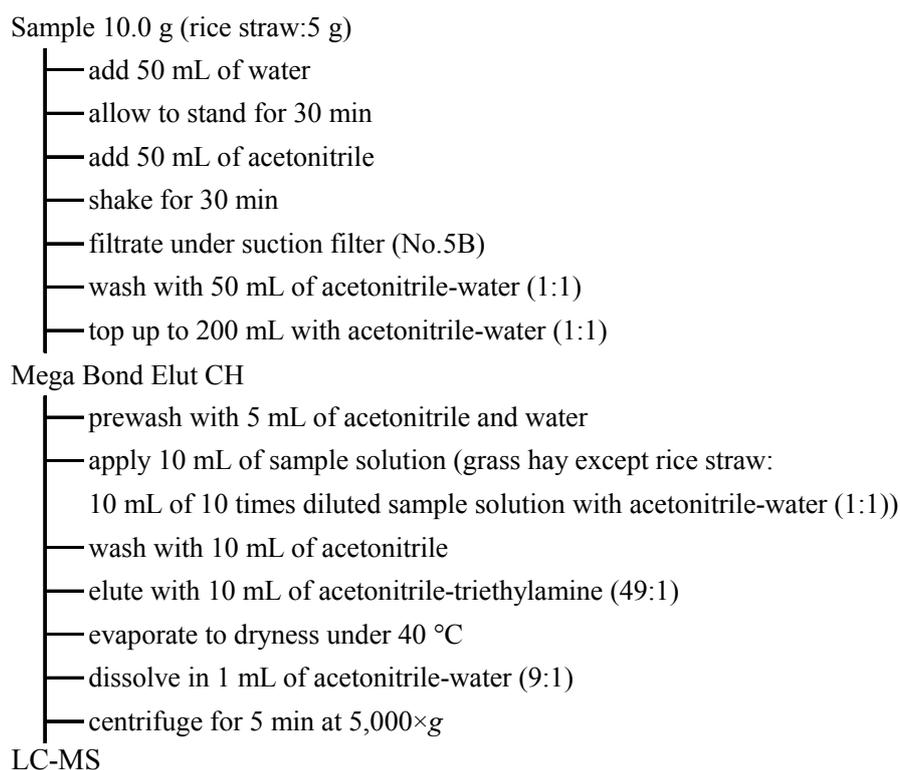
4) 計算

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、試料中のスピノシン A 及び D 量を算出し、その含量をスピノサド量とした。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS for analyzing spinosad

Column	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	Acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (9:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 732 (spinosyn A), <i>m/z</i> 746 (spinosyn D)



Scheme 1 Analytical procedure for spinosad in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

分析センター法⁴⁾ではスピノシン A 及び D のイオン化法として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ることから, 本法においても ESI 法を用いて検討を行った.

スピノシン A 及び D 各標準液について, 本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ, Fig. 2 に示したように, 各マススペクトルが得られた.

このマススペクトルにおいて基準ピークは, スピノシン A 及び D で m/z 732 及び 746 (プロトン付加分子 $[M+H]^+$) であった.

よって, これらをモニターイオンとして採用することにした.

また, 確認イオンとして使用できるようなフラグメントイオンは測定されなかった.

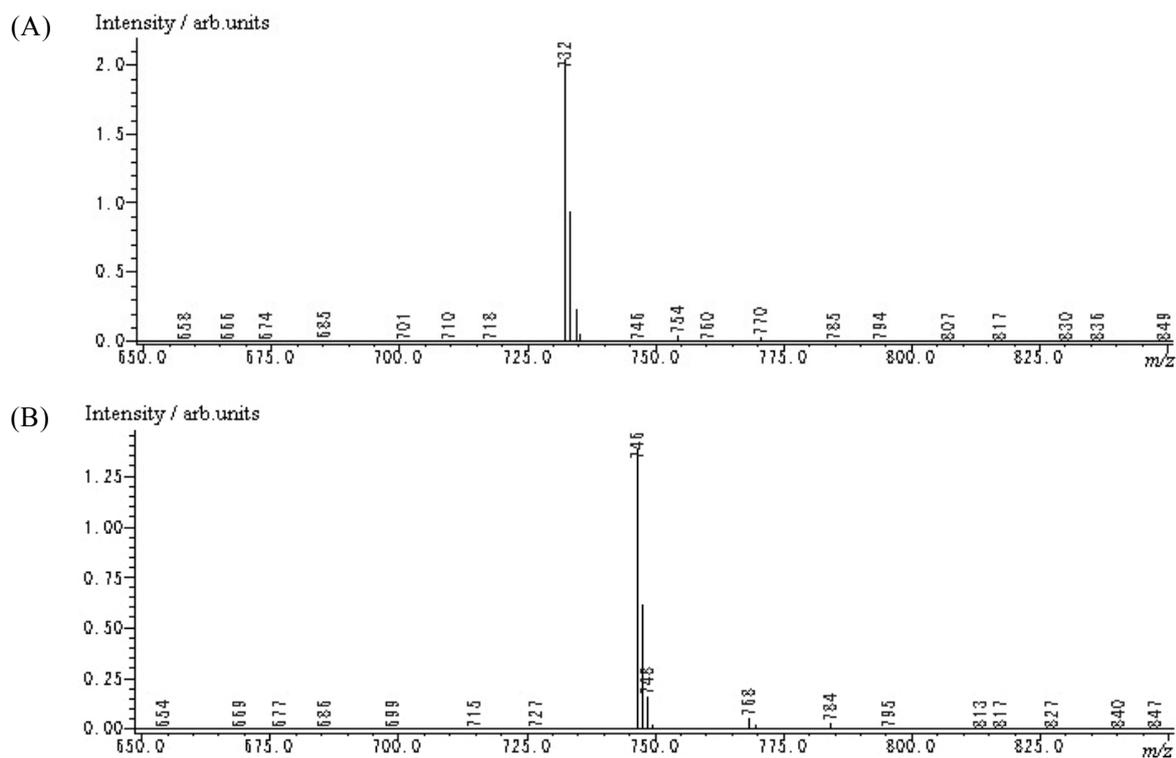


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution

(A) Spinosyn A (B) Spinosyn D

3.2 液体クロマトグラフ条件の検討

スピノシン A 及び D 各標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入することにより、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⁴⁾では、溶離液としてアセトニトリル-2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) を使用している。ここで、酢酸アンモニウム溶液の濃度について 2, 5 及び 10 mmol/L を検討したところ、酢酸アンモニウム溶液濃度が 2 mmol/L よりも 5 mmol/L 又は 10 mmol/L を用いた方が感度は良好であり、5 mmol/L と 10 mmol/L とでは特に感度に差異は無かった。このことから、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、溶離液としてアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) を採用した。

3.3 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した標準液各 5 μ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた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 及び 4 のとおり、検量線はスピノシン A 及び D として 1~1,000 ng/mL (注入量として 0.005~5 ng) の範囲で直線性を示した。

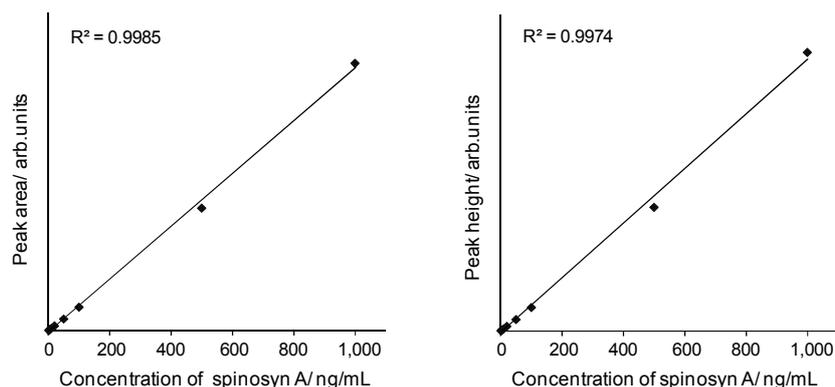


Fig. 3 Calibration curves of spinosyn A by peak area(left) and peak height(right)

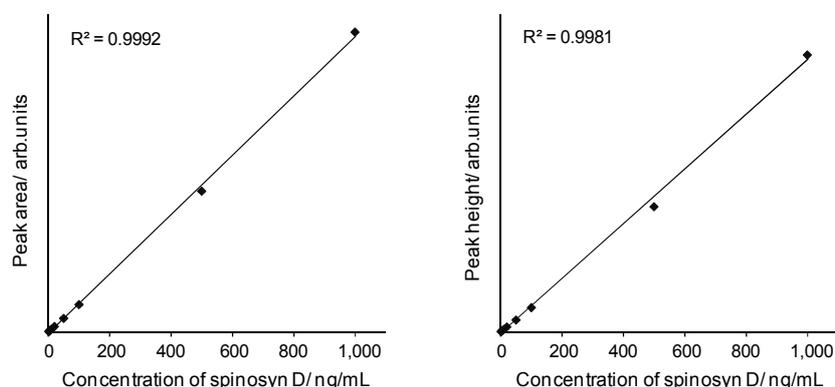


Fig. 4 Calibration curves of spinosyn D by peak area(left) and peak height(right)

3.4 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の検討

スピノシン A 及び D について、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1)に従って成鶏飼育用配合飼料から抽出した抽出液 10 mL に対して、スピノシン A 及び D として 80 ng 相当量添加し、2.4 の 2)に従ってミニカラム処理を行った。

ミニカラムからの各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取し、これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリル-水 (9+1) 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た。

その結果、Table 3 のとおり、スピノシン A 及び D は、アセトニトリル-トリエチルアミン (49+1) 0~10 mL に溶出し、それ以外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⁴⁾と同様にアセトニトリル-トリエチルアミン (49+1) 10 mL で溶出することとした。

Table 3 Elution pattern from mini column

	Acetonitrile-water (1+1)	Acetonitrile 0~10 mL	Acetonitrile-triethylamine (49+1)		Total
	0~10 mL		0~10 mL	~15 mL	
Recovery of spinosyn A (%)	0	0	98	0	98
Recovery of spinosyn D (%)	0	0	98	0	98

3.5 妨害物質の検討

市販の配合飼料（成鶏飼育用，ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用，若令牛育成用及び肉用牛肥育用），とうもろこし，大麦，大豆油かす及び乾牧草（スーダングラス乾草，アルファルファ乾草及び稲わら）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. 5 に示した。

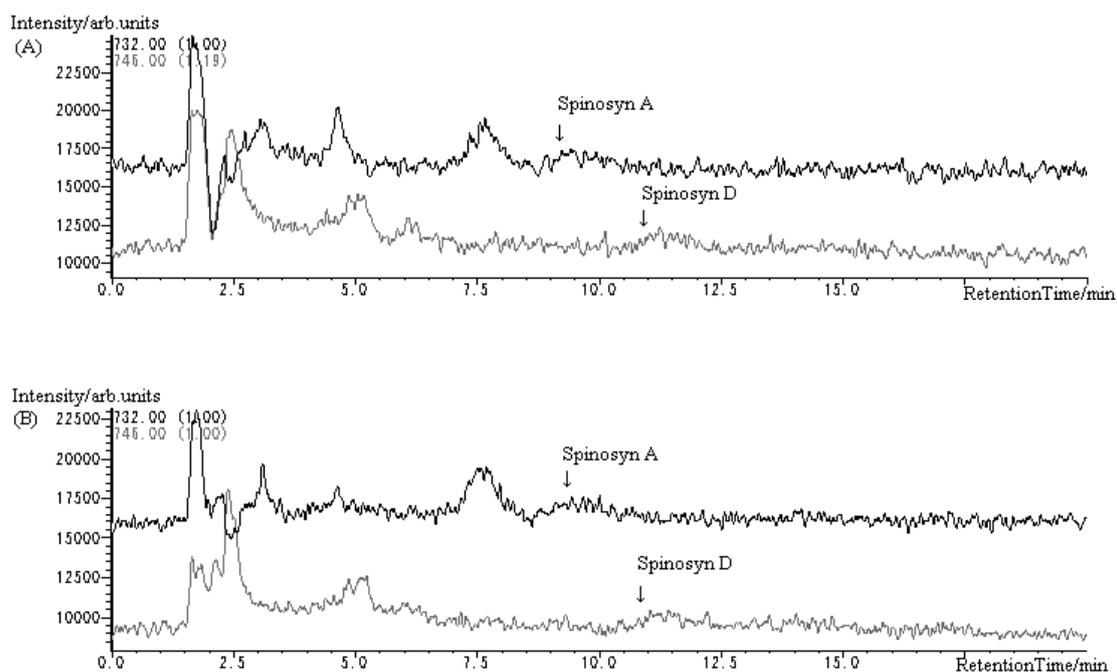


Fig. 5 SIM chromatograms of blank solutions

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

(B) Sample solution of alfalfa hay (not spiked)

(Arrows indicate the retention time of spinosyn A and D)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した成鶏飼育用配合飼料，若令牛育成用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及び D として 0.10 及び 0.010 mg/kg 相当量，アルファルファ乾草に 1.0 及び 0.10 mg/kg 相当量，稲わらに 0.25 及び 0.025 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は，Table 4 及び 5 のとおり，スピノシン A については平均回収率 86.8~106 %，その繰返し精度は，相対標準偏差（RSD）として 5.4 %以下，スピノシン D については平均回収率 86.5~100 %，その繰返し精度は，RSD として 6.5 %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. 6 に示した。

Table 4 Recoveries of spinosyn A from five kinds of feed

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for layer		Formula feed for growing cattle		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
1.0							91.6	1.0		
0.25									98.2	2.6
0.10	106	1.6	93.4	2.4	95.8	1.2	96.8	4.2		
0.025									86.8	0.9
0.010	91.7	5.4	92.9	0.3	101	2.2				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recoveries of spinosyn D from five kinds of feed

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for layer		Formula feed for growing cattle		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
1.0							89.2	1.6		
0.25									100	2.0
0.10	99.6	4.3	94.7	2.9	98.0	1.7	91.9	6.5		
0.025									86.5	4.0
0.010	90.1	2.4	95.2	4.8	98.9	1.4				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

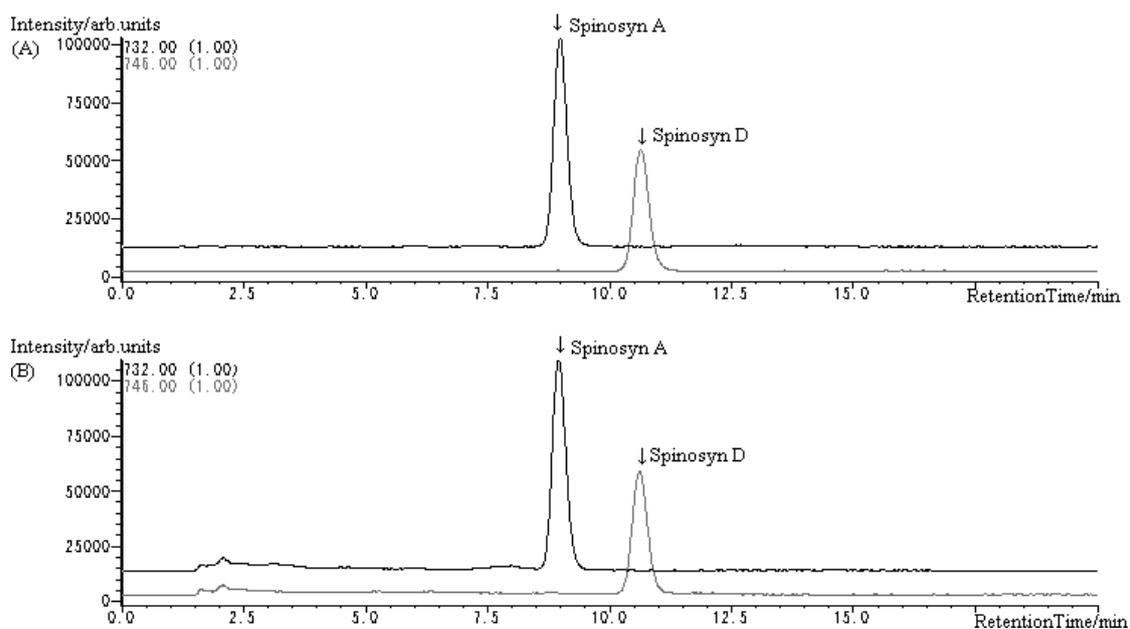


Fig. 6 SIM chromatograms of spinosyn A and D

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Standard solution of spinosyn A and D (The amount was each 0.25 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer spiked at each 0.10 mg/kg

(Arrows indicate the peak of spinosyn A and D)

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、スピノシン A 及び D をそれぞれ添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度をそれぞれ求めた。

その結果、スピノシン A においては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.0025 mg/kg（乾牧草では 0.025 mg/kg、稲わらでは 0.0050 mg/kg）であった。また、スピノシン D においては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.0050 mg/kg（乾牧草では 0.050 mg/kg、稲わらでは 0.010 mg/kg）であった。

確認のため、スピノシン A として、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、それぞれ 0.0025、0.025 及び 0.0050 mg/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結果は Table 6 のとおりであり、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらにおいて、平均回収率は 95.2、102 及び 89.9 %、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 2.6、4.8 及び 1.4 %であった。

また、スピノシン D として、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、それぞれ 0.0050、0.050 及び 0.010 mg/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結果は Table 7 のとおりであり、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらにおいて、平均回収率は 88.7、90.8 及び 84.1 %、その繰返し精度は RSD として 4.4、6.1 及び 0.2 %であった。

以上の結果から、スピノシン A では、本法の定量下限は 0.0025 mg/kg（乾牧草では 0.025 mg/kg、稲わらでは 0.0050 mg/kg）であった。また、検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.001

mg/kg（乾牧草では 0.008 mg/kg，稲わらでは 0.002 mg/kg）であった。

また，スピノシン D では，本法の定量下限は 0.0050 mg/kg（乾牧草では 0.050 mg/kg，稲わらでは 0.010 mg/kg）であった。また，検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.002 mg/kg（乾牧草では 0.02 mg/kg，稲わらでは 0.003 mg/kg）であった。

Table 6 Recoveries and limit of quantification of spinosyn A in feeds

Spiked level (mg/kg)	Feed types					
	Formula feed for layer		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.025			102	4.8		
0.0050					89.9	1.4
0.0025	95.2	2.6				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries and limit of quantification of spinosyn D in feeds

Spiked level (mg/kg)	Feed types					
	Formula feed for layer		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.050			90.8	6.1		
0.010					84.1	0.2
0.0050	88.7	4.4				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため，成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.10 mg/kg 相当量，稲わらにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，株式会社島津総合分析試験センター，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，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（8 試験室）において，本法に従って共同試験を実施した。

その結果，Table 8 のとおり，スピノシン A について，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 96.3 %，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_F 及び RSD_R）として 2.7 % 及び 11 % であり，HorRat は 0.49 であった。稲わらでは，平均回収率は 90.1 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.8 % 及び 8.5 % であり，HorRat は 0.43 であった。とうもろこしでは，平均回収率は 93.2 %，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 4.5 % 及び 9.2 % であり, HorRat は 0.42 であった.

また, Table 9 のとおり, スピノシン D について, 成鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 95.2 %, 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 3.6 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.52 であった. 稲わらでは, 平均回収率は 92.8 %, 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 2.8 % 及び 10 % であり, HorRat は 0.52 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, 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 3.7 % 及び 14 % であり, HorRat は 0.62 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質量分析計の機種等を Table 10 に示した.

Table 8 Collaborative study for spinosyn A

Lab.No.	Formula feed for layer		Rice straw		Corn	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.107	0.107	0.250	0.249	0.0956	0.0971
2	0.0971	0.0990	0.233	0.235	0.0971	0.0909
3	0.109	0.110	0.247	0.241	0.100	0.103
4	0.0923	0.0922	0.222	0.229	0.0918	0.0956
5	0.0905	0.0939	0.200	0.190	0.0817	0.0713
6	0.0754	0.0813	0.237	0.229	0.102	0.0984
7	0.106	0.100	0.206	0.202	0.0911	0.101
8	0.0875	0.0918	0.215	0.217	0.0880	0.0871
Spiked level (mg/kg)	0.10		0.25		0.10	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0963		0.225		0.0932	
Recovery ^{a)} (%)	96.3		90.1		93.2	
RSD_r ^{b)} (%)	2.7		1.8		4.5	
RSD_R ^{c)} (%)	11		8.5		9.2	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		22	
HorRat	0.49		0.43		0.42	

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 9 Collaborative study for spinosyn D

Lab.No.	Formula feed		Rice straw		Corn	
	for layer (mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.103	0.101	0.256	0.252	0.100	0.0979
2	0.104	0.108	0.244	0.237	0.102	0.0970
3	0.109	0.110	0.246	0.247	0.101	0.103
4	0.0992	0.0958	0.230	0.229	0.0951	0.0956
5	0.0897	0.0934	0.194	0.190	0.0784	0.0751
6	0.0814	0.0922	0.251	0.274	0.115	0.103
7	0.0797	0.0745	0.220	0.216	0.0721	0.0745
8	0.0918	0.0909	0.217	0.210	0.0904	0.0912
Spiked level (mg/kg)	0.10		0.25		0.10	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0952		0.232		0.0932	
Recovery ^{a)} (%)	95.2		92.8		93.2	
RSD _r ^{b)} (%)	3.6		2.8		3.7	
RSD _R ^{c)} (%)	12		10		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		22	
HorRat	0.52		0.52		0.62	

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 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instrument	LC column
		(i.d. × length, particle size)
1	SHIMADZU	GL Sciences Inertsil ODS-3
	LCMS-2010EV	(2.1×150 mm, 5 μm)
2	Waters	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18
	micromass Quattro Micro	(2.1×150 mm, 3.5 μm)
3	SHIMADZU	GL Sciences Inertsil ODS-3
	LCMS-2010EV	(2.1×150 mm, 5 μm)
4	Waters	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18
	ACQUITY TQ Detector	(2.1×150 mm, 5 μm)
5	SHIMADZU	GL Sciences Inertsil ODS-3
	LCMS-2010EV	(2.1×150 mm, 5 μm)
6	SHIMADZU	GL Sciences Inertsil ODS-3
	LCMS-2010EV	(2.1×150 mm, 5 μm)
7	SHIMADZU	SHIMADZU Shim-pack VP-ODS
	LCMS-2010EV	(2.0×150 mm, 5 μm)
8	Agilent Technologies	GL Sciences Inertsil ODS-3
	G1946C	(2.1×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料中のスピノサドについて、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たところ、次の結果を得た。

- 1) イオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード) , モニターイオンとして、スピノシン A 及び D についてそれぞれ m/z 732 及び 746 (すべてプロトン付加分子 $[M+H]^+$) を適用したところ良好な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アセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) , カラムに Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μm) を適用したところ良好な測定が可能であった。
- 3) 検量線はスピノシン A 及び D として 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 4) シクロヘキシルシリル化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 10 mL であった。
- 5) 5 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、スピノシン A 及び D の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料, 若令牛育成用配合飼料, とうもろこし, アルファルファ乾草及び稲わらにスピノシン A 及び D として 0.10 及び 0.010 mg/kg 相当量 (アルファルファ乾草については 1.0 及び 0.10 mg/kg 相当量, 稲わらについては 0.25 及び 0.025 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, スピノシン A については平均回収率 86.8~106 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 5.4 %以下, スピノシン D については平均回収率 86.5~100 %, その繰返し精度は, RSD として 6.5 %以下の成績が得られた。
- 7) 本法によるスピノシン A の定量下限は試料中で 0.0025 mg/kg (乾牧草では 0.025 mg/kg, 稲わらでは 0.0050 mg/kg) , 検出下限は 0.001 mg/kg (乾牧草では 0.008 mg/kg, 稲わらでは 0.002 mg/kg) であった。

また, スピノシン D の定量下限は試料中で 0.0050 mg/kg (乾牧草では 0.050 mg/kg, 稲わらでは 0.010 mg/kg) , 検出下限は 0.002 mg/kg (乾牧草では 0.02 mg/kg, 稲わらでは 0.003 mg/kg) であった。

- 8) 成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.10 mg/kg 相当量, 稲わらにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 8 試験室において, 本法による共同試験を実施した。その結果, スピノシン A について, 成鶏飼育用配合飼料では, 平均回収率は 96.3 %, 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_f 及び RSD_R) として 2.7 %及び 11 %であり, HorRat は 0.49 であった。稲わらでは, 平均回収率は 90.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.8 %及び 8.5 %であり, HorRat は 0.43 であった。とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 4.5 %及び 9.2 %であり, HorRat は 0.42 であった。スピノシン D について, 成鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 95.2 %, 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_f 及び RSD_R) として 3.6 %及び 12 %であり, HorRat は 0.52 であった。稲わらでは, 平均回収率は 92.8 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.8 %及び 10 %であり, HorRat は 0.52 であった。とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室

内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 3.7 %及び 14 %であり、HorRat は 0.62 であった。

謝 辞

共同試験に参加して頂いた JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，株式会社島津総合分析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 第 54 回農薬専門調査会幹事会：スピノサド農薬評価書（案），平成 21 年 8 月 21 日 (2009).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：“食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 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，97 (2007).
- 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).

3 飼料中のクリスタルバイオレット及びメチレンブルーの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

高橋 亜紀子*

Determination of Crystal violet and Methylene blue in Feeds by LC-MS/MS

Akiko TAKAHASHI*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method for determination of crystal violet and methylene blue in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. After addition of 5 mL of mixed internal standard solution (crystal violet- d_4 and methylene blue- d_6) and 20 mL of acidic buffer, the sample was left standing for 30 minutes. Crystal violet and methylene blue were extracted with 100 mL of acetonitrile. The extract was filtered and topped up to 200 mL with acetonitrile. 4 mL of sample solution was mixed with 40 mL of water and 5 mL of phosphoric acid buffer, the sample solution adjust to pH 7 with 1 mol/L sodium hydroxide. The sample solution was purified by weak acidic cation-exchange mini column (Varian, Bond Elut CBA) with 10 mL of methanol-hydrochloric acid (1,000:1). After the elute was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile-water (1:1) and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of crystal violet and methylene blue. The LC separation was carried out on an ODS column, (Shiseido, CAPCELLPAK C18 AQ, 2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μ m), and acetonitrile-5 mmol/L heptafluorobutyric acid solution was used as a mobile phase. The determination was performed in a selected reaction monitoring (SRM) mode. A spike test was conducted with there kinds of formula feed and fish meal spiked with 10 and 100 μ g/kg of crystal violet and methylene blue. The spike test resulted in recoveries ranging from 98.6 % to 112 % of crystal violet and from 97.2 % to 110 % of methylene blue, and in relative standard deviations (RSD) within 7.6 % and 7.4 % respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layer, formula feed for red sea bream and fish meal spiked with crystal violet and methylene blue at 20 μ g/kg, 40 μ g/kg and 80 μ g/kg respectively. The mean recovery of crystal violet in the formula feed for layer was 94.5 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.4 %, 7.5 % and 0.34 respectively. These values were 101 %, 2.1 %, 3.1 % and 0.14 for the formula feed for red sea bream, 99.1 %, 0.83 %, 3.2 % and 0.15 for fish meal respectively. The mean recovery of methylene blue, in the formula feed for layer was 83.5 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 2.2 %, 13 % and 0.59 respectively. These values were 93.3 %, 2.6 %, 15 % and 0.70 for the formula feed for red sea bream, 97.7 %, 2.9 %, 14 % and 0.62 for fish meal respectively.

* 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 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

Key words: クリスタルバイオレット crystal violet ; メチレンブルー methylene blue ; 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; 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) ; 飼料 feed ; 魚粉 fish meal

1 緒 言

クリスタルバイオレット（以下「CV」という。）は塩基性色素のトリフェニルメタン染料の一種で、木材、繊維、紙等の染色に使用されている。魚に対し、抗菌剤や寄生虫の予防や治療目的にも使われるが、現在、わが国では、動物用医薬品として承認はされていない。

メチレンブルー（以下「MB」という。）は塩基性色素のチアジン染料の一種であり、細菌の染色や指示薬としても使用されている。魚に対して水カビ病、カラムナリス症、ワタカブリ病、白点病などの予防や治療に用いられており、わが国においても観賞魚用の動物用医薬品として承認されている。MB は、耐光性の低い色素であり、市販の観賞魚用の動物用医薬品でも、暗所保管や直射日光をさけて使用するとされている。

CV 及び MB 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¹⁾では飼料に含んではならないこととされている。近年、未承認の水産用動物用医薬品が輸入水畜産物に残留する事例が多く報告されており²⁾、例えば EU のモニタリングにおいて、インドネシア産、タイ産、ジャマイカ産及び中国産の魚介類から CV が検出されたことが報告されている²⁾。また、米国のモニタリングの結果では、ナマズ及びエビからの CV の検出が報告されている²⁾。このため、飼料用として輸入される魚粉に CV が残留することが懸念されている。

食品等からの CV 及び MB の分析法としては、厚生労働省通知試験法としてクリスタルバイオレット、ブリリアントグリーン及びメチレンブルー試験法が規定されている³⁾。

飼料からの分析法としては、厚生労働省通知試験法を参考として、(財)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、CV 及び MB の液体クロマトグラフ質量分析計及び液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で測定する分析法（以下「分析センター法」という。）を開発した⁴⁾。

今回、この分析センター法を基に、飼料分析基準⁵⁾への適応の可否について検討したので報告する。

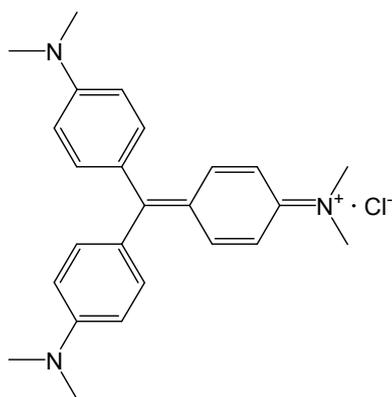
なお、CV 及び MB の構造式を Fig. 1 に示した。

2 実験方法

2.1 試 料

成鶏飼育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、まだい育成用配合飼料及び魚粉をそれぞれ 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。

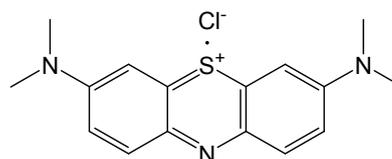


Crystal violet (CV)

((4-Bis(*p*-(dimethylamino)phenyl)methylene)-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)dimethylammonium chloride

C₂₅H₃₀ClN₃ MW: 408.0

CAS No.: 548-62-9



Methylene blue (MB)

3,7-Bis(dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride

C₁₆H₁₈ClN₃S MW: 319.9

CAS No.: 61-73-4

Fig. 1 Chemical structures of crystal violet (CV) and methylene blue (MB)

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn, Milo
	Oil seed meal	26	Soybean meal, Corn gluten meal
	Brans	2	Rice bran
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extracts, Silicic acid, Bacillus subtilis, Enzyme processed copra meal, Fermented milk powder, Feed additives
For growing pig	Grains	68	Corn, Milo, Cassava
	Oil seed meal	19	Soybean meal, Rapeseed meal
	Brans	5	Rice meal, Distiller's dried grains with solubles
	Others	8	Bakery waste, Calcium carbonate, Molasses, Salt, Calcium phosphate, Wakame powder, Feed additives
For red sea bream	Animal by-products	60	Fish meal
	Grains	16	Wheat flour
	Oil seed meal	12.5	Soybean meal
	Brans	2	Rice bran
	Others	9.5	Fish oil, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Feed yeast, Seaweed powder, Licorice powder, Marigold, Bread yeast, Dextrin, Feed additives

2.2 試薬

1) CV 標準原液

CV [C₂₅H₃₀ClN₃] (Riedel-de Haën 製, 純度 89 %) 11.3 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 CV 標準原液を調製した（この液 1 mL は、CV として 100 μg ($f=1.006$) を含有する。）。

2) MB 標準原液

MB [$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$]（林純薬工業製，純度 97.2 %）10.2 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 MB 標準原液を調製した（この液 1 mL は、MB として 100 μg ($f=0.991$) を含有する。）。

3) 安定同位体元素標識 CV (CV-d₄) 内標準原液

CV-d₄ 標準品 [$\text{C}_{25}\text{D}_4\text{H}_{26}\text{ClN}_3$]（林純薬工業製，純度 97.9 %）5 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 CV-d₄ 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、CV-d₄ として 100 μg ($f=0.979$) を含有する。）。

4) 安定同位体元素標識 MB (MB-d₆) 内標準原液

MB-d₆ 標準品 [$\text{C}_{16}\text{D}_6\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{S}$]（林純薬工業製，純度 98.5 %）5 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 MB-d₆ 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、MB-d₆ として 100 μg ($f=0.985$) を含有する。）。

5) 混合内標準液

CV-d₄ 及び MB-d₆ 各内標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を標線まで加えて、1 mL 中に CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 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、CV 及び MB 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 CV 及び MB としてそれぞれ 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15 ng を含有し、かつ CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 50 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した。

7) メタノール、アセトニトリルは残留農薬試験用試薬を用いた。ヘプタフルオロ酪酸は、IPC-PFFA-4（東京化成工業製，0.5 mol/L 水溶液）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。

8) クエン酸-リン酸緩衝液

クエン酸一水和物 63.0 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液に、リン酸三ナトリウム・12水 228 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液 110 mL 程度を加えて pH を 3.0 に調整した。

9) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 2.71 g を水に溶かして 1,000 mL とし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7.0 に調整した。

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 部：Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部：Agilent Technologies 製 Agilent 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) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

4) 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム：Varian 製 Mega Bond Elut CBA（充てん剤量 1,000 mg）

2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の三角フラスコに入れ、混合内標準液 5 mL 及びクエン酸-リン酸緩衝液 20 mL を加えて 30 分間静置した。更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分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ニトリル 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同溶媒を加えた。この液 4 mL を 100 mL の三角フラスコに正確に入れ、水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加えた後、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で pH を 7 に調整し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

弱酸性陽イオン交換ミニカラムをメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した（吸引マニホールドを使用した。以下同様。）。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三角フラスコをメタノール 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えて同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-塩酸（1,000+1）10 mL をミニカラムに加えて CV, MB, CV-d₄ 及び MB-d₆ 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、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水（1+1）2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ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

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 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 2 及び Table 3 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 of LC-MS/MS for analyzing CV and MB

Column	Shiseido, CAPCELLPAK C18 (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	5 mmol/L heptafluorobutyric acid solution-acetonitrile (3:1)→5 min→(9:11) (5 min)→0.01 min→(1:9)(6 min)→0.01min→(3:1)(14 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (340 kPa)
Drying gas temperature	N ₂ (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

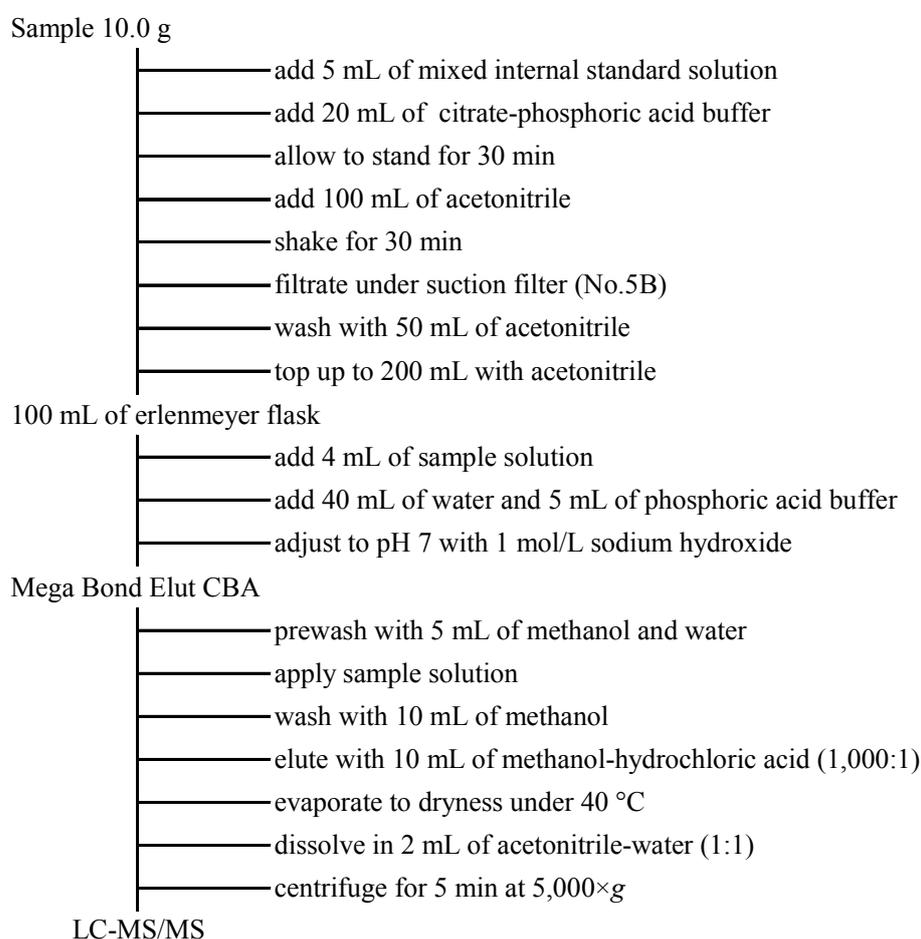
Table 3 MS/MS Parameters

Substance	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision (eV)
CV	372	356	340	100	45
CV-d ₄	376	360		100	45
MB	284	268	240	100	40
MB-d ₆	290	274		100	40

4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから CV, MB, CV-d₄ 及び MB-d₆ 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 CV 量及び MB 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 CV and MB in feeds

3 結果及び考察

3.1 タンデム型質量分析計条件の検討

分析センター法⁴⁾では、魚粉中の MB を測定する際には妨害物質の影響を受けるため、LC-MS/MS により測定を行い、CV 及びその他の飼料中の MB を測定する際には、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により測定する方法として検討された。

そこで、魚粉について 2.4 に示した方法に従って調製した試料溶液を LC-MS で測定したところ、Fig. 2 のとおり、CV 及び MB の溶出時間付近に妨害ピークが認められた。そのため、LC-MS での測定は困難であると判断し、より選択性の高い LC-MS/MS での測定条件を検討した。

CV, MB, CV-d₄ 及び MB-d₆ の各標準液について、本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ、Fig. 3 の MS/MS スペクトルが得られた。この結果から、CV, MB, CV-d₄ 及び MB-d₆ の各定量イオンとして、それぞれ m/z 356, m/z 268, m/z 360 及び m/z 274 を採用し、CV 及び MB の各確認イオンとしてそれぞれ m/z 340 及び m/z 240 を採用した。

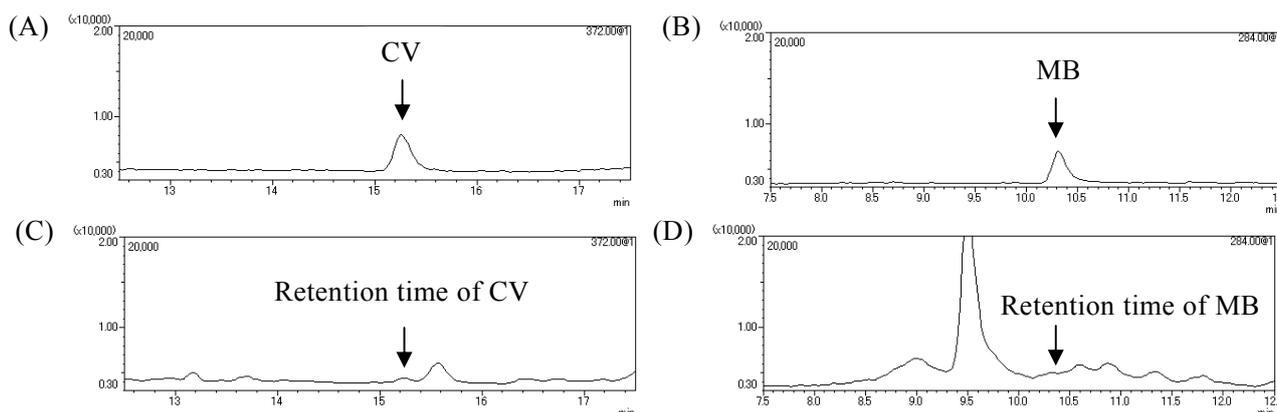


Fig. 2 SIM chromatograms by LC-MS (CV; m/z 372, MB; m/z 284)

(A) Standard solution of CV (0.5 ng/mL)

(B) Standard solution of MB (0.5 ng/mL)

(C) Fish meal (not spiked)

(D) Fish meal (not spiked)

(Arrows indicate the retention time of CV and MB)

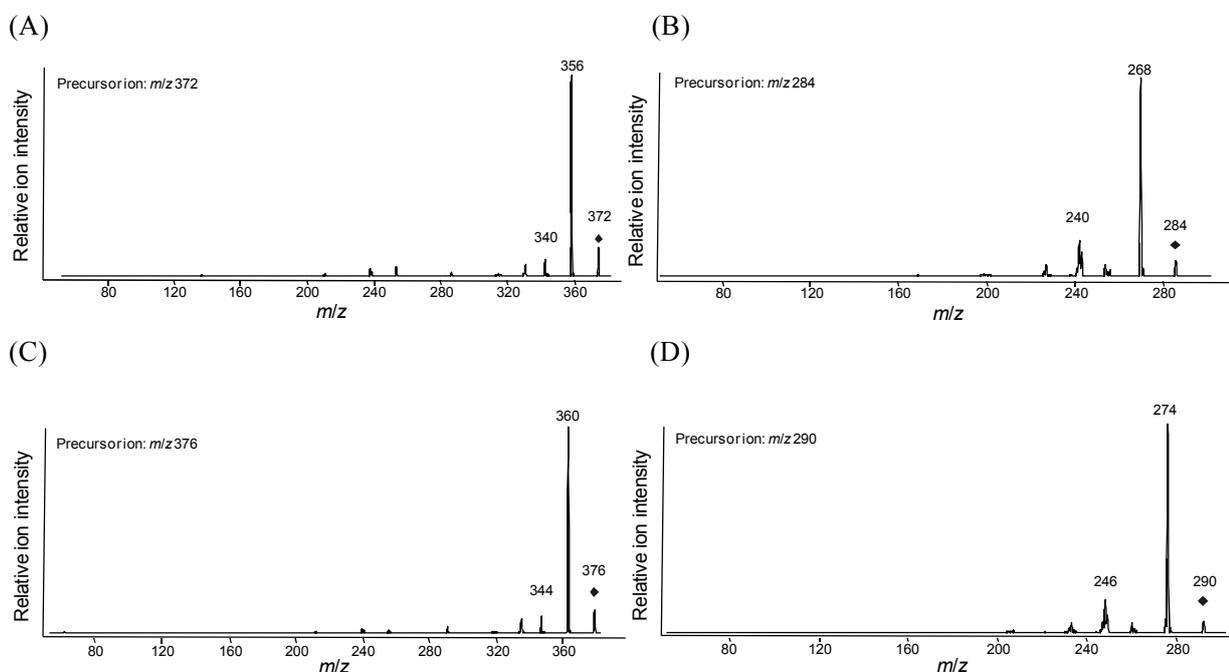


Fig. 3 MS/MS spectrum of mixed standard solution

(A) CV, (B) MB, (C) CV-d₄, (D) MB-d₆

3.2 検量線の作成

CV 及び MB として 1 mL 中に 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15 ng を含有する各混合標準液を調製し, これらの液各 10 μ 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 CV 及び MB のピーク面積を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は Fig. 4 のとおり, CV 及び MB として 0.25~15 ng/mL (注入量として 2.5~150 pg) の範囲で直線性を示した.

2.2 の 6) で調製した各検量線作成用標準液各 10 μ 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 CV と CV-d₄ 及び MB と MB-d₆ の各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. 4 のとおり, CV 及び MB の絶対検量線と同範囲で直線性を示した.

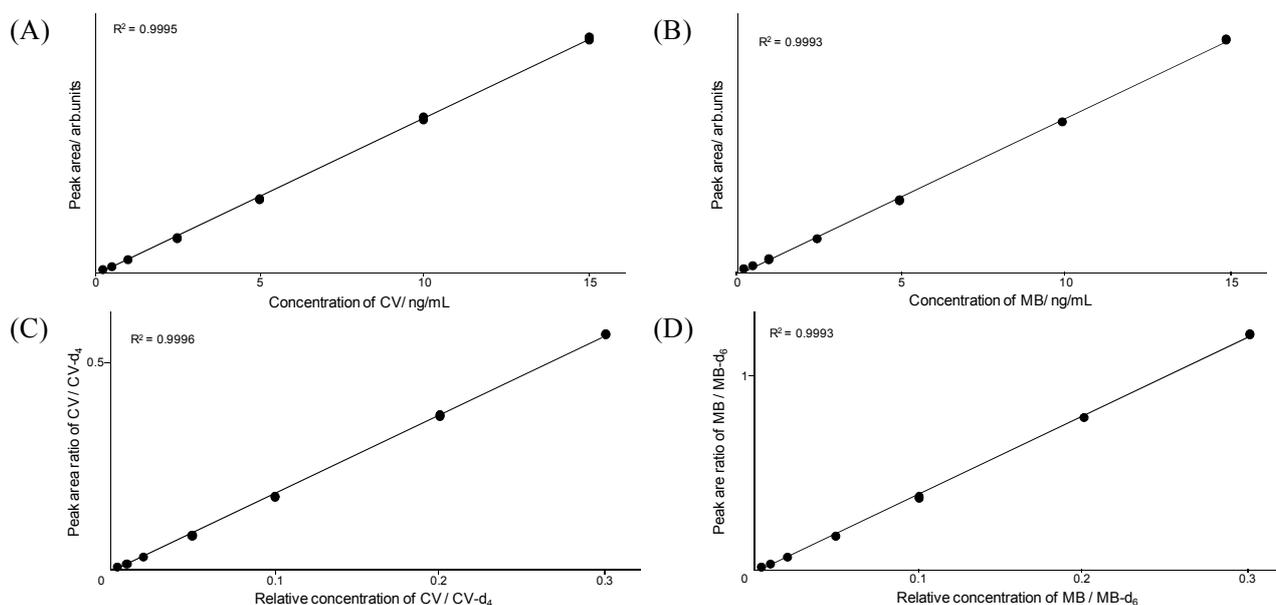


Fig. 4 Calibration curves of CV and MB

- (A) CV (absolute calibration method), (B) MB (absolute calibration method)
 (C) CV (internal standard method), (D) MB (internal standard method)

3.3 遮光条件の検討

MB は, 耐光性の低い色素であるため, 遮光条件の必要性について検討を行った. 成鶏飼育用配合飼料, 肉豚肥育用配合飼料, まだい育成用配合飼料及び国産魚粉について, 昼光の入る試験室において蛍光灯を点けた場合と, 昼光の入らない試験室において紫外線を除去した照明を点けた場合で本法に従い定量を行い, 内標準物質の回収率を求めた. その結果は, Table 4 のとおりであり, 遮光した状態の方が, 全ての試料で内標準物質の回収率が高くなった. また, MB-d₆ は遮光しない状態での回収率が 40 %を下回っているため, 本法の定量操作は遮光した状態で行うこととした.

Table 4 Recoveries of CV-d₄ and MB-d₆ under shading or not-shading conditions

Matrix	Internal standard name			
	CV-d ₄		MB-d ₆	
	Not-shading ^{a)}	Shading ^{b)}	Not-shading ^{a)}	Shading ^{b)}
	Recovery ^{c)} (%)	Recovery ^{c)} (%)	Recovery ^{c)} (%)	Recovery ^{c)} (%)
Formula feed for layer	89.1	97.6	34.6	74.4
Formula feed for growing pig	90.7	96.3	38.8	61.7
Formula feed for red sea bream	82.9	90.6	11.2	48.6
Fish meal (domestic)	76.7	90.3	22.8	50.9

a) Under the fluorescent lighting in a laboratory with window that daylight enters

b) Under the lighting that removes ultraviolet rays in a laboratory with window that daylight doesn't enter

c) Mean($n=3$)

3.4 弱酸性陽イオン交換体ミニカラムの溶出画分の検討

成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉を用いて、それぞれ 2.4 の 1)により抽出を行い、各抽出液中の濃度が CV 及び MB として各 5 ng/mL 相当量となるように各標準液を添加した。この液 4 mL に水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加え、弱酸性陽イオン交換ミニカラムに負荷し、洗浄液であるメタノールとミニカラムからの溶出液であるメタノール-塩酸 (1,000+1) の各溶出画分を確認した。その結果、Table 5 のとおり CV, MB, CV-d₄ 及び MB-d₆ は、分析センター法⁴⁾と同様メタノールによる洗浄画分には流出せず、メタノール-塩酸 (1,000+1) 10 mL で良好に溶出された。

Table 5 Elution pattern from weak-acid cation exchange mini column

Matrix	Methanol 10 mL	Methanol-hydrochloric acid (1,000:1)		Total
		0~10 mL	10~20 mL	
Recovery ^{a)} of CV (%)	0	105	0	105
Formula feed for layer				
Recovery ^{a)} of CV-d ₄ (%)	0	105	0	105
Recovery ^{a)} of MB (%)	0	92	1	93
Recovery ^{a)} of MB-d ₆ (%)	0	92	1	93
Fish meal (domestic)				
Recovery ^{a)} of CV (%)	0	106	0	106
Recovery ^{a)} of CV-d ₄ (%)	0	106	0	106
Recovery ^{a)} of MB (%)	0	86	1	87
Recovery ^{a)} of MB-d ₆ (%)	0	86	1	87

a) $n=1$

3.5 妨害物質の検討

配合飼料 8 種類 (成鶏飼育用, 幼すう育成用, 肉豚肥育用, ほ乳期子豚育成用, 種豚飼育用, まだい育成用, ブリ類育成用及びます類育成用), 国産魚粉 2 種類及び輸入魚粉 3 種類を用い、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。

Table 1 の配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用及びまだい育成用）及び魚粉（国産魚粉，輸入魚粉（ペルー産））に CV 及び MB として 100 及び 10 µg/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 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

分析センター法では，絶対検量線法での回収率の悪い MB のみを内標準物質を用いることとしているが，CV の内標準物質の使用についても検討した。

その結果は，内標準法では Table 6 のとおり，CV の平均回収率は 98.6~112 %，繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 7.6 %以下，MB の平均回収率は 97.2~110 %，繰返し精度は RSD として 7.4 %以下であった。絶対検量線法では Table 7 のとおり，CV の平均回収率は 89.0~109 %，繰返し精度は RSD として 7.5 %以下，MB は，平均回収率は 48.2~87.6 %，繰返し精度は RSD として 24 %以下であった。

CV は，内標準法及び絶対検量線法とも良好な結果であったが，MB は，内標準法による定量結果のみが良好であった。本法では，MB 及び CV 共に内標準物質を使用することとした。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 6 Recoveries of CV and MB from five kinds of feed with internal standard method

Spiked level (µg/kg)	Feed types										
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Domestic)		Fish meal (Peruvian)		
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	
CV	100	103	0.5	103	0.5	101	0.5	98.6	0.9	100	1.0
	10	109	2.3	103	7.6	108	3.3	99.3	5.3	112	5.1
MB	100	106	0.6	105	2.0	97.2	0.9	101	2.9	105	0.8
	10	108	3.3	104	2.4	110	4.0	99.9	7.4	106	2.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries of CV and MB from five kinds of feed with absolute calibration method

Spiked level (µg/kg)	Feed types										
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Domestic)		Fish meal (Peruvian)		
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	
CV	100	102	0.9	100	1.5	91.7	4.2	89.0	3.8	92.5	0.5
	10	108	2.3	103	7.5	104	3.5	91.1	5.6	109	4.4
MB	100	79.2	3.1	65.7	2.4	48.2	24	52.2	9.8	61.9	4.6
	10	87.6	4.4	74.6	3.3	77.5	15	58.7	9.6	78.5	4.8

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

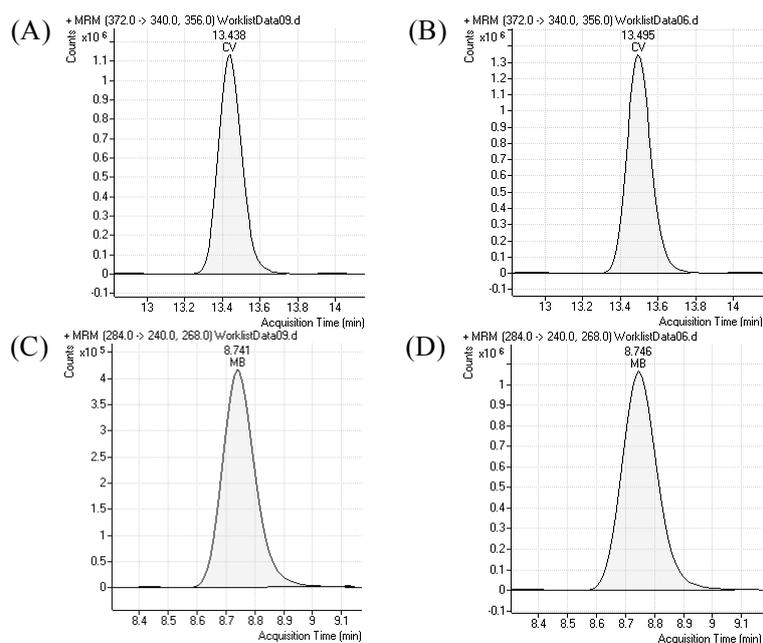


Fig.5 SRM chromatograms of CV and MB

LC-MS/MS conditions are shown in Table 2 and 3.

- (A) Fish meal spiked CV at 100 µg/kg (B) Standard solution of CV (10 ng/mL)
 (C) Fish meal spiked MB at 100 µg/kg (D) Standard solution of MB (10 ng/mL)

3.7 検出下限

本法の検出下限 (CV 及び MB は、飼料に含まれてはならない抗菌性物質であるため、定量下限相当の精度を有する濃度をもって検出下限と表す。)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 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、5 µg/kg であった。

確認のため、成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉に CV 及び MB として 5 µg/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 8 のとおり、CV の平均回収率は 109~116 %、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4 %以下、MB の平均回収率は 112~114 %、繰返し精度は RSD として 5.5 %以下であった。

以上の結果から、本法による CV 及び MB の検出下限は、試料中 5 µg/kg であった。

Table 8 Recoveries and limit of detection of CV and MB in feeds

	Spiked level (µg/kg)	Feed types			
		Formula feed for layer		Fish meal (Domestic)	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
CV	5	109	2.4	116	1.1
MB	5	114	5.5	112	2.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、成鶏飼育用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 20 µg/kg

相当量，まだい育成用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量，輸入魚粉に CV 及び MB としてそれぞれ 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，協同飼料株式会社，日本ウォーターズ株式会社，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，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 8 試験室）において，本法に従い共同試験を実施した。

CV の結果を Table 9 に示した．成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 94.5 %，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_f 及び RSD_R) として 3.4 % 及び 7.5 % であり，HorRat は 0.34 であった．まだい育成用配合飼料では，平均回収率は 101 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.1 % 及び 3.1 % であり，HorRat は 0.14 であった．魚粉では，平均回収率は 99.1 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 0.83 % 及び 3.2 % であり，HorRat は 0.15 であった。

MB の結果を Table 10 に示した．成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 83.5 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.2 % 及び 13 % であり，HorRat は 0.59 であった．まだい育成用配合飼料では，平均回収率は 93.3 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.6 % 及び 15 % であり，HorRat は 0.70 であった．魚粉では，平均回収率は 97.7 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.9 % 及び 14 % であり，HorRat は 0.62 であった。

なお，MB の結果において，Grubbs 検定で外れ値とされるデータが認められた．そのデータを除外しなくても前述のとおり良好な成績であったが，参考までにそのデータを除外して室内繰返し精度，室間再現精度及び HorRat についても算出した．その結果は，成鶏飼育用配合飼料では，室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.3 % 及び 3.9 %，HorRat は 0.18 であった．まだい育成用配合飼料では，室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.9 % 及び 7.1 % であり，HorRat は 0.32 であった．魚粉では，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 3.3 % 及び 5.3 % であり，HorRat は 0.24 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タンデム型質量分析計の機種等を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study for CV

Lab.No.	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Ecuadorian)	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
1	19.6	19.5	40.8	41.1	81.4	80.0
2	20.0	19.5	40.5	40.0	79.2	79.2
3	18.1	18.5	40.0	40.4	79.6	79.5
4	18.9	16.8	39.6	39.8	77.5	77.8
5	18.4	17.8	38.9	40.3	78.7	79.5
6	17.7	17.5	39.3	39.1	76.1	77.5
7	18.3	18.6	41.8	38.9	77.2	76.6
8	21.1	22.2	43.0	42.4	83.8	85.2
Spiked level (µg/kg)	20		40		80	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	18.9		40.4		79.3	
Recovery ^{a)} (%)	94.5		101		99.1	
RSD _r ^{b)} (%)	3.4		2.1		0.83	
RSD _R ^{c)} (%)	7.5		3.1		3.2	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.34		0.14		0.15	

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 for MB

Lab.No.	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Ecuadorian)	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
1	16.3	16.2	36.4	37.2	82.6	81.8
2	16.7	16.1	36.3	35.8	73.0	72.7
3	16.5	16.4	36.2	36.3	74.9	75.3
4	16.6	16.2	34.8	34.1	75.7	72.4
5	14.9	15.5	32.2	28.6	75.6	67.2
6	16.3	15.5	37.1	37.4	74.5	73.6
7	14.9	15.5	37.1	36.9	71.7	73.0
8	21.6 ^{e)}	22.1 ^{e)}	50.4 ^{e)}	50.1 ^{e)}	103 ^{e)}	103 ^{e)}
Spiked level (µg/kg)	20		40		80	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	16.7		37.3		78.1	
Recovery ^{a)} (%)	83.5		93.3		97.7	
RSD _r ^{b)} (%)	2.2		2.6		2.9	
RSD _R ^{c)} (%)	13		15		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.59		0.70		0.62	
RSD _r ^{b')} (%)	2.3		2.9		3.3	
RSD _R ^{c')} (%)	3.9		7.1		5.3	
HorRat ^{f)}	0.18		0.32		0.24	

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

b') Relative standard deviations of repeatability within laboratory calculated excluding Lab.No.8

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

c') Relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated excluding Lab.No.8

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

e) Date excluded by Grubbs test

f) HorRat calculated excluding Lab.No.8

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies 1200series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
2	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	Waters Alliance2695	Waters Micromass Quattro micro API	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
6	Shiseido NANOSPACE SI-2	Thermo Electron TSQ Quantum DISCOVERY	Shiseido CAPCELL-PAK C18 UG120 (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1200series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Waters Atlantis dC18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

3.9 ろ紙の検討

本検討当初から 3.8 の共同試験まで定量操作に使用するろ紙は、分析センター法で使用していた 4 種を使用していたが、汎用性の観点から飼料分析基準において他の多くの成分の定量で使用されている 5 種 B が使用出来ることが望ましい。5 種 B は、4 種に比べ保留孔径が大きいことから、使用するろ紙を 4 種から 5 種 B に変更した場合の影響について検討した。

配合飼料 8 種類（成鶏飼育用、幼すう育成用、肉豚肥育用、ほ乳期子豚育成用、種豚飼育用、まだい育成用、ブリ類育成用及びます類育成用）、国産魚粉 2 種類及び輸入魚粉 3 種類を用い、ろ紙（5 種 B）を使用して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ところ、妨害ピークは認められなかった。

配合飼料（成鶏飼育用及びまだい育成用）及び魚粉（エクアドル産）に CV 及び MB として 100 μg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、ろ紙（5 種 B）を用いて本法による添加回収試験を実施した。その結果を、Table 12 に示した。CV の回収率は 105~106 %、CV-d₄ の回収率は 93.8~100 %、MB の回収率は 109~111 %、MB-d₆ の回収率は 75.1~77.7 %であった。定量結果及びクロマトグラムは 4 種を用いた場合と同様であり、内標準物質の回収率から吸着等も認められなかったため、ろ紙を 4 種から 5 種 B に変更をしても問題はないものと考えられた。

Table 12 Recoveries of CV and MB in feeds using filter paper No.5B

	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Formula feed for layer ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Formula feed for red sea bream ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Fish meal (Ecuadorian) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
		Recovery ^{a)}	Recovery of internal std ^{a)}	Recovery ^{a)}	Recovery of internal std ^{a)}	Recovery ^{a)}	Recovery of internal std ^{a)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
CV	100	106	100	106	98.4	105	93.8
MB		111	75.4	110	77.7	109	75.1

a) $n=1$

4 まとめ

飼料中に残留しているクリスタルバイオレット (CV) 及びメチレンブルー (MB) 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たところ、次の結果を得た。

- 1) 魚粉については、夾雑成分の影響により LC-MS による定量は困難であったが、LC-MS/MS による定量とすることで改善された。
- 2) 混合標準液を使用して CV 及び MB の検量線を作成したところ、絶対検量線法及び内標準法検量線ともに 2.5~150 pg の範囲で直線性を示した。
- 3) 遮光した状態と遮光しない状態での内標準物質の回収率を比較した結果、遮光しない状態で定量操作を行うと MB-d₆ 回収率が 40 %を下回ることがあったため、本法の定量操作は遮光下で行うこととした。
- 4) 弱酸性陽イオン交換体ミニカラムからの溶出画分を検討した結果、溶出溶媒の必要量は、10 mL であった。
- 5) 8 種類の配合試料及び 5 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 CV 及び MB の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、まだい育成用配合飼料及び魚粉 2 種類に、CV 及び MB としてそれぞれ 100 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施した。その結果、CV の平均回収率は 98.6~112 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 7.6 %以下、MB の平均回収率は 97.2~110 %、その繰返し精度は RSD として 7.4 %以下の成績が得られた。
- 7) CV は、CV-d₄ を使用しない絶対検量線法による定量も可能であったが、MB は、MB-d₆ を用いた内標準法による定量が必要であるため、本法は CV 及び MB ともに内標準法による定量を採用した。
- 8) 本法による CV 及び MB の検出下限は、試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。
- 9) 成鶏飼育用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、まだい育成用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、輸入魚粉に CV 及び MB としてそれぞれ 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室において、本法に従い共同試験を実施した。その結果、CV について、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 94.5 %、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_f 及び RSD_R) として 3.4 %及び 7.5 %であり、HorRat は 0.34 であった。まだい育成用配合飼料では、平均回収率は 101 %、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 2.1 % 及び 3.1 % であり、HorRat は 0.14 であった。魚粉では、平均回収率は 99.1 %、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 0.83 % 及び 3.2 % であり、HorRat は 0.15 であった。MB について、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 83.5 %、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 2.2 % 及び 13 % であり、HorRat は 0.59 であった。まだい育成用配合飼料では、平均回収率は 93.3 %、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 2.6 % 及び 15 % であり、HorRat は 0.70 であった。魚粉では、平均回収率は 97.7 %、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 2.9 % 及び 14 % であり、HorRat は 0.62 であった。

- 10) 検討当初から共同試験まで使用していたろ紙 (4 種) を、飼料分析基準に記載されている他の多くの成分の定量法で用いているろ紙 (5 種 B) に変更するために、ろ紙 (5 種 B) を用いて本法に従い定量を妨げるピークの有無の確認と添加回収試験を行った。その結果、ろ紙を変更することによる影響は認められなかったため、本法ではろ紙 (5 種 B) を採用した。

謝 辞

共同試験に参加して頂いた財団法人日本食品分析センター多摩研究所、協同飼料株式会社、日本ウォータース株式会社の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 2) 山本 都，登田 美桜，杉田 たき子，田中 敬子，畝山 智香子，森川 馨：“わが国及び各国における畜水産食品中の残留動物用医薬品の検出状況について”，国立衛研報第 127 号，84 (2009).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度 飼料中の有害物等残留基準を設定するための分析法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，77 (2008).
- 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).

技術レポート

1 飼料中のイソフェンホスオキシソンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

山本 謙吾*

1 緒 言

イソフェンホスはバイエル社が開発した無色液体の有機リン系殺虫剤であり、主にさとうきび、落花生の土壌害虫の防除に用いられている。

わが国では、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）の規定により、とうもろこし中のイソフェンホスの残留基準は 0.02 ppm と規定されている。ここでいうイソフェンホスとはイソフェンホスと代謝産物であるイソフェンホスオキシソンをイソフェンホス含量に換算したものの和として表している¹⁾。

イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンは、飼料分析基準の有機リン系農薬の系統的分析法（その 1）²⁾により同時分析が可能であるが、当センターの検査分析でスクリーニング的に繁用している農薬のガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）による一斉分析法²⁾（以下「一斉法」という。）は、イソフェンホスオキシソンが分析対象に含まれていない。そこで、イソフェンホスオキシソンの一斉法への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンの構造式を Fig. 1 に示した。

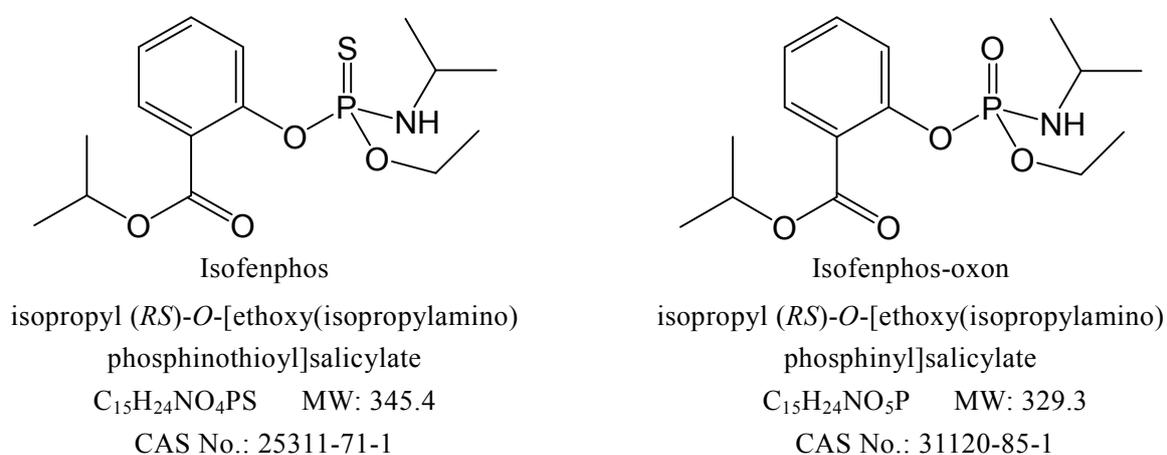


Fig. 1 Chemical structures of isofenphos (left) and isofenphos-oxon (right)

2 実験方法

2.1 試 料

市販の成鶏飼育用配合飼料及び乾牧草（アルファルファ乾草）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎して用いた。検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
for layer	Grains	61	Corn, Milo
	Oil seed meal	27	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	11	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt Paprika extract, Silicic anhydride, Feed additives

2.2 試薬

1) イソフェンホスオキソン標準液

有機リン系農薬混合標準液 B グループ（和光純薬工業特注品，イソフェンホスオキソン他 13 農薬各 20 µg/mL）を標準原液とした。

使用に際して，上記標準原液の一定量を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にイソフェンホスオキソンとしてそれぞれ 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 µg を含有する各標準液を調製した。

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

2.3 装置及び器具

1) ガスクロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 GCMS-QP2010

2) ゲル浸透クロマトグラフ：島津製作所製 GPC システム

ポンプ：LC-20AT

オートサンプラー：SIL-10AP

フラクションコレクター：FRC-10A

3) 振とう機：タイテック製 ストロングシェーカー SR-2DW

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

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

6) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム ：Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg)

7) 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) にリザーバーを連結したもの

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

2.4 定量方法

定量は，一斉法により実施した。ゲル浸透クロマトグラフ条件を Table 2 に，ガスクロマトグラフ質量分析計による測定条件を Table 3 に示した。

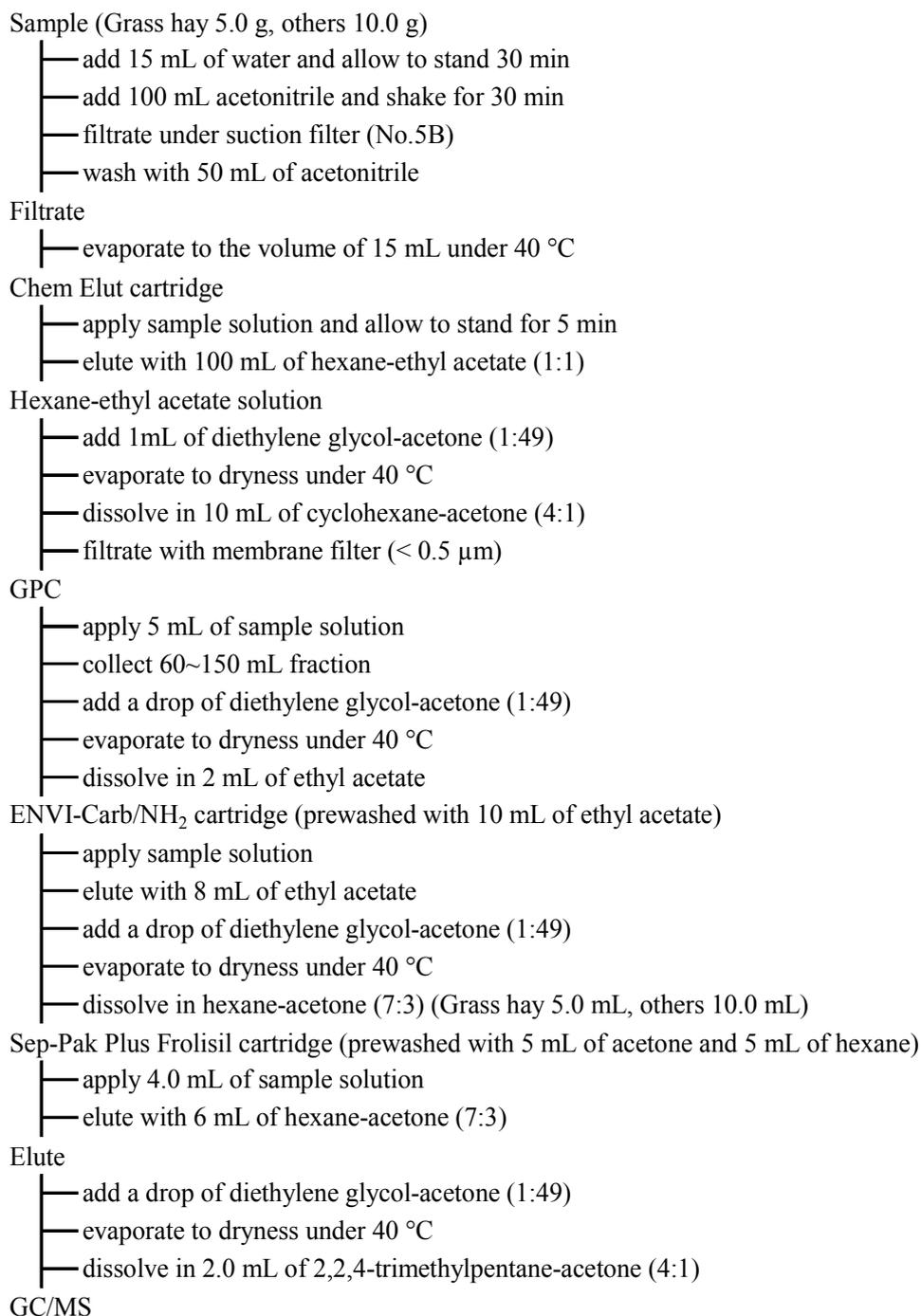
なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions of GPC for analyzing isofenphos-oxon

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	60~150 mL

Table 3 Operating conditions of GC/MS for analyzing isofenphos-oxon

Column	Rtx-5ms (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness)
Column temperature	70 °C (1 min) → 25 °C /min → 150 °C → 3 °C /min → 200 °C → 8 °C /min → 280 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60s)
Injector temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 229 (for quantitation), 201 (for confirmation)



Scheme 1 Analytical procedure for isofenphos-oxon in feeds

3 結果及び考察

3.1 モニターイオンの設定

イソフェンホスオキシソンのモニターイオンは、食品の分析法である「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」別表³⁾で規定するモニターイオンを準用して、定量イオンとして m/z 229, 確認イオンとして m/z 201 を採用した。

参考として 0.5 μg/mL のイソフェンホスオキシソン標準液 1 μL を GC-MS に注入し、スキャンモ

ードで測定したマススペクトルを Fig. 2 に示した.

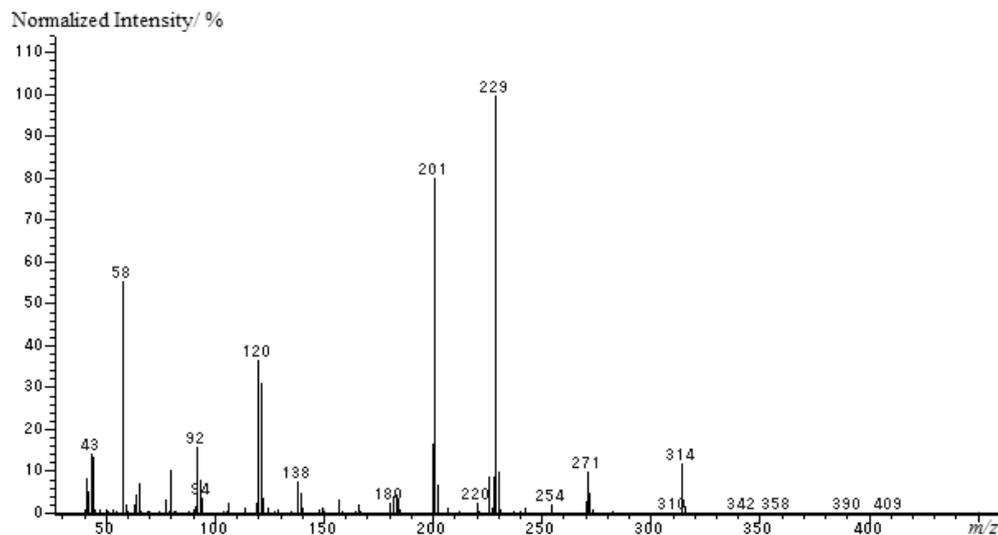


Fig. 2 Mass spectrum of isofenphos-oxon

3.2 検量線の作成

調製した 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 $\mu\text{g/mL}$ のイソフェンホスオキシソン標準液各 1 μL を GC-MS に注入し, 得られた選択イオン検出クロマトグラムのピーク高さから検量線を作成した.

その結果, 検量線は 0.02~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.02~0.5 ng) の範囲で直線性を示した (Fig. 3) .

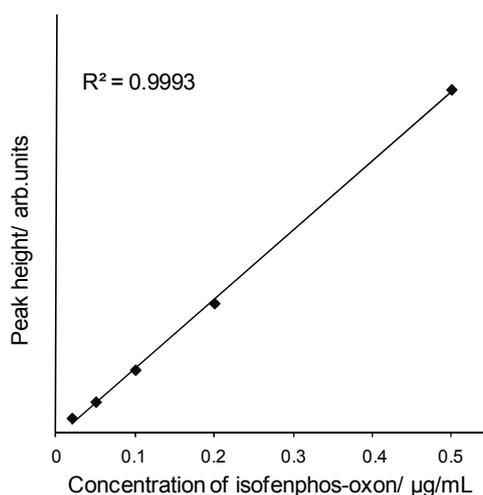


Fig. 3 Calibration curve of isofenphos-oxon

3.3 妨害物質の検討

4 種類の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, 肉用牛肥育用, 乳用牛飼育用), 3 種類の乾牧草 (アルファルファ乾草, スーダングラス乾草, えん麦乾草), えん麦, 大麦, とうもろこし, ビールかす, ふすま, なたね油かす及び綿実について, 本法に従って選択イオン検出クロマトグラムを作成し, イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークの有無を検討した. その結果,

イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークは認められなかった。

3.4 添加回収試験

成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとしてそれぞれ 50, 100 及び 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加した試料を用い、本法に従って 3 回併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 4 に示したように、平均回収率が 124~161 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 14 %以下であり、この結果は、一斉法検討の際の平均回収率及び繰返し精度の目標値⁴⁾ (平均回収率: 50~200 %, RSD: 20 %以下) に適合していた。

Table 4 Recoveries of isofenphos-oxon from two kinds of feed

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
500	150	0.7	147	8.1
100	124	5.2	155	14
50	139	2.2	161	5.6

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 定量下限及び検出下限

本法によるイソフェンホスオキシソンの定量下限について、イソフェンホスと同様に試料中 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を目標として以下の検討を行った。

成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとして 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて添加回収試験を行い、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。その結果、SN 比は 10 以上であり、平均回収率は 139 及び 161 %、繰返し精度は RSD として 5.6 %以下であった。検出下限は、イソフェンホスと同様 SN 比 3 を確保できる 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった (Table 4)。

3.6 共同試験

飼料中のイソフェンホスの残留基準はイソフェンホスと代謝産物であるイソフェンホスオキシソンをイソフェンホス含量に換算したものの和として規定されていることから、本法の再現精度を確認するため、イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンについて共同試験を実施した。成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンとしてそれぞれ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用い、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥料安全検査部、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、同福岡センターの 6 試験室で共同分析を実施した。

イソフェンホスオキシソンについての結果を Table 5 に示した。成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 98.4 %、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 13 %及び 21 %であり、HorRat は 0.96 であった。アルファルファ乾草では、平均回収率は 107 %、RSD_r 及び RSD_R はそれぞれ 9.8 %及び 22 %であり、HorRat は 0.99 であった。

また、イソフェンホスについての結果を Table 6 に示した。成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 107 %、 RSD_r 及び RSD_R はそれぞれ 6.4 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.47 であった。アルファルファ乾草では、平均回収率は 119 %、 RSD_r 及び RSD_R はそれぞれ 4.4 % 及び 23 % であり、HorRat は 1.0 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 7 に示した。

Table 5 Collaborative study for isofenphos-oxon

Lab. No.	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	(µg/kg)		(µg/kg)	
1	42.4	54.0	31.6	45.2
2	37.7	48.8	46.5	49.3
3	37.8	35.1	53.2	50.7
4	57.5	67.1	67.0	68.2
5	44.2	51.3	48.2	51.9
6	52.9	61.2	70.6	59.7
Spiked level (µg/kg)	50		50	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	49.2		53.5	
Recovery ^{a)} (%)	98.4		107	
RSD_r ^{b)} (%)	13		9.8	
RSD_R ^{c)} (%)	21		22	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.96		0.99	

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 6 Collaborative study for isofenphos

Lab. No.	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	(μg/kg)		(μg/kg)	
1	55.9	60.9	61.7	64.7
2	44.5	46.3	43.6	41.7
3	49.6	58.7	84.0	79.8
4	57.2	60.8	61.0	62.8
5	50.9	53.9	49.6	51.2
6	51.5	54.5	59.2	52.5
Spiked level (μg/kg)	50		50	
Mean value ^{a)} (μg/kg)	53.7		59.3	
Recovery ^{a)} (%)	107		119	
RSD _r ^{b)} (%)	6.4		4.4	
RSD _R ^{c)} (%)	10		23	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.47		1.0	

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 7 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	GC-MS	GC column
		(i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GC-MS QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	SHIMADZU GC-MS QP2010Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	Thermo Electron FOCUS/POLARISQ	Agilent Technologies DB-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	Thermo Electron FOCUS/POLARISQ	Thermo Electron TR-5ms SQC (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	SHIMADZU GC-MS QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	SHIMADZU GC-MS QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のイソフェンホスオキシソンの定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) イソフェンホスオキシソンの定量イオンとして m/z 229, 確認イオンとして m/z 201 を採用した。

- 2) イソフェンホスオキシソンの検量線は 0.02~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 3) 4 種類の配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，肉用牛肥育用，乳用牛飼育用），3 種類の乾牧草（アルファルファ乾草，スーダングラス乾草，えん麦乾草），えん麦，大麦，とうもろこし，ビールかす，ふすま，なたね油かす及び綿実について，本法に従って選択イオン検出クロマトグラムを作成したところ，イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 4) 配合飼料及び乾牧草にイソフェンホスオキシソンとして 50，100 及び 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 124~161 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 14 %以下であった。
- 5) 本法によるイソフェンホスオキシソンの定量下限及び検出下限は，イソフェンホスと同様に試料中で 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとして 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて 6 試験室において共同試験を実施した結果，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 98.4 %，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 13 %及び 21 %，HorRat は 0.96 であり，アルファルファ乾草では，平均回収率は 107 %，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 9.8 %及び 22 %，HorRat は 0.99 であった。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について”，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 (2006).
- 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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：“食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 野崎 友春，堀米 明日香，渡部 千会：飼料研究報告，31，39 (2006).

技術レポート**2 鶏用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良法について**関口 好浩^{*1}, 佐藤 梢^{*2}, 吉村 哲史^{*3}**1 緒 言**

アビラマイシンは, *Streptomyces viridochromogenes* の産生するオルトソマイシン系の抗生物質で, 飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を用途として, 飼料添加物に指定され¹⁾, 鶏用(幼すう用, 中すう用及びブロイラー用)飼料に 2.5~10 g(力価)/トン, ほ乳期子豚用飼料に 10~40 g(力価)/トン及び子豚期用飼料に 5~40 g(力価)/トン添加することができる^{2,3)}.

配合飼料中のアビラマイシンの定量法は, サリノマイシンナトリウム又はラサロシドナトリウムを含まない飼料を対象として菅野らが検討した微生物学的定量法⁴⁾(以下「菅野らの方法」という.), 豚用飼料を対象として大島らが検討した微生物学的定量法⁵⁾が飼料分析基準⁶⁾に記載されている.

しかし, 菅野らの方法⁴⁾は抽出溶媒にクロロホルムを用いており, 環境面及び分析者の安全性確保等の理由により塩素系溶媒の使用を避けることが望まれていることから方法の改良が求められていた. そのため, 豚用飼料を対象とした改良法が検討された⁵⁾が, 鶏用配合飼料については未だ検討されていない.

今回, これらの問題を解決するために, 荒木らが検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法⁷⁾と大島らが検討した改良法⁵⁾を基に, 鶏用配合飼料を対象とした改良法を検討したので, その概要を報告する.

なお, アビラマイシンの構造式は Fig. 1 に示したとおり, アビラマイシン A, B, C, D1, D2, E の混合物であり, 主成分はアビラマイシン A である.

2 実験方法**2.1 試 料**

抗生物質を含まない市販の配合飼料(幼すう育成用, 中すう育成用及びブロイラー肥育前期用)及びアビラマイシン製剤(Eli Lilly & Co.製)を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した.

粉碎後, 各配合飼料にアビラマイシン製剤を添加して, アビラマイシンとしてそれぞれ 2.5, 5 及び 10 g(力価)/トン含有する試料をそれぞれ調製した.

試料の調製に用いた配合飼料の配合割合は, Table 1 に示した.

*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

*2 (独)農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 同仙台センター

*3 (独)農林水産消費安全技術センター神戸センター

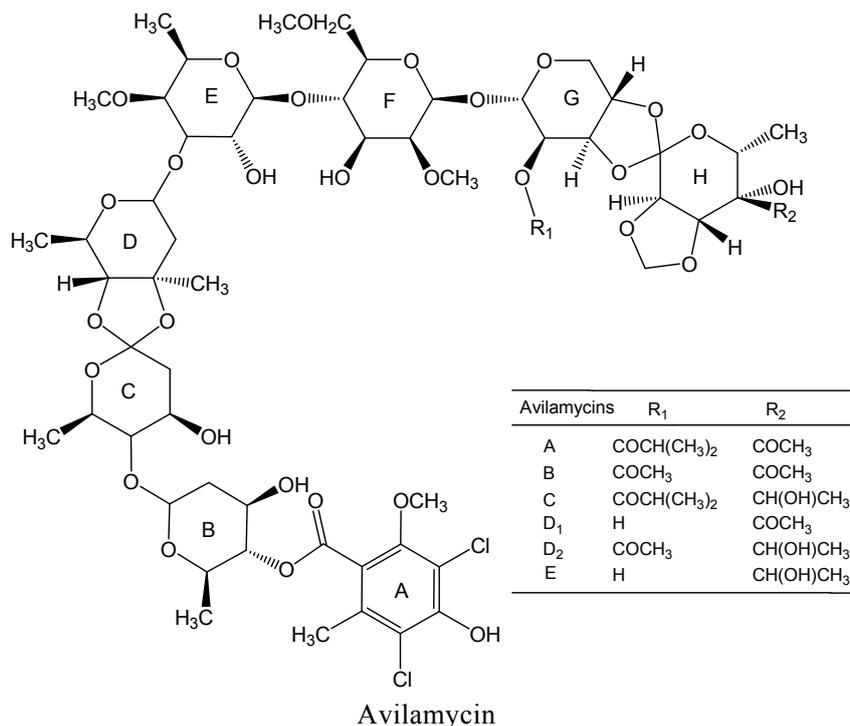


Fig. 1 Chemical structure of avilamycin

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For starting chick	Grains	59	Corn, Milo
	Oil seed meal	32	Soybean meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	2	Fish meal
	Brans	2	Rice bran, Wheat bran, Corn gluten feed
	Others	5	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Fructose, Glucose, Green tuff, Sugar cane extracts, Isomalt oligosaccharide, Yeast, Animal fat, Alfalfa meal, Feed additives
For growing chick	Grains	62	Corn
	Oil seed meal	26	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Brans	5	Wheat bran, Corn gluten feed
	Others	4	Calcium phosphate, Animal fat, Calcium carbonate, Salt, Isomalt oligosaccharide, Silicic acid, Molasses, Green tuff, Fructose, Glucose, Sugar cane extracts, Yeast, Malic acid, Citric acid, Tartaric acid, Lactic acid, Feed additives
For broiler starting chick	Grains	54	Corn, Wheat flour
	Oil seed meal	39	Soybean meal
	Others	7	Animal fat, Calcium carbonate, Salt, Yeast, Calcium phosphate, Feed additives

2.2 試 薬

1) 7号緩衝液

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

2) 希釈溶媒

7号緩衝液－アセトン (4+1)

3) アピラマイシン標準液

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

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

4) F-25 号培地

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

5) 菌液

試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、飼料分析基準⁶⁾に準じて菌液を調製した。

6) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51 °C に保温した培地に 2.2 の 5) で調製した菌液の 10 倍希釈液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 20 mL をペトリ皿 (内径 90 mm, 高さ 15 mm, 合成樹脂製) に一様に広がるように分注し、水平に静置して凝固させた。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90° の間隔となる位置に、せん孔機を用いて 4 個のせん孔 (内径 8 mm) を設けた。

7) 抽出溶媒

アセトン－水 (4+1)

8) 溶出溶媒

7号緩衝液－アセトン (1+1)

なお、試薬は全て特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4

2) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

：Waters 製 Sep-Pak Plus C₁₈ Cartridge (充てん剤量 360 mg) にリザーバーを連結したもの

3) 吸引マニホールド：Waters 製 Sep-Pak Vacuum Manifold

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

5) せん孔機：システムサイエンス製 ZP-SM

6) 培養器：東京理化学器械製 LTI-1001ED

7) ゾーンアナライザー：システムサイエンス製 ZA-F Model PCA-11

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5.0~20.0 g (アビラマイシンとして 50 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、マグネチックスターラーで 20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙 (5 種 A) でろ過した。ろ液 10 mL を試験管 (内径 25 mm, 長さ 200 mm) に正確に入れ、7 号緩衝液 6 mL を加えてアセトン濃度を 50 v/v% とした後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトン 10 mL 及び溶出溶媒 10 mL で順次洗浄した後、50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液全量をミニカラムに入れ、吸引マニホールドで 6 kPa 程度減圧してアビラマイシンを流出させた (流速はおよそ 2 mL/min.)。先の試験管、ろ紙及び試料溶液の入っていた容器を順次、溶出溶媒 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。

流出液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL まで減圧濃縮した後、残留物を 25 mL の全量フラスコに入れた。先のなす形フラスコをアセトン 5 mL で洗浄し、洗液を全量フラスコに合わせた。更に全量フラスコの標線まで 7 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製した。

3) 分注及び培養

2.2 の 6) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準⁶⁾の標準曲線法に準じ、標準液及び試料溶液をそれぞれ 100 µL ずつ各せん孔に分注し、9~11 °C で 2 時間静置した後、35~37 °C で 16~24 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

ゾーンアナライザー又はノギスを用い、培養を終えた寒天平板上の阻止円の直径をそれぞれ 0.1 mm まで正確に測定し、飼料分析基準⁶⁾の標準曲線法に準じ、試料中のアビラマイシン濃度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 抽出溶媒の検討

大島らの豚用飼料での検討⁵⁾において、アセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした場合に加熱加工された飼料に対する回収率の改善が認められたことから、本検討でもアセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした。

3.2 培地の検討

Micrococcus luteus ATCC 10240 を試験菌としてアビラマイシンの定量を行う場合、F-25 号培地が適していることが報告されている^{5,7)}ため、本検討でもこの培地を用いることにした。

3.3 併用できる抗菌性物質の影響

現在、飼料添加物に指定されている抗菌性物質のうち、鶏用配合飼料でアビラマイシンと併用が可能なものには、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、ピコザマイシン、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、硫酸コリスチン、アンプロロウ

ム, エトパベート, スルファキノキサリン, デコキネート, ナイカルバジン及びハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの 13 種類があり, その含有量及び本分析法での最終試料溶液中の濃度は Table 2 に示した.

Table 2 Concentrations of antibiotics approved to use with avilamycin in feeds and in sample solution

Antibiotics and synthetic antibacterials	Concentration	
	in feed (g(potency)/ton)	in sample solution (µg(potency)/mL)
Salinomycin sodium	50	1~4
Semduramicin sodium	25	0.5~2
Narasin	80	1.6~6.4
Bicozamycin	5~20	0.1~1.6
Monensin sodium	80	1.6~6.4
Lasalocid sodium	75	1.5~6
Colistine sulfate	2~20	0.04~1.6
Amprolium	40~250	0.8~20
Ethopabate	2.56~16	0.0512~1.28
Sulfaquinoxaline	60	1.2~4.8
Decoquate	20~40	0.4~3.2
Calcium halofuginone polystyrenesulfonate	40	0.8~3.2

これらの標準液を用い, F-25 号培地における試験菌 *Micrococcus luteus* ATCC 10240 に対する感度曲線を求め, その感受性, 阻止円の状態及び配合飼料への添加量等から, これらの併用が鶏用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害する可能性を検討した結果, Fig. 2 のとおり, サリノマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの 4 種類の抗菌性物質が鶏用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害する可能性が示唆された.

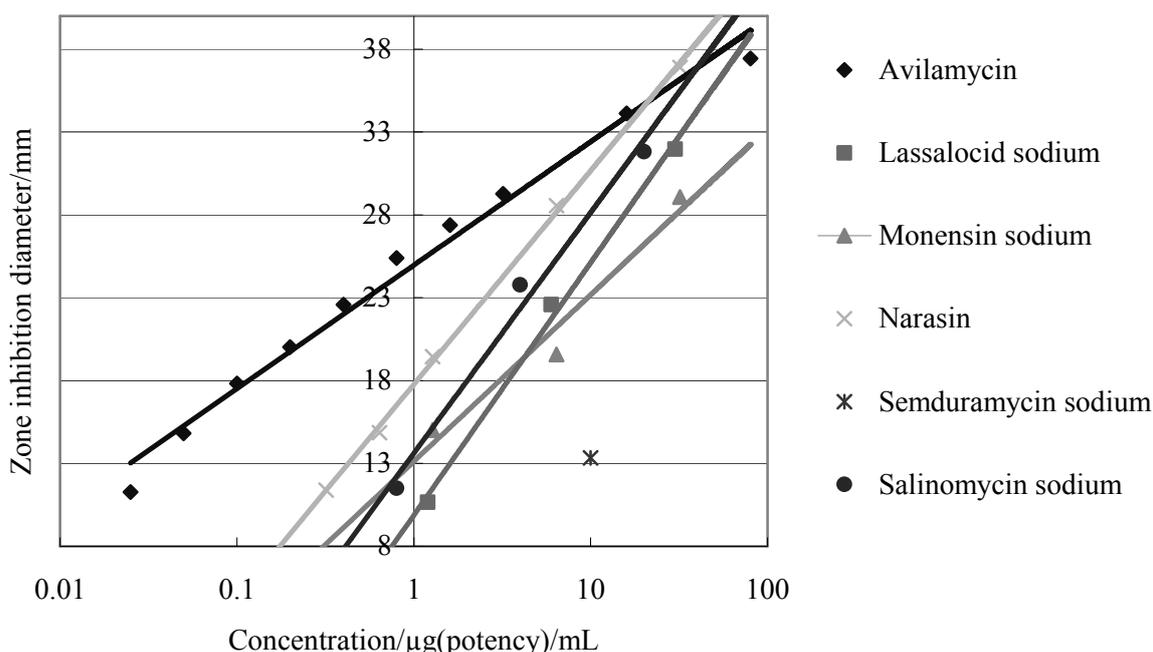


Fig. 2 Standard curves of antibiotics approved to use with avilamycin

3.4 カラム処理による精製方法の検討

荒木ら⁷⁾は、プレミックス中のサリノマイシンナトリウム及びラサロシドナトリウムを除去するためにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた。そこで、鶏用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害する可能性のある4種類の抗生物質を同様に、カラム処理で除去することを検討した。

1) 溶出溶媒の検討

プレミックスでのカラム処理は、溶出溶媒として7号緩衝液-アセトン(11+9)が適当とされている。鶏用配合飼料でも同じ溶出溶媒が使用できるか確認するために、アビラマイシン標準原液を抽出溶媒で正確に希釈して、 $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL}$ 及び $1 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL}$ の各標準液を調製し、それぞれミニカラムに $5 \mu\text{g}(\text{力価})$ 相当量負荷した。さらに溶出速度を変えるため吸引マニホールドの減圧条件を変えて溶出を行った。

その結果、Table 3のとおり、7号緩衝液-アセトン(11+9)を溶出溶媒とした場合、7号緩衝液-アセトン(1+1)の場合より回収率が低く、バラツキの大きい結果となった。また、7号緩衝液-アセトン(1+1)が溶出溶媒の場合、ミニカラムへのアビラマイシンの負荷量を $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL} \times 10 \text{ mL}$ とした方が、減圧条件に関わらずバラツキが少なく100%に近い回収率が得られたことから、本検討では以降、溶出溶媒を7号緩衝液-アセトン(1+1)、負荷量を $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL} \times 10 \text{ mL}$ として検討することとした。

Table 3 Differences of proportion of acetone of eluent, vacuum condition and loading volume of avilamycin into Sep-Pak plus C₁₈ cartridge

Eluent	Vacuum condition	Loading volume			
		0.5 µg(potency)/mL × 10 mL		1 µg(potency)/mL × 5 mL	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Phosphoate buffer (pH 7) - acetone (1:1)	-2 kPa	105	12	122	12
	-6 kPa	105	11	114	16
Phosphoate buffer (pH 7) - acetone (11:9)	-2 kPa	88.1	30	104	18
	-6 kPa	96.1	14	92.7	40

a) Mean ($n = 6$)

b) Relative standard deviation

2) アビラマイシンの定量を妨害する抗生物質の除去の確認

3.4 の 1)の結果から、7号緩衝液-アセトン (1+1) を溶出溶媒として用いアビラマイシンの定量を妨害する抗生物質の除去について確認した。

アビラマイシンの定量を妨害する可能性のあるサリノマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムを用いて、併用の許される最大量相当の抽出溶液を調製し、本分析法で試験を行った。

その結果は Table 4 に示した。回収率はすべてアビラマイシンに換算した値 (0.2 µg(力価)/mL を 100 %とした値) である。

モネンシンナトリウムの除去は、荒木ら⁷⁾と同様に、本検討でも除去できなかった。ラサロシドナトリウム及びナラシンは、アビラマイシンの定量を妨害する程度は小さいものと考えられた。サリノマイシンナトリウムは定量に妨害を与えなかった。また、減圧条件の違いについてはモネンシンナトリウムを除けば大きな差はなかった。

これらの結果から、ナラシン及びラサロシドナトリウムによる妨害は少なく、サリノマイシンによる妨害の影響はないと考えられることと、モネンシンナトリウムについてはどちらの減圧条件でも除去することはできなかったことから分析時間を考慮し、今後の検討は減圧条件を -6 kPa で行うこととした。

Table 4 Removals of antibiotics that prevent detection of avilamycin

Antibiotics	Vacuum condition			
	-2 kPa		-6 kPa	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Salinomycin sodium	0	0	0	0
Narasin	0	0	3.6	173
Monensin sodium	67.2	56	108	62
Lasalocid sodium	11.3	106	14.0	87

a) Mean recovery as 0.2 µg(potency)/mL of avilamycin ($n = 3$)

b) Relative standard deviation

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのロット間差の確認

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる処理に使用している Sep-Pak Plus C₁₈ Cartridge のロット間差を確認するために、7号緩衝液-アセトンで希釈したアビラマイシンを4つのロットの異なるミニカラムに負荷した結果、ロット間差は認められなかった (Table 5).

Table 5 Inter lot difference of Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge

Lot	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)
029138142A	117	3.0
029138142B	119	2.0
029038100A	119	1.0
029538165A	118	4.0

a) Mean ($n = 4$)

b) Relative standard deviation

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した試料を用いて、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、平均回収率は、92.1~114%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として15%以下の成績が得られた (Table 6)。

Table 6 Recoveries of avilamycin from three kinds of feed

Added level (g(potency)/ton)	Formula feed					
	For starting chick		For growing chick		For broiler starting chick	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2.5	114	7.5	109	6.3	104	13
5	96.3	15	99.9	1.3	102	8.6
10	104	6.2	93.8	3.7	92.1	6.8

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation

4 まとめ

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

- 1) 鶏用配合飼料中のアビラマイシンをアセトン-水 (4+1) で抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて精製した後、*Micrococcus luteus* ATCC 10240 を試験菌として F-25 号培地で標準曲線法により定量することができた。
- 2) 本法では、鶏用配合飼料中のモノニンナトリウムがアビラマイシンの定量に与える妨害を除去することはできなかった。
- 3) 幼すう育成用配合飼料、中すう育成用配合飼料及びブロイラー肥育前期用配合飼料にアビラマ

イシンとして、それぞれ 2.5, 5 及び 10 g(力価)/トン相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、92.1~114%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 15% 以下の成績が得られた。

- 4) 本法の飼料分析基準への適用の可否について検討した結果、必要な繰返し精度が得られなかった。

文 献

- 1) 農林省告示：“飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件”，昭和 51 年 7 月 24 日，告示第 750 号 (1976).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”，平成 20 年 8 月 29 日，省令第 55 号 (2008).
- 4) 菅野 清，佐々木 隆：飼料研究報告，17，83 (1992).
- 5) 大島 慎司，篠田 直樹，橋本 仁康，千原 哲夫：飼料研究報告，32，61 (2007).
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 荒木誠士，風間鈴子：飼料研究報告，22，97 (1997).

技術レポート

3 飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンのガスクロマトグラフによる定量法

野崎 友春*, 井手 康人*

1 緒 言

ジスルホトン（エチルチオメトン）はバイエル社とサンド社が開発した浸透性有機リン系殺虫剤である。環境中では酸化によりジスルホトンスルホンに変化する可能性があるため、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、ジスルホトンスルホン含有量をジスルホトン相当に換算した上でジスルホトンとの和で設定されている。日本では1964年に農薬登録され、適用作物も多い¹⁾。

食品中の残留農薬基準値は、麦・穀類で0.02~0.2 mg/kg、綿実で0.1 mg/kgとなっている。また、諸外国の牧草類の基準値は3~10 mg/kgである。現在のところ、日本国内での飼料中の基準は設定されていない。

飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンの定量法としては、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、ガスクロマトグラフによるジスルホトンの残留分析法¹⁾（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²⁾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、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの構造式をFig. 1に示した。

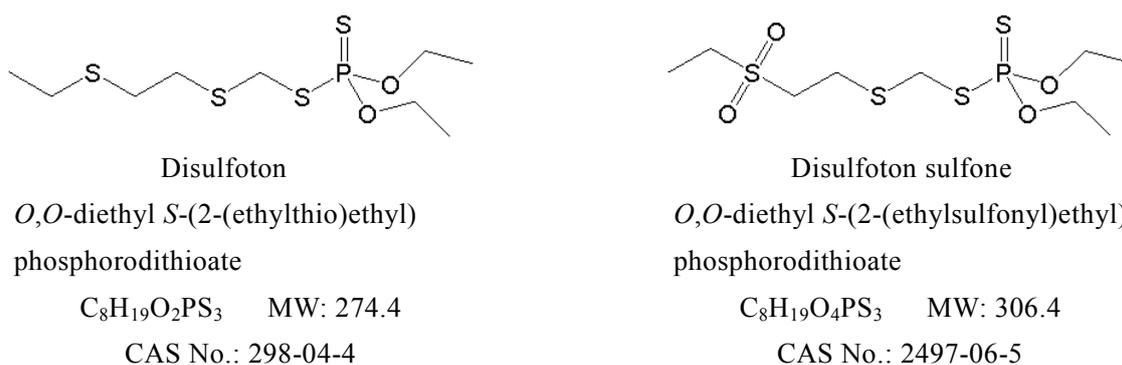


Fig. 1 Chemical structures of disulfoton (left) and disulfoton sulfone (right)

2 実験方法

2.1 試 料

市販のとうもろこし、スーダングラス乾草及び配合飼料（若令牛育成用）をそれぞれ1 mmの網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合をTable 1に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For growing cattle	Grains	56	Corn, Wheat flour
	Brans	21	Wheat bran
	Oil seed meal	12	Soybean meal
	Others	11	Molassess, Alfalfa meal, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Feed additives

2.2 試 薬

1) ジスルホトン標準原液

ジスルホトン ($C_8H_{19}O_2PS_3$) 標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 93.5 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてジスルホトン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジスルホトンとして 0.5 mg ($f=0.935$) を含有する.) .

2) ジスルホトンスルホン標準原液

ジスルホトンスルホン ($C_8H_{19}O_4PS_3$) 標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてジスルホトンスルホン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジスルホトンスルホンとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する.) .

3) 混合標準液

使用に際して, ジスルホトン標準原液及びジスルホトンスルホン標準原液の一定量を正確にとり, アセトンで正確に希釈し, 1 mL 中にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ 20, 50, 100, 200, 500 及び 1,000 ng を含有する各混合標準液を調製した.

4) アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル及びアセトニトリルは残留農薬分析用試薬を用いた. ジエチレングリコールは純度 99.5 % 以上のものを用いた. 特記している以外の試薬については特級を用いた.

2.3 装置及び器具

1) ガスクロマトグラフ装置: Agilent Technologies 製 6890 Series

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: BÜCHI 製 R-200

4) 遠心分離器: 久保田商事製 5200

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

6) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg /500 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 15 mL (乾牧草は 30 mL) を加え, 10 分間静置後, アセトン 100 mL を加え, 60 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコ (とうもろこしは 300 mL のなす形フラスコ) をブフナー漏斗の下に置き, 抽出液を

ろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、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、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 (乾牧草は 10 mL) を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ (とうもろこしはなす形フラスコに受けたろ液全量を)、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮 (乾牧草は 2 mL まで) 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、30 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-ヘキサン (1+1) 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、各農薬を溶出させた。更に、酢酸エチル-ヘキサン (1+1) 70 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) (以下「キーパー」という。) 100 µL を加える。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。

乾牧草以外の試料は、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、650×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

乾牧草試料は、ヘキサン-アセトン (4+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) 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、各農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取した。溶出液にキーパー 100 µL を加え、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。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 2 に示した。

ヘキサン-アセトン (4+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。

Table 2 Operating conditions of GPC for analyzing disulfoton and disulfoton sulfone

Column	Shodex CLNpak EV-2000AC (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
Column temperature	35 °C
Fraction volume	70~110 mL

4) カラム処理 II

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムをヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL で洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を溶出させた。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 (4+1) 2 mL ずつで3回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に溶出させた。更にヘキサン-アセトン (4+1) 9 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液にキーパー100 μ L を加える。溶出液を 40 $^{\circ}$ 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。アセトン 1 mL (乾牧草は 5 mL) を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

5) ガスクロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 2 μ L をガスクロマトグラフに注入し、Table 3 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

Table 3 Operating conditions of GC for analyzing disulfoton and disulfoton sulfone

Column	HP-5 (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μ m film thickness)
Column temperature	80 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (10 min)
Injection mode	Splitless (60s)
Injection temperature	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He 2.0 mL/min
Hydrogen	75 mL/min
Air	100 mL/min
Make up gas	N ₂ (30 mL /min)
Detector	FPD
Detector temperature	250 $^{\circ}$ C

6) 計算

得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のジスルホトン量及びジスルホトンスルホン量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 精製条件の検討

分析センター法¹⁾の追試を行ったところ、液液分配による精製操作で懸濁がおこり回収率が悪くなったことから、各精製段階を検討することとした。

1) キーパーの必要性の検討

従来、揮散しやすい農薬等の分析では、ジエチレングリコール含有アセトン等のキーパーを使用して乾固ロスを減少させてきた。

今回の分析対象であるジスルホトン及びジスルホトンスルホンは、リン系の農薬であり、比較的揮散しやすいと考えられるため、キーパーの使用について検討を行った。

200 ng/mL の混合標準液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴で減圧濃縮した後に窒素ガスを送って乾固し、アセトン 1 mL を正確に加えた試験溶液と、減圧濃縮時にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 100 μ L 及び 200 μ L をそれぞれ加えたもの

を同様に操作した試験溶液をガスクロマトグラフで測定した。

その結果、Table 4 のとおり、キーパーを使用した方が高い回収率が得られたことから、以後の検討ではキーパーを使用することとした。また、キーパーの量による変化は見られなかったことから、100 μ L を加えることとした。

Table 4 Effectiveness of the usage of keeper

	Added amount of acetone - diethylene glycol (49:1)		
	No addition	100 μ L	200 μ L
Relative recovery of disulfoton (%) ^{a)}	61	100	99
Relative recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}	84	100	91

a) Relative value to maximum recovery indicated with bold type

2) 多孔性ケイソウ土カラムによる精製の検討

分析センター法¹⁾では試料溶液を2 mLまで減圧濃縮した後に水15 mL及び塩化ナトリウム3 gを加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、更に容器を水5 mLで洗浄し、洗液をカラムに加えた後、ヘキサンで溶出している。

この方法では、ヘキサン溶出時、ヘキサンと混合しない溶液が流出することがあることから、その後の精製に影響を及ぼしていると考えられた。

このことから、多孔性ケイソウ土カラムによる精製に用いる溶出溶媒として、飼料分析基準²⁾でよく用いられている酢酸エチル、酢酸エチル-ヘキサン(1+1)及びヘキサンについて検討を行った。また、分析センター法では試料溶液と洗浄用の水の負荷量合計が20 mLを超えていること及びとうもろこし由来の試料溶液は2 mLまで濃縮が不可能であることから、試料溶液を10 mL以下、洗浄水を5 mLに変更した。

若令牛育成用配合飼料を2.4の1)に従って抽出、定容後、試料溶液40 mLに1,000 ng/mLの混合標準液0.2 mLを加え、40 $^{\circ}$ C以下の水浴で約10 mLまで減圧濃縮(乾牧草は2 mLまで)して2.4の2)のカラム処理Iに供する試料溶液とした。多孔性ケイソウ土カラムに負荷した後、水5 mLで容器を洗浄し、洗液をカラムに負荷した。一定時間静置した後に、各溶媒を流下させ、分画し、それぞれについて2.4の残りの操作を行って試料溶液とし、測定を行った。

その結果はTable 5, 6及び7のとおりであった。ジスルホトンスルホンでは溶媒による差より、静置時間の差が大きくなる傾向であった(静置時間30分の時の回収率74~88%, 静置時間10分の時の回収率105~123%)が、ジスルホトンでは静置時間及び溶出溶媒と回収率の間に明確な関連性がないように思われた。今回の検討では、1回目の結果において、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンで良好な結果が得られた酢酸エチル-ヘキサン(1+1)を多孔性ケイソウ土カラムからの溶出溶媒とすることとしたが、更なる検討が必要であると考えられた。また、溶出液量は100 mLとした。

Table 5 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The first time, allow to stand for 30 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	54	N.D.	N.D.	54
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		60	19	N.D.	79
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	116	10	N.D.	126
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		75	N.D.	N.D.	75
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	112	11	N.D.	123
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		60	14	N.D.	74

a) $n=1$

Table 6 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The second time, allow to stand for 30 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	75	18	2	95
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		63	15	1	79
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	51	6	1	58
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		81	7	N.D.	88
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	46	13	1	60
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		65	19	1	85

a) $n=1$

Table 7 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The third time, allow to stand for 10 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	55	19	1	75
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		101	19	3	123
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	56	17	1	74
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		71	34	N.D.	105
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	71	7	1	79
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		105	17	N.D.	122

a) $n=1$

3) ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の検討

分析センター法¹⁾では、配合飼料のみ多孔性ケイソウ土カラムによる精製を行った後、液液分配による精製を行っている。

液液分配では、エマルジョンがおこりやすく、作業者が溶媒に触れる時間も長くなることから、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²⁾等で使用しているゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）による精製の検討を行った。

若令牛育成用配合飼料を 2.4 の 1)及び 2)に従って操作を行い、多孔性ケイソウ土カラムによる精製後の試料溶液に 1,000 ng/mL の混合標準液 1 mL 及びアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 100 μ L を加え、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴で減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固し、シクロヘ

キサンーアセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて試料溶液とした。操作条件は、分画条件以外は 2.4 の 3) と同一とした。分画後の各試料溶液にキーパー 100 μ L を加え、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、ヘキサンーアセトン (4+1) 5 mL を加えて残留物を溶かした。その後 2.4 の 4) のカラム処理 II 以下の操作を行い試料溶液とし、定量を行った。

その結果は Table 8 のとおりであり、ジスルホトンは 80 mL から 100 mL の画分で、ジスルホトンスルホンは 90 mL から 110 mL の画分でそれぞれ溶出したことから、本法では 70 mL から 110 mL の画分を分取することとした。

Table 8 Elution pattern from GPC

	Fraction volume (mL)						Total	
	60~70	~80	~90	~100	~110	~120		~130
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	N.D.	4	93	8	N.D.	N.D.	N.D.	105
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}	N.D.	N.D.	9	102	6	N.D.	N.D.	117

a) $n=1$

3.2 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した各混合標準液各 2 μ L をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから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. 2 及び 3 のとおり、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンのいずれの検量線も 20~1,000 ng/mL (注入量として 40~2,000 pg) で直線性を示した。

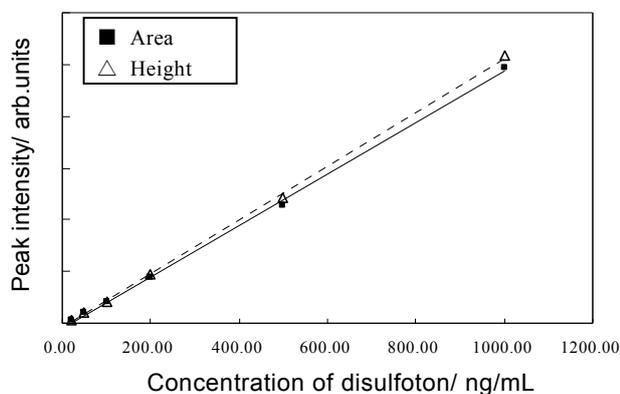


Fig. 2 Calibration curves of disulfoton

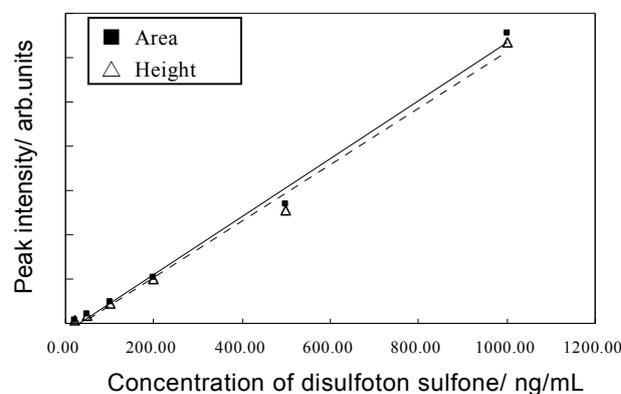


Fig. 3 Calibration curves of disulfoton sulfone

3.3 妨害物質の検討

分析センター法から精製方法を変更したことから、妨害物質について検討を行った。

とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草について、本法に従って操作を行ったところ、定量を妨害するピークは検出されなかった。クロマトグラム例を Fig. 4 に示した。

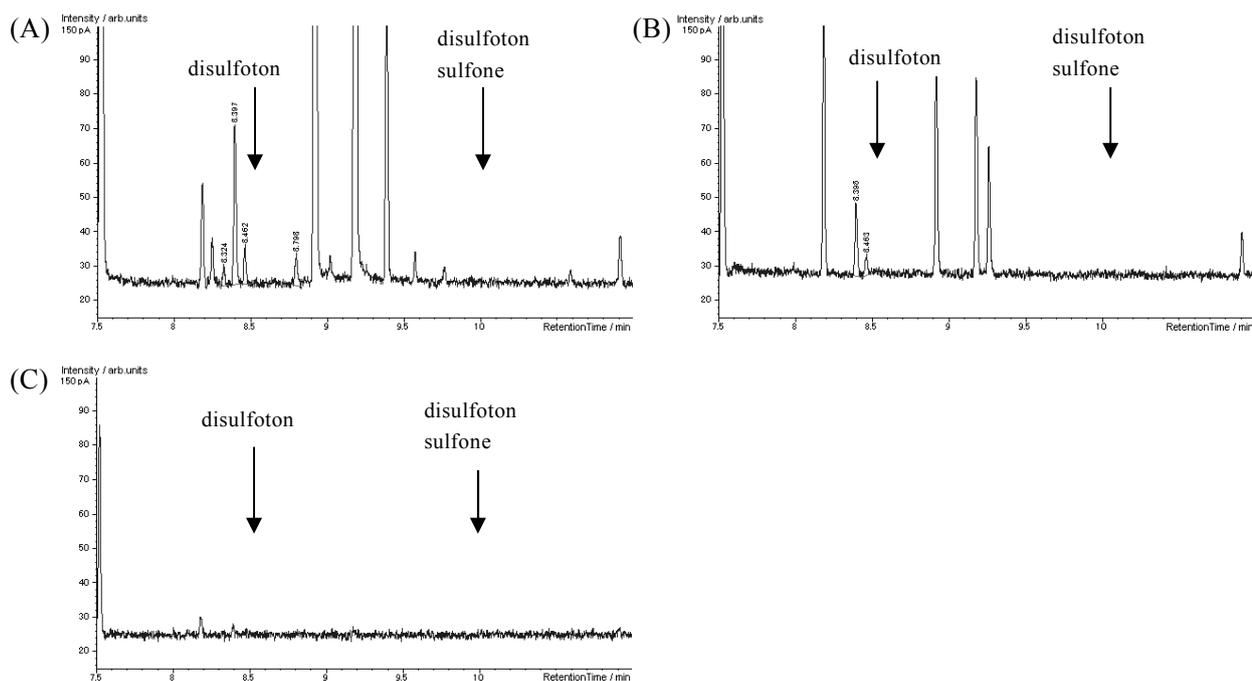


Fig. 4 Chromatograms of blank solutions

GC conditions are shown in Table 3.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

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

(C) Sample solution of sudangrass hay (not spiked)

(Arrows indicate the retention times of disulfoton and disulfoton sulfone)

3.4 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。

ジスルホトン及びジスルホトンスルホンとして、とうもろこしに 10 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、配合飼料に 40 及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、スーダングラス乾草に 100 及び 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量をそれぞれ添加した試料について、本法に従って 3 点併行で定量を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 9 のとおり、ジスルホトンの平均回収率は 21.1~142 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 47 %以下、ジスルホトンスルホンの平均回収率は 72.6~211 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.5 %以下であった。

ジスルホトンスルホンは、ばらつきは少ないが一部の試料で回収率が高かった。ジスルホトンはばらつきも大きく、回収率の差も大きかった。

そこで、試料に各農薬を添加してからの時間経過による差を検討するため、とうもろこしに標準液を添加した後、速やかに抽出作業を行い精製した場合と、一晚放置した後に抽出作業を行い精製した場合の比較を行った。

その結果、Table 10 のとおり、ジスルホトンでは明確な回収率の低下が見られたが、ジスルホトンスルホンでは回収率は高いものの、回収率の変動は少なかった。

この結果より、ジスルホトンは標準液添加後の静置時間によって定量に影響がでることが考えられた。

Table 9 Recoveries of disulfoton and disulfoton sulfone from three kinds of feed

Pesticide	Feed types	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Disulfoton	Corn	10	54.9	17
		20	57.9	6.5
	Formula feed	40	82.5	2.7
		200	21.1	47
	Sudangrass hay	100	142	5.3
		1,000	70.0	5.3
Disulfoton sulfone	Corn	10	111	6.5
		20	72.6	2.5
	Formula feed	40	127	3.2
		200	77.3	3.8
	Sudangrass hay	100	211	3.8
		1,000	83.6	5.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 10 Influence of standing time on recoveries

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Disulfoton ^{c)}	20	122	3.9
Disulfoton sulfone ^{c)}		244	5.2
Disulfoton ^{d)}	20	12.0	20
Disulfoton sulfone ^{d)}		247	2.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract at once after addition of standard solution

d) Allow to stand for over night after addition of standard solution

3.5 共同試験

本法の室間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。

とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ 20, 200 及び 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用い、株式会社島津総合分析試験センター、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、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターの 8 試験室で共同分析を実施した。

ジスルホトンの結果は Table 11 のとおりであり、とうもろこしでは、平均回収率は 50.4 %、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として 7.4 及び 39 %であり、HorRat は 1.77 であった。

また、若令牛育成用配合飼料では、平均回収率は 32.8 %、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として 15 及び 80 %であり、HorRat は 3.91 であった。

また、スーダングラス乾草では、平均回収率は 49.5 %、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として 5.0 及び 44 % であり, HorRat は 2.74 であった.

ジスルホトンスルホンの結果は Table 12 のとおりであり, とうもろこしでは, 平均回収率は 105 %, 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として 7.9 及び 10 % であり, HorRat は 0.46 であった.

また, 若令牛育成用配合飼料では, 平均回収率は 103 %, 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として 4.6 及び 10 % であり, HorRat は 0.50 であった.

また, スーダングラス乾草では, 平均回収率は 97.4 %, 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として 5.7 及び 27 % であり, HorRat は 1.66 であった.

なお, 参考のため, 各試験室で使用したガスクロマトグラフの機種等を Table 13 に示した.

Table 11 Collaborative study for disulfoton

	Corn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Formula feed for growing cattle ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Sudangrass hay ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	3.26	3.22	11.8	19.7	349	405
2	10.20	8.25	78.8	85.9	443	500
3	8.95	9.02	54.1	40.0	496	511
4	13.2	14.0	150	171	918	919
5	14.4	15.9	25.9	37.6	401	367
6	13.1	12.1	113	134	702	703
7	11.7	10.7	26.5	40.8	374	328
8	6.90	6.40	34.2	27.6	249	258
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.0		200		1000	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	10.1		65.7		495	
Recovery ^{a)} (%)	50.4		32.8		49.5	
RSD _r ^{b)} (%)	7.4		15		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	39		80		44	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		16	
HorRat	1.77		3.91		2.74	

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 12 Collaborative study for disulfoton sulfone

	Corn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Formula feed for growing cattle ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Sudangrass hay ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	19.9	19.9	193	191	1140	1160
2	22.0	19.1	216	190	1070	1250
3	19.8	20.6	216	226	1030	1010
4	24.8	24.6	252	228	1150	1200
5	21.6	21.3	201	206	980	932
6	23.7	17.8	189	194	972	936
7	21.8	21.8	221	217	946	1040
8	18.5	18.9	176	180	403	364
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.0		200		1000	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	21.0		206		974	
Recovery ^{a)} (%)	105		103		97.4	
RSD _r ^{b)} (%)	7.9		4.6		5.7	
RSD _R ^{c)} (%)	10		10		27	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		16	
HorRat	0.46		0.50		1.66	

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 13 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-FPD	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies HP6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
3	Hewlett-Packard 6890 plus	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
4	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
5	Shimadzu GC-17A (FPD-17)	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
6	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
7	Agilent Technologies 6890	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
8	Shimadzu GC-2010AF (FPD-2010)	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンについて、分析センター法を基に、ガス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) ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの窒素ガス乾固による影響を確認したところ、キーパーとしてアセトン-ジエチレングリコール (1+1) を添加する必要があることが確認された。
- 2) 多孔性ケイソウ土カラムによる精製を検討したところ、酢酸エチル-ヘキサン (1+1) で溶出する方法を選択したが、更なる検討が必要であると考えられた。
- 3) ゲル浸透クロマトグラフィーによる精製を検討したところ、70 mL~110 mL の画分でジスルホトン及びジスルホトンスルホンが溶出することが確認された。
- 4) ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの検量線は 20~1,000 ng/mL (注入量として 40~2,000 pg) で直線性を示した。
- 5) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 6) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草を用いて、とうもろこしに 10 及び 20 µg/kg 相当量、配合飼料に 40 及び 200 µg/kg 相当量、スーダングラス乾草に 100 及び 1,000 µg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料について添加回収試験を実施した結果、ジスルホトンの平均回収率は 21.1~142 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 47 %以下、ジスルホトンスルホンの平均回収率は 72.6~211 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.5 %以下の結果が得られた。
- 7) 添加回収試験を行う際に、各農薬を添加した後静置する時間について検討を行ったところ、一晚静置した場合、ジスルホトンの回収率が低くなる傾向があった。
- 8) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ 20, 200 及び 1,000 µg/kg 相当量を添加した共通試料を用いて 8 試験室で本法による共同分析を実施した。その結果、ジスルホトンについて、とうもろこしでは、平均回収率は 50.4 %、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として 7.4 及び 39 %であり、HorRat は 1.77 であった。若令牛育成用配合飼料では、平均回収率は 32.8 %、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として 15 及び 80 %であり、HorRat は 3.91 であった。スーダングラス乾草では、平均回収率は 49.5 %、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として 5.0 及び 44 %であり、HorRat は 2.74 であった。
ジスルホトンスルホンについて、とうもろこしでは、平均回収率は 105 %、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として 7.9 及び 10 %であり、HorRat は 0.46 であった。若令牛育成用配合飼料では、平均回収率は 103 %、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として 4.6 及び 10 %であり、HorRat は 0.50 であった。スーダングラス乾草では、平均回収率は 97.4 %、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として 5.7 及び 27 %であり、HorRat は 1.66 であった。
- 9) 以上のことから、本法による飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンの同時定量は難しいと思われる。

謝 辞

共同試験にご協力いただいた株式会社島津総合分析センター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) 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，85 (2007).
- 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).

精度管理

1 平成 21 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

高橋 亜紀子^{*1}，松尾 信吾^{*2}，大島 慎司^{*3}，榊原 良成^{*4}，
田中 里美^{*5}，高橋 雄一^{*6}，杉本 泰俊^{*7}，矢野 愛子^{*7}

1 目 的

飼料検査指導機関，飼料・飼料添加物業者，民間分析機関等を対象に飼料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	幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料調製試料
D 試料	ほ乳期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 21 年 7 月 3 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令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料 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．

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課，

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター札幌センター，

^{*3} (独) 農林水産消費安全技術センター仙台センター，現 同肥飼料安全検査部

^{*4} (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター，

^{*5} (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター，現 同神戸センター，

^{*6} (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター，

^{*7} (独) 農林水産消費安全技術センター福岡センター

表 1 混合区画表

回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
	8	7	4	8	7	7	5
区画番号	1	6	8	2	9	6	4
	6	3	5	1	5	3	2
	9	4	1	3	2	9	6

(2) B 試料

粉碎した後，1 mm の網ふるいを通させた魚粉 100 kg を用いて，A 試料と同様の操作を行い，1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

(3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去し，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。

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
マイロ	10	アルファルファミール	8
大麦	10	ビートパルプ	8
米ぬか	10	炭酸カルシウム	3
なたね油かす	10	食塩	2

(4) D 試料

ほ乳期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。

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，リン及びモネンシンナトリウム

B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・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「平成 21 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（103 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 protocol¹⁾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	19.15	19.24	6.03	6.04	70.40	70.48	14.10	14.11	52.68	52.58	50.00	49.79
2	19.27	19.23	6.09	5.99	70.28	70.74	14.31	14.19	52.56	52.34	50.87	51.35
3	19.38	19.39	6.07	6.07	70.78	70.32	14.03	14.29	51.69	51.35	49.54	49.45
4	19.13	19.16	6.05	6.09	70.19	70.17	14.27	14.31	52.88	51.98	50.37	49.43
5	19.14	19.11	6.04	6.10	70.36	70.62	14.10	14.12	52.64	52.21	49.92	51.01
6	19.10	19.16	6.12	6.11	70.35	70.67	14.19	14.10	52.65	51.68	51.23	51.05
7	19.04	19.26	6.03	6.00	70.61	70.24	14.24	14.35	52.56	51.41	50.47	50.03
8	19.33	19.06	6.05	6.07	70.08	70.21	14.28	14.16	52.28	52.24	50.24	51.18
9	19.06	19.27	5.99	6.03	70.68	70.85	14.31	14.22	52.37	51.65	50.64	50.30
10	19.34	19.06	6.03	6.11	70.17	70.19	14.30	14.34	51.44	51.86	49.45	50.35

表 4 A, B 及び D 試料のバラツキ調査

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	S_s/σ^a	
		S	ϕ	V	F_0		
A試料	粗たん白質	試料間 A	0.1074	9	0.0119	0.92	-
		分析誤差 E	0.1295	10	0.0130		
		総計 T	0.2369	19			
	粗灰分	A	0.0181	9	0.0020	1.59	-
		E	0.0126	10	0.0013		
		T	0.0307	19			
B試料	粗たん白質	A	0.6965	9	0.0774	1.98	-
		E	0.3916	10	0.0392		
		T	1.0881	19			
	粗灰分	A	0.1157	9	0.0129	2.00	-
		E	0.0642	10	0.0064		
		T	0.1799	19			
D試料	銅	A	2.3608	9	0.2623	1.27	-
		E	2.0644	10	0.2064		
		T	4.4252	19			
	亜鉛	A	5.4185	9	0.6021	2.74	-
		E	2.1947	10	0.2195		
		T	7.6133	19			

a) σ の値は Horwitz の式から求めた標準偏差であり, $S_s = \sqrt{(A-E)/2}$ である.

b) 一元配置の分散分析で分散比 $F_0 < F(9,10;0.05) = 3.02$ の場合はそれ以降の計算は行わなかった.

6 参加試験室

- (1) 総数 274
 うち 飼料関係...179
 飼料添加物関係...18
 団体等...28
 検査指導機関...49
- (2) 試料別参加試験室数
 A 試料...270
 B 試料...261
 C 試料...148
 D 試料...118

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		MN(管理分析・70-127)	MN(HPLC・アミノ酸)
	分析値 (%)	No. z-score														
1	12.75	1 0.26	19.20	4 0.97	3.29	1 0.78			6.07	1 -0.38						
2	12.60	1 -0.26	19.33	1 1.54					5.86	2 -2.40						
3	12.60	3 -0.26	18.40	5 -2.56					5.88	2 -2.21						
5	12.80	1 0.44	19.18	1 0.88	3.40	1 1.56			5.98	1 -1.25						
6	12.60	1 -0.26	18.66	1 -1.41					5.30	1 -7.80						
7	12.18	1 -1.78	19.23	4 1.10					6.12	1 0.09						
8	12.74	1 0.23	19.10	2 0.53	3.93	1 5.32			6.40	1 2.79						
9	12.60	1 -0.26	19.12	4 0.61	3.54	1 2.55			5.60	1 -4.91						
10	12.64	1 -0.12	19.44	4 2.03	3.30	1 0.85			6.09	1 -0.19						
11	12.62	1 -0.19	19.03	3 0.22	3.03	2 -1.06			6.83	1 6.23	1.050	3 2.68	0.560	2 -1.07		
12	12.84	1 0.59	18.79	2 -0.84	3.18	1 0.00	6.10	2 0.64	5.76	1 -3.37	1.036	2 2.26	0.567	1 -0.44		
13	12.91	1 0.84	19.37	2 1.72	3.12	1 -0.42	4.01	2 -4.19	6.20	1 0.86	0.912	2 -1.43	0.566	1 -0.53		
14	12.47	1 -0.73	18.93	4 -0.22	3.83	2 4.61	6.83	2 2.33	5.91	1 -1.92	0.860	3 -2.98	0.560	2 -1.07		
16	11.59	1 -3.90	18.86	2 -0.53	3.18	1 0.00	5.08	2 -1.71	6.27	1 1.54	0.940	2 -0.59	0.570	1 -0.17		
17	12.23	1 -1.60	19.58	2 2.65					5.90	1 -2.02						
18	12.68	1 0.01	19.06	4 0.35	3.16	2 -0.14	6.11	3 0.67	6.06	1 -0.48	0.971	1 0.32	0.575	1 0.26	33.8	1 1.04
19	12.93	1 0.91	18.98	4 0.00	3.24	2 0.42	6.37	3 1.27	6.06	1 -0.48	0.943	2 -0.50	0.570	1 -0.17		
20	12.86	1 0.66	19.22	4 1.06	3.00	2 -1.27	6.16	2 0.78	6.16	1 0.48	0.967	1 0.20	0.573	1 0.08	31.3	2 -0.40
21	12.95	1 0.98	18.79	4 -0.84	3.13	1 -0.35	6.41	3 1.36	6.15	1 0.38	0.945	2 -0.44	0.565	1 -0.62	32.8	1 0.46
22	12.67	1 -0.01	19.07	4 0.39	2.88	2 -2.13	5.99	3 0.39	5.97	1 -1.34	0.940	1 -0.59	0.565	1 -0.62		36.2 3 5.84
23	12.78	1 0.37	18.93	2 -0.22	2.98	2 -1.42	2.98	2 -1.42	6.13	1 0.19	0.979	2 0.56	0.561	1 -0.98	33.6	1 0.92
24	12.77	2 0.34	19.15	4 0.75	3.12	1 -0.42	5.84	3 0.04	5.98	1 -1.25	0.957	2 -0.08	0.557	1 -1.34	33.5	1 0.87
25	12.66	1 -0.05	18.94	4 -0.17	3.31	2 0.92	6.56	3 1.71	6.10	1 -0.09	0.987	1 0.80	0.580	1 0.71	36.6	2 2.66
26	11.95	2 -2.60	18.82	4 -0.70	3.08	2 -0.71	6.48	2 1.52	6.25	1 1.34	0.960	2 0.00	0.560	1 -1.07		
27	12.88	1 0.73	19.03	4 0.22	3.48	1 2.13	6.02	2 0.46	6.19	1 0.77	1.000	2 1.19	0.570	1 -0.17	29.8	1 -1.27
28	13.05	1 1.34	19.01	4 0.13	3.16	1 -0.14	6.36	2 1.25	6.06	1 -0.48	0.943	2 -0.50	0.567	1 -0.44	32.9	1 0.52
29	12.90	1 0.80	19.17	4 0.84	3.44	1 1.84	6.40	2 1.34	6.26	1 1.44	0.970	2 0.29	0.590	2 1.61	32.7	1 0.40
30	12.67	1 -0.01	18.99	4 0.04	3.25	1 0.49	6.52	2 1.62	5.66	1 -4.33	0.960	2 0.00	0.590	1 1.61		31.9 3 1.54
31	12.84	1 0.59	19.14	4 0.70	2.98	2 -1.42	5.82	3 0.00	6.09	1 -0.19	0.929	2 -0.92	0.578	1 0.53		
32	12.68	1 0.01	19.13	4 0.66	3.24	1 0.42	5.78	2 -0.09	6.18	1 0.67	0.970	2 0.29	0.566	1 -0.53	33.8	1 1.04
35	12.66	1 -0.05	19.20	1 0.97	3.20	1 0.14	6.27	2 1.04	6.27	1 1.54	0.904	2 -1.66	0.566	1 -0.53		31.1 3 0.74
41	12.71	1 0.12	18.99	4 0.04	3.23	1 0.35	5.91	2 0.20	6.11	1 0.00	0.951	2 -0.26	0.583	1 0.98	29.2	3 -1.14
42	12.90	1 0.80	18.96	4 -0.08	3.28	1 0.70	6.85	2 2.38	6.10	1 -0.09	0.933	2 -0.80	0.590	1 1.61	33.1	1 0.63
43	12.75	1 0.26	19.20	2 0.97	2.90	2 -1.98	6.01	3 0.44	6.03	1 -0.77	0.959	2 -0.02	0.566	1 -0.53		30.0 3 -0.34
44	12.43	1 -0.88	18.82	4 -0.70	3.03	2 -1.06	6.45	3 1.45	5.96	1 -1.44	0.969	3 0.26	0.565	1 -0.62		
45	12.64	1 -0.12	18.98	4 0.00	3.05	2 -0.92	6.70	2 2.03	6.16	1 0.48	0.992	1 0.95	0.571	1 -0.08		29.0 3 -1.34
46	11.83	1 -3.03	18.68	2 -1.32												
47	11.91	1 -2.75	18.76	4 -0.97					5.91	1 -1.92						
48	11.43	1 -4.47	19.38	4 1.76	3.68	1 3.55			5.65	1 -4.43						
50	12.99	1 1.13	18.91	4 -0.30	3.13	1 -0.35	5.82	2 0.00	6.06	1 -0.48	0.984	2 0.71	0.575	1 0.26	31.7	1 -0.17
52	12.41	1 -0.95	19.04	4 0.26	3.09	2 -0.63	5.98	2 0.37	6.08	1 -0.28	0.956	2 -0.11	0.551	1 -1.88		
53	12.75	1 0.26	19.02	4 0.17	3.27	1 0.63			5.97	1 -1.34						
54	12.89	1 0.77	19.06	4 0.35					6.08	1 -0.28						
56	12.71	1 0.12	19.06	1 0.35	3.11	1 -0.49			6.09	1 -0.19						
57	12.59	1 -0.30	17.87	1 -4.90	3.23	1 0.35	6.12	1 0.69	5.44	1 -6.45	0.985	3 0.74	0.610	2 3.41		
58	12.37	1 -1.09							6.15	1 0.38						
59	12.73	1 0.19	19.10	4 0.53	3.14	1 -0.28	6.15	2 0.76	6.04	1 -0.67	0.980	1 0.59	0.579	1 0.62		
60	12.44	1 -0.84	19.18	4 0.88	3.17	1 -0.07	5.93	2 0.25	6.38	1 2.60	0.985	2 0.74	0.567	1 -0.44		
62	12.78	1 0.37	18.96	4 -0.08	2.98	1 -1.42	6.22	2 0.92	6.20	1 0.86	0.961	1 0.02	0.563	1 -0.80		
63	12.42	1 -0.91	19.11	4 0.57	3.05	2 -0.92			6.08	1 -0.28						
64	13.02	1 1.24	22.48	4 15.48	3.24	1 0.42	5.83	3 0.02	6.15	1 0.38			0.590	1 1.61		
65	12.24	1 -1.56	19.03	1 0.22					5.72	1 -3.75						
66	12.63	1 -0.16	19.02	4 0.17	3.32	1 0.99	6.34	2 1.20	6.11	1 0.00	0.923	2 -1.10	0.609	1 3.32		
67	12.60	1 -0.26	18.93	4 -0.22	3.28	1 0.70	5.55	2 -0.62	6.16	1 0.48	0.961	2 0.02	0.575	1 0.26		
68			18.76	3 -0.97												
69	12.78	1 0.37	19.12	3 0.61	3.08	2 -0.71	5.98	2 0.37	6.08	1 -0.28	0.995	2 1.04	0.565	1 -0.62		
70	12.75	1 0.26	19.00	4 0.08	3.21	2 0.21			6.24	1 1.25						
71	12.89	1 0.77	19.00	4 0.08	3.21	1 0.21			6.15	1 0.38	0.887	2 -2.17	0.579	1 0.62	30.9	1 -0.63
72	12.80	1 0.44	17.99	2 -3.32	3.06	1 -0.85			6.20	1 0.86						
73	11.48	1 -4.29	19.45	4 2.07	3.59	1 2.91			6.05	1 -0.57						
75	12.60	1 -0.26	19.20	4 0.97	3.28	1 0.70	5.75	1 -0.16	6.10	1 -0.09	0.997	1 1.10	0.549	1 -2.06		
77	12.61	1 -0.23							5.82	1 -2.79	1.008	2 1.43	0.555	2 -1.52		
78	12.44	1 -0.84	19.06	4 0.35	2.93	2 -1.77	6.15	3 0.76	6.15	1 0.38	0.959	2 -0.02	0.563	1 -0.80		
79	13.14	1 1.67	18.97	4 -0.04	3.19	1 0.07			6.10	1 -0.09						
84	12.78	1 0.37	18.98	1 0.00	3.15	1 -0.21	5.79	2 -0.06	6.09	1 -0.19	0.941	2 -0.56	0.573	1 0.08		
85	12.60	1 -0.26	19.00	2 0.08	3.23	1 0.35	5.91	3 0.20	6.10	1 -0.09	0.940	2 -0.59	0.554	1 -1.61		
86	12.52	1 -0.55	18.64	4 -1.50	3.01	2 -1.20	5.71	3 -0.25	6.07	1 -0.38	0.951	2 -0.26	0.539	1 -2.96		
87	13.00	1 1.16	18.74	4 -1.06	3.06	1 -0.85	6.67	3 1.96	6.09	1 -0.19	0.835	2 -3.72	0.534	1 -3.41		
88	12.79	1 0.41	20.13	2 5.08	3.08	1 -0.71	5.98	1 0.37	6.12	1 0.09						
89	12.80	1 0.44	18.93	4 -0.22	3.26	1 0.56	6.27	3 1.04	6.06	1 -0.48	1.026	2 1.96	0.560	1 -1.07		
90	12.20	1 -1.70	18.72	4 -1.14	3.17	1 -0.07	6.35	3 1.22	6.26	1 1.44	0.979	2 0.56	0.585	1 1.16		
93	12.84	1 0.59	19.29	1 1.37	3.24	1 0.42	5.99	2 0.39	6.13	1 0.19	1.002	2 1.25	0.574	1 0.17		
107	12.76	1 0.30	18.88	4 -0.44	3.03	1 -1.06	5.97	2 0.34	6.15	1 0.38	0.959	1 -0.02	0.578	1 0.53	32.0	4 1.64
108	12.70	1 0.08	18.80	1 -0.79	2.92	1 -1.84	5.18	2 -1.48	6.19	1 0.77	0.987	2 0.80	0.572	1 0.00		
109			19.91	3 4.11												
110											0.960	1 0.00	0.565	1 -0.62		
111	12.79	1 0.41	18.98	4 0.00	2.99	2 -1.34	6.11	3 0.67	6.00	1 -1.05	0.943	2 -0.50	0.573	1 0.08		
112	13.02	1 1.24	19.59	3 2.69	2.91	2 -1.91	5.87	2 0.11	6.14	1 0.28	1.015	2 1.63	0.610	1 3.41		
113	12.88	1 0.73	18.73	4 -1.10	3.10	2 -0.56	6.04	3 0.50	6.18	1 0.67	0.942	2 -0.53	0.577	1 0.44	33.4	1 0.81
113	</															

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		MN(管理分析 - 70-02/1933)	MN(HPLC・Kイオン)	
	分析値 (%)	No. z-score			分析値 (g/100g)												
122	12.85	1 0.62	18.94	3 -0.17	3.02	2 -1.13	6.35	3 1.22	6.21	1 0.96	1.183	3 0.64	0.503	2 -0.20			
123	12.58	1 -0.34	18.80	4 -0.79	3.26	1 0.56	5.65	2 -0.39	6.08	1 -0.28	0.908	2 -1.55	0.555	1 -1.52	34.5	2 1.45	
124	12.32	1 -1.27	18.80	4 -0.79	3.38	1 1.42	6.02	2 0.46	6.11	1 0.00	0.950	2 -0.29	0.570	1 -0.17			
125	12.83	1 0.55	19.08	4 0.44	3.50	2 2.27			6.28	1 1.63	0.850	2 -2.27	0.550	1 -1.97			
127	12.81	1 0.48	19.00	3 0.08	3.23	1 0.35			6.21	1 0.96	0.959	2 -0.02	0.594	1 1.97	34.1	2 1.21	
128	12.63	1 -0.16	18.84	2 -0.61	3.30	1 0.85	4.40	2 -3.28	6.12	1 0.09							
129	12.37	1 -1.09	19.27	1 1.28	3.35	1 1.20	6.12	2 0.69	6.02	1 -0.86	0.978	2 0.53	0.566	1 -0.53			
130	12.80	1 0.44	18.87	4 -0.48	3.14	1 -0.28	5.33	2 -1.13	6.13	1 0.19	0.950	2 -0.29	0.572	1 0.00	31.3	1 -0.40	
131	11.62	1 -3.79													32.5	1 0.29	
132	12.43	1 -0.88															
133	12.63	1 -0.16	18.97	3 -0.04	3.33	1 1.06	5.60	2 -0.50	6.15	1 0.38	0.958	1 -0.05	0.570	1 -0.17			
134	12.78	1 0.37	19.05	4 0.30	3.10	2 -0.56	5.71	3 -0.25	6.16	1 0.48	0.973	2 0.38	0.579	1 0.62			
135	11.89	1 -2.82	18.54	3 -1.94	3.02	1 -1.13	6.08	4 0.60	6.03	1 -0.77	0.939	2 -0.62	0.575	1 0.26	32.2	1 0.11	
136	12.85	1 0.62	18.80	4 -0.79	2.96	1 -1.56	6.41	3 1.36	6.32	1 2.02	0.950	2 -0.29	0.580	1 0.71	31.3	1 -0.40	
137	13.07	1 1.42	19.00	4 0.08	3.36	2 1.27	6.16	3 0.78	6.33	1 2.11	0.973	3 0.38	0.573	1 0.08		30.8 3 0.44	
138	12.61	1 -0.23	18.76	3 -0.97	2.93	2 -1.77	5.73	3 -0.20	6.26	1 1.44	0.962	2 0.05	0.580	1 0.71			
138			18.51	4 -2.07													
139	12.85	1 0.62	19.12	4 0.61	3.22	1 0.28	6.01	3 0.44	6.11	1 0.00	0.979	2 0.56	0.595	1 2.06		29.8 3 -0.54	
140	12.52	1 -0.55			3.14	2 -0.28	5.71	3 -0.25	6.06	1 -0.48	0.980	2 0.59	0.560	1 -1.07			
141	12.72	1 0.16	19.11	4 0.57	3.31	1 0.92	5.52	2 -0.69	6.12	1 0.09	0.934	2 -0.77	0.584	1 1.07	29.4	3 -0.94	
142	12.49	1 -0.66	18.93	1 -0.22	3.00	1 -1.27	6.07	2 0.57	6.09	1 -0.19	0.930	2 -0.89	0.575	1 0.26			
142			19.55	3 2.52													
143	12.64	1 -0.12	18.60	4 -1.68	3.19	2 0.07	5.46	3 -0.83	6.13	1 0.19	0.806	1 -4.59	0.564	1 -0.71			
144	12.51	1 -0.59	19.25	1 1.19	3.12	1 -0.42	6.47	2 1.50	5.53	1 -5.58	0.951	2 -0.26	0.565	1 -0.62	36.3	1 2.49	
146	12.96	1 1.02	18.17	4 -3.88	3.05	2 -0.92	5.88	2 0.13	6.31	1 1.92	0.478	2 -14.36	0.581	1 0.80			
148	12.71	1 0.12	19.04	4 0.26	3.27	2 0.63	6.63	3 1.87	6.18	1 0.67	0.944	2 -0.47	0.570	1 -0.17	28.9	2 -1.79	
149	12.70	1 0.08	18.83	3 -0.66	3.00	2 -1.27	5.45	2 -0.85	6.13	1 0.19	0.948	2 -0.35	0.597	1 2.24		30.3 3 -0.04	
150	12.89	1 0.77	19.19	3 0.92	3.29	1 0.78	5.73	3 -0.20	6.11	1 0.00	0.946	2 -0.41	0.585	1 1.16	34.5	2 1.45	
150			18.86	4 -0.53												29.7 3 -0.64	
151	12.75	1 0.26	18.98	4 0.00	3.35	1 1.20	5.72	2 -0.23	6.03	1 -0.77	0.955	2 -0.14	0.571	1 -0.08			
153	12.67	1 -0.01	18.93	3 -0.22	3.10	1 -0.56	5.83	2 0.02	6.11	1 0.00	0.939	1 -0.62	0.578	1 0.53	31.1	1 -0.52	
155	12.95	1 0.98	18.95	2 -0.13	3.12	1 -0.42	6.13	2 0.71	6.09	1 -0.19	1.004	2 1.31	0.573	1 0.08			
156	12.74	1 0.23	18.88	4 -0.44	3.47	1 2.05	5.41	1 -0.94	6.18	1 0.67	0.965	2 0.14	0.585	1 1.16			
157	12.35	1 -1.16	17.91	2 -4.73	3.18	1 0.00	5.20	2 -1.43	6.41	1 2.89	0.339	2 -18.51	0.524	1 -4.31			
158	13.10	1 1.52	19.08	4 0.44	3.11	2 -0.49	6.64	2 1.89	5.57	1 -5.20	0.996	1 1.07	0.570	1 -0.17			
159	13.20	1 1.88	18.18	2 -3.53	3.01	1 -1.20	6.64	2 1.89	6.21	1 0.96							
160	12.19	1 -1.74	18.95	1 -0.13	2.19	1 -2.02	5.60	1 -4.91	5.60	1 -4.91			0.136	1 -39.21			
161	12.90	1 0.80	18.94	4 -0.17	3.56	1 2.69	5.95	3 0.30	5.69	1 -4.04	0.999	2 1.16	0.617	1 4.04			
162			18.97	3 -0.04													
164	12.33	1 -1.24	18.51	2 -2.07	2.18	2 -7.10	5.68	1 -0.32	6.09	1 -0.19	0.983	2 0.68	0.571	1 -0.08			
165	12.35	1 -1.16	19.07	4 0.39	3.12	1 -0.42											
165	12.35	2 -1.16															
168	12.77	1 0.34	19.04	2 0.26	3.33	1 1.06	5.61	2 -0.48	5.62	1 -4.72							
168			19.07	3 0.39													
169	12.78	1 0.37	19.17	1 0.84	3.18	1 0.00	5.52	2 -0.69	5.43	1 -6.55	0.945	2 -0.44	0.566	1 -0.53			
169			18.87	3 -0.48													
170	12.46	1 -0.77	19.08	4 0.44	3.20	1 0.14	5.67	2 -0.34	6.06	1 -0.48	0.952	2 -0.23	0.570	1 -0.17			
171	12.65	1 -0.08	18.90	2 -0.35	3.21	1 0.21	5.37	1 -1.04	6.15	1 0.38	0.980	2 0.59	0.572	1 0.00			
171			18.84	4 -0.61			5.28	2 -1.25									
172	7.36	1 -19.11	18.31	3 -2.96											29.6	3 -0.74	
173	12.20	1 -1.70	18.83	4 -0.66	3.03	1 -1.06	5.86	2 0.09	5.90	1 -2.02	0.946	2 -0.41	0.563	1 -0.80	31.3	1 -0.40	
173																	
174	12.87	1 0.70	18.92	3 -0.26	3.10	2 -0.56	5.98	3 0.37	6.07	1 -0.38	0.963	2 0.08	0.581	1 0.80		30.4 3 0.04	
175	12.96	1 1.02	19.03	4 0.22	3.27	1 0.63	5.88	3 0.13	6.09	1 -0.19	0.958	1 -0.05	0.577	1 0.44	31.1	1 -0.52	
177	12.43	1 -0.88	19.20	2 0.97	3.20	1 0.14	4.99	1 -1.92	6.00	1 -1.05	0.967	2 0.20	0.580	1 0.71			
178			18.95	2 -0.13	3.20	1 0.14	6.03	2 0.48	5.84	1 -2.60	1.023	2 1.87	0.560	1 -1.07			
179	12.43	1 -0.88	19.05	4 0.30	3.17	1 -0.07	5.67	1 -0.34	6.16	1 0.48	0.956	2 -0.11	0.576	1 0.35			
180															29.9	3 -0.44	
181	12.83	1 0.55	18.95	4 -0.13	3.15	1 -0.21			6.21	1 0.96	0.979	2 0.56	0.573	1 0.08			
184	12.74	1 0.23	18.80	3 -0.79	3.18	1 0.00	5.73	2 -0.20	5.99	1 -1.15	0.944	2 -0.47	0.572	1 0.00			
186	12.81	1 0.48	18.88	2 -0.44	3.12	1 -0.42	4.96	2 -1.99	6.15	1 0.38	0.980	2 0.59	0.579	1 0.62			
187	12.57	1 -0.37	18.75	2 -1.01	3.20	1 0.14	5.91	2 0.20	5.98	1 -1.25	0.955	2 -0.14	0.583	1 0.98			
188	12.67	1 -0.01	18.37	4 -2.69	3.09	1 -0.63	5.16	2 -1.52	6.18	1 0.67	0.717	2 -2.24	0.579	1 0.62			
189	12.42	1 -0.91	19.16	4 0.79	3.27	1 0.63	6.23	1 0.94	6.24	1 1.25	0.948	2 -0.35	0.560	1 -1.07			
190	12.55	1 -0.44	18.76	4 -0.97	3.17	1 -0.07	6.29	2 1.08	6.11	1 0.00	1.027	2 1.99	0.585	1 1.16			
191	12.86	1 0.66	21.72	4 12.11	3.60	1 2.98	6.41	2 1.36	6.56	1 4.33	1.111	2 4.50	0.659	1 2.82			
192	12.41	1 -0.95	18.99	1 0.04	3.10	1 -0.56	5.07	2 -1.73	6.26	1 1.44	0.958	2 -0.05	0.571	1 -0.08	30.8	1 -0.69	
206	13.10	1 1.52	19.12	4 0.61	3.29	1 0.78			6.14	1 0.28					29.7	4 -0.64	
207	12.82	1 0.52	18.73	4 -1.10	3.18	1 0.00	5.90	2 0.18	7.10	1 2.53	1.187	1 6.76	0.556	1 -1.43			
208	13.42	1 2.68	19.18	4 0.88					5.90	1 -2.02					29.2	2 -1.62	
209	12.86	1 0.66	19.37	4 1.72	3.11	6 -0.49			6.22	1 1.05							
210	13.01	1 1.20	19.34	4 1.59	2.85	2 -2.34			5.97	1 -1.34			0.610	2 3.41			
211	11.76	1 -3.29	18.18	1 -3.53	4.04	1 6.10	4.98	2 -1.94	6.36	1 2.40	0.737	1 -6.64	0.518	1 -4.85			
212	12.60	1 -0.26	18.82	4 -0.70	2.96	2 -1.56	7.37	3 3.58	6.15	1 0.38	1.018	1 1.72	0.568	1 -0.35	33.7	3 3.34	
213	12.75	1 0.26	18.95	1 -0.13	3.38	1 1.42			6.12	1 0.09							
214	12.91	1 0.84	18.89	4 -0.39	3.10	2 -0.56			6.08	1 -0.28					30.9	1 -0.63	
215	12.82	1 0.52	18.75	4 -1.01	3.03	1 -1.06	5.07	3 -1.73	6.24	1 1.25	0.997	2 1.10	0.604	1 2.87	31.7	1 -0.17	
216	11.45	1 -4.40	17.81	1 -5.17	3.52	1 2.41	5.74	2 -0.18	6.02	1 -0.86			0.614	1 3.27			
217	12.87	1 0.70	18.22	1 -3.36	3.46	1 1.98			6.0								

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		MN(管理分析・70-1793)	MN(HPLC・Kイリヤイ)
	分析値 (%)	No. z-score														
225	12.96	1 1.02	18.94	4 -0.17	3.03	2 -1.06	5.41	2 -0.94	6.15	1 0.38			0.580	1 0.71		
225																
226	12.83	1 0.55	18.85	4 -0.57	3.15	1 -0.21	5.87	2 0.11	6.09	1 -0.19	1.041	1 2.41	0.548	1 -2.15		
227	12.93	1 0.91	18.86	4 -0.53			4.61	2 -2.80	6.16	1 0.48			0.580	1 0.71		
228	12.45	1 -0.80	19.83	1 3.75					5.59	1 -5.01						
229	12.67	1 -0.01							5.93	2 -1.73						
236	12.58	1 -0.34	19.19	4 0.92	2.95	2 -1.63	6.03	2 0.48	6.16	1 0.48						
237	12.61	1 -0.23	19.37	3 1.72	3.25	1 0.49	5.48	1 -0.78	6.15	1 0.38	1.010	2 1.49	0.555	1 -1.52		30.2 3 -0.14
237			18.98	4 0.00												
238	12.55	1 -0.44	18.94	4 -0.17	3.04	1 -0.99			6.00	1 -1.05						
239	12.13	1 -1.96	18.93	2 -0.22	3.26	1 0.56	5.55	2 -0.62	6.11	1 0.00	0.919	2 -1.23	0.575	1 0.26		
241	12.65	1 -0.08	18.83	3 -0.66					6.32	1 2.02						
242	12.82	1 0.52	18.76	2 -0.97	3.29	1 0.78			6.14	1 0.28	0.972	2 0.35	0.575	1 0.26		
243	12.85	1 0.62	18.81	1 -0.75	3.24	1 0.42	5.42	2 -0.92	6.14	1 0.28	1.046	2 2.56	0.595	1 2.06		
244	11.99	1 -2.46	19.06	4 0.35	2.89	2 -2.05	6.34	2 1.20	6.14	1 0.28	0.970	2 0.29	0.430	1 -12.27		
246	12.71	1 0.12	19.02	4 0.17	3.23	1 0.35	6.05	2 0.53	6.09	1 -0.19	0.885	3 -2.23	0.590	1 1.61		
247	12.35	1 -1.16	18.91	4 -0.30	3.30	2 0.85	5.29	2 -1.22	6.24	1 1.25					31.6 2 -0.23	
248	13.13	1 1.63					5.08	2 -1.71	6.03	1 -0.77					32.0 1 0.00	
249	12.62	1 -0.19	19.02	2 0.17	3.16	1 -0.14	5.75	2 -0.16	6.21	1 0.96	0.989	1 0.86	0.576	1 0.35		31.2 4 0.84
250	12.81	1 0.48	19.31	2 1.45	2.96	1 -1.56	4.49	1 -3.08	6.12	1 0.09	1.029	1 2.05	0.576	1 0.35		
252	12.62	1 -0.19	18.38	2 -2.65					6.27	1 1.54						
253	12.68	1 0.01	18.67	4 -1.37	3.19	1 0.07	5.41	2 -0.94	6.16	1 0.48	0.953	2 -0.20	0.569	1 -0.26	30.4 1 -0.92	
254	12.57	1 -0.37	19.46	2 2.12	3.07	2 -0.78	5.84	2 0.04	5.57	1 -5.20						
260	12.65	1 -0.08	19.12	4 0.61	2.98	2 -1.42	5.75	1 -0.16	6.18	1 0.67	1.016	2 1.66	0.570	1 -0.17		
261	12.75	1 0.26	18.89	4 -0.39	2.98	1 -1.42	5.09	2 -1.69	6.09	1 -0.19	0.960	2 0.00	0.563	1 -0.80		
264																
269	12.88	1 0.73	18.99	4 0.04	3.32	1 0.99	5.07	2 -1.73	6.06	1 -0.48	0.955	2 -0.14	0.543	1 -2.60		
271	12.65	1 -0.08	19.13	3 0.66					6.30	1 1.83						
274	12.73	1 0.19	19.08	4 0.44	3.24	1 0.42	5.64	2 -0.41	6.06	1 -0.48	0.930	2 -0.89	0.558	1 -1.25		30.1 3 -0.24
277															32.0 1 0.00	
278	12.40	1 -0.98	19.34	2 1.59	3.12	1 -0.42			6.04	1 -0.67						
279	12.04	1 -2.28	18.62	2 -1.59	3.23	1 0.35	6.96	2 2.64	5.58	1 -5.10	0.962	2 0.05	0.551	1 -1.88		
280	12.52	1 -0.55	19.15	2 0.75	3.64	1 3.26	5.69	2 -0.30	6.09	1 -0.19	0.996	1 1.07	0.570	1 -0.17		
281	12.70	1 0.08	19.37	4 1.72	3.23	1 0.35	5.71	2 -0.25	6.09	1 -0.19	1.103	2 4.26	0.569	1 -0.26		
282	12.82	1 0.52	19.00	4 0.08	3.17	1 -0.07	5.06	2 -1.76	6.24	1 1.25	0.878	2 -2.44	0.592	1 1.79		31.0 3 0.64
283	12.36	1 -1.13	19.31	4 1.45	3.35	1 1.20	5.23	2 -1.36	6.21	1 0.96	0.970	2 0.29	0.589	1 1.52	34.9 2 1.68	
284	12.50	1 -0.62	18.88	4 -0.44	3.25	1 0.49	5.67	1 -0.34	6.15	1 0.38						
285	12.89	1 0.77	19.19	2 0.92	3.11	1 -0.49	5.92	2 0.23	5.96	1 -1.44	0.911	2 -1.46	0.569	1 -0.26		
286	13.28	1 2.17	19.19	3 0.92	3.25	1 0.49	5.60	2 -0.50	6.11	1 0.00	1.015	1 1.63	0.570	1 -0.17		
287																
288	12.54	1 -0.48	19.52	4 2.38	3.15	1 -0.21			6.07	1 -0.38						
289	12.71	1 0.12	19.40	1 1.85	3.26	1 0.56	5.66	1 -0.37	6.11	1 0.00	0.897	2 -1.87	0.569	1 -0.26		
290	12.60	1 -0.26	19.20	4 0.97	3.28	1 0.70	5.75	1 -0.16	6.10	1 -0.09	0.997	1 1.10	0.549	1 -2.06		
291	11.27	1 -5.05	18.41	3 -2.52	3.19	2 0.07										
292	12.78	1 0.37	19.32	3 1.50	3.05	1 -0.92	6.24	2 0.97	5.96	1 -1.44	0.947	2 -0.38	0.567	1 -0.44		29.7 3 -0.64
293	12.42	1 -0.91	19.19	2 0.92	3.25	1 0.49			6.19	1 0.77						
294	12.78	1 0.37	19.15	1 0.75	3.15	1 -0.21	5.80	2 -0.04	6.14	1 0.28	0.985	1 0.74	0.577	1 0.44		
295	12.74	1 0.23	19.04	4 0.26	2.87	2 -2.20	6.09	4 0.62	6.19	1 0.77	1.137	1 5.27	0.576	1 0.35		33.5 3 3.14
298	13.05	1 1.34	17.56	3 -6.28	3.19	1 0.07	5.48	2 -0.78	5.92	1 -1.83						
299	12.65	1 -0.08	19.06	4 0.35	3.19	1 0.07	7.01	3 2.75	6.18	1 0.67						
300	12.76	1 0.30	18.93	2 -0.22	3.26	1 0.56	5.63	2 -0.44	6.22	1 1.05	0.924	2 -1.07	0.571	1 -0.08		30.5 3 0.14
303	12.44	1 -0.84	18.18	3 -3.53	3.25	1 0.49	6.44	3 1.43	6.05	1 -0.57						
307	11.88	1 -2.85	18.77	4 -0.92	3.01	1 -1.20	5.07	1 -1.73	6.16	1 0.48	0.965	1 0.14	0.576	1 0.35		
308	13.10	1 1.52	18.35	2 -2.78	3.04	1 -0.99	5.84	2 0.04	6.15	1 0.38						
309	12.74	1 0.23	19.01	4 0.13	3.22	1 0.28	5.41	1 -0.94	6.13	1 0.19	0.939	2 -0.62	0.577	1 0.44		
310	12.28	1 -1.42	18.74	3 -1.06	2.97	1 -1.49	5.57	1 -0.57	6.13	1 0.19	0.971	2 0.32	0.580	1 0.71		
311	13.29	1 2.21	18.90	2 -0.35	3.43	1 1.77	5.44	1 -0.88	6.19	1 0.77	0.830	1 -3.87	0.580	1 0.71		
312	12.70	1 0.08	19.06	4 0.35	2.80	2 -2.69			6.12	1 0.09	0.983	2 0.68	0.568	1 -0.35	30.5 2 -0.87	
314	12.43	1 -0.88	18.83	4 -0.66	3.26	1 0.56	5.80	2 -0.04	5.77	1 -3.27					32.0 1 0.00	
315	12.93	1 0.91														
316	12.39	1 -1.02	19.17	2 0.84	3.41	1 1.63			5.76	1 -3.37						
317	12.63	1 -0.16	18.84	2 -0.61	3.37	1 1.34	6.03	2 0.48	6.01	1 -0.96	1.008	2 1.43	0.570	1 -0.17		
318	12.29	1 -1.38	18.50	3 -2.12	3.26	1 0.56	5.63	2 -0.44	6.16	1 0.48	0.727	1 -6.94	0.614	1 3.27		
319	11.38	1 -4.65	18.69	2 -1.28	3.53	1 2.48	6.79	2 2.24	6.24	1 1.25	0.884	2 -2.26	0.054	1 -46.58		
320	12.63	1 -0.16	18.79	4 -0.84	3.10	2 -0.56	5.29	1 -1.22	6.25	1 1.34	0.930	2 -0.89	0.571	1 -0.08		
321	12.81	1 0.48	18.94	4 -0.17	2.94	1 -1.70	6.23	3 0.94	5.83	1 -2.69	0.882	1 -2.32	0.546	1 -2.33		33.7 3 3.34
322	12.39	1 -1.02	18.84	4 -0.61	3.19	1 0.07	6.17	1 0.81	6.10	1 -0.09			0.570	1 -0.17		
323	12.54	2 -0.48	18.88	4 -0.44	3.22	1 0.28	5.93	3 0.25	6.08	1 -0.28	0.977	2 0.50	0.580	1 0.71		
324	10.70	1 -7.10	19.30	2 1.41	3.30	1 0.85			5.60	1 -4.91						
325	12.25	1 -1.52	19.50	4 2.29	3.20	1 0.14	5.43	1 -0.90	6.11	1 0.00	0.966	2 0.17	0.581	1 0.80		
326	12.62	1 -0.19	18.99	4 0.04	3.08	1 -0.71			6.02	1 -0.86	0.950	2 -0.29	0.580	1 0.71		
327	12.22	1 -1.63	18.61	2 -1.63	3.27	1 0.63	5.96	2 0.32	6.21	1 0.96	1.055	2 2.83	0.566	1 -0.53	33.4 1 0.81	
328	12.08	1 -2.14	18.69	1 -1.28	3.35	1 1.20			6.34	1 2.21			0.760	1 16.90		
329	12.36	1 -1.13	18.86	4 -0.53	3.15	1 -0.21	5.87	2 0.11	6.14	1 0.28	0.946	2 -0.41	0.562	1 -0.89		
330	12.39	1 -1.02	19.00	4 0.08	3.06	1 -0.85	5.66	2 -0.37	6.06	1 -0.48	1.020	2 1.78	0.544	1 -2.51		
331	12.74	1 0.23	18.95	1 -0.13					6.16	1 0.48					27.8 2 -2.43	
332	12.87	1 0.70	18.84	2 -0.61	3.30	1 0.85			6.16	1 0.48	0.920	2 -1.19	0.580	1 0.71		
333	12.64	1 -0.12	19.01	4 0.13	2.98	2 -1.42	5.20	2 -1.43	6.09	1 -0.19	0.961	2 0.02	0.602	1 2.69		
334	12.59	1 -0.30	18.81	4 -0.75	3.25	1 0.49	5.08	2 -1.71	5.87	1 -2.31	0.880	2 -2.38	0.690	1 10.61		27.9 3 -2.44
335	12.85	1 0.62	18.89	4 -0.39	3.20	2 0.04	5.49	2 -0.76	6.21	1 0.96	0.944	2 -0.47				

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		MN(管理分析・70-イジ 17937) 分析値 (g/力値/t)	MN(HPLC・K イワサキ) 分析値 (g/力値/t)
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score		
341	12.65	1 -0.08	19.06	2 0.35	3.20	1 0.14	5.77	2 -0.11	6.07	1 -0.38	1.000	1 1.19	0.580	1 0.71		
342	12.66	1 -0.05	19.05	4 0.30	2.97	2 -1.49	6.38	3 1.29	6.13	1 0.19	0.975	2 0.44	0.578	1 0.53		
343	12.23	1 -1.60	19.96	2 <u>4.33</u>	3.68	1 <u>3.55</u>	6.24	2 0.97	6.22	1 1.05	0.862	2 -2.92	1.110	1 <u>48.38</u>		
344	12.39	1 -1.02	19.27	4 1.28	3.15	2 -0.21	5.31	2 -1.18	6.08	1 -0.28	0.970	2 0.29	0.520	1 -4.67		
345	12.57	1 -0.37	19.18	4 0.88	3.22	1 0.28			6.09	1 -0.19	0.950	2 -0.29	0.590	1 1.61		
346	12.33	1 -1.24	18.85	2 -0.57	3.14	1 -0.28			6.20	1 0.86			0.591	1 1.70		
347	12.93	1 0.91	18.89	2 -0.39	3.32	1 0.99	5.97	2 0.34	6.00	1 -1.05	0.831	2 <u>-3.84</u>	0.580	1 0.71		
348	12.66	1 -0.05	19.19	4 0.92	3.15	1 -0.21			6.14	1 0.28	0.900	1 -1.78				
349	13.15	1 1.70	19.32	4 1.50	3.07	2 -0.78	6.38	3 1.29	6.17	1 0.57	1.030	2 2.08	0.580	1 0.71	30.7	1 -0.75
350	12.90	1 0.80							5.70	1 <u>-3.95</u>						
351	13.00	1 1.16	18.69	4 -1.28	3.14	1 -0.28			6.13	1 0.19						
352	12.44	1 -0.84							6.19	1 0.77	1.040	1 2.38	0.560	1 -1.07		
353	12.43	1 -0.88	18.92	2 -0.26	3.47	1 2.05			6.14	1 0.28						
354	12.62	1 -0.19	18.90	4 -0.35	3.13	1 -0.35	5.93	3 0.25	6.20	1 0.86	0.970	2 0.29	0.582	1 0.89		
355	13.36	1 2.46	18.83	4 -0.66	3.37	1 1.34	5.48	2 -0.78	6.07	1 -0.38			0.577	1 0.44		
356	13.02	1 1.24	19.25	3 1.19	2.99	2 -1.34	5.70	3 -0.27	6.22	1 1.05	0.944	2 -0.47	0.400	1 <u>-15.46</u>		
357	12.66	1 -0.05	19.21	4 1.01	3.15	1 -0.21	5.55	2 -0.62	6.01	1 -0.96	0.930	2 -0.89	0.570	1 -0.17		
358	12.69	1 0.05	18.84	4 -0.61	3.05	2 -0.92	5.71	2 -0.25	6.16	1 0.48	1.067	2 <u>3.18</u>	0.574	1 0.17	32.7	2 0.40
359	12.09	1 -2.10	18.90	4 -0.35	3.56	1 2.69	5.53	1 -0.67	5.91	1 -1.92	0.960	2 0.00	0.574	1 0.17		
360	12.57	1 -0.37	19.11	2 0.57	3.49	1 2.20	5.52	2 -0.69	6.11	1 0.00	0.984	1 0.71	0.565	1 -0.62		
361	12.68	1 0.01	19.17	3 0.84	3.08	2 -0.71	6.47	2 1.50	5.95	1 -1.54	1.026	1 1.96	0.538	1 <u>-3.05</u>		
362	11.77	1 <u>-3.25</u>	19.27	2 1.28					6.23	1 1.15					31.1	1 -0.52
366																
368			18.76	3 -0.97												
380	12.21	2 -1.67	19.25	2 1.19	3.12	1 -0.42	5.71	2 -0.25	6.21	1 0.96	0.989	2 0.86	0.571	1 -0.08		30.2 4 -0.14
381																31.0 4 0.64
382	12.30	1 -1.34													34.4	1 1.39
383			18.62	4 -1.59												
384			18.76	3 -0.97												
385	12.69	1 0.05	19.12	1 0.61	3.49	1 2.20	4.97	2 -1.96	6.12	1 0.09	0.960	2 0.00	0.579	1 0.62		

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 水ウ酸溶液 吸収法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光度 法	2 その他
3 その他	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他	
	4 自動分析機	6 不明	4 その他			
	5 その他					

モネンシンナトリウム

- 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

表 5 分析成績 (5)

試料 番号	B試料						D試料									
	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランデル	
	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (g/トン)	No., z-score	分析値 (g/トン)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score
1	7.22	1 0.05	69.75	4 -1.00	14.14	1 -0.49										
2	7.13	1 -0.40	70.29	1 -0.20	14.07	2 -0.99										
3	6.90	3 -1.56	69.40	5 -1.52	13.40	2 -5.75										
5	7.35	1 0.70	69.47	1 -1.42	14.45	1 1.70										
6	7.10	1 -0.55	69.84	1 -0.87	13.90	1 -2.20										
7	7.10	1 -0.55	71.85	4 2.10	14.31	1 0.70										
8	7.40	1 0.95	69.99	2 -0.65	14.53	1 2.27										
9	6.65	1 -2.82	70.33	4 -0.14	14.33	1 0.85										
10	7.33	1 0.60	69.71	4 -1.06	14.26	1 0.35										
11	6.90	1 -1.56	71.62	3 1.76	15.19	1 6.95					50.12	2 -0.85	42.72	2 -3.23		
12	7.46	1 1.26	70.37	2 -0.08	14.05	1 -1.13	0.69	1 1.71	256.50	1 -0.40	50.60	1 -0.52	48.65	1 -0.75		
13	7.54	1 1.66	70.26	2 -0.25	14.22	1 0.07	0.61	1 -0.24			48.95	1 -1.65	46.73	1 -1.72		
14	7.05	1 -0.80	69.60	4 -1.23	14.30	1 0.63										
16	6.39	1 -4.13	69.69	2 -1.09	14.39	1 1.27	0.60	2 -0.49			51.40	1 0.02	50.00	1 -0.07		
17	7.27	1 0.30	72.40	2 2.92	13.84	1 -2.62										
18	7.27	1 0.30	70.31	4 -0.17	14.20	1 -0.07										
19	7.45	1 1.21	70.32	4 -0.16	14.31	1 0.70										
20	7.32	1 0.55	70.99	4 0.83	14.26	1 0.35										
21	7.46	1 1.26	70.02	4 -0.60	14.34	1 0.92										
22	7.20	1 -0.05	70.63	4 0.29	14.20	1 -0.07									15.2	1 -0.19
23	7.16	1 -0.25	70.94	2 0.75	14.38	1 1.20										
24	7.03	2 -0.90	70.08	4 -0.51	14.35	1 0.99					51.64	1 0.18				
25	7.14	1 -0.35	70.65	4 0.32	14.22	1 0.07										
26	7.17	2 -0.20	68.89	4 -2.28	14.15	1 -0.42										
27	7.10	1 -0.55	70.92	4 0.72	14.24	1 0.21					52.45	1 0.73	55.38	1 2.63		
28	7.41	1 1.00	70.47	4 0.05	14.25	1 0.28					51.37	1 0.00	55.34	1 2.61		
29	7.31	1 0.50	70.85	4 0.62	14.11	1 -0.71					51.76	1 0.26	55.09	1 2.48		
30	7.14	1 -0.35	70.49	4 0.08	14.09	1 -0.85					51.74	1 0.25	54.79	1 2.33		
31	7.35	1 0.70	70.83	4 0.59	14.32	1 0.78					51.42	1 0.03	49.66	1 -0.24		
32	7.15	1 -0.30	71.06	4 0.93	14.20	1 -0.07										
35	7.16	1 -0.25	70.35	1 -0.11	14.25	1 0.28	0.61	2 -0.24	302.1	1 1.07	53.83	1 1.67	52.44	1 1.15	14.7	1 -1.15
41	7.17	1 -0.20	70.43	4 0.00	14.08	1 -0.92	0.59	2 -0.73			50.55	1 -0.55	51.63	1 0.74	13.6	1 -3.27
42	7.40	1 0.95	70.59	4 0.23	14.09	1 -0.85					49.61	1 -1.20				
43	7.46	1 1.26	70.63	2 0.29	14.06	1 -1.06	0.65	2 0.73			50.71	1 -0.45	47.45	1 -1.35		
44	7.28	1 0.35	70.77	4 0.50	14.17	1 -0.28										
45	7.43	1 1.10	70.89	4 0.68	14.07	1 -0.99									15.8	1 0.96
46	6.83	1 -1.91	69.99	2 -0.65												
47	7.03	1 -0.90	70.01	4 -0.62	13.95	1 -1.84										
48	6.60	1 -3.07	71.45	4 1.51	14.10	1 -0.78										
50	7.57	1 1.81	69.94	4 -0.72	14.08	1 -0.92					51.51	1 0.09	51.67	1 0.76		
52	7.04	1 -0.85	70.34	4 -0.13	14.18	1 -0.21										
53	7.37	1 0.80	70.34	4 -0.13	14.53	1 2.27										
54	7.52	1 1.56	70.67	4 0.35	14.21	1 0.00										
56	7.24	1 0.15	70.21	1 -0.32	14.12	1 -0.63										
57	7.24	1 0.15	67.41	1 -4.47	13.75	1 -3.26					47.62	2 -2.55	44.84	2 -2.67		
58	6.98	1 -1.15	69.11	4 -1.95	14.30	1 0.63										
59	7.29	1 0.40	70.15	4 -0.41	14.05	1 -1.13										
60	7.18	1 -0.15	70.54	4 0.16	14.01	1 -1.42					52.05	1 0.46	56.83	1 3.36	15.2	1 -0.19
62	7.37	1 0.80	70.93	4 0.74	14.43	1 1.56										
63	7.21	1 0.00	70.45	4 0.02	14.22	1 0.07										
64	7.50	1 1.46	70.19	4 -0.35	13.03	1 -8.37										
65	7.62	1 2.06	69.93	1 -0.74	14.07	1 -0.99										
66	7.33	1 0.60	70.30	4 -0.19	14.23	1 0.14					51.09	1 -0.19				
67	7.19	1 -0.10	69.91	4 -0.77	14.32	1 0.78					50.95	1 -0.28	50.51	1 0.18		
68			70.92	3 0.72												
69	7.23	1 0.10	70.22	3 -0.31	14.20	1 -0.07										
70	7.45	1 1.21	70.26	4 -0.25	14.26	1 0.35										
71	7.50	1 1.46	69.96	4 -0.69	14.24	1 0.21										
72	7.52	1 1.56	70.41	2 -0.02	14.12	1 -0.63										
73	6.41	1 -4.03	71.56	4 1.67	13.65	1 -3.97										
75	7.23	1 0.10	70.15	4 -0.41	14.12	1 -0.63										
77	7.29	1 0.40			14.44	1 1.63	0.76	2 3.43			50.86	1 -0.34	50.90	1 0.37		
78	7.09	1 -0.60	70.26	4 -0.25	14.24	1 0.21										
79	7.69	1 2.42	69.23	4 -1.77	14.19	1 -0.14										
84	7.24	1 0.15	70.97	1 0.80	14.19	1 -0.14	0.63	1 0.24			51.62	1 0.17	49.59	1 -0.28		
85	7.12	1 -0.45	70.79	2 0.53	14.24	1 0.21	0.63	2 0.24			49.41	1 -1.33	46.90	1 -1.63		
86	6.91	1 -1.51	70.39	4 -0.05	14.30	1 0.63	0.61	2 -0.24			52.06	1 0.47	53.79	1 1.83		
87	7.40	1 0.95	69.94	4 -0.72	14.60	1 2.76							52.88	1 1.37		
88	7.37	1 0.80	72.97	2 3.76	14.24	1 0.21										
89	7.17	1 -0.20	70.23	4 -0.29	13.94	1 -1.91	0.74	1 2.94			51.43	1 0.04	49.68	1 -0.23		
90	6.76	1 -2.26	69.38	4 -1.55	14.27	1 0.42										
93	7.27	1 0.30	70.96	1 0.78	14.10	1 -0.78	0.59	2 -0.73	304.9	1 1.16	50.40	1 -0.66	49.49	1 -0.33	15.0	1 -0.57
107	7.26	1 0.25	70.32	4 -0.16	14.20	1 -0.07										
108	7.19	1 -0.10	70.62	1 0.28	14.35	1 0.99	0.63	2 0.24			52.61	1 0.84	50.27	1 0.06		
109			73.38	3 4.37												
110											54.65	2 2.23	56.17	2 3.03		
111	7.35	1 0.70	70.42	4 -0.01	14.10	1 -0.78	0.63	2 0.24			49.10	1 -1.54	46.89	1 -1.64		
112	7.45	1 1.21	71.33	3 1.33	14.28	1 0.49										
113	7.28	1 0.35	69.45	4 -1.45	14.48	1 1.91	0.64	1 0.49	261.8	1 -0.22	51.17	1 -0.13	47.92	1 -1.12		
113							0.59	2 -0.73								
115																
116			70.92	3 0.72												
117	7.30	3 0.45	71.53	3 1.63	14.21	2 0.00										
118	7.21	1 0.00	70.36	1 -0.10	14.13	1 -0.56	0.66	2 0.98	268.5	1 -0.01	53.26	1 1.28	50.87	1 0.36	15.5	1 0.38
119	7.03	1 -0.90	70.88	3 0.66	14.04	1 -1.20					51.18	1 -0.12	48.94	1 -0.60		

表5 分析成績(7)

試料 番号	B試料						D試料									
	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランテル	
	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (%)	No., z-score	分析値 (g/トン)	No., z-score	分析値 (g/トン)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score	分析値 (g/kg)	No., z-score
225	7.63	1 2.11	70.33	4 -0.14	14.16	1 -0.35									15.3	1 0.00
225	8.12	3 4.58	68.82	5 -2.38												
226	7.39	1 0.90	69.47	4 -1.42	14.13	1 -0.56										
227	7.22	1 0.05	69.87	4 -0.83	14.24	1 0.21										
228	7.25	1 0.20	72.12	1 2.50	14.18	1 -0.21										
229	7.09	1 -0.60			13.89	2 -2.27										
236	7.20	1 -0.05	71.80	4 2.03	14.12	1 -0.63										
237	7.22	1 0.05	71.71	3 1.89	14.43	1 1.56					51.05	1 -0.21	49.31	1 -0.42	14.9	1 -0.77
237			70.22	4 -0.31												
238	7.04	1 -0.85	70.79	4 0.53	14.41	1 1.41										
239	6.72	1 -2.47	69.77	2 -0.97	14.37	1 1.13										
241	7.24	1 0.15	71.21	3 1.15	14.28	1 0.49										
242	7.24	1 0.15	69.98	2 -0.66	14.46	1 1.77	0.62	1 0.00								
243	7.39	1 0.90	70.50	1 0.10	14.20	1 -0.07										
244	6.56	1 -3.27	70.20	4 -0.34	14.11	1 -0.71										
246	7.35	1 0.70	70.36	4 -0.10	14.10	1 -0.78										
247	6.84	1 -1.86	69.90	4 -0.78	14.25	1 0.28										
248	7.70	1 2.47			14.22	1 0.07			366.2	1 3.14	50.55	1 -0.55	49.20	1 -0.47	15.7	1 0.77
249	7.09	1 -0.60	70.48	2 0.07	14.66	1 3.19	0.67	2 1.22			53.05	1 1.14	50.15	1 0.00	15.5	1 0.38
250																
252	7.06	1 -0.75	69.41	2 -1.51	14.38	1 1.20										
253	7.16	1 -0.25	70.45	4 0.02	14.37	1 1.13	0.62	1 0.00	339.1	1 2.27	51.07	1 -0.20	52.23	1 1.04	16.2	1 1.73
254	7.01	1 -1.00	72.58	2 3.18	13.90	1 -2.20										
260	7.22	1 0.05	70.76	4 0.48	14.41	1 1.41			273.9	1 0.16	54.35	1 2.03	52.16	1 1.01		
261	7.24	1 0.15	70.61	4 0.26	14.32	1 0.78					50.31	1 -0.72	50.22	1 0.03	15.7	1 0.77
264	7.00	1 -1.05			14.22	1 0.07			296.7	1 0.89						
269	7.21	1 0.00	71.06	4 0.93	14.31	1 0.70					50.98	1 -0.26	50.07	1 -0.04		
271	7.33	1 0.60	71.09	3 0.97	14.32	1 0.78										
274	7.19	1 -0.10	70.77	4 0.50	14.17	1 -0.28	0.58	2 -0.98	218.5	1 -1.63	53.57	1 1.50	50.78	1 0.31		
277									303.7	1 1.12	52.14	1 0.52	49.30	1 -0.42	15.4	1 0.19
278	7.20	1 -0.05	69.91	2 -0.77	14.10	1 -0.78	0.72	2 2.45								
279	6.79	1 -2.11	69.17	2 -1.86	14.03	1 -1.27										
280																
281	7.22	1 0.05	71.29	4 1.27	13.98	1 -1.63	0.67	1 1.22			51.50	1 0.08	50.75	1 0.30		
282	7.35	1 0.70	70.88	4 0.66	15.09	1 6.24	1.05	2 10.54			50.78	1 -0.40	49.58	1 -0.28		
283	7.46	1 1.26	70.51	4 0.11	14.15	1 -0.42										
284	7.21	1 0.00	69.80	4 -0.93	14.33	1 0.85										
285	7.24	1 0.15	70.39	2 -0.05	14.19	1 -0.14	0.65	1 0.73			52.48	1 0.75	51.70	1 0.78		
286	7.55	1 1.71	71.36	3 1.37	14.08	1 -0.92										
287											52.75	1 0.94	49.15	1 -0.50	15.1	1 -0.38
288	7.13	1 -0.40	70.80	4 0.54	14.62	1 2.91										
289	7.21	1 0.00	70.75	1 0.47	14.22	1 0.07	0.69	1 1.71			50.33	1 -0.70	49.99	1 -0.08		
290	7.23	1 0.10	70.15	4 -0.41	14.12	1 -0.63										
291	6.16	1 -5.29	70.07	3 -0.53												
292	7.35	1 0.70	71.83	3 2.07	14.16	1 -0.35					51.43	1 0.04	51.53	1 0.69	15.5	1 0.38
293	7.21	1 0.00	69.89	2 -0.80	14.10	1 -0.78	0.71	2 2.20								
294	7.30	1 0.45	70.60	1 0.25	14.15	1 -0.42										
295	7.10	1 -0.55	70.60	4 0.25	14.14	1 -0.49			300.5	1 1.02						
298	7.27	1 0.30	69.09	3 -1.98	14.31	1 0.70										
299	7.17	1 -0.20	69.38	4 -1.55	14.08	1 -0.92										
300	7.56	1 1.76	69.83	2 -0.88	14.42	1 1.49	0.60	2 -0.49	270.0	1 0.03	53.04	1 1.13	51.66	1 0.76	15.9	1 1.15
303	6.95	1 -1.31	66.84	4 -5.32	14.10	1 -0.78										
307	6.71	1 -2.52	69.24	4 -1.76	14.11	1 -0.71										
308	7.43	1 1.10	71.54	2 1.64	14.35	1 0.99										
309	7.20	1 -0.05	70.62	4 0.28	14.10	1 -0.78	0.63	1 0.24	262.4	1 -0.21	51.23	1 -0.09	52.06	1 0.96	18.8	1 6.74
310	6.98	1 -1.15	71.22	3 1.17	14.40	1 1.34			253.9	1 -0.48					13.8	1 -2.89
311	7.65	1 2.21	70.53	2 0.14	14.22	1 0.07					57.70	1 4.31	50.00	1 -0.07		
312	7.08	1 -0.65	70.57	4 0.20	14.16	1 -0.35										
314	7.10	1 -0.55	70.71	4 0.41	14.35	1 0.99										
315	7.47	1 1.31							263.5	1 -0.17	51.42	1 0.03	49.14	1 -0.50	15.5	1 0.38
316	6.99	1 -1.10	70.44	2 0.01	14.15	1 -0.42										
317	7.21	1 0.00	70.37	2 -0.08	14.04	1 -1.20	0.53	2 -2.20	254.9	1 -0.45	49.81	1 -1.06	49.65	1 -0.25		
318	6.89	1 -1.61	60.24	1 -15.10	14.13	1 -0.56										
319	6.45	1 -3.83	68.98	2 -2.14	14.13	1 -0.56	0.50	1 -2.94	96.8	1 -5.56	51.23	1 -0.09	47.79	1 -1.18		
320	7.28	1 0.35	69.72	4 -1.05	14.33	1 0.85					56.83	1 3.72	48.10	1 -1.03	14.7	1 -1.15
321	7.43	1 1.10	71.01	4 0.85	14.40	1 1.34										
322	7.02	1 -0.95	70.28	4 -0.22	14.32	1 0.78										
323	7.28	2 0.35	70.40	4 -0.04	14.13	1 -0.56										
324	5.70	1 -7.61	68.50	2 -2.86	13.80	1 -2.91										
325	7.02	1 -0.95	71.42	4 1.46	14.24	1 0.21										
326	7.13	1 -0.40	70.54	4 0.16	14.15	1 -0.42					51.40	1 0.02				
327	7.02	1 -0.95	69.49	2 -1.39	14.19	1 -0.14	0.22	1 -9.81	270.4	1 0.04	54.72	1 2.28	39.72	1 -5.25	14.8	1 -0.96
328	6.67	1 -2.72	69.60	1 -1.23	14.30	1 0.63										
329	7.07	1 -0.70	69.45	4 -1.45	14.25	1 0.28					53.28	1 1.30	51.27	1 0.56		
330	6.97	1 -1.21	71.34	4 1.34	14.21	1 0.00										
331	7.25	1 0.20	70.64	1 0.31	14.30	1 0.63										
332	7.20	1 -0.05	69.08	2 -2.00	14.27	1 0.42					52.71	1 0.91	49.11	1 -0.52		
333	7.09	1 -0.60	70.52	4 0.13	14.06	1 -1.06			311.2	1 1.36	25.24	1 -17.82	24.54	1 -12.89	17.0	1 3.27
334	7.14	1 -0.35	70.66	4 0.34	14.05	1 -1.13	0.53	2 -2.20	286.7	1 0.57					14.6	1 -1.34
335	7.24	1 0.15	70.58	4 0.22	14.26	1 0.35										
336	7.14	1 -0.35	71.39	2 1.42	14.24	1 0.21					53.02	1 1.12	53.74	1 1.80		
337	7.08	1 -0.65	65.56	4 -7.21	14.32	1 0.78										
338	7.26	1 0.25	71.65	3 1.80	14.11	1 -0.71					51.27	1 -0.06	50.22	1 0.03		
339	7.18	1 -0.15	70.16	4 -0.40	14.38	1 1.20					51.47	1 0.06	50.60	1 0.22	15.1	1 -0.38
340	6.99	1 -1.10	70.69	4 0.38	14.37	1 1.13	0.73	2 2.69			50.69	1 -0.46	52.54	1 1.20		

表 5 分析成績 (8)

試料 番号	B試料						D試料									
	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランテル	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score
341	7.15	1 -0.30	71.49	1 1.57	14.13	1 -0.56					47.58	1 -2.58	46.09	1 -2.04	14.6	1 -1.34
342	7.16	1 -0.25	71.12	4 1.02	14.18	1 -0.21	0.48	2 -3.43								
343	6.73	1 -2.42	71.44	2 1.49	14.58	1 2.62										
344	7.38	1 0.85	71.18	4 1.11	14.14	1 -0.49					48.05	1 -2.26	46.11	1 -2.03		
345	7.12	1 -0.45	70.70	3 0.40	14.00	1 -1.49					51.30	1 -0.04	50.00	1 -0.07		
346	7.11	1 -0.50	69.54	2 -1.31	14.14	1 -0.49										
347	7.28	1 0.35	69.02	2 -2.09	14.22	1 0.07										
348	7.04	1 -0.85	70.02	4 -0.60	14.30	1 0.63										
349	7.48	1 1.36	70.83	4 0.59	14.28	1 0.49										
350	7.32	1 0.55			14.13	1 -0.56										
351	7.34	1 0.65	70.39	4 -0.05	14.63	1 2.98										
352	6.83	1 -1.91			14.33	1 0.85	5.64	2 123.12			48.52	1 -1.94	49.56	1 -0.29		
353	7.08	1 -0.65	69.66	2 -1.14	14.12	1 -0.63										
354	7.18	1 -0.15	70.27	4 -0.23	14.15	1 -0.42										
355	7.84	1 3.17	70.46	4 0.04	14.17	1 -0.28										
356	7.43	1 1.10	71.13	2 1.03	14.27	1 0.42	0.50	2 -2.94	331.4	1 2.02	53.26	1 1.28	52.43	1 1.14		
357	7.01	1 -1.00	70.90	4 0.69	14.23	1 0.14					52.68	1 0.89	47.87	1 -1.14		
358	7.20	1 -0.05	70.46	4 0.04	14.34	1 0.92					49.59	1 -1.21	46.75	1 -1.71		
359	6.66	1 -2.77	70.43	4 0.00	14.00	1 -1.49	0.33	1 -7.11			53.47	1 1.43	58.91	1 4.40		
360	7.14	1 -0.35	70.38	2 -0.07	14.18	1 -0.21										
361	7.43	1 1.10	70.53	3 0.14	14.91	1 4.96			223.3	1 -1.47						
362	6.96	1 -1.26	71.41	2 1.45	14.28	1 0.49										
366	6.96	1 -1.26	69.50	4 -1.37	14.32	1 0.78										
368			70.92	3 0.72												
380	7.04	2 -0.85	71.42	2 1.46	14.21	1 0.00	0.61	2 -0.24	235.8	1 -1.07	52.56	1 0.81	51.66	1 0.76	15.5	1 0.38
381											50.33	1 -0.70	51.41	1 0.63	15.9	1 1.15
382	6.81	1 -2.01							281.5	1 0.40	48.04	1 -2.27	50.72	1 0.28	15.7	1 0.77
383			70.12	4 -0.45												
384			69.69	3 -1.09												
385	7.33	1 0.60	70.27	1 -0.23	14.37	1 1.13	0.74	2 2.94			53.12	1 1.19	53.36	1 1.61		

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	6 不明	3 その他			
	4 自動分析機					
	5 その他					

クエン酸モランテル

No. 分析方法
 1 HPLC法

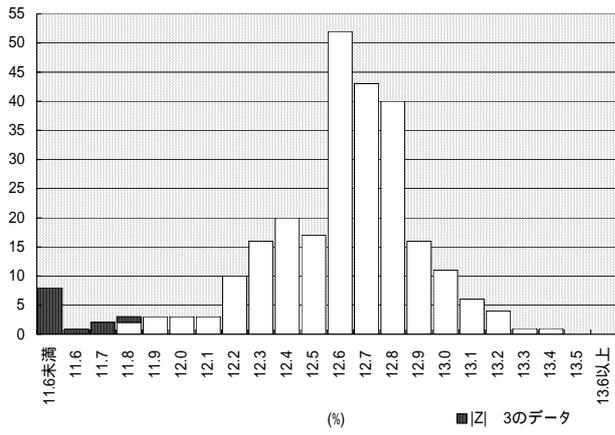


図1 水分の分析成績 (A 試料)

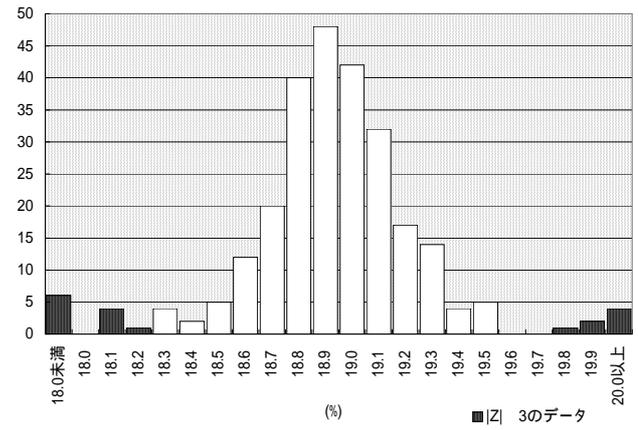


図2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

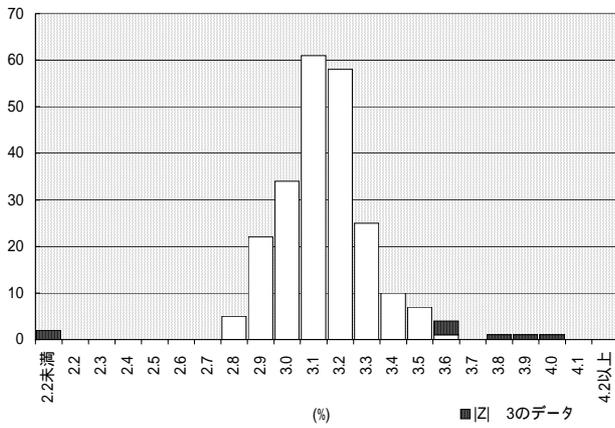


図3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

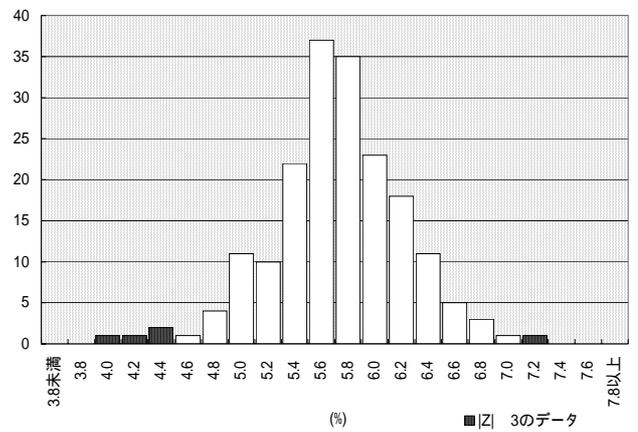


図4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

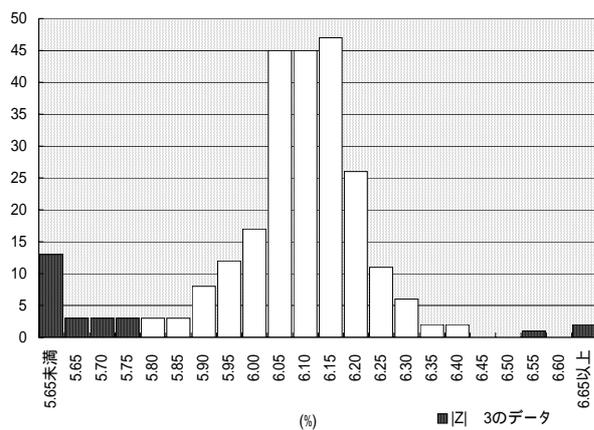


図5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

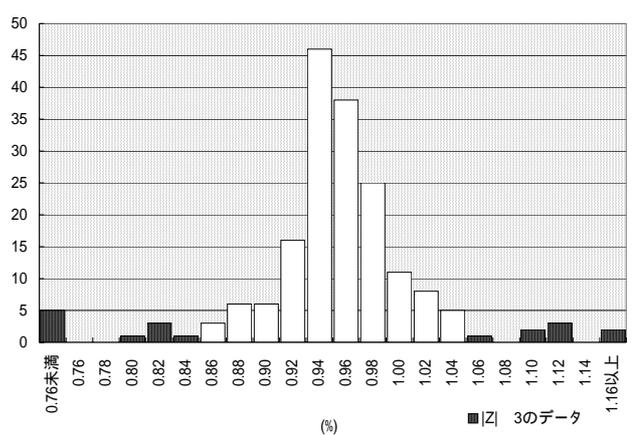


図6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

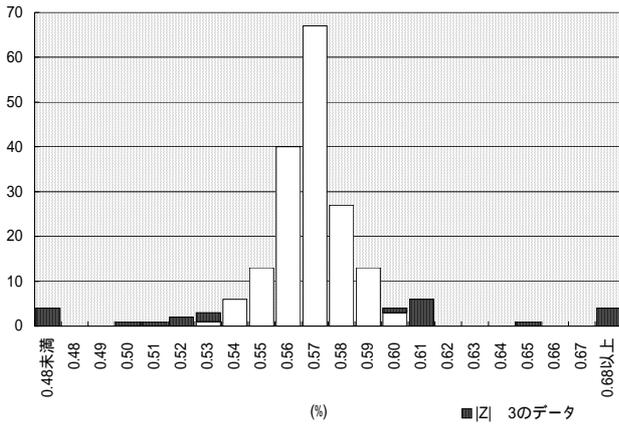


図 7 リンの分析成績 (A 試料)

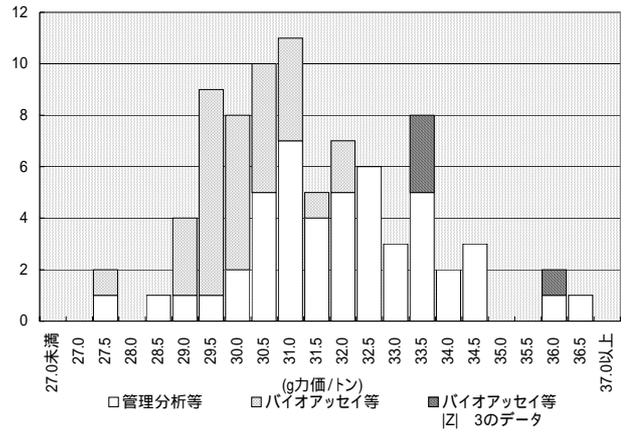


図 8 モネンシナトリウムの分析成績 (A 試料)

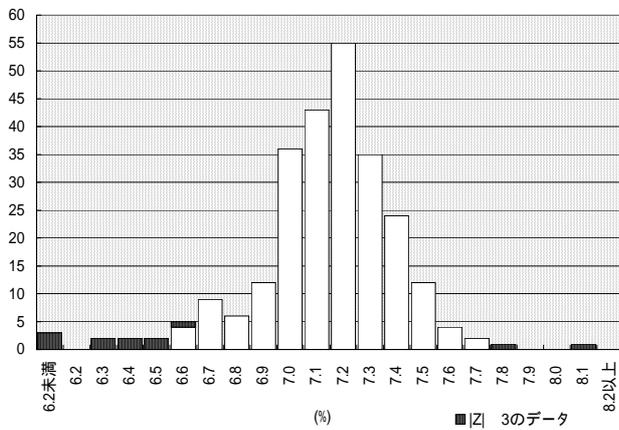


図 9 水分の分析成績 (B 試料)

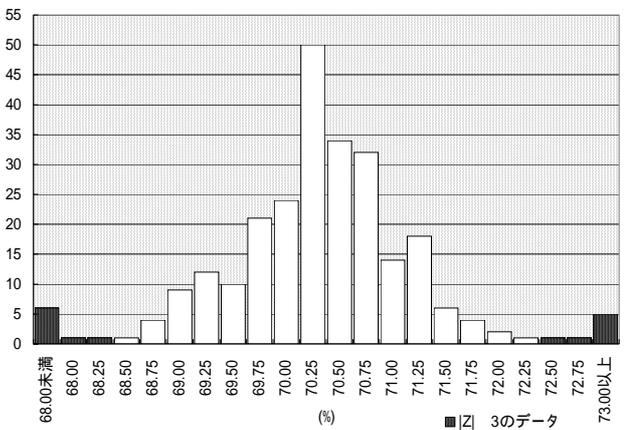


図 10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

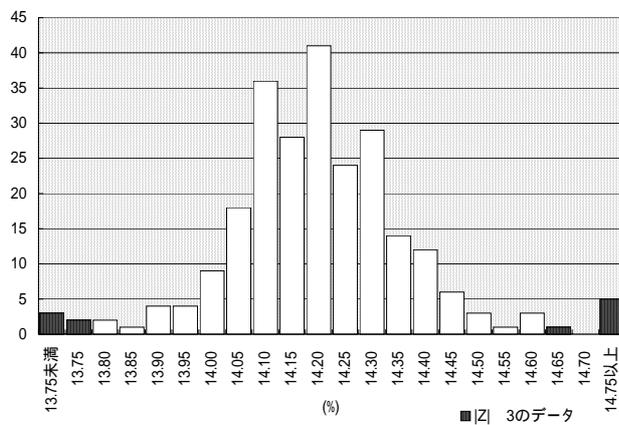


図 11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

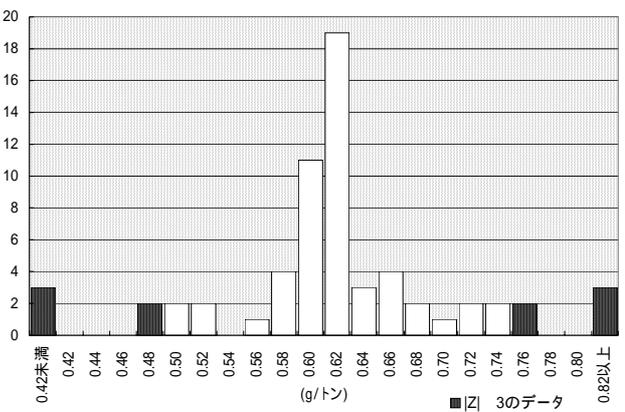


図 12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

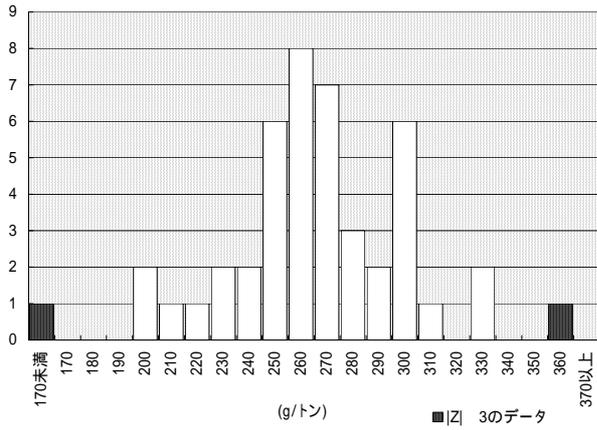


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

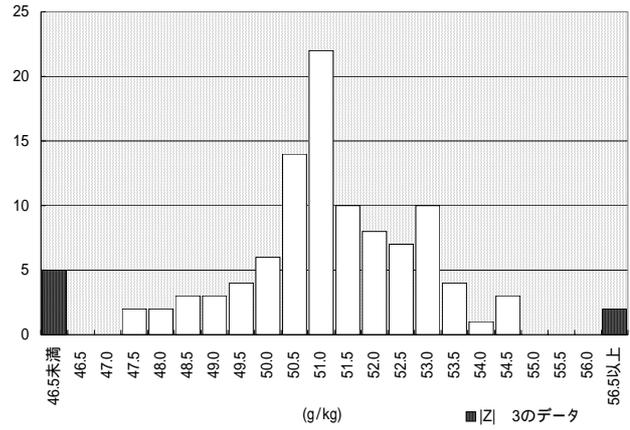


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

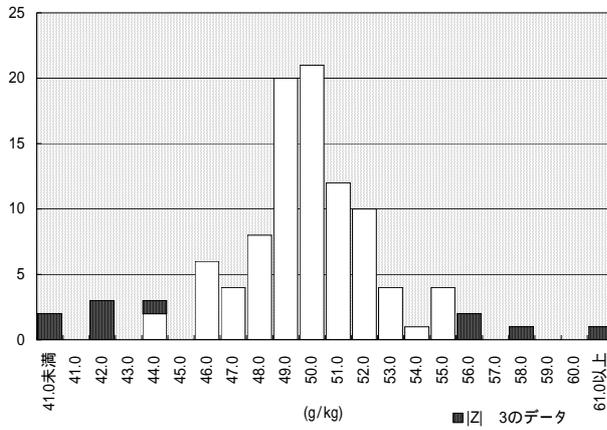


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

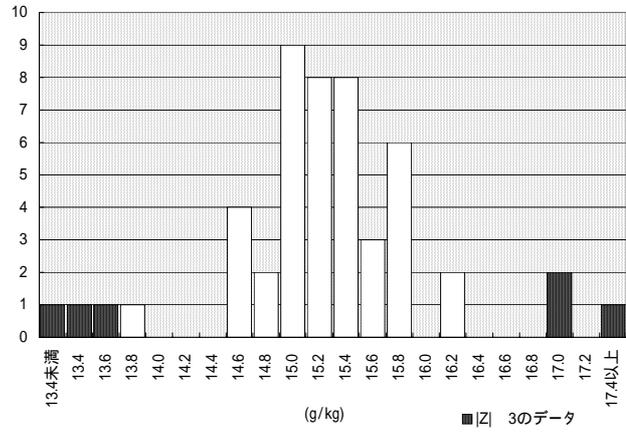


図 16 クエン酸モランテルの
分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分
データ数	260	263	231	186	252
1 中央値	12.68	18.98	3.18	5.82	6.11
1 下限境界値 ^{注2}	11.84	18.30	2.76	4.52	5.80
1 上限境界値	13.51	19.66	3.60	7.12	6.42
2 平均值	12.67	18.98	3.18	5.84	6.12
2 95%信頼区間	12.64~12.70	18.95~19.01	3.16~3.20	5.77~5.90	6.11~6.13

区分	カルシウム	リン	MN(管理分析等) ^{注3}	MN(HPLC等) ^{注4}
データ数	182	192	48	34
1 中央値	0.960	0.572	32.0	30.4
1 下限境界値 ^{注2}	0.859	0.539	26.8	27.3
1 上限境界値	1.061	0.605	37.2	33.4
2 平均值	0.963	0.572	32.2	30.3
2 95%信頼区間	0.958~0.969	0.570~0.574	31.7~32.7	30.0~30.6

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 MN(管理分析等)は，モネン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 MN(HPLC等)は，モネンシンナトリウムの HPLC 法及びバイオアッセイを集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン
データ数	254	257	246	63	45
1 中央値	7.21	70.43	14.21	0.62	268.9
1 下限境界値 ^{注2}	6.62	68.41	13.79	0.50	176.2
1 上限境界値	7.80	72.45	14.63	0.74	361.6
2 平均值	7.20	70.44	14.22	0.63	270.8
2 95%信頼区間	7.18~7.23	70.36~70.53	14.20~14.24	0.61~0.64	262.1~279.6

注 1 区分 1 の数値は報告のあったデータから算出した結果であり，区分 2 は区分 1 で算出した z -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除外して算出した結果である。

2 z -スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
データ数	106	102	49
1 中央値	51.37	50.15	15.3
1 下限境界値 ^{注2}	46.97	44.19	13.7
1 上限境界値	55.77	56.11	16.9
2 平均値	51.44	50.31	15.3
2 95%信頼区間	51.14~51.74	49.86~50.76	15.2~15.4

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	計		
とうもろこし	30	136	11	1	148	0	100
マイロ	10	2	63	59	124	24	84
大麦	10	64	60	3	127	21	86
米ぬか	10	11	56	34	101	47	68
なたね油かす	10	11	118	15	144	4	97
魚粉	9	2	64	70	136	12	92
アルファルファミール	8	23	93	23	139	9	94
ビートパルプ	8	12	75	16	103	45	70
炭酸カルシウム	3	0	1	124	125	23	84
食塩	2	0	1	140	141	7	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	計
あまに油かす	1	5	2	8
えん麦	4	12	2	18
かに殻粉末	0	0	4	4
カポック油かす	0	1	2	3
玄米	0	4	5	9
コーングルテンフィード	0	2	4	6
ごま油かす	0	3	4	7
小麦	1	6	3	10
小麦粉	0	1	2	3
サフラワー油かす	0	1	3	4
精白米	0	2	3	5
大豆油かす	2	20	15	37
チキンミール	0	5	8	13
肉骨粉	0	0	6	6
ビールかす	0	1	1	2
フェザーミール	0	0	1	1
ふすま	1	7	3	11
ホミニーフード	1	0	1	2
麦ぬか	0	4	1	5
綿実油かす	0	1	0	1
やし油かす	0	3	5	8
ライ麦	1	3	1	5
りん酸カルシウム	0	0	19	19

8 ま と め

(1) A 試料 (幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料)

1) 水分

260 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件であった。これらのデータを除いた平均値は 12.67 %、95 %信頼区間は 12.64~12.70 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、253 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.68 %、0.26 %及び 2.1 %であった。

水分測定器を使用した試験では、5 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.36 %、0.31 %及び 2.5 %であった。

その他の方法 (乾燥時間が飼料分析基準と異なる方法等) によるデータが 2 件報告された。

2) 粗たん白質

263 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 件であった。これらのデータを除いた平均値は 18.98 %、95 %信頼区間は 18.95~19.01 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、28 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 19.02 %、0.34 %及び 1.8 %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、53 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.93 %、0.32 %及び 1.7 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、39 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.94 %、0.31 %及び 1.6 %であった。

自動分析機を使用した試験では、142 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.99 %、0.19 %及び 1.0 %であった。

その他の方法 (セミマイクロケルダール法) によるデータが 1 件報告された。

3) 粗脂肪

231 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件であった。これらのデータを除いた平均値は 3.18 %、95 %信頼区間は 3.16~3.20 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを

除いて解析した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、167 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.22 %、0.13 % 及び 4.1 % であった。

自動分析機を使用した試験では、63 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.06 %、0.12 % 及び 3.9 % であった。

4) 粗繊維

186 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件であった。これらのデータを除いた平均値は 5.84 %、95 % 信頼区間は 5.77~5.90 % であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、25 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.64 %、0.34 % 及び 6.0 % であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、116 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.78 %、0.46 % 及び 7.9 % であった。

自動分析機を使用した試験では、43 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 6.08 %、0.36 % 及び 5.9 % であった。

その他の方法 (自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法) によるデータが 2 件報告された。

5) 粗灰分

252 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 25 件であった。これらのデータを除いた平均値は 6.12 %、95 % 信頼区間は 6.11~6.13 % であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、248 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 26 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 6.12 %、0.10 % 及び 1.6 % であった。

その他の方法 (加熱方法及び時間が飼料分析基準と異なる方法、酢酸マグネシウムを添加して灰化する方法等) によるデータが 4 件報告された。

6) カルシウム

182 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18

件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.963 %，95 %信頼区間は 0.958~0.969 %であった。

なお，分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・シュウ酸アンモニウム法による試験では，38 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件) が報告され，その平均値，標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.982 %，0.032 % 及び 3.3 % であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法による試験では，137 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 14 件) が報告され，その平均値，標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.959 %，0.031 % 及び 3.2 % であった。

その他の方法 (ICP による測定，キレート滴定法等) によるデータが 7 件報告された。

7) リン

192 件のデータの報告があり，ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 22 件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.572 %，95 %信頼区間は 0.570~0.574 % であった。

なお，分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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，184 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 19 件) が報告され，その平均値，標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.572 %，0.012 % 及び 2.0 % であった。

その他の方法 (ICP による測定，モリブデン青吸光光度法等) によるデータが 8 件報告された。

8) モネンシンナトリウム

今回の試験ではモネン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，48 件のデータの報告があり，ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものはなかった。その平均値が 32.2 g(力価)/トン，95 %信頼区間が 31.7~32.7 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，34 件のデータの報告があり，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 4 件であった。これらのデータを除いた平均値は 30.3 %，95 %信頼区間は 30.0~30.6 g(力価)/トンであった。

なお，分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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，35 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され，その平均値，標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 32.0 g(力価)/トン，1.2 g(力価)/トン及び 3.6 % であった。

フローインジェクションによる試験では、13 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 32.3 g(力価)/トン、2.7 g(力価)/トン及び 8.3 %であった。

飼料分析基準・HPLC 法による試験では、27 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 30.1 g(力価)/トン、0.8 g(力価)/トン及び 2.8 %であった。

飼料分析基準・バイオアッセイによる試験では、7 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 31.0 g(力価)/トン、0.9 g(力価)/トン及び 2.9 %であった。

(2) B 試料 (魚粉)

1) 水分

254 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件であった。これらのデータを除いた平均値は 7.20 %、95 %信頼区間は 7.18~7.23 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、246 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 7.21 %、0.21 %及び 2.9 %であった。

水分測定器を使用した試験では、5 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 7.12 %、0.10 %及び 1.5 %であった。

その他の方法 (NIR による測定、乾燥時間が飼料分析基準と異なる方法等) によるデータが 3 件報告された。

2) 粗たん白質

257 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 15 件であった。これらのデータを除いた平均値は 70.44 %、95 %信頼区間は 70.36~70.53 %であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、28 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 70.32 %、0.95 %及び 1.4 %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、48 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 70.21 %、0.80 %及び 1.1 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、38 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 71.03 %、0.54 %及び 0.8 %であった。

自動分析機を使用した試験では、141 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 70.41 %、0.53 % 及び 0.7 % であった。

その他の方法 (NIR による測定、セミマイクロケルダール法) によるデータが 2 件報告された。

3) 粗灰分

246 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらのデータを除いた平均値は 14.22 %、95 % 信頼区間は 14.20~14.24 % であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、241 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 14.22 %、0.14 % 及び 1.0 % であった。

その他の方法 (加熱方法及び時間が飼料分析基準と異なる方法、酢酸マグネシウムを添加して灰化する方法等) によるデータが 4 件報告された。

4) カドミウム

63 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.63 mg/kg、95 % 信頼区間は 0.61~0.64 mg/kg であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法による試験では、23 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.63 mg/kg、0.01 mg/kg 及び 1.6 % であった。

飼料分析基準・簡易法による試験では、39 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.62 mg/kg、0.06 mg/kg 及び 10.5 % であった。

その他の方法 (湿式灰化後 GFA による測定) によるデータが 1 件報告された。

5) エトキシキン

45 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらのデータを除いた平均値は 270.8 mg/kg、95 % 信頼区間は 262.1~279.6 mg/kg であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、44 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件)

が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 271.2 mg/kg、29.4 mg/kg 及び 10.8 %であった。

その他の方法（GC-MS による測定）によるデータが 1 件報告された。

(3) D 試料（ほ乳期子豚育成用プレミックス）

1) 銅

106 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件であった。これらのデータを除いた平均値は 51.44 g/kg、95 %信頼区間は 51.14~51.74 g/kg であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、103 件のデータ（ z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 51.46 g/kg、1.44 g/kg 及び 2.8 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 3 件報告された。

2) 亜鉛

102 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらのデータを除いた平均値は 50.31 g/kg、95 %信頼区間は 49.86~50.76 g/kg であった。

なお、分析方法ごとにロバスト法による z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上のデータを除いて解析した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、99 件のデータ（ z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件）が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 50.44 g/kg、2.04 g/kg 及び 4.0 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 3 件報告された。

3) クエン酸モランテル

49 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらのデータを除いた平均値は 15.3 g/kg、95 %信頼区間は 15.2~15.4 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。その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.5 g/kg 及び 3.0 %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。148 試験室より報告があり、配合した 10 種類の他に 23 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（配合割合 30 %）では、148 試験室（検出率 100

%) から報告があり、その内訳は多量 (15 % 以上, 以下同じ) との報告した試験室が 136, 中量 (5 % 以上~15 % 未満, 以下同じ) と報告した試験室が 11, 少量 (1 % 以上~5 % 未満, 以下同じ) と報告した試験室が 1 であった。

マイロ (配合割合 10 %) では, 124 試験室 (検出率 84 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 2, 中量と報告した試験室が 63, 少量と報告した試験室が 59 であった。

大麦 (配合割合 10 %) では, 127 試験室 (検出率 86 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 64, 中量と報告した試験室が 60, 少量と報告した試験室が 3 であった。

米ぬか (配合割合 10 %) では, 101 試験室 (検出率 68 %) 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 56, 少量と報告した試験室が 34 であった。

なたね油かす (配合割合 10 %) では, 144 試験室 (検出率 97 %) 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 118, 少量と報告した試験室が 15 であった。

魚粉 (配合割合 9 %) では, 136 試験室 (検出率 92 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 2, 中量と報告した試験室が 64, 少量と報告した試験室が 70 であった。

アルファルファミール (配合割合 8 %) では, 139 試験室 (検出率 94 %) から報告があり, その内訳は多量と報告した試験室が 23, 中量と報告した試験室が 93, 少量と報告した試験室が 23 であった。

ビートパルプ (配合割合 8 %) では, 103 試験室 (検出率 70 %) 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 75, 少量と報告した試験室が 16 であった。

炭酸カルシウム (配合割合 3 %) では, 125 試験室 (検出率 84 %) から報告があり, その内訳は中量と報告した試験室が 1, 少量と報告した試験室が 124 であった。

食塩 (配合割合 2 %) では, 141 試験室 (検出率 95 %) から報告があり, その内訳は中量と報告した試験室が 1, 少量と報告した試験室が 140 であった。

誤って検出したものについては, 大豆油かすが最も多く, 37 試験室から報告があった。次いで, リン酸カルシウムが 19 試験室, えん麦が 18 試験室, チキンミールが 13 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)

平成 21 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

1. 目的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物業者、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...幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料

B 試料...魚粉

C 試料...鑑定用飼料原料調製試料

D 試料...ほ乳期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、リン及びモネンシンナトリウム

B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・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60年10月15日付け60畜B第2928号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知)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(全項目でなくても可)について分析・鑑定を行い、報告してください。
- (3) モネンシンナトリウムについて、液体クロマトグラフによる定量法及び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、分析を実施するようお願いいたします。
- (4) B試料のエトキシキンの分析における標準品は、今回配布したものを使用してください。(当該標準品は冷蔵庫に保管してください。)
- (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、それぞれ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「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、モネンシナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kgで、カドミウム、エトキシキンについてはg/トンで表してください。

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、モネンシナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析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

各地方管轄の独立行政法人農林水産消費安全技術センターにお問い合わせください。

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 ()
モネンシン ナトリウム	(g(カ値)/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(カ値)/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(カ値)/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
スクリーニングベレット	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 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 20 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

有害な物質、病原微生物等を含む飼料の使用が原因となって、人の健康をそこなうおそれがある家畜の肉等の有害畜産物が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止するため、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（飼料安全法）第 3 条第 1 項の規定により、農林水産省令及び関係通知等で飼料中の有害物質等の基準・規格が設定されている。

（独）農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、これらの有害物質等の基準・規格への適合状況の確認及び基準・規格が設定されていないその他の有害物質等の飼料中の汚染実態等を把握するためのモニタリングを実施しており、平成 20 年度に実施したモニタリングの結果について取りまとめたので報告する。

2 方 法**2.1 試 料**

FAMIC 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、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、平成 20 年 4 月から平成 21 年 3 月までに各管内の飼料原料工場、配合飼料工場及び港湾サイロ等に対して実施した飼料立入検査の際に採取した飼料等についてモニタリングを実施した。

モニタリングを行った試料及び点数は表 1 のとおりである。

2.2 モニタリング実施項目

以下の 1)~3)の各項目について、モニタリングを実施した。

なお、飼料原料のモニタリング実施項目については、原料の原産国及び過去の汚染実態等を参考にして選定し、配混合飼料のモニタリング実施項目は、使用原料及び対象家畜等を考慮して選定した。

1) 有害物質**i かび毒及びエンドファイト産生毒素（21 成分）****ア 飼料中の基準値又は暫定許容値が設定されている 3 成分****① アフラトキシン B₁**

飼料の有害物質の指導基準（昭和 63 年 10 月 14 日付け 63 畜 B 第 2050 号農林水産省畜産局長通知）で基準値が設定されている配混合飼料及びその他汚染の可能性のある飼料原料についてモニタリングを実施した。

② デオキシニバレノール

飼料中のデオキシニバレノールについて（平成 14 年 7 月 5 日付け 14 生畜第 2267 号農林水産省生産局畜産部飼料課長通知）で暫定許容値が設定されている家畜等用飼料及びその他汚染の可能性のある飼料原料についてモニタリングを実施した。

③ ゼアラレノン

ゼアラレノンの検出について（平成 14 年 3 月 25 日付け 13 生畜第 7269 号農林水産省生産局畜産部飼料課長通知）で暫定許容値が設定されている家畜用飼料及びその他汚染の可能性のある飼料原料についてモニタリングを実施した。

イ その他 18 成分

アのかび毒以外で、「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）に分析法が収載されている以下のかび毒及びエンドファイト産生毒素 18 成分についてモニタリングを実施した。

かび毒：アフラトキシン B₂, G₁ 及び G₂, ステリグマトシスチン, HT-2 トキシン, T-2 トキシン, ネオソラニオール, フザレノン-X, 3-アセチルデオキシニバレノール, 15-アセチルデオキシニバレノール, ニバレノール, フモニシン B₁, B₂ 及び B₃, オクラトキシン A 並びにシトリニン

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

ii 重金属（4 成分）

基準値（飼料の有害物質の指導基準）が設定されている飼料中のカドミウム、鉛、水銀及びび素について、モニタリングを実施した。

iii 農薬（157 成分）

ア 飼料中の基準値が設定されている 48 成分

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 日付け農林省令第 35 号。以下「成分規格等省令」という）で基準値が設定されている農薬のうちの 48 成分について、モニタリングを実施した。

イ その他 109 成分

アの農薬以外で、飼料分析基準に分析法が収載されている農薬のうちの 109 成分について、モニタリングを実施した。

iv その他の有害物質（9 成分）

最近、飼料への混入事例が認められて問題となった以下の有害物質 9 成分についてモニタリングを実施した。

ア 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素（以下「硝酸態窒素等」という）

イ ヒスタミン

ウ マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン（以下「マラカイトグリーン等」という）

エ メラミン、シアヌル酸、アンメリド及びアンメリン（以下「メラミン等」という）

2) BSE 発生防止に係る試験

i 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

成分規格等省令別表第 1 の 2 の基準・規格に規定された飼料中への動物由来たん白質の混

入の有無を確認するために、肉骨粉の顕微鏡鑑定、動物由来たん白質及び動物由来 DNA の定性試験を実施した。

ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の成分規格への適合確認のために、動物性油脂及び特定動物性油脂中の不溶性不純物含有量の試験を実施した。

3) 病原微生物

i サルモネラ

配混合飼料及び飼料原料についてモニタリングを実施した。

表1 モニタリングを行った試料及び点数

モニタリングを行った 試料の種類	モニタ リングを 行った 試料の 総点数	項目別の試料点数							BSE発生防止に係る試験			病原微生物	
		有害物質							動物由来たん白質				
		かび毒	重金属	農薬	硝酸態 窒素等	ヒスタ ミン	マラカ イトグ リニン 等	メラミ ン等	顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR 試験		不溶性 不純物
幼すう育成用	11	9	3	8									2
中すう育成用	13	8	5	11									4
大すう育成用	8	7	3	8									3
成鶏飼育用	67	44	33	52									29
ブロイラー肥育前期用	19	18	4	9									4
ブロイラー肥育後期用	20	12	9	16									4
肉用種鶏幼すう育成用	1	1		1									
肉用種鶏中すう育成用	1	1											1
肉用種鶏飼育用	3	2	2	2									1
鶏複数ステージ用	9	8	3	6									2
ほ乳期子豚育成用	46	42	13	26									7
子豚育成用	34	20	11	19									7
肉豚肥育用	29	19	11	26									10
種豚育成用	5	2	2	4									
種豚飼育用	15	11	7	10									7
豚複数ステージ用	4	3	1	4									
ほ乳期子牛育成用(代用乳用)	10	6	2	3				8					1
ほ乳期子牛育成用	7	7	4	3				7	7	7			4
若令牛育成用	9	7	5	7				9	5	5			
乳用牛飼育用	57	48	17	42				57	48	48			16
幼令肉用牛育成用	11	8	4	10				10	7	7			1
肉用牛肥育用	87	57	18	69				87	64	64			15
乳用牛飼育用	2	1	1	2				2	2	2			1
肉牛繁殖用	9	6	3	8				9	9	9			1
種牛飼育用	2	1	2	2				2	2	2			1
牛複数ステージ用	33	17	7	25				33	19	19			6
成じゅん用(うずら用)	1	1		1									1
にじます育成用	1						1						
あゆ育成用	1						1						
ぶり育成用	3						3						
まだい育成用	6						4	2					
魚用(対象魚を限定しないもの)	1							1	1	1			
とうもろこし・魚粉二種混合飼料	3	3											1
圧べんとうもろこし・アルファルファ二種混合飼料	1		1					1	1	1			
二種混(上記以外のもの)	1							1	1	1			1
動物性たん白質混合飼料	8							8	8	8			3
糖蜜吸着飼料	1							1	1	1			1
上記以外の混合飼料(成分量表示)	15	2	2	5				14	14	14			1
上記以外の混合飼料(成分量非表示)	61	4	10	4				58	47	47			1
小計	615	375	182	384			9	13	308	236	236		136
とうもろこし	35	34		22									
マイロ	2	2											
小麦	3	1		2									
大麦	32	27		29									
圧べん大麦	3	2		3									
えん麦	2	2		2									
ライ麦	1	1											
大豆	1	1											
エクストルーダ処理大豆	1			1									
小麦粉	1	1		1									
甘しよ	2	1		2									
末粉	4	2		3									
そば粉	1			1									
小計	88	74		66									
米ぬか	3	2		3									
ふすま	28	24		24									2
脱脂ぬか	7	4		3									4
麦ぬか	3	1		3									
コーングルテンフィード	17	16		14							1		
とうもろこしジスチラーズグレイン	3	2		3									
とうもろこしジスチラーズグレインリユアブル(DDGS)	8	8	1	5									1
大豆皮	1			1							1		
スクリーニングペレット	1	1											
ビールかす	5	5		4						1			1
しょう油かす	1									1			
小計	77	63	1	60					3				8

表 1 モニタリングを行った試料及び点数 (続き)

モニタリングを行った試料の種類	モニタリングを行った試料の総点数	項目別の試料点数										BSE発生防止に係る試験		病原微生物	
		有害物質					マラカイトグリーン等			動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ	
		かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素等	ヒスタミン	メラミン等	頭微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験					
大豆油かす	54	33		42						1					6
なたね油かす	28	14		25											5
米ぬか油かす	2	2		2											
やし油かす	3	2													1
ごま油かす	1														1
コーングルテンミール	16	16		11						1					
コーンジャムミール	2	2		2											
加糖加熱大豆油かす	1			1											
大豆たん白	1			1						1					
小計	108	69		84						3					13
魚粉	122		45			16	46	17	103	103	103				80
豚肉骨粉	8		2							8	8				5
チキンミール	29		9						29	29	29				25
フェザーミール	20								20	20	20				13
原料混合肉骨粉	18		2						8	18	18				13
血粉	1								1	1	1				
フィッシュソリュブル	1								1						
カンニシ粉末	2								2	2	2				2
サナギ	1									1					
エビ粉末	1								1	1	1				
加水分解たん白	1								1	1	1				
イカミール	4								2	2	2				2
酵素処理魚抽出物	2								2	2	2				
魚鱗抽出物	1								1	1	1				1
上記以外の飼料	1								1	1	1				
小計	212		58			16	46	20	172	189	189				141
アルファルファ	11			10	9										
チモシー	6			6	2										
スーダングラス	12			12	12										
パミューダグラス	2			2											
稲わら	3		3												
ライグラス	4	4		2	3										
オーツヘイ	7			7	3										
フェスク	1	1		1											
オーチャードグラス	1			1											
古畳わら	3			3											
小計	50	5	3	44	29										
綿実	13		11		13										
ビートパルプ	8		4		8					1					
コーンコブミール	4		4		3										
パイナップルかす	4		4		3										
バガス	1									1	1	1			
とうふかす	1	1		1											
やし中果皮	2	1		2											
にんにく粉末	4			2						2					
菓子くず	1			1											
カカオ豆殻	1	1		1											
飼料用酵母	1			1						1					
乾燥酵母細胞壁	1									1	1	1			
サンザシ(山査子)乾燥末	1			1											
茶粉末	1			1											
動物性油脂	77														77
特定動物性油脂	4														4
複合製剤	6		2						2	6	3	3			
プロピオン酸	1									1					
小計	131	26	2	37					6	9	5	5			81
合計	1,281	612	246	675	29	16	55	45	489	430	430				298

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物試験用試料

試料の採取方法は、「飼料等検査実施要領」(昭和52年5月10日付け52畜B第793号農林省畜産局長通知)によった。ただし、乾牧草の採取方法は、「飼料中の農薬の検査について」(平成18年5月26日付け18消安第2322号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知)によった。

試験用試料の調製及び保管方法は、飼料分析基準第2章の規定によった。

2) 動物由来たん白質及び DNA 分析用試料

試料の採取，試験用試料の調製及び保管方法は，飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定によった。

3) 動物性油脂及び特定動物性油脂

基準油脂分析試験法の試料採取方法¹⁾に準拠した次の方法により採取した。

動物性油脂を積み込み後のタンクローリー車の上部のふたを開け，ポンプサンプラー（容量約 300 mL）を用いてハッチの上部，中部及び下部の 3 箇所から採取し，これらを混合・かくはんして試料とした²⁾。

2.4 試験方法

1) 有害物質

i 飼料分析基準収載法によるもの

ア かび毒及びエンドファイト産生毒素

飼料分析基準第 5 章の各方法により試験を実施した。

イ 重金属

飼料分析基準第 4 章第 1 節の各対象物質の項に記載された方法により試験を実施した。

ウ 農薬

飼料分析基準第 6 章の各方法により試験を実施した。

エ 硝酸態窒素等

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 の方法により試験を実施した。

オ ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5 の 1 の方法により試験を実施した。

カ マラカイトグリーン等

飼料分析基準第 8 章第 2 節 2 の方法により試験を実施した。

ii i 以外の方法によるもの

ア メラミン等

米国食品医薬品局（FDA）が公表している方法³⁾に準拠した図 1 の方法により試験を実施した。

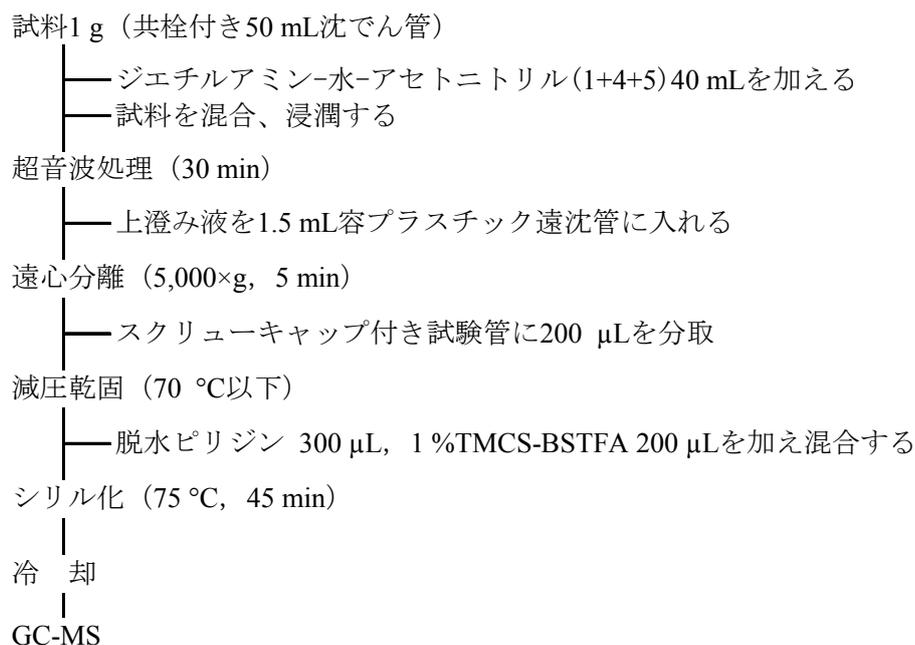


図1 飼料中のメラミン、シアヌル酸、アクリリド及びアクリリンの同時定量法

2) 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

試験は、以下の3法により行った。結果の判定は、「牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いについて」（平成14年11月8日付け農林水産省生産局畜産部飼料課課長補佐（検査指導班担当）事務連絡）に基づき、総合的に行った。

i 顕微鏡鑑定

試験用試料中の獣骨及び獣毛等の有無を、図2の方法で光学顕微鏡を用い鑑定した。

ii ELISA 試験

牛由来たん白質は、「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）を用い、魚粉等及び国産の牛用配混合飼料を対象として定性試験を実施した。（飼料分析基準第17章第2節1.1の(2)）

反すう動物由来たん白質は、「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット反すう動物用」（ELISA Technologies 製）を用い、チキンミール等、ポークミール等及び輸入飼料を対象として定性試験を実施した。（飼料分析基準第17章第2節1.2）

iii PCR 試験

粉砕した試料から組織・細胞用ミトコンドリア DNA 抽出キットを用い抽出し、PCR 反応による対象 DNA を増幅した後、電気泳動を行い対象 DNA の混入の有無を確認した。

魚粉等及び国産の牛用配混合飼料は、ほ乳動物由来 DNA を対象に試験を実施した。（飼料分析基準第16章第2節1.1）

チキンミール等、ポークミール等及び輸入飼料は、反すう動物由来 DNA を対象に試験を実施した。（飼料分析基準第16章第2節1.2）

試験の実施に当たっては、DNA の抽出確認のため同時にコントロールとなる DNA の検出を確認した。（飼料分析基準第16章第3節1～4）

また、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、乳製品等除去処理を実

施した。（飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記）

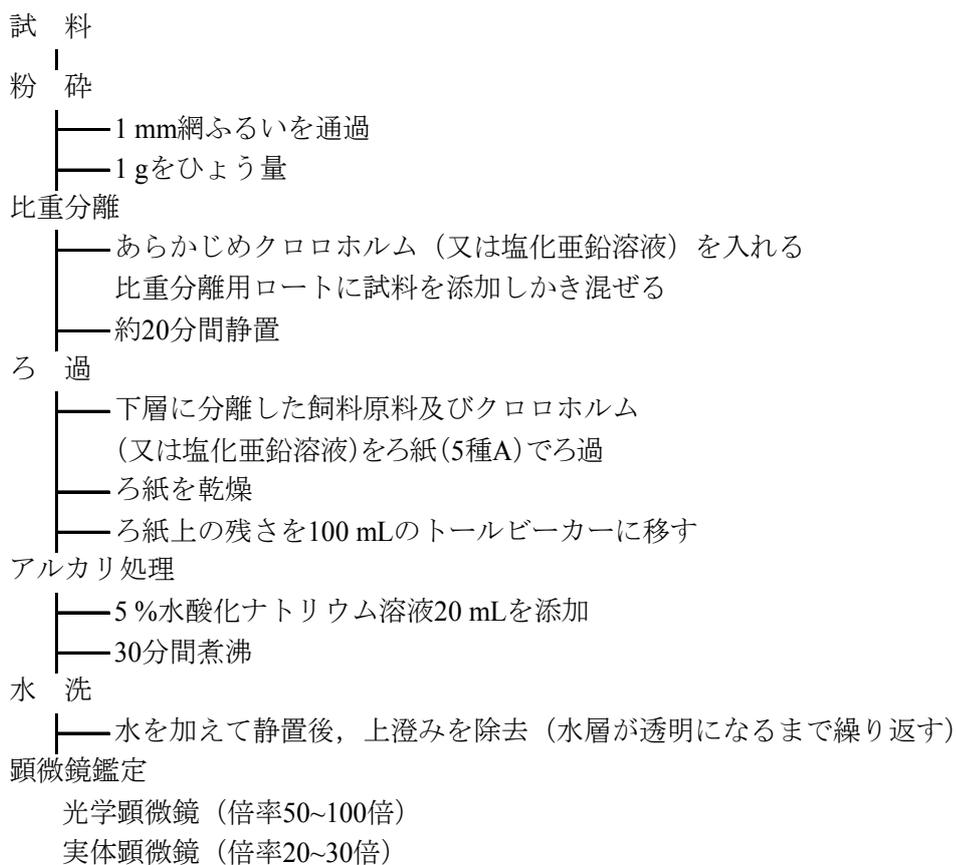


図 2 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3) 不溶性不純物

ガラスろ過器を用いたろ過法により不溶性不純物の含有量を算出した（成分規格等省令別表第 1 の 5 の(1)のアに定められた方法）。

4) サルモネラ

試験用試料中の細菌を増菌培養し、サルモネラを選択分離した後、確認培地を用いサルモネラを検出した。検出されたサルモネラの血清型を同定した。（飼料分析基準第 18 章 1）

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

基準値の設定されているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを始め、計 21 成分について 3,556 点のモニタリングを実施した。その結果を表 2 に示した。

そのうち基準値の設定されている 3 成分のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i アフラトキシン B₁

配混合飼料 304 点中 127 点（検出率 42 %）から検出され、有害物質の指導基準を超えるものはなかったが、幼令肉用牛育成用、乳用牛飼育用及び種豚飼育用各 1 点から基準値レベルの数値が検出された。

原料では、とうもろこしの検出率は41%、最大値0.009 ppmと、19年度より検出率、検出値も低く特に問題のない結果であった。

また、とうもろこしの副産原料であるグルテンフィード、グルテンミールについても同程度の検出率であったが、高濃度のものはなかった。

その他の原料では、パイナップルかす（タイ産）から0.014 ppm、やし油かす（フィリピン産）から0.004 ppm検出されており、東南アジア産の原料等の熱帯、亜熱帯産原料を使用する際には留意が必要である。

ii デオキシニバレノール

配混合飼料100点中85点（検出率85%）から検出され、19年度と同様に高い検出率であったが、基準を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で0.71 ppmであった。

原料で検出率の高いものは、穀類ではとうもろこしの93%（最大値0.53 ppm）、大麦47%（最大値1.0 ppm）、とうもろこしの副産原料のグルテンフィード100%（最大値0.63 ppm）、グルテンミール60%（最大値0.67 ppm）、DDGS100%（最大値0.97 ppm）、麦類の副産原料のふすま84%（最大値0.83 ppm）等があり、これらの原料を使用する際には留意が必要である。

iii ゼアラレノン

配混合飼料66点中62点（検出率94%）から検出され、19年度と同様に高い検出率であったが、基準を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で0.15 ppmであった。

原料で検出率の高いものは、穀類ではとうもろこしの78%（最大値0.18 ppm）、マイロ100%（最大値0.076 ppm）、とうもろこしの副産原料のグルテンフィード56%（最大値0.062 ppm）、グルテンミール63%（最大値0.95 ppm）等があり、これらの原料を使用する際には留意が必要である。

表 2 かび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	指導基準値 (ppb)	モニタリング点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
アフラトキシンB ₁	配混合飼料（ほ乳期，幼令期用等）	1×10	139	55	39.6	10	1.7
	配混合飼料（上記以外）	2×10	165	72	43.6	22	2.1
	とうもろこし	—	34	14	41.2	9	2.0
	コーングルテンフィード	—	12	5	41.7	4	1.7
	コーングルテンミール	—	14	4	28.6	2	1.4
	大豆油かす	—	29	11	37.9	2	0.7
	やし油かす	—	2	2	100.0	4	3.0
	パイナップルかす	—	4	1	25.0	14	14
	その他	—	80	9	11.3	4	1.9
計	—	—	479	173	36.1	22	1.9
デオキシニバレノール	配混合飼料（生後3ヶ月以上の牛用）	4.0×10 ³	33	31	93.9	440	160
	配混合飼料（上記以外）	1.0×10 ³	67	54	80.6	710	120
	とうもろこし	—	15	14	93.3	530	140
	大麦	—	17	8	47.1	1,000	200
	ふすま	—	19	16	84.2	830	330
	コーングルテンフィード	—	6	6	100.0	630	370
	コーングルテンミール	—	5	3	60.0	670	310
	DDGS	—	5	5	100.0	970	280
	その他	—	55	14	25.5	320	74
計	—	—	222	151	68.0	1,000	170
ゼアラレノン	配混合飼料（家畜用）	1.0×10 ³	52	48	92.3	64	21
	配混合飼料（上記以外）	—	14	14	100.0	150	29
	とうもろこし	—	18	14	77.8	180	28
	マイロ	—	2	2	100.0	76	70
	大麦	—	18	6	33.3	32	9
	ふすま	—	18	7	38.9	9	4
	コーングルテンフィード	—	9	5	55.6	62	37
	コーングルテンミール	—	8	5	62.5	950	350
	その他	—	43	14	32.6	70	24
計	—	—	182	115	63.2	950	39
アフラトキシンB ₂	—	—	471	26	5.5	8	1.5
アフラトキシンG ₁	—	—	471	7	1.5	4	1.4
アフラトキシンG ₂	—	—	470	0	—	—	—
ステリグマトシスチン	—	—	118	81	68.6	19	1.7
HT-2トキシン	—	—	70	8	11.4	27	10
T-2トキシン	—	—	188	63	33.5	87	7
ネオソラニオール	—	—	118	2	1.7	5	4
フザレノン-X	—	—	128	1	0.8	26	26
3-アセチルデオキシニバレノール	—	—	10	1	10.0	30	30
15-アセチルデオキシニバレノール	—	—	10	3	30.0	12	7
ニバレノール	—	—	218	19	8.7	310	79
フモニシンB ₁	—	—	81	64	79.0	3,500	530
フモニシンB ₂	—	—	81	46	56.8	1,700	250
フモニシンB ₃	—	—	62	39	62.9	440	91
オクラトキシンA	—	—	114	4	3.5	7	4
シトリニン	—	—	54	0	—	—	—
エルゴバリン	—	—	5	5	100.0	320	120
ロリトレムB	—	—	4	4	100.0	580	460

2) 重金属

有害物質の指導基準のあるカドミウム，鉛，水銀及びヒ素について配混合飼料 511 点，魚粉 134 点，チキンミール等（豚肉骨粉，原料混合肉骨粉，チキンミール）39 点，稲わら 9 点等のモニタリングを実施し，その結果を表 3 に示した。

各重金属のモニタリング結果は，以下のとおりであった。

i カドミウム

配混合飼料 172 中 140 点（検出率 81 %）から検出されたが、基準値を超えるものはなく最大値は種鶏飼育用で 0.35 ppm であった。

原料については、魚粉は 45 点中 45 点（検出率 100 %，最大値 2.1 ppm），チキンミール等は 13 点中 11 点（検出率 85 %，最大値 0.1 ppm），稲わらは 2 点中 1 点（検出率 50 %，0.03 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。

ii 鉛

配混合飼料 171 点中 58 点（検出率 34 %）から検出されたが、基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 1.9 ppm であった。

原料については、魚粉 44 点中 35 点（検出率 80 %，最大値 1.7 ppm），チキンミール等 13 点中 8 点（検出率 62 %，最大値 1.5 ppm），稲わら 2 点中 1 点（検出率 50 %，0.3 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。

iii 水銀

配混合飼料 168 点中 36 点（検出率 21 %）から検出されたが、基準を超えるものはなく最大値は子豚育成用で 0.25 ppm であった。

原料については、魚粉は 45 点中 45 点（検出率 100 %，最大値 0.74 ppm），チキンミール等は 13 点中 9 点（検出率 69 %，最大値 0.15 ppm），稲わら 2 点中 2 点（検出率 100 %，最大値 0.19 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。

iv ひ素

稲わらについて、実施した 3 点全てで検出（最大値 4.4 ppm）されたが、基準値を超えるものはなかった。

表 3 重金属のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	指導基準値 (ppm)	モニタリング点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppm)	平均値 (ppm)
カドミウム	配合飼料，乾牧草等	1.0	174	141	81.0	0.35	0.10
	魚粉，チキンミール等	2.5	58	56	96.6	2.1	0.65
	その他	—	13	12	92.3	1.3	0.28
	計	—	245	209	85.3	2.1	0.26
鉛	配合飼料，乾牧草等	3.0	173	59	34.1	1.9	0.37
	魚粉，チキンミール等	7.5	57	43	75.4	1.7	0.70
	その他	—	13	12	92.3	11	6.1
	計	—	243	114	46.9	11	1.1
水銀	配合飼料，乾牧草等	0.4	170	38	22.4	0.25	0.05
	魚粉，チキンミール等	1.0	58	54	93.1	0.74	0.27
	その他	—	13	2	15.4	0.04	0.04
	計	—	241	94	39.0	0.74	0.17
ひ素	稲わら	7	3	3	100.0	4.4	3.2
	その他	—	12	11	91.7	1.6	0.72
	計	—	15	14	93.3	4.4	1.3

3) 農薬

農薬の汚染の可能性のある飼料等 675 点に対し、省令で基準の設定されている 48 成分及び

その他の農薬 109 成分の計 157 成分について、71,492 点のモニタリングを実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

そのうち、検出された主な農薬のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i マラチオン

配混合飼料 332 点中 57 点（検出率 17 %）から検出され、19 年度と同様の結果であり、最大値は乳用牛飼育用で 0.330 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこしで 21 点中 5 点（検出率 24 %）から検出されたが、基準値を超えたものはなく、最大値 1.4 ppm であった。その他モニタリングを実施したえん麦及び乾草からは検出されなかった。

また、基準値はないものの検出率の高い原料は、ふすまの 30 %（最大値 0.48 ppm）、とうもろこし DDGS 20 %（最大値 1.7 ppm）等があった。

ii クロルピリホスメチル

配混合飼料 329 点中 10 点（検出率 3 %）から検出され、19 年度は検出されていないため若干検出率が上がっている。最大値は牛用配合飼料で 0.13 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこし及びえん麦について実施したが不検出であった。

また、基準値はないものの検出率の高い原料は、ふすまの 39 %（最大値 0.056 ppm）、ビールかす 25 %（最大値 0.040 ppm）等があった。

iii グリホサート

配混合飼料 10 点中 6 点（検出率 60 %）から検出され、最大値はほ乳期子豚育成用で 0.48 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこし及び乾草をそれぞれ 1 点実施し、とうもろこしから 0.053 ppm 検出されたが、基準値よりかなり低い数値であった。

iv その他検出されている農薬

① 配混合飼料

EPN, アニロホス, エジフェンホス, クロルプロファム, ジフェノコナゾール, フェニトロチオン, フェノトリン, フェンブコナゾール, プロピコナゾール

② 原料

BHC（古畳わら）、DDT（古畳わら）、アトラジン（スーダングラス）、イサゾホス（ライグラス）、イソフェンホス（オーツヘイ）、カズサホス（アルファルファ、バミューダグラス）、ジクロラン（古畳わら）、シハロトリン（ビートパルプ）、ディルドリン（古畳わら）、テブコナゾール（ビートパルプ）、トリアジメホン（バミューダグラス）、トリフルラリン（アルファルファ、スーダングラス）、ピリミホスメチル（ビールかす）、フルトラニル（米ぬか油かす）、プロパルギット（ライグラス）、プロピコナゾール（ふすま、チモシー、ライグラス）、ヘキサクロロベンゼン（古畳わら）、ペンディメタリン（スーダングラス）

農薬については、有機リン系の農薬の検出率が高いことから、とうもろこし、麦類及びその副産原料を中心に留意が必要である。また、牧草については、検出率は低いものの多種類の農薬が検出されており、幅広く留意が必要である。

表4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分）

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
BHC	配混合飼料	5	312	0			
	乾草	2×10	44	1	2.3	4	4
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	1	0.2	4	4
DDT	配混合飼料	1×10 ²	312	0			
	乾草	1×10 ²	44	1	2.3	3	3
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	1	0.2	3	3
アセフェート	基準値のない飼料	—	38	0			
アトラジン	とうもろこし	2×10 ²	21	0			
	えん麦	2×10 ²	2	0			
	乾草	15×10 ³	41	1	2.4	200	200
	基準値のない飼料	—	482	0			
計	—	546	1	0.2	200	200	
アラクロール	とうもろこし	2×10 ²	21	0			
	えん麦	1×10 ²	2	0			
	乾草	3×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	484	0			
計	—	551	0				
アルジカルブ	基準値のない飼料	—	20	0			
アルドリン 及び ディルドリン	配混合飼料	2×10	312	0			
	乾草	2×10	44	2	4.5	12	9
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	2	0.3	12	9
イソフェンホス	とうもろこし	2×10	21	0			
	基準値のない飼料	—	586	2	0.3	78	63
	計	—	607	2	0.3	78	63
イミダクロプリド	とうもろこし	1×10 ²	1	0			
	乾草	6×10 ³	3	0			
	計	—	4	0			
エチオン	乾草	20×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	569	0			
	計	—	610	0			
エンドリン	配混合飼料	1×10	312	0			
	乾草	1×10	44	0			
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	0			
カルバリル	基準値のない飼料	—	20	0			
カルボフラン	基準値のない飼料	—	20	0			
グリホサート	とうもろこし	1×10 ³	1	1	100.0	53	53
	乾草	120×10 ³	1	0			
	基準値のない飼料	—	10	6	60.0	480	160
	計	—	12	7	58.3	480	150
グルホシネート	とうもろこし	1×10 ²	1	0			
	乾草	15×10 ³	1	0			
	基準値のない飼料	—	10	0			
	計	—	12	0			
クロルピリホス	とうもろこし	1×10 ²	21	0			
	えん麦	75×10	2	0			
	乾草	13×10 ³	41	1	2.4	280	280
	基準値のない飼料	—	514	0			
計	—	578	1	0.2	280	280	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7×10 ³	21	0			
	えん麦	10×10 ³	2	0			
	基準値のない飼料	—	558	20	3.6	130	43
	計	—	581	20	3.4	130	43
クロルフェンピホス	とうもろこし	5×10	21	0			
	基準値のない飼料	—	582	0			
	計	—	603	0			

表 4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
クロルプロファム	とうもろこし	5×10	21	0			
	基準値のない飼料	—	525	0			
	計	—	546	0			
クロルベンジレート	とうもろこし	2×10	21	0			
	基準値のない飼料	—	560	0			
	計	—	581	0			
ジカンバ	乾草	200×10 ³	2	0			
ジクロルボス	基準値のない飼料	—	38	0			
シハロトリン	とうもろこし	4×10	21	0			
	えん麦	2×10 ²	2	0			
	乾草	6×10 ²	41	0			
	基準値のない飼料	—	489	2	0.4	340	320
	計	—	553	2	0.4	340	320
シフルトリン	基準値のない飼料	—	7	0			
ジメトエート	とうもろこし	1×10 ³	21	0			
	えん麦	2×10 ²	2	0			
	乾草	2×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	511	0			
	計	—	575	0			
ダイアジノン	とうもろこし	2×10	21	0			
	えん麦	1×10 ²	2	0			
	乾草	10×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	578	0			
デルタメトリン 及び トラロメトリン	とうもろこし	1×10 ³	21	0			
	えん麦	1×10 ³	2	0			
	乾草	5×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	489	0			
	計	—	553	0			
テルブホス	とうもろこし	1×10	21	0			
	えん麦	5×10	2	0			
	乾草	1×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	578	0			
トリシクラゾール	とうもろこし	2×10	1	0			
	えん麦	2×10	1	0			
	計	—	2	0			
パラチオン	とうもろこし	3×10 ²	21	0			
	えん麦	8×10	2	0			
	乾草	5×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	578	0			
ピペロニルブトキシド	基準値のない飼料	—	10	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1×10 ³	21	0			
	えん麦	1×10 ³	2	0			
	基準値のない飼料	—	555	3	0.5	41	35
	計	—	578	3	0.5	41	35
フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	1×10	90	0			
	配混合飼料（豚・牛等用）	2×10	222	0			
	乾草	2×10 ²	41	0			
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	577	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1×10 ³	21	0			
	えん麦	1×10 ³	2	0			
	乾草	10×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	3	0.6	31	29
	計	—	578	3	0.5	31	29
フェノブカルブ	基準値のない飼料	—	20	0			

表 4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	省令基準値 (ppb)	モニタリング点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
フェンチオン	とうもろこし	5×10 ³	21	0			
	基準値のない飼料	—	589	0			
	計	—	610	0			
フェントエート	とうもろこし	4×10 ²	21	0			
	えん麦	4×10 ²	2	0			
	基準値のない飼料	—	555	0			
計	—	578	0				
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	5×10 ²	92	0			
	配混合飼料（豚用）	4×10 ³	73	0			
	配混合飼料（牛等用）	8×10 ³	152	0			
	乾草	13×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	227	0			
計	—	585	0				
フェンプロパトリン	乾草	20×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	545	0			
	計	—	586	0			
プロモキシニル	乾草	1×10 ²	8	0			
	基準値のない飼料	—	4	0			
	計	—	12	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	2×10	312	0			
	乾草	2×10	44	0			
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2×10 ³	21	0			
	えん麦	2×10 ³	2	0			
	乾草	55×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	489	0			
	計	—	553	0			
ペンディメタリン	とうもろこし	2×10 ²	21	0			
	えん麦	1×10 ²	2	0			
	乾草	1×10 ²	41	1	2.4	40	40
	基準値のない飼料	—	482	0			
	計	—	546	1	0.2	40	40
ホスメット	とうもろこし	5×10	21	0			
	えん麦	5×10	2	0			
	乾草	40×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	578	0			
ホレート	とうもろこし	5×10	21	0			
	えん麦	5×10	2	0			
	乾草	1.5×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	511	0			
	計	—	575	0			
マラチオン	とうもろこし	2×10 ³	21	5	23.8	1,400	320
	えん麦	2×10 ³	2	0			
	乾草	135×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	520	67	12.9	1,700	110
	計	—	584	72	12.3	1,700	120
メチダチオン	とうもろこし	1×10 ²	21	0			
	えん麦	2×10 ²	2	0			
	乾草	12×10 ³	41	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	578	0			
リンデン (γ-BHC)	配混合飼料（鶏・うずら，豚用）	5×10	161	0			
	配混合飼料（牛等用）	4×10 ²	152	0			
	乾草	4×10 ²	43	0			
	基準値のない飼料	—	224	0			
	計	—	580	0			

4) その他の有害物質

i 硝酸態窒素等

乾牧草についてアルファルファ、スーダングラスを主に 29 点モニタリングを実施し、アルファルファ 9 点、スーダングラス 12 点とともに実施した全ての試料から検出された。最大値は、アルファルファが 1,000 ppm、スーダングラスが 970 ppm の最大値であった。特に問題となる高濃度の牧草はなかったが、今後とも留意が必要である。

ii ヒスタミン

魚粉 16 点についてモニタリングを実施した結果、6 点から検出された。
特に問題となる高濃度の汚染はなかったが、今後とも留意が必要である。

iii マラカイトグリーン等

養殖水産動物用飼料 14 点及び魚粉 45 点についてモニタリングを実施した結果、いずれも検出されなかった。

表 6 その他の有害物質のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	モニタリング点数	うち検出されたもの				
			点数	検出率 (%)	最大値 ¹⁾	平均値 ¹⁾	
硝酸態窒素等	硝酸態窒素	アルファルファ	9	9	100.0	1,000	390
		スーダングラス	12	12	100.0	970	420
		その他の乾牧草	8	6	75.0	260	120
		計	29	27	93.1	1,000	340
	亜硝酸態窒素	アルファルファ	9	4	44.4	110	62
		スーダングラス	12	0			
		その他の乾牧草	7	0			
		計	28	4	14.3	110	62
ヒスタミン	魚粉	16	6	37.5	610	240	
マラカイトグリーン等	マラカイトグリーン	養魚用配合飼料	14	0			
		魚粉	45	0			
		計	59	0			
	ロイコマラカイトグリーン	養魚用配合飼料	14	0			
		魚粉	45	0			
		計	59	0			
	メラミン	養魚用配合飼料	2	1	50.0	22	22
		その他の配混合飼料	11	0			
魚粉, サナギ, イカミール		19	1	5.3	18	18	
その他の飼料原料		12	0				
計		44	2	4.5	22	20	
メラミン等	養魚用配合飼料	2	0				
	その他の配混合飼料	11	0				
	魚粉, サナギ, イカミール	20	4	20.0	18	13	
	その他の飼料原料	12	0				
	計	45	4	8.9	18	13	
アンメリド	養魚用配合飼料	2	0				
	その他の配混合飼料	11	0				
	魚粉, サナギ, イカミール	19	1	5.3	11	11	
	その他の飼料原料	12	0				
	計	44	1	2.3	11	11	
アンメリン	養魚用配合飼料	2	0				
	その他の配混合飼料	11	0				
	魚粉, サナギ, イカミール	19	1	5.3	8	8	
	その他の飼料原料	12	0				
	計	44	1	2.3	8	8	

1) 単位は、硝酸態窒素等、ヒスタミン及びメラミン等はppm、マラカイトグリーン等はppbで示した。

iv メラミン等

養殖水産動物用飼料 2 点，混合飼料 11 点及び原料 31 点のモニタリングを実施した結果，メラミンがまだい育成用配合飼料から 1 点（22 ppm），イカミールから 1 点（18 ppm）検出された。

検出数は少ないが，今後とも留意が必要である。

なお，農林水産省からの指導により，当該飼料の出荷停止等の措置が講じられている。

3.2 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

国内で製造した魚粉 102 検体，魚鱗抽出物等 6 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，全ての検体で不検出であり，総合判定で動物由来たん白質は検出されなかった。（表 7 参照）

チキンミール 29 検体，フェザーミール 20 検体及び豚血粉等 2 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，チキンミール 1 検体が PCR 試験で反すう動物由来 DNA が検出された。この反すう動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため PCR を実施した結果，牛由来 DNA が検出されたが，判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした。（表 8 参照）

ポークミール 3 検体及び原料混合肉骨粉 22 検体について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，原料混合肉骨粉 1 検体が PCR 試験で反すう動物由来 DNA が検出された。この反すう動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため PCR を実施した結果，牛由来 DNA は検出されなかった。判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした。（表 8 参照）

表 7 魚粉等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	102	0	0.0	102	0	0.0	102	0	0.0	0
魚鱗抽出物	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
イカミール	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0	0
えび粉末	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
かに殻粉末	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0	0

表 8 豚肉骨粉等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験						総合 判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA			牛由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	29	0	0.0	29	0	0.0	29	1	3.4	1	1	100.0	0
フェザーミール	20	0	0.0	20	0	0.0	20	0	0.0				0
鶏加水分解たん白	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
鶏豚混合肉骨粉				22	0	0.0	22	1	4.5	1	0	0.0	0
豚肉骨粉				3	0	0.0	3	0	0.0				0
豚血粉	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0

国内で製造した子牛用配合飼料 42 検体，乳牛用配合飼料 53 検体，肉牛用配合飼料 82 検体，種牛等用配合飼料 4 検体，牛用混合飼料 32 検体，牛用プレミックス 4 検体及び糖蜜吸着飼料 1 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，子牛用配合飼料 2 検体，牛用混合飼料 3 検体及び牛用プレミックス 1 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質が検出された．子牛用配合飼料 2 検体には，乳製品が原料に使用されていた．判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした．（表 9 参照）

一連の工程で製造するため農林水産大臣の確認が必要な動物由来たん白質を使用した混合飼料 10 検体及び発酵飼料等 7 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，全ての検体で不検出であり，総合判定で動物由来たん白質は検出されなかった．（表 9 参照）

輸入の牛用混合飼料 33 検体及びフミン酸 1 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，フランス産の牛用混合飼料 1 検体が PCR 試験で反すう動物由来 DNA が検出された．この反すう動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため PCR を実施した結果，牛由来 DNA は検出されなかった．判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした．（表 10 参照）

表 9 国内製造牛用飼料等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験						PCR試験						総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来たん白質			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用飼料等																
ほ乳期子牛用配合飼料	15	0	0.0	7	1	14.3				7	0	0.0				0
若令牛用配合飼料	16	0	0.0	15	0	0.0				15	0	0.0				0
幼令肉牛用配合飼料	11	0	0.0	11	1	9.1				11	0	0.0				0
乳牛用配合飼料	53	0	0.0	50	0	0.0				50	0	0.0				0
肉牛用配合飼料	82	0	0.0	73	0	0.0				73	0	0.0				0
種牛等用配合飼料	4	0	0.0	3	0	0.0				3	0	0.0				0
混合飼料	32	0	0.0	30	3	10.0				30	0	0.0				0
プレミックス	4	0	0.0	3	1	33.3				3	0	0.0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)																
混合飼料	10	0	0.0	9	0	0.0	1	0	0.0	9	0	0.0	1	0	0.0	0
発酵飼料等	7	0	0.0	6	0	0.0				6	0	0.0				0

表 10 輸入飼料等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨, 獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA				牛由来DNA		
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用混合飼料													
アメリカ	19	0	0.0	19	0	0.0	19	0	0.0				0
オーストラリア	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
シンガポール	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
スイス	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
タイ	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
台湾	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0				0
中国	4	0	0.0	4	0	0.0	4	0	0.0				0
フランス	2	0	0.0	2	0	0.0	2	1	50.0	1	0	0.0	0
ベルギー	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
フミン酸													
カナダ	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0

3.3 サルモネラ

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。（表 11 参照）

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。（表 12 参照）

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。（表 13 参照）

陽性検体から分離した血清型は 6 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。（表 14 参照）

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⁴⁾によれば、これら 6 血清型のうち、*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。

表 11 飼料原料の種類別検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	80	1	1.3
チキンミール	25	0	0
フェザーミール	13	2	15.4
原料混合肉骨粉	16	1	6.3
魚粉・大豆油かす二種混合飼料	1	1	100
魚粉・とうもろこし二種混合飼料	1	0	0
フェザーミール・大豆油かす二種混合飼料	1	0	0
魚鱗抽出物	1	0	0
ポークミール	2	0	0
魚介類入り発酵飼料	1	0	0
イカミール	1	0	0
イカミール・大豆油かす二種混合飼料	1	0	0
カニ殻粉末	2	0	0
小 計	145	5	3.4
植物油かす			
大豆油かす	6	1	16.7
なたね油かす	5	0	0
ごま油かす	1	0	0
やし油かす	1	0	0
植物性油かす	1	0	0
小 計	14	1	7.1
そうこう類			
ふすま	2	0	0
ビールかす	1	0	0
米ぬか	4	0	0
DDGS	1	0	0
小 計	8	0	0
合 計	167	6	3.6

表 12 原産国及び飼料原料の種類別陽性率（サルモネラ）

原産国	陽性検体数/検体数									合計 (陽性率)
	動物質性飼料			植物性油かす			そうこう類			
	魚粉	チキン ミール	その他	大豆 油かす	なたね 油かす	その他	ふすま	米ぬか	その他	
国産 (陽性率)	1/76 (1.3%)	0/25 (0%)	4/40 (10%)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/4 (0%)	0/1 (0%)	5/159 (3.1%)
輸入										
カナダ				0/1						0/1 (0%)
インド				1/1						1/1 (100%)
メキシコ	0/1									0/1 (0%)
ミャンマー	0/1									0/1 (0%)
ナミビア	0/1									0/1 (0%)
ペルー	0/1									0/1 (0%)
フィリピン						0/1				0/1 (0%)
アメリカ									0/1	0/1 (0%)
小 計 (陽性率)	0/4 (0%)			1/2 (50%)		0/1 (0%)			0/1 (0%)	1/8 (12.5%)
合 計 (陽性率)	1/80 (1.3%)	0/25 (0%)	4/40 (10%)	1/6 (16.7%)	0/5 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/4 (0%)	0/2 (0%)	6/167 (3.6%)

表 13 配混合飼料の検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率(%)
鶏用配混合飼料	50	1	2.0
豚用配混合飼料	31	1	3.2
牛用配混合飼料	49	0	0
その他の混合飼料	2	0	0
合 計	132	2	1.5

表 14 陽性検体の血清型（サルモネラ）

血清型	陽性検体数							合 計
	フェザー ミール	魚粉	原料混合 肉骨粉	大豆 油かす	魚粉・大 豆油かす 二種混合 飼料	鶏用配合 飼料	豚用配合 飼料	
<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
合 計	2	1	1	1	1	1	1	8

文 献

- 1) (社) 日本油化学会編：“基準油脂分析試験法（I）”，1996年版(2)，2.1.1 試料採取方法(1996).
- 2) 泉和夫，石橋隆幸，青山幸二，石黒瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 3) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課課長補佐（飼料検査指導班担当）事務連絡：“中国産飼料へのメラミン混入に対する対応について”，平成20年10月29日(2008).
- 4) 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 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 21 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

有害な物質、病原微生物等を含む飼料の使用が原因となって、人の健康をそこなうおそれがある家畜の肉等の有害畜産物が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止するため、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（飼料安全法）第 3 条第 1 項の規定により、農林水産省令及び関係通知等で飼料中の有害物質等の基準・規格が設定されている。

（独）農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、これらの有害物質等の基準・規格への適合状況の確認及び基準・規格が設定されていないその他の有害物質等の飼料中の汚染実態等を把握するためのモニタリングを実施しており、平成 21 年度に実施したモニタリングの結果について取りまとめたので報告する。

2 方 法**2.1 試 料**

FAMIC 肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターが、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、平成 21 年 4 月から平成 22 年 3 月までに各管内の飼料原料工場、配合飼料工場及び港湾サイロ等に対して実施した飼料立入検査の際に採取した飼料等についてモニタリングを実施した。

モニタリングを行った試料及び点数は表 1 のとおりである。

2.2 モニタリング実施項目

平成 20 年度と同様に、以下の 1)~3)の各項目について、モニタリングを実施した。

なお、詳細については平成 20 年度の報告内容を参照願いたい。

1) 有害物質**i かび毒及びエンドファイト産生毒素（21 成分）****ア 飼料中の基準値又は暫定許容値が設定されている 3 成分**

アフラトキシン B₁、デオキシニバレノール及びゼアラレノン

イ その他 18 成分

かび毒：アフラトキシン B₂、G₁及び G₂、ステリグマトシスチン、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ネオソラニオール、フザレノン-X、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、フモニシン B₁、B₂及び B₃、オクラトキシン A 並びにシトリニン

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

- ii 重金属（4成分）
カドミウム，鉛，水銀及びヒ素
- iii 農薬（152成分）
 - ア 飼料中の基準値が設定されている46成分
 - イ その他106成分
- iv その他の有害物質（9成分）
 - ア 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素（以下「硝酸態窒素等」という）
 - イ ヒスタミン
 - ウ マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン（以下「マラカイトグリーン等」という）
 - エ メラミン，シアヌル酸，アンメリド及びアンメリン（以下「メラミン等」という）

2) BSE 発生防止に係る試験

- i 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験
成分規格等省令別表第1の2の基準・規格に規定された飼料中への動物由来たん白質の混入の有無を確認するために，肉骨粉の顕微鏡鑑定，動物由来たん白質及び動物由来DNAの定性試験を実施した。
- ii 不溶性不純物

3) 病原微生物

- i サルモネラ

2.3 サンプルング方法等

平成20年度と同じサンプルング方法等により採取した。
なお，詳細については平成20年度の報告内容を参照願いたい。

2.4 試験方法

平成20年度と同じ試験方法により実施した。
なお，詳細については平成20年度の報告内容を参照願いたい。

表 1 モニタリングを行った試料及び点数

モニタリングを行った 試料の種類	モニタ リングを 行った 試料の 総点数	項目別の試料点数										
		有 害 物 質					BSE発生防止に係る試験				病原微生物	
		かび毒	重金属	農薬	硝酸態 窒素等	ヒスタ ミン	マラカ イトグ リール 等	メラミ ン等	動物由来たん白質			サルモ ネラ
							顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR 試験	不溶性 不純物		
幼すう育成用	6	6	2	3								4
中すう育成用	11	5	4	8								4
大すう育成用	7	2	4	5								4
成鶏飼育用	63	45	26	38								34
ブロイラー肥育前期用	18	15	5	7								3
ブロイラー肥育後期用	35	19	17	17								8
肉用種鶏中すう育成用	1		1									
肉用種鶏飼育用	1	1	1	1								
種鶏飼育用	2		1	1								
鶏複数ステージ用	4	2		3								2
ほ乳期子豚育成用	38	31	14	18								14
子豚育成用	31	20	8	22								7
肉豚肥育用	29	18	8	22								10
種豚育成用	4	3	1	2								2
種豚飼育用	15	7	7	7								3
豚複数ステージ用	4	2		3								2
ほ乳期子牛育成用代用乳用	8	3	3	2				8				2
ほ乳期子牛育成用	3	1		1				3	2	2		
若令牛育成用	14	5	4	5				14	13	13		4
乳用牛飼育用	64	44	16	40				63	54	54		20
幼令肉用牛育成用	9	3	5	7				7	7	7		1
肉用牛肥育用	73	37	14	39				73	63	63		10
乳肉用牛飼育用	1	1						1	1	1		
肉牛繁殖用	7	4	2	3				7	7	7		
種牛飼育用	2	2		1				2	2	2		2
牛複数ステージ用	29	17	8	18				29	17	17		5
あゆ育成用	1											
ぶり育成用	1											
まだい育成用	5											
ぎんざけ育成用	2											
あまご育成用	1											
うなぎ育成用	1											
魚用（対象魚を限定しないもの）	1											
とうもろこし・魚粉二種混合飼料	2		2	2								
二種混（その他のもの）	2							2	2	2		
動物性たん白質混合飼料	3							3	3	3		3
糖蜜吸着飼料	1							1	1	1		
その他の混合飼料(成分量表示)	16		2	3				15	15	15		3
その他の混合飼料(成分量非表示)	57	3		5				55	55	55		8
小 計	572	296	155	283				283	242	242		155

表 1 モニタリングを行った試料及び点数 (続き)

モニタリングを行った 試料の種類	モニタ リングを 行った 試料の 総点数	項目別の試料点数							BSE発生防止に係る試験			病原微生物	
		有害物質				マラカイトグリーン等			動物由来たん白質				
		かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素等	ヒスタミン	マラカイトグリーン等	メラミン等	顕微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験		不溶性不純物
とうもろこし	53	52		37									
マイロ	3	3		3									
小麦	6	6		3									
大麦	23	19		20									
大豆	1	1		1									
エクストルーダ処理大豆	1	1		1									
穀類	1			1									
圧べん大豆	1			1									
膨化脱皮大豆	1			1									
キャッサバ	1	1		1									
小麦粉	2	2		2									
甘しょ	1	1		1									
末粉	2	1		2									
パン粉	2	2		2									
小計	97	89		73									
米ぬか	3	3		2									
ふすま	29	19		26								1	
脱脂ぬか (米ぬか油かす)	5	2		3								1	
麦ぬか	1	1		1									
コーングルテンフィード	26	13		20									2
とうもろこしジスチラーズグレイン	6	5		4									
とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	10	10		8									1
雑穀酒かす	2	1		2									
スクリーニングペレット	2	2		2									
ビールかす	2	2		2									1
しょう油かす	1	1		1									
小計	87	59		71									6
大豆油かす	66	39		49									13
なたね油かす	33	19		23									7
やし油かす	2	2		1									
ごま油かす	8	7		6									1
あまに油かす	1												1
コーングルテンミール	12	9		11									
小計	122	76		90									22
魚粉	108		37		6	29	12	90	91	91			77
豚肉骨粉	3		1						3	3			3
チキンミール	30		6					30	30	30			26
フェザーミール	17							17	17	17			15
原料混合肉骨粉	22		6						22	22			14
血粉	1							1	1	1			
カニ殻粉末	1							1	1	1			1
エビ粉末	1							1	1	1			1
加水分解たん白	1								1	1			
イカミール	1							1	1	1			1
酵素処理魚抽出物	2							2	2	2			1
魚鱗抽出物	1							1	1	1			1
小計	188		50		6	29	12	144	171	171			140
アルファルファ	10			10									
チモシー	6			6									
スーダングラス	13			13		10							
バミューダグラス	3			3		2							
稲わら	5		5										
ライグラス	4			4		2							
オーツヘイ	7	2		7		1							
クレイングラス	1			1									
古畳わら	3			3									
小計	52	2	5	47	25								
綿実	7	7		6									
ビートパルプ	4	1		3									
コーンコブミール	2	1		2									
パイナップルかす	2	2		1									
みかんジュースかす	1	1		1									
さつまいも粉末	1	1		1									
エゴマミール	1	1											
にんにく粉末	1									1			
菓子くず	2	2											
カカオ豆殻	1	1											
蒟蒻飛粉	1	1											
乾燥酵母細胞壁	1							1	1	1			
オオバコ粉末	1							1		1			
動物性油脂	79											79	
特定動物性油脂	4											4	
上記以外の飼料	2							1	1	1			1
複合製剤	2							2	1	1			
プロビオン酸	1							1					
小計	113	18	14				1	6	3	4		83	1
合計	1,231	540	210	578	25	6	40	433	416	417		83	324

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

基準の設定されているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを始め、計 21 成分について 4,232 点のモニタリングを実施した。その結果を表 2 に示した。

そのうち基準値の設定されている 3 成分のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i アフラトキシン B₁

配混合飼料 265 点中 119 点（検出率 45 %）から検出され、有害物質の指導基準を超えるものはなかったが、ほ乳期子牛用を含む牛複数ステージ用で 0.007 ppm、若令牛育成用で 0.008 ppm 検出されたものがあった。

原料では、とうもろこしの検出率は 42 %、最大値 0.010 ppm と、20 年度と検出率、検出値ともほぼ同程度であり、特に問題のない結果であった。

また、とうもろこしの副産原料であるグルテンフィード、グルテンミールについては、とうもろこしよりやや高い検出率であったが、高濃度のものはない。

その他の原料では、やし油かす（フィリピン産）から 0.026 ppm 検出されており、東南アジア産の原料等の熱帯、亜熱帯産原料を使用する際には留意が必要である。

ii デオキシニバレノール

配混合飼料 135 点中 124 点（検出率 92 %）から検出され、20 年度より更に高い検出率であったが、基準を超えるものはなく最大値は乳用牛飼育用で 1.4 ppm であった。

原料で検出率の高いものは、とうもろこし 97 %（最大値 1.4 ppm）、コーングルテンフィード 92 %（最大値 6.3 ppm）、コーングルテンミール 83 %（最大値 5.2 ppm）、DDGS 88 %（最大値 3.2 ppm）等のとうもろこし由来原料であり、20 年度より検出値がひと桁高くなっている。これらの原料を使用する際には留意が必要である。

iii ゼアラレノン

配混合飼料 126 点中 121 点（検出率 96 %）から検出され、20 年度と同様に高い検出率であったが、基準を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.23 ppm であった。

原料で検出率の高いものは、とうもろこし 86 %（最大値 0.43 ppm）、コーングルテンフィード 82 %（最大値 0.053 ppm）、コーングルテンミール 100 %（最大値 5.4 ppm）、DDGS 71 %（最大値 0.45 ppm）等のとうもろこし由来原料であり、20 年度より検出率、検出値ともに高くなっている。これらの原料を使用する際には留意が必要である。

表2 かび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	指導基準値 (ppb)	モニタリング点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
アフラトキシンB ₁	配混合飼料 (ほ乳期, 幼令期用等)	1×10	76	52	68.4	7	1.4
	配混合飼料 (上記以外)	2×10	189	67	35.4	8	1.4
	とうもろこし	—	52	22	42.3	10	1.8
	コーングルテンフィード	—	10	6	60.0	2	1.0
	コーングルテンミール	—	8	4	50.0	4	1.7
	DDGS	—	15	1	6.7	0.3	0.3
	大豆油かす	—	37	15	40.5	4	1.2
	やし油かす	—	2	2	100.0	26	15
	その他	—	83	9	10.8	2	1.0
	計	—	472	178	37.7	26	1.6
デオキシニバレノール	配混合飼料 (生後3ヶ月以上の牛用)	4.0×10 ³	43	42	97.7	1,400	470
	配混合飼料 (上記以外)	1.0×10 ³	92	82	89.1	690	280
	とうもろこし	—	37	36	97.3	1,400	510
	ふすま	—	18	13	72.2	420	200
	コーングルテンフィード	—	12	11	91.7	6,300	3,100
	コーングルテンミール	—	6	5	83.3	5,200	1,400
	DDGS	—	8	7	87.5	3,200	2,200
	大豆油かす	—	28	9	32.1	210	51
	その他	—	62	21	33.9	3,000	270
	計	—	306	226	73.9	6,300	560
ゼアラレノン	配混合飼料 (家畜用)	1.0×10 ³	84	80	95.2	170	58
	配混合飼料 (上記以外)	—	42	41	97.6	230	72
	とうもろこし	—	36	31	86.1	430	80
	ふすま	—	15	7	46.7	240	40
	コーングルテンフィード	—	11	9	81.8	530	220
	コーングルテンミール	—	7	7	100.0	5,400	1,100
	DDGS	—	7	5	71.4	450	320
	大豆油かす	—	31	16	51.6	20	7
	その他	—	61	33	54.1	460	34
	計	—	294	229	77.9	5,400	100
アフラトキシンB ₂	—	—	472	41	8.7	3	0.6
アフラトキシンG ₁	—	—	472	6	1.3	5	3.0
アフラトキシンG ₂	—	—	472	1	0.2	0.3	0.3
ステリグマトシスチン	—	—	254	151	59.4	21	1.1
HT-2トキシン	—	—	21	1	4.8	11	11
T-2トキシン	—	—	285	118	41.4	160	8
ネオソラニオール	—	—	264	13	4.9	16	8
フザレノン-X	—	—	267	5	1.9	110	53
3-アセチルデオキシニバレノール	—	—	3	1	33.3	56	56
15-アセチルデオキシニバレノール	—	—	3	1	33.3	1,500	1,500
ニバレノール	—	—	305	22	7.2	550	89
フモニシンB ₁	—	—	80	55	68.8	4,300	610
フモニシンB ₂	—	—	80	49	61.3	2,300	270
フモニシンB ₃	—	—	52	42	80.8	670	87
オクラトキシンA	—	—	102	3	2.9	7	5
シトリニン	—	—	22	0	—	—	—
エルゴバリン	—	—	3	3	100.0	190	120
ロリトレムB	—	—	3	2	66.7	760	620

2) 重金属

有害物質の指導基準のあるカドミウム，鉛，水銀及びヒ素について配合飼料 551 点，魚粉 134 点，チキンミール等（豚肉骨粉，原料混合肉骨粉，チキンミール）39 点，稲わら 9 点等のモニタリングを実施し，その結果を表 3 に示した．

各重金属のモニタリング結果は，以下のとおりであった．

i カドミウム

配合飼料 156 点中 92 点（検出率 59 %）から検出されたが，基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.40 ppm であった．

原料については，魚粉は 37 点中 37 点（検出率 100 %，最大値 2.3 ppm），チキンミール等は 13 点中 2 点（検出率 15 %，最大値 0.06 ppm）からそれぞれ検出されたが，基準値を超えるものはなかった．稲わらは 1 点実施し不検出であった．

ii 鉛

配合飼料 156 点中 36 点（検出率 23 %）から検出されたが，基準値を超えるものはなく最大値はほ乳期子豚育成用で 2.1 ppm であった．

原料については，魚粉は 37 点中 24 点（検出率 65 %，最大値 3.9 ppm），チキンミール等は 13 点中 6 点（検出率 46 %，最大値 1.9 ppm），稲わらは 1 点中 1 点（検出率 100 %，0.6 ppm）からそれぞれ検出されたが，基準値を超えるものはなかった．

iii 水銀

配合飼料 156 点中 39 点（検出率 26 %）から検出され，基準を超えるものはなく最大値は子豚育成用で 0.11 ppm であった．

原料については，魚粉は 37 点中 37 点（検出率 100 %，最大値 0.97 ppm），チキンミール等は 13 点中 8 点（検出率 62 %，最大値 0.24 ppm），稲わら 1 点中 1 点（検出率 100 %，0.02 ppm）からそれぞれ検出されたが，基準値を超えるものはなかった．

iv ヒ素

稲わらについて，実施した 5 点全てで検出（最大値 4.7 ppm）されたが，基準値を超えるものはなかった．

表 3 重金属のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った試料の種類	指導基準値 (ppm)	モニタリング点数	うち検出されたもの			
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppm)	平均値 (ppm)
カドミウム	配合飼料，乾牧草等	1.0	157	92	58.6	0.40	0.08
	魚粉，チキンミール等	2.5	50	39	78.0	2.3	0.78
	計	—	207	131	63.3	2.3	0.29
鉛	配合飼料，乾牧草等	3.0	157	37	23.6	2.1	0.40
	魚粉，チキンミール等	7.5	50	30	60.0	3.9	0.83
	計	—	207	67	32.4	3.9	0.59
水銀	配合飼料，乾牧草等	0.4	157	40	25.5	0.11	0.04
	魚粉，チキンミール等	1.0	50	45	90.0	0.97	0.31
	計	—	207	85	41.1	0.97	0.18
ヒ素	稲わら	7	5	5	100.0	4.7	3.9
	計	—	5	5	100.0	4.7	3.9

3) 農薬

農薬の汚染の可能性のある飼料等 578 点に対し、省令で基準の設定されている 46 成分及びその他の農薬 106 成分の計 152 成分について、66,012 点のモニタリングを実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

そのうち、検出された主な農薬のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i マラチオン

配混合飼料 267 点中 12 点（検出率 4 %）から検出されたが、20 年度よりかなり減少し、最大値は若令牛育成用で 0.15 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこしで 37 点中 1 点（検出率 3 %、0.022 ppm）検出事例があったが、その他モニタリングを実施したマイロ及び乾草からは検出されなかった。

また、基準値はないものの検出率の高い原料は、ふすまの 50 %（最大値 0.48 ppm）、スクリーニングペレット 100 %（最大値 0.56 ppm）等があった。

ii クロルピリホスメチル

配混合飼料 267 点中 19 点（検出率 7 %）から検出され、20 年度よりやや検出率が上がっている。最大値は牛用配合飼料で 0.20 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこしで 37 点中 1 点（検出率 3 %、0.047 ppm）、マイロで 3 点中 2 点（検出率 67 %、最大値 0.38 ppm）の検出事例があったが、いずれも基準値よりかなり低い数値であった。

また、基準値はないものの検出率の高い原料は、ふすまの 32 %（最大値 0.20 ppm）等があった。

iii グルホシネート

配混合飼料 8 点中 4 点（検出率 50 %）から検出され、不検出だった 20 年度より検出率が上がっている。最大値は子豚育成用及び幼令肉用牛育成用で 0.051 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこしで 6 点中 3 点（検出率 50 %、最大値 0.050 ppm）、乾草で 1 点中 1 点（検出率 100 %、0.025 ppm）の検出事例があったが、いずれも基準値を超えたものはなかった。

iv グリホサート

基準値のある原料は、とうもろこしで 6 点中 3 点（検出率 50 %、最大値 0.23 ppm）、乾草で 1 点中 1 点（検出率 100 %、0.13 ppm）の検出事例があったが、いずれも基準値を超えたものはなかった。

また、20 年度に検出率が 60 %であった配合飼料からは検出されなかった。

v フェニトロチオン

配混合飼料 267 点中 4 点（検出率 1 %）から検出され、20 年度と同様の検出率であった。最大値はブロイラー肥育後期用で 0.050 ppm であった。

基準値のある原料は、とうもろこしで 37 点中 2 点（検出率 5 %、最大値 0.044 ppm）、マイロで 3 点中 1 点（検出率 33 %、0.083 ppm）の検出事例があったが、いずれも基準値よりかなり低い数値であった。

また、基準値のない原料で、コーングルテンミール、ふすま、ビールかす、とうもろこしジスチラーズグレイン、麦ぬかから各 1 点検出された。

vi その他検出されている農薬

① 配混合飼料

EPN, クロルピリホス, クロルプロファム, ピペロニルブトキシド, ピリミホスメチル, フェンプロパトリン, プロパルギット

② 原料

EPN (ふすま), エンドスルファン (古畳わら), クロルピリホス (とうもろこし, ふすま), テブコナゾール (とうもろこしジスチラーズグレイン, ライグラス), トリフルラリン (アルファルファ), ピリミホスメチル (とうもろこし, マイロ, ビールかす), プロパルギット (ふすま, 綿実), プロピコナゾール (麦ぬか, ライグラス), メチダチオン (ミカンジュースかす), メトキシクロル (古畳わら)

農薬については、有機リン系の農薬の検出率が高いことから、とうもろこし、麦類及びその副産原料を中心に留意が必要である。

また、牧草については、検出数及び検出農薬数ともに 20 年度より低くなった。

表4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分）

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
BHC	配混合飼料	5	252	0			
	乾草	2×10	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			
DDT	配混合飼料	1×10 ²	252	0			
	乾草	1×10 ²	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			
アセフェート	とうもろこし	5×10 ²	1	0			
	基準値のない飼料	—	20	0			
	計	—	21	0			
アトラジン	とうもろこし	2×10 ²	36	0			
	マイロ	2×10	3	0			
	乾草	15×10 ³	44	0			
	その他	—	427	0			
	計	—	510	0			
アラクロール	とうもろこし	2×10 ²	36	0			
	マイロ	1×10 ²	3	0			
	乾草	3×10 ³	47	0			
	その他	—	428	0			
計	—	514	0				
アルジカルブ	基準値のない飼料	—	5	0			
アルドリン 及び ディルドリン	配混合飼料	2×10	252	0			
	乾草	2×10	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			
イソフェンホス	とうもろこし	2×10	37	0			
	基準値のない飼料	—	517	0			
	計	—	554	0			
エチオン	乾草	20×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	558	0			
エンドリン	配混合飼料	1×10	252	0			
	乾草	1×10	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			
カルバリル	基準値のない飼料	—	5	0			
カルボフラン	基準値のない飼料	—	5	0			
グリホサート	とうもろこし	1×10 ³	6	3	50.0	230	110
	乾草	120×10 ³	1	1	100.0	130	130
	基準値のない飼料	—	8	0			
	計	—	15	4	26.7	230	110
グルホシネート	とうもろこし	1×10 ²	6	3	50.0	50	27
	乾草	15×10 ³	1	1	100.0	25	25
	基準値のない飼料	—	8	4	50.0	51	49
	計	—	15	8	53.3	51	38
クロルピリホス	とうもろこし	1×10 ²	37	1	2.7	44	44
	マイロ	75×10	3	0			
	乾草	13×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	447	2	0.4	40	26
	計	—	531	3	0.6	44	32
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7×10 ³	37	1	2.7	47	47
	マイロ	10×10 ³	3	2	66.7	380	220
	基準値のない飼料	—	491	28	5.7	200	65
	計	—	531	31	5.8	380	74
クロルフェンビンホス	とうもろこし	5×10	37	0			
	基準値のない飼料	—	514	0			
	計	—	551	0			

表 4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
クロルプロファム	とうもろこし	5×10	36	0			
	基準値のない飼料	—	474	3	0.6	160	160
	計	—	510	3	0.6	160	160
クロルベンジレート	とうもろこし	2×10	36	0			
	基準値のない飼料	—	500	0			
	計	—	536	0			
ジカンバ	とうもろこし	5×10 ²	4	0			
ジクロルボス	とうもろこし	2×10 ²	1	0			
	基準値のない飼料	—	20	0			
	計	—	21	0			
シハロトリン	とうもろこし	4×10	36	0			
	マイロ	2×10 ²	3	0			
	乾草	6×10 ²	44	0			
	基準値のない飼料	—	427	0			
	計	—	510	0			
ジメトエート	とうもろこし	1×10 ³	37	0			
	マイロ	2×10 ²	3	0			
	乾草	2×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	447	0			
	計	—	531	0			
ダイアジノン	とうもろこし	2×10	37	0			
	マイロ	1×10 ²	3	0			
	乾草	10×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	0			
	計	—	535	0			
デルタメトリン 及び トラロメトリン	とうもろこし	1×10 ³	36	0			
	マイロ	1×10 ³	3	0			
	乾草	5×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	427	0			
	計	—	510	0			
テルブホス	とうもろこし	1×10	37	0			
	マイロ	5×10	3	0			
	乾草	1×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	0			
	計	—	535	0			
パラチオン	とうもろこし	3×10 ²	37	0			
	マイロ	8×10	3	0			
	乾草	5×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	447	0			
	計	—	531	0			
ピペロニルブトキシド	とうもろこし	24×10 ³	1	0			
	基準値のない飼料	—	9	1	11.1	32	32
	計	—	10	1	10.0	32	32
ピリミホスメチル	とうもろこし	1×10 ³	37	1	2.7	29	29
	マイロ	1×10 ³	3	1	33.3	370	370
	基準値のない飼料	—	495	4	0.8	81	54
	計	—	535	6	1.1	370	100
	フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	1×10	75	0		
配混合飼料（豚・牛等用）		2×10	177	0			
乾草		2×10 ²	44	0			
基準値のない飼料		—	237	0			
計		—	533	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1×10 ³	37	2	5.4	44	32
	マイロ	1×10 ³	3	1	33.3	83	83
	乾草	10×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	9	2.0	170	63
	計	—	535	12	2.2	170	60
フェノブカルブ	基準値のない飼料	—	5	0			

表 4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
フェンチオン	とうもろこし	5×10 ³	37	0			
	基準値のない飼料	—	521	0			
	計	—	558	0			
フェントエート	とうもろこし	4×10 ²	37	0			
	マイロ	4×10 ²	3	0			
	基準値のない飼料	—	495	0			
	計	—	535	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	5×10 ²	75	0			
	配混合飼料（豚用）	4×10 ³	66	0			
	配混合飼料（牛等用）	8×10 ³	111	0			
	乾草	13×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
計	—	533	0				
フェンプロパトリン	乾草	20×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	489	1	0.2	120	120
	計	—	533	1	0.2	120	120
プロモキシニル	乾草	1×10 ²	1	0			
	基準値のない飼料	—	2	0			
	計	—	3	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	2×10	252	0			
	乾草	2×10	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2×10 ³	36	0			
	マイロ	2×10 ³	3	0			
	乾草	55×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	427	0			
	計	—	510	0			
ベンタゾン	とうもろこし	2×10 ²	4	0			
ペンディメタリン	とうもろこし	2×10 ²	36	0			
	マイロ	1×10 ²	3	0			
	乾草	1×10 ²	44	0			
	基準値のない飼料	—	427	0			
	計	—	510	0			
ホスメット	とうもろこし	5×10	37	0			
	マイロ	5×10	3	0			
	乾草	40×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	0			
	計	—	535	0			
ホレート	とうもろこし	5×10	37	0			
	マイロ	5×10	3	0			
	乾草	1.5×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	0			
	計	—	535	0			
マラチオン	とうもろこし	2×10 ³	37	1	2.7	22	22
	マイロ	2×10 ³	3	0			
	乾草	135×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	28	6.2	560	100
	計	—	535	29	5.4	560	97
メチダチオン	とうもろこし	1×10 ²	37	0			
	マイロ	2×10 ²	3	0			
	乾草	12×10 ³	44	0			
	基準値のない飼料	—	451	1	0.2	460	460
	計	—	535	1	0.2	460	460
リンデン (γ-BHC)	配混合飼料（鶏・うずら，豚用）	5×10	141	0			
	配混合飼料（牛等用）	4×10 ²	111	0			
	乾草	4×10 ²	47	0			
	基準値のない飼料	—	237	0			
	計	—	536	0			

表 5 農薬のモニタリング結果（基準値のない成分）

モニタリング項目	モニタリング点数	うち検出されたもの				モニタリング項目	モニタリング点数	うち検出されたもの			
		点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)			点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
EPN	558	5	0.9	49	33	パラチオンメチル	554	0			
XMC	5	0				ハルフェンプロックス	533	0			
アセトクロール	533	0				ビフェントリン	533	0			
アニコホス	533	0				ビペロホス	533	0			
アメトリン	533	0				ピリダフェンチオン	533	0			
アリドクロール	533	0				ピリダベン	533	0			
アレスリン	533	0				ピリプロキシフェン	533	0			
イサゾホス	533	0				ピンクロゾリン	533	0			
イソプロカルブ	5	0				フェナリモル	533	0			
イソプロチオラン	533	0				フェノチオカルブ	533	0			
イプロベンホス	558	0				フェノトリン	533	0			
エジフェンホス	558	0				フェンスルホチオン	21	0			
エタルフルラリン	533	0				フェンブコナゾール	533	0			
エトフェンプロックス	533	0				ブタクロール	3	0			
エトフメセート	533	0				ブタミホス	533	0			
エトプロホス	554	0				フラムプロップメチル	533	0			
エトリジアゾール	533	0				フルシトリネート	533	0			
エトリムホス	558	0				フルトラニル	533	0			
エンドスルファン	3	1	33.3	21	21	フルトリアホール	533	0			
オキサジアゾン	533	0				フルバリネート	533	0			
カズサホス	533	0				フルミオキサジン	533	0			
カルフェントラゾンエチル	533	0				フルミクロラックペンチル	533	0			
カルボフェノチオン	25	0				プレチラクロール	3	0			
キシリルカルブ	5	0				プロシミドン	533	0			
キナルホス	21	0				プロチオホス	25	0			
キントゼン	533	0				プロパクロール	533	0			
クレソキシムメチル	533	0				プロパジン	533	0			
クロルタールジメチル	533	0				プロパニル	533	0			
クロルフェナビル	533	0				プロパルギット	533	8	1.5	64	41
ジクロホップメチル	533	0				プロピコナゾール	533	4	0.8	6,200	2,000
ジクロラン	536	0				プロファム	533	0			
ジフェナミド	533	0				プロフェノホス	533	0			
ジフェノコナゾール	533	0				プロペタンホス	533	0			
ジメテナミド	533	0				プロボキシル	5	0			
ジメビペレート	533	0				プロモブチド	533	0			
シラフルオフェン	533	0				プロモプロピレート	533	0			
ターバシル	533	0				プロモホス	533	0			
チオベンカルブ	533	0				ヘキサクロロベンゼン	3	0			
テクナゼン	533	0				ヘキサコナゾール	533	0			
テトラクロルビンホス	533	0				ベノキサコール	533	0			
テトラコナゾール	533	0				ペンコナゾール	533	0			
テトラジホン	533	0				ベンダイオカルブ	5	0			
テブコナゾール	533	2	0.4	980	540	ベンフルラリン	533	0			
テブフェンピラド	533	0				ホサロン	558	0			
テフルトリン	533	0				ホスチアゼート	533	0			
テルブトリン	533	0				メカルバム	21	0			
トリアジメホン	533	0				メタクリホス	533	0			
トリアレート	533	0				メトキシクロル	536	1	0.2	6	6
トリフルラリン	533	1	0.2	1,900	1,900	メトミノストロビン	533	0			
トリフロキシストロビン	533	0				メトラクロール	536	0			
トリフルアニド	533	0				メトルカルブ	5	0			
トルクロホスメチル	25	0				メビンホス	533	0			
ナブロパミド	533	0				モノクロトホス	21	0			

4) その他の有害物質

i 硝酸態窒素等

乾牧草についてアルファルファ、スーダングラスを主に 24 点モニタリングを実施し、アルファルファ、スーダングラスともに実施した 10 点全てで検出された。最大値は、アルファルファが 2,100 ppm, スーダングラスが 1,400 ppm であった。特に問題となる高濃度の牧草はなかったが、今後とも留意が必要である。

ii ヒスタミン

魚粉 6 点についてモニタリングを実施した結果、4 点から検出された。
特に問題となる高濃度の汚染はなかったが、今後とも留意が必要である。

iii マラカイトグリーン等

養殖水産動物用配合飼料 11 点及び魚粉 28 点についてモニタリングを実施した結果、いずれも検出されなかった。

iv メラミン等

養殖水産動物用配合飼料 1 点、魚粉 12 点及びにんにく粉末（中国産）1 点のモニタリングを実施した結果、魚粉 1 点からアンメリドが検出（14 ppm）された。

表 6 その他の有害物質のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
			点 数	検出率 (%)	最大値 ¹⁾	平均値 ¹⁾
硝酸態窒素 等	アルファルファ	10	10	100.0	2,100	690
	スーダングラス	10	10	100.0	1,400	430
	その他の乾牧草	4	4	100.0	140	68
	計	24	24	100.0	2,100	480
	アルファルファ	10	2	20.0	120	100
	スーダングラス	7	0			
	その他の乾牧草	4	1	25.0	28	28
	計	21	3	14.3	120	77
ヒスタミン	魚粉	6	4	66.7	910	460
マラカイト グリーン等	養殖水産動物用配合飼料	11	0			
	魚粉	28	0			
	計	39	0			
	養殖水産動物用配合飼料	11	0			
	魚粉	28	0			
	計	39	0			
		計	39	0		
メラミン	養殖水産動物用配合飼料	1	0			
	魚粉	12	0			
	その他の飼料原料	1	0			
	計	14	0			
シアヌル酸	養殖水産動物用配合飼料	1	0			
	魚粉	12	0			
	その他の飼料原料	1	0			
	計	14	0			
メラミン等	養殖水産動物用配合飼料	1	0			
	魚粉	12	1	8.3	14	14
	その他の飼料原料	1	0			
	計	14	1	7.1	14	14
		計	14	1	7.1	14
アンメリン	養殖水産動物用配合飼料	1	0			
	魚粉	12	0			
	その他の飼料原料	1	0			
	計	14	0			

1) 単位は、硝酸態窒素等、ヒスタミン及びメラミン等はppm、マラカイトグリーン等はppbで示した。

3.2 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

国内で製造した魚粉 91 検体，魚鱗抽出物等 8 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，魚粉 1 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質が検出されたが，乳製品除去処理を行った PCR 試験では，ほ乳動物由来 DNA は検出されなかった．また，他の魚粉 4 検体が PCR 試験では乳動物由来 DNA が検出された．このほ乳動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため 3 検体について PCR 試験を実施した結果，1 検体から牛由来 DNA が検出されたが判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした（表 7）．

チキンミール 30 検体，フェザーミール 17 検体及び豚血粉等 2 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，フェザーミール 1 検体が PCR 試験で反すう動物由来 DNA が検出された．この反すう動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため PCR を実施した結果，牛由来 DNA は検出されなかった．判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした（表 8）．

ポークミール 3 検体及び原料混合肉骨粉 22 検体について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，全ての検体で不検出であり，総合判定で動物由来たん白質は検出されなかった（表 8）．

表 7 魚粉等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験						総合判定 検出点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			牛由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	91	0	0.0	91	1	1.1	91	4	4.4	3	1	33.3	0
魚鱗抽出物	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
イカミール	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
えび粉末	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
かに殻粉末	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
他の大臣確認魚介類	4	0	0.0	4	0	0.0	4	0	0.0				0

表 8 豚肉骨粉等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験						総合判定 検出点数
	獣骨，獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA			牛由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	30	0	0.0	30	0	0.0	30	0	0.0				0
フェザーミール	17	0	0.0	17	0	0.0	17	1	5.9	1	0	0.0	0
鶏血液加水分解たん白	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0
鶏豚混合肉骨粉				22	0	0.0	22	0	0.0				0
豚肉骨粉				3	0	0.0	3	0	0.0				0
豚血粉	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0

国内で製造した子牛用配合飼料 45 検体，乳牛用配合飼料 57 検体，肉牛用配合飼料 71 検体，種牛等用配合飼料 3 検体，牛用混合飼料 34 検体及び糖蜜吸着飼料 1 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，子牛用配合飼料 4 検体，乳牛用飼料 1 検体及び牛用混合飼料 3 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質が検出された．子牛用配合飼料 4 検体に

は、乳製品が原料に使用されていた。また、乳牛用飼料 1 検体及び牛用混合飼料 3 検体について乳製品除去処理を行った PCR 試験では、ほ乳動物由来 DNA は検出されなかった。判定の基準に従い総合判定で動物由来たん白質は不検出とした。また、牛用プレミックスについて、顕微鏡鑑定を実施した結果、肉骨粉等は検出されなかった（表 9）。

一連の工程で製造するため農林水産大臣の確認が必要な動物由来たん白質を使用した混合飼料 7 検体及び発酵飼料等 4 検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果、全ての検体で不検出であり、総合判定で動物由来たん白質は検出されなかった（表 9）。

輸入の牛用混合飼料 28 検体、牛用プレミックス 1 検体、フミン酸 1 検体、乾燥酵母細胞壁 1 検体及びオオバコ粉末 1 検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果、全ての検体で不検出であり、総合判定で動物由来たん白質は検出されなかった。オオバコ粉末については、ELISA 試験の抽出操作で抽出液が糊化し、試験を実施することができなかった（表 10）。

表 9 国内製造牛用飼料等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験						PCR試験						総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来たん白質			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用飼料等																
ほ乳期子牛用配合飼料	13	0	0.0	5	1	20.0				5	0	0.0				0
若令牛用配合飼料	21	0	0.0	21	1	4.8				21	0	0.0				0
幼令肉牛用配合飼料	11	0	0.0	11	2	18.2				11	0	0.0				0
乳牛用配合飼料	57	0	0.0	56	1	1.8				56	0	0.0				0
肉牛用配合飼料	71	0	0.0	70	0	0.0				70	0	0.0				0
種牛等用配合飼料	3	0	0.0	3	0	0.0				3	0	0.0				0
混合飼料	34	0	0.0	34	3	8.8				34	0	0.0				0
プレミックス	1	0	0.0													0
糖蜜吸着飼料	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)																
混合飼料	7	0	0.0	6	0	0.0	1	0	0.0	6	0	0.0	1	0	0.0	0
発酵飼料等	4	0	0.0	4	0					4	0	0.0				0

表 10 輸入飼料等の試験結果（牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ	18	0	0.0	18	0	0.0	18	0	0.0	0
オーストラリア	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
台湾	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0	0
中国	4	0	0.0	4	0	0.0	4	0	0.0	0
フランス	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0	0
牛用プレミックス										
アメリカ	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
フミン酸										
カナダ	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
乾燥酵母細胞壁										
ブラジル	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
オオバコ粉末										
インド	1	0	0.0				1	0	0.0	0

3.3 サルモネラ

飼料原料は、175 検体中 4 検体が陽性で、その陽性率は 2.3 %であった。陽性率は、前年度の 3.6 %に比べて低い値であった。

飼料原料の区分別の陽性率は、動物質性飼料が 2.7 %（前々年度 1.7 %，前年度 3.4 %）であった。一方、植物性油かす類（前々年度 0 %，前年度 7.1 %）等は、すべて陰性であった。（表 11 参照）

国内製造品の陽性率は 2.4 %であり、前年度の 3.1 %と比べると低い値であった。一方、輸入品はすべて陰性であった。（表 12 参照）

配混合飼料は 141 検体中 2 検体が陽性で、成鶏飼育用配合飼料及び乳用牛飼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 0 %及び 1.5 %であった。（表 13 参照）

陽性検体から分離した血清型は 5 種類であった。

S. Livingstone は前々年度、前年度にも、また *S. Senftenberg* は前々年度にも飼料から分離されている。また、フェザーミールから検出されたサルモネラについては、血清型を特定することができなかった。（表 14 参照）

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¹⁾によれば、これら 5 血清型の内、*S. Agona* 及び *S. Newport* は、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。

表 11 飼料原料の種類別検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	77	2	2.6
チキンミール	26	1	4
フェザーミール	15	1	6.7
原料混合肉骨粉	14	0	0
ポークミール	3	0	0
魚粉・大豆油かす二種混合飼料	2	0	0
フェザーミール・大豆油かす二種混合飼料	1	0	0
魚鱗抽出物	1	0	0
FS吸着飼料	1	0	0
魚介類入り発酵飼料	1	0	0
酵素処理魚抽出物	1	0	0
魚あら乳酸発酵飼料	1	0	0
イカミール	1	0	0
エビ粉末	1	0	0
カニ殻粉末	1	0	0
小 計	146	4	2.7
植物油かす			
大豆油かす	14	0	0
なたね油かす	7	0	0
ごま油かす	1	0	0
あまに油かす	1	0	0
小 計	23	0	0
そうこう類			
コーングルテンフィード	2	0	0
ふすま	1	0	0
ビールかす	1	0	0
米ぬか	1	0	0
DDGS	1	0	0
小 計	6	0	0
合 計	175	4	2.3

表 12 原産国及び飼料原料の種類別陽性率（サルモネラ）

原産国	陽性検体数/検体数									合計 (陽性率)
	動物質性飼料			植物性油かす			そうこう類			
	魚粉	チキン ミール	その他	大豆 油かす	なたね 油かす	その他	ふすま	米ぬか	その他	
国産	2/76	1/26	1/43	0/11	0/7	0/2	0/1	0/1	0/2	4/169
(陽性率)	(2.6%)	(3.8%)	(2.3%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(2.4%)
輸入										
アメリカ									0/1	0/1 (0%)
アルゼンチン				0/1						0/1 (0%)
インド	0/1									0/1 (0%)
中国				0/2					0/1	0/3 (0%)
小計	0/1			1/3					0/2	0/6
(陽性率)	(0%)			(0%)					(0%)	(0%)
合計	2/77	1/26	1/43	0/14	0/7	0/2	0/1	0/1	0/4	4/175
(陽性率)	(2.6%)	(3.8%)	(2.3%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(2.3%)

表 13 配混合飼料の検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
鶏用配混合飼料	57	1	1.8
豚用配混合飼料	38	0	0
牛用配混合飼料	45	1	2.2
その他の混合飼料	1	0	0
合計	141	2	1.4

表 14 陽性検体の血清型（サルモネラ）

血清型	陽性検体数					合計
	フェザー ミール	魚粉	チキン ミール	鶏用 配合飼料	牛用 配合飼料	
S.Agona			1			1
S.Livingstone					1	1
S.Newport				1		1
S.Rissen		1				1
S.Senftenberg		2				2
不明	1					1
合計	1	3	1	1	1	7

文 献

- 1) 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>.

Journal of Food Protection, Vol. 72, 1496~1499 ページより転載

Development of Primers for Detection of Heat-Treated Cetacean Materials in Porcine Meat and Bone Meal

Naoki SHINODA, Tomotaro YOSHIDA, Toyoko KUSAMA, Masami TAKAGI,
Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA

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	飯田 健雄
	石橋 隆幸		中村 行伸
	小嶋 二三夫		橋本 亮
	小森谷 敏一		日比野 洋
	高木 昌美		牧野 大作
	田中 公子		山谷 昭一

飼料研究報告 第35号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
TEL 050-3797-1857
FAX 048-601-1179
<http://www.famic.go.jp/>

平成22年8月

編集 飼料研究報告編集委員会