

飼料研究報告

第37号

平成24年

Research Report of Animal Feed

Vol. 37
2012



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（FAMIC）の飼料検査担当職員らが飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析・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37巻目の発刊となります。

FAMICは、農業生産資材（肥料、農薬、飼料など）、ペットフードや食品等を対象として科学的分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、検査等の業務を行う組織です。また、平成21年5月に「飼料の安全と分析の分野」で、国際獣疫事務局（OIE）コラボレーティング・センターに指定され、引き続き、飼料の安全性に関する情報の収集・発信、技術協力等を通じ、安全な畜産物の国際取引の確保に寄与しています。

FAMICの飼料検査担当部署は、「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づき、飼料及び飼料添加物並びにペットフードの製造業者及び輸入業者等に立入検査を実施すると共に、収去又は集取した試料を分析し、飼料等及びペットフードの安全性の確保を図っています。また、これらの検査業務を迅速かつ的確に実施するための分析法の研究開発等にも取り組んでいます。

昨年度は、平成23年3月11日に発生した東日本大震災に伴う東京電力株式会社福島第一原子力発電所の事故を踏まえ、農林水産省等からの協力依頼に対し、牧草・稲わら・飼料・土壌・堆肥等の農業生産資材中の放射性物質の測定・調査等に、最優先業務として対応してきたところです。

近年、食料自給率の向上及び畜産経営の安定を図るために、可能な限り国内で飼料生産を推進することが重要な課題となっており、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米等を家畜用飼料として活用する取り組みが行われています。これを踏まえて、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に使用された農薬の残留に係る指導基準値が定められ、FAMICでは、これらの農薬の同時定量法の開発にも着手し、本研究報告においてもその研究成果をとりまとめています。

今回とりまとめた研究成果は、公定法として農林水産省消費・安全局長が通知する「飼料分析基準」及びFAMIC理事長が制定する「愛玩動物用飼料等の検査法」に追加収載されるほか、飼料等に係る分析法に関しては既に2009年12月に発刊されている『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際に、追加収載されるものと考えています。

本研究報告が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの安全性の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位の皆様には、更なるFAMICの技術レベルの向上のために、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24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 23 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 24 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) |
| 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 家畜生理栄養研究領域 上席研究員 |
| 小田中 芳次 | 財団法人日本植物調節剤研究協会 研究所 技術顧問 |
| 後藤 哲久 | 国立大学法人信州大学農学部応用生命科学科 教授 |
| 中島 正博 | 名古屋市衛生研究所 生活環境部部長 |
| 永山 敏廣 | 東京都健康安全研究センター 食品化学部長 |
| 濱本 修一 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部長 |
| 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 | 崇城大学 生物生命学部応用微生物工学科
食品生物科学講座 教授 |
| 南澤 正敏 | 一般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 寒地酪農衛生研究領域長 |
| 安井 明美 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 企画管理部 専門員 |

目 次

1 飼料用イネ中のクロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法 杉本 泰俊	1
2 飼料用イネ中のカルバリル他 8 成分の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法 榊原 良成	19
3 脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法 山本 謙吾，大島 慎司	46
4 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法 上野山 智洋，田中 里美，山多 利秋，高橋 雄一	59
5 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のメタミドホスの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法 小森谷 敏一	73
6 愛玩動物用飼料（ウェット製品）中の有機塩素系農薬のガスクロマトグラフ（ECD）による同時定量法 屋方 光則	84
7 愛玩動物用飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法 山多 利秋，吉村 哲史	115
技術レポート	
1 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の共同試験 大島 慎司	142
2 愛玩動物用飼料（ウェット製品）中の水分の測定法の間接精度評価のための枝分かれ実験 石橋 隆幸，田端 麻里	147

精度管理

- 1 平成 23 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
大島 慎司, 齊木 雅一, 佐藤 梢, 武田 然也,
田中 里美, 石塚 優香 151

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 23 年度)
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 182
- 2 特定飼料添加物国家検定結果 (平成 23 年度)
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課
..... 205

他誌掲載論文 (抄録)

- 1 飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討
千原哲夫, 田中里美, 八木寿治
(日本食品微生物学会雑誌, 28(3), 175–185 (2011).) 219
- 2 GC-FPD による飼料中のエテホン分析法の開発と性能評価
屋方光則, 倉光良造, 甲斐茂浩, 工藤尚史, 矢本亮介,
松尾信吾
(食品衛生学雑誌, 53(1), 45–51 (2012).) 219

CONTENTS

1 Simultaneous Determination of Clothianidin, Dinotefuran and Thiamethoxam in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS Simultaneous	
Yasutoshi SUGIMOTO	1
2 Simultaneous Determination of Carbaryl and 8 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS	
Yoshinari SAKAKIBARA	19
3 Determination of Chloramphenicol in Dried Skim Milk by LC-MS/MS	
Kengo YAMAMOTO and Shinji OSHIMA	46
4 Determination of Deoxynivalenol in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS	
Tomohiro UENOYAMA, Satomi TANAKA, Toshiaki YAMATA and Yuuichi TAKAHASHI	59
5 Determination of Methamidophos in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS/MS	
Toshiichi KOMORIYA	73
6 Simultaneous Determination of Organochlorine Pesticides in Wet Type Pet Foods by GC-ECD	
Mitsunori YAKATA	84
7 Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Pet Foods by LC-MS/MS	
Toshiaki YAMATA and Satoshi YOSHIMURA.....	115
§ Technical report	
1 Collaborative Study of Melamine in Feeds by LC-MS/MS	
Shinji OSHIMA	142
2 Nested experiment for Intermediate precision assessment of Determination of Moisture Content in Wet Pet Foods	
Takayuki ISHIBASHI and Mari TABATA.....	147

§ Proficiency test

1 Proficiency Test (in the fiscal 2011)

Shinji OSHIMA, Masakazu SAIKI, Kozue SATOU,
Zenya TAKEDA, Satomi TANAKA
and Yuka Ishizuka 151

§ Investigative report

1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the fiscal 2011)

Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed
Inspection Department 182

2 National Assay Results of Specified Feed Additives (in the fiscal 2011)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection
Department 205

§ Papers accepted in other journal (abstract)

1 Comparison of Selective Enrichment Broths for Detection of *Salmonella* in Animal Feed

Tetsuo CHIHARA, Satomi TANAKA and Toshiharu YAGI
(*Jpn. J. Food Microbiol.*, **28**(3), 175–185 (2011).) 219

2 Development and Performance Evaluation of a GC-FPD Method for Quantification of Ethephon in Feeds

Mitsunori YAKATA, Ryouzou KURAMITSU, Shigehiro KAI,
Naofumi KUDO, Ryouzuke YAMOTO and Shingo MATSUO
(*Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku
Zasshi)*, **53**(1), 45–51 (2012).) 219

1 飼料用イネ中のクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

杉本 泰俊*

Simultaneous Determination of Clothianidin, Dinotefuran and Thiamethoxam in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS Simultaneous

Yasutoshi SUGIMOTO*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka regional Center)

An analytical method was developed to determine clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam levels in rice straw and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam were extracted with acetone and solutions were filtered. The filtrate was diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was evaporated to dryness and dissolved in water, and then purified by Chem Elut cartridge (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) with ethyl acetate. The elute was evaporated to dryness and dissolved in acetonitrile, and then purified by an ENVI-Carb/NH₂ cartridge (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), with acetonitrile. The elute was desolvated again, dissolved in a water-methanol solution (9:1 v/v) and analyzed by LC-ESI-MS/MS for determination of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam. The LC separation was carried out on an ODS column (Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm i.d.×150 mm, 3 μm from Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) using gradient with 5 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. The MS/MS analysis was performed using the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.01, 0.02, 0.2, 2 or 5 mg/kg of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam. The mean recoveries of clothianidin were 77.5 to 101 % and its repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) was not more than 16 %. The mean recoveries of dinotefuran were 76.9 to 106 %, and RSD_r were not more than 13 %. The mean recoveries of thiamethoxam were 79.8 to 105 %, and RSD_r were not more than 8.7 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam at 5, 3 and 0.2 mg/kg, respectively. The mean recoveries of clothianidin were 90.4 to 94.5 % and the repeatability (RSD_r) and reproducibility (RSD_R) in terms of relative standard deviation, and Horwitz ratio (HorRat) were 8.3 %, 14 % and 0.68, respectively. The values for dinotefuran were 89.3 to 94.4 %, 4.0 %, 15 % and 0.71 respectively. The values for thiamethoxam were 92.1 to 98.6 %, 9.5 %, 11 % and 0.72 respectively.

This method was validated and established for use in inspection of rice straw and rice products for feed for clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam.

*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

Key words: clothianidin ; dinotefuran ; thiamethoxam ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; rice straw ; whole-crop rice silage ; paddy rice ; collaborative study

キーワード：クロチアニジン；ジノテフラン；チアメトキサム；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

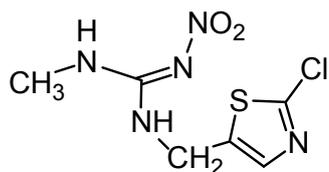
クロチアニジンは 1988 年武田薬品工業（現 住化武田農薬）が開発したネオニコチノイド系殺虫剤で、後述のチアメトキサムの変化生成物でもある。非食用作物については 2001 年に、食用作物については 2002 年に国内で農薬登録されている。飼料の有害物質の指導基準¹⁾（以下「指導基準」という。）は、稲わらで 2 mg/kg、稲発酵粗飼料で 1 mg/kg となっており、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾は、玄米 0.7 ppm、小麦 0.02 ppm、大麦 0.1 ppm、ライ麦 0.02 ppm 及びとうもろこし 0.02 ppm となっている。厚生労働省通知試験法³⁾（以下「通知法」という。）として個別試験法（HPLC-UV 及び LC-MS）及び LC-MS 一斉試験法 I（農作物）が示されている。

ジノテフランは 1993 年に三井化学が開発したネオニコチノイド系殺虫剤である。国内では 2002 年に稲、野菜、果実等を対象に初めて農薬登録された。指導基準¹⁾は、稲わらで 5 mg/kg、稲発酵粗飼料で 5 mg/kg となっており、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²⁾は、玄米 2 ppm となっている。通知法³⁾として個別試験法（HPLC-UV 及び LC-MS）が示されている。

チアメトキサムはチバガイギー（現 シンジェンタ）が開発したネオニコチノイド系殺虫剤である。2000 年に国内で農薬登録されている。指導基準¹⁾は、稲わらで 0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料で 0.1 mg/kg、粃米で 3 mg/kg となっており、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²⁾は、玄米 0.3 ppm、小麦 0.02 ppm、大麦 0.3 ppm、その他穀類 0.02 ppm、とうもろこし 0.02 ppm となっている。通知法³⁾として LC-MS 一斉試験法 I（農作物）が示されている。

飼料中のこれらの残留農薬の検査法の迅速化、簡便化を図るため、財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において LC-MS/MS による同時定量法⁴⁾（以下「食品分析センター法」という。）を検討し開発した。今回この食品分析センター法を基に、指導基準が設定されている稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米（本報告中において、これらを併せて表現する場合には「飼料用イネ」と表記する。）中のこれらの農薬の同時定量法の飼料分析基準⁵⁾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、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの構造式を Fig. 1 に示した。

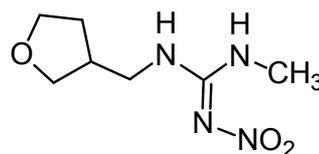


Clothianidin

(*E*)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine

C₆H₈ClN₅O₂S MW: 249.7

CAS No.: 210880-92-5

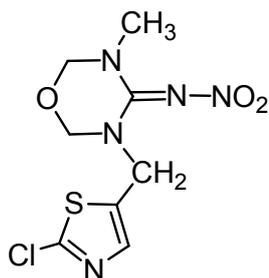


Dinotefuran

(*RS*)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl)guanidine

C₇H₁₄N₄O₃ MW: 202.2

CAS No.: 165252-70-0



Thiamethoxam

(*EZ*)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)

-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine

C₈H₁₀ClN₅O₃S MW: 291.7

CAS No.: 153719-23-4

Fig. 1 Chemical structures of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕し、供試試料とした。稲発酵粗飼料については、乾燥した後、稲わら及び籾米と同様に粉砕し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) クロチアニジン標準原液

クロチアニジン標準品（和光純薬工業製，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，更に標線まで同溶媒を加えてクロチアニジン標準原液を調製した（この液 1 mL は，クロチアニジンとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する。）。

2) ジノテフラン標準原液

ジノテフラン標準品（林純薬工業製，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，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ジノテフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ジノテフランとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する。）。

3) チアメトキサム標準原液

チアメトキサム標準品（和光純薬工業製，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、更に標線まで同溶媒を加えてチアメトキサム標準原液を調製した（この液 1 mL は、チアメトキサムとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する.）.

4) 農薬混合標準液

使用に際して、クロチアニジン標準原液、ジノテフラン標準原液及びチアメトキサム標準原液の一定量を混合し、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 及び 100 ng を含有する各混合標準液を調製した.

5) アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン及びメタノールは、残留農薬試験用を用いた. 水は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タンデム型質量分析計：

LC 部：Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

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-210

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

5) 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：ジーエルサイエンス製 InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg)

6) 中性アルミナミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J AL-N (充てん剤量 1,710 mg) にリザーバーを連結したもの

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL (粃米は 20 mL) を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した. 更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた. この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした.

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 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置した. 先のなす形フラスコをヘキサン 25 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた.

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、先のなす形フラスコを酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、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.

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

3) カラム処理 II

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アセトニトリル 10 mL で洗浄した. 100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに

入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、各農薬を流出させた。更に、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。

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

水-メタノール (9+1) 20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

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

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

Column	Kanto Chemical, Mightysil RP-18 GP (2.0 mm i.d.×150 mm, 3 µm)
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (9:1) → 15 min → acetonitrile (2 min) → 0.1 min → 5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (9:1) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	110 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	1 kV

Table 2 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Qualifier (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Clothianidin	250	132	169	15	15
Dinotefuran	203	129	157	10	10
Thiamethoxam	292	211	132	15	15

5) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g
- add 30 mL of water (Paddy rice : 20 mL)
 - allow to stand for 30 min
 - add 120 mL of acetone (Paddy rice : 100 mL)
 - shake for 30 min
 - filtrate with suction filter (No.5B)
 - wash with 50 mL of acetone
 - top up to 200 mL with acetone
 - evaporate 20 mL of sample solution to the volume of about 2 mL under 40 °C
- Chem Elut cartridge
- apply concentrated sample solution
 - wash with 2 mL of water
 - allow to stand for 10 min
 - wash with 25 mL of hexane (twice)
 - elute with 40 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 5 mL of acetonitrile
- InertSep GC/NH₂
- prewash with 10 mL of acetonitrile
 - apply sample solution
 - wash with 10 mL of acetonitrile (twice)
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 20 mL of water-methanol (9:1)
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した農薬混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク高さ及び面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2~4 のとおり、検量線はクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして、それぞれ 0.25~100 ng/mL (注入量として 0.00125~0.5 ng) の範囲で直線性を示した。

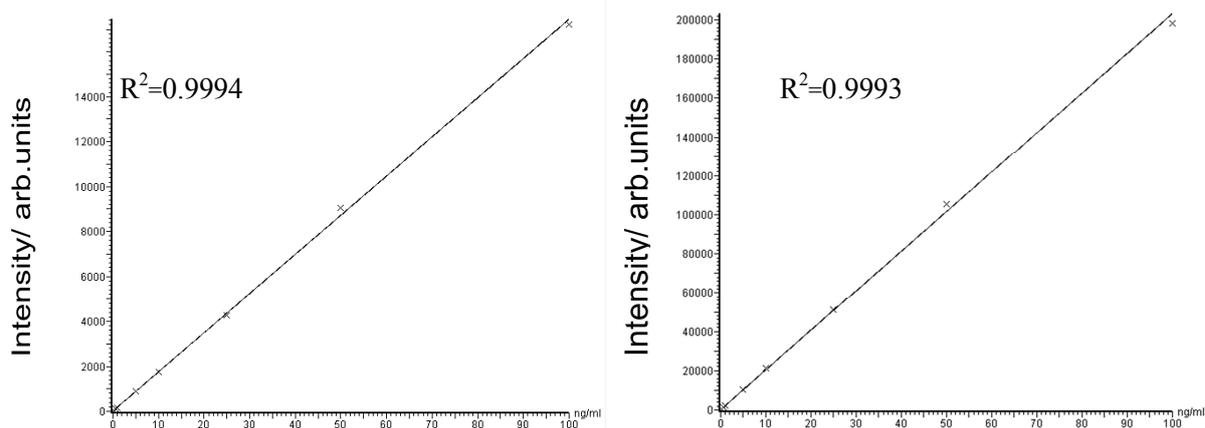


Fig. 2 Calibration curves of clothianidin (left : peak area, right : peak height)

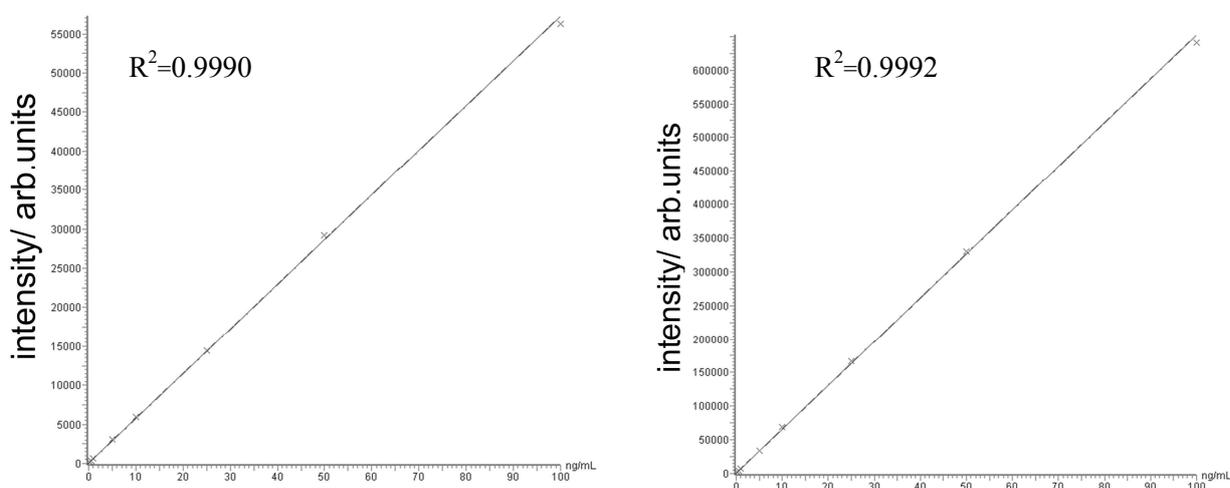


Fig. 3 Calibration curves of dinotefuran (left : peak area, right : peak height)

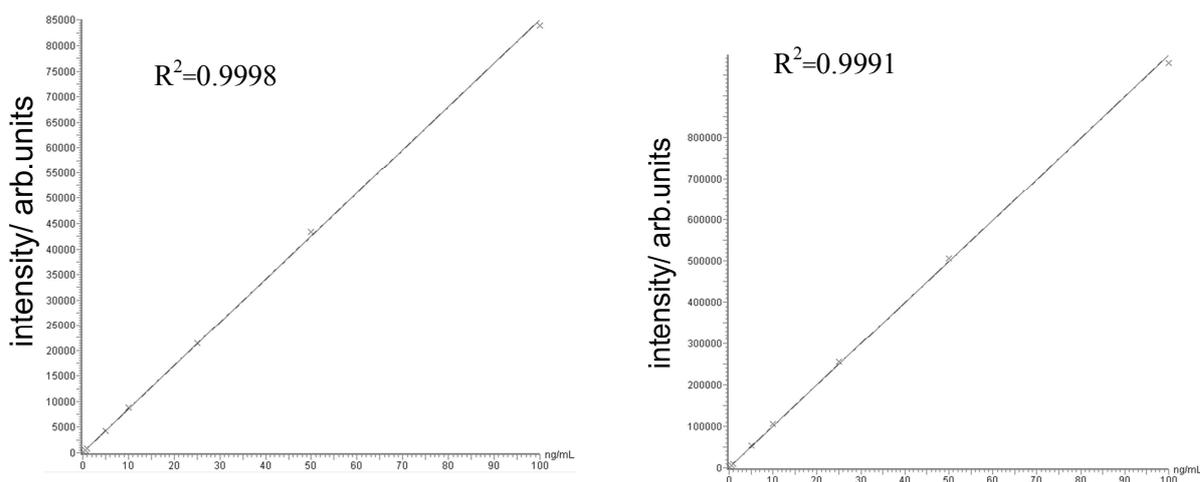


Fig. 4 Calibration curves of thiamethoxam (left : peak area, right : peak height)

3.2 ミニカラム処理の検討

稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びピチアメトキサムとして各 2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、食品分析センター法により測定したところ、クロチアニジン及びジノテフランの回収率

が70%を下回る結果であった。

そこで、低回収率の原因を確認するため、稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各2 mg/kg相当量を添加して、2.4の1)に従い抽出した試料溶液（以下「検討用試料溶液」という。）を用いて、食品分析センター法で使用されている3種類のカラム処理についてそれぞれ検討した。

1) 多孔性ケイソウ土カラムを用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)の手順により多孔性ケイソウ土カラム（以下「カラム I」という。）で処理し、ヘキサンによる洗浄液50 mL及び酢酸エチルによる溶出液40 mLをそれぞれ40 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mLの全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

2) 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用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)に従い処理した後、2.4の3)の手順により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（以下「カラム II」という。）で処理したアセトニトリルによる流出液25 mL（負荷した試料溶液5 mLを含む。）を40 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mLの全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

3) 中性アルミナミニカラムを用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)及び3)に従い処理し、カラム IIからの流出液を40 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル5 mLを加えて残留物を溶かし、あらかじめ酢酸エチル10 mLで洗浄した中性アルミナミニカラムに加えた。酢酸エチル10 mLずつで容器を2回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた。酢酸エチルによる流出液25 mL（負荷した試料溶液5 mLを含む）を40 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mL全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

1)~3)の結果は、Table 3のとおりであった。

カラム I 及び II による処理は良好な回収率であることが確認された。

中性アルミナミニカラムによる処理において、酢酸エチルによる洗浄の際にジノテフラン、クロチアニジン及びチアメトキサムが保持されずに一部流出することが確認された。このことが食品分析センター法でクロチアニジン及びジノテフランの回収率が低下した原因と考えられたため、本法では中性アルミナミニカラムによる処理を省略することとして、以降の検討を行った。

Table 3 Results of elution and spillage from column I, II and neutral alumina

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%) ^{a)}			
		Column I		Column II	Neutral alumina
		Hexane (50 mL)	Ethyl acetate (40 mL)	Acetonitril e	Ethyl acetate (25 mL)
Clothianidin	2	0	92.0	97.0	56.0
Dinotefuran	2	0	99.0	95.0	28.0
Thiamethoxam	2	0	91.0	91.0	11.0

a) $n=1$

3.3 最終試料溶液量の検討

稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、2.4 の 1) ~3) に従い操作し、食品分析センター法に従い最終試料溶液を水-メタノール (9+1) 2 mL で調製し、LC-MS/MS により測定したところ、クロチアニジン及びチアメトキサムの回収率が 70 % を下回る結果であった。

そこで、この原因は夾雑成分によるイオン化抑制であると推定し、その影響を軽減するために、先の最終試料溶液を、更に水-メタノール (9+1) で 2~20 倍に希釈し、LC-MS/MS により測定し回収率を求めた。

その結果は、Table 4 のとおりであり、10 倍以上希釈した場合に良好な結果が得られた。

ここで、希釈倍率は 10 倍で十分な結果が得られると考えられたことから、本法では水-メタノール (9+1) の液量を食品分析センター法の 2 mL から 20 mL に変更して最終試料溶液を調製することにした。

Table 4 Comparison of recoveries of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam by dilution level

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%) ^{a)}				
		undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Clothianidin	0.2	43.8	61.3	84.2	94.0	94.1
Dinotefuran	0.2	96.7	96.0	101	91.2	94.6
Thiamethoxam	0.2	58.9	77.7	94.9	95.1	92.8

a) $n=1$

3.4 妨害物質の検討

稲わら (4 検体)、稲発酵粗飼料 (2 検体) 及び粃米 (3 検体) 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。

なお、妨害物質の検討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。

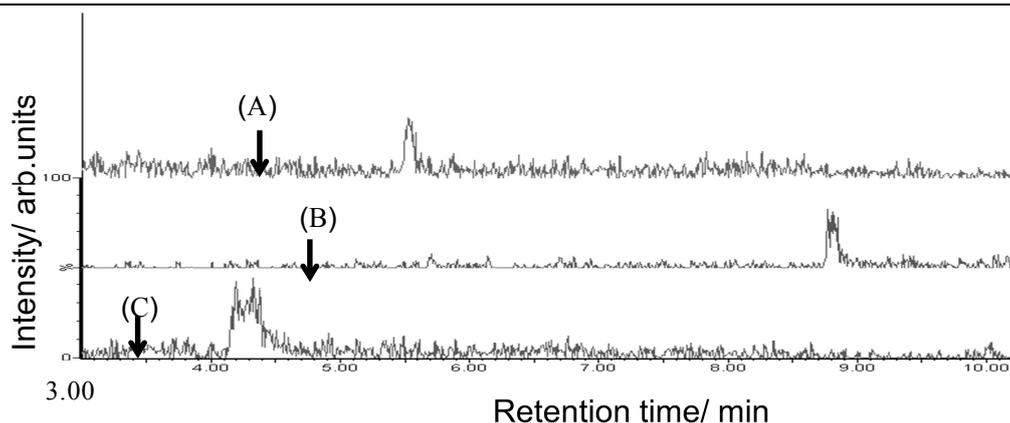


Fig. 5 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

(Arrows indicate the retention time of thiamethoxam (A), clothianidin (B) and dinotefuran (C).)

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した稲わら 2 検体, 稲発酵粗飼料及び粃米各 1 検体にクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 5, 2 及び 0.2 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 5~7 のとおり, クロチアニジンの平均回収率は 83.1~101 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.0 %以下, ジノテフランの平均回収率は 81.5~106 %, その繰返し精度は RSD_r として 9.1 %以下, チアメトキサムの平均回収率は 87.9~105 %, その繰返し精度は RSD_r として 8.7 %以下であった.

なお, 添加回収試験の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した.

Table 5 Recoveries for clothianidin

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)						
5	88.0	3.6	90.0	3.7	83.1	2.7	87.5	4.5
2	99.5	2.4	86.5	0.7	101	2.7	94.0	1.9
0.2	91.0	3.5	91.4	2.6	98.0	3.1	91.6	7.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries for dinotefuran

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
5	87.0	4.9	88.0	4.8	84.0	6.6	89.0	5.7
2	99.0	2.8	85.0	1.4	100	2.2	85.7	2.7
0.2	95.2	9.1	106	8.9	96.0	3.3	81.5	3.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

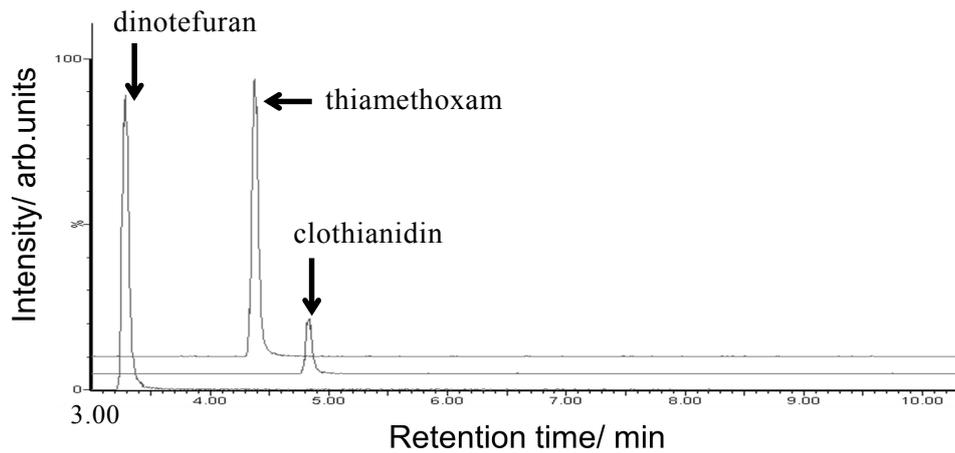
Table 7 Recoveries for thiamethoxam

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
5	95.0	3.0	93.0	2.0	96.0	2.7	91.0	2.1
2	105	8.0	96.8	2.3	101	2.7	95.7	1.4
0.2	102	6.5	92.0	8.2	87.9	8.7	98.8	5.7

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

(A)



(B)

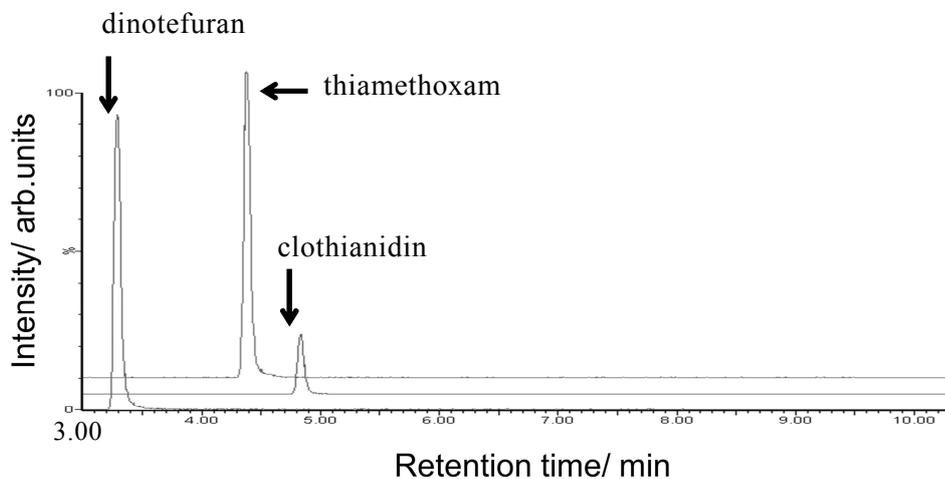


Fig. 6 SRM chromatograms of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

(A) Standard solution (The amount of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam are each 0.25 ng.)

(B) Sample solution of rice straw spiked with clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam at each 2 mg/kg

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら及び籾米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムを添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.01 mg/kg であった。

確認のために、稲わら及び籾米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 0.02 mg/kg 及び 0.01 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 8~10 のとおり、クロチアニジンの平均回収率は 77.5~93.0 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 16 %以下、ジノテフランの平均回収率は 76.9~89.1 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、チアメトキサムの平均回収率は 79.8~96.1 %、その繰返し精度は RSD_r として 6.5 %以下であった。

また、*SN* 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限はクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムともに 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

Table 8 Recoveries for clothianidin at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	81.6	3.7	93.0	2.3
0.01	77.5	7.3	80.2	16

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 9 Recoveries for dinotefuran at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	89.1	5.4	86.8	2.1
0.01	82.8	4.8	76.9	13

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 10 Recoveries for thiamethoxam at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	79.8	5.9	89.0	2.1
0.01	96.1	4.6	95.6	6.5

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 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。

稲わら、稲発酵粗飼料及び粳米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとしてそれぞれ 0.2 mg/kg、3 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量 (1 mL 中にそれぞれ 2 µg, 30 µg, 50 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を添加した試料を用い、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、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 (計 9 試験室) において、本法に従い共同試験を実施した。結果の解析につ

いては、IUPAC のプロトコール⁶⁾に従い、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却を行った上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 11~13 のとおりであった。

クロチアニジンでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 90.4、94.5 及び 92.3 %、RSD_r はそれぞれ 8.3、4.2 及び 1.8 %、RSD_R はそれぞれ 14、5.9 及び 4.4 %、HorRat はそれぞれ 0.68、0.46 及び 0.32 であった。

ジノテフランでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 89.3、94.4 及び 92.3 %、RSD_r はそれぞれ 3.4、4.0 及び 3.5 %、RSD_R はそれぞれ 15、6.7 及び 8.9 %、HorRat はそれぞれ 0.71、0.53 及び 0.65 であった。

チアメトキサムでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 92.1、98.6 及び 93.7 %、RSD_r はそれぞれ 9.5、3.8 及び 3.5 %、RSD_R はそれぞれ 11、9.0 及び 5.8 %、HorRat はそれぞれ 0.52、0.72 及び 0.43 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 14 に示した。

Table 11 Collaborative study results of clothianidin

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.213	0.204	5.05	5.03	2.70	2.61
2	0.156	0.152	4.66	4.64	2.75	2.75
3	0.160	0.166	4.66	4.78	2.94	2.92
4	0.167	0.152	4.32	4.59	2.72	2.67
5	0.195	0.169	4.18	4.78	2.67	2.70
6	0.163	0.185	5.06	5.03	2.81	2.93
7	0.160	0.170	4.52	4.55	2.73	2.62
8	0.222	0.191	6.24 ^{b)}	5.94 ^{b)}	2.90	2.96
9	0.195	0.233	4.68	5.09	3.55 ^{a)}	2.65 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.181		4.73		2.77	
Recovery ^{c)} (%)	90.4		94.5		92.3	
RSD _r ^{d)} (%)	8.3		4.2		1.8	
RSD _R ^{e)} (%)	14		5.9		4.4	
PRSD _R ^{f)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.68		0.46		0.32	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 18$; whole-crop rice silage and paddy rice: $n = 16$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 12 Collaborative study results of dinotefuran

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.178	0.161	4.59	4.79	2.64	2.43
2	0.182	0.183	4.98	5.05	2.88	2.90
3	0.129	0.134	4.17	4.30	2.83	2.73
4	0.180	0.184	4.72	4.89	2.77	2.72
5	0.182	0.171	4.45	4.96	2.61	2.79
6	0.210	0.215	5.23	4.93	2.69	2.64
7	0.168	0.162	5.00	4.63	2.44	2.68
8	0.214	0.206	6.07 ^{b)}	6.28 ^{b)}	3.27	3.29
9	0.244 ^{a)}	0.315 ^{a)}	4.42	4.38	3.55 ^{a)}	2.40 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.179		4.72		2.77	
Recovery ^{c)} (%)	89.3		94.4		92.3	
RSD _r ^{d)} (%)	3.4		4.0		3.5	
RSD _R ^{e)} (%)	15		6.7		8.9	
PRSD _R ^{f)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.71		0.53		0.65	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice: $n=16$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Collaborative study results of thiamethoxam

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.170	0.207	5.15	5.40	2.78	2.56
2	0.189	0.193	5.14	5.07	2.86	2.88
3	0.182	0.182	4.54	4.62	2.81	2.74
4	0.154	0.156	4.54	4.64	2.70	2.66
5	0.189	0.185	4.43	4.90	2.89	3.02
6	0.163	0.192	5.25	4.97	2.90	2.87
7	0.174	0.168	4.87	4.58	2.51	2.60
8	0.212	0.196	5.72	5.87	3.05	2.92
9	0.175	0.230	4.71	4.34	3.06	2.79
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.184		4.93		2.81	
Recovery ^{a)} (%)	92.1		98.6		93.7	
RSD _r ^{b)} (%)	9.5		3.8		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	11		9.0		5.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.52		0.72		0.43	

a) Rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice: $n=18$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 14 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	SHISEIDO SHISEIDO CAPCELL PAK C18 AQ (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
6	Waters ACQUITY TQD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-3200	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Tosoh TSKgel ODS-100S (2.0 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留するクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサムについて, LC-MS/MS 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, 以下の結果が得られ, 適用が可能であると考えられた.

- 1) 検量線はそれぞれ 0.25~100 ng/mL (注入量として 0.00125~0.5 ng) の範囲で直線性を示した.
- 2) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液量の検討を行ったところ, 溶出溶媒は 40 mL で十分であった.
- 3) 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での流出液量の検討を行ったところ, 流出溶媒は 20 mL で十分であった.
- 4) 食品分析センター法から中性アルミナカラムによる精製を省略し, 最終試料溶液量を 2 mL から 20 mL とすることで良好な結果となった.
- 5) 稲わら 4 検体, 稲発酵粗飼料 2 検体及び粃米 3 検体について, 本法に従って選択反応検出クロマト

グラムを作成したところ、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの定量を妨げるピークは認められなかった。

- 6) 稲わら 2 検体，稲発酵粗飼料及び粃米にクロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムとして，それぞれ 0.2~5 mg/kg 相当量を添加し，本法により添加回収試験を実施したところ，クロチアニジンについて平均回収率は，83.1~101 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.0 % 以下，ジノテフランについて平均回収率は，81.5~106 %，その繰返し精度は RSD_r として 9.1 % 以下，チアメトキサムについて平均回収率は，87.9~105 %，その繰返し精度は RSD_r として 8.7 % 以下の成績が得られた。
- 7) 本法による定量下限は，クロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムともに試料中で 0.01 mg/kg，検出下限は，0.003 mg/kg であった。
- 8) クロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムとして，稲わらにそれぞれ 0.2 mg/kg，稲発酵粗飼料にそれぞれ 5 mg/kg 及び粃米にそれぞれ 3 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料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)。
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959)。
- 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 21 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010)。
- 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)。
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem. , 67(2), 331-343 (1995)。

2 飼料用イネ中のカルバリル他 8 成分の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

榊原 良成*

Simultaneous Determination of Carbaryl and 8 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Yoshinari SAKAKIBARA*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya regional Center)

An analytical method was developed to determine nine pesticides (carbaryl, carbofuran, fenobucarb, fludioxonil, furametpyr, furametpyr-hydroxy, methoxyfenozide, tebufenozide, and thiacloprid) levels in rice straw and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, 9 pesticides were extracted with acetone and solutions were filtered. The filtrate was diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with octadecylsilanized silica gel mini column (InertSep Slim-J C18-B from GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using gradient with 2 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile as a mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.05 or 0.1 mg/kg of fludioxonil and 0.1, 0.2 or 1.0 mg/kg of other eight pesticides. This resulted in recoveries ranging from 77.1 % to 115 % with not more than 16 % in relative standard deviations of repeatability.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories using rice straw and paddy rice spiked with 0.1 mg/kg of fludioxonil and 1.0 mg/kg each of the other eight pesticides. The mean recoveries of the pesticides in rice straw were 94.0 to 100%, the relative standard deviations of repeatability and reproducibility (RSD_r and RSD_R) were 4.4 to 9.8 % and 4.7 to 12 %, respectively. The mean recoveries of the pesticides in paddy rice were 92.5 to 107 %, RSD_r and RSD_R were 2.8 to 5.1 % and 5.2 to 12 %, respectively.

These results suggested that this method will be added to the Official Methods of Feed Analysis. This method was validated and established for use in the inspection for nine pesticides in rice straw and rice products for feed.

Key words: carbaryl ; carbofuran ; fenobucarb ; fludioxonil ; furametpyr ; furametpyr-hydroxy ; methoxyfenozide ; tebufenozide ; thiacloprid ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; rice straw ; whole crop rice silage ; paddy rice ; collaborative study

* 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

キーワード：カルバリル；カルボフラン；フェノブカルブ；フルジオキシニル；フラメトピ
ル；フラメトピルヒドロキシ体；メトキシフェノジド；テブフェノジド；チアクロプリ
ド；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料
；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

農林水産省は基本政策である食料・農業・農村基本計画（平成 22 年 3 月 30 日閣議決定）において、平成 20 年度に 26 %（可消化養分総量（TDN）に換算）であった飼料自給率を平成 32 年までに 36 %に引き上げることを目標としている。そのための取り組みの一つとして、平成 19 年度の概算で 78 %であった粗飼料における国産の割合を、平成 27 年度までに 100 %とすることを目標とし、稲わら等の飼料利用を促進している。これに伴って、平成 21 年 1 月 29 日付けで飼料の有害物質の指導基準¹⁾が改正され、稲わら及び稲発酵粗飼料について残留農薬の基準値が設定された。その後も数回改正され、現在は粃米についても残留農薬の指導基準値が設定されている。

稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米（本報告中において、これらを併せて表現する場合には「飼料用イネ」と表記する。）に指導基準が設定されている農薬のうち、飼料分析基準²⁾に記載されていない成分があること、指導基準は設定されていないが国内で稲に適用される可能性のある農薬についてもモニタリングする必要があることから、これらの農薬を迅速に定量可能な分析法の開発が必要とされている。

今回、財団法人日本食品分析センターが、平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において開発した系統的分析法³⁾（以下、「食品分析センター法」という。）を基に、食品分析センター法が対象とする農薬成分のうちの A グループに区分された 8 種類 9 成分（カルバリル、カルボフラン、フェノブカルブ、フルジオキシニル、フラメトピル及びフラメトピルヒドロキシ体、メトキシフェノジド、テブフェノジド並びにチアクロプリド）の飼料分析基準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、参考までに、今回検討した農薬のうち指導基準値が設定されている 6 種類について、指導基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the harmful substances in feed (extract)

Kind of pesticide	Target feed	Regulation value (mg/kg)
Fenobucarb	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	5
	Paddy Rice	3
Fludioxonil	Rice straw	0.05
	Whole-crop rice silage	0.1
Furametpyr	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	1
Methoxyfenozide	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	2
	Paddy Rice	2
Tebufenozide	Rice straw	20
	Whole-crop rice silage	10
Thiacloprid	Rice straw	0.5
	Whole-crop rice silage	0.2

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。稲発酵粗飼料については、乾燥した後、稲わら及び籾米と同様に粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) 各農薬標準原液

Table 2 の各農薬標準品 25 mg を正確に量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した（これらの液 1 mL は、各農薬 0.5 mg を含有する。）。

2) 農薬混合標準液

フルジオキシニル標準原液 10 mL 及びその他 8 成分の各農薬標準原液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、フルジオキシニルとして 50 µg、その他 8 成分の農薬として各 10 µg を含有する。）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、アセトニトリル-水 (3+2) で正確に希釈し、1 mL 中にフルジオキシニルとして 0.5, 1, 2.5, 5 及び 10 ng、その他 8 成分の農薬として 0.1, 0.2, 0.5, 1 及び 2 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

3) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水を用いた。

Table 2 Pesticide standards

Kind of pesticide	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No	Purity(%)
Carbaryl	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.2	63-25-2	99.0
Carbofuran	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.3	1563-66-2	98.0
Fenobucarb	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	207.3	3766-81-2	99.8
Fludioxonil	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	248.2	131341-86-1	99.0
Furametpyr	Wako pure chemical industries	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₂	333.8	123572-88-3	99.0
Furametpyr-hydroxy	Wako pure chemical industries	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	349.8	-	99.0
Methoxyfenozide	Dr.Ehrenstorfer	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	368.5	161050-58-4	99.5
Tebufenozide	Wako pure chemical industries	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352.5	112410-23-8	99.0
Thiacloprid	Wako pure chemical industries	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252.7	111988-49-9	98.0

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：Waters製 ACQUITY UPLC System

MS部：Waters製 ACQUITY TQ Detector

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) にリザーバーを連結したもの

4) 吸引マニホールド：ジーエルサイエンス製 GL-SPE 吸引マニホールド

5) 高速遠心分離器：コクサン製 H-51

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 30 mL (粃米は 20 mL) を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 2 mL (フルジオキサニル以外のその他 8 成分の農薬を測定する場合にあっては、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて混合した後、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ニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。

試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1 mL/min 程度で吸引して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル (9+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (3+2) 10 mL をミニカラムに加え、圧注して各農薬成分を溶出させた。更に、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、その液の一定量を 5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供

する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 μ L 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 3 及び Table 4 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 3 Operating conditions of LC-MS/MS for analysing pesticide

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μ m)
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate-acetonitrile (4:1) \rightarrow 15 min \rightarrow (1:9) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 $^{\circ}$ C
Desolvation temperature	N ₂ (650 L/h, 350 $^{\circ}$ C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 3.5 kV, Negative: 1.0 kV

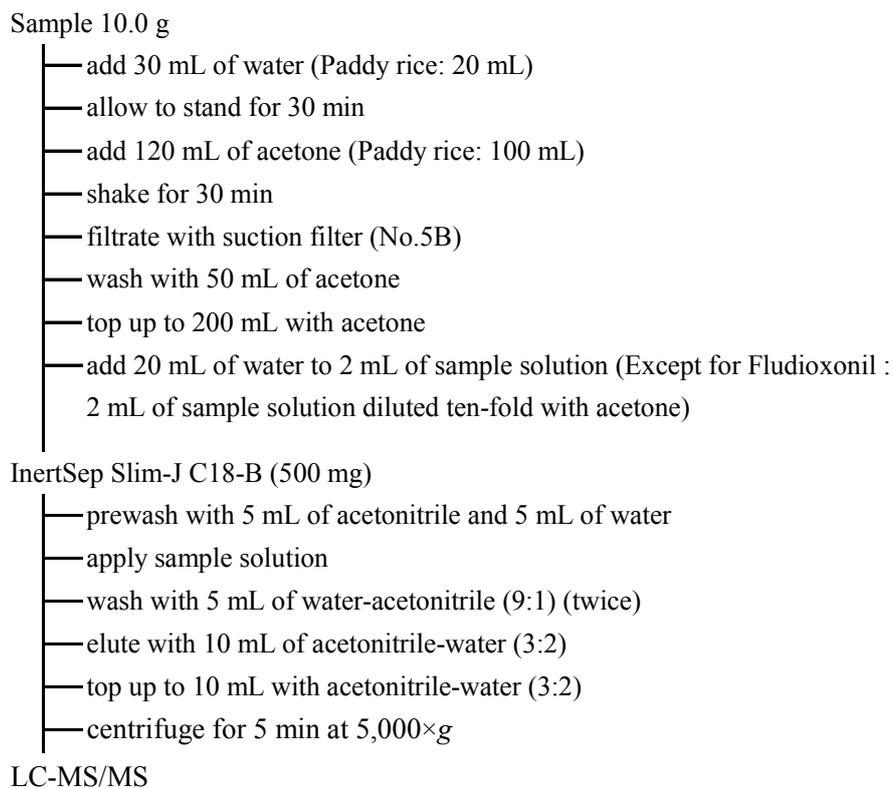
Table 4 MS/MS Parameters

Target ion	Mode	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Carbaryl	+	202	145	-	24	11
			-	127	24	25
Carbofuran	+	222	165	-	32	11
			-	123	32	23
Fenobucarb	+	208	95	-	28	13
			-	77	28	35
Fludioxonil	-	247	180	-	48	28
			-	126	48	28
Furametpyr	+	334	157	-	36	32
			-	290	36	16
Furametpyr-hydroxy	+	332	157	-	38	22
			-	76	38	56
Methoxyfenozide	+	369	149	-	18	18
			-	133	18	28
Tebufenozide	+	353	133	-	18	20
			-	105	18	42
Thiacloprid	+	253	126	-	36	20
			-	90	36	36

4) 計 算

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

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for pesticides in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 2)に従って調製した農薬混合標準液各 5 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、Fig. 1-1 から 1-2 のとおり、フルジオキシニルは、0.5~10 ng/mL (注入量として 0.0025~0.05 ng) の範囲で直線性を示した。その他 8 成分の農薬は 0.1~2 ng/mL (注入量として 0.0005~0.01 ng) の範囲で直線性を示した。

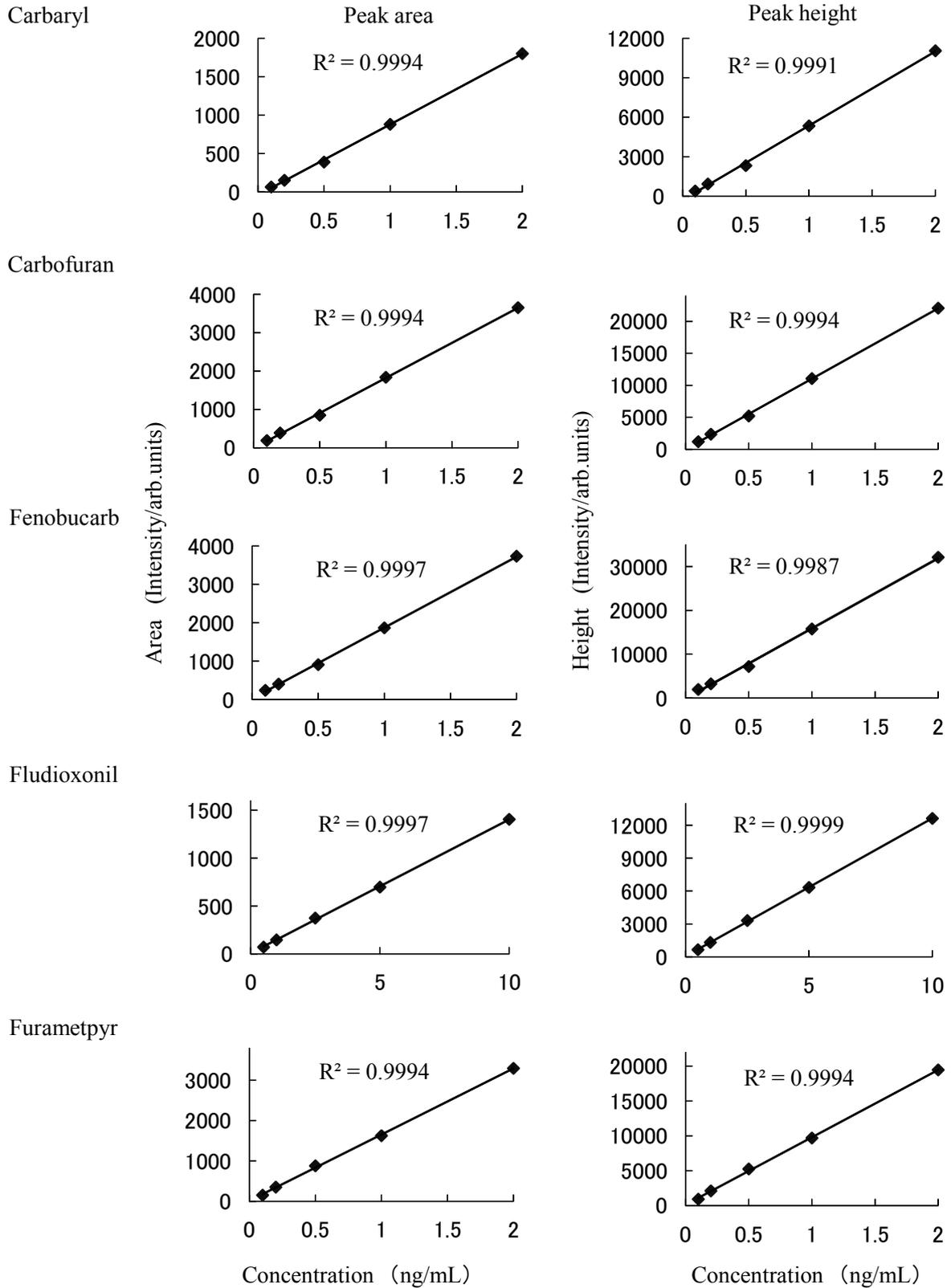


Fig. 1-1 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

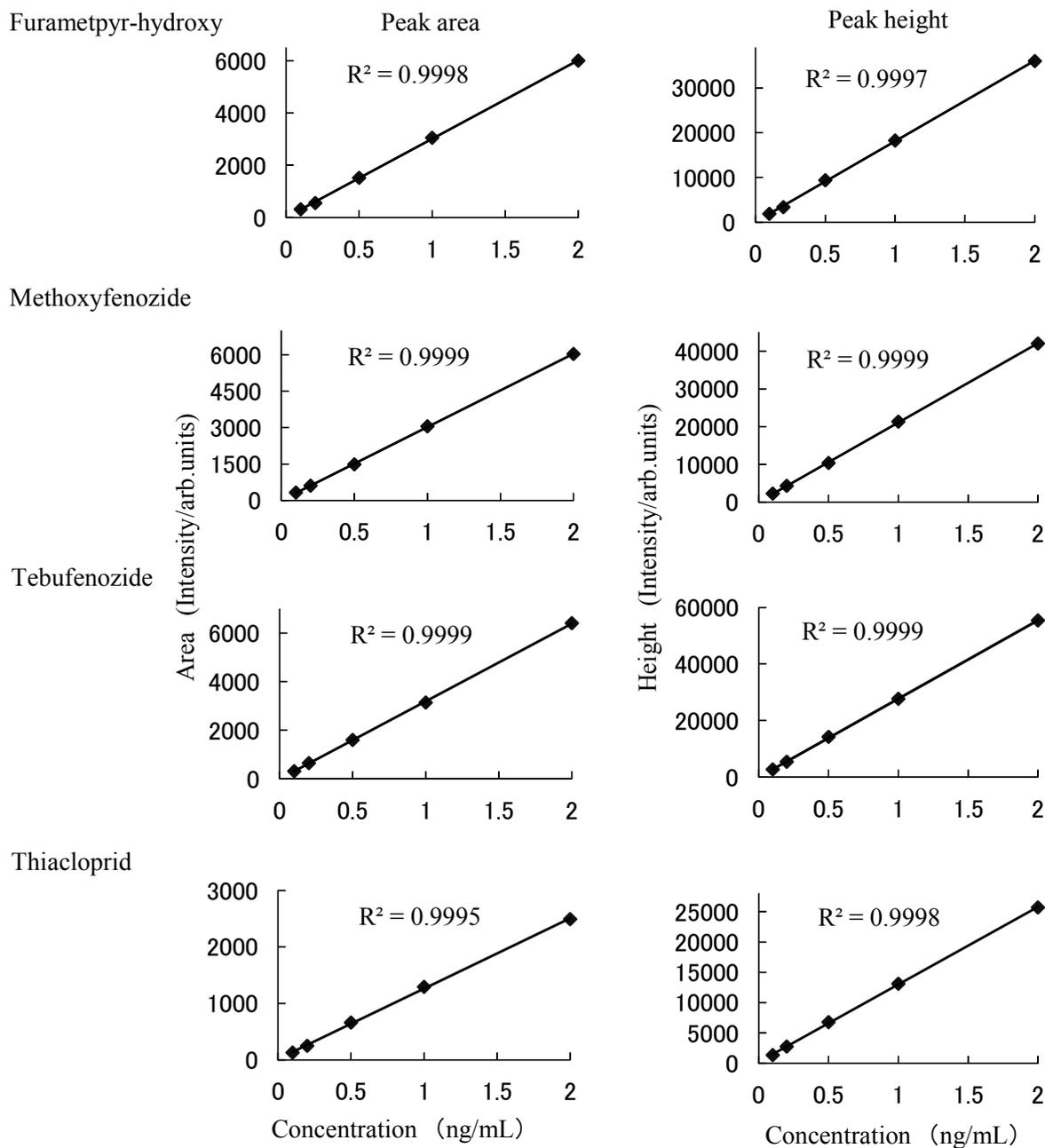


Fig. 1-2 Calibration curves of four pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の確認

市販の稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米を用い、本法により抽出した試料溶液に各農薬の標準液 0.1 μg 相当量を添加して、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果、Table 5-1 から 5-3 のとおりいずれの場合においても洗浄液である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL には農薬成分の流出は見られず、溶出液であるアセトニトリル-水 (3+2) では 10 mL で全ての農薬成分の溶出が確認され、またその後の 10 mL には溶出は確認されなかった。

Table 5-1 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1)	(2:3)	(2:3)	
	10 mL	0~10 mL	~20 mL	
Carbaryl	0	93	0	93
Carbofuran	0	94	0	94
Fenobucarb	0	98	0	98
Fludioxonil	0	86	0	86
Furametpyr	0	98	0	98
Furametpyr-hydroxy	0	99	0	99
Methoxyfenozide	0	95	0	95
Tebufenozide	0	97	0	97
Thiacloprid	0	99	0	99

a) $n=1$

Table 5-2 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (whole-crop rice silage)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1)	(2:3)	(2:3)	
	10 mL	0~10 mL	~20 mL	
Carbaryl	0	99	0	99
Carbofuran	0	99	0	99
Fenobucarb	0	100	0	100
Fludioxonil	0	87	0	87
Furametpyr	0	99	0	99
Furametpyr-hydroxy	0	103	0	103
Methoxyfenozide	0	104	0	104
Tebufenozide	0	102	0	102
Thiacloprid	0	102	0	102

a) $n=1$

Table 5-3 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (paddy rice)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Carbaryl	0	105	0	105
Carbofuran	0	102	0	102
Fenobucarb	0	105	0	105
Fludioxonil	0	96	0	96
Furametpyr	0	101	0	101
Furametpyr-hydroxy	0	99	0	99
Methoxyfenozide	0	99	0	99
Tebufenozide	0	102	0	102
Thiacloprid	0	102	0	102

a) $n=1$

3.3 妨害物質の検討

稲わら 1 検体, 稲発酵粗飼料 1 検体及び粳米 3 検体を用い, 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, いずれの試料においても妨害となるピークは認められなかった.

妨害物質の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 2-1 に示した.

なお, Fig. 2-1 において保持時間の位置に微小のピークが認められるカルバルル及びメトキシフェノジドについて, 定量下限相当の標準液 (0.1 ng/mL) の選択反応検出クロマトグラムとの比較を Fig. 2-2 に示した.

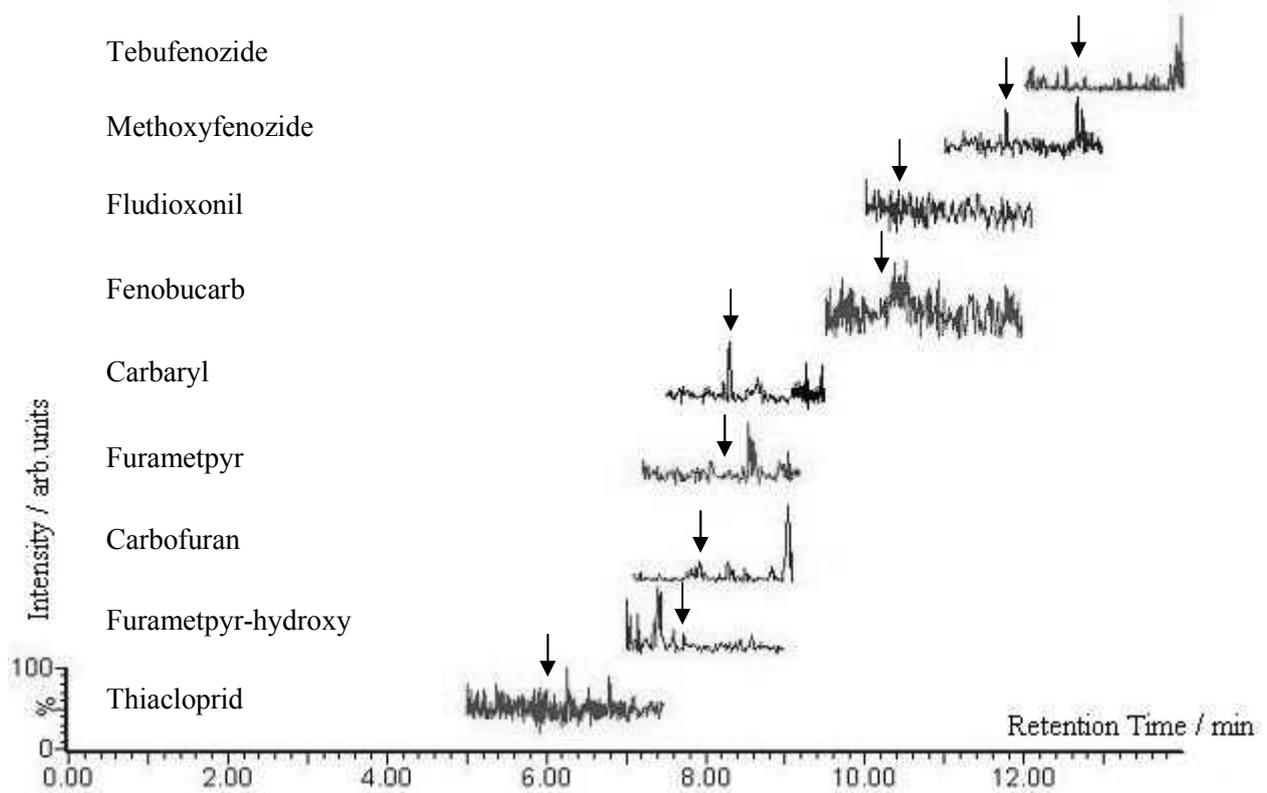


Fig. 2-1 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides and highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

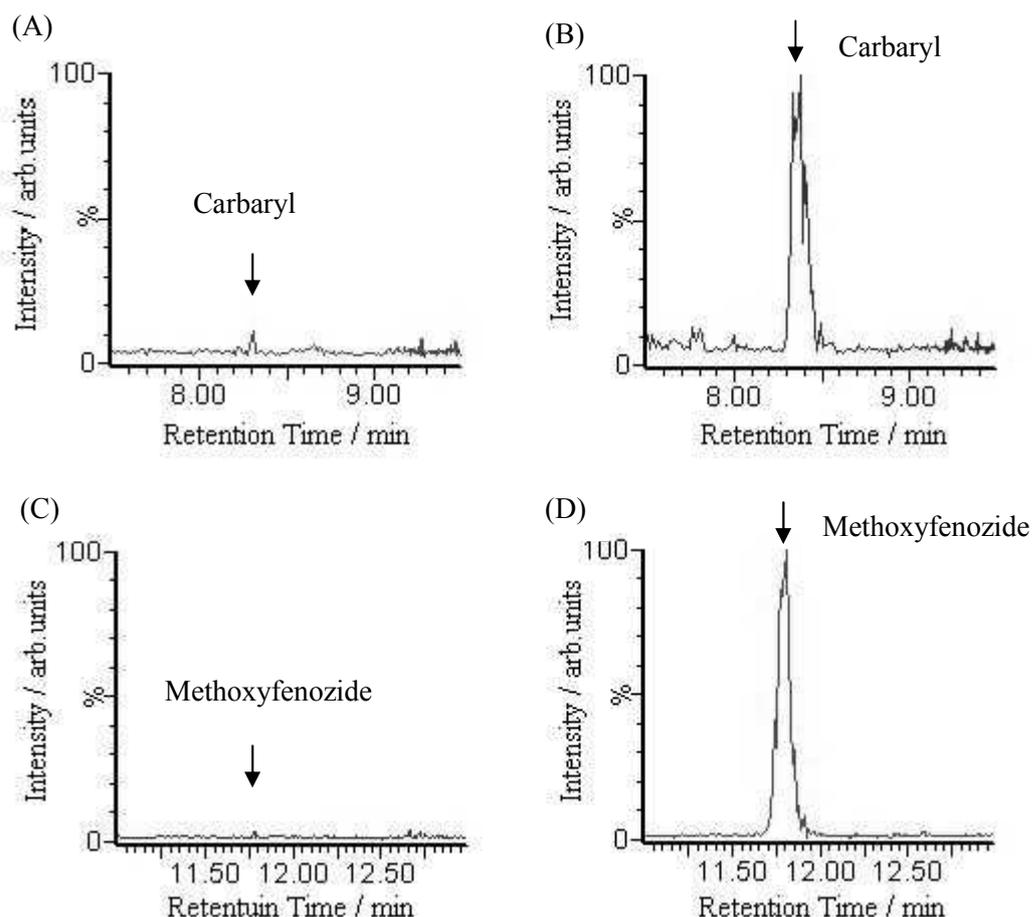


Fig. 2-2 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked) and standard solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

(A) (C) Sample solution of rice straw (non-spiked)

(B) (D) Standard solution (The amount of carbaryl and methoxyfenozide are 0.1 ng/mL.)

3.4 添加回収試験

2.1 で調製した稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキサニルとして 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、その他 8 成分の農薬については各農薬として 1 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、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。

その結果は、Table 6 のとおり、カルバリルについては平均回収率 90.1~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.2 %以下、カルボフランについては平均回収率 82.5~101 %、その繰返し精度は RSD_r として 9.1 %以下、フェノブカルブについては平均回収率 86.1~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.9 %以下、フルジオキサニルについては平均回収率 92.0~104 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.6 %以下、フラメトピルについては平均回収率 87.0~104 %、その繰返し精度は RSD_r として 11.1 %以下、フラメトピルヒドロキシ体については平均回収率 78.5~90.4 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.1 %以下、メトキシフェノジドについては平均回収率 77.1~93.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.7 %以下、テブフェノジドについては平均回収率 88.8~94.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 3.7 %以下、チアクロプリドについては平均回収率 88.0~94.2 %、その繰返し精度は RSD_r

として 4.0 %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反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 6 Recoveries of pesticides

Kind of pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Carbaryl	1.0	96.0	4.0	99.4	1.6	99.0	0.7
	0.2	101	0.8	97.7	8.2	90.1	6.2
Carbofuran	1.0	89.0	2.5	96.7	1.8	96.3	7.1
	0.2	101	8.6	96.6	3.0	82.5	9.1
Fenobucarb	1.0	86.1	1.7	94.3	6.9	94.4	3.6
	0.2	103	6.4	96.3	6.9	91.4	7.9
Fludioxonil	0.1	92.9	2.6	92.0	1.7	95.9	2.7
	0.05	104	7.6	99.3	6.8	98.9	1.7
Furametpyr	1.0	87.0	4.1	93.8	3.7	93.7	3.0
	0.2	104	9.8	103	11	87.8	7.4
Furametpyr-hydroxy	1.0	89.6	3.7	90.4	4.9	90.0	3.5
	0.2	85.5	7.1	82.0	6.5	78.5	1.4
Methoxyfenozide	1.0	91.6	3.7	92.9	1.1	93.2	0.4
	0.2	92.5	6.3	77.1	7.7	90.7	5.1
Tebufenozide	1.0	89.2	1.0	94.2	1.9	92.9	2.8
	0.2	92.7	2.6	92.7	3.7	88.8	2.4
Thiacloprid	1.0	88.0	1.7	94.2	0.4	91.7	2.6
	0.2	89.9	2.9	89.3	3.4	89.5	4.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

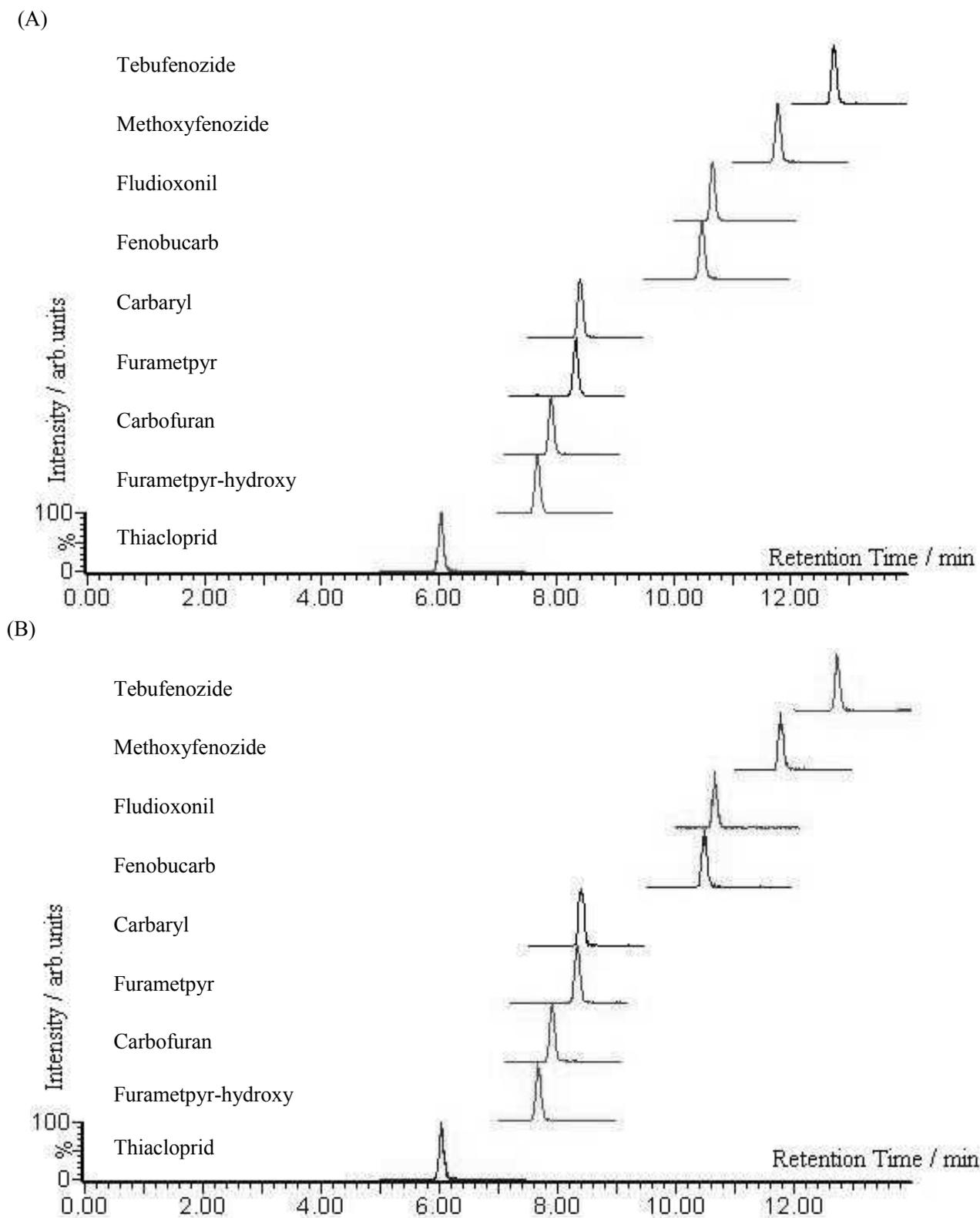


Fig. 3 SRM chromatograms of pesticides

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

- (A) Standard solution (The concentration is 10 ng/mL for fludioxonil and 2 ng/mL for other pesticides.)
 (B) Sample solution of rice straw (Spiked at 0.1 mg/kg of fludioxonil and 1 mg/kg of other pesticides)
 (Highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に 9 成分の各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

フルジオキシニルについては、ピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.05 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

確認のために、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキシニルとして 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 7 のとおりであった。

その他 8 成分の農薬については、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であった。

確認のため、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にその他 8 成分の農薬として 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 7 のとおりであった。

以上の結果から、本法のフルジオキシニルの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02mg/kg であり、その他 8 成分の農薬の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。

Table 7 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Carbaryl	0.1	103	6.7	115	11	106	9.3
Carbofuran	0.1	89.4	11	92.1	16	94.4	8.0
Fenobucarb	0.1	99.1	9.3	101	2.8	92.3	13
Fludioxonil	0.05	104	7.6	99.3	6.8	98.9	1.7
Furametpyr	0.1	103	12	104	12	111	5.7
Furametpyr-hydroxy	0.1	102	5.7	96.4	9.9	89.1	9.8
Methoxyfenozide	0.1	95.3	6.7	96.7	9.6	89.8	0.7
Tebufenozide	0.1	102	12	97.3	1.6	93.0	7.3
Thiacloprid	0.1	107	11	99.1	6.9	97.0	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.6 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。

稲わら及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 2 µg を含有する標準液 0.5 mL 添加)、その他 8 成分の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 20 µg を含有する標準液 0.5 mL 添加) を添加した試料を用い、協同飼料株式会社研究所、株式会社島津テクノリサーチ、全国酪農業協同組合連合会分析センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、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 (計 12 試験室) において, 本法に従い共同試験を実施した. 結果の解析については, IUPAC のプロトコール⁴⁾に従い, Cochran 検定, 外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い, 外れ値の棄却を行った上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した. 得られた RSD_R から, 修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた.

結果を Table 8 から 16 に示した.

カルバリルでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 97.6 及び 101 %, RSD_f はそれぞれ 4.4 及び 4.3 %, RSD_R はそれぞれ 7.7 及び 11 %, HorRat はそれぞれ 0.48 及び 0.69 であった.

カルボフランでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 99.2 及び 102 %, RSD_f はそれぞれ 4.6 及び 3.8 %, RSD_R はそれぞれ 6.1 及び 7.8 %, HorRat はそれぞれ 0.38 及び 0.49 であった.

フェノブカルブでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 99.3 及び 105 %, RSD_f はそれぞれ 5.5 及び 5.0 %, RSD_R はそれぞれ 10 及び 6.2 %, HorRat はそれぞれ 0.65 及び 0.39 であった.

フルジオキソニルでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 100 及び 107 %, RSD_f はそれぞれ 9.8 及び 3.8 %, RSD_R はそれぞれ 12 及び 12 %, HorRat はそれぞれ 0.55 及び 0.53 であった.

フラメトピルでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 98.2 及び 100 %, RSD_f はそれぞれ 7.6 及び 4.5 %, RSD_R はそれぞれ 7.9 及び 9.5 %, HorRat はそれぞれ 0.50 及び 0.60 であった.

フラメトピルヒドロキシ体では稲わら及び粃米について, 平均回収率は 94.0 及び 92.5 %, RSD_f はそれぞれ 5.5 及び 3.7 %, RSD_R はそれぞれ 7.3 及び 8.0 %, HorRat はそれぞれ 0.45 及び 0.49 であった.

メトキシフェノジドでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 97.3 及び 103 %, RSD_f はそれぞれ 5.0 及び 5.0 %, RSD_R はそれぞれ 7.8 及び 5.9 %, HorRat はそれぞれ 0.49 及び 0.37 であった.

チアクロプリドでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 99.0 及び 103 %, RSD_f はそれぞれ 4.5 及び 2.8 %, RSD_R はそれぞれ 8.6 及び 5.2 %, HorRat はそれぞれ 0.53 及び 0.33 であった.

テブフェノジドでは稲わら及び粃米について, 平均回収率は 95.2 及び 102 %, RSD_f はそれぞれ 5.1 及び 5.1 %, RSD_R はそれぞれ 4.7 及び 6.1 %, HorRat はそれぞれ 0.29 及び 0.39 であった.

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 17 に示した.

Table 8 Collaborate study results of carbaryl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.900	0.872	0.946	0.858
2	1.01	1.01	1.05	0.994
3	0.894	0.805	0.774	0.718
4	1.09	1.02	1.04	1.12
5	0.974	0.976	1.03	1.07
6	0.992	1.09	0.967	0.981
7	0.939	0.891	0.961	0.959
8	0.925	0.994	1.05	1.04
9	1.01	0.946	1.08	1.10
10	0.989	0.916	1.05	1.05
11	1.04	1.02	1.16	1.11
12	1.10	1.03	1.19	1.05
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.976		1.01	
Recovery ^{a)} (%)	97.6		101	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		4.3	
RSD _R ^{c)} (%)	7.7		11	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.48		0.69	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Collaborate study results of carbofuran

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.986	0.932	0.841	0.854
2	0.986	0.989	1.01	1.00
3	0.936	0.990	1.17	1.04
4	1.06	1.06	0.992	1.06
5	0.952	0.971	1.00	1.01
6	1.04	1.15	1.14	1.08
7	0.946	1.03	1.01	0.975
8	1.03	1.02	1.01	0.941
9	1.01	0.889	0.965	0.999
10	0.900	0.924	1.01	1.00
11	0.973	1.07	1.14	1.09
12	0.978	0.978	1.09	1.05
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.992		1.02	
Recovery ^{a)} (%)	99.2		102	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.1		7.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.38		0.49	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Collaborate study results of fenobucarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.987	0.927	0.96	0.99
2	0.961	0.982	1.03	1.02
3	0.840	0.747	0.763 ^{a)}	0.742 ^{a)}
4	1.10	0.967	1.05	1.07
5	0.993	1.02	1.02	1.02
6	1.03	1.18	1.17	1.06
7	0.975	0.969	1.01	0.99
8	1.04	0.974	1.11	1.12
9	1.00	0.927	1.03	0.93
10	0.952	0.976	1.05	1.02
11	1.21	1.19	1.08	1.01
12	0.988	0.908	1.21	1.04
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.993		1.05	
Recovery ^{b)} (%)	99.3		105	
RSD _r ^{c)} (%)	5.5		5.0	
RSD _R ^{d)} (%)	10		6.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.65		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 24$; Paddy rice: $n = 22$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Collaborate study results of fludioxonil

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0924	0.0855	0.0909	0.0933
2	0.105	0.107	0.111	0.113
3	0.114	0.108	0.108	0.110
4	0.107	0.100	0.106	0.109
5	0.0936	0.0982	0.110	0.106
6	0.103	0.114	0.118	0.125
7	0.106	0.103	0.109	0.119
8	0.131	0.0969	0.0904	0.0926
9	0.0968	0.0847	0.0838	0.0940
10	0.0826	0.0833	0.103	0.101
11	0.0991	0.112	0.126	0.133
12	0.102	0.0790	0.100	0.107
Spiked level (mg/kg)	0.100		0.100	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.100		0.107	
Recovery ^{a)} (%)	100		107	
RSD _r ^{b)} (%)	9.8		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.55		0.53	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 12 Collaborate study results of furametpyr

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	1.00	0.906	0.896	0.915
2	0.977	1.02	1.03	1.05
3	1.03	0.813	0.850	0.727
4	1.09	0.981	0.987	1.06
5	0.947	0.940	0.991	1.06
6	1.05	1.16	1.17	1.12
7	1.03	0.884	0.953	0.988
8	0.970	0.948	1.03	0.976
9	1.00	0.943	1.04	0.969
10	0.877	0.923	1.02	0.995
11	0.985	1.11	1.12	1.09
12	1.03	0.942	0.966	1.06
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.982		1.00	
Recovery ^{a)} (%)	98.2		100	
RSD _r ^{b)} (%)	7.6		4.5	
RSD _R ^{c)} (%)	7.9		9.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.50		0.60	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 13 Collaborate study results of furametpyr-hydroxy

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.936	0.944	0.879	0.905
2	0.917	0.931	0.929	0.930
3	0.908	0.850	0.751	0.763
4	1.05	0.959	0.941	1.05
5	0.935	0.982	0.946	0.935
6	1.00	1.15	1.04	0.985
7	0.924	0.919	0.968	0.904
8	0.950	0.937	0.944	0.936
9	0.915	0.879	0.875	0.836
10	0.880	0.841	0.922	0.929
11	0.917	1.01	1.04	0.960
12	0.972	0.842	0.907	0.921
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.940		0.925	
Recovery ^{a)} (%)	94.0		92.5	
RSD _r ^{b)} (%)	5.5		3.7	
RSD _R ^{c)} (%)	7.3		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.45		0.49	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 14 Collaborate study results of methoxyfenozide

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.885	0.941	0.904	1.07
2	0.944	0.952	1.02	0.999
3	0.899	0.922	1.02	0.899
4	1.07	1.05	1.08	1.09
5	0.958	0.967	1.03	0.995
6	1.03	1.14	1.17	1.09
7	0.839	0.887	1.06	0.965
8	1.04	0.998	1.02	1.03
9	0.998	0.884	1.01	0.967
10	0.930	0.926	1.03	1.03
11	0.961	1.09	1.11	1.07
12	1.06	0.981	1.04	1.01
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.973		1.03	
Recovery ^{a)} (%)	97.3		103	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	7.8		5.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.49		0.37	

a) $n=24$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 15 Collaborative study results of tebufenozide

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.939	0.928	0.863	0.969
2	0.935	0.945	1.01	1.01
3	0.960	0.923	0.952	0.956
4	1.11 ^{a)}	1.06 ^{a)}	1.00	1.13
5	0.945	0.997	1.08	1.04
6	0.925	1.05	1.08	1.00
7	0.967	0.839	0.929	1.01
8	0.997	0.978	0.972	1.08
9	0.996	0.945	1.03	0.949
10	0.926	0.899	1.03	1.03
11	0.902	1.00	1.09	1.04
12	1.00	0.951	1.08	1.08
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.952		1.02	
Recovery ^{b)} (%)	95.2		102	
RSD _F ^{c)} (%)	5.1		5.1	
RSD _R ^{d)} (%)	4.7		6.1	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.29		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 22$; Paddy rice: $n = 24$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 16 Collaborative study results of thiacloprid

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.964	0.947	0.97	0.940
2	0.975	0.995	1.05	1.04
3	0.888	0.817	0.749 ^{a)}	0.718 ^{a)}
4	1.12	1.07	1.07	1.13
5	0.951	0.960	1.04	0.997
6	1.04	1.19	1.14	1.10
7	1.01	0.965	1.00	0.971
8	0.938	1.00	0.97	1.03
9	1.01	0.945	1.03	0.989
10	0.898	0.912	0.98	1.01
11	1.06	1.14	1.05	1.07
12	0.998	0.967	0.97	1.03
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.990		1.03	
Recovery ^{b)} (%)	99.0		103	
RSD _r ^{c)} (%)	4.5		2.8	
RSD _R ^{d)} (%)	8.6		5.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.53		0.33	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 24$; Paddy rice: $n = 22$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 17 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters 2695 MS/MS: Waters Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro	KANTO CHEMICAL Mightysil RP-18 GP Aqua (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
11	LC: Shimadzu Nexera System MS/MS: Shimadzu LCMS-8030	KANTO CHEMICAL Mightysil RP-18 MS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
12	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留する 8 種類 9 成分の農薬（カルバリル，カルボフラン，フェノブカルブ，フルジオキサニル，フラメトピル及びフラメトピルヒドロキシ体，メトキシフェノジド，テブフェノジド並びにチアクロプリド）について，液体クロマトグラフト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，以下の結果が得られ，適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、フルジオキシニルは、0.5~10 ng/mL（注入量として 0.0025~0.05 ng）の範囲で直線性を示した。その他 8 成分の農薬は 0.1~2 ng/mL（注入量として 0.0005~0.01 ng）の範囲で直線性を示した。
- 2) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、ミニカラムからの溶出画分を確認したところ、アセトニトリル-水（3+2）の溶出液量は 10 mL で十分であった。
- 3) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、その他 8 成分の農薬については各農薬として 1 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、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ところ良好な結果が得られた。
- 5) 本法のフルジオキシニルの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であり、その他 8 成分の農薬の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。
- 6) 稲わら及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 mg/kg 相当量、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 12 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、良好な室間再現精度が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所、株式会社島津テクノリサーチ、全国酪農業協同組合連合会分析センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料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).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について、平成 20 年 4 月 1 日、19 消安第 14729 号(2008).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).

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

山本 謙吾^{*1}, 大島 慎司^{*2}

Determination of Chloramphenicol in Dried Skim Milk by LC-MS/MS

Kengo YAMAMOTO^{*1} and Shinji OSHIMA^{*2}

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

^{*2}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

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

An analytical method was developed to determine chloramphenicol levels in dried skim milk using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding chloramphenicol-d₅ and 100 mL of methanol-1 % metaphosphoric acid solution (3:2 v/v), the sample was homogenized. The extract was filtered and the sample was diluted with water to a final volume of 200 mL. Twenty mL of this solution was concentrated and purified with a divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer column (Oasis HLB from Waters; Milford, MA, U.S.), and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using 10 mmol/L of ammonium formate solution-acetonitrile (7:3 v/v) as the mobile phase. The MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on four kinds of dried skim milk spiked with 1 or 25 μg/kg of chloramphenicol and two kinds of dried skim milk spiked with 0.5 μg/kg of chloramphenicol. The mean recoveries ranged from 93.8 to 102 % with relative standard deviations of repeatability of not more than 12 %.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories on two kinds of dried skim milk spiked with chloramphenicol at 5 μg/kg. The mean recoveries of chloramphenicol ranged from 105 to 106 %, with repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) of 4.9 %, 9.9 %, respectively and Horwitz ratio (HorRat) of 0.79.

This method was validated and established for use in the inspection of dried skim milk for animal feed for chloramphenicol.

Key words: chloramphenicol ; liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) ; dried skim milk

^{*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

キーワード：クロラムフェニコール；液体クロマトグラフ-エレクトロスプレーイオン化-タンデム型質量分析計；脱脂粉乳

1 緒 言

クロラムフェニコール（以下「CP」という。）は、化学合成によって工業的製造が行われている広範囲な抗菌スペクトルを有する抗生物質である¹⁻⁴⁾。副作用として、骨髄の造血機能に作用を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある¹⁻⁴⁾。

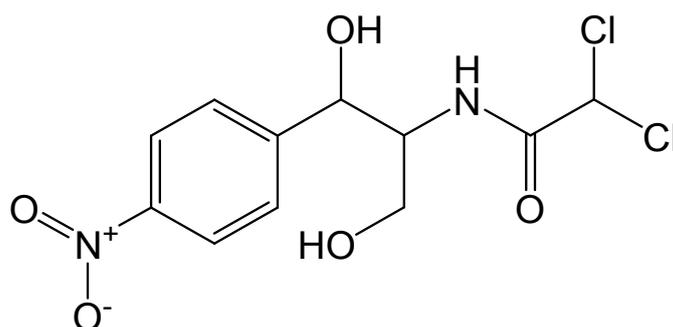
我が国では、CPは飼料添加物に指定された抗生物質ではないため、飼料安全法に基づく成分規格等省令⁵⁾の規定により、飼料に含まれてはならないとされている。また、食品一般の成分規格において含有されてはならない成分として規定されている⁶⁾。

CPの定量法は、飼料では、脱脂粉乳を対象とした方法⁷⁾及び魚粉及び配合飼料（脱脂粉乳を主原料とするものを除く。）を対象とした方法⁸⁾が飼料分析基準⁹⁾に記載されている。また、この他に、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた厚生労働省の告示試験法⁶⁾等が示されている。

脱脂粉乳を対象とした方法は抽出及び精製操作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観点から、クロロホルムを用いない方法が望まれている。また、CPは飼料に含まれてはならない成分であり、脱脂粉乳を対象としては従来法の定量下限である5 µg/kgより低濃度での定量が求められている。

今回、厚生労働省の告示試験法⁶⁾を参考として、脱脂粉乳を対象に、クロロホルムを用いない高感度分析法の開発を目的とし、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。）を用いた方法を検討したので、その概要を報告する。

なお、CPの構造式をFig. 1に示した。



Chloramphenicol (CP)

2,2-dichloro-*N*-[(1*R*,2*R*)-1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide

C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅ MW: 323.13

CAS No.: 56-75-7

Fig. 1 Chemical structure of chloramphenicol

2 実験方法

2.1 試料

脱脂粉乳（米国産，カナダ産，ニュージーランド産及びフランス産）をそれぞれ 1 mm の網ふるいにかけて，通過したものを，供試試料とした．

2.2 試薬

1) CP 標準液

CP 標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて CP 標準原液を調製した（この液 1 mL は，CP として 0.1 mg を含有する．）．

更に，標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中に CP として 1 μ g を含有する標準液を調製した．

2) 安定同位体元素標識 CP (CP-d₅) 内標準原液

CP-d₅ 標準原液（Cambrige Isotope Laboratories 製，100 μ g/mL アセトニトリル溶液，D₅ 98 %）1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ，標線までアセトニトリルを加えて CP-d₅ 内標準原液を調製した（この液 1 mL 中は CP-d₅ として 1 μ g を含有する．）．

3) 検量線作成用標準液

内標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中に CP-d₅ として 250 ng を含有する内標準液を調製した．更に，CP 標準液及び先の内標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し，1 mL 中に CP として 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 及び 20 ng を含有し，かつ CP-d₅ として 2.5 ng を含有する検量線作成用標準液を調製した．

4) 添加用内標準液

使用に際して内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 CP-d₅ として 25 ng を含有する添加用内標準液を調製した．

5) ケイソウ土

ハイフロスーパーセル（Celite 製）を使用した．

6) 水，メタノール及びアセトニトリルは，液体クロマトグラフ用を用いた．メタリン酸は，関東化学製（鹿特級．純度 37.0 %以上）のものを用いた．

2.3 装置及び器具

1) LC-MS/MS :

LC 部 : Agilent Technologies 製 1200 Series

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

2) ホモジナイザー : Hsiangtai 製 HG-200 (使用時回転数 10,000 rpm)

3) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

4) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「ミニカラム」という) : Waters 製 Oasis HLB (充てん剤量 : 60 mg, リザーバー容量 : 3 mL)

5) メンブランフィルター : 東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45 μ m, 直径 13 mm, 親水性 PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、添加用内標準液 1 mL を正確に加えた。更にメタノール-1 w/v%メタリン酸溶液 (3+2) 100 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 10,000 rpm で 1 分間かき混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した。先の共栓遠心沈殿管及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで水を加えた。この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮し、ミニカラム処理に供する試料溶液とした。

2) ミニカラム処理

ミニカラムに 10 mL のリザーバーを連結し、メタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に水 10 mL をミニカラムに加え同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール 10 mL をミニカラムに加えて CP を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水-アセトニトリル (7+3) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、Table 1 及び Table 2 の測定条件に従って選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS for analysing chloramphenicol

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	10 mmol/L ammonium formate solution-acetonitrile (7:3)(1 min)→9 min→(1:19) (10 min)→0.1 min→(7:3)(10 min)
Flow rate	0.18 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (340 kPa)
Drying gas temperature	N ₂ (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

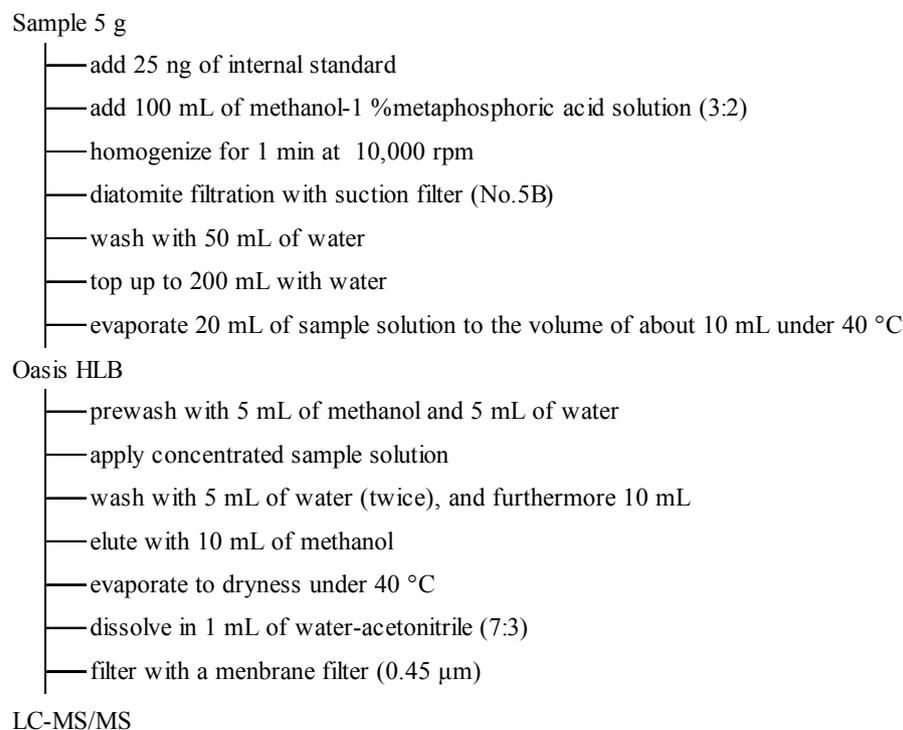
Table 2 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
Chloramphenicol	321	152	—	100	10
		—	257	100	5
CP-d ₅	326	157	—	100	15

4) 計 算

得られた SRM 選択反応検出クロマトグラムから CP 及び CP-d₅ 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 CP 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for chloramphenicol in dried skim milk

3 結果及び考察

3.1 検量線法と内標準法の検討

CP の分析法について、厚生労働省の告示試験法⁶⁾では検量線法を採用しているが、飼料分析基準に記載されている LC-MS/MS による魚粉及び配合飼料（脱脂粉乳を主原料とするものを除く。）を対象とした分析法⁹⁾では内標準法を採用している。そこで本法における内標準法の必要性について検討した。

2.1 で調製した脱脂粉乳に CP として 1 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行分析を実施し検量線法及び内標準法におけるそれぞれの CP の回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 3 のとおりであり、検量線法では平均回収率 147 及び 144 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.5 及び 1.8 %であった。内標準法では平均回収率 99.6 及び 102 %，その繰返し精度は、 RSD_r として 3.1 及び 1.0 %であった。

このことから、検量線法ではみかけ上の回収率が高くなり正確な定量が困難であったが、内標準法では良好な結果が得られた。よって、本法では内標準法を採用することにした。

Table 3 Recoveries of chloramphenicol by external and internal standard method

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Kind of sample (Country of origin)	External standard method		Internal standard method	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
1	Dried skim milk (NZ)	147	4.5	99.6	3.1
	Dried skim milk (France)	144	1.8	102	1.0

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した検量線作成用標準液各 10 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムから CP 及び CP- d_5 のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり、CP として 0.1~20 ng/mL (注入量として 1~200 pg) の範囲で直線性を示した。

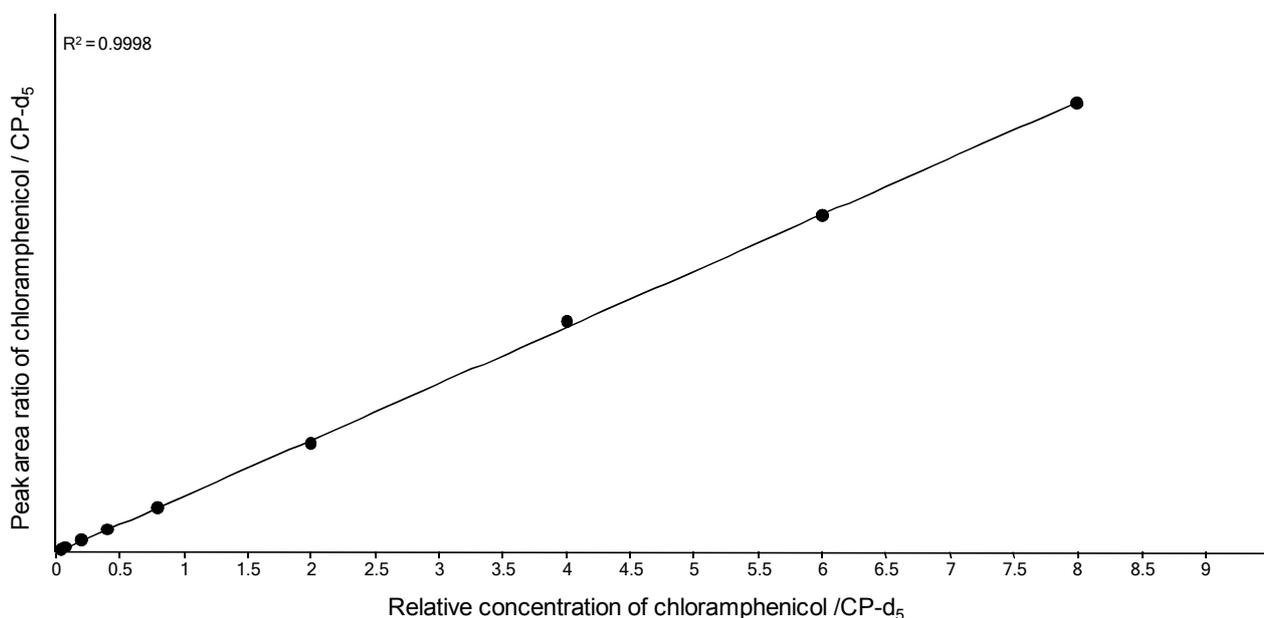


Fig. 2 Calibration curve of chloramphenicol

3.3 ミニカラムの溶出画分の検討

CP についてジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の検

討を行った。

2.4 の 1) に従って脱脂粉乳（米国产）から抽出した抽出液に，CP として 10 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。メタノールを溶出液として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た。以下，本法に従い，各溶出画分中の CP 量を算出し，溶出画分を確認した。

その結果は Table 4 のとおりであり，CP は，メタノール 0~5 mL の画分に溶出し，水での洗浄液及び 5 mL 以降のメタノール画分には溶出されなかった。以上の結果から，厚生労働省の告示試験法⁶⁾と同様にメタノール 10 mL で溶出することとした。

Table 4 Elution pattern from Oasis HLB

Fraction volume (mL)	Water		Methanol	
	20	0~5	~10	
Area ratio of chloramphenicol ^{a)} (%)	0	100	0	
Area ratio of CP-d ₅ (%)	0	100	0	

a) Ratio to area of methanol 0~5 mL

3.4 妨害物質の検討

脱脂粉乳 9 点（米国产 3 点，フランス産 1 点，オーストラリア産 1 点，ニュージーランド産 1 点，カナダ産 3 点）を用い，本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した。その結果，定量を妨害するピークは検出されなかった。

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

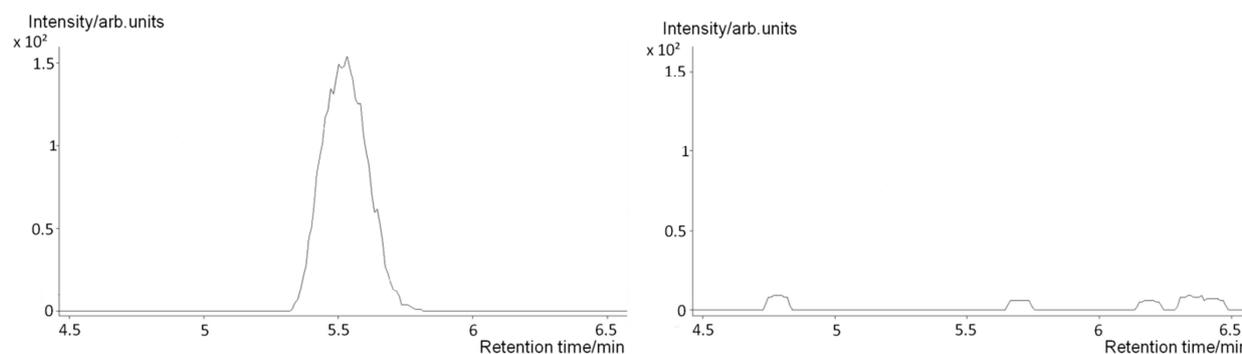


Fig. 3 SRM chromatograms of standard and blank solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2.

(Left) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 2 pg.)

(Right) Sample solution of dried skim milk (not spiked)

3.5 汚染試料への適用

CP に汚染された脱脂粉乳を入手することが困難であったため，次のようにして疑似汚染試料を調製し，本法の汚染試料への適用について検討を行った。

i: 脱脂粉乳 100 g に CP として 10 µg/kg 相当量となるように CP 標準液を添加した後，溶媒

が十分に揮発するまで3日間静置，乾燥した。

ii : ラボミルサーで粉碎してよく混合し，供試試料とした。調製した疑似汚染試料について，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。

その結果は Table 5 のとおりであり，平均回収率は 101 及び 105 %，その繰返し精度は RSD_r として 12 及び 9.9 %であった。このことから，CP に汚染された試料に対し，本法を適用することに問題はないと推察された。

Table 5 Recoveries of chloramphenicol from pseudo-contaminated dried skim milk

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (NZ)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
10	101	12	105	9.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

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添加回収試験を実施した。

脱脂粉乳に CP としてそれぞれ 1 及び 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って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。

その結果は Table 6 のとおりであり，CP の平均回収率は 94.2~102 %，その繰返し精度は RSD_r として 6.2 %以下であった。

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

Table 6 Recoveries of chloramphenicol from spiked dried skim milk

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (Canada)		Dried skim milk (NZ)		Dried skim milk (France)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
25	95.4	2.7	95.2	3.4	99.4	5.8	96.4	1.2
1	94.2	6.2	98.7	3.7	99.6	3.1	102	1.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

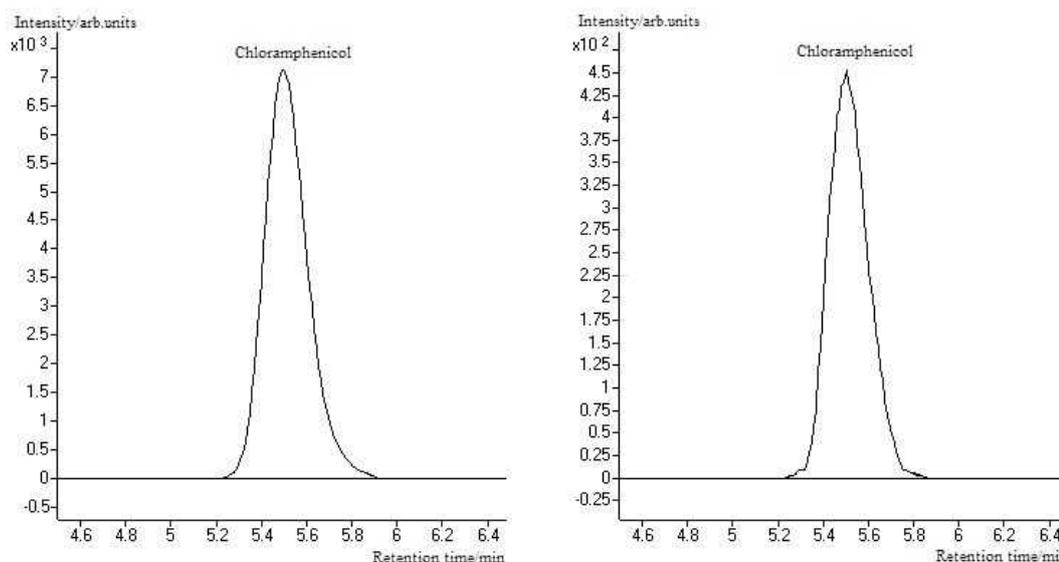


Fig. 4 SRM chromatograms of chloramphenicol

LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2.

(Left) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 0.1 ng.)

(Right) Sample solution of dried skim milk spiked at 1 µg/kg

3.7 検出下限

本法の検出下限（CP 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、脱脂粉乳に CP を添加し、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。

得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.5 µg/kg であった。

確認のため、2 種類の脱脂粉乳に CP として 0.5 µg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。

その結果は Table 7 のとおりであり、2 種類の脱脂粉乳において平均回収率は 99.3 及び 93.8 %、繰返し精度は RSD_r として 7.3 及び 12 %であった。

以上の結果から、本法による脱脂粉乳中の CP の検出下限は 0.5 µg/kg と推察された。

Table 7 Recoveries of chloramphenicol at the level of limit of detection

Spiked level (µg/kg)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (France)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
0.5	99.3	7.3	93.8	12

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 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。

フランス産脱脂粉乳及びニュージーランド産脱脂粉乳に CP として 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量 (1 mL 中に 25 μg を含有する標準液 1 mL 添加) を添加した試料を用い、協同飼料株式会社研究所, 日本ウォーターズ株式会社, 社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター, 財団法人日本食品分析センター彩都研究所, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人マイコトキシシン検査協会, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 12 試験室) において, 本法に従い共同試験を実施した。結果の報告があった 12 試験室のうち, 1 試験室において指示の方法の逸脱が認められたため, 当該試験室の報告値は異常値として除外した。残りの 11 試験室について, IUPAC のプロトコール¹⁰⁾に従い, Cochran 検定, 外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った後, 平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から, 修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果を Table 8 に示した。棄却検定によりいずれの試料においても外れ値とされるデータは認められなかった。脱脂粉乳 (フランス産) について, 平均回収率は 106 %, RSD_r は 4.3 %, RSD_R は 7.2 %, HorRat は 0.58 であった。脱脂粉乳 (ニュージーランド産) について, 平均回収率は 105 %, RSD_r は 4.9 %, RSD_R は 9.9 %, HorRat は 0.79 であった。

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study for chloramphenicol

Lab. No.	Dried skim milk (France) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Dried skim milk (NZ) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	1	4.77	5.54	5.34
2	4.96	5.09	4.99	5.05
3	5.90	5.79	5.69	4.99
4	5.32	5.43	5.93	6.30
5	5.22	5.26	4.99	5.21
6	5.59	5.55	5.58	5.36
7	5.14	5.15	5.15	5.18
8	4.73	4.63	4.71	4.55
9	5.08	4.75	5.24	4.97
10	5.80	5.22	4.76	4.04
11	5.74	5.53	5.95	5.66
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5		5	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5.28		5.23	
Recovery ^{a)} (%)	106		105	
RSD _r ^{b)} (%)	4.3		4.9	
RSD _R ^{c)} (%)	7.2		9.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	12		12	
HorRat	0.58		0.79	

a) $n=22$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: Shimadzu LC-20AD MS/MS: AB SCIEX API-3200	Shimadzu Shim-pack XR-ODS (2.0 mm×100 mm, 2.2 μm)
7	LC: Shimadzu UFLC XR MS/MS: Thermo Fisher TSQ Quantum Ultra	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 4 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
11	LC: Waters ACQUITY UPLC H-Class MS/MS: Waters Xevo TQD	Waters SunFire C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

脱脂粉乳中の CP について、LC-MS/MS 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、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 本法は安定同位体標識 CP を用いた内標準法による定量を採用した。また、検量線は 0.1~20 ng/mL (注入量として 1~200 pg) の範囲で直線性を示した。
- 2) 脱脂粉乳 9 点を用い、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、CP の定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 疑似汚染試料を用いた回収試験の結果、良好な回収率及び併行精度が得られたことから、本法は汚染試料への適用が可能と考えられた。
- 4) 4 種類の脱脂粉乳を用いて、CP として 1 及び 25 μg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施し

た結果、平均回収率は 94.2~102 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 6.2 %以下の成績が得られた。

- 5) 本法による CP の検出下限は、試料中で 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。
- 6) 脱脂粉乳 (フランス産及びニュージーランド産) に CP として 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、12 試験室 (うち 1 試験室は手順を逸脱したため除外) において本法に従い共同試験を実施した。その結果、フランス産脱脂粉乳について、平均回収率は 106 %、 RSD_r は 4.3 %、 RSD_R は 7.2 %、HorRat は 0.58 であった。ニュージーランド産脱脂粉乳について、平均回収率は 105 %、 RSD_r は 4.9 %、 RSD_R は 9.9 %、HorRat は 0.79 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所、日本ウォーターズ株式会社、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、日本ハム株式会社中央研究所及び財団法人マイコトキシン検査協会における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 二宮幾代治：動物の抗生物質，369-371 (1987). (株式会社養賢堂) .
- 2) 今堀和友，山川民夫 監修：生化学辞典 [第 2 版]，409 (1990). (株式会社東京化学同人) .
- 3) 田中信夫，中村昭四郎：抗生物質大要 [第 4 版]，160-161 (1995). (東京大学出版会) .
- 4) クリロビッツ (岡見吉郎訳)：抗生物質論，153-155 (1978). (学会出版センター) .
- 5) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 6) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 7) 菅野清：高速液体クロマトグラフィーによる脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの定量，飼料研究報告，29，60-67 (2004).
- 8) 山本克己，大島慎司：飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法，飼料研究報告，34，55-66 (2009).
- 9) 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).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).

4 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

上野山 智洋^{*1}, 田中 里美^{*1}, 山多 利秋^{*2}, 高橋 雄一^{*3}

Determination of Deoxynivalenol in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS

Tomohiro UENOYAMA^{*1}, Satomi TANAKA^{*1}, Toshiaki YAMATA^{*2} and Yuuichi TAKAHASHI^{*3}

(^{*1}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center

^{*2}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department)

^{*3}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Nagoya Regional Center))

An analytical method was developed to determine deoxynivalenol levels in dry and semi-dry pet food using liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometer (LC-APCI-MS).

Deoxynivalenol was extracted from pet food with acetonitrile-water solution (21:4 v/v). Twenty five grams of pet food was added to 100 mL of acetonitrile-water (21:4 v/v) and heated at 60 °C for an hour before extraction. The extract was diluted to two-fold with acetonitrile-water (21:4 v/v). The diluted solution was purified with MultiSep 227 Trich+ multifunctional column (Romer Labs Inc.; Union, MO, U.S.) and desolvated. The residue was dissolved in water-methanol-acetonitrile (18:1:1 v/v/v) and analyzed by LC-APCI-MS.

Spike tests were conducted on four kinds of pet food. Adult dry dog food, adult dry cat food, all life stages dry cat food, and small breed adult semi-dry dog food spiked with 0.1 or 2.0 mg/kg, 0.1 or 1.0 mg/kg, 0.1 or 1.0 mg/kg, and 0.1 or 1.4 mg/kg of deoxynivalenol, respectively. The mean recoveries of deoxynivalenol ranged from 88.2 % to 108 % with relative standard deviations of repeatability of not more than 6.8 %.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using four kinds of pet food. Adult dry dog food, adult dry cat food, all life stages dry cat food or adult semi-dry dog food was spiked with 2.0 mg/kg, 1.0 mg/kg, 0 mg/kg (without added deoxynivalenol) or 0.2 mg/kg of deoxynivalenol, respectively. The mean recoveries of deoxynivalenol were 97.3 %, and both repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) were 6.5 % for adult dry dog food. These values were 97.1 %, 5.7 % and 7.2 % for adult dry cat food and 97.6 %, 2.8 % and 6.3 % for small breed adult semi-dry dog food. For naturally contaminated all life stages dry cat food, the average quantitative value of deoxynivalenol was 0.225 mg/kg and RSD_r and RSD_R were 6.6 % and 9.4 % respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for deoxynivalenol.

^{*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

^{*2} 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 肥飼料安全検査部

^{*3} 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 名古屋センター

Key words: deoxynivalenol ; pet food ; liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS) ; atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; collaborative study

キーワード：デオキシニバレノール；愛玩動物用飼料；液体クロマトグラフ質量分析計；大気圧化学イオン化法；共同試験

1 緒 言

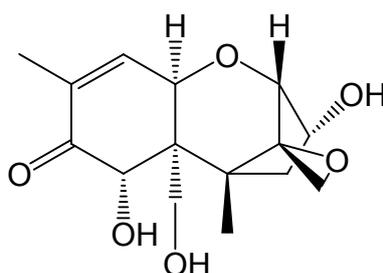
デオキシニバレノール（以下「DON」という．）は、主に*Fusarium*属の赤かびが産生するトリコテセン系のかび毒である．愛玩動物用飼料中のDONについては、平成23年9月1日付けで犬用2 $\mu\text{g/g}$ 及び猫用1 $\mu\text{g/g}$ 以下の基準値が定められた^{1), 2)}．

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）が定める愛玩動物用飼料中のDONの定量法については、ウェット製品を対象とした方法³⁾のみが規定されている．この方法は、財団法人日本食品分析センターが開発した液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という．）を用いた方法⁴⁾（以下「食品分析センター法」という．）について、FAMICが共同試験による妥当性確認を行った⁵⁾ものである．

ドライ製品及びセミドライ製品を対象とした方法についても、今回、食品分析センター法を基に検討を行った．食品分析センター法では多機能カラムで精製後、クロロホルムを用いたフロリジルカラムによる精製を行っていたが、本法では抽出液を希釈後、多機能カラムで精製することにより、クロロホルムを用いるフロリジルカラムによる精製の省略が可能であった．また、一部の試料で回収率及び繰返し精度の低下が認められたことから、抽出方法について改良を行った．

改良した定量法の愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について、添加回収試験等の妥当性確認を行ったので、その概要を報告する．

なお、DONの構造式をFig. 1に示した．



(3 α ,7 α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ MW: 296.3 CAS No.: 51481-10-8

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol (DON)

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎したものを用いた。原材料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Examples of ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Complete and balanced dry type for adult dogs	Grains (maize, rice, wheat flour, unpolished rice, etc.), meat (chicken, beef, etc.), plant protein, oils and fats (palm oil, soybean oil, sunflower oil, etc), alimentary fiber (beat pulp), dehydrated protein, soybean, xylose, vegetables (carrot, tomato), green tea extracts, powdered milk, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, choline, niacin, pantothenic acid, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (glycine, methionine, cysteine), preservative (potassium sorbate), colorant (caramel), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), pH adjuster
Complete and balanced dry type for adult cats	Wheat, poultry meal, cone gluten meal, beef fat, dehydrated protein, egg, fish meal, tuna meal, bonito meal, sardine meal, lamb meal, beef meat meal, potato, powdered milk, powdered cheeze, cereal bran, vegetable meal, minerals (Ca, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se, Co), vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , pantothenic acid, niacine, B ₆ , folic acid, biotin, B ₁₂ , choline, C), amino acids (taurine, methionine), colorant (food red no.2, food yellow no.4), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts)
Complete and balanced dry type for cats in all growth stages	Grains (maize, cone gluten meal, wheat flour, bread crumbs), meat (poultry by-product meal, powdered beef, powdered pork), fishes (fish meal, dried bonito fish, bonito extracts, powdered small fish, powdered white bait), oils and fats (palm oil, chicken oil, beef oil, γ -linolenic acid), white meat chips, defatted soy bean, oligosaccharide, herbs (thyme, dill, fennel), vegetables (tomato, carrot, spinach), powdered cranberry, minerals (Ca, P, K, Cl, Cu, Zn, I), wall of yeast cells, pH adjuster, amino acids (taurine, triptophan, methionine), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , E, K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), colorant (annatto pigment food red no.102, food yellow no.5, food blue no.1, titanium dioxide), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), glucosamine, chondroitin
Complete and balanced semi-dry type for adult small dogs	Meat (chicken, etc.), saccharides, beans, starch, grains, fish, oils and fats, powdered green tea, alimentary fiber (powdered cellulose), vitamins (A, D, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, sodium chloride, magnesium sulfate, ferric sulfate, zinc carbonate, copper sulfate, manganese carbonate, calcium iodate), emulsifier, thickening stabilizer (glycerin, casein sodium), quality improving agent (propylene glycol), preservative (potassium sorbate), pH adjuster, colorant (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), colorant (sodium nitrite), antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extracts)

2.2 試薬

1) DON 標準液

デオキシニバレノール標準品（マイコトキシン試験用，和光純薬工業製，純度 100.0 %）2.5 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 DON 標準原液を調製した（この液 1 mL は，DON として 0.05 mg ($f = 1.00$) を含有する．）．

標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し，1 mL 中に DON として 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 及び 1.0 μg を含有する各 DON 標準液を調製した．

2) 水，メタノール及びアセトニトリルは液体クロマトグラフ用を用いた．

2.3 装置及び器具

1) 振とう機：宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV

2) 遠心分離器：久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

3) 多機能カラム：Romer Labs 製 MultiSep[®] 227 Trich+カートリッジ

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200（真空コントローラ V-800 付き）

5) 高速遠心分離機：日立工機製 HIMAC SCT15B

6) 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

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）100 mL を加え，60 °C で 60 分間静置後，60 分間振り混ぜて抽出した．

抽出液を 50 mL の遠心沈殿管に入れ，1,000 \times g（2,300 rpm）で 5 分間遠心分離した．上澄み液の一定量をアセトニトリル-水（21+4）で正確に 2 倍希釈し，カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ，初めの流出液 3 mL を捨てた．その後の流出液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．

水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，5,000 \times g（10,000 rpm）で 5 分間遠心分離し，上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした．

3) LC-MS による測定

試料溶液及び各デオキシニバレノール標準液各 5 μL を LC-MS 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．

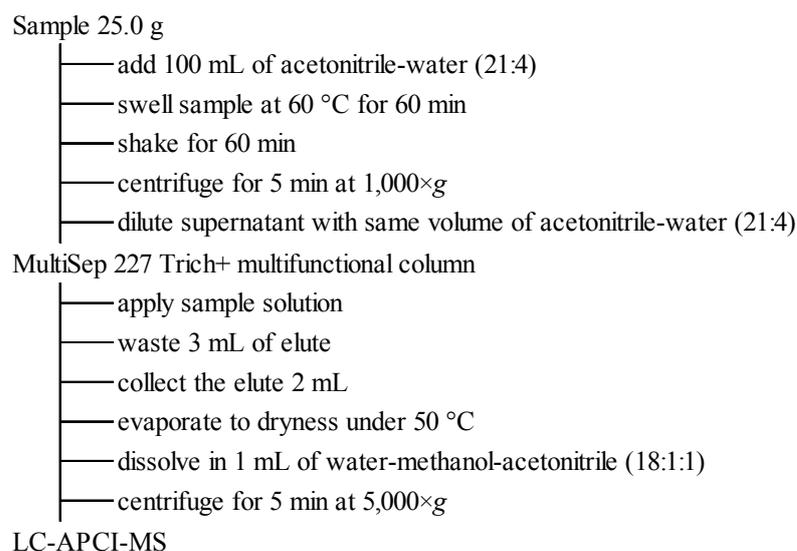
Table 2 Operating conditions of LC-MS for analyzing deoxynivalenol

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (19:1) (1 min) → 10 min → (1:1) → 4 min → (1:19) (15 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Interface temperature	400 °C
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 355

4) 計 算

得られた選択イオン検出クロマトグラムから DON のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の DON 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 deoxynivalenol in dry and semi-dry type pet foods

3 結果及び考察

3.1 LC-MS 測定条件の変更

食品分析センター法の液体クロマトグラフ条件では、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (4+1) からメタノールへのグラジエントとなっている。しかし、当試験室で使用した LC-MS 機器及び分析カラムでは、各種の愛玩動物用飼料の試料溶液を繰返し測定すると、信号強度が不安定になり、ピーク形状の変化、感度の低下等が見られることがあった。試料溶液に由来する夾雑成分がカラム及びイオン源に蓄積することが原因として考えられ、溶離液をメタノー

ルより若干溶出力が高いとされるアセトニトリルに変更することとした。なお、当 LC-MS の APCI (負イオンモード) では、溶離液に酸を用いることができないことから、これ以上の溶離液の変更等は検討しなかった。

3.2 検量線

2.2 の 1)により調製した 0.01~1 $\mu\text{g/mL}$ のデオキシニバレノール標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり 0.01~1 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.05~5 ng) の範囲で直線性を示した。

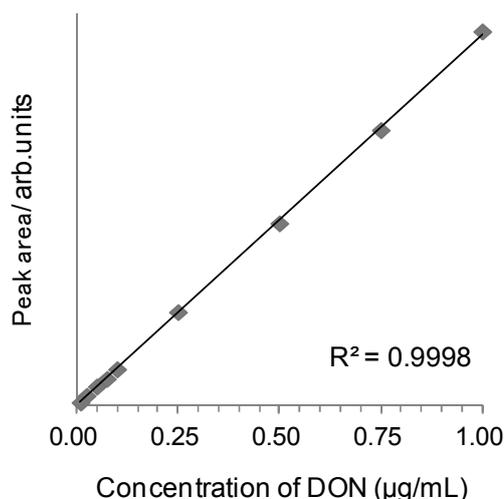


Fig. 2 Calibration curve of deoxynivalenol by peak area

3.3 ドライ及びセミドライ製品の精製操作の簡素化

食品分析センター法のドライ及びセミドライ製品の前処理においては、多機能カラムからの流出液の一定量をクロロホルム-メタノール (9+1) に転溶した後、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil) により更に精製を行うこととしている。分析法の愛玩動物用飼料等の検査法³⁾への適用を検討するに当たり、クロロホルムの使用は可能な限り差し控えるべきであることから、当該操作の代替を検討した。

食品分析センター法で合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製が追加された理由は、選択イオン検出クロマトグラム上に夾雑成分が現れ、定量に影響するため⁴⁾であったが、食品分析センター法の目標とする定量限界 0.02 mg/kg に対して、当該妨害ピークの影響は分析試料中濃度として 0.01 mg/kg 未満であり、すべての試料で現れるものではなかった。愛玩動物用飼料中の DON の基準値は、犬用 2 mg/kg 及び猫用 1 mg/kg 以下であることから^{1), 2)}、試料溶液を希釈して定量限界を引き上げても支障がないと考えられた。

そのため、多機能カラムによる精製効果の向上も目的として、当該カラム処理前に抽出液を希釈する操作を加え、食品分析センター法の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を省略する方法を検討した。

DON による汚染が認められた 4 種類の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品 2 種類、猫用ドライ製品 1 種類及び犬用セミドライ製品 1 種類。ただし、猫用ドライ製品は低濃度であったため、

DONとして0.05 mg/kg相当量を添加したもの。）について、本法により抽出した後、(A) 原液のまま、(B) 原液を2倍希釈した後、それぞれ多機能カラムで精製し、以下本法に従って試料溶液を調製し、定量値を比較した。

その結果はTable 3のとおりであり、有意差は認められないが、(B)の方が若干高めに定量された。また、いずれの方法、試料においても、選択イオン検出クロマトグラム上で定量を妨害するピークは認められなかった。試料に由来する共存成分（マトリックス）が定量値に影響している可能性が考えられたが、(A)の最終試料溶液を希釈して測定しても定量値の増加は認められなかったことから、LC-MSにおけるイオン化抑制ではなく、多機能カラムにおける何らかの影響の懸念があった。

一方、比較的高濃度（0.5 mg/kg~）にDONによる汚染が認められた犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各1種類を用いて、試験的に抽出液を5倍希釈して同様に定量を行ったところ、2倍希釈の場合の定量値より低かった。このため、マトリックスを過剰に希釈すると、DONが多機能カラムに吸着される可能性が考えられた。

以上のことを勘案し、本法では、クロロホルムを必要とする合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を省略し、また、回収率低下の防止及びLC-MSへの負荷を軽減する観点から、抽出液を2倍希釈した後、多機能カラムによる精製を行うこととした。

Table 3 Quantitative value relative with dilution of extract solutions

Sample solution	Undiluted solution	Diluted solution (two-fold) ^{b)}
Pet food types	Quantitative value (mg/kg) ^{a)}	Quantitative value (mg/kg) ^{a)}
Dry type pet food for dogs A	0.047	0.067
Dry type pet food for dogs B	1.23	1.31
Dry type pet food for cats	0.090	0.098
Semi-dry type pet food for dogs	0.067	0.072

a) $n=2$

b) Extract solutions were the same origin of the left column.

3.4 抽出前の加温の検討

検討に際して一部の猫用ドライ製品で、数ヶ月保存した後に回収率及び繰返し精度の低下が見られた。しかし、これらの試料を用いても、保存前は良好な結果が得られており、また、いずれの場合においても使用した標準液、多機能カラムには問題は認められなかった。

このため、数ヶ月保存した間に当該試料に何らかの変性が起こり、DONの抽出を妨げた可能性を疑い、振とう抽出の前に加温・膨潤操作を加えることを検討した。

DONによる汚染が認められた5種類の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品2種類、猫用ドライ製品2種類及び犬用セミドライ製品1種類）について、分析試料10gにアセトニトリル-水（21+4）100 mLを加えた後、直ちに振とう抽出（食品分析センター法）した場合と40、50、60又は70℃に設定した恒温機中で60分間静置した後、振とう抽出した場合との定量値を比較した（一部試料については40及び70℃を省略した。）。

その結果はFig. 3のとおりであり、犬用及び猫用のドライ製品で、振とう抽出の前に加温することにより高い定量値が得られる試料があった。また、温度による定量値の変化については、

50 °C 以上で一定であった。抽出溶媒であるアセトニトリルと水は、沸点 76.5 °C で水組成 16 % の共沸混合物となることから、安全のため抽出前の加温温度は 60 °C とした。

加温時間については、犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各 1 種類を用い、30 分と 60 分とを比較した予備試験 ($n = 3$) の結果、定量値に相違はなく、相対標準偏差は犬用ドライ製品で 30 分 : 9.8 %, 60 分 : 4.7 %, 猫用ドライ製品で 30 分 : 7.2 %, 60 分 : 5.5 % と 60 分加温した方が若干小さい傾向が認められたため、60 分とした。

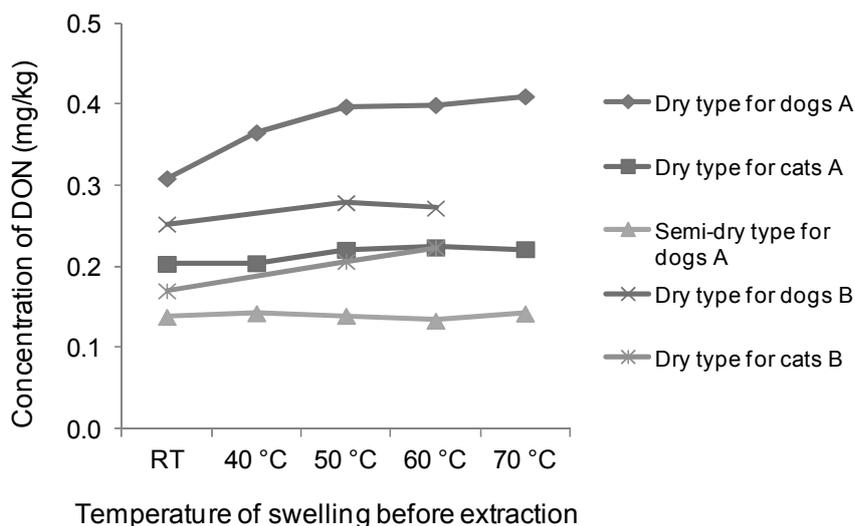


Fig. 3 Concentration of deoxynivalenol (DON) in pet foods derived by several temperatures of swelling before extraction

(40~70 °C: Samples were swelled at each temperature for 60 minutes before extraction; RT: DON was extracted without swelling of samples.)

3.5 妨害物質の検討

本法の選択性を確認するため、15 種類の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品 5 種類、猫用ドライ製品 5 種類及び犬用セミドライ製品 5 種類）について本法に従いクロマトを得た。

その結果、妨害ピークは認められなかった。

本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 A) に示した。

なお、確認イオンとして m/z 295 (DON のプロトン脱離イオン) についても測定したが、当該イオンはピーク強度が定量イオン m/z 355 の 1/10 以下で、SN 比が低下するため、DON のピークが確認できるのは約 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 以上、試料中濃度として 0.4 mg/kg 以上の場合であった。

3.6 添加回収試験

本法の真度及び併行精度を確認するため、犬用ドライ製品 1 種に DON として 0.10 及び 2.0 mg/kg 相当量、猫用ドライ製品 2 種に DON として 0.10 及び 1.0 mg/kg 相当量並びに犬用セミドライ製品 1 種（水分表示量 30 %）に DON として 0.10 及び 1.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、本法に従って 5 点併行で分析を行った。なお、猫用ドライ製品については、DON を含有していたため、定量値から自然汚染値を差し引いて回収率を求めた。

その結果は Table 4 のとおりであり、いずれも真度及び精度の規準³⁾を満たしていた。

なお、各愛玩動物用飼料に DON として 0.10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、振とう抽出

前の加温をしない方法で、3点併行で分析を行った。その結果、回収率は成犬用ドライ製品で111%、成猫用ドライ製品で86.2%、全成長段階猫用ドライ製品で74.3%及び成犬期・維持期小型犬用セミドライ製品で86.2%であり、猫用ドライ製品で若干低下が見られた。

本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 B)に示した。

Table 4 Recoveries of deoxynivalenol from four kinds of pet food

Spiked level of deoxynivalenol (mg/kg)	Pet food types							
	Dry type for dogs		Dry type for cats		Dry type for cats in all growth stages		Semi-dry type for small dogs	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a),c)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a),d)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
2.0	92.6	2.5	-	-	-	-	-	-
1.4	-	-	-	-	-	-	96.5	1.8
1.0	-	-	97.0	2.5	93.8	4.0	-	-
0.10	108	6.8	92.4	2.5	88.2	2.5	90.0	3.7

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

c) Blank value (0.04 mg/kg) was subtracted in calculation of recovery.

d) Blank value (0.11 mg/kg) was subtracted in calculation of recovery.

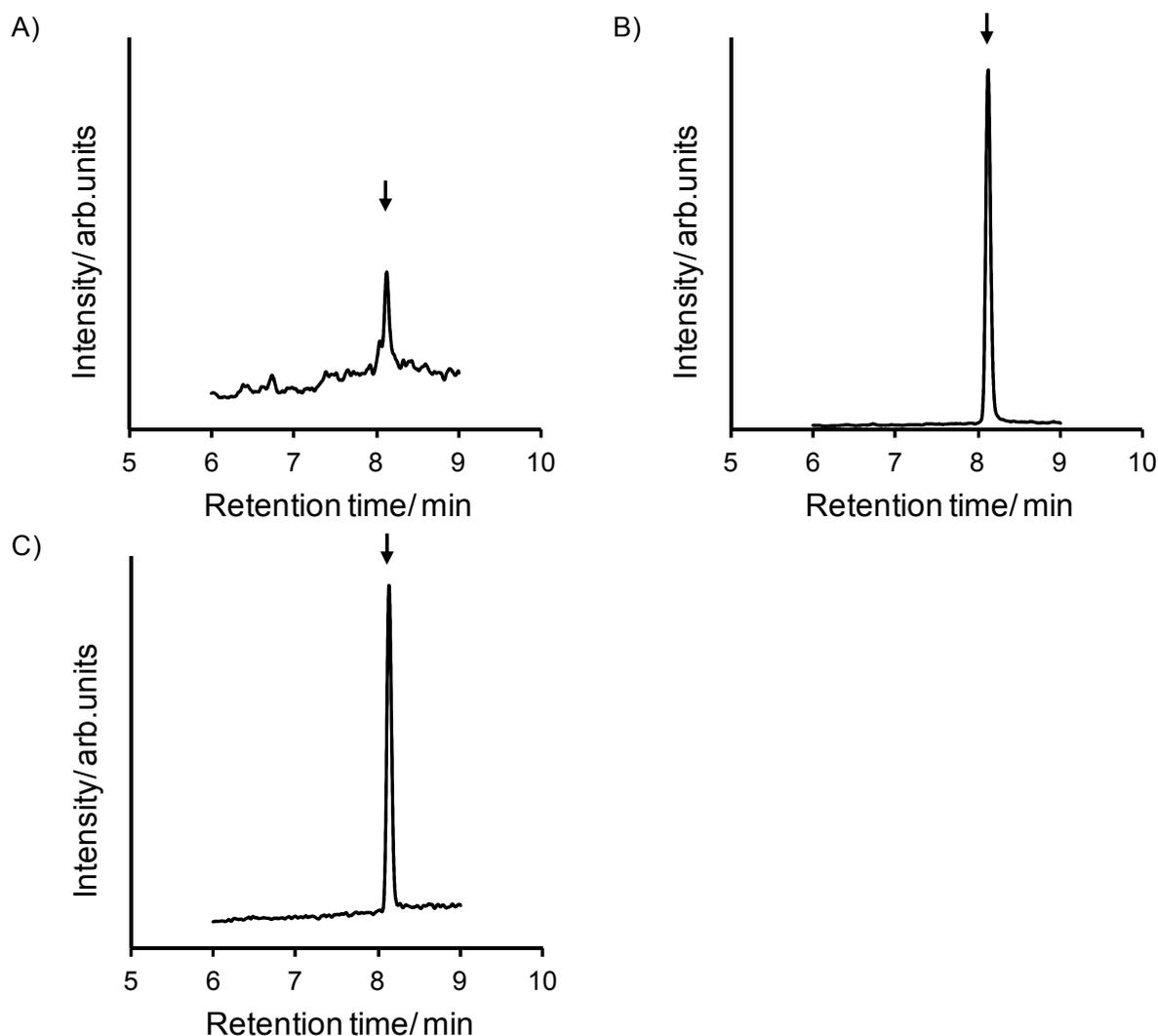


Fig. 4 SIM chromatograms of deoxynivalenol (DON) in selectivity and recovery tests

(Arrows indicate the peak or retention time of DON.)

Scale of Y-axis for B is ten times larger than A and C.)

A) Blank sample of dry type pet food for cats

B) Spiked dry type pet food for cats (Spiked level was 1 mg/kg for DON)

C) Standard solution of DON (0.125 ng equivalent per milliliter)

3.7 定量限界（下限）及び検出限界

前項で実施した添加回収試験のうち、低濃度（0.1 mg/kg 相当量）における選択イオン検出クロマトグラムからピークの *SN* 比を確認した。

その結果、加温せずに抽出した場合に比べ、わずかにノイズが大きくなっていたが、いずれの試料においても *SN* 比 10 以上が確保され、添加回収試験の結果も良好であったことから、本法の定量限界は試料中 0.1 mg/kg とした。

本法の検出限界は、*SN* 比 3 を満たす濃度として、試料中 0.03 mg/kg とした。

3.8 共同試験

犬用ドライ製品（ブランク値 0.03 mg/kg）にデオキシニバレノール（DON）として 2 mg/kg 相当量（50 µg/mL 標準液 1 mL）を添加した試料、猫用ドライ製品 A（ブランク値 0.04 mg/kg）に

DON として 1 mg/kg 相当量 (25 µg/mL 標準液 1 mL) を添加した試料, 猫用ドライ製品 B の自然汚染試料及び犬用セミドライ製品 (ブランク値 0.03 mg/kg) に DON として 0.2 mg/kg 相当量 (5 µg/mL 標準液 1 mL) を添加した試料を用い, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 日本ハム株式会社中央研究所, 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, 同福岡センター及び同神戸センター (計 8 試験室) において, 本法に従い共同試験を実施した。

各試験室から有効数字 3 けたで分析値を報告させ, IUPAC のプロトコール⁶⁾に従い, Cochran 検定並びに外れ値 1 個及び 2 個の Grubbs 検定を行った上, 統計処理を行った。なお, 各検定により棄却された試験室はなかった。

その結果は Table 5 のとおりであり, 犬用ドライ製品では平均回収率は 97.3 %, その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 6.5 % 及び 6.5 % であり, HorRat は 0.45 であった。猫用ドライ製品 A では, 平均回収率は 97.1 %, RSD_r 及び RSD_R は 5.7 % 及び 7.2 % であり, HorRat は 0.45 であった。猫用ドライ製品 B では, 平均定量値は 0.225 mg/kg, RSD_r 及び RSD_R は 6.6 % 及び 9.4 % であり, HorRat は 0.47 であった。犬用セミドライ製品では, 平均回収率は 97.6 %, RSD_r 及び RSD_R は 2.8 % 及び 6.3 % であり, HorRat は 0.31 であった。いずれも良好な室間再現精度が得られた。

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 6 に示した。

Table 5 Collaborative study results of deoxynivalenol

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type for dogs		Dry type for cats A	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	2.05	2.03	1.16	1.07
2	1.81	2.03	1.00	0.984
3	2.10	1.81	0.984	0.891
4	1.90	2.00	1.05	0.955
5	1.93	1.99	0.984	1.03
6	2.07	1.74	1.01	0.858
7	1.99	2.11	1.06	1.07
8	2.03	2.02	1.05	1.02
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.98		1.01	
Spiked level (mg/kg)	2.00		1.00	
Blank (mg/kg)	0.03		0.04	
Recovery ^{b)} (%)	97.3		97.1	
RSD _r ^{c)} (%)	6.5		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	6.5		7.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	14		16	
HorRat	0.45		0.45	

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type for cats B		Semi-dry type for small dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.232	0.239	0.247	0.240
2	0.220	0.188	0.208	0.200
3	0.214	0.249	0.234	0.233
4	0.236	0.238	0.210	0.227
5	0.212	0.209	0.212	0.219
6	0.194	0.215	0.242	0.230
7	0.213	0.224	0.214	0.219
8	0.243	0.269	0.235	0.233
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.225		0.225	
Spiked level (mg/kg)	---		0.20	
Blank (mg/kg)	---		0.03	
Recovery ^{b)} (%)	---		97.6	
RSD _r ^{c)} (%)	6.6		2.8	
RSD _R ^{d)} (%)	9.4		6.3	
PRSD _R ^{e)} (%)	20		20	
HorRat	0.47		0.31	

a) $n = 16$

b) Blank value was subtracted in calculation of recovery.

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
2	Waters Quatro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
3	LC: Waters 2695 Alliance MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
5	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column2 ODS (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1100 Series G1956B	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS: Applied Biosystems API2000	Tosoh ODS-120A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のデオキシニバレノールについて、LC-MSを用いた食品分析センター法の精製操作の一部を簡素化し、更に抽出前に加温操作を加えた方法を検討し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について、妥当性の確認を行い、次の結果が得られたことから、適用が可能であると考えられた。

- 1) 振とう抽出前に 60 °C で 60 分加温・膨潤させることにより、犬用及び猫用のドライ製品でより高い定量値が得られる試料が認められた。
- 2) 検量線は、0.01~1 μg/mL（注入量として 0.05~5 ng）の範囲で直線性を示した。
- 3) 食品分析センター法においてクロロホルムを必要とする合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製操作を省略し、抽出液を 2 倍希釈後に多機能カラムによる精製を行い、更に抽出前に加温・膨潤操作を加えても、妨害ピークは現れず、選択性の規準を満たしていた。
- 4) 本法により添加回収試験を実施した結果、真度及び併行精度の規準を満たしていた。
- 5) 本法の定量下限は、試料中 0.1 mg/kg、検出限界は 0.03 mg/kg であった。
- 6) 本法により 4 種の試料を用いて 8 試験室で共同試験を実施した結果、室間再現精度の規準を満たしていた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，平成 23 年 9 月 1 日，農林水産省令・環境省令第 3 号 (2011).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発，47-72 (2010).
- 5) 吉村 哲史，高橋 雄一，山多 利秋：愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の共同試験，飼料研究報告，36，114-119 (2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67 (2), 331-343 (1995).

5 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のメタミドホスの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

小森谷 敏一*

Determination of Methamidophos in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS/MS

Toshiichi KOMORIYA *

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

An analytical method was developed to determine methamidophos levels in pet food using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Methamidophos was extracted with acetone-water. The extract was purified with macroporous diatomaceous earth, Envi ENVI-Carb (Supelco; Bellefonte, PA, U.S.) and Sep-Pak Plus Silica Cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.), followed by LC-ESI-MS/MS analysis for determination of methamidophos. The LC separation was performed with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara CA, U.S.) using 2 mmol/L ammonium acetate solution-methanol (19:1 v/v) as the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Spike tests were conducted on adult dry dog food, all life stages semi-dry dog food, and two kinds of dry cat food spiked with 0.02 or 0.2 mg/kg of methamidophos and adult dry dog food and dry kitten food spiked with 0.01 mg/kg of methamidophos. The mean recoveries of methamidophos ranged from 72.6 to 86.8 % and the relative standard deviations of repeatability were not more than 8.7 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using adult dry dog food, all life stages semi-dry dog food or adult dry cat food spiked with 0.08, 0.05 or 0.08 mg/kg of methamidophos. The mean recovery of adult dry dog food was 85.9 %, the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_T and RSD_R) were 2.1 % and 11 %, respectively, and the Horwitz ratio (HorRat) was 0.48. The values for all life stages semi-dry dog food and adult dry cat food were 85.6 %, 4.0 %, 11 % and 0.49, and 80.6 %, 2.6 %, 12 % and 0.53, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for methamidophos.

Key words: pesticide residue ; methamidophos ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; pet food ; collaborative study

キーワード：残留農薬；メタミドホス；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；愛玩動物用飼料；共同試験

* 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 緒 言

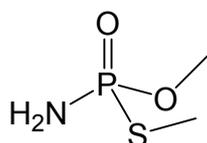
メタミドホスは 1964 年にバイエル社によって開発された有機リン系化合物であり、海外では殺虫剤として使用されている。メタミドホスは水に溶けやすい性質で浸透性が高く、動物の中樞神経系にあるアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害することにより殺虫効果を示し、毒性が高い。

日本において農薬登録はなく、農薬取締法に基づき国内での農薬としての製造・輸入・使用は禁止されている。

国内における愛玩動物用飼料中の成分規格として、0.2 µg/g の基準値が設定されている¹⁾が、メタミドホスの定量法がないことから、今回、検討することとなった。

そこで、「平成 20 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した畜産用飼料中のメタミドホス及びアセフェートとの同時定量法²⁾（以下「食品分析センター法」という。）を基に、愛玩動物用飼料等の検査法³⁾への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、メタミドホスの構造式を Fig. 1 に示した。



O,S-dimethyl phosphoramidothioate

C₂H₈NO₂PS MW: 141.1

CAS No.: 10265-92-6

Fig. 1 Chemical structure of methamidophos

2 実験方法

2.1 試 料

愛玩動物用飼料（成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品。）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。それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult dogs	Corn, Gluten feed, Rice bran, Soybean meal, Wheat bran, Poultry by-product meal, Animal fat, Feather meal, Fish oil (DHA, EPA), Yeast extracts, Carrot, Chamomile, Rosemary, Oolong tea extracts, Minerals (Calcium carbonate, Salt, Zinc sulfate, Calcium iodate, Copper sulfate), Vitamins (A, B ₂ , B ₁₂ , D ₃ , E, Calcium D-pantothenate, Choline chloride, d-biotin), Coloring agents (Yellow-4, Blue-1)
Semi-dry type for dogs of all life stage	Grains (Corn, Wheat, Bread crumb), Meat (Poultry by-product meal, Beef meat meal, Beef powder), Soybean meal, High-fructose corn syrup, Animal fat, Defatted rice bran, Beer yeast, Vegetables (Spinach, Carrot, Pumpkin), Dried small fish, Powdered cheese, Oligosaccharide, Propyleneglycol, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, Na, P, Zn), Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Citric acid, Coloring agents (Titanium dioxide, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1)
Dry type for adult cats	Grains (Corn, Bakery waste), Meat (Poultry by-product meal, Pork meat meal), Corn gluten meal, Fish (Fish meal, Powdered fish extracts, Tuna meal), Animal fat, Powdered cellulose, Vegetables (Beat pulp), Minerals (Cl, Co, Cu, Fe, I, K, Mn, Zn), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, K, Choline, Niacin, Pantothenate, Biotin, Folic acid), Amino acids (Methionine, Taurine), Coloring agents (Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5, Blue-1), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Dry food for kittens	Grains, Meat, Plant protein extracts, Fish (White fish, Bonito, Tuna, Salmon), Amino acids (Taurine), Vitamins, Minerals

2.2 試薬

1) メタミドホス標準液

メタミドホス標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 98.5 %) 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, 更に標線まで同溶媒を加えてメタミドホス標準原液を調製した (この液 1 mL は, メタミドホスとして 0.5 mg を含有する ($f=0.985$) .) .

使用に際して, メタミドホス標準原液 2 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトンを加えて, 1 mL 中にメタミドホスとして 20 μg を含有する液を調製した. この液 1 mL を正確にとり, 窒素ガスを送って乾固した後に水で正確に希釈し, 1 mL 中にメタミドホスとしてそれぞれ 0.002, 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08 及び 0.16 μg を含有する各標準液を調製した.

2) アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン及び塩化ナトリウムは残留農薬・PCB 試験用を用いた. メタノールは液体クロマトグラフ用, 酢酸アンモニウムは遺伝子工学研究用 10 mol/L 溶液 (ニッポンジーン製) を用いた.

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 :

LC 部 : Agilent Technologies 製 1200 Series

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

2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

3) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

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

5) グラファイトカーボンミニカラム : Supelco 製 ENVI-Carb (充てん剤量 500 mg)

6) シリカゲルミニカラム : Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. 更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた. この液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で 2 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

試料溶液に水 3 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えた後, 多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 10 分間静置した. 先のなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 4 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた.

次に, グラファイトカーボンミニカラムを酢酸エチル 5 mL で洗浄し, これを多孔性ケイソウ土カラムの下部に連結させた. 100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, 試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下してメタミドホスを溶出させた. 更に同溶媒 40 mL をカラムに加え, 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。

ヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL で洗浄した。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (7+3) 2.5 mL ずつで3回洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させた。更にヘキサン-アセトン (7+3) 5 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (1+1) 20 mL をミニカラムに加えてメタミドホスを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

水 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）に注入し、Table 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 methamidophos

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution-methanol (19:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer	N ₂ (340 kPa)
Drying gas temperature	N ₂ (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

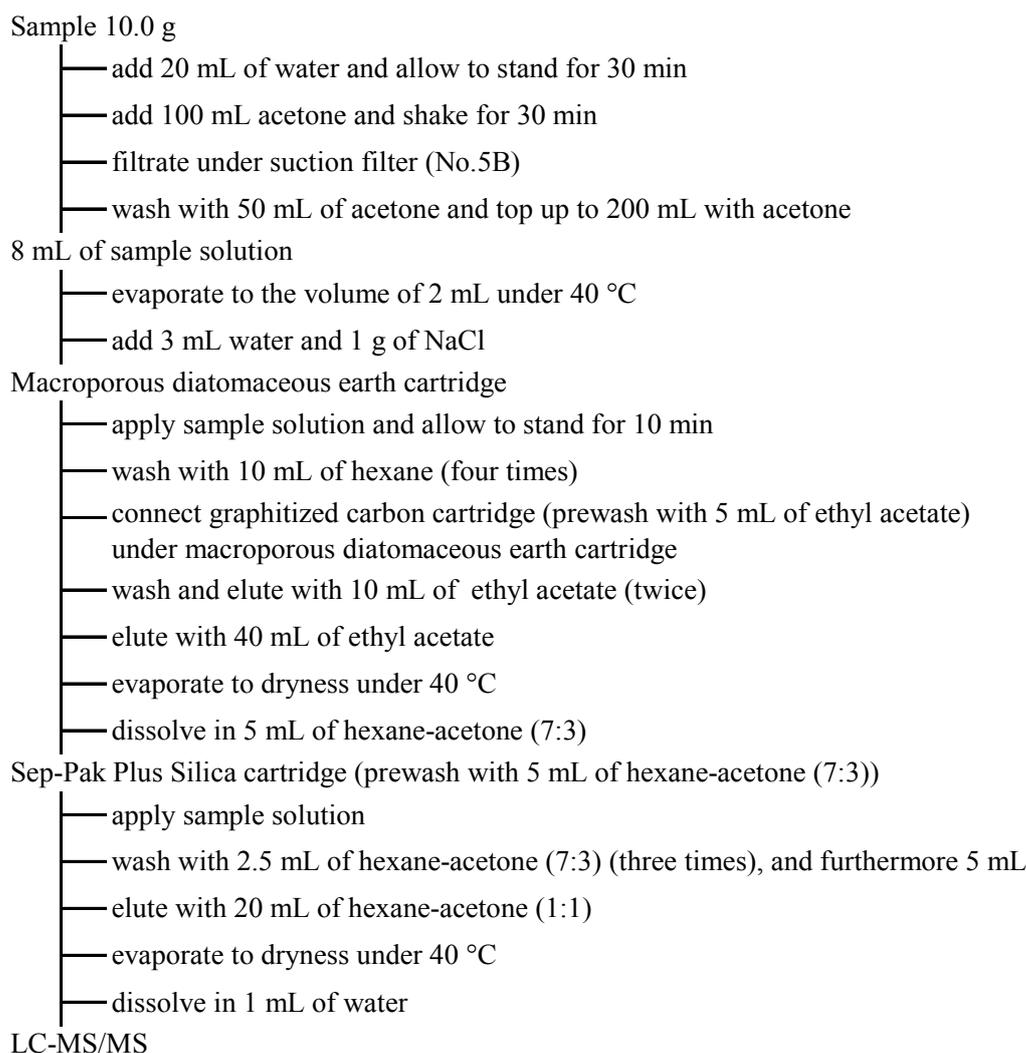
Table 3 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
Methamidophos	142	94	125	100	12

5) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメタミドホスのピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のメタミドホス量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for methamidophos in pet foods

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 1)に従ってメタミドホスとして 1 mL 中に 0.002, 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08 及び 0.16 μg を含有する各標準液を調製し, 各標準液 5 μL を LC-MS/MS に注入し, 得られた選択反応検出クロマトグラムからメタミドホスのピーク高さ及び面積を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は Fig. 2 のとおり, 0.002~0.16 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.01~0.8 ng) の範囲で直線性を示した.

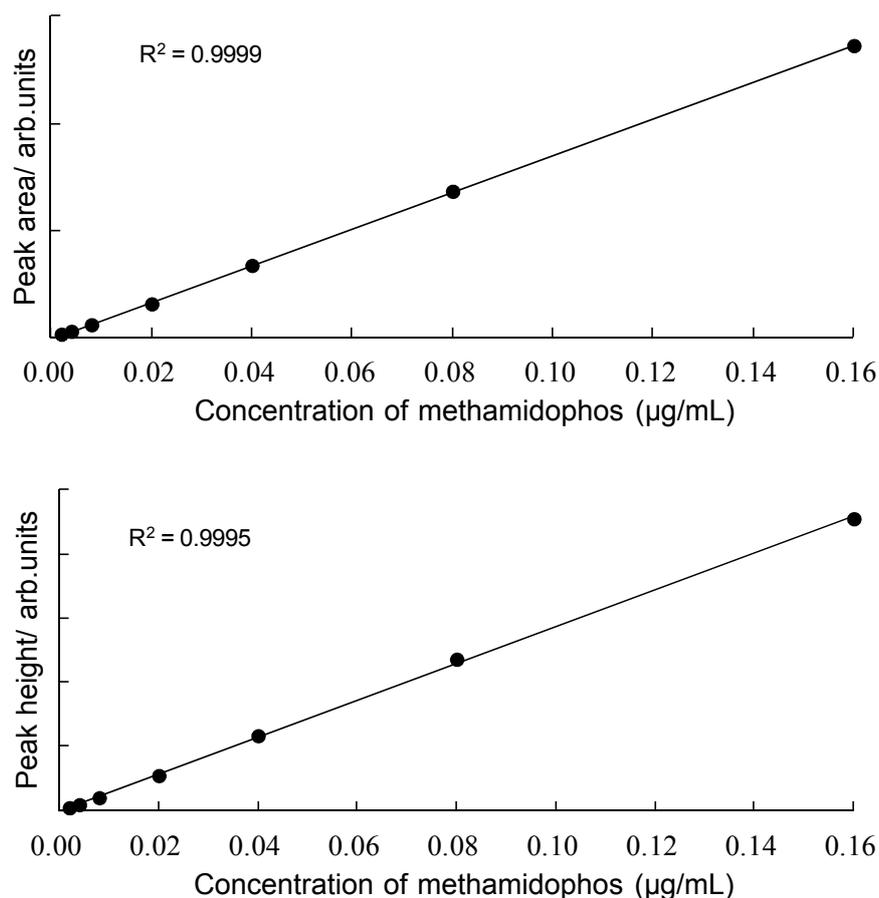


Fig. 2 Calibration curves of methamidophos by peak area (upper) and peak height (lower)

3.2 多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボンミニカラム処理の検討

多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボンミニカラム処理の溶出画分の確認を以下のとおり行った。

成犬用ドライ製品を 2.4 の 1)により抽出し、吸引ろ過した後、200 mL に定容した液 8 mL にメタミドホスとして 0.1 µg (試料中濃度として 0.25 mg/kg 相当量) を添加し、40 °C 以下の水浴で 2 mL 以下まで減圧濃縮して確認のための試料溶液とした。この試料溶液を 2.4 の 2)により操作し、メタミドホスの溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 4 のとおりメタミドホスは酢酸エチル 0~60 mL の画分で溶出し、60 mL 以降の画分には溶出されなかった。また、ヘキサン洗浄液からメタミドホスの溶出は認められなかった。

以上の結果から本法では酢酸エチル 60 mL で溶出することとした。

Table 4 Elution pattern from macroporous diatomaceous earth cartridge and graphitized carbon cartridge

Fraction volume (mL)	Hexane 0~40	Ethyl acetate							Total
		0~10	~20	~30	~40	~50	~60	~70	
Recovery of methamidophos (%)	0	8	39	24	20	3	Tr.	0	94

3.3 シリカゲルミニカラム処理の検討

シリカゲルミニカラム処理の溶出画分の確認を以下のとおり行った。

成犬用ドライ製品を 2.4 の 1)及び 2)により操作した液にメタミドホスとして 0.1 μ g (試料中濃度として 0.25 mg/kg 相当量) を添加した溶液を、2.4 の 3)にしたがって処理し、メタミドホスの溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 5 のとおりメタミドホスはヘキサン-アセトン (1+1) 0~15 mL の画分で溶出し、20 mL 以降の画分には溶出されなかった。また、ヘキサン-アセトン (7+3) 洗浄液からメタミドホスの溶出は認められなかった。

以上の結果から、食品分析センター法と同様、本法はヘキサン-アセトン (1+1) 20 mL で溶出することとした。

Table 5 Elution pattern from silica-gel mini column

Fraction volume (mL)	Hexane-acetone (7:3) (0~12.5)	Hexane-acetone (1:1)					Total
		0~5	~10	~15	~20	~25	
Recovery of methamidophos (%)	0	5	85	2	0	0	92

3.4 酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数の検討

食品分析センター法ではカラム処理 I においてメタミドホスを溶出する際、酢酸エチル 10 mL で容器を洗浄し、洗液を多孔性ケイソウ土カラムに加える操作を 6 回繰り返しているが、操作が煩雑になることから、洗浄回数を軽減する目的で以下の検討を行った。

なす形フラスコに、メタミドホスとして 100 ng を含有する水溶液 5 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えた。次に、それらをディスポーザブルピペットにて除去した後、更にヘキサン 10 mL ずつで 4 回洗浄し酢酸エチルによる洗浄回数の検討を行った。

その結果、1 回目の洗浄液においてメタミドホスとして 0.4 ng ($n=2$) の残留が認められたがそれ以降は残留が認められなかったことから、酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数を 2 回とした。

3.5 妨害物質の検討

市販の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品及びセミドライ製品各 3 種類並びに猫用ドライ製品 4 種類) を用い、本法に従って調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、妨害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

2.1 で調製した成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼

猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.2 及び 0.02 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 6 のとおりであり、メタミドホスの平均回収率は 72.6~86.8 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 8.7 %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反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 6 Recoveries of methamidophos from four kinds of pet food

Spiked level (mg/kg)	Pet food types							
	Dry type for adult dogs		Semi-dry type for dogs of all life stages		Dry type for adult cats		Dry type for kittens	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
0.2	84.8	1.1	77.3	8.7	75.9	4.6	72.6	4.0
0.02	86.8	2.7	78.7	7.8	73.8	5.3	77.5	3.6

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

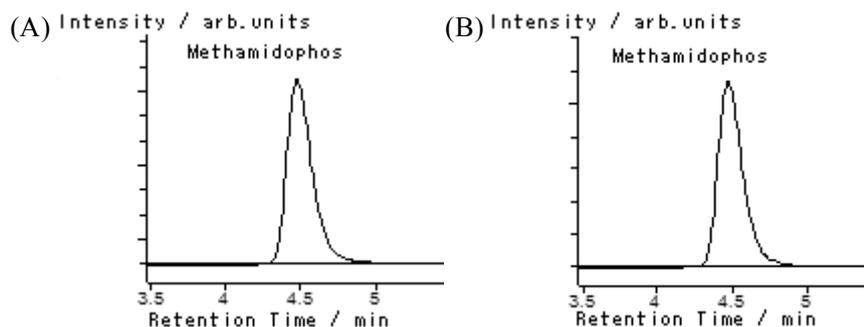


Fig. 3 SRM chromatograms of standard solution and sample solution

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

(A) Standard solution (The amount of methamidophos is 0.4 ng.)

(B) Sample solution of dry food for adult dogs spiked methamidophos at 0.2 mg/kg

3.7 定量限界及び検出限界

本法の定量下限を確認するため、成犬用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により定量し、得られたピークの SN 比を求めた。その結果、 SN 比が 10 となる濃度は 0.01 mg/kg であったことから、メタミドホスの定量下限は 0.01 mg/kg であった。また、同試料を用いて本法に従って 3 点併行で定量した結果は Table 7 のとおりであり、平均回収率は 82.0~85.7 %，その繰返し精度は RSD_r として 2.0 %以下であった。また、メタミドホスの検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.003 mg/kg であった。

Table 7 Recoveries of methamidophos at the level of limit of quantitation

Spiked level (mg/kg)	Pet food types			
	Dry type for adult dogs		Dry type for kittens	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	85.7	1.5	82.0	2.0

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を調査するため、成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.08 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 0.8 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、全成長段階犬用セミドライ製品にメタミドホスとして 0.05 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 0.5 µg を含有する標準液 1 mL 添加) 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、社団法人日本科学飼料協会、全国酪農業協同組合連合会分析センター、協同飼料株式会社研究所、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 (9 試験室) において、本法に従って共同試験を実施した。結果の解析については、IUPAC のプロトコール⁴⁾に従い、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った上で平均回収率、繰返し精度及び室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 8 に示した。成犬用ドライ製品では、平均回収率は 85.9 %、その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 11 % であり、HorRat は 0.48 であった。全成長段階犬用セミドライ製品では、平均回収率は 85.6 %、その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 4.0 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.49 であった。成猫用ドライ製品では、平均回収率は 80.6 %、その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 12 % であり、HorRat は 0.53 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study results of methamidophos

Lab. No.	Pet food types					
	Dry type for adult dogs		Semi-dry type for dogs of all life stages		Dry type for adult cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0708	0.0731	0.0470	0.0449	0.0646	0.0687
2	0.0815	0.0838	0.0495	0.0510	0.0773	0.0793
3	0.0596	0.0609	0.0390	0.0381	0.0608	0.0596
4	0.0599	0.0572	0.0387	0.0360	0.0560	0.0548
5	0.0709	0.0728	0.0430	0.0432	0.0681	0.0668
6	0.0660	0.0647	0.0386	0.0365	0.0537	0.0539
7	0.0704	0.0713	0.0494	0.0437	0.0677	0.0684
8	0.0697	0.0732	0.0431	0.0439	0.0666	0.0678
9	0.0655	0.0663	0.0430	0.0422	0.0608	0.0654
Spiked level (mg/kg)	0.08		0.05		0.08	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0688		0.0428		0.0645	
Recovery ^{a)} (%)	85.9		85.6		80.6	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		4.0		2.6	
RSD _R ^{c)} (%)	11		11		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.48		0.49		0.53	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column
			(i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies 1200 series	Applied Biosystems API 3200	Tosoh TSK-GEL ODS-100V (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
3	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
5	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
6	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
7	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
9	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料中に残留するメタミドホスについて、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を検討したところ、以下の結果が得られ、愛玩動物用飼料等の検査法へ適用が可能であると考えられた。

なお、本法は平成 22 年 8 月 18 日付けで愛玩動物用飼料等の検査法に収載された。

- 1) 検量線はメタミドホスとして 0.01~0.8 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボン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 60 mL であった。
- 3) シリカゲルミニカラムからの溶出画分を検討したところ、溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 4) 酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数を検討を行ったところ、2 回が適当であった。
- 5) 市販の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品及びセミドライ製品各 3 種類並びに猫用ドライ製品 4 種類）について、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、メタミドホスの定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.2, 0.02 及び 0.01 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、72.6~86.8 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 8.7 %以下の成績が得られた。
- 7) 本法によるメタミドホスの定量下限は、試料中で 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であり、基準値に対して十分な精度が得られた。
- 8) 成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.08 mg/kg 相当量、全成長段階犬用セミドライ製品にメタミドホスとして 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、9 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、良好な室間再現精度が得られた。

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、社団法人日本科学飼料協会、全国酪農業協同組合連合会分析センター及び協同飼料株式会社研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，省令第 1 号 (2009)。
- 2) 財団法人日本食品分析センター：平成 20 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（飼料中の有害物質の分析法の開発）(2009)。
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009)。
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995)。

6 愛玩動物用飼料（ウェット製品）中の有機塩素系農薬のガスクロマトグラフ（ECD）による同時定量法

屋方 光則*

Simultaneous Determination of Organochlorine Pesticides in Wet Type Pet Foods by GC-ECD

Mitsunori YAKATA*

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

An analytical method of determination was developed to determine organochlorine pesticides levels (16 kinds of organic chlorinated compounds) in wet pet food using a gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD).

Sixteen organic chlorinated compounds (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, *trans*-heptachlor epoxide, aldrin, dieldrin, endrin, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT) were extracted from the samples using acetonitrile. The acetonitrile extract was dehydrated by liquid-liquid distribution with ethyl acetate/hexane solution (1:1 v/v). Further purification was performed using sequential solid phase extraction with the following: Chem Elut cartridge (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.), gel permeation chromatography (GPC), and ENVI-Carb/NH₂ (Supelco; Bellefonte, PA, U.S.) and Sep-pak Vac Florisil (Waters; Milford, MA, U.S.). Analyses of the purified samples were performed with a GC-ECD equipped with a fused silica capillary column (DB-1701; 0.25 mm i.d. \times 30 m, film thickness 0.25 μ m from Agilent Technologies).

Spike tests were conducted on wet dog and cat food spiked with 1 or 20 μ g/kg of six DDT related compounds and 1 or 2 μ g/kg of other ten compounds. Recoveries of six DDT related compounds and the other ten compounds ranged from 81.6 % to 97.1 % and 58.2 % to 98.7 %, respectively with repeatability in terms of relative standard deviations which did not exceed 12 % of DDT related compounds or 17 % of the other compounds.

A collaborative study was conducted in six laboratories using wet pet food spiked with 1, 2 or 20 μ g/kg of six DDT related compounds and 1 or 2 μ g/kg of the other ten compounds. The range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations, and Horwitz ratio (HorRat) were 91.3 to 110 %, not more than 6.8 % and not more than 19%, and not more than 0.85 regarding kind of DDT, respectively; 62.3 to 110 %, not more than 7.2 % and not more than 16%, and not more than 0.75 regarding other compounds, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for organochlorine pesticides.

Key words: organochlorine pesticides ; gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD) ; gel permeation chromatography (GPC) ; collaborative study

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

キーワード：有機塩素系農薬；電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ；ゲル浸透クロマトグラフィー；共同試験

1 緒 言

有機塩素系農薬は残留性有機汚染物質に含まれるが、残留性有機汚染物質とは、強毒性、難分解性、生物蓄積性及び長距離移動性を有し、人の健康又は環境に影響を及ぼす化学物質である。我が国も含め世界 170 カ国以上が締結している残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約では、これらの化学物質を特定し、製造、流通及び使用を規制することとしている。現在のところ 21 物質が特定されているが、順次追加されている。有機塩素系農薬は優れた殺虫力と安価な理由から我が国でも広く使用されたが、散布された農産物中への残留及び環境汚染が社会問題となり、我が国を含む先進国では 1960 年代後半よりこれら農薬の使用又は製造禁止等の対策がとられたが、有機塩素系農薬は安定した構造から土壌中でも分解しにくく環境中に長く留まることから、現在でも我が国及び海外において農産物中のこれら農薬の残留事例が報告されている。

愛玩動物用飼料中の有機塩素系農薬の残留については平成 23 年 9 月に基準値^{1,2)}が定められた。ドライ及びセミドライ製品の分析法については愛玩動物用飼料等の検査法³⁾に記載（以下「ドライ製品法」という。）されているが、ウェット製品については記載されていない。今回、ドライ製品法を基にウェット製品中の基準値が定められた化学物質を含む 16 種類の有機塩素系農薬の定量法について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、検討した有機塩素系農薬を Table 1 に示した。また、愛玩動物用飼料中の基準値（水分含有量 10 %に換算したものに対して）と水分含有量が 80 %の場合のウェット製品の原物中の基準値の比較を Table 2 に示した。

Table 1 List of organochlorine pesticides used in this study

Name	Formula	MW	CAS No	Name	Formula	MW	CAS No
1 α -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.8	319-84-6	9 <i>o,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.5	789-02-6
2 β -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.8	319-85-7	10 <i>p,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.5	50-29-3
3 γ -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.8	58-89-9	11 Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364.9	309-00-2
4 δ -BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.8	319-86-8	12 Endrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380.9	72-20-8
5 <i>o,p'</i> -DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320.0	53-19-0	13 Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380.9	60-57-1
6 <i>p,p'</i> -DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320.0	72-54-8	14 Heptachlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373.3	76-44-8
7 <i>o,p'</i> -DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318.0	3424-82-6	15 Heptachlor epoxide	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389.3	1024-57-3
8 <i>p,p'</i> -DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318.0	72-55-9	16 <i>trans</i> -Heptachlor epoxide	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389.3	28044-83-9

Table 2 Standard values of organochlorine pesticides

Name	Standard value ($\mu\text{g/g}$)	Real standard value corresponding to wet type product ^{a)}	Instructions
		(mg/kg)	
BHC	0.01	0.002	Total of α -BHC, β -BHC, γ -BHC and δ -BHC
DDT	0.1	0.022	Total of p,p' -DDD, p,p' -DDE, p,p' -DDT and o,p' -DDT
Aldrin Dieldrin	0.01	0.002	Total of aldrin and dieldrin
Endrin	0.01	0.002	
Heptachlor Heptachlor epoxide	0.01	0.002	Total of heptachlor and heptachlor epoxide

a) Calculated with 80 % of moisture content

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 2 種類）をフードプロセッサで均質化し供試試料として用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 3 に示した。

Table 3 Examples of ingredients of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Wet type for adult dogs 1	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Wheat flour, Culinary plants (Potato, Carrot, Green peas), Minerals (Cl, Na, K, Mg, Zn, Se, I), Emulsifier, Thickening agent, Coloring agent (Caramel, Titanium dioxide, colcothar), Vitamins (Choline chloride, Pantothenic acid, Biotin, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, Folic acid)
Wet type for adult dogs 2	Meat (Chicken, etc.), Rice, Carrot, Corn, Dietary fiber, Vitamins (B ₁₂ , D, E), Choline chloride, Pantothenic acid, Folic acid), Minerals (Ca, K, Na, S, Zn), Glycine, Thickening agent, Phosphate (Ca, Na), Color coupler (Nitrous acid Na), Coloring agents (Colcothar, Titanium dioxide)
Wet type for adult cats 1	Turkey, Pork, Salmon, Rice, Cornstarch, Cellulose, Wheat, Chicken extract, Soy bean, Chicken, Animal fats, Corn gluten, Yeast, Minerals, Vitamins Amino acids (Taurine, methionine), Thickening agent
Wet type for adult cats 2	Tuna, Pork, Wheat gluten, Chicken, Soy bean protein, Spinach, Glucose Minerals, Vitamins, Amino acid, Thickening agent (Modified starch), Coloring agents (Food red No.3, Titanium dioxide)

2.2 試薬

1) 各農薬標準原液

Table 4 の各農薬標準品 10 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 10 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は、各農薬として 0.2 mg を含有する。）。

2) 農薬混合標準液

使用に際して、各農薬標準原液の一定量を混合し、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 中に各農薬としてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 μg を含有する各農薬混合標準液を調製した。

3) アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン及びシクロヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。ジエチルエーテル及び 2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ用を用いた。

Table 4 The details of organochlorine pesticides used in this study

Name	Manufacturer	Purity(%)	$f=$	Name	Manufacturer	Purity(%)	$f=$
α -BHC	Dr. Ehrenstorfer	98.0	0.980	<i>o,p'</i> - DDT	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985
β -BHC	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985	<i>p,p'</i> - DDT	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985
γ -BHC	Dr. Ehrenstorfer	98.6	0.986	Aldrin	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990
δ -BHC	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985	Endrin	Dr. Ehrenstorfer	99.5	0.995
<i>o,p'</i> - DDD	Dr. Ehrenstorfer	99.5	0.995	Dieldrin	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990
<i>p,p'</i> - DDD	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990	Heptachlor	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990
<i>o,p'</i> - DDE	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990	Heptachlor epoxide	Dr. Ehrenstorfer	99.0	0.990
<i>p,p'</i> - DDE	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985	<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	Dr. Ehrenstorfer	98.5	0.985

2.3 装置及び器具

- 1) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W
- 2) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 NAJ-160
- 3) ガスクロマトグラフ：Agilent Technologies 製 6890N
- 4) ゲル浸透クロマトグラフ：日本分光製 GPC システム
ポンプ：PU-2080
オートサンプラー：AS-2050
フラクションコレクター：SF-212N
- 5) 多孔性ケイソウ土カラム：Agilent Technologies 製 Chem Elut, 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/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 Vac Florisil Cartridge (充てん剤量 5 g, リザーバー容量 20 mL)
- 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, 親水性 PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 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ニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ろ液を 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で 50 mL 以下になるまで減圧濃縮した後、精製に供する試料溶液とした。

2) 精 製

試料溶液を 200 mL の分液漏斗に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 4 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗に加えた。ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 100 mL を分液漏斗に加えて 3 秒間振り混ぜた後、液層が 3 層に分離するまで 15 分間静置した。水層 (最下層) を捨て、残った 2 層を 300 mL のなす形フラスコに入れ、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。

飽和食塩水 20 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

3) 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、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 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させて定量する各農薬を溶出させた。更に同溶媒 40 mL をカラムに加えて同様に溶出させた。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。

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、1,000×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。

4) 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 100 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。なお、ゲル浸透クロマトグラフィーの条件を Table 5 に示した。

酢酸エチル 4 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 5 Operating conditions of GPC for analysing organochlorine pesticides

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	70~105 mL

5) 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酢酸エチル 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させた後、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加えて定量する各農薬を流出させた。更に、酢酸エチル 4 mL をミニカラムに加え同様に流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

6) カラム処理 III

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをジエチルエーテル 20 mL 及びヘキサン 20 mL で順次洗浄した。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、

液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させた後、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、各農薬を流出させた。更にヘキサノージエチルエーテル (9+1) 40 mL をミニカラムに加えて同様に流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

7) ガスクロマトグラフィー

試料溶液及び各農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得た。

ガスクロマトグラフの測定条件を Table 6 に示した。

Table 6 Operating conditions of GC-ECD for analysing organochlorine pesticides

Column	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.× 30 m, 0.25 µm film thickness)
Column temperature	60 °C (1 min)→20 °C/min→195 °C →2 °C/min→240 °C →20 °C/min→280 °C (7 min)
Injection mode	Pulsed Splitless (30 psi, 60 s)
Injection temperature	250 °C
Carrier gas	He (1.0 mL/min)
Make up gas	N ₂ (60 mL/min)
Detector	Electron capture detector
Detector temperature	280 °C
Injection volume	1 µL

8) 計 算

得られたクロマトグラムから各ピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 20.0 g
- add 100 mL of acetonitrile and shake for 30 min
 - filtrate with suction filter (No.5B)
 - wash with 50 mL of acetonitrile
 - evaporate to the volume under 50 mL under 40 °C
- Liquid-liquid extraction
- add 100 mL of hexane-ethyl acetate (1:1) and shake for 3 seconds
 - allow to stand for 15 min
- Upper layer and middle layer (hexane-ethyl acetate and acetonitrile)
- evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 20 mL of saturated salt solution
- Chem Elut cartridge
- apply sample solution and allow to stand for 5 min
 - wash flask with 60 mL of hexane and apply washed solution
 - elute with 40 mL of hexane
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 10 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
 - centrifuge for 5 min at 1,000×g
 - filtrate with membrane filter (0.5 μm)
- GPC
- apply 5 mL of sample solution
 - collect the fraction of 70~105 mL
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 4 mL of ethyl acetate
- ENVI-Carb/NH₂
- prewash with 10 mL of ethyl acetate
 - apply sample solution and wash flask with 4 mL of ethyl acetate and apply washed solution
 - elute with 4 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 2 mL of hexane
- Sep-pak Vac Florisil cartridge
- prewash with 20 mL of diethyl ether and 20 mL of hexane
 - apply sample solution and wash flask with 4 mL of hexane and apply washed solution
 - elute with 40 mL of hexane-diethyl ether (9:1)
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 1 mL of 2,2,4-trimethyl pentane-acetone (4:1)
- GC-ECD

Scheme 1 Analytical procedure for organochlorine pesticides in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

各農薬として 1 mL 中にそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 及び 0.5 μg を含有する各農薬混合標準液を調製し、これらの液各 1 μL を GC-ECD に注入し、得られたクロマトグラムから各農薬のピーク高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 1 のとおりであり、各農薬として 0.005~0.5 μg/mL (注入量として 0.005~0.5 ng) の範囲で直線性を示した。

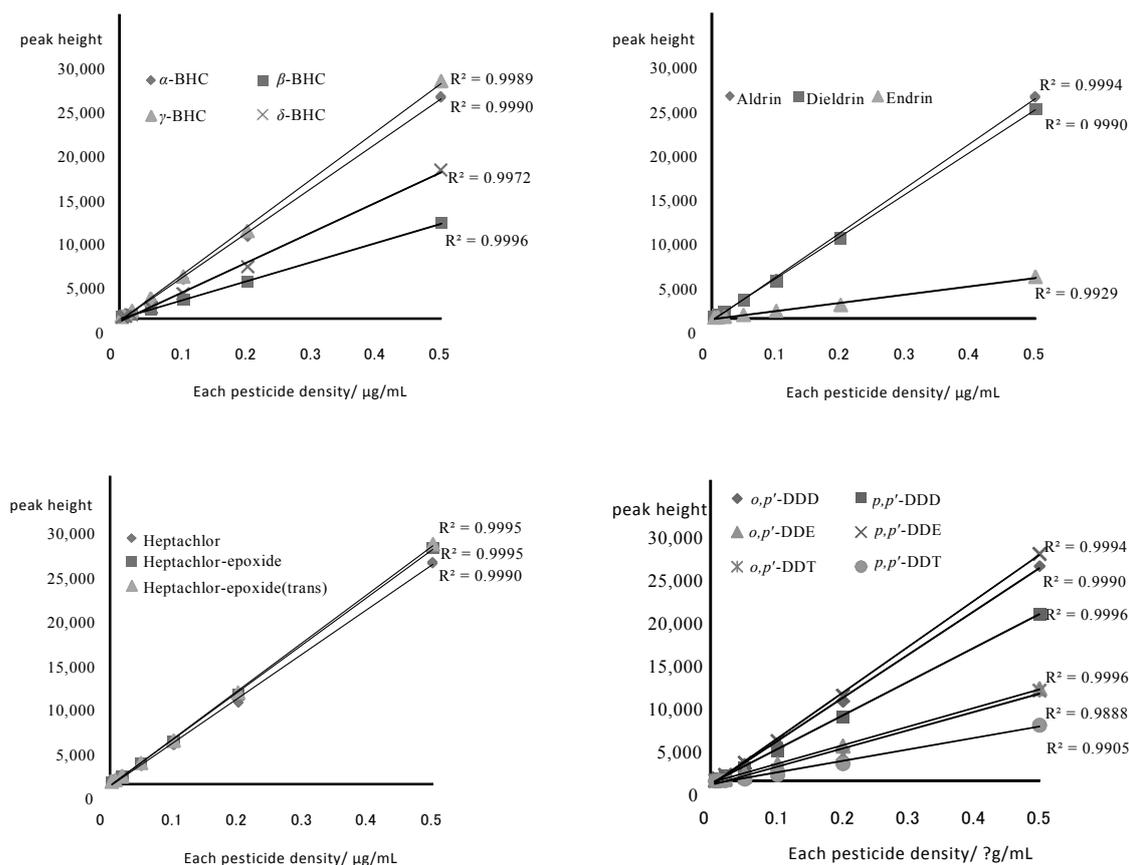


Fig. 1 Calibration curves of organochlorine pesticides

3.2 液液分配の検討

ドライ製品法では、アセトニトリル-水 (3+1) を用いて抽出し、抽出液を乾固後、多孔性ケイソウ土カラムで精製を行っている。ドライ製品法を用いて犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品の試料の抽出液の濃縮乾固を試みたところ、濃縮時に抽出液が突沸しやすくなり、突沸を防止するために穏やかな減圧条件で操作する必要があることから濃縮操作に長時間を要する試料があった。また、濃縮後、エマルジョンが発生し乾固操作及びその後のカラム処理が不可能であった。

濃縮操作中の突沸と乾固時のエマルジョンの発生は、抽出液中に水分と脂質及び両親媒性の物質が多量に混在することが原因と考えられた。このことから、抽出液中のこれらの夾雑物を除去するため、抽出液にヘキサン-酢酸エチル (1+1) を加えることにより有機溶媒層と水層に分離させる方法を検討した。

犬用ウェット製品 8 種及び猫用ウェット製品 10 種を用い、それぞれの抽出液を約 50 mL 以下に濃縮し、これを 200 mL 用の分液漏斗に移し、ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 100 mL を加え 3 秒間振り混ぜた後 15 分間静置したところ、全ての試料で有機溶媒層と水層に分離できた。水層を捨てた後、残った有機溶媒層を 300 mL のなす形フラスコに移し、通常の高圧下でほとんど乾固するまで濃縮したところ、全ての試料で突沸及びエマルジョンは発生しなかった。

液液分配に供する抽出液を約 80 mL に濃縮し、同様に操作したところ、その後の濃縮操作で突沸するものがあった。これは濃縮した抽出液量に対してヘキサン-酢酸エチル (1+1) の添加

量が少ないことから、水層の分離が不十分であったためと考えられた。検討に供した全ての試料の抽出液は通常の減圧下での濃縮操作で約 50 mL 以下に濃縮されるまでは突沸しなかったことから、使用溶媒の低減と操作の確実性から、抽出液は 50 mL 以下に濃縮し液液分配に供することが適当と考えられた。

ヘキサン-酢酸エチルを分液漏斗に加えた後の振とう時間を 3 秒と 5 分にした場合の比較を行った。5 分にしたところ、3 秒の場合と比較して振とう後の水層の分離に時間を要し、また分離した水層の量及び以降の濃縮乾固操作においては同等の結果であった。

これらの結果から、本法では水溶性の夾雑物を取り除くため、抽出液を 50 mL 以下に濃縮し、分液漏斗に入れ、ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 100 mL を加え 3 秒間振り混ぜた後、水層が分離するまで静置することとした。

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の溶出画分の検討を行った。

犬用ウェット製品を 2.4 の 1)及び 2)により抽出精製した液に各農薬として 10 µg/kg (試料原物中濃度として) 相当量を添加し、2.4 の 3)の多孔性ケイソウ土カラム処理に供する試料溶液として、本法により操作した後、溶出画分の回収率を確認した。その結果は Table 7 のとおりであり、全ての農薬は 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、本カラムによる溶出にはヘキサン 100 mL を用いることとした。

Table 7 Elution pattern from Chem Elut

Name	Spike level (µg/kg)	Hexane (mL)	
		0 - 100	100 - 150
		Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
<i>α</i> -BHC	10	81.3	0
<i>β</i> -BHC	10	90.1	0
<i>γ</i> -BHC	10	81.2	0
<i>δ</i> -BHC	10	93.7	0
<i>o,p'</i> -DDD	10	95.5	0
<i>p,p'</i> -DDD	10	87.8	0
<i>o,p'</i> -DDE	10	90.6	0
<i>p,p'</i> -DDE	10	79.9	0
<i>o,p'</i> -DDT	10	94.0	0
<i>p,p'</i> -DDT	10	87.8	0
Aldrin	10	81.2	0
Endrin	10	84.5	0
Dieldrin	10	89.6	0
Heptachlor	10	86.7	0
Heptachlor epoxide	10	88.4	0
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	10	84.5	0

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検討を行った。

犬用ウェット製品を 2.4 の 1)~3)により抽出精製した液に各農薬として 10 µg/kg（試料原物中濃度として）相当量を添加し、2.4 の 4)のゲル浸透クロマトグラフィー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。その結果は Table 8 のとおりであり、全ての農薬は 75~100 mL に溶出し、75 mL 以前及び 100 mL 以後の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本法では安全性を考慮し 70~105 mL を分取することとした。

Table 8 Elution pattern from GPC

Name	Spike level	Cyclohexane-acetone (4:1) ^{a)}		Recovery ^{b)}
	(µg/kg)	(mL)		(%)
α -BHC	10	80 ~	100	87.3
β -BHC	10	80 ~	100	91.9
γ -BHC	10	85 ~	90	82.5
δ -BHC	10	75 ~	90	91.8
<i>o,p'</i> -DDD	10	75 ~	95	105
<i>p,p'</i> -DDD	10	75 ~	100	97.8
<i>o,p'</i> -DDE	10	80 ~	100	89.9
<i>p,p'</i> -DDE	10	75 ~	95	99.6
<i>o,p'</i> -DDT	10	75 ~	95	94.0
<i>p,p'</i> -DDT	10	75 ~	95	99.0
Aldrin	10	75 ~	90	81.7
Endrin	10	90 ~	100	86.6
Dieldrin	10	80 ~	100	94.0
Heptachlor	10	75 ~	90	86.6
Heptachlor epoxide	10	75 ~	90	90.2
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	10	75 ~	100	86.7

a) Pesticides eluted only to fraction

b) Mean ($n=2$)

3.5 ミニカラム処理の検討

ドライ製品法ではゲル浸透クロマトグラフィーの後、Sep-pak plus Florisil（充てん剤量 910 mg. 以下「Plus Florisil」という。）を用いて精製することとしている。無添加の犬用及び猫用ウェット製品を用いて 2.4 の 1)~4)により処理を行い、ゲル浸透クロマトグラフィーで分取した画分を濃縮乾固した後の残留物をドライ製品法と同様にヘキサン 2 mL に溶かした後、Plus Florisil に加え、ヘキサソージエチルエーテル (9+1) で溶出し、本法に基づいてガスクロマトグラフに供したところ、Fig. 2-1 の(B)のとおり多くの夾雑成分由来と考えられる妨害ピークが確認された。これは、ドライ製品等と比較してウェット製品中の夾雑物が多く、これまでの精製操作のみでは精製が不十分であり、Plus Florisil を使用した場合、夾雑成分を保持しきれず流出していることが考えられた。また、有機塩素系農薬を基準値相当量含有したウェット製品の最終試料溶液濃度はドライ製品等のその約 5 分の 1 であり、微量の夾雑ピークであっても定量の妨害に

なることから、更なる精製操作が必要であった。

そこで、Plus Florisil に供する前の試料溶液を飼料分析基準⁴⁾に記載されている「農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法」（以下「一斉法」という。）で使用されている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（以下「GC/NH₂ ミニカラム」という。）及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを用いて精製した場合の精製効果について検討した。

1) GC/NH₂ ミニカラムの検討

先と同様に、無添加の犬用ウェット製品を用いて 2.4 の 1)~4)により処理を行い、ゲル浸透クロマトグラフィーで分取した画分を濃縮乾固した後の残留物を一斉法に基づき酢酸エチル 4 mL で溶かした後、GC/NH₂ ミニカラムに加え、残留物の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL で 2 回洗浄し、洗液も同様に GC/NH₂ ミニカラムに加えて各農薬を流出させた。更に酢酸エチル 4 mL を GC/NH₂ ミニカラムに加えて同様に流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。これをヘキサン 2 mL に溶解し、先と同様に Plus Florisil で精製を行ったところ、Fig. 2-1 の(C)のとおり、夾雑ピークは軽減され精製効果が確認された。

また、混合標準液を用いて GC/NH₂ ミニカラムからの各農薬の流出画分の確認を行った。酢酸エチル 4 mL に溶解した混合標準液を GC/NH₂ ミニカラムに負荷した後、酢酸エチルで各農薬を画分に流出させた。その結果は Table 9 のとおりであり、試料溶液負荷後に洗液 4 mL を負荷し、更に酢酸エチル 4 mL を加えることで全農薬が流出することが確認された。

2) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの検討

充てん剤量を増やすことによる精製効果について検討するために、Plus Florisil, Sep-pak Vac Florisil Cartridge の充てん剤量 2 g（以下「Vac Florisil 2 g」という。）及び同 5 g（以下「Vac Florisil 5 g」という。）を用いた場合を比較した。無添加の犬用及び猫用ウェット製品を用いて 2.4 の 1)~5)により処理して得られた試料溶液を各ミニカラムに加え、それぞれのミニカラムからの各農薬の流出画分を確認した。流出溶媒はドライ製品法と同様にヘキサレンジエチルエーテル (9+1) を使用した。その結果は Table 10 のとおりであり、Plus Florisil では流出溶媒 10 mL, Vac Florisil 2 g では 20 mL, Vac Florisil 5 g では 40 mL 以上の流出画分には各農薬の流出が確認されなかった。そこで、先と同じ試料溶液を用いてそれぞれのミニカラムに加え、更に先の検討で確認した流出液量として Plus Florisil では 10 mL, Vac Florisil 2 g では 20 mL 及び Vac Florisil 5 g では 40 mL を加え各農薬を流出させた。ここで、Vac Florisil 2 g 及び Vac Florisil 5 g を使用した場合のそれぞれのクロマトグラムを Fig. 2-2 の(D)及び(E)に示した。これらのクロマトグラムを比較したところ、Vac Florisil 2 g 及び Vac Florisil 5 g を使用した場合、夾雑ピークが低減することが確認された。Vac Florisil 2 g を使用した場合、検討に用いた試料では定量下限における添加回収試験で *o,p'*-DDD の定量を妨害するピークが確認されたが、Vac Florisil 5 g を使用した場合は定量を妨害するピークは軽減され、定量下限における添加回収試験の結果は良好であった。

以上のことから、本法ではゲル浸透クロマトグラフィーで分取した画分を濃縮乾固した後の残留物を酢酸エチル 4 mL で溶解し、GC/NH₂ ミニカラムに加えた後、容器の洗液を加え、更に酢酸エチル 4 mL を加え流出させる精製操作を行うこととした。また、GC/NH₂ ミニカラム処理後、

ヘキサンに溶解し Vac Florisil 5 g に加え，容器の洗液も同様に加え，更にヘキサノージエチルエーテル（9+1）40 mL を加え流出することとした。

Table 9 Elution pattern from ENVI-Carb/NH₂

Name	Spike level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	
		Ethyl acetate (mL)	
		0~12	12~19
α -BHC	10	99.2	0
β -BHC	10	98.3	0
γ -BHC	10	101	0
δ -BHC	10	100	0
<i>o,p'</i> -DDD	10	98.0	0
<i>p,p'</i> -DDD	10	98.5	0
<i>o,p'</i> -DDE	10	102	0
<i>p,p'</i> -DDE	10	98.2	0
<i>o,p'</i> -DDT	10	99.5	0
<i>p,p'</i> -DDT	10	99.3	0
Aldrin	10	101	0
Endrin	10	102	0
Dieldrin	10	99.6	0
Heptachlor	10	96.2	0
Heptachlor epoxide	10	97.1	0
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	10	99.2	0

a) $n=1$

Table 10 Elution pattern from several Florisil mini columns

Name	Plus Florisil		Vac Florisil 2 g		Vac Florisil 5 g	
	Hexane - diethyl ether	Recovery ^{b)} (%)	Hexane - diethyl ether	Recovery ^{b)} (%)	Hexane - diethyl ether	Recovery ^{b)} (%)
	(9+1) ^{a)} (mL)		(9+1) ^{a)} (mL)		(9+1) ^{a)} (mL)	
α -BHC	0 ~ 10	88.1	0 ~ 10	87.1	0 ~ 20	89.5
β -BHC	0 ~ 10	85.4	0 ~ 10	88.3	0 ~ 20	88.3
γ -BHC	0 ~ 10	90.1	0 ~ 10	92.4	0 ~ 20	89.0
δ -BHC	0 ~ 10	91.8	0 ~ 20	101	0 ~ 40	83.8
<i>o,p'</i> -DDD	0 ~ 10	112	0 ~ 10	88.4	0 ~ 20	100
<i>p,p'</i> -DDD	0 ~ 10	101	0 ~ 10	89.6	0 ~ 20	97.4
<i>o,p'</i> -DDE	0 ~ 10	90.8	0 ~ 10	84.1	0 ~ 20	98.2
<i>p,p'</i> -DDE	0 ~ 10	99.4	0 ~ 10	82.4	0 ~ 20	113
<i>o,p'</i> -DDT	0 ~ 10	104	0 ~ 10	89.1	0 ~ 20	98.4
<i>p,p'</i> -DDT	0 ~ 10	106	0 ~ 10	96.3	0 ~ 20	99.0
Aldrin	0 ~ 10	82.0	0 ~ 10	75.4	0 ~ 20	83.0
Endrin	0 ~ 10	89.2	0 ~ 20	77.4	0 ~ 30	82.5
Dieldrin	0 ~ 10	94.1	0 ~ 20	82.5	0 ~ 40	89.1
Heptachlor	0 ~ 10	87.6	0 ~ 10	80.6	0 ~ 20	93.6
Heptachlor epoxide	0 ~ 10	86.5	0 ~ 10	77.3	0 ~ 20	84.5
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	0 ~ 10	86.5	0 ~ 10	84.1	0 ~ 20	89.0

a) Pesticides eluted only to fraction

b) $n=1$

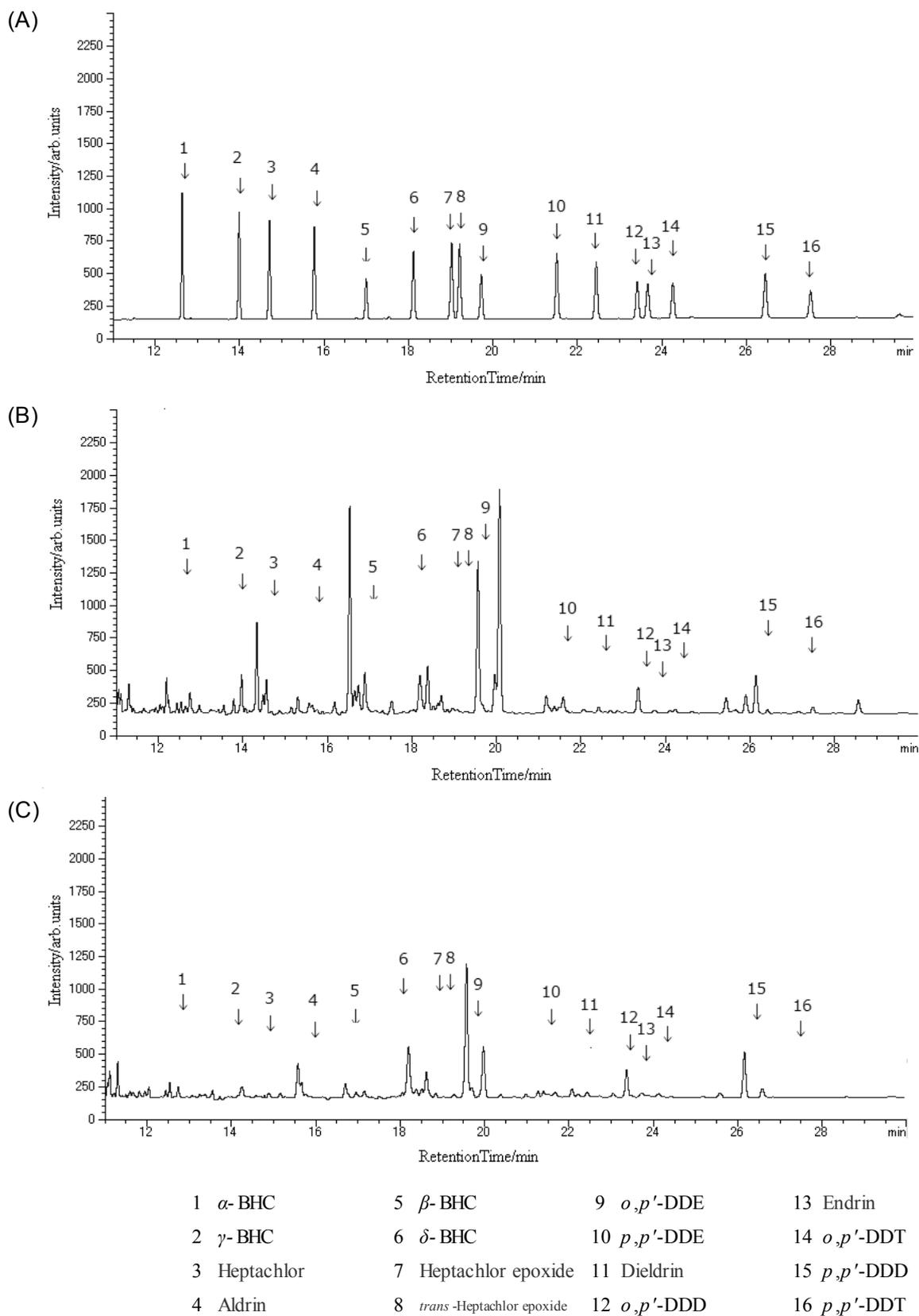


Fig. 2-1 Chromatograms regarding the effect of purification by several mini columns

(A) Mix standard solution (The amount was each 0.01 ng.)

(B) Sample solution of wet type pet food for dogs (purified with Plus Florisil)

(C) Sample solution of wet type pet food for dogs (purified with GC/NH₂ and Plus Florisil)

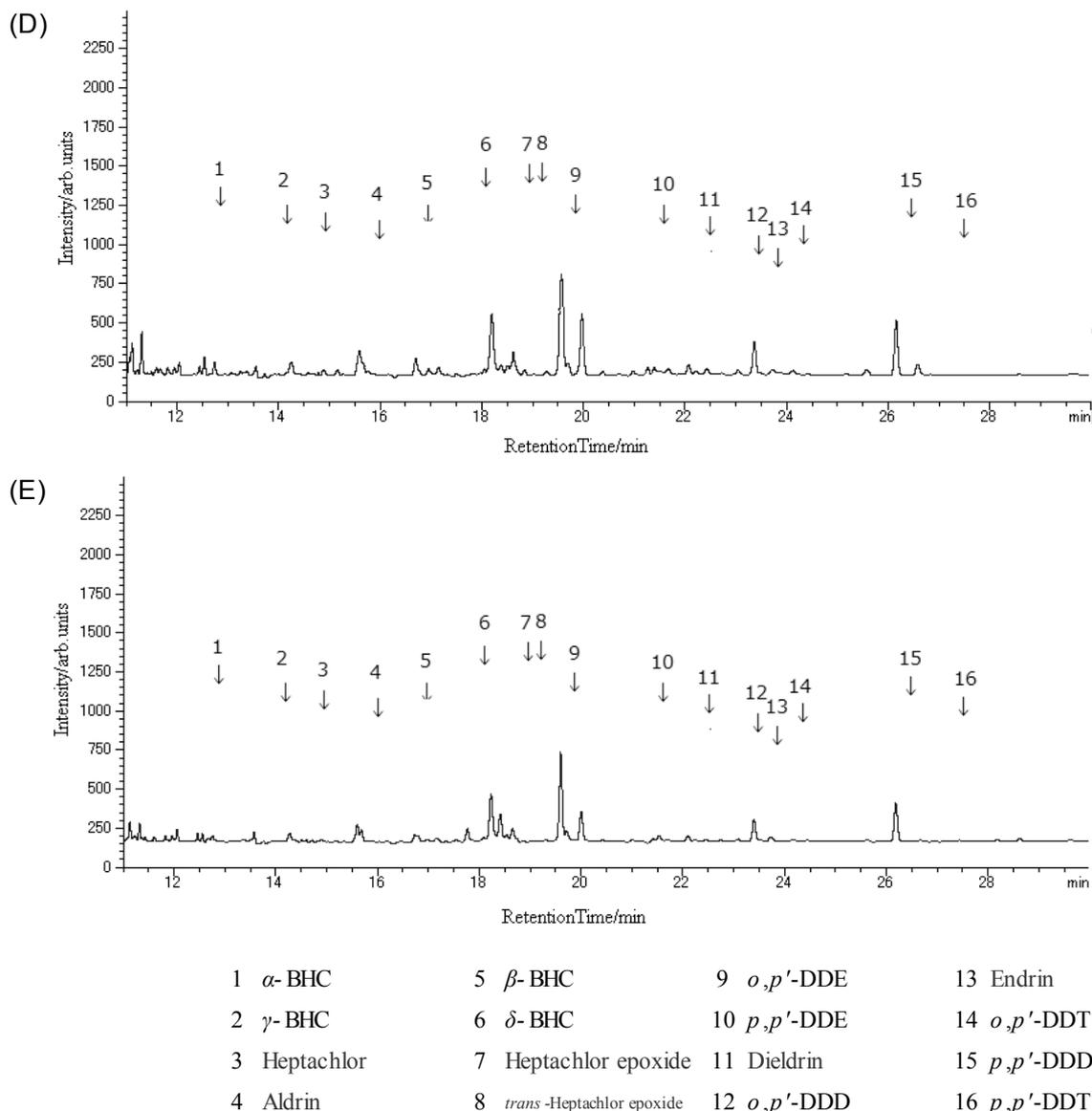


Fig. 2-2 Chromatograms regarding the effect of purification by several mini columns

(D) Sample solution of wet type pet food for dogs (purified with GC/NH₂ and Vac Florisil 2 g)

(E) Sample solution of wet type pet food for dogs (purified with GC/NH₂ and Vac Florisil 5 g)

3.6 妨害物質の検討

愛玩動物用飼料（犬用ウェット製品 8 種，猫用ウェット製品 9 種）を本法に従って分析を行い，妨害ピークの有無を確認した。

その結果，犬用ウェット製品の 4 種で *o,p'*-DDD の保持時間にピークが確認された。ピークが確認された試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計に供して，確認されたピークの定性を試みたが濃度が低く定性は不可能であった。しかし，これらのピークは全ての試料で *o,p'*-DDD の定量限界（下限）濃度に相当するピークの約 20 % 以下の高さであったことから，愛玩動物用飼料等の検査法¹⁾に係る妥当性確認における選択性の基準を満たしていた。その他の農薬の定量を妨害するピークは認められなかった。

3.7 添加回収試験

犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 2 種類に、DDT 類 6 種類（*o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDT）については各 20 µg/kg 相当量，その他の農薬については各 2 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法により 5 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，Table 11 のとおり，全ての農薬で愛玩動物用飼料等の検査法¹⁾に定める真度及び精度の基準を満たしていた。

なお，添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 11 Recoveries of pesticides from four kinds of wet type pet food

Name	Spike level (µg/kg)	for dog 1		for dog 2		for cat 1		for cat 2	
		Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}						
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>α</i> -BHC	2	86.8	3.9	80.8	4.8	91.4	3.0	87.1	2.9
<i>β</i> -BHC	2	88.3	4.0	91.3	3.6	94.7	4.8	88.3	3.9
<i>γ</i> -BHC	2	85.7	3.6	82.6	2.5	98.7	5.3	92.4	3.1
<i>δ</i> -BHC	2	91.0	4.1	91.5	3.7	94.3	6.2	92.5	3.9
<i>o,p'</i> -DDD	20	89.5	3.1	90.9	3.6	94.2	2.7	87.1	3.3
<i>p,p'</i> -DDD	20	89.8	2.1	93.6	3.5	96.8	2.2	89.1	3.2
<i>o,p'</i> -DDE	20	91.0	2.6	91.1	4.4	89.7	2.1	83.5	2.2
<i>p,p'</i> -DDE	20	94.4	3.3	94.6	4.0	89.1	3.3	81.6	2.8
<i>o,p'</i> -DDT	20	93.8	2.5	97.1	2.1	89.5	3.0	88.1	2.8
<i>p,p'</i> -DDT	20	93.7	2.8	94.9	3.5	95.5	3.4	95.5	3.2
Aldrin	2	78.1	7.6	71.7	5.6	84.9	5.9	75.4	3.9
Endrin	2	84.5	5.1	89.9	4.5	73.0	6.1	73.8	5.9
Dieldrin	2	86.1	4.3	83.6	5.6	79.9	5.9	74.2	4.1
Heptachlor	2	82.5	4.5	87.0	2.9	87.7	3.2	80.6	3.5
Heptachlor epoxide	2	90.6	3.2	88.1	1.6	93.8	5.0	77.3	4.5
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	2	88.6	3.6	85.9	1.8	95.8	3.2	84.1	4.0

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

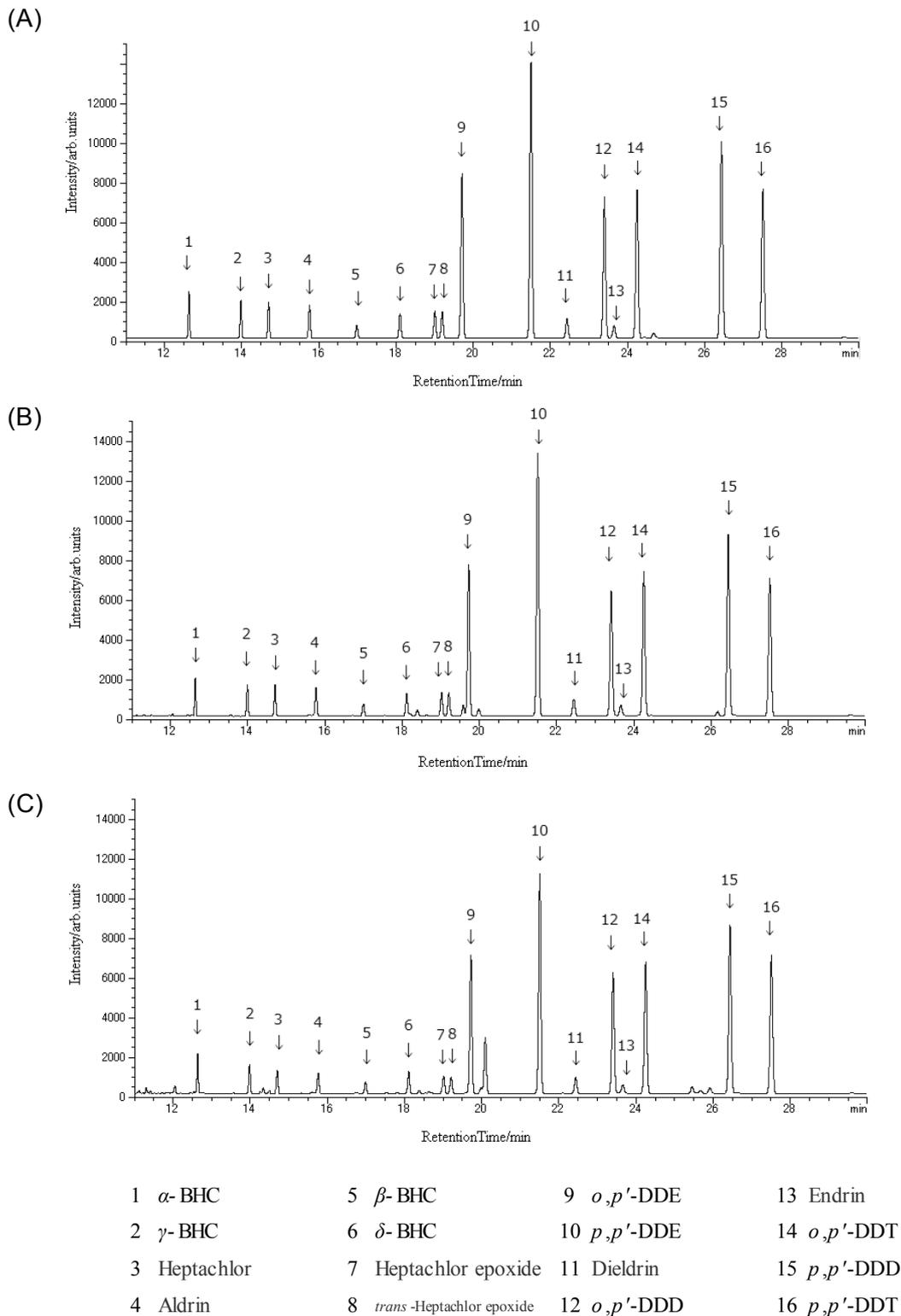


Fig. 3 Chromatograms of standard and sample solution in recovery test

(A) Mix standard solution (The amount were 0.2 ng for No.9,10,12,14,15 and 16 (6 kinds of DDTs) and 0.02 ng for other 10 pesticides.)

(B) Sample solution of wet dog food spiked 6 kinds of DDTs at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and other 10 pesticides at 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

(C) Sample solution of wet cat food spiked 6 kinds of DDTs at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and other 10 pesticides at 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

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、添加回収試験により得られるピークの *SN* 比、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、得られたピークの *SN* 比が 10 以上となる濃度は、最も低い *p,p'*-DDT で、1 µg/kg であり、*SN* 比が 3 以上となる濃度は 0.3 µg/kg であった。

確認のために、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品に各農薬としてそれぞれ 1 µg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は、Table 12 のとおりであり、愛玩動物用飼料等の検査法¹⁾に定める真度及び精度の基準を満たしていた。

以上の結果から、本法による定量下限は 1 µg/kg、検出下限は 0.3 µg/kg と推察された。

Table 12 Recoveries at the level of limit of quantitation from two kinds of wet type pet foods

Name	Spike level (µg/kg)	for dog		for cat	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
<i>α</i> -BHC	1	88.3	3.6	88.5	3.1
<i>β</i> -BHC	1	94.9	6.1	99.5	2.9
<i>γ</i> -BHC	1	90.9	5.0	88.6	4.2
<i>δ</i> -BHC	1	82.4	8.4	90.9	5.5
<i>o,p'</i> -DDD	1	106	12	95.4	9.8
<i>p,p'</i> -DDD	1	92.6	5.9	94.7	5.7
<i>o,p'</i> -DDE	1	98.4	3.9	95.4	1.5
<i>p,p'</i> -DDE	1	98.8	5.3	83.9	12
<i>o,p'</i> -DDT	1	97.1	1.4	97.5	1.0
<i>p,p'</i> -DDT	1	99.0	8.2	104	2.2
Aldrin	1	58.2	17	76.6	16
Endrin	1	91.4	10	81.9	7.2
Dieldrin	1	92.2	4.1	90.6	3.8
Heptachlor	1	96.5	6.4	71.6	11
Heptachlor epoxide	1	86.9	8.9	73.0	11
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	1	93.4	5.5	70.7	8.9

a) Mean (*n*=5)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.9 対象農薬ピーク定性確認の検討

本法により得られるクロマトグラムにおける各農薬の対象ピークは微少であることから、夾雑ピークが対象ピークの近傍に出現し定性又は定量が困難な場合がある。このような場合、特性の違うキャピラリーカラムを用いてこれらのピークの出現時間や分離状況を確認し、定性及び定量が可能か検討した。3.7 でガスクロマトグラフに供した犬用ウェット製品 1 種及び猫用ウェット製品 1 種の試料溶液を 5 %ジフェニル-95 %ジメチルポリシロキサンコーティング (Agilent Technologies 製 DB-5, 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm) カラムを装着したガスクロマトグラフに供してクロマトグラムを得た。なお、ガスクロマトグラフの測定条件は本法によった。

結果は Fig. 4 のとおりであり、近傍の夾雑ピークと対象ピークはカラムの特性により出現時間が変化し、各ピークは分離することが確認された。また、定量の結果は Table 13 のとおりであり良好な回収率が得られた。これらのことから、本法により各農薬が検出された場合、キャピラリーカラムを DB-5 に変更し、本法のガスクロマトグラフの測定条件により得られたクロマトグラムを用いることにより各農薬の定性及び定量が可能と考えられた。

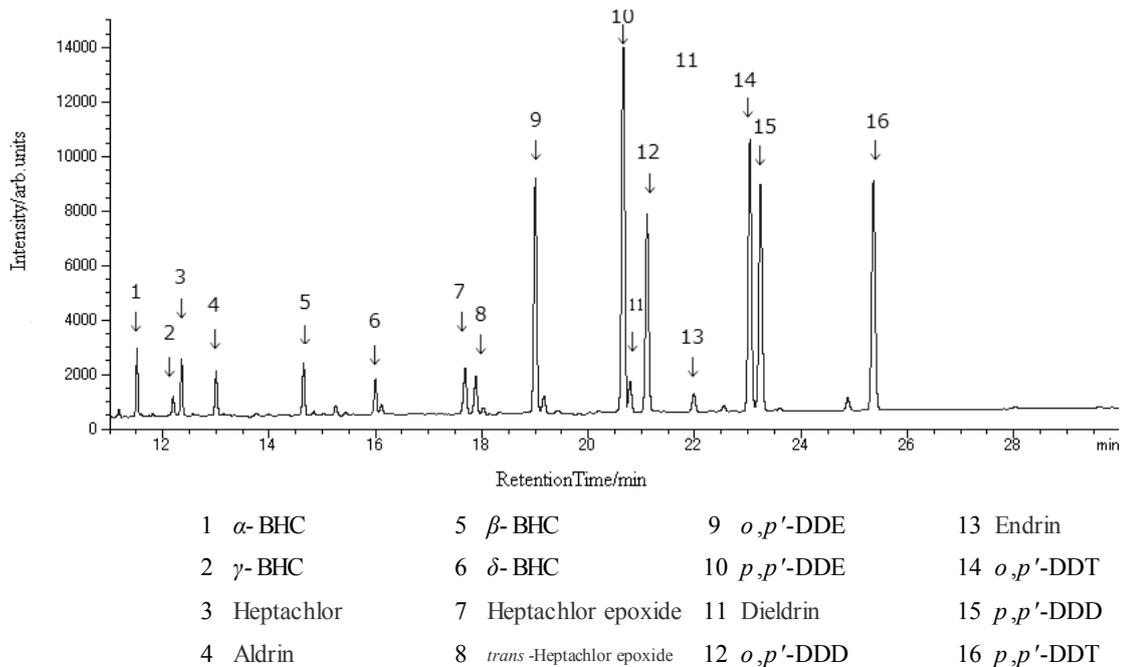


Fig. 4 Chromatogram of each pesticide used capillary column DB-5

Sample solution of wet dog food spiked 6 kinds of DDTs at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and other 10 pesticide at 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Table 13 Recoveries of pesticides from wet type pet food used capillary column DB-5

Name	Spike level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	for dog		for cat	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
α -BHC	2	86.8	2.3	85.4	6.2
β -BHC	2	97.5	4.4	99.1	3.9
γ -BHC	2	93.7	3.1	94.8	7.2
δ -BHC	2	97.2	6.0	95.7	6.7
<i>o,p'</i> -DDD	20	92.1	3.5	91.3	6.3
<i>p,p'</i> -DDD	20	109	2.7	111	4.3
<i>o,p'</i> -DDE	20	92.7	3.8	94.2	4.8
<i>p,p'</i> -DDE	20	92.5	3.6	93.0	5.0
<i>o,p'</i> -DDT	20	87.7	5.6	88.8	5.7
<i>p,p'</i> -DDT	20	118	4.4	116	4.4
Aldrin	2	70.1	1.5	85.2	5.4
Endrin	2	99.6	6.2	103	9.4
Dieldrin	2	94.8	5.6	99.2	4.1
Heptachlor	2	99.3	9.6	98.1	5.8
Heptachlor epoxide	2	102	8.3	95.6	5.7
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	2	90.0	7.2	86.3	3.2

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.10 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。成犬用ウェット製品 A、成犬用ウェット製品 B 及び成猫用ウェット製品 C を用いて、財団法人日本食品分析センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同名古屋センター、同神戸センター及び福岡センター（計 6 試験室）において本法に従って共同分析を実施した。各試験室において配布した試料に添加用標準液を一定量（添加濃度は不通知）添加し分析に供することとした。

BHC 類については Table 15 から 18 のとおりであり、ウェット製品中の基準値及び定量限界値相当量を添加した。 α -BHC の平均回収率が BHC 類の他の物質と比較して低い傾向にあったが、BHC 類 4 物質ともに室内及び室間再現精度は良好であり、結果は愛玩動物用飼料等の検査法第 9 章に定める回収率及び精度の目標値³⁾を満たした。

DDT 類については Table 19 から 24 のとおりであり、ウェット製品中の基準値、定量限界値及び定量限界値の 2 倍相当量を添加した。犬用ウェット製品で平均回収率が 97.0 ~ 110 % であり過回収となる傾向が確認されたが、得られた結果は DDT 類の全物質で目標とする回収率及び精度を満たした。

ドリリン類については Table 25 から 27 のとおりであり、ウェット製品中の基準値及び定量限界値相当量を添加した。アルドリンの回収率が成犬用ウェット製品 A において特に低く、最も低い測定値では回収率が 48.5 % であった。共同試験に用いた試料成犬用ウェット製品 A は、検討の中で添加回収試験に用いた試料「成犬用 2」と同一銘柄品（製造ロット及び試料調整日は別）

であるが、添加回収試験においても低回収率の傾向が確認されている。これら低回収率の原因は、検討の中で成犬用 2 の試料中に含まれる成分によって液液分配操作において損失が生じているものと考えられたが、共同試験に用いた成犬用ウェット製品 A ではその傾向が顕著であったと考えられた。エンドリン及びディルドリンにおいて結果は良好であり、アルドリンの回収率は低い結果ではあるものの目標とする回収率及び精度を満たした。

ヘプタクロル類については Table 28 から 30 のとおりであり、ウェット製品中のおおよその基準値、定量限界値相当量及び定量限界値の 2 倍相当量を添加した。ヘプタクロル類の全物質ともに室内及び室間再現精度は良好であり、目標とする回収率及び精度を満たした。

参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフの機種等を Table 14 に示した。

Table 14 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instrument	GC column (i.d.×length,Filmthickness)
1	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)
2	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)
3	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)
4	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)
5	SHIMADZU GC-17A ^{a)} Agilent Technologies 6890N ^{b)}	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)
6	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 µm)

a) It was used to study of sample dogs B .

b) It was used to study of sample dogs A and cats C .

Table 15 Results of collaborative study (α -BHC)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.39	1.49	0.703	0.700	1.41	1.33
2	1.35	1.52	0.664	0.626	1.68	1.50
3	1.30	1.23	0.647	0.664	1.21	1.25
4	1.44	1.44	0.715	0.676	1.52	1.55
5	1.34	1.51	0.709	0.691	1.42	1.29
6	1.83	1.78	0.870	0.890	1.59	1.71
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.47		0.713		1.45	
Recovery ^{a)} (%)	73.4		71.3		72.7	
RSD _r ^{b)} (%)	5.4		2.6		5.4	
RSD _R ^{c)} (%)	13		12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.58		0.55		0.53	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 16 Results of collaborative study (β -BHC)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.66	1.67	0.929	0.871	1.67	1.59
2	1.88	1.96	1.02	1.02	2.01	2.03
3	1.98	1.96	1.03	0.929	2.03	1.99
4	1.91	1.88	0.982	0.931	1.89	1.82
5	1.72	1.87	1.09	1.00	1.93	1.85
6	2.12	2.14	1.14	1.16	2.00	2.07
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.90		1.01		1.91	
Recovery ^{a)} (%)	94.8		101		95.4	
RSD _r ^{b)} (%)	2.7		4.4		2.4	
RSD _R ^{c)} (%)	8.5		9.1		8.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.39		0.41		0.38	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 17 Results of collaborative study (γ -BHC)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.47	1.58	0.828	0.792	1.53	1.48
2	1.46	1.55	0.746	0.709	1.80	1.64
3	1.57	1.52	0.803	0.772	1.50	1.54
4	1.51	1.48	0.828	0.786	1.65	1.66
5	1.47	1.64	0.848	0.771	1.66	1.51
6	1.98	1.91	0.960	0.960	1.78	1.84
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.60		0.817		1.63	
Recovery ^{a)} (%)	79.8		81.7		81.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.3		3.8		4.2	
RSD _R ^{c)} (%)	11		9.8		7.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.51		0.44		0.36	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 18 Results of collaborative study (δ -BHC)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.47	1.55	0.660	0.624	1.47	1.33
2	1.62	1.65	0.794	0.710	1.95	1.85
3	1.75	1.75	0.941	0.894	1.61	1.60
4	1.78	1.72	0.811	0.791	1.72	1.69
5	1.53	1.62	0.710	0.683	1.57	1.51
6	1.83	1.84	0.980	0.980	1.83	1.91
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.68		0.798		1.67	
Recovery ^{a)} (%)	83.8		79.8		83.5	
RSD _r ^{b)} (%)	2.4		3.9		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	7.5		16		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.34		0.75		0.54	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 19 Results of collaborative study (*o,p'*-DDD)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		dogs B ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		cats C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	19.0	18.3	1.05	0.955	1.75	1.58
2	21.5	21.2	1.11	1.16	2.02	2.00
3	22.5	22.7	1.14	0.951	1.99	2.21
4	19.2	19.5	1.11	1.10	1.97	1.99
5	18.9	21.3	1.10	1.14	1.98	1.93
6	21.4	21.7	1.17	1.16	1.95	2.18
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.6		1.10		1.96	
Recovery ^{a)} (%)	103		110		98.1	
RSD _r ^{b)} (%)	3.6		5.8		5.3	
RSD _R ^{c)} (%)	7.7		6.9		8.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.35		0.31		0.40	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 20 Results of collaborative study (*p,p'*-DDD)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		dogs B ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		cats C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	19.5	18.2	1.02	0.866	1.71	1.55
2	21.4	21.7	0.830	0.908	1.96	1.85
3	22.2	22.6	1.16	1.04	1.90	2.12
4	19.6	19.3	0.981	0.991	1.93	1.98
5	18.2	19.8	1.10	1.14	2.08	2.02
6	21.3	20.6	1.08	1.12	1.97	2.06
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.4		1.02		1.93	
Recovery ^{a)} (%)	102		102		96.4	
RSD _r ^{b)} (%)	3.2		6.1		4.8	
RSD _R ^{c)} (%)	7.6		11		8.7	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.34		0.50		0.40	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 21 Results of collaborative study (*o,p'*-DDE)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	18.0	17.9	0.983	0.899	1.64	1.54
2	20.4	20.3	0.957	0.922	2.00	1.86
3	22.0	21.5	1.07	0.902	1.81	2.01
4	16.8	17.6	0.914	0.851	1.72	1.73
5	18.1	19.8	1.05	1.01	2.00	1.91
6	20.1	20.2	1.17	1.17	1.82	1.87
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	19.4		0.991		1.83	
Recovery ^{a)} (%)	97.0		99.1		91.3	
RSD _r ^{b)} (%)	2.9		5.9		4.5	
RSD _R ^{c)} (%)	8.9		11		8.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.40		0.50		0.38	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 22 Results of collaborative study (*p,p'*-DDE)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	18.9	18.4	1.07	0.935	1.76	1.68
2	19.7	20.9	0.849	0.808	1.94	1.86
3	21.5	21.7	1.11	0.949	1.73	1.97
4	17.4	17.7	1.06	1.04	1.88	1.92
5	17.4	19.5	1.09	1.08	2.04	1.93
6	20.1	20.7	1.14	1.17	1.97	2.06
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	19.5		1.03		1.89	
Recovery ^{a)} (%)	97.5		103		94.7	
RSD _r ^{b)} (%)	3.8		6.2		4.7	
RSD _R ^{c)} (%)	8.2		12		6.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.37		0.53		0.29	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 23 Results of collaborative study (*o,p'*-DDT)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A ($\mu\text{g/kg}$)		dogs B ($\mu\text{g/kg}$)		cats C ($\mu\text{g/kg}$)	
1	19.0	17.5	1.19	1.05	1.94	1.78
2	20.5	20.9	0.840	0.849	1.89	1.84
3	23.0	23.3	1.20	1.02	1.99	2.27
4	17.7	17.9	0.833	0.871	1.76	1.74
5	17.8	19.6	1.00	1.05	2.11	2.16
6	21.2	20.2	1.18	1.17	1.96	2.06
Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g/kg}$)	19.9		1.02		1.96	
Recovery ^{a)} (%)	99.4		102		97.9	
RSD _r ^{b)} (%)	3.8		6.7		5.1	
RSD _R ^{c)} (%)	11		15		8.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.48		0.67		0.40	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 24 Results of collaborative study (*p,p'*-DDT)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A ($\mu\text{g/kg}$)		dogs B ($\mu\text{g/kg}$)		cats C ($\mu\text{g/kg}$)	
1	19.8	18.2	0.954	0.896	1.69	1.67
2	20.5	20.5	0.709	0.696	1.86	1.69
3	22.8	23.9	1.27	1.16	2.03	2.39
4	17.9	18.7	1.00	1.02	1.75	1.81
5	17.1	18.7	1.00	1.04	2.11	2.25
6	21.6	20.4	1.19	1.18	2.02	2.19
Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	20		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g/kg}$)	20.0		1.01		1.96	
Recovery ^{a)} (%)	100		101		97.8	
RSD _r ^{b)} (%)	4.2		3.8		6.8	
RSD _R ^{c)} (%)	11		19		13	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.48		0.85		0.59	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 25 Results of collaborative study (Aldrin)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.22	1.25	0.839	0.791	1.49	1.41
2	1.16	1.28	0.724	0.670	1.67	1.54
3	1.25	1.22	0.656	0.671	1.24	1.26
4	1.35	1.35	0.793	0.738	1.57	1.55
5	0.970	1.24	0.856	0.881	1.60	1.45
6	1.37	1.28	0.880	0.870	1.62	1.62
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.25		0.781		1.50	
Recovery ^{a)} (%)	62.3		78.1		75.1	
RSD _r ^{b)} (%)	7.2		3.5		4.2	
RSD _R ^{c)} (%)	8.7		12		9.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.39		0.53		0.43	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 26 Results of collaborative study (Endrin)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.97	1.80	1.25	1.08	1.91	1.77
2	1.75	1.80	0.998	0.882	2.10	2.04
3	2.18	2.22	1.18	1.02	1.93	1.94
4	1.98	1.87	1.06	1.08	1.98	2.00
5	1.82	1.93	1.27	1.17	2.05	2.13
6	2.34	2.35	1.06	1.10	2.09	2.14
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.00		1.10		2.01	
Recovery ^{a)} (%)	100		110		100	
RSD _r ^{b)} (%)	3.5		7.5		2.6	
RSD _R ^{c)} (%)	11		10		5.6	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.51		0.46		0.25	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 27 Results of collaborative study (Dieldrin)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.66	1.62	0.978	0.920	1.75	1.62
2	1.65	1.69	0.834	0.790	1.86	1.85
3	2.08	2.12	1.13	0.995	1.91	1.88
4	1.90	1.87	0.992	1.01	1.91	1.94
5	1.75	2.03	1.12	1.12	2.05	1.98
6	2.20	2.16	1.00	1.05	2.04	2.16
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.89		0.995		1.91	
Recovery ^{a)} (%)	94.7		99.5		95.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.5		4.7		3.0	
RSD _R ^{c)} (%)	12		11		7.7	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.54		0.51		0.35	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 28 Results of collaborative study (Heptachlor)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.70	1.70	0.981	0.885	1.65	1.54
2	1.42	1.54	0.756	0.710	1.70	1.62
3	2.04	1.95	0.828	0.820	1.59	1.61
4	1.71	1.74	0.880	0.818	1.74	1.79
5	1.66	1.82	1.05	1.03	1.79	1.79
6	1.93	1.93	1.00	1.02	1.79	1.87
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2		1		2	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.76		0.898		1.71	
Recovery ^{a)} (%)	88.1		89.8		85.3	
RSD _r ^{b)} (%)	3.6		4.1		2.8	
RSD _R ^{c)} (%)	11		13		6.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.49		0.61		0.28	

a) $n = 12$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 29 Results of collaborative study (Heptachlor epoxide)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	(μg/kg)		(μg/kg)		(μg/kg)	
1	1.66	1.67	0.894	0.836	1.63	1.56
2	1.75	1.81	0.825	0.811	1.98	1.81
3	2.01	1.97	1.00	0.887	1.77	1.79
4	1.81	1.84	0.941	0.945	1.86	1.88
5	1.52	1.66	1.15	1.11	1.39	1.32
6	1.89	1.86	1.06	1.14	1.72	1.75
Spiked level (μg/kg)	2		1		2	
Mean value ^{a)} (μg/kg)	1.79		0.967		1.70	
Recovery ^{a)} (%)	89.4		96.7		85.2	
RSD _r ^{b)} (%)	2.6		4.8		3.4	
RSD _R ^{c)} (%)	8.3		13		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.38		0.61		0.55	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 30 Results of collaborative study (*trans*-Heptachlor epoxide)

Laboratory No.	Pet food types (wet type for)					
	dogs A		dogs B		cats C	
	(μg/kg)		(μg/kg)		(μg/kg)	
1	1.68	1.66	0.914	0.850	1.65	1.57
2	1.71	1.74	0.815	0.834	1.97	1.85
3	2.00	2.00	1.06	0.913	1.82	1.84
4	1.79	1.76	0.937	0.909	1.81	1.91
5	1.69	1.78	1.17	1.14	1.88	1.83
6	1.92	2.00	1.11	1.17	1.57	1.65
Spiked level (μg/kg)	2		1		2	
Mean value ^{a)} (μg/kg)	1.81		0.985		1.78	
Recovery ^{a)} (%)	90.5		98.5		88.9	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		5.1		3.2	
RSD _R ^{c)} (%)	7.6		14		7.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.35		0.65		0.36	

- a) $n = 12$
 b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
 c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
 d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

4 まとめ

愛玩動物用飼料中の 16 種類の有機塩素系農薬 (BHC 類 4 種類 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC 及び δ -BHC), DDT 類 6 種類 (o,p' -DDD, p,p' -DDD, o,p' -DDE, p,p' -DDE, o,p' -DDT 及び p,p' -DDT)), ドリン類 3 種類 (アルドリン, エンドリン及びディルドリン) 及びヘプタクロル類 3 種類 (ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド及び *trans*-ヘプタクロルエポキシド) について, ドライ製品法を基にガスクロマトグラフによる同時定量法を検討し, 愛玩動物用飼料等の検査法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) 検討した全ての農薬の検量線は 0.005~0.5 ng 相当量 (注入量として 0.005~0.5 ng) の範囲で直線性を示した.
- 2) ウェット製品の抽出液は, 抽出液を 50 mL 以下に濃縮した後, ヘキサン-酢酸エチル (1+1) を加えて液々分配することにより水分及び水溶性夾雑物が除去され, 濃縮乾固操作時の突沸とエマルジョンの発生を防止できた.
- 3) 多孔性ケイソウ土カラムでは, ヘキサン 100 mL で全ての農薬が溶出した.
- 4) ゲル浸透クロマトグラフでは溶出画分 75~100 mL で全ての農薬が溶出した.
- 5) ミニカラムによる精製にグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) 及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (5 g) を用いることにより十分な精製効果が得られた.
- 6) 試験法の妥当性を確認するため犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 2 種類に DDT 類 6 種類については各 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量, その他の農薬 10 種類については各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した場合及び犬用ウェット製品 1 種類及び猫用ウェット製品 1 種類に全ての農薬を各 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加した場合の添加回収試験を実施した結果, いずれの場合でも全ての農薬で愛玩動物用飼料等の検査法に定める真度及び精度を満たしていた.
- 7) 本法による定量下限は各農薬ともに, 試料 (原物) 中で 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 検出下限は 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった.
- 8) 夾雑ピークにより定性又は定量が困難な場合, ガスクロマトグラフのキャピラリーカラムを DB-5 に変更し, 本法の測定条件により測定することにより定性及び定量が可能と考えられた.
- 9) 本法の再現精度を確認するため犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 1 種類を用いて 6 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, BHC 類 4 種類については, 各試料に試料 (原物) 中で 1~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加したところ, 平均回収率は 71.3~101 %, その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 5.4 % 及び 16 % 以下であり, HorRat は 0.34~0.75 であった. DDT 類 6 種類については, 各試料に試料 (原物) 中で 1~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加したところ, 平均回収率は 91.3~110 %, その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 6.8 % 及び 19 % 以下であり, HorRat は 0.29~0.85 であった. ドリン類 3 種類 (アルドリン, エンドリン及びディルドリン) については, 各試料に試料 (原物) 中で 1~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加したところ, 平均回収率は 62.3~110 %, その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 7.5 % 及び 12 % 以下であり, HorRat は 0.25~0.54 であった. ヘプタクロル類 3 種類 (ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド及び *trans*-ヘプタクロルエポキシド) については, 各試料に試料 (原物) 中で 1~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加したところ, 平均回収率は 85.3~98.5 %, その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 5.1 % 及び 14 % 以下であり, HorRat は 0.28~0.65 であった.

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，平成 23 年 9 月 1 日，農林水産省令・環境省令第 3 号 (2011).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 社団法人日本植物防疫協会，農薬ハンドブック 2005 年度版編集委員会編集：農薬ハンドブック 2005 年度版
- 6) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 22 年度愛玩動物用飼料安全確保調査等委託事業報告書，(2009).
- 7) 農薬残留分析法研究班（武田 明治，小田中 芳次，小松 一裕，前川 吉明）編：最新 農薬の残留分析法 [改訂版]，中央法規出版，946-947 (2006).

7 愛玩動物用飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

山多 利秋^{*1}, 吉村 哲史^{*2}

Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Pet Foods by LC-MS/MS

Toshiaki YAMATA^{*1} and Satoshi YOSHIMURA^{*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 was developed to determine levels of glyphosate, glufosinate and their metabolites in pet food using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Pet foods were spiked with glyphosate-¹³C₂, ¹⁵N. Glyphosate (GLYP), (aminomethyl) phosphonic acid (AMPA), glufosinate (GLUF) and 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) were extracted with water. The extract was purified with two types of solid phase extraction mini columns (Oasis HLB and MCX from Waters; Milford, MA, U.S.). Then the compounds were derivatized with trimethyl orthoacetate. The sample solution was further purified with two other types of SPE mini columns (Sep-pak Plus NH₂ and Silica from Waters) and injected into the LC-MS/MS. The LC separation was carried out on ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using 0.01 v/v% formic acid solution-acetonitrile (93:7 v/v) as a mobile phase. In MS/MS, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used. The determined value of GLYP was corrected with the recovery rate of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N.

Spike tests were conducted on pet food. Dry dog food, dry cat food and semi-dry dog food were spiked with 1 or 15 mg/kg of GLYP, AMPA, GLUF and MPPA. Wet dog and cat food were spiked with the same compounds at 0.5 or 2.5 mg/kg and 0.5 or 3.5 mg/kg, respectively. Recoveries ranged from: 88.2 % to 102 % for GLYP, 56.1 % to 110 % for AMPA, 88.3 % to 102 % for GLUF and 81.9 % to 98.2 % for MPPA. The relative standard deviations of repeatability were not more than: 8.9 % for GLYP, 22 % for AMPA, 10 % for GLUF and 11 % for MPPA, respectively.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using pet food spiked with GLYP, AMPA, GLUF and MPPA in the following quantities: dry dog food: 2 mg/kg of GLYP or AMPA or 5 mg/kg of GLUF or MPPA; dry cat food 15 mg/kg of GLYP or AMPA or 2 mg/kg of GLUF or MPPA; semi-dry dog food: 7 mg/kg of GLYP or AMPA or 2 mg/kg; of GLUF or MPPA; wet dog food: 1 mg/kg of GLYP or AMPA or 2.5 mg/kg and wet cat food: 3.5 of GLYP or AMPA mg/kg or 1 mg/kg of GLUF or MPPA, respectively.

^{*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 肥飼料安全検査部

^{*2} 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

The range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations and Horwitz ratio (HorRat) for each compound is reported as follows: GLYP:90.6 to 99.8 % with not more than 7.0 %, 8.7 % and 0.65; AMPA: 73.4 to 92.1 % with not more than 20 %, 24 % and 2.0; GLUF: 93.2 to 112 %, with not more than 15 %, 23 % and 1.6; and MPPA: 90.3 to 98.3 % with not more than 7.8 %, 11 % and 0.83, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for GLYP, GLUF and MPPA.

Key words: pet food ; glyphosate ; glufosinate ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; glyphosate-¹³C₂, ¹⁵N

キーワード：ペットフード；グリホサート；グルホシネート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；安定同位体標識グリホサート

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という。）は、モンサント社（米国）が開発した非選択性茎葉処理型除草剤である。我が国では愛玩動物用飼料（犬用及び猫用）の成分規格として、15 µg/g の基準値が設定されている¹⁾が、その定量法は確立されておらず、開発が急務となっている。

愛玩動物用飼料中の GLYP の定量法を検討するに当たり、畜産用飼料の定量法を参考とした。飼料分析基準²⁾には、ガスクロマトグラフによる系統的定量法（以下「飼料分析基準収載法」という。）がある。しかしながら、操作が煩雑であるなどの理由から、財団法人日本食品分析センターが「平成 20 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、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。）を用いた比較的簡便な定量法（以下「食品分析センター法」という。）を開発した³⁾ところであり、この食品分析センター法を検討の基礎とした。

また、飼料分析基準収載法及び食品分析センター法が定量の対象としているグルホシネート（以下「GLUF」という。）及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という。）への適用についても同時に検討した。GLUF は、ヘキスト社（ドイツ）が開発した非選択性茎葉処理型除草剤であり、MPPA はその主要代謝物である。我が国では、畜産用飼料については、MPPA を含めた量として GLUF の基準値が設定されているが、愛玩動物用飼料については基準値がない。

一方、GLYP の主要代謝物であるアミノメチルホスホン酸（以下「AMPA」という。）は、残留基準に係る GLYP の定義には含まれないが、コーデックス委員会、EU 等が定める摂取量評価等に係る定義では GLYP 及び AMPA を GLYP に換算した量の総和をとることとなっている^{4, 5)}。このため、本法の AMPA への適用可能性についても確認した。

検討の結果、食品分析センター法の一部を改良することで愛玩動物用飼料中の GLYP、GLUF 及び MPPA の定量が可能であったので、その概要を報告する。

参考に GLYP、AMPA、GLUF 及び MPPA の構造式等を Fig. 1 に示した。

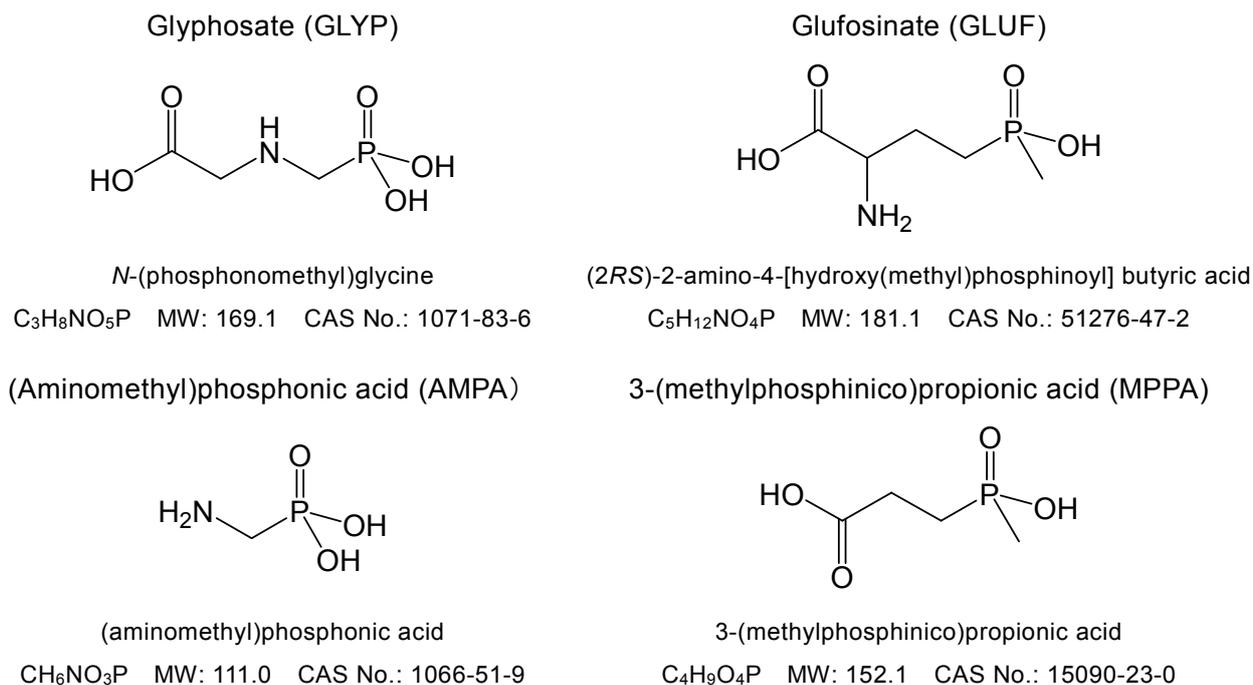


Fig. 1 Chemical structures of glyphosate, (aminomethyl)phosphonic acid, glufosinate and 3-(methylphosphinico)propionic acid

2 実験方法

2.1 試料

- 1) ドライ製品及びセミドライ製品 市販の愛玩動物用飼料を 1 mm のスクリーンを装着した遠心粉碎機で粉碎したものをを用いた。
- 2) ウェット製品 市販の愛玩動物用飼料をフードプロセッサーでペースト状にしたものをを用いた。

用いた試料の原材料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Examples of ingredients of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Complete and balanced dry type for adult dogs	Grains (maize, rice, wheat flour, unpolished rice, etc.), meat (chicken, etc.), plant protein, oils and fats (palm oil, soybean oil, sunflower oil, etc.), alimentary fiber (beet pulp), dehydrated protein, soybean, xylose, vegetables (carrot, tomato), green tea extracts, sodium tripolyphosphate, powdered milk, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, choline, niacin, panthothenate, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (glycine, methionine, cysteine), preservative (potassium sorbate), colorant (caramel), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), pH adjuster
Complete and balanced dry type for kitten or cats in pregnancy and lactation	Grains (corn gluten meal, wheat, cereal bran, etc.), meat (poultry by-product meal, beef by-product meal, lamb by-product meal, etc.), oils and fats (beef tallow, etc.), beans (soybean meal, etc.), dehydrated protein, fish (fish meal), tubers (potato), dairy products (powdered cheese, powdered milk), vegetables (vegetable meal), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se, Co), vitamins (A, D, E, B ₁ , B ₂ , panthothenate, niacin, B ₆ , folic acid, B ₁₂ , choline), amino acids (taurine, methionine), colorant (food red no.2, food red no.102, food blue no.1, food yellow no.4, food yellow no.5)
Complete and balanced semi-dry type for adult dogs	Grains (maize, wheat flour, etc.), saccharides (glucose-fructose syrup, sucrose) meat (poultry by-product meal, beef by-product meal, powdered white chicken meat, etc.), animal fat, beans (defatted soybean, powdered soybean, etc.), fish (fish meal, dried small fish), brewer's yeast, powdered cellulose, vegetables (powdered spinach, powdered carrot, powdered pumpkin, etc.), powdered cheese, propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), malic acid, colorant (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, panthothenate), antioxidants (mixed tocopherol, herb extracts)
Complete and balanced wet type for adult dogs	Meat (chicken, etc.), rice, carrot, maize, plant protein, alimentary fiber, vitamins (B ₁₂ , D, E, choline, panthothenate, folic acid), minerals (Ca, Cl, K, Na, S, Zn), glycine, polysaccharide thickener, pH adjuster, colorant (ferric oxide, titanium dioxide), coloring agent (sodium nitrite)
Complete and balanced wet type for adult cats	Pork, beef, wheat gluten, chicken, sardine, powdered soybean, soybean protein, glucose, minerals, vitamins, amino acids, thickening stabilizer (processed starch), colorant (ferric oxide, caramel)

2.2 試薬

1) グリホサート標準原液

グリホサート標準品（和光純薬工業製，純度 99.3 %）0.1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えてグリホサート標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP として 1 mg を含有する（ $f=0.994$ ））。

2) アミノメチルホスホン酸標準原液

アミノメチルホスホン酸標準品（和光純薬工業製，純度 100.1 %）0.1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えてアミノメチルホスホン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，AMPA として 1 mg を含有する（ $f=0.988$ ））。

3) グルホシネート標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 94.5 %) 0.05 g を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えてグルホシネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLUF として 1 mg を含有する ($f=0.895$) .) .

4) 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液

3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.7 %) 0.1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液を調製した (この液 1 mL は, MPPA として 1 mg を含有する ($f=1.00$) .) .

5) 安定同位体元素標識グリホサート標準原液及び内標準液

グリホサート- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ (以下「GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ 」という.) 標準品 (Medical Isotopes 製, $^{13}\text{C}_2$ 純度 98 %, ^{15}N 純度 98 %) 3 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えて安定同位体元素標識グリホサート標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ として 0.1 mg を含有する ($f=1.15$) .) .

更に, 標準原液の一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中に GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ として 10 μg を含有する内標準液を調製した.

6) 農薬混合標準原液

グリホサート標準原液, グルホシネート標準原液, アミノメチルホスホン酸標準原液及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液の一定量を混合し, 更に水で正確に希釈し, 1 mL 中に GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA としてそれぞれ 100 μg を含有する農薬混合標準原液を調製した.

7) 0.01 v/v%ギ酸溶液

ギ酸 (試薬特級. 98.0 %以上のもの) 1 mL に水を加えて 1 L とし, 更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした.

8) 水及びアセトニトリルは, 液体クロマトグラフ用を用いた. アセトン及び酢酸エチルは, 残留農薬・PCB 試験用を用いた. 酢酸は, 試薬特級を用いた. オルト酢酸トリメチルは, 東京化成工業製 (純度 98.0 %以上) のものを用いた.

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計:

LC 部: Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 部: Waters 製 ACQUITY TQ Detector

2) 振とう機: 宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV

3) 遠心分離器: 久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200 (真空コントローラ V-800 付き)

5) 恒温乾燥機: いすゞ製作所製 SNH-215S (自然対流型)

6) 吸引マニホールド: Waters 製 Extraction manifold

7) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) : Waters 製 Oasis[®] HLB カートリッジ (リザーバー容量 6 mL)

8) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) :

Waters 製 Oasis[®] Plus MCX カートリッジ

- 9) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) : Waters 製 Sep-Pak[®] Plus NH₂ カートリッジにリザーバー (10 mL) を連結したもの
- 10) シリカゲルミニカラム (690 mg) : Waters 製 Sep-Pak[®] Plus Silica カートリッジ

2.4 定量方法

1) 抽出

- i) ドライ製品及びセミドライ製品 分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、内標準液 0.5 mL を正確に加えた。水 200 mL を加え、60 °C で 2 時間静置後、30 分間振り混ぜて抽出した。

抽出液の一定量を 1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

- ii) ウェット製品 分析試料 10.0 g を量って 100 mL の遠心沈殿管に入れ、内標準液 0.25 mL を正確に加えた。更に水 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。

遠心沈殿管内の残さに水 40 mL を加え、更に 30 分間振り混ぜて抽出した後、1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加えた。更にこの操作を同様に 1 回繰り返した。

全量フラスコの標線まで水を加え、この液の一定量を 5,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を水で正確に 2.5 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) の下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) を連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。) 。

50 mL のなす形フラスコを連結カラムの下に置き、ドライ製品及びセミドライ製品では試料溶液 1 mL、ウェット製品では試料溶液 2 mL をカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に水 18 mL をカラムに加え、全量を流出させた。

流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化

試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸エチル 4 mL を正確に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。

4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。) 。

試料溶液 2 mL を連結カラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。

更に酢酸エチル 18 mL をカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して GLYP 誘導体、AMPA 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。

次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加えて MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。

溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v%ギ酸溶液 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

5) 標準液の誘導体化

農薬混合標準原液 1 mL 及び内標準液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

0.01 v/v%ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA としてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75 及び 100 ng 相当量並びに GLYP-¹³C₂, ¹⁵N として 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 及び 10 ng 相当量を含む各標準液を調製した。

6) 液体クロマトグラフタンデム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タンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2-1 及び 2-2 に示した。

Table 2-1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (93:7) (12 min) → 3 min → (5:95) (10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Ion source	120 °C
Capillary voltage	3 kV

Table 2-2 MS/MS parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
GLYP derivative	254	102	152	22	17
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N derivative	257	105	154	22	17
AMPA derivative	182	111	140	20	12
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

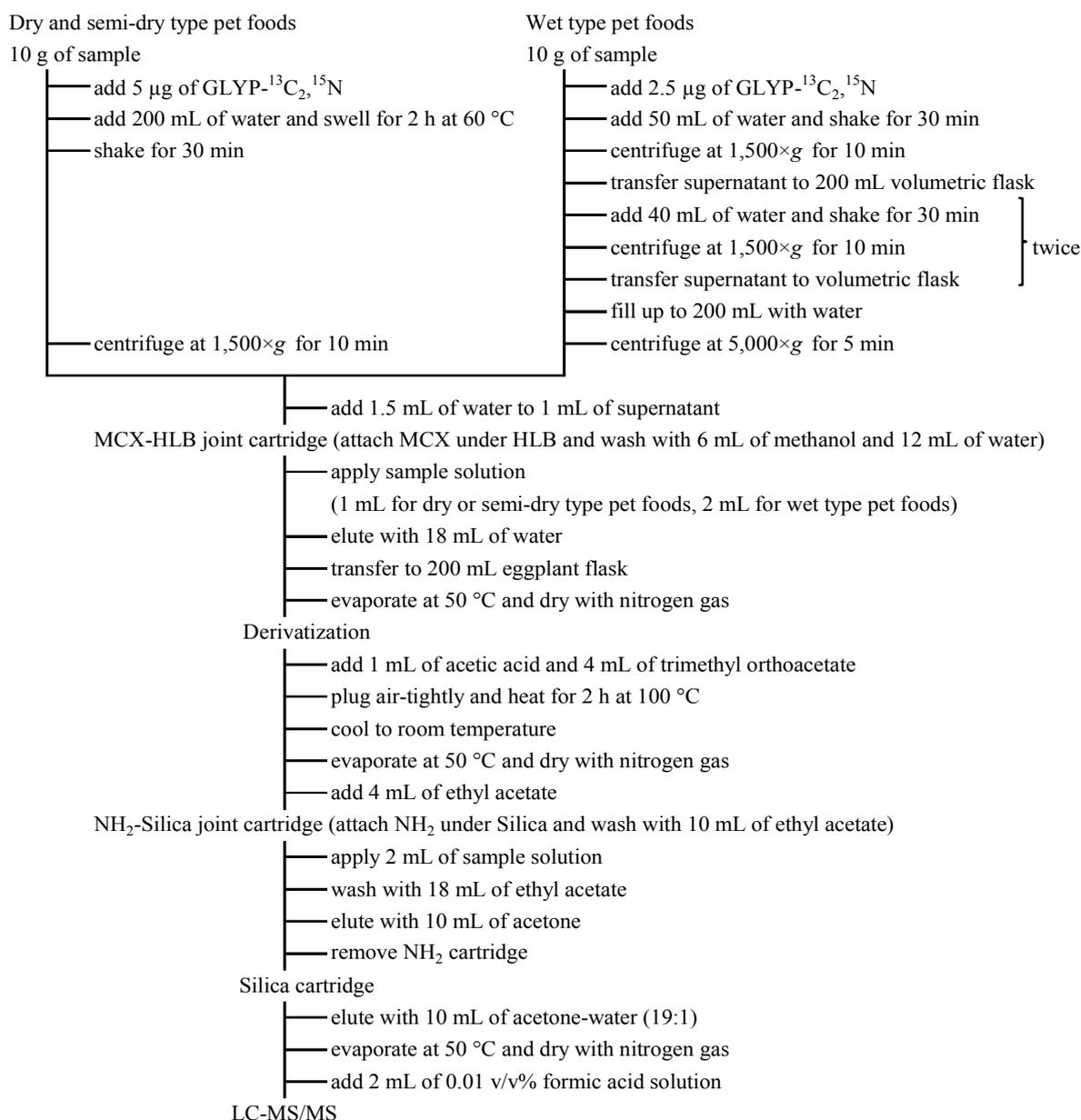
7) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから GLYP 誘導体, GLUF 誘導体, AMPA 誘導体, MPPA 誘導体及び GLYP-¹³C₂, ¹⁵N 誘導体のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料中の GLYP 量, GLUF 量, AMPA 量, MPPA 量及び試料溶液中の GLYP-¹³C₂, ¹⁵N 誘導体濃度を算出した.

更に下式により, GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率で補正した試料中の GLYP 量を求めた.

$$\text{試料中の GLYP 量の補正值} = \text{試料中の GLYP 量} \times 2.5 \div \text{試料溶液中の GLYP-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N 濃度 (ng/mL)}$$

定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF and their metabolites in pet foods

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

食品分析センター法の液体クロマトグラフ条件は、0.01 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル(93+7)によるイソクラティック溶出であるが、試料溶液には夾雑成分が多く含まれていた(後述)ことから、念のため、測定対象物質の溶出後にグラジエント溶出でカラムを洗浄することとした。

また、質量分析条件については、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを当試験室で使用した機種に最適化し、更に、確認イオンの一部を変更した。

3.2 食品分析センター法の適用

予備的に幼猫用ドライ製品に GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用い, 食品分析センター法に従って 3 点併行分析を行った. その結果, Table 3 のとおり, GLYP の回収率が低く, またばらつきも大きかった.

Table 3 Recovery test conducted by JFRL method

Analyte	Timing of spike	One night before analysis		Just before analysis	
	Spike level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)
GLUF	1	99.7	2.3	105	7.3
MPPA	1	89.0	6.7	90.6	8.0
GLYP	1	44.2	15	52.6	28

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviations repeatability

この原因を確認するため, 同試料について, 前処理の各段階 (下記 i)~iii)) で試料溶液を 1/10 に希釈した場合の GLYP の定量値を食品分析センター法により得られた定量値 (100 %とする) と比較した. その結果は以下のとおりであり, 共存成分の影響により LC-MS/MS 測定時のイオン化阻害及び誘導体化の効率低下が起こっていることが示唆された.

- i) アミノプロピルシリル化シリカゲル/シリカゲル連結カラム処理後, LC-MS/MS による測定の前に試料溶液を 10 倍希釈 … 116 %
- ii) 誘導体化後, アミノプロピルシリル化シリカゲル/シリカゲル連結カラム処理の前に試料溶液を 10 倍希釈し, 以降の処理 … 121 %
- iii) 抽出後, 誘導体化の前に試料溶液を 10 倍希釈し, 以降の処理 … 150 %

3.3 誘導体化前のカラム精製の検討

GLYP 等はイオン解離性の農薬であるため, 飼料分析基準収載法では誘導体化の前に強塩基性陰イオン交換樹脂カラムによる精製を行っている. 食品分析センター法は, 当該操作を省略したことが利点の 1 つであるが, 共存物質の影響と思われる回収率の低下を抑制するため, カラム精製の導入を検討した.

飼料分析基準収載法で規定されている強塩基性陰イオン交換樹脂ムロマック 1×2 Cl⁻型 (ムロマチテクノス製) は, ムロマチテクノスの現行カタログに記載されていないこと及び感度の高い LC-MS/MS により測定するため試料供試量は少量でよいことから, ミニカラムを用いることとした.

予備的に陰イオン交換体ミニカラム (Varian (現 Agilent Technologies) 製 Mega Bond Elut SAX (1 g, 6 mL)) による吸着, 溶出を検討したが, 最適な条件の確立が困難であったため, 逆相モード及び陽イオン交換モードによる試料溶液の精製⁶⁾を試みた.

成犬用ドライ製品に GLYP 等として各 10 mg/kg 相当量を添加した試料 10 g に水 200 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した後, 上澄み液を水で正確に 10 倍希釈して試料溶液とした.

2 種類の逆相ミニカラム (Waters 製 Sep-Pak Plus C₁₈ (充てん剤量 360 mg) 及び Waters 製

Oasis HLB (充てん剤量 500 mg) の下にそれぞれ陽イオン交換体ミニカラム (Waters 製 Oasis Plus MCX (充てん剤量 225 mg)) を連結し、メタノール 5 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをそれぞれのカラムの下に置き、試料溶液 2 mL ずつを各カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して GLYP 等を流出させた。水 10 mL を各カラムに加え、同様に流出させた。

以下、2.4 の 3) の誘導体化以降の操作を行い、LC-MS/MS による測定に供した。

その結果は Table 4 のとおりであり、両性化合物である GLYP がシリカゲルベースの Sep-Pak 充てん剤に保持される可能性が認められ、ポリマー系の Oasis HLB の使用が適していると考えられた。

食品分析センター法による試料溶液及び Oasis HLB/Oasis Plus MCX 連結カラムにより精製した試料溶液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の例は Fig. 2 のとおりであり、当該連結カラムにより GLYP 誘導体の保持時間に現れる夾雑成分が除去され、イオン化阻害の影響が軽減されることが期待された。

なお、当該連結カラムからの GLYP 等の流出画分を確認するため、犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各 1 種を 2.4 の 1) の i) に従って処理し、2) のカラム処理 I において試料溶液 1 mL に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 200 µg 相当量を加え、その後の流出液を分画して 3) の誘導体化以降の処理を行った。その結果は Table 5 のとおりであり、水 6 mL で測定対象成分のほとんどが流出していたが、念のため水 18 mL で流出させることとした。

しかし、同様の添加回収試験において、GLYP の回収率が 40 % 台となる試料 (幼犬用ドライ製品) が認められた。夾雑成分の影響は低減していると思われることから、抽出が不十分である可能性が考えられた。

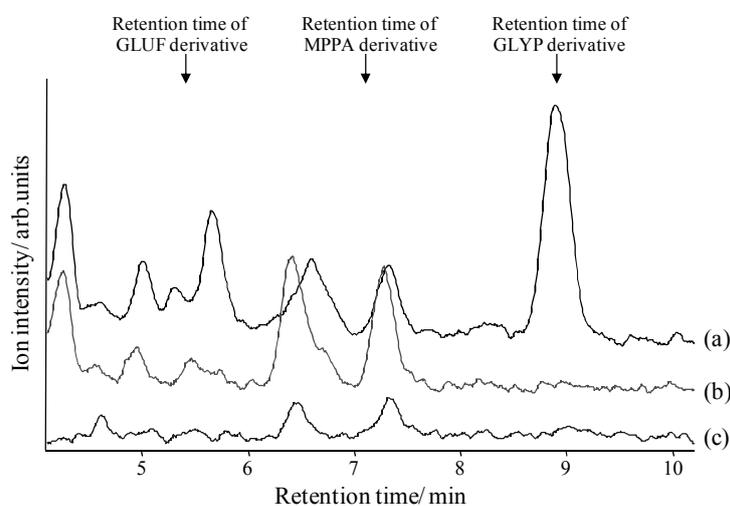
Table 4 Recovery test with two types of reverse phase - cation exchange joint column

Analyte	Reverse phase mini-column Spiked level (mg/kg)	Sep-Pak Plus C ₁₈ (360 mg)	Oasis HLB (500 mg)
		Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
GLUF	10	92.1	98.0
MPPA	10	94.0	99.2
GLYP	10	49.0	79.1

a) $n = 1$

Table 5 Fractioning test of the effluent from Oasis HLB - Oasis MCX joint column

Pet food types	Fraction	Sample solution		
		+ 0 ~ 6 mL	6 ~ 12 mL	12 ~ 18 mL
	Analyte	Recovery ^{a)} (%)		
Dry type for dogs	GLUF	109	0.49	0.10
	MPPA	86.6	0.24	0.07
	GLYP	97.2	0.07	ND
Dry type for cats	GLUF	98.3	0.42	0.11
	MPPA	87.4	0.32	0.22
	GLYP	109	0.08	0.05

a) Mean ($n = 2$)Fig. 2 Total ion chromatograms (Scanned range: m/z 50 ~ 500)
(Baselines were shifted to distinguish them easily.)

- (a) Sample solution of dry type pet food for kitten prepared by JFRL method
 (b) Sample solution of dry type pet food for kitten prepared by JFRL method added purification with Oasis HLB - Oasis Plus MCX joint column
 (c) Standard solution

3.4 内標準物質の使用による回収率の補正

犬用ドライ製品の一部で、GLYPが低回収となる試料があり、抽出不十分の可能性が示唆されたことから、安定同位体元素で標識したGLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N を内標準物質として用い、回収率を補正することを検討した。

GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N 標準品は5 mgで\$ 2,120と非常に高価であり、毎回の分析で多量に用いられないことから、天然同位体組成のGLYP (Native GLYP)等の標準液に対して1/10濃度の標準液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を誘導体化に供することとした。

通常の内標準法では、各検量線用標準液に一定濃度の内標準物質が含まれるように調製するため、Native GLYP及びGLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N をそれぞれ誘導体化させることとなるが、そのようにす

ると、Native GLYP 及び GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ を 1 つのなす形フラスコ内で誘導体化した場合に比べて GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 誘導体のピーク強度が 5 ~ 10 % 低下した。微量の GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ がガラス製のなす形フラスコの器壁等に吸着された可能性が考えられ、分析値が過大評価されることから、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ の誘導体化は、10 倍量の Native GLYP 等の存在下で行うこととし、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 単独の検量線を作成して試料溶液中の GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 濃度を求め、試料中の Native GLYP 量を GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ の回収率で割って補正することとした。

3.5 検量線

2.2 の 5) に従って調製した GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1.0~100 ng/mL 相当量並びに GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ として 0.10~10 ng/mL 相当量の標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 3 の A から E までのとおりであり、GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA では各 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 相当量（注入量として 5~500 ng 相当量）の範囲、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ では 0.50~10 ng/mL 相当量（注入量として 2.5~50 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。ピーク高さを用いても同等の直線性が得られた。

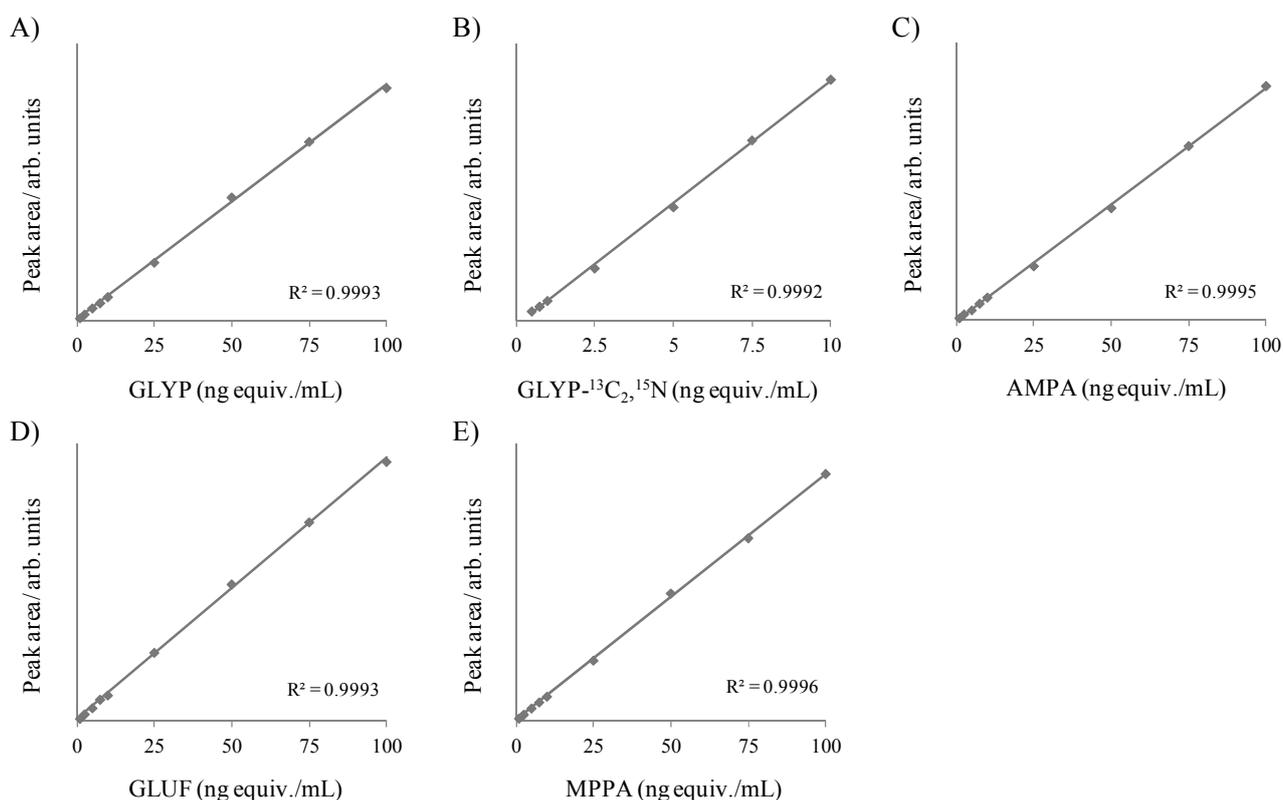


Fig. 3 Calibration curves of A) GLYP, B) GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$, C) AMPA, D) GLUF and E) MPPA by their derivative peak areas in selected reaction monitoring chromatograms

3.6 抽出条件の検討

(1) 飼料分析基準収載法による抽出

犬用ドライ製品に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1 mg/kg 相当量を添加後一夜静置した試料を用い、飼料分析基準収載法による抽出（水 200 mL を加えた後 30 分間振とう）

食品分析センター法と同じ。)を行い、その後は本法に従って添加回収試験 ($n = 5$) を実施した。

その結果は Table 6 のとおりであり、内標準物質の使用により一定の補正効果が認められたが十分ではなく、一夜静置の間に GLYP が試料に結合する等して抽出されにくくなっており、抽出法の改良を要すると推測された。

なお、AMPA は GLYP と同様に回収率が低下した。

Table 6 Recovery test of GLYP in dry type pet foods for dogs without swelling of samples with water before extraction

Compounds		GLYP (corrected)		GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N		GLYP (raw data)	
Spiked level (mg/kg)	Replicate	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{c)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	5	67.6	5.5	48.8	25	33.2	28

Compounds		AMPA		GLUF		MPPA	
Spiked level (mg/kg)	Replicate	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	5	43.3	32	96.2	11	89.0	8.0

- a) Recovery correction was applied by dividing raw data by each recovery of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N.
 b) Relative standard deviations of repeatability
 c) 1 μg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-sample.

(2) 加熱条件等の検討

環境省が定める底質中の GLYP の分析法⁷⁾では、GLYP が底質と強固に結合していることから 80 °C で 30 分間超音波処理した後振とう抽出することとなっている。また、食品分析においても、大豆等の高たん白質の試料では、2 時間膨潤させてから抽出を行っている試験所もあるとの情報を得ていた。このため、抽出温度の検討及び膨潤と超音波処理との比較を行った。

犬用ドライ製品に GLYP 及び GLUF として 1 mg/kg 相当量を添加した後一夜静置した試料について、それぞれ 40 °C、60 °C 及び 80 °C で 2 時間膨潤させた後 30 分間振とう抽出し、その後本法に従って定量 ($n = 1$) を行ったところ、GLYP の回収率は、それぞれ 63 %、75 % 及び 79 % であった。なお、同時に添加した GLUF の回収率はそれぞれ 92 %、95 % 及び 106 % であった。一方、同試料について 80 °C の水を入れた超音波洗浄装置 (温度調節機能なし) で 30 分間超音波処理した後同様に定量 ($n = 2$) した場合、GLYP の回収率は 71 %、GLUF の回収率は 43 % に低下した。温度が高い方が抽出効率は高まる一方、試料の変性等により回収率の低下が起こった可能性が示唆された。

このことを確認するため、畜産用飼料 (とうもろこし及び幼すう育成用配合飼料) を用いて、80 °C で 1~2 時間膨潤させた後同様に定量したところ、GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率がとうもろこしで 11 %、幼すう育成用配合飼料で 47 % と大幅に低下した。70 °C でも同様に回収率の低下が見られた。原因は特定できないが、試料中のでんぷんが糊化し、測定対象成分の抽出を阻害しているのではないかと推察された。

そのため、加熱温度は 60 °C に抑えることとした。また、畜産用配合飼料を用いた予備検討

では、2 時間膨潤させた場合と 30 分間超音波処理した場合とでブランク値に相違がなかったことから、より多検体処理に適し、温度調節が確実な恒温乾燥機内で 2 時間静置して膨潤させてから振とう抽出する方法を採用した。

本法の適用性を確認するため、5 種類の犬用ドライ製品を用い、添加回収試験 ($n = 1$) を実施した。

その結果は Table 7 のとおりであり、いずれの試料においても問題のない回収率が得られた。他の 4 検体より回収率が比較的 low かった 1 検体 (試料 No. E) は、粗たん白質及び粗脂肪の高い幼犬用総合栄養食であった。参考として加温、膨潤なしで抽出した場合の回収率を併記した。

Table 7 Recovery of GLYP in several dry type pet food for dogs by two extraction methods

Sample	Extraction method	Spiked level (mg/kg)	Swelled at 60 °C for 2 h before shaking		Without swelling before shaking		Nutrients (as labelled)		
			GLYP recovery (%)	GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N recovery (%)	GLYP recovery (%)	GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N recovery (%)	Moisture less than (%)	Crude protein more than (%)	Crude fat more than (%)
A		2	86.8	61.7	67.0	88.4	10	20.0	8.0-9.75
B		2	103	72.2	92.2	78.4	10.5	23.5	8.5
C		2	102	72.6	106	57.7	9.5	22.0	12.0
D		2	95.6	74.9	58.0	82.0	10	21.5	13.0
E		2	80.2	56.2	67.9	62.7	10	28.0	18.0

(3) ウェット製品の抽出

水分含有量が高いウェット製品では、抽出液を定容する必要があり、ろ過又は遠心分離を行う必要がある。しかし、愛玩動物用飼料の水抽出液は浮遊する微粒子が多く、吸引ろ過等は不可能であったため、遠心沈殿管内で抽出を行い、遠心分離後上澄み液を全量フラスコに移す操作を繰り返すこととした。ただし、この方法でも試料溶液は澄明にならないため、カラム処理に供する前に遠心分離を追加した。

100 mL の遠心沈殿管内で抽出を行う場合、2 種類のウェット製品について試料採取量 10 g と 20 g とを比較 ($n = 1$) した結果、10 g の方が GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率が 10 % 以上高く、また、操作の支障となる抽出液表面への油膜の形成が少なかった。このため、試料採取量は 10 g とした。ウェット製品では、ドライ製品よりも定量限界を下げる必要があるため、カラム処理 I での試料溶液供試量をドライ製品の場合の 2 倍とした。

3.7 妨害物質の検討

食品分析センター法から抽出、精製方法を変更したため、改めてクロマトグラム上で定量を妨害するピークの有無について確認した。

市販の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品 6 種、猫用ドライ製品 2 種、犬用セミドライ製品 2 種、犬用ウェット製品 2 種、猫用ウェット製品 2 種)、本法に従って分析を行った結果、GLYP 等の定量を妨害するピークは認められず、本法は愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に係る妥当性確認における選択性の規準を満たしていた。

なお、得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 A) に示した。

3.8 添加回収試験

犬用ドライ製品、猫用ドライ製品及び犬用セミドライ製品に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1 及び 15 mg/kg 相当量を添加した試料、犬用ウェット製品 (水分表示量 86 % 以

下)に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量 (水分 10 %に換算して 3.1 及び 16 mg/kg) 並びに猫用ウェット製品 (水分表示量 80 %以下) に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 0.5 及び 3.5 mg/kg 相当量 (水分 10 %に換算して 2.2 及び 16 mg/kg) を添加した試料を用いて 5 点繰返しによる添加回収試験を実施した。

試験結果及び愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に係る妥当性確認における回収率及び併行精度の規準との比較した評価の概要は以下のとおりである。

なお, 得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 B)に示した。

1) GLYP GLYP の分析結果は Table 8 のとおりであり, 全ての試料, 添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

また, GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率は, 全ての試料, 添加区で 40 %を超えていた。

Table 8 Results of recovery test (GLYP)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	101	0.064	6.4	102	0.030	2.9
15	95.3	0.75	5.3	101	0.32	2.1
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	70.6		11	91.7		4.6
Pet food types	Semi-dry type for dogs					
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}			
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)			
1.0	101	0.082	8.1			
15	101	0.43	2.9			
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	98.1		4.6			
Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	88.2	0.032	7.3	90.8	0.018	3.9
2.5	89.8	0.20	8.9	---	---	---
3.5	---	---	---	98.3	0.089	2.6
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	69.8		12	78.2		10

a) Mean ($n = 5$)

b) Standard deviations

c) Relative standard deviations of repeatability

d) $n = 10$. 0.5 μg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-dry or -semi-dry sample.
0.25 μg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-wet sample.

2) AMPA AMPA の分析結果は Table 9 のとおりであり, 犬用ドライ製品, 犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品の低濃度添加区で回収率の目標値 (80 ~ 110 %) を下回った。また, 全体的に併行精度の RSD が他の測定対象物質より高めであり, 犬用セミドライ製品の高濃度添加区及び犬用ウェット製品の高濃度添加区で RSD の規準 (Horwitz 修正式による 15 mg/kg での PRSD = 10.6 %, 2.5 mg/kg での PRSD = 13.9 %) を超えていた。

AMPA の分析値は, 一部の試料で低回収となるなど GLYP と同様の挙動を示したため, 本

法を全ての試料に適用するためには、安定同位体で標識した内標準物質等を用いて分析値を補正する必要があると考えられた。

Table 9 Results of recovery test (AMPA)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	58.3	0.072	12	84.2	0.13	15
15	78.8	0.87	7.4	97.8	1.2	8.4
Pet food types	Semi-dry type for dogs					
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}			
(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)			
1.0	95.8	0.074	7.7			
15	110	1.8	11			
Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
Spiked level	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	72.9	0.039	11	56.1	0.040	14
2.5	70.8	0.381	22	---	---	---
3.5	---	---	---	83.9	0.17	5.9

a) Mean ($n = 5$)

b) Standard deviations

c) Relative standard deviations of repeatability

3) GLUF GLUF の分析結果は Table 10 のとおりであり、全ての試料、添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

Table 10 Results of recovery test (GLUF)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	96.5	0.053	5.5	88.3	0.020	2.3
15	96.4	1.5	10	92.2	0.33	2.4

Pet food types	Semi-dry type for dogs		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	102	0.076	7.5
15	100	0.36	2.4

Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	102	0.030	5.9	101	0.023	4.5
2.5	102	0.14	5.5	---	---	---
3.5	---	---	---	106	0.13	3.6

- a) Mean ($n = 5$)
b) Standard deviations
c) Relative standard deviations of repeatability

4) MPPA MPPA の分析結果は Table 11 のとおりであり、全ての試料、添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

Table 11 Results of recovery test (MPPA)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	84.0	0.061	7.3	84.8	0.049	5.8
15	95.4	0.27	1.9	88.6	0.15	1.1

Pet food types	Semi-dry type for dogs		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	98.2	0.091	9.3
15	91.8	0.80	5.8

Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	81.9	0.015	3.7	85.0	0.036	8.5
2.5	88.1	0.25	11	---	---	---
3.5	---	---	---	91.6	0.13	3.9

- a) Mean ($n = 5$)
b) Standard deviations
c) Relative standard deviations of repeatability

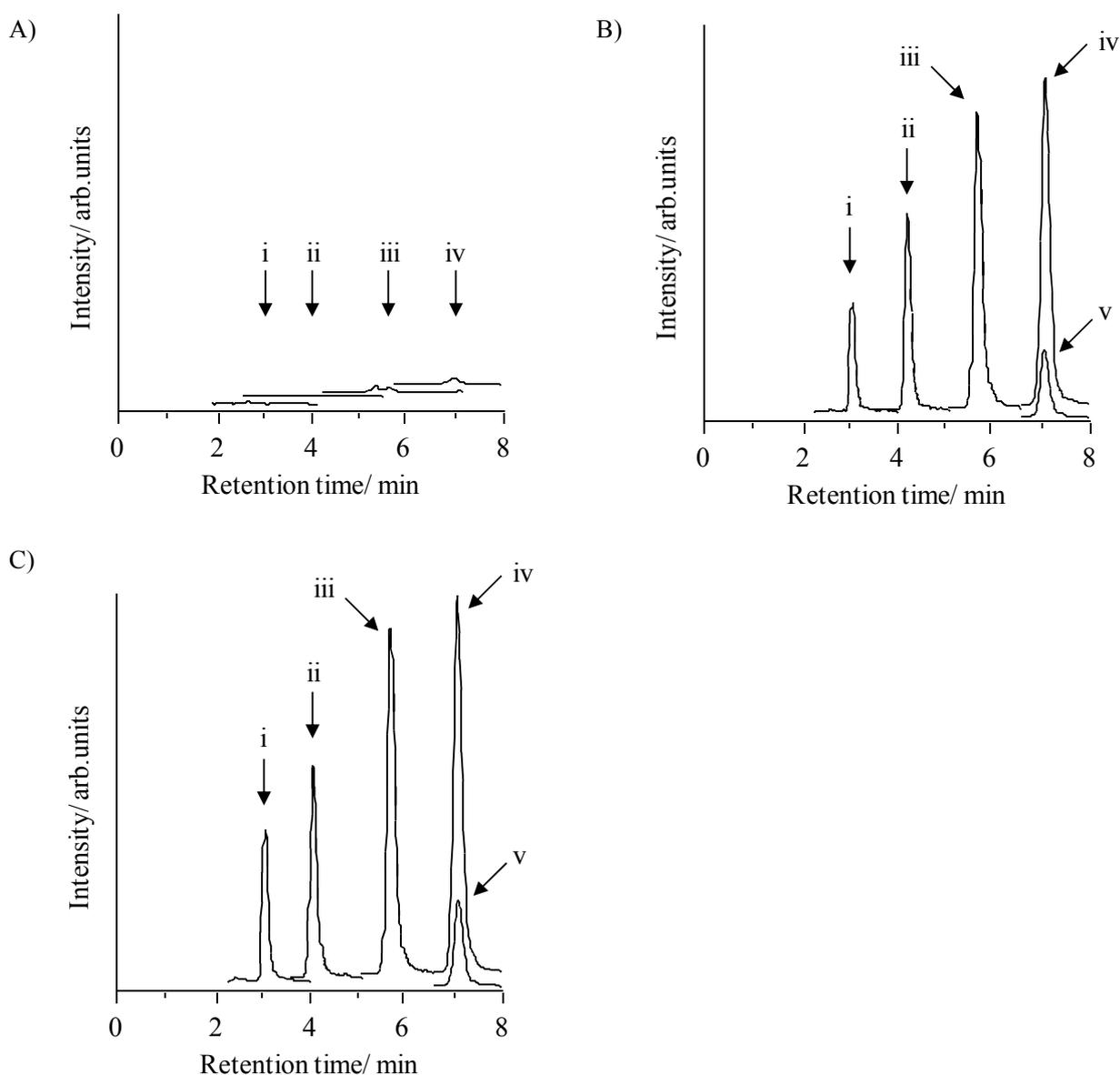


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate peaks or retention times of i) AMPA derivative, ii) GLUF derivative, iii) MPPA derivative, iv) GLYP derivative and v) GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N derivative, respectively.

Three graphs are drawn in the same scale.)

- A) Blank sample of dry type petfood for dogs.
B) Spiked dry type petfood for dogs (Spiked levels were 1 mg/kg for AMPA, GLUF, MPPA and GLYP, respectively.)
C) Standard solution (5 ng equivalent per milliliter for GLYP, AMPA, GLUF and MPPA, 2.5 ng equivalent per milliliter for GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N .)

3.9 定量限界（下限）及び検出限界

本法の測定対象成分のうち愛玩動物用飼料において残留基準値が設定されているのは GLYP のみであり、その値は 15 mg/kg である。従って、目標とする定量限界（下限）及び検出限界は、

ドライ製品及びセミドライ製品でそれぞれ 3 mg/kg 以下及び 1.5 mg/kg 以下、ウェット製品（水分 90 % の場合）でそれぞれ 1.2 mg/kg 以下及び 0.8 mg/kg 以下である。

当試験室で使用した LC-MS/MS で十分な SN 比が得られる濃度を推定し、目標定量限界をドライ製品及びセミドライ製品で 1 mg/kg、ウェット製品で 0.5 mg/kg と設定した。当該濃度における添加回収試験結果は前項の Table 8 から 11 までに記載のとおりであり、GLYP、GLUF 及び MPPA について、いずれの試料においてもピークの SN 比が 10 を超え、かつ、標準偏差 (σ) の 10 倍が当該目標濃度を超えていなかった。

従って、本法の定量限界（下限）は、GLYP、GLUF 及び MPPA について、ドライ製品及びセミドライ製品で 1 mg/kg、ウェット製品で 0.5 mg/kg とした。また、検出限界は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の *t*-値の 2 倍 (= 4.26) を乗じた値を参考として、すなわち定量限界の 4.26/10 とし、それぞれ 0.4 mg/kg 及び 0.2 mg/kg とした。

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、市販の犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品に GLYP、AMPA、GLUF 及び MPPA を添加した共通試料を用い、10 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

i) 分析試料の調製 ドライ製品及びセミドライ製品については、遠心粉碎機で粉碎した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 1 mL）を分析開始の前日に添加して調製した。ウェット製品については、フードプロセッサでペースト状にした分析用試料を送付し、各試験室において一定量を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 0.5 mL）を分析開始の 30 分前に添加して調製した。5 種類の試料について、非明示の 2 点反復で試験を実施した。それぞれの添加濃度は Table 12 のとおりである。

Table 12 Spiked levels of GLYP, AMPA, GLUF and MPPA in the collaborative study expressed relative to original matter

Petfood types	Moisture less than (%)	GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
		spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)
Dry type for dogs	11	2.0	2.0	5.0	5.0
Dry type for cats	12	15	15	2.0	2.0
Semi-dry type for dogs	30	7.0	7.0	2.0	2.0
Wet type for dogs	86	1.0	1.0	2.5	2.5
Wet type for cats	80	3.5	3.5	1.0	1.0

ii) 参加試験室 財団法人日本食品分析センター 多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会 分析センター，協同飼料株式会社 研究所，日本ハム株式会社 中央研究所，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，同福岡センター及び同神戸センター（計 10 試験室）。

iii) 試験実施期間 平成 23 年 9 月 12 日から平成 23 年 10 月 14 日まで

iv) 結果の報告 分析結果は、試料原物中濃度 (mg/kg) として有効数字 3 けたで報告させた。また、GLYP については、全ての試料について GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率で補正後の値を報告さ

せるとともに、最終試料溶液中の GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N 誘導体の濃度 (ng/mL) についても参考のため報告させた。

- v) 結果の解析 IUPAC のプロトコール⁹⁾に従い、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 2 個の Grubbs 検定を行い、はずれ値の棄却等を行った上で平均回収率、繰返し精度の相対標準偏差 (RSD_f) 及び室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果の概要は以下のとおりである。

- 1) GLYP GLYP の各分析結果及び統計解析結果は Table 13 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 95.5, 90.6, 94.9, 99.7 及び 99.8, RSD_f (%) はそれぞれ 5.4, 7.0, 5.3, 5.8 及び 4.3, RSD_R (%) はそれぞれ 8.7, 7.0, 6.9, 8.4 及び 5.5, HorRat はそれぞれ 0.60, 0.65, 0.58, 0.53 及び 0.42 であった。いずれも良好な結果であった。

なお、参考までに GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N についても統計解析を行った。その結果 (表省略) は、平均回収率 (%) はそれぞれ 70.9, 84.8, 79.5, 71.6 及び 72.6, RSD_f (%) はそれぞれ 10, 11, 13, 12 及び 18, RSD_R (%) はそれぞれ 21, 17, 14, 31 及び 20, HorRat はそれぞれ 1.1, 0.91, 0.78, 1.5 及び 0.99 であった。

- 2) AMPA AMPA は、測定不能であった 1 試験室を除く 9 試験室から報告があった。各分析結果及び統計解析結果は Table 14 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 73.4, 92.1, 89.9, 86.0 及び 86.1, RSD_f (%) はそれぞれ 11, 20, 12, 14 及び 18, RSD_R (%) はそれぞれ 22, 22, 21, 24 及び 22, HorRat はそれぞれ 1.5, 2.0, 1.7, 1.5 及び 1.6 であった。当試験室での添加回収試験結果と同様、犬用ドライ製品で回収率が低かった。また、繰返し精度及び室間再現精度が他の成分よりも劣っていたものの、室間再現精度の規準は満たしていた。

- 3) GLUF GLUF の各分析結果及び統計解析結果は Table 15 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 98.6, 104, 112, 93.2 及び 101, RSD_f (%) はそれぞれ 11, 10, 6.4, 7.5 及び 15, RSD_R (%) はそれぞれ 15, 13, 9.4, 23 及び 21, HorRat はそれぞれ 1.2, 0.94, 0.66, 1.6 及び 1.3 であった。回収率及び繰返し精度の値が当試験室での検討結果よりやや大きい試料があったが、室間再現精度は全て良好であった。

- 4) MPPA MPPA は、測定不能であった 1 試験室を除く 9 試験室から報告があった。各分析結果及び統計解析結果は Table 16 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 90.3, 97.2, 98.3, 94.1 及び 96.4, RSD_f (%) はそれぞれ 7.8, 6.2, 6.9, 7.2 及び 6.2, RSD_R (%) はそれぞれ 11, 8.6, 6.9, 9.4 及び 9.0, HorRat はそれぞれ 0.83, 0.59, 0.48, 0.67 及び 0.56 であった。いずれも良好な結果であった。

Table 13 Results of collaborative study (GLYP)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	1.88	1.92	13.0	13.8	5.78	6.05	1.05	1.16	3.26	3.19
1	1.88	1.92	13.0	13.8	5.78	6.05	1.05	1.16	3.26	3.19
2	2.04	1.92	13.9	14.5	7.06	6.67	0.891	0.937	3.68	3.87
3	2.04	1.75	15.5	13.7	7.07	6.72	0.914	0.777	3.39	3.47
4	1.74	1.74	13.6	16.7	7.35	6.96	1.09	1.05	3.74	3.42
5	1.92	1.78	14.4	14.3	6.52	6.79	0.949	1.03	3.59	3.62
6	1.99	1.96	13.2	14.8	6.21	6.30	1.09	0.943	3.47	3.45
7	1.83	1.60	13.4	13.1	6.40	6.63	0.978	1.01	3.51	3.81
8	1.98	1.86	13.3	13.6	6.86	6.00	1.01	1.01	3.60	3.18
9	2.25	2.19	16.2 ^{b)}	18.4 ^{b)}	6.60	7.65	1.04	1.00	3.44	3.31
10	--- ^{a)}	1.89 ^{a)}	13.9	13.0	6.59	6.58	1.03	0.980	3.37	3.47
Mean value (mg/kg) ^{c)}	1.91		14.0		6.64		0.997		3.49	
Spiked level (mg/kg)	2.00		15.0		7.00		1.00		3.50	
Blank (mg/kg)	Tr.		0.4		Tr.		ND		ND	
Recovery (%)	95.5		90.6		94.9		99.7		99.8	
RSD _r ^{d)} (%)	5.4		7.0		5.3		5.8		4.3	
RSD _R ^{e)} (%)	8.7		7.0		6.9		8.4		5.5	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		11		12		16		13	
HorRat	0.60		0.65		0.58		0.53		0.42	

a) Date excluded because of lack of counterpart in experimental disorder

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Dry type for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 10); dry type for cats: $n = 18$ (without laboratory No. 9); others: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 14 Results of collaborative study (AMPA)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
1	1.39	1.07	8.32	18.2	4.22	6.10	0.697	0.604	2.98	2.69
2	1.28	1.39	10.1	10.1	5.56	4.70	0.935	0.949	3.13	2.64
3	1.30	1.44	13.1	18.1	4.25	5.63	0.955	1.05	3.59 ^{b)}	3.36 ^{b)}
4	1.99 ^{b)}	2.07 ^{b)}	17.3	16.5	8.69	7.61	0.568	0.919	2.21	2.99
5	1.63	1.18	14.8	15.0	6.55	7.03	0.905	0.967	2.85	2.53
6	1.35	1.50	9.19	12.7	7.22	8.10	0.756	0.744	2.51	2.69
7	1.07	1.33	15.6	15.0	6.02	6.76	0.746	0.696	3.02	2.53
8	1.96 ^{b)}	1.93 ^{b)}	15.0	15.1	6.21	6.77	1.26	1.24	4.42 ^{b)}	4.03 ^{b)}
9	1.36	1.20	13.0	11.6	5.30	4.34	0.908	0.584	2.04	4.05
10	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
Mean value (mg/kg) ^{c)}	1.47		13.8		6.30		0.860		3.01	
Spiked level (mg/kg)	2.00		15.0		7.00		1.00		3.50	
Blank (mg/kg)	ND		Tr.		ND		ND		Tr.	
Recovery (%)	73.4		92.1		89.9		86.0		86.1	
RSD _r ^{d)} (%)	11		20		12		14		18	
RSD _R ^{e)} (%)	22		22		21		24		22	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		11		12		16		14	
HorRat	1.5		2.0		1.7		1.5		1.6	

a) Lack of data because of LC-MS/MS malfunctioning

b) To make valid number of laboratories not less than 8, paired Grubbs test was avoided. If these two laboratories were excluded by paired Grubbs test, recovery (%), RSD_r (%), RSD_R (%) and HorRat for dry type pet food for dogs would be 66.0, 14, 14 and 0.89, respectively, and for wet type pet food for cats, 79.3, 22, 22 and 1.6, respectively.

c) $n = 18$ (without laboratory No. 10)

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 15 Results of collaborative study (GLUF)

Laboratory No.	Dry type pet food		Semi-dry type pet food		Wet type pet food					
	for dogs (mg/kg)	for cats (mg/kg)	for dogs (mg/kg)	for cats (mg/kg)	for dogs (mg/kg)	for cats (mg/kg)				
1	4.30	5.01	1.93	2.31	2.28	2.38	1.98	1.58	0.917	0.847
2	6.06	5.70	2.26	2.28	2.66	2.26	2.85	2.93	1.10	1.12
3	5.02	4.69	2.08	2.36	2.32	2.49	2.06	2.13	0.959	0.971
4	4.94	4.98	1.88	2.01	2.21	2.03	1.79	2.17	0.792	0.884
5	4.71	4.52	1.96	1.95	1.89	1.89	2.45	2.49	0.969	0.923
6	3.99	3.94	1.44	1.74	2.21	2.40	1.83	1.93	0.957	0.964
7	5.25	4.92	2.15	2.43	2.47	2.17	3.21	3.06	1.13	1.38
8	6.89	4.82	3.25 ^{b)}	3.23 ^{b)}	3.28 ^{b)}	3.49 ^{b)}	2.70	3.03	1.63	1.15
9	4.65	4.34	2.34	1.73	1.99	2.10	1.71	2.02	0.753	1.13
10	--- ^{a)}	4.72 ^{a)}	2.21	2.45	2.32	2.29	1.65	1.69	0.870	0.830
Mean value (mg/kg) ^{c)}		4.93		2.08		2.24		2.33		1.01
Spiked level (mg/kg)		5.00		2.00		2.00		2.50		1.00
Blank (mg/kg)		ND		ND		ND		ND		ND
Recovery (%)		98.6		104		112		93.2		101
RSD _r ^{d)} (%)		11		10		6.4		7.5		15
RSD _R ^{e)} (%)		15		13		9.4		23		21
PRSD _R ^{f)} (%)		13		14		14		14		16
HorRat		1.2		0.94		0.66		1.6		1.3

a) Date excluded because of lack of counterpart in experimental disorder

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Dry type pet food for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 10); dry type pet food for cats and semi-dry type pet food for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 8); others: $n = 20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 16 Results of collaborative study (MPPA)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
1	4.58	4.53	1.86	2.00	1.93	1.93	2.26	2.17	0.908	0.959
2	4.99	4.77	2.01	1.91	2.11	1.74	2.03	2.11	1.03	1.08
3	4.59	4.76	2.02	2.05	1.98	2.02	2.37	2.38	0.985	0.914
4	5.28	4.76	2.09	1.86	2.19	1.91	2.21	2.29	0.923	1.03
5	4.70	4.56	1.99	1.90	1.96	1.96	2.52	2.44	0.965	0.929
6	3.40	4.27	1.62	1.76	1.86	2.15	2.78	2.42	1.10	1.13
7	3.84	4.13	1.59	1.92	2.01	1.97	2.59	2.38	0.936	0.907
8	4.63	3.84	2.21	2.09	1.93	1.97	2.39	2.17	0.970	0.830
9	5.12	4.50	1.97	2.13	1.79	1.96	2.13	2.21	0.807	0.945
10	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
Mean value (mg/kg) ^{b)}	4.51		1.94		1.97		2.35		0.96	
Spiked level (mg/kg)	5.00		2.00		2.00		2.50		1.00	
Blank (mg/kg)	ND		ND		ND		ND		ND	
Recovery (%)	90.3		97.2		98.3		94.1		96.4	
RSD _r ^{c)} (%)	7.8		6.2		6.9		7.2		6.2	
RSD _R ^{d)} (%)	11		8.6		6.9		9.4		9.0	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		14		14		14		16	
HorRat	0.83		0.59		0.48		0.67		0.56	

a) Lack of data because of LC-MS/MS malfunctioning

b) $n = 18$ (without laboratory No. 10)

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

参考のため、各試験室で用い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 17 に示した。

Table 17 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
2	Waters Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: AB Sciex API-3200 Q TRAP	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm × 150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Waters Quattro micro	GL Science Inertsil ODS-3 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1100 MS/MS: Applied Biosystems API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
10	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料に残留するグリホサート等含リンアミノ酸系農薬及びその代謝物について、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（以下「本法」という。）を検討し、以下の結果を得た。

- 1) グリホサートは、犬用ドライ製品等で試料によって回収率が低下するため、内標準物質として安定同位体標識化合物を用いて分析値を補正する必要があった。また、抽出効率を高めるため、

振とう抽出の前に 60 °C で 2 時間試料を水で膨潤させる必要があった。

- 2) グリホサートの代謝物であるアミノメチルホスホン酸は、試料によってグリホサートと同様に回収率及び精度が十分でない場合があり、本法を適用するには内標準物質の使用が必要と考えられた。よって本法の分析対象化合物から除外した。
- 3) 本法により添加回収試験及び共同試験を実施した結果、グリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸について、真度、併行精度、室間再現精度の規準を満たしており、当該 3 成分について本法の適用が可能であった。
- 4) 本法によるグリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の定量限界（下限）及び検出限界は、ドライ製品及びセミドライ製品でそれぞれ試料原物中 1 mg/kg 及び 0.4 mg/kg、ウェット製品でそれぞれ試料原物中 0.5 mg/kg 及び 0.2 mg/kg であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター 多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会 分析センター、協同飼料株式会社 研究所、日本ハム株式会社 中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 20 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）(2009).
- 4) JMPR: Pesticide residues in food - 2004, FAO Plant Production and Protection Paper, 178, 98-103 (2004).
- 5) European Food Safety Authority: Modification of the residue definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin, EFSA Journal 2009; 7(9):1310 (2009).
- 6) 高橋 邦彦，堀江 正一，青羽 信次：HPLC による農産物中のグリホサート及びその代謝物アミノメチルホスホン酸の分析，食品衛生学雑誌，42(5)，304 (2001).
- 7) 環境省水環境部企画課：要調査項目等調査マニュアル（水質，底質，水生生物），平成 14 年 3 月.
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67 (2), 331-343 (1995).

技術レポート

1 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の共同試験

大島 慎司*

Collaborative Study of Melamine in Feeds by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*

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

1 緒言

食品及び飼料中のメラミンの基準値については、コーデックス規格として 2.5 mg/kg が採択されている。また国内における飼料中の基準値は、「尿素を除く飼料(飼料原料を含む.)」について 2.5 mg/kg となっている²⁾。

そのため、当センターにおいて、飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法¹⁾を開発したところであるが、更に今回、共通試料を用いた共同試験を行ったので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 分析試料

市販の成鶏飼育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。なお、試験に用いた成鶏飼育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of the formula feed

Formula feed type	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	61	Corn, Milo, Polished rice
	Oil seed meal	22	Soybean meal, Corn gluten meal, Rapeseed meal
	Brans	3	Corn gluten feed
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extract, Enzyme processed copra meal, Silicic acid, Feed additives

* 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

2.2 定量方法

2.1 で調製した各試料について飼料分析基準³⁾第7章7により2点併行分析を行った。

なお、メラミンの定量値は、mg/kg 単位で有効数字4桁目を四捨五入し、有効数字3桁とした。

3 結果及び考察

成鶏飼育用配合飼料にメラミンとして0.4 mg/kg 相当量(1 mL 中に4 µg を含有する標準液0.1 mL 添加)、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして1 mg/kg 相当量(1 mL 中に10 µg を含有する標準液0.1 mL 添加)を添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、協同飼料株式会社研究所、日本ハム株式会社中央研究所、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の9試験室において共同試験を実施した。結果の解析については、IUPACのプロトコール⁴⁾に従い、Cochran 検定、外れ値1個のGrubbs 検定及び外れ値2個のGrubbs 検定を行い、平均回収率、繰返し精度(RSD_F)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られたRSD_Rから、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 2 に示した。成鶏飼育用配合飼料の平均回収率は97.1 %、その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4.2 %及び6.3 %であり、HorRat は0.34であった。魚粉では平均回収率は97.8 %、その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3.9 %及び7.0 %であり、HorRat は0.44であった。脱脂粉乳では平均回収率は99.3 %、その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4.7 %及び6.4 %であり、HorRat は0.40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 3 に示した。

Table 2 Collaborative study for melamine

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for layer (mg/kg)		Fish meal (mg/kg)		Dried skim milk (mg/kg)	
1	0.346	0.346	0.851	0.909	0.915	0.830
2	0.366	0.399	0.944	0.955	0.948	1.04
3	0.399	0.405	0.992	0.982	0.987	1.01
4	0.385	0.395	1.05	0.937	1.03	0.926
5	0.362	0.404	0.957	0.980	1.01	1.06
6	0.410	0.432	1.13	1.04	0.998	1.02
7	0.376	0.375	0.905	0.932	1.04	1.01
8	0.398	0.422	1.06	1.05	1.07	1.05
9	0.372	0.401	0.969	0.956	1.01	0.915
Spiked level (mg/kg)	0.4		1.0		1.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.389		0.978		0.993	
Recovery ^{a)} (%)	97.1		97.8		99.3	
RSD _r ^{b)} (%)	4.2		3.9		4.7	
RSD _R ^{c)} (%)	6.3		7.0		6.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	18		16		16	
HorRat	0.34		0.44		0.40	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×100 mm, 3.5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×100 mm, 3.5 μm)
4	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
6	Waters Alliance 2695	Waters Quattro Premier XE	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX RX-S (2.1×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
9	Agilent Technologies 1200 series	Applied Biosystems API 3000	Waters Atlantis HILIC Silica (2.1×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の繰返し精度及び室間再現精度を確認するため、成鶏飼育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳を用いて、9試験室において、共同試験を実施した。その結果、成鶏飼育用配合飼料の平均回収率は97.1%、その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4.2%及び6.3%であり、HorRatは0.34であった。魚粉では平均回収率は97.8%、その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3.9%及び7.0%であり、HorRatは0.44であった。脱脂粉乳では平均回収率は99.3%、その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4.7%及び6.4%であり、HorRatは0.40であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター彩都研究所、協同飼料株式会社研究所、日本ハム株式会社中央研究所、日本ウォーターズ株式会社における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 大島慎司：飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法，飼料研究報告，36，1-12 (2011)。
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：「飼料の有害物質の指導基準」の一部改正について，平成24年4月9日，23消安6540号 (2012)。

- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).

技術レポート

2 愛玩動物用飼料（ウェット製品）中の水分の測定法の間接精度評価のための枝分かれ実験

石橋 隆幸^{*}，田端 麻里^{*}

Nested experiment for Intermediate precision assessment of Determination of Moisture Content in Wet Pet Foods

Takayuki ISHIBASHI^{*} and Mari TABATA^{*}

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

1 緒 言

愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令¹⁾が平成21年6月1日に施行され、同省令別表の1の(4)に「成分規格が規定された物質の販売用愛玩動物用飼料中の含有量を算出するに当たっては、当該販売用愛玩動物用飼料中の水分の含有量が10%を超えるときは、その超える量を当該販売用愛玩動物用飼料の量から除外するものとし、当該販売用愛玩動物用飼料中の水分の含有量が10%に満たないときは、その不足する量を当該販売用愛玩動物用飼料の量に加算する」と規定された。

愛玩動物用飼料は、概ね①水分が10%程度のドライ製品、②水分が25~35%程度のセミドライ製品、③水分が70%以上のウェット製品に分類されるが、これまでに愛玩動物用飼料等の検査法²⁾（以下「検査法」という。）に記載されている水分の測定法は、ドライ及びセミドライ製品に相当する試料を適用範囲とする常圧加熱乾燥法のみであり、ウェット製品に相当する試料に適用できる方法は記載されていなかった。

そこで、筆者らは、粘質状、液状及びペースト状などの食品中の水分測定法を参考にしてウェット製品中の水分の測定法の検討を行い、その方法が検査法に記載されたが、開発した測定法の精度を調査するため、検査法第9章3の(3)のiiの規定にしたがって単一試験室内での中間精度評価のための枝分かれ実験を以下のとおり実施したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

2種類の愛玩動物用飼料（犬用一般食（水分表示量89.5%以下、粗脂肪表示量0.5%以上）及び猫用一般食（水分表示量84.0%、粗脂肪表示量0.5%以上））を、それぞれ総量が200g以上となる個数の包装容器を開封・混合し、フードプロセッサーで試料が液状又はペースト状になるまで均質化して用いた。なお、調製後の試料は、チャック付きアルミ袋に入れて冷蔵保管した。

* 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

2.2 試薬等

1) ケイソウ土

ハイフラスーパーセル (Celite 製) を使用した。

2) シリカゲル

シリカゲル, 中粒状 (青色) (和光純薬工業製) 適量を 135 °C で 2 時間加熱乾燥し, 放冷した後, デシケーター中に入れ使用した。

2.3 装置及び器具等

1) 電気定温乾燥機: いすゞ製作所製 SS-K-300 (自然対流型)

東洋製作所製 DRM420DB (送風型)

2) フードプロセッサー: 松下電器産業製 MK-K80

3) 精密天びん: 島津製作所製 AW320

4) デシケーター: 上口コック付きで中板の直径が 18 cm のもの

5) ポリエチレンフィルム製袋: 高密度ポリエチレン (幅 80 mm, 長さ 130 mm, 厚さ 0.05 mm)

6) 携帯型除電器: マスコット除電器 (理研精工製, アズワン販売 1-8912-01)

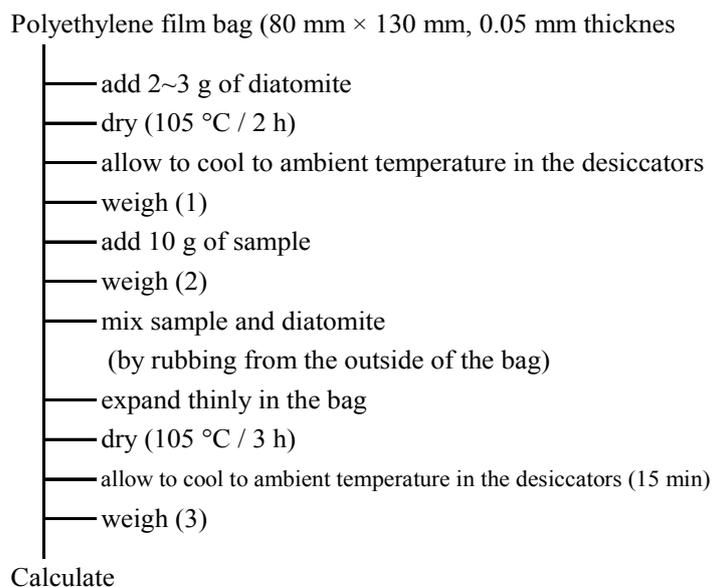
2.4 測定方法

ケイソウ土 2~3 g をポリエチレンフィルム製袋に入れ, 袋の口を開いて袋を膨らませた後, 105±2 °C で 2 時間乾燥した。乾燥後, 袋の口を三つ折りにして閉じ, ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後, ゼムクリップをはずして重さを正確に量った。ひょう量の際には, 精密天びんの風防内を携帯型除電器で天びんのひょう量値が安定するまで除電した後, 数値を読み取った。以後ひょう量の際には, 同様に操作した。

分析試料約 10 g を正確に量って先のポリエチレンフィルム製袋に入れ, 袋の口を三つ折りにした後, 袋の外側から手で揉んで試料とケイソウ土を混和させた。混和物に粘着性がなく水が浮いた状態の場合は, 袋の口を開いて袋を膨らませ, 105±2 °C で加熱しながら, ときどき同様に混和させ, 粘着性が出るまで予備乾燥した。また, 混和物が既に粘着性がある状態の場合は, 予備乾燥は行わなかった。混和物を袋の外側から押し伸ばして袋の中に均一に薄く広げた。

次に, 袋の口を開いて袋を膨らませ, 105±2 °C で 3 時間乾燥した。乾燥途中にときどき袋を取り出し, 袋の口の開きを整えると同時に, 乾燥が進んで固着して塊状になった混和物を袋の外側から押しつぶしてできるだけ粉末状にした。乾燥後, 袋の口を三つ折りにして閉じ, ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後, ゼムクリップをはずして重さを正確に量り, 試料中の水分量を算出した。

なお, 測定法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for moisture content in wet type pet foods

3 結果及び考察

当試験室において、分析者 1 名が、2.1 で調製した 2 種類の試料を用い、2.4 の分析方法に従って各試料につき 1 日 3 回、5 日間分析する枝分かれ実験を実施した。

その結果は Table 1 のとおりであり、犬用一般食では平均測定値は 86.14 %，その併行精度及び中間精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_I) として 0.0698 % 及び 0.0700 % であった。これらはいずれも検査法第 9 章 3 の(3)の式 1 に規定された併行精度又は中間精度の目標値 (RSD_r は Horwitz 修正式による予想室間再現精度の相対標準偏差 (PRSD) 以下， RSD_I は PRSD の 5/4 倍以下) を満たしていた。猫用一般食では、平均測定値は 83.39 %，その併行精度及び中間精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_I として 0.0854 % 及び 0.0932 % であり、これらはいずれも同目標値を満たしていた。

Table 1 Results of nested experiment of determination of moisture content in wet type pet foods

Number of trial on a day	Measured value (%)									
	Wet type for dogs					Wet type for cats				
	day1	day2	day3	day4	day5	day1	day2	day3	day4	day5
1	86.18	86.12	86.12	86.16	86.25	83.36	83.25	83.44	83.42	83.37
2	86.13	86.20	86.05	86.16	86.23	83.48	83.35	83.37	83.50	83.47
3	86.04	86.11	86.11	86.12	86.08	83.44	83.31	83.44	83.26	83.43
Mean value ^{a)} (%)	86.14					83.39				
RSDr ^{b)} (%)	0.0698					0.0854				
RSD _i ^{c)} (%)	0.0700					0.0932				
PRSD ^{d)} (%)	1.08					1.10				

a) $n=15$

b) Relative standard deviations of repeatability within a day

c) Relative standard deviations of intermediate precision within a single laboratory

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

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，第 1 号 (2009).
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).

精度管理**1 平成 23 年度飼料の共通試料による分析鑑定について**

大島 慎司^{*1}, 齊木 雅一^{*2}, 佐藤 梢^{*3},
武田 然也^{*4}, 田中 里美^{*5}, 石塚 優香^{*6}

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	中すう育成用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料調製試料
D 試料	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 23 年 7 月 1 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
3.3 調製方法

(1) A 試料

粉碎した後, 1 mm の網ふるいを通過させた中すう育成用配合飼料 100 kg を用いて, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後 9 等分し, その中から 4 区画を取って混合し 4 等分して元に戻す。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

^{*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} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*4} 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

^{*5} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

^{*6} 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

表 1 混合区画表

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

(2) B 試料

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

(3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去し、必要に応じ粉碎した後、表 2 に掲げる 11 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	ビートパルプ	7
ライ麦	10	なたね油かす	6
大麦	10	魚粉	3
コーングルテンフィード	10	炭酸カルシウム	3
大豆油かす	10	りん酸カルシウム	3
あまに油かす	8		

(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，リン及びサリノマイシンナトリウム
- B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・11 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 23 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（175 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を表 3 に示した. また, 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を表 4 に示した. その結果, いずれの試料においても, 分散比 F_0 が $F(9,10;0.05)=3.02$ を下回ったことから, 有意水準 5%において試料間に有意な差は認められず, 試料は均質であることを確認した.

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	17.78	17.74	5.64	5.66	56.39	56.52	20.77	20.91	59.45	59.73	63.44	64.73
2	17.73	17.70	5.63	5.66	56.42	56.67	20.74	20.56	59.48	59.33	64.90	64.29
3	17.74	17.79	5.63	5.65	56.33	56.45	20.89	20.74	59.52	59.11	63.99	63.87
4	17.65	17.58	5.66	5.67	56.34	56.59	20.64	20.57	59.05	59.46	63.56	63.21
5	17.64	17.72	5.65	5.65	56.60	56.39	20.59	20.93	60.66	61.51	65.90	64.17
6	17.67	17.72	5.65	5.67	56.68	56.93	20.50	20.70	60.15	59.23	62.58	61.53
7	17.59	17.77	5.67	5.71	56.50	56.86	20.83	20.64	59.96	60.24	63.61	64.16
8	17.85	17.67	5.63	5.67	56.58	56.25	20.47	20.60	59.72	60.50	62.39	61.77
9	17.75	17.58	5.69	5.69	56.82	56.83	20.97	20.96	59.73	59.39	63.66	63.26
10	17.52	17.59	5.66	5.67	56.46	56.16	20.76	20.58	58.73	60.13	65.64	62.56

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	0.0821	9	0.0091	1.52	
		分析誤差 E	0.0602	10	0.0060		— ^{b)}
		総計 T	0.1423	19			
	粗灰分	A	0.0056	9	0.0006	2.08	
		E	0.0030	10	0.0003		—
		T	0.0086	19			
B 試料	粗たん白質	A	0.5445	9	0.0605	2.00	
		E	0.3030	10	0.0303		—
		T	0.8475	19			
	粗灰分	A	0.3107	9	0.0345	2.18	
		E	0.1583	10	0.0158		—
		T	0.4690	19			
D 試料	銅	A	5.5143	9	0.6127	2.59	
		E	2.3693	10	0.2369		—
		T	7.8836	19			
	亜鉛	A	16.8938	9	1.8771	2.26	
		E	8.3034	10	0.8303		—
		T	25.1971	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 258
 うち 飼料関係…164
 飼料添加物関係…16
 民間分析機関等…31
 検査指導機関…47
- (2) 試料別参加試験室数
 A 試料…257
 B 試料…247
 C 試料…137
 D 試料…111

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、11 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 に示した。

表 5 分析成績 (1)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(糖類分析-ワエログ法)		SL(LC・ハイチアゲ)							
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/100gトシ)	No. z-score	分析値 (g/100gトシ)	No. z-score																		
2	12.53	1	-1.03	18.21	3	0.55	4.30	2	0.00	3.38	3	0.98	5.48	1	-1.26	1.043	2	0.31	0.631	1	-3.62	47.2	3	-0.69
3	13.05	1	0.76	17.58	4	-2.12	4.15	1	-1.12	3.32	3	0.79	5.59	1	-0.39	0.984	2	-0.97	0.678	1	-0.14			
4	12.88	1	0.17	18.09	4	0.04	4.08	2	-1.64	3.28	3	0.67	5.71	1	0.55	1.042	2	0.29	0.674	1	-0.44			
6	12.29	1	-1.86	18.28	1	0.84	4.41	1	0.82	2.68	2	-1.16	5.64	1	0.00	0.997	2	-0.68	0.670	1	-0.73	51.8	3	1.23
7	11.82	1	-3.49	17.88	2	-0.84	4.28	1	-0.14	2.68	2	-1.16	5.83	1	1.50	1.006	2	-0.49	0.683	1	0.22			
8	13.17	1	1.17	18.13	4	0.21	4.06	2	-1.79				5.38	1	-2.06	0.990	2	-0.84						
10	12.85	1	0.06	18.13	4	0.21	4.17	2	-0.97	3.21	2	0.45	5.64	1	0.00	1.099	1	1.54	0.664	1	-1.18			
11	13.06	1	0.79	18.18	3	0.42	4.11	2	-1.42	3.62	2	1.71	5.75	1	0.87	1.061	3	0.70	0.686	2	0.44			
12	13.87	1	3.59	18.02	2	-0.25	4.02	1	-2.09	2.07	2	-3.03	5.77	1	1.03	0.986	2	-0.92	0.685	1	0.36			
13	12.72	1	-0.38	18.17	2	0.38	4.69	1	2.92				5.81	1	1.34									
14	12.89	1	0.20	18.14	3	0.25							5.61	1	-0.23									
15	12.70	1	-0.44	17.84	1	-1.01							5.07	1	-4.52									
16	12.29	1	-1.86	18.65	1	2.42	4.20	1	-0.74				5.18	1	-3.65									
18	13.09	1	0.89	18.18	4	0.42	4.19	1	-0.82				5.61	1	-0.23									
19	12.92	1	0.31	17.71	4	-1.57	3.38	2	-6.89				6.15	1	4.04	1.233	3	4.46	0.664	2	-1.18			
19				19.12	3	4.41																		
20	12.68	1	-0.51	18.05	4	-0.12	4.38	1	0.59				5.29	1	-2.77									
21	12.95	1	0.41	17.52	2	-2.37	4.34	1	0.29	3.09	2	0.09	5.41	1	-1.82				0.674	1	-0.44			
22	12.63	1	-0.69	16.33	2	-7.43							4.74	1	-7.14									
23	12.75	1	-0.27	18.13	1	0.21							5.21	2	-3.41									
24	12.88	1	0.17	18.15	4	0.29	4.41	1	0.82				5.64	1	0.00									
25	12.56	1	-0.93	18.26	2	0.76	4.21	2	-0.67				5.70	1	0.47	1.010	2	-0.40	0.666	1	-1.03			
26	12.90	1	0.24	18.13	4	0.21	4.28	2	-0.14	3.33	3	0.82	5.59	1	-0.39	1.001	2	-0.60	0.686	1	0.44			
27	12.87	1	0.13	17.92	4	-0.67	4.63	1	2.47	3.28	2	0.67	5.63	1	-0.07	1.020	2	-0.18	0.700	1	1.47			
28	12.70	1	-0.44	18.22	4	0.59	4.27	1	-0.22	2.68	2	-1.16	5.72	1	0.63	1.000	2	-0.62	0.660	1	-1.47	45.9	3	-1.23
29	13.04	1	0.72	17.88	4	-0.84	4.45	1	1.12	3.44	2	1.16	5.75	1	0.87	1.070	2	0.90	0.690	1	0.73			
31	12.78	1	-0.17	17.69	4	-1.65	4.63	1	2.47	3.91	2	2.60	5.68	1	0.31	1.014	2	-0.31	0.674	1	-0.44			
32	12.89	1	0.20	17.97	4	-0.46	4.11	1	-1.42	3.17	3	0.33	5.51	1	-1.03	0.992	2	-0.79	0.682	1	0.14	50.0	1	-0.27
33	13.24	1	1.41	18.06	4	-0.08	4.60	1	2.24	3.23	2	0.52	5.74	1	0.79	1.045	2	0.36	0.695	1	1.10			
34	12.92	1	0.31	18.11	4	0.12	4.31	2	0.07	3.31	3	0.76	5.65	1	0.07	1.045	1	0.36	0.673	1	-0.51	48.6	3	-0.10
35	12.89	1	0.20	18.35	3	1.14	4.21	2	-0.67	3.31	3	0.76	5.54	1	-0.79	1.069	1	0.88	0.683	1	0.22	57.9	2	2.66
36	13.02	1	0.65	18.09	4	0.04	4.38	2	0.59	3.33	3	0.82	5.64	1	0.00	0.997	1	-0.68	0.678	1	-0.14			
44	13.03	1	0.69	17.99	4	-0.38	4.31	1	0.07				5.51	1	-1.03									
46	12.03	1	-2.76	18.19	4	0.46	4.37	1	0.52				5.35	1	-2.30									
48	13.01	1	0.62	18.08	1	0.00	4.27	1	-0.22				5.55	1	-0.71									
50	13.03	1	0.69	18.17	4	0.38	4.32	1	0.14				5.60	1	-0.31	0.982	2	-1.01	0.674	1	-0.44	46.6	3	-0.94
51	12.98	1	0.51	18.21	1	0.55	4.06	2	-1.79	2.94	3	-0.36	5.48	1	-1.26	1.196	2	3.65	0.660	1	-1.47	49.7	3	0.35
52	9.35	1	-12.03	17.98	4	-0.42																		
53	12.85	1	0.06	18.12	4	0.16	4.25	2	-0.37	3.16	2	0.30	5.70	1	0.47	1.075	2	1.01	0.658	1	-1.62			
54	13.31	1	1.66	18.28	3	0.84							5.48	1	-1.26									
58	12.77	1	-0.20	15.48	1	-11.04	4.28	1	-0.14	3.43	1	1.13	5.21	1	-3.41	0.774	3	-5.55	0.528	2	-11.23			
59	12.67	1	-0.55										5.05	1	-4.68	1.529	2	10.93	0.993	2	23.13			
63	13.39	1	1.93	19.82	1	7.39							9.87	1	33.56									
64				18.15	3	0.29	4.21	2	-0.67	3.52	3	1.41												
65	12.72	1	-0.38	17.97	4	-0.46	4.29	1	-0.07	2.86	2	-0.61	5.60	1	-0.31	0.995	2	-0.73	0.681	1	0.07	50.0	1	-0.27
66	12.81	3	-0.06	18.04	3	-0.16							5.44	2	-1.58									
69	12.95	1	0.41	18.21	3	0.55	4.25	2	-0.37	3.20	2	0.42	5.78	1	1.11	1.090	2	1.34	0.651	1	-2.14	50.6	1	-0.05
70	12.98	1	0.51	17.91	4	-0.72	4.36	2	0.44	3.29	3	0.70	5.38	1	-2.06	0.994	3	-0.75	0.673	1	-0.51	50.1	1	-0.24
71	12.09	1	-2.55	18.10	2	0.08																		
72	12.80	1	-0.10	18.14	4	0.25	4.11	2	-1.42				5.54	1	-0.79							49.9	1	-0.31
73	12.84	1	0.03	17.65	2	-1.82	4.33	1	0.22	3.29	2	0.70	5.52	1	-0.95	1.093	2	1.40	0.681	1	0.07	51.3	1	0.20
74	12.87	1	0.13	17.88	4	-0.84	4.41	1	0.82	3.03	2	-0.09	5.63	1	-0.07	0.982	2	-1.01	0.682	1	0.14			
76	12.52	1	-1.07	18.09	4	0.04	4.26	2	-0.29	3.14	3	0.24	5.81	1	1.34	1.017	2	-0.25	0.679	1	-0.07			
77	12.24	1	-2.04	17.97	2	-0.46	4.48	1	1.34				5.78	1	1.11	0.948	2	-1.75	0.668	1	-0.88	47.0	1	-1.39
78	12.61	1	-0.76	18.23	4	0.63	4.12	2	-1.34	3.35	2	0.88	5.61	1	-0.23	1.251	1	4.86	0.662	1	-1.33			
80	12.74	1	-0.31	17.85	1	-0.97	4.30	1	0.00	3.14	2	0.24	5.82	1	1.42	0.946	2	-1.80	0.679	1	-0.07	49.8	3	0.39
81	13.10	1	0.93	17.83	1	-1.06	4.33	1	0.22	2.83	2	-0.70	5.59	1	-0.39	0.998	2	-0.66	0.682	1	0.14	49.3	3	0.18
82	12.39	1	-1.52	18.41	2	1.40	4.27	1	-0.22	3.19	3	0.39	5.64	1	0.00	1.053	2	0.53	0.667	1	-0.96			
83	12.57	1	-0.89	17.49	4	-2.50	4.16	2	-1.04	3.18	3	0.36	5.66	1	0.15	1.014	2	-0.31	0.678	1	-0.14			
84	13.53	1	2.42	17.88	4	-0.84	4.59	1	2.17	3.83	3	2.36	6.46	1	6.50	1.015	2	-0.29	0.677	1	-0.22			
85	13.82	1	3.42	17.60	4	-2.03	4.12	2	-1.34	3.39	3	1.01	5.12	1	-4.12									
86	12.28	1	-1.90	17.60	4	-2.03	4.03	1	-2.02	4.27	3	3.70	5.76	1	0.95	1.096	2	1.47	0.722	1	3.10			
87	12.92	1	0.31	17.57	4	-2.16	4.35	1	0.37	3.32	3	0.79	5.87	1	1.82	1.081	2	1.14	0.674	1	-0.44			
97	12.82	1	-0.03	18.18	4	0.42	4.21	2	-0.67	3.45	3	1.19	5.60	1	-0.31	0.977	2	-1.12	0.687	1	0.51			
98													5.82	1	1.42	1.055	2	0.57	0.626	1	-3.99	52.8	4	1.65
99	12.98	1	0.51	18.27	3	0.80					</													

表 5 分析成績 (2)

試料 番号	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			SL(管理分析・FAS-100)分析値 (g/カブ/トン) No. z-score	SL(LC・ハイアグゼイ)分析値 (g/カブ/トン) No. z-score	
	分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score		分析値 (%)	No. z-score				
116				17.98	1	-0.42	4.22	1	-0.59	3.44	2	1.16	5.71	1	0.55	1.027	2	-0.03	0.651	1	-2.14			
117	12.61	1	-0.76	17.39	1	-2.93	4.06	1	-1.79	2.63	2	-1.31	5.70	1	0.47	1.025	2	-0.07	0.697	1	1.25			
118	13.40	1	1.97	17.93	4	-0.63	4.36	1	0.44	3.05	2	-0.03	5.69	1	0.39	0.979	2	-1.08	0.680	1	0.00			
119	12.78	1	-0.17	18.08	3	0.00	4.39	1	0.67	4.39	1	0.67	5.72	1	0.63	1.055	2	0.57			57.6	2	2.54	
120	12.75	1	-0.27	17.91	2	-0.72	5.29	1	2.41	2.77	1	-0.88	5.88	1	1.90	1.195	2	3.63	0.678	1	-0.14			
122	12.91	1	0.27	17.75	4	-1.40	4.33	1	0.22	3.23	3	0.52	5.53	1	-0.87	0.979	2	-1.08	0.669	1	-0.81	53.1	2	0.87
122				17.90	3	-0.76																48.3	3	-0.23
123	12.82	1	-0.03	18.07	2	-0.04	4.19	1	-0.82	3.02	2	-0.12	5.18	1	3.65									
123				18.15	3	0.29																		
125																1.057	1	0.62	0.678	1	-0.14			
126	12.60	1	-0.79																					
127	12.68	1	-0.51	17.85	4	-0.97	4.42	2	0.89	3.27	3	0.64	5.63	1	-0.07	1.026	2	-0.05	0.685	1	0.36			
127				18.15	3	0.29																		
128	12.83	1	0.00	18.10	2	0.08							5.60	1	-0.31									
130	13.11	1	0.96	17.99	3	-0.38	4.26	1	-0.29	3.07	1	0.03	5.47	1	-1.34	0.996	2	-0.70	0.689	1	0.66			
131	13.14	1	1.07	17.80	4	-1.18	4.35	1	0.37	3.01	2	-0.15	5.57	1	-0.55	0.997	2	-0.68	0.688	1	0.59	52.0	1	0.46
132	12.89	1	0.20	18.24	4	0.67	4.33	1	0.22	4.33	1	0.22	5.84	1	1.58	1.005	2	-0.51	0.687	1	0.51			
133	12.80	1	-0.10	18.06	4	-0.08	4.42	1	0.89	3.24	1	0.55	5.70	1	0.47	0.994	2	-0.75	0.677	1	-0.22			
133				18.34	3	1.10																		
134	13.14	1	1.07	17.90	3	-0.76	4.20	2	-0.74	2.85	3	-0.64	5.72	1	0.63	1.018	2	-0.22	0.693	1	0.96			
135	12.57	1	-0.89	18.41	1	1.40	4.17	1	-0.97	3.05	2	-0.03	5.59	1	-0.39	1.014	2	-0.31	0.690	1	0.73			
137	12.87	1	0.13	18.06	3	-0.08	4.53	1	1.72	3.00	2	-0.18	5.56	1	-0.63	1.003	2	-0.55	0.690	1	0.73	49.0	3	0.06
137				18.12	4	0.16										1.058	1	0.64						
138	12.54	1	-1.00	17.95	2	-0.55							5.12	1	4.12									
139	12.85	1	0.06	17.88	4	-0.84	4.20	1	-0.74	3.25	1	0.58	5.38	1	-2.06	0.999	2	-0.64	0.650	1	-2.21			
140	13.03	1	0.69	18.34	3	1.10	4.33	1	0.22	3.26	3	0.61	5.53	1	-0.87	1.062	2	0.73	0.666	1	-1.03	49.3	3	0.18
141	13.04	1	0.72	18.22	3	0.59	4.31	1	0.07	3.00	2	-0.18	5.64	1	0.00									
142	12.79	1	-0.13	17.68	4	-1.69	4.28	2	-0.14	3.54	3	1.47	5.70	1	0.47	1.098	2	1.51	0.680	1	0.00			
143				17.76	4	-1.35																		
143				18.31	3	0.97																		
144	12.78	1	-0.17	18.07	4	-0.04	4.25	2	-0.37	3.53	3	1.44	5.62	1	-0.15	1.156	2	2.78	0.649	1	-2.29			
145	12.90	1	0.24	17.86	1	-0.93	4.39	1	0.67	2.60	2	-1.41	5.61	1	-0.23	1.070	2	0.90	0.674	1	-0.44			
145				18.12	4	0.16				2.82	1	-0.73												
145				18.13	3	0.21																		
146	12.21	1	-2.14																			55.6	1	1.80
147	12.20	1	-2.17	18.50	1	1.78	3.37	1	-6.96				6.13	1	3.88				0.646	1	-2.51			
148				18.15	3	0.29	4.21	2	-0.67	3.52	3	1.41												
149	12.73	1	-0.34	18.15	4	0.29	4.14	2	-1.19	4.14	2	-1.19	5.65	1	0.07	1.038	1	0.20	0.672	1	-0.59			
150	12.80	1	-0.10	18.35	1	1.14	4.25	1	-0.37	2.90	2	-0.49	5.58	1	-0.47	1.000	2	-0.62	0.683	1	0.22			
150				19.09	3	4.22																		
151	12.98	3	0.51	17.95	3	-0.55							5.47	2	-1.34									
152				18.25	3	0.72																		
153	12.92	1	0.31	17.17	1	-3.86	4.15	1	-1.12	3.06	2	0.00	5.82	1	1.42									
154	12.43	1	-1.38	17.89	4	-0.80	4.46	2	1.19	3.23	3	0.52	5.56	1	-0.63	1.007	1	-0.46	0.671	1	-0.66			
155	12.80	1	-0.10	18.15	4	0.29	4.25	1	-0.37	3.18	3	0.36	5.64	1	0.00	0.995	1	-0.73	0.681	1	0.07	46.5	1	-1.58
157				18.81	3	3.10																		
159	13.01	1	0.62	18.25	3	0.72	4.42	1	0.89	3.46	3	1.22	5.37	1	-2.14	0.990	2	-0.84	0.661	1	-1.40			
160	12.67	1	-0.55	18.04	4	-0.16	4.38	1	0.59	2.61	2	-1.37	5.67	1	0.23	1.010	2	-0.40	0.676	1	-0.29			
161				18.32	3	1.01																		
163	12.60	1	-0.79										5.27	1	-2.93	1.075	2	1.01						
164	12.59	1	-0.83	18.25	3	0.72	4.21	1	-0.67	3.00	2	-0.18	5.63	1	-0.07	1.014	1	-0.31	0.673	1	-0.51	46.5	1	-1.58
166	13.64	2	2.80	18.12	3	0.16	4.21	2	-0.67	3.55	3	1.50	5.63	1	-0.07	1.015	2	-0.29	0.696	1	1.18	45.2	1	-2.06
167	12.64	1	-0.65	18.28	3	0.84	4.20	2	-0.74	3.42	3	1.10	5.79	1	1.19	1.095	2	1.45	0.670	1	-0.73			
168	12.71	1	-0.41																			56.4	1	2.10
170	13.18	1	1.21	17.97	1	-0.46	4.37	1	0.52	2.92	2	-0.42	5.43	1	-1.66	1.008	2	-0.44	0.683	1	0.22			
172	13.07	1	0.83	18.02	4	-0.25	4.15	2	-1.12	3.24	3	0.55	5.56	1	-0.63	1.018	2	-0.22	0.683	1	0.22			
173	13.14	1	1.07	17.98	4	-0.42	4.29	1	-0.07	2.65	2	-1.25	5.67	1	0.23	1.017	2	-0.25	0.682	1	0.14			
176	13.03	1	0.69	16.85	2	-2.22	4.19	1	-0.82	3.86	2	2.45	5.63	1	-0.07									
177	12.74	1	-0.31	18.03	2	-0.21	4.81	2	3.82	3.01	1	-0.15	5.63	1	-0.07				0.672	1	-0.59			
178	12.88	1	0.17	18.04	2	-0.16	4.38	1	0.59	2.94	2	-0.36	5.62	1	-0.15	1.030	2	0.03	0.665	1	-1.10	53.7	4	2.02
181	12.98	1	0.51	17.75	4	-1.40	4.20	1	-0.74	2.83	2	-0.70	6.26	1	4.21	1.390	1	2.89	0.650	1	-2.21			
182	13.03	1	0.69	17.62	4	-1.95							5.32	1	-2.53									
183	12.64	1	-0.65	18.07	4	-0.04	4.05	2	-1.87	3.02	3	-0.12	5.73	1	0.71	1.110	1	1.78	0.690	1	0.73	44.8	3	-1.69
184	13.04	1	0.72	17.75	4	-1.40	4.31	1	0.07	2.93	3	-0.39	5.70	1	0.47	1.003	2	-0.55	0.693	1	0.96			
185	12.74	1	-0.31	18.22	3	0.59	4.43	1	0.97	2.67	2	-1.19	5.72	1	0.63	0.987	1	-0.90	0.674	1	-0.44	47.3	3	-0.64
186	13.20	1	1.27	17.99	4	-0.38	4.20	1	-0.74	2.92	2	-0.42	5.49	1	-1.19	1.041	2	0.27	0.672	1	-0.59	46.3	3	-1.06
187	13.15	1	1.10	17.61	4	-1.99	4.43	2	0.97	3.05	2	-0.03	5.53	1	-0.87	1.121	1	2.02	0.682	1	0.14	52.1	1	0.50
188	12.97	1	0.48	17.94	3	-0.59	4.50	1	1.49	3.26	2	0.61	5.73	1	0.71	1.082	2	1.16	0.644	1	-2.66	51.2	3	0.98
189	12.81	1	-0.06	17.91	4	-0.72	4.31	2	0.07				5.80	1	1.26	1.056	2	0.60	0.6					

表 5 分析成績 (3)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(糖類分析-ケミカル法)	SL(LC・HA(秤量))		
	分析値 (%)	No. z-score			分析値 (g(力価/t))	No. z-score												
200	12.09	1 -2.55	18.56	1 2.03	4.56	1 1.94	2.58	1 -1.47	5.55	1 -0.71								
201	11.63	1 -1.15	17.88	1 -0.84	4.26	1 -0.29	2.51	2 -1.68	5.85	1 1.66	0.773	1 -5.58	0.632	1 -3.54				
202	12.96	1 0.44							5.58	2 -0.47								
203	12.29	1 -1.86							5.46	1 -1.42								
207	12.70	1 -0.44	17.71	1 -1.57	4.26	1 -0.29	2.34	2 -2.20	5.74	1 0.79	1.030	2 0.03	0.689	1 0.66	52.5	1 0.65	50.0	4 0.48
208	13.08	1 0.86	18.17	4 0.38	4.27	1 -0.22	2.99	1 -0.21	5.64	1 0.00	0.970	2 -1.27	0.689	1 0.66				
209	12.78	1 -0.17	17.68	4 -1.69	4.11	2 -1.42	3.60	2 1.65	5.77	1 1.03	1.039	2 0.22	0.660	1 -1.47				
210	12.83	1 0.00	18.29	4 0.89	4.38	1 0.59	2.76	2 -0.91	5.60	1 -0.31	1.030	2 0.03	0.690	1 0.73				
211	9.44	1 -11.22	18.33	2 1.06	4.31	1 0.07	3.37	2 0.95	5.57	1 -0.55	1.015	2 -0.29	0.731	1 3.76				
212	13.20	1 1.27	17.69	2 -1.65	4.18	1 -0.89	3.61	1 1.68	5.70	1 0.47	1.027	2 -0.03	0.677	1 -0.22				
213	12.86	1 0.10	17.73	4 -1.48	4.33	1 0.22	2.65	2 -1.25	5.63	1 -0.07	0.876	2 -3.33	0.685	1 0.36				
231	12.52	1 -1.07	18.26	4 0.76	4.19	1 -0.82	2.44	2 -1.90	5.74	1 0.79	1.163	2 2.93	0.653	1 -1.99	48.1	3 -0.31		
232	13.05	1 0.76	18.19	4 0.46	4.73	1 3.22	3.14	1 0.24	5.68	1 0.31	1.112	1 1.82	0.655	1 -1.84				
233	13.28	1 1.55	17.84	3 -1.01	4.29	1 -0.07	3.10	2 0.12	5.55	1 -0.71								
234	12.79	1 -0.13	18.24	4 0.67	4.25	1 -0.37	3.24	2 0.55	5.65	1 0.07	1.039	2 0.22	0.682	1 0.14				
235	13.17	1 1.17	18.00	2 -0.33	4.34	1 0.29	3.00	2 -0.18	5.75	1 0.87	1.020	2 -0.18	0.679	1 -0.07				
236	12.55	1 -0.96	18.05	4 -0.12	4.39	1 0.67	2.97	1 -0.27	5.50	1 -1.11	1.041	1 0.27	0.687	1 0.51				
237	12.80	1 -0.10	18.35	2 1.14	4.44	1 1.04	2.79	2 -0.82	5.61	1 -0.23	1.060	1 0.68	0.672	1 -0.59				
238	13.53	1 2.42	18.06	3 -0.08					5.70	1 0.47								
239	12.99	1 0.55	18.22	4 0.59	4.20	1 -0.74	3.00	2 -0.18	5.55	1 -0.71	1.067	2 0.84	0.669	1 -0.81	49.7	3 0.35		
240	12.72	1 -0.38	18.28	2 0.84	4.77	1 3.52			5.73	1 0.71								
241	13.03	1 0.69	17.95	1 -0.55	4.20	1 -0.74	3.01	1 -0.15	5.75	1 0.87	1.058	2 0.64	0.683	1 0.22				
242	12.04	1 -2.73			4.12	1 -1.34	2.78	2 -0.85	5.62	1 -0.15	1.045	2 0.36	0.687	1 0.51				
243	12.47	1 -1.24	17.90	4 -0.76	4.25	1 -0.37	3.22	1 0.49	5.67	1 0.23	1.244	1 4.70	0.640	1 -2.95	52.9	2 0.80		
244	11.39	1 -4.98	17.73	4 -1.48	4.40	2 0.74												
245	14.12	1 4.46	19.11	2 4.37	10.03	1 42.94	3.65	2 1.80	5.19	1 -3.57								
246	13.33	1 1.72	18.03	4 -0.21	4.04	2 -1.94	3.27	4 0.64	5.74	1 0.79	1.080	1 1.12	0.684	1 0.29	47.4	3 -0.60		
247	12.74	1 -0.31	17.89	4 -0.80	4.68	1 2.84			5.52	1 -0.95	1.013	2 -0.33	0.680	1 0.00				
248	12.75	1 -0.27	18.31	2 0.97	4.35	1 0.37	2.58	2 -1.47	5.68	1 0.31	1.032	1 0.07	0.678	1 -0.14	54.1	1 1.24	55.4	4 2.73
249	12.89	1 0.20	16.79	4 -5.48	4.60	1 2.24	3.04	1 -0.06	5.72	1 0.63	1.000	2 -0.62	0.685	1 0.36				
250															48.9	1 -0.68		
251	12.63	1 -0.69			3.93	2 -2.77	2.98	2 -0.24	5.31	1 -2.61								
252	12.53	1 -1.03							5.84	1 1.58								
253	12.89	1 0.20	17.92	4 -0.67	4.16	2 -1.04	3.16	1 0.30	5.73	1 0.71	1.112	2 1.82	0.685	1 0.36	51.4	3 1.06		
254	12.66	1 -0.58	18.10	3 0.08	4.25	2 -0.37	3.05	1 -0.03	5.72	1 0.63	0.974	2 -1.19	0.603	1 -5.62	50.8	3 0.81		
255	12.78	1 -0.17	17.81	4 -1.14	4.55	1 1.87	3.07	1 0.03	5.60	1 -0.31	1.081	2 1.14	0.676	1 -0.29	51.5	3 1.10		
255			17.98	3 -0.42														
256	12.74	1 -0.31	17.81	4 -1.14	4.15	1 -1.12	3.10	2 0.12	5.66	1 0.15								
257	12.96	1 0.44	18.05	2 -0.12	4.46	1 1.19	2.45	2 -1.87	5.72	1 0.63	0.999	3 -0.64	0.689	1 0.66				
258	13.10	1 0.93					2.74	2 -0.98	5.74	1 0.79					52.5	1 0.65		
259	13.06	1 0.79	18.08	4 0.00	4.17	1 -0.97			5.61	1 -0.23								
260	13.00	1 0.58	17.92	4 -0.67	4.38	1 0.59	3.30	3 0.73	5.71	1 0.55	1.131	2 2.23	0.705	1 1.84				
261	12.85	1 0.06	18.10	3 0.08	4.21	1 -0.67	2.96	2 -0.30	5.62	1 -0.15	0.988	1 -0.88	0.686	1 0.44	53.3	1 0.94		
262	12.53	1 -1.03	18.02	3 -0.25	4.34	1 0.29	3.24	2 0.55	5.65	1 0.07	1.083	2 1.19	0.668	1 -0.88	49.8	2 -0.35		
263	12.87	1 0.13	18.00	4 -0.33	4.28	1 -0.14	2.91	2 -0.45	5.60	1 -0.31	0.978	1 -1.10	0.629	1 -3.76	51.9	1 0.42		
264	12.77	1 -0.20	18.05	3 -0.12	4.13	2 -1.27			5.70	1 0.47								
266	12.15	1 -2.35	17.75	4 -1.40	4.08	2 -1.64	2.80	2 -0.79	5.69	1 0.39								
267	12.63	1 -0.69	18.34	2 1.10	4.88	1 4.34			5.50	1 -1.11								
268	12.46	1 -1.27	17.34	4 -3.14	4.48	1 1.34	3.50	3 1.34	5.19	1 -3.57								
269	12.61	1 -0.76	18.33	4 1.06	4.25	1 -0.37	2.77	2 -0.88	5.72	1 0.63	1.077	2 1.05	0.668	1 -0.88				
270	12.64	1 -0.65	17.91	4 -0.72	4.22	1 -0.59	2.99	1 -0.21	5.73	1 0.71								
271	12.89	1 0.20	18.09	3 0.04	4.37	1 0.52	2.84	2 -0.67	5.69	1 0.39	1.050	2 0.46	0.643	1 -2.73				
272	12.81	1 -0.06			4.41	1 0.82	2.86	2 -0.61	5.81	1 1.34	0.989	2 -0.86	0.666	1 -1.03	46.7	1 -1.50		
276	12.57	1 -0.89	18.04	4 -0.16	4.53	1 1.72	2.99	2 -0.21	5.66	1 0.15	1.067	2 0.84	0.655	1 -1.84				
281	12.80	1 -0.10	18.20	1 0.50	4.36	1 0.44	3.00	2 -0.18	5.63	1 -0.07	1.070	1 0.90	0.685	1 0.36				
284	12.27	1 -1.93	17.23	2 -3.61	4.30	1 0.00	3.76	2 2.14	5.60	1 -0.31	0.966	2 -1.36	0.643	1 -2.73				
290	12.86	1 0.10	17.79	2 -1.23	4.50	1 1.49	2.67	2 -1.19	5.59	1 -0.39	1.132	2 2.26	0.675	1 -0.36	50.9	1 0.05	50.2	4 0.56
290																		
293	13.51	1 2.35	17.77	4 -1.31	3.91	2 -2.92	3.31	3 0.76	5.49	1 -1.19	1.037	2 0.18	0.669	1 -0.81				
301	13.20	1 1.27	18.17	4 0.38	4.42	2 0.89	3.60	3 1.65	5.65	1 0.07	1.040	2 0.25	0.690	1 0.73	47.8	3 -0.43		
302	12.56	1 -0.93	18.28	4 0.84	4.55	1 1.87	2.79	1 -0.82	5.59	1 -0.39	1.041	2 0.27	0.699	1 1.40				
303	12.98	1 0.51	17.87	2 -0.89	4.56	1 1.94			5.74	1 0.79	1.090	2 1.34	0.720	1 2.95				
304	12.89	1 0.20	18.38	3 1.27	4.25	2 -0.37	2.63	2 -1.31	5.65	1 0.07	1.030	2 0.03	0.680	1 0.00				
305	12.18	1 -2.24	17.66	4 -1.78	4.84	1 4.04			5.65	1 0.07								
306	12.98	1 0.51	18.12	2 0.16	4.17	1 -0.97	3.58	2 1.59	5.74	1 0.79	0.970	1 -1.27	0.710	1 2.21	52.4	1 0.61		
307	12.62	1 -0.72	18.36	3 1.18	4.29	1 -0.07			5.60	1 -0.31	1.021	2 -0.16	0.687	1 0.51				
308	12.66	1 -0.58	17.79	4 -1.23	4.22	2 -0.59	3.05	1 -0.03	5.58	1 -0.47	0.901	2 -2.78	0.680	1 0.00				
309	11.88	1 -3.28	18.53	3 1.91	4.35	1 0.37			5.69	1 0.39								
310																		
311	12.71	1 -0.41	18.31	2 0.97	4.39	1 0.67	2.95	2 -0.33	5.63	1 -0.07	1.055	1 0.57	0.677	1 -0.22				
312	12.68	1 -0.51	18.08	1 0.00	4.33	1 0.22			5.79	1 1.19	1.033	2 0.09	0.682	1 0.14	52.2	3 1.40		
313	12.58	1 -0.86	17.82	2 -1.10	4.34	1 0.29			5.31	1 -2.61								
314	13.05	1 0.76	18.13	3 0.21	4.41	1 0.82	2.64	2 -1.28	5.62	1 -0.15	1.038	2 0.20	0.699	1 1.40				
315	12.97	1 0.48	18.07	2 -0.04	5.59	1 9.66	2.35	2 -2.17	5.25	1 -3.09								
316	13.17	1 1.17	18.23	4 0.63					5.74	1 0.79								
317	12.79	1 -0.13	18.28	3 0.84	4.35	2 0.37	3.41	2 1.07	5.64	1 0.00	1.059	2 0.66	0.711	1 2.29	47.1	1 -1.35		
318	11.54	1 -4.46	18.16	3 0.33	4.38	1 0.59	3.92	1 2.63	5.69	1 0.39	2.095	1 23.29	0.646	1 -2.51				
319	12.74	1 -0.31	18.21	3 0.55	4.24	2 -0.44	2.79	2 -0.82	5.63	1 -0.07	1.007	2 -0.46	0.708	1 2.06				

表 5 分析成績 (4)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析・78-072030)	SL(LC・バイオアッセイ)						
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力価/l)	No. z-score	分析値 (g/力価/l)	No. z-score																
322	12.76	1	-0.24	17.79	4	-1.23	4.36	1	0.44	5.74	1	0.79										
323	13.01	1	0.62	18.05	4	-0.12	4.05	2	-1.87	5.56	1	-0.63										
323				18.12	3	0.16																
324	12.91	1	0.27	17.90	2	-0.76	4.21	2	-0.67	5.80	1	1.26	1.127	2	2.15	0.637	1	-3.17				
325	12.51	1	-1.10	18.40	3	1.35	4.33	1	0.22	2.65	2	-1.25	5.55	1	-0.71	1.010	2	-0.40				
326	13.07	1	0.83	18.22	3	0.59				6.24	1	4.76						47.6	1	-1.17		
327	13.30	1	1.62	18.08	4	0.00	4.37	1	0.52	5.60	1	-0.31	1.155	2	2.76	0.659	1	-1.55	48.6	2	-0.80	
328	13.06	1	0.79	17.99	2	-0.38	4.73	1	3.22	3.07	2	0.03	5.72	1	0.63	1.023	2	-0.12	0.683	1	0.22	
329	12.27	1	-1.93	18.22	2	0.59	4.17	2	-0.97	2.77	4	-0.88	5.71	1	0.55	1.180	1	3.30	0.680	1	0.00	
330	12.79	1	-0.13	18.20	3	0.50	4.31	2	0.07	3.16	2	0.30	5.76	1	0.95	1.083	2	1.19	0.684	1	0.29	
330				18.12	2	0.16	4.53	1	1.72	3.00	2	-0.18	5.70	1	0.47							
332	12.79	1	-0.13	18.18	4	0.42	4.46	1	1.19	2.14	2	-2.82	5.65	1	0.07	1.070	2	0.90	0.647	1	-2.43	
333	12.64	1	-0.65	18.20	1	0.50	4.37	1	0.52	2.27	2	-2.42	5.70	1	0.47	0.989	2	-0.86	0.685	1	0.36	
334	12.73	1	-0.34	18.24	3	0.67	4.23	1	-0.52	3.01	2	-0.15	5.49	1	-1.19	1.040	2	0.25	0.660	1	-1.47	
335	12.97	1	0.48	18.62	2	2.29	4.37	1	0.52				5.59	1	-0.39				55.1	1	1.61	
336	12.68	1	-0.51	18.10	4	0.08	4.30	1	0.00	3.30	2	0.73	5.33	1	-2.45							
337	12.59	1	-0.83	18.19	3	0.46	4.34	1	0.29	2.80	2	-0.79	5.68	1	0.31	1.010	2	-0.40	0.677	1	-0.22	
338				18.15	3	0.29	4.21	2	-0.67	3.52	3	1.41										
339	13.75	2	3.18	18.40	4	1.35	4.26	1	-0.29	3.49	3	1.31	5.41	1	-1.82	1.233	1	4.46	0.670	1	-0.73	
340	12.89	1	0.20	18.30	4	0.93	4.46	1	1.19	3.30	3	0.73	5.74	1	0.79	1.015	2	-0.29	0.675	1	-0.36	
341	12.48	1	-1.21	18.13	3	0.21	4.27	1	-0.22	2.60	2	-1.41	5.45	1	-1.50	0.820	2	4.55	0.560	1	-8.87	
342	12.64	1	-0.65	18.27	3	0.80	4.26	2	-0.29	3.02	2	-0.12	5.81	1	1.34	0.971	2	-1.25	0.697	1	1.25	
343	12.76	1	-0.24	17.80	4	-1.18	4.49	1	1.42	3.19	2	0.39	5.60	1	-0.31	0.983	2	-0.99	0.722	1	3.10	
344	13.17	1	1.17	17.86	4	-0.93	4.52	2	1.64	3.51	2	1.37	5.57	1	-0.55	1.039	1	0.22	0.684	1	0.29	
345	12.98	1	0.51	18.08	2	0.00	4.29	1	-0.07	3.41	3	1.07	5.64	1	0.00	1.030	2	0.03	0.678	1	-0.14	
346	12.13	1	-2.42							5.10	1	-4.28	1.004	1	-0.53	0.680	1	0.00				
347																			50.2	1	-0.20	
348	12.87	1	0.13	18.07	4	-0.04	4.40	1	0.74	3.03	1	-0.09	5.55	1	-0.71	1.007	2	-0.46	0.670	1	-0.73	
349	13.21	1	1.31	18.17	3	0.38	4.39	2	0.67	2.63	2	-1.31	5.69	1	0.39	1.022	2	-0.14	0.660	1	-1.47	
350	12.76	1	-0.24	18.45	3	1.57	4.26	2	-0.29				5.72	1	0.63	1.055	2	0.57	0.680	1	0.00	
352	12.64	1	-0.65	18.63	2	2.33	4.55	1	1.87	3.47	2	1.25	5.66	1	0.15	1.030	2	0.03	0.703	1	1.70	
384	12.62	1	-0.72	17.68	3	-1.69	4.19	1	-0.82	2.75	2	-0.95	5.73	1	0.71							

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

注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

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

サリノマイシンナトリウム

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

表 5 分析成績 (7)

試料番号	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モナンデル	
	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
200	9.95	1 -0.95	56.49	1 -0.65	20.51	1 -2.38										
201																
202	10.25	1 0.40			20.49	2 -2.53										
203	9.86	1 -1.36			20.82	1 0.07										
207	10.09	1 -0.31	55.46	1 -2.14	20.93	1 0.95	1.64	2 0.24	10.8	1 -0.32	61.64	1 0.94	61.84	1 0.33	15.3	1 0.71
208	10.34	1 0.81	56.54	4 -0.57	20.90	1 0.71										
209	9.86	1 -1.36	56.47	4 -0.67	20.88	1 0.55										
210	10.17	1 0.04	57.17	4 0.33	20.99	1 1.42										
211	7.66	1 -11.33	57.57	2 0.91	20.79	1 -0.15										
212	10.34	1 0.81	56.44	2 -0.72	20.95	1 1.11										
213	10.21	1 0.22	57.01	4 0.10	20.86	1 0.39					56.96	1 -1.51	66.13	1 1.41		
231	9.81	1 -1.58	57.88	4 1.35	21.03	1 1.74					62.94	1 1.62	67.02	1 1.63		
232																
233	10.26	1 0.45	56.70	3 -0.34	20.64	1 -1.34										
234	10.13	1 -0.13	56.93	4 -0.01	20.78	1 -0.23	1.71	1 0.94			57.85	1 -1.04	65.96	1 1.37		
235	10.37	1 0.95	56.91	2 -0.04	20.90	1 0.71	1.73	1 1.14			58.53	1 -0.68	59.80	1 -0.17		
236	10.10	1 -0.27	56.42	4 -0.75	20.81	1 0.00										
237																
238	10.43	1 1.22	58.02	3 1.56	20.86	1 0.39										
239	8.93	1 -5.57	57.43	4 0.70	21.40	1 4.68	2.24	2 6.24			59.12	1 -0.37	66.62	1 1.53		
240	9.99	1 -0.77	56.52	2 -0.60	20.79	1 -0.15	1.67	2 0.54								
241	10.22	1 0.27	56.98	1 0.05	20.89	1 0.63	1.73	1 1.14			59.05	1 -0.41	59.85	1 -0.15		
242	9.57	1 -2.67			20.79	1 -0.15										
243	9.82	1 -1.54	56.64	4 -0.43	20.92	1 0.87									15.3	1 0.71
244	9.47	1 -3.12	55.61	4 -1.92												
245	11.08	1 4.17	58.93	2 2.87	20.75	1 -0.47										
246	10.28	1 0.54	56.59	4 -0.50	20.88	1 0.55			16.1	1 2.53						
247	10.14	1 -0.09	56.57	4 -0.53	20.90	1 0.71	1.75	1 1.34	11.4	1 0.00						
248	10.19	1 0.13	57.32	2 0.54	20.91	1 0.79	1.61	2 -0.04	11.3	1 -0.05	61.47	1 0.85	61.10	1 0.15	15.3	1 0.71
249	10.15	1 -0.04	46.72	4 -14.78	20.82	1 0.07	1.43	2 -1.84	10.2	1 -0.64	56.32	1 -1.84	55.48	1 -1.25		
250									11.8	1 0.21	59.30	1 -0.28	57.12	1 -0.84	15.6	1 1.13
251	10.06	1 -0.45			20.81	1 0.00										
252									16.7	1 2.85						
253	10.24	1 0.36	56.72	4 -0.31	20.88	1 0.55			3.9	1 -4.04						
254	9.98	1 -0.81	58.23	3 1.86	20.69	1 -0.95			9.3	1 -1.13					14.5	1 -0.42
255	10.17	1 0.04	56.37	4 -0.82	20.89	1 0.63			12.3	1 0.48	60.18	1 0.17	61.02	1 0.13	14.8	1 0.00
255			57.30	3 0.52												
256	10.14	1 -0.09	56.50	4 -0.63	20.93	1 0.95			9.4	1 -1.07						
257	10.16	1 0.00	56.60	2 -0.49	20.60	1 -1.66	1.28	3 -3.34	19.3	1 4.26	60.61	2 0.40	58.31	2 -0.54		
258	10.44	1 1.26			20.93	1 0.95			12.4	1 0.53	59.91	1 0.03	60.02	1 -0.11	14.9	1 0.14
259	10.28	1 0.54	56.82	4 -0.17	20.72	1 -0.71										
260	10.41	1 1.13	56.51	4 -0.62	20.83	1 0.15										
261	10.09	1 -0.31	57.65	3 1.02	20.86	1 0.39										
262	9.90	1 -1.17	57.83	3 1.28	20.75	1 -0.47										
263	10.21	1 0.22	56.63	4 -0.44	20.72	1 -0.71										
264	10.28	1 0.54	58.02	3 1.56	20.87	1 0.47										
266	10.01	1 -0.68	56.68	4 -0.37	20.53	1 -2.22										
267	9.87	1 -1.31	56.77	2 -0.24	20.88	1 0.55	1.64	2 0.24								
268	9.87	1 -1.31	55.26	4 -2.43	20.98	1 1.34										
269	9.91	1 -1.13	57.42	4 0.69	20.93	1 0.95					58.31	1 -0.80	58.02	1 -0.61	15.2	1 0.56
270	10.10	1 -0.27	56.53	4 -0.59	20.85	1 0.31										
271	10.27	1 0.49	57.67	3 1.05	20.89	1 0.63					49.25	1 -5.55	56.27	1 -1.05	14.3	1 -0.71
272	10.30	1 0.63			20.98	1 1.34	1.67	1 0.54	14.3	1 1.56	61.12	1 0.67	55.82	1 -1.17	15.5	1 0.99
276	10.12	1 -0.18	56.75	4 -0.27	20.72	1 -0.71					48.75	1 -5.82	53.50	1 -1.75		
281	10.10	1 -0.27	56.85	1 -0.13	20.89	1 0.63										
284	9.66	1 -2.26	55.49	2 -2.09	20.74	1 -0.55										
290	10.12	1 -0.18	57.12	2 0.26	21.00	1 1.50	1.64	2 0.24	11.8	1 0.21	61.25	1 0.74	65.99	1 1.38	15.0	1 0.28
290							1.73	1 1.14								
293	10.69	1 2.40	56.67	4 -0.39	20.69	1 -0.95										
301	10.47	1 1.40	56.62	4 -0.46	20.80	1 -0.07										
302	9.99	1 -0.77	57.27	4 0.47	20.96	1 1.19										
303	10.20	1 0.18	56.28	2 -0.95	21.02	1 1.66					58.75	1 -0.57	58.14	1 -0.58		
304	9.96	1 -0.90	57.65	3 1.02	20.71	1 -0.79					58.40	1 -0.75	70.50	1 2.51	13.4	1 -1.98
305	10.38	1 0.99	56.62	4 -0.46	20.60	1 -1.66										
306	9.70	1 -2.08	56.80	2 -0.20	20.72	1 -0.71					60.83	1 0.51	57.81	1 -0.67	15.1	1 0.42
307	9.67	1 -2.22	57.65	3 1.02	21.01	1 1.58										
308	9.97	1 -0.86	56.78	4 -0.23	20.88	1 0.55					63.61	1 1.97	62.23	1 0.43		
309	9.29	1 -3.94	57.92	3 1.41	20.84	1 0.23										
310									27.6	1 8.74						
311	10.03	1 -0.58	57.43	2 0.70	20.81	1 0.00										
312	9.94	1 -0.99	57.05	1 0.15	20.88	1 0.55					60.27	1 0.22				
313	9.80	1 -1.63	56.77	2 -0.24	20.52	1 -2.30										
314	10.35	1 0.86	57.70	3 1.09	20.86	1 0.39					59.23	1 -0.32	62.23	1 0.43		
315	10.08	1 -0.36	57.32	2 0.54	20.77	1 -0.31										
316	10.20	1 0.18	57.84	4 1.30	20.64	1 -1.34										
317	10.30	1 0.63	57.48	3 0.78	20.83	1 0.15					59.13	1 -0.37	60.73	1 0.06	15.3	1 0.71
318	8.79	1 -6.21	33.46	1 -33.96	20.81	1 0.00										
319	10.09	1 -0.31	58.13	3 1.72	20.82	1 0.07					58.22	1 -0.85	55.62	1 -1.22	14.2	1 -0.85
320	9.96	1 -0.90	56.67	4 -0.39	20.70	1 -0.87	2.03	2 4.14			57.82	1 -1.06	59.79	1 -0.17		
321	10.25	1 0.40	56.79	2 -0.21	20.86	1 0.39					59.73	1 -0.05	58.69	1 -0.45		

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									
322	10.17	1	0.04	56.69	4	-0.36	20.84	1	0.23																
323	10.29	1	0.58	57.50	4	0.81	20.80	1	-0.07	1.69	2	0.74													
323				57.73	3	1.14																			
324	10.16	1	0.00	55.84	2	-1.59	21.09	1	2.22			58.30	1	-0.80	59.30	1	-0.29								
325	9.81	1	-1.58	57.85	3	1.31	20.67	1	-1.11			59.37	1	-0.24	67.50	1	1.75								
326	10.19	1	0.13	57.64	3	1.01	21.02	1	1.66																
327	10.45	1	1.31	57.59	4	0.94	20.57	1	-1.90			63.75	1	2.05											
328	10.23	1	0.31	57.07	2	0.18	20.79	1	-0.15																
329	9.76	1	-1.81	57.86	2	1.33	20.83	1	0.15			38.80	1	-11.04	37.70	1	-5.71								
330	10.05	1	-0.49	57.48	3	0.78	20.71	1	-0.79			58.55	1	-0.67	56.41	1	-1.02								
331	9.59	1	-2.58	57.12	2	0.26	20.75	1	-0.47																
332	10.27	1	0.49	57.14	4	0.28	20.87	1	0.47																
333	10.02	1	-0.63	58.12	1	1.70	20.71	1	-0.79	1.62	2	0.04	11.0	1	-0.21	60.57	1	0.38							
334	9.97	1	-0.86	57.51	3	0.82	20.68	1	-1.03			61.04	1	0.62	67.37	1	1.72								
335	10.19	1	0.13	56.60	2	-0.49	20.82	1	0.07																
336	10.03	1	-0.58	57.03	4	0.13	20.57	1	-1.90																
337	10.04	1	-0.54	58.07	3	1.63	20.70	1	-0.87																
338				57.87	3	1.34																			
339	10.59	2	1.94	56.88	4	-0.08	20.97	1	1.26								14.8	1	0.00						
340	9.92	1	-1.08	57.35	4	0.59	21.00	1	1.50																
341	9.91	1	-1.13	58.15	3	1.75	20.72	1	-0.71	1.54	2	-0.74	13.0	1	0.86				13.9	1	-1.27				
342	9.93	1	-1.04	57.81	3	1.25	20.86	1	0.39																
343	10.08	1	-0.36	56.03	4	-1.31	20.86	1	0.39	0.84	1	-7.74			61.20	1	0.71	62.15	1	0.41	15.1	1	0.42		
344	10.35	1	0.86	56.32	4	-0.89	20.90	1	0.71			6.4	1	-2.69											
345	10.29	1	0.58	57.00	2	0.08	20.70	1	-0.87																
346	9.49	1	-3.03				20.99	1	1.42	1.59	2	-0.24			63.13	1	1.72	64.88	1	1.10					
347												10.5	1	-0.48	61.28	1	0.75	62.40	1	0.48			14.7	1	-0.14
348	10.19	1	0.13	56.92	4	-0.02	21.02	1	1.66																
349	10.41	1	1.13	57.85	3	1.31	20.86	1	0.39																
350	10.05	1	-0.49	57.67	3	1.05	20.84	1	0.23																
352	10.11	1	-0.22	56.63	2	-0.44	20.84	1	0.23	1.73	1	1.14	12.1	1	0.37	61.82	1	1.03	56.35	1	-1.03				
384	10.26	1	0.45	57.79	3	1.22	20.88	1	0.55																

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 取法	1 飼料分析基準	1 溶媒抽出法	1 LC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 取法	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		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 LC法
2 その他

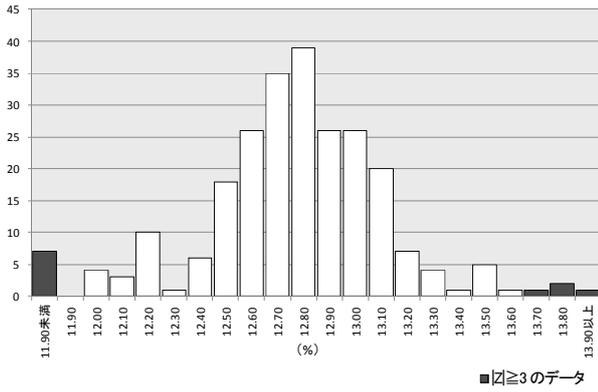


図1 水分の分析成績 (A 試料)

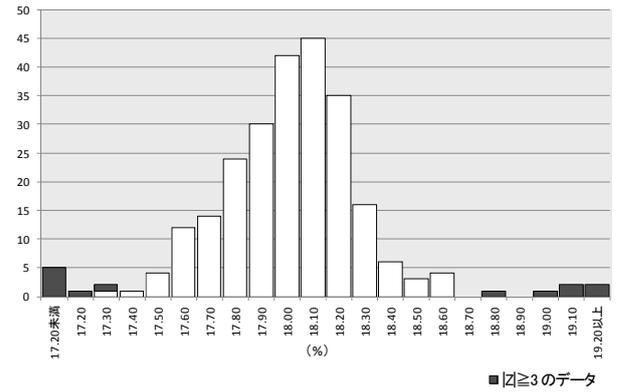


図2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

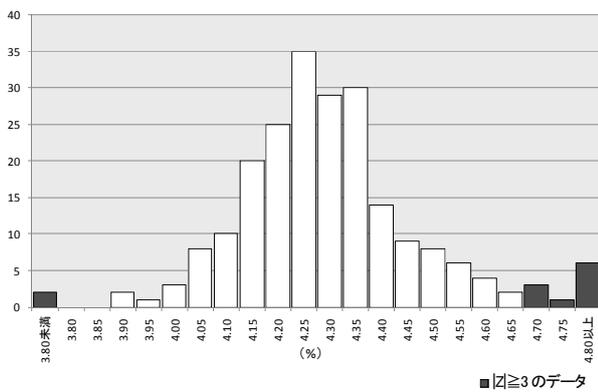


図3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

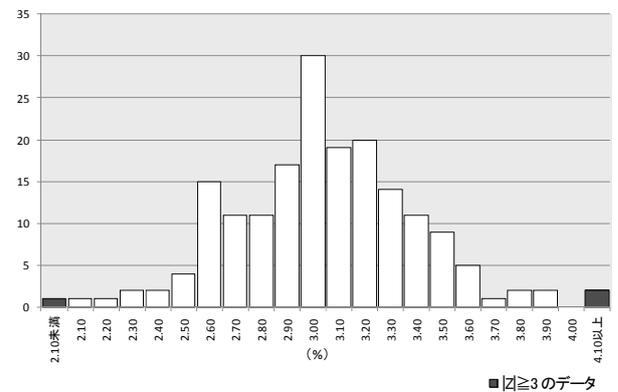


図4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

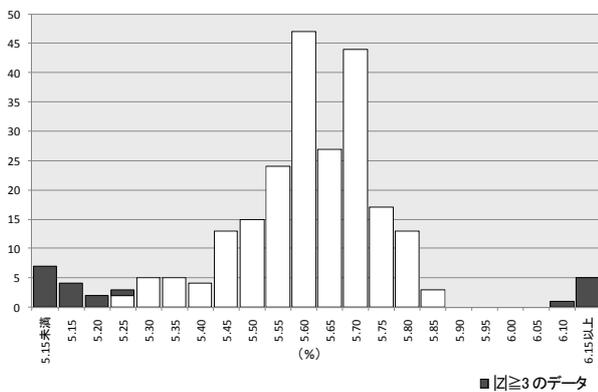


図5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

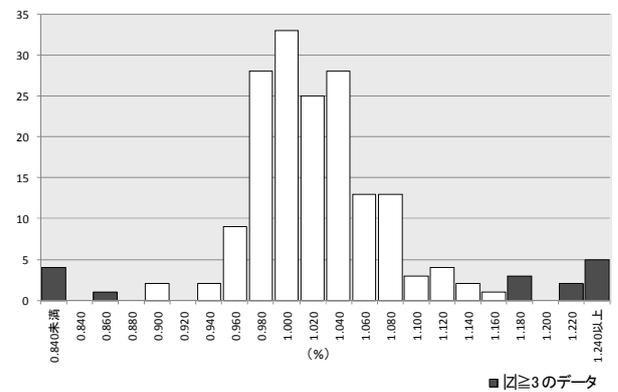


図6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

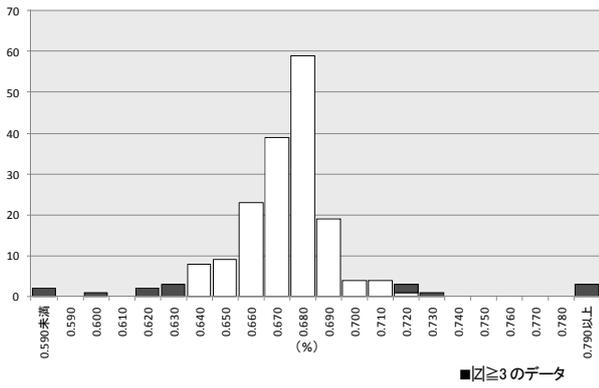


図7 リンの分析成績 (A 試料)

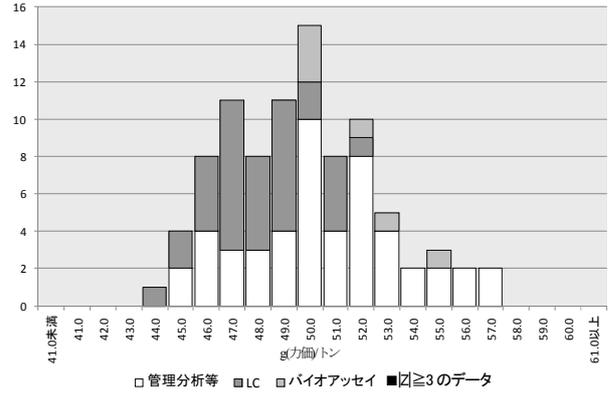


図8 サリノマイシンナトリウムの分析成績 (A 試料)

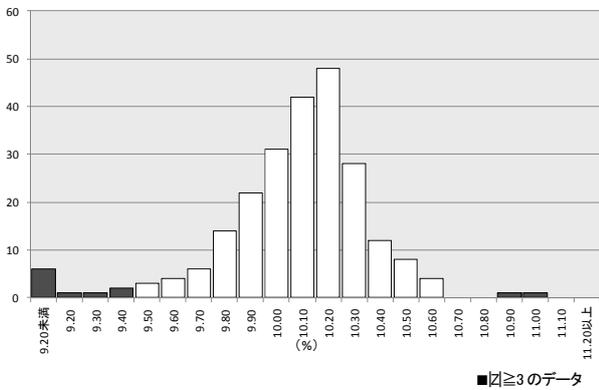


図9 水分の分析成績 (B 試料)

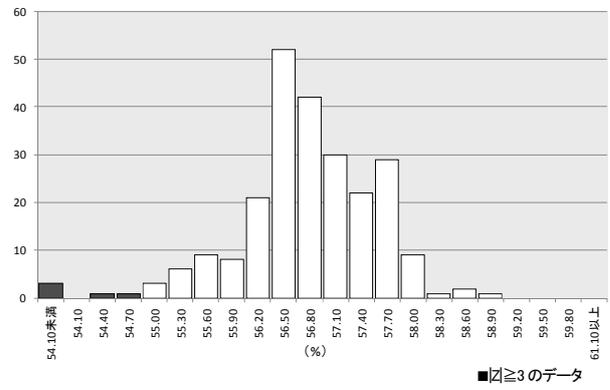


図10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

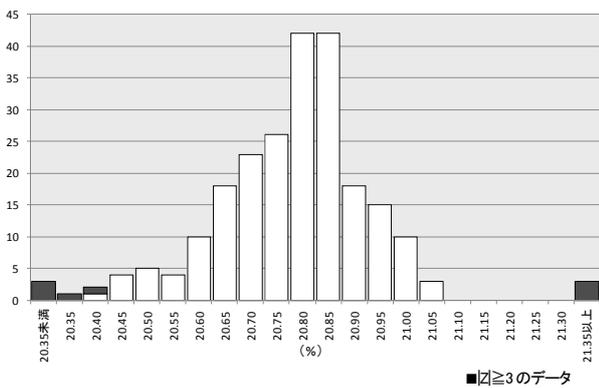


図11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

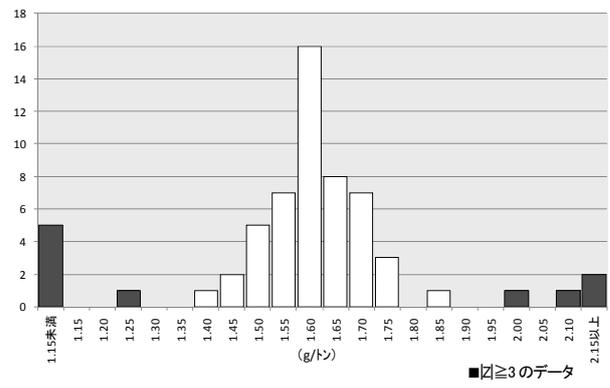


図12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

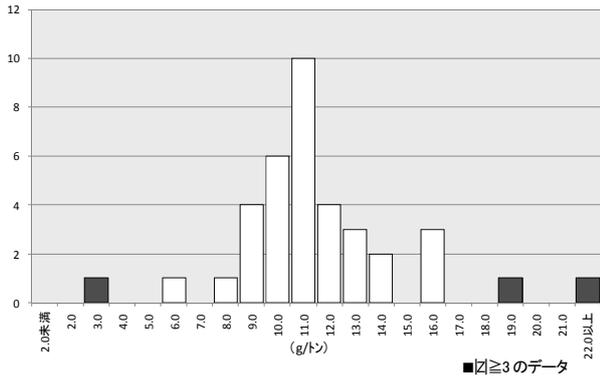


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

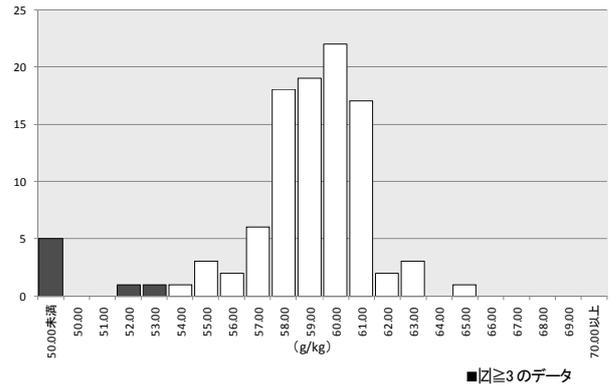


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

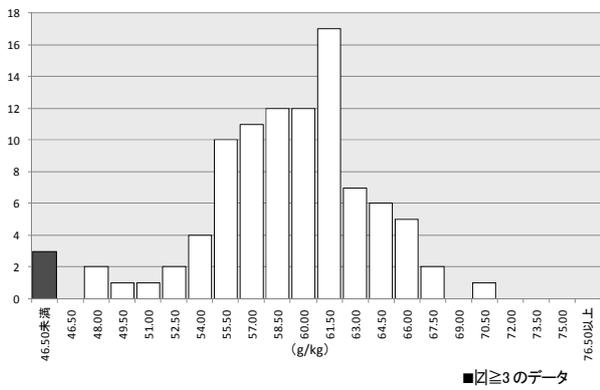


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

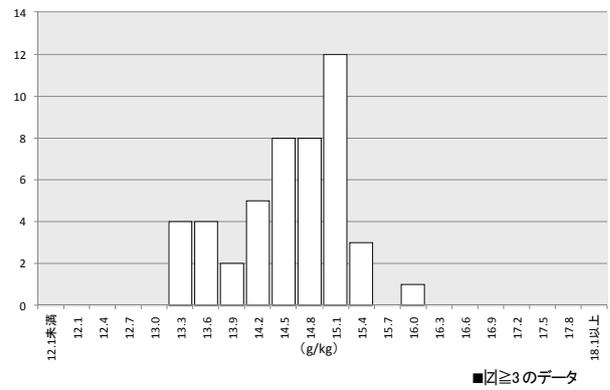


図 16 クエン酸モランテルの
分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	243	250	218	180	239
1 中央値	12.83	18.08	4.30	3.06	5.64
1 下限境界値 ^{注2}	11.96	17.37	3.90	2.08	5.26
1 上限境界値	13.70	18.79	4.70	4.04	6.02
2 平均值	12.83	18.06	4.30	3.08	5.63
2 95%信頼区間	12.79~12.86	18.03~18.08	4.28~4.32	3.03~3.13	5.62~5.65

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	SL (管理分析等) ^{注3} (g(力価)/トン)	SL (LC等) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	178	180	50	40
1 中央値	1.029	0.680	50.8	48.9
1 下限境界値 ^{注2}	0.891	0.639	42.7	41.7
1 上限境界値	1.166	0.721	58.8	56.0
2 平均值	1.031	0.678	51.1	49.1
2 95%信頼区間	1.024~1.038	0.676~0.680	50.2~51.9	48.4~49.8

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

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 SL (管理分析等) は、サリノマイシンナトリウムの管理分析及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 SL (LC 等) は、サリノマイシンナトリウムの LC 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 (g/トン)	エトキシキン (g/トン)
データ数	234	240	229	60	37
1 中央値	10.16	56.94	20.81	1.62	11.40
1 下限境界値 ^{注2}	9.50	54.87	20.43	1.31	5.80
1 上限境界値	10.82	59.01	21.19	1.92	17.00
2 平均值	10.15	56.98	20.80	1.63	11.70
2 95%信頼区間	10.12~10.18	56.89~57.06	20.79~20.82	1.61~1.65	11.0~12.4

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 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
	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
データ数	101	96	47
1	中央値	59.84	60.49
	下限境界値 ^{注2}	54.12	48.53
	上限境界値	65.56	72.44
2	平均値	59.79	60.24
	95%信頼区間	59.41~60.17	59.37~61.10
			14.5~14.8

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				検出率 (%)	
		検 出			不検出		
		多量	中量	少量			計
とうもろこし	30	136	1	0	137	0	100
ライ麦	10	17	86	17	120	17	88
大麦	10	17	81	15	113	24	82
コーングルテンフィード	10	0	14	8	22	115	16
大豆油かす	10	2	100	28	130	7	95
あまに油かす	8	0	51	34	85	52	62
ビートパルプ	7	7	82	26	115	22	84
なたね油かす	6	6	99	23	128	9	93
魚粉	3	1	16	105	122	15	89
炭酸カルシウム	3	0	7	80	87	50	64
りん酸カルシウム	3	1	5	80	86	51	63

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
アルファルファミール	1	4	6	11
えん麦	0	4	3	7
かき殻	0	0	6	6
かに殻粉末	0	1	2	3
カポック油かす	0	0	2	2
キャッサバ	1	2	2	5
玄米	0	3	0	3
コーングルテンミール	0	2	7	9
ごま油かす	0	8	22	30
小麦	9	35	16	60
小麦粉	0	2	1	3
米ぬか	0	32	27	59
サフラワー油かす	0	1	0	1
食塩	0	0	32	32
スクリーニングペレット	0	0	1	1
精白米	0	0	2	2
ゼオライト	0	11	22	33
チキンミール	0	1	12	13
肉骨粉	0	0	5	5
ビールかす	0	2	3	5
フェザーミール	0	1	2	3
ふすま	1	20	8	29
ポークチキンミール	0	0	1	1
ホミニーフード	0	2	0	2
マイロ	1	14	2	17
麦ぬか	0	4	2	6
綿実油かす	0	1	0	1
やし油かす	0	4	3	7

8 ま と め

(1) A 試料 (中すう育成用配合飼料)

1) 水 分

243 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 12.83 %、95 %信頼区間は 12.79~12.86 %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、238 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 12.82 %、0.29 %及び 2.2 %であった。

水分測定器を使用した試験では、2 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 13.70 %、0.08 %及び 0.6 %であった。

その他の方法 (NIR による測定等) によるデータが 3 件報告された。

2) 粗たん白質

250 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 13 件であった。これらのデータを除いた平均値は 18.06 %、95 %信頼区間は 18.03~18.08 %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、27 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 18.06 %、0.31 %及び 1.7 %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、45 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 18.07 %、0.25 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、67 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 18.16 %、0.14 %及び 0.8 %であった。

自動分析機を使用した試験では、111 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 17.98 %、0.22 %及び 1.2 %であった。

3) 粗脂肪

218 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 4.30 %、95 %信頼区間は 4.28~4.32 %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、151 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 4.33 %、0.12 %及び 2.9 %であった。

自動分析機を使用した試験では、67 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 4.22 %、0.13 %及び 3.1 %であった。

4) 粗繊維

180 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 3 件であった。これらのデータを除いた平均値は 3.08 %、95 %信頼区間は 3.03~3.13 %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・静置法による試験では、26 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 3.03 %、0.18 %及び 6.0 %であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、103 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 2.97 %、0.35 %及び 11.8 %であった。

自動分析機を使用した試験では、47 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 3.30 %、0.19 %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 4 件報告された。

5) 粗灰分

239 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 20 件であった。これらのデータを除いた平均値は 5.63 %、95 %信頼区間は 5.62~5.65 %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、234 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 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 5.63 %、0.12 %及び 2.1 %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、自動分析装置による測定等）によるデータが 5 件報告された。

6) カルシウム

178 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 1.031 %、95 %信頼区間は 1.024~1.038 %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、34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1.064%、0.075%及び7.0%であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法による試験では、136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1.026%、0.041%及び4.0%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8件報告された。

7) リン

180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14件であった。これらのデータを除いた平均値は0.678%、95%信頼区間は0.676~0.680%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、173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0.678%、0.014%及び2.1%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7件報告された。

8) サリノマイシンナトリウム

今回の試験ではサリノマイシンナトリウム無添加試料の配布がなく、その差を差し引くことになっていないため、管理分析及びフローインジェクションによる試験とLC法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、50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。その平均値は51.1 g(力価)/トン、95%信頼区間は50.2~51.9 g(力価)/トンであった。

LC法及びバイオアッセイによる試験では、40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。その平均値は49.1 g(力価)/トン、95%信頼区間は48.4~49.8 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、40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50.8 g(力価)/トン、2.9 g(力価)/トン及び5.7%であった。

フローインジェクションによる試験では、10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52.0 g(力価)/トン、3.7 g(力価)/トン及び7.1%であった。

飼料分析基準・LC法による試験では、34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48.5 g(力価)/トン、1.9 g(力価)/トン及び3.9%であった。

飼料分析基準・バイオアッセイによる試験では、6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 52.1 g(力価)/トン, 2.2 g(力価)/トン及び 4.3 %であった。

(2) B 試料 (魚粉)

1) 水分

234 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 10.15 %, 95 %信頼区間は 10.12~10.18 %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, 229 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 10.15 %, 0.22 %及び 2.1 %であった。

水分測定器を使用した試験では, 2 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 10.61 %, 0.028 %及び 0.30 %であった。

その他の方法 (NIR による測定等) によるデータが 3 件報告された。

2) 粗たん白質

240 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 56.98 %, 95 %信頼区間は 56.89~57.06 %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, 26 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 56.48 %, 0.90 %及び 1.6 %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, 42 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 56.87 %, 0.46 %及び 0.80 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では, 63 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 57.66 %, 0.42 %及び 0.70 %であった。

自動分析機を使用した試験では, 109 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 56.76 %, 0.46 %及び 0.80 %であった。

3) 粗灰分

229 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 20.80 %、95 %信頼区間は 20.79~20.82 %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、224 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 20.81 %、0.12 %及び 0.60 %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、自動分析装置による測定等) によるデータが 5 件報告された。

4) カドミウム

60 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 1.63 g/トン、95 %信頼区間は 1.61~1.65 g/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。

飼料分析基準・溶媒抽出法による試験では、19 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 1.70 g/トン、0.07 g/トン及び 4.2 %であった。

飼料分析基準・簡易法による試験では、37 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 1.60 g/トン、0.07 g/トン及び 4.5 %であった。

その他の方法 (ICP による測定) によるデータが 4 件報告された。

5) エトキシキン

37 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 3 件であった。これらのデータを除いた平均値は 11.7 g/トン、95 %信頼区間は 11.0~12.4 g/トンであった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準 (LC 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 2.1 g/トン及び 18.0 %であった。

(3) D 試料 (ほ乳期子豚育成用プレミックス)

1) 銅

101 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 59.79 g/kg、95 %信頼区間は 59.41~60.17 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、96 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 59.77 g/kg, 1.89 g/kg 及び 3.2 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 5 件報告された。

2) 亜鉛

96 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 3 件であった。これらのデータを除いた平均値は 60.24 g/kg, 95 %信頼区間は 59.37~61.10 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、91 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 60.20 g/kg, 4.32 g/kg 及び 7.2 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 5 件報告された。

3) クエン酸モランテル

47 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。その平均値は 14.7 g/kg, 95 %信頼区間は 14.5~14.8 g/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（LC 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 0.65 g/kg 及び 4.4 %であった。

(4) C 試料（鑑定用試料）

鑑 定

11 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。137 試験室より報告があり、配合した 11 種類の他に 28 種類の原料が報告された。

配合した原料について、とうもろこし（配合割合 30 %）では、137 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 1 であった。

ライ麦（配合割合 10 %）では、120 試験室（検出率 88 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 17、中量と報告した試験室が 86、少量（1 %以上~5 %未満、以下同じ）と報告した試験室が 17 であった。

大麦（配合割合 10 %）では、113 試験室（検出率 82 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 17、中量と報告した試験室が 81、少量と報告した試験室が 15 であった。

コーングルテンフィード（配合割合 10 %）では、22 試験室（検出率 16 %）から報告があり、その内訳は中量と報告した試験室が 14、少量と報告した試験室が 8 であった。

大豆油かす（配合割合 10 %）では、130 試験室（検出率 95 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 2、中量と報告した試験室が 100、少量と報告した試験室が 28 であった。

あまに油かす（配合割合 8 %）では、85 試験室（検出率 62 %）から報告があり、その内訳は中量と報告した試験室が 51、少量と報告した試験室が 34 であった。

ビートパルプ（配合割合 7 %）では、115 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 7、中量と報告した試験室が 82、少量と報告した試験室が 26 であった。

なたね油かす（配合割合 6 %）では、128 試験室（検出率 93 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 6、中量と報告した試験室が 99、少量と報告した試験室が 23 であった。

魚粉（配合割合 3 %）では、122 試験室（検出率 89 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 1、中量と報告した試験室が 16、少量と報告した試験室が 105 であった。

炭酸カルシウム（配合割合 3 %）では、87 試験室（検出率 64 %）から報告があり、その内訳は中量と報告した試験室が 7、少量と報告した試験室が 80 であった。

りん酸カルシウム（配合割合 3 %）では、86 試験室（検出率 63 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 1、中量と報告した試験室が 5、少量と報告した試験室が 80 であった。

誤って検出したものについては、小麦が最も多く、60 試験室から報告があった。次いで、米ぬかが 59 試験室、ゼオライトが 33 試験室、食塩が 32 試験室の順で多く報告された。

文 献

- 1) Michael Thompson, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories, *Pure Appl. Chem.*, **65**(9), 2123-2144 (1993).

(参考)

平成 23 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…中すう育成用配合飼料
- B 試料…魚粉
- C 試料…鑑定用飼料原料調製試料
- D 試料…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、リン及びサリノマイシンナトリウム
- B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・11種類の原料の配合割合の推定
- D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

4. 分析・鑑定要領

- (1) 試料の分析・鑑定方法は、「飼料分析基準」(平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号 農林水産省消費・安全局長通知)に定める方法及び「サリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法」(「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」(昭和 53 年 9 月 5 日付け 53 畜 B 第 2173 号、53 水振第 464 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) サリノマイ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、サリノマイシンナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kgで、カドミウム、エトキシキンについてはg/トンで表してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、サリノマイシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析方法及び使用した分析機器等を備考欄の該当する番号に○印を付し、その詳細を様式に従って記載してください。

また、分析上の特記事項があれば、その旨も記載してください。

なお、参考のため、クエン酸モランテル及びエトキシキンについては、標準液及び試料溶液のクロマトグラムを各1葉添付してください。

(3) 鑑定成績は、検出物欄に検出した原料名を分析鑑定成績報告書(4)の語群から選んで記入し、推定される配合割合は、多量(15%以上)、中量(5%以上15%未満)及び少量(1%以上5%未満)欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出物欄に記入しないでください。なお、C試料には11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 ()
サリノマイ シンナトリ ウム	(g(カ匳)/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. LC 法(参考) (g(カ匳)/トン) LC (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 μ m) 4. 微生物学的定量法(参考) (g(カ匳)/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/トン)	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/トン)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (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 LC (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 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) 11 種類の原料が配合されています。

検出物の語群

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

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

調査資料**1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 23 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、病原微生物等に汚染された飼料の使用が原因となって、有害畜産物（食用に供され、人の健康をそこなう恐れがある家畜の肉等）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等が設定されている。

（独）農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、飼料中のこれらの有害物質等の基準等への適合状況の確認及び基準等が設定されていない有害物質等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 23 年度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 23 年 4 月から平成 24 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項目は、原産国、過去の汚染実態等を、また、配混合飼料のモニタリング項目は、使用原料、対象家畜等を考慮し、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（18 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。以下「指導基準」という。）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がある飼料原料について実施した。

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が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 15 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 13 成分及びエンドファイト産生毒素 2 成分について実施した。

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, T-2 トキシン, ネオソラニオール, ニバレノール, フザレノン-X, 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）

指導基準で基準値が設定されている飼料中のカドミウム，鉛，水銀及びヒ素について実施した。

iii 農薬（144 成分）

ア 飼料中の基準値が設定されている 40 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）別表第 1 の 1 の (1) に基準値が設定されている農薬のうちの 40 成分について実施した。

イ その他 104 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 104 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（6 成分）

近年、飼料の汚染又は混入事例が認められて問題となった以下の有害物質 6 成分について実施した。

ア 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

イ メラミン

ウ ヒスタミン

エ マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

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 (1) に規定された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の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実施した。

表1 モニタリングを実施した試料及び点数

モニタリングを行った試料		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			
種類	点数	かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	マラカイトグリーン等	メラミン	動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ
									顕微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験		
幼すう育成用	5	5	2	2									2
中すう育成用	6	2	2	4									1
大すう育成用	7	3	2	4									3
成鶏飼育用	73	34	31	38									35
ブロイラー肥育前期用	8	5	2	4									3
ブロイラー肥育後期用	21	12	7	8									4
種鶏飼育用	2	2		1									
鶏複数ステージ用	3	2	1	2									1
ほ乳期子豚育成用	27	19	8	11									8
子豚育成用	29	21	9	12									4
肉豚肥育用	37	21	10	25									10
種豚育成用	3	2		1									2
種豚飼育用	13	11	2	6									4
豚複数ステージ用	8	1	4	5									2
ほ乳期子牛育成用代用乳用	5								5				2
ほ乳期子牛育成用	2	2		1					2	1	1		
若令牛育成用	10	1	4	7					9	9	9		2
乳用牛飼育用	43	35	13	26					42	39	39		16
幼令肉用牛育成用	8	3	3	6					8	8	8		2
肉用牛肥育用	66	37	12	35					64	54	54		9
肉牛繁殖用	4	2	2	3					4	3	3		
牛複数ステージ用	26	20	5	14					25	19	19		6
まだい育成用	2								2	2	2		
魚用(対象魚を限定しないもの)	3						1		2	2	2		1
とうもろこし・魚粉二種混合飼料	2		2										
二種混合飼料(上記以外のもの)	2	1							1	1	1		1
動物性たん白質混合飼料	9								9	9	9		7
糖蜜吸着飼料	1								1	1	1		
上記以外の混合飼料	54	1	1	1					54	54	54		2
小計	479	242	122	216			1		228	202	202		127
とうもろこし	58	58		36									
マイロ	4	2		4									
小麦	5	3		5									
小麦粉	2	2											
末粉	1			1									
大麦	14	11		14									
圧べん大麦	2	2											
えん麦	1	1											
ライ麦	1	1		1									
大豆	1			1									
圧べん大豆	1	1		1									
エクストルーダ処理大豆	1	1		1									1
きな粉	1	1											
精白米	1			1									
甘しょ	2	1		2									
小計	95	84		67									1
ふすま	34	16		29					1	1	1		4
米ぬか	3	3		1									
脱脂ぬか	5	4		2									
麦ぬか	3	3		2									
コーングルテンフィード	17	17		8									2
とうもろこしシスチン・スチン(DDG)	4	4		1									
とうもろこしシスチン・スチン(DDGS)	16	13		7									2
大豆皮	3	2		3									
スクリーニングペレット	1	1											
ホミニフィード	2	1		2									
小計	88	64		55					1	1	1		8
大豆油かす	48	26		31				2					8
米ぬか油かす	4	1		2									1
なたね油かす	30	10		22									7
やし油かす	2	1		1									2
ごま油かす	2	1		2									1
コーングルテンミール	13	12		1									
綿実油かす	1			1									1
小計	100	51		60				2					20

表 1 モニタリングを実施した試料及び点数（続き）

モニタリングを行った試料	種類	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	
			かび毒	重金属	農薬	有害物質			動物由来たん白質					
						硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	マラカイトグリーン等	メラミン	顕微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験		不溶性不純物
動物質性飼料	魚粉	83		22			10	17	3	74	74	74		57
	チキンミール	26		3						26	26	26		19
	フェザーミール	16								16	16	16		13
	豚肉骨粉	2		2							2	2		2
	原料混合肉骨粉	25		2							25	25		17
	コラーゲン	1												1
	イカミール	2								2	2	2		2
	イカ内臓溶解液	1								1	1	1		
小計	156		29			10	17	3	119	146	146		111	
乾牧草	アルファルファ	8			8	8								
	スーダングラス	13			13	11								
	チモシー	9			9									
	オーツヘイ	4			4									
	クレイングラス	1			1									
	パミュダグラス	2			2									
	ライグラス	3	3		3									
	稲わら	5		5										
小計	46	3	5	41	19									
その他	綿実	2	2		2									
	アルファルファミール	1	1		1									
	海藻ミール	1								1	1	1		
	カカオ豆殻	1	1		1									
	菓子くず	2	2		1									
	乾燥酵母細胞壁	1								1	1	1		
	コーンコブミール	2	2		1			1						
	飼料用酵母	2	1							1	1	1		
	タビオカ澱粉	1			1									
	バナナ粉末	1	1											
	フミン酸	1								1	1	1		
	やし中果皮	1			1									
	動物性油脂	69												69
特定動物性油脂	3												3	
小計	88	10	7	1				1	4	4	4		72	
合計	1,052	454	156	446	20	10	18	6	352	353	353		267	

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物分析用試料

試料は、「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）に従い、採取、保管した。なお、牧草は、「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）に従い、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第 2 章の規定に従い、調製した。

2) 動物由来たん白質及び DNA 分析用試料

分析用試料は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定に従い、採取、保管及び調製した。

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 分析方法

1) 有害物質

i かび毒及びエンドファイト産生毒素

飼料分析基準第 5 章に規定された方法に従い、実施した。

ii 重金属

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法に従い、実施した。

iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法に従い、実施した。

iv 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 に規定された方法に従い、実施した。

v メラミン

飼料分析基準第 7 章 7.1 に規定された方法に従い、実施した。

vi ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5.1 に規定された方法に従い、実施した。

vii マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

飼料分析基準第 8 章第 2 節 2 に規定された方法に従い、実施した。

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 法を用いて実施した。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

光学顕微鏡を用い、図 1 の方法により、獣骨及び獣毛等の混入の有無を鑑定した。

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の一部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の一部は、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）

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）

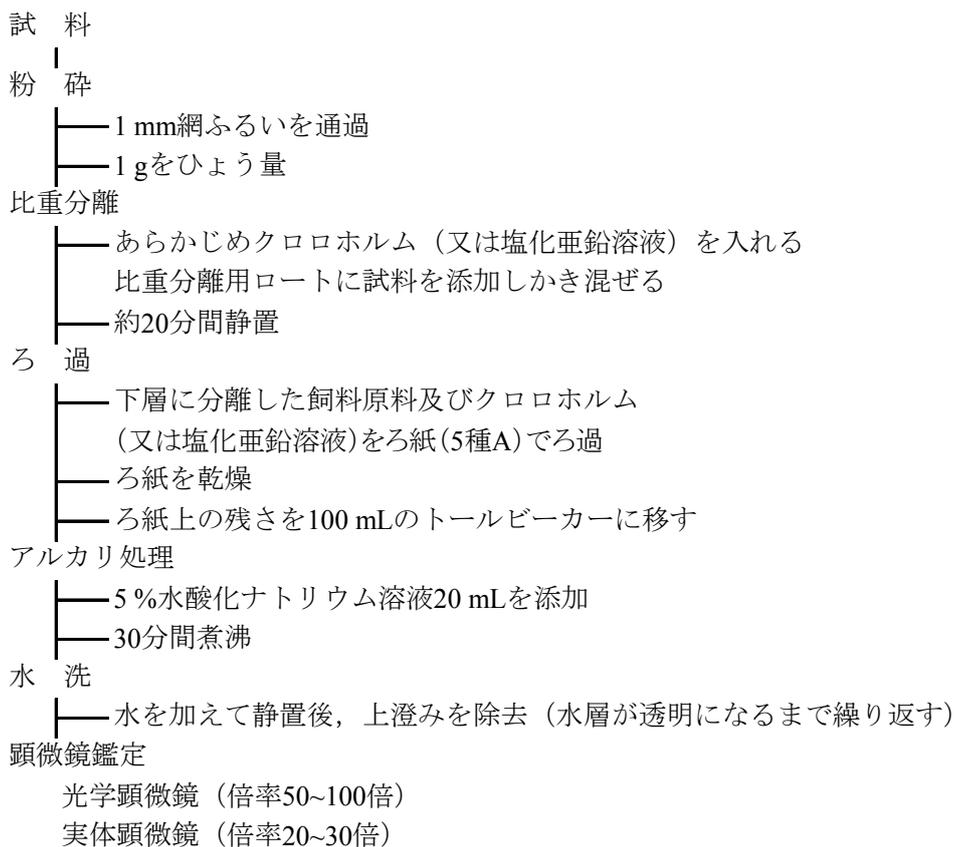


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

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) のアに規定された方法）

4) サルモネラ

分析用試料中の細菌を増菌培養した後，サルモネラを選択的に分離し，サルモネラを検出した。陽性試料は，分離したサルモネラの血清型別を実施した。（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 18 成分について 4,883 点のモニタリングを実施した。

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を表 2-1 に，基準値のない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を表 2-2 に示した。各かび毒の汚染状況は，以下のとおりであった。

i アフラトキシン B₁

配混合飼料 224 点中 125 点（検出率 55.8 %）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，肉用牛肥育用及び牛複数ステージ用（ほ乳期及び乳用牛飼育用を対象としないもの）各 1 点から 0.010 mg/kg を超えて検出された。

原料では、とうもろこしの検出率は 43.1 %、検出されたものの最大値は 0.013 mg/kg と 22 年度よりは低く、例年とほぼ同程度であった。

また、とうもろこしの副産原料における検出率は、DDGS 以外はとうもろこしの検出率を超えており、特にコーングルテンミールは 90.0 % と例年より高い検出率であった。特に、コーンコブミール（タイ産）からは 0.042 mg/kg 検出され、22 年度と同様に高濃度のものが認められた。

とうもろこしの副産原料以外の原料では、大豆油かすの検出率が 50.0 % と高くなったが、検出された 13 点のうちインド産が 9 点（他は米国産 2 点、国内加工品（原料産地不明）2 点）とインド産の汚染が目立った。その他では、やし油かす（フィリピン産）から 0.030 mg/kg、ホミニフィード（米国産）から 0.029 mg/kg 検出された。東南アジア等の熱帯、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

平成 22 年度は、収穫時期の天候不良の影響により、デオキシニバレノールに高濃度に汚染された米国産とうもろこしが輸入され、とうもろこし及びとうもろこし副産原料のモニタリング結果は、検出率及び検出値ともに高かった。しかし、平成 23 年度は、検出率は平成 22 年度並みに高かったものの、検出値は平成 21 年度並みに低い結果となり、これらが主原料である配混合飼料も同様の傾向を示し、暫定許容値を超えるものはなかった。

しかし、とうもろこしの副産原料の一部で、検出値の高いものがあり、1.0 mg/kg を超えて検出されたものがコーングルテンフィードで 5 点（最大値 2.1 mg/kg）、コーングルテンミールで 1 点（9.2 mg/kg）、DDGS で 4 点（最大値 3.7 mg/kg）、DDG で 2 点（最大値 1.7 mg/kg）、コーンコブミールで 1 点（2.7 mg/kg）あった。これらの原料を使用する際には留意が必要である。

上記以外では、特に小麦 50.0 %（最大値 0.15 mg/kg）及びその副産原料のふすま 100 %（最大値 0.49 mg/kg）からの検出率が高くなった。

iii ゼアラレノン

家畜用配混合飼料 163 点中 154 点（検出率 94.5 %）から検出され、例年と同様に高い検出率であったが、暫定許容値を超えるものはなく最大値は子豚育成用で 0.15 mg/kg であった。

原料では、とうもろこし及びその副産原料で検出率が高く、特に副産原料は検出率 100 % で中国産コーングルテンミール（デオキシニバレノールが 9.2 mg/kg 検出されたものと同じ品）から 9.9 mg/kg 検出された。また、検体数及び検出値は少ないもののコメ副産原料の検出率が 100 % となっており、今後注視していく必要がある。

表2-1 基準値が設定されているかび毒のモニタリング結果

モニタリングを行った 飼料の種類	アフラトキシンB ₁ (検出下限 0.2 µg/kg)					デオキシニバレノール (検出下限 10 µg/kg)					ゼアラレノン (検出下限 0.3 µg/kg)						
	指導 基準値 (µg/kg)	うち検出されたもの			平均値 (µg/kg)	モニタ リング 点数	検出率 (%)	うち検出されたもの			モニタ リング 点数	検出率 (%)	うち検出されたもの				
		1×10 ³	2×10 ³	3				許容値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)			許容値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)		
配合飼料 (表外に示す飼料)	1×10	64	36	56.3	6	1.4	132	107	81.1	500	150	1×10 ³	163	154	94.5	150	23
配合飼料 (上記以外の飼料)	2×10	160	89	55.6	13	1.5	86	82	95.3	540	200	—	61	56	91.8	380	40
とうもろこし	—	58	25	43.1	13	3.8	57	54	94.7	860	200	—	57	53	93.0	130	16
コーングルテンフアイード	—	17	9	52.9	9	4.2	16	15	93.8	2,100	960	—	17	17	100.0	150	56
DDG	—	3	2	66.7	1	1.0	3	3	100.0	1,700	1,300	—	3	3	100.0	150	99
DDGS	—	11	4	36.4	3	2.2	11	11	100.0	3,700	1,200	—	11	11	100.0	150	69
コーングルテンミール	—	10	9	90.0	12	5.7	9	8	88.9	9,500	1,200	—	10	10	100.0	9,900	1,100
コーンコブミール	—	2	1	50.0	42	42	2	1	50.0	2,700	2,700	—	2	2	100.0	510	300
マイロ	—	2	—	—	—	—	2	1	50.0	12	12	—	2	2	100.0	13	12
小麦 (小麦粉含む)	—	4	—	—	—	—	4	2	50.0	150	89	—	4	1	25.0	0.8	0.8
ふすま	—	16	1	6.3	3	3.0	16	16	100.0	490	230	—	16	10	62.5	7	3
大麦 (圧べん大麦含む)	—	12	—	—	—	—	12	5	41.7	78	36	—	12	1	8.3	0.7	0.7
麦ぬか	—	3	—	—	—	—	3	3	100.0	170	120	—	3	1	33.3	10	10
大豆 (きな粉を含む)	—	2	—	—	—	—	2	1	50.0	56	56	—	2	1	50.0	7	7
大豆油かす	—	26	13	50.0	3	1.3	24	3	12.5	21	16	—	26	16	61.5	8	3
大豆皮	—	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	2	2	100.0	45	31
米ぬか	—	3	—	—	—	—	3	1	33.3	30	30	—	3	3	100.0	11	6
脱脂ぬか	—	4	1	25.0	1	1.0	4	1	25.0	43	43	—	4	4	100.0	11	6
米ぬか油かす	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	100.0	4	4
甘しょ	—	1	—	—	—	—	1	1	100.0	21	21	—	1	1	100.0	12	12
スクリーニングペレット	—	1	—	—	—	—	1	1	100.0	88	88	—	1	1	100.0	7	7
ホミニフイード	—	1	1	100.0	29	29	1	1	100.0	910	910	—	1	1	100.0	87	87
なたね油かす	—	10	—	—	—	—	10	1	10.0	21	21	—	10	1	10.0	1	1
やし油かす	—	1	1	100.0	30	30	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
ごま油かす	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
綿実	—	2	1	50.0	1	0.9	1	1	100.0	610	610	—	2	1	50.0	44	44
アルファルファミール	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
カカオ豆殻	—	1	1	100.0	1	0.5	1	—	—	—	—	—	1	1	100.0	6	6
菓子くず	—	2	—	—	—	—	2	2	100.0	150	93	—	2	1	50.0	6	6
飼料用酵母	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
バナナ粉末	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
計	—	423	194	45.9	42	2.6	411	321	78.1	9,500	290	—	422	356	84.4	9,900	58

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシンB₁：幼すう育成用、プロイラー肥育前期用、ほ乳期子豚育成用、ほ乳期子牛育成用、ほ乳期子牛育成用、乳用牛飼育用

デオキシニバレノール：生後3ヶ月以内の牛用以外の飼料

ゼアラレノン：家畜用飼料

表 2-2 基準値のない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	(検出下限)	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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
アフラトキシンB ₂	(0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	423	44	10.4	4	1.0
アフラトキシンG ₁	(0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	423	39	9.2	14	2.7
アフラトキシンG ₂	(0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	423	9	2.1	4	0.9
ステリグマトシスチン	(0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	422	203	48.1	55	1.2
T-2トキシン	(2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	422	150	35.5	62	6
ネオソラニオール	(2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	411	36	8.8	10	4
フザレノン-X	(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	411	14	3.4	96	43
ニバレノール	(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	411	17	4.1	92	78
フモニシンB ₁	(0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	71	67	94.4	4,600	630
フモニシンB ₂	(0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	71	66	93.0	2,000	230
フモニシンB ₃	(0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	71	66	93.0	880	100
オクラトキシンA	(2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	55	3	5.5	20	10
シトリニン	(7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	8	1	12.5	10	10
エルゴバリン	(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	2	2	100.0	420	330
ロリトレムB	(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	3	3	100.0	710	520

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 122 点，魚粉 22 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）7 点，稲わら 5 点のモニタリングを実施し，その結果を表 3 に示した。

各重金属の結果は，以下のとおりであった。

i カドミウム

配合飼料 122 点中 86 点（検出率 70.5 %）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 0.31 mg/kg であった。

原料は，魚粉 22 点中 22 点（検出率 100 %，最大値 2.0 mg/kg），チキンミール等は 7 点中 3 点（検出率 42.9 %，最大値 0.47 mg/kg），稲わら 2 点中 2 点（検出率 100 %，0.03 mg/kg）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

配合飼料 122 点中 32 点（検出率 26.2 %）から検出されたが，基準値を超えるものはなく最大値はブロイラー肥育後期用で 1.7 mg/kg であった。

原料は，魚粉 22 点中 16 点（検出率 72.7 %，最大値 1.4 mg/kg），チキンミール等 7 点中 1 点（検出率 14.3 %，最大値 0.9 mg/kg），稲わら 2 点中 2 点（検出率 100 %，最大値 0.7 mg/kg）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 122 点中 41 点（検出率 33.6 %）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 0.19 mg/kg であった。

原料は，魚粉 22 点中 22 点（検出率 100 %，最大値 0.69 mg/kg），チキンミール等 7 点中 4 点（検出率 57.1 %，最大値 0.10 mg/kg），稲わら 2 点中 2 点（検出率 100 %，最大値 0.14

mg/kg) 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

配合飼料 14 点中 10 点（検出率 71.4 %，最大値 0.55 mg/kg）から、稲わらは実施した 5 点全てから検出（最大値 2.7 mg/kg）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	指導基準値 (mg/kg)	モニタリングを行った飼料の種類	モニタリング点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	
カドミウム	1	配合飼料	122	86	70.5	0.31	0.10
		乾牧草等	2	2	100.0	0.03	0.03
		小計	124	88	71.0	0.31	0.10
	3	魚粉	22	22	100.0	2.0	0.83
		チキンミール	3	1	33.3	0.15	0.15
		原料混合肉骨粉	2	2	100.0	0.47	0.26
		豚肉骨粉	2	0			
	小計	29	25	86.2	2.0	0.76	
	カドミウム 計		153	113	73.9	2.0	0.24
	鉛	3.0 注1)	配合飼料	122	32	26.2	1.7
乾牧草等			2	2	100.0	0.7	0.7
小計			124	34	27.4	1.7	0.5
7.5 注2)		魚粉	22	16	72.7	1.4	0.8
		チキンミール	3	0			
		原料混合肉骨粉	2	1	50.0	0.9	0.9
		豚肉骨粉	2	0			
小計		29	17	58.6	1.4	0.8	
鉛 計			153	51	33.3	1.7	0.6
水銀		0.4	配合飼料	122	41	33.6	0.19
	乾牧草等		2	2	100.0	0.14	0.13
	小計		124	43	34.7	0.19	0.04
	1	魚粉	22	22	100.0	0.69	0.33
		チキンミール	3	1	33.3	0.08	0.08
		原料混合肉骨粉	2	2	100.0	0.10	0.07
		豚肉骨粉	2	1	50.0	0.05	0.05
	小計	29	26	89.7	0.69	0.29	
	水銀 計		153	69	45.1	0.69	0.13
	ひ素	2	配合飼料	14	10	71.4	0.55
7		稲わら	5	5	100.0	2.7	2.2
ひ素 計			19	15	78.9	2.7	0.97

注1) 23年度当時の指導基準値（現在は3 mg/kg（H24.4.9改正））

注2) 23年度当時の指導基準値（現在は7 mg/kg（H24.4.9改正））

3) 農薬

農薬の残留の可能性のある飼料等 446 点に対し、成分規格等省令で基準値の設定されている 40 成分及びその他の農薬 104 成分の計 144 成分について、49,481 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。

農薬が基準値を超過して検出された飼料はなかった。

その他、基準値を超過しなかったものの検出された主な農薬の結果は、以下のとおりであった。

i マラチオン

基準値のある原料について、穀類 3 種類 14 点及び牧草 41 点のモニタリングを実施した結果、とうもろこし 1 点から 35 µg/kg 検出されたが、基準値をかなり下回る数値であった。

また、配混合飼料を中心に基準値のない飼料についても 333 点のモニタリングを実施し、19 点から検出された。その内訳は、ふすま 29 点中 10 点（検出率 34.5 %，最大値 0.59 mg/kg），ふすま（小麦）を主原料とする牛用配合飼料 91 点中 8 点（検出率 8.8 %，最大値 0.067 mg/kg），ブロイラー肥育後期用配合飼料 8 点中 1 点（検出率 12.5 %）であり、ふすま（小麦）への残留が確認された。

ii クロルピリホスメチル

基準値のある原料について、穀類 3 種類 14 点のモニタリングを実施した結果、いずれも不検出であった。

また、配混合飼料を中心に基準値のない飼料についても 374 点のモニタリングを実施し、26 点から検出された。その内訳は、ふすま 29 点中 11 点（検出率 38.0 %，最大値 0.40 mg/kg）からのみ検出された。配混合飼料は 211 点中 15 点（検出率 7.1 %）から検出され、最大値はブロイラー肥育後期用で 0.82 mg/kg であった。

iii ピリミホスメチル

基準値のある原料について、穀類 3 種類 14 点のモニタリングを実施した結果、いずれも不検出であった。

また、配混合飼料を中心に基準値のない飼料についても 374 点のモニタリングを実施し、配混合飼料 211 点中 14 点（検出率 6.6 %）から検出され、最大値は肉用牛肥育用で 0.096 mg/kg であった。

iv フェニトロチオン

基準値のある原料について、穀類 3 種類 14 点及び牧草 41 点のモニタリングを実施した結果、いずれも不検出であった。

また、配混合飼料を中心に基準値のない飼料についても 333 点のモニタリングを実施し、配混合飼料 211 点中 7 点（検出率 3.3 %）から検出され、最大値は肉用牛肥育用で 0.28 mg/kg であった。

v プロピコナゾール

基準値は設定されていないが、395 点（配混合飼料 211 点，飼料原料 184 点）についてモニタリングを実施した結果、ライグラス 3 点中 3 点（検出率 100 %）及び麦ぬか 2 点中 2 点（検出率 100 %）から検出された。

vi その他に検出されている農薬

① 配混合飼料から検出されたもの

クロルプロファム，ジクロホップメチル並びにデルタメトリン及びトラロメトリン

② 原料から検出されたもの

EPN（ふすま），イソプロチオラン（ふすま），クロルピリホス（アルファルファ），シハロトリン（アルファルファ），テブコナゾール（ライグラス），トリフルラリン（アルファルファ），ピフェントリン（ライグラス），フルトラニル（米ぬか），プロシミド

ン（大麦わら），プロパルギット（ふすま，スーダングラス），メトプレン（マイロ），
メトミノストロビン（米ぬか）

農薬については，有機リン系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）

モニタリング成分	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			検出 下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
				点数	検出率 (%)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
BHC	配混合飼料	5	215	0			
	牧草	2×10^2	41	0			
	基準値のない飼料	—	143	0			5
	計	—	399	0			
DDT	配混合飼料	1×10^2	215	0			
	牧草	1×10^2	41	0			
	基準値のない飼料	—	143	0			20
	計	—	399	0			
アセフェート	基準値のない飼料	—	12	0			7
アトラジン	とうもろこし	2×10^2	10	0			
	マイロ	2×10^2	2	0			
	ライ麦	2×10^2	1	0			
	牧草	15×10^3	41	0			20
	基準値のない飼料	—	323	0			
計	—	377	0				
アラクロール	とうもろこし	2×10^2	11	0			
	マイロ	1×10^2	2	0			
	ライ麦	5×10^2	1	0			
	牧草	3×10^3	41	0			20
	基準値のない飼料	—	329	0			
計	—	384	0				
アルドリン 及び ディルドリン	配混合飼料	2×10^2	215	0			
	牧草	2×10^2	41	0			
	基準値のない飼料	—	143	0			20
	計	—	399	0			
イソフェンホス	とうもろこし	2×10^2	11	0			
	基準値のない飼料	—	396	0			20
	計	—	407	0			
イミダクロプリド	とうもろこし	1×10^2	14	0			
	牧草	6×10^3	2	0			2
	計	—	16	0			
エチオン	牧草	20×10^3	41	0			
	基準値のない飼料	—	366	0			20
	計	—	407	0			
エンドリン	配混合飼料	1×10^2	215	0			
	牧草	1×10^2	41	0			
	基準値のない飼料	—	143	0			20
	計	—	399	0			
クロルピリホス	とうもろこし	1×10^2	11	0			
	マイロ	75×10^2	2	0			
	ライ麦	1×10^2	1	0			
	牧草	13×10^3	41	1	2.4	160	160
	基準値のない飼料	—	333	0			
	計	—	388	1	0.3	160	160
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7×10^3	11	0			
	マイロ	10×10^3	2	0			
	ライ麦	7×10^3	1	0			
	基準値のない飼料	—	374	26	7.0	820	120
	計	—	388	26	6.7	820	120

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）

モニタリング成分	モニタリングを行った試料の種類	省令基準値(μg/kg)	モニタリング点数	うち検出されたもの				検出下限(μg/kg)
				点数	検出率(%)	最大値(μg/kg)	平均値(μg/kg)	
クロルフェンピホス	とうもろこし	5×10	11	0				20
	基準値のない飼料	—	388	0				
	計	—	399	0				
クロルプロファム	とうもろこし	5×10	11	0				20
	ライ麦	5×10	1	0				
	基準値のない飼料	—	365	1	0.3	180	180	
	計	—	377	1	0.3	180	180	
クロルベンジレート	とうもろこし	2×10	11	0				20
	基準値のない飼料	—	388	0				
	計	—	399	0				
シハロトリン	とうもろこし	4×10	11	0				20
	マイロ	2×10 ²	2	0				
	ライ麦	2×10	1	0				
	牧草	6×10 ²	41	1	2.4	130	130	
	基準値のない飼料	—	322	0				
計	—	377	1	0.3	130	130		
ジメトエート	とうもろこし	1×10 ³	11	0				20
	マイロ	2×10 ²	2	0				
	ライ麦	2×10 ²	1	0				
	牧草	2×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	0					
ダイアジノン	とうもろこし	2×10	11	0				20
	マイロ	1×10 ²	2	0				
	ライ麦	1×10 ²	1	0				
	牧草	10×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	0					
チアベンダゾール	とうもろこし	5×10	7	0				3
	マイロ	5×10	1	0				
	その他	—	2	0				
	計	—	10	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	11	0				30
	マイロ	1×10 ³	2	0				
	ライ麦	1×10 ³	1	0				
	牧草	5×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	322	2	0.6	220	130	
計	—	377	2	0.5	220	130		
テルブホス	とうもろこし	1×10	11	0				5
	マイロ	5×10	2	0				
	ライ麦	5	1	0				
	牧草	1×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	0					
二臭化エチレン	とうもろこし	1×10	7	0				0.7
	基準値のない飼料	—	5	0				
	計	—	12	0				
パラチオン	とうもろこし	3×10 ²	11	0				20
	マイロ	8×10	2	0				
	ライ麦	5×10	1	0				
	牧草	5×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	0					
ピリミホスメチル	とうもろこし	1×10 ³	11	0				20
	マイロ	1×10 ³	2	0				
	ライ麦	1×10 ³	1	0				
	基準値のない飼料	—	374	14	3.7	96	44	
	計	—	388	14	3.6	96	44	

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）

モニタリング成分	モニタリングを行った試料の種類	省令基準値(μg/kg)	モニタリング点数	うち検出されたもの				検出下限(μg/kg)
				点数	検出率(%)	最大値(μg/kg)	平均値(μg/kg)	
フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	1×10	62	0				3
	配混合飼料（豚・牛等用）	2×10	149	0				
	牧草	2×10 ²	41	0				
	基準値のない飼料	—	143	0				
	計	—	395	0				
フェニトロチオン	とうもろこし	1×10 ³	11	0				20
	マイロ	1×10 ³	2	0				
	ライ麦	1×10 ³	1	0				
	牧草	10×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	7	2.1	280	95	
計	—	388	7	1.8	280	95		
フェンチオン	とうもろこし	5×10 ³	11	0				20
	基準値のない飼料	—	396	0				
	計	—	407	0				
フェントエート	とうもろこし	4×10 ²	11	0				20
	マイロ	4×10 ²	2	0				
	ライ麦	4×10 ²	1	0				
	基準値のない飼料	—	374	0				
	計	—	388	0				
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	5×10 ²	62	0				20
	配混合飼料（豚用）	4×10 ³	58	0				
	配混合飼料（牛等用）	8×10 ³	91	0				
	牧草	13×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	143	0				
計	—	395	0					
フェンプロパトリン	牧草	20×10 ³	41	0				20
	基準値のない飼料	—	354	0				
	計	—	395	0				
ヘプタクロル	配混合飼料	2×10	215	0				20
	牧草	2×10	41	0				
	基準値のない飼料	—	143	0				
	計	—	399	0				
ペルメトリン	とうもろこし	2×10 ³	11	0				20
	マイロ	2×10 ³	2	0				
	ライ麦	2×10 ³	1	0				
	牧草	55×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	322	0				
計	—	377	0					
ベンディメタリン	とうもろこし	2×10 ²	11	0				20
	マイロ	1×10 ²	2	0				
	ライ麦	2×10 ²	1	0				
	牧草	1×10 ²	41	0				
	基準値のない飼料	—	322	0				
計	—	377	0					
ホスメット	とうもろこし	5×10	11	0				20
	マイロ	5×10	2	0				
	ライ麦	5×10	1	0				
	牧草	40×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	0					
ホレート	とうもろこし	5×10	11	0				20
	マイロ	5×10	2	0				
	ライ麦	5×10	1	0				
	牧草	1.5×10 ³	41	0				
	基準値のない飼料	—	333	0				
計	—	388	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）

モニタリング成分	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの				検出 下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
				点数	検出率 (%)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
マラチオン	とうもろこし	2×10^3	11	1	9.1	35	35	
	マイロ	2×10^3	2	0				
	ライ麦	2×10^3	1	0				
	牧草	135×10^3	41	0				20
	基準値のない飼料	—	333	19	5.7	590	87	
	計	—	388	20	5.2	590	84	
メチダチオン	とうもろこし	1×10^2	11	0				
	マイロ	2×10^2	2	0				
	ライ麦	2×10	1	0				
	牧草	12×10^3	41	0				20
	基準値のない飼料	—	333	0				
	計	—	388	0				
メトブレン	とうもろこし	5×10^3	2	0				
	マイロ	5×10^3	1	1	100.0	49	49	20
	計	—	3	1	33.3	49	49	
リンデン (γ -BHC)	配混合飼料 (鶏・うずら、豚用)	5×10	124	0				
	配混合飼料 (牛等用)	4×10^2	91	0				
	牧草	4×10^2	41	0				5
	基準値のない飼料	—	143	0				
	計	—	399	0				

表5 農薬のモニタリング結果（基準値のない成分）

モニタリング成分	うち検出されたもの				うち検出されたもの				うち検出されたもの			
	モニタリング点数	抽出率 (%)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)	モニタリング点数	抽出率 (%)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)	モニタリング点数	抽出率 (%)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)
EPN	407	0.2	160	160	395	0			395	0		
アセトクロール	395	0	20	20	395	0	20	20	395	1	0.3	36
アニコホス	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		
アメトリン	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		
アリドクロール	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		
アレスリン	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		
イサゾホス	395	0	20	20	395	2	2,100	1,400	395	0		
イソプロチオラン	395	1	0.3	170	395	0	20	20	395	1	0.3	93
イプロベンホス	407	0	20	20	395	0	20	20	12	0		7
エジエンホス	407	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
エタフルラリン	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
エトフェンプロックス	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
エトフメセート	395	0	20	20	395	1	0.3	59	395	3	0.8	300
エトプロホス	407	0	20	20	395	0	20	20	395	5	1.3	5,900
エトリジアゾール	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		1,900
エトリムホス	407	0	20	20	12	0	7	7	395	0		20
エンドスルフアen	4	0	0.7	0.7	395	0	20	20	395	0		20
オキサジアゾン	395	0	20	20	4	0	0.7	0.7	395	0		20
カズサホス	395	0	20	20	4	0	0.7	0.7	395	0		20
カルフェントラゾンエチル	395	0	20	20	407	0	20	20	395	0		20
カルボフェノチオン	12	0	7	7	395	0	20	20	4	0		0.7
キナルホス	12	0	7	7	395	1	0.3	39	395	0		20
キントゼン	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
クレソキシムメチル	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
クロルタルジメチル	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
クロルピレン	4	0	0.7	0.7	395	0	20	20	407	0		20
クロルフェナピル	395	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
ジクロホップメチル	395	1	0.3	29	395	0	20	29	395	0		7
ジクロラン	399	0	20	20	395	0	20	20	395	0		20
ジクロルボス	11	0	7	7	395	0	20	20	12	0		7
ジフェナミド	395	0	20	20	395	0	20	20	399	0		20
ジフェノコナゾール	395	0	20	20	395	0	20	20	395	1	0.3	26
ジメテナミド	395	0	20	20	395	0	20	20	399	0		20
ジメピベレート	395	0	20	20	4	0	3	3	395	0		20
シラフルオフェン	395	0	20	20	395	0	20	20	12	0		7

4) その他の有害物質

近年、飼料の汚染又は混入事例が認められて問題となった以下の有害物質 6 成分について、計 92 点のモニタリングを実施した。その結果を表 6 に示した。

各成分の結果は、以下のとおりであった。

i 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

乾牧草についてアルファルファ 9 点及びスーダングラス 11 点の計 20 点モニタリングを実施した。硝酸態窒素は、アルファルファは全 9 点から、スーダングラスは 10 点から検出された。最大値は、アルファルファが 1,300 mg/kg、スーダングラスが 1,200 mg/kg であった。亜硝酸態窒素はスーダングラス 1 点から検出された。

特に問題となる高濃度汚染の牧草はなかったが、硝酸態窒素は検出率が高く今後とも留意が必要である。

ii メラミン

大豆油かす 2 点、魚粉 3 点、コーンコブミール 1 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。

iii ヒスタミン

魚粉 10 点についてモニタリングを実施した結果、7 点から検出（検出率 70.0 %）された。特に問題となる高濃度の汚染はなかったが、検出率が高く今後とも留意が必要である。

iv マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

魚粉 17 点、養魚用配合飼料 1 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

モニタリング成分	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			検出下限 ¹⁾	
			点数	検出率 (%)	最大値 ¹⁾		平均値 ¹⁾
硝酸態窒素	アルファルファ	9	9	100.0	1,300	450	10
	スーダングラス	11	10	90.9	1,200		
	計	20	19	95.0	1,300		
亜硝酸態窒素	アルファルファ	9	0			16	10
	スーダングラス	11	1	9.1	16		
	計	20	1	5.0	16		
メラミン	大豆油かす	2	0			0.5	
	魚粉	3	0				
	コーンコブミール	1	0				
	計	6	0				
ヒスタミン	魚粉	10	7	70.0	1,200	330	3
マラカイトグリーン	養魚用配合飼料	1	0				2
	魚粉	17	0				
	計	18	0				
ロイコマラカイトグリーン	養魚用配合飼料	1	0				2
	魚粉	17	0				
	計	18	0				

3.2 牛用配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 74 検体、イカミール等 3 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 3 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質陽性反応を示し、魚粉 2 検体が PCR 試験では乳動物由来 DNA 陽性反応を示したが、牛由来たん白質及びほ乳動物由来 DNA の両方が陽性反応を示したものはなく、判定の基準に従い総合判定では動物由来たん白質不検出と判定された。（表 7 参照）

チキンミール 26 検体及びフェザーミール 16 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った。（表 8 参照）

ポークミール 2 検体及び原料混合肉骨粉 25 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、全ての検体で不検出であった。（表 8 参照）

表 7 魚粉等の試験結果（牛用配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	74	0	0.0	74	3	4.1	74	2	2.7	2	1	50.0	0
イカミール	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0				0
イカ内臓溶解液	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0				0

表 8 豚肉骨粉等の試験結果（牛用配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 (%)	
チキンミール	26	0	0.0	26	0	0.0	26	0	0.0	0
フェザーミール	16	0	0.0	16	0	0.0	16	0	0.0	0
豚肉骨粉				2	0	0.0	2	0	0.0	0
原料混合肉骨粉				25	0	0.0	25	0	0.0	0

国内で製造したほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 5 検体、ほ乳期子牛用配合飼料 2 検体、若令牛用配合飼料 9 検体、乳牛用配合飼料 42 検体、幼令肉牛用配合飼料 8 検体、肉牛用配合飼料 64 検体、肉牛繁殖用配合飼料 4 検体、種牛等用配合飼料 25 検体、二種混合飼料 1 検体、その他の混合飼料 22 検体、糖蜜吸着飼料 1 検体及びふすま 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、乳牛用配合飼料 2 検体及び肉牛用配合飼料 4 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質陽性反応を示した。判定の基準に従い総合判定では動物由来たん白質は不検出と判定した。（表 9 参照）

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で一連の工程で製造するため、最終製品である混合飼料等 13 検体（養魚用飼料 4 検体を含む）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った。（表 9 参照）

輸入の牛用混合飼料 32 検体, 海藻ミール 1 検体, 飼料用酵母 1 検体, 乾燥酵母細胞壁 1 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, 全ての検体で不検出であった。(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 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用飼料等																
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	5	0	0.0													0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	2	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
若令牛育成用配合飼料	9	0	0.0	9	0	0.0				9	0	0.0				0
乳用牛飼育用配合飼料	42	0	0.0	39	2	5.1				39	0	0.0				0
幼令肉用牛育成用配合飼料	8	0	0.0	8	0	0.0				8	0	0.0				0
肉用牛肥育用配合飼料	64	0	0.0	54	4	7.4				54	0	0.0				0
肉牛繁殖用配合飼料	4	0	0.0	3	0	0.0				3	0	0.0				0
牛複数ステージ用配合飼料	25	0	0.0	19	0	0.0				19	0	0.0				0
二種混合飼料	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
その他の混合飼料	22	0	0.0	22	0	0.0				22	0	0.0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
ふすま	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)																
混合飼料等	13	0	0.0	12	0	0.0	1	0	0.0	12	0	0.0	1	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			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 (%)	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
シンガポール	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
デンマーク	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
ドイツ	1	0	0.0				1	0	0.0				1	0	0.0	0
フランス	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
韓国	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
中国	5	0	0.0				5	0	0.0				5	0	0.0	0
海藻ミール																
カナダ	1	0	0.0				1	0	0.0				1	0	0.0	0
飼料用酵母																
イタリア	1	0	0.0				1	0	0.0				1	0	0.0	0
乾燥酵母細胞壁																
デンマーク	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 不溶性不純物

飼料用として出荷, 流通している動物性油脂 (確認済動物性油脂, 回収食用油, 混合油脂等) 69 検体及び特定動物性油脂 3 検体について, 不溶性不純物の含有量を測定し, その結果を表 11 に示した。

不溶性不純物の含有量が成分規格等省令の動物性油脂の成分規格の含有量を超えたものはなかった。

表 11 不溶性不純物のモニタリング結果

モニタリング を行った 試料の種類	成分規格 (不溶性不純物の 含有量 (%以下))	モニタリング 点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15	69	0.112	0.015
特定動物性油脂	0.02	3	0.018	0.006

3.4 サルモネラ

飼料原料の試験結果は表 12 のとおりであり，140 検体のうち 2 検体が陽性（陽性率 1.4 %）であった。なお，前年度及び前々年度の陽性率は，それぞれ 1.2 %及び 2.3 %であった。区分別にみると，動物質性飼料の陽性率が 1.8 %（前年度 0.8 %，前々年度 2.7 %）であった。一方，植物性油かす類（前年度 4.2 %，前々年度 0 %）及びそうこう類（前年度 0 %，前々年度 0 %）は，すべて陰性であった。原産国別に整理した結果は表 13 のとおりであり，国内製造品（133 検体）の陽性率は 1.5 %であった。なお，前年度及び前々年度の陽性率は 0.7 %及び 2.4 %であった。一方，輸入品（7 検体，前年度 10 %，前々年度 0 %）は，すべて陰性であった。

配混合飼料の試験結果は表 14 のとおりであり，127 検体すべて陰性であった。なお，前年度及び前々年度の陽性率は，それぞれ 1.9 %及び 1.4 %であった。

サルモネラ陽性となった魚粉 2 検体から分離された血清型は，表 15 のとおり各 1 種類であった。S. Mbandaka は，前年度も豚用配合飼料 1 検体から分離されている。また，S. Weltevreden は，平成 20 年度に魚粉・大豆油かす二種混合飼料から分離された例がある。なお，国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報³⁾によると，上記 2 血清型は，国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としてヒトから分離された上位 15 血清型には入っていないが，毎年分離事例があるものである。サルモネラに係る飼料の製造，品質管理については，引き続き留意が必要である。

表 12 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	57	2	3.4
チキンミール	19	0	0
フェザーミール	13	0	0
原料混合肉骨粉	17	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
イカミール	2	0	0
コラーゲン	1	0	0
小 計	111	2	1.8
植物油かす			
大豆油かす	8	0	0
なたね油かす	7	0	0
綿実油かす	1	0	0
米ぬか油かす	1	0	0
やし油かす	2	0	0
ごま油かす	1	0	0
小 計	20	0	0
そうこう類			
ふすま	4	0	0
とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	2	0	0
コーングルテンフィード	2	0	0
小 計	8	0	0
その他			
エクストルーダー処理大豆	1	0	0
小 計	1	0	0
合 計	140	2	1.4

表 13 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									
	動物質性飼料		植物性油かす				その他		合計	
	魚粉	その他	とうもろこし DDGS	大豆 油かす	綿実 油かす	やし 油かす	その他	そうこ う類	その他	(陽性率)
国産	2/ 57	0/ 54		0/ 6			0/ 9	0/ 6	0/ 1	2/133
(陽性率)	(3.4%)	(0%)		(0%)			(0%)	(0%)	(0%)	(1.5%)
輸入										
アメリカ			0/ 1							0/ 1 (0%)
カナダ			0/ 1							0/ 1 (0%)
中国				0/ 1						0/ 1 (0%)
インド				0/ 1						0/ 1 (0%)
オーストラリア					0/ 1					0/ 1 (0%)
フィリピン						0/ 2				0/ 2 (0%)
小 計			0/ 2	0/ 2	0/ 1	0/ 2				0/ 7
(陽性率)			(0%)	(0%)	(0%)	(0%)				(0%)
合 計	2/ 57	0/ 54	0/ 2	0/ 8	0/ 1	0/ 2	0/ 9	0/ 6	0/ 1	2/140
(陽性率)	(3.4%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1.4%)

表 14 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 (%)
鶏用配合飼料	49	0	0
豚用配合飼料	30	0	0
牛用配合飼料	37	0	0
魚用混合配合飼料	1	0	0
動物質性たん白質混合飼料	7	0	0
その他の混合飼料	3	0	0
合 計	127	0	0

表 15 陽性検体の血清型（サルモネラ）

血清型	検出検体数 (魚粉2検体中)
S. Mbandaka	1
S. Weltevreden	1
合 計	2

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) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>.

調査資料

3 特定飼料添加物国家検定結果（平成 23 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

National assay results of specified feed additives (in the fiscal 2011)

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年 4 月 11 日法律第 35 号、以下「飼料安全法」という。）第 5 条第 1 項の規定により、飼料添加物のうち抗生物質製剤は、特定添加物（飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令（昭和 51 年 7 月 16 日政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう。以下同じ。）として、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「センター」という。）が農林水産省令（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号）をいう。）で定める方法により行う検定を受け、検定合格証紙が貼付されたものでなければ販売できない。ただし、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者が製造し、同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し、同条第 2 項の表示が付されたものは、この限りではない。

平成 23 年度にセンターに対して検定申請があった特定添加物について、検定の結果をとりまとめたので、その概要等を紹介する。また、平成 23 年度中の登録製造業者による製造数量等について併せて紹介する。

1 検定申請業者、品名等

平成 23 年度に申請があった業者別の抗生物質製剤の種類、品名等を表 1 に示した。

申請は 7 業者からあり、その製造形態等は、①製造用原体または製剤を自社で輸入し、あるいは他社から購入し、製剤を製造しているのが 4 業者、②製剤を輸入し、販売のみを行っているのが 3 業者という内訳であり、国内で製造用原体から製剤までを自社で一貫して製造している業者はなかった。

特定添加物として申請があった抗生物質製剤は 10 種類（前年度 10 種類）で、品名にして 16 銘柄（前年度 16 銘柄）となり前年度から変わらなかった。そのうち、製造用原体又は製剤を海外に依存している抗生物質製剤は 9 種類（前年度 9 種類）、14 銘柄（前年度 13 銘柄）であった。

製剤又は製造用原体の輸入先国は、亜鉛バシトラシン（製剤）、モネンシンナトリウム（製造用原体）、硫酸コリスチン（製造用原体）及びアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン（製造用原体）は中国、サリノマイシンナトリウム（製造用原体）は中国及びブルガリア、クロルテトラサイクリン（製剤）はシンガポール、リン酸タイロシン（製剤）及びナラシン（製剤）はアメリカ、アピラマイシン（製剤）はイギリスで、輸入先国は 5 カ国（前年度 6 カ国）に及んだ。

表 1 検定申請業者及び申請品名一覧（平成 23 年度）

管内	申請業者名	製造事業場名	抗生物質製剤の種類	飼料級に該当	申請品名	含有力価 mg(力価)/g	備考
本部	科研製薬株式会社	※	亜鉛バシトラシン	○	バシトラシン-100	100	4,200単位/g
				○	バシトラシン-150	150	6,300単位/g
	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100	
			モネンシンナトリウム		モネンシンTZ20	200	
	日本ニュートリオン株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100	
株式会社ティエヌビー	※	クロルテトラサイクリン	○	CTC F-100	100		
神戸	株式会社科学飼料研究所	龍野工場	硫酸コリスチン		コリスチン10%G「明治」	100	
			ノシヘプタイド	○	ノシ-4F	40	
			リン酸タイロシン		タイラン275	275	
	日本イーライリリー株式会社	※	アピラマイシン	○	サーマックス200	200	
			ナラシン	○	モンテパン100	100	
リン酸タイロシン		タイロシン275	275				
福岡	株式会社科学飼料研究所	日向工場	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン「科研」10%G	100	
	コーキン化学株式会社	九州工場	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン		テーエム-400FA	400	
			サリノマイシンナトリウム	○	コクシスタック-100FA	100	
			ノシヘプタイド	○	ノシフィード40	40	
計	7業者	8事業場			16銘柄		

注：「製造事業場名」欄に※が付されている業者は、輸入業者に該当する。

2 抗生物質製剤の種類別の合格件数等

平成 23 年度の抗生物質製剤の種類別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を平成 21 年度及び平成 22 年度分とともに表 2 に示した。

平成 23 年度の検定では、サリノマイシンナトリウムで 1 件、性状試験（粒度）の不適合により不合格となる事例があった。平成 23 年度の合格件数は 215 件（申請 216 件）、合格数量は 997 トン、その実量力価換算量は 112 トン（力価）で、対前年度比はそれぞれ 110.8 %、107.8 %、107.9 %で、件数、数量及び実量力価換算量ともに増加した。

抗生物質製剤の種類別の合格数量の総計に占める割合は、ナラシンが 25.3 %（前年度 28.4 %）で最も多く、次いでサリノマイシンナトリウムが 25.1 %（前年度 16.7 %）、硫酸コリスチンが 22.1 %（前年度 23.8 %）、アピラマイシンが 10.4 %（前年度 10.8 %）、ノシヘプタイドが 8.0 %（前年度 9.6 %）と、これに続いた。また、実量力価換算量の総計に占める割合では、ナラシンが 22.5 %（前年度 25.3 %）で最も多く、次いでサリノマイシンナトリウムが 22.4 %（前年度 14.9 %）、硫酸コリスチンが 19.7 %（前年度 21.3 %）、アピラマイシンが 18.6 %（前年度 19.3 %）、亜鉛バシトラシンが 5.3 %（前年度 5.9 %）となった。

サリノマイシンナトリウム、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン及びアピラマイシンは、平成 22 年度に比べて、合格数量及び実量力価換算量がいずれも増加した。一方、ナラシン、硫酸コリスチン、ノシヘプタイド、亜鉛バシトラシン、リン酸タイロシン、モネンシンナトリウム及びクロルテトラサイクリンはいずれも減少した。

また、平成 22 年度から検定実績がないセンデュラマイシンナトリウム、エンラマイシン及びラサロシドナトリウム、平成 20 年度から検定実績がないバージニアマイシン、平成 19 年度から検定実績がないフラボフォスフォリポール、平成 17 年度から検定実績がないエフロトマイシン及びセデカマイシンと平成 11 年度から検定実績がないピコザマイシンは、平成 23 年度においても申請はなかった。ただし、エンラマイシン及びラサロシドナトリウムは飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者による製造が行われた。

表 2 抗生物質製剤の種類別の合格件数、合格数量及び実量力価換算表
（平成 21 年度～平成 23 年度）

類別	抗生物質製剤の種類	平成 21 年度					平成 22 年度					平成 23 年度				
		合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシラシン	11	38,325.0	4.0	4,423.8	4.1	10	52,260.0	5.6	6,121.0	5.9	11	49,880.0	5.0	5,984.0	5.3
	エンラマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ノシヘプタイド	20	80,000.0	8.3	3,200.0	3.0	26	88,360.0	9.6	3,534.4	3.4	22	79,760.0	8.0	3,190.4	2.9
	バージニアマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	硫酸コリスチン	53	204,940.0	21.3	20,494.0	18.9	57	220,360.0	23.8	22,036.0	21.3	55	220,000.0	22.1	22,000.0	19.7
小計	84	323,265.0	33.7	28,117.8	26.0	93	360,980.0	39.0	31,691.4	30.6	88	349,640.0	35.1	31,174.4	27.9	
テトラサイクリン系	アルボトリチルアルブミンカリスチンキチンテトラサイクリン	2	2,520.0	0.3	1,008.0	0.9	1	2,000.0	0.2	800.0	0.8	2	4,000.0	0.4	1,600.0	1.4
	クロルテトラサイクリン	3	12,000.0	1.2	1,200.0	1.1	3	12,000.0	1.3	1,200.0	1.2	2	8,000.0	0.8	800.0	0.7
小計	5	14,520.0	1.5	2,208.0	2.0	4	14,000.0	1.5	2,000.0	1.9	4	12,000.0	1.2	2,400.0	2.1	
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	20,477.0	2.1	5,631.2	5.2	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7	5	19,609.0	2.0	5,392.5	4.8
	小計	4	20,477.0	2.1	5,631.2	5.2	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7	5	19,609.0	2.0	5,392.5	4.8
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリボル	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	小計	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	64	255,400.0	26.6	25,540.0	23.6	38	154,120.0	16.7	15,412.0	14.9	64	250,612.0	25.1	25,061.2	22.4
	センデュラマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	ナラシン	18	196,525.0	20.5	19,652.5	18.1	24	262,725.0	28.4	26,272.5	25.3	23	251,875.0	25.3	25,187.5	22.5
	モネンシンナトリウム	8	30,360.0	3.2	6,072.0	5.6	4	11,600.0	1.3	2,320.0	2.2	3	9,260.0	0.9	1,852.0	1.7
	ラサロシドナトリウム	3	11,780.0	1.2	1,767.0	1.6	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	
小計	93	494,065.0	51.5	53,031.5	49.0	66	428,445.0	46.3	44,004.5	42.5	90	511,747.0	51.3	52,100.7	46.6	
その他	アピラマイシン	29	107,950.0	11.2	19,347.5	17.9	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3	28	103,975.0	10.4	20,795.0	18.6
	エフロトマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	セデカマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	ピコザマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	小計	29	107,950.0	11.2	19,347.5	17.9	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3	28	103,975.0	10.4	20,795.0	18.6
総計	215	960,277.0	100.0	108,335.9	100.0	194	925,063.0	100.0	103,642.7	100.0	215	996,971.0	100.0	111,862.6	100.0	
対前年度比 (%)	62.0	64.2		64.1		90.2	96.3		95.7		110.8	107.8		107.9		

3 精製級及び飼料級別の合格件数等

飼料添加物に指定された抗生物質製剤は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出、精製した比較的純度の高い製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した比較的純度の低い製造用原体に由来するものである。

平成 23 年度の精製級及び飼料級の抗生物質製剤の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表 3 に示した。

精製級及び飼料級の抗生物質製剤の割合を実量力価換算量で比較すると、飼料級の製剤が全体の 72.4 %（前年度 70.0 %）を占めた。

ノシヘプタイド、硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムは、精製級及び飼料級の規格がそれぞれ設定されているが、平成 23 年度では、硫酸コリスチンは精製級のみ、ノシヘプタイド及びサリノマイシンナトリウムは飼料級のみが申請されている。

表 3 精製級・飼料級別の合格件数、合格数量及び実量力価換算表（平成 23 年度）

類 別	抗 生 物 質 製 剤 の 種 類	精 製 級			飼 料 級		
		合格 件数 件	合格数量 kg	実量力価 換算量 kg(力価)	合格 件数 件	合格数量 kg	実量力価 換算量 kg(力価)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	11	49,880.0	5,984.0
	エンラマイシン	—	—	—	0	0.0	0.0
	ノシヘプチド	0	0.0	0.0	22	79,760.0	3,190.4
	バージニアマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	硫酸コリスチン	55	220,000.0	22,000.0	0	0.0	0.0
テトラサイクリン系	アルキルリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	2	4,000.0	1,600.0	—	—	—
	クロルテトラサイクリン	—	—	—	2	8,000.0	800.0
マクロライド系	リン酸タイロシン	5	19,609.0	5,392.5	—	—	—
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	—	—	—	0	0.0	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	64	250,612.0	25,061.2
	センデュラマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	—	—	—
	ナラシン	—	—	—	23	251,875.0	25,187.5
	モネンシンナトリウム	3	9,260.0	1,852.0	—	—	—
	ラサロシドナトリウム	0	0.0	0.0	—	—	—
そ の 他	アピラマイシン	—	—	—	28	103,975.0	20,795.0
	エフトマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	セデカマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	ビコザマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
合 計		65	252,869.0	30,844.5	150	744,102.0	81,018.1
割 合 (%)		30.2	25.4	27.6	69.8	74.6	72.4

4 抗生物質製剤の類別の合格数量等の推移等

平成 14 年度から平成 23 年度までの過去 10 年間における抗生物質製剤の類別の合格数量及び実量力価換算量の推移を図 1 及び図 2 に示した。

抗生物質製剤の類別の合格数量は、平成 16 年度をピークに増減を繰り返しながら減少傾向にあり、平成 20 年度から平成 21 年度にかけて大幅に減少し、平成 22 年度は過去 10 年間で最低となったが、平成 23 年度はわずかながら増加した（前年度比 108 %）。また、実量力価換算量についても同様の傾向であった。なお、平成 19 年度に 1 種類、平成 21 年度に 5 種類の特定添加物について特定飼料等製造業者の登録が行われている。

抗生物質製剤の類別の実量力価換算量は、平成 14 年度から平成 20 年度まではポリエーテル系が全体の半数を超える割合で推移していたが、平成 21 年度以降は 40 % 台を推移し、平成 23 年度は全体の 46.6 %（前年度 42.5 %）を占め、ポリペプチド系が 27.9 %（前年度 30.6 %）でそれに続いた。

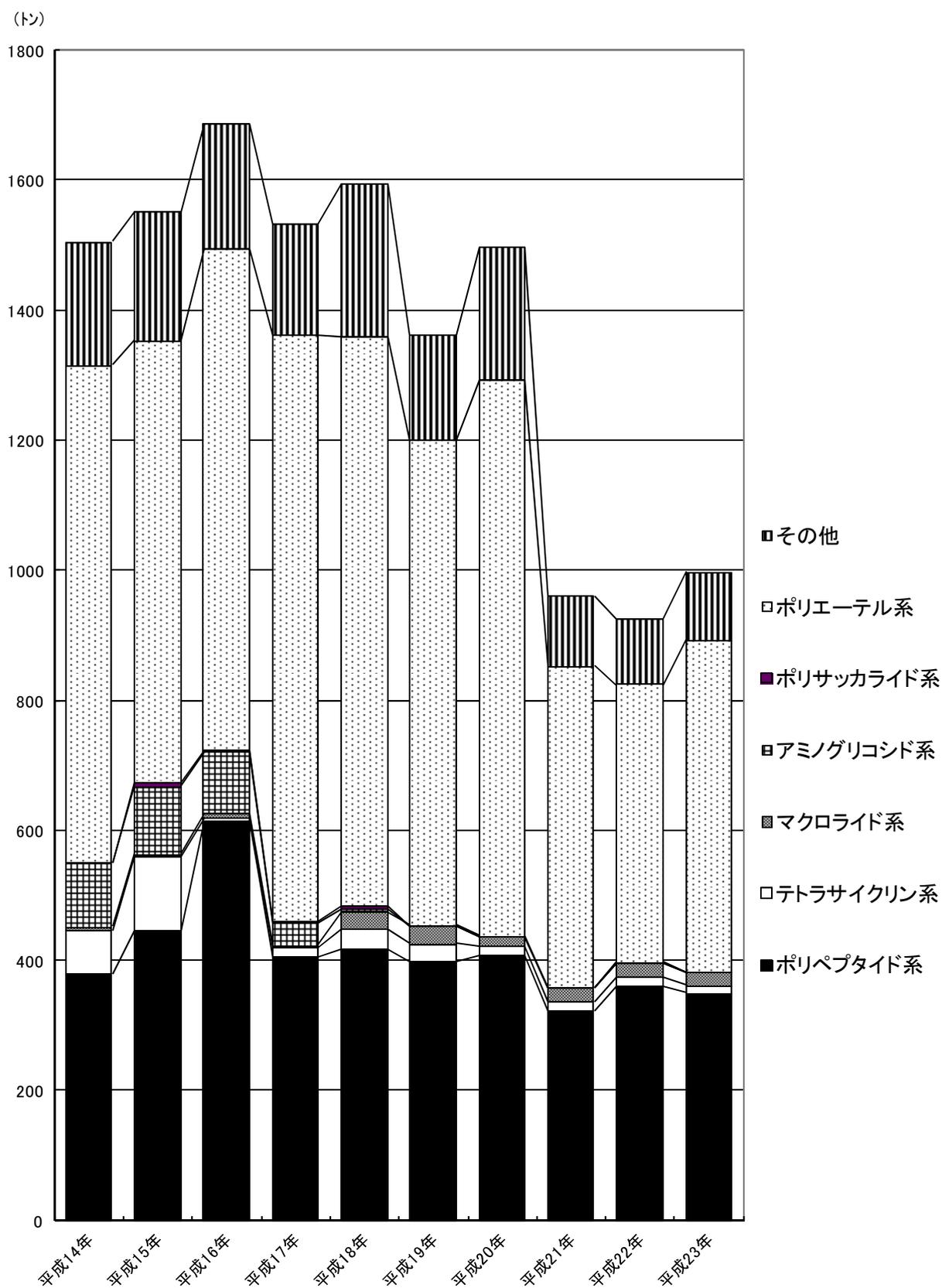


図1 抗生物質製剤の類別の検定合格数量

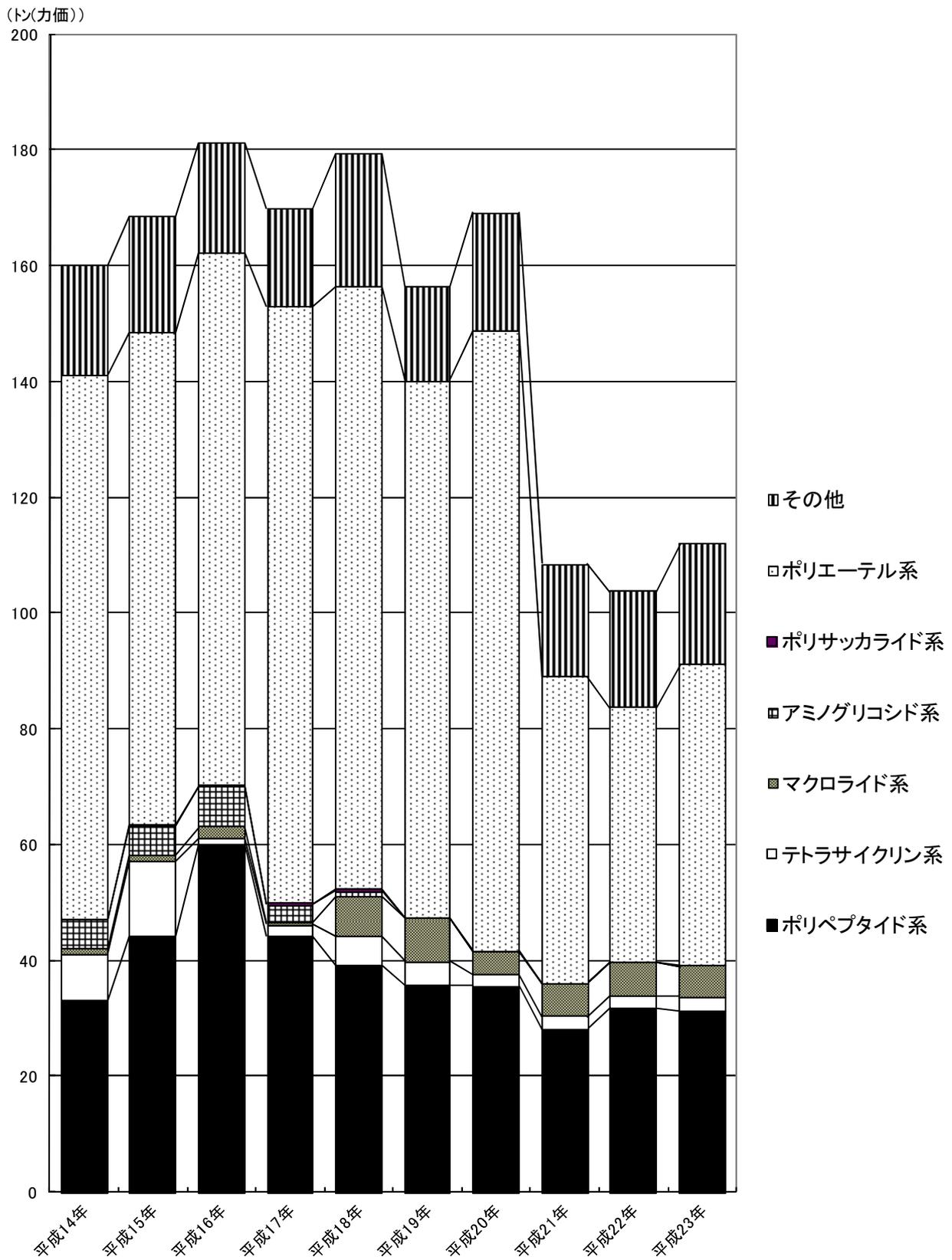


図2 抗生物質製剤の類別の実量力価換算量

5 地域センター別の合格件数等

センター本部及び各地域センター別の合格件数，合格数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。平成 23 年度の合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸センター管内が最も多く，次いで本部，福岡センターの順となった。

各センター管内ともに，合格件数，合格数量及び実量力価換算量が前年度より増加した。

なお，平成 19 年度から実績がない名古屋センター管内，平成 17 年度から実績がない札幌センター管内及び平成 7 年度から実績がない仙台センター管内では，平成 23 年度も申請はなかった。

表 4 センター別の合格件数、合格数量及び実量力価換算表
(平成 23 年度)

管 内	合格件数 件	合格数量 kg	実量力価換算量 Kg(力価)
本 部	61 (41)	241,752 (173,980)	26,097 (19,453)
札 幌	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
仙 台	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
名 古 屋	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
神 戸	95 (94)	531,419 (518,403)	65,065 (64,642)
福 岡	59 (59)	223,800 (232,680)	20,700 (19,548)
計	215 (194)	996,971 (925,063)	111,863 (103,643)

注:()内の数値は、平成22年度を示す。

6 登録特定飼料等製造業者の製造数量等

飼料安全法第 7 条第 1 項の規定に基づき，平成 19 年度にセンデュラマイシンナトリウムに係る特定飼料等製造業者の事業場としてコーキン化学株式会社九州工場第 3 工場が，平成 21 年度にサリノマイシンナトリウム，モネンシンナトリウム，ラサロシドナトリウム，エンラマイシン及び硫酸コリスチンに係る特定飼料等製造業者の事業場として株式会社科学飼料研究所龍野工場が登録された。平成 23 年度の抗生物質製剤の種類別の製造数量及び実量力価換算量を表 5 に示した。なお，ラサロシドナトリウム及びエンラマイシンについては検定合格実績がなく，登録特定飼料等製造業者による製造のみであった。

登録特定飼料等製造業者の製造数量等について，平成 23 年度の製造数量は 594 トン（対前年度比 84 %）であり，実量力価換算量は 83 トン（対前年度比 92 %）で，検定合格数量と合わせた全体の 43 %を占めていた。平成 14 年度から平成 23 年度までの過去 10 年間における抗生物質製剤の類別の検定合格と登録特定飼料等製造業者による製造の合計製造数量及び実量力価換算量の推移を図 3 及び図 4 に示した。全体の実量力価換算量はこの 2 年間横ばいで，平成 16 年度より多くなった。また，抗生物質製剤の種類別の製造数量はサリノマイシンナトリウム（29.6 %），ナラシン（15.8 %），硫酸コリスチン（14.1 %）の順で多く，実量力価換算量ではサリノマイシ

ンナトリウム (24.1 %) , モネンシンナトリウム (20.6 %) , ナラシン (12.9 %) の順が多かった.

表 5 登録特定飼料等製造業者の製造数量等 (平成 23 年度)

類 別	抗 生 物 質 製 剤 の 種 類	平 成 23 年 度	
		製 造 数 量 kg	実 量 力 価 換 算 量 kg(力 価)
ポリペプチド系	エンラマイシン	59,800	4,784
	硫酸コリスチン(その1)	3,920	392
	小 計	63,720	5,176
ポリエーテル系	サリマイシンナトリウム(その2)	219,540	21,954
	センテュラマイシンナトリウム(精製級)	0	0
	モネンシンナトリウム	191,700	38,340
	ラサロシドナトリウム	118,940	17,841
	小 計	530,180	78,135
総 計		593,900	83,311
対 前 年 度 比 (%)		84	92

(各製造業者提出資料より)

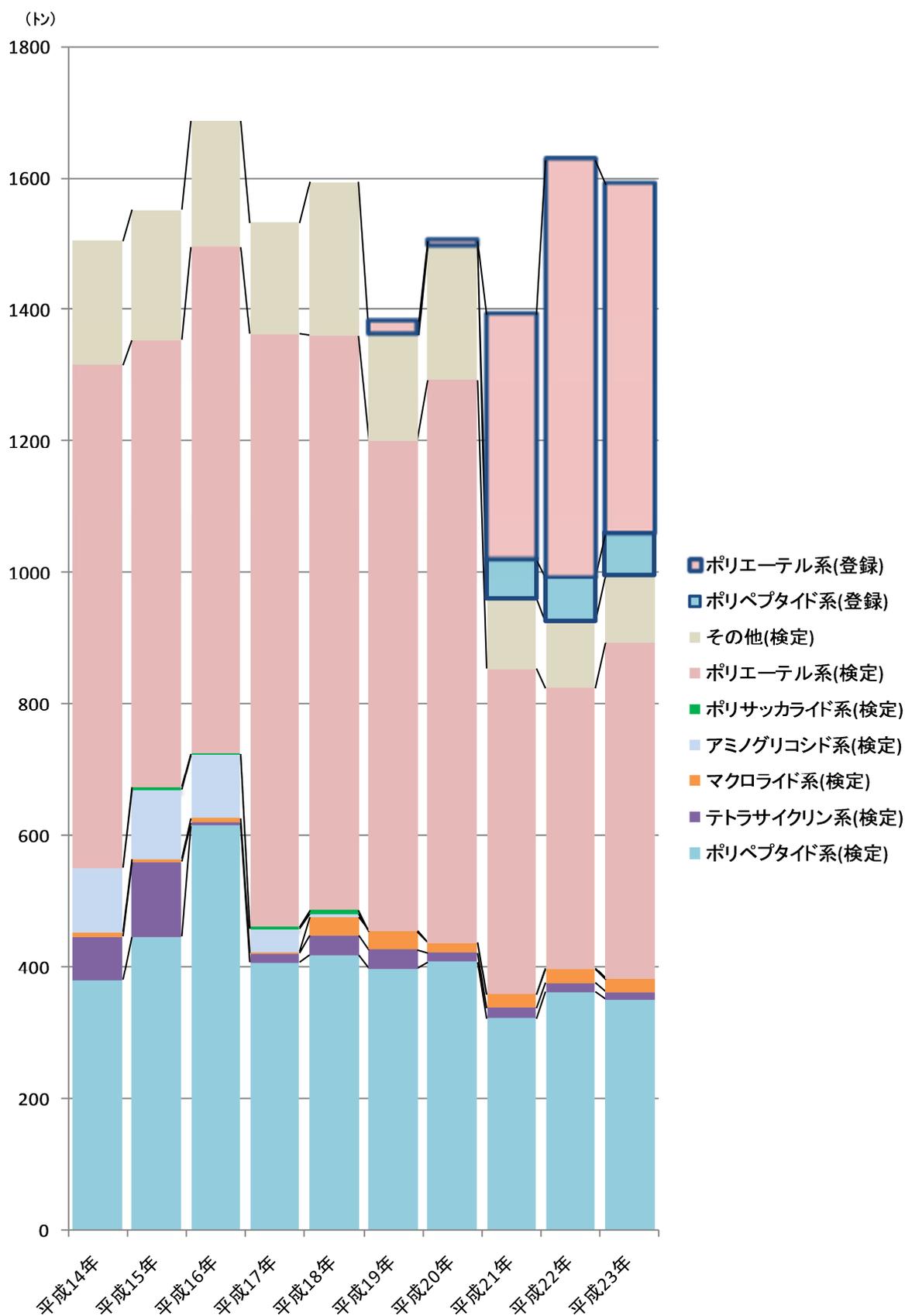


図3 抗生物質製剤の類別の製造数量
 (検定合格及び登録特定飼料等製造業者による製造)

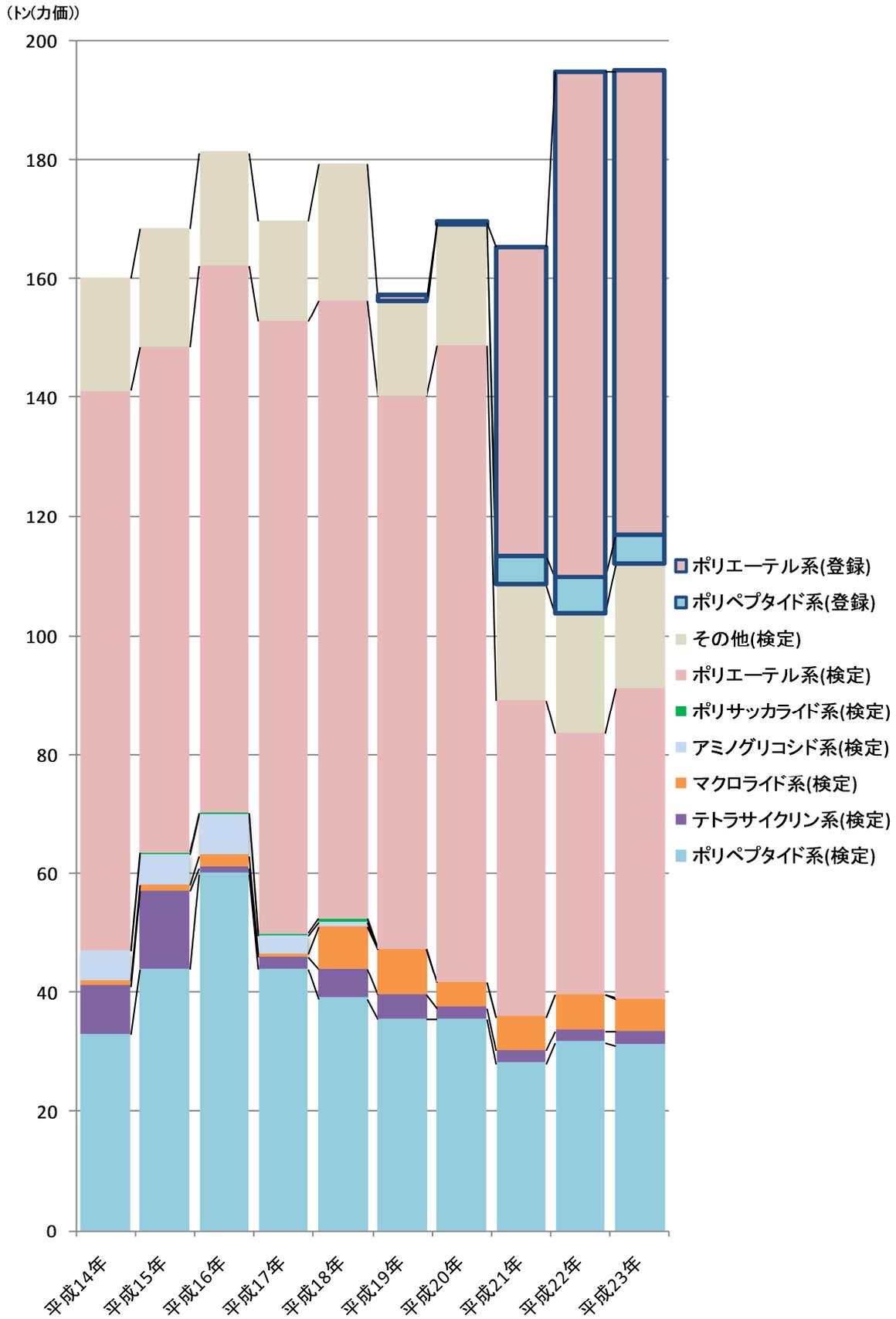


図4 抗生物質製剤の類別の実量力価換算量
(検定合格及び登録特定飼料等製造業者による製造)

7 要 約

平成 23 年度の特定添加物の検定結果は、以下のとおりであった。

- (1) 検定は 7 業者から、10 種類の抗生物質製剤について、16 銘柄の申請があった。
- (2) 製造用原体または製剤を海外に依存している抗生物質製剤は、9 種類、14 銘柄であった。
- (3) 合格件数は 215 件（申請 216 件）、合格数量は 997 トン、その実量力価換算量は 112 トン（力価）で、前年度に比べて、件数、数量及び実量力価換算量ともに増加した。不合格件数は 1 件で、性状試験（粒度）の不適合による不合格であった。
- (4) 合格数量が多い抗生物質製剤は、ナラシン（25.3 %）で、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、アピラマイシン、ノシヘプタイドがこの順で続いた。
- (5) 実量力価換算量が多い抗生物質製剤は、ナラシン（22.5 %）で、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、アピラマイシン、亜鉛バシトラシンがこの順で続いた。
- (6) 合格したものについて実量力価換算量で精製級及び飼料級の製剤の割合を比較すると、飼料級の製剤が全体の 72.4 %を占めた。
- (7) 合格したものについて過去 10 年間の実量力価換算量の推移をみると、平成 16 年度以降増減を繰り返しながら減少傾向にあり、平成 22 年度に過去 10 年間で最低となって、平成 23 年度はわずかに増加した。
- (8) 地域センター別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量は、神戸センター管内が最も多かった。
- (9) サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン及び硫酸コリスチンについて、登録特定飼料等製造業者による製造が行われた。
- (10) 検定合格と登録特定飼料等製造業者による製造を合わせると、製造数量が多い抗生物質製剤はサリノマイシンナトリウム（29.6 %）、ナラシン、硫酸コリスチンで、実量力価換算量が多い抗生物質製剤は、サリノマイシンナトリウム（24.1 %）、モネンシンナトリウム、ナラシンであった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討

千原哲夫, 田中里美, 八木寿治

日本食品微生物学会雑誌, **28(3)**, 175–185 (2011).

2 GC-FPD による飼料中のエテホン分析法の開発と性能評価

屋方光則, 倉光良造, 甲斐茂浩, 工藤尚史, 矢本亮介, 松尾信吾

食品衛生学雑誌, **53(1)**, 45–51 (2012).

飼料研究報告編集委員

委員長	竹原 敏郎	副委員長	大橋 史郎
	會田 紀雄		千原 哲夫
	石橋 隆幸		中村 行伸
	小森谷 敏一		永原 貴子
	佐々木 隆		橋本 亮
	高木 昌美		山多 利秋
	田中 公子		吉永 晋

飼料研究報告 第37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24年8月

編集 飼料研究報告編集委員会